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

(11) PI 0511026-2 B1

BRPI0511026B1

(22) Data do Depósito: 11/05/2005

(45) Data de Concessão: 08/01/2019

(54) Título: USO DE UM LOS NEISSERIAL, E, COMPOSIÇÃO

(51) Int.Cl.: A61K 39/39; A61K 39/095; C07H 3/06; A61P 31/00.

(30) Prioridade Unionista: 11/05/2004 EP 04076401.1.

(73) Titular(es): DE STAAT DER NEDERLANDEN, VERTEGENWOORDIGD DOOR DE MINISTER VAN VWS.

(72) Inventor(es): LIANA JULIANA JOSEPHINE STEEGHS; JOHANNES GERARDUS JOSEPH VAN DE WINKEL; PETER ANDRÉ VAN DE LEY.

(86) Pedido PCT: PCT NL2005000358 de 11/05/2005

(87) Publicação PCT: WO 2005/107798 de 17/11/2005

(85) Data do Início da Fase Nacional: 10/11/2006

(57) Resumo: USO DE UM LOS NEISSERIAL, E, COMPOSIÇÃO A presente invenção refere-se a Lipo-Oligo-Sacarídeos (LOS) Neisseriais, que compreendem um núcleo externo de tri-sacarídeo, que apresenta aumentada ligação ao receptor DC-SIGN das células dendríticas, como resultado do que os LOS39>s Neisseriais da invenção têm aumentada atividade imunoestimuladora. O núcleo externo de tri-sacarídeo dos LOS39>s Neisseriais, combinados com uma porção de Lipídeo A com reduzida toxicidade, é útil como um adjuvante em preparações de vacina.

"USO DE UM LOS NEISSERIAL, E, COMPOSIÇÃO"

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a Lipo-Oligo-Sacarídeos (LOS) Neisseriais, que têm aumentada atividade imunoestimuladora. Os LOS's Neisseriais da invenção compreendem um núcleo externo de tri-sacarídeo, que apresenta aumentada ligação a um receptor das células dendríticas. O núcleo externo de tri-sacarídeos dos LOS's Neisseriais, combinados com uma porção de Lipídeo A, com reduzida toxicidade, é útil como um adjuvante em preparações de vacina.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Os LPS de *Neisseria meningitidis* tem recebido atenção como um candidato a vacina potencial, devido a sua capacidade de induzir respostas imunes específicas-LPS, bem como sendo um potente adjuvante. Entretanto, a atividade endotóxica de LPS tem limitado seu uso em vacinas até agora.

O LPS meningocócico é composto de uma parte de lipídeo A hidrofóbica, que o ancora na membrana externa bacteriana, e de um núcleo oligossacarídeo hidrofílico, que é exposto à superfície bacteriana (Figura 1). A inclusão da cadeia oligossacarídea nativa em preparações de vacina é desaconselhável devido a sua similaridade estrutural com antígenos de glicolipídeo hospedeiros. A engenharia genética dos trajetos de biossíntese do oligossacarídeo LPS tem possibilitado a produção de séries de mutantes de *N. meningitidis* expressando cadeias de oligossacarídeos truncadas (Figura 1). As propriedades endotóxicas e adjuvantes do LPS parece ser determinada pela parte do lipídeo A da molécula. Geramos previamente um único conjunto de mutantes de lipídeo A de *N. meningitidis*, com propriedades farmacológicas altamente aperfeiçoadas. Em particular, a inativação do gene *lpxL1* (htrB1), envolvido a aciloxiacilação do lipídeo A, resultou no isolamento de um mutante de lipídeo A expressando lipídeo A penta-acilado em vez de hexa-

acilado, com reduzida atividade adjuvante endotóxica porém retida. Além disso, um mutante de *N. meningitidis*, faltando completamente LPS à inativação do gene *lpxA* meningocócico, foi isolado. Assim, a modificação da parte de lipídeo A, bem como da parte de oligossacarídeo do LPS meningocócico, abriu novas possibilidades para desenvolvimento de vacinas meningocócicas.

As células dendríticas (DC) tornaram-se de interesse principal por causa de seu papel na iniciação de uma resposta imune, tanto durante infecção natural como em resposta a vacinação. As respostas imunes a bactérias são iniciadas por DC, que fagocitam e processam os antígenos bacterianos para apresentação às células T. Mostramos recentemente que o LPS de *N. meningitidis* representa um papel principal durante as interações com as DC humanas. Além disso, o LPS é necessário para internalização das bactérias e ativação completa das DC.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

Definições

Os adjuvantes são aqui definidos incluírem qualquer substância ou composto que, quando usado em combinação com um antígeno, para imunizar um mamífero, preferivelmente um humano, estimula o sistema imune, desse modo provocando, aumentando ou facilitando a resposta imune contra o antígeno, preferivelmente sem gerar uma resposta imune específica para o próprio adjuvante. Os adjuvantes preferidos aumentam a resposta imune contra um dado antígeno em pelo menos um fator de 1,5, 2, 2,5, 5, 10 ou 20, em comparação com a resposta imune gerada contra o antígeno sob as mesmas condições, porém na ausência do adjuvante. Testes para determinar o aumento médio estatístico da resposta imune contra um dado antígeno, como produzido por um adjuvante de um grupo de animais ou humanos através de um correspondente grupo de controle, são disponíveis na arte. O adjuvante preferivelmente é capaz de aumentar a resposta imune contra pelo menos dois

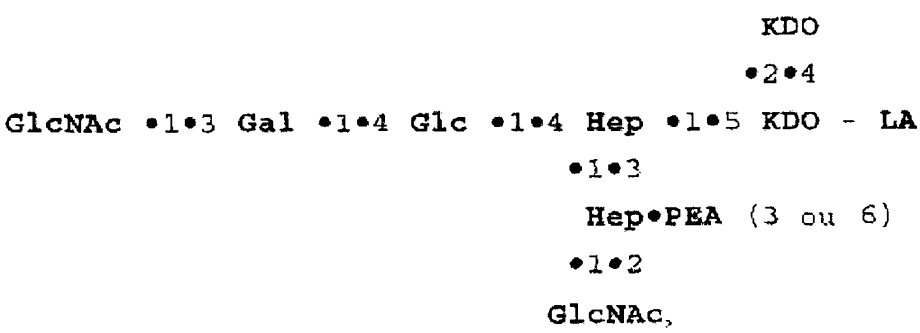
17

diferentes antígenos. O adjuvante da invenção usualmente será um composto que é estranho a um mamífero, desse modo excluindo compostos imunoestimulatórios que são endógenos para os mamíferos, tais como, p. ex., interleucinas, interferons e outros hormônios.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção é baseada na surpreendente descoberta de que um LPS Neisserial com uma estrutura de núcleo externa trissacarídea particular, mostra aumentada ligação e internalização pelas células dendríticas (DC's) humanas. A ligação e internalização do LPS contendo trissacarídeo, ou preferivelmente LOS (lipo-oligossacarídeo) contendo trissacarídeo, é mediada pelo DC-SIGN da lectina tipo C, que é expresso nas DC's humanas e resulta em ativação e maturação das DC's em taxa aumentada. A atividade imunoestimuladora melhorada deste novo LOS contendo trissacarídeo Neisserial permite seu uso como um potente adjuvante na imunização e vacinação.

Assim, em um primeiro aspecto, a invenção refere-se a um método para imunização ou vacinação de um mamífero com um antígeno, o método compreendendo a administração (a um mamífero) do antígeno, e um LOS Neisserial é representado pela fórmula (I):



por meio da qual LA é uma porção de Lipídeo A tipo selvagem, preferivelmente de uma cepa *Neisseria*, ou mais preferivelmente uma porção de Lipídeo A com toxicidade reduzida.

Na fórmula (I), GlcNAc define D-glicosamina; Gal define D-galactose; Glc define D-glicose; Hep define D-heptose; KDO define o ácido

3-deóxi-D-manooctulosônico; PEA define fosfo-etanolamina; β1 →4 define uma ligação β-glicosídica entre as primeira e quarta posições; β1→ 3 define uma ligação β-glicosídica entre a primeira e terceira posições; α1 → 5 define uma ligação α-glicosídica entre a primeira e quinta posições; α1 → 3 define uma ligação α-glicosídica entre a primeira e terceira posições; α1→ 2 define uma ligação α-glicosídica entre a primeira e segunda posições; α2→4 define uma ligação α-glicosídica entre a segunda e quarta posições; PEA(3 ou 6) indica que a fosfo-etanolamina pode ser ligada na terceira ou sexta posição da heptose ou pode estar completamente ausente.

A invenção assim refere-se ao uso de um LOS Neisserial, como definido acima, na manufatura de um medicamento para imunização ou vacinação de um mamífero. Preferivelmente, o LOS Neisserial da invenção é usado como um adjuvante. Mais preferivelmente, o LOS Neisserial é usado em combinação com um antígeno na manufatura de um medicamento para elevar uma resposta imune contra (ou vacinação com) o antígeno do mamífero.

Nos métodos e usos da invenção, o mamífero preferivelmente é um humano. O antígeno preferivelmente é um antígeno de um produzido por uma bactéria, um vírus, um fungo, um parasita, uma célula de câncer ou um alérgeno, como ainda definido abaixo. O antígeno e o LOS Neisserial são preferivelmente usados no tratamento e/ou prevenção de uma doença infecciosa causada pela bactéria, vírus, fungo ou parasita, ou o tumor causado pela célula de câncer, ou da alergia causada pelo alérgeno.

Nas formas de realização preferidas da invenção, o LOS Neisserial da invenção tem uma porção de Lipídeo A (LA) modificado com reduzida toxicidade. A toxicidade do LA modificado preferivelmente é menor do que a toxicidade de um LA tipo selvagem correspondente, mais preferivelmente o LA modificado é menor do que 90, 80, 60, 40, 20, 10, 5, 2, 1, 0,5 ou 0,2% da toxicidade do LA tipo selvagem. As toxicidades dos LA's

tipo selvagem e vários modificados, com reduzida toxicidade, podem ser determinadas em qualquer ensaio adequado conhecido na arte. Um ensaio preferido para determinar a toxicidade, isto é, a atividade biológica do LA's ou dos LOS's Neisseriais da invenção é o teste WEHI para indução de TNF-alfa na linhagem de célula macrófaga MM6 (Epevik e Niessen, 1986, J. Immunol. Methods 95:99-105; Ziegler-Heitbrock et al., 1988, Int. J. Cancer 41:456-461).

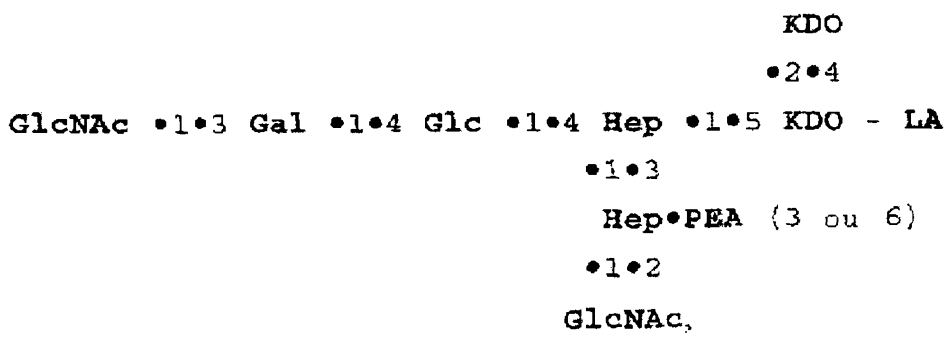
Por outro lado, o LOS Neisserial da invenção, tendo um LA com reduzida toxicidade, deve ainda ter suficiente atividade imunoestimuladora, isto é, atividade adjuvante. O LOS Neisserial da invenção, com reduzida toxicidade, preferivelmente tem pelo menos 10, 20, 40, 80, 90 ou 100% da atividade imunoestimuladora do correspondente LOS Neisserial com um LA tipo selvagem, por meio do que a atividade imunoestimuladora é determinada medindo-se a produção de pelo menos uma citocina ou da expressão de pelo menos uma molécula coestimuladora, como descrito no Exemplo 3 aqui.

Os LOS's Neisseriais, tendo reduzida toxicidade da porção de lipídeo A, porém retendo (parte da) a atividade adjuvante, podem, p. ex., ser obtidos de patógenos Gram-negativos geneticamente modificados e como recapitulado no WO 02/09746. Em particular, LOS's Neisserial preferidos, com LA's com reduzida toxicidade, incluem: (a) LOS's com uma porção de Lipídeo A como obtenível de uma cepa *Neisseria* com uma mutação que causa uma redução ou inativação da expressão de um ou mais dos genes *lpxL1* e *lpxL2* (anteriormente conhecidos como *htrB* e msbB) ou seus homólogos (vide, p. ex., EP 1 127 137; US 5.997.881); (b) LOS's com uma porção de Lipídeo A, como obtenível por remoção de um ou mais ácidos graxos esterificados O-ligados secundários de uma porção de Lipídeo A tipo selvagem, por tratamento com uma aciloxi-hidrolase ou hidrólie alcalina (US 5.103.661; Erwin et al., 1991, Infect. Immun. 59: 1881-87); (c) LOS's com

uma porção de Lipídeo A como obtenível por tratamento com hidrazina de uma porção de Lipídeo A tipo selvagem (Gu et al., 1996, Infect. Immun. 64: 4047-53; Polotsky et al., Infect. Immun. 62: 210-14; Gu et al., 1998, Infect. Immun. 66:191-97, 1998); (d) LOS's com uma porção de Lipídeo A, como obtenível por desfosforilação de uma porção de Lipídeo A com uma fosfatase alcalina (US 6.290.952); e (e) LOS's obtenível por desfosforilação ou desacilação enzimática de LOS produzido em hospedeiro Neisserial, em que um gene *lpxE* ou *pagL* é expresso. Expressão reduzida é aqui entendido significar aumentada ou reduzida, quando comparado com uma correspondente cepa tipo selvagem, por meio do que o nível de expressão preferivelmente pelo menos difere por um fator 2, 5 ou 10 da correspondente cepa tipo selvagem.

LA's preferidos com reduzida toxicidade incluem, assim, LA com uma C_{12}-acila secundária somente na glicosamina redutora, LA com uma C_{12}-acila secundária somente na glicosamina não redutora, LA sem ambos os grupos C_{12}-acila secundários, LA's sem um ou mais grupos fosfato da posição 1 ou 4' e combinações das desacilações e desfosforilações supracitadas.[

Em um outro aspecto, a invenção refere-se a um LOS Neisserial, que é representado pela fórmula (I):



por meio da qual o LA é uma porção de Lipídeo A com reduzida toxicidade, como definido acima.

Em ainda outro aspecto, a invenção refere-se a uma composição compreendendo um LOS Neisserial como aqui definido acima, e um veículo farmaceuticamente aceitável. Preferivelmente, a composição

compreende ainda um antígeno que é de ou produzido por uma bactéria, um vírus, um fungo, um parasita, uma célula de câncer ou um alérgeno. As composições farmacêuticas podem ainda compreender agentes estabilizadores farmaceuticamente aceitáveis, agentes osmóticos, agentes tamponantes, agentes dispersantes e similares. A forma preferida da composição farmacêutica depende do modo pretendido de administração e aplicação terapêutica. O veículo farmacêutico pode ser qualquer substância compatível, não-tóxica, adequada para suprir os ingredientes ativos, isto é, o LOS Neisserial e o antígeno, ao paciente. Veículos farmaceuticamente aceitáveis para suprimento intranasal são exemplificados por água, soluções salinas tamponadas, glicerina, polissorbato 20, cremophor EL, e uma mistura aquosa de glicerídeo caprílico/cáprico e podem ser tamponados para fornecer um meio-ambiente de pH neutro. Os veículos farmaceuticamente aceitáveis para suprimento parenteral são exemplificados por 0,9% NaCl ou 5% glicose tamponado estéril, opcionalmente suplementados com 20% albumina. As preparações para administração parenteral devem ser estéreis. A via parenteral para administração dos ingredientes ativos é de acordo com os métodos conhecidos, p. ex., injeção ou infusão por vias subcutânea, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraarterial ou intralesional. As composições da invenção são preferivelmente administradas por injeção de bolo. Uma composição farmacêutica típica para injeção intramuscular seria preparada para conter, por exemplo, 1 – 10 ml de solução salina tamponada com fosfato e 1 a 100 μg, preferivelmente 15 – 45 μg de antígeno e 1 a 100 μg, preferivelmente 15 – 45 μg do LOS Neisserial da invenção. Para administração oral, o ingrediente ativo pode ser administrado em formas de dosagem líquida, tais como elixires, xaropes e suspensões. As formas de dosagem líquida para administração oral podem conter colorante e aromatizante, para aumentar a aceitação do paciente. Métodos para preparar composições parenteral, oral ou intranasalmente administráveis são bem

conhecidos na arte e descritos com mais detalhes em várias fontes, incluindo, por exemplo, Remington's Pharmaceutical Science (15a. ed., Mack Publishing, Easton, PA, 1980) (incorporado por referência em sua totalidade para todas as finalidades).

O antígeno da composição da invenção preferivelmente é um antígeno que é de ou produzido por uma bactéria, um vírus, um fungo, um parasita, uma célula de câncer ou um alérgeno. Antígenos virais que podem ser combinados com o LOS Neisserial da invenção podem ser derivados de todas as espécies de vírus, exemplos não-limitativos de tais vírus sendo: Retroviridae, tal como Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV); um rubelavírus; paramixoviridae, tal como vírus da parainfluenza, sarampo, caxumba, vírus sincial respiratório, metapneumovírus humano; flaviviridae, tal como o vírus da febre amarela, o vírus da dengue, Vírus da Hepatite C (HCV), Vírus da Encefalite Japonesa (JEV), encefalite inata no carrapato, encefalite de St. Louis ou vírus West Nile; Herpesviridae, tal como vírus do herpes simples, citomegalovírus, vírus Epstein-Barr; Bunyaviridae; Aernaviridae; Hantaviridae tal como Hataan; Coronaviridae; Papovaviridae tal como papilomavírus humano; Rhabdoviridae, tal como vírus da raiva. Coronaviridae, tal como coronavírus humano; Alphaviridae, Arteriviridae, filoviridae tal como Ebolavírus, Arenaviridae, poxiviridae, tal como vírus da varíola e vírus da febre suína africana. Igualmente, os LOS's Neisseriais da invenção podem ser combinados com antígenos derivados de bactérias patogênicas, fungos (incluindo leveduras) ou parasitas. Tais antígenos incluem antígenos bacterianos de, p. ex., *Helicobacter*, tais como *H. pylori*, *Neisseria*, tais como *N. meningitidis*, *Haemophilus*, tais como *H. influenza*, *Bordetella*, tais como *B. pertussis*, *Chlamydia*, *Streptococcus*, tais como *Streptococcus* sp., sorotipo A, *Vibrio*, tal como *V. cholera*, patógenos entéricos gram-negativos, incluindo, p. ex., *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter* e *Escerichia*, bem como antígeno de bactéiras causando

antraz, lepra, tuberculose, difteria, doença de Lyme, sífilis, febre tifóide e gonorréia. Antígenos de parasitas, p. ex., incluem antígenos de protozoarios, tais como *Babesis bovis, Plasmodium, Leishmania* spp, *Toxoplasma gondii* e *Trypanosoma*, tais como *T. cruzi*. Os antígenos fúngicos podem incluir antígenos de fungos tais como *Aspergillus* sp., *Candida albicans*, *Cryptococcus*, tais como, p. ex., *C. neoformans*, e *Histoplasma capsulatum*.

Embora a vacinação seja geralmente aplicada para a proteção profilática contra patógenos ou para o tratamento de doenças em seguida à infecção patogênica, uma pessoa hábil na arte está ciente da aplicação de vacinas para tratamento de tumor. Além disso, um número crescente de proteínas específicas de tumores é constatado serrem entidades apropriadas, que podem ser alvejadas por anticorpos humanos ou humanizados. Tais proteínas específicas de tumor estão também dentro do escopo da presente invenção. Muitos antígenos específicos de tumor são conhecidos na arte. Portanto, em uma forma de realização preferida, a invenção fornece composições compreendendo um antígeno específico de tumor e um LOS Neisserial, como definido acima. Antígenos de tumor adequados incluem, p. ex., antígeno carcinoembriônico, antígeno de membrana específico de próstata, antígeno específico de próstata, proteína MZ2-E, mucina epitelial polimórfica (PEM), proteína de ligação de folato LK26, receptor do fator de crescimento epidérmico (truncado) (EGRF), HER2, antígeno Thomsen-Friedenreich (T), gangliosídeos GM-2 e GD-2, Ep-CAM, mucina-I, glicoproteina-2 epitelial e antígeno específico de cólon.

Além disso, os antígenos podem ser alvejados em DC's, a fim de induzir tolerância na prevenção de doença auto-imune. Tais alérgenos estão também dentro do escopo da presente invenção.

Em outro aspecto, a invenção refere-se a métodos para produzir um LOS Neisserial, como definido acima. Um método preferido compreende as etapas de: (a) cultivar uma cepa *N. meningitidis*, por meio do

que a cepa expressa um LOS Neisserial de imunotipo L2, L3 ou L4 e não tem um gene *lgtB* ativo, ou expressa um LOS Neisserial de imunotipo L6 e por meio do que contém uma mutação que inativa ou reduz a expressão de um ou mais dos genes *lpxL1* e *lpxL2*; e (b) recuperação do LOS Neisserial. Alternativamente, o método compreendendo as etapas de: (a) cultivar uma cepa *N. meningitidis*, por meio do que a cepa expressa um LOS Neisserial do imunotipo L2, L3 ou L4 e não tem o gene *lgtB* ativo ou expressa um LOS Neisserial do imunotipo L6; (b) recuperação do LOS Neisserial; e (c) tratamento do LOS Neisserial com pelo menos um de hidrazina, fosfatase alcalina ou aciloxiidrolase, para reduzir a toxicidade da porção de lipídeo A. No método, a ordem de etapas (b) e (c) pode ser trocada. Em um método preferido, na etapa c), a toxicidade é reduzida ate menos do que 80% da toxicidade do LOS Neisserial tipo selvagem, como determinado em um ensaio WEHI, como descrito acima.

Em ainda outro aspecto, a invenção refere-s a OMV's Gram-negativas (Vesículas Membranosas Externas) ou vesículas compreendendo os LOS's Neisseriais, como definido acima. Meios e métodos para produzir OMV's ou vesículas Gram-negativas são descritos em WO 02/09746. As vesículas Gram-negativas assim obtidas podem ser combinadas com o LOS Neisserial da invenção, para produzir vesículas Gram-negativas compreendendo os LOS's Neisseriais. Alternativamente, as vesículas podem ser produzidas de uma cepa Neisserial, como definido acima, que é capaz de produzir um LOS Neisserial da invenção. As vesículas Gram-negativas podem ainda ser combinadas com um antígeno como descrito acima e/ou com veículos farmaceuticamente aceitáveis, como descrito acima.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS:

Figura 1: Representação esquemática de *N. meningitidis* WT L3 LPS e seus mutantes oligossacarídeos, que podem ser gerados por inativação insercional dos genes (indicados em itálico) codificando as

glicosiltransferases.

Figura 2: Células dendríticas (DC) foram cultivadas com bactérias rotuladas FITC em uma relação de 1:50 por 24 h. Nos pontos de tempo indicados, amostras foram tiradas para medir a associação das bactérias com as DCs por FACS. Um representante de três experimentos separados de três diferentes doadores é mostrado.

Figura 3: As DCs foram estimuladas com bactérias rotuladas FITC em uma relação de 1:50 por 18 h, na presença de brefeldina A e então tingidas para TNF-α e IL-12 intracelulares. As plotagens de pontos mostram percentagens de DC associadas com as bactérias não produzindo (quadrante direito mais inferior) ou produzindo (quadrante direito superior) citocinas intracelulares.

Figura 4: A produção de TNF-α, IL-12, IL-1β, IL-10 e IL-6 pelas DC, em resposta a *N. meningitidis* WT e mutantes foi medida em sobrenadantes de cultura por ELISA, após 18 h de co-cultura. A média e SEM de três experimentos separados são mostrados.

Figura 5: Expressão de CD40 e CD86, após 18 h de cocultura do *N. meningitidis* WT e mutantes com DCs como indicado por Intensidade de Fluorescência Média (MFI).

Figura 6: Ligação das moléculas C-tipo-lectina-Fc em *N. meningitidis* WT e mutantes em um ensaio de adesão solúvel.

Figura 7: Associação DC de *N. meningitidis* WT e mutante *lgtB*, na presença e ausência de 20 microgramas de AZN-D1 de anticorpo anti-DC-SIGN por ml.

Figura 8: Proliferação das células Th1/Th2 acionada por DC:

DCs foram incubadas com *N. meningitidis* tipo selvagem H44/76, o mutante *lgtB*, LPS de *E. coli*, poli I:C ou PGE2 por 48 h, lavadas e (A) analisadas quanto aos marcadores de maturação (a média e SEM de três experimentos separados) ou (B) co-cultivadas com células $CD45RA^{+}CD4^{+}$T.

Células T quiescentes foram reestimuladas com PMA e ionomicina e IL-4 intracelular e IFN-γ (preto) foi analisado em uma base de célula única por citometria de fluxo. Dados de três diferentes doadores são mostrados.

Figura 9: Associação de DC e indução de citona de bactérias vivas. Células dendríticas (DC) foram cultivadas com *N. meningitidis* tipo selvagem rotulado-FITC e mutantes LPS em uma relação de 1:100. Nos pontos de tempo indicados, amostras foram tiradas para mediar a associação das bactérias com DCs por FACS. Os resultados são mostrados com células de dois diferentes doadores.

EXEMPLOS

1. Materiais e Métodos

1.1 Cepas bacterianas

O núcleo dos oligossacarídeos e mutantes de lipídeo A foram derivados de *N. meningitidis* grupo B *N* (WT) H44/76 e foram descritos anteriormente:

Cepa ou mutante	Referência
H44/76	Holten, 1979, J.Clin. Microbiol. 9: 186-188
galE	Jennings et al., 1993, Mol. Microbiol. 10: 361 – 369
lgtB	Jennings et al., 1995, Mol. Microbiol. 18: 729 – 740
lpxL1	van der Ley et al., 2001, Infect. Immun. 69: 5981 – 5990

A estrutura dos mutantes de núcleo de oligossacarídeos usada neste estudo é mostrada na Figura 1. Todas as cepas foram cultivadas em ágar gonocócico (Difco, Basingstoke, UK), suplementado com Vitox (Oxoid Ltd., Baingstoke, UK) em uma atmosfera de 6% de CO_2 em ar a 36 °C. As bactérias foram usadas na fase estacionária após cultura por 18 horas. Suspensões de bactérias foram preparadas em meio RPMI 1640, sem vermelho de fenol (Gibco, Paisley, UK) e sua densidade óptica medida a 540 nm. A densidade óptica de 1 foi calculada para corresponder a 10^9 organismos/ml. As bactérias foram fixadas em 0,5% de paraformaldeído (PFA) em Solução Salina Tamponada co Fosfato (PBS) por 15 minutos e lavadas completamente em meio RPMI. Bactérias rotuladas FITC foram

preparadas por incubação com 0,5 mg/ml de FITC (Sigma, Poole, UK) por 20 min a 37 °C, seguido por extensa lavagem.

1.2 Células

DC's foram geradas de células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC), como descrito anteriormente (F. Sallusto e A. lanzavecchia, 1994, J. Exp. Med. 179: 1109 – 1118; H. Uronem-Hansson et al., 2004, Immunology 111: 173 – 178). Em resumo, monócitos foram preparados de PBMC por centrifugação através de gradientes Percoll de multietapas. A fração de monócitos foi de > 95% CD14+/CD3-/CD19-. Para gerar DC's, monócitos foram incubados por dias em RPMI suplementado com 10% de FCS inativado pelo calor, 2,4 mM L-glutamina, 100 U/ml Penicilina-estreptomicina (todos da GIBCO, Paisley, UK), 100 ng/ml de GM-CSF recombinante humano e 50 ng/ml de IL-4 recombinante humano (Schering-Plough, Welwyn Garden City, Herts UK). DC's imaturos, preparados desta maneira foram $CD14^{baixo}$, $CD83^{-ve}$, $CD86^{baixo}$, $CD25^{-ve}$. Eles também expressaram HLA DR,HLA DQ, HLA Classe I, CD40 e CD1a e foram negativos para tanto CD19 como CD3.

DC's em uma concentração de 5 x 10^5/ml foram cultivadas com bactérias *N. meningitidis* H44/76 na relação de DC/bactérias de 1:50 e 1:200 (como indicado na legenda da figura) em RPMI 1640 suplementado com 10% FCS. Quando citocinas intracelulares eram para ser medidas, o inibidor do transporte de proteína Brefeldin A (Sigma, Poole, UK) foi adicionado a 10 μg/mL.

A especificidade de ligação do mutante *lgtBl* nas DCs foi determinada incubando-se DC's imaturos com 20 μg/ml de AZN-D1 mAb anti-DC-SIGN por 30 min a 37 °C e, subseqüentemente, com bactérias tipo selvagem e mutantes por 45 min a 37 °C.

1.3 Ligação de DC e Internalização

A ligação de DC e a internalização de bactérias foram

determinadas por uma combinação de citometria de fluxo e microscopia confocal. Para detecção por citometria de fluxo, as DC's foram incubadas com bactérias rotuladas FITC por períodos de tempo entre 30 minutos e 20 h, fixadas em FACSFix (BD), lavadas e analisadas em um FACS Calibur. As DC's associadas com bactérias foram facilmente identificadas por fluorescência dentro da população ativada por DC. Para microscopia confocal, as DC's estimuladas com *N. meningitidis* rotulado com FITC foram permitidas aderir por 10 min a uma lâmina de adesão (Bio-Rad Laboratories Ltd., Herts, UK). Para parar a internalização, as DC's foram fiadas com 4% PFA por 10 min. As DC's foram visualizadas por tingimento com 5 μg/ml de anticorpos monoclonais Classe II anti MHC (Dako, Glstrup, Dinamarca). Após lavagem, o anticorpo ligado foi detectado com 5 μg/ml de anticorpo anti-camundongo de cargra conjugado com Vermelho do Texas (Molecular probes) por 1 h. As lâminas foram lavadas e montadas em Citifluor (Citifluor Ltd., UK). Imagens confocais foram obtidas utilizando-se um sistema de microscópio de varredura a leiser confocal Leica SP2 (Leica, Milton Keynes, UK), equipado com conjuntos apropriados de filtro. Para identificar as bactérias intracelulares, 15 – 20 seções ópticas (0,2 – 0,5 μm) cobrindo as inteiras DC's, foram projetadas e superpostas com software de imageação confocal Leica.

1.4. Medições de Citocina

Para medir a produção intracelular de citocina, as DC's foram fixadas com 4 % PFA em PBS por 15 minutos, lavadas em PBS contendo 0,1% de azida sódica e 0,5% BSA (todos da Sigmaq) e permeabilizadas em 25 μl de solução de Permeabilização (Caltag). As células foram então incubadas com anticorpos monoclonais em TNF-α (Becton Dickinson BD, Oxford UK) e IL-12 p40/70 (Pharmingen) ou controles igualados por isótipo por 30 minutos em temperatura ambiente no escuro. As células foram então lavadas duas vezes em PBS, fixadas em CelFix (Becton Dickinson) e

analisadas por citometria de fluxo em um FACScalibur, empregando-se software Cell Quest (Becton Dickinson). As DC's produziram uma população distinta, identificada por dispersão ângulo para diante e reto. Pelo menos 95% das células desta população eram DC's, como definido por sua expressão de MHC II, CD1a, CD25, CD80, CD83 e CD86. Um mínimo de 3000 eventos dentro dos portões correspondendo às DC foi coletado para análise. Para os ensaios ELISA de citocinas solúveis, kits CytoSets™ ELISA (Biosource Europe S.A., Nivelles Belgium) para IL-12, TNF-α e IL-10, IL6 e IL1β humanos foram usados de acordo com instruções do fabricante.

1.5 Ensaio de Adesão de C-tipo-lectina-Fc Solúvel

As moléculas C-tipo-lectina-Fc consistem da parte extracelular do receptor da lectina tipo-C (DC-SIGN, MGL e Dectina-1B), fundida no término COOH a um fragmento IgG1-Fc humano (T. Geijtenbeek et al., 2003, J. Exp. Med., 197: 7 – 17). O ensaio de adesão de C-tipo-lectina-Fc solúvel foi realizado como segue. Células inteiras (OD540=0,1) foram revestidas sobre placas ELISA (100 µl/poço) por 18 h em TA, seguido por bloqueio com 1% BSA por 30 min a 37 °C. O sobrenadante C-tipo-lectina-Fc solúvel foi adicionado por 2 h em TA. C-tipo-lectina-Fc desligada foi retirada por lavagem e a ligação foi determinada por ELISA anti-IgG1.

1.6 Diferenciação Th1/Th2 acionada-DC

As DC's foram cultivadas de monócitos de doadores saudáveis em Meio da Dulbecco Modificado de Iscove (Gibco), suplementado com 10% FCS (BioWithaker, Verviers, Bélgica), 500 U/ml IL-4 e 800 U/ml GM-CSF (ambos da Shering-Plough). No dia 6, foi induzida maturação de DC com *N. meningitidis* tipo selvagem e mutante *lgtB* em uma multiplicidade de infecções de 10. Os controles positivos a seguir foram incluídos na resposta de Th1/Th2 misturados com o ensaio (i), 10 ng/ml *Scherichia coli* LPS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) (ii) diferenciação Th1, 20 µg/ml poli I: (Sigma-Aldrich) e (iii) diferenciação TH2, 10 µg/ml PGE2 10 ng/ml LPS

(Sigma-Aldrich). No dia 2 as DCs foram analisadas quanto aos marcadores de maturação (CD80, CD83, CD86 e HLA-DR) por citometria de fluxo. Para avaliar a diferenciação das células T, DCs maduros foram incubados com células T $CD45RA^+/CD4^+$ ($5,10^3$ células T/ $20,10^3$ DC). No dia 12-15, células T quiescentes foram reestimuladas com 10 ng/ml PMA (Sigma-Aldrich) e 1 μg/ml de ionomicina (Sigma-Aldrich) por 6 horas. Após 1 hora, 10 μg/ml de Brefeldina A (Sigma-Aldrich) foram adicionados às células T. A produção de células simples de IL-4 e IFN-γ foi determinada por análise fluxocitométrica intracelular. As células foram fixadas em 2% PFA, permeabilizada com 0,5% de saponina (Sigma-Aldrich) e tingidas com IFN-γ-FITC anti-humano e IL-4-PE anti-humano (BD Pharmingen, San Diego, CA).

2. Exemplo: Ligação e internalização de cepas mutantes de núcleo de oligossacarídeo de *N. meningitidis* por DC's

Uma técnica citométrica de fluxo foi usada para investigar a ligação e internalização de *N. meningitidis* WT, os mutantes de oligossacarídeo e o mutante deficiente-LPS por DC's humanos. DC's imaturas foram co-cultivadas com cepas mutantes rotuladas-FITC, derivadas de *N. meningitidis* WT H44/76 em uma relação de DC/bactérias de 1:50 (Figura 2) e 1:200 (dados não mostrados) e analisadas por FACS quanto à presença de bactérias rotuladas FITC associadas DC. Aumento dependente de tempo e dose de associação DC foi observado para mutantes tanto WT como de oligossacarídeo. Dificilmente qualquer associação DC foi encontrada para o mutante deficiente LPS nas primeiras seis horas do curso de tempo. O mutante *lgtB* apresentou associação DC consistentemente mais elevada do que os mutantes WT ou *galE* em ambas as concentrações.

Para discriminar entre ligação bacteriana e internalização, em seguida usamos microscopia confocal para estudar a internalização de *N. meningitidis* WT e mutantes (não mostrados). As bactérias FITC foram facilmente detectadas com partículas pequenas verdes em lâminas.

Tingimento Classe II MHC foi usado para visualizar as DC's. A maior parte das DC's tinha internalizado mais *lgtB* já após 1 h de incubação, em comparação com as bactérias WT ou o mutante *galE*. Dificilmente qualquer internalização foi vista para o mutante deficiente-LPS. Além de alto nível de internalização, a aderência de superfície permaneceu tipicamente elevada para as bactérias mutantes *lgtB* por todo o curso do tempo. Estes resultados confirmam os resultados por FACS; associação aumentada de bactérias com DC's resulta em aumentada internalização de bactérias.

3. Exemplo: Ativação e maturação de DC's em resposta a cepas mutantes *N. meningitidis*

A fim de estudar a relação entre internalização das bactérias e produção de citocina, IL12 e TNF-α, produzidos por DC's em resposta a WT e aos mutantes foram medidos e análise intracelular e simultânea quanto à internalização (Figura 3). As DC's foram co-cultivadas com bactérias rotuladas-FITC em uma relação de 1:50 por 18 horas e então tingidas para a produção intracelular de TNF-α e IL12. Os quadrantes foram colocados para separar as células que tinham-se associado com as bactérias FITC de células que não tinham bactérias FITC fixadas. As percentagens dadas são as percentagens das DC's produzindo (quadrante direito superior) ou não produzindo (quadrante direito inferior) citocinas intracelulares após internalização de bactérias. Os mutantes WT, *lgtB* e *galE* eram todos indutores potentes de produção de TNF-α e IL-12 por DC's, enquanto o mutante deficiente de LPS não era. Virtualmente todas as DC's que tinham internalizado *N. meningitidis* WT, os mutantes *lgtB* e *galE* estavam produzindo altos níveis de TNF-α. No caso de IL-12, a produção foi constatada para aproximadamente 50% das DC's que tinham internalizado as bactérias rotuladas FITC.

Além das medições de citocina intracelular, também medidos os níveis de citocina secretada por DC's, em resposta a *N. meningitidis*

(Figura 4). As DC's foram co-cultivadas com as bactérias mutantes e WT em relação de 1:200 por 18 h e os sobrenadantes coletados para análise de IL12, IL10, TNF-α, IL6 e IL-1β secretados. Os resultados são mostrados como a percentagem de produção de citocina, comparada com WT (WT = 100%). Tanto o mutante *lgtB* como *galE* induziram um tanto menos IL12, TNF-α e IL-1β, em comparação com as bactérias WT. A produção de IL-10 e IL-6 de tanto *lgtB* e *galE* parece ser similar à da cepa WT. Dificilmente qualquer produção de citocina foi observada para a cepa deficiente-LPS.

Finalmente, a maturação de DC's estimulada por WT e bactérias mutantes foi estudada medindo-se a expressão das moléculas co-estimuladoras CD40 e CD86 (Figura 5). A expressão de CD40 e, em particular, CD86, foi mais elevada quando DC's foram estimuladas com o mutante *lgtB*, em comparação com DC's estimuladas com WT ou bactérias mutantes *galE*. Dificilmente qualquer expressão de CD40 e CD86 foi encontrada quando as DCs foram estimuladas com o mutante *lpxA*.

Em conclusão, estes dados demonstram que a ligação e internalização do mutante *lgtB* por DC's resulta em ativação e maturação das DC's, comparável com o nível de ativação e maturação DC induzidas com bactérias WT.

4. <u>Exemplo: Identificação da ligação mediando receptor e internalização do mutante *lgtB*</u>

A ligação aumentada e a absorção por DC's do mutante *lgtB* incitaram-nos a investigar se esta ligação e internalização era mediada via um receptor DC específico. Portanto, analisamos a capacidade da WT e dos mutantes ligarem-se aos receptores de lecitina tipo-C, que são capazes de reconhecer os oligossacarídeos e são altamente expressos em DC's imaturas. A ligação de um painel de quimeras C-tipo-lectina-Fc em células integrais de bactérias WT e mutantes foi estudada em um ensaio de adesão solúvel (Figura 6). Enquanto WT, o mutante *galE* e o mutante deficiente-LPS não se ligaram

a qualquer das quimeras-C-tipo-lectina Fc, forte ligação de DC-SIGN-Fc foi constatada para o mutante *lgtB*. A ligação do mutante *lgtB* em DC-SIGN foi também constatada em células HEK293T, transitoriamente transfectadas com células DC-SIGN ou K562 estavelmente expressando DC-SIGN (dados não mostrados). Além disso, a especificidade de *lgtB* para DC-SIGN foi demonstrada estudando-se fagocitose DC do mutante *lgtB*, na presença ou ausência do anticorpo AZN-D1 (Figura 7) bloqueando anti-DC-SIGN. Na presença de AZN-D1, a fagocitose de *lgtB* por DCs foi reduzida ao nível de ligação observada para WT, claramente demonstrando que DC-SIGN liga e internaliza o mutante *lgtB*.

5. Exemplo: Alvejamento do mutante *lgtB* em DC-SIGN inicia uma resposta imune R_H1

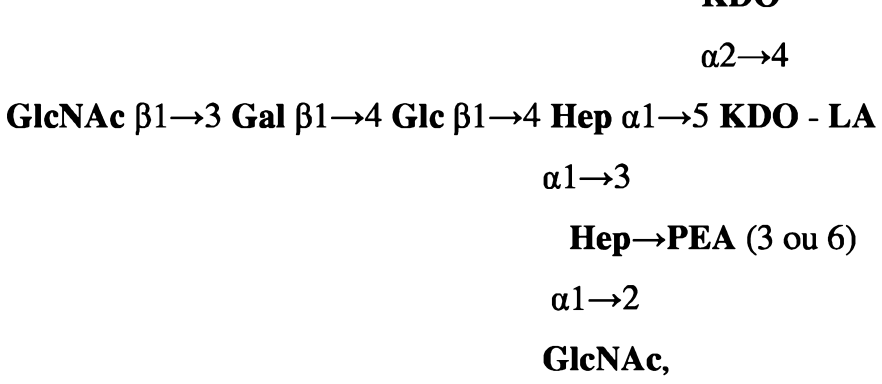
Para avaliar a relevância funcional, se alguma, da interação de LPS mutante *lgtB* com DC-SIGN, estudamos as respostas de células T acionadas-DC, após pulsar DC imaturas com bactérias tipo selvagem PFA-fixo ou mutante *lgtB*. Não foram encontradas diferenças de maturação das DC's pulsadas com bactérias tipo selvagem ou mutante *lgtB*, como avaliado pela expressão das moléculas co-estimuladoras e marcadores de maturação (Fig. 8a). Entretanto, as diferenças marcadas foram observadas nos perfis-T_H1/T_H2 induzidos com estas cepas (Fig. 8b). As DCs pulsadas com *N. meningitidis* tipo selvagem predominantemente geraram uma resposta imune tipo T_H2, visto que a maior parte das células T estavam produzindo IL-4. As DCs pulsadas com o mutante *lgtB* predominantemente evocaram as células T produzindo-IFN-γ, assim mudando o equilíbrio T_H1 versus T_H2 em direção a T_H1. Esta mudança de equilíbrio T_H1/T_H2 foi observada em 3 doadores independentes. Estes dados indicam que o alvejamento específico de LPS *lgtB* em direção a DC-SIGN gera sinais DC que acionam a resposta imune dentro de T_H1, o que é um fenômeno altamente desejável para adjuvantes. Vide também P. Moingeon et al. (2001) Vaccine 19:4363-4372.

6. Exemplo: Ligação e internalização de cepas mutantes duplas de oligossacarídeo/lipídeo A de *N. meningitidis* por DC's

Uma técnica citométrica de fluxo foi usada para investigar a ligação e internalização de *N. meningitidis* WT, os mutantes de oligossacarídeo *lgtA* e *lgtB* e seus mutantes duplos *lpxL1* e o mutante deficiente-LPS por DC's humanas. As DC's imaturas foram co-cultivadas com cepas mutantes rotuladas-FITC, derivadas de H44/76 *N. meningitidis* WT em uma relação de DC/bactérias de 1:100 e analisadas por FACS quanto à presença de bactérias rotuladas FITC associadas com DC (Figura 9). O único mutante *lgtB* mostrou consistentemente mais elevada associação DC do que WT ou o único mutante *lgtA*. Além disso, também no segundo plano do mutante *lpxL1* a mutação *lgtB* resultou em mais elevada associação do que as estruturas de oligossacarídeos tipo selvagem ou *lgtA*, indicando que a ligação mediada-*lgtB* em DC-SIGN é também possível com LPS contendo lipídeo A *lpxL1* penta-acilado.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de um lipo-oligossacarídeo (LOS) Neisserial, caracterizado pelo fato de ser na manufatura de um medicamento para imunização de um mamífero, em que os lipo-oligossacarídeos (LOS) Neisseriais são representados pela fórmula (I):



em que LA é uma porção de Lipídeo A tipo selvagem ou uma porção de Lipídeo A com reduzida toxicidade e em que os lipo-oligossacarídeos (LOS) Neisseriais são usados como adjuvantes.

2. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de os lipo-oligossacarídeos (LOS) Neisseriais serem usados em combinação com um antígeno, na manufatura de um medicamento para elevar uma resposta imune contra o antígeno no mamífero.

3. Uso de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de o antígeno ser de ou produzido por uma bactéria, um vírus, um fungo, um parasita, uma célula de câncer ou um alérgeno.

4. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de LA ser uma porção de Lipídeo A, cuja toxicidade é menor do que 80% da toxicidade de uma porção de Lipídeo A tipo selvagem, como determinado em um ensaio WEHI.

5. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de a porção de lipídeo A ser selecionado do grupo consistindo de:

(a) uma porção de lipídeo A, como obtenível de uma cepa *Neisseria* com uma mutação que reduz a atividade ou inativa um gene *lpxL1 ou lpxL2* ou um seu homólogo;

(b) uma porção de lipídeo A, como obtenível por remoção de um ou mais ácidos graxos esterificados O-ligados secundários de uma porção de Lipídeo A tipo selvagem, por tratamento com uma aciloxiidrolase;

(c) uma porção de lipídeo A, como obtenível por tratamento com hidrazina de uma porção de Lipídeo A tipo selvagem;

(d) uma porção de Lipídeo A, como obtenível por desfosforilação com uma fosfatase alcalina.

6. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de a porção de lipídeo A ser selecionada do grupo consistindo de:

(a) uma porção de lipídeo A com uma C_{12}-acila secundária somente na glicosamina redutora;

(b) uma porção de lipídeo A com uma C_{12}-acila secundária somente na glicosamina não-redutora;

(c) uma porção de lipídeo A faltando ambos os grupos C_{12}-acila secundária;

(d) uma porção de lipídeo A faltando um ou mais grupos de fosfato da posição 1 ou 4'; e

(e) uma porção de lipídeo A, com uma combinação das desacilações de (a), (b) ou (c) e das desfosforilações de (d).

7. Composição, caracterizada pelo fato de compreender um lipo-oligossacarídeo (LOS) Neisserial representado pela fórmula (I):

KDO

α2→4

GlcNAc β1→3 **Gal** β1→4 **Glc** β1→4 **Hep** α1→5 **KDO** - **LA**

α1→3

Hep→PEA (3 ou 6)

α1→2

GlcNAc,

em que LA é uma porção de Lipídeo A tipo selvagem ou uma porção de Lipídeo A com reduzida toxicidade, em que a composição ainda compreendendo um antígeno de ou produzida por um vírus, um fungo, um parasita, uma célula de câncer, um alérgeno ou uma bactéria, e por meio de que a bactéria é selecionado do grupo consistindo de *Helicobacter*, *Haemophilus, Bordetella, Chlamydia, Streptococcus, Vibrio*, patógenos entéricos gram-negativos, *Salmonella*, *Shigella, Campylobacter Escerichia*, e bactérias causando antraz, lepra, tuberculose, difteria, doença de Lyme, sífilis, ou febre tifoide, e em que a composição compreende um veículo farmaceuticamente aceitável.

8. Composição de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de a toxicidade da porção de Lipídeo A ser menor do que 80% da toxicidade de uma porção de Lipídeo A tipo selvagem, como determinado em um ensaio WEHI.

9. Composição de acordo com a reivindicação 7 ou 8, caracterizada pelo fato de a porção de lipídeo A ser selecionada do grupo consistindo de:

(a) uma porção de lipídeo A, como obtenível de uma cepa *Neisseria* com uma mutação que reduz a atividade ou inativa um gene *lpxL1 ou lpxL2* ou um seu homólogo;

(b) uma porção de lipídeo A, como obtenível por remoção de um ou mais ácidos graxos esterificados O-ligados secundários de uma porção de Lipídeo A tipo selvagem, por tratamento com uma aciloxiidrolase;

(c) uma porção de lipídeo A, como obtenível por tratamento com hidrazina de uma porção de Lipídeo A tipo selvagem;

(d) uma porção de Lipídeo A, como obtenível por desfosforilação com uma fosfatase alcalina.

10. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 9, caracterizada pelo fato de a porção de lipídeo A ser:

(a) uma porção de Lipídeo A com uma C_{12}-acila secundária somente na glicosamina redutora;

(b) uma porção de Lipídeo A com uma C_{12}-acila secundária somente na glicosamina não-redutora;

(c) uma porção de Lipídeo A faltando ambos os grupos C_{12}-acila;

(d) uma porção de Lipídeo A faltando um ou mais grupos fosfato da posição 1 ou 4'; e

(e) uma porção de Lipídeo A com uma combinação das desacilações de (a), (b) ou (c) e a desfosforilação de (d).

Fig 1

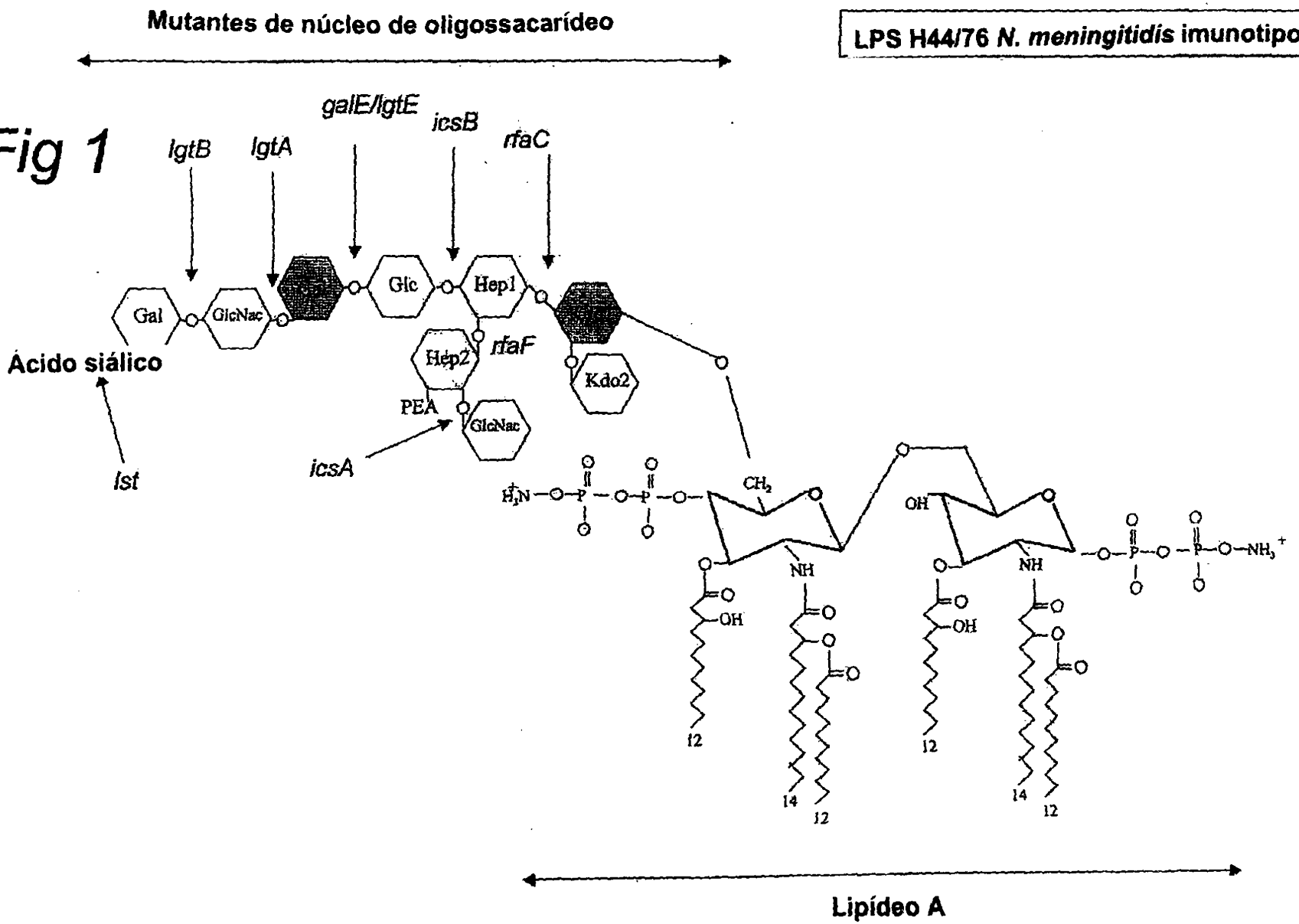

Mutantes de núcleo de oligossacarídeo
LPS H44/76 N. meningitidis imunotipo L3
lgtB
lgtA
galE/lgtE
icsB
rfaC
rfaF
Gal
GlcNac
Glc
Hep1
Hep2
PEA
GlcNac
Kdo2
Ácido siálico
lst
icsA
Lipídeo A

Fig 2

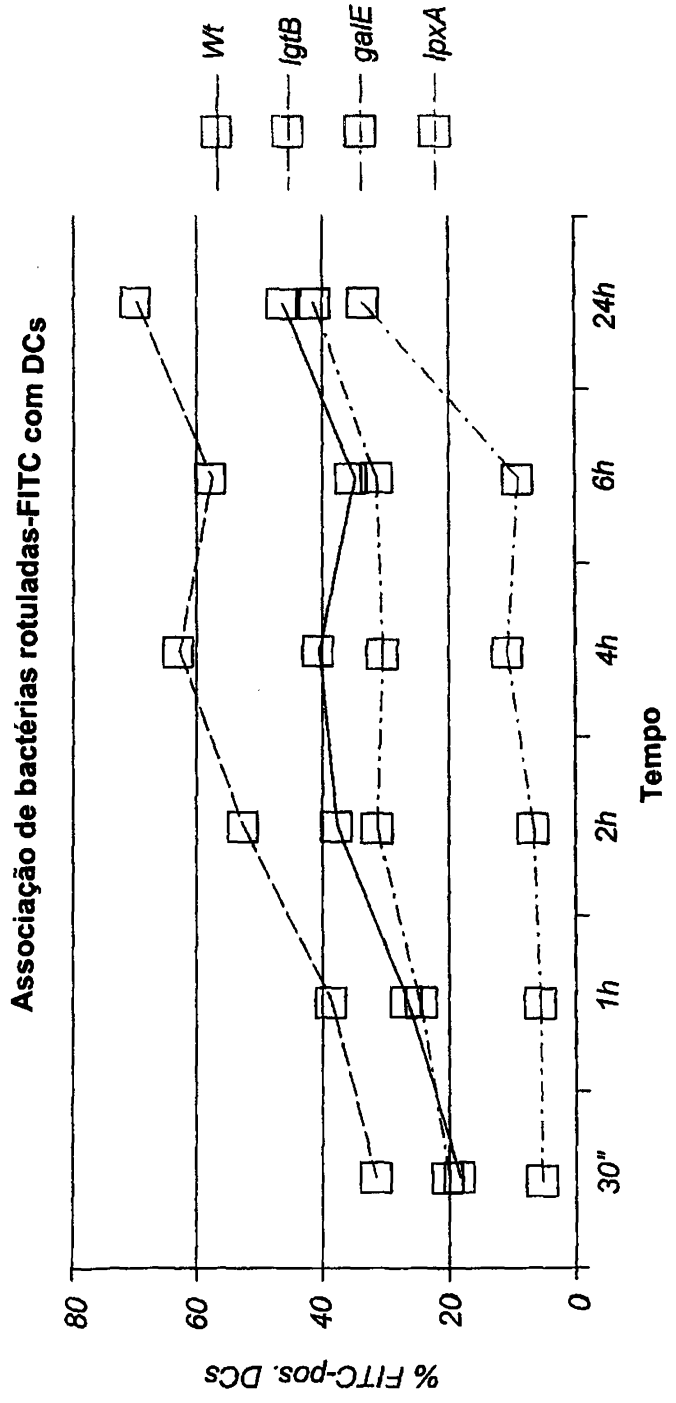
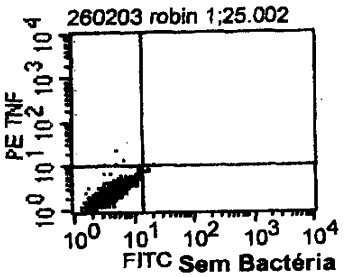

Associação de bactérias rotuladas-FITC com DCs
Wt
lgtB
galE
lpxA
% FITC-pos. DCs
0
20
40
60
80
30"
1h
2h
4h
6h
24h
Tempo

Fig 3a



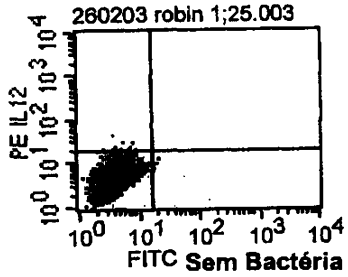
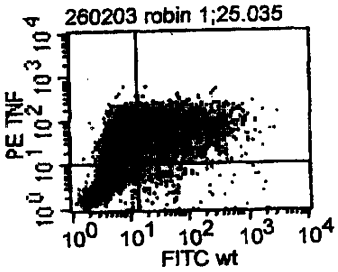


Fig 3b



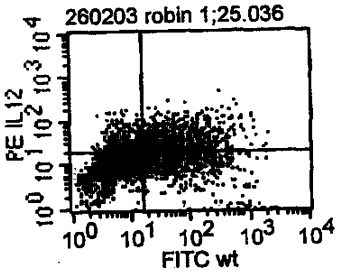
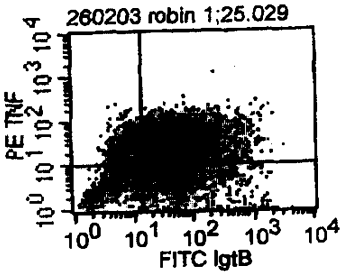


Fig 3c



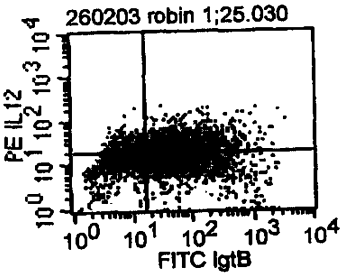
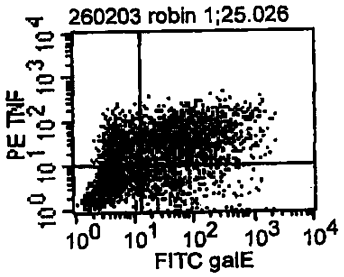


Fig 3d



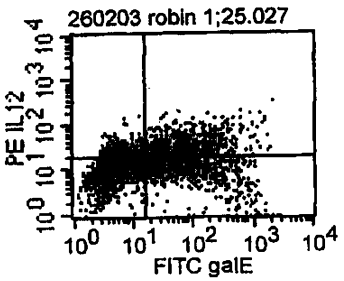
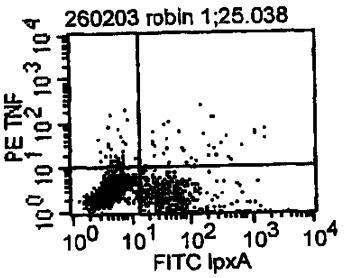
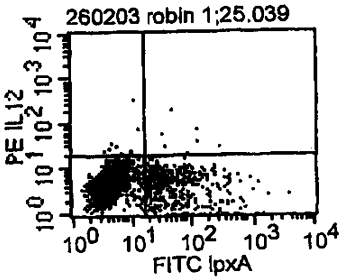


Fig 3e





43

Fig 4a

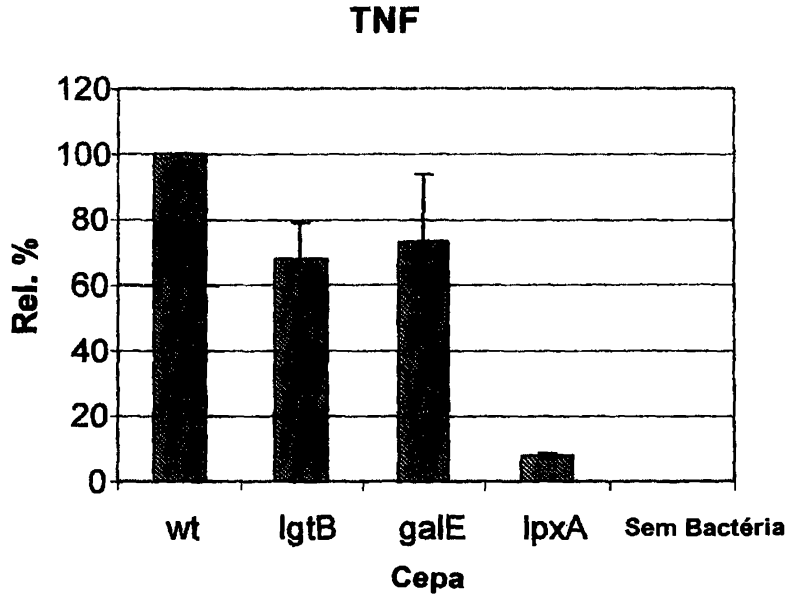
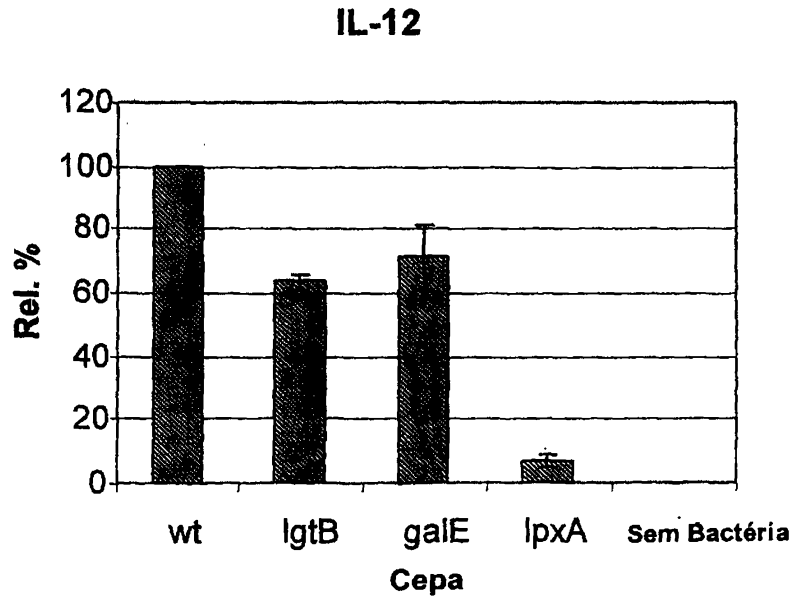


Fig 4b



44

Fig 4c

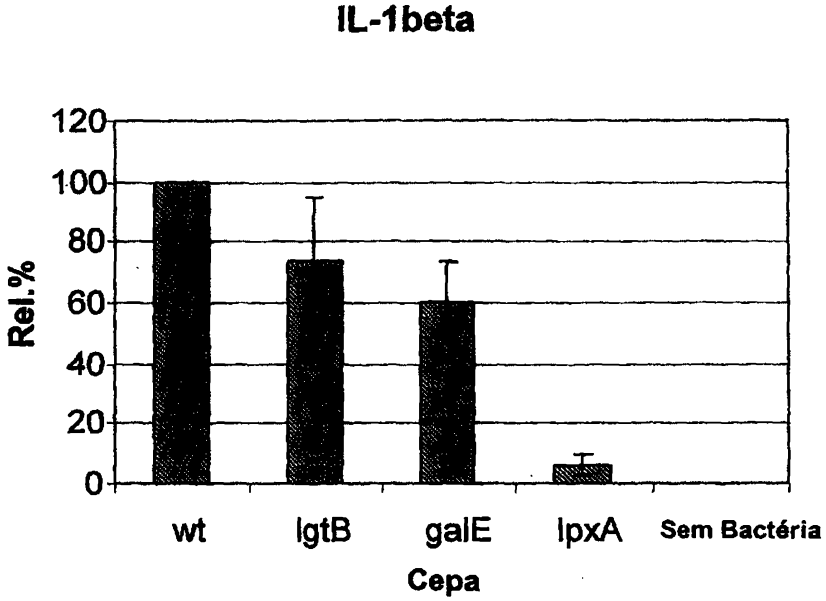
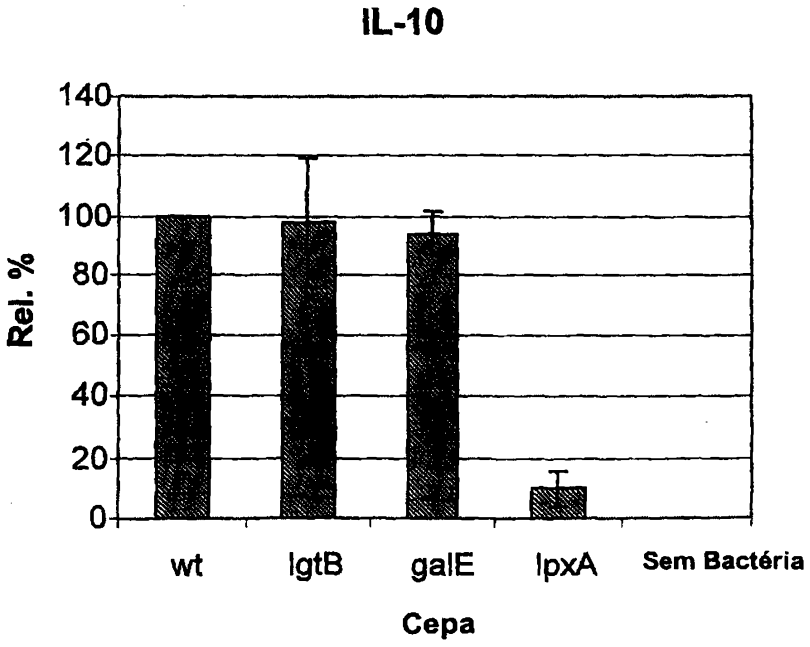
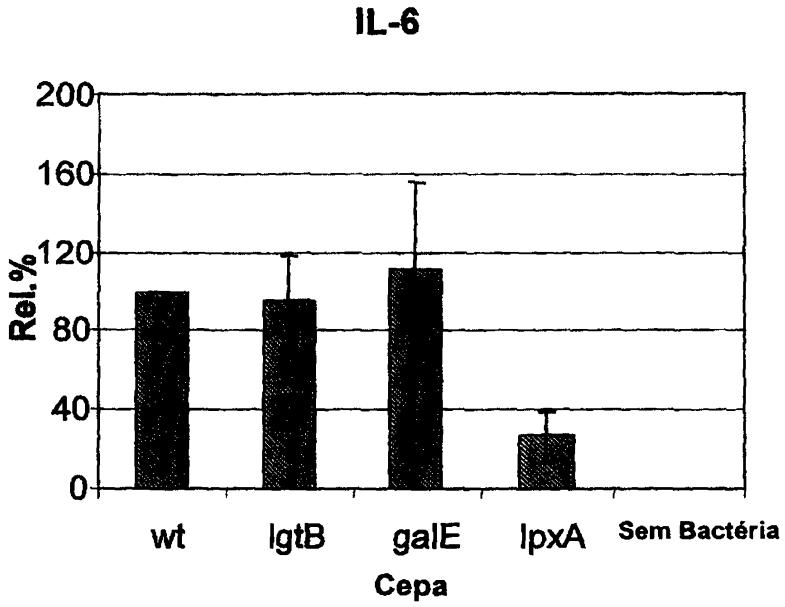


Fig 4d



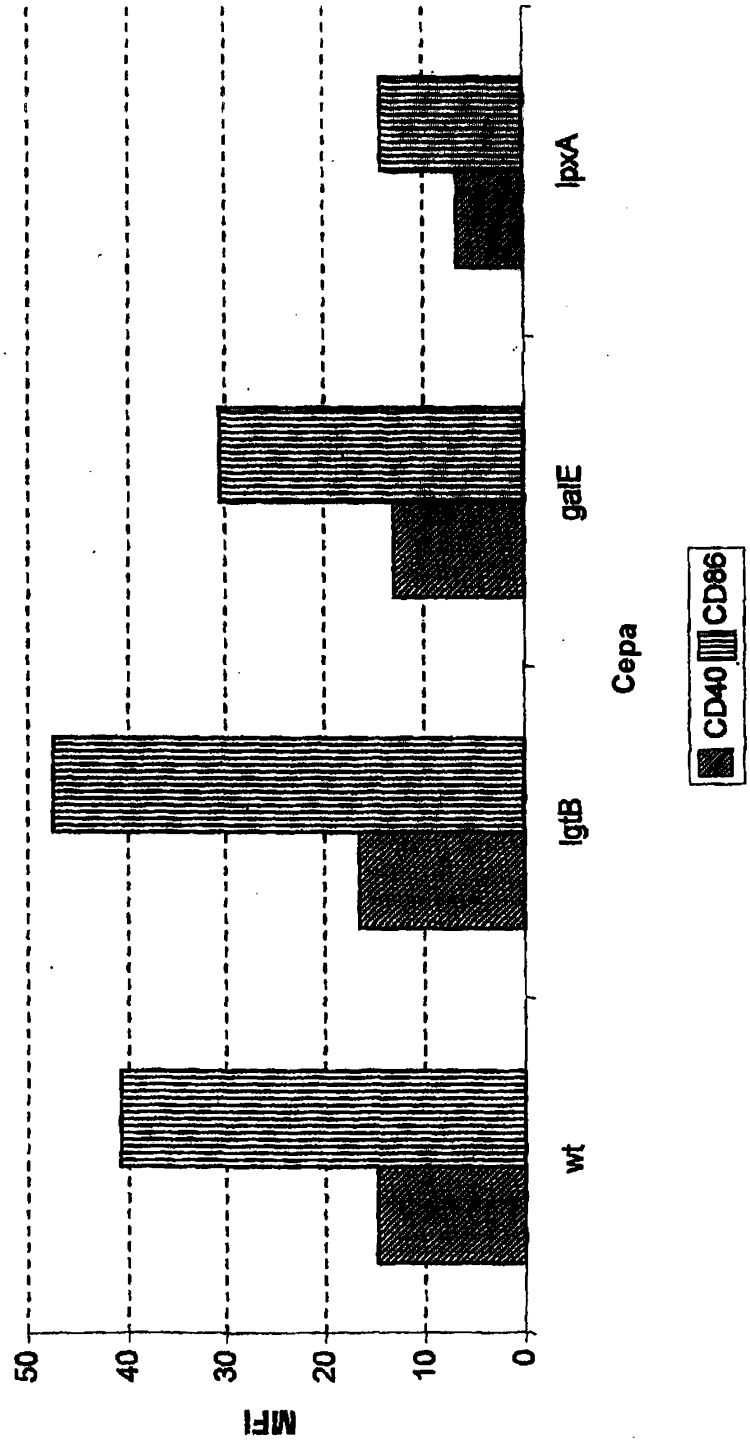
45

Fig 4e



46

Fig 5


Expressão de molécula coestimuladora por DCs
MFI
50
40
30
20
10
0
wt
lgtB
galE
lpxA
Cepa
CD40
CD86

47

Fig 6

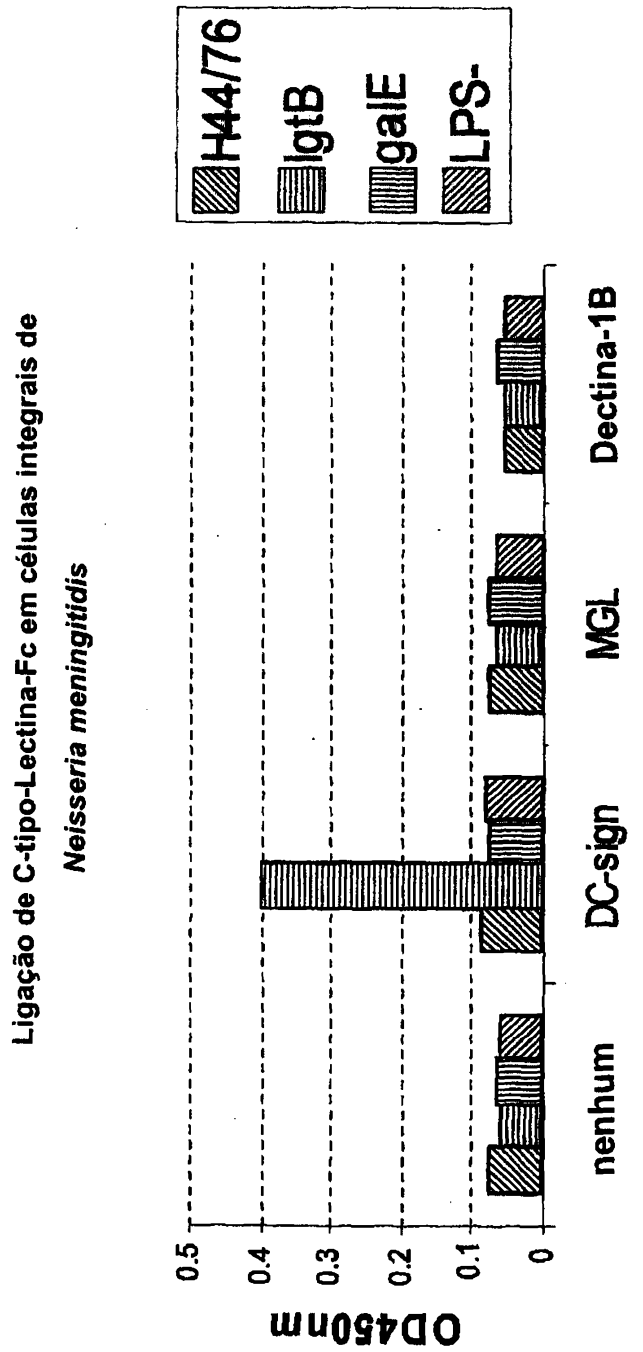

Ligação de C-tipo-Lectina-Fc em células integrais de
Neisseria meningitidis
H44/76
lgtB
galE
LPS-
OD450nm
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
nenhum
DC-sign
MGL
Dectina-1B
Proteína de fusão

Fig 7

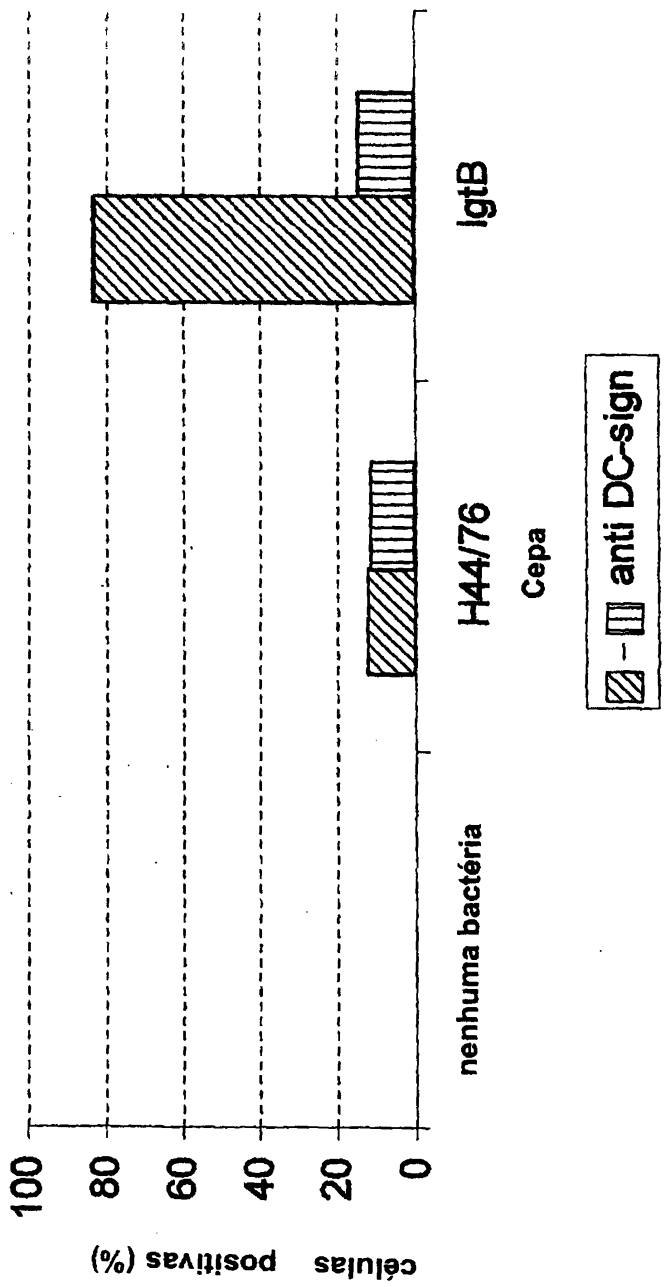

Ligação *lgtB* mediada DC-SIGN por DCs
células positivas (%)
100
80
60
40
20
0
nenhuma bactéria
H44/76
lgtB
Cepa
- anti DC-sign

Fig 8a

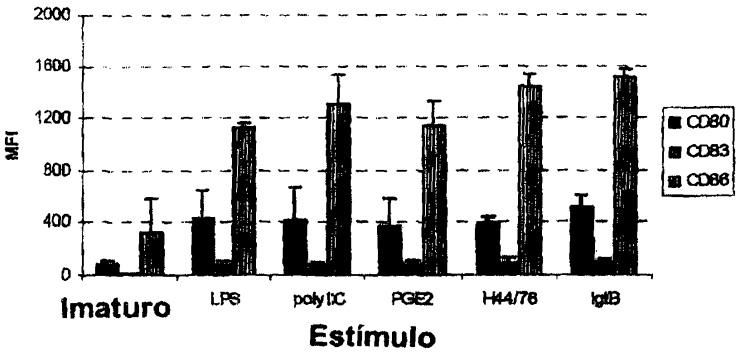

2000
1600
1200
800
400
0
MFI
CD80
CD83
CD86
Imaturo
LPS
poly I:C
PGE2
H44/76
lgtB
Estímulo

Fig 8b

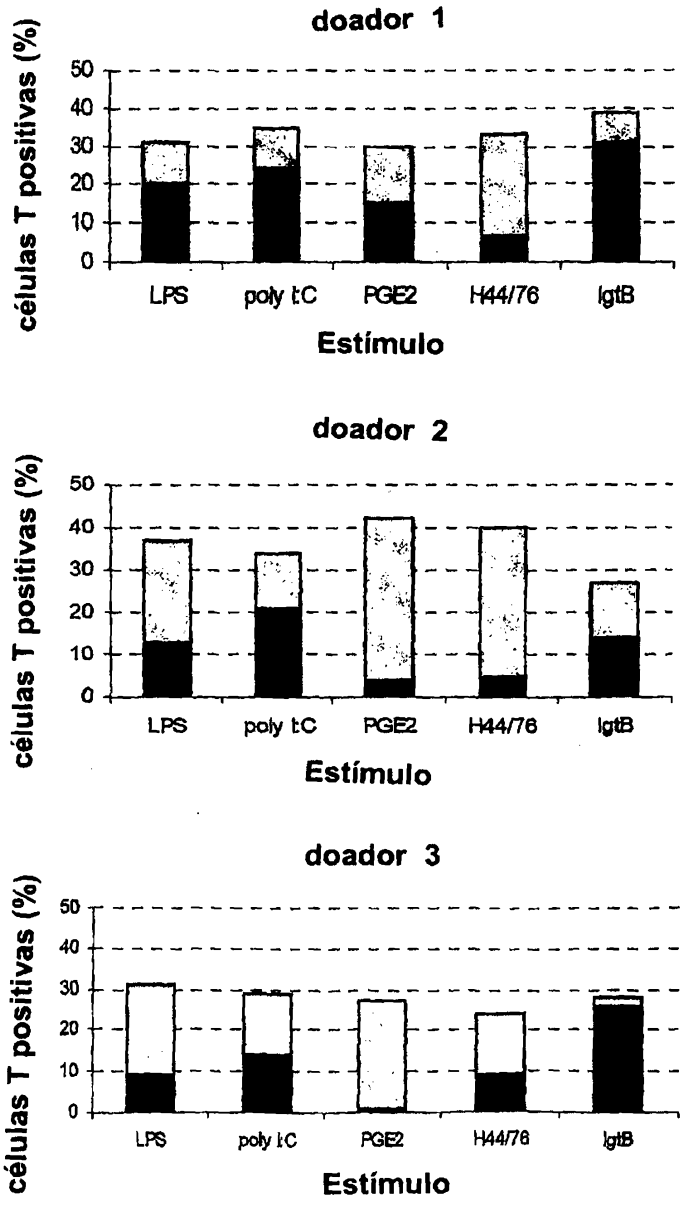

doador 1
células T positivas (%)
50
40
30
20
10
0
LPS
poly I:C
PGE2
H44/76
lgtB
Estímulo
doador 2
células T positivas (%)
50
40
30
20
10
0
LPS
poly I:C
PGE2
H44/76
lgtB
Estímulo
doador 3
células T positivas (%)
50
40
30
20
10
0
LPS
poly I:C
PGE2
H44/76
lgtB
Estímulo

Fig 9a

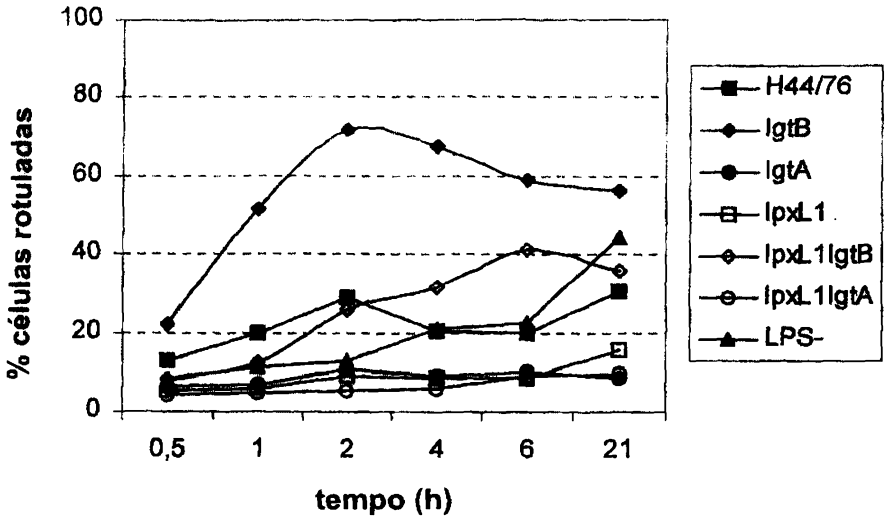
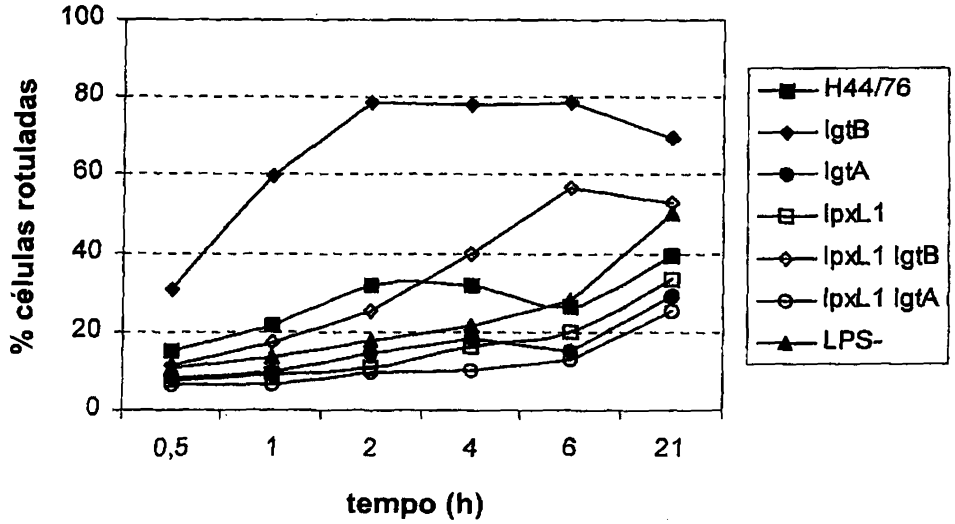

100
80
60
40
20
0
% células rotuladas
0,5
1
2
4
6
21
tempo (h)
H44/76
lgtB
lgtA
lpxL1
lpxL1lgtB
lpxL1lgtA
LPS-

Fig 9b


100
80
60
40
20
0
% células rotuladas
0,5
1
2
4
6
21
tempo (h)
H44/76
lgtB
lgtA
lpxL1
lpxL1 lgtB
lpxL1 lgtA
LPS-