

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

(22) Data de pedido: 2005.11.02	(73) Titular(es): THE BOARD OF TRUSTEES OF LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY 1705 EL CAMINO REAL PALO ALTO, CALIFORNIA 94306-1106	US
(30) Prioridade(s): 2004.11.02 US 624562 P 2005.08.08 US 706548 P		
(43) Data de publicação do pedido: 2007.08.01	(72) Inventor(es): SAMUEL STROBER EVERETT HURTEAU MEYER DALE T. UMETSU	US US US
(45) Data e BPI da concessão: 2012.01.04 036/2012	(74) Mandatário: MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA RUA CASTILHO, N.º 50, 5º - ANDAR 1269-163 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **MÉTODOS DE INIBIÇÃO DE CÉLULAS NKT**

(57) Resumo:

MOLÉCULAS QUE INTERAGEM COM O RECETOR DE ANTIGÉNIOS DE CÉLULAS NKT E SUA CORRESPONDENTE MOLÉCULA APRESENTADORA DE ANTIGÉNIOS, MAS QUE INIBEM A FUNÇÃO IMUNOLÓGICA DE CÉLULAS NKT, SÃO ADMINISTRADAS A UM PACIENTE. CONDIÇÕES DE INTERESSE PARTICULAR INCLUEM O TRATAMENTO DE LÚPUS ERMATOSO SISTÉMICO (SLE), CANCRO, ATROSCLEROSE E DOENÇA ALÉRGICA. NALGUMA FORMA DE REALIZAÇÃO DA INVENÇÃO, O AGENTE INIBIDOR É UM GLICOLÍPIDO ANERGIZANTE, POR EXEMPLO, GALACTOSILCERAMIDA. SÃO PROPORCIONADAS FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS DESSES GLICOLÍPIDOS, E TÊM APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DE DOENÇAS ENVOLVENDO ATIVAÇÃO INDESEJÁVEL DE CÉLULAS NKT.

RESUMO

"MÉTODOS DE INIBIÇÃO DE CÉLULAS NKT"

Moléculas que interagem com o recetor de antigénios de células NKT e sua correspondente molécula apresentadora de antigénios, mas que inibem a função imunológica de células NKT, são administradas a um paciente. Condições de interesse particular incluem o tratamento de lúpus eritematoso sistémico (SLE), cancro, aterosclerose e doença alérgica. Nalguma forma de realização da invenção, o agente inibidor é um glicolípido anergizante, por exemplo, β -galactosilceramida. São proporcionadas formulações farmacêuticas desses glicolípidos, e têm aplicação no tratamento de doenças envolvendo ativação indesejável de células NKT.

DESCRIÇÃO

"MÉTODOS DE INIBIÇÃO DE CÉLULAS NKT"

Esta invenção foi financiada com apoio governamental pela bolsa NIH-AI-40093 atribuída pelos Institutos Nacionais de Saúde. O Governo detém certos direitos desta invenção.

As células NKT constituem uma subpopulação única de linfócitos T que estão altamente conservados em humanos e espécies murinas. As células NKT expressam alguns marcadores de superfície específicos de NK, como a lectina do tipo C NKRP-1A, desse modo partilhando algumas propriedades com células NK clássicas. As células NKT também expressam um recetor de células T semi-invariante, consistindo, em humanos, num rearranjo V α 24J α Q invariante emparelhado preferencialmente com uma cadeia V β 11 variável. No ratinho, as células NKT expressam um rearranjo V α 14J α 281 invariante emparelhado com V β 8, V β 7 ou V β 2 variável. Em termos da expressão de corretores, células NKT invariantes pertencem ao conjunto de linfócitos unicamente positivos CD4+ ou ao CD4-CD8-TCR α/β + duplamente negativos.

Apesar de ainda não terem sido identificados ligandos naturais de células NKT, estas células são ativadas quando o seu TCR reconhece glicosilceramidas derivadas de esponjas marinhas, apresentadas por CD1d. Apesar de esta classe de ceramidas α -glicosiladas não ser detetável em mamíferos, pode partilhar características estruturais críticas com ligandos CD1d naturais, sugerindo que células NKT reconhecem antigénios contendo uma fração hidrófoba (lípidio) e uma hidrófila.

O papel biológico de células NKT não está bem definido. Em resposta à ativação através do seu recetor de células T, foi mostrado que células NKT segregam grandes quantidades de interferão- γ (IFN- γ) e interleuquina-4 (IL-4) (ver, por exemplo, Hong *et al.* (1999) *Immunol. Rev.* 169: 131; e Singh *et al.* (1999) *J Immunol* 163: 2373). Após ativação repetida, as células NKT tornam-se em células polarizadas que produzem predominantemente IL-4.

Também foi sugerido que as células NKT servem uma função de regulação imunológica no controlo da suscetibilidade a certas doenças autoimunes. Por exemplo, nalguns modelos de doença, a transferência de células NKT para recetores suscetíveis a doença previne o desenvolvimento da doença autoimune, e foi sugerido que a ativação de células NKT pode proporcionar intervenção terapêutica para a regulação imunológica de doença autoimune (Sharif *et al.* (2002) *J MoI. Med.* 80: 290-300) por polarização de células T convencionais no sentido da produção de IL-4. Também foi relatado que células NKT e IL-13 (possivelmente produzida por células NKT) podem regular negativamente a imunovigilância tumoral mediada por linfócitos T citotóxicos (Terabe *et al.* (2000) *Nat Immunol.* 1(6): 515-20).

No entanto, também foi relatado que a ativação de células NKT aumenta respostas imunológicas do tipo Th1 e secreção de autoanticorpos que contribuem para o desenvolvimento de lúpus em ratinhos NZB/W adultos (Zeng *et al.* (2003) *J Clin Invest* 112: 1211).

O papel de células NKT em estados clínicos humanos tem muito interesse. Há um nível elevado de conservação do

sistema de células NKT entre espécies. A α -galactosilceramida pode estimular células NKT murinas e humanas, e moléculas CD1d de ratinho e humanas são capazes de apresentar α -GalCer a células NKT de qualquer das espécies, indicando a relevância de estudos animais para ensaios clínicos humanos. A presente invenção proporciona métodos de manipulação de respostas de células NKT.

RESUMO DA INVENÇÃO

São proporcionadas composições para a inibição ("anergia") da função de células NKT, desse modo inibindo a ativação de células NK T por agonistas sintéticos ou naturais. Moléculas que interagem com o recetor de antigénios de células NKT e a sua molécula apresentadora, por exemplo, CD1, de modo que a função imunológica da célula NK T é inibida, são administradas a um paciente e atuam de modo a inibir a ativação de células NKT. Os estados de interesse particular consistem em asma. Nalguma forma de realização da invenção, o agente inibidor é um glicolípido anergizante que regula negativamente os recetores de antigénios de células NK T. Esses glicolípidos podem compreender uma ligação β entre as frações de açúcar e lípido, por exemplo, β -galactosilceramida. São proporcionadas formulações farmacêuticas desses glicolípidos, e têm aplicação no tratamento de doenças envolvendo ativação indesejável de células NKT.

DESCRIÇÃO BREVE DAS FIGURAS

Figuras 1A - 1D. Tratamento com β -Galcer reduz os efeitos da ativação de células NKT *in vivo*, incluindo a expressão

de IFN- γ , IL-4 e síntese de IgE. A síntese de IgG2c não é afetada.

Figura 2A - B. Tratamento com C12- β -GalCer bloqueia AHR induzida por α -GalCer.

Figura 3A - C. Tratamento com C12- β -GalCer reduz AHR induzida por OVA/alum.

Figura 4A - B. Tratamento com anticorpo anti-CD1d (HB323) bloqueia a hiperreatividade das vias aéreas (AHR) induzida por OVA/alum.

Figura 5. Administração oral de β -galactosilceramida.

DESCRIÇÃO PORMENORIZADA DA INVENÇÃO

São proporcionadas composições para inibição da função imunológica de células NKT. Moléculas que interagem especificamente com o recetor de antígenos de células NKT e a sua molécula apresentadora, por exemplo, CD1, e que inibem a função imunológica das células NKT, são administradas a um paciente e atuam de modo a inibir a resposta de ativação de células NKT a agonistas. Nalguma forma de realização da invenção, o agente bloqueador é um glicolípido anergizante que regula negativamente os recetores de antígenos de células NK T. Esses glicolípidos podem compreender uma ligação β entre as frações de açúcar e lípido, por exemplo, β -galactosilceramida.

O termo "tratamento" ou "tratar" significa qualquer tratamento de uma doença num mamífero, incluindo asma, em modelos humanos e animais. Tratamento inclui prevenir a

doença, isto é, impedir o desenvolvimento dos sintomas clínicos da doença, por administração de uma composição protetora antes da indução da doença; suprimir a doença, isto é, impedir o desenvolvimento dos sintomas clínicos da doença, por administração de uma composição protetora após o evento indutor mas antes do aparecimento ou reaparecimento clínico da doença; inibir a doença, isto é, travar o desenvolvimento de sintomas clínicos, por administração de uma composição protetora após o seu aparecimento inicial; e/ou atenuar a doença, isto é, causar a regressão de sintomas clínicos, por administração de uma composição protetora após o seu aparecimento inicial.

Será entendido que, em medicina humana, nem sempre é possível distinguir entre "prevenir" e "suprimir", uma vez que o evento ou eventos indutores finais podem ser desconhecidos, estar latentes, ou o paciente não ser examinado até bastante tempo depois da ocorrência do evento ou eventos. Em consequência, é comum usar o termo "profilaxia", distinto de "tratamento", para abranger ambas as situações de "prevenção" e "supressão", como definidas aqui. Pretende-se que o termo "tratamento", como usado aqui, inclua "profilaxia".

O termo "quantidade eficaz" significa uma dosagem suficiente para proporcionar tratamento do estado de doença a ser tratado. Esta irá variar dependendo do paciente, da doença e do tratamento a ser realizado. Agentes inibidores de células NKT são utilizados para o tratamento de doença; e podem ser utilizados em coformulações, por exemplo, como um agente poupador de esteroides para facilitar a utilização de uma dose menor de prednisona ou hidrocortisona.

A atividade *in vivo* para o tratamento de doença pode ser demonstrada testando um agente inibidor num modelo animal, por exemplo, um modelo de asma induzida em animais; ou uma de várias estirpes de ratinhos consanguíneos com doença hereditária do tipo lúpus, observando o aparecimento da produção de ANA, anticorpos anti-DNA de filamentação dupla patogénicos, glomerulonefrite complexa imunológica, linfadenopatia e função anormal de células B e T imitando a situação humana, em grupos de controlo e tratados. A eficácia clínica humana é demonstrada em ensaios clínicos, empregando metodologia conhecida dos profissionais.

Definições

Como usadas aqui, as formas singulares "um", "uma", "e" e "o", "a" incluem referentes plurais, a menos que o contexto claramente dite em contrário. Assim, por exemplo, referência a "uma construção" inclui uma pluralidade dessas construções e referência a "a célula" inclui referência a uma ou mais células e respetivos equivalentes conhecidos dos profissionais, e assim por diante. Todos os termos técnicos e científicos usados aqui têm o mesmo significado habitualmente entendido pelo profissional da área à qual pertence esta invenção, a menos que seja claramente indicado em contrário.

Alergia é uma tendência acrescida para sensibilidade baseada em IgE resultando na produção de anticorpo IgE específico para um imunogénio, incluindo, por exemplo, veneno de inseto, ácaros domésticos, pólenes, bolores, pelagem de animais, antigénios alimentares ou látex. As respostas alérgicas são específicas de antigénios e são caracterizadas pela produção de citocinas do tipo Th2,

tais como, por exemplo, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, etc. Ocorre sensibilização a um alérgeno particular em pessoas geneticamente predispostas após exposição ao antígeno; o fumo de cigarros e infecções virais podem auxiliar o processo de sensibilização.

Neste grupo estão incluídos aqueles com alergias associadas a asma, que desenvolvem doença clínica variando desde rinite trivial até asma com risco de vida. Após a sensibilização, a exposição continuada a alérgenos conduz a um aumento significativo da prevalência de asma. Depois de ter ocorrido sensibilização, a nova exposição ao alérgeno é um fator de risco para exacerbação de asma. Uma gestão eficaz de asma alérgica tem tipicamente requerido terapia farmacológica e prevenção de contacto com o alérgeno. Os efeitos fisiológicos específicos de asma associada a alergias incluem inflamação das vias aéreas, eosinofilia e produção de muco, e produção de IL-4 e IgE específica para o antígeno.

Os mastócitos, derivados de células precursoras hematopoiéticas que sofrem as suas fases terminais de diferenciação/maturação nos tecidos periféricos onde residem, expressam recetores da superfície celular (FcRI) que lhes permitem ligar-se à porção Fc da IgE com elevada afinidade. Esses mastócitos sensibilizados para IgE, após o encontro com o antígeno específico que é reconhecido pela sua IgE ligada a FcRI, segregam um painel largo de mediadores bioativos, incluindo: mediadores pré-formados que são armazenados nos grânulos citoplasmáticos da célula, por exemplo, histamina, heparina, e proteases neutras, produtos lipídicos sintetizados de novo, por exemplo, prostaglandina D2 e leucotrieno C4, e diversas citocinas.

Muitos destes mediadores potencialmente derivados de mastócitos podem promover obstrução reversível das vias aéreas, hiperreatividade brônquica, e/ou inflamação das vias aéreas.

No entanto, tipos de células adicionais, incluindo eosinófilos e linfócitos Th2, ambos os quais estão bem representados nos infiltrados inflamatórios crônicos nas vias aéreas de pacientes com asma, também podem produzir citocinas ou outros mediadores que podem contribuir para muitas das características da doença. O FcRI, que anteriormente se pensava estar restrito a mastócitos e basófilos teciduais, também é expresso na superfície de monócitos, células dendríticas em circulação, células de Langerhans e eosinófilos, desse modo implicando estas células como fontes potenciais adicionais de mediadores em várias respostas inflamatórias dependentes de IgE. (Quanto a uma revisão ver Galli (1997) *J.E.M.* 186: 343-347.)

Alergénios são compostos imunogénicos que causam respostas de células T do tipo Th2 e respostas de células B de IgE em indivíduos suscetíveis. O alérgénio específico pode ser qualquer tipo de composto químico, tal como, por exemplo, um polissacárido, uma fração de ácido gordo, uma proteína, etc. Os alérgénios incluem antigénios presentes em alimentos, como frutos (por exemplo, melões, morangos, ananás e outros frutos tropicais), amendoins, óleo de amendoim, outros frutos de casca dura, proteínas do leite, claras de ovo, marisco, tomates, etc.; antigénios aéreos, como pólenes de gramíneas, pelagens de animais, excrementos de ácaros domésticos, etc.; antigénios de fármacos, como penicilinas e antibióticos relacionados, sulfonamidas, barbituatos, anticonvulsivos, preparações de insulina

(particularmente de fontes animais de insulina), anestésicos locais (por exemplo, Novocaína) e iodo (presente em muitos corantes de contraste de raios X); venenos de insetos e agentes responsáveis por dermatite alérgica causada por artrópodes sugadores de sangue, como *Diptera*, incluindo mosquitos (*Anopheles* sp., *Aedes* sp., *Culiseta* sp., *Culex* sp.), moscas (*Phlebotomus* sp., *Culicoides* sp.), particularmente tripídeos da ervilha, moscas dos estábulos e mosquitos picadores, carraças (*Dermmacenter* sp., *Ornithodoros* sp., *Otobius* sp.), pulgas (por exemplo, a ordem *Siphonaptera*, incluindo os géneros *Xenopsylla*, *Pulex* e *Ctenocephalides felis felis*); e látex.

Alergénios anafiláticos são aqueles antigénios que colocam indivíduos hipersensíveis em risco de uma reação anafilática. Anafilaxia é uma reação alérgica aguda e sistémica que ocorre depois de um indivíduo ter ficado sensibilizado a um antigénio. A anafilaxia está associada à produção de níveis elevados de anticorpos IgE e à libertação de histaminas, que causam contrações musculares, constrição das vias aéreas e dilatação de vasos sanguíneos. Os sintomas de reações anafiláticas incluem urticária, prurido generalizado, congestão nasal, respiração ruidosa, dificuldade em respirar, tosse, cianose, atordoamento, tonturas, confusão, discurso pouco claro, pulsação rápida, palpitações, náuseas e vômitos, dor abdominal ou câibras, vermelhidão ou inflamação da pele, dilatação nasal, retrações intercostais, etc.

Asma, como definido aqui, é uma síndrome tipicamente caracterizada pelas três características cardinais de obstrução intermitente e reversível das vias aéreas, hiperreatividade das vias aéreas e inflamação das vias

aéreas, que podem surgir devido a interações entre múltiplos fatores genéticos e ambientais. A asma é caracterizada pela presença de células, como eosinófilos, mastócitos, basófilos e linfócitos T CD25⁺, nas paredes das vias aéreas. Há uma interação próxima entre estas células devido à atividade de citocinas, que têm uma variedade de propriedades de comunicação e efectoras biológicas. Quimioquinas atraem células para o sítio de inflamação e citocinas ativam-nas, resultando em inflamação e danos na mucosa. Com o carácter crónico do processo ocorrem alterações secundárias, como espessamento de membranas basais e fibrose. A doença é caracterizada por hiperreatividade aumentada das vias aéreas a uma variedade de estímulos, e inflamação das vias aéreas. Um paciente diagnosticado como sendo asmático terá geralmente múltiplas indicações ao longo do tempo, incluindo respiração ruidosa, ataques asmáticos e uma resposta positiva a provocação com metacolina, isto é, um PC20 por provocação com metacolina menor do que cerca de 4 mg/mL. Podem encontrar-se diretrizes para diagnóstico, por exemplo, no "National Asthma Education Program Expert Panel Guidelines for Diagnosis and Management of Asthma", National Institutes of Health, 1991, Publicação N° 91-3042.

Células NKT constituem uma subpopulação de linfócitos abundante no timo, baço, fígado e medula óssea e também presente no pulmão. Desenvolvem-se no timo a partir das células progenitoras CD4⁺CD8⁺ e circulam no sangue, têm grânulos citoplasmáticos distintos e podem ser funcionalmente identificadas pela sua capacidade para matar certas linhas de células tumorais linfoides *in vitro* sem necessidade de imunização ou ativação prévia. O mecanismo de morte de células NKT é o mesmo utilizado pelas células T

citotóxicas geradas numa resposta imunológica adaptativa; grânulos citotóxicos são libertados na superfície da célula alvo ligada, e as proteínas efetoras que contêm penetram na membrana celular e induzem morte celular programada.

As células NKT expressam marcadores de superfície que são característicos de células assassinas naturais (como NK1.1 e CD161) e células T convencionais (como TCRs). Várias células NKT reconhecem antígenos glicolipídicos apresentados pela proteína CD1d do tipo complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I não polimórfica e expressam um TCR invariante em ratinhos.

Recetor de antígenos de células NKT. O recetor de antígenos de células NKT é um recetor de células T $\alpha:\beta$ composto por duas cadeias proteicas, recetor de células T α e recetor de células T β . Tal como com o recetor em células T convencionais, crê-se que o recetor de células NKT não reconhece um antígeno no seu estado nativo. Células T convencionais reconhecem um ligando composto de um antígeno peptídico ligado a uma molécula MHC. Crê-se que a molécula apresentadora para o recetor de antígenos de células NKT seja CD1d, que muitas vezes está associada a glicolípidos, em vez de fragmentos peptídicos. Crê-se que, de modo análogo a outras moléculas MHC de classe I, o antígeno ligado é ensanduichado entre os dois segmentos α -helicoidais da CD1d. O recetor de células T interage com este ligando composto, fazendo contactos com CD1d e com o antígeno.

As sequências de aminoácidos de recetores de células T mostram que ambas as cadeias têm uma região variável (V) amino-terminal com homologia a um domínio V de

imunoglobulina, uma região constante (C) com homologia a um domínio C de imunoglobulina, e uma pequena região conetora contendo um resíduo cisteína que forma a ligação dissulfureto intercadeias. Cada cadeia abrange a bicamada lipídica por um domínio transmembranar hidrófobo, e termina numa pequena cauda citoplasmática.

O *locus* TCR α contém segmentos genéticos V e J (V α e J α). O *locus* TCR β contém segmentos genéticos D para além de segmentos genéticos V β e J β . As terceiras alças hipervariáveis (CDR3s) das cadeias α e β de recetores de células T, para as quais contribuem os segmentos genéticos D e J, formam o centro do sítio de ligação de antígenos de um recetor de células T; a periferia do sítio consiste no equivalente das alças CDR1 e CDR2, que são codificadas nos segmentos genéticos V α e V β da linha germinativa.

O recetor de células T de células NKT consiste, em humanos, num rearranjo V α 24J α Q invariante emparelhado preferencialmente com uma cadeia V β 11 variável. No ratinho, as células NKT expressam um rearranjo V α 14J α 281 invariante emparelhado com V β 8, V β 7 ou V β 2 variável.

CD1: CD1 é uma molécula não polimórfica do tipo MHC de classe I não codificada por MHC que pode ser encontrada associada de modo não covalente à microglobulina β_2 (β_2m). Em humanos foram identificadas cinco isoformas da CD1 (CD1a, b, c, d e e), e é conhecido que células B humanas expressam CD1c e CD1d. Em ratinhos só foi identificada a isoforma CD1d. Foi demonstrado que as moléculas CD1 são moléculas apresentadoras de antígenos para glicolípidos e péptidos hidrófobos. Nalgumas formas de realização da

invenção, a isoforma de CD1 é CD1d, que interage com o recetor de antigénios de células NKT.

As isoformas humana e de ratinho da CD1 foram clonadas e caracterizadas quanto à sua sequência. A sequência da CD1a humana pode ser encontrada na Genbank, número de acesso M28825. A sequência da CD1b pode ser encontrada na secção PIR1 da Base de Dados de Sequências Proteicas, tiragem 64.00, 31 de março de 2000, números de acesso B39957; B45801; e I79470 (Martin *et al.* (1987) *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(24): 9189-93). A sequência da CD1c pode encontrar-se em PIR1, números de acesso C45801; C39957; e I79472 (Aruffo e Seed (1989) *J. Immunol.* 143: 1723-1730). A CD1d humana pode encontrar-se na Genbank, número de acesso J04142 (Balk *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86 (1), 252-256). A sequência da CD1e humana pode encontrar-se na Genbank, número de acesso X14975, X15110 (Calabi *et al.* (1989) *Eur. J. Immunol.* 19 (2), 285-292).

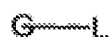
Para as finalidades da presente invenção, o agente anergizante ligar-se-á à proteína CD1 presente em células apresentadoras de antigénios do paciente a ser tratado. Isto é, para terapia humana, o agente anergizante ligar-se-á à CD1 humana, e afins. Uma vez que a CD1 não é altamente polimórfica, um paciente geralmente expressará a proteína de tipo selvagem como descrito acima, apesar de poder haver exceções quando um paciente expressa uma forma variante da proteína.

Agentes podem ligar-se especificamente a uma ou mais das isoformas da CD1 humana, particularmente isoformas expressas em células apresentadoras de antigénios, por exemplo, CD1d. Numa forma de realização alternativa, um

agente anergizante com reatividade cruzada que reconhece epítomos comuns em todas as isoformas da CD1, ou um "cocktail" de agentes específicos para isoformas, é utilizado para se ligar em geral a todas as isoformas presentes no paciente.

Agentes inibidores de células NKT: são moléculas que interferem na ativação de células NKT através do seu recetor de antigénios, por exemplo, por ligação competitiva ou não competitiva ao domínio extracelular da CD1, ou aos recetores de antigénios de células T, ou que bloqueiam a apresentação de um antigénio ativador. Habitualmente, a afinidade de ligação do agente inibidor será pelo menos cerca de 100 μM . Agentes inibidores podem ser péptidos, lípidos, por exemplo, glicolípidos, fosfolípidos, etc., isoladamente ou em combinação com um péptido; pequenas moléculas orgânicas, péptido-miméticos, recetores de células T solúveis, ou afins. Glicolípidos são um agente bloqueador preferido.

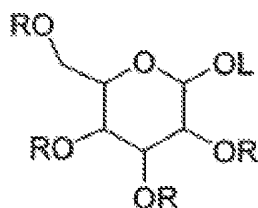
Numa forma de realização da invenção, o agente inibidor de células NKT é um glicolípidos anergizante. Glicolípidos de interesse têm a estrutura geral:



em que L é um lípido e G é um sacárido, que pode ser uma hexose ou uma pentose, e pode ser um mono-, di-, tri-, oligo ou polissacárido, ou um derivado destes. Açúcares de interesse incluem alose, altrose, glucose, manose, gulose, idose, galactose, talose, frutose, maltose, lactose e sucrose. A ligação entre o açúcar e o lípido pode ocorrer em qualquer dos átomos O, habitualmente na posição 1, 2, 3 ou 4, mais habitualmente na posição 1. A ligação pode

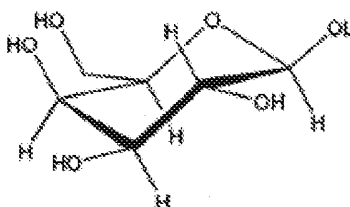
adotar a configuração alfa ou beta; nalgumas formas de realização específicas, a ligação adota a configuração beta. Lípidos de interesse incluem ceramidas, com uma cadeia acilo e uma cadeia esfingosina.

Por exemplo, o agente inibidor de células NKT pode ter a estrutura:



em que L é um lípido e R é selecionado do grupo que consiste em H, um açúcar pentose, um açúcar hexose, um oligo- ou polissacárido; ou um grupo alquilo, arilo ou alcenilo, como um C1 até C6 alquilo de cadeia curta, cujo alquilo está opcionalmente substituído, cujo substituinte pode incluir, sem limitação, um grupo alquilo, arilo, alcenilo, aralquilo, aralcenilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo ou cicloalquilalcenilo; e pode conter um ou mais heteroátomos N, S ou O. Cada um dos átomos O pode estar na orientação α ou β , por exemplo, glucose, galactose, manose, etc.

Numa forma de realização da invenção, G tem a estrutura:



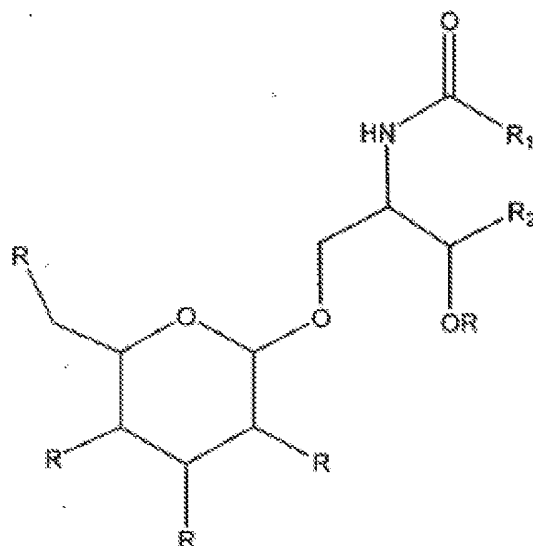
em que G é uma galactose, e em que a ligação a L (como mostrado) ocorre na posição 1, na configuração α ou β .

Alguns lípidos podem ser utilizados como L, incluindo C8 até C30 ácidos gordos, álcoois secundários de cadeia longa, aminoálcoois de cadeia longa, amidas de ácidos gordos com bases di- ou tri-hidroxi de cadeia longa, e afins. Por exemplo, uma fração glicosilo (uma ou várias unidades) pode ser ligada a um grupo hidroxilo de um álcool gordo ou hidroxí álcool gordo, ou a um grupo carbonilo de um ácido gordo. Exemplos de lípidos adequados incluem ceramidas, esfingomielina, cerebrósidos, e afins, incluindo esfingosina, di-hidroesfingosina, C20-di-hidroesfingosina, fitoesfingosina, C20-fitoesfingosina, desidrofitoesfingosina, esfingadienina, etc.

Foram descritas bases esfingoides de cadeia ramificada nalguns invertebrados marinhos. Assim, foi mostrado que uma base com uma cadeia C19 alquilo ramificada e três ligações duplas, 2-amino-9-metil-4,8,10-octadecatrieno-1,2-diol, está presente em glucosilceramida da estrela-do-mar (Irie *et al.*, *J Biochem* 1990, 107, 578) e em esfingomielina de nervo de lula (Ohashi *et al.*, *J Lipid Res* 2000, 41, 1118). Foi encontrada uma base ramificada com duas ligações duplas em cerebrósidos de uma anêmona-do-mar (Karlsson *et al.*, *Biochim Biophys Acta* 1979, 574, 79) e de micélios de um fungo (Kawai *et al.*, *J Lipid Res* 1985, 26, 338).

Ceramidas são amidas de ácidos gordos com bases di- ou tri-hidroxi de cadeia longa, em que a mais comum em animais é esfingosina e em plantas é fitoesfingosina. O grupo acilo das ceramidas consiste geralmente num ácido gordo saturado ou monoinsaturado de cadeia longa. Os ácidos gordos mais frequentes encontrados em ceramidas animais são 18:0, 24:0 e 24:1(n-9), também se encontrando hidroxí ácidos gordos de cadeia longa.

Numa forma de realização, o inibidor de células NKT tem a estrutura:

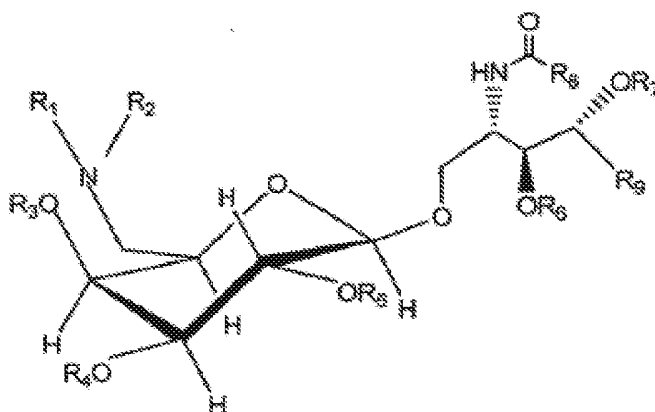


em que R^1 e R^2 podem ser iguais ou diferentes e são independentemente selecionados de um alquilo ou alcenilo possuindo desde cerca de 8 até 30 carbonos, que pode ser linear ou ramificado, habitualmente linear, e habitualmente possuindo não mais do que 0, 1, 2 ou 3 ligações insaturadas, cuja cadeia pode estar opcionalmente substituída ou fosforilada ou sulfatada; ou um derivado destes, incluindo ésteres e afins; e

Cada R pode ser igual ou diferente e é independentemente selecionado do grupo que consiste em H, OH, um éter de um grupo alquilo de cadeia curta arilo ou alcenilo, cujo alquilo está opcionalmente substituído, cujo substituinte pode incluir, sem limitação, um grupo alquilo, arilo, alcenilo, aralquilo, aralcenilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo ou cicloalquilalcenilo; e pode conter um ou mais heteroátomos N, S ou O, um açúcar pentose ligado a O, um açúcar hexose ligado a O, um oligo- ou polissacárido ligado a O; ou um grupo alquilo, arilo ou alcenilo, como um C1 até C6 alquilo de cadeia curta, cujo alquilo está

opcionalmente substituído, cujo substituinte pode incluir, sem limitação, um grupo alquilo, arilo, alcenilo, aralquilo, aralcenilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo ou cicloalquilalcenilo; e pode conter um ou mais heteroátomos N, S ou O. Cada um dos átomos R pode estar na orientação α ou β , por exemplo, glucose, galactose, manose, etc.

Numa forma de realização, o inibidor de células NKT tem a estrutura:



em que R_1 é: (i) hidrogénio; ou (ii) $-\text{SO}_2\text{R}_{10}$, em que R_{10} é: halo; hidroxí; OR_{11} ; OR_{12} ; amino; NHR_{11} ; $\text{N}(\text{R}_{11})_2$; NHR_{12} ; $\text{N}(\text{R}_{12})_2$; aralquilamino; ou $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ alquilo opcionalmente substituído com halo, hidroxí, oxo, nitro, OR_{11} , OR_{12} , aciloxi, amino, NHR_{11} , $\text{N}(\text{R}_{11})_2$, NHR_{12} , $\text{N}(\text{R}_{12})_2$, aralquilamino, mercapto, tioalcoxi, $\text{S}(\text{O})\text{R}_{11}$, $\text{S}(\text{O})\text{R}_{12}$, SO_2R_{11} , SO_2R_{12} , $\text{NHSO}_2\text{R}_{11}$, $\text{NHSO}_2\text{R}_{12}$, sulfato, fosfato, ciano, carboxilo, $\text{C}(\text{O})\text{R}_{11}$, $\text{C}(\text{O})\text{R}_{12}$, $\text{C}(\text{O})\text{OR}_{11}$, $\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$, $\text{C}(\text{O})\text{NHR}_{11}$, $\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}_{11})_2$, $\text{C}_3\text{-C}_{10}$ cicloalquilo contendo 0-3 R_{13} , $\text{C}_3\text{-C}_{10}$ heterociclilo contendo 0-3 R_{13} , $\text{C}_2\text{-C}_6$ alcenilo, $\text{C}_2\text{-C}_6$ alcinilo, $\text{C}_5\text{-C}_{10}$ cicloalcenilo, $\text{C}_5\text{-C}_{10}$ heterocicloalcenilo, $\text{C}_6\text{-C}_{20}$ arilo contendo 0-3 R_{14} , ou heteroarilo contendo 0-3 R_{14} ; ou $\text{C}_3\text{-C}_{10}$ cicloalquilo, $\text{C}_3\text{-C}_{10}$ heterociclilo, $\text{C}_5\text{-C}_{10}$ cicloalcenilo, ou $\text{C}_5\text{-C}_{10}$ heterocicloalcenilo opcionalmente substituído com um ou mais halo, hidroxí, oxo, OR_{11} , OR_{12} ,

aciloxi, nitro, amino, NHR_{11} , $\text{N(R}_{11})_2$, NHR_{12} , $\text{N(R}_{12})_2$, aralquilamino, mercapto, tioalcoxi, S(O)R_{11} , S(O)R_{12} , SO_2R_{11} , SO_2R_{12} , $\text{NHSO}_2\text{R}_{11}$, $\text{NHSO}_2\text{R}_{12}$, sulfato, fosfato, ciano, carboxilo, C(O)R_{11} , C(O)R_{12} , C(O)OR_{11} , C(O)NH_2 , C(O)NHR_{11} , $\text{C(O)N(R}_{11})_2$, alquilo, haloalquilo, $\text{C}_3\text{-C}_{10}$ cicloalquilo contendo 0-3 R_{13} , $\text{C}_3\text{-C}_{10}$ heterociclilo contendo 0-3 R_{13} , $\text{C}_2\text{-C}_6$ alcenilo, $\text{C}_2\text{-C}_6$ alcinilo, $\text{C}_5\text{-C}_{10}$ cicloalcenilo, $\text{C}_5\text{-C}_{10}$ heterocicloalcenilo, $\text{C}_6\text{-C}_{20}$ aril-heteroarilo contendo 0-3 R_{14} , ou $\text{C}_6\text{-C}_{20}$ heteroarilo contendo 0-3 R_{14} ; ou

$\text{C}_2\text{-C}_6$ alcenilo, $\text{C}_2\text{-C}_6$ alcinilo, arilo, ou heteroarilo opcionalmente substituído com um ou mais halo, hidroxil, OR_{11} , OR_{12} , aciloxil, nitro, amino, NHR_{11} , $\text{N(R}_{11})_2$, NHR_{12} , $\text{N(R}_{12})_2$, aralquilamino, mercapto, tioalcoxi, S(O)R_{11} , S(O)R_{12} , SO_2R_{11} , SO_2R_{12} , $\text{NHSO}_2\text{R}_{11}$, $\text{NHSO}_2\text{R}_{12}$, sulfato, fosfato, ciano, carboxilo, C(O)R_{11} , C(O)R_{12} , C(O)OR_{11} , C(O)NH_2 , C(O)NHR_{11} , $\text{C(O)N(R}_{11})_2$, alquilo, haloalquilo, $\text{C}_3\text{-C}_{10}$ cicloalquilo contendo 0-3 R_{13} , $\text{C}_3\text{-C}_{10}$ heterociclilo contendo 0-3 R_{13} , $\text{C}_2\text{-C}_6$ alcenilo, $\text{C}_2\text{-C}_6$ alcinilo, $\text{C}_5\text{-C}_{10}$ cicloalcenilo, $\text{C}_5\text{-C}_{10}$ heterocicloalcenilo, $\text{C}_6\text{-C}_{20}$ arilo contendo 0-3 R_{14} , ou $\text{C}_6\text{-C}_{20}$ heteroarilo contendo 0-3 R_{14} ; ou

(iii)- C(O)R_{10} , em que R_{10} é definido como acima; ou (iv)- $\text{C(R}_{10})_2(\text{R}_{15})$, em que R_{10} é definido como acima; R_{15} é hidrogénio, R_{10} , ou R_{15} e R_2 tomados em conjunto formam uma ligação dupla entre os átomos de carbono e azoto aos quais estão ligados; ou (v) R_1 e R_2 tomados em conjunto formam um heterociclilo de 3-10 átomos de anel opcionalmente substituído com R_{10} ; R_2 é hidrogénio, ou R_2 e R_{15} tomados em conjunto formam uma ligação dupla entre os átomos de carbono e azoto aos quais estão ligados, ou R_2 e R_1 tomados em conjunto formam um heterociclilo de 3-10 átomos de anel opcionalmente substituído com R_{10} ;

R_3 , R_4 , R_5 , R_6 e R_7 , cada um independentemente, são hidrogénio, $\text{C}_1\text{-C}_6$ alquilo, $\text{C}_6\text{-C}_{12}$ aralquilo, ou $\text{C}_1\text{-C}_6$ acilo;

R_8 é $-(CH_2)_XCH_3$; R_9 é um C_3 - C_{100} alquilo linear ou ramificado; R_{11} é C_1 - C_{20} alquilo opcionalmente substituído com halo, hidroxí, alcoxi, amino, alquilamino, dialquilamino, sulfato, ou fosfato; R_{12} é arilo opcionalmente substituído com halo, haloalquilo, hidroxí, alcoxi, nitro, amino, alquilamino, dialquilamino, sulfato, ou fosfato; Cada R_{13} é independentemente halo, haloalquilo, hidroxí, alcoxi, oxo, amino, alquilamino, dialquilamino, sulfato, ou fosfato; Cada R_{14} é independentemente halo, haloalquilo, hidroxí, alcoxi, nitro, amino, alquilamino, dialquilamino, sulfato, ou fosfato; e X é 1-100.

Referindo-nos à fórmula acima, um subconjunto dos compostos descritos acima consiste naqueles em que X é 24 e R_9 é n-tetradecilo.

Outros substituintes adequados são descritos em PCT/US2003/008530. O documento PCT/US2003/008530 é dirigido à forma α dos compostos; no entanto, é pretendido aqui que o mesmo tipo de substituições possa ser feito na forma β .

Ensaio de Rastreamento: Agentes candidatos podem ser rastreados quanto à sua capacidade para inibir a ativação de células NKT. Ensaio para determinar a afinidade e especificidade da ligação são conhecidos na área, incluindo ensaios competitivos e não competitivos. Ensaio de interesse incluem ELISA, RIA, citometria de fluxo, etc. Ensaio de ligação podem ligar CD1 a uma matriz sólida, depois adicionar o ligando (agente) candidato à CD1 ligada. A afinidade da ligação pode ser medida por espectroscopia de ressonância de plasmões (ensaio Biacore). Alternativamente, o agente bloqueador candidato pode ser combinado com a CD1

ligada na presença de um competidor, por exemplo, um glicolípido, etc.

Também podem ser realizados ensaios de ligação para avaliar de um agente candidato interfere na ligação de moléculas a CD1; ou interfere na interação entre o recetor de células NKT e um complexo CD1/glicolípido. Um ensaio para determinar se um agente candidato pode ligar-se ao recetor de células NKT (NKTCR) pode empregar um dímero ou tetrâmero de CD1 (ver Kronenberg *et al.* (2001) *P.N.A.S.* 98: 2950-2952). Por exemplo, um tetrâmero de CD1 pode ser carregado com um agente candidato; o complexo resultante é então contactado com NKTCR, habitualmente células NKT, e o nível de ligação é quantificado, por exemplo, por citometria de fluxo. Como controlo positivo, a ligação de um tetrâmero de CD1/ α -galactosilceramida pode ser quantificada, ou utilizada um ensaio de ligação competitiva. Nalgumas formas de realização, o agente de interesse ligar-se-á ao NKTCR nestas condições.

Noutras formas de realização, um agente de interesse irá interferir com um agonista que se liga a CD1 e TCR. Esse bloqueio pode ser avaliado carregando primeiramente o controlo positivo (agonista, como α -galcer) em dímeros ou tetrâmeros de CD1, cujos tetrâmeros podem ser etiquetados de forma detetável. O reagente resultante é utilizado para ligação a uma população de células NKT, cuja ligação é quantificada, por exemplo, por citometria de fluxo. Para mostrar que um agente candidato interrompe a ligação, o tetrâmero é pré-incubado com o antagonista do candidato, depois é carregado com o agonista, e o complexo resultante é comparado com o complexo de agonista quanto à sua capacidade de ligação a células NKT. Nalgumas formas de

realização, o agente de interesse irá interferir na interação entre a ligação de um agonista e CD1.

Em geral, uma pluralidade de misturas de ensaio é processada em paralelo com diferentes concentrações do agente, para se obter uma resposta diferencial às várias concentrações. Tipicamente, uma destas concentrações serve de controlo negativo, isto é, a concentração nula ou inferior ao nível de deteção.

Ensaio de interesse são dirigidos a agentes que inibem a função imunológica de células NKT. Ensaio de interesse podem ser dirigidos a ensaios de ligação para o recetor de células NKT, e/ou CD1; ou podem utilizar ensaios funcionais dirigidos a uma avaliação da ativação de células NKT, e/ou modelos animais para ativação de células NKT.

Um ensaio funcional *in vitro* que pode ser utilizado para rastreio de compostos inibidores baseia-se na capacidade da α -galactosilceramida para ativar células NKT em misturas de células imunológicas, como células de baço de ratinho, que incluem células NKT e células apresentadoras de antígenos. Tipicamente, a α -galactosilceramida é adicionada à cultura de células durante 24 horas, e a ativação é avaliada por proliferação celular e a secreção de IL-4 e IFN- γ para o sobrenadante de cultura.

O rastreio de compostos inibidores pode ser efetuado por pré-incubação da mistura de células com a molécula inibidora (antagonista) candidata, depois adição da molécula ativadora (agonista) α -galactosilceramida e avaliação da proliferação celular. Os sobrenadantes são avaliados 24 horas depois quanto à secreção de citocinas.

A potência inibidora é determinada pela redução da proliferação e secreção de citocinas. Alternativamente, culturas de células podem incluir células NKT purificadas e células apresentadoras de antígenos purificadas, em particular células dendríticas.

Agentes candidatos são obtidos de uma grande variedade de fontes, incluindo bibliotecas de compostos sintéticos ou naturais. Por exemplo, estão disponíveis numerosos meios para síntese aleatória e dirigida de uma grande variedade de compostos orgânicos e biomoléculas. Alternativamente, bibliotecas de compostos naturais na forma de extratos bacterianos, fúngicos, vegetais e animais estão disponíveis ou são facilmente produzidas. Adicionalmente, bibliotecas e compostos naturais ou produzidos de modo sintético são facilmente modificados por meios químicos, físicos e bioquímicos convencionais. Agentes farmacológicos conhecidos podem ser sujeitos a modificações químicas dirigidas ou aleatórias, como acilação, alquilação, esterificação, amidação, para produzir análogos estruturais.

Para o tratamento de asma são interessantes anticorpos específicos para CD1, com a finalidade de inibir ou bloquear a ativação de NKT. Anticorpos adequados podem ser obtidos por imunização de um animal hospedeiro com péptidos compreendendo a totalidade ou uma porção da proteína CD1. Animais hospedeiros adequados incluem ratinho, rato, ovelha, cabra, hamster, coelho, etc. A origem do imunogénio proteico pode ser um ratinho, humano, rato, macaco, etc. Em geral, o animal hospedeiro será de uma espécie diferente da do imunogénio, por exemplo, CD1 de ratinho utilizada para imunizar hamsters, CD1 humana para imunizar ratinhos, etc.

Péptidos derivados dessas regiões altamente conservadas podem ser utilizados como imunogénios para gerar anticorpos com especificidade cruzada. O imunogénio pode compreender a proteína completa, ou respetivos fragmentos e derivados. Imunogénios preferidos compreendem a totalidade ou uma parte do domínio extracelular da CD1 humana, em que estes resíduos podem conter as modificações pós-tradução, como glicosilação, presentes na CD1 nativa. Imunogénios compreendendo o domínio extracelular são produzidos de uma variedade de modos conhecidos na área, por exemplo, expressão de genes clonados utilizando métodos recombinantes convencionais, isolamento a partir de células T, populações de células submetidas a triagem que expressam níveis elevados de CD1, etc. Anticorpos monoclonais são produzidos por técnicas convencionais. Em geral, o baço e/ou nodos linfáticos de um animal hospedeiro imunizado proporcionam uma fonte de células plasmáticas. As células plasmáticas são imortalizadas por fusão com células de mieloma, para produzir células de hibridoma. O sobrenadante de cultura de hibridomas individuais é rastreado utilizando técnicas comuns para identificar aqueles que produzem anticorpos com a especificidade desejada. Animais adequados para a produção de anticorpos monoclonais para a proteína humana incluem ratinho, rato, hamster, etc. Para dirigir anticorpos contra a proteína de ratinho, o animal será geralmente um hamster, porquinho-da-índia, coelho, etc. O anticorpo pode ser purificado dos sobrenadantes de células de hibridoma ou fluido de ascites por técnicas convencionais, por exemplo, cromatografia de afinidade utilizando CD1 ligada a um suporte insolúvel, proteína A sefarose, etc. Para utilização *in vivo*, particularmente para injeção em humanos, é desejável diminuir a antigenicidade do agente bloqueador. Uma resposta

imunológica de um recetor contra o agente bloqueador irá potencialmente diminuir o período de tempo durante o qual a terapia é eficaz. Há vários métodos que podem ser seguidos para proporcionar anticorpos humanos ou humanizados, incluindo a produção de anticorpos humanos em animais hospedeiros transgênicos, modificação de anticorpos animais para "humanizar" o anticorpo ou dotá-lo de "resíduos superficiais mutados"; ou seleção de fragmentos de anticorpos humanos num rastreio de expressão em fagos. Pode encontrar-se uma revisão de anticorpos humanos e humanizados em Vaughan *et al.* (1998) *Nat. Biotech.* 16: 535. Métodos de humanização de anticorpos são conhecidos na área. O anticorpo de interesse pode ser manipulado por técnicas de DNA recombinante para substituir os CH1, CH2, CH3, domínios conectores e/ou o domínio de arcabouço pela sequência humana correspondente (ver WO 92/02190; Roguska *et al.* (1994) *P.N.A.S.* 91: 969-973; Jones *et al.* (1986) *Nature* 321: 522-525; Padlan (1991) *Mol. Immunol.* 28: 489-498).

Uma variedade de outros agentes pode ser incluída no ensaio de rastreio. Estes incluem reagentes tais como sais, proteínas neutras, por exemplo, albumina, detergentes, etc., que podem ser utilizados para facilitar a ligação ótima proteína-DNA e/ou reduzir interações inespecíficas ou de fundo. Também podem ser utilizados reagentes que, de outro modo, melhoram a eficiência do ensaio, como inibidores de proteases, inibidores de nucleases, agentes antimicrobianos, etc.

Ensaio funcionais de interesse incluem uma avaliação da ativação funcional de células NKT num cenário *in vitro* ou *in vivo*. A ativação pode ser medida por proliferação de

células NKT; a libertação de citocinas, por exemplo, IFN- γ e/ou IL-4; a morte de células alvo, e afins. Controlos positivos para a ativação podem incluir a utilização de α -galactosilceramida, apresentada por células apresentadoras de antígenos que expressam uma CD1; ou um respetivo análogo sem células, por exemplo, um tetrâmero de CD1.

Células NKT podem ser isoladas de sangue periférico do paciente utilizando vários métodos de afinidade, por exemplo, citometria de fluxo, esférulas imunomagnéticas, etc. Ensaios de ativação podem ser realizados em clones de células NKT ou hibridomas de células NKT, por exemplo, utilizando células humanas, células de roedores, etc. Ensaios para monitorização da ativação de células NKT são conhecidos na área, e incluem ensaios de proliferação e ensaios de libertação de citocinas, incluindo ensaios de manchas de ELISA.

Ensaios de proliferação medem o nível da proliferação de células NKT em resposta a um antígeno específico. Num ensaio exemplificativo, células de baço de ratinho, misturas de células NKT purificadas e células dendríticas, etc., são preparadas e lavadas, depois são cultivadas na presença de um agente ativador, por exemplo, α -galactosilceramida. As células são habitualmente cultivadas durante 24 horas até vários dias. A proliferação induzida por glicolípidos é avaliada pela monitorização da síntese de DNA pelas culturas, por exemplo, incorporação de ^3H -timidina durante as últimas 18 horas da cultura.

Ensaios citotóxicos de células NKT medem o número de células NKT citotóxicas com atividade assassina. Células NKT são testadas quanto à sua capacidade para matar células

alvo. Num ensaio exemplificativo, células alvo são etiquetadas com $\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$. Em seguida, as células alvo são adicionadas a uma suspensão de células NKT potencialmente ativadas. A citotoxicidade é medida por quantificação da libertação de $\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$ a partir de células lisadas. São tipicamente incluídos no ensaio controles para a libertação espontânea e total. A libertação percentual específica de ^{51}Cr pode ser calculada com base numa percentagem da libertação espontânea.

O ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA) e outros ensaios imunoespecíficos podem ser utilizados para determinar o perfil de citocinas de células NKT ativadas, e podem ser utilizados para monitorizar a expressão dessas citocinas, como IL-4, γ -IFN, etc. Os anticorpos de captura podem consistir em qualquer anticorpo específico para uma citocina de interesse, em que sobrenadantes das culturas de células NKT, como descrito acima, são convenientemente utilizados como fonte do antígeno. Após bloqueio e lavagem adicionam-se anticorpos detetores etiquetados e determinam-se as concentrações de proteínas presentes em função da etiqueta que está ligada.

Formulações

Os agentes inibidores de células NKT podem ser proporcionados em solução ou em qualquer outra forma farmacologicamente adequada para administração. Os agentes são formulados para administração de um modo habitual para a administração desses materiais. Formulações típicas são as apresentadas em "Remington's Pharmaceutical Sciences", última edição, Mack Publishing Company, Easton, PA. A via de administração será selecionada com base no composto a

ser administrado, o estado do paciente e a doença a ser tratada. Um composto pode ser administrado por diferentes vias dependendo da gravidade da doença; por exemplo, situações de emergência podem requerer administração i.v., uma situação aguda mas sem risco de vida pode ser tratada oralmente, ao passo que um tratamento crônico pode ser administrado por aerossol.

Para utilização terapêutica, particularmente em doenças das vias aéreas, é preferida a distribuição local. A distribuição por inalação ou aerossóis de insuflação proporciona concentrações em nível elevado de fármaco em comparação com a concentração absorvida de modo sistêmico. Alternativamente, o agente pode ser administrado por injeção, incluindo injeção intramuscular, intravenosa (IV), subcutânea ou peritoneal, muito preferivelmente injeções IV e locais. No entanto, também podem ser utilizados outros modos de administração desde que estejam disponíveis meios para permitir a entrada do agente na circulação sistêmica, como formulações orais, transmucosas ou transdérmicas, que podem ser aplicadas na forma de supositórios, emplastros da pele ou de modo intranasal. Pode ser apropriadamente utilizada qualquer formulação adequada que efetue a transferência do agente para a corrente sanguínea ou localmente para os pulmões.

Para injeção, formulações adequadas compreendem geralmente soluções ou suspensões aquosas utilizando soro fisiológico, solução de Hank ou outros tampões opcionalmente incluindo agentes estabilizadores ou outros componentes minoritários. Também podem ser utilizadas preparações lipossômicas e outras formas de microemulsões. O agente também pode ser fornecido em forma liofilizada e reconstituído para

administração. Administrações transmucosas e transdérmicas incluem geralmente agentes que facilitam a passagem através da barreira mucosa ou dérmica, como biliar, sais, ácido fusídico e seus análogos, vários detergentes e afins. Também é possível administração oral (ver, por exemplo, Miyamoto *et al.* (2001) *Nature* 413(6855): 531-4).

A natureza da formulação dependerá, nalguma extensão, da natureza do agente escolhido. Uma formulação adequada é preparada utilizando técnicas conhecidas e princípios de formulação bem conhecidos dos profissionais. A percentagem de agente contido numa composição farmacêutica particular também dependerá da natureza da formulação; a percentagem pode variar numa gama ampla desde cerca de 1% por peso até cerca de 85% por peso.

Podem ser administrados agentes ao paciente afetado através de um sistema de distribuição farmacêutica para a via de inalação. Os compostos podem ser formulados numa forma adequada para administração por inalação. O sistema de distribuição farmacêutica é tal que é adequado para terapia respiratória por administração tópica dos respetivos agentes em revestimentos de mucosa dos brônquios. Esta invenção pode empregar um sistema que dependa do poder de um gás comprimido para expelir os agentes de um recipiente. Para esta finalidade pode ser empregue um aerossol ou embalagem pressurizada.

Como usado aqui, o termo "aerossol" é utilizado no seu sentido convencional, referindo-se a partículas líquidas ou sólidas muito finas transportadas, por um gás impulsor sob pressão, para um sítio de aplicação terapêutica. Quando for empregue nesta invenção um aerossol farmacêutico, o

aerossol conterá o composto terapeuticamente ativo, que pode estar dissolvido, suspenso ou emulsionado numa mistura de um transportador fluido e um impulsor. O aerossol pode estar na forma de uma solução, suspensão, emulsão, pó ou preparação semissólida. Os aerossóis empregues na presente invenção destinam-se a administração na forma de partículas sólidas finas ou de nevoeiros líquidos via o trato respiratório de um paciente. Podem ser utilizados vários tipos de impulsores conhecidos do profissional. Exemplos de impulsores adequados incluem mas não estão limitados a hidrocarbonetos ou outro gás adequado. No caso do aerossol pressurizado, a unidade de dosagem pode ser determinada estabelecendo um valor para distribuição de uma quantidade medida.

A presente invenção também pode ser implementada com um nebulizador, que é um instrumento que gera partículas líquidas muito finas de tamanho substancialmente uniforme num gás. Preferivelmente, um líquido contendo o agente é disperso na forma de gotículas. As pequenas gotículas podem ser transportadas por uma corrente de ar através de um tubo de descarga do nebulizador. O nevoeiro resultante penetra no trato respiratório do paciente.

Uma composição em pó contendo o agente, com ou sem um lubrificante, transportador ou impulsor, pode ser administrada a um mamífero necessitado de terapia. Esta forma de realização da invenção pode ser implementada com um dispositivo convencional para administrar uma composição farmacêutica em pó por inalação. Por exemplo, uma mistura em pó do composto e uma base em pó adequada, como lactose ou amido, pode ser apresentada em forma galénica unitária, por exemplo, em embalagens capsulares ou cartuchos, por

exemplo, gelatina, ou alveolares, de onde o pó pode ser administrado com o auxílio de um inalador.

As micropartículas contendo o agente podem ser mantidas como tal, isto é, na forma de um pó seco, num recipiente. Durante o armazenamento ou na formulação podem ser misturadas com quaisquer agentes farmacêuticos, transportadores, diluentes adequados, etc., e podem ser processadas por qualquer técnica desejada para dar origem a um produto com as propriedades pretendidas para a utilização terapêutica final. Em particular, é conhecida dos profissionais a formulação de partículas para formulações que possam ser distribuídas no pulmão, por exemplo, utilizando uma dose medida ou inalador de pó seco.

Pode ser usado aqui um "excipiente farmacêuticamente aceitável", e refere-se a um composto, que é útil na preparação de uma composição farmacêutica, que geralmente é seguro, não tóxico e não é indesejável do ponto de vista biológico ou outro, e inclui excipientes que são aceitáveis para utilização farmacêutica. Um excipiente farmacêuticamente aceitável, como usado na especificação e reivindicações, inclui um e mais do que um desses excipientes. Alguns exemplos de excipientes adequados incluem lactose, dextrose, sucrose, sorbitol, manitol, amidos, goma de acácia, fosfato de cálcio, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato de cálcio, celulose microcristalina, polivinilpirrolidona, fosfatidilcolina, celulose, água esterilizada, xarope e metilcelulose.

As formulações podem adicionalmente incluir: agentes lubrificantes, como talco, estearato de magnésio e óleo mineral; agentes humedecedores; agentes emulsionantes e de

suspensão; e agentes conservantes, tais como hidróxi-benzoatos de metilo e propilo e álcool benzílico.

A formulação contendo o agente ativo da presente invenção pode ser formulada com vários excipientes. Excipientes farmacologicamente aceitáveis podem ser voláteis ou não voláteis. Os excipientes voláteis, quando aquecidos, são concorrentemente volatilizados, transformados em aerossóis e inalados com o anti-histamínico. Classes desses excipientes são conhecidas na área e incluem, sem limitação, solventes gasosos, fluidos supercríticos, líquidos e sólidos. Apresenta-se em seguida uma lista de transportadores exemplificativos dentro das classes: água; terpenos, como mentol; álcoois, como etanol, propilenoglicol, glicerol e outros álcoois semelhantes; dimetilformamida; dimetilacetamida; cera; dióxido de carbono supercrítico; gelo seco, e misturas destes. Outros exemplos de excipientes incluem, apenas a título exemplificativo, surfactantes, que são moléculas anfifílicas possuindo uma fração lipófila e uma hidrófila, com um equilíbrio variável entre estas duas características. Se a molécula for lipófila, a baixa solubilidade da substância em água pode limitar a sua utilidade. No entanto, se a parte hidrófila dominar de modo esmagador, as propriedades de atividade de superfície da molécula podem ser mínimas. Em consequência, para ser eficaz, o surfactante deve atingir um equilíbrio apropriado entre suficiente solubilidade e suficiente atividade de superfície. Todos os sais biliares e derivados de sais biliares (sais de sódio de ursodesoxicolato, taurocolato, glicocolato e taurodi-hidrofusidato) aumentam eficazmente a absorção no pulmão.

Fosfolípidos, glicósido, octilglucopiranosídeo, alquilglicósidos, como tioglucopiranosídeos e maltopiranosídeos, ciclodextrinas e seus derivados aumentam eficazmente a absorção nasal, e podem funcionar de modo semelhante no pulmão. Outros surfactantes potencialmente úteis são salicilato de sódio, 5-metoxissalicilato de sódio, e os surfactantes de ocorrência natural, como sais do ácido glicirrizina, glicósidos de saponina e acilcarnitinas.

Nas formulações da presente invenção podem ser utilizados lípidos, tais como, apenas a título exemplificativo, lípidos sintéticos, semissintéticos ou de ocorrência natural, incluindo fosfolípidos, tocoferóis, esteróis, ácidos gordos, glicoproteínas, como albumina, lípidos com carga negativa e lípidos catiónicos. Em termos de fosfolípidos, podem incluir lípidos tais como fosfatidilcolina do ovo (EPC), fosfatidilglicerol do ovo (EPG), fosfatidilinositol do ovo (EPI), fosfatidilserina do ovo (EPS), fosfatidiletanolamina (EPE) e ácido fosfatídico (EPA); os correspondentes da soja, fosfatidilcolina da soja (SPC); SPG, SPS, SPI, SPE e SPA; os correspondentes hidrogenados do ovo e da soja (por exemplo, HEPC, HSPC), outros fosfolípidos constituídos por ligações éster de ácidos gordos nas posições 2 e 3 de glicerol, contendo cadeias com 12 até 26 átomos de carbono e diferentes grupos principais na posição I do glicerol, que incluem colina, glicerol, inositol, serina, etanolamina, bem como os ácidos fosfatídicos correspondentes. As cadeias destes ácidos gordos podem ser saturadas ou insaturadas, e o fosfolípido pode ser constituído por ácidos gordos com diferentes comprimentos de cadeias e diferentes graus de insaturação. Em particular, as composições das formulações podem incluir

DPPC, um constituinte maioritário do surfactante pulmonar de ocorrência natural. Outros exemplos incluem dimiristoílfosfatidilcolina (DMPC) e dimiristoílfosfatidilglicerol (DMPG) dipalmitoílfosfatidilcolina (DPPC) e dipalmitoílfosfatidilglicerol (DPPG), diestearoílfosfatidilcolina (DSPC) e diestearoílfosfatidilglicerol (DSPG), dioleílfosfatidiletanolamina (DOPE) e fosfolípidos misturados, tais como palmitoílestearoílfosfatidilcolina (PSPC) e palmitoílestearoílfosfatidilglicerol (PSPG), e fosfolípidos de acilação simples, como mono-oleoílfosfatidiletanolamina (MOPE). Os esteróis podem incluir colesterol, ésteres de colesterol incluindo hemissuccinato de colesterol, sais de colesterol incluindo hidrogenossulfato de colesterol e sulfato de colesterol, ergosterol, ésteres de ergosterol incluindo hemissuccinato de ergosterol, sais de ergosterol incluindo hidrogenossulfato de ergosterol e sulfato de ergosterol, lanosterol, ésteres de lanosterol incluindo hemissuccinato de lanosterol, sais de lanosterol incluindo hidrogenossulfato de lanosterol e sulfato de lanosterol. Os tocoferóis podem incluir tocoferóis, ésteres de tocoferóis incluindo hemissuccinatos de tocoferol, sais de tocoferóis incluindo hidrogenossulfatos de tocoferol e sulfatos de tocoferol. O termo "composto esterol " inclui esteróis, tocoferóis e afins.

Os lípidos catiónicos utilizados podem incluir sais de amónio de ácidos gordos, fosfolípidos e glicéridos. Os ácidos gordos incluem ácidos gordos com comprimentos da cadeia carbonada de 12 até 26 átomos de carbono, que são saturados ou insaturados. Alguns exemplos específicos incluem: miristilamina, palmitilamina, laurilamina e estearilamina, dilauroíletilfosfocolina (DLEP), dimiristoíletilfosfocolina (DMEP), dipalmitoíletil-

fosfocolina (DPEP) e diestearoíletilfosfocolina (DSEP), cloreto de N-(2,3-di-(9-(Z)-octadeceniloxy)-prop-1-il-N,N,N-trimetilamónio (DOTMA) e 1,2-bis(oleoíloxy)-3-(trimetilamónio)propano (DOTAP). Os lípidos de carga negativa que podem ser utilizados incluem fosfatidilgliceróis (PGs), ácidos fosfatídicos (PAs), fosfatidilinositóis (PIs) e as fosfatidilserinas (PSs). Exemplos incluem DMPG, DPPG, DSPG, DMPA, DPPA, DSPA, DMPI, DPPI, DSPI, DMPS, DPPS e DSPS.

Para intensificadores iónicos (por exemplo, os surfactantes aniónicos descritos acima), a natureza do contraíão pode ser importante. O contraíão particular selecionado pode influenciar as propriedades do pó, solubilidade, estabilidade, higroscopicidade e toxicidade local/sistémica do intensificador ou de qualquer formulação que contenha o intensificador. Também pode afetar a estabilidade e/ou solubilidade do agente ativo com o qual é combinado. Em geral, iões metálicos monovalentes, tais como sódio, potássio, lítio, rubídio e cézio, amoníaco e aminas orgânicas. Exemplos dessas aminas orgânicas incluem etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, 2-amino-2-metiletilamina, betaínas, etilenodiamina, N,N-dibenziletilenotetramina, arginina, hexametenotetramina, histidina, N-metilpiperidina, lisina, piperazina, espermidina, espermina e tris(hidroximetil)aminometano.

Outros excipientes que podem ser úteis nas formulações do agente inibidor de células NKT podem ser, apenas a título exemplificativo, microesferas de amido, e agentes quelantes como um sal de sódio do ácido etilenodiaminotetracético (EDTA).

A razão preferida para a combinação agente inibidor de células NKT/excipiente (ou agente inibidor de células NKT/excipiente/diluyente) pode ser facilmente determinada, pelo profissional da área da farmacologia, por métodos comuns com base em critérios tais como distribuição eficiente e consistente da dosagem ótima, minimização de efeitos secundários e taxa de absorção aceitável.

Há vários tipos diferentes de metodologias de inalação que podem ser empregues em conexão com a presente invenção. Antagonistas da presente invenção podem ser formulados em basicamente três tipos diferentes de formulações para inalação. Em primeiro lugar, inibidores da invenção podem ser formulados com impulsores de baixo ponto de ebulição. Essas formulações são geralmente administradas por inaladores de doses medidas (MDI's) convencionais. No entanto, MDI's convencionais podem ser modificados de modo a aumentar a capacidade para se obter uma dosagem repetível por utilização de tecnologia que mede o volume inspiratório e a taxa de fluxo do paciente, como discutido nas Patentes U.S. 5,404,871 e 5,542,410. Alternativamente, os inibidores da presente invenção podem ser formulados em soluções aquosas ou etanólicas e distribuídos por nebulizadores convencionais. No entanto, mais preferivelmente, essas formulações em solução são transformadas em aerossóis utilizando dispositivos e sistemas como os divulgados na Patente U.S. 5,497,763; 5,544,646; 5,718,222; e 5,660,166. Por fim, compostos inibidores da presente invenção podem ser formulados em formulações de pó seco. Essas formulações podem ser administradas simplesmente inalando a formulação de pó seco após a criação de um nevoeiro de aerossol do pó. A tecnologia para implementá-lo é descrita na Patente U.S.

5,775,320 registada em 7 de julho de 1998, e Patente U.S. 5,740,794 registada em 21 de abril de 1998.

Para preparações orais, os agentes são utilizados isoladamente ou em combinação com aditivos apropriados para preparar comprimidos, pós, grânulos ou cápsulas, por exemplo, com aditivos convencionais, como lactose, manitol, amido de milho ou amido de batata; com aglutinantes, como celulose cristalina, derivados de celulose, acácia, amido de milho ou gelatinas; com desintegrantes, como amido de milho, amido de batata ou carboximetilcelulose sódica; com lubrificantes, como talco ou estearato de magnésio; e, nalgumas formas de realização, com diluentes, agentes de tamponamento, agentes humedecedores, conservantes e agentes aromatizantes.

Numa forma de realização da invenção, as formulações orais compreendem revestimentos entéricos, de modo que o agente ativo é distribuído no trato intestinal. Formulações entéricas são frequentemente usadas para proteger um ingrediente ativo do conteúdo fortemente ácido do estômago. Essas formulações são criadas por revestimento de uma forma galénica sólida com um filme de um polímero que é insolúvel em ambientes ácidos e solúvel em ambientes básicos. Filmes exemplificativos são acetato de ftalato de celulose, acetato de ftalato de polivinilo, ftalato de hidroxipropilmetilcelulose e acetato de succinato de hidroxipropilmetilcelulose, copolímeros de metacrilato e acetato de ftalato de celulose.

Outras formulações entéricas compreendem microesferas de polímeros manipulados feitas de polímeros sujeitos a erosão biológica, que exibem interações adesivas fortes com muco

gastrointestinal e revestimentos celulares, podem atravessar o epitélio de absorção da mucosa e o epitélio associado ao folículo que recobre o tecido linfoide de placas de Peyer. Os polímeros mantêm contacto com o epitélio intestinal durante períodos prolongados de tempo e penetram realmente nele, através e entre células. Ver, por exemplo, Mathiowitz *et al.* (1997) *Nature* 386 (6623): 410-414. Sistemas de distribuição de fármacos também podem utilizar um núcleo de hidrogéis superporosos (SPH) e compósito de SPH (SPHC), como descrito por Dorkoosh *et al.* (2001) *J Control Release* 71 (3): 307-18.

As formulações são tipicamente proporcionadas numa forma galénica unitária, em que o termo "forma galénica unitária" se refere a unidades fisicamente discretas adequadas como dosagens unitárias para sujeitos humanos, em que cada unidade contém uma quantidade predeterminada calculada numa quantidade suficiente para produzir o efeito desejado, associada a um diluente, transportador ou veículo farmacologicamente aceitável. As especificações das formas galénicas unitárias da presente invenção dependem do agente particular empregue e do efeito a ser obtido, e da farmacodinâmica associada a cada complexo no hospedeiro.

Coformulações

O agente inibidor de células NK T em questão pode ser formulado ou administrado em conjunção com outros agentes cuja ação consiste em atenuar os sintomas de SLE, asma, etc. Estes agentes incluem fármacos anti-inflamatórios não-esteroides (NSAIDs), por exemplo, ácido acetilsalicílico; ibuprofeno; naproxeno; indometacina; nabumetona; tolmetina; etc. Corticosteroides são utilizados para reduzir

inflamação e suprimir a atividade do sistema imunológico. O fármaco deste tipo mais habitualmente prescrito é Prednisona. Cloroquina (Aralen) ou hidroxiclороquina (Plaquenil) também podem ser muito úteis nalguns indivíduos com lúpus. São muito frequentemente prescritos para sintomas de lúpus na pele e articulações. Azatioprina (Imuran) e ciclofosfamida (Cytosan) suprimem inflamação e tendem a suprimir o sistema imunológico. Os efeitos secundários destes fármacos incluem anemia, baixo número de glóbulos brancos e risco aumentado de infeção. Outros agentes, por exemplo, metotrexato e ciclosporina, são utilizados para controlar os sintomas de lúpus. Ambos são fármacos imunomoduladores que têm os seus próprios efeitos secundários. Empregam-se anticoagulantes para prevenir a coagulação rápida do sangue. Variam desde aspirina a dose muito baixa, que previne a adesão de plaquetas, até heparina/coumadina.

Medicamentos que podem ser administrados em conjunção com o agente inibidor de células NK T de acordo com a invenção incluem quaisquer fármacos utilmente distribuídos por inalação, por exemplo, analgésicos, por exemplo, codeína, di-hidromorfina, ergotamina, fentanilo ou morfina; preparações anginosas, por exemplo, diltiazem; antialérgicos, por exemplo, cromoglicato, cetotifeno ou nedocromil; anti-infecciosos, por exemplo, cefalosporinas, penicilinas, estreptomicina, sulfonamidas, tetraciclinas ou pentamidina; anti-histamínicos, por exemplo, metapirileno; anti-inflamatórios, por exemplo, beclometasona, flunisolida, budesonida, tipredano, acetonido de triancinolona ou fluticasona; antitússicos, por exemplo, noscapina; broncodilatadores, por exemplo, efedrina, adrenalina, fenoterol, formoterol, isoprenalina,

metaproterenol, fenilefrina, fenilpropanolamina, pirbuterol, reproterol, rimiterol, salbutamol, salmeterol, terbutalina, isoetarina, tulobuterol, orciprenalina ou (-)-4-amino-3,5-dicloro- α -[[[6-[2-(2-piridinil)etoxi]-hexil]-amino]metil]benzenometanol; diuréticos, por exemplo, amilorida; anticolinérgicos, por exemplo, ipratrópio, atropina ou oxitrópio; hormonas, por exemplo, cortisona, hidrocortisona ou prednisolona; xantinas, por exemplo, aminofilina, teofilinato de colina, teofilinato de lisina ou teofilina; e proteínas e péptidos terapêuticos, por exemplo, insulina ou glucagon. Será claro para o profissional que, quando apropriado, os medicamentos podem ser utilizados na forma de sais (por exemplo, como sais de metais alcalinos ou amina ou como sais de adição de ácidos) ou como ésteres (por exemplo, ésteres de alquilo de cadeia curta) ou como solvatos (por exemplo, hidratos), para otimizar a atividade e/ou estabilidade do medicamento.

Os agentes inibidores de células NKT são administrados a um paciente que sofre de ativação indesejável de células NKT, cujos pacientes podem incluir indivíduos que sofrem de doenças alérgicas, incluindo asma, de SLE, e afins. Os pacientes com SLE podem sofrer de indícios da doença na pele, articulação, rim e/ou sistema nervoso central. Noutras formas de realização, pacientes com cancro podem beneficiar de métodos para inibir células NKT de modo a atenuar a regulação negativa da imunovigilância. Pacientes com aterosclerose também podem beneficiar dos métodos da invenção.

Dosagens

Podem ser empregues vários métodos de administração. A formulação do agente pode ser inalada, injetada de forma intravascular, subcutânea, peritoneal, etc. A dosagem da formulação terapêutica irá variar muito, dependendo da natureza da doença, da frequência da administração, do modo de administração, da finalidade da administração, da eliminação do agente a partir do hospedeiro, e afins. A dosagem administrada irá variar dependendo de fatores conhecidos, como as características farmacodinâmicas do agente particular, modo e via de administração, idade, estado de saúde e peso do recetor, natureza e extensão dos sintomas, tratamentos concorrentes, frequência do tratamento e efeito desejado. A dose pode ser administrada de modo tão infrequente quanto semanalmente ou bissemanalmente, ou pode ser fracionada em doses mais pequenas e administradas diariamente, semisemanalmente, etc., para manter um nível de dosagem eficaz. Em geral, uma dosagem diária de ingrediente ativo pode ser cerca de 0,1 até 100 mg/kg de peso do corpo. Formas galénicas adequadas para administração interna contêm geralmente desde cerca de 0,1 mg até 500 mgs de ingrediente ativo por unidade. O ingrediente ativo pode variar desde 0,5 até 95% por peso com base no peso total da composição.

O ingrediente ativo pode variar desde 0,5 até 95% por peso com base no peso total da composição.

Nalgumas formas de realização, a dosagem do ingrediente ativo por ser menor do que 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, 0,1%, 0,09%, 0,08%, 0,07%, 0,06%, 0,05%, 0,04%, 0,03%, 0,02%, 0,01%, 0,009%, 0,008%, 0,007%, 0,006%, 0,005%, 0,004%, 0,003%, 0,002%, 0,001%,

0,0009%, 0,0008%, 0,0007%, 0,0006%, 0,0005%, 0,0004%, 0,0003%, 0,0002% ou 0,0001% por peso com base no peso total da composição.

Nalgumas formas de realização, a dosagem do ingrediente ativo pode ser maior do que 20%, 19,75%, 19,50%, 19,25%, 19%, 18,75%, 18,50%, 18,25%, 18%, 17,75%, 17,50%, 17,25%, 17%, 16,75%, 16,50%, 16,25%, 16%, 15,75%, 15,50%, 15,25%, 15%, 14,75%, 14,50%, 14,25%, 14%, 13,75%, 13,50%, 13,25%, 13%, 12,75%, 12,50%, 12,25%, 12%, 11,75%, 11,50%, 11,25%, 11%, 10,75%, 10,50%, 10,25%, 10%, 9,75%, 9,50%, 9,25%, 9%, 8,75%, 8,50%, 8,25%, 8%, 7,75%, 7,50%, 7,25%, 7%, 6,75%, 6,50%, 6,25%, 6%, 5,75%, 5,50%, 5,25%, 5%, 4,75%, 4,50%, 4,25%, 4%, 3,75%, 3,50%, 3,25%, 3%, 2,75%, 2,50%, 2,25%, 2%, 1,75%, 1,50%, 1,25%, 1%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, 0,1%, 0,09%, 0,08%, 0,07%, 0,06%, 0,05%, 0,04%, 0,03%, 0,02%, 0,01%, 0,009%, 0,008%, 0,007%, 0,006%, 0,005%, 0,004%, 0,003%, 0,002%, 0,001%, 0,0009%, 0,0008%, 0,0007%, 0,0006%, 0,0005%, 0,0004%, 0,0003%, 0,0002% ou 0,0001% por peso com base no peso total da composição.

Nalgumas formas de realização, a dosagem do ingrediente ativo situa-se no intervalo desde aproximadamente 0,0001% até aproximadamente 50%, aproximadamente 0,001% até aproximadamente 40 %, aproximadamente 0,01 % até aproximadamente 30%, aproximadamente 0,02% até aproximadamente 29%, aproximadamente 0,03% até aproximadamente 28%, aproximadamente 0,04% até aproximadamente 27%, aproximadamente 0,05% até aproximadamente 26%, aproximadamente 0,06% até aproximadamente 25%, aproximadamente 0,07% até aproximadamente 24%, aproximadamente 0,08% até aproximadamente 23%, aproximadamente 0,09% até

aproximadamente	22%,	aproximadamente	0,1%	até
aproximadamente	21%,	aproximadamente	0,2%	até
aproximadamente	20%,	aproximadamente	0,3%	até
aproximadamente	19%,	aproximadamente	0,4%	até
aproximadamente	18%,	aproximadamente	0,5%	até
aproximadamente	17%,	aproximadamente	0,6%	até
aproximadamente	16%,	aproximadamente	0,7%	até
aproximadamente	15%,	aproximadamente	0,8%	até
aproximadamente	14%,	aproximadamente	0,9%	até

aproximadamente 12%, aproximadamente 1% até aproximadamente 10% por peso com base no peso total da composição.

Nalgumas formas de realização, a dosagem do ingrediente ativo é igual a ou menor do que 10 g, 9,5 g, 9,0 g, 8,5 g, 8,0 g, 7,5 g, 7,0 g, 6,5 g, 6,0 g, 5,5 g, 5,0 g, 4,5 g, 4,0 g, 3,5 g, 3,0 g, 2,5 g, 2,0 g, 1,5 g, 1,0 g, 0,95 g, 0,9 g, 0,85 g, 0,8 g, 0,75 g, 0,7 g, 0,65 g, 0,6 g, 0,55 g, 0,5 g, 0,45 g, 0,4 g, 0,35 g, 0,3 g, 0,25 g, 0,2 g, 0,15 g, 0,1 g, 0,09 g, 0,08 g, 0,07 g, 0,06 g, 0,05 g, 0,04 g, 0,03 g, 0,02 g, 0,01 g, 0,009 g, 0,008 g, 0,007 g, 0,006 g, 0,005 g, 0,004 g, 0,003 g, 0,002 g, 0,001 g, 0,0009 g, 0,0008 g, 0,0007 g, 0,0006 g, 0,0005 g, 0,0004 g, 0,0003 g, 0,0002 g ou 0,0001 g por kg do peso do corpo.

Nalgumas formas de realização, a dosagem do ingrediente ativo é maior do que 0,0001 g, 0,0002 g, 0,0003 g, 0,0004 g, 0,0005 g, 0,0006 g, 0,0007 g, 0,0008 g, 0,0009 g, 0,001 g, 0,0015 g, 0,002 g, 0,0025 g, 0,003 g, 0,0035 g, 0,004 g, 0,0045 g, 0,005 g, 0,0055 g, 0,006 g, 0,0065 g, 0,007 g, 0,0075 g, 0,008 g, 0,0085 g, 0,009 g, 0,0095 g, 0,01 g, 0,015 g, 0,02 g, 0,025 g, 0,03 g, 0,035 g, 0,04 g, 0,045 g, 0,05 g, 0,055 g, 0,06 g, 0,065 g, 0,07 g, 0,075 g, 0,08 g, 0,085 g, 0,09 g, 0,095 g, 0,1 g, 0,15 g, 0,2 g, 0,25 g, 0,3

g, 0,35 g, 0,4 g, 0,45 g, 0,5 g, 0,55 g, 0,6 g, 0,65 g, 0,7 g, 0,75 g, 0,8 g, 0,85 g, 0,9 g, 0,95 g, 1 g, 1,5 g, 2 g, 2,5, 3 g, 3,5, 4 g, 4,5 g, 5 g, 5,5 g, 6 g, 6,5 g, 7 g, 7,5 g, 8 g, 8,5 g, 9 g, 9,5 g ou 10 g por kg do peso do corpo.

Nalgumas formas de realização, a dosagem do ingrediente ativo é 0,0001-10 g, 0,0005-9 g, 0,001-8 g, 0,005-7 g, 0,01-6 g, 0,05-5 g, 0,1-4 g, 0,5-4 g ou 1-3 g por kg do peso do corpo.

Em geral, uma dosagem diária do ingrediente ativo pode ser cerca de 0,1 até 100 mg/kg do peso do corpo. Formas galénicas adequadas para administração interna contêm geralmente desde cerca de 0,1 mg até 500 mgs de ingrediente ativo por unidade. Nalgumas formas de realização da presente invenção, a dosagem do ingrediente ativo pode ser 0,1-10 mg/kg do peso do corpo. Nalgumas formas de realização da presente invenção, a dosagem do ingrediente ativo pode ser 0,1-5 mg/kg do peso do corpo. Nalgumas formas de realização da presente invenção, a dosagem do ingrediente ativo pode ser 0,1-2 mg/kg do peso do corpo. Nalgumas formas de realização da presente invenção, a dosagem do ingrediente ativo pode ser 0,5-10 mg/kg do peso do corpo. Nalgumas formas de realização da presente invenção, a dosagem do ingrediente ativo pode ser 0,5-2 mg/kg do peso do corpo.

Nalguns aspetos da presente invenção, formulações de dose unitária são proporcionadas a um paciente para administração da formulação do agente inibidor de células NKT. Essa dose unitária pode ter, por exemplo, um volume total menor do que 50 mL, 40 mL, 30 mL, 20 mL, 10 mL, 9 mL, 8 mL, 7 mL, 6, mL 5 mL, 4 mL, 3 mL, 2 mL, 1 mL, 0,9 mL, 0,8

mL, 0,7 mL, 0,6 mL, 0,5 mL, 0,4 mL, 0,3 mL, 0,2 mL, 0,1 mL, 0,09 mL, 0,08 mL, 0,07 mL, 0,06 mL, 0,05 mL, 0,04 mL, 0,03 mL, 0,02 mL, 0,01 mL, 0,009 mL, 0,008 mL, 0,007 mL, 0,006 mL, 0,005 mL, 0,004 mL, 0,003 mL, 0,002 mL, 0,001 mL, 0,0009 mL, 0,0008 mL, 0,0007 mL, 0,0006 mL, 0,0005 mL, 0,0004 mL, 0,0003 mL, 0,0002 mL ou 0,0001 mL. Nalgumas formas de realização, essa dose unitária pode ter um volume total maior do que 0,2 mL e menor do que 500 mL. Nalgumas formas de realização, essa dose unitária pode ter um volume total menor do que 0,1 mL. Nalgumas formas de realização, essa dose unitária pode ter um volume total menor do que 0,1 mL. Nalgumas formas de realização, essa dose unitária pode ter um volume total de 0,1-0,2 mL (inclusive de 0,1 mL e 0,2 mL). Nalgumas formas de realização, essa dose unitária pode ter um volume total menor do que 0,1 e maior do que 0,2.

Nalgumas formas de realização, uma dose unitária tem um volume total situado no intervalo de 0,0001-500 mL, 0,0005-400 mL, 0,001-300 mL, 0,005-200 mL, 0,01-100 mL, 0,05-90 mL, 0,06-80 mL, 0,07-70 mL, 0,08-60 mL, 0,09-50 mL, 0,1-40 mL, 0,2-30 mL, 0,3-29 mL, 0,4-28 mL, 0,5-27 mL, 0,6-26 mL, 0,7-25 mL, 0,8-24 mL, 0,9-23 mL, 10-22 mL, 11-21 mL, 12-20 mL, 13-19 mL, 14-18 mL ou 15-17 mL por sítio alvo.

Dispositivos

Para distribuir os volumes relativamente pequenos das formulações da presente invenção para inalação nos períodos de dosagem relativamente curtos, as formulações podem ser administradas utilizando um dispositivo de inalação com uma taxa relativamente elevada de descarga do aerossol. Dispositivos úteis também podem exibir elevada eficiência

da dose emitida (isto é, pequeno volume residual no dispositivo). Para aumentar a eficiência global do sistema, a emissão pode ser adicionalmente limitada a períodos de inalação real pelo paciente (isto é, atuados pela respiração). Assim, nebulizadores convencionais de jato de ar podem exibir uma taxa de descarga do aerossol da ordem de 3 $\mu\text{L}/\text{segundo}$, de cerca de 4 $\mu\text{L}/\text{segundo}$, de cerca de 5 $\mu\text{L}/\text{segundo}$ ou não menor do que cerca de 8 $\mu\text{L}/\text{segundo}$. Os dispositivos de inalação úteis para prática na presente invenção podem libertar pelo menos cerca de 55%, pelo menos cerca de 65%, pelo menos cerca de 75%, mais preferivelmente pelo menos cerca de 80% e muito preferivelmente pelo menos cerca de 85% da dose carregada na forma de aerossol para inalação pelo paciente. Nalgumas formas de realização, dispositivos de inalação para utilização na presente invenção podem ser atuados pela respiração, e restringidos à distribuição de partículas, na forma de aerossol, da formulação contendo agente inibidor de células NK T ao período de inalação real pelo paciente. O inalador pode ser um inalador manual, autónomo e facilmente transportado. Noutras formas de realização da invenção, dispositivos úteis para distribuir as formulações de agente inibidor de células NK T concentradas da invenção incluem nebulizadores convencionais de jato de ar acoplados a um compressor capaz de originar pressões de descarga mais elevadas do que as convencionais.

Os exemplos seguintes são oferecidos a título ilustrativo e não por via de limitação.

EXPERIMENTAL

Exemplo 1

A injeção i.p. de α -galactosilceramida (obtida da Brigham Young University, Provo, UT) em ratinhos C57BL/6 aumenta os níveis no soro de IL-4 e IFN- γ por ativação seletiva de células NKT. A injeção de C12 β -galactosilceramida (Avanti Lipids, Inc.) i.p. antagoniza a capacidade da α -galactosilceramida para aumentar os níveis de IL-4, interferon-gama e IgE no soro destes ratinhos.

Ratinhos C57BL/6 machos com cerca de 8 semanas de idade receberam 100 μ g de β -galactosilceramida (β Galcer) i.p., 0,1 μ g de α -galactosilceramida (α Galcer) i.p., 100 μ g de β Galcer i. p. 1 hora antes ou ao mesmo tempo de 0,1 μ g de α Galcer i.p., ou nenhum tratamento. A β -Galcer foi obtida da Avanti Lipids Inc. Os glicolípidos estavam em soluções aquosas com PBS. Os níveis de citocinas foram determinados por ELISA como previamente descrito por Zeng *et al.* (2003), *supra*. Todos os ratinhos foram sacrificados 6 horas mais tarde e determinaram-se os níveis no soro de IFN- γ e IL-4, como mostrado nas Figuras 1A e 1B.

O ensaio quanto ao IFN- γ mostrou que ratinhos normais (não tratados) tinham um nível de cerca de 50 pg/mL. A injeção de β Galcer acima não aumentou o nível, mas a injeção de α Galcer isolada aumentou o nível em mais do que duas vezes. No entanto, quando a β Galcer foi administrada 1 hora antes da α Galcer ou ao mesmo tempo da α Galcer, então os níveis foram inferiores a 40 pg/mL. Os resultados mostram que a β Galcer bloqueou o aumento que foi induzido pela α Galcer.

Observou-se um padrão semelhante quando se determinaram os níveis de IL-4 no soro. Os ratinhos não tratados tinham cerca de 100 pg/mL de IL-4, e 100 μ g de β Galcer isolada não aumentaram o nível. No entanto, 0,1 μ g de α Galcer

aumentaram o nível em cerca de 10 vezes, para 1000 pg/mL. Quando se administraram 100 µg de β Galcer uma hora antes de 0,1 µg de α Galcer, então o aumento foi completamente bloqueado, e quando ambos os glicolípidos foram administrados ao mesmo tempo, o nível de IL-4 foi cerca de 250 pg/mL. Os resultados mostram que a β Galcer consegue inibir não só o aumento do nível de IFN-γ no soro, induzido pela α Galcer, mas também consegue inibir o aumento do nível de IL-4. Concluimos que a β Galcer pode bloquear a ativação de células NKT *in vivo* induzida pela α Galcer, avaliado pela secreção de citocinas para o soro.

Numa experiência separada, mediram-se os níveis médios de IgE no soro de grupos de três ratinhos C57BL/6 antes ou 10 dias após uma única injeção *i.p.* de 0,1 µg de α Galcer isolada, 100 µg de β Galcer isolada, ou 100 µg de β Galcer injetados uma hora antes de 0,1 µg de α Galcer. Os resultados, mostrados nas Figuras 1 C e 1 D, demonstram que a α Galcer isolada aumentou o nível de IgE em cerca de três vezes, para cerca de 500 ng/mL, a β Galcer induziu um aumento menor para cerca de 400 µg/mL, e a combinação de glicolípidos induziu um nível de cerca de 250 µg/mL. As barras mostram médias de determinações em triplicado, e os parênteses mostram desvios padrão. A única diferença significativa entre níveis no soro antes e depois foi observada com α Galcer isolada ($p < 0,05$), avaliada pelo teste t de student de médias independentes. Concluimos que a β Galcer bloqueia o aumento dos níveis de IgE no soro induzidos pela α Galcer. Não se observam alterações significativas com a expressão de IgG2c de controle.

Exemplo 2

Efeitos de β -Galcer em Asma

No modelo murino de asma administrou-se β -GalCer a ratinhos BALB/c imunizados com OVA, ou ratinhos com hiperreatividade das vias aéreas (AHR) induzida por α -GalCer.

Materiais e Métodos

Animais: Ratinhos BALB/cByJ foram obtidos do Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME. O Comité da Universidade de Stanford sobre o Bem-Estar de Animais aprovou os protocolos animais utilizados neste estudo.

Anticorpos Monoclonais: Anticorpos monoclonais foram purificados de ascites por precipitação com sulfato de amónio e cromatografia de permuta iónica. Utilizaram-se os hibridomas seguintes: R46A2 (mAb anti-IFN- γ) obtido da ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD); XMG1.2 (anticorpo anti-IFN- γ); BVD4-1D11, BVD6-24G2 (mAb anti-IL-4). Como isotipo de controlo utilizou-se o mAb do idiotipo anti-38C13 4G10 (IgG2a de rato).

Imunizações. Ratinhos BALB/c foram iniciados nas plantas das patas com OVA (100 μ g/ratinho) adsorvida em 200 μ g de alum ($\text{Al}[\text{OH}]_3$). Os ratinhos foram provocados com 50 μ g de OVA em 50 μ L de NaCl 0,9% de modo intranasal 7, 8 e 9 dias mais tarde. Um dia depois da última provocação intranasal com OVA mediu-se a hiperreatividade das vias aéreas de ratinhos conscientes após inalação de concentrações crescentes de metacolina num pletismógrafo de corpo inteiro. A imunização com α -GalCer foi realizada como descrito.

Para facilitar a aspiração pulmonar durante a administração intranasal do antígeno, os ratinhos foram ligeiramente anestesiados de modo intraperitoneal (i.p.) com 0,25 mL de cetamina (0,44 mg/mL)/xilazina (6,3 mg/mL) em solução salina normal. Setenta e cinco por cento do antígeno administrado de modo intranasal podem ser subsequentemente detetados nos pulmões (Tsuyuki *et al.* (1997) *J. Exp. Med.* 185: 1671-9).

ELISA de Citoquinas. Realizaram-se ELISAs como previamente descrito por Macaulay *et al.* (1998) *J. Immunol.* 160: 1694-1700. Os pares de anticorpos utilizados foram os seguintes, listados por captura/deteção biotinilada: IL-4, BVD4-1D11/BVD6-24G2; IFN- γ , R4-6A2/ XMG1.2. Utilizaram-se citoquinas recombinantes como padrões, com curvas geradas em diluições 1:2 desde 500 até 39 pg/mL para IL-4, e 20-2, 156 ng/mL para IFN- γ .

Medição de isotipos de anticorpos anti-OVA. Os ratinhos foram sangrados na altura do sacrifício e mediu-se anticorpo específico para OVA utilizando um ELISA específico para antígeno modificado. Para a medição de IgG específica para OVA, as placas foram revestidas durante a noite com 5 μ g/mL de OVA. Depois de lavagem e bloqueio, adicionaram-se às placas soros diluídos em série. Após incubação durante a noite, as placas foram desenvolvidas utilizando anticorpos específicos de subclasses anti-IgG de cabra conjugados com HRPO (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, ALA). Após lavagem adicional adicionou-se o substrato OPD, as placas foram desenvolvidas e a OD foi determinada a 492 nm. Utilizaram-se como padrões mAb IgG1 anti-OVA 6C1 e mAb IgG2a anti-OVA 3A11 para a quantificação de cada subclasse de IgG. A determinação de

IgG específico para OVA foi realizada por ELISA, utilizando o mAb IgE anti-ratinho de rato EM95 (5,0 µg/mL) para revestir as placas. Depois de as amostras terem sido aplicadas e incubadas durante a noite, as placas foram lavadas e adicionou-se OVA biotinilada (10 µg/mL). Duas horas mais tarde, as placas foram lavadas e adicionou-se estreptavidina conjugada a HRPO (Southern Biotechnology Associates). As placas foram desenvolvidas com substrato OPD e a OD foi determinada a 492 nm. Soros de ratinhos hiperimunizados com OVA em alum foram quantificados quanto a IgE e utilizados como padrão para a ELISA de IgE específica para OVA.

Medição da Reatividade das Vias Aéreas. A reatividade das vias aéreas foi avaliada por obstrução do fluxo de ar induzida por metacolina de ratinhos conscientes colocados num pletismógrafo de corpo inteiro (modelo PLY 3211, Buxco Electronics Inc., Troy, NY). A obstrução pulmonar do fluxo de ar foi medida por Penh utilizando a fórmula seguinte:

$$Penh = \left(\frac{T_e}{RT} - 1 \right) \times \left(\frac{PEF}{PIF} \right),$$
 em que Penh = pausa aumentada (adimensional), T_e = tempo expiratório, RT = tempo de relaxamento, PEF = pico do fluxo expiratório (mL/s) e PIF = pico do fluxo inspiratório (mL/s) (Hamelmann *et al.* (1997) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 156: 766-75. A pausa aumentada (Penh), volume minuto, volume corrente e frequência respiratória foram obtidos da pressão interna, medida com um transdutor (modelo TRD5100) ligado a módulos pré-amplificadores (modelo MAX2270), e analisados pelo "software" do sistema XA (modelo SF I 1810). Obtiveram-se medições da reatividade à metacolina por exposição dos ratinhos durante 2 minutos a NaCl 0,9%.

Recolha de Fluido de BAL e Histologia do Pulmão. Os animais foram injetados i.p. com uma dose letal de fenobarbital (450 mg/kg). A traqueia foi canulada, o pulmão foi lavado três vezes com 0,8 mL de PBS e o fluido foi reunido. Contaram-se as células presentes no fluido de lavagem utilizando um hemocitómetro e determinaram-se diferenciais de células de BAL em preparações em lâminas coradas com Hansel Stain (Lide Laboratories, Florissant, MO). Pelo menos 200 células foram diferenciadas por microscopia de luz com base em critérios morfológicos convencionais. Nalguns animais não foi efetuada nenhuma BAL, mas os pulmões foram removidos, lavados com PBS, fixados em 10% formalina e corados com hematoxilina e eosina.

Resultados

Tratamento com C12- β -GalCer bloqueia AHR induzida por α -GalCer. Como mostrado na Figura 2, a administração i.v. de 100 μ g de C12- β -GalCer administrados 2 horas antes da administração i.n. de 1,5 μ g de α -GalCer reduz grandemente a AHR às 24 horas. A administração i.v. de C12- β -GalCer isolada não induz qualquer AHR por si própria. (b) A administração i.n. e i.v. de 50 μ g de C12- β -GalCer 2 horas antes da administração i.n. de 0,5 μ g de α -GalCer reduz grandemente a AHR às 24 horas, apesar de a C12- β -GalCer administrada i.n. induzir AHR ligeira. Utilizou-se um mínimo de 4 ratinhos por grupo.

Tratamento com C12- β -GalCer reduz AHR induzida por OVA/alum. Como mostrado na Figura 3, os ratinhos foram sensibilizados por injeção i.p. de 100 μ g de OVA com 200 μ L de hidróxido de alumínio (alum) e depois foram provocados i.n. com 50 μ g de OVA 7, 8 e 9 dias mais tarde. (a) A AHR

foi medida no dia 10. C12- β -GalCer foi administrada i.v. (100 μ g) 1 dia antes da sensibilização com OVA/alum e 6 horas antes de cada provocação i.n. (100 μ g). Verificou-se que o tratamento reduz a AHR. (b) A IgE no soro específica para OVA foi reduzida no grupo tratado com C12- β -GalCer. (c) Células de nodos linfáticos do grupo tratado com C12- β -GalCer produziram ligeiramente mais IFN- γ e menos IL-4 após quatro dias em cultura com 62,5 μ g/mL de OVA ($5,0 \times 10^6$ células por cavidade). Testaram-se quatro ratinhos por grupo.

Tratamento com anticorpo anti-CD1d (HB323) bloqueia AHR induzida por OVA/alum. Como mostrado na Figura 4, (a) Ratinhos foram sensibilizados por injeção i.p. de 100 μ g de OVA com 200 μ L de hidróxido de alumínio (alum) e depois foram provocados i.n. com 50 μ g de OVA 7, 8 e 9 dias mais tarde. A AHR foi medida no dia 10. O anticorpo anti-CD1d foi administrado i.p. 1 dia antes da sensibilização com OVA/alum (500 μ g) e de novo imediatamente antes da provocação i.n. (500 μ g). Verificou-se que o tratamento reduz a AHR. (b) Tratamento com anticorpo anti-CD1d (HB323) reduz a produção de citocinas em nodos linfáticos. Culturas de nodos linfáticos de $5,0 \times 10^5$ células por cavidade foram estabelecidas no dia 11 após sensibilização com OVA/alum e provocação das vias aéreas. As culturas foram tratadas com OVA, titulada desde 125 μ g/mL, e determinaram-se as citocinas presentes no sobrenadante por ELISA. Empregou-se um mínimo de 4 ratinhos por grupo, os dados são representativos de 2 experiências.

C12- β -GalCer origina a produção de mais IFN- γ no soro após AHR induzida por α -GalCer. A histologia demonstra inflamação eosinofílica peribronquiolar reduzida com

tratamento com C12- β -GalCer. É importante notar que a injeção i.v. de C12- β -GalCer por si própria não origina qualquer inflamação pulmonar. O grupo tratado com C12- β -GalCer exibiu grandes nodos linfáticos brônquicos e mediastinais. Por histologia, estes ratinhos exibiram infiltração eosinofílica reduzida mas presente dos pulmões, com possivelmente mais neutrofilia do que controlo positivo de OVA/alum. A histologia também demonstra que a inflamação eosinofílica está reduzida (mas ainda presente) nos pulmões de ratinhos tratados com anti-CD1d. Não obstante o bloqueio com HB323 proporcionar os melhores resultados, a utilização do anticorpo 1B1 anti-CD1d também causa uma redução da AHR.

Estes dados demonstram o envolvimento de células NKT no desenvolvimento de AHR e asma, e também demonstram a eficácia do agente bloqueador β -GalCer, e anti-CD1, no tratamento desta doença.

Exemplo 3

Administração Oral de Agentes Inibidores

Doses de β -galactosilceramida variando entre 100-800 μ g/ratinho foram administradas oralmente. Determinaram-se os níveis de citocinas de IFN- γ e IL-4 por ELISA como previamente descrito por Zeng *et al.* (2003), *supra*, a partir dos níveis no soro.

O ensaio quanto a IFN- γ mostrou que, às 24 horas após a administração, não houve nenhum aumento dos níveis no soro a nenhuma dose. Observou-se um padrão semelhante quando se determinaram os níveis de IL-4 no soro.

Como mostrado na Figura 5, a administração oral de β -galactosilceramida resultou em coloração decrescida quanto a marcadores de células NKT no fígado.

As dosagens de 100-800 μ g/ratinho são equivalentes a uma dose de 4-32 mg/kg. Usando as diretrizes da FDA para equivalência humana, a dose humana equivalente é 0,32 - 2,6 mg/kg.

Apesar de a invenção anterior ter sido descrita em algum pormenor a título ilustrativo e exemplificativo por motivos de clareza do entendimento, será claro para os profissionais, à luz dos ensinamentos desta invenção, que podem ser feitas certas alterações e modificações sem sair do âmbito das reivindicações adjuntas.

Lisboa, 10 de Fevereiro de 2012

REIVINDICAÇÕES

1. Dose eficaz de um β -glicolípido ou anticorpo anti-CD1 para bloqueio ou redução da hiperreatividade das vias aéreas associada a asma, em que o referido β -glicolípido ou anticorpo anti-CD1 é administrado local ou sistemicamente.
2. β -glicolípido ou anticorpo anti-CD1 da reivindicação 1, em que a administração local compreende inalação ou insuflação.
3. β -glicolípido ou anticorpo anti-CD1 da reivindicação 2, em que a administração local é efetuada por inalação.
4. β -glicolípido ou anticorpo anti-CD1 da reivindicação 1, em que a administração sistêmica compreende injeção intramuscular, intravenosa, subcutânea, peritoneal ou local; administração oral, transmucosa, transdérmica ou intranasal.
5. β -glicolípido ou anticorpo anti-CD1 da reivindicação 1, em que o referido β -glicolípido ou anticorpo anti-CD1 é administrado de modo profilático.
6. β -glicolípido da reivindicação 1, em que o referido β -glicolípido compreende um açúcar pentose, um açúcar hexose, um oligossacárido ou um polissacárido.
7. β -glicolípido da reivindicação 6, em que o referido açúcar hexose compreende glucose, galactose ou manose.

8. β -glicolípido da reivindicação 1, em que o referido β -glicolípido compreende um lípido compreendendo um C8 até C30 ácido gordo, um álcool secundário de cadeia longa, um aminoálcool de cadeia longa ou uma amida de ácido gordo com uma base di- ou tri-hidroxí de cadeia longa, em que qualquer um desses está opcionalmente fosforilado ou sulfatado.
9. β -glicolípido da reivindicação 1, em que o referido β -glicolípido compreende um lípido compreendendo uma ceramida, esfingomielina, cerebrósido, esfingosina, di-hidroesfingosina, C20-di-hidroesfingosina, fitoesfingosina, C20-fitoesfingosina, desidrofitoesfingosina ou esfingadienina.
10. β -glicolípido da reivindicação 1, em que o referido β -glicolípido é β -galactosilceramida.
11. β -glicolípido ou anticorpo anti-CD1 da reivindicação 1, em que o referido β -glicolípido ou anticorpo anti-CD1 compreende desde 0,5 até 95% por peso com base no peso total da composição.
12. β -glicolípido ou anticorpo anti-CD1 da reivindicação 1, em que o referido β -glicolípido ou anticorpo anti-CD1 é doseado desde cerca de 0,1 até 100 mg/kg de peso do corpo numa base diária.
13. β -glicolípido ou anticorpo anti-CD1 da reivindicação 1, em que o referido β -glicolípido ou anticorpo anti-CD1 compreende 0,1 mg até 500 mgs de uma forma galénica para administração interna.

14. β -glicolípido ou anticorpo anti-CD1 da reivindicação 1, em que o referido β -glicolípido ou anticorpo anti-CD1 compreende uma solução aquosa, suspensão aquosa, preparação liposmal ou formulação em pó.

Lisboa, 10 de Fevereiro de 2012

F16. 1A

Exp# 05.29.04 (Revista)
 C57BL/6, F, 4-6 semanas de idade

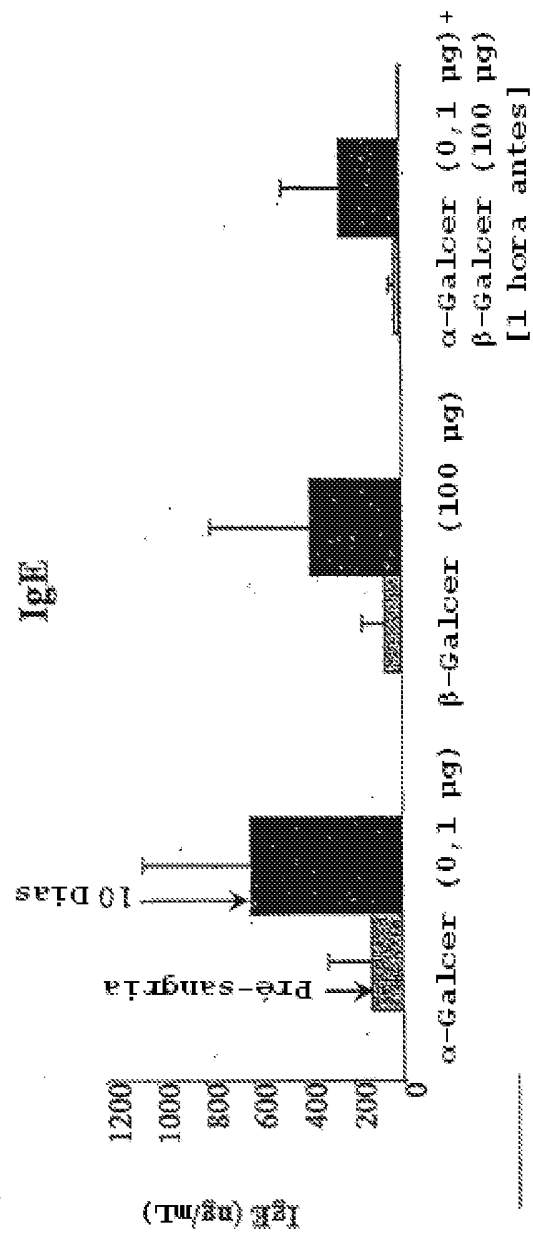


FIG. 1B

Exp# 05.29.04
C57BL/6, F, 4-6 semanas de idade

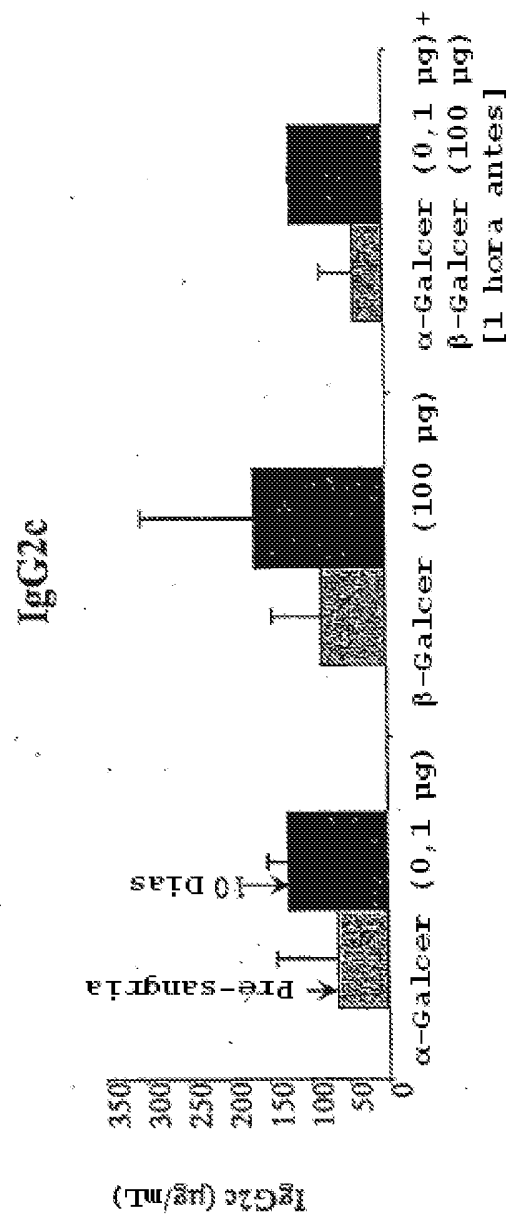


FIG 1C

Exp# 5/14/04 (Revisto)
 Ratinhos C57BL/6 injetados com α -Galcer e β -Galcer
 Ratinhos mortos após 6 horas

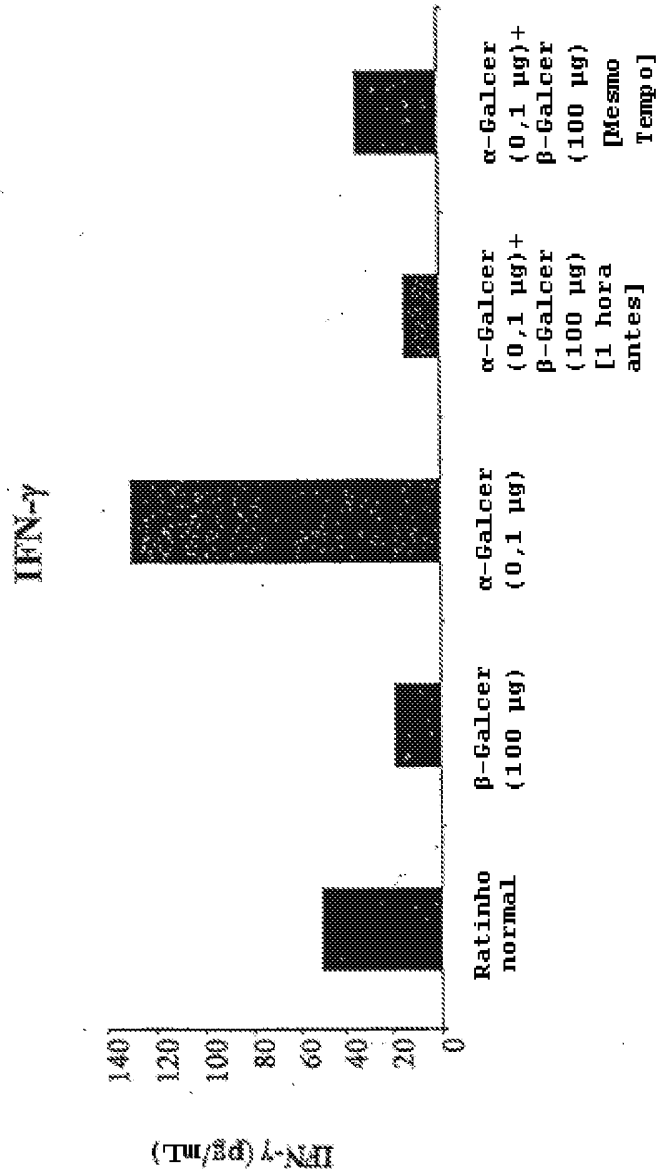


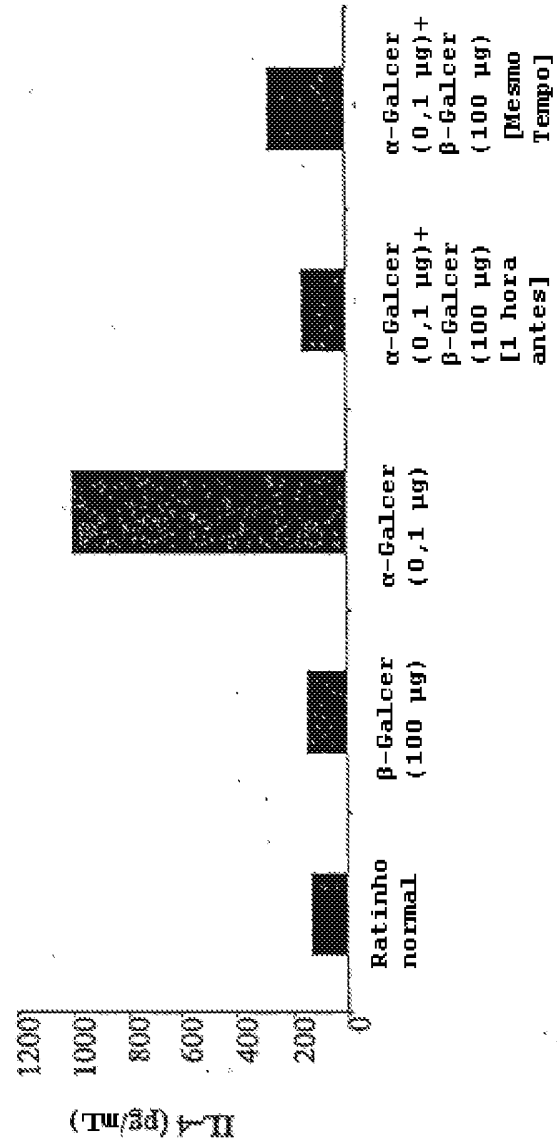
FIG. 1D

Exp# 5/14/04

Ratinhos C57BL/6 injetados com α -Galcer e β -Galcer

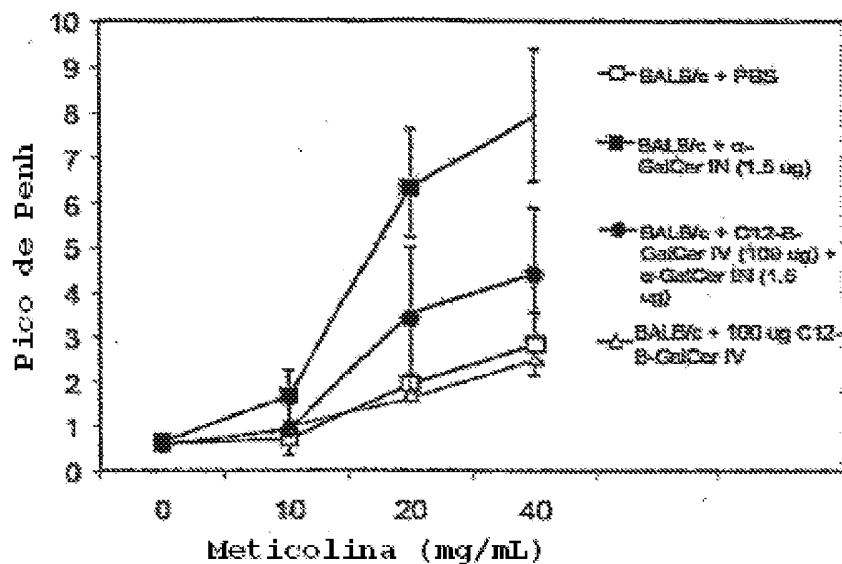
Ratinhos mortos após 6 horas

IL-4



a.

FIGURA 2



b.

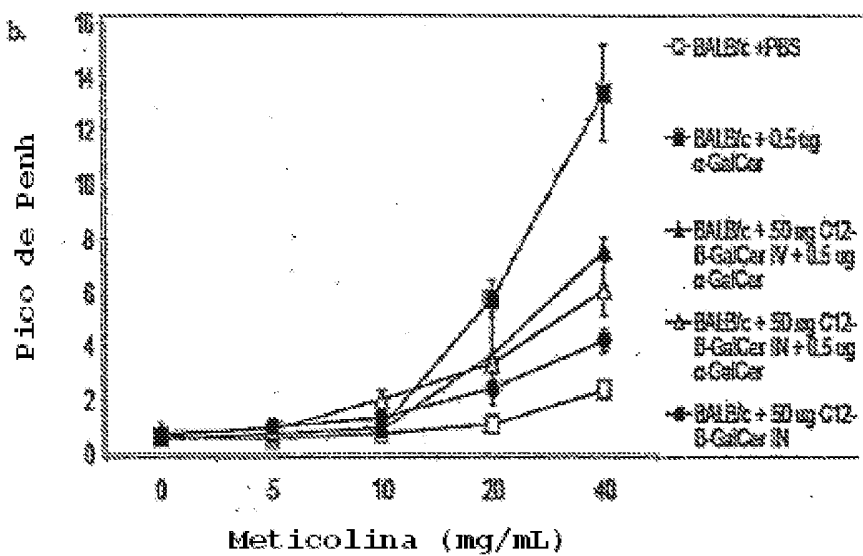


FIGURA 3

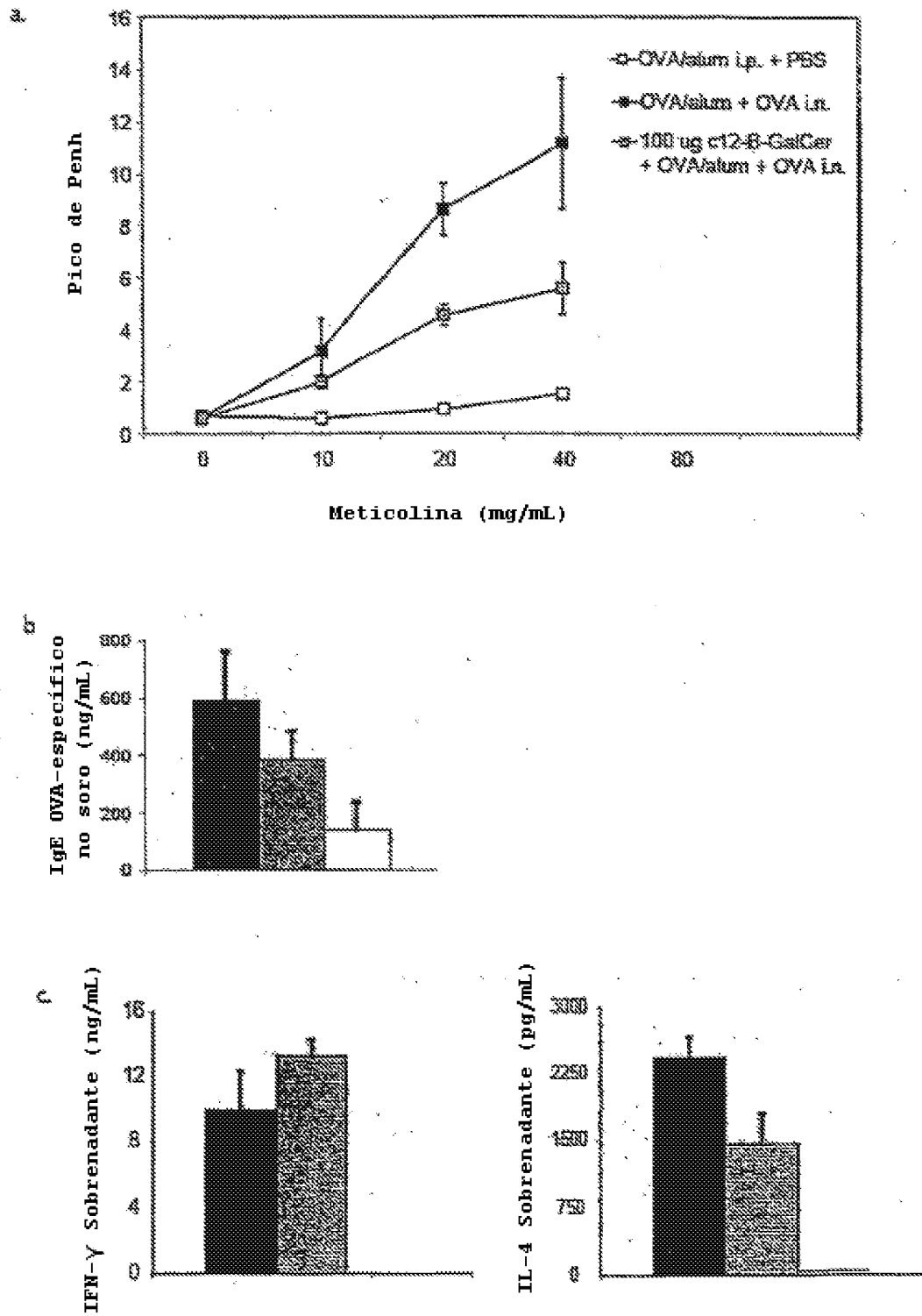


FIGURA 4

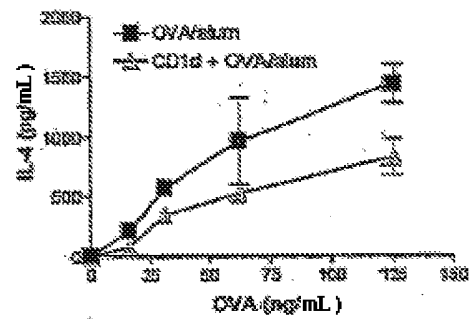
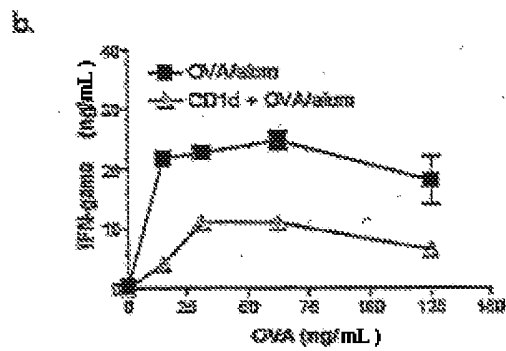
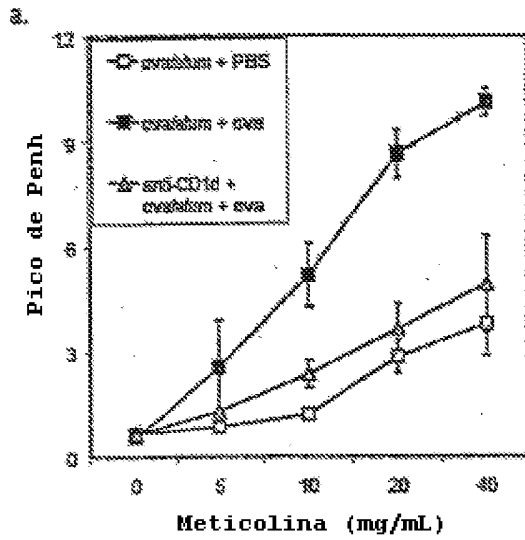


FIGURA 5

Distribuição de células NKT, 24 horas após
administração oral de b-Galcer a ratinhos
C57BL/6. N = 2, Idade = 12 semanas

