

(11) Número de Publicação: **PT 2510946 E**

(51) Classificação Internacional:

A61K 39/85 (2015.01) **A61K 39/39** (2015.01)

A61K 31/4745 (2015.01) **A61P 11/06**

(2015.01)

A61K 31/52 (2015.01) **C07D 487/04** (2015.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2008.02.07**

(30) Prioridade(s): **2007.02.07 US 888699 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2012.10.17**

(45) Data e BPI da concessão: **2015.08.05**
229/2015

(73) Titular(es):

THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA

12TH FLOOR 1111 FRANKLIN STREET

OAKLAND, CA 94607-5200

US

(72) Inventor(es):

HOWARD B. COTTAM

US

DENNIS A. CARSON

US

CHRISTINA C. N. WU

US

WOLFGANG WRASIDLO

US

GREGORY A. DANIELS

US

(74) Mandatário:

ANTÓNIO INFANTE DA CÂMARA TRIGUEIROS DE ARAGÃO

RUA DO PATROCÍNIO, Nº 94 1399-019 LISBOA

PT

(54) Epígrafe: **CONJUGADOS DE AGONISTAS SINTÉTICOS DE TLR E SUAS UTILIZAÇÕES**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO PROPORCIONA AGONISTAS DE TLR E SEUS CONJUGADOS ÚTEIS EM VACINAS E PARA PREVENIR, INIBIR OU TRATAR UMA VARIEDADE DE DISTÚRBIOS INCLUINDO INFEÇÃO PATOGENICA E ASMA.

RESUMO

"CONJUGADOS DE AGONISTAS SINTÉTICOS DE TLR E SUAS UTILIZAÇÕES"

A invenção proporciona agonistas de TLR e seus conjugados úteis em vacinas e para prevenir, inibir ou tratar uma variedade de distúrbios incluindo infecção patogénica e asma.

DESCRIÇÃO

“CONJUGADOS DE AGONISTAS SINTÉTICOS DE TLR E SUAS UTILIZAÇÕES”

Antecedentes

Na última década, muito se aprendeu sobre a base molecular do reconhecimento inato de patógenos microbianos. É geralmente aceite que muitas células somáticas expressam uma gama de recetores de reconhecimento padrão que detetam potenciais patógenos, independentemente do sistema imunitário adaptativo (ver Janeway *et al.*, Annu. Rev. Immunol., 20:197 (2002)). Acredita-se que estes recetores interagem com componentes microbianos, designados padrões moleculares associados a patógenos (PAMP). Exemplos de PAMP incluem peptidoglicanos, ácidos lipotécóicos de paredes de células gram-positivas, o açúcar manose (o qual é comum em hidratos de carbono microbianos mas raro em humanos), ADN bacteriano, ARN de cadeia dupla de vírus e glucanos de paredes de células fúngicas. Os PAMP geralmente cumprem determinados critérios que incluem, (a) a sua expressão por micróbios mas não os seus hospedeiros mamíferos, (b) conservação de estrutura através da ampla gama de patógenos e (c) a capacidade de estimular a imunidade inata. Verificou-se que os recetores do tipo Toll (TLR) desempenham um papel central na deteção de PAMP e na resposta precoce a infeções microbianas (ver Underhill *et al.*, Curr. Opin. Immunol., 14:103 (2002)). Foram identificados dez TLR de mamífero e vários seus agonistas. Por exemplo, TLR7 e TLR9 reconhecem e respondem a imiquimod e oligonucleótidos imunoestimulatórios CpG (ISS-ODN), respetivamente. O imunomodulador sintético R-848 (resiquimod)

ativa TLR7 e TLR8. Enquanto a estimulação de TLR inicia uma cascata de sinalização comum (envolvendo a proteína adaptadora MyD88, o fator de transcrição NF- κ B e citocinas pró-inflamatórias e efectoras), determinados tipos de células tendem a produzir determinados TLR. Por exemplo, TLR7 e TLR9 são encontrados predominantemente nas faces internas de endossomas em células dendríticas (DCs) e linfócitos B (em humanos; os macrófagos de murganho expressam TLR7 e TLR9). O TLR8, por outro lado, encontra-se em monócitos de sangue humano (ver Hornung *et al.*, J. Immunol., 168:4531 (2002)).

Os interferões (INF) também estão envolvidos na indução eficiente de uma resposta imunitária, especialmente após infecção viral (Brassard *et al.*, J. Leukoc. Biol., 71:568 (2002)). Contudo, muitos vírus produzem uma variedade de proteínas que bloqueiam a produção ou ação de interferão a diversos níveis. Acredita-se que o antagonismo de interferão seja parte de uma estratégia geral para evitar a imunidade inata, assim como a adaptativa (ver Levy *et al.*, Cytokine Growth Factor Rev., 12:143 (2001)). O pedido de patente internacional WO 2007/024707 pós-publicado descreve agonistas de TLR7 e TLR8. Foram posteriormente divulgados conjugados de Gag de VIH e um agonista de TLR7/8 (ver Wille-Reece *et al.*, PNAS, 102: 151190 (2005)). Também foi descrita a síntese e a atividade imunoestimuladora de amino-9-benziladeninas 8-substituídas como agonistas de TLR7 (ver Jin *et al.*, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 16: 4559 (2006)). Além disso, os agonistas de TLR complexados a lipossomas foram descritos como componentes de adjuvantes vacinais (Zaks *et al.*, J. Immunol., 176: 7335 (2006)). Embora os agonistas de TLR possam ser suficientemente ativos para alguns métodos de tratamento, em alguns casos os antagonistas

microbianos de interferção poderiam mitigar os efeitos de adjuvante do agonista de TLR sintético.

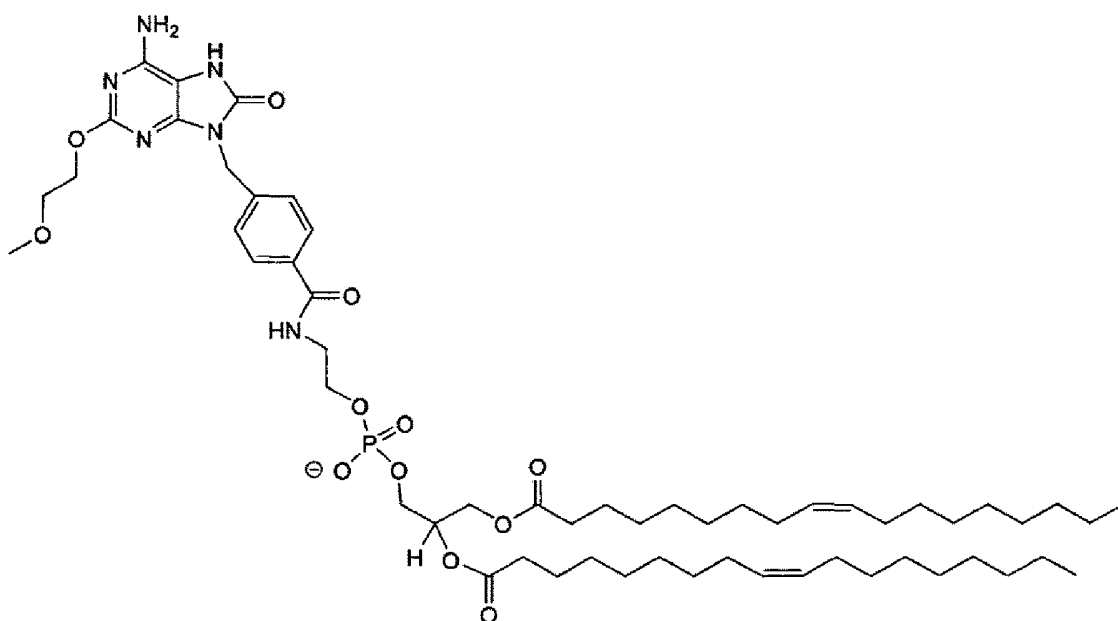
Uma resposta mais específica a infeções microbianas é baseada em imunização ativa ou passiva. Se a imunização universal não for considerada eficaz em termos de custos (ou farmacoeconomicamente viável), a identificação de uma população em risco que beneficiaria de imunoprofilaxia pode ser eficaz em termos de custos, embora a identificação dessa população possa não ser simples. Não obstante, há algumas populações em risco claramente definidas para determinadas infeções bacterianas, tal como infeções estafilocócicas, incluindo doentes de diálise, doentes com derivações ventriculoperitoneais, doentes em risco de endocardite infecciosa e residentes de lares, todos eles sofrem de estados crónicos que os colocam num risco acrescido prolongado para infeções estafilocócicas. Muitos destes doentes também estão em risco acrescido de adquirirem *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina associado aos serviços de saúde (HA-MRSA). Contudo, o bloqueio da colonização de *Staphylococcus* pode ser mais alcançável do que a proteção contra infeção.

A imunoprofilaxia passiva, utilizando anticorpos policlonais (Capparelli *et al.*, Antimicrob. Agents Chemo., 49:4121 (2005)) ou anticorpos monoclonais (mAb) (www.biosynexus.com/productcandidates.html), pode proporcionar proteção imediata (embora de curto prazo) para doentes que, ou não possam esperar que ocorra um efeito vacinal, ou cujos sistemas imunitários estejam demasiado comprometidos para montarem uma resposta a uma vacina. Uma potencial indicação para imunoprofilaxia passiva é um surto hospitalar de infeções relacionadas com MRSA. Nesses casos, os indivíduos expostos podem beneficiar de profilaxia imediata, enquanto que indivíduos

residindo na mesma enfermaria ou serviço de cuidados crónicos podem beneficiar de imunização ativa. Além disso, os doentes de unidade de cuidados intensivos são potenciais beneficiários de imunoprofilaxia passiva, dado que cada um deles provavelmente adquiriria um ou mais fatores de risco para infeções estafilocócicas.

Sumário da Invenção

A presente invenção proporciona um composto de acordo com a seguinte fórmula



O composto da invenção é um conjugado sintético de fosfolípido agonista de TLR (composto conjugado) e atua como um agente imunoestimulatório sintético de largo espectro, de longa duração e não tóxico, o qual é útil para ativação do sistema imunitário de um mamífero, e. g., um humano. Em particular, o composto da invenção otimiza a resposta imunitária limitando,

simultaneamente, efeitos secundários sistémicos associados a agonistas de TLR não conjugados.

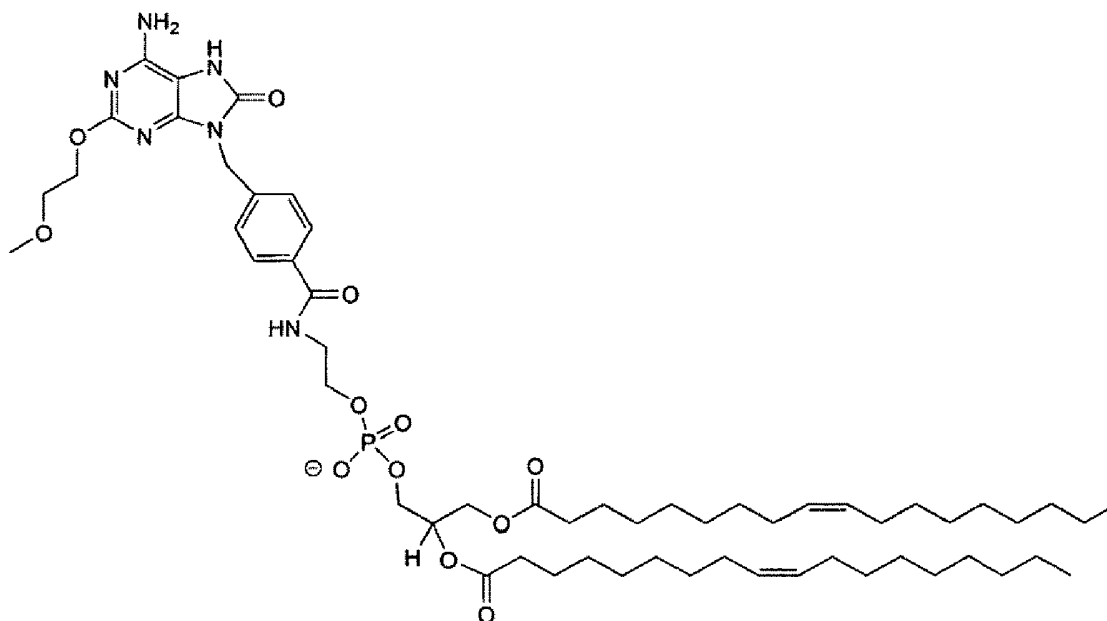
O agonista de TLR sintético pode ajudar a dirigir o conjugado para os TLR nos endossomas de células alvo e melhorar a distribuição do componente macromolecular. Numa forma de realização, o agonista de TLR pode ser um agonista de TLR7 ou TLR8. Além disso, o agonista de TLR sintético pode melhorar a resposta ao componente macromolecular do composto inventivo (e. g., resposta imunitária). Do mesmo modo, a macromolécula pode ser útil para ativação do sistema imunitário e/ou pode dirigir o conjugado a células particulares. Deste modo, o componente macromolecular do composto inventivo pode melhorar a atividade do agonista de TLR sintético ou ter atividade desejável separada. Por exemplo, o componente macromolecular pode melhorar a atividade do agonista de TLR ao ajudar a dirigir o agonista para o TLR nos endossomas de células alvo, por estimulação da transdução de sinal induzida pelo agonista de TLR ou por reticulação do recetor ou qualquer sua combinação. De acordo com a invenção, o componente macromolecular do composto inventivo é um lípido o qual pode ser espontaneamente incorporado em lipossomas. Numa forma de realização não reivindicada, a macromolécula é uma nanopartícula a qual tem grupos amina na sua superfície. Uma vez ligado a um agonista de TLR, o conjugado agonista de TLR-nanopartícula pode ser de um tamanho, por exemplo, cerca de 100 nm, que pode residir (estar presente) em endossomas.

As infeções de *Staphylococcus aureus* (SA) adquiridas em hospital são uma causa muito importante de morbidade e mortalidade. Contudo, as vacinas não são utilizadas em quadros agudos, porque demoram demasiado a atuar e não são eficazes em

doentes imunocomprometidos. A invenção proporciona um método para a vacinação rápida de doentes em risco para infeções bacterianas gram-positivas, *e. g.*, infeções de SA, o qual emprega agonistas do recetor 7 do tipo Toll (TLR7) e um ou mais antigénios (imunogénios) de bactérias gram-positivas. A utilização das vacinas da invenção induz imunidade em cerca de 6 dias, a qual proporciona para aplicações não recetivas a protocolo de vacinação padrão (*e. g.*, quadros de cuidados agudos).

Como aqui divulgado, foi preparada uma composição compreendendo uma bactéria gram-positiva, *Bacillus anthracis* (BA), e um agonista de TLR7 sintético. A composição induziu a secreção de IL 12 e IL6 (indicativa de ativação de macrófagos derivados de medula óssea (BMDM)) *in vitro* e protegeu murganhos *versus* desafio subsequente de BA intrapulmonar, de outro modo letal, *in vivo*. Em particular, a administração de uma composição que contém um conjugado de agonista de TLR7 e um imunogénio (UC-IV199-albumina/esporos de BA irradiados) induziu imunidade protetora para BA no espaço de 6 dias. Em contraste, a injeção dos animais com esporos de BA isoladamente, ou com BA mais um adjuvante convencional, *i. e.*, toxina da cólera (CT), não protegeu os animais de um desafiador letal. A rapidez de uma resposta imunitária protetora num animal não tratado foi inesperada.

A invenção proporciona, deste modo, uma composição farmacêutica, de um modo preferido, uma composição imunogénica, compreendendo o composto de acordo com a fórmula



Numa forma de realização não reivindicada, uma composição imunogénica da invenção inclui um agonista de TLR sintético, tal como um agonista de TLR7, e. g., UC-IV199, ligado a uma célula bacteriana gram-positiva, por exemplo, ligado a grupos amino livres em *Staphylococcus aureus* morto; um agonista de TLR sintético, tal como um agonista de TLR7 ligado a um extrato bacteriano de antigénios bacterianos gram-positivos isolados; um agonista de TLR sintético, tal como um agonista de TLR7 ligado a uma proteína bacteriana gram-positiva isolada, e. g., proteína recombinante; ou um agonista de TLR sintético, tal como um agonista de TLR7 ligado a hidratos de carbono bacterianos gram-positivos isolados. Por exemplo, um agonista de TLR7 sintético pode ser ligado a hidratos de carbono bacterianos utilizando métodos para conjugar polissacáridos de *Staphylococcus aureus* a veículos proteicos (tal como os utilizados para toxoide tetânico). A preparação bacteriana morta pode ser preparada utilizando irradiação gama, tratamento térmico ou químico. Noutra forma de realização não reivindicada, uma composição imunogénica da invenção inclui um agonista de TLR

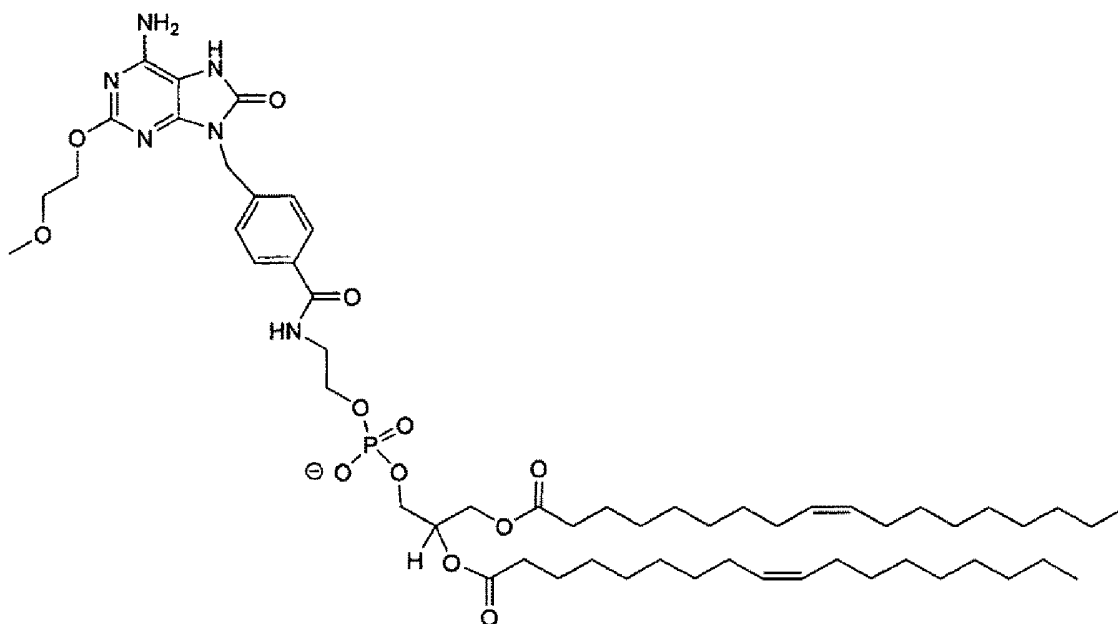
sintético, tal como um agonista de TLR7 ligado a um adjuvante e uma preparação compreendendo células bacterianas gram-positivas mortas; um agonista de TLR sintético, tal como um agonista de TLR7 ligado a um adjuvante e uma preparação compreendendo um extrato bacteriano gram-positivo; ou um agonista de TLR sintético, tal como um agonista de TLR7 ligado a um adjuvante e uma preparação compreendendo um antigénio bacteriano gram-positivo isolado, e. g., proteína recombinante. Por exemplo, a composição imunogénica pode incluir UC-IV199 ligado a albumina e uma preparação com bactérias gram-positivas mortas, e. g., *Staphylococcus aureus* morta. Numa forma de realização não reivindicada, uma composição imunogénica da invenção inclui um agonista de TLR7 sintético ligado a um adjuvante e uma preparação compreendendo um antigénio bacteriano gram-positivo recombinante, tal como uma proteína bacteriana gram-positiva isolada ou um seu péptido, ou hidrato de carbono bacteriano gram-positivo isolado. Numa forma de realização, uma dose única da composição imunogénica pode mostrar atividade muito potente, e. g., proporcionar imunidade protetora, num curto período de tempo, e. g., inferior a cerca de 10 dias.

Numa forma de realização, uma vacina esterilizada é administrada a um indivíduo, de 0 a 7 dias antes da hospitalização. Numa forma de realização, a vacina é administrada intramuscularmente. Numa forma de realização, a vacina é administrada a uma dosagem entre 10 µg e 10 mg.

A utilização de conjugados de agonistas de TLR sintéticos, tal como agonistas de TLR7 da invenção, é vantajosa, dado que a química acessível e versátil permite a conjugação a qualquer antigénio e os conjugados modificáveis têm estequiometria definida. Os conjugados são pouco dispendiosos de preparar e são

potentes e, assim, proporcionam rápida proteção, possibilitando a utilização em quadros agudos, tais como trauma, queimadura, pré-cirurgia ou bioterrorismo.

Consequentemente, é proporcionado um composto da seguinte fórmula:



O componente macromolecular no conjugado da invenção forma uma ligação estável com o agonista de TLR, *i. e.*, o conjugado não atua como um profármaco.

Alem disso, a invenção proporciona uma composição farmacêutica compreendendo o composto da fórmula acima, de um modo preferido, em combinação com um diluente ou veículo farmacologicamente aceitável.

A invenção inclui a utilização do composto conjugado de acordo com a fórmula acima. O conjugado pode ser útil para prevenir, inibir ou tratar distúrbios, incluindo, mas não

limitados a asma alérgica, doenças infecciosas, tal como infeções respiratórias virais, e. g., as associadas a infeção por vírus de influenza ou vírus sincicial respiratório (RSV), lúpus e outras doenças autoimunes, e como uma vacina, e. g., para cancro ou doenças infecciosas. Numa forma de realização, uma dose única do conjugado pode mostrar atividade muito potente na estimulação da resposta imunitária. Além disso, devido à baixa toxicidade do conjugado, em algumas circunstâncias, podem ser administradas doses mais elevadas, e. g., sistemicamente, enquanto sob outras circunstâncias podem ser administradas doses inferiores, e. g., devido a localização do conjugado. Numa forma de realização, quando administrado a doses elevadas, o conjugado de agonista de TLR sintético pode deduzir uma resposta antagonística e, assim, pode ser útil para inibir ou tratar a asma ou doenças autoimunes. Uma primeira dose pode deduzir uma hiperresposta, a qual, por sua vez, suprime a resposta imunitária evitando, desse modo, a inflamação. Deste modo, a utilização de doses mais elevadas e a readministração podem resultar em inibição de uma resposta imunitária.

Numa forma de realização, a invenção proporciona um método para prevenir ou inibir uma infeção bacteriana gram-positiva num mamífero.

A invenção proporciona um composto da invenção para utilização em terapia médica (e. g., para profilaxia de doenças bacterianas, tal como numa vacina). O composto da invenção também pode ser utilizado para biodefesa, e., contra *B. antraz*.

É ainda proporcionada a composição e o composto da invenção para utilização em terapia médica, e. g., para tratar asma ou infeções virais, ou prevenir infeção viral, assim como a

utilização dos conjugados para o fabrico de um medicamento para o tratamento de um estado ou sintoma associado a TLR ou um estado ou sintoma no qual estejam indicadas uma resposta imunitária aumentada ou uma resposta imunitária suprimida

Além disso, a invenção também proporciona uma composição farmacêutica compreendendo o composto da invenção, em combinação com um diluente ou veículo farmacêuticamente aceitável, opcionalmente, em combinação com uma preparação de uma bactéria gram-positiva selecionada, e. g., uma preparação ou um extrato morto, proteína isolada de uma bactéria gram-positiva selecionada ou hidrato de carbono (polissacárido) isolado de uma bactéria gram-positiva selecionada.

O composto conjugado pode otimizar a resposta imunitária limitando, simultaneamente, efeitos secundários sistémicos indesejáveis de agonistas de TLR7.

Numa forma de realização, a invenção proporciona o composto reivindicado para utilização na prevenção ou tratamento de uma infeção bacteriana gram-positiva num mamífero, tal como um humano. A utilização inclui a administração, a um mamífero a necessitar dessa terapia, de uma quantidade eficaz do composto da invenção ou um seu sal farmacêuticamente aceitável.

Também é proporcionado um método não reivindicado para identificar conjugados úteis para prevenir, inibir ou tratar um estado ou sintoma particular, e. g., por identificação do perfil de citocina induzido pelo conjugado *in vitro* ou *in vivo* ou por identificação do endossoma, e. g., precoce, médio ou tardio, que tem o TLR para o agonista de TLR. Como células diferentes têm endossomas diferentes, a identificação de padrões de endossoma

em células pode permitir o direcionamento de conjugados para tipos de células específicos ou melhorar o acesso de conjugados a endossomas.

Breve Descrição de Figuras

As Figuras 1 a 5, 10 a 15, 17 a 25 e 27 relacionam-se com formas de realização não reivindicadas.

A Figura 1 mostra um conjugado de agonista de TLR/alfagalactosil-ceramida.

A Figura 2 ilustra um conjugado UC-1V150 de G1 PAMAM com um núcleo de etilenodiamina.

A Figura 3A ilustra um ligante (SANH) para conjugação de uma macromolécula e um agonista de TLR sintético.

A Figura 3B ilustra a síntese de UC-1V150.

A Figura 3C ilustra a conjugação de UC-1V150 a MSA. 200 μ L de MSA (25 mg/mL) são misturados com 100 μ L de tampão de conjugação (fosfatos a 1 M, pH=7,2) e 690 μ L de PBS. 844 μ g de SANH, em 10 μ L de DMF (excesso molar de 40 vezes para MSA), são adicionados a solução de proteína (A concentração final de NP na mistura reacional é 5 mg/mL). Após mistura suave, a reação é deixada prosseguir, à temperatura ambiente, durante 2 horas. Para remover o excesso de SANH, a mistura reacional é carregada num dispositivo de filtro *microcon spin* (YM-3, Millipore) e concentrada para cerca de 70 μ L. 460 μ g de UC-1V150 dissolvidos em 10 μ L de DMF foram adicionados a MSA modificada com SANH e a

mistura reacional foi incubada, à T.A., de um dia para o outro. Para remover o excesso de UC-1V150, a mistura reacional foi, em primeiro lugar, concentrada para 50 µL utilizando um dispositivo de filtro *microcon spin* (Millipore: YM-3) e carregada numa coluna G25 *micro-spin* (GE Healthcare).

A Figura 4 é uma ilustração gráfica do perfil de absorção (a cerca de 350 nm) de um composto de fórmula I (um conjugado de OVA/SANH/UC-1V50).

A Figura 5 ilustra o perfil de absorvência de uma reação de conjugação de um agonista de TLR7 sintético, UC-1V150, a albumina de soro de murganho (MSA). A proporção de UC-1V150 para MSA é, aproximadamente, 5:1.

A Figura 6 ilustra um conjugado de agonista de TLR/fosfolípido.

A Figura 7 mostra o efeito da administração de UC-1V199/lípido a diferentes doses e calendarizações.

As Figuras 8A-B mostram que o UC-1V199/lípido inibe a sinalização de TLR7 e TLR2.

A Figura 9 ilustra a resposta de dose bifásica a um agonista de TLR7 ultrapotente (um agonista pico/nanomolar e antagonista micromolecular).

As Figuras 10A e B ilustram que os conjugados de UC-1V150/MSA ativam macrófagos derivados de medula óssea de murino (painel A) e células mononucleares de sangue periférico humano (painel B). As células foram incubadas com diversas

concentrações dos conjugados, de 0,5 nM a 10 µM com BMDM, ou de 0,1 a 10 µM com PBMC. Os sobrenadantes de cultura foram recolhidos após 24 horas e os níveis de citocina foram analisados por Luminex.

As Figuras 11A, B, e C ilustram a eficácia *in vivo* de um conjugado de agonista de TLR7. Os murganhos C57BL/6 foram injetados (i.v., por meio da veia da cauda) com diversas quantidades de UC-1V150 (SM-360320 modificado com aldeído) ou UC-1V150/MSA por murganho. As amostras de soro foram recolhidas e os níveis de citocina foram analisados por Luminex. O efeito do agonista de TLR7 sintético não conjugado, SM-360320, durou apenas apenas 2 horas, enquanto que o UC-1V150/MSA prolongou o efeito para, pelo menos, 6 horas.

A Figura 12 mostra atividade local *in vivo* sustida de um conjugado de UC-1V150/MSA, sem um efeito sistémico. Os murganhos C57BL/6 foram anestesiados e administrados (i.t.) com 3 nmol de UC-1V150/MSA. Nos intervalos de tempo indicados, os murganhos foram sacrificados e BALF e soros recolhidos. Os dados foram combinados a partir de duas experiências separadas com, pelo menos, seis murganhos por grupo. Os resultados mostram os valores médios ± SEM.

A Figura 13 mostra a indução de citocina em BMDM por conjugado de esporo de antraz irradiado-agonista de TLR7.

A Figura 14 proporciona gráficos de sobrevivência após imunização de murganhos com UC-1V150/MSA e desafio com esporos. A) Os murganhos A/J fêmea com idades correspondentes foram administrados, i.n., apenas com solução salina ou solução salina contendo MSA (uma quantidade equivalente a UC-1V150/MSA), UC-

1V150 ou UC-1V150/MSA, a 0,75 nmole/murganho, 1 dia antes de infecção por *B. anthracis* e a sobrevivência foi avaliada até 13 dias. B) Os murganhos Balb/c foram administrados, i.n., com solução salina ou UC-1V150/MSA, a 5 nmole/murganho, 1 dia antes de infecção por vírus de influenza e a sobrevivência seguiu-se durante 21 dias. Em cada modelo, foram realizadas curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier e testes de log-rank para determinar a significância. Em cada grupo, foram testados, pelo menos, 8 murganhos.

A Figura 15 proporciona um gráfico de sobrevivência percentual após uma dose única de vacina com agonistas e conjugados de TLR7.

A Figura 16 ilustra que a proteção contra a exposição a esporos de antraz depende de células CD4+.

A Figura 17 mostra um perfil de citocina local em murganhos. Murganhos C57BL/6 foram administrados, i.t., com um conjugado de UC-1V150/MSA ou UC-1V136 não conjugado, a 3 nmole ou 500 nmole por murganho, respectivamente. BALF e soros foram recolhidos nos intervalos de tempo indicados e os níveis de citocina determinados por imunensaio múltiplice. Os valores médios de, pelo menos, 3-5 murganhos por grupo, são mostrados \pm SEM.

A Figura 18 ilustra o espectro de absorvência para conjugação direta de partículas de SIV a UC-1V150.

A Figura 19 ilustra a indução de citocina em BMDC por um conjugado de um agonista de TLR7 sintético e partículas virais.

As Figuras 20A-B ilustram os efeitos de um conjugado de UC-1V150/SIV inativado (painel A) ou UC-1V150/OVA/ODN (painel B) na produção de IL-12. As BMDC mielóides foram incubadas, durante 24 horas, sob diversas condições, com 0,1 µg/mL, como indicado. Os níveis de IL-12 no sobrenadante celular foram medidos por ELISA.

A Figura 21 é uma ilustração gráfica da estimulação de células dendríticas derivadas de medula óssea (BMDC) com OVA/UC-1V150 ou OVA/ODN (ODN = oligodesoxinucleótido).

A Figura 22 é uma ilustração do espectro de UV de um conjugado duplo, (OVA/UC-1V150/ODN 1043).

A Figura 23 é uma ilustração da indução de IL-12 em BMDC utilizando conjugados de OVA/ODN/UC-1V150. OVA/1043 e OVA/1018 são conjugados de ODN.

A Figura 24 ilustra a conjugação de um agonista de TLR sintético a um componente de lípido de um lipossoma. O autoagrupamento do conjugado de TLR, ligado por meio de ligante espaçador a um lípido C-15, resultou na formação de nanopartículas a 100 nm. O agonista de TLR e um éster de NHS do lípido foram colocados em reação em quantidades equimolares em DMF e 1 equivalente de trietilamina, durante 6 horas. A mistura reacional foi purificada por preparação de HPLC sob condições isocráticas em 50:50 acetonitrilo/água.

A Figura 25 mostra um esquema de um conjugado de agonista de TLR/lipossoma. Os lipossomas são formados com colesterol:DOPE:DSPC:mPEG2000-DSPE:TLR-DSPE:BODIPY-DOPE 30:30:30:5:5:1,5; DSPE = distearoilfosfatidiletanolamina;

DOPE = dioleoilfosfatidiletanolamina; BODIPY = 6-(((4-4-difluoro-5-(2-tienil)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-il)estiriloxi)acetil)amino-hexanamido-DOPE.

Colesterol:DOPE:DSPC:DSPE-agonista de TLR:DSPE-mPEG (em proporção molar de 1:1:1:0,16:0,16) em clorofórmio foram retirados em tubos de cultura de vidro de 30 mL, secos sob uma corrente de azoto gasoso e dessecados em vácuo, durante um mínimo de 6 h, para remover qualquer solvente orgânico residual. A película lipídica seca foi hidratada em água desionizada estéril num volume total de 1 mL, durante um mínimo de 12 horas. Os lipossomas foram agitados, durante 2-3 minutos, para remover qualquer película lipídica aderente e sonicados num sonicador de banho (ULTRASONIK 28X), durante 2-3 minutos, à temperatura ambiente, para produzir vesículas multilamelares (MLV). As MLV foram, depois, sonicadas com uma sonda de Ti (utilizando um sonicador Branson 450, a 100% de ciclo de serviço e potência de saída de 25 W), num banho de gelo, durante 1-2 minutos, para produzir vesículas unilamelares pequenas (SUV), como indicado pela formação de uma solução translúcida clara. A solução foi filtrada por pressão em sequência através de membranas de policarbonato Nucleopore de 200 e, depois, 100 nm, para se obterem nanopartículas de lipossomas de 100 nm, com um fator de polidispersibilidade inferior a 0,1.

A Figura 26 mostra a síntese do conjugado lipídico WW-109. 0,45 mg (1 μ mole) de IV-199 foram adicionados a 100 μ L de uma solução de DOPE a 10 mM em clorofórmio. A esta solução foram adicionados 0,1 mg de trietilamina de um stock de clorofórmio. A mistura foi colocada em reação, à temperatura ambiente, durante 24 horas e o clorofórmio foi submetido a rotavapor. O resíduo sólido branco foi lavado três vezes em 60%/metanol/hexano e centrifugado, para se obter um sólido branco. A m/z por *spec* de

Massa foi 1086 e o composto tinha uma absorção máx. de UV a 268 nm. As unidades de ácidos gordos de diversos comprimentos de cadeia podem ser utilizadas para preparar os compostos análogos, incluindo ácidos carboxílicos C₁₄-C₂₂ com um, dois, três ou quatro sítios de insaturação, epoxidação, hidroxilação ou uma sua combinação, em quaisquer localizações exequíveis da cadeia de carbono de ácido carboxílico. Numa forma de realização específica, as porções de ácidos gordos são ácidos carboxílicos C₁₇ com um local de insaturação em C₈-C₉. Noutra forma de realização específica, as porções de ácidos gordos são ácidos carboxílicos C₁₈ com um local de insaturação em C₉-C₁₀. As porções de ácidos carboxílicos de cada porção de ácidos gordos podem ser iguais ou podem ser diferentes (ver, e. g., a Figura 6).

A Figura 27 ilustra um esquema de uma partícula de sílica com agonistas de TLR ligados covalentemente a ela.

A Figura 28 proporciona compostos exemplificativos para a preparação de conjugados da invenção ou para utilização nos métodos da invenção. Outros conjugados incluem agonistas de TLR ligados a albumina sérica humana, e. g., HSA/UC-1V150, ou DOPE/UC-1V199. O UC-1X-51 aumenta os níveis de TNF alfa três vezes (110 ng/mL)

Descrição Detalhada da Invenção

Definições

Como aqui utilizado, o termo "anticorpo" refere-se a uma proteína tendo um ou mais polipéptidos substancialmente codificados por genes de imunoglobulina ou fragmentos de genes

de imunoglobulina. Os genes de imunoglobulina reconhecidos incluem os genes da região constante *capa*, *lambda*, *alfa*, *gama*, *delta*, *épsilon* e *mu*, assim como a miríade de genes de região variável de imunoglobulina. As cadeias leves são classificadas como *capa* ou *lambda*. As cadeias pesadas são classificadas como *gama*, *mu*, *alfa*, *delta* ou *épsilon*, as quais, por sua vez, definem as classes de imunoglobulina, *IgG*, *IgM*, *IgA*, *IgD* e *IgE*, respectivamente.

Sabe-se que a unidade estrutural básica de imunoglobulina (anticorpo) compreende um tetrâmero. Cada tetrâmero é composto por dois pares idênticos de cadeias polipeptídicas, cada par tendo uma cadeia "leve" (cerca de 25 kD) e uma "pesada" (cerca de 50-70 kD). A terminação N de cada cadeia define uma região variável de cerca de 100 a 110 ou mais aminoácidos responsáveis, principalmente, pelo reconhecimento de antigénio. As expressões cadeia leve variável (V_L) e cadeia pesada variável (V_H) referem-se a estas cadeias leves e pesadas, respectivamente.

Os anticorpos podem existir como imunoglobulinas intactas, ou como modificações numa variedade de formas incluindo, por exemplo, $FabFc_2$, *Fab*, *Fv*, *Fd*, $(FabN)_2$, um fragmento de *Fv* que contém apenas as regiões variáveis de cadeia leve e pesada, um fragmento de *Fab* ou $(Fab)N_2$ contendo as regiões variáveis e partes das regiões constantes, um anticorpo de cadeia única, e. g., *scFv*, anticorpos enxertados com CDR e semelhantes. A cadeia pesada e leve de uma *Fv* pode ser derivada do mesmo anticorpo ou anticorpos diferentes produzindo, desse modo, uma região de *Fv* quimérica. O anticorpo pode ser de origem animal (especialmente murganho ou rato) ou humana ou pode ser quimérico ou humanizado. Como aqui utilizado, o termo "anticorpo" inclui estas formas diversas.

Uma composição é constituída por "substancialmente tudo" de um composto particular, ou uma forma particular de um composto (e. g., um isómero) quando uma composição compreende, pelo menos, cerca de 90% e, de um modo preferido, pelo menos, cerca de 95%, 99% e 99,9%, da composição particular com base no peso. Uma composição compreende uma "mistura" de compostos, ou formas do mesmo composto, quando cada composto (e. g., isómero) representa, pelo menos, cerca de 10% da composição com base no peso. Um análogo de purina da invenção, ou um seu conjugado, pode ser preparado como um sal de ácido ou como um sal de base, assim como nas formas de ácido livre ou base livre. Em solução, determinados compostos da invenção podem existir como zwitteriões, em que os contra-íões são proporcionados pelas próprias moléculas de solvente, ou de outros íões dissolvidos ou suspensos no solvente.

Como aqui utilizado, o termo "isolado" refere-se a preparação, isolamento e/ou purificação *in vitro* de uma molécula de ácido nucleico, um péptido ou proteína ou outra molécula, de modo que não esteja associada a substâncias *in vivo* ou esteja presente numa forma que é diferente da que se encontra na natureza. Deste moo, o termo "isolado", quando utilizado em relação a um ácido nucleico, como em "oligonucleótido isolado" ou "polinucleótido isolado", refere-se a uma sequência de ácidos nucleicos que é identificada e separada de, pelo menos, um contaminante com o qual está habitualmente associada na sua fonte. Um ácido nucleico isolado está presente numa forma ou configuração que é diferente daquela na qual é encontrada na natureza. Em contraste, ácidos nucleicos não isolados (e. g., ADN e ARN) são encontrados no estado em que existem na natureza. Por exemplo, uma dada sequência de ADN (e. g., um gene) é

encontrada no cromossoma de célula hospedeira na proximidade de genes vizinhos; as sequências de ARN (e. g., uma sequência de ARNm específica codificando uma proteína específica) são encontradas na célula como uma mistura com numerosos outros ARNm que codificam um sem-número de proteínas. Por este motivo, com respeito a uma "molécula de ácido nucleico isolada", a qual inclui um polinucleótido de origem genómica, de ADNc ou sintética ou alguma sua combinação, a "molécula de ácido nucleico isolada" (1) não está associada à totalidade ou uma porção de um polinucleótido no qual a "molécula de ácido nucleico isolada" se encontra na natureza, (2) está ligada, de um modo operativo, a um polinucleótido ao qual não está ligada na natureza ou (3) não ocorre na natureza como parte de uma sequência maior. A molécula de ácido nucleico isolada pode estar presente na forma de cadeia única ou cadeia dupla. Quando uma molécula de ácido nucleico for utilizada para expressar uma proteína, o ácido nucleico contém, no mínimo, a cadeia sentido ou codificante (*i. e.*, o ácido nucleico pode ser de cadeia única), mas pode conter as cadeias sentido e anti-sentido (*i. e.*, o ácido nucleico pode ser de cadeia dupla).

O termo "aminoácido", como aqui utilizado, compreende os resíduos dos aminoácidos naturais (e. g., Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Hyl, Hyp, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr e Val) na forma D ou L, assim como aminoácidos não naturais (e. g., fosfoserina, fosfotreonina, fosfotirosina, hidroxiprolina, gama-carboxiglutamato; ácido hipúrico, ácido octa-hidroindole-2-carboxílico, estatina, ácido 1,2,3,4,-tetra-hidroisoquinolina-3-carboxílico, penicilamina, ornitina, citrulina, -metil-alanina, *para*-benzoilfenilalanina, fenilglicina, propargilglicina, sarcosina e *terc*-butilglicina). O termo também compreende aminoácidos naturais e não naturais,

portadores de um grupo protetor amino convencional (e. g., acetilo ou benziloxicarbonilo), assim como aminoácidos naturais e não naturais protegidos na terminação carboxilo (e. g., como um alquilo(C₁-C₆), fenil ou benzil éster ou amida; ou como uma -metilbenzilamida). Outros grupos protetores amino e carboxilo adequados são conhecidos pelos especialistas na técnica (ver, por exemplo, T.W. Greene, *Protecting Groups In Organic Synthesis*; Wiley: Nova Iorque, 1981, e referências aí citadas). Por exemplo, um aminoácido pode estar ligado ao resto de um composto de fórmula I através da terminação carboxilo, da terminação amino ou através de qualquer outro ponto de conjugação conveniente, tal como, por exemplo, através do enxofre da cisteína.

A expressão "recetor do tipo Toll" (TLR) refere-se a um membro de uma família de recetores que se ligam a padrões moleculares associados a patogénios (PAMP) e facilitam uma resposta imunitária num mamífero. São conhecidos dez TLR de mamífero, e. g., TLR1-10.

A expressão "agonista do recetor do tipo Toll" (agonista de TLR) refere-se a uma molécula que se liga a um TLR. Os agonistas de TLR sintéticos são compostos químicos que são concebidos para se ligarem a um TLR e ativarem o recetor. Agonistas de TLR sintéticos exemplificativos aqui proporcionados incluem "agonista de TLR-7", "agonista de TLR", "agonista de TLR-3" e "agonista de TLR-9". Os agonistas de TLR incluem imiquimod, resiquimod, broprimina e loxoribina.

A expressão "ácido nucleico", como aqui utilizada, refere-se a ADN, ARN, motivos de hibridação de cadeia única, cadeia dupla ou mais altamente agregados e quaisquer suas

modificações químicas. As modificações incluem mas não estão limitadas às que proporcionam grupos químicos que incorporam carga, polarizabilidade, ligações de hidrogénio, interação eletrostática e fluxionalidade adicionais às bases de ligando de ácido nucleico ou ao ligando de ácido nucleico como um todo. Essas modificações incluem mas não estão limitadas a ácidos nucleicos peptídicos (ANP), modificações de grupo fosfodiéster (e. g., fosforotioatos, metilfosfonatos), modificações de açúcar na posição 2', modificações de pirimidina na posição 5, modificações de purina na posição 7, modificações de purina na posição 8, modificações de purina na posição 9, modificações em aminas exocíclicas, substituição de 4-tiouridina, substituição de 5-bromo ou 5-iodo-uracilo; modificações de estrutura, metilações, combinações de emparelhamento de bases pouco habituais, tais como as isobases, isocitidina e isoguanidina e semelhantes. Os ácidos nucleicos também podem incluir bases não naturais, tal como, por exemplo, nitroindole. As modificações também podem incluir modificações em 3' e 5', tais como capsulação com um BHQ, um fluoróforo ou outra unidade.

Como aqui utilizados, "sais farmacologicamente aceitáveis" referem-se a derivados dos compostos divulgados, em que o composto parental é modificado por preparação dos seus sais de ácido ou base. Exemplos de sais farmacologicamente aceitáveis incluem mas não estão limitados a sais de ácidos minerais ou orgânicos de resíduos básicos, tal como aminas; sais alcalinos ou orgânicos de resíduos ácidos, tal como ácidos carboxílicos; e semelhantes. Os sais farmacologicamente aceitáveis incluem os sais não tóxicos convencionais ou os sais de amónio quaternário do composto parental formado, por exemplo, de ácidos inorgânicos ou orgânicos não tóxicos. Por exemplo, esses sais não tóxicos convencionais incluem os derivados de ácidos inorgânicos, tais

como clorídrico, bromídrico, sulfúrico, sulfâmico, fosfórico, nítrico e semelhantes; e os sais preparados a partir de ácidos orgânicos, tais como acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, pamóico, maleico, hidroximaleico, fenilacético, glutâmico, benzoico, salicílico, sulfanílico, 2-acetoxibenzóico, fumárico, toluenossulfónico, metanossulfónico, etanodissulfónico, oxálico, isetiónico e semelhantes.

Os sais farmacêuticamente aceitáveis dos compostos úteis na presente invenção podem ser sintetizados a partir do composto parental, o qual contém uma porção básica ou ácida, por métodos químicos convencionais. Geralmente, esses sais podem ser preparados por reação das formas de ácido ou base livre destes compostos com uma quantidade estequiométrica da base ou ácido apropriado em água ou num solvente orgânico, ou numa mistura dos dois; geralmente, os meios não aquosos, como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol ou acetonitrilo, são preferidos. As listas de sais adequados são encontradas em Remington's Pharmaceutical Sciences, 17^a ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, p. 1418 (1985), cuja divulgação é aqui dada como incorporada por citação.

A expressão "farmacêuticamente aceitável" é aqui utilizada para se referir aos compostos, materiais, composições e/ou formas de dosagem que são, no âmbito da avaliação médica idónea, adequados para utilização em contacto com os tecidos de seres humanos e animais, sem toxicidade, irritação, resposta alérgica excessivas, ou outro problema ou complicação proporcional a uma razão benefício/risco razoável.

Salvo descrito de outro modo, são utilizadas as seguintes definições: halo ou halogéneo é fluoro, cloro, bromo ou iodo. Alquilo, alcoxilo, alcenilo, alcinilo, etc., denotam grupos lineares e ramificados; mas a referência a um radical individual, tal como "propilo", abrange apenas o radical de cadeia linear, um isómero de cadeia ramificada, tal como "isopropilo", sendo especificamente referido. Arilo denota um radical fenilo ou um radical carbocíclico bicíclico fundido em orto que tem cerca de nove a dez átomos de anel, nos quais, pelo menos, um anel é aromático. Het pode ser heteroarilo, o qual abrange um radical conjugado por meio de um carbono de anel de um anel aromático monocíclico contendo cinco ou seis átomos de anel consistindo de carbono e um a quatro heteroátomos, cada selecionado do grupo consistindo de oxigénio não-peróxido, enxofre e N(X), em que x está ausente ou é H, O, alquilo(C₁-C₄), fenilo ou benzilo, assim como um radical de um heterociclo bicíclico fundido em orto, de cerca de oito a dez átomos de anel dele derivados, particularmente um derivado benzo ou um derivado, por fusão a este de um dirradical de propileno, trimetileno ou tetrametileno.

Será entendido pelos especialistas na técnica que os compostos da invenção que têm um centro quiral podem existir e ser isolados nas formas opticamente ativas e racémicas. Alguns compostos podem exibir polimorfismo. Deve ser compreendido que a presente invenção abrange qualquer forma racémica, opticamente ativa, polimórfica ou estereoisomérica, ou suas misturas, de um composto da invenção, o qual possui as propriedades úteis aqui descritas, sendo bem conhecido na técnica como preparar formas opticamente ativas (por exemplo, por resolução da forma racémica por técnicas de recristalização, por síntese a partir de materiais de partida opticamente ativos, por síntese quiral ou

por separação cromatográfica utilizando uma fase estacionária quiral) e como determinar atividade agonista utilizando os testes padrão aqui descritos, ou utilizando outros testes semelhantes, os quais são bem conhecidos na técnica. Também é compreendido pelos especialistas na técnica que os compostos aqui descritos incluem os seus diversos tautômeros, os quais podem existir em diversos estados de equilíbrio entre si.

"Quantidade terapêuticamente eficaz" pretende incluir uma quantidade de um composto útil na presente invenção ou uma quantidade da combinação de compostos reivindicados, *e. g.*, para tratar ou prevenir a doença ou distúrbio, ou para tratar os sintomas da doença ou distúrbio, num hospedeiro. Como aqui utilizado, "tratamento" ou "tratar" inclui (i) prevenção da ocorrência de um estado patológico (*e. g.*, profilaxia); (ii) inibição do estado patológico ou paragem do seu desenvolvimento; (iii) alívio do estado patológico; e/ou diminuição dos sintomas associados ao estado patológico.

Como aqui utilizado, o termo "doente" refere-se a organismos a serem tratados pelos métodos da presente invenção. Esses organismos incluem mas não estão limitados a mamíferos, tal como humanos. No contexto da invenção, o termo "indivíduo" geralmente refere-se a um indivíduo que irá receber ou que recebeu tratamento (*e. g.*, administração de um composto da invenção).

"Composto estável" e "estrutura estável" pretendem indicar um composto que é suficientemente robusto para sobreviver ao isolamento até um grau de pureza útil de uma mistura reacional e formulação num agente terapêutico eficaz. Apenas os compostos estáveis são contemplados pela presente invenção.

Agonistas e Conjugados de TLR da Invenção e Suas Utilizações

Numa forma de realização, a invenção proporciona o composto inventivo para utilização na prevenção ou tratamento de um estado ou sintoma patológico num mamífero, tal como um humano, em que está implicada a atividade de um agonista de TLR e a sua ação é desejada. A utilização inclui a administração, a um mamífero a necessitar dessa terapia, de uma quantidade eficaz do composto da invenção ou um seu sal farmacologicamente aceitável. Exemplos não limitativos de estados ou sintomas patológicos que são adequados para tratamento incluem cancro, doenças inflamatórias do aparelho gastrointestinal, cérebro, pele, articulações e outros tecidos, doenças bacterianas ou virais, doenças autoimunes e tratamento da Doença de Crohn. O composto da invenção também pode ser utilizado para preparar vacinas contra bactérias, vírus, células cancerígenas, ou péptidos específicos de cancro, ou para estimular anticorpos monoclonais anticancerígenos, como um estimulante do SNC, ou para biodefesa. A invenção proporciona, deste modo, um composto da invenção para utilização em terapia médica (e. g., para utilização como um agente anticancerígeno, para tratar doenças bacterianas, para tratar doenças virais, tais como hepatite C e hepatite B, para tratar a Doença de Crohn e, geralmente, como agentes terapêuticos para tratamento de doença imunológica). Além disso, o composto da invenção pode prevenir a carcinogénese, e. g., por vírus da hepatite C e hepatite B e pode ser utilizado para o fabrico de um medicamento útil para o tratamento de cancro, infeção viral ou bacteriana, Doença de Crohn e distúrbios imunológicos num mamífero, tal como um humano.

Numa forma de realização, a presente invenção proporciona o composto inventivo para utilização no tratamento de uma infeção viral num mamífero, por administração do conjugado de agonista de TLR da invenção. A infeção viral pode ser causada por um vírus de ARN, um produto do vírus de ARN que atua como um agonista de TLR e/ou um vírus de ADN. Um vírus de ADN exemplificativo é o vírus da hepatite B. Numa forma de realização, a infeção viral é causada por um coronavírus que causa Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS), um vírus da Hepatite B ou um Vírus da Hepatite C.

Numa forma de realização, a presente invenção proporciona o composto inventivo para utilização no tratamento do cancro, por administração de uma quantidade eficaz do conjugado de agonista de TLR da invenção. O cancro pode ser um cancro sensível a interferão, tais como, por exemplo, uma leucemia, um linfoma, um mieloma, um melanoma ou um cancro renal. Os cancros específicos que podem ser tratados incluem melanoma, cancro superficial da bexiga, queratoses actínicas, neoplasia intraepitelial e carcinoma da pele de célula basal, escamosa e semelhantes. Além disso, o método da invenção inclui tratamento para um estado pré-canceroso, tais como, por exemplo, queratoses actínicas ou neoplasia intraepitelial, polipose familiar (pólipos), displasia cervical, cancros cervicais, cancro superficial da bexiga e quaisquer outros cancros associados a infeção (e. g., linfoma, sarcoma de Karposi ou leucemia); e semelhantes.

Noutra forma de realização, a presente invenção proporciona o composto inventivo para utilização no tratamento de uma doença autoimune, por administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz do conjugado de agonista de TLR da invenção ou um sal

farmaceuticamente aceitável desse composto. São doenças autoimunes exemplificativas a Esclerose Múltipla, lúpus, artrite reumatoide e semelhantes.

Noutra forma de realização, a presente invenção proporciona o composto inventivo para utilização no tratamento da Doença de Crohn, por administração do conjugado de agonista de TLR da invenção.

Numa forma de realização não reivindicada, os conjugados de agonista de TLR podem incluir um polímero agonista de TLR homofuncional, e. g., formado de um agonista de TLR7 ou um agonista de TLR3. O agonista de TLR7 pode ser uma porção de 7-tia-8-oxoguanosinilo (TOG), uma porção de 7-desazaguanosinilo (7DG), uma porção de resiquimod ou uma porção de imiquimod. Noutra forma de realização não reivindicada, o conjugado de agonista de TLR pode incluir um polímero agonista de TLR heterofuncional. O polímero agonista de TLR heterofuncional pode incluir um agonista de TLR7 e um agonista de TLR3 ou um agonista de TLR9 ou todos os três agonistas. O polímero agonista de TLR heterofuncional pode incluir um agonista de TLR8 e um agonista de TLR9.

Um aspeto não reivindicado da invenção inclui conjugar covalentemente um agonista de TLR sintético com macromoléculas selecionadas para alcançar, por exemplo, uma forma, tamanho e valência moleculares desejados, de modo a otimizar as propriedades imunológicas do conjugado resultante e/ou direcionar ou distribuir o conjugado para células e tecidos desejados. Como aqui descrito, o conjugado é concebido para ser útil numa variedade de aplicações médicas, incluindo mas não limitadas a asma alérgica, infeções respiratórias virais

(influenza e RSV), lúpus e outras doenças autoimunes e como combinações de antigénio-adjuvante para vacinas contra cancro e doenças infecciosas. O conjugado proporciona uma resposta imunitária ótima limitando, simultaneamente, efeitos secundários sistémicos indesejáveis por união do ativador imunitário (o agonista de TLR sintético) a uma macromolécula por uma ligação covalente forte. A macromolécula pode servir como uma entidade de direcionamento e/ou uma parte integral da resposta imunitária, tal como o antigénio num conjugado de adjuvante-antigénio. Uma vantagem muito importante quando se administra o conjugado estável num ambiente localizado é que apenas são libertadas quantidades muito pequenas de agonista de TLR ao longo do tempo no ambiente sistémico.

Numa forma de realização não reivindicada, a macromolécula é selecionada de produtos, tais como proteínas, lípidos ou dendrímeros, ou polímeros tendo grupos amino nas suas superfícies, tal como "esferas amino" de poliestireno, cada tendo grupos amino primários disponíveis para conjugação a um ligante, tal como SANH, ou para conjugação direta ao agonista de TLR7 sintético. Por exemplo, após conjugação do ligante e macromolécula, o agonista de TLR7, tal como UC-1V150, é colocado em reação com o éster NHS do conjugado de SANH-macromolécula, para proporcionar um conjugado de agonista de TLR7-SANH-macromolécula.

As vacinas não são geralmente utilizadas em quadros agudos, porque (1) demoram demasiado a atuar e (2) não são eficazes em doentes imunocomprometidos. Por exemplo, as infeções por *Staphylococcus aureus* (SA) são uma causa muito importante de morbidade e mortalidade em doentes hospitalizados. Os grupos particularmente em risco são os aqueles com imunossupressão

devido a queimaduras, trauma, colocação de cateter, diálise ou idade avançada em lares. Além disso, muitas estirpes de SA adquiridas em hospital são resistentes aos antibióticos convencionais.

A presente invenção supera estas duas barreiras para tratamento. A utilização de composições, incluindo o composto reivindicado, é aqui proporcionada. Os ligandos de TLR7 geralmente têm fraca farmacocinética e absorção e excreção sistêmicas rápidas. Devido a dispersão sistêmica, resultam em síndrome de citocina. Adjuvantes eficazes devem criar um "gradiente imunitário" de citocinas e quimiocinas. Numa forma de realização, a conjugação de um agonista de TLR7 sintético potente a uma macromolécula melhora as propriedades de distribuição, melhora a farmacocinética e evita toxicidade sistêmica por exposição localizada.

Numa forma de realização não reivindicada, a invenção proporciona um método para prevenir ou inibir uma infecção bacteriana gram-positiva num mamífero, compreendendo a administração ao mamífero de uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo um antigénio bacteriano de uma bactéria gram-positiva e uma quantidade de um agonista de TLR7 sintético. Noutra forma de realização, a invenção proporciona um método para prevenir ou inibir uma infecção bacteriana gram-positiva num mamífero, compreendendo a administração ao mamífero de uma quantidade eficaz do composto reivindicado. Por exemplo, um conjugado de 1V150-MSA (não reivindicado) retém a sua atividade de agonista de TLR7, tem potência melhorada e toxicidade reduzida, causa ativação local de imunidade inata e induz proteção imunitária dependente de célula T no espaço de 6 dias após uma única vacinação com um antigénio bacteriano.

Numa forma de realização não reivindicada, um agonista de TLR7 sintético é administrado ou conjugado a um ou mais antigénios de *S. aureus*. A Tabela 1 proporciona antigénios exemplificativos para *S. aureus* para utilização com agonistas de TLR7 sintéticos, particularmente em quadros de cuidados agudos. As vacinas da invenção podem, inesperadamente, proporcionar uma resposta imunitária rápida e eficaz.

Tabela 1

Imunogénios de <i>Staphylococcus aureus</i>
Arma
Toxina B exfoliativa
Toxina A exfoliativa
Toxina da síndrome de choque tóxico
Enterotoxina A-E, H-U
Proteína de ligação de sialoproteína óssea
Proteína de ligação de colagénio
Fator A de aglutinação
Fator B de aglutinação
α -hemolisina
γ -hemolisina
Proteína A
Fator A de aglutinação
Proteína A de ligação de fibronectina

(continuação)

Imunogénios de *Staphylococcus aureus*

Arma

Proteína B de ligação de fibronectina

Proteína de ligação de colagénio

Ácido lipoteicóico

Peptidoglicano

Proteína A

Proteína B de ligação de fibronectina

α -hemolisina

Leucocidina de Panton-Valentine

Proteína de ligação de colagénio

Ácido lipoteicóico

Peptidoglicano

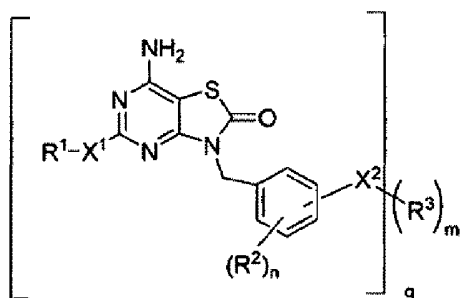
Polissacárido capsular

Fator A de aglutinação

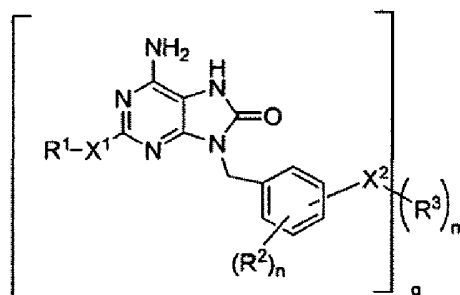
Proteína A

Proteínas de ligação de fibronectina

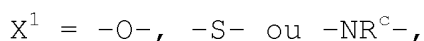
Numa forma de realização não reivindicada, a invenção proporciona os seguintes conjugados



um composto de fórmula (II)
Tiazolopirimidinas



um composto de fórmula (III)
Purinas



em que R^c hidrogénio, alquilo C_{1-10} ou alquilo C_{1-10} substituído com cicloalquilo C_{3-6} ou R^c e R^1 , considerados em conjunto com o átomo de azoto podem formar um anel heterocíclico ou um anel heterocíclico substituído, em que os substituintes são hidróxido, alquilo C_{1-6} , hidroxí-alcileno C_{1-6} , alcóxilo C_{1-6} , alcóxilo C_{1-6} alcileno C_{1-6} ou ciano;

em que R^1 é alquilo(C_1-C_{10}), alquilo(C_1-C_{10}) substituído, arilo C_{6-10} ou arilo C_{6-10} substituído, heterocíclico C_{5-9} , heterocíclico C_{5-9} substituído; em que os substituintes nos grupos alquilo, arilo ou heterocíclico são hidróxido, alquilo C_{1-6} , hidroxí-alcileno C_{1-6} , alcóxilo C_{1-6} , alcóxilo C_{1-6} alcileno C_{1-6} , amino, ciano, halogéneo ou arilo;

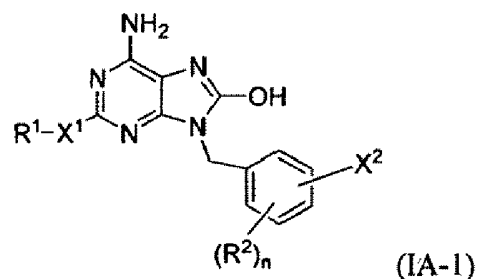
cada R^2 é, independentemente, hidrogénio, -OH, alquilo(C_1-C_6), alquilo(C_1-C_6) substituído, alcóxilo(C_1-C_6), alcóxilo(C_1-C_6) substituído, -C(O)-alquilo(C_1-C_6) (alcanoílo), -C(O)-alquilo(C_1-C_6) substituído, -C(O)-arilo(C_6-C_{10}) (aroílo),

-C(O)-arilo (C₆-C₁₀) substituído, -C(O)OH (carboxilo),
-C(O)Oalquilo (C₁-C₆) (alcoxicarbonilo), -C(O)Oalquilo (C₁-C₆)
substituído, -NR^aR^b, -C(O)NR^aR^b (carbamoílo), -O-C(O)NR^aR^b,
-alcileno (C₁-C₆)-NR^aR^b, -alcileno (C₁-C₆)-C(O)NR^aR^b, halo, nitro ou
ciano;

em que cada R^a e R^b é, independentemente, hidrogénio,
alquilo (C₁₋₆), cicloalquilo (C₃₋₈), alcoxilo (C₁₋₆),
halo-alquilo (C₁₋₆), cicloalquil (C₃₋₈)alquilo (C₁₋₆),
alcanoílo (C₁₋₆), hidroxialquilo (C₁₋₆), arilo, aril-alquilo (C₁₋₆),
arilo, aril-alquilo (C₁₋₆), Het, Het alquilo (C₁₋₆) ou
alcoxicarbonilo (C₁₋₆); em que X² é uma ligação ou um grupo de
ligação; em que R³ é uma macromolécula; em que n é 1, 2, 3 ou 4;
em que m é 1 ou 2;

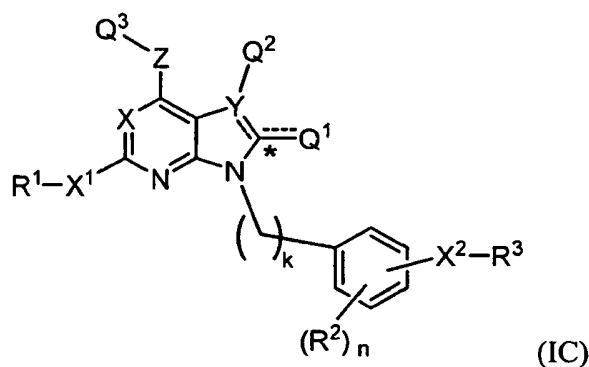
em que q é 1 a 1000, 10⁴, 10⁵, 10⁶ ou mais; ou um seu sal
farmaceuticamente aceitável. Os grupos de macromoléculas podem
incluir moléculas orgânicas, compostas por carbono, oxigénio,
hidrogénio, azoto, enxofre, fósforo ou suas combinações, as
quais não sejam nocivas para tecidos corporais (e. g., são não
tóxicas e/ou não causam inflamação) e podem incluir, mas não
estar limitadas a dendrímeros, proteínas, péptidos, lípidos e
suas formulações (e. g., nanopartículas de lipossomas), com ou
sem ligantes (grupos X²) e polímeros modificados por amino, tal
como esferas de poliestireno, assim como α-galactosilceramidas
(ver a Figura 1).

Os compostos podem ser preparados utilizando compostos que tendo a fórmula (IA-1):



onde X^2 é um grupo que pode reagir com um grupo específico de compostos, e. g., os divulgados na Patente U.S. Nº 6329381 (Kurimoto *et al.*), ou forma uma ligação com um grupo de ligação ou reage para formar uma ligação com uma macromolécula e as variáveis restantes são como definidas acima para a fórmula (IA). Exemplos não limitativos de macromoléculas incluem aqueles com cadeias laterais que aumentam a solubilidade, tais como, por exemplo, grupos contendo anéis de morfolino, piperidino, pirrolidino ou piperazino e semelhantes; aminoácidos, polímeros de aminoácidos (proteínas ou péptidos), e. g., dipéptidos ou tripéptidos e semelhantes; hidratos de carbono (polissacáridos), nucleótidos, tais como, por exemplo, ANP, ARN e ADN e semelhantes; polímeros de materiais orgânicos, tais como, por exemplo, polietilenoglicol, poli-lactida e semelhantes; lípidos monoméricos e poliméricos; nanopartículas orgânicas insolúveis; substâncias corporais não tóxicas, tais como, por exemplo, células, lípidos, vitaminas, cofatores, antigénios, tal como, por exemplo micróbios, tais como, por exemplo, vírus, bactérias, fungos e semelhantes. Os antigénios podem incluir organismos intactos inativados ou seus subcomponentes, e. g., células e semelhantes.

Numa forma de realização não reivindicada, um composto da invenção tem fórmula (IC):



em que

X é N ou CR^x, em que R^x é hidrogénio, halogéneo, alquilo substituído, alquilo não substituído, heteroalquilo substituído ou heteroalquilo não substituído;

Y é S ou N;

os traços (----) indicam ligações opcionais; em que:

quando a ligação entre Y e o carbono marcado por um asterisco é uma ligação dupla, Q² não está presente;

quando a ligação entre Q¹ e o carbono marcado por um asterisco é uma ligação dupla, Q¹ é O, S, NY¹ ou NNY²Y³; e

quando a ligação entre Q¹ e o carbono marcado por um asterisco é uma ligação simples, Q¹ é hidrogénio, ciano, nitro, O-Y², S-Y², NY¹Y² ou NY²NY³Y⁴; em que

Y^1 é hidrogénio, alquilo substituído, alquilo não substituído, cicloalquilo substituído, cicloalquilo não substituído, heteroalquilo substituído, heteroalquilo não substituído, arilo substituído, arilo não substituído, heteroarilo substituído, heteroarilo não substituído, $-C(=O)$ -alquilo substituído, $-C(=O)$ -alquilo não substituído, $-C(=O)O$ -alquilo substituído, $-C(=O)O$ -alquilo não substituído, ciano, nitro, hidroxilo ou $O-Y^2$;

Y^2 , Y^3 e Y^4 , são, cada, independentemente, hidrogénio, alquilo substituído, alquilo não substituído, heteroalquilo substituído, heteroalquilo não substituído, arilo substituído, arilo não substituído, heteroarilo substituído, heteroarilo não substituído;

Z é O , S ou NY^5 , em que Y^5 é hidrogénio, alquilo substituído, alquilo não substituído, heteroalquilo substituído, heteroalquilo não substituído, arilo substituído, arilo não substituído, heteroarilo substituído, heteroarilo não substituído;

Q^2 e Q^3 são, cada, independentemente hidrogénio, alquilo substituído, alquilo não substituído, heteroalquilo substituído, heteroalquilo não substituído, arilo substituído, arilo não substituído, heteroarilo substituído, heteroarilo não substituído;

X^1 é $-O-$, $-S-$ ou $-NR^c-$;

R^c é hidrogénio, alquilo C_{1-10} , ou alquilo C_{1-10} substituído, ou R^c e R^1 considerados em conjunto com o átomo de azoto podem formar um anel heterocíclico ou um anel heterocíclico substituído;

R^1 é hidrogénio, alquilo(C_1-C_{10}), alquilo(C_1-C_{10}) substituído, arilo C_{6-10} ou arilo C_{6-10} substituído, anel heterocíclico C_{5-9} ou anel heterocíclico C_{5-9} substituído;

cada R^2 é, independentemente, hidrogénio, -OH, alquilo(C_1-C_6), alquilo(C_1-C_6) substituído, alcoxilo(C_1-C_6), alcoxilo(C_1-C_6) substituído, -C(O)-alquilo(C_1-C_6) (alcanoílo), -C(O)-alquilo(C_1-C_6) substituído, -C(O)-arilo(C_6-C_{10}) (aroílo), -C(O)-arilo(C_6-C_{10}) substituído, -C(O)OH (carboxilo), -C(O)Oalquilo(C_1-C_6) (alcoxicarbonilo), -C(O)Oalquilo(C_1-C_6) substituído, -NR^aR^b, -C(O)NR^aR^b (carbamoílo), -O-C(O)NR^aR^b, -alcileno(C_1-C_6)-NR^aR^b, -alcileno(C_1-C_6)-C(O)NR^aR^b, halo, nitro ou ciano;

cada R^a e R^b é, independentemente, hidrogénio, alquilo(C_1-C_6), cicloalquilo(C_3-C_8), heteroalquilo(C_1-C_6), alcoxilo(C_1-C_6), haloalquilo(C_1-C_6), cicloalquil(C_3-C_8) alquilo(C_1-C_6), alcanoílo(C_1-C_6), hidroxialquilo(C_1-C_6), arilo, arilalquilo(C_1-C_6), Het, Het alquilo(C_1-C_6) ou alcoxicarbonilo(C_1-C_6);

em que os substituintes em quaisquer grupos alquilo, cicloalquilo, heteroalquilo, amino, alcoxilo, alcanoílo, arilo, heteroarilo ou heterocíclico são um ou mais (e. g., 1, 2, 3, 4, 5 ou 6) hidróxido, alquilo C_{1-6} , hidroxialcileno C_{1-6} , alcoxilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-6} , alcoxialcileno C_{1-6} , amino, ciano, halogéneo, heterociclo (tais como piperidinilo ou morfolinilo) ou arilo;

X^2 é uma ligação ou um grupo de ligação;

k é 0, 1, 2, 3 ou 4;

n é 0, 1, 2, 3 ou 4; e

R^3 é uma macromolécula compreendendo uma célula, vírus, vitamina, cofator, péptido, proteína, molécula de ácido nucleico, lípido, esfera ou partícula, tal como uma esfera de poliestireno, ou nanopartículas, ou um dendrímero;

ou um seu sal farmacêuticamente aceitável, incluindo os seus hidratos.

Em determinadas formas de realização não reivindicadas, os grupos X^2-R^3 podem formar um ligante a uma segunda porção de fórmula (IC), de modo a formar um dímero. Por exemplo, o ligante pode ser qualquer ligante como aqui descrito, tais como um arilo ou heteroarilo divalente, bis-arilamida, bis-heteroarilamida, bis-aril-hidrazida, bis-heteroaril-hidrazida ou semelhantes. Alternativamente, Q^1 pode formar um ligante a uma segunda porção de fórmula (IC), de modo a formar um dímero através de uma ligação dissulfureto. Ver, por exemplo, A Figura 28.

Nos casos onde os compostos são suficientemente básicos ou ácidos para formarem sais de ácido ou base, a utilização dos compostos como sais pode ser apropriada. São exemplos de sais aceitáveis os sais de adição de ácido orgânico formados com ácidos os quais formam um anião fisiológico aceitável, por exemplo, tosilato, metanossulfonato, acetato, citrato, malonato, tartarato, succinato, benzoato, ascorbato, α -cetoglutarato e α -glicerofosfato. Também podem ser formados sais inorgânicos adequados, incluindo sais de cloridrato, sulfato, nitrato, bicarbonato e carbonato.

Os sais aceitáveis podem ser obtidos utilizando processos correntes bem conhecidos na técnica, por exemplo, por reação de

um composto suficientemente básico, tal como uma amina, com um ácido adequado proporcionando um anião fisiologicamente aceitável. Também podem ser preparados sais de metais alcalinos (por exemplo, sódio, potássio ou lítio) ou metais alcalinoterrosos (por exemplo, cálcio) de ácidos carboxílicos.

Alquilo inclui grupos alquiloC₁₋₁₀ lineares ou ramificados, e. g., metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, isopropilo, isobutilo, 1-metilpropilo, 3-metilbutilo, hexilo e semelhantes.

Alquilo inferior inclui grupos alquiloC₁₋₆ lineares ou ramificados, e. g., metilo, etilo, propilo, 1-metiletilo, butilo, 1-metilpropilo, 2-metilpropilo, 1,1-dimetiletilo, pentilo, 1-metilbutilo, 2-metilbutilo, 3-metilbutilo, 1,1-dimetilpropilo, 1,2-dimetilpropilo, 2,2-dimetilpropilo e semelhantes.

O termo "alcileno" refere-se a uma cadeia de hidrocarboneto divalente linear ou ramificada (e. g., etileno: -CH₂-CH₂-).

CicloalquiloC₃₋₇ inclui grupos tais como, ciclopropilo, ciclopentilo, ciclo-hexilo, ciclo-heptilo, e semelhantes, e grupo cicloalquiloC₃₋₇ substituído em alquilo, de um modo preferido, grupo alquiloC₁₋₆ linear ou ramificado, tais como metilo, etilo, propilo, butilo ou pentilo e grupo cicloalquiloC₅₋₇, tais como ciclopentilo ou ciclo-hexilo e semelhantes.

Alcoxilo inferior inclui grupos alcoxiloC₁₋₆, tais como metoxilo, etoxilo ou propoxilo e semelhantes.

Alcanoílo inferior inclui grupos alcanoíloC₁₋₆, tais como formilo, acetilo, propanoílo, butanoílo, pentanoílo ou hexanoílo e semelhantes.

AroíloC₇₋₁₁, inclui grupos tais como benzoílo ou naftoílo;

Alcoxicarbonilo inferior inclui grupos alcoxicarboniloC₂₋₇, tais como metoxicarbonilo, etoxicarbonilo ou propoxicarbonilo e semelhantes.

Grupo alquilamino inferior significa grupo amino substituído com grupo alquiloC₁₋₆, tais como metilamino, etilamino, propilamino, butilamino e semelhantes.

Grupo di(alquilo inferior)amino significa grupo amino substituído pelo mesmo ou diferente e grupo alquiloC₁₋₆ (e. g., dimetilamino, dietilamino, etilmetilamino).

Grupo alquilcarbamoílo inferior significa grupo carbamoílo substituído com grupo alquiloC₁₋₆ (e. g., metilcarbamoílo, etilcarbamoílo, propilcarbamoílo, butilcarbamoílo).

Grupo di(alquilo inferior)carbamoílo significa grupo carbamoílo substituído pelo mesmo ou diferente e grupo alquiloC₁₋₆ (e. g., dimetilcarbamoílo, dietilcarbamoílo, etilmetilcarbamoílo).

Átomo de halogéneo significa átomo de halogéneo, tais como átomo de flúor, átomo de cloro, átomo de bromo ou átomo de iodo.

Arilo refere-se a um grupo ariloC₆₋₁₀ monocíclico ou cíclico fundido, tais como fenilo, indenilo ou naftilo e semelhantes.

Heterocíclico ou heterociclo refere-se a grupos heterocíclicos monocíclicos saturados, ou grupo heterocíclico monocíclico ou fundido insaturado, contendo, pelo menos, um heteroátomo, e. g., 0-3 átomos de azoto ($-NR^d-$, onde R^d é H, alquilo ou Y^2 , como aqui definido), 0-1 átomos de oxigénio ($-O-$) e 0-1 átomos de enxofre ($-S-$). Exemplos não limitativos de grupo heterocíclico monocíclico saturado incluem grupo heterocíclico saturado de 5 ou 6 membros, tais como tetra-hidrofuranilo, pirrolidinilo, morfolinilo, piperidilo, piperazinilo ou pirazolidinilo. Exemplos não limitativos de grupo heterocíclico monocíclico insaturado incluem grupo heterocíclico insaturado de 5 ou 6 membros, tais como furilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tiazolilo, tienilo, piridilo ou pirimidinilo. Exemplos não limitativos de grupos heterocíclicos fundidos insaturados incluem grupo heterocíclico bicíclico insaturado, tais como indolilo, isoindolilo, quinolilo, benztizolilo, cromanilo, benzofuranilo e semelhantes. Um grupo Het pode ser um grupo heterocíclico saturado ou um grupo heterocíclico insaturado, tal como um grupo heteroarilo.

R^c e R^1 , considerados em conjunto com o átomo de azoto ao qual estão conjugados, podem formar um anel heterocíclico. Exemplos não limitativos de anéis heterocíclicos incluem anéis heterocíclicos saturados de 5 ou 6 membros, tais como 1-pirrolidinilo, 4-morfolinilo, 1-piperidilo, 1-piperazinilo ou 1-pirazolidinilo, anéis heterocíclicos insaturados de 5 ou 6 membros, tal como 1-imidazolilo e semelhantes.

Os grupos alquilo, arilo heterocíclicos de R^1 podem ser opcionalmente substituídos com um ou mais substituintes, em que os substituintes são iguais ou diferentes e incluem alquilo inferior; cicloalquilo, hidroxilo; hidroxil-alcileno C_{1-6} , tais

como hidroximetilo, 2-hidroxiético ou 3-hidroxiético; alcóxilo inferior; alcóxilo_{C₁₋₆} alquilo_{C₁₋₆}, tais como 2-metoxietilo, 2-etoxietilo ou 3-metoxipropilo; amino; alquilamino; dialquilamino; ciano; nitro; acilo; carboxilo; alcóxicarbonilo inferior; halogéneo; mercapto; alquil_{C₁₋₆}tio, tais como, metiltio, etiltio, propiltio ou butiltio; alquiltio_{C₁₋₆} substituído, tais como metoxietiltio, metiltioetiltio, hidroxietiltio ou cloroetiltio; arilo; arilo substituído em C₆₋₁₀ monocíclico ou cíclico fundido, tais como 4-hidroxifenilo, 4-metoxifenilo, 4-fluorofenilo, 4-clorofenilo ou 3,4-diclorofenilo; heterocíclico insaturado de 5-6 membros, tais como furilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tiazolilo, tienilo, piridilo ou pirimidinilo; e heterocíclico bicíclico insaturado, tais como indolilo, isoindolilo, quinolilo, benzotiazolilo, cromanilo, benzofuranilo ou ftalimino. Em determinadas formas de realização, um ou mais dos grupos acima podem ser expressamente excluídos como um substituinte de diversos outros grupos das fórmulas.

Em algumas formas de realização não reivindicadas, o anel de cinco membros da fórmula é um anel de tiazole, e. g., onde Y da fórmula IA acima é S e Q² está ausente.

Os grupos alquilo, arilo, heterocíclico de R² podem ser opcionalmente substituídos com um ou mais substituintes, em que os substituintes são iguais ou diferentes e incluem hidroxilo; alcóxilo_{C₁₋₆}, tais como metóxilo, etóxilo ou propóxilo; carboxilo; alcóxicarbonilo_{C₂₋₇}, tais como metóxicarbonilo, etóxicarbonilo ou propóxicarbonilo) e halogéneo.

Os grupos alquilo, arilo, heterocíclico de R^c podem ser opcionalmente substituído com um ou mais substituintes, em que

os substituintes são iguais ou diferentes e incluem cicloalquiloC₃₋₆; hidroxilo; alcoxiloC₁₋₆; amino; ciano; arilo; arilo substituído, tais como 4-hidroxifenilo, 4-metoxifenilo, 4-clorofenilo ou 3,4-diclorofenilo; nitro e halogéneo.

O anel heterocíclico formado juntamente com R^c e R¹ e o átomo de azoto ao qual estão conjugados pode ser opcionalmente substituído com um ou mais substituintes, em que os substituintes são iguais ou diferentes e incluem alquiloC₁₋₆; hidroxi-alcilenoC₁₋₆; alcoxilenoC₁₋₆; alcilenoC₁₋₆; hidroxilo; alcoxiloC₁₋₆; e ciano.

Em algumas formas de realização, quando Q¹ é O-Y², Y² não é hidrogénio.

Um valor específico para x é N.

Outro valor específico para x é CH.

Evidentemente, apenas uma das duas ligações indicadas por linhas a tracejado pode estar presente numa molécula de um composto da fórmula indicado. Numa forma de realização não reivindicada, a ligação entre Y e o carbono marcado por um asterisco é uma ligação dupla. Noutra forma de realização não reivindicada, a ligação entre Q¹ e o carbono marcado por um asterisco é uma ligação dupla.

Um valor específico para Q¹ é O.

Outro valor específico para Q¹ é S.

Outro valor específico para Q¹ é NY¹, por exemplo, =NH.

Outro valor específico para Q^1 é NNY^2Y^3 .

Numa forma de realização não reivindicada, a ligação entre Q^1 e o carbono marcado por um asterisco é uma ligação simples.

Um valor específico para Q^1 é hidrogénio.

Outro valor específico para Q^1 é NH_2 .

Outro valor específico para Q^1 é $O-Y^2$.

Um valor específico para Y^1 é hidrogénio.

Outro valor específico para Y^1 é alquilo, por exemplo, alquilo(C_1-C_6), tal como metilo.

Outro valor específico para Y^1 é arilo, tal como fenilo.

Um valor específico para cada de Y^2 , Y^3 e Y^4 é hidrogénio.

Outro valor específico para cada de Y^2 , Y^3 e Y^4 (independentemente) é alquilo, por exemplo, alquilo(C_1-C_6), tal como metilo.

Outro valor específico para cada de Y^2 , Y^3 e Y^4 (independentemente) é arilo, tal como fenilo.

Um valor específico para Z é O .

Outro valor específico para Z é S .

Outro valor específico para Z é NY^5 , em que Y^5 é hidrogénio, metilo ou fenilo.

Um valor específico para Q^2 é hidrogénio.

Outro valor específico para Q^2 é metilo ou fenilo.

Um valor específico para Q^3 é hidrogénio.

Outro valor específico para Q^3 é metilo ou fenilo.

Um valor específico para X^1 é um átomo de enxofre, um átomo de oxigénio ou $-NR^c-$.

Outro X^1 específico é um átomo de enxofre.

Outro X^1 específico é um átomo de oxigénio.

Outro X^1 específico é $-NR^c-$.

Outro X^1 específico é $-NH-$.

Um valor específico para Y é N.

Outro valor específico para Y é S.

Um valor específico para R^c é hidrogénio, alquilo C_{1-4} ou alquilo C_{1-4} substituído.

Um valor específico para R^1 e R^c , considerados em conjunto, é quando formam um anel heterocíclico ou um anel heterocíclico substituído.

Outro valor específico para R^1 e R^c , considerados em conjunto, é anel morfolino, piperidino, pirrolidino ou piperazino, substituído ou não substituído

Um valor específico para R^1 é hidrogénio, alquilo C_{1-4} ou alquilo C_{1-4} substituído.

Outro R^1 específico é 2-hidroxi-etilo, 3-hidroxi-propilo, 4-hidroxi-butilo, 2-amino-etilo, 3-amino-propilo, 4-amino-butilo, metoxi-metilo, 2-metoxi-etilo, 3-metoxi-propilo, etoxi-metilo, 2-etoxi-etilo, metiltio-metilo, 2-metiltio-etilo, 3-metiltio-propilo, 2-fluoro-etilo, 3-fluoro-propilo, 2,2,2-trifluoro-etilo, ciano-metilo, 2-ciano-etilo, 3-ciano-propilo, metoxi-carbonil-metilo, 2-metoxi-carbonil-etilo, 3-metoxi-carbonil-propilo, benzilo, fenilo, 4-piridil-metilo, ciclo-hexil-metilo, 2-tienil-metilo, 4-metoxifenil-metilo, 4-hidroxi-fenil-metilo, 4-fluoro-fenil-metilo ou 4-cloro-fenil-metilo.

Outro R^1 específico é hidrogénio, CH_3- , CH_3-CH_2- , $CH_3CH_2CH_2-$, hidroxi-alcileno C_{1-4} ou alcoxi C_{1-4} alcileno C_{1-4} .

Outro valor específico para R^1 é hidrogénio, CH_3- , CH_3-CH_2- , $CH_3-O-CH_2CH_2-$ ou $CH_3-CH_2-O-CH_2CH_2-$.

Um valor específico para R^2 é hidrogénio, halogéneo ou alquilo C_{1-4} .

Outro valor específico para R^2 é hidrogénio, cloro, bromo, CH_3- ou CH_3-CH_2- .

Os substituintes específicos para substituição nos grupos alquilo, arilo ou heterocíclicos são hidróxido, alquilo C_{1-6} ,

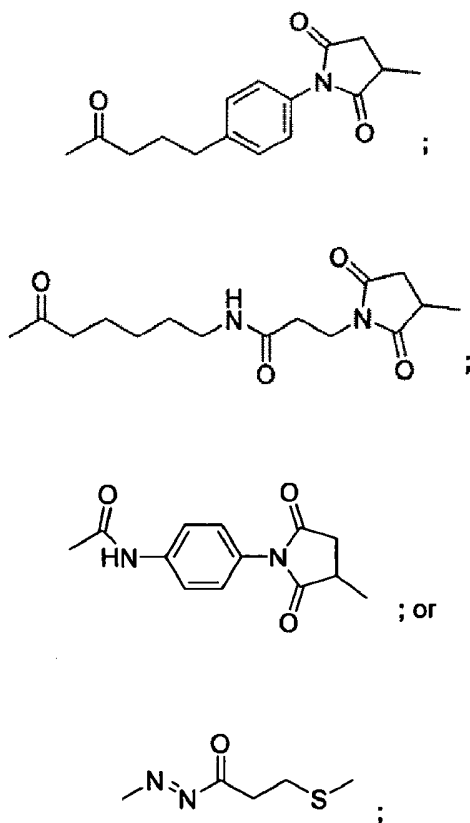
hidroxi-alcilenoC₁₋₆, alcoxiloC₁₋₆, alcoxiC₁₋₆alcilenoC₁₋₆, cicloalquiloC₃₋₆, amino, ciano, halogéneo ou arilo.

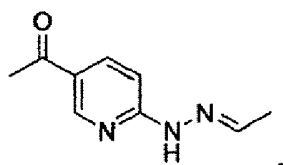
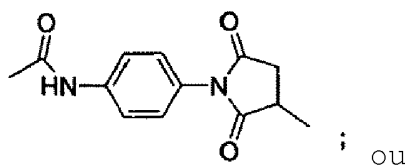
Um valor específico para X² é uma ligação ou uma cadeia tendo até cerca de 24 átomos; em que os átomos são selecionados do grupo consistindo de carbono, azoto, enxofre, oxigénio não-peróxido e fósforo.

Outro valor específico para X² é uma ligação ou uma cadeia tendo de cerca 4 a cerca de 12 átomos.

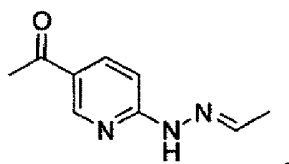
Outro valor específico para X² é uma ligação ou uma cadeia tendo de cerca 6 a cerca de 9 átomos.

Outro valor específico para X² é





Outro valor específico para X^2 é



Em determinadas formas de realização não reivindicadas, o ligante ou o grupo X^2 não é um ligante divulgado na Publicação de Pedido PCT N° WO 2007/024707. Além disso, em algumas formas de realização não reivindicadas, R^3 não é um auxiliar divulgado na Publicação de Pedido PCT N° WO 2007/024707.

Uma macromolécula específica é um aminoácido, um hidrato de carbono, um péptido, uma proteína, um antigénio, um ácido nucleico, um lípido, um dendrímero, uma substância corporal ou uma célula, tal como um micróbio.

Um péptido específico tem de 2 a cerca de 20 resíduos de aminoácidos.

Outro péptido específico, tem de 10 a cerca de 20 resíduos de aminoácidos.

Uma macromolécula específica inclui um hidrato de carbono.

Um ácido nucleico específico é ADN, ARN ou ANP.

Uma macromolécula específica é uma célula, lípido, vitamina, lípido ou cofator.

Um antigénio específico é um micróbio.

Um micróbio específico é um vírus, bactérias ou fungos.

Outro micróbio específico é um vírus ou uma bactéria.

As bactérias específicas são *Bacillus anthracis*, *Listeria monocytogenes*, *Francisella tularensis*, *Salmonella* ou *Staphylococcus*.

As *Salmonella* específicas são *S. typhimurium* ou *S. enteritidis*.

O *Staphylococcus* específico inclui *S. aureus*.

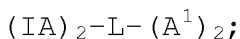
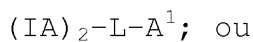
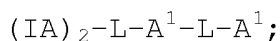
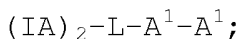
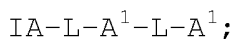
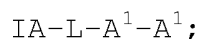
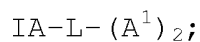
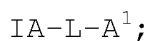
Os vírus específicos são vírus de ARN, incluindo RSV e vírus de influenza, um produto do vírus de ARN, ou um vírus de ADN, incluindo herpesvírus.

Um vírus de ADN específico é o vírus da hepatite B.

Noutras formas de realização não reivindicadas, a macromolécula não é um aminoácido, um hidrato de carbono, um péptido, um antigénio, tal como um micróbio, por exemplo, um vírus (por exemplo, vírus de ARN, e. g., SIV, vírus da hepatite C ou um coronavírus, um produto do vírus de ARN, ou um vírus de ADN, tal como vírus da Hepatite B, fungos ou bactérias, tais como *Bacillus anthracis* (antraz), *Listeria monocytogenes*, *Francisella tularensis* ou *Salmonella* (e. g., *typhimurium* ou *enteritidis*), um ácido nucleico, tais como ADN, ARN, ANP ou uma substância corporal, tais como uma célula ou lípido.

Um valor específico para k é 0. Outro valor específico para k é 1. Outro valor específico para k é 2. Em algumas formas de realização, k não é 1.

Os compostos específicos têm a fórmula geral



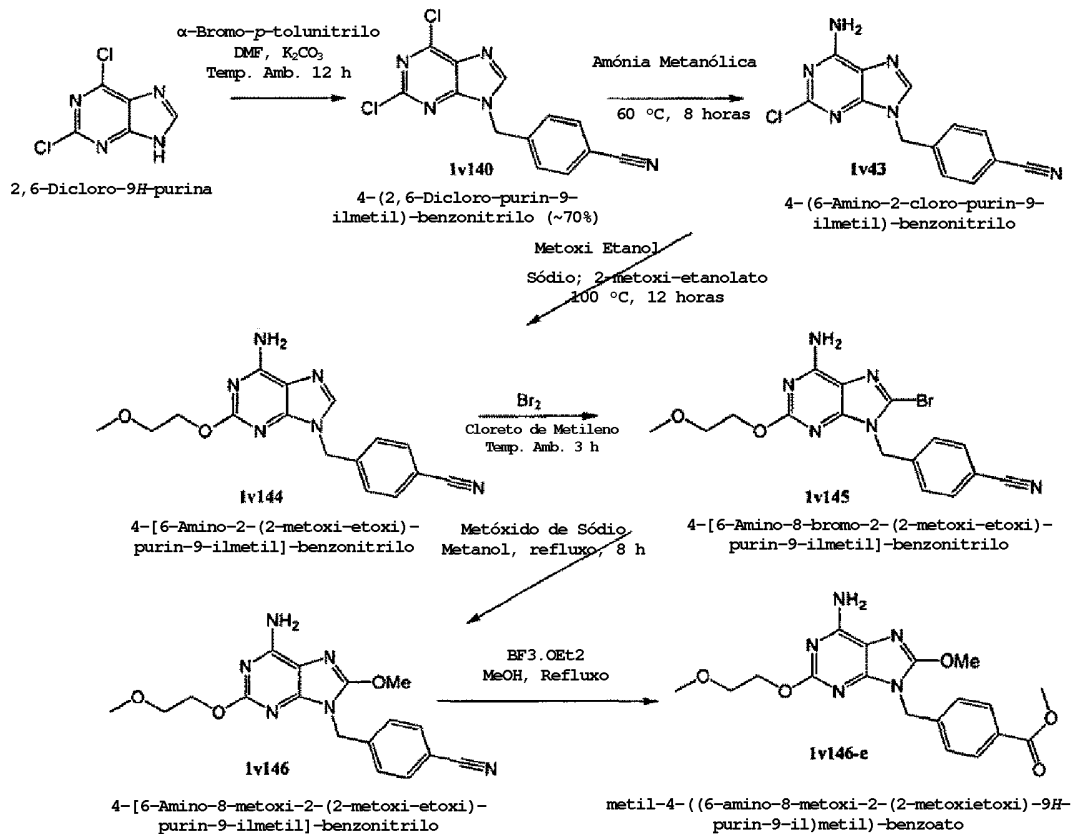
em que IA é como aqui divulgado; L está ausente ou é um grupo de ligação; e cada grupo A¹ representa, independentemente, uma macromolécula.

A invenção inclui composições do composto da invenção, opcionalmente em combinação com outros agentes ativos, e. g., ribavirina, mizoribina e micofenolato mofetilo. Outros exemplos não limitativos são conhecidos e são divulgados no pedido de patente publicado U.S. Nº 20050004144.

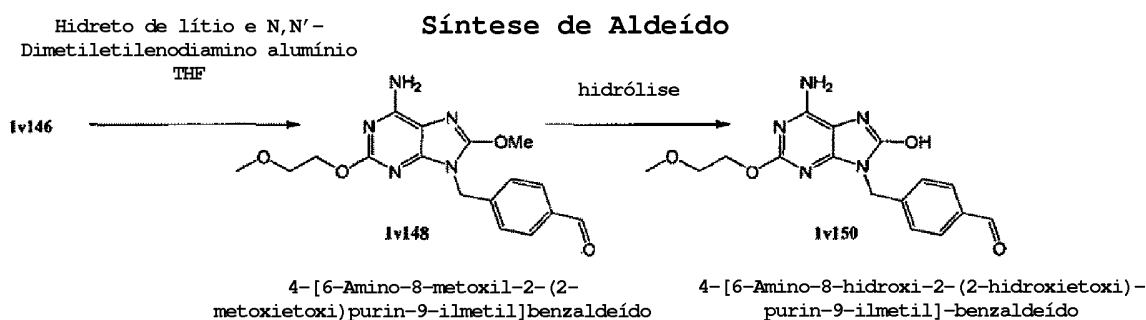
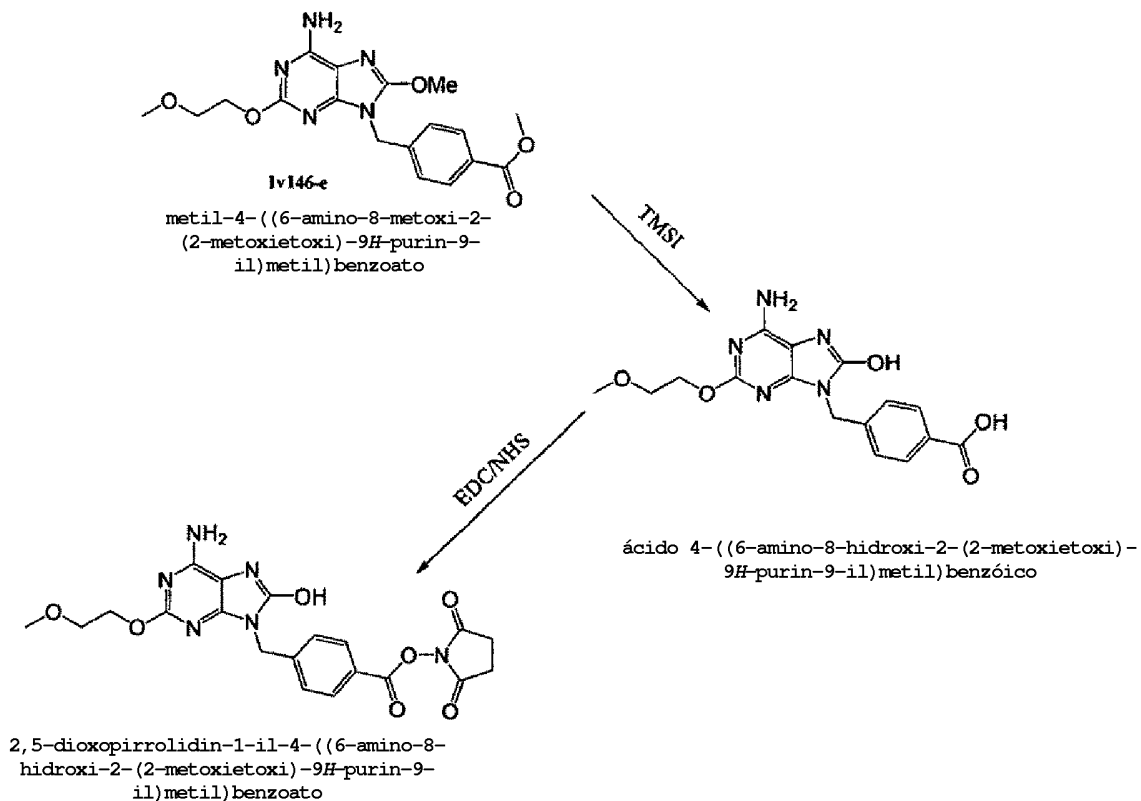
Os processos para a preparação do composto da invenção e para a preparação de intermediários úteis para a preparação do composto da invenção são proporcionados como formas de realização adicionais da invenção. Os intermediários úteis para a preparação de compostos da invenção também são proporcionados como formas de realização adicionais da invenção.

Por exemplo, o composto (conjugado) da invenção pode ser preparado utilizando métodos sintéticos padrão conhecidos na técnica. Uma síntese geral de éster e aldeído é ilustrada abaixo. UC-1V150 (não reivindicado) foi sintetizado em sete passos a partir de 2,6-dicloropurina. O grupo aldeído livre na porção benzilo de UC-1V150 possibilitou a ligação do agonista a muitas entidades químicas auxiliares diferentes, incluindo proteínas, oligonucleótidos, moléculas aromáticas, lípidos, vírus e células, através de uma molécula ligante que continha um grupo hidrazina ou amino.

Síntese Geral



Síntese de Éster NHS



Química de UC-1V150. A síntese de UC-1V150 (não reivindicado) e a preparação dos compostos 2-8 indicados (não reivindicados) foi como se segue. **Composto 2:** 4-(2,6-dicloropurin-9-ilmetil)benzonitrilo. 2,6-dicloro-9H-purina (1, 16 mmol) foi dissolvida em DMF (50 mL) com carbonato

de potássio (50 mmol) adicionado e a mistura foi agitada, à temperatura ambiente, durante 16 horas, após adição de α -Bromo-*p*-tolunitrilo (22 mmol). Após filtração para remover sais inorgânicos insolúveis, o filtrado foi vertido em água (1500 mL) e extraído com acetato de etilo (2 x 400 mL), seco sobre sulfato de magnésio e evaporado, para produzir um resíduo o qual foi submetido a cromatografia de sílica gel flash, utilizando acetato de etilo/acetona/hexanos a 1:2:10. Rendimento 3,33 g (69%). UV, RMN e MS foram consistentes com a atribuição de estrutura. **Composto 3:** 4-(6-amino-2-cloropurin-9-ilmetilbenzonitrilo. O **composto 2** (1,9 g) foi colocado num recipiente reacional de aço e foi adicionada amônia metanólica (80 mL, 7 N). O recipiente vedado foi aquecido a 60 °C, durante 12 horas, arrefecido em gelo e o produto sólido removido por filtração. Rendimento 1,09 g. UV, RMN e MS foram consistentes com a estrutura atribuída. **Composto 4:** 4-[6-amino-2-(2-metoxietoxi)purin-9-ilmetil]benzonitrilo. O sal de sódio de 2-metoxietanol foi, em primeiro lugar, produzido por dissolução do metal sódio (81 mg) em 2-metoxietanol (30 mL) com calor e, depois, o **composto 3** (1,0 g) dissolvido em metoxietanol foi adicionado (300 mL, com calor). A mistura reacional foi aquecida, durante 8 horas, à temperatura de banho de 115 °C, concentrada *in vacuo* até próximo da secura e o resíduo particionado entre acetato de etilo e água. A cromatografia de sílica gel flash da camada orgânica utilizando metanol a 5% em diclorometano deu 763 mg de produto. A RMN foi consistente com a atribuição de estrutura. **Composto 5:** 4-[6-amino-8-bromo-2-(2-metoxietoxi)purin-9-ilmetil]benzonitrilo. O **composto 4** (700 mg) foi dissolvido em diclorometano (400 mL) e o bromo (7 mL) foi adicionado gota a gota. A mistura foi agitada, de um dia para o outro, à temperatura ambiente e extraída, em primeiro lugar, com solução de tiosulfato de sódio aquoso (2 L de 0,1 M), depois,

com bicarbonato de sódio aquoso (500 mL, saturado). O resíduo da camada orgânica foi submetido a cromatografia em sílica gel utilizando metanol a 3% em diclorometano, para produzir 460 mg do produto bromo. RMN, W e MS foram consistentes com a atribuição de estrutura. **Composto 6:** 4-[6-amino-8-metoxil-2-(2-metoxietoxi)purin-9-ilmetil] benzonitrilo. O metóxido de sódio foi produzido por reação do metal sódio (81 mg) em metanol seco (30 mL) e combinado com uma solução de **composto 5** (700 mg) dissolvido em dimetoxietano seco e a temperatura elevada para 100 °C. Após reação de um dia para o outro, a mistura foi concentrada *in vacuo* e o resíduo foi submetido a cromatografia em sílica utilizando metanol a 5% em diclorometano. Rendimento 120 mg. A RMN foi consistente com a atribuição de estrutura. **Composto 7:** 4-[6-amino-8-metoxil-2-(2-metoxietoxi)purin-9-ilmetil]benzaldeído. O **composto 6** (100 mg) foi dissolvido em THF seco (3 mL) e arrefecido para 0 °C, sob árgon. O agente redutor, hidreto de lítio e N,N'-(dimetiletilenodiamino)alumínio, utilizado para converter o nitrilo na função aldeído. Foi preparada uma solução a 0,5 M em THF seco e 0,72 mL desta foram adicionados ao frasco reacional. A mistura foi agitada, a 0-5 °C, durante 1 hora, neutralizada por adição de HCl a 3 M, extraída com acetato de etilo seguido de diclorometano e, depois, concentrada *in vacuo*, para produzir 85 mg. A RMN foi consistente com a atribuição de estrutura. **Composto 8:** 4-[6-amino-8-hidroxi-2-(2-metoxietoxi)purin-9-ilmetil]benzaldeído (UC-1V150). O **composto 7** (800 mg) foi combinado com iodeto de sódio (504 mg) e acetonitrilo (40 mL) e clorotrimetilsilano (0,5 mL) foram lentamente adicionados. A mistura foi aquecida a 70 °C, durante 3,5 horas, arrefecida e filtrada. O produto sólido foi lavado com água, depois, éter, para produzir 406 mg. RMN, UV e MS foram consistentes com a atribuição de estrutura.

São aqui incluídos exemplos adicionais para a preparação de compostos específicos.

Como descrito nos presentes exemplos, foi preparado um agonista de TLR7 solúvel, capaz de se ligar covalentemente a aminas primárias sob condições fisiológicas. A atividade *in vitro* de vários compostos e complexos de antigénio-adjuvante foi, depois, testada utilizando células dendríticas (DC) murinas derivadas de medula óssea ou derivadas de células mononucleares de sangue periférico para caracterizar a maturação de DC e secreção de citocina (e. g., IL-12, IL-6, TGF-beta e IFN-gama). Murganhos C57/B1 singénicos imunocompetentes foram vacinados profilaticamente com complexos de antigénio-agonista de TLR7 intradérmicos e provocados com células tumorais de melanoma B16 expressando o transgene cOVA.

A concentração eficaz (EC_{50}) para cada composto geralmente seguia uma distribuição em forma de sino, com doses mais elevadas sendo inibitórias. A estimulação máxima ocorreu entre 10 e 1000 nM. As moléculas de adjuvante ligadas covalentemente a agonista de TLR retiveram atividade mas com valores de EC_{50} geralmente inferiores. A ligação de UC-1V199 a ovalbumina de galinha quase duplicou a sobrevivência mediana de 22 para 35 dias após provocação de tumor subcutâneo, em comparação com ovalbumina de galinha isoladamente.

Deste modo, a ligação covalente de um agonista de TLR7 a um antigénio tumoral estimulou a produção de citocina de DC e protegeu os murganhos do desafio tumoral. A utilização de um agonista de TLR7 adequado, o qual retém as suas propriedades imunoestimulantes sob condições fisiológicas após ligação a uma macromolécula, tal como um antigénio, pode ser útil no

desenvolvimento de uma vacina *in situ* na terapia de tumor sólido.

Mostrou-se que diversas purinas, piridinas e imidazoquinolinas, com pesos moleculares de 200-400 kD, ativam TLR7 e os compostos que eram ligandos de TLR7 específicos foram 100-1000 vezes mais poderosos do que o imiquimod, numa base molar (Lee *et al.*, *infra*). Devido a estes agonistas de TLR serem estruturalmente muito semelhantes ao componente normal dos nucleótidos, é muito improvável que induzam reação imunitária hapténica após administração repetida.

Um *pharmacore* de TLR7 baseado em adenina pode necessitar de ser unido covalentemente a um "grupo auxiliar" (macromolécula) para promover a absorção para dentro dos endossomas de células dendríticas, onde o TLR7 é expresso, e para reter o agonista de TLR. Consequentemente, o agonista de TLR7, UC-1V150, foi preparado e ligado por meio da sua função aldeído e um ligante a grupos amino livre em diversas proteínas, incluindo albumina de murganho (MSA) (Figura 3). Os conjugados foram 100 vezes mais potentes *in vitro* e *in vivo* do que o análogo de adenina não ligado. Além disso, a administração intrapulmonar do conjugado de albumina (UC-1V150/MSA) a murganhos induziu produção local de citocina no fluido de lavagem alveolar brônquico (BALF), sem libertação sistémica de citocina. Em marcado contraste, a distribuição do fármaco não unido às vias respiratórias rapidamente provocou a libertação de citocina na corrente sanguínea.

Numa forma de realização, um agonista de TLR7 maximiza a produção de citocinas estimulantes de Th1 (interferões e IL-12) em comparação com TNF α e IL-1. O TLR7 está localizado nas

superfícies internas das vesículas endossômicas que são constantemente sintetizadas e sofrem maturação em DC. Por exemplo, para prevenir a asma, é preferido um agonista de TLR estável e potente que transite para os endossomas precoces de células dendríticas e induza, principalmente, interferões do Tipo I. Um agonista de TLR foi conjugado covalentemente a um grupo auxiliar de fosfolípido com a expectativa de que o conjugado, UC-1V199/L (Figura 6), se inserisse rapidamente e de um modo estável dentro das membranas lipídicas das células, incluindo vesículas endossômicas. Notavelmente, apenas 30 picomolar de UC-1V199/L induziram síntese de citocina em células mononucleares de murganho derivadas de medula óssea. As Figuras 7-8 mostram dados para a síntese de IL-12.

Os ligandos de TLR7 que sejam purinas ou imidazoquinolinas têm uma propriedade peculiar, *i. e.*, uma curva de dose-resposta bifásica. A concentrações elevadas, o fármaco não induz a síntese de citocina. O efeito bifásico é observado em células dendríticas altamente purificadas e parece ser autónomo celular. Contudo, a potência notável de UC-1V199/L possibilitou o reexame do fenómeno, utilizando concentrações de fármaco farmacologicamente aceitáveis (Figura 9). A produção máxima de citocina foi observada com UC-1V199/L a 10 nM, enquanto concentrações mais elevadas induziram progressivamente menos libertação de IL-12 (e TNF).

Concentrações elevadas e prolongadas de agonistas de TLR7 são conhecidas por induzirem refratariedade a reestimulação de TLR que pode durar 24 horas ou mais. Esse complexo sistema de regulação é aparentemente parte de um mecanismo contra falhas que impede as células e tecidos de autodestruição durante respostas inflamatórias. Deste modo, foi de interesse determinar

se concentrações de UC-1V199/L que não induziram síntese significativa de citocina poderiam, não obstante, induzir "tolerância de TLR". De facto, quando células mononucleares derivadas de medula óssea foram expostas a uma concentração de não-ativação de UC-1V199/L (1 µM) e, depois, reestimuladas 24 horas mais tarde com o mesmo composto, com UC-1V150 (não reivindicado) ou com pam3Cys (P3C, um ativador de TLR2; não reivindicado), exibiram uma resposta de citocina marcadamente diminuída. Em contraste, as células tratadas com UC-1V199/L retiveram responsividade aos ligandos de TLR3 e TLR4, os quais passam pela via de TRIF (resultados não mostrados). Experiências preliminares indicaram que a não responsividade também foi induzida *in vivo*. Deste modo, a administração diária de UC-1V199/L, e fármacos relacionados, pode suprimir a inflamação induzida por estímulos dependentes de MyD88, sem os efeitos secundários sistémicos associados a ativação de TLR.

Numa forma de realização, os conjugados da invenção podem ser úteis para prevenção, inibição ou tratamento da asma. A asma é caracterizada por episódios de constricção reversível intermitente das vias respiratórias, hiperplasia de músculo liso brônquico e inflamação crónica. A doença atópica predispõe para a asma mas até metade dos doentes afetados são não atópicos. Outros fatores de risco ambientais para a asma incluem fumo do tabaco e poluentes atmosféricos. Além disso, os recrudescimentos da doença em doentes asmáticos afetados podem ser provocados não apenas por alergénios mas também por irritantes das vias respiratórias, alterações de temperatura e infeções.

O desenvolvimento inicial de uma resposta alérgica é parcialmente regulado por um equilíbrio entre os linfócitos Th1 e Th2 e suas respetivas citocinas, especialmente os interferões

e IL-4. A vacinação de animais com um alergénio, em conjunto com um agonista de TLR7 ou TLR9, de um modo preferido, expande células de memória Th1 específicas de alergénio. Consequentemente, a imunização subsequente com antigénio, em conjunto com um adjuvante mais orientado para Th2, não deduz facilmente uma resposta de IgE. Os murganhos que foram vacinados com antigénio e agonistas de TLR7 ou TLR9 eram resistentes a asma experimental.

É necessária uma abordagem diferente para o tratamento da asma com agonistas de TLR *versus* a prevenção da asma. Em doentes afetados, os tecidos das vias respiratórias e pulmonares estão já infiltrados com uma população diversa de células inflamatórias, incluindo muitos subconjuntos de linfócitos, macrófagos, células dendríticas, mastócitos, eosinófilos e neutrófilos. Nesta situação, os agonistas de TLR podem potencialmente exacerbar a doença, por aumento da libertação de mediadores inflamatórios, tais como TNF alfa e IL-1. De facto, a capacidade de os diversos agentes microbianos ativarem os TLR pode explicar porque provocam ataques asmáticos.

Um agonista de TLR para a prevenção da asma, de um modo preferido, está confinado aos pulmões mas também maximiza a produção de citocinas de estimulação de Th1 (interferões e IL-12), em comparação com TNF alfa e IL-1. TLR7 e TLR9 estão localizados nas superfícies internas das vesículas endossómicas que são constantemente sintetizadas e sofrem maturação nas células dendríticas. Os oligonucleótidos de ativação de TLR9 que são oligonucleótidos de fosfodiéster agregados permanecem por mais tempo em vesículas endossómicas precoces e, por conseguinte, induzem mais interferões de tipo I do que oligonucleótidos de fosforotioato não agregados, os quais

avançam para vesículas maduras. Os resultados implicam que a organização espacial do agonista de TLR governa o seu tráfego e o seu padrão de síntese de citocina induzida. Para prevenir a asma, é preferido um agonista de TLR estável, potente e caracterizado molecularmente que transite para os endossomas precoces de células dendríticas e induza, principalmente, interferões do Tipo I.

Para estudar o efeito do conjugado da invenção na asma alérgica, a inflamação das vias respiratórias é induzida por sensibilização de murganhos, por meio de injeção subcutânea de 20 µg de ovalbumina absorvida com 500 µg de alúmen por murganho em solução salina, no dia 0 e dia 7. Nos dias 16 e 21, os murganhos são desafiados, i.n., com 5 µg de ovalbumina por murganho. Os conjugados são administrados, i.n., p.o. ou i.v., em diferentes intervalos de tempo, antes da primeira provocação de ovalbumina no dia 16. Vinte e quatro horas após o último desafio (dia 22), a responsividade das vias respiratórias é medida, os murganhos são sacrificados e recolhidas amostras de células BALF, pulmão e baço. Os murganhos não tratados e os murganhos sensibilizados com ovalbumina/alúmen servem como controlos. O número total de células em BALF é contado e corado com Wright-Giemsa, para determinar o número de eosinófilos, linfócitos, neutrófilos e mastócitos. Os níveis de citocina no BALF são determinados por ensaios de Luminex. A responsividade das vias respiratórias a metacolina é avaliada 24 horas após o último desafio, utilizando um pletismógrafo de câmara única, de corpo total. O Penh, um valor adimensional que se correlaciona bem com a resistência pulmonar, medida por pletismografia convencional de duas câmaras em murganhos ventilados, é utilizado para monitorizar a responsividade das vias respiratórias.

O composto desta invenção é administrado numa quantidade terapêuticamente eficaz a um indivíduo a necessitar de tratamento. A administração da composição da invenção pode ser por meio de qualquer via de administração adequada, particularmente parentericamente, por exemplo, intravenosamente, intra-arterialmente, intraperitonealmente, intratecalmente, intraventricularmente, intrauretralmente, intraesternalmente, intracranianamente, intramuscularmente ou subcutaneamente. Essa administração pode ser como uma única injeção de bólus, múltiplas injeções ou como uma infusão de curta ou longa duração. Também podem ser empregues dispositivos implantáveis (e. g., bombas de infusão implantáveis) para a distribuição parentérica periódica ao longo do tempo de dosagens equivalentes ou variáveis da formulação particular. Para essa administração parentérica, o composto é, de um modo preferido, formulado como uma solução estéril em água ou outro solvente ou mistura de solventes adequados. A solução pode conter outras substâncias, tais como sais, açúcares (particularmente glucose ou manitol), para preparar a solução isotónica com sangue, agentes de tamponização, tais como os ácidos acético, cítrico e/ou fosfórico e seus sais de sódio e conservantes.

O composto da invenção pode ser formulado como composições farmacêuticas e administrado a um hospedeiro de mamífero, tal como um doente humano, numa variedade de formas adaptadas à via de administração escolhida, i. e., oralmente ou parentericamente, pelas vias intravenosa, intramuscular, tópica ou subcutânea.

Deste modo, o presente composto pode ser administrado sistemicamente, e. g., oralmente, em combinação com um transportador farmacêuticamente aceitável, tal como um diluente

inerte ou um veículo comestível assimilável. Pode ser encerrado em cápsulas de gelatina de revestimento duro ou mole, pode ser prensado em comprimidos ou pode ser incorporado diretamente com o alimento da dieta do doente. Para administração terapêutica oral, o composto ativo pode ser combinado com um ou mais excipientes e utilizado na forma de comprimidos ingeríveis, comprimidos bucais, trociscos, cápsulas, elixires, suspensões, xaropes, pastilhas e semelhantes. Essas composições e preparações devem conter, pelo menos, 0,1% de composto ativo. A percentagem das composições e preparações pode, evidentemente, ser variada e pode, de um modo conveniente, ser entre cerca de 2 a cerca de 60% do peso de uma dada forma de dosagem unitária. A quantidade de composto ativo nessas composições terapêuticamente úteis é de tal modo que será obtido um nível de dosagem eficaz.

Os comprimidos, trociscos, pílulas, cápsulas e semelhantes também podem conter o seguinte: aglutinantes, tais como goma de tragacanto, acácia, amido de milho ou gelatina; excipientes, tal como fosfato dicálcio; um agente desintegrante, tais como amido de milho, amido de batata, ácido algínico e semelhantes; um lubrificante, tal como estearato de magnésio; e um agente adoçante, tais como sacarose, frutose, lactose ou aspartame ou um agente aromatizante, tais como hortelã-pimenta, óleo de gaultéria ou pode ser adicionado aromatizante de cereja. Quando a forma de dosagem unitária é uma cápsula, pode conter, além de materiais do tipo acima, um veículo líquido, tais como um óleo vegetal ou um polietilenoglicol. Diversos outros materiais podem estar presentes como revestimentos ou para, de outro modo, modificar a forma física da forma de dosagem unitária sólida. Por exemplo, comprimidos, pílulas ou cápsulas podem ser revestidos com gelatina, cera, goma-laca ou açúcar e semelhantes. Um xarope ou elixir pode conter o composto ativo,

sacarose ou frutose como um agente adoçante, metil e propilparabenos como conservantes, um corante e aromatizante, tal como aromatizante de cereja ou laranja. Evidentemente, qualquer material utilizado na preparação de qualquer forma de dosagem unitária deve ser farmacologicamente aceitável e substancialmente não tóxico nas quantidades empregues. Além disso, o composto ativo pode ser incorporado em preparações e dispositivos de libertação prolongada.

O composto ativo também pode ser administrado intravenosamente ou intraperitonealmente por infusão ou injeção. As soluções do composto ativo ou seus sais podem ser preparadas em água, opcionalmente misturada com um tensioativo não tóxico. As dispersões também podem ser preparadas em glicerol, polietilenoglicóis líquidos, triacetina e suas misturas e em óleos. Em condições normais de armazenamento e utilização, estas preparações contêm um conservante para prevenir o crescimento de microrganismos.

As formas de dosagem farmacêuticas adequadas para injeção ou infusão podem incluir soluções ou dispersões aquosas estéreis ou pós estéreis compreendendo o ingrediente ativo, os quais estão adaptados para a preparação extemporânea de soluções ou dispersões injetáveis ou infusíveis estéreis, opcionalmente encapsuladas em lipossomas. Em todos os casos, a derradeira forma de dosagem deve ser estéril, fluida e estável sob as condições de fabrico e armazenamento. O veículo ou transportador líquido pode ser um solvente ou meio de dispersão líquido compreendendo, por exemplo, água, etanol, um poliol (por exemplo, glicerol, propilenoglicol, polietilenoglicóis líquidos e semelhantes), óleos vegetais, ésteres de glicerilo não tóxicos e suas misturas adequadas. A fluidez apropriada pode ser

mantida, por exemplo, pela formação de lipossomas, pela manutenção do tamanho de partícula requerido, no caso de dispersões, ou pela utilização de tensioativos. A prevenção da ação de microrganismos pode ser conduzida por diversos agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal e semelhantes. Em muitos casos, será preferido incluir agentes isotônicos, por exemplo, açúcares, tampões ou cloreto de sódio. A absorção prolongada das composições injetáveis pode ser conduzida pela utilização nas composições de agentes retardando a absorção, por exemplo, monoestearato de alumínio e gelatina.

As soluções injetáveis estéreis são preparadas por incorporação do composto ativo, na quantidade requerida, no solvente apropriado, com vários outros ingredientes enumerados acima, como requerido, seguido de esterilização por filtro. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injetáveis estéreis, os métodos de preparação preferidos são secagem a vácuo e as técnicas de secagem por congelação, as quais produzem um pó do ingrediente ativo mais qualquer ingrediente desejado adicional presente nas soluções anteriormente filtradas estéreis.

Para administração tópica, o presente composto pode ser aplicado na forma pura, *i. e.*, quando são líquidos. Contudo, será geralmente desejável administrá-los na pele como composições ou formulações, em combinação com um veículo dermatologicamente aceitável, o qual pode ser um sólido ou um líquido.

Veículos sólidos úteis incluem sólidos finamente divididos, tais como talco, argila, celulose microcristalina, sílica,

alumina e semelhantes. Veículos líquidos úteis incluem água, álcoois ou glicóis ou misturas de água-álcool/glicol, nos quais os presentes compostos podem ser dissolvidos ou dispersos a níveis eficazes, opcionalmente com a ajuda de tensoativos não tóxicos. Adjuvantes, tal como fragrâncias e agentes antimicrobianos adicionais, podem ser adicionados para otimizar as propriedades para uma dada utilização. As composições líquidas resultantes podem ser aplicadas a partir de blocos absorventes, utilizadas para impregnar ligaduras e outros pensos, ou atomizadas na área afetada utilizando atomizadores do tipo bomba ou aerossol.

Espessantes, tais como polímeros sintéticos, ácidos gordos, sais e ésteres de ácidos gordos, álcoois gordos, celuloses modificadas ou materiais minerais modificados também podem ser empregues com veículos líquidos para formar pastas, géis, pomadas, sabões e semelhantes barráveis, para aplicação diretamente na pele do utilizador.

Além disso, numa forma de realização, a invenção proporciona diversas formulações de dosagem do conjugado para distribuição por inalação. Por exemplo, as formulações podem ser concebidas para utilização de aerossol em dispositivos, tais como inaladores de dose calibrada, inaladores de pó seco e nebulizadores.

Exemplos de composições dermatológicas úteis, as quais podem ser utilizadas para distribuir o composto da invenção na pele, são conhecidos na técnica; ver, por exemplo, Jacquet *et al.* (Pat. U.S. N° 4608392), Geria (Pat. U.S. N° 4992478), Smith *et al.* (Pat. U.S. N° 4559157) e Wortzman (Pat. U.S. N° 4820508).

As dosagens úteis do composto da invenção podem ser determinadas por comparação da sua atividade *in vitro* e atividade *in vivo* em modelos animais. Os métodos para a extrapolação de dosagens eficazes em murganhos e outros animais para humanos são conhecidos na técnica; ver, por exemplo, Pat. U.S. Nº 4938949. A capacidade de o composto da invenção atuar como um agonista de TLR pode ser determinada utilizando modelos farmacológicos, os quais são bem conhecidos na técnica, incluindo os processos divulgados por Lee *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100: 6646 (2003).

Geralmente, a concentração do composto da invenção numa composição líquida, tal como uma loção, será de cerca de 0,1-25% em peso, de um modo preferido, de cerca de 0,5-10% em peso. A concentração numa composição semissólida ou sólida, tais como um gel ou um pó, será cerca de 0,1-5% em peso, de um modo preferido, cerca de 0,5-2,5% em peso.

O ingrediente ativo pode ser administrado para alcançar concentrações plasmáticas de pico do composto ativo de cerca de 0,5 a cerca de 75 μM , de um modo preferido, cerca de 1 a 50 μM , de um modo muito preferido, cerca de 2 a cerca de 30 μM . Isto pode ser alcançado, por exemplo, pela injeção intravenosa de uma solução de 0,05 a 5% do ingrediente ativo, opcionalmente, em solução salina, ou administrada oralmente como um bólus contendo cerca de 1-100 mg do ingrediente ativo. Os níveis sanguíneos desejáveis podem ser mantidos por infusão contínua para proporcionar cerca de 0,01-5,0 mg/kg/h ou por infusões intermitentes contendo cerca de 0,4-15 mg/kg do ingrediente(s) ativo(s).

A quantidade do composto, ou um seu sal ou derivado ativo, requerido para utilização no tratamento, irá variar, não apenas com o sal particular selecionado, mas também com a via de administração, a natureza do estado sendo tratado e a idade e estado do doente e ficará, em última análise, ao critério do médico ou clínico assistente. Em geral, contudo, uma dose adequada será na gama de cerca de 0,5 a cerca de 100 mg/kg, e. g., de cerca de 10 a cerca de 75 mg/kg de peso corporal por dia, tal como 3 a cerca de 50 mg por quilograma de peso corporal do recetor por dia, de um modo preferido, na gama de 6 a 90 mg/kg/dia, de um modo muito preferido, na gama de 15 a 60 mg/kg/dia.

O composto é, de um modo conveniente, administrado na forma de dosagem unitária; por exemplo, contendo 5 a 1000 mg, de um modo conveniente, 10 a 750 mg, de um modo muito conveniente, 50 a 500 mg de ingrediente ativo por forma de dosagem unitária.

A dose desejada pode, de um modo conveniente, ser apresentada numa dose única ou como doses divididas, administradas em intervalos apropriados, por exemplo, como duas, três, quatro ou mais subdoses por dia. A própria subdose pode ser ainda dividida, e. g., num número de administrações discretas livremente espaçadas; tal como múltiplas inalações de um insuflador ou por aplicação de uma pluralidade de gotas no olho. A dose e, talvez, a frequência de dose, também irão variar de acordo com a idade, peso corporal, estado e resposta do doente individual. Em geral, a gama de dose diária total para um composto ou compostos de fórmula (I), para os estados aqui descritos, pode ser de cerca de 50 mg a cerca de 5000 mg, em doses únicas ou divididas. De um modo preferido, uma gama de dose diária deve ser cerca de 100 mg a cerca de 4000 mg, de um

modo muito preferido, cerca de 1000-3000 mg, em doses únicas ou divididas, e. g., 750 mg, de 6 em 6 horas, de composto administrado oralmente. Isto pode alcançar níveis plasmáticos de cerca de 500-750 μM , os quais podem ser eficazes para provocar a morte a células cancerígenas. Na gestão do doente, a terapia deve ser iniciada a uma dose inferior e aumentada dependendo da resposta global do doente.

Como descrito acima, as composições que contêm o composto da invenção são úteis no tratamento ou prevenção de uma doença ou distúrbio, por exemplo, em humanos ou outros mamíferos (e. g., animais bovinos, caninos, equinos, felinos, ovinos e porcinos) e, talvez, também outros animais. A composição irá, por exemplo, tipicamente ser útil para tratamento de cancro, de uma infeção, estimulação da imunidade adaptativa (e. g., produção de anticorpos, ativação de células T, etc.), como vacinas e/ou estimulação do sistema nervoso central.

A invenção será ainda descrita pelos seguintes exemplos não limitativos.

Exemplo I

Os processos para a preparação de compostos reivindicados e não reivindicados de fórmula (I) são proporcionados como formas de realização adicionais da invenção e são ilustrados pelos seguintes processos, nos quais, salvo qualificados em contrário, os significados dos radicais genéricos são como dados acima.

Química Geral. Os reagentes e solventes foram adquiridos a Aldrich, Milwaukee, WI. Os pontos de fusão não corrigidos foram

determinados num aparelho de ponto de fusão capilar Mel-Temp II da Laboratory Device. Os espectros de ressonância magnética nuclear de prótons foram registados num espectrofotómetro de RMN Varian Unity 500, a 499,8 MHz, ou num espectrofotómetro de RMN Varian Mercury, a 400,06 MHz. Os desvios químicos foram referidos em ppm na escala da referência indicada. Os espectros de ansa de ião positivo e negativo foram realizados pelo Departamento de Química da UCSD, San Diego, CA. As análises elementares foram realizadas por NuMega Resonance Labs, San Diego, CA. A cromatografia de coluna foi conduzida em sílica gel E Merck (malha 230-400) com o sistema de solventes indicado. A cromatografia de camada fina (TLC) analítica foi conduzida em placas de sílica gel 60 F-254 (EM Reagents).

Preparação de 4-(2,6-dicloropurin-9-ilmetil)benzonitrilo (não reivindicado). 2,6-dicloro-9H-purina (16 mmol) é dissolvida em DMF (50 mL) e é adicionado carbonato de potássio (50 mmol). α -Bromo-*p*-tolunitrilo (22 mmol) é, depois, adicionado e a mistura é agitada, à temperatura ambiente, durante 16 horas. Após filtração para remover sais inorgânicos insolúveis, o filtrado é vertido em água (1500 mL) e extraído com acetato de etilo (2 x 400 mL), seco sobre sulfato de magnésio e evaporado, para produzir um resíduo o qual é submetido a cromatografia de sílica gel flash, utilizando acetato de etilo/acetona/hexanos a 1:2:10. Rendimento 3,33 g (69%). UV, RMN e MS foram consistentes com atribuição de estrutura.

Preparação de 4-(6-amino-2-cloropurin-9-ilmetilbenzonitrilo (não reivindicado). O produto acima (1,9 g) é colocado num recipiente reacional de aço e é adicionada amónia metanólica (80 mL, 7 N). O recipiente vedado é aquecido a 60 °C, durante 12 horas, arrefecido em gelo e o produto sólido removido por

filtração. Rendimento 1,09 g. UV, RMN e MS foram consistentes com a estrutura atribuída.

Preparação de 4-[6-amino-2-(2-metoxietoxi)purin-9-ilmetil]benzonitrilo (não reivindicado). O sal de sódio de 2-metoxietanol é produzido por dissolução do metal sódio (81 mg) em 2-metoxietanol (30 mL) com calor. A esta solução é adicionado o produto do exemplo 2 (1,0 g) dissolvido em metoxietanol (300 mL, com calor). A mistura reacional é aquecida, durante 8 horas, à temperatura de banho de 115 °C, concentrada *in vacuo* até próximo da secura e o resíduo particionado entre acetato de etilo e água. A cromatografia de sílica gel flash da camada orgânica utilizando metanol a 5% em diclorometano deu 763 mg de produto. A RMN é consistente com a atribuição de estrutura.

Preparação de 4-[6-amino-8-bromo-2-(2-metoxetioxi)purin-9-ilmetil]benzonitrilo (não reivindicado). O produto imediatamente acima (700 mg) é dissolvido em diclorometano (400 mL) e é adicionado bromo (7 mL), gota a gota. A mistura é agitada, de um dia para o outro, à temperatura ambiente e extraída com solução de tiosulfato de sódio aquoso (2 L de 0,1 M) e, depois, com bicarbonato de sódio aquoso (500 mL, saturado). O resíduo da camada orgânica é submetido a cromatografia em sílica gel utilizando metanol a 3% em diclorometano), para produzir 460 mg do produto bromo. RMN, UV e MS são consistentes com a atribuição de estrutura.

Preparação de 4-[6-amino-8-metoxi-2-(2-metoxietoxi)purin-9-ilmetil]benzonitrilo (não reivindicado). O metóxido de sódio é produzido por reação do metal sódio (81 mg) em metanol seco (30 mL). O produto imediatamente acima (700 mg) é dissolvido em dimetoxietano seco e a temperatura elevada para 100 °C. Após

reação de um dia para o outro, a mistura é concentrada *in vacuo* e o resíduo é submetido a cromatografia em sílica utilizando metanol a 5% em diclorometano. Rendimento 120 mg. A RMN é consistente com a atribuição de estrutura.

Preparação de Hidreto de lítio e N,N'-(dimetiletilenodiamino)alumínio (não reivindicado). Este agente redutor utilizado para converter o nitrilo na função aldeído é preparado essencialmente como descrito em Bull. Korean Chem. Soc., 23:1697 (2002). É preparada uma solução a 0,5 M em THF seco.

Preparação de 4-[6-amino-8-metoxi-2-(2-metoxietoxi)purin-9-ilmetil]benzaldeído (não reivindicado). 4-[6-amino-8-metoxi-2-(2-metoxietoxi)purin-9-ilmetil]benzonitrilo (100 mg) é dissolvido em THF seco (3 mL) e arrefecido para 0 °C, sob árgon. O reagente de hidreto de alumínio produzido acima (0,72 mL) é adicionado ao frasco reacional e a mistura é agitada, a 0-5 °C, durante 1 hora e, depois, neutralizada por adição de HCl a 3 M. A mistura é, depois, extraída com acetato de etilo e, depois, diclorometano e concentrada *in vacuo*, para produzir 85 mg. A RMN é consistente com a atribuição de estrutura.

Preparação de 4-[6-amino-8-hidroxi-2-(2-metoxietoxi)purin-9-ilmetil]benzaldeído (UC-1V150) (não reivindicado). O produto imediatamente acima (800 mg) é combinado com iodeto de sódio (504 mg) e acetonitrilo (40 mL) e, depois, é lentamente adicionado clorotrimetilsilano (0,5 mL). A mistura é aquecida a 70 °C, durante 3,5 horas, arrefecida e filtrada. O produto sólido é lavado com água, depois, éter, para produzir 406 mg. RMN, UV, MS são consistentes com a atribuição de estrutura. Este

material é adequado para reações de conjugação entre ligantes e macromoléculas.

Preparação de metil-4-[6-amino-8-metoxi-2-(2-metoxietoxi)purin-9-ilmetil]benzoato (não reivindicado). O processo é como descrito por Jayachitra, *et al.*, Synth. Comm., 33:3461 (2003)). 4-[6-amino-8-metoxi-2-(2-metoxietoxi)purin-9-ilmetil]benzonitrilo (1 mmol) é dissolvido em metanol seco (5 mL) e eterato de BF₃ destilado de fresco (4 mmol) é adicionado à solução. A mistura resultante é submetida a refluxo, sob argon, durante 20 horas. O solvente é removido *in vacuo* e o resíduo é tomado em diclorometano (10 mL) e extraído com bicarbonato de sódio aquoso diluído (2 x 10 mL) e a camada orgânica é seca sobre sulfato de magnésio. Após evaporação, o produto é purificado por cromatografia de coluna de sílica gel utilizando metanol a 5% em diclorometano, para produzir 0,8 mmol.

Preparação de ácido 4-[6-amino-8-hidroxi-2-(2-metoxietoxi)purin-9-ilmetil]benzoico (não reivindicado). 4-[6-amino-8-metoxi-2-(2-metoxietoxi)purin-9-ilmetil]benzoato (100 mg) é combinado com iodeto de sódio (63 mg) e acetonitrilo (10 mL) e, depois, clorotrimetilsilano (120 mL) é lentamente adicionado. A mistura é aquecida a 70 °C, durante 6 horas, arrefecida e filtrada. O produto sólido é lavado com água, depois, éter, para produzir 51 mg.

Preparação de 2,5-dioxopirrolidin-1-il-4-[6-amino-8-hidroxi-2-(2-metoxietoxi)purin-9-ilmetil]benzoato (não reivindicado). 4-[6-amino-8-metoxi-2-(2-metoxietoxi)purin-9-ilmetil]benzoato (2 mmol) é dissolvido em diclorometano ou dioxano (10 mL) e EDC (2 mmol) é adicionado. A esta solução é

adicionada N-hidroxissuccinimida (2 mmol) e a mistura resultante é agitada, à temperatura ambiente, durante 1 hora. A mistura é levada à secura *in vacuo* e o produto em bruto é purificado por cromatografia de sílica gel, para produzir 2 mmol de produto que é adequado para reações de conjugação envolvendo aminas primárias.

Exemplo II

O UC-1V150 foi ligado covalentemente a MSA, modificada primeiro com um ligante de succinimidil-6-hidrazino-nicotinamida acetona hidrazona (SANH), para produzir uma molécula estável com um espectro de UV caracteristicamente alterado. O conjugado de UC-1V150/MSA (não reivindicado) foi identificado por um pico de absorção de UV a 342 nm, devido a formação de hidrazona, enquanto que a SANH isoladamente absorveu a 322 nm. A quantificação de moléculas de UC-1V150 conjugada por MSA foi extrapolada de uma curva padrão de UC-1V150-SANH (Figura 1). Consistentemente, os conjugados de UC-1V150/MSA foram obtidos a uma proporção de cerca de 5:1. Os estudos biológicos aqui referidos foram feitos por utilização de UC-1V150/MSA a 5:1.

Modificação de MSA com SANH. 200 µL de MSA (25 mg/mL) foram misturados com 100 µL de tampão de conjugação (NaPi a 1 M, pH=7,2) e 690 µL de PBS. 844 µg de SANH, em 10 µL de DMF (excesso molar de 40 vezes para MSA), foram adicionados a solução de proteína (a concentração final de MSA na mistura reacional é 5 mg/mL). Após mistura suave, a reação foi prosseguida, à temperatura ambiente, durante 2 horas. Para remover excesso de SANH, a mistura reacional foi carregada em

coluna NAP-10 equilibrada com PBS e MSA modificada foi eluída com 1,5 mL de PBS.

Ligação de IV150 a MSA modificado com SANH (não reivindicado). 460 µg de IV150 dissolvidos em 10 µL de DMF foram adicionados a MSA modificada com SANH e a mistura reacional foi incubada, à T.A., de um dia para o outro. Para remover o excesso de IV150, a mistura reacional foi primeiramente concentrada para 1 mL utilizando coluna micro-spin (Millipore: BIOMAX 5K) e carregada numa coluna NAP-10, como mencionado acima.

Os agonistas de TLR7 também foram conjugados a oligodesoxinucleótidos (ODN) (Figuras 20-21), um vírus (Figuras 18-19) e a um componente de lípido o qual pode ser, depois, incorporado num lipossoma (Figuras 24-25).

Síntese de agonista de TLR7 regulado espacialmente. Cada conjugado é preparado por técnicas correntes bem conhecidas na química de bioconjugação. A caracterização de cada por métodos quantitativos de UV, LC/MS e PAGE determina a "valência" ou proporção de agonista de TLR para o seu grupo auxiliar (macromolécula). Desta informação, o tamanho e forma dos conjugados são facilmente estimados por técnicas de modelação. A diversidade em tamanho, forma e valência dos conjugados é introduzida através da seleção da macromolécula, representada no esquema de estrutura como R3. Por exemplo, quando R3 é um dendrímero, tal como da variedade comum de poli(amidoamina), o número de grupos funcionais de superfície para ligação do agonista de TLR é precisamente definido com base no número de pontos de ramificação ou produções desse dendrímero particular. Uma primeira geração (G1) tem 8 grupos amino de superfície, um G2 tem 16, e por aí adiante, resultando, deste modo, num elevado

nível de controlo sobre valência e tamanho dos conjugados (ver a Figura 2). Além disso, algumas nanopartículas de dendrímeros podem conter um ligando de direcionamento e o agonista de TLR7. Os conjugados de agonista de TLR7-lípido também podem ter uma variedade de "valências", dependendo da seleção dos lípidos. Por exemplo, o potente conjugado UV-1V199/L (Figura 6) foi preparado por ligação de um derivado carboxilo do agonista de TLR7 (UC-1V199) ao grupo etanolamino da dioleanilfosfatidiletanolamina (DOPE) comercialmente disponível.

Estes conjugados lipídicos são formulados em diversas nanopartículas lipossomais, por combinação com colesterol, DOPE e outros lípidos, para produzir partículas que têm um diâmetro hidrodinâmico de cerca de 100 nm (Figuras 24-25). Os hexágonos na figura representam UC-1V199/L e agonista de TLR7 relacionado com caudas de fosfolípido.

Mostrou-se que os agonistas e dímeros de TLR7, assim como conjugados de TLR, têm libertação de citocina e/ou atividade de citocina *in vivo*, como determinado por ensaios, tal como os aqui divulgados. Por exemplo, imiquimod, bropirimina, UC-1V138, UC-1V136, UC-1V150, UC-1X105, UC-1V199, UC-1W236, UC-1X51, UC-1W247, UC-1X113, UC-1V199/L, UC-1V150/BSA, conjugados de UC-1V150, com ou sem um ligante e MSA, OVA, viriões e/ou ODN, conjugados de UC-1V199 e DOPE, sílica, lípido ou esporos irradiados e conjugados de UC-1V1043 e UC-1V1018 com OVA, mostraram todos atividade.

Exemplo III

Materiais e Métodos

Avaliação de composto *in vitro*. A capacidade de os conjugados de TLR7 estimularem e/ou inibirem a produção de citocina é avaliada em células mononucleares derivadas de medula óssea de murino (BMDM) que são altamente enriquecidas em células dendríticas, assim como em células de células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC). As BMDM são plaqueadas em placas de 96 poços e tratadas em triplicado com transportador ou diversas doses, partindo de 10 μ M diluídas em incrementos de 3 vezes até concentrações picomolares. Após 24 horas, os sobrenadantes são recolhidos e ensaiados para até 30 diferentes citocinas, quimiocinas e outros mediadores, utilizando um sistema de ensaio de esferas de Luminex e reagentes comercialmente disponíveis. Os resultados de ELISA de citocina/hemocina são suplementados com medições quantitativas de expressão de ARNm e com análises bidimensionais de fosfoproteína, para adquirir conhecimento sobre o âmbito e mecanismo de indução de tolerância. No momento da recolha do sobrenadante, os meios são substituídos nos poços com MTT, como uma avaliação colorimétrica da sobrevivência celular. As PBMC humanas são isoladas de embalagens de sangue comercial e tratadas de modo semelhante.

Para avaliar o tráfego dos nanolipossomas e dendrímeros conjugados a agonista de TLR, as respectivas nanopartículas são carregadas ou modificadas com um fluorocromo. A localização subcelular é determinada microscopicamente, em alguns casos em células que foram tratadas com inibidores da maturação endossômica.

Para comparar as atividades anti-inflamatórias dos conjugados de TLR7 com diferentes grupos auxiliares, as BMDM são tratadas, em primeiro lugar, com os compostos mais potentes, a concentrações determinadas anteriormente que tiveram efeitos mínimos na estimulação de citocina pro-inflamatória (TNF α , IL-1). Após 24 horas, o meio é substituído e as células são desafiadas com ligandos de ativação de diferentes membros da família de TLR (Pam3Cys para TLR2, poli(I:C) para TLR3, LPS para TLR4, flagelina para TLR5, Malp-2 para TLR6, UC-1V150 para TLR7, R848 para TLR7/8, oligonucleótidos CpG para TLR9 e semelhantes), a concentrações que induzem eficazmente a produção de citocina em células falsamente tratadas. As células são avaliadas por imunoensaio múltiplex, PCR quantitativo e transferência de fosfoproteína. Para melhor compreender a cinética da indução e manutenção de tolerância, células iniciadas com conjugado de TLR7 também são desafiadas a diferentes intervalos de tempo e analisadas para o padrão de produção de citocina.

Avaliação de composto *in vivo*. É avaliada a produção de fluido de lavagem broncoalveolar (BALF) *versus* citocinas sistêmicas após administração nas vias respiratórias de murganhos. Murganhos C57BL/6 fêmea, com idades correspondentes, anestesiados, são administrados nasalmente (i.n.), oralmente (p.o.) ou intravenosamente (i.v.) com diversas quantidades dos conjugados de TLR7, como descrito anteriormente, ou com os lipossomas ou dendrímeros em transportadores apropriados. Após recuperação e em diferentes intervalos de tempo, os soros e BALF são recolhidos e analisados para citocinas e quimiocinas por ensaio de Luminex. Os padrões de pesos, temperaturas e ingestão de fluido dos animais tratados são registados como um substituto clínico para uma "síndrome de citocina" sistêmica.

Experiências subsequentes avaliam a capacidade de os diferentes agentes produzirem refratariedade local e sistêmica (tolerância de TLR) a ativação de TLR após administração de elevada dose i.n., p.o. ou i.v., como determinado por citocinas de soros e BALF. São selecionadas doses elevadas dos diversos conjugados de TLR7, as quais não induzem citocinas significativas *in vivo*, nem sinais clínicos de uma síndrome de citocina. Os murganhos são tratados com as doses elevadas selecionadas, dadas pelas diferentes vias de administração e, depois, desafiados com ativadores de diferentes TLR, a diversos intervalos de tempo. Soro e BALF são recolhidos e analisados e os sintomas clínicos são registados. As atividades anti-inflamatórias dos conjugados são confirmadas com um modelo de choque letal, utilizado anteriormente para estudar LPS e CpG. Neste modelo, murganhos Balb/c que foram anteriormente injetados, i.p., com D-galactosamina sucumbem após desafio sistêmico com diferentes ativadores de TLR, devido a estimulação de citocina e lesão no fígado. Os fármacos anti-inflamatórios ativos não induzem sintomas clínicos em animais sensibilizados e também irão prevenir o choque causado por outros ligandos de TLR. Com um ponto final definido, este modelo é especialmente útil para determinar a cinética e duração da tolerância a TLR.

Exemplo IV

Materiais e Métodos

Murganhos. Murganhos C57BL/6 fêmea (5-6 semanas de idade) foram obtidos de Harlan West Coast (Germantown, CA) e murganhos A/J fêmea (6-8 semanas de idade) foram adquiridos ao The Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). Os murganhos A/J foram utilizados

para infecção com a estirpe Sterne de *B. anthracis* (Kenney *et al.*, J. Infect. Dis., 190:774 (2004)). Os murganhos foram reproduzidos e mantidos sob condições padrão na Universidade da Califórnia, na San Diego Animal Facility, a qual está acreditada pela American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care. Todos os protocolos animais receberam aprovação prévia pelo Institutional Review Board. Para o estudo de influenza H1N1, os murganhos BALB/c fêmea (16-18 g) foram obtidos de Charles River Laboratories (Wilmington, MA) e mantidos no Laboratory Animal Research Center of Utah State University acreditado pela American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care.

Estimulação *In Vitro* de BMDM. Os BMDM foram isolados de diversas estirpes de murganhos e foram semeados em placas de 96 poços, a uma densidade de 5×10^4 células por poço. Os compostos foram adicionados a culturas de 10 dias de idade, a uma concentração final variando entre 0,01 e 10 μ M, ou como indicado de outro modo. Após 24 horas de incubação, os sobrenadantes de cultura foram recolhidos e ensaiados para induções de citocina por ELISA em sanduíche (BD Pharmingen, San Diego, CA) ou ensaio de Luminex múltiplice (Austin, TX) utilizando o kit personalizado Beadlyte Mouse MultiCytokine (Upstate, Charlottesville, VA, e eBiosciences, San Diego, CA), de acordo com as instruções do fabricante.

Administração de Compostos a Murganhos. Murganhos C57BL/6 fêmea, com idades correspondentes, foram injetados com 100 μ L de solução salina contendo UC-1V150 (não reivindicado) ou UC-1V150/MSA (não reivindicado), cada contendo o equivalente de 0,38-38 nmol do *pharmacore* por meio da veia da cauda. Para administração intrapulmonar, os murganhos foram anestesiados com

solução de Avertin, i.p., e rapados em volta da área do pescoço. As traqueias foram expostas com uma pequena incisão e injetadas com 50 µL de solução salina contendo diversas quantidades de UC-1V150/MSA ou o fármaco não conjugado. Após recuperação e a diferentes intervalos de tempo, soro e BALF foram recolhidos e analisados para IL-6, IL-12p40, IFN-γ, RANTES e MCP-1 por ensaio de Luminex. Noutras experiências, os murganhos foram anestesiados com uma solução intramuscular de cetamina/xileno e administrados com a mesma quantidade de UC-1V150/MSA em doses i.t. de 50 µL ou doses i.n. de 20 µL. Devido a terem sido observados níveis semelhantes de citocina nas 24 horas de BALF após administração por qualquer dos métodos, foi utilizada a via i.n. mais conveniente em estudos de modelo infeccioso.

Infeção de Murganhos A/J com Esporos de *B. anthracis*. Os esporos foram preparados a partir da estirpe Sterne de *B. anthracis* (pX01⁺pX02⁻), como descrito anteriormente (Sabet *et al.*, FEMS Immunol. Med. Microbiol., 47:369 (2006); Guidi-Rontani *et al.*, Mol. Microbiol., 42:931 (2001)). Os esporos purificados foram armazenados em PBS, a 1×10^8 a 4×10^8 cfu/mL, a 4 °C. Antes da infeção, os esporos foram aquecidos para 65 °C, durante 30 minutos, para iniciar a germinação. Os murganhos A/J foram anestesiados intramuscularmente com solução de cetamina/xileno e administrados, i.n., com 0,75 nmol de UC-1V150 ou UC-1V150/MSA por murganho, 1 dia antes da infeção por antraz. Os murganhos de controlo receberam apenas solução salina ou solução salina contendo MAS, a quantidades equivalentes como em UC-1V150/MSA. A infeção foi efetuada i.n., com 2×10^5 a 8×10^5 esporos de *B. anthracis*, num volume de 20 µL. A sobrevivência foi observada durante 13 dias, porque a maioria dos murganhos tratados com

solução salina morreu no espaço de 3-6 dias. Os resultados foram obtidos a partir de oito murganhos por grupo.

Infeção de murganhos Balb/c com vírus de influenza. O vírus de influenza A/Nova Caledónia/20/99 (H1N1) foi obtido dos Centers for Disease Control and Prevention (Atlanta, GA). O vírus foi propagado, duas vezes, em células de rim canino Madin Darby (MDCK), adicionalmente passadas 7 vezes em murganhos para as tornar virulentas, seguido de outra passagem em cultura celular para as amplificar. Os murganhos foram anestesiados, i.p., com cetamina (100 mg/kg) e infetados, i.n., com vírus a, aproximadamente, $10^{5,0}$ doses infecciosas de cultura celular por murganho, num volume de inóculo de 50 μ L. Uma única dose intranasal de 75 μ L em solução salina isoladamente ou contendo UC-1V150/MSA para 5 nmole por murganho foi dada 24 horas antes de exposição ao vírus. Dez murganhos infetados por grupo tratado e 20 animais de controlo placebo foram seguidos para sobrevivência, durante 21 dias.

Estatística. Os níveis de citocina foram comparados pelo teste U de Mann Whitney, com $p \leq 0,05$, para determinar a significância estatística. As curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier e testes de log rank foram realizados utilizando a versão 4.0c do software GraphPad Prism (San Diego, CA), para comparar diferenças em sobrevivência.

Resultados

Potente libertação de citocina *in vitro* e *in vivo* em resposta a conjugados de UC-1V150/MSA (não-reivindicados). A incubação de macrófagos derivados de medula óssea (BMDM) com UC-1V150 isoladamente estimulou a libertação de citocina (Figura 10). Quando conjugado a MSA, foram detetados níveis semelhantes ou mais elevados de citocinas, com uma concentração equivalente 10 vezes inferior do agonista de TLR7. As experiências com transformantes de TLR, realizadas como descrito anteriormente, confirmaram que o UC-1V150, semelhante ao composto desprovido da modificação de aldeído (UC-1V136), era um agonista específico de TLR7 (Lee et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:1828.(2006)). Após injeção i.v. em murganhos, o UC-1V150 induziu níveis séricos de citocina que tiveram um pico a cerca de 2 horas após injeção e, depois, rapidamente diminuíram para próximo dos níveis de fundo (dados não mostrados). A comparação dos perfis de produção de citocina de UC-1V150 versus o UC-1V150/MAS, 2 horas após injeção i.v. a diversas dosagens, demonstrou que o conjugado de MSA melhorou a potência em 10 a 100 vezes (Figura 11). Os soros de grupos de controlo de solução salina ou MSA revelaram poucos ou nenhuns níveis de citocina detetáveis (dados não mostrados).

Conjugados de UC-1V150/MSA (não reivindicados) Proporcionam Atividade Pulmonar Prolongada e Localizada. Para garantir distribuição adequada dos agonistas de TLR7 no sistema respiratório, os fármacos foram inicialmente diretamente para a traqueia. Verificou-se indução substancial de citocina no fluido de lavagem alveolar brônquico (BALF) extraído de murganhos tratados intratraquealmente (i.t.) com UC-1V150/MSA, enquanto que as citocinas séricas foram muito baixas e próximas dos

níveis de fundo nos mesmos animais (Figura 12). Em marcado contraste, foram observados níveis semelhantes de citocina em BALF e soros de murganhos injetados, i.t., com agonistas de TLR7 de moléculas pequenas, os quais, por vezes, induziram alterações comportamentais, tais como pelo eriçado na extremidade e tremura, sugestivos de uma síndrome de citocina (Tabela 2). Estudos subsequentes com UC-1V150 mostraram que a distribuição intranasal (i.n.) também induziu produção seletiva de citocina no BALF, provavelmente devido a aspiração de fármaco. Consequentemente, foi utilizada a administração i.n. para avaliar os conjugados de UC-1V150 em dois modelos animais infecciosos de pneumonite. Os murganhos pré-tratados, i.n., com UC-1V150/MAS, um dia antes da infeção com esporos de *B. anthracis*, tiveram uma sobrevivência média prolongada de 7,5 dias, em comparação com 5 dias em murganhos de controlo ($P < 0,025$) (Figura 14A). Em contraste, não foi observada diferença significativa em murganhos tratados com solução salina, a quantidade equivalente de MSA, ou com UC-1V150 isoladamente. Estes dados confirmaram que o conjugado de UC-1V150, mas não o fármaco livre, teve atividade imunoterapêutica intrapulmonar. Deste modo, a conjugação do agonista de TLR7 a MSA melhorou a sua potência e reduziu a sua toxicidade após distribuição local no aparelho respiratório.

Noutro estudo, murganhos BALB/c foram pré-tratados, i.n., com o conjugado de UC-1V150/MAS, 1 dia antes da infeção por vírus de influenza (estirpe H1N1). A sobrevivência média dos murganhos tratados foi prolongada para 11,5 dias, em comparação com 7 dias em controlos não tratados ($P < 0,0001$) (Figura 14B). Em conjunto, estes resultados sugerem que a conjugação do agonista de TLR7 a MSA melhorou a sua potência e reduziu a sua toxicidade, após distribuição local no aparelho respiratório.

O UC-1V150/MSA foi administrado, i.n., antes da infecção por antraz, seguido de tratamento com ciprofloxacina (25 mg/kg), no dia 4. O tratamento com placebo, seguido de tratamento com ciprofloxacina, resultou em cerca de 15-25% de sobrevivência, enquanto o tratamento com um conjugado e ciprofloxacina resultou em cerca de 90% de sobrevivência. Deste modo, o conjugado é particularmente útil como um coadjuvante com uma vacina de antraz.

Discussão

O composto UC-1V150 (não reivindicado) é um dos ligandos de TLR7 sintéticos de moléculas pequenas mais potente e versátil já descoberto, porque (i) é ativo a concentrações nanomolares; (ii) pode ser ligado a uma variedade de macromoléculas, em alguns casos com melhoramento da atividade; e (iii) as suas propriedades farmacocinéticas podem ser alteradas por modificação dos grupos auxiliares. O conjugado proteico de TLR7 UC-1V150/MSA (não reivindicado) foi caracterizado como tendo, aproximadamente, cinco moléculas pequenas ligadas covalentemente a cada molécula da proteína MSA. O conjugado reteve atividade de agonista de TLR7 e, de facto, foi mais potente e teve uma duração de ação mais longa, em comparação com o fármaco monomérico livre. Além disso, este conjugado poderia ser distribuído eficazmente no sistema respiratório por administração i.n. ou i.t. A distribuição de fármaco por i.n. provou ser eficaz num modelo de murganho de uma infecção bacteriana. Quando se considera a distribuição no sistema respiratório, uma vantagem potencialmente importante da preparação dos agonistas de TLR7 como conjugados de

macromoléculas é que os efeitos secundários sistémicos podem ser evitados por confinamento da atividade imunoestimulatória ao ambiente mucosal local.

Seria de esperar que o conjugado macromolecular fosse absorvido para a circulação sistémica mais lentamente do que o fármaco livre e, de facto, pode ser avidamente eliminado por macrófagos e células dendríticas residentes expressando TLR7. Consequentemente, o conjugado deverá mitigar o tipo de efeitos secundários graves que foram associados à distribuição sistémica de agonistas de TLR7/8. O conjugado de UC-1V150/MSA também pode proporcionar atividade imunoterapêutica benéfica quando administrado a sítios mucosais, tais como os tratos genitourinário e gastrointestinal, para o controlo de doenças infecciosas, alérgicas ou malignas. O veículo macromolecular do agonista de TLR7 também pode proporcionar uma abordagem melhorada para a distribuição seletiva do imunoterapêutico a um órgão ou tecido específico. Por exemplo, os conjugados lipídicos de UC-1V150 podem ser incorporados em lipossomas de diferente tamanho e composição, enquanto que os conjugados proteicos do agonista de TLR7 podem visar diferentes subconjuntos de células dendríticas. Diferenças no tráfego intracelular do conjugado de UC-1V150 podem induzir padrões distintos de produção de citocina, análogos aos efeitos observados com oligonucleótidos de ativação de TLR9 (Rothenfusser *et al.*, Hum. Immunol., **63**: 111 (2002)).

Um potencial problema que foi observado com fármacos conjugados a proteínas é o desenvolvimento de anticorpos contra a porção de baixo peso molecular do tipo hapteno da molécula. Contudo, o UC-1V150, contrariamente aos conjugados vacinais de TLR7/8 estudados anteriormente, tem uma estrutura do tipo

adenina simples que é improvável que induza reações de hipersensibilidade. De facto, após administração dos conjugados proteicos, não foram observados anticorpos anti-UC-1V150, exceto após administração repetida de um veículo de hemocianina de lapa californiana em adjuvante completo de Freud (dados não publicados).

Estão a ser pesquisados novos agentes para a prevenção e tratamento de infeções por vírus de influenza, particularmente com a disseminação de estirpes altamente patogénicas da Ásia. Todos os anos, a morbidade e mortalidade de estirpes comuns em circulação são elevadas. O tratamento da infeção pode ser alcançado por fármacos antivíricos aprovados, os quais são moderadamente eficazes se iniciados precocemente. O melhoramento do sistema imunitário também está a ser investigado como uma estratégia que poderia acelerar as respostas antivíricas protetoras, especialmente em hospedeiros imunocomprometidos. É possível que a ativação imunitária sistémica por meio da sinalização de TLR não crie um gradiente de citocina e quimiocina local, requerido para mobilizar células imunitárias para o local de infeção. Em favor desta hipótese, o UC-1V150 não conjugado, o qual é rapidamente absorvido através da mucosa, não protegeu murganhos de infeção por *B. anthracis*, enquanto que o conjugado de UC-1V150 foi eficaz.

O *B. anthracis* tornou-se num agente do bioterrorismo. Uma resposta rápida contra patogénios microbianos é crítica para biodefesa eficaz. Em geral, um anticorpo ou resposta imunitária celular pode proteger contra estes patogénios; contudo, a geração destas respostas protetoras rapidamente requer exposição anterior a antigénios específicos para cada organismo. Embora seja conhecido que o vírus de influenza se liga a TLR7 (Barchet

et al., Eur. J. Immunol., 35:360 (2005)), o antraz bacteriano muito provavelmente pode ligar-se a TLR2, TLR4 e TLR9. Além de ser um intermediário de sinalização comum para os TLR, também se mostrou que o MyD88 é necessário para resistência a infecção num modelo de murganho de antraz (Hughes *et al.*, Infect. Immun., 73:7535 (2005)). Em virtude de o conjugado de UC-1V150 funcionar eficazmente como um adjuvante contra infecções que utilizam diferentes vias, pode ser aplicado como uma estratégia de biodefesa que não necessitaria de ser específica para os antígenos de um micróbio particular e que fosse útil em ataques mistos, assim como simpes.

Exemplo V

Não existe vacina de SA conhecida que seja potente o suficiente ou que possa atuar rápido o suficiente para prevenir infecções por SA em doentes "em risco", antes da hospitalização. Uma única injeção de um potente agonista de TLR7 e bactérias gram-positivas mortas, *e. g.*, SA, ou um sua subunidade, pode reforçar a imunidade protetora para as bactérias no espaço de uma semana da administração. A injeção pode incluir, por exemplo, 1) um agonista de TLR7, tal como UC-IV199 (não reivindicado) conjugado diretamente a grupos amino livres em bactérias gram-positivas mortas, 2) um agonista de TLR7, tal como UC-IV199 conjugado a albumina em combinação com bactérias gram-positiva mortas, 3) um agonista de TLR7, tal como UC-IV199 conjugado a uma proteína bacteriana gram-positiva recombinante ou 4) um agonista de TLR7, tal como UC-IV199 conjugado a polissacáridos bacterianos gram-positivos (*e. g.*, por meio de um ligante conhecido na técnica, tal como o utilizado em StaphVax®).

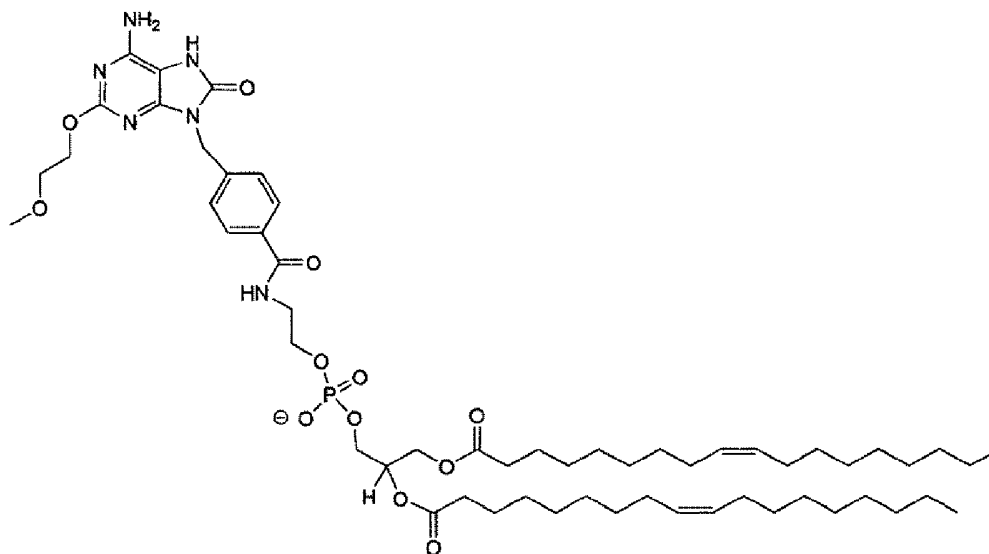
Como descrito acima, um agonista de TLR7 foi conjugado a esporos irradiados letalmente da estirpe vacinal Sterne de *Bacillus anthracis* (BA). Como o SA, o BA é uma bactéria Gram-positiva. Em comparação com esporos isoladamente, a bactéria conjugada foi um potente ativador de macrófagos derivados de medula óssea (BMDM) de murganho, como medido por secreção de citocina (IL-12 e IL-6). Noutra experiência, uma única injeção em murganhos de esporos irradiados letalmente da estirpe Sterne de BA, misturados com um agonista de TLR7 conjugado a albumina de murganho (MSA), protegeu os animais contra desafio de BA letal intrapulmonar, dada apenas seis dias mais tarde. Em contraste, a injeção dos animais com esporos de BA isoladamente, ou com BA mais um adjuvante convencional, toxina da cólera (CT), não protegeu os animais. Deste modo, uma vacina de agonista de TLR7 de albumina/esporo irradiado induziu imunidade protetora para *Bacillus anthracis* no espaço de 6 dias. Esta rapidez de resposta num animal naïve foi totalmente inesperada. A mesma tecnologia vacinal irá provavelmente proteger humanos de infeção por SA adquirida em hospital.

A invenção foi descrita fazendo referência a diversas formas de realização e técnicas específicas e preferidas.

Lisboa, 5 de novembro de 2015

REIVINDICAÇÕES

1. Composto de acordo com a seguinte fórmula



2. Composição farmacêutica compreendendo o composto de acordo com a reivindicação 1.
3. Composição de acordo com a reivindicação 2, a qual compreende nanopartículas lipossomais compreendendo o composto de acordo com a reivindicação 1 com colesterol, DOPE e outros lípidos tendo um diâmetro hidrodinâmico de cerca de 100 nm.
4. Composto de acordo com a reivindicação 1 para utilização como um agente imunoestimulante.

5. Composto de acordo com a reivindicação 1 para utilização na prevenção, tratamento ou inibição da asma.

Lisboa, 5 de novembro de 2015

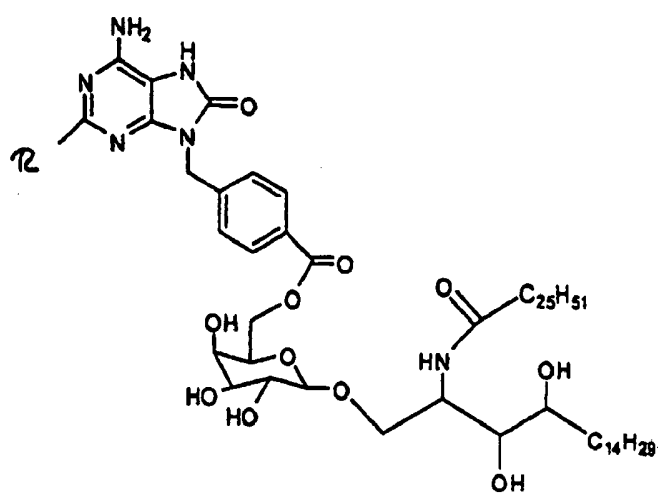


FIG. 1

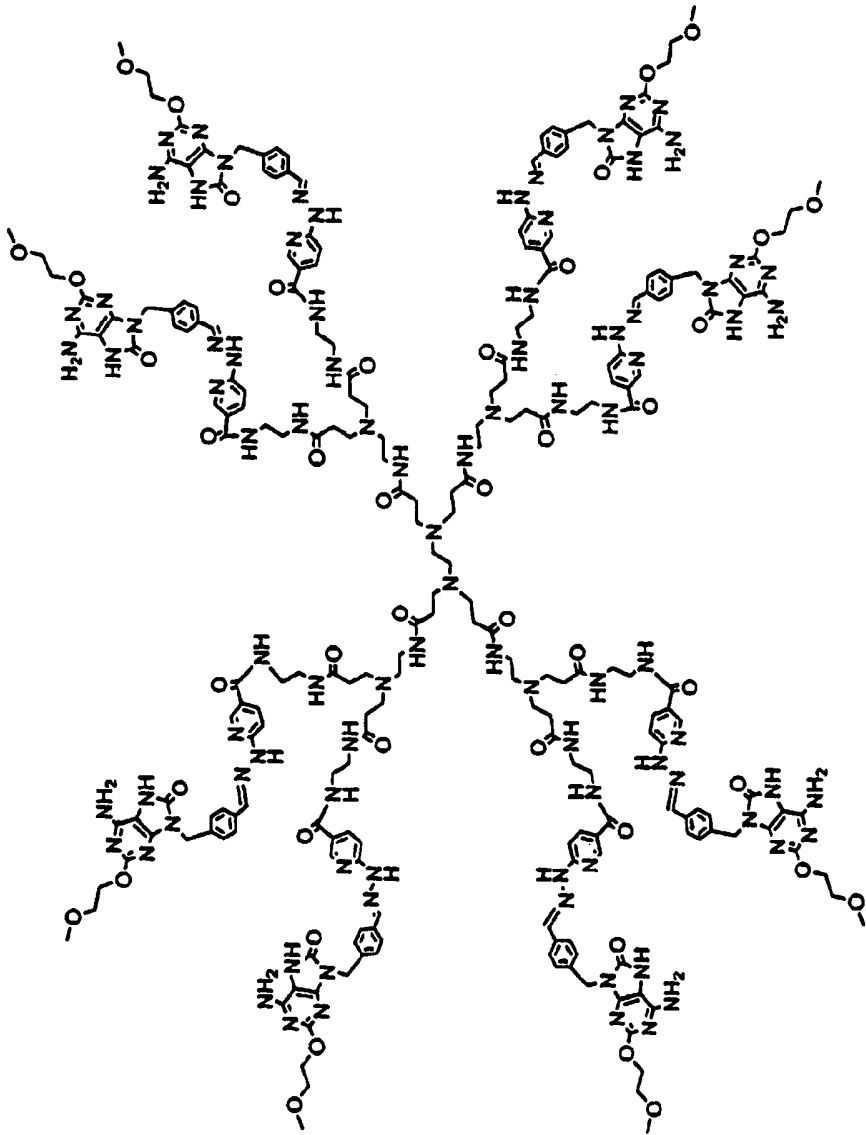


FIG. 2

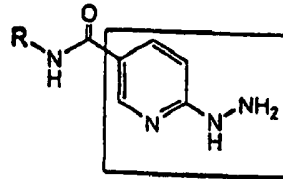
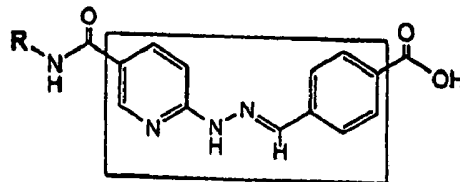
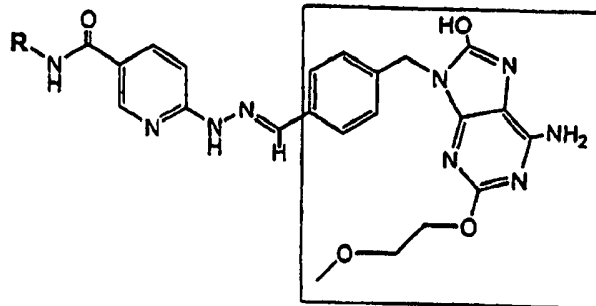
SANH**SANH-SFB****SANH-IV150**

FIG. 3A

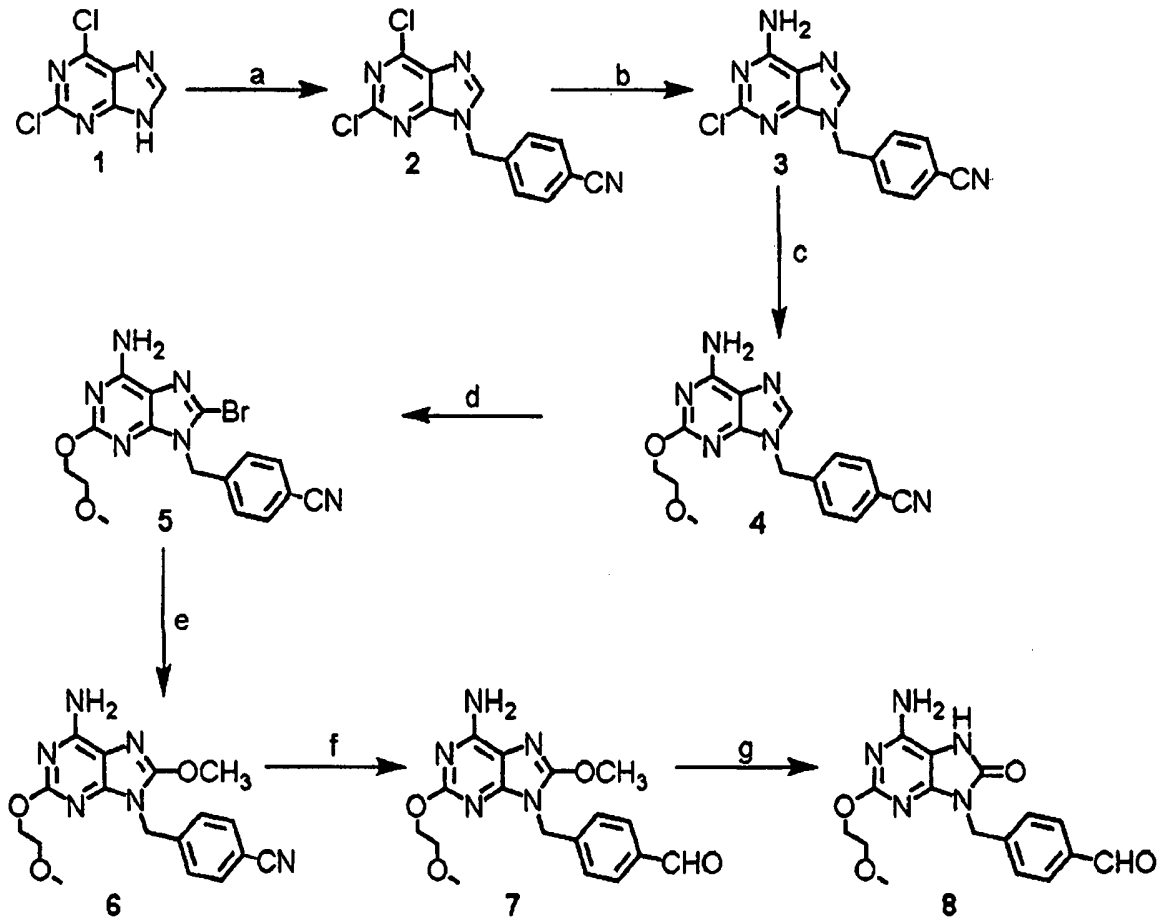
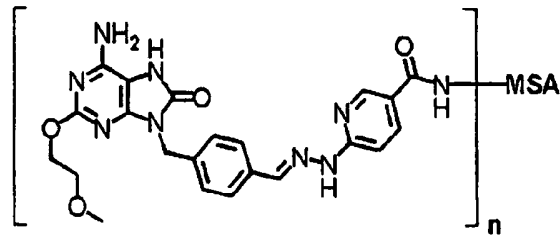
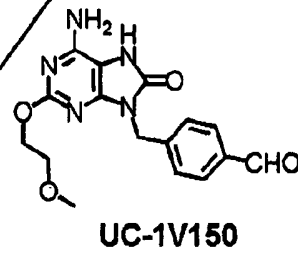
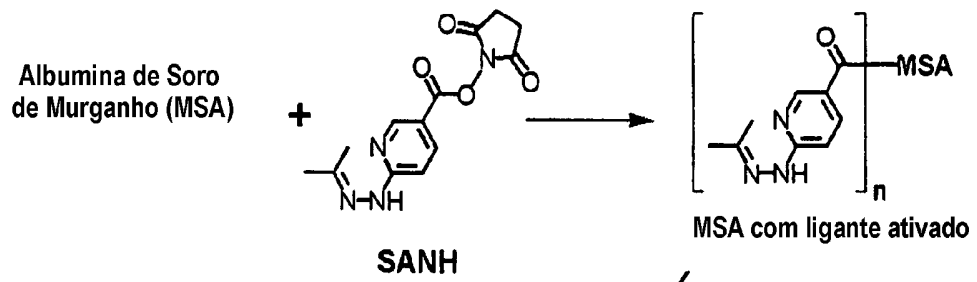


FIG. 3B

UC-1V150



$n = 3 \text{ to } 15$

Conjugado de UC-1V150/MSA com ligante

FIG. 3C

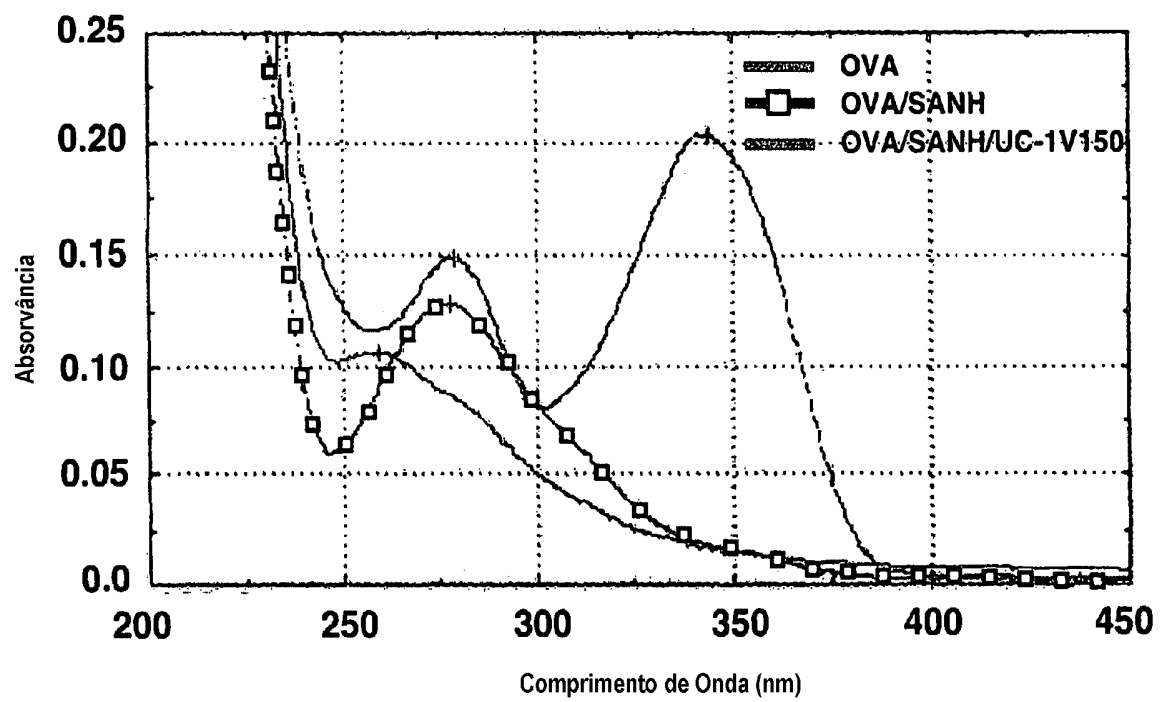


FIG. 4

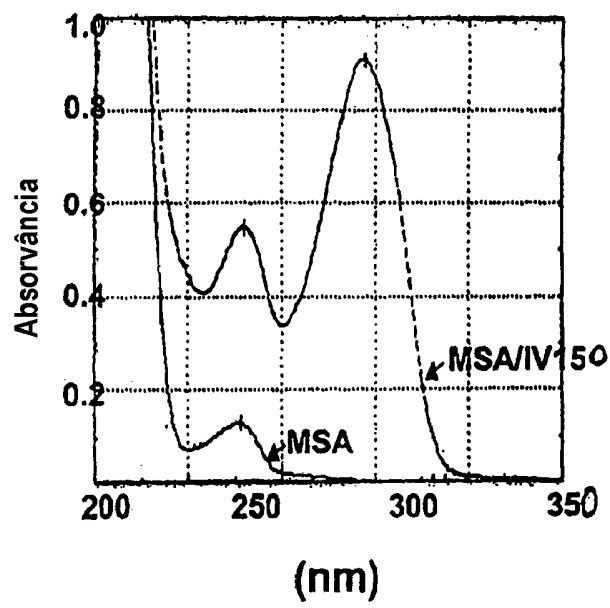
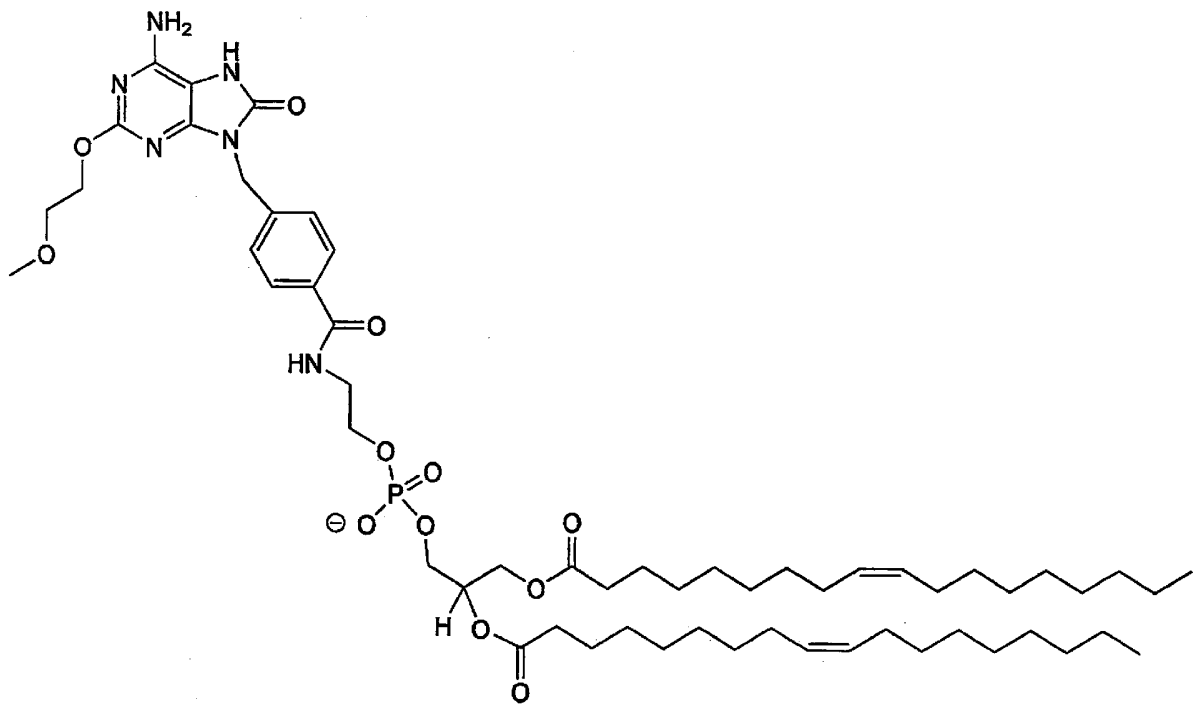


FIG. 5

*FIG. 6*

O UC-1V199/L pode Atuar como um Inibidor da Sinalização de TLR7

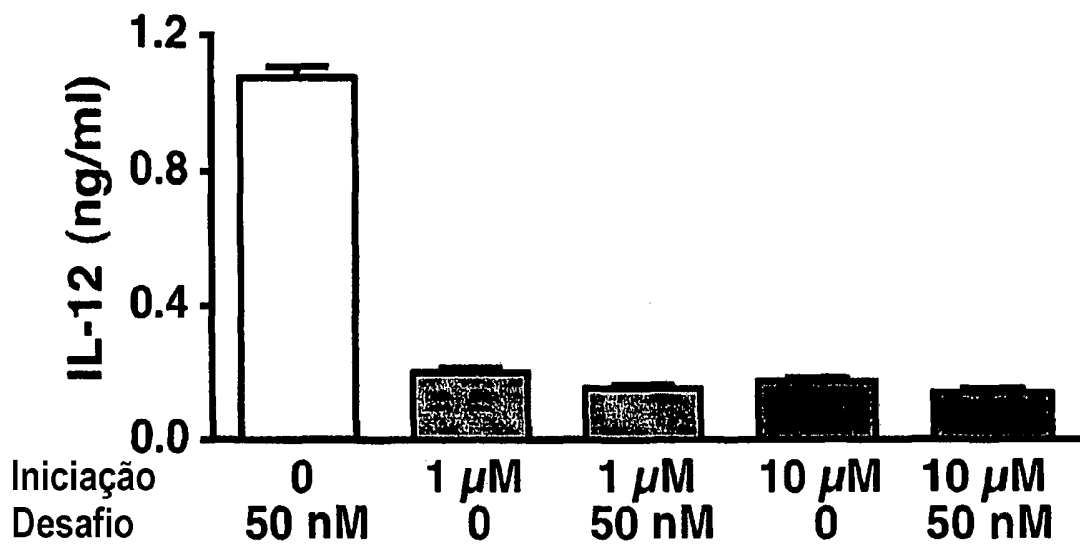


FIG. 7

O UC-1V199/L Inibe a Sinalização de TLR7

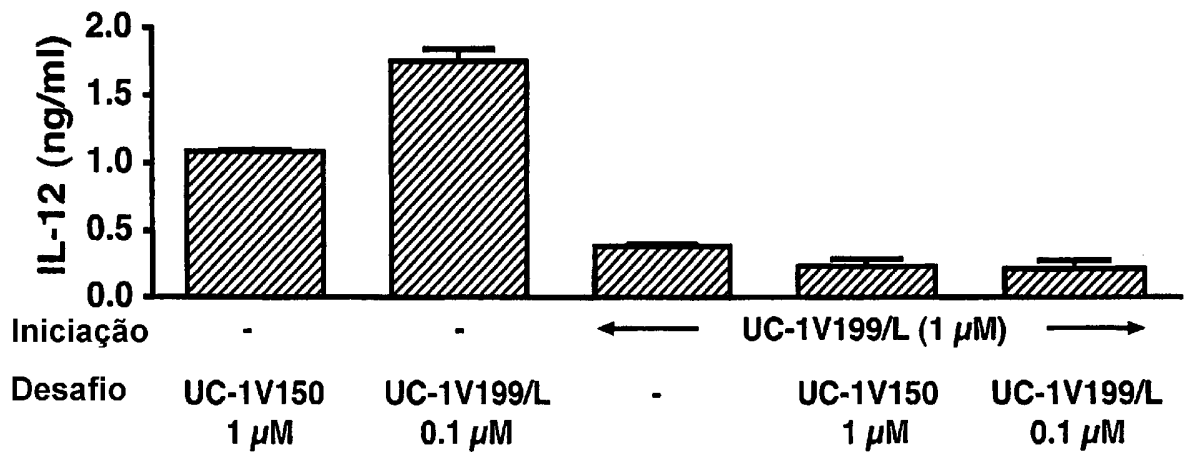
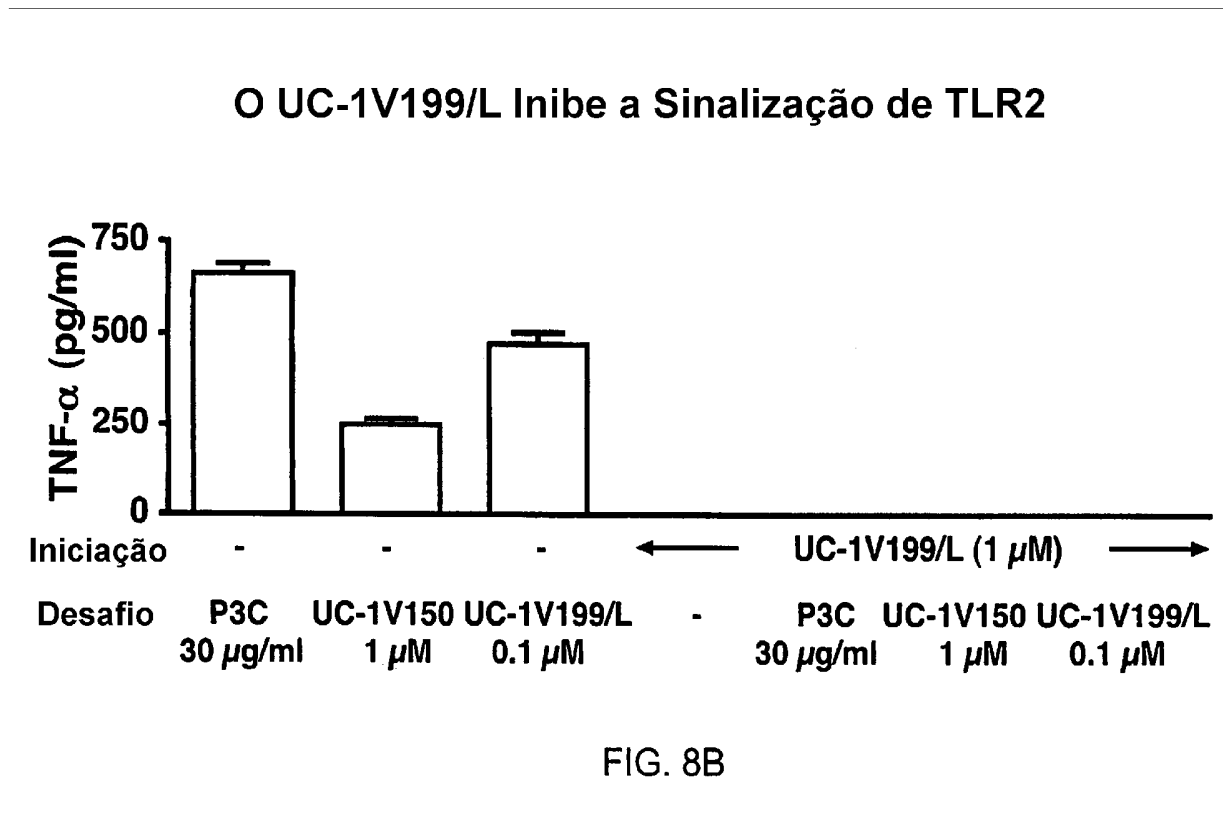


FIG. 8A



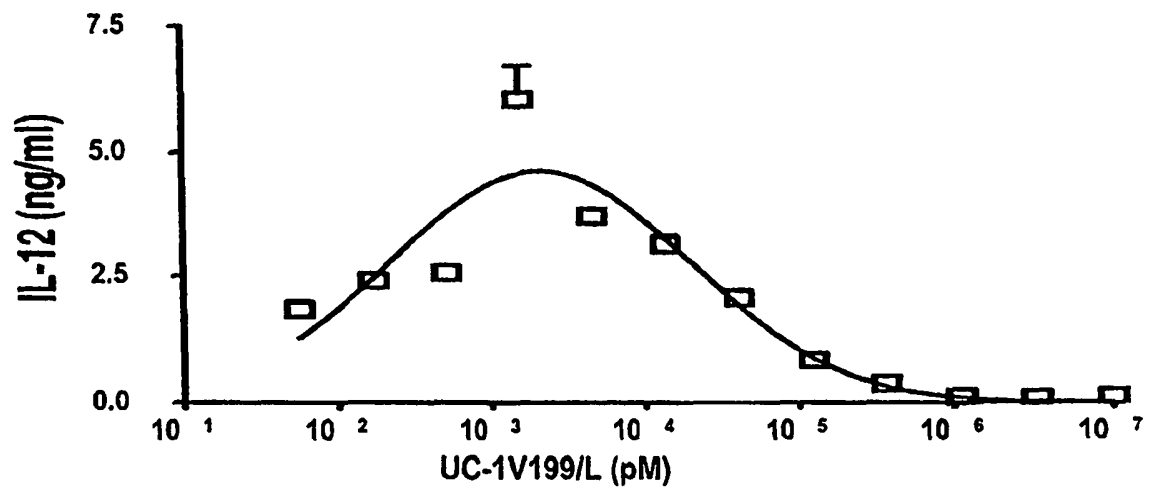


FIG. 9

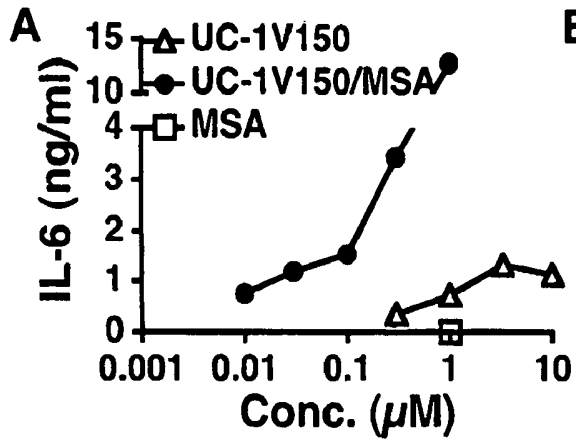


FIG. 10A

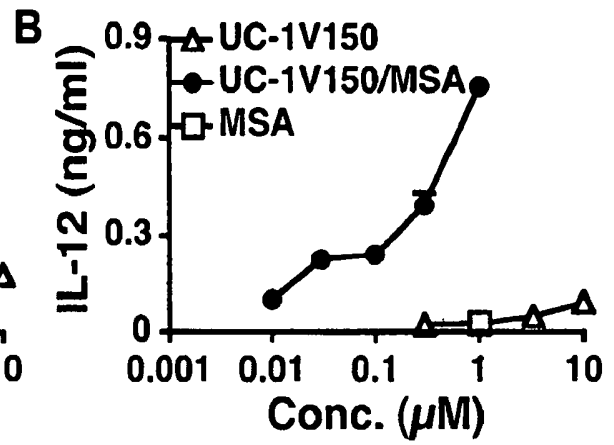


FIG. 10B

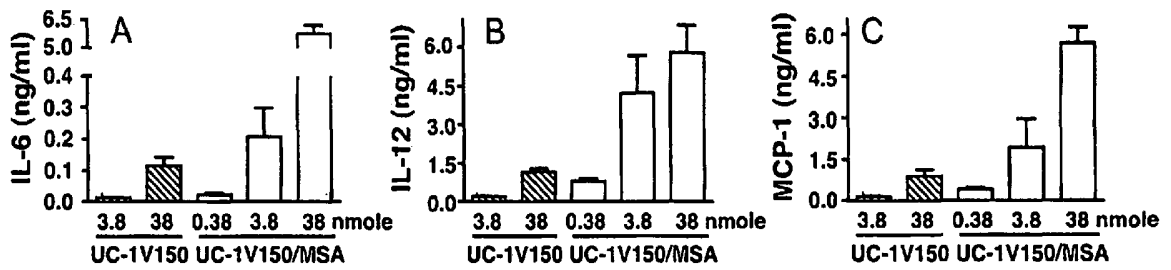


FIG. 11A

FIG. 11B

FIG. 11C

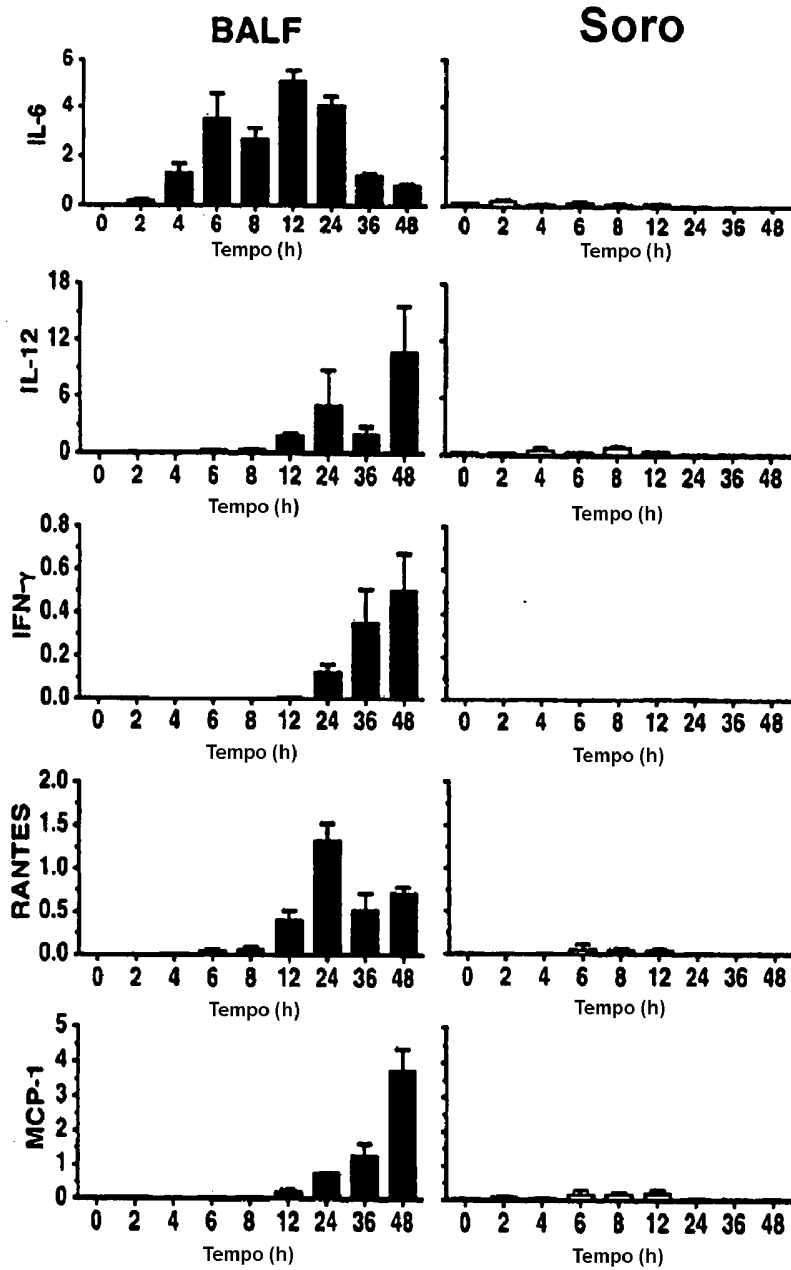


FIG. 12

Indução de citocina em BMDM por conjugado de esporo de antraz irradiado

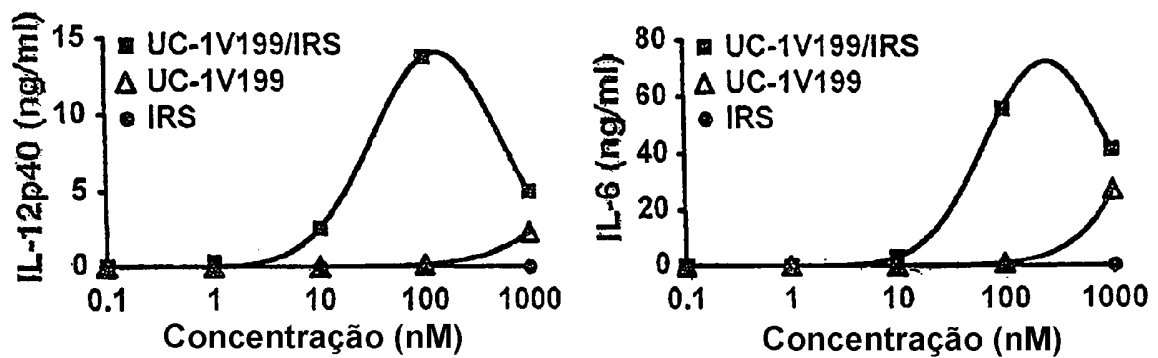


FIG. 13

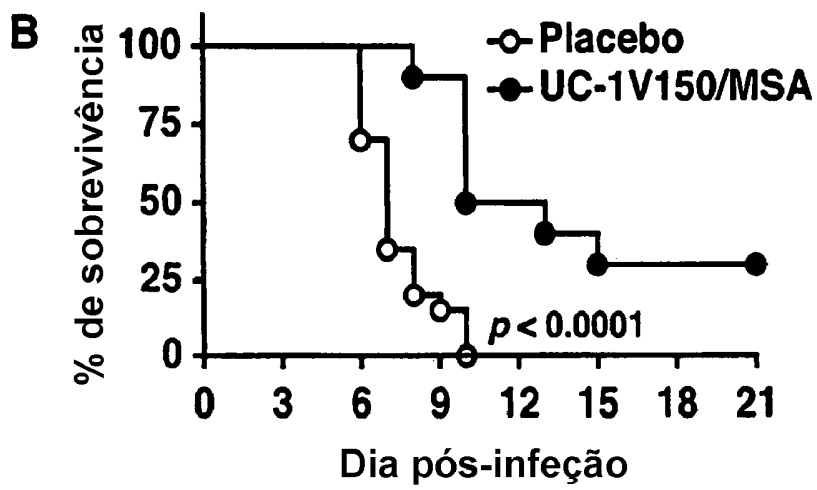
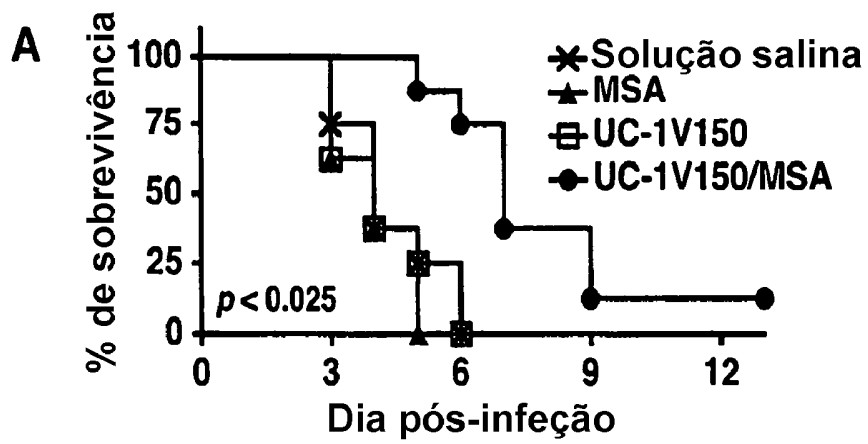


FIG. 14

UC-1V150/MSA como adjuvante de vacina de esporo de antraz:
(I) Uma imunização 6 dias antes da infecção

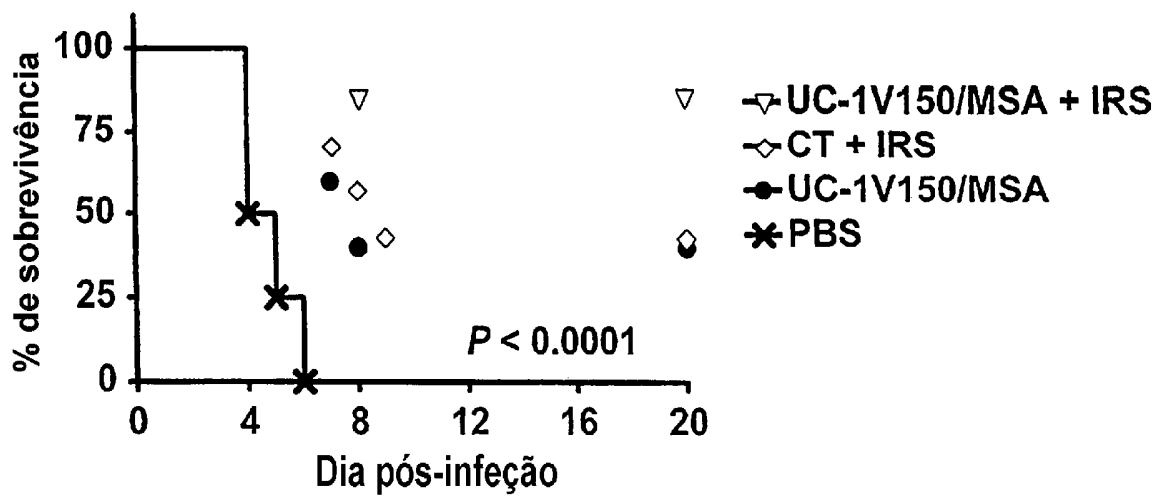


FIG. 15

A proteção deduzida por esporos de antraz gama-irradiados depende de células CD4+

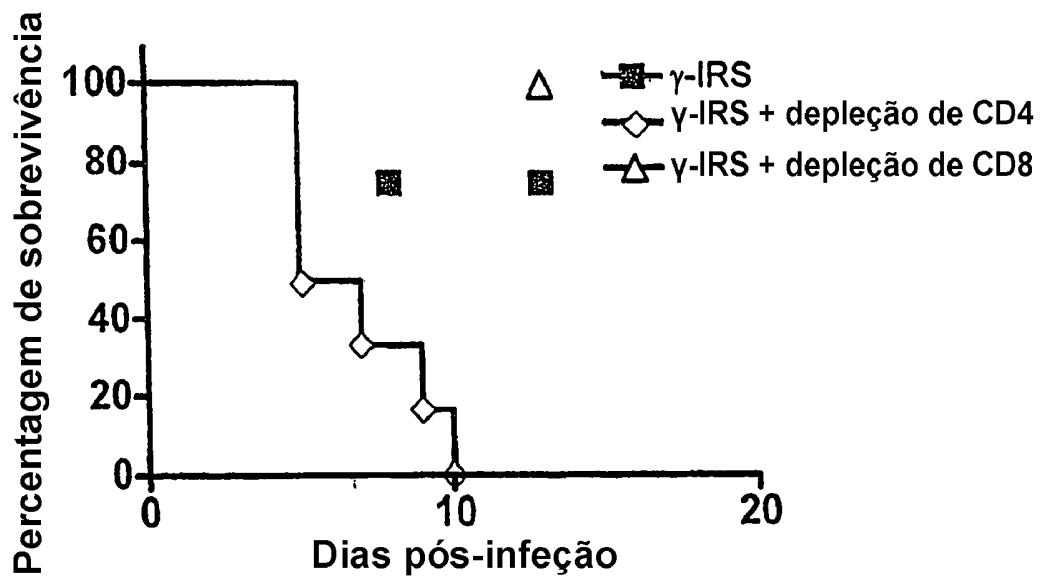


FIG. 16

Citocina	Tempo (h)	Conjugado					Não conjugado				
		BALF		Soro		Proporção	BALF		Soro		Proporção
		ng/ml	SEM	ng/ml	SEM		ng/ml	SEM	ng/ml	SEM	
IL-6	2	0.25	0.09	0.28	0.00	0.9	0.73	0.40	5.00	1.14	0.1
	4	1.34	0.38	0.06	0.02	22.1	1.09	0.64	2.93	1.53	0.4
	6	3.50	1.07	0.14	0.05	24.3	3.00	0.76	3.95	1.24	0.8
	24	4.06	0.41	0.03	0.00	117.2	4.39	0.84	1.08	0.31	4.1
IL-12p40	2	0.06	0.00	0.23	0.03	0.2	0.11	0.09	0.53	0.53	0.2
	4	0.11	0.00	0.50	0.39	0.2	0.06	0.03	0.23	0.23	0.3
	6	0.29	0.04	0.25	0.06	1.1	0.00	0.00	2.82	0.46	0.0
	24	5.05	3.70	0.11	0.00	45.1	0.01	0.01	0.49	0.47	0.0
TNF-a	2	1.25	1.02	0.08	0.01	16.4	2.62	0.83	0.52	0.21	5.0
	4	9.67	1.01	0.02	0.01	580.1	1.53	0.73	0.32	0.16	4.8
	6	8.28	1.72	0.02	0.00	427.5	2.03	0.67	0.39	0.15	5.2
	24	4.22	2.80	0.01	0.00	551.8	0.93	0.47	0.15	0.04	6.2

FIG. 17

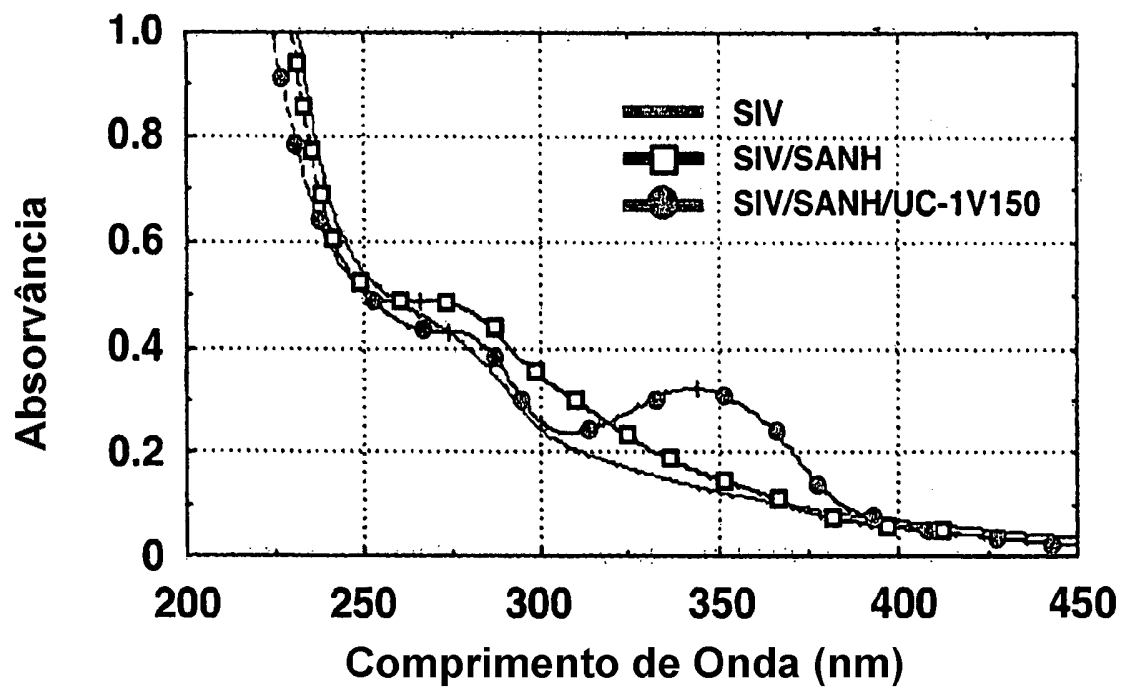


FIG. 18

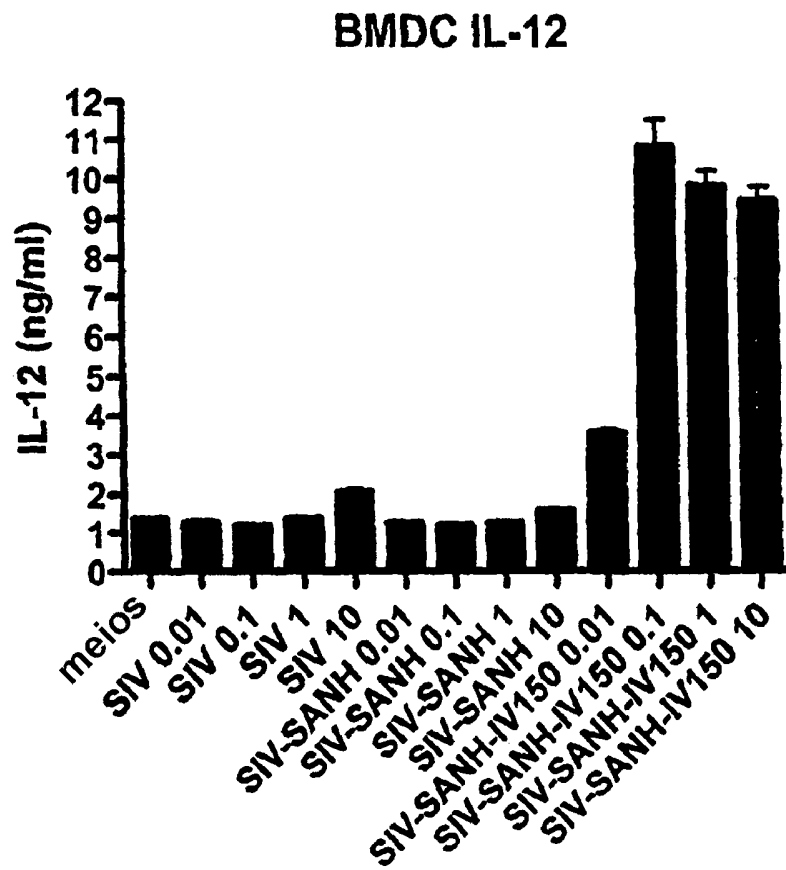


FIG. 19

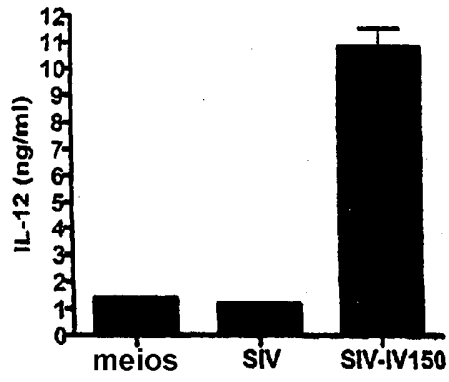


FIG. 20A

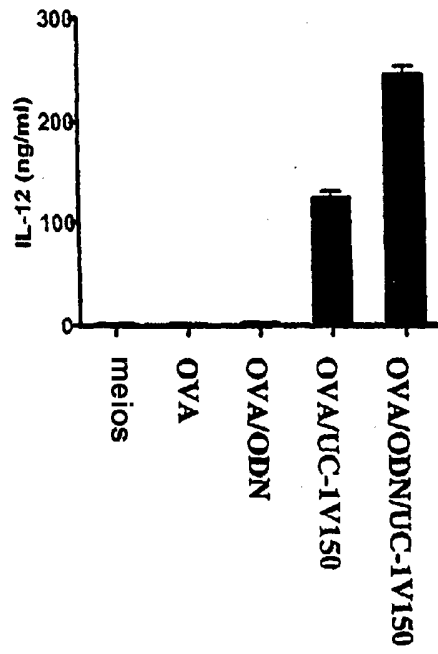


FIG. 20B

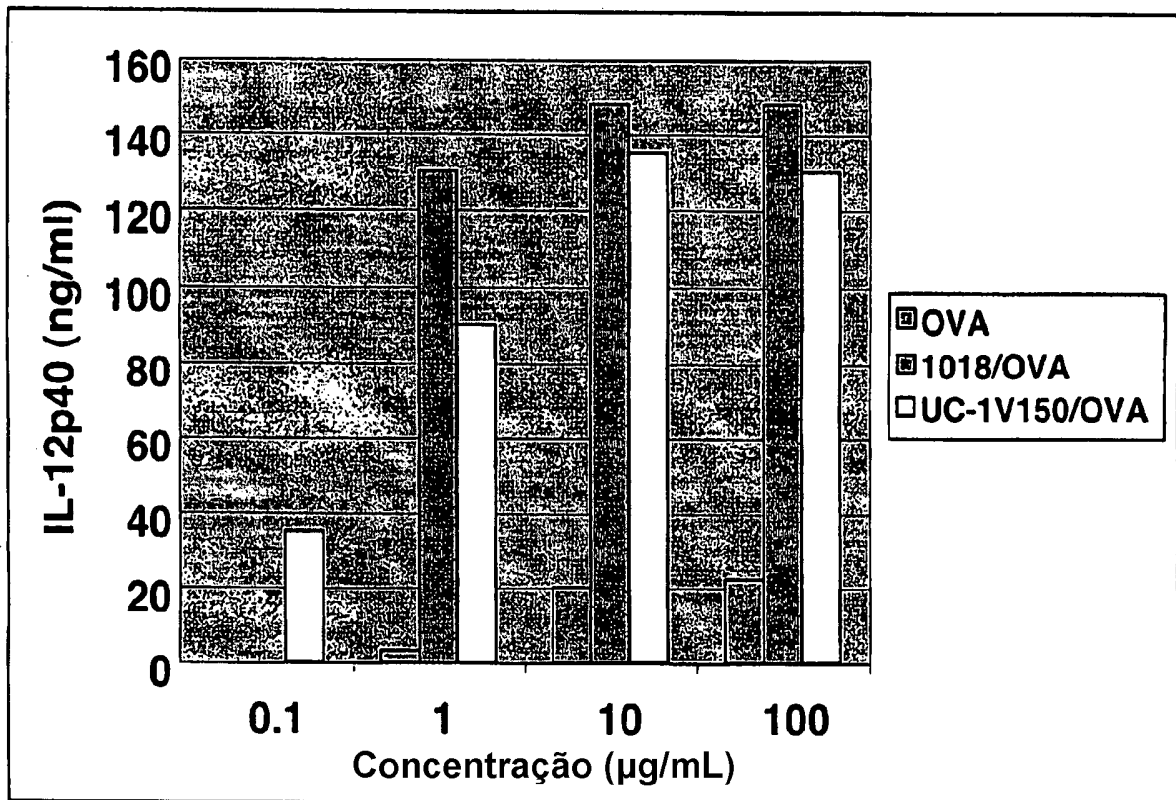


FIG. 21

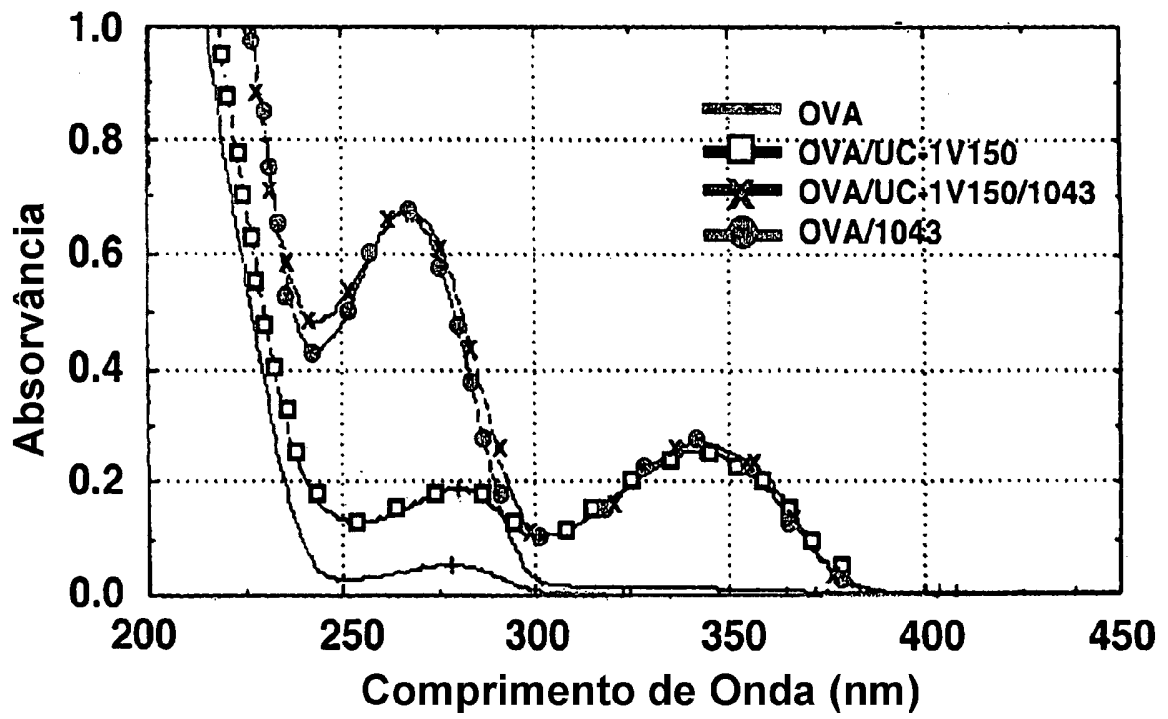


FIG. 22

Indução de IL-12 em BMDC

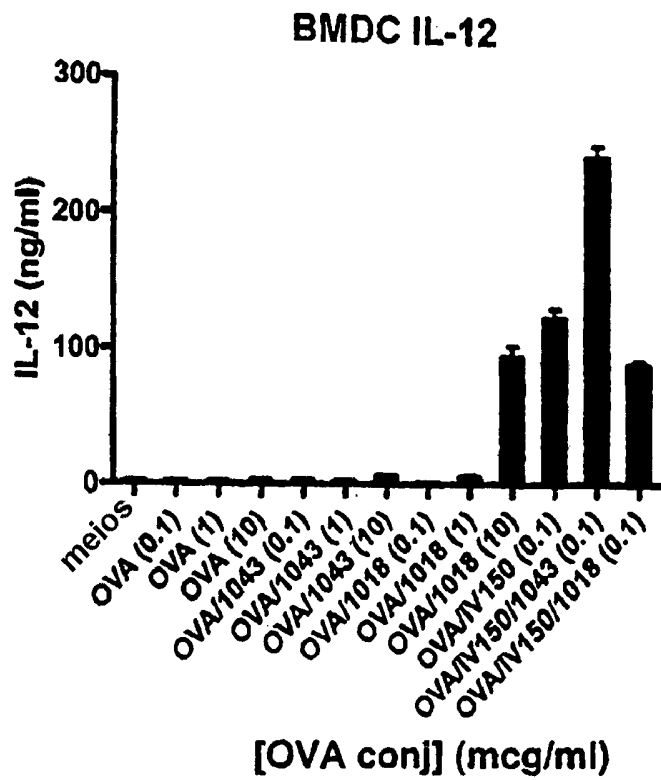
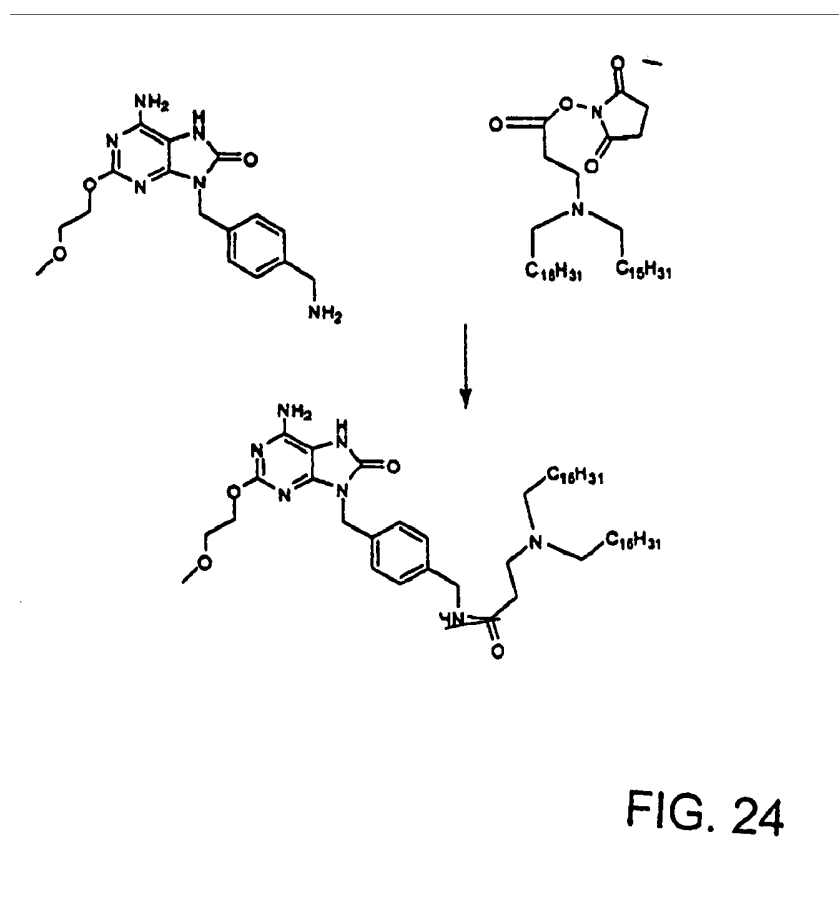
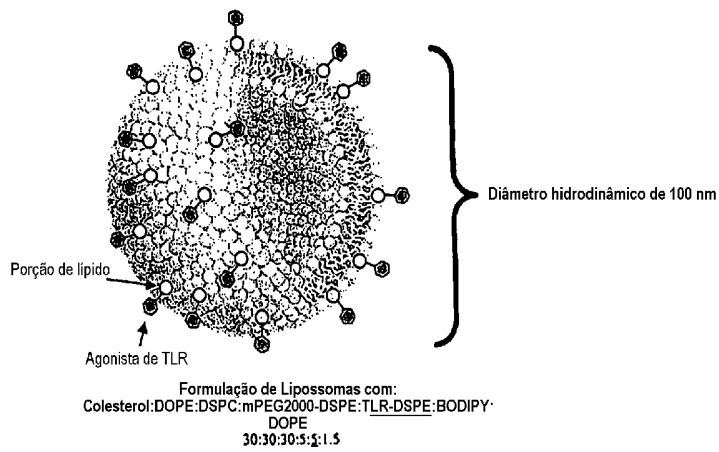


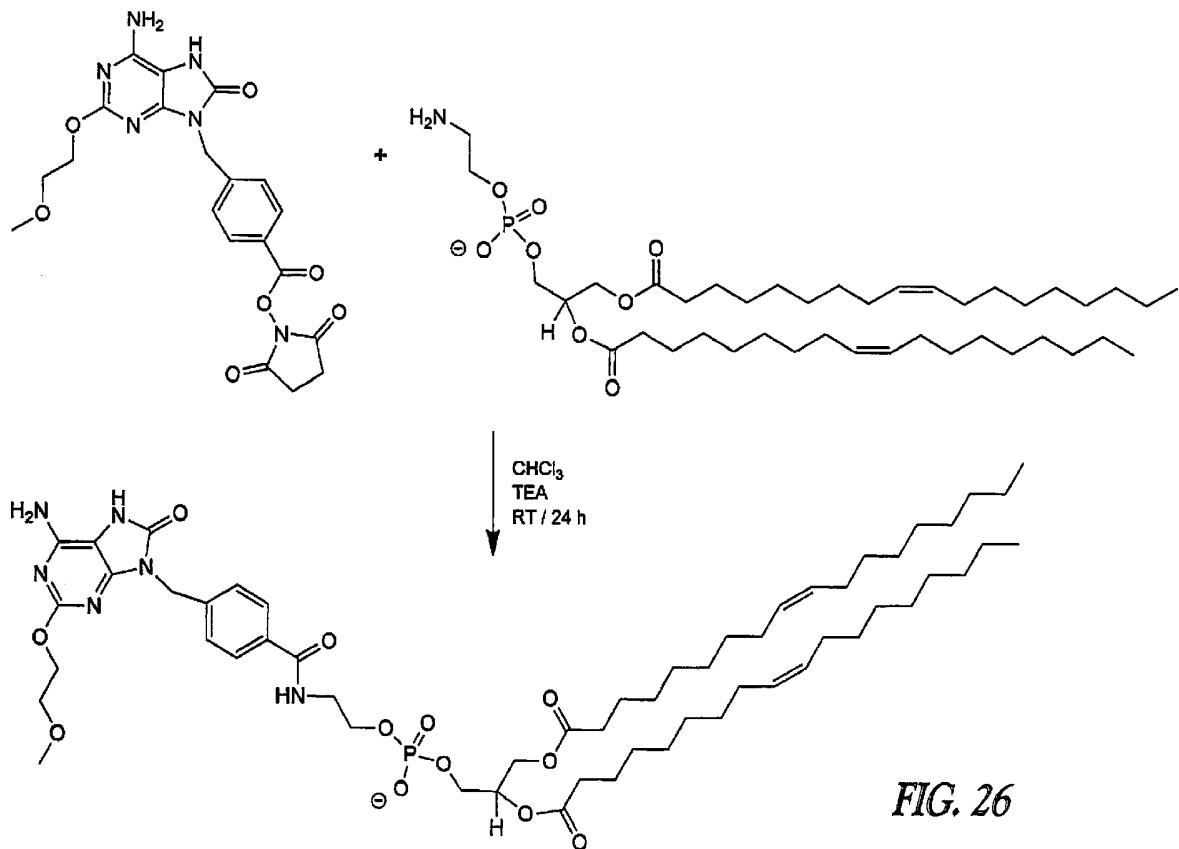
FIG. 23

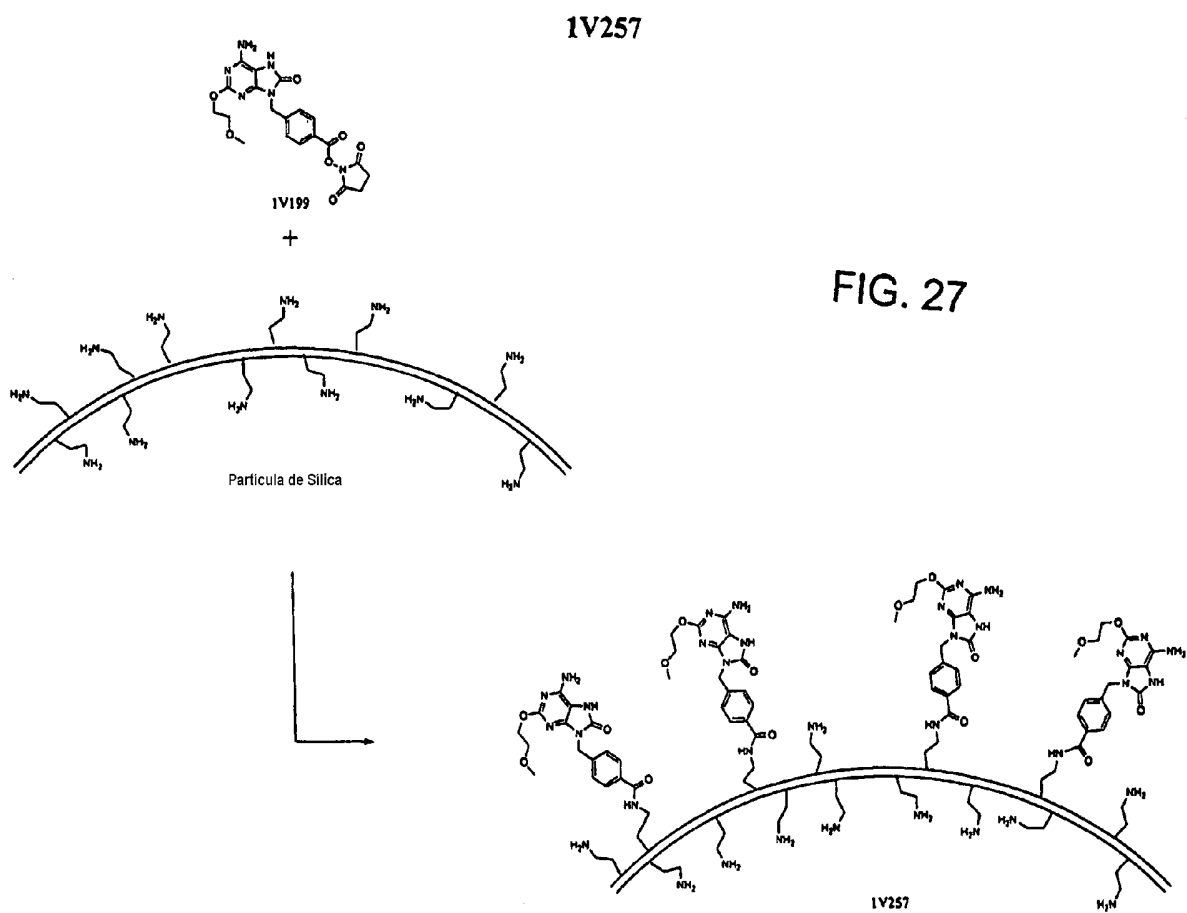




DSPE = distearoilfosfatidiletanolamina
DOPE = dioleoilfosfatidiletanolamina
BODIPY = 6-(((4,4-difluoro-5-(2-tienil)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-il)estiriloxi)acetil)amino-hexanamido-DOPE

FIG. 25





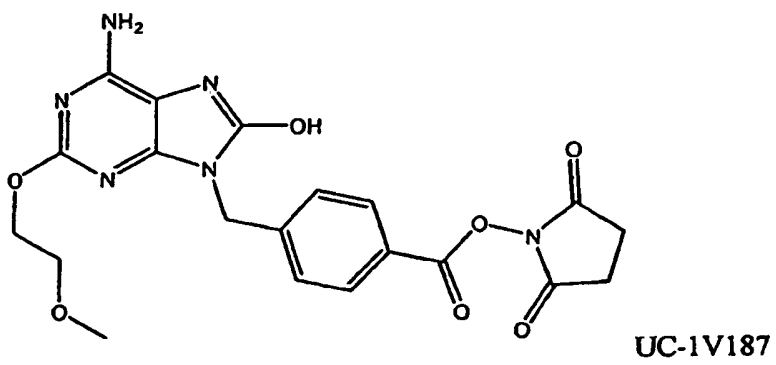
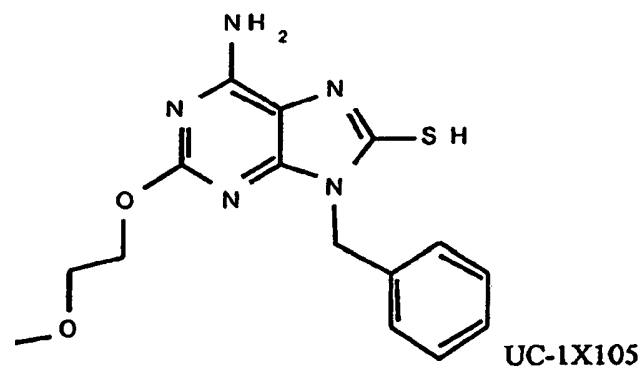
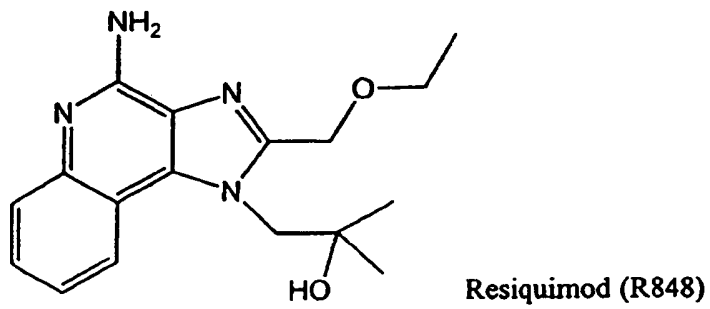
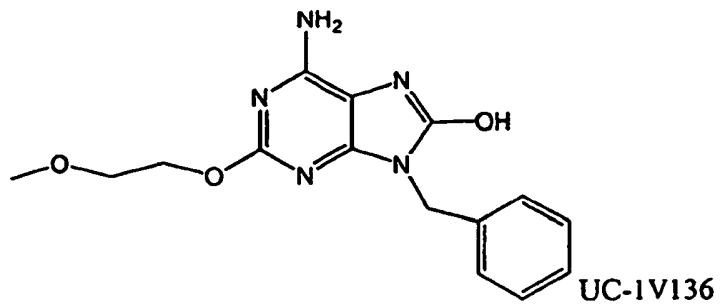
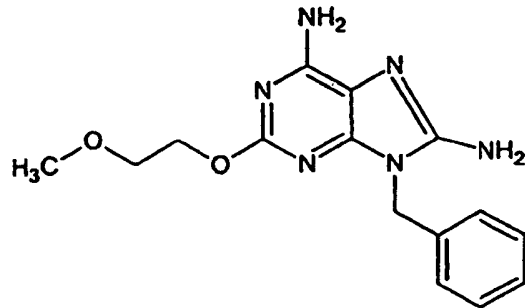
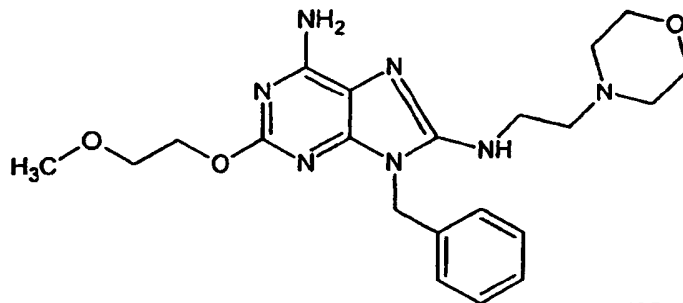


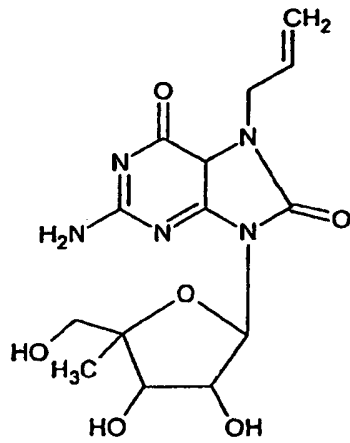
FIG. 28



UC-1W236

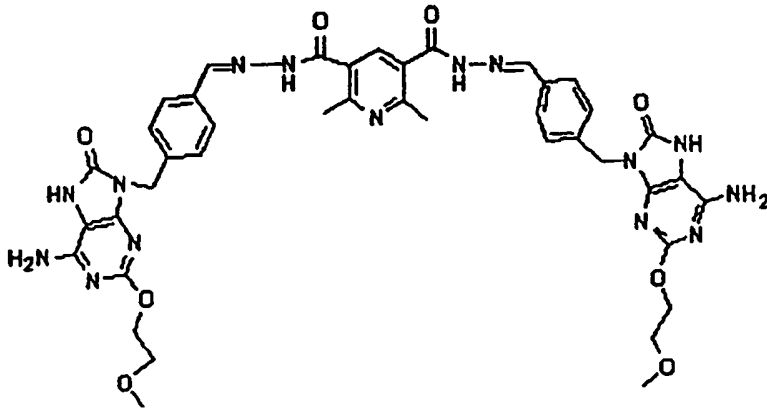


UC-1X51

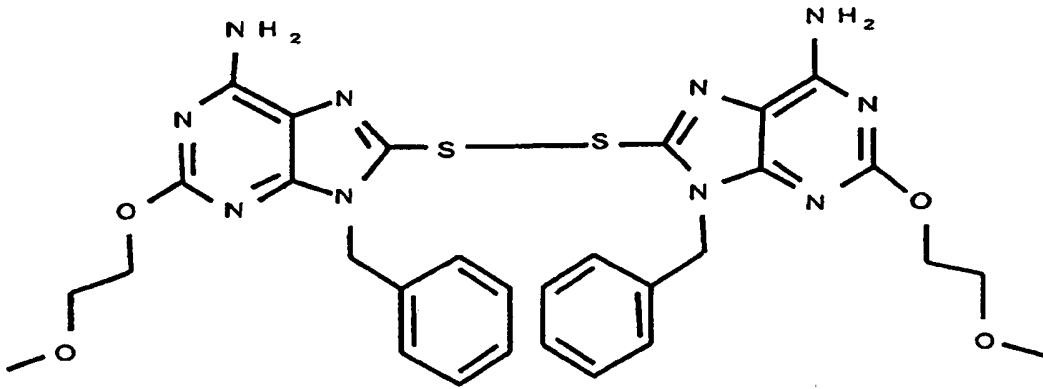


Loxoribina

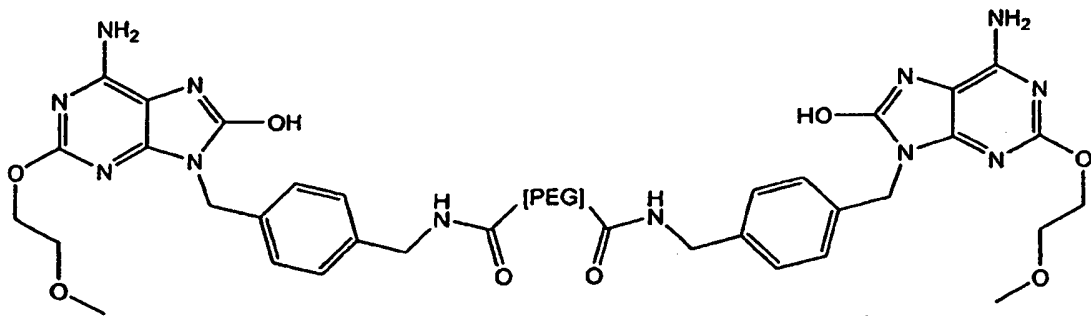
Fig. 28 (Cont.)



UC-1W247



UC-1X113



UC-1V186

FIG. 28 (Cont.)