

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 947**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7125 (2006.01)
A61K 38/08 (2006.01)
C12N 15/117 (2010.01)
A61K 45/06 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 31/10 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2010 E 10716433 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.01.2015 EP 2411521**

54 Título: **Composiciones para la estimulación de resistencia inmunitaria innata de mamíferos a patógenos**

30 Prioridad:

25.03.2009 US 163137 P
18.05.2009 US 179246 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.04.2015

73 Titular/es:

**THE BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY
OF TEXAS SYSTEM (100.0%)
201 West 7th Street
Austin, TX 78701, US**

72 Inventor/es:

**DICKEY, BURTON;
TUVIM, MICHAEL y
EVANS, SCOTT**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 534 947 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones para la estimulación de resistencia inmunitaria innata de mamíferos a patógenos

5 **Antecedentes de la invención****I. Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere generalmente a los campos de la microbiología, inmunología y farmacoterapia antimicrobiana. Más particularmente, las composiciones de la invención se refieren a la modulación de inmunidad innata en los pulmones de un individuo para el tratamiento o atenuación de infección o invasión microbiana usando composiciones de molécula pequeña.

15 **II. Antecedentes**

15 La susceptibilidad de los pulmones a la infección surge de los requisitos arquitectónicos del intercambio de gases. Para soportar la ventilación, los seres humanos exponen continuamente 100 m² de área superficial de pulmón al entorno externo. Los pulmones se exponen no solo al aire, sino también a las partículas, gotitas y patógenos que están suspensas dentro de él. A diferencia de las superficies cutáneas que están envueltas en piel impermeable o el tubo gastrointestinal con una gruesa manta adsorbente de moco, los pulmones presentan una gran superficie de separación medioambiental con una defensa de barrera mínima. Se excluye una barrera más sustancial por la demanda de difusión gaseosa sin obstáculos.

25 A pesar de su vulnerabilidad estructural, los pulmones generalmente se defienden a sí mismos satisfactoriamente contra la infección mediante una variedad de mecanismos mecánicos, humorales y celulares (Knowles et al., 2002; Martin y Frevert, 2005; Rogan, et al., 2006; Travis, et al., 2001); (Mizgerd, 2008; Bals y Hiemstra, 2004; Bartlett et al., 2008; Hiemstra, 2007; Hippenstiel et al., 2006; Schutte y McCray, 2002). La mayoría de los patógenos microbianos inhalados dejan de penetrar en los alvéolos debido al impacto contra las paredes de las vías respiratorias, en las que quedan atrapados por moco y luego se expulsan por el sistema escalador mucociliar (Knowles et al., 2002). Para aquellos patógenos que escapan de este destino, la presencia constitutiva de péptidos antimicrobianos en el fluido de revestimiento de las vías respiratorias limita su crecimiento (Rogan et al., 2006; Travis, et al., 2001). Los macrófagos alveolares que residen en los espacios aéreos más distales pueden ingerir estos organismos, limpiando así los pulmones de una posible infección.

35 Aunque frecuentemente se consideran barreras de intercambio de gas pasivas, las vías respiratorias y epitelios alveolares complementan las defensas del pulmón básicas experimentando sorprendentes cambios estructurales y funcionales locales cuando se encuentran estímulos patógenos. En respuesta a inflamación viral, fúngica o alérgica, las células secretoras de las vías respiratorias rápidamente aumentan su altura y llenan su citoplasma apical con gránulos secretores, un proceso llamado metaplasia inflamatoria (Evans et al., 2004; Williams et al., 2006). En presencia de patógenos, los epitelios alveolares activan sus sistemas plasmalemales y la maquinaria secretora, cooperando así los leucocitos en la protección del pulmón (Evans et al., 2005). Quizás, y lo que es más importante, las interacciones microbianas con receptores de reconocimiento de patrones epiteliales respiratorios producen numerosos productos microbicidas que van a expresarse en el fluido de revestimiento de las vías respiratorias, que incluye defensinas, catelicidinas, lisozima y especies reactivas de oxígeno (Rogan et al., 2006; Forteza et al., 2005; Akinbi et al., 2000; Bals y Hiemstra, 2004; Bals y Hiemstra, 2006). Debe observarse que la neumonía (bacteriana o viral) es la principal causa de muerte por infección en el mundo.

Existe la necesidad de métodos y composiciones adicionales para inhibir y/o tratar infecciones microbianas.

50 **Resumen de la invención**

La presente invención se define por las reivindicaciones. Proporciona composiciones que estimulan la resistencia innata (resistencia innata estimulada (StIR)). También se desvelan métodos de uso de tales composiciones para estimular la StIR. En ciertas realizaciones, la StIR es StIR del pulmón. Un aspecto de la invención proporciona una mayor relación terapéutica/toxicidad o índice. Realizaciones de la invención incluyen composiciones y formulaciones para la potenciación de las defensas biológicas del sujeto mamífero, por ejemplo, humanas, contra infección, por ejemplo, la inmunidad del sujeto contra infección. En ciertos aspectos, las composiciones de la invención se depositan en una cantidad eficaz en los pulmones de un individuo. Aspectos de la invención proporcionan un fortalecimiento rápido y temporal o aumento de las defensas biológicas contra la infección microbiana. La potenciación de la inmunidad de un sujeto atenúa las infecciones microbianas. La atenuación puede ser inhibiendo, tratando o previniendo la infección o crecimiento microbiano o supervivencia. Los aspectos de la invención potencian las defensas del pulmón y las vías respiratorias de un sujeto.

65 En ciertos aspectos de la divulgación se contemplan métodos para tratar, inhibir o atenuar una infección microbiana en un individuo que tiene o está en riesgo de desarrollar una infección tal, métodos que comprenden administrar una cantidad eficaz de una composición de StIR que comprende uno o más ligandos para uno o más receptores innatos.

Se han identificado varios receptores innatos que incluyen, pero no se limitan a, receptor similar a Toll (TLR), receptores de lectina tipo C (CLR) y receptores similares al dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (receptores similares a Nod o NLR). Los TLR son una clase de proteínas que desempeñan una función clave en el sistema inmunitario innato. Son receptores no catalíticos que atraviesan una única membrana que reconocen moléculas estructuralmente conservadas derivadas de microbios. Una vez estos microbios están presentes sobre o en la piel o tubo intestinal, pulmón y mucosa genitourinaria, son reconocidos por TLR, que activan respuestas de células inmunitarias. De forma interesante, muchos de estos agonistas de TLR no inducen una StIR significativa cuando se administran solos. Normalmente, un individuo o sujeto que está tratándose usando los métodos descritos en el presente documento se ha expuesto a un microbio patógeno o está en riesgo de tal exposición.

Ciertas realizaciones de la divulgación se refieren a composiciones que pueden administrarse a las vías respiratorias que comprenden 1, 2, 3, 4 o más agonistas de TLR, además de métodos que usan tales composiciones. Los agonistas de TLR están seleccionados de agonista de TLR2/1, TLR2/6, TLR3, TLR4, TLR5, TLR9 o TLR7. En ciertos aspectos, los agonistas de TLR están seleccionados de agonista de TLR9 y TLR2/6. En otro aspecto, los agonistas de TLR están seleccionados de agonista de TLR5. En todavía otro aspecto, un agonista de TLR5 puede usarse en combinación con un agonista de TLR2/6, TLR4, TLR9 o TLR7. En ciertos aspectos, un agonista de TLR9 puede usarse en combinación con TLR2/6, TLR4, TLR5 o TLR7. En otro aspecto, un agonista de TLR2/6 puede usarse en combinación con un agonista de TLR4, TLR5, TLR9 o TLR7. En ciertos aspectos, un agonista de TLR4 puede usarse en combinación con un agonista de TLR2/6, TLR5, TLR9 o TLR7. En otro aspecto, un agonista de TLR7 puede usarse en combinación con un agonista de TLR2/6, TLR4, TLR5 o TLR9. En todavía otro aspecto, cualquiera de estas dobles combinaciones puede incluir un tercer o un cuarto o un quinto agonista de TLR seleccionado de un agonista de TLR2/6, TLR4, TLR5, TLR9 o TLR7.

Ciertas realizaciones de la divulgación se refieren a métodos para tratar, inhibir o atenuar una infección microbiana que comprende administrar una cantidad eficaz de un agonista de TLR9 y un agonista de TLR2/6 a un individuo que ha estado o está en riesgo de desarrollar o adquirir una infección microbiana. En ciertos aspectos, el agonista de TLR2/6 es PAM2CSK4. En otro aspecto, el agonista de TLR9 es un oligodesoxinucleótido tipo C (ODN). El ODN tipo C puede incluir, pero no se limita a, ODN2395 u ODNM362 u ODN10101 u otro ODN tipo C o análogo del mismo. En ciertos aspectos, el sujeto se ha expuesto o está en riesgo de exposición a un microbio patógeno. El microbio puede ser un virus, una bacteria o un hongo.

En otros aspectos, el agonista de TLR9 y el agonista de TLR2/6 se administran en una formulación nebulizada. El agonista de TLR9 y/o el agonista de TLR2/6 pueden administrarse en una cantidad de aproximadamente 0,1, 1, 5, 10, 50 µg o mg/kg a aproximadamente 5, 10, 50, 100 µg o mg/kg del peso corporal del individuo, que incluye todos los valores e intervalos intermedios.

Ciertas realizaciones se refieren a una composición farmacéuticamente aceptable que comprende un agonista de TLR9 y un agonista de TLR2/6, un agente antiinflamatorio y uno o más excipientes farmacéuticos, en la que dicha composición es estéril y esencialmente libre de microbios patógenos. En ciertos aspectos, el agonista de TLR2/6 es PAM2CSK4. En otro aspecto, el agonista de TLR9 es un oligodesoxinucleótido tipo C (ODN). El ODN tipo C puede incluir, pero no se limita a, ODN2395 u ODNM362 u ODN10101.

En ciertos aspectos, la composición de StIR comprende un polipéptido de flagelina que comprende 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ó 22 aminoácidos consecutivos del péptido QRLSTGSRINSAKDDAAGLQIA (SEC ID N°: 2), que se conoce como un agonista de TLR5, o un segmento o derivado del mismo. Un polipéptido de la divulgación también puede comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos el 70, 80 o el 90 %, que incluye todos los valores e intervalos intermedios, idéntica a SEC ID N°: 2. En otros aspectos, la flagelina es un polipéptido o péptido de flagelina sintetizado y/o purificado o aislado. El término "purificado" o "aislado" significa que el componente se aisló o purificó previamente de otras proteínas o reactivos o subproductos de síntesis, y que el componente es al menos aproximadamente el 95 % puro antes de formularse en la composición. En ciertas realizaciones, el componente purificado o aislado es aproximadamente o es al menos aproximadamente el 80, 95, 96, 97, 98, 99, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, 99,5 % o más puro, o cualquier intervalo derivable en su interior. Un componente purificado tal puede entonces mezclarse con otros componentes para formar una composición como se describe en el presente documento.

Una proteína flagelina recombinante o fragmento o segmento de la misma comprende 5, 10, 15, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250, 300, 350 ó 400 aminoácidos consecutivos, que incluyen todos los valores e intervalos intermedios, de SEC ID N°: 2 u otros polipéptidos de flagelina. Estos fragmentos o segmentos son al menos, como máximo, o aproximadamente el 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o el 100 % idénticos a SEC ID N°: 2 u otros polipéptidos de flagelina. En ciertos aspectos, un polipéptido de flagelina o segmento es al menos el 75 % idéntico a la secuencia de SEC ID N°: 2. En otro aspecto, el polipéptido de flagelina o segmento es al menos el 80 % idéntico a la secuencia de SEC ID N°: 2. En otro aspecto, el polipéptido de flagelina o segmento es al menos el 85 % idéntico a la secuencia de SEC ID N°: 2. En otro aspecto, el polipéptido de flagelina o segmento es al menos el 90 % idéntico a la secuencia de SEC ID N°: 2. En otro aspecto, el polipéptido de flagelina o segmento es al menos el 95 % idéntico a la secuencia de SEC ID N°: 2. Derivados o variantes de flagelina o sus segmentos incluyen mutaciones de inserción, delección y puntuales de SEC ID N°: 2. Una mutación de inserción

particular es una proteína de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos exógena a flagelina en el extremo carboxi o amino. Se conocen varias proteínas flagelina en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, una flagelina que tiene el número de acceso BAB58984 (gi|14278896); YP_001330159 (gi|150402865); YP_001323483 (gi|150399716); CAA28975 (gi|1333716); CAA02137 (gi|1567895); CAA67105 (gi|1580779); AAR10473 (gi|38049688); CAR58992 (gi|197093531); YP_001217666 (gi|147675484); CAL12564 (gi|122089712); BAD14977 (gi|46093563); o CAD05707 (gi|16503200).

Las realizaciones de la invención pueden administrarse por las vías respiratorias. Las composiciones para el uso de la invención incluyen la administración de una composición por inhalación u otros métodos de administración a las vías respiratorias superiores y/o inferiores. En ciertos aspectos, la administración es por inhalación. En ciertos aspectos, la composición de StIR se administra en una formulación nebulizada o aerosolizada. En otro aspecto, la composición está aerosolizada o nebulizada o en una forma que puede ser inhalada por o instilarse en un sujeto. La composición puede administrarse por inhalación o inspiración. La composición de StIR, que incluye agonista de TLR individualmente o en agregado, puede administrarse en una cantidad de aproximadamente 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 µg o mg/kg a aproximadamente 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 200 µg o mg/kg de peso corporal del individuo. En otros aspectos, un sujeto puede administrarse con aproximadamente 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 200 µg o mg de StIR o agonista de TLR individualmente o todos los agonistas de TLR totales. El sujeto puede estar en riesgo de exposición a o exponerse a un virus, bacteria u hongo inhalado. Todavía otras realizaciones de la divulgación incluyen métodos en los que la composición se administra antes; después; durante; antes y después; antes y durante; durante y después; antes, después de y durante la exposición o exposición sospechada o elevado riesgo de exposición al organismo. El sujeto puede exponerse a un arma biológica o a un patógeno oportunista. En aspectos particulares, el sujeto está inmunocomprometido, tal como un paciente con cáncer o un paciente con SIDA.

En otra realización más, la presente divulgación se refiere a una composición farmacéuticamente aceptable que comprende uno o más agonistas de TLR; un agente antiinflamatorio; un agente antimicrobiano; y/o uno o más excipientes farmacéuticos. Normalmente, tales composiciones son estériles y esencialmente libres de microbios patógenos.

En ciertos aspectos, el microbio patógeno o potencialmente patógeno que está tratándose o contra el cual se protege es un virus, una bacteria y/o un hongo. En ciertos aspectos, un microbio es un virus. El virus puede ser de las familias de virus Adenoviridae, Coronaviridae, Filoviridae, Flaviviridae, Hepadnaviridae, Herpesviridae, Orthomyxoviridae, Paramyxovirinae, Pneumovirinae, Picornaviridae, Poxviridae, Retroviridae o Togaviridae; y/o paragripe, gripe, H5N1, Marburgo, Ébola, coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave, virus de la fiebre amarilla, virus respiratorio sincitial humano, hantavirus o virus de la variolovacuna.

En todavía otro aspecto, el microbio patógeno o potencialmente patógeno que está tratándose o contra el cual se protege es una bacteria. Una bacteria puede ser una bacteria intracelular, una Gram-positiva o una Gram-negativa. En otro aspecto, la bacteria incluye, pero no se limita a, una bacteria *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Francisella* o *Yersinia*. En todavía otro aspecto, la bacteria es *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, *Pseudomonas aeruginosa* o *Staphylococcus aureus*. En ciertas realizaciones, una bacteria es *Bacillus anthracis* y/o *Staphylococcus aureus*. En todavía otro aspecto, una bacteria es una bacteria resistente a fármacos, tal como una *Staphylococcus aureus* resistente a múltiples fármacos (MRSA). Bacilos Gram-negativos médicamente relevantes representativos incluyen *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Helicobacter pylori*, *Salmonella enteritidis* y *Salmonella typhi*. Bacterias Gram-positivas representativas incluyen, pero no se limitan a, *Bacillus*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Actinobacteria* y *Clostridium mycoplasma* que carecen de paredes celulares y no pueden teñirse con Gram, que incluyen aquellas bacterias que se derivan de tales formas.

En todavía otro aspecto, el microbio patógeno o potencialmente patógeno que está tratándose o contra el cual se protege es un hongo, tal como miembros de la familia *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Coccidioides*, *Blastomyces*, *Pneumocystis* o *Zygomycetes*. En todavía otras realizaciones, un hongo incluye, pero no se limita a, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis* o *Pneumocystis carinii*. La familia zigomicetes incluye Basidiobolales (Basidiobolaceae), Dimargaritales (Dimargaritaceae), Endogonales (Endogonaceae), Entomophthorales (Ancylistaceae, Completoariaceae, Entomophthoraceae, Meristacraceae, Neozygitaceae), Kickxellales (Kickxellaceae), Mortierellales (Mortierellaceae), Mucorales y Zoopagales. La familia *Aspergillus* incluye, pero no se limita a, *Aspergillus caesiellus*, *A. candidus*, *A. carneus*, *A. clavatus*, *A. deflectus*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. glaucus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. oryzae*, *A. parasiticus*, *A. penicilloides*, *A. restrictus*, *A. sojae*, *A. sydowi*, *A. tamari*, *A. terreus*, *A. ustus*, *A. versicolor* y similares. La familia *Candida* incluye, pero no se limita a, *Candida albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. lusitanae*, *C. milleri*, *C. oleophila*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. utilis* y similares.

En ciertos aspectos, la bacteria patógena es una bacteria intracelular, una Gram-positiva o una Gram-negativa. En ciertas realizaciones, la bacteria es una *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Francisella* o *Yersinia*. En todavía otros aspectos, la bacteria es *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y/o *Burkholderia cepacia*.

5 Los términos “atenuar”, “inhibir”, “reducir” o “prevención”, o cualquier variación de estos términos, cuando se usan en las reivindicaciones y/o la memoria descriptiva, incluyen cualquier disminución medible o inhibición completa para lograr un resultado deseado, por ejemplo, reducción en la carga o crecimiento de microbios tras la exposición.

10 El uso de la palabra “un” o “una” cuando se usa conjuntamente con el término “que comprende” en las reivindicaciones y/o la memoria descriptiva puede significar “uno”, pero también está de acuerdo con el significado de “uno o más”, “al menos uno”, y “uno o más de uno”.

15 Se contempla que cualquier realización tratada en el presente documento puede implementarse con respecto a cualquier método o composiciones de la divulgación, y viceversa. Además, pueden usarse composiciones y kits de la divulgación para lograr los métodos de la divulgación.

20 En toda la presente solicitud, el término “aproximadamente” se usa para indicar que un valor incluye la desviación estándar del error para el dispositivo o método que se emplea para determinar el valor.

25 El uso del término “o” en las reivindicaciones se usa para significar “y/o”, a menos que se indique explícitamente para referirse a alternativas solo o las alternativas son mutuamente excluyentes, aunque la divulgación soporte una definición que se refiere a solo alternativas y “y/o.” En cierta lista que incluye y/o, o, o y uno o más de los miembros enumerados pueden excluirse específicamente de la lista.

30 Como se usa en esta memoria descriptiva y reivindicación (reivindicaciones), las palabras “que comprende” (y cualquier forma de que comprende, tal como “comprenden” y “comprende”), “que tiene” (y cualquier forma de que tiene, tal como “tienen” y “tiene”), “que incluye” (y cualquier forma de que incluye, tal como “incluye” y “incluyen”) o “que contiene” (y cualquier forma de que contiene, tal como “contiene” y “contienen”) son incluyentes o de extremos abiertos y no excluyen elementos adicionales no citados o etapas del método.

35 Otros objetivos, características y ventajas de la presente invención serán evidentes de la siguiente descripción detallada. Debe entenderse, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones específicas de la invención, se facilitan a modo de ilustración solo, ya que diversos cambios y modificaciones dentro del espíritu y alcance de la invención serán evidentes para aquellos expertos en la materia de esta descripción detallada.

Descripción de los dibujos

40 Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y están incluidos para demostrar adicionalmente ciertos aspectos de la presente invención. La invención puede entenderse mejor por referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de realizaciones específicas presentadas en el presente documento.

45 FIG. 1. La endotoxina natural (un agonista de TLR4) induce algunas StIR. Se expusieron ratones Swiss-Webster no mutados (10/grupo) a *S. pneumoniae* (5×10^{10} UFC/ml) 24 h después del tratamiento a lisado de NTHi (“NTHi sup”), la concentración de LPS estimada que estaba en el lisado de NTHi (“Endotoxina 1x”), diez veces el LPS que se creía que estaba en el lisado (“Endotoxina 10x”) o sin tratamiento.

50 FIG. 2. El lípido A hexacilado sintético (agonista de TLR4) no induce StIR. Se trataron ratones Swiss-Webster no mutados (8/grupo) con suspensiones de lípido A sintético o PBS 24 h antes de la exposición a *P. aeruginosa*.

55 FIG. 3. Se muestra un experimento representativo de ratones Swiss-Webster (8/grupo) tratados con alta o baja dosis de imiquimod (agonista de TLR7) o PBS 24 h antes de la exposición infecciosa a *P. aeruginosa*.

FIG. 4. Estimulación de TLR9 solo induce protección mínima. Ratones Swiss-Webster no mutados (8/grupo) se trataron con PBS u ODN2395 24 h antes de la infección con *P. aeruginosa* inhalado.

60 FIG. 5. El tratamiento de alta dosis con un agonista de TLR2/6 induce StIR. Se trataron ratones Swiss-Webster no mutados con alta o baja dosis de Pam2CSK4 o PBS 24 h antes de la infección con *P. aeruginosa*.

65 FIG. 6. Una combinación de agonistas de TLR induce mayor StIR que cualquiera solo. Ratones Swiss-Webster no mutados se trataron con ODN2395 (20 µg/ml, 8 ratones), Pam2CSK4 (20 µg/ml, 8 ratones), ambos agonistas (10 ratones), o PBS (10 ratones).

FIG. 7. Un fragmento sintético de flagelina (agonista de TLR5) induce StIR. Un segmento altamente conservado de 22 aminoácidos de flagelina o PBS solo se aerosolizó a Swiss-Webster no mutados 24 h antes de la infección con *P. aeruginosa*.

5 **FIG. 8.** Efecto de la infección en aerosol de la gripe A/HK del depósito de pulmón 11-29-05 sobre el peso corporal: Un tratamiento con aerosol de 30 min; dosis del virus de la gripe: ~100 TCID₅₀/ratón. El peso disminuye inicialmente a medida que avanza la infección, reflejando la gravedad de la enfermedad, luego aumenta durante la recuperación.

10 **FIG. 9.** Efecto de la infección en aerosol de la gripe A/HK del depósito de pulmón 11-29-05 sobre la supervivencia: Un tratamiento con aerosol de 30 min; dosis del virus de la gripe: ~100 TCID₅₀/ratón.

15 **FIG. 10.** Ilustra el efecto de un pretratamiento con aerosol de 30 min con ODN/PAM2/poli IC sobre la supervivencia de ratones infectados con aerosol de la gripe A/HK; dosis viral ~130 TCID₅₀/ratón.

FIG. 11. Efecto de la infección en aerosol de la gripe A/HK del depósito de pulmón 11-29-05 sobre el peso corporal: Un tratamiento con aerosol de 30 min; dosis del virus de la gripe: ~100 TCID₅₀/ratón. El peso disminuye inicialmente a medida que avanza la infección, reflejando la gravedad de la enfermedad, luego aumenta durante la recuperación.

20 **FIG. 12A y 12B.** Se requiere señalización de MyD88, pero no de TRIF, para la resistencia inducida por lisado bacteriano a neumonía. FIG. 12A. Ratones *Myd88*^{-/-} y no mutados se expusieron por inhalación a *P. aeruginosa* con o sin pretratamiento 24 h antes con un lisado aerosolizado de *H. influenzae* no tipificable (NTHi). *Izquierda*, supervivencia (N = 10 ratones/grupo, *p<0,0001). *Derecha*, carga bacteriana de pulmón inmediatamente después de la infección (derecha, N = 3 ratones/grupo, **p<0,004, †p=0,39 frente a control no mutado). FIG. 12B. Exposición a *P. aeruginosa* de ratones *Trif*^{-/-} con o sin pretratamiento con el lisado bacteriano. *Izquierda*, supervivencia (N = 10 ratones/grupo, *p<0,0001). *Derecha*, carga bacteriana de pulmón inmediatamente después de la infección (N = 3 ratones/grupo, *p<0,0001).

30 **FIG. 13. La destrucción de patógenos inducida no está alterada en ratones deficientes en el receptor de interleucina-1.** Se trataron ratones *Il1r*^{-/-} y no mutados con PBS aerosolizado o un lisado de *Haemophilus influenzae* no tipificable (NTHi) 24 h antes de la exposición a *P. aeruginosa*. Se muestra la carga bacteriana de homogeneizados de pulmón inmediatamente después de la infección. (N = 3 ratones/grupo, *p=0,001 frente a no mutados + PBS, **p=0,01 frente a *Il1r*^{-/-}, †p=0,66 frente a no mutados + PBS, ‡p=0,89 frente a no mutados + NTHi)

35 **FIG. 14. Recuentos de leucocitos en líquido de lavado broncoalveolar después del tratamiento con ligandos de TLR sintéticos individuales.** Se sometieron ratones a BAL 24 h después del tratamiento con PBS o uno de los siguientes ligandos de TLR: Pam3CSK4 (agonista de TLR2/1, 1 µg/ml, 3 µg/ml, 10 µg/ml), Pam2CSK4 (agonista de TLR2/6, 1 µg/ml, 3 µg/ml, 10 µg/ml), poli (I:C) (agonista de TLR3, 1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml), lípido A sintético (MPLA, agonista de TLR4, 1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml), Flg22 (sintético 22-mero de flagelina, agonista de TLR5, 10 µg/ml, 100 µg/ml, 1000 µg/ml), imiquimod (TLR7 y TLR8, 100 µg/ml, 300 µg/ml, 1000 µg/ml) u ODN2395 (agonista de TLR9, 2 µg/ml, 20 µg/ml). Se muestran recuentos de neutrófilos (barras negras) y recuentos de macrófagos (barras grises) en líquido de BAL.

45 **FIG. 15A - 15G.** El tratamiento aerosolizado con ligandos de TLR sintéticos individuales no induce un alto nivel de resistencia contra neumonía. Se expusieron ratones no mutados a *P. aeruginosa* después del tratamiento (8 ml nebulizados durante 20 min) con PBS o los siguientes ligandos de TLR sintéticos 24 h antes: FIG. 15A. Agonista de TLR2/1 Pam3CSK4 100 µg/ml, FIG. 15B. Agonista de TLR2/6 Pam2CSK4 10 µg/ml, FIG. 15C. Agonista de TLR3 poli (I:C) 100 µg/ml, FIG. 15D. Agonista de TLR4 MPLA 100 µg/ml, FIG. 15E. Agonista de TLR5 Flg22 100 µg/ml, FIG. 15F. Agonista de TLR7 y TLR8 imiquimod 1 mg/ml, o FIG. 15G. Agonista de TLR9 ODN 2395 20 µg/ml. Las curvas de supervivencia son ejemplos representativos de al menos tres experimentos distintos para ratones tratados y no tratados (N = 8 ratones/grupo, *p=0,5, **p=1,0, †p=0,47, ‡p=0,2).

55 **FIG. 16A - 16C.** Los agonistas de TLR2/6 y TLR9 cooperan para inducir resistencia contra neumonía bacteriana. FIG. 16A. *Izquierda*, supervivencia de ratones expuestos a *P. aeruginosa* 24 h después del tratamiento con PBS, Pam2CSK4 10 µg/ml, ODN 2395 20 µg/ml, la combinación, o la combinación a dosis doble (N = 6 ratones/grupo, ‡p=0,008 frente a PBS). *Derecha*, carga bacteriana de homogeneizados de pulmón inmediatamente después de la infección con *P. aeruginosa* (N = 3 ratones/grupo, #p=0,045 frente a PBS, ###p=0,030 frente a PBS). FIG. 16B. *Izquierda*, supervivencia de ratones expuestos a *S. pneumoniae* 24 h después del tratamiento con PBS, Pam2CSK4 10 µg/ml, ODN 2395 20 µg/ml, la combinación, o la combinación a dosis doble (N = 10 ratones/grupo, ‡p<0,0001 frente a tratados con PBS). *Derecha*, carga bacteriana de homogeneizados de pulmón inmediatamente después de la infección por *S. pneumoniae* 2x10¹⁰ (N = 3 ratones/grupo, †p<0,001, ‡p<0,0001). FIG. 16C. Recuento de células de BAL de ratones 4 ó 24 h después del tratamiento con PBS, Pam2CSK4 10 µg/ml, ODN 2395 20 µg/ml, o la combinación de Pam2CSK4 y ODN2395 (N = 3 ratones/grupo, *p=0,016 frente a PBS, **p<0,0001 frente a PBS, †p=0,041 frente a Pam2 solo).

FIG. 17A - 17F. No todas las combinaciones de agonistas de TLR proporcionan protección significativa contra neumonía. Se expusieron ratones no mutados a *P. aeruginosa* siguiendo el tratamiento con PBS o las siguientes combinaciones de agonistas de TLR 24 h antes: FIG. 17A. Pam2CSK4 y poli (I:C), FIG. 17B. Pam2CSK4 y Flg22, FIG. 17C. Pam2CSK4 e imiquimod, FIG. 17D. ODN2395 y poli (I:C), FIG. 17E. ODN2395 y Flg22, FIG. 17F. ODN2395 y Pam3CSK4. Las curvas de supervivencia son ejemplos representativos de al menos tres experimentos distintos (N = 8 ratones/grupo, *p=0,20, **p=0,08, †p=1,0, ‡p=0,5).

FIG. 18A - 18B. TLR2 es suficiente para promover la sinergia protectora de Pam2CSK4 y ODN2395, pero no se requiere para resistencia inducida. FIG. 18A. *Izquierda*, supervivencia de ratones *Tlr2*^{-/-} y no mutados expuestos a *P. aeruginosa* con o sin tratamiento con ODN2395 y Pam2CSK4 24 h antes (N = 8 ratones/grupo, *p<0,0002). *Derecha*, carga bacteriana de homogeneizados de pulmón inmediatamente después de la infección con *P. aeruginosa* (N = 4 ratones/grupo, **p<0,0001 frente a no mutados + PBS, †p=0,59 frente a *Tlr2*^{-/-} + PBS). FIG. 18B. *Izquierda*, supervivencia de ratones TLR2^{-/-} y no mutados expuestos a *P. aeruginosa* con o sin tratamiento 24 h antes con un lisado aerosolizado de *H. influenzae* no tipificable (NTHi) (N = 10 ratones/grupo, *p<0,0002). *Derecha*, carga bacteriana de homogeneizados de pulmón inmediatamente después de la infección con *P. aeruginosa* (N = 3 ratones/grupo, ‡p=0,03 frente a no mutados + PBS, #p=0,002 frente a *Tlr2*^{-/-} + PBS).

FIG. 19A - 19B. ODN de CpG de clase C de unión a TLR9, pero no de clase A o B, interaccionan sinérgicamente con Pam2CSK4 para inducir resistencia a neumonía bacteriana. FIG. 19A. Supervivencia de ratones no mutados tratados con Pam2CSK4 y ODN2395 o Pam2CSK4 y un ODN de control negativo 24 h antes de la exposición a *P. aeruginosa* (N = 10 ratones/grupo, *p<0,0001). FIG. 19B. Supervivencia de ratones no mutados expuestos a *P. aeruginosa* 24 h después del tratamiento con PBS o Pam2CSK4 combinado con un ODN de CpG de clase A (ODN1585 u ODN2216), un ODN de CpG de clase B (ODN 2006-G5) o un ODN de CpG de clase C (M362 u ODN2395) (N = 10 ratones/grupo, *p=0,01 frente a PBS, **p=0,0001 frente a PBS; †p=0,3 frente a Pam2 + ODN2395).

FIG. 20A - 20D. Los agonistas de TLR2/6 y TLR9 cooperan para inducir la destrucción bacteriana por células epiteliales respiratorias murinas y humanas *in vitro*. FIG. 20A. Células MLE-15 se trataron con Pam2CSK4 (10 µg/ml) y/u ODN2395 (20 µg/ml) durante 4 h antes de la infección con *B. anthracis* (1000 esporas). Se muestran las UFC bacterianas 4 h después de la infección (*p=0,05 frente a PBS, **p=0,016 frente a PBS, #p>0,05 frente a cualquier agonista individual). FIG. 20B. El medio de cultivo de MLE (sin células) se trató con ODN2395 y Pam2CSK4, se infectó con *B. anthracis* (1000 esporas) y se cultivó después de 4 h (†p=1,0). FIG. 20C. Se trataron células A549 con ODN2395 y Pam2CSK4 durante 4 h antes de la infección con *P. aeruginosa* (2700 UFC). Se muestran UFC bacterianas 4 h después de la infección (*p=0,01 frente a PBS, **p=0,003 frente a PBS, ***p=0,001 frente a PBS, #p=>0,05 frente a cualquier agonista individual). FIG. 20D. Se trató medio de cultivo de MLE (sin células) con ODN2395 y Pam2CSK4, se infectó con *P. aeruginosa* (4000 UFC) y se cultivó después de 4 h (‡p=0,58).

FIG. 21. Supervivencia de ratones Swiss-Webster inmunizados con diversos agonistas de TLR sintéticos y expuestos intranasalmente a 5 DL50 de esporas Ames de *Bacillus anthracis* (MD-10-013). Se pretrataron ratones con agonistas de TLR aerosolizados como se indica 24 horas antes de la exposición a carbunco. ALIIS = lisado bacteriano de NTHi, 2395 = ODN2395, 10101 = ODN10101, M362 = ODN-M362. 1x = ODN a 40 µg/ml y Pam2 a 20 µg/ml.

FIG. 22. Efecto del pretratamiento con aerosol con lisado de ODN/Pam2 o NTHi sobre la supervivencia de ratones infectados con gripe A/HK. Un tratamiento con aerosol de 30 min; dosis del virus de la gripe: ~100 TCID₅₀/ratón.

50 Descripción detallada de la invención

El sistema inmunitario es el sistema de células y órganos especializados que protegen un organismo de influencias biológicas externas. Cuando el sistema inmunitario está funcionando apropiadamente, protege el cuerpo contra infecciones microbianas, y destruye células cancerosas y sustancias extrañas. Si el sistema inmunitario se debilita, su capacidad para defender el cuerpo también se debilita, permitiendo que los patógenos crezcan en el cuerpo.

El sistema inmunitario se divide frecuentemente en: (a) una inmunidad innata comprendida de componentes que proporcionan una "primera línea" inmediata de defensa para repeler continuamente patógenos y (b) una inmunidad adaptativa (adquirida) que comprende la fabricación de anticuerpos y la producción o estimulación de linfocitos T específicamente diseñados para elegir como diana patógenos particulares. Usando inmunidad adaptativa el cuerpo puede desarrollar con el tiempo una inmunidad específica a patógeno(s) particular(es). Esta respuesta dura días en desarrollarse, y así no es eficaz en prevenir una invasión inicial, pero normalmente prevendrá cualquier infección posterior, y también ayuda a despejar infecciones de mayor duración.

En respuesta a ciertos estímulos inflamatorios, las células secretoras del epitelio de las vías respiratorias de ratones y seres humanos rápidamente experimentan un cambio sorprendente en la estructura llamado metaplasia

inflamatoria. La mayoría de los cambios estructurales pueden atribuirse a la elevada producción de mucinas formadoras de gel secretadas, mientras que macromoléculas adicionales con funciones en la secreción de mucinas, destrucción microbiana o señalización inflamatoria también están reguladas por incremento. Se cree que la función fisiológica de esta respuesta es el aumento de las defensas locales contra patógenos microbianos, aunque esa hipótesis solo ha recibido prueba formal limitada. Paradójicamente, la excesiva producción y secreción de mucinas formadoras de gel es una causa importante de obstrucción del flujo de aire en enfermedades inflamatorias comunes de las vías respiratorias tales como asma, fibrosis quística y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). La estimulación de la inmunidad innata sin la producción de mucina proporcionaría un método adicional de atenuar la infección de las vías respiratorias previniendo y/o tratando un sujeto.

Realizaciones de la divulgación incluyen la estimulación de las vías respiratorias de un sujeto con una composición que comprende 1, 2, 3, 4 o más agonistas de TLR, que incluyen segmentos o derivados o análogos de los mismos. Un sujeto administrado con una composición de la invención proporciona una respuesta terapéutica, profiláctica o terapéutica y profiláctica a un organismo posiblemente infectante. En aspectos particulares, una composición se aerosoliza y administra mediante las vías respiratorias. La composición se usa para inducir o de otro modo provocar un efecto protector, por ejemplo, activando o aumentando la inmunidad innata de los pulmones.

Ciertos aspectos de la divulgación incluyen moléculas pequeñas y/o agonistas de TLR derivados de diversos microorganismos o sintetizados por el hombre. Normalmente, el agonista de molécula pequeña y/o de TLR no produce una elevada producción de mucinas secretadas. Las realizaciones de la divulgación pueden usarse como terapéutico preventivo y preferente contra, por ejemplo, armas biológicas, microbios neo-virulentos o microbios oportunistas.

I. COMPOSICIONES DE StIR

A. Compuestos y restos heterólogos

Varias moléculas de no huésped o heterólogas puede estimular, potenciar o contribuir a la producción de una respuesta inmunitaria. Estos restos incluyen diversos agonistas de receptores innatos y/o componentes microbianos.

1. Ligandos de receptores innatos

Los receptores de reconocimiento de patrones, o PRR (receptores innatos), son proteínas expresadas por células del sistema inmunitario innato para identificar patrones moleculares asociados a patógenos, o PAMP, que están asociados a patógenos microbianos o estrés celular. Los PAMP incluyen, pero no se limitan a, hidratos de carbono bacterianos (por ejemplo, lipopolisacárido o LPS, manosa), ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN o ARN bacteriano o viral), peptidoglicanos y ácidos lipoteicoicos (de bacterias Gram-positivas), N-formilmetionina, lipoproteínas, glucanos fúngicos y similares.

Los PRR se clasifican normalmente según su especificidad por ligando, función, localización y/o relaciones evolutivas. Basándose en la función, los PRR pueden dividirse en PRR endocíticos o PRR de señalización. Los PRR de señalización incluyen las grandes familias de receptores similares a Toll unidos a la membrana y receptores similares a NOD citoplásmicos. Los PRR endocíticos promueven la unión, engullición y destrucción de microorganismos por fagocitos, sin transmitir una señal intracelular. Estos PRR reconocen hidratos de carbono e incluyen receptores de manosa de macrófagos, receptores de glucano presentes sobre todos los fagocitos y receptores depuradores que reconocen ligandos cargados, se encuentran en todos los fagocitos y median en la eliminación de células apoptóticas.

Se han identificado varios receptores innatos que incluyen, pero no se limitan a, receptor similar a Toll (TLR), receptor de lectina tipo C (CLR) y receptores similares al dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (receptor similar a Nod o NLR). Los TLR son una clase de proteínas que desempeñan una función clave en el sistema inmunitario innato. Son receptores no catalíticos que atraviesan una única membrana que reconocen moléculas estructuralmente conservadas derivadas de microbios. Una vez estos microbios están presentes sobre o en la piel o mucosa del tubo intestinal, son reconocidos por TLR que activan respuestas de células inmunitarias. De forma interesante, muchos de estos agonistas de TLR no inducen una StIR significativa cuando se administran solos. Normalmente, un individuo o sujeto que está tratándose usando los métodos descritos en el presente documento se ha expuesto a un microbio patógeno o está en riesgo de tal exposición.

a. Agonista de receptores similares a Toll (TLR)

Los receptores similares a Toll (TLR) son los mejor caracterizados de los PRR (Ishii et al., 2008). Son proteínas transmembrana altamente conservadas que consisten en un ectodominio con múltiples repeticiones ricas en leucina para el reconocimiento de patrones, una hélice α que atraviesa la membrana y un dominio del receptor de Toll/interleucina-1 (TIR) para la señalización intracelular. Se han identificado al menos 13 de los TLR de mamífero, localizándose cada uno específicamente en tanto la membrana plasmática como las membranas endosómicas, y detectando cada uno un complemento único de PAMP (Akira et al., 2006; Shi et al., 2006). Tras el reconocimiento de

- PAMP, la transducción de señales se produce mediante el reclutamiento específico de TLR de combinaciones de proteínas adaptadoras de TIR citosólicas. En sintonía con una o más de las otras cuatro adaptadoras, la proteína adaptadora de TIR MyD88 se requiere para la señalización de la mayoría de los TLR. Los acontecimientos de señalización independientes de MyD88 observados de TLR3 y TLR4 requieren el adaptador de TIR TRIF (también conocido como TICAM-1), con o sin participación de TRAM (Yamamoto et al., 2003). La cascada de señalización de adaptadores de TIR específicos de TLR activa factores de transcripción específicos de receptor, tales como NF- κ B, proteína-1 activante y factores reguladores de interferón (IRF), que conducen a la expresión de genes inflamatorios y antimicrobianos (Akira et al., 2006; O'Neill, L.A., y Bowie, 2007; Takeda, K. y Akira, 2004).
- 10 Un agonista de TLR es cualquier compuesto o sustancia que funciona activando un TLR, por ejemplo, para inducir un acontecimiento de señalización mediado por una ruta de transducción de señales de TLR. Agonistas de TLR adecuados incluyen agonistas de TLR1, agonistas de TLR2, agonistas de TLR3, agonistas de TLR4, agonistas de TLR5, agonistas de TLR6, agonistas de TLR7, agonistas de TLR8 y agonistas de TLR9.
- 15 Ahora se ha reconocido ampliamente que la generación de inmunidad protectora depende no solo de la exposición a antígeno, sino también del contexto en el que se encuentra el antígeno. Existen numerosos ejemplos en los que la introducción de un antígeno novedoso en un huésped en un contexto inflamatorio genera tolerancia inmunológica en vez de inmunidad a largo plazo mientras que la exposición al antígeno en presencia de un agente inflamatorio (adyuvante) induce inmunidad (Mondino et al., 1996; Pulendran et al., 1998; Jenkins et al., 1994; y Keamey et al.).
- 20 Desde que puede significar la diferencia entre tolerancia e inmunidad, se han realizado muchos esfuerzos en descubrir los “adyuvantes” presentes dentro de agentes infecciosos que estimulan las rutas moleculares que participan en la creación del contexto inmunogénico apropiado de la presentación de antígeno. Ahora se sabe que mucha de la actividad de adyuvante es debida a interacciones de productos microbianos y virales con diferentes miembros de los receptores similares a Toll (TLR) expresados sobre células inmunitarias (Beutler et al., 2004; Kaisho, 2002; Akira et al., 2003; y Takeda y Akira, 2004). Los TLR se llaman por su homología a una molécula en la *Drosophila*, llamada Toll, que funciona en el desarrollo de la misma y participa en la inmunidad antimicrobiana (Lernaitre et al., 1996; y Hashimoto et al., 1988).
- 25 Un trabajo temprano mostró que los homólogos de mamífero a Toll y las moléculas de la ruta de Toll fueron críticos para la capacidad de células del sistema inmunitario innato para responder a exposiciones microbianas y subproductos microbianos (Medzhitov et al., 1997; Medzhitov et al., 1998; Medzhitov et al., 2000; y Janeway et al., 2002). Desde la identificación de LPS como agonista de TLR4 (Poltorak et al., 1998) se han descrito numerosos otros agonistas de TLR tales como polipéptidos HPV de multitypo tri-acilo (TLR1), peptidoglicano, ácido lipoteicoico y Pam₃Cys (TLR2), ARNbc (TLM), flagelina (TLR5), polipéptidos HPV de multitypo diacilo tales como Malp-2 (TLR6), imidazoquinolinas y ARN monocatenario (TLR7.8), ADN bacteriano, secuencias de ADN de CpG sin metilar, e incluso complejos de ADN genómico humano-anticuerpos (TLR9) (Takeuchi et al., 2001; Edwards et al., 2002; Hayashi et al., 2003; Nagase et al., 2003).
- 30 El término “agonista”, como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto que pueden combinarse con un receptor (por ejemplo, un TLR) para producir una actividad celular. Un agonista puede ser un ligando que se une directamente al receptor. Alternativamente, un agonista puede combinarse con un receptor indirectamente, por ejemplo, (a) formando un complejo con otra molécula que se une directamente al receptor, o (b) de otro modo produce la modificación de otro compuesto de manera que el otro compuesto se una directamente al receptor. Un agonista puede denominarse un agonista de un TLR particular (por ejemplo, un agonista de TLR7) o una combinación particular de TLR (por ejemplo, un agonista de TLR 7/8 -- un agonista de tanto TLR7 como TLR8).
- 35 Los términos “CpG-ODN”, “ácido nucleico CpG”, “polinucleótido CpG” y “oligonucleótido CpG”, usados indistintamente en el presente documento, se refieren a un polinucleótido que comprende al menos un resto 5'-CG-3', y en muchas realizaciones comprende un resto 5'-CG-3' sin metilar. En general, un ácido nucleico CpG es un polinucleótido de ADN o ARN mono o bicatenario que tiene al menos seis bases de nucleótidos que pueden comprender, o consistir en, un nucleótido modificado o una secuencia de nucleósidos modificados. En algunas realizaciones, el resto 5'-CG-3' del ácido nucleico CpG es parte de una secuencia de nucleótidos palindrómica. En algunas realizaciones, el resto 5'-CG-3' del ácido nucleico CpG es parte de una secuencia de nucleótidos no palindrómica.
- 40 Agonistas de TLR adecuados incluyen agonistas de TLR que se producen naturalmente aislados; y agonistas de TLR sintéticos. Los agonistas de TLR aislados de una fuente que se produce naturalmente de agonista de TLR están generalmente purificados, por ejemplo, el agonista de TLR purificado es al menos aproximadamente el 80 % puro, al menos aproximadamente el 90 % puro, al menos aproximadamente el 95 % puro, al menos aproximadamente el 98 % puro, al menos aproximadamente el 99 % puro, o superior al 99 % puro. Agonistas de TLR sintéticos se preparan por métodos convencionales, y son generalmente al menos aproximadamente el 80 % puros, al menos aproximadamente el 90 % puros, al menos aproximadamente el 95 % puros, al menos aproximadamente el 98 % puros, al menos aproximadamente el 99 % puros, o superior al 99 % puros.
- 45 Agonistas de TLR adecuados incluyen agonistas de TLR que no están unidos a ningún otro compuesto. Agonistas de TLR adecuados incluyen agonistas de TLR que están unidos, covalentemente o no covalentemente, a un

segundo compuesto. En algunas realizaciones, un agonista de TLR está unido a otro compuesto directamente. En otras realizaciones, un agonista de TLR está unido a otro compuesto mediante un conector. El compuesto al que un agonista de TLR está unido incluye un vehículo, un andamiaje, un soporte insoluble, una micropartícula, una microesfera y similares. Vehículos incluyen polipéptidos terapéuticos; polipéptidos que proporcionan elevada solubilidad; polipéptidos que aumentan la semivida del agonista de TLR en un medio fisiológico (por ejemplo, suero u otro fluido corporal); y similares. En algunas realizaciones, un agonista de TLR se conjugará, directamente o mediante un conector, con un segundo agonista de TLR.

En algunas realizaciones, el agonista de TLR es una versión de profármaco de un agonista de TLR. Los profármacos están compuestos de una porción de profármaco ligada covalentemente a un agente terapéutico activo. Los profármacos pueden convertirse en fármacos (agentes terapéuticos activos) *in vivo* por ciertas modificaciones químicas o enzimáticas de su estructura. Ejemplos de porciones de profármaco son muy conocidas en la técnica y pueden encontrarse en las siguientes referencias: Biological Approaches to the Controlled Delivery of Drugs, R. L. Juliano, New York Academy of Sciences, (1988); Hydrolysis in Drug and Prodrug Metabolism: Chemistry, Biochemistry, and Enzymology, Bernard Testa, Vch Verlagsgesellschaft Mbh, (2003); y Prodrugs: Topical and Ocular Drug Delivery, Kenneth Sloan, Marcel Dekker; (1992). Ejemplos de porciones de profármaco son péptidos, por ejemplo, péptidos que dirigen el ligando de TLR al sitio de acción, y un péptido que posee dos o más ácidos carboxílicos libres y sin acoplar en su extremo amino. Otras porciones de profármaco escindibles a modo de ejemplo incluyen grupos éster, grupos éter, grupos acilo, grupos alquilo, grupos fosfato, grupos sulfonato, N-óxidos y grupos terc-butoxicarbonilo.

En algunas realizaciones, el agonista de TLR es un agonista de TLR monomérico. En otras realizaciones, el agonista de TLR está multimerizado, por ejemplo, el agonista de TLR es polimérico. En algunas realizaciones, un agonista multimerizado de TLR es homofuncional, por ejemplo, está compuesto por un tipo de agonista de TLR. En otras realizaciones, el agonista multimerizado de TLR es un agonista de TLR heterofuncional.

En algunas realizaciones, un ligando de TLR es un ligando de TLR quimérico (también denominado en el presente documento un ligando de TLR "heterofuncional"). En algunas realizaciones, un agonista de TLR quimérico comprende un resto agonista de TLR9 y un resto agonista de TLR2. Lo siguiente son ejemplos no limitantes de agonistas de TLR heterofuncionales.

En algunas realizaciones, un ligando de TLR quimérico tiene la siguiente fórmula: (X)_n-(Y)_m en la que X es un agonista de TLR1, agonista de TLR2, agonista de TLR3, agonista de TLR4, agonista de TLR5, agonista de TLR6, agonista de TLR7, agonista de TLR8 y agonista de TLR9, y en la que Y es un agonista de TLR2, agonista de TLR3, agonista de TLR4, agonista de TLR5, agonista de TLR6, agonista de TLR7, agonista de TLR8 y agonista de TLR9, y n y m son independientemente un número entero de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más que incluye todos los valores e intervalos intermedios. En ciertas realizaciones, X o Y es TLR9 y X o Y es TLR2/6.

Agonistas de TLR2. Los agonistas de TLR2 incluyen agonistas de TLR2 aislados que se producen naturalmente; y agonistas de TLR2 sintéticos. Los agonistas de TLR2 aislados de una fuente que se produce naturalmente de agonista de TLR2 están generalmente purificados, por ejemplo, el agonista de TLR2 purificado es al menos aproximadamente el 80 % puro, al menos aproximadamente el 90 % puro, al menos aproximadamente el 95 % puro, al menos aproximadamente el 98 % puro, al menos aproximadamente el 99 % puro, o más del 99 % puro. Los agonistas de TLR2 sintéticos se preparan por medios estándar, y son generalmente al menos aproximadamente el 80 % puros, al menos aproximadamente el 90 % puros, al menos aproximadamente el 95 % puros, al menos aproximadamente el 98 % puros, al menos aproximadamente el 99 % puros, o más del 99 % puros.

Los agonistas de TLR2 incluyen agonistas de TLR2 que no están unidos a ningún otro compuesto. Los agonistas de TLR2 incluyen agonistas de TLR2 que están unidos, covalentemente o no covalentemente, a un segundo compuesto. En algunas realizaciones, un agonista de TLR2 está unido a otro compuesto directamente. En otras realizaciones, un agonista de TLR2 está unido a otro compuesto mediante un conector.

Los agonistas de TLR2 incluyen lipopéptidos triacilados y diacilados sintéticos. Un ejemplo no limitante de un ligando de TLR2 es FSL-1 (una lipoproteína sintética derivada de *Mycoplasma salivarium* 1), Pam₃Cys (tripalmitoil-S-gliceril cisteína) o S-[2,3-bis(palmitoiloxi)-(2RS)-propil]-N-palmitoil-(R)-cisteína, en la que "Pam₃" es "tripalmitoil-S-glicerilo" (Aliprantis et al., 1999). Derivados de Pam₃Cys también son agonistas de TLR2 adecuados, en los que los derivados incluyen, pero no se limitan a, S-[2,3-bis(palmitoiloxi)-(2-R,S)-propil]-N-palmitoil-(R)-Cys-(S)-Ser-(Lys)₄-hidroxitriclorhidrato; Pam₃Cys-Ser-Ser-Asn-Ala; Pam₃Cys-Ser-(Lys)₄; Pam₃Cys-Ala-Gly; Pam₃Cys-Ser-Gly; Pam₃Cys-Ser; Pam₃Cys-OMe; Pam₃Cys-OH; PamCAG, palmitoil-Cys((RS)-2,3-di(palmitoiloxi)-propil)-Ala-Gly-OH; y similares. Otro ejemplo no limitante de un agonista de TLR2 adecuado es Pam₂CSK₄ Pam₂CSK₄ (dipalmitoil-S-gliceril cisteína-serina-(lisina)₄; o Pam₂Cys-Ser-(Lys)₄) es un lipopéptido diacilado sintético. Agonistas de TLR sintéticos se han descrito en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Kellner et al. (1992); Seifer et al. (1990); Lee et al. (2003).

Agonistas de TLR3. Los agonistas de TLR3 incluyen agonistas de TLR3 aislados que se producen naturalmente; y agonistas de TLR3 sintéticos. Los agonistas de TLR3 aislados de una fuente que se produce naturalmente de

agonista de TLR3 están generalmente purificados, por ejemplo, el agonista de TLR3 purificado es al menos aproximadamente el 80 % puro, al menos aproximadamente el 90 % puro, al menos aproximadamente el 95 % puro, al menos aproximadamente el 98 % puro, al menos aproximadamente el 99 % puro, o más del 99 % puro. Los agonistas de TLR3 sintéticos se preparan por métodos convencionales, y son generalmente al menos

5 aproximadamente el 80 % puros, al menos aproximadamente el 90 % puros, al menos aproximadamente el 95 % puros, al menos aproximadamente el 98 % puros, al menos aproximadamente el 99 % puros, o más del 99 % puros.

Los agonistas de TLR3 incluyen agonistas de TLR3 que no están unidos a ningún otro compuesto. Los agonistas de TLR3 incluyen agonistas de TLR3 que están unidos, covalentemente o no covalentemente, a un segundo

10 compuesto. En algunas realizaciones, un agonista de TLR3 está unido a otro compuesto directamente. En otras realizaciones, un agonista de TLR3 está unido a otro compuesto mediante un conector.

Los agonistas de TLR3 incluyen ARN bicatenario que se produce naturalmente (ARNbc); ARNbc sintético; y análogos de ARNbc sintético; y similares (Alexopoulou et al., 2001). Un ejemplo no limitante a modo de ejemplo de

15 un análogo de ARNbc sintético es poli (I:C).

Agonistas de TLR4. Agonistas de TLR4 adecuados incluyen agonistas de TLR4 aislados que se producen naturalmente; y agonistas de TLR4 sintéticos. Los agonistas de TLR4 aislados de una fuente que se produce naturalmente de agonista de TLR4 están generalmente purificados, por ejemplo, el agonista de TLR4 purificado es al menos aproximadamente el 80 % puro, al menos aproximadamente el 90 % puro, al menos aproximadamente el 95 % puro, al menos aproximadamente el 98 % puro, al menos aproximadamente el 99 % puro, o más del 99 % puro. Los agonistas de TLR4 sintéticos se preparan por métodos convencionales, y son generalmente al menos

20 aproximadamente el 80 % puros, al menos aproximadamente el 90 % puros, al menos aproximadamente el 95 % puros, al menos aproximadamente el 98 % puros, al menos aproximadamente el 99 % puros, o más del 99 % puros.

Los agonistas de TLR4 incluyen agonistas de TLR4 que no están unidos a ningún otro compuesto. Agonistas de TLR4 adecuados incluyen agonistas de TLR4 que están unidos, covalentemente o no covalentemente, a un segundo compuesto. En algunas realizaciones, un agonista de TLR4 está unido a otro compuesto directamente. En otras realizaciones, un agonista de TLR4 está unido a otro compuesto mediante un conector. Compuestos adecuados con

30 los que un agonista de TLR4 está unido incluyen un vehículo, un andamiaje, y similares.

Los agonistas de TLR4 incluyen lipopolisacáridos que se producen naturalmente (LPS), por ejemplo, LPS de una amplia variedad de bacterias Gram-negativas; derivados de LPS que se producen naturalmente; LPS sintético; proteína-60 de choque térmico de bacterias (Hsp60); polímeros de ácido manurónico; flavolipinas; ácidos teicurónicos; neumolisina de *S. pneumoniae*; fimbrias bacterianas, proteína de la envuelta del virus respiratorio sincitial; y similares. Los agonistas de TLR4 también incluyen monofosforil lípido A sintético (MPLA, Invivogen) y disacárido de hexa-acilo fosforilado (PHAD, Avanti Polar Lipids), además de otros agonistas de TLR4 sintéticos.

35

Agonistas de TLR5. Agonistas de TLR5 adecuados incluyen agonistas de TLR5 aislados que se producen naturalmente; y agonistas de TLR5 sintéticos. Los agonistas de TLR5 aislados de una fuente que se produce naturalmente de agonista de TLR5 están generalmente purificados, por ejemplo, el agonista de TLR4 purificado es al menos aproximadamente el 80 % puro, al menos aproximadamente el 90 % puro, al menos aproximadamente el 95 % puro, al menos aproximadamente el 98 % puro, al menos aproximadamente el 99 % puro, o más del 99 % puro. Los agonistas de TLR5 sintéticos se preparan por métodos convencionales, y son generalmente al menos

40 aproximadamente el 80 % puros, al menos aproximadamente el 90 % puros, al menos aproximadamente el 95 % puros, al menos aproximadamente el 98 % puros, al menos aproximadamente el 99 % puros, o más del 99 % puros.

Los agonistas de TLR5 incluyen agonistas de TLR5 que no están unidos a ningún otro compuesto. Agonistas de TLR5 adecuados incluyen agonistas de TLR5 que están unidos, covalentemente o no covalentemente, a un segundo compuesto. En algunas realizaciones, un agonista de TLR5 está unido a otro compuesto directamente. En otras realizaciones, un agonista de TLR5 está unido a otro compuesto mediante un conector. Compuestos adecuados con

50 los que un agonista de TLR5 está unido incluyen un vehículo, un andamiaje y similares.

Los agonistas de TLR5 incluyen un segmento de 22 aminoácidos altamente conservado de flagelina, además de

55 flagelina de longitud completa y otros segmentos de la misma.

Agonistas de TLR7. Agonistas de TLR7 adecuados incluyen agonistas de TLR7 aislados que se producen naturalmente; y agonistas de TLR7 sintéticos. Los agonistas de TLR7 aislados de una fuente que se produce naturalmente de agonista de TLR7 están generalmente purificados, por ejemplo, el agonista de TLR7 purificado es al menos aproximadamente el 80 % puro, al menos aproximadamente el 90 % puro, al menos aproximadamente el 95 % puro, al menos aproximadamente el 98 % puro, al menos aproximadamente el 99 % puro, o más del 99 % puro. Los agonistas de TLR7 sintéticos se preparan por medios estándar, y son generalmente al menos aproximadamente

60 el 80 % puros, al menos aproximadamente el 90 % puros, al menos aproximadamente el 95 % puros, al menos aproximadamente el 98 % puros, al menos aproximadamente el 99 % puros, o más del 99 % puros.

65

Los agonistas de TLR7 incluyen agonistas de TLR7 que no están unidos a ningún otro compuesto. Agonistas de TLR7 adecuados incluyen agonistas de TLR7 que están unidos, covalentemente o no covalentemente, a un segundo compuesto. En algunas realizaciones, un agonista de TLR7 está unido a otro compuesto directamente. En otras realizaciones, un agonista de TLR7 está unido a otro compuesto mediante un conector.

5 Los ligandos de TLR7 incluyen compuestos de imidazoquinolina; análogos de guanosina; compuestos de pirimidina tales como bropirimina y análogos de bropirimina; y similares. Los compuestos de imidazoquinolina que funcionan de ligandos de TLR7 incluyen, pero no se limitan a, imiquimod (también conocido como Aldara, R-837, S-26308) y R-848 (también conocido como resiquimod, S-28463; que tiene la estructura química: 4-amino-2-etoximetil- α,α -
10 dimetil-1H-imidazol[4,5-c]quinolin-1-etanol). Agentes de imidazoquinolina adecuados incluyen imidazoquinolinaminas, imidazopiridinaminas, cicloalquilimidazopiridinaminas fusionadas en 6,7 e imidazoquinolinaminas con puentes en 1,2. Estos compuestos se han descrito en las patentes de EE.UU. 4.689.338, 4.929.624, 5.238.944, 5.266.575, 5.268.376, 5.346.905, 5.352.784, 5.389.640, 5.395.937, 5.494.916, 5.482.936, 5.525.612, 6.039.969 y 6.110.929. Especies particulares de agentes de imidazoquinolina que son adecuados para su uso en un método objeto incluyen R-848 (S-28463); 4-amino-2-etoximetil- α,α -dimetil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-s-i-
15 etanol; y 1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina (R-837 o imiquimod). También es adecuado para su uso el compuesto 4-amino-2-(etoximetil)- α,α -dimetil-6,7,8,9-tetrahidro-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-etanol hidratado (véase, por ejemplo, BM-003 en Gorden et al. (2005).

20 Compuestos adecuados incluyen aquellos que tienen una 2-aminopiridina condensada con un anillo heterocíclico que contiene nitrógeno de cinco miembros. Tales compuestos incluyen, por ejemplo, imidazoquinolinaminas que incluyen, pero no se limitan a, imidazoquinolinaminas sustituidas tales como, por ejemplo, imidazoquinolinaminas sustituidas con amida, imidazoquinolinaminas sustituidas con sulfonamida, imidazoquinolinaminas sustituidas con urea, imidazoquinolinaminas sustituidas con aril éter, imidazoquinolinaminas sustituidas con éter heterocíclico,
25 imidazoquinolinaminas sustituidas con amido éter, imidazoquinolinaminas sustituidas con sulfonamido éter, imidazoquinolinéteres sustituidas con urea, imidazoquinolinaminas sustituidas con tioéter e imidazoquinolinaminas sustituidas con 6-, 7-, 8- o 9-arilo o heteroarilo; tetrahidroimidazoquinolinaminas que incluyen, pero no se limitan a, tetrahidroimidazoquinolinaminas sustituidas con amida, tetrahidroimidazoquinolinaminas sustituidas con sulfonamida, tetrahidroimidazoquinolinaminas sustituidas con urea, tetrahidroimidazoquinolinaminas sustituidas con aril éter, tetrahidroimidazoquinolinaminas sustituidas con éter heterocíclico, tetrahidroimidazoquinolinaminas sustituidas con amido éter, tetrahidroimidazoquinolinaminas sustituidas con sulfonamido éter, tetrahidroimidazoquinolinéteres sustituidos con urea y tetrahidroimidazoquinolinaminas sustituidas con tioéter; imidazopiridinaminas que incluyen, pero no se limitan a, imidazopiridinaminas sustituidas con amida, imidazopiridinaminas sustituidas con sulfonamido, imidazopiridinaminas sustituidas con urea, imidazopiridinaminas sustituidas con aril éter, imidazopiridinaminas sustituidas con éter heterocíclico, imidazopiridinaminas sustituidas con amido éter, imidazopiridinaminas sustituidas con sulfonamido éter, imidazopiridinéteres sustituidos con urea e imidazopiridinaminas sustituidas con tioéter; imidazoquinolinaminas con puentes en 1,2; cicloalquilimidazopiridinaminas condensadas en 6,7; imidazonaftiridinaminas; tetrahidroimidazonaftiridinaminas; oxazoloquinolinaminas; tiazoloquinolinaminas; oxazolopiridinaminas; tiazolopiridinaminas; oxazonaftiridinaminas; tiazolonaftiridinaminas; y dímeros de 1H-imidazo condensados con piridinaminas, quinolinaminas, tetrahidroquinolinaminas, naftiridinaminas y tetrahidronaftiridinaminas.

Compuestos incluyen una imidazoquinolinamina sustituida, una tetrahidroimidazoquinolinamina, una imidazopiridinamina, una imidazoquinolinamina con puente en 1,2, una cicloalquilimidazopiridinamina condensada
45 en 6,7, una imidazonaftiridinamina, una tetrahidroimidazonaftiridinamina, una oxazoloquinolinamina, una tiazoloquinolinamina, una oxazolopiridinamina, una tiazolopiridinamina, una oxazonaftiridinamina y una tiazolonaftiridinamina.

Como se usa en el presente documento, una imidazoquinolinamina sustituida se refiere a una imidazoquinolinamina sustituida con amida, una imidazoquinolinamina sustituida con sulfonamida, una imidazoquinolinamina sustituida con urea, una imidazoquinolinamina sustituida con aril éter, una imidazoquinolinamina sustituida con éter heterocíclico, una imidazoquinolinamina sustituida con amido éter, una imidazoquinolinamina sustituida con sulfonamido éter, un imidazoquinolinéter sustituido con urea, una imidazoquinolinamina sustituida con tioéter, o una imidazoquinolinamina sustituida con 6-, 7-, 8- o 9-arilo o heteroarilo.

55 Los análogos de guanosina que funcionan como ligandos de TLR7 incluyen ciertos ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos de guanina sustituidos en C8 y disustituidos en N7,C8 que incluyen, pero no se limitan a, loxoribina (7-alil-8-oxoguanosina), 7-tia-8-oxo-guanosina (TOG), 7-deazaguanosina y 7-deazadesoxiguanosina (Lee et al., 2003). La bropirimina (PNU-54461), una 5-halo-6-fenil-pirimidinona, y los análogos de bropirimina se describen en la bibliografía y también son adecuados para su uso. Véase, por ejemplo, Vroegop et al. (1999). Ejemplos adicionales de guanosinas sustituidas en C8 adecuadas incluyen, pero no se limitan a, 8-mercaptoguanosina, 8-bromoguanosina, 8-metilguanosina, 8-oxo-7,8-dihidroguanosina, C8-arilamino-2'-desoxiguanosina, C8-propinilguanosa, ribonucleósidos de guanina sustituidos en C8 y N7 tales como 7-alil-8-oxoguanosina (loxoribina) y 7-metil-8-oxoguanosina, 8-aminoguanosina, 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina y 8-hidroxiguanosina.

65

En algunas realizaciones, un ligando de TLR7 de guanina sustituido es monomérico. En otras realizaciones, un ligando de TLR7 de guanina sustituido es multimérico. Así, en algunas realizaciones, un ligando de TLR7 tiene la fórmula: (B)q en la que B es un ligando de TLR7 de guanina sustituido, y q es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10. Los monómeros del ligando de TLR7 individuales en un ligando de TLR7 multimérico están enlazados, covalentemente o no covalentemente, tanto directamente entre sí como mediante un conector. Agonistas de TLR7 adecuados incluyen un ligando de TLR7 como se describe en la publicación de patente de EE.UU. 2004/0162309.

En algunas realizaciones, un agonista de TLR7 es un agonista de TLR7 selectivo, por ejemplo, el agonista modula la actividad celular mediante TLR7, pero no modula la actividad celular mediante TLR8. Los agonistas selectivos de TLR7 incluyen aquellos mostrados en la publicación de patente de EE.UU. 2004/0171086. Tales compuestos agonistas selectivos de TLR7 incluyen, pero no se limitan a, N¹-{4-[4-amino-2-(2-metoxietil)-6,7,8,9-tetrahidro-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il]butil}-4-fluoro-1-bencenosulfonamida, N¹-[4-(4-amino-2-(2-metoxietil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)butil]-4-fluoro-1-bencenosulfonamida, N-[4-(4-amino-2-propil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)butil]metanosulfonamida, N-{3-[4-amino-2-(2-metoxietil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il]-2,2-dimetilpropil}benzamida, N-(2-{2-[4-amino-2-(2-metoxietil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il]etoxi}etil)-N-metilmetanosulfonamida, N-(2-{2-[4-amino-2-(2-metoxietil)-6,7,8,9-tetrahidro-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il]etoxi}etil)benzamida, N-[4-(4-amino-2-metil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)butil]ciclopentanocarboxamida, 1-[4-(1,1-dioxidoisotiazolidin-2-il)butil]-2-(2-metoxietil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina, 2-metil-1-[5-metilsulfonil]pentil-6,7,8,9-tetrahidro-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina, N-{2-[4-amino-2-(etoximetil)-6,7-dimetil-1H-imidazo[4,5-c]piridin-1-il]-1,1-dimetiletil}-N-ciclohexilurea, N-[2-(4-amino-2-etil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)-1,1-dimetiletil]benzamida, N-[3-(4-amino-2-butil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)-2,2-dimetilpropil]metanosulfonamida, 1-[6-(metanosulfonil)hexil]-6,7-dimetil-2-propil-1H-imidazo[4,5-c]piridin-4-amina, 6-(6-amino-2-propil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)-N-metoxi-N-metilhexamida, 1-[2,2-dimetil-3-(metilsulfonil)propil]-2-(etoximetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina, N-[4-(4-amino-2-metil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)butil]-N-metil-N-fenilurea, 1-{3-[4-amino-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-8-il]fenil}etanona, 7-(4-amino-2-propil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)-2-metilheptan-2-ol, N-metil-4-(4-amino-2-etil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)butano-1-sulfonamida, N-(4-metoxibencil)-4-(4-amino-2-etil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)butano-1-sulfonamida, N-{2-[4-amino-3-(etoximetil)-6,7-dimetil-1H-imidazo[4,5-c]piridin-1-il]-1,1-dimetiletil}metanosulfonamida, 2-etoximetil-1-(3-metoxipropil)-7-(5-hidroximetilpiridin-3-il)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina, 1-[(2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil]-2-(etoximetil)-7-(piridin-3-il)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina, éster etílico del ácido 4-[3-(4-amino-6,7-dimetil-2-propil-1H-imidazo[4,5-c]piridin-1-il)propano-1-sulfonil]-benzoico, 2-butil-1-[2-(2-(metilsulfonil)etoxi)etil]-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina, N-(2-{4-amino-2-etoximetil-7-[6-(metanosulfonilamino)hexiloxi]-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il]-1,1-dimetiletil}metanosulfonamida, N-(6-{[4-amino-2-etoximetil-1-(2-metanosulfonilamino-2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-7-il]oxi}hexil)acetamida, 1-[4-(1,1-dioxidoisotiazolidin-2-il)butil]-2-etoximetil-7-(piridin-3-il)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina, 1-[4-(1,1-dioxidoisotiazolidin-2-il)butil]-2-etoximetil-7-(piridin-4-il)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina, 1-[4-(1,1-dioxidoisotiazolidin-2-il)butil]-2-etoximetil-7-fenil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina, 2-(etoximetil)-1-[(1-(isobutirilpiperidin-4-il)metil]-7-(piridin-3-il)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina, 2-(etoximetil)-1-[(1-(morfolic-4-ylcarbonil)piperidin-4-il)metil]-7-(piridin-3-il)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina, [3-(4-amino-2-propil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)propoxi]amida del ácido ciclopropanocarboxílico, éster 4-amino-2-(2-metoxietil)-1-propil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-7-ilino del ácido isopropilcarbámico, 4-(4-amino-2-propil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)butirato de etilo, 1-[4-amino-2-etil-7-(piridin-3-il)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il]-2-metilpropan-2-ol, 1-(4-amino-2-etil-7-[5-(hidroximetil)piridin-3-il]-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)-2-metilpropan-2-ol, 1-(3-[4-amino-2-(2-metoxietil)-8-(piridin-3-il)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il]propil]pirrolidin-2-ona, N-(2-{4-amino-2-etoximetil-7-[6-(metanosulfonilamino)hexiloxi]-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il]-1,1-dimetiletil}acetamida, 1-{3-[4-amino-7-(3-hidroximetilfenil)-2-(2-metoxietil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il]propil}pirrolidin-2-ona, N-{4-[4-amino-2-etoximetil-7-(piridin-3-il)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il]butil}-N-propilurea, N-[4-[4-amino-2-etoximetil-7-(piridin-3-il)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il]butil]butiramida, 5-(4-amino-2-propil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)-4,4-dimetilpentan-2-ona, 1-ciclohexilmetil-2-etoximetil-7-(5-hidroximetilpiridin-3-il)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina, N,N-dimetil-5-(4-amino-2-etoximetil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)pentano-1-sulfonamida, N-{3-[(4-amino-2-etoximetil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)amino]propil}metanosulfonamida y/o N,N-dimetil-4-(4-amino-2-etoximetil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)butano-1-sulfonamida.

Agonistas selectivos de TLR7 adecuados adicionales incluyen, pero no se limitan a, 2-(etoximetil)-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina (patente de EE.UU. 5.389.640); 2-metil-1-[2-(3-piridin-3-ilpropoxi)etil]-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina (documento WO 02/46193); N-(2-{2-[4-amino-2-(2-metoxietil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il]etoxi}etil)-N-metilciclohexanocarboxamida (publicación de patente de EE.UU. 2004/0171086); 1-[2-(benciloxi)etil]-2-metil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina (documento WO 02/46189); N-{8-[4-amino-2-(2-methoxietil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il]octil}-N-fenilurea (publicación de patente de EE.UU. 2004/0171086 (IRM5)); 2-butil-1-[5-(metilsulfonil)pentil]-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina (documento WO 02/46192); N-{3-[4-amino-2-(2-metoxietil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il]propil}-4-metilbencenosulfonamida (patente de EE.UU. 6.331.539); y N-[4-(4-amino-2-etil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)butil]ciclohexanocarboxamida (publicación de patente de EE.UU. 2004/0171086 (IRM8)). También es adecuado para su uso el agonista selectivo de TLR7 N-[4-(4-amino-2-etil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)butil]-metanosulfonamida (Gorden et al., 2005).

- Agonistas de TLR8. Agonistas de TLR8 adecuados incluyen agonistas de TLR8 aislados que se producen naturalmente; y agonistas de TLR8 sintéticos. Los agonistas de TLR8 aislados de una fuente que se produce naturalmente de agonista de TLR8 están generalmente purificados, por ejemplo, el agonista de TLR8 purificado es al menos aproximadamente el 80 % puro, al menos aproximadamente el 90 % puro, al menos aproximadamente el 95 % puro, al menos aproximadamente el 98 % puro, al menos aproximadamente el 99 % puro, o más del 99 % puro. Los agonistas de TLR8 sintéticos se preparan por métodos convencionales, y son generalmente al menos aproximadamente el 80 % puros, al menos aproximadamente el 90 % puros, al menos aproximadamente el 95 % puros, al menos aproximadamente el 98 % puros, al menos aproximadamente el 99 % puros, o más del 99 % puros.
- Los agonistas de TLR8 incluyen agonistas de TLR8 que no están unidos a ningún otro compuesto. Los agonistas de TLR8 incluyen agonistas de TLR8 que están unidos, covalentemente o no covalentemente, a un segundo compuesto. En algunas realizaciones, un agonista de TLR8 está unido a otro compuesto directamente. En otras realizaciones, un agonista de TLR8 está unido a otro compuesto mediante un conector.
- Los agonistas de TLR8 incluyen, pero no se limitan a, compuestos tales como R-848, y derivados y análogos del mismo. Agonistas de TLR8 adecuados incluyen compuestos que tienen una 2-aminopiridina condensada con un anillo heterocíclico que contiene nitrógeno de cinco miembros. Tales compuestos incluyen, por ejemplo, imidazoquinolinaminas que incluyen, pero no se limitan a, imidazoquinolinaminas sustituidas tales como, por ejemplo, imidazoquinolinaminas sustituidas con amida, imidazoquinolinaminas sustituidas con sulfonamida, imidazoquinolinaminas sustituidas con urea, imidazoquinolinaminas sustituidas con aril éter, imidazoquinolinaminas sustituidas con éter heterocíclico, imidazoquinolinaminas sustituidas con amido éter, imidazoquinolinaminas sustituidas con sulfonamido éter, imidazoquinolinéteres sustituidos con urea, imidazoquinolinaminas sustituidas con tioéter e imidazoquinolinaminas sustituidas con 6-, 7-, 8- o 9-arilo o heteroarilo; tetrahidroimidazoquinolinaminas que incluyen, pero no se limitan a, tetrahidroimidazoquinolinaminas sustituidas con amida, tetrahidroimidazoquinolinaminas sustituidas con sulfonamida, tetrahidroimidazoquinolinaminas sustituidas con urea, tetrahidroimidazoquinolinaminas sustituidas con aril éter, tetrahidroimidazoquinolinaminas sustituidas con éter heterocíclico, tetrahidroimidazoquinolinaminas sustituidas con amido éter, tetrahidroimidazoquinolinaminas sustituidas con sulfonamido éter, tetrahidroimidazoquinolinéteres sustituidos con urea y tetrahidroimidazoquinolinaminas sustituidas con tioéter; imidazopiridinaminas que incluyen, pero no se limitan a, imidazopiridinaminas sustituidas con amida, imidazopiridinaminas sustituidas con sulfonamida, imidazopiridinaminas sustituidas con urea, imidazopiridinaminas sustituidas con aril éter, imidazopiridinaminas sustituidas con éter heterocíclico, imidazopiridinaminas sustituidas con amido éter, imidazopiridinaminas sustituidas con sulfonamido éter, imidazopiridinéteres sustituidos con urea e imidazopiridinaminas sustituidas con tioéter; imidazoquinolinaminas unidas con puentes en 1,2; cicloalquilimidazopiridinaminas condensadas en 6,7; imidazonaftiridinaminas; tetrahidroimidazonaftiridinaminas; oxazoloquinolinaminas; tiazoloquinolinaminas; oxazolopiridinaminas; tiazolopiridinaminas; oxazolonaftiridinaminas; tiazolonaftiridinaminas; y dímeros de 1H-imidazo condensados con piridinaminas, quinolinaminas, tetrahidroquinolinaminas, naftiridinaminas o tetrahidronaftiridinaminas.
- En una realización particular, el agonista de TLR8 es una imidazoquinolinamina sustituida con amida. En una realización alternativa, el agonista de TLR8 es una imidazoquinolinamina sustituida con sulfonamida. En otra realización alternativa, el agonista de TLR8 es una imidazoquinolinamina sustituida con urea. En otra realización alternativa, el agonista de TLR8 es una imidazoquinolinamina sustituida con aril éter. En otra realización alternativa, el agonista de TLR8 es una imidazoquinolinamina sustituida con amido éter. En otra realización alternativa, el agonista de TLR8 es una imidazoquinolinéter sustituido con urea. En otra realización alternativa, el agonista de TLR8 es una imidazoquinolinamina sustituida con tioéter. En otra realización alternativa, el agonista de TLR8 es una imidazoquinolinamina sustituida con 6-, 7-, 8- o 9-arilo o heteroarilo.
- En otra realización alternativa, el agonista de TLR8 es una tetrahidroimidazoquinolinamina sustituida con amida. En otra realización alternativa, el agonista de TLR8 es una tetrahidroimidazoquinolinamina sustituida con sulfonamida. En otra realización alternativa, el agonista de TLR8 es una tetrahidroimidazoquinolinamina sustituida con urea.
- En otra realización alternativa, el agonista de TLR8 es una tetrahidroimidazoquinolinamina sustituida con aril éter. En otra realización alternativa, el agonista de TLR8 es una tetrahidroimidazoquinolinamina sustituida con éter heterocíclico. En otra realización alternativa, el agonista de TLR8 es una tetrahidroimidazoquinolinamina sustituida con amido éter. En otra realización alternativa, el agonista de TLR8 es una tetrahidroimidazoquinolinamina sustituida con sulfonamido éter. En otra realización alternativa, el agonista de TLR8 es un tetrahidroimidazoquinolinéter sustituido con urea. En otra realización alternativa, el agonista de TLR8 es una tetrahidroimidazoquinolinamina sustituida con tioéter.
- En otra realización alternativa, el agonista de TLR8 es una imidazopiridinamina sustituida con amida. En otra realización alternativa, el agonista de TLR8 es una imidazopiridinamina sustituida con sulfonamida. En otra realización alternativa, el agonista de TLR8 es una imidazopiridinamina sustituida con urea. En otra realización alternativa, el agonista de TLR8 es una imidazopiridinamina sustituida con aril éter. En otra realización alternativa, el agonista de TLR8 es una imidazopiridinamina sustituida con éter heterocíclico. En otra realización alternativa, el

agonista de TLR8 es una imidazopiridinamina sustituida con amido éter. En otra realización alternativa, el agonista de TLR8 es una imidazopiridinamina sustituida con sulfonamido éter. En otra realización alternativa, el agonista de TLR8 es un imidazopiridinéter sustituido con urea. En otra realización alternativa, el agonista de TLR8 es una imidazopiridinamina sustituida con tioéter.

5 En otra realización alternativa, el agonista de TLR8 es una imidazoquinolinamina unida con puentes en 1,2. En otra realización alternativa, el agonista de TLR8 es una cicloalquilimidazopiridinamina condensada en 6,7.

10 En otra realización alternativa, el agonista de TLR8 es una imidazonaftiridinamina. En otra realización alternativa, el agonista de TLR8 es una tetrahidroimidazonaftiridinamina. En otra realización alternativa, el agonista de TLR8 es una oxazoloquinolinamina. En otra realización alternativa, el agonista de TLR8 es una tiazoloquinolinamina. En otra realización alternativa, el agonista de TLR8 es una oxazolopiridinamina. En otra realización alternativa, el agonista de TLR8 es una tiazolopiridinamina. En otra realización alternativa, el agonista de TLR8 es una oxazonaftiridinamina. En otra realización alternativa, el agonista de TLR8 es una tiazolonaftiridinamina.

15 En otra realización alternativa más, el agonista de TLR8 es un dímero de 1H-imidazo condensado con una piridinamina, quinolinamina, tetrahidroquinolinamina, naftiridinamina o una tetrahidronaftiridinamina.

20 En algunas realizaciones, el agonista de TLR8 es un agonista de TLR8 selectivo, por ejemplo, el agonista modula la actividad celular mediante TLR8, pero no modula la actividad celular mediante TLR7. Agonistas selectivos de TLR8 incluyen aquellos en la publicación de patente de EE.UU. 2004/0171086. Tales compuestos agonistas selectivos de TLR8 incluyen, pero no se limitan a, los compuestos mostrados en la publicación de patente de EE.UU. nº 2004/0171086 que incluyen N-{4-[4-amino-2-(2-metoxietil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il]butil}quinolin-3-carboxamida, N-{4-[4-amino-2-(2-metoxietil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il]butil}quinoxolin-2-carboxamida y N-[4-(4-amino-2-propil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)butil]morfolin-4-carboxamida.

25 Otros agonistas selectivos de TLR8 adecuados incluyen, pero no se limitan a, 2-propiltiazolo[4,5-c]quinolin-4-amina (patente de EE.UU. 6.110.929); N¹-[2-(4-amino-2-butil-1H-imidazo[4,5-c][1,5]naftiridin-1-il)etil]-2-amino-4-metilpentanamida (patente de EE.UU. 6.194.425); N¹-[4-(4-amino-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)butil]-2-fenoxibenzamida (patente de EE.UU. 6.451.810); N¹-[2-(4-amino-2-butil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)etil]-1-propanosulfonamida (patente de EE.UU. 6.331.539); N-[2-[2-(4-amino-2-etil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)etioxi]etil]-N'-fenilurea (publicación de patente de EE.UU. 2004/0171086); 1-[4-[3,5-diclorofenil]tio]butil]-2-etil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina (publicación de patente de EE.UU. 2004/0171086); N-[2-[4-amino-2-(etoximetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il]etil]-N'-(3-cianofenil)urea (documento WO 00/76518 y publicación de patente de EE.UU. nº 2004/0171086); y 4-amino- α,α -dimetil-2-metoxietil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-etanol (patente de EE.UU. 5.389.640). Para su uso como agonistas selectivos de TLR8 están incluidos los compuestos en la publicación de patente de EE.UU. nº 2004/0171086. También es adecuado para su uso el compuesto 2-propiltiazolo[4,5-c]quinolin-4-amina (Gorden et al., 2005, arriba).

40 **Agonistas de TLR9.** Agonistas de TLR9 adecuados incluyen agonistas de TLR9 aislados que se producen naturalmente; y agonistas de TLR9 sintéticos. Los agonistas de TLR9 aislados de una fuente que se produce naturalmente de agonista de TLR9 están generalmente purificados, por ejemplo, el agonista de TLR9 purificado es al menos aproximadamente el 80 % puro, al menos aproximadamente el 90 % puro, al menos aproximadamente el 95 % puro, al menos aproximadamente el 98 % puro, al menos aproximadamente el 99 % puro, o más del 99 % puro.

45 Los agonistas de TLR9 sintéticos se preparan por métodos convencionales, y son generalmente al menos aproximadamente el 80 % puros, al menos aproximadamente el 90 % puros, al menos aproximadamente el 95 % puros, al menos aproximadamente el 98 % puros, al menos aproximadamente el 99 % puros, o más del 99 % puros.

50 Los agonistas de TLR9 incluyen agonistas de TLR9 que no están unidos a ningún otro compuesto. Los agonistas de TLR9 incluyen agonistas de TLR9 que están unidos, covalentemente o no covalentemente, a un segundo compuesto. En algunas realizaciones, un agonista de TLR9 está unido a otro compuesto directamente. En otras realizaciones, un agonista de TLR9 está unido a otro compuesto mediante un conector.

55 Ejemplos de agonistas de TLR9 (también denominados en el presente documento "ligandos de TLR9") incluyen ácidos nucleicos que comprenden la secuencia 5'-CG-3' (un "ácido nucleico CpG"), en ciertos aspectos C está sin metilar. Los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico", como se usan indistintamente en el presente documento en el contexto de moléculas de ligandos de TLR9, se refieren a un polinucleótido de cualquier longitud, y engloba, entre otros, oligonucleótidos mono y bicatenarios (que incluyen desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, o ambos), oligonucleótidos modificados, y oligonucleósidos, solos o como parte de una construcción de ácidos nucleicos mayor, o como parte de un conjugado con una molécula no de ácido nucleico tal como un polipéptido. Así, un ligando de TLR9 puede ser, por ejemplo, ADN monocatenario (ADNmc), ADN bicatenario (ADNbc), ARN monocatenario (ARNmc) o ARN bicatenario (ARNbc). Los ligandos de TLR9 también engloban ARN o ADN bacteriano (por ejemplo, micobacteriano) desintoxicado en bruto, además de plásmidos enriquecidos enriquecidos en un ligando de TLR9. En algunas realizaciones, un "plásmido enriquecido en un ligando de TLR9" se refiere a un plásmido lineal o circular que comprende o se manipula para comprender un mayor número de motivos CpG que los normalmente encontrados en ADN de mamífero.

Ejemplos de plásmidos enriquecidos en un ligando de TLR9 no limitantes se describen en Roman et al. (1997). Las modificaciones de oligonucleótidos incluyen, pero no se limitan a, modificaciones del grupo 3'OH o 5'OH, modificaciones de la base nucleotídica, modificaciones del componente de azúcar y modificaciones del grupo fosfato.

5 Un ligando de TLR9 puede comprender al menos un nucleósido que comprende un L-azúcar. El L-azúcar puede ser desoxirribosa, ribosa, pentosa, desoxipentosa, hexosa, desoxihexosa, glucosa, galactosa, arabinosa, xilosa, lixosa, o un grupo ciclopentilo de "análogo" de azúcar. El L-azúcar puede estar en forma piranosilo o furanosilo.

10 Los ligandos de TLR9 generalmente no proporcionan, ni existe ningún requisito de que proporcionen, expresión de cualquier secuencia de aminoácidos codificada por el polinucleótido, y así la secuencia de un ligando de TLR9 puede ser, y generalmente es, no codificante. Los ligandos de TLR9 pueden comprender una molécula doble lineal o monocatenaria, una molécula circular, o puede comprender tanto segmentos lineales como circulares. Los ligandos de TLR9 pueden ser monocatenarios, o pueden ser completamente o parcialmente bicatenarios.

15 En algunas realizaciones, un ligando de TLR9 para su uso en un método objeto es un oligonucleótido, por ejemplo, consiste en una secuencia de aproximadamente 5 nucleótidos a aproximadamente 200 nucleótidos, de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 100 nucleótidos, de aproximadamente 12 nucleótidos a aproximadamente 50 nucleótidos, de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 25 nucleótidos, de 20 nucleótidos a aproximadamente 30 nucleótidos, de aproximadamente 5 nucleótidos a aproximadamente 15 nucleótidos, de aproximadamente 5 nucleótidos a aproximadamente 10 nucleótidos, o de aproximadamente 5 nucleótidos a aproximadamente 7 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, un ligando de TLR9 que es inferior a aproximadamente 15 nucleótidos, inferior a aproximadamente 12 nucleótidos, inferior a aproximadamente 10 nucleótidos, o inferior a aproximadamente 8 nucleótidos de longitud está asociado con una molécula mayor.

25 En algunas realizaciones, un ligando de TLR9 no proporciona la expresión de un péptido o polipéptido en una célula eucariota, por ejemplo, la introducción de un ligando de TLR9 en una célula eucariota no produce la producción de un péptido o polipéptido, debido a que el ligando de TLR9 no proporciona la transcripción de un ARNm que codifica un péptido o polipéptido. En estas realizaciones, un ligando de TLR9 carece de regiones promotoras y otros elementos de control necesarios para la transcripción en una célula eucariota.

30 Un ligando de TLR9 puede aislarse de una bacteria, por ejemplo, separarse de una fuente bacteriana; producirse por métodos sintéticos (por ejemplo, producirse por métodos convencionales para la síntesis química de polinucleótidos); producirse por métodos recombinantes estándar, luego aislarse de una fuente bacteriana; o una combinación de los anteriores. En muchas realizaciones, un ligando de TLR9 está purificado, por ejemplo, es al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 98 %, al menos aproximadamente el 99 %, o más, por ejemplo, el 99,5 %, 99,9 %, o más, puro. En muchas realizaciones, el ligando de TLR9 se sintetiza químicamente, luego se purifica.

40 En otras realizaciones, un ligando de TLR9 es parte de una construcción de nucleótidos mayor (por ejemplo, un vector plasmídico, un vector viral, u otra construcción tal). Se conocen en la técnica una amplia variedad de vectores de plásmido y virales, y no necesitan ser elaborados aquí. Se ha descrito un gran número de tales vectores en diversas publicaciones, que incluyen, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology (1987, y actualizaciones).

45 En general, un ligando de TLR9 usado en una composición objeto comprende al menos un motivo CpG no metilado. La posición relativa de cualquier secuencia de CpG en un polinucleótido en ciertas especies de mamífero (por ejemplo, roedores) es 5'-CG-3' (es decir, la C está en la posición 5' con respecto a la G en la posición 3').

50 En algunas realizaciones, un ligando de TLR9 comprende una secuencia de núcleo palindrómica central que comprende al menos una secuencia de CpG, en la que la secuencia de núcleo palindrómica central contiene un esqueleto de fosfodiéster, y en la que la secuencia de núcleo palindrómica central está flanqueada en uno o ambos lados por secuencias de poliguanosina que contienen esqueleto de fosforotioato.

55 En otras realizaciones, un ligando de TLR9 comprende una o más secuencias de TCG en o próximas al extremo 5' del ácido nucleico; y al menos dos dinucleótidos CG adicionales. En algunas de estas realizaciones, los al menos dos dinucleótidos CG adicionales están separados tres nucleótidos, dos nucleótidos o un nucleótido. En algunas de estas realizaciones, los al menos dos dinucleótidos CG adicionales son contiguos el uno al otro. En algunas de estas realizaciones, el ligando de TLR9 comprende (TCG)_n en la que n = 1 a 3, en el extremo 5' del ácido nucleico. En otras realizaciones, el ligando de TLR9 comprende (TCG)_n en la que n = 1 a 3, y en la que la secuencia (TCG)_n está flanqueada por un nucleótido, dos nucleótidos, tres nucleótidos, cuatro nucleótidos o cinco nucleótidos, en el extremo 5' de la secuencia de (TCG)_n.

60 Motivos CpG consenso a modo de ejemplo de ligandos de TLR9 útiles en la invención incluyen, pero no se limitan necesariamente a: 5'-Purina-Purina-(C)-(G)-Pirimidina-Pirimidina-3', en el que el ligando de TLR9 comprende un motivo CpG flanqueado por al menos dos nucleótidos de purina (por ejemplo, GG, GA, AG, AA, ll, etc.,) y al menos dos nucleótidos de pirimidina (CC, TT, CT, TC, UU, etc.); 5'-Purina-TCG-Pirimidina-Pirimidina-3'; 5'-TCG-N-N-3'; en

la que N es cualquier base; 5'-Nx(CG)nNy en la que N es cualquier base, en la que x e y son independientemente cualquier número entero de 0 a 200, por ejemplo, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11-15, 16-20, 21-25, 25-30, 30-50, 50-75, 75-100, 100-150 ó 150-200; y n es cualquier número entero que es 1 o mayor, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o mayor. 5'-Nx(TCG)nNy en la que N es cualquier base, en la que x e y son independientemente cualquier número entero de 0 a 200, por ejemplo, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11-15, 16-20, 21-25, 25-30, 30-50, 50-75, 75-100, 100-150 ó 150-200; y n es cualquier número entero que es 1 o mayor, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o mayor. 5'-(TCG)n-3' en la que n es cualquier número entero que es 1 o mayor, por ejemplo, para proporcionar un ligando de TLR9 basado en TCG (por ejemplo, en la que n=3, el polinucleótido comprende la secuencia 5'-TCGNNTCGNNTCG-3'; SEC ID N°: 3); 5'-Nm-(TCG)n-Np-3', en la que N es cualquier nucleótido, en la que m es cero, uno, dos o tres, en la que n es cualquier número entero que es 1 o mayor, y en la que p es uno, dos, tres o cuatro; 5'-Nm-(TCG)n-Np-3' en la que N es cualquier nucleótido, en la que m es cero a 5, y en la que n es cualquier número entero que es 1 o mayor, en la que p es cuatro o mayor, y en la que la secuencia N-N-N-N comprende al menos dos dinucleótidos CG que son tanto contiguos entre sí como que están separados por un nucleótido, dos nucleótidos o tres nucleótidos; y 5'-Purina-Purina-CG-Pirimidina-TCG-3'.

Si un ligando de TLR9 de ácido nucleico comprende una secuencia de fórmula: 5'-Nm-(TCG)n-Np-3' en la que N es cualquier nucleótido, en la que m es cero a 5 y en la que n es cualquier número entero que es 1 o mayor, en la que p es cuatro o mayor y en la que la secuencia N-N-N-N comprende al menos dos dinucleótidos CG que son tanto contiguos entre sí como que están separados por un nucleótido, dos nucleótidos o tres nucleótidos, ligandos de TLR9 a modo de ejemplo útiles en la invención incluyen, pero no se limitan necesariamente a: (1) una secuencia de la fórmula en la que n=2 y Np es NNCGNNCG; (2) una secuencia de la fórmula en la que n=2 y Np es AACGTTTCG; (3) una secuencia de la fórmula en la que n=2 y Np es TTCGAACG; (4) una secuencia de la fórmula en la que n=2 y Np es TACGTACG; (5) una secuencia de la fórmula en la que n=2 y Np es ATCGATCG; (6) una secuencia de la fórmula en la que n=2 y Np es CGCGCGCG; (7) una secuencia de la fórmula en la que n=2 y Np es GCCGGCCG; (8) una secuencia de la fórmula en la que n=2 y Np es CCCGGGCG; (9) una secuencia de la fórmula en la que n=2 y Np es GGCGCCCG; (10) una secuencia de la fórmula en la que n=2 y Np es CCCGTTTCG; (11) una secuencia de la fórmula en la que n=2 y Np es GGCGTTTCG; (12) una secuencia de la fórmula en la que n=2 y Np es TTCGCCCG; (13) una secuencia de la fórmula en la que n=2 y Np es TTCGGGCG; (14) una secuencia de la fórmula en la que n=2 y Np es AACGCCCG; (15) una secuencia de la fórmula en la que n=2 y Np es AACGGGCG; (16) una secuencia de la fórmula en la que n=2 y Np es CCCGAACG; y (17) una secuencia de la fórmula en la que n=2 y Np es GGCGAACG; y en la que, en cualquiera de 1-17, m=cero, uno, dos o tres.

Si un ligando de TLR9 de ácido nucleico comprende una secuencia de fórmula: 5'-Nm-(TCG)n-Np-3' en la que N es cualquier nucleótido, en la que m es cero, uno, dos, o tres, en la que n es cualquier número entero que es 1 o mayor, y en la que p es uno, dos, tres o cuatro, ligandos de TLR9 a modo de ejemplo útiles en la invención incluyen, pero no se limitan necesariamente a: (1) una secuencia de la fórmula en la que m=cero, n=1 y Np es T-T-T; (2) una secuencia de la fórmula en la que m=cero, n=1 y Np es T-T-T-T; (3) una secuencia de la fórmula en la que m=cero, n=1 y Np es C-C-C-C; (4) una secuencia de la fórmula en la que m=cero, n=1 y Np es A-A-A-A; (5) una secuencia de la fórmula en la que m=cero, n=1 y Np es A-G-A-T; (6) una secuencia de la fórmula en la que Nm es T, n=1 y Np es T-T-T; (7) una secuencia de la fórmula en la que Nm es A, n=1 y Np es T-T-T; (8) una secuencia de la fórmula en la que Nm es C, n=1 y Np es T-T-T; (9) una secuencia de la fórmula en la que Nm es G, n=1 y Np es T-T-T; (10) una secuencia de la fórmula en la que Nm es T, n=1 y Np es A-T-T; (11) una secuencia de la fórmula en la que Nm es A, n=1 y Np es A-T-T; y (12) una secuencia de la fórmula en la que Nm es C, n=1 y Np es A-T-T.

La estructura de núcleo de un ligando de TLR9 útil en la invención puede estar flanqueada en la dirección 5' y/o en la dirección 3' por cualquier número o composición de nucleótidos o nucleósidos. En algunas realizaciones, la secuencia de núcleo de un ligando de TLR9 tiene al menos 6 bases u 8 bases de longitud, y el ligando de TLR9 completo (secuencias de núcleo más secuencias flanqueantes 5', 3' o ambas) tiene normalmente entre 6 bases y 8 bases, y hasta aproximadamente 200 bases de longitud.

Ligandos de TLR9 basados en ADN útiles en la invención incluyen, pero no se limitan necesariamente a, polinucleótidos que comprenden una o más de las siguientes secuencias de nucleótidos: AGCGCT, AGCGCC, AGCGTT, AGCGTC, AACGCT, AACGCC, AACGTT, AACGTC, GGCGCT, GGCGCC, GGCGTT, GGCGTC, GACGCT, GACGCC, GACGTT, GACGTC, GTCGTC, GTCGCT, GTCGTT, GTCGCC, ATCGTC, ATCGCT, ATCGTT, ATCGCC, TCGTCG y TCGTCGTCG.

Ligandos de TLR9 adicionales útiles en la invención incluyen, pero no se limitan necesariamente a, polinucleótidos que comprenden una o más de las siguientes secuencias de nucleótidos: TCGXXXX, TCGAXXX, XTCGXXX, XTCGAXX, TCGTTCGA, TCGACGT, TCGAACG, TCGAGAT, TCGACTC, TCGAGCG, TCGATTT, TCGCTTT, TCGGTTT, TCGTTTT, TCGTCGT, ATCGATT, TTCGTTT, TTCGATT, ACGTTCG, AACGTTT, TGACGTT, TGTCGTT, TCGXXX, TCGAXX, TCGTCG, AACGTT, ATCGAT, GTCGTT, GACGTT, TCGXX, TCGAX, TCGAT, TCGTT, TCGTC, TCGA, TCGT, TCGX y TCG (en las que "X" es cualquier nucleótido).

Ligandos de TLR9 basados en ADN útiles en la invención incluyen, pero no se limitan necesariamente a, polinucleótidos que comprenden las siguientes secuencias de nucleótidos octaméricas: AGCGCTCG, AGCGCCCG, AGCGTTTCG, AGCGTCCG, AACGCTCG, AACGCCCG, AACGTTTCG, AACGTCCG, GGCGCTCG, GGCGCCCG,

GGCGTTTCG, GGCGTCCG, GACGCTCG, GACGCCCG, GACGTTCG y GACGTCCG.

5 Un ligando de TLR9 útil en llevar a cabo un método objeto puede comprender uno o más de cualquiera de los motivos CpG anteriores. Por ejemplo, un ligando de TLR9 útil en la invención puede comprender un único caso o múltiples casos (por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o más) del mismo motivo CpG. Alternativamente, un ligando de TLR9 puede comprender múltiples motivos CpG (por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o más) en los que al menos dos de los múltiples motivos CpG tienen diferentes secuencias consenso, o en los que todos los motivos CpG en el ligando de TLR9 tienen diferentes secuencias consenso.

10 Un ligando de TLR9 útil en la invención puede o puede no incluir regiones palindrómicas. Si está presente, un palíndromo puede extenderse solo a un motivo CpG, si está presente, en la secuencia de hexámero u octámero de núcleo, o puede englobar más de la secuencia de hexámero u octámero, además de secuencias de nucleótidos flanqueantes.

15 **Ligandos de TLR9 multiméricos.** En algunas realizaciones, un ligando de TLR9 es multimérico. Un ligando de TLR9 multimérico comprende dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más ligandos de TLR9 de ácido nucleico individuales (monoméricos), como se ha descrito anteriormente, ligados mediante enlaces no covalentes, ligados mediante enlaces covalentes, y tanto ligados directamente entre sí como ligados mediante uno o más espaciadores. Espaciadores adecuados incluyen moléculas de ácido nucleico y no de ácido nucleico, en tanto
20 que sean biocompatibles. En algunas realizaciones, el ligando de TLR9 multimérico comprende una matriz lineal de ligandos de TLR9 monoméricos. En otras realizaciones, un ligando de TLR9 multímero es una matriz ramificada, o dendrímica, de ligandos de TLR9 monoméricos.

25 En algunas realizaciones, un ligando de TLR9 multimérico tiene la estructura general $(X1)_n(X2)_n$ en la que X es un ligando de TLR9 de ácido nucleico como se ha descrito anteriormente, y que tiene una longitud de aproximadamente 6 nucleótidos a aproximadamente 200 nucleótidos, por ejemplo, de aproximadamente 6 nucleótidos a aproximadamente 8 nucleótidos, de aproximadamente 8 nucleótidos a aproximadamente 10 nucleótidos, de aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 12 nucleótidos, de aproximadamente 12 nucleótidos a aproximadamente 15 nucleótidos, de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 20 nucleótidos, de
30 aproximadamente 20 nucleótidos a aproximadamente 25 nucleótidos, de aproximadamente 25 nucleótidos a aproximadamente 30 nucleótidos, de aproximadamente 30 nucleótidos a aproximadamente 40 nucleótidos, de aproximadamente 40 nucleótidos a aproximadamente 50 nucleótidos, de aproximadamente 50 nucleótidos a aproximadamente 60 nucleótidos, de aproximadamente 60 nucleótidos a aproximadamente 70 nucleótidos, de aproximadamente 70 nucleótidos a aproximadamente 80 nucleótidos, de aproximadamente 80 nucleótidos a aproximadamente 90 nucleótidos, de aproximadamente 90 nucleótidos a aproximadamente 100 nucleótidos, de aproximadamente 100 nucleótidos a aproximadamente 125 nucleótidos, de aproximadamente 125 nucleótidos a aproximadamente 150 nucleótidos, de aproximadamente 150 nucleótidos a aproximadamente 175 nucleótidos, o de aproximadamente 175 nucleótidos a aproximadamente 200 nucleótidos; y en la que n es cualquier número de uno a aproximadamente 100, por ejemplo, n=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, de 10 a aproximadamente 15, de 15 a aproximadamente 20, de 20 a aproximadamente 25, de 25 a aproximadamente 30, de 30 a aproximadamente 40, de 40 a aproximadamente 50, de 50 a aproximadamente 60, de 60 a aproximadamente 70, de 70 a aproximadamente 80, de 80 a aproximadamente 90, o de 90 a aproximadamente 100. En estas realizaciones, X y X2 se diferencian en la secuencia de nucleótidos entre sí por al menos un nucleótido, y pueden diferenciarse en la secuencia de nucleótidos entre sí por dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más bases.

45 Como se observa anteriormente, en algunas realizaciones, un ligando de TLR9 multimérico objeto comprende un ligando de TLR9 separado de un ligando de TLR9 adyacente por un espaciador. En algunas realizaciones, un espaciador es un ácido nucleico no de ligando de TLR9. En otras realizaciones, un espaciador es un resto no de ácido nucleico. Espaciadores adecuados incluyen aquellos descritos en la publicación de patente de EE.UU. 20030225016. Un ligando de TLR9 se multimeriza usando cualquier método conocido.

Modificaciones de ligandos de TLR9. Un ligando de TLR9 adecuado para su uso en una composición objeto puede modificarse en una variedad de formas. Por ejemplo, un ligando de TLR9 puede comprender modificaciones en el grupo fosfato del esqueleto (por ejemplo, enlaces internucleotídicos de metilfosfonato, fosforotioato, fosforoamidato y fosforoditioato), modificaciones que pueden, por ejemplo, potenciar su estabilidad *in vivo*, haciéndolos particularmente útiles en aplicaciones terapéuticas. Una modificación del grupo fosfato particularmente útil es la conversión en las formas de fosforotioato o fosforoditioato de un ligando de TLR9 de ácido nucleico. Los fosforotioatos y fosforoditioatos son más resistentes a la degradación *in vivo* que sus homólogos de oligonucleótido no modificados, aumentando las semividas de los ligandos de TLR9 y haciéndolos más disponibles para el sujeto que está tratándose.

60 Otros ligandos de TLR9 modificados englobados por la presente invención incluyen ligandos de TLR9 que tienen modificaciones en el extremo 5', el extremo 3', o ambos de los extremos 5' y 3'. Por ejemplo, el extremo 5' y/o 3' pueden asociarse covalentemente o no covalentemente a una molécula (tanto ácido nucleico, no ácido nucleico, como ambos) para, por ejemplo, aumentar la biodisponibilidad del ligando de TLR9, aumentar la eficiencia de captación si es deseable, facilitar la administración a células de interés y similares. Moléculas para la conjugación

con un ligando de TLR9 incluyen, pero no se limitan necesariamente a, colesterol, fosfolípidos, ácidos grasos, esteroides, sacáridos, polipéptidos (por ejemplo, inmunoglobulinas), péptidos, antígenos (por ejemplo, péptidos, moléculas pequeñas, etc.), moléculas de ácidos nucleicos lineales o circulares (por ejemplo, un plásmido), soportes insolubles, polipéptidos terapéuticos y similares. Polipéptidos terapéuticos que son adecuados para la unión a un agonista de TLR9 incluyen, pero no se limitan a, un factor de crecimiento celular dendrítico (por ejemplo, GM-CSF); una citocina; un interferón (por ejemplo, un IFN- α , un IFN- β , etc.); un antagonista de TNF- α ; y similares.

Un ligando de TLR9 está en algunas realizaciones ligado (por ejemplo, conjugado, ligado covalentemente, asociado no covalentemente a, o adsorbido sobre) un soporte insoluble. Un ejemplo no limitante a modo de ejemplo de un soporte insoluble es poli(D,L-lactida-co-glicolida) catiónica.

Conjugados de ligando de TLR9 adicionales, y métodos para prepararlos, se conocen en la técnica y se describen en, por ejemplo, los documentos WO 98/16427 y WO 98/55495. Así, el término ligando de TLR9^o incluye conjugados que comprenden un ligando de TLR9 de ácido nucleico.

Un polipéptido, por ejemplo, un polipéptido terapéutico, puede conjugarse directamente o indirectamente, por ejemplo, mediante una molécula de conector, a un ligando de TLR9. Se conocen en la técnica una amplia variedad de moléculas de conector y pueden usarse en los conjugados. El enlace del péptido con el oligonucleótido puede ser mediante una cadena lateral reactiva con péptido, o el extremo N o C del péptido. El enlace del oligonucleótido con el péptido puede ser en cualquiera de los extremos 3' o 5', o interno. Un conector puede ser una molécula orgánica, inorgánica o semiorgánica, y puede ser un polímero de una molécula orgánica, una molécula inorgánica, o un copolímero que comprende tanto moléculas inorgánicas como orgánicas.

Si están presentes, las moléculas de conector son generalmente de longitud suficiente para permitir que los oligonucleótidos y/o polinucleótidos y un polipéptido ligado permitan algún movimiento flexible entre el oligonucleótido y el polipéptido. Las moléculas de conector tienen generalmente aproximadamente 6-50 átomos de longitud. Las moléculas de conector también pueden ser, por ejemplo, arilacetileno, oligómeros de etilenglicol que contienen 2-10 unidades de monómero, diaminas, diácidos, aminoácidos, o combinaciones de los mismos. Otras moléculas de conector que pueden unirse a oligonucleótidos pueden usarse en vista de la presente divulgación.

b. Agonista de receptor similar a NOD (NLR)

Los receptores similares a NOD (NLR) son proteínas citoplásmicas que pueden tener una variedad de funciones en la regulación de respuestas inflamatorias y apoptóticas. Se han encontrado aproximadamente 20 de estas proteínas en el genoma de mamífero e incluyen dos subfamilias principales llamadas NOD y NALP, el transactivador de clase II del MHC (CIITA), y algunas otras moléculas (por ejemplo, IPAF y BIRC1). El actual entendimiento sugiere que algunas de estas proteínas reconocen moléculas endógenas o microbianas o respuestas a tensión y forman oligómeros que activan caspasas inflamatorias (por ejemplo, caspasa 1) causando la escisión y activación de importantes citocinas inflamatorias tales como IL-1, y/o activan la ruta de señalización de NF- κ B para inducir la producción de moléculas inflamatorias. La familia de NLR se conoce bajo varios nombres diferentes, que incluye la familia CATERPILLER (o CLR) o NOD-LRR.

Los ligandos son actualmente conocidos para NOD1 y NOD2. NOD1 reconoce una molécula llamada meso-DAP, que es un peptidoglicano constituyente de solo bacterias Gram-negativas. Las proteínas NOD2 reconocen MDP intracelular (muramildipéptido), que es un peptidoglicano constituyente de tanto bacterias Gram-positivas como Gram-negativas. NOD2 transduce señales en la ruta de las NF- κ B y MAP cinasas mediante la serina-treonina cinasa llamada RIP2. Las proteínas NOD se llaman así ya que contienen un dominio de oligomerización de unión a nucleótidos que se une al nucleótido trifosfato. Los NOD señalizan mediante dominios CARD del extremo N para activar acontecimientos de inducción del gen en la dirección 3', e interaccionan con moléculas microbianas por medio de una región de repeticiones ricas en leucina (LRR) del extremo C.

Al igual que NOD, las proteínas NALP contienen LRR del extremo C, que parecen actuar como dominio regulador y pueden participar en el reconocimiento de patógenos microbianos. También al igual que NOD, estas proteínas también contienen un sitio de unión al nucleótido (NBS) para el nucleótido trifosfatos. La interacción con otras proteínas (por ejemplo, la molécula adaptadora ASC) está mediada mediante el dominio de pirina del extremo N (PYD). Hay 14 miembros de esta subfamilia en seres humanos (llamados NALP1 a NALP14). Las mutaciones en NALP3 son responsables de las enfermedades autoinflamatorias síndrome autoinflamatorio familiar por frío, síndrome de Muckle-Wells y enfermedad inflamatoria multisistémica de aparición neonatal. Los activadores de NALP3 incluyen muramildipéptido, ADN bacteriano, ATP, toxinas, ARN bicatenario, paramixovirus y cristales de ácido úrico.

También se ha mostrado que otros NLR tales como IPAF y NAIP5/Birc1e activan caspasa-1 en respuesta a Salmonella y Legionella.

Los agonistas de NLR incluyen, pero no se limitan a, GM-tripéptido (*Shigella flexneri*), mesolantionina (*Helicobacter pilori*), meso-DAP, γ -D-Glu-DAP (iEDAP) (*Enteroinvasive Escherichia coli*), D-lactil-L-ala- γ -Glu-meso-DAP-Gly

(FK156) (*Pseudomonas*), heptanolil- γ -Glu-meso-DAP-D-ala (FK565) (*Chlamydia*, *Listeria monocytogenes*), MDP (*Listeria monocytogenes*), MurNAc-L-Ala- γ -D-Glu-L-Lys (M-TRILys) (*Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella flexneri*), flagelina, ARN bacteriano, ATP, nigericina, maitotoxina, cristales de ácido úrico, aerolisina y toxina letal del carbunco.

5

c. Agonista de receptores similares a RIG (RLR)

Diversas células en el cuerpo pueden detectar virus infecciosos e iniciar reacciones conjuntamente conocidas como respuestas innatas antivirales. Estas respuestas incluyen la producción de citocinas antivirales tales como interferón tipo I (IFN) y la posterior síntesis de enzimas antivirales, que son responsables de la alteración de la replicación viral y promoción de respuestas inmunitarias adaptativas. Los receptores similares al RIG (gen inducible por ácido retinoico) detectan moléculas de ARN viral que desencadenan componentes del sistema inmunitario innato. Ligandos para RLR incluyen, pero no se limitan a, ARNm, ARNbc, poliinosina-ácido policitidílico ("poli(rI:rC)", un análogo sintético de ARN bicatenario (ARNbc), y otros ácidos nucleicos virales – que incluyen porciones de genomas virales de ARN (por ejemplo, virus de la encefalitis japonesa (VEJ), virus de la estomatitis vesicular (VEV), virus de la gripe, virus del dengue, virus del Nilo occidental, reovirus y virus de la encefalomiocarditis (VEMCV) - y análogos de los mismos. Un segmento o análogo de ARN pueden al menos 20, 25, 30, 35, 40 o más nucleótidos o pares de nucleótido o el equivalente. En ciertos aspectos, el ARN es un ARN de trifosfato en 5'.

10

15

20

d. Agonista de receptores similares a inmunoglobulina de leucocitos (LIR)

La clonación de ocho moléculas relacionadas con LIR-1 (véase Fanger et al., 1999, y referencias en su interior), con 63-84 % de identidad de aminoácidos con LIR-1, estableció una novedosa familia de inmunorreceptores (LIR). Los LIR pueden agruparse según su estructura. Cinco de los LIR (1, 2, 3, 5 y 8) tienen dominios citoplásmicos que contienen dos, tres o cuatro secuencias similares al motivo inhibitor basado en tirosina de inmunorreceptores (ITIM). Aunque dos de los motivos basados en tirosina (motivos nº 2 y 3; I/VxYxxL/V) se ajustan a la secuencia consenso de ITIM original, algunos de estos LIR contienen motivos basados en tirosina con un residuo de asparagina (motivo nº 1; NxYxxL/V) o un residuo de serina (motivo nº 4; SxYxxL/V) localizado dos aminoácidos en la dirección 5' de la tirosina. A diferencia de los LIR que contienen ITIM, tres de los LIR (6a, 6b y 7) contienen regiones citoplásmicas cortas y un residuo de arginina positivamente cargado en el dominio transmembrana.

25

30

Los miembros de la familia de LIR se unen a moléculas de clase I del MHC. LIR-1 y LIR-2 reconocen los alelos HLA-A (A0101, A0301), HLA-B (B0702, B0802, B1501, B2702) y HLA-C (C0304) y la molécula de clase I no clásica HLA-G1. Por tanto, la especificidad de unión de LIR-1 y LIR-2 es distinta de la de KIR, que reconoce subconjuntos relativamente limitados de alelos de clase I del MHC, además de CD94/NKG2A. La última molécula reconoce HLA-E cuyos sitios de unión están ocupados por péptidos derivados de la secuencia señal de antígenos de clase I del MHC específicos.

35

2. Componentes microbianos

40

a. EF2505

En ciertos aspectos se contemplan métodos para tratar, inhibir o atenuar una infección microbiana en un individuo que tiene o está en riesgo de desarrollar una infección tal, comprendiendo los métodos administrar una cantidad eficaz de un péptido de StIR, por ejemplo, la proteína EF2505 de *Enterococcus faecalis* (SEC ID N°: 1), o un fragmento o derivado del mismo a dicho individuo. Normalmente, el individuo o sujeto se ha expuesto a un microbio patógeno o está en riesgo de tal exposición. En ciertos aspectos, el péptido de StIR es un polipéptido o péptido purificado o aislado. El término "purificado" o "aislado" significa que el componente se había aislado previamente o purificado de otras proteínas y que el componente es al menos aproximadamente el 70, 75, 80, 90, 95, 97 o el 99 % puro antes de formularse en la composición. En ciertas realizaciones, el componente purificado o aislado es aproximadamente o es al menos aproximadamente el 95, 96, 97, 98, 99, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, 99,5 % puro o más, o cualquier intervalo derivable en su interior. Un componente purificado tal puede entonces mezclarse con otros componentes para formar una composición como se describe en el presente documento.

45

50

55

Una proteína de StIR recombinante, por ejemplo, EF2505, o fragmento o segmento de la misma o análogo de la misma, comprende al menos, como máximo, o aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1500, 1600 ó 1651 aminoácidos consecutivos, que incluyen todos los valores e intervalos intermedios, de SEC ID N°: 1. En ciertos aspectos, un fragmento o análogo del mismo incluye al menos o como máximo o aproximadamente la secuencia de aminoácidos del aminoácido 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120 al aminoácido 100, 150, 200, 250, 300, 350, 355, 360, 365, 370, 375, 380, 390, 395, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450 de SEC ID N°: 1, que incluyen todos los valores e intervalos intermedios. En otro aspecto, un fragmento de polipéptido o análogo del mismo incluye, pero no se limita a, una secuencia de

60

65

aminoácidos que comprende al menos, como máximo, o aproximadamente los aminoácidos 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 al aminoácido 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450 de SEC ID N°: 1. En ciertos aspectos, un segmento de polipéptido o fragmento o análogo del mismo incluye, pero no se limita a, una secuencia de aminoácidos que comprende al menos o como máximo o aproximadamente los aminoácidos 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 200, 250, al aminoácido 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450 de SEC ID N°: 1, que incluye todos los valores e intervalos intermedios. En todavía otro aspecto, un fragmento de polipéptido o análogo del mismo comprende una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o el 100 % idéntica al aminoácido 28 a 449, 28 a 442, 111 a 449, 111 a 442, 223 a 449, o 223 a 442 de SEC ID N°: 1, que incluye todos los valores e intervalos intermedios. Derivados o variantes de la proteína de StIR o sus segmentos incluyen mutaciones de inserción, delección y puntuales. Una mutación de inserción particular es una proteína de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos exógena a la proteína EF2505 en el extremo carboxi o amino.

En ciertos aspectos, la proteína de StIR o un fragmento o un segmento o un derivado de la misma se administra en una formulación nebulizada o aerosolizada. La composición puede administrarse por inhalación o inspiración. La StIR o un fragmento o derivado de la misma puede administrarse en una cantidad de aproximadamente 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 µg o mg/kg a aproximadamente 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 200 µg o mg/kg del peso corporal del individuo. En otro aspecto, un sujeto puede administrarse con aproximadamente 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 200 µg o mg del polipéptido o péptido de StIR o variante o derivado o análogo del mismo. Basándose en la siguiente divulgación, un experto habitual en esta técnica sería fácilmente capaz de determinar segmentos, fragmentos o derivados útiles de un polipéptido StIR, por ejemplo, proteína EF2505 de *Enterococcus faecalis*. En un aspecto preferido, el fragmento, segmento o derivado es al menos el 75 % idéntico a una secuencia de SEC ID N°: 1. En otro aspecto, el fragmento, segmento o derivado es al menos el 80 % idéntico a una secuencia de SEC ID N°: 1. En otro aspecto, el fragmento, segmento o derivado es al menos el 85 % idéntico a una secuencia de SEC ID N°: 1. En otro aspecto, el fragmento, segmento o derivado es al menos el 90 % idéntico a una secuencia de SEC ID N°: 1. En otro aspecto, el fragmento, segmento o derivado es al menos el 95 % idéntico a una secuencia de SEC ID N°: 1.

En otra realización más, la presente divulgación se refiere a una composición farmacéuticamente aceptable que comprende uno o más polipéptidos de StIR (por ejemplo, proteína EF2505 de *Enterococcus faecalis*) o un fragmento o un segmento o un derivado o un análogo del mismo; un agente antiinflamatorio; un agente antimicrobiano; y/o uno o más excipientes farmacéuticos. Normalmente, tales composiciones son estériles y esencialmente libres de microbios patógenos.

b. Flagelina

En ciertos aspectos, la composición de StIR comprende un polipéptido de flagelina que comprende 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ó 22 aminoácidos consecutivos del péptido QRLSTGSRINSKDDAAGLQIA (SEC ID N°: 2), que se conoce como un agonista de TLR5, o un segmento o derivado del mismo. Un polipéptido de la divulgación también puede comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos el 70, 80 o el 90 %, que incluye todos los valores e intervalos intermedios, idéntica a SEC ID N°: 2. En otros aspectos, la flagelina es polipéptido o péptido de flagelina sintetizado y/o purificado o aislado. El término "purificado" o "aislado" significa que el componente se aisló previamente o purificó de otras proteínas o reactivos o subproductos de síntesis y que el componente es al menos aproximadamente el 95 % puro antes de formularse en la composición. En ciertas realizaciones, el componente purificado o aislado es aproximadamente o es al menos aproximadamente el 80, 95, 96, 97, 98, 99, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, 99,5 % puro o más, o cualquier intervalo derivable en su interior. Un componente purificado tal puede entonces mezclarse con otros componentes para formar una composición como se describe en el presente documento.

Una proteína flagelina recombinante o fragmento o segmento de la misma comprende 5, 10, 15, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250, 300, 350 ó 400 aminoácidos consecutivos, que incluyen todos los valores e intervalos intermedios, de SEC ID N°: 2 u otros polipéptidos de flagelina. Estos fragmentos o segmentos son al menos, como máximo, o aproximadamente el 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o el 100 % idénticos a SEC ID N°: 2 u otros polipéptidos de flagelina. En ciertos aspectos, un polipéptido de flagelina o segmento es al menos el 75 % idéntico a la secuencia de SEC ID N°: 2. En otro aspecto, polipéptido de flagelina o segmento es al menos el 80 % idéntico a la secuencia de SEC ID N°: 2. En otro aspecto, el polipéptido de flagelina o segmento es al menos el 85 % idéntico a la secuencia de SEC ID N°: 2. En otro aspecto, el polipéptido de flagelina o segmento es al menos el 90 % idéntico a la secuencia de SEC ID N°: 2. En otro aspecto, el polipéptido de flagelina o segmento es al menos el 95 % idéntico a la secuencia de SEC ID N°: 2. Derivados o variantes de flagelina o su segmento incluyen mutaciones de inserción, delección y puntuales de SEC ID N°: 2. Una mutación de inserción particular es una proteína de fusión que comprende secuencia de aminoácidos exógena a la flagelina en el extremo carboxi o amino. Se conocen varias proteínas de flagelina en e incluyen, pero no se limitan a, flagelina que tiene número de acceso BAB58984 (gi|14278896); YP_001330159 (gi|150402865); YP_001323483 (gi|150399716); CAA28975 (gi|13337116); CAA02137 (gi|1567895); CAA67105 (gi|1580779); AAR10473 (gi|38049688); CAR58992 (gi|197093531); YP_001217666 (gi|147675484); CAL12564 (gi|122089712); BAD14977 (gi|46093563); o CAD05707

(gil16503200).

c. Lisado microbiano

- 5 Las realizaciones de la divulgación también incluyen composiciones farmacéuticamente aceptables que comprenden un lisado de un microbio esencialmente no patógeno, un agente antiinflamatorio y uno o más excipientes farmacéuticos, en las que dicha composición es estéril y esencialmente libre de microbios patógenos. Un lisado microbiano normalmente se sonica; homogeneiza; irradia; lisa por métodos barométricos, neumáticos, con detergentes o enzimáticos y combinaciones de los mismos. En un aspecto particular, el lisado microbiano se irradia con UV antes, durante o después de la lisis. El lisado microbiano puede incluir, pero no se limita a, un lisado bacteriano, fúngico o viral. En ciertas realizaciones, el lisado microbiano es un lisado bacteriano. El microorganismo a partir del cual se prepara el lisado no necesita ser un microorganismo virulento, y normalmente no será un microorganismo virulento. Aspectos de la divulgación incluyen un lisado derivado de bacterias que tiene un efecto limitado sobre la salud de un sujeto. Efecto limitado se refiere a producir reacciones adversas mínimas y alteración insustancial en la función de un tejido, un órgano, o un sistema de un sujeto durante un periodo de al menos, como máximo, o aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 días.

- 20 Las composiciones de la divulgación no necesitan derivarse directamente de un organismo virulento del que se busca protección o terapia. Las bacterias pueden ser del género *Haemophilus*, pero no se limitan a *Haemophilus*. Pueden identificarse bacterias que poseen una amenaza mínima de efectos adversos en un sujeto. En ciertos aspectos, la bacteria es *Haemophilus influenzae*, particularmente *Haemophilus influenzae* no tipificable (NTHi) (Clement et al., 2008; Clement et al., 2009; Evans et al., 2010; Tuvim et al., 2009).

- 25 Un lisado microbiano puede tener una concentración de proteína de al menos aproximadamente, aproximadamente, o como máximo de aproximadamente 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5 ó 10 mg/ml, que incluye todos los valores e intervalos intermedios. En ciertos aspectos, el lisado microbiano puede tener una concentración de proteína de al menos aproximadamente, aproximadamente, o como máximo de aproximadamente 10 mg/ml.

- 30 Las realizaciones de la divulgación incluyen un lisado microbiano que puede administrarse mediante las vías respiratorias. En ciertos aspectos, la administración es por inhalación. En otro aspecto, la composición es aerosolizada o en una forma que puede ser inhalada por un sujeto. En ciertas realizaciones, una composición de lisado comprende un agente antiinflamatorio, que incluye antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos (AINE). Para más detalle véase la solicitud de patente de EE.UU. 11/830.622 "Compositions and methods for stimulation of lung innate immunity" Dickey et al.

B. Componentes huésped o autólogos

- 40 Varias moléculas derivadas de células y tejidos de un sujeto o huésped pueden estimular, potenciar o contribuir a la producción de una respuesta inmunitaria. Estos restos se denominan restos o componentes huésped o autólogos e incluyen moléculas pequeñas liberadas de células lesionadas, estresadas o moribundas; componentes que participan en la destrucción microbiana o neutralización; citocinas; y macromoléculas liberadas de células o tejidos.

1. Compuestos huésped de molécula pequeña

- 45 Las moléculas pequeñas que están asociadas o se liberan de células que están lesionadas, estresadas o moribundas, tales como adenosina 5'-trifosfato (ATP), ácido úrico (urato) y adenosina. Los receptores para muchas de estas moléculas y las rutas por las que modulan la inflamación están bien definidos. La inflamación es una de las primeras respuestas del sistema inmunitario a la infección o irritación. La inflamación se estimula por factores químicos liberados por células lesionadas y sirve para establecer una barrera física contra la propagación de la infección, y para promover la curación de cualquier tejido dañado tras la eliminación de los patógenos. Los factores químicos producidos durante la inflamación (histamina, bradiquinina, serotonina, leucotrienos también prostaglandinas) sensibilizan receptores del dolor, producen vasodilatación de los vasos sanguíneos en el lugar, y atraen fagocitos, especialmente neutrófilos. Entonces, los neutrófilos desencadenan otras partes del sistema inmunitario liberando factores que citan a otros leucocitos y linfocitos.

Los componentes huésped de molécula pequeña que pueden incluirse en las composiciones de StIR de la divulgación incluyen ATP, adenosina, histamina, bradiquinina, serotonina, leucotrienos, prostaglandinas.

2. Restos de huésped extracelulares

- 60 Las proteínas huésped extracelulares que tienen una función en la destrucción microbiana directa y/o en la señalización, tales como complemento, pentraxinas, defensinas y catelicidinas. Estas moléculas están frecuentemente presentes constitutivamente, pero no señalizan hasta que se activan uniéndose a productos microbianos, o que se escinden proteolíticamente, o algún otro mecanismo de activación. Además, su producción puede aumentarse. En ciertos aspectos, estas proteínas están tanto en una forma activada (tanto por activación o

procesamiento *in vitro* como por manipulación de la proteína).

5 El sistema del complemento es una cascada bioquímica que ayuda a limpiar de patógenos un organismo. Es parte del sistema inmunitario más grande que no es adaptable y no cambia durante el transcurso de la vida de un individuo; como tal, pertenece al sistema inmunitario innato. Sin embargo, puede ser reclutado y ser puesto en servicio por el sistema inmunitario adaptativo.

10 El sistema del complemento consiste en varias proteínas pequeñas encontradas en la sangre, normalmente circulando como zimógenos inactivos. Cuando se estimulan por uno de los varios desencadenantes, las proteasas en el sistema escinden proteínas específicas para liberar citocinas e inician una cascada de amplificación de otras escisiones. El resultado final de esta cascada de activación es la enorme amplificación de la respuesta y activación del complejo de ataque a membrana destructor de células. Más de 20 proteínas y fragmentos de proteínas constituyen el sistema del complemento, que incluyen proteínas del suero, proteínas serosas y receptores de la membrana celular. Estas proteínas se sintetizan principalmente en el hígado, y representan aproximadamente el 5 %
15 de la fracción de globulina del suero de la sangre.

Los componentes del sistema del complemento que pueden incluirse en una composición de StIR incluyen, pero no se limitan a, C1-complejo, (C1q, C1r, C1s y C1qr2s2), C1r2s2, C4, C2, C4a, C4b, C2a, C2b C3-convertasa (C4b2a complejo), C3a, C3b; C5 convertasa (complejo de C4bC2aC3b), factor de aceleración del decaimiento (DAF), factor
20 B, C3bB, factor D, Ba, Bb, C3bBb, C3bBbC3b, C5, C5a, C5b, C6, C7, C8, C9 y complejo de ataque a la membrana (MAC) (C5b6789).

Las pentraxinas son una familia de proteínas que normalmente tienen unión al ligando dependiente del calcio y una estructura de brazo de gitano en β aplanado distintivo similar a la de las lectinas de legumbre. Las pentraxinas
25 "cortas" incluyen componente P del suero amiloide (SAP) y proteína C reactiva (CRP). Las pentraxinas "largas" incluyen PTX3 (una molécula modulada por citocina) y varias pentraxinas neuronales.

Las defensinas son proteínas catiónicas ricas en cisteína pequeñas encontradas en tanto vertebrados como invertebrados. Son activas contra bacterias, hongos y muchos virus envueltos y no envueltos. Consisten en 18-45
30 aminoácidos que incluyen seis (en vertebrados) a 8 residuos de cisteína conservados. Las células del sistema inmunitario contienen estos péptidos para ayudar en la destrucción de bacterias fagocitadas, por ejemplo, en granulocitos neutrófilos y casi todas las células epiteliales. La mayoría de las defensinas funcionan uniéndose a la membrana celular microbiana, y una vez incorporadas, formando defectos de la membrana similares a poros que permiten la salida de iones y nutrientes esenciales.
35

La defensina puede incluirse en composiciones de StIR de la divulgación que incluyen, pero no se limitan a, α -defensinas (DEFA1, DEFA1A3, DEFA3, y/o DEFA4), β -defensinas (DEFB1, DEFB4, DEFB103A/DEFB103B a DEFB107A/DEFB107B, DEFB110 a DEFB133) y/o θ -defensinas (DEFT1P).

40 El péptido antimicrobiano catelicidina es una familia de polipéptidos encontrada en lisosomas en leucocitos polimorfonucleares (PMN). Los miembros de la familia de las catelicidinas de polipéptidos antimicrobianos se caracterizan por una región altamente conservada (dominio de catelina) y un dominio de péptido de catelicidina altamente variable. Los péptidos de catelicidina se han aislado de muchas especies diferentes de mamíferos. Las
45 catelicidinas se encontraron originalmente en neutrófilos, pero desde entonces se han encontrado en muchas otras células que incluyen células epiteliales y macrófagos activados por bacterias, virus, hongos, o la hormona 1,25-D. La familia de las catelicidinas comparte homología de secuencias primaria con la familia de las catepsinas de inhibidores de la cisteína proteinasa, aunque normalmente carecen de residuos de aminoácidos que se cree que son importantes en tal inhibición de proteasas.

50 3. Citocinas

Las citocinas son una categoría de moléculas de señalización que se usan ampliamente en la comunicación celular. Son proteínas, péptidos o glucoproteínas. El término citocina engloba una familia grande y diversa de reguladores de
55 polipéptidos que se producen ampliamente en todo el cuerpo por células de diverso origen embriológico. La acción de las citocinas puede ser autocrina, paracrina y endocrina. Las citocinas son críticas para el desarrollo y funcionamiento de tanto la respuesta inmunitaria innata como adaptiva, aunque no se limitan a solo el sistema inmunitario. Son frecuentemente secretadas por células inmunitarias que han encontrado un patógeno, activando así y reclutando adicionalmente células inmunitarias para aumentar la respuesta del sistema al patógeno.

60 Las citocinas que estimulan defensas antimicrobianas de células inmunitarias innatas, en particular células epiteliales, tales como IL-17, IL-22, IFN- γ . En algunos casos, esto representa una amplificación de la inflamación innata por el sistema inmunitario innato adaptativo, como cuando la IL-17 se produce por células Th 17. En otros casos, las citocinas son liberadas por células que no son parte del sistema inmunitario adaptativo, por ejemplo, por células epiteliales, células mesenquimatosas o células dendríticas.
65

Las citocinas que pueden incluirse en las composiciones de StIR de la divulgación incluyen la superfamilia 1 de IL-1 ((IL-1Ra), IL-18, IL-33); la familia similar a IL-6/que utiliza gp130 (IL-6, IL-11, IL-27, IL-30, IL-31, oncostatina M, factor inhibidor de leucemia, factor neurotrófico ciliar, cardiotrofina 1); la familia de IL-10 (IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26); interferón tipo III (IL-28, IL-29); familia de la cadena γ común (IL-2/15, IL-3, IL-4, IL-7, IL-9, IL-13, IL-21); la familia de IL-12 (IL-12, IL-23, IL-27, IL-35), IL-5; IL-8; IL-14; IL-16; IL-17/25; IL-32; las quimiocinas CCL (CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL6, CCL7, CCL8, CCL9, CCL10, CCL11, CCL12, CCL13, CCL14, CCL15, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL21, CCL22, CCL23, CCL24, CCL25, CCL26, CCL27, CCL28); las quimiocinas CXCL (CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL15, CXCL16, CXCL17); CX3CL-1; XCL1; XCL2; superfamilia de TNF (ligando) (ligando 4-1BB, factor activante de linfocitos B, ligando FAS, linfotoxina, OX40L, RANKL, TRAIL); agrupación de citocinas de diferenciación (CD70, CD153, CD154); interferones (IFN-I alfa (2a PEGilado, 2b PEGilado), IFN-Ibeta (1a, 1b)), IFN-II y IFN-III.

4. Restos de huésped macromolecular

Macromoléculas o fragmentos de las mismas que pueden liberarse de la matriz extracelular, la superficie celular o el interior de la célula y activan la señalización inmunitaria innata, tales como dectina, versicano, HMGB-I, ADN y ARN. Normalmente, estas macromoléculas normalmente están ocultas de receptores diana, tanto dentro del interior de la célula como enmascaradas por interacciones intramoleculares o intermoleculares. Son liberadas para interactuar con receptores diana después de la rotura de la célula, o después de la proteólisis de la superficie celular de la matriz para revelar un resto de señalización, o algún mecanismo similar.

II. COMPOSICIONES DE POLIPÉPTIDO Y PÉPTIDO

En ciertas realizaciones, la presente divulgación se refiere a al menos un polipéptido o péptido (por ejemplo, un segmento de polipéptido) o derivado o variante del mismo. Como se usa en el presente documento, una "proteína", "polipéptido", "péptido", "composición de polipéptido o péptido", o "compuesto de polipéptido o péptido", generalmente se refiere, pero no se limita a, una proteína o polipéptido de al menos cinco aminoácidos o análogos de aminoácidos (conjuntamente una molécula de amino, véase más adelante). Todos los términos de "polipéptido o péptido" descritos anteriormente pueden usarse indistintamente en el presente documento.

En ciertas realizaciones, el tamaño de la al menos una molécula de polipéptido o péptido puede comprender, pero no se limita a, una molécula que tiene al menos, como máximo o aproximadamente 5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 50, 100, 500, 1000 a aproximadamente 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 50, 100, 500, o más residuos de molécula amino, y cualquier valor o intervalo derivable en su interior. La divulgación incluye aquellas longitudes de aminoácidos contiguos o análogos de los mismos de cualquier secuencia tratada en el presente documento.

Segmentos o fragmento de un polipéptido de péptido incluyen del aminoácido 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 300, 350, 400, 450 al aminoácido 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600 aminoácidos de secuencias desveladas o citadas en el presente documento, que incluyen todos los valores e intervalos intermedios.

Como se usa en el presente documento, una "molécula de amino" se refiere a cualquier aminoácido, derivado de aminoácido o mimético de aminoácido como se conoce para un experto habitual en la materia. En ciertas realizaciones, los residuos del polipéptido o molécula de péptido son secuenciales, sin ninguna molécula de amino que interrumpa la secuencia de residuos de moléculas de amino. En otras realizaciones, la secuencia puede comprender uno o más restos de molécula de no amino. En ciertas realizaciones, la secuencia de residuos de la molécula de polipéptido o péptido puede interrumpirse por uno o más restos de molécula de no amino.

Por consiguiente, el término "composición de polipéptido o péptido" engloba secuencias de moléculas de amino que comprenden al menos uno de los 20 aminoácidos comunes en proteínas naturalmente sintetizadas, o al menos un aminoácido modificado o inusual.

En ciertas realizaciones, la composición de polipéptido o de péptido comprende al menos una proteína, polipéptido o péptido. En métodos que implican una composición agonista de TLR, un polipéptido o péptido pueden tener toda o parte de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de flagelina, tal como SEC ID N°: 2, o polipéptidos homólogos. En ciertas realizaciones, las composiciones que contienen proteína, polipéptido o péptido serán generalmente proteínas o péptidos o proteínas sintéticas o péptidos cada uno esencialmente libre de toxinas, patógenos e inmunógenos perjudiciales. En ciertos aspectos, el polipéptido es una secuencia de aminoácidos recombinante o sintética.

Las composiciones de polipéptido o péptido pueden prepararse por cualquier técnica conocida para aquellos expertos en la materia, que incluye la expresión de proteínas, polipéptidos o péptidos mediante técnicas de biología molecular convencionales, el aislamiento de polipéptidos o péptidos de fuentes naturales, o la síntesis química de materiales de polipéptido o péptido. Las regiones codificantes para estos polipéptidos o péptidos pueden

amplificarse y/o expresarse usando las técnicas desveladas en el presente documento o como serían conocidas para aquellos expertos habituales en la materia. Alternativamente, aquellos expertos conocen diversas preparaciones comerciales de proteínas, polipéptidos y péptidos.

5 En ciertas realizaciones, puede purificarse un compuesto de polipéptido o péptido. Generalmente, "purificado" se referirá a una composición específica o de proteína, polipéptido o de péptido que se ha sometido a fraccionamiento para eliminar diversas otras proteínas, polipéptidos, péptidos, y otras moléculas y compuestos, y composición que retiene sustancialmente su actividad, como puede evaluarse, por ejemplo, por ensayos de proteína, como se conoce por un experto habitual en la materia para la proteína, polipéptido o péptido específico o deseado.

10 Se contempla que prácticamente cualquier componente que contiene proteína, polipéptido o péptido pueda usarse en las composiciones y métodos desvelados en el presente documento. En ciertas realizaciones, se prevé que la formación de un aerosol o composición nebulizada o aerosolizable o nebulizable pueda permitir que la composición se aplique con más precisión o fácilmente al aparato respiratorio por inhalación, inspiración, y similares.

15 **A. Variantes y derivados de polipéptidos o péptidos**

Variantes o derivados de la secuencia de aminoácidos de las proteínas, polipéptidos y péptidos de la presente divulgación pueden ser variantes sustitucionales, de inserción o de delección, además de inclusión de análogos o derivados de aminoácidos. Las variantes de delección carecen de uno o más residuos de la proteína nativa que no son esenciales para la función o actividad inmunogénica. Otro tipo común de variante de delección es uno que carece de secuencias señal secretoras o secuencias señal que dirigen a una proteína para unirse a una parte particular de una célula o regiones que atraviesan la membrana u otras secuencias funcionales no necesarias para la actividad *in vivo* buscada. Los mutantes de inserción normalmente implican la adición de material en un punto no terminal en el polipéptido. Esto puede incluir la inserción de un epítopo inmunorreactivo o simplemente un único residuo. Las adiciones terminales, llamadas proteínas de fusión, se tratan más adelante.

Las variantes de sustitución normalmente contienen el intercambio de un aminoácido con otro en uno o más sitios dentro de un polipéptido o péptido, y pueden diseñarse para modular una o más propiedades, tales como estabilidad contra la escisión proteolítica, sin la pérdida de otras funciones o propiedades. Las sustituciones de este tipo son preferentemente conservativas, es decir, un aminoácido se sustituye con uno de forma y carga similar. Las sustituciones conservativas son muy conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, los cambios de: alanina a serina; arginina a lisina; asparagina a glutamina o histidina; aspartato a glutamato; cisteína a serina; glutamina a asparagina; glutamato a aspartato; glicina a prolina; histidina a asparagina o glutamina; isoleucina a leucina o valina; leucina a valina o isoleucina; lisina a arginina; metionina a leucina o isoleucina; fenilalanina a tirosina, leucina o metionina; serina a treonina; treonina a serina; triptófano a tirosina; tirosina a triptófano o fenilalanina; y valina a isoleucina o leucina.

El término "equivalente biológicamente funcional" es muy entendido en la materia y se define adicionalmente en detalle en el presente documento. Por consiguiente, un equivalente biológicamente funcional tendrá una secuencia de aproximadamente el 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 % de aminoácidos que son idénticos o funcionalmente equivalentes a los aminoácidos de un polipéptido o péptido o variante o análogo o derivado del mismo y proporcionan una actividad biológica/respuesta similar a flagelina u otro agonista de TLR.

Lo siguiente es una discusión basada en el cambio de los aminoácidos de un polipéptido o péptido para crear un equivalente, o incluso una molécula de segunda generación mejorada. Por ejemplo, ciertos aminoácidos pueden estar sustituidos con otros aminoácidos en un polipéptido o péptido sin pérdida apreciable de una actividad particular tal como potenciamiento de la respuesta inmunológica. Como es la capacidad interactiva y naturaleza de un polipéptido o péptido la que normalmente define la actividad funcional de una proteína, pueden hacerse ciertas sustituciones de aminoácidos en un polipéptido o secuencia de péptidos, y en su secuencia codificante de ADN subyacente, y sin embargo producir una proteína con propiedades similares. Así, los inventores contemplan que pueden hacerse diversos cambios en las secuencias de ADN que codifican polipéptidos o péptidos de la divulgación sin pérdida apreciable de su utilidad o actividad biológica, como se trata más adelante.

Al hacer tales cambios puede considerarse el índice hidropático de los aminoácidos. La importancia del índice de aminoácidos hidropático en conferir función biológica interactiva sobre una proteína se entiende generalmente en la materia (Kyte & Doopoco, 1982). Se acepta que el carácter hidropático relativo del aminoácido contribuye a la estructura secundaria de la proteína resultante, que a su vez define la interacción de la proteína con otras moléculas, células, tejido y similares, por ejemplo, enzimas, sustratos, receptores, ADN, anticuerpos, antígenos, células inmunológicas y sistemas, y similares.

También se entiende en la materia que la sustitución de aminoácidos similares puede hacerse eficazmente basándose en la hidrofilia. La patente de EE.UU. 4.554.101 establece que la mayor hidrofilia promedio local de una proteína, como se gobierna por la hidrofilia de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con una propiedad biológica de la proteína. Como se detalla en la patente de EE.UU. 4.554.101, los siguientes valores de hidrofilia se han asignado a los residuos de aminoácidos: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0 ± 1); glutamato (+3,0 ± 1);

serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5 ± 1); alanina (-0,5); histidina *-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4).

5 También se entiende que un aminoácido puede estar sustituido con otro que tiene un valor de hidrofilia similar y todavía producir una proteína biológicamente equivalente e inmunológicamente equivalente. En tales cambios se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofilia están dentro de ± 2 , aquellos que están dentro de ± 1 son particularmente preferidos, y aquellos dentro de $\pm 0,5$ son incluso más particularmente preferidos.

10 Como se explica resumidamente anteriormente, las sustituciones de aminoácidos generalmente se basan en la similitud relativa de los sustituyentes de la cadena lateral del aminoácido, por ejemplo, su hidrofobia, hidrofilia, carga, tamaño y similares. Sustituciones a modo de ejemplo que tienen en cuenta las diversas características anteriores son muy conocidas para aquellos expertos en la materia e incluyen: arginina y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina; glutamina y asparagina; y valina, leucina e isoleucina.

15 También pueden modificarse los aminoácidos internos, y/o extremo amino y/o carboxi de compuestos de polipéptido o péptido de la divulgación, para producir otros compuestos de la divulgación, es decir, derivados de polipéptido o péptido. Las modificaciones del extremo amino incluyen metilación (por ejemplo, $-\text{NHCH}_3$ o $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$), acetilación (por ejemplo, con ácido acético o un derivado halogenado del mismo tal como ácido α -cloroacético, ácido α -bromoacético o ácido α -yodoacético), añadir un grupo benciloxicarbonilo (Cbz), o bloquear el extremo amino con cualquier grupo de bloqueo que contenga una funcionalidad carboxilato definida por $\text{RCOO}-$ o funcionalidad sulfonilo definida por R-SO_2- , en la que R está seleccionado de alquilo, arilo, heteroarilo, alquilarilo y similares, y grupos similares. También puede incorporarse un desaminoácido en el extremo N (de manera que no haya grupo amino del extremo N) para reducir la susceptibilidad a las proteasas o para limitar la conformación del compuesto de polipéptido o péptido.

20 Las modificaciones del extremo carboxi incluyen sustituir el ácido libre con un grupo carboxamida o formar una lactama cíclica en el extremo carboxi para introducir limitaciones estructurales. También pueden ciclarse los péptidos de la divulgación, o incorporar un residuo desamino o descarboxi en los extremos del péptido, de manera que no haya grupo amino o carboxilo terminal, para reducir la susceptibilidad a proteasas o para limitar la conformación del péptido. Los grupos funcionales del extremo C de los compuestos de la presente divulgación incluyen amida, amida-alquilo inferior, amida-di(alquilo inferior), alcoxi inferior, hidroxilo y carboxi, y los derivado de éster inferior de los mismos, y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

30 Pueden sustituirse las cadenas laterales que se producen naturalmente de los 20 aminoácidos genéticamente codificados (o los D-aminoácidos estereoisoméricos) con otras cadenas laterales, por ejemplo, con grupos tales como alquilo, alquilo inferior, alquilo cíclico de 4, 5, 6 ó 7 miembros, amida, amida-alquilo inferior, amida-di(alquilo inferior), alcoxi inferior, hidroxilo, carboxi y los derivados de éster inferior de los mismos, y con heterocíclico de 4, 5, 6 ó 7 miembros. En particular, pueden emplearse análogos de prolina en los que el tamaño del anillo del residuo de prolina se cambia de 5 miembros a 4, 6 ó 7 miembros. Los grupos cíclicos pueden estar saturados o insaturados, y si están insaturados, pueden ser aromáticos o no aromáticos. Los grupos heterocíclicos contienen preferentemente uno o más heteroátomos de nitrógeno, oxígeno y/o azufre. Ejemplos de tales grupos incluyen furazanilo, furilo, imidazolidinilo, imidazolilo, imidazolinilo, isotiazolilo, isoxazolilo, morfolinilo (por ejemplo, morfolino), oxazolilo, piperazinilo (por ejemplo, 1-piperazinilo), piperidilo (por ejemplo, 1-piperidilo, piperidino), piranilo, pirazinilo, pirazolidinilo, pirazolinilo, pirazolilo, piridazinilo, piridilo, pirimidinilo, pirrolidinilo (por ejemplo, 1-pirrolidinilo), pirrolinilo, pirrolilo, tiadiazolilo, tiazolilo, tienilo, tiomorfolinilo (por ejemplo, tiomorfolino) y triazolilo. Estos grupos heterocíclicos pueden estar sustituidos o sin sustituir. Si un grupo está sustituido, el sustituyente puede ser alquilo, alcoxi, halógeno, oxígeno, o fenilo sustituido o sin sustituir.

40 También pueden modificarse fácilmente polipéptidos o péptidos por fosforilación, y otros métodos (por ejemplo, como se describen en Hruby et al. (1990).

50 Los compuestos de péptido de la divulgación también sirven de modelos estructurales para compuestos no peptídicos con actividad biológica similar. Aquellos expertos en la materia reconocen que están disponibles una variedad de técnicas para construir compuestos con la misma actividad biológica deseada o similar a la del compuesto de péptido principal, pero con actividad más favorable que la del principal con respecto a solubilidad, estabilidad y susceptibilidad a la hidrólisis y proteólisis (véase, Morgan y Gainor, 1989). Estas técnicas incluyen sustituir el esqueleto de péptido con un esqueleto compuesto de fosfonatos, amidatos, carbamatos, sulfonamidas, aminos secundarias y N-metilaminoácidos.

60 Además, los compuestos de la presente divulgación pueden contener uno o más enlaces disulfuro intramoleculares. En una realización, un monómero o dímero de péptido comprende al menos un enlace disulfuro intramolecular. En realizaciones preferidas, un dímero de péptido comprende dos enlaces disulfuro intramoleculares. Tales enlaces disulfuro pueden formarse por oxidación de los residuos de cisteína de la secuencia de núcleo del péptido. En una realización, el control de la formación del enlace de cisteína se ejerce eligiendo un agente de oxidación del tipo y concentración eficaz para optimizar la formación del isómero deseado. Por ejemplo, la oxidación de un dímero de

péptido para formar dos enlaces disulfuro intramoleculares (uno sobre cada cadena de péptido) se consigue preferencialmente (mediante la formación de enlaces disulfuro intermoleculares) cuando el agente de oxidación es DMSO. En ciertas realizaciones, la formación de enlaces cisteína está controlada por el uso selectivo de grupos protectores de tiol durante la síntesis de péptidos.

5 Otras realizaciones de la presente divulgación proporcionan análogos de estos derivados de disulfuro en los que uno de los azufres se ha sustituido con un grupo CH₂ u otro isótero por azufre. Estos análogos pueden prepararse a partir de los compuestos de la presente divulgación, en los que cada secuencia de núcleo contiene al menos un Cys (C) o residuo de homocisteína y un ácido α -amino- γ -butírico en lugar del segundo residuo de C, mediante un desplazamiento intramolecular o intermolecular, usando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Barker et al., 1992 y Or et al., 1991). Un experto en la materia apreciará fácilmente que este desplazamiento también puede producirse usando otros homólogos de ácido α -amino- γ -butírico y homocisteína.

15 Además de las estrategias de ciclado anteriores, pueden emplearse otras estrategias de ciclado de péptidos no de disulfuro. Tales estrategias de ciclado alternativas incluyen, por ejemplo, estrategias de ciclado de amidas, además de aquellas que implican la formación de enlaces tio-éter. Así, los compuestos de la presente divulgación pueden existir en una forma ciclada con tanto un enlace amida intramolecular como un enlace tio-éter intramolecular. Por ejemplo, puede sintetizarse un péptido en el que una cisteína de la secuencia de núcleo se sustituye con lisina y la segunda cisteína se sustituye con ácido glutámico. Después puede formarse un monómero cíclico mediante un enlace amida entre las cadenas laterales de estos dos residuos. Alternativamente, puede sintetizarse un péptido en el que una cisteína de la secuencia de núcleo se sustituye con lisina. Entonces puede formarse un monómero cíclico mediante un enlace tio-éter entre las cadenas laterales del residuo de lisina y el segundo residuo de cisteína de la secuencia de núcleo. Como tales, además de las estrategias de ciclado de disulfuro, estrategias de ciclado de amidas y estrategias de ciclado de tio-éter pueden ambas usarse fácilmente para ciclar los compuestos de la presente divulgación. Alternativamente, el extremo amino del péptido puede rematarse con un ácido acético sustituido en α , en el que el sustituyente en α es un grupo saliente, tal como un ácido α -haloacético, por ejemplo, ácido α -cloroacético, ácido α -bromoacético o ácido α -yodoacético.

30 Pueden usarse polímeros solubles en agua, tales como polietilenglicol (PEG), para la modificación covalente de polipéptidos o péptidos de importancia terapéutica. Se cree que la unión de tales polímeros potencia la actividad biológica, aumenta la solubilidad acuosa y potencia la resistencia a la digestión con proteasas. Por ejemplo, se ha informado que la unión covalente de PEG a polipéptidos terapéuticos tales como interleucinas (Knauf, et al., 1988; 15064; Tsutsumi et al., 1995, interferones (Kita et al., 1990), catalasa (Abuchowski et al., 1977, superóxido dismutasa (Beauchamp et al., 1983, y adenosina desaminasa (Chen et al., 1981), prolonga su semivida *in vivo*, y/o reduce su inmunogenicidad y antigenicidad.

40 Los compuestos de la divulgación pueden comprender además uno o más restos de polímero solubles en agua. Preferentemente, estos polímeros están covalentemente unidos a los compuestos. El polímero soluble en agua puede ser, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (tanto homopolímeros como copolímeros al azar), poli(n-vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de poli(óxido de propileno)/óxido de etileno y polioles polioxitilados.

45 Los compuestos de la divulgación pueden unirse a polímeros solubles en agua (por ejemplo, PEG) usando cualquiera de una variedad de químicas para enlazar el (los) polímero(s) soluble(s) en agua con la porción de unión al receptor de la molécula (por ejemplo, péptido+espaciador). Una realización típica emplea un único empalme de unión para la unión covalente del (de los) polímero(s) soluble(s) en agua a la porción de unión al receptor, sin embargo en realizaciones alternativas pueden usarse múltiples empalmes de unión, que incluyen adicionalmente variaciones en las que diferentes especies del polímero soluble en agua están unidas a la porción de unión al receptor en distintos empalmes de unión, que pueden incluir empalme(s) de unión covalente al espaciador y/o a una o ambas cadenas de péptido.

55 Los reactivos de PEG incluyen, pero no se limitan a, mPEG2-NHS, mPEG2-ALD, PEG de múltiples brazos, mPEG(MAL)₂, mPEG2(MAL), mPEG-NH₂, mPEG-SPA, mPEG-SBA, mPEG-tioésteres, mPEG-ésteres dobles, mPEG-BTC, mPEG-ButirALD, mPEG-ACET, PEG heterofuncionales (NH₂-PEG-COOH, Boc-PEG-NHS, Fmoc-PEG-NHS, NHS-PEG-VS, NHS-PEG-MAL), acrilatos de PEG (ACRL-PEG-NHS), PEG-fosfolípidos (por ejemplo, mPEG-DSPE), PEG de múltiples brazos de la serie SUNBRITE que incluyen la serie GL de PEG basados en glicerina activados por una química elegida por aquellos expertos en la materia, cualquiera de los PEG activados de SUNBRITE (que incluyen, pero no se limitan a, carboxil-PEG, p-NP-PEG, tresil-PEG, aldehído-PEG, acetal-PEG, amino-PEG, tiol-PEG, maleimido-PEG, hidroxil-PEG-amina, amino-PEG-COOH, hidroxil-PEG-aldehído, PEG tipo anhídrido carboxílico, PEG funcionalizado-fosfolípido, y otros PEG reactivos similares y/o adecuados como se selecciona por aquellos expertos en la materia para su aplicación particular y uso.

65 El número de moléculas de polímero unidas puede variar; por ejemplo, pueden unirse una, dos, tres o más polímeros a un polipéptido o péptido de la divulgación. Los múltiples polímeros unidos pueden ser restos químicos

iguales o diferentes (por ejemplo, PEG de peso molecular diferente). En algunos casos, el grado de unión del polímero (el número de restos de polímero unidos a un péptido y/o el número total de péptidos a los que un polímero está unido) puede influirse por la proporción de moléculas de polímero frente a las moléculas de péptido en una reacción de unión, además de por la concentración total de cada uno en la mezcla de reacción. En general, la relación óptima de polímero frente a péptido (en términos de eficiencia de reacción para no proporcionar exceso de péptidos sin reaccionar y/o restos de polímero) se determinará por factores tales como el grado deseado de unión del polímero (por ejemplo, mono, di-, tri-, etc.), el peso molecular del polímero seleccionado, si el polímero está ramificado o sin ramificar, y las condiciones de reacción para un método de unión particular.

En otros aspectos, un compuesto de la divulgación puede derivatizarse mediante la adición de polímeros insolubles en agua. Polímeros insolubles en agua representativos incluyen, pero no se limitan a, polifosfazinas, poli(alcoholes vinílicos), poliamidas, policarbonatos, polialquilenos, poli(acrilamidas), polialquilenglicoles, poli(óxidos de alquileno), poli(tereftalatos de alquileno), polivinil éteres, polivinil ésteres, poli(haluros de vinilo), polivinilpirrolidona, poliglicolidas, polisiloxanos, poliuretanos, poli(metacrilato de metilo), poli(metacrilato de etilo), poli(metacrilato de butilo), poli(metacrilato de isobutilo), poli(metacrilato de hexilo), poli(metacrilato de isodecilo), poli(metacrilato de laurilo), poli(metacrilato de fenilo), poli(acrilato de metilo), poli(acrilato de isopropilo), poli(acrilato de isobutilo), poli(acrilato de octadecilo), polietileno, polipropileno, poli(etilenglicol), poli(óxido de etileno), poli(tereftalato de etileno), poli(acetato de vinilo), poli(cloruro de vinilo), poliestireno, polivinilpirrolidona, Pluronic y polivinilfenol y copolímeros de los mismos.

Polímeros naturales sintéticamente modificados de uso en derivados de la divulgación incluyen, pero no se limitan a, alquilcelulosas, hidroxialquilcelulosas, éteres de celulosa, ésteres de celulosa y nitrocelulosas. Miembros de las amplias clases de polímeros naturales sintéticamente modificados incluyen, pero no se limitan a, metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxibutilmetilcelulosa, acetato de celulosa, propionato de celulosa, acetato-butirato de celulosa, acetato-ftalato de celulosa, carboximetilcelulosa, triacetato de celulosa, sal de sodio de sulfato de celulosa, y polímeros de ésteres acrílicos y metacrílicos y ácido alginico.

En ciertos aspectos, un polipéptido o péptido de la divulgación puede modificarse o derivatizarse mediante la adición de grupos sacárido, o azúcares modificados. La presente divulgación proporciona derivados de polipéptido y péptido que contienen azúcares modificados, nucleótidos de azúcares modificados y conjugados de los azúcares modificados. En compuestos de azúcares modificados de la divulgación, el resto de azúcar es preferentemente un sacárido, un desoxi-sacárido, un amino-sacárido o un N-acilsacárido. El término "sacárido" y sus equivalentes, "sacarilo", "azúcar" y "glucosilo" se refieren a monómeros, dímeros, oligómeros y polímeros. El resto de azúcar también puede funcionalizarse con un grupo de modificación. El grupo de modificación está conjugado con el resto de azúcar, normalmente mediante conjugación con un resto amina, sulfhidrilo o hidroxilo, por ejemplo, hidroxilo primario, sobre el azúcar. En una realización, el grupo de modificación está unido mediante un resto amina sobre el azúcar, por ejemplo, mediante una amida, un uretano o una urea que se forma mediante la reacción de la amina con un derivado reactivo del grupo de modificación.

Puede utilizarse cualquier azúcar como el azúcar para los conjugados de la divulgación. Tales azúcares incluyen, pero no se limitan a, glucosa, galactosa, manosa, fucosa y ácido siálico. Otros azúcares útiles incluyen aminoazúcares tales como glucosamina, galactosamina, manosamina, el análogo de 5-amina de ácido siálico y similares. El azúcar puede ser una estructura encontrada en la naturaleza o puede modificarse para proporcionar un sitio para conjugar un grupo de modificación adicional.

Aquellos expertos en la materia reconocerán que las estructuras y composiciones expuestas son generalmente aplicables a través del género de grupos sacárido, grupos sacárido modificados, grupos sacárido modificados activados y conjugados de grupos sacárido modificados.

III. ESTIMULACIÓN DE LAS DEFENSAS DEL PULMÓN

Los inventores han usado el ratón como modelo para la infección microbiana del pulmón. En ciertos estudios, ratones sin tratar tienen una mortalidad del 100 %, pero ratones tratados están altamente protegidos. Sin adherirse a mecanismo particular alguno o teoría, se cree que la protección es debida a la activación de las defensas locales o inmunidad innata. Se han determinado los efectos de una única exposición y exposición repetitiva de un sujeto a una composición de la invención y no se ha observado patología macroscópica obvia, tal como muerte prematura, pérdida de peso o cambios del comportamiento.

Un beneficio no limitante de la presente invención es que puede administrarse y tener efecto rápidamente y fácilmente. Por tanto, las composiciones pueden producirse económicamente en grandes cantidades y guardarse fácilmente, además de ser fácilmente transportadas por una persona fuera de un ámbito hospitalario. Normalmente, la administración de las composiciones inventivas de la invención produce al menos alguna destrucción o inhibición de los patógenos invasores, incluso antes de la entrada celular. En el caso de que algunos patógenos entren en las células en los pulmones tanto escapando de la destrucción extracelular como debido a que las composiciones se administran después de la exposición al patógeno (preferentemente) en lugar de antes de la exposición al patógeno (preventivamente), se contempla que las composiciones y métodos relacionados promuevan la destrucción

intracelular resultante de las respuestas locales potenciadas o aumentadas en los pulmones. Se contempla que las composiciones y métodos relacionados tienen o producen respuestas protectoras o terapéuticas contra una variedad de patógenos respiratorios.

5 La protección o terapia proporcionada a un individuo por una composición de StIR puede prolongarse a clases adicionales de patógenos microbianos que incluyen bacterias Gram-negativas, bacterias intracelulares, hongos y virus debido a la amplia actividad de los mecanismos antimicrobianos de las vías respiratorias. Un agente tal como el descrito en la presente solicitud simplificaría el almacenamiento y despliegue de contrataque. Por tanto, las composiciones de la invención eliminarían la dificultad de identificar rápidamente un patógeno específico durante un
10 ataque con armas biológicas u otra exposición o posible acontecimiento de exposición.

Además, las ventajas económicas de producir y comprar un agente con aplicabilidad en múltiples ámbitos civiles y de biodefensa son significativas. El aumentar los mecanismos epiteliales locales es particularmente atractivo en sujetos que frecuentemente tienen neutropenia o función inmunitaria adaptativa alterada, por ejemplo, sujetos
15 inmunodeprimidos. Los métodos normalmente actúan localmente en vez de sistémicamente, y proporcionan amplios efectos contra múltiples patógenos. Los efectos son rápidos y son atractivos en un ámbito de biodefensa, médico y epidémico.

El aumento de las capacidades de defensa innata de los pulmones en huéspedes normales sería valioso durante las epidemias de gripe o virales respiratorias emergentes para las que no están disponibles vacunas inmunitarias adaptativas. Los brotes bacterianos con organismos emergentes o resistentes a fármacos podrían también ser una
20 situación en la que podría ser útil reforzar las defensas innatas del pulmón. Similarmente, la protección de los profesionales sanitarios durante una epidemia facilitaría el cuidado del enfermo a la vez que limitaría la propagación.

Muchas personas en la comunidad viven con defensas crónicamente comprometidas contra la infección, tales como pacientes con diabetes y pacientes que toman fármacos inmunosupresores para enfermedades autoinmunitarias o para prevenir el rechazo de trasplante. Estas personas podrían beneficiarse particularmente del aumento de las defensas del pulmón durante epidemias o momentos en los que las posibilidades de exposición a microbios fueran elevadas. Incluso más sorprendentemente, los pacientes con cáncer que reciben quimioterapia que tienen
25 respuestas inmunitarias transitorias, pero gravemente comprometidas, podrían beneficiarse de la protección transitoria. La neumonía es una manifestación común en estos pacientes, y es una causa frecuente de muerte infecciosa. Muchos fármacos de quimioterapia, tales como agentes alquilantes y análogos de nucleósido, producen neutropenia transitoria grave. Inicialmente, los pacientes neutropénicos son susceptibles a neumonía bacteriana de organismos observados en huéspedes normales, además de bacterias de baja virulencia tales como
30 *Stenotrophomonas maltophilia*. Con neutropenia prolongada, los pacientes también se vuelven susceptibles a infección con hongos de baja virulencia, particularmente especies de *Aspergillus*.

Las defensas del pulmón pueden estimularse para proporcionar protección transitoria durante periodos prolongados de neutropenia. Otros pacientes con cáncer, tales como aquellos que reciben fludarabina o anticuerpos anti-
40 linfocitos, o aquellos que reciben inhibidores de calcineurina y esteroides después del trasplante de citoblastos hematopoyéticos, tienen inmunidad adaptativa alterada. Estos pacientes podrían también beneficiarse de la estimulación episódica de la inmunidad del pulmón para proteger contra la invasión por hongos y bacterias que han colonizado las vías respiratorias, o para proteger contra virus epidémicos. Los brotes en comunidad de virus "fríos" respiratorios estacionales tales como la paragripe y RSV pueden producir neumonía fatal en estos pacientes
45 comprometidos, y la infección con muchos de estos virus puede identificarse rápidamente de lavados nasales.

Tras la infección, el reconocimiento de microorganismos está principalmente mediado por un conjunto de moléculas codificadas por la línea germinal en las células inmunitarias innatas que se denominan receptores del reconocimiento patrón (PRR) (Medzhitov y Janeway, 1997). Estos receptores del reconocimiento patrón se expresan
50 como tanto proteínas unidas a la membrana como solubles que reconocen estructuras moleculares invariantes, llamadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) (Janeway y Medzhitov, 2002). Los patrones moleculares asociados a patógenos son componentes microbianos únicos, conservados y esenciales, tales como LPS, que son estructuralmente diferentes de las moléculas huésped (Medzhitov y Janeway, 1997; Janeway y Medzhitov, 2002).

La mayoría de los organismos multicelulares poseen un "sistema inmunitario innato" que no cambia durante la vida del organismo. A diferencia, la inmunidad adaptativa es las respuestas a patógenos que cambian y se desarrollan durante la vida de un individuo. Los organismos que poseen una inmunidad adaptativa también poseen una
55 inmunidad innata, y siendo comunes muchos de los mecanismos entre los sistemas, no siempre es posible deducir un límite estricto entre los componentes individuales que participan en cada uno, a pesar de la clara diferencia en la operación. Los vertebrados superiores y todos los mamíferos tienen tanto un sistema inmunitario innato como uno adaptativo.
60

A. Sistema inmunitario innato.

El sistema inmunitario adaptativo puede durar días o semanas después de una infección inicial en tener un efecto. Sin embargo, la mayoría de los organismos están bajo un constante asalto de patógenos que debe mantenerse controlado por el sistema inmunitario innato que actúa más rápido. La inmunidad innata defiende contra patógenos por rápidas respuestas coordinadas mediante mecanismos “innatos” que reconocen un amplio espectro de componentes patógenos conservados. La mayoría de los estudios de inmunidad innata se han basado en leucocitos tales como neutrófilos, macrófagos y linfocitos citolíticos espontáneos. Sin embargo, las células epiteliales desempeñan funciones clave en las defensas innatas que incluyen proporcionar una barrera mecánica a la entrada microbiana, señalar a leucocitos y destruir directamente patógenos. Y, lo que es más importante, todas estas defensas son altamente inducibles en respuesta a la detección de productos microbianos y huésped. En pulmones sanos, el nivel de función epitelial inmunitaria innata es bajo al nivel inicial. Esto se indica por bajos niveles de destrucción microbiana espontánea y liberación de citocinas, reflejando estimulación constitutiva baja en las vías respiratorias inferiores casi estériles cuando los mecanismos de eliminación mucociliar están funcionando eficazmente. Esto muestra la diferencia con el colon, en el que las bacterias están continuamente presentes y las células epiteliales están constitutivamente activadas. Aunque el área superficial de los pulmones presenta una gran diana para la invasión microbiana, las células epiteliales del pulmón activadas que están estrechamente yuxtapuestas para los patógenos depositados están idealmente posicionadas para la destrucción microbiana (véase Evans et al., 2010). Las plantas y muchos animales inferiores no poseen un sistema inmunitario adaptativo, y se basan en su lugar en su inmunidad innata. Sustancias de fuentes tanto microbianas como no microbianas pueden estimular respuestas inmunitarias innatas.

El sistema inmunitario innato, cuando se activa, tiene una amplia matriz de células efectoras y mecanismos. Hay varios tipos diferentes de células fagocíticas, que ingieren y destruyen patógenos invasores. Los fagocitos más comunes son neutrófilos, macrófagos y células dendríticas. Otro tipo de células, los linfocitos citolíticos espontáneos, son especialmente expertos en destruir células infectadas con virus. Otro componente del sistema inmunitario innato se conoce como el sistema del complemento. Las proteínas del complemento normalmente son componentes inactivos de la sangre. Sin embargo, cuando se activan por el reconocimiento de un patógeno o anticuerpo, las diversas proteínas se activan para reclutar células inflamatorias, recubrir patógenos para hacerlos más fácilmente fagocitados, y para hacer poros destructivos en las superficies de los patógenos.

La defensa de “primera línea” incluye barreras físicas y químicas a la infección, tales como la piel y el recubrimiento de moco del intestino y las vías respiratorias, previniéndose físicamente la interacción entre el huésped y el patógeno. Los patógenos, que penetran en estas barreras, encuentran moléculas antimicrobianas constitutivamente expresadas (por ejemplo, lisozima) que limitan la infección. La defensa de “segunda línea” incluye células fagocíticas (macrófagos y granulocitos neutrófilos) que pueden engullir (fagocitar) sustancias extrañas.

La fagocitosis implica la quimiotaxia, en la que células fagocíticas son atraídas a microorganismos por medio de productos químicos quimiotácticos tales como productos microbianos, complemento, células dañadas y fragmentos de glóbulos blancos. La quimiotaxia va seguida de la adhesión en la que el fagocito se pega al microorganismo. La adhesión se potencia por opsonización, en la que proteínas similares a opsoninas están recubiertas sobre la superficie de la bacteria. Esto va seguido de ingestión, en la que el fagocito extiende proyecciones, formando pseudópodos que engullen el organismo extraño. Finalmente, el patógeno se digiere por las enzimas en el lisosoma, que implica especies reactivas de oxígeno y proteasas.

Además, las proteínas antimicrobianas pueden activarse si un patógeno pasa a través de una barrera física. Hay varias clases de proteínas antimicrobianas, tales como proteínas de la fase aguda (por ejemplo, proteína C reactiva, que potencia la fagocitosis y activa el complemento cuando se une a la proteína C de *S. pneumoniae*), lisozima y el sistema del complemento).

El sistema del complemento es un grupo muy complejo de proteínas del suero, que se activa en un modo de cascada. Tres rutas diferentes participan en la activación del complemento: (a) una ruta clásica que reconoce los complejos de antígeno-anticuerpo, (b) una ruta alternativa que se activa espontáneamente en contacto con superficies celulares patógenas, y (c) una ruta de lectina de unión a manosa que reconoce azúcares de manosa, que tienden a aparecer solo sobre superficies celulares patógenas. Una cascada de actividad de proteína sigue la activación del complemento; esta cascada puede producir una variedad de efectos, que incluyen opsonización del patógeno, destrucción del patógeno por formación y activación del complejo de ataque a la membrana, e inflamación.

Los interferones también son proteínas antimicrobianas. Estas moléculas son proteínas que son secretadas por células infectadas por virus. Entonces, estas proteínas difunden rápidamente a células vecinas, induciendo a las células para inhibir la propagación de la infección viral. Esencialmente, estas proteínas antimicrobianas actúan previniendo la proliferación de célula a célula de virus.

B. Sistema inmunitario adaptativo

El sistema inmunitario adaptativo, también llamado el “sistema inmunitario adquirido”, garantiza que la mayoría de los mamíferos que sobreviven a una infección inicial por un patógeno sean generalmente inmunes a la enfermedad posterior, producida por ese mismo patógeno. El sistema inmunitario adaptativo se basa en células inmunitarias dedicadas llamadas leucocitos (glóbulos blancos) que se producen por citoblastos en la médula ósea, y maduran en el timo y/o ganglios linfáticos. En muchas especies, que incluyen mamíferos, el sistema inmunitario adaptativo puede dividirse en: (a) un sistema inmunitario humoral que actúa contra bacterias y virus en los líquidos del cuerpo (por ejemplo, sangre) por medio de proteínas, llamadas inmunoglobulinas (también conocidas como anticuerpos), que se producen por los linfocitos B; y (b) un sistema inmunitario celular que destruye células infectadas por virus (entre otras funciones) con linfocitos T (también llamados “linfocitos T”; “T” significa que se desarrollan en el timo). El sistema inmunitario adaptativo normalmente está dirigido hacia un patógeno específico, por ejemplo, vacunación.

IV. ORGANISMOS MICROBIANOS

Las realizaciones de la divulgación incluyen composiciones y métodos relacionados para una amplia protección contra una variedad de patógenos o posibles patógenos (por ejemplo, patógenos de prioridad de la categoría A, B y C del NIAID). Por ejemplo, la neumonía bacteriana en un huésped normal se produce a una tasa de 1/100 personas/año, principalmente en adultos ancianos y niños jóvenes y puede producirse mediante una variedad de organismos. Se produce más comúnmente por *Streptococcus pneumoniae*, seguido en frecuencia por *Haemophilus influenzae* encapsulado. Otras bacterias tales como Gram-negativas entéricas, anaerobias y *Staphylococcus aureus* son causas significativas de neumonía en ámbitos específicos, tales como instalaciones de asistencia sanitaria. *Mycobacterium tuberculosis* es altamente infecciosa, e históricamente fue una causa importante de mortalidad en el mundo. Prácticamente se ha controlado con antibióticos en el mundo desarrollado, aunque las cepas resistentes a múltiples fármacos continúan produciendo problemas y se clasifican como agentes de armas biológicas de categoría C. *Legionella pneumophila* fue identificada por primera vez durante un brote en Filadelfia en 1978, aunque ahora se ha reconocido que se produce ampliamente a una baja tasa endémica relacionada con fuentes medioambientales. Por tanto, las infecciones fúngicas de los pulmones pueden producir enfermedad sintomática en huéspedes normales. *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis* y *Cryptococcus neoformans* pueden todos producir neumonía relacionada con exposición local a altas concentraciones medioambientales. La neumonía debida a estos hongos patógenos está normalmente auto-limitada en huéspedes normales. Algunos microorganismos “atípicos” adicionales, tales como micoplasmas, explican una fracción sustancial de neumonías adicionales en huéspedes normales. Se contempla que una composición de la presente invención puede proporcionar una rápida protección temporal contra un espectro de agentes que pueden producir, por ejemplo, neumonía u otros estados de enfermedad. En ciertos aspectos, la presente invención puede usarse en combinación con una pauta de vacunación para proporcionar una protección adicional a un sujeto que puede o se expone a uno o más organismos patógenos o potencialmente patógenos.

En aspectos particulares de la invención, las composiciones pueden usarse para prevenir, reducir el riesgo de o tratar infección o exposición a un arma biológica/microbio oportunista o exposición de un sujeto(s) a un agente infeccioso inhalado. El único patógeno microbiano que se ha usado como arma terrorista en la era moderna es *Bacillus anthracis*, que tiene una tasa de letalidad del 75 % cuando la infección se produce por la vía respiratoria, incluso con el uso de antibióticos apropiados. *Francisella tularensis* es un coccobacilo Gram-negativo aerobio que es un patógeno intracelular facultativo. Es altamente infeccioso, altamente patógeno y sobrevive bajo duras condiciones medioambientales, que lo hacen una amenaza bioterrorista grave, aunque sea malamente transmisible de persona a persona (Dennis, 2001). Está disponible una vacuna, pero solo es parcialmente protectora. La Organización Mundial de la Salud estimó que la dispersión en aerosol de 50 kg de *Francisella tularensis* virulenta sobre un área metropolitana con 5 millones de habitantes produciría a 250.000 víctimas incapacitantes, que incluyen 19.000 muertes; los Centros para el Control de Enfermedades (CDC) estimaron que el coste económico de un ataque tal sería 5,4 billones de dólares por cada 100.000 personas expuestas (Dennis, 2001).

Otros agentes de bioterrorismo de clase A que pueden transmitirse por aerosol son *Yersinia pestis*, virus de la viruela y virus de fiebres hemorrágicas. Además, los múltiples agentes de clase B y C pueden administrarse eficazmente por la vía respiratoria. Juntos, estos organismos comprenden bacterias Gram-positivas, Gram-negativas, intracelulares y extracelulares, además de una variedad de clases virales. Debido a la posible dificultad en identificar inicialmente un agente de bioterrorismo específico, la complejidad de almacenar localmente vacunas inmunitarias adaptativas y antibióticos dirigidos a agentes específicos, y la sorprendente virulencia de organismos tales como *Bacillus anthracis* a pesar del tratamiento apropiado, estimulación de las capacidades de defensa innata de los pulmones que podrían tanto prevenir o anticiparse a como atenuar la infección con un agente bioterrorista administrado por la vía respiratoria; un efecto tal podría tener gran valor para la salud pública.

A. Microbios patógenos o potencialmente patógenos

Hay numerosos microbios que se consideran patógenos o potencialmente patógenos bajo ciertas condiciones (es decir, patógenos/microbios oportunistas). En ciertos aspectos, la patogenicidad se determina con respecto a la infección mediante los pulmones. Los microbios bacterianos incluyen, pero no se limitan a, diversas especies del

género *Bacillus*, *Yersinia*, *Francisella*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Burkholderia* de bacterias. Especies particulares de bacterias de las que un sujeto puede protegerse incluyen, pero no se limita a, *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridia spp*, *Shigella spp.*,
 5 *Mycobacterium avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. paratuberculosis*, *M. scrofulaceum*, *M. simiae*, *M. habana*, *M. interjectum*, *M. xenopi*, *M. heckeshornense*, *M. szulgai*, *M. fortuitum*, *M. immunogenum*, *M. chelonae*, *M. marinum*, *M. genavense*, *M. haemophilum*, *M. celatum*, *M. conspicuum*, *M. malmoense*, *M. ulcerans*, *M. smegmatis*, *M. wolinskyi*, *M. goodii*, *M. thermo resistibile*, *M. neoaurum*, *M. vaccae*, *M. palustre*, *M. elephantis*, *M. bohemica* y *M. septicum*.

10 B. Virus

Hay numerosos virus y cepas virales que se consideran patógenas o potencialmente patógenas bajo ciertas condiciones. Los virus pueden situarse en uno de los siete siguientes grupos: Grupo I: virus de ADN bicatenario, Grupo II: virus de ADN monocatenario, Grupo III: virus de ARN bicatenario, Grupo IV: virus de ARN monocatenario de sentido positivo, Grupo V: virus de ARN monocatenario de sentido negativo, Grupo VI: virus de ARN monocatenario diploide de transcripción inversa, Grupo VII: virus de ADN bicatenario circular de transcripción inversa. Los virus incluyen la familia *Adenoviridae*, *Arenaviridae*, *Caliciviridae*, *Coronaviridae*, *Filoviridae*,
 15 *Flaviviridae*, *Hepadnaviridae*, *Herpesviridae* (*Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae*, *Gammaherpesvirinae*), *Nidovirales*, *Papillomaviridae*, *Paramyxoviridae*. (*Paramyxovirinae*, *Pneumovirinae*), *Parvoviridae* (*Parvovirinae*, *Picornaviridae*), *Poxviridae* (*Chordopoxvirinae*), *Reoviridae*, *Retroviridae* (*Orthoretrovirinae*) y/o *Togaviridae*. Estos virus incluyen, pero no se limitan a, diversas cepas de la gripe, tales como la gripe aviar (por ejemplo, H5N1). Virus particulares de los que un sujeto puede protegerse incluyen, pero no se limita a, citomegalovirus, virus respiratorio sincitial y similares.

25 Ejemplos de virus patógenos incluyen, pero no se limitan a, gripe A, H5N1, Marburgo, Ébola, Dengue, coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave, virus de la fiebre amarilla, virus respiratorio sincitial humano, virus de la variolovacuna y similares.

30 C. Hongos

Hay numerosas especies fúngicas que se consideran patógenas o potencialmente patógenas bajo ciertas condiciones. La protección puede proporcionarse para, pero no se limita a, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*,
 35 *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis* o *Pneumocystis carinii*, y/o *Blastomyces dermatitidis*.

V. FORMULACIONES Y ADMINISTRACIÓN

Las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento pueden administrarse mediante el aparato respiratorio de un sujeto. En ciertos aspectos, las composiciones se depositan en el pulmón por métodos y dispositivos conocidos en la técnica. Las composiciones de StIR pueden prepararse en agua adecuadamente mezclada con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. También pueden prepararse dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos, y en aceites. Bajo condiciones habituales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos. Las formas farmacéuticas adecuadas para inhalación incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inhalables estériles. En todos los casos, la forma normalmente es estéril y capaz de inhalación directamente o mediante algún proceso o dispositivo intermedio. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y/o aceites vegetales. La prevención de la acción de microorganismos puede provocarse por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares.

55 Alguna variación en la dosificación se producirá necesariamente dependiendo de la afección del sujeto que está tratándose y las circunstancias particulares que implican la exposición o posible exposición. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada para el sujeto individual. Además, para administración humana, las preparaciones deben cumplir la esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y criterios de pureza según se requiera por los criterios de la IFDA Office of Biologics u otras organizaciones similares.

60 Se preparan composiciones estériles incorporando los componentes activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con diversos otros componentes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de, por ejemplo, esterilización por filtración. Generalmente, se preparan dispersiones incorporando los diversos principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros componentes requeridos de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de composiciones estériles, algunos métodos de preparación son técnicas de secado a vacío y liofilización que dan
 65

un polvo del principio activo más cualquier componente deseado adicional de una disolución previamente esterilizada por filtración.

5 La administración pulmonar/respiratoria de fármaco puede implementarse por diferentes enfoques, que incluyen nebulizadores de líquido, inhaladores de dosis medidas basados en aerosol (MDI), pulverizadores, dispositivos de dispersión de polvo seco y similares. Tales métodos y composiciones son muy conocidos para aquellos expertos en la materia, como se indica por las patentes de EE.UU. 6.797.258, 6.794.357, 6.737.045 y 6.488.953. Según la invención, al menos una composición farmacéutica puede administrarse por cualquiera de una variedad de dispositivos de inhalación o nasales conocidos en la técnica para la administración de un agente terapéutico por inhalación. También se conocen en la técnica otros dispositivos adecuados para dirigir la administración pulmonar o nasal. Normalmente, para administración pulmonar, al menos una composición farmacéutica se administra en un tamaño de partícula eficaz para alcanzar las vías respiratorias inferiores del pulmón o senos. Algunos ejemplos específicos de dispositivos de inhalación comercialmente disponibles adecuados para la práctica de la presente invención son Turbohaler™ (Astra), Rotahaler® (Glaxo), Diskus® (Glaxo), inhalador Spiros™ (Dura), dispositivos comercializados por Inhale Therapeutics, AERx™ (Aradigm), el nebulizador Ultravent® (Mallinckrodt), el nebulizador Acorn II® (Marquest Medical Products), el inhalador de dosis medida Ventolin® (Glaxo), el inhalador de polvo Spinhaler® (Fisons), o similares.

20 Todos aquellos dispositivos de inhalación pueden usarse para la administración de una composición farmacéutica en un aerosol. Tales aerosoles pueden comprender tanto disoluciones (tanto acuosas como no acuosas) o partículas sólidas. Los inhaladores de dosis medidas normalmente usan un gas propulsor y requieren la actuación durante la inspiración. Véanse, por ejemplo, los documentos WO 98/35888; WO 94/16970. Los inhaladores de polvo seco usan actuación por la respiración de un polvo mixto. Véanse las patentes de EE.UU. 5.458.135; 4.668.218; publicaciones PCT WO 97/25086; documentos WO 94/08552; WO 94/06498; y solicitud europea EP 0237507. Los nebulizadores producen aerosoles de disoluciones, mientras que los inhaladores de dosis medidas, inhaladores de polvo seco y similares generan aerosoles de partículas pequeñas. Formulaciones adecuadas para administración incluyen, pero no se limitan a, spray nasal o gotas nasales, y pueden incluir disoluciones acuosas o aceitosas de una composición de StIR.

30 Un spray que comprende una composición farmacéutica de la presente invención puede producirse forzando a pasar una suspensión o disolución de una composición a través de una boquilla bajo presión. El tamaño y configuración de la boquilla, la presión aplicada y la tasa de alimentación de líquido pueden elegirse para lograr la salida deseada y el tamaño de partícula. Puede producirse una electropulverización, por ejemplo, por un campo eléctrico a propósito de una alimentación capilar o por boquilla.

35 Una composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse por un nebulizador, tal como un nebulizador de chorro o un nebulizador ultrasónico. Normalmente, en un nebulizador de chorro, se usa una fuente de aire comprimido para crear un chorro de aire de alta velocidad a través de un orificio. Como el gas se expande por encima de la boquilla, se crea una región de baja presión, que saca una composición mediante un tubo capilar conectado a un depósito de líquido. La corriente de líquido del tubo capilar se cizalla en filamentos y gotitas inestables a medida que sale del tubo, creando el aerosol. Puede emplearse una variedad de configuraciones, velocidades de flujo y tipos de deflectores para lograr las características de rendimiento deseadas de un nebulizador de chorro dado. En un nebulizador ultrasónico, se usa energía eléctrica de alta frecuencia para crear energía mecánica vibracional, normalmente empleando un transductor piezoeléctrico. Esta energía se transmite a la composición creando un aerosol.

50 En un inhalador de dosis medida (MDI), un propulsor, una composición y cualquier excipiente u otro aditivo está contenido en un bote como una mezcla con un gas comprimido. La actuación de la válvula dosificadora libera la mezcla como un aerosol.

Las composiciones farmacéuticas para su uso con un dispositivo inhalador de dosis medida incluirán generalmente un polvo finamente dividido que contiene una composición de la invención como una suspensión en un medio no acuoso, por ejemplo, suspenso en un propulsor con la ayuda de un tensioactivo. El propulsor puede ser cualquier material convencional empleado para este fin tal como clorofluorocarburo, un hidroclofluorocarburo, un hidrofurocarburo o un hidrocarburo que incluye triclorofluorometano, diclorodifluorometano, diclorotetrafluoroetanol y 1,1,1,2-tetrafluoroetano, HFA-134a (hidrofluoroalcano-134a), HFA-227 (hidrofluoroalcano-227), o similares.

60 Como se usa en el presente documento, "vehículo" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, vehículos, recubrimientos, diluyentes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y que retrasan la absorción, tampones, disoluciones de vehículo, suspensiones, coloides y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias activas farmacéuticas es muy conocido en la técnica. Excepto en la medida de que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el principio activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. También pueden incorporarse principios activos suplementarios en las composiciones.

65 La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción alérgica o inadecuada similar cuando se administran a un sujeto. La preparación de una composición

acuosa que contiene un polipéptido o péptido como principio activo se entiende bien en la materia.

VI. TRATAMIENTOS DE COMBINACIÓN

5 Las composiciones de la presente invención pueden usarse en el contexto de varias aplicaciones terapéuticas o profilácticas. Con el fin de aumentar la eficacia de un tratamiento con las composiciones de la presente invención o de aumentar la protección de otra terapia (segunda terapia), por ejemplo, vacunación o terapia antimicrobiana, puede desearse combinar estas composiciones y métodos con otros agentes y métodos eficaces en el tratamiento, reducción del riesgo de infección, o prevención de enfermedades y afecciones patológicas, por ejemplo, tratamientos
10 antibacterianos, antivirales y/o antifúngicos.

Pueden emplearse diversas combinaciones; por ejemplo, una composición de StIR es "A" y la terapia secundaria es "B":

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

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

20 B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

La administración de una composición de la presente invención a un sujeto seguirá protocolos generales para la administración mediante el aparato respiratorio, y también se seguirán los protocolos generales para la administración de una terapia secundaria particular, teniendo en cuenta la toxicidad, si la hay, del tratamiento. Se espera que los ciclos de tratamiento se repitan según sea necesario. También se contempla que pueden aplicarse
25 diversas terapias convencionales, además de vacunación, en combinación con las terapias descritas.

A. Antivirales

En ciertos aspectos de la divulgación, un agente antiviral puede usarse en combinación con una composición de StIR. Los fármacos antivirales son una clase de medicación usada específicamente para tratar infecciones virales y deben distinguirse de los viricidas, que desactivan activamente partículas de virus fuera del cuerpo. La mayoría de los antivirales ahora disponibles están diseñados para ayudar a tratar el VIH, los virus del herpes, los virus de la hepatitis B y C, y los virus de la gripe A y B. Agentes antivirales útiles en la divulgación incluyen, pero no se limitan a, inmunoglobulinas, amantadina, interferones, análogos de nucleótidos e inhibidores de la proteasa.
35

Una estrategia antiviral es interferir con la capacidad de un virus para infiltrar una célula diana. Esta etapa de la replicación viral puede inhibirse usando agentes que imitan la proteína asociada al virus (VAP) y se unen a los receptores celulares. O usando agentes que imitan el receptor celular y se unen a la VAP. Esto incluye anticuerpos anti-VAP, anticuerpos antiidiotípicos del receptor, receptor externo y miméticos de receptores sintéticos. Se han introducido dos de tales "bloqueantes de la entrada", amantadina y rimantadina, para combatir la gripe.
40

Un segundo enfoque a la terapia antiviral es elegir como diana los procesos que sintetizan componentes de virus después de que un virus invada una célula. Una forma de hacer esto es desarrollar análogos de nucleótidos o de nucleósidos que se parecen a los elementos estructurales de ARN o ADN, pero desactivan las enzimas que sintetizan el ARN o ADN una vez se incorpora el análogo. Los análogos de nucleótidos incluyen, pero no se limitan a, ribavirina, vidarabina, aciclovir, ganciclovir, zidovudina, didanosina, zalcitabina, estavudina y lamivudina.
45

Todavía otra técnica antiviral es un conjunto de fármacos basados en ribozimas, que son enzimas que cortarían ARN o ADN viral en sitios seleccionados. En su ciclo natural, las ribozimas se usan como parte de la secuencia de fabricación viral, pero estas ribozimas sintéticas se diseñan para cortar ARN y ADN en sitios que las inutilizarán.
50

Algunos virus incluyen una enzima conocida como una proteasa que corta cadenas de proteína viral de manera que pueden ensamblarse en su configuración final. El VIH incluye una proteasa, y entonces se ha realizado investigación considerable para encontrar "inhibidores de la proteasa" para atacar el VIH en esa fase de su ciclo de vida. Los inhibidores de la proteasa estuvieron disponibles en los años 90 y han demostrado ser eficaces, aunque pueden tener efectos secundarios inusuales, por ejemplo, haciendo que se forme grasa en sitios inusuales. Ahora están en desarrollo inhibidores de la proteasa mejorados.
55

La etapa final del ciclo de vida de un virus es la liberación de virus completados de la célula huésped, y esta etapa también ha sido elegida como diana por desarrolladores de fármacos antivirales. Dos fármacos llamados zanamivir (RELENZA™) y oseltamivir (TAMIFLU™) que se han introducido para tratar la gripe previenen la liberación de partículas virales bloqueando una molécula llamada neuraminidasa que se encuentra sobre la superficie de los virus de la gripe, y también parece que es constante a través de una amplia variedad de cepas de la gripe.
60

Los agentes antivirales incluyen, pero no se limitan a, abacavir; acemanano; aciclovir; aciclovir sodio; adefovir; alovedina; alvircept sudotox; clorhidrato de amantadina; amprenavir; arantona; arildona; mesilato de atevirdina;
65

avridina; cidofovir; cipamfilina; clorhidrato de citarabina; mesilato de delavirdina; desciclovir; didanosina; disoxarilo; edoxudina; efavirenz; enviroadeno; enviroxima; famciclovir; clorhidrato de famotina; fiacitabina; fialuridina; fosarilato; fosfonoformiato de trisodio; fosfonet sodio; ganciclovir; ganciclovir sodio; idoxuridina; indinavir; ketoxal; lamivudina; lobucavir; clorhidrato de memotina; metisazona; nelfinavir; nevirapina; penciclovir; pirodavid; ribavirina; clorhidrato de rimantadina; ritonavir; mesilato de saquinavir; clorhidrato de somantadina; sorivudina; estatolona; estavudina; clorhidrato de tilorona; trifluridina; clorhidrato de valaciclovir; vidarabina; fosfato de vidarabina; fosfato de sodio de vidarabina; viroxima; zalcitabina; zidovudina; zinviroxima, interferón, ciclovir, alfa-interferón y/o beta globulina.

En ciertas realizaciones, un antiviral es ribivirina y ribivirina a alta dosis. La ribavirina es un fármaco antiviral que es activo contra varios virus de ADN y ARN. Es un miembro de los fármacos antimetabolitos de nucleósidos que interfieren con la duplicación del material genético viral. Aunque no es eficaz contra todos los virus, la ribavirina tiene un amplio intervalo de actividad, que incluye importantes actividades contra gripes, flavivirus y agentes de muchas fiebres hemorrágicas virales.

Normalmente, se usa la forma oral de la ribavirina en el tratamiento de la hepatitis C, en combinación con fármacos de interferón PEGilado. La forma en aerosol se ha usado tiempo atrás para tratar enfermedades relacionadas con el virus respiratorio sincitial en niños. Sin embargo, su eficacia ha sido puesta en cuestión por múltiples estudios, y la mayoría de las instituciones ya no la usan.

B. Antibacterianos

Ejemplos de antibacterianos incluyen, pero no se limitan a, antibióticos β -lactámicos, penicilinas (tales como penicilinas naturales, aminopenicilinas, penicilinas resistentes a penicilinas, carboxipenicilinas, ureidopenicilinas), cefalosporinas (cefalosporinas de primera generación, segunda generación y tercera generación), y otros β -lactámicos (tales como imipenem, monobactámicos), inhibidores de la β -lactamasa, vancomicina, aminoglucósidos y espectinomicina, tetraciclinas, cloranfenicol, eritromicina, lincomicina, clindamicina, rifampina, metronidazol, polimixinas, sulfonamidas y trimetoprim, y quinolinas. Antibacterianos también incluyen, pero no se limitan a: Acedapsona, acetosulfona sódica, alamecina, alexidina, amdinocilina, amdinocilina pivoxilo, ampicilina, amifloxacina, mesilato de amifloxacina, amikacina, sulfato de amikacina, ácido aminosalicílico, aminosalicilato de sodio, amoxicilina, amoxicilina, ampicilina, ampicilina sódica, apalcilina sódica, apramicina, aspartocina, cefinetaazol sódico, avoparcina, avoparcina, azitromicina, azlocilina, azlocilina sódica, clorhidrato de bacampicilina, bacitracina, metilendisalicilato de bacitracina, bacitracina de cinc, bambarmicinas, benzoilpas cálcico, beritromicina, sulfato de betamicina, biapenem, biniramicina, clorhidrato de bifenamina, bispiritiona magsulfex, butikacina, sulfato de butirosina, sulfato de capreomicina, carbadox, carbenicilina disódica, carbenicilina indanilo sódica, carbenicilina fenilo sódica, carbenicilina potásica, carumonam sódico, cefaclor, cefadroxilo, cefamandol, nafato de cefamandol, cefamandol sódico, cefaparol, cefatrizina, cefazafur sódico, cefazolina, cefazolina sódica, cefbuperazona, cefdinir, cefepima, clorhidrato de cefepima, cefetecol, cefixima, clorhidrato de cefinnoxima, cefinetazol, cefinetazol sódico, cefonicida monosódica, cefonicida sódica, cefoperazona sódica, ceforanida, cefotaxima sódica, cefotetan, cefotetan disódico, clorhidrato de cefotiam, cefoxitina, cefoxitina sódica, cefpimizol, cefpimizol sódico, cefpiramida, cefpiramida sódica, sulfato de cefpiroma, cefpodoxima proxetilo, cefprozilo, cefroxadina, cefsulodina sódica, ceftazidima, ceftibuteno, ceftizoxima sódica, ceftriaxona sódica, cefuroxima, cefuroxima axetilo, cefuroxima pivoxetilo, cefuroxima sódica, cefacetilo sódico, cefalexina, clorhidrato de cefalexina, cefaloglicina, cefaloridina, cefalotina sódica, cefapirina sódica, cefradina, clorhidrato de cetociclina, cetofenicol, cloranfenicol, palmitato de cloranfenicol, complejo de pantotenato de cloranfenicol, succinato sódico de cloranfenicol, fosfanilato de clorhexidina, cloroxilenol, bisulfato de clortetraciclina, clorhidrato de clortetraciclina, cinoxacina, ciprofloxacina, clorhidrato de ciprofloxacina, cirolemicina, claritromicina, clorhidrato de clinafloxacina, clindamicina, clorhidrato de clindamicina, clorhidrato de palmitato de clindamicina, fosfato de clindamicina, clofazimina, cloxacilina benzatina, cloxacilina sódica, cloxiquina, colistimetato sódico, sulfato de colistina, coumermicina, coumermicina sódica, ciclacilina, cicloserina, dalfopristina, dapsona, daptomicina, demeclociclina, clorhidrato de demeclociclina, demeciclina, denofungina, diaveridina, dicloxacilina, dicloxacilina sódica, sulfato de dihidroestreptomina, dipiritiona, diritromicina, doxiciclina, doxiciclina cálcica, doxiciclina fosfatex, hclato de doxiciclina, droxacina sódica, enoxacina, epicilina, clorhidrato de epitetraciclina, eritromicina, acistrato de eritromicina, estolato de eritromicina, etilsuccinato de eritromicina, gluceptato de eritromicina, lactobionato de eritromicina, propionato de eritromicina, estearato de eritromicina, clorhidrato de etambutol, etionamida, fleroxacina, floxacilina, fludalanina, flumequina, fosfomicina, fosfomicina trometamina, fumoxicilina, cloruro de furazolio, tartrato de furazolio, fusidato sódico, ácido fusídico, sulfato de gentamicina, gloximonom, gramicidina, haloprogina, hetacilina, hetacilina potásica, hededina, ibafloxacina, imipenem, isoconazol, isepamicina, isoniazida, josamicina, sulfato de kanamicina, kitasamicina, levofuraltadona, levopropilicilina potásica, lexitromicina, lincomicina, clorhidrato de lincomicina, lomefloxacina, clorhidrato de lomefloxacina, mesilato de lomefloxacina, loracarbef, mafenida, meclociclina, sulfosalicilato de meclociclina, fosfato de potasio de megalomicina, mequidox, meropenem, metaciclina, clorhidrato de metaciclina, metenamina, hipurato de metenamina, mandelato de metenamina, meticilina sódica, metioprim, clorhidrato de metronidazol, fosfato de metronidazol, mezlocilina, mezlocilina sódica, minociclina, clorhidrato de minociclina, clorhidrato de mirincamicina, monensina, monensina sódica, nafcilina sódica, nalidixato sódico, ácido nalidíxico, natamicina, nebramicina, palmitato de neomicina, sulfato de neomicina, undecilenato de neomicina, sulfato de netilmicina, neutramicina, nifuradeno, nifuraldeazona, nifuratel, nifuratróna, nifurdazilo, nifurimida, nifurpirinol, nifurquinazol, nifurtiazol, nitroclina, nitrofurantoina, nitromida, norfloxacina, novobiocina sódica, ofloxacina, ormetoprim, oxacilina sódica,

oximonom, oximonom sódico, ácido oxolínico, oxitetraciclina, oxitetraciclina cálcica, clorhidrato de oxitetraciclina, paldimicina, paraclorofenol, paulomicina, pefloxacina, mesilato de pefloxacina, penamecilina, penicilina G benzatina, penicilina G potásica, penicilina G procaína, penicilina G sódica, penicilina V, penicilina V benzatina, penicilina V hidrabamina, penicilina V potásica, pentizidona sódica, aminosalicilato de fenilo, piperacilina sódica, pibenicilina sódica, piridicilina sódica, clorhidrato de pirlimicina, clorhidrato de pivampicilina, pamoato de pivampicilina, probenato de pivampicilina, sulfato de polimixina B, porfiromicina, propikacina, pirazinamida, piritona cinc, acetato de quindecamina, quinupristina, racefenicol, ramoplanina, ranimicina, relomicina, repromicina, rifabutina, rifametano, rifamexilo, rifamida, rifampina, rifapentina, rifaximina, rolitetraciclina, nitrato de rolitetraciclina, rosaramicina, butirato de rosaramicina, propionato de rosaramicina, fosfato sódico de rosaramicina, estearato de rosaramicina, rosoxacina, roxarsona, roxitromicina, sanciclina, sanfetrinem sódico, sarmoxicilina, sarpicilina, escopafungina, sisomicina, sulfato de sisomicina, esparfloxacina, clorhidrato de espectinomicina, espiramicina, clorhidrato de estalimicina, estefimicina, sulfato de estreptomina, estreptonicozida, sulfabenz, sulfabenzamida, sulfacetamida, sulfacetamida sódica, sulfacitina, sulfadiazina, sulfadiazina sódica, sulfadoxina, sulfaleno, sulfamerazina, sulfameter, sulfametazina, sulfametazol, sulfametoxazol, sulfamonometoxina, sulfamoxol, sulfanilato de cinc, sulfanitrán, sulfasalazina, sulfasomizol, sulfatiazol, sulfazamet, sulfisoxazol, sulfisoxazol acetilo, sulfisoxazol diolamina, sulfomixina, sulopenem, sultamicilina, suncilina sódica, clorhidrato de talampicilina, teicoplanina, clorhidrato de temafloxacina, temocilina, tetraciclina, clorhidrato de tetraciclina, complejo de fosfato de tetraciclina, tetroxoprim, tianfenicol, tifencilina potásica, ticarcilina cresilo sódica, ticarcilina disódica, ticarcilina monosódica, ticlatona, cloruro de tiodonio, tobramicina, sulfato de tobramicina, tosufloxacina, trimetoprim, sulfato de trimetoprim, trisulfapirimidinas, troleandomicina, sulfato de trospectomicina, tirotricina, vancomicina, clorhidrato de vancomicina, virginamicina y/o zorbamicina.

B. Antifúngicos

Los agentes antifúngicos incluyen, pero no se limitan a, azoles, imidazoles, polienos, posaconazol, fluconazol, itraconazol, anfotericina B, 5-fluorocitosina, miconazol, ketoconazol, Myambutol (clorhidrato de etambutol), dapsona (4,4'-diaminodifenilsulfona), gránulos de Paser (gránulos de ácido aminosalicílico), rifapentina, pirazinamida, isoniazida, rifadina IV, rifampina, pirazinamida, sulfato de estreptomina y Trecator-SC (etionamida) y/o voriconazol (Vfend™).

C. Otros agentes

En ciertos aspectos de la divulgación puede usarse un agente antiinflamatorio en combinación con una composición de StIR.

Antiinflamatorios esteroideos para su uso en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, fluticasona, beclometasona, cualquier derivado farmacéuticamente aceptable del mismo, y cualquier combinación de los mismos. Como se usa en el presente documento, un derivado farmacéuticamente aceptable incluye cualquier sal, éster, enol éter, enol éster, ácido, base, solvato o hidrato del mismo. Tales derivados pueden prepararse por aquellos expertos en la materia usando métodos conocidos para tal derivatización.

Fluticasona - El propionato de fluticasona es un corticosteroide sintético y tiene la fórmula empírica $C_{25}H_{31}F_3O_5S$. Tiene el nombre químico 17-propionato de S-(fluometil)6 α ,9-difluoro-11 β -17-dihidroxi-16 α -metil-3-oxoandrosta-1,4-dieno-17 β -carbotoato. El propionato de fluticasona es un polvo de blanco a blanquecino con un peso molecular de 500,6 y es prácticamente insoluble en agua, libremente soluble en sulfóxido de dimetilo y dimetilformamida, y ligeramente soluble en metanol y etanol al 95 %.

En una realización, las formulaciones de la presente divulgación pueden comprender un antiinflamatorio esteroideo (por ejemplo, propionato de fluticasona)

Beclometasona - En ciertos aspectos, el antiinflamatorio esteroideo puede ser dipropionato de beclometasona o su monohidrato. El dipropionato de beclometasona tiene el nombre químico 7,21-dipropionato de 9-cloro-11 β ,17,21-trihidroxi-16 β -metilpregna-1,4-dieno-3,20-diona. El compuesto puede ser un polvo blanco con un peso molecular de 521,25; y es muy ligeramente soluble en agua (vademécum), muy soluble en cloroformo y libremente soluble en acetona y en alcohol.

El proporcionar antiinflamatorios esteroideos según la presente divulgación puede potenciar las composiciones de la invención, por ejemplo, atenuando cualquier inflamación no deseada. Ejemplos de otros antiinflamatorios esteroideos para su uso en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, betametasona, triamcinolona, dexametasona, prednisona, mometasona, flunisolida y budesonida.

Según todavía otro aspecto de la divulgación, el agente antiinflamatorio no esteroideo puede incluir aspirina, salicilato sódico, acetaminofeno, fenacetina, ibuprofeno, ketoprofeno, indometacina, flurbiprofeno, diclofenaco, naproxeno, piroxicam, tebufelona, etodolaco, nabumetona, tenidap, alcofenaco, antipirina, aminopirina, dipirona, animopirina, fenilbutazona, clofezona, oxifenbutazona, prexazona, apazona, bencidamina, bucoloma, cincopeno, clonixina, ditrazol, eprizol, fenoprofeno, floctafenina, ácido flufenámico, glafenina, indoprofeno, ácido

meclofenámico, ácido mefenámico, ácido niflúmico, salidifamidas, sulindaco, suprofen, tolmetina, nabumetona, tiaramida, procuazona, bufexamaco, flumizol, tinoridina, timegadina, dapsona, diflunisal, benorilato, fosfosal, fenclofenaco, etodolaco, fentiazaco, tilomisol, carprofeno, fenbufeno, oxaprozina, ácido tiaprofénico, pirprofeno, feprazona, piroxicam, sudoxicam, isoxicam, celecoxib, Vioxx® y/o tenoxicam.

5

VII. KITS

Cualquiera de las composiciones descritas en el presente documento puede estar comprendida en un kit. En un ejemplo no limitante, reactivos para la producción y/o administración de una composición de StIR están incluidos en un kit. En ciertos aspectos, el kit es portátil y puede ser llevado por una persona al igual que se lleva un inhalador para el asma. El kit puede incluir además un detector de patógenos. El kit también puede contener un gas o propulsor mecánico para las composiciones de la divulgación.

10

Los componentes de los kits pueden envasarse tanto en una forma acuosa, en polvo como liofilizada. El medio de recipiente de los kits incluirá generalmente al menos un inhalador, bote, vial, tubo de ensayo, matraz, botella, jeringa u otros medios de recipiente, en los que puede ponerse un componente, y preferentemente, adecuadamente en alícuotas. Si hay más de un componente en el kit (segundo agente, etc.), el kit también contendrá generalmente un segundo, tercer u otro recipiente adicional en el que los componentes adicionales pueden disponerse por separado. Sin embargo, diversas combinaciones de componentes pueden estar comprendidas en un vial, bote o inhalador. Un recipiente de la divulgación puede incluir un bote o inhalador que puede ser llevado en un cinturón o llevarse fácilmente en un bolsillo, mochila u otro recipiente de almacenamiento. Los kits de la presente divulgación también incluirán normalmente un recipiente para las composiciones descritas o sus variaciones, y cualquier otro recipiente de reactivo en estrecho confinamiento para venta comercial. Tales recipientes pueden incluir recipientes de plástico moldeados por inyección o por soplado en los que se guardan los viales deseados.

15

20

25

Si los componentes del kit se proporcionan en una y/o más disoluciones líquidas, por ejemplo, la disolución líquida es una disolución acuosa, prefiriéndose particularmente una disolución acuosa estéril, pero no se requiere. Sin embargo, los componentes del kit pueden proporcionarse como polvo(s) seco(s). Cuando los reactivos y/o componentes se proporcionan como un polvo seco, el polvo puede reconstituirse mediante la adición de un disolvente adecuado o administrarse en forma de polvo. Se prevé que un disolvente también pueda proporcionarse en otros medios de recipiente.

30

35

Un kit también incluirá instrucciones para emplear los componentes del kit, además del uso de cualquier otro reactivo no incluido en el kit. Las instrucciones pueden incluir variaciones que pueden implementarse.

Se contempla que tales reactivos sean realizaciones de kits de la divulgación. Tales kits, sin embargo, no se limitan a los artículos particulares identificados anteriormente y pueden incluir cualquier reactivo usado directamente o indirectamente en la detección de microorganismos patógenos o la administración de una composición de StIR de la divulgación.

40

VIII. EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se facilitan con el fin de ilustrar diversas realizaciones de la invención y no pretenden limitar de ninguna forma la presente invención. Un experto en la materia apreciará fácilmente que la presente invención está bien adaptada para llevar a cabo los objetivos y obtener los fines y ventajas mencionados, además de aquellos objetivos, fines y ventajas inherentes en el presente documento. Los presentes ejemplos, junto con los métodos descritos en el presente documento, son presentemente representativos de ciertas realizaciones y no están previstos como limitaciones del alcance de la invención. Parte de los ejemplos se ha incluido para fin de referencia solo.

45

50

EJEMPLO 1

Exposición a *P. aeruginosa*. Se obtuvo la cepa PA103 de la ATCC y se guardó como cepa congelada (1×10^8 UFC/ml) en 20 % de glicerol en medio LB (Bio 101 Systems). Se incubó un ml de disolución madre durante 16 h en 100 ml de medio LB a 37 °C en 5 % de CO₂, a continuación se diluyó en 1 l de caldo fresco y se cultivó a 37 °C durante 6-7 h a DO₆₀₀ de 0,3, dando $\sim 3 \times 10^{10}$ UFC. La suspensión se centrifugó, se lavó, se resuspendió y se expuso aerosolizada, y se determinaron concentraciones bacterianas por diluciones sucesivas en placa sobre placas de agar de soja tríptico (Becton Dickinson). Para la aerosolización, se dispusieron 10 ml de la suspensión en un nebulizador AeroMist CA-209 (CIS-US) accionado por 10 l/min de 5 % de CO₂ en aire para promover la profunda ventilación. Después de 30 min, se añadieron otros 5 ml, con un total de 10 ml de suspensión aerosolizada durante los 60 min enteros.

55

60

Tratamiento del ligando de TLR. Antes de las exposiciones infecciosas, los ratones se trataron con aerosoles de ligandos de TLR, solos o en combinación, o con PBS (control negativo). Todos los tratamientos se administraron 18 horas antes de la exposición infecciosa usando un nebulizador AeroMist CA-209 accionado por 10 l/min complementado con 5 % de CO₂ para promover la ventilación. Para cada tratamiento, 10 ml de la suspensión de

65

ligando de TLR o PBS se dispusieron en el nebulizador y se administraron durante 20 min. Para los experimentos usando combinaciones de ligandos de TLR, ambos ligandos se suspendieron en la misma suspensión de 10 ml, y se administraron simultáneamente. Para cada ligando, la dosificación de aerosol inicial se determinó por la concentración de suspensión mínima a la que la infiltración de neutrófilos del pulmón se indujo, como se ha determinado por los recuentos totales de glóbulos blancos y neutrófilos en el líquido de lavado broncoalveolar 24 h después del tratamiento.

Ligandos de TLR 4. A diferencia del lípido A que se produce naturalmente que contiene una mezcla de 5, 6 y 7 grupos acilo, el monofosforil lípido A sintético (MPLA, Invivogen) es un sintético puro que contiene 6 grupos acilo grasos. Las suspensiones de MPLA se administraron a 100 µg/ml. Otro lípido A sintético con 6 grupos acilo grasos, disacárido de hexa-acilo fosforilado (PHAD, Avanti Polar Lípidos), se administró a 100 µg/ml.

Ligandos de TLR 2/6. Pam2CSK4 y FSL-1 (ambos de Invivogen) son lipopéptidos diacilados sintéticos conocidos por señalar mediante heterodímeros de TLR2 y TLR6. Pam2CSK4 se administró a 6 ó 20 µg/ml, como se indica, y FSL-1 se administró a 20 µg/ml.

Ligando de TLR 9. ODN 2395 (Invivogen) es un oligonucleótido de CpG tipo C con alta afinidad por TLR9 humano y murino. ODN 2395 se aerosolizó a 20 µg/ml.

Ligando de TLR 7. Imiquimod (R837, Invivogen) es un análogo de guanosina de imidazoquinolinamina que estimula TLR7, y posiblemente TLR8. Imiquimod se administró por aerosol a 1 ó 300 µg/ml, como se indica.

Ligando de TLR 5. Se identificó un segmento de 22 aminoácidos altamente conservados de flagelina, un ligando conocido de TLR5. Este segmento de aminoácidos se envió para síntesis a Cell Essentials, Inc., Boston, MA. Se confirmó que el péptido era >95 % puro basándose en HPLC y espectrometría de masas MALDI-TOF, y se confirmó su solubilidad en PBS. El fragmento sintético de Flg22 se administró a 100 µg/ml.

EJEMPLO 2

Materiales y métodos

Animales y reactivos. Todos los reactivos generales se obtuvieron de Sigma (St Louis, MO), excepto como se indica. Todos los ratones se manipularon según las políticas del Centro Oncológico M. D. Anderson del Comité Institucional de Cuidado y Uso Animal de la Universidad de Texas. Se usaron ratones Swiss-Webster hembra de cinco a ocho semanas de edad no mutados (Charles River, Wilmington, MA) para la mayoría de los experimentos de protección y cifra de células. Como se indica, se usaron ratones MyD88^{-/-} hembra de cinco a ocho semanas de edad proporcionados por Shizuo Akira (1998), ratones Trif^{-/-} (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) y ratones TLR2^{-/-} (Jackson) en comparación con ratones C57BL/6J no mutados (Jackson).

Tratamientos aerosolizados. Se cultivó disolución madre congelada de *Haemophilus influenzae* no tipificable (NTHi) sobre agar de chocolate (Remel, Lenexa, KS), se expandió en caldo de infusión de cerebro-corazón (Acumedia, Baltimore, MD) complementado con 3,5 µg/ml de NAD y se rompió con un EmulsiFlex C5 (Avestin, Mannheim, Alemania), como se ha descrito (Clement et al., 2008; Evans et al., 2010; Moghaddam et al., 2008). La concentración de proteína se ajustó a 2,5 mg/ml en solución salina por ensayo bicinonínico (Pierce, Rockford, IL) y el lisado se congeló en alícuotas de 10 ml a -80 °C. Para el tratamiento, se dispuso una alícuota descongelada en un nebulizador AeroMist CA-209 (CIS-US) accionado por 10 l/min de aire complementado con 5 % de CO₂ (para promover la respiración profunda) durante 20 min. El nebulizador se conectó por tubería de polietileno (30 cm x 22 mm) a una cámara de exposición de polietileno de 10 litros, con un tubo de salida idéntico con un filtro microbiano de baja resistencia (BB50T, Pall, East Hills, NY) en su extremo ventilado con una campana de bioseguridad.

Se compraron Pam3CSK4, Pam2CSK4, poli (I:C), MPLA, imiquimod y ODN 2395 de InvivoGen (San Diego, California). Un 22-mero de Flg22, el dominio de flagelina más conservado (QRLSTGSRINSAKDDAAGLQIA), se sintetizó por Cell Essentials (Boston, MA). Para tratar los animales, se reconstituyeron agonistas de TLR sintéticos en agua libre de endotoxina, se suspendieron en 8 ml de PBS estéril a las concentraciones indicadas y se aerosolizaron a los animales durante 20 min usando la misma técnica que se usa para el tratamiento del lisado de NTHi.

Exposiciones infecciosas *in vivo*. Como se describe previamente (Clement et al., 2008; Clement et al., 2009; Evans et al., 2010), los ratones se expusieron por inhalación a inóculos bacterianos dirigidos a DL₈₀ -DL₁₀₀. Se obtuvo la cepa PA103 de *P. aeruginosa* de la ATCC y se guardó como disolución madre congelada (1 x 10⁸ UFC/ml) en 20 % de glicerol en medio LB (Bio 101 Systems). Se incubó un ml de disolución madre durante 16 h en 100 ml de medio LB a 37 °C en 5 % de CO₂, a continuación se diluyó en 1 l de caldo fresco y se cultivó a 37 °C durante 6-7 h a DO₆₀₀ de 0,3, dando 1-4 x 10¹⁰ UFC/ml. Se almacenó el serotipo 4 de *S. pneumoniae* como disolución madre congelada (1 x 10⁹ UFC) en 20 % de glicerol en caldo de Todd-Hewett (Becton Dickinson). Se incubó un ml de disolución madre descongelada durante 16 h en 150 ml de caldo de Todd-Hewitt a 37 °C en 5 % de CO₂, a continuación se diluyó en 1,5 l de caldo fresco y se cultivó en fase logarítmica durante 6-7 h a una DO₆₀₀ de 0,3,

dando $2-6 \times 10^{11}$ UFC/ml. Las suspensiones bacterianas se centrifugaron, se lavaron, se resuspendieron en 10 ml de PBS y se aerosolizaron durante un periodo de 60 min usando un sistema idéntico al usado para los tratamientos. Se determinaron concentraciones bacterianas sembrando diluciones sucesivas sobre placas de agar de soja triptica (Becton Dickinson).

5 **Cuantificación de la carga de patógeno del pulmón.** Como se ha descrito previamente (Clement et al., 2008; Clement et al., 2009; Evans et al., 2010), inmediatamente después de la infección con patógenos bacterianos, los ratones se anestesiaron y sus pulmones se recogieron y se homogeneizaron en 1 ml de PBS utilizando un molinillo de tejido de 2 ml (Kontes, Vineland, NJ). Las diluciones sucesivas de los homogeneizados se sembraron sobre
10 placas de agar de soja triptica (TSA), se incubaron a 37 °C durante 16 h y se contaron las colonias bacterianas.

15 **Análisis de líquido de lavado broncoalveolar.** Como se ha descrito previamente (Clement et al., 2008; Clement et al., 2009; Evans et al., 2010), se obtuvo líquido de lavado broncoalveolar (BAL) por instilación y recogiendo dos alícuotas de 1 ml cada una de PBS mediante una cánula con adaptador de punta de luer (Becton Dickinson) insertada a través de anillos de la tráquea expuesta en momentos de tiempo indicados. La cifra de leucocitos total se determinó con un hemocitómetro (Hauser Scientific, Horsham, PA), y la cifra diferencial por citocentrifugación de 300 μ l de líquido BAL a 2.000 rpm durante 5 min, seguido de tinción con Wright-Giemsa.

20 **Ensayo de destrucción *in vitro*.** Como se ha descrito previamente (Clement et al., 2008; Clement et al., 2009; Evans et al., 2010), se cultivaron células MLE-15 y células A549 sobre placas de 6 pocillos en RPMI-1640 complementado con 10 % de SBF inactivado por calor y 1 % de penicilina/estreptomocina (Invitrogen). Cuando crecieron al ~80 % de confluencia, las células se lavaron con PBS, se suministraron con medio libre de antibiótico fresco con 10 % de SBF inactivado por calor y se trataron con 20 μ l de PBS o a 20 μ l de volumen de ODN 2395 (20 μ g/ml), Pam2CSK4 (10 μ g/ml), o ambos en RPMI-1640 que contiene 10 % de SBF inactivado por calor. Después de
25 4 h, a continuación se añadieron 1000 esporas de la cepa Sterne de *Bacillus anthracis* o 2000 UFC de la cepa PA103 de *P. aeruginosa* a todos los pocillos. Cuatro h después de la infección, se aspiraron 20 μ l del sobrenadante de cada pocillo, se diluyeron en serie, se sembraron sobre una placa de agar TSA, se incubaron durante 16 h a 37 °C y se contaron las UFC.

30 **Microscopía de inmunofluorescencia.** Se cultivaron células A549 sobre portaobjetos de cámaras Lab-Tek II (Nunc, Rochester, NY) en RPMI-1640 complementado con 10 % de SBF inactivado por calor y 1 % de penicilina/estreptomocina (Invitrogen) durante 48 h, luego se trataron con un volumen de 20 μ l de ODN 2395 marcado con Texas Red (20 μ g/ml, Invivogen), Pam2CSK4 marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (10 μ g/ml, Invivogen), o ambos en RPMI-1640 que contenía 10 % de SBF inactivado por calor. Después de 2 h, el medio
35 se succionó, las cámaras se desprendieron y las células se lavaron tres veces con PBS congelado. A continuación, las células se fijaron con 4 % de paraformaldehído, se extinguieron con glicina, se lavaron tres veces con PBS, se contratiñeron los núcleos con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; 0,1 μ g/ml) y se examinaron con microscopía de fluorescencia (microscopio Olympus BX-60, Melville, NY) usando óptica apropiada (Texas Red: excitación = 540 nm; emisión = 620 nm; FITC: excitación = 495 nm, emisión = 520 nm; DAPI: excitación = 360 nm; emisión = 460 nm).
40 Las imágenes se recogieron secuencialmente con una cámara Spot RT regulada por ordenador (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI) y se ensamblaron en Photoshop CS3 (Adobe, San Jose, CA). El solapamiento de la fluorescencia roja y verde apareció amarillo.

45 **Análisis estadístico.** Se realizó análisis estadístico usando el software SAS/STAT (versión 8.2, SAS Institute). Se usó la prueba de la t de Student para comparar los títulos bacterianos o virales de pulmón entre grupos. Se comparó el porcentaje de ratones que sobreviven a las exposiciones a patógenos usando la prueba exacta de Fisher, y se usó la prueba del orden logarítmico para comparar la distribución de supervivencia estimada por el método de Kaplan-Meier. Se usó ANOVA unilateral con prueba a posteriori de Dunnett para comparar los recuentos diferenciales de líquido de BAL entre los animales tratados y sin tratar.

50 Resultados

Se requiere MyD88, pero no TRIF, para la inducción de resistencia a neumonía por un lisado bacteriano aerosolizado. La estimulación del epitelio de pulmón por un lisado aerosolizado de NTHi induce un alto nivel de
55 resistencia a una amplia matriz de patógenos microbianos 9 (Clement et al., 2008; Clement et al., 2009; Evans et al., 2010; Tuvim et al., 2009). Para probar si se requiere señalización de TLR para la protección inducida por lisado, ratones deficientes en señalización de TLR mediante adaptadores TIR se expusieron por inhalación a *P. aeruginosa*. Ratones no mutados y deficientes en TRIF (*Trif*^{-/-}) se protegieron completamente contra las exposiciones letales a *P. aeruginosa* por pretratamiento con el lisado bacteriano aerosolizado, mientras que la resistencia no pudo inducirse
60 en ratones deficientes en MyD88 (*Myd88*^{-/-}; FIG. 12A y 12B, paneles izquierdos). La protección se correlacionó estrechamente con la inducción de la rápida destrucción de patógenos en los pulmones (FIG. 12A y 12B, paneles derechos). El receptor de IL-1 también señala mediante MyD88 (Adachi et al., 1998; Medzhitov et al., 1998), pero responde a la señalización de citocinas huésped, en vez de a productos microbianos directamente. La destrucción de patógenos se preservó completamente en ratones deficientes en receptores de IL-1 (*Il1r1*^{-/-}; FIG. 13) estimulados
65 por el lisado bacteriano aerosolizado. Este hallazgo indica que no todos los receptores que señalizan mediante MyD88 se requieren para la protección inducida por el lisado, y sugiere que la señalización microbiana directa

mediante TLR es más importante que la señalización indirecta mediante citocinas huésped para resistencia epitelial inducible.

Los agonistas de TLR individuales inducen un bajo nivel de resistencia a neumonía. En vista del requisito para la señalización de MyD88, los inventores probaron si algún agonista de TLR sintético individual podría inducir resistencia similar a la proporcionada por el lisado bacteriano aerosolizado. Como TLR1 y TLR6 se expresan como heterodímeros con TLR2, y como TLR7 y TLR8 reconocen ambos imiquimod, los TLR 1 a 9 de ratón podrían todos estimularse con los siguientes siete ligandos sintéticos: Pam3CSK4 (agonista de TLR2/1), Pam2CSK4 (agonista de TLR2/6), poli (I:C) (agonista de TLR3), lípido A sintético (MPLA, agonista de TLR4), Flg22 (22-mero sintético de flagelina, agonista de TLR5), imiquimod (TLR7 y TLR8) u ODN2395 (agonista de TLR9).

No se supieron las dosis aerosolizadas apropiadas de estos agonistas, así se formuló una estrategia para identificar una dosis adecuada para la administración a los pulmones para evitar un error de tipo II (β). Cada uno de los agonistas de TLR sintéticos usados tiene una concentración informada a la que la máxima secreción de citocinas se estimula de células dendríticas ([CDmáx]) (Yamamoto et al., 2003; Aliprantis et al., 1999; Buwitt-Beckmann et al., 2005; Hayashi et al., 2001; Krug et al., 2001; Lee et al., 2003; Martin et al., 2003). Basándose en los cálculos de la administración eficaz a las vías respiratorias de compuestos aerosolizados (Clement et al., 2009; Evans et al., 2004), los inventores determinaron las concentraciones de líquido nebulizador requeridas para lograr [CDmáx] en la superficie epitelial de las vías respiratorias. Aunque la resistencia inducida por lisado aerosolizado no depende de la entrada de leucocitos, el fenómeno protector está estrechamente correlacionado con el momento preciso y la magnitud de neutrofilia del pulmón inducida (Clement et al., 2008). Por tanto, para identificar dosis de agonistas de TLR suficientes para probar, los inventores empezaron a la [CDmáx] informada para cada ligando y aumentaron las concentraciones nebulizadas logarítmicamente hasta que se logró la infiltración de leucocitos.

Como se muestra en la FIG. 14, en ratones tratados con PBS, el número de neutrófilos en el líquido de BAL es $0,1 \times 10^3 \pm 0,2$ células/ml. Solo Pam2CSK4 demostró un aumento significativo en neutrófilos a CDmáx, aunque todos, excepto poli (I:C) y Flg22 mostraron un aumento significativo en los niveles de neutrófilos a concentraciones de uno a dos logaritmos por encima de CDmáx. Por otra parte, tanto poli (I:C) como Flg22 indujeron una entrada significativa de macrófagos sobre BAL 24 h después del tratamiento. Flg22 e imiquimod tuvieron cada uno una concentración de ligando por encima de la cual hubo una reducción en la infiltración de neutrófilos. Pam2CSK4 indujo un nivel de neutrofilia casi 5 veces mayor que Pam3CSK4 y 15 veces mayor que cualquier otro ligando.

La concentración elegida para cada ligando fue la menor dosis para inducir un aumento de 10 veces en neutrófilos/ml o para inducir el duplicado de los macrófagos (ninguna hizo ambos). Mientras que algunos de los ligandos indujeron una infiltración celular robusta, ninguno de los agonistas sintéticos proporcionó protección robusta contra neumonía de *P. aeruginosa* letal (FIG. 15). Hubo una tendencia hacia la protección con Pam2CSK4, Flg22, e imiquimod, aunque estos no alcanzaron significancia estadística con experimentos individuales o en la media de múltiples experimentos. Los ratones tratados con MPLA no mostraron una tendencia significativa hacia elevada mortalidad después de la exposición a patógenos.

Una combinación de agonistas de TLR2/6 y de TLR9 induce un alto nivel de resistencia contra neumonía. Aunque los agonistas de TLR sintéticos individuales proporcionaron solo protección moderada, es posible que se requiera la estimulación simultánea de múltiples PRR para inducir un alto nivel de resistencia (Clement et al., 2008; Evans et al., 2010). Para determinar si las combinaciones de agonistas de TLR podrían inducir resistencia, los inventores probaron las permutaciones por emparejamiento de los siete ligandos sintéticos.

Sorprendentemente, el tratamiento simultáneo con Pam2CSK4 y ODN2395 (ODN + Pam2) produjo supervivencia del 100 % de los ratones de una exposición de otro modo letal con *P. aeruginosa* Gram-negativa (FIG. 16A, izquierda), y supervivencia del 80 % de una exposición letal con *S. pneumoniae* Gram-positiva (FIG. 16B, izquierda). El doblar la concentración de ambos ligandos en el tratamiento con aerosol produjo el 90 % de supervivencia de la exposición con *S. pneumoniae* (FIG. 16B). La protección de ratones de las exposiciones infecciosas letales se asoció a destrucción sinérgica de los patógenos dentro de los pulmones (FIG. 16A y 16B, derecha), y el doblar la concentración de los ligandos se asoció a una tendencia hacia mayor destrucción de patógenos. También se observaron interacciones sinérgicas entre Pam2CSK4 y ODN2395 en el reclutamiento de leucocito a los pulmones a las 4 y 24 h (FIG. 16C). Estos resultados indican que los ligandos para TLR2/6 y TLR9 inducen la activación sinérgica de respuestas efectoras antimicrobianas, que incluyen aquellas para la destrucción de patógenos y el reclutamiento de leucocitos, que produce un nivel sinérgico de protección contra neumonía. Similar a la cinética de resistencia inducida por lisado de NTHi, la protección estuvo presente 4 h después del tratamiento.

No todas las combinaciones de agonistas de TLR producen protección robusta contra la infección. Los inventores probaron las siguientes combinaciones de agonistas de TLR: Pam2 + poli (I:C), Pam2 + Flg22, Pam2 + Imiquimod, ODN + poli (I:C), ODN + Flg 22 y ODN + Pam3. Los inventores encontraron que estas combinaciones fueron menos eficaces en proteger contra una exposición a *P. aeruginosa* (FIG. 17A-F) en comparación con la combinación de Pam2-ODN (FIG. 16). Estos resultados sugieren que no todas las combinaciones de agonistas de TLR confieren la misma estimulación inmunitaria que Pam2-ODN.

TLR2 es suficiente para promover la sinergia de Pam2CSK4 y ODN2395 protectora, pero no se requiere para resistencia inducida. La detección de los efectos sinérgicos de los ligandos de TLR Pam2CSK4 y ODN2395, que tienen especificidades de receptor bien definidas, proporciona una evidencia hipotética de la participación de TLR2/6 y TLR9. Los inventores buscaron evidencia adicional usando ratones inactivados y ligandos adicionales.

Los inventores compararon la supervivencia de ratones no mutados y deficientes en TLR2 pretratados con Pam2-ODN o PBS antes de la exposición a *P. aeruginosa*. Mientras que los ratones no mutados estuvieron completamente protegidos por Pam2-ODN, no hubo supervivencia en el grupo de no mutados tratados con referencia o cualquier grupo *Tlr2^{-/-}* (FIG. 18A, panel izquierdo), confirmando el requisito para TLR2 en la protección inducida por Pam2-ODN. La pérdida de protección en los ratones *Tlr2^{-/-}* se correlacionó estrechamente con la pérdida de destrucción de patógenos intrapulmonar inducida por Pam2-ODN (FIG. 18A, panel derecho).

Como Pam2CSK4 y Pam3CSK4 discriminan entre TLR2/6 y TLR2/1, y Pam2CSK4 pero no Pam3CSK4 produce un fuerte efecto protector sinérgico cuando se combina con ODN2395, pueden requerirse heterodímeros de TLR2/6 para inducir resistencia epitelial del pulmón. Los inventores también expusieron ratones *Tlr2^{-/-}* y no mutados después del tratamiento con lisado de NTHi y no encontraron ni pérdida de protección (FIG. 18B, panel izquierdo) ni un defecto en la destrucción bacteriana inducida por lisado (FIG. 18B, panel derecho). Tomados conjuntamente, estos resultados sugieren que TLR2/6 es suficiente para interactuar sinérgicamente con TLR9, pero no se requiere para toda la resistencia epitelial del pulmón inducida.

Los ODN de CpG de clase C, pero no la clase A o B, interactúan sinérgicamente con Pam2CSK4 para inducir resistencia a neumonía bacteriana. Los inventores buscaron evaluar adicionalmente si TLR9 se requiere para la interacción sinérgica de Pam2-ODN. Debido a que los ratones *Tlr9^{-/-}* no estuvieron disponibles, los inventores probaron la participación de TLR9 usando un ODN de control negativo conocido por no unirse a TLR9. Mientras que el pretratamiento con Pam2-ODN produjo el 90 % de supervivencia de ratones expuestos a *P. aeruginosa*, ninguno sobrevivió cuando se pretrató con Pam2CSK4 y el ODN de control (FIG. 19A), que indica que la unión de TLR9 por el ODN se requiere para la protección sinérgica.

Para explorar adicionalmente la especificidad de la interacción Pam2-ODN, los inventores trataron ratones no mutados con Pam2CSK4 y diferentes clases de ODN de CpG antes de la exposición a *P. aeruginosa*. La combinación de un ODN de clase A (ODN 1585 u ODN 2216) o un ODN de clase B (ODN 2006-G5) con Pam2CSK4 no confirió protección, mientras que la combinación de Pam2CSK4 con un ODN de clase C (ODN M362 u ODN 2395) promovió resistencia significativa contra neumonía de otro modo letal (FIG. 19B). Estos resultados indican que no solo los ligandos de TLR2/6 y de TLR9 sinergizan, sino que hay ligandos específicos que interactúan más favorablemente que otros.

Pam2CSK4 y ODN2395 inducen la destrucción bacteriana por células epiteliales *in vitro*. Se inducen células epiteliales de pulmón para destruir bacterias *in vitro* cuando se estimulan con lisado de NTHi (Clement et al., 2009; Evans et al., 2010). Como Pam2-ODN resumen el efecto inmunoestimulante del lisado bacteriano *in vivo*, los inventores probaron si la combinación también podría inducir la destrucción de patógenos por células epiteliales de pulmón aisladas *in vitro*. El pretratamiento de células epiteliales respiratorias MLE-15 murinas durante 4 h con Pam2-ODN redujo significativamente las UFC bacterianas en medio de cultivo celular después de la inoculación con *B. anthracis* (FIG. 20A). Similarmente, el tratamiento de células A549 humanas con Pam2-ODN produjo reducciones significativas en las UFC de *P. aeruginosa* 4 h después de la infección (FIG. 20C). Demostrando que la destrucción de patógenos se produce mediante la estimulación de células epiteliales en vez de mediante efectos antibióticos directos de Pam2-ODN, las bacterias crecieron a igual número en pocillos que no contenían células epiteliales, tanto si se trataron con Pam2-ODN como con PBS (FIG. 20B y 20D).

Así, el efecto antimicrobiano se induce en tanto células epiteliales murinas como humanas y produce la destrucción de tanto patógenos Gram-positivos como bacterias Gram-negativas. Estos datos imitan la destrucción bacteriana observada *in vivo* tras el tratamiento con Pam2-ODN. Los aumentos en serie en la dosificación de Pam2-ODN hasta 32 veces mayor que los indicados aquí no aumentaron significativamente la destrucción de patógenos.

Pam2CSK4 y ODN2395 están co-localizados intracelularmente *in vitro*. El mecanismo por el que Pam2CSK4 y ODN2395 interactúan para inducir sinergia sigue estando sin resolver. Como se informa que TLR2/6 está localizado en la membrana plasmática y se informa que TLR9 está localizado en endosomas (Beutler, 2009; Dostert et al., 2008), no se anticiparía interacción física de los ligandos. Sin embargo, debido a que TLR4 puede requerir la internalización con el fin de señalizar (Kagan et al., 2008), los inventores investigaron si los dos ligandos se internalizaron por células epiteliales. Se cultivaron células A549 en monocapa sobre portaobjetos de cultivo celular, a continuación se trataron con Pam2CSK4 marcado con FITC (10 µg/ml) y ODN2395 marcado con Texas Red (20 µg/ml) a las mismas concentraciones usadas en los experimentos de destrucción de patógenos. Después de 2 horas, las células se lavaron, los núcleos se marcaron con DAPI y los portaobjetos se enviaron a microscopía de fluorescencia. Tanto Pam2CSK4 como ODN2395 fueron internalizados por las células epiteliales. Además, Pam2CSK4 y ODN2395 están co-localizados en el compartimento citoplásmico, supuestamente dentro de endosomas. Estos resultados sugieren que Pam2CSK4 y ODN2395 pueden co-localizarse dentro de endosomas.

El pretratamiento con la combinación de Pam2CSK4, un agonista de TLR2/6 y un ODN de clase C (2395, 10101 o M362), agonistas de TLR9, induce altos niveles de resistencia a la infección de pulmón con *Bacillus anthracis* y virus de la gripe. Se pretrataron ratones con ligandos de TLR aerosolizados como se indica un día antes de la exposición intranasal con esporas de carbunco o exposición a aerosol con virus de la gripe. Se monitorizó la supervivencia de ratones.

REFERENCIAS

- 10 Patente de EE.UU. 4.554.101
 Patente de EE.UU. 4.668.218
 Patente de EE.UU. 4.689.338
 Patente de EE.UU. 4.929.624
 Patente de EE.UU. 5.238.944
 Patente de EE.UU. 5.266.575
 15 Patente de EE.UU. 5.268.376
 Patente de EE.UU. 5.346.905
 Patente de EE.UU. 5.352.784
 Patente de EE.UU. 5.389.640
 Patente de EE.UU. 5.389.640
 20 Patente de EE.UU. 5.389.640
 Patente de EE.UU. 5.395.937
 Patente de EE.UU. 5.458.135
 Patente de EE.UU. 5.482.936
 Patente de EE.UU. 5.494.916
 25 Patente de EE.UU. 5.525.612
 Patente de EE.UU. 6.039.969
 Patente de EE.UU. 6.110.929
 Patente de EE.UU. 6.110.929
 Patente de EE.UU. 6.194.425
 30 Patente de EE.UU. 6.331.539
 Patente de EE.UU. 6.331.539
 Patente de EE.UU. 6.451.810
 Patente de EE.UU. 6.488.953
 Patente de EE.UU. 6.737.045
 35 Patente de EE.UU. 6.794.357
 Patente de EE.UU. 6.797.258
 Solicitud de patente de EE.UU.11/830,622
 Publicación de patente de EE.UU. 20030225016
 Publicación de patente de EE.UU. 2004/0162309
 40 Publicación de patente de EE.UU. 2004/0171086
 Patente de EE.UU. nº de serie 10/844.933
- Abuchowski et al., J. Biol. Chem., 252:582, 1977.
 Adachi et al., Immunity, 9:143-150, 1998.
 45 Akinbi et al., J. Immunol., 165(10):5760-6, 2000.
 Akira et al., Biochem. Soc. Trans., 31(Pt 3):637-42, 2003.
 Akira et al., Cell, 124:783-801, 2006.
 Alexopoulou et al., Nature, 413:732-738, 2001.
 Aliprantis et al., Science, 285:736-739, 1999.
 50 Aliprantis et al., Science, 285:736-739, 1999.
 Bals and Hiemstra, Curr. Drug Targets, 7(6):743-50, 2006.
 Bals and Hiemstra, Eur. Respir. J., 23(2):327-33. 20, 2004.
 Bals and Hiemstra, Eur. Respir. J., 23:327-333, 2004.
 Barker et al., J. Med. Chem., 35:2040-2048, 1992.
 55 Bartlett et al., Microbiol., 15:147-163, 2008.
 Beauchamp et al., Anal. Biochem., 131:25, 1983.
 Beutler, Blood, 113:1399-1407, 2009.
 Biological Approaches to the Controlled Delivery of Drugs, R. L. Juliano, New York Academy of Sciences, 1988.
 Buwitt-Beckmann et al., FEBS J., 272:6354-6364, 2005.
 60 Chen et al., Biochim. Biophys. Acta, 660:293, 1981.
 Clement et al., Am. J. Respir. Crit. Care Med., 177:1322-1330, 2008.
 Clement et al., Respir. Res., 10:70, 2009.
 Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al. (Eds.), 1987.
 Dennis et al., JAMA, 285:2763-2773, 2001.
 65 Dostert et al., Adv. Drug Deliv. Rev., 60:830-840, 2008.
 Edwards et al., Cancer Res., 62:4671-4677, 2002.

- European Appln. EP 0237507
- Evans et al., *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 31(4):382-94, 2004.
- Evans et al., *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 32(6): 490-7, 2005.
- Evans et al., *Am. J. Respir. Cell Molec. Biol.*, 42:40-50, 2010.
- 5 Evans et al., *Annu. Rev. Physiol.*, (72)413-35, 2010.
- Fanger et al., *J. Leukocyte Biology*, 66:231-236, 1999.
- Forteza et al., *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 32(5):462-9, 2005.
- Gorden et al., *J. Immunol.*, 174:1259-1268, 2005.
- Hayashi et al., *Nature*, 410:1099-1103, 2001.
- 10 Hiemstra, *Exp. Lung Res.*, 33:537-542, 2007.
- Hippenstiel et al., *Respir. Res.*, 7:97, 2006.
- Hruby et al., *Biochem J.*, 268:249-262, 1990.
- Hydrolysis in Drug and Prodrug Metabolism: Chemistry, Biochemistry, and Enzymology, Bernard Testa, Vch Verlagsgesellschaft MbH, 2003.
- 15 Ishii et al., *Cell Host Microbe.*, 3:352-363, 2008.
- Janeway, Jr. and Medzhitov, *Annu. Rev. Immunol.*, 20:197-216, 2002.
- Kagan et al., *Nat. Immunol.*, 9:361-368, 2008.
- Kaisho et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1589(1):1-13, 2002.
- Keamey et al., *Immunity*, 1:327, 1994.
- 20 Kellner et al., *Biol. Chem.* 373:1:51-5, 1992.
- Kita et al., *Drug Des. Delivery*, 6:157, 1990.
- Knauf et al., *J. Biol. Chem.*, 263:15064, 1988.
- Knowles et al., *J. Clin. Invest.*, 109(5):571-7, 2002.
- Krug et al., *Eur. J. Immunol.*, 31:2154-2163, 2001.
- 25 Kyte and Doolittle, *J. Mol. Biol.*, 157(1):105-132, 1982.
- Lee et al., *J. Lipid Res.*, 44:479-486, 2003.
- Lee et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:6646-6651, 2003.
- Martin and Frevert, *Proc. Am. Thorac. Soc.*, 2(5):403-11, 2005.
- Martin et al., *Infect. Immun.*, 71:2498-2507, 2003.
- 30 Medzhitov and Janeway, Jr., *Curr. Opin. Immunol.*, 9(1):4-9, 1997.
- Medzhitov and Janeway, Jr., *Trends Microbiol.*, 8(10):452-456, 2000.
- Medzhitov et al., *Mol. Cell*, 2(2):253-8, 1998.
- Mizgerd, *N. Engl. J. Med.*, 358:716-727, 2008.
- Moghaddam et al., *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 38:629-638, 2008.
- 35 Mondino et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(6):2245-52, 1996.
- Morgan and Gainor, *Ann. Rep. Med. Chem.*, 24:243-252, 1989.
- Nagase et al., *J Immunol.*, 171(8):3977-82, 2003.
- O'Neill and Bowie, *Nat. Rev. Immunol.*, 7:353-364, 2007.
- Or et al., *J. Org. Chem.*, 56:3146-3149, 1991.
- 40 Solicitud PCT WO 00/76518
- Solicitud PCT WO 02/46189
- Solicitud PCT WO 02/46192
- Solicitud PCT WO 02/46193
- Solicitud PCT WO 94/06498
- 45 Solicitud PCT WO 94/08552
- Solicitud PCT WO 94/16970
- Solicitud PCT WO 97/25086
- Solicitud PCT WO 98/16427
- Solicitud PCT WO 98/35888
- 50 Solicitud PCT WO 98/55495
- Poltorak et al., *Science*, 282(5396):2085-8, 1998.
- Prodrugs: Topical and Ocular Drug Delivery, Kenneth Sloan, Marcel Dekker; 1992.
- Pulendran et al., *J. Exp. Med.*, 188(11):2075-82, 1998.
- Rogan et al., *Respir. Res.*, 7:29, 2006.
- 55 Roman et al., *Nat. Med.*, 3(8):849-54, 1997.
- Schutte and McCray, *Annu. Rev. Physiol.*, 64:709-748, 2002.
- Seifer et al., *Biochem. J.*, 26:795-802, 1990.
- Shi et al., *J. Biol. Chem.*, 284:20540-20547, 2009.
- Takeda and Akira, *J. Dermatol. Sci.*, 34(2):73-82, 2004.
- 60 Takeda and Akira, *Semin. Immunol.*, 16:3-9, 2004.
- Takeuchi et al., *Int. Immunopharmacol.*, 1(4):625-35, 2001.
- Travis et al., *Curr. Opin. Immunol.*, 13(1):89-95, 2001.
- Tsutsumi et al., *J. Controlled Rel.*, 33:447, 1995.
- Tuvim et al., *PLoS ONE*, 4:e4176, 2009.
- 65 Vroegop et al., *Intl. J. Immunopharmacol.*, 21:647-662, 1999.
- Williams et al., *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 34(5):527-36. 10, 2006.

Yamamoto et al., Science, 301:640-643, 2003.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> DICKEY, BURTON
TUVIM, MICHAEL
EVANS, SCOTT
- 10 <120> COMPOSICIONES PARA LA ESTIMULACIÓN DE RESISTENCIA INMUNITARIA INNATA DE
MAMÍFEROS A PATÓGENOS
- <130> TAMK:252WO
- 15 <140> DESCONOCIDO
<141> 25-03-2010
- <150> 61/163.137
<151> 25-03-2009
- 20 <150> 61/179.246
<151> 18-05-2009
- <160> 3
- 25 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
<211> 1651
<212> PRT
- 30 <213> *Enterococcus faecalis*
- <400> 1

ES 2 534 947 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 534 947 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Pro Val Asp Thr Thr Val Thr Thr Asn Ser Lys Arg Gly Ser Glu
 660 665 670
 Arg Thr Leu Gln Ser Ser Lys Asn Gln Phe Leu Val Asn Ala Arg Asn
 675 680 685
 Asp Ser Phe Asp Ser Leu Ser Val Arg Thr Lys Ile Pro Ala Gly Ala
 690 695 700
 Asp Val Leu Phe Asp Ile Tyr Asp Val Ser Asn Asp Gln Val Asp Ser
 705 710 715 720
 Ile Tyr Pro Gln Tyr Trp Asp Arg Gly Gln Tyr Phe Asp Lys Pro Met
 725 730 735
 Thr Pro Asn Ser Pro Gly Tyr Pro Thr Ile Thr Phe Asp Glu Asn Thr
 740 745 750
 Asn Ser Tyr Thr Phe Asp Phe Gly Lys Thr Asn Lys Arg Tyr Ile Ile
 755 760 765
 Glu Tyr Lys Asn Ala Asn Gly Trp Ile Asp Val Pro Thr Leu Tyr Ile
 770 775 780
 Thr Gly Thr Ala Lys Glu Pro Gln Ser Asn Asn Asn Glu Gly Ser Ala
 785 790 795 800
 Ser Val Ser Val Gln Asn Glu Ala Leu Asp Ile Leu Ser Ala Thr Gln
 805 810 815
 Ala Ala Asn Pro Thr Leu Lys Asn Val Thr Lys Thr Thr Val Thr Thr
 820 825 830
 Lys Asn Ile Asp Asn Lys Thr His Arg Val Lys Asn Pro Thr Ile Glu
 835 840 845
 Leu Thr Pro Lys Gly Thr Thr Asn Ala Gln Ile Asp Leu Asn Ser Ile
 850 855 860
 Thr Val Lys Gly Val Pro Glu Asp Ala Tyr Ser Leu Glu Lys Thr Thr
 865 870 875 880
 Asn Gly Ala Lys Val Ile Phe Lys Asp Tyr Thr Leu Thr Glu Asn Ile
 885 890 895
 Thr Ile Glu Tyr Asn Thr Val Ser Ala Asn Ala Gly Gln Ile Tyr Thr
 900 905 910
 Glu Thr Thr Ile Asp Ser Glu Thr Leu Asn Gln Met Ser Ala Ser Lys

ES 2 534 947 T3

915	920	925											
Lys 930	Lys Val Thr Thr Ala Pro 935	Ile Thr Leu Lys Phe Ser Glu Gly Asp 940											
Ala 945	Glu Gly Ile Val Tyr Leu Ala Thr Ala Thr Phe Tyr Thr His Asn 950	955											
Val Glu Asp Glu Asn Gln Ala Ile Ala Lys Val Ser Phe Glu Leu Ile 965	970	975											
Asp Asn Val Thr His Thr Ala Thr Glu Phe Thr Thr Asp Glu Lys Gly 980	985	990											
Gln Tyr Ser Phe Asp Ala Ile Met Thr Gly Asp Tyr Thr Leu Arg V 995	1000	1005											
Thr Asn Val Pro Gln Glu Tyr Ser Val Asp Glu Glu Tyr Leu Thr 1010	1015	1020											
Gly Lys Ala Ile Lys Leu Val Lys Gly Asp Asn Gln Leu Lys Ile 1025	1030	1035											
Pro Leu Thr Lys Thr Ile Asp His Ser Arg Leu Gln Val Lys Asp 1040	1045	1050											
Ser Thr Ile Tyr Val Gly Asp Ser Trp Lys Pro Glu Glu Asn Phe 1055	1060	1065											
Val Ser Ala Thr Asp Lys Thr Gly Gln Asp Val Pro Phe Glu Lys 1070	1075	1080											
Ile Thr Val Ser Gly Gln Val Asp Asn Thr Lys Ala Gly Val Tyr 1085	1090	1095											
Pro Ile Ile Tyr Ser Asp Glu Gly Lys Glu Glu Thr Ala Tyr Val 1100	1105	1110											
Thr Val Lys Pro Asp Gln Ser Lys Leu Glu Val Lys Asp Thr Thr 1115	1120	1125											
Ile Tyr Val Gly Asp Ser Trp Lys Pro Glu Asp Asn Phe Val Ser 1130	1135	1140											
Ala Thr Asp Lys Thr Gly Gln Asp Val Pro Phe Glu Lys Ile Asp 1145	1150	1155											
Val Gln Gly Thr Val Asn Val Asp Lys Ile Gly Asp Tyr Glu Ile 1160	1165	1170											

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 2
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 2
 10
Gln Arg Leu Ser Thr Gly Ser Arg Ile Asn Ser Ala Lys Asp Asp Ala
1 5 10 15

Ala Gly Leu Gln Ile Ala
20

 <210> 3
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Cebador sintético
 20
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4) .. (5)
 <223> n es a, c, g o t
 25
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9) .. (10)
 <223> n es a, c, g o t
 30
 <400> 3
 tcgnntcgnn tcg 13

REIVINDICACIONES

1. Un agonista de TLR9 para su uso en un método para tratar, inhibir o atenuar una infección microbiana que comprende administrar una cantidad eficaz de un agonista de TLR9 y un agonista de TLR2/6 a un individuo que tiene o está en riesgo de desarrollar o adquirir una infección microbiana; donde dicho agonista de TLR2/6 es un lipopolipéptido diacilado sintético.
2. Un agonista de TLR2/6 para su uso en un método para tratar, inhibir o atenuar una infección microbiana que comprende administrar una cantidad eficaz de un agonista de TLR9 y un agonista de TLR2/6 a un individuo que tiene o está en riesgo de desarrollar o adquirir una infección microbiana; donde dicho agonista de TLR2/6 es un lipopolipéptido diacilado sintético.
3. Una composición farmacéuticamente aceptable que comprende un agonista de TLR9 y un agonista de TLR2/6 para su uso en un método para tratar, inhibir o atenuar una infección microbiana que comprende administrar una cantidad eficaz de un agonista de TLR9 y un agonista de TLR2/6 a un individuo que tiene o está en riesgo de desarrollar o adquirir una infección microbiana; donde dicho agonista de TLR2/6 es un lipopolipéptido diacilado sintético.
4. Un agonista o composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el agonista de TLR2/6 es PAM2CSK4.
5. Un agonista o composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el agonista de TLR9 es un oligodesoxinucleótido (ODN) tipo C.
6. El agonista o composición para su uso de la reivindicación 5, donde el ODN tipo C es ODN2395 u ODNM362 u ODN10101.
7. Un agonista o composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el sujeto ha estado expuesto a un microbio patógeno.
8. Un agonista o composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el microbio es un virus, una bacteria o un hongo.
9. El agonista o composición para su uso de la reivindicación 8, donde:
- (a) el virus es Adenoviridae, Coronaviridae, Filoviridae, Flaviviridae, Hepadnaviridae, Herpesviridae, Orthomyxoviridae, Paramyxovirinae, Pneumovirinae, Picornaviridae, Poxviridae, Retroviridae, Togaviridae, Parainfluenza, Influenza, H5N1, Marburgo, Ébola, coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo, fiebre amarilla, virus respiratorio sincitial humano, Hantavirus o Vaccinia;
 - (b) la bacteria es *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pneumoniae*, *Staphylococcus maltophilia*, *Burholderia spp.* o *Moraxella spp.*; o
 - (c) el hongo es un *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Coccidioides*, *Blastomyces*, *Zygometes* o *Pneumocystis*.
10. Un agonista o composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el agonista de TLR9 y el agonista de TLR2/6 se administran en una formulación nebulizada.
11. Un agonista o composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la cantidad eficaz del agonista de TLR9 y agonista de TLR2/6 se deposita en los pulmones del individuo.
12. Un agonista o composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el agonista de TLR9 y el agonista de TLR2/6 se administra en una cantidad de entre 0,1 mg/kg y 100 mg/kg del peso corporal del individuo.
13. Una composición farmacéuticamente aceptable que comprende un agonista de TLR9 y un agonista de TLR2/6, un agente antiinflamatorio y uno o más excipientes farmacéuticos, donde dicha composición es estéril y esencialmente libre de microbios patógenos; donde dicho agonista de TLR2/6 es un lipopolipéptido diacilado sintético.
14. La composición de la reivindicación 13, donde la composición está formulada para nebulización.
15. La composición de la reivindicación 13, donde el agonista de TLR2/6 es PAM2CSK4; o donde el agonista de TLR9 es un oligodesoxinucleótido tipo C (ODN), preferiblemente ODN2395 u ODN M362 u ODN10101.

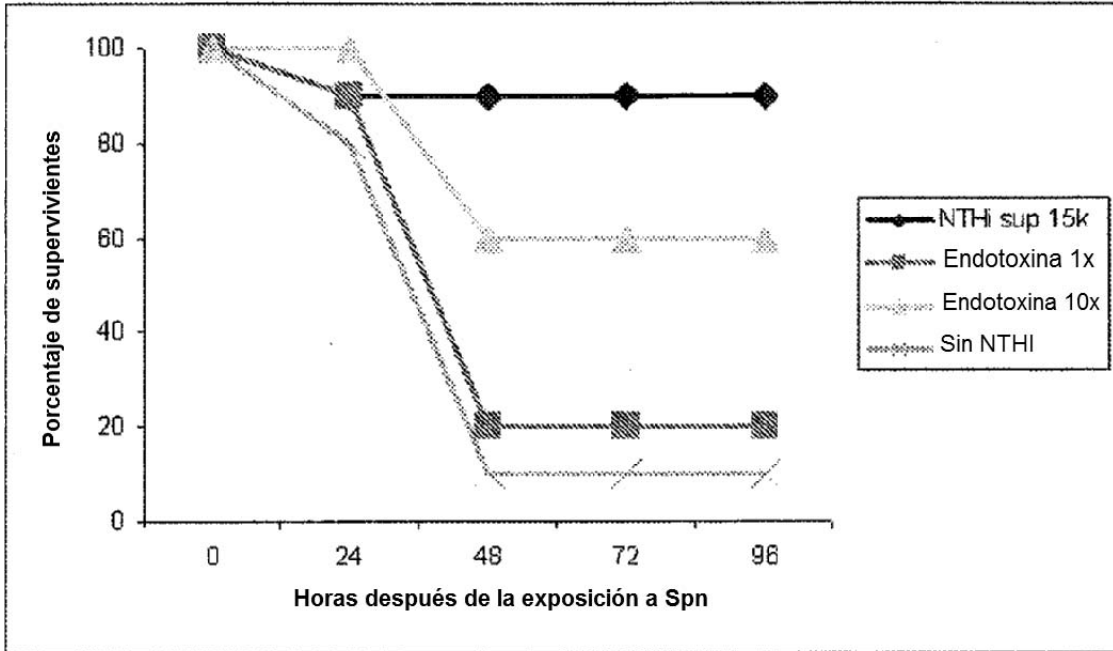


FIG. 1

Protección de *P. aeruginosa* con PHAD/MPLA

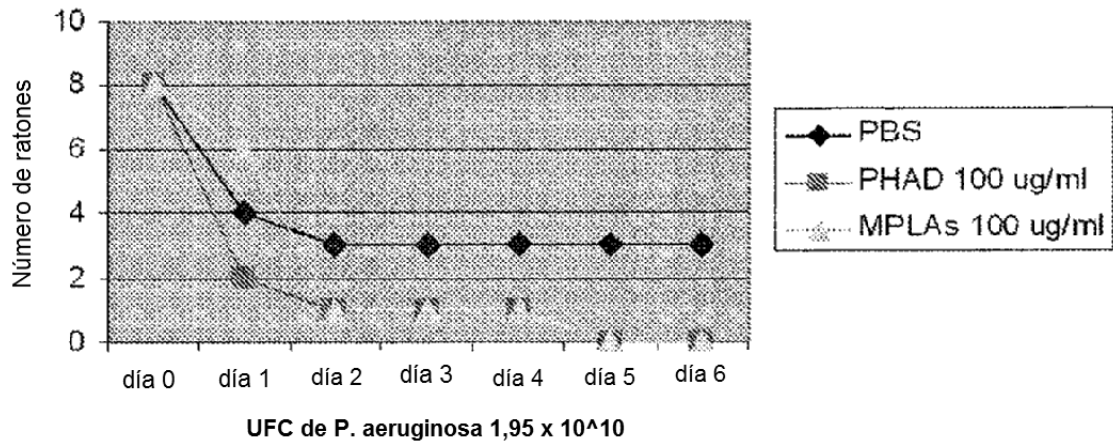


FIG. 2

Protección de *P. aeruginosa* con imiquimod

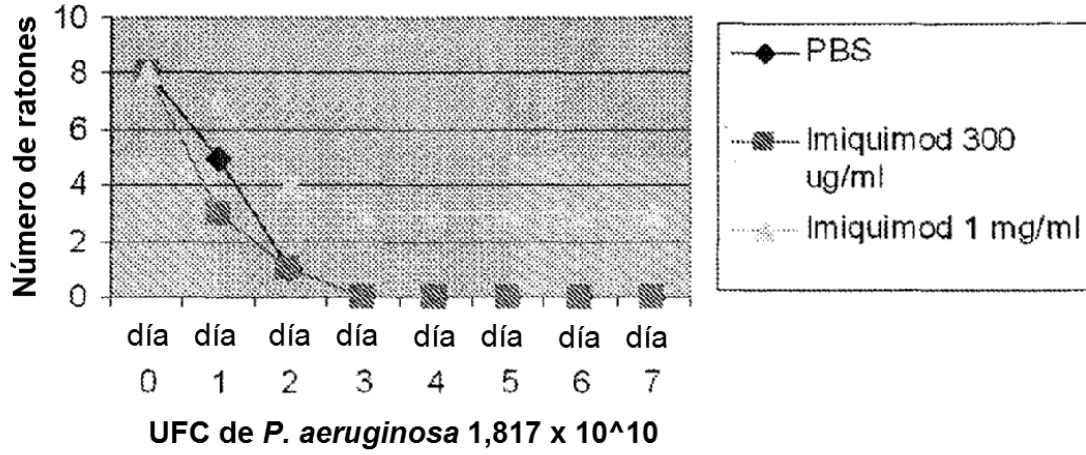


FIG. 3

Protección inducida por ODN2395 (TLR9)

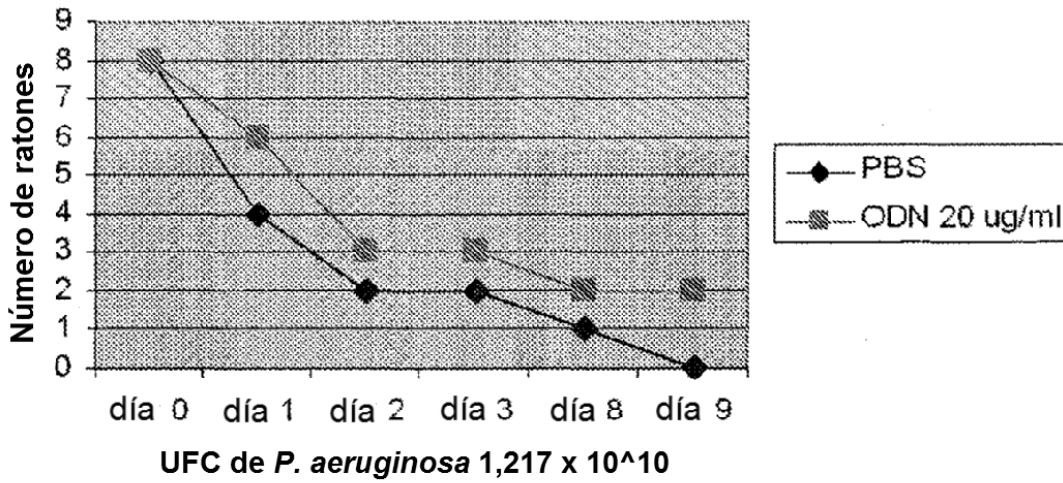


FIG. 4

Protección inducida por Pam2CSK4 (TLR 2/6, 2/1)

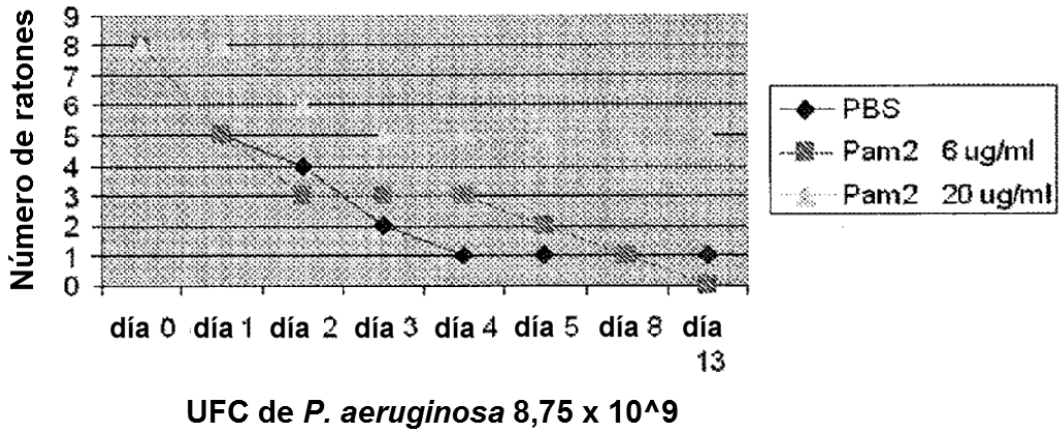
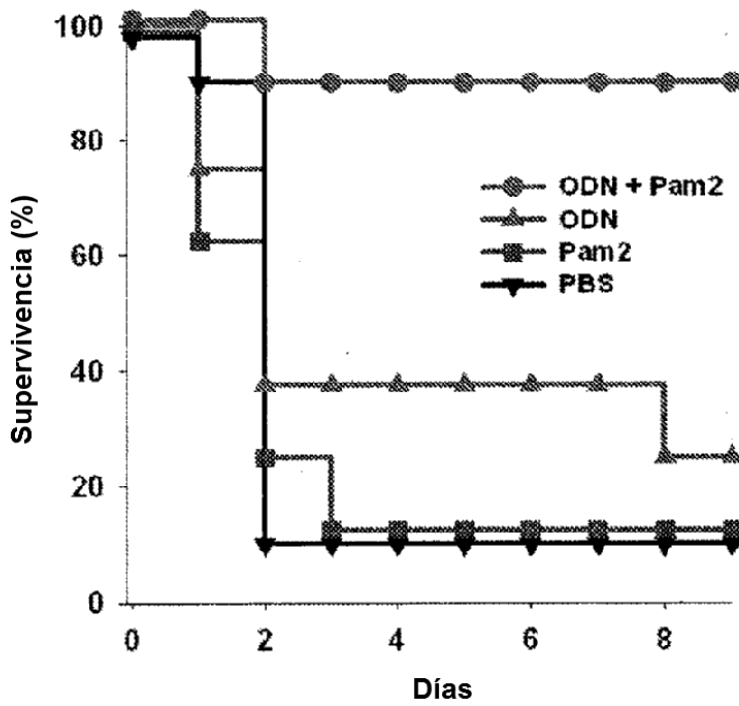
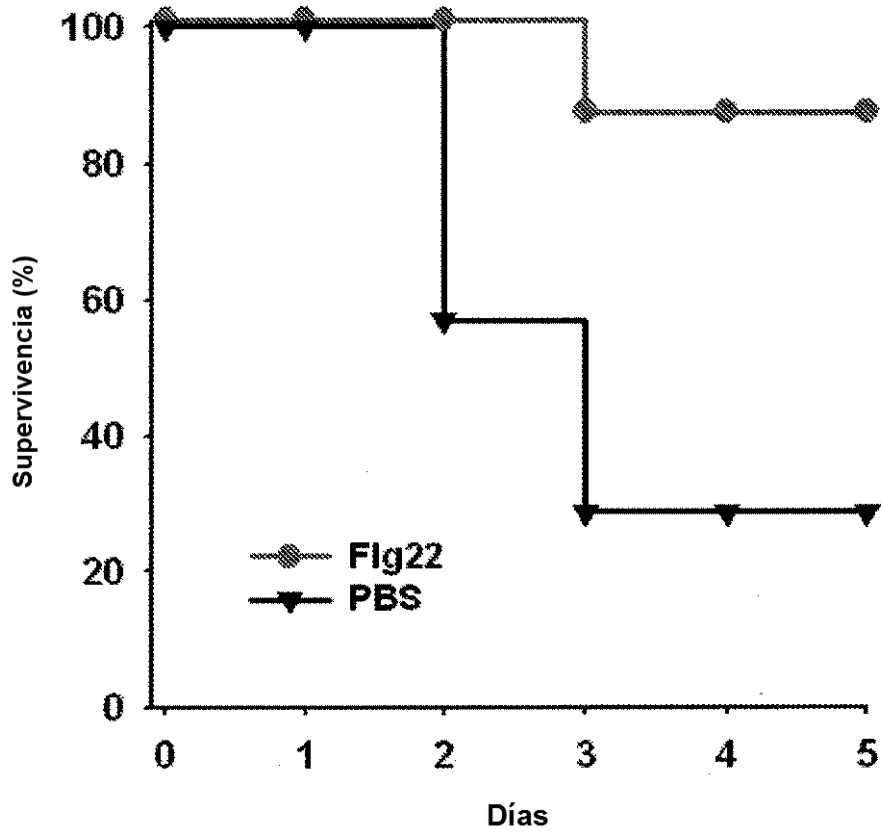


FIG. 5



Ratones Swiss-Webster expuestos a *P. aeruginosa* (2×10^{10} UFC/ml)

FIG. 6



Exposición a *P. aeruginosa* (2×10^{10} UFC/ml)

FIG. 7

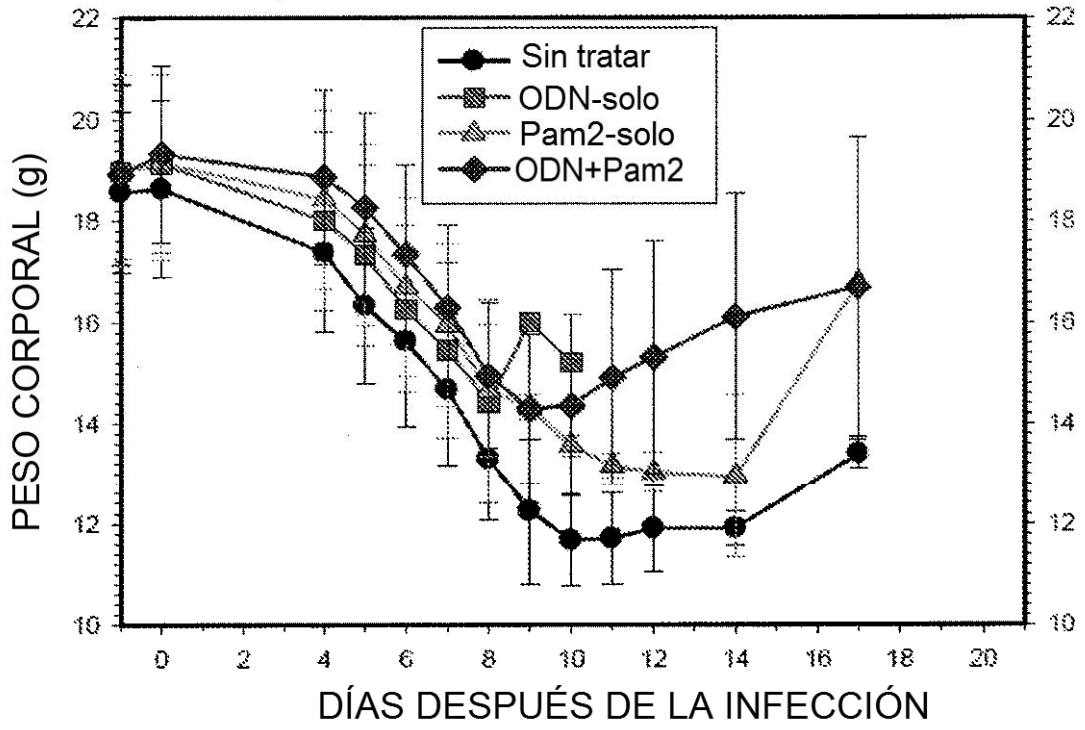


FIG. 8

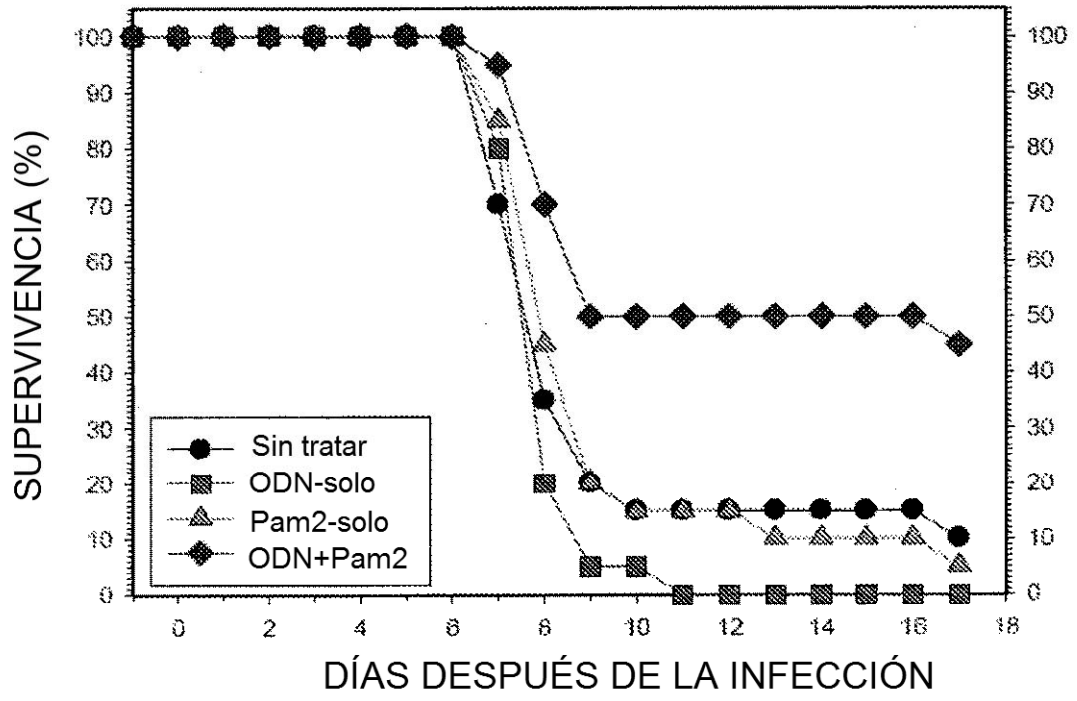


FIG. 9

Expt. 3. Efecto de un pretratamiento con aerosol de 30 min (D-1) con ODN/Pam2/poli IC sobre la supervivencia de ratones infectados con aerosol de la gripe A/HK; dosis de virus: ~ 130 TCID₅₀/ratón

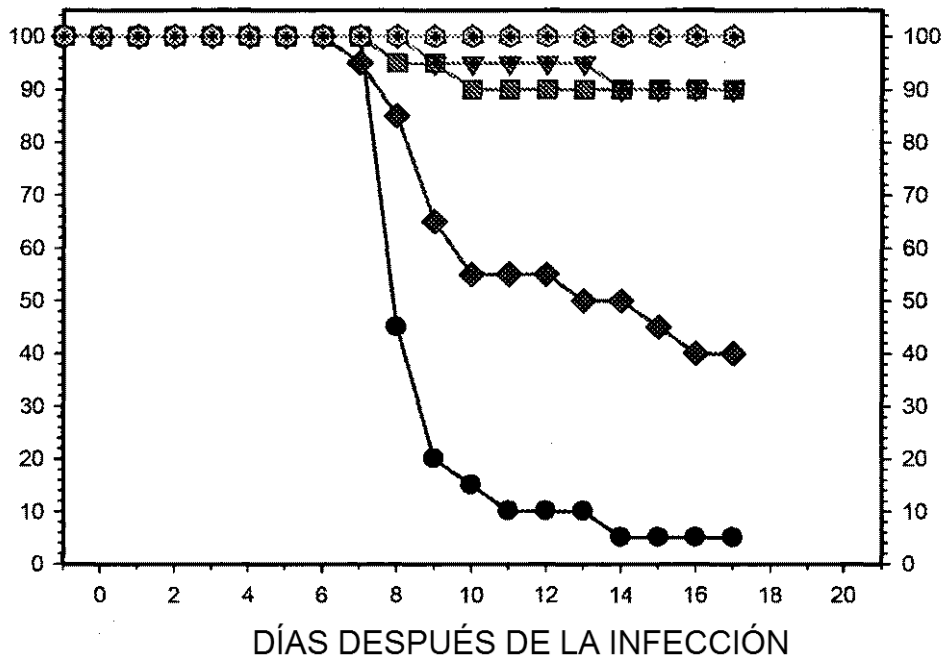


FIG. 10

Expt. 3. Efecto de un pretratamiento con aerosol de 30 min (D-1) con ODN/Pam2/poli IC sobre el peso de ratones infectados con aerosol de la gripe A/HK; dosis de virus: ~ 130 TCID₅₀/ratón

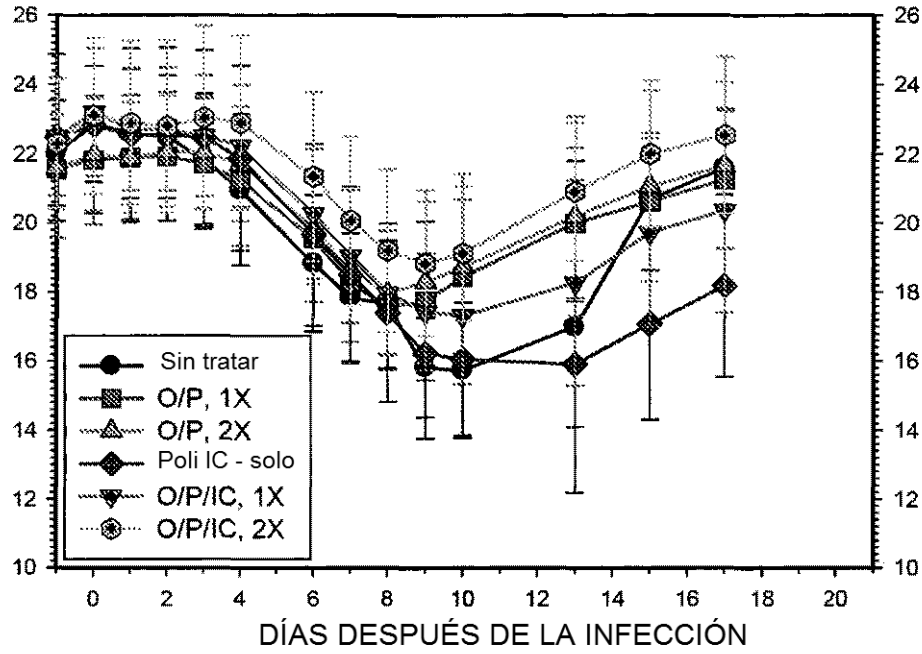


FIG. 11

FIGS. 12A-B

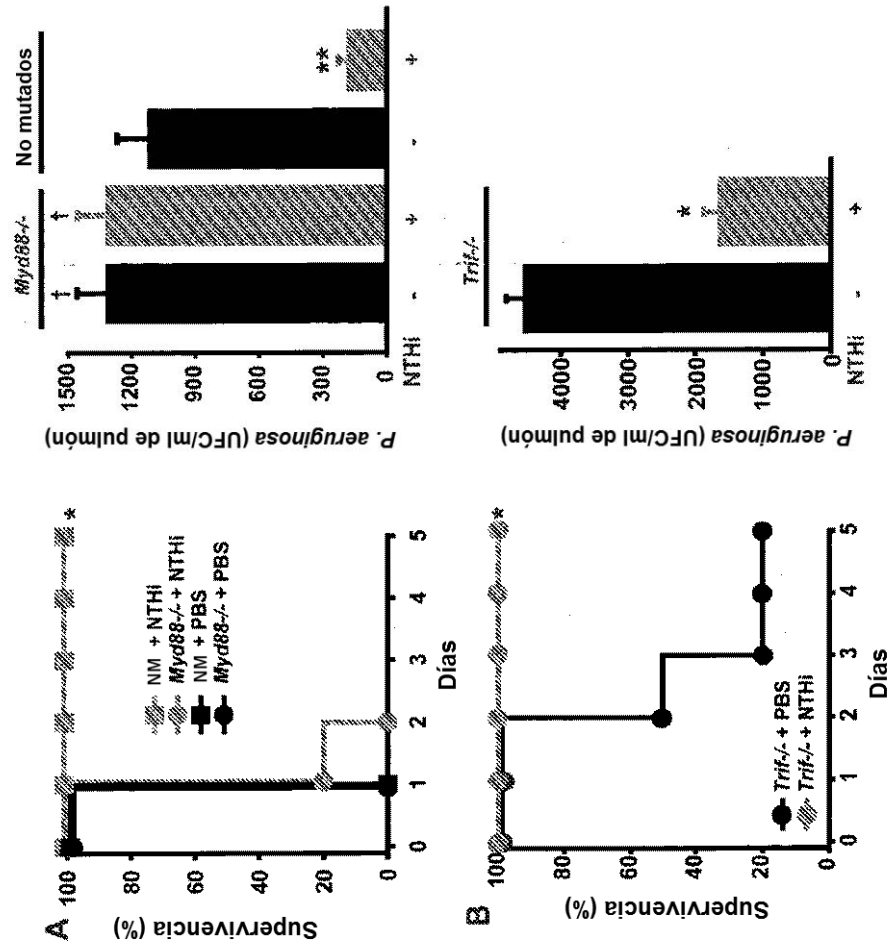


FIG. 13

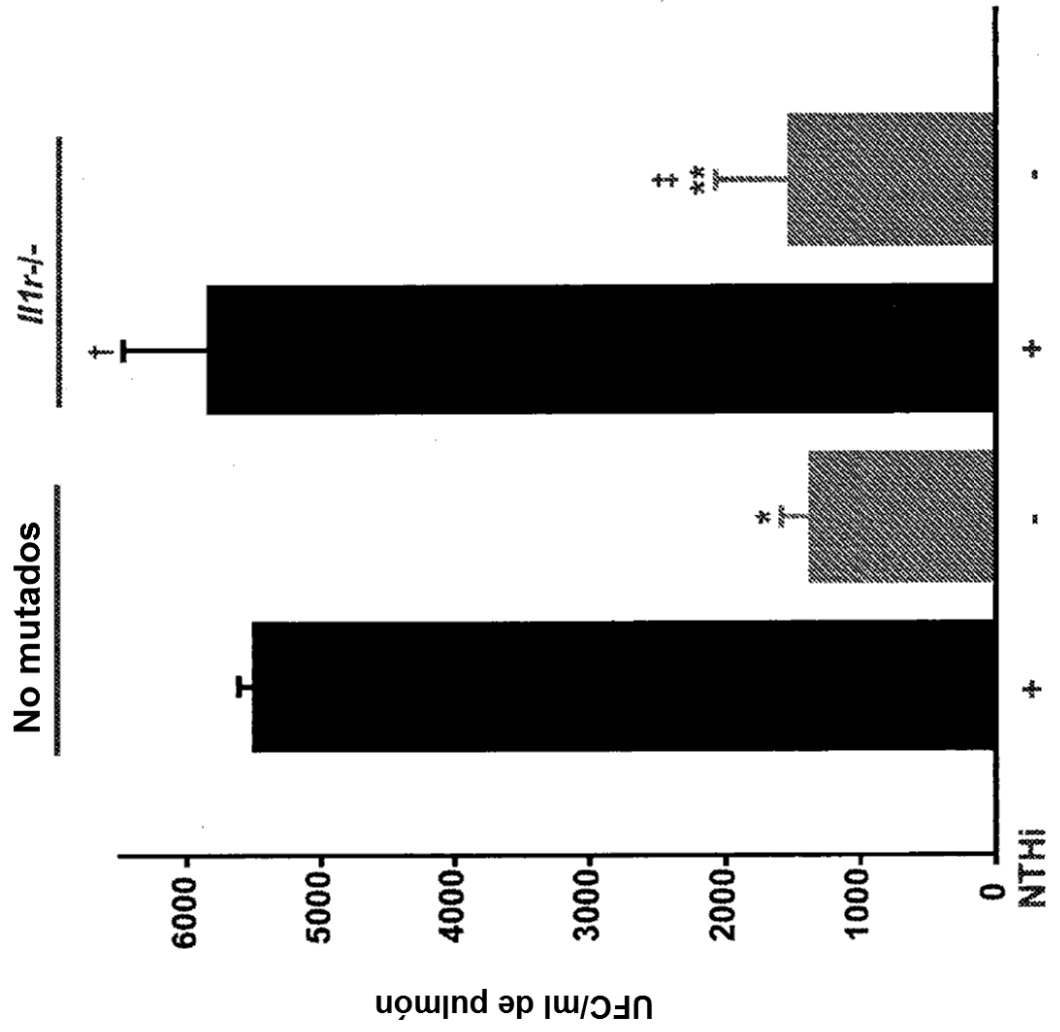


FIG. 14

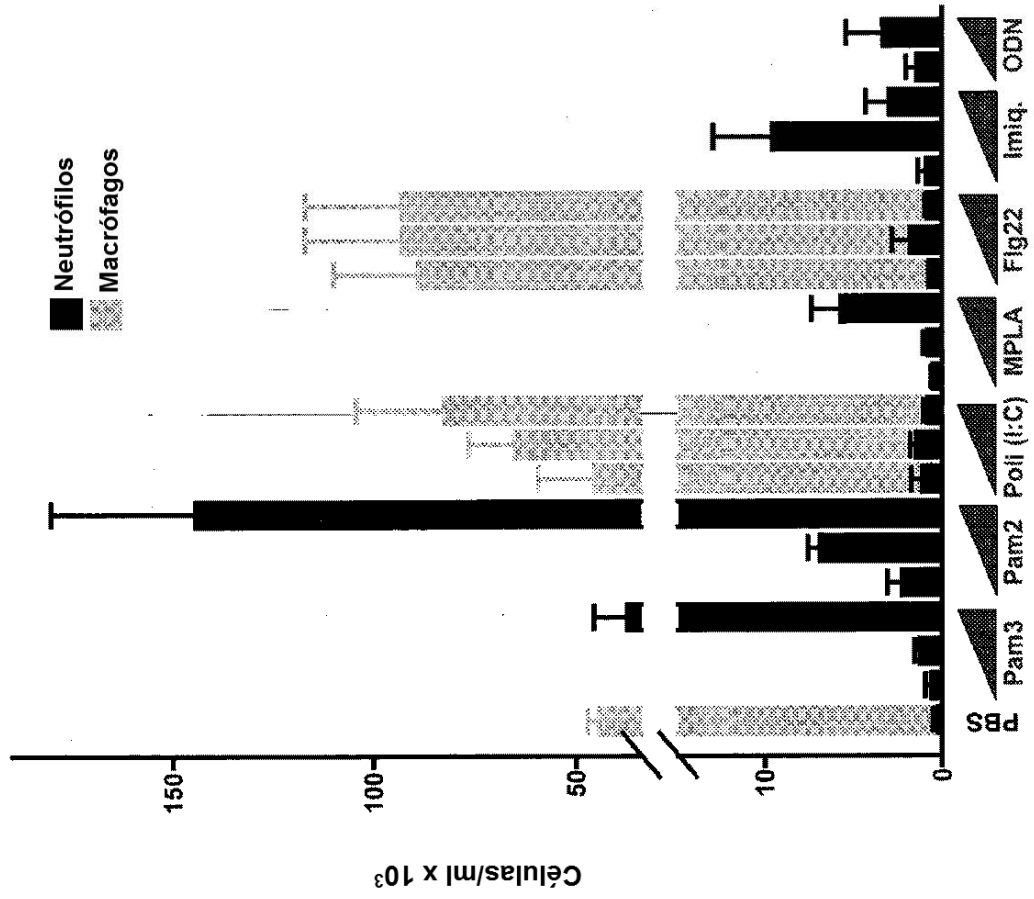
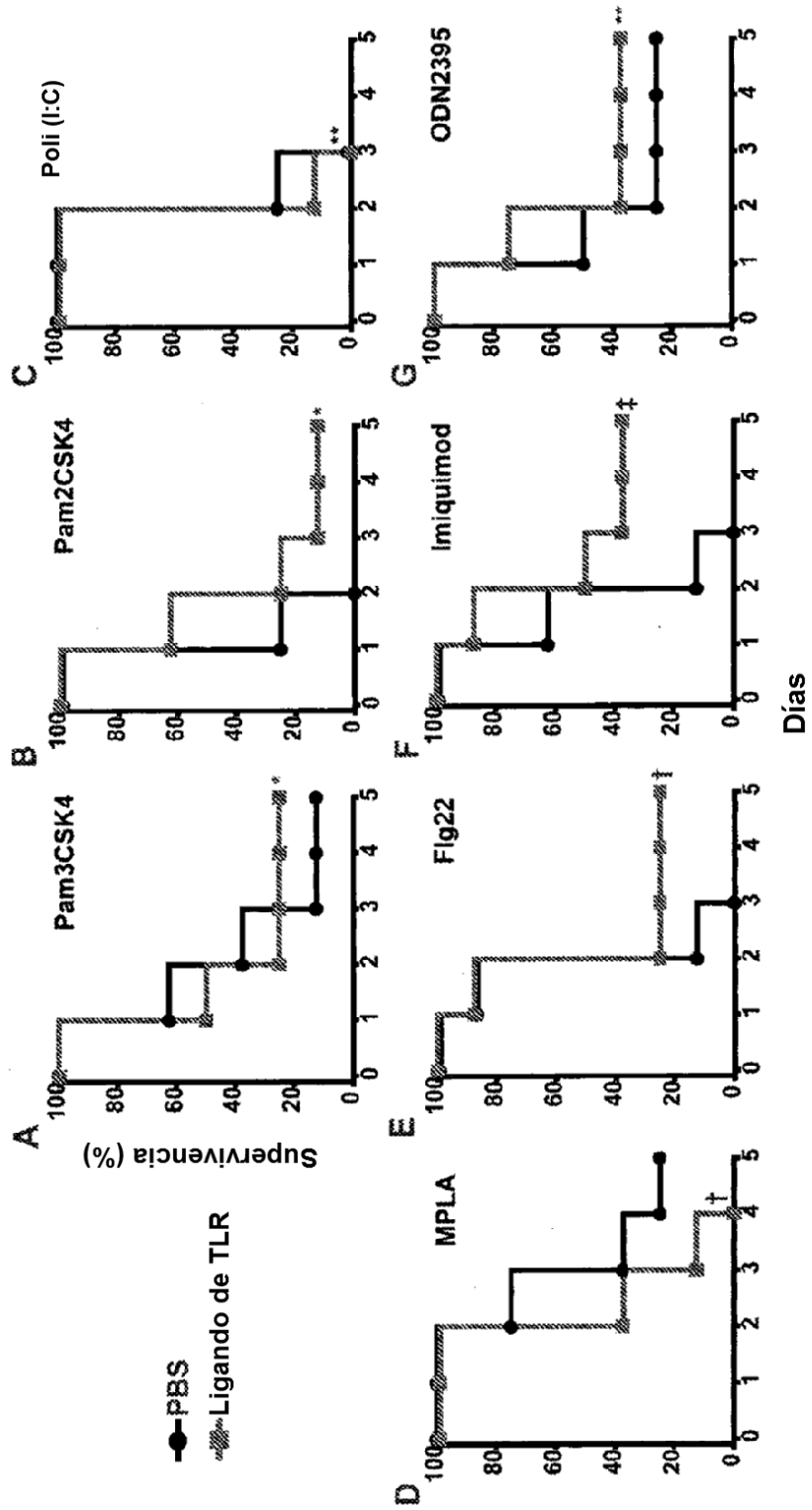
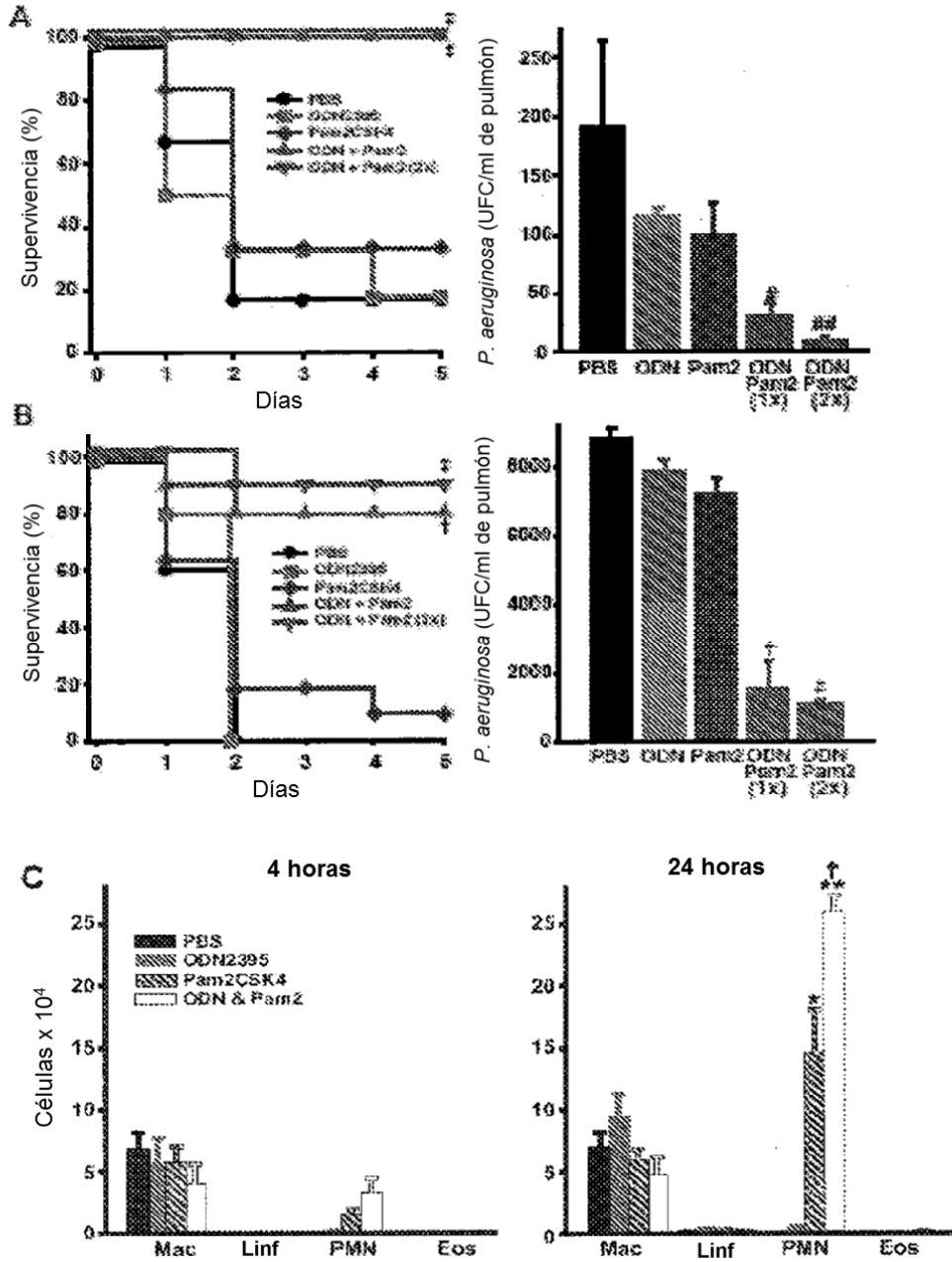


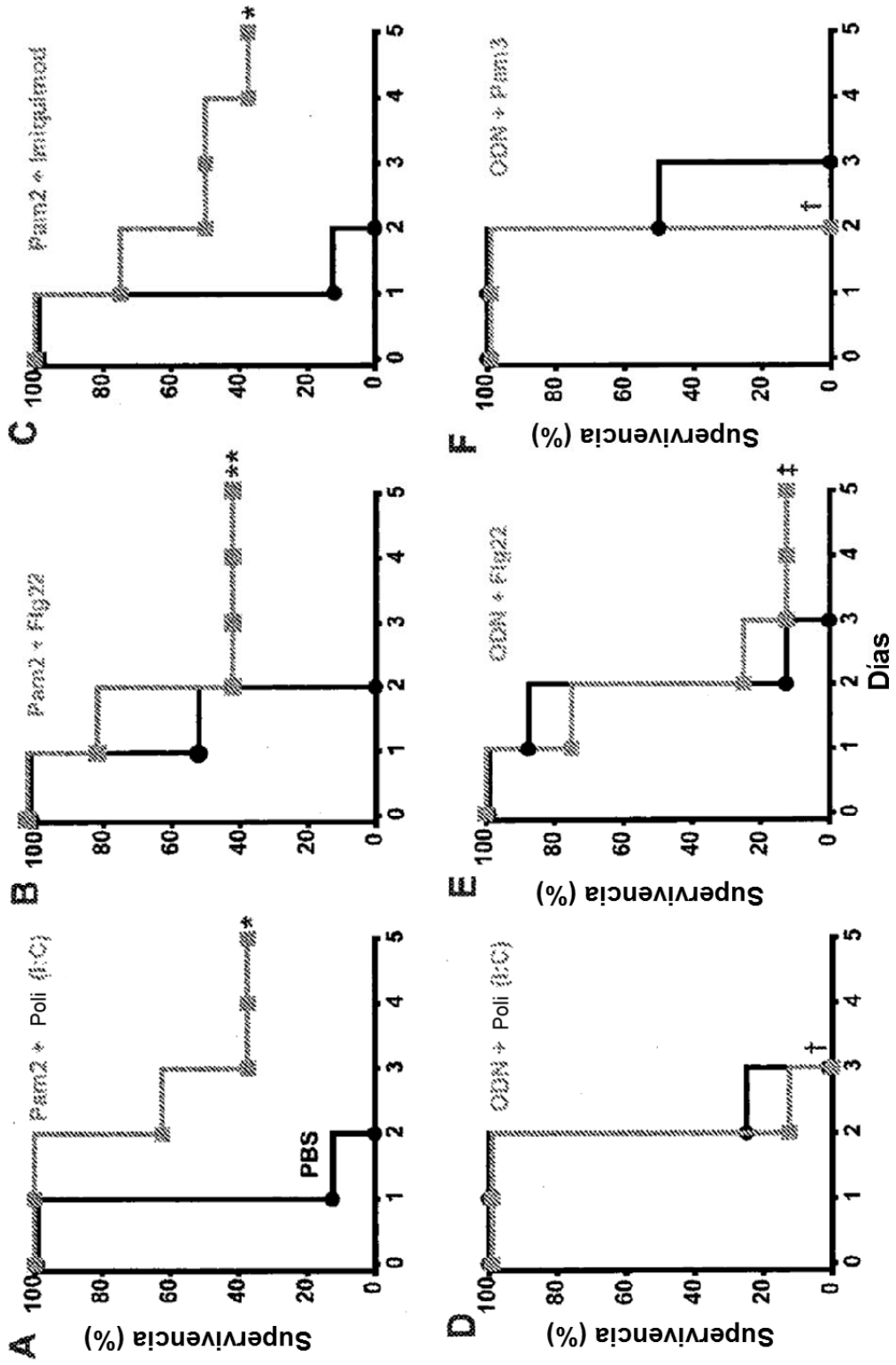
FIG. 15



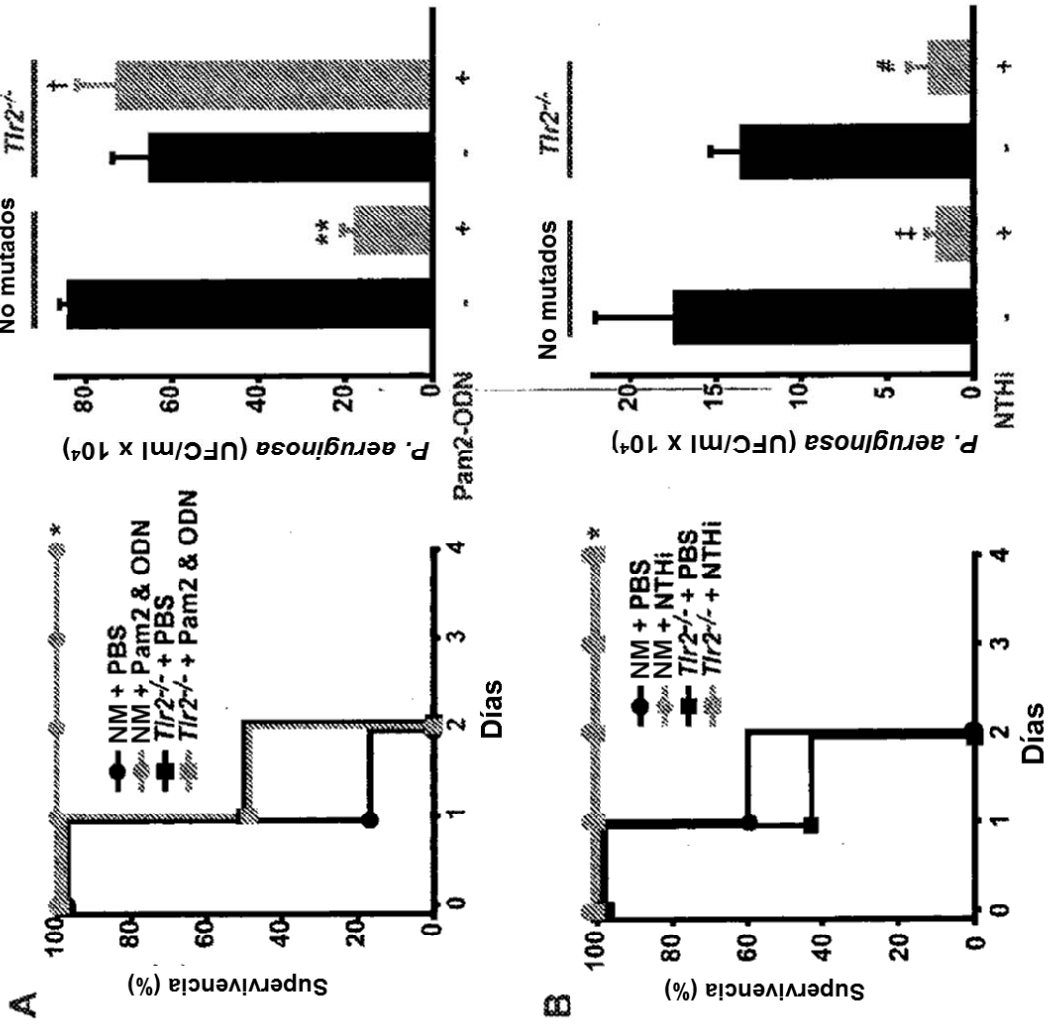
FIGS. 16A-C



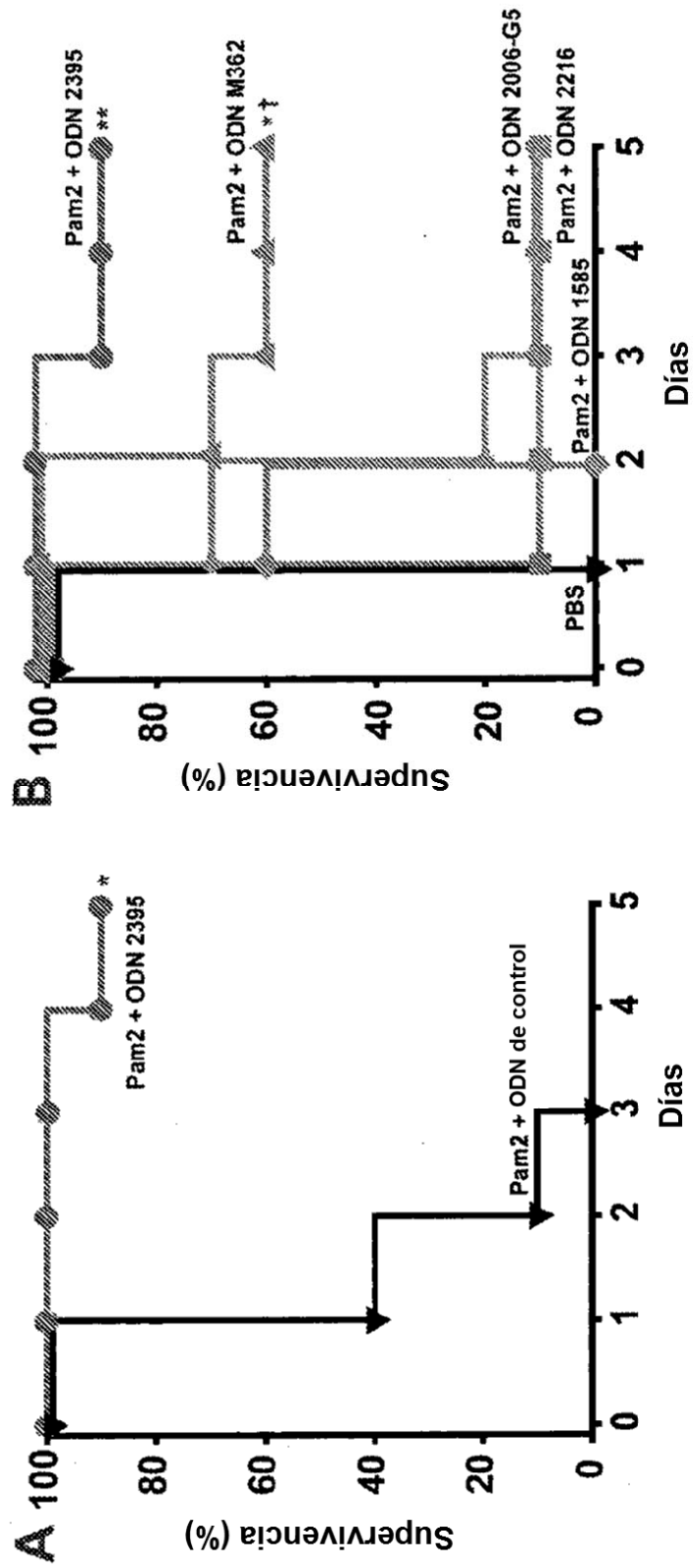
FIGS. 17A-F



FIGS. 18A-B



FIGS. 19A-B



FIGS. 20A-D

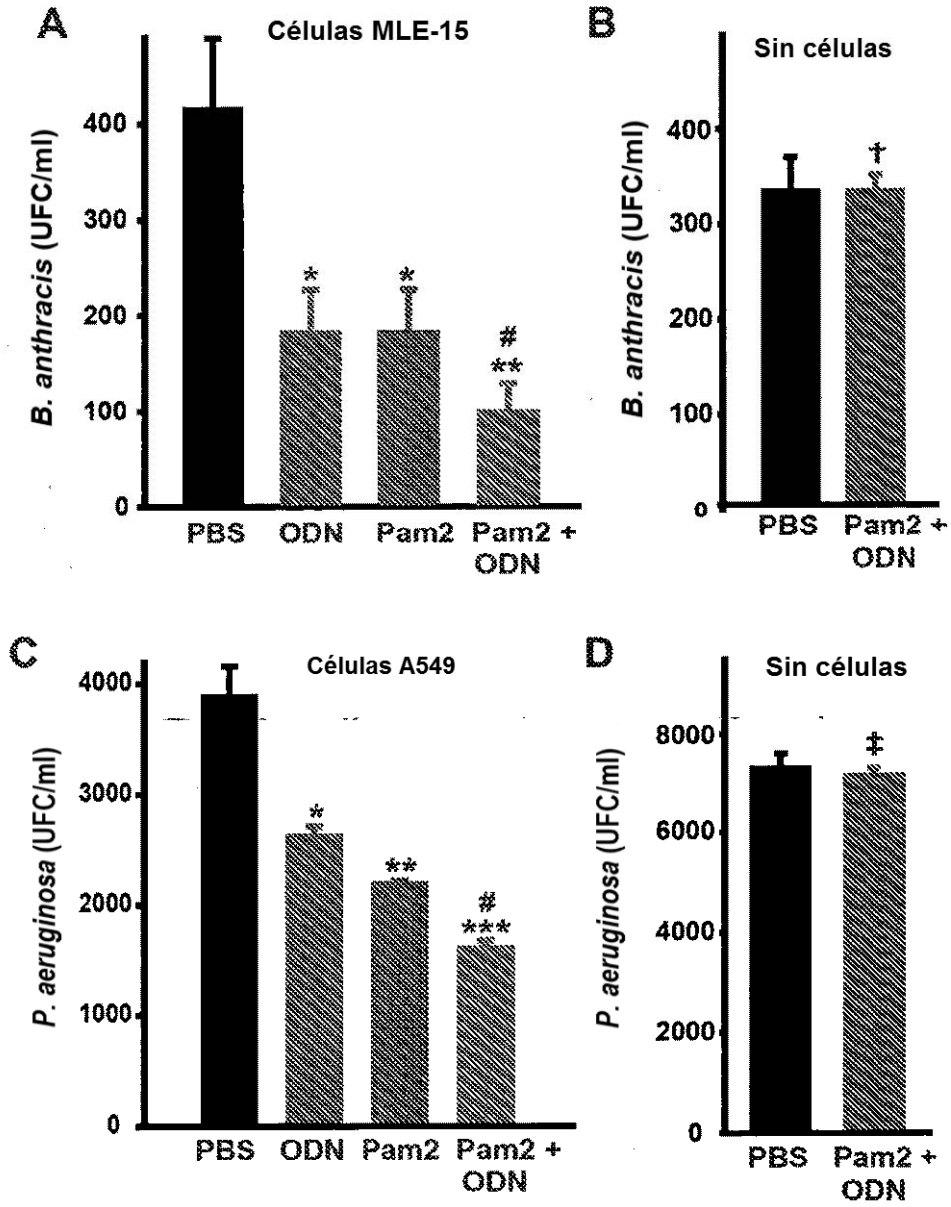


FIG. 21

Supervivencia de ratones Swiss-Webster inmunizados con diversos agonistas de TLR sintéticos y expuestos intranasalmente a 5 DL50 de esporas Ames de *Bacillus anthracis* (MD-10-013)

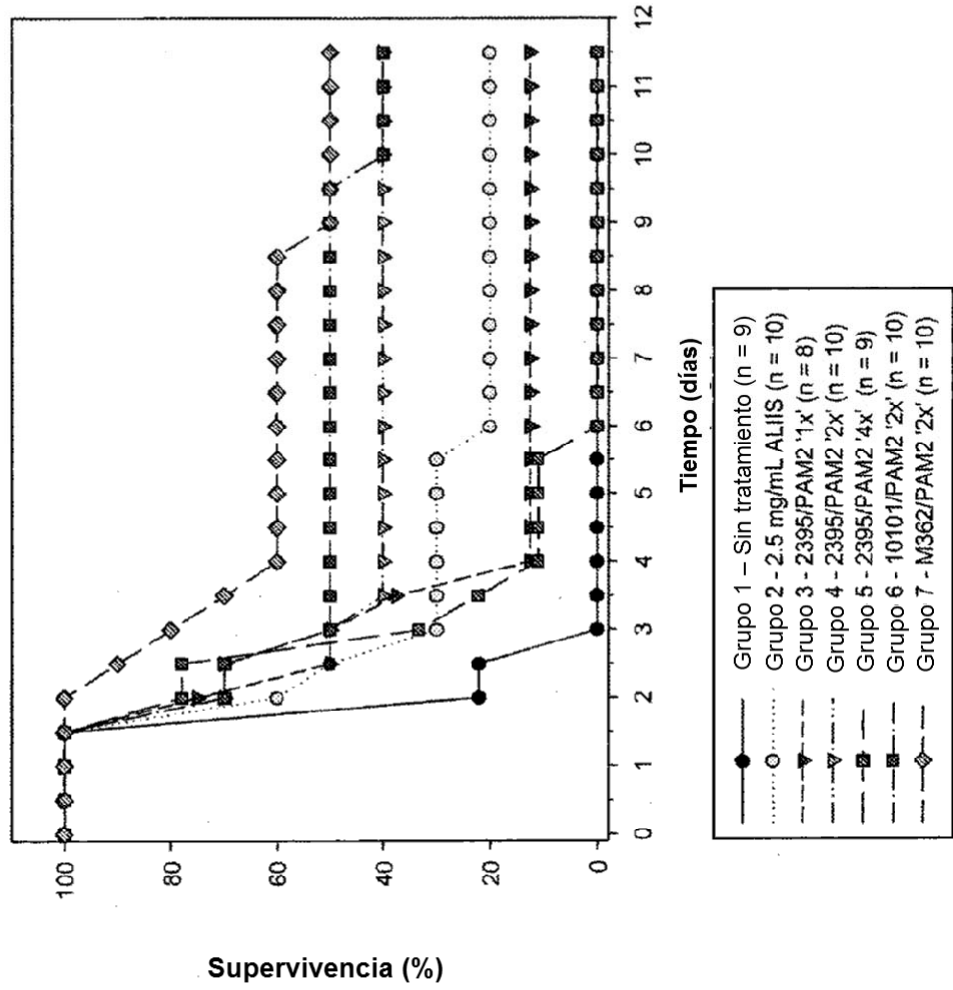


FIG. 22

Efecto del pretratamiento con aerosol con ODN/Pam2 o lisado de NTHi sobre la supervivencia de ratones infectados por la gripe A/HK

