

(11) Número de Publicação: **PT 1575977 E**

(51) Classificação Internacional:

C07H 21/02 (2007.10) **C07H 21/04** (2007.10)
C07H 21/00 (2007.10) **A01N 43/04** (2007.10)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2003.12.18**

(30) Prioridade(s): **2002.12.23 US 436122 P**
2003.02.13 US 447885 P
2003.05.01 US 467546 P

(43) Data de publicação do pedido: **2005.09.21**

(45) Data e BPI da concessão: **2009.09.09**
241/2009

(73) Titular(es):

DYNAVAX TECHNOLOGIES CORPORATION
2929 SEVENTH STREET, SUITE 100 BERKELEY,
CA 94710 **US**

(72) Inventor(es):

DINO DINA **US**
KAREN L. FEARON **US**
JASON MARSHALL **US**

(74) Mandatário:

ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º AND 1249-235 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **OLIGONUCLEÓTIDOS DE SEQUÊNCIA IMUNOESTIMULADORA E MÉTODOS DE UTILIZAÇÃO DOS MESMOS**

(57) Resumo:

DESCRIÇÃO

"Oligonucleótidos de sequência imunoestimuladora e métodos de utilização dos mesmos"

CAMPO TÉCNICO

O presente invento refere-se a polinucleótidos imunomoduladores. Refere-se também à administração dos polinucleótidos para modular uma resposta imunitária.

ANTECEDENTES DO INVENTO

O tipo de resposta imunitária gerada à infecção ou outra provocação antigénica pode geralmente ser distinguido através do subconjunto de células T auxiliares (Th) envolvido na resposta. O subconjunto Th1 é responsável por funções clássicas mediadas por células tais como hipersensibilidade de tipo retardado e activação de linfócitos T citotóxicos (CTL), enquanto o subconjunto Th2 funciona mais eficazmente como auxiliar da activação de células B. O tipo de resposta imunitária a um antigénio é geralmente influenciado pelas citocinas produzidas pelas células que respondem ao antigénio. Crê-se que as diferenças nas citocinas segregadas por células Th1 e Th2 reflectem diferentes funções biológicas destes dois subconjuntos. Ver, por exemplo, Romagnani, *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 85: 9-18, 2000.

O subconjunto Th1 pode ser particularmente adequado para responder a infecções virais, patógenos intracelulares e células tumorais porque segrega IL-2 e IFN- γ , que activam CTL. O subconjunto Th2 pode ser mais adequado para responder a bactérias de vida livre e parasitas helmínticos e pode mediar reacções alérgicas, uma vez que se sabe que IL-4 e IL-5 induzem a produção de IgE e a activação de eosinófilos, respectivamente. Em geral, as células Th1 e Th2 segregam padrões distintos de citocinas e assim um tipo de resposta pode moderar a actividade do outro tipo de resposta. Uma mudança no equilíbrio Th1/Th2 pode resultar numa resposta alérgica, por exemplo, ou alternativamente, numa maior resposta de CTL.

Para muitas doenças infecciosas, tais como tuberculose e malária, as respostas de tipo Th2 são de pouco valor protector contra a infecção. As vacinas propostas utilizando pequenos péptidos derivados do antigénio alvo e outros agentes antigénicos actualmente utilizados que evitam a utilização de partículas virais intactas potencialmente infecciosas, nem sempre desencadeiam a resposta imunitária necessária para alcançar um efeito terapêutico. As vacinas baseadas em proteínas induzem tipicamente respostas imunitárias de tipo Th2, caracterizadas por elevados títulos de anticorpos neutralizadores mas sem significativa imunidade mediada por células.

Para além disso, alguns tipos de respostas de anticorpos são inapropriados em certas indicações, mais nitidamente em alergia onde uma resposta de anticorpos IgE pode resultar em choque anafiláctico. Geralmente, as respostas alérgicas envolvem também respostas imunitárias de tipo Th2. As respostas alérgicas, incluindo as da asma alérgica, são caracterizadas por uma resposta de fase inicial, que ocorre dentro de segundos a minutos desde a exposição ao alergénio e se caracteriza por desgranulação celular, e uma resposta de fase tardia, que ocorre 4 a 24 horas depois e se caracteriza por infiltração de eosinófilos no local de exposição ao alergénio. Especificamente, durante a fase inicial da resposta alérgica, o alergénio liga-se de forma cruzada a anticorpos IgE em basófilos e mastócitos, que por sua vez desencadeiam desgranulação e a subsequente libertação de histamina e outros mediadores de inflamação de mastócitos e basófilos. Durante a resposta de fase tardia, os eosinófilos infiltram-se no local de exposição ao alergénio (onde resulta danos nos tecidos e disfunção).

A imunoterapia de antigénios para distúrbios alérgicos envolve a injeção subcutânea de pequenas quantidades, mas gradualmente crescentes, de antigénio. Tais tratamentos de imunização apresentam o risco de indução de anafilaxia mediada por IgE e não se dirigem eficientemente a eventos mediados por citocinas da resposta alérgica de fase tardia. Até agora, esta abordagem produziu apenas um sucesso limitado.

A administração de certas sequências de ADN, geralmente conhecidas como sequências imunoestimuladoras, induz uma resposta imunitária com uma tendência para o tipo Th1 tal como indicado pela segregação de citocinas associadas a Th1. A administração de um polinucleótido imunoestimulador com um antigénio resulta numa resposta imunitária de tipo Th1 ao antigénio administrado. Roman *et al.*, *Nature Med.* 3: 849-854, 1997. Por exemplo, ratinhos injectados intradermicamente com β -galactosidase (β -Gal) de *Escherichia coli* (*E. coli*) em solução salina ou no adjuvante alúmen responderam produzindo anticorpos IgG1 e IgE específicos, e células CD4⁺ que segregavam IL-4 e IL-5, mas não IFN- γ , demonstrando que as células T eram predominantemente do subconjunto Th2. No entanto, os ratinhos injectados intradermicamente (ou com um aplicador de raspagem da pele) com ADN plasmídico (em solução salina) codificando β -Gal e contendo uma sequência imunoestimuladora responderam produzindo anticorpos IgG2a e células CD4⁺ que segregavam IFN- γ , mas não IL-4 e IL-5, demonstrando que as células T eram predominantemente do subconjunto Th1. Para além disso, a produção de IgE específica pelos ratinhos injectados com ADN plasmídico foi reduzida em 66-75%. Raz *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 5141-5145, 1996. Em geral, a resposta a imunização com ADN nu caracteriza-se pela produção de IL-2, TNF- α e IFN- γ por células T CD4⁺ estimuladas com antigénio, o que é indicativo de uma resposta de tipo Th1. Isto é particularmente importante no tratamento de alergia e asma tal como mostrado pela menor produção de IgE. A capacidade dos polinucleótidos imunoestimuladores para estimularem uma resposta imunitária de tipo Th1 foi demonstrada com antigénios bacterianos, antigénios virais e com alergénios (ver, por exemplo, WO 98/55495).

As referências que descrevem actividade imunoestimuladora de polinucleótidos incluem: Krug *et al.* (2001) *Eur. J. Immunol.* 31:3026; Bauer *et al.* (2001) *J. Immunol.* 166:5000; Klinman *et al.* (1999) *Vaccine* 17:19; Jahn-Schmid *et al.* (1999) *J. Allergy Clin. Immunol.* 104:1015; Tighe *et al.* (2000) *Eur. J. Immunol.* 30:1939; Shirota *et al.* (2000) *J. Immunol.* 164:5575; Klinman *et al.* (1999) *Infect. Immun.* 67:5658; Sur *et al.* (1999) *J. Immunol.* 162:6284; Magone *et al.* (2000) *Eur. J. Immunol.* 30:1841; Kwarada *et al.* (2001) *J. Immunol.* 167:5247;

Kranzer et al. (2000) *Immunology* 99:170; Krug et al. (2001) *Eur. J. Immunol.* 31:2154; Hartmann et al. (2000) *J. Immunol.* 164:944; Bauer et al. (1999) *Immunology* 97:699; Fujieda et al. (2000) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 162:232; Krieg (2002) *Annu. Rev. Immunol.* 20:709; Verthelyi et al. (2002) *J. Immunol.* 168:1659; Hornung et al. (2002) *J. Immunol.* 168:4531; Yamamoto et al. (2000) *Springer Semin. Immunopathol.* 22:35; Lee et al. (2000) *J. Immunol.* 165:3631; Gursel et al. (2002) *J. Leukoc. Biol.* 71:813; Gursel et al. (2002) *Eur. J. Immunol.* 32:2617; Broide et al. (2001) *J. Clin. Immunol.* 21:175; Zhu et al. (2001) *Immunology* 103:226; Klinman et al. (2002) *Microbes Infect.* 4:897; Hartmann et al. (2000) *J. Immunol.* 164:1617; Krieg (1999) *Biochim. Biophys. Acta* 1489:107; Dalpke et al. (2002) *Immunology* 106:102; Yu et al. (2002) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297:83; Hafner et al. (2001) *Cancer Res.* 61:5523; Zwaveling et al. (2002) *J. Immunol.* 169:350; Davis et al. (2000) *Vaccine* 18:1920; Gierynska et al. (2002) *J. Virol.* 76:6568; Lipford et al. (2000) *J. Immunol.* 165:1228; Freidag et al. (2000) *Infect. Immun.* 68:2948; Dieudonne et al. (2001) *J. Allergy Clin. Immunol.* 107:S233.

Outras referências que descrevem sequências imunoestimuladoras incluem: Krieg et al. (1989) *J. Immunol.* 143:2448-2451; Tokunaga et al. (1992) *Microbiol. Immunol.* 36:55-66; Kataoka et al. (1992) *Jpn. J. Cancer Res.* 83:244-247; Yamamoto et al. (1992) *J. Immunol.* 148:4072-4076; Mojcić et al. (1993) *Clin. Immuno. and Immunopathol.* 67:130-136; Branda et al. (1993) *Biochem. Pharmacol.* 45:2037-2043; Pisetsky et al. (1994) *Life Sci.* 54(2):101-107; Yamamoto et al. (1994a) *Antisense Research and Development.* 4:119-122; Yamamoto et al. (1994b) *Jpn. J. Cancer Res.* 85:775-779; Raz et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:9519-9523; Kimura et al. (1994) *J. Biochem. (Tokyo)* 116:991-994; Krieg et al. (1995) *Nature* 374:546-549; Pisetsky et al. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 772:152-163; Pisetsky (1996a) *J. Immunol.* 156:421-423; Pisetsky (1996b) *Immunity* 5:303-310; Zhao et al. (1996) *Biochem. Pharmacol.* 51:173-182; Yi et al. (1996) *J. Immunol.* 156:558-564; Krieg (1996) *Trends Microbiol.* 4(2):73-76; Krieg et al. (1996) *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 6:133-139; Klinman et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:2879-2883; Raz et al. (1996); Sato et al. (1996) *Science* 273:352-354; Stacey et al. (1996) *J. Immunol.* 157:2116-2122; Ballas et

al. (1996) *J. Immunol.* 157:1840-1845; Branda et al. (1996) *J. Lab. Clin. Med.* 128:329-338; Sonehara et al. (1996) *J. Interferon and Cytokine Res.* 16:799-803; Klinman et al. (1997) *J. Immunol.* 158:3635-3639; Sparwasser et al. (1997) *Eur. J. Immunol.* 27:1671-1679; Roman et al. (1997); Carson et al. (1997) *J. Exp. Med.* 186:1621-1622; Chace et al. (1997) *Clin. Immunol. and Immunopathol.* 84:185-193; Chu et al. (1997) *J. Exp. Med.* 186:1623-1631; Lipford et al. (1997a) *Eur. J. Immunol.* 27:2340-2344; Lipford et al. (1997b) *Eur. J. Immunol.* 27:3420-3426; Weiner et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:10833-10837; Macfarlane et al. (1997) *Immunology* 91:586-593; Schwartz et al. (1997) *J. Clin. Invest.* 100:68-73; Stein et al. (1997) *Antisense Technology*, Ch. 11 pp. 241-264, C. Lichtenstein and W. Nellen, Eds., IRL Press; Wooldridge et al. (1997) *Blood* 89:2994-2998; Leclerc et al. (1997) *Cell. Immunol.* 179:97-106; Kline et al. (1997) *J. Invest. Med.* 45(3):282A; Yi et al. (1998a) *J. Immunol.* 160:1240-1245; Yi et al. (1998b) *J. Immunol.* 160:4755-4761; Yi et al. (1998c) *J. Immunol.* 160:5898-5906; Yi et al. (1998d) *J. Immunol.* 161:4493-4497; Krieg (1998) *Applied Antisense Oligonucleotide Technology* Ch. 24, pp. 431-448, C.A. Stein and A.M. Krieg, Eds., Wiley-Liss, Inc.; Krieg et al. (1998a) *Trends Microbiol.* 6:23-27; Krieg et al. (1998b) *J. Immunol.* 161:2428-2434; Krieg et al. (1998c) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:12631-12636; Spiegelberg et al. (1998) *Allergy* 53(45S):93-97; Homer et al. (1998) *Cell Immunol.* 190:77-82; Jakob et al. (1998) *J. Immunol.* 161:3042-3049; Redford et al. (1998) *J. Immunol.* 161:3930-3935; Weeratna et al. (1998) *Antisense & Nucleic Acid Drug Development* 8:351-356; McCluskie et al. (1998) *J. Immunol.* 161(9):4463-4466; Gramzinski et al. (1998) *Mol. Med.* 4:109-118; Liu et al. (1998) *Blood* 92:3730-3736; Moldoveanu et al. (1998) *Vaccine* 16: 1216-1224; Brazolot Milan et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:15553-15558; Briode et al. (1998) *J. Immunol.* 161:7054-7062; Briode et al. (1999) *Int. Arch. Allergy Immunol.* 118:453-456; Kovarik et al. (1999) *J. Immunol.* 162:1611-1617; Spiegelberg et al. (1999) *Pediatr. Pulmonol. Suppl.* 18:118-121; Martin-Orozco et al. (1999) *Int. Immunol.* 11:1111-1118; EP 468,520; WO 96/02555; WO 97/28259; WO 98/16247; WO 98/18810; WO 98/37919; WO 98/40100; WO 98/52581; WO 98/55495; WO 98/55609 e WO 99/11275. Veja-se também Elkins et al. (1999) *J. Immunol.* 162:2291-2298, WO 98/52962, WO 99/33488, WO 99/33868, WO 99/51259 e

WO 99/62923. Veja-se também Zimmermann *et al.* (1998) *J. Immunol.* 160:3627-3630; Krieg (1999) *Trends Microbiol.* 7:64-65 e as Patentes U.S. 5,663,153, 5,723,335 e 5,849,719. Veja-se também Liang *et al.* (1996) *J. Clin. Invest.* 98:1119-1129; Bohle *et al.* (1999) *Eur. J. Immunol.* 29:2344-2353 e WO 99/56755. Veja-se também WO 99/61056; WO 00/06588; WO 00/16804; WO 00/21556; WO 00/54803; WO 00/61151; WO 00/67023; WO 00/67787 e a Patente U.S. 6,090,791. Veja-se também Manzel *et al.* (1999) *Antisense Nucl. Acid Drug Dev.* 9:459-464; Verthelyi *et al.* (2001) *J. Immunol.* 166:2372-2377; WO 01/15726; WO 01/12223; WO 01/22972; WO 01/22990; WO 01/35991; WO 01/51500; WO 01/54720; Patentes U.S. 6,174,872, 6,194,388, 6,207,646, 6,214,806, 6,218,371, 6,239,116. Veja-se também, WO 01/12804; WO 01/45750; WO 01/55341; WO 01/55370; WO 01/62207; WO 01/68077; WO 01/68078; WO 01/68103; WO 01/68116; WO 01/68117; WO 01/68143; WO 01/68144; WO 01/72123; WO 01/76642; WO 01/83503; WO 01/93902; WO 02/026757; WO 02/052002; WO 02/069369; WO 02/074922; Patentes U.S. 6,339,068, 6,406,705, 6,426,334, 6,426,336, 6,429,199, 6,476,000.

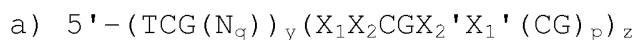
Os polinucleótidos imunomoduladores incluem geralmente uma sequência CG. Os nucleótidos flanqueando o CG de um PIM parecem também ter um papel na actividade imunomoduladora do polinucleótido. Permanece a necessidade de identificação continuada de polinucleótidos imunomoduladores.

DIVULGAÇÃO DO INVENTO

O presente invento refere-se a polinucleótidos imunomoduladores (PIM) e à modulação de respostas imunitárias em indivíduos utilizando estes polinucleótidos, particularmente humanos.

Num aspecto, o presente invento proporciona polinucleótidos imunomoduladores. Em certas concretizações, o presente invento inclui composições imunomoduladoras que compreendem qualquer um dos polinucleótidos imunomoduladores do presente invento. As composições podem também incluir, por exemplo, um excipiente farmacologicamente aceitável ou qualquer um de uma variedade de outros componentes, tais como um antigénio.

Em particular, o presente invento proporciona um polinucleótido imunomodulador compreendendo:



em que N são nucleósidos, $y=1$, $p=0$ ou 1 , $q=0$, 1 ou 2 , e $z=2-20$, X_1 e X_1' são nucleósidos auto-complementares, X_2 e X_2' são nucleósidos auto-complementares, e em que o T 5' da sequência $(TCG(N_q))_y$ está na extremidade 5' do polinucleótido; e

b) uma sequência palindrômica de pelo menos 8 bases de comprimento em que a sequência palindrômica compreende a primeira $(X_1X_2CGX_2'X_1')$ das sequências $(X_1X_2CGX_2'X_1'(CG)_p)_z$.

É também descrito aqui um polinucleótido imunomodulador que compreende (a) uma sequência palindrômica compreendendo pelo menos dois dinucleótidos CG, em que os dinucleótidos CG estão separados por 0, 1, 2, 3, 4 ou 5 bases e em que a sequência palindrômica tem pelo menos 8 bases de comprimento; e (b) uma $(TCG)_y$, em que y é 1 ou 2, em que o T 5' da $(TCG)_y$ está posicionado a 0, 1, 2 ou 3 bases da extremidade 5' do polinucleótido e em que a $(TCG)_y$ está separada da extremidade 5' da sequência palindrômica por 0, 1 ou 2 bases. Nalguns polinucleótidos imunomoduladores do presente invento, descritos neste parágrafo ou noutro local neste pedido, a sequência palindrômica tem uma composição de bases de menos de dois terços de G e C. Nalgumas concretizações, a sequência palindrômica tem uma composição em bases de mais de um terço de A e T.

É também aqui descrito um polinucleótido imunomodulador que compreende (a) uma sequência palindrômica compreendendo pelo menos dois dinucleótidos CG, em que os dinucleótidos CG estão separados por 0, 1, 2, 3, 4 ou 5 bases e em que a sequência palindrômica tem pelo menos 8 bases de comprimento; e (b) uma sequência $(TCG)_y$, em que y tem 1 ou 2, em que o T 5' da sequência $(TCG)_y$ está posicionado a 0, 1, 2 ou 3 bases da extremidade 5' do polipéptido, e ainda em que a sequência palindrômica de (a) inclui toda ou parte da sequência $(TCG)_y$ e em que um CG da sequência $(TCG)_y$ pode ser um dos dinucleótidos CG da sequência palindrômica de (a).

É também aqui descrito um polinucleótido imunomodulador que compreende (a) $5'-N_x(TCG(N_q))_yN_w(X_1X_2CGX_2'X_1'(CG)_p)_z$ (SEQ ID NO:156) em que N são nucleósidos, $x=0-3$, $y=1-4$, $w=-2, -1, 0, 1$ ou 2 , $p=0$ ou 1 , $q=0, 1$ ou 2 , e $z=1-20$, X_1 e X_1' são nucleósidos auto-complementares, X_2 e X_2' são nucleósidos auto-complementares, e em que o T 5' da sequência $(TCG(N_q))_y$ está a 0-3 bases da extremidade 5' do polinucleótido; e (b) uma sequência palindrômica de pelo menos 8 bases de comprimento em que a sequência palindrômica compreende a primeira $(X_1X_2CGX_2'X_1')$ das sequências $(X_1X_2CGX_2'X_1'(CG)_p)_z$. Nalguns casos, X_1 e X_2 são cada um A ou T. Num PIM com $w=-1$, a base 3' da sequência $(TCG(N_q))_y$ é o X_1 5' da primeira sequência $(X_1X_2CGX_2'X_1'(CG)_p)$. Num PIM com $w=-2$, a penúltima (*i.e.*, antes da final) e a última (*i.e.*, a final) bases 3' da sequência $(TCG(N_q))_y$ são o X_1 e X_2 5', respectivamente, da primeira sequência $(X_1X_2CGX_2'X_1'(CG)_p)$.

Também aqui descrito está um polinucleótido imunomodulador que compreende (a) $5'-N_x(TCG(N_q))_yN_w(X_1X_2CGX_3X_3'CGX_2'X_1'(CG)_p)_z$ (SEQ ID NO:159) em que N são nucleósidos, $x=0-3$, $y=1-4$, $w=-2, -1, 0, 1$ ou 2 , $p=0$ ou 1 , $q=0, 1$ ou 2 , e $z=1-20$, X_1 e X_1' são nucleósidos auto-complementares, X_2 e X_2' são nucleósidos auto-complementares, X_3 e X_3' são nucleósidos auto-complementares e em que o T 5' da sequência $(TCG(N_q))_y$ está a 0-3 bases da extremidade 5' do polinucleótido; e (b) uma sequência palindrômica de pelo menos 10 bases de comprimento em que a sequência palindrômica compreende a primeira $(X_1X_2CGX_3X_3'CGX_2'X_1')$ (SEQ ID NO:216) das sequências $(X_1X_2CGX_3X_3'CGX_2'X_1'(CG)_p)_z$ (SEQ ID NO:217). Nalguns casos, quando $p=1$, X_1 , X_2 , e X_3 são cada um A ou T. Nalguns casos, quando $p=0$, pelo menos dois de X_1 , X_2 e X_3 são A ou T.

É também aqui descrito um polinucleótido imunomodulador que compreende (a) $5'-N_x(TCG(N_q))_yN_w(X_1X_2X_3X_4X_5CGX_5'X_4'X_3'X_2'X_1'(CG)_p)_z$ (SEQ ID NO:160) em que N são nucleósidos, $x=0-3$, $y=1-4$, $w=-3, -2, -1, 0, 1$ ou 2 , $p=0$ ou 1 , $q=0, 1$ ou 2 , e $z=1-20$, X_1 e X_1' são nucleósidos auto-complementares, X_2 e X_2' são nucleósidos auto-complementares, X_3 e X_3' são nucleósidos auto-complementares, X_4 e X_4' são nucleósidos auto-complementares, X_5 e X_5' são nucleósidos auto-complementares, e em que o T 5' da sequência $(TCG(N_q))_y$ está a 0-3 bases da extremidade 5' do polinucleótido; e (b) uma sequência palindrômica de pelo menos

12 bases de comprimento em que a sequência palindrômica compreende a primeira $(X_1X_2X_3X_4X_5CGX_5'X_4'X_3'X_2'X_1')$ (SEQ ID NO:218) das sequências $(X_1X_2X_3X_4X_5CGX_5'X_4'X_3'X_2'X_1'(CG)_p)_z$ (SEQ ID NO:219). Nalguns casos, pelo menos três de X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , e X_5 são A ou T.

É também aqui descrito um polinucleótido imunomodulador que compreende (a) $5'-N_x(TCG(N_q))_yN_w(CGX_1X_1'CG(CG)_p)_z$ (SEQ ID NO:161) em que N são nucleósidos, $x=0-3$, $y=1-4$, $w=-2, 0, 1$ ou 2 , $p=0$ ou 1 , $q=0, 1$ ou 2 , e $z=1-20$, em que X_1 e X_1' são nucleósidos auto-complementares e em que o T 5' da sequência $(TCG(N_q))_y$ está a 0-3 bases da extremidade 5' do polinucleótido; e (b) uma sequência palindrômica com pelo 8 bases de comprimento em que a sequência palindrômica compreende a primeira $(CGX_1X_1'CG)$ das sequências $(CGX_1X_1'CG(CG)_p)_z$.

É também aqui descrito um polinucleótido imunomodulador que compreende (a) $5'-N_x(TCG(N_q))_yN_w(X_1CGCGX_1'(CG)_p)$ (SEQ ID NO:162) em que N são nucleósidos, $x=0-3$, $y=1-4$, $w=-1, 0, 1$ ou 2 , $p=0$ ou 1 , $q=0, 1$ ou 2 , e $z=1-20$, X_1 e X_1' são nucleósidos auto-complementares e em que o T 5' da sequência $(TCG(N_q))_y$ está a 0-3 bases da extremidade 5' do polinucleótido; e (b) uma sequência palindrômica de pelo 8 bases de comprimento em que a sequência palindrômica compreende a primeira (X_1CGCGX_1') das sequências $(X_1CGCGX_1'(CG)_p)_z$.

É também aqui descrito um polinucleótido imunomodulador que compreende (a) $5'-N_x(TCG(N_q))_yN_w(X_1X_2CGCGX_2'X_1'(CG)_p)_z$ (SEQ ID NO:163) em que N são nucleósidos, $x=0-3$, $y=1-4$, $w=-2, -1, 0, 1$ ou 2 , $p=0$ ou 1 , $q=0, 1$ ou 2 , e $z=1-20$, X_1 e X_1' são nucleósidos auto-complementares, X_2 e X_2' são nucleósidos auto-complementares, e em que o T 5' da sequência $(TCG(N_q))_y$ está a 0-3 bases da extremidade 5' do polinucleótido; e (b) uma sequência palindrômica de pelo menos 8 bases de comprimento em que a sequência palindrômica compreende a primeira $(X_1X_2CGCGX_2'X_1')$ das sequências $(X_1X_2CGCGX_2'X_1'(CG)_p)_z$ (SEQ ID NO:220). Nalguns casos, X_1 e X_2 são cada um A ou T.

É aqui também descrito um polinucleótido imunomodulador que compreende (a) $5'-N_x(TCG(N_q))_yN_w(X_1X_2X_3CGCGX_3'X_2'X_1'(CG)_p)_z$

(SEQ ID NO:164) em que N são nucleósidos, $x=0-3$, $y=1-4$, $w=-3, -2, -1, 0, 1$ ou 2 , $p=0$ ou 1 , $q=0, 1$ ou 2 , e $z=1-20$, X_1 e X_1' são nucleósidos auto-complementares, X_2 e X_2' são nucleósidos auto-complementares, X_3 e X_3' são nucleósidos auto-complementares, e em que o T 5' da sequência $(TCG(N_q))_y$ está a 0-3 bases da extremidade 5' do polinucleótido; e (b) uma sequência palindrômica de pelo menos 10 bases de comprimento em que a sequência palindrômica compreende a primeira $(X_1X_2X_3CGCGX_3'X_2'X_1')$ (SEQ ID NO:221) das sequências $(X_1X_2X_3CGCGX_3'X_2'X_1'(CG)_p)_z$ (SEQ ID NO:222). Nalguns casos, quando $p=1$, X_1 , X_2 , e X_3 são cada um A ou T. Nalguns casos, quando $p=0$, pelo menos dois de X_1 , X_2 , e X_3 são A ou T.

É também aqui descrito um polinucleótido imunomodulador que compreende (a) $5'-N_x(TCG(N_q))_yN_w(CGX_1X_2X_2'X_1'CG(CG)_p)_z$ (SEQ ID NO:165) em que N são nucleósidos, $x=0-3$, $y=1-4$, $w=-2, 0, 1$ ou 2 , $p=0$ ou 1 , $q=0, 1$ ou 2 , e $z=1-20$, X_1 e X_1' são nucleósidos auto-complementares, X_2 e X_2' são nucleósidos auto-complementares, e em que o T 5' da sequência $(TCG(N_q))_y$ está a 0-3 bases da extremidade 5' do polinucleótido; e (b) uma sequência palindrômica de pelo menos 8 bases de comprimento em que a sequência palindrômica compreende a primeira $(CGX_1X_2X_2'X_1'CG)$ das sequências $(CGX_1X_2X_2'X_1'CG(CG)_p)_z$ (SEQ ID NO:223). Nalguns casos, X_1 e X_2 são cada um A ou T.

Noutro aspecto, o presente invento proporciona um polinucleótido imunomodulador do presente invento para utilizar em modulação de uma resposta imunitária num indivíduo. Um polinucleótido imunomodulador do presente invento é administrado a um indivíduo numa quantidade suficiente para modular uma resposta imunitária no referido indivíduo. A imunomodulação de acordo com o presente invento pode ser praticada em indivíduos incluindo os que sofrem de um distúrbio associado a uma resposta imunitária de tipo Th2 (p.ex., alergias, asma induzida por alergia ou dermatite atópica), indivíduos que recebem vacinas tais como vacinas terapêuticas (p.ex., vacinas compreendendo um epítipo de alergia, um epítipo micobacteriano ou um epítipo associado a um tumor) ou vacinas profiláticas, indivíduos com cancro e indivíduos possuindo uma doença infecciosa.

Noutro aspecto, o presente invento proporciona um polinucleótido imunomodulador do presente invento para utilizar no aumento de interferência gama (IFN- γ) num indivíduo. É administrada ao referido indivíduo uma quantidade eficaz de um polinucleótido imunomodulador do presente invento. A administração de um polinucleótido imunomodulador de acordo com o presente invento aumenta o IFN- γ no indivíduo.

Noutro aspecto, o presente invento proporciona um polinucleótido imunomodulador do presente invento para utilizar no aumento de interferência alfa (IFN- α) num indivíduo. É administrada ao referido indivíduo uma quantidade eficaz de um polinucleótido imunomodulador do presente invento. A administração de um polinucleótido imunomodulador de acordo com o presente invento aumenta o IFN- α no indivíduo.

Noutro aspecto, o presente invento proporciona um polinucleótido imunomodulador do presente invento para utilizar no melhoramento de um ou mais sintomas de uma doença infecciosa. É administrada uma quantidade eficaz de um polinucleótido imunomodulador do presente invento a um indivíduo possuindo uma doença infecciosa. A administração de um polinucleótido imunomodulador de acordo com o presente invento melhora um ou mais sintomas da doença infecciosa.

Noutro aspecto, o presente invento proporciona um polinucleótido imunomodulador do presente invento para utilizar no melhoramento de um ou mais sintomas de um distúrbio relacionado com IgE. É administrada uma quantidade eficaz de um polinucleótido imunomodulador do presente invento a um indivíduo possuindo um distúrbio relacionado com IgE. A administração de um polinucleótido imunomodulador de acordo com o presente invento melhora um ou mais sintomas do distúrbio relacionado com IgE. O presente invento proporciona também a utilização de um polinucleótido imunomodulador do presente invento para o fabrico de um medicamento para tratamento de asma e um polinucleótido imunomodulador do presente invento para utilizar no tratamento de asma.

São também aqui descritos estojos, de preferência para realizar o presente invento. Os estojos compreendem geralmente um polinucleótido imunomodulador do presente invento

(geralmente num recipiente adequado), e podem ainda conter instruções para a utilização do polinucleótido imunomodulador em imunomodulação de um indivíduo.

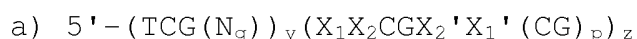
BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Fig. 1 é um gráfico representando a quantidade de IFN- α produzida (pg/ml) a partir de PBMC humanas em resposta a doses variáveis de quatro PIM diferentes: SEQ ID NO:1, 27, 113 e 172.

A Fig. 2 contém gráficos representando a actividade lítica de células NK estimulada por PIM.

MODOS DE REALIZAÇÃO DO INVENTO

Determinámos polinucleótidos imunomoduladores e métodos para modulação de respostas imunitárias em indivíduos, particularmente seres humanos, utilizando estes polinucleótidos imunomoduladores. As composições do presente invento compreendem um polinucleótido imunomodulador do presente invento. Os polinucleótidos imunomoduladores do presente invento incluem:



em que N são nucleósidos, $y=1$, $p=0$ ou 1 , $q=0$, 1 ou 2 , e $z=2-20$, X_1 e X_1' são nucleósidos auto-complementares, X_2 e X_2' são nucleósidos auto-complementares, e em que o T 5' da sequência $(TCG(N_q))_y$ está na extremidade 5' do polinucleótido; e

b) uma sequência palindrômica de pelo menos 8 bases de comprimento em que a sequência palindrômica compreende a primeira $(X_1X_2CGX_2'X_1')$ das sequências $(X_1X_2CGX_2'X_1'(CG)_p)_z$.

Verificámos que os polinucleótidos imunomoduladores do presente invento modulam eficientemente células imunitárias, incluindo células humanas, numa variedade de modos. Observámos que os polinucleótidos imunomoduladores do presente invento podem estimular eficazmente a produção de citocinas, incluindo interferões de tipo I, tais como IFN- α e IFN- ω , e IFN- γ , a partir de células humanas. Observámos também que os polinucleótidos imunomoduladores do presente invento podem estimular eficazmente células B a proliferar. Observámos que alguns dos polinucleótidos imunomoduladores do presente

invento activam células dendríticas plasmacitóides a sofrer maturação. Observámos também que a presença de alguns dos polinucleótidos imunomoduladores do presente invento pode resultar no retardamento da apoptose de células dendríticas plasmacitóides em cultura.

O presente invento proporciona também um polinucleótido imunomodulador do presente invento para utilização na modulação de uma resposta imunitária num indivíduo. É administrado ao indivíduo um polinucleótido imunomodulador do presente invento. São ainda descritos estojos compreendendo os PIM do presente invento. Os estojos podem ainda compreender instruções para administração de um polinucleótido imunomodulador do presente invento para imunomodulação num sujeito e polinucleótidos imunomoduladores.

Técnicas Gerais

A prática do presente invento empregará, a menos que indicado em contrário, técnicas convencionais de biologia molecular (incluindo técnicas recombinantes), microbiologia, biologia celular, bioquímica e imunologia, que estão dentro da perícia na especialidade. Tais técnicas são completamente explicadas na literatura, tal como em, "*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*", segunda edição (Sambrook et al., 1989); "*Oligonucleotide Synthesis*" (M.J. Gait, ed., 1984); "*Animal Cell Culture*" (R.I. Freshney, ed., 1987); "*Handbook of Experimental Immunology*", (D.M. Weir & C.C. Blackwell, eds.); "*Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells*" (J.M. Miller & M.P. Calos, eds., 1987); "*Current Protocols in Molecular Biology*" (F.M. Ausubel et al., eds., 1987); "*PCR: The Polymerase Chain Reaction*", (Mullis et al., eds., 1994); "*Current Protocols in Immunology*" (J.E. Coligan et al., eds., 1991); "*The Immunoassay Handbook*" (D. Wild, ed., Stockton Press NY, 1994); "*Bioconjugate Techniques*" (Greg T. Hermanson, ed., Academic Press, 1996); e "*Methods of Immunological Analysis*" (R. Masseyeff, W.H. Albert, e N.A. Staines, eds., Weinheim: VCH Verlags gesellschaft mbH, 1993).

Definições

Tal como aqui se utiliza, a forma singular “um”, “uma” e “o” e “a” incluem referências plurais a menos que indicado em contrário. Por exemplo, “um” PIM inclui um ou mais PIM.

Tal como aqui se utilizam indiferentemente, os termos “polinucleótido” e “oligonucleótido” incluem ADN de cadeia simples (ADNcs), ADN de cadeia dupla (ADNcd), ARN de cadeia simples (ARNcs) e ARN de cadeia dupla (ARNcd), oligonucleótidos modificados e oligonucleósidos ou combinações destes. O oligonucleótido pode estar configurado linearmente ou circularmente ou o oligonucleótido pode conter segmentos tanto lineares como circulares. Os oligonucleótidos são polímeros de nucleósidos unidos, geralmente, através de ligações fosfodiéster, embora ligações alternativas, tais como ésteres de fosforotioato possam também ser utilizadas nos oligonucleótidos. Um nucleósido consiste numa base purina (adenina (A) ou guanina (G) ou derivado desta) ou pirimidina (timidina (T), citosina (C) ou uracilo (U), ou derivado desta) ligada a um açúcar. As quatro unidades nucleosídicas (ou bases) no ADN são designadas desoxiadenosina, desoxiguanosina, desoxitimidina, e desoxicitidina. Um nucleótido é um éster de fosfato de um nucleósido.

O termo “polinucleótido imunomodulador” ou “PIM” tal como aqui se utiliza refere-se a um polinucleótido que efectua e/ou contribui para uma resposta imunitária mensurável medida *in vitro*, *in vivo* e/ou *ex vivo*. Exemplos de respostas imunitárias mensuráveis incluem, mas não se limitam à produção de anticorpos específicos do antigénio, secreção de citocinas, activação ou expansão de populações de linfócitos tais como células NK, linfócitos T CD4+, linfócitos T CD8+, linfócitos B e semelhantes. De preferência, as sequências de PIM activam preferencialmente uma resposta de tipo Th1.

O termo “imunomodulador” ou “modulador de uma resposta imunitária” tal como aqui se utiliza inclui efeitos imunoestimuladores bem como imunossuppressores. A imunomodulação é primariamente uma alteração qualitativa numa resposta imunitária global, embora possam também ocorrer alterações quantitativas em conjunto com a imunomodulação. Uma

resposta imunitária que seja imunomodulada de acordo com o presente invento é uma que é mudada para uma resposta imunitária "de tipo Th1", em oposição a uma resposta imunitária de "tipo Th2". As respostas de tipo Th1 são tipicamente consideradas respostas do sistema imunitário celular (p.ex., linfócitos citotóxicos), enquanto as respostas de tipo Th2 são geralmente "humorais", ou baseadas em anticorpos. As respostas imunitárias de tipo Th1 são normalmente caracterizadas por reacções de "hipersensibilidade de tipo retardado" a um antigénio e podem ser detectadas ao nível bioquímico através de níveis aumentados de citocinas associadas a Th1 tais como IFN- γ , IFN- α , IL-2, IL-12, e TNF- β , bem como IL-6, embora IL-6 possa também estar associada a respostas de tipo Th2. As respostas imunitárias de tipo Th1 estão geralmente associadas à produção de linfócitos citotóxicos (CTL) e baixos níveis de produção transiente de anticorpo. As respostas imunitárias de tipo Th2 estão geralmente associadas a níveis mais elevados de produção de anticorpos, incluindo produção de IgE, uma ausência ou produção mínima de CTL, bem como expressão de citocinas associadas a Th2 tais como IL-4. Assim, a imunomodulação de acordo com o presente invento pode ser reconhecida através, por exemplo, de um aumento em IFN- γ e/ou IFN- α e/ou uma diminuição na produção de IgE num indivíduo tratado de acordo com o presente invento em comparação com a ausência de tratamento.

O termo "3'" refere-se genericamente a uma região ou posição num polinucleótido ou oligonucleótido a 3' (jusante) de outra região ou posição no mesmo polinucleótido ou oligonucleótido. O termo "extremidade 3'" refere-se ao terminal 3' do polinucleótido.

O termo "5'" refere-se genericamente a uma região ou posição num polinucleótido ou oligonucleótido a 5' (montante) de outra região ou posição no mesmo polinucleótido ou oligonucleótido. O termo "extremidade 5'" refere-se ao terminal 5' do polinucleótido.

Uma região, porção ou sequência que está "adjacente" a outra sequência une-se directamente a essa região, porção ou sequência. Por exemplo, uma sequência polinucleotídica

adicional (p.ex., um trinucleótido TCG) que está adjacente a uma determinada porção de um polinucleótido imunomodulador une-se directamente a essa região.

O termo "sequência palindrômica" ou "palíndroma" refere-se a uma sequência de ácido nucleico que é uma repetição invertida, p.ex., ABCDD'C'B'A', onde as bases, p.ex., A e A', B e B', C e C', D e D', são capazes de formar os pares de bases de Watson-Crick. Tais sequências podem ser de cadeia simples ou podem formar estruturas de cadeia dupla ou podem formar estruturas em "gancho de cabelo" sob certas condições. Por exemplo, tal como aqui se utiliza, "um palíndroma de 8 bases" refere-se a uma sequência de ácido nucleico na qual a sequência palindrômica tem 8 bases de comprimento, tal como ABCDD'C'B'A'. Uma sequência palindrômica pode fazer parte de um polinucleótido que contenha também sequências não palindrômicas. Um polinucleótido pode conter uma ou mais porções com sequência palindrômica e uma ou mais porções com sequência não palindrômica. Alternativamente, uma sequência polinucleotídica pode ser inteiramente palindrômica. Num polinucleótido com mais de uma porção com sequência palindrômica, as porções com sequência palindrômica podem sobrepor-se umas às outras ou as porções com sequência palindrômica podem não se sobrepor umas às outras.

O termo "conjugado" refere-se a um complexo no qual estão ligados um PIM e um antigénio. Tais ligações de conjugado incluem ligações covalentes e/ou não covalentes.

O termo "antigénio" significa uma substância que é reconhecida e à qual se liga especificamente um anticorpo ou um receptor de antigénio de células T. Os antigénios podem incluir péptidos, proteínas, glicoproteínas, polissacáridos, hidratos de carbono complexos, açúcares, gangliósidos, lípidos e fosfolípidos; porções destes e combinações destes. Os antigénios podem ser os verificados na natureza ou podem ser sintéticos. Antigénios adequados para administração com PIM incluem qualquer molécula capaz de desencadear uma resposta de células B ou células T específica do antigénio. De preferência, os antigénios desencadeiam uma resposta de anticorpos específica para o antigénio. Os haptenos estão incluídos dentro do âmbito de "antigénio". Um hapteno é um

composto de baixo peso molecular que não é imunogénico por si próprio mas que se torna imunogénico quando conjugado com uma molécula imunogénica contendo determinantes antigénicos. Moléculas pequenas podem necessitar de ser haptenizadas para serem tornadas antigénicas. De preferência, os antigénios do presente invento incluem péptidos, lípidos (p.ex., esteróides, ácidos gordos e fosfolípidos), polissacáridos tais como os utilizados em vacinas de *Hemophilus influenza*, gangliósidos e glicoproteínas.

“Adjuvante” refere-se a uma substância que, quando adicionada a um agente imunogénico tal como um antigénio, aumenta de modo não específico ou potencia uma resposta imunitária ao agente no hospedeiro receptor após exposição à mistura.

O termo “péptido” designa polipéptidos que têm comprimento suficiente e composição para efectuar uma resposta biológica, p.ex., produção de anticorpos ou actividade de citocinas seja o péptido um hapteno ou não. Tipicamente, os péptidos têm pelo menos seis resíduos de aminoácidos de comprimento. O termo “péptido” inclui ainda aminoácidos modificados (de ocorrência natural ou não natural), incluindo tais modificações, mas não se limitando a, fosforilação, glicosilação, “peguilação”, lipidação e metilação.

Os “péptidos antigénicos” podem incluir péptidos nativos purificados, péptidos sintéticos, proteínas recombinantes, extractos proteicos brutos, vírus atenuados ou inactivados, células, microrganismos ou fragmentos de tais péptidos. Um “péptido antigénico” ou “polipéptido antigénico” significa assim a totalidade ou uma porção de um polipéptido que exhibe uma ou mais propriedades antigénicas. Assim, por exemplo, um “polipéptido antigénico Amb a 1” ou “antigénio polipeptídico Amb a 1” é uma sequência de aminoácidos de Amb a 1, seja a sequência inteira, uma porção da sequência, e/ou uma modificação da sequência, que exhibe uma propriedade antigénica (i.e., liga-se especificamente a um anticorpo ou a um receptor de células T).

Uma “molécula de entrega” ou “veículo de entrega” é uma porção química que facilita, permite, e/ou aumenta a entrega

de um polinucleótido imunomodulador a um determinado local e/ou em relação a um determinado momento. Um veículo de entrega pode ou não estimular adicionalmente uma resposta imunitária.

Uma “resposta alérgica ao antigénio” significa uma resposta imunitária geralmente caracterizada pela criação de eosinófilos e/ou IgE específica do antigénio e seus efeitos resultantes. Tal como é bem conhecido na especialidade, a IgE liga-se a receptores de IgE nos mastócitos e basófilos. Após posterior exposição ao antigénio reconhecido pela IgE, o antigénio liga-se de forma cruzada à IgE nos mastócitos e basófilos causando desgranulação destas células, incluindo, mas não se limitando a, libertação de histamina. Entende-se e pretende-se que os termos “resposta alérgica ao antigénio”, “alergia” e “condição alérgica” sejam igualmente apropriados para a aplicação do presente invento. Mais, entende-se e pretende-se que as utilizações do presente invento incluam as que são igualmente apropriadas para prevenção de uma resposta alérgica bem como tratamento de uma condição alérgica preexistente.

Tal como aqui se utiliza, o termo “alergénio” significa um antigénio ou porção antigénica de uma molécula, habitualmente uma proteína, que desencadeia uma resposta alérgica após exposição a um sujeito. Tipicamente o sujeito é alérgico ao alergénio tal como indicado, por exemplo, pelo teste de pápulas e vermelhidão ou qualquer outro método conhecido na especialidade. Uma molécula é referida como sendo um alergénio mesmo se apenas um pequeno subconjunto de sujeitos exibir uma resposta imunitária alérgica (p.ex., IgE) após exposição à molécula. São conhecidos na especialidade vários alergénios isolados. Estes incluem, mas não se limitam aos proporcionados na Tabela 1 aqui.

O termo “dessensibilização” refere-se ao processo de administração de doses crescentes de um alergénio ao qual o sujeito demonstrou sensibilidade. Exemplos de doses de alergénio utilizadas para dessensibilização são conhecidos na especialidade, ver, por exemplo, Fornadley, *Otolaryngol. Clin. North Am.* 31: 111-127, 1998.

“Imunoterapia específica do antígeno” refere-se a qualquer forma de imunoterapia que envolva o antígeno e gere uma modulação da resposta imunitária específica do antígeno. No contexto de alergia, a imunoterapia específica do antígeno inclui, mas não se limita a, terapia de dessensibilização.

O termo “microtransportador” refere-se a uma composição particulada que é insolúvel em água e que tem um tamanho de menos de cerca de 150, 120 ou 100 μm , de preferência menos de cerca de 50-60 μm , de preferência menos de cerca de 10 μm , de preferência menos de cerca de 5, 2,5, 2 ou 1,5 μm . Os microtransportadores incluem “nanotransportadores”, que são microtransportadores possuindo um tamanho de menos de cerca de 1 μm , de preferência menos de cerca de 500 nm. Os microtransportadores incluem partículas de fase sólida tais como partículas formadas a partir de polímeros biocompatíveis de ocorrência natural, polímeros sintéticos ou copolímeros sintéticos, embora microtransportadores formados a partir de agarose ou agarose reticulada possam estar incluídos ou excluídos da definição de microtransportadores daqui bem como outros materiais biodegradáveis conhecidos na especialidade. Os microtransportadores para utilizar no presente invento podem ser microtransportadores biodegradáveis ou não biodegradáveis. Os microtransportadores não biodegradáveis de fase sólida são formados por polímeros ou outros materiais que não são erodíveis e/ou não degradáveis sob condições fisiológicas de mamífero, tais como poliestireno, polipropileno, sílica, cerâmica, poliacrilamida, ouro, látex, hidroxiapatite, dextrano e materiais ferromagnéticos e paramagnéticos. Os microtransportadores biodegradáveis de fase sólida podem ser formados a partir de polímeros que são degradáveis (p.ex., poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico) e copolímeros destes) ou erodíveis (p.ex., poli(orto-ésteres tais como 3,9-dietilideno-2,4,8,10-tetraoxaespиро[5.5]undecano (DETOSU) ou poli(anidridos), tais como poli(anidridos) de ácido sebácico) sob condições fisiológicas de mamífero. Os microtransportadores podem também estar em fase líquida (p.ex., baseados em óleos ou lípidos), tais lipossomas, ISCOM (complexos imunoestimuladores, que são complexos estáveis de colesterol, fosfolípidos e saponina com adjuvante activo) sem antígeno, ou gotículas ou micelas verificadas em emulsões de óleo em água ou de água em óleo. Os microtransportadores

biodegradáveis de fase líquida incorporam tipicamente um óleo biodegradável, vários dos quais são conhecidos na especialidade, incluindo esqualeno e óleos vegetais. Os microtransportadores são tipicamente de forma esférica, mas microtransportadores que se desviem da forma esférica são também aceitáveis (p.ex., elipsoidais, bastonetes, etc.). Devido à sua natureza insolúvel (em relação à água), os microtransportadores são filtráveis da água e de soluções baseadas em água (aquosas).

O termo "não biodegradáveis", tal como aqui se utiliza, refere-se a um microtransportador que não é degradado ou erodido sob composições fisiológicas normais de mamífero. Geralmente, um microtransportador é considerado não biodegradável se não for degradado (*i.e.*, perder menos de 5% da sua massa ou comprimento médio do polímero) após uma incubação de 72 horas a 37°C em soro humano normal.

Um microtransportador é considerado "biodegradável" se for degradável ou erodível sob condições fisiológicas normais de mamífero. Geralmente, um microtransportador é considerado biodegradável se for degradado (*i.e.*, perder pelo menos 5% da sua massa ou comprimento médio do polímero) após uma incubação de 72 horas a 37°C em soro humano normal.

O "tamanho" de um microtransportador é geralmente o "tamanho de desenho" ou tamanho pretendido das partículas indicado pelo fabricante. O tamanho pode ser uma dimensão medida directamente, tal como o diâmetro médio ou máximo, ou pode ser determinado através de um ensaio indirecto tal como um ensaio de pesquisa por filtração. A medição directa do tamanho do microtransportador é tipicamente realizada através de microscopia, geralmente microscopia óptica ou microscopia electrónica de varrimento (MEV), em comparação com partículas de tamanho conhecido ou através de referência a um micrómetro. Uma vez que surgem variações menores no tamanho durante o processo de fabrico, os microtransportadores são considerados como sendo de um tamanho indicado se as medições mostrarem que os microtransportadores têm $\pm$ cerca de 5-10% da medida indicada. As características do tamanho podem também ser determinadas através de técnicas de dispersão dinâmica de luz ou de obscuridade. Alternativamente, o tamanho do

microtransportador pode ser determinado através de ensaios de pesquisa por filtração. Um microtransportador tem menos que o tamanho afirmado se pelo menos 97% das partículas passam através de um filtro "de tipo ecrã" (i.e., um filtro no qual as partículas retidas estão à superfície do filtro, tais como filtros de policarbonato ou poliéter-sulfona, em oposição a um "filtro de profundidade" no qual as partículas retidas se alojam dentro do filtro) com o tamanho indicado. Um microtransportador tem mais que o tamanho indicado se pelo menos cerca de 97% das partículas do microtransportador ficarem retidas por um filtro de tipo ecrã do tamanho indicado. Assim, pelo menos cerca de 97% dos microtransportadores com cerca de 10 μm a cerca de 10 nm de tamanho passam através de um filtro de ecrã com poro de 10 μm e são retidos por um filtro de ecrã de 10 nm.

Tal como a discussão acima indica, a referência a um tamanho ou intervalo de tamanhos para um microtransportador inclui implicitamente variações aproximadas e aproximações do tamanho e/ou intervalo de tamanhos indicado. Isto é reflectido através da utilização do termo "cerca" quando se refere a um tamanho e/ou intervalo de tamanhos e a referência a um tamanho ou intervalo de tamanhos sem referência a "cerca" não significa que o tamanho e/ou intervalo de tamanhos seja exacto.

O termo "complexo polinucleótido imunomodulador/microtransportador" ou "complexo PIM/MT" refere-se a um complexo de um polinucleótido imunomodulador e um microtransportador. Os componentes do complexo podem ser ligados covalentemente ou não covalentemente. As ligações não covalentes podem ser mediadas por qualquer força de ligação não covalente, incluindo através de interacção hidrófoba, ligação iónica (electrostática), pontes de hidrogénio e/ou atracções de van der Waals. No caso das ligações hidrófobas, a ligação é geralmente através de uma porção hidrófoba (p.ex., colesterol) ligada covalentemente ao PIM.

Um "indivíduo" é um vertebrado, tal como uma ave, e é de preferência um mamífero, de maior preferência um humano. Os mamíferos incluem, mas não se limitam a, humanos, primatas,

animais de quinta, animais de desporto, roedores e animais de estimação.

Uma “quantidade eficaz” ou uma “quantidade suficiente” de uma substância é a quantidade suficiente para ter resultados benéficos ou desejados, incluindo resultados clínicos e, como tal, uma “quantidade eficaz” depende do contexto em que está a ser aplicada. No contexto de administração de uma composição que modula uma resposta imunitária a um antigénio co-administrado, uma quantidade eficaz de um polinucleótido imunomodulador e um antigénio é uma quantidade suficiente para alcançar uma tal modulação em comparação com a resposta imunitária obtida quando o antigénio é administrado sozinho. Uma quantidade eficaz pode ser administrada numa ou mais administrações.

O termo “co-administração” tal como aqui se utiliza refere-se à administração de pelo menos duas substâncias diferentes suficientemente próximas no tempo para modular uma resposta imunitária. De preferência, a co-administração refere-se à administração simultânea de pelo menos duas substâncias diferentes.

“Estimulação” de uma resposta ou parâmetro inclui o desencadeamento e/ou a estimulação dessa resposta ou parâmetro. Por exemplo, a “estimulação” de uma resposta imunitária, tal como a resposta Th1, significa um aumento na resposta, que pode surgir do desencadeamento e/ou reforço de uma resposta. Semelhantemente, “estimulação” de uma citocina ou tipo celular (tal como CTL) significa um aumento na quantidade ou nível de citocina ou tipo celular. A “estimulação” de células B inclui, por exemplo, maior proliferação de células B, activação de células B induzidas e/ou maior produção de citocinas, tais como IL-6 e/ou TNF- α , a partir das células B estimuladas.

Um “distúrbio associado a IgE” é uma condição fisiológica que é caracterizada, em parte, por níveis elevados de IgE, que podem ou não ser persistentes. Distúrbios associados a IgE incluem, mas não se limitam a, alergia e reacções alérgicas, alergias alimentares, distúrbios relacionados com alergia (descritos abaixo), asma, rinite, dermatite atópica,

conjuntivite, urticária, choque, alergias a picada de *Hymenoptera*, e alergias a fármacos, e infecções parasitárias. O termo inclui também manifestações relacionadas destes distúrbios. Geralmente, a IgE em tais distúrbios é específica do antígeno.

Um "distúrbio relacionado com alergia" significa um distúrbio resultante dos efeitos de uma resposta imunitária de IgE específica do antígeno. Tais efeitos podem incluir, mas não se limitam a, hipotensão e choque. A anafilaxia é um exemplo de um distúrbio relacionado com alergia durante o qual a histamina libertada para a circulação causa vasodilatação bem como maior permeabilidade dos capilares com resultante perda marcada de plasma da circulação. A anafilaxia pode ocorrer sistemicamente, com os efeitos associados experimentados ao longo de todo o corpo, e pode ocorrer localmente, com a reacção limitada a um tecido ou órgão alvo específico.

O termo "doença viral", tal como aqui se utiliza, refere-se a uma doença que tem um vírus como seu agente etiológico. Exemplos de doenças virais incluem hepatite B, hepatite C, influenza, síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA), e herpes zóster.

Tal como aqui se utiliza e tal como é bem entendido na especialidade, "tratamento" é uma abordagem para obter resultados benéficos ou desejados, incluindo resultados clínicos. Para os fins deste invento, resultados clínicos benéficos ou desejados incluem, mas não se limitam a, alívio ou melhoria de um ou mais sintomas, diminuição da extensão da doença, estado estabilizado (*i.e.*, sem se agravar) da doença, prevenção da disseminação da doença, retardamento ou abrandamento da progressão da doença, melhoria ou palição do estado de doença, e remissão (parcial ou total), detectável ou indetectável. "Tratamento" pode também significar prolongamento da sobrevivência em comparação com a esperança de vida sem receber tratamento.

"Palição" de uma doença ou distúrbio significa que a extensão e/ou manifestações clínicas indesejáveis de um distúrbio ou um estado de doença são reduzidos e/ou é atrasado

ou prolongado o curso de tempo da progressão da doença, em comparação com o não tratamento do distúrbio. Especialmente no contexto de alergia, tal como é bem entendido pelos peritos na especialidade, a paliação pode ocorrer após modulação da resposta imunitária contra um ou mais alérgenos. Mais, a paliação não ocorre necessariamente através de administração de uma dose, mas ocorre frequentemente após administração de uma série de doses. Assim, uma quantidade suficiente para paliar uma resposta ou distúrbio pode ser administrada numa ou mais administrações.

Um "título de anticorpo", ou "quantidade de anticorpo", que é "desencadeada" por um polinucleótido imunomodulador e um antígeno refere-se à quantidade de um dado anticorpo medida num momento após a administração do polinucleótido imunomodulador e o antígeno.

Um "anticorpo associado a Th1" é um anticorpo cuja produção e/ou aumento está associado a uma resposta imunitária Th1. Por exemplo, IgG2a é um anticorpo associado a Th1 em ratinho. Para os fins deste invento, a medição de um anticorpo associado a Th1 pode ser a medição de um ou mais desses anticorpos. Por exemplo, em humano, a medição de um anticorpo associado a Th1 pode implicar a medição de IgG1 e/ou IgG3.

Um "anticorpo associado a Th2" é um anticorpo cuja produção e/ou aumento está associado a uma resposta imunitária Th2. Por exemplo, IgG1 é um anticorpo associado a Th2 em ratinho. Para os fins deste invento, a medição de um anticorpo associado a Th2 pode ser a medição de um ou mais desses anticorpos. Por exemplo, em humano, a medição de um anticorpo associado a Th2 pode implicar a medição de IgG2 e/ou IgG4.

"Suprimir" ou "inibir" uma função ou actividade, tal como a produção de citocinas, a produção de anticorpos ou a libertação de histamina, é reduzir a função ou actividade quando comparada com as mesmas condições excepto quanto a um parâmetro de interesse ou, alternativamente, em comparação com outra condição. Por exemplo, uma composição compreendendo um polinucleótido imunomodulador e um antígeno que suprima a libertação de histamina reduz a libertação de histamina em comparação, por exemplo, com a libertação de histamina

induzida pelo antigénio sozinho. Como outro exemplo, uma composição compreendendo um polinucleótido imunomodulador e um antigénio que suprima a produção de anticorpos reduz a extensão e/ou os níveis de anticorpos em comparação, por exemplo, com a extensão e/ou níveis de anticorpos produzidos pelo antigénio sozinho.

Uma “proteína sérica” é uma proteína que é normalmente verificada no soro de mamíferos sem doenças, particularmente bovinos sem doenças. A proteína sérica mais prevalente é a albumina do soro.

Tal como aqui se utiliza, o termo “compreendendo” e seus cognatos são utilizados no seu sentido inclusivo; isto é, equivalente ao termo “incluindo” e seus correspondentes cognatos.

Composições do invento

O presente invento proporciona polinucleótidos imunomoduladores (PIM) para modulação de respostas imunitárias em indivíduos. As composições do presente invento compreendem um polinucleótido imunomodulador do presente invento sozinho (ou uma combinação de dois ou mais polinucleótidos imunomoduladores do presente invento) ou em conjunto com outro agente imunomodulador, tal como um péptido, um antigénio (descrito abaixo) e/ou um adjuvante adicional. As composições do presente invento podem compreender um polinucleótido imunomodulador do presente invento e um excipiente farmacologicamente aceitável. Os excipientes farmacologicamente aceitáveis, incluindo tampões, são bem conhecidos na especialidade. *“Remington; The Science and Practice of Pharmacy”*, 20^a edição, Mack Publishing (2000).

Após administração, as composições compreendendo um antigénio, um polinucleótido imunomodulador do presente invento, e opcionalmente um adjuvante podem conduzir a uma potenciação de uma resposta imunitária ao antigénio e podem assim resultar numa maior resposta imunitária em comparação com a que resulta de uma composição compreendendo o PIM e o antigénio sozinhos. Os adjuvantes são conhecidos na especialidade e incluem, mas não se limitam a, emulsões de

óleo em água, emulsões de água em óleo, alúmen (sais de alumínio), lipossomas e micropartículas, incluindo mas não se limitam a, poliestireno, amido, polifosfazeno e polilactida/poliglicósidos. Outros adjuvantes adequados incluem também, mas não se limitam a, MF59, DETOXTM (Ribi), misturas de esqualeno (SAF-1), péptido de muramilo, derivados de saponina, preparações de parede celular de micobactérias, monofosforil-lípido A, derivados de ácido micólico, tensioactivos de copolímeros de blocos não iónicos, Quil A, subunidade B da toxina da cólera, polifosfazeno e derivados, e complexos imunoestimuladores (ISCOM) tais como os descritos por Takahashi et al., *Nature* 344: 873-875, 1990, bem como adjuvantes à base de lípidos e outros aqui descritos. Para utilização veterinária e para produção de anticorpos em animais, podem ser utilizados os componentes mitogénicos do adjuvante de Freund (completo e incompleto).

Os PIM do presente invento podem ser combinados com outras terapias para determinadas indicações. Por exemplo, para além de um PIM, as composições do presente invento podem compreender também fármacos anti-malária tais como cloroquina para pacientes de malária, fármacos leishmanicidas tais como pentamidina e/ou alopurinol para pacientes de leishmaniose, fármacos antimicobacterianos tais como isoniazida, rifampina e/ou etambutol para pacientes de tuberculose, ou reagentes de dessensibilização a alergénios para pacientes (de alergia) atópicos.

Tal como aqui descrito, as composições do presente invento podem incluir PIM e podem ainda compreender um ou mais agentes imunoterapêuticos (*i.e.*, um agente que actue através do sistema imunitário e/ou seja derivado do sistema imunitário) incluindo, mas não se limitando a, citocina, adjuvantes e anticorpos. Exemplos de anticorpos terapêuticos incluem os utilizados no contexto de cancro (*p.ex.*, anticorpos antitumorais), tais como os descritos abaixo.

Polinucleótidos imunomoduladores

Nos parágrafos seguintes, polinucleótidos imunomoduladores específicos que caem dentro do âmbito do presente invento são marcados com um asterisco (*). É aqui

descrito um polinucleótido imunomodulador que contém pelo menos uma sequência palindrômica (*i.e.*, palíndroma) de pelo menos 8 bases de comprimento contendo pelo menos um dinucleótido CG. O PIM contém também pelo menos uma sequência trinucleotídica TCG na extremidade 5' do polinucleótido ou próximo desta (*i.e.*, 5'-TCG). Nalguns casos, a sequência palindrômica e a 5'-TCG são separadas por 0, 1 ou 2 bases no PIM. Nalguns casos, a sequência palindrômica inclui toda ou parte da 5'-TCG.

Os PIM foram descritos na especialidade e a sua actividade pode ser facilmente identificada utilizando ensaios padrão que indicam vários aspectos da resposta imunitária, tal como secreção de citocinas, produção de anticorpos, activação de células NK, proliferação de células B, proliferação de células T. Ver, *p.ex.*, WO 97/28259; WO 98/16247; WO 99/11275; Krieg *et al.*, *Nature* 374: 546-549, 1995; Yamamoto *et al.*, 1992a; Ballas *et al.*, 1996; Klinman *et al.*, 1997; Sato *et al.*, 1996; Pisetsky, 1996a; Shimada *et al.*, *Jpn. J. Cancer Res.* 77: 808-816, 1986; Cowdery *et al.*, *J. Immunol.* 156: 4570-4575, 1996; Roman *et al.*, 1997; Lipford *et al.*, 1997a; WO 98/55495 e WO 00/61151. Assim, estes e outros métodos podem ser utilizados para identificar, testar e/ou confirmar PIM imunomoduladores.

O PIM pode ser de qualquer comprimento superior a 10 bases ou pares de bases, de preferência superior a 15 bases ou pares de bases, de maior preferência superior a 20 bases ou pares de bases de comprimento.

Tal como é claramente aqui comunicado, entende-se que, em relação às fórmulas aqui descritas, qualquer um e todos os parâmetros são seleccionados independentemente. Por exemplo, se $x=0-2$, y pode ser seleccionado de forma independente independentemente dos valores de x (ou qualquer outro parâmetro seleccionável num fórmula).

Nalguns casos, um PIM compreende (a) uma sequência palindrômica de pelo menos 8 bases de comprimento que contém pelo menos dois dinucleótidos CG, onde os dinucleótidos CG são separados um do outro por 0, 1, 2, 3, 4 ou 5 bases e (b) uma sequência (TCG)_y posicionada a 0, 1, 2, ou 3 bases da

extremidade 5' do polinucleótido, onde y é 1 ou 2, e onde a extremidade 3' da sequência $(TCG)_y$ é separada da extremidade 5' da sequência palindrômica por 0, 1 ou 2 bases. Nalguns casos, um dinucleótido CG da sequência $(TCG)_y$ de (b) pode contar para um dos pelo menos dois dinucleótidos CG na sequência palindrômica de (a). Nalguns casos, os dinucleótidos CG da sequência palindrômica são separados um do outro por 1, 3 ou 4 bases. Nalguns PIM do presente invento, descritos neste parágrafo ou noutro local no pedido, a sequência palindrômica tem uma composição de bases de menos de dois terços de G e C. Nalgumas concretizações, a sequência palindrômica tem uma composição de bases de mais de um terço de A e T.

É aqui descrito um PIM que compreende (a) uma sequência palindrômica de pelo menos 8 bases de comprimento que contém pelo menos dois dinucleótidos CG, onde os dinucleótidos CG são separados um do outro por 0, 1, 2, 3, 4 ou 5 bases, e (b) uma sequência $(TCG)_y$ posicionada a 0, 1, 2, ou 3 bases da extremidade 5' do polinucleótido, onde y é 1 ou 2, onde a sequência palindrômica inclui toda ou parte da sequência $(TCG)_y$ e onde um dinucleótido CG da sequência $(TCG)_y$ de (b) pode contar para um dos dinucleótidos CG da sequência palindrômica de (a). De preferência, os dinucleótidos CG da sequência palindrômica são separados uns dos outros por 1, 3 ou 4 bases.

Assim, um PIM pode compreender uma sequência de fórmula: $5'-N_x(TCG(N_q))_yN_w(X_1CGX_1'(CG)_p)_z$ (SEQ ID NO:155) em que N são nucleósidos com $x=0-3$, $y=1-4$, $w=-1, 0, 1$ ou 2, $p=0$ ou 1, $q=0, 1$ ou 2, e $z=1-20$, em que X_1 e X_1' são auto-complementares e em que o T 5' da sequência $(TCG(N_q))_y$ está a 0-3 bases da extremidade 5' do polinucleótido. O PIM compreende ainda uma sequência palindrômica de 8 bases de comprimento ou mais em que a sequência palindrômica compreende pelo menos uma das sequências $(X_1CGX_1'(CG)_p)$. Num PIM com $w=-1$, a base 3' da sequência $(TCG(N_q))_y$ é o X_1 5' da primeira sequência $(X_1CGX_1'(CG)_p)$. Nalguns casos, a sequência $(TCG(N_q))_y$ é separada da sequência palindrômica por 0, 1 ou 2 bases. Noutros casos, a sequência palindrômica inclui toda ou parte da sequência $(TCG(N_q))_y$. Nalguns casos, quando $p=0$, X_1 é A ou T.

As seguintes sequências (sequências palindrômicas sublinhadas), excepto as marcadas com um asterisco (*), são mostradas apenas para fins ilustrativos.

5'-TCGTCGACGTCGAGATGATAT (SEQ ID NO:35);
 5'-TCGTCGACGTCGACGAGATAT (SEQ ID NO:60);
 5'-TCGACGTCGACGTCGACGTAT (SEQ ID NO:61);
 5'-TCGGTCGACGTCGACCGATT (SEQ ID NO:82*);
 5'-TCGGACGTCGACGTCCGATT (SEQ ID NO:83*);
 5'-TCGACGTCGA (SEQ ID NO:105);
 5'-TCGGACGTCGACGTGCGATT (SEQ ID NO:114);
 5'-TCGACGTCGACGTCGACGTCGA (SEQ ID NO:119);
 5'-ACGTCGACGTCGACGTCGACGT (SEQ ID NO:120);
 5'-TCGTCGACGTCGACGTCGACGT (SEQ ID NO:121);
 5'-TCGTCGGCGCCGGCGCCGGCGC (SEQ ID NO:122);
 5'-TCGTCGCCGGCGCCGGCGCCGG (SEQ ID NO:123);
 5'-TCGATACGTCGACGTCGACGT (SEQ ID NO:124).

Um PIM pode compreender uma sequência com a fórmula: $5'-N_x(TCG(N_q))_yN_w(X_1X_2X_3CGX_3'X_2'X_1'(CG)_p)_z$ (SEQ ID NO:157) em que N são nucleósidos com $x=0-3$, $y=1-4$, $w=-3, -2, -1, 0, 1$ ou 2 , $p=0$ ou 1 , $q=0, 1$ ou 2 , e $z=1-20$, em que X_1 e X_1' , X_2 e X_2' , e X_3 e X_3' são auto-complementares e em que o T 5' da sequência $(TCG(N_q))_y$ está a 0-3 bases da extremidade 5' do polinucleótido. O PIM compreende ainda uma sequência palindrômica de 8 bases de comprimento ou mais em que a sequência palindrômica compreende a primeira $(X_1X_2X_3CGX_3'X_2'X_1')$ da pelo menos uma sequência $(X_1X_2X_3CGX_3'X_2'X_1'(CG)_p)$ (SEQ ID NO:224). Num PIM com $w=-1$, a base 3' da sequência $(TCG(N_q))_y$ é o X1 5' da primeira sequência $(X_1X_2X_3CGX_3'X_2'X_1'(CG)_p)$ (SEQ ID NO:224). Num PIM com $w=-2$, a penúltima (*i.e.*, antes da final) e a última (*i.e.*, a final) base 3' da sequência $(TCG(N_q))_y$ são o X_1 e X_2 5', respectivamente, da primeira sequência $(X_1X_2X_3CGX_3'X_2'X_1'(CG)_p)$ (SEQ ID NO:224). Num PIM com $w=-3$, a antepenúltima (*i.e.*, em terceiro antes da última), a penúltima (*i.e.*, a segunda antes da final) e a última (*i.e.*, a final) base 3' da sequência $(TCG(N_q))_y$ são o X_1 , X_2 e X_3 5', respectivamente, da primeira sequência $(X_1X_2X_3CGX_3'X_2'X_1'(CG)_p)$ (SEQ ID NO:224). Nalguns casos, a sequência $(TCG(N_q))_y$ é

separada da sequência palindrômica por 0, 1 ou 2 bases. Noutros casos, a sequência palindrômica inclui toda ou parte da sequência $(TCG(N_q))_y$. Nalguns casos, quando $p=1$, X_1 , X_2 , e X_3 são cada um A ou T. Nalguns casos, quando $p=0$, pelo menos dois de X_1 , X_2 , e X_3 são A ou T.

As seguintes sequências (sequências palindrômicas sublinhadas) são mostradas apenas para fins ilustrativos:

5'-TCGTCGAAACGTTTCGACAGT (SEQ ID NO:62);
 5'-TCGTCGAGACGTCCTCGAC AGT (SEQ ID NO:63);
 5'-TCGTCGAAGCGCTTCGACAGT (SEQ ID NO:125);
 5'-TCGTCGAATCGATTTCGACAGT (SEQ ID NO:126);
 5'-TCGTCGAGTCGACTCGACAGT (SEQ ID NO:127);
 5'-TCGTCGCAACGTTGCGACAGT (SEQ ID NO:128);
 5'-TCGTCGCCGCGCGGCGACAGT (SEQ ID NO:129);
 5'-TCGAAACGTTTTCGACAGTGAT (SEQ ID NO:130).

Um PIM pode compreender uma sequência de fórmula: $5'-N_x(TCG(N_q))_yN_w(X_1X_2X_3X_4CGX_4'X_3'X_2'X_1'(CG)_p)_z$ (SEQ ID NO:158) em que N são nucleósidos com $x=0-3$, $y=1-4$, $w=-3, -2, -1, 0, 1$ ou 2 , $p=0$ ou 1 , $q=0, 1$ ou 2 , e $z=1-20$, em que X_1 e X_1' , X_2 e X_2' , X_3 e X_3' , e X_4 e X_4' são auto-complementares e em que o T 5' da sequência $(TCG(N_q))_y$ está a 0-3 bases da extremidade 5' do polinucleótido. O PIM compreende ainda uma sequência palindrômica com 10 bases de comprimento ou mais em que a sequência palindrômica compreende a primeira $(X_1X_2X_3X_4CGX_4'X_3'X_2'X_1')$ (SEQ ID NO:225) da pelo menos uma sequência $(X_1X_2X_3X_4CGX_4'X_3'X_2'X_1'(CG)_p)$ (SEQ ID NO:226). Num PIM com $w=-1$, a base 3' de uma sequência $(TCG(N_q))_y$ é o X_1 5' da primeira sequência $(X_1X_2X_3X_4CGX_4'X_3'X_2'X_1'(CG)_p)$ (SEQ ID NO:226). Num PIM com $w=-2$, a penúltima (*i.e.*, a segunda antes da final) e a última (*i.e.*, a final) bases 3' de uma sequência $(TCG(N_q))_y$ são X_1 e X_2 5', respectivamente, da primeira sequência $(X_1X_2X_3X_4CGX_4'X_3'X_2'X_1'(CG)_p)$ (SEQ ID NO:226). Num PIM com $w=-3$, a antepenúltima (*i.e.*, a terceira antes da final), a penúltima (*i.e.*, a segunda antes da final) e a última (*i.e.*, a final) bases 3' da sequência $(TCG(N_q))_y$ são X_1 , X_2 , e X_3 5', respectivamente, da primeira sequência $(X_1X_2X_3X_4CGX_4'X_3'X_2'X_1'(CG)_p)$ (SEQ ID NO:226). Nalguns casos, a

sequência $(TCG(N_q))_y$ é separada da sequência palindrômica por 0, 1 ou 2 bases. Noutros casos, a sequência palindrômica inclui toda ou parte da sequência $(TCG(N_q))_y$. Nalguns casos, quando $p=1$, pelo menos três de X_1 , X_2 , X_3 , e X_4 são A ou T. Nalguns casos, quando $p=0$, pelo menos dois de X_1 , X_2 , X_3 , e X_4 são A ou T.

As seguintes sequências (sequências palindrômicas sublinhadas), excepto as marcadas com um asterisco (*), são apenas para fins ilustrativos:

5' -TCGAAAACGTTTTTCGAGATGAT (SEQ ID NO:65);
 5' -TCGAGGACGTCCTCGAGAGATGAT (SEQ ID NO:66*);
 5' -TCGAGGTCGACCTCGAGATGAT (SEQ ID NO:131*);
 5' -ATCGATGTCGACATCGATATGAT (SEQ ID NO:132);
 5' -TCGTCGTCGACGACGAGATGAT (SEQ ID NO:133).

Um PIM pode compreender uma sequência de fórmula: $5'-N_x(TCG(N_q))_yN_w(X_1CGCGX_1'(CG)_p)_z$ (SEQ ID NO:162) em que N são nucleósidos com $x=0-3$, $y=1-4$, $w=-1, 0, 1$ ou 2 , $p=0$ ou 1 , $q=0, 1$ ou 2 , e $z=1-20$, em que X_1 e X_1' são auto-complementares e em que o T 5' da sequência $(TCG(N_q))_y$ está a 0-3 bases da extremidade 5' do polinucleótido. O PIM compreende ainda uma sequência palindrômica de 8 bases de comprimento ou mais em que a sequência palindrômica compreende a primeira (X_1CGCGX_1') de pelo menos uma sequência $(X_1CGCGX_1'(CG)_p)$. Num PIM com $w=-1$, a base 3' da sequência $(TCG(N_q))_y$ é o X_1 5' da primeira sequência $(X_1CGCGX_1'(CG)_p)$. Nalguns casos, a sequência $(TCG(N_q))_y$ é separada da sequência palindrômica por 0, 1 ou 2 bases. Noutros casos, a sequência palindrômica inclui toda ou parte da sequência $(TCG(N_q))_y$. As seguintes sequências (sequências palindrômicas sublinhadas) são mostradas apenas para fins ilustrativos:

5' -TCGTCGTCGCGACGAGATGAT (SEQ ID NO:50);
 5' -TCGTCGACGCGTCGAGATGAT (SEQ ID NO:142);
 5' -TCGTCGGCGCGCCGAGATGAT (SEQ ID NO:143).

Um PIM pode compreender uma sequência de fórmula: $5'-N_x(TCG(N_q))_yN_w(CGX_1X_1'CG(CG)_p)_z$ (SEQ ID NO:161) em que N são nucleósidos com $x=0-3$, $y=1-4$, $w=-2, 0, 1$ ou 2 , $p=0$ ou 1 , $q=0$,

1 ou 2, e $z=1-20$, em que X_1 e X_1' são auto-complementares e em que o T 5' da sequência $(TCG(N_q))_y$ está a 0-3 bases da extremidade 5' do polinucleótido. O PIM compreende ainda uma sequência palindrômica de 8 bases de comprimento ou mais em que a sequência palindrômica compreende a primeira $(CGX_1X_1'CG)$ de pelo menos uma sequência $(CGX_1X_1'CG(CG)_p)$. Num PIM com $w=-2$, a penúltima (*i.e.*, a segunda antes da final) e a última (*i.e.*, a final) bases 3' da sequência $(TCG(N_q))_y$ são CG e são o CG 5' da primeira sequência $(CGX_1X_1'CG(CG)_p)_y$. Nalguns casos, a sequência $(TCG(N_q))_y$ é separada da sequência palindrômica por 0, 1 ou 2 bases. Noutros casos, a sequência palindrômica inclui toda ou parte da sequência $(TCG(N_q))_y$. As seguintes sequências (sequências palindrômicas sublinhadas) são mostradas apenas para fins ilustrativos:

5'-TCGTCGCGATCGCGAGATGAT (SEQ ID NO:49);

5'-TCGTCGCGTACGCGAGATGAT (SEQ ID NO:139);

5'-TCGTCGCGGCCGCGAGATGAT (SEQ ID NO:140);

5'-TCGCGATCGCGGATCGCGA (SEQ ID NO:141).

Um PIM pode compreender uma sequência de fórmula: $5'-N_x(TCG(N_q))_yN_w(X_1X_2CGX_3X_3'CGX_2'X_1'(CG)_p)_z$ (SEQ ID NO:159) em que N são nucleósidos com $x=0-3$, $y=1-4$, $w=-2, -1, 0, 1$ ou 2 , $p=0$ ou 1 , $q=0, 1$ ou 2 , e $z=1-20$, em que X_1 e X_1' , X_2 e X_2' , e X_3 e X_3' são auto-complementares e em que o T 5' da sequência $(TCG(N_q))_y$ está a 0-3 bases da extremidade 5' do polinucleótido. O PIM compreende ainda uma sequência palindrômica de 10 bases de comprimento ou mais em que a sequência palindrômica compreende a primeira $(X_1X_2CGX_3X_3'CGX_2'X_1')$ (SEQ ID NO:216) de pelo menos uma sequência $(X_1X_2CGX_3X_3'CGX_2'X_1'(CG)_p)$ (SEQ ID NO:217). Num PIM com $w=-1$, a base 3' de uma sequência $(TCG(N_q))_y$ é o X_1 5' da primeira sequência $(X_1X_2CGX_3X_3'CGX_2'X_1'(CG)_p)$ (SEQ ID NO:217). Num PIM com $w=-2$, a penúltima (*i.e.*, a segunda antes da final) e a última (*i.e.*, a final) bases 3' da sequência $(TCG(N_q))_y$ são o X_1 e X_2 5', respectivamente, da primeira sequência $(X_1X_2CGX_3X_3'CGX_2'X_1'(CG)_p)$ (SEQ ID NO:217). Nalguns casos, a sequência $(TCG(N_q))_y$ é separada da sequência palindrômica por 0, 1 ou 2 bases. Noutros casos, a sequência palindrômica inclui toda ou parte da sequência $(TCG(N_q))_y$. Nalguns casos, quando $p=1$, X_1 , X_2 , e X_3 são cada um A ou T. Nalgumas concretizações, quando $p=0$, pelo menos dois de X_1 , X_2 , e X_3 são

A ou T. As seguintes sequências (sequências palindrómicas sublinhadas) são mostradas apenas para fins ilustrativos:

5'-TCGGACGATCGTCGACGATCGTC (SEQ ID NO:86);
 5'-TCGTCGGACGATCGTCACGACG (SEQ ID NO:87);
 5'-TCGGTCGATCGACGTCGATCGAC (SEQ ID NO:134);
 5'-TCGGACGGCCGTCGACGGCCGTC (SEQ ID NO:135);
 5'-TCGGACGTACGTCGACGTACGTC (SEQ ID NO:136);
 5'-TCGATCGTACGATATCGTACGAT (SEQ ID NO:137);
 5'-TCGTCGGACGATCGTCCGACGA (SEQ ID NO:138).

Um PIM do presente invento compreende uma sequência de fórmula: $5'-(TCG(N_q))_y(X_1X_2CGX_2'X_1')(CG)_p)_z$ em que N são nucleósidos com $y=1$, $p=0$ ou 1 , $q=0$, 1 ou 2 , e $z=2-20$, em que X_1 e X_1' , X_2 e X_2' são auto-complementares, e em que o T 5' da sequência $(TCG(N_q))_y$ está na extremidade 5' do polinucleótido. O PIM compreende ainda uma sequência palindrómica de 8 bases de comprimento ou mais em que a sequência palindrómica compreende a primeira $(X_1X_2CGX_2'X_1')$ de pelo menos uma sequência $(X_1X_2CGX_2'X_1')(CG)_p)_z$. Nalgumas concretizações, a sequência $(TCG(N_q))_y$ é separada da sequência palindrómica por 0, 1 ou 2 bases. Noutras concretizações, a sequência palindrómica inclui toda ou parte da sequência $(TCG(N_q))_y$. Nalgumas concretizações, X_1 e X_2 são cada uma A ou T.

Nalgumas concretizações, o PIM compreende as seguintes sequências (sequências palindrómicas sublinhadas) marcadas com um asterisco (*). O resto é apenas para fins ilustrativos:

5'-TCGAACGTTTCGTTTGAACGAACGTT (SEQ ID NO:147*);
 5'-TCGAACGTTTTTCGAAAACGTT (SEQ ID NO:148*);
 5'-TCGTCGAACGTTCTTAACGTTTCG (SEQ ID NO:7);
 5'-TCGAACGTTAACGTTTCGATT (SEQ ID NO:80*);
 5'-TCGTCGAACGTTTCGAGATGAT (SEQ ID NO:27);
 5'-GGTCGAACGTTTCGAGGGGGG (SEQ ID NO:30);
 5'-TCGTCGAACGTTTCGAGGGGGG (SEQ ID NO:32);
 5'-TTCGAACGTTTCGAACGTTTCGAAT (SEQ ID NO:38);
 5'-TCGAACGTTTCGAACGTTTCGAAT (SEQ ID NO:39*);

5'-TCGTCGAACGTTTCGACGA (SEQ ID NO:52);
5'-TTTCGAACGTTTCGAACGTTTCGAAAT (SEQ ID NO:57);
5'-TTTTTCGAACGTTTCGAACGTTTCGAAAAT (SEQ ID NO:58);
5'-TTTTTCGAACGTTTCGAACGTTTCGAAT (SEQ ID NO:59);
5'-TCGAACGTTTCGAACGTTTCGA (SEQ ID NO:97*);
5'-TTCGAACGTTTCGAA (SEQ ID NO:98);
5'-TCGTCGAACGTTTCGAGAT (SEQ ID NO:99);
5'-TCGTCGAACGTTTCGAG (SEQ ID NO:100);
5'-TCGTCGAACGTTTCGA (SEQ ID NO:101);
5'-TCGAACGTTTCGAG (SEQ ID NO:102);
5'-TCGAACGTTTCGA (SEQ ID NO:103);
5'-TCGAACGTTTCG (SEQ ID NO:104);
5'-TCGTCGTCGAACGTTTCGAGAT (SEQ ID NO:106);
5'-TCGTCGTCGTCGAACGTTTCGA (SEQ ID NO:107);
5'-TCGTCGTCGAACGTTTCGACGAGAT (SEQ ID NO:108);
5'-TCGAACGTTTCGAACGTTTCGAACGTT (SEQ ID NO:113*);
5'-CTTCGAACGTTTCGAAGTG (SEQ ID NO:115);
5'-TGATCGTCGAACGTTTCGACGATCA (SEQ ID NO:116);
5'-TCGAACGTTTCGAACGTTTCGAATTTT (SEQ ID NO:117*);
5'-TCGCGAACGTTTCGAACGTTTCG (SEQ ID NO:150*);
5'-TCGCGAACGTTTCGAACGTTTC (SEQ ID NO:151*);
5'-TCGATAACGTTTCGAACGTTAT (SEQ ID NO:152*);
5'-TCGATAACGTTTCGAACGTTTC (SEQ ID NO:153*);
5'-TCGTCGAACGTTTCGAGATG (SEQ ID NO:166);
5'-TCGTCGAACGTTTCG (SEQ ID NO:167);
5'-TCGAACGTTTCGA TCGAACGTTTCGA (SEQ ID NO:168);
5'-TCGACCGGTCGACCGGTCGA (SEQ ID NO:169*);
5'-TCGAACGTTTCGAACGTTGATGT (SEQ ID NO:170*);
5'-TCGAACGTTTCGAAGATGATGAT (SEQ ID NO:171);
5'-TCGAACGTTTCGAACGTTTCGAACG (SEQ ID NO:175*);
5'-TCGAACGTTTCGAACGTTTCGAACGTTTCGAAT (SEQ ID NO:172*);

5'-TCGATAACGTTTCGAACGTTTCGAACGTTAT (SEQ ID NO:173*);

5'-TCGTAACGTTTCGAACGTTTCGAACGTTA (SEQ ID NO:174*).

Nalgumas concretizações, num PIM do presente invento, X_1X_2 não é AA. Nalgumas concretizações, num PIM do presente invento, X_1 não é A. Assim, nalgumas concretizações, o PIM compreende as seguintes sequências (sequências palindrômicas sublinhadas) marcadas com um asterisco (*). O resto é apenas para fins ilustrativos.

5'-TCGAGCGCTAGCGCTCGATT (SEQ ID NO:81*);

5'-TCGGTCGACGTCGACCGATT (SEQ ID NO:82*);

5'-TCGGACGTCGACGTCCGATT (SEQ ID NO:83*);

5'-TCGTTTCGAATTCGAACGATT (SEQ ID NO:84*);

5'-TCGTCGGCCGGCCGAGATGAT (SEQ ID NO:112);

5'-TCGGACGTCCGGACGTCCGA (SEQ ID NO:79*);

5'-TCGTCGCACGTGCGAGATGAT (SEQ ID NO:48);

5'-TCGTCGTACGTACGAGATGAT (SEQ ID NO:51);

5'-TCGTCGGGCGCCCGAGATGAT (SEQ ID NO:70);

5'-TCGTCGCGCGCGCGAGATGAT (SEQ ID NO:71);

5'-TCGTCGCTCGAGCGAGATGAT (SEQ ID NO:72);

5'-TCGTCGCCCCGGGCGAGATGAT (SEQ ID NO:73);

5'-TCGTCGTGCGCACGAGATGAT (SEQ ID NO:74);

5'-TCGTCGTCCGGACGAGATGAT (SEQ ID NO:76);

5'-TCGAGCGCTCGAGCGCTCGA (SEQ ID NO:77*);

5'-TCGTCGGTCGACCGAGATGAT (SEQ ID NO:46);

5'-TCGTCGGACGTCCGAGATGAT (SEQ ID NO:47);

5'-TCGTCGAGCGCTCGAGATGAT (SEQ ID NO:44);

5'-TCGATTTCGAACGTTTCGAACGTTTCG (SEQ ID NO:40*);

5'-TCGTTTCGAACGTTTCGAAGTGAT (SEQ ID NO:41*);

5'-TCGTTTCGAACGTTTCGAACGA (SEQ ID NO:42*);

5'-TCGTTTCGAACGTTTCGAACGTTTCG (SEQ ID NO:53*);

5'-TCGTTTCGAACGTTTCGAA (SEQ ID NO:54*);

5'-TCGTTTCGAACGTTTCGAACGTTTCGAA (SEQ ID NO:55*);

5'-TCGTTCGAACGTTTCGAACGATTTTTCGTTTCGAACGTTTCGAACGA (SEQ ID NO:56)*;
 5'-TCGATCGATCGATCGATCGATT (SEQ ID NO:43*);
 5'-TCGTCGATCGATCGAGATGAT (SEQ ID NO:45);
 5'-TCGTCGACCGGTCGAGATGAT (SEQ ID NO:69);
 5'-TCGTCGTTTCGAACGAGATGAT (SEQ ID NO:75);
 5'-TCGGTCGACCGGTCGACCGA (SEQ ID NO:78*);
 5'-TCGTTTCGAACGTTTCGAACGTTTCGAACG (SEQ ID NO:109*);
 5'-TCGTTTCGAACGTTTCGAACGAATGAT (SEQ ID NO:118*);
 5'-TCGACCGGTCGACCGGTCGACCGGT (SEQ ID NO:176*);
 5'-TCGCGCGCGCGCGCGCGCGCA (SEQ ID NO:177*);
 5'-TCGCCCCGGGCGCCCGGGCGA (SEQ ID NO:178*);
 5'-TCGGCCGGACGTCCGGACGA (SEQ ID NO:179);
 5'-TCGGCCGGCCGGCCGGCCGA (SEQ ID NO:180*).

Um PIM pode compreender uma sequência de fórmula:
 $5'-N_x(TCG(N_q))_yN_w(X_1X_2X_3X_4X_5CGX_5'X_4'X_3'X_2'X_1'(CG)_p)_z$ (SEQ ID NO:160)
 em que N são nucleósidos com $x=0-3$, $y=1-4$, $w=-3, -2, -1, 0, 1$ ou 2 , $p=0$ ou 1 , $q=0, 1$ ou 2 , e $z=1-20$, em que X_1 e X_1' , X_2 e X_2' , X_3 e X_3' , X_4 e X_4' , e X_5 e X_5' são auto-complementares, e em que o T 5' da sequência $(TCG(N_q))_y$ está a 0-3 bases da extremidade 5' do polinucleótido. O PIM compreende ainda uma sequência palindrômica de 12 bases de comprimento ou mais em que a sequência palindrômica compreende a primeira $(X_1X_2X_3)_4X_5CGX_5'X_4'X_3'X_2'X_1'$ (SEQ ID NO:218) de pelo menos uma sequência $((X_1X_2X_3X_4X_5CGX_5'X_4'X_3'X_2'X_1')(CG)_p)$ (SEQ ID NO:219). Num PIM com $w=-1$, a base 3' da sequência $(TCG(N_q))_y$ é o X_1 5' da primeira sequência $(X_1X_2X_3X_4X_5CGX_5'X_4'X_3'X_2'X_1'(CG)_p)$ (SEQ ID NO:219). Num PIM com $w=-2$, a penúltima (i.e., a segunda antes da final) e a última (i.e., a final) bases 3' da sequência $(TCG(N_q))_y$ são o X_1 e X_2 5', respectivamente, da primeira sequência $(X_1X_2X_3X_4X_5CGX_5'X_4'X_3'X_2'X_1'(CG)_p)$ (SEQ ID NO:219). Num PIM com $w=-3$, a antepenúltima (i.e., a terceira antes da final), a penúltima (i.e., a segunda antes da final) e a última (i.e., a final) bases 3' da sequência $(TCG(N_q))_y$ são o X_1 , X_2 , e X_3 5', respectivamente, da primeira sequência $(X_1X_2X_3X_4X_5CGX_5'X_4'X_3'X_2'X_1'(CG)_p)$ (SEQ ID NO:219). Nalguns casos, a sequência $(TCG(N_q))_y$ é separada da sequência

palindrômica por 0, 1 ou 2 bases. Noutros casos, a sequência palindrômica inclui toda ou parte da sequência $(TCG(N_q))_y$. Nalguns casos, pelo menos três de X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , e X_5 são A ou T. As seguintes sequências (sequências palindrômicas sublinhadas) são mostradas apenas para fins ilustrativos:

5'-TCGTGCATCGATGCAACG (SEQ ID NO:93);

5'-TCGTGCATCGATGCAGATGAT (SEQ ID NO:110);

5'-TCGTGCATCGATGCATGCATCGATGCA (SEQ ID NO:111);

5'-TCGTGCATCGATGCACGA (SEQ ID NO:149).

Um PIM pode compreender uma sequência de fórmula: $5'-N_x(TCG(N_q))_yN_w(X_1X_2CGCGX_2'X_1'(CG)_p)_z$ (SEQ ID NO:163) em que N são nucleósidos com $x=0-3$, $y=1-4$, $w=-2, -1, 0, 1$ ou 2 , $p=0$ ou 1 , $q=0, 1$ ou 2 , e $z=1-20$, em que X_1 e X_1' , e X_2 e X_2' são auto-complementares, e em que o T 5' da sequência $(TCG(N_q))_y$ está a 0-3 bases da extremidade 5' do polinucleótido. O PIM compreende ainda uma sequência palindrômica de 8 bases de comprimento ou mais em que a sequência palindrômica compreende a primeira $(X_1X_2CGCGX_2'X_1')$ de pelo menos uma sequência $(X_1X_2CGCGX_2'X_1'(CG)_p)$ (SEQ ID NO:220). Num PIM com $w=-1$, a base 3' da sequência $(TCG(N_q))_y$ é o X_1 5' da primeira sequência $(X_1X_2CGCGX_2'X_1'(CG)_p)$ (SEQ ID NO:220). Num PIM com $w=-2$, a penúltima (i.e., a segunda antes da final) e a última (i.e., a final) bases 3' da sequência $(TCG(N_q))_y$ são o X_1 e X_2 5', respectivamente, da primeira sequência $(X_1X_2CGCGX_2'X_1'(CG)_p)$ (SEQ ID NO:220). Nalguns casos, a sequência $(TCG(N_q))_y$ é separada de uma sequência palindrômica por 0, 1 ou 2 bases. Noutros casos, a sequência palindrômica inclui toda ou parte da sequência $(TCG(N_q))_y$. Nalguns casos, X_1 e X_2 são cada um A ou T. A seguinte sequência (sequência palindrômica sublinhada) é mostrada apenas para fins ilustrativos:

5'-TCGTGATCGCGATCGACGA (SEQ ID NO:144).

Um PIM pode compreender uma sequência de fórmula: $5'-N_x(TCG(N_q))_yN_w(X_1X_2X_3CGCGX_3'X_2'X_1'(CG)_p)_z$ (SEQ ID NO:164) em que N são nucleósidos com $x=0-3$, $y=1-4$, $w=-3, -2, -1, 0, 1$ ou 2 , $p=0$ ou 1 , $q=0, 1$ ou 2 , e $z=1-20$, em que X_1 e X_1' , X_2 e X_2' , e X_3 e X_3' são auto-complementares, e em que o T 5' da sequência $(TCG(N_q))_y$ está a 0-3 bases da extremidade 5' do polinucleótido. O PIM compreende ainda uma sequência

palindrómica de 10 bases de comprimento ou mais em que a sequência palindrómica compreende a primeira $(X_1X_2X_3CGCGX_3'X_2'X_1')$ (SEQ ID NO:221) de pelo menos uma sequência $(X_1X_2X_3CGCGX_3'X_2'X_1')(CG)_p$ (SEQ ID NO:222). Num PIM com $w=-1$, a base 3' de uma sequência $(TCG(N_q))_y$ é o X_1 5' da primeira sequência $(X_1X_2X_3CGCGX_3'X_2'X_1')(CG)_p$ (SEQ ID NO:222). Num PIM com $w=-2$, a penúltima (*i.e.*, a segunda antes da final) e a última (*i.e.*, a final) bases 3' da sequência $(TCG(N_q))_y$ são o X_1 e X_2 5', respectivamente, da primeira sequência $(X_1X_2X_3CGCGX_3'X_2'X_1')(CG)_p$ (SEQ ID NO:222). Num PIM com $w=-3$, a antepenúltima (*i.e.*, a terceira antes da final), a penúltima (*i.e.*, a segunda antes da final) e a última (*i.e.*, a final) bases 3' da sequência $(TCG(N_q))_y$ são o X_1 , X_2 , e X_3 5', respectivamente, da primeira sequência $(X_1X_2X_3CGCGX_3'X_2'X_1')(CG)_p$ (SEQ ID NO:222). Nalguns casos, a sequência $(TCG(N_q))_y$ é separada da sequência palindrómica por 0, 1 ou 2 bases. Noutros casos, a sequência palindrómica inclui toda ou parte da sequência $(TCG(N_q))_y$. Nalguns casos, quando $p=1$, X_1 , X_2 , e X_3 são cada um A ou T. Nalguns casos, quando $p=0$, pelo menos dois de X_1 , X_2 , e X_3 são A ou T. A seguinte sequência (sequência palindrómica sublinhada) é apenas para fins ilustrativos:

5'-TCGTCGAATCGCGATTTCGACGA (SEQ ID NO:145).

Um PIM pode compreender uma sequência de fórmula: $5'-N_x(TCG(N_q))_yN_w(CGX_1X_2X_2'X_1'CG(CG)_p)_z$ (SEQ ID NO:165) em que N são nucleósidos com $x=0-3$, $y=1-4$, $w=-2, 0, 1$ ou 2 , $p=0$ ou 1 , $q=0, 1$ ou 2 , e $z=1-20$, em que X_1 e X_1' , e X_2 e X_2' são auto-complementares, e em que o T 5' da sequência $(TCG(N_q))_y$ está a 0-3 bases da extremidade 5' do polinucleótido. O PIM compreende ainda uma sequência palindrómica de 8 bases de comprimento ou mais em que a sequência palindrómica compreende a primeira $(CGX_1X_2X_2'X_1'CG)$ de pelo menos uma sequência $(CGX_1X_2X_2'X_1'CG(CG)_p)$ (SEQ ID NO:223). Num PIM com $w=-2$, a penúltima (*i.e.*, a segunda antes da final) e a última (*i.e.*, a final) bases 3' da sequência $(TCG(N_q))_y$ são CG e são o CG 5' da primeira sequência $(CGX_1X_2X_2'X_1'CG(CG)_p)$ (SEQ ID NO:223). Nalguns casos, a sequência $(TCG(N_q))_y$ é separada da sequência palindrómica por 0, 1 ou 2 bases. Noutros casos, a sequência palindrómica inclui toda ou parte da sequência $(TCG(N_q))_y$. Nalguns casos, X_1 e X_2 são cada um A ou T. A seguinte

sequência (sequência palindrômica sublinhada) é mostrada apenas para fins ilustrativos:

5'-TCGTCGCGATATCGCGACGA (SEQ ID NO:146).

Para PIM compreendendo qualquer um dos motivos aqui descritos (*i.e.*, SEQ ID NO:155-165) onde $y=2$ ou mais, o (N_q) em cada uma das repetições de y de $(TCG(N_q))$ é seleccionado independentemente. Por exemplo, num PIM com $y=2$, a primeira $TCG(N_q)$ pode ter $N=A$ e $q=1$ e a segunda $TCG(N_q)$ pode ter $q=0$ caso em que esta porção do PIM será ...TCGATCG... Nalguns casos de PIM compreendendo qualquer um dos motivos aqui descritos (*i.e.*, SEQ ID NO:155-165), x é de preferência 0 ou 1. Nalguns casos de PIM compreendendo qualquer um dos motivos aqui descritos (*i.e.*, SEQ ID NO:155-165), y é de preferência 1 ou 2. Nalguns casos de PIM compreendendo qualquer um dos motivos aqui descritos (*i.e.*, SEQ ID NO:155-165), w é de preferência 0. Nalguns casos de PIM compreendendo qualquer um dos motivos aqui descritos (*i.e.*, SEQ ID NO:155-165), z é de preferência 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8. Em PIM do presente invento, z é de preferência 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8.

Tal como observado acima, os PIM contêm pelo menos uma sequência palindrômica de pelo menos 8 bases de comprimento. Nalgumas concretizações, um PIM contém pelo menos uma sequência palindrômica com pelo menos os seguintes comprimentos (em bases): 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30. Nalgumas concretizações, a sequência palindrômica é repetida pelo menos uma vez num PIM. Nalgumas concretizações, a sequência palindrômica inclui também bases 5' da sequência $(TCG(N_q))_y$, se houver.

Um polinucleótido imunomodulador pode conter modificações. As modificações de PIM incluem qualquer uma conhecida na especialidade, mas não se limitam a modificações do grupo 3'OH ou 5'OH, modificações da base nucleotídica, modificações do componente açúcar e modificações do grupo fosfato. Várias dessas modificações estão descritas abaixo. As bases modificadas podem estar incluídas na sequência palindrômica de um PIM desde que a base ou bases modificadas mantenham a mesma especificidade para o seu complemento natural através de emparelhamento de bases de Watson-Crick

(p.ex., a porção palindrômica do PIM é ainda auto-complementar).

Um PIM pode ser linear, pode ser circular ou incluir porções circulares e/ou pode incluir uma volta em "gancho de cabelo". Nalgumas concretizações, o PIM compreende a seguinte sequência cíclica (sequências palindrômicas sublinhadas):

--5'-TCGAACGTTCGAACGTTCGAAT-

(SEQ ID NO:181*)

Um PIM pode ser ADN de cadeia simples ou cadeia dupla, bem como ARN de cadeia simples ou dupla ou outros polinucleótidos modificados. As seguintes sequências de cadeia dupla são apenas para fins ilustrativos:

5'-TCGTCGAACGTTGAGATGAT / 5'-ATCATCTCGAACGTTGACGA
(SEQ ID NO:27 / SEQ ID NO:29);

5'-TCG*TCG*AACG*TTG*AG*ATG*AT / 5'-ATCATCTCGAACGTTGACGA (G*
= 7-desaza-8-aza-dG, SEQ ID NO:187/SEQ ID NO:29);

5'-TCGTCGA*A*CGTTCGA*GA*TGA*T/5'-ATCATCTCGAACGTTGACGA (A*= 2-
amino-dA, SEQ ID NO:188 / SEQ ID NO:29);

5'-TCGTCGAA*CGT*TCGAGATGAT/ 5'-ATCATCTCGAACGTTGACGA (A*= 2-
amino-dA; T*= 2-tio-dT, SEQ ID NO:189/SEQ ID NO:29);

5'-TCGTCGA*A*CGT*T*CGAGATGAT/5'-ATCATCTCGAACGTTGACGA (A*=2-
amino-dA; T*= 2-tio-dT, (SEQ ID NO:190/SEQ ID NO:29)).

Um PIM pode conter bases de ocorrência natural ou modificadas de ocorrência não natural, e pode conter açúcar, fosfato, e/ou terminais modificados. Por exemplo, para além das ligações fosfodiéster, as modificações do fosfato incluem, mas não se limitam a, metilfosfonato, fosforotioato, fosforamidato (em ponte ou não), fosfotriéster e fosforoditioato e podem ser utilizadas em qualquer combinação. Podem também ser utilizadas outras ligações não fosfato. Nalgumas concretizações, os polinucleótidos do presente invento compreendem apenas estruturas de fosforotioato. Nalgumas concretizações, os polinucleótidos do presente invento compreendem apenas estruturas de fosfodiéster. Nalgumas concretizações, um PIM pode compreender uma combinação de ligações fosfato na estrutura de fosfato tais

como uma combinação de ligações fosfodiéster fosforotioato. Por exemplo, nalgumas concretizações, o PIM compreende as seguintes sequências ("s" indica ligações fosforotioato) marcadas com um asterisco (*). O resto é apenas para fins ilustrativos.

5'-TCGTCGAAACGTTTCGACAGT (SEQ ID NO:62), todas ligações fosforotioato;

5'-TCGTTCGAACGTTTCGAACGA (SEQ ID NO:88*), todas ligações fosfodiéster;

5'-TsCsGsTTCGAACGTTTCGsAsAsCsGsA (SEQ ID NO:89*), quimera fosforotioato/fosfodiéster;

5'-GsGsTCGAACGTTTCGAGsGsGsGsGsG (SEQ ID NO:26), quimera fosforotioato/fosfodiéster;

5'-TsCsGsTCGAACGTTTCGAGsGsGsGsGsG (SEQ ID NO:33), quimera fosforotioato/fosfodiéster;

5'-TsCsGsTGCATCGATGCAGGsGsGsGsG (SEQ ID NO:34), quimera fosforotioato/fosfodiéster.

Modificações de açúcar conhecidas no campo, tais como análogos 2'-alcoxi-ARN, análogos 2'-amino-ARN, 2'-fluoro-ADN e quimeras 2'-alcoxi- ou 2'-amino-ARN/ADN e outras aqui descritas, podem também ser feitas e combinadas com qualquer modificação de fosfato. Exemplos de modificações de bases (discutidas mais abaixo) incluem, mas não se limitam à adição de uma porção de retirada de electrões ao C-5 e/ou C-6 de uma citosina do PIM (p.ex., 5-bromocitosina, 5-clorocitosina, 5-fluorocitosina, 5-iodocitosina) e C-5 e/ou C-6 de um uracilo do PIM (p.ex., 5-bromouracilo, 5-clouracilo, 5-flourouracilo, 5-iodouracilo). Ver, por exemplo, Pedido Internacional de Patente WO 99/62923. Tal como observado acima, a utilização de uma modificação de uma base numa sequência palindrómica de um PIM não deve interferir com a capacidade de auto-complementaridade das bases envolvidas para emparelhamento de bases de Watson-Crick. No entanto, fora de uma sequência palindrómica, as bases modificadas podem ser utilizadas sem esta restrição. As seguintes sequências são apenas para fins ilustrativos:

5'-uCGuCGAACGTTTCGAGATG (SEQ ID NO:21), u=2'-O-metil-uridina;

5'-TcGTTCGAACGTTTCGAGATG (SEQ ID NO:22), c=2'-O-metil-citidina;

5'-TCGTcGAACGTTTCGAGATG (SEQ ID NO:23), c=2'-O-metil-citidina;
5'-TBGTBGAABGTTBGAGATGAT (SEQ ID NO:28), B=5-bromo-2'-
desoxycitidina.

O PIM pode ser sintetizado utilizando técnicas e equipamento de síntese de ácidos nucleicos que são bem conhecidos na especialidade incluindo, mas não se limitando a, métodos enzimáticos, métodos químicos e a degradação de sequências oligonucleotídicas maiores. Ver, por exemplo, Ausubel *et al.*, 1987; e Sambrook *et al.*, 1989. Quando montadas enzimaticamente, as unidades individuais podem ser ligadas, por exemplo, com uma ligase tal como ADN-ligase ou ARN-ligase de T4. Patente U.S. 5124246. A degradação de oligonucleótidos pode ser alcançada através da exposição de um oligonucleótido a uma nuclease, tal como exemplificado na Patente U.S. 4650675.

O PIM pode também ser isolado utilizando procedimentos convencionais de isolamento de polinucleótidos. Tais procedimentos incluem, mas não se limitam a, hibridação de sondas com bibliotecas de ADN genómico ou ADNc para detectar sequências nucleotídicas partilhadas, pesquisa de bibliotecas de expressão com anticorpos para detectar características estruturais partilhadas e síntese de determinadas sequências nativas através de reacção em cadeia da polimerase.

O polinucleótido circular imunomodulador pode ser isolado, sintetizado através de métodos recombinantes ou quimicamente sintetizado. Quando o PIM circular é obtido através de isolamento ou através de métodos recombinantes, o PIM será de preferência um plasmídeo. A síntese química de oligonucleotídicos circulares menores pode ser efectuada utilizando qualquer método descrito na literatura. Ver, por exemplo, Gao *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 23: 2025-2029, 1995; e Wang *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 22: 2326-2333, 1994.

As formas em dúplex (*i.e.*, de cadeia dupla) e em "gancho de cabelo" da maioria dos PIM estão em equilíbrio dinâmico, com a forma em "gancho de cabelo" geralmente favorecida a baixa concentração de polinucleótido e temperaturas mais elevadas. As ligações cruzadas covalentes intercadeias ou intracadeias aumentam a estabilidade do dúplex ou do "gancho

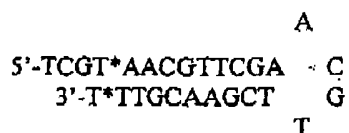
de cabelo", respectivamente, para alterações conformacionais induzidas pela temperatura, força iónica, pH e concentração. As ligações cruzadas químicas podem ser utilizadas para prender o polinucleótido na forma de dúplex ou de "gancho de cabelo" para caracterização físico-química e biológica. Os PIM com ligações cruzadas que sejam conformacionalmente homogêneos e estejam "presos" na sua forma mais activa (forma em dúplex ou "gancho de cabelo") podem ser potencialmente mais activos que as suas contrapartidas sem ligações cruzadas. Assim, alguns PIM do presente invento contêm ligações cruzadas covalentes intercadeias e/ou intracadeias.

É conhecida na especialidade uma variedade de modos para ligar quimicamente de forma cruzada ADN dúplex. Pode ser utilizado qualquer método de ligação cruzada desde que o produto polinucleótido com ligações cruzadas possua a actividade imunomoduladora desejada.

Um método, por exemplo, resulta numa ponte dissulfureto entre duas timidinas opostas no terminal do dúplex ou "gancho de cabelo". Para este método de ligação cruzada, o oligonucleótido ou oligonucleótidos de interesse são sintetizados com uma 5'-DMT-N3-(tBu-SS-etil)timidina-3'-fosforamidito ("T*"). Para formar a ponte dissulfureto, as ligações dissulfureto mistas são reduzidas, o oligonucleótido é purificado, as cadeias hibridadas e o composto oxidado ao ar para formar a ligação cruzada intracadeia no caso de uma forma em "gancho de cabelo" ou a ligação cruzada intercadeias no caso de uma forma dúplex. Alternativamente, os oligonucleótidos podem ser primeiro hibridados e depois reduzidos, purificados e oxidados ao ar. Tais métodos e outros estão descritos, por exemplo, em Glick et al., *J. Org. Chem.* 56: 6746-6747, 1991; Glick et al., *J. Am. Chem. Soc.* 114: 5447-5448, 1992; Goodwin et al., *Tetrahedron Letters* 35: 1647-1650, 1994; Wang et al., *J. Am. Chem. Soc.* 117: 2981-2991, 1995; Osborne et al., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 6: 2339-2342, 1996; e Osborne et al., *J. Am. Chem. Soc.* 118: 11993-12003, 1996.

Exemplos de sequências polinucleotídicas nas quais uma 5'-DMT-N3-(tBu-SS-etil)timidina-3'-fosforamidito ("T*") pode ser incorporada para fins de ligação cruzada incluem as

seguintes. A incorporação da T* na extremidade 3' de um análogo de SEQ ID NO:27 (5'-TCGTCGAACGTTTCGAGATGAT*-3', SEQ ID NO:185) e na extremidade 5' de um análogo de SEQ ID NO:29 (5'-T*TCATCTCGAACGTTTCGACGA-3', SEQ ID NO:186) permitirá uma ligação cruzada num dúplex das duas cadeias na extremidade 3' do análogo da SEQ ID NO:27. A incorporação da T* em dois locais num análogo de SEQ ID NO:113* permitirá duas ligações cruzadas para formar um dúplex ou uma única ligação cruzada para manter uma forma em "gancho de cabelo". Por exemplo, a dobragem da sequência 5'-TCGT*AACGTTTCGAACGTTTCGAACGTTT*-3' SEQ ID NO:227*) numa estrutura em "gancho de cabelo" e a formação de uma ligação cruzada nos resíduos T substituídos resultarão num polinucleótido com ligações cruzadas com a seguinte estrutura secundária.



Uma tal estrutura em "gancho de cabelo" ou estrutura dúplex da mesma sequência terá uma 5'-TCG livre embora constrangida em duas posições (a extremidade 3' e 4 bases internas desde a extremidade 5').

Outro método de ligação cruzada forma uma ponte dissulfureto entre resíduos de deslocamento na estrutura dúplex ou em "gancho de cabelo". Para este método de ligação cruzada, o oligonucleótido ou oligonucleótidos de interesse são sintetizados com nucleósidos convertíveis (comercialmente disponíveis, por exemplo, em Glen Research). Este método utiliza, por exemplo, uma ponte dissulfureto A-A ou uma ponte dissulfureto C-A e são também possíveis ligações através de outras bases. Para formar o polinucleótido modificado por dissulfuretos, faz-se reagir o polinucleótido contendo o nucleósido convertível com cistamina (ou outra amina contendo dissulfureto). Para formar a ponte dissulfureto, as ligações mistas de dissulfureto são reduzidas, o oligonucleótido é purificado, as cadeias hibridadas e o composto é oxidado ao ar para formar a ligação cruzada intracadeia no caso de uma forma em "gancho de cabelo" ou a ligação cruzada intercadeias no caso de uma forma dúplex. Alternativamente, os oligonucleótidos podem ser primeiro hibridados e depois reduzidos, purificados e oxidados ao ar. Tais métodos estão

descritos, por exemplo, em Ferentz *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 113: 4000-4002, 1991 e Ferentz *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 115: 9006-9014, 1993.

Exemplos de sequências polinucleotídicas nas quais resíduos N6-cistamina-2'-dA (A*) de deslocamento são utilizados para ligar de forma cruzada um dúplex incluem as seguintes. A incorporação da A* na extremidade 3' da sequência 5'-TCGTCGAACGTTTCGAGA*TGAT-3', SEQ ID NO:191 e na extremidade 5' do seu complemento 5'-ATCA*TCTCGAACGTTTCGACGA-3', SEQ ID NO:192 permitirá uma ligação cruzada num dúplex das duas cadeias na extremidade 3' da SEQ ID NO:191. Tais modificações podem também ser utilizadas para ligação cruzada de estruturas em "gancho de cabelo".

As técnicas para produzir polinucleótidos e polinucleótidos modificados são conhecidas na especialidade. O ADN ou ARN de ocorrência natural, contendo ligações fosfodiéster, é geralmente sintetizado através da ligação sequencial do nucleósido-fosforamidito apropriado ao grupo 5'-hidroxilo do oligonucleótido em crescimento ligado a um suporte sólido na extremidade 3', seguido de oxidação do triéster de fosfito intermediário num triéster de fosfato. Uma vez sintetizada a sequência polinucleotídica desejada, o polinucleótido é removido do suporte, os grupos triéster de fosfato são desprotegidos em diésteres de fosfato e as bases nucleosídicas são desprotegidas utilizando amónia aquosa ou outras bases. Ver, por exemplo, Beaucage (1993) "Oligodeoxyribonucleotide Synthesis" em *Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Synthesis and Properties* (Agrawal, ed.) Humana Press, Totowa, NJ; Warner *et al.*, *DNA* 3: 401, 1984; e Patente U.S. 4458066.

O PIM pode também conter polinucleótidos com modificação do fosfato, alguns dos quais sabe-se que estabilizam o polinucleótido. Assim, algumas concretizações incluem polinucleótidos imunomoduladores estabilizados. A síntese de polinucleótidos contendo ligações fosfato ou ligações não fosfato modificadas é também conhecida na especialidade. Para uma revisão, ver Matteucci (1997) "Oligonucleotide Analogs: an Overview" em *Oligonucleotides as Therapeutic Agents*, (D.J. Chadwick e G. Cardew, ed.) John Wiley and Sons, New York, NY.

O derivado fosforoso (ou grupo fosfato modificado) que pode ser unido à porção açúcar ou análogo de açúcar nos polinucleótidos do presente invento pode ser um monofosfato, difosfato, trifosfato, alquilfosfonato, fosforotioato, fosforoditioato, fosforamidato ou semelhante. A preparação dos análogos fosfato acima observados, e sua incorporação em nucleótidos, nucleótidos modificados e oligonucleótidos, *per se*, é também conhecida e não necessita de ser aqui descrita em detalhe. Peyrottes *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 24: 1841-1848, 1996; Chaturvedi *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 24: 2318-2323, 1996; e Schultz *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 24: 2966-2973, 1996. Por exemplo, a síntese de oligonucleótidos fosforotioato é semelhante à descrita para oligonucleótidos de ocorrência natural excepto que o passo de oxidação é substituído por um passo de sulfurização (Zon (1993) "Oligonucleoside Phosphorothioates" em *Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Synthesis and Properties* (Agrawal, ed.) Humana Press, págs. 165-190). Semelhantemente foi também descrita a síntese de outros análogos de fosfato, tais como fosfotriéster (Miller *et al.*, *JACS* 93: 6657-6665, 1971), fosforamidatos sem formar pontes (Jager *et al.*, *Biochem.* 27: 7247-7246, 1988), fosforamidiatos N3' a P5' (Nelson *et al.*, *JOC* 62: 7278-7287, 1997) e fosforoditioatos (Patente U.S. 5453496). Outros oligonucleótidos modificados de bases não fosforosas podem também ser utilizados (Stirchak *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 17: 6129-6141, 1989). Os polinucleótidos com estruturas de fosforotioato podem ser mais imunogénicos que aqueles com estruturas fosfodiéster e parecem ser mais resistentes à degradação após injeção no hospedeiro. Braun *et al.*, *J. Immunol.* 141: 2084-2089, 1988; e Latimer *et al.*, *Mol. Immunol.* 32: 1057-1064, 1995.

Os PIM utilizados no presente invento podem compreender um ou mais ribonucleótidos (contendo ribose como o único ou o principal componente açúcar), desoxirribonucleótidos (contendo desoxirribose como o principal componente açúcar), ou, tal como é conhecido na especialidade, podem também ser incorporados no PIM açúcares modificados ou análogos de açúcares. Assim, para além da ribose e da desoxirribose, a porção açúcar pode ser pentose, desoxipentose, hexose, desoxihexose, glicose, arabinose, xilose, lixose, e um grupo ciclo-pentilo "análogo" de açúcar. O açúcar pode estar numa forma de

piranosilo ou de furanosilo. No PIM, a porção açúcar é de preferência o furanósido da ribose, desoxirribose, arabinose ou 2'-O-alquilribose, e o açúcar pode ser unido às respectivas bases heterocíclicas na configuração α ou β anomérica. As modificações do açúcar incluem, mas não se limitam a, análogos 2'-alcoxi-ARN, análogos 2'-amino-ARN, análogos 2'-fluoro-ADN e quimeras 2'-alcoxi- ou 2'-amino-ARN/ADN. Por exemplo, uma modificação do açúcar no PIM inclui, mas não se limita a, 2'-O-metil-uridina e 2'-O-metil-citidina. A preparação destes açúcares ou análogos de açúcar e respectivos "nucleósidos" em que tais açúcares ou análogos estão ligados a uma base heterocíclica (base de ácido nucleico) é conhecida *per se*, e não necessita de ser aqui descrita, excepto até ao ponto em que tal preparação pode pertencer a qualquer exemplo específico. Modificações de açúcares podem também ser feitas e combinadas com qualquer modificação do fosfato na preparação de um PIM.

As bases heterocíclicas, ou bases de ácidos nucleicos, que são incorporadas no PIM podem ser as bases purina e pirimidina principais de ocorrência natural, (nomeadamente uracilo, timina, citosina, adenina e guanina, tal como mencionado acima), bem como modificações de ocorrência natural e sintéticas das referidas bases principais. Assim, um PIM pode incluir 2'-desoxiuridina e/ou 2-amino-2'-desoxiadenosina.

Os peritos na especialidade reconhecerão que um grande número de nucleósidos não naturais "sintéticos" compreendendo vários bases heterocíclicas e várias porções açúcar (e análogos de açúcar) estão disponíveis na especialidade, e que desde que outros critérios do presente invento sejam satisfeitos, o PIM pode incluir uma ou várias bases heterocíclicas para além das cinco bases principais componentes dos ácidos nucleicos de ocorrência natural. De preferência, no entanto, a base heterocíclica no PIM inclui, mas não se limita aos grupos uracil-5-ilo, citosin-5-ilo, adenin-7-ilo, adenin-8-ilo, guanin-7-ilo, guanin-8-ilo, 4-aminopirrolo[2,3-d]pirimidin-5-ilo, 2-amino-4-oxopirrolo-[2,3-d]pirimidin-5-ilo, 2-amino-4-oxopirrolo[2,3-d]pirimidin-3-ilo, onde as purinas estão ligadas à porção açúcar do PIM através da posição 9, as pirimidinas através da posição 1, as

pirrolopirimidinas através da posição 7 e as pirazolopirimidinas através da posição 1.

O PIM pode compreender pelo menos uma base modificada. Tal como aqui se utiliza, o termo "base modificada" é sinónimo de "análogo de base", por exemplo, "citosina modificada" é sinónimo de "análogo de citosina". Semelhantemente, nucleósidos ou nucleótidos "modificados" são aqui definidos como sendo sinónimos de "análogos" de nucleósidos ou nucleótidos. Exemplos de modificações de bases incluem, mas não se limitam à adição de uma porção de retirada de electrões ao C-5 e/ou C-6 de uma citosina do PIM. De preferência, a porção de retirada de electrões é um halogéneo. Tais citosinas modificadas podem incluir, mas não se limitam a, azacitosina, 5-bromocitosina, bromouracilo, 5-clorocitosina, citosina clorada, ciclocitosina, arabinósido de citosina, 5-fluorocitosina, fluoropirimidina, fluorouracilo, 5,6-di-hidrocitosina, 5-iodocitosina, hidroxiiureia, iodouracilo, 5-nitrocitosina, uracilo e qualquer outro análogo de pirimidina ou pirimidina modificada. Outros exemplos de modificações de bases incluem, mas não se limitam à adição de uma porção de retirada de electrões ao C-5 e/ou C-6 de um uracilo do polinucleótido imunomodulador. De preferência, a porção de retirada de electrões é um halogéneo. Tais uracilos modificados podem incluir, mas não se limitam a, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-fluorouracilo, 5-iodouracilo.

Outros exemplos de modificações de bases incluem a adição de um ou mais grupos tiol à base incluindo, mas não se limitando a, 2-amino-adenina, 6-tio-guanina, 2-tio-timina, 4-tio-timina, 5-propinil-uracilo e 4-tio-uracilo. Outros exemplos de modificações de bases incluem, mas não se limitam a, N4-etilcitosina, 7-desazaguanina, 7-desaza-8-azaguanina e 5-hidroxicitosina. Ver, por exemplo, Kandimalla *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* 9: 807-813, 2001. Nalgumas concretizações, o PIM compreende as seguintes sequências com bases modificadas (sequência palindrómica sublinhada) e marcadas com um asterisco (*). O resto é apenas para fins ilustrativos.

5'-TCXTCXAACXTTCXAGATGAT (X = 7-desaza-dG) (SEQ ID NO:193);

5'-TCGTCGAA*CGT*TCGAGATGAT (A* = 2-amino-dA; T* = 2-tio-dT) (SEQ ID NO:189);

5'-TCGTCGA*A*CGT*T*CGAGATGAT (A* = 2-amino-dA; T* = 2-tio-dT)
(SEQ ID NO:190);

5'-TCG*TCG*AACG*TTTCG*AG*ATG*AT (G* = 7-desaza-8-aza-dG)
(SEQ ID NO:187);

5'-TCG*AACG*TTTCG*AACG*TTTCG*AACG*TT (G* = 7-desaza-8-aza-dG)
(SEQ ID NO:194*);

5'-TCGT*CGAACGT*T*CGAGAT*GAT* (T* = 5-propinil-dU)
(SEQ ID NO:195);

5'-TCGAACGT*T*CGAACGT*T*CGAACGT*T* (T* = 5-propinil-dU)
(SEQ ID NO:196*);

5'-TCGTCGA*A*CGTTTCGA*GA*TGA*T (A* = 2-amino-dA)
(SEQ ID NO:188);

5'-TCGA*A*CGTTTCGA*A*CGTTTCGA*A*CGTT (A* = 2-amino-dA)
(SEQ ID NO:197*).

Tal como exemplificado no Exemplo 1, os PIM que mantêm uma forma de dúplex a baixa concentração tendem a ser capazes de estimular a produção de IFN- α a partir de PBMC humanas. A estabilização das formas dúplex do polinucleótido através de ligações cruzadas foi descrita acima. Quando na forma dúplex com a sua sequência complementar, certas bases modificadas podem também aumentar a estabilidade dos dúplexes. Por exemplo, 2-amino-dA (comercialmente disponível, por exemplo, em Glen Research) forma 3 ligações de hidrogénio com T em vez de duas ligações de hidrogénio, tal como formadas entre dA e T. SEQ ID NO:188, um análogo de SEQ ID NO:27, contém cinco bases 2-amino-dA em vez das cinco bases dA de SEQ ID NO:27 e forma um dúplex mais forte consigo próprio que SEQ ID NO:27 (dados de cromatografia de exclusão de tamanho). A incorporação destas bases modificadas aumenta a T_f cerca de 3°C por modificação. Tal como demonstrado aqui no Exemplo 1, SEQ ID NO:188 também induziu a produção de mais IFN- α que SEQ ID NO:27 quando as PBMC humanas foram tratadas com 0,8 μ g/ml de PIM. A SEQ ID NO:884 de cadeia dupla induziu cerca de três vezes a produção de IFN- α como SEQ ID NO:188 de cadeia simples.

A preparação de nucleósidos de bases modificadas, e a síntese de oligonucleótidos modificados utilizando os referidos nucleósidos de bases modificadas como precursores,

foi descrita, por exemplo, nas Patentes U.S. 4910300, 4948882 e 5093232. Estes nucleósidos de bases modificadas foram desenhados para poderem serem incorporados através de síntese química em posições terminais ou internas de um oligonucleótido. Tais nucleósidos de bases modificadas, presentes em posições terminais ou internas de um oligonucleótido, podem servir como locais para união de um péptido ou outro antigénio. Foram também descritos nucleósidos modificados na sua porção açúcar (incluindo, mas não se limitando a, p.ex., Patentes U.S. 4849513, 5015733, 5118800, 5118802) e podem ser utilizados semelhantemente.

Nalgumas concretizações, um polinucleótido imunomodulador tem menos de cerca de qualquer um dos seguintes comprimentos (em bases ou pares de bases): 10000; 5000; 2500; 2000; 1500; 1250; 1000; 750; 500; 300; 250; 200; 175; 150; 125; 100; 75; 60; 50; 40; 30; 25; 20; 15; 14; 13; 12; 11; 10. Nalgumas concretizações, um polinucleótido imunomodulador é maior que cerca de qualquer um dos seguintes comprimentos (em bases ou pares de bases): 10; 11; 12; 13; 14; 15; 20; 25; 30; 40; 50; 60; 75; 100; 125; 150; 175; 200; 250; 300; 350; 400; 500; 750; 1000; 2000; 5000; 7500; 10000; 20000; 50000. Alternativamente, o polinucleótido imunomodulador pode ser qualquer um de um intervalo de tamanhos possuindo um limite superior de 10000; 5000; 2500; 2000; 1500; 1250; 1000; 750; 500; 300; 250; 200; 175; 150; 125; 100; 75; 60; 50; 40; 30; 25; 20; 15; 14; 13; 12; 11; 10 e um limite inferior seleccionado independentemente a partir de 10; 11; 12; 13; 14; 15; 20; 25; 30; 40; 50; 60; 75; 100; 125; 150; 175; 200; 250; 300; 350; 400; 500; 750; 1000; 2000; 5000; 7500, em que o limite inferior é menor que o limite superior. Nalgumas concretizações, um PIM tem de preferência cerca de 200 ou menos bases de comprimento.

São também aqui descritos métodos de produção dos polinucleótidos imunomoduladores aqui descritos. Os métodos podem ser qualquer um dos aqui descritos. Por exemplo, o método pode ser síntese do PIM (por exemplo, utilizando síntese em estado sólido) e pode ainda compreender qualquer passo ou passos de purificação. Os métodos de purificação são conhecidos na especialidade. Outros métodos de preparação incluem a combinação de um polinucleótido imunomodulador com um antigénio.

Antigénio

Qualquer antigénio pode ser co-administrado com um polinucleótido imunomodulador e/ou utilizado em composições compreendendo um polinucleótido imunomodulador e um antigénio (e preparações destas composições).

Nalgumas concretizações, o antigénio é um alergénio. Exemplos de alergénios recombinantes são proporcionados na Tabela 1. A preparação de muitos alergénios é bem conhecida na especialidade, incluindo, mas não se limitando a, preparação do alergénio Antigénio E do pólen da ambrósia (Amb a I) (Rafnar et al., *J. Biol. Chem.* 266: 1229-1236, 1991), alergénio Lol p 1 da erva (Tamborini et al., *Eur. J. Biochem.* 249: 886-894, 1997), principais alergénios dos ácaros do pó Der pI e Der PII (Chua et al., *J. Exp. Med.* 167: 175-182, 1988; Chua et al., *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 91: 124-129, 1990), alergénio do gato doméstico Fel d I (Rogers et al., *Mol. Immunol.* 30: 559-568, 1993), pólen de bétula americana Bet vl (Breiteneder et al., *EMBO J.* 8: 1935-1938, 1989), alergénios da criptoméria do Japão Cry j 1 e Cry j 2 (Kington et al., *Immunology* 99: 625-629, 2000), e antigénios proteicos do pólen de outras árvores (Elsayed et al., *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* 204: 17-31, 1991). Tal como indicado, são conhecidos alergénios de árvores, incluindo alergénios do vidoeiro, zimbro e criptoméria do Japão. A preparação de antigénios proteicos a partir do pólen de erva para administração *in vivo* foi relatada.

Nalgumas concretizações, o alergénio é um alergénio alimentar, incluindo, mas não se limitando a, alergénio do amendoim, por exemplo Ara h I (Stanley et al., *Adv. Exp. Med. Biol.* 409: 213-216, 1996); alergénio da noz, por exemplo, Jug r I (Tueber et al., *J. Allergy Clin. Immunol.* 101: 807-814, 1998); alergénio da castanha-do-pará, por exemplo, albumina (Pastorello et al., *J. Allergy Clin. Immunol.* 102: 1021-1027, 1998; alergénio do camarão, por exemplo, Pen a I (Reese et al., *Int. Arch. Allergy Immunol.* 113: 240-242, 1997); alergénio do ovo, por exemplo, ovomucóide (Crooke et al., *J. Immunol.* 159: 2026-2032, 1997); alergénio do leite, por exemplo, β -lactoglobulina bovina (Sel et al., *Clin. Exp. Allergy* 29: 1055-1063, 1999); alergénio do peixe, por exemplo,

parvalbuminas (Van Do et al., *Scand. J. Immunol.* 50: 619-625, 1999; Galland et al., *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 706: 63-71, 1998). Nalgumas concretizações, o alergénio é um alergénio do látex, incluindo mas não se limitando a, Hev b 7 (Sowka et al., *Eur. J. Biochem.* 255: 213-219, 1998). A Tabela 1 mostra uma lista de exemplos de alergénios que podem ser utilizados.

TABELA 1**ALERGÊNIOS RECOMBINANTES**

Grupo	Alergênio	Referência
ANIMAIS:		
CRUSTÁCEOS		
Camarão/Lagosta	tropomiosina Pan s I	Leung et al. (1996) J. Allergy Clin. Immunol. 98:954-961 Leung et al. (1998) Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 7:12-20
INSETOS		
Formiga	Sol i 2 (veneno)	Schmidt et al. J Allergy Clin Immunol., 1996, 98:82-8
Abelha	Fosfolipase A2 (PLA) Hialuronidase (Hya)	Muller et al. J Allergy Clin Immunol, 1995, 96:395-402 Forster et al. J Allergy Clin Immunol, 1995, 95:1229-35 Muller et al. Clin Exp Allergy, 1997, 27:915-20 Soldatova et al. J Allergy Clin Immunol, 1998, 101:691-8
Barata	Bla g Bd9OK Bla g 4 (uma calicina) Glutathione-S- transferase Per a 3	Helm et al. J Allergy Clin Immunol, 1996, 98:172-180 Vailes et al. J Allergy Clin Immunol, 1998, 101:274-280 Arruda et al. J Biol Chem, 1997, 272:20907-12 Wu et al. Mol Immunol, 1997, 34:1-8
Ácaro do pó	Der p 2 (alergênio principal) variante de Der p2 Der f2 Der p10 Tyr p 2	Lynch et al. J Allergy Clin Immunol, 1998, 101:562-4 Hakkaart et al. Clin Exp Allergy, 1998, 28:169-74 Hakkaart et al. Clin Exp Allergy, 1998, 28:45-52 Hakkaart et al. Int Arch Allergy Immunol, 1998, 115 (2):150-6 Mueller et al. J Biol Chem, 1997, 272:26893-8 Smith et al. J Allergy Clin Immunol, 1998, 101:423-5 Yasue et al. Clin Exp Immunol, 1998, 113:1-9 Yasue et al. Cell Immunol, 1997, 181:30-7 Asturias et al. Biochim Biophys Acta, 1998, 1397:27-30 Eriksson et al. Eur J Biochem, 1998
Vespão	Antigênio 5 aka Dol m V (veneno)	Tomalski et al. Arch Insect Biochem Physiol, 1993, 22:303-13
Mosquito	Aed a I (apirase salivar)	Xu et al. Int Arch Allergy Immunol, 1998, 115:245-51
Vespa	antigênio 5, hialuronidase e fosfolipase (veneno)	King et al. J Allergy Clin Immunol, 1996, 98:588-600
MAMÍFEROS		
Gato	Fel d I	Slunt et al. J Allergy Clin Immunol, 1995, 95:1221-8 Hoffmann et al. (1997) J Allergy Clin Immunol 99:227-32 Hedlin Curr Opin Pediatr, 1995, 7:676-82
Vaca	Bos d 2 (pêlo; uma lipocalina) β-lactoglobulina (BLG, principal alergênio do leite de vaca)	Zeiler et al. J Allergy Clin Immunol, 1997, 100:721-7 Rautiainen et al. Biochem Bioph. Res Comm., 1998, 247:746-50 Chatel et al. Mol Immunol, 1996, 33:1113-8 Lehrer et al. Crit Rev Food Sci Nutr, 1996, 36:553-64
Cão	Can f I e Can f 2, lipocalinas salivares	Konieczny et al. Immunology, 1997, 92:577-86 Spitzauer et al. J Allergy Clin Immunol, 1994, 93:614-27 Vrtala et al. J Immunol, 1998, 160:6137-44
Cavalo	Equ c1 (principal alergênio, uma lipocalina)	Gregoire et al. J Biol Chem, 1996, 271:32951-9
Ratinho	proteína urinária de ratinho (MUP)	Konieczny et al. Immunology, 1997, 92:577-86
OUTROS ALERGÊNIOS DE MAMÍFERO		
Insulina		Ganz et al. J Allergy Clin Immunol, 1990, 86:45-51 Grammer et al. J Lab Clin Med, 1987, 109:141-6 Gonzalo et al. Allergy, 1998, 53:106-7
Interferões	interferão alfa 2c	Detmar et al. Contact Dermatitis, 1989, 20:149-50
MOLUSCOS		
	topomiosina	Leung et al. J Allergy Clin Immunol, 1996, 98:954-61
ALERGÊNIOS VEGETAIS:		
Cevada	Hor v 9	Astwood et al. Adv Exp Med Biol, 1996, 409:269-77
Bétula	alergênio do pólen, Bet v 4 rBet v 1 Bet v 2: (profilina)	Twardosz et al. Biochem Bioph. Res Comm., 1997, 23 9:197 Pauli et al. J Allergy Clin Immunol, 1996, 97:1100-9 van Neerven et al. Clin Exp Allergy, 1998, 28:423-33 Jahn-Schmid et al. Immunotechnology, 1996, 2:103-13

		Breitwieser et al. <i>Biotechniques</i> , 1996, 21:918-25 Fuchs et al. <i>J Allergy Clin Immunol</i> , 1997, 100:3 56-64
Castanha-do-pará	globulina	Bartolome et al. <i>Allergol Immunopathol</i> , 1997,25:135-44
Cereja	Pru a I (principal alergénio)	Scheurer et al. <i>Mol Immunol</i> , 1997, 34:619-29
Milho	Zml3 (pólen)	Heiss et al. <i>FEBS Lett</i> , 1996,381:217-21 Lehrer et al. <i>Int Arch Allergy Immunol</i> , 1997, 113:122-4
Erva	Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5 (pólen de rabo-de-gato) Hol 15 pólen da erva-lanar alergénio do género Poa Cyn d 7 de grama Cyn d 12 (uma profilina)	Bufe et al. <i>Am J Respir Crit Care Med</i> , 1998, 157:1269-76 Vrtala et al. <i>J Immunol Jun</i> 15, 1998, 160:6137-44 Niederberger et al. <i>J Allergy Clin Immunol.</i> , 1998, 101:258-64 Schramm et al. <i>Eur J Biochem</i> , 1998, 252:200-6 Zhang et al. <i>J Immunol</i> , 1993, 151:791-9 Smith et al. <i>Int Arch Allergy Immunol</i> , 1997, 114:265-71 Asturias et al. <i>Clin Exp Allergy</i> , 1997, 27:1307-13 Fuchs et al. <i>J Allergy Clin Immunol</i> , 1997, 100:356-64
Criptomeria do Japão	Jun a 2 (<i>Juniperus ashei</i>) Cry j 1, Cry j 2 (<i>Criptomeria japonica</i>)	Yokoyama et al. <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> , 2000, 275:195-202 Kinetsetu et al. <i>Immunology</i> , 2000, 99:625-629
Zimbro	Jun o 2 (pólen)	Tinghino et al. <i>J Allergy Clin Immunol</i> , 1998, 101:772-7
Látex	Hev b 7	Sowka et al. <i>Eur J Biochem</i> , 1998,255:213-9 Fuchs et al. <i>J Allergy Clin Immunol</i> , 1997, 100:3 56-64
<i>Mercurialis</i>	Mer a I (profilina)	Vallverdu et al. <i>J Allergy Clin Immunol</i> , 1998, 101:3 63-70
Mostarda (Amarela)	Sin a I (semente)	Gonzalez de la Pena et al. <i>Biochem Bioph. Res Commun.</i> , 1993, 190:648-53
Colza	alergénio do pólen Bra r I	Smith et al. <i>Int Arch Allergy Immunol</i> , 1997, 114:265-71
Amendoim	Ara h I	Stanley et al. <i>Adv Exp Med Biol</i> , 1996, 409:213-6 Burks et al. <i>J Clin Invest</i> , 1995, 96:1715-21 Burks et al. <i>Int Arch Allergy Immunol</i> , 1995, 107:248-50
<i>Poa pratensis</i>	Poa p9	Parronchi et al. <i>Eur J Immunol</i> , 1996, 26:697-703 Astwood et al. <i>Adv Exp Med Biol</i> , 1996, 409:269-77
Ambrósia	Amb a I	Sun et al. <i>Biotechnology Aug</i> , 1995, 13:779-86 Hirschwehr et al. <i>J Allergy Clin Immunol</i> , 1998, 101:196-206 Casale et al. <i>J Allergy Clin Immunol</i> , 1997, 100:110-21
Centeio	Lol p I	Tamborini et al. <i>Eur J Biochem</i> , 1997, 249:886-94
Noz	Jug r I	Teuber et al. <i>J Allergy Clin Immunol.</i> , 1998, 101:807-14
Trigo	alergénio	Fuchs et al. <i>J Allergy Clin Immunol</i> , 1997, 100:356-64 Donovan et al. <i>Electrophoresis</i> , 1993, 14:917-22
FUNGOS:		
<i>Aspergillus</i>	Asp f 1, Asp f2, Asp f3, Asp f 4, rAsp f6 Manganês- superóxido- dismutase (MNSOD)	Cramer et al. <i>Mycoses</i> , 1998, 41 Suppl 1:56-60 Hemmann et al. <i>Eur J Immunol</i> , 1998, 28:1155-60 Banerjee et al. <i>J Allergy Clin Immunol</i> , 1997, 99:821-7 Cramer et al. <i>Int Arch Allergy Immunol</i> , 1998, 115:99-114 Cramer et al. <i>Adv Exp Med Biol</i> , 1996, 409:111-6 Moser et al. <i>J Allergy Clin Immunol</i> , 1994, 93: 1-11 Mayer et al. <i>Int Arch Allergy Immunol</i> , 1997, 113:213-5
<i>Blomia</i>	alergénio	Caraballo et al. <i>Adv Exp Med Biol</i> , 1996, 409:81-3
<i>Penicillium</i>	alergénio	Shen et al. <i>Clin Exp Allergy</i> , 1997, 27:682-90
<i>Psilocybe</i>	Psi c 2	Horner et al. <i>Int Arch Allergy Immunol</i> , 1995, 107:298-300

Nalgumas concretizações, o antigénio é de um agente infeccioso, incluindo protozoários, bacterianos, fúngicos (incluindo unicelulares e multicelulares), e virais. Exemplos de antigénios virais adequados são aqui descritos e são conhecidos na especialidade. As bactérias incluem *Hemophilus influenza*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Bordetella pertussis*. Agentes infecciosos protozoários incluem o plasmódio da malária, espécies de *Leishmania*, espécies de *Trypanosoma* e espécies de *Schistosoma*. Os fungos incluem *Candida albicans*.

Nalgumas concretizações, o antígeno é um antígeno viral. Antígenos polipeptídicos virais incluem, mas não se limitam a, proteínas de VIH tais como proteínas gag de VIH (incluindo, mas não se limitando a, proteína de ancoramento na membrana (MA), proteína da cápside nuclear (CA) e proteína da nucleocápside (NC)), polimerase de VIH, proteína da matriz do vírus *influenza* (M) e proteína da nucleocápside do vírus *influenza* (NP), antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg), proteína nuclear da hepatite B (HBcAg), proteína da hepatite e (HBeAg), ADN-polimerase da hepatite B, antígenos da hepatite C e semelhantes. Referências discutindo a vacinação de *influenza* incluem Scherle e Gerhard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 4446-4450, 1998; Scherle e Gerhard, *J. Exp. Med.* 164: 1114-1128, 1986; Granoff et al., *Vaccine* 11: 546-51, 1993; Kodihalli et al., *J. Virol.* 71: 3391-3396, 1997; Ahmeida et al., *Vaccine* 11: 1302-1309, 1993; Chen et al., *Vaccine* 17: 653-659, 1999; Govorkova e Smimov, *Acta Virol.* 41: 251-257, 1997; Koide et al., *Vaccine* 13: 3-5, 1995; Mbawuiké et al., *Vaccine* 12: 1340-1348, 1994; Tamura et al., *Vaccine* 12: 310-316, 1994; Tamura et al., *Eur. J. Immunol.* 22: 477-481, 1992; Hirabayashi et al., *Vaccine* 8: 595-599, 1990. Outros exemplos de polipéptidos antígenos são os antígenos específicos do grupo ou subgrupo, que são conhecidos para vários agentes infecciosos, incluindo, mas não se limitando a, adenovírus, vírus de herpes *simplex*, vírus do papiloma, vírus sincicial respiratório e poxvírus.

Muitos péptidos e proteínas antigénicos são conhecidos e estão disponíveis na especialidade; outros podem ser identificados utilizando técnicas convencionais. Para imunização contra formação de tumores ou tratamento de tumores existentes, os péptidos imunomoduladores podem incluir células tumorais (vivas ou irradiadas), extractos de células tumorais ou subunidades proteicas de antígenos tumorais tais como Her-2/neu, Mart1, antígeno carcinoembrionário (CEA), gangliósidos, glóbulo de gordura do leite humano (HMFG), mucina (MUC1), antígenos MAGE, antígenos BAGE, antígenos GAGE, gp100, antígeno específico da próstata (PSA) e tirosinase. Podem ser formadas vacinas para contracepção com base imunológica incluindo proteínas de esperma administradas com PIM. Lea et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1307: 263, 1996.

Vírus atenuados e inactivados são adequados para utilizar aqui como antigénio. A preparação destes vírus é bem conhecida na especialidade e muitos estão comercialmente disponíveis (ver, p.ex., "Physicians' Desk Reference" (1998) 52ª edição, Medical Economics Company, Inc.). Por exemplo, o poliovírus está disponível como IPOL® (Pasteur Merieux Connaught) e ORIMUNE® (Lederle Laboratories), o vírus da hepatite A como VAQTA® (Merck), o vírus do sarampo como ATTENUVAX® (Merck), o vírus da papeira como MUMPSVAX® (Merck) e vírus da rubéola como MERUVAX®II (Merck). Adicionalmente, vírus atenuados e inactivados tais como VIH-1, VIH-2, vírus de herpes *simplex*, vírus da hepatite B, rotavírus, papilomavírus humano e não humano e vírus lentos do cérebro podem proporcionar antigénios peptídicos.

Nalgumas concretizações, o antigénio compreende um vector viral, tal como vacínia, adenovírus e varíola canarina.

Os antigénios podem ser isolados a partir da sua fonte utilizando técnicas de purificação conhecidas na especialidade ou, mais convenientemente, podem ser produzidos utilizando métodos recombinantes.

Os péptidos antigénicos podem incluir péptidos nativos purificados, péptidos sintéticos ou proteínas recombinantes, extractos proteicos brutos, vírus atenuados ou inactivados, células, microrganismos ou fragmentos de tais péptidos. Os péptidos imunomoduladores podem ser nativos ou sintetizados quimicamente ou enzimaticamente. Qualquer método de síntese química conhecido na especialidade é adequado. A síntese peptídica em fase de solução pode ser utilizada para construir péptidos de tamanho moderado ou, para a construção química de péptidos, pode ser empregue síntese de fase sólida. Atherton *et al.*, *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 362: 833-839, 1981. Podem também ser utilizadas enzimas proteolíticas para unir aminoácidos para produzir péptidos. Kullmann (1987) "Enzymatic Peptide Synthesis", CRC Press, Inc. Alternativamente, o péptido pode ser obtido através da utilização da maquinaria bioquímica de uma célula ou através de isolamento a partir de uma fonte biológica. Para a produção de péptidos podem ser empregues técnicas de ARN recombinante. Hames *et al.*, 1987,

"Transcription and Translation: A Practical Approach", IRL Press. Os péptidos podem também ser isolados utilizando técnicas padrão tais como cromatografia de afinidade.

De preferência os antígenos são péptidos, lípidos (p.ex., esteróis excluindo colesterol, ácidos gordos e fosfolípidos), polissacáridos tais como os utilizados em vacinas de *H. influenza*, gangliósidos e glicoproteínas. Estes podem ser obtidos através de vários métodos conhecidos na especialidade, incluindo isolamento e síntese utilizando métodos químicos e enzimáticos. Em certos casos, tais como para muitos esteróis, ácidos gordos e fosfolípidos, as porções antigénicas das moléculas estão comercialmente disponíveis.

Exemplos de antígenos virais úteis nas composições e métodos sujeitos utilizando as composições incluem, mas não se limitam a, antígenos de VIH. Tais antígenos incluem, mas não se limitam aos antígenos derivados das glicoproteínas do envelope de VIH incluindo, mas não se limitam a, gp160, gp120 e gp41. São conhecidas numerosas sequências para genes e antígenos de VIH. Por exemplo, a base de dados *Los Alamos National Laboratory HIV Sequence Database* recolhe, trata e anota sequências nucleotídicas e de aminoácidos de VIH. Esta base de dados está acessível através da *internet* e numa publicação anual, ver "Human Retrovirus and AIDS Compendium" (por exemplo, edição de 2000).

Os antígenos derivados de agentes infecciosos podem ser obtidos utilizando métodos conhecidos na especialidade, por exemplo, a partir de extractos virais ou bacterianos, a partir de células infectadas com o agente infeccioso, a partir de polipéptidos purificados, a partir de polipéptidos produzidos de forma recombinante e/ou como péptidos sintéticos.

PIM-Antigénio

Quando utilizado com antigénio, o PIM pode ser administrado com o antigénio de vários modos. Nalgumas concretizações, um PIM e um antigénio podem ser administrados espacialmente próximos em relação um ao outro, ou como uma mistura (*i.e.*, em solução). Tal como descrito abaixo, a aproximação espacial pode ser alcançada de vários modos, incluindo conjugação (ligação), encapsidação, através de afixação numa plataforma ou adsorção numa superfície. Geralmente, e de maior preferência, um PIM e um antigénio estão associados em proximidade a uma distância eficaz para aumentar a resposta imunitária gerada em comparação com a administração do PIM e do antigénio como uma mistura.

Nalgumas concretizações, o PIM é conjugado com o antigénio. A porção PIM pode ser ligada à porção antigénio de um conjugado numa variedade de modos, incluindo interacções covalentes e/ou não covalentes.

A ligação entre as porções pode ser feita na extremidade 3' ou 5' do PIM, ou numa base adequadamente modificada numa posição interna no PIM. Se o antigénio for um péptido e contiver um grupo reactivo adequado (*p.ex.*, um éster de N-hidroxissuccinimida), pode reagir directamente com o grupo amino N⁴ dos resíduos de citosina. Dependendo do número e da localização dos resíduos de citosina no PIM, pode ser alcançada a ligação específica num ou mais resíduos.

Alternativamente, oligonucleósidos modificados, tais como são conhecidos na especialidade, podem ser incorporados em posições terminais ou internas no PIM. Estes podem conter grupos funcionais bloqueados que, quando desbloqueados, são reactivos com uma variedade de grupos funcionais que podem estar presentes ou ser unidos ao antigénio de interesse.

Quando o antigénio é um péptido ou polipéptido, esta porção do conjugado pode ser unida à extremidade 3' do PIM através de química de suporte sólido. Por exemplo, a porção PIM pode ser adicionada a uma porção polipéptido que tenha sido pré-sintetizada num suporte. Haralambidis *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 18: 493-499, 1990a; e Haralambidis *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 18: 501-505, 1990b. Alternativamente, o PIM pode

ser sintetizado de modo a que fique ligado a um suporte sólido através de um ligante clivável que se prolongue desde a extremidade 3'. Após clivagem química do PIM do suporte, é deixado um grupo tio terminal na extremidade 3' do oligonucleótido (Zuckermann *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 15: 5305-5321, 1987; e Corey *et al.*, *Science* 238: 1401-1403, 1987) ou é deixado um grupo amino terminal na extremidade 3' do oligonucleótido (Nelson *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 17: 1781-1794, 1989). A conjugação do PIM modificado em amino com grupos amino do péptido pode ser efectuada tal como descrito em Benoit *et al.*, *Neuromethods* 6: 43-72, 1987. A conjugação do PIM modificado em tiol com grupos carboxilo do péptido pode ser efectuada tal como descrito em Sinah *et al.*, 1991, "Oligonucleótido Analogues: A Practical Approach", IRL Press. Foi também descrita a ligação de um oligonucleótido possuindo uma maleimida anexa à cadeia lateral tiol de um resíduo de cisteína de um péptido. Tung *et al.*, *Bioconjug. Chem.* 2: 464-465, 1991.

A porção péptido ou polipéptido do conjugado pode ser unida à extremidade 5' do PIM através de um grupo amina, tiol ou carboxilo que tenha sido incorporado no oligonucleótido durante a sua síntese. De preferência, enquanto o oligonucleótido é fixado no suporte sólido, um grupo de ligação compreendendo uma amina, um tiol ou um carboxilo protegido numa extremidade e um fosforamidito na outra, é ligado covalentemente ao hidroxilo 5'. Agrawal *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 14: 6227-6245, 1986; Connolly, *Nucleic Acids Res.* 13: 4485-4502, 1985; Kremsky *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 15: 2891-2909, 1987; Connolly, *Nucleic Acids Res.* 15: 3131-3139, 1987; Bischoff *et al.*, *Anal. Biochem.* 164: 336-344, 1987; Blanks *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 16: 10283-10299, 1988; e Patentes U.S. 4849513, 5015733, 5118800 e 5118802. Subsequentemente à desprotecção podem ser utilizadas as funcionalidades de amina, tiol e carboxilo para ligar covalentemente o oligonucleótido a um péptido. Benoit *et al.*, 1987; e Sinah *et al.*, 1991.

Um conjugado PIM-antigénio pode também ser formado através de interacções não covalentes, tais como ligações iónicas, interacções hidrófobas, pontes de hidrogénio e/ou atracções de van der Waals.

Os conjugados ligados não covalentemente podem incluir uma interacção não covalente tal como um complexo biotina-estreptavidina. Um grupo biotinilo pode ser ligado, por exemplo, a uma base modificada de um PIM. Roget et al., *Nucleic Acids Res.* 17: 7643-7651, 1989. A incorporação de uma porção estreptavidina na porção péptido permite a formação de um complexo ligado não covalentemente do péptido conjugado com estreptavidina com o oligonucleótido biotinilado.

Podem também ocorrer associações não covalentes através de interacções iónicas envolvendo um PIM e resíduos dentro do antigénio, tais como aminoácidos com carga ou através da utilização de uma porção ligante compreendendo resíduos com carga que possam interagir tanto como o oligonucleótido como com o antigénio. Por exemplo, pode ocorrer conjugação não covalente entre um PIM com carga geralmente negativa e resíduos de aminoácidos com carga positiva de um péptido, p.ex., resíduos de polilisina, poliarginina e poli-histidina.

A conjugação não covalente entre PIM e antigénios podem ocorrer através de motivos de ligação ao ADN de moléculas que interajam com ADN como seus ligandos naturais. Por exemplo, tais motivos de ligação ao ADN podem ser verificados em factores de transcrição e anticorpos anti-ADN.

A ligação do PIM a um lípido pode ser formada utilizando métodos padrão. Estes métodos incluem, mas não se limitam à síntese de conjugados oligonucleótido-fosfolípido (Yanagawa et al., *Nucleic Acids Symp. Ser.* 19: 189-192, 1988), conjugados oligonucleótido-ácido gordo (Grabarek et al., *Anal. Biochem.* 185: 131-135, 1990; e Staros et al., *Anal. Biochem.* 156: 220-222, 1986), e conjugados oligonucleótido-esterol. Boujrad et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5728-5731, 1993.

A ligação do oligonucleótido a um oligossacárido pode ser formada utilizando métodos padrão conhecidos. Estes métodos incluem, mas não se limitam à síntese de conjugados oligonucleótido-oligossacárido, em que o oligossacárido é uma porção de uma imunoglobulina. O'Shannessy et al., *J. Applied Biochem.* 7: 347-355, 1985.

A ligação de um PIM circular a um péptido ou antigénio pode ser formada de vários modos. Quando o PIM circular é sintetizado utilizando métodos recombinantes ou químicos, é adequado um nucleósido modificado. Ruth (1991) em "Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach", IRL Press. Tecnologia de ligação padrão pode então ser utilizada para ligar o PIM circular ao antigénio ou outro péptido. Goodchild, *Bioconjug. Chem.* 1: 165, 1990. Quando o PIM circular é isolado, ou sintetizado utilizando métodos recombinantes ou químicos, a ligação pode ser formada através de activação química, ou fotoactivação, de um grupo reactivo (p.ex., carbeno, radical) que tenha sido incorporado no antigénio ou outro péptido.

Métodos adicionais para a ligação de péptidos e outras moléculas a oligonucleótidos podem ser verificados na Patente U.S. 5391723; Kessler (1992) "Nonradioactive labeling methods for nucleic acids" em Kricka (ed.) "Nonisotopic DNA Probe Techniques", Academic Press; e Geoghegan *et al.*, *Bioconjug. Chem.* 3: 138-146, 1992.

Um PIM pode estar associado em proximidade com um ou mais antigénios de outros modos. Nalgumas concretizações, um PIM e um antigénio estão associados em proximidade através de encapsulamento. Noutras concretizações, um PIM e um antigénio estão associados em proximidade através de ligação a uma molécula plataforma. Uma "molécula plataforma" (também chamada "plataforma") é uma molécula contendo locais que permitem a ligação do PIM e do antigénio ou antigénios. Noutras concretizações, um PIM e um antigénio estão associados em proximidade através de adsorção numa superfície, de preferência uma partícula transportadora.

Nalgumas concretizações, o presente invento emprega um agente de encapsulamento que pode manter a associação próxima do PIM com o primeiro antigénio até o complexo estar disponível para o alvo (ou composições compreendendo tais agentes de encapsulamento). De preferência, a composição compreendendo PIM, antigénio e agente de encapsulamento está na forma de emulsões adjuvantes de óleo em água, micropartículas e/ou lipossomas. De maior preferência, as emulsões adjuvantes de óleo em água, micropartículas e/ou

lipossomas que encapsulam uma molécula imunomoduladora PIM estão na forma de partículas com cerca de 0,04 μm a cerca de 100 μm de tamanho, de preferência qualquer um dos seguintes intervalos: de cerca de 0,1 μm a cerca de 20 μm ; de cerca de 0,15 μm a cerca de 10 μm ; de cerca de 0,05 μm a cerca de 1,00 μm ; de cerca de 0,05 μm a cerca de 0,5 μm .

Sistemas de dispersão coloidais, tais como microesferas, contas, complexos macromoleculares, nanocápsulas e sistemas baseados em lípidos, tais como emulsões de óleo em água, micelas, micelas mistas e lipossomas podem proporcionar um encapsulamento eficaz de composições contendo PIM.

A composição de encapsulamento compreende ainda qualquer um de uma variedade de componentes. Estes incluem, mas não se limitam a, alúmen, lípidos, fosfolípidos, estruturas membranares lipídicas (LMS), polietilenoglicol (PEG) e outros polímeros, tais como polipéptidos, glicopéptidos e polissacáridos.

Polipéptidos adequados para encapsular componentes incluem qualquer um conhecido na especialidade e incluem, mas não se limitam a, proteínas de ligação a ácidos gordos. Os polipéptidos modificados contêm qualquer uma de uma variedade de modificações, incluindo, mas não se limitando a, glicosilação, fosforilação, miristilação, sulfatação e hidroxilação. Tal como aqui se utiliza, um polipéptido adequado é um que protegerá uma composição contendo PIM para conservar a actividade imunomoduladora deste. Exemplos de proteínas de ligação incluem, mas não se limitam a, albuminas tais como albumina de soro bovino (BSA) e albumina de ervilha.

Outros polímeros adequados podem ser qualquer um conhecido na especialidade farmacêutica e incluem, mas não se limitam a, polímeros de ocorrência natural tais como dextranos, hidroxietil-amido e polissacáridos, e polímeros sintéticos. Exemplos de polímeros de ocorrência natural incluem proteínas, glicopéptidos, polissacáridos, dextrano e lípidos. O polímero adicional pode ser um polímero sintético. Exemplos de polímeros sintéticos que são adequados para utilizar no presente invento incluem, mas não se limitam a, polialquilglicóis (PAG) tais como PEG, polióis polioxietilados

(POP), tais como glicerol polioxietilado (POG), politrimetilenoglicol (PTG), polipropilenoglicol (PPG), polihidroxietilmetacrilato, poli(álcool vinílico) (PVA), poli(ácido acrílico), polietiloxazolina, poliacrilamida, polivinilpirrolidona (PVP), poliaminoácidos, poliuretano e polifosfazeno. Os polímeros sintéticos podem também ser lineares ou ramificados, substituídos ou não substituídos, homopoliméricos, copolímeros, ou copolímeros de blocos de dois ou mais monómeros sintéticos diferentes.

Os PEG para utilizar no encapsulamento das composições do presente invento são adquiridos em fornecedores de produtos químicos ou sintetizados utilizando técnicas conhecidas dos peritos na especialidade.

O termo "LMS", tal como aqui se utiliza, significa partículas lipídicas lamelares em que grupos de cabeça polar de um lípido polar são dispostos para fazerem face a uma fase aquosa de uma interface para formar estruturas membranares. Exemplos das LMS incluem lipossomas, micelas, cocleatos (*i.e.*, lipossomas geralmente cilíndricos), microemulsões, vesículas unilamelares, vesículas multilamelares e semelhantes.

Um sistema de dispersão coloidal preferido deste invento é um lipossoma. Em ratinhos imunizados com um antigénio encapsulado em lipossomas, os lipossomas pareceram aumentar uma resposta imunitária de tipo Th1 ao antigénio. Aramaki *et al.*, *Vaccine* 13: 1809-1814, 1995. Tal como aqui se utiliza um "lipossoma" ou "vesícula lipídica" é uma pequena vesícula ligada através de pelo menos uma e possivelmente mais de uma membrana de bicamada lipídica. Os lipossomas são produzidos artificialmente a partir de fosfolípidos, glicolípidos, lípidos, esteróides tais como colesterol, moléculas aparentadas ou uma combinação destes através de qualquer técnica conhecida na especialidade, incluindo mas não se limitando a ultra-sons, extrusão ou remoção de detergente a partir de complexos lípido-detergente. Um lipossoma pode também compreender opcionalmente componentes adicionais, tais como um componente de direcção para o tecido. Entende-se que uma "membrana lipídica" ou "bicamada lipídica" não consiste exclusivamente em lípidos, mas pode adicionalmente conter quaisquer outros componentes adequados, incluindo, mas

não se limitando a, colesterol e outros esteróides, químicos solúveis em lípidos, proteínas de qualquer comprimento e outras moléculas anfipáticas, desde que a estrutura geral da membrana seja um folha de duas superfícies hidrófilas ensanduichando um núcleo central hidrófobo. Para uma discussão geral da estrutura membranar, ver "The Encyclopedia of Molecular Biology" de J. Kendrew (1994). Para lípidos adequados ver p.ex., Lasic (1993) "Lipossomas: from Physics to Applications" Elsevier, Amsterdão.

Os processos para preparação de composições contendo PIM contendo lipossomas são conhecidos na especialidade. As vesículas lipídicas podem ser preparadas através de qualquer técnica conhecida na especialidade. Os métodos incluem, mas não se limitam a, microencapsulamento, microfluidificação, método LLC, injeção de etanol, injeção de fréon, o método da "bolha", diálise de detergente, hidratação, ultra-sons, e evaporação de fase inversa. Revisto em Watwe *et al.*, *Curr. Sci.* 68: 715-724, 1995. As técnicas podem ser combinadas para proporcionar vesículas com os atributos mais desejáveis.

O presente invento engloba a utilização de LMS contendo componentes de direccionamento para tecidos ou células. Tais componentes de direccionamento são componentes de uma LMS que aumentam a sua acumulação preferencialmente em certos locais tecidulares ou celulares em relação a outros locais tecidulares ou celulares quando administrados a um animal intacto, órgão ou cultura celular. Um componente de direccionamento é geralmente acessível de fora do lipossoma e está portanto de preferência ligado à superfície externa ou inserido na bicamada lipídica externa. Um componente de direccionamento pode ser *inter alia* um péptido, uma região de um péptido maior, um anticorpo específico para uma molécula ou marcador da superfície celular, ou um fragmento de ligação ao antigénio deste, um ácido nucleico, um hidrato de carbono, uma região de um hidrato de carbono complexo, um lípido especial, ou uma molécula pequena tal como um fármaco, uma hormona ou um hapteno, ligada a qualquer uma das moléculas acima mencionadas. Anticorpos com especificidade para marcadores da superfície celular específicos do tipo celular são conhecidos na especialidade e são facilmente preparados através de métodos conhecidos na especialidade.

As LMS podem ser direccionadas a qualquer tipo celular contra o qual se pretende dirigir um tratamento terapêutico, p.ex., um tipo celular que possa modular e/ou participar numa resposta imunitária. Tais células e órgãos alvo incluem, mas não se limitam a, APC, tais como macrófagos, células dendríticas e linfócitos, estruturas linfáticas, tais como nódulos linfáticos e o baço, e estruturas não linfáticas, particularmente aquelas nas quais se verificam células dendríticas.

As composições de LMS do presente invento podem compreender adicionalmente tensioactivos. Os tensioactivos podem ser catiónicos, aniónicos, anfifílicos, ou não iónicos. Uma classe preferida de tensioactivos é a dos tensioactivos não iónicos; particularmente preferidos são os que são solúveis em água.

Em concretizações nas quais um PIM e um antigénio estão associados em proximidade através de ligação a uma molécula plataforma, a plataforma pode ser proteinácea ou não proteinácea (*i.e.*, orgânica). Exemplos de plataformas proteináceas incluem, mas não se limitam a, albumina, gamaglobulina, imunoglobulina (IgG) e ovalbumina. Borel *et al.*, *Immunol. Methods* 126: 159-168, 1990; Dumas *et al.*, *Arch. Dermatol. Res.* 287: 123-128, 1995; Borel *et al.*, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 107: 264-267, 1995; Borel *et al.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 778: 80-87, 1996. Uma plataforma é multivalente (*i.e.*, contém mais de um local de ligação ou união) para acomodar a ligação a um PIM e um antigénio. Assim, uma plataforma pode conter 2 ou mais, 3 ou mais, 4 ou mais, 5 ou mais, 6 ou mais, 7 ou mais, 8 ou mais, 9 ou mais, 10 ou mais locais de ligação ou união. Outros exemplos de plataformas poliméricas são dextrano, poliacrilamida, Ficoll, carboximetilcelulose, poli(álcool vinílico) e poli-ácido D-glutâmico/D-lisina.

Os princípios de utilização de moléculas plataforma são bem compreendidos na especialidade. Geralmente, uma plataforma contém, ou é derivada para conter, locais de ligação apropriados para o PIM e o antigénio. Adicionalmente, ou alternativamente, o PIM e/ou o antigénio é derivado para

proporcionar grupos de ligação apropriados. Por exemplo, uma simples plataforma é um ligante bifuncional (*i.e.*, tem dois locais de ligação), tal como um péptido. Mais exemplos são discutidos abaixo.

As moléculas plataforma podem ser biologicamente estabilizadas, *i.e.*, exibem frequentemente uma semivida de excreção *in vivo* de horas a dias a meses para conferir eficácia terapêutica e são de preferência compostas de uma cadeia simples sintética de composição definida. Têm geralmente um peso molecular no intervalo de cerca de 200 a cerca de 1 000 000, de preferência qualquer um dos seguintes intervalos: de cerca de 200 a cerca de 500 000; de cerca de 200 a cerca de 200 000; de cerca de 200 a cerca de 50 000 (ou menos, tal como 30 000). Exemplos de moléculas plataforma de valência são polímeros (ou são constituídas por polímeros) tais como polietilenoglicol (PEG; de preferência possuindo um peso molecular de cerca de 200 a cerca de 8000), poli-D-lisina, poli(álcool vinílico), polivinilpirrolidona, ácido D-glutâmico e D-lisina (numa proporção de 3:2). Outras moléculas que podem ser utilizadas são albumina e IgG.

Outras moléculas plataforma adequadas para utilizar dentro do presente invento são as moléculas plataforma de valência quimicamente definidas, não poliméricas divulgadas na Patente U.S. 5552391. Outras moléculas plataforma de valência quimicamente definidas homogêneas adequadas para utilizar no presente invento são derivadas de 2,2'-etilenodioxidiethylamina (EDDA) e trietilenoglicol (TEG).

Moléculas plataforma de valência adequadas adicionais incluem, mas não se limitam a, tetra-aminobenzeno, hepta-aminobetaciclodextrina, tetra-aminopentaeritritol, 1,4,8,11-tetra-azaciclotetradecano (Cyclam) e 1,4,7,10-tetra-azaciclododecano (Cyclen).

Em geral, estas plataformas são feitas através de técnicas de síntese química padrão. O PEG tem de ser derivado e tornado multivalente, o que é conseguido utilizando técnicas padrão. Algumas substâncias adequadas para síntese conjugada, tais como PEG, albumina, e IgG estão comercialmente disponíveis.

A conjugação de um PIM e um antígeno com uma molécula plataforma pode ser efectuada de muitos modos, tipicamente envolvendo um ou mais agentes de reticulação e grupos funcionais na plataforma de antígeno e PIM e na molécula plataforma. As plataformas e o PIM e o antígeno têm de ter grupos de ligação apropriados. Os grupos de ligação são adicionados a plataformas utilizando técnicas de síntese química padrão. Os grupos de ligação podem ser adicionados a antígenos polipeptídicos e a PIM utilizando técnicas sintéticas de fase sólida padrão ou técnicas recombinantes. As abordagens recombinantes podem requerer modificação pós-tradução para unir um ligante, e tais métodos são conhecidos na especialidade.

Como exemplo, os polipéptidos contêm porções da cadeia lateral dos aminoácidos contendo grupos funcionais tais como grupos amino, carboxilo ou sulfidrilos que servem como locais para ligação do polipéptido à plataforma. Os resíduos que têm tais grupos funcionais podem ser adicionados ao polipéptido se o polipéptido não contiver já esses grupos. Tais resíduos podem ser incorporados através de técnicas de síntese de fase sólida ou técnicas recombinantes, ambas as quais são bem conhecidas nas artes de síntese peptídica. Quando o polipéptido tem uma ou mais cadeias laterais de hidrato de carbono (ou se o antígeno for um hidrato de carbono), grupos funcionais amino, sulfidrilos e/ou aldeído podem ser incorporados aí através de química convencional. Por exemplo, grupos amino primários podem ser incorporados através de reacção do açúcar oxidado com etilenodiamina na presença de cianoboro-hidreto de sódio, podem ser introduzidos sulfidrilos através de reacção de dicloridrato de cisteamina seguida de redução com um agente redutor de dissulfureto padrão, enquanto grupos aldeído podem ser gerados após oxidação de periodato. De um modo semelhante, a molécula plataforma pode também ser derivada para conter grupos funcionais se não possuir já grupos funcionais apropriados.

Ligantes hidrófilos de comprimentos variáveis são úteis para ligar o PIM e o antígeno a moléculas plataforma. Ligantes adequados incluem oligómeros lineares ou polímeros de etilenoglicol. Tais ligantes incluem ligantes com a fórmula

$R^1S(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2O(CH_2)_mCO_2R^2$ em que $n=0-200$, $m=1$ ou 2 , $R^1=H$ ou um grupo protector tal como tritilo, $R^2=H$ ou alquilo ou arilo, p.ex., éster de 4-nitrofenilo. Estes ligantes são úteis na ligação de uma molécula contendo um grupo tiol reactivo tal como haloaceílo, maleiamida, etc., através de um tioéter a uma segunda molécula que contenha um grupo amino através de uma ligação amida. Estes ligantes são flexíveis em relação à ordem de ligação, i.e., o tioéter pode ser formado primeiro ou no fim.

Em concretizações nas quais um PIM e um antigénio estão associados em proximidade através de adsorção numa superfície, a superfície pode estar na forma de uma partícula transportadora (por exemplo, uma nanopartícula) feita com um núcleo inorgânico ou orgânico. Exemplos de tais nanopartículas incluem, mas não se limitam a, partículas nanocristalinas, nanopartículas feitas através de polimerização de alquilcianoacrilatos e nanopartículas feitas através de polimerização de metilidenomalonato. Superfícies adicionais às quais um PIM e um antigénio podem ser adsorvidos incluem, mas não se limitam a, partículas de carbono activado e nanoplacas cerâmicas de proteínas. Outros exemplos de partículas transportadoras são aqui proporcionados.

A adsorção de polinucleótidos e polipéptidos a uma superfície para o fim de entrega das moléculas adsorvidas a células é bem conhecida na especialidade. Ver, por exemplo, Douglas *et al.*, *Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier Syst.* 3: 233-261, 1987; Hagiwara *et al.*, *In Vivo* 1: 241-252, 1987; Bousquet *et al.*, *Pharm. Res.* 16: 141-147, 1999; e Kossovsky *et al.*, Patente U.S. 5460831. De preferência, o material compreendendo a superfície adsorvente é biodegradável. A adsorção de um PIM e/ou um antigénio a uma superfície pode ocorrer através de interacções não covalentes, incluindo interacções iónicas e/ou hidrófobas.

Em geral, as características de transportadores como nanopartículas, tais como carga superficial, tamanho da partícula e peso molecular, dependem das condições de polimerização, concentração do monómero e presença de estabilizantes durante o processo de polimerização (Douglas *et al.*, 1987). A superfície das partículas transportadores pode

ser modificada, por exemplo, com um revestimento de superfície, para permitir ou aumentar a adsorção do PIM e/ou do antigénio. As partículas de transportador com PIM e/ou antigénio adsorvidos podem ainda ser revestidas com outras substâncias. A adição de tais outras substâncias pode, por exemplo, prolongar a semivida das partículas uma vez administradas ao sujeito e/ou pode direccionar as partículas para um tipo celular ou tecido específico, tal como aqui descrito.

Foram descritas superfícies nanocristalinas às quais um PIM e um antigénio podem ser adsorvidos (ver, por exemplo, Patente U.S. 5460831). Partículas centrais nanocristalinas (com diâmetros de 1 μm ou menos) são revestidas com uma camada de alteração da energia superficial que promove a adsorção de polipéptidos, polinucleótidos e/ou outros agentes farmacêuticos. Tal como descrito na Patente U.S. 5460831, por exemplo, uma partícula central é revestida com uma superfície que promova a adsorção de um oligonucleótido e é subsequentemente revestida com uma preparação de antigénio, por exemplo, na forma de uma mistura lípido-antigénio. Tais nanopartículas são complexos que se montam por si de partículas com um tamanho em nanómetros, tipicamente na ordem de 0,1 μm , que possuem uma camada interna de PIM e uma camada externa de antigénio.

Outra superfície adsorvente são nanopartículas feitas através de polimerização de alquilcianoacrilatos. Os alquilcianoacrilatos podem ser polimerizados em meios aquosos acidificados através de um processo de polimerização aniónica. Dependendo das condições de polimerização, as partículas pequenas tendem a ter tamanhos no intervalo de 20 a 3000 nm, e é possível fazer nanopartículas com características superficiais específicas e com cargas superficiais específicas (Douglas et al., 1987). Por exemplo, oligonucleótidos podem ser adsorvidos a nanopartículas de poli-isobutilcianoacrilato e poli-iso-hexilcianoacrilato na presença de catiões hidrófobos tais como cloreto de tetrafenilfosfónio ou sais de amónia quaternários, tais como brometo de cetiltrimetilamónio. A adsorção de oligonucleótidos nestas nanopartículas parece ser mediada pela formação de pares iónicos entre grupos fosfato com carga negativa da cadeia do ácido nucleico e os

catiões hidrófobos. Ver, por exemplo, Lambert et al., *Biochimie* 80: 969-976, 1998, Chavany et al., *Pharm. Res.* 11: 1370-1378, 1994; Chavany et al., *Pharm. Res.* 9: 441-449, 1992. Polipéptidos podem também ser adsorvidos a nanopartículas de polialquilcianoacrilato. Ver, por exemplo, Douglas et al., 1987; Schroeder et al., *Peptides* 19: 777-780, 1998.

Outra superfície adsorvente são nanopartículas feitas através da polimerização de metilideno-malonato. Por exemplo, tal como descrito em Bousquet et al., 1999, polipéptidos adsorvidos a nanopartículas de poli(metilideno-malonato 2.1.2) parecem fazê-lo inicialmente através de forças electrostáticas seguido de estabilização através de forças hidrófobas.

Complexos PIM/MT

Os PIM podem ser administrados na forma de complexos polinucleótido imunomodulador/microtransportador (PIM/MT). Assim, o presente invento proporciona composições compreendendo complexos PIM/MT.

Os microtransportadores úteis no presente invento têm menos de cerca de 150, 120 ou 100 μm de tamanho, mais vulgarmente menos de cerca de 50-60 μm de tamanho, de preferência menos de cerca de 10 μm de tamanho, e são insolúveis em água pura. Os microtransportadores utilizados no presente invento são de preferência biodegradáveis, embora sejam aceitáveis microtransportadores não biodegradáveis. Os microtransportadores estão vulgarmente em fase sólida, tais como "contas" ou outras partículas, embora microtransportadores de fase líquida tais como emulsões de óleo em água compreendendo polímeros biodegradáveis ou óleos estejam também contemplados. Uma ampla variedade de materiais biodegradáveis e não biodegradáveis aceitáveis para utilizar como microtransportadores é conhecida na especialidade.

Os microtransportadores para utilizar nas composições ou métodos do presente invento têm geralmente menos de cerca de 10 μm de tamanho (p.ex., têm um diâmetro médio de menos de cerca de 10 μm , ou pelo menos cerca 97% das partículas passam através de um filtro de ecrã de 10 μm), e incluem nanotransportadores (i.e., transportadores com menos de cerca

de 1 μm de tamanho). De preferência, são seleccionados microtransportadores possuindo tamanhos dentro de um limite superior de cerca de 9, 7, 5, 2, ou 1 μm ou 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, ou 100 nm e um limite inferior seleccionado independentemente de cerca de 4, 2, ou 1 μm ou cerca de 800, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100, 50, 25, ou 10 nm, onde o limite inferior é menor que o limite superior. Nalgumas concretizações, os microtransportadores têm um tamanho de cerca de 1,0-1,5 μm , cerca de 1,0-2,0 μm ou cerca de 0,9-1,6 μm . Em certas concretizações preferidas, os microtransportadores têm um tamanho de cerca de 10 nm a cerca de 5 μm ou de cerca de 25 nm a cerca de 4,5 μm , de cerca de 1 μm , cerca de 1,2 μm , cerca de 1,4 μm , cerca de 1,5 μm , cerca de 1,6 μm , cerca de 1,8 μm , cerca de 2,0 μm , cerca de 2,5 μm ou cerca de 4,5 μm . Quando os microtransportadores são nanotransportadores, concretizações preferidas incluem nanotransportadores de cerca de 25 a cerca de 300 nm, 50 a cerca de 200 nm, cerca de 50 nm ou cerca de 200 nm.

Microtransportadores biodegradáveis de fase sólida podem ser fabricados a partir de polímeros biodegradáveis incluindo, mas não se limitando a: poliésteres biodegradáveis, tais como poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), e copolímeros (incluindo seus copolímeros de blocos), bem como copolímeros de blocos de poli(ácido láctico) e poli(etilenoglicol); poliortoésteres tais como polímeros baseados em 3,9-dietilideno-2,4,8,10-tetraoxaspiro[5.5]undecano (DETOSU); polianidridos tais como polímeros de poli(anidrido) baseados em monómeros relativamente hidrófilos tais como ácido sebácico; imidas de polianidrido, tais como polímeros de polianidrido baseados em monómeros derivados de ácido sebácico incorporando aminoácidos (*i.e.*, ligados a ácido sebácico por ligações imida através do azoto amino-terminal) tais como glicina ou alanina; ésteres de polianidrido; polifosfazenos, especialmente poli(fosfazenos) que contenham grupos éster sensíveis a hidrólise que possam catalisar a degradação da estrutura polimérica através da criação de grupos ácido carboxílico (Schacht *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.* 1996: 102, 1996); e poliamidas tais como poli(ácido láctico-co-lisina).

É também conhecida uma ampla variedade de materiais não biodegradáveis adequados para fabrico de microtransportadores,

incluindo, mas não se limitando a poliestireno, polipropileno, polietileno, sílica, cerâmica, poliacrilamida, dextrano, hidroxiapatite, látex, ouro e materiais ferromagnéticos ou paramagnéticos. Certas concretizações excluem ouro, látex e/ou contas magnéticas. Em certas concretizações, os microtransportadores podem ser feitos de um primeiro material (p.ex., um material magnético) encapsulado com um segundo material (p.ex., poliestireno).

Microesferas de fase sólida são preparadas utilizando técnicas conhecidas na especialidade. Por exemplo, podem ser preparadas através da técnica de extracção/evaporação de solvente de emulsão. Geralmente, nesta técnica, polímeros biodegradáveis tais como polianidros, poli(alquil- α -cianoacrilatos) e poli(ésteres de α -hidroxilo), por exemplo, poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), poli(ácido D,L-láctico-co-glicólico) e poli(caprolactona), são dissolvidos num solvente orgânico adequado, tal como cloreto de metileno, para constituir a fase dispersa (FD) da emulsão. A FD é emulsionada através de homogeneização a elevada velocidade num excesso de volume de fase contínua aquosa (FC) que contém um tensioactivo dissolvido, por exemplo, poli(álcool vinílico) (PVA) ou polivinilpirrolidona (PVP). O tensioactivo na FC é para assegurar a formação de gotículas de emulsão discretas e de tamanho adequado. O solvente orgânico é então extraído na FC e subsequentemente evaporado subindo a temperatura do sistema. As micropartículas sólidas são então separadas através de centrifugação ou filtração, e secas, por exemplo, através de liofilização ou aplicação de vácuo, antes de armazenamento a 4°C.

Características físico-químicas tais como o tamanho médio, a distribuição de tamanhos e a carga superficial das microesferas secas podem ser determinadas. As características de tamanho são determinadas, por exemplo, através da técnica de dispersão dinâmica da luz e a carga superficial foi determinada através da medição do potencial zeta.

Microtransportadores de fase líquida incluem lipossomas, micelas, gotículas de óleo e outras partículas baseadas em lípidos ou óleos que incorporem polímeros ou óleos biodegradáveis. Em certas concretizações, o polímero

biodegradável é um tensioactivo. Noutras concretizações, os microtransportadores de fase líquida são biodegradáveis devido à inclusão de um óleo biodegradável tal como esqualeno ou um óleo vegetal. Um microtransportador de fase líquida preferido é gotículas de óleo dentro de uma emulsão de óleo em água. De preferência, as emulsões de óleo em água utilizadas como microtransportadores compreendem substituintes biodegradáveis tais como esqualeno.

Os complexos PIM/MT compreendem um PIM ligado à superfície de um microtransportador (*i.e.*, o PIM não está encapsulado no MT), e compreendem de preferência múltiplas moléculas de PIM ligadas a cada microtransportador. Em certas concretizações, uma mistura de diferentes PIM pode ser complexada com um microtransportador, de modo a que o microtransportador fique ligado a mais de uma espécie de PIM. A ligação entre o PIM e o MT pode ser covalente ou não covalente. Tal como será entendido por um perito na especialidade, o PIM pode ser modificado ou derivado e a composição do microtransportador pode ser seleccionada e/ou modificada para acomodar o tipo de ligação desejado para a formação do complexo PIM/MT.

Os complexos PIM/MT ligados covalentemente podem ser ligados utilizando qualquer tecnologia de ligação cruzada conhecida na especialidade. Tipicamente, a porção PIM será modificada, para incorporar uma porção adicional (*p.ex.*, um grupo amina, carboxilo ou sulfidrilo livre) ou incorporar bases nucleotídicas modificadas (*p.ex.*, fosforotioato) para proporcionar um local no qual a porção PIM possa ser ligada ao microtransportador. A ligação entre as porções PIM e MT do complexo pode ser feita na extremidade 3' ou 5' do PIM, ou numa base adequadamente modificada numa posição interna no PIM. O microtransportador é também geralmente modificado para incorporar porções através das quais possa ser formada uma ligação covalente, embora possam também ser utilizados grupos funcionais normalmente presentes no microtransportador. O PIM/MT é formado através de incubação do PIM com um microtransportador sob condições que permitam a formação de um complexo covalente (*p.ex.*, na presença de um agente de reticulação ou através da utilização de um microtransportador

activado compreendendo uma porção activada que formará uma ligação covalente com o PIM).

É conhecida na especialidade uma ampla variedade de tecnologias de reticulação que inclui agentes de reticulação reactivos com grupos amino, carboxilo e sulfidriilo. Tal como será aparente a um perito na especialidade, a selecção de um agente de reticulação e do protocolo de reticulação dependerá da configuração do PIM e do microtransportador bem como da configuração final desejada do complexo PIM/MT. O agente de reticulação pode ser homobifuncional ou heterobifuncional. Quando é utilizado um agente de reticulação homobifuncional, o agente de reticulação explora a mesma porção no PIM e no MT (p.ex., um agente de reticulação de aldeídos pode ser utilizado para ligar covalentemente um PIM e um MT quando ambos compreendem uma ou mais amins livres). Os agentes de reticulação heterobifuncionais utilizam diferentes porções no PIM e no MT, (p.ex., um éster de maleimido-N-hidroxisuccinimida pode ser utilizado para ligar covalentemente um sulfidriilo livre no PIM e uma amina livre no MT), e são preferidos para minimizar a formação de ligações inter-microtransportador. Na maioria dos casos, é preferível reticular através de uma primeira porção de reticulação no microtransportador e uma segunda porção de reticulação no PIM, quando a segunda porção de reticulação não está presente no microtransportador. Um método preferido de produção do complexo PIM/MT é através de "activação" do microtransportador através de incubação com um agente de reticulação heterobifuncional, formando então o complexo PIM/MT através de incubação do PIM e do MT activado sob condições apropriadas para reacção. O agente de reticulação pode incorporar um braço "espaçador" entre as porções reactivas ou as duas porções reactivas no agente de reticulação podem ser ligadas directamente.

Numa concretização preferida, a porção PIM compreende pelo menos um sulfidriilo livre (p.ex., proporcionado por uma base ou ligante 5'-tiol modificado) para reticulação com o microtransportador, enquanto o microtransportador compreende grupos amina livres. Um agente de reticulação heterobifuncional reactivo com estes dois grupos (p.ex., um agente de reticulação compreendendo um grupo maleimida e um

éster de NHS), tal como succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclo-hexano-1-carboxilato é utilizado para activar o MT, depois ligar covalentemente de forma cruzada o PIM para formar o complexo PIM/MT.

Complexos PIM/MT não covalentes podem ser ligados através de qualquer ligação não covalente ou interacção, incluindo ligações iónicas (electrostáticas), interacções hidrófobas, pontes de hidrogénio, atracções de van der Waals ou uma combinação de duas ou mais interacções diferentes, tal como é normalmente o caso quando é utilizado um par de ligação para ligar o PIM e o MC.

Os complexos PIM/MT não covalentes preferidos são tipicamente complexados através de interacções hidrófobas ou electrostáticas (iónicas), ou uma combinação destas, (p.ex., através de emparelhamento de bases entre um PIM e um polinucleótido ligado a um MT utilizando um par de ligação). Devido à natureza hidrófila da estrutura dos polinucleótidos, os complexos PIM/MT que assentam em interacções hidrófobas para formar o complexo requerem geralmente a modificação da porção PIM do complexo para incorporar uma porção altamente hidrófoba. De preferência, a porção hidrófoba é biocompatível, não imunogénica e de ocorrência natural no indivíduo para quem se pretende a composição (p.ex., é verificada em mamíferos, particularmente humanos). Exemplos de porções hidrófobas preferidas incluem lípidos, esteróides, esteróis tais como colesterol e terpenos. O método de ligação da porção hidrófoba ao PIM dependerá, claro, da configuração do PIM e da identidade da porção hidrófoba. A porção hidrófoba pode ser adicionada em qualquer local conveniente no PIM, de preferência na extremidade 5' ou 3'; no caso de adição de uma porção colesterol a um PIM, a porção colesterol é de preferência adicionada à extremidade 5' do PIM, utilizando reacções químicas convencionais (ver, por exemplo, Godard *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 232: 404-410, 1995). De preferência, os microtransportadores para utilizar em complexos PIM/MT ligados através de ligação hidrófoba são feitos a partir de materiais hidrófobos, tais como gotículas de óleo ou polímeros hidrófobos, embora possam igualmente ser utilizados materiais hidrófilos modificados para incorporar porções hidrófobas. Quando o microtransportador é um lipossoma ou outro

microtransportador de fase líquida compreendendo um lúmen, o complexo PIM/MT é formado através da mistura do PIM com o MT após preparação do MT, para evitar encapsulamento do PIM durante o processo de preparação do MT.

Os complexos PIM/MT não covalentes ligados através de ligação electrostática exploram tipicamente a carga altamente negativa da estrutura do polinucleótido. Assim, os microtransportadores para utilizar em complexos PIM/MT ligados não covalentemente têm geralmente carga positiva (catiónicos) a pH fisiológico (p.ex., pH cerca de 6,8-7,4). O microtransportador pode possuir intrinsecamente uma carga positiva, mas os microtransportadores feitos a partir compostos que normalmente não possuem uma carga positiva podem ser derivados ou de outro modo modificados para ficarem com carga positiva (catiónicos). Por exemplo, o polímero utilizado para fazer o microtransportador pode ser derivado para adicionar grupos com carga positiva, tais como aminas primárias. Alternativamente, podem ser incorporados compostos com carga positiva na formulação do microtransportador durante o fabrico (p.ex., podem ser utilizados tensioactivos com carga positiva durante o fabrico de copolímeros de poli(ácido láctico)/poli(ácido glicólico) para conferir uma carga positiva às partículas de microtransportador resultantes).

Tal como aqui descrito, para preparar microesferas catiónicas, são adicionados lípidos ou polímeros catiónicos, por exemplo, 1,2-dioleoil-1,2,3-trimetilamóniopropano (DOTAP), brometo de cetiltrimetilamónio (CTAB) ou polilisina, à FD ou à FC, consoante a sua solubilidade nestas fases.

Tal como aqui descrito, os complexos PIM/MT podem ser formados através de adsorção em microesferas catiónicas através da incubação do polinucleótido e das partículas, de preferência numa mistura aquosa. Tal incubação pode ser realizada sob quaisquer condições desejadas, incluindo temperatura ambiente (p.ex., aproximadamente 20°C) ou sob refrigeração (p.ex., 4°C). Como as microesferas catiónicas e os polinucleótidos se associam de forma relativamente rápida, a incubação pode ser durante qualquer período de tempo conveniente, tal como 5, 10, 15 minutos ou mais, incluindo incubações de um dia para o outro e mais longas. Por exemplo,

os PIM podem ser adsorvidos nas microesferas catiónicas através de incubação aquosa de um dia para o outro do polinucleótido e das partículas a 4°C. No entanto, como as microesferas catiónicas e os polinucleótidos se associam espontaneamente, o complexo PIM/MT pode ser formado através de simples co-administração do polinucleótido com o MT. As microesferas podem ser caracterizadas pelo tamanho e pela carga da superfície antes e após associação ao polinucleótido. Lotes seleccionados podem então ser avaliados quanto à actividade contra controlos adequados, por exemplo, em células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC) estabelecidas, tal como aqui descrito, e ensaios de esplenócitos de ratinho. As formulações podem também ser avaliadas em modelos animais adequados.

Complexos PIM/MT não covalentes ligados através de emparelhamento de bases nucleotídicas podem ser produzidos utilizando metodologias convencionais. Geralmente, os complexos PIM/MT com bases emparelhadas são produzidos utilizando um microtransportador compreendendo um polinucleótido ligado, de preferência ligado covalentemente, (o "polinucleótido de captura") que é pelo menos parcialmente complementar ao PIM. O segmento de complementaridade entre o PIM e o nucleótido de captura é de preferência de pelo menos 6, 8, 10 ou 15 pares de bases contíguos, de maior preferência pelo menos 20 pares de bases contíguos. O nucleótido de captura pode ser ligado ao MT através de qualquer método conhecido na especialidade e é de preferência ligado covalentemente ao PIM na extremidade 5' ou 3'.

Noutras concretizações, pode ser utilizado um par de ligação para ligar o PIM e o MT num complexo PIM/MT. O par de ligação pode ser um receptor e um ligando, um anticorpo e um antigénio (ou epítipo) ou qualquer outro par de ligação que se ligue com elevada afinidade (p.ex., K_d menor que cerca de 10^{-8}). Um tipo de par de ligação preferido é biotina e estreptavidina ou biotina e avidina, que formam complexos muito apertados. Quando se utiliza um par de ligação para mediar a ligação do complexo PIM/MT, o PIM é derivado, tipicamente através de uma ligação covalente, com um membro do par de ligação e o MT é derivado com o outro membro do par de

ligação. A mistura dos dois compostos derivados resulta na formação do complexo PIM/MT.

Muitas concretizações de complexos PIM/MT não incluem um antigénio, e certas concretizações excluem o antigénio ou antigénios associados à doença ou ao distúrbio que é o objecto da terapia com o complexo PIM/MT. Noutras concretizações, o PIM é também ligado a uma ou mais moléculas de antigénio. O antigénio pode ser ligado à porção PIM de um complexo PIM/MT numa variedade de modos, incluindo interacções covalentes e/ou não covalentes, tal como descrito, por exemplo, em WO 98/16247. Alternativamente, o antigénio pode ser ligado ao microtransportador. A ligação entre o antigénio e o PIM em complexos PIM/MT compreendendo um antigénio ligado ao PIM pode ser feita através de técnicas aqui descritas e conhecidas na especialidade, incluindo, mas não se limitando a ligação covalente directa, conjugação covalente através de uma porção de reticulação (que pode incluir um braço espaçador), conjugação não covalente através de um par de ligação específico (p.ex., biotina e avidina) e conjugação não covalente através de interacção electrostática ou hidrófoba.

Complexos de PIM com um agente de condensação catiónico e um agente estabilizante

Os PIM podem ser administrados como uma composição compreendendo um agente de condensação catiónico, um PIM, e um agente estabilizante (*i.e.*, composição CIS) para modulação de uma resposta imunitária no receptor. Ver, Pedido de Patente U.S. 60/402968. Nalgumas concretizações, a composição CIS pode também compreender um antigénio e/ou um ácido gordo.

As composições CIS do presente invento estão tipicamente na forma particulada. Tal como será aparente aos peritos na especialidade, as composições CIS particuladas do presente invento consistirão numa população de partículas de diferentes tamanhos. Devido à sua variabilidade que surge naturalmente, o "tamanho" das partículas nas composições do presente invento pode ser descrito em intervalos ou como um diâmetro máximo ou mínimo. As partículas são consideradas terem um determinado tamanho se pelo menos 95% das partículas (em massa) verificarem a dimensão especificada (p.ex., se pelo menos 97%

das partículas tiverem menos de 20 μm de diâmetro, então a composição é considerada como consistindo em partículas de menos de 20 μm de diâmetro). O tamanho das partículas pode ser medido através de qualquer método conveniente conhecido na especialidade, incluindo filtração (p.ex., a utilização de um filtro de "profundidade" para capturar partículas maiores que as do tamanho limite), dispersão dinâmica de luz, microscopia electrónica, incluindo MET (particularmente em combinação com processamento de criofractura) e MEV, e semelhantes.

De preferência, as composições CIS do presente invento compreendem partículas que têm menos de cerca de 50 μm de diâmetro, de preferência menos de cerca de 20 μm de diâmetro, embora nalgumas concretizações as partículas terão menos de cerca de 3, 2 ou 1 μm de diâmetro. O intervalo preferido do tamanho de partículas inclui cerca de 0,01 μm a 50 μm , 0,02 a 20 μm , 0,05 a 5 μm , e 0,05 a 3 μm de diâmetro.

Os componentes das composições CIS podem estar presentes em várias quantidades/proporções nas composições, embora esteja contemplado que as quantidades do agente ou agentes estabilizantes e componentes opcionais tais como ácidos gordos e antigénio permanecerão relativamente invariantes, com os agentes estabilizantes a variarem geralmente de cerca de 0,1% a 0,5% (v/v), os ácidos gordos variando de cerca de 0 a 0,5%, e as concentrações de antigénio variando de cerca de 0,1 a cerca de 100 $\mu\text{g/ml}$, de preferência de cerca de 1 a cerca de 100 $\mu\text{g/ml}$, de maior preferência de cerca de 10 a 50 $\mu\text{g/ml}$. As quantidades e proporções do PIM e do agente de condensação catiónico são sujeitas a um maior intervalo de variação nas composições do presente invento. A quantidade do PIM variará até certo ponto em função do peso molecular do PIM e varia geralmente de cerca de 50 $\mu\text{g/ml}$ a cerca de 2 mg/ml , de preferência de cerca de 100 $\mu\text{g/ml}$ a 1 mg/ml . O agente de condensação catiónico está geralmente presente em excesso (em termos de massa) em relação ao PIM, geralmente nas proporções de cerca de 1:2 (PIM:agente de condensação catiónico) a cerca de 1:6, de preferência de cerca de 2:5 a 1:5.

O tamanho da partícula nas composições CIS é uma função de várias variáveis. A distribuição de tamanhos das partículas nas composições pode ser modulada através da alteração da

proporção de agente de condensação catiónico para PIM. Por exemplo, a alteração da proporção de agente de condensação catiónico para PIM nas composições exemplares de +ISS/Tween 85 a 0,4%/oleato a 0,4%/polimixina B pode alterar o tamanho médio das partículas de cerca de 1,5 μm a agente de condensação catiónico:PIM=1 a cerca de 45 μm a agente de condensação catiónico:PIM=10.

Em certas concretizações, as composições CIS compreendem um agente de condensação catiónico, um PIM e um agente estabilizante que é um detergente não iónico. Noutras concretizações, as composições compreendem um lipopéptido catiónico destruidor de membranas (de preferência uma polimixina, de maior preferência polimixina B), um PIM e um agente estabilizante. Nalgumas concretizações o agente estabilizante não é uma proteína sérica (particularmente não uma proteína sérica bovina). Uma composição exemplar desta classe de concretizações utiliza um detergente de éter de polioxietileno tal como Tween 80 ou Tween 85 como agente estabilizante, com oleato como um agente estabilizante adicional opcional.

Nalgumas concretizações, as composições CIS compreendem partículas imunomoduladoras, em que as partículas são feitas através do processo de combinação de um agente de condensação catiónico, um PIM e um agente de estabilização que é um detergente não iónico. Noutras concretizações, as composições do presente invento compreendem partículas imunomoduladoras, em que as partículas são feitas através do processo de combinação de um lipopéptido catiónico destruidor de membranas (de preferência uma polimixina, de preferência polimixina B), um PIM e um agente estabilizante. Nalgumas concretizações o agente estabilizante não é uma proteína sérica (particularmente não uma proteína sérica bovina).

Nalgumas concretizações, as composições CIS compreendem partículas imunomoduladoras, em que as partículas são formadas através do processo de combinação de um PIM e um agente estabilizante que é um detergente não iónico, formando deste modo uma mistura PIM/agente estabilizante, e combinando um agente de condensação catiónico com a mistura PIM/agente estabilizante. Noutras concretizações, as composições do

presente invento compreendem partículas imunomoduladoras, em que as partículas são formadas através do processo de combinação de um PIM com um agente estabilizante, formando deste modo uma mistura PIM/agente estabilizante, e combinando um lipopéptido catiónico destruidor de membranas (de preferência uma polimixina, de maior preferência polimixina B) com a mistura PIM/agente estabilizante. Nalgumas concretizações o agente estabilizante não é uma proteína sérica (particularmente não uma proteína sérica bovina).

Nalgumas concretizações, composições CIS compreendem partículas imunomoduladoras em que as partículas compreendem um agente de condensação catiónico, um PIM e um agente estabilizante que é um detergente não iónico. Noutras concretizações, as composições do presente invento compreendem partículas imunomoduladoras, em que as partículas compreendem um lipopéptido catiónico destruidor de membranas (de preferência uma polimixina, de maior preferência polimixina B), um PIM e um agente estabilizante. Nalgumas concretizações o agente estabilizante não é uma proteína sérica (particularmente não uma proteína sérica bovina).

Os agentes de condensação catiónicos úteis nas composições CIS e métodos de utilização das composições CIS são moléculas que têm carga positiva a pH fisiológico (i.e., pH de cerca de 7,0 a cerca de 7,5). De preferência, os agentes de condensação catiónicos utilizados no presente invento não são zwitteriónicos e são policatiónicos, isto é, possuindo mais de uma carga positiva por molécula. Agentes de condensação catiónicos úteis no presente invento incluem policatiões hidrófilos ou anfipáticos.

Agentes de condensação catiónicos preferidos incluem: (a) lipopéptidos catiónicos destruidores de membranas incluindo, mas não se limitando a polimixinas incluindo polimixina A, polimixina B (incluindo polimixina B₁ e polimixina B₂), polimixina C, polimixina D, polimixina E (também conhecida como colistina), polimixina K, polimixina M, polimixina P, polimixina S e polimixina T, circulinas incluindo circulina A, circulina B, circulina C, circulina D, circulina E e circulina F, octapeptina, anfotericinas incluindo anfotericina B, e péptidos acilados incluindo octanoíl-KFFKFFKFF (SEQ ID NO:182)

e acil-KALA (octanoíl-WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALEACEA (SEQ ID NO:183); (b) péptidos catiónicos destruidores de membranas incluindo, mas não se limitando a nonapéptido polimixina B, cecropinas incluindo cecropina A, cecropina B e cecropina P1, KFFKFFKFF (SEQ ID NO:182) e KALA (WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKACEA (SEQ ID NO:184)); (c) tensioactivos catiónicos de cadeia simples incluindo, mas não se limitando a brometo de cetiltrimetilamónio (CTAB), brometo de benzildimetilamónio (BDAB), CpyrB (brometo de cetilpiridínio), CimB (brometo de cetilimidazólio), e polímeros policatiónicos, incluindo, mas não se limitando a, poli-L-lisina (PLL) e polietilenoimina (PEI). Em certas concretizações, o agente de condensação catiónico é um lipopéptido catiónico destruidor de membranas, de preferência uma polimixina, de maior preferência polimixina B. Nalgumas concretizações, os agentes de condensação catiónicos podem excluir ésteres de ácidos gordos (*i.e.*, lípidos) e tensioactivos catiónicos de cadeia dupla.

Os agentes estabilizantes úteis nas composições CIS e os métodos de utilização das composições CIS incluem os que podem ser suspensos em água e reduzem a tensão superficial da água, embora sejam preferíveis agentes estabilizantes que sejam solúveis em água e/ou completamente miscíveis em água. Várias classes de agentes estabilizantes são úteis nas composições e métodos do presente invento, incluindo proteínas (de preferência proteínas hidrófilas), detergentes não iónicos, tensioactivos poliméricos (p.ex., poli(álcool vinílico) e polivinilpirrolidona), detergentes catiónicos, detergentes aniónicos e ácidos gordos, embora em certas concretizações proteínas séricas (particularmente proteínas séricas bovinas), ácidos gordos e/ou detergentes iónicos possam ser excluídos da definição de agentes estabilizantes.

Qualquer proteína pode ser utilizada como agente estabilizante de acordo com o presente invento. Nalgumas concretizações, o agente estabilizante é uma proteína que não é pretendida como antigénio (ver discussão abaixo); nestas concretizações, é preferido que a proteína seja derivada da mesma espécie do receptor pretendido da composição (p.ex., se a composição for pretendida para utilização em humanos, é então preferível que a proteína utilizada como agente

estabilizante seja uma proteína humana). A albumina sérica é uma proteína exemplar útil como agente estabilizante em tais concretizações. Noutras concretizações, é utilizado um antigénio como agente estabilizante, caso em que o antigénio não necessita de ser, e em general de preferência não é, da mesma espécie que o receptor pretendido. Os antigénios úteis nas composições e métodos do presente invento são aqui divulgados.

Detergentes não iónicos úteis nas composições CIS e métodos de utilização das composições CIS incluem glucamidas tais como óxido de decildimetilfosfina (APO-10) e óxido de dimetildodecilfosfina (APO-12), octanoíl-N-metilglucamida (MEGA-8), nonanoíl-N-metilglucamida (MEGA-9) e decanoíl-N-metilglucamida (MEGA-10), detergentes de éter de polioxietileno incluindo polioxietileno(10)-dodeciléter (Genapol C100), polioxietileno(4)-lauriléter (BRIJ® 30), polioxietileno(9)-lauriléter (LUBROL® PX) polioxietileno(23)-lauriléter (BRIJ® 35), polioxietileno(2)-cetiléter (BRIJ® 52), polioxietileno(10)-cetiléter (BRIJ® 56), polioxietileno(20)-cetiléter (BRIJ® 58), polioxietileno(2)-esteariléter (BRIJ® 72), polioxietileno(10)-esteariléter (BRIJ® 76), polioxietileno(20)-esteariléter (BRIJ® 78), polioxietileno(100)-esteariléter (BRIJ® 700), polioxietileno(2)-oleiléter (BRIJ® 92), polioxietileno(10)-oleiléter (BRIJ® 97), polioxietileno(20)-oleiléter (BRIJ® 98), isotridecilpoli(etilenoglicoléter)₈ (Genapol 80), PLURONIC® F-68, PLURONIC® F-127, dodecilpoli(etilenoglicoléter)₉ (Thesit) polioxietileno(10)-isooctilfeniléter (TRITON® X-100), polioxietileno(8)-isooctilfeniléter (TRITON® X-114), monolaurato de polietilenoglicol-sorbitano (TWEEN® 20), monopalmitato de polioxietileno-sorbitano (TWEEN® 40), monostearato de polietilenoglicol-sorbitano (TWEEN® 60), triestearato de polioxietileno-sorbitano (TWEEN® 65), monooleato de polietilenoglicol-sorbitano (TWEEN® 80), trioleato de polioxietileno(20)-sorbitano (TWEEN® 85), poloxâmero 188 e polietilenoglicol-p-isooctilfeniléter (Nonidet NP40), detergentes de alquilmaltósido incluindo ciclo-hexil-*n*-etil-β-D-maltósido, ciclo-hexil-*n*-hexil-β-D-maltósido e ciclo-hexil-*n*-metil-β-D-maltósido, *n*-decanoílsacarose, glucopiranósidos incluindo metil-6-O-(*N*-heptilcarbamoíl)-α-D-glucopiranósido (HECAMEG) e alquilglucopiranósidos tais como *n*-decil-β-D-glucopiranósido,

n-heptil- β -D-glucopiranosídeo, *n*-dodecil- β -D-glucopiranosídeo, *n*-nonil- β -D-glucopiranosídeo, *n*-octil- α -D-glucopiranosídeo, e *n*-octil- β -D-glucopiranosídeo, alquiltiogluco-piranosídeos incluindo *n*-heptil- β -D-tiogluco-piranosídeo, alquilmalto-piranosídeos incluindo *n*-decil- β -D-malto-piranosídeo e *n*-octil- β -D-malto-piranosídeo, *n*-decil- β -D-tiomaltósido, digitonina, *n*-dodecanoílsacarose, *n*-dodecil- β -D-maltósido, heptano-1,2,3-triol, *n*-octanoíl- β -D-glucosilamina (NOGA), *n*-octanoílsacarose, poloxâmeros (copolímeros de blocos de polioxietileno/polioxipropileno) tais como poloxâmero 188 e poloxâmero 407, e sulfobetainas incluindo SB-10, SB-12, e SB-14 e *n*-undecil- β -D-maltósido. Agentes estabilizantes preferidos incluem detergentes de éter de polioxietileno, particularmente monooleato de polietilenoglicol sorbitano e trioleato de polioxietileno(20)-sorbitano.

Detergentes aniônicos úteis nas composições CIS e métodos de utilização das composições CIS incluem ácido caprílico e sais deste, ácido quenodesoxicólico e sais deste, ácido cólico e sais deste, ácido decanossulfônico e sais deste, ácido desoxicólico e sais deste, ácido glicodesoxicólico e sais deste, lauroílsarcosina e sais deste, *n*-dodecilsulfato e sais deste (incluindo sais de sódio e lítio), ácido tauroquenodesoxicólico e sais deste, ácido taurocólico e sais deste, ácido taurodesidrocólico e sais deste, ácido taurodesoxicólico e sais deste, ácido taurolitocólico e sais deste, e ácido tauroursodesoxicólico e sais deste.

Detergentes catiônicos incluem cetilpiridínio e seus sais, cetiltrimetilamônia e seus sais incluindo brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), dodeciltrimetilamônia e seus sais incluindo brometo de dedeciltrimetilamônio, alquilamônio imidazolinás, imidazolinás quaternárias, e tetradeciltrimetilamônia e sais deste incluindo brometo tetradeciltrimetilamônio.

Os detergentes seleccionados para utilizar como agentes estabilizantes são de preferência os que são considerados detergentes emulsionantes de óleo/água. Os detergentes emulsionantes de óleo/água são conhecidos na especialidade e são geralmente caracterizados por um valor de equilíbrio hidrófobo/lipófilo (HLB) de cerca de 8 a cerca de 18. De

preferência, os detergentes incorporados nas composições particuladas têm valores HLB de cerca de 10 a cerca de 16, de preferência de cerca de 11 a cerca de 15 (p.ex., monooleato de polietilenoglicol sorbitano, HLB=15,4; polioxietileno(10) isooctilfeniléter, HLB=13,5; trioleato de polioxietileno(20) sorbitano HLB=11).

Em certas concretizações, as composições CIS podem também incluir um ou mais ácidos gordos, ou um sal destes, como componente adicional. Nessas concretizações empregando um ácido gordo como componente agente estabilizante e um ácido gordo como componente adicional da composição, o ácido gordo utilizado como agente estabilizante será diferente do ácido gordo utilizado como componente "adicional". Os ácidos gordos úteis nas composições CIS do presente invento podem variar no tamanho de quatro a 30 átomos de carbono e podem ser insaturados (p.ex., ácido esteárico), mono-insaturados (p.ex., ácido oleico) ou polinsaturados (p.ex., ácido linoleico), embora sejam geralmente preferidos ácidos gordos mono-insaturados e polinsaturados.

Nalgumas concretizações, as composições CIS incorporarão um ácido gordo possuindo um comprimento da cadeia de carbono de pelo menos cerca de 4, 5, 6, 8, 10, 15, 18, ou 20 átomos de carbono e menos de cerca de 30, 25, 20, 19, 15 ou 10 átomos de carbono. Assim, nalgumas concretizações os ácidos gordos utilizados no presente invento podem ter cadeias de carbono com um comprimento no intervalo de cerca de 4 a 30, 5 a 25, 10 a 20, ou 15 a 20 átomos de carbono.

Os ácidos gordos úteis nas composições CIS incluem, mas não se limitam a, ácido araquidônico, ácido decanóico, ácido docosanóico, ácido docosa-hexanóico, ácido eicosanóico, ácido heneicosanóico, ácido heptadecanóico, ácido heptanóico, ácido hexanóico, ácido láurico, ácido linoleico, ácido linolénico, ácido mirístico, ácido nonadecanóico, ácido nonanóico, ácido octanóico, ácido oleico, ácido palmítico, ácido pentadecanóico, ácido esteárico, ácido tetracosanóico, ácido tricosanóico, ácido tridecanóico e ácido undecanóico. Ácidos gordos preferidos para utilizar nas composições CIS incluem ácido oleico, ácido palmitoleico e ácido linoleico.

Em certas concretizações do presente invento, um antigénio é incorporado na composição CIS ou administrado em combinação com uma composição CIS. As composições CIS que incorporam um antigénio podem incorporar o antigénio na própria composição particulada, ou serem dissolvidas ou suspensas na solução na qual a composição particulada é suspensão. Qualquer antigénio pode ser incorporado ou co-administrado com uma composição CIS do presente invento.

Métodos do invento

Tal como aqui descrito, os PIM do presente invento podem estimular particularmente a produção de IL-6, TNF- α , IFN- γ e de interferões de tipo I, incluindo IFN- α e IFN- ω , estimular a proliferação de células B e/ou activar células dendríticas plasmacitóides para se diferenciarem. Os PIM do presente invento podem também estimular a produção de outras citocinas, quimiocinas e proteínas associadas a activação incluindo, mas não se limitando a, IP-10 (proteína de 10 kDa induzida por interferão), MCP-1 (proteína 1 quimioatraente de monócitos), MCP-2, MCP-3, MIG, MIP-3b, CD80, CD86, CD40, CD54 e MHC de classe II. Os PIM do presente invento podem também estimular a expressão de genes indutíveis por IFN- α incluindo, mas não se limitando a 2,5-oligoadenilato-sintetase (2,5-OAS), gene-54K de estimulação por interferão (ISG-54K) e proteína 1 de ligação a guanilato (GBP-1). Os polinucleótidos imunomoduladores do presente invento podem também proporcionar um sinal que retarde a apoptose de células dendríticas plasmacitóides. Os polinucleótidos imunomoduladores do presente invento podem também estimular a actividade lítica de células assassinas naturais (NK). Assim, os PIM do presente invento são particularmente eficazes na modulação de uma resposta imunitária num indivíduo.

O presente invento refere-se à modulação de uma resposta imunitária num indivíduo, de preferência um mamífero, de maior preferência um humano, através da administração ao indivíduo de um PIM do presente invento. A imunomodulação pode incluir estimulação de uma resposta imunitária de tipo Th1 e/ou inibição ou redução de uma resposta imunitária de tipo Th2. O PIM é administrado numa quantidade suficiente para modular uma resposta imunitária. Tal como aqui descrito, a modulação de

uma resposta imunitária pode ser humoral e/ou celular, e é medida utilizando técnicas padrão na especialidade e tal como aqui descrito.

Por exemplo, a modulação de uma resposta imunitária de um animal ou população de células, p.ex., de mamífero, opcionalmente células sanguíneas humanas (p.ex., PBMC, linfócitos, células dendríticas), células de lavagem broncoalveolar ou outras células ou populações celulares contendo células que respondem a ISS, é alcançada através do contacto das células com um PIM ou composição contendo PIM aqui descrita (p.ex., uma composição contendo um PIM, um PIM e um antigénio, um conjugado PIM-antigénio, um complexo PIM/microtransportador, etc.). A modulação pode ser alcançada através de qualquer forma de contacto, incluindo sem limitação, co-incubação de células com o PIM *in vitro*, aplicação do PIM na pele de um mamífero (p.ex., de um animal experimental), e administração parentérica.

Uma resposta imunitária em animais ou populações celulares pode ser detectada através de vários modos, incluindo maior expressão de um ou mais de IFN- γ , IFN- α , IL-2, IL-12, TNF- α , IL-6, IL-4, IL-5, IP-10, ISG-54K, MCP-1, ou uma alteração nas características do perfil de expressão génica da estimulação imunitária bem como respostas tais como proliferação de células B e maturação de células dendríticas. A capacidade para estimular uma resposta imunitária numa população celular tem várias utilizações, p.ex., num sistema de ensaio para agentes imunossupressores.

Vários indivíduos são adequados para receber o polinucleótido ou polinucleótidos imunomoduladores aqui descritos. De preferência, mas não necessariamente, o indivíduo é humano.

Em certas concretizações, o indivíduo sofre de um distúrbio associado a uma resposta imunitária de tipo Th2, tal como alergias ou asma induzida por alergia. A administração de um PIM resulta em imunomodulação, maiores níveis de uma ou mais citocinas associadas a respostas de tipo Th1, que podem resultar numa redução das características da resposta de tipo Th2 associadas à resposta do indivíduo ao alergénio. A

imunomodulação de indivíduos com distúrbios associados a respostas de tipo Th2 resulta numa redução ou melhoria de um ou mais dos sintomas do distúrbio. Quando o distúrbio é alergia ou asma induzida por alergia, a melhoria de um ou mais dos sintomas inclui uma redução de um ou mais dos seguintes: rinite, conjuntivite alérgica, níveis de IgE em circulação, níveis de histamina em circulação e/ou necessidade de terapia "SOS" por inalador (p.ex., albuterol inalado administrado através de inalador ou nebulizador de dose calibrada).

Noutras concretizações, o indivíduo sujeito à terapia imunomoduladora do presente invento é um indivíduo que recebe uma vacina. A vacina pode ser uma vacina profilática ou uma vacina terapêutica. Uma vacina profilática compreende um ou mais epítomos associados a um distúrbio para o qual o indivíduo pode estar em risco (p.ex., antigénios de *M. tuberculosis* como vacina para prevenção de tuberculose). As vacinas terapêuticas compreendem um ou mais epítomos associados a um determinado distúrbio que afecte o indivíduo, tal como antigénios superficiais de *M. tuberculosis* ou *M. bovis* em pacientes de tuberculose, antigénios para os quais o indivíduo é alérgico (i.e., terapia de dessensibilização da alergia) em indivíduos sujeitos a alergias, células tumorais de um indivíduo com cancro (p.ex., tal como descrito na Patente U.S. 5484596), ou antigénios associados a tumores em pacientes de cancro.

O PIM pode ser dado em conjunto com a vacina (p.ex., na mesma injeção ou numa injeção contemporânea, mas separada) ou o PIM pode ser administrado separadamente (p.ex., pelo menos 12 horas antes ou depois da administração da vacina). Em certas concretizações, o antigénio ou antigénios da vacina fazem parte do PIM, através de ligação covalente ou não covalente ao PIM. Noutras concretizações, o PIM pode ser administrado sozinho ou como uma vacina profilática para aumentar a resistência a infecção por uma ampla variedade de patogénios bacterianos ou virais, incluindo organismos naturais ou geneticamente modificados empregues como agentes de guerra biológica ou terrorismo. A administração de terapia de polinucleótidos imunomoduladores a um indivíduo recebendo uma vacina resulta numa resposta imunitária à vacina que muda para uma resposta de tipo Th1 em comparação com indivíduos que

recebam a vacina sem PIM. A mudança para uma resposta de tipo Th1 pode ser reconhecida através de uma resposta de hipersensibilidade de tipo retardado (DTH) ao antigénio ou antígenos da vacina, aumento de IFN- γ e outras citocinas associadas a respostas de tipo Th1, produção de CTL específicos para o antigénio ou antígenos da vacina, níveis baixos ou reduzidos de IgE específica para o antigénio ou antígenos da vacina, uma redução nos anticorpos associados a Th2 específicos para o antigénio ou antígenos da vacina, e/ou um aumento nos anticorpos associados a Th1 específicos para o antigénio ou antígenos da vacina. No caso de vacinas terapêuticas, a administração do PIM e da vacina resulta em melhoria de um ou mais sintomas do distúrbio que se pretende que a vacina trate. Tal como será aparente a um perito na especialidade, o sintoma ou sintomas exactos e o modo da sua melhoria dependerá do distúrbio que se pretende tratar. Por exemplo, quando a vacina terapêutica é para tuberculose, o tratamento de PIM com vacina resulta em reduzida tosse, dor pleural ou da parede do tórax, febre e/ou outros sintomas conhecidos na especialidade. Quando a vacina é um alérgeno utilizado em terapia de dessensibilização de alergia, o tratamento resulta numa redução nos sintomas de alergia (p.ex., redução em rinite, conjuntivite alérgica, níveis de IgE em circulação, e/ou níveis de histamina em circulação).

Outras concretizações do presente invento referem-se a terapia imunomoduladora de indivíduos possuindo uma doença ou distúrbio preexistente, tal como cancro ou uma doença infecciosa. O cancro é um alvo atractivo para imunomodulação porque a maioria dos cancros expressa antígenos associados a tumores e/ou específicos de tumores que não se verificam noutras células do corpo. A estimulação de uma resposta de tipo Th1 contra células tumorais resulta em matança directa e/ou intermediária de células tumorais pelo sistema imunitário, conduzindo a uma redução nas células de cancro e/ou uma redução nos sintomas. A administração de um PIM a um indivíduo possuindo cancro resulta em estimulação de uma resposta imunitária de tipo Th1 contra as células tumorais. Uma tal resposta imunitária pode matar células tumorais, através de acção directa de células do sistema imunitário celular (p.ex., CTL, células NK) ou componentes do sistema imunitário humoral, ou através de efeitos intermediários em células próximas de

células alvo do sistema imunitário. Ver, por exemplo, Cho *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 18: 509-514, 2000. No contexto de cancro, a administração de PIM pode ainda compreender a administração de um ou mais agentes terapêuticos adicionais tais como, por exemplo, anticorpos antitumorais, regímenes de quimioterapia e/ou tratamento de radiação. Os anticorpos antitumorais, incluindo, mas não se limitando a fragmentos de anticorpos antitumorais e/ou derivados destes, e anticorpos antitumorais monoclonais, fragmentos e/ou derivados destes, são conhecidos na especialidade tal como a administração de tais reagentes anticorpos em terapia do cancro (p.ex., Rituxan® (rituximab); Herceptin® (trastuzumab)). A administração de um ou mais agentes terapêuticos adicionais pode ocorrer antes, após e/ou concorrente com a administração dos PIM.

A terapia imunomoduladora de acordo com o presente invento é também útil para indivíduos com doenças infecciosas, particularmente doenças infecciosas que sejam resistentes a respostas imunitárias humorais (p.ex., doenças causadas por infecções micobacterianas e patogénios intracelulares). A terapia imunomoduladora pode ser utilizada para o tratamento de doenças infecciosas causadas por patogénios celulares (p.ex., bactérias ou protozoários) ou através de patogénios subcelulares (p.ex., vírus). A terapia de PIM pode ser administrada a indivíduos sofrendo de doenças micobacterianas tais como tuberculose (p.ex., infecções de *M. tuberculosis* e/ou *M. bovis*), lepra (*i.e.*, infecções de *M. leprae*), ou infecções de *M. marinum* ou *M. ulcerans*. A terapia de PIM é também útil para o tratamento de infecções virais, incluindo infecções por vírus influenza, vírus sincicial respiratório (RSV), vírus da hepatite B, vírus da hepatite C, herpesvírus, particularmente vírus de herpes *simplex*, e vírus de papiloma. As doenças causadas por parasitas intracelulares tais como malária (p.ex., infecção por *Plasmodium vivax*, *P. ovale*, *P. falciparum* e/ou *P. malariae*), leishmaniose (p.ex., infecção por *Leishmania donovani*, *L. tropica*, *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. peruviana*, *L. infantum*, *L. chagasi*, e/ou *L. aethiopica*), e toxoplasmose (*i.e.*, infecção por *Toxoplasmosis gondii*) também beneficiam de terapia de PIM. A terapia de PIM é também útil para tratamento de doenças parasitárias tais como esquistossomíase (*i.e.*, infecção por

platelmintas sanguíneos do género *Schistosoma* tais como *S. haematobium*, *S. mansoni*, *S. japonicum*, e *S. mekongi*) e clonorquíase (*i.e.*, infecção por *Clonorchis sinensis*). A administração de um PIM a um indivíduo sofrendo de uma doença infecciosa resulta numa melhoria dos sintomas da doença infecciosa. Nalgumas concretizações, a doença infecciosa não é uma doença viral.

O presente invento refere-se ainda ao aumento ou estimulação de pelo menos uma citocina associada a Th1 num indivíduo, incluindo EL-2, IL-12, TNF- β , IFN- γ e IFN- α . Em certas concretizações, o presente invento refere-se a aumento ou estimulação de IFN- γ num indivíduo, particularmente num indivíduo necessitado de maiores níveis de IFN- γ , através de administração de uma quantidade eficaz de um PIM ao indivíduo para que seja aumentado o IFN- γ . Os indivíduos necessitados de maior IFN- γ são os que possuem distúrbios que geralmente respondem à administração de IFN- γ . Tais distúrbios incluem vários distúrbios inflamatórios incluindo, mas não se limitando a, colite ulcerosa. Tais distúrbios incluem também vários distúrbios fibróticos, incluindo, mas não se limitando a, fibrose pulmonar idiopática (FPI), esclerodermia, fibrose induzida por radiação cutânea, fibrose hepática incluindo fibrose hepática induzida por esquistossomíase, fibrose renal bem como outras condições que podem ser melhoradas através da administração de IFN- γ . A administração de PIM de acordo com o presente invento resulta num aumento nos níveis de IFN- γ , e resulta na melhoria de um ou mais sintomas, estabilização de um ou mais sintomas, e/ou prevenção ou retardamento da progressão (*p.ex.*, redução ou eliminação de lesões ou sintomas adicionais) do distúrbio que responde a IFN- γ .

O presente invento pode ser praticado em combinação com outras terapias que constituam o padrão dos cuidados para o distúrbio, tais como a administração de agentes anti-inflamatórios como terapia sistémica de corticosteróides (*p.ex.*, cortisona) em FPI.

Em certas concretizações, o presente invento refere-se a aumento do interferão de tipo I, incluindo IFN- α , IFN- β e IFN- ω , num indivíduo, particularmente num indivíduo necessitado de maiores níveis de interferão de tipo I, através

de administração de uma quantidade eficaz de um PIM ao indivíduo para que os níveis de interferão de tipo I sejam aumentados. Em certas concretizações, o presente invento refere-se a aumento de IFN- α num indivíduo, particularmente num indivíduo necessitado de maiores níveis de IFN- α , através de administração de uma quantidade eficaz de um PIM ao indivíduo para que sejam aumentados os níveis de IFN- α . Os indivíduos necessitados de IFN- α aumentado são os que possuem distúrbios que geralmente respondem à administração de IFN- α , incluindo IFN- α recombinante, incluindo, mas não se limitando a, infecções virais e cancro. Nalgumas concretizações em que se deseja produção de níveis maiores de IFN- α , o PIM contém pelo menos uma sequência palindrómica com pelo menos os seguintes comprimentos (em bases): 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 ou 30, e, nalgumas concretizações, o PIM contém pelo menos uma sequência palindrómica com um comprimento superior a 30 bases.

A administração do PIM de acordo com o presente invento resulta num aumento nos níveis de IFN- α , e resulta na melhoria de um ou mais sintomas, estabilização de um ou mais sintomas, e/ou prevenção ou atraso da progressão (p.ex., redução ou eliminação de lesões ou sintomas adicionais) do distúrbio que responde a IFN- α . Os métodos do presente invento podem ser praticados em combinação com outras terapias que constituam o padrão dos cuidados para o distúrbio, tais como administração de agentes antivirais para infecções virais.

Também, o presente invento refere-se à redução de níveis, particularmente níveis séricos, de IgE num indivíduo possuindo um distúrbio relacionado com IgE através da administração de uma quantidade eficaz de um PIM ao indivíduo. Em tais concretizações, o polinucleótido imunomodulador pode ser administrado sozinho (p.ex., sem antigénio) ou administrado com antigénio, tal como um alergénio. A redução em IgE resulta numa melhoria de um ou mais sintomas do distúrbio relacionado com IgE. Tais sintomas incluem sintomas de alergia tais como rinite, conjuntivite, em menor sensibilidade a alergénios, uma redução nos sintomas de alergia num indivíduo com alergias, ou uma redução na gravidade de uma resposta alérgica. Assim, o presente invento também se refere a tratamento de uma condição alérgica num indivíduo. Nalgumas concretizações, o tratamento

de uma condição alérgica inclui a administração do polinucleótido imunomodulador com uma determinada quantidade ou dose de antigénio. Com a administração de qualquer antigénio adicional, a quantidade ou dose de antigénio administrada pode permanecer a mesma, pode diminuir ou pode aumentar (tal como em terapia convencional de dessensibilização) ao longo do curso do tratamento.

Nalgumas concretizações, o presente invento refere-se a estimulação da produção de CTL num indivíduo, particularmente num indivíduo necessitado de maior número e/ou actividade de CTL, compreendendo a administração de uma quantidade eficaz de um PIM ao indivíduo para que a produção de CTL seja aumentada. Os indivíduos a necessitar de maior produção de CTL são os que possuem distúrbios que geralmente respondem à actividade de CTL. Tais distúrbios incluem, mas não se limitam a, cancro e infecções intracelulares. A administração de PIM de acordo com o presente invento resulta num aumento dos níveis de CTL, e resulta na melhoria de um ou mais sintomas, estabilização de um ou mais sintomas, e/ou prevenção ou retardamento da progressão (p.ex., redução ou eliminação de lesões ou sintomas adicionais) do distúrbio que responde a actividade de CTL presente.

O presente invento inclui quaisquer concretizações aqui descritas, tais como a administração de PIM na forma de complexo polinucleótido imunomodulador/microtransportador (com ou sem antigénio, ou com ou sem antigénio durante um curso de administrações), ou em íntima associação com um antigénio.

Tal como será aparente a um perito na especialidade, o presente invento pode ser praticado em combinação com outras terapias para a indicação particular para a qual o PIM é administrado. Por exemplo, a terapia de PIM pode ser administrada em conjunto com fármacos anti-malária tais como cloroquina para pacientes de malária, em conjunto com fármacos leishmanicidas tais como pentamidina e/ou alopurinol para pacientes de leishmaniose, em conjunto com fármacos anti-micobacterianos tais como isoniazida, rifampina e/ou etambutol em pacientes de tuberculose, ou em conjunto com terapia de dessensibilização a alergénios para pacientes atópicos (alergia).

Tal como aqui descrito, a administração de PIM pode ainda compreender a administração de um ou mais agentes imunoterapêuticos adicionais (*i.e.*, um agente que actue através do sistema imunitário e/ou seja derivado do sistema imunitário) incluindo, mas não se limitando a, citocina, adjuvantes e anticorpos (incluindo, mas não se limitando a, fragmentos e/ou derivados de anticorpos e anticorpos monoclonais, fragmentos e/ou derivados destes). Exemplos de anticorpos terapêuticos incluem os utilizados no contexto de cancro (*p.ex.*, anticorpos antitumorais). A administração de tais agentes imunoterapêuticos adicionais aplica-se a todos os métodos aqui descritos.

Um PIM pode também ser administrado em conjunto com um adjuvante. A administração de um antigénio com um PIM e um adjuvante conduz a uma potenciação de uma resposta imunitária a um antigénio e assim, pode resultar numa maior resposta imunitária em comparação com a que resulta de uma composição compreendendo o PIM e o antigénio sozinhos. Os adjuvantes são conhecidos na especialidade e incluem, mas não se limitam a, emulsões de óleo em água, emulsões de água em óleo, alúmen (sais de alumínio), lipossomas e micropartículas, incluindo mas não se limitando a, poliestireno, amido, polifosfazeno e polilactida/poliglicósidos. Outros adjuvantes adequados incluem também, mas não se limitam a, MF59, DETOX™ (Ribi), misturas de esqualeno (SAF-1), péptido de muramilo, derivados de saponina, preparações de parede celular de micobactérias, monofosforil-lípido A, derivados de ácido micólico, tensioactivos não iónicos de copolímeros de blocos, Quil A, subunidade B da toxina da cólera, polifosfazeno e derivados, e complexos imunoestimuladores (ISCOM) tais como os descritos por Takahashi *et al.*, *Nature* 344: 873-875, 1990, bem como adjuvantes baseados em lípidos e outros aqui descritos. Para utilização veterinária e para produção de anticorpos em animais, podem ser utilizados componentes mitogénicos do adjuvante de Freund (completo e incompleto).

Administração e avaliação da resposta imunitária

O PIM pode ser administrado em combinação com outros agentes farmacêuticos e/ou imunogénicos e/ou imunoestimuladores, tal como aqui descrito, e pode ser

combinado com um transportador fisiologicamente aceitável destes (e como tal o presente invento inclui estas composições). O PIM pode ser qualquer um dos aqui descritos.

Assim, o PIM pode ser administrado em conjunto com outros agentes imunoterapêuticos incluindo, mas não se limitando a, citocina, adjuvantes e anticorpos.

Tal como com todas as composições imunogénicas, as quantidades imunologicamente eficazes e o método de administração da formulação do PIM particular podem variar com base no indivíduo, de qual a condição a tratar e doutros factores evidentes a um perito na especialidade. Os factores a considerar incluem a antigenicidade do antigénio se administrado, de se o PIM será ou não administrado com ou covalentemente unido a uma molécula de entrega adjuvante e/ou um antigénio, a via de administração e o número de doses de imunização a administrar. Tais factores são conhecidos na especialidade e está bem dentro da perícia na especialidade fazer tais determinações sem demasiada experimentação. Um intervalo de dosagem adequado é um que proporcione a modulação desejada da resposta imunitária (p.ex., estimulação de IFN- α e/ou IFN- γ). Quando é desejada uma resposta imunitária a um antigénio, um intervalo de dosagem adequado é um que proporcione a modulação desejada da resposta imunitária ao antigénio. Geralmente, a dosagem é determinada através da quantidade de PIM administrada ao paciente, em vez da quantidade global de composição contendo PIM administrada. Intervalos de dosagem úteis de PIM, dados em quantidades de PIM entregues, podem ser, por exemplo, cerca de qualquer um dos seguintes: 1 a 500 $\mu\text{g/kg}$, 100 a 400 $\mu\text{g/kg}$, 200 a 300 $\mu\text{g/kg}$, 1 a 100 $\mu\text{g/kg}$, 100 a 200 $\mu\text{g/kg}$, 300 a 400 $\mu\text{g/kg}$, 400 a 500 $\mu\text{g/kg}$. A quantidade absoluta dada a cada paciente depende de propriedades farmacológicas tais como biodisponibilidade, taxa de eliminação e via de administração.

A quantidade eficaz e o método de administração da formulação de PIM particular podem variar com base em cada paciente, no resultado desejado e/ou no tipo de distúrbio, no estágio da doença e noutros factores evidentes a um perito na especialidade. A via ou vias de administração úteis numa determinada aplicação são aparentes a um perito na

especialidade. As vias de administração incluem mas não se limitam a tópica, dérmica, transdérmica, transmucosa, epidérmica; parentérica, gastrointestinal, e nasofaríngea e pulmonar, incluindo transbrônquica e transalveolar. Um intervalo de dosagem adequado é um que proporcione suficiente composição contendo PIM para se obter uma concentração tecidual de cerca de 1-10 μM medidos através dos níveis sanguíneos. A quantidade absoluta dada a cada paciente depende de propriedades farmacológicas tais como biodisponibilidade, taxa de eliminação e via de administração.

Tal como aqui descrito, APC e tecidos com elevada concentração de APC são alvos preferidos para o PIM. Assim, a administração de PIM a pele e/ou mucosa de mamífero, onde as APC estão presentes em concentração relativamente elevada, é preferida.

O presente invento proporciona formulações de PIM adequadas para aplicação tópica incluindo, mas não se limitando a, implantes, unguentos, cremes, enxagúes e géis fisiologicamente aceitáveis. A administração tópica é, por exemplo, através de um penso ou ligadura possuindo disperso nele um sistema de entrega, através de administração directa de um sistema de entrega em incisões ou feridas abertas, ou através de dispositivo de administração transdérmica dirigido a um local de interesse. Os cremes, enxagúes, géis e unguentos possuindo disperso neles um PIM são adequados para utilizar como unguentos tópicos ou agentes de preenchimento de feridas.

As vias preferidas de administração dérmica são as que forem menos invasivas. Entre estes os meios preferidos são a transmissão transdérmica, a administração epidérmica e a injeção subcutânea. Destes meios, a administração epidérmica é preferida para as maiores concentrações de APC que se espera estarem no tecido intradérmico.

A administração transdérmica é alcançada através de aplicação de um creme, enxágue, gel, etc. capaz de permitir que o PIM penetre na pele e entre na corrente sanguínea. Composições adequadas para administração transdérmica incluem, mas não se limitam a, suspensões, óleos, cremes e unguentos farmacologicamente aceitáveis aplicados directamente na pele ou

incorporados num transportador protector tal como um dispositivo transdérmico (designado "penso"). Exemplos de cremes, unguentos, etc. adequados podem ser verificados, por exemplo, em "Physician's Desk Reference".

Para transmissão transdérmica, a iontoforese é um método adequado. A transmissão iontoforética pode ser alcançada utilizando pensos comercialmente disponíveis que entregam o seu produto continuamente através da pele intacta durante períodos de vários dias ou mais. A utilização deste método permite a transmissão controlada de composições farmacêuticas em concentrações relativamente grandes, permite a infusão de fármacos de combinação e permite a utilização contemporânea de um promotor da absorção.

Um produto penso exemplar para utilizar neste método é o produto com a marca registada LECTRO PATCH de General Medical Company de Los Angeles, CA. Este produto mantém electronicamente eléctrodos reservatório a pH neutro e pode ser adaptado para proporcionar dosagens de concentrações diferentes, para dosear continuamente e/ou periodicamente. A preparação e utilização do penso devem ser efectuadas de acordo com as instruções impressas pelo fabricante que acompanham o produto LECTRO PATCH; essas instruções são aqui incorporadas por esta referência. Outros sistemas de penso oclusivo são também adequados.

Para transmissão transdérmica, a entrega ultra-sónica de baixa frequência é também um método adequado. Mitragotri *et al.*, *Science* 269: 850-853, 1995. A aplicação de frequências ultra-sónicas de baixa frequência (cerca de 1 MHz) permite a entrega geral controlada das composições terapêuticas, incluindo as de peso molecular elevado.

A administração epidérmica envolve essencialmente irritação mecânica ou química da camada mais externa da epiderme o suficiente para provocar uma resposta imunitária ao irritante. Especificamente, a irritação deve ser suficiente para atrair APC ao local de irritação.

Um meio irritante mecânico exemplar emprega uma multiplicidade de dentes curtos de diâmetro muito estreito que

podem ser utilizados para irritar a pele e atrair APC ao local de irritação, para tomar um PIM transferido desde a extremidade dos dentes. Por exemplo, o teste da tuberculina velha MONO-VACC fabricado por Pasteur Merieux de Lyon, França contém um dispositivo adequado para a introdução de composições contendo PIM.

O dispositivo (que é distribuído nos EUA por Connaught Laboratories, Inc. de Swiftwater, PA) consiste num recipiente de plástico possuindo um êmbolo de seringa numa extremidade e um disco de dentes na outra. O disco de dentes suporta uma multiplicidade de dentes de diâmetro estreito com um comprimento que arranhará apenas a camada mais externa de células epidérmicas. Cada um dos dentes no estojo de MONO-VACC é revestido com tuberculina velha; no presente invento, cada agulha é revestida com uma composição farmacêutica de formulação de PIM. A utilização do dispositivo é de preferência de acordo com as instruções escritas do fabricante incluídas com o produto dispositivo. Dispositivos semelhantes que também podem ser utilizados nesta concretização são os que são actualmente utilizados para efectuar testes de alergias.

Outra abordagem adequada à administração epidérmica de PIM é através da utilização de um químico que irrite as células mais exteriores da epiderme, provocando assim uma resposta imunitária suficiente para atrair APC à área. Um exemplo é um agente queratinolítico, tal como o ácido salicílico utilizado no creme depilatório tópico comercialmente disponível vendido por Noxema Corporation com a marca NAIR. Esta abordagem pode também ser utilizada para alcançar administração epitelial na mucosa. O irritante químico pode também ser aplicado em conjunto com o irritante mecânico (tal como por exemplo ocorreria se o dente tipo MONO-VACC fosse também revestido com o irritante químico). O PIM pode ser suspenso num transportador que também contenha o irritante químico ou co-administrado com ele.

As vias parentéricas de administração incluem mas não se limitam a injeção eléctrica (iontoforese) ou directa tal como injeção directa numa linha venosa central, injeção intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intradérmica ou subcutânea. As formulações de PIM adequadas para administração

parentérica são geralmente formuladas em água pura ou água para injeção e podem compreender ainda tampões de pH, sais, agentes de volume, conservantes e outros excipientes farmacologicamente aceitáveis. O polinucleótido imunomodulador para injeção parentérica pode ser formulado em soluções isotônicas estéreis farmacologicamente aceitáveis tais como solução salina e solução salina tamponada com fosfato para injeção.

Vias gastrointestinais de administração incluem, mas não se limitam a, ingestão e retal. O presente invento inclui formulações de PIM adequadas para administração gastrointestinal incluindo, mas não se limitando a, pós, comprimidos ou líquidos para ingestão e supositórios para administração retal farmacologicamente aceitáveis. Tal como será aparente a um perito na especialidade, os comprimidos ou supositórios compreenderão ainda sólidos farmacologicamente aceitáveis, tais como amido, para proporcionar volume à composição.

As administrações nasofaríngea e pulmonar são alcançadas por inalação e incluem vias de entrega tais como a via intranasal, transbrônquica e transalveolar. O presente invento inclui formulações de PIM adequadas para administração por inalação incluindo, mas não se limitando a, suspensões líquidas para formação de aerossóis bem como formas em pó para sistemas de entrega por inalação de pó seco. Dispositivos adequados para administração por inalação de formulações de PIM incluem, mas não se limitam a, atomizadores, vaporizadores, nebulizadores e dispositivos de entrega por inalação de pó seco.

Tal como é bem conhecido na especialidade, as soluções ou suspensões utilizadas para as vias de administração aqui descritas podem incluir qualquer um ou mais de um dos seguintes componentes: um diluente estéril tal como água para injeção, solução salina, óleos fixados, polietilenoglicóis, glicerina, propilenoglicol ou outros solventes sintéticos; agentes antibacterianos tais como álcool benzílico ou metilparabenos; antioxidantes tais como ácido ascórbico ou bissulfito de sódio; agentes quelantes tais como ácido etilenodiaminotetra-acético; tampões tais como acetatos,

citratos ou fosfatos e agentes para o ajustamento da tonicidade tal como cloreto de sódio ou dextrose. O pH pode ser ajustado com ácidos ou bases, tais como ácido clorídrico ou hidróxido de sódio. A preparação parentérica pode ser encerrada em ampolas, seringas descartáveis ou frascos de múltiplas doses feitos de vidro ou plástico.

Tal como é bem conhecido na especialidade, composições farmacêuticas adequadas para utilização injectável incluem soluções aquosas estéreis (quando solúveis em água) ou dispersões e pós estéreis para a preparação extemporânea de soluções ou dispersões injectáveis estéreis. Para administração intravenosa, transportadores adequados incluem solução salina fisiológica, água bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) ou solução salina tamponada com fosfato (PBS). Em todos os casos, a composição tem de ser estéril e deve ser líquida até ao ponto em que exista facilidade em utilizar uma seringa. Deve ser estável sob as condições de fabrico e armazenamento e tem de ser conservada contra a acção contaminante de microrganismos tais como bactérias e fungos. O transportador pode ser um solvente ou meio de dispersão contendo, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propilenoglicol e polietilenoglicol líquido, e semelhantes) e misturas adequadas destes. A fluidez correcta pode ser mantida, por exemplo, através da utilização de um revestimento tal como lecitina, através da manutenção do tamanho de partícula requerido no caso de dispersão e através da utilização de tensioactivos. A prevenção da acção de microrganismos pode ser alcançada através de vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal e semelhantes. Pode ser preferível incluir na composição agentes isotónicos, por exemplo, açúcares, poli-álcoois tais como manitol, sorbitol, cloreto de sódio. Uma absorção prolongada das composições injectáveis pode ser obtida incluindo na composição um agente que atrase a absorção, por exemplo, mono-estearato de alumínio e gelatina.

Tal como é bem conhecido na especialidade, soluções injectáveis estéreis podem ser preparadas através da incorporação do composto ou compostos activos na quantidade necessária num solvente apropriado com a ou uma combinação de

ingredientes enumerados acima, conforme necessário, seguida de esterilização por filtração. Geralmente, as dispersões são preparadas através da incorporação do composto activo num veículo estéril que contenha um meio de dispersão básico e os outros ingredientes requeridos dos enumerados acima. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injectáveis estéreis, os métodos preferidos de preparação são secagem em vácuo e secagem por congelação que rendam um pó do ingrediente activo mais qualquer ingrediente adicional desejado de uma solução destes previamente esterilizada por filtração.

A escolha das vias de entrega pode ser utilizada para modular a resposta imunitária desencadeada. Por exemplo, os títulos de IgG e actividades de CTL foram idênticos quando foi administrado um vector de vírus influenza através das vias intramuscular ou epidérmica (pistola de genes); no entanto, a inoculação muscular rendeu principalmente IgG2a, enquanto a via epidérmica rendeu principalmente IgG1. Pertmer *et al.*, *J. Virol.* 70: 6119-6125, 1996. Assim, um perito na especialidade pode tirar vantagem de ligeiras diferenças na imunogenicidade desencadeada por diferentes vias de administração dos polinucleótidos imunomoduladores do presente invento.

Pretende-se que as composições e os métodos de administração acima mencionados descrevam mas não limitem os métodos de administração das formulações de PIM do presente invento. Os métodos de produção das várias composições e dispositivos estão dentro da capacidade de um perito na especialidade e não são aqui descritos em detalhe.

A análise (tanto qualitativa como quantitativa) da resposta imunitária ao PIM pode ser através de qualquer método conhecido na especialidade, incluindo mas não se limitando a, medição da produção de anticorpo específico do antigénio (incluindo a medição das subclasses específicas de anticorpo), activação de populações específicas de linfócitos tais como células T CD4+, células B, células NK ou CTL, maturação de células dendríticas (incluindo células dendríticas plasmacitóides), produção de citocinas e quimiocinas tais como IFN- γ , IFN- α , IFN- ω , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IP-10, MCP-1, MCP-2, MCP-3, MIG ou MIP-3 β e/ou libertação de histamina. Os métodos para medição de respostas

de anticorpos específicas incluem ensaio enzimático imunossorvente (ELISA) e são bem conhecidos na especialidade. A medição do número de tipos específicos de linfócitos tais como células T CD4+ pode ser alcançada, por exemplo, com separação de células activada com fluorescência (FACS). A medição da activação de determinadas populações celulares pode ser alcançada através da determinação de marcadores, por exemplo, marcadores da superfície celular, específicos para activação do tipo celular particular. A expressão do marcador celular pode ser medida, por exemplo, através da medição da expressão de ARN ou da medição da expressão na superfície celular do marcador particular através, por exemplo, de análise FACS. A citotoxicidade e os ensaios de CTL podem ser efectuados por exemplo, tal como descrito em Raz *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 9519-9523, 1994 e Cho *et al.*, 2000. As concentrações de citocina podem ser medidas, por exemplo, através de ELISA. A medição da maturação de células dendríticas pode ser efectuada por exemplo tal como descrito em Hartmann *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 9305-9310, 1999. Estes e outros ensaios para avaliar a resposta imunitária a um imunogénio são bem conhecidos na especialidade. Ver, por exemplo, "Selected Methods in Cellular Immunology", (1980) Mishell e Shiigi, eds., W.H. Freeman and Co.

A análise (tanto qualitativa como quantitativa) da resposta imunitária ao PIM pode também ser através da medição do nível de citocinas, quimiocinas e/ou outras moléculas que sejam induzidas por citocinas, tais como IFN- γ e/ou IFN- α , cuja produção é estimulada por PIM. Assim, os PIM do presente invento podem também estimular a expressão de citocinas indutoras de IFN- γ e/ou IFN- α , quimiocinas e proteínas inflamatórias incluindo, mas não se limitando a, IP-10 (proteína de 10 kDa induzida por interferão), monocina induzida por IFN- γ , e proteína 1 quimiotáctica dos monócitos (MCP-1). A resposta imunitária a PIM pode também ser analisada através da medição do nível de citocinas, quimiocinas e/ou outras moléculas que se saiba terem actividades antivirais, incluindo 2,5-oligoadenilato-sintetase (2,5-OAS), gene-54K que estimula interferão (ISG-54K), MxA, MxB e proteína 1 de ligação a guanilato (GBP-1). Assim, moléculas antivirais e moléculas induzidas por IFN- γ e/ou IFN- α podem ser utilizadas

como marcadores da actividade do PIM. A medição da produção e/ou da expressão génica de tais moléculas induzidas por interferão pode ser através de qualquer método conhecido na especialidade, incluindo, mas não se limitando a, ELISA e PCR quantitativa para medir a produção de ARN.

De preferência, uma resposta de tipo Th1 é estimulada, *i.e.*, desencadeada e/ou aumentada. Em relação ao presente invento, a estimulação de uma resposta imunitária de tipo Th1 pode ser determinada *in vitro* ou *ex vivo* através da medição da produção de citocinas a partir de células tratadas com PIM em comparação com as tratadas sem PIM. Os métodos para determinar a produção de citocinas das células incluem os métodos aqui descritos e qualquer um conhecido na especialidade. O tipo de citocinas produzidas em resposta ao tratamento de PIM indica uma resposta imunitária pelas células tendente para tipo Th1 ou tipo Th2. Tal como aqui se utiliza, o termo produção de citocinas "tendente para tipo Th1" refere-se à maior produção mensurável de citocinas associadas a uma resposta imunitária de tipo Th1 na presença de um estimulador em comparação com a produção de tais citocinas na ausência de estimulação. Exemplos de tais citocinas tendentes para tipo Th1 incluem, mas não se limitam a, IL-2, IL-12, IFN- γ e IFN- α . Em contraste, "citocinas tendentes para tipo Th2" referem-se às associadas a uma resposta imunitária de tipo Th2, e incluem, mas não se limitam a, IL-4, IL-5, e IL-13. Células úteis para a determinação da actividade de PIM incluem células do sistema imunitário, células primárias isoladas de um hospedeiro e/ou linhas celulares, de preferência APC e linfócitos, ainda de maior preferência macrófagos e células T.

A estimulação de uma resposta imunitária de tipo Th1 pode também ser medida num hospedeiro tratado com um PIM e pode ser determinada através de qualquer método conhecido na especialidade incluindo, mas não se limitando a: (1) uma redução nos níveis de IL-4 ou IL-5 medida antes e após provocação com o antigénio; ou a detecção de níveis inferiores (ou mesmo ausentes) de IL-4 ou IL-5 num hospedeiro tratado com PIM, opcionalmente em comparação com um controlo sensibilizado com antigénio ou sensibilizado e provocado, tratado sem PIM; (2) um aumento nos níveis de IL-12, IL-18 e/ou IFN (α , β ou γ) antes e após provocação com o antigénio; ou detecção de

maiores níveis de IL-12, IL-18 e/ou IFN (α , β ou γ) num hospedeiro tratado com PIM em comparação com um controlo sensibilizado com antígeno ou sensibilizado e provocado, tratado sem PIM; (3) produção de anticorpo “tendente a tipo Th1” num hospedeiro tratado com PIM em comparação com um controlo tratado sem PIM; e/ou (4) uma redução nos níveis de IgE específica do antígeno medidos antes e após provocação com o antígeno; ou a detecção de níveis inferiores (ou mesmo ausentes) de IgE específica do antígeno num hospedeiro tratado com PIM em comparação com um controlo sensibilizado com antígeno ou sensibilizado e provocado, tratado sem PIM. Uma variedade destas determinações pode ser feita através da medição das citocinas produzidas por APC e/ou linfócitos, de preferência macrófagos e/ou células T, *in vitro* ou *ex vivo* utilizando métodos aqui descritos ou qualquer um conhecido na especialidade. Algumas destas determinações podem ser feitas através da medição da classe e/ou subclasse dos anticorpos específicos do antígeno utilizando métodos aqui descritos ou qualquer um conhecido na especialidade.

A classe e/ou subclasse de anticorpos específicos do antígeno produzidos em resposta a tratamento de PIM indicam uma resposta imunitária pelas células tendente a tipo Th1 ou tipo Th2. Tal como aqui se utiliza, o termo produção de anticorpos “tendente a tipo Th1” refere-se ao aumento mensurável da produção de anticorpos associada a uma resposta imunitária de tipo Th1 (*i.e.*, anticorpos associados a Th1). Pode ser medido um ou mais anticorpos associados a Th1. Exemplos de tais anticorpos tendentes a tipo Th1 incluem, mas não se limitam a, IgG1 e/ou IgG3 humano (ver, *p.ex.*, Widhe *et al.*, *Scand. J. Immunol.* 47: 575-581, 1998 e de Martino *et al.*, *Ann. Alergia Asthma Immunol* 83: 160-164, 1999) e IgG2a de murídeo. Em contraste, “anticorpos tendentes a tipo Th2” refere-se aos associados a uma resposta imunitária de tipo Th2, e incluem, mas não se limitam a, IgG2, IgG4 e/ou IgE humanos (ver, *p.ex.*, Widhe *et al.*, 1998, e de Martino *et al.*, 1999) e IgG1 e/ou IgE de murídeo.

A indução de citocinas tendentes a tipo Th1 que ocorre em resultado da administração de PIM produz maiores respostas imunitárias celulares, tais como as efectuadas por células NK, células assassinas citotóxicas, células auxiliares Th1 e de

memória. Estas respostas são particularmente benéficas para utilizar em vacinação protectora ou terapêutica contra vírus, fungos, parasitas protozoários, bactérias, doenças alérgicas e asma, bem como tumores.

Nalgumas concretizações, uma resposta Th2 é suprimida (reduzida). A supressão de uma resposta Th2 pode ser determinada, por exemplo, através de redução nos níveis de citocinas associadas a Th2, tais como IL-4 e IL-5, redução nos níveis de anticorpos associados a Th2, bem como uma redução da IgE e uma redução na libertação de histamina em resposta ao alérgénio.

Estojos

São também aqui descritos estojos. Em certos casos, os estojos compreendem geralmente um ou mais recipientes compreendendo qualquer PIM aqui descrito. Os estojos podem ainda compreender um conjunto adequado de instruções, geralmente instruções escritas, referentes à utilização do PIM para qualquer um dos métodos aqui descritos (p.ex., imunomodulação, melhoria de um ou mais sintomas de uma doença infecciosa, aumento dos níveis de IFN- γ , aumento dos níveis de IFN- α , ou melhoria de um distúrbio relacionado com IgE).

Os estojos podem compreender o PIM empacotado em qualquer embalagem conveniente e apropriada. Por exemplo, se o PIM for uma formulação seca (p.ex., um pó liofilizado ou seco), é normalmente utilizado um frasco com uma tampa elástica, para que o PIM possa ser facilmente ressuspenso através de injeção de líquido através da tampa elástica. Ampolas com tampas não elásticas removíveis (p.ex., vidro selado) ou tampas elásticas são muito convenientemente utilizadas para formulações líquidas de PIM. Estão também contempladas embalagens para utilizar em combinação com um dispositivo específico, tal como um inalador, um dispositivo de administração nasal (p.ex., um atomizador) ou um dispositivo de infusão tal como uma minibomba.

As instruções referentes à utilização do PIM incluem geralmente informação quanto a dosagem, programas de dosagem e via de administração para o método de utilização pretendido.

Os recipientes do PIM podem ser unidades-dose, embalagens do todo (p.ex., embalagens multi-dose) ou doses em subunidades. As instruções fornecidas nos estojos são tipicamente instruções escritas numa etiqueta ou folheto informativo (p.ex., uma folha de papel incluída no estojo), mas instruções de leitura por máquinas (p.ex., instruções contidas num disco de armazenamento magnético ou óptico) são também aceitáveis.

Nalgumas concretizações, os estojos compreendem ainda um antigénio (ou um ou mais antigénios), que podem ou não ser empacotados no mesmo recipiente (formulação) que o PIM ou PIM. O antigénio foi aqui descrito.

Em certas concretizações, os estojos compreendem um PIM na forma de um complexo polinucleótido imunomodulador/microtransportador (PIM/MT) e podem compreender ainda um conjunto de instruções, geralmente instruções escritas, relacionadas com a utilização do complexo PIM/MT para qualquer um dos métodos aqui descritos (p.ex., imunomodulação, melhoria de um ou mais sintomas de uma doença infecciosa, aumento dos níveis de IFN- γ , aumento dos níveis de IFN- α , ou melhoria de um distúrbio relacionado com IgE).

Nalgumas concretizações, os estojos compreendendo materiais para produção do complexo PIM/MT incluem geralmente recipientes separados de PIM e MT, embora em certas concretizações sejam fornecidos os materiais para a produção do MT em vez do MT já formado. O PIM e o MT são de preferência fornecidos numa forma que permita a formação de complexo PIM/MT após mistura do PIM e do MT fornecidos. Esta configuração é preferida quando o complexo PIM/MT está ligado através de ligação não covalente. Esta configuração é também preferida quando se pretende que o PIM e o MT sejam ligados de forma cruzada através de um agente de reticulação heterobifuncional; sendo o PIM ou o MT fornecido numa forma "activada" (p.ex., ligado ao agente de reticulação heterobifuncional para que a porção reactiva com o PIM fique disponível).

Os estojos para os complexos PIM/MT compreendendo um MT de fase líquida compreendem de preferência um ou mais recipientes incluindo materiais para produção do MT de fase

líquida. Por exemplo, um estojo de PIM/MT para MT de emulsão de óleo em água pode compreender um ou mais recipientes contendo uma fase oleosa e uma fase aquosa. O conteúdo do recipiente é emulsionado para produzir o MT, que pode ser então misturado com o PIM, de preferência um PIM que tenha sido modificado para incorporar uma porção hidrófoba. Tais materiais incluem óleo e água, para produção de emulsões de óleo em água, ou recipientes de componentes de lipossomas liofilizados (p.ex., uma mistura de fosfolípidos, colesterol e um tensioactivo) mais um ou mais recipientes de uma fase aquosa (p.ex., um tampão aquoso farmacêuticamente aceitável). Em certos casos, os estojos compreendem um PIM na forma de uma composição de agente de condensação catiónico-PIM-agente estabilizante (CIS) num ou mais recipientes compreendendo qualquer composição particulada CIS imunomoduladora tal como aqui descrita. Alternativamente, os estojos podem compreender um ou mais recipientes dos componentes das composições CIS do presente invento. As configurações incluem estojos com um recipiente de mistura PIM/agente estabilizante e um recipiente de agente de condensação catiónico e estojos com um recipiente de PIM, um recipiente de agente estabilizante, e um recipiente de agente de condensação catiónico. Os estojos podem ainda compreender um conjunto adequado de instruções, geralmente instruções escritas, relacionadas com a utilização da composição particulada CIS para qualquer um dos métodos aqui descritos (p.ex., imunomodulação, melhoria de um ou mais sintomas de uma doença infecciosa, aumento dos níveis de IFN- γ , aumento dos níveis de IFN- α , ou melhoria de um distúrbio relacionado com IgE). As concretizações de estojo que compreendem recipientes dos componentes das composições CIS incluirão geralmente instruções para produção das composições CIS de acordo com os métodos aqui divulgados. Para além da composição CIS e/ou de componentes da composição CIS do presente invento, as concretizações de estojo podem também encerrar instruções para produção das composições CIS de acordo com os métodos aqui divulgados e instruções para utilização nas composições CIS imunomoduladoras para qualquer um dos métodos aqui descritos.

Os seguintes Exemplos são proporcionados para ilustrar, mas não limitar, o presente invento. Os polinucleótidos imunomoduladores do presente invento estão marcados com um

asterisco (*). As restantes sequências são apenas para fins ilustrativos.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Imunomodulação de células humanas através de polinucleótidos imunomoduladores

Polinucleótidos imunomoduladores (PIM) ou amostras de controlo, incluindo polinucleótidos sem uma sequência imunomoduladora (5'-TGACTGTGAACCTTAGAGATGA-3' (SEQ ID NO:2)), SAC e apenas meio, foram testados quanto à actividade imunomoduladora em células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC). Foi também testado o polinucleótido imunomodulador padrão 5'-TGACTGTGAACGTTTCGAGATGA (SEQ ID NO:1). A menos que observado em contrário, os polinucleótidos testados eram oligodesoxinucleótidos fosforotioato inteiramente modificados.

Sangue periférico foi colhido a partir de voluntários através de punção venosa utilizando seringas heparinizadas. O sangue foi vertido sobre uma almofada de FICOLL[®] (Amersham Pharmacia Biotech) e centrifugado. As PBMC, situadas na interface de FICOLL[®], foram colhidas, depois lavadas duas vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS). As células foram ressuspensas e cultivadas em placas de 48 ou 96 poços a 2×10^6 células/ml em RPMI 1640 com soro humano AB inactivado pelo calor a 10% mais 50 unidades/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomicina, 300 µg/ml de glutamina, piruvato de sódio 1 mM e aminoácidos não essenciais (NEAA) em MEM 1×.

As células foram cultivadas na presença de amostras de teste (PIM ou controlos) a doses que variam de 0,2 a 20 µg/ml durante 24 horas, depois foi colhido meio livre de células de cada poço e ensaiou-se quanto à concentração de IFN-γ e/ou IFN-α. O IFN-γ e o IFN-α foram ensaiados utilizando estojos de ELISA CYTOSCREEN[™] de BioSource International, Inc., de acordo com as instruções do fabricante. Geralmente, as amostras de teste foram testadas com PBMC de 4 dadores humanos.

Os PIM estimularam a secreção de IFN-γ e/ou IFN-α pelas PBMC humanas. No ensaio de PBMC humanas, os níveis de fundo de

IFN- γ podem variar, mesmo significativamente, com o dador. Outras citocinas tais como IFN- α , no entanto, demonstram um padrão geralmente estável de activação e exibem rotineiramente níveis de fundo baixos sob condições não estimuladas. Exemplos de resultados de tais ensaios com PBMC estão resumidos nas Tabelas 2-7.

Num ensaio de titulação da dose, PBMC de 4 dadores foram estimuladas com 0,2 a 20 $\mu\text{g/ml}$ de SEQ ID NO:27 tal como descrito acima. A quantidade de IFN- α e IFN- γ produzida foi avaliada tal como descrito acima e foi calculada a média dos resultados dos 4 dadores e os resultados médios são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Titulação do PIM - IFN (pg/ml)

SEQ ID NO:27 ($\mu\text{g/ml}$)	IFN- γ	IFN- α
20	412	749
8	583	4036
3,2	203	4073
1,3	39	887
0,5	15	108
0,2	11	50

Tal como se pode observar a partir dos resultados apresentados na Tabela 2, a capacidade para induzir produção de IFN- α aumentou à medida que a dose de PIM diminuía e tornou-se óptima a aproximadamente 3-8 $\mu\text{g/ml}$, após o que a actividade diminuiu com a dose. Ensaios adicionais confirmaram este resultado.

PBMC de quatro dadores foram estimuladas com 20 $\mu\text{g/ml}$ de PIM ou controlos e a estimulação da produção de IFN- α e IFN- γ foi avaliada tal como descrito acima. Entre os polinucleótidos testados estavam:

5'-TCGTCGAACGTTTCGTTAACGTTTCG (SEQ ID NO:5);

5'-TCGTCGAACGTTTCGTT (SEQ ID NO:12);

5'-TCGTCGGAACGTTTCGAGATG (SEQ ID NO:14);

5'-TCGTCGTGAACGTTTCGAGATGA (SEQ ID NO:13);
 5'-TCGTCGAACGTTCTTAACGTTCC (SEQ ID NO:6);
 5'-TCGTCGTAAACGTTTCGAGATG (SEQ ID NO:15);
 5'-TCGTCGAACGTTTTTAACGTT (SEQ ID NO:31);
 5'-TCGTTCAACGTTTCGTTAACGTTTCG (SEQ ID NO:9);
 5'-TCGTCGGACGTTTCGAGATG (SEQ ID NO:16);
 5'-TCGTCGTACGTTTCGAGATG (SEQ ID NO:17);
 5'-TCGTCGTTTCGTTTCGAGATG (SEQ ID NO:18);
 5'-TCGTCGAACCTTCGTTAACCTTCG (SEQ ID NO:11);
 5'-TGATCGTCGAACGTTTCGAGATG (SEQ ID NO:24);
 5'-TGATCGAACGTTTCGTTAACGTTTCG (SEQ ID NO:8);
 5'-TGATTCAACGTTTCGTTAACGTTTCG (SEQ ID NO:10);
 5'-TCAACGTTTCGTTAACGTTTCGTT (SEQ ID NO:4).

Foi calculada a média dos resultados da produção de citocinas pelas PBMC de cada dador e os resultados médios são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Ensaio de PBMC humanas - IFN (pg/ml)

teste ou controlo (SEQ ID NO:)	IFN- γ	IFN- α
2 (não-PIM)	11	50
1 (PIM padrão)	205	141
27	335	842
5	297	517
35	308	686
12	153	157
14	340	576
13	297	142
7	510	594
6	554	103
15	204	194
31	169	178
9	310	57

teste ou controlo (SEQ ID NO:)	IFN- γ	IFN- α
16	274	421
17	387	208
18	78	50
11	36	50
24	462	708
8	650	704
10	111	66
4	126	50
meio	11	50

Tal como demonstrado na Tabela 3, os PIM que estimularam a produção de mais IFN- α que um padrão PIM, SEQ ID NO:1, incluem pelo menos uma sequência TCG na extremidade 5' do polinucleótido ou próximo desta (uma sequência 5'-TCG) e uma sequência palindrômica de pelo menos 8 bases de comprimento adjacente ou a 3 bases da sequência 5'-TCG. Em general, a estimulação da produção de IFN- γ espelhou a estimulação da produção de IFN- α , embora o intervalo de variação na estimulação de IFN- γ fosse menor que para IFN- α . Nos polinucleótidos em que a sequência palindrômica e a 5'-TCG estava separadas, foi geralmente preferível para a produção de IFN- α que a separação fosse em, ou se sobrepusesse com um segundo trinucleótido TCG (ver, por exemplo, SEQ ID NO:14). Os PIM contendo uma 5'-TCG mas nenhuma sequência palindrômica tal como descrito acima induziram níveis muito baixos de IFN- γ e não induziram produção de IFN- α (ver, por exemplo, SEQ ID NO:18 e 11). Os PIM contendo palíndromas de 6-8 bases mas nenhum trinucleótido 5'-TCG induziram IFN- γ mas apenas níveis baixos de IFN- α (ver, por exemplo, SEQ ID NO:1 e 4). Notavelmente, os PIM contendo um TCG a até três bases removidas da extremidade 5' do polinucleótido e contendo uma sequência palindrômica de pelo menos 10 bases de comprimento induziram um nível particularmente elevado de IFN- α em comparação com um padrão PIM sem uma 5'-TCG, SEQ ID NO:1 (ver, por exemplo, SEQ ID NO:24 e 8).

Foi efectuado um ensaio para testar a dependência da dose de PIM da estimulação da produção de IFN- α . Os PIM testados neste ensaio variaram na posição da sequência palindrómica no polinucleótido e/ou na posição de pelo menos uma sequência TCG na extremidade 5'. Entre os polinucleótidos testados estavam alguns dinucleótidos CG e sequências 5'-TCG mas sem sequências palindrómicas com 8 bases ou mais de comprimento (por exemplo, SEQ ID NO:11; SEQ ID NO:18; 5'-TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT (SEQ ID NO:3)). Foram também testados polinucleótidos com dinucleótidos CG e sequências palindrómicas com 8 bases ou mais de comprimento mas sem trinucleótidos 5'-TCG (por exemplo, SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:4; 5'-ATCATCTCGAACGTTTCGACGA (SEQ ID NO:29); 5'-AACGTTTCGAACGTTTCGAACGTTT (SEQ ID NO:67); 5'-TCAACGTTTCGAACGTTTCGAACGTT (SEQ ID NO:68); 5'-GACGATCGTCGACGATCGTC (SEQ ID NO:85)). PBMC de quatro dadores foram estimuladas com 0,8, 4,0 ou 20 $\mu\text{g/ml}$ de PIM ou controlos. A estimulação da produção de IFN- α foi avaliada tal como descrito acima e a média dos resultados dos 4 dadores está relatada na Tabela 4.

Tabela 4. Ensaio de PBMC humanas - IFN- α (pg/ml)

teste ou controlo (SEQ ID NO:)	20 $\mu\text{g/ml}$	4,0 $\mu\text{g/ml}$	0,8 $\mu\text{g/ml}$
2 (não-PIM)	52	52	52
1 (PIM padrão)	52	108	52
27	8626	7908	715
52	2425	4249	1085
39*	2388	9325	3590
38	1874	7744	4635
57	1991	4262	9780
58	915	1654	5965
59	616	3221	1147
24	1848	2233	71
8	1023	544	52
29	1000	3325	95
35	3507	8734	63
60	1978	517	52
61	7256	13767	599

teste ou controlo (SEQ ID NO:)	20 µg/ml	4,0 µg/ml	0,8 µg/ml
62	11157	16722	2254
63	17077	12510	360
64	569	2896	80
65	2007	1158	55
66*	3926	718	64
67	246	2399	52
68	520	1558	1254
85	52	411	52
4	158	124	52
18	473	618	52
11	52	261	756
3	138	289	53
meio	52		

Os resultados apresentados na Tabela 4 apoiam a importância de uma sequência palindrômica com pelo menos 8 bases de comprimento e pelo menos uma sequência TCG na extremidade 5' do polinucleótido ou próximo desta para estimulação de IFN- α a partir de PBMC humanas.

Foi efectuado outro ensaio para testar a dependência da dose de PIM na estimulação da produção de IFN- α . Os PIM testados nestes ensaios variaram na presença de dinucleótidos CG e sequências 5'-TCG no polinucleótido. Entre os polinucleótidos testados estavam alguns com sequências palindrômicas mas sem dinucleótidos CG (por exemplo, SEQ ID NO:2; 5'-TGCTTGCAAGCTTGCAAGCA (SEQ ID NO:90), 5'-TCAGTCAGTCAGCTGACTGACTGA (SEQ ID NO:96) e/ou sem uma sequência 5'-TCG (por exemplo, SEQ ID NO:1, 90, 96; 5'-ACCGATAACGTTGCCGGTGACGGCACCACG (SEQ ID NO:92), 5'-AACAACAACGTTGTTGTT (SEQ ID NO:95), 5'-ACCGA TAACGTTGCCGGTGACGGCACCACG (SEQ ID NO:25), 5'-AACAACAACGTTGTTGTT (SEQ ID NO:94)). Foi também testado neste ensaio o polinucleótido 5'-TCGTTGCAAGCTTGCAACGA (SEQ ID NO:91). Alguns dos PIM variaram na composição da estrutura fosfato. PBMC de três dadores foram estimuladas com 0,8, 4,0 ou 20 µg/ml de PIM

ou controlos. A estimulação da produção de IFN- α foi avaliada utilizando PBMC de 3 dadores tal como descrito acima e os resultados médios para os 3 dadores estão relatados na Tabela 5.

Tabela 5. Ensaios de PBMC humanas - IFN- α , (pg/ml)

teste ou controlo (SEQ ID NO:)	20 μ g/ml	4,0 μ g/ml	0,8 μ g/ml
meio	43	–	–
2 (não-PIM)	43	43	43
1 (PIM padrão)	43	371	43
27	823	4958	1893
53*	1968	13779	13550
54*	142	5090	2832
97*	1244	12097	5173
42*	1790	7923	4249
90	43	43	50
96	58	613	43
91	1177	1539	870
25	43	43	43
92	43	903	43
94	235	56	43
95	216	84	43
26	25420	19903	4136
30	1125	7543	5955
32	1483	5088	2933
33	6031	24061	14111
34	15012	17241	6979
93	1355	6193	1762

Tal como se pode observar a partir dos resultados apresentados na Tabela 5, a inversão dos dinucleótidos CG na sequência altamente activa SEQ ID NO:42 em dinucleótidos GC abole a capacidade de SEQ ID NO:90 para induzir IFN- α .

Semelhantemente SEQ ID NO:96, um polinucleótido palindrômico sem dinucleótidos CG também é inactivo.

Tal como se pode observar na Tabela 5, dois polinucleótidos fosfodiéster representativos, SEQ ID NO:25 e SEQ ID NO:94, e suas versões fosforotioato completamente modificadas, SEQ ID NO:92 e SEQ ID NO:95, respectivamente, não foram activos na indução de IFN- α a partir de PBMC humanas. Embora as SEQ ID NO: 25 e 92 contenham vários dinucleótidos CG, incluindo o motivo AACGTT, elas não incluem TCG nem uma sequência palindrômica de pelo menos 8 bases. As SEQ ID NO:94 e 95 são palíndromas de 18 bases e contêm um dinucleótido CG, mas nenhum trinucleótido TCG. Assim, estes polinucleótidos não se ajustam aos motivos aqui descritos.

As SEQ ID NO:26, 30, 32, e 33, contendo todas ligações fosforotioato (SEQ ID NO: 30 e 32) ou ligações quiméricas fosforotioato/fosfodiéster (SEQ ID NO:26 e 33), induziram elevadas quantidades de IFN- α a partir de PBMC humanas. Tanto a SEQ ID NO:34 (que contém ligações quiméricas fosforotioato/fosfodiéster) como a 93 (todas ligações fosforotioato) induziram IFN- α a partir de PBMC humanas.

Num ensaio para testar o efeito do comprimento de uma sequência palindrômica na estimulação de IFN- α , PBMC de quatro dadores foram estimulados com 2 μ g/ml ou 20 μ g/ml de PIM ou controlos, a estimulação da produção de IFN- α foi avaliada tal como descrito acima e os resultados médios estão relatados na Tabela 6. Entre os polinucleótidos testados estavam 5'-TTCGAACGTTTCGTTAACGTTTCG (SEQ ID NO:20) e 5'-TCGTCGAACGTTTCGAACGTTTCG (SEQ ID NO:19).

Tabela 6. Ensaio de PBMC humanas - IFN- α (pg/ml)

teste ou controlo (SEQ ID NO:)	20 μ g/ml	2 μ g/ml
2 (não-PIM)	26	26
1 (PIM padrão)	93	34
5	2146	4018
20	2350	312
19	9844	15989

teste ou controlo (SEQ ID NO:)	20 µg/ml	2 µg/ml
38	1935	15217
39*	3729	14127
40*	4584	12550
43*	4174	10362
27	2008	10062
41*	543	12916
42*	3935	14752
meio	26	26

Os resultados apresentados na Tabela 6 apoiam a importância de uma sequência palindrómica com pelo menos 8 bases de comprimento e pelo menos uma sequência TCG na extremidade 5' do polinucleótido ou próximo desta para estimulação de IFN- α por PBMC humanas.

Num ensaio para testar a actividade estimuladora de IFN- α de PIM com uma variedade de palíndromas com 12 bases, PBMC de quatro dadores foram estimuladas com 0,8, 4 ou 20 µg/ml de PIM ou controlos, a estimulação da produção de IFN- α foi avaliada tal como descrito acima e os resultados médios estão relatados na Tabela 7.

Tabela 7. Ensaio de PBMC humanas - IFN- α (pg/ml)

teste ou controlo (SEQ ID NO:)	20 µg/ml	4 µg/ml	0,8 µg/ml
2 (não-PIM)	169	133	133
1 (PIM padrão)	190	238	143
27	3010	6473	2775
44	4951	10420	5468
45	3821	7221	2864
46	1403	5296	5169
47	2798	6731	3992
48	3082	9190	4113

teste ou controlo (SEQ ID NO:)	20 µg/ml	4 µg/ml	0,8 µg/ml
51	2701	5699	1727
69	1886	8299	5195
70	7893	8429	5553
71	10647	10525	6173
72	9652	9101	5095
73	10419	9376	4896
74	9883	9085	5635
75	10269	8153	3888
76	10551	9773	5062
49	5424	7762	2788
50	6112	8517	3239
42*	7634	8208	5472
43*	6777	6768	4472
77*	3694	4725	768
78*	2542	4257	4311
79*	1201	5725	5757
39*	7454	9965	6622
80*	2938	4137	1412
81*	5914	4918	865
82*	3451	4249	4170
84*	3454	5363	2255
86	10742	11881	6332
87	5110	5950	4139
114	4779	5491	2907
meio	204	204	204

Os resultados apresentados na Tabela 7 indicam que qualquer um dos PIM testados com palíndromas com 12 bases era activo na estimulação de IFN- α por PBMC humanas. Estes PIM contêm um palíndromo de 12 bases com a sequência TCGX₁X₂CGX₂'X₁'CGA (SEQ ID NO:198) na qual não há limitações de

nucleótidos para X_1 e X_2 , apesar da formação de troços de CGCG, CCGG e GCGC, que foram anteriormente descritos como sequências imunoinibidoras ou sequências neutralizadoras do sistema imunitário (Krieg *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 12631-12636, 1998). Por exemplo, as SEQ ID NO:49 e 50 são activas na estimulação de IFN- α e contêm a sequência CGCG. SEQ ID NO:49 exemplifica um polinucleótido imunomodulador contendo a SEQ ID NO:161 descrita acima. SEQ ID NO:50 exemplifica um polinucleótido imunomodulador contendo a SEQ ID NO:162 descrita acima.

Os PIM com palíndromas maiores induziram níveis mais elevados de IFN- α de PBMC humanas, particularmente a doses de PIM inferiores. Tal como se pode observar nos resultados do ensaio mostrados na Fig. 1, a quantidade de IFN- α produzida pelas células em resposta a SEQ ID NO:172 foi significativamente mais elevada que SEQ ID NO:113, SEQ ID NO:27 e SEQ ID NO:1 à dose de 0,4 μ g/ml de PIM. Também, a quantidade de IFN- α produzida em resposta a SEQ ID NO:172 foi significativamente mais elevada que SEQ ID NO:27 e SEQ ID NO:1 à dose de 0,8 μ g/ml de PIM ($p < 0,001$). O comprimento do palíndroma nos PIM é de: 28 bases em SEQ ID NO:172, 22 bases em SEQ ID NO:113, 12 bases em SEQ ID NO:27, e 8 bases em SEQ ID NO:1.

Noutro ensaio, o comprimento global do PIM e o comprimento do palíndroma do PIM foram comparados na indução da produção de IFN- α de PBMC humanas. Entre os polinucleótidos testados estavam: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:27, 5'-TCGTCGAACGTTTCGAGATG (SEQ ID NO:166); 5'-TCGTCGAACGTTTCGAGAT (SEQ ID NO:99); 5'-TCGTCGAACGTTTCGAG (SEQ ID NO:100); 5'-TCGTCGAACGTTTCGA (SEQ ID NO:101); 5'-TCGAACGTTTCGAG (SEQ ID NO:102); 5'-TCGAACGTTTCGA (SEQ ID NO:103); 5'-TCGAACGTTTCG (SEQ ID NO:104); 5'-TCGACGTCGA (SEQ ID NO:105); 5'-TCGTCGAACGTTTCG (SEQ ID NO:167); 5'-TCGTCGAACGTT (SEQ ID NO:199); 5'-TCGTTTCGAACGTTTCGAA (SEQ ID NO:54*); 5'-TTTCGAACGTTTCGAA (SEQ ID NO:98). PBMC de quatro dadores foram estimuladas com 0,8, 4,0 ou 20 μ g/ml de PIM ou controlos e a produção resultante de IFN- α foi avaliada tal como descrito acima. Os resultados médios para os 4 dadores a cada concentração de PIM estão relatados na Tabela 8.

Tabela 8. Ensaaios de PBMC humanas - IFN- α (pg/ml)

Teste (SEQ ID NO:) ou controlo	IFN- α			PIM	
	20 $\mu\text{g/ml}$	4 $\mu\text{g/ml}$	0,8 $\mu\text{g/ml}$	Comprimento total (bases)	Palíndroma (bases)
1 (PIM padrão)	128	412	52	22	8
2 (não-PIM)	52	52	52	22	–
27	1181	5697	1264	21	12
166	1527	4827	2095	19	12
99	204	4254	2093	18	12
100	451	3835	2115	16	12
101	601	3065	547	15	12
102	1016	3529	533	13	12
103	484	1091	83	12	12
104	321	52	52	11	10
105	52	52	52	10	10
12	224	1692	63	16	10
167	319	556	69	14	10
199	52	52	52	12	6
54*	99	3143	1133	17	14
98	1027	2321	744	14	14
meio	82	82	82		

Os resultados apresentados na Tabela 8 indicam que, para os polinucleótidos testados, o comprimento mínimo total do polinucleótido para estimular a produção de IFN- α em PBMC humanas tem cerca de 12 bases com um palíndroma de cerca de 10 bases de comprimento. Assim, nalgumas concretizações em que é desejada a produção de elevados níveis de IFN- α , o PIM contém pelo menos uma sequência palindrómica com pelo menos os seguintes comprimentos (em bases): 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 ou 30, e, nalgumas concretizações, o PIM contém pelo menos uma sequência palindrómica com um comprimento superior a 30 bases.

Noutro ensaio, PBMC de três dadores foram estimuladas com 0,8, 4,0 ou 20 µg/ml de PIM ou controlos. A estimulação da produção de IFN- α , IFN- β e IFN- ω foi avaliada tal como descrito acima. IFN- ω foi avaliado utilizando um estojo de ELISA de PBL Biomedical Laboratories e o limite inferior e superior de detecção de IFN- ω foi de 48 pg/ml e 6000 pg/ml, respectivamente. IFN- β foi ensaiado utilizando um estojo de ELISA de BioSource e o limite inferior e superior de detecção foi de 12 UI/ml e 3046 UI/ml, respectivamente. Os resultados médios para os 3 dadores a cada concentração de PIM estão relatados na Tabela 9.

Tabela 9. Ensaaios de PBMC humanas - IFN- α ou IFN- ω (pg/ml)

	IFN- α			IFN- ω		
teste (SEQ ID NO:) ou controlo	20 µg/ml	4,0 µg/ml	0,8 µg/ml	20 µg/ml	4,0 µg/ml	0,8 µg/ml
meio	16	–	–	48	–	–
2 (não-PIM)	14	16	14	48	48	48
1 (PIM padrão)	49	198	19	48	48	48
27	700	7394	2146	76	629	163
39*	2716	6180	5922	284	741	604
38	nd	nd	nd	228	632	650
nd = não determinado						

Tal como se pode observar na Tabela 9, os PIM do presente invento estimulam a produção de IFN- ω de PBMC humanas bem como a produção de IFN- α . No ensaio descrito acima, não foi detectado IFN- β .

Noutro ensaio, formas dúplices de polinucleótidos foram comparadas com formas não dúplices na indução da produção de IFN- α por PBMC humanas. Entre os polinucleótidos testados estavam: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:90, SEQ. ID NO:27, e 5'-TCGTCGAACGTTTCGAGATGAT/5'-ATCATCTCGAACGTTTCGACGA (dúplice de SEQ ID NO:27 e SEQ ID NO:29). PBMC de três dadores foram estimuladas com 0,4, 0,8, 4,0 ou 20 µg/ml de PIM ou controlos e a produção resultante de IFN- α foi avaliada tal como descrito acima. Os dúplices foram comparados com as sequências

simples utilizando a mesma dose total de polinucleótido (p.ex., 4 µg/ml de SEQ ID NO:27 em comparação com 4 µg/ml de um dúplex que continha 2 µg/ml de SEQ ID NO:27 e 2 µg/ml de SEQ ID NO:29). Os resultados médios para os 3 dadores a cada concentração de PIM estão relatados na Tabela 10.

Tabela 10. Ensaio de PBMC humanas - IFN- α (pg/ml)

	IFN- α			
teste (SEQ ID NO:) ou controlo	20 µg/ml	4 µg/ml	0,8 µg/ml	0,4 µg/ml
27	592	3719	254	57
182 (27/29 dpx)	386	2612	4725	1027
1	124	312	52	52
90	52	nd	nd	nd
meio	52	52	52	52
nd= não determinado				

Tal como se pode observar na Tabela 10, SEQ ID NO:182, a forma dúplex de SEQ ID NO:27 é mais activa que SEQ ID NO:27 na estimulação da produção de IFN- α a doses inferiores de PIM. A doses mais elevadas (4 e 20 µg/ml), SEQ ID NO:27 foi de algum modo mais estimuladora.

Noutro ensaio, um polinucleótido contendo bases modificadas e polinucleótidos sem bases modificadas foram comparados na indução da produção de IFN- α por PBMC humanas. Entre os polinucleótidos testados estavam: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 5'-TCGTCGAACGTTTCGAGATGAT (SEQ ID NO:27), e 5'-TCXTCXAACXTTCXAGATGAT (X=7-desaza-dG, SEQ ID NO:193). SEQ ID NO:27 e SEQ ID NO:193 têm a mesma sequência nucleotídica excepto quanto às substituições desaza-dG para os quatro dG em SEQ ID NO:27. PBMC de quatro dadores foram estimuladas com 0,8, 4,0 ou 20 µg/ml de PIM ou controlos e a produção resultante de IFN- α foi avaliada tal como descrito acima. Os resultados médios para os 4 dadores a cada concentração de PIM estão relatados na Tabela 11.

Tabela 11. Ensaaios de PBMC humanas - IFN- α (pg/ml)

	IFN- α		
teste (SEQ ID NO:) ou controlo	20 μ g/ml	4 μ g/ml	0,8 μ g/ml
1 (PIM padrão)	129	118	80
2 (não-PIM)	102	102	102
27	10248	13871	3798
193	10754	12262	193
meio	102		

Tal como se pode observar na Tabela 11, SEQ ID NO:193 tem actividade estimuladora de IFN- α comparável a SEQ ID NO:27 excepto na dose de 0,8 μ g/ml.

As formas simples e de cadeia dupla dos polinucleótidos contendo bases modificadas foram ensaiadas quanto à actividade na indução de produção de IFN- α por PBMC humanas. Entre os polinucleótidos testados estavam: SEQ ID NO:1 de cadeia simples e dupla, SEQ ID NO:2 de cadeia simples, SEQ ID NO:29 de cadeia simples, SEQ ID NO:27 de cadeia simples e de cadeia dupla, SEQ ID NO:187 de cadeia simples e dupla, SEQ ID NO:188 de cadeia simples e dupla, SEQ ID NO:189 de cadeia simples e dupla, SEQ ID NO:190 de cadeia simples e dupla, SEQ ID NO:194 de cadeia simples, e SEQ ID NO:197 de cadeia simples. As SEQ ID NO: 187, 188, 189, 190, 194 e 197 têm a mesma sequência nucleotídica que SEQ ID NO: 27 excepto quanto às substituições observadas:

5'-TCGTCGAA*CGT*TCGAGATGAT (A* = 2-amino-dA; T* = 2-tio-dT)
(SEQ ID NO:189);

5'-TCGTCGA*A*CGT*T*CGAGATGAT (A* = 2-amino-dA; T* = 2-tio-dT)
(SEQ ID NO:190);

5'-TCG*TCG*AACG*TTTCG*AG*ATG*AT (G* = 7-desaza-8-aza-dG)
(SEQ ID NO:187);

5'-TCG*AACG*TTTCG*AACG*TTTCG*AACG*TT (G* = 7-desaza-8-aza-dG)
(SEQ ID NO:194*);

5'-TCGTCGA*A*CGTTTCGA*GA*TGA*T (A* = 2-amino-dA)
(SEQ ID NO:188);

Tal como se pode observar na Tabela 12, a utilização de certas bases modificadas no PIM pode resultar em polinucleótidos que têm actividade estimuladora de IFN- α . Com a excepção de 183, estes resultados mostram também que a formação de um polinucleótido dúplex com a sequência complementar conduz a um PIM altamente activo para estimulação da produção de IFN- α , particularmente a doses mais baixas. Os polinucleótidos que não puderam formar dúplexes por si mesmos, p.ex., SEQ ID NO:189 e SEQ ID NO:190, induziram pouco IFN- α enquanto sequências maiores (p.ex., SEQ ID NO:172, um 30-mero com um palíndroma de 28 bases) e o dúplex SEQ ID NO:182 induziram mais IFN- α a doses baixas (p.ex., 0,4 e 0,8 μ g/ml) que SEQ ID NO:27 e outros PIM com palíndromas inferiores a 28 bases de comprimento (tal como mostrado na Tabela 12 e Fig. 1). Tal como aqui discutido, certas bases modificadas podem aumentar a estabilidade dos dúplexes formados.

Exemplo 2: Activação de células B humanas por polinucleótidos imunomoduladores

A capacidade dos PIM para activar células B humanas foi determinada através da medição da proliferação de células B e da produção de IL-6 em resposta à incubação com PIM. PBMC humanas foram incubadas com contas MACS de CD19 (Miltenyi Biotec) e passadas através de um magneto, separando as células B CD19⁺ através de selecção positiva (>98% CD19⁺ determinado através de FACS). Para o ensaio de proliferação, as células B foram cultivadas a 1×10^5 /poço (5×10^5 /ml) em placas de 96 poços 96 de fundo redondo. As células foram incubadas em triplicado com 2 μ g/ml de PIM ou controlo durante 72 horas. No final do período de cultura, as placas foram pulsadas com ³H-timidina (1 μ Ci/poço, Amersham) e incubadas durante mais 8 horas. As placas foram então colhidas e a incorporação radioactiva determinada utilizando técnicas de cintilação líquida padrão, e os dados foram colhidos em contagens por minuto (cpm). Para a secreção de IL-6, células B foram cultivadas a $0,5$ – 1×10^6 /poço em placas de 48 poços com 5 μ g/ml de PIM ou controlo durante 48 horas, depois os sobrenadantes da cultura foram colhidos e ensaiados quanto a IL-6 utilizando ELISA com pares de anticorpos CytoSet de acordo com as instruções do fabricante (BioSource). Os limites de detecção máximo/mínimo foram 4000/2 pg/ml.

Os resultados do ensaio de proliferação de células B apresentados na Tabela 13 são a média dos valores das cpm da proliferação celular em triplicado para as células de cada dador e a média dos valores das cpm para ambos os dadores. Os resultados para o ensaio de IL-6 de células B apresentados na Tabela 13 são a quantidade de IL-6 produzida pelas células de cada dador e o valor médio para ambos os dadores.

Tabela 13. Ensaio de Células B Humanas

teste (SEQ ID NO:) ou controlo	Ensaio de proliferação (cpm)			Ensaio de IL-6 (pg/ml)		
	Dador 1	Dador 2	Média	Dador 1	Dador 2	Média
meio	415	575	495	26	28	27
1 (PIM padrão)	27 731	43 403	35 567	222	531	377
2 (não-PIM)	6748	7704	7226	52	126	89
43*	22 695	26 456	24 576	187	935	561
38	45 364	27 327	36 346	248	984	616
40*	60 250	52 916	56 583	172	336	254
19	22 683	29 569	26 126	173	257	215
LPS	1647	544	1096	34	21	28

Dos resultados apresentados na Tabela 13, os compostos contendo dinucleótidos CG induziram proliferação de células B e produção de IL-6. Tal como se pode observar dos resultados apresentados na Tabela 9, embora uma boa actividade estimuladora de células B em polinucleótidos imunoestimuladores esteja dependente da presença de um dinucleótido CG, não parece requerer os motivos mais especializados aqui descritos para elevada indução de IFN- α .

Noutro ensaio, formas dúplex de polinucleótidos foram comparadas com formas não dúplex na activação de células B. Entre os polinucleótidos testados estavam: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:90, SEQ ID NO:27 e SEQ ID NO:182 - dúplex de SEQ ID NO:27 e SEQ ID NO:29. Células B de três dadores foram estimuladas com 1,0 ou 5,0 μ g/ml de PIM ou controlo e a

proliferação celular e produção de IL-6 resultantes foram avaliadas tal como descrito acima. Os resultados médios para os 3 dadores a cada concentração de PIM estão relatados na Tabela 14.

Tabela 14. Ensaio de Células B Humanas

teste (SEQ ID NO:) ou controlo	Ensaio de proliferação (cpm)		Ensaio de IL-6 (pg/ml)	
	5 µg/ml	1 µg/ml	5 µg/ml	1 µg/ml
1	57921	11307	554	73
27	66735	24529	723	322
182 (27/29 dpx)	78047	25344	809	281
90	3333	2181	5	4
meio	2104	2104	4	4

Dos resultados apresentados na Tabela 14, SEQ ID NO:182, a forma dúplex de SEQ ID NO:27 é aproximadamente equivalente a SEQ ID NO:27 na activação de células B medida através da estimulação da produção de IL-6 e proliferação celular.

Exemplo 3: Imunomodulação de células de murídeo através de polinucleótidos imunomoduladores

Polinucleótidos imunomoduladores ou polinucleótidos de controlo foram ensaiados quanto à actividade imunomoduladora em esplenócitos de ratinho. Os polinucleótidos testados eram oligodesoxinucleótidos fosforotioato completamente modificados. Entre os polinucleótidos testados estavam SEQ ID NO:1 (controlo positivo) e SEQ ID NO:2 (controlo negativo).

Fragmentos de baço de ratinhos Balb/c foram digeridos com collagenase/dispase (0,1 U/ml/0,8 U/ml) dissolvida em solução salina tamponada com fosfato (PBS) durante 45 minutos a 37°C, depois mecanicamente dispersa forçando os fragmentos digeridos através de ecrãs metálicos. Os esplenócitos dispersos foram sedimentados por centrifugação, depois ressuspensos em meio fresco (RPMI 1640 com soro fetal de vitelo a 10%, mais

50 unidades/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomicina, glutamina 2 mM e β-mercaptoetanol 0,05 mM).

Os esplenócitos de ratinho foram dispensados para poços de placas de 96 poços (7×10^7 células/ml) e incubados durante uma hora a 37°C. Foram adicionados às células 100 µl de amostra de teste ou de controlo concentrada 2× e incubou-se mais 24 horas. Cada amostra de teste ou de controlo foi testada em duplicado. O meio foi colhido de cada poço e congelado a -80°C antes dos testes. O meio colhido foi descongelado e testado quanto às concentrações de citocina através de ELISA. Os polinucleótidos foram testados a várias concentrações incluindo 5,0, 1,0 e 0,1 µg/ml. Entre os polinucleótidos testados estavam 5'-TGACTGTGAACGTTTCGAAATGA (SEQ ID NO:36) e 5'-TGACTGTGAACGTTTCGAAGTGA (SEQ ID NO:37). As amostras de controlo incluíram apenas meio e PANSORBIN®, *Staphylococcus aureus* (SAC) (CalBiochem) fixado em formalina, morto com calor.

A IL-6, IL-12 e IFN-γ foram ensaiadas utilizando um ELISA em formato de sanduíche. Meio do ensaio de esplenócitos de ratinho foi incubado em placas de microtitulação revestidas com anticorpo monoclonal anti-IL-6, anti-IL-12 p40/p70 ou anti-IFN-γ (Nunc). A citocina ligada (IL-6, IL-12 ou IFN-γ) foi detectada utilizando um anticorpo anti-citocina biotinilado (anti-IL-6, anti-IL-12 p40/p70 ou anti-IFN-γ) e um anticorpo secundário conjugado com estreptavidina-peroxidase de rábano, revelada com o substrato cromogénico da peroxidase 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) na presença de peroxidase, e quantificada através da medição da absorvância a 450 nm utilizando um leitor de microplacas de precisão Emax (Molecular Devices). Aos valores de IL-6 inferiores a 45 pg/ml foi-lhes atribuído um valor de 45 pg/ml (*i.e.*, 45=<45). Aos valores de IL-12 p40/p70 inferiores a 36 pg/ml foi-lhes atribuído um valor de 36 pg/ml (*i.e.*, 36=<36). Aos valores de IFN-γ inferiores a 54 pg/ml foi-lhes atribuído um valor de 54 pg/ml (*i.e.*, 54=<54).

As Tabelas 15 e 16 resumem os resultados do ensaio para produção de citocina em resposta a PIM. Os polinucleótidos imunomoduladores contendo um dinucleótido CG estimularam geralmente a secreção de IL-6, IL-12 e IFN-γ por esplenócitos

de murídeo independentemente da presença dos motivos mais especializados aqui descritos para elevada indução de IFN- α .

Tabela 15. Ensaio de Esplenócitos de Murídeo - IL-6 (pg/ml)

Teste (SEQ ID NO:) ou Controlo	Dose (μ g/ml)	Rep. 1	Rep. 2	Méd.
1 (PIM padrão)	5,0	4623	4655	4639
	1,0	999	961	980
	0,1	47	45	46
2 (não-PIM)	5,0	45	45	45
	1,0	45	45	45
SAC		308	296	302
Meios		--	--	45
5	5,0	4755	4653	4704
	1,0	1055	985	1020
	0,1	45	46	46
20	5,0	4953	5464	5209
	1,0	1318	1413	1366
	0,1	90	124	107
19	5,0	4421	4726	4574
	1,0	645	740	693
	0,1	45	45	45
38	5,0	4267	4350	4309
	1,0	613	673	643
	0,1	89	160	125
39*	5,0	4775	4819	4797
	1,0	802	731	767
	0,1	213	147	180
40*	5,0	2644	2217	2431
	1,0	341	251	296
	0,1	45	45	45
43*	5,0	101	105	103

Teste (SEQ ID NO:) ou Controlo	Dose (µg/ml)	Rep. 1	Rep. 2	Méd.
	1,0	45	45	45
	0,1	45	45	45
27	5,0	4809	5245	5027
	1,0	2182	2693	2438
	0,1	216	242	229
41*	5,0	4781	5504	5143
	1,0	1979	2285	2132
	0,1	316	372	344
42*	5,0	2706	3242	2974
	1,0	460	577	519
	0,1	66	70	68
44	5,0	2458	2585	2522
	1,0	358	321	340
	0,1	45	45	45
45	5,0	3920	3667	3794
	1,0	1177	1117	1147
	0,1	45	45	45
46	5,0	45	45	45
	1,01	45	45	45
	0,1	45	45	45
47	5,0	163	213	188
	1,0	45	45	45
	0,1	45	45	45
48	5,0	182	216	199
	1,0	45	45	45
	0,1	45	45	45
49	5,0	690	765	728
	1,0	66	73	70
	0,1	45	45	45
50	5,0	45	45	45

Teste (SEQ ID NO:) ou Controlo	Dose (µg/ml)	Rep. 1	Rep. 2	Méd.
	1,0	45	45	45
	0,1	45	45	45
51	5,0	1942	1868	1905
	1,0	224	197	211
	0,1	45	45	45
52	5,0	1421	1234	1328
	1,0	456	488	472
	0,1	45	45	45
36	5,0	3656	3834	3745
	1,0	858	991	925
	0,1	45	45	45
36	5,0	3716	3750	3733
	1,0	897	934	916
	0,1	45	45	45
37	5,0	4253	4643	4448
	1,0	1256	1218	1237
	0,1	157	190	174
37	5,0	4457	4323	4390
	1,0	1099	941	1020
	0,1	88	109	99

Tabela 16. Ensaio de Esplenócitos de Murídeo - IL-12 & IFN-γ

Teste (SEQ ID NO:) ou Controlo	Dose (ug/ml)	IL-12 (pg/ml)			IFN-γ (pg/ml)		
		Rep. 1	Rep. 2	Méd.	Rep. 1	Rep. 2	Méd.
1 (PIM padrão)	5,0	1915	1737	1826	1858	2589	2089
	1,0	1419	1424	1422	1941	1954	1948
	0,1	573	603	588	179	395	287
2 (não-PIM)	5,0	38	36	37	54	54	54
	1,0	36	43	40	54	54	54

Teste (SEQ ID NO:) ou Controlo	Dose (ug/ml)	IL-12 (pg/ml)			IFN- γ (pg/ml)		
		Rep. 1	Rep. 2	Méd.	Rep. 1	Rep. 2	Méd.
SAC		609	620	615	11889	13338	12614
media		--	--	44	--	--	54
5	5,0	1773	1679	1726	1331	1463	1397
	1,0	2099	2193	2146	1878	1811	1845
	0,1	651	649	650	271	157	214
20	5,0	1838	2023	1931	2822	3342	3082
	1,0	2245	2315	2280	2662	3402	3032
	0,1	1016	1077	1047	513	1392	953
19	5,0	1364	1458	1411	1997	2686	2343
	1,0	1513	1702	1608	1427	2375	1901
	0,1	648	597	623	58	54	56
38	5,0	1822	1870	1846	3168	3851	3510
	1,0	1963	2239	2101	3440	3721	3581
	0,1	1207	1430	1319	446	1364	905
39*	5,0	2476	2344	2410	3578	3065	3322
	1,0	2856	2504	2680	2415	3497	2956
	0,1	2101	2085	2093	1403	1217	1310
40*	5,0	902	797	850	605	502	554
	1,0	1244	1216	1230	1116	318	717
	0,1	304	210	257	54	54	54
43*	5,0	940	720	830	54	54	54
	1,0	721	852	787	54	54	54
	0,1	37	36	37	54	54	54
27	5,0	1978	2295	2137	3603	4546	4075
	1,0	1833	2373	2103	3634	4735	4185
	0,1	1761	1945	1853	2401	2313	2357
41*	5,0	1590	1898	1744	3328	4447	3888
	1,0	1611	1910	1761	4197	3402	3800
	0,1	1738	1853	1796	3030	3016	3023

Teste (SEQ ID NO:) ou Controlo	Dose (ug/ml)	IL-12 (pg/ml)			IFN- γ (pg/ml)		
		Rep. 1	Rep. 2	Méd.	Rep. 1	Rep. 2	Méd.
42*	5,0	1507	1887	1697	2747	3203	2975
	1,0	2185	2269	2227	2609	4162	3386
	0,1	669	669	669	192	206	199
44	5,0	1870	1805	1838	2593	2802	2698
	1,0	2058	1854	1956	1464	1747	1606
	0,1	235	214	225	54	54	54
45	5,0	1716	1597	1657	2153	1776	1965
	1,0	1341	1175	1258	1567	1368	1468
	0,1	646	446	546	54	54	54
46	5,0	525	392	459	54	54	54
	1,0	234	132	183	54	54	54
	0,1	36	36	36	54	54	54
47	5,0	746	738	742	54	54	54
	1,0	757	752	755	54	54	54
	0,1	59	64	62	54	54	54
48	5,0	578	676	627	54	54	54
	1,0	697	786	742	54	54	54
	0,1	41	51	46	54	54	54
49	5,0	1095	1288	1192	376	778	577
	1,0	1510	1551	1531	54	54	54
	0,1	79	111	95	54	54	54
50	5,0	586	424	505	54	54	54
	1,0	206	178	192	54	54	54
	0,1	39	44	42	54	54	54
51	5,0	1341	1117	1229	955	1023	989
	1,0	1412	1257	1335	426	845	636
	0,1	92	75	84	54	54	54
52	5,0	1855	1557	1706	2408	2107	2258
	1,0	2961	2821	198	4421	5632	5027

Teste (SEQ ID NO:) ou Controlo	Dose (ug/ml)	IL-12 (pg/ml)			IFN- γ (pg/ml)		
		Rep. 1	Rep. 2	Méd.	Rep. 1	Rep. 2	Méd.
	0,1	205	245	225	54	934	494
36	5,0	1717	1656	1687	3390	3338	3364
	1,0	1480	1510	1495	2547	2832	2690
	0,1	700	571	636	384	264	324
36	5,0	1478	1565	1522	2281	2200	2241
	1,0	1293	1235	1264	2073	3112	2593
	0,1	666	590	628	54	448	251
37	5,0	1679	1918	1799	3240	3748	3494
	1,0	1603	1561	1582	3950	4437	4194
	0,1	1232	1235	1234	1548	2044	1796
37	5,0	2064	3202	2633	2419	2631	2525
	1,0	1895	2417	2156	1894	3332	2613
	0,1	831	1430	1131	293	530	412

Dos resultados apresentados nas Tabelas 15 e 16, todos os compostos contendo motivos CpG induziram produção de IL-12 a partir de esplenócitos de murídeo e a maioria, mas não todos, os compostos contendo motivos CpG induziram produção de IL-6 e IFN- γ a partir de esplenócitos de murídeo. Tal como se pode observar a partir dos resultados apresentados nas Tabela 15 e 16, embora a actividade estimuladora de IL-6, IL-12 e IFN- γ dos polinucleótidos imunoestimuladores nos esplenócitos de murídeo seja geralmente dependente da presença de um dinucleótido CG, não parece requerer os motivos mais especializados aqui descritos para elevada indução de IFN- α .

Exemplo 4: Estimulação da expressão génica indutível por interferência através de polinucleótidos imunomoduladores

Tal como aqui demonstrado, os polinucleótidos imunomoduladores podem induzir produção de IFN- γ e/ou IFN- α a partir de PBMC. Os PIM foram ensaiados quanto à actividade em PBMC humanas para indução da expressão de ARNm de genes de citocinas adicionais, genes de quimiocinas, e outros genes

utilizando uma técnica de PCR quantitativa, a técnica TaqMan. Os polinucleótidos testados eram oligodesoxinucleótidos fosforotioato completamente modificados. Entre os polinucleótidos testados estavam SEQ ID NO:1 (controlo positivo) e SEQ ID NO:2 (controlo negativo).

PMBC humanas foram preparadas tal como descrito no Exemplo 1. As células foram cultivadas na presença de amostras de teste (PIM ou controlos) a 5 µg/ml durante 24 horas. O ARN total foi extraído utilizando o protocolo de Qiagen RNeasy Mini (Qiagen) e convertido em ADNc utilizando oligo dT (Promega), hexâmeros aleatórios (Promega), e SuperScript RT II (Invitrogen). O ADNc foi diluído 1:10 e a PCR conduzida utilizando *QuantiTect SYBR green PCR master mix* (Qiagen) e iniciadores nus (sintetizados por Operon) ou *QuantiTect probe PCR master mix* (Qiagen) e iniciadores PDAR com sondas marcadas (Applied BioSystems). As reacções foram conduzidas utilizando o Detector de Sequências GeneAmp 5700 (PE BioSystems).

Exemplos das sequências para iniciadores sintetizados são como se segue (listados de 5' para 3'):

Ubiquitina (F: CACTTGGTCGTGCGCTTGA (SEQ ID NO:200), R: CAATTGGGAATGCAACAACCTTTAT (SEQ ID NO:201));

2,5-OAS (F: AGGGAGCATGAAAACACATTTCA (SEQ ID NO:202), R: TTGCTGGTAGTTTATGACTAATTCCTAAG (SEQ ID NO:203));

GBP-1 (F: TGGAACGTGTGAAAGCTGAGTCT (SEQ ID NO:204), R: CATCTGCTCATTCTTTCTTTGCA (SEQ ID NO:205));

IFN-α (F: CCCAGGAGGAGTTTGGCAA (SEQ ID NO:206), R: TGCTGGATCATCTCATGGAGG (SEQ ID NO:207));

ISG-54K (F: CTGGACTGGCAATAGCAAGCT (SEQ ID NO:208), R: AGAGGGTCAATGGCGTTCTG (SEQ ID NO:209));

MCP-2 (F: CTGCTCATGGCAGCCACTTT (SEQ ID NO:210), R: AGCAGGTGATTGGAATGGAAA (SEQ ID NO:211));

MIG (F: CATCTTGCTGGTTCTGATTGGA (SEQ ID NO:212), R: TGGTGCTGATGCAGGAACAG (SEQ ID NO:213));

TNF-α (F: CTTCTGCCTGCTGCACTTTG (SEQ ID NO:214), R: CTGGGCCAGAGGGCTGAT (SEQ ID NO:215)).

IFN- γ , IL-1 α , IL-6, IP-10, MCP-3, e MIP-3 β , foram medidos utilizando PDAR fornecidos por PE BioSystems. Os valores limiares do ciclo (C_T) para cada gene foram normalizados para ubiquitina utilizando a fórmula $1,8^{(UBQ-GENE)}(100000)$, onde UBQ é o C_T médio das corridas de ubiquitina em triplicado, GENE é o C_T médio de corridas em duplicado do gene de interesse, e 100 000 é escolhido arbitrariamente como um factor para levar todos os valores acima de 0. Ao controlo negativo para cada experiência, estimulação apenas com meio, é atribuído um valor de 1 e todos os dados são expressos como vezes de indução em relação ao controlo negativo.

A Tabela 17 resume os resultados do ensaio para expressão génica de citocinas, quimiocinas e proteínas inflamatórias de PBMC em resposta ao PIM SEQ ID NO:27. Foi também testado o polinucleótido 5'-GGTGCATCGATGCAGGGGGG (SEQ ID NO:154). Os dados são apresentados como a média de vezes de indução em relação ao controlo de meio (dado o valor de 1,0) com EPM.

Tabela 17. Perfil de expressão génica modulada por PIM

Teste ou Controlo (SEQ ID NO)	IL-1 α		IP-10		MCP-2		MCP-3		MIG	
	média	EPM	média	EPM	média	EPM	média	EPM	média	EPM
meio	1,0	0,0	1,0	0,0	1,0	0,0	1,0	0,0	1,0	0,0
2	2,0	0,7	0,6	0,3	0,2	0,1	0,9	0,1	0,6	0,1
1	1,7	0,4	2,7	0,6	28,3	21,2	3,0	1,0	3,0	0,9
27	0,4	0,2	94,0	27,5	198,8	59,6	8,0	2,2	8,8	2,0
154	0,2	0,1	145,4	65,1	284,8	108,7	8,5	1,4	14,5	7,0
	MIP-3 β		2,5-OAS		GBP-1		ISG-54K			
	média	EPM	média	EPM	média	EPM	média	EPM		
meio	1,0	0,0	1,0	0,0	1,0	0,0	1,0	0,0		
2	1,2	0,3	0,7	0,2	1,0	0,1	0,7	0,1		
1	2,9	0,9	7,6	3,3	2,5	0,6	4,9	2,1		
27	6,9	1,8	16,5	2,3	5,9	0,4	27,1	2,6		
154	10,5	2,1	15,7	1,3	5,7	1,1	31,9	2,1		

Tal como mostrado na Tabela 17, SEQ ID NO:27 aumentou fortemente a expressão das quimiocinas IP-10, MCP-2, MCP-3,

MIG, e MIP-3 β . A expressão de IL-1 α diminuiu na presença de SEQ ID NO:27. Adicionalmente, SEQ ID NO:27 aumentou marcadamente a expressão dos genes indutíveis por IFN- α , 2,5-oligoadenilato-sintetase (2,5-OAS), gene-54K que estimula interferão (ISG-54K) e proteína 1 de ligação a guanilato (GBP-1).

Nestes ensaios, o PIM SEQ ID NO:27 não teve qualquer efeito significativo nos níveis de ARNm expresso das citocinas G-CSF, IL-1 β , IL-6, IL-12 p40, IL-23, TNF- α , ou das quimiocinas BCA-1, IL-8, LPTN, MCP-1, MDC, MIP-1a, MIP-1b, MIP-3a, RANTES, e TARC.

Exemplo 5: Estimulação da actividade lítica de células NK através de polinucleótidos imunomoduladores

Os PIM do presente invento estimulam a actividade lítica melhorada das células assassinas naturais (NK) em comparação com um PIM padrão. A actividade lítica das células NK foi avaliada através da lise de células alvo K562. Resumidamente, foram estimuladas PBMC com 10 mg/ml de PIM (dose óptima previamente obtida) ou polinucleótido de controlo negativo durante 48 horas em cultura. As PBMC tratadas foram então co-cultivadas com células alvo tumorais K562 carregadas com ^{51}Cr a um intervalo de proporções efector:alvo durante 4 horas. O ^{51}Cr libertado após lise celular foi medido através de um contador de cintilações TopCount NXT (Packard) e relatado como contagens por minuto (cpm).

Os resultados da estimulação de células NK de dois dadores diferentes de PBMC são mostrados na Fig. 2. As PIM utilizadas nos ensaios foram SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:90, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:172* e SEQ ID NO:113*. O comprimento do palíndroma nos PIM é de: 28 bases em SEQ ID NO:172*, 22 bases em SEQ ID NO:113*, 12 bases em SEQ ID NO:27, e 8 bases em SEQ ID NO:1. SEQ ID NO:90, um controlo não PIM, tem um comprimento de palíndroma de 20 bases mas não contém uma sequência 5'-C, G-3'. Nesta experiência, os PIM com palíndromas de 12 bases de comprimento ou mais estimularam uma quantidade crescente de actividade lítica de células NK em comparação com o padrão PIM SEQ ID NO:1 com um comprimento de palíndroma de 8 bases.

Embora o presente invento antecedente tenha sido descrito nalgum detalhe por meio de ilustrações e exemplos para fins de clareza e compreensão, será aparente aos peritos na especialidade que certas alterações e modificações podem ser praticadas. Por essa razão, as descrições e os exemplos não deverão ser entendidos como limitantes do âmbito do presente invento.

Lisboa, 2009-12-07

REIVINDICAÇÕES

1. Polinucleótido imunomodulador compreendendo:

a) $5'-(TCG(N_q))_y(X_1X_2CGX_2'X_1'(CG)_p)_z$

em que N são nucleósidos, $y=1$, $p=0$ ou 1 , $q=0$, 1 ou 2 , e $z=2-20$, X_1 e X_1' são nucleósidos auto-complementares, X_2 e X_2' são nucleósidos auto-complementares, e em que o T 5' da sequência $(TCG(N_q))_y$ está na extremidade 5' do polinucleótido; e

b) uma sequência palindrômica de pelo menos 8 bases de comprimento em que a sequência palindrômica compreende a primeira $(X_1X_2CGX_2'X_1')$ das sequências $(X_1X_2CGX_2'X_1'(CG)_p)_z$.

2. Polinucleótido imunomodulador de acordo com a reivindicação 1, em que a sequência palindrômica tem uma composição de bases de mais de 1/3 de A e T.

3. Polinucleótido imunomodulador de acordo com a reivindicação 1 ou 2 em que o PIM compreende uma sequência seleccionada de entre o grupo que consiste em SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:55 e SEQ ID NO:113.

4. Polinucleótido imunomodulador de acordo com a reivindicação 3, em que o PIM compreende a sequência mostrada em SEQ ID NO:39.

5. Polinucleótido imunomodulador de acordo com a reivindicação 3, em que o PIM compreende a sequência mostrada em SEQ ID NO:42.

6. Polinucleótido imunomodulador de acordo com a reivindicação 3, em que o PIM compreende a sequência mostrada em SEQ ID NO:113.

7. Polinucleótido imunomodulador de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que z é 2 ou 3.

8. Polinucleótido imunomodulador de acordo com a reivindicação 1 ou 2 em que p é 0.

9. Polinucleótido imunomodulador de acordo com a reivindicação 1 ou 2 em que p é 1.

10. Polinucleótido imunomodulador de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9 em que os nucleósidos são unidos através de ésteres de fosforotioato.

11. Composição imunomoduladora compreendendo um polinucleótido imunomodulador de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9.

12. Polinucleótido imunomodulador de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9 para utilizar em modulação de uma resposta imunitária num indivíduo.

13. Polinucleótido imunomodulador de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9 para utilizar no aumento de interferão-gama (IFN- γ) num indivíduo.

14. Polinucleótido imunomodulador de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9 para utilizar no aumento de interferão-alfa (IFN- α) num indivíduo.

15. Polinucleótido imunomodulador de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9 para utilizar na melhoria de um sintoma de uma doença infecciosa num indivíduo.

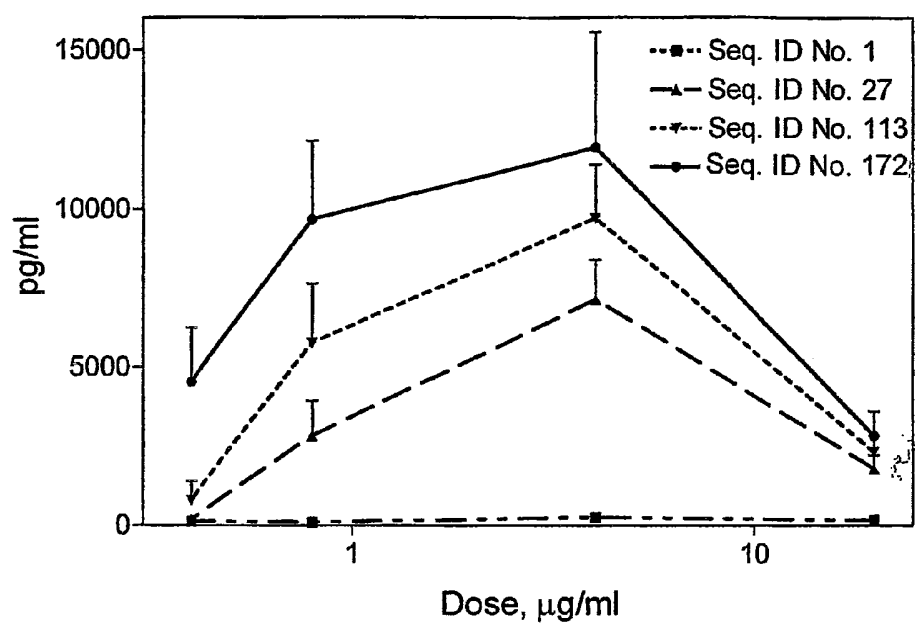
16. Polinucleótido imunomodulador de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9 para utilizar na melhoria de um sintoma de um distúrbio relacionado com IgE num indivíduo.

17. Utilização de um polinucleótido imunomodulador de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 to 9 para o fabrico de um medicamento para tratamento de asma.

18. Polinucleótido imunomodulador de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9 para utilizar em tratamento de asma.

RESUMO**"Oligonucleótidos de sequência imunoestimuladora e métodos de utilização dos mesmos"**

O presente invento proporciona polinucleótidos imunomoduladores e métodos para imunomodulação de indivíduos utilizando os polinucleótidos imunomoduladores.

Produção de IFN- α 

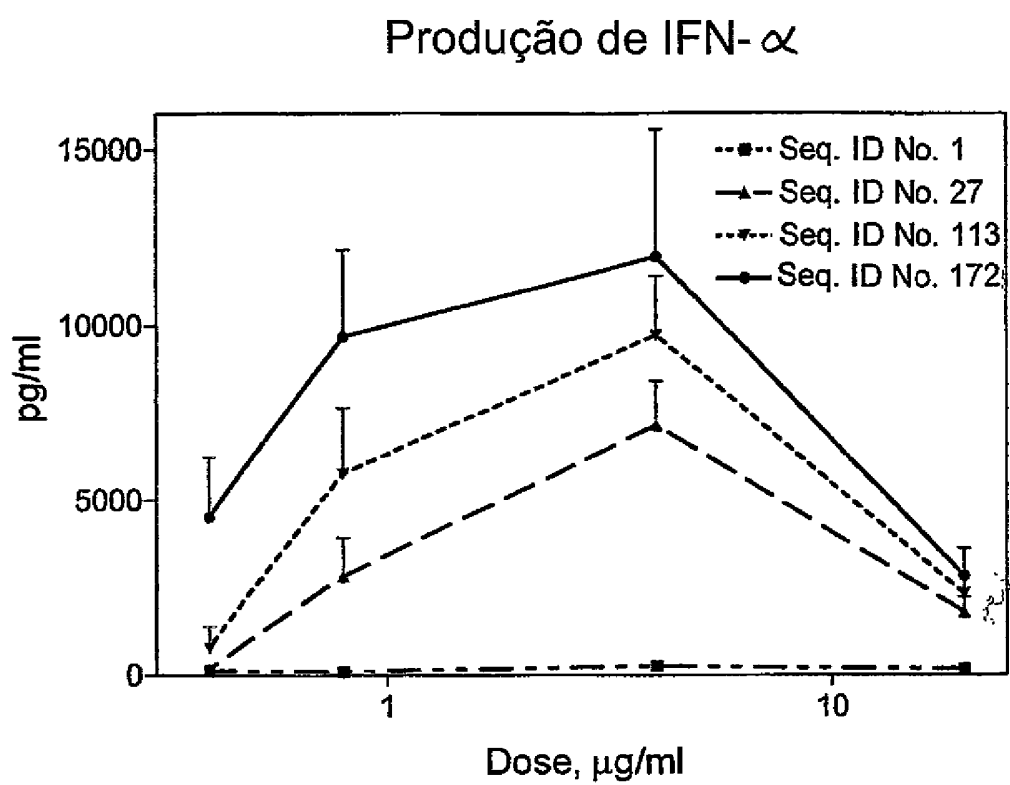


Fig. 1

Fig. 2

