



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

(11) PI 0923341-5 B1

(22) Data do Depósito: 01/12/2009

(45) Data de Concessão: 06/04/2021



* B R P I 0 9 2 3 3 4 1 B 1 *

(54) Título: OLIGONUCLEOTÍDEO IMUNOESTIMULADOR, VACINA COMPREENDENDO O MESMO E SEU USO

(51) Int.Cl.: A61K 39/00; A61K 39/29.

(30) Prioridade Unionista: 09/12/2008 US 61/121.022; 28/05/2009 US 61/181.799.

(73) Titular(es): COLEY PHARMACEUTICAL GROUP, INC..

(72) Inventor(es): HEATHER LYNN DAVIS; RISINI DHAMMIKA WEERATNA.

(86) Pedido PCT: PCT IB2009055444 de 01/12/2009

(87) Publicação PCT: WO 2010/067262 de 17/06/2010

(85) Data do Início da Fase Nacional: 07/06/2011

(57) Resumo: OLIGONUCLEOTÍDEO IMUNOESTIMULADOR, VACINA COMPREENDENDO O MESMO E SEU USO. A invenção refere-se a oligonucleotídeos imunoestimuladores e métodos de usar oligonucleotídeos imunoestimuladores para induzir uma resposta imune específica ao antígeno. A invenção também se refere a uma vacina que compreende um oligonucleotídeo imunoestimulador e um antígeno, e compreende um veículo farmacologicamente aceitável. Os oligonucleotídeos imunoestimuladores da invenção, em algumas modalidades, incluem uma ou mais ligações modificadas.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
**“OLIGONUCLEOTÍDEO IMUNOESTIMULADOR, VACINA COMPRE-
ENDENDO O MESMO E SEU USO”.**

CAMPO DA INVENÇÃO

[0001] A invenção refere-se a oligonucleotídeos imunoestimuladores e métodos de usar oligonucleotídeos imunoestimuladores para induzir uma resposta imune específica ao antígeno.

ANTECEDENTE DA INVENÇÃO

[0002] DNA bacteriano tem efeitos estimuladores imunes para ativar células B e células exterminadoras naturais, porém, DNA vertebrado não (Tokunaga, T., e outro, 1988. Jpn. J. Cancer Res. 79:682-686; Tokunaga, T., e outro, 1984, JNCI 72:955-962; Messina, J. P., e outro, 1991, J. Immunol. 147:1759-1764; e revisado e, in Krieg, 1998, In: Applied Oligonucleotide Technology, C. A. Stein e A. M. Krieg, (Eds.), John Wiley and Sons, Inc., New York, N.Y., pp. 431-448). É agora entendido que estes efeitos estimuladores imunes de DNA bacteriano são como um resultado da presença de dinucleotídeos de CpG não metilados em particular contextos básicos (motifs de CpG), que são comuns em DNA bacteriano, porém metilado e sub representado em DNA vertebrado (Krieg e outro, 1995 Nature 374:546-549; Krieg, 1999 Biochim. Biophys. Acta 1489:107-116). Os efeitos estimuladores imunes de DNA bacteriano podem ser imitados com oligodesoxinucleotídeos sintéticos (ODN) contendo estes motivos de CpG. Tal CpG ODN têm efeitos altamente estimuladores em leucócitos humanos e de murino, induzindo proliferação de célula B; secreção de citocina e imunoglobulina; a atividade lítica de célula exterminadora natural (NK) e secreção de IFN- γ ; e ativação de células dendríticas (DCs) e outras células de apresentação de antígeno para expressar moléculas co-estimuladoras e segregar citocinas, especialmente as citocinas semelhantes a Th1 que são

importantes promovendo o desenvolvimento de respostas de célula T semelhantes a Th1. Estes efeitos estimuladores imunes de esqueleto de fosfodiéster nativo CpG ODN são altamente específicos de CpG em que os efeitos são dramaticamente reduzidos se o motivo de CpG é metilado, mudado para um GpC, ou de outra maneira eliminado ou alterado (Krieg e outro, 1995 Nature 374:546-549; Hartmann e outro, 1999 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:9305-10).

[0003] Foi previamente informado que a atividade imunoestimuladora de oligonucleotídeos de CpG é dependente do número de motivos de CpG, as sequências flanqueando o dinucleotídeo de CG, o local do(s) motif(s) de CpG e o espaçamento entre os motivos de CpG (Ballas e outro, 1996, J. Immunol. 157(5): 1840-5; Hartmann e outro, 2000, J. Immunol., 164(3): 1617-24; Klinman e outro, 2003, Clin. Exp. Immunol., 133(2): 227-32). Um oligonucleotídeo imunoestimulador tendo o motivo de CpG 3' removido é descrito aqui que surpreendentemente retém sua atividade imunoestimuladora. Uma vacina compreendendo o oligonucleotídeo imunoestimulador e um antígeno, e métodos de usar tal vacina são também descritos.

BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0004] Em aspectos da invenção, um oligonucleotídeo imunoestimulador compreendendo a sequência de nucleotídeo 5' TCGTCGTTTTTCGGTGCTTTT 3' (SEQ ID NO:1) é fornecido. Em algumas modalidades, o oligonucleotídeo imunoestimulador compreende uma ou mais ligações modificadas. Em certas modalidades, o oligonucleotídeo imunoestimulador compreende uma ou mais ligações de fosforotioato. Em certas modalidades, todas as ligações de internucleotídeo do oligonucleotídeo são ligações de fosforotioato. Em algumas modalidades, compreende o oligonucleotídeo imunoestimulador compreende pelo menos um

análogo de nucleotídeo substituído lipofílico e um dinucleotídeo de pirimidina-purina.

[0005] Em aspectos da invenção, uma vacina compreendendo um antígeno e um oligonucleotídeo imunoestimulador compreendendo a sequência de nucleotídeo SEQ ID NO:1, também compreendendo um veículo farmacêuticamente aceitável é fornecida. Em algumas modalidades, o oligonucleotídeo imunoestimulador está em uma quantidade eficaz para induzir uma resposta imune específica ao antígeno. Em outras modalidades, a resposta imune específica ao antígeno induzida é uma resposta imune Th1. Em algumas modalidades, o antígeno é um antígeno microbiano, um autoantígeno ou uma substância aditiva. Em outras modalidades, o antígeno bacteriano está associado com *Staphylococcus aureus*, ou o antígeno bacteriano está associado com uma bactéria que causa cárie dentária. Em outras modalidades, a bactéria é *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sanguis*, *Lactobacillus acidophilus*, ou *Actinomyces viscosus*. Em outras modalidades, o antígeno bacteriano está associado com uma bactéria que causa doença periodontal. Em outras modalidades, a bactéria é *Porphyromonas gingivalis* ou *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Em algumas modalidades, o antígeno viral está associado com vírus Sincicial Respiratório (VSR), vírus do herpes simples 1, vírus do herpes simples 2, Vírus da Imunodeficiência Humana-1 (HIV-1) ou HIV-2. Em outras modalidades, o antígeno parasitário está associado com um parasita que causa malária. Em algumas modalidades, o autoantígeno é um antígeno tumoral, um antígeno associado com Doença de Alzheimer, um antígeno contra um anticorpo humano, ou um antígeno que é expresso a partir de elementos retrovirais endógenos humanos. Em outras modalidades, o antígeno tumoral é HER2, MAGE, NY-ESO, PSA, CEA ou uma forma variante de EGFR.

Em outras modalidades, em que o antígeno está associado com Doença de Alzheimer, o antígeno é tau ou β -amiloide. Em algumas modalidades, o antígeno é IgE. Em algumas modalidades, o antígeno é um hapteno de nicotina conjugado em um veículo. Em outras modalidades, o veículo ao qual o hapteno de nicotina é conjugado é toxina de difteria (DT). Em outras modalidades, o antígeno é um peptídeo, uma proteína recombinante, uma proteína purificada, patógenos mortos, vírus atenuado vivo ou vetor viral, bactérias atenuadas vivas ou um vetor bacteriano, um polissacarídeo, um hapteno, ou codificado por DNA de plasmídeo.

[0006] Em algumas modalidades, o antígeno é conjugado em um veículo. Em outras modalidades, o veículo é toxina de difteria (DT). Em outras modalidades, o veículo é uma partícula semelhante a vírus. Em outras modalidades, a partícula semelhante a vírus é fago de RNA Q- β , antígeno de superfície de hepatite B (HBsAg), ou antígeno de núcleo de hepatite B (HBcAg). Em algumas modalidades, a vacina também compreende um ou mais adjuvantes. Em outras modalidades, o adjuvante é um agonista para um receptor tipo toll (TLR) que não é TLR 9. Em outras modalidades, o agonista é para TLR 3. Em outras modalidades, o agonista de TLR 3 é poli I:C estabilizado. Em algumas modalidades, o agonista é para TLR 4. Em outras modalidades, o agonista de TLR 4 é um derivado de lipopolissacarídeo (LPS). Em ainda outras modalidades, o derivado de LPS é MPL ou GLA. Em outras modalidades, o agonista é para TLR 5. Em outras modalidades, o agonista de TLR 5 é flagelina. Em algumas modalidades, o agonista é para TLR 7 ou 8. Em outras modalidades, o agonista de TLR 7 ou 8 é uma molécula pequena da família imidazoquinolina. Em outras modalidades, o adjuvante é um sal de alumínio. Em outras modalidades, o sal de alumínio é hidróxido de alumínio. Em algumas modalidades, o adjuvante é um complexo imunoestimulante (ISCOM).

Em outras modalidades, o adjuvante é uma emulsão de óleo-em-água ou água-em-óleo. Em algumas modalidades, o adjuvante é um lipossoma. Em outras modalidades, o adjuvante é um sistema de liberação. Em outras modalidades, o sistema de liberação é uma nanopartícula ou uma micropartícula.

[0007] Em algumas modalidades, o oligonucleotídeo imunoestimulador compreende uma ou mais ligações modificadas. Em outras modalidades, o oligonucleotídeo imunoestimulador compreende uma ou mais ligações de fosforotioato. Em certas modalidades, todas as ligações de internucleotídeo do oligonucleotídeo são ligações de fosforotioato. Em outras modalidades, o oligonucleotídeo imunoestimulador compreende pelo menos um análogo de nucleotídeo substituído lipofílico e um dinucleotídeo de pirimidina-purina. Em algumas modalidades, a vacina é formulada para administração. Em outras modalidades, a vacina é formulada para administração por meio de uma via de parenteral, em que a via parental é intramuscular, subcutânea, intradérmica, intravenosa ou intraperitoneal. Em ainda outras modalidades, a vacina é formulada para administração por meio de uma via tópica, em que a via tópica é a pele, transdérmica ou uma superfície mucosal. Em outras modalidades, a via mucosal é oral, intranasal, intravaginal, intrarretal, intrabucal ou intraocular.

[0008] Em alguns aspectos da invenção, um método de induzir uma resposta imune específica ao antígeno em um indivíduo em necessidade do mesmo compreende administrar a um indivíduo um antígeno e um oligonucleotídeo imunoestimulador compreendendo sequência de nucleotídeo SEQ ID NO:1 em uma quantidade eficaz para induzir uma resposta imune específica ao antígeno no referido indivíduo. Em algumas modalidades, o antígeno é um antígeno microbiano, um autoantígeno ou uma substância viciante. Em outras modalidades, o antígeno microbiano é um antígeno bacteriano, um

antígeno viral ou um antígeno parasitário. Em outras modalidades, o antígeno bacteriano está associado com *Staphylococcus aureus*, ou o antígeno bacteriano está associado com uma bactéria que causa cárie dentária. Em outras modalidades, a bactéria é *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sanguis*, *Lactobacillus acidophilus*, ou *Actinomyces viscosus*. Em outras modalidades, o antígeno bacteriano está associado com uma bactéria que causa doença periodontal. Em outras modalidades, a bactéria é *Porphyromonas gingivalis* ou *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Em algumas modalidades, o antígeno viral está associado com vírus Sincicial Respiratório (VSR), vírus do herpes simples 1, vírus do herpes simples 2, Vírus da Imunodeficiência Humana-1 (HIV-1) ou HIV-2. Em outras modalidades, o antígeno parasitário está associado com um parasita que causa malária. Em algumas modalidades, o autoantígeno é um antígeno tumoral, um antígeno associado com Doença de Alzheimer, um antígeno contra um anticorpo humano, ou um antígeno que é expresso a partir de elementos retrovirais endógenos humanos. Em outras modalidades, o antígeno tumoral é HER2, MAGE, NY-ESO, PSA, CEA ou uma forma variante de EGFR. Em outras modalidades, em que o antígeno está associado com Doença de Alzheimer, o antígeno é tau ou β -amiloide. Em algumas modalidades, o antígeno é IgE. Em algumas modalidades, o antígeno é um hapteno de nicotina conjugado a um veículo. Em outras modalidades, o veículo ao qual o hapteno de nicotina é conjugado é toxina de difteria (DT). Em outras modalidades, o antígeno é um peptídeo, uma proteína recombinante, uma proteína purificada, patógenos mortos, vírus atenuado vivo ou vetor viral, bactérias atenuadas vivas ou um vetor bacteriano, um polissacarídeo, um hapteno, ou codificado por DNA de plasmídeo.

[0009] Em algumas modalidades, o antígeno é conjugado a um

veículo. Em outras modalidades, o veículo é toxina de difteria (DT). Em outras modalidades, veículo é uma partícula semelhante a vírus. Em outras modalidades, a partícula semelhante a vírus é fago de RNA Q- β , antígeno de superfície de hepatite B (HBsAg), ou antígeno de núcleo de hepatite B (HBcAg). Em algumas modalidades, a vacina também compreende um ou mais adjuvantes. Em outras modalidades, o adjuvante é um agonista para um receptor tipo toll (TLR) que não é TLR 9. Em outras modalidades, o agonista é para TLR 3. Em outras modalidades, o agonista de TLR 3 é poli I:C estabilizado. Em algumas modalidades, o agonista é para TLR 4. Em outras modalidades, o agonista de TLR 4 é um derivado de lipopolissacarídeo (LPS). Em ainda outras modalidades, o derivado de LPS é MPL ou GLA. Em outras modalidades, o agonista é para TLR 5. Em outras modalidades, o agonista de TLR 5 é flagelina. Em algumas modalidades, o agonista é para TLR 7 ou 8. Em outras modalidades, o agonista de TLR 7 ou 8 é uma molécula pequena da família imidazoquinolina. Em outras modalidades, o adjuvante é um sal de alumínio. Em outras modalidades, o sal de alumínio é hidróxido de alumínio. Em algumas modalidades, o adjuvante é um complexo imunoestimulante (ISCOM). Em outras modalidades, o adjuvante é uma emulsão de óleo-em-água ou água-em-óleo. Em algumas modalidades, o adjuvante é um lipossoma. Em outras modalidades, o adjuvante é um sistema de liberação. Em outras modalidades, o sistema de liberação é uma nanopartícula ou uma micropartícula.

[00010] Em algumas modalidades, o oligonucleotídeo imunoestimulador compreende uma ou mais ligações modificadas. Em outras modalidades, o oligonucleotídeo imunoestimulador compreende uma ou mais ligações de fosforotioato. Em certas modalidades, todas as ligações de internucleotídeo do oligonucleotídeo são ligações de fosforotioato. Em outras modalidades, o oligonucleotídeo imunoestimulador compreende

pelo menos um análogo de nucleotídeo substituído lipofílico e um dinucleotídeo de pirimidina-purina. Em algumas modalidades, o antígeno e/ou oligonucleotídeo imunoestimulador é formulado para administração. Em outras modalidades, o antígeno e/ou oligonucleotídeo imunoestimulador são/é formulado(s) para administração por meio de uma via parenteral, em que a via parental é intramuscular, subcutânea, intradérmica, intravenosa ou intraperitoneal. Em ainda outras modalidades, o antígeno e/ou oligonucleotídeo imunoestimulador são/é formulado(s) para administração por meio de uma via tópica, em que a via tópica é a pele, transdérmica ou uma superfície mucosal. Em outras modalidades, a via mucosal é oral, intranasal, intravaginal, intrarretal, intrabucal ou intraocular. Em algumas modalidades, o antígeno e oligonucleotídeo imunoestimulador são administrados pelas mesmas, vias similares ou diferentes. Em outras modalidades, o antígeno e oligonucleotídeo imunoestimulador são administrados juntamente, simultaneamente ou separadamente. Em outras modalidades, o antígeno e oligonucleotídeo imunoestimulador são administrados dentro de 24 horas um ao outro. Em algumas modalidades, o indivíduo é uma espécie tratada por medicina veterinária. Em outras modalidades, o indivíduo é um indivíduo não roedor. Em algumas modalidades, o indivíduo é um humano.

DESCRIÇÃO DE FIGURAS

[00011] Figura 1: Aumento de respostas imunes humorais em camundongos. Camundongos adultos (6-8 semanas; n=10/gp) foram imunizados com 1 µg de HBsAg (painel esquerdo) ou 20 µg de OVA (painel direito) sem adjuvante ou em combinação com CPG 24555, 10103 ou 7909 (10 µg) ou ODN de controle de não CpG 2137 (10 µg; apenas com OVA. Plasma de 2 semanas (para HBsAg) ou 1 semana (para OVA) após último reforço foi analisado quanto a níveis de IgG, IgG1 e IgG2a/c totais específicos de antígeno (anti-HBs ou anti-OVA).

Cada bar representa os títulos da média geométrica ($\pm$ SEM) para IgG total. Títulos foram definidos como a diluição mais alta resultando em um valor de absorvência duas vezes aquele de plasma não imune com um valor de corte de 0,05. Os números sobre cada barra representam a relação de IgG2a(ou 2c)/IgG1 específica de antígeno.

[00012] Figura 2: Natureza da resposta imune humoral induzida em camundongos. Camundongos adultos (6-8 semanas; n=10/gp) foram imunizados com 1 μ g de HBsAg (painel esquerdo) ou 20 μ g de OVA (painel direito) sem adjuvante ou em combinação com CPG 24555, 10103 ou 7909 (10 μ g) ou ODN de controle de não CpG 2137 (10 μ g; apenas com OVA). Plasma de 2 semanas (para HBsAg) ou 1 semana (para OVA) após último reforço foi avaliado quanto a níveis de IgG1 (barras claras) e IgG2a ou IgG2c (barras pretas) contra HBsAg (Anti-HBs) ou OVA (anti-OVA). Cada barra representa a média geométrica ($\pm$ SEM) do título de diluição de ponto final de ELISA para o grupo total (n=10). Títulos foram definidos como a diluição mais alta resultando em um valor de absorvência duas vezes aquele de plasma não imune com um valor de corte de 0,05.

[00013] Figura 3: respostas de linfócito T citotóxicas induzidas em camundongos. Camundongos adultos (6-8 semanas; n=5/gp) foram imunizados com 1 μ g de HBsAg (painel esquerdo) ou 20 μ g de OVA (painel direito) sem adjuvante ou em combinação com CPG 24555, 10103 ou 7909 (10 μ g) ou ODN de controle de não CpG 2137 (10 μ g; apenas com OVA). Esplenócitos de 2 semanas (para HBsAg) ou 1 semana (para OVA) após último reforço foram avaliados quanto a respostas de CTL específicas de antígeno usando ensaio de liberação de ^{51}Cr padrão.

[00014] Figura 4: Nenhum aumento mediado por CpG em respostas de CTL em camundongos deficientes de TLR9. Camundongos adultos deficientes de TLR9 (6-8 semanas; n=5 gp) foram imunizados com 20

µg de OVA sem adjuvante ou em combinação com CPG 24555, 10103 ou 7909 (10 µg) ou ODN de controle de não CpG 2137 (10 µg). Esplenócitos de 1 semana após último reforço foram avaliados quanto a respostas de CTL específicas de OVA usando ensaio de liberação de 51Cr padrão.

[00015] Figura 5: células CD8 T específicas de OVA em tipo selvagem vs. camundongos deficientes de TLR9. Camundongos Tipo selvagem e deficientes de TLR9 (6-8 semanas; n=5/gp) foram imunizados com 20 µg de OVA sem adjuvante ou em combinação com CPG 24555, 10103 ou 7909 (10 µg) ou ODN de controle de não CpG 2137 (10 µg). Esplenócitos de 1 semana após último reforço foram avaliados quanto às células CD8 T específicas de OVA usando Tetrâmeros MHC Classe I H-2Kb -SIINFEKL.

[00016] Figura 6: Secreção de IFN-g específica de antígeno em camundongos. Camundongos adultos (6-8 semanas; n=5/gp) foram imunizados com 1 µg de HBsAg (painel esquerdo) ou 20 µg de OVA (painel direito) sem adjuvante ou em combinação com CPG 24555, 10103 ou 7909 (10 µg) ou ODN de controle de não CpG 2137 (10 µg; apenas com OVA). Esplenócitos de 2 semanas (para HBsAg) ou 1 semana (para OVA) após último reforço foram estimulados com o antígeno relevante como mostrado nas figuras durante 72 horas e sobrenadantes de cultura analisados para IFN-γ por ELISA.

[00017] Figura 7: Nenhum aumento mediado por CpG em secreção de IFN-g específica de antígeno em camundongos deficientes de TLR9. Camundongos adultos deficientes de TLR9 (6-8 semanas; n=5/gp) foram imunizados com 20 µg de OVA sem adjuvante ou em combinação com CPG 24555, 10103 ou 7909 (10 µg) ou ODN de controle de não CpG 2137 (10 µg). Esplenócitos 1 semana após último reforço foram estimulados com OVA em concentrações de 0, 0,5 e 1 mg/ml durante 72 horas e sobrenadantes de cultura analisados quanto

a IFN- γ por ELISA.

[00018] Figura 8: Populações de célula T segregadoras de múltiplas citocinas específicas de antígeno em camundongos. Camundongos adultos (6-8 semanas; n=5/gp) foram imunizados com 1 μ g de HBsAg apenas com antígeno ou em combinação com CPG 24555, 10103 ou 7909 (10 μ g). Esplenócitos de 2 semanas após reforço foram re-estimulados com o antígeno de HBsAg (para CD4) ou peptídeo de HBs Classe I (para CD8) e CD4 (Painel A) e CD8 (Painel B) populações de célula T segregando IFN- γ , TNF- α e/ou IL-2 foram quantificados usando citometria de fluxo.

[00019] Figura 9: Imunidade inata em PBMC Humano. PBMC humano (5×10^6 /ml) foi incubado com concentrações variadas de CPG 10103, CPG 24555 ou ODN de controle de não CpG 22881 durante 24 ou 48 horas. Sobrenadantes de célula foram coletados e analisados quanto à secreção de citocina/quimiocina usando um kit de ELISA comercial. A Figura 9A mostra secreção de IFN- α , MCP-1 e IP-10. A Figura 9B mostra secreção de IL-6, IL-10 e IL-2R.

[00020] Figura 10: Imunidade inata in vivo em camundongos BALB/c. Camundongos BALB/c (n=5/grupo) foram injetados subcutaneamente com PBS (controle de placebo), CPG 24555, CPG 10103 ou ODN de controle de não CpG 2137 em 100 μ g de nível de dose. Animais foram sangrados em 3 horas pós injeção e plasma analisado quanto a IP-10 (Figura 10A) e IL-12 (Figura 10B) ou IL-6 (Figura 10C) usando ELISA comercial.

[00021] Figura 11: Imunidade humoral in vivo em camundongos BALB/c. Camundongos BALB/c foram intramuscularmente imunizados com HBsAg (1 μ g) $\pm$ CPG 24555 ou 10103 (10 μ g), OVA (20 μ g) $\pm$ CPG 24555 ou 10103 (10 μ g), ou com Influenza A HA de Texas 1/77, H3N2 (1 μ g) + alume (25 μ g Al₃⁺), $\pm$ CPG 24555 ou 10103 (10 μ g). Os camundongos foram imunizados em 0 e 14 dias (HBsAg), em 0, 7 e 21

dias (OVA) ou no dia 0 apenas (HA). A Figura 11A mostra para títulos de IgG total específicos de HBsAg em 2 semanas poste reforço medido por ELISA de ponto final. A Figura 11B mostra títulos de IgG total específicos de OVA a 1 semana após reforço. A Figura 11C mostra cinéticas de IgG total específico de HA em vários tempos após imunização medidos por ELISA de ponto final.

[00022] Figura 12: respostas de célula T em camundongos BALB/c. Camundongos BALB/c foram intramuscularmente injetados com HBsAg (1 µg) com ou sem CPG ODN 2455, CPG 10103 ou ODN de controle de não CpG 2137 a 10 µg. Os camundongos foram injetados em 0 e 14 dias. A Figura 12A mostra CTL específico de HBsAg medido por liberação de 51Cr em 2 semanas após reforço. Camundongos de C57bl/6 foram intramuscularmente injetados com OVA (20 µg) com ou sem CPG ODN 2455, CPG 10103 ou ODN de controle de não CpG 2137 a 10 µg. Os camundongos foram injetados em 0, 7 e 21 dias. A Figura 12B mostra CTL específico de OVA medido por liberação de 51Cr em 1 semana após reforço.

[00023] Figura 13: respostas de célula T em camundongos BALB/c. Camundongos BALB/c foram intramuscularmente injetados com HBsAg (1 µg) com ou sem CPG ODN 2455, CPG 10103 ou ODN de controle de não CpG 2137 a 10 µg. Os camundongos foram injetados em 0 e 14 dias. Esplenócitos de 2 semanas após último reforço foram incubados com antígeno respectivo durante 72 horas e sobrenadantes de cultura testados quanto a IFN- γ por ELISA (Figura 13A). Camundongos de C57bl/6 foram intramuscularmente injetados com OVA (20 µg) com ou sem CPG ODN 2455, CPG 10103 ou ODN de controle de não CpG 2137 a 10 µg. Os camundongos foram injetados em 0, 7 e 21 dias. Esplenócitos de 1 semana após último reforço foram incubados com antígeno respectivo durante 72 horas e sobrenadantes de cultura testados quanto a IFN- γ por ELISA (Figura 13B).

[00024] Figura 14: Anti-HA em 6 Semanas Após Imunização. Camundongos BALB/c fêmeas foram imunizados com HA (1 µg) ± CpG ou ODN de controle (10 µg) ± alume (25 µg Al₃⁺) em um volume total de 50 µl. A quantidade de anti-HA foi medida em 6 semanas após imunização.

[00025] Figura 15: Títulos de Inibição de Hemaglutinação (HIA) em 4 Semanas Pós Imunização. A funcionalidade dos anticorpos foi avaliada usando um ensaio de inibição de hemaglutinação (HIA). A capacidade para aumentar títulos de HIA sozinho ou em combinação com alume foi medida.

[00026] Figura 16: Secreção de IFN γ específica de HA. Camundongos BALB/c fêmeas foram imunizados com HA (1 µg) ± CpG ou ODN de controle (10 µg) ± alume (25 µg Al₃⁺) em um volume total de 50 µl. Esplenócitos removidos em 6 semanas após imunização foram usados para avaliar quanto à secreção de IFN γ específica de antígeno.

[00027] Figura 17: Respostas Humorais em primatas não humanos. Macacos Cinomolgos (3-5 anos de idade; n=5 por grupo) foram imunizados com Engerix-B (10 µg HBsAg; 250 µg Al₃⁺) sozinho ou em combinação com 0,5 mg pf CPG 7909 ou CPG 24555 por injeção intramuscular nas semanas 0, 4 e 8. Animais foram sangrados em intervalos de tempo regulares e títulos de anticorpo específico de HBsAg foram medidos usando kits comercialmente disponíveis (MONOLISA™ Anti-HBS).

[00028] Figura 18: Respostas Humorais em não primatas humanos. Macacos Cinomolgos (3-5 anos de idade; n=5 por grupo) foram imunizados com Engerix-B (10 µg HBsAg; 250 µg Al₃) sozinho ou em combinação com 0,5 mg de CPG 7909 ou CPG 24555 por injeção intramuscular nas semanas 0, 4 e 8. Plasma de 4 semanas após 2ª imunização e 2 semanas após 3ª imunização foi avaliado quanto à

avidez de anticorpo usando método de elusão de tiocianato de sódio.

[00029] Figura 19: Respostas de Célula T em primatas não humanos: Macacos Cinomolgos (3-5 anos de idade; n=5 por grupo) foram imunizados com Engerix-B (10 µg HBsAg; 250 µg Al₃) sozinho ou em combinação com 0,5 mg de CPG 7909 ou CPG 24555 por injeção intramuscular nas semanas 0, 4 e 8, células mononucleares de sangue periférico (PBMC) em pré-vacinação e em pontos de tempo pós vacinação foram testadas quanto à secreção de citocina intracelular mediada por célula CD4 T específica de HBsAg por citometria de fluxo. A Figura 19A mostra secreção de IFN-γ. A Figura 19B mostra secreção de IL-2. A Figura 19C mostra secreção de TNF-α.

[00030] Figura 20: Respostas de Célula T: Células CD4 T Poli Funcionais; Análise Quantitativa. Macacos Cinomolgos (3-5 anos de idade; n=5 por grupo) foram imunizados com Engerix-B (10 µg HBsAg; 250 µg Al₃) sozinho ou em combinação com 0,5 mg de CPG 7909 ou CPG 24555 por injeção intramuscular nas semanas 0, 4 e 8, células mononucleares de sangue periférico (PBMC) nas 2 semanas após 3ª imunização foram testadas quanto às células CD4 T específicas de HBsAg segregando uma, duas ou três citocinas por citometria de fluxo. A Figura 20 A mostra o número de várias células CD4 T específicas de HBsAg segregando uma, duas ou três citocinas por um milhão de células CD4 T analisadas. A Figura 20B mostra a proporção de citocina simples, dupla e tripla produzindo células T dentro da população de célula CD4 T específica de HBsAg.

[00031] Figura 21: Respostas de Célula T: Células CD4 T poli-funcionais; Análise Qualitativa. O número de células segregando IL-2, IFN-γ e TNFα, ou combinações destas citocinas, foi medido. Macacos cinomolgos (3-5 anos de idade; n=5 por grupo) foram imunizados com Engerix-B (10 µg HBsAg; 250 µg Al₃) sozinho ou em combinação com 0,5 mg de CPG 7909 ou CPG 24555 por injeção intramuscular nas

semanas 0, 4 e 8, Células mononucleares de sangue periférico (PBMC) em 2 semanas após 3a imunização foram testadas quanto ao número de células CD4 T específicas de HBsAg segregando IL-2, IFN- γ e TNF α ou combinações destas citocinas por citometria de fluxo.

DESCRIÇÃO DE SEQUÊNCIA

[00032] SEQ ID NO:1 - Sequência de nucleotídeo de oligonucleotídeo imunoestimulador ODN CPG 24555.

[00033] SEQ ID NO:2 - Sequência de nucleotídeo de oligonucleotídeo imunoestimulador CPG 10103.

[00034] SEQ ID NO:3 - Sequência de nucleotídeo de oligonucleotídeo imunoestimulador CPG 7909.

[00035] SEQ ID NO:4 - Sequência de nucleotídeo de oligonucleotídeo não CpG 22881.

[00036] SEQ ID NO:5 - Sequência de nucleotídeo de oligonucleotídeo não CpG 2137.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[00037] Aspectos da invenção são baseados, em parte, na detecção surpreendente que a remoção de um motivo de CpG de um oligonucleotídeo imunoestimulador não teve um impacto negativo na capacidade do oligonucleotídeo imunoestimulador aumentar respostas imunes específicas de antígenos. Foi da mesma forma surpreendentemente constatado que a remoção do referido motivo de CpG permite a geração de uma população de células T específicas de antígeno que é diferente. Em particular foi constatado que a referida população de células T específicas de antígeno compreende mais células T segregadoras de IFN-gama e mais células T polifuncionais.

[00038] Em aspectos da invenção, o oligonucleotídeo imunoestimulador tem a sequência de ácido nucleico 5' TCGTCGTTTTTCGGTGCTTTT 3' (ODN CPG 24555; SEQ ID NO:1). A sequência de ácido nucleico de oligonucleotídeo imunoestimulador de

SEQ ID NO:1 difere-se de um oligonucleotídeo imunoestimulador previamente relatado (ODN 10103) 5' TCGTCGTTTTTCGGTCGTTTT 3' (SEQ ID NO:2) pela reversão do 3' mais dinucleotídeo de CG. As semelhanças em atividade entre os dois oligonucleotídeos imunoestimuladores são surpreendentes porque foi previamente relatado que atividade imunoestimuladora de oligonucleotídeos de CpG é dependente no número de motivos de CpG, as sequências flanqueando o dinucleotídeo de CG, o local do(s) motivo(s) de CpG e o espaçamento entre os motivos de CpG (Ballas e outro, 1996, J. Immunol. 157(5): 1840-5; Hartmann e outro, 2000, J. Immunol., 164(3): 1617-24; Klinman e outro, 2003, Clin. Exp. Immunol., 133(2): 227-32). A remoção do 3' mais dinucleotídeo de CG em oligonucleotídeo imunoestimulador CPG ODN 24555 (SEQ ID NO:1) não resulta em um impacto negativo na capacidade deste oligonucleotídeo imunoestimulador aumentar respostas imunes específicas de antígenos como foi esperado a partir de descrições prévias. CPG ODN 24555 demonstrou atividade imunoestimuladora realçada similar e, em alguns casos, quando comparado com CPG ODN 10103.

[00039] Além disso, foi constatado que CPG ODN 24555 induz uma população diferente de células T específicas de antígeno quando comparado a CPG ODN 10103 (veja figura 8, tabela 1 e tabela 2). Em particular, foi surpreendentemente constatado que a população de células T específicas de antígeno (em particular a população de célula CD4⁺ T específica de antígeno) gerada usando CPG ODN 24555 como adjuvante compreende mais células T segregadoras de IFN-gama e mais células T polifuncionais quando comparado à população de células T específicas de antígeno geradas usando CPG ODN 10103 ou CPG ODN 7909.

[00040] Por exemplo, uma proporção mais alta de células CD4⁺ T específicas de antígeno produzindo IFN- γ foi obtida quando

comparadas à população de células CD4⁺ T específicas de antígeno obtidas com CpG ODN 10103. Da mesma forma, uma proporção mais alta de células CD4⁺ T específicas de antígeno polifuncionais produzindo igualmente a IFN- γ e TNF- α , igualmente IFN- γ e IL-2 ou igualmente TNF- α e IL-2, ou ainda triplamente produtoras segregando IFN- γ , TNF- α e IL-2 foi obtida quando comparada à população de células CD4⁺ T específicas de antígeno obtidas com CPG ODN 10103 ou CPG ODN 7909. Da mesma forma uma proporção mais alta de células CD8⁺ T específicas de antígeno que produzem TNF- α foi obtida quando comparado a população de células CD8⁺ T específicas de antígeno obtida com CPG ODN 10103. Uma proporção mais alta de células CD8⁺ T específicas de antígeno produzindo igualmente IFN- γ e IL-2, igualmente TNF- α e IL-2, ou ainda triplamente produtoras segregando IFN- γ , TNF- α e IL-2 foi da mesma forma obtida quando comparada à população de células CD8⁺ T específicas de antígeno obtidas com CPG ODN 10103 ou CPG ODN 7909.

[00041] A importância da polifuncionalidade de células T em imunogenicidade foi realçada recentemente. Em particular, polifuncionalidade de células T específicas de antígeno em termos de produção de quimiocina (tal como IFN- γ , TNF- α e IL-2) foi correlatada em alguns exemplos ao seu potencial protetor (veja, por exemplo, Harari A, e outro, *Immunol Rev.* 2006;211:236-54, Makedonas G e Betts MR. *Springer Semin Immunopathol.* 2006;28(3):209-19, Precopio ML e outro, *J Exp Med.* 2007 204(6):1405-16, Xu R e outro *Vaccine.* 2008; 26(37):4819-29) acreditado ser devido à sua melhor função efetora comparado a células T que segregam porém uma única citocina.

[00042] CPG ODN 24555 vantajosamente permite gerar populações de células T específicas de antígenos polifuncionais quando usado como um adjuvante que pode ser de importância em um ajuste de vacina.

[00043] Os ácidos nucleicos imunoestimuladores podem ser de filamento duplo ou de filamento único. Geralmente, moléculas de filamento duplo são mais estáveis in vivo, enquanto moléculas de filamento único aumentaram atividade imune. Em alguns aspectos da invenção é preferido que o ácido nucleico seja de filamento único e em outros aspectos é preferido que o ácido nucleico seja de filamento duplo.

[00044] Os termos “ácido nucleico” e “oligonucleotídeo” são usados alternadamente aqui para significar nucleotídeos múltiplos (isto é, moléculas compreendendo um açúcar (por exemplo, ribose ou desoxirribose) ligados a um grupo fosfato e a uma base orgânica trocável, que é uma pirimidina substituída (por exemplo, citosina (C), timidina (T) ou uracila (U)) ou uma purina substituída (por exemplo, adenina (A) ou guanina (G)). Quando aqui usado, os termos referem-se a oligodesoxiribonucleotídeos, oligoribonucleotídeos (isto é, um polinucleotídeo menos o fosfato) e qualquer outra base orgânica contendo polímero. Moléculas de ácido nucleico podem ser obtidas a partir de fontes de ácido nucleico existentes (por exemplo, genômicas ou cDNA), porém são preferivelmente sintéticas (por exemplo, produzidas por síntese de ácido nucleico).

[00045] Em aspectos da invenção, os oligonucleotídeos imunoestimuladores podem abranger várias modificações químicas e substituições, em comparação ao DNA e RNA natural, envolvendo uma ponte de internucleosídeo de fosfodiéster, uma unidade β -D-ribose e/ou uma base de nucleosídeo natural (adenina, guanina, citosina, timina, uracila). Exemplos de modificações químicas são conhecidos à pessoa versada e são descritos, por exemplo, em Uhlmann E. e outro (1990), Chem. Rev. 90:543; “Protocols for Oligonucleotides and Analogs” Synthesis and Properties & Synthesis and Analytical Techniques, S. Agrawal, Ed., Humana Press, Totowa,

USA 1993; Crooke, S.T. e outro (1996) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 36:107-129; and Hunziker J. e outro, (1995), *Mod. Synth. Methods* 7:331-417. Um oligonucleotídeo de acordo com a invenção pode ter uma ou mais modificações, em que cada modificação está localizada em uma ponte de internucleosídeo de fosfodiéster particular e/ou em uma unidade de β -D-ribose e/ou em uma posição de base de nucleosídeo natural particular em comparação a um oligonucleotídeo da mesma sequência que é composta de DNA natural ou RNA.

[00046] Em aspectos da invenção, os oligonucleotídeos podem compreender uma ou mais modificações. Tais modificações podem ser selecionadas a partir de: a) a substituição de uma ponte de internucleosídeo de fosfodiéster localizada na extremidade 3' e/ou 5' de um nucleosídeo por uma ponte de internucleosídeo modificada, b) a substituição de ponte de fosfodiéster localizada na extremidade 3' e/ou 5' de um nucleosídeo por uma ponte de defosfo, c) a substituição de uma unidade de fosfato de açúcar do esqueleto de fosfato de açúcar por outra unidade, d) a substituição de uma unidade de β -D-ribose por uma unidade de açúcar modificada, e e) a substituição de uma base de nucleosídeo natural.

[00047] Ácidos nucleicos da mesma forma incluem purinas substituídas e pirimidinas, tais como C-5 propina pirimidina e bases modificadas por purina 7-deaza-7-substituída (Wagner e outro, 1996, *Nat. Biotechnol.* 14:840-4). Purinas e pirimidinas incluem, porém não são limitadas a, adenina, citosina, guanina, timidina, 5-metilcitosina, 2-aminopurina, 2-amino-6-cloropurina, 2,6-diaminoputina, hipoxantina, e outras nucleobases de ocorrência natural e não natural, porções aromáticas substituídas e não substituídas. Outras tais modificações são bem conhecidas àqueles de experiência na técnica.

[00048] Uma base modificada é qualquer base que é quimicamente distinto das bases de ocorrência natural tipicamente encontrada em

DNA e RNA, tal como T, C, G, A, e U, porém que compartilham estruturas químicas básicas com estas bases de ocorrência natural. A base de nucleosídeo modificada pode, por exemplo, ser selecionada a partir de hipoxantina, diidrouacil pseudouracila, 2-tiouracila, 4-tiouracila, 5-aminouracila, 5-(C1-C6)-alquiluracila, 5-(C2-C6)-alqueniluracila, 5-(C2-C6)-alquilniluracila, 5-(hidroximetil)uracila, 5-clorouracila, 5-fluorouracila, 5-bromouracila, 5-hidroxicitosina, 5-(C1-C6)-alquilocitosina, 5-(C2-C6)-alquenilocitosina, 5-(C2-C6)-alquilnilocitosina, 5-clorocitosina, 5-fluorocitosina, 5-bromocitosina, N2-dimetilguanina, 2,4-dimaino-purina, 8-azapurina, uma 7-deazapurina substituída, preferivelmente 7-deaza-7-substituída e/ou purina 7-deaza-8-substituída, 5-hidroximetilocitosina, N4-alquilocitosina (por exemplo, N4-etilocitosina), 5-hidroxidesoxicitidina, 5-hidroximetildesoxicitidina, N4-alquildesoxicitidina (por exemplo, N4-etildesoxicitidina), 6-tiodesoxiguanosina, desoxiribonucleosídeos de nitropirrol, C5-propinilpirimisina, diaminopurina (por exemplo, 2,6-diaminopurina), inosina, 5-metilcitosina, 2-aminopurina, 2-amino-6-cloropurina, hipoxantina ou outras modificações de uma base de nucleosídeo natural. Esta lista é pretendida ser exemplar e não será interpretada para ser limitante.

[00049] Em alguns aspectos da invenção, o dinucleotídeo de CpG dos oligonucleotídeos imunoestimuladores descritos aqui são preferivelmente não metilados. Um motivo de CpG não metilado é uma sequência de dinucleotídeo de citosina-guanina (isto é, uma citosina 5' não metilada seguida por guanosina 3' e ligada por uma ligação de fosfato). Em outros aspectos, os motivos de CpG são metilados. Um motivo de CpG metilado é uma sequência de dinucleotídeo de citosina-guanina metilada (isto é, um citosina 5' metilada seguido por uma guanosina 3' e ligada por uma ligação de fosfato).

[00050] Em alguns aspectos da invenção, um oligonucleotídeo

imunoestimulador pode conter uma citosina modificada. Uma citosina modificada é um análogo de base de pirimidina de ocorrência natural ou de ocorrência não natural de citosina que pode substituir esta base sem prejudicar a atividade imunoestimuladora do oligonucleotídeo. Citosinas modificadas incluem, porém, não são limitadas às citosinas 5-substituídas (por exemplo, 5-metilcitosina, 5-fluorocitosina, 5-clorocitosina, 5-bromocitosina, 5-iodocitosina, 5-hidroxicitosina, 5-hidroximetilcitosina, 5-difluorometilcitosina, e 5-alquilcitosina não substituída ou substituída), citosinas 6-substituídas, citosinas N4-substituídas (por exemplo, N4-etilcitosina), 5-azacitosina, 2-mercaptocitosina, isocitosina, pseudo-isocitosina, análogos de citosina com sistemas de anel condensados (por exemplo, citosina de N,N'-propileno ou fenoxazina). Algumas das citosinas preferidas incluem 5-metilcitosina, 5-fluorocitosina, 5-hidroxicitosina, 5-hidroximetilcitosina, e N4-etilcitosina. Em outra modalidade da invenção, a base de citosina é substituída por uma base universal (por exemplo, 3-nitropirrol, P-base), um sistema de anel aromático (por exemplo, fluorobenzeno ou difluorobenzeno) ou um átomo de hidrogênio (dSpacer). Em alguns aspectos, um oligonucleotídeo imunoestimulador pode conter uracila e/ou seus derivados (por exemplo, 5-fluoro-uracila, 5-bromo-uracila, 5-bromovinil-uracila, 4-tio-uracila, 5-hidroxi-uracila, 5-propinil-uracila).

[00051] Em alguns aspectos da invenção, um oligonucleotídeo imunoestimulador pode conter uma guanina modificada. Uma guanina modificada é um análogo de base de guanina de ocorrência natural ou de ocorrência não natural que pode substituir esta base sem prejudicar a atividade imunoestimuladora do oligonucleotídeo. Guaninas modificadas incluem, porém não são limitadas a 7-deazaguanina, guanina 7-deaza-7-substituída, hipoxantina, guaninas N2-substituídas (por exemplo, N2-metil-guanina), 5-amino-3-metil-3H,6H-tiazolo[4,5-d]pirimidina-2,7-diona, 2,6-diaminopurina, 2-aminopurina, purina, indol,

adenina, adeninas substituídas (por exemplo, N6-metil-adenina, 8-oxo-adenina), guanina 8-substituída (por exemplo, 8-hidroxiguanina ou 8-bromoguanina), e 6-tioguanina. Em outra modalidade da invenção, a base de guanina é substituída por uma base universal (por exemplo, 4-metil-indol, 5-nitro-indol, ou base K), um sistema de anel aromático (por exemplo, benzimidazol ou dicloro-benzimidazol, amida de ácido 1-metil-1H-[1,2,4]triazol-3-carboxílico) ou um átomo de hidrogênio (dSpacer).

[00052] Em certos aspectos, os oligonucleotídeos podem incluir ligações de internucleotídeo modificadas. Estas ligações modificadas podem ser parcialmente resistentes a degradação (por exemplo, são estabilizadas). Uma “molécula de ácido nucleico estabilizada” significará uma molécula de ácido nucleico que é relativamente resistente a degradação in vivo (por exemplo, por uma exo ou endonuclease). Estabilização pode ser uma função de comprimento ou estrutura secundária. Ácidos nucleicos que são dez a centenas de kilobases contanto que sejam relativamente resistentes a degradação in vivo. Para ácidos nucleico mais curtos, estrutura secundária pode estabilizar e aumentar seu efeito. A formação de uma estrutura de alça de tronco pode estabilizar uma molécula de ácido nucleico. Por exemplo, se a extremidade 3' de um ácido nucleico tem alta complementaridade a uma região a montante de forma que pode dobrar outra vez e pode formar uma estrutura de alça de tronco, em seguida o ácido nucleico pode se tornar estabilizado e exibir mais atividade.

[00053] Estabilização de ácido nucleico pode, da mesma forma, ser realizada por meio de modificações de esqueleto de fosfato. Oligonucleotídeos tendo ligações de fosforotioato, em algumas modalidades, podem fornecer atividade máxima e proteger o oligonucleotídeo de degradação por exo e endonucleases intracelulares.

[00054] Para uso in vivo, ácidos nucleicos são preferivelmente relativamente resistentes a degradação (por exemplo, por meio de endo e exonucleases). Foi demonstrado que modificação do esqueleto de ácido nucleico fornece atividade aumentada de ácidos nucleicos quando administrada in vivo. Estruturas secundárias, tais como alças de tronco, podem estabilizar ácidos nucleicos contra degradação. Alternativamente, estabilização de ácido nucleico pode ser realizada por meio de modificações de esqueleto de fosfato. Um ácido nucleico estabilizado preferido tem pelo menos um esqueleto modificado por fosforotioato parcial. Fosforotioatos podem ser sintetizados usando técnicas automatizadas empregando químicas de fosforamidato ou H-fosfonato. Aril e alquil-fosfonatos podem ser feitos, por exemplo, como descrito em Pat U.S. No. 4.469.863; e alquilfosfotriésteres (em que a porção de oxigênio carregado é alquilada como descrito em Pat U.S. No. 5.023.243 e Patente Européia No. 092.574) podem ser preparados por síntese de fase sólida automatizada usando reagentes comercialmente disponíveis. Métodos para preparar outras modificações de esqueleto de DNA e substituições foram descritos (Uhlmann, E. e Peyman, A. (1990) Chem. Rev. 90:544; Goodchild, J. (1990) Bioconjugate Chem. 1:165). Ácidos nucleicos de 2'-O-metila com motivos de CpG da mesma forma causam ativação imune, como faz ácidos nucleicos de CpG modificados por etóxi. De fato, nenhuma modificação de esqueleto foi constatada que completamente abole o efeito de CpG, embora seja muito reduzido substituindo-se o C com um C de 5-metila. Construtores tendo ligações de fosforotioato fornecem atividade máxima e protege o ácido nucleico de degradação por exo e endo nucleases intracelular. Outros ácidos nucleicos modificados incluem ácidos nucleicos modificados por fosfodiéster, combinações de fosfodiéster e ácido nucleico de fosforotioato, metilfosfonato, metilfosforotioato, fosfororditioato, p-etóxi, e

combinações dos mesmos. Cada uma destas combinações e seus efeitos particulares em células imunes é discutida em mais detalhes com respeito a ácidos nucleicos de CpG em Pedidos de Patente Publicados PCT PCT/US95/01570 (WO 96/02555) e PCT/US97/19791 (WO 98/18810) e em Patente US no. 6.194.388 B1 emitida em 27 de fevereiro de 2001 e Patente US No. 6.239.116 B1 emitida no dia 29 de maio de 2001. Acredita-se que estes ácidos nucleicos modificados podem mostrar mais atividades estimuladoras devido a resistência de nuclease realçada, captação celular aumentada, ligação de proteína aumentada, e/ou localização intracelular alterada.

[00055] Para administração in vivo, ácidos nucleicos podem estar associados com uma molécula que resulta em uma afinidade de ligação mais alta a uma célula alvo (por exemplo, célula B, célula monocítica ou célula exterminadora natural (NK)) superfícies e/ou captação celular aumentada por células alvo para formar um “complexo de liberação de ácido nucleico”. Ácidos nucleicos podem ser ionicamente ou covalentemente associados com moléculas apropriadas usando técnicas que são bem conhecidas na técnica. Uma variedade de agentes de acoplamento ou de reticulação podem ser usados tal como, proteína A, carbodiimida, ou propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditio) (SPDP). Ácidos nucleicos podem alternativamente ser encapsulados em lipossomas ou virossomas usando técnicas bem conhecidas.

[00056] Outros ácidos nucleicos estabilizados incluem, porém não são limitados a, análogos de DNA não iônicos, tais como alquil e aril fosfatos (em que o oxigênio de fosfonato carregado é substituído por um grupo alquila ou arila), fosfodiéster e alquilfosfotriésteres em que a porção de oxigênio carregada é alquilada. Ácidos nucleicos que contêm um diol, tal como tetraetilenoglicol ou hexaetilenoglicol, em qualquer um ou ambos terminais foram da mesma forma mostrados

ser substancialmente resistentes à degradação de nuclease. Em algumas modalidades, um oligonucleotídeo imunoestimulador da invenção pode incluir pelo menos um análogo de nucleotídeo substituído lipofílico e/ou um dinucleotídeo de pirimidina-purina.

[00057] Os oligonucleotídeos podem ter uma ou duas extremidades 5' acessíveis. É possível criar oligonucleotídeos modificados tendo duas tais extremidades 5', por exemplo, ligando-se dois oligonucleotídeos através de uma ligação 3'-3' para gerar um oligonucleotídeo tendo uma ou duas extremidades 5' acessíveis. A ligação 3'-3' pode ser um fosfodiéster, fosforotioato ou qualquer outra ponte de internucleosídeo modificada. Métodos por realizar tais ligações são conhecidos na técnica. Por exemplo, tais ligações foram descritas em Seliger, H. e outro, Oligonucleotide analogs with terminal 3'-3'- and 5'-5'-internucleotidic linkages as antisense inhibitors of viral gene expression, *Nucleosides & Nucleotides* (1991), 10(1-3), 469-77 and Jiang, e outro, Pseudo-cyclic oligonucleotides: in vitro and in vivo properties, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (1999), 7(12), 2727-2735.

[00058] Adicionalmente, oligonucleotídeos ligados a 3'3' onde a ligação entre os nucleosídeos de terminal 3' não é um fosfodiéster, fosforotioato ou outra ponte modificada, podem ser preparados usando um espaçador adicional, tal como porção de fosfato de tri ou tetra etilenoglicol (Durand, M. e outro, Triple-helix formation by an oligonucleotide containing one (dA)₁₂ and two (dT)₁₂ sequences bridged by two hexaethylene glycol chains, *Biochemistry* (1992), 31(38), 9197-204, Patente US No. 5,658,738, and Patente US No. 5,668,265). Alternativamente, o ligante não nucleotídico pode ser derivado de etanodiol, propanodiol, ou de uma unidade de desoxirribose abásica (dSpacer) (Fontanel, Marie Laurence e outro, Sterical Recognition by T4 polynucleotide kinase of non-nucleosidic moieties 5'-attached to oligonucleotides; *Nucleic Acids Research* (1994), 22(11), 2022-7)

usando química de fosforamidita padrão. Os ligantes não nucleotídicos podem ser incorporados uma vez ou múltiplas vezes, ou combinados entre si permitindo qualquer distância desejável entre as extremidades 3' dos dois oligonucleotídeos a ser ligado.

[00059] Uma ponte de internucleosídeo de fosfodiéster localizada na extremidade 3' e/ou 5' de um nucleosídeo pode ser substituída por um ponte de internucleosídeo modificada, em que a ponte de internucleosídeo modificada é, por exemplo, selecionada de fosforotioato, fosforoditioato, NR₁R₂-fosforamidato, boranofosfato, fosfonato de α -hidroxibenzila, éster de fosfato-(C1-C21)-O-alquila, fosfato-[(C6-C12)aril-(C1-C21)-O-alquil]éster, (C1-C8)alquifosfonato e/ou pontes de (C6-C12)arilfosfonato, (C7-C12)- α -hidroximetil-arila (por exemplo, como descrito em WO 95/01363), em que (C6-C12)arila, (C6-C20)arila e (C6-C14)arila são opcionalmente substituídos por halogênio, alquil, alcóxi, nitro, ciano, e onde R₁ e R₂ são, independentemente um do outro, hidrogênio, (C1-C18)-alquila, (C6-C20)-arila, (C6-C14)-arila, (C1-C8)-alquila, preferivelmente hidrogênio, (C1-C8)-alquila, preferivelmente (C1-C4)-alquila e/ou metoxietila, ou R₁ e R₂ formam, juntamente com o átomo de nitrogênio que os transporta, um anel heterocíclico de 5 ou 6 membros que pode adicionalmente conter outro heteroátomo do grupo O, S e N.

[00060] A substituição de uma ponte de fosfodiéster localizada na extremidade 3' e/ou 5' de um nucleosídeo por uma ponte de defosfo (pontes de defosfo são descritas, por exemplo, em Uhlmann E. and Peyman A. in "Methods in Molecular Biology", Vol. 20, "Protocols for Oligonucleotides and Analogs", S. Agrawal, Ed., Humana Press, Totowa 1993, Chapter 16, pp. 355 ff), em que uma ponte de defosfo é selecionada, por exemplo, das pontes de defosfo formacetal, 3'-tioformacetal, metilidroxilamina, oxima, metilenodimetil-hidrazo, dimetilenossulfona e/ou grupos sílica.

[00061] Os oligonucleotídeos imunoestimuladores da invenção podem opcionalmente ter cadeias principais quiméricas. Um esqueleto quimérico é aquele que compreende mais do que um tipo de ligação. Em uma modalidade, a esqueleto quimérica pode ser representada pela fórmula: 5' Y1N1ZN2Y2 3'. Y1 e Y2 são moléculas de ácido nucleico tendo entre 1 e 10 nucleotídeos. Y1 e Y2 cada qual inclui pelo menos uma ligação de internucleotídeo modificada. Visto que pelo menos 2 nucleotídeos dos oligonucleotídeos quiméricos incluem modificações de esqueleto estes ácidos nucleicos são um exemplo de um tipo de ácido nucleico imunoestimulador estabilizado.

[00062] Com respeito aos oligonucleotídeos quiméricos, Y1 e Y2 são considerados independentes um do outro. Isto significa que cada um dentre Y1 e Y2 pode ou pode não ter sequência diferentes e ligações de esqueleto diferentes uma das outras na mesma molécula. Em algumas modalidades, Y1 e/ou Y2 têm entre 3 e 8 nucleotídeos. N1 e N2 são moléculas de ácido nucleico tendo entre 0 e 5 nucleotídeos contanto que N1ZN2 tenha pelo menos 6 nucleotídeos em total. Os nucleotídeos de N1ZN2 têm um esqueleto de fosfodiéster e não incluem ácidos nucleicos tendo um esqueleto modificado. Z é um motivo de ácido nucleico imunoestimulador, preferivelmente selecionado a partir do oligonucleotídeo imunoestimulador recitado aqui.

[00063] Os nucleotídeos do centro (N1ZN2) da fórmula Y1N1ZN2Y2 têm ligações de internucleotídeo de fosfodiéster e Y1 e Y2 tem pelo menos um, porém pode ter mais do que um ainda pode ter todas as ligações de internucleotídeo modificadas. Em modalidades preferidas, Y1 e/ou Y2 têm pelo menos duas ou entre duas e cinco ligações de internucleotídeo modificadas ou Y1 tem cinco ligações de internucleotídeo modificadas e Y2 tem duas ligações de internucleotídeo modificadas. A ligação de internucleotídeo modificada, em algumas modalidades, é uma ligação modificada por fosforotioato, uma ligação de

fosforoditioato ou uma ligação modificada por p-etóxi.

[00064] Os ácidos nucleicos da mesma forma incluem ácidos nucleicos tendo açúcares de esqueleto que são covalentemente ligados a grupos orgânicos de peso molecular baixo diferentes de um grupo hidroxila na posição 2' e diferente de um grupo fosfato na posição 5'. Desse modo, ácidos nucleicos modificados podem incluir um grupo ribose 2'-O-alquilado. Além disso, ácidos nucleicos modificados podem incluir açúcares tais como arabinose ou 2'-fluoroarabinose em vez de ribose. Desse modo, os ácidos nucleicos podem ser heterogêneos em composição de esqueleto desse modo contendo qualquer combinação possível de unidades de polímero ligadas juntas tal como peptídeo - ácidos nucleicos (que têm um esqueleto de aminoácido com bases de ácido nucleico). Em algumas modalidades, os ácidos nucleicos são homogêneos em composição de esqueleto.

[00065] Uma unidade de fosfato de açúcar (isto é, um β -D-ribose e ponte de internucleosídeo de fosfodiéster juntos formando uma unidade de fosfato de açúcar) do esqueleto de fosfato de açúcar (isto é, um esqueleto de fosfato de açúcar é composta de unidades de fosfato de açúcar) pode ser substituída por outra unidade, em que a outra unidade é, por exemplo, adequada para formar um oligômero "derivado de morfolino" (como descrito, por exemplo, em Stirchak E. P. e outro (1989) *Nucleic Acid Res.* 17:6129-41), isto é, por exemplo, a substituição por um derivado de morfolino; ou para formar um ácido nucleico de poliamida ("PNA"; como descrito, por exemplo, em Nielsen P. E. e outro (1994) *Bioconjug. Chem.* 5:3-7), isto é, por exemplo, a substituição por uma unidade de esqueleto de PNA, por exemplo, por 2-aminoetilglicina. O oligonucleotídeo pode ter outras modificações de esqueleto de carboidrato e substituições, tais como ácidos nucleicos de peptídeo com grupos fosfato (PHONA), ácidos nucleicos fechados

(LNA), e oligonucleotídeos tendo seções de esqueleto com ligantes de alquila ou ligantes de amino. O ligante de alquila pode ser ramificado ou não ramificado, substituído ou não substituído, e quiralmente puro ou uma mistura racêmica.

[00066] Uma unidade de β -ribose ou uma unidade de β -D-2'-desoxirribose pode ser substituída por uma unidade de açúcar modificada, em que a unidade de açúcar modificada é por exemplo selecionada a partir de β -D-ribose, α -D-2'-desoxirribose, L-2'-desoxirribose, 2'-F-2'-desoxirribose, 2'-F-arabinose, 2'-O-(C1-C6)alquil-ribose, preferivelmente 2'-O-(C1-C6) alquil-ribose é 2'-O-metilribose, 2'-O-(C1-C6)alquenil-ribose, 2'-[O-(C1-C6)alquil-O-(C1-C6)alquil]-ribose, 2'-NH₂-2'-desoxirribose, β -D-xilo-furanose, α -arabinofuranose, 2,4-didesóxi- β -D-eritro-hexo-piranoose, um carbocíclico (descrito, por exemplo, em Froehler J. (1992) Am. Chem. Soc. 114:8320) e/ou análogos de açúcar de cadeia aberta (descritos, por exemplo, em Vandendriessche e outro (1993) Tetrahedron 49:7223) e/ou análogos de bicicloaúcar (descritos, por exemplo, em Tarkoy M. e outro (1993) Helv. Chim. Acta. 76:481).

[00067] Em algumas modalidades, o açúcar é 2'-O-metilribose, particularmente para um ou ambos os nucleotídeos ligados por uma ligação de internucleosídeo de fosfodiéster ou semelhante a fosfodiéster.

[00068] Os oligonucleotídeos da invenção podem ser sintetizados novamente usando quaisquer de vários procedimentos conhecidos na técnica. Por exemplo, o método de fosforamidita de b-cianoetila (Beaucage, S. L., and Caruthers, M. H., (1981) Tet. Let. 22:1859); método de H-fosfonato de nucleosídeo (Garegg e outro, (1986) Tet. Let. 27:4051-4054; Froehler e outro, (1986) Nucl. Acid Res.14:5399-5407; Garegg e outro, (1986) 27:4055-4058; Gaffney e outro, (1988) Tet. Let. 29:2619-2622). Estas químicas podem ser realizadas por uma variedade de sintetizadores de ácido nucleico automatizados

disponível no mercado. Estes oligonucleotídeos são chamados oligonucleotídeos sintéticos. Alternativamente, dinucleotídeos de T-rich e/ou TG podem ser produzidos em uma escala grande em plasmídeos, (veja Sambrook T. e outro, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor laboratory Press, New York, 1989) e separados em pedaços menores ou administrados como plasmídeos totais. Ácidos nucleicos podem ser preparados a partir das sequências de ácido nucleico existentes (por exemplo, genômico ou cDNA) usando técnicas conhecidas, tal como aquelas empregando enzimas de restrição, exonucleases ou endonucleases.

[00069] Em uma modalidade da invenção, todas as ligações de internucleotídeo do oligonucleotídeo imunoestimulador são ligações de fosforotioato.

[00070] Cadeias principais modificadas tais como fosforotioatos podem ser sintetizadas usando técnicas automatizadas empregando químicas de fosforamidato ou H-fosfonato. Aril e alquil fosfonatos, podem ser feitos, por exemplo, como descrito em Patente US No. 4.469.863, e alquifosfotriésteres (em qual a porção de oxigênio carregada é alquilada como descrito em Patente US No. 5.023.243) podem ser preparados por síntese de fase sólida automatizada usando reagentes comercialmente disponíveis. Métodos para preparar outras modificações de esqueleto de DNA e substituições (por exemplo, Uhlmann, E. e Peyman, A., Chem. Rev. 90:544, 1990; Goodchild, J., Bioconjugate Chem. 1:165, 1990).

[00071] Ácidos nucleicos preparados desta maneira são chamados ácido nucleico isolado. Um "ácido nucleico isolado" geralmente refere-se a um ácido nucleico que é separado de componentes com os quais é separado de uma célula, de um núcleo, de mitocôndrias ou de cromatina e quaisquer outros componentes que podem ser considerados como contaminantes.

[00072] Em uma modalidade, o oligonucleotídeo imunoestimulador da invenção consiste em

[00073] 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T*C*G*G*T*G*C*T*T*T*T 3' em que * indica ligação de fosforotioato.

[00074] Em uma modalidade, o oligonucleotídeo imunoestimulador da invenção induz uma proporção alta de células CD4+ T específicas de antígeno segregando IFN- γ . Em uma modalidade, o oligonucleotídeo imunoestimulador da invenção é capaz de induzir pelo menos 40%, preferivelmente pelo menos 45%, ainda preferivelmente pelo menos 50%, ainda preferivelmente cerca de 53% de células CD4+ T específicas de antígeno segregando IFN- γ , na população de célula CD4+ T específica de antígeno segregando IFN- γ , TNF- α e/ou IL-2. Em uma modalidade, a referida proporção de células CD4+ T específicas de antígeno segregando IFN- γ é determinada por citometria de fluxo policromática. Um exemplo de tal determinação é descrito no exemplo 1 do presente documento (veja parágrafo 'Populações de célula T segregadoras de múltiplas citocinas específicas de antígeno').

[00075] Em uma modalidade, o oligonucleotídeo imunoestimulador da invenção pode induzir pelo menos 10%, preferivelmente pelo menos 15%, ainda preferivelmente pelo menos 20%, ainda preferivelmente cerca de 22% de células CD4+ T específica de antígenos segregando igualmente IFN- γ e TNF- α , na população de célula CD4+ T específica de antígeno segregando IFN- α , TNF- α e/ou IL-2. Em uma modalidade, a referida proporção de células CD4+ T específicas de antígeno polifuncionais segregando igualmente IFN- γ e TNF- α é determinada por citometria de fluxo policromática. Um exemplo de tal determinação é descrito no exemplo 1 do presente documento (veja parágrafo 'Populações de célula T segregadoras de múltiplas citocinas específicas de antígeno').

[00076] Em uma modalidade, o oligonucleotídeo imunoestimulador da invenção pode induzir pelo menos 30%, preferivelmente pelo menos 40%, ainda preferivelmente pelo menos 45%, ainda preferivelmente cerca de 47% de células CD8⁺ T específicas de antígeno segregando igualmente IFN- γ e TNF- α , na população de célula CD8⁺ T específica de antígeno segregando IFN- γ , TNF- α e/ou IL-2. Em uma modalidade, a referida proporção de células CD8⁺ T específicas de antígeno polifuncionais segregando igualmente IFN- γ e TNF- α é determinada por citometria de fluxo policromática. Um exemplo de tal determinação é descrito no exemplo 1 do presente documento (veja parágrafo 'Populações de célula T segregadoras de múltiplas citocinas específicas de antígeno').

[00077] Os ácidos nucleicos da invenção podem ser usados como terapias isoladas. Uma terapia isolada é uma terapia em que um resultado profilaticamente ou terapeuticamente benéfico pode ser obtido a partir da administração de único agente ou composição. Desta maneira, os ácidos nucleicos descritos aqui podem ser usados sozinhos na prevenção ou tratamento de doença infecciosa porque os ácidos nucleicos são capazes de induzir respostas imunes que são benéficas ao resultado terapêutico destas doenças. Alguns dos métodos referidos aqui relatam uso dos ácidos nucleicos em combinação com outros agentes terapêuticos.

[00078] Os ácidos nucleicos da invenção podem ser usados em uma vacina. Quando usado em uma vacina, o ácido nucleico pode ser administrado com um antígeno. Preferivelmente o antígeno é específico para o distúrbio pretendido ser prevenido ou tratado. Por exemplo, se o distúrbio for uma doença infecciosa, o antígeno é preferivelmente derivado do organismo infeccioso (por exemplo, bactéria, vírus, parasita, fungo, etc.), se o distúrbio envolve um autoantígeno (por exemplo, um tumor, distúrbio neurodegenerativo tal

como Doença de Alzheimer, um antígeno contra um anticorpo humano, ou um antígeno que é expresso a partir de elementos retrovirais endógenos humanos), o antígeno é preferivelmente derivado a partir do distúrbio particular associado com o antígeno. Se o distúrbio envolve uma substância viciante, o antígeno é preferivelmente derivado da substância aditiva particular associada com o antígeno (por exemplo, um hapteno de nicotina).

[00079] Quando aqui usado, os termos “distúrbio” e “doença” são usados alternadamente.

[00080] Em uma modalidade, a invenção pertence ao oligonucleotídeo imunoestimulador da invenção para uso como um adjuvante em uma vacina, para o tratamento ou prevenção de uma doença, em que a referida vacina compreende pelo menos um antígeno e em que a referida doença beneficia-se da geração de células T específicas de antígeno polifuncionais.

[00081] Foi constatado que CPG ODN 24555 induz uma proporção mais alta de células CD4⁺ T específicas de antígeno produzindo IFN- γ quando comparado a população de células CD4⁺ T específicas de antígeno obtidas com CPG ODN 10103. Da mesma forma uma proporção mais alta de células CD4⁺ T específicas de antígeno polifuncionais produzindo igualmente IFN- γ e TNF- α , igualmente IFN- γ e IL-2, igualmente TNF- α e IL-2, ou ainda produtores triplos de IFN- γ , TNF- α e IL-2 foi obtido quando comparado à população de células CD4⁺ T específicas de antígeno obtidas com CPG ODN 10103 ou CPG ODN 7909. Uma proporção mais alta de células CD8⁺ T específicas de antígeno polifuncionais produzindo igualmente IFN- γ e IL-2, igualmente TNF- α e IL-2, ou ainda produtores triplos de IFN- γ TNF- α e IL-2 foi da mesma forma obtido quando comparado à população de células CD8⁺ T específicas de antígeno obtidas com CPG ODN 10103 ou CPG ODN 7909.

[00082] IFN- γ , TNF- α e IL-2 foram envolvidos em uma variedade de doenças. Por exemplo, TNF- α foi envolvido em câncer e IFN- γ foi envolvido em doenças infecciosas, tal como infecções virais. Portanto, em uma modalidade, a invenção pertence ao oligonucleotídeo imunoestimulador da invenção para uso como um adjuvante em uma vacina, para o tratamento ou prevenção de câncer. Em uma modalidade, a invenção pertence ao oligonucleotídeo imunoestimulador da invenção para uso como um adjuvante em uma vacina, para o tratamento ou prevenção de câncer, em que a referida vacina compreende pelo menos um antígeno tumoral, preferivelmente quaisquer dos antígenos de tumor descritos aqui.

[00083] Em uma modalidade, a invenção pertence ao oligonucleotídeo imunoestimulador da invenção para uso como um adjuvante em uma vacina, para o tratamento ou prevenção de uma doença infecciosa. Em uma modalidade, a invenção pertence ao oligonucleotídeo imunoestimulador da invenção para uso como um adjuvante em uma vacina, para o tratamento ou prevenção de uma doença infecciosa, em que a referida vacina compreende pelo menos um antígeno microbiano, preferivelmente quaisquer dos antígenos microbianos descritos aqui.

[00084] Os oligonucleotídeos imunoestimuladores são úteis em alguns aspectos da invenção como uma vacina profilática para a prevenção de uma infecção (isto é, uma doença infecciosa), um distúrbio associado com um alto antígeno, ou um distúrbio associado com uma substância viciante. Preferivelmente, vacinação profilática é usada em indivíduos que não são diagnosticados com a condição a qual a vacina é pretendida, e mais preferivelmente os indivíduos são considerados em risco de desenvolver uma destas condições. Por exemplo, o indivíduo pode ser um que está em risco de desenvolver uma infecção com um organismo infeccioso, ou suscetível a um distúrbio associado com um alto antígeno, ou suscetível a um distúrbio

associado com uma substância viciante.

[00085] Um indivíduo em risco, quando aqui usado, é um indivíduo que tem qualquer risco de exposição a uma infecção causando patógeno, um distúrbio associado com um autoantígeno ou um distúrbio associado com uma substância viciante. Um indivíduo em risco da mesma forma inclui indivíduos que têm uma predisposição a desenvolver tais distúrbios. Algumas predisposições podem ser genéticas (e podem desse modo ser identificadas por análise genética ou por história familiar). Algumas predisposições são ambientais (por exemplo, exposição anterior aos agentes infecciosos, alto antígenos ou substâncias viciadoras). Para um indivíduo em risco de desenvolver uma infecção, um exemplo de tal um indivíduo é um indivíduo vivo ou esperando viajar em uma área onde um tipo particular de agente infeccioso é ou foi encontrado, ou pode ser um indivíduo que por estilo de vida ou procedimentos médicos são expostos a um organismo diretamente ou indiretamente por contato com fluidos corporais que podem conter organismos infecciosos. Indivíduos em risco de desenvolver infecção da mesma forma incluem populações gerais para as quais uma agência médica recomenda vacinação a um organismo infeccioso particular.

[00086] Um indivíduo é um indivíduo tratado por medicina veterinária, um indivíduo roedor ou um não roedor. Indivíduos não roedores incluem, porém não são limitados a, humano ou animal vertebrado, tal como um cachorro, um gato, um cavalo, uma vaca, um porco, uma ovelha, uma cabra, uma galinha, um primata (por exemplo, macaco) e um peixe (espécies de aquicultura, por exemplo, salmão). Indivíduos roedores incluem, porém não são limitados a, ratos e camundongos. Em algumas modalidades, um indivíduo é um humano.

[00087] Os oligonucleotídeos imunoestimuladores podem, da mesma forma, ser determinados a um indivíduo sem um antígeno para

proteção a curto prazo contra infecção. Neste caso, doses repetidas permitirão proteção à longo prazo.

[00088] Um indivíduo tendo uma infecção é um indivíduo que foi exposto a um patógeno infeccioso e tem níveis detectáveis agudos ou crônicos do patógeno no corpo, ou em resíduo corporal. Quando usados terapeuticamente, os oligonucleotídeos imunoestimuladores podem ser usados sozinhos ou em combinação com outro agente terapêutico. Por exemplo, oligonucleotídeos imunoestimuladores podem ser usados terapeuticamente com um antígeno para montar uma resposta imune sistêmica ou mucosal específica de antígeno que é capaz de reduzir o nível de, ou erradicar, o patógeno infeccioso.

[00089] Uma doença infecciosa, quando aqui usada, é uma doença que surge da presença de um microorganismo estranho no corpo. É particularmente importante desenvolver estratégias de vacina eficazes e tratamentos para proteger as superfícies mucosas do corpo que são o sítio primário de entrada patogênica.

[00090] Um distúrbio associado com um autoantígeno é qualquer distúrbio que é causado por um antígeno das próprias células de um indivíduo ou produtos de célula que causa uma resposta imune no referido indivíduo. Por exemplo, em algumas modalidades, um autoantígeno é um antígeno tumoral, um antígeno associado com Doença de Alzheimer, um antígeno contra um anticorpo, ou um antígeno que é expresso a partir de elementos retrovirais endógenos humanos. Um antígeno tumoral pode ser HER2, MAGE, NYESO-1, PSA, CEA ou uma forma variante de EGFR. Um antígeno associado com Doença de Alzheimer pode ser tau ou β -amiloide. Um antígeno contra um anticorpo pode ser um antígeno contra um anticorpo humano, por exemplo, em algumas modalidades o antígeno é IgE.

[00091] Em algumas modalidades, um antígeno tumoral é MAGE A1, MAGE A2, MAGE A3, MAGE A4, MAGE A6, MAGE A10, MAGE

A12, HAGE (CT13), BAGE, BORIS, SSX-2, LAGE-1, CAMEL (estrutura de leitura alt LAGE-1), GAGE 1,2,3, TRAG-3, NY-ESO-1, Melan-A/MART-1, tirosinase, tyrp1 (gp75), tyrp2, gp100/pmel17, PAP, PSA, CEA, Ep-CAM, PSMA, MUC1, MUC2, HER-2, AFP, EphA2, FGF-5, htert, iCE, Livin (ML-IAP), RAGE, RU2, Survivin, Survivin 2B, WT1, antígeno de Thomsen-Friedenreich (TF), 5T4, PSCA, STEAP, TGR, Adipofilina, AIM-2, G250, OGT, TGFaRII, CO-95 (KIAA1416), CO-94 (seb4D), CO-9 (HDAC 5), CO-61 (HIP1R), CO-58 (KN6SL6), CO-45, CO-42 (TRIP4), CO-41 (MBD2), Ren-32 (Lamin C), TNKL (AC-203), CO-26 (MNK 1), SDCCAG3, GA733-2, STn, CA125, EGFRvIII, BCR-abl, Receptor de Folato de Alta Afinidade, Mesotelina, hCG, FAP alfa, Ciclina 1, Topoisomerase, Serpin B5/Maspin, Legumain, CDK4, PRAME, ADAM 17, EDDR1, CDC2, Proteína de Replicação A, CDK2, GM2, Globo H, TF(c), Ley, Tn(c), STn(c), GD2, GD3 ou GD3L.

[00092] Um distúrbio associado com uma substância viciante é qualquer distúrbio que envolve uma substância química ou biológica que causa um indivíduo desenvolver um hábito a uma substância viciante. Por exemplo, em algumas modalidades, uma substância viciante pode ser nicotina ou cocaína. Em algumas modalidades, um antígeno de nicotina pode ser um hapteno de nicotina conjugado a um veículo. Em algumas modalidades, o veículo em que um hapteno de nicotina é conjugado é toxina de difteria.

[00093] Quando aqui usado, o termo “tratar”, “tratado” ou “tratando” quando usado com respeito a uma doença infecciosa refere-se a um tratamento profilático que aumenta a resistência de um indivíduo (um indivíduo em risco de infecção) para infecção com um patógeno, ou em outras palavras, diminui a probabilidade que o indivíduo será infectado com o patógeno bem como um tratamento depois que o indivíduo (um indivíduo que foi infectado) foi infectado para lutar a infecção, por exemplo, reduzir ou eliminar a infecção ou impedir de ficar pior.

[00094] O termo “tratar”, “tratado” ou “tratando” quando usado com respeito a um distúrbio associado com um autoantígeno refere-se a um tratamento profilático que aumenta a resistência de um indivíduo (um indivíduo em risco de um distúrbio associado com um alto antígeno) desenvolver um tal distúrbio ou diminui a probabilidade que o indivíduo desenvolverá o distúrbio associado com um autoantígeno bem como tratamento depois que o indivíduo (um indivíduo em risco de um distúrbio associado com um alto antígeno) desenvolveu um tal distúrbio ou começou a desenvolver sinais ou sintomas de desenvolver tal um distúrbio, reduzir o efeito do distúrbio, por exemplo, reduzir ou eliminar os sinais ou sintomas associados com o distúrbio ou lhes impedir de ficar pior.

[00095] O termo “tratar”, “tratado” ou “tratando” quando usado com respeito a um distúrbio associado com uma substância viciante refere-se a um tratamento profilático que aumenta a resistência de um indivíduo (um indivíduo em risco de um distúrbio associado com uma substância viciante) desenvolver um tal distúrbio ou diminui a probabilidade que o indivíduo desenvolverá o distúrbio associado com uma substância viciante bem como tratamento depois que o indivíduo (um indivíduo em risco de um distúrbio associado com uma substância viciante) desenvolveu um tal distúrbio ou começou a desenvolver sinais ou sintomas de desenvolver um tal distúrbio, reduzir o efeito do distúrbio, por exemplo, reduzir ou eliminar os sinais ou sintomas associados com o distúrbio ou lhes impedir de tornar-se pior.

[00096] O tratamento de um indivíduo ou com um oligonucleotídeo imunoestimulador como descrito aqui, resulta na redução de infecção ou a abolição completa da infecção, redução dos sinais/sintomas associados com um distúrbio associado com um autoantígeno ou a abolição completa no distúrbio, ou redução dos sinais/sintomas associados com um distúrbio associado com uma substância viciante

ou a abolição completa do distúrbio. Um indivíduo pode ser considerado como tratado se tais sintomas relacionados à doença infecciosa, distúrbio associado com um autoantígeno ou distúrbio associado com uma substância viciante são reduzidos, são administrados ou são abolidos como um resultado de tal tratamento. Para uma doença infecciosa, tal tratamento da mesma forma abrange uma redução na quantidade de agente infeccioso presente no indivíduo (por exemplo, tais quantidades podem ser medidas usando ensaios padrões tais como ELISA conhecidos àqueles de experiência ordinária na técnica). Para uma doença associada com alto antígeno, tal tratamento da mesma forma abrange uma redução na quantidade de autoantígeno presente no indivíduo ou uma redução na resposta imune induzida como um resultado do alto antígeno. Para um distúrbio associado com uma substância viciante, tal tratamento da mesma forma abrange uma redução nos sinais/sintomas associados com hábito a uma substância viciante.

[00097] Um “antígeno” quando aqui usado é uma molécula que é capaz de provocar uma resposta imune. Antígenos incluem, porém não são limitados a, células, extratos de célula, proteínas, proteínas recombinantes, proteínas purificadas, polipeptídeos, peptídeos, polissacarídeos, conjugados de polissacarídeo, cópias de peptídeo e não peptídeo de polissacarídeos e outras moléculas codificadas por DNA de plasmídeo, haptenos, moléculas pequenas, lipídios, glicolipídios, carboidratos, patógenos exterminadores totais, vírus e extratos virais, vírus atenuado vivo ou vetor viral, bactérias atenuadas vivas ou um vetor bacteriano e organismos multicelulares tais como parasitas e alergênicos. O termo antígeno amplamente inclui qualquer tipo de molécula que é reconhecida por um sistema imune hospedeiro como sendo estranho. Antígenos incluem, porém não são limitados a, antígenos microbianos, alto antígenos e substâncias viciadoras.

[00098] Em alguns aspectos, um antígeno é conjugado a um veículo. Em algumas modalidades, o veículo é toxina de difteria, ou uma partícula semelhante a vírus. Em algumas modalidades, um partícula semelhante a vírus é compreendida de fago de RNA Q-β, antígeno de superfície de hepatite B (HBsAg), ou antígeno de núcleo de hepatite B (HBcAg).

[00099] Um “antígeno microbiano” quando aqui usado é um antígeno de um microorganismo e inclui, porém não é limitado a, vírus, bactérias, parasitas e fungos. Em algumas modalidades, um antígeno bacteriano é um associado com a bactéria *Staphylococcus aureus*. Em outras modalidades, um antígeno bacteriano é um associado com uma bactéria que causa cárie dentária, por exemplo, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sanguis*, *Lactobacillus acidophilis* ou *Actinomyces viscosus*. Em algumas modalidades, um antígeno bacteriano é um associado com uma bactéria que causa doença periodontal, por exemplo, *Porphyromonas gingivalis* ou *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Em algumas modalidades, um antígeno viral é um associado com Vírus Sincicial Respiratório (VSR), Vírus do herpes simples 1 (HSV1), Vírus do herpes simples 2 (HSV2), ou Vírus da Imunodeficiência Humana-1 (HIV-1) ou HIV-2. Em algumas modalidades, um antígeno parasitário é um associado com um parasita que causa malária.

[000100] Tais antígenos incluem o microorganismo intato bem como isolados naturais e fragmentos ou derivados dos mesmos e da mesma forma compostos sintéticos que são idênticos ou similares a antígenos de microorganismo naturais e induz uma resposta imune específica para aquele microorganismo. Um composto é similar a um antígeno de microorganismo natural se induzir uma resposta imune (humoral e/ou celular) a um antígeno de microorganismo natural. Tais antígenos são usados habitualmente na técnica e são bem conhecidos àqueles de experiência ordinária na técnica.

[000101] Em alguns aspectos da invenção, está o indivíduo “exposto ao” antígeno. Quando aqui usado, o termo “exposto a” refere-se à etapa ativa de contatar o indivíduo com um antígeno ou a exposição passiva do indivíduo ao antígeno in vivo. Métodos para a exposição ativa de um indivíduo a um antígeno são bem conhecidos na técnica. Em geral, um antígeno é administrado diretamente ao indivíduo por quaisquer meios tais como administração intravenosa, intramuscular, oral, transdérmica, mucosal, intranasal, intratraqueal, ou subcutânea. O antígeno pode ser administrado localmente ou sistemicamente. Métodos para administrar o antígeno e o oligonucleotídeo imunoestimulador são descritos em mais detalhes abaixo. Um indivíduo é passivamente exposto a um antígeno se um antígeno se torna disponível a exposição às células imunes no corpo. Um indivíduo pode ser exposto passivamente a um antígeno, por exemplo, por entrada de um patógeno estrangeiro no corpo.

[000102] Os métodos em que um indivíduo é passivamente exposto a um antígeno podem ser particularmente dependente em cronometragem de administração do oligonucleotídeo imunoestimulador. Por exemplo, em um indivíduo em risco de desenvolver uma doença infecciosa, o indivíduo pode ser administrado o oligonucleotídeo imunoestimulador em uma base regular quando o risco for maior. Adicionalmente, o oligonucleotídeo imunoestimulador pode ser administrado a viajantes antes que eles viajassem a terras estrangeiras onde eles estão em risco de exposição a agentes infecciosos. O oligonucleotídeo imunoestimulador pode, da mesma forma, ser administrado a soldados ou civis em risco de exposição a guerra biológica para induzir uma resposta imune sistêmica ou mucosal ao antígeno quando e se o indivíduo é exposto a isto.

[000103] Exemplos de vírus que foram encontrados em humanos incluem, porém não são limitados a: Retroviridae (por exemplo, vírus

da imunodeficiência humana, tal como HIV-1 (da mesma forma chamado HTLV-III, LAV ou HTLV-III/LAV, ou HIV-III; e outros isolados, tais como HIV-LP); Picornaviridae (por exemplo, vírus de pólio, vírus da hepatite A; enterovírus, vírus coxsackie humano, rinovírus, ecovírus); Calciviridae (por exemplo, cepas que causam gastroenterite); Togaviridae (por exemplo, vírus de encefalite equino, vírus da rubéola); Flaviridae (por exemplo, vírus de dengue, vírus de encefalite, vírus de febre amarela); Coronaviridae (por exemplo, coronavírus); Rhabdoviridae (por exemplo, vírus de estomatite vesiculares, vírus de raivas); Filoviridae (por exemplo, vírus ebola); Paramyxoviridae (por exemplo, vírus de parainfluenza, vírus da caxumba, vírus do sarampo, vírus sincicial respiratório); Orthomyxoviridae (por exemplo, vírus influenza); Bungaviridae (por exemplo, Vírus de Hantaan, vírus de bunga, phleboviruses e vírus de Nairo); Arena viridae (vírus da febre hemorrágica); Reoviridae (por exemplo, reovírus, orbivírus e rotavírus); Birnaviridae; Hepadnaviridae (vírus da hepatite B); Parvovirida (parvovírus); Papovaviridae (papiloma vírus, polioma vírus); Adenoviridae (mais adenovírus); Herpesviridae (vírus do herpes simples (HSV) 1 e 2, vírus de zoster de varicela, citomegalovírus (CMV), vírus do herpes); Poxviridae (vírus de varíola, vírus de vacinia, vírus de catapora); e Iridoviridae (por exemplo, Vírus da peste suína africana); e vírus não classificado (por exemplo, os agentes etiológicos de encefalopatias Espongiforme, o agente de hepatite delta (acreditado ser um satélite defeituoso de vírus da hepatite B), os agentes de hepatite não-A, não-B (classe 1=internamente transmitida; classe 2=parenteralmente transmitida (isto é, Hepatite C); Norwalk e vírus relacionados, e astrovírus). Em algumas modalidades, os vírus são Vírus Sincicial Respiratório (VSR), Vírus do herpes simples 1 (HSV1), Vírus do herpes simples 2 (HSV2), Vírus da Imunodeficiência Humana-1 (HIV1) ou HIV2.

[000104] Embora muitos dos antígenos microbianos descritos aqui se referem a distúrbios humanos, a invenção é da mesma forma útil para tratar outros vertebrados não humanos. Vertebrados não humanos são da mesma forma capazes de desenvolver infecções que podem ser prevenidas ou tratadas com os ácidos nucleicos imunoestimuladores descritos aqui. Por exemplo, além do tratamento de doenças humanas infecciosas, os métodos da invenção são úteis para tratar infecções de animais.

[000105] Igualmente bactérias gram negativas e gram positivas servem como antígenos em animais vertebrados. Tais bactérias gram positivas incluem, porém não são limitadas a, espécies de *Pasteurella*, espécies de *Staphylococci*, e espécies de *Streptococcus*. Bactérias gram negativas incluem, porém não são limitadas a, *Escherichia coli*, espécies de *Pseudomonas*, e espécies de *Salmonella*. Exemplos específicos de bactérias infecciosas incluem, porém, não são limitados a, *Helicobacter pylori*, *Borelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacteria* sps., (por exemplo. *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. gordonae*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (Grupo A *Streptococcus*), *Streptococcus agalactiae* (Grupo B *Streptococcus*), *Streptococcus* (grupo *viridans*), *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus* (anaerobic sps.), *Streptococcus pneumoniae*, *Campylobacter* sp. patogênico, *Enterococcus* sp., *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium* sp., *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Bacteroides* sp., *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Leptospira*, *Rickettsia*, e *Actinomyces israelii*. Em algumas modalidades, uma bactéria é uma que causa cárie dentária, por exemplo,

Streptococcus mutans, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sanguis*, *Lactobacillus acidophilus*, ou *Actinomyces viscosus*. Em outras modalidades, uma bactéria é uma que causas doença periodontal, por exemplo *Porphyromonas gingivalis* ou *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.

[000106] Polipeptídeos de patógenos bacterianos incluem, porém não são limitados a uma proteína de membrana exterior regulada por ferro (IROMP), uma proteína de membrana exterior (OMP), e uma proteína A de *Aeromonis salmonicida* que causa furunculose, proteína p57 de *Renibacterium salmoninarum* que causa doença do rim bacteriana (BKD), antígeno associado a superfície principal (msa), uma citotoxina expressa por superfície (mpr), uma hemolisina expressa por superfície (ish), e um antígeno flagelar de Yersiniose; uma proteína extracelular (ECP), um IROMP, e uma proteína estrutural de Pasteurelose; um OMP e uma proteína flagelar de *Vibrosis anguillarum* e *V. ordalii*; uma proteína flagelar, uma proteína de OMP, *aroA*, e *purA* de *Edwardsiella ictaluri* e *E. tarda*; e antígeno de superfície de *Ichthyophthirius*; e uma proteína estrutural e reguladora de *Cytophaga columnari*; e uma proteína estrutural e reguladora de *Rickettsia*.

[000107] Exemplos de fungos incluem *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Chlamydia trachomatis*, *Candida albicans*. Outros organismos infecciosos (isto é, protiste) incluem *Plasmodium* spp. tal como *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium vivax* e *Toxoplasma gondii*. Parasitas de tecidos e/ou originados do sangue incluem *Plasmodium* spp., *Babesia microti*, *Babesia divergens*, *Leishmania tropica*, *Leishmania* spp., *Leishmania braziliensis*, *Leishmania donovani*, *Trypanosoma gambiense* e *Trypanosoma rhodesiense* (doença do sono africana), *Trypanosoma cruzi* (doença de Chagas), e *Toxoplasma gondii*. Em algumas modalidades, um parasita é um associado com malária. Outros

microorganismos medicalmente relevantes foram descritos extensivamente na literatura, por exemplo, veja C. G. A Thomas, Medical Microbiology, Bailliere Tindall, Great Britain 1983.

[000108] Muitas vacinas para o tratamento de vertebrados não humanos são descritas em Bennett, K., Compendium of Veterinary Products, 3rd ed. North American Compendiums, Inc., 1995. Como discutido acima, antígenos incluem micróbios infecciosos tais como vírus, parasitas, bactérias e fungos e fragmentos dos mesmos, derivados de fontes naturais ou sinteticamente. Vírus infecciosos de ambos os vertebrados humanos e não humanos, incluem retrovírus, vírus de RNA e vírus de DNA. Este grupo retrovírus inclui retrovírus simples e retrovírus complexos. Os retrovírus simples incluem os subgrupos de retrovírus tipo B, retrovírus tipo C e retrovírus tipo D. Um exemplo de um retrovírus tipo B é vírus de tumor mamário de camundongo (MMTV). Os retrovírus tipo C incluem subgrupos grupo A tipo C (incluindo vírus do sarcoma de Rous (VSR), vírus da leucemia aviária (ALV), e vírus de mieloblastose aviária (AMV)) e grupo B tipo C (incluindo vírus da leucemia felina (FeLV), vírus da leucemia de macaco gibbon (GALV), vírus da necrose de baço (SNV), vírus da reticuloendoteliose (RV) e vírus de sarcoma símio (SSV)). Os retrovírus tipo D incluem vírus de macaco Mason-Pfizer (MPMV) e retrovírus símio tipo 1 (SRV-1). Os retrovírus complexos incluem os subgrupos de lentivírus, vírus da leucemia de célula T e os vírus espumosos. Lentivírus incluem HIV-1, porém da mesma forma inclui HIV-2, SIV, vírus de Visna, vírus da imunodeficiência felina (FIV), e vírus da anemia infecciosa equina (EIAV). Os vírus da leucemia de célula T incluem HTLV-1, HTLV-II, vírus da leucemia de célula T símio (STLV), e vírus da leucemia bovina (BLV). Os vírus espumosos incluem vírus espumosos humanos (HFV), vírus espumoso símio (SFV) e vírus espumoso bovino (BFV).

[000109] Exemplos de outros vírus de RNA que são antígenos em animais vertebrados incluem, porém não são limitados a, membros da família Reoviridae, incluindo o gênero Orthoreovirus (sorotipos múltiplos de ambos os retrovírus mamíferos e aviários), o gênero Orbivirus (vírus de Bluetongue, vírus de Eugenangee, vírus de Kemerovo, vírus da doença de cavalo africano, e Vírus da febre do Carrapato do Colorado), o gênero Rotavírus (rotavírus humano, vírus da diarreia de cabra de Nebraska, rotavírus símio, rotavírus bovino ou ovino, aviário); a família Picornaviridae, incluindo o gênero Enterovirus (poliovírus, vírus de Coxsackie A e B, vírus órfão humano citopático entérico (ECO), vírus da hepatite A, enterovírus Símio, vírus da encefalomielite de Murino (ME), Poliovirus muris, enterovírus Bovino, enterovírus Porcino, o gênero Cardiovirus (vírus da Encefalomiocardite (EMC), Mengovírus), o gênero Rinovírus (rinovírus Humanos incluindo pelo menos 113 subtipos; outros rinovírus), o gênero Aphthovirus (doença de Pé e Boca (FMDV)); a família Calciviridae, incluindo exantema Vesicular de vírus suíno, vírus do leão marinho de San Miguel, picornavírus Felino e vírus de Norwalk; a família Togaviridae, incluindo o gênero Alphavirus (vírus da encefalite equina do Oeste, vírus da floresta Semliki, vírus de Sindbis, vírus de Chikungunya, vírus de O'Nyong-Nyong, vírus do rio Ross, vírus da encefalite equina venezuelano, vírus da encefalite equina do Oeste), o gênero Flavivirus (vírus da febre amarela conduzido por Mosquito, vírus da Dengue, vírus da encefalite japonês, vírus da encefalite de St., Louis, vírus da encefalite Murray Valley, vírus do Nilo Ocidental, vírus de Kunjin, vírus conduzido por carrapato da Europa Central, vírus conduzido por carrapato Oriental, vírus da floresta de Kyasanur, vírus Louping III, vírus de Powassan, vírus da febre hemorrágica de Omsk), o gênero Rubivirus (vírus da rubéola), o gênero Pestivirus (vírus da doença Mucosal, vírus da cólera de Porco, vírus de doença de Margem); a

família Bunyaviridae, incluindo o gênero Bunivírus (Bunyamwera e vírus relacionados, vírus do grupo encefalites de Califórnia), o gênero Flebovírus (vírus Siciliano da febre de Sandfly, vírus da febre de Rift Valley), o gênero Nairovirus (vírus da febre hemorrágica Crimean-Congo, vírus da doença de ovelha de Nairobi), e o gênero Uukuvirus (Uukuniemi e vírus relacionados); a família Orthomyxoviridae, incluindo o vírus do gênero influenza (vírus influenza tipo A, muitos subtipos humanos); vírus influenza de Suíno, e vírus influenza Aviários e Equinos; gripe tipo B (muitos subtipos humanos), e gripe tipo C (possível gênero separado); a família paramyxoviridae, incluindo o gênero Paramyxovirus (vírus Parainfluenza tipo 1, vírus de Sendai, vírus da Hemadsorção, vírus Parainfluenza tipo 2 a 5, Vírus da Doença de Newcastle, vírus da caxumba), o gênero Morbilivirus (vírus do sarampo, vírus de panencefalite esclerosante subagudo, vírus da sinomose, vírus de Rinderpest), o gênero Pneumovirus (vírus sincicial respiratório (VSR), vírus sincicial respiratório Bovino e vírus da pneumonia); a família Rhabdoviridae, incluindo o gênero Vesiculovírus (VSV), vírus de Chandipura, vírus do Parque Flandres-Hart), o gênero Lissavirus (vírus da Raiva), Rabdovírus de peixe, e dois prováveis Rabdovirus (vírus de Marburg e vírus Ebola); a família Arenaviridae, incluindo vírus da coriomeningie Linfocítica (LCM), complexo de vírus Tacaribe, e vírus de Lassa; a família Coronaviridae, incluindo Vírus da Bronquite Infecciosa (IBV), vírus da Hepatite, vírus coroa entérico Humano, e peritonite infecciosa Felina (coronavírus Felino).

[000110] Vírus do DNA ilustrativo que são antígenos em animais vertebrados incluem, porém não são limitados a, a família Poxviridae, incluindo o gênero Orthopoxvirus (Varíola principal, Variola secundária, Vacina de Varicela de Macaco, Cowpox, Buffalopox, Rabbitpox, Ectromelia), o gênero Leporipoxvirus (Myxoma, Fibroma), o gênero Avipoxvirus (Fowlpox, outros vírus da varicela aviária), o gênero

Capripoxvirus (sheeppox, goatpox), o gênero Suipoxvirus (Swinepox), o gênero Parapoxvirus (vírus da dermatite postular contagiosa, pseudocowpox, vírus da estomatite papular bovina); a família Iridoviridae (vírus da peste suína africana, vírus da perereca 2 e 3, vírus da Linfociste de peixe); a família Herpesviridae, incluindo os alfa-Herpesvírus (Herpes Simples Tipos 1 e 2, Varicela-Zoster, vírus da absorção Equina, vírus do herpes Equino 2 e 3, vírus da pseudo-raiva, vírus da ceratoconjuntivite infecciosa bovina, vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina, vírus da rinotraqueíte felina, vírus da laringotraqueíte infecciosa) os Beta-herpesvírus (citomegalovírus Humano e citomegalovírus de suínos e macacos); os gama-herpesvírus (vírus Epstein-Barr (EBV), vírus da doença de Marek, Herpes saimiri, Herpesvirus ateles, Herpesvirus sylvilagus, vírus do herpes de cobaia, vírus do tumor de Lucke); a família Adenoviridae, incluindo o gênero Mastadenovírus (subgrupos Humanos A,B,C,D,E e não agrupados; adenovírus símio (pelo menos 23 sorotipos), hepatite canina infecciosa, e adenovírus de gado, porcos, ovelha, pererecas e muitas outras espécies, o gênero Aviadenovírus (adenovírus Aviário); e adenovírus não cultiváveis; a família Papoviridae, incluindo o gênero Papilomavirus (papiloma vírus Humano, papiloma vírus bovino, papiloma vírus de coelho Shope, e vários papiloma vírus patogênicos de outras espécies), o gênero Poliomavirus (poliomavírus, agente de vacuolização Símio (SV-40), agente de vacuolização de Coelho (RKV), vírus K, vírus BK, vírus JC, e outros polioma vírus de primata tais como papiloma vírus Linfotrópico); a família Parvoviridae incluindo o gênero vírus Adenoassociado, o gênero Parvovírus (vírus da panleucopenia de Felino, parvovírus bovino, parvovírus canino, Vírus da doença de Aleutian mink, etc). Além disso, vírus de DNA podem incluir vírus que não se ajustam nas famílias anteriores tais como os vírus da doença de Kuru e Creutzfeldt-Jacob e agentes neuropáticos infecciosos crônicos (vírus de CHINA).

[000111] Em uma modalidade, a invenção pertence a um método de induzir uma resposta imune específica ao antígeno compreendendo administrar um antígeno e um oligonucleotídeo imunoestimulador da invenção em que pelo menos 40%, preferivelmente pelo menos 45%, ainda preferivelmente pelo menos 50%, ainda preferivelmente cerca de 53% das células CD4⁺ T específicas de antígeno induziram IFN- γ secreto, na população de célula CD4⁺ T específica de antígeno segregando IFN- γ , TNF- α e/ou IL-2. Em uma modalidade, a referida proporção de células CD4⁺ T específicas de antígeno segregando IFN- γ é determinada por citometria de fluxo policromática. Um exemplo de tal determinação é descrito no exemplo 1 do presente documento (veja parágrafo 'Populações de célula T segregadoras de múltiplas citocinas específicas de antígeno'). Em uma modalidade, o antígeno e oligonucleotídeo imunoestimulador são administrados em uma quantidade eficaz para induzir uma resposta imune específica ao antígeno no referido indivíduo. Em uma modalidade, o antígeno é quaisquer dos antígenos descritos aqui.

[000112] Em uma modalidade, a invenção pertence a um método de induzir uma resposta imune específica ao antígeno compreendendo administrar um antígeno e um oligonucleotídeo imunoestimulador da invenção em que pelo menos 10%, preferivelmente pelo menos 15%, ainda preferivelmente pelo menos 20%, ainda preferivelmente cerca de 22% das células CD4⁺ T específicas de antígeno induzidas são as produtores de citocina dupla, preferencialmente segregando igualmente IFN- γ e TNF- α , na população de célula CD4⁺ T específica de antígeno segregando IFN- γ , TNF- α e/ou IL-2. Em uma modalidade, a referida proporção de células CD4⁺ T específicas de antígeno segregando igualmente IFN- γ e TNF- α é determinada por citometria de fluxo policromática. Um exemplo de tal determinação é descrito no exemplo 1 do presente documento (veja parágrafo 'Populações de

célula T segregadoras de múltiplas citocinas específicas de antígeno'). Em uma modalidade, o antígeno e oligonucleotídeo imunoestimulador são administrados em uma quantidade eficaz para induzir uma resposta imune específica ao antígeno no referido indivíduo. Em uma modalidade, o antígeno é quaisquer dos antígenos descritos aqui.

[000113] Em uma modalidade, a invenção pertence a um método de induzir uma resposta imune específica ao antígeno compreendendo administrar um antígeno e um oligonucleotídeo imunoestimulador da invenção em que pelo menos 30%, preferivelmente pelo menos 40%, ainda preferivelmente pelo menos 45%, ainda preferivelmente cerca de 47% das células CD8⁺ T específicas de antígeno induzidas são os produtores de citocina duplos, preferencialmente segregando igualmente IFN- γ e TNF- α , na população de célula CD8⁺ T específica de antígeno segregando IFN- γ , TNF- α e/ou IL-2. Em uma modalidade, a referida proporção de células CD8⁺ T específicas de antígeno segregando igualmente IFN- α e TNF- α é determinada por citometria de fluxo policromática. Um exemplo de tal determinação é descrito no exemplo 1 do presente documento (veja parágrafo 'Populações de célula T segregadoras de múltiplas citocinas específicas de antígeno'). Em uma modalidade, o antígeno e oligonucleotídeo imunoestimulador são administrados em uma quantidade eficaz para induzir uma resposta imune específica ao antígeno no referido indivíduo. Em uma modalidade, o antígeno é quaisquer dos antígenos descritos aqui.

[000114] Em uma modalidade, a invenção pertence ao oligonucleotídeo imunoestimulador da invenção para uso induzindo uma resposta imune contra um antígeno, em que pelo menos 40%, preferivelmente pelo menos 45%, ainda preferivelmente pelo menos 50%, ainda preferivelmente cerca de 53% das células CD4⁺ T específicas de antígeno induziram IFN- γ secret, na população de célula CD4⁺ T específica de antígeno segregando IFN- γ , TNF- α e/ou

IL-2. Em uma modalidade, a referida proporção de células CD4⁺ T específicas de antígeno segregando IFN- γ é determinada por citometria de fluxo policromática. Um exemplo de tal determinação é descrito no exemplo 1 do presente documento (veja parágrafo 'Populações de célula T segregadoras de múltiplas citocinas específicas de antígeno'). Em uma modalidade, o antígeno é quaisquer dos antígenos descritos aqui.

[000115] Em uma modalidade, a invenção pertence ao oligonucleotídeo imunoestimulador da invenção para uso induzindo uma resposta imune contra um antígeno, em que pelo menos 10%, preferivelmente pelo menos 15%, ainda preferivelmente pelo menos 20%, ainda preferivelmente cerca de 22% das células CD4⁺ T específicas de antígeno induzidas são os produtores de citocina duplos, preferencialmente segregando igualmente IFN- γ e TNF- α , na população de célula CD4⁺ T específica de antígeno segregando IFN- γ , TNF- α e/ou IL-2. Em uma modalidade, a referida proporção de células CD4⁺ T específicas de antígeno segregando igualmente IFN- γ e TNF- α é determinada por citometria de fluxo policromática. Um exemplo de tal determinação é descrito no exemplo 1 do presente documento (veja parágrafo 'Populações de célula T segregadoras de múltiplas citocinas específicas de antígeno'). Em uma modalidade, o antígeno é quaisquer dos antígenos descritos aqui.

[000116] Em uma modalidade, a invenção pertence ao oligonucleotídeo imunoestimulador da invenção para uso induzindo uma resposta imune contra um antígeno, em que pelo menos 30%, preferivelmente pelo menos 40%, ainda preferivelmente pelo menos 45%, ainda preferivelmente cerca de 47% das células CD8⁺ T específicas de antígeno induzidas são os produtores de citocina duplos, preferencialmente segregando igualmente IFN- γ e TNF- α , na população de célula CD8⁺ T específica de antígeno segregando IFN- γ ,

TNF- α e/ou IL-2. Em uma modalidade, a referida proporção de células CD4+ T específicas de antígeno segregando igualmente IFN- γ e TNF- α é determinada por citometria de fluxo policromática. Um exemplo de tal determinação é descrito no exemplo 1 do presente documento (veja parágrafo 'Populações de célula T segregadoras de múltiplas citocinas específicas de antígeno'). Em uma modalidade, o antígeno é quaisquer dos antígenos descritos aqui.

[000117] Em uma modalidade, a invenção pertence ao oligonucleotídeo imunoestimulador da invenção para uso como um adjuvante em uma vacina, em que a referida vacina induz uma resposta imune contra um antígeno e em que pelo menos 40%, preferivelmente pelo menos 45%, ainda preferivelmente pelo menos 50%, ainda preferivelmente cerca de 53% das células CD4+ T específicas de antígeno induziram IFN- γ secreto, na população de célula CD4+ T específica de antígeno segregando IFN- γ , TNF- α e/ou IL-2. Em uma modalidade, a referida proporção de células CD4+ T específicas de antígeno segregando IFN- γ é determinada por citometria de fluxo policromática. Um exemplo de tal determinação é descrito no exemplo 1 do presente documento (veja parágrafo 'Populações de célula T segregadoras de múltiplas citocinas específicas de antígeno'). Em uma modalidade, o antígeno é quaisquer dos antígenos descritos aqui.

[000118] Em uma modalidade, a invenção pertence ao oligonucleotídeo imunoestimulador da invenção para uso como um adjuvante em uma vacina, em que a referida vacina induz uma resposta imune contra um antígeno e em que pelo menos 10%, preferivelmente pelo menos 15%, ainda preferivelmente pelo menos 20%, ainda preferivelmente cerca de 22% das células CD4+ T específicas de antígeno induzidas são os produtores de citocina duplos, preferencialmente segregando igualmente IFN- γ e TNF- α , na

população de célula CD4⁺ T específica de antígeno segregando IFN- γ , TNF- α e/ou IL-2. Em uma modalidade, a referida proporção de células CD4⁺ T específicas de antígeno de produção dupla segregando igualmente IFN- γ e TNF- α é determinada por citometria de fluxo policromática. Um exemplo de tal determinação é descrito no exemplo 1 do presente documento (veja parágrafo 'Populações de célula T segregadoras de múltiplas citocinas específicas de antígeno'). Em uma modalidade, o antígeno é quaisquer dos antígenos descritos aqui.

[000119] Em uma modalidade, a invenção pertence ao oligonucleotídeo imunoestimulador da invenção para uso como um adjuvante em uma vacina, em que a referida vacina induz uma resposta imune contra um antígeno e em que pelo menos 30%, preferivelmente pelo menos 40%, ainda preferivelmente pelo menos 45%, ainda preferivelmente cerca de 47% das células CD8⁺ T específicas de antígeno induzidas são os produtores de citocina duplos, preferencialmente segregando igualmente IFN- γ e TNF- α , na população de célula CD8⁺ T específica de antígeno segregando IFN- γ , TNF- α e/ou IL-2. Em uma modalidade, a referida proporção de células CD8⁺ T específicas de antígeno de produção dupla segregando igualmente IFN- γ e TNF- α é determinada por citometria de fluxo policromática. Um exemplo de tal determinação é descrito no exemplo 1 do presente documento (veja parágrafo 'Populações de célula T segregadoras de múltiplas citocinas específicas de antígeno'). Em uma modalidade, o antígeno é quaisquer dos antígenos descritos aqui.

[000120] Em uma modalidade, a invenção pertence a uma vacina compreendendo um antígeno e um oligonucleotídeo imunoestimulador da invenção para uso induzindo uma resposta imune ao referido antígeno em que pelo menos 40%, preferivelmente pelo menos 45%, ainda preferivelmente pelo menos 50%, ainda preferivelmente cerca de 53% das células CD4⁺ T específicas de antígeno induziram IFN- γ

secret, na população de célula CD4⁺ T específica de antígeno segregando IFN- γ , TNF- α e/ou IL-2. Em uma modalidade, a referida proporção de células CD4⁺ T específicas de antígeno segregando IFN- γ é determinada por citometria de fluxo policromática. Um exemplo de tal determinação é descrito no exemplo 1 do presente documento (veja parágrafo 'Populações de célula T segregadoras de múltiplas citocinas específicas de antígeno'). Em uma modalidade, o antígeno é quaisquer dos antígenos descritos aqui.

[000121] Em uma modalidade, a invenção pertence a uma vacina compreendendo um antígeno e um oligonucleotídeo imunoestimulador da invenção para uso induziu uma resposta imune ao referido antígeno em que pelo menos 10%, preferivelmente pelo menos 15%, ainda preferivelmente pelo menos 20%, ainda preferivelmente cerca de 22% das células CD4⁺ T específicas de antígeno induzidas são os produtores de citocina duplos, preferencialmente segregando igualmente IFN- γ e TNF- α , na população de célula CD4⁺ T específica de antígeno segregando IFN- γ , TNF- α e/ou IL-2. Em uma modalidade, a referida proporção de células CD4⁺ T específicas de antígeno segregando igualmente IFN- γ e TNF- α é determinada por citometria de fluxo policromática. Um exemplo de tal determinação é descrito no exemplo 1 do presente documento (veja parágrafo 'Populações de célula T segregadoras de múltiplas citocinas específicas de antígeno'). Em uma modalidade, o antígeno é quaisquer dos antígenos descritos aqui.

[000122] Em uma modalidade, a invenção pertence a uma vacina compreendendo um antígeno e um oligonucleotídeo imunoestimulador da invenção para uso induziu uma resposta imune ao referido antígeno em que pelo menos 30%, preferivelmente pelo menos 40%, ainda preferivelmente pelo menos 45%, ainda preferivelmente cerca de 47% das células CD8⁺ T específicas de antígeno induzidas são os produtores de citocina duplos, preferencialmente segregando igualmente IFN- γ e

TNF- α , na população de célula CD8⁺ T específica de antígeno segregando IFN- γ , TNF- α e/ou IL-2. Em uma modalidade, a referida proporção de células CD8⁺ T específicas de antígeno segregando igualmente IFN- γ e TNF- α é determinada por citometria de fluxo policromática. Um exemplo de tal determinação é descrito no exemplo 1 do presente documento (veja parágrafo 'Populações de célula T segregadoras de múltiplas citocinas específicas de antígeno'). Em uma modalidade, o antígeno é quaisquer dos antígenos descritos aqui.

[000123] A linguagem "quantidade eficaz" de uma molécula de ácido nucleico refere-se à quantidade necessária ou suficiente para realizar um efeito biológico desejado. Por exemplo, uma quantidade eficaz de um ácido nucleico contendo pelo menos um CpG não metilado para tratar um distúrbio poderia ser aquela quantidade necessária para eliminar uma infecção microbiana ou um tumor. Uma quantidade eficaz para uso como um adjuvante de vacina poderia ser aquela quantidade útil para reforçar uma resposta imune em indivíduos para uma vacina. Uma "quantidade eficaz" para tratar uma doença infecciosa, um distúrbio associado com um autoantígeno ou um distúrbio associado com uma substância viciante pode ser aquela quantidade útil para induzir uma resposta imune específica ao antígeno. A quantidade eficaz para qualquer aplicação particular pode variar, dependendo de tais fatores como a doença ou condição a ser tratada, o oligonucleotídeo imunoestimulador de CpG particular sendo administrado, o tamanho do indivíduo, ou a severidade da doença ou condição. Alguém de experiência ordinária na técnica pode empiricamente determinar a quantidade eficaz de um oligonucleotídeo particular sem necessitar experimentação indevida.

[000124] Em aspectos da invenção, uma vacina pode também incluir um adjuvante. Em algumas modalidades, um adjuvante é um agonista para um receptor tipo toll (TLR) que não é TLR9. Um agonista para um

TLR em algumas modalidades é um agonista para TLR3 (por exemplo, poli I:C estabilizado), TLR4 (por exemplo, um derivado de lipopolissacarídeo (LPS) por exemplo, MPL ou GLA), TLR5 (por exemplo, flagelina), TLR7 (por exemplo, uma molécula pequena da família imidazoquinolina) ou TLR8 (por exemplo, uma molécula pequena da família imidazoquinolina). Em algumas modalidades, o adjuvante é sal de alumínio, por exemplo, hidróxido de alumínio, um complexo imunoestimulante (ISCOM), uma emulsão de óleo-em-água ou água-em-óleo, um lipossoma, ou um sistema de liberação, por exemplo, uma nanopartícula ou micropartícula.

[000125] O termo quantidade eficaz de um oligonucleotídeo imunoestimulador de CpG refere-se à quantidade necessária ou suficiente para realizar um efeito biológico desejado. Por exemplo, uma quantidade eficaz de um oligonucleotídeo imunoestimulador de CpG administrada com um antígeno para induzir uma resposta imune específica ao antígeno é aquela quantidade necessária para induzir uma resposta imune com respeito a um antígeno sob exposição ao antígeno. Combinado com os ensinamentos fornecidos aqui, escolhendo-se entre os vários oligonucleotídeos imunoestimuladores ativos e fatores de peso tais como potência, biodisponibilidade relativa, peso corporal do paciente, severidade de efeitos colaterais adversos e modo preferido de administração, um regime de tratamento profilático ou terapêutico eficaz pode ser planejado que não causa toxicidade substancial e ainda é eficaz para tratar o indivíduo particular. A quantidade eficaz para qualquer aplicação particular pode variar dependendo de tais fatores como a doença ou a condição sendo tratada, o oligonucleotídeo imunoestimulador de CpG particular a ser administrado, o tamanho do indivíduo, ou a severidade da doença ou condição. Alguém de experiência ordinária na técnica pode empiricamente determinar a quantidade eficaz de um oligonucleotídeo

imunoestimulador de CpG particular e/ou antígeno e/ou outro agente terapêutico sem necessitar experimentação indevida levando em conta esta descrição.

[000126] Doses de indivíduo dos compostos descritos aqui para liberação local tipicamente varia de cerca de 0,1 µg a 50 mg por administração que, dependendo da aplicação, poderia ser dada diariamente, semanalmente, ou mensalmente e qualquer outra quantidade entre estas de tempo. Mais tipicamente doses locais variam de cerca de 10 µg a 10 mg por administração, e opcionalmente de cerca de 100 µg a 1 mg, com 2-4 administrações sendo dias espaçados ou semanas separadamente. Mais tipicamente, doses estimulantes imune variam de 1 µg a 10 mg por administração, e tipicamente 10 µg a 1 mg, com administrações diárias ou semanais. Doses objeto dos compostos descritos aqui para liberação parenteral para o propósito de induzir uma resposta imune específica ao antígeno, em que os compostos são liberados com um antígeno, porém, não outro agente terapêutico é tipicamente 5 a 10.000 vezes mais alta do que a dose local eficaz para adjuvante de vacina ou aplicações estimulantes imunes, e mais tipicamente 10 a 1.000 vezes mais alta, e tipicamente 20 a 100 vezes mais alta. Doses dos compostos descritos aqui para liberação parenteral, por exemplo, para induzir uma resposta imune inata, para aumentar ADCC, para induzir uma resposta imune específica ao antígeno quando os oligonucleotídeos imunoestimuladores de CpG são administrados em combinação com outros agentes terapêuticos ou em veículos de liberação especializados tipicamente varia de cerca de 0,1 µg a 10 mg por administração que, dependendo da aplicação, poderia ser dada diariamente, semanalmente, ou mensalmente e qualquer outra quantidade de entre estas de tempo. Mais tipicamente doses parenterais para estes propósitos variam de cerca de 10 µg a 5 mg por

administração, e tipicamente de cerca de 100 µg a 1 mg, com 2-4 administrações que são dias espaçados ou semanas separadas. Em algumas modalidades, entretanto, dose parenteral para estes propósitos podem ser usadas em uma faixa de 5 a 10.000 vezes mais alta do que as doses típicas descritas acima.

[000127] Para qualquer composto descrito aqui a quantidade terapeuticamente eficaz pode ser inicialmente determinada de modelos animais. Uma dose terapeuticamente eficaz pode, da mesma forma, ser determinada a partir de dados humanos para oligonucleotídeos de CpG que foram testadas em humanos (por exemplo, tentativas clínicas humanas foram iniciadas) e para compostos que são conhecidos para exibir atividades farmacológicas similares, tais como outros adjuvantes, por exemplo, LT e outros antígenos para propósitos de vacinação. Doses mais altas podem ser requeridas para administração parenteral. A dose aplicada pode ser ajustada com base na biodisponibilidade relativa e potência do composto administrado. Ajustando a dose para obter eficácia máxima com base nos métodos descritos acima e outros métodos como são bem conhecidos na técnica está bem dentro das capacidades do técnico normalmente versado.

[000128] As formulações da invenção são administradas em soluções farmaceuticamente aceitáveis, que podem habitualmente conter concentrações farmaceuticamente aceitáveis de sal, agentes de tamponamento, preservativos, veículos compatíveis, adjuvantes, e opcionalmente outros ingredientes terapêuticos.

[000129] Para uso em terapia, uma quantidade eficaz do oligonucleotídeo imunoestimulador de CpG pode ser administrada a um indivíduo por qualquer modo que libera o oligonucleotídeo à superfície desejada. Administração da composição farmacêutica da presente invenção pode ser realizada por quaisquer meios conhecido

ao técnico versado. Vias preferidas de administração incluem, porém não são limitadas a parenteral (por exemplo, intramuscular, subcutânea, intradérmica, intravenosa, intravesical ou intraperitoneal), tópica (por exemplo, pele (transdérmica), mucosal), oral, intranasal, intravaginal, intrarretal, transbucal, intraocular ou sublingual.

[000130] Os oligonucleotídeos imunoestimuladores sozinhos ou juntamente com outros agentes terapêuticos, podem ser administrados por meio de qualquer via descrita aqui. Em algumas modalidades preferidas, a administração é local. Administração local pode incluir aplicação tópica a superfícies mucosais, por exemplo, a pele, tal como aquelas da boca e órgão genitais.

[000131] Os oligonucleotídeos imunoestimuladores, quando for desejável para liberá-los sistemicamente, podem ser formulados para administração parenteral por injeção, por exemplo, por injeção de bolo ou infusão contínua. Formulações para injeção podem ser apresentadas na forma de dosagem unitária, por exemplo, em ampolas ou em recipientes de múltiplas doses, com um preservativo adicionado. As composições podem tomar tais formas como suspensões, soluções ou emulsões em veículos oleosos ou aquosos, e pode conter os agentes formuladores tais como agentes de suspensão, estabilização e/ou dispersão.

[000132] Formulações farmacêuticas para administração parenteral incluem soluções aquosas dos oligonucleotídeos imunoestimuladores na forma solúvel em água. Adicionalmente, suspensões dos oligonucleotídeos imunoestimuladores podem ser preparadas como suspensões de injeção oleosas apropriadas. Solventes lipofílicos adequados ou veículos incluem óleos graxos tais como óleo de gergelim, ou ésteres de ácido graxo sintéticos, tal como oleato de etila ou triglicerídeos, ou lipossomas. Suspensões de injeção aquosas podem conter substâncias que aumentam a viscosidade da

suspensão, tal como carboximetil celulose sódica, sorbitol, ou dextrano. Opcionalmente, a suspensão pode, da mesma forma, conter estabilizadores adequados ou agentes que aumentam a solubilidade dos oligonucleotídeos imunoestimuladores para permitir a preparação de soluções altamente concentradas.

[000133] Os oligonucleotídeos imunoestimuladores, quando for desejável para liberá-los sistemicamente, podem ser formulados para administração parenteral por injeção, por exemplo, por injeção de bolo ou infusão contínua. Formulações para injeção podem ser apresentadas na forma de dosagem unitária, por exemplo, em ampolas ou em recipientes de múltiplas doses, com um preservativo adicionado. As composições podem tomar tal forma como suspensões, soluções ou emulsões em veículos oleosos ou aquosos, e pode conter os agentes formuladores tais como agentes de suspensão, estabilização e/ou dispersão.

[000134] Alguém pode diluir ou aumentar o volume do terapêutico com um material inerte. Estes diluentes poderiam incluir carboidratos, especialmente manitol, a-lactose, lactose anidrosa, celulose, sacarose, dextranos modificados e/ou amido. Certos sais inorgânicos podem, da mesma forma, ser usados como cargas incluindo trifosfato de cálcio, carbonato de magnésio e/ou cloreto de sódio. Alguns diluentes comercialmente disponíveis são Fast-Flo, Emdex, STA-Rx 1500, Emcompress e Avicell.

[000135] Para ajudar a dissolução do terapêutico no ambiente aquoso um surfactante poderia ser adicionado como um agente umectante. Surfactantes podem incluir detergentes aniônicos tais como lauril sulfato de sódio, sulfossucinato de sódio de dioctila e/ou sulfonato de sódio de dioctila. Detergentes catiônicos poderiam ser usados e poderiam incluir cloreto de benzalcônio ou cloreto benzetômio. A lista de detergentes não iônicos potenciais que

poderiam ser incluídos na formulação como surfactante são lauromacrogol 400, estearato de polioxila 40, óleo de rícino hidrogenado de polioxietileno 10, 50 e/ou 60, monostearato de glicerol, polissorbato 40, 60, 65 e/ou 80, éster de ácido graxo de sacarose, metil celulose e carboximetil celulose. Estes surfactantes poderiam estar presentes na formulação dos oligonucleotídeos imunoestimuladores sozinhos ou como uma mistura em relações diferentes.

[000136] Formulações farmacêuticas para administração parenteral incluem soluções aquosas dos oligonucleotídeos imunoestimuladores na forma solúvel em água. Adicionalmente, suspensões dos oligonucleotídeos imunoestimuladores podem ser preparadas como suspensões de injeção oleosas apropriadas. Solventes lipofílicos adequados ou veículos incluem óleos graxos tais como óleo de gergelim, ou ésteres de ácido graxo sintéticos, tais como oleato de etila ou triglicerídeos, ou lipossomas. Suspensões de injeção aquosas podem conter substâncias que aumentam a viscosidade da suspensão, tal como carboximetil celulose sódica, sorbitol, ou dextrano. Opcionalmente, a suspensão pode, da mesma forma, conter estabilizadores adequados ou agentes que aumentam a solubilidade dos oligonucleotídeos imunoestimuladores para permitir a preparação de soluções altamente concentradas.

[000137] Alternativamente, os oligonucleotídeos imunoestimuladores podem estar na forma de pó para constituição com um veículo adequado, por exemplo, água livre de pirogênio estéril, antes do uso.

[000138] Para administração oral, os compostos (isto é, oligonucleotídeos imunoestimuladores de CpGs, antígenos e outros agentes terapêuticos) podem ser formulados facilmente combinando-se os oligonucleotídeos imunoestimuladores com veículos farmacêuticamente aceitáveis bem conhecidos na técnica. Tais veículos permitem os oligonucleotídeos imunoestimuladores da invenção ser formulados

como comprimidos, pílulas, drágeas, cápsulas, líquidos, géis, xaropes, lamas, suspensões e similares, para ingestão oral por um indivíduo a ser tratado. Preparações farmacêuticas para uso oral podem ser obtidas como excipiente sólido, opcionalmente moer uma mistura resultante, e processar a mistura de grânulos, depois de adicionar auxiliares adequados, se desejado, para obter comprimidos ou núcleos de drágeas. Excipientes adequados são, em particular, cargas tais como açúcares, incluindo lactose, sacarose, manitol, ou sorbitol; preparações de celulose tais como, por exemplo, amido de milho, amido de trigo, amido de arroz, amido de batata, gelatina, goma tragacanto, metil celulose, hidroxipropilmetil-celulose, carboximetilcelulose sódica, e/ou polivinilpirrolidona (PVP). Se desejado, agentes desintegrantes podem ser adicionados, tal como a polivinil pirrolidona reticulada, ágar, ou ácido algínico ou um sal dos mesmos tal como alginato de sódio. Opcionalmente as formulações orais podem, da mesma forma, ser formuladas em solução salina ou tampões, isto é EDTA para neutralizar condições de ácido internas ou podem ser administradas sem qualquer veículo.

[000139] Da mesma forma considerado são formas de dosagem orais dos agentes acima ou formulações. Os agentes ou formulações podem quimicamente ser modificados de forma que a liberação oral do derivado é eficaz. Geralmente, a modificação química considerada é a ligação de pelo menos uma porção ao agente ou formulação sozinha, onde a referida porção permite (a) inibição de proteólise; e (b) captação na corrente sanguínea do estômago ou intestino. Da mesma forma desejado é o aumento em estabilidade total do agente ou formulação e aumenta em tempo de circulação no corpo. Exemplos de tais porções incluem: polietileno glicol, copolímeros de etileno glicol e propileno glicol, carboximetil celulose, dextrano, álcool polivinílico, polivinil pirrolidona e poliprolina. Abuchowski e Davis, 1981, "Soluble

Polymer-Enzyme Adducts" In: Enzymes as Drugs, Hocenberg e Roberts, eds., Wiley-Interscience, New York, N.Y., pp. 367-383; Newmark, e outro, 1982, J. Appl. Biochem. 4:185-189. Outros polímeros que poderiam ser usados são poli-1,3-dioxolano e poli-1,3,6-tioxocano. Preferido para uso farmacêutico, como indicado acima, são porções de polietileno glicol.

[000140] Liberação intranasal de uma composição farmacêutica da presente invenção é da mesma forma considerada. Liberação intranasal permite a passagem de uma composição farmacêutica da presente invenção à corrente sanguínea diretamente depois de administrar o produto terapêutico ao nariz, sem a necessidade para deposição do produto no pulmão. Formulações para liberação nasal incluem aquelas com dextrano ou ciclodextrano.

[000141] Para administração intranasal, um dispositivo útil é um frasco pequeno, duro em que um pulverizador com dosímetro é ligado. Em uma modalidade, a dose medida é liberada puxando-se a composição farmacêutica da solução da presente invenção em uma câmara de volume definido, cuja câmara tem uma abertura dimensionada para aerossolizar uma formulação de aerossol formando-se um spray quando um líquido na câmara é comprimido. A câmara é comprimida para administrar a composição farmacêutica da presente invenção. Em uma modalidade específica, a câmara é uma disposição de pistão. Tais dispositivos estão comercialmente disponíveis.

[000142] Alternativamente, um frasco de compressão plástica com um orifício ou abertura dimensionada para aerossolizar uma formulação de aerossol formando-se um spray quando o frasco é comprimido. A abertura é normalmente encontrada no topo do frasco, e o topo é geralmente afunilado para parcialmente ajustar nas passagens nasais para administração eficiente da formulação de

aerossol. Preferivelmente, o inalador nasal fornecerá uma quantidade medida da formulação de aerossol, para administração de uma dose medida do fármaco.

[000143] Para administração transbucal, as composições podem tomar a forma de comprimidos ou pastilhas formuladas de maneira convencional.

[000144] Os compostos podem, da mesma forma, ser formulados em composições retais ou vaginais tais como supositórios ou enemas de retenção, por exemplo, contendo bases de supositório convencionais tais como manteiga de cacau ou outros glicerídeos.

[000145] Além das formulações descritas previamente, os compostos podem, da mesma forma, ser formulados como uma preparação de depósito. Tais formulações de ação longa podem ser formuladas com materiais poliméricos ou hidrofóbicos adequados (por exemplo, como uma emulsão em um óleo aceitável) ou resinas de troca iônica, ou como derivados raramente solúveis, por exemplo, como um sal raramente solúvel.

[000146] As composições farmacêuticas da mesma forma podem compreender sólido adequado ou veículos de fase de gel ou excipientes. Exemplos de tais veículos ou excipientes incluem, porém, não são limitados a carbonato de cálcio, fosfato de cálcio, vários açúcares, amidos, derivados de celulose, gelatina, e polímeros tais como polietileno glicóis.

[000147] Líquidos adequados ou formas de preparação farmacêuticas sólidas são, por exemplo, soluções aquosas ou salinas para inalação, microencapsuladas, encochleated, revestidas em partículas de ouro microscópicas, contidas em lipossomas, nebulizadas, aerossóis, pelotas para implantação na pele, ou secadas em um objeto afiado a ser arranhado na pele. As composições farmacêuticas da mesma forma incluem grânulos, pós, comprimidos, comprimidos

revestidos, (micro)cápsulas, supositórios, xaropes, emulsões, suspensões, cremes, gotas ou preparações com liberação demorada de compostos ativos, cujos excipientes de preparação e aditivos e/ou auxiliares tais como desintegrantes, aglutinantes, agentes de revestimento, agentes de tumefação, lubrificantes, flavorizantes, adoçantes ou solubilizadores são habitualmente usados como descrito acima. As composições farmacêuticas são adequadas para uso em uma variedade de sistemas de liberação de fármaco. Para uma breve revisão de métodos para liberação de fármaco, veja Langer, Science 249:1527-1533, 1990.

[000148] Os oligonucleotídeos imunoestimuladores de CpGs e opcionalmente outros terapêuticos e/ou antígenos podem ser administrados por si próprio (limpo) ou na forma de um sal farmaceuticamente aceitável. Quando usado em medicina, os sais deveriam ser farmaceuticamente aceitáveis, porém sais não farmaceuticamente aceitáveis podem convenientemente ser usados para preparar sais farmaceuticamente aceitáveis dos mesmos. Tais sais incluem, porém não são limitados, aqueles preparados a partir dos seguintes ácidos: clorídrico, bromídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, p-tolueno sulfônico, tartárico, cítrico, metano sulfônico, fórmico, malônico, succínico, naftaleno-2-sulfônico, e benzeno sulfônico. Da mesma forma, tais sais podem ser preparados como metal alcalino ou sais alcalinos terrosos, tais como sais de sódio, potássio ou cálcio do grupo ácido carboxílico.

[000149] Agentes de tamponamento adequados incluem: ácido acético e um sal (1-2% p/v); ácido cítrico e um sal (1-3% p/v); ácido bórico e um sal (0,5-2,5% p/v); e ácido fosfórico e um sal (0,8-2% p/v). Preservativos adequados incluem cloreto de benzalcônio (0,003-0,03% p/v); clorobutanol (0,3-0,9% p/v); parabenos (0,01-0,25% p/v) e timerosal (0,004-0,02% p/v).

[000150] As composições farmacêuticas da invenção contêm uma quantidade eficaz de um oligonucleotídeo imunoestimulador de CpG e opcionalmente antígenos e/ou outros agentes terapêutico opcionalmente incluídos em um veículo farmacêuticamente aceitável. O termo veículo farmacêuticamente aceitável significa um ou mais sólidos compatíveis ou cargas líquidas, diluentes ou substâncias de encapsulação que são adequadas para administração a um humano ou outro animal vertebrado. O termo veículo denota um ingrediente orgânico ou inorgânico, natural ou sintético, com que o ingrediente ativo é combinado para facilitar a aplicação. Os componentes das composições farmacêuticas da mesma forma são capazes de ser misturados com os compostos da presente invenção, e entre si, de uma maneira tal que não há interação que substancialmente prejudicaria a eficiência farmacêutica desejada.

[000151] A presente invenção é também ilustrada pelos seguintes Exemplos, que de nenhuma maneira deveriam ser interpretados como limitante. Os teores totais de todas as referências (incluindo referências de literatura, patentes emitidas, pedidos de patente publicados, e pedidos de patente co-pendentes) citadas ao longo deste pedido estão aqui expressamente incorporadas por referência em sua totalidade.

EXEMPLOS

Exemplo 1:

[000152] Oligonucleotídeo imunoestimulador CPG 24555 foi comparado com oligonucleotídeos CPG 10103 e CPG 7909 quanto a sua capacidade de aumentar respostas imunes específica de antígenos em camundongos quando imunizados intramuscularmente (IM) usando antígeno de superfície de hepatite B (HBsAg) ou ovalbumina (OVA) como antígenos de modelo.

Métodos e Materiais

[000153] Todos ODN foram preparados de oligodesoxinucleotídeo liofilizado (ODN). Brevemente, ODN foram dissolvidos em tampão de Tris-EDTA livre de endotoxina em pH 8,0 (OmniPur®; EM Science, Gibbstown, NJ) e diluídos em Solução Salina Tamponada de Fosfato livre de endotoxina estéril (PBS) em pH 7,2 (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) sob condições assépticas para prevenir igualmente contaminação microbiana e de endotoxina. Soluções de matéria prima foram armazenadas a 4°C até o uso.

[000154] Camundongos BALB/c e C57Bl/6 tipo selvagem fêmeas foram adquiridos de Charles River Canada (Quebec, Canada). Camundongos deficientes de TLR9 no C57 antecedente foram criados em Taconic Farms e transferidos em Coley Animal Care Facility para estudos. Camundongos foram alojados em gaiolas microisoladoras na Animal Care Facility at Coley Pharmaceutical Group Canada. Todos os estudos foram conduzidos de acordo com o Animal Care Committee of Coley Canada sob a orientação da Associação para avaliação e credenciamento de cuidado de animal de laboratório (AAALAC International) e o Canadian Council on Animal Care. Os animais foram aproximadamente 18-20 g de peso no início do estudo.

Imunização de camundongos

Antígeno de superfície de hepatite B (HBsAg)

[000155] Camundongos BALB/c (n=10/grupo) foram imunizados intramuscularmente (IM) no músculo anterior tibial esquerdo com 1 µg de HBsAg; subtipo ad (Cliniqa, 4076), sozinho ou em combinação com 10 µg de CPG 24555, CPG 10103 ou CPG 7909 em um volume total de 50 µl. Em 2 semanas após início, animais foram sangrados pela veia submandibular usando heparina como um anticoagulante e reforçados usando a mesma formulação de vacina usada para a imunização primária. Em 2 semanas após reforço, animais foram sangrados por punção cardíaca usando heparina como um

anticoagulante, eutanizados por deslocamento cervical e os baços removidos assepticamente para uso em imunoensaio para detecção de atividade de CTL específica de antígeno, secreção de IFN- γ (sobrenadantes de cultura) e múltiplas citocinas (IFN- γ , TNF- α e IL-2) segregando células CD4 vs CD8 T. Plasma de cada ponto de tempo de sangramento foi usado para detecção de isotipos de IgG e IgG total específicos de antígeno IgG1 e IgG2a.

Ovalbumina de Galinha (OVA)

[000156] Camundongos deficientes de TLR9 e tipo selvagem C57Bl/6 (C57Bl/6 TLR9-/-) (n=10/grupo) foram imunizados intramuscularmente (IM) no músculo anterior tibial esquerdo com 20 μ g de OVA grau VII (Sigma, A7641) sozinho ou em combinação com 10 μ g de CPG 24555, CPG 10103, CPG 7909 ou ODN 2137 de controle de não CpG em um volume total de 50 μ l. Animais foram reforçados usando a mesma formulação de vacina como usado para a imunização primária em 14 e 21 dias após imunização primária. Em 7 dias após último reforço, animais foram sangrados por punção cardíaca usando heparina como um anticoagulante, eutanizados por deslocamento cervical e baços assepticamente removidos para uso em ensaio imune para detecção de atividade de CTL específica de antígeno, secreção de IFN- γ (sobrenadantes de cultura), células CD8 T positivas de tetrâmero e células CD4 vs. CD8 T segregando múltiplas citocinas (IFN- γ , TNF- α e IL-2). Plasma foi usado para detecção de isotipos de IgG e IgG total específicos de antígeno IgG1 e IgG2c.

Ensaio imunes

Determinação de títulos de anticorpo específicos de antígeno

[000157] Anticorpos (IgG total, IgG1 e IgG2a/c) específicos a HBsAg (anti-HBs) ou ovalbumina (anti-OVA) foram detectados e quantificados por ensaio de ELISA de diluição de ponto final, que foi realizado em triplicatas em amostras de animais individuais. Títulos de ponto final

foram definidos quando a diluição de plasma mais alta que resultou em um valor de absorvência (OD 450nm) duas vezes maior do que aquele de plasma não imune com um valor de corte de 0,05. Estes foram relatados como títulos de média geométrica de grupo (GMT) $\pm$ SEM.

Avaliação de respostas de CTL

[000158] Baços removidos em 1 semana (para OVA) ou 2 semanas (para HBsAg) pós última imunização foram usados para ensaio de respostas de linfócito T citotóxico específicas de antígeno (CTL). Baços foram homogeneizados em única suspensão de célula em meio de cultura de RPMI 1640 (Hyclone, Logan, UT) de tecido suplementado com 10% de soro bovino fetal (Hyclone, Logan, UT), solução de penicilina-estreptomicina (concentração final de 1000 U/ml e 1 mg/ml respectivamente; Invitrogen, Burlington, EM), L-glutamina (concentração final de 2mM; Invitrogen, Burlington, EM) e 5×10^{-5} M β -mercaptoetanol (Invitrogen, Burlington, EM). Linfócitos específicos de HBsAg em suspensões de esplenócito (3×10^6 células/ml) foram re-estimulados durante 5 dias incubando-se com uma linha de célula de murino irradiada (P815/S) expressando linfócitos específicos de HBsAg e OVA em suspensões de esplenócito (3×10^6 células/ml) foram re-estimulados durante 5 dias incubando-se com uma linha de célula de murino irradiada (EG.7) expressando OVA. Seguindo o re-estímulo, o potencial dos linfócitos para matar células expressando HBsAg ou OVA foi determinado usando-se ensaio de liberação de ^{51}Cr . Os resultados são apresentados como % de lise específico em efetor diferente para relações alvo (E:T).

Avaliação de secreção de IFN- γ específica de antígeno por esplenócitos

[000159] Esplenócitos de 1 semana (para OVA) ou 2 semanas (para HBsAg) pós última imunização foram usados medindo secreção de IFN- γ seguindo re-estímulo de antígeno. Brevemente, suspensões de célula de

baço foram preparadas como terminado para ensaio de CTL e ajustadas em uma concentração final de 5×10^6 células por ml em RPMI 1640 (Hyclone, Logan, UT) meio de cultura de tecido suplementado com 2% de soro de camundongo normal (Cedarlane Laboratories, Ontario, Canada), solução de penicilina-estreptomicina (concentração final de 1000 U/ml e 1 mg/ml respectivamente; Invitrogen, Burlington, EM), L-glutamina (concentração final de 2mM; Invitrogen, Burlington, EM) e 5×10^{-5} M β -mercaptoetanol (Invitrogen, Burlington, EM) [RPMI 1640 Completo]. Suspensão de esplenócito foi semeada em placas de cultura de tecido de base U de 96 cavidades (100 μ l/cavidade) juntamente com 100 μ l de cada estimulante (como descrito em legendas de figura apropriadas) diluídas em concentrações apropriadas em RPMI 1640 Completo. Concanavalina A (10 μ g/ml, Sigma) foi usada como um controle positivo e células cultivadas com meio apenas foram usados como controles negativos. Cada amostra de esplenócito foi semeada em triplicata e as células foram incubadas em uma incubadora de CO₂ a 5% umedecida a 37°C durante 72 horas. Sobrenadantes de cultura foram colhidos ao término do período de incubação e armazenados a -80°C até que analisados. *Kits* de ensaio comercialmente disponíveis (camundongo IFN- γ OptEIA; BD Pharmingen, Mississauga, EM) foram usados de acordo com as instruções do fabricante para avaliar níveis de IFN- γ em sobrenadantes de cultura.

Quantificação de população de CD8 positiva de tetrâmero de OVA

[000160] Suspensões de esplenócito obtidas como descrito acima foram da mesma forma usadas para quantificação de populações de CD8 positivas de tetrâmero de OVA por FACS. Esplenócitos (2×10^6) de baços individuais foram transferidos em tubos de teste de 12x75mm contendo 500 μ l de tampão de manchamento: DPBS contendo 1% de soro bovino fetal (Hyclone, Logan, UT) e 0,1% de Azida de sódio (Sigma). Células foram centrifugadas em 1200 rpm

durante 5 minutos e sobrenadantes removidos. Receptores de Fc foram bloqueados incubando-se células a 4°C durante 10 minutos com anticamundongo CD16/CD32 (bloqueio de Fc) (BD Pharmingen). Células foram lavadas com tampão de manchamento e manchadas durante 20 minutos a 4°C usando tetrâmero específico de OVA classe-1 (SIINFEKL) (Beckman Coulter). Células foram em seguida lavadas novamente com tampão de manchamento e manchadas durante 20 minutos a 4°C com anticamundongo CD8a-FITC (BD Pharmingen). Células foram lavadas com tampão de manchamento, ressuspensas em 500 µl de tampão de manchamento e analisadas usando um citômetro de fluxo FC500 (Beckman coulter). Células CD8 T específicas de OVA foram identificadas como células que eram igualmente positivas para CD8a bem como tetrâmero. Dados são expressos como % de CD8 e células positivas de tetrâmero.

Quantificação de Populações de célula T segregadoras de múltiplas citocinas específicas de antígeno

[000161] Suspensões de esplenócito agrupadas para cada grupo foram re-estimuladas em placas de cultura de tecido de 24 cavidades em RPMI 1640 (Hyclone, Logan, UT) meio de cultura de tecido suplementado com 2% de soro de camundongo normal (Cedarlane Laboratories, Ontario, Canada), solução de penicilina-estreptomicina (concentração final de 1000 U/ml e 1 mg/ml respectivamente; Invitrogen, Burlington, EM), L-glutamina (concentração final de 2mM; Invitrogen, Burlington, EM) e 5×10^{-5} M β -mercaptoetanol (Invitrogen, Burlington, EM).

[000162] Para re-estímulo de CD4: células 5×10^6 foram estimuladas durante a noite em um volume final de 1 ml contendo 5 µg/ml de HBsAg.

[000163] Para re-estímulo de CD8; células 5×10^6 foram estimuladas durante 5 horas em um volume final de 1 ml contendo 5 µg/ml de peptídeo de HBs (IPQSLDSWWTSL).

[000164] Meios sem estimulantes foram usados como controle negativo onde como 10 ng/ml de PMA (Sigma) e 1 µg/ml de ionomicina (Sigma) [adicionado durante as últimas 4 horas de incubação] foram usados como controles positivos. Adicionalmente, durante as últimas 4 horas de re-estímulo, Brefelden A (BD Pharmingen) e monensina (BD Pharmingen) foram adicionados para parar transporte de proteína.

[000165] Após o re-estímulo, células foram lavadas com tampão de manchamento e receptores de Fc foram bloqueados incubando-se células a 4°C durante 10 minutos com anticamundongo CD16/CD32 (bloqueio de Fc) (BD Pharmingen). Células foram em seguida centrifugadas e re-suspensas em tampão de manchamento contendo 5 µg/ml de anticamundongo CD4-ECD (Invitrogen) ou anticamundongo CD8-ECD (Invitrogen) e incubadas durante 30 minutos a 4°C. Células foram lavadas com tampão de manchamento e re-suspensas em Solução de BD Fix/Perm (BD Pharmingen) durante 20 minutos a 4°C. Células foram lavadas novamente com solução BD Perm Wash (BD Pharmingen) e re-suspensas em solução de 1x BD Perm Wash (BD Pharmingen) contendo 5µg/ml de cada de IL-2-FITC (BD Pharmingen), TNF-APC (BD Pharmingen) e IFN-γ- PeCy7 (BD Pharmingen) e incubadas durante 20 minutos em temperatura ambiente protegida de luz. Células foram lavadas com solução de 1X BD Perm Wash (BD Pharmingen) e re-suspensas em tampão de manchamento normal e analisadas usando um citômetro de fluxo de FC500 (Beckman Coulter).

Resultados

Respostas imunes humorais

[000166] Todos os três CpG ODN testados (CPG 24555, 10103 e 7909) significativamente aumentaram HBsAg e títulos de IgG total específicos de OVA em camundongos de tipo selvagem ($P < 0,05$).

Não houve diferença significativa entre os três CpG ODN em termos de sua capacidade de aumentar HBsAg ou OVA IgG total específico em camundongos (Figura 1).

[000167] A capacidade de CPG 24555, CPG 10103 e CPG 7909 de aumentar títulos de anticorpo em animais deficientes de TLR9 foi testada usando OVA. Os títulos de anticorpo totais detectados em 1 semana após reforço com quaisquer dos regimes de vacinação foi menos do que 100 e nenhum do CpG ODNs foi capaz de significativamente aumentar títulos de anticorpo contra OVA comparado quando a vacina foi usada sozinha ou em combinação com não CpG ODN 2137 (dados não mostrados).

[000168] Em camundongos, a distribuição de isótipos de IgG é amplamente usada como uma indicação da natureza da resposta imune onde níveis de IgG2a ou IgG2c altos são indicativos de uma resposta imune influenciada por Th1 visto que títulos de IgG1 altos são indicativos de uma resposta imune influenciada por Th2. Todo o três CpG ODNs ajudaram induzir respostas imunes influenciadas por Th1 fortes com relações de IgG2a/IgG1 e IgG2c/IgG1 >1 (Figura 1) e com títulos de IgG2a/c significativamente aumentado comparado quando antígeno foi usado sozinho ($P < 0,05$) (Figura 2).

Respostas imunes celulares: Respostas de CTL

[000169] Uma maneira funcional para medir respostas com base em Th1 é medir atividade de CTL contra antígeno apresentando células alvo. Como visto na Figura 3, todos os CpG ODN testados foram capazes de significativamente aumentar respostas de CTL específicas de antígeno contra OVA em camundongos comparado quando o antígeno foi usado sozinho ou em combinação com ODN de não CPG 2137 ($P < 0,05$; Figura 3 painel direito). Não houve diferença significativa entre o CpG ODN testado promovendo-se a indução de CTL específico de OVA exceto na relação 6,25:1 E:T

onde grupos CPG 24555 e CPG 7909 mostraram CTL específico de OVA significativamente mais alto do que grupos recebendo CPG 10103.

[000170] Com HBsAg, igualmente o CPG 24555 e 10103 porém não CPG 7909 foram capazes de induzir respostas de CTL específicas de antígeno significativamente mais altas comparadas quando o antígeno foi usado sozinho. ($P < 0,05$; Figura 3 painel esquerdo). Não houve diferença significativa entre o CPG 24555 e CPG 10103 em sua capacidade de promover a indução de respostas de CTL específicas de HBsAg em camundongos.

[000171] Aumento mediado por CpG ODN de respostas de CTL não foi observado em camundongos deficientes de TLR9 (Figura 4).

Células CD8 T específicas de antígeno

[000172] MHC Classe I H-2Kb-SIINFEKL tetrâmeros específicos foram usados para quantificar respostas de célula CD8 T em camundongos imunizados com OVA. Todos os CpG ODN testados realçaram células CD8 T específicas de antígeno comparados quando OVA foi usado sozinho ou em combinação com o ODN de controle de não CpG 2137 (Figura 5). CPG 7909 foi superior a CPG 24555 e 10103 promovendo-se a indução de células CD8 T específicas de OVA ($P < 0,05$). Não houve diferença significativa entre CPG 24555 e 10103 em sua capacidade de induzir células CD8 T específicas de OVA ($P > 0,05$).

[000173] Aumento mediado por CPG de células CD8 T específicas de OVA não foi observado em camundongos deficientes de TLR9 (Figura 5).

Secreção de IFN- γ Específica de Antígeno

[000174] Produção de interferona gama (IFN- γ) com respeito a estímulo de antígeno como uma medida de imunidade celular foi da mesma forma investigada por detecção da citocina em sobrenadante

de cultura de esplenócitos re-estimulados com antígeno vacinado usando imunoensaios de enzima. Sobrenadantes de cultura de esplenócitos colhidos de animais imunizados com HBsAg ou OVA usando CPG 24555 ou CPG 10103 mostraram níveis significativamente mais altos de IFN- γ comparados a sobrenadantes imunizados apenas com antígeno. Quando usado com HBsAg, CPG 24555 foi significativamente melhor promovendo-se secreção de IFN- γ específica de antígeno comparado a CPG 10103 ou CPG 7909 (Figura 6; painel esquerdo). Quando usado CPG de OVA 24555 foi igual a CPG 10103 porém superior para CPG 7909 promovendo-se secreção de IFN- γ específica de antígeno (Figura 6; painel direito).

[000175] Aumento mediado por CpG ODN de secreção de IFN- γ específica de antígeno não foi observado em animais deficientes de TLR9 (Figura 7).

Populações de célula T segregadoras de múltiplas citocinas específicas de antígeno

[000176] De acordo com resultados mais recentes, produção de IFN- γ apenas por células T não é previsível da capacidade de células T específicas de antígenos de induzir resposta imune protetora. Portanto, neste estudo nós avaliamos a capacidade de células CD4 e CD8 T específicas de antígeno produzirem IL-2, TNF- α e IFN- γ usando citometria de fluxo policromática.

[000177] Igualmente com as células CD4 e CD8 T, um nível relativamente baixo de secreção de IL-2 foi visto em comparação à secreção de IFN- γ e TNF- α (Figura 8). Com células CD4 T, CPG 24555 ajudou a induzir a porcentagem mais alta de células T segregadoras de citocina dupla comparado a CPG 10103 e 7909 (23% com CPG 24555 onde como 4 e 6% com CPG 10103 e 7909 respectivamente). Porcentagem total, muito baixa de células CD4 T produtoras de citocina tripla específicas de HBsAg foram observadas (2, 0 e 1% com CPG

24555, 10103 e 7909 respectivamente) (Figura 8A).

[000178] Com células CD8 T, CPG 24555 e CPG 7909 ajudaram a induzir nível alto de células T segregadoras de citocina dupla em comparação a CPG 10103 (48 e 56% com CPG 24555 e CPG 7909 respectivamente, considerando apenas 19% com CPG 10103). Similar às células CD4, a porcentagem muito baixa de células CD8+ T específicas de HBsAg produtoras de citocina tripla foi observada (1, 0 e 0% com CPG 24555, 10103 e 7909 respectivamente) (Figura 8B).

Tabela 1: Porcentagem de células CD4+ T específicas de HBsAg que são produtoras de citocina simples, dupla ou tripla segregando IFN- γ e/ou IL-2 e/ou TNF- α

células CD4+ T	apenas Ag	Ag + CpG 24555	Ag + CpG 10103
IFN- γ *	69%	53%	36%
TNF- α *	41%	65%	62%
IL-2 *	15%	9%	6%
IFN- γ / IL-2 #	7%	2%	0%
IFN- γ / TNF- α #	10%	22%	2%
TNF- α / IL-2 #	8%	5%	2%
IFN- γ / IL-2 / TNF- α	0%	2%	0%
% de produtor de citocina simples	75%	75%	96%
% produzindo pelo menos duas citocinas	25%	25%	4%

* indica a proporção total de células produzindo estas citocinas se elas são produtoras simples, duplas ou triplas

indica proporção total de células produzindo estas duas citocinas se elas são produtoras duplas ou triplas

Tabela 2: Porcentagem de células CD8+ T específicas de HBsAg que são produtoras de citocina simples, duplas ou triplas segregando IFN- γ

e/ou IL-2 e/ou TNF- α

células CD8+ T	Ag apenas	Ag + CpG 24555	Ag + CpG 10103
IFN- γ *	63%	67%	76%
TNF- α *	42%	76%	37%
IL-2 *	10%	7%	6%
IFN- δ / IL-2 #	5%	2%	0%
IFN- δ / TNF- α #	10%	47%	18%
TNF- α / IL-2 #	2%	2%	1%
IFN- γ / IL-2 / TNF- α	2%	1%	0%
% de produtor de citocina simples	87%	51%	81%
% produzindo pelo menos duas citocinas	13%	49%	19%

* indica proporção total de células que produzem estas citocinas se elas são produtoras simples, duplas ou triplas

indica proporção total de células produzindo estas duas citocinas se elas são produtoras duplas ou triplas

Discussão

[000179] Estudos foram designados para comparar CPG 24555 com CPG 10103 e CPG 7909 para sua capacidade de aumentar respostas imunes específicas de antígeno em camundongos quando usado com 2 modelos de antígeno: HBsAg e OVA. CPG 24555 e CPG 10103 têm sequência de nucleotídeo idêntica exceto CPG 24555 tem uma reversão da 3' mais dinucleotídeo de CG resultando na eliminação de um motivo de CpG em CPG 24555. CPG 7909 é uma CpG ODN de classe B que provou atividade de adjuvante em tentativas clínicas humanas com vários antígenos de vacina.

[000180] Eliminação do motivo de CpG 3' em CPG 24555 não teve

qualquer impacto negativo em sua capacidade de aumentar respostas imunes específicas de antígeno e mostrou igual (respostas de anticorpo e células CD8 T específicas de antígeno como medido por manchamento de tetrâmero) ou melhor (secreção de IFN- γ específica de antígeno) aumento de respostas imunes adaptáveis comparadas a CPG 10103. Similarmente CPG 24555 foi igual a CPG 7909 aumentando-se respostas de anticorpo específicas de antígeno bem como respostas de CTL. CPG 24555 foi superior a CPG 7909 promovendo-se secreção de IFN-g específica de antígeno.

[000181] Aumento de respostas imunes adaptáveis com todos os três CpG ODN testado foram TLR9 dependente como nenhum aumento em respostas imunes adaptáveis foram vistas em camundongos deficientes de TLR9.

[000182] Como mostrado na tabela 1, uma proporção mais alta de células CD4+ T específicas de antígeno produzindo IFN- γ foram obtidas com CPG 24555. Da mesma forma, uma proporção mais alta de células CD4+ T específicas de antígeno polifuncionais produzindo pelo menos duas citocinas entre IFN- γ TNF- α e IL-2 (isto é, igualmente IFN- γ e TNF- α , igualmente IFN- γ e IL-2 ou igualmente TNF- α e IL-2, ou ainda produtoras triplas segregando IFN- γ TNF- α e IL-2) foi obtida.

[000183] Quanto às células CD8+ T (tabela 2), uma proporção mais alta de células CD8+ T específicas de antígeno polifuncionais produzindo duas citocinas, e em particular IFN- γ e TNF- α , igualmente IFN- γ e IL-2 foi obtida.

[000184] Conjuntamente, estes resultados mostram que CPG 24555 é melhor do que CPG 10103 para gerar as populações de células T específicas de antígenos polifuncionais quando usadas como um adjuvante. Isto pode ser de importância quando as células T polifuncionais, em particular em termos de produção de quimiocina (tal

como IFN- γ , TNF- α e IL-2) acreditam-se ser as melhores células efectoras comparadas às células T que segregam uma citocina simples.

Exemplo 2:

Comparação de CPG 24555 e CPG 10103

Sequências de nucleotídeo de ODNs testados

CPG ODN 10103

5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*T*C*G*T*T*T*T 3' (SEQ

ID NO:2)

CPG ODN 24555

5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*T*G*C*T*T*T*T 3' (SEQ

ID NO:1)

ODN de não CpG 22881

5' T*G*C*T*G*C*T*T*T*T*G*G*C*T*G*C*T*T*T*T 3' (SEQ

ID NO:4)

ODN de não CpG 2137

5' T*G*C*T*G*C*T*T*T*T*G*T*G*C*T*T*T*T*G*T*G*C*T*T

3' (SEQ ID NO:5)

* indica ligação de fosforotioato (PS)

[000185] O porção sublinhada das sequência representa a diferença entre CpG ODN 10103 e CpG ODN 24555.

Motif de CpG ideal para humanos: GTCGTT

Imunidade inata em PBMC Humano

[000186] PBMC humano (5×10^6 /ml) foi incubado com concentrações variadas de CPG 10103, CPG 24555 ou ODN de controle de não CpG 22881 durante 24 ou 48 horas. Sobrenadantes de célula foram coletados e analisados para secreção de citocina/quimiocina usando um *kit* de ELISA comercial (Figura 9A e Figura 9B).

Imunidade inata in vivo em camundongos BALB/c

[000187] Camundongos BALB/c (n=5/grupo) foram subcutaneamente injetados com PBS (controle de placebo), CPG 24555, CPG 10103 ou

ODN de controle de não CpG 2137 em nível de dose de 100µg. Animais foram sangrados em 3 horas pós injeção e plasma analisados para IP-10 (Figura 10A) e IL-12 (Figura 10B) ou IL-6 (Figura 10C) usando ELISA comercial. Resultados mostrados são os meios de grupo $\pm$ erro padrão da média (NS = não significante).

Imunidade humoral in vivo em camundongos BALB/c

[000188] Camundongos BALB/c foram intramuscularmente injetados com HBsAg (1 µg) com ou sem CPG 2455, CPG 10103 ou ODN de controle de não CpG 2137 a 10 µg. Os camundongos foram injetados em 0 e 14 dias. Resultados mostrados são títulos de IgG total específicos de HBsAg em 2 semanas após reforço medido por ELISA de ponto final (Figura 11A).

[000189] Camundongos C57bl/6 foram intramuscularmente injetados com OVA (20 µg) com ou sem CpG ODN 2455, CPG 10103 ou ODN de controle de não CpG 2137 a 10 µg. Os camundongos foram injetados em 0, 7 e 21 dias. Resultados mostrados são títulos de IgG total específicos de OVA em 1 semana após último reforço (Figura 11B).

[000190] Camundongos BALB/c foram intramuscularmente injetados com Influenza A HA de Texas 1/77, H3N2 (1 µg) $\pm$ alume (25 µg Al₃⁺) com ou sem CpG ODN 2455, CPG 10103 ou ODN de controle de não CpG 2137 a 10 µg. Resultados mostrados são cinéticas de IgG total específico de HA em vários tempos após imunização medido por ELISA de ponto final (Figura 11C).

Respostas de célula T em camundongos BALB/c

[000191] Camundongos BALB/c foram injetados intramuscularmente com HBsAg (1 µg) com ou sem CpG ODN 2455, CPG 10103 ou ODN de controle de não CpG 2137 a 10 µg. Os camundongos foram injetados em 0 e 14 dias. Resultados mostrados são CTL específico de HBsAg medidos por liberação de ⁵¹Cr em 2 semanas após reforço (Figura 12A).

[000192] Camundongos C57bl/6 foram intramuscularmente injetados

com OVA (20 µg) com ou sem CpG ODN 2455, CPG 10103 ou ODN de controle de não CpG 2137 a 10 µg. Os camundongos foram injetados em 0, 7 e 21 dias. Resultados mostrados são CTL específico de OVA medido por liberação de ^{51}Cr em 1 semana após último reforço (Figura 12B).

[000193] Camundongos BALB/c foram intramuscularmente injetados com HBsAg (1 µg) com ou sem CpG ODN 2455, CPG 10103 ou ODN de controle de não CpG 2137 a 10 µg. Os camundongos foram injetados em 0 e 14 dias. Esplenócitos de 2 semanas após último reforço foram incubados com antígeno respectivo durante 72 horas e sobrenadantes de cultura testados para IFN- γ por ELISA (Figura 13A).

[000194] Camundongos C57bl/6 foram intramuscularmente injetados com OVA (20 µg) com ou sem CpG ODN 2455, CPG 10103 ou ODN de controle de não CpG 2137 a 10 µg. Os camundongos foram injetados em 0, 7 e 21 dias. Esplenócitos de 1 semana após último reforço foram incubados com antígeno respectivo durante 72 horas e sobrenadantes de cultura testados para IFN- γ por ELISA (Figura 13B).

Resultados e Discussão

[000195] CPG 10103 e CPG 24555 têm sequências de nucleotídeo idênticas exceto para a reversão do 3' ' mais dinucleotídeo de CG presente em CPG 10103 em GC em CPG 24555 resultando em eliminação de um motivo de CpG em CPG 24555. Com base em relatórios prévios, determinado a mesma sequência de flanqueamento, local de motivo e espaçamento, um número aumentado de motivos de CPG deveria levar a estímulo imune aumentado. Com base no conhecimento anterior, foi esperado que CPG 24555 seria menos imunoestimulador do que CPG 10103 e menos eficazes como um adjuvante de vacina. Entretanto, os resultados acima demonstram que CPG 24555 tem potencial de imunoestimulador similar ou maior e atividade de adjuvante comparada a CPG 10103.

Exemplo 3

[000196] Comparação de CPG 10103, CPG 24555 e CPG 7909 como um Adjuvante de Vacina para Antígeno de Influenza Hemaglutinina (HA) em Camundongos BALB/C

Métodos e Materiais

[000197] Camundongos BALB/c fêmeas (10/gp), foram imunizados por injeção intramuscular (IM) no músculo anterior tibial esquerdo (TA) com Influenza A hemaglutinina (HA) de Texas 1/77, H3N2(1 µg) ± CpG ou ODN de controle (10 mg) ± alume (25 mg Al³⁺) em um volume total de 50 µl. Camundongos foram sangrados em intervalos de tempo diferentes após imunização para avaliar resposta de anticorpo específica de HA. Metade dos animais por grupo foram eutanizados em 6 semanas após imunização para avaliar respostas imunes mediadas por célula (CTL, secreção de IFN-γ específica de HA e análise citométrica de fluxo de secreção de citocina de célula T).

Tabela 3

Reagente	Fonte, Lote N°	Conc. de matéria prima	Conc. final
Antígeno de Influenza A (Texas 1/77 H3N ₂)	Microbix Biosystems Inc. 13037A8	1,0 mg/ml	0,02 mg/ml
Alume (Al ³⁺) Alidrogel "85"2%	Cedarlane 85339	10,4 mg/ml	0,5 mg/ml
CPG 7909	Coley, Lot ACZ-03I-016-M	37,15mg/ml	0,2 mg/ml
CPG 24555 (da mesma forma conhecido como CPG 10103_GC4)	Avecia, Lot#ASD-A0218-157 [rotulado como CPG 10103]	17,75	0,2 mg/ml
CPG 10103	Dow Chemical, Lot #MM021230	24,51 mg/ml	0,2 mg/ml
ODN de Controle 2137	Coley, Lot #008	22,18 mg/ml	0,2 mg/ml
PBS	Sigma (P4244) Lot #096K6064	N/A	N/A

Resultados e Discussão

Anti-HA em 6 Semanas Pós Imunização

[000198] Em 6 semanas após imunização, a quantidade de anti-HA foi medida. CPG 24555 foi superior a CPG 10103 e CPG 7909 aumentando-se IgG específico de HA (Figura 14).

Inibição de Hemaglutinação (HIA) Títulos em 4 Semanas Pós Imunização

[000199] A funcionalidade dos anticorpos foi avaliada usando um ensaio de inibição de hemaglutinação (HIA). Quando usado apenas como adjuvante, CPG 24555 foi superior a CPG 10103 ($p=0,009$) e igual a CPG 7909 ($p=0,1$) para aumentar títulos de HIA (Figura 15). Todo 3 CpG ODN testados foram iguais para aumentar títulos de HIA quando usados em combinação com alume.

Secreção de $IFN\gamma$ específico de HA

[000200] A concentração de $IFN\gamma$ segregada foi medida. CPG 24555 quando usou apenas como um adjuvante foi superior a CPG 10103 para aumentar secreção de $IFN-\gamma$ específica de HA (marcador de imunidade mediada por célula) (Figura 16). Quando usado em combinação com alume, CPG 24555 foi superior a CPG 10103 e CPG 7909 para aumentar secreção de $IFN-\gamma$ específica de HA (Figura 16).

Exemplo 4

[000201] Comparação de CPG 24555 e CPG 7909 como um Adjuvante de Vacina para Antígeno de Superfície de Hepatite B (HBsAg) em Macacos Cinomolgos

Materiais e Métodos

[000202] Macacos Cinomolgos (3-5 anos; 2,5 a 5,5 kg; $n=5/gp$; exceto para $n=4$ em grupo HBsAg + IMX) foram imunizados intramuscularmente (0,6 ml de injeção de IM no quadríceps direito) com:

- 1) Engerix-B (dose pediátrica; 10 mg de HBsAg)

2) Engerix-B + CPG 7909 (0,5 mg)

3) Engerix-B + CPG 24555 (0,5 mg)

[000203] Animais receberam 3 imunizações; na semana 0 (principal), 4 (reforço 1) e 8 (reforço 2). Os animais foram sangrados 4 semanas pré-principal, pós-principal (semana 4), 2 semanas após reforço 1 (semana 6), 4 semanas após reforço 1 (semana 8) e 2 semanas após reforço 2 (semana 10).

Ensaio imunes específicos de HBsAg foram executados como segue:

1) Título de anticorpo e avidéz

2) Secreção de citocina intracelular (IL-2, IFN- γ , TNF- α)

3) Células T Polifuncionais

4) Ensaio ELISPOT: IL2, TNF- α , IFN- γ , Perforin

Resultados e Discussão

Respostas Humorais

[000204] Uma possibilidade de exposição prévia de animais neste estudo para vírus da hepatite B foi evidente por nível alto de títulos de anticorpo específico de HBsAg detectado em pré-vacinação. Além disso, um animal na remessa testada positivo para HBV por sorologia sugerindo possível exposição a HBV. Entretanto, todos os animais usados neste estudo testaram negativo para HBV por PCR. Houve um aumento em título anti-HBsAg com cada reforço. A adição de CpG para títulos de anticorpo específicos de HBsAg realçados por Engerix-B comparado quando Engerix-B foi usado sozinho (Figura 17). Além disso, adição de CpG realçou avidéz de anticorpo comparada quando Engerix-B foi usado sozinho (Figura 18). CPG 24555 foi igual a CPG 7909 aumentando-se igualmente título de anticorpo e avidéz.

Respostas de Célula T: Secreção de Citocina Intracelular por Células CD4 T

[000205] A adição de CpG para Engerix-B tendeu a aumentar a frequência de IFN- γ mediado por célula CD4 T e TNF- α porém não

secreção de IL-2 (Figura 19A, B e C). Total, CPG 24555 foi igual a ou melhor do que CPG 7909 para a indução de citocinas mediadas por CD4.

Respostas de Célula T: Células CD4 T Poli Funcionais; Análise Quantitativa

[000206] O número de células segregando uma, duas ou três citocinas foi medido na semana 10 (2 semanas após reforço 2). CPG 24555 foi igual a CPG 7909 induzindo-se célula CD4 T específica de Engerix-B segregando um citocina. Nível total, relativamente baixo de células CD4 T produtoras de citocina tripla foram detectadas. Entretanto, CPG 24555 induziu citocina tripla mais alta produzindo células CD4 T do que CPG 7909 ou Engerix-B apenas (Figura 20A). Além disso, animais imunizados com Engerix-B + CPG 24555 teve uma proporção mais alta de citocina tripla produzindo células T comparadas a animais imunizados com Engerix-B apenas ou Engerix-B + CPG 7909 (Figura 20B).

Respostas de Célula T: células CD4 T poli funcionais; Análise Qualitatitva

[000207] O número de células segregando IL-2, IFN- γ e TNF α , ou combinações destas citocinas, foi medido. CPG 24555 foi igual a ou melhor do que CPG 7909 para induzir células T polifuncionais (Figura 21A e Figura 21B).

Respostas de Célula T: Poli-Funcionalidade de células CD4 T

[000208] A proporção de células CD4 T produtoras de citocina tripla foi medida em 2 semanas após reforço 2. Uma proporção mais alta de células CD4 T produtoras de citocina tripla foi observada com CPG 24555 do que com CPG 7909 (Figura 22).

Conclusões

[000209] Com base nos dados, eliminação do motivo de CpG 3' em CPG 24555 não teve qualquer impacto negativo em sua capacidade de aumentar respostas imunes específicas de antígeno e mostrou

aumento igual ou melhor de respostas imunes adaptáveis em comparação a CPG 10103 e CPG 7909. Atividade de adjuvante de CPG 24555 vista com antígenos múltiplos em camundongos foi da mesma forma traduzida em humanos não primatas com CPG 24555 exibindo igual (imunidade humoral) ou superior (células T poli funcionais específicas de Ag) atividade de adjuvante para CPG 7909 com antígeno de superfície de hepatite B em macacos cinomolgos.

[000210] Aqueles versados na técnica reconhecerão, ou serão capazes de averiguar usando não mais do que experimentação de via, muitos equivalentes das modalidades específicas da invenção descritas aqui. Tais equivalentes são pretendidos ser abrangidos pelas seguintes reivindicações.

REIVINDICAÇÕES

1. Oligonucleotídeo imunoestimulador, caracterizado pelo fato de que compreende a sequência de nucleotídeo

5' TCGTCGTTTTTCGGTGCTTTT 3' (SEQ ID NO:1).

2. Oligonucleotídeo imunoestimulador, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o oligonucleotídeo compreende uma ou mais ligações modificadas.

3. Oligonucleotídeo imunoestimulador, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o oligonucleotídeo compreende uma ou mais ligações de fosforotioato.

4. Oligonucleotídeo imunoestimulador, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que as ligações de internucleotídeo do oligonucleotídeo são ligações de fosforotioato.

5. Oligonucleotídeo imunoestimulador, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que o oligonucleotídeo compreende pelo menos um análogo de nucleotídeo substituído lipofílico e um dinucleotídeo de pirimidina-purina.

6. Oligonucleotídeo imunoestimulador, caracterizado pelo fato de que consiste na sequência de nucleotídeo

5' TCGTCGTTTTTCGGTGCTTTT 3' (SEQ ID NO:1).

7. Oligonucleotídeo imunoestimulador, caracterizado pelo fato de que consiste em

5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*T*G*C*T*T*T*T 3'

em que * indica a ligação de fosforotioato.

8. Vacina, caracterizada pelo fato de que compreende um antígeno e um oligonucleotídeo imunoestimulador como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 7, compreendendo ainda um veículo farmacêuticamente aceitável.

9. Vacina, de acordo com a reivindicação 8, caracterizada

pelo fato de que o oligonucleotídeo imunoestimulador está presente em uma quantidade eficaz para induzir uma resposta imune específica ao antígeno.

10. Vacina, de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que a resposta imune específica ao antígeno induzida é uma resposta imune Th1.

11. Vacina, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 10, caracterizada pelo fato de que o antígeno é um antígeno microbiano, um autoantígeno ou uma substância viciante.

12. Vacina, de acordo com a reivindicação 11, caracterizada pelo fato de que o antígeno microbiano é um antígeno bacteriano, um antígeno viral ou um antígeno parasitário.

13. Vacina, de acordo com a reivindicação 12, caracterizada pelo fato de que

o antígeno bacteriano está associado com *Staphylococcus aureus*, uma bactéria que causa cárie dentária, ou uma bactéria que causa doença periodontal;

o antígeno viral está associado com vírus Sincicial Respiratório (VSR), vírus do herpes simples 1, vírus do herpes simples 2, Vírus da Imunodeficiência Humana-1 (HIV-1) ou HIV-2, ou

o antígeno parasitário está associado com um parasita que causa malária.

14. Vacina, de acordo com a reivindicação 11, caracterizada pelo fato de que o autoantígeno é um antígeno tumoral, um antígeno associado com Doença de Alzheimer, um antígeno contra um anticorpo humano, um antígeno que é expresso a partir de elementos retrovirais endógenos humanos, ou um hapteno de nicotina conjugado a um veículo.

15. Vacina, de acordo com a reivindicação 14, caracterizada pelo fato de que

o antígeno tumoral é HER2, MAGE, NY-ESO, PSA, CEA ou uma forma variante de EGFR;

o antígeno associado com Doença de Alzheimer é tau ou β -amiloide;

o antígeno é IgE; ou

o veículo ao qual o hapteno de nicotina é conjugado é toxina de difteria (DT).

16. Vacina, de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que o antígeno é um peptídeo, uma proteína recombinante, uma proteína purificada, patógenos mortos completos, vírus atenuado vivo ou vetor viral, bactérias atenuadas vivas ou um vetor bacteriano, um polissacarídeo, um hapteno, ou codificado por DNA de plasmídeo.

17. Vacina, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 16, caracterizada pelo fato de que o antígeno é conjugado a um veículo.

18. Vacina, de acordo com a reivindicação 17, caracterizada pelo fato de que o veículo é toxina da difteria (DT) ou uma partícula semelhante a vírus, em que a partícula semelhante a vírus é fago de RNA Q- β , antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg), ou antígeno do núcleo da hepatite B (HBcAg).

19. Vacina, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 18, caracterizada pelo fato de que compreende, adicionalmente, um ou mais adjuvantes.

20. Vacina, de acordo com a reivindicação 19, caracterizada pelo fato de que o adjuvante é um sal de alumínio, um complexo imunoestimulante (ISCOM), uma emulsão de óleo-em-água ou água-em-óleo, um lipossoma ou um sistema de liberação.

21. Vacina, de acordo com a reivindicação 20, caracterizada pelo fato de que o sal de alumínio é hidróxido de alumínio.

22. Vacina, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 21, caracterizada pelo fato de que

a vacina é formulada para administração por uma via parenteral, em que a via parental é intramuscular, subcutânea, intradérmica, intravenosa ou intraperitoneal; ou

a vacina é formulada para administração por uma via tópica, em que a via tópica é a pele, transdérmica ou uma superfície mucosal.

23. Vacina, de acordo com a reivindicação 22, caracterizada pelo fato de que a via mucosal é oral, intranasal, intravaginal, intrarretal, intrabucal ou intraocular.

24. Oligonucleotídeo imunoestimulador, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que é para uso como adjuvante em uma vacina.

25. Uso de um antígeno e um oligonucleotídeo imunoestimulador compreendendo sequência de nucleotídeo 5' TCGTCGTTTTTCGGTGCTTTT 3' (SEQ ID NO:1), caracterizado pelo fato de ser para a preparação de uma vacina para induzir uma resposta imune específica ao antígeno em um indivíduo em necessidade do mesmo.

26. Uso, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que o antígeno é um antígeno microbiano, um autoantígeno ou uma substância viciante.

27. Uso, de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que o dito antígeno microbiano é um antígeno bacteriano, um antígeno viral ou um antígeno parasitário.

28. Uso, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que o dito antígeno bacteriano está associado com *Staphylococcus aureus*, está associado com uma bactéria que causa cárie dentária, ou está associado com uma bactéria que

causa doença periodontal.

29. Uso, de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que o dito autoantígeno é um antígeno tumoral, um antígeno associado com Doença de Alzheimer, um antígeno contra um anticorpo humano, ou um antígeno que é expresso a partir de elementos retrovirais endógenos humanos.

30. Uso, de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que o antígeno tumoral é HER2, MAGE, NY-ESO, PSA, CEA ou uma forma variante de EGFR.

31. Uso, de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que o dito antígeno associado com Doença de Alzheimer é tau ou β -amiloide.

32. Uso, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que o antígeno é IgE.

33. Uso, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que o antígeno é hapteno de nicotina conjugado a um veículo.

34. Uso, de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que o veículo ao qual o hapteno de nicotina é conjugado é toxina da difteria (DT).

35. Uso, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que o antígeno é um peptídeo, uma proteína recombinante, uma proteína purificada, patógenos mortos completos, vírus atenuado vivo ou vetor viral, bactérias atenuadas vivas ou um vetor bacteriano, um polissacarídeo, um hapteno, ou codificado por DNA de plasmídeo.

36. Uso, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que o antígeno é conjugado a um veículo.

37. Uso, de acordo com a reivindicação 36, caracterizado pelo fato de que o dito veículo é uma partícula semelhante a vírus.

38. Uso, de acordo com a reivindicação 37, caracterizado pelo fato de que a dita partícula semelhante a vírus é fago de RNA Q- β , antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg), ou antígeno do núcleo da hepatite B (HBcAg).

39. Uso, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que o oligonucleotídeo imunoestimulador compreende uma ou mais ligações modificadas.

40. Uso, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que o oligonucleotídeo imunoestimulador compreende uma ou mais ligações de fosforotioato.

41. Uso, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que todas as ligações de internucleotídeo do oligonucleotídeo são ligações de fosforotioato.

42. Uso, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que o dito indivíduo é um humano.

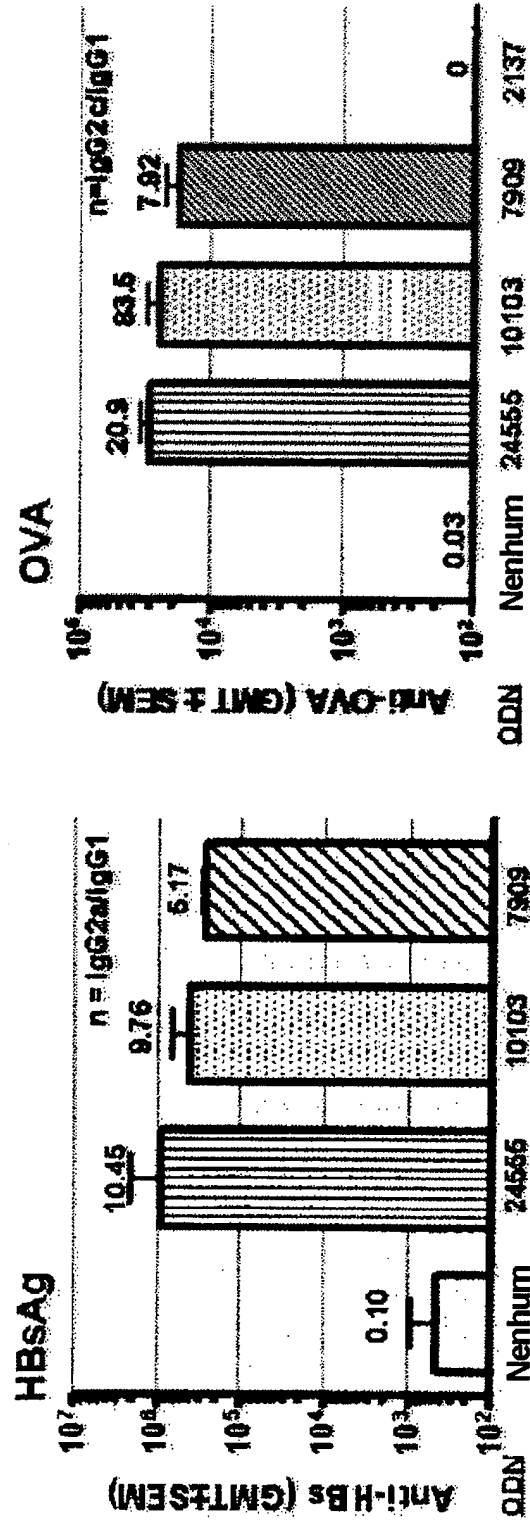


Figura 1

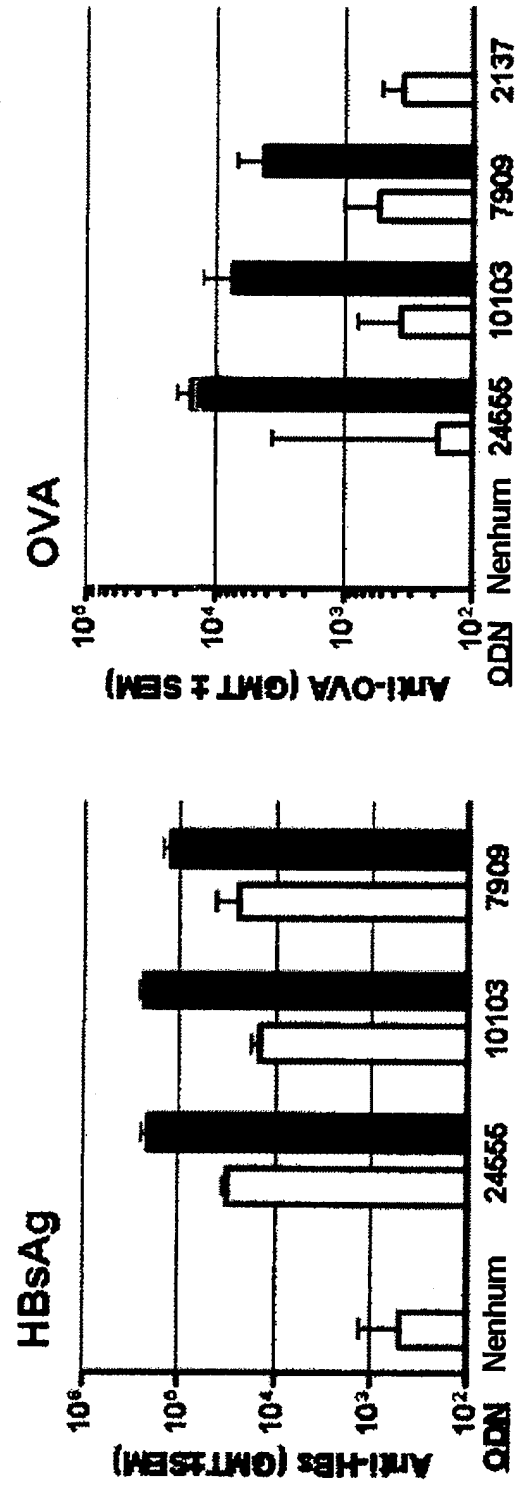


Figura 2

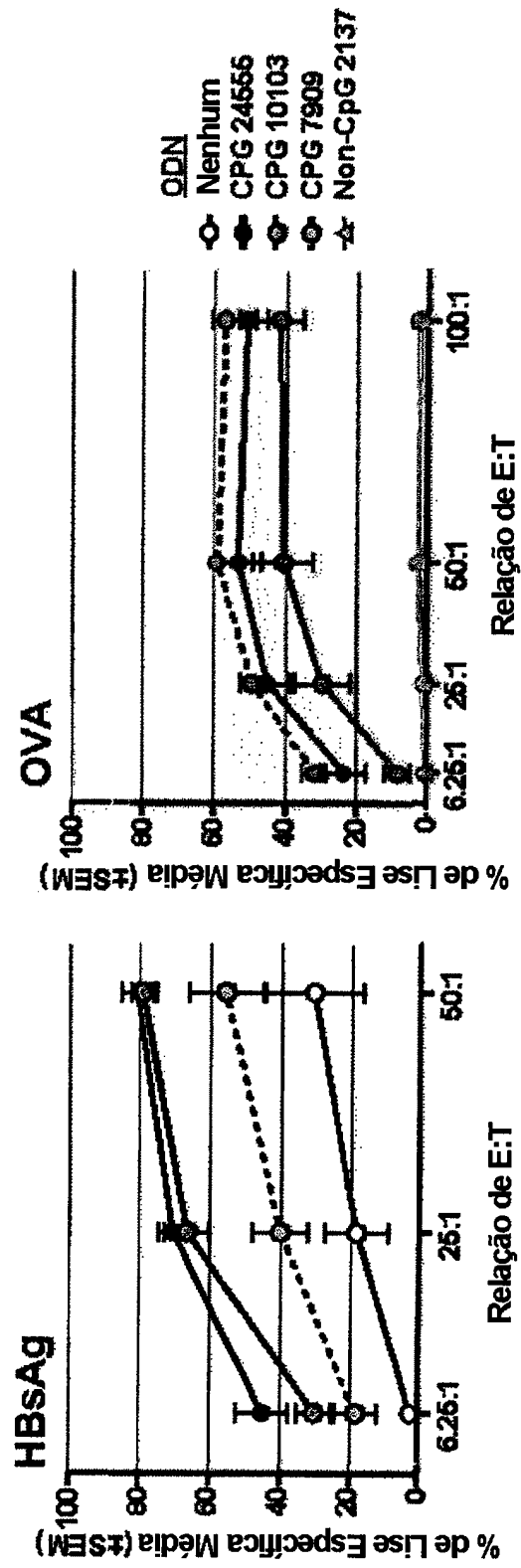


Figura 3

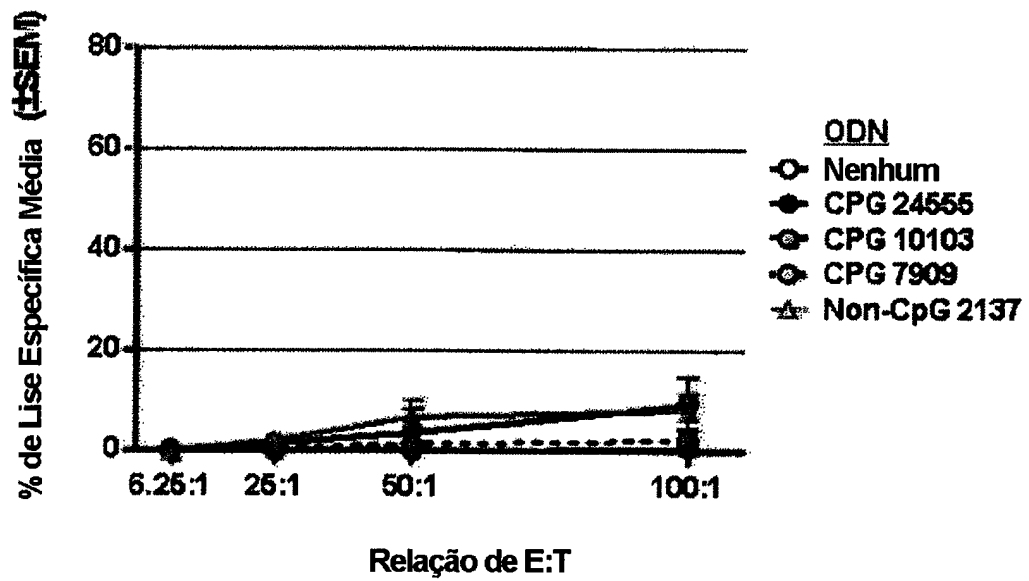


Figura 4

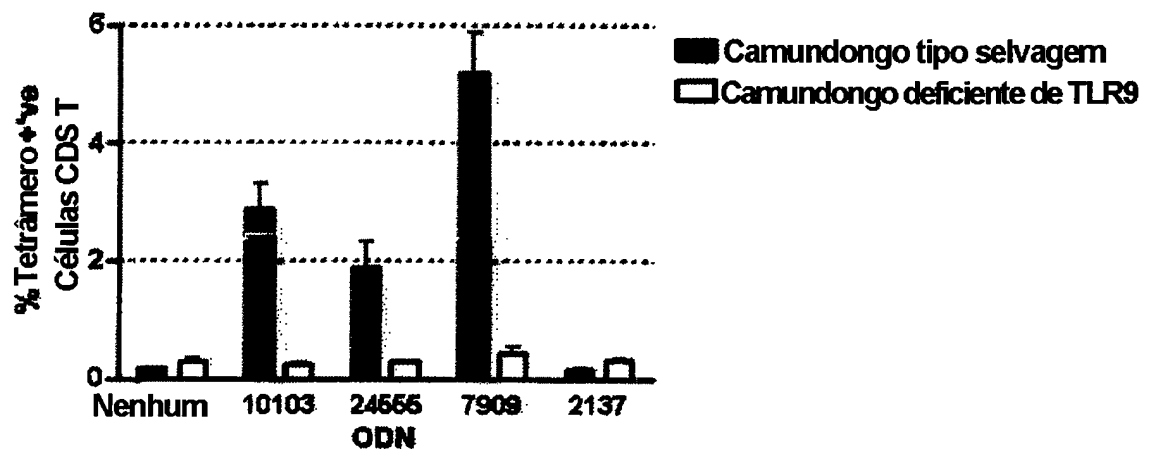


Figura 5

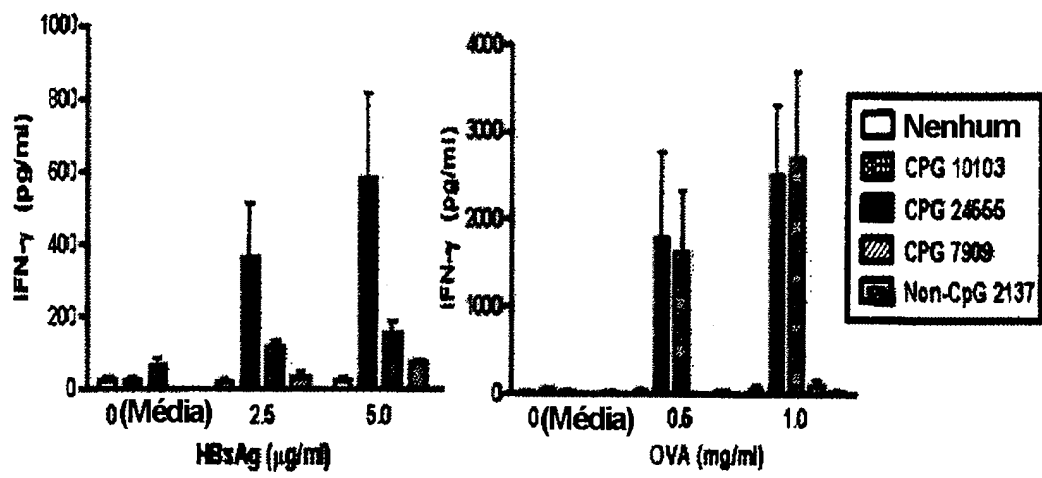


Figura 6

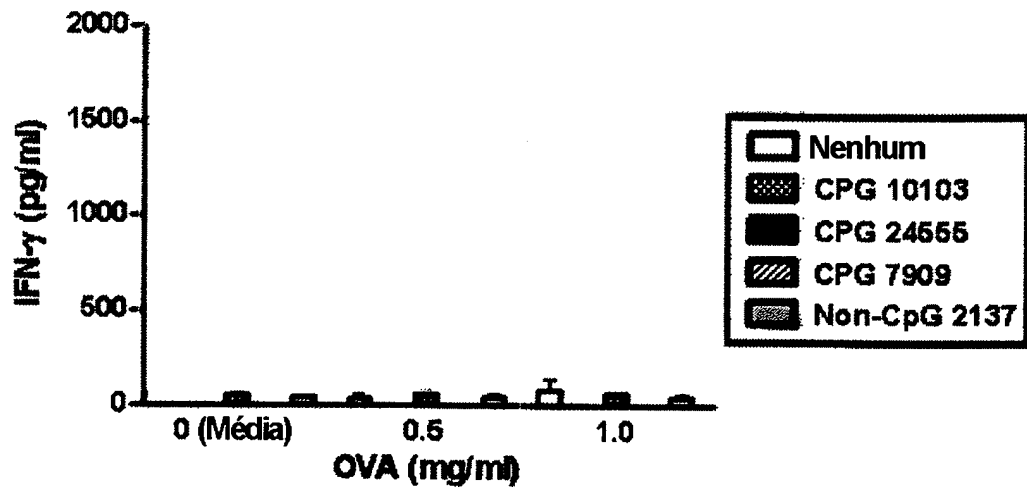


Figura 7

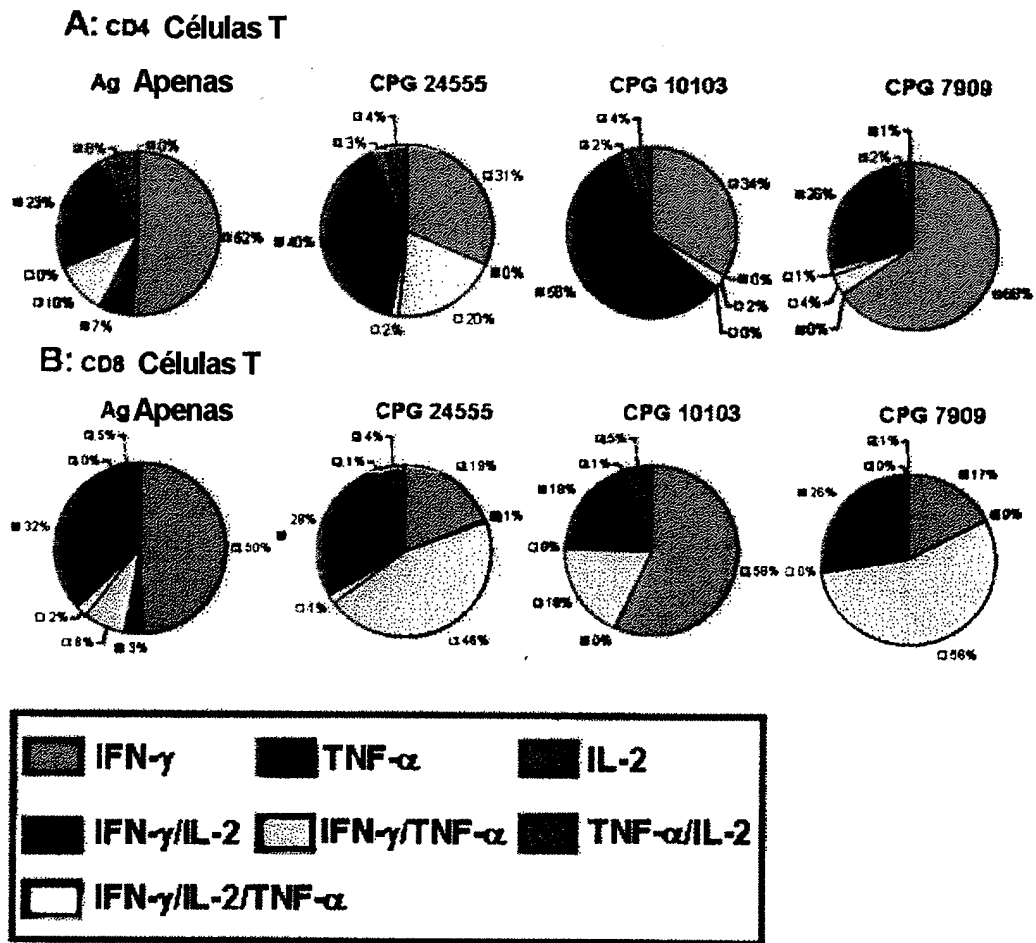


Figura 8

ODN	IFN- α (6 doadores)		MCP-1 (3 doadores)		IP-10 (6 doadores)	
	EC50 (nM)	Max (pg/mL)	EC50 (nM)	Max (pg/mL)	EC50 (nM)	Max (pg/mL)
CPG 10103	410	840	460	13,850	570	520
CpG 24555	310	800	390	17,990	220	490
Non-CpG ODN 22881	1,570	200	1,170	840	330	100

Figura 9A

ODN	IL-6 (5 doadores)		IL-10 (6 doadores)		IL-2R (3 doadores)	
	EC50 (nM)	Max (pg/mL)	EC50 (nM)	Max (pg/mL)	EC50 (nM)	Max (pg/mL)
CPG 10103	120	330	120	120	390	170
CpG 24555	190	450	100	160	190	200
Non-CpG ODN 22881	210	210	140	20	250	140

Figura 9B

Figura 10A

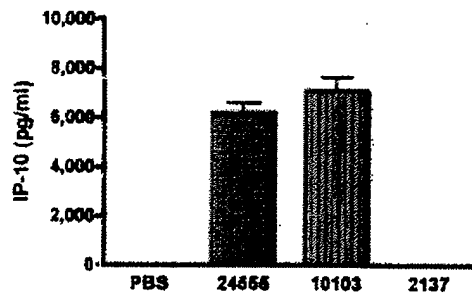


Figura 10B

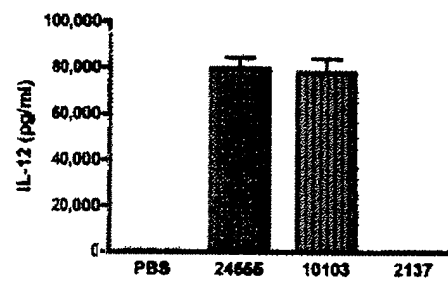


Figura 10C

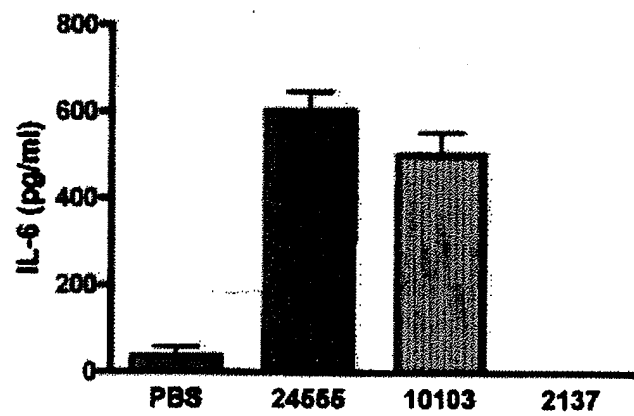


Figura 11A

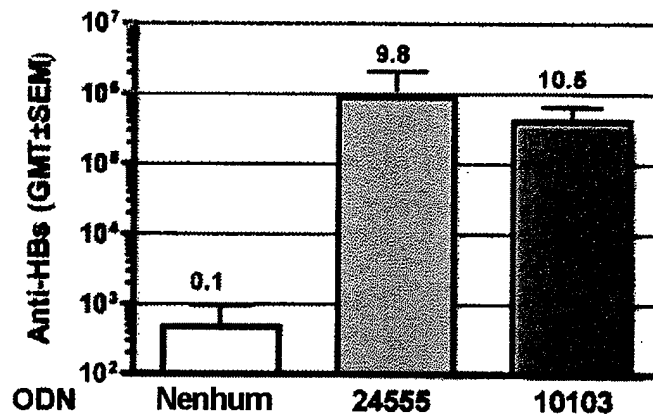


Figura 11B

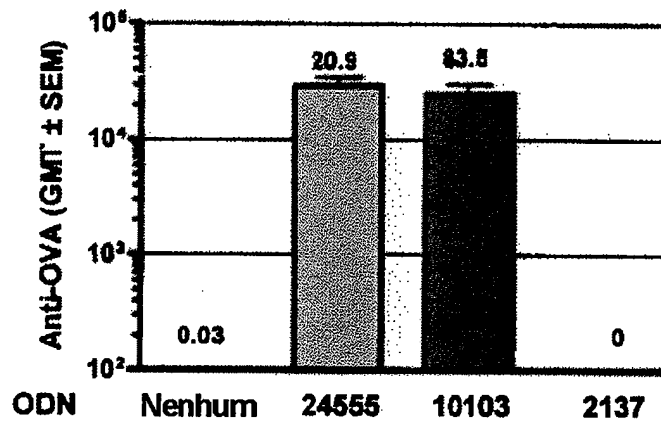


Figura 11C

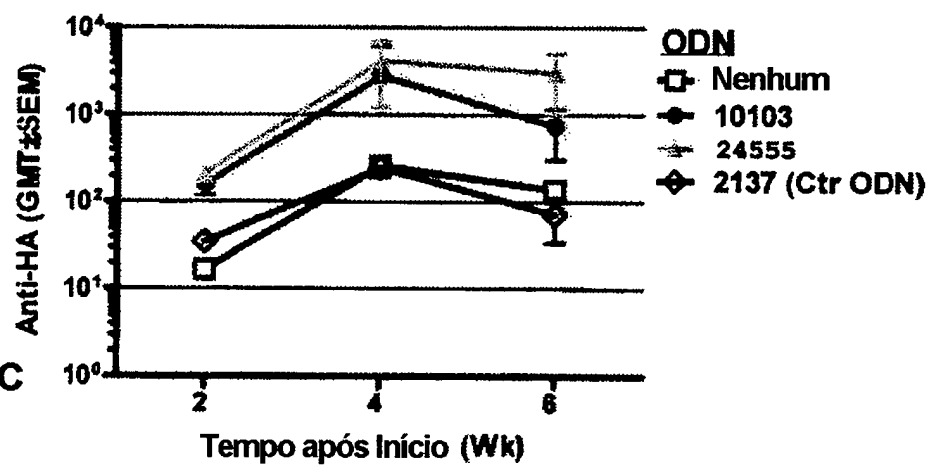


Figura 12A

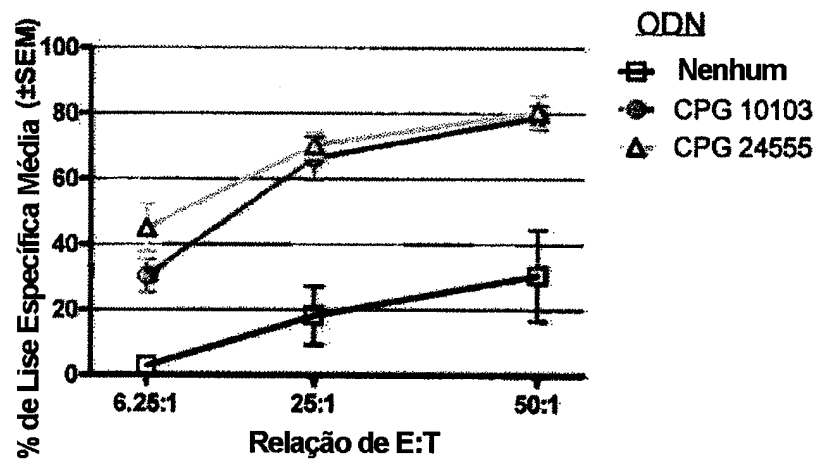


Figura 12B

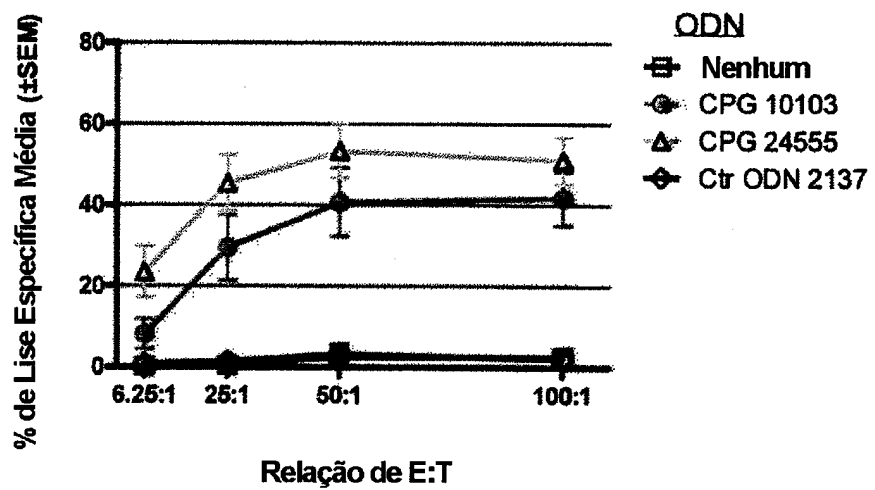


Figura 13A

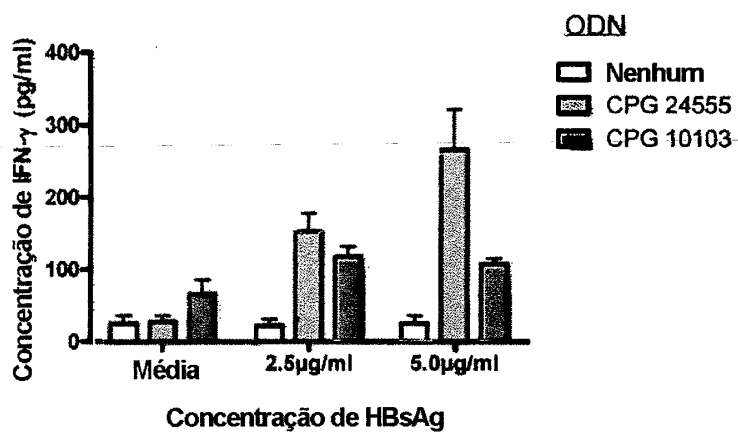
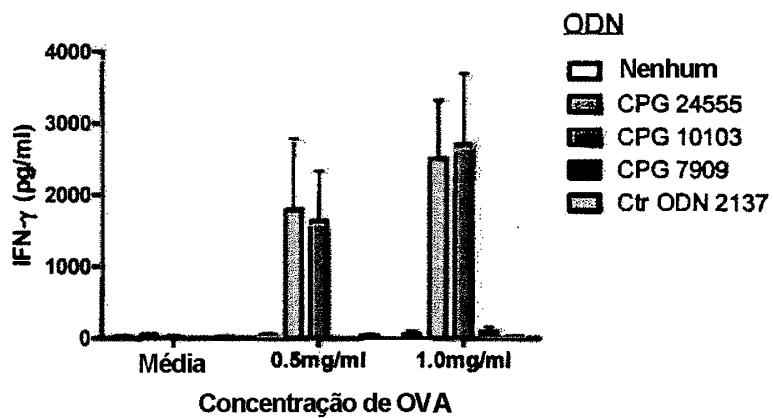


Figura 13B



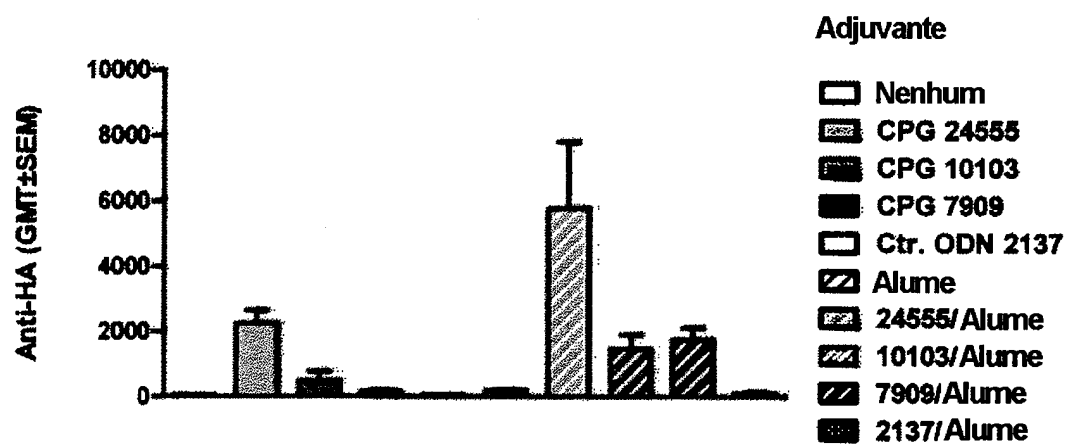


Figura 14

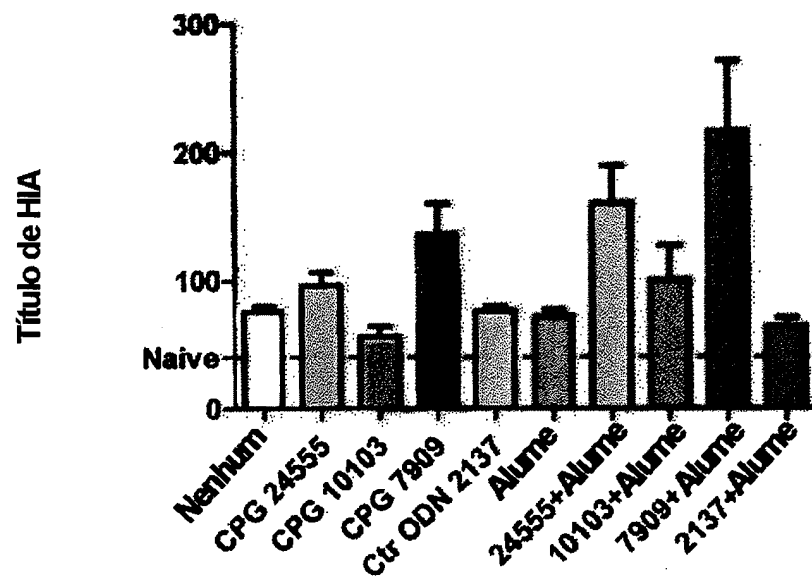


Figura 15

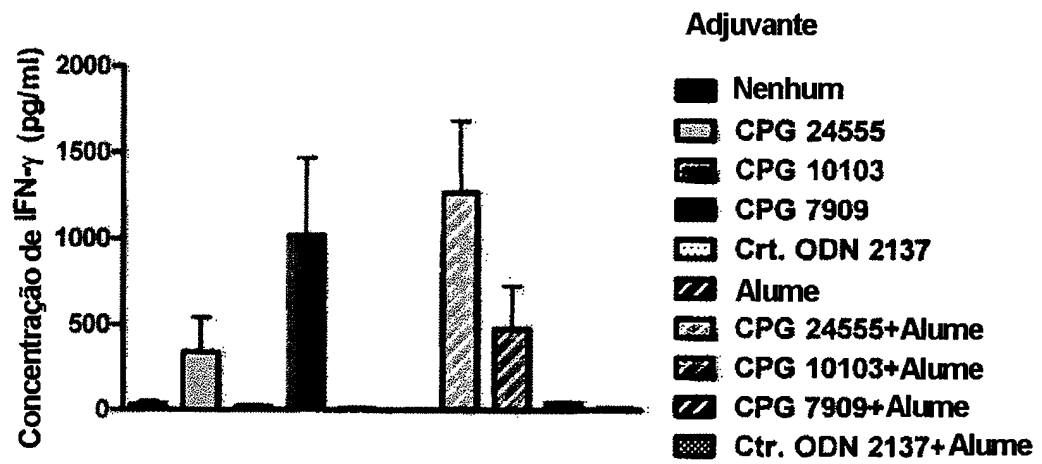


Figura 16

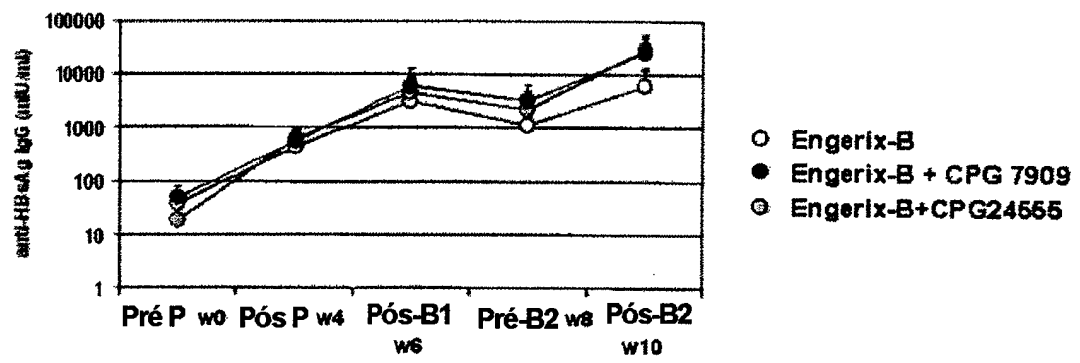


Figura 17

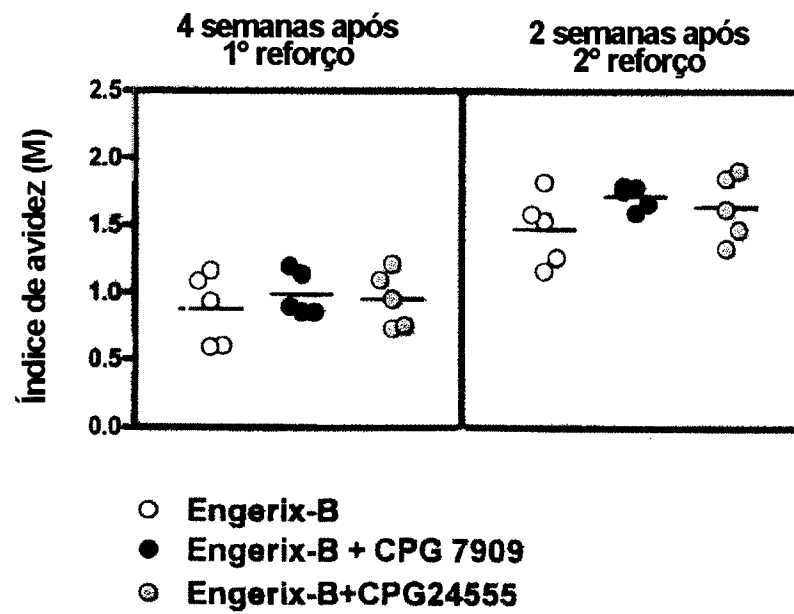


Figura 18

Figura 19A

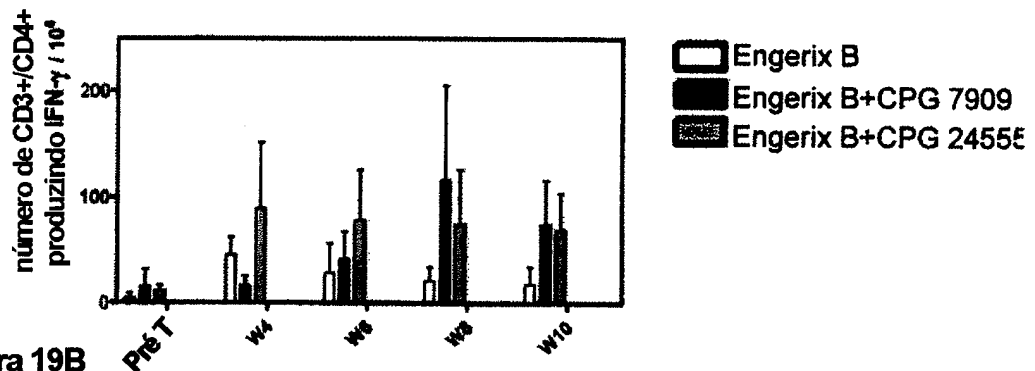


Figura 19B

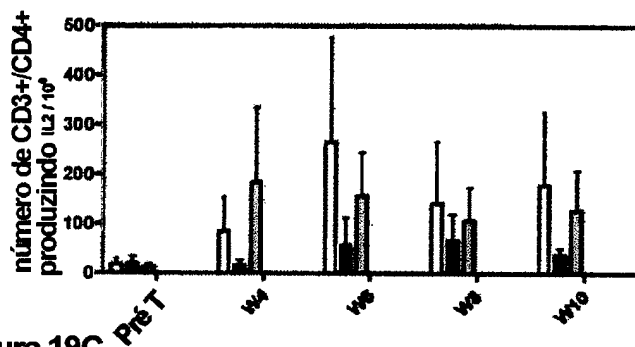


Figura 19C

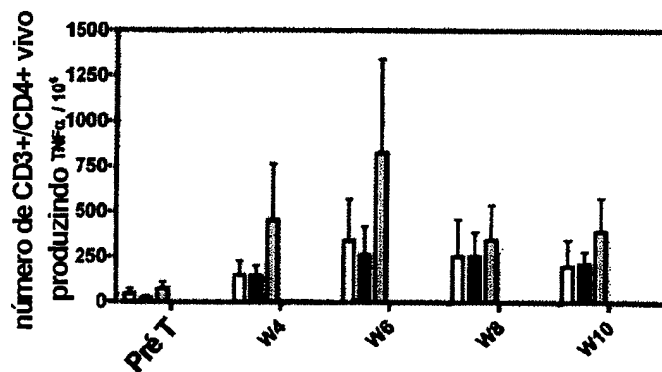


Figura 20A

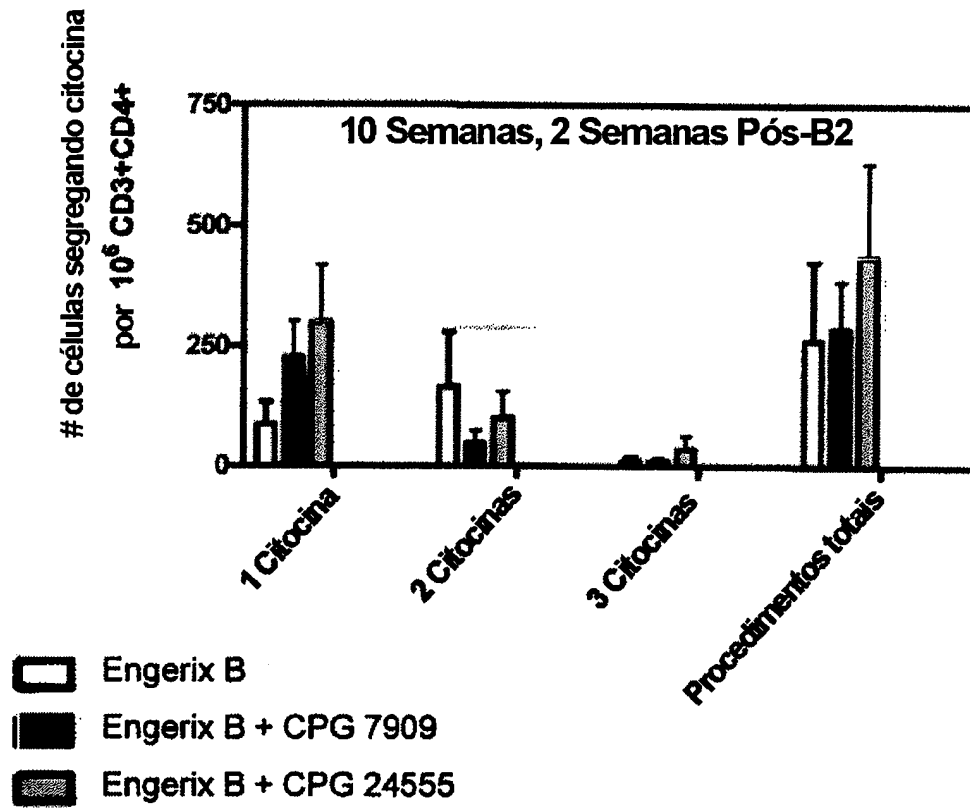


Figura 20B

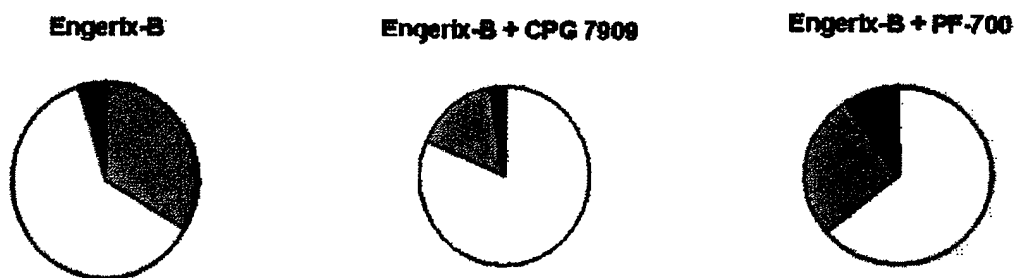


Figura 21A

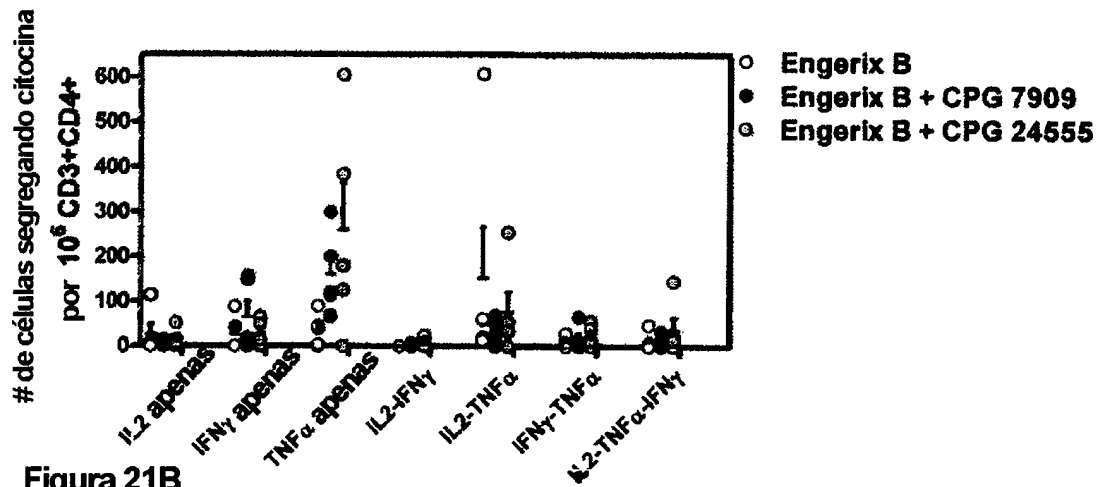


Figura 21B

