

(11) Número de Publicação: **PT 1794174 E**

(51) Classificação Internacional:

**C12N 15/117** (2011.01) **C07H 21/00** (2011.01)  
**A61K 31/7115** (2011.01)    **A61K 31/7088**  
(2011.01)

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

(22) Data de pedido: **2005.08.24**

(30) Prioridade(s): **2004.09.01 US 606833 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2007.06.13**

(45) Data e BPI da concessão: **2012.06.06**  
**157/2012**

(73) Titular(es):

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

(72) Inventor(es):

**FRANCK BARRAT** US  
**ROBERT L. COFFMAN** US

(74) Mandatário:

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

(54) Epígrafe: **MÉTODOS E COMPOSIÇÕES PARA INIBIÇÃO DE RESPOSTAS IMUNITÁRIAS INATAS E AUTO-IMUNIDADE**

(57) Resumo:

O INVENTO PROPORCIONA POLINUCLEÓTIDOS IMUNO-REGULADORES E MÉTODOS PARA IMUNO-REGULAÇÃO DE INDIVÍDUOS UTILIZANDO OS POLINUCLEÓTIDOS IMUNO-REGULADORES.

RESUMO

**"Métodos e composições para inibição de respostas imunitárias inatas e auto-imunidade"**

O invento proporciona polinucleótidos imuno-reguladores e métodos para imuno-regulação de indivíduos utilizando os polinucleótidos imuno-reguladores.

DESCRIÇÃO

**"Métodos e composições para inibição de respostas imunitárias inatas e auto-imunidade"**

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

Este pedido reivindica o benefício do Pedido de Patente Provisória U.S. com o Nº. de Série 60/606833, apresentado a 1 de Setembro de 2004.

CAMPO TÉCNICO

O presente invento refere-se a um oligonucleótido para utilização na inibição de uma resposta imunitária dependente de TLR7/8 num indivíduo, em que o oligonucleótido tem menos de cerca de 200 bases ou pares de bases e o oligonucleótido compreende uma sequência imuno-reguladora, em que a sequência imuno-reguladora, compreende pelo menos uma sequência trinucleotídica TGC na extremidade 5' do oligonucleótido.

ANTECEDENTES DO INVENTO

A imunidade pode ser geralmente classificada como imunidade inata ou como imunidade adaptativa. As respostas imunitárias inatas tipicamente ocorrem imediatamente após infecção para proporcionar uma barreira inicial a doenças infecciosas enquanto as respostas imunitárias adaptativas ocorrem mais tarde com a geração de células efectoras específicas do抗原 e frequentemente imunidade protectora de longo prazo. As respostas imunitárias inatas não geram imunidade protectora duradoura, mas parecem desempenhar um papel na geração da resposta imunitária adaptativa que surge mais tarde.

A imunidade inata utiliza receptores codificados na linha germinativa para reconhecer características que são comuns a muitos patogénios e para activar eventos de sinalização que resultam na expressão de moléculas efectoras. Algumas destas moléculas efectoras podem, eventualmente, induzir uma resposta imunitária adaptativa. A família de receptores semelhantes a Toll (TLR) tem sido associada à sinalização da resposta imunitária inata e foram

identificados ligandos microbianos para vários TLR de mamífero. Por exemplo, TLR2 interage com peptidoglicano, lipopéptidos bacterianos e certos tipos de lipopolissacárido (LPS), TLR3 interage com ARN de cadeia dupla, TLR4 interage com LPS e TLR-5 interage com flagelina bacteriana. Ver, por exemplo, Poltorak *et al.* (1998) *Science* 282: 2085-2088; Akira *et al.* (2003) *Immunol. Lett.* 85: 85-95; Alexopoulou *et al.* (2001) *Nature* 413: 732-738; Hayashi *et al.* (2001) *Nature* 410: 1099-1103. TLR-7 é activado por análogos de guanosina, através de pequenos compostos antivirais como imidazoquinolinas, imiquimod e R-848, e através de ARN viral de cadeia simples, e TLR-8 também é activado através de R-848 e ARN viral de cadeia simples. Ver, por exemplo, Lee *et al.* (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 100: 6646-6651; Hemmi *et al.* (2002) *Nat. Immunol.* 3: 196-200; Jurk *et al.* (2002) *Nat. Immunol.* 3: 499; Heil *et al.* (2004) *Science* 303: 1526-1529; Diebold *et al.* (2004) *Science* 303: 1529-1531. Tem sido demonstrado que TLR-9 reconhece moléculas de ácido nucleico imuno-estimulador tais como ADN bacteriano e ADN imuno-estimulador contendo uma sequência 5'-CG-3'. Ver, por exemplo, Hemmi *et al.* (2000) *Nature* 408: 740-745; Bauer *et al.* (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 98: 9237-9242; Takeshita *et al.* (2001) *J. Immunol.* 167: 3555-3558. Além disso, certos TLR (por exemplo, TLR-1, TLR-2 e TLR-6) podem heterodimerizar, interagir com os seus ligandos microbianos e conduzir a activação de células, expandindo assim o repertório de ligandos da família TLR. Ozinsky *et al.* (2000) *J. Endotoxin Res.* 6: 393-396; Ozinsky *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 13766-13771.

Moléculas de ácido nucleico imuno-estimulador (ISNA), tais como ADN bacteriano ou um polinucleótido contendo sequências 5'-CG-3' não metiladas, podem estimular respostas imunitárias inatas, tais como a produção de citocinas, e a activação de células dendríticas e macrófagos, e depois conduzir a uma resposta imunitária de tipo Th1. As moléculas de ácido nucleico imuno-estimulador estimulam a resposta imunitária através da interacção com, e sinalização através do, receptor TLR9 de mamífero. Hemmi *et al.* (2000), *Supra*. O ADN de mamífero não possui geralmente actividade imuno-estimuladora, devido a aparentemente uma baixa frequência de sequências CG e à maioria das sequências CG possuir uma

citosina metilada. As células do sistema imunitário de mamífero parecem assim distinguir ADN bacteriano de ADN do ADN próprio através do receptor TLR9.

Moléculas de ácido nucleico imuno-estimuladores têm sido implicadas na patogénese da artrite. Foi demonstrado que um ácido nucleico imuno-estimulador desempenha um papel na activação de células B auto-reactivas, tais como aquelas que produzem uma classe de auto-anticorpos conhecidos como factor reumatóide (RF). Assim, tais ácidos nucleicos imuno-estimuladores parecem desempenhar um papel na auto-imunidade sistémica. Além disso, o ácido nucleico imuno-estimulador pode aumentar a toxicidade de LPS e contribuir para efeitos adversos da administração de vectores para terapia génica. Ver, por exemplo, Deng *et al.* (1999) *Nature Med.* 5: 702-705, Leadbetter *et al.* (2002) *Nature* 416: 603-607, Cowdery *et al.* (1996) *J. Immunol.* 156: 4570-4575, Pat. U.S. No. 6225292.

Continua a existir a necessidade de identificar estratégias para controlar a activação imunitária indesejada, incluindo a activação indesejada da resposta imunitária inata.

#### DIVULGAÇÃO DO INVENTO

O invento refere-se a um oligonucleótido para utilização na inibição de uma resposta imunitária dependente de TLR7/8 num indivíduo, em que o oligonucleótido é inferior a cerca de 200 bases ou pares de bases e o oligonucleótido compreende uma sequência imuno-reguladora, em que a sequência imuno-reguladora compreende pelo menos uma sequência trinucleotídica TGC na extremidade 5' do oligonucleótido.

Num aspecto, a resposta imunitária está associada a uma doença auto-imune. Noutro aspecto, a inibição da resposta imunitária melhora um ou mais sintomas de uma doença auto-imune. A administração de um oligonucleótido de acordo com o invento melhora um ou mais sintomas da doença auto-imune, incluindo LES e artrite reumatóide. Em certas concretizações, o oligonucleótido é para utilização em supressão de um sintoma de LES.

Noutro aspecto, a inibição da resposta imunitária previne ou atrasa o desenvolvimento da doença auto-imune. A administração de um oligonucleótido de acordo com o invento impede ou retarda o desenvolvimento da doença auto-imune.

Noutro aspecto, a resposta imunitária está associada a doença inflamatória. A administração de um oligonucleótido de acordo com o invento melhora um ou mais sintomas da doença ou distúrbio inflamatório. Em certas concretizações, o oligonucleótido é para utilização na melhoria de um sintoma de doença ou distúrbio inflamatório crónico.

Noutro aspecto, a resposta imunitária está associada a estimulação crónica do patogénio. A administração de um oligonucleótido de acordo com o invento suprime a estimulação crónica do patogénio no indivíduo, incluindo a associada à malária e a infecções virais crónicas.

Nalgumas concretizações, os oligonucleótidos para utilização de acordo com o invento inibem uma resposta de uma célula B ou uma célula dendrítica plasmocitóide. Nalgumas concretizações, as respostas imunitárias inibidas pelos oligonucleótidos para utilização de acordo com o invento incluem a inibição da produção de citocinas, tais como IL-6, IL-12, IFN- $\alpha$ , e/ou TNF- $\alpha$ , pela célula, inibição da maturação da célula e/ou inibição da proliferação celular. São aqui descritas composições que inibem uma resposta celular dependente de TLR9, uma resposta celular dependente de TLR7/8, e/ou uma resposta celular dependente de TLR7/8/9.

São também aqui descritos estojos, de preferência para a realização do invento. Os estojos compreendem geralmente um oligonucleótido para utilização de acordo com o invento (geralmente num recipiente adequado), e podem ainda incluir instruções para a utilização do oligonucleótido em imuno-regulação de um indivíduo.

São aqui proporcionados oligonucleótidos para utilização de acordo com o invento compreendendo a sequência 5'-TGCTTGCAAGCTTGCAAGCA-3' (SEQ ID NO:\_\_ (C661)) ou um fragmento desta sequência que inclua, pelo menos, uma porção palindrómica de 10 bases desta. São aqui proporcionados

oligonucleótidos para utilização de acordo com o invento consistindo na sequência nucleotídica 5'-TGCNm-3', em que cada N é um nucleótido, m é um inteiro de 5 a cerca de 50 e a sequência N1-Nm compreende pelo menos um dinucleótido GC (isto é, em que a sequência Nm compreende pelo menos um dinucleótido GC). Nalguns exemplos, o oligonucleótido consiste na sequência nucleotídica 5'-TGCNmA-3'. Noutros exemplos, o oligonucleótido consiste na sequência nucleotídica 5'-TGCNmGCA-3'. São aqui proporcionados oligonucleótidos compreendendo a sequência nucleotídica TGCNmTCCTGGAGGGTTGT-3' (SEQ ID NO:  ), em que cada N é um nucleótido e m é um inteiro de 0 a cerca de 100. Nalguns exemplos do oligonucleótido, a sequência N1-Nm compreende um fragmento da sequência 5'-TTGACAGCTTGACAGCA-3' (SEQ ID NO:  )

São também aqui descritos métodos de regulação de uma resposta imunitária num indivíduo, compreendendo a administração a um indivíduo do oligonucleótido que consiste na sequência nucleotídica 5'-TGCNm-3', em que cada N é um nucleótido, m é um inteiro de 5 a cerca de 50 e a sequência N1-Nm compreende pelo menos um dinucleótido GC, numa quantidade suficiente para regular uma resposta imunitária no referido indivíduo.

São também aqui descritos métodos de regulação de uma resposta imunitária num indivíduo, compreendendo a administração a um indivíduo do oligonucleótido compreendendo a sequência nucleotídica TGCNmTCCTGGAGGGTTGT-3' (SEQ ID NO:  ), em que cada N é um nucleótido e m é um inteiro de 0 a cerca de 100, numa quantidade suficiente para regular uma resposta imunitária no referido indivíduo.

São também aqui descritos métodos de inibição de uma resposta imunitária inata dependente de TLR7/8 num indivíduo, compreendendo a administração a um indivíduo de um oligonucleótido consistindo na sequência nucleotídica 5'-TGCNm-3', em que cada N é um nucleótido, m é um inteiro de 5 a cerca de 50 e a sequência N1-Nm compreende pelo menos um dinucleótido GC, numa quantidade suficiente para suprimir a

produção de citocinas dependente de TLR7/8 no referido indivíduo.

São também aqui descritos métodos de inibição de uma resposta imunitária inata dependente de TLR9 e uma resposta imunitária dependente de TLR7/8 num indivíduo, compreendendo a administração a um indivíduo do oligonucleotídeo consistindo na sequência nucleotídica 5'-TGCNm-3', em que cada N é um nucleotídeo, m é um inteiro de 5 a cerca de 50 e a sequência N1-Nm comprehende pelo menos um dinucleotídeo GC, numa quantidade suficiente para suprimir a produção de citocinas dependente de TLR9 e a produção de citocinas dependente de TLR7/8 no referido indivíduo.

São também aqui descritos métodos de melhoria de um ou mais sintomas de uma doença auto-imune, o método compreendendo a administração de uma quantidade eficaz do oligonucleotídeo compreendendo uma sequência nucleotídica de fórmula: X1GGGX2X3 (SEQ ID NO:\_\_), em que X1, X2, e X3 são nucleotídeos, desde que se X1 = C ou A, então X2X3 não é AA, a um indivíduo possuindo uma doença auto-imune. Nalguns exemplos, a doença auto-imune é seleccionada a partir do grupo que consiste em lúpus eritematoso sistémico (LES) e artrite reumatóide. São aqui proporcionados métodos para melhoria de um ou mais sintomas de uma doença auto-imune, o método compreendendo a administração de uma quantidade eficaz do oligonucleotídeo que consiste na sequência nucleotídica 5'-TGCNm-3', em que cada N é um nucleotídeo, m é um inteiro de 5 a cerca de 50 e a sequência N1-Nm comprehende pelo menos um dinucleotídeo GC, a um indivíduo possuindo uma doença auto-imune. São também aqui descritos métodos para melhoria de um ou mais sintomas de uma doença auto-imune, o método compreendendo a administração de uma quantidade eficaz do oligonucleotídeo compreendendo a sequência nucleotídica TGCNmTCCTGGAGGGTTGT-3' (SEQ ID NO:\_\_), em que cada N é um nucleotídeo e m é um inteiro de 0 a cerca de 100, a um indivíduo possuindo uma doença auto-imune. Nalguns exemplos, a doença auto-imune é seleccionada a partir do grupo que consiste em lúpus eritematoso sistémico (LES) e artrite reumatóide.

São também aqui descritos métodos de prevenção ou retardamento do desenvolvimento de uma doença auto-imune, o método compreendendo a administração de uma quantidade eficaz do oligonucleótido consistindo na sequência nucleotídica 5'-TGCNm-3', em que cada N é um nucleótido, m é um inteiro de 5 a cerca de 50 e a sequência N1-Nm compreende pelo menos um dinucleótido GC, a um indivíduo em risco de desenvolver uma doença auto-imune.

São também aqui descritos métodos de prevenção ou retardamento do desenvolvimento de uma doença auto-imune, o método compreendendo a administração de uma quantidade eficaz do oligonucleótido compreendendo a sequência nucleotídica TGCNmTCCTGGAGGGGTTGT-3' (SEQ ID NO:\_\_), em que cada N é um nucleótido e m é um inteiro de 0 a cerca de 100, a um indivíduo em risco de desenvolver uma doença auto-imune.

São também aqui descritos métodos de melhoria de um ou mais sintomas de uma doença ou distúrbio inflamatório, o método compreendendo a administração de uma quantidade eficaz do oligonucleótido compreendendo uma sequência nucleotídica de fórmula: X1GGGX2X3 (SEQ ID NO:\_\_), em que X1, X2, e X3 são nucleótidos, desde que se X1 = C ou A, então X2X3 não é AA, a um indivíduo possuindo uma doença ou distúrbio inflamatório. São aqui proporcionados métodos de melhoria de um ou mais sintomas de uma doença ou distúrbio inflamatório, o método compreendendo a administração de uma quantidade eficaz do oligonucleótido consistindo na sequência nucleotídica 5'-TGCNm-3', em que cada N é um nucleótido, m é um inteiro de 5 a cerca de 50 e a sequência N1-Nm compreende pelo menos um dinucleótido GC, a um indivíduo possuindo uma doença ou distúrbio inflamatório. São também aqui descritos métodos de melhoria de um ou mais sintomas de uma doença ou distúrbio inflamatório, o método compreendendo a administração de uma quantidade eficaz do oligonucleótido compreendendo a sequência nucleotídica TGCNmTCCTGGAGGGGTTGT-3' (SEQ ID NO:\_\_), em que cada N é um nucleótido e m é um inteiro de 0 a cerca de 100, a um indivíduo possuindo uma doença ou distúrbio inflamatório.

Além disso, são aqui descritos estojos compreendendo: oligonucleótidos consistindo na sequência nucleotídica 5'-TGCNm-3', em que cada N é um nucleótido, m é um inteiro de 5 a cerca de 50 e a sequência N1-Nm compreende pelo menos um dinucleótido GC; ou

oligonucleótidos compreendendo a sequência nucleotídica TGCNmTCCTGGAGGGGTTGT-3' (SEQ ID NO:\_\_), em que cada N é um nucleótido e m é um inteiro de 0 a cerca de 100, em que o oligonucleótido está num recipiente adequado e em que o referido estojo compreende instruções de utilização do oligonucleótido em imuno-regulação de um indivíduo.

#### BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

As Figs. 1A-1B são gráficos que mostram a inibição por IRP da produção de IL-6 e IL-12 a partir de células estimuladas com ácido nucleico imuno-estimulador (ISNA). A Fig. 1A mostra resultados de esplenócitos de murídeo estimulados com ISNA SEQ ID NO:\_\_(1018) sozinho e em conjunto com IRP SEQ ID NO:\_\_(530), IRP SEQ ID NO:\_\_(C869) ou SEQ ID NO:\_\_(C532) de controlo. A Fig. 1B mostra os resultados de células CD11c+ de murídeo estimuladas com ISNA SEQ ID NO:\_\_(C274) sozinho e em conjunto com IRP SEQ ID NO:\_\_(530), IRP SEQ ID NO:\_\_(C869) ou SEQ ID NO:\_\_(C532) de controlo.

A Fig. 2 é um gráfico mostrando a produção de IL-6 a partir de células B humanas estimuladas com ISNA SEQ ID NO:\_\_(1018) sozinho e em conjunto com IRP SEQ ID NO:\_\_(530), IRP SEQ ID NO:\_\_(C869) ou oligonucleótido de controlo SEQ ID NO:\_\_(C532).

A Fig. 3 é um gráfico mostrando os níveis de IL-6 em soro de ratinhos injectados com ISNA SEQ ID NO:\_\_(1018) sozinho e em conjunto com IRP SEQ ID NO:\_\_(C869) ou oligonucleótido de controlo, e IRP SEQ ID NO:\_\_(C869) sozinho. A razão de IRP:ISNA ou IRP:oligonucleótido de controlo co-administrados variou de 3:1 a 1:3.

A Fig. 4 é um gráfico mostrando os níveis de IL-12 no soro de ratinhos injectados com ISNA SEQ ID NO:\_\_(1018) sozinho e em conjunto com IRP SEQ ID NO:\_\_(C869) ou oligonucleótido de controlo, e IRP SEQ ID NO:\_\_(C869)

sozinho. A razão de IRP:ISNA ou IRP:oligonucleótido de controlo co-administrados variou de 3:1 a 1:3.

A Fig. 5 é um gráfico mostrando os níveis de TNF- $\alpha$  no soro de ratinhos injectados com ISNA SEQ ID NO:\_\_ (1018) sozinho e em conjunto com IRP SEQ ID NO:\_\_ (C869) ou oligonucleótido de controlo, e SEQ ID NO IRP: (C869) sozinho. A razão de IRP:ISNA ou IRP:oligonucleótido de controlo co-administrados variou de 3:1 a 1:3.

A Fig. 6 é um gráfico mostrando os níveis de IL-6 no soro de ratinhos injectados com ISNA SEQ ID NO:\_\_ (1018) subcutaneamente num local e oligonucleótido de controlo ou IRP SEQ ID NO:\_\_ (C869) administrado no mesmo local ou em locais diferentes.

A Fig. 7 é um gráfico mostrando os níveis de IL-12 no soro de ratinhos injectados com ISNA SEQ ID NO:\_\_ (1018) subcutaneamente num local e oligonucleótido de controlo ou IRP SEQ ID NO:\_\_ (C869) administrado no mesmo local ou em locais diferentes.

As Figs. 8A-8B apresentam gráficos mostrando a produção de IFN- $\alpha$  Fig. 8A e IL-12 Fig. 8B por esplenócitos CD11c+ de murídeo em resposta a diferentes quantidades de infecção por HSV-1.

As Figs. 9A-9C apresentam gráficos mostrando a inibição por IRP da produção de citocinas a partir de células estimuladas com HSV-1. A Fig. 9A mostra a produção de IFN- $\alpha$  por esplenócitos CD11c+ de murídeo em resposta a HSV-1 na presença de várias concentrações de IRP SEQ ID NO:\_\_ (C869) ou oligonucleótido de controlo. A Fig. 9B mostra a produção de IL-12 por esplenócitos CD11c+ de murídeo em resposta a HSV-1 na presença de várias concentrações de IRP SEQ ID NO:\_\_ (C869) ou oligonucleótido de controlo. A Fig. 9C mostra a produção de IFN- $\alpha$  por PDC humanas em resposta a HSV-1 na presença de várias concentrações de IRP SEQ ID NO:\_\_ (C869) ou oligonucleótido de controlo.

As Figs. 10A-10B apresentam gráficos mostrando inibição de IRP da produção de citocinas a partir de células

estimuladas com vírus da gripe (PR/8). A Fig. 10A apresenta a produção de IFN- $\alpha$  por PDC humanas em resposta a diferentes quantidades de vírus da gripe. A Fig. 10B mostra a produção de IFN- $\alpha$  por PDC humanas em resposta a vírus da gripe, na presença de várias concentrações de IRP SEQ ID NO:\_\_ (C869) ou oligonucleótido de controlo.

As Figs. 11A-11B apresentam gráficos mostrando a inibição por IRP da produção de IFN- $\alpha$  a partir de células PDC humanas estimuladas com vírus. É mostrada a produção de IFN- $\alpha$  pelas células em resposta a HSV-1 (Fig. 11A, gráfico à esquerda) e vírus da gripe (Fig. 11B, gráfico à direita) na presença de vírus sozinho, IRP SEQ ID NO:\_\_ (C869), IRP SEQ ID NO:\_\_ (C661) ou oligonucleótido de controlo.

As Figs. 12A-12B representam gráficos mostrando o efeito de IRP na produção de IL-6 a partir de esplenócitos estimulados com ISNA da Fig. 12A ou LPS da Fig. 12B, um estimulador de TLR4. As células estimuladas foram incubadas com ISNA ou LPS sozinho e em conjunto com IRP SEQ ID NO:\_\_ (530), SEQ ID NO IRP:\_\_ (C869) ou oligonucleótido de controlo.

As Figs. 13A-13D apresentam gráficos mostrando o efeito de IRP na produção de IL-6 (Figs. 13A-13B) e IL-12 (Figs. 13C-13D) a partir de esplenócitos estimulados com loxorribina, um estimulador de TLR7. As células estimuladas foram incubadas com loxorribina sozinha e em conjunto com quantidades variáveis de IRP SEQ ID NO:\_\_ (C869) (Figs. 13A-13C) ou oligonucleótido de controlo (Figs. 13B-13D).

As Figs. 14A-14D apresentam gráficos mostrando o efeito de IRP na produção de IL-6 (Figs. 14A-14B) e IL-12 (Figs. 14C-14D) a partir de esplenócitos estimulados com resiquimod (R848), um estimulador de TLR7/8. As células estimuladas foram incubadas com R848 sozinho e em conjunto com quantidades variáveis de IRP SEQ ID NO:\_\_ (C869) (Figs. 14A-14C-) ou oligonucleótido de controlo (Figs. 14B-14D).

As Figs. 15A-15D representam gráficos mostrando o efeito de IRP na produção de IL-6 a partir de esplenócitos estimulados com estimuladores de TLR Fig. 15A, ISNA (SEQ ID

NO:\_\_ (1018)), Fig. 15B, LPS, Fig. 15C, loxorribina e Fig. 15D, R848. As células estimuladas foram incubadas com o estimulador de TLR indicado sozinho e em conjunto com IRP SEQ ID NO:\_\_ (C869), IRP SEQ ID NO:\_\_ (C661) ou oligonucleótido de controlo.

As Figs. 16A-16B representam gráficos mostrando a inibição por IRP da produção de IL-6 a partir de células estimuladas com ISNA SEQ ID NO:\_\_ (1018) ou estimuladas com R848. A Fig. 16A mostra os resultados de esplenócitos de murídeo estimulados com ISNA SEQ ID NO:\_\_ (1018) sozinho e em conjunto com IRP SEQ ID NO:\_\_ (869), IRP SEQ ID NO:\_\_ (661) ou IRP SEQ ID NO:\_\_ (954). A Fig. 16B mostra os resultados de esplenócitos de murídeo estimulados com R848 sozinho e em conjunto com IRP SEQ ID NO:\_\_ (869), SEQ ID NO IRP:\_\_ (661) ou SEQ ID NO IRP:\_\_ (954).

As Figs. 17A-17B são um gráfico mostrando os níveis de IL-12 Fig. 17A, e de TNF- $\alpha$  Fig. 17B, no soro de ratinhos uma hora depois de terem sido injectados com R848 sozinho e em conjunto com IRP SEQ ID NO:\_\_ (954) ou oligonucleótido de controlo.

A Fig. 18 é um gráfico mostrando a percentagem de ratinhos vivos após tratamento com D-galactosamina e ISNA SEQ ID NO:\_\_ (1018) sozinho e em conjunto com IRP SEQ ID NO:\_\_ (954) ou IRP SEQ ID NO:\_\_ (869) ou oligonucleótido de controlo.

As Figs. 19A-19B apresentam gráficos mostrando a inibição por IRP da produção de IL-6 a partir células estimuladas com ISNA SEQ ID NO:\_\_ (1018) ou estimuladas com R848. A Fig. 19A mostra os resultados de esplenócitos de murídeo estimulados com ISNA SEQ ID NO:\_\_ (1018) sozinho e em conjunto com IRP SEQ ID NO:\_\_ (954), IRP SEQ ID NO:\_\_ (DV019: N-1), IRP SEQ ID NO:\_\_ (DV020: N-2), IRP SEQ ID NO:\_\_ (DV021: N-3), IRP SEQ ID NO:\_\_ (DV022: N-4), IRP SEQ ID NO:\_\_ (DV023: N-5) ou IRP SEQ ID NO:\_\_ (DV024: N-6). A Fig. 19B mostra os resultados de esplenócitos de murídeo estimulados com R848 sozinho e em conjunto com IRP SEQ ID NO:\_\_ (954), IRP SEQ ID NO:\_\_ (DV019), IRP SEQ ID NO:\_\_ (DV020), IRP SEQ ID

NO:\_\_ (DV021), IRP SEQ ID NO:\_\_ (DV022), IRP SEQ ID NO:\_\_ (DV023) ou IRP SEQ ID NO:\_\_ (DV024).

A Fig. 20 é um gráfico mostrando os níveis no soro de ratinhos (NZBxNZW) F<sub>1</sub> de auto-anticorpos anti-ADNcd na ausência de tratamento ou após injecção duas vezes por semana com 15 µg ou 45 µg de IRP SEQ ID NO:\_\_ (954).

A Fig. 21 é um gráfico mostrando a percentagem de ratinhos (NZBxNZW) F<sub>1</sub> vivos após injecção três vezes por semana aos 8-9 meses de idade com 100 µg de IRP SEQ ID NO:\_\_ (954) ou oligonucleótido de controlo.

As Figs. 22A-22B são gráficos mostrando a produção de IL-6 a partir de células B humanas estimuladas com Fig. 22A, ISNA SEQ ID NO:\_\_ (1018) ou Fig. 22B, R848 sozinho e em conjunto com IRP SEQ ID NO:\_\_ (869), IRP SEQ ID NO:\_\_ (661), IRP SEQ ID NO:\_\_ (954) ou oligonucleótido de controlo.

A Fig. 23 é um gráfico mostrando a produção de IFN-α a partir de células PDC humanas estimuladas com vírus HSV-1 inactivado com UV sozinho e em conjunto com IRP SEQ ID NO:\_\_ (954) ou oligonucleótido de controlo.

A Fig. 24 é um gráfico mostrando a produção de IFN-α a partir de células PDC humanas estimuladas com vírus da gripe inactivado pelo calor sozinho e em conjunto com IRP SEQ ID NO:\_\_ (954) ou oligonucleótido de controlo.

A Fig. 25 é um gráfico mostrando a produção de IFN-α a partir de células PDC humanas estimuladas com soro contendo complexos imunitários anti-ADNcd sozinhos e em conjunto com IRP SEQ ID NO:\_\_ (954) ou oligonucleótido de controlo.

A Fig. 26 é um gráfico mostrando a produção de IFN-α a partir de células PDC humanas estimuladas com complexos imunitários anti-RNP sozinhos e em conjunto com IRP SEQ ID NO:\_\_ (954) ou oligonucleótido de controlo.

A Fig. 27 é um gráfico mostrando a produção de IL-6 a partir de esplenócitos de murídeo estimulados com ISNA SEQ ID NO:\_\_ (1018) sozinho e em conjunto com IRP SEQ ID NO:\_\_ (869),

IRP SEQ ID NO: (661), IRP SEQ ID NO: (954), IRP SEQ ID NO: (983), IRP SEQ ID NO: (984), IRP SEQ ID NO: (985), IRP SEQ ID NO: (986), IRP SEQ ID NO: (987), IRP SEQ ID NO: (988), IRP SEQ ID NO: (989), IRP SEQ ID NO: (990), IRP SEQ ID NO: (991) ou oligonucleótido de controlo.

A Fig. 28 é um gráfico mostrando a produção de IL-6 a partir de esplenócitos de murídeo estimulados com R848 sozinho e em conjunto com IRP SEQ ID NO: (869), IRP SEQ ID NO: (661), IRP SEQ ID NO: (954), IRP SEQ ID NO: (983), IRP SEQ ID NO: (984), IRP SEQ ID NO: (985), IRP SEQ ID NO: (986), IRP SEQ ID NO: (987), IRP SEQ ID NO: (988), IRP SEQ ID NO: (989), IRP SEQ ID NO: (990), IRP SEQ ID NO: (991) ou oligonucleótido de controlo.

#### MODOS DE REALIZAÇÃO DO INVENTO

Descobrimos polinucleótidos imuno-reguladores e métodos de regulação de respostas imunitárias em indivíduos, particularmente humanos, utilizando estes polinucleótidos imuno-reguladores. Os oligonucleótidos para utilização de acordo com o invento são descritos acima. Os oligonucleótidos para utilização de acordo com o invento inibem particularmente respostas imunitárias inatas que envolvem sinalização através de TLR7/8.

Verificámos que os oligonucleótidos para utilização de acordo com o invento regulam de forma eficiente células imunitárias, incluindo células humanas, numa variedade de modos. Observámos que os oligonucleótidos para utilização de acordo com o invento podem suprimir eficazmente a produção de citocinas, incluindo IFN- $\alpha$ , IL-6, IL-12 e TNF- $\alpha$ , a partir de células humanas. Os oligonucleótidos para utilização de acordo com o invento suprimem respostas celulares, incluindo a produção de citocinas, estimuladas através de receptores TLR7/8. Observámos, também, que os oligonucleótidos para utilização de acordo com o invento podem suprimir eficazmente a proliferação e/ou maturação de células estimuladas com um ácido nucleico imuno-estimulador, incluindo células B e células dendríticas plasmocitóides. Assim, os oligonucleótidos para utilização de acordo com os do invento são úteis na supressão de respostas imunitárias a ISNA tal

como ADN microbiano presente devido a uma infecção ou supressão de vectores de ácido nucleico administrados para fins de terapia génica.

São também aqui descritos métodos de tratamento e prevenção de distúrbios auto-imunes e distúrbios inflamatórios crónicos num indivíduo através de administração de um polinucleótido imuno-regulador do invento ao indivíduo.

São também aqui descritos estojos compreendendo os oligonucleótidos para utilização de acordo com o invento. Os estojos podem ainda compreender instruções para administração do oligonucleótido para imuno-regulação num sujeito.

#### *Técnicas Gerais*

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

#### *Definições*

Tal como aqui utilizado, a forma singular "um", "uma", e "o", "a" inclui referências plurais salvo indicação em contrário. Por exemplo, "um" IRP inclui um ou mais IRP.

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

O termo "ácido nucleico imuno-estimulador" ou "polinucleótido imuno-estimulador" tal como aqui utilizado refere-se a uma molécula de ácido nucleico (p.ex., polinucleótido) que efectua e/ou contribui para uma resposta imunitária mensurável tal como medida *in vitro*, *in vivo* e/ou *ex vivo*. Exemplos de respostas imunitárias mensuráveis incluem, mas não se limitam à produção de anticorpos específicos do antigénio, secreção de citocinas, activação ou expansão de populações de linfócitos, tais como células NK, linfócitos T CD4+, linfócitos T CD8+, linfócitos B e semelhantes. Sabe-se que sequências de ácido nucleico imuno-estimulador (ISNA) estimulam respostas imunitárias inatas, em particular, essas respostas ocorrem através de sinalização de TLR-9 na célula. Tal como é conhecido na técnica, moléculas de ácido nucleico imuno-estimulador (ISNA) podem ser isoladas a partir de fontes microbianas, tais como bactérias, podem estar presentes em vectores de ácido nucleico para utilização em terapia génica, ou podem ser sintetizadas utilizando técnicas e equipamento aqui descritos e conhecidos na técnica. Geralmente, uma sequência de ácido nucleico imuno-estimulador inclui pelo menos um dinucleótido CG, sendo o C

deste dinucleótido não metilado. Concordantemente, a infecção microbiana e o ADN administrado podem, nalguns casos, resultar na estimulação de respostas imunitárias inatas.

O termo "imuno-estimulador" ou "estimulando uma resposta imunitária", tal como aqui utilizado, inclui a estimulação de tipos celulares que participam em reacções imunitárias e aumento de uma resposta imunitária a uma substância antigénica específica. Uma resposta imunitária que é estimulada por um ácido nucleico imuno-estimulador é geralmente uma resposta imunitária "de tipo Th1", em oposição a uma resposta imunitária "de tipo Th2". As respostas imunitárias de tipo Th1 são normalmente caracterizadas por reacções de "hipersensibilidade de tipo retardado" a um antigénio e função activada de macrófagos e podem ser detectadas ao nível bioquímico através de maiores níveis de citocinas associadas a Th1 tais como IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12, e TNF- $\beta$ . As respostas imunitárias de tipo Th2 estão geralmente associadas a níveis elevados de produção de anticorpos, especialmente produção de anticorpos IgE e um maior número e activação de eosinófilos, bem como expressão de citocinas associadas a Th2 tais como IL-4, IL-5 e IL-13.

O termo "resposta imunitária inata" ou "imunidade inata" tal como aqui utilizado inclui uma variedade de mecanismos de resistência inatos através dos quais uma célula ou um indivíduo reconhece e responde à presença de um agente patogénico. Tal como aqui utilizado, uma "resposta imunitária inata" inclui os eventos intracelulares e intercelulares e as reacções que ocorrem quando a célula reconhece padrões ou sinais moleculares associados a patogénios. Receptores celulares activos numa resposta imunitária inata incluem uma família de receptores semelhantes a Toll (TLR) e foram identificados ligandos microbianos para vários TLR, tal como aqui descrito.

O termo "sequência imuno-reguladora" ou "IRS" tal como aqui utilizado refere-se a uma sequência de ácido nucleico que inibe e/ou suprime uma resposta imunitária inata mensurável medida *in vitro*, *in vivo* e/ou *ex vivo*. O termo "polinucleótido imuno-regulador" ou "IRP" tal como aqui utilizado refere-se a um polinucleótido compreendendo pelo

menos um IRS que inibe e/ou suprime uma resposta imunitária inata mensurável medida *in vitro*, *in vivo* e/ou *ex vivo*. A inibição de um TLR, p.ex., TLR-7, 8 ou 9, inclui, sem limitação, a inibição no local do receptor, p.ex., através do bloqueio da ligação ligando-receptor, e inibição da via de sinal a jusante após a ligação ligando-receptor. Exemplos de respostas imunitárias inatas mensuráveis incluem, mas não se limitam a, secreção de citocinas, activação ou expansão de populações de linfócitos tais como células NK, linfócitos T CD4+, linfócitos T CD8+, linfócitos B, maturação de populações celulares tais como células dendríticas plasmocitóides e semelhantes.

O termo "composto imuno-regulador" ou "IRC", tal como aqui utilizado, refere-se a uma molécula que possui actividade imuno-reguladora e que compreende uma porção ácido nucleico compreendendo uma IRS. O IRC pode consistir numa porção ácido nucleico que compreende mais do que uma IRS, consistir numa IRS, ou não possuir actividade imuno-estimuladora por si próprio. O IRC pode consistir num polinucleótido (um "polinucleótido IRC") ou pode compreender porções adicionais. Concordantemente, o termo IRC inclui compostos que incorporam uma ou mais porções ácido nucleico, pelo menos uma das quais compreende um IRC, covalentemente ligadas a uma porção espaçadora não nucleotídica.

O termo "sequência palindrómica" ou "palíndromo" refere-se a uma sequência de ácido nucleico que é uma repetição invertida, p.ex., ABCDD'C'B'A', onde as bases, p.ex., A, e A', B e B', C e C', D e D', são capazes de formar os pares de bases de Watson-Crick. Tais sequências podem ser de cadeia simples ou podem formar estruturas de cadeia dupla ou podem formar estruturas de volta em alfinete sob algumas condições. Por exemplo, tal como aqui utilizado, "um palíndromo de 8 bases" refere-se a uma sequência de ácido nucleico em que a sequência palindrómica tem 8 bases de comprimento, tal como ABCDD'C'B'A'. Uma sequência palindrómica pode fazer parte de um polinucleótido que contém também sequências não palindrómicas. Um polinucleótido pode conter uma ou mais porções de sequência palindrómica e uma ou mais porções de sequência não palindrómica. Alternativamente, uma sequência polinucleotídica pode ser inteiramente palindrómica. Num

polinucleótido com mais de uma porção de sequência palindrómica, as porções de sequência palindrómica podem sobrepor-se umas às outras ou as porções de sequência palindrómica podem não se sobrepor umas às outras.

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

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

O termo "conjugado" refere-se a um complexo no qual uma IRP e/ou um IRC estão ligados. Tais ligações conjugadas incluem ligações covalentes e/ou não covalentes.

"Adjuvante" refere-se a uma substância que, quando adicionada a um agente imunogénico tal como antigénio, aumenta ou potencia inespecificamente uma resposta imunitária ao agente no hospedeiro receptor após exposição à mistura.

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

Uma "molécula de distribuição" ou "veículo de distribuição" é uma porção química que facilita, permite e/ou aumenta a distribuição de um IRP e/ou IRC a um determinado local e/ou em relação a um determinado momento.

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

Uma "quantidade eficaz" ou uma "quantidade suficiente" de uma substância é a quantidade suficiente para efectuar resultados benéficos ou desejados, incluindo resultados clínicos, e, como tal, uma "quantidade eficaz" depende do contexto em que está a ser aplicada. No contexto da administração de uma composição que suprime uma resposta imunitária dependente de TLR-9, uma quantidade eficaz de uma IRP é uma quantidade suficiente para inibir ou diminuir uma resposta celular à estimulação através de TLR-9. No contexto da administração de uma composição que suprime uma resposta imunitária dependente de TLR-7/8, uma quantidade eficaz de uma IRP é uma quantidade suficiente para inibir ou diminuir uma resposta celular à estimulação através de TLR-7/8. Uma quantidade eficaz pode ser administrada numa ou mais administrações.

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

A "supressão" ou "inibição" de uma resposta ou parâmetro inclui a diminuição dessa resposta ou parâmetro quando comparado com as mesmas condições excepto quanto à condição ou parâmetro de interesse, ou alternativamente, quando comparado com outra condição. Por exemplo, uma composição compreendendo um IRP que suprime a produção de citocinas induzida por ácido nucleico imuno-estimulador reduz a produção de citocinas, em comparação com, por exemplo, a produção de citocinas induzida pelo ácido nucleico imuno-estimulador sozinho. Como outro exemplo, uma composição compreendendo um IRP que suprime a produção de citocinas associada a uma resposta imunitária inata reduz a extensão e/ou os níveis de produção de citocinas, em comparação com,

por exemplo, a extensão e/ou os níveis de citocinas produzidas pela resposta imunitária inata sozinha. A "supressão" de células B inclui, por exemplo, reduzida proliferação de células B, reduzida activação de células B e/ou reduzida produção de citocinas, tais como IL-6 e/ou TNF- $\alpha$ , a partir da célula B estimulada. A inibição de uma resposta de TLR, p.ex., uma resposta de TLR-7, 8 ou 9, inclui, mas não se limita a, inibição no local do receptor, p.ex., através da prevenção ou do bloqueio da ligação eficaz ligando-receptor, e inibição da via de sinal a jusante, p.ex., após ligação eficaz ligando-receptor.

A "estimulação" de uma resposta ou parâmetro inclui o desencadeamento e/ou a melhoria dessa resposta ou parâmetro. Por exemplo, a "estimulação" de uma resposta imunitária, tal como um resposta imunitária inata ou resposta Th1, significa um aumento na resposta, que pode surgir a partir do desencadeamento e/ou da estimulação de uma resposta. Semelhantemente, a "estimulação" de uma citocina ou tipo celular (tal como CTL) significa um aumento na quantidade ou no nível de citocina ou tipo celular. A "estimulação" de células B inclui, por exemplo, maior proliferação de células B, activação de células B induzida e/ou maior produção de citocinas, tais como IL-6 e/ou TNF- $\alpha$ , a partir da célula B estimulada.

Tal como aqui utilizado, e como bem compreendido na técnica, "tratamento" é uma abordagem para a obtenção de resultados benéficos ou desejados, incluindo resultados clínicos. Para os fins deste invento, resultados clínicos benéficos ou desejados incluem, mas não se limitam a, alívio ou melhoria de um ou mais sintomas, diminuição da extensão da doença, estado de doença estabilizado (i.e., sem agravamento), prevenção da disseminação da doença, atraso ou abrandamento da progressão da doença, melhoria ou paliação do estado de doença e remissão (tanto parcial como total), detectável ou indetectável. "Tratamento" pode também significar prolongamento da sobrevivência, em comparação com a sobrevivência esperada sem receber tratamento.

"Paliação" de uma doença ou distúrbio significa que a extensão e/ou manifestações clínicas indesejáveis de um

distúrbio ou um estado de doença são diminuídas e/ou o curso de tempo da progressão é retardado ou prolongado, em comparação com o não tratamento do distúrbio. Especialmente no contexto da doença auto-imune, tal como é bem compreendido pelos peritos na técnica, pode ocorrer paliação após regulação ou redução da resposta imunitária indesejada. Além disso, a paliação não ocorre necessariamente através da administração de uma dose, mas ocorre frequentemente após a administração de uma série de doses. Assim, uma quantidade suficiente para paliar uma resposta ou um distúrbio pode ser administrada numa ou mais administrações.

Tal como aqui utilizado, o termo "compreendendo" e seus cognatos são utilizados no seu sentido abrangente, ou seja, equivalente ao termo "incluindo" e seus correspondentes cognatos.

#### *Composições do invento*

O invento proporciona um oligonucleótido para utilização na inibição de uma resposta imunitária dependente de TLR7/8 num indivíduo, em que o oligonucleótido é inferior a cerca de 200 bases ou pares de bases e o oligonucleótido compreende uma sequência imuno-reguladora, em que a sequência imuno-reguladora compreende pelo menos uma sequência trinucleotídica TGC na extremidade 5' do oligonucleótido. São também aqui descritas sequências imuno-reguladoras (IRS), polinucleótidos imuno-reguladores (IRP) e compostos imuno-reguladores (IRC) para regulação de respostas imunitárias inatas em indivíduos. Cada IRP e IRC compreende pelo menos uma IRS.

São também aqui descritas composições que compreendem um oligonucleótido para utilização de acordo com o invento sozinho (ou numa combinação de dois ou mais oligonucleótidos para utilização de acordo com o invento). As composições podem compreender um oligonucleótido para utilização de acordo com o invento e um excipiente farmaceuticamente aceitável. Excipientes farmaceuticamente aceitáveis, incluindo tampões, são aqui descritos e bem conhecidos na técnica. "Remington: The Science e Practice of Pharmacy", 20<sup>a</sup> edição, Mack Publishing (2000).

Polinucleótidos imuno-reguladores e compostos imuno-reguladores

Um oligonucleótido para utilização de acordo com o invento contém pelo menos uma sequência imuno-reguladora. Um oligonucleótido para utilização de acordo com o invento compreende uma sequência 5'-G,C-3'. Um oligonucleótido para utilização de acordo com o invento inclui pelo menos uma sequência trinucleotídica TGC na extremidade 5' do polinucleótido (i.e., 5'-TGC). Nalguns casos, uma IRS compreende uma sequência 5'-GGGG-3'. Nalguns casos, uma IRS não compreende uma sequência 5'-GGGG-3'. Concordantemente, nalguns casos, um IRP ou IRC não compreende uma sequência 5'-GGGG-3'. Nalguns casos, um IRP ou IRC compreendendo uma sequência 5'-GGGG-3' é particularmente eficaz quando utilizado na forma de cadeia simples. Nalguns casos, um IRP ou IRC compreendendo uma sequência 5'-GGGG-3' é particularmente eficaz quando produzido com uma estrutura de fosfotioato.

Tal como aqui demonstrado, determinados IRP e IRC inibem respostas celulares dependentes de TLR-7 e/ou TLR-8. Além disso, determinados IRP e IRC inibem respostas celulares dependentes de TLR-9, e determinados IRP e IRC inibem respostas celulares dependentes de TLR-7/8 e respostas celulares dependentes de TLR-9. Tal como aqui utilizado, "TLR-7/8" refere-se a "TLR-7 e/ou TLR-8". Concordantemente, tal como aqui utilizado, "TLR-7/8/9" refere-se a "(TLR-7 e/ou TLR-8) e TLR-9". Também tal como aqui mostrado, certos IRP não inibem respostas celulares dependentes de TLR4.

Ácidos nucleicos imuno-estimuladores e outros estimuladores de uma resposta imunitária inata têm sido descritos na técnica e a sua actividade pode ser prontamente medida utilizando ensaios padrão que indicam vários aspectos de uma resposta imunitária inata, tais como secreção de citocinas, produção de anticorpos, activação de células NK, proliferação de células B, proliferação de células T, maturação de células dendríticas. Ver, p.ex. Krieg et al. (1995) *Nature* 374: 546-549; Yamamoto et al. (1992) *J. Immunol.* 148: 4072-4076; Klinman et al. (1997) *J. Immunol.*

158: 3635-3639; Pisetsky (1996) *J. Immunol.* 156: 421-423; Roman et al. (1997) *Nature Med.* 3: 849-854; Hemmi et al. (2000), *Supra*; Lee et al. (2003), *Supra*; WO 98/16247; WO 98/55495; WO 00/61151 e Patente U.S. No. 6225292. Concordantemente, estes e outros métodos podem ser utilizados para identificar, testar e/ou confirmar sequências polinucleótidos e/ou compostos imuno-reguladores. Por exemplo, o efeito de IRP ou IRC pode ser determinado quando células ou indivíduos nos quais uma resposta imunitária inata foi estimulada são colocados em contacto com o IRP ou IRC.

Tal como é claramente aqui veiculado, entende-se que, em relação às fórmulas aqui descritas, qualquer um e todos os parâmetros são seleccionados independentemente. Por exemplo, se  $x = 0-2$ ,  $y$  pode ser independentemente seleccionado independentemente dos valores de  $x$  (ou qualquer outro parâmetro seleccionável numa fórmula). De preferência, o IRP ou IRC que comprehende a IRS é um oligonucleótido com pelo menos uma ligação estrutural fosfotioato.

Tal como aqui demonstrado, uma classe de IRS descoberta é particularmente eficaz na inibição de estimulação celular dependente de TLR9. Consequentemente, IRS com esta actividade são referidas como IRS da "classe TLR9".

Nalguns casos, uma IRS pode compreender uma sequência da fórmula:  $X_1GGGX_2X_3$  (SEQ ID NO:1) em que  $X_1$ ,  $X_2$ , e  $X_3$  são nucleótidos, desde que se  $X_1 = C$  ou  $A$ , então  $X_2X_3$  não é AA. Nalguns casos, uma IRS pode compreender uma sequência da fórmula SEQ ID NO:1 em que  $X_1$  é C ou A. Nalguns casos, uma IRS pode compreender uma sequência da fórmula:  $X_1GGGX_2X_3$  (SEQ ID NO:2) em que  $X_1$ ,  $X_2$ , e  $X_3$  são nucleótidos, desde que se  $X_1 = C$  ou  $A$ , então  $X_2X_3$  não é AA, e em que  $X_1$  é C ou A.

Nalguns casos, uma IRS pode compreender uma sequência da fórmula:  $GGN_nX_1GGGX_2X_3$  (SEQ ID NO:3), em que  $n$  é um inteiro de 1 a cerca de 100 (de preferência de 1 a cerca de 20), cada  $N$  é um nucleótido, e  $X_1$ ,  $X_2$ , e  $X_3$  são nucleótidos, desde que se  $X_1 = C$  ou  $A$ , então  $X_2X_3$  não é AA. Nalguns casos, uma IRS pode compreender uma sequência da fórmula SEQ ID NO:3 em que  $X_1$  é C ou A.

Nalguns casos, uma IRS pode compreender uma sequência da fórmula:  $N_i T C C N_j (G G) _k N_m X_1 G G G G X_2 X_3$  (SEQ ID NO:4), em que cada N é um nucleótido, em que i é um inteiro de 1 a cerca de 50, em que j é um inteiro de 1 a cerca de 50, k é 0 ou 1, m é um inteiro de 1 a cerca de 20, e  $X_1$ ,  $X_2$ , e  $X_3$  são nucleótidos, desde que se  $X_1 = C$  ou A, então  $X_2 X_3$  não é AA. Nalguns casos, uma IRS pode compreender uma sequência da fórmula SEQ ID NO:4 em que  $X_1$  é C ou A.

Nalguns casos, uma IRS pode compreender uma sequência da fórmula:  $X_1 X_2 X_3 G G G G A A$  (SEQ ID NO:5), em que  $X_1$ ,  $X_2$ , e  $X_3$  são nucleótidos, desde que se  $X_3 = C$  ou A, então  $X_1 X_2$  não é GG.

Exemplos de sequências oligonucleotídicas compreendendo SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, ou 5 incluem as seguintes sequências:

5'-TCCTAACGGGGAAAGT-3' (SEQ ID NO:10 (C827));  
 5'-TCCTAACGGGGAAAGT-3' (SEQ ID NO:11 (C828));  
 5'-TCCTAACGGGGTTGT-3' (SEQ ID NO:12 (C841));  
 5'-TCCTAACGGGGCTGT-3' (SEQ ID NO:13 (C842));  
 5'-TCCTCAAGGGGCTGT-3' (SEQ ID NO:14 (C843));  
 5'-TCCTCAAGGGGTTGT-3' (SEQ ID NO:15 (C844));  
 5'-TCCTCATGGGGTTGT-3' (SEQ ID NO:16 (C845));  
 5'-TCCTGGAGGGGTTGT-3' (SEQ ID NO:17 (C869));  
 5'-TCCTGGAGGGGCTGT-3' (SEQ ID NO:18 (C870));  
 5'-TCCTGGAGGGGCCAT-3' (SEQ ID NO:19 (C871));  
 5'-TCCTGGAGGGGTCAT-3' (SEQ ID NO:20 (C872));  
 5'-TCCGGAAGGGGAAGT-3' (SEQ ID NO:21 (C873)); e  
 5'-TCCGGAAGGGGTTGT-3' (SEQ ID NO:22 (C874)).

Nalguns casos, uma IRS pode compreender uma sequência de qualquer uma de SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, ou 5, em que pelo menos um G é substituído por 7-desaza-dG. Por exemplo, nalguns casos, a IRS pode compreender a sequência 5'-TCCTGGAGZ'GGTTGT-3' (Z' = 7-desaza-dG; SEQ ID NO:23 (C920)).

IRP compreendendo SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, ou 5 ou um IRP compreendendo SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, ou 5, em que pelo menos um G é substituído por 7-desaza-dG, são particularmente eficazes em inibição de estimulação celular dependente de TLR9. Outras sequências IRS que são também eficazes em inibição de sinalização celular dependente de TLR9 incluem as seguintes:

5'-TGACTGTAGGCGGGGAAGATGA- 3' (SEQ ID NO:24 (C533));  
5'-GAGCAAGCTGGACCTTCCAT-3' (SEQ ID NO:25 (C707)); e  
5'-CCTCAAGCTTGAGZ'GG-3' (Z' = 7-desaza-dG; SEQ ID NO:26  
(C891)).

Tal como aqui mostrado, algumas IRS são particularmente eficazes em inibição de estimulação celular dependente de TLR7/8. Consequentemente, as IRS com esta actividade são referidas como IRS de "classe TLR7/8". Por exemplo, um oligonucleótilo compreendendo a sequência 5'-TGCTTGCAAGCTTGCAAGCA-3' (SEQ ID NO:27\* (C661)) inibe estimulação celular dependente de TLR7/8 e é um oligonucleótilo para utilização de acordo com o invento.

Nalgumas concretizações, um oligonucleótilo para utilização de acordo com o invento compreende um fragmento de SEQ ID NO:C661 que inclui pelo menos uma porção palindrómica de 10 bases desta. Por exemplo, tais fragmentos incluem as seguintes sequências:

5'-TGCTTGCAAGCTTGCAAG-3' (SEQ ID NO:28\* (C921));  
5'-TGCTTGCAAGCTTGCA-3' (SEQ ID NO:29\* (C922));  
5'-GCTTGCAAGCTTGCAAGCA-3' (SEQ ID NO:30 (C935));  
5'-CTTGCAAGCTTGCAAGCA-3' (SEQ ID NO:31 (C936)); e  
5'-TTGCAAGCTTGCAAGCA-3' (SEQ ID NO:32 (C937)).

Os oligonucleótildos para utilização de acordo com o invento estão marcados com um asterisco.

Nalgumas concretizações, o oligonucleótilo para utilização de acordo com o invento consiste em SEQ ID NO:27\* (C661), ou num fragmento desta. Nalgumas concretizações, um oligonucleótilo para utilização de acordo com o invento consiste num fragmento de SEQ ID NO:27\* (C661) e inclui pelo menos uma porção palindrómica de 10 bases desta.

Nalgumas concretizações, um oligonucleótilo para utilização de acordo com o invento consiste na sequência 5'-TGCN<sub>m</sub>-3', em que N é um nucleótido, m é um inteiro de 5 a cerca de 50 e em que a sequência N<sub>1</sub>-N<sub>m</sub> compreende pelo menos um dinucleótido GC. Nalgumas concretizações, um tal oligonucleótilo para utilização de acordo com o invento consiste na sequência 5'-TGCN<sub>m</sub>A-3', sequência 5'-TGCN<sub>m</sub>CA-3'

ou sequência 5'-TGCN<sub>m</sub>GCA-3'. Por exemplo, algumas concretizações, o oligonucleótido para utilização de acordo com o invento pode consistir nas seguintes sequências:

5'-TGCTTGCAAGCTAGCAAGCA-3' (SEQ ID NO:33\* (C917));  
5'-TGCTTGCAAGCTTGCTAGCA-3' (SEQ ID NO:34\* (C918));  
5'-TGCTTGACAGCTTGACAGCA-3' (SEQ ID NO:35\* (C932));  
5'-TGCTTAGCAGCTATGCGAGCA-3' (SEQ ID NO:36\* (C933)); ou  
5'-TGCAAGCAAGCTAGCAAGCA-3' (SEQ ID NO:37\* (C934)).

Outras sequências IRS que também são eficazes em inibição de sinalização celular dependente de TLR7/8 incluem as seguintes:

5'-TGCAAGCTTGCAAGCTTG CAA GCT T-3' (SEQ ID NO:38\* (C793));  
5'-TGCTGCAAGCTTGCAAGAT GAT-3' (SEQ ID NO:39\* (C794));  
5'-TGCTTGCAAGCTTGCAAGC-3' (SEQ ID NO:40\* (C919));  
5'-TGCAAGCTTGCAAGCTTGCAAT-3' (SEQ ID NO:41\* (C923));  
5'-TGCTTGCAAGCTTG-3' (SEQ ID NO:42\* (C930));  
5'-AGCTTGCAAGCTTGCAAGCA-3' (SEQ ID NO:43 (C938));  
5'-TACTTGCAAGCTTGCAAGCA-3' (SEQ ID NO:44 (C939));  
5'-TGATTGCAAGCTTGCAAGCA-3' (SEQ ID NO:45 (C940));  
5'-AAATTGCAAGCTTGCAAGCA-3' (SEQ ID NO:46 (C941));  
5'-TGCTGGAGGGGTGT-3' (SEQ ID NO:47 (C945));  
5'-AAATTGACAGCTTGACAGCA-3' (SEQ ID NO:48 (C951));  
5'-TGATTGACAGCTTGACAGCA-3' (SEQ ID NO:49 (C959));  
5'-TGATTGACAGATTGACAGCA-3' (SEQ ID NO:50 (C960)); e  
5'-TGATTGACAGATTGACAGAC-3' (SEQ ID NO:51 (C961)).

Os oligonucleótidos para utilização de acordo com o invento estão marcados com um asterisco.

Outra classe de IRS inclui as que são particularmente eficazes em inibição da estimulação celular dependente de TLR7/8 e TLR9. Consequentemente, as IRS com esta actividade são referidas como IRS de "classe TLR7/8/9". Nalguns casos, uma combinação de uma IRS de classe TLR7/8 com uma IRS de classe TLR9 resulta numa IRS da classe TLR7/8/9.

A classe TLR7/8/9 de IRS inclui as que compreendem a sequência TGCN<sub>m</sub>TCCTGGAGGGTTGT-3' (SEQ ID NO:6) em que cada N é um nucleótido e m é um inteiro de 0 a cerca de 100, nalguns casos de 0 a cerca de 50, de preferência de 0 a cerca de 20.

Nalguns casos, uma IRS comprehende SEQ ID NO:6, em que a sequência N<sub>1</sub>-N<sub>m</sub> comprehende um fragmento da sequência 5'-TTGACAGCTTGACAGCA-3' (SEQ ID NO:7). Um fragmento de SEQ ID NO:7 é qualquer porção dessa sequência, por exemplo, TTGAC ou GCTTGA. Nalguns casos, o fragmento de SEQ ID NO:7 é da extremidade 5' de SEQ ID NO:7, incluindo, por exemplo, TTGAC ou TTG.

Nalguns casos, a IRS comprehende a sequência 5'-TGCRRZNYY-3' (SEQ ID NO:8), em que Z é qualquer nucleótido excepto C, em que N é qualquer nucleótido, em que quando Z não é G ou inosina, N é guanosina ou inosina. Noutros casos, a IRS comprehende a sequência 5'-TGCRRZNpoli(Pirimidina)-3' (SEQ ID NO:9), em que Z é qualquer nucleótido excepto C, em que N é qualquer nucleótido, em que quando Z não é G ou inosina, N é guanosina ou inosina.

Exemplos de sequências IRS que também são eficazes na inibição de sinalização celular dependente de TLR7/8/9 incluem as seguintes:

5'-TGCTCCTGGAGGGTTGT-3' (SEQ ID NO:52\* (C954));  
5'-TGCTTGTCTGGAGGGGTTGT-3' (SEQ ID NO:53\* (C956));  
5'-TGCTTGACATCCTGGAGGGGTTGT-3' (SEQ ID NO:54\* (C957));  
5'-TGCTTGACAGCTTGACAGTCCTGGAGGGGTTGT-3' (SEQ ID NO:55\* (C962));  
5'-TGCTTGACAGCTTGATCCTGGAGGGGTTGT-3' (SEQ ID NO:56\* (C963));  
5'-TGCTTGACAGCTCCTGGAGGGGTTGT-3' (SEQ ID NO:57\* (C964));  
5'-TGCTTGACAGCTGCTCCTGGAGGGGTTGT-3' (SEQ ID NO:58\* (C965));  
5'-TGCTTGACAGCTTGCTGGAGGGGTTGT-3' (SEQ ID NO:59\* (C966));  
5'-TGCTTGACAGCTTGACAGCATCCTGGAGGGGTTGT-3' (SEQ ID NO:60\* (C967));  
5'-TGCTTGACAGCTTGACAGCATCCTGGAGGGGTTGT-3' (SEQ ID NO:61\* (C968));  
5'-TGCTTGACAGCTTGACAGCATCCTGGAGGGGT-3' (SEQ ID NO:62\* (C969));  
5'-TGCTTGACAGCTTGACAGCATCCTGGAGGGG-3' (SEQ ID NO:63 \* (C970));  
5'-TGCTTGCAAGCTTGCTCCTGGAGGGGTTGT-3' (SEQ ID NO:64\* (C971));  
5'-TGCTTGCAAGCTCCTGGAGGGGTTGT-3' (SEQ ID NO:65\* (C972)); e  
5'-TGCTTGCAAGCTTGCAAGCATCCTGGAGGGGTTGT-3' (SEQ ID NO:66\* (C908)). Os oligonucleótidos para utilização de acordo com o invento estão marcados com um asterisco.

Tal como aqui descrito, alguns IRP são particularmente eficazes na supressão de respostas celulares dependentes de TLR9. Tais IRP incluem, mas não se limitam a, SEQ ID NO:24 (C533); SEQ ID NO:25 (C707); SEQ ID NO:86 (1019); SEQ ID

NO:91 (C891); SEQ ID NO:10 (C827); SEQ ID NO:11 (C828); SEQ ID NO:12 (C841); SEQ ID NO:13 (C842); SEQ ID NO:14 (C843); SEQ ID NO:15 (C844); SEQ ID NO:16 (C845); SEQ ID NO:17 (C869); SEQ ID NO:18 (C870); SEQ ID NO:19 (871); SEQ ID NO:20 (C872); SEQ ID NO:21 (C873); SEQ ID NO:22 (C874); SEQ ID NO:23 (C920), e SEQ ID NO:66\* (C908).

Tal como aqui descrito, alguns IRP são particularmente eficazes em supressão de respostas celulares dependentes de TLR7/8. Tais IRP incluem, mas não se limitam a, SEQ ID NO:17 (C869); SEQ ID NO:23 (C920); SEQ ID NO:27\* (C661); SEQ ID NO:38\* (C793); SEQ ID NO:29\* (C794); SEQ ID NO:33\* (C917); SEQ ID NO:34\* (C918); SEQ ID NO:40\* (C919); SEQ ID NO:28\* (C921); SEQ ID NO:29\* (C922); SEQ ID NO:41 \* (C923), e SEQ ID NO:66\* (C908).

Um IRP pode ser ADN de cadeia simples ou de cadeia dupla, bem como ARN de cadeia simples ou de cadeia dupla ou outros polinucleótidos modificados. Um IRP pode ser linear, pode ser circular ou incluir porções circulares e/ou pode incluir uma volta em alfinete. Um IRP pode conter bases de ocorrência natural ou modificadas de ocorrência não natural, e pode conter açúcar, fosfato, e/ou terminais modificados. Várias dessas modificações são aqui descritas.

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

O IRP pode compreender pelo menos uma base modificada. Tal como aqui utilizado, o termo "base modificada" é sinónimo de "análogo de base", por exemplo, "citosina modificada" é sinónimo de "análogo de citosina". Semelhantemente, nucleósidos ou nucleótidos "modificados" são aqui definidos como sendo sinónimos de "análogos" de nucleósidos ou nucleótidos. Exemplos de modificações de bases incluem, mas não se limitam a, adição de uma porção de remoção de

electrões a C-5 e/ou C-6 de uma citosina do IRP. De preferência, a porção de remoção de electrões é um halogénio, p.ex., 5-bromocitosina, 5-clorocitosina, 5-fluorocitosina, 5-iodocitosina. Outros exemplos de modificações de bases incluem, mas não se limitam a, adição de uma porção de remoção de electrões a C-5 e/ou C-6 de um uracilo do polinucleótido imuno-regulador. De preferência, a porção de remoção de electrões é um halogénio. Tais uracilos modificados podem incluir, mas não se limitam a, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-fluorouracilo, 5-iodouracilo.

Outros exemplos de modificações de bases incluem a adição de um ou mais grupos tiol à base incluindo, mas não se limitando a, 6-tio-guanina, 4-tio-timina, e 4-tio-uracilo. Outros exemplos de modificações de bases incluem, mas não se limitam a, N4-etilcitosina, 7-desazaguanina, e 5-hidroxicitosina. Ver, por exemplo, Kandimalla *et al.* (2001) *Bioorg. Med Chem.* 9: 807-813.

O IRP pode conter polinucleótidos modificados com fosfato, alguns dos quais sabe-se que estabilizam o polinucleótido. Consequentemente, algumas concretizações incluem polinucleótidos imuno-reguladores estabilizados. Por exemplo, além de ligações fosfodiester, modificações fosfato incluem, mas não se limitam a, metilfosfonato, fosforotioato, fosforamidato (em ponte ou não), fosfotriéster e fosforoditioato e podem ser utilizadas em qualquer combinação. Outras ligações não fosfato podem também ser utilizadas. Nalgumas concretizações, os oligonucleótidos para utilização de acordo com o presente invento compreende apenas estruturas fosforotioato. Nalgumas concretizações, os oligonucleótidos para utilização de acordo com o presente invento compreendem apenas estruturas fosfodiéster. Nalgumas concretizações, um oligonucleótido para utilização de acordo com o invento pode compreender uma combinação de ligações fosfato na estrutura fosfato tal como uma combinação de ligações fosfodiéster e fosforotioato.

Os IRP utilizados no invento podem compreender um ou mais ribonucleótidos (contendo ribose como o único ou principal componente açúcar), desoxirribonucleótidos (contendo desoxirribose como o principal componente açúcar),

ou, como é conhecido na técnica, açúcares modificados ou análogos de açúcar podem ser incorporados no IRP. Assim, para além da ribose e desoxirribose, a porção açúcar pode ser pentose, desoxipentose, hexose, desoxi-hexose, glicose, arabinose, xilose, lixose, e um grupo ciclopentilo "análogo" de açúcar. O açúcar pode estar na forma piranosilo ou furanosilo. No IRP, a porção açúcar é de preferência o furanósido de ribose, desoxirribose, arabinose ou 2'-O-alquilribose, e o açúcar pode ser ligado às respectivas bases heterocíclicas, na configuração anomérica  $\alpha$  ou  $\beta$ . Modificações de açúcar incluem, mas não se limitam a, análogos de 2'-alcoxi-ARN, análogos de 2'-amino-ARN, 2'-fluoro-ADN, e quimeras 2'-alcoxi- ou amino-ARN/ADN. Por exemplo, uma modificação de açúcar no IRP inclui, mas não se limita a, 2'-O-metil-uridina e 2'-O-metil-citidina. A preparação destes açúcares ou análogos de açúcares e dos respectivos "nucleósidos" em que tais açúcares ou análogos são ligados a uma base heterocíclica (base de ácido nucleico) *per se* é conhecida, e não precisa de ser aqui descrita, excepto na medida em que tal preparação pode pertencer a qualquer exemplo específico. Modificações de açúcares podem também ser feitas e combinadas com qualquer modificação de fosfato na preparação de um IRP.

O IRP pode ser sintetizado utilizando técnicas e equipamento de síntese de ácidos nucleicos que são bem conhecidos na arte incluindo, mas não se limitando a, métodos enzimáticos, métodos químicos, e a degradação de sequências oligonucleotídicas maiores. Ver, por exemplo, Ausubel *et al.* (1987); e Sambrook *et al.* (1989). Quando montadas enzimaticamente, as unidades individuais podem ser ligadas, por exemplo, com uma ligase tal como ADN ou ARN-ligase de T4. Pat. U.S. No. 5124246. A degradação do oligonucleótido pode ser realizada através da exposição de um oligonucleótido numa nuclease, tal como exemplificado na Pat. U.S. No. 4650675.

O IRP pode também ser isolado utilizando procedimentos convencionais de isolamento de polinucleótidos. Tais procedimentos incluem, mas não se limitam a, hibridação de sondas a bibliotecas genómicas ou de ADNc para detectar sequências nucleotídicas partilhadas, pesquisa de anticorpos de bibliotecas de expressão para detectar características

estruturais partilhadas e síntese de determinadas sequências nativas através da reacção em cadeia da polimerase.

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

As técnicas para produção de polinucleótidos e polinucleótidos modificados são conhecidas na arte. O ADN ou ARN de ocorrência natural, contendo ligações fosfodiéster, é geralmente sintetizado através de acoplamento do nucleósido fosforamidite apropriado ao grupo 5'-hidroxilo do oligonucleótido em crescimento ligado a um suporte sólido na extremidade 3', seguido de oxidação do triéster de fosfito intermediário num triéster de fosfato. Uma vez sintetizada a sequência polinucleotídica desejada, o polinucleótido é removido do suporte, os grupos triéster de fosfato são desprotegidos para diésteres de fosfato e as bases nucleosídicas são desprotegidas utilizando amônia aquosa ou outras bases. Ver, por exemplo, Beauchage (1993) "Oligodeoxyribonucleotide Synthesis" em "Protocols for Oligonucleotides and Analogs", *Synthesis and Properties* (Agrawal, ed.) Humana Press, Totowa, NJ; Warner et al. (1984) ADN 3: 401 e Pat. U.S. No. 4458066.

A síntese de polinucleótidos contendo ligações fosfato ou ligações não fosfato modificadas é também conhecida na técnica. Para uma revisão, ver Matteucci (1997) "Oligonucleotide Analogs: an Overview" em *Oligonucleotides as Therapeutic Agents*, (D.J. Chadwick e G. Cardew, ed.) John Wiley e Sons, New York, NY. O derivado fosforoso (ou grupo fosfato modificado) que pode ser ligado à porção açúcar ou análogo de açúcar nos oligonucleótidos para utilização de acordo com o presente invento pode ser um monofosfato, difosfato, trifosfato, alquilfosfonato, fosforotioato, fosforoditioato, fosforamidato ou semelhante. A preparação

dos análogos de fosfato acima mencionados, e sua incorporação nos nucleótidos, nucleótidos modificados e oligonucleótidos, *per se*, é também conhecida e não precisa de ser descrita aqui em detalhe. Peyrottes et al. (1996) *Nucleic Acids Res.* 24: 1841-1848; Chaturvedi et al. (1996) *Nucleic Acids Res.* 24: 2318-2323; e Schultz et al. (1996) *Nucleic Acids Res.* 24: 2966-2973. Por exemplo, a síntese de oligonucleótidos fosforotioato é semelhante à descrita acima para oligonucleótidos de ocorrência natural excepto que o passo de oxidação é substituído por um passo de sulfuração (Zon (1993) "Oligonucleoside Phosphorotioates" em "Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Synthesis and Properties" (Agrawal, ed.) Humana Press, pp. 165-190). De forma semelhante a síntese de outros análogos de fosfato, tais como fosfotriéster (Miller et al. (1971) *JACS* 93: 6657-6665), fosforamidatos sem ser em ponte (Jager et al. (1988) *Biochem.* 27: 7247-7246), fosforamidiatos de N3' para P5' (Nelson et al. (1997) *JOC* 62: 7278-7287) e fosforoditioatos (Pat. U.S. No. 5453496) foi também descrita. Outros oligonucleótidos não fosforosos com base modificada podem também ser utilizados (Stirchak et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17: 6129-6141).

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

A preparação de nucleósidos com bases modificadas, e a síntese de oligonucleótidos modificados utilizando os

referidos nucleósidos com bases modificadas como precursores, foram descritas, por exemplo, nas Pat. U.S. No. 4910300, 4948882, e 5093232. Estes nucleósidos com bases modificadas foram desenhados para que possam ser incorporados através de síntese química em posições terminais ou internas de um oligonucleótido. Tais nucleósidos com bases modificadas, presentes em posições terminais ou internas de um oligonucleótido, podem servir como locais para ligação de um péptido. Nucleósidos modificados na sua porção açúcar têm também sido descritos (incluindo, mas não se limitando a, p.ex., Pat. U.S. No. 4849513, 5015733, 5118800, 5118802) e podem ser utilizados de forma semelhante.

O oligonucleótido para utilização de acordo com o invento é inferior a cerca de qualquer um dos seguintes comprimentos (em bases ou pares de bases): 200; 175; 150; 125; 100; 75; 60; 50; 40; 30; 25; 20; 15; 14; 13; 12; 11; 10; 9; 8; 7; 6; 5; 4. Nalgumas concretizações, o oligonucleótido é superior a cerca de qualquer um dos seguintes comprimentos (em bases ou pares de bases): 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12; 13; 14; 15; 20; 25; 30; 40; 50; 60; 75; 100; 125; 150. Alternativamente, o oligonucleótido pode ser qualquer um de uma variedade de tamanhos com um limite superior de 175; 150; 125; 100; 75; 60; 50; 40; 30; 25; 20; 15; 14; 13; 12; 11; 10; 9; 8; 7; 6; 5; 4 e um limite inferior seleccionado independentemente de 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12; 13; 14; 15; 20; 25; 30; 40; 50; 60; 75; 100; 125; 150; 175, em que o limite inferior é menor que o limite superior. O oligonucleótido é de 200 ou menos bases de comprimento.

São aqui descritos métodos de produzir os polinucleótidos imuno-reguladores aqui descritos. Os métodos podem ser qualquer um dos aqui descritos. Por exemplo, o método poderia ser síntese do IRP (por exemplo, utilizando síntese em estado sólido) e pode ainda compreender qualquer ou quaisquer passos de purificação. Os métodos de purificação são conhecidos na técnica.

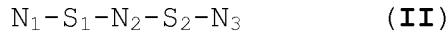
São aqui descritos compostos imuno-reguladoras (IRC) que têm actividade imuno-reguladora e que compreendem uma porção ácido nucleico compreendendo uma IRS. Os IRC contêm uma ou mais porções ácido nucleico e uma ou mais porções espaçadoras

não-ácido nucleico. Compostos em conformidade com uma variedade de fórmulas estruturais estão contemplados para utilização como IRC, incluindo as estruturas nucleares descritas nas fórmulas I-VII, abaixo. As fórmulas I-III mostram sequências nucleares para "IRC lineares". As fórmulas IV-VI mostram sequências nucleares para "IRC ramificados". A fórmula VII mostra uma estrutura nuclear para "IRC de espaçador único".

Em cada fórmula aqui proporcionada, "N" designa uma porção ácido nucleico (orientada numa orientação 5'→3' ou 3'→5') e "S" designa uma porção espaçadora não-ácido nucleico. Um traço ("-") designa uma ligação covalente entre uma porção ácido nucleico e uma porção espaçadora não-ácido nucleico. Um duplo traço ("--") designa ligações covalentes entre uma porção espaçadora não-ácido nucleico e pelo menos 2 porções ácido nucleico. Um triplo traço ("---") designa ligações covalentes entre uma porção espaçadora não-ácido nucleico e múltiplas (i.e., pelo menos 3) porções ácido nucleico. Os sub-índices são utilizados para designar porções ácido nucleico ou espaçadoras não-ácido nucleico diferentemente posicionadas. No entanto, a utilização de sub-índices para distinguir diferentes porções ácido nucleico não pretende indicar que as porções tenham necessariamente uma estrutura ou sequência diferente. De forma semelhante, a utilização de sub-índices para distinguir diferentes porções espaçadoras não pretende indicar que as porções tenham necessariamente diferentes estruturas. Por exemplo, na fórmula II, *infra*, as porções ácido nucleico designadas N<sub>1</sub> e N<sub>2</sub> podem ter a mesma ou diferentes sequências, e as porções espaçadoras designadas S<sub>1</sub> e S<sub>2</sub> podem ter a mesma ou diferentes estruturas. Mais, está contemplado que porções químicas adicionais (p.ex., fosfato, mononucleótido, porções ácido nucleico adicionais, grupo alquilo, amino, tio ou dissulfureto ou grupos de ligação, e/ou porções espaçadoras) podem ser covalentemente ligadas nos terminais das estruturas nucleares.

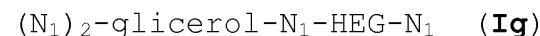
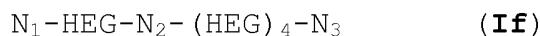
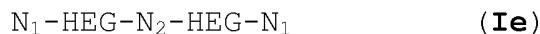
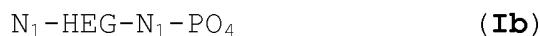
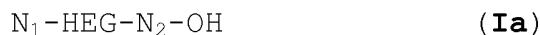
Os IRC lineares têm estruturas em que as porções espaçadoras não-ácido nucleico na estrutura nuclear estão covalentemente ligadas a não mais de duas porções ácido

nucleico. IRC lineares exemplares estão em conformidade com as seguintes fórmulas:



em que A é um inteiro entre 1 e cerca de 100 e  $[N_v-S_v]$  indica A iterações adicionais de porções ácido nucleico conjugadas com porções espaçadoras não-ácido nucleico. O sub-índice "v" indica que N e S são seleccionados independentemente em cada iteração de " $[N_v-S_v]$ ". "A" está por vezes entre 1 e cerca de 10, por vezes entre 1 e 3, por vezes exactamente é 1, 2, 3, 4 ou 5. Nalguns casos, A é um inteiro num intervalo definido por um limite inferior de 1, 2, 3, 4, ou 5, e um limite superior seleccionado independentemente de 10, 20, 50 ou 100 (p.ex., entre 3 e 10).

Exemplos de IRC lineares incluem:



Em que HEG refere-se a hexa-(etilenoglicol). TEG refere-se a tetra-(etilenoglicol).

IRC lineares preferidos incluem:

5'-TGCTTGCAAGCTTGCAAGCA-HEG-TCCTGGAGGGTTGT-3' (SEQ ID NO: 67\* (C907, C661-HEG-C869));

5'-TGCTTGCAAGCTAGCAAGCA-HEG-TCCTGGAGGGTTGT-3' (SEQ ID NO: 68\* (C913, C917-HEG-C869));

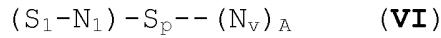
5'-TGCTTGCAAGCTTGCTAGCA-HEG-TCCTGGAGGGTTGT-3' (SEQ ID NO: 69\* (C914, C918-HEG-C869));

5'-TGCTTGCAAGCTTGCTAGCA-HEG-TCCTGGAGZGGTTGT-3' (SEQ ID NO: 70\* (C916, C661-HEG-C920)); e

5'-TCCTGGAGGGTTGT-HEG-TGCTTGCAAGCTTGCAAGCA-3' (SEQ ID NO:71 (C928, C869-HEG-C661)).

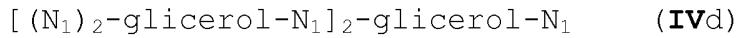
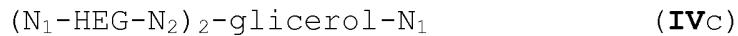
Oligonucleótidos para utilização de acordo com o invento estão marcados com um asterisco.

Os IRC ramificados compreendem uma porção espaçadora multivalente ( $S_p$ ) covalentemente ligada a pelo menos três (3) porções ácido nucleico. Exemplos de IRC ramificados são descritos de acordo com as seguintes fórmulas:



em que  $S_p$  é um espaçador multivalente covalentemente ligado à quantidade "A" independentemente seleccionada de porções ácido nucleico  $N_v$ ,  $S_v-N_v$  (que compreende uma porção espaçadora ligada covalentemente a uma porção ácido nucleico). Para as fórmulas IV e V, A é pelo menos 3. Em vários casos de fórmulas IV e V, A é um inteiro entre 3 e 100 (inclusive), embora A possa ser um inteiro num intervalo definido por um limite inferior de cerca de 3, 5, 10, 50 ou 100 e um limite superior independentemente seleccionado de cerca de 5, 7, 10, 50, 100, 150, 200, 250, ou 500, ou alternativamente A pode ser maior do que 500. Para a fórmula VI, A é pelo menos 2, um inteiro num intervalo definido por um limite inferior de 2, 5, 10, 50 ou 100 e um limite superior independentemente seleccionado de 5, 10, 50, 100, 150, 200, 250, ou 500, ou maior do que 500.

Exemplos de IRC ramificados incluem:



IRC ramificados preferidos incluem  $(5'\text{-}N_1\text{-}3'\text{-}HEG)_2\text{-glicerol-}HEG\text{-}5'\text{-}N_1\text{-}3'$  e  $(5'\text{-}N_1\text{-}3'\text{-}HEG)_2\text{-glicerol-}HEG\text{-}5'\text{-}N_1'$ .

Os IRC com um único espaçador compreendem uma estrutura na qual há uma única porção ácido nucleico covalentemente conjugada com uma única porção espaçadora, isto é,

$N_1-S_1$  (VII)

Num exemplo preferido  $S_1$  tem a estrutura de um multímero compreendendo unidades menores (p.ex., HEG, TEG, glicerol, 1'2'-didesoxirribose, subunidades alquilo C2-alquilo C12, e semelhantes), tipicamente ligadas através de uma ligação éster (p.ex., fosfodiéster ou éster de fosforotioato), p.ex., tal como descrito *infra*. Ver, p.ex., fórmula VIIa, *infra*. O multímero pode ser heteromérico ou homomérico. Num caso, o espaçador é um heterómero de unidades monoméricas (p.ex., HEG, TEG, glicerol, 1'2'-didesoxirribose, ligadores de alquilo C2 a alquilo C12, e semelhantes) ligado através de uma ligação éster (p.ex., fosfodiéster ou éster de fosforotioato). Ver, p.ex., fórmula VIIb, *infra*.

Exemplos de IRC de espaçador único incluem:

$N_1-(HEG)_{15}$  (VIIa)

$N_1-HEG-propil-HEG-propil-HEG$  (VIIb)

Em certos casos, as estruturas terminais do IRC estão covalentemente unidas (p.ex., porção ácido nucleico-a-porção ácido nucleico; porção espaçadora-a-porção espaçadora, ou porção ácido nucleico-a-porção espaçadora), resultando numa conformação circular.

IRC para utilização nas composições imuno-reguladoras incluem pelo menos uma porção ácido nucleico. O termo "porção ácido nucleico", tal como aqui utilizado, refere-se a um monómero nucleotídico (i.e., um mononucleótido) ou polímero (i.e., compreendendo pelo menos 2 nucleótidos contíguos). Tal como aqui utilizado, um nucleótido compreende (1) uma base purina ou pirimidina ligada a um açúcar que está numa ligação éster com um grupo fosfato, ou (2) um análogo no qual a base e/ou o açúcar e/ou éster de fosfato são substituídos por análogos, p.ex., tal como descrito *infra*. Num IRC compreendendo mais de uma porção ácido nucleico, as porções ácido nucleico podem ser as mesmas ou diferentes.

As porções ácido nucleico utilizadas em IRC incorporados nas composições imuno-reguladoras podem compreender qualquer uma das sequências IRS aqui divulgadas, e podem

adicionalmente ser sequências de seis pares de bases ou menos. Está contemplado que num IRC compreendendo múltiplas porções ácido nucleico, as porções ácido nucleico podem ter o mesmo ou diferentes comprimentos. Em certos casos em que o IRC compreende mais de uma porção ácido nucleico, apenas uma das porções precisa compreender a IRS.

Está contemplado que num IRC compreendendo múltiplas porções ácido nucleico, as porções ácido nucleico podem ser as mesmas ou diferentes. Consequentemente, em vários casos, os IRC incorporados nas composições imuno-reguladoras compreendem (a) porções ácido nucleico com a mesma sequência, (b) mais de uma iteração de uma porção ácido nucleico, ou (c) duas ou mais porções ácido nucleico diferentes. Adicionalmente, uma única porção ácido nucleico pode compreender mais de uma IRS, que pode estar adjacente, sobreposta, ou separada por bases nucleotídicas adicionais dentro da porção ácido nucleico.

Tal como aqui descrito, alguns IRP são particularmente eficazes na supressão de respostas celulares dependentes de TLR9 e alguns IRP são particularmente eficazes na supressão de respostas celulares dependentes de TLR7/8. Uma vez que um IRC pode compreender mais de um IRP, IRP com várias actividades podem ser combinados para criar um IRC com uma determinada actividade para uma utilização particular.

Nalguns casos, a combinação de dois IRP num IRC conduz a uma actividade imuno-reguladora do IRC diferente do IRP sozinho. Por exemplo, IRC SEQ ID NO:68\* (C913) contém IRP SEQ ID NO:33 (C917) ligado a IRP SEQ ID NO:17 (C869) através de uma porção HEG. IRP SEQ ID NO:33 (C917) inibe respostas celulares dependentes de TLR-7/8 mas não respostas celulares dependentes de TLR-9. IRP SEQ ID NO:17 (C869) tem maior actividade inibidora para respostas celulares dependentes de TLR-9 que para respostas celulares dependentes de TLR-7/8. O IRC SEQ ID NO:68\* (C913) é no entanto muito activo na inibição tanto de respostas celulares dependentes de TLR-7/8 como de respostas celulares dependentes de TLR-9. O mesmo é também verdade para IRC SEQ ID NO:69\* (C914) e seus IRP SEQ ID NO:34 (C918) e SEQ ID NO:17 (C869) componentes.

Os IRC compreendem uma ou mais porções espaçadoras não-ácido nucleico covalentemente ligadas às porções ácido nucleico. Por conveniência, as porções espaçadoras não-ácido nucleico são por vezes aqui referidas simplesmente como "espaçadores" ou "porções espaçadoras". Os espaçadores são geralmente de peso molecular de cerca de 50 a cerca de 50000, tipicamente de cerca de 75 a cerca de 5000, muito frequentemente de cerca de 75 a cerca de 500, que estão covalentemente ligados, em vários casos, a uma, duas, três, ou mais de três porções ácido nucleico. Uma variedade de agentes é adequada para unir porções ácido nucleico. Por exemplo, uma variedade de compostos referidos na literatura científica como "ligadores não-ácido nucleico", "ligadores não nucleotídicos", ou "moléculas de plataforma de valência" podem ser utilizados como espaçadores num IRC. Em certos casos, um espaçador comprehende múltiplas subunidades covalentemente ligadas e pode ter uma estrutura homopolimérica ou heteropolimérica. Será apreciado que os mononucleótidos e polinucleótidos não estão incluídos na definição de espaçadores não-ácido nucleico, sem cuja exclusão não haveria diferença entre uma porção ácido nucleico e uma porção espaçadora não-ácido nucleico adjacente.

Em certos casos, um espaçador pode compreender um ou mais nucleótidos abásicos (i.e., sem uma base nucleotídica, mas possuindo as porções açúcar e fosfato). Exemplos de nucleótidos abásicos incluem 1'2'-didesoxirribose, 1'-desoxirribose, 1'-desoxiarabinose e polímeros destes.

Outros espaçadores adequados compreendem alquilo opcionalmente substituído, poliglicol opcionalmente substituído, poliamina opcionalmente substituída, polialcool opcionalmente substituído, poliamida opcionalmente substituída, poliéster opcionalmente substituído, poliimina opcionalmente substituída, polifosfodiéster opcionalmente substituído (tal como poli(1-fosfo-3-propanol), e semelhantes. Substituintes opcionais incluem álcool, alcoxilo (tal como metoxilo, etoxilo e propoxilo), alquilo de cadeia linear ou ramificada (tal como alquilo C1-C12), amina, aminoalquilo (tal como amino-alquilo C1-C12), fosforamidite, fosfato, tiofosfato, hidrazida, hidrazina, halogéneo, (tal

como F, Cl, Br, ou I), amida, alquilamida (tal como alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-amida), ácido carboxílico, éster carboxílico, anidrido carboxílico, halogeneto de ácido carboxílico, halogeneto de sulfônico, éster de imidato, isocianato, isotiocianato, haloformato, aducto carbodiimida, aldeídos, cetonas, sulfidrilo, haloacetilo, halogeneto de alquilo, sulfonato de alquilo, NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub> em que R<sub>1</sub>R<sub>2</sub> é -C(=O)CH=CHC(=O) (maleimida), tioéter, ciano, açúcar (tal como manose, galactose, e glicose), carbonilo α,β-insaturado, alquilo mercurial, sulfona α,β-insaturada.

Espaçadores adequados podem compreender moléculas policíclicas, tais como aquelas contendo anéis fenilo ou ciclo-hexílo. O espaçador pode ser um poliéter tal como polifosfopropanodiol, polietilenoglicol, polipropilenoglicol, uma molécula bifuncional policíclica, tal como um pentaleno, indeno, naftaleno, azuleno, heptaleno, bifeníleno, asimindaceno, sim-indaceno, acenaftíleno, fluoreno, fenaleno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, acefenatríleno, aceantríleno, trifeníleno, pireno, criseno, naftaceno, tiantreno, isobenzofurano, cromeno, xanteno, fenoxatiina bifuncional, que podem ser substituídos ou modificados, ou uma combinação dos poliéteres e das moléculas policíclicas. A molécula policíclica podem ser substituída ou poli-substituída com alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, alquilo C<sub>6</sub>, alcenilo, hidroxialquilo, halogénio ou um grupo haloalquilo. Moléculas poli-heterocíclicas contendo azoto (p.ex., indolizina) são tipicamente espaçadores inadequados. O espaçador pode também ser um polialcool, tal como glicerol ou pentaeritritol. Num caso, o espaçador compreende 1-(fosfopropano)<sub>3</sub>-fosfato ou 1-(fosfopropano)<sub>4</sub>-fosfato (também designados tetrafosfopropanodiol e pentafosfopropanodiol). Num caso, o espaçador compreende 2,2'-etilenodioxidietilamina (EDDA).

Exemplos específicos de espaçadores não-ácido nucleico úteis em IRC incluem "ligadores", descritos por Cload et al. (1991) *J. Am. Chem. Soc.* 113: 6324; Richardson et al. (1991) *J. Am. Chem. Soc.* 113: 5109; Ma et al. (1993) *Nucleic Acids Res.* 21: 2585; Ma et al. (1993) *Biochemistry* 32: 1751; McCurdy et al. (1991) *Nucleosides & Nucleotides* 10: 287; Jaschke et al. (1993) *Tetrahedron Lett.* 34: 301; Ono et al.

(1991) *Biochemistry* 30: 9914; e Publicação Internacional No. WO 89/02439.

Outros espaçadores adequados incluem ligadores descritos por Salunkhe *et al.* (1992) *J. Am. Chem. Soc.* 114: 8768; Nelson *et al.* (1996) *Biochemistry* 35: 5339-5344; Bartley *et al.* (1997) *Biochemistry* 36: 14502-511; Dagneaux *et al.* (1996) *Nucleic Acids Res.* 24: 4506-12; Durand *et al.* (1990) *Nucleic Acids Res.* 18: 6353-59; Reynolds *et al.* (1996) *Nucleic Acids Res.* 24: 760-65; Hendry *et al.* (1994) *Biochem. Biophys Acta* 1219: 405-12; Altmann *et al.* (1995) *Nucleic Acids Res.* 23: 4827-35. Ainda outros espaçadores adequados são descritos em Pat. Europeia No. EP0313219B1 e Pat. U.S. No. 6117657.

Exemplos de espaçadores não-ácido nucleico compreendem oligo-etilenoglicol (p.ex., espaçadores de trietilenoglicol, tetraetilenoglicol, hexaetilenoglicol, e outros polímeros compreendendo até cerca de 10, cerca de 20, cerca de 40, cerca de 50, cerca de 100 ou cerca de 200 unidades de etilenoglicol), espaçadores de alquilo (p.ex., propilo, butilo, hexilo, e outros espaçadores de alquilo C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, p.ex., geralmente alquilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>, mais frequentemente alquilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>), espaçadores de nucleótidos abásicos, espaçadores simétricos ou assimétricos derivados de glicerol, pentaeritritol ou 1,3,5-tri-hidroxiciclo-hexano (p.ex., porções espaçadoras duplicadoras e triplicadoras simétricas aqui descritas). Os espaçadores podem também compreender oligómeros heteroméricos ou homoméricos e polímeros dos compostos anteriormente mencionados (p.ex., ligados através de uma amida, éster, éter, tioéter, dissulfureto, fosfodiéster, fosforotioato, fosforamidato, fosfotriéster, fosforoditioato, metilfosfonato ou outra ligação).

Porções espaçadoras adequadas podem contribuir com carga e/ou hidrofobicidade para o IRC, contribuir para propriedades farmacocinéticas favoráveis (p.ex., melhor estabilidade, maior tempo de permanência no sangue) para o IRC, e/ou resultar no direcccionamento do IRC para determinadas células ou órgãos. As porções espaçadoras podem ser seleccionadas ou modificadas para adaptar o IRC para propriedades farmacocinéticas desejadas ou adequação para modos de administração desejados (p.ex., administração oral). Será

apreciado pelo leitor que, por conveniência, um espaçador (ou componente espaçador) é por vezes referido pelo nome químico do composto a partir do qual o componente espaçador é derivado (p.ex., hexaetilenoglicol), com o entendimento de que o IRC comprehende realmente o conjugado do composto e porções de ácido nucleico adjacentes ou outros componentes da porção espaçadora.

Num IRC comprehendo mais do que uma porção espaçadora, os espaçadores podem ser o mesmo ou diferentes. Assim, num caso todas as porções espaçadoras não-ácido nucleico num IRC têm a mesma estrutura. Num caso, um IRC comprehende porções espaçadoras não-ácido nucleico com pelo menos 2, pelo menos 3, pelo menos 4, pelo menos 5, ou pelo menos 6 ou mais estruturas diferentes.

Nalguns casos contemplados, a porção espaçadora de um IRC é definida para excluir certas estruturas. Assim, nalguns casos, um espaçador é diferente de um nucleótido abásico ou polímero de nucleótidos abásicos. Nalguns casos, um espaçador é diferente de um oligo(etilenoglicol) (p.ex., HEG, TEG e semelhantes) ou poli(etilenoglicol). Nalguns casos, um espaçador é diferente de um espaçador alquilo C3. Nalguns casos, um espaçador é diferente de um polipéptido. Assim, nalguns casos, uma molécula imunogénica, p.ex., uma proteína ou polipéptido, não é adequado como componente de porções espaçadoras. No entanto, tal como discutido *infra*, está contemplado que em certos casos, um IRC é um "IRC proteináceo", i.e., comprehendo uma porção espaçadora comprehendo um polipéptido. No entanto, nalguns casos, a porção espaçadora não é proteinácea e/ou não é um antigénio (i.e., a porção espaçadora, se isolada do IRC, não é um antigénio).

Geralmente, porções espaçadoras adequadas não tornam o IRC do qual são um componente insolúvel numa solução aquosa (p.ex., PBS, pH 7,0). Assim, a definição de espaçadores exclui microtransportadores ou nanotransportadores. Adicionalmente, uma porção espaçadora que possui baixa solubilidade, tal como um espaçador dodecil (solubilidade <5 mg/ml quando medida como precursor diálcool 1,12-di-hidroxidodecano) não é preferida porque pode reduzir a

hidrofilicidade e actividade do IRC. De preferência, as porções espaçadoras têm solubilidade muito maior que 5 mg/ml (p.ex., ≥20 mg/ml, ≥50 mg/ml ou ≥100 mg/ml) quando medidas como precursores diálcool.

A carga de um IRC pode ter o contributo de fosfato, tiofosfato, ou outros grupos nas porções ácido nucleico, bem como grupos em porções espaçadoras não-ácido nucleico. Nalguns casos, uma porção espaçadora não-ácido nucleico possui uma carga líquida (p.ex., uma carga líquida positiva ou carga líquida negativa medida a pH 7). Num caso útil, o IRC tem uma carga líquida negativa. Nalguns casos, a carga negativa de uma porção espaçadora num IRC é aumentada através de derivação de uma subunidade espaçadora aqui descrita para aumentar a sua carga. Por exemplo, o glicerol pode ser covalentemente ligado a duas porções ácido nucleico e o restante álcool pode reagir com uma fosforamidite activada, seguida de oxidação ou sulfuração para formar um fosfato ou tiofosfato, respectivamente. Em certos casos a carga negativa contributo das porções espaçadoras não-ácido nucleico num IRC (i.e., a soma das cargas quando existe mais de um espaçador) é maior do que a carga negativa contributo das porções ácido nucleico do IRC. A carga pode ser calculada com base na fórmula molecular, ou determinada experimentalmente, p.ex. através de electroforese capilar (Li, ed., 1992, "Capillary electrophoresis, Principles, Practice and Application" Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands, págs. 202-206).

Tal como é observado *supra*, espaçadores adequados podem ser polímeros de compostos sem ser de ácido nucleico menores (p.ex. não nucleotídicos), tais como os aqui descritos, que são eles próprios úteis como espaçadores, incluindo compostos vulgarmente referidos como "ligadores" não nucleotídicos. Tais polímeros (i.e., "espaçadores multiunidades") podem ser heteroméricos ou homoméricos, e compreendem frequentemente unidades monoméricas (p.ex., HEG, TEG, glicerol, 1'2'-didesoxirribose, e semelhantes) ligadas através de uma ligação éster (p.ex., fosfodiéster ou éster de fosforotioato). Assim, num caso o espaçador compreende uma estrutura polimérica (p.ex., heteropolimérica) de unidades não nucleotídicas (p.ex., de 2 a cerca de 100 unidades,

alternativamente 2 a cerca de 50, p.ex., 2 a cerca de 5, alternativamente p.ex., cerca de 5 a cerca de 50, p.ex., cerca de 5 a cerca de 20).

Para ilustração, IRC contendo SEQ ID NO:17 (C869) e espaçadores multiunidades incluem:

5'-TCCTGGAGGGGTTCT- (C3)<sub>15</sub>-T  
 5'-TCCTGGAGGGGTTGT- (glicerol)<sub>15</sub>-T  
 5'-TCCTGGAGGGGTTGT- (TEG)<sub>8</sub>-T  
 5'-TCCTGGAGGGGTTGT- (HEG)<sub>4</sub>-T

em que (C3)<sub>15</sub> significa 15 ligadores propilo ligados através de ésteres de fosforotioato; (glicerol)<sub>15</sub> significa 15 ligadores glicerol ligados através de ésteres de fosforotioato; (TEG)<sub>8</sub> significa 8 ligadores trietilenoglicol ligados através de ésteres de fosforotioato; e (HEG)<sub>4</sub> significa 4 ligadores de hexaetilenoglicol ligados através de ésteres de fosforotioato. Será apreciado que certos espaçadores de multi-unidades têm uma carga líquida negativa, e que a carga negativa pode ser aumentada através do aumento do número de, p.ex., unidades monoméricas ligadas por éster.

Em certos casos, uma porção espaçadora é uma porção espaçadora não-ácido nucleico multivalente (i.e., um "espaçador multivalente"). Tal como utilizado neste contexto, um IRC contendo um espaçador multivalente contém um espaçador covalentemente ligado a três (3) ou mais porções ácido nucleico. Os espaçadores multivalentes são por vezes referidos na arte como "moléculas de plataforma". Os espaçadores multivalentes podem ser poliméricos ou não poliméricos. Exemplos de moléculas adequadas incluem glicerol ou glicerol substituído (p.ex., 2-hidroximetilglicerol, levulinil-glicerol); tetra-aminobenzeno, hepta-aminobetaciclodextrina, 1,3,5-tri-hidroxiciclo-hexano, pentaeritritol e derivados de pentaeritritol, tetra-aminopentaeritritol, 1,4,8,11-tetra-azaciclotetradecano (Cyclam), 1,4,7,10-tetra-azaciclododecano (Cyclen), polietilenoimina, 1,3-diamino-2-propanol e derivados substituídos, compostos [propiloximetil]etilo (p.ex., "triplo"), derivados de polietilenoglicol tais como os designados "Star PEG" e "bPEG" (ver, p.ex., Gnanou et al. (1988) *Makromol. Chem.* 189: 2885; Rein et al. (1993) *Acta Polimer* 44: 225; Pat. U.S. No. 5171264) e dendrímeros.

Os dendrimeros são conhecidos na arte e são quimicamente definidos como moléculas globulares, geralmente preparadas através de reacção passo a passo ou reiterativa de monómeros multifuncionais para obter uma estrutura ramificada (ver, p.ex., Tomalia *et al.* (1990) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 29: 138-75). É conhecida uma variedade de dendrimeros, p.ex., dendrimeros de poliamidoamina, polietilenoimina e polipropilenoimina terminados com amina. Exemplos de dendrimeros úteis no presente caso incluem polímeros "dense star" ou polímeros "starburst" tais como os descritos em Pat. U.S. Nos. 4587329, 5338532 e 6177414, incluindo os designados "dendrimeros de poli(amidoamina)" ("PAMAM"). Ainda outras moléculas espaçadoras multiméricas adequadas para utilização dentro do presente caso incluem moléculas de plataforma de valência não poliméricas, quimicamente definidas tais como as divulgadas em Pat. U.S. No. 5552391; e publicações de pedidos PCT WO 00/75105, WO 96/40197, WO 97/46251, WO 95/07073, e WO 00/34231. Muitos outros espaçadores multivalentes adequados podem ser utilizados e serão conhecidos dos peritos na arte.

A conjugação de uma porção ácido nucleico com uma molécula de plataforma pode ser efectuada de vários modos, tipicamente envolvendo um ou mais agentes de reticulação e grupos funcionais na porção ácido nucleico e molécula de plataforma. Os grupos de ligação são adicionados a plataformas utilizando técnicas de química de síntese padrão. Os grupos de ligação podem ser adicionados a porções ácido nucleico utilizando técnicas de síntese padrão.

Espaçadores multivalentes com uma variedade de valências são úteis, e em vários casos o espaçador multivalente de um IRC é ligado a entre cerca de 3 e cerca de 400 porções ácido nucleico, frequentemente 3 a 100, por vezes de 3 a 50, frequentemente de 3 a 10, e por vezes mais de 400 porções ácido nucleico. Em vários casos, o espaçador multivalente é conjugado com mais de 10, mais de 25, mais de 50, ou mais de 500 porções ácido nucleico (que podem ser a mesma ou diferentes). Será apreciado que, em certos casos nos quais um IRC comprehende uma espaçador multivalente, são descritas populações de IRC com estruturas moleculares ligeiramente diferentes. Por exemplo, quando um IRC é preparado utilizando

um dendrímero como espaçador multivalente de elevada valência, é produzida uma mistura de moléculas de certo modo heterogénea, i.e., compreendendo um número diferente (dentro ou predominantemente dentro de um intervalo determinável) de porções ácido nucleico unidas a cada molécula de dendrímero.

Polissacáridos derivados para permitir a ligação a porções ácido nucleico podem ser utilizados como espaçadores em IRC. Polissacáridos adequados incluem polissacáridos de ocorrência natural (p.ex., dextrano) e polissacáridos sintéticos (p.ex., ficoll). Por exemplo, pode ser preparado aminoetilcarboximetil-ficoll (AECM-Ficoll) através do método de Inman (1975) *J. Imm.* 114: 704-709. O ACM-Ficoll pode então reagir com um reagente de reticulação heterobifuncional, tal como éster de 6-maleimido-capróico-acil-N-hidroxisuccinimida, e depois conjugado com uma porção ácido nucleico derivada com tiol (ver Lee et al. (1980) *Mol. Imm.* 17: 749-56). Outros polissacáridos podem ser modificados de forma semelhante.

Estará bem dentro da capacidade de um perito, guiado por este fascículo e conhecimento na técnica, preparar IRC utilizando métodos de rotina. As técnicas para produzir porções ácido nucleico (p.ex., oligonucleótidos e oligonucleótidos modificados) são conhecidas. Porções ácido nucleico podem ser sintetizadas utilizando técnicas que incluem, mas não se limitam a, métodos enzimáticos e métodos químicos e combinações de abordagens enzimáticas e químicas. Por exemplo, ADN ou ARN contendo ligações fosfodiéster pode ser quimicamente sintetizado através da ligação sequencial da fosforamidite do nucleóside apropriada ao grupo 5'-hidroxilo do oligonucleótido em crescimento ligado a um suporte sólido na extremidade 3', seguida de oxidação do triéster de fosfato intermediário a um triéster de fosfato. Suportes sólidos úteis para síntese de ADN incluem Vidro de Poro Controlado (Applied Biosystems, Foster City, CA), matriz de contas de poliestireno (Primer Support, Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ) e TentGel (Rapp Polymere GmbH, Tubingen, Alemanha). Uma vez sintetizada a sequência oligonucleotídica desejada, o oligonucleótido é removido do suporte, os grupos triéster de fosfato são desprotegidos para diésteres de fosfato e as

bases nucleosídicas são desprotegidas utilizando amónia aquosa ou outras bases.

Por exemplo, polinucleótidos de ADN ou ARN (porções ácido nucleico), contendo ligações fosfodiéster são geralmente sintetizados através de iterações repetitivas dos seguintes passos: a) remoção do grupo protector do grupo 5'-hidroxilo do nucleósido ou ácido nucleico ligado em 3' ao suporte sólido, b) ligação da fosforamidite do nucleósido activada ao grupo 5'-hidroxilo, c) oxidação do triéster de fosfito ao triéster de fosfato, e d) terminação dos grupos 5'-hidroxilo que não reagiram. O ADN ou ARN contendo ligações fosforotioato é preparado tal como descrito acima, excepto que o passo de oxidação é substituído por um passo de sulfuração. Uma vez sintetizada a sequência oligonucleotídica desejada, o oligonucleótido é removido do suporte, os grupos triéster de fosfato são desprotegidos para diésteres de fosfato e as bases nucleosídicas são desprotegidas utilizando amónia aquosa ou outras bases. Ver, por exemplo, Beaucage (1993) "Oligodeoxyribonucleotide Synthesis" em PROTOCOLS FOR OLIGONUCLEOTIDES AND ANALOGS, SYNTHESIS AND PROPERTIES (Agrawal, ed.) Humana Press, Totowa, NJ; Warner et al. (1984) DNA 3: 401; Tang et al. (2000) Org. Process Res. Dev. 4: 194-198; Wyrzykiewica et al. (1994) Bioorg. & Med Chem. Lett. 4: 1519-1522; Radhakrishna et al. (1989) J. Org. Chem. 55: 4693-4699. e Pat. U.S. No. 4458066. Máquinas programáveis que sintetizam automaticamente porções ácido nucleico de sequências especificadas estão amplamente disponíveis. Exemplos incluem o sintetizador automático de ADN, Expedite 8909 (Perseptive Biosystem, Framington MA), ABI 394 (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA), e II OligoPilot (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

Os polinucleótidos podem ser montados na direcção 3' para 5', p.ex., utilizando nucleósidos com bases protegidas (monómeros) contendo um grupo protector a 5' sensível a ácido e uma 3'-fosforamidite. Exemplos de tais monómeros incluem 5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-nucleósido protegido-3'-O-(N,N-diisopropilamino)-2-cianoetil-fosforamidite, em que exemplos dos nucleósidos protegidos incluem, mas não se limitam a, N6-benzoiladenosina, N4-benzoilcitrina, N2-isobutirilguanosina, timidina, e uridina. Neste caso, o

suporte sólido utilizado contém um nucleósido protegido ligado a 3'. Alternativamente, polinucleótidos podem ser montados na direcção 5' para 3' utilizando nucleósidos com bases protegidas contendo um grupo protector a 3' sensível a ácido e uma 5'-fosforamidite. Exemplos de tais monómeros incluem 3'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-nucleósido protegido-5'-O-(N,N-diisopropilamino)-2-cianoetyl-fosforamidite, em que exemplos dos nucleósidos protegidos incluem, mas não se limitam a N6-benzoiladenosina, N4-benzoilcitrina, N2-isobutirilguanosina, timidina, e uridina (Glen Research, Sterling, VA). Neste caso, o suporte sólido utilizado contém um nucleósido protegido ligado a 5'. Componentes ácido nucleico circulares podem ser isolados, sintetizados através de métodos recombinantes ou quimicamente sintetizados. A síntese química pode ser efectuada utilizando qualquer método descrito na literatura. Ver, por exemplo, Gao *et al.* (1995) *Nucleic Acids Res.* 23: 2025-2029 e Wang *et al.* (1994) *Nucleic Acids Res.* 22: 2326-2333.

A adição de porções espaçadoras não-ácido nucleico pode ser realizada utilizando métodos de rotina. Métodos para a adição de determinadas porções espaçadoras são conhecidos na técnica e, por exemplo, são descritos nas referências citadas *supra*. Ver, por exemplo, Durand *et al.* (1990) *Nucleic Acids Res.* 18: 6353-6359. A ligação covalente entre uma porção espaçadora e uma porção ácido nucleico pode ser qualquer uma de vários tipos, incluindo fosfodiéster, fosforotioato, amida, éster, éter, tioéter, dissulfureto, fosforamidato, fosfotriéster, fosforoditioato, metilfosfonato e outras ligações. Será frequentemente conveniente combinar uma ou mais porções espaçadoras e uma ou mais porções ácido nucleico utilizando a mesma química do tipo fosforamidite utilizada para a síntese da porção ácido nucleico. Por exemplo, os IRC podem ser convenientemente sintetizados utilizando um sintetizador de ADN automático (p.ex., Expedite 8909; PerSeptive Biosystems, Framington, MA) utilizando química de fosforamidite (ver, p.ex., Beaucage, 1993, *supra*; *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, *supra*). No entanto, um perito compreenderá que os mesmos passos de síntese (ou equivalentes) realizados por um sintetizador de ADN automático podem também ser realizados manualmente, se desejado. Em tal síntese, tipicamente, uma extremidade do

espacador (ou subunidade do espaçador para espaçadores multiméricos) está protegida com um grupo 4,4'-dimetoxitritilo, enquanto a outra extremidade contém um grupo fosforamidite.

Uma variedade de espaçadores com os grupos protectores e reagentes necessários estão comercialmente disponíveis, por exemplo:

espacador	9-O-(4,4'-
trietilenoglicol ou "espacador TEG"	dimetoxitritil)etrietenoglicol-1-O-[ (2-cianoetil)N,N-diisopropilfosforamidite] (Glen Research, 22, 825 Davis Drive, Sterling, VA)
espacador hexaetilenoglicol ou "espacador HEG"	18-O-(4,4'-dimetoxitritil)hexaetilenoglicol-1-O-[ (2-cianoetil)N,N-diisopropilfosforamidite] (Glen Research, Sterling, VA)
espacador propilo	3-(4,4'-dimetoxitritiloxi)propiloxi-1-O-[ (2-cianoetil)N,N-diisopropilfosforamidite] (Glen Research, Sterling, VA);
espacador butilo	4-(4,4'-dimetoxitritiloxi)butiloxi-1-O-[ (2-cianoetil)N,N-diisopropilfosforamidite] (Chem Genes Corporation, Ashland Technology Center, 200 Homer Ave., Ashland, MA)
espacador hexilo	6-(4,4'-dimetoxitritiloxi)hexiloxi-1-O-[ (2-cianoetil)N,N-diisopropilfosforamidite]
espacador (hidroximetil)etilo ou "espacador HME"	2-1-(4,4'-dimetoxitritiloxi)-3-(levuliniloxi)-propiloxi-2-O-[ (2-cianoetil)N,N-diisopropilfosforamidite]; também chamado espacador "ramificado assimétrico"
"espacador nucleotídico abásico"	5-O-(4,4'-dimetoxitritil)-1,2-didesoxirribose-3-O-[ (2-cianoetil)N,N-diisopropilfosforamidite] (Glen Research, Sterling, VA)
"espacador abásico"	1,3-O,bis(4,4'-dimetoxitritil)glicerol-2-O-[ (2-cianoetil)N,N-diisopropilfosforamidite]
"espacador ramificado simétrico"	

"espaçador glicerol"	(Genes Chem, Ashland, MA)
"espaçador triplo"	2,2,2-O,O,O-tris[3-O-(4,4'-dimetoxitritiloxi)propiloximetil]etil-1-O-[ (2-cianoetil)N,N-diisopropilfosforamidite] (Glen Research, Sterling, VA)
"espaçador simétrico"	duplo 1,3-O,O-bis[5-O-(4,4'-dimetoxitritiloxi)pentilamido]propil-2-O-[ (2-cianoetil)N,N-diisopropilfosforamidite] (Glen Research, Sterling, VA)
"espaçador dodecil"	12-(4,4'-dimetoxitritiloxi)dodecilioxi-1-O-[ (2-cianoetil)N,N-diisopropilfosforamidite] (Glen Research, Sterling, VA)

Estes e uma grande variedade de outros precursores de porções espaçadoras protegidas (p.ex., compreendendo grupos protectores dos grupos DMT e fosforamidite) podem ser adquiridos ou podem ser sintetizados utilizando métodos de rotina para utilização na preparação dos IRC aqui divulgados. O instrumento é programado de acordo com as instruções do fabricante para adicionar os monómeros nucleotídicos e espaçadores na ordem desejada.

Embora a utilização de química de fosforamidite seja conveniente para a preparação de certos IRC, será apreciado que os IRC não estão limitados a compostos preparados através de qualquer método particular de síntese ou preparação.

Num caso, são preparados IRC com espaçadores multivalentes conjugados com mais de um tipo de porção ácido nucleico. Por exemplo, foram descritas plataformas contendo dois grupos maleimida (que podem reagir com polinucleótidos contendo tiol), e dois grupos éster activados (que podem reagir com ácidos nucleicos contendo amino) (ver, p.ex., pedido de publicação PCT WO 95/07073). Estes dois grupos activados podem reagir independentemente um do outro. Isto resultará num IRC contendo um total de 4 porções ácido nucleico, duas de cada sequência.

IRC com espaçadores multivalentes contendo duas sequências de ácido nucleico diferentes podem também ser preparados utilizando o espaçador ramificado simétrico, descrito acima, e química convencional de fosforamidite (p.ex., utilizando métodos manuais ou automáticos). O espaçador ramificado simétrico contém um grupo fosforamidite e dois grupos protectores que são o mesmo e são removidos simultaneamente. Numa abordagem, por exemplo, um primeiro ácido nucleico é sintetizado e ligado ao espaçador ramificado simétrico, os grupos protectores são removidos do espaçador. Depois, dois ácidos nucleicos adicionais (da mesma sequência) são sintetizados no espaçador (utilizando o dobro da quantidade de reagentes utilizados para a síntese de uma única porção ácido nucleico em cada passo).

Um método semelhante pode ser utilizado para ligar três porções ácido nucleico diferentes (referidas abaixo como Ácidos nucleicos I, II, e III) a uma plataforma multivalente (p.ex., espaçador ramificado assimétrico). Isto é mais convenientemente realizado utilizando um sintetizador de ADN automático. Num caso, o espaçador ramificado assimétrico contém um grupo fosforamidite e dois grupos protectores ortogonais que podem ser removidos independentemente. Primeiro, o ácido nucleico I é sintetizado, depois o espaçador ramificado assimétrico é ligado ao ácido nucleico I, depois o ácido nucleico II é adicionado após a remoção selectiva de um dos grupos protectores. O ácido nucleico II é desprotegido, e terminado, e então o outro grupo protector no espaçador é removido. Finalmente é sintetizado o ácido nucleico III.

Nalguns casos, uma porção ou mais porções ácido nucleico são sintetizadas, e um grupo de ligação reactivo (p.ex., amino, carboxilato, tio, dissulfureto, e semelhantes) é adicionado utilizando técnicas padrão de química sintética. O grupo de ligação reactivo (que se considera que forma uma porção da porção espaçadora resultante) é conjugado com compostos adicionais sem ser de ácido nucleico para formar a porção espaçadora. Grupos de ligação são adicionados a ácidos nucleicos utilizando métodos padrão para síntese de ácidos nucleicos, empregando uma variedade de reagentes descritos na literatura ou comercialmente disponíveis. Exemplos incluem

reagentes que contêm um grupo amino, grupo carboxilato, grupo tiol, ou grupo dissulfureto protegido e um grupo fosforamidite. Uma vez incorporados estes compostos nos ácidos nucleicos, através do grupo fosforamidite activado, e desprotegidos, estes proporcionam ácidos nucleicos com reactividade amino, carboxilato ou tiol.

Ligadores hidrófilos de comprimentos variáveis são úteis, por exemplo para ligar porções ácido nucleico e moléculas de plataforma. É conhecida uma variedade de ligadores adequados. Ligadores adequados incluem, sem limitação, oligómeros ou polímeros lineares de etilenoglicol. Tais ligadores incluem ligadores com a fórmula  $R^1S(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2O(CH_2)_mCO_2R^2$  em que  $n = 0-200$ ,  $m = 1$  ou  $2$ ,  $R^1 = H$  ou um grupo protector tal como tritilo,  $R^2 = H$  ou alquilo ou arilo, p.ex. éster de 4-nitrofenilo. Estes ligadores são úteis na ligação de uma molécula contendo um grupo tiol reactivo tal como haloaceilo, maleiamida, etc., através de um tioéter a uma segunda molécula que contém um grupo amino através de uma ligação amida. A ordem de ligação pode variar, i.e., a ligação tioéter pode ser formada antes ou depois da ligação amida ser formada. Outros ligadores úteis incluem Sulfo-SMCC (4-[N-Maleimidometil]-ciclo-hexano-1-carboxilato de sulfossuccinimidilo) Pierce Chemical Co. produto 22322; Sulfo-EMCS (éster de  $N$ -[ $\varepsilon$ -maleimidocaproiloxil]sulfosuccinimida) Pierce Chemical Co. produto 22307; Sulfo-GMBS (éster de  $N$ -[ $\gamma$ -maleimidobutiriloxi]sulfosuccinimida) Pierce Chemical Co. produto 22324 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL), e compostos semelhantes da fórmula geral éster de maleimido-R-C-(O)NHS, em que R = alquilo, alquilo cíclico, polímeros de etilenoglicol e semelhantes.

Métodos particularmente úteis para ligar covalentemente porções ácido nucleico a espaçadores multivalentes são descritos nas referências citadas *supra*.

Em certos casos, um polipéptido é utilizado como porção espaçadora multivalente à qual uma pluralidade de porções ácido nucleico são covalentemente conjugadas, directamente ou através de ligadores, para formar um "IRC proteináceo". O polipéptido pode ser um transportador (p.ex., albumina).

Tipicamente, um IRC proteináceo compreende pelo menos uma, e geralmente várias ou muitas porções ácido nucleico que (a) têm entre 2 e 7, mais frequentemente entre 4 e 7 nucleótidos de comprimento, alternativamente entre 2 e 6, 2 e 5, 4 e 6, ou 4 e 5 nucleótidos de comprimento e/ou (b) têm actividade imunomoduladora isolada inferior ou não têm actividade imunomoduladora isolada. Os métodos de produção de um IRC proteináceo serão aparentes a um técnico após revisão da presente divulgação. Um ácido nucleico, por exemplo, pode ser covalentemente conjugado com uma porção espaçadora polipeptídica através de métodos conhecidos na técnica, incluindo ligações entre a extremidade 3' ou 5' de uma porção ácido nucleico (ou numa base adequadamente modificada numa posição interna numa porção ácido nucleico) e um polipéptido com um grupo reactivo adequado (p.ex., um éster de N-hidroxissuccinimida, que pode reagir directamente com o grupo amino N<sup>4</sup> de resíduos de citosina). Como outro exemplo, um polipéptido pode ser ligado a uma extremidade 5' livre de uma porção ácido nucleico através de um grupo amina, tiol, ou carboxilo que tenha sido incorporado na porção ácido nucleico. Alternativamente, o polipéptido pode ser conjugado com uma porção espaçadora, tal como aqui descrito. Além disso, um grupo de ligação compreendendo uma amina, tiol, ou carboxilo protegido numa extremidade, e uma fosforamidite podem ser covalentemente ligados a um grupo hidroxilo de um polinucleótido, e, subsequente à desprotecção, a funcionalidade pode ser utilizada para ligar covalentemente o IRC a um péptido.

#### Complexos e composições de IRP e/ou IRC

Os IRP ou IRC podem ser directamente administrados ao indivíduo ou podem ser administrados numa composição ou complexo para aumentar a distribuição de IRP ou IRC às células e/ou a tomada pelas células. As composições ou complexos podem também ser utilizados para aumentar a co-distribuição de duas ou mais espécies diferentes de IRP e/ou IRC a uma célula. Em certos casos, uma mistura de IRC e IRP pode ser complexada, de modo a proporcionar pelo menos uma espécie de IRC e IRP. Tais composições ou complexos de distribuição incluem, mas não se limitam a, encapsulamento dos complexos e sistemas de dispersão coloidais tal como aqui

descrito e conhecido na técnica. Exemplos de tais composições de distribuição incluem emulsões óleo-em-água, micelas, e lipossomas. As composições ou complexos de distribuição incluem também IRP e/ou IRC ligados a uma molécula ligadora, uma molécula de plataforma, uma nanopartícula ou uma micropartícula, tal como aqui descrito. Tais ligações incluem ligações tanto covalentes como não-covalentes. Salvo indicação em contrário, as formulações de complexos e composições aqui descritas para utilização com IRP são também apropriadas para utilização com IRC.

Nalguns casos, o IRP e/ou IRC é conjugado com uma molécula ligadora. A porção IRP e/ou IRC pode ser ligada à porção ligadora de um conjugado de uma variedade de maneiras, incluindo interacções covalentes e/ou não covalentes.

A ligação entre as porções pode ser feita na extremidade 3' ou 5' do IRP e/ou IRC, ou numa base adequadamente modificada numa posição interna no IRP e/ou IRC. Se o ligador for um péptido e contiver um grupo reactivo adequado (p.ex., um éster de N-hidroxisuccinimida), este pode ser feito reagir directamente com o grupo amino N<sup>4</sup> de resíduos de citosina. Dependendo do número e localização dos resíduos de citosina no IRP e/ou IRC, pode ser alcançada ligação específica num ou mais resíduos.

Alternativamente, oligonucleósidos modificados, tais como são conhecidos na técnica, podem ser incorporados em qualquer terminal, ou em posições internas no IRP e/ou IRC. Estes podem conter grupos funcionais bloqueados que, quando desbloqueados, são reactivos com uma variedade de grupos funcionais que podem estar presentes em, ou ligados ao, ligador de interesse.

Quando o ligando é um péptido, esta porção do conjugado pode ser ligada à extremidade 3' do IRP e/ou IRC através de química de suporte sólido. Por exemplo, a porção de IRP pode ser adicionada a uma porção peptídica que tenha sido pré-sintetizada num suporte. Haralambidis *et al.* (1990a) *Nucleic Acids Res.* 18: 493-499; e Haralambidis *et al.* (1990b) *Nucleic Acids Res.* 18: 501-505. Alternativamente, o IRP pode ser sintetizado de forma a ficar ligado a um suporte sólido

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

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

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

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

Associações não covalentes também podem ocorrer através de interacções iónicas envolvendo um IRP e/ou IRC através da utilização de uma porção ligadora compreendendo resíduos com carga que possam interagir com um oligonucleótido. Por exemplo, conjugação não covalente pode ocorrer entre um IRP e/ou IRC com carga geralmente negativa e resíduos de aminoácidos de carga positiva de um ligador peptídico, p.ex., resíduos de polilisina, poliarginina e poli-histidina.

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

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

A ligação de um IRP e/ou IRC circular a um ligador peptídico pode ser formada de várias maneiras. Quando o IRP e/ou IRC circular é sintetizado utilizando métodos recombinantes ou químicos, é adequado um nucleósido modificado. Ruth (1991) em "Oligonucleotides e Analogues: A Practical Approach", IRL Press. Tecnologia de ligação padrão

pode então ser utilizada para ligar o IRP e/ou IRC circular ao péptido. Goodchild (1990) *Bioconjug. Chem.* 1: 165. Quando o IRP e/ou IRC circular é isolado, ou sintetizado utilizando métodos recombinantes ou químicos, a ligação pode ser formada através de activação química, ou fotoactivação, de um grupo reactivo (por exemplo, carbeno, radical) que tenha sido incorporado no péptido.

Métodos adicionais para a ligação de péptidos e outras moléculas a oligonucleótidos podem ser encontrados em Pat. U.S. No. 5391723; Kessler (1992) "Nonradioactive labeling methods for nucleic acids" em Kricka (ed.) *Nonisotopic DNA Probe Techniques*, Academic Press; e Geoghegan et al. (1992) *Bioconjug. Chem.* 3: 138-146.

Um IRP e/ou IRC pode ser associado de forma íntima de outras maneiras. Nalguns casos, um IRP e/ou IRC são intimamente associados através de encapsulação. Noutros casos, um IRP e/ou IRC são intimamente associados através de ligação a uma molécula de plataforma. A "molécula de plataforma" (também chamada "plataforma") é uma molécula contendo locais que permitem a ligação do IRP e/ou IRC. Noutros casos, um IRP e/ou IRC são intimamente associados através de adsorção numa superfície, de preferência uma partícula transportadora.

Nalguns casos, os métodos aqui descritos empregam um agente de encapsulação em associação com o IRP e/ou IRC. De preferência, a composição compreendendo IRP e/ou IRC e agente de encapsulação está na forma de emulsões adjuvantes óleo-em-água, micropartículas e/ou lipossomas. De preferência, as emulsões adjuvantes óleo-em-água, micropartículas e/ou lipossomas encapsulando um IRP e/ou IRC estão na forma de partículas de cerca de 0,04 µm a cerca de 100 µm de tamanho, de preferência qualquer um dos seguintes intervalos: de cerca de 0,1 µm a cerca de 20 µm; de cerca de 0,15 µm a cerca de 10 µm; de cerca de 0,05 µm a cerca de 1,00 µm; de cerca de 0,05 µm a cerca de 0,5 µm.

Sistemas de dispersão coloidal, tais como microesferas, contas, complexos macromoleculares, nanocápsulas e sistema baseado em lípidos, tais como emulsões óleo-em-água, micelas,

micelas mistas e lipossomas podem proporcionar um encapsulamento eficaz de composições contendo IRP e/ou IRC.

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

Polipéptidos adequados para componentes de encapsulamento incluem qualquer um conhecido na técnica e incluem, mas não se limitam a, proteínas de ligação a ácidos gordos. Os polipéptidos modificados contêm qualquer uma de uma variedade de modificações, incluindo, mas não se limitando a, glicosilação, fosforilação, miristilação, sulfatação e hidroxilação. Tal como aqui utilizado, um polipéptido adequado é um que protegerá uma composição contendo IRP e/ou IRC para conservar a actividade imuno-reguladora destes. Exemplos de proteínas de ligação incluem, mas não se limitam a, albuminas tais como albumina de soro bovino (BSA) e albumina de ervilha.

Outros polímeros adequados podem ser qualquer um conhecido na técnica dos produtos farmacêuticos e incluem, mas não se limitam a, polímeros de ocorrência natural, tais como dextrans, amido de hidroxietilo e polissacáridos, e polímeros sintéticos. Exemplos de polímeros de ocorrência natural incluem proteínas, glicopéptidos, polissacáridos, dextrano e lípidos. O polímero adicional pode ser um polímero sintético. Exemplos de polímeros sintéticos que são adequados para utilização incluem, mas não se limitam a, polialquilglicóis (PAG) tais como PEG, polióis polioxietilados (POP), tais como glicerol polioxietilado (POG), politrimetilenoglicol (PTG), polipropilenoglicol (PPG), poli-hidroxietilmetacrilato, álcool polivinílico (PVA), ácido poliacrílico, polietiloxazolina, poliacrilamida, polivinilpirrolidona (PVP), poliaminoácidos, poliuretano e polifosfzeno. Os polímeros sintéticos podem também ser lineares ou ramificados, substituídos ou não substituídos, copolímeros homopoliméricos, ou copolímeros de blocos de dois ou mais monómeros sintéticos diferentes.

Os PEG para utilização em composições de encapsulamento do presente invento são adquiridos em fornecedores de produtos químicos ou sintetizados utilizando técnicas conhecidas dos peritos na arte.

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

Um sistema de dispersão coloidal opcional é um lipossoma. Tal como aqui utilizado, um "lipossoma" ou "vesícula lipídica" é uma pequena vesícula ligada através de pelo menos uma e possivelmente mais de uma membrana em bicamada lipídica. Os lipossomas são produzidos artificialmente a partir de fosfolípidos, glicolípidos, lípidos, esteróides tais como colesterol, moléculas aparentadas, ou uma combinação destes através de qualquer técnica conhecida na arte, incluindo mas não se limitando a ultra-sons, extrusão, ou remoção de detergente a partir de complexos lípido-detergente. Um lipossoma pode também opcionalmente compreender componentes adicionais, tais como um componente direcccionador para um tecido. Entenda-se que uma "membrana lipídica" ou "bicamada lipídica" não necessita de consistir exclusivamente de lípidos, mas pode adicionalmente conter quaisquer outros componentes adequados, incluindo, mas não se limitando a, colesterol e outros esteróides, produtos químicos lipossolúveis, proteínas de qualquer comprimento, e outras moléculas anfipáticas, desde que a estrutura geral da membrana seja uma folha de duas superfícies hidrófilas ensanduichando um núcleo hidrófobo. Para uma discussão geral da estrutura membranar, ver "The Encyclopedia of Molecular Biology" de J. Kendrew (1994). Para lípidos adequados ver p.ex., Lasic (1993) "Liposomes: from Physics to Applications" Elsevier, Amsterdão.

Os processos para preparação de lipossomas contendo composições de IRP e/ou IRC são conhecidos na técnica. As

vesículas lipídicas podem ser preparadas através de qualquer técnica adequada conhecida na arte. Métodos incluem, mas não se limitam a, microencapsulação, microfluidificação, método de LLC, injecção de etanol, injecção de fréon, método da "bolha", diálise de detergente, hidratação, ultra-sons, e evaporação de fase inversa. Revisto em Watwe *et al.* (1995) *Curr. Sci.* 68: 715-724. As técnicas podem ser combinadas para proporcionar vesículas com os atributos mais desejáveis.

A utilização de LMS contendo componentes de direcccionamento tecidual ou celular está englobada. Tais componentes de direcccionamento são componentes de um LMS que aumentam a sua acumulação em certos locais do tecido ou celulares de preferência noutras locais de tecido ou celulares quando administrados a um animal intacto, órgão, ou cultura celular. Um componente de direcccionamento é geralmente acessível a partir do exterior do lipossoma, e está portanto de preferência ligado à superfície externa ou inserido na bicamada lipídica externa. Um componente de direcccionamento pode ser *inter alia* um péptido, uma região de um péptido maior, um anticorpo específico para uma molécula ou marcador da superfície celular, ou fragmento de ligação ao antigénio deste, um ácido nucleico, um hidrato de carbono, uma região de um hidrato de carbono complexo, um lípido especial, ou uma molécula pequena tal como um fármaco, hormona, ou hapteno, ligado a qualquer uma das moléculas acima mencionadas. Os anticorpos com especificidade para marcadores da superfície celular específicos do tipo celular são conhecidos na técnica e são prontamente preparados através de métodos conhecidos na técnica.

Os LMS podem ser direcccionados para qualquer tipo celular para o qual é dirigido um tratamento terapêutico, p.ex., um tipo celular que seja capaz de regular e/ou participar numa resposta imunitária. Tais células e órgãos alvo incluem, mas não se limitam a, APC, tais como macrófagos, células dendríticas e linfócitos, estruturas linfáticas, tais como nódulos linfáticos e o baço, e estruturas não linfáticas, particularmente aquelas onde se encontram células dendríticas.

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

Nalguns casos em que um IRP e/ou IRC estão intimamente associados através de ligação a uma molécula de plataforma, a plataforma pode ser proteinácea ou não proteinácea (i.e., orgânica). Exemplos de plataformas proteináceas incluem, mas não se limitam a, albumina, gama-globulina, imunoglobulina (IgG) e ovalbumina. Borel et al. (1990) *Immunol. Methods* 126: 159-168; Dumas et al. (1995) *Arch. Dermatol. Res.* 287: 123-128; Borel et al. (1995) *Int. Arch. Allergy Immunol.* 107: 264-267; Borel et al. (1996) *Ann. N. Y. Acad Sci.* 778: 80-87. A plataforma é multivalente (i.e., contém mais de uma ligação, ou local de ligação) para acomodar a ligação a mais de 1 IRP e/ou IRC. Consequentemente, a plataforma pode conter 2 ou mais, 3 ou mais, 4 ou mais, 5 ou mais, 6 ou mais, 7 ou mais, 8 ou mais, 9 ou mais, 10 ou mais ligações ou locais de ligação. Outro exemplos de plataformas poliméricas são dextrano, poliacrilamida, ficoll, carboximetilcelulose, álcool polivinílico, e poli-ácido D-glutâmico/D-lisina.

Os princípios de utilização das moléculas de plataforma são bem compreendidos na técnica. Geralmente, uma plataforma contém, ou é derivada para conter, locais de ligação adequados para IRP e/ou IRC. Além disso, ou alternativamente, o IRP e/ou IRC é derivado para proporcionar grupos de ligação apropriados. Por exemplo, uma plataforma simples é um ligador bi-funcional (i.e., possui dois locais de ligação), tal como um péptido. Outros exemplos são discutidos abaixo.

As moléculas de plataforma podem ser biologicamente estabilizadas, i.e., exibem uma semivida de excreção *in vivo* frequentemente de horas a dias a meses para conferir eficácia terapêutica, e são de preferência constituídas por uma cadeia simples sintética de composição definida. Geralmente têm um peso molecular no intervalo de cerca de 200 a cerca de 1000000, de preferência, qualquer um dos seguintes intervalos: de cerca de 200 a cerca de 500000; de cerca de

200 a cerca de 200000; de cerca de 200 a cerca de 50000 (ou menos, tal como 30000). Exemplos de moléculas de plataforma de valência são polímeros (ou são contituídas por polímeros) tais como polietilenoglicol (PEG; de preferência possuindo um peso molecular de cerca de 200 a cerca de 8000), poli-D-lisina, álcool polivinílico, polivinilpirrolidona, ácido D-glutâmico e D-lisina (numa razão de 3:2). Outras moléculas que podem ser utilizadas são albumina e IgG.

Outras moléculas de plataforma adequadas para utilização são as moléculas de plataforma de valência não poliméricas quimicamente definidas divulgadas em Pat. U.S. No. 5552391. Outras moléculas de plataforma de valência homogéneas quimicamente definidas adequadas para utilização no presente invento são 2,2'-etilenodioxidietylamina (EDDA) e trietilenoglicol (TEG) derivados.

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

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

A conjugação de um IRP e/ou IRC a uma molécula de plataforma pode ser efectuada através de várias maneiras, tipicamente envolvendo um ou mais agentes de reticulação e grupos funcionais no IRP e/ou IRC e na molécula de plataforma. As plataformas e o IRP e/ou IRC devem possuir grupos de ligação apropriados. Os grupos de ligação são adicionados às plataformas utilizando técnicas de síntese química padrão. Grupos ligadores podem ser adicionados às plataformas polipeptídicas e ao IRP e/ou IRC utilizando tanto técnicas padrão de síntese em fase sólida como técnicas recombinantes. As abordagens recombinantes podem exigir

modificação pós-tradução para anexar um ligador, e tais métodos são conhecidos na técnica.

Como exemplo, os polipéptidos contêm porções cadeia lateral de aminoácido contendo grupos funcionais tais como os grupos amino, carboxilo ou sulfidrilo que servem como locais para a ligação do polipéptido à plataforma. Resíduos que possuem tais grupos funcionais podem ser adicionados ao polipéptido se o polipéptido não contiver já estes grupos. Tais resíduos podem ser incorporados através de técnicas de síntese em fase sólida ou técnicas recombinantes, ambas as quais são bem conhecidas no campo da síntese peptídica. Quando o polipéptido tem uma ou mais cadeias laterais de hidrato de carbono (ou se a plataforma for um hidrato de carbono), grupos funcionais amino, sulfidrilo e/ou aldeído podem ser incorporados aí através de química convencional. Por exemplo, grupos amino primários podem ser incorporados através de reacção do açúcar oxidado com etilenodiamina na presença de cianoboro-hidreto de sódio, sulfidrilos podem ser introduzidos através de reacção de dicloridrato de cisteamina seguido de redução com um agente de redução de dissulfuretos padrão, enquanto grupos aldeído podem ser gerados após oxidação de periodato. De um modo semelhante, a molécula de plataforma pode também ser derivada para conter grupos funcionais se não possuir já grupos funcionais apropriados.

Ligadores hidrófilos de comprimentos variáveis são úteis para ligação de IRP e/ou IRC a moléculas de plataforma. Ligadores adequados incluem oligómeros ou polímeros lineares de etilenoglicol. Tais ligadores incluem ligadores com a fórmula  $R^1S(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2O(CH_2)_mCO_2R^2$  em que  $n = 0-200$ ,  $m = 1$  ou  $2$ ,  $R^1 = H$  ou um grupo protector tal como tritilo,  $R^2 = H$  ou alquilo ou arilo, p.ex., éster de 4-nitrofenilo. Estes ligadores são úteis em ligação de uma molécula contendo um grupo tiol reactivo tal como haloaceilo, maleiamida, etc., através de um tioéter a uma segunda molécula que contém um grupo amino através de uma ligação amida. Estes ligadores são flexíveis em relação à ordem de ligação, i.e., o tioéter pode ser formado primeiro ou por último.

Em casos em que um IRP e/ou IRC estão intimamente associados através de adsorção a uma superfície, a superfície

pode estar na forma de uma partícula transportadora (por exemplo, uma nanopartícula) produzida com um núcleo inorgânico ou orgânico. Exemplos de tais nanopartículas incluem, mas não se limitam a, partículas nanocristalinas, nanopartículas produzidas através da polimerização de alquilcianoacrilatos e nanopartículas produzidas através de polimerização de malonato de metilideno. Superfícies adicionais às quais um IRP e/ou IRC podem ser adsorvidos incluem, mas não se limitam a, partículas de carvão activado e nanoplacas proteína-cerâmica. Outros exemplos de partículas transportadoras são aqui proporcionados.

A adsorção de polinucleótidos e polipeptídos a uma superfície com o objectivo de distribuir as moléculas adsorvidas às células é bem conhecida na técnica. Ver, por exemplo, Douglas *et al.* (1987) *Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier Syst.* 3: 233-261; Hagiwara *et al.* (1987) *In Vivo* 1: 241-252; Bousquet *et al.* (1999) *Pharm. Res.* 16: 141-147; e Kossovsky *et al.*, Pat. U.S. No. 5460831. De preferência, o material compreendendo a superfície adsorvente é biodegradável. A adsorção de um IRP e/ou IRC a uma superfície pode ocorrer através de interacções não covalentes, incluindo interacções iónicas e/ou hidrofobas.

Em geral, características de transportadores tais como nanopartículas, tais como carga da superfície, tamanho da partícula e peso molecular, dependerão das condições de polimerização, concentração do monómero e presença de estabilizadores durante o processo de polimerização (Douglas *et al.*, 1987). A superfície de partículas transportadoras pode ser modificada, por exemplo, com um revestimento da superfície, para permitir ou aumentar a adsorção do IRP e/ou IRC. As partículas transportadoras com IRP e/ou IRC adsorvidos podem ainda ser revestidas com outras substâncias. A adição de tais outras substâncias pode, por exemplo, prolongar a semivida das partículas uma vez administradas ao sujeito e/ou podem direcionar as partículas para um tipo específico de célula ou tecido, como aqui descrito.

Superfícies nanocristalinas a que um IRP e/ou IRC podem ser adsorvidos foram descritas (ver, por exemplo, Pat. U.S. No. 5460831). Partículas nanocristalinas nucleares (com

diâmetros de 1 micrómetro ou menos) são revestidas com uma camada modificadora da energia superficial, que promove a adsorção de polipéptidos, polinucleótidos e/ou outros agentes farmacêuticos. Outra superfície adsorvente são nanopartículas produzidas através da polimerização de alquilcianoacrilatos. Alkilcianoacrilatos podem ser polimerizados em meios aquosos acidificados através de um processo de polimerização aniónica. Dependendo das condições de polimerização, as pequenas partículas tendem a ter tamanhos no intervalo de 20 a 3000 nm, e é possível produzir nanopartículas com características de superfície específicas e com cargas superficiais específicas (Douglas et al., 1987). Por exemplo, os oligonucleótidos podem ser adsorvidos a nanopartículas de poli-isobutil- e poli-iso-hexilcianoacrilato na presença de catiões hidrófobos tais como cloreto de tetrafenilfosfónio ou sais de amónio quaternários, tais como brometo de cetiltrimetilamónio. A adsorção do oligonucleótido nestas nanopartículas parece ser mediada pela formação de pares iónicos entre grupos fosfato com carga negativa da cadeia de ácido nucleico e os catiões hidrófobos. Ver, por exemplo, Lambert et al. (1998) *Biochimie* 80: 969-976, Chavany et al. (1994) *Pharm. Res.* 11: 1370-1378, Chavany et al. (1992) *Pharm. Res.* 9: 441-449. Outra superfície adsorvente são nanopartículas produzidas através da polimerização de malonato de metilideno.

Os IRP ou IRC podem ser administrados na forma de complexos microtransportadores (MC). Consequentemente, são descritas composições compreendendo complexos IRP/MC ou complexos IRC/MC. Os complexos IRP/MC compreendem um IRP ligado à superfície de um microtransportador (i.e., o IRP não é encapsulado no MC), e compreendem de preferência múltiplas moléculas de IRP ligadas a cada microtransportador. Em certos casos, uma mistura de diferentes IRP pode ser complexada com um microtransportador, tal que o microtransportador seja ligado a mais de uma espécie de IRP. A ligação entre o IRP e MC pode ser covalente ou não covalente. Tal como será entendido por um perito na técnica, o IRP pode ser modificado ou derivado e a composição do microtransportador pode ser seleccionada e/ou modificada para acomodar o tipo de ligação desejada para a formação do complexo IRP/MC. Esta mesma descrição aplica-se a complexos IRC/MC. Em certos casos, uma

mistura de IRC e IRP pode ser complexada com um microtransportador, tal que o microtransportador seja ligado a pelo menos uma espécie de IRC e IRP.

Microtransportadores úteis neste caso têm menos do que cerca de 150, 120 ou 100  $\mu\text{m}$  de tamanho, mais vulgarmente menos de cerca de 50-60  $\mu\text{m}$  de tamanho, de preferência menos do que cerca de 10  $\mu\text{m}$  de tamanho, e são insolúveis em água pura. Os microtransportadores utilizados são de preferência biodegradáveis, embora microtransportadores não biodegradáveis sejam aceitáveis. Os microtransportadores estão vulgarmente em fase sólida, tais como "contas" ou outras partículas, embora microtransportadores de fase líquida, tais como emulsões de óleo em água compreendendo polímeros ou óleos biodegradáveis estejam também contemplados. Uma grande variedade de materiais biodegradáveis e não biodegradáveis aceitáveis para utilização como microtransportadores é conhecida na técnica.

Os microtransportadores para utilização nas composições ou métodos aqui descritos têm geralmente menos do que cerca de 10  $\mu\text{m}$  de tamanho (p.ex., têm um diâmetro médio de menos do que cerca de 10  $\mu\text{m}$ , ou pelo menos cerca de 97% das partículas passam através de um filtro de écran de 10  $\mu\text{m}$ ), e incluem nanotransportadores (i.e., transportadores com menos de cerca de 1  $\mu\text{m}$  de tamanho). De preferência, são seleccionados microtransportadores possuindo tamanhos dentro de um limite superior de cerca de 9, 7, 5, 2, ou 1  $\mu\text{m}$  ou 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, ou 100 nm e um limite inferior seleccionado independentemente de cerca de 4, 2, ou 1  $\mu\text{m}$  ou cerca de 800, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100, 50, 25, ou 10 nm, em que o limite inferior é inferior ao limite superior. Nalguns casos, os microtransportadores possuem um tamanho de cerca de 1,0-1,5  $\mu\text{m}$ , cerca de 1,0-2,0  $\mu\text{m}$  ou cerca de 0,9-1,6  $\mu\text{m}$ . Em certos casos preferidos, os microtransportadores possuem um tamanho de cerca de 10 nm a cerca de 5  $\mu\text{m}$  ou cerca de 25 nm a cerca de 4,5  $\mu\text{m}$ , cerca de 1  $\mu\text{m}$ , cerca de 1,2  $\mu\text{m}$ , cerca de 1,4  $\mu\text{m}$ , cerca de 1,5  $\mu\text{m}$ , cerca de 1,6  $\mu\text{m}$ , cerca de 1,8  $\mu\text{m}$ , cerca de 2,0  $\mu\text{m}$ , cerca de 2,5  $\mu\text{m}$  ou cerca de 4,5  $\mu\text{m}$ . Quando os microtransportadores são nanotransportadores, casos preferidos incluem

nanotransportadores de cerca de 25 a cerca de 300 nm, 50 a cerca de 200 nm, cerca de 50 nm ou cerca de 200 nm.

Os microtransportadores de fase sólida biodegradáveis podem ser produzidos a partir de polímeros biodegradáveis, incluindo, mas não se limitando a: poliésteres biodegradáveis, tais como poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), e copolímeros (incluindo copolímeros de blocos) destes, bem como copolímeros de blocos de poli(ácido láctico) e poli(etilenoglicol); poliorthoésteres, tais como polímeros baseados em 3,9-dietilideno-2,4,8,10-tetraoxaspiro[5,5]undecano (DETOSU); polianidridos, tais como polímeros polianidrido com base em monómeros relativamente hidrófilos tais como ácido sebáxico; imidas polianidrido, tais como polímeros polianidrido com base em monómeros derivados de ácido sebáxico incorporando aminoácidos (i.e., ligados a ácido sebáxico por ligações imida, através do azoto amino-terminal), tais como glicina ou alanina; ésteres polianidrido; polifosfazenos, especialmente poli(fosfazenos) que contenham grupos éster sensíveis a hidrólise que possam catalisar a degradação da estrutura do polímero através da geração de grupos de ácido carboxílico (Schacht et al., (1996) *Biotechnol. Bioeng.* 1996: 102); e poliamidas tais como poli(ácido láctico-co-lisina).

Uma grande variedade de materiais não biodegradáveis adequados para produção de microtransportadores é também conhecida, incluindo, mas não se limitando a, poliestireno, polipropileno, polietileno, sílica, cerâmica, poliacrilamida, dextrano, hidroxiapatite, látex, ouro, e materiais ferromagnéticos ou paramagnéticos. Certos casos excluem ouro, látex e/ou contas magnéticas. Em certos casos, os microtransportadores podem ser feitos de um primeiro material (p.ex, um material magnético) encapsulado com um segundo material (p.ex., polistireno).

As microesferas de fase sólida são preparadas utilizando técnicas conhecidas na arte. Por exemplo, podem ser preparadas através da técnica de emulsão-extracção de solvente/evaporação. Geralmente, nesta técnica, polímeros biodegradáveis, tais como polianidratos, poli(alquil- $\alpha$ -cianoacrilatos) e poli( $\alpha$ -hidroxiésteres), por exemplo,

poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), poli(ácido D,L-láctico-co-glicólico) e poli(caprolactona), são dissolvidos num solvente orgânico adequado, tal como cloreto de metileno, para constituir a fase dispersa (FD) da emulsão. A FD é emulsionada através de homogeneização de alta velocidade num volume em excesso de fase contínua (FC) aquosa que contém um agente tensioactivo dissolvido, por exemplo, álcool polivinílico (PVA) ou polivinilpirrolidona (PVP). O tensioactivo na FC é para assegurar a formação de gotículas de emulsão discretas e de tamanho adequado. O solvente orgânico é então extraído para a FC e subsequentemente evaporado através da elevação da temperatura do sistema. As micropartículas sólidas são então separadas através de centrifugação ou filtração, e secas, por exemplo, através de liofilização ou aplicação de vácuo, antes de armazenamento a 4°C.

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

Microtransportadores de fase líquida incluem lipossomas, micelas, gotículas de óleo e outros lípidos ou partículas à base de óleo, que incorporem polímeros ou óleos biodegradáveis. Em certos casos, o polímero biodegradável é um tensioactivo. Noutros casos, os microtransportadores de fase líquida são biodegradáveis devido à inclusão de um óleo biodegradável, tal como esqualeno ou um óleo vegetal. Um microtransportador de fase líquida preferido é gotículas de óleo dentro de uma emulsão óleo-em-água. De preferência, as emulsões óleo-em-água utilizadas como microtransportadores compreendem substituintes biodegradáveis, tais como esqualeno.

Os complexos IRP/MC ligados covalentemente podem ser ligados utilizando qualquer tecnologia de reticulação covalente conhecida na técnica. Tipicamente, a porção IRP será modificada, para incorporar uma porção adicional (p.ex., um grupo amina, carboxilo ou sulfidrilo livre) ou para

incorporar bases nucleotídicas modificadas (p.ex., fosforotioato) para proporcionar um local em que a porção IRP possa ser ligada ao microtransportador. A ligação entre as porções IRP e MC do complexo pode ser feita na extremidade 3' ou 5' do IRP, ou numa base adequadamente modificada numa posição interna no IRP. O microtransportador é geralmente também modificado para incorporar porções através das quais pode ser formada uma ligação covalente, embora grupos funcionais normalmente presentes no microtransportador possam também ser utilizados. O IRP/MC é formado através de incubação do IRP com um microtransportador sob condições que permitam a formação de um complexo covalente (p.ex., na presença de um agente de reticulação ou através da utilização de um microtransportador activado compreendendo uma porção activada que formará uma ligação covalente com o IRP).

Uma grande variedade de tecnologias de reticulação é conhecida na técnica, e inclui agentes de reticulação reactivos com grupos amino, carboxilo e sulfidrilo. Como será aparente a um perito na técnica, a selecção de um agente de reticulação e do protocolo de reticulação dependerá da configuração do IRP e do microtransportador, bem como da configuração final desejada do complexo IRP/MC. O reticulador pode ser homobifuncional ou heterobifuncional. Quando é utilizado um reticulador homobifuncional, o reticulador explora a mesma porção no IRP e MC (p.ex., pode ser utilizado um reticulador aldeído para ligar covalentemente um IRP e MC em que tanto o IRP como o MC compreendem uma ou mais aminas livres). Os reticuladores heterobifuncionais utilizam porções diferentes no IRP e MC, (p.ex., um éster de maleimido-N-hidroxissuccinimida pode ser utilizado para ligar covalentemente um sulfidrilo livre no IRP e uma amina livre no MC), e são preferidos para minimizar a formação de ligações inter-microtransportadores. Na maioria dos casos, é preferível reticular através de uma primeira porção de reticulação no microtransportador e uma segunda porção de reticulação no IRP, em que a segunda porção de reticulação não está presente no microtransportador. Um método preferido de produção do complexo IRP/MC é através de "activação" do microtransportador através de incubação com um agente de reticulação heterobifuncional, depois formação do complexo IRP/MC através de incubação do IRP e MC activado sob

condições apropriadas para reacção. O reticulador pode incorporar um braço "espaçador" entre as porções reactivas, ou as duas porções reactivas no reticulador podem ser ligadas directamente.

Num caso preferido, a porção IRP comprehende pelo menos um sulfidrilo livre (p.ex., proporcionado por uma base 5'-tiol modificada ou ligador) para reticulação com o microtransportador, enquanto o microtransportador comprehende grupos amina livres. Um reticulador heterobifuncional reactivo com estes dois grupos (p.ex., a reticulador comprehendendo um grupo maleimida e um NHS-éster), tal como 4-(N-maleimidometil)ciclo-hexano-1-carboxilato de succinimidilo é utilizado para activar o MC, covalentemente reticulando depois o IRP para formar o complexo IRP/MC.

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

Complexos IRP/MC não covalentes preferidos são tipicamente complexados através de interacções hidrófobas ou electrostáticas (iónicas), ou uma combinação destas, (p.ex., através de emparelhamento de bases entre um IRP e um polinucleótido ligado a uma utilização de MC de um par de ligação). Devido à natureza hidrófila da estrutura dos polinucleótidos, os complexos IRP/MC que se baseiam em interacções hidrófobas para formar o complexo requerem geralmente modificação da porção IRP do complexo para incorporar uma porção altamente hidrófoba. De preferência, a porção hidrófoba é biocompatível, não imunogénica, e é de ocorrência natural no indivíduo para o qual a composição é pretendida (p.ex., verifica-se em mamíferos, particularmente humanos). Exemplos de porções hidrófobas preferidas incluem lípidos, esteróides, esteróis tais como colesterol, e terpenos. O método de ligação da porção hidrófoba ao IRP dependerá, como é claro, da configuração do IRP e da identidade da porção hidrófoba. A porção hidrófoba pode ser

adicionada a qualquer local conveniente no IRP, de preferência na extremidade 5' ou 3'; no caso de adição de uma porção colesterol a um IRP, a porção colesterol é de preferência adicionada à extremidade 5' do IRP, utilizando reacções químicas convencionais (ver, por exemplo, Godard et al. (1995) *Eur. J. Biochem.* 232: 404-410). De preferência, os microtransportadores para utilização em complexos IRP/MC ligados através de ligação hidrófoba são produzidos a partir de materiais hidrófobos, tais como gotículas de óleo ou polímeros hidrófobos, embora possam também ser utilizados materiais hidrófilos modificados para incorporarem porções hidrófobas. Quando o microtransportador é um lipossoma ou outro microtransportador de fase líquida compreendendo um lúmen e se deseja que o IRP esteja associado à superfície externa do MC, o complexo IRP/MC é formado através de mistura do IRP e do MC após preparação do MC, para evitar a encapsulação do IRP durante o processo de preparação do MC.

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

Por exemplo, para preparar microesferas catiónicas, lípidos ou polímeros catiónicos, por exemplo, 1,2-dioleoil-1,2,3-trimetilamoniopropano (DOTAP), brometo de

cetiltrimetilamónio (CTAB) ou polilisina, são adicionados quer na FD ou FC, segundo a sua solubilidade nestas fases.

Os complexos IRP/MC podem ser preformados através de adsorção sobre microesferas catiónicas através de incubação do polinucleótido e das partículas, de preferência numa mistura aquosa. Tal incubação pode ser realizada sob quaisquer condições desejadas, incluindo temperatura ambiente (p.ex., aproximadamente 20°C) ou sob refrigeração (p.ex., 4°C). Como as microesferas catiónicas e os polinucleótidos se associam de forma relativamente rápida, a incubação pode ser durante qualquer período de tempo conveniente, tal como 5, 10, 15 minutos ou mais, incluindo de um dia para o outro e incubações maiores. Por exemplo, os IRP podem ser adsorvidos nas microesferas catiónicas através de incubação aquosa de um dia para o outro do polinucleótido e das partículas a 4°C. No entanto, como as microesferas catiónicas e os polinucleótidos se associam espontaneamente, o complexo IRP/MC pode ser formado através da simples co-administração do polinucleótido e de MC. As microesferas podem ser caracterizadas quanto ao tamanho e carga da superfície antes e após a associação dos polinucleótidos. Lotes seleccionados podem então ser avaliados quanto à actividade contra controlos adequados em, por exemplo, ensaios de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) humanas e de esplenócitos de ratinho. As formulações podem também ser avaliadas em modelos animais adequados.

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

sequência 5'-GGGG-3' manterá esta porção da sequência como de cadeia simples.

Noutros casos, um par de ligação pode ser utilizado para ligar o IRP e MC num complexo IRP/MC. O par de ligação pode ser um receptor e ligando, um anticorpo e antígeno (ou epitopo), ou qualquer outro par de ligação que se ligue a afinidade elevada (p.ex. Kd inferior a cerca de  $10^{-8}$ ). Um tipo de par de ligação preferido é biotina e estreptavidina ou biotina e avidina, que formam complexos muito apertados. Quando se utiliza um par de ligação para mediar a ligação do complexo IRP/MC, o IRP é derivado, tipicamente através de uma ligação covalente, com um membro do par de ligação, e o MC é derivado com o outro membro do par de ligação. A mistura dos dois compostos derivados resulta na formação do complexo IRP/MC.

### ***Métodos***

São aqui descritos métodos de regulação de uma resposta imunitária num indivíduo, de preferência um mamífero, de maior preferência um humano, compreendendo a administração ao indivíduo de um polinucleótido contendo IRS tal como aqui descrito. Métodos de imuno-regulação incluem os que suprimem e/ou inibem uma resposta imunitária inata, incluindo, mas não se limitando a, uma resposta imunitária estimulada por moléculas de ácido nucleico imuno-estimulador tais como ADN bacteriano. São também descritos métodos para inibição da resposta celular induzida por TLR7/8 e/ou TLR9. São também aqui descritos métodos para melhorar sintomas associados a activação imunitária indesejada, incluindo, mas não se limitando aos sintomas associados a auto-imunidade.

O polinucleótido contendo IRS é administrado numa quantidade suficiente para regular uma resposta imunitária. Tal como aqui descrito, a regulação de uma resposta imunitária pode ser humoral e/ou celular, e é medida utilizando técnicas padrão na arte e tal como aqui descrito.

Em certos casos, o indivíduo sofre de um distúrbio associado a activação imunitária indesejada, tal como uma doença ou condição alérgica, alergia e asma. Um indivíduo

possuindo uma doença alérgica ou asma é um indivíduo com um sintoma reconhecível de uma doença alérgica ou asma existente.

Em certos casos, o indivíduo sofre de um distúrbio associado a activação imunitária indesejada, tal como uma doença auto-imune e doença inflamatória. Um indivíduo possuindo uma doença auto-imune ou doença inflamatória é um indivíduo com um sintoma reconhecível de uma doença auto-imune ou doença inflamatória existente.

As doenças auto-imunes podem ser divididas em duas grandes categorias: específicas dos órgãos e sistémicas. As doenças auto-imunes incluem, sem limitação, artrite reumatóide (AR), lúpus eritematoso sistémico (LES), diabetes mellitus de tipo I, diabetes mellitus de tipo II, esclerose múltipla (EM), infertilidade imuno-mediada, tal como insuficiência prematura do ovário, esclerodermia, doença de Sjogren, vitiligo, alopecia (calvície), insuficiência poliglandular, doença de Grave, hipotirooidismo, polimiosite, pênfigo vulgar, pênfigo foliáceo, doença inflamatória do intestino incluindo doença de Crohn e colite ulcerosa, hepatite auto-imune incluindo a associada a vírus da hepatite B (HBV) e vírus da hepatite C (HCV), hipopituitarismo, doença de enxerto-versus-hospedeiro (GvHD), miocardite, doença de Addison, doenças auto-imunes da pele, uveíte, anemia perniciosa, hipoparatiroidismo.

As doenças auto-imunes podem também incluir, sem limitação, tiroidite de Hashimoto, síndromas poliglandulares auto-imunes de tipo I e tipo II, pênfigo paraneoplásico, bolo penfigóide, dermatite herpetiforme, doença de IgA linear, epidermólise bolhosa adquirida, eritema nodoso, penfigóide gestacional, penfigóide cicatricial, crioglobulinemia essencial mista, doença bolhosa crónica da infância, anemia hemolítica, púrpura trombocitopénica, síndroma de Goodpasture, neutropenia auto-imune, miastenia grave, síndroma miasténica de Eaton-Lambert, síndroma de pessoa-rígida, encefalomielite disseminada aguda, síndroma de Guillain-Barré, polirradiculoneuropatia desmielinizante inflamatória crónica, neuropatia motora multifocal com bloqueio de condução, neuropatia crónica com gamopatia

monoclonal, síndroma opsonoclonus-mioclonus, degeneração cerebelar, encefalomielite, retinopatia, esclerose biliar primária, colangite esclerosante, enteropatia sensível ao glúten, espondilite anquilosante, artrite reactiva, poliomiosite/dermatomiosite, doença mista do tecido conjuntivo, síndroma de Bechet, psoriase, poliarterite nodosa, anguite alérgica e granulomatose (doença de Churg-Strauss), síndroma de sobreposição de poliangeíte, vasculite de hipersensibilidade, granulomatose de Wegener, arterite temporal, arterite de Takayasu, doença de Kawasaki, vasculite isolada do sistema nervoso central, tromboangiite obliterante, sarcoidose, glomerulonefrite e criopatias. Estas condições são bem conhecidas nas artes médicas e são descritas, por exemplo, em "Harrison's Principles of Internal Medicine, 14<sup>a</sup> ed., Fauci A. S. et al., eds., New York: McGraw-Hill, 1998.

A doença sistémica LES caracteriza-se pela presença de anticorpos para抗énios que são abundantes em quase todas as células, tais como anticorpos anti-cromatina, anticorpos anti-spliceossomas, anticorpos anti-ribossomas e anticorpos anti-ADN. Consequentemente, os efeitos do LES são observados numa variedade de tecidos, tais como pele e rins. As células T auto-reactivas desempenham também um papel no LES. Por exemplo, estudos num modelo de lúpus de murídeo mostraram que抗énios nucleossómicos não-ADN, p.ex. histonas, estimulam células T auto-reactivas que podem dirigir células B produtoras de anti-ADN. Níveis séricos de IFN- $\alpha$  aumentados têm sido observados em pacientes com LES e mostrou-se que se correlacionavam tanto com a actividade como com a gravidade da doença, incluindo febre e erupções da pele, bem como marcadores essenciais associados ao processo de doença (p.ex., títulos de anticorpo anti-ADNcd). Foi também mostrado que complexos imunitários presentes na circulação podiam desencadear IFN- $\alpha$  nestes pacientes e, portanto, manter esta presença crónica de IFN- $\alpha$  elevado. Dois tipos diferentes de complexos imunitários têm sido descritos para desencadear IFN- $\alpha$  a partir de PDC humana: complexos ADN/anticorpo anti-ADN e complexos ARN/anticorpo anti-ribonucleoproteína-ARN. Como o ADN é um ligando de TLR-9 e o ARN um ligando para TLR-7/8, espera-se que estas duas vias utilizem sinalização de TLR-9 e TLR-7/8, respectivamente, para induzir cronicamente

IFN- $\alpha$  e assim participar na etiopatogénese do LES. Consequentemente, composições de IRP e/ou IRC que são eficazes na inibição de respostas de TLR-7/8 e TLR-9 podem ser particularmente eficazes no tratamento de LES.

Em certos casos, um indivíduo está em risco de desenvolver uma doença auto-imune e um IRP ou IRC é administrado numa quantidade eficaz para retardar ou prevenir a doença auto-imune. Indivíduos em risco de desenvolver uma doença auto-imune incluem, por exemplo, aqueles com uma predisposição genética ou outra para desenvolvimento de uma doença auto-imune. Em humanos, a susceptibilidade a determinadas doenças auto-imunes está associada ao tipo de HLA estando algumas mais fortemente ligadas a determinados alelos de MHC de classe II e outras a determinados alelos de MHC de classe I. Por exemplo, a espondilite anquilosante, a uveíte anterior aguda, e a artrite reumatóide juvenil estão associadas a HLA-B27, a síndroma de Goodpasture e a EM estão associadas a HLA-DR2, a doença de Grave, a miastenia grave e o LES estão associados a HLA-DR3, a artrite reumatóide e o pênfigo vulgar estão associados a HLA-DR4 e a tiroidite de Hashimoto está associada a HLA-DR5. Outras predisposições genéticas para doenças auto-imunes são conhecidas na técnica e um indivíduo pode ser examinado quanto à existência de tais predisposições através de ensaios e métodos bem conhecidos na técnica. Consequentemente, nalguns casos, um indivíduo em risco de desenvolver uma doença auto-imune pode ser identificado.

Tal como aqui descrito, os IRP podem inibir particularmente a produção de uma citocina, incluindo, mas não limitado a, IL-6, I-12, TNF- $\alpha$ , e/ou IFN- $\alpha$ , e podem suprimir a proliferação de células B e/ou a activação de células dendríticas plasmocitóides para se diferenciarem. Consequentemente, IRP e IRC são particularmente eficazes na supressão de uma resposta imunitária a um ácido nucleico imuno-estimulador num indivíduo.

Modelos animais para o estudo de doença auto-imune são conhecidos na técnica. Por exemplo, modelos animais que parecem mais semelhantes a doença auto-imune humana incluem estirpes de animais que desenvolvem espontaneamente uma

elevada incidência da doença particular. Exemplos de tais modelos incluem, mas não se limitam ao ratinho diabético não obeso (NOD), que desenvolve uma doença semelhante a diabetes de tipo 1, e animais propensos a doença semelhante a lúpus, tais como o híbrido da Nova Zelândia, MRL-Fas<sup>lpr</sup> e ratinhos BXSB. Modelos animais em que uma doença auto-imune foi induzida incluem, mas não se limitam a, encefalomielite auto-imune experimental (EAE), que é um modelo para esclerose múltipla, artrite induzida por colagénio (CIA), que é um modelo para artrite reumatóide, e uveíte auto-imune experimental (EAU), que é um modelo para uveíte. Modelos animais de doença auto-imune têm também sido criados através de manipulação genética e incluem, por exemplo, ratinhos *knock-out* para IL-2/IL-10 para doença inflamatória do intestino, *knock-out* para Fas ou ligando de Fas para LES, e *knock-out* para antagonistas do receptor de IL-1 para artrite reumatóide.

Consequentemente, modelos animais padrão na técnica estão disponíveis para o rastreio e/ou avaliação da actividade e/ou eficácia dos métodos e composições para o tratamento de distúrbios auto-imunes.

Em certos casos, o indivíduo sofre de um distúrbio associado a uma resposta inflamatória crónica. A administração de um IRP resulta em imunomodulação, diminuindo os níveis de uma ou mais citocinas associadas a respostas imunitárias inatas, o que pode resultar numa redução da resposta inflamatória. A imuno-regulação dos indivíduos com a resposta imunitária indesejada associada aos distúrbios descritos resulta numa redução ou melhoria de um ou mais dos sintomas do distúrbio.

Outros exemplos referem-se a terapia imuno-reguladora de indivíduos tendo sido expostos a, ou infectados com, um vírus. A administração de um IRP ou IRC a um indivíduo tendo sido exposto a, ou infectado com, um vírus resulta em supressão da produção de citocinas induzida pelo vírus. A citocina produzida em resposta a um vírus pode contribuir para um ambiente favorável para a infecção viral. A supressão da produção de citocina induzida por vírus pode servir para limitar ou prevenir a infecção viral.

Em certos casos, o indivíduo sofre de uma doença ou distúrbio associado a estimulação crónica por patogénio, tal como a associada a infecções virais crónicas e a malária. Composições de IRP e/ou IRC que são eficazes na inibição de respostas de TLR-7/8 podem ser particularmente eficazes no tratamento de doenças e sintomas relacionados com estimulação crónica por patogénio.

Os métodos podem ser praticados em combinação com outras terapias que compõem o padrão de cuidados para o distúrbio, tais como administração de agentes anti-inflamatórios, tais como terapia sistémica de corticosteróides (p.ex., cortisona).

Nalgumas situações, a tolerância periférica a um auto-antigénio é perdida (ou quebrada) e segue-se uma resposta auto-imune. Por exemplo, num modelo animal para EAE, a activação de células apresentadoras de antigénio (APC), através do receptor imunitário inato TLR9 ou TLR4 mostrou-se que quebrava a auto-tolerância e resultava na indução de EAE (Waldner et al. (2004) *J. Clin. Invest.* 113:990-997).

Consequentemente, são também descritos métodos para suprimir ou reduzir a estimulação celular dependente de TLR9. A administração de um IRP resulta em supressão de respostas celulares dependentes TLR9, incluindo diminuição dos níveis de uma ou mais citocinas associadas a TLR9. IRP adequados para utilização em supressão da estimulação celular dependente de TLR9 são os IRP que inibem ou suprimem respostas celulares associadas a TLR9.

São também descritos métodos para supressão ou redução da estimulação celular dependente de TLR7/8. A administração de um IRP resulta na supressão de respostas celulares dependentes de TLR7/8, incluindo menores níveis de uma ou mais citocinas associadas a TLR7/8. IRP adequados para utilização em supressão da estimulação celular dependente de TLR7/8 são os IRP que inibem ou suprimem respostas celulares associadas a TLR7/8.

Tal como aqui demonstrado, alguns IRP suprimem tanto respostas celulares dependentes de TLR9 como respostas celulares dependentes de TLR7/8. Alguns IRP suprimem respostas celulares dependentes de TLR9 mas não respostas celulares dependentes de TLR7/8. Alguns IRP suprimem respostas celulares dependentes de TLR7/8, mas não respostas celulares dependentes de TLR9. Consequentemente, determinados IRP podem ser administrados para regular determinadas respostas imunitárias.

#### Administração e avaliação da resposta imunitária

O IRP ou IRC pode ser administrado em combinação com outros agentes farmacêuticos, tal como aqui descrito, e pode ser combinado com um transportador fisiologicamente aceitável deste (e como tal estas composições são descritas). O IRP ou IRC pode ser qualquer um dos aqui descritos.

Tal como com todas as composições para modulação de uma resposta imunitária, as quantidades eficazes e o método de administração da formulação de IRP ou IRC particular podem variar com base no indivíduo, na condição a tratar e outros factores evidentes para um perito na técnica. Factores a considerar incluem se o IRP ou IRC será ou não administrado com ou covalentemente ligado a uma molécula de distribuição, a via de administração e o número de doses a administrar. Tais factores são conhecidos na técnica e estão bem dentro da perícia dos peritos na técnica para fazer tais determinações sem demasiada experimentação. Um intervalo de dosagem adequado é um que proporcione a regulação desejada da resposta imunitária (p.ex., supressão da produção de IFN- $\alpha$  ou outra citocina em resposta a um ácido nucleico imuno-estimulador). Quando é desejada supressão de uma resposta imunitária a um ácido nucleico imuno-estimulador, um intervalo de dosagem adequado é um que proporcione a supressão desejada da estimulação imunitária através do ácido nucleico imuno-estimulador. Geralmente, a dosagem é determinada através da quantidade de IRP administrada ao paciente, em vez da quantidade global de composição contendo IRP administrada. Intervalos de dosagem úteis do IRP, dados em quantidades de IRP distribuído, podem ser, por exemplo, de cerca de qualquer uma das seguintes: 0,5 a 10 mg/kg, 1 a 9

mg/kg, 2 a 8 mg/kg, 3 a 7 mg/kg, 4 a 6 mg/kg, 5 mg/kg, 1 a 10 mg/kg, 5 a 10 mg/kg. A quantidade absoluta dada a cada paciente depende de propriedades farmacológicas tais como biodisponibilidade, velocidade de eliminação e via de administração.

A quantidade eficaz e o método de administração da formulação de IRP ou IRC particular podem variar com base em cada paciente, no resultado desejado e/ou tipo de distúrbio, no estádio da doença e outros factores evidentes para um perito na técnica. As vias de administração úteis numa determinada aplicação são aparentes para um perito na técnica. Vias de administração incluem, mas não se limitam à tópica, dérmica, transdérmica, transmucosa, epidérmica, parentérica, gastrointestinal e nasofaríngea e pulmonar, incluindo transbrônquica e transalveolar. Um intervalo de dosagem adequado é um que proporcione uma composição contendo suficiente IRP para atingir uma concentração nos tecidos de cerca de 1-50 µM medida através dos níveis sanguíneos. A quantidade absoluta dada a cada paciente depende de propriedades farmacológicas tais como a biodisponibilidade, velocidade de eliminação e via de administração.

Tal como aqui descrito, os tecidos em que ocorre ou é provável que ocorra activação imunitária indesejada são alvos preferidos para o IRP ou IRC. Assim, a administração de IRP ou IRC a nódulos linfáticos, baço, medula óssea, sangue, bem como tecidos expostos a vírus, são locais preferidos de administração.

São descritas formulações de IRP ou IRC adequadas para aplicação tópica, incluindo, mas não se limitando a, implantes fisiologicamente aceitáveis, ungüentos, cremes, lavagens e géis. Exemplos de vias de administração dérmica são as que são menos invasivas, tais como transmissão transdérmica, administração epidérmica e injecção subcutânea.

A administração transdérmica é conseguida através da aplicação de um creme, lavagem, gel, etc. capaz de permitir que o IRP ou IRC penetre na pele e entre na corrente sanguínea. Composições adequadas para administração transdérmica incluem, mas não se limitam a, suspensões,

óleos, cremes e ungamentos farmaceuticamente aceitáveis aplicados directamente na pele ou incorporados num transportador protector tal como um dispositivo transdérmico (chamado "adesivo"). Exemplos de cremes, ungamentos, etc., adequados podem ser encontrados, por exemplo, em "Physician's Desk Reference". A transmissão transdérmica pode também ser realizada através de iontoforese, por exemplo utilizando adesivos comercialmente disponíveis que distribuem o seu produto continuamente através da pele íntegra durante períodos de vários dias ou mais. A utilização deste método permite a transmissão controlada de composições farmacêuticas em concentrações relativamente grandes, permite a infusão de fármacos de combinação e permite a utilização simultânea de um promotor de absorção.

Vias parentéricas de administração incluem, mas não se limitam a injecção eléctrica (iontoforese) ou directa, tal como injecção directa numa linha venosa central, injecção intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intradérmica, ou subcutânea. Formulações de IRP ou IRC adequadas para administração parentérica são geralmente formuladas em água USP ou água para injecção e podem ainda compreender tampões de pH, sais, agentes de volume, conservantes, e outros excipientes farmaceuticamente aceitáveis. O polinucleótido imuno-regulador para injecção parentérica pode ser formulado em soluções isotónicas estéreis farmaceuticamente aceitáveis, tais como solução salina e solução salina tamponada com fosfato para injecção.

Vias gastrointestinais de administração incluem, mas não se limitam às vias por ingestão e rectal e podem incluir a utilização de, por exemplo, pós, comprimidos ou líquidos farmaceuticamente aceitáveis para ingestão e supositórios para administração rectal.

A administração naso-faríngea e pulmonar são realizadas através de inalação, e incluem vias de distribuição tais como as vias intranasal, transbrônquica e transalveolar. São descritas formulações de IRP ou IRC adequadas para administração através de inalação incluindo, mas não se limitando a, suspensões líquidas para formação de aerossóis, bem como formas em pó para sistemas de distribuição por

inalação de pó seco. Dispositivos adequados para administração através de inalação de formulações de IRP ou IRC incluem, mas não se limitam a, atomizadores, vaporizadores, nebulizadores, e dispositivos de distribuição por inalação de pó seco.

Tal como é bem conhecido na arte, as soluções ou suspensões utilizadas para as vias de administração aqui descritas podem incluir qualquer um ou mais dos seguintes componentes: um diluente estéril tal como água para injecção, solução salina, óleos fixos, polietilenoglicóis, glicerina, propilenoglicol ou outros solventes sintéticos, agentes antibacterianos tais como álcool benzílico ou metil-parabenos; antioxidantes tais como ácido ascórbico ou bissulfito de sódio; agentes quelantes tais como ácido etilenodiaminotetraacético; tampões tais como acetatos, citratos ou fosfatos e agentes para o ajustamento da tonicidade tais como cloreto de sódio ou dextrose. O pH pode ser ajustado com ácidos ou bases, tais como ácido clorídrico ou hidróxido de sódio. A preparação parentérica pode ser encerrada em ampolas, seringas descartáveis ou frascos de múltipla dose feitos de vidro ou plástico.

Tal como é bem conhecido na técnica, composições farmacêuticas adequadas para utilização injectável incluem soluções aquosas estéreis (quando solúveis em água) ou dispersões e pós estéreis para a preparação extemporânea de soluções injectáveis ou de dispersão estéreis. Para administração intravenosa, transportadores adequados incluem solução salina fisiológica, água bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) ou solução salina tamponada com fosfato (PBS). Em todos os casos, a composição tem de ser estéril e deve ser fluida ao ponto de ser fácil o enchimento de uma seringa. Deve ser estável sob as condições de fabrico e armazenamento e tem de ser conservada contra a acção contaminante de microorganismos tais como bactérias e fungos. O transportador pode ser um solvente ou meio de dispersão contendo, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propilenoglicol, e polietilenoglicol líquido, e semelhantes), e misturas adequadas destes. A fluidez adequada pode ser mantida, por exemplo, através da utilização de um revestimento tal como lecitina, através da manutenção do

tamanho de partícula requerido no caso de dispersão e através da utilização de tensioactivos. A prevenção da acção de microorganismos pode ser alcançada através de vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, e semelhantes. Pode ser preferível incluir agentes isotónicos, por exemplo, açúcares, polialcoois tais como manitol, sorbitol, cloreto de sódio, na composição. A absorção prolongada das composições injectáveis pode ser conseguida incluindo na composição um agente que atrase a absorção, por exemplo, monoestearato de alumínio e gelatina.

Tal como é bem conhecido na técnica, as soluções injectáveis estéreis podem ser preparadas através de incorporação do composto ou compostos activos na quantidade necessária num solvente apropriado com um ou uma combinação dos ingredientes enumerados acima, conforme requerido, seguido de esterilização por filtração. Geralmente, as dispersões são preparadas através de incorporação do composto activo num veículo estéril que contém um meio de dispersão básico e os outros ingredientes necessários a partir daqueles acima enumerados. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injectáveis estéreis, os métodos preferidos de preparação são secagem sob vácuo e secagem por congelação que produz um pó do ingrediente activo mais qualquer ingrediente adicional desejado a partir de uma solução deste previamente esterilizada por filtração.

As composições e os métodos de administração acima mencionados são destinados a descrever, mas não a limitar, os métodos de administração das formulações de IRP e IRC. Os métodos de produção das várias composições e dispositivos estão dentro da capacidade de um perito na técnica e não são aqui descritos em detalhe.

A análise (tanto qualitativa como quantitativa) da actividade de um IRP ou IRC na supressão da estimulação imunitária pode ser através de qualquer método aqui descrito ou conhecido na técnica, incluindo, mas não se limitando a, medição da supressão ou uma diminuição na proliferação de populações celulares específicas tais como células B, medição da supressão da maturação de populações celulares

específicas, tais como células dendríticas (incluindo células dendríticas plasmocitóides) e células T, e medição da supressão na produção de citocinas, tais como, mas não se limitando a, IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, e/ou IL-12. A medição de vários tipos específicos de células pode ser conseguida, por exemplo, com separação de células activada com fluorescência (FACS). A medição da maturação de determinadas populações de células pode ser conseguida através da determinação da expressão de marcadores, por exemplo, marcadores da superfície celular, específicos para um determinado estádio de maturação celular. A expressão do marcador celular pode ser medida, por exemplo, através da medição da expressão de ARN ou da medição da expressão na superfície celular do marcador particular, por exemplo, análise de FACS. A medição da maturação de células dendríticas pode ser realizada, por exemplo, tal como descrito em Hartmann et al. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 96: 9305-9310. As concentrações de citocinas podem ser medidas, por exemplo, através de ELISA. Estes e outros ensaios para avaliar a supressão de uma resposta imunitária, incluindo uma resposta imunitária inata, são bem conhecidos na técnica.

### ***Estojos***

São aqui descritos estojos. Em certos casos, os estojos compreendem geralmente um ou mais recipientes compreendendo qualquer IRP e/ou IRC tal como aqui descrito. Os estojos podem ainda compreender um conjunto adequado de instruções, geralmente instruções escritas, relativas à utilização do IRP e/ou IRC através de qualquer um dos métodos aqui descritos (p.ex., supressão de uma resposta a um ácido nucleico imuno-estimulador, supressão de uma resposta dependente de TLR-7/8 e/ou TLR-9, melhoria de um ou mais sintomas de uma doença auto-imune, melhoria de um sintoma de doença inflamatória crónica, diminuição da produção de citocinas em resposta a um vírus).

Os estojos podem compreender IRP e/ou IRC embalado em qualquer embalagem conveniente apropriada. Por exemplo, se o IRP ou IRC for uma formulação seca (p.ex., um pó liofilizado ou seco), é normalmente utilizado um frasco com uma rolha maleável, de modo a que o IRP ou IRC possa ser facilmente

ressuspenso através da injecção de fluido através da tampa maleável. Ampolas com tampas removíveis, não maleáveis (p.ex., vidro selado) ou rolhas maleáveis são muito convenientemente utilizadas para formulações líquidas de IRP ou IRC. Estão também contemplados pacotes para utilização em combinação com um dispositivo específico, tal como um inalador, dispositivo de administração nasal (p.ex. um atomizador), uma seringa ou um dispositivo de infusão, tal como uma minibomba.

As instruções relativas à utilização de IRP e/ou IRC incluem geralmente informação sobre a dosagem, o programa da dosagem, e via de administração para o método de utilização pretendido. Os recipientes de IRP ou IRC podem ser doses unitárias, embalagens a granel (p.ex. embalagens multi-dose) ou doses em subunidades. As instruções fornecidas nos estojos são tipicamente instruções escritas num rótulo ou folheto (p.ex., uma folha de papel incluída no estojo), mas instruções legíveis por máquina (p.ex., instruções num disco de armazenamento magnético ou óptico) também são aceitáveis.

Nalguns casos, os estojos compreendem materiais para a produção de IRP e/ou IRC como complexos para administração, por exemplo, material de encapsulamento, material complexo microtransportador e assim por diante. Geralmente, o estojo inclui recipientes separados de IRP ou IRC e o material ou materiais complexos. O IRP ou IRC e complexos são, de preferência, fornecidos numa forma que permita a formação de IRP- ou IRC-complexo após mistura do IRP ou IRC fornecido com o material complexo. Esta configuração é preferida quando o IRP- ou IRC-complexo está ligado através de ligação não covalente. Esta configuração é também preferida quando o IRP- ou IRC-complexo é para reticular através de um reticulador heterobifuncional; o IRP/IRC ou o complexo é fornecido numa forma "activada" (p.ex., ligado ao reticulador heterobifuncional de modo a que a porção reactiva com o IRP/IRC fique disponível).

Os seguintes Exemplos são proporcionados para ilustrar, mas não para limitar, o invento. Os oligonucleótidos para utilização de acordo com o invento estão marcados com um asterisco.

## EXEMPLOS

Exemplo 1: Regulação de respostas imunitárias inatas de células através de polinucleótidos contendo IRS

Os polinucleótidos imuno-reguladores (IRP) (i.e., polinucleótidos contendo pelo menos uma IRS) ou amostras de controlo foram ensaiados quanto à actividade imuno-reguladora (IR) de respostas imunitárias inatas em células humanas e de ratinho. A actividade IR foi ensaiada através da medição de vários indicadores da resposta imunitária inata incluindo resposta de citocinas, maturação celular e proliferação celular. Salvo indicação em contrário, os polinucleótidos testados foram oligodesoxinucleótidos fosforotioato completamente modificados.

Uma resposta imunitária inata foi estimulada nas células a ensaiar, através de adição de um ácido nucleico imuno-estimulador (ISNA) à cultura celular. Os IRP ou amostras de controlo foram então adicionados à cultura celular. Após a incubação das células, o meio de cultura e/ou as células foram testados quanto ao nível de uma determinada citocina no meio de cultura, o estado de maturação das células e/ou proliferação celular.

Para ensaios de células de ratinho, fragmentos de baço de ratinhos BALB/c ou C57Bl/6 foram mecanicamente dispersos, forçando os fragmentos digeridos através de redes metálicas. Os esplenócitos dispersos foram sedimentados através de centrifugação, depois ressuspensos em meio fresco (RPMI 1640 com soro fetal de vitelo a 10%, mais 50 unidades/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomicina, glutamina 2 mM, e β-mercaptoetanol 0,05 mM). Para alguns ensaios, células CD11c+ de murídeo purificadas, isoladas dos esplenócitos utilizando as microcontas revestidas com CD11c de Miltenyi Biotec (Auburn, CA, número de catálogo 130-052-501) e seguindo as instruções do fabricante, foram utilizadas nos ensaios.

Esplenócitos de ratinho foram dispensados nos poços de placas de 96 poços ( $7 \times 10^7$  células/ml). Um ISNA, tal como SEQ ID NO:\_\_ (1018) ou SEQ ID NO:\_\_ (C274), foi adicionado às

células a uma concentração de 0,7 µM e a amostra de teste de IRP ou a amostra do controlo foi adicionada às células. As células foram incubadas durante mais 48 horas. O meio foi colhido a partir de cada poço e testado quanto à concentração das citocinas IL-6 e IL-12 utilizando o imunoensaio ELISA. Para realizar o ELISA, utilizámos anticorpos anti-IL-6 (Número de catálogo 554400 e 554402, Pharmingen, SanDiego, CA) e anticorpos anti-IL-12 (Número de catálogo 551219 e 554476, Pharmingen, SanDiego) e utilizámos os protocolos recomendados pelo fabricante. Os IRP foram testados a várias concentrações, incluindo 1,4 µM, 0,7 µM, 0,14 µM e 0,07 µM ou razões de IRP:ISNA de 2:1, 1: 1,1:5, e 1:10. Outras razões foram testadas dependendo do desenho experimental. As amostras de controlo incluíram ISNA sozinho, IRP sozinho, meio sozinho e um oligonucleótido de controlo SEQ ID NO:\_\_ (C532) que não contém ISNA nem IRS.

Os IRP inibiram a secreção de IL-6 e IL-12 a partir de esplenócitos de murídeo e células CAD11c+ estimulados com ISNA. Exemplos de resultados de tais ensaios com células de murídeo são apresentados nas Figs. 1A-1B. A Fig. 1A mostra resultados de esplenócitos estimulados com ISNA (1018) sozinho e com ISNA (1018) juntamente com quantidades variáveis de dois IRP diferentes, SEQ ID NO:92 (530) e SEQ ID NO:17 (C869), e a sequência de controlo (C532). A Fig. 1B mostra os resultados de células CD11+ estimuladas com ISNA SEQ ID NO:\_\_ 5'-TCG TCG AAC GTT CGA GAT GAT-3' (C274) sozinho e com ISNA SEQ ID NO:\_\_ (C274) juntamente com dois IRP diferentes, (SEQ ID NO:92 (530) e SEQ ID NO:17 (C869)), e a sequência de controlo SEQ ID NO:76 (C532). Tal como indicado nas Figs. 1A e 1B, a presença de qualquer IRP resultou numa redução na quantidade de IL-6 e IL-12 produzida pelas células em resposta ao ISNA. A inibição da produção de citocinas através do IRP respondeu à dose de IRP.

Para os ensaios de células humanas, sangue periférico foi colhido a partir de voluntários através de punção venosa utilizando seringas heparinizadas. O sangue foi vertido sobre uma almofada de FICOLL® (Amersham Pharmacia Biotech) e centrifugado. PBMC, localizados na interface de Ficoll®, foram colhidos, depois lavados duas vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS) fria. As células foram

ressuspensas e cultivadas em placas de 48 ou 96 poços em  $2 \times 10^6$  células/ml em RPMI 1640 com soro AB humano inactivado pelo calor a 10% mais 50 unidades/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomicina, 300 µg/ml de glutamina, piruvato de sódio 1 mM, e MEM 1× com aminoácidos não essenciais (NEAA).

Células B humanas e PDC humanas foram isoladas utilizando procedimentos descritos em Marshall et al. (2003) *J. Leukoc Biol.* 73: 781-92. As células B humanas foram dispensadas, incubadas e o meio foi colhido de cada poço e testado quanto às concentrações da citocina IL-6 através de ELISA, tal como descrito em Marshall et al. (2003). Os IRP SEQ ID NO:92 (530) e SEQ ID NO:17 (869) foram testados a várias concentrações, incluindo 2,8 µM, 0,7 µM e 0,175 µM ou a razões de IRP:ISNA de 4:1, 1:1, e 1:4. As amostras de controlo incluíram ISNA (1018), IRP sozinho (SEQ ID NO:92 (530) e SEQ ID NO:17 (869)), meio sozinho e um oligonucleótido de controlo (532) que não contém nem ISNA nem IRS.

Tal como mostrado na Fig. 2, a presença de qualquer um dos IRP resultou numa redução da quantidade de IL-6 produzida pelas células B humanas purificadas estimuladas com ISNA.

A actividade *in vivo* dos IRP foi examinada em ratinhos. Um grupo de ratinhos (cinco animais por grupo) foi injectado cada um subcutaneamente com 25 µg de ISNA (1018) sozinho ou em combinação com 75 µg, 25 µg ou 8,5 µg de oligonucleótido de controlo ou IRP SEQ ID NO: 17 (C869). Razões de IRP:ISNA de 3:1, 1:1, e 1:3 foram co-administradas aos animais. Outros grupos de controlo foram injectados com solução salina, oligonucleótido de controlo sozinho ou IRP SEQ ID NO: 17 (C869) sozinho. O soro foi colhido 2 horas após a injecção dos ácidos nucleicos e o nível de IL-6, IL-12 e TNF-α no soro foi determinado através de imunoensaio, tal como descrito anteriormente para IL-6 e IL-12, e utilizando o anti-TNF-α de ratinho Quantikine (R&D System, Inc., Minneapolis, MN). Os resultados desses ensaios são mostrados nas Figs. 3-5. A administração do IRP juntamente com o ISNA resultou numa diminuição da quantidade de cada uma das citocinas no soro relativamente à quantidade das citocinas nos soros de animais que receberam o ISNA sozinho.

Tal como mostrado na Fig. 3, a administração do IRP com o ISNA em qualquer uma das razões testadas resultou em pelo menos uma redução de aproximadamente 6 vezes no nível sérico de IL-6 em comparação com a administração do ISNA sozinho. A Fig. 4 demonstra que a inibição da produção de IL-12 através do IRP era dependente da dose, com todas as razões de IRP:ISNA testadas resultando numa redução da citocina em relação à administração do ISNA sozinho. A Fig. 5 demonstra que todas as razões de IRP:ISNA testadas resultaram numa redução de TNF- $\alpha$  em relação à administração do ISNA sozinho.

A actividade *in vivo* do IRP foi também examinada quando o IRP e ISNA eram administrados a animais em locais separados no animal. Nesta experiência, as respostas de citocinas foram comparadas em grupos de ratinhos (cinco animais por grupo) que foram injectados subcutaneamente com 25  $\mu$ g de ISNA (1018) sozinho ou em combinação com 25  $\mu$ g de IRP SEQ ID NO:17 (C869). Enquanto o ISNA foi injectado subcutaneamente em todos os animais, o IRP foi injectado subcutaneamente no mesmo flanco que o ISNA (SC1), subcutaneamente no flanco oposto ao do ISNA (SC2), intraperitonealmente (IP), intravenosamente (IV), intramuscularmente (IM) ou intranasalmente (IN). Os grupos de controlo foram injectados com solução salina, o IRP SEQ ID NO:17 (C869) sozinho ou o oligonucleótido de controlo com ISNA (1018) subcutaneamente no flanco mesmo.

O soro foi colhido 2 horas após a injecção dos ácidos nucleicos e o nível de IL-6 e IL-12 no soro foi determinado. Tal como mostrado na Fig. 6, a administração do IRP em todos os locais testados (i.e., SC1, SC2, IP, IV, IM e IN) resultou numa clara supressão da quantidade de IL-6 produzida em resposta ao ISNA. Tal como mostrado na Fig. 7, a administração do IRP em todos os locais testados também resultou numa supressão da quantidade de IL-12 sérica em resposta ao ISNA.

Os ensaios efectuados *in vitro* e *in vivo* demonstram que o IRP e o ISNA não precisam de ser co-administrados ao mesmo tempo ou no mesmo local, para que o IRP iniba a actividade estimuladora do ISNA.

Exemplo 2: Actividade do IRP e resposta celular dependente de TLR

Tal como aqui demonstrado, o IRP inibe as actividades ou respostas associadas a sinalização de TLR-9. Foram efectuadas experiências para investigar melhor a actividade de IRP e as actividades ou respostas associadas a TLR-9 e outros TLR.

Esplenócitos de murídeo e PBMC humanas e PDC infectadas com vírus herpes simplex de tipo 1 (HSV-1) respondem através da produção de IFN- $\alpha$  e esta resposta é dependente de sinalização de TLR-9. Esplenócitos de murídeo e PBMC humanas e PDC infectadas com vírus da gripe (estirpe PR/8) respondem também através da produção de IFN- $\alpha$ , no entanto, esta resposta é dependente de sinalização de TLR-7/8 e independente de TLR-9. O efeito dos IRP sobre a produção de citocinas de resposta imunitária inata por células infectadas foi examinado.

Esplenócitos de CD11+ de murídeo, preparados tal como descrito acima, foram infectados com quantidades variáveis de HSV-1. A quantidade de IFN- $\alpha$  medida através de imunoensaio (PBL Biomedical Laboratories, Piscataway, NJ) e IL-12 produzida pelas células foi medida e comparada com a quantidade de vírus utilizada para infecção. As Figs. 8A-8B representam um exemplo da produção de IFN- $\alpha$  e IL-12 em resposta à quantidade de HSV-1 (multiplicidade de infecção, MOI) utilizada para infecção. As células infectadas a uma MOI de HSV-1 de 10 produziram claramente tanto IFN- $\alpha$  como IL-12.

Esplenócitos CD11+ de murídeo foram então infectados com uma MOI de HSV-1 de 10 na presença de quantidades variáveis de IRP SEQ ID NO:17 (C869) (7, 3,5 ou 1,75  $\mu$ M) ou de oligonucleótilo de controlo e a quantidade de IFN- $\alpha$  e IL-12 produzida foi determinada. Tal como mostrado nas Figs. 9A e 9B, IRP SEQ ID NO:C869 inibiu claramente a produção de IFN- $\alpha$  e de IL-12 a partir dos esplenócitos a cada uma das concentrações testadas. O IRP SEQ ID NO:17 (C869) também inibiu a produção de IFN- $\alpha$  por PDC humanas infectadas com HSV-1, tal como mostrado na Fig. 9C. Estes resultados são

consistentes com IRP SEQ ID NO:17 (C869) a inibir respostas celulares dependentes de TLR-9.

PDC humanas foram também infectadas com uma quantidade variável de vírus da gripe (estirpe PR/8). A quantidade de IFN- $\alpha$  produzida pelas células foi medida e comparada com a quantidade de vírus utilizada para a infecção. A Fig. 10A mostra um exemplo da produção de IFN- $\alpha$  em resposta à quantidade de vírus da gripe (multiplicidade de infecção, MOI) utilizada para a infecção. As células infectadas a uma MOI de vírus da gripe de 10 (estirpe PR/8) produziram claramente IFN- $\alpha$  em resposta à infecção.

As PDC humanas foram então infectadas com uma MOI de vírus da gripe de 10 (estirpe PR/8), na presença de quantidades variáveis de IRP SEQ ID NO:17 (C869) (7, 3,5 ou 1,75  $\mu$ M) ou oligonucleótido de controlo e a quantidade de IFN- $\alpha$  produzida foi determinada. Tal como mostrado na Fig. 10B, o IRP SEQ ID NO:17 (C869) inibiu claramente a produção de IFN- $\alpha$  a partir das células de uma forma dependente da dose. Estes resultados são consistentes com IRP SEQ ID NO:17 (C869) inibir também respostas celulares dependentes de TLR-7/8.

Verificou-se que SEQ ID NO:27\* (C661) inibe diferencialmente células estimuladas com HSV-1 e vírus da gripe (PR/8). As PDC humanas foram infectadas com HSV-1 a uma MOI de 30 na presença de SEQ ID NO:17 (C869), SEQ ID NO:27\* (C661) ou um oligonucleótido de controlo. Nalgumas experiências, outras concentrações de HSV-1 foram utilizadas com resultados semelhantes. As PDC foram enriquecidas como descrito em Duramad et al. (2003) *Blood* 102: 4487 e incubadas com HSV-1 letalmente irradiado com UV. Tal como mostrado nas Figs. 11A-11B, SEQ ID NO:27 (C661) não mostrou qualquer efeito inibitório na produção de IFN- $\alpha$  a partir das células, embora IRP SEQ ID NO:17 (C869) tenha inibido completamente a produção de IFN- $\alpha$ . As PDC humanas foram infectadas com vírus da gripe (PR/8) a uma MOI de 10 na presença de SEQ ID NO:17 (C869), SEQ ID NO:27\* (C661) ou um oligonucleótido de controlo. Tal como mostrado nas Figs. 11A-11B, o efeito inibitório da SEQ ID NO:27\* (C661) sobre a produção de IFN- $\alpha$  pelas células foi comparável ao efeito do IRP SEQ ID NO:17

(C869). Consequentemente, diferentes espécies de IRP podem ter diferentes efeitos inibitórios nas células. Por exemplo, o IRP SEQ ID NO:27\* (C661) inibe respostas celulares dependentes de TLR-7/8, mas não respostas celulares de TLR-9.

Esplenócitos de murídeo produzem IL-6 em resposta a LPS através de estimulação de TLR-4. Os IRP SEQ ID NO:17 (C869) e SEQ ID NO:92 (530) e um oligonucleótido de controlo foram testados quanto ao seu efeito na produção de IL-6 por células de baço estimuladas com LPS. Tal como representado nas Figs. 12A-12B, nenhum IRP inibiu a produção de IL-6 a partir de células do baço estimuladas por LPS. Por contraste, uma concentração quatro vezes menor de qualquer IRP inibiu a produção de IL-6 a partir de células do baço estimuladas com ISNA. Consequentemente, nem o IRP SEQ ID NO:17 (C869) nem o IRP SEQ ID NO:92 (530) inibem esta resposta celular dependente de TLR-4.

O efeito do IRP SEQ ID NO:17 (C869) em respostas dependentes de TLR-7/8 foi ainda examinado com a utilização de dois activadores de TLR. Loxorribina (7-alil-7,8-di-hidro-8-oxo-guanosina) actua como um adjuvante sintético em respostas anti-tumorais e foi demonstrado que activava células do sistema imunitário inato selectivamente através da via de sinalização dependente de TLR-7 (Heil et al. (2003) *Eur. J. Immunol.* 33: 2987-2997). Células do baço de murídeo foram estimuladas com loxorribina (100 µM) na presença de várias concentrações de IRP SEQ ID NO:17 (C869) ou de um oligonucleótido de controlo, e a quantidade de IL-6 e IL-12 produzida foi determinada. Tal como mostrado nas Figs. 13A-13D, o IRP SEQ ID NO:17 (C869) inibiu a produção de IL-6 induzida por TLR-7 a partir das células de uma forma dependente da dose, mas não afectou a produção de IL-12 pelas células.

Resiquimod (R-848) é um estímulo para a sinalização de TLR-7 e TLR-8. Células de baço de murídeo foram estimuladas com R-848 (1 µM) na presença de várias concentrações de IRP SEQ ID NO:17 (C869) ou um oligonucleótido de controlo, e a quantidade de IL-6 e IL-12 produzida foi determinada. Tal como mostrado nas Figs. 14A-14D, o IRP SEQ ID NO:17 (C869) inibiu a produção de IL-6 induzida por TLR-7/8 a partir das

células de uma forma dependente da dose, mas não afectou a produção de IL-12 pelas células.

Quando testado quanto à inibição da estimulação de vários TLR, verificou-se novamente que SEQ ID NO:27\* (C661) inibe respostas celulares dependentes de TLR-7/8, mas não respostas celulares dependentes de TLR-4 ou dependentes de TLR-9. Tal como representado nas Figs. 15A-15D, o IRP SEQ ID NO:27\* (C661) inibiu a produção de IL-6 a partir de células do baço estimuladas com loxorribina 100 µM e de células do baço estimuladas com R848 1 µM. Isto demonstra que SEQ ID NO:27\* (C661) é eficaz na inibição de respostas celulares dependentes de TLR-7/8. No entanto, as Figs. 15A-15D mostram também que SEQ ID NO:27 (C661) não inibe a produção de IL-6 a partir de células de baço estimuladas com ISNA ou a partir de células de baço estimuladas com LPS. Assim, SEQ ID NO:27\* (C661) não é eficaz na inibição de respostas celulares dependentes de TLR-9 ou TLR-4.

O IRP SEQ ID NO:17 (C869) inibe tanto a produção de citocinas dependente de TLR-7/8 como de TLR-9 em resposta a estimulação com ISNA, infecção viral, e estimulação química. O IRP SEQ ID NO:27\* (C661) inibe a produção de citocinas dependente de TLR-7/8, mas não de TLR-9 em resposta a infecção viral, estimulação química e estimulação com ISNA. Nem o IRP SEQ ID NO:17 (C869), nem o IRP SEQ ID NO:92 (530), nem o IRP SEQ ID NO:27\* (C661) inibe a produção de IL-6 dependente de TLR-4.

Exemplo 3: Actividades dependentes de TLR de polinucleótidos contendo IRS

Numa série de experiências, esplenócitos de ratinho foram estimulados com R848 (sinalização de TLR-7/8) ou ISNA (1018) (sinalização de TLR-9) juntamente com vários IRP ou oligonucleótidos de controlo. A Tabela 1 contém resultados de 2 experiências. O valor dado é a percentagem da resposta de IL-6 na presença do IRP ou oligonucleótilo de controlo, em comparação com a resposta de IL-6 com R848 sozinho.

Tabela 1. Produção de IL-6 a partir de esplenócitos estimulados com R848 e IRP.

Oligonucleótido	$\mu\text{M}$	Exp. #1	Exp. #2	% R848 (IL-6) Méd.
Sem oligonucleótido	-	100	100	100
5'-TGCTTGCAAGCTTGCAAGCA-3' SEQ ID NO: _C661*	2,8 0,7	24 49	27 53	26 51
5'-TGCAAGCTTGCAAGCTTGCAAGCTT-3' SEQ ID NO: _C793	2,8 0,7	23 48	27 58	25 53
5'-TGCTGCAAGCTIGCAGATGAT-3' SEQ ID NO: _C794*	2,8 0,7	24 43	26 51	25 47
5'-TGCAAGCTTGCAAGCTTGCAAT-3' SEQ ID NO: _C923*	2,8 0,7	29 54	31 69	30 61
5'-TGCTTGCAAGCTTGCAAGC-3' SEQ ID NO: _C919*	2,8 0,7	22 41	25 43	23 42
5'-TGCTTGCAAGCTTGCAAG-3' SEQ ID NO: _C921*	2,8 0,7	18 36	18 36	18 36
5'-TGCTTGCAAGCTTGCA-3' SEQ ID NO: _C922*	2,8 0,7	20 36	22 37	21 36
5'-TGCTTGCAAGCTTG-3' SEQ ID NO: _C930*	2,8 0,7	48 60	42 63	45 62
5'-TGCTTGCAAGC-3' SEQ ID NO: _C931*	2,8 0,7	64 77	74 90	69 84
5'-GCTTCCAAGCTTGCAAGCA-3' SEQ ID NO: _C935	2,8 0,7	31 57	32 70	32 63
5'-CTTCCAAGCTTGCAAGCA-3' SEQ ID NO: _C936	2,8 0,7	39 65	41 71	40 68
5'-TTGCAAGCTTGCAAGCA-3' SEQ ID NO: _C937	2,8 0,7	25 49	26 54	26 52
5'-AGCTTGCAAGCTTGCAAGCA-3' SEQ ID NO: _C938	2,8 0,7	28 56	27 54	27 55
5'-TACTTGCAAGCTTGCAAGCA-3' SEQ ID NO: _C939	2,8 0,7	23 39	22 46	22 43
5'-TGATTGCAAGCTTGCAAGCA-3' SEQ ID NO: _C940	2,8 0,7	29 43	25 46	27 44
5'-AAATTGCAAGCTTGCAAGCA-3' SEQ ID NO: _C941	2,8 0,7	21 47	24 48	23 48
5'-CTTGCAAGCTTGCAAG-3' SEQ ID NO: _C909	2,8 0,7	61 84	70 91	66 88
5'-TGCAAGCTTGCA-3' SEQ ID NO: _C910*	2,8 0,7	62 73	62 80	62 77
5'-TGCTTGCAAGCTAGCAAGCA-3' SEQ ID NO: _C917*	2,8 0,7	25 43	30 59	27 51

5'-TGCTTGCAAGCTTGCTAGCA-3' SEQ ID NO: _C918*	2,8 0,7	17 34	18 40	17 37
5'-TGCTTGACAGCTTGACAGCA-3' SEQ ID NO: _C932*	2,8 0,7	16 35	19 43	18 39
5'-TGCTTAGCAGCTATGCAGCA-3' SEQ ID NO: _C933*	2,8 0,7	18 34	20 41	19 38
5'-TGCAAGCAAGCTAGCAAGCA-3' SEQ ID NO: _C934*	2,8 0,7	22 36	24 52	23 44
5'-TCCTGGAGGGGTTGT-3' SEQ ID NO: _C869	2,8 0,7	78 82	94 119	86 100
5'-TGCTGGAGGGGTTGT-3' SEQ ID NO: _C945*	2,8 0,7	20 37	24 49	22 43

A Tabela 2 contém resultados de células estimuladas com ISNA (1018) (sinalização de TLR-9). O valor dado é a percentagem da resposta de IL-6 ou IL-12 na presença do IRP ou oligonucleótido de controlo em comparação com a resposta de IL-6 ou IL-12 com o ISNA sozinho.

Tabela 2. Produção de IL-6 e IL-12 a partir de esplenócitos estimulados com ISNA e IRP.

Oligonucleótido	µM	IL-6	% de ISNA	IL-12	% de ISNA
ISNA SEQ ID NO: _1018	0,7	12875	100	3489	100
ISNA + SEQ ID NO: _C869	0,7	1234	10	1228	35
ISNA + SEQ ID NO: _C945*	0,7	5664	44	1605	46
ISNA + SEQ ID NO: _C661*	0,7	11376	88	2591	74

A Tabela 3 contém resultados de 3 experiências. O valor dado é a percentagem da resposta de IL-6 na presença do IRP ou oligonucleótido de controlo em comparação com a resposta de IL-6 com R848 sozinho (sinalização de TLR-7/8).

Tabela 3. Produção de IL-6 a partir de esplenócitos estimulados com R848 e IRP.

Oligonucleótido	μM	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	% R848 (IL-6) Méd.
Sem oligonucleótido	-	100	100	100	100
5'-TCCTGCAGGTTAAGT-3' C532	2,8 0,7	96 98	2 79	88 95	92 91
5'-TGCTTGCAAGCTTGCAAGCA-3' SEQ ID NO: _C661*	2,8 0,7	14 27	7 18	23 70	15 38
5'-TCCTGGAGGGGTTGT-3' SEQ ID NO: _C869	2,8 0,7	47 50	94 76	117 106	86 78
5'-TGCTGGAGGGGTTGT-3' SEQ ID NO: _C945*	2,8 0,7	18 30	20 38	24 47	21 38
5'-TACTGGAGGGGTTGT-3' SEQ ID NO: _C946	2,8 0,7	33 50	28 48	43 73	35 57
5'-TTCTGGAGGGGTTGT-3' SEQ ID NO: _C947	2,8 0,7	6 77	131 79	82 101	90 86
5'-TGCTGCTGGAGZ' GGTTGT-3' SEQ ID NO: _C949* (Z' = 7-desaza-dG)	2,8 0,7	26 46	21 46	26 54	24 49
5'-TGCTGGAGZ' GGTTGT-3' SEQ ID NO: _C950* (Z' = 7-desaza-dG)	2,8 0,7	27 41	26 42	36 50	29 44

As Tabelas 4 e 5 contêm resultados de células estimuladas com ISNA (1018) (sinalização de TLR-9). O valor dado é a percentagem da resposta de IL-6 (Tabela 4) ou IL-12 (Tabela 5) na presença do IRP ou oligonucleótido de controlo em comparação com a resposta de IL-6 ou IL-12 com o ISNA sozinho.

Tabela 4. Produção de IL-6 a partir de esplenócitos estimulados com ISNA e IRP.

Oligonucleótido	$\mu\text{M}$	Exp #1	Exp #2	% ISNA (IL-6) Méd.
Sem oligonucleótido	-	100	100	100
5'-TCCTGCAGGTAAGT-3' C532	2,8 0,7	104 86	93 184	98 135
5'-TGCTTGCAAGCTTGCAAGCA-3' SEQ ID NO:C661*	2,8 0,7	61 142	62 119	61 130
5'-TCCTGGAGGGGTTGT-3' SEQ ID NO:_C869	2,8 0,7	10 35	8 25	9 30
5'-TGCTGGAGGGGTTGT-3' SEQ ID NO_C945*	2,8 0,7	30 54	41 59	35 56
5'-TACTGGAGGGGTTGT-3' SEQ ID NO:_C946	2,8 0,7	20 38	20 56	20 47
5'-ITCTGGAGGGGTTGT-3' SEQ ID NO:_C947	2,8 0,7	52 64	116 34	84 49
5'-TGCTGCTGGAGZ' GGTTGT-3' SEQ ID NO:_C949* (Z' = 7-desaza-dG)	2,8 0,7	25 62	18 93	21 77
5'-TGC TGG AGZ' GGT TGT-3' SEQ ID NO:_C950* (Z' = 7-desaza-dG)	2,8 0,7	86 118	47 146	66 132

Tabela 5. Produção de IL-12 a partir de esplenócitos estimulados com ISNA e IRP.

Oligonucleótido	$\mu\text{M}$	Exp #1	Exp #2	% ISNA (IL-12) Méd.
Sem oligonucleótido	-	100	100	100
5'-TCCTGCAGGITAAGT-3' C532	2,8 0,7	101 74	94 74	98 74
5'-TGCTTGCAAGCTTGAAAGCA-3' SEQ ID NO:_C661*	2,8 0,7	64 58	59 63	61 61
5'-TCCTGGAGGGGTTGT-3' SEQ ID NO:_C869	2,8 0,7	19 35	21 40	20 38
5'-TGCTGGAGGGGTTGT-3' SEQ ID NO:_C945*	2,8 0,7	48 49	35 44	42 46
5'-TACTGGAGGGGTTGT-3' SEQ ID NO:_C946	2,8 0,7	30 42	23 37	26 39
5'-TTCTGGAGGGGTTGT-3' SEQ ID NO:_C947	2,8 0,7	45 53	44 42	45 47
5'-TGCTGCTGGAGZ' GGTTGT-3' SEQ ID NO:_C949* (Z' = 7-desaza-dG)	2,8 0,7	39 53	45 44	42 49
5'-TGC TGG AGZ' GGT TGT-3' SEQ ID NO:_C950* (Z' = 7-desaza-dG)	2,8 0,7	68 66	69 65	68 65

A Tabela 6 lista exemplos de IRS e sua eficácia na inibição da sinalização de TLR.

Tabela 6. Sequências de ADN Imuno-reguladoras (IRS)

SEQ NO:	ID	Inibição de TLR-9	Inibição de TLR-7/8
C532	5'-TCCTGCAGGTTAAGT-3' (controlo)	-	-
C869	5'-TCCTGGAGGGGTTGT-3'	+++	+/-
C661*	5'-TGCTTGCAAGCTTGCAAGCA-3'	-	+++
C907*	5'-TGCTTGCAAGCTTGCAAGCA- <b>HEG</b> - TCCTGGAGGGGTTGT-3'	+++	+++
C945*	5'-TGCTGGAGGGGTTGT-3'	++/-	+++
1040	5'-TGACTGTGAACCTTAGAGATGA-3' (Controlo)	-	-
C709	5'-GCTAGAGCTTAGGCT-3' (Controlo)	-	-
C533	5'-TGACTGTAGGCGGGAAAGATGA-3'	++	-
C217	5'-GCGGCCGGCGCGCGCCC-3'	+	-
C218	5'-GCGCGCGCGCGCGCGC-3'	+	-
C219	5'-CCGGCCGGCCGGCCGG-3'	+	-
C707	5'-GAGCAAGCTGGACCTTCCAT-3'	+	-
1019	5'-TGACTGTGAAGGTTAGAGATGA-3'	++	-
C708	5'-CCTCAAGCTTGAGGGG-3'	+++	+
C888	5'-TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-3'	++	ND
C889	5'-TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-3'	-	ND
C890	5'-CCTCAAGCTTGAGGGG-3'	-	ND
C891	5'-CCTCAAGCTTGAGZ'GG-3'	+++	ND
530	5'-TCCTGGCGGGAAAGT-3'	+++	+
C823	5'-TCCTGGCGZ'GGAAGT-3'	+++	+
C824	5'-TCCTGGCGAGGAAGT-3'	-	ND
C825	5'-TCCTGGCGGGAAAGT-3'	+	ND
C826	5'-TCCTGGCGAAAAGT-3'	-	-
C827	5'-TCCTAACGGGGAAAGT-3'	+++	ND
C531	5'-TCCTGGAGGGGAAGT-3'	+++	+
C828	5'-TCCTAACGGGGAAAGT-3'	+++	ND
C841	5'-TCCTAACGGGGTTGT-3'	+++	ND
C842	5'-TCCTAACGGGGCTGT-3'	+++	ND
C843	5'-TCCTAACGGGGCTGT-3'	++	ND
C844	5'-TCCTAACGGGGTTGT-3'	++	ND
C845	5'-TCCTCATGGGGTTGT-3'	++	ND
C892	5'-TCCTGGCGGGGAAGT-3'	-	ND
C869	5'-TCCTGGAGGGGTTGT-3'	+++	++/-
C870	5'-TCCTGGAGGGGCTGT-3'	+++	ND
C871	5'-TCCTGGAGGGGCCAT-3'	+++	ND

C872	5'-TCCTGGAGGGTCAT-3'	+++	ND
C873	5'-TCCGGAAGGGAAAGT-3'	++	ND
C874	5'-TCCGGAAGGGTTGT-3'	++	ND
C920	5'-TCCTGGAGZ'GGTTGT-3'	+++	++/-
C661	5'-TGCTTGCAAGCTTGCAAGCA-3'	-	+++
C793	5'-TGCAAGCTTGCAAGCTTGCAAGCTT-3'	+/-	+++
C794*	5'-TGCTGCAAGCTTGAGATGAT-3'	+/-	+++
C909	5'-CTTGCAAGCTTGCAA G-3'	-	-
C910	5'-TGCAAGCTTGCA-3'	-	-
C917*	5'-TGCTTGCAAGCTAGCAAGCA-3'	-	+++
C918*	5'-TGCTTGCAAGCTTGCTAGCA-3'	-	+++
C919*	5'-TGCTTGCAAGCTTGCAAGC-3'	-	+++
C921*	5'-TGCTTGCAAGCTTGCAAG-3'	-	+++
C922*	5'-TGCTTGCAAGCTTGCA-3'	-	+++
C923*	5'-TGCAAGCTTGCAAGCTTGCAAT-3'	-	+++
C907*	5'-TGCTTGCAAGCTTGCAAGCA- <b>HEG</b> - TCCTGGAGGGTTGT-3'	+++	+++
C908*	5'-TGCTTGCAAGCTTGCAAGCATCCTGGAGGGTTGT-3'	+++	+++
C913*	5'-TGCTTGCAAGCTAGCAAGCA- <b>HEG</b> - TCCTGGAGGGTTGT-3'	+++	+++
C914*	5'-TGCTTGCAAGCTTGCTAGCA- <b>HEG</b> - TCCTGGAGGGTTGT-3'	+++	+++
C916*	5'-TGCTTGCAAGCTTGCTAGCA- <b>HEG</b> - TCCTGGAGZ'GGTTGT-3'	+++	+++

Z' = 7-desaza-dG; +++ a - indica variação da actividade de muito activo a inactivo; ND: não determinado.

Numa série de experiências de dose-resposta, esplenócitos de ratinho foram estimulados com R848 (sinalização de TLR-7/8) ou ISNA (1018) (sinalização de TLR-9) juntamente com vários IRP ou oligonucleótidos de controlo. A Tabela 7 contém os resultados da produção de IL-6 na presença de razões variáveis de IRP:ISNA. O valor dado é a percentagem da resposta de IL-6 na presença do IRP ou oligonucleótilo de controlo em comparação com a resposta de IL-6 com ISNA sozinho.

Tabela 7. Produção de IL-6 a partir de esplenócitos estimulados com ISNA e IRP.

	% de ISNA (IL-6)					
	Razão de IRP:ISNA					
	2:1	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16
ISNA 1018	100	100	100	100	100	100
Meio de cultura	1	1	1	1	1	1
5'-TCCTGCAGGTTAAGT SEQ ID NO: _C532	132	104	102	97	88	105
5'-TGCTTGCAAGCTTGCAAGCA SEQ ID NO: _C661*	58	78	81	84	85	104
5'-TCCTGGAGGGGTTGT SEQ ID NO: _C869	2	7	12	32	53	79
5'-TGCTCCTGGAGGGGTTGT SEQ ID NO: _C954*	2	4	7	19	41	80
5'-TCCTGCTGGAGGGGTTGT SEQ ID NO: _C955	14	29	39	55	67	85
5'-TGCTTGACATCCTGGAGGGGTTGT SEQ ID NO: _C956*	2	2	4	10	25	72
5'-TGCTTGACAGCTTGACAGTCCTGGA GGGGTTGT SEQ ID NO: _C957*	2	2	4	10	26	76
5'-TGCTTGACAGCTTGACAGTCCTGGAGGGGTTGT SEQ ID NO: _C962*	2	2	3	9	31	71
5'-TGCTTGACAGCTTGATCCTGGAGGGGTTGT SEQ ID NO: _C963*	3	2	3	4	22	58
5'-TGCTTGACAGCTTGACAGTCCTGGAGGGGTTGT SEQ ID NO: _C964*	3	1	2	7	24	55
5'-TGCTTGACAGCTTGCTCCTGGAGGGGTTGT SEQ ID NO: _C965*	2	1	2	4	24	53
5'-TGCTTGACAGCTTGCTTCCTGGAGGGGTTGT SEQ ID NO: _C966*	2	1	2	7	29	63
5'-TGCTTGACAGCTTGACAGCATCCTGGAGGGGTTGT SEQ ID NO: _C967*	2	1	2	8	33	62
5'-TGCTTGACAGCTTGACAGCATCCTGGAGGGGTTGT SEQ ID NO: _C968*	2	1	2	2	12	46
5'-TGCTTGACAGCTTGACAGCATCC TGGAGGGGT SEQ ID NO: _C969*	2	1	1	2	8	44
5'-TGCTTGACAGCTTGACAGCATCCTGGAGGGGG SEQ ID NO: _C970*	2	1	2	3	19	59
5'-TGCTTGACAGCTTGACAGCATCCTGGAGGGGTTGT SEQ ID NO: _C971*	2	2	3	9	31	58
5'-TGCTTGACAGCTTGACAGCATCCTGGAGGGGTTGT SEQ ID NO: _C972*	2	2	3	8	28	56

A Tabela 8 contém os resultados da produção de IL-12 a partir de esplenócitos de murídeo na presença de razões variáveis de IRP:ISNA. O valor dado é a percentagem da resposta de IL-12 na presença do IRP ou oligonucleótido de

controlo em comparação com a resposta de IL-12 com ISNA sozinho.

Tabela 8. Produção de IL-12 a partir de esplenócitos estimulados com ISNA e IRP.

	% de ISNA (IL-12)					
	Razão de IRP:ISNA					
	2:1	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16
ISNA SEQ ID NO:_1018	100	100	100	100	100	100
Meio de cultura	6	6	6	6	6	6
5'-TCCTGCAGGTTAAGT SEQ ID NO:_C532	108	96	84	80	74	93
5'-TGCTTGCAAGCTTGCAAGCA SEQ ID NO:_C661*	44	61	61	61	61	74
5'-TCCTGGAGGGGTTGT SEQ ID NO:_C869	6	20	22	27	35	60
5'-TGCTCCTGGAGGGGTTGT SEQ ID NO:_C954*	7	19	20	24	35	58
5'-TCCTGCTGGAGGGGTTGT SEQ ID NO:_C955	27	43	47	43	50	65
5'-TGCTTGCTCCTGGAGGGGTTGT SEQ ID NO:_C956*	8	22	26	33	43	59
5'-TGCTTGACATCCTGGAGGGGTTGT SEQ ID NO:_C957*	8	23	30	38	46	60
5'-TGCTTGACAGCTTGACAGTCCTGGA GGGGTTGT SEQ ID NO:_C962*	8	9	17	32	46	71
5'-TGCTTGACAGCTTGATCCTGGAGGGGTTGT SEQ ID NO:_C963*	5	5	8	18	29	53
5'-TGCTTGACAGCTCCTGGAGGGGTTGT SEQ ID NO:_C964*	5	10	16	25	33	53
5'-TGCTTGACAGCTTGCTCCTGGAGGGGTTGT SEQ ID NO:_C965*	5	5	9	18	31	51
5'-TGCTTGACAGCTTGCTTCCTG GAGGGGTTGT SEQ ID NO:_C966*	5	6	10	19	31	54
5'-TGCTTGACAGCTTGACAGCATCCT GGAGGGGTTGT SEQ ID NO:_C967*	5	5	8	19	33	54
5'-TGCTTGACAGCTTGACAGCATCCT GGAGGGGTTGT SEQ ID NO:_C968*	5	4	9	11	21	46
5'-TGCTTGACAGCTTGACAGCATCC TGGAGGGGT SEQ ID NO:_C969*	6	4	6	9	18	45
5'-TGCTTGACAGCTTGACAGCATCCTGGAGGGG SEQ ID NO:_C970*	6	5	9	16	30	52
5'-TGCTTGCAAGCTTGCTCCTGGAGGGGTTGT SEQ ID NO:_C971*	6	8	11	21	33	54
5'-TGCTTGCAAGCTCCTGGAGGGGTTGT SEQ ID NO:_C972*	7	11	15	22	35	57

A Tabela 9 contém os resultados da produção de IL-6 a partir de esplenócitos de ratinho na presença de concentrações variáveis de IRP na presença de R848 (sinalização de TLR 7/8). O valor dado é a percentagem da resposta de IL-6 na presença do IRP ou oligonucleótido de controlo em comparação com a resposta de IL-6 com R848 sozinho.

Tabela 9. Produção de IL-6 a partir de esplenócitos estimulados com R848 e IRP.

	% de R848 (IL-6)				
	Conc. de IRP				
	5,6 μM	2,8 μM	1,4 μM	0,7 μM	0,35 μM
	100	100	100	100	100
R848					
Meio de cultura	0	0	0	0	0
5'-TCCTGCAGGTTAAGT SEQ ID NO: _C532	108	104	108	108	105
5'-TGCTTGCAAGCTTGCAAGCA SEQ ID NO: _C661*	21	31	47	59	77
5'-TCCTGGAGGGGTTGT SEQ ID NO: _C869	93	106	110	109	104
5'-TGCTCCTGGAGGGGTTGT SEQ ID NO: _C954*	23	31	44	56	72
5'-TCCTGCTGGAGGGGTTGT SEQ ID NO: _C955	73	87	107	101	108
5'-TGCTTGCTGGAGGGGTTGT SEQ ID NO: _C936*	20	28	45	66	75
5'-TGCTTGACATCCTGGAGGGGTTGT SEQ ID NO: _C957*	17	27	39	63	78
5'-TGCTTGACAGCTTGACAGTCCTGGA GGGGTTGT SEQ ID NO: _C962*	17	36	51	75	83
5'-TGCTTGACAGCTTGATCCTGGAGGGGTTGT SEQ ID NO: _C963*	26	35	54	77	93
5'-TGCTTGACAGCTTCCTGGAGGGGTTGT SEQ ID NO: _C964*	15	30	45	68	89
5'-TGCTTGACAGCTTGCTCCTGGAGGGGTTGT SEQ ID NO: _C965*	16	31	48	72	82
5'-TGCTTGACAGCTTGCTGTGCTGGAGGGGTTGT SEQ ID NO: _C966*	18	40	60	78	92
5'-TGCTTGACAGCTTGACAGCATCCT GGAGGGGTTGT SEQ ID NO: _C967*	16	41	49	68	80
5'-TGCTTGACAGCTTGACAGCATCCT GGAGGGGTTGT SEQ ID NO: _C968*	13	29	43	67	83
5'-TGCTTGACAGCTTGACAGCATCC TGGAGGGGTTGT SEQ ID NO: _C969*	14	26	45	62	80
5'-TGCTTGACAGCTTGACAGCATCCTGGAGGGG SEQ ID NO: _C970*	16	25	45	54	74

5'-TGCTTGCAAGCTTGCTCCTGGAGGGTTGT SEQ ID NO: C971*	15	29	58	66	67
5'-TGCTTGCAAGCTTGCTCCTGGAGGGTTGT SEQ ID NO: C972*	17	28	41	54	64

Tal como mostrado nas Tabelas 7-9, SEQ ID NO:52\* (C954), SEQ ID NO:53\* (C956), SEQ ID NO:54\* (C957) e SEQ ID NOS: 55-65\* (C962-C972) são particularmente eficazes na inibição de respostas celulares dependentes tanto de TLR-7/8 como de TLR-9.

#### Exemplo 4:

Esplenócitos de murídeo foram activados com ISNA (1018) (0,7 µM) ou R848 (1 µM) sozinho e juntamente com quantidades crescentes de IRP SEQ ID NO:17 (869), IRP SEQ ID NO:27\* (661), IRP SEQ ID NO:52\* (954). Tal como mostrado nas Figs. 16A-16B, IRP SEQ ID NO:17 (869) e IRP SEQ ID NO:52\* (954) são potentes inibidores da produção de IL-6 em resposta a ISNA (1018) enquanto IRP SEQ ID NO:27\* (661) e IRP SEQ ID NO:52\* (954) são potentes inibidores da activação por R848.

Cada um dos ratinhos de um grupo foi injectado subcutaneamente com 2,5 µg de R848 sozinho ou em combinação com 450-500 µg ou 100-150 µg de oligonucleótido de controlo ou IRP SEQ ID NO:52\* (954). O soro foi colhido 1 hora após injecção de R848 e o nível de IL-12 e TNF-α no soro foi determinado utilizando imunoensaio tal como descrito anteriormente. Os resultados destes ensaios são representados nas Figs. 17A-17B. A administração do IRP juntamente com R848 resultou numa quantidade decrescente de cada uma das citocinas no soro relativamente à quantidade das citocinas no soro em animais que receberam R848 sozinho.

Ratinhos BALB/c com 6 a 12 semanas de idade foram injectados intraperitonealmente com 20 mg de D-galactosamina em solução salina e subcutaneamente com 50 µg de ISNA (1018) sozinho ou em combinação com 200 µg, 100 µg ou 50 µg de IRP SEQ ID NO:52\* (954) ou IRP SEQ ID NO:17 (869) ou de um oligonucleótido de controlo ODN. Os ratinhos foram então avaliados quanto à sobrevivência ao longo de um período de 7 dias. Em ratinhos normais, 50 µg de ISNA (1018) não induzem

morte, no entanto, quando os ratinhos são pré-tratados com D-galactosamina, tornam-se altamente susceptíveis a inflamação e morrem rapidamente. Tal como representado nas Figs. 18, o IRS pode prevenir a morte de um modo dependente da dose enquanto o ODN inactivo de controlo não. À dose mais elevada (200 µg de IRS) 100% dos ratinhos ficaram protegidos, quase 90% com 100 µg de IRS e ainda acima de 60% a uma razão de 1:1. Estes dados apoiam assim uma forte actividade *in vivo* de IRS.

Esplenócitos de ratinho foram activados com ISNA (1018) (Fig 19A) ou R848 (Fig 19B) sozinho e juntamente com IRP SEQ ID NO:52\* (954) ou com os produtos de degradação de IRP SEQ ID NO:52\* (954), IRP SEQ ID NO:\_\_ (DV019)\*, IRP SEQ ID NO:\_\_ (DV020)\*, IRP SEQ ID NO:\_\_ (DV021)\*, IRP SEQ ID NO:\_\_ (DV022)\*, IRP SEQ ID NO:\_\_ (DV023)\* e IRP SEQ ID NO:\_\_ (DV024)\*.

As sequências DV0 são as "sequências IRS 954 N menos" (IRS 954 com N = 1 a 6 nucleótidos suprimidos da extremidade 3'):

SEQ ID NO:\_\_ DV019: 5'-TGC TCC TGG AGG GGT TG\*  
 SEQ ID NO:\_\_ DV020: 5'-TGC TCC TGG AGG GGT T\*  
 SEQ ID NO:\_\_ DV021: 5'-TGC TCC TGG AGG GGT\*  
 SEQ ID NO:\_\_ DV022: 5'-TGC TCC TGG AGG GG\*  
 SEQ ID NO:\_\_ DV023: 5'-TGC TCC TGG AGG G\*  
 SEQ ID NO:\_\_ DV024: 5'-TGC TCC TGG AGG\*

Tal como mostrado nas Figs. 19A e 19B, a produção de IL-6 foi menor quando as células foram cultivadas na presença de IRP SEQ ID NO:52\* (954), SEQ ID NO IRP:\_\_ (DV019)\*, IRP SEQ ID NO:\_\_ (DV020)\*, IRP SEQ ID NO:\_\_ (DV021)\*, IRP SEQ ID NO:\_\_ (DV022)\*, IRP SEQ ID NO:\_\_ (DV023)\* com pouca ou nenhuma inibição com IRP SEQ ID NO:\_\_ (DV024)\*. Isto sugere que a actividade de IRP SEQ ID NO:52\* (954) é mantida mesmo após a degradação da extremidade 3' da sequência.

Ratinhos (NZBxNZW) F<sub>1</sub> foram deixados sem tratamento, ou tratados duas vezes por semana com 15 µg ou 45 µg de IRP SEQ ID NO:52\* (954). O tratamento foi iniciado aos 4-5 meses de idade, quando os primeiros sinais da doença surgiram nos ratinhos. Tal como representado na Fig. 20, os níveis no soro

de auto-anticorpos anti-ADNcd na ausência de tratamento aumentaram ao longo do tempo. Os ratinhos injectados com IRP SEQ ID NO:52\* (954) tinham níveis reduzidos de auto-anticorpos que demonstram a sua capacidade para afectar a progressão da doença destes ratinhos propensos a lúpus.

Ratinhos (NZBxNZW) F<sub>1</sub> com 8-9 meses de idade e já doentes foram injectados com 100 µg de IRP SEQ ID NO:52\* (954) ou oligonucleótido de controlo três vez por semana. Tal como representado na Fig. 21, o tratamento com IRP SEQ ID NO:52\* (954) reduziu a mortalidade dos ratinhos, em comparação com o oligonucleótido de controlo.

Células B humanas purificadas foram activadas com ISNA (1018) ou R848 sozinho e em conjunto com IRP SEQ ID NO:17 (869), IRP SEQ ID NO: 27\* (661), IRP SEQ ID NO: 52\* (954) ou oligonucleótido de controlo. Tal como representado na Fig. 24, o padrão de actividade inibidora destes oligonucleótidos é semelhante no rato e no homem. Em particular, o IRP SEQ ID NO:52\* (954) inibiu a produção de IL-6 a partir de células B humanas estimuladas com ambos os estímulos.

PDC humanas foram infectadas com vírus HSV-1 inactivado com UV sozinho (MOI: 5) e juntamente com IRP SEQ ID NO:52\* (954) ou oligonucleótido de controlo. A Fig. 23 mostra um exemplo do forte efeito inibidor do IRP SEQ ID NO:52\* (954) na produção de IFN-α em resposta ao vírus sozinho.

PDC humanas foram infectadas com vírus da gripe inactivado pelo calor sozinho (MOI: 2) e juntamente com IRP SEQ ID NO:52\* (954) ou oligonucleótido de controlo. A Fig. 24 mostra um exemplo do forte efeito inibitório do IRP SEQ ID NO:52\* (954) na produção de IFN-α em resposta ao vírus sozinho.

PDC humanas foram cultivadas na presença de células U937 irradiadas com UV (60 mJ) na presença de soro a 10% obtido a partir de pacientes de LES positivos para anti-ADNcd isoladamente e em conjunto com IRP SEQ ID NO:52\* (954) ou oligonucleótido de controlo. Tal como representado na Fig. 25, o soro contendo anti-ADNcd pode activar PDC e induzir IFN-α. Quando adicionado à cultura, no entanto, o IRP SEQ ID

NO:52\* (954) pôde inibir a resposta de IFN- $\alpha$  enquanto o oligonucleórido de controlo não teve qualquer efeito. Isto demonstra que o IRP SEQ ID NO:52\* (954) pode inibir significativamente a activação de PDC neste ensaio *in vitro* que utiliza amostras de pacientes de LES.

PDC humanas foram cultivadas na presença de células U937 irradiadas com UV (60 mJ), na presença de 0,5 mg/ml de IgG purificada de pacientes de LES positivos para anti-RNP sozinha e em conjunto com IRP SEQ ID NO:52\* (954) ou oligonucleórido de controlo. As IgG foram purificadas a partir do soro de pacientes utilizando uma coluna HiTrap Protein G HP (GE Healthcare, Waukesha, WI). Uma vez purificadas, as IgG foram dessalinizadas e depois quantificadas. Tal como representado na Fig. 26, a IgG específica anti-RNP pode activar PDC e induzir IFN- $\alpha$ . Quando adicionado na cultura, no entanto, o IRP SEQ ID NO:52\* (954) pôde inibir a resposta de IFN- $\alpha$  enquanto o oligonucleórido de controlo não teve qualquer efeito. Isto demonstra que o IRP SEQ ID NO:52\* (954) pode inibir significativamente a activação de PDC neste ensaio *in vitro* que utiliza amostras de pacientes de LES.

Esplenócitos de murídeo foram activados com ISNA (1018) ou R848 sozinho e em conjunto com IRP SEQ ID NO:17 (869), IRP SEQ ID NO:77 (661), IRP SEQ ID NO:52\* (954), IRP SEQ ID NO:\_\_ (983), IRP SEQ ID NO:\_\_ (984), IRP SEQ ID NO:\_\_ (985), IRP SEQ ID NO:\_\_ (986), IRP SEQ ID NO:\_\_ (987), IRP SEQ ID NO:\_\_ (988), IRP SEQ ID NO:\_\_ (989), IRP SEQ ID NO:\_\_ (990), IRP SEQ ID NO:\_\_ (991) ou oligonucleórido de controlo. Tal como representado na Fig. 27 e Fig 28, a adição de grupos não nucleotídicos não conduziu a completa perda de actividade embora pudesse modular o nível da resposta.

Lisboa, 2012-08-09

REIVINDICAÇÕES

1. Oligonucleótido para utilização na inibição de uma resposta imunitária dependente de TLR7/8 num indivíduo, em que o oligonucleótido tem menos de cerca de 200 bases ou pares de bases e o oligonucleótido compreende uma sequência imuno-reguladora, em que a sequência imuno-reguladora compreende pelo menos uma sequência trinucleotídica TGC na extremidade 5' do oligonucleótido.

2. Oligonucleótido para utilização de acordo com a reivindicação 1, em que a resposta imunitária está associada a uma doença auto-imune.

3. Oligonucleótido para utilização de acordo com a reivindicação 2, em que a inibição da resposta imunitária melhora um ou mais sintomas da doença auto-imune.

4. Oligonucleótido para utilização de acordo com a reivindicação 2, em que a inibição da resposta imunitária previne ou atrasa o desenvolvimento da doença auto-imune.

5. Oligonucleótido para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 4, em que a doença auto-imune é seleccionada a partir do grupo que consiste em lúpus eritematoso sistémico (LES), artrite reumatóide e doenças da pele auto-imunes.

6. Oligonucleótido para utilização de acordo com a reivindicação 1, em que a resposta imunitária está associada a estimulação crónica por patogénio.

7. Oligonucleótido para utilização de acordo com a reivindicação 1, em que a resposta imunitária está associada a doença inflamatória.

8. Oligonucleótido para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, em que o oligonucleótido tem 50 bases ou pares de bases de comprimento ou menos.

9. Oligonucleótido para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, em que o oligonucleótido consiste na sequência nucleotídica 5'-TG<sub>N</sub>-3',

em que cada N é um nucleótido,  
m é um inteiro de 5 a cerca de 50 e  
a sequência N<sub>1</sub>-N<sub>m</sub> compreende pelo menos um dinucleótido GC.

10. Oligonucleótido para utilização de acordo com a reivindicação 9, em que o oligonucleótido consiste na sequência nucleotídica seleccionada a partir do grupo que consiste em 5'-TG<sub>N</sub>A-3', 5'-TG<sub>N</sub>CA-3', e 5'-TG<sub>N</sub>GCA-3'.

11. Oligonucleótido para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, em que o oligonucleótido compreende a sequência 5'-TGCTTGCAAGCTTGCAAGCA-3' ou um fragmento desta sequência que inclui pelo menos uma porção palindrómica de 10 bases desta.

12. Oligonucleótido para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, em que o oligonucleótido é seleccionado a partir do grupo que consiste em

5'-TGCTTGCAAGCTTGCAAGCA-3',  
5'-TGCTTGCAAGCTTGCAAG-3',  
5'-TGCTTGCAAGCTTGCA-3',  
5'-TGCTTGCAAGCTAGCAAGCA-3',  
5'-TGCTTGCAAGCTTGCTAGCA-3',  
5'-TGCTTGACAGCTTGACAGCA-3',  
5'-TGCTTAGCAGCTATGCAGCA-3',  
5'-TGCAAGCAAGCTAGCAAGCA-3',  
5'-TGCAAGCTTGCAAGCTTGCAAGCTT-3',  
5'-TGCTGCAAGCTTGCAAGATGAT-3',  
5'-TGCTTGCAAGCTTGCAAGC-3',  
5'-TGCAAGCTTGCAAGCTTGCAAT-3',  
5'-TGCTTGCAAGCTTG-3',  
5'-TGCTGGAGGGTTGT-3',  
5'-TGCTCCTGGAGGGTTGT-3',  
5'-TGCTTGCCCTGGAGGGTTGT-3',  
5'-TGCTTGACATCCTGGAGGGTTGT-3',  
5'-TGCTTGACAGCTTGACAGTCCTGGAGGGTTGT-3',

5'-TGCTTGACAGCTTGATCCTGGAGGGTTGT-3',  
5'-TGCTTGACAGCTTCCTGGAGGGTTGT-3',  
5'-TGCTTGACAGCTGCTCCTGGAGGGTTGT-3',  
5'-TGCTTGACAGCTGCTGTCCCTGGAGGGTTGT-3,  
5'-TGCTTGACAGCTTGACAGCATCCTGGAGGGTTGT-3',  
5'-TGCTTGACAGCTTGACAGCATCCTGGAGGGGT-3',  
5'-TGCTTGCAAGCTTGCTCCTGGAGGGTTGT-3',  
5'-TGCTTGCAAGCTTGCAAGCATCCTGGAGGGTTGT-3',  
5'-TGCTTGCAAGCTTGCAGCA-HEG-TCCTGGAGGGTTGT-3',  
5'-TGCTTGCAAGCTAGCAAGCA-HEG-TCCTGGAGGGTTGT-3',  
5'-TGCTTGCAAGCTTGCTAGCA-HEG-TCCTGGAGGGTTGT-3',  
5'-TGCTTGCAAGCTTGCTAGCA-HEG-TCCTGGAGZGGTTGT-3'  
5'-TGCTGCTGGAGZ'GGTTGT-3', e  
5'-TGCTGGAGZ'GGTTGT-3', em que HEG é hexa-  
(etilenoglicol) e Z' é 7-desaza-dG.

13. Oligonucleótido para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o oligonucleótido contém polinucleótidos modificados com fosfato.

14. Oligonucleótido para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o oligonucleótido compreende ligações fosforotioato.

15. Oligonucleótido para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o indivíduo é um humano.

16. Oligonucleótido para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, em que o oligonucleótido tem 200 bases de comprimento ou menos.

Lisboa, 2012-08-09

Razão expressa  
como IRS:ISNA

### Esplenócitos de Ratinho

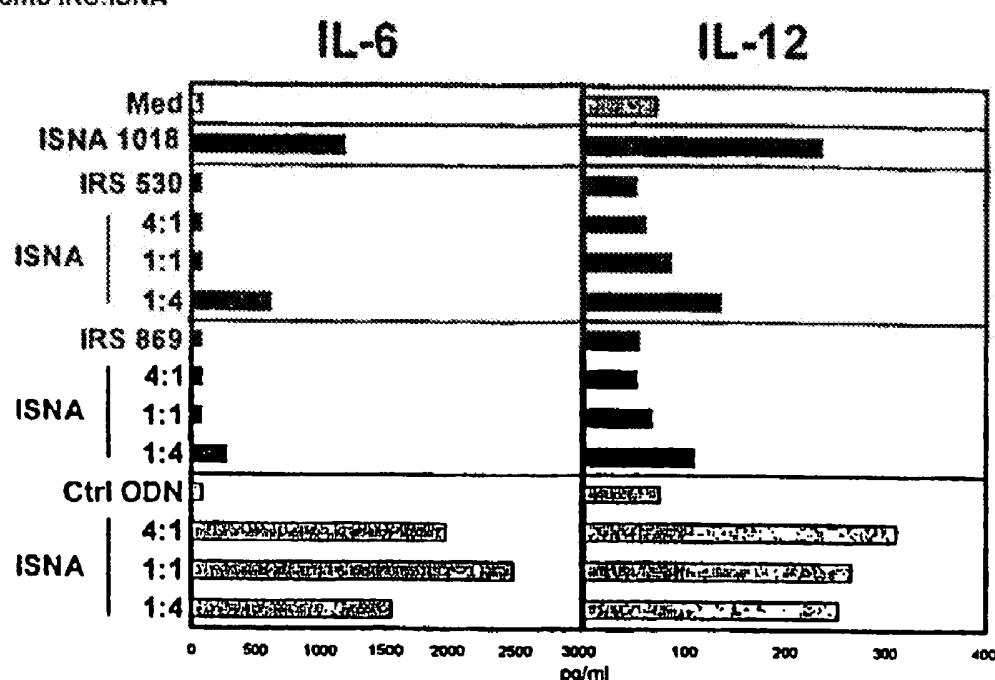


Fig. 1A

### Células CD11c+ de Ratinho isoladas a partir de Esplenócitos

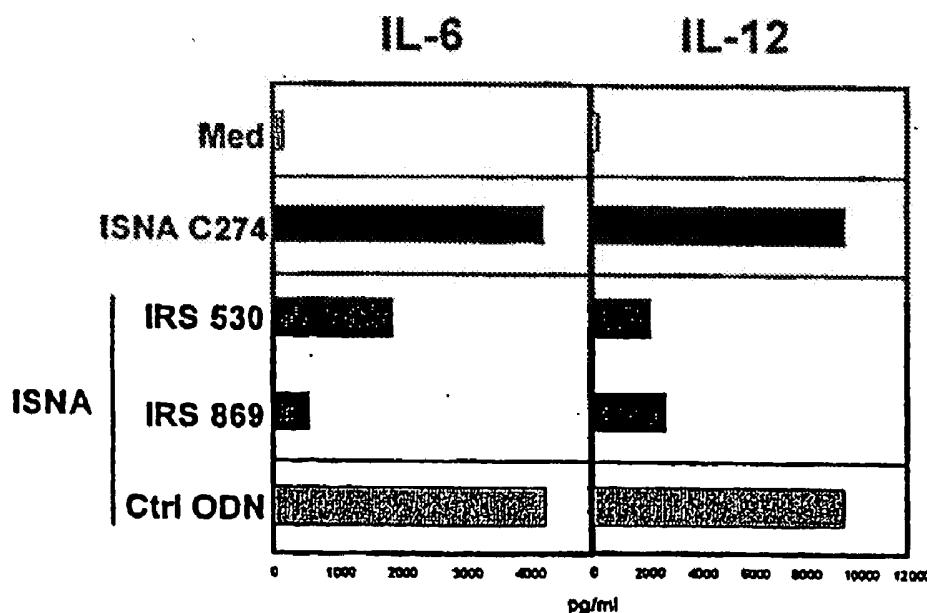


Fig. 1B

Razão expressa  
como IRS:ISS

### Célula B Humana

#### IL-6

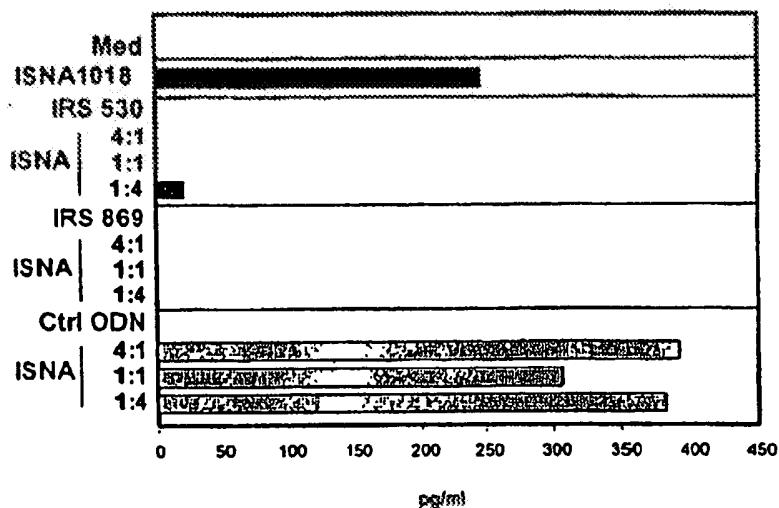


Fig. 2

#### IL-6 (Média de 5 ratinhos )

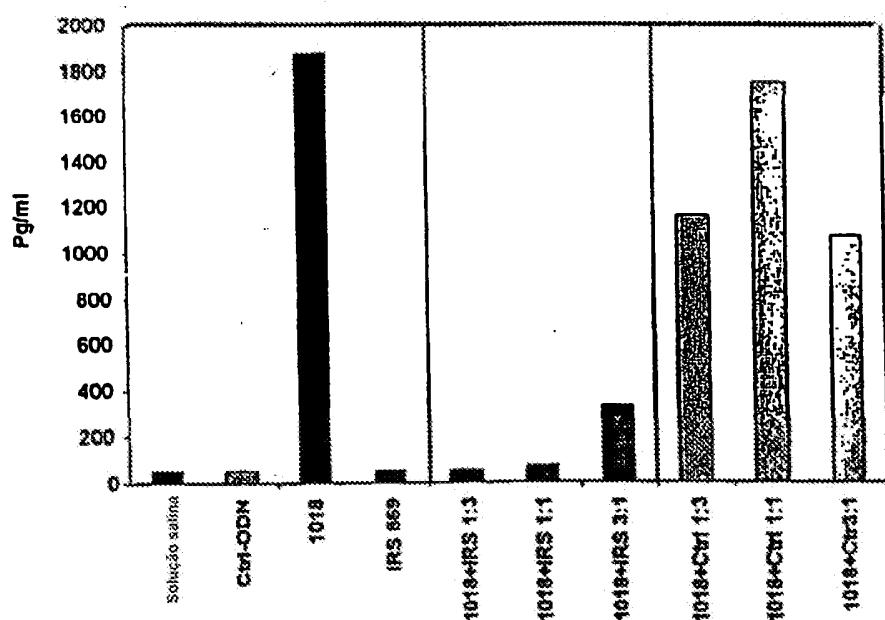


Fig. 3

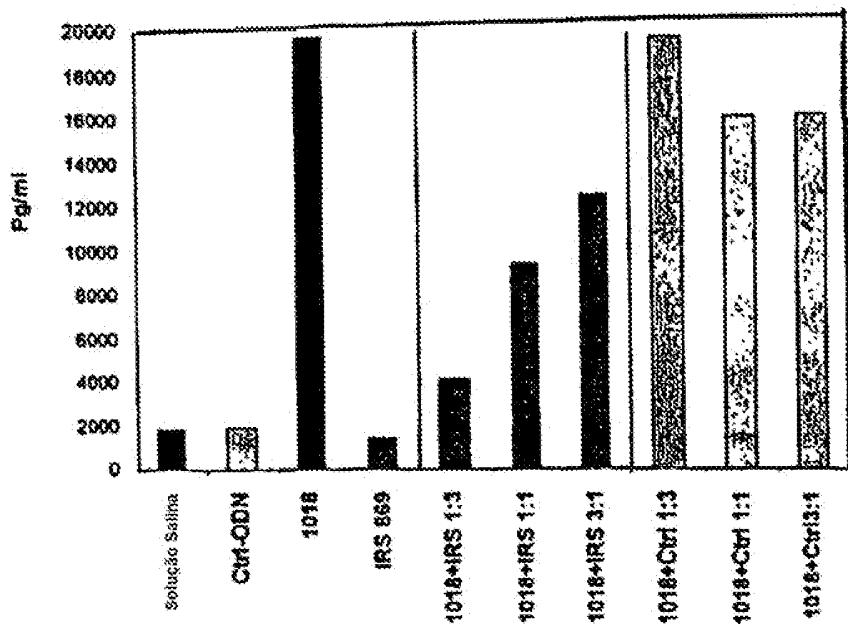
**IL-12 ( Média de 5 ratinhos )**

Fig. 4

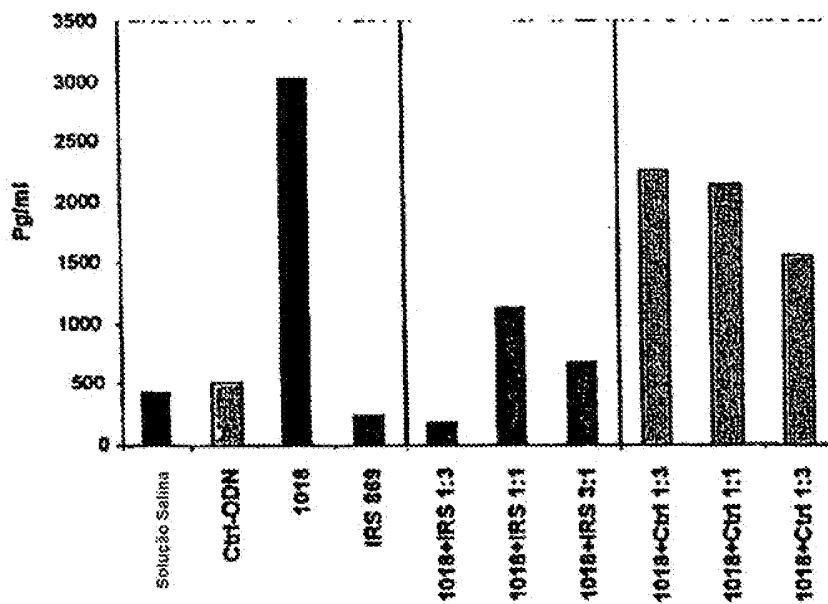
**TNF- $\alpha$  ( Média de 5 ratinhos )**

Fig. 5

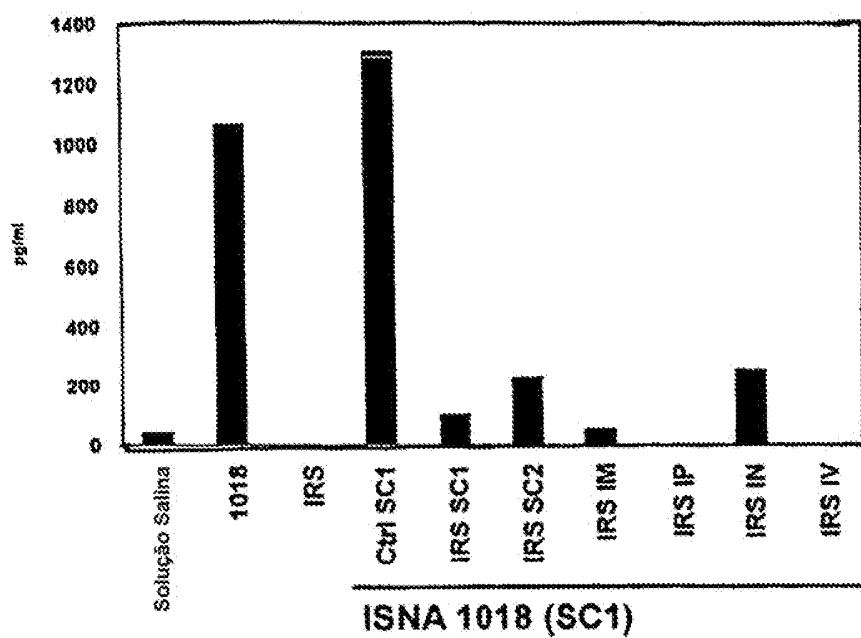
**IL-6 (Média de 5 ratinhos)**

Fig. 6

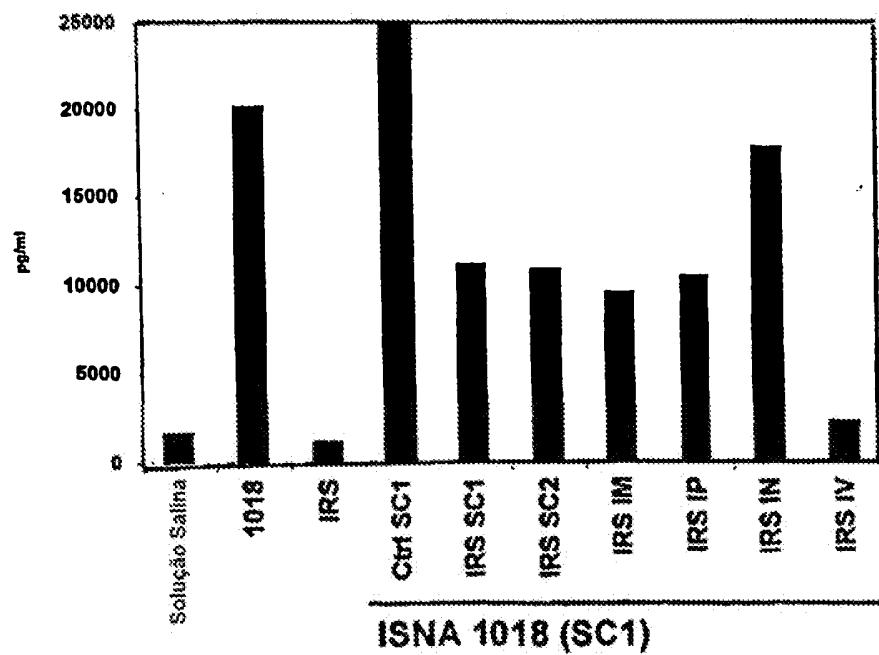
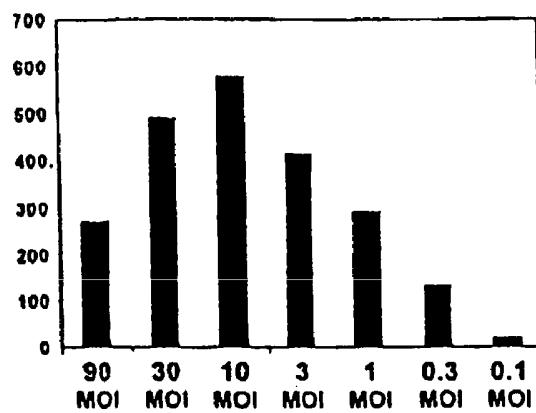
**IL-12 (Média de 5 ratinhos)**

Fig. 7

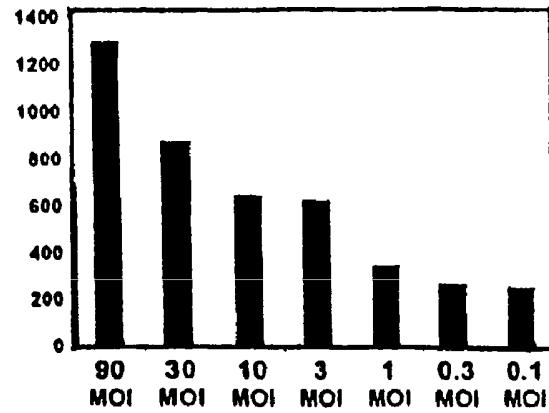
**IFN- $\alpha$**



**HSV-1**

Fig. 8A

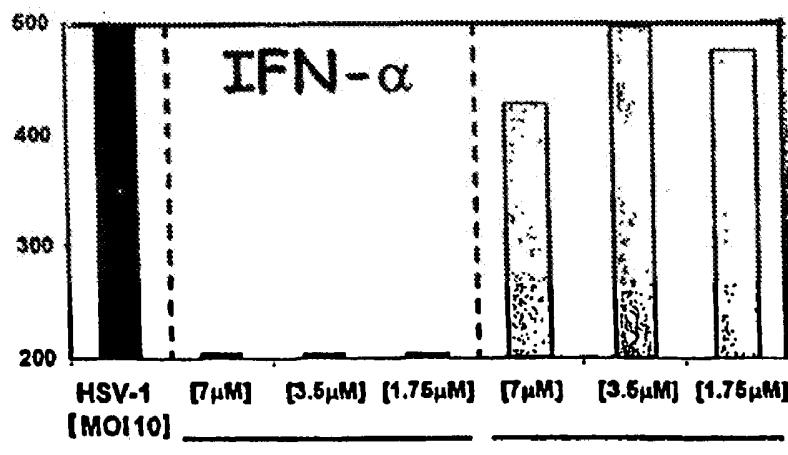
**IL-12**



**HSV-1**

Fig. 8B

**Esplenócitos CD11c+ de Ratinho**



**IRS 869**

**Controlo**

Fig. 9A

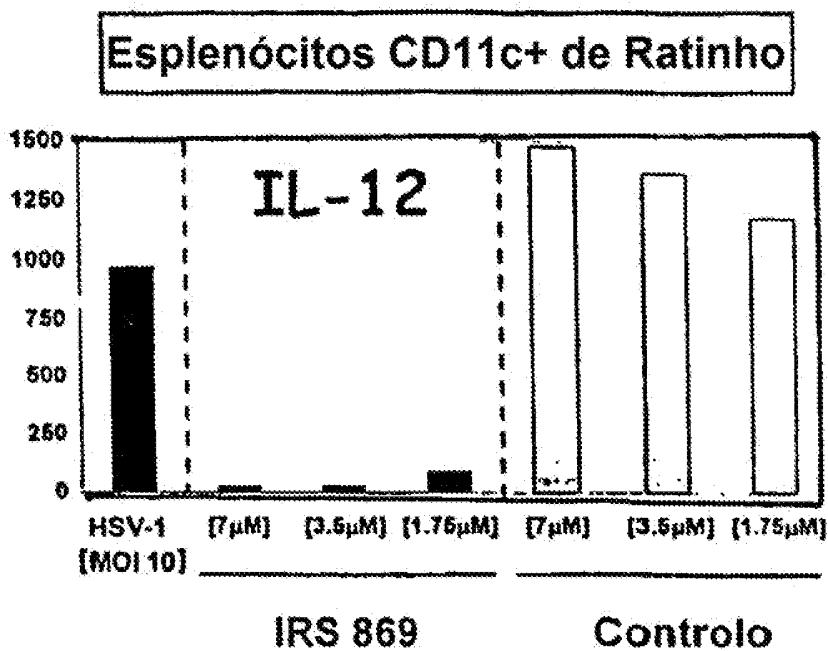


Fig. 9B

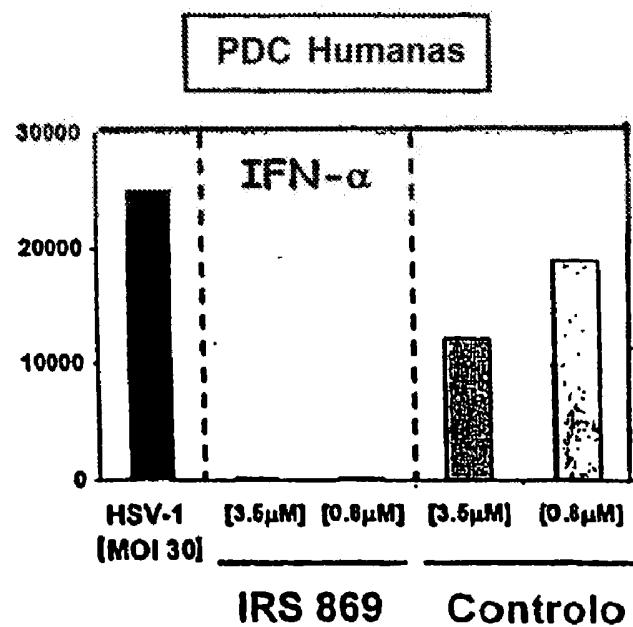


Fig. 9C

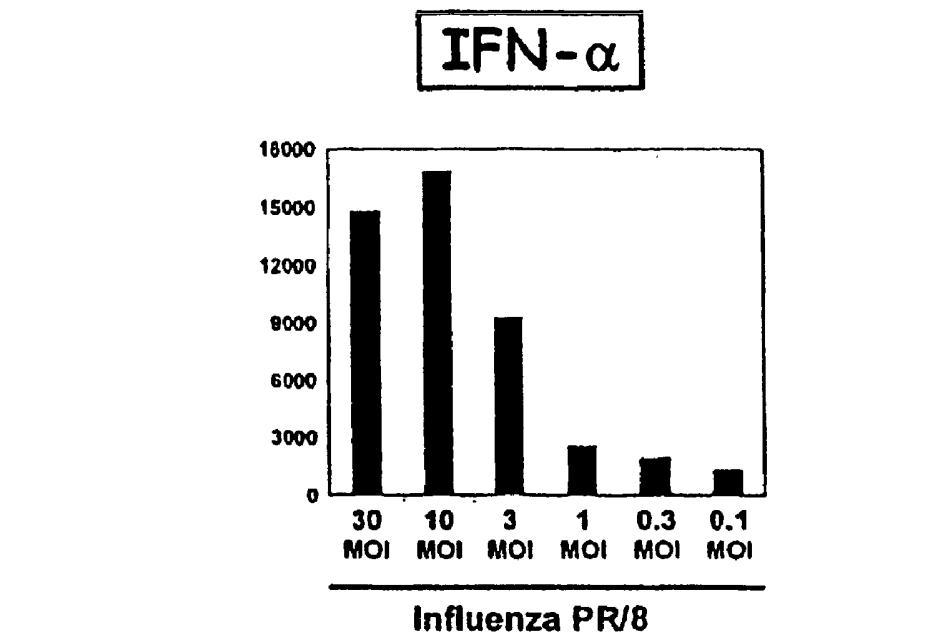


Fig. 10A

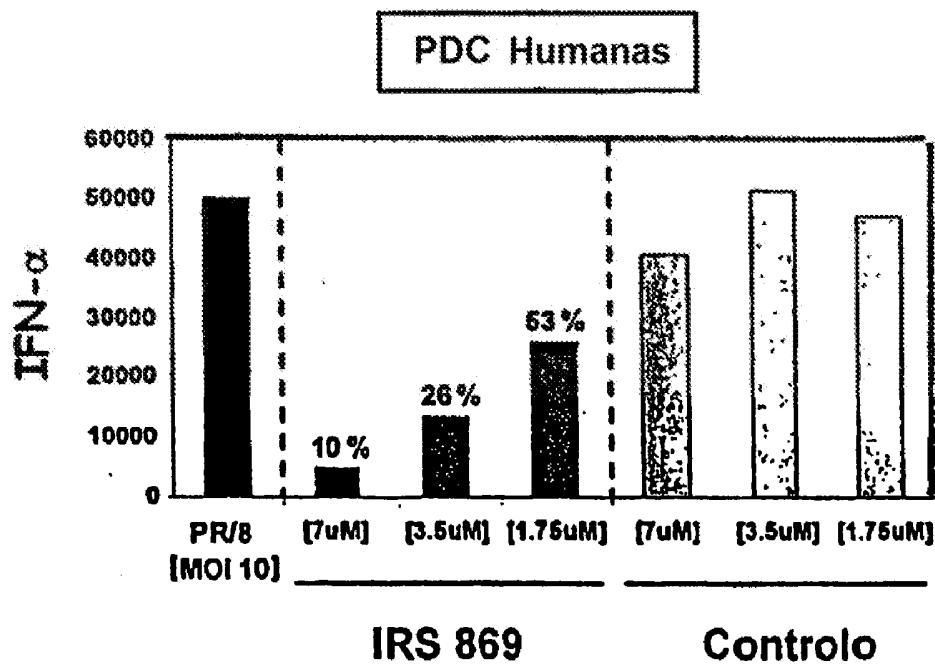


Fig. 10B

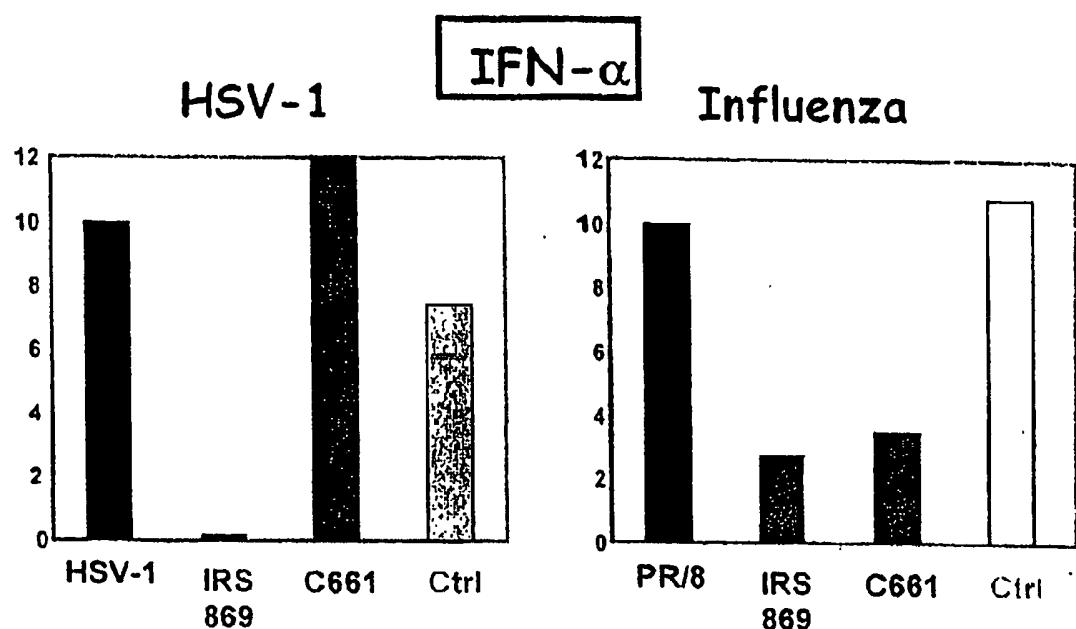


Fig. 11A

Fig. 11B

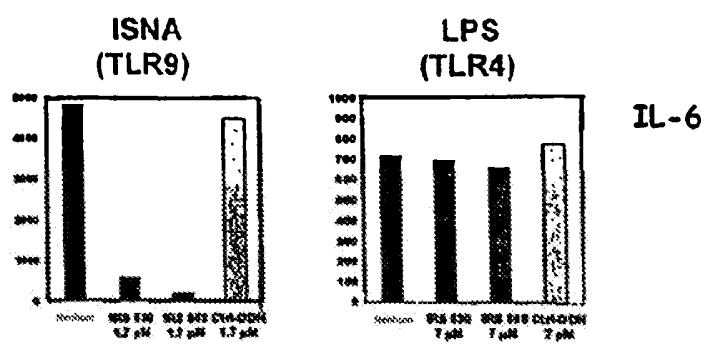


Fig. 12A

Fig. 12B

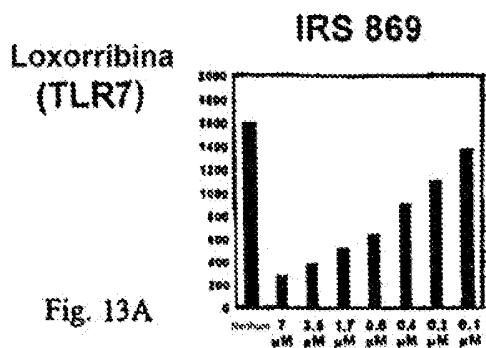
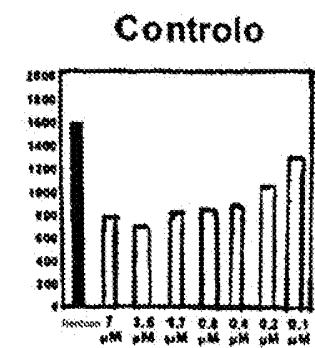


Fig. 13A



IL-6

Fig. 13B

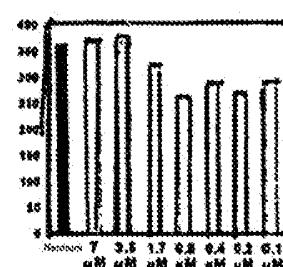
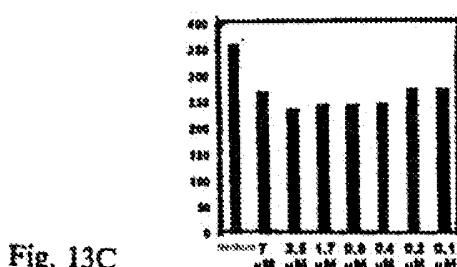


Fig. 13D

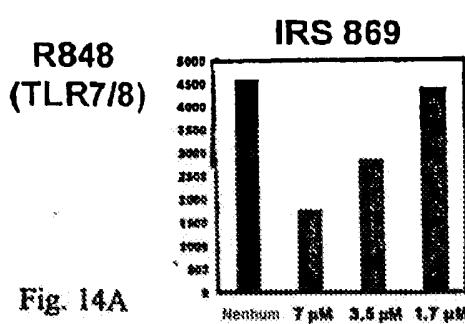
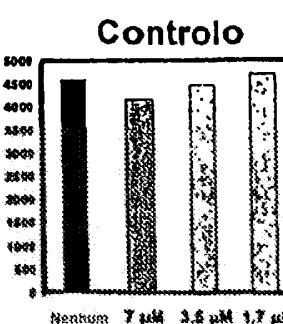


Fig. 14A



IL-6

Fig. 14B

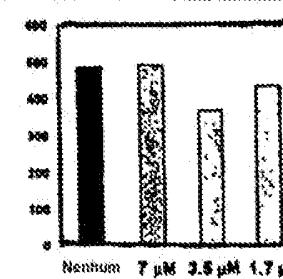
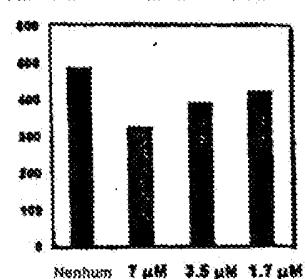


Fig. 14D

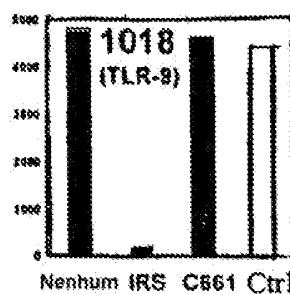
**Baço  
IL-6**

Fig. 15A

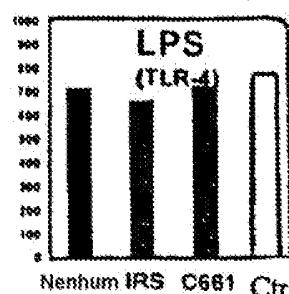


Fig. 15B

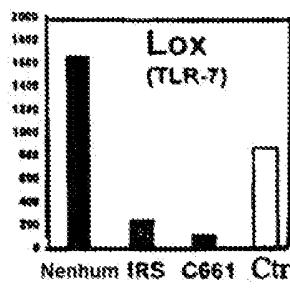


Fig. 15C

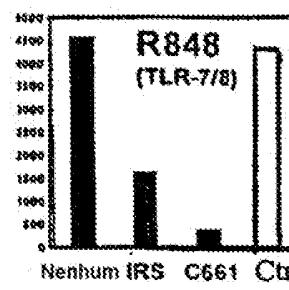
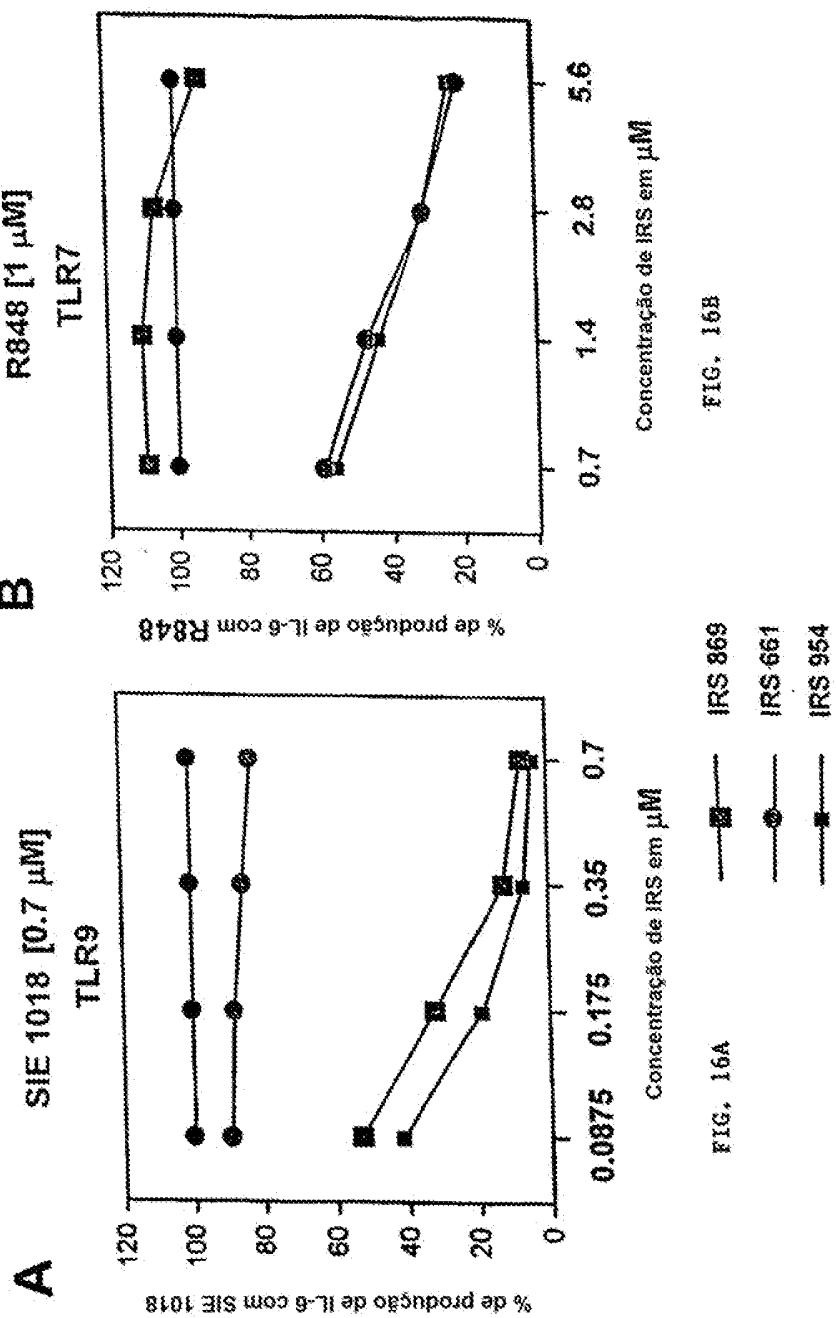


Fig. 15D

### Identificação de Novas IRS que Inibem TLR7/8 e 9



## IRS Inibe a estimulação por TLR7 *in vivo*

Citocina Sérica a 1 h

IL-12

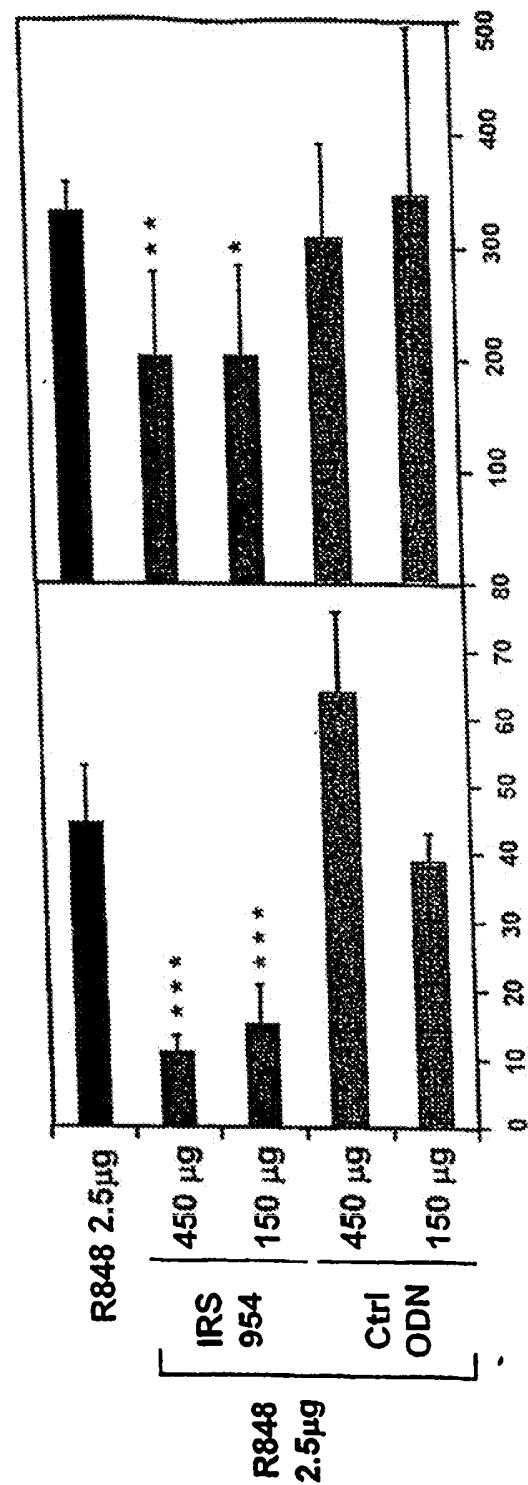


FIG. 17A .. ng/ml

FIG. 17B pg/ml

### IRS Previne a Morte por Choque Séptico Induzido por TLR-9

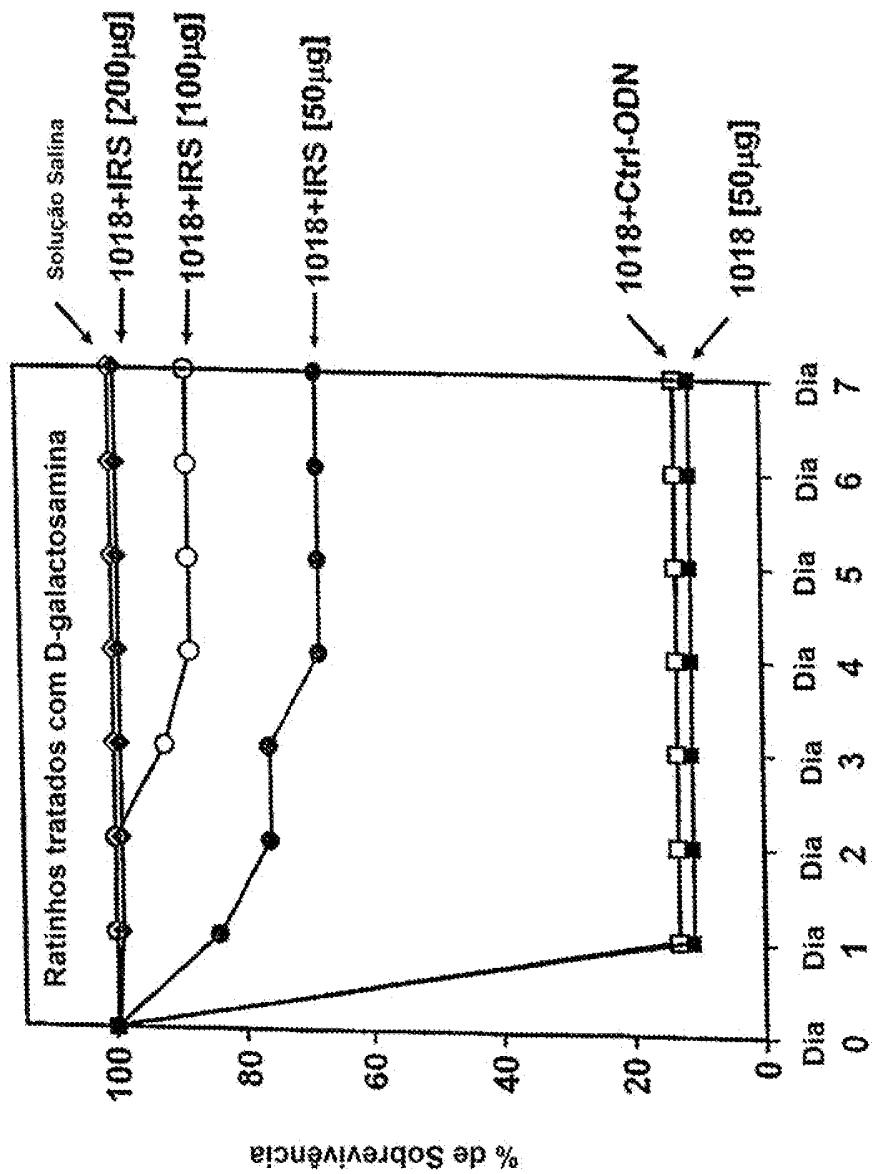


FIG. 18

Os Produtos Iniciais de Degradação (até N-4) Mantém Toda a Actividade Biológica

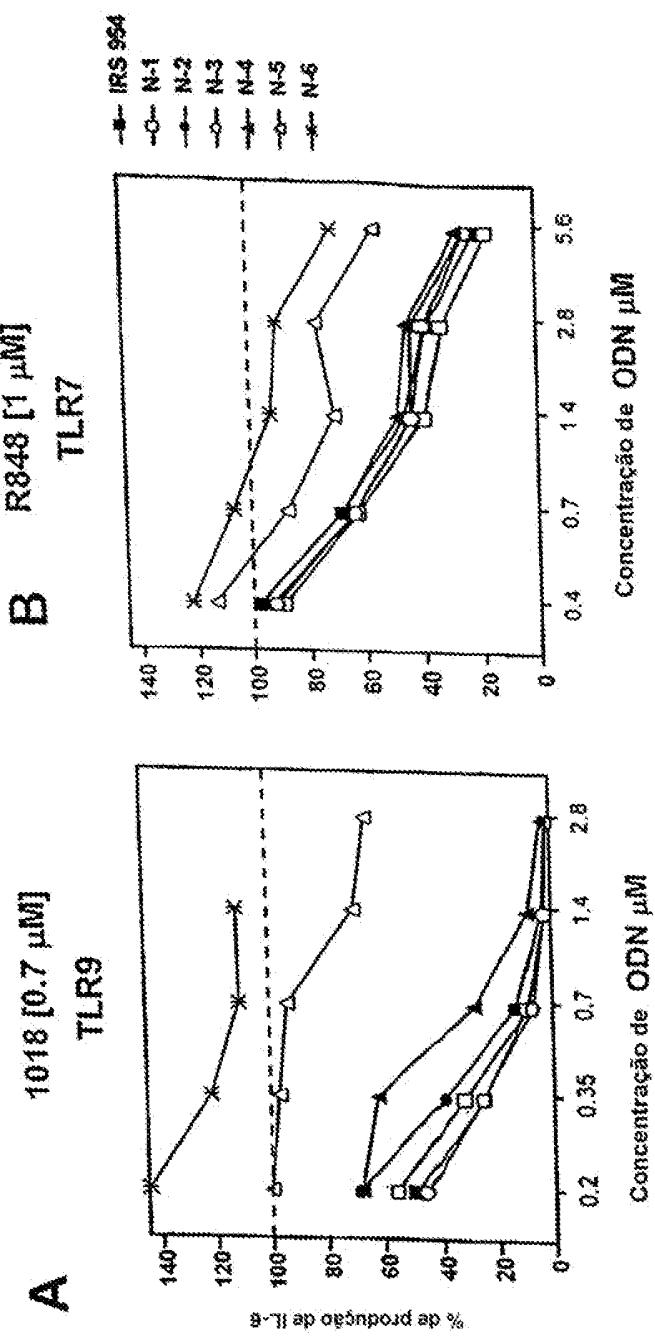


FIG. 19A

FIG. 19B

Níveis Reduzidos de Ab Anti-ADNcd em ratinhos NZBW/F1  
tratados com IRS

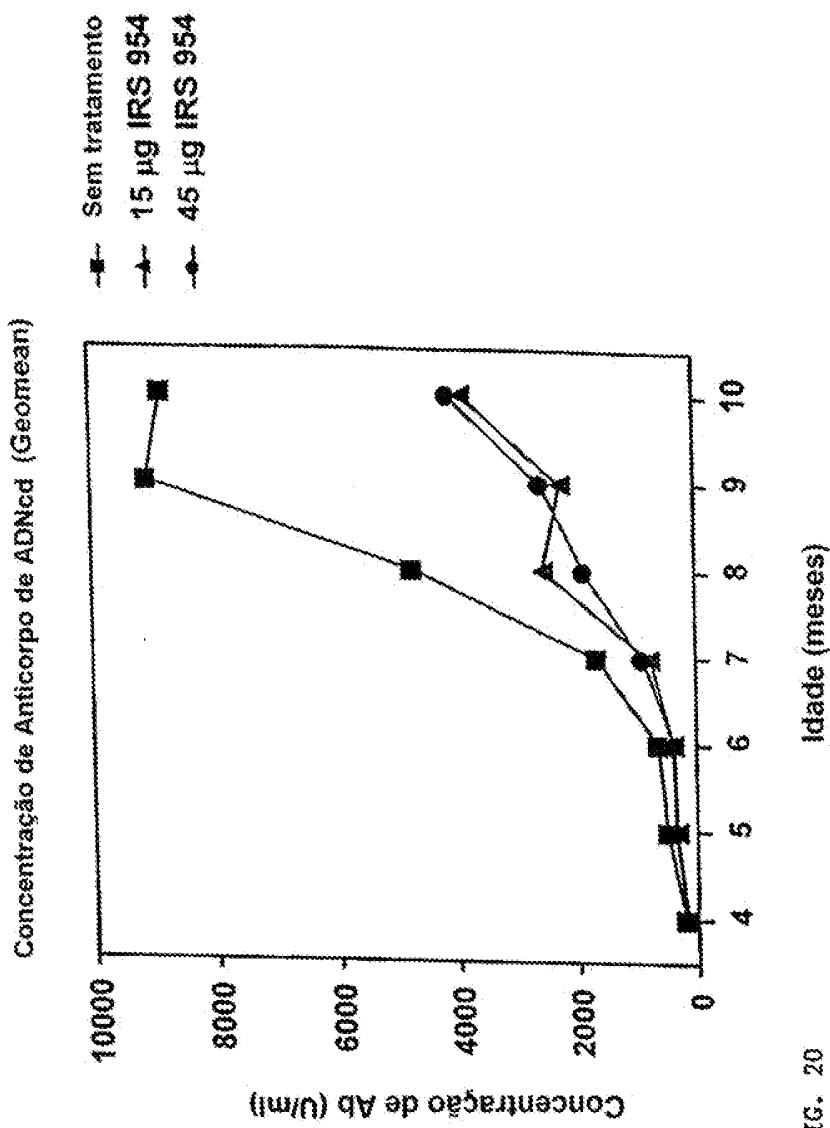


FIG. 20

Mortalidade Reduzida em ratinhos NZBWF1 tratados com IRS

Sobrevida de NZBWF1

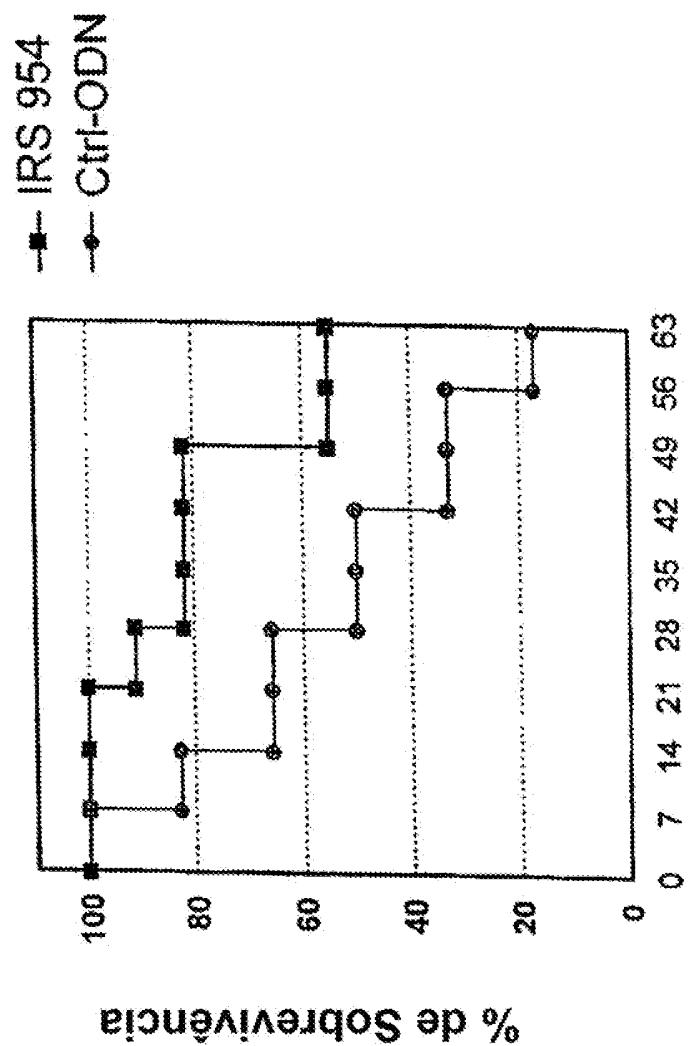
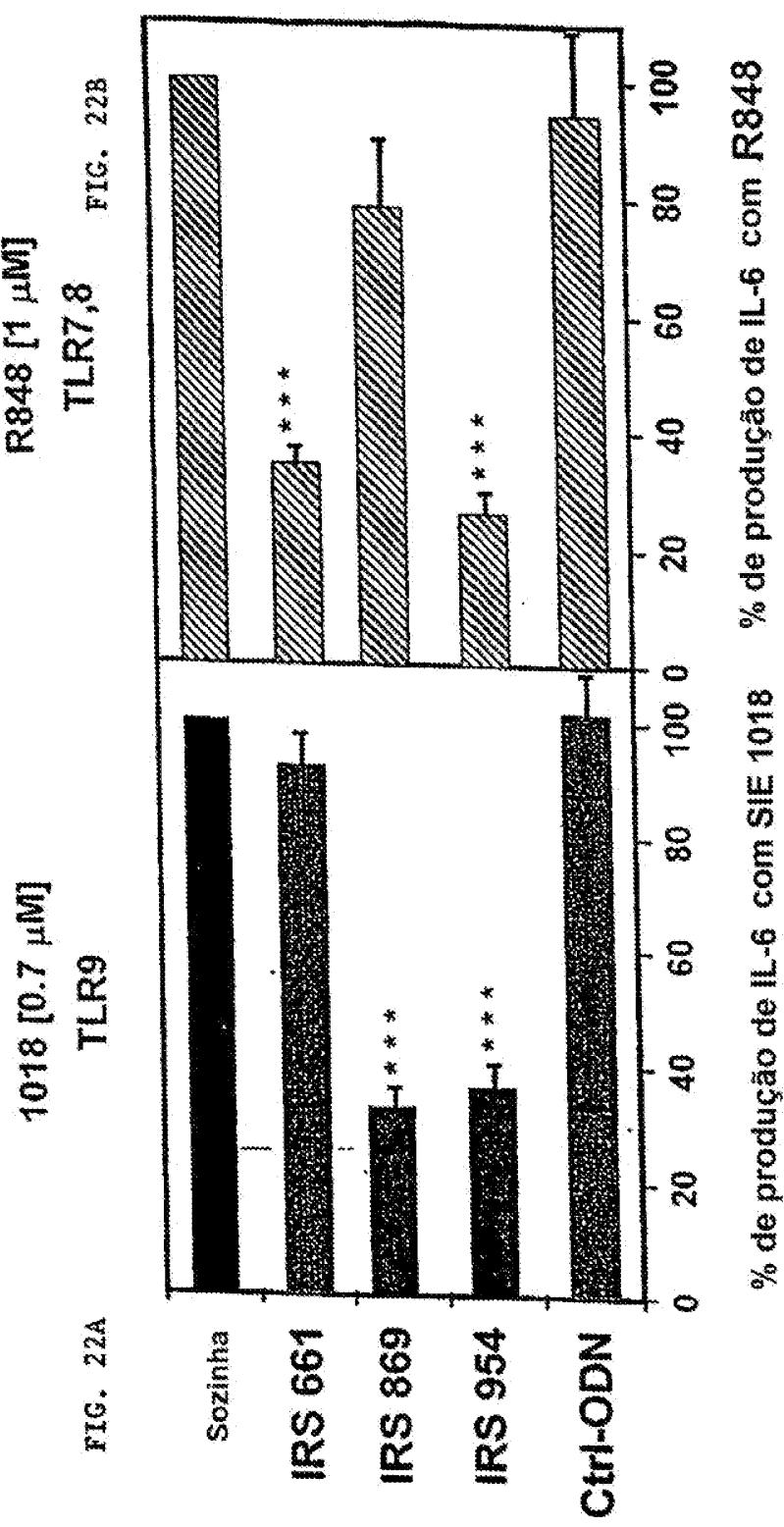


FIG. 21

Dias Após Início de Tx

## IRS Mantém a Especificidade em Células Humanas

FIG. 22A



## IRS 954 Inibe IFN- $\alpha$ Induzido por um Vírus de ADN

PDC estimuladas com Virus Herpes Simplex-1 (MOI=5)

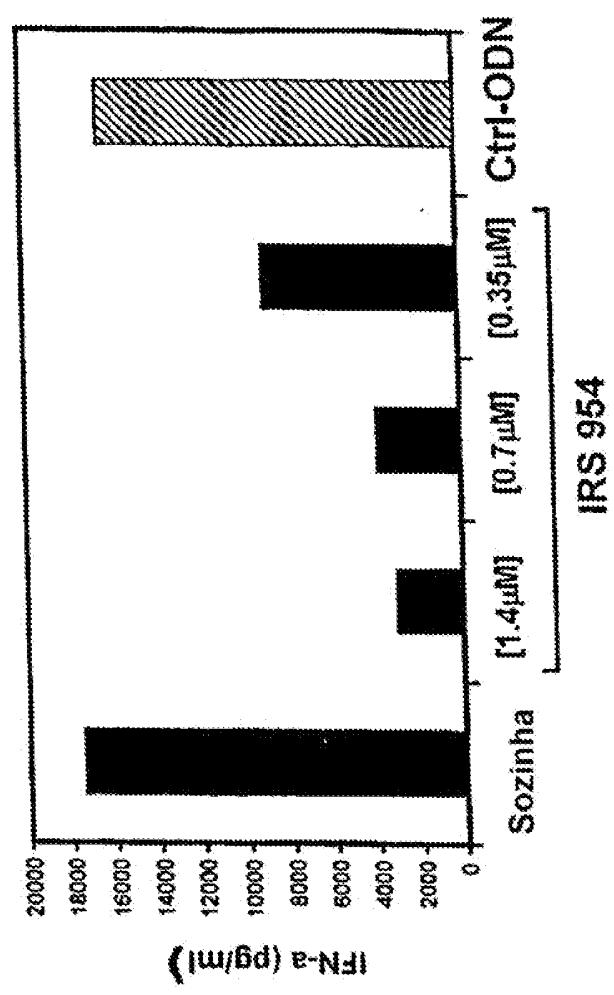


FIG. 23

## IRS 954 Inibe IFN- $\alpha$ Induzido por um Vírus de ARN

PDC estimuladas com Vírus Influenza (MOI=2)

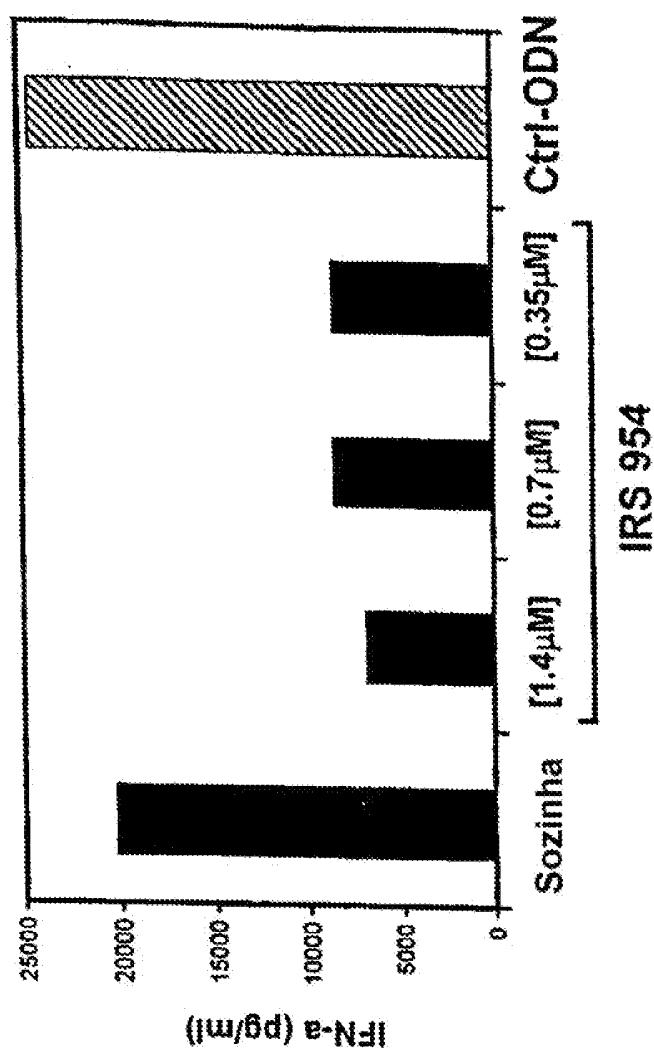


FIG. 24

**IRS 954 Inibe IFN- $\alpha$  Induzido por Cl anti-ADNcd**

PDC estimuladas com Complexos Imunitários anti-ADNcs

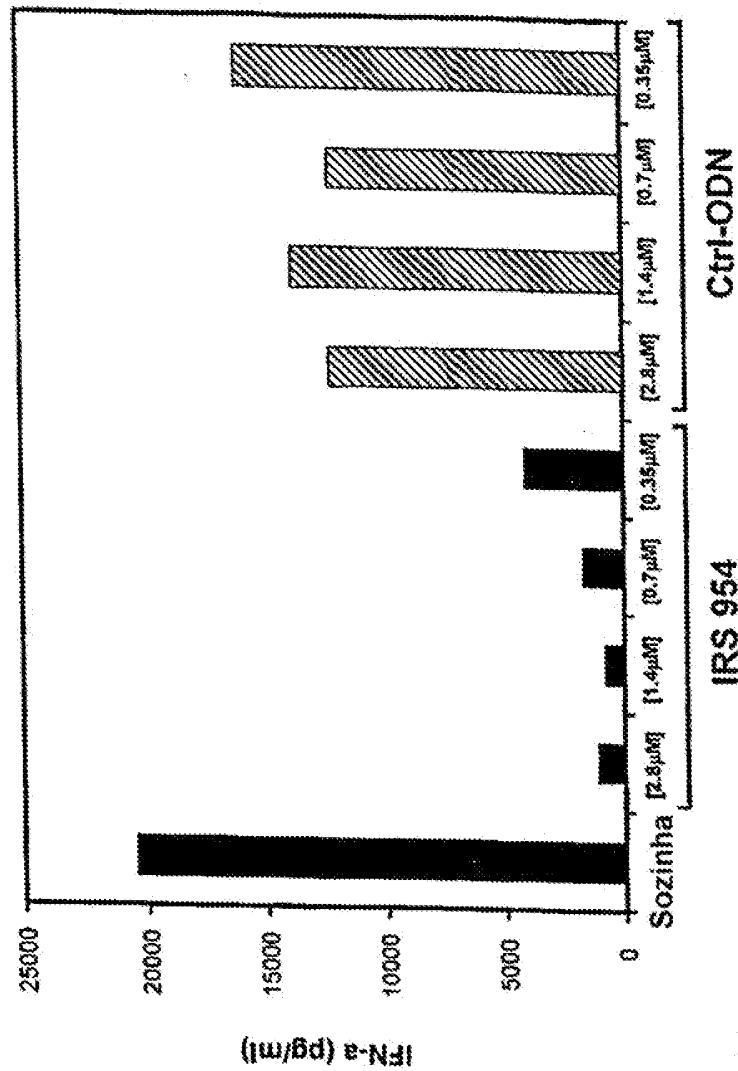


FIG. 25

## IRS 954 Inibe IFN- $\alpha$ Induzido por CI anti-RNP

PDC estimuladas com Complexos Imunitários anti-RNP

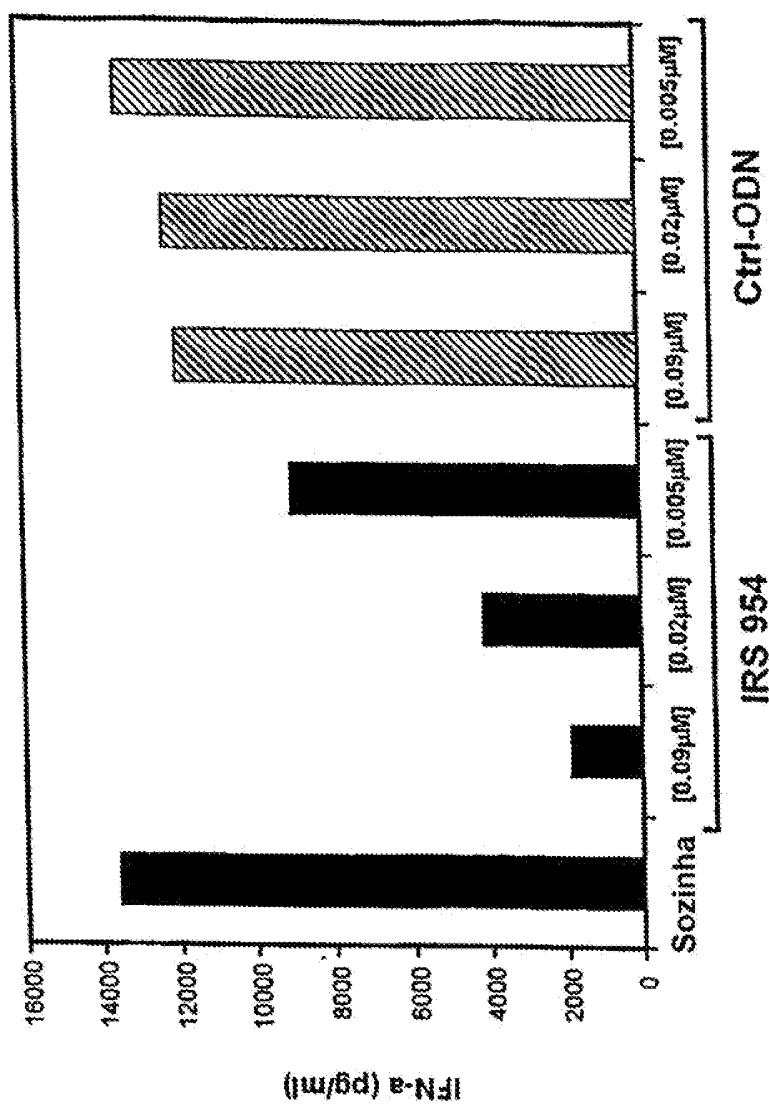


FIG. 26

## ELISA DE IL-6 (1018)

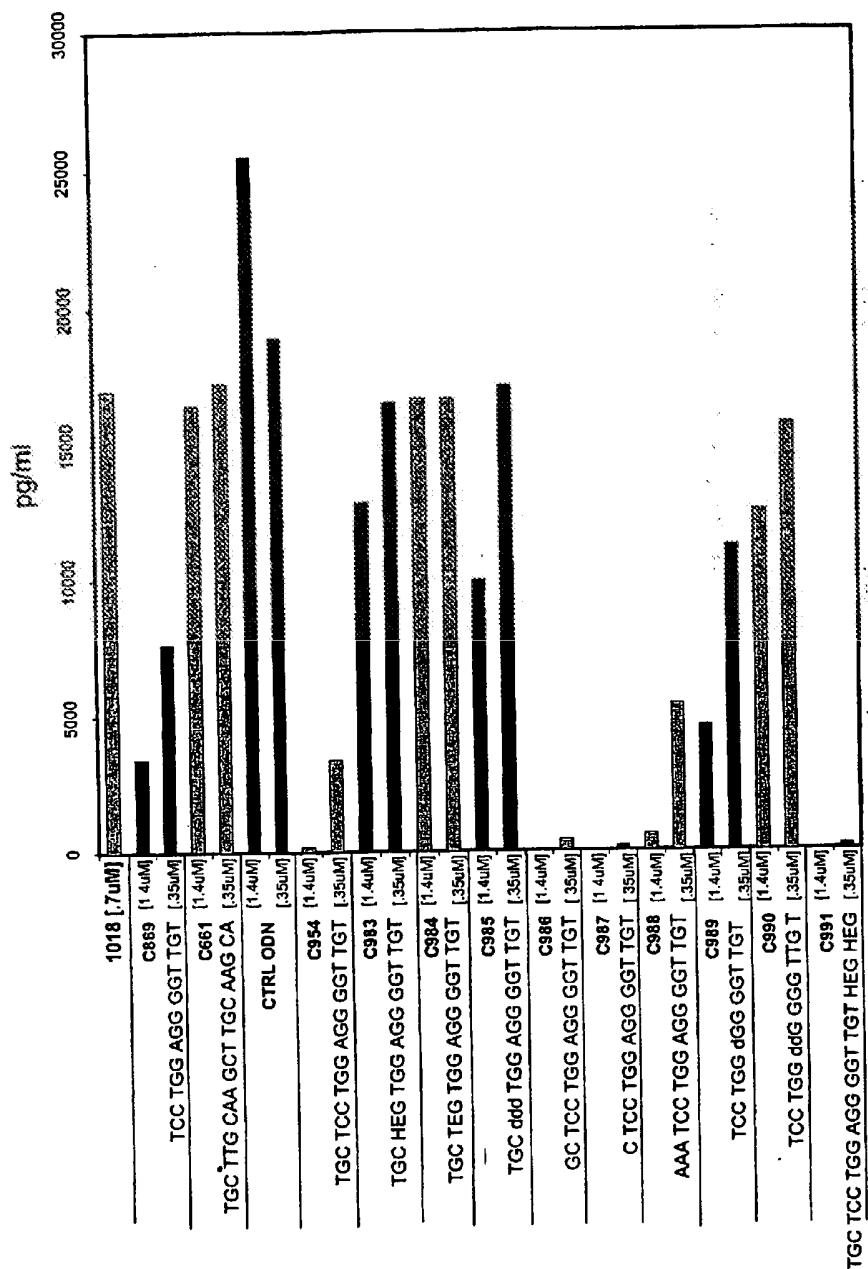


FIG. 27

## ELISA DE IL-6 (R848)

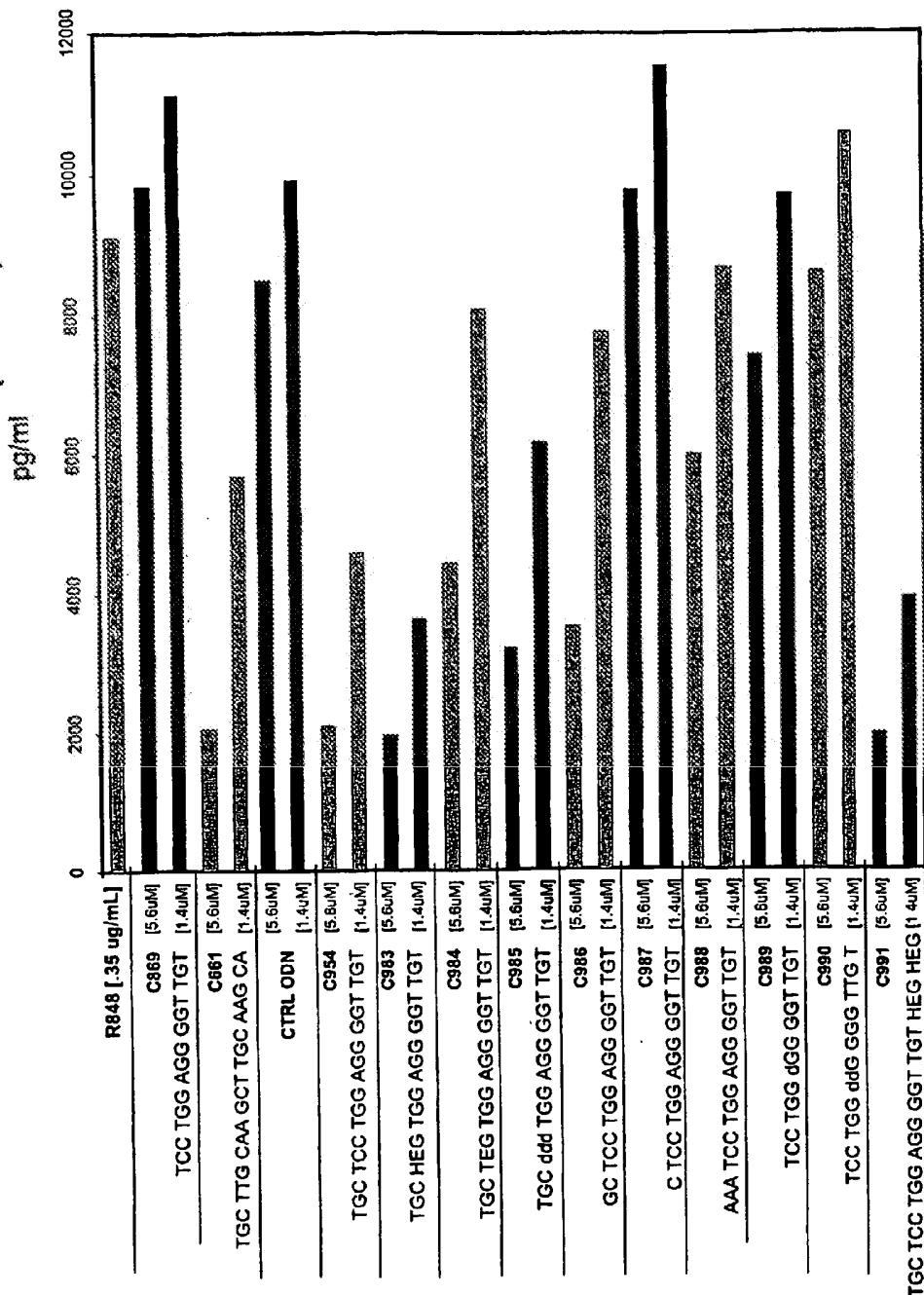


FIG. 28