

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI 0622298-6 A2**



(22) Data de Depósito: 22/11/2006
(43) Data da Publicação: 11/12/2012
(RPI 2188)

(51) *Int.Cl.:*
C12N 15/11
A61K 31/7052
A61K 9/127
A61P 31/00
A61P 35/00
A61P 37/04

(54) **Título:** OLIGORRIBONUCLEOTÍDEO PARA ESTIMULAR A PRODUÇÃO DE UMA CITOCINA PRÓ-INFLAMATÓRIA, USO DO MESMO E COMPOSIÇÃO CONTENDO TAL OLIGORRIBONUCLEOTÍDEO

(30) **Prioridade Unionista:** 25/11/2005 US 60/739,529, 03/03/2006 US 60/778,989, 03/03/2006 US 60/778,989, 25/11/2005 US 60/739,529

(73) **Titular(es):** Coley Pharmaceutical GmbH, Coley Pharmaceutical Group, Inc.

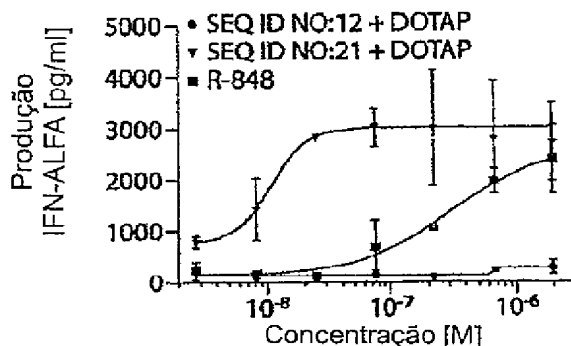
(72) **Inventor(es):** Alexandra Forsbach, Grayson B. Lipford, Jörg Vollmer

(86) **Pedido Internacional:** PCT US2006045183 de 22/11/2006

(87) **Publicação Internacional:** WO 2007/062107 de 31/05/2007

(57) **Resumo:** OLIGORRIBONUCLEOTÍDEO PARA ESTIMULAR A PRODUÇÃO DE UMA CITOCINA PRÓ-INFLAMATÓRIA, USO DO MESMO E COMPOSIÇÃO CONTENDO TAL OLIGORRIBONUCLEOTÍDEO. A invenção fornece composições imunoestimuladoras e o uso desses compostos na preparação de medicamentos para o tratamento de doenças assim como para usos in vitro. Em particular, as composições da invenção incluem oligorribonucleotídeos imunoestimuladores que incorporam um motivo de sequência imunoestimulador dependente da sequência. São fornecidas modificações específicas envolvendo ligações fosfato, análogos de nucleotídeos, adutos, e combinações dos mesmos. As composições da invenção, que opcionalmente podem incluir um antígeno, podem ser usadas isoladas ou junto com outros tratamentos para estimular ou intensificar uma resposta imune. Também são fornecidas composições e métodos úteis para tratar um indivíduo que tem uma infecção, um câncer, uma condição alérgica, asma, remodelagem das vias aéreas, ou imunodeficiência. Acredita-se que os oligorribonucleotídeos da invenção estimular o receptor 8 semelhante a um "toll" (TLR8).

Estimulação PBMC
Média de 3 doadores 16 h



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**OLIGORRIBONUCLEOTÍDEO PARA ESTIMULAR A PRODUÇÃO DE UMA CITOCINA PRÓ-INFLAMATÓRIA, USO DO MESMO E COMPOSIÇÃO CONTENDO TAL OLIGORRIBONUCLEOTÍDEO**".

5 Pedido dividido do PI 0618857-5, depositado em 22.11.2006.

Campo da Invenção

 A invenção refere-se de um modo geral ao campo da imunologia, e mais particularmente a moléculas imunoestimuladoras. Mais especificamente a invenção refere-se a moléculas de ácido ribonucléico (RNA), inclusive oligorribonucleotídeos, com atividade imunoestimuladora.

Antecedentes da Invenção

 Receptores tipo a toll (TLR) são uma família de polipeptídeos receptores de reconhecimento de padrões (PRR) altamente conservados que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e desempenham um papel crítico na imunidade inata nos mamíferos. Atualmente já foram identificados pelo menos dez membros da família, designados TLR1 - TLR10. Os domínios citoplasmáticos dos vários TLRs caracterizam-se por um domínio do receptor toll de interleucina 1 (TIR). Medzhitov R et al. (1998) *Mol. Cell* 2:253-8. O reconhecimento de invasão microbiana por TLRs desencadeia a ativação de uma cascata de sinalização que é evolutivamente conservada na *Drosophila* e nos mamíferos. Foi relatado que a proteína adaptadora contendo o domínio MyD88 se associa a TLRs e recruta a cinase associada ao receptor de interleucina 1 (IRAK) e o fator 6 associado ao receptor de fator de necrose tumoral (TNF) (TRAF6) para os TLRs. Acredita-se que a via de sinalização dependente de MyD88 leva à ativação de fatores de transcrição de NF- κ B e a proteínas cinases ativadas por mitógenos de cinase com terminal NH₂ c-Jun (Jnk) (MAPKs), etapas críticas na ativação imune e na produção de citocinas inflamatórias. Para recapitulações, vide Aderem A et al. (2000) *Nature* 406:782-87, e Akira S et al. (2004) *Nat Rev Immunol* 4:499-511.

 Inúmeros ligandos de TLR específicos já foram identificados. Ligandos para TLR2 incluem peptidoglicano e lipopeptídeos. Yoshimura A et

al. (1999) *J Immunol* 163:1-5; Yoshimura A et al. (1999) *J Immunol* 163:1-5; Aliprantis AO et al. (1999) *Science* 285:736-9. Lipopolissacarídeo (LPS) é um ligando para TLR4. Poltorak A et al. (1998) *Science* 282:2085-8; Hoshino K et al. (1999) *J Immunol* 162:3749-52. Flagelina bacteriana é um ligando para TLR5. Hayashi F et al. (2001) *Nature* 410:1099-1103. Peptidoglicano foi apresentado como sendo um ligando não só para TLR2, mas também para TLR6. Ozinsky A et al. (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* 97:13766-71; Takeuchi O et al. (2001) *Int Immunol* 13:933-40. Recentemente certos compostos sintéticos de baixo peso molecular, as imidazoquinolinas imiquimod (R-837) e resiquimod (R-848) foram apresentadas como sendo ligandos de TLR7 e TLR8. Hemmi H et al. (2002) *Nat Immunol* 3:196-200; Jurk M et al. (2002) *Nat Immunol* 3:499.

A partir da recente descoberta de que DNA bacteriano não metilado e análogos sintéticos do mesmo (CpG DNA) são ligandos para TLR9 (Hemmi H et al. (2000) *Nature* 408:740-5; Bauer S et al. (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 9237-42), foi relatado que ligandos para certos TLRs incluem certas moléculas de ácido nucléico. Recentemente, foi relatado que certos tipos de RNA são imunoestimuladores de maneira independente da seqüência ou de maneira dependente da seqüência. Além disso, foi relatado que esses vários RNAs imunoestimuladores estimulam TLR3, TLR7, ou TLR8.

Sumário da Invenção

A invenção refere-se de um modo geral a oligorribonucleotídeos imunoestimuladores (ORN) que contêm certos motivos de RNA imunoestimuladores, assim como a composições imunoestimuladoras relacionadas contendo tais ORN imunoestimuladores, e métodos para o uso de tais ORN e composições imunoestimuladores. Os ORN imunoestimuladores da invenção são úteis em qualquer situação ou aplicação que requer estimulação ou aumento de uma resposta imune. Como descrito abaixo, os ORN imunoestimuladores da invenção são de uso particular na preparação de composições farmacêuticas, incluindo adjuvantes, vacinas, e outros medicamentos, para uso no tratamento de várias condições, que incluem infecções, câncer,

alergia, e asma. A invenção em certos aspectos refere-se, portanto a composições imunoestimuladoras que incluem ORN imunoestimuladores da invenção, assim como a métodos de uso das mesmas. Também como descrito abaixo, os ORN imunoestimuladores e as composições imunoestimuladoras da invenção são de uso particular em métodos para ativar uma célula imune, vacinar um indivíduo, tratar um indivíduo que tenha uma deficiência do sistema imunológico, tratar um indivíduo que tenha uma infecção, tratar um indivíduo que tenha uma doença auto-imune, tratar um indivíduo que tenha câncer, tratar um indivíduo que tenha uma condição alérgica, tratar um indivíduo que tenha asma, remodelagem das vias aéreas, promover a disseminação de epítomos, e citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC).

Como descrito abaixo em maiores detalhes, os ORN imunoestimuladores da invenção caracterizam-se por sua inclusão de pelo menos um motivo de RNA imunoestimulador dependente da seqüência. O motivo de RNA imunoestimulador dependente da seqüência geralmente é uma seqüência de RNA curta, embora em certas modalidades o motivo também possa incluir uma modificação tal como uma ligação fosfato internucleotídeos modificada, uma nucleobase modificada, um açúcar modificado, um análogo de nucleotídeo, ou qualquer combinação dos mesmos. Como descrito abaixo em detalhes, em uma modalidade o motivo de RNA imunoestimulador ocorre no contexto de um ORN imunoestimulador mais extenso da invenção. Também o motivo de RNA imunoestimulador pode ocorrer no contexto de uma molécula de ácido nucléico de DNA:RNA quimérica.

Os motivos de RNA imunoestimuladores dependentes da seqüência e os ORN imunoestimuladores incorporando tais motivos são descritos como sendo agonistas para TLR8. Mais particularmente, pelo menos alguns dos motivos de RNA imunoestimuladores dependentes da seqüência, ORN imunoestimuladores, e moléculas de ácido nucléico de DNA:RNA quiméricas imunoestimuladoras estão descritos como sendo agonistas de TLR8, porém não agonistas de TLR7.

O motivo de RNA imunoestimulador de acordo com alguns as-

pectos da invenção é N-U-R₁-R₂.

N é um ribonucleotídeo e N não inclui um U. Em algumas modalidades, N é adenosina ou citosina (C) ou derivados das mesmas.

U é uracila ou um derivado do mesmo.

5 R é um ribonucleotídeo onde pelo menos um de R₁ e R₂ é adenosina (A) ou citosina ou derivados das mesmas. R não é U a menos que N-U-R₁-R₂ inclua pelo menos dois A.

o ORN da invenção inclui pelo menos um e em algumas modalidades mais de um (isto é, 2, 3, ou 4) motivos imunoestimuladores, N-U-R₁-
10 R₂. O ORN não inclui um motivo TLR7/8. O ORN tem de preferência 4-100 de comprimento e opcionalmente inclui pelo menos uma modificação de estrutura principal.

N-U-R₁-R₂ pode em algumas modalidades incluir pelo menos 3 As ou pelo menos 2 Cs. Opcionalmente, N-U-R₁-R₂ inclui pelo menos um G
15 ou C.

Em algumas modalidades, o ORN não é ACCCAUCUAUUAUA UAACUC (SEQ ID N°: 89).

Em outras modalidades, o motivo de ORN é separado de um ribonucleotídeo 5' por um ligante não-nucleotídico. Em ainda outras modalidades,
20 o motivo de ORN é separado de um ribonucleotídeo 3' por um ligante não-nucleotídico. Opcionalmente, o motivo de ORN é separado de um ribonucleotídeo 5' e 3' por um ligante não-nucleotídico.

O ORN pode ainda compreender um veículo farmacêuticamente aceitável que opcionalmente é um veículo lipídico tal como N-[1-(2,3-Dioleoilóxi)propil]-N,N,N-trimetilamonioetil-sulfato (DOTAP). Em outras modalidades,
25 o ORN não é complexado com DOTAP.

O ORN pode ser de filamento simples ou de filamento duplo.

Em outras modalidades, o ORN inclui pelo menos um AU. Em ainda outras modalidades o ORN inclui pelo menos um CU.

30 Em algumas modalidades, o ORN é um dos seguintes:

A*U*A*G*G*C*A*C (SEQ ID N°: 4),

G*C*C*A*C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*U*A*U*A*C*C (SEQ ID N°: 11),

A*U*A*U*A*U*A*U*A*U*A*U*A*U*A*U*A*U (SEQ ID N°: 12),
 U*U*A*U*U*A*U*U*A*U*U*A*U*U*A*U*U*A*U*U (SEQ ID N°: 13),
 A*A*U*A*A*U*A*A*U*A*A*U*A*A*U*A*A*U*A*A (SEQ ID N°: 16),
 A*A*A*U*A*A*A*U*A*A*A*U*A*A*A*U*A*A*A*U (SEQ ID N°: 17),
 5 A*A*A*A*U*A*A*A*A*U*A*A*A*A*U*A*A*A*A*U (SEQ ID N°: 18),
 C*U*A*C*U*A*C*U*A*C*U*A*C*U*A*C*U*A*C*U (SEQ ID N°: 24),
 U*U*A*U*U*A*U (SEQ ID N°: 30), U*A*U*A*U*A*U (SEQ ID N°: 33),
 C*C*G*A*G*C*C*G*C*A*U*U*A*C*C*C (SEQ ID N°: 48),
 C*C*G*A*G*C*C*G*A*U*U*G*A*A*C*C (SEQ ID N°: 76),
 10 C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*U*A*C*C*C*C (SEQ ID N°: 42),
 C*C*G*A*G*C*C*A*U*A*U*A*U*A*U*C (SEQ ID N°: 39),
 C*C*G*A*G*C*C*G*A*U*A*U*U*A*C*C (SEQ ID N°: 65),
 C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*U*C*C*C*C*C (SEQ ID N°: 44),
 C*C*G*A*G*C*C*G*C*C*U*A*C*C*C*C (SEQ ID N°: 47),
 15 C*C*G*A*G*C*C*A*U*A*U*A*U*C*C*C (SEQ ID N°: 38),
 C*C*G*A*G*C*C*G*C*U*A*U*A*C*C*C (SEQ ID N°: 37),
 C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*U*A*A*C*C*C (SEQ ID N°: 40),
 C*C*G*A*G*C*C*G*C*U*A*U*C*C*C*C (SEQ ID N°: 55),
 C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*G*G*U*A*C*C (SEQ ID N°: 82),
 20 C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*G*A*U*A*C*C (SEQ ID N°: 85),
 C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*U*G*U*A*C*C (SEQ ID N°: 63),
 C*C*G*A*G*C*C*G*C*U*A*A*C*C*C (SEQ ID N°: 43),
 C*C*G*A*G*C*C*G*C*A*U*A*U*C*C*C (SEQ ID N°: 36),
 C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*G*C*U*A*C*C (SEQ ID N°: 87),
 25 C*C*G*A*G*C*C*G*C*A*U*A*C*C*C*C (SEQ ID N°: 45),
 C*C*G*A*G*C*C*G*C*A*U*A*A*C*C*C (SEQ ID N°: 41),
 C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*G*G*U*G*C*C (SEQ ID N°: 83),
 C*C*G*A*G*C*C*G*C*A*U*C*C*C*C*C (SEQ ID N°: 46),
 C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*G*C*U*G*C*C (SEQ ID N°: 88),
 30 C*C*G*A*G*C*C*G*C*C*G*C*C*C*C*C (SEQ ID N°: 35),
 C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*G*C*U*C*C*C (SEQ ID N°: 84), ou
 C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*G*G*C*A*C*C (SEQ ID N°: 56).

O ORN exclui especificamente os motivos TLR7/8. Um motivo TLR7/8 pode incluir por exemplo, uma sequência de ribonucleotídeo selecionada de

- 5 (i) 5'-C/U-U-G/U-U-3',
(ii) 5'-R-U-R-G-Y-3',
(iii) 5'-G-U-U-G-B-3',
(iv) 5'-G-U-G-U-G/U-3', e
(v) 5'-G/C-U-A/C-G-G-C-A-C-3',

onde C/U é citosina (C) ou uracila (U), G/U é guanina (G) ou U, R é purina,
10 Y é pirimidina, B é U, G, ou C, G/C é G ou C, e A/C é adenina (A) ou C.

Em várias modalidades, 5'-C/U-U-G/U-U-3' é CUGU, CUUU, UUGU, ou UUUU.

Em várias modalidades, 5'-R-U-R-G-Y-3' é GUAGU, GUAGC, GUGGU, GUGGC, AUAGU, AUAGC, AUGGU, ou AUGGC. Em uma moda-
15 lidade a sequência de base é GUAGUGU.

Em várias modalidades, 5'-G-U-U-G-B-3' é GUUGU, GUUGG, ou GUUGC.

Em várias modalidades, 5'-G-U-G-U-G/U-3' é GUGUG ou GUGUU. Em uma modalidade a sequência de base é GUGUUUAC.

20 Em várias modalidades, 5'-G/C-U-A/C-G-G-C-A-C-3' é GUAGGCAC, GUCGGCAC, CUAGGCAC, ou CUCGGCAC.

Em um aspecto, a invenção fornece uma composição imunoestimuladora incluindo um ORN imunoestimulador da invenção e um adjuvante. Em várias modalidades o adjuvante é um adjuvante que cria um efeito de
25 depósito, um adjuvante imunoestimulador, ou um adjuvante que cria um efeito de depósito e estimula o sistema imunológico. Em uma modalidade, a composição imunoestimuladora de acordo com este aspecto da invenção é um conjugado do ORN imunoestimulador e do adjuvante. Em uma modalidade de acordo com este aspecto da invenção, o ORN imunoestimulador é
30 covalentemente ligado ao adjuvante. Em outras modalidades, eles não são conjugados. Em uma modalidade, o adjuvante é um agonista de TLR9. Em uma modalidade, o adjuvante é um ácido nucléico CpG imunoestimulador.

As composições da invenção podem opcionalmente incluir um antígeno. Portanto, em um aspecto, a invenção fornece uma vacina, onde a vacina inclui um ORN imunoestimulador da invenção e um antígeno. Em um aspecto a invenção fornece uma vacina que inclui um conjugado de um
5 ORN imunoestimulador da invenção e um antígeno. Em uma modalidade, o conjugado de acordo com este aspecto da invenção inclui o ORN imunoestimulador covalentemente ligado ao antígeno. Em outras modalidades, eles não são conjugados. Em várias modalidades, o antígeno pode ser um antígeno *per se*. O antígeno pode ser qualquer antígeno, incluindo um antígeno
10 de câncer, um antígeno microbiano ou um alérgeno.

Em um aspecto, a invenção fornece uma composição imunoestimuladora incluindo um conjugado de um ORN imunoestimulador da invenção e uma porção lipofílica. Em uma modalidade o ORN imunoestimulador é covalentemente ligado à porção lipofílica. Em uma modalidade, a porção
15 lipofílica é selecionada do grupo que consiste em colestera, palmitila, e acila graxa. Em uma modalidade, a porção lipofílica é um derivado de colesterol, por exemplo, colestera.

Em uma modalidade, o ORN imunoestimulador inclui pelo menos um desoxirribonucleotídeo. Pelo menos um desoxirribonucleotídeo geralmente pode ocorrer em qualquer lugar fora do motivo de RNA imunoestimulador. Em várias modalidades, pelo menos um desoxirribonucleotídeo é 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, ou 24 desoxirribonucleotídeos consecutivos. ORN imunoestimuladores incluindo desoxirribonucleotídeos não consecutivos também são contemplados
25 pela presente invenção. Em várias modalidades o pelo menos um desoxirribonucleotídeo é uma extremidade 5', uma extremidade 3', ou tanto uma extremidade 5' como uma extremidade 3' do ORN imunoestimulador. O pelo menos um desoxirribonucleotídeo também corresponde a uma porção de DNA de uma molécula de DNA:RNA quimérica. Em uma modalidade um
30 componente de DNA da molécula de DNA:RNA quimérica inclui um ácido nucleico CpG, isto é, um agonista de TLR9. Em uma modalidade as porções de DNA e RNA da molécula de DNA:RNA quimérica são covalentemente

ligadas através de uma ligação fosfato internucleotídeos. Em uma outra modalidade as porções de DNA e RNA da molécula de DNA:RNA quimérica são covalentemente ligadas através de um ligante, por exemplo, um ligante não-nucleotídico.

5 Em um aspecto, a invenção fornece uma composição imunoestimuladora que inclui uma molécula de ácido nucléico em forma de haltere, parcialmente de filamento único, covalentemente fechada, onde pelo menos uma porção de filamento simples da molécula inclui um motivo de RNA imunoestimulador da invenção.

10 Em um aspecto, a invenção fornece uma composição farmacêutica inclui a composição de qualquer um dos aspectos precedentes da invenção, em associação com um veículo de distribuição escolhido de um lipídio catiônico, um lipossoma, um cocleato, um virossoma, um complexo imunoestimulador (ISCOM), uma micropartícula, uma microesfera, uma nanoesfera,
15 uma vesícula unilamelar (LUV), uma vesícula multilamelar, uma emulsão de óleo em água, uma emulsão de água em óleo, uma emulsoma, e um peptídeo policatiônico, e, opcionalmente, um veículo farmaceuticamente aceitável. Em uma modalidade de acordo com este aspecto da invenção a composição farmacêutica inclui um antígeno.

20 O ORN pode ser formulado em um nebulizador ou em um inalador, tal como um inalador de dose regulada ou um inalador de pó. Em algumas modalidades, o ORN inclui ainda uma composição adicional tal como um agente quimioterapêutico, um agente antiviral ou um veículo farmaceuticamente aceitável. O veículo farmaceuticamente aceitável pode ser formulado para injeção ou para administração mucosa.
25

Ainda de acordo com estes e outros aspectos da invenção, em várias modalidades o ORN imunoestimulador pode opcionalmente incluir pelo menos uma ligação internucleotídica 5'-5', pelo menos uma ligação internucleotídica 3'-3', pelo menos uma ligação internucleotídica 5'-5' que inclui uma porção ligadora, pelo menos uma ligação internucleotídica 3'-3' que
30 inclui uma porção ligadora, ou qualquer combinação das mesmas. A porção ligadora em uma modalidade é uma porção ligadora não-nucleotídica.

Ainda de acordo com estes e outros aspectos da invenção, em várias modalidades o ORN imunoestimulador pode opcionalmente incluir pelo menos uma ligação internucleotídica 2'-2', pelo menos uma ligação internucleotídica 2'-3', pelo menos uma ligação internucleotídica 2'-5', ou qualquer combinação das mesmas. Em uma modalidade preferida pelo menos uma ligação internucleotídica 2'-2', pelo menos uma ligação internucleotídica 2'-3', ou pelo menos uma ligação internucleotídica 2'-5' ocorre fora do motivo de RNA imunoestimulador.

Também de acordo com estes e outros aspectos da invenção, o ORN imunoestimulador em uma modalidade inclui pelo menos uma unidade multiplicadora. Por conseguinte, em certas modalidades o ORN imunoestimulador da invenção pode ter uma estrutura ramificada. Composições ramificadas podem incluir ligações internucleotídicas 3'-5', 5'-5', 3'-3', 2'-2', 2'-3', ou 2'-5', em qualquer combinação. Em uma modalidade, o ORN imunoestimulador inclui pelo menos duas unidades multiplicadoras, resultando no chamado dendrímero. Além disso, em certas modalidades o ORN imunoestimulador da invenção pode incluir dois ou mais motivos de RNA imunoestimulador, dispostos por exemplo em série ao longo de um ORN linear, em braços diferentes de uma estrutura ramificada, ou ao mesmo tempo em série ao longo de um ORN linear e em braços diferentes de uma estrutura ramificada. Estruturas ramificadas, inclusive dendrímeros, podem opcionalmente incluir pelo menos um ácido nucleico CpG imunoestimulador, por exemplo, como um braço separado de uma estrutura ramificada.

Ainda de acordo com estes e outros aspectos da invenção, em uma modalidade o ORN imunoestimulador não inclui um dinucleotídeo CG DNA ou RNA.

Em um aspecto, a invenção fornece um método para infra-regular células reguladoras (Treg) CD4+ imunossupressoras. O método de acordo com este aspecto da invenção inclui a etapa de contatar uma célula Treg CD4+ com uma composição contendo um ORN imunoestimulador específico para TLR8 da invenção em uma quantidade eficaz para reduzir o efeito inibitória da célula Treg CD4+. Em uma modalidade, a composição

inclui um ORN específico para TLR8 e um ácido nucléico CpG imunoestimulador, onde o ORN específico para TLR8 e o ácido nucléico CpG imunoestimulador não são ligados. Em uma modalidade a composição inclui um ORN específico para LTR8 e um ácido nucléico CpG imunoestimulador, onde o ORN específico para TLR8 e o ácido nucléico CpG imunoestimulador estão presentes como um conjugado.

Em um outro aspecto, a invenção fornece um método para modular uma resposta imune em um indivíduo. O método de acordo com este aspecto da invenção inclui a etapa de administrar a um indivíduo uma quantidade eficaz de uma composição da invenção. Em algumas modalidades o ORN pode ser distribuído para o indivíduo para tratar uma doença auto-imune ou remodelagem das vias aéreas no indivíduo. O ORN pode ser administrado com ou sem antígeno ao indivíduo. Opcionalmente o ORN é distribuído por uma via tal como oral, nasal, sublingual, intravenosa, subcutânea, mucosa, respiratória, injeção direta, e dérmica. O ORN pode ser distribuído para o indivíduo em uma quantidade eficaz para induzir a expressão de citocinas, tais como $TNF\alpha$, IL-10, IL-6, IFN- γ , MCP1, e IL-12.

Em um aspecto a invenção fornece um método para vacinar um indivíduo. O método de acordo com este aspecto da invenção inclui a etapa de administrar ao indivíduo um antígeno e um ORN imunoestimulador da invenção.

Em um aspecto a invenção fornece um método para tratar um indivíduo que tenha ou corra o risco de ter uma doença infecciosa. O método de acordo com este aspecto da invenção inclui a etapa de administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de uma composição da invenção. Em uma modalidade, o método inclui a etapa de administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um ORN imunoestimulador da invenção. Em uma modalidade, o indivíduo tem uma infecção viral. A infecção viral pode ser, por exemplo, hepatite B ou hepatite C. Um agente antiviral também pode ser administrado ao indivíduo. Opcionalmente, o agente antiviral é ligado ao ORN.

Em um aspecto, a invenção fornece um método para tratar um indivíduo que tenha ou corra o risco de ter um câncer. O método de acordo

com este aspecto da invenção inclui a etapa de administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de uma composição da invenção. Em uma modalidade, o método inclui a etapa de administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um ORN imunoestimulador da invenção. Em uma modalidade, um
5 quimioterápico ou radiação também é administrada ao indivíduo.

Em um aspecto, a invenção fornece um método para tratar um indivíduo que tenha ou corra o risco de ter um câncer. O método de acordo com este aspecto da invenção inclui a etapa de administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de uma composição contendo um ORN imunoesti-
10 mulador específico para TLR8 da invenção para reduzir o efeito inibitório de Células Treg CD4+. Em uma modalidade, a composição inclui um ORN específico para TLR8 e um ácido nucléico CpG imunoestimulador, onde o ORN específico para TLR8 e o ácido nucléico CpG imunoestimulador não são ligados. Em uma modalidade, a composição inclui um ORN específico
15 para TLR8 e um ácido nucléico CpG imunoestimulador, onde o ORN específico para TLR8 e o ácido nucléico CpG imunoestimulador estão presentes como um conjugado.

Em um aspecto a invenção fornece um método para tratar um indivíduo que tenha ou corra o risco de ter uma condição alérgica. O método
20 de acordo com este aspecto da invenção inclui a etapa de administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de uma composição da invenção. Em uma modalidade, o método inclui a etapa de administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um ORN imunoestimulador da invenção. Em uma modalidade, o indivíduo tem rinite alérgica.

25 Em um aspecto, a invenção fornece um método para tratar um indivíduo que tenha ou corra o risco de ter asma. O método de acordo com este aspecto da invenção inclui a etapa de administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de uma composição da invenção. Em uma modalidade, o método inclui a etapa de administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de
30 um ORN imunoestimulador da invenção. Em uma modalidade, a asma é asma exacerbada por uma infecção viral. O ORN pode ser administrado com ou sem alérgeno.

Em um outro aspecto, a invenção fornece um método para tratar um indivíduo que tenha remodelagem das vias aéreas. O método de acordo com este aspecto da invenção inclui a etapa de administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um ORN imunoestimulador da invenção.

5 Em um aspecto, a invenção fornece um método para aumentar a citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC). O método de acordo com este aspecto da invenção inclui a etapa de administrar a um indivíduo com necessidade de ADCC aumentada uma quantidade eficaz de um ORN imunoestimulador da invenção e um anticorpo para aumentar a ADCC.

10 Em uma modalidade, o anticorpo é um anticorpo específico para um antígeno de câncer ou outro antígeno expresso por uma célula cancerosa. Em uma modalidade, o anticorpo é um anticorpo IgG.

 A invenção em um aspecto fornece um método para melhorar a disseminação de epítomos. O método de acordo com este aspecto da invenção inclui as etapas sequenciais de contatar uma célula do sistema imunológico com um antígeno e subsequente contatar a célula com pelo menos duas doses de um ORN imunoestimulador da invenção. Em uma modalidade, o método é realizado in vivo. O método em uma modalidade, inclui as etapas de administrar a um indivíduo uma vacina que inclui um antígeno e um adjuvante e subsequente administrar ao indivíduo pelo menos duas doses de um ORN imunoestimulador da invenção, em uma quantidade eficaz para induzir múltiplas respostas imunes específicas para epítomo. O método em uma modalidade, envolve aplicar um protocolo terapêutico que resulta na exposição do sistema imunológico a um antígeno em um indivíduo, seguido da administração de pelo menos duas doses de um ORN imunoestimulador da invenção, em uma quantidade eficaz para induzir múltiplas respostas imunes específicas para epítomo. Em várias modalidades o protocolo terapêutico é cirurgia, radiação, quimioterapia, outros medicamentos para câncer, uma vacina, ou uma vacina contra câncer. Em uma modalidade, as pelo menos duas doses do ORN imunoestimulador são administradas em um intervalo de pelo menos um dia a uma semana uma da outra. Em uma modalidade, as pelo menos duas doses do ORN imunoesti-

15
20
25
30

mulador são administradas em um intervalo de pelo menos uma semana a um mês uma da outra. Em uma modalidade, as pelo menos duas doses do ORN imunoestimulador são administradas em um intervalo de pelo menos um mês a seis meses uma da outra.

- 5 Em um aspecto, a invenção constitui um método para estimular a produção de uma citocina pró-inflamatória, pelo contato de uma célula expressando TLR8 com um RNA oligonucleotídeo (ORN) compreendendo: N-U-R₁-R₂, onde N é um ribonucleotídeo e N não inclui um U, U é uracila ou um derivado do mesmo, e R é um ribonucleotídeo onde pelo menos um de
- 10 R₁ e R₂ é adenosina (A) ou citosina ou derivados das mesmas e onde R não é U a menos que N-U-R₁-R₂ inclua pelo menos dois A, onde o ORN não inclui um motivo TLR7/8 e onde o ORN tem 4-100 de comprimento, em uma quantidade eficaz para estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias e onde a produção de IFN- α em resposta ao ORN não é induzida de forma
- 15 significativa em relação ao valor de referência. Em algumas modalidades, a produção de IFN- α em resposta ao ORN é menor que 300 pg/ml. Em uma modalidade, o ORN não é ACCCAUCUAUUAUAUAACUC (SEQ ID N°: 89). O ORN pode ser complexado ou não com N-[1-(2,3-Dioleoilóxi)propil]-N,N,N-trimetilamonioetil-sulfato (DOTAP).
- 20 Em algumas modalidades a célula expressando TLR8 é um monócito ou um mDC. Em ainda outras modalidades, a célula expressando TLR8 é *in vitro* ou *in vivo*.

Estes e outros aspectos da invenção serão descritos em maiores detalhes junto com a descrição detalhada da invenção.

25 Breve Descrição dos Desenhos

- A figura 1 é um conjunto de gráficos representando a produção de citocinas induzida por ORN mediante estimulação de PBMC. Medindo-se a produção de citocinas IFN-alfa e TNF-alfa foram observadas diferenças entre os motivos TLR8 e TLR7/8. PBMC humanos foram estimulados com o
- 30 ORN indicado (2 μ M com diluição de 1/3) complexado com DOTAP (25 μ g/ml diluição de 1/3) ou com R-848 (2 μ M com diluição de 1/3) em uma curva de titulação completa. Depois de 16 horas os sobrenadantes foram colhidos

e IFN-alfa (Figura 1a) e TNF-alfa (Figura 1b) foram medidos por ELISA. Os dados mostram a média de três doadores de sangue de pelo menos três experiências independentes. DOTAP isolado não apresentou efeito. Os ORN são complexados com DOTAP, o R-848 não é complexado. DOTAP isolado é um controle. Na figura 1c, PBMC humanos foram estimulados com 0,2 μ M do ORN indicado complexo com DOTAP (2,2 μ g/ml) ou com R-848 (2 μ M). Depois de 16 horas os sobrenadantes foram colhidos e IFN-alfa (painel esquerdo) e TNF-alfa (painel direito) foram medidos por ELISA. Os dados mostram a média ($\pm$ SEM) de 3 doadores.

A figura 2 é um conjunto de gráficos de barras representando a produção de citocinas induzida por ORN mediante estimulação de pDC isolado (Figura 2a), monócitos (Figura 2b) e mDC (Figura 2c). As células foram estimuladas com 0,5 μ M de ORN complexado com 10 μ g/ml de DOTAP, 0,5 μ M de CpG ODN ou DOTAP ou meio isolado e o IFN-alfa (Figura 2a), TNF-alfa (Figura 2c) e IL-12p40 (Figura 2c) foram medidos.

A figura 3 é um conjunto de gráficos de barras representando a produção de citocinas induzida por ORN mediante estimulação de PBMC. PBMC humanos foram estimulados com o ORN indicado (0,5 μ M de ORN) complexado com 10 μ g/ml de DOTAP e o IFN-alfa (Figura 3A) e TNF-alfa (Figura 3B) foram medidos e a produção de citocinas foi medida pela técnica de ELISA e pela técnica de Luminex comparadas.

A figura 4 é um gráfico de barras demonstrando uma comparação das atividades máxima de IFN-alfa (Figura 4a) e TNF-alfa (Figura 4b) do ORN indicado. PBMC humanos foram estimulados com ORN (7 concentrações, partindo de 2 μ M com diluição de 1/3) complexado com DOTAP (partindo de 25 μ g/ml com diluições de 1/3) e as atividades máximas médias a 0,6 μ M de 3 - 6 doadores de sangue em duas experiências individuais foram avaliadas.

A figura 5 é um gráfico de barras demonstrando uma comparação de atividade máxima de IFN-alfa (Figura 5a) com IFN-alfa EC50 (Figura 5b). PBMC humanos foram estimulados com ORN complexado com DOTAP e o IFN-alfa foi medido.

A figura 6 é um conjunto de gráficos comparando curvas de titulação para ORN com TLR8 (SEQ ID N°: 13) ou TLR7/8 (SEQ ID N°: 21) com PBMC, pDC isolado ou monócitos isolados de 3 doadores de sangue. As células foram estimuladas com ORN (4 concentrações, partindo de 1 μ M com diluição de 1/4) complexado com DOTAP (partindo de 25 μ g/ml com diluições de 1/4). Depois de 16 horas, os sobrenadantes foram colhidos e a produção de citocinas foi medida por tecnologias Luminex. Os gráficos mostram a percentagem de produção de citocinas de SEQ ID N°: 21 (a 0,3 μ M).

As figuras 7-1 a 7-4 mostram um conjunto de gráficos de barras demonstrando as atividades máximas médias em qualquer concentração de 3 doadores de sangue para PBMC, monócitos isolados e pDC isolado e CD14-CD123- PBMC. As células foram estimuladas com ORN (4 concentrações, partindo de 1 μ M com diluição de 1/4) complexado com DOTAP (partindo de 25 μ g/ml com diluições de 1/4). Depois de 16 horas os sobrenadantes foram colhidos e a produção de citocinas foi medida pela tecnologia Luminex. Quadrados vermelhos indicaram reações positivas em relação ao valor de referência de DOTAP e do meio.

A figura 8 é um conjunto de gráficos de barras mostrando as diferenças entre TLR8 (SEQ ID N°: 13) e TLR7/8 (SEQ ID N°: 21) ORN. As células foram estimuladas com ORN (4 concentrações, partindo de 1 μ M com diluição de 1/4) complexado com DOTAP (partindo de 25 μ g/ml com diluições de 1/4). Depois de 16 horas, os sobrenadantes foram colhidos e a produção de citocinas foi medida pela tecnologia Luminex. O gráfico mostrou a produção máxima média medida de citocinas em qualquer concentração ("measured mean max at any concentration cytokine production") como a percentagem do TLR8 ORN (SEQ ID N°: 13) para o TLR7/8 ORN (SEQ ID N°: 21). Isto está mostrado para pDC isolado, PBMC, monócitos isolados e CD123-CD14- PBMC.

A figura 9 é um conjunto de gráficos de barras e curvas que mostra a reação de TLR8 ORN (SEQ ID N°: 13) e TLR7/8 ORN (SEQ ID N°: 21) agindo via TLR8 em células HEK-293 transfectadas estáveis. Células K-293 transfectadas estáveis com repórter de leitura de NF κ B-luciferase e

TLR8 humano foram estimuladas por 16 horas com o ORN indicado. Depois de 16 horas os sobrenadantes foram removidos, as células lisadas e a atividade de luciferase ou o nível de citocina foram medidos. As figuras 9a e 9b mostram a indução de dobras de luciferase NF κ B-luciferase depois de estímulo. A figura 9c mostra a indução de dobras de luciferase NF κ B-luciferase depois de estímulo na presença de inibidores. A figura 9d mostra a estimulação de IP-10 depois de estímulo medida pelo ensaio de luciferase.

A figura 10 é uma série de gráficos mostrando a expressão de marcador de superfície mediante estimulação de pDC humano com ORN rico em AU ou rico em GU. pDC purificado com CD123+ (Figuras 10a e 10b) ou monócitos isolados (Figura 10c) foram incubados com 1 μ M de ORN complexado com 25 μ g/ml de DOTAP ou DOTAP isolado (Figura 10a) ou com as quantidades indicadas de ORN complexado com DOTAP ou DOTAP isolado (Figuras 10b-10c). Depois de 16 horas as células foram colhidas e coloridas com os anticorpos CD123, CD11c e HLA-DR (Figuras 10a e 10b) ou CD14 e CD19 (Figura 10c). A ativação do marcador de superfície celular foi medida pela expressão de CD86 (Figuras 10a e 10b) ou CD80 (Figura 10c). A figura 10a mostra a análise por FACS demonstrando que o ORN rico em AU (SEQ ID N°: 13) e o ORN rico em GU (SEQ ID N°: 21) apresentam diferenças na expressão de marcador de superfície de CD86. A figura 10b é um gráfico ilustrando que a expressão de marcador de superfície de CD86 mediante estimulação de pDC humano é dependente da dose. A figura 10c é um gráfico mostrando que ORN rico em AU (SEQ ID N°: 13) e ORN rico em GU (SEQ ID N°: 21) não apresentam diferenças na expressão de marcador de superfície de CD80 mediante estimulação com PBMC humano (dados não mostrados) e com células positivas para CD14.

A figura 11 é um conjunto de gráficos de barras mostrando diferenças entre TLR8 ORN (SEQ ID N°: 13) e TLR7/8 ORN (SEQ ID N°: 21). SEQ ID N°: 5 ORN foi usado como controle. PBMC bovinos foram incubados com 10 μ g/ml de ORN (HD) ou 2,5 μ g/ml de ORN (LD) por 48 horas. Os sobrenadantes foram colhidos e analisados por ELISA. As figuras 11a-c mostram o nível de IL-12, IFN- γ , e TNF-alfa, respectivamente.

A figura 12 é uma série de gráficos demonstrando que células murinas não respondem ao ORN rico em AU SEQ ID N°: 13 *in vivo* ou *in vitro*. As células usadas foram células Raw264.7 da linhagem celular macrófago de camundongo (Figura 12a), células J774 (Figura 12b), células CD11c+ purificadas de camundongo (camundongos sv129) (figuras 12c-12g) e células de camundongo *in vivo*. A concentração de citocinas foi avaliada por ELISA.

A figura 13 é um gráfico demonstrando que esplenócitos de rato não respondem ao ORN rico em AU SEQ ID N°: 13. Esplenócitos de 3 ratos Sprague-Dawley foram reunidos e estimulados com as concentrações indicadas de SEQ ID N°: 21, SEQ ID N°: 13 (ambos complexados com 62,5 µg/ml de DOTAP com diluição de 1/5), R-848 ou DOTAP isolado (62,5 µg/ml -> diluição de 1/5). Os sobrenadantes foram colhidos depois de 20 horas e os níveis de TNF-alfa foram medidos por ELISA.

15 Descrição Detalhada da Invenção

A invenção refere-se em parte à descoberta pelos inventores de inúmeros motivos de RNA imunoestimuladores específicos para seqüência. Foi agora descoberto que moléculas contendo um motivo de RNA imunoestimulador são, isoladas ou em combinação com certos outros componentes, compostos imunoestimuladores importantes que encontram utilidade em inúmeros métodos para tratar indivíduos que têm ou correm o risco de ter uma condição na qual seria vantajoso induzir, aumentar ou redirecionar uma resposta imune. Conforme usado neste relatório, em uma modalidade, uma composição imunoestimuladora da invenção é um ORN imunoestimulador da invenção.

Foi descoberto que certos de RNA específicos para seqüência são imunoestimuladores, agindo através do TLR8, ao contrário de outros motivos (ricos em GU e ricos em CU) que agem sobre TLR 7 e TLR8. RNA oligonucleotídeos (ORN), de preferência contendo seqüências ricas em AU, estimulam uma resposta imune através de TLR8. Diferenças entre a produção de IFN-alfa, TNF-alfa, IFN-gama e IL-12 foram observadas nestas classes distintas de ORN, por exemplo, ORN contendo repetições de AU e de

GU. O interessante é que foi descoberto que o ORN imunoestimulador da invenção produz uma forte resposta a citocinas pró-inflamatórias, com exceção das moléculas relacionadas ao IFN-alfa e ao IFN-alfa. A produção de IFN-alfa é diminuída ou não existe mediante estimulação com estes novos
5 ORN.

O motivo de RNA imunoestimulador de acordo com alguns aspectos da invenção é N-U-R₁-R₂.

N é um ribonucleotídeo e N não inclui um U. Em algumas modalidades N é adenosina ou citosina (C) ou derivados das mesmas.

10 U é uracila ou um derivado do mesmo.

R é um ribonucleotídeo onde pelo menos um de R₁ e R₂ é adenosina (A) ou citosina ou derivados das mesmas. R não é U a menos que N-U-R₁-R₂ inclua pelo menos dois A.

O ORN da invenção inclui pelo menos um e em algumas modalidades mais de um (isto é, 2, 3, ou 4) motivos imunoestimuladores, N-U-R₁-R₂. O ORN não inclui um motivo TLR7/8.
15

O ORN é um oligonucleotídeo. Opcionalmente, o oligonucleotídeo tem 4-100 de comprimento. O ORN também pode ter, por exemplo, 8-40, 15-25 ou 20-30 nucleotídeos de comprimento. Opcionalmente o ORN
20 inclui pelo menos uma modificação de estrutura principal.

N-U-R₁-R₂ pode em algumas modalidades incluir pelo menos 3 As ou pelo menos 2 Cs. Opcionalmente, N-U-R₁-R₂ inclui pelo menos um G ou C.

Em algumas modalidades o ORN não é ACCCAUCUAUUUAU
25 AUAACUC (SEQ ID N°: 89).

O ORN pode ainda compreender um veículo farmacologicamente aceitável que opcionalmente é um veículo lipídico tal como N-[1-(2,3-Dioleoilóxi)propil]-N,N,N-trimetilamôniometil-sulfato (DOTAP). Em outras modalidades, o ORN não é complexado com DOTAP. Em outras modalidades o veículo farmacologicamente aceitável pode ser um peptídeo tal como
30 um peptídeo policationico. Peptídeos policationicos incluem, por exemplo, múltiplas polilisinas, poliargininas e polipeptídeos contendo mais de 50% de

aminoácidos básicos, especialmente resíduos arginina ou lisina, em uma faixa de mais de 5, especialmente mais de 8 resíduos de aminoácidos ou misturas dos mesmos e podem, por exemplo, incluir derivados de proteínas antimicrobianas naturais de inseto.

5 Em outras modalidades, o ORN inclui pelo menos um AU.

Além de serem específicos para seqüência, os motivos de RNA imunoestimuladores são eficazes como RNA de filamento simples, RNA de filamento parcialmente duplo, ou RNA de filamento integralmente duplo.

Foram observadas diferenças nítidas entre a produção de molé-
10 culas relacionadas ao IFN-alfa e ao IFN-alfa e outras citocinas pró-inflamatórias tais como TNF-alfa, IFN-gama, IL-10, IL-6 e IL-12 para os ORN da invenção e para ORN tendo um motivo TLR7/8, isto é, repetições contendo GU. O ORN da invenção tendo um motivo N-U-R₁-R₂, por exemplo, aqueles contendo repetições AU ou AUU (SEQ ID N°: 12, SEQ ID N°: 13)
15 não revelaram produção da citocina IFN-alfa mediante estimulação com PBMC e pDC. Ao contrário, ORN tendo três ou mais U em uma fileira (SEQ ID N°: 14, SEQ ID N°: 15) induziram a produção de IFN-alfa, apesar da presença de As. De forma interessante, usando o mesmo conjunto de ORN, porém com G substituído por A foi observada uma forte produção de IFN-
20 alfa mediante estimulação com PBMC. Os dados apresentados neste relatório sugerem fortemente a existências de duas classes diferentes de ORN: uma agindo sobre células expressando TLR8 tais como monócitos e mDCs (SEQ ID N°: 12, SEQ ID N°: 13, SEQ ID N°: 16-SEQ ID N°: 18), o ORN contendo motivos N-U-R₁-R₂ da invenção e uma outra agindo sobre células ex-
25 pressando TLR7/8 tais como monócitos, mDCs e pDCs (SEQ ID N°: 14, SEQ ID N°: 15, SEQ ID N°: 19-SEQ ID N°: 23) contendo as seqüências CU, GU e GUU.

Portanto, os ORN da invenção têm a capacidade de induzir uma resposta imune sem induzir quantidades significativas de IFN-alfa ou de mo-
30 léculas relacionadas ao IFN-alfa em relação ao valor de referência. Uma quantidade significativa de IFN-alfa ou de moléculas relacionadas ao IFN-alfa em relação aos valores de referência é de preferência menor que 20%

de alteração nos níveis de IFN-alfa ou de moléculas relacionadas ao IFN-alfa em relação ao valor de referência. Em algumas modalidades, ela é menor que 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, ou 1%. Em outras modalidades, a quantidade de IFN-alfa ou de moléculas relacionadas ao IFN-alfa que é induzida é equivalente ao valor de referência ou menor que os níveis de referência. Em ainda outras modalidades, a quantidade de IFN-alfa induzida pelo ORN da invenção é menor ou igual a 20% do IFN-alfa induzido por um TLR7/8 ORN. A quantidade de IFN-alfa induzida pelo ORN da invenção pode opcionalmente ser menor que 300 pg/ml em um ensaio *in vitro* ou pode ter um EC50 maior que 1,5 μ M.

Uma molécula relacionada ao IFN-alfa, conforme usado neste relatório, é uma citocina ou um fator que é relacionado à expressão de IFN-alfa. Estas moléculas incluem, porém sem limitação MIP1-beta, IP-10 e MIP1- alfa.

Foi recentemente relatado que células Treg CD4⁺ expressam TLR8 e que a sinalização de TLR8 nestas células reduz ou reverte sua função imunoinibitória. Peng G et al. (2005) *Science* 309:1380-4. Foram observadas populações aumentadas de células Treg CD4⁺ em pacientes com vários tipos de cânceres, onde a imunossupressão pode contribuir para o "escape" imune e o crescimento desregulado desses cânceres. É de se esperar que a supressão mediada por Treg seja benéfica no tratamento de câncer.

O ORN especificamente exclui os motivos TLR7/8. Foi descoberto que os motivos TLR7/8 podem produzir resultados dominantes que mascaram as propriedades imunoestimuladoras singulares do ORN da invenção. Um motivo TLR7/8 pode incluir, por exemplo, uma seqüência de ribonucleotídeos tal como 5'-C/U-U-G/U-U-3', 5'-R-U-R-G-Y-3', 5'-G-U-U-G-B-3', 5'-G-U-G-U-G/U-3', ou 5'-G/C-U-A/C-G-G-C-A-C-3'. C/U é citosina (C) ou uracila (U), G/U é guanina (G) ou U, R é purina, Y é pirimidina, B é U, G, ou C, G/C é G ou C, e A/C é adenina (A) ou C. O 5'-C/U-U-G/U-U-3' pode ser CUGU, CUUU, UUGU, ou UUUU. Em várias modalidades 5'-R-U-R-G-Y-3' é GUAGU, GUAGC, GUGGU, GUGGC, AUAGU, AUAGC, AUGGU, ou

21/105

AUGGC. Em uma modalidade, a sequência de base é GUAGUGU. Em várias modalidades 5'-G-U-U-G-B-3' é GUUGU, GUUGG, ou GUUGC. Em várias modalidades 5'-G-U-G-U-G/U-3' é GUGUG ou GUGUU. Em uma modalidade, a sequência de base é GUGUUUAC. Em várias outras modalidades

5 5'-G/C-U-A/C-G-G-C-A-C-3' é GUAGGCAC, GUCGGCAC, CUAGGCAC, ou CUCGGCAC.

A invenção refere-se de um modo geral a oligorribonucleotídeos imunoestimuladores que incluem um ou mais motivos de RNA imunoestimuladores, composições imunoestimuladoras contendo um ou mais ORN imunoestimuladores da invenção, e métodos para uso dos ORN imunoestimuladores e das composições imunoestimuladoras da invenção.

10

Conforme usado neste relatório, os termos "RNA" e de forma equivalente "RNA natural" referem-se a dois ou mais ribonucleotídeos (isto é, moléculas compreendendo cada uma um açúcar ribose ligado a um grupo

15 fosfato e a uma nucleobase purina ou pirimidina (por exemplo, guanina, adenina, citosina, ou uracil)) covalentemente ligados por ligações 3'-5' fosfodiéster.

O motivo de RNA imunoestimulador pode ocorrer em uma extremidade do ORN imunoestimulador (quando o ORN imunoestimulador tiver

20 extremidades livres). Por exemplo, um ORN imunoestimulador com extremidades livres e o motivo de RNA imunoestimulador posicionado em uma extremidade do ORN imunoestimulador pode ser representado como X_aM ou como MX_b , onde M representa o motivo de RNA imunoestimulador e cada um de X_a e X_b independentemente representa um ou mais nucleotídeos iguais ou diferentes do ORN imunoestimulador exclusivo do motivo de RNA

25 imunoestimulador.

Alternativamente, o motivo de RNA imunoestimulador pode ser flanqueado nas suas duas extremidades por pelo menos um nucleotídeo adicional do ORN imunoestimulador, independente de o ORN imunoestimulador ter extremidades livres ou não. Por exemplo, um ORN imunoestimulador com extremidades livres e nucleotídeos flanqueando o motivo de RNA

30 imunoestimulador pode ser representado como X_aMX_b , onde M representa o

motivo de RNA imunoestimulador e cada um de X_a e X_b independentemente representa um ou mais nucleotídeos iguais ou diferentes do ORN imunoestimulador exclusivo do motivo de RNA imunoestimulador.

Em diferentes modalidades o ORN imunoestimulador incluindo o
5 motivo de RNA imunoestimulador pode incluir um único motivo ou mais de um motivo de RNA imunoestimulador. Acredita-se que pode ser vantajoso ter dois ou mais motivos de RNA imunoestimuladores em um único ORN imunoestimulador, por exemplo se os motivos forem espaçados de modo que o ORN imunoestimulador possa engatar dois ou mais TLRs. Por exem-
10 plo, o ORN imunoestimulador poderia engatar dois ou mais receptores de TLR8 dessa forma amplificando ou modificando o efeito imunoestimulador resultante.

Quando o ORN imunoestimulador inclui mais de um motivo de RNA imunoestimulador, o ORN imunoestimulador pode ser representado em
15 uma modalidade, como M_1XM_2 , onde M_1 e M_2 cada um independentemente representam um motivo de RNA imunoestimulador e X representa um ou mais nucleotídeos iguais ou diferentes do ORN imunoestimulador exclusivo dos motivos de RNA imunoestimuladores. Em uma modalidade, X inclui um ligante não-nucleotídico conforme descrito neste relatório. Em uma modali-
20 dade, X inclui uma unidade ramificadora conforme descrito neste relatório.

Quando há mais de um motivo de RNA imunoestimulador no ORN imunoestimulador, os motivos geralmente podem ocorrer em qualquer posição no ORN imunoestimulador. Por exemplo, quando existem dois moti-
25 vos, cada um deles pode ocorrer em uma extremidade do ORN imunoestimulador. Alternativamente, um motivo pode ocorrer em uma extremidade e um motivo pode ser flanqueado em suas duas extremidades por pelo menos um nucleotídeo adicional do ORN imunoestimulador. Em ainda uma outra modalidade, cada motivo pode ser flanqueado em suas duas extremidades por pelo menos um nucleotídeo adicional do ORN imunoestimulador.

30 ORN imunoestimuladores incluem, porém sem limitação, os seguintes, mostrando leitura 5' para 3' da esquerda para a direita:

Em algumas modalidades, o ORN é um dos ORN ativos mostra-

dos nas Tabelas 1 e 2 abaixo, tais como os seguintes: U*U*A*G*G*C*A*C
 (SEQ ID N°: 2), A*U*A*G*G*C*A*C (SEQ ID N°: 4),
 G*C*C*A*C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*U*A*U*A*C*C (SEQ ID N°: 11),
 A*U*A*U*A*U*A*U*A*U*A*U*A*U*A*U*A*U*A*U (SEQ ID N°: 12),
 5 U*U*A*U*U*A*U*U*A*U*U*A*U*U*A*U*U*A*U*U (SEQ ID N°: 13),
 A*A*U*A*A*U*A*A*U*A*A*U*A*A*U*A*A*U*A*A (SEQ ID N°: 16),
 A*A*A*U*A*A*A*U*A*A*A*U*A*A*A*U*A*A*A*U (SEQ ID N°: 17),
 A*A*A*A*U*A*A*A*A*U*A*A*A*A*U*A*A*A*A*U (SEQ ID N°: 18),
 C*U*A*C*U*A*C*U*A*C*U*A*C*U*A*C*U*A*C*U (SEQ ID N°: 24),
 10 U*U*A*U*U*A*U (SEQ ID N°: 30), U*A*U*A*U*A*U (SEQ ID N°: 33),
 C*C*G*A*G*C*C*G*A*U*U*A*C*C*C (SEQ ID N°: 48),
 C*C*G*A*G*C*C*G*A*U*U*G*A*A*C*C (SEQ ID N°: 76),
 C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*U*A*C*C*C*C (SEQ ID N°: 42),
 C*C*G*A*G*C*C*A*U*A*U*A*U*A*U*C (SEQ ID N°: 39),
 15 C*C*G*A*G*C*C*G*A*U*A*U*U*A*C*C (SEQ ID N°: 65),
 C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*U*C*C*C*C*C (SEQ ID N°: 44),
 C*C*G*A*G*C*C*G*C*C*U*A*C*C*C*C (SEQ ID N°: 47),
 C*C*G*A*G*C*C*A*U*A*U*A*U*C*C*C (SEQ ID N°: 38),
 C*C*G*A*G*C*C*G*C*U*A*U*A*C*C*C (SEQ ID N°: 37),
 20 C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*U*A*A*C*C*C (SEQ ID N°: 40),
 C*C*G*A*G*C*C*G*C*U*A*U*C*C*C*C (SEQ ID N°: 55),
 C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*G*G*U*A*C*C (SEQ ID N°: 82),
 C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*G*A*U*A*C*C (SEQ ID N°: 85),
 C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*U*G*U*A*C*C (SEQ ID N°: 63),
 25 C*C*G*A*G*C*C*G*C*C*U*A*A*C*C*C (SEQ ID N°: 43),
 C*C*G*A*G*C*C*G*C*A*U*A*U*C*C*C (SEQ ID N°: 36),
 C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*G*C*U*A*C*C (SEQ ID N°: 87),
 C*C*G*A*G*C*C*G*C*A*U*A*C*C*C*C (SEQ ID N°: 45),
 C*C*G*A*G*C*C*G*C*A*U*A*A*C*C*C (SEQ ID N°: 41),
 30 C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*G*G*U*G*C*C (SEQ ID N°: 83),
 C*C*G*A*G*C*C*G*C*A*U*C*C*C*C*C (SEQ ID N°: 46),
 C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*G*C*U*G*C*C (SEQ ID N°: 88),

24/105

C*C*G*A*G*C*C*G*C*C*G*C*C*C*C (SEQ ID N°: 35),
 C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*G*C*U*C*C*C (SEQ ID N°: 84), ou
 C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*G*G*C*A*C*C (SEQ ID N°: 56).

Como mencionado acima, RNA é um polímero de ribonucleotí-
 5 deos unidos através de ligações 3'-5' fosfodiéster. Em certas modalidades,
 os ORN imunoestimuladores da invenção são RNA. No entanto, os ORN
 imunoestimuladores da invenção não estão limitados a RNA, como será
 descrito abaixo.

Um ORN imunoestimulador da invenção pode em uma modali-
 10 dade, incluir uma ou mais nucleobases modificadas, isto é, derivados de A,
 C, G, e U. Modalidades específicas destas nucleobases modificadas inclu-
 em porém, sem limitação citosinas 5-substituídas (por exemplo, 5-metil-
 citosina, 5-flúor-citosina, 5-cloro-citosina, 5-bromo-citosina, 5-iodo-citosina,
 5-hidróxi-citosina, 5-hidroximetil-citosina, 5-difluormetil-citosina, e 5-alquil-
 15 citosina não-substituída ou substituída), citosinas 6-substituídas, citosinas
 N4-substituídas (por exemplo, N4-etil-citosina), 5-aza-citosina, 2-mercapto-
 citosina, isocitosina, pseudo-isocitosina, análogos de citosina com sistemas
 de anel condensados (por exemplo, N,N'-propileno citosina ou fenoxazina),
 e uracila e seus derivados (por exemplo, 5-flúor-uracila, 5-bromo-uracila, 5-
 20 bromovinil-uracila, 4-tio-uracila, 5-hidróxi-uracila, 5-propinil-uracil), derivados
 de timina (por exemplo, 2-tiotimina, 4-tiotimina, timinas 6-substituídas), deri-
 vados de guanosina (7-deazaguanina, guanina 7-deaza-7-substituída (tal
 como 7-deaza-7-(C2-C6)alquilguanina), guanina 7-deaza-8-substituída, hi-
 poxantina, guaninas N2-substituídas (por exemplo, N2-metil-guanina), gua-
 25 nina 8-substituída (por exemplo, 8-hidroxiguanina e 8-bromoguanina), e 6-
 tioguanina), ou derivados de adenosina (5-amino-3-metil-3H,6H-tiazol[4,5-
 d]pirimidina-2,7-diona, 2,6-diaminopurina, 2-aminopurina, purina, indol, ade-
 nina, adeninas substituídas (por exemplo, N6-metil-adenina, 8-oxo-ade-
 nina)). A base também pode ser substituída por uma base universal (por
 30 exemplo, 4-metil-indol, 5-nitro-indol, 3-nitropirrol, P-base, e K-base), um sis-
 tema de anel aromático (por exemplo, benzimidazol ou dicloro- benzimida-
 zol, amida de ácido 1-metil-1H-[1,2,4]triazol-3-carboxílico), um sistema de

anel aromático (por exemplo, fluorbenzeno ou difluorbenzeno) ou um átomo de hidrogênio (dSpacer). Modificações de base preferidas são uracila e 7-deaza-guanina. As nucleobases U modificadas e seus ribonucleosídeos correspondentes encontram-se disponíveis em fornecedores comerciais.

5 Modalidades específicas de nucleobases G modificadas incluem N²-dimetilguanina, 7-deazaguanina, 8-azaguanina, guanina 7-deaza-7-substituída, 7-deaza-7-(C2-C6)alquilguanina, guanina 7-deaza-8-substituída, 8-hidroxiguanina, 6-tioguanina, e 8-oxoguanina. Em uma modalidade, a nucleobase G modificada é 8-hidroxiguanina. Estas nucleobases G modifi-
10 cadas e seus ribonucleosídeos correspondentes encontram-se disponíveis em fornecedores comerciais.

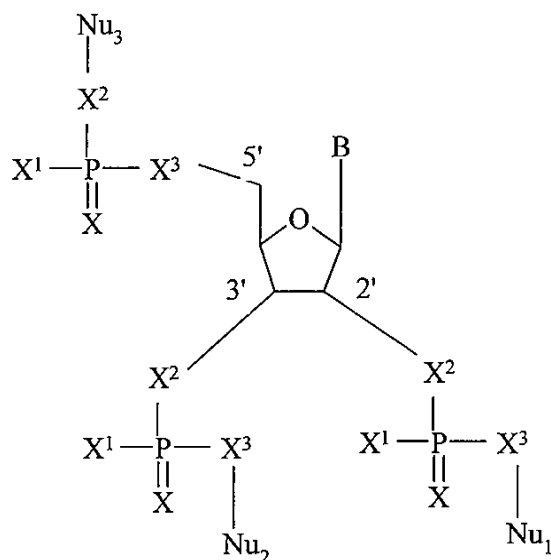
Em certas modalidades, pelo menos uma unidade β -ribose pode ser substituída por β -D-desoxirribose ou uma unidade de açúcar modificado, onde a unidade de açúcar modificado é por exemplo, selecionada de β -D-
15 ribose, α -D-ribose, β -L-ribose (como em 'Spiegelmers'), α -L-ribose, 2'-amino-2'-desoxirribose, 2'-flúor-2'-desoxirribose, 2'-O-(C1-C6)alquil-ribose, de preferência 2'-O-(C1-C6)alquil-ribose é 2'-O-metilribose, 2'-O-(C2-C6)alquenil-ribose, 2'-[O-(C1-C6)alquil-O-(C1-C6)alquil]-ribose, LNA e α -LNA (Nielsen P et al. (2002) *Chemistry-A European Journal* 8:712-22), β -D-xilo-
20 furanose, α -arabinofuranose, 2'-flúor arabinofuranose, e análogos de açúcar de cadeia carbocíclica e/ou aberta (descritos, por exemplo, em Vandendriessche et al. (1993) *Tetrahedron* 49:7223) e/ou análogos de bicicloaçúcar (descritos, por exemplo, em Tarkov M et al. (1993) *Helv Chim Acta* 76:481).

Os ribonucleotídeos e ribonucleosídeos individuais dos ORN
25 imunoestimuladores da invenção podem ser alternativamente ligados por ligados não-nucleotídicos, em particular ligados abásicos (dSpacers), unidades trietileno glicol, ou unidades hexaetileno glicol. Ligantes adicionais são ligantes do tipo alquilamino, tais como C3, C6, e C12 aminoligantes, e também do tipo alquiltiol, tais como ligantes tipo C3 ou C6 tiol. Os nucleotídeos
30 e ribonucleosídeos individuais dos ORN imunoestimuladores da invenção podem ser alternativamente ligados por resíduos aromáticos que podem ser ainda substituídos com grupos alquila ou alquila substituída.

RNA é um polímero de ribonucleotídeos unidos através de ligações 3'-5' fosfodiéster. Os nucleotídeos dos ORN imunoestimuladores da invenção também podem ser unidos através de ligações 3'-5' fosfodiéster. No entanto, a invenção também abrange ORN imunoestimuladores com ligações internucleotídicas incomuns, incluindo especificamente as ligações internucleotídicas 5'-5', 3'-3', 2'-2', 2'-3', e 2'-5'. Em uma modalidade, tais ligações incomuns são excluídas do motivo de RNA imunoestimulador, embora uma ou mais destas ligações possam ocorrer em uma alguma parte do ORN imunoestimulador. Para ORN imunoestimuladores com extremidades livres, a inclusão de uma ligação internucleotídica 3'-3' pode resultar em um ORN imunoestimulador com duas extremidades 5' livres. Ao contrário, para ORN imunoestimuladores com extremidades livres, a inclusão de uma ligação internucleotídica 5'-5' pode resultar em um ORN imunoestimulador com duas extremidades 3' livres.

Uma composição imunoestimuladora desta invenção pode conter dois ou mais motivos de RNA imunoestimuladores que podem ser ligados através de uma unidade ramificadora. As ligações internucleotídicas podem ser ligações 3'-5', 5'-5', 3'-3', 2'-2', 2'-3', ou 2'-5'. Dessa forma, a nomenclatura 2'-5' é escolhida de acordo com o átomo de carbono da ribose. A ligação internucleotídica incomum pode ser uma ligação fosfodiéster, mas ela pode ser alternativamente modificada como fosforotioato ou qualquer outra ligação modificada conforme descrito neste relatório. A fórmula abaixo mostra uma estrutura geral para os ORN imunoestimuladores ramificados da invenção via uma unidade ramificadora nucleotídica. Dessa forma Nu₁, Nu₂, e Nu₃ podem ser ligados através de ligações 3'-5', 5'-5', 3'-3', 2'-2', 2'-3', ou 2'-5'. A ramificação de ORN imunoestimuladores também pode envolver o uso de ligantes não-nucleotídicos e espaçadores abásicos. Em uma modalidade, Nu₁, Nu₂, e Nu₃ representam motivos de RNA imunoestimuladores iguais ou diferentes. Em uma outra modalidade, Nu₁, Nu₂, e Nu₃ compreendem pelo menos um motivo de RNA imunoestimulador e pelo menos um motivo de DNA de CpG imunoestimulador.

27/105



Os ORN imunoestimuladores podem conter uma unidade duplicadora ou triplicadora (Glen Research, Sterling, VA), em particular os ORN imunoestimuladores com uma ligação 3'-3'. Uma unidade duplicadora em uma modalidade, pode ser à base de 1,3-bis-[5-(4,4'-dimetoxitritilóxi) penti-

5 lamido]propil-2-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidito. Uma unidade triplicadora em uma modalidade, pode ser à base de incorporação de Tris-2,2,2-[3-(4,4'-dimetoxitritilóxi)propiloximetil]etil-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopro-

10 pil)]-fosforamidito. Ramificação dos ORN imunoestimuladores por múltiplas unidades duplicadoras, triplicadoras, ou outras unidades multiplicadoras leva a dendrímeros que constituem uma outra modalidade, desta invenção. ORN imunoestimuladores ramificados podem levar à reticulação de receptores para RNA imunoestimulador tal como TLR3, TLR7, e TLR8, com efeitos imunes distintos em comparação com formas não ramificadas dos ORN imuno-

15 estimuladores. Além disso, a síntese de ORN imunoestimuladores ramificados ou então multiméricos pode estabilizar o RNA contra degradação e pode permitir que seqüências de RNA fracas ou parcialmente eficazes exerçam um nível terapeuticamente útil de atividade imune. Os ORN imunoestimuladores também podem conter unidades ligadoras resultantes de reagentes modificadores de peptídeo ou de reagentes modificadores de oligonu-

20 cleotídeo (Glen Research). Além disso, os ORN imunoestimuladores podem conter um ou mais resíduos de aminoácidos naturais ou não naturais que

são ligados ao polímeros por ligações peptídicas (amídicas).

As ligações internucleotídicas 3'-5', 5'-5', 3'-3', 2'-2', 2'-3', e 2'-5' podem ser diretas ou indiretas. Ligações diretas neste contexto refere-se a uma ligação fosfato ou fosfato modificado como descrito neste relatório, sem
5 uma porção ligadora intermediária. Uma porção ligadora intermediária é uma porção orgânica distinta de uma ligação fosfato ou fosfato modificado como descrito neste relatório, que pode incluir, por exemplo, polietileno glicol, trietileno glicol, hexaetileno glicol, dSpacer (isto é, um desoxinucleotídeo abásico), uma unidade duplicadora, ou uma unidade triplicadora.

10 Em certas modalidades, o ORN imunoestimulador é conjugado a uma outra entidade para fornecer um conjugado. Conforme usado neste relatório um conjugado refere-se a uma combinação de quaisquer duas ou mais entidades ligadas uma à outra por qualquer meio físico-químico, que inclui interação hidrofóbica e acoplamento covalente.

15 Em uma outra modalidade, o ORN imunoestimulador pode ser conjugado a um ligando de baixo peso molecular que é reconhecido por um receptor imunomodulador. Este receptor é de preferência um membro da família TLR, tal como TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8, ou TLR9. Os ligandos de baixo peso molecular são cópias dos ligandos naturais para esses
20 receptores. Exemplos incluem, porém sem limitação R-848 (Resiquimod), R-837 (Imiquimod; ALDARA®, 3M Pharmaceuticals), 7-deaza-guanosina, 7-tia-8-oxo-guansosina, e 7-alil-8-oxo-guansosina (Loxoribine) que estimulam o TLR7 ou o TLR8. Derivados de D-glicopirranose, tais como 3D-MPL (ligando para TLR4), também podem ser conjugados aos ORN imunoestimuladores.
25 Pam3-Cys é um exemplo de um ligando para TLR2 que pode ser conjugado aos ORN imunoestimuladores. Oligodesoxinucleotídeos contendo motivos CpG são ligandos para TLR9, e estes também podem ser conjugados aos ORN imunoestimuladores da invenção. Em uma modalidade, pelo menos um oligodesoxinucleotídeo compreendendo um motivo CpG eficaz para es-
30 timular a sinalização de TLR9 é conjugado a um ORN imunoestimulador da invenção. A conjugação de ligandos para diferentes TLRs em uma molécula pode levar à multimerização de receptores o que resulta em estimulação

imune aumentada ou em um perfil imunoestimulador diferente daquele resultante de qualquer tal ligando simples.

Em um aspecto, a invenção fornece um conjugado de um ORN imunoestimulador da invenção e uma porção lipofílica. Em certas modalidades, o ORN imunoestimulador é covalentemente ligado a uma porção lipofílica. A porção lipofílica geralmente vai ocorrer em uma ou mais extremidades de um ORN imunoestimulador com extremidades livres, embora em certas modalidades a porção lipofílica possa ocorrer em outra parte no ORN imunoestimulador e portanto não requerer que o ORN imunoestimulador tenha uma extremidade livre. Em uma modalidade, o ORN imunoestimulador tem uma extremidade 3' e a porção lipofílica é covalentemente ligada à extremidade 3'. O grupo lipofílico de um modo geral pode ser um colesteril, um colesteril modificado, um derivado de colesterol, um colesterol reduzido, um colesterol substituído, um colestano, uma cadeia C16 alquila, um ácido biliar, ácido cólico, ácido taurocólico, ácido oleil litocólico, ácido oleoil colênico, um glicolipídio, um fosfolipídio, um esfingolipídio, um isoprenóide, tal como esteróides, vitaminas, tais como vitamina E, ácidos graxos saturados, ácidos graxos insaturados, ésteres de ácidos graxos, tais como triglicerídeos, pirenos, porfirinas, texafirina, adamantano, acridinas, biotina, cumarina, fluoresceína, rodamina, Texas-Red, digoxigenina, dimetoxitritil, t-butil-dimetilsilil, t-butildifenilsilil, corantes à base de cianina (por exemplo, Cy3 ou Cy5), corante 33258 da Hoechst, psoraleno, ou ibuprofeno. Em certas modalidades a porção lipofílica é escolhida de colesteril, palmitil, e ácido graxo. Em uma modalidade, a porção lipofílica é colesteril. Acredita-se que a inclusão de uma ou mais destas porções lipofílicas nos ORN imunoestimuladores da invenção confere aos mesmos ainda uma estabilidade adicional contra a degradação por nucleases. Onde existem duas ou porções lipofílicas em um único ORN imunoestimulador da invenção, cada porção lipofílica pode ser selecionada independentemente de qualquer outra.

Em uma modalidade, o grupo lipofílico é preso a uma posição 2' de um nucleotídeo do ORN imunoestimulador. Um grupo lipofílico pode alternativamente ou adicionalmente ser ligado à nucleobase heterocíclica de

um nucleotídeo do ORN imunoestimulador. A porção lipofílica pode ser covalentemente ligada ao ORN imunoestimulador via qualquer ligação direta ou indireta adequada. Em uma modalidade, a ligação é direta e é um éster ou uma amida. Em uma modalidade, a ligação é indireta e inclui uma porção
5 espaçadora, por exemplo, um ou mais resíduos de nucleotídeos abásicos, oligoetilenoglicol, tal como trietilenoglicol (espaçador 9) ou hexaetilenoglicol (espaçador 18), ou um alceno-diál, tal como butanodiol.

Em uma modalidade, o ORN imunoestimulador da invenção é vantajosamente combinado com um lipídio catiônico ou um peptídeo catiônico.
10 co. Acredita-se que lipídios catiônicos e peptídeos catiônicos auxiliam o tráfego do ORN imunoestimulador no compartimento endossômico, onde o TLR8 é encontrado. Em uma modalidade, o lipídio catiônico é DOTAP (metil-sulfato N-[1-(2,3-dioleoilóxi)propil]-N,N,N-trimetilamônio). Acredita-se que o DOTAP transporta RNA oligômero para as células e especificamente tra-
15 fegam para o compartimento endossômico, onde ele pode liberar o RNA oligômero de maneira dependente do pH. Uma vez no compartimento endossômico, o RNA pode interagir com certos TLRs intracelular, desencadeando vias de transdução de sinal mediadas por TLR envolvidas na geração de uma resposta imune. Outros agentes com propriedades semelhantes que
20 incluem o tráfego para o compartimento endossômico podem ser usados no lugar do DOTAP ou junto com ele. Outras formulações lipídicas incluem, por exemplo, EFFECTENE® (um lipídio não-lipossômico com um intensificador da condensação de DNA especial) e SUPERFECT® (uma nova tecnologia dendrimerica atuante). Lipossomas encontram-se comercialmente disponíveis na Gibco BRL, por exemplo, como LIPOFECTIN® e LIPOFECTACE®,
25 que são formados de lipídios catiônicos tais como cloreto de N-[1-(2, 3 dioleilóxi)-propil]-N, N, N-trimetilamônio (DOTMA) e brometo de dimetil dioctadecilamônio (DDAB). Métodos para fazer lipossomas são bastante conhecidos na literatura e foram descritos em muitas publicações. Lipossomas tam-
30 bém foram revistos por Gregoriadis G (1985) *Trends Biotechnol* 3:235-241.

Em uma modalidade, os ORN imunoestimuladores da invenção estão na forma de moléculas em forma de haltere covalentemente fechadas

com estrutura primária e secundária. Como descrito, em uma modalidade, tais oligorribonucleotídeos cíclicos incluem duas alças de filamento simples conectadas por um segmento de filamento duplo intermediário. Em uma modalidade, pelo menos uma alça de filamento simples inclui um motivo de
5 RNA imunoestimulador da invenção. Outras moléculas em forma de haltere covalentemente fechadas da invenção incluem moléculas de DNA:RNA quiméricas nas quais, por exemplo, o segmento de filamento duplo é pelo menos parcialmente DNA (por exemplo, dsDNA homodimérico ou DNA:RNA heterodimérico) e pelo menos uma alça de filamento simples inclui um moti-
10 vo de RNA imunoestimulador da invenção. Alternativamente, o segmento de filamento duplo da molécula quimérica é RNA.

Em certas modalidades, ORN imunoestimulador é isolado. Uma molécula isolada é uma molécula que é substancialmente pura e é livre de outras substâncias com as quais ela é normalmente encontrada na natureza
15 ou em sistemas in vivo em uma extensão prática e apropriada para o uso pretendido. Em particular, os ORN imunoestimuladores são suficientemente puros e são suficientemente livres de outros constituintes biológicos de células de modo a serem úteis, por exemplo, na produção de preparações farmacêuticas. Como um ORN imunoestimulador isolado da invenção pode ser
20 misturado com um veículo farmacêuticamente aceitável em uma preparação farmacêutica, o ORN imunoestimulador pode compreender somente uma pequena percentagem em peso da preparação. O ORN imunoestimulador, é todavia, substancialmente puro no sentido de que ele foram substancialmente separado das substâncias com as quais ele pode estar associado em sis-
25 temas vivos.

Para uso na presente invenção os ORN imunoestimuladores da invenção podem ser sintetizados de novo usando ou adaptado de qualquer um de inúmeros procedimentos bastante conhecidos na literatura. Por exemplo, o método de β -cianoetil fosforamidito (Beaucage SL et al. (1981) *Tetrahedron Lett* 22:1859); o método de nucleosídeo H-fosfonato (Garegg P et al. (1986) *Tetrahedron Lett* 27:4051-4; Froehler BC et al. (1986) *Nucl Acid Res* 14:5399-407; Garegg P et al. (1986) *Tetrahedron Lett* 27:4055-8; Gaff-

30

ney BL et al. (1988) *Tetrahedron Lett* 29:2619-22). Estas químicas podem ser realizadas por uma variedade de sintetizadores de ácidos nucleicos automáticos disponíveis no mercado. Métodos de síntese adicionais úteis de acordo com a presente invenção estão descritos em Uhlmann E et al. (1990) *Chem Rev* 90:544-84, e Goodchild J (1990) *Bioconjugate Chem* 1:165.

A síntese de oligorribonucleotídeos pode ser efetuada em solução ou em um suporte de fase sólida. Em solução, reações de acoplamento em blocos (dímeros, trímeros, tetrâmeros etc.) são preferidas, ao passo que a síntese em fase sólida é de preferência realizada em um processo de etapas usando blocos de construção monoméricos. Químicas diferentes, tais como o método de fosfotriéster, o método de H-fosfonato, e o método de fosforamidito, foram descritas (Eckstein F (1991) *Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach*, IRL Press, Oxford). Enquanto que no método de fosfotriéster o grupo fósforo reativo está no estado de oxidação +V, os derivados de fósforo +III mais reativos são usados nas reações de acoplamento de acordo com as abordagens de fosforamidito e H-fosfonato. Nestas duas últimas abordagens, o fósforo é oxidado depois da etapa de acoplamento para produzir derivados de P(V) estáveis. Se o oxidante for iodo/água/base, então fosfodiésteres são obtidos depois da desproteção. Ao contrário, se o oxidante for um agente sulfurizante, tal como reagente de Beaucage, então fosforotioatos são obtidos depois da desproteção.

Um método eficiente para a síntese de oligorribonucleotídeos é a combinação da síntese em suporte sólido usando a química de fosforamidito originalmente descrita para oligodesoxinucleotídeos por Matteucci & Caruthers. Matteucci MD et al. (1981) *J Am Chem Soc* 103:3185.

A síntese de oligorribonucleotídeos é semelhante à de oligodesoxinucleotídeos, com a diferença de que o grupo 2'-hidróxi nos oligorribonucleotídeos deve ser protegido por um grupo protetor de hidróxi adequado. Os monômeros podem ser protegidos por exemplo, pelo grupo 2'-O-t-butildimetilsilil (TBDMS) nos blocos de construção monoméricos do RNA. No entanto, foi relatado que a síntese de RNA usando monômeros contendo o grupo 2'-O-triisopropilsililoximetil (TOM) (TOM-Protecting-Group®) resulta

em maior eficiência de acoplamento, porque o grupo protetor TOM apresenta bloqueio estérico mais baixo que o grupo TBDMS. Embora o grupo protetor TBDMS seja removido usando fluoreto, obtém-se uma desproteção rápida para o grupo TOM usando metilamina em etanol/água à temperatura ambiente. Na síntese de oligo(ribo)nucleotídeos, alongamento da cadeia da extremidade 3' para 5' é preferido, o que é obtido por acoplamento de uma unidade ribonucleotídeo tendo um grupo 3'-fósforo (III) ou seu derivado ativado a um grupo 5'-hidróxi livre de uma outra unidade nucleotídeo.

A síntese pode ser convenientemente realizada usando um sintetizador de DNA/RNA automático. Dessa forma, podem ser usados ciclos de síntese conforme recomendado pelos fabricantes dos sintetizadores. Para monômeros de ribonucleosídeo fosforamidito, os tempos de acoplamento são mais longos (por exemplo, 400 s) em comparação com monômeros de desoxinucleosídeo. Como suporte sólido, pode ser usado um suporte de vidro de poro controlado (CpG) de 500 a 1000 Å ou um suporte de polímero orgânico, tal como o suporte iniciador PS200 (Amersham). O suporte sólido normalmente contém o primeiro nucleosídeo, tal como 5'-O-Dimetoxitritil-N-6-benzoiladenosina, preso via sua extremidade 3'. Depois da clivagem do grupo 5'-O-Dimetoxitritil com ácido tricloroacético, o alongamento da cadeia é obtido usando por exemplo, 5'-O-Dimetoxitritil-N-protégido-2'-O-terc butil-dimetilsilil-nucleosídeo-3'-O-fosforamiditos. Depois de sucessivos ciclos repetitivos, o oligorribonucleotídeo completado é clivado do suporte e desprotegido por tratamento com amônia concentrada/etanol (3:1, v:v) por 24 horas a 30°C. O grupo bloqueador TBDMS é finalmente removido por clivagem usando trietilamina/HF. Os oligorribonucleotídeos brutos podem ser purificados por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) com troca iônica, HPLC de fase reversa de par de íons, ou eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) e caracterizados por espectrometria de massa.

A síntese de 5'-conjugados é realizada por acoplamento de um fosforamidito da molécula a ser ligado ao grupo 5'-hidróxi do nucleotídeo terminal na síntese em fase sólida. Uma variedade de derivados de fosforamidito de tais ligandos, tais como colesterol, acridina, biotina, psoraleno, eti-

leno glicol, ou resíduos aminoalquila encontram-se comercialmente disponíveis. Alternativamente, funções aminoalquila podem ser introduzidas durante a síntese em fase sólida que permite derivatização pós-síntese por moléculas de conjugados ativadas, tais como ésteres, isotiocianatos ou iodoacetamidas ativas.

A síntese de conjugados de extremidade 3' geralmente é obtida usando os suportes sólidos modificados de forma correspondente, tais como por exemplo, os suportes sólidos derivatizados de colesterol comercialmente disponíveis. No entanto, a conjugação também pode ser feita em ligações internucleotídicas, nucleobases ou nos resíduos ribose, tal como na posição 2' da ribose.

Para oligorribonucleotídeos cíclicos, o alongamento da cadeia de oligonucleotídeo pode ser efetuado no suporte sólido Nucleotídeo PS (Glen Research) usando química de fosforamidito tradicional. A reação de ciclização é então efetuada no suporte sólido usando um procedimento de acoplamento de fosfotriéster (Alazzouzi et al. (1997) *Nucleosides Nucleotides* 16:1513-14). Na desproteção final com hidróxido de amônio, virtualmente o único produto que entra em solução é o oligonucleotídeo cíclico desejado.

Os oligorribonucleotídeos cíclicos da invenção incluem formas circulares fechadas de RNA e podem incluir RNA de filamento simples com ou sem RNA de filamento duplo. Por exemplo, em uma modalidade, o oligorribonucleotídeo cíclico inclui RNA de filamento duplo e tem a conformação de um haltere com duas alças de filamento simples conectadas por um segmento de filamento duplo intermediário. Oligodesoxinucleotídeos CpG em forma de haltere covalentemente fechados foram descritos na Patente US N° 6.849.725. Em uma outra modalidade, o oligorribonucleotídeo cíclico inclui RNA de filamento duplo e tem uma conformação com três ou mais alças de filamento simples conectadas por segmentos de filamento duplo intermediários. Em uma modalidade, um motivo de RNA imunoestimulador está localizado em um ou mais segmentos de filamento simples.

Os ORN imunoestimuladores da invenção são úteis, isolados ou

em combinação com outros agentes, como adjuvantes. Um adjuvante conforme usado neste relatório refere-se a uma substância que não um antígeno que aumenta a ativação da célula imune em resposta a um antígeno, por exemplo, uma resposta imune humoral e/ou celular. Adjuvantes promovem a
5 acumulação e/ou a ativação de células acessórias para aumentar respostas imunes específicas para antígeno. Adjuvantes são usados para aumentar a eficácia de vacinas, isto é, composições contendo antígeno usadas para induzir imunidade protetora contra o antígeno.

Adjuvantes em geral incluem adjuvantes que criam um efeito de
10 depósito, adjuvantes imunoestimuladores, e adjuvantes que criam um efeito de depósito e estimulam o sistema imunológico. Um adjuvante que cria um efeito de depósito conforme usado neste relatório é um adjuvante que faz com que o antígeno seja liberado lentamente no corpo, dessa forma prolongando a exposição das células imunes ao antígeno. Esta classe de adjuvan-
15 tes inclui, porém sem limitação alúmen (por exemplo, hidróxido de alumínio, fosfato de alumínio); formulações à base de emulsão incluindo emulsão de óleo mineral, de óleo não mineral, de água em óleo ou de óleo em água em óleo, emulsões de óleo em água tais como a série Seppic ISA de adjuvantes Montanide (por exemplo, Montanide ISA 720; AirLiquide, Paris, França); MF-
20 59 (uma emulsão de esqualeno em água estabilizada com Span 85 e Tween 80; Chiron Corporation, Emeryville, Calif.); e PROVAX (uma emulsão de óleo em água contendo um detergente estabilizante e um agente formador de micelas; IDEC Pharmaceuticals Corporation, San Diego, Calif.).

Um adjuvante imunoestimulador é um adjuvante que causa a
25 ativação de uma célula do sistema imunológico. Ele pode, por exemplo, fazer com que uma célula imune produza e secrete citocinas. Esta classe de adjuvantes inclui, porém sem limitação saponinas purificadas a partir da casca da árvore *Q. saponaria*, tal como QS21 (um glicolípido que elui no 21° pico com fracionamento por HPLC; Aquila Biopharmaceuticals, Inc.,
30 Worcester, Mass.); poli[di(carboxilatofenóxi)fosfazeno (polímero de PCPP; Virus Research Institute, EUA); derivados de lipopolissacarídeos tais como monofosforil lipídio A (MPL; Ribi ImmunoChem Research, Inc., Hamilton,

Mont.), muramil dipeptídeo (MDP; Ribi) e treonil-muramil dipeptídeo (t-MDP; Ribi); OM-174 (um glicosamina dissacarídeo relacionado ao lipídio A; OM Pharma SA, Meyrin, Suíça); e fator de alongamento de Leishmania (uma proteína de Leishmania purificada; Corixa Corporation, Seattle, Wash.). Esta
5 classe de adjuvantes também inclui CpG DNA.

Adjuvantes que criam um efeito de depósito e estimulam o sistema imunológico são os compostos que têm ambas as funções identificadas acima. Esta classe de adjuvantes inclui, porém sem limitação ISCOMS (complexos imunoestimuladores que contêm saponinas mistas, lipídios e
10 formam partículas do tamanho de vírus com poros que podem reter o antígeno; CSL, Melbourne, Austrália); SB-AS2 (sistema adjuvante #2 da SmithKline Beecham que é uma emulsão de óleo em água contendo MPL e QS21; SmithKline Beecham Biologicals [SBB], Rixensart, Bélgica); SB-AS4 (sistema adjuvante #4 da SmithKline Beecham que contém alúmen e MPL;
15 SBB, Bélgica); copolímeros em blocos não iônicos que formam micelas tais como CRL 1005 (estes contêm uma cadeia linear de polioxipropileno hidrófobo flanqueada por cadeias de polioxietileno; Vaxcel, Inc., Norcross, Ga.); e a formulação de adjuvante Syntex (SAF, uma emulsão de óleo em água contendo Tween 80 e um copolímero em blocos não iônico; Syntex Chemicals, Inc., Boulder, Colo.).
20

A invenção em um aspecto fornece um adjuvante que inclui um ORN imunoestimulador da invenção, por si só. Em uma outra modalidade, a invenção fornece um adjuvante que inclui um ORN imunoestimulador da invenção e pelo menos um outro adjuvante (um adjuvante de combinação).
25 O outro adjuvante pode incluir um adjuvante que cria um efeito de depósito, um adjuvante imunoestimulador, um adjuvante que cria um efeito de depósito e estimula o sistema imunológico, e qualquer combinação dos mesmos. Em uma modalidade, o ORN imunoestimulador da invenção e pelo menos um outro adjuvante são covalentemente ligados um ao outro. Um adjuvante
30 de combinação de acordo com a invenção pode exibir um efeito imunoestimulador sinérgico comparado à soma dos efeitos do ORN imunoestimulador isolado e do pelo menos um outro adjuvante isolado. Adicionalmente ou

alternativamente, um adjuvante de combinação de acordo com a invenção pode exibir um perfil imunoestimulador alterado comparado àquele do ORN imunoestimulador isolado ou do pelo menos um outro adjuvante isolado. Por exemplo, o adjuvante de combinação pode oferecer uma forma mais equilibrada de imunoestimulação de Th1/Th2 em uma modalidade, ou ele pode oferecer uma forma mais desviada de imunoestimulação de Th1/Th2 em uma outra modalidade. Os especialistas na técnica vão saber como selecionar os componentes individuais para promover um tipo desejado de imunoestimulação, por exemplo, mais equilibrada ou mais desviada em relação ao caráter de Th1 e Th2. Th1 e Th2 estão descritos mais adiante.

Também é fornecida uma composição que inclui um ORN imunoestimulador da invenção mais um outro adjuvante, onde o outro adjuvante é uma citocina. Em uma modalidade, a composição é um conjugado do ORN imunoestimulador da invenção e da citocina.

Citocinas são proteínas solúveis e glicoproteínas produzidas por muitos tipos de células que medeiam reações inflamatórias e imunes. As citocinas medeiam a comunicação entre as células do sistema imunológico, agindo localmente assim como sistemicamente para recrutar células e regular sua função e proliferação. As categorias de citocinas incluem mediadores e reguladores da imunidade inata, mediadores e reguladores da imunidade adaptativa, e estimuladores de hematopoiese. Incluídas entre as citocinas encontram-se interleucinas (por exemplo, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, e as interleucinas 19-32 (IL-19 - IL-32), entre outras), quimiocinas (por exemplo, IP-10, RANTES, MIP-1a, MIP-1b, MIP-3a, MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, eotaxina, I-TAC, e BCA-1, entre outras), assim como outras citocinas incluindo interferons tipo 1 (por exemplo, IFN- α e IFN- β), interferon tipo 2 (por exemplo, IFN- γ), fator-alfa de necrose tumoral (TNF- α), fator-beta do crescimento de transformação ("transforming growth factor-beta") (TGF- β), e vários fatores estimuladores de colônias (CSFs), incluindo GM-CSF, G-CSF, e M-CSF.

Também é fornecida uma composição que inclui um ORN imu-

noestimulador da invenção mais um ácido nucléico CpG imunoestimulador. Em uma modalidade, a composição é um conjugado do ORN imunoestimulador da invenção e do ácido nucléico CpG, por exemplo, um conjugado RNA:DNA. Em uma modalidade, a composição é uma mistura do ORN imunoestimulador da invenção e do ácido nucléico CpG, isto é, não é um conjugado RNA:DNA.

Um ácido nucléico CpG imunoestimulador conforme usado neste relatório refere-se a uma seqüência de DNA natural ou sintética que inclui um motivo CpG e que estimula a ativação ou a proliferação de células do sistema imunológico. Ácidos nucléicos CpG imunoestimuladores foram descritos em inúmeras patentes expedidas, pedidos de patente publicados, e outras publicações, incluindo as Patentes US N^{os} 6.194.388, 6.207.646, 6.214.806, 6.218.371, 6.239.116, e 6.339.068. Em uma modalidade, ao ácido nucléico CpG imunoestimulador é um oligodesoxinucleotídeo CpG (CpG ODN) de 6 - 100 nucleotídeos de comprimento. Em uma modalidade, o ácido nucléico CpG imunoestimulador é um oligodesoxinucleotídeo CpG (CpG ODN) de 8-40 nucleotídeos de comprimento.

Ácidos nucléicos CpG imunoestimuladores incluem diferentes classes de ácidos nucléicos CpG. Uma classe é potente para ativar células B, mas é relativamente fraca para induzir a ativação de IFN- α e de células NK; esta classe foi denominada classe B. Os ácidos nucléicos CpG da classe B tipicamente são totalmente estabilizados e incluem um dinucleotídeo CpG não metilado em certos contextos básicos preferidos. Vide, por exemplo, as Patentes US N^{os} 6.194.388, 6.207.646, 6.214.806, 6.218.371, 6.239.116, e 6.339.068. Uma outra classe é potente para induzir a ativação de IFN- α e de células NK mas é relativamente fraca para estimular células B; esta classe foi denominada classe A. Os ácidos nucléicos CpG da classe A tipicamente possuem uma seqüência contendo o dinucleotídeo fosfodiéster CpG palindrômico de pelo menos 6 nucleotídeos e uma seqüência poli-G estabilizada em uma das extremidades 5' e 3' ou em ambas. Vide, por exemplo, o pedido de patente internacional publicado WO 01/22990. Ainda uma outra classe de ácidos nucléicos, CpG ativa as células B e as células

NK e induz o IFN- α ; esta classe foi denominada classe C. Os ácidos nucléicos CpG da classe C, como caracterizados pela primeira vez, tipicamente são completamente estabilizados, incluem uma seqüência tipo classe B e um palíndromo ou quase palíndromo rico em GC. Esta classe foi descrita no
5 pedido de patente US publicado 2003/0148976, cujo conteúdo está aqui incorporado a título de referência.

Ácidos nucléicos CpG imunoestimuladores também incluem os chamados ácidos nucléicos CpG macios e semimacios, descritos no pedido de Patente US publicado 2003/0148976, cujo conteúdo está aqui incorpora-
10 do a título de referência. Tais ácidos nucléicos CpG imunoestimuladores macios e semi-macios incorporam uma combinação de ligações internucleotídicas resistentes à nuclease e sensíveis à nuclease, onde os diferentes tipos de ligação são posicionadas de acordo com certas regras.

Também é fornecida uma composição que inclui um ORN imunoestimulador da invenção mais um outro adjuvante, onde o outro adjuvante
15 é um lipopeptídeo tal como Pam3Cys, um polissacarídeo catiônico tal como quitosano, ou um peptídeo catiônico tal como protamina. Em uma modalidade, a composição é um conjugado do ORN imunoestimulador da invenção e do outro adjuvante.

20 A invenção em um aspecto fornece uma vacina que inclui um ORN imunoestimulador da invenção e um antígeno. Um "antígeno" conforme usado neste relatório refere-se a qualquer molécula capaz de reconhecerida por um receptor de antígeno de células T ou por um receptor de antígeno de células B. O termo inclui amplamente qualquer tipo de molécula que é
25 reconhecida por um sistema imunológico hospedeiro como sendo estranha. Antígenos geralmente incluem porém sem limitação células, extratos celulares, proteínas, polipeptídeos, peptídeos, polissacarídeos, conjugados de polissacarídeos, imitações peptídicas e não-peptídicas de polissacarídeos e outras moléculas, moléculas pequenas, lipídios, glicolipídios, polissacarí-
30 deos, carboidratos, vírus e extratos virais, e organismo multilcelulares tais como parasitas, e alérgenos. Quanto aos antígenos que são proteínas, polipeptídeos, ou peptídeos, tais antígeno podem incluir moléculas de ácidos

nucléicos codificando tais antígenos. Antígenos mais especificamente incluem, porém sem limitação, antígenos de câncer, que incluem células cancerosas e moléculas expressas em ou sobre células cancerosas; antígenos microbianos, que incluem micróbios e moléculas expressas em ou sobre micróbios; e alérgenos. Por conseguinte, a invenção em certas modalidades fornece vacinas para cânceres, agentes infecciosos, e alérgenos.

A invenção em um aspecto fornece um uso de um ORN imunostimulador da invenção para a preparação de um medicamento para vacinar um indivíduo.

10 A invenção em um aspecto fornece um método para preparar uma vacina. O método inclui a etapa de colocar um ORN imunostimulador da invenção em associação íntima com um antígeno e, opcionalmente, um veículo farmaceuticamente aceitável.

Em várias modalidades, o antígeno é um antígeno microbiano, um antígeno de câncer, ou um alérgeno. Um "antígeno microbiano" conforme usado neste relatório é um antígeno de um microorganismo e inclui porém sem limitação vírus, bactérias, parasitas, e fungos. Tais antígenos incluem o microorganismo intacto assim como isolados e fragmentos naturais ou derivados do mesmo e também compostos sintéticos que são idênticos ou similares a antígenos de microorganismo natural e induzem uma resposta imune específica para aquele microorganismo. Um composto é similar a um antígeno de microorganismo natural se ele induzir uma resposta imune (humoral e/ou celular) para um antígeno de microorganismo natural. Tais antígenos são rotineiramente usados na literatura e são bastante conhecidos pelos especialistas na técnica.

Vírus são agentes infecciosos pequenos que geralmente contêm um núcleo de ácido nucléico e um revestimento de proteína, mas não são organismos vivos independentes. Os vírus também podem assumir a forma de ácidos nucléicos infecciosos faltando uma proteína. Um vírus não pode sobreviver na ausência de uma célula viva onde ele possa se replicar. Os vírus entram em células vivas específicas seja por endocitose ou por injeção de DNA (fago) e se multiplicam, causando doença. O vírus multiplicado pode

então ser liberado e infectar células adicionais. Alguns vírus são vírus contendo DNA e outros são vírus contendo RNA. Em alguns aspectos, a invenção também se destina a tratar doenças nas quais prions estão envolvidos na progressão da doença tais como por exemplo, encefalopatia espongiforme bovina (isto é, doença da vaca louca, BSE) ou infecção priônica ("scrapie infection") em animais, ou doença de Creutzfeldt-Jakob em seres humanos.

Vírus incluem, porém sem limitação, enterovírus (incluindo, porém sem limitação, vírus da família *picornaviridae*, tais como vírus da poliomielite, vírus Coxsackie, echovírus), rotavírus, adenovírus, vírus da hepatite. Exemplos específicos de vírus que foram encontrados em seres humanos incluem porém sem limitação: *Retroviridae* (por exemplo, vírus da imunodeficiência humana, tais como HIV-1 (também chamado HTLV-III, LAV ou HTLV-III/LAV, ou HIV-III; e outros isolados, tais como HIV-LP; *Picornaviridae* (por exemplo, vírus da poliomielite, vírus da hepatite A; enterovírus, vírus Coxsackie humanos, rinovírus, echovírus); *Calciviridae* (por exemplo, cepas que causam gastroenterite); *Togaviridae* (por exemplo, vírus da encefalomielite eqüina, vírus da rubéola); *Flaviviridae* (por exemplo, vírus da dengue, vírus da encefalite, vírus da febre amarela); *Coronaviridae* (por exemplo, coronavírus); *Rhabdoviridae* (por exemplo, vírus da estomatite vesicular, vírus da raiva); *Filoviridae* (por exemplo, vírus Ebola); *Paramyxoviridae* (por exemplo, vírus parainfluenza, vírus da caxumba, vírus do sarampo, vírus sincicial respiratório); *Orthomyxoviridae* (por exemplo, vírus influenza); *Bunyaviridae* (por exemplo, vírus Hantaan, vírus Bunyamwera, flebovírus e vírus Nairo); *Arenaviridae* (vírus da febre hemorrágica); *Reoviridae* (por exemplo, reovírus, orbivírus e rotavírus); *Birnaviridae*; *Hepadnaviridae* (vírus da hepatite B); *Parvoviridae* (parvovírus); *Papovaviridae* (papilomavírus, vírus do políoma); *Adenoviridae* (a maioria dos adenovírus); *Herpesviridae* (vírus do herpes simples (HSV) 1 e 2, vírus varicela-zoster, citomegalovírus (CMV)); *Poxviridae* (vírus da varíola, vírus da vacínia, poxvírus); *Iridoviridae* (por exemplo, vírus da febre suína africana); e vírus não classificados (por exemplo, os agentes etiológicos de encefalopatias espongiformes, o agente da hepatite

delta (que se acredita ser um satélite defeituoso do vírus da hepatite B), os agentes da hepatite não-A, não-B (classe 1 = transmitida internamente; classe 2 = transmitida parenteralmente (isto é, hepatite C); e vírus Norwalk e vírus relacionados, e astrovírus).

5 Bactérias são organismos unicelulares que se multiplicam asse-
xuadamente por fissão binária. Elas são classificadas e denominadas se-
gundo sua morfologia, reações de coloração, exigências nutricionais e me-
tabólicas, estrutura antigênica, composição química, e homologia genética.
As bactérias podem ser classificadas em três grupos segundo suas formas
10 morfológicas, bastonete esférico (coco), bastonete reto (bacilo) e bastonete
encurvado ou espiral (vibrião, *Campylobacter*, espirilo, e espiroqueta). As
bactérias são mais comumente caracterizadas segundo suas reações de
coloração em duas classes de organismos, gram-positivos e gram-
negativos. Gram refere-se ao método de coloração que é comumente reali-
15 zado nos laboratórios de microbiologia. Os organismos gram-positivos retêm
o corante depois do procedimento de coloração e aparece uma cor violeta-
escuro. Os organismos gram-negativos não retêm o corante, mas absorvem
o contracorante e portanto aparece uma cor rosa.

Bactérias infecciosas incluem, porém sem limitação, bactérias
20 gram-negativas e bactérias gram-positivas. Bactérias gram-positivas inclu-
em, porém sem limitação, a espécie *Pasteurella*, a espécie *Staphylococci*, e
a espécie *Streptococcus*. Bactérias gram-negativas incluem, porém sem li-
mitação, *Escherichia coli*, a espécie *Pseudomonas*, e a espécie *Salmonella*.
Exemplos específicos de bactérias infecciosas incluem porém sem limita-
25 ção: *Helicobacter pylori*, *Borrelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, *My-
cobacteria sps* (por exemplo, *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M.
kansasii*, *M. gordonae*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*,
Neisseria meningitidis, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*
(*Streptococcus* Grupo A), *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* Grupo
30 B), *Streptococcus* (grupo viridans), *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus
bovis*, *Streptococcus* (espécie anaeróbica), *Streptococcus pneumoniae*,
Campylobacter sp. patogênico, *Enterococcus sp.*, *Haemophilus influenzae*,

Bacillus anthracis, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium sp.*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasturella multocida*, *Bacteroides sp.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Leptospira*, *Rickettsia*, e *Actinomyces israelii*.

Parasitas são organismos que dependem de outros organismos para sobreviver e portanto devem penetrar, ou infectar, um outro organismo para continuar seu ciclo de vida. O organismo infectado, isto é, o hospedeiro, oferece nutrição e habitat para o parasita. Embora em seu sentido mais amplo o termo parasita possa incluir todos os agentes infecciosos (isto é, bactérias, vírus, fungos, protozoários e helmintos), de um modo geral, o termo é usado para se referir apenas a protozoários, helmintos, e artrópodes ectoparasitários (por exemplo, carrapatos, ácaros etc.). Protozoários são organismos unicelulares que podem se replicar tanto intracelularmente quanto extracelularmente, em particular no sangue, no trato intestinal ou na matriz extracelular dos tecidos. Helmintos são organismos multicelulares que quase sempre são extracelulares (*Trichinella* spp. sendo uma exceção). Os helmintos normalmente requerem saída de um hospedeiro primário e transmissão para um segundo hospedeiro para replicar. Ao contrário destas classes acima mencionadas, os artrópodes ectoparasitários formam uma relação parasitária com a superfície externa do corpo do hospedeiro.

Parasitas incluem parasitas intracelulares e parasitas intracelulares obrigatórios. Exemplos de parasitas incluem, porém sem limitação *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium knowlesi*, *Babesia microti*, *Babesia divergens*, *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii*, *Trichinella spiralis*, *Leishmania major*, *Leishmania donovani*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania tropica*, *Trypanosoma gambiense*, *Trypanosoma rhodesiense* e *Schistosoma mansoni*.

Fungos são organismos eucarióticos, dos quais apenas alguns causam infecção em mamíferos vertebrados. Como os fungos são organismos eucarióticos, eles diferem significativamente das bactérias procarióticas em termos de tamanho, organização estrutural, ciclo de vida e mecanismo

de multiplicação. Os fungos geralmente são classificados segundo aspectos morfológicos, modos de reprodução e características de cultura. Embora os fungos causem diferentes tipos de doenças nos indivíduos, tais como alergias respiratórias subsequente à inalação de antígenos fúngicos, intoxicação fúngica devido à ingestão de substâncias tóxicas, tais como a toxina e a falotoxina de *Amanita phalloides* produzidas por cogumelos venenosos e aflatoxinas, produzidas por espécies de *Aspergillus*, nem todos os fungos causam doenças infecciosas.

Fungos infecciosos podem causar infecções sistêmicas ou superficiais. Infecção sistêmica primária pode ocorrer em indivíduos saudáveis normais, e infecções oportunistas são encontradas com mais frequência em indivíduos imunocomprometidos. Os agentes fúngicos mais comuns que causam infecção sistêmica primária incluem *Blastomyces*, *Coccidioides*, e *Histoplasma*. Os fungos comuns que causam infecção oportunística em indivíduos imunocomprometidos ou imunossuprimidos incluem, porém sem limitação, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, e várias espécies de *Aspergillus*. Infecções fúngicas sistêmicas são infecções invasivas dos órgãos internos. O organismo geralmente penetra no corpo através dos pulmões, do trato gastrointestinal, ou de cateteres intravenosos. Estes tipos de infecções podem ser causadas por fungos patogênicos primários ou por fungos oportunistas.

Infecções fúngicas superficiais envolvem o crescimento de fungos em uma superfície externa sem invasão dos tecidos internos. Infecções fúngicas superficiais típicas incluem infecções fúngicas cutâneas envolvendo a pele, o cabelo, ou as unhas.

Doenças associadas à infecção fúngica incluem aspergilose, blastomicose, candidíase, cromoblastomicose, coccidioidomicose, criptococose, infecções fúngicas dos olhos, infecções fúngicas do cabelo, das unhas, e da pele, histoplasmose, lobomicose, micetoma, otomicose, paracoccidioidomicose, *Penicillium marneffei* disseminado, feoifomicose, rinosporidiose, esporotricose, e zigomicose.

Outros microorganismos relevantes em termos médicos foram

extensivamente descritos na literatura, por exemplo, vide C.G.A Thomas, *Medical Microbiology*, Bailliere Tindall, Grã-Bretanha 1983, cujo conteúdo está aqui incorporado a título de referência. Cada uma das listas acima é ilustrativa e não pretende ser limitativa.

5 Conforme usado neste relatório, os termos "antígeno de câncer" e "antígeno tumoral" são usados alternadamente para se referir a um composto, tal como um peptídeo, uma proteína, ou uma glicoproteína, que é associado a uma célula tumoral ou cancerosa e que é capaz de provocar uma resposta imune quando expresso na superfície de uma célula apresentando o antígeno no contexto de uma molécula de complexo de histocompatibilidade maior (MHC). Antígenos de câncer que são diferencialmente expressos por células cancerosas e portanto podem ser explorados para atacar células cancerosas. Antígenos de câncer são antígenos que podem potencialmente estimular respostas imunes aparentemente específicas para tumor. Alguns destes antígenos são codificados, embora não necessariamente expressos, por células normais. Estes antígenos podem ser caracterizados como aqueles que são normalmente silenciosos (isto é, não expressos) em células normais, aqueles que são expressos apenas em certos estágios de diferenciação, e aqueles que são temporalmente expressos tais como antígenos embrionários e fetais. Outros antígenos de câncer são codificados por genes celulares mutantes, tais como oncogenes (por exemplo, oncogene *ras* ativado), genes supressores (por exemplo, p53 mutante), proteínas de fusão resultantes de deleções internas ou de translocações cromossômicas. Ainda outros antígenos de câncer podem ser codificados por genes virais tais como aqueles transportados em vírus tumorais de RNA e de DNA.

Antígenos de câncer podem ser preparados a partir de células cancerosas seja por preparação de extratos brutos de células cancerosas, por exemplo, como descrito em Cohen PA et al. (1994) *Cancer Res* 54:1055-8, por purificação parcial dos antígenos, por tecnologia recombinante, ou por síntese de novo de antígenos conhecidos. Antígenos de câncer incluem porém sem limitação antígenos que são expressos recombinante-

mente, uma porção imunogênica de, ou um tumor ou câncer inteiro ou uma célula do mesmo. Tais antígenos podem ser isolados ou preparados de forma recombinante ou por qualquer outro meio conhecido na literatura.

Exemplos de antígenos tumorais incluem MAGE, MART-
 5 1/Melano-A, gp100, dipeptidil peptidase IV (DPPIV), proteína fixadora de adenosina desaminase (ADA_{bp}), ciclofilina b, antígeno associado colorretal (CRC)--C017-1A/GA733, antígeno carcinoembrionário (CEA) e seus epítomos imunogênicos CAP-1 e CAP-2, etv6, aml1, antígeno específico para próstata (PSA) e seus epítos imunogênicos PSA-1, PSA-2, e PSA-3, antígeno mem-
 10 branoso específico para próstata (PSMA), receptor de células T/cadeia CD3-zeta, família MAGE de antígenos tumorais (por exemplo, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, MAGE-Xp2 (MAGE-B2), MAGE-Xp3 (MAGE-B3), MAGE-Xp4 (MAGE-B4), MAGE-C1, MAGE-C2,
 15 MAGE-C3, MAGE-C4, MAGE-C5), família GAGE de antígenos tumorais (por exemplo, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, GAGE-8, GAGE-9), BAGE, RAGE, LAGE-1, NAG, GnT-V, MUM-1, CDK4, tirosinase, p53, família MUC, HER2/neu, p21ras, RCAS1, α -fetoproteína, E-caderina, α -catenina, β -catenina e γ -catenina, p120ctn, gp100^{Pmel117},
 20 PRAME, NY-ESO-1, cdc27, proteína coli de polipose adenomatosa (APC), fodrina, Connexin 37, Ig-idiotipo, p15, gp75, gangliosídeos GM2 e GD2, produtos virais tais como proteínas do papilomavírus humano, família Smad de antígenos tumorais, Imp-1, P1A, antígeno nuclear codificado por EBV (EBNA)-1, glicogênio fosforilase cerebral, SSX-1, SSX-2 (HOM-MEL-40),
 25 SSX-1, SSX-4, SSX-5, SCP-1 e CT-7, e c-erbB-2. Esta lista não pretende ser limitativa.

Um "alérgeno" conforme usado neste relatório é uma molécula capaz de provocar uma resposta imune caracterizada pela produção de IgE. Um alérgeno também é uma substância que pode induzir uma resposta a-
 30 lérgica ou asmática em um indivíduo suscetível. Portanto, no contexto desta invenção, o termo alérgeno significa um tipo específico de antígeno que pode desencadear uma resposta alérgica que é mediada pelo anticorpo IgE.

A lista de alérgenos é enorme e pode incluir pólenes, venenos de inseto, pequenas escamas de animais, esporos fúngicos e fármacos (por exemplo, penicilina). Exemplos de alérgenos animais e vegetais naturais incluem proteínas específicas para os seguintes gêneros: Canis (*Canis familiaris*); Dermatophagoides (por exemplo, *Dermatophagoides farinae*); Felis (5 *Felis domesticus*); Ambrosia (*Ambrosia artemisiifolia*); Lolium (por exemplo, *Lolium perenne* e *Lolium multiflorum*); Cryptomeria (*Cryptomeria japonica*); Alternaria (*Alternaria alternata*); Alder; Alnus (*Alnus gultinosa*); Betula (*Betula verrucosa*); Quercus (*Quercus alba*); Olea (*Olea europa*); Artemisia (*Artemisia vulgaris*); Plantago (por exemplo, *Plantago lanceolata*); Parietaria (por 10 *Parietaria officinalis* e *Parietaria judaica*); Blattella (por exemplo, *Blattella germanica*); Apis (por exemplo, *Apis multiflorum*); Cupressus (por exemplo, *Cupressus sempervirens*, *Cupressus arizonica* e *Cupressus macrocarpa*); Juniperus (por exemplo, *Juniperus sabinoideis*, *Juniperus virginiana*, *Juniperus communis*, e *Juniperus ashei*); Thuya (por exemplo, *Thuya* 15 *orientalis*); Chamaecyparis (por exemplo, *Chamaecyparis obtusa*); Periplaneta (por exemplo, *Periplaneta americana*); Agropyron (por exemplo, *Agropyron repens*); Secale (por exemplo, *Secale cereale*); Triticum (por exemplo, *Triticum aestivum*); Dactylis (por exemplo, *Dactylis glomerata*); Festuca (por 20 *Festuca elatior*); Poa (por exemplo, *Poa pratensis* and *Poa compressa*); Avena (por exemplo, *Avena sativa*); Holcus (por exemplo, *Holcus lanatus*); Anthoxanthum (por exemplo, *Anthoxanthum odoratum*); Arrhenatherum (por exemplo, *Arrhenatherum elatius*); Agrostis (por exemplo, *Agrostis alba*); Phleum (por exemplo, *Phleum pratense*); Phalaris (por exemplo, 25 *Phalaris arundinacea*); Paspalum (por exemplo, *Paspalum notatum*); Sorghum (por exemplo, *Sorghum halepensis*); e Bromus (por exemplo, *Bromus inermis*).

A invenção em um aspecto fornece um conjugado de um ORN imunoestimulador da invenção e de um antígeno. Em uma modalidade, o 30 ORN imunoestimulador da invenção é covalentemente ligado ao antígeno. A ligação covalente entre o ORN imunoestimulador e o antígeno pode ser qualquer tipo adequado de ligação covalente, contanto que o ORN imuno-

timulador e o antígeno quando ligados desta maneira retenham atividade funcional mensurável de cada componente individual. Em uma modalidade, a ligação covalente é direta. Em uma outra modalidade, a ligação covalente é indireta, por exemplo, através de uma porção ligadora. O ORN imunoestimulador e o antígeno ligados covalentemente podem ser processados em uma célula para se soltarem. Desta maneira, a distribuição para uma célula de qualquer dos componentes pode ser aumentada se comparada com sua distribuição quando administrados como uma preparação separada ou como um componente separado. Em uma modalidade, o antígeno é um antígeno *per se*, isto é, ele é um antígeno pré-formado.

Em um aspecto, a invenção fornece uma composição farmacêutica que inclui uma composição da invenção, em associação com um veículo de distribuição. Em várias modalidades, o veículo de distribuição pode ser escolhido de um lipídio catiônico, um lipossoma, um cocleato, um virossoma, um complexo imunoestimulador (ISCOM), uma micropartícula, uma microesfera, uma nanoesfera, uma vesícula unilamelar (LUV), uma vesícula multilamelar, uma emulsão de óleo em água, uma emulsão de água em óleo, uma emulsoma, e um peptídeo poliacetônico, e, opcionalmente, um veículo farmacêuticamente aceitável. Veículos farmacêuticamente aceitáveis estão discutidos abaixo. A composição farmacêutica da invenção opcionalmente pode incluir ainda um antígeno. A composição da invenção, junto com o antígeno quando presente, é colocado em associação física com o veículo de distribuição usando qualquer método adequado. A composição imunoestimuladora pode estar contida no veículo de distribuição, ou pode estar presente em uma superfície do veículo de distribuição exposta a um solvente ou pode estar associado a tal superfície. Em uma modalidade, o ORN imunoestimulador está presente em uma superfície do veículo de distribuição exposta a um solvente ou está associado a tal superfície, e o antígeno, se presente, está contido no veículo de distribuição. Em uma outra modalidade, tanto o ORN imunoestimulador como o antígeno estão presentes em uma superfície do veículo de distribuição exposta a um solvente ou estão associados a tal superfície. Em ainda uma outra modalidade, o anti-

geno em uma superfície do veículo de distribuição exposta a um solvente ou está associado a tal superfície, e o ORN imunoestimulador está contido no veículo de distribuição. Em ainda uma outra modalidade, tanto o ORN imunoestimulador como o antígeno, se algum antígeno estiver incluído, estão
5 contidos no veículo de distribuição.

A invenção também fornece métodos para uso das composições imunoestimuladoras da invenção. Em um aspecto, a invenção fornece um método para ativar uma célula imune. O método de acordo com este aspecto da invenção inclui a etapa de contatar uma célula imune, *in vitro* ou *in vi-*
10 vo, com uma quantidade eficaz de uma composição da invenção, para ativar a célula imune. A composição da invenção pode opcionalmente incluir um antígeno. Uma "célula imune" conforme usado neste relatório refere-se a qualquer célula derivada da medula óssea que pode participar em uma resposta imune inata ou adaptativa. Células do sistema imunológico incluem,
15 sem limitação, células dendríticas (DC), células exterminadoras naturais (NK), monócitos, macrófagos, granulócitos, linfócitos B, células plasmáticas, linfócitos T, e células precursoras dos mesmos.

Conforme usado neste relatório, o termo "quantidade eficaz" refere-se à quantidade de uma substância que é necessária ou suficiente
20 para provocar um efeito biológico desejado. Uma quantidade eficaz pode mas não precisa ser limitada a uma quantidade administrada em uma única administração.

Conforme usado neste relatório, o termo "ativar uma célula imune" refere-se a induzir uma célula imune a entrar em um estado ativado que
25 é associado a uma resposta imune. O termo "ativar uma célula imune" refere-se tanto a induzir como a aumentar uma resposta imune. Conforme usado neste relatório, o termo "resposta imune" refere-se a qualquer aspecto de uma resposta imune inata ou adaptativa que reflete a ativação de célula imune para proliferar, realizar uma função imune efetora, ou produzir um
30 produto gênico envolvido em uma resposta imune. Produtos gênicos envolvidos em uma resposta imune podem incluir produtos secretados (por exemplo, anticorpos, citocinas, e quimiocinas) assim como moléculas da su-

perfície intracelular e celular características de função imune (por exemplo, certos antígenos de agrupamento de diferenciação (CD), fatores de transcrição, e transcritos gênicos). O termo "resposta imune" pode ser aplicado a uma célula individual ou a uma população de células.

5 A produção de citocinas pode ser avaliada por qualquer um de vários métodos bastante conhecidos na literatura, que incluem ensaios de resposta biológica, ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA), análise por classificação de células ativadas pressão reduzida fluorescência intracelular (FACS), e reação de cadeia de transcriptase reversa/polimerase
10 (RT-PCR).

Em uma modalidade, a resposta imune envolve a produção de uma resposta imune de citocina pró-inflamatória. Uma resposta imune de citocina pró-inflamatória pode incluir a expressão de qualquer uma de determinadas citocinas e quimiocinas, que incluem IFN- γ , TNF- α , IL-12, IL-10, IL-
15 6, e qualquer combinação das mesmas. Ela exclui especificamente IFN- α para os propósitos da invenção.

Em uma modalidade, a resposta imune envolve a supra-regulação de marcadores de superfície celular da ativação de células imunes, tais como CD25, CD80, CD86, e CD154. Métodos para medir a expressão
20 de superfície celular de tais marcadores são bastante conhecidos na literatura e incluem análise por FACS.

Para medir a resposta imune em uma célula ou população de células, em uma modalidade, a célula ou população de células expressa TLR8. A célula pode expressar o TLR naturalmente, ou ela pode ser manipulada para expressar o TLR através da introdução na célula de um vetor de
25 expressão adequado para o TLR. Em uma modalidade, a célula ou população de células é obtida como células mononucleares de sangue periférico (PBMC). Em uma modalidade, a célula ou população de células é obtida como uma linhagem celular expressando o TLR. Em uma modalidade, a célula ou população de células é obtida como um transfectante transitório expressando o TLR. Em uma modalidade, a célula ou população de células é
30 obtida como um transfectante estável expressando o TLR.

Também para uso na medição de uma resposta imune em uma célula ou população de células, pode ser conveniente introduzir na célula ou população de células uma construção repórter que é sensível à sinalização intracelular por um TLR. Em uma modalidade, tal repórter é um gene colocado sob o controle de um promotor para NF-kB. Em uma modalidade, gene colocado sob controle do promotor é luciferase. Em condições de ativação adequadas, a construção repórter de luciferase é expressa e emite um sinal luminoso detectável que pode ser medido quantitativamente usando um luminômetro. Tais construções repórteres e outros constructos repórteres adequados encontram-se comercialmente disponíveis.

A invenção também contempla o uso de métodos livres de células para detectar a ativação de TLR.

A invenção em certos aspectos refere-se a composições e métodos para uso em terapia. As composições imunoestimuladoras da invenção podem ser usadas isoladas ou combinadas com outros agentes terapêuticos. A composição imunoestimuladora e o outro agente terapêutico podem ser administrados simultaneamente ou seqüencialmente. Quando a composição imunoestimuladora da invenção e o outro agente terapêutico são administrados simultaneamente, eles podem ser administrados na mesma formulação ou em formulações separadas, mas eles são administrados ao mesmo tempo. Além disso, quando a composição imunoestimuladora da invenção e o outro agente terapêutico são administrados simultaneamente, eles podem ser administrados pela mesma via de administração ou por vias de administração separadas, mas eles são administrados ao mesmo tempo. A composição imunoestimuladora da invenção e um outro agente terapêutico da invenção são administrados seqüencialmente quando a administração da composição imunoestimuladora da invenção é temporalmente separada da administração do outro agente terapêutico. A separação no tempo entre a administração destes compostos pode ser uma questão de minutos ou pode ser mais longa. Em uma modalidade, a composição imunoestimuladora da invenção é administrada antes da administração do outro agente terapêutico. Em uma modalidade, a composição imunoestimuladora

da invenção é administrada depois da administração do outro agente terapêutico. Além disso, quando a composição imunoestimuladora da invenção e o outro agente terapêutico são administrados seqüencialmente, eles podem ser administrados pela mesma via de administração ou por vias de administração separadas. Outros agentes terapêuticos incluem, porém sem limitação adjuvantes, antígenos, vacinas, e medicamentos úteis para o tratamento de infecção, câncer, alergia, e asma.

Em um aspecto, a invenção fornece um método para vacinar uma indivíduo. O método de acordo com este aspecto da invenção inclui a etapa de administrar ao indivíduo um antígeno e uma composição da invenção. Em uma modalidade, a administração do antígeno incluir administrar um ácido nucléico codificando o antígeno.

Um "indivíduo" conforme usado neste relatório refere-se a um animal vertebrado. Em várias modalidades o indivíduo é um ser humano, um primata não humano, ou outro mamífero. Em certas modalidades o indivíduo é um camundongo, rato, porquinho-da-índia, coelho, gato, cachorro, porco, carneiro, cabra, vaca, ou cavalo.

Para uso no método de vacinação de um indivíduo, a composição da invenção em uma modalidade, inclui um antígeno. O antígeno pode ser separado a um ORN da invenção ou covalentemente ligado ao mesmo. Em uma modalidade, a composição da invenção não inclui o antígeno. Nesta modalidade, o antígeno pode ser administrado ao indivíduo seja separadamente da composição da invenção, ou junto com a composição da invenção. A administração que é separada inclui separada no tempo, separada em localização ou via de administração, ou separada tanto no tempo como em localização ou via de administração. Quando a composição da invenção e o antígeno são administrados separados no tempo, o antígeno pode ser administrado antes ou depois da composição. Em uma modalidade, o antígeno é administrados 48 horas a 4 semanas depois da administração da composição da invenção. O método também contempla a administração de uma ou mais doses de reforço do antígeno isolado, da composição isolada, ou do antígeno e da composição, subsequente a uma administração inicial

de antígeno e composição.

A invenção também contempla que um indivíduo pode ser preparado para um futuro encontro com um antígeno desconhecido administrando ao indivíduo uma composição da invenção, onde a composição não
5 inclui um antígeno. De acordo com esta modalidade, o sistema imunológico do indivíduo é preparado para produzir uma resposta mais vigorosa a um antígeno que será posteriormente enfrentado pelo indivíduo, por exemplo, através de exposição ambiental ou ocupacional. Tal método pode ser usado, por exemplo, por viajantes, profissionais da área médica, e soldados que
10 provavelmente venham a ser expostos a agentes microbianos.

Em um aspecto, a invenção fornece um método para tratar um indivíduo que tenha uma deficiência do sistema imunológico. O método de acordo com este aspecto da invenção inclui a etapa de administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de uma composição da invenção para tratar o
15 indivíduo. Uma "deficiência do sistema imunológico" conforme usado neste relatório refere-se a uma capacidade anormalmente reduzida de um sistema imunológico para produzir uma resposta imune a um antígeno. Em uma modalidade, uma deficiência do sistema imunológico é uma doença ou distúrbio no qual o sistema imunológico do indivíduo não está funcionando com sua
20 capacidade normal ou no qual seria útil reforçar a resposta imune do indivíduo, por exemplo, para eliminar um tumor ou câncer ou uma infecção no indivíduo. Um "indivíduo tendo uma deficiência imunológica" conforme usado neste relatório refere-se a um indivíduo no qual existe uma capacidade reduzida do sistema imunológico do indivíduo para produzir uma resposta
25 imune a um antígeno. Indivíduos com uma deficiência imunológica incluem indivíduos com uma deficiência imunológica adquirida assim como indivíduos com uma deficiência congênita do sistema imunológico. Indivíduos com deficiência imunológica adquirida incluem, sem limitação, indivíduos com uma condição inflamatória crônica, indivíduos com insuficiência renal
30 crônica ou insuficiência renal, indivíduos com infecção, indivíduos com câncer, indivíduos recebendo fármacos imunossupressores, indivíduos recebendo outro tratamento imunossupressor, e indivíduos com desnutrição. Em

uma modalidade, o indivíduo tem uma população reduzida de células T CD4+. Em uma modalidade, o indivíduo tem uma infecção com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) ou tem síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). O método de acordo com este aspecto da invenção fornece portanto um método para reforçar uma resposta imune ou reforçar a capacidade de produzir uma resposta imune em um indivíduo com necessidade de uma resposta imune mais vigorosa.

As composições e os métodos da invenção podem ser usados isolados ou junto com outros agentes e métodos úteis no tratamento de infecções. Em um aspecto, a invenção fornece um método para tratar um indivíduo que tenha uma infecção. O método de acordo com este aspecto da invenção inclui a etapa de administrar a um indivíduo tendo uma infecção uma quantidade eficaz da composição da invenção para tratar o indivíduo.

Em um aspecto, a invenção fornece um método para tratar um indivíduo que tenha uma infecção. O método de acordo com este aspecto da invenção inclui a etapa de administrar a um indivíduo tendo uma infecção uma quantidade eficaz da composição da invenção e um medicamento contra infecção para tratar o indivíduo.

Em um aspecto, a invenção fornece o uso de um ORN imunoestimulador da invenção para a preparação de um medicamento para tratar uma infecção em um indivíduo.

Em um aspecto, a invenção fornece uma composição útil para o tratamento de infecção. A composição de acordo com este aspecto inclui um ORN imunoestimulador da invenção e um medicamento contra infecção.

Conforme usado neste relatório, o termo "tratar" conforme usado em relação a um indivíduo tendo uma doença ou condição significa prevenir, melhorar, ou eliminar pelo menos um sinal ou sintoma da doença ou condição no indivíduo.

Um "indivíduo com uma infecção" é um indivíduo que tem um distúrbio proveniente da invasão do indivíduo, superficialmente, topicamente, ou sistemicamente, por um microorganismo infeccioso. O organismo infeccioso pode ser um vírus, uma bactéria, um fungo ou um parasita, como

descrito acima.

Medicamentos contra infecção incluem, porém sem limitação agentes antibacterianos, agentes antivirais, agentes antifúngicos e agentes antiparasitários. Expressões tais como "agente anti-infeccioso", "antibiótico",
5 "agente antibacteriano", "agente antiviral", "agente antifúngico", "agente antiparasitário" e "parasiticida" possuem significados bem estabelecidos para os especialistas na técnica e encontram-se definidos em livros médicos. Em resumo, agentes antibacterianos eliminam ou inibem bactérias, e incluem antibióticos assim como outros compostos sintéticos ou naturais com fun-
10 ções similares. Agentes antivirais podem ser isolados de fontes naturais ou podem ser sintetizados e são úteis para eliminar ou inibir vírus. Agentes antifúngicos são usados para tratar infecções fúngicas superficiais assim como infecções fúngicas oportunistas e sistêmicas primárias. Agentes antiparasitários eliminam ou inibem parasitas. Muitos antibióticos são moléculas de
15 baixo peso molecular que são produzidas como metabólitos secundários por células, tais como microorganismos. Em geral, os antibióticos interferem em uma ou mais funções ou estruturas que são específicas para o microorganismo e que não estão presentes nas células hospedeiras.

Um dos problemas com as terapias anti-infecciosas é os proble-
20 mas colaterais que ocorrem no hospedeiro que é tratado com o agente anti-infeccioso. Por exemplo, muitos agentes anti-infecciosos podem eliminar ou inibir um amplo espectro de microorganismos e não são específicos para um tipo particular de espécie. O tratamento com estes tipos de agentes anti-infecciosos resulta na eliminação da flora microbiana normal que vive no hos-
25 pedeiro, assim como do microorganismo infeccioso. A perda da flora microbiana pode levar a complicações patológicas e predispor o hospedeiro à infecção por outros patógenos, uma vez que a flora microbiana compete com patógenos infecciosos e funciona como barreiras para patógenos infecciosos. Podem surgir outros efeitos colaterais como resultado dos efeitos espe-
30 cíficos ou inespecíficos destas entidades químicas nas células ou tecidos não microbianos do hospedeiro.

Um outro problema com o uso difundido de anti-infecciosos é o

desenvolvimento de cepas resistentes a antibióticos dos microorganismos. Cepas de enterococos resistentes à vancomicina, pneumococos resistentes à penicilina, *S. aureus* multirresistentes, e tuberculose multirresistentes já se desenvolveram e estão se tornando problemas clínicos importantes. O uso

5 difundido de anti-infecciosos certamente vai produzir muitas cepas de bactérias resistentes a antibióticos. Como resultando, serão necessárias novas estratégias anti-infecciosas para combater estes microorganismos.

Antibióticos antibacterianos que são eficazes para eliminar ou inibir uma ampla gama de bactérias são denominados antibióticos de amplo

10 espectro. Outros tipos de antibióticos antibacterianos são predominantemente eficazes contra as bactérias da classe gram-positiva ou gram-negativa. Estes tipos de antibióticos são denominados antibióticos de pequeno espectro. Outros antibióticos que são eficazes contra um único organismo ou doença e não contra outros tipos de bactérias são denominados antibióticos de

15 espectro limitado.

Os agentes antibacterianos às vezes são classificados segundo seu modo primário de ação. Em geral, os agentes antibacterianos são inibidores da síntese da parede celular, inibidores da membrana celular, inibidores da síntese de proteínas, inibidores da síntese de ácidos nucleicos ou

20 inibidores funcionais de ácidos nucleicos, e inibidores competitivos. Inibidores da síntese da parede celular inibem uma etapa no processo de síntese da parede celular, e em geral na síntese de peptidoglicano bacteriano. Inibidores da síntese da parede celular incluem antibióticos do tipo β -lactama, penicilinas naturais, penicilinas semi-sintéticas, ampicilina, ácido clavulânico,

25 cefalosporinas, e bacitracina.

As β -lactamas são antibióticos contendo um anel β -lactama de quatro membros que inibe a última etapa da síntese de peptidoglicano. Antibióticos do tipo β -lactama podem ser sintetizados ou naturais. Os antibióticos do tipo β -lactama produzidos pelo *penicillium* são penicilinas naturais,

30 tais como penicilina G ou penicilina V. Estes são produzidos por fermentação de *Penicillium chrysogenum*. As penicilinas naturais possuem um espectro de atividade pequeno e geralmente são eficazes contra *Streptococcus*,

Gonococcus, e *Staphylococcus*. Outros tipos de penicilinas naturais, que também são eficazes contra bactérias gram-positivas, incluem as penicilinas F, X, K, e O.

penicilinas semi-sintéticas geralmente são modificações da molécula ácido 6-aminopenicilânico produzida por um bolor. O ácido 6-aminopenicilânico pode ser modificado pela adição de cadeias laterais que produzem penicilinas com espectros de atividade mais amplos que as penicilinas naturais ou várias outras propriedades vantajosas. Alguns tipos de penicilinas semi-sintéticas possuem amplos espectros contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, mas são inativadas pela penicilinase. Estas penicilinas semi-sintéticas incluem ampicilina, carbenicilina, oxacilina, azlocilina, mezlocilina, e piperacilina. Outros tipos de penicilinas semi-sintéticas possuem atividades menores contra bactérias gram-positivas, mas desenvolveram propriedades tais que elas não são inativadas pela penicilinase. Estas incluem, por exemplo, meticilina, dicloxacilina, e nafcilina. Algumas das penicilinas semi-sintéticas de amplo espectro podem ser usadas em combinação com inibidores de β -lactamase, tais como ácidos clavulânicos e sulbactama. Os inibidores de β -lactamase não possuem ação antimicrobiana mas eles funcionam para inibir a penicilinase, dessa forma protegendo a penicilina semi-sintética contra degradação.

Um outro tipo de antibiótico do tipo β -lactama são as cefalosporinas. Elas são sensíveis à degradação por β -lactamases bacterianas, e portanto, nem sempre são eficazes isoladas. As cefalosporinas, no entanto, são resistentes à penicilinase. Elas são eficazes contra uma variedade de bactérias gram-positivas e gram-negativas. Cefalosporinas incluem, porém sem limitação, cefalotina, cefapirina, cefalexina, cefamandol, cefaclor, cefazolina, cefuroxina, cefoxitina, cefotaxima, cefsulodina, cefetamet, cefixima, ceftriaxona, cefoperazona, ceftazidina e moxalactama.

Bacitracina é uma outra classe de antibióticos que inibem a síntese da parede celular, inibindo a liberação de subunidades muopeptídicas ou de peptidoglicano da molécula que distribui a subunidade para o exterior da membrana. Embora a bacitracina seja eficaz contra bactérias gram-

positivas, seu uso em geral é limitado à administração tópica por causa de sua alta toxicidade.

Carbapenemas são um outro antibiótico do tipo β -lactama de amplo espectro, que é capaz de inibir a síntese da parede celular. Exemplos de carbapenemas incluem, porém sem limitação, imipenemas. Monobactamas também são antibióticos do tipo β -lactama de amplo espectro, e incluem euztreonam. Um antibiótico produzido por *Streptomyces*, vancomicina, também é eficaz contra bactérias gram-positivas inibindo a síntese da parede celular.

Uma outra classe de agentes antibacterianos são os agentes antibacterianos que são inibidores da membrana celular. Estes compostos desorganizam a estrutura ou inibem a função de membranas bacterianas. Um problema com os agentes antibacterianos que são inibidores de membrana celular é que eles podem produzir efeitos em células eucarióticas assim como em bactérias por causa das semelhanças em fosfolipídios nas membranas bacterianas e eucarióticas. Portanto estes compostos raramente são suficientemente específicos para permitir que estes compostos sejam usados sistemicamente e prevenir o uso de doses altas para administração local.

Um inibidor de membrana celular clinicamente útil é Polymyxin. O Polymyxin interfere na função da membrana fixando fosfolipídios à membrana. O Polymyxin é eficaz principalmente contra bactérias gram-negativas e geralmente é usado em infecções severas por *Pseudomonas* ou em infecções por *Pseudomonas* que são resistentes a antibióticos menos tóxicos. Os severos efeitos colaterais associados à administração sistêmica deste composto incluem lesões no rim e em outros órgãos.

Outros inibidores de membrana celular incluem anfotericina B e nistatina que são agentes antifúngicos usados predominantemente no tratamento de infecções fúngicas sistêmicas e infecções pela levedura *Candida*. Imidazóis são uma outra classe de antibiótico que é um inibidor de membrana celular. Os imidazóis são usados como agentes antibacterianos e também como agentes antifúngicos, por exemplo, usados para o trata-

mento de infecções por levedura, infecções dermatofíticas, e infecções fúngicas sistêmicas. Imidazóis incluem porém sem limitação clotrimazol, miconazol, cetoconazol, itraconazol, e fluconazol.

Muitos agentes antibacterianos são inibidores da síntese de proteínas. Estes compostos impedem que as bactérias sintetizem proteínas e enzimas estruturais e dessa forma causam a inibição do crescimento ou da função de células bacterianas ou morte celular. Em geral, estes compostos interferem nos processos de transcrição ou translação. Agentes antibacterianos que bloqueiam a transcrição incluem, porém sem limitação rifampinas e etambutol. Rifampinas, que inibem a enzima RNA polimerase, possuem um amplo espectro de atividade e são eficazes contra bactérias gram-positivas e gram-negativas e também contra *Mycobacterium tuberculosis*. Etambutol é eficaz contra *Mycobacterium tuberculosis*.

Agentes antibacterianos que bloqueiam a translação interferem nos ribossomos bacterianos para impedir que mRNA seja traduzido para proteínas. Em geral, esta classe de compostos inclui porém sem limitação tetraciclínas, cloranfenicol, os macrolídeos (por exemplo, eritromicina) e os aminoglicosídeos (por exemplo, estreptomicina).

Os aminoglicosídeos são uma classe de antibióticos que são produzidos pela bactéria *Streptomyces*, tais como, por exemplo, estreptomicina, canamicina, tobramicina, amicacina, e gentamicina. Aminoglicosídeos vêm sendo usados contra uma ampla variedade de infecções bacterianas causadas por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A estreptomicina vem sendo bastante usada como um fármaco primário no tratamento de tuberculose. A gentamicina é usada contra muitas cepas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, que incluem infecções por *Pseudomonas*, especialmente em combinação com tobramicina. A canamicina é usada contra muitas bactérias gram-positivas, inclusive *Staphylococci* resistentes à penicilina. Um efeito colateral dos aminoglicosídeos que limitou seu uso clínico e que nas dosagens que são essenciais para eficácia, o uso prolongado mostrou prejudicar a função hepática e causar danos aos nervos auditivos levando à surdez.

Um outro tipo de agente antibacteriano inibidor da translação são as tetraciclina. As tetraciclina são uma classe de antibióticos que são de amplo espectro e são eficazes contra uma variedade de bactérias gram-positivas e gram-negativas. Exemplos de tetraciclina incluem tetraciclina, minociclina, doxiciclina, e clortetraciclina. Elas são importantes para o tratamento de muitos tipos de bactérias mas são particularmente importantes no tratamento da doença de Lyme. Como resultado de sua baixa toxicidade e efeitos colaterais diretos mínimos, as tetraciclina vêm sendo usadas com exagero e de forma errada pela comunidade médica, levando a problemas. Por exemplo, seu uso abusivo levou a um grande desenvolvimento de resistência.

Agentes antibacterianos tais como os macrolídeos se ligam de forma irreversível à subunidade ribossômica 50 S e inibem o alongamento da proteína pela peptidil transferase ou impedem a liberação da tRNA não carregado do ribossoma bacteriano ou ambos. Estes compostos incluem eritromicina, roxitromicina, oleandomicina, e azitromicina. A eritromicina é ativa contra a maioria das bactérias Gram-positivas, *Neisseria*, *Legionella* e *Haemophilus*, mas não contra as *Enterobacteriaceae*. Lincomicina e clindamicina, que bloqueiam a formação de ligação peptídica durante a síntese de proteínas, são usadas contra bactérias gram-positivas.

Um outro tipo de inibidor de translação é cloranfenicol. O cloranfenicol se liga ao ribossoma 70 S inibindo a enzima bacteriana peptidil transferase dessa forma impedindo o crescimento da cadeia polipeptídica durante a síntese de proteínas. Um grave efeito colateral associado ao cloranfenicol é a anemia aplásica. A anemia aplásica desenvolve-se a doses de cloranfenicol que são eficazes para tratar bactérias em uma pequena proporção (1/50.000) de pacientes. O cloranfenicol que já foi um antibiótico bastante prescrito é agora usado raramente como resultado das mortes por anemia. Devido a sua eficácia ele ainda é usado em situações de risco de vida (por exemplo, febre tifóide).

Alguns agentes antibacterianos interrompem a síntese ou a função de ácidos nucleicos, por exemplo, se ligam ao DNA ou RNA de modo

que suas mensagens não podem ser lidas. Estes incluem, porém sem limitação quinolonas e co-trimoxazol, ambos produtos químicos sintéticos, e rifamicinas, um produto químico natural ou semi-sintético. As quinolonas bloqueiam a replicação de DNA bacteriano inibindo a DNA girase, a enzima necessária por bactérias para produzir seu DNA circular. Elas são de amplo espectro e exemplos incluem norfloxacin, ciprofloxacina, enoxacin, ácido nalidíxico e temafloxacina. O ácido nalidíxico é um agente bactericida que se liga à enzima DNA girase (topoisomerase) que é essencial para a replicação de DNA e permite que as superespirais sejam relaxadas e reformadas, inibindo a atividade de DNA girase. O principal uso do ácido nalidíxico é no tratamento de infecções do trato urinário inferior (UTI) porque ele é eficaz contra vários tipos de bactérias gram-negativas tais como as espécies *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *K. pneumoniae* *Proteus* que são causas comuns de UTI. O co-trimoxazol é uma combinação de sulfametoxazol e trimetoprima, que bloqueia a síntese bacteriana do ácido fólico necessário para fazer DNA nucleotídeos. Rifampicina é um derivado de rifamicina que é ativo contra bactérias gram-positivas (incluindo *Mycobacterium tuberculosis* e meningite causada por *Neisseria meningitidis*) e algumas bactérias gram-negativas. A rifampicina se liga à subunidade beta da polimerase e bloqueia a adição do primeiro nucleotídeo que é necessário para ativar a polimerase, dessa forma bloqueando a síntese de mRNA.

Uma outra classe de agentes antibacterianos são compostos que funcionam como inibidores competitivos de enzimas bacterianas. Os inibidores competitivos são quase todos estruturalmente similares a um fator de crescimento bacteriano e competem pela ligação mas não desempenham a função metabólica na célula. Estes compostos incluem sulfonamidas e formas quimicamente modificadas de sulfanilamida que possuem atividade antibacteriana ainda mais alta e mais ampla. As sulfonamidas (por exemplo, gantrisin e trimetoprima) são úteis para o tratamento de *Streptococcus pneumoniae*, *streptococci* beta-hemolíticos e *E. coli*, e são usados no tratamento de UTI sem complicações causadas por *E. coli*, e no tratamento de meningite meningocócica.

Agentes antivirais são compostos que previnem a infecção de células por vírus ou a replicação do vírus dentro da células. Existem muito menos fármacos antivirais do que fármacos antibacterianos porque o processo de replicação viral é tão relacionado à replicação de DNA no interior da célula hospedeira, que agentes antivirais inespecíficos geralmente seriam tóxicos para o hospedeiro. Há vários estágios no processo de infecção viral que podem ser bloqueados ou inibidos por agentes antivirais. Estes ensaios incluem fixação do vírus à célula hospedeira (imunoglobulina ou peptídeos fixadores), remoção do revestimento do vírus (por exemplo, amantadina), síntese ou translação do mRNA viral (por exemplo, interferon), replicação do RNA ou DNA viral (por exemplo, análogos nucleosídicos), maturação de novas proteínas do vírus (por exemplo, inibidores de protease), e germinação e liberação do vírus.

Uma outra categoria de agentes antivirais são análogos nucleosídicos. Análogos nucleosídicos são compostos sintéticos que são similares a nucleosídeos, mas que têm um grupo desoxirribose ou ribose incompleto ou anormal. Depois que os análogos nucleosídicos estão na célula, eles são fosforilados, produzindo a forma trifosfato que compete com nucleotídeos normais pela incorporação no DNA ou RNA viral. Depois que a forma trifosfato do análogo nucleosídico é incorporada na cadeia de ácidos nucléicos em desenvolvimento, ela causa associação irreversível com a polimerase viral e assim terminação de cadeia. Análogos nucleosídicos incluem, porém sem limitação, acyclovir (usado para o tratamento do vírus do herpes simples e do vírus varicela-zoster), gancyclovir (útil para o tratamento do citomegalovírus), idoxuridina, ribavirina (útil para o tratamento do vírus sincicial respiratório), didesoxiinosina, didesoxicitidina, e zidovudina (azidotimidina).

Uma outra classe de agentes antivirais inclui citocinas tais como interferons. Os interferons são citocinas que são secretadas por células infectadas por vírus assim como por células imunes. Os interferons funcionam ligando-se a receptores específicos nas células adjacentes às células infectadas, causando a alteração na célula que a protege contra infecção pelo vírus. α e β -interferons também induzem a expressão de moléculas MHC

Classe I e Classe II na superfície de células infectadas, resultando em apresentação aumentada de antígeno para reconhecimento da célula imune hospedeira. α e β -interferons estão disponíveis como formas recombinantes e são usados para o tratamento de infecção crônica por hepatite B e C. Nas
5 dosagens que são eficazes para terapia antiviral, os interferons têm efeitos colaterais severos tais como febre, mal-estar e perda de peso.

A terapia com imunoglobulina é usada para a prevenção de infecção viral. A terapia com imunoglobulina para infecções virais é diferente daquela para infecções bacterianas, porque em vez de ser específica para
10 antígeno, a terapia com imunoglobulina funciona ligando-se a vírions extracelulares e impedindo-os de se fixarem e entrarem nas células que são suscetíveis à infecção viral. A terapia é útil para a prevenção de infecção viral pelo período de tempo em que os anticorpos estiverem presentes no hospedeiro. Em geral, existem dois tipos de terapias com imunoglobulina, a terapia
15 com imunoglobulina normal e a terapia com hiperimunoglobulina. A terapia com imunoglobulina normal utiliza um produto de anticorpo que é preparado a partir do soro de doadores de sangue normal e reunidos. Este produto reunido contém dois títulos de anticorpo para uma ampla gama de vírus humanos, tais como hepatite A, parvovírus, enterovírus (especialmente em recém-nascidos). A terapia com hiper-imunoglobulina utiliza anticorpos que
20 são preparados a partir do soro de indivíduos que têm títulos altos de um anticorpo para um vírus particular. Esses anticorpos são então usados contra um vírus específico. Exemplos de hiper-imunoglobulinas incluem imunoglobulina do zoster (útil para a prevenção de varicela em crianças e recém-nascidos imunocomprometidos), imunoglobulina da raiva humana (útil na
25 profilaxia pós-exposição de um indivíduo mordido por um animal raivoso), imunoglobulina da hepatite B (útil na prevenção do vírus da hepatite B, especialmente em um indivíduo exposto ao vírus), e imunoglobulina de RSV (útil no tratamento de infecções pelo vírus sincicial respiratório).

30 Agentes antifúngicos são úteis para o tratamento e a prevenção de fungos infecciosos. Os agentes antifúngicos às vezes são classificados por seu mecanismo de ação. Alguns agentes antifúngicos funcionam como

inibidores da parede celular inibindo a glicose sintase. Estes incluem, porém sem limitação, basiungina/ECB. Outros agentes antifúngicos funcionam desestabilizando a integridade da membrana. Estes incluem, porém sem limitação, imidazóis, tais como clotrimazol, sertaconazol, fluconazol, itraconazol, cetoconazol, miconazol, e voriconazol, assim como FK 463, anfotericina B, BAY 38-9502, MK 991, pradimicina, UK 292, butenafina, e terbinafina. Outros agentes antifúngicos funcionam destruindo a quitina (por exemplo, quitinase) ou a imunossupressão (creme 501).

Parasiticidas são agentes que eliminam parasitas diretamente.

- 10 Tais compostos são conhecidos na literatura e geralmente encontram-se comercialmente disponíveis. Exemplos de parasiticidas úteis para administração humana incluem, porém sem limitação albendazol, anfotericina B, benznidazol, bitionol, cloroquina HCl, fosfato de cloroquina, clindamicina, desidroemetina, dietilcarbamazina, furoato de diloxanida, eflornitina, furazolidona, glucocorticóides, halofantrina, iodoquinol, ivermectina, mebendazol, mefloquina, antimoniatto de meglumina, melarsoprol, metrifonato, metronidazol, niclosamida, nifurtimox, oxamniquina, paromomicina, isetionato de pentamidina, piperazina, praziquantel, fosfato de primaquina, proguanil, pamoato de pirantel, pirimetanmina-sulfonamidas, pirimetanmina-sulfadoxina, quinacrina HCl, sulfato de quinino, gliconato de quinidina, espiamicina, estibogliconato sódico (gliconato misto de sódio e antimônio), suramina, tetraciclina, doxiciclina, tiabendazol, tinidazol, trimetroprima-sulfametoxazol, e tripar-samida.

- Os ORNs também são úteis para tratar e prevenir doenças auto-imunes. Doença auto-imune é uma classe de doenças nas quais os anticorpos do próprio indivíduo reagem com o tecido hospedeiro ou nas quais as células T efectoras imunes são auto-reativas a auto-peptídeos endógenos e causam destruição do tecido. Portanto, é produzida uma resposta imune contra os antígenos do próprio indivíduo, denominados auto-antígenos. Doenças auto-imunes incluem, porém sem limitação artrite reumatóide, doença de Crohn, esclerose múltipla, lúpus eritematoso sistêmico (SLE), encefalomielite auto-imune, miastenia grave (MG), tireoidite de Hashimoto, síndro-

me de Goodpasture, pênfigo (por exemplo, pênfigo vulgar), doença de Grave, anemia hemolítica auto-imune, púrpura trombocitopênica auto-imune, escleroderma com anticorpos anticolágeno, doença de tecido conjuntivo misto, polimiosite, anemia perniciosa, doença de Addison idiopática, infertilidade associada à autoimunidade, glomerulonefrite (por exemplo, glomerulonefrite crescente, glomerulonefrite proliferativa), penfigóide bolhoso, síndrome de Sjögren, resistência à insulina, e diabetes melito auto-imune.

Um "auto-antígeno" conforme usado neste relatório refere-se a um antígeno de um tecido hospedeiro normal. Tecido hospedeiro normal não inclui células cancerosas. Portanto uma resposta imune produzida contra um auto-antígeno, no contexto de uma doença auto-imune, é uma resposta imune indesejável e contribui para a destruição e dano de tecido normal, ao passo que uma resposta imune produzida contra um antígeno de câncer é uma resposta imune desejável e contribui para a destruição do tumor ou câncer. Portanto, em alguns aspectos da invenção voltados para o tratamento de distúrbios auto-imunes não é recomendado que o ORN seja administrado com auto-antígenos, particularmente aqueles que são os alvos do distúrbio auto-imune.

Em outros casos, o ORN pode ser distribuído com doses baixas de auto-antígenos. Inúmeros estudos em animais demonstraram que a administração mucosa de doses baixas de antígeno pode resultar em um estado de hipossensibilidade imune ou "tolerância". O mecanismo ativo parece ser um desvio imune mediado por citocina de uma resposta de Th1 para uma resposta predominantemente Th2 e Th3 (isto é, dominada por TGF- β). A supressão ativa com a distribuição de doses baixas de antígeno também pode suprimir uma resposta imune não relacionada (supressão inespecífica) que é de interesse considerável na terapia de doenças auto-imunes, por exemplo, artrite reumatóide e SLE. A supressão de inespecífica envolve a secreção de citocinas supressoras contra-reguladoras de Th1 no ambiente local onde citocinas pró-inflamatórias e citocinas Th1 são liberadas de maneira específica para antígeno ou de maneira inespecífica para antígeno. "Tolerância" conforme usado neste relatório é usado para se referir a este

fenômeno. De fato, a tolerância oral é eficaz no tratamento de inúmeras doenças auto-imunes em animais incluindo: encefalomielite auto-imune experimental (EAE), miastenia grave auto-imune experimental, artrite induzida por colágeno (CIA), e diabetes melito dependente de insulina. Nestes modelos, a prevenção e a supressão da doença auto-imune estão associadas a um desvio nas respostas humorais e celulares específicas para antígeno de uma resposta de Th1 para uma resposta Th2/Th3.

As composições e os métodos da invenção podem ser usados isolados ou junto com outros agentes e métodos úteis para o tratamento de câncer. Em um aspecto, a invenção fornece um método para tratar um indivíduo que tenha um câncer. O método de acordo com este aspecto da invenção inclui a etapa de administrar a um indivíduo tendo um câncer uma quantidade eficaz de uma composição da invenção para tratar o indivíduo.

Em um aspecto, a invenção fornece um método para tratar um indivíduo que tenha um câncer. O método de acordo com este aspecto da invenção inclui a etapa de administrar a um indivíduo tendo um câncer uma quantidade eficaz da composição da invenção e uma terapia anticâncer para tratar o indivíduo.

Em um aspecto, a invenção fornece o uso de um ORN imunoestimulador da invenção para a preparação de um medicamento para tratar câncer em um indivíduo.

Em um aspecto, a invenção fornece uma composição útil para o tratamento de câncer. A composição de acordo com este aspecto inclui um ORN imunoestimulador da invenção e um medicamento contra câncer.

Um indivíduo tendo um câncer é um indivíduo que tem células cancerosas detectáveis. O câncer pode ser um câncer maligno ou não maligno. "Câncer" conforme usado neste relatório refere-se a um crescimento descontrolado de células que interfere no funcionamento normal dos órgãos e sistemas do corpo. Cânceres que migram de seu local original e semeiam órgão vitais podem eventualmente levar à morte do indivíduo através da deterioração funcional dos órgãos afetados. Cânceres hemopoiéticos, tais como leucemia, são capazes de competir e vencer os compartimentos hemo-

poiéticos normais em um indivíduo, dessa forma levando à insuficiência hemopoiética (na forma de anemia, trombocitopenia e neutropenia) finalmente causando morte.

Uma metástase é uma região de células cancerosas, distinta da localização original do tumor, resultando da disseminação de células cancerosas a partir do tumor original para outras partes do corpo. Quando do diagnóstico da massa tumoral original, o indivíduo pode ser monitorado quanto à presença de metástases. As metástases são detectadas com mais frequência através do uso isolado ou combinado de imagens de ressonância magnética (MRI), imagens de tomografia computadorizada (CT), contagens sangüíneas e contagens de plaquetas, estudos da função hepática, raios X do tórax e imagens ósseas além do monitoramento de sintomas específicos.

Cânceres incluem, porém sem limitação, carcinoma de células basais, câncer do trato biliar; câncer de bexiga; câncer ósseo; câncer cerebral e câncer do sistema nervoso central (SNC); câncer de mama; câncer cervical; coriocarcinoma; câncer de cólon e câncer retal; câncer do tecido conjuntivo; câncer do sistema digestivo; câncer endometrial; câncer de esôfago; câncer do olho; câncer de cabeça e pescoço; neoplasma intra-epitelial; câncer renal; câncer de laringe; leucemia; câncer de fígado; câncer de pulmão (por exemplo, células pequenas e não-pequenas células); linfoma incluindo linfoma de Hodgkin e não-Hodgkin; melanoma; mieloma; neuroblastoma; câncer da cavidade oral (por exemplo, lábio, língua, boca e faringe); câncer de ovário; câncer de pâncreas; câncer de próstata; retinoblastoma; rabdomiossarcoma; câncer retal; câncer do sistema respiratório; sarcoma; câncer de pele; câncer de estômago; câncer testicular; câncer da tireóide; câncer de útero; câncer do sistema urinário, assim como outros carcinomas, adenocarcinomas, e sarcomas.

A composição imunoestimuladora da invenção também pode ser administrada em conjunto com uma terapia anticâncer. Terapias anticâncer incluem medicamentos contra câncer, radiação, e procedimentos cirúrgicos. Conforme usado neste relatório, um "medicamento contra câncer" refere-se a um agente que é administrado a um indivíduo com o propósito de tratar

um câncer. Conforme usado neste relatório, "tratar câncer" inclui prevenir o desenvolvimento de um câncer, reduzir os sintomas do câncer, e/ou inibir o crescimento de um câncer estabelecido. Em outros aspectos, o medicamento contra câncer é administrado a um indivíduo com risco de desenvolver um

5 câncer com o propósito de reduzir o risco de desenvolver o câncer. Vários tipos de medicamentos para o tratamento de câncer estão descritos nesta invenção. Para os fins deste relatório, os medicamentos contra câncer são classificados como agentes quimioterapêuticos, agentes imunoterapêuticos, vacinas contra câncer, terapia hormonal, e modificadores da resposta biológica.

10

O agente quimioterapêutico pode ser selecionado do grupo que consiste em metotrexato, vincristina, adriamicina, cisplatina, cloroetilnitrosouréias não contendo açúcar, 5-fluoruracila, mitomicina C, bleomicina, doxorubicina, dacarbazina, taxol, fragilina, meglamina GLA, valrubicina, carmustaina e poliferposan, MMI270, BAY 12-9566, inibidor de RAS famesil transferase, inibidor de famesul transferase, MMP, MTA/LY231514, LY264618/ Lometexol, Glamolec, CI-994, TNP-470, Hicantina/Topotecano, PKC412, Valspodar/PSC833, Novantrona/Mitroxantrona, Metaret/Suramina, Batimastat, E7070, BCH-4556, CS-682, 9-AC, AG3340, AG3433, Incel/VX-

15 710, VX-853, ZD0101, ISI641, ODN 698, TA 2516/Marmistat, BB2516/ Marmistat, CDP 845, D2163, PD183805, DX8951f, Lemonal DP 2202, FK 317, Picibanil/OK-432, AD 32/Valrubicina, Metastron/derivado de estrôncio, Temodal/Temozolomida, Evacet/liposomal doxorubicina, Yewtaxan/Paclitaxel, Taxol/Paclitaxel, Xeload/Capecitabina, Furtulon/Doxifluridina, Cyclopax/ paclitaxel oral, Taxóide Oral, SPU-077/Cisplatina, HMR 1275/Flavopiridol, CP-

20 358 (774)/EGFR, CP-609 (754)/inibidor de RAS oncogene, BMS-182751/platina oral, UFT(Tegafur/Uracil), Ergamisol/Levamisol, intensificador de Eniluracil/776C85/5FU, Campto/Levamisol, Camptosar/Irinotecano, Tumodex/Ralitrexed, Leustatina/Cladribina, Paxex/Paclitaxel, Doxil/ doxorubicina lipossômica, Caelyx/doxorubicina lipossômica, Fludara/Fludarabina, Farmarubicina/Epirubicina, DepoCyt, ZD1839, LU 79553/Bis-Naftalimida, LU

25 103793/Dolastatina, Caetyx/doxorubicina lipossômica, Gemzar/ Gemcitabi-

30

na, ZD 0473/Anormed, YM 116, sementes de iodo, inibidores de CDK4 e CDK2, inibidores de PARP, D4809/Dexifosamida, Ifes/Mesnex/Ifosamida, Vumon/Teniposida, Paraplatina/Carboplatina, Plantinol/cisplatina, Vepesida/Etoposida, ZD 9331, Taxotere/Docetaxel, pró-fármaco de guanina arabinosida, análogo de Taxano, nitrosouréias, agentes alquilantes tais como melfelano e ciclofosfamida, Aminoglutetimida, Asparaginase, Busulfan, Carboplatina, Clorombucil, Citarabina HCl, Dactinomicina, Daunorrubicina HCl, fosfato sódico de estramustina, Etoposidae (VP16-213), Floxuridinae, Fluoruracila (5-FU), Flutamida, Hidroxiuréia (hidroxicarbamida, Ifosfamida, Interferon Alfa-2a, Alfa-2b, acetato de leuprolida (análogo do fator liberador de LHRH), Lomustina (CCNU), Mecloretamina HCl (mostarda nitrogenada), Mercaptopurina, Mesna, Mitotane (o.p'-DDD), Mitoxantrona HCl, Octreotida, Plicamicina, Procarbazina HCl, estreptozocina, citrato de tamoxifeno, Tio-
 10 guanina, Tiotepa, sulfato de vimblastina, Amsacrina (m-AMSA), Azacitidina, Ertopoietina, Hexametilmelamina (HMM), Interleucina 2, Mitoguazona (metil-GAG; metil glicoxal bis-guanil hidrazona; MGBG), Pentostatina (2'-desoxicoformicina), Semustina (metil-CCNU), Teniposida (VM-26) e sulfato de vindesina, porém sem limitação aos mesmos.

O agente imunoterapêutico pode ser selecionado do grupo que
 20 consiste em 3622W94, 4B5, ANA Ab, anti-FLK-2, anti-VEGF, ATRAGEN, AVASTIN (bevacizumab; Genentech), BABS, BEC2, BEXXAR (tositumomab; GlaxoSmithKline), C225, CAMPATH (alemtuzumab; Genzyme Corp.), CEACIDE, CMA 676, EMD-72000, ERBITUX (cetuximab; ImClone Systems, Inc.), Gliomab-H, GNI-250, HERCEPTIN (trastuzumab; Genentech), IDEC-
 25 Y2B8, ImmuRAIT-CEA, ior c5, ior egf.r3, ior t6, LDP-03, LymphoCide, MDX-11, MDX-22, MDX-210, MDX-220, MDX-260, MDX-447, MELIMMUNE-1, MELIMMUNE-2, Monopharm-C, NovoMAb-G2, Oncolym, OV103, Ovarex, Panorex, Pretarget, Quadramet, Ributaxin, RITUXAN (rituximab; Genentech), SMART 1D10 Ab, SMART ABL 364 Ab., SMART M195, TNT, e
 30 ZENAPAX (daclizumab; Roche), porém sem limitação aos mesmos.

A vacina contra câncer pode ser selecionada do grupo que consiste em EGF, vacinas contra câncer antiidiotípicas, antígeno Gp75, vacina

contra GMK melanoma, vacina de conjugado MGv gangliosídeo, Her2/neu, Ovarex, M-Vax, O-Vax, L-Vax, STn-KHL theratope, BLP25 (MUC-1), vacina idiotípica lipossômica, Melacina, vacinas de antígeno peptídico, vacinas de toxina/antígeno, vacinas à base de MVA, PACIS, vacina BCG, TA-HPV, TA-CIN, DISC-vírus e ImmuCyst/TheraCys, porém sem limitação às mesmas.

As composições e os métodos da invenção podem ser usados isolados ou em conjunto com outros agentes e métodos úteis para o tratamento de alergia. Em um aspecto a invenção fornece um método para tratar um indivíduo que tenha uma condição alérgica. O método de acordo com este aspecto da invenção inclui a etapa de administrar a um indivíduo tendo uma condição alérgica uma quantidade eficaz de uma composição da invenção para tratar o indivíduo.

Em um aspecto, a invenção fornece um método para tratar um indivíduo que tenha uma condição alérgica. O método de acordo com este aspecto da invenção inclui a etapa de administrar a um indivíduo tendo uma condição alérgica uma quantidade eficaz da composição da invenção e uma terapia antialérgica para tratar o indivíduo.

Em um aspecto, a invenção fornece o uso de um ORN imunoestimulador da invenção para a preparação de um medicamento para tratar uma condição alérgica em um indivíduo.

Em um aspecto, a invenção fornece uma composição útil para o tratamento de uma condição alérgica. A composição de acordo com este aspecto inclui um ORN imunoestimulador da invenção e um medicamento para alergia.

Um "indivíduo tendo uma condição alérgica" refere-se a um indivíduo que esteja sofrendo ou já tenha sofrido de uma reação alérgica em resposta a um alérgeno.

Uma "condição alérgica" ou "alergia" refere-se à hipersensibilidade adquirida a uma substância (alérgeno). Condições alérgicas incluem porém sem limitação eczema, rinite alérgica ou coriza, febre do feno, conjuntivite alérgica, asma brônquica, urticária (hives) e alergias alimentares, outras condições atópicas incluindo dermatite atópica; anafilaxia; alergia a

fármacos, e angioedema.

Alergia é tipicamente uma condição episódica associada à produção de anticorpos a partir de uma classe particular de imunoglobulinas, IgE, contra alérgenos. O desenvolvimento de uma resposta mediada por IgE a aeroalérgenos também é um fator que indica predisposição em relação ao desenvolvimento de asma. Se um alérgeno encontra uma IgE específica que é ligada a um receptor Fc de IgE (FcεR) na superfície de um basófilo (circulando no sangue) ou mastócito (disperso pelo tecido sólido), a célula fica ativada, resultando na produção e liberação de mediadores tais como histamina, serotonina, e mediadores lipídicos.

Uma reação alérgica ocorre quando imunoglobulina sensibilizadora de tecidos do tipo IgE reage com um alérgeno estranho. O anticorpo IgE é ligado a mastócitos e/ou basófilos, e estas células específicas liberam mediadores químicos (aminas vasoativas) da reação alérgica quando estimuladas a agir dessa forma por alérgenos que fazem pontes com as extremidades da molécula do anticorpo. Histamina, fator de ativação plaquetária, metabólitos do ácido araquidônico, e serotonina estão entre os mediadores mais conhecidos de reações alérgicas no homem. A histamina e as outras aminas vasoativas normalmente são armazenadas em mastócitos e leucócitos basófilos. Os mastócitos encontram-se dispersados em todo o tecido animal e os basófilos circulam no sistema vascular. Estas células produzem e armazenam histamina no interior da célula a menos que a sequência específica de eventos envolvendo a ligação de IgE ocorra para desencadear sua liberação.

Os sintomas de uma reação alérgica variam, dependendo do local no corpo em que a IgE reage com o antígeno. Se a reação ocorre ao longo do epitélio respiratório, os sintomas geralmente são espirros, tosse e reações asmáticas. Se a interação ocorre no trato digestivo, como no caso de alergias a alimentos, dor abdominal e diarreia são comuns. As reações alérgicas sistêmicas, por exemplo, subsequente à picada de abelha ou à administração de penicilina a um indivíduo alérgico, podem ser severas e frequentemente com risco de vida.

A alergia está associada a um tipo Th2 de resposta imune, que é caracterizada pelo menos em parte por citocinas IL-4 e IL-5 Th2, assim como isótipo de anticorpo desviando para IgE. As respostas imunes Th1 e Th2 são mutuamente contra-reguladoras, de modo que o desvio da resposta imune para um tipo Th1 de resposta imune pode prevenir ou melhorar uma tipo Th2 de resposta imune, inclusive alergia. Os ORN imunoestimuladores da invenção são portanto úteis por si sós para tratar um indivíduo tendo uma condição alérgica, porque os ORN imunoestimuladores podem desviar a resposta imune para um tipo Th1 de resposta imune. Alternativamente ou adicionalmente, os ORN imunoestimuladores da invenção podem ser usados em combinação com um alérgeno para tratar um indivíduo tendo uma condição alérgica.

A composição imunoestimuladora da invenção também pode ser administrada em conjunto com uma terapia antialérgica. Métodos convencionais para tratar ou prevenir alergia envolvem o uso de medicamentos contra alergia ou terapias de dessensibilização. Algumas terapias em desenvolvimento para tratar ou prevenir alergia incluem o uso de anticorpos anti-IgE neutralizantes. Anti-histaminas e outros fármacos que bloqueiam os efeitos de mediadores químicos da reação alérgica ajudam a regular a severidade dos sintomas alérgicos mas não previnem a reação alérgica e não têm qualquer efeito sobre as respostas alérgicas subsequentes. As terapias de dessensibilização são efetuadas dando-se pequenas doses de um alérgeno, geralmente por injeção sob a pele, com a finalidade de induzir uma resposta tipo IgG contra o alérgeno. A presença do anticorpo IgG ajuda a neutralizar a produção de mediadores resultantes da indução de anticorpos IgE, acredita-se. Inicialmente, o indivíduo é tratado com uma dose muito baixa do alérgeno para evitar a indução de uma reação severa e a dose é aumentada lentamente. Este tipo de terapia é perigosa, porque o indivíduo na verdade está recebendo os compostos que causam a resposta alérgica e podem resultar reações alérgicas severas.

Medicamentos contra alergia incluem, porém sem limitação, anti-histaminas, corticosteróides, e indutores de prostaglandina. Anti-histami-

nas são compostos que neutralizam a histamina liberada por mastócitos ou basófilos. Estes compostos são bastante conhecidos na literatura e normalmente usados para o tratamento de alergia. Anti-histaminas incluem, porém sem limitação, acrivastina, astemizol, azatadina, azelastina, betastastina, bromfeniramina, buclizina, cetirizina, análogos de cetirizina, clorfeniramina, clemastina, CS 560, ciproheptadina, desloratadina, dexchlorpheniramina, ebastina, epinastina, fexofenadina, HSR 609, hidroxizina, levocabastina, loratidina, metscopolamina, mizolastina, norastemizol, fenindamina, prometazina, pirilamina, terfenadina, e tranilast.

10 Corticosteróides incluem, porém sem limitação, metilprednisolona, prednisolona, prednisona, beclometasona, budesonida, dexametasona, flunisolida, propionato de fluticasona, e triamcinolona. Embora a dexametasona seja um corticosteróide com ação antiinflamatória, ele não é regularmente usado para o tratamento de alergia ou asma em uma forma inalada porque ele é altamente absorvido e possui efeitos colaterais supressores prolongados em uma dose eficaz. A dexametasona, no entanto, pode ser usada de acordo com a invenção para tratar alergia ou asma porque quando administrada em combinação com uma composição da invenção ela pode ser administrada em doses baixas para reduzir os efeitos colaterais. Alguns dos efeitos colaterais associados ao uso de corticosteróide incluem tosse, disfonia, sapinhos orais (candidíase), e em doses mais altas, efeitos sistêmicos, tais como supressão adrenal, intolerância à glicose, osteoporose, necrose asséptica dos ossos, formação de catarata, supressão de crescimento, hipertensão, fraqueza muscular, afinamento da pele, e fácil contusão. Barnes & Peterson (1993) *Am Rev Respir Dis* 148:S1-S26; e Kamada AK et al. (1996) *Am J Respir Crit Care Med* 153:1739-48.

As composições e os métodos da invenção podem ser usados isolados ou em conjunto com outros agentes e métodos úteis para o tratamento de asma. Em um aspecto, a invenção fornece um método para tratar um indivíduo que tenha asma. O método de acordo com este aspecto da invenção inclui a etapa de administrar a um indivíduo tendo asma uma quantidade eficaz de uma composição da invenção para tratar o indivíduo.

Em um aspecto, a invenção fornece um método para tratar um indivíduo que tenha asma. O método de acordo com este aspecto da invenção inclui a etapa de administrar a um indivíduo tendo asma uma quantidade eficaz da composição da invenção e uma terapia antiasma para tratar o

5 indivíduo.

Em um aspecto, a invenção fornece o uso de um ORN imunoestimulador da invenção para a preparação de um medicamento para tratar asma em um indivíduo.

Em um aspecto, a invenção fornece uma composição útil para o

10 tratamento de asma. A composição de acordo com este aspecto inclui um ORN imunoestimulador da invenção e um medicamento contra asma.

"Asma" conforme usado neste relatório refere-se a um distúrbio do sistema respiratório caracterizado por inflamação e estreitamento das vias aéreas, e reatividade aumentada das vias aéreas a agentes inalados. A

15 asma é freqüentemente, embora não exclusivamente, associada a uma condição atópica ou alérgica. Os sintomas de asma incluem episódios recorrentes de chiado, falta de ar, pressão no peito, e tosse, resultantes de obstrução do fluxo de ar. Inflamação das vias aéreas associada à asma pode ser detectada através de inúmeras alterações fisiológicas, tais como, des-

20 nudação do epitélio das vias aéreas, deposição de colágeno abaixo da membrana basal, edema, ativação de mastócitos, infiltração de células inflamatórias, incluindo neutrófilos, eosinófilos, e linfócitos. Como um resultado da inflamação das vias aéreas, pacientes com asma experimentam hipersensibilidade das vias aéreas, limitação do fluxo de ar, sintomas respira-

25 tórios, e cronicidade da doença. Limitações do fluxo de ar incluem broncoconstricção aguda, edema das vias aéreas, formação de tampão mucoso, e remodelagem das vias aéreas, aspectos que frequentemente levam à obstrução brônquica. Em alguns casos de asma, pode ocorrer fibrose da membrana sub-basal, levando a anormalidades persistentes na função pulmonar.

30 Ao longo dos últimos anos as pesquisas revelaram que a asma provavelmente resulta de interações complexas entre células inflamatórias, mediadores, e outras células e tecidos residentes nas vias aéreas. Mostóci-

tos, eosinófilos, células epiteliais, macrófagos, e células T ativadas desempenham todas um papel importante no processo inflamatório associado à asma. Djukanovic R et al. (1990) *Am Rev Respir Dis* 142:434-457. Acredita-se que estas células podem influenciar a função das vias aéreas através da

5 secreção de mediadores preformados e recentemente sintetizados que podem agir diretamente ou indiretamente sobre o tecido local. Também foi reconhecido que subpopulações de linfócitos T (Th2) desempenham um papel importante na regulação de inflamação alérgica nas vias aéreas liberando citocinas seletivas e estabelecendo a cronicidade da doença. Robinson DS

10 et al. (1992) *N Engl J Med* 326:298-304.

Asma é um distúrbio complexo que surge em diferentes estágios do desenvolvimento e pode ser classificada segundo o grau de sintomas como aguda, subaguda, ou crônica. Uma resposta inflamatória aguda é associada a um primeiro estágio de recrutamento de células nas vias aéreas.

15 A resposta inflamatória subaguda envolve o recrutamento de células assim como a ativação de células residentes causando um padrão de inflamação mais persistente. A resposta inflamatória crônica é caracterizada por um nível persistente de danos celulares e um processo de reparação contínuo, que pode resultar em anormalidades permanentes das vias áreas.

20 Um "indivíduo tendo asma" é um indivíduo que tem um distúrbio do sistema respiratório caracterizado por inflamação e estreitamento das vias aéreas e reatividade aumentada das vias aéreas a agentes inalados. Fatores associados ao início da asma incluem, porém sem limitação, alérgenos, baixa temperatura, exercícios, infecções virais, e SO₂.

25 Como mencionado acima, a asma pode ser associada a um tipo Th2 de resposta imune, que é caracterizado pelo menos em parte por citocinas IL-4 e IL-5 Th2, assim como isótipo de anticorpo desviando para IgE. As respostas imunes Th1 e Th2 são mutuamente contra-reguladoras, de modo que o desvio da resposta imune para um tipo Th1 de resposta imune pode

30 prevenir ou melhorar um tipo Th2 de resposta imune, inclusive alergia. Os análogos de oligorribonucleotídeos modificados da invenção são portanto úteis por si sós para tratar um indivíduo tendo asma, porque os análogos

podem desviar a resposta imune para um tipo Th1 de resposta imune. Alternativamente ou adicionalmente, os análogos de oligorribonucleotídeos modificados da invenção podem ser usados em combinação com um alérgeno para tratar um indivíduo tendo asma.

5 A composição imunoestimuladora da invenção também pode ser administrada em conjunto com uma terapia contra asma. Métodos convencionais para tratar ou prevenir a asma envolvem o uso de terapias contra alergia (descritas acima) e inúmeros outros agentes, inclusive agentes inalados.

10 Os medicamentos para o tratamento de asma geralmente são separados em duas categorias, medicamentos de alívio rápido e medicamentos para controle prolongado. Os pacientes com asma tomam medicamentos para controle prolongado em uma base diária para obter e manter controle da asma persistente. Os medicamentos para controle prolongado
15 incluem agentes antiinflamatórios tais como corticosteróides, cromolina sódica e nedocromil; broncodilatadores de ação prolongada, tais como β_2 -agonistas de ação prolongada e metilxantinas; e modificadores de leucotrieno. Os medicamentos de alívio rápido incluem β_2 agonistas de curta ação, anticolinérgicos, e corticosteróides sistêmicos. Existem muitos efeitos colaterais associados a cada um desses fármacos e nenhum dos fármacos isolados ou combinados é capaz de prevenir ou tratar completamente a asma.
20

Medicamentos contra asma incluem, porém sem limitação, inibidores de PDE-4, broncodilatadores/beta-2 agonistas, abridores do canal de K^+ , antagonistas de VLA-4, antagonistas de neurocina, inibidores da síntese
25 de tromboxano A2 (TXA2), xantinas, antagonistas do ácido araquidônico, inibidores de lipoxigenase 5, antagonistas do receptor de TXA2, antagonistas de TXA2, inibidor de proteínas de ativação de 5-lipox, e inibidores de protease.

Broncodilatadores/ β_2 agonistas constituem uma classe de compostos que causam broncodilatação e relaxamento do músculo liso. Broncodilatadores/ β_2 agonistas incluem, porém sem limitação, salmeterol, salbutamol, albuterol, terbutalina, D2522/formoterol, fenoterol, bitolterol, pirbuerol
30

metilxantrinas e orciprenalina. β_2 -agonistas e broncodilatadores de ação prolongada são compostos que são usados para prevenção prolongada dos sintomas além das terapias antiinflamatórias. β_2 -agonistas de ação prolongada incluem, porém sem limitação, salmeterol e albuterol. Estes compostos normalmente são usados em combinação com corticosteróides e geralmente não são usados sem alguma terapia inflamatória. Eles foram associados a efeitos colaterais tais como taquicardia, tremor de músculos esqueléticos, hipocalcemia, e prolongamento do intervalo QTc em superdosagem.

Metilxantinas, incluindo por exemplo, teofilina, são usadas para controle e prevenção prolongados de sintomas. Estes compostos causam broncodilatação resultante da inibição de fosfodiesterase e provavelmente de antagonismo de adenosina. Toxicidades agudas relacionadas à dose constituem um problema particular com esses tipos de compostos. Como resultante, concentração sérica regular deve ser monitorada para se estimar a toxicidade e a restrita faixa terapêutica resultantes de diferenças individuais na depuração metabólica. Os efeitos colaterais incluem taquicardia, taquiarritmias, náusea e vômito, estimulação do sistema nervoso central, dor de cabeça, convulsões, hematemese, hiperglicemia e hipocalcemia. β_2 -agonistas de curta ação incluem, porém sem limitação, albuterol, bitolterol, pirbuterol, a terbutalina. Alguns dos efeitos adversos associados à administração de β_2 -agonistas de curta ação incluem taquicardia, tremor dos músculos esqueléticos, hipocalcemia, ácido láctico aumentado, dor de cabeça, e hiperglicemia.

Cromolina sódica e nedocromil são usados como medicamentos de controle prolongado para prevenir principalmente os sintomas de asma decorrentes de exercícios ou os sintomas alérgicos decorrentes de alérgenos. Acredita-se que esses compostos bloqueiam as reações precoces e tardias a alérgenos interferindo na função dos canais de cloreto. Eles também estabilizam as membranas dos mastócitos e inibem a ativação e a liberação de mediadores de inosinófilos e células epiteliais. Geralmente, é necessário um período de quatro a seis semanas de administração para obter benefício máximo.

Anticolinérgicos geralmente são usados para o alívio de bronco-espasmo agudo. Acredita-se que estes compostos funcionam por inibição competitiva de receptores colinérgicos muscarínicos. Anticolinérgicos incluem, por exemplo, brometo de ibratrópio. Estes compostos revertem apenas o broncoespasmo mediado de forma colinérgica e não modificam qualquer reação a antígeno. Os efeitos colaterais incluem boca seca e secreções respiratórias, chiado aumentado em alguns indivíduos, e visão turva se aspergidos nos olhos.

Os ORN imunoestimuladores da invenção também podem ser úteis para tratar remodelagem das vias aéreas. Remodelagem das vias aéreas resulta da proliferação de células do músculo liso e/ou de espessamento submucoso nas vias aéreas, e por fim causa estreitamento das vias aéreas levando a um fluxo de ar limitado. Os ORN imunoestimuladores da invenção podem ainda prevenir a remodelagem e possivelmente até mesmo reduzir o acúmulo resultante do processo de remodelagem.

Os ORN imunoestimuladores da invenção também são úteis para aumentar a sobrevivência, a diferenciação, a ativação e a maturação das células dendríticas. Os oligorribonucleotídeos imunoestimuladores possuem a singular capacidade de promover a sobrevivência celular, a diferenciação, a ativação e a maturação de células dendríticas.

Os ORN imunoestimuladores da invenção também aumentar a atividade lítica das células exterminadoras naturais e a citotoxicidade celular dependente do anticorpo (ADCC). A ADCC pode ser efetuada usando um ORN imunoestimulador em combinação com um anticorpo específico para um alvo celular, tal como uma célula cancerosa. Quando o ORN imunoestimulador é administrado a um indivíduo junto com o anticorpo, o sistema imunológico do indivíduo é induzido a exterminar a célula tumoral. Os anticorpos úteis no procedimento de ADCC incluem anticorpos que interagem com uma célula no corpo. Muitos destes anticorpos específicos para alvos celulares já foram descritos na literatura e muitos encontram-se comercialmente disponíveis. Em uma modalidade, o anticorpo é um anticorpo IgG.

Em certos aspectos, a invenção fornece um método para melho-

rar a disseminação do epítopo. "Disseminação de epítopo" conforme usado neste relatório refere-se à diversificação de especificidade para epítopo a partir de uma resposta imune inicial enfocada específica para um epítopo dominante, direcionada contra uma auto-proteína ou uma proteína estranha, a epítomos subdominantes e/ou crípticos naquela proteína (dispersão intramolecular) ou outras proteínas (dispersão intermolecular). A disseminação de epítopo resulta em múltiplas respostas imunes específicas para epítopo.

A resposta imune consiste em uma fase inicial de amplificação, que pode ser prejudicial, como na doença auto-imune, ou benéfica, como em vacinações, e uma fase posterior infra-reguladora para o sistema imune retornar à homeostasia e gerar memória. A disseminação de epítopo pode ser um componente importantes em ambas as fases. O aumento da dispersão de epítopo no cenário de um tumor permite que o sistema imunológico do indivíduo determine epítomos alvos adicionais, não inicialmente reconhecidos pelo sistema imunológico em resposta a um protocolo terapêutico original, ao mesmo tempo em que reduz a possibilidade de variantes de escape na população do tumor e assim afeta a progressão da doença.

Os oligorribonucleotídeos da invenção podem ser úteis para promover a disseminação de epítomos em indicações terapeuticamente benéficas tais como câncer, infecções virais e bacterianas, e alergia. O método em uma modalidade, inclui as etapas de administrar uma vacina que inclui um antígeno e um adjuvante a um indivíduo e subsequente administrar ao indivíduo pelo menos duas doses do ORN imunoestimulador da invenção em uma quantidade eficaz para induzir múltiplas respostas imunes específicas para epítopo. O método em uma modalidade, inclui as etapas de administrar uma vacina que inclui um antígeno de tumor e um adjuvante a um indivíduo e subsequente administrar ao indivíduo pelo menos duas doses do ORN imunoestimulador da invenção em uma quantidade eficaz para induzir múltiplas respostas imunes específicas para epítopo. O método em uma modalidade, envolve aplicar um protocolo terapêutico que resulta em exposição a antígeno do sistema imunológico em um indivíduo, seguida de pelo menos duas administrações de um oligorribonucleotídeo imunoesti-

mulador da invenção, para induzir múltiplas respostas imunes específicas para epítopo, isto é, para promover a disseminação de epítopos. Em várias modalidades o protocolo terapêutico é cirurgia, radiação, quimioterapia, outros medicamentos contra câncer, uma vacina, ou uma vacina contra câncer.

O protocolo terapêutico pode ser implementado junto com um imunostimulante, além da subsequente terapia com imunostimulante. Por exemplo, quando o protocolo terapêutico é uma vacina, ele pode ser administrado junto com um adjuvante. A combinação da vacina e do adjuvante pode ser uma mistura ou administrações separadas, isto é, injeções (isto é, o mesmo campo de drenagem). A administração não é necessariamente simultânea. Se for usada injeção não simultânea, o programa pode envolver pré-injeção do adjuvante seguida da formulação de vacina.

Depois de implementado o protocolo terapêutico, tem início a monoterapia imunostimulante. A frequência otimizada, a duração, e o local de administração vão depender do alvo e de outros fatores, mas a administração pode ser por exemplo, mensal ou bimensal por um período de seis meses a dois anos. Alternativamente a administração pode ser diária, semanal, ou quinzenal, ou a administração pode ser feita várias vezes durante o dia, semana ou mês. Em alguns casos, a duração de administração pode depender do tempo da terapia, por exemplo, ela pode acabar depois de uma semana, depois de um mês, depois de um anos, ou depois de vários anos. Em outros casos, a monoterapia pode ser contínua como por gotejamento intravenoso. O imunostimulante pode ser administrado a um campo de drenagem comum ao alvo.

Para uso em terapia, podem ser necessárias diferentes doses para tratamento de um indivíduo, dependendo da atividade do composto, do modo de administração, da finalidade da imunização (isto é, profilática ou terapêutica), da natureza e da severidade do distúrbio, da idade e do peso corporal do indivíduo. A administração de uma dada dose pode ser efetuada por uma única administração na forma de uma unidade de dose individual ou ainda várias unidades de dose menores. A administração múltipla de do-

ses em intervalos específicos de semanas ou meses é comum para reforçar as respostas imunes específicas para antígeno.

Em combinação com os ensinamentos previstos nesta invenção, escolhendo entre os vários compostos ativos e fatores importantes tais como potência, biodisponibilidade relativa, peso do paciente, severidade dos efeitos colaterais adversos e modo de administração preferido, é possível programar um regime de tratamento profilático ou terapêutico eficaz que não cause toxicidade substancial e que ainda seja totalmente eficaz para tratar o indivíduo particular. A quantidade eficaz para qualquer aplicação particular pode variar dependendo de fatores tais como a doença ou condição sendo tratada, o agente terapêutico particular sendo administrado, o tamanho do indivíduo, ou a severidade da doença ou condição. O especialista na técnica pode determinar empiricamente a quantidade eficaz de um ácido nucléico particular e/ou de outro agente terapêutico sem necessidade de experimentação desnecessária.

As doses individuais dos compostos descritos nesta invenção tipicamente variam de cerca de 0,1 μg a 10.000 mg, mais tipicamente de cerca de 1 $\mu\text{g}/\text{dia}$ a 8000 mg, e ainda mais tipicamente de cerca de 10 μg a 100 μg . Em termos do peso do indivíduo, as dosagens típicas variam de cerca de 0,1 μg a 20 mg/kg/dia, mais tipicamente de cerca de 1 a 10 mg/kg/dia, e ainda mais tipicamente de cerca de 1 a 5 mg/kg/dia.

As composições farmacêuticas contendo ácidos nucléicos e/ou outros compostos podem ser administradas por qualquer via adequada para administrar medicamentos. Encontram-se disponíveis diversas vias. O modo particular selecionado vai depender, naturalmente, do agente ou agentes particulares selecionados, da condição particular sendo tratada, e da dosagem necessária para eficácia terapêutica. Os métodos desta invenção, de um modo geral, podem ser praticados usando qualquer modo de administração que seja aceitável em termos médicos, o que significa qualquer modo que produza níveis eficazes de uma resposta imune sem causar efeitos adversos clinicamente inaceitáveis. Os modos de administração preferidos estão discutidos neste relatório. Para uso em terapia, uma quantidade eficaz

do ácido nucléico e/ou outro agente terapêutico pode ser administrada a um indivíduo por qualquer modo que distribua o agente para a superfície desejada, por exemplo, mucosa, sistêmica.

A administração da composição farmacêutica da presente invenção pode ser efetuada por qualquer meio conhecido pelo especialista na técnica. As vias de administração incluem, porém sem limitação as vias oral, parenteral, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intranasal, sublingual, intratraqueal, inalação, subcutânea, ocular, vaginal, e retal. Para tratamento ou prevenção da asma ou alergia, tais compostos são de preferência inalados, ingeridos ou administrados por vias sistêmicas. Vias sistêmicas incluem oral e parenteral. Medicamentos inalados são preferidos em algumas modalidades por causa da distribuição direta para o pulmão, o sítio de inflamação, principalmente em pacientes asmáticos. Vários tipos de dispositivos são regularmente usados para administração por inalação. Estes tipos de dispositivos incluem inaladores de dose regulada (MDI), MDI acionados pela respiração, inaladores de pó seco (DPI), câmaras espaçadoras/ retentoras em combinação com MDI, e nebulizadores.

Os agentes terapêuticos da invenção podem ser distribuídos para um tecido particular, um tipo de célula, ou para o sistema imunológico, ou ambos, com a ajuda de um vetor. Em seu sentido mais amplo, um "vetor" é qualquer veículo capaz de facilitar a transferência das composições para as células alvos. O vetor geralmente transporta o ácido nucléico imunoestimulador, o ant, o antígeno, e/ou o medicamento específico para o distúrbio para as células alvos com degradação reduzida em relação à extensão de degradação que resultaria na ausência do vetor.

Em geral, os vetores úteis na invenção são divididos em duas classes: vetores biológicos e vetores químicos/físicos. Vetores biológicos e vetores químicos/físicos são úteis na distribuição e/ou absorção dos agentes terapêuticos da invenção.

A maioria dos vetores biológicos são usados para a distribuição de ácidos nucléicos e estes seriam mais apropriados na distribuição de agentes terapêuticos que são ou que incluem ácidos nucléicos imunoestimuladores.

ladores.

Além dos vetores biológicos discutidos nesta invenção, é possível vetores químicos/físicos para distribuir agentes terapêuticos que incluem ácidos nucleicos imunostimuladores, anticorpos, antígenos, e medicamentos específicos para o distúrbio. Conforme usado neste relatório, um "vetor químico/físico" refere-se a uma molécula natural ou sintética, que não aquelas derivadas de fontes bacteriológicas ou virais, capazes de distribuir o ácido nucleico e/ou outro medicamento.

Um vetor químico/físico preferido é um sistema de dispersão coloidal. Sistemas de dispersão coloidal incluem sistemas à base de lipídios incluindo emulsões de óleo em água, micelas, micelas mistas, e lipossomas. Um sistema coloidal preferido da invenção é um lipossoma. Lipossomas são vasos de membrana artificiais que são úteis como um vetor de distribuição *in vivo* ou *in vitro*. Foi mostrado que vesículas unilamelares grandes (LUVs), cujo tamanho varia de 0,2 - 0,4 μm , podem encapsular macromoléculas grandes. RNA, DNA e vírions intactos podem ser encapsulados no interior aquoso e distribuídos para células em uma forma biologicamente ativa. Fraley et al. (1981) *Trends Biochem Sci* 6:77.

Os lipossomas podem ser vetorizados para um tecido particular por acoplamento do lipossoma a um ligando específico tal como um anticorpo monoclonal, açúcar, glicolípido, ou proteína. Ligandos que podem ser úteis para vetorizar um lipossoma para uma célula imune incluem, porém sem limitação, moléculas intactas ou fragmentos de moléculas que interagem com receptores e moléculas específicos para células imunes, tais como anticorpos, que interagem com marcadores da superfície celular de células imunes. Tais ligandos podem ser facilmente identificados por ensaios de ligação bastante conhecidos pelos especialistas na técnica. Em ainda outras modalidades, o lipossoma pode ser vetorizado para o câncer por acoplamento do mesmo a um dos anticorpos imunoterapêuticos discutidos acima. Adicionalmente, o vetor pode ser acoplado a um peptídeo vetorizador nuclear, que vai direcionar o vetor para o núcleo da célula hospedeira.

Formulações lipídicas para transfecção encontram-se comerci-

almente disponíveis na QIAGEN, por exemplo, como EFFECTENE® (um lipídio não-lipossômica com um intensificador de condensação de DNA especial) e SUPERFECT® (uma nova tecnologia dendrímica atuante).

Lipossomas encontram-se comercialmente disponíveis na Gibco BRL, por exemplo, como LIPOFECTIN® e LIPOFECTACE®, que são formados de lipídios catiônicos tais como cloreto de N-[1-(2, 3 dioleilóxi)-propil]-N, N, N-trimetilamônio (DOTMA) e brometo de dimetil dioctadecilamônio (DDAB). Métodos para fazer lipossomas são bastante conhecidos na literatura e foram descritos em muitas publicações. Lipossomas também foram
10 recapitulados por Gregoriadis G (1985) *Trends Biotechnol* 3:235-241.

Certos lipídios catiônicos, incluindo em particular N-[1-(2, 3 dioleilóxi)-propil]-N,N,N-trimetilamônio metil-sulfato (DOTAP), parecem ser especialmente vantajosos quando combinados com os análogos de oligorribonucleotídeos modificados da invenção.

15 Em uma modalidade, o veículo é uma micropartícula ou implante biocompatível que é adequado para implantação ou administração ao receptor mamífero. Implantes bioerodíveis exemplificativos que são úteis de acordo com este método estão descritos no pedido internacional PCT nº PCT/US/03307 (Publicação Nº WO95/24929, intitulado "Polymeric Gene
20 Delivery System". O PCT/US/03307 descreve uma matriz polimérica biocompatível, de preferência biodegradável, para conter um gene exógeno sob o controle de um promotor apropriado. A matriz polimérica pode ser usada para obter uma liberação sistemática do agente terapêutico no indivíduo.

A matriz polimérica de preferência está na forma de uma micropartícula tal como uma microesfera (onde o ácido nucléico e/ou outro agente
25 terapêutico é dispersado em toda a matriz polimérica sólida) ou uma microcápsula (onde o ácido nucléico e/ou o outro agente terapêutico fica armazenado no núcleo de um envoltório polimérico). Outras formas da matriz polimérica para conter o agente terapêutico incluem filmes, revestimentos, géis,
30 implantes, e stents. O tamanho e a composição da matriz polimérica são selecionados de modo a resultar em uma cinética de liberação favorável no tecido no qual a matriz é introduzida. O tamanho da matriz polimérica ainda

é selecionado de acordo com o método de distribuição que será usado, tipicamente injeção em um tecido ou administração de uma suspensão por aerossol nas áreas nasais e/ou pulmonares. De preferência quando se usa uma via aerossol a matriz polimérica e o ácido nucléico e/ou o outro agente terapêutico estão incluídos em um veículo tensoativo. A composição da matriz polimérica pode ser selecionada de modo a ter taxas de degradação favoráveis e também de modo a ser formada de um material que seja bioadesivo, para aumentar ainda mais a eficácia de transferência quando a matriz for administrada a uma superfície nasal e/ou pulmonar que tenha uma lesão.

10 A composição da matriz também pode ser selecionada de modo a não ser degradada, e sim ser liberada por difusão durante um período de tempo prolongado. Em algumas modalidades preferidas, o ácido nucléico é administrado ao indivíduo via um implante ao passo que o outro agente terapêutico é administrado de forma aguda. Microesferas biocompatíveis que são adequadas para distribuição, tal como distribuição oral ou mucosa, estão descritas em Chickering et al. (1996) *Biotech Bioeng* 52:96-101 e Mathiowitz E et al. (1997) *Nature* 386:410-414 e Pedido de Patente PCT WO97/03702.

Matrizes poliméricas não-biodegradáveis e biodegradáveis podem ser usadas para distribuir o ácido nucléico e/ou o outro agente terapêutico para o indivíduo. Matrizes biodegradáveis são preferidas. Tais polímeros podem ser polímeros naturais ou sintéticos. O polímero é selecionado com base no período de tempo durante o qual a liberação é desejada, geralmente da ordem de algumas horas a um ano ou mais. Tipicamente, a liberação durante um período variando entre algumas horas e três a doze meses é mais desejável, particularmente para os agentes tipo ácido nucléico. O polímero opcionalmente está na forma de um hidrogel que pode absorver até

20

25

cerca de 90% de seu peso em água e ainda, opcionalmente é reticulado com íons multivalentes ou outros polímeros.

Polímeros bioadesivos de particular interesse incluem hidrogéis bioerodíveis descritos por H.S. Sawhney, C.P. Pathak & J.A. Hubell em *Macromolecules*, (1993) 26:581-587, cujos ensinamentos estão aqui incorporados a título de referência. Estes incluem ácidos polihialurônicos, caseína,

30

gelatina, glutina, polianidridos, ácido poliacrílico, alginato, quitosano, poli(metil metacrilatos), poli(etil metacrilatos), poli(butilmetacrilato), poli(isobutil metacrilato), poli(hexilmetacrilato), poli(isodecil metacrilato), poli(lauril metacrilato), poli(fenil metacrilato), poli(metil acrilato), poli(isopropil acrilato), poli(isobutil acrilato), e poli(octadecil acrilato).

Se o agente terapêutico for um ácido nucléico, o uso de agentes de compactação também pode ser desejável. Os agentes de compactação também podem ser usados isolados, ou em combinação com um vetor biológico ou químico/físico. Um "agente de compactação", conforme usado neste relatório, refere-se a um agente, tal como uma histona, que neutraliza as cargas negativas no ácido nucléico e dessa forma permite a compactação do ácido nucléico na forma de um grânulo fino. A compactação do ácido nucléico facilita a absorção do ácido nucléico pela célula alvo. Os agentes de compactação podem ser usados isolados, isto é, para distribuir um ácido nucléico em uma forma que seja absorvida de maneira mais eficiente pela célula ou, mais preferivelmente, em combinação com um ou mais dos vetores descritos acima.

Outras composições exemplificativas que podem ser usadas para facilitar a absorção de um ácido nucléico incluem fosfato de cálcio e outros mediadores químicos do transporte intracelular, composições microinjetáveis, composições de eletroporação e de recombinação homóloga (por exemplo, para integrar um ácido nucléico em um local pré-selecionado no cromossoma da célula alvo).

Os compostos podem ser administrados isolados (por exemplo, em solução salina ou tampão) ou usando qualquer veículo de distribuição conhecido na literatura. Por exemplo, já foram descritos os seguintes veículos de distribuição: cocleatos (Gould-Fogerite et al., 1994, 1996); Emulsomas (Vancott et al., 1998, Lowell et al., 1997); ISCOMs (Mowat et al., 1993, Carlsson et al., 1991, Hu et., 1998, Morein et al., 1999); lipossomas (Childers et al., 1999, Michalek et al., 1989, 1992, de Haan 1995a, 1995b); vetores bacterianos vivos (por exemplo, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Bacillus Calmette-Guérin*, *Shigella*, *Lactobacillus*) (Hone et al., 1996, Pouwels et al.,

1998, Chatfield et al., 1993, Stover et al., 1991, Nugent et al., 1998); vetores virais vivos (por exemplo, vacínia, adenovírus, Herpes Simples) (Gallichan et al., 1993, 1995, Moss et al., 1996, Nugent et al., 1998, Flexner et al., 1988, Morrow et al., 1999); microesferas (Gupta et al., 1998, Jones et al., 1996, 5 Maloy et al., 1994, Moore et al., 1995, O'Hagan et al., 1994, Eldridge et al., 1989); vacinas de ácido nucléico (Fynan et al., 1993, Kuklin et al., 1997, Sasaki et al., 1998, Okada et al., 1997, Ishii et al., 1997); polímeros (por exemplo, carboximetilcelulose, quitosano) (Hamajima et al., 1998, Jabbal-Gill et al., 1998); anéis de polímeros (Wyatt et al., 1998); proteossomas (Vancott et 10 al., 1998, Lowell et al., 1988, 1996, 1997); fluoreto de sódio (Hashi et al., 1998); plantas transgênicas (Tacket et al., 1998, Mason et al., 1998, Haq et al., 1995); virossomas (Gluck et al., 1992, Mengiardi et al., 1995, Cryz et al., 1998); e partículas semelhantes a vírus (Jiang et al., 1999, Leibl et al., 1998).

15 As formulações da invenção são administradas em soluções farmaceuticamente aceitáveis, que de praxe podem conter concentrações farmaceuticamente aceitáveis de sal, agentes tamponantes, preservativos, veículos compatíveis, adjuvantes, e opcionalmente outros componentes terapêuticos.

20 O termo veículo farmaceuticamente aceitável significa uma ou mais cargas sólidas ou líquidas compatíveis, diluentes ou substâncias encapsulantes que são adequadas para administração a um ser humano ou outro animal vertebrado. O termo veículo significa um componente orgânico ou inorgânico, natural ou sintético, com o qual o componente ativo é combinado para facilitar a aplicação. Os componentes das composições farma- 25 cêuticas também são capazes de ser misturados com os compostos da presente invenção, e entre si, de tal maneira que não ocorra nenhuma interação que prejudique substancialmente a eficiência farmacêutica desejada.

Para administração oral, os compostos (isto é, ácidos nucléicos, 30 antígenos, anticorpos, e outros agentes terapêuticos) podem ser facilmente formulados por combinação dos compostos ativos com veículos farmaceuticamente aceitáveis bastante conhecidos na literatura. Tais veículos permi-

tem que os compostos da invenção sejam formulados como comprimidos, pílulas, drágeas, cápsulas, líquidos, géis, xaropes, pastas, suspensões e outras formas, para ingestão oral por um indivíduo a ser tratado. Preparações farmacêuticas para uso oral podem ser obtidas como excipiente sólido, 5 opcionalmente triturando a mistura resultante, e processamento a mistura de grânulos, depois da adição de auxiliares adequados, se necessário, para obter núcleos de comprimidos ou drágeas. Excipientes adequados são, em particular, cargas tais como açúcares, incluindo lactose, sacarose, manitol ou sorbitol; preparações de celulose tais como, por exemplo, amido de mi- 10 lho, amido de trigo, amido de arroz, amido de batata, gelatina, goma de tragacanto, metil celulose, hidroxipropilmetil celulose, carboximetilcelulose sódica, e/ou polivinilpirrolidona (PVP). Se desejado, podem ser adicionados agentes desintegrantes, tais como polivinil pirrolidona reticulada, ágar, ou ácido algínico ou um sal do mesmo tal como alginato de sódio. Opcional- 15 mente, as formulações orais também podem ser formuladas em solução salina ou tampões para neutralizar as condições ácidas internas ou podem ser administradas sem quaisquer veículos.

Núcleos de drágea são fornecidos com revestimentos adequados. Para tanto, podem-se usar soluções de açúcar concentradas, que po- 20 dem opcionalmente conter goma arábica, talco, polivinil pirrolidona, carbopol gel, polietileno glicol, e/ou dióxido de titânio, soluções de laca, e solventes orgânicos adequados ou misturas de solventes. Corantes ou pigmentos podem ser adicionados aos comprimidos ou revestimentos de drágeas para identificação ou para caracterizar diferentes combinações de doses do com- 25 posto ativo.

Preparações farmacêuticas que podem ser usadas por via oral incluem cápsulas de encaixe feitas de gelatina, como cápsulas vedadas macias feitas de gelatina e um plastificante, tal como glicerol ou sorbitol. As cápsulas de encaixe podem conter os componentes ativos em mistura com 30 uma carga tal como lactose, aglutinantes tais como amidos, e/ou lubrificantes tais como talco ou estearato de magnésio e, opcionalmente, estabilizante. Nas cápsulas macias, os compostos ativos podem ser dissolvidos ou

suspensos em líquidos adequados, tais como óleos graxos, parafina líquida, ou polietileno glicóis líquidos. Além disso, estabilizantes podem ser adicionados. Também é possível usar microesferas formuladas para administração oral. Estas microesferas já foram bem definidas na literatura. Todas as
5 formulações para administração oral devem estar em dosagens adequadas para este tipo de administração.

Para administração bucal, as composições podem estar na forma de comprimidos ou pastilhas formulados de maneira convencional.

Para administração por inalação, os compostos para uso de acordo com a presente invenção podem ser convenientemente distribuídos na forma de uma apresentação de spray aerossol a partir de pacotes pressurizados ou de um nebulizador, com o uso de um propelente adequado, por exemplo, diclorodifluormetano, triclorofluormetano, diclorotetrafluoretano, dióxido de carbono ou outro gás adequado. No caso de um aerossol
10 pressurizado a unidade de dosagem pode ser determinada oferecendo uma válvula para distribuir uma quantidade regulada. Cápsulas e cartuchos por exemplo, de gelatina para uso em um inalador ou insuflador podem ser formulados contendo uma mistura em pó do composto e de uma base de pó adequada tal como lactose ou amido.

Os compostos, quando é desejável distribuí-los sistemicamente, podem ser formulados para administração parenteral por injeção, por exemplo, por injeção de bolo ou por infusão contínua. As formulações para injeção podem ser apresentadas em uma forma de dosagem unitária, por exemplo, em ampolas ou em recipientes com múltiplas doses, com um conservante adicionado. As composições podem adquirir formas tais como suspensões, soluções ou emulsões em veículos oleosos ou aquosos, e podem
15 conter agentes de formulação tais como agentes suspensores, estabilizantes e/ou dispersantes.

As formulações farmacêuticas para administração parenteral
30 incluem soluções aquosas dos compostos ativos em uma forma solúvel em água. Adicionalmente, suspensões dos compostos ativos podem ser preparadas como suspensões injetáveis oleosas apropriadas. Solventes ou veícu-

los lipofílicos adequados incluem óleos graxos tais como óleo de gergelim, ou ésteres de ácidos graxos sintéticos, tais como oleato de etila ou triglicerídeos, ou lipossomas. As suspensões injetáveis aquosas podem conter substâncias que aumentam a viscosidade da suspensão, tais como carboximetil

5 celulose sódica, sorbitol, ou dextrana. Opcionalmente, a suspensão também pode conter solubilizantes adequados ou agentes que aumentam a solubilidade dos compostos para permitir a preparação de soluções altamente concentradas.

Alternativamente, os compostos ativos podem estar na forma de

10 pó para reconstituição com um veículo adequado, por exemplo, água estéril livre de pirogênio, antes do uso.

Os compostos também podem ser formulados como composições retais ou vaginais tais como supositórios ou enemas de retenção, por exemplo, contendo bases convencionais para supositório tais como mantei-

15 ga de cacau ou outros glicerídeos.

Além das formulações descritas anteriormente, os compostos também podem ser formulados como uma preparação de depósito. Estas formulações de ação prolongada podem ser formuladas com materiais poliméricos ou hidrófobos adequados (por exemplo, como uma emulsão em um

20 óleo aceitável) ou resinas trocadoras de íons, ou derivados moderadamente solúveis, por exemplo, um sal moderadamente solúvel.

As composições farmacêuticas também podem compreender veículos ou excipientes adequados em fase sólida ou em gel. Exemplos de tais veículos ou excipientes incluem, porém sem limitação carbonato de cálcio, fosfato de cálcio, vários açúcares, amidos, derivados de celulose, gelatina, e polímeros tais como polietileno glicóis.

25

Formas líquidas ou sólidas adequadas de preparação farmacêutica são, por exemplo, soluções aquosas ou salinas para inalação, microencapsuladas, encocleadas, aplicadas como revestimento a partículas de ouro

30 microscópicas, contidas em lipossomas, nebulizadas, aerosóis, péletes para implantação na pele, ou secadas sobre um objeto agudo para serem introduzidas por esfregação. As composições farmacêuticas também incluem

grânulos, pós, comprimidos, comprimidos revestidos, (micro)cápsulas, supositórios, xaropes, emulsões, suspensões, cremes, gotas ou preparações com liberação demorada dos compostos ativos, em cujas preparações excipientes e aditivos e/ou auxiliares tais como desintegrantes, aglutinantes, agentes de revestimento, agentes de intumescimento, lubrificantes, flavorizantes, adoçantes ou solubilizantes são usualmente usados da maneira descrita acima. As composições farmacêuticas são adequadas para uso em uma variedade de sistemas de distribuição de fármacos. Para uma rápida recapitulação de métodos para distribuição de fármacos vide Langer R (1990) *Science* 249:1527-1533, que está aqui incorporado a título de referência.

Os ácidos nucléicos e opcionalmente outros terapicos e/ou antígenos podem ser administrados per se (como tais) ou na forma de um sal farmaceuticamente aceitável. Quando usados em medicina os sais devem ser farmaceuticamente aceitáveis, mas sais não farmaceuticamente aceitáveis podem ser convenientemente usados para preparar sais farmaceuticamente aceitáveis dos mesmos. Tais sais incluem, porém sem limitação, aqueles preparados a partir dos seguintes ácidos: clorídrico, bromídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maléico, acético, salicílico, p-toluenossulfônico, tartárico, cítrico, metanossulfônico, fórmico, malônico, succínico, naftaleno-2-sulfônico, e benzenossulfônico. Também, estes sais podem ser preparados como sais de metal alcalino ou de metal alcalino-terroso, tais como sais sódicos, potássicos ou cálcicos do grupo ácido carboxílico.

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

As composições podem ser convenientemente apresentados em uma forma de dosagem unitária e podem ser preparadas por qualquer um dos métodos bastante conhecidos na literatura farmacêutica. Todos os métodos incluem a etapa de associar os compostos a um veículo que constitui

um ou mais componentes acessórios. Em geral, as composições são preparadas pela associação uniforme e íntima dos compostos a um veículo líquido, um veículo sólido finamente dividido, ou ambos, e em seguida, se necessário, moldagem do produto. Unidades de dose líquida são frascos ou
5 ampolas. Unidades de dose sólida são comprimidos, cápsulas e supositórios.

Outros sistemas de distribuição podem incluir sistemas de distribuição de liberação lenta, de liberação retardada ou de liberação sistemática. Tais sistemas podem evitar repetidas administrações dos compostos,
10 aumentando a conveniência para o indivíduo e para o médico. Muitos tipos de sistemas de distribuição de liberação estão disponíveis e são conhecidos pelos especialistas na técnica. Eles incluem sistemas à base de polímeros tais como poli(lactídeo-glicolídeo), copolioxalatos, policaprolactonas, poliesteramidas, polioctoésteres, ácido polihidroxibutírico, e polianidridos. Micro-
15 cápsulas dos polímeros precedentes contendo fármacos estão descritas, por exemplo, na Patente US N° 5.075.19. Sistemas de distribuição também incluem sistemas não-poliméricos que são: lipídios incluindo esteróis tais como colesterol, ésteres de colesterol e ácidos graxos ou gorduras neutras tais como mono-, di- e triglicerídeos; sistemas de liberação de hidrogel; sistemas
20 silásticos; sistemas à base de peptídeo; revestimentos de cera; comprimidos prensados usando aglutinantes e excipientes convencionais; implantes parcialmente fundidos; e outros. Exemplos específicos incluem, porém sem limitação, (a) sistemas de erosão nos quais um agente da invenção está contido em uma forma no interior de uma matriz tais como aquelas descritas
25 nas Patentes US N°s 4.452.775, 4.675.189, e 5.736.152, e (b) sistemas de difusão nos quais um componente ativo difunde a uma taxa controlada a partir de um polímero tal como descrito nas Patentes US N°s 3.854.480, 5.133.974 e 5.407.686. Além disso, podem ser usados sistemas de distribuição à base de bomba, alguns dos quais são adaptados para implantação.

30 A presente invenção é ainda ilustrada pelos exemplos a seguir, que não devem de modo algum ser interpretados como limitativos.

EXEMPLOS

Exemplo 1

Sensibilidade de PBMC humano a oligorribonucleotídeos contendo N-U-R₁-R₂,

Métodos: Tecnologia Luminex

5 Códigos de cor Luminex separam minúsculos glóbulos, denominados microesferas, em 100 grupos distintos. Cada grupo de glóbulos pode ser revestido com um reagente específico para um bioensaio particular, permitindo a captura e a detecção de analitos específicos provenientes de uma amostra. No analisador compacto Luminex, lasers excitam os corantes
10 internos que identificam cada partícula de microesfera, e também qualquer corante repórter capturado durante o ensaio. São feitas muitas leituras em cada grupo de glóbulos, validando ainda os resultados. Desta maneira, a tecnologia Luminex permite repetir até 100 ensaios únicos em uma mesma amostra, de forma rápida e precisa.

15 Células mononucleares de sangue periférico humano (PBMCs) foram isoladas de doadores saudáveis, plaqueadas, e estimuladas *in vitro* com vários agentes imunoestimuladores de teste e de controle por 16 horas. Depois de 16 horas, os sobrenadantes foram recolhidos e em seguida analisados pelo ensaio ELISA. Oligorribonucleotídeos contendo N-U-R₁-R₂, tes-
20 tados complexados com DOTAP e com curvas de titulação completas (7 concentrações), partindo de 2 µM de ORN complexado com 25 µg/ml DOTAP e com etapas de diluição de 1/3. Também foram incluídos certos controles negativos, inclusive meio isolado e DOTAP (25 mg/ml de cavidade de cultura; "lipossomas") isolado. Os agentes imunoestimuladores de contro-
25 le incluíram a imidazoquinolina R-848 (2 µM com etapas de diluição de 1/3 e 7 concentrações) o ligando reportado para TLR7, ORN com motivos TLR8 tais como as seqüências AU e AUU (SEQ ID N°: 13- SEQ ID N°: 15) ORN com motivos TLR7/8 tais como as seqüências CU, GU e GUU (SEQ ID N°: 19- SEQ ID N°: 23). Os resultados estão mostrados nas figuras 1 e 3.

30 Foi realizado um ensaio similar testando diferentes seqüências de ORN usando pDC isolado, monócitos e estimulação com mDC. As células foram estimuladas com 0,5 µM ORN complexado com 10 µg/ml de

DOTAP, 0,5 μ M de CpG ODN ou DOTAP ou meio isolado. Depois de 16 horas, os sobrenadantes foram colhidos e os níveis de IFN-alfa, TNF-alfa e IL-12p40 foram medidos por ELISA. Os resultados estão mostrados na figura 2.

5 A figura 1 mostra uma nítida diferença entre a produção de TNF-alfa e IFN-alfa com a estimulação com PBMC para a SEQ ID N°: 12 contendo uma sequência AU e para a sequência SEQ ID N°: 21 contendo uma sequência GU. Nova análise de sequências revelou que uma repetição CUA (SEQ ID N°: 24) é um ORN indutor de TNF-alfa adicional sem produção de
10 IFN-alfa. ORN mais curtos contendo repetições AU e GU (SEQ ID N°: 29-SEQ ID N°: 34) mostraram resultados similares quando comparados com os mais compridos (SEQ ID N°: 12- SEQ ID N°: 23), porém com uma queda na eficácia e na potência.

As figuras 2 e 6 mostram a análise de AU-ORN (SEQ ID N°: 13) e GU-ORN (SEQ ID N°: 21) em monócitos isolados, pDCs e mDCs refletindo uma produção de IFN-alfa bastante reduzida para AU-ORN (SEQ ID N°: 13) e uma nítida produção de TNF-alfa e IL-12p40 para ambos os ORN. A produção de IFN-alfa com a estimulação com ORN a partir de pDC parece ser mediada por TLR7 ao passo que a produção de TNF-alfa e IL-12p40 a partir
15 de monócitos isolados e mDC parece ser mediada por TLR8.

Os resultados de Luminex refletiram resultados equiparáveis para os dados de ELISA e provaram que a principal diferença entre GU-ORN e AU-ORN deve-se à produção de IFN-alfa e de genes/citocinas relacionadas ao IFN-alfa (figuras 3 e 8a). Além disso, outros dados de Luminex
20 mostraram que ao contrário do IFN-alfa e dos genes/citocinas relacionadas ao IFN-alfa as outras citocinas/quimiocinas permanecem inafetadas (figuras 7 e 8a-d) com uma IL-6 separada das células CD123-CD14. Esta produção de IL-6 pode ser devida à ativação de células B mediadas por TLR7.

Exemplo 2

30 *Comparação das atividades máximas de IFN-alfa e TNF-alfa de oligorribonucleotídeos*

PBMC humanos foram estimulados com ORN complexado com

DOTAP. Depois de 16 horas, os sobrenadantes foram recolhidos e os níveis de TNF-alfa e IFN-alfa foram medidos. Foram determinadas as atividades média/máxima a 0,6 μ M de 3 - 6 doadores de sangue e duas experiências individuais. Os resultados estão mostrados na figura 4. Esses dados diferenciam nitidamente entre os motivos TLR8 e TLR7/8: ORN com o motivo N-U-R₁-R₂ apresentou produção de IFN-alfa inferior a 300 pg/ml ao passo que TLR7/8 ORN apresentou maior produção de IFN-alfa mediante estimulação com PBMC (figura 4a). TLR8 e TLR7/8 ORN estão divididos por uma linha vermelha. Em contraste, as medidas dos níveis de TNF-alfa indicaram que tanto o ORN com o motivo TLR8 e o ORN com o motivo TLR7/8 estimulam a produção de TNF-alfa.

Exemplo 3

Comparação da atividade máxima de IFN-alfa com o EC50 de IFN-alfa EC50 de oligorribonucleotídeos

PBMC humanos foram estimulados com ORN complexado com DOTAP. Depois de 16 horas, os sobrenadantes foram recolhidos e os níveis de IFN-alfa foram medidos. Foram determinadas as atividades média/máxima a 0,6 μ M e o EC50 de curvas de titulação completa (faixa: 2 μ M a 0,9 nM) de 3 - 6 doadores de sangue e duas experiências individuais. Os resultados estão mostrados na figura 5. O EC50 e as atividades máximas mostraram resultados equiparáveis no que diz respeito aos motivos TLR8 e aos motivos TLR7/8. EC50 baixo/atividade máxima alta representa TLR7/8 ORN (Figura 5a) ao passo que EC50 alto e atividade máxima baixa representa TLR8 ORN (Figura 5b).

As seqüências de ORN listadas na Tabela 1 foram testadas quanto à produção de IFN-alfa e TNF-alfa mediante estimulação com PBMC humanas. PBMC humanas foram estimuladas durante 16 horas com o ORN indicado, e os sobrenadantes foram recolhidos e a produção de citocinas foi medida por ELISA. A Tabela 2 resume a atividade min/max e o EC50 de ORN para a produção de IFN-alfa e TNF-alfa.

Tabela 1:

		IFN- alfa	TNF- alfa
SEQ ID N°: 1	G*U*A*G*G*C*A*C	-	+
SEQ ID N°: 2	U*U*A*G*G*C*A*C	-	+
SEQ ID N°: 3	C*U*A*G*G*C*A*C	-	+
SEQ ID N°: 4	A*U*A*G*G*C*A*C	-	+
SEQ ID N°: 7	dN*dN*dN*dN*dN*N*A*U*A*U*N*N*dN*dN*dN*dN*dN	-	+
SEQ ID N°: 9	dN*dN*dN*dN*dN*A*U*A*U*A*U*A*U*dN*dN*dN*dN*dN	-	+
SEQ ID N°: 11	G*C*C*A*C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*U*A*U*A*C*C	-	+
SEQ ID N°: 12	A*U*A*U*A*U*A*U*A*U*A*U*A*U*A*U*A*U*A*U	-	+
SEQ ID N°: 13	U*U*A*U*U*A*U*U*A*U*U*A*U*U*A*U*U*A*U*U	-	+
SEQ ID N°: 14	U*U*U*A*U*U*U*A*U*U*U*A*U*U*U*A*U*U*U*A	+	+
SEQ ID N°: 15	U*U*U*U*A*U*U*U*U*A*U*U*U*U*A*U*U*U*U*A	+	+
SEQ ID N°: 16	A*A*U*A*A*U*A*A*U*A*A*U*A*A*U*A*A*U*A*A	-	+
SEQ ID N°: 17	A*A*A*U*A*A*U*A*A*U*A*A*U*A*A*U*A*A*U	-	+
SEQ ID N°: 18	A*A*A*A*U*A*A*A*U*A*A*A*U*A*A*A*U*A*A*A*U	-	+
SEQ ID N°: 19	C*U*C*U*C*U*C*U*C*U*C*U*C*U*C*U*C*U	+	+
SEQ ID N°: 20	G*U*G*U*G*U*G*U*G*U*G*U*G*U*G*U*G*U	+	+
SEQ ID N°: 21	U*U*G*U*U*G*U*U*G*U*U*G*U*U*G*U*U*G*U	+	+
SEQ ID N°: 22	U*U*U*G*U*U*U*G*U*U*U*G*U*U*U*G*U*U*U*G	+	+
SEQ ID N°: 23	U*U*U*U*G*U*U*U*U*G*U*U*U*U*G*U*U*U*U*G	+	+
SEQ ID N°: 24	C*U*A*C*U*A*C*U*A*C*U*A*C*U*A*C*U*A*C*U	-	+
SEQ ID N°: 25	G*U*A*G*U*A*G*U*A*G*U*A*G*U*A*G*U*A*G*U	+	+
SEQ ID N°: 26	G*U*C*G*U*C*G*U*C*G*U*C*G*U*C*G*U*C*G*U	+	+

97/105

		IFN- alfa	TNF- alfa
SEQ ID N°: 27	I*U*A*I*U*A*I*U*A*I*U*A*I*U*A*I*U*A*I*U	+	+
SEQ ID N°: 28	U*U*I*U*U*I*U*U*I*U*U*I*U*U*I*U*U*I*U*U	+	+
SEQ ID N°: 29	U*U*G*U*U*G*U	+	+
SEQ ID N°: 30	U*U*A*U*U*A*U	-	+
SEQ ID N°: 31	U*G*U*G*U*G*U	+	+
SEQ ID N°: 32	U*C*U*C*U*C*U	+	+
SEQ ID N°: 33	U*A*U*A*U*A*U	-	+
SEQ ID N°: 34	G*U*A*G*U*A*G	+	+

+: produção de citocina.

-: sem produção de citocina.

Tabela 2

SEQ ID N°	ORN	Atividade max IFN-alfa [pg/ml]		Atividade max TNF-alfa [pg/ml]		IFN-alfa EC50 [µM]		TNF-alfa EC50 [µM]	
SEQ ID N°: 49	C*C*G*A*G*C*C*G*C*U*U*A*A*C*C*C	3367	710,4	18039	5982	0,375	0	0,35	0
SEQ ID N°: 53	C*C*G*A*G*C*C*G*C*U*U*A*A*C*C*C	3091	1028	14623	2088	0,244	0	0,952	0
SEQ ID N°: 51	C*C*G*A*G*C*C*G*C*U*U*A*U*C*C*C	2615	893,9	23325	3378	0,582	0	0,125	0
SEQ ID N°: 50	C*C*G*A*G*C*C*G*C*A*U*U*C*C*C	2614	599,2	11141	5133	0,562	0	0,564	0
SEQ ID N°: 77	C*C*G*A*G*C*C*G*A*G*U*U*C*A*C*C	2519	336,9	21820	8316	0,151	0,15	0,257	0,095
SEQ ID N°: 52	C*C*G*A*G*C*C*G*C*A*U*U*C*C*C	2263	744,8	11920	5654	0,508	0	0,895	0
SEQ ID N°: 67	C*C*G*A*G*C*C*G*A*G*U*U*C*A*C*C	2094	0	40729	0	0,081	0	0,079	0
SEQ ID N°: 62	C*C*G*A*G*C*C*G*A*T*U*G*U*A*C*C	1945	503,8	37334	4597	0,276	0,029	0,343	0,004
SEQ ID N°: 72	C*C*G*A*G*C*C*G*A*U*U*U*T*A*C*C	1896	476,1	38811	11366	0,075	0,019	0,146	0,037
SEQ ID N°: 68	C*C*G*A*G*C*C*G*A*T*U*U*C*A*C*C	1821	0	29647	0	0,018	0	0,217	0
SEQ ID N°: 58	C*C*G*A*G*C*C*G*A*G*U*U*U*A*C*C	1760	423,3	36627	9350	0,063	0,047	0,203	0,08
SEQ ID N°: 59	C*C*G*A*G*C*C*G*A*T*U*U*U*A*C*C	1714	473,8	26762	691,6	0,074	0,036	0,224	0,106
SEQ ID N°: 70	C*C*G*A*G*C*C*G*A*U*U*U*T*A*C*C	1702	554,3	44904	10972	0,132	0,035	0,15	0,029
SEQ ID N°: 71	C*C*G*A*G*C*C*G*A*U*U*U*C*A*C*C	1626	629,7	45164	13344	0,051	0,023	0,16	0,011
SEQ ID N°: 66	C*C*G*A*G*C*C*G*A*U*G*U*U*A*C*C	1616	188,4	43098	3722	0,558	0,326	0,051	0,033
SEQ ID N°: 78	C*C*G*A*G*C*C*G*A*T*U*U*C*A*C*C	1609	805,1	20126	4342	0,006	0,002	0,241	0,139
SEQ ID N°: 57	C*C*G*A*G*C*C*G*A*U*U*U*A*C*C	1499	54,8	33624	1507	0,077	0,034	0,213	0,072
SEQ ID N°: 60	C*C*G*A*G*C*C*G*A*U*U*U*A*C*C	1463	192,9	36562	2374	0,109	0,036	0,187	0,06

Tabela 2 continuação

SEQ ID N°	ORN	Atividade max IFN-alfa [pg/ml]		Atividade max TNF-alfa [pg/ml]		IFN-alfa EC50 [μM]		TNF-alfa EC50 [μM]	
SEQ ID N°: 64	C*C*G*A*G*C*C*G*A*U*C*U*A*C*C	1421	0	30712	0	0,577	0	0,289	0
SEQ ID N°: 73	C*C*G*A*G*C*C*G*A*U*U*A*A*C*C	1395	367,9	31619	10958	0,055	0,013	0,163	0,024
SEQ ID N°: 54	C*C*G*A*G*C*C*G*C*A*U*U*C*C*C*C	1233	772,4	12595	5272	0,78	0	0,339	0
SEQ ID N°: 80	C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*U*U*C*A*C*C	1225	486,6	28108	3911	0,033	0,02	0,217	0,022
SEQ ID N°: 79	C*C*G*A*G*C*C*G*A*T*U*U*C*A*C*C	1152	402,7	17728	415,8	0,035	0,02	0,334	0,138
SEQ ID N°: 69	C*C*G*A*G*C*C*G*A*U*C*U*C*A*C*C	1031	584,8	26915	3185	0,619	0,582	0,313	0,174
SEQ ID N°: 75	C*C*G*A*G*C*C*G*A*U*U*C*T*A*C*C	929,9	408,7	27576	4712	1,297	0,433	0,129	0,071
SEQ ID N°: 86	C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*G*U*C*C*C	856,5	212,6	4178	2818	0,767	0	0,85	0
SEQ ID N°: 81	C*C*G*A*G*C*C*G*A*G*C*U*C*A*C*C	842,9	0	14519	3965	0,667	0,083	0,802	0,093
SEQ ID N°: 74	C*C*G*A*G*C*C*G*A*U*U*G*C*A*C*C	609,1	141,6	30958	13275	0,419	0,408	0,329	0,067
SEQ ID N°: 61	C*C*G*A*G*C*C*G*A*C*U*G*U*A*C*C	587,7	223,7	42180	2040	0,736	0,009	0,141	0,077
SEQ ID N°: 48	C*C*G*A*G*C*C*G*C*A*U*U*A*C*C*C	543,4	457,8	9988	3681	0,75	0	0,801	0
SEQ ID N°: 76	C*C*G*A*G*C*C*G*A*U*U*G*A*A*C*C	448,6	323,9	26371	7157	1,543	0,457	0,109	0,017
SEQ ID N°: 42	C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*U*A*C*C*C	392,4	277,9	17418	3300	1,5	0	0,395	0
SEQ ID N°: 39	C*C*G*A*G*C*C*A*U*A*U*A*U*C	356,7	262,3	19253	4261	1,5	0	0,324	0
SEQ ID N°: 65	C*C*G*A*G*C*C*G*A*U*A*U*A*C*C	335,2	63,87	39377	3971	1,131	0,03	0,077	0,002
SEQ ID N°: 44	C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*U*C*C*C*C	305,6	163,3	19473	7758	1,5	0	0,321	0
SEQ ID N°: 47	C*C*G*A*G*C*C*G*C*U*A*C*C*C	271,9	204	14265	4080	1,5	0	0,566	0

Tabela 2 continuação

SEQ ID N°	ORN	Atividade max IFN-alfa [pg/ml]		Atividade max TNF-alfa [pg/ml]		IFN-alfa EC50 [µM]		TNF-alfa EC50 [µM]	
SEQ ID N°: 38	C*C*G*A*G*C*C*A*U*A*U*A*U*C*C*C	245	148,3	14064	3564	1,5	0	0,89	0
SEQ ID N°: 37	C*C*G*A*G*C*C*G*C*U*A*U*A*U*C*C*C	240,5	161,2	22800	6376	1,5	0	0,75	0
SEQ ID N°: 40	C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*U*A*U*A*U*C*C*C	235,3	124,3	18083	4101	1,5	0	0,352	0
SEQ ID N°: 55	C*C*G*A*G*C*C*G*C*U*A*U*A*U*C*C*C	224,4	772,4	15154	5272	2	0	0,337	0
SEQ ID N°: 82	C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*G*U*A*U*A*U*C	204	28,62	12595	4373	2	0	0,219	0
SEQ ID N°: 85	C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*G*A*U*A*U*A*U*C	193,7	37,15	17146	7964	2	0	0,215	0
SEQ ID N°: 63	C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*U*G*U*A*U*A*U*C	177,3	6,443	34219	5563	1,836	0,094	0,309	0,151
SEQ ID N°: 43	C*C*G*A*G*C*C*G*C*U*A*U*A*U*A*U*C	144,3	74,51	10261	2883	2	0	0,954	0
SEQ ID N°: 36	C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*U*G*U*A*U*A*U*C	110,4	32,54	18063	6409	1,5	0	0,85	0
SEQ ID N°: 87	C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*G*C*U*A*U*A*U*C	100,5	73,84	12979	6676	2	0	0,346	0
SEQ ID N°: 45	C*C*G*A*G*C*C*G*C*A*U*A*U*A*U*A*U*C	98,44	42,34	10491	4195	1,7	0	0,754	0
SEQ ID N°: 41	C*C*G*A*G*C*C*G*C*A*U*A*U*A*U*A*U*C	97,97	42,23	10756	3679	2	0	0,897	0
SEQ ID N°: 83	C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*G*U*G*U*A*U*A*U	96,22	2,398	12207	6121	2	0	0,215	0
SEQ ID N°: 46	C*C*G*A*G*C*C*G*C*A*U*A*U*A*U*A*U*A	74,76	32,92	7096	1767	2	0	0,765	0
SEQ ID N°: 88	C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*G*C*U*G*U*A*U*A	73,19	34,21	11996	6696	2	0	2	0
SEQ ID N°: 35	C*C*G*A*G*C*C*G*C*G*C*G*C*G*C*G*C*G	70,6	11,78	2854	1505	2	0	2	0
SEQ ID N°: 84	C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*G*C*U*A*U*A*U*A	67,76	15,71	8545	3592	2	0	0,377	0
SEQ ID N°: 56	C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*G*G*C*A*U*A*U*A	59,84	8,006	4430	1124	2	0	2	0

Exemplo 4

ORN sintéticos diferenciam entre a liberação de IFN-alfa e TNF-alfa mediante estimulação com PBMC humanas

pDC purificado com CD123+ (Figuras 10a e 10b) ou monócitos isolados (Figura 10c) foram incubados com 1 μ M de ORN complexado com 25 μ g/ml de DOTAP ou DOTAP isolado (Figura 10a) ou indicaram quantidades de ORN complexado com DOTAP ou DOTAP isolado (Figuras 10b-10c). Depois de 16 horas, as células foram recolhidas e coloridas com os anticorpos CD123, CD11c e HLA-DR (Figuras 10a e 10b) ou CD14 e CD19 (Figura 10c). Análise por FACS quanto à presença de CD86 mostra que ORN rico em AU (SEQ ID N°: 13) e ORN rico em GU (SEQ ID N°: 21) apresentam diferenças na supressão do marcador de superfície de CD86 mediante estimulação com pDC (Figura 10a). A estimulação com ORN rico em AU SEQ ID N°: 13 resultou em muito pouca ativação de CD86, ao passo que a estimulação com ORN rico em GU ORN SEQ ID N°: 21 resultou em significativa ativação de CD86. Foi determinado que esta ativação era dependente da dose (figura 10b). ORN rico em AU (SEQ ID N°: 13) e ORN rico em GU (SEQ ID N°: 21) não apresentaram diferenças na supressão do marcador de superfície de CD80 mediante estimulação com PBMC humanas (dados não mostrados) e com células positivas para CD14 (Figura 10c).

Exemplo 5

ORN rico em AU (SEQ ID N°: 13) e ORN rico em GU (SEQ ID N°: 21) estimulam a sinalização de TLR8 humano específico de maneira dependente da dose

Células HEK-293 insensíveis foram estavelmente transfectadas com o plasmídio de expressão TLR3 ou TLR8 humano e com a construção do gene repórter de NF κ B-luciferase. As células foram incubadas com as seqüências de ORN indicadas (10 μ M complexados com 50 μ g/ml de DOTAP) ou estímulos de controle (10 μ M de R-848, 50 μ g/ml de polilC, 3,3 μ M de ODN 10103 ou 50 μ g/ml de DOTAP) por 16 horas. A ativação de NF κ B foi medida analisando-se a atividade de luciferase. Os resultados estão dados como indução de dobras acima do valor de referência (meio). A-

presentamos uma experiência representativa de 6 repetições independentes (Figura 9a).

Células HEK-293 estavelmente transfectadas expressando TLR8 humano foram estimuladas com as concentrações indicadas de ORN complexado com DOTAP (50 µg/ml -> diluição de 1/3) ou DOTAP isolado (50 µg/ml -> diluição de 1/3) por 16 horas. A ativação de NFκB foi medida analisando-se a atividade de luciferase. Os resultados estão dados como indução de dobras acima do valor de referência (meio). Apresentamos uma experiência representativa de 3 repetições independentes (Figura 9b).

Células HEK-293 insensíveis foram estavelmente transfectadas com o plasmídio de expressão TLR8 humano e com a construção do gene repórter de NFκB-luciferase. As células foram incubadas com as seqüências de ORN indicadas (15 µM complexados com 75 µg/ml de DOTAP) ou estímulos de controle (15 µM de R-848 ou 75 µg/ml de DOTAP) e com meio (à esquerda), 200 nM de bafilomicina (Baf., no centro) ou 1 mM de cloroquina (CQ, à direita) por 16 horas. A ativação de NFκB foi medida analisando-se a atividade de luciferase. Os resultados estão dados como indução de dobras acima do valor de referência (meio). Apresentamos uma experiência representativa de 4 repetições independentes (Figura 9c).

Células RPMI 8226 foram pré-incubadas com 1000 U/ml de Intron A por 3 horas, lavadas duas vezes com meio e então estimuladas por 16 horas com as concentrações indicadas de ORN complexado com DOTAP (50 µg/ml -> diluição de 1/3). A liberação de citocina de IP-10 foi medida por ELISA. Os resultados estão dados como pg/ml. Apresentamos uma experiência representativa de 3 repetições independentes (Figura 9d).

Estes dados demonstram a especificidade da SEQ ID N°: 13 e da SEQ ID N°: 21 para TLR8.

O ensaio foi repetido com um TLR8 ORN (SEQ ID N°: 13), um TLR 7/8 ORN (SEQ ID N°: 21) e um ORN de controle (SEQ ID N°: 5) (Tabela 3) tanto em uma dose alta (H.D., 10 µg/ml) como em uma dose baixa (L.D., 2,5 µg/ml). Só o tratamento com a SEQ ID N°: 21 resultou em produção significativa de IL-12 e TNF-alfa (Figura 11a e 11b, respectivamente).

Todos os ORN estimularam a produção de IFN- γ (Figura 11c).

SEQ ID N°	ORN
SEQ ID N°: 5	C*C*G*U*C*U*G*U*U*G*U*G*U*G*A*C*U*C
SEQ ID N°: 13	U*U*A*U*U*A*U*U*A*U*U*A*U*U*A*U*U*A*U*U
SEQ ID N°: 21	U*U*G*U*U*G*U*U*G*U*U*G*U*U*G*U*U*G*U*U

Exemplo 6

Macrófagos de camundongo não respondem a ORN rico em AU (SEQ ID N°: 13) in vitro ou in vivo

5 Células Raw264.7 (Figura 12a), células J774 (Figura 12b) e células CD11c⁺ purificadas (Milteny, marcadas com glóbulos magnéticos) foram isoladas de esplenócitos de camundongos sv129 (figuras 12c-12e) e foram estimuladas com as concentrações indicadas de ORN complexado com DOTAP (50 μ g/ml e diluído com ORN), R-848 ou DOTAP isolado (50 μ g/ml). Depois de 16 horas (figuras 12a e 12b) ou 20 horas (figuras 12c-12e) os sobrenadantes foram recolhidos e usados para ELISA de TNF-alfa (figuras 12a e 12b), IL-12p40 (Figura 12c), IFN-alfa (Figura 12d) e IP-10 (Figura 12e). Os dados representam um indivíduo de pelo menos três experiências (figuras 12a e 12b) e a média de 3 camundongos (figuras 12c-12e). Para

10 medir a capacidade do ORN rico em AU para estimular células de camundongo *in vivo*, camundongos sv129 (n = 5/grupo) foram injetados com as quantidades indicadas de ORN formulado com DOTAP (60, 20 ou 6 μ g/ml), e exsudados depois de 3 horas. A produção de IL-12p40 (Figura 12f), IFN-alfa (Figura 12g) e IP-10 (Figura 12h) foi medida em sangue total por ELISA.

20 Exemplo 7

Esplenócitos de rato purificados não respondem a ORN rico em AU SEQ ID N°: 13

Esplenócitos de 3 ratos Sprague-Dawley foram reunidos e estimulados com as concentrações indicadas de SEQ ID N°: 21, SEQ ID N°: 13 (tanto complexada com 62,5 μ g/ml de DOTAP com diluição de 1/5), R-848

25 ou DOTAP isolado (62,5 μ g/ml -> diluição de 1/5). Os sobrenadantes foram recolhidos depois de 20 horas e os níveis de TNF-alfa foram medidos por ELISA. Como mostrado na figura 13, a estimulação com ORN rico em GU

SEQ ID N°: 21 resultou na produção de TNF-alfa, ao passo que a estimulação com ORN rico em AU SEQ ID N°: 13 não resultou em produção de TNF-alfa.

Exemplo 8

5 *O fracasso de células de roedores em responder a ORN rico em AU SEQ ID N°: 13 pode resultar de polimorfismo de TLR8 entre espécies*

A estimulação de células humanas e bovinas com ORN rico em AU resultou na produção de citocinas, ao passo que a estimulação de células de camundongo e de rato não. Foi feito alinhamento e análise da sequência de TLR8. A comparação de seqüências de proteínas de TLR8 entre diferentes vertebrados (homem, macaco, chimpanzé, cachorro, vaca, porco, camundongo e rato) mostrou fortes diferenças na repetição rica em leucina (LRR) 3 do domínio 1. Enquanto o homem, o chimpanzé e o macaco são
10 altamente conservados, o rato, o camundongo e o porco demonstraram deleções de 4 AA na posição 106 (camundongo), 103 (rato) ou 102 (porco), e a vaca demonstrou uma inserção de 2 AA (105-106) comparada com humanos. O interessante é que o porco e o gado revelaram uma outra deleção de
15 2 AA na mesma região (posição 97). É possível que a deleção na região de repetição rica em leucina do domínio interfira na ligação de ORN rico em AU.
20 em AU.

EQUIVALENTES

O relatório descritivo acima exposto é considerado suficiente para tornar possível que o especialista na técnica pratique a invenção. A
25 presente invenção não deve ter seu escopo limitado pelos exemplos fornecidos, visto que os exemplos são apenas ilustrativos de um aspecto da invenção e outras modalidades equivalentes em termos funcionais estão dentro do escopo da invenção. Várias modificações da invenção além daquelas mostradas e descritos tornar-se-ão aparentes para os especialistas na técnica a partir da descrição dada acima e se enquadram no escopo das reivindicações anexas. As vantagens da invenção não são necessariamente abrangidas por cada modalidade, da invenção.
30

Todas as referências, patentes e publicações de patente que estão mencionadas neste relatório estão aqui aqui incorporadas em sua integridade a título de referência.

REIVINDICAÇÕES

1. Oligorribonucleotídeo, caracterizado pelo fato de que apresenta a SEQ ID N° 21.

5 2. Uso de um oligorribonucleotídeo de SEQ ID N° 21, caracterizado pelo fato de ser para a preparação de um medicamento para modular uma resposta imune em um paciente, compreendendo administrar ao paciente em necessidade de tal um oligorribonucleotídeo de SEQ ID N° 21 em uma quantidade eficaz para modular uma resposta imune.

10 3. Uso de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o oligorribonucleotídeo é administrado ao paciente em uma dose eficaz para induzir a expressão de citocina.

4. Uso de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a citocina é selecionada de IL-6, IL-10, IL-12, TNF-alfa e IFN-gamma.

15 5. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende um oligorribonucleotídeo de SEQ ID N° 21 em um veículo farmaceuticamente aceitável.

20 6. Composição de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que compreende ainda um antígeno em que tal antígeno é opcionalmente conjugado ao oligorribonucleotídeo.

7. Composição de acordo com a reivindicação 5 ou 6, caracterizada pelo fato de que o veículo farmaceuticamente aceitável é formulado para injeção.

25 8. Composição de acordo com a reivindicação 5 ou 6, caracterizada pelo fato de que o veículo farmaceuticamente aceitável é formulado para administração oral, nasal, sublingual, por mucosa, respiratória, e dérmica.

1/24

Estimulação PBMC
Média de 3 doadores 16 h

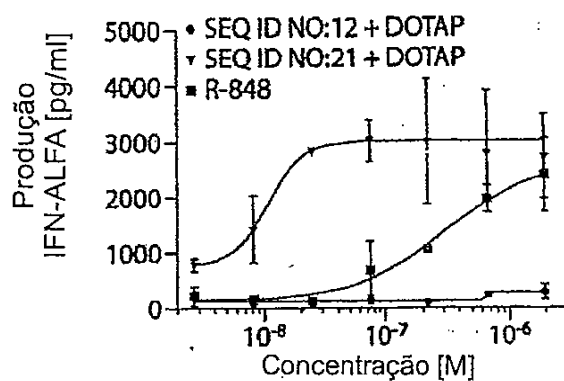


Fig. 1A

Estimulação PBMC
Média de 3 doadores 16 h

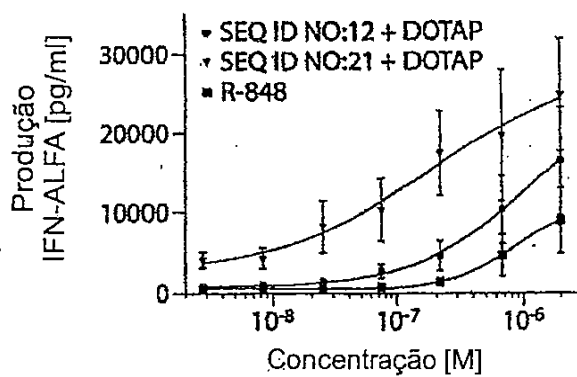
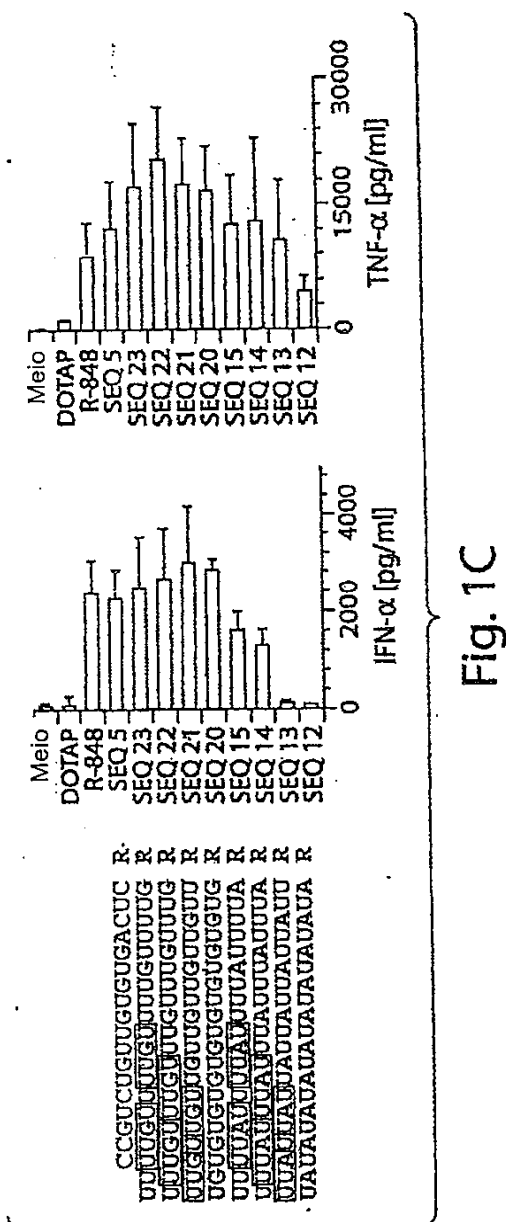


Fig. 1B



3/24

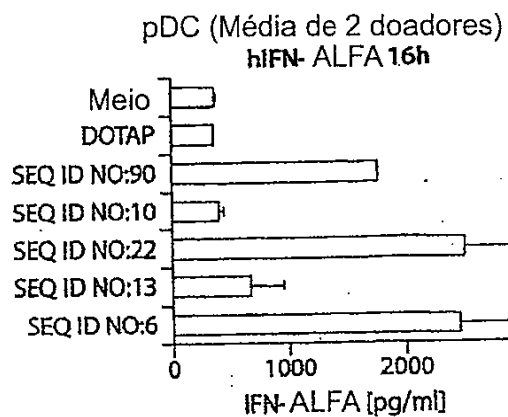


Fig. 2A

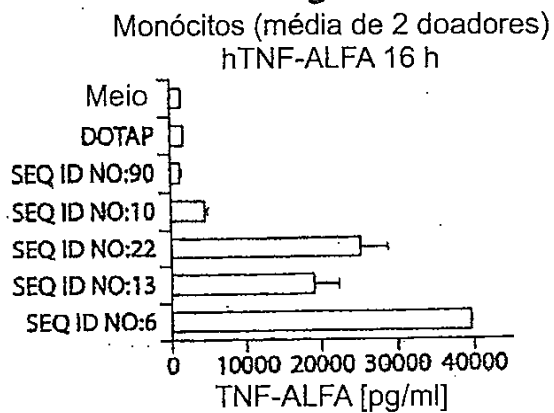


Fig. 2B

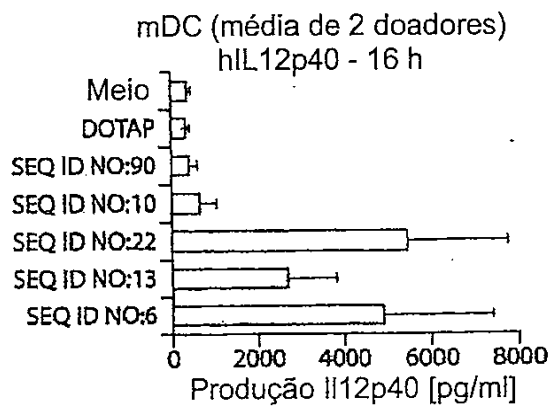


Fig. 2C

4/24

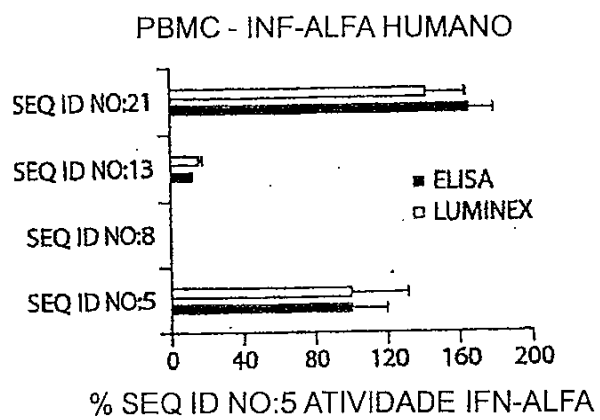


Fig. 3A

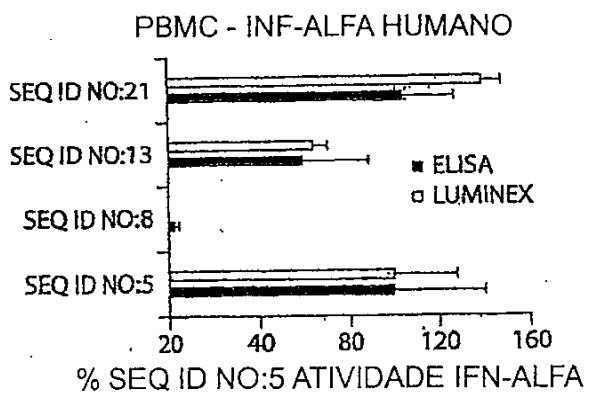


Fig. 3B

5/24

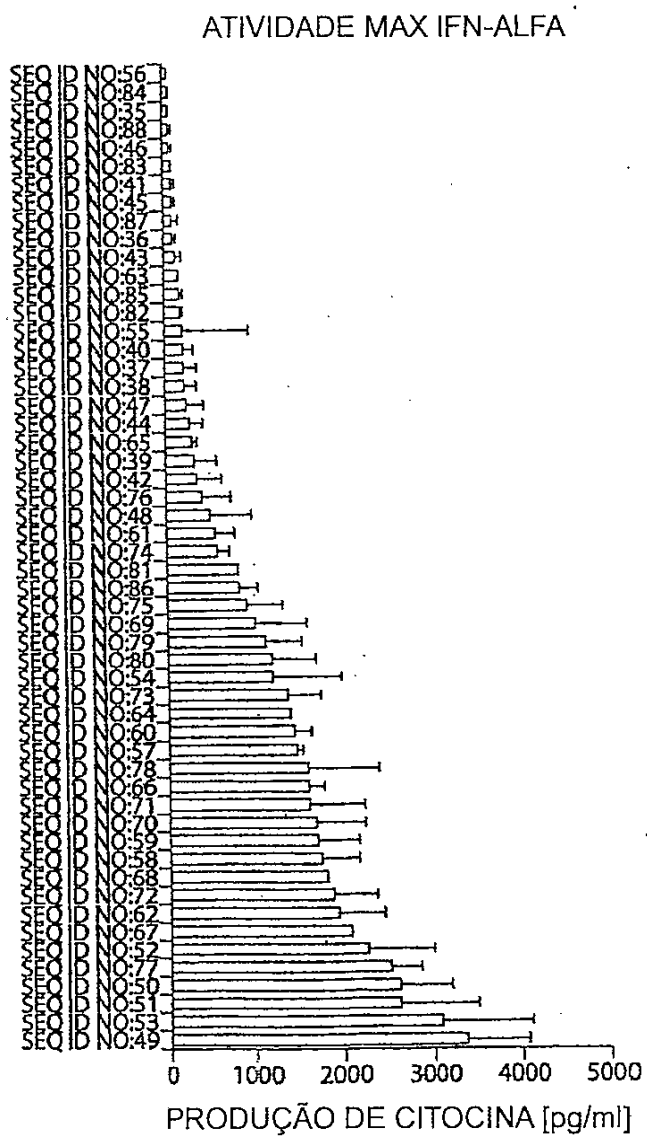


Fig. 4A

6/24

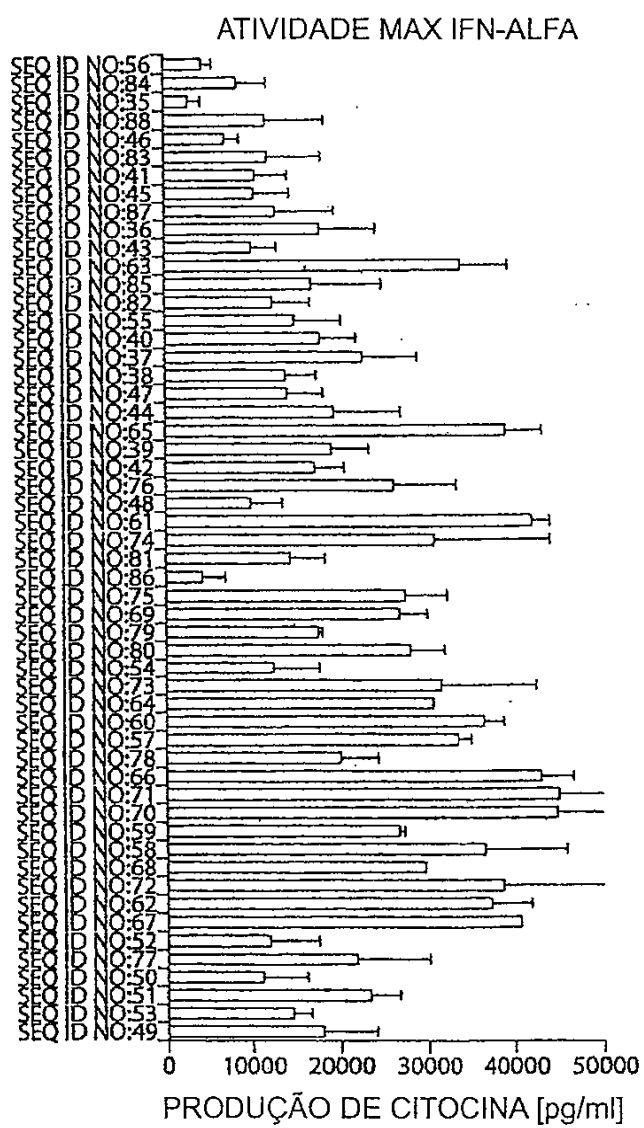


Fig. 4B

Fig. 5A

8/24

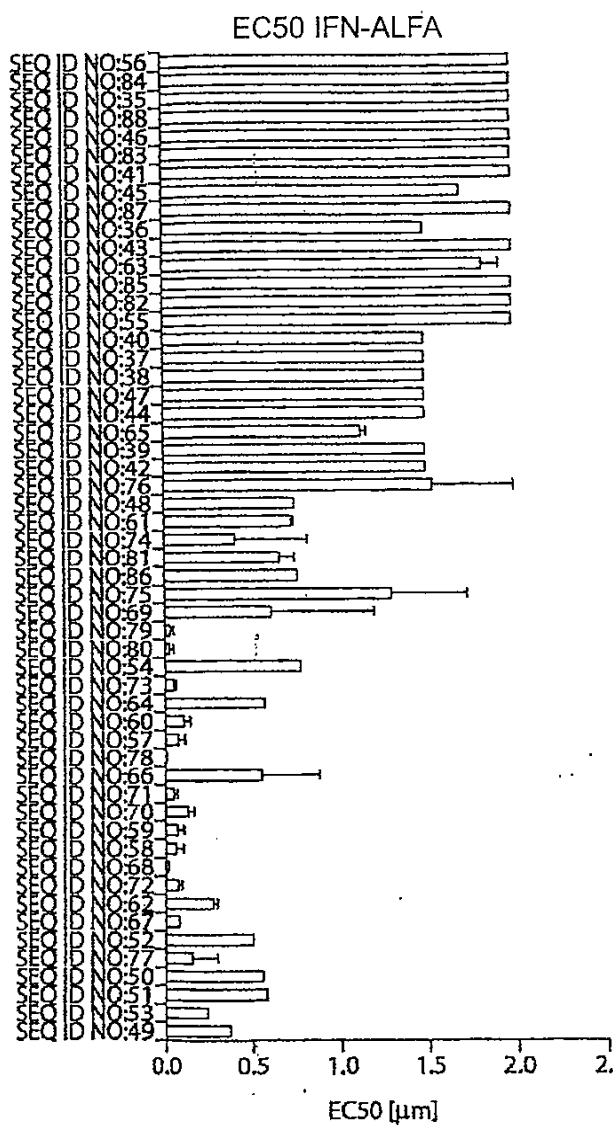


Fig. 5B

9/24

CD123 + CÉLULAS
MÉDIA DE 3 DOADORES DE SANGUE - ESTIMULAÇÃO DE 16 H

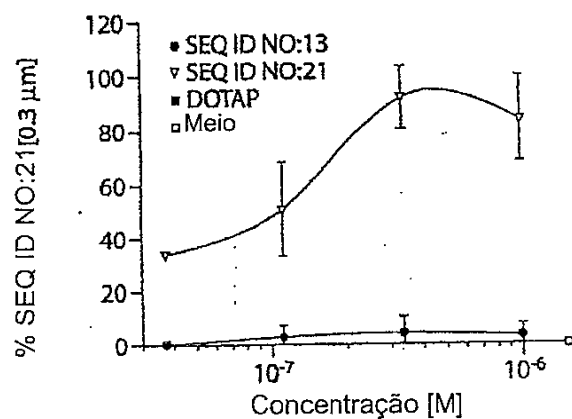


Fig. 6A

PBMC
MÉDIA DE 3 DOADORES DE SANGUE - ESTIMULAÇÃO DE 16 H

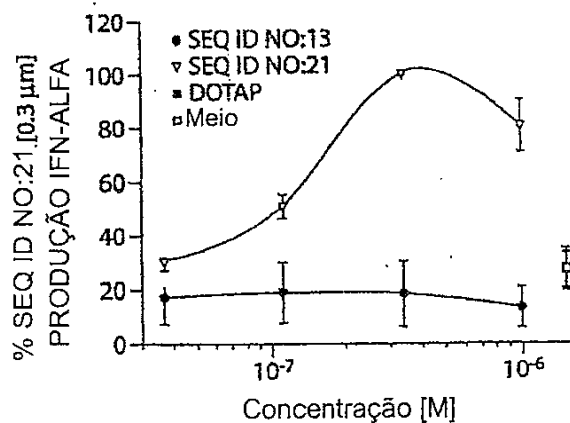


Fig. 6B

10/24

Cd14 + CÉLULAS
MÉDIA DE 3 DOADORES DE SANGUE - ESTIMULAÇÃO DE 16 H

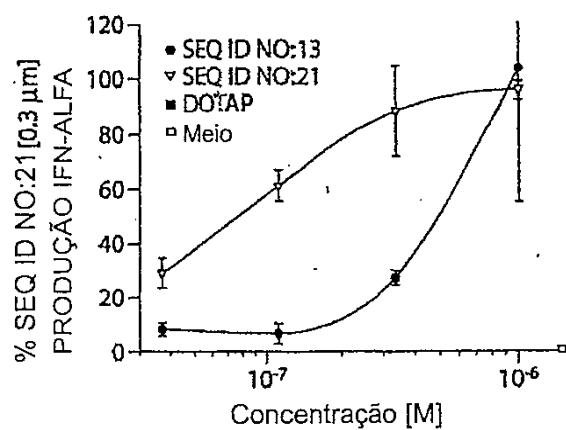


Fig. 6C

PMBC
MÉDIA DE 3 DOADORES DE SANGUE - ESTIMULAÇÃO DE 16 H

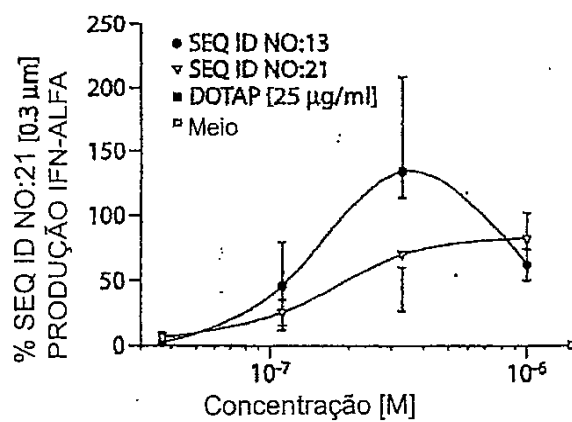


Fig. 6D

11/24

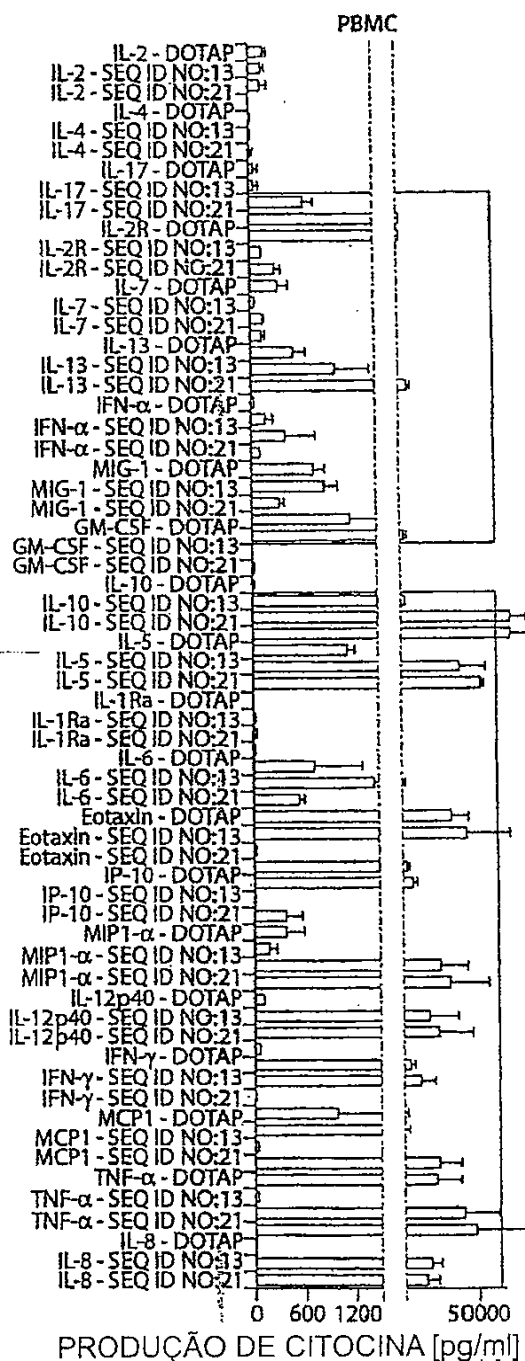


Fig. 7-1

12/24

CD14 + CÉLULAS

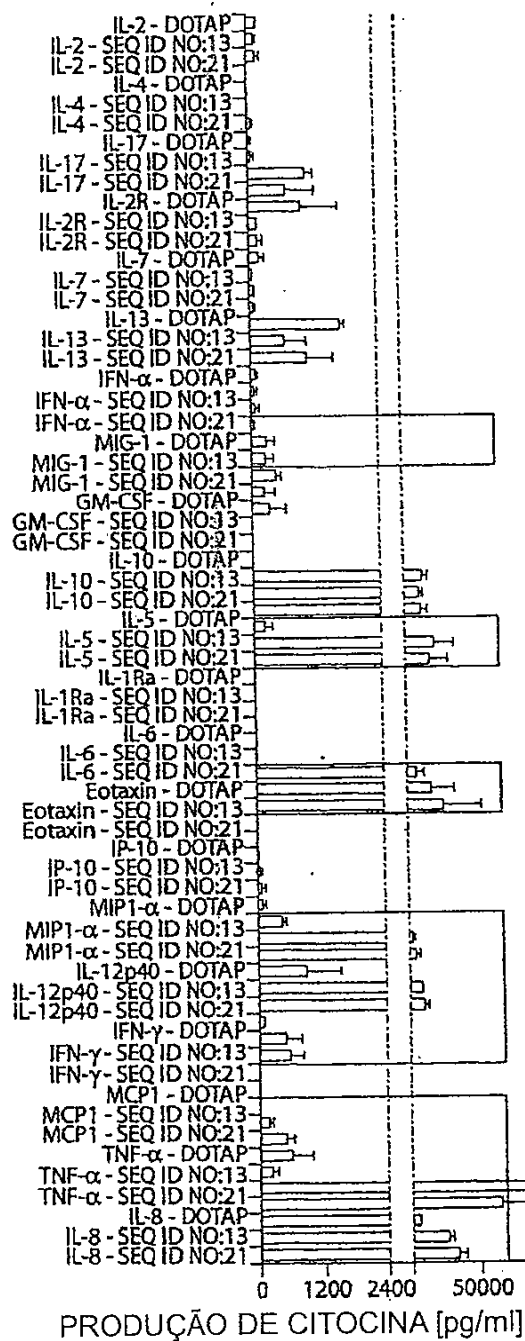


Fig. 7-2

13/24

CD123 + CÉLULAS

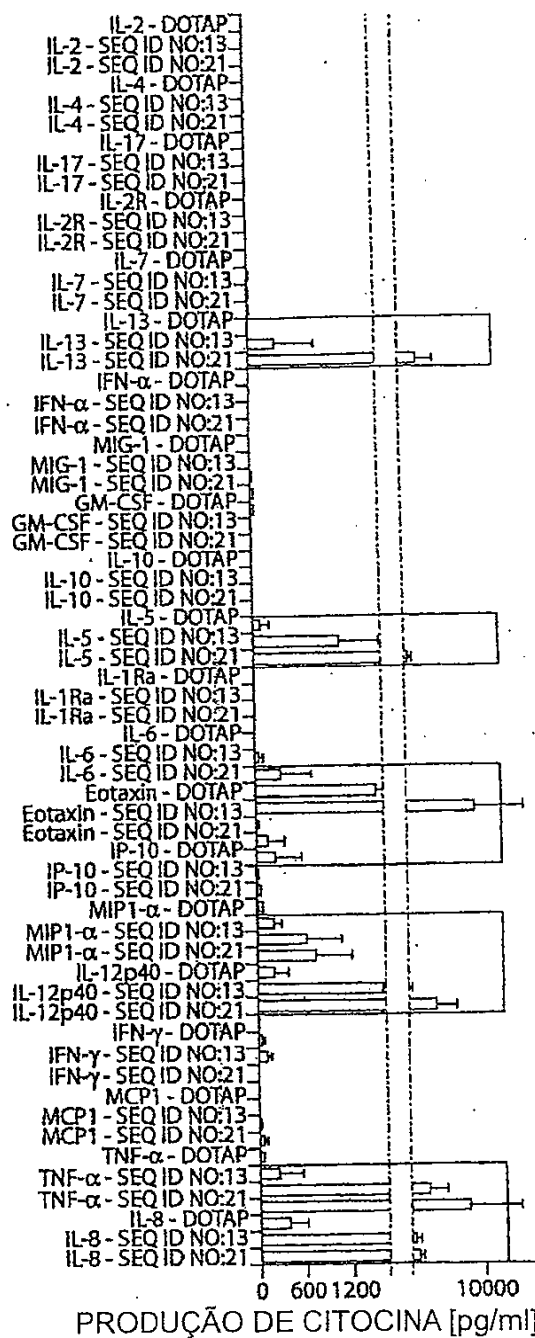


Fig. 7-3

14/24

CD14-CD123 + CÉLULAS

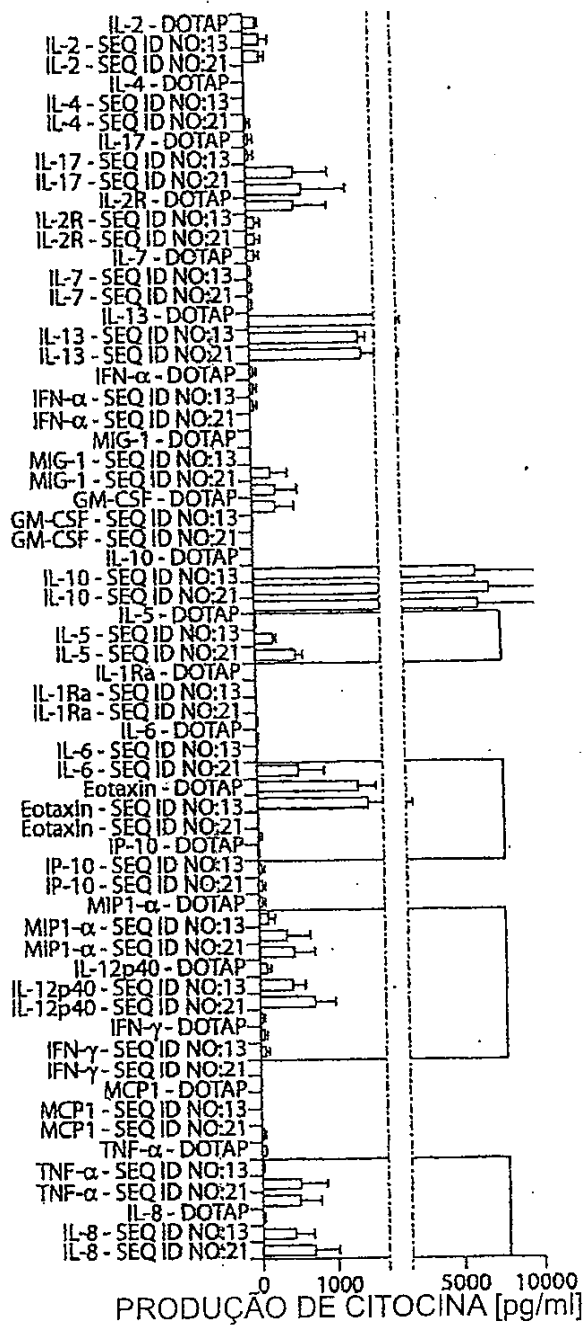


Fig. 7-4

15/24

CD123 + CÉLULAS - ESTIMULAÇÃO DE 16 H

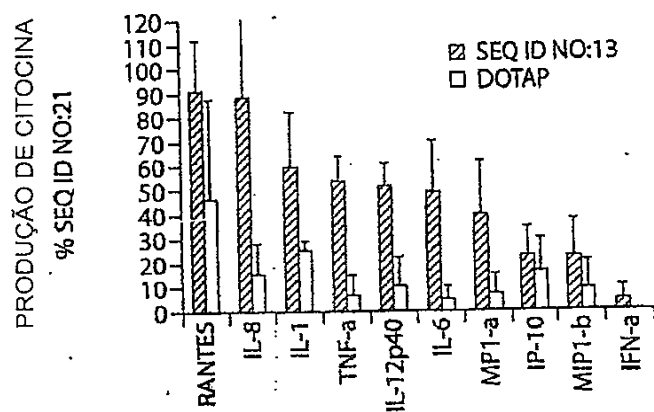


Fig. 8A

PBMC - ESTIMULAÇÃO DE 16 H

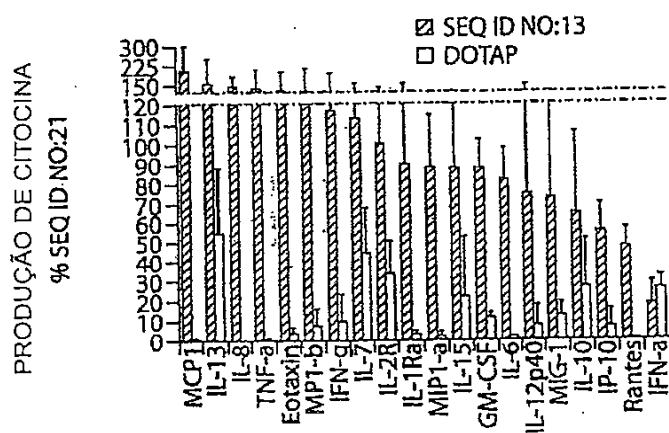


Fig. 8B

16/24

CD14 + CÉLULAS - ESTIMULAÇÃO DE 16 H

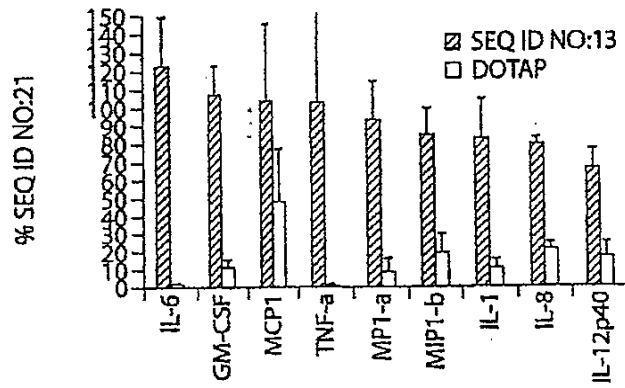


Fig. 8C

CD14 + CD123 CÉLULAS - ESTIMULAÇÃO DE 16 H

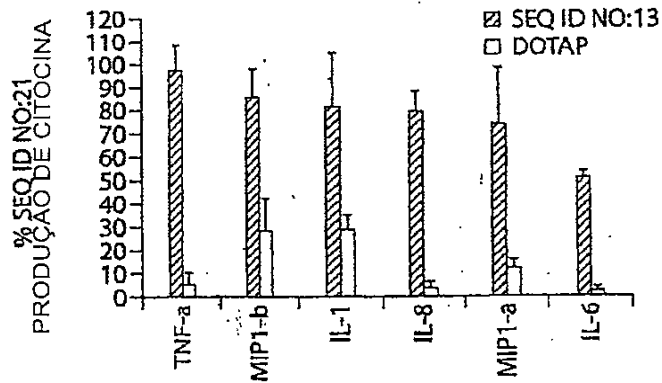


Fig. 8D

17/24

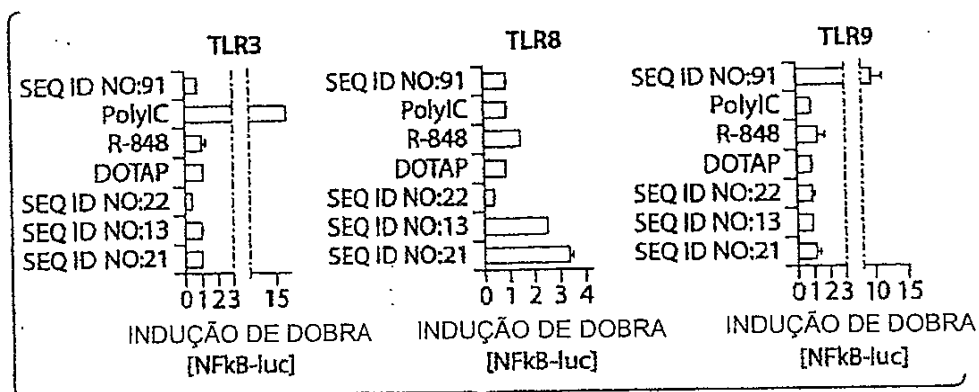


Fig. 9A

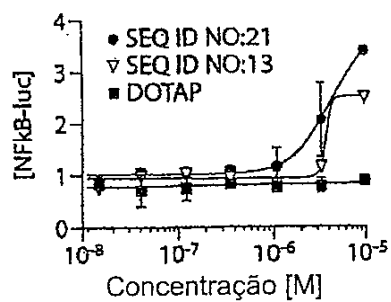


Fig. 9B

18/24

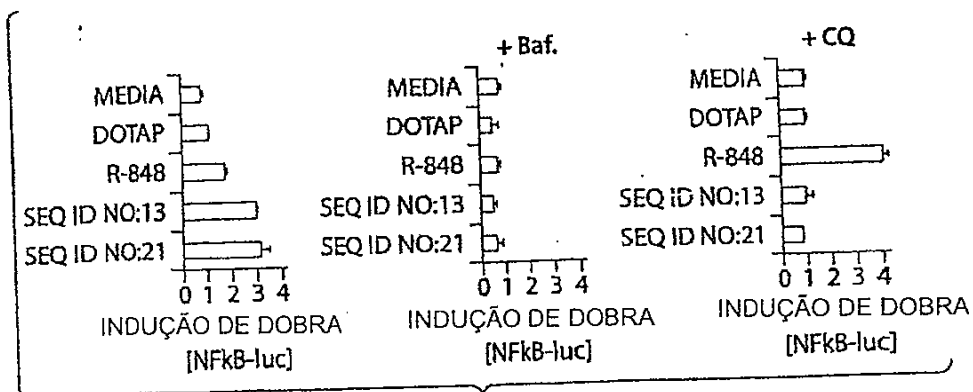


Fig. 9C

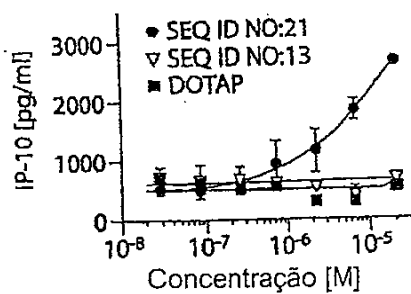


Fig. 9D

19/24

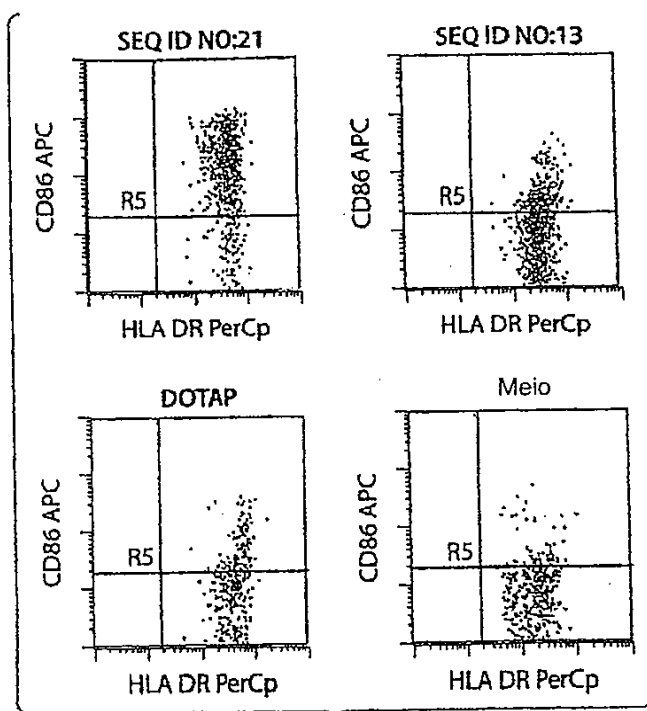


Fig. 10A

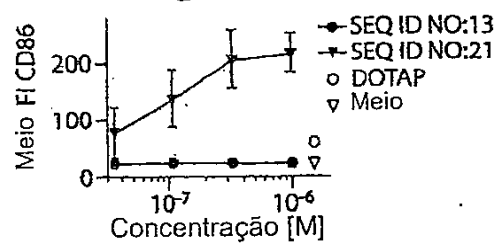


Fig. 10B

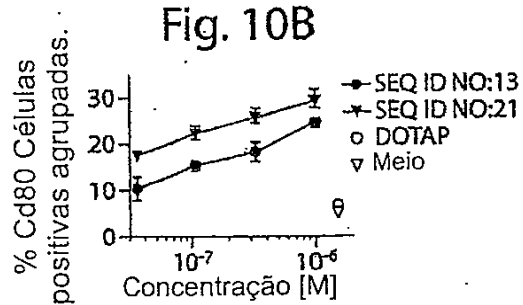


Fig. 10C

20/24

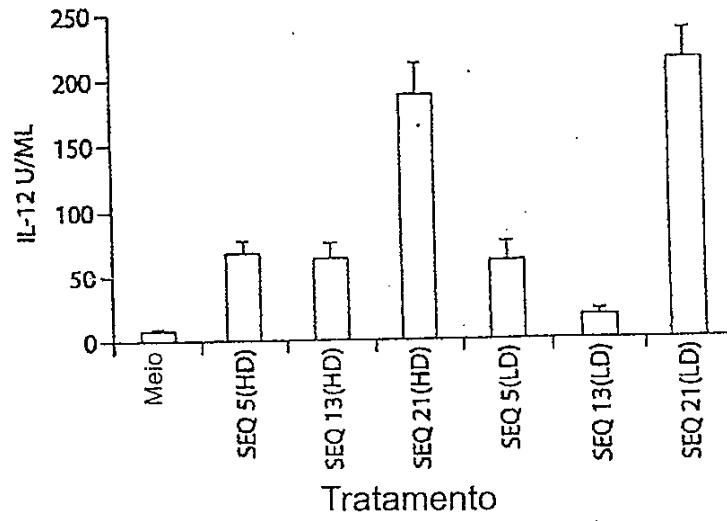


Fig. 11A

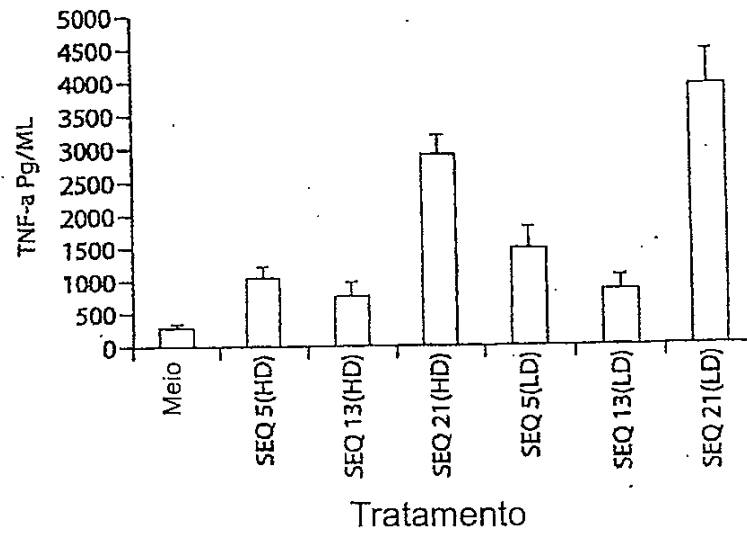
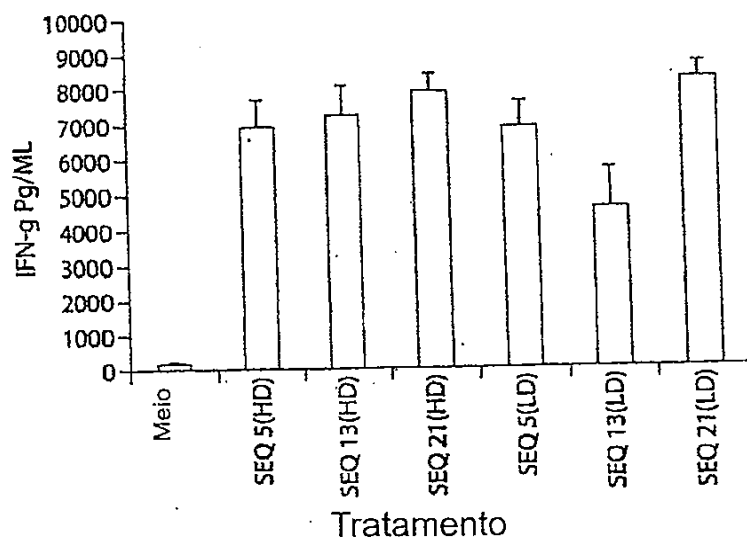


Fig. 11B

21/24



Tratamento

Fig. 11C

22/24

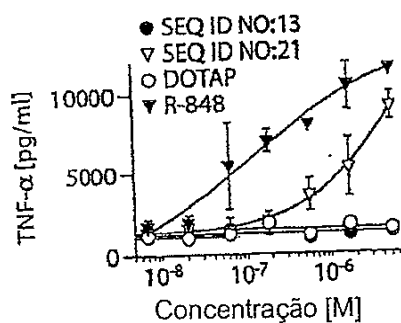


Fig. 12A

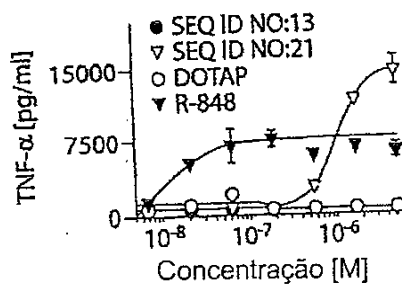


Fig. 12B

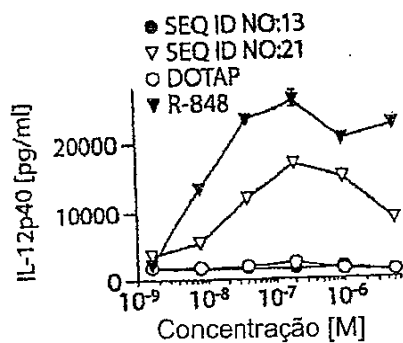


Fig. 12C

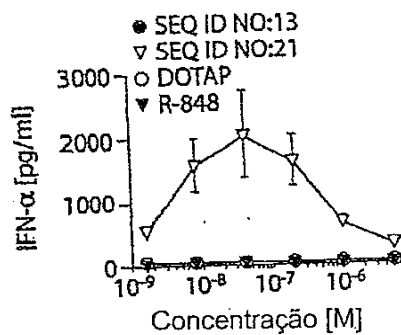


Fig. 12D

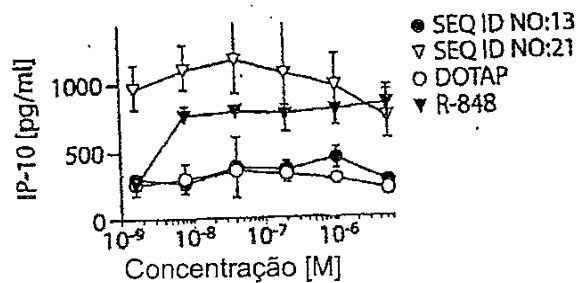


Fig. 12E

23/24

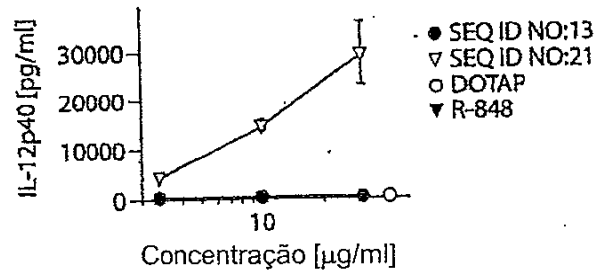


Fig. 12F

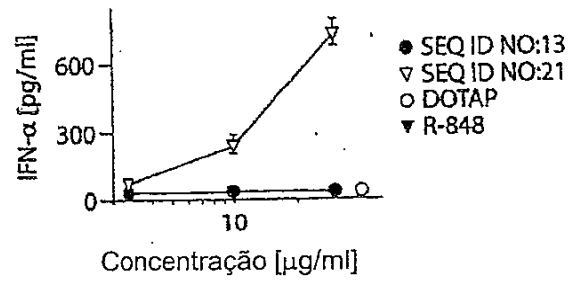


Fig. 12G

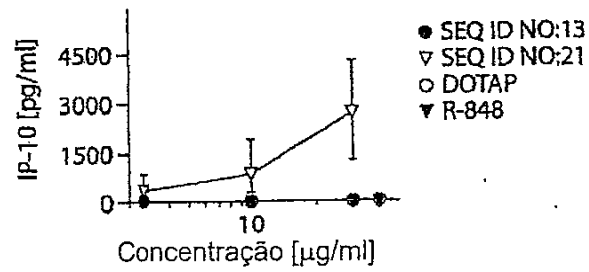


Fig. 12H

24/24

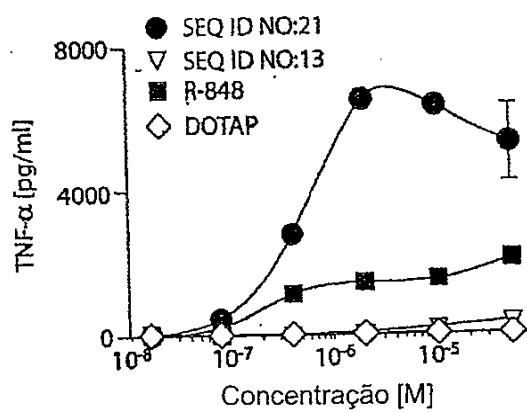


Fig. 13

RESUMO

Patente de Invenção: **"OLIGORRIBONUCLEOTÍDEO PARA ESTIMULAR A PRODUÇÃO DE UMA CITOCINA PRÓ-INFLAMATÓRIA, USO DO MESMO E COMPOSIÇÃO CONTENDO TAL OLIGORRIBONUCLEOTÍDEO"**.

- 5 A invenção fornece composições imunoestimuladoras e o uso desses compostos na preparação de medicamentos para o tratamento de doenças assim como para usos in vitro. Em particular, as composições da invenção incluem oligorribonucleotídeos imunoestimuladores que incorporam um motivo de sequência imunoestimulador dependente da sequência.
- 10 São fornecidas modificações específicas envolvendo ligações fosfato, análogos de nucleotídeos, adutos, e combinações dos mesmos. As composições da invenção, que opcionalmente podem incluir um antígeno, podem ser usadas isoladas ou junto com outros tratamentos para estimular ou intensificar uma resposta imune. Também são fornecidas composições e métodos úteis para tratar um indivíduo que tem uma infecção, um câncer, uma
- 15 condição alérgica, asma, remodelagem das vias aéreas, ou imunodeficiência. Acredita-se que os oligorribonucleotídeos da invenção estimular o receptor 8 semelhante a um "toll" (TLR8).