

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2007.02.15	(73) Titular(es): ADIUTIDE PHARMACEUTICALS GMBH ALT FECHENHEIM 34 60386 FRANKFURT AM MAIN DE
(30) Prioridade(s): 2006.02.15 US 773505 P 2006.11.09 US 858240 P	
(43) Data de publicação do pedido: 2008.11.19	(72) Inventor(es): EUGEN UHLMANN DE ARTHUR M. KRIEG US JOERG VOLLMER DE ULRIKE SAMULOWITZ DE BERNHARD O. NOLL DE
(45) Data e BPI da concessão: 2015.09.09 231/2015	(74) Mandatário: JOÃO LUÍS PEREIRA GARCIA RUA CASTILHO, 167 2º 1070-050 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA FORMULAÇÕES DE OLIGONUCLEÓTIDOS**

(57) Resumo:

PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE EM GERAL A ÁCIDOS NUCLEICOS IMUNOESTIMULANTES, COMPOSIÇÕES DOS MESMOS E MÉTODOS DE UTILIZAR OS ÁCIDOS NUCLEICOS IMUNOESTIMULANTES. EM PARTICULAR, A INVENÇÃO REFERE-SE A ÁCIDOS NUCLEICOS IMUNOESTIMULANTES CONTENDO PALÍNDROMO E À UTILIZAÇÃO DESTES ÁCIDOS NUCLEICOS NO TRATAMENTO DE DOENÇA.

RESUMO

COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA FORMULAÇÕES DE OLIGONUCLEÓTIDOS

A presente invenção refere-se em geral a ácidos nucleicos imunoestimulantes, composições dos mesmos e métodos de utilizar os ácidos nucleicos imunoestimulantes. Em particular, a invenção refere-se a ácidos nucleicos imunoestimulantes contendo palíndromo e à utilização destes ácidos nucleicos no tratamento de doença.

DESCRIÇÃO

COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA FORMULAÇÕES DE OLIGONUCLEÓTIDOS

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se em geral a ácidos nucleicos imunoestimulantes, composições dos mesmos e métodos de utilização dos ácidos nucleicos imunoestimulantes.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

O cancro é a segunda causa principal de morte nos Estados Unidos, resultando em uma em cada quatro mortes. Em 1997, o número total estimado de novos diagnósticos para cancro do pulmão, da mama, da próstata, colo-retal e do ovário foi aproximadamente dois milhões. Devido ao envelhecimento crescente da população nos Estados Unidos, é razoável esperar que as taxas de incidência de cancro continuem a aumentar.

A asma é uma doença inflamatória crónica que afeta 14-15 milhões de pessoas só nos Estados Unidos.

A doença infecciosa é uma das causas principais de morte em todo o mundo. Só nos Estados Unidos a taxa de mortalidade devido a doença infecciosa ascendeu a 58% entre 1980 e 1992. Durante este período, a utilização de terapêuticas anti-infecciosas para combater a doença infecciosa cresceu significativamente e representa agora uma indústria de vários bilhões de dólares por ano. Mesmo com estes aumentos na utilização de agente anti-infeccioso, o tratamento e prevenção da doença infecciosa permanece um desafio para a comunidade médica em todo o mundo.

O ADN bacteriano tem efeitos estimulantes imunes para ativar as células B e as células exterminadoras naturais, mas o ADN dos vertebrados não tem (Tokunaga, T., et al., 1988. Jpn. J. Cancro Res. 79:682-686; Tokunaga, T., et al., 1984, JNCI 72:965-962; Messina, J.P., et al., 1991, J.

Immunol. 147:1759-1764; e revisto em Krieg, 1998, Em: Applied Oligonucleotide Technology, C.A. Stein e A.M. Krieg, (Editores), John Wiley and Sons, Inc., Nova Iorque, NY, páginas 431-448). Agora entende-se que estes efeitos estimulantes imunes do ADN bacteriano são um resultado da presença de dinucleótidos CpG não metilados em particular contextos base (motivos CpG), que são comuns no ADN bacteriano, mas metilados e sub-representados no ADN de vertebrados (Krieg et al, 1995 Nature 374:546-549; Krieg, 1999 Biochim. Biophys. Acta 93321:1-10). Os efeitos estimulantes imunes do ADN bacteriano podem ser imitados com oligodeoxinucleótidos sintéticos (ODN) que contêm estes motivos CpG. Tais CpG ODN têm efeitos altamente estimulantes em leucócitos humanos e murinos, induzindo a proliferação das células B; secreção de citocina e imunoglobulina; atividade lítica das células exterminadoras naturais (NK) e secreção de IFN- γ ; e a ativação de células dendríticas (DCs) e de outras células apresentadoras de antigénio para expressar moléculas co-estimulantes e segregar citoquinas, especialmente as citoquinas tipo Th1 que são importantes na promoção do desenvolvimento de respostas das células T tipo Th1. Yamamoto et al. (1992) J Immunol 148: 4072-4076 mostraram que sequências palindrómicas de fosfodiéster contendo dinucleótidos CpG são diretamente responsáveis pela secreção de interferões. Iho et al. (1999) J Immunol 163: 3642-3652 descreveram que sequências palindrómicas de fosfodiéster contendo dinucleótidos CpG ativam células NK e induzem a produção de IFN γ . Os efeitos estimulantes imunes dos CpG ODN com esqueletos fosfodiéster nativos são altamente específicos de CpG pelo facto dos efeitos serem dramaticamente reduzidos se o motivo CpG for metilado, alterado para um GpC, ou de outra forma eliminado ou alterado (Krieg et al, 1995 Nature 374:546-549; Hartmann et al, 1999 Proc. Natl. Acad. Sci USA 96:9305-10).

Nos estudos iniciais, pensava-se que o motivo CpG estimulante imune seguia a fórmula purina-purina-CpG-pirimidina-pirimidina (Krieg et al, 1995 Nature 374:546-549; Pisetsky, 1996 J. Immunol. 156:421-423; Hacker et al., 1998 EMBO J. 17:6230-6240; Lipford et al, 1998 Trends in Microbiol. 6:496-500). Contudo, é agora evidente que os linfócitos de ratinho respondem bastante bem a motivos CpG fosfodiéster que não seguem esta "fórmula" (Yi et al., 1998 J. Immunol. 160:5898-5906) e o mesmo é verdade das células B humanas e células dendríticas (Hartmann et al, 1999 Proc. Natl. Acad. Sci USA 96:9305-10; Liang, 1996 J. Clin. Invest. 98:1119-1129).

Foram recentemente descritas várias classes diferentes de oligonucleótidos CpG. Uma classe é potente para ativar as células B mas é relativamente fraca na indução da ativação de IFN- α e células NK; esta classe foi designada a classe B. Os oligonucleótidos CpG da classe B são tipicamente completamente estabilizados e incluem um dinucleótido CpG não metilado dentro de certos contextos base preferidos. Ver, por exemplo, Patentes U.S. N^os 6 194 388; 6 207 646; 6 214 806; 6 218 371; 6 239 116; e 6 339 068. Outra classe de oligonucleótidos CpG ativa as células B e as células NK e induz IFN- α ; esta classe foi designada a classe C. Os oligonucleótidos CpG da classe C, conforme primeiramente caracterizados, são tipicamente completamente estabilizados; incluem uma sequência tipo classe B e um palíndromo ou quase palíndromo rica em GC. Esta classe foi descrita no pedido de patente provisório U.S. co-pendente 60/313 273, submetido a 17 de agosto de 2001 e U.S. 10/224 523 submetido a 19 de agosto de 2002 e Pedido de patente PCT PCT/US02/26468 relacionado publicado sob o Número de Publicação Internacional WO 03/015711. Vários oligonucleótidos CpG de classe C são divulgados no documento WO 2004/016805 A2. Kandimalla et al. (2002) Current Opinion in Molecular Therapeutics Vol 4 No. 2

resumem as características químicas e estruturais de oligonucleótidos CpG que são importantes para o reconhecimento molecular.

As distintas atividades imunomodulatórias da classe A, classe B e classe C de oligonucleótidos CpG foram caracterizadas em Vollmer et al. (2004) Eur. J. Immunol. 34: 251-262.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção é definida nas reivindicações anexas.

A presente invenção refere-se em parte a oligonucleótidos contendo CpG imunoestimulantes, em particular a uma nova classe de oligonucleótidos imunoestimulantes designadas classe P. Originalmente a estrutura dos oligonucleótidos CpG não foi considerada particularmente importante para a ativação imune, mas subsequentemente verificou-se que os oligonucleótidos contendo motivos poli G numa ou em ambas as extremidades (Classe A), ou oligonucleótidos com um palíndromo 3' (classe C), induziam níveis superiores de ativação das células NK e secreção pDC IFN- α do que os oligonucleótidos sem potencial para formar estruturas secundárias. Os oligonucleótidos de classe A podem formar estruturas de hierarquia superior muito complexas, tais como nanopartículas (Kerkmann et al., J. Biol Chem. (2005) 280 (9):8086-93.) e a classe C pode formar duplexs ou ganchos intermoleculares. A presente invenção diz respeito à identificação de uma nova subclasse de oligonucleótidos CpG, que contêm regiões que formam duplexs tais como, por exemplo, palíndromos perfeitos ou imperfeitos nas extremidades 5' e 3' ou próximo delas, dando-lhes o potencial de formar concatêmeros. Estes oligonucleótidos referidos como oligonucleótidos de classe P têm a capacidade em algumas ocasiões de induzir níveis muito maiores de secreção de IFN- α do que os da classe C. Os

oligonucleótidos de classe P têm a capacidade de se auto-reunirem espontâneamente em concatâmeros seja *in vitro* e/ou *in vivo*. Sem estar ligado por qualquer teoria particular para o método de ação destas moléculas, uma hipótese potencial é que esta propriedade dota os oligonucleótidos de classe P com a capacidade de reticular TLR9 num nível superior dentro de certas células imunes, induzindo um padrão distinto de ativação imune comparado com as classes previamente descritas de oligonucleótidos CpG.

Num aspeto da invenção, o oligonucleótido imunoestimulante contém um domínio de ativação TLR a 5' e pelo menos duas regiões palindrómicas, uma região palindrómica tendo uma região palindrómica 5' pelo menos 6 nucleótidos de comprimento e estando ligada a uma região palindrómica 3' com pelo menos 8 nucleótidos de comprimento seja diretamente ou através de um espaçador, em que o oligonucleótido inclui pelo menos um CpG não metilado, e em que o oligonucleótido tem a fórmula 5' XP₁SP₂T 3', em que X é o domínio de ativação de TLR, P₁ é um palíndromo, S é um espaçador, P₂ é um palíndromo, e T é uma cauda de 0-100 nucleótidos em comprimento, em que um "palíndromo" ou "região palindrómica" é uma sequência de ácido nucleico que é o seu próprio complemento reverso perfeito. Noutra forma de realização, o domínio de ativação TLR é TCG, TTCG, TTTCG, TYpR, TTYpR, TTTYpR, UCG, UUUCG, UUUCG, TTT ou TTTT. Noutra forma de realização, o domínio de ativação TLR está imediatamente 5' em relação à região palindrómica 5'. Ainda numa outra forma de realização, a região palindrómica 5' tem pelo menos 8 nucleótidos de comprimento. Noutra forma de realização, a região palindrómica 3' tem pelo menos 10 nucleótidos de comprimento. Noutra forma de realização, a região palindrómica 5' tem pelo menos 10 nucleótidos de comprimento. Ainda numa outra forma de realização, a região palindrómica 3' inclui um dinucleótido CpG não metilado. Noutra forma de realização, a região palindrómica 3' inclui

dois dinucleótidos CpG não metilados. Noutra forma de realização, a região palindrômica 5' inclui um dinucleótido CpG não metilado. Ainda numa outra forma de realização, a região palindrômica 5' inclui dois dinucleótidos CpG não metilados. Noutra forma de realização, as regiões palindrômicas 5' e 3' têm um valor de estabilidade de duplex de pelo menos 25. Noutra forma de realização, as regiões palindrômicas 5' e 3' têm um valor de estabilidade de duplex de pelo menos 30. Noutra forma de realização, as regiões palindrômicas 5' e 3' têm um valor de estabilidade de duplex de pelo menos 35. Noutra forma de realização, as regiões palindrômicas 5' e 3' têm um valor de estabilidade de duplex de pelo menos 40. Noutra forma de realização, as regiões palindrômicas 5' e 3' têm um valor de estabilidade de duplex de pelo menos 45. Noutra forma de realização, as regiões palindrômicas 5' e 3' têm um valor de estabilidade de duplex de pelo menos 50. Noutra forma de realização, as regiões palindrômicas 5' e 3' têm um valor de estabilidade de duplex de pelo menos 55. Noutra forma de realização, as regiões palindrômicas 5' e 3' têm um valor de estabilidade de duplex de pelo menos 60. Noutra forma de realização, as regiões palindrômicas 5' e 3' têm um valor de estabilidade de duplex de pelo menos 65.

Numa forma de realização, o espaçador é um ácido nucleico com um comprimento de 1-50 nucleótidos. Noutra forma de realização, o espaçador é um ácido nucleico com um comprimento de 1 nucleótido. Noutra forma de realização, o espaçador é um espaçador não nucleotídico. Numa forma de realização, o espaçador não nucleotídico é um D-espaçador. Noutra forma de realização, o espaçador não nucleotídico é um ligante.

Numa forma de realização, o oligonucleótido tem a fórmula 5' XP_1SP_2T 3', em que X é o domínio de ativação TLR, P_1 é um palíndromo, S é um espaçador, P_2 é um palíndromo e T é uma cauda 3' de 0-100 nucleótidos de

comprimento. Numa forma de realização, X é TCG, TTCG ou TTTCG. Noutra forma de realização, T tem 5-50 nucleótidos de comprimento. Ainda numa outra forma de realização, T tem 5-10 nucleótidos de comprimento. Numa forma de realização, S é um ácido nucleico com um comprimento de 1-50 nucleótidos. Noutra forma de realização, S é um ácido nucleico com um comprimento de 1 nucleótido. Noutra forma de realização, S é um espaçador não nucleotídico. Numa forma de realização, o espaçador não nucleotídico é um D-espaçador. Noutra forma de realização, o espaçador não nucleotídico é um ligante. Noutra forma de realização, o oligonucleótido não é um oligonucleótido antissenso ou uma ribozima. Numa forma de realização, P_1 é rico em A e T. Noutra forma de realização, P_1 inclui pelo menos 4 Ts. Noutra forma de realização, P_2 é um palíndromo perfeito. Noutra forma de realização, P_2 é rico em G-C. Ainda numa outra forma de realização, P_2 é CGGCGCX₁GCGCCG (SEQ. ID N° 334), onde X₁ é T ou nada.

Numa forma de realização, o oligonucleótido inclui pelo menos uma ligação fosforotioato. Noutra forma de realização, todas as ligações internucleotídicas do oligonucleótido são ligações fosforotioato. Noutra forma de realização, o oligonucleótido inclui pelo menos uma ligação tipo fosfodiéster. Noutra forma de realização, a ligação tipo fosfodiéster é uma ligação fosfodiéster. Noutra forma de realização, um grupo lipofílico é conjugado com o oligonucleótido. Numa forma de realização, o grupo lipofílico é colesterol.

Um outro aspeto da invenção é um oligonucleótido imunoestimulante com um domínio de ativação TLR a 5' e pelo menos duas regiões contendo complementariedade, uma região 5' e uma 3' contendo complementariedade cada região contendo complementariedade tendo pelo menos 8 nucleótidos de comprimento e estando ligada uma à outra seja diretamente ou através de um espaçador, em que o oligonucleótido inclui

pelo menos um dinucleótido CpG não metilado, e em que pelo menos uma das regiões contendo complementaridade não é um palíndromo perfeito. e em que o domínio de ativação de TLR é imediatamente 5' para a região contendo complementaridade 5'. Noutra forma de realização, o domínio de ativação TLR é TCG, TTCG, TTTCG, TYpR, TTYpR, TTTYpR, UCG, UUCG, UUUCG, TTT ou TTTT. Noutra forma de realização, a região contendo complementaridade 3' tem pelo menos 10 nucleótidos de comprimento. Ainda numa outra forma de realização, a região contendo complementaridade 5' tem pelo menos 10 nucleótidos de comprimento. Numa forma de realização, a região contendo complementaridade 3' inclui um dinucleótido CpG não metilado. Noutra forma de realização, a região contendo complementaridade 3' inclui dois dinucleótidos CpG não metilados. Ainda numa outra forma de realização, a região contendo complementaridade 5' inclui um dinucleótido CpG não metilado. Noutra forma de realização, a região palindrômica 5' inclui dois dinucleótidos CpG não metilados. Noutra forma de realização, as regiões contendo complementaridade incluem pelo menos um análogo de nucleótido. Noutra forma de realização, as regiões contendo complementaridade formam um duplex intramolecular.

Numa forma de realização, o duplex intramolecular inclui pelo menos um par de base não nos moldes Watson Crick. Noutra forma de realização, o par de base não nos moldes Watson Crick é G-T, G-A, G-G ou C-A. Numa forma de realização, as regiões contendo complementaridade formam duplexs intermoleculares. Noutra forma de realização, pelo menos um dos duplexs intermoleculares inclui pelo menos um par de base não nos moldes Watson Crick. Noutra forma de realização, o par de base não nos moldes Watson Crick é G-T, G-A, G-G ou C-A. Ainda numa outra forma de realização, as regiões contendo complementaridade contêm uma discordância. Ainda numa outra forma de realização, as regiões contendo complementaridade contêm duas

discordâncias. Noutra forma de realização, as regiões contendo complementaridade contêm um nucleótido interveniente. Noutra forma de realização, as regiões contendo complementaridade contêm dois nucleótidos intervenientes.

Numa forma de realização, as regiões contendo complementaridade 5' e 3' têm um valor de estabilidade de duplex de pelo menos 25. Noutra forma de realização, as regiões contendo complementaridade 5' e 3' têm um valor de estabilidade de duplex de pelo menos 30. Noutra forma de realização, as regiões contendo complementaridade 5' e 3' têm um valor de estabilidade de duplex de pelo menos 35. Noutra forma de realização, as regiões contendo complementaridade têm um valor de estabilidade de duplex de pelo menos 40. Noutra forma de realização, as regiões contendo complementaridade têm um valor de estabilidade de duplex de pelo menos 45. Noutra forma de realização, as regiões contendo complementaridade têm um valor de estabilidade de duplex de pelo menos 50. Noutra forma de realização, as regiões contendo complementaridade têm um valor de estabilidade de duplex de pelo menos 55. Noutra forma de realização, as regiões contendo complementaridade têm um valor de estabilidade de duplex de pelo menos 60. Noutra forma de realização, as regiões contendo complementaridade têm um valor de estabilidade de duplex de pelo menos 65.

Noutra forma de realização, as duas regiões contendo complementaridade estão ligadas diretamente. Noutra forma de realização, as duas regiões contendo complementaridade estão ligadas por uma ligação 3'-3'. Ainda noutra forma de realização as duas regiões contendo complementaridade sobrepõem-se por um nucleótido. Noutra forma de realização, as duas regiões contendo complementaridade sobrepõem-se por dois nucleótidos. Noutra forma de realização as duas regiões contendo complementaridade não se sobrepõem. Noutra

forma de realização as duas regiões contendo complementaridade estão ligadas por um espaçador. Noutra forma de realização, o espaçador é um ácido nucleico com um comprimento de 1-50 nucleótidos. Noutra forma de realização, o espaçador é um ácido nucleico com um comprimento de 1 nucleótido. Numa forma de realização, o espaçador é um espaçador não nucleótido. Noutra forma de realização, o espaçador não nucleótido é um D-espaçador. Ainda numa outra forma de realização, o espaçador não nucleótido é um ligante.

Numa forma de realização o oligonucleótido tem a fórmula 5' XNSPT 3', em que X é o domínio de ativação TLR, N é um palíndromo imperfeito, P é um palíndromo, S é um espaçador e T é uma cauda 3' com 0-100 nucleótidos de comprimento. Noutra forma de realização, X é TCG, TTCG ou TTTCG. Noutra forma de realização, T tem 5-50 nucleótidos de comprimento. Noutra forma de realização, T tem 5-10 nucleótidos de comprimento. Noutra forma de realização, S tem um ácido nucleico com um comprimento de 1-50 nucleótidos. Noutra forma de realização, S é um ácido nucleico com um comprimento de 1 nucleótido. Noutra forma de realização, S é um espaçador não nucleótido. Noutra forma de realização, o espaçador não nucleótido é um D-espaçador. Noutra forma de realização, o espaçador não nucleótido é um ligante. Noutra forma de realização, o oligonucleótido não é um oligonucleótido antissenso ou uma ribozima. Noutra forma de realização, N é um A e rico em T. Noutra forma de realização N inclui pelo menos 4 Ts. Noutra forma de realização, P é um palíndromo perfeito. Noutra forma de realização, P é rico em G-C. Noutra forma de realização, P é CGGCGCX₁GCGCCG (SEQ. ID N° 334), em que X₁ é T ou nada. Noutra forma de realização, o oligonucleótido inclui pelo menos uma ligação fosforotioato. Noutra forma de realização, todas as ligações internucleotídicas do oligonucleótido são ligações fosforotioato. Noutra forma de

realização, o oligonucleótido inclui pelo menos uma ligação tipo fosfodiéster. Noutra forma de realização, a ligação tipo fosfodiéster é uma ligação fosfodiéster. Noutra forma de realização, um grupo lipofílico é conjugado com o oligonucleótido. Numa forma de realização, o grupo lipofílico é colesterol.

Outro aspeto da invenção proporciona composições terapêuticas dos oligonucleótidos previamente mencionados. Numa forma de realização a composição inclui uma mistura de oligonucleótidos imunoestimulantes que formam duplex formulada num tampão com baixo conteúdo em sal e incluindo um soluto. Numa forma de realização, o soluto é um aminoácido. Numa forma de realização, o aminoácido tem uma cadeia lateral hidrofóbica. Noutra forma de realização, o aminoácido é isoleucina. Ainda numa outra forma de realização, o aminoácido é glicina. Noutra forma de realização, o aminoácido tem uma cadeia lateral carregada. Noutra forma de realização, o soluto é um álcool. Numa forma de realização, o álcool é um sacarídeo. Nalgumas formas de realização, o sacarídeo é dextrose, frutose, lactose, sacarose, ribose, arabinose ou um dissacarídeo. Numa forma de realização, os oligonucleótidos imunoestimulantes que formam duplex são qualquer um dos oligonucleótidos previamente mencionados. Noutra forma de realização, a composição inclui pelo menos dois oligonucleótidos imunoestimulantes que formam duplexes diferentes com diferentes sequências nucleotídicas. Noutra forma de realização, a composição inclui pelo menos dois oligonucleótidos imunoestimulantes que formam duplex com as mesmas sequências nucleotídicas um do outro. Noutra forma de realização, cada oligonucleótido imunoestimulante que forma duplex inclui pelo menos uma sequência formadora de duplex. Noutra forma de realização, cada oligonucleótido imunoestimulante que forma duplex inclui pelo menos duas sequências formadoras de duplex. Noutra forma de

realização, cada sequência formadora de duplex tem um valor de estabilidade de duplex de pelo menos 25. Noutra forma de realização, cada sequência formadora de duplex tem um valor de estabilidade de duplex de pelo menos 30. Noutra forma de realização, cada sequência formadora de duplex tem um valor de estabilidade de duplex de pelo menos 35. Noutra forma de realização, os oligonucleótidos imunoestimulantes que formam duplex incluem pelo menos uma sequência poli G com 4 nucleótidos G consecutivos.

Outro aspeto da divulgação é um método de preparar uma mistura substancialmente homogénea de oligonucleótidos, identificando oligonucleótidos imunoestimulantes que formam duplex e formulando os oligonucleótidos imunoestimulantes que formam duplex num tampão com baixo conteúdo em sal e um soluto para produzir uma mistura substancialmente homogénea de oligonucleótidos.

Outro aspeto da divulgação é uma composição de uma mistura de pelo menos dois oligonucleótidos imunoestimulantes que formam duplex diferentes, em que pelo menos os dois oligonucleótidos imunoestimulantes que formam duplex diferentes cada um tem um domínio de ativação TLR a 5' incluindo um dinucleótido CpG não metilado e uma sequência formadora de duplex 3' com pelo menos 8 nucleótidos de comprimento, em que a sequência formadora de duplex 3' de cada um dos pelo menos dois oligonucleótidos imunoestimulantes que formam duplex diferentes são complementares um do outro e em que pelo menos os dois oligonucleótidos imunoestimulantes que formam duplex diferentes têm 11-100 nucleótidos de comprimento. Numa forma de realização a composição inclui um tampão com baixo conteúdo em sal e um soluto. Noutra forma de realização, o domínio de ativação TLR é TCG, TTCG ou TTTCG. Numa forma de realização, o domínio de ativação TLR está ligado diretamente à sequência formadora de duplex 3'. Noutra forma de realização, as duas regiões palindrómicas estão

ligadas por uma ligação 3'-3'. Noutra forma de realização, o domínio de ativação TLR e a sequência formadora de duplex 3' estão ligados por um espaçador. Numa forma de realização, o espaçador é um ácido nucleico com um comprimento de 1-50 nucleótidos. Noutra forma de realização, o espaçador é um ácido nucleico com um comprimento de 1 nucleótido. Ainda numa outra forma de realização, o espaçador é um espaçador não nucleótido. Ainda numa outra forma de realização, o espaçador não nucleótido é um D-espaçador. Noutra forma de realização, o espaçador não nucleótido é um ligante. Numa forma de realização, o oligonucleótido inclui pelo menos uma ligação fosforotioato. Noutra forma de realização, todas as ligações internucleotídicas do oligonucleótido são ligações fosforotioato. Noutra forma de realização, o oligonucleótido inclui pelo menos uma ligação tipo fosfodiéster. Noutra forma de realização, a ligação tipo fosfodiéster é uma ligação fosfodiéster. Noutra forma de realização, um grupo lipofílico é conjugado com o oligonucleótido. Noutra forma de realização, o grupo lipofílico é colesterol.

Outro aspeto da divulgação é um método para tratar cancro administrando a um sujeito em necessidade do mesmo qualquer um dos oligonucleótidos previamente mencionados ou qualquer uma das composições previamente mencionadas numa quantidade eficaz para tratar o cancro. Numa forma de realização, o tratamento anticancerígeno é administrado ao sujeito. Noutra forma de realização, o tratamento anticancerígeno é quimioterapêutica. Noutra forma de realização, o tratamento anticancerígeno é radiação. Noutra forma de realização, o tratamento anticancerígeno inclui um anticorpo.

Outro aspeto da divulgação é um método para tratar asma administrando a um sujeito em necessidade do mesmo qualquer um dos oligonucleótidos previamente mencionados ou

qualquer uma das composições previamente mencionadas numa quantidade eficaz para tratar asma. Numa forma de realização, um tratamento adicional contra asma é co-administrado ao sujeito.

Outro aspeto da divulgação é um método para tratar alergia administrando a um sujeito em necessidade qualquer um dos oligonucleótidos previamente mencionados ou qualquer uma das composições previamente mencionadas numa quantidade eficaz para tratar alergia. Numa forma de realização, um tratamento adicional contra alergia é administrado ao sujeito. Numa forma de realização, o sujeito tem rinite alérgica. Noutra forma de realização, o sujeito tem alergia ocular.

Outro aspeto da divulgação é um método para modular uma resposta imune num sujeito administrando a um sujeito em necessidade do mesmo qualquer um dos oligonucleótidos previamente mencionados ou qualquer uma das composições previamente mencionadas numa quantidade eficaz para modular uma resposta imune. Numa forma de realização, um modulador imune adicional é administrado ao sujeito. Noutra forma de realização, o oligonucleótido ou a composição é entregue ao sujeito para tratar doença autoimune no sujeito. Noutra forma de realização, o oligonucleótido ou a composição é entregue ao sujeito para tratar uma doença inflamatória no sujeito. Noutra forma de realização, o oligonucleótido ou a composição é entregue ao sujeito para tratar remodelação das vias respiratórias no sujeito. Noutra forma de realização, o oligonucleótido ou a composição é administrada sem um antigénio ao sujeito. Ainda numa outra forma de realização, o oligonucleótido ou a composição é entregue por uma via selecionada do grupo que consiste em injeção direta oral, nasal, sublingual, intravenosa, subcutânea, mucosal, ocular, respiratória e por via dérmica. Noutra forma de realização, o oligonucleótido ou a composição é entregue ao sujeito numa quantidade eficaz

para induzir a expressão de citocina e/ou quimiocina. Noutra forma de realização, a citocina e/ou quimiocina é selecionada do grupo que consiste em IFN-a, IFN-p, IL-28, IL-29, IFN-co, TNF-a, IL-10, IL-6, IFN-y, IP-10, MCP-1 e IL-12.

Outro aspeto da divulgação é um método para tratar asma exacerbada por infeção viral administrando a um sujeito em necessidade do mesmo qualquer um dos oligonucleótidos previamente mencionados ou qualquer uma das composições previamente mencionadas numa quantidade eficaz para tratar a asma exacerbada pela infeção viral.

Outro aspeto da divulgação é um método para tratar doença infecciosa administrando a um sujeito em necessidade do mesmo qualquer um dos oligonucleótidos previamente mencionados ou qualquer uma das composições previamente mencionadas numa quantidade eficaz para tratar a doença infecciosa. Numa forma de realização, o sujeito tem uma infeção viral. Numa forma de realização, a infeção viral é causada pelo vírus da hepatite B (HBV), vírus da hepatite C (HCV), vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus da influenza, vírus sincicial respiratório (RSV) ou vírus do papiloma humano (HPV). Noutra forma de realização, um agente antiviral é co-administrado ao sujeito. Numa forma de realização, o agente antiviral é ligado ao oligonucleótido. Noutra forma de realização, o oligonucleótido ou a composição é entregue por uma via selecionada do grupo que consiste em injeção direta oral, nasal, sublingual, intravenosa, subcutânea, mucosal, ocular, respiratória e por via dérmica.

A presente divulgação também contempla uma utilização de qualquer um dos oligonucleótidos imunoestimulantes da invenção ou composições da invenção para o tratamento das doenças descritas aqui, por exemplo, cancro, doença infecciosa, asma, alergia, distúrbios inflamatórios e doenças autoimunes.

A invenção também contempla uma utilização de qualquer um dos oligonucleótidos imunoestimulantes da invenção ou composições da invenção no fabrico de um medicamento para o tratamento das doenças descritas aqui, por exemplo, cancro, doença infecciosa, asma, alergia, distúrbios inflamatórios e doenças autoimunes.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Não se pretende que os desenhos acompanhantes estejam desenhados à escala. Nos desenhos, cada componente idêntico ou quase idêntico que é ilustrado em várias figuras é representado por um número semelhante. Para fins de claridade, nem todos os componentes podem estar rotulados em cada desenho. Nos desenhos:

A Figura 1 são dois gráficos que mostram a indução de IFN- α em relação à quantidade de oligonucleótido numa comparação de um oligonucleótido de classe P que contém dois palíndromos com um oligonucleótido de classe C que contém um palíndromo 3'. Os eixos dos yy são a quantidade de IFN- α em pg/ml e os eixos dos xx são concentração de oligonucleótido em μ M.

A Figura 2 são dois gráficos que mostram a indução de IFN- α em relação à quantidade de oligonucleótido numa análise da eficácia do comprimento do palíndromo. Os eixos dos yy são a quantidade de IFN- α em pg/ml e os eixos dos xx são concentração de oligonucleótido em μ M.

A Figura 3 são dois gráficos que mostram a indução de IFN- α em relação à quantidade de oligonucleótido numa análise de regiões formadoras de duplex, tais como palíndromos imperfeitos. Os eixos dos yy são a quantidade de IFN- α em pg/ml e os eixos dos xx são concentração de oligonucleótido em μ M.

A Figura 4 são dois gráficos que mostram estimulação de respostas de citocina tipo Th1 e quimiocina *in vivo* em ratinhos após tratamento com ODN de classe C convencional. A Figura 4A mostra a indução de IL-12 e a

Figura 4B mostra a indução de IP-10. Os eixos dos yy representam indução em pg/ml e o eixo dos xx representa o ODN.

A Figura 5 são dois gráficos que mostram a indução de IFN- α *in vivo* em ratinhos em resposta a ODN de classe C e de classe P. A Figura 5A mostra a indução de IFN- α após administração subcutânea (SC) de ODN e a Figura 5B mostra a indução de IFN- α após administração intravenosa (IV) de ODN. Os eixos dos yy representam a indução de IFN- α e os eixos dos xx representam o ODN utilizado.

A Figura 6 é um gráfico que mostra uma comparação de resposta anti-HBs após estimulação de ODN de classe A, B, C e P *in vivo*. O eixo dos yy representa anti-HBs e o eixo dos xx representa o ODN utilizado.

A Figura 7 é um diagrama que representa um concatâmero formado por hibridização de um oligonucleótido de classe P que contém duas regiões palindrômicas.

A Figura 8 é um gráfico que mostra a formação de dímero da SEQ. ID N° 234 em solução fosfato com uma variedade de aditivos. O eixo dos yy é % formação de dímero e o eixo dos xx indica os diferentes aditivos.

A Figura 9 é dois gráficos que mostram a indução de IFN- α *in vivo* em ratinhos em resposta a ODN de classe A, B, C e P. A Figura 9A mostra a indução de IFN- α após administração SC de ODN e a Figura 9B mostra a indução de IFN- α após administração IV. O eixo dos yy representa IFN- α em pg/ml e o eixo dos xx representa o ODN utilizado.

A Figura 10 são três gráficos que mostram a indução de IFN- α em relação à quantidade de oligonucleótido em análise do efeito da adição de ligantes. A Figura 10A mostra a indução de IFN- α , a Figura 10b mostra a indução de IL-10 e a Figura 10c mostra a indução de IL-6. Os eixos dos yy são concentração de citocina em pg/ml e os eixos dos xx são concentração de oligonucleótido em μ M.

A Figura 11 é um gráfico que mostra a indução de IFN- α em relação à quantidade de oligonucleótido em análise do efeito de modificação do açúcar do ODN de classe P. O eixo dos yy é concentração de IFN- α em pg/ml e o eixo dos xx é concentração de oligonucleótido em μ M.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Foi descoberta uma nova classe de oligonucleótidos imunoestimulantes, referidos aqui como oligonucleótidos de classe P, capazes de induzir níveis elevados de IFN- α . Oligonucleótidos CpG de classe C, que contêm um único palíndromo na ou próximo da metade 3' do oligonucleótido, são conhecidos por induzir ambas a forte proliferação de células B e produção de IFN- α . Os oligonucleótidos de classe P da invenção, como os oligonucleótidos de classe C, induzem a ativação das células B e produção de IFN- α , mas são capazes de produzir, em algumas instâncias, níveis muito superiores de IFN- α do que os oligonucleótidos de classe C. Pensa-se que a sequência palindrômica 3' dos oligonucleótidos de classe C é necessária para o perfil imunoestimulante específico observado para os oligonucleótidos de classe C, muito provavelmente por causa da formação de dímeros com 2 extremidades 5' livres. Pensa-se que a extremidade 5' de um ODN CpG é a região que é mais importante para a ativação do recetor TLR9 e duas extremidades 5' livres num único ODN podem induzir reticulação de dois recetores TLR9. A reticulação de recetores TLR9 pode induzir a ativação de secreção mais forte de IFN- α através do ansa em feedback IFNR de tipo I nas células dendríticas plasmacitóides.

Surpreendentemente foi descoberto que uma nova classe de oligonucleótidos, que não estão otimizados para manter extremidades 5' livres, são capazes de induzir elevada IFN- α . Os oligonucleótidos de classe P da invenção têm duas regiões formadoras de duplex; uma próxima da extremidade 5' e a outra extremidade mais próxima de ou na metade 3' do

ODN. Pensa-se que o desenho do oligonucleótido conduz à formação de estruturas de hierarquia elevada complexas chamadas concatâmeros. A formação de concatâmeros pode ser observada por cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) do oligonucleótido em solução em condições fisiológicas ou de sal elevado. Apesar de a invenção não estar limitada por um mecanismo particular, pensa-se que estas estruturas podem funcionar causando um grau elevado de reticulação de TLR9, resultando numa ativação ainda mais forte de secreção de IFN- α das células dendríticas plasmacitóides através do anseio em feedback IFNR de tipo I. Também é possível que estas estruturas de hierarquia superior resultem no recrutamento de co-fatores adicionais ou moléculas adaptadoras ao complexo sinalizador TLR9. Outra possibilidade é uma distribuição intracelular diferente do ODN concatâmero devido às estruturas de hierarquia superior.

Os oligonucleótidos imunoestimulantes desta invenção podem ser utilizadas para tratar doenças nas quais a estimulação imune tipo Th1 ou a modulação imune seriam vantajosas. As aplicações incluem, mas não se limitam a, doenças autoimunes, distúrbios inflamatórios, doenças infecciosas, cancro, asma e alergias. Por causa da capacidade de induzir elevados níveis de IFN- α e Th1 e citocinas tipo Th1 o tratamento de doenças virais, tais como vírus da Hepatite B e C, Citomegalovírus (CMV), vírus do Papiloma, VIH e Herpes simplex (HSV) são de interesse particular. Os oligonucleótidos da invenção também são úteis como adjuvantes de vacina. Os compostos da presente invenção podem ser utilizados para profilaxia e terapêutica, seja como terapêutica isolada ou em combinação com outras terapêuticas ou dispositivos médicos.

Em geral, os oligonucleótidos imunoestimulantes da invenção têm vários domínios, incluindo um domínio de ativação TLR a 5', 2 regiões formadoras de duplex e um

espaçador opcional e cauda 3'.

O termo "região formadora de duplex", conforme utilizado aqui, é definido como uma região capaz de formar um duplex com outra região formadora de duplex. Tais regiões podem compreender palíndromos, regiões contendo complementaridade, palíndromos imperfeitos ou regiões não palindrômicas que são capazes de formar pares de base intermoleculares nos moldes Watson-Crick ou não nos moldes Watson-Crick com uma região de complementaridade de um segundo oligonucleótido.

Em algumas ocasiões, os oligonucleótidos imunoestimulantes podem formar estruturas secundárias que surgem da formação de duplexs intramoleculares. Conforme utilizado aqui, um "duplex intramolecular" é formado quando múltiplas regiões formadoras de duplex numa única molécula formam um duplex uma com a outra. Com frequência em tais casos as regiões serão ligadas através de um espaçador. Nalgumas ocasiões, os oligonucleótidos imunoestimulantes podem formar duplexs intermoleculares. Conforme utilizado aqui, um "duplex intermolecular" é formado quando as regiões formadoras de duplex são em moléculas diferentes e formam interações de par de base uma com a outra que ligam as moléculas. Nalgumas ocasiões, um duplex intermolecular forma-se entre os dois oligonucleótidos com a mesma sequência. Noutras ocasiões, o duplex intermolecular forma-se entre diferentes oligonucleótidos com diferentes sequências nucleotídicas. Nalgumas ocasiões, os oligonucleótidos imunoestimulantes podem formar duplexs ambos intermoleculares e intramoleculares.

As regiões formadoras de duplex podem ser palíndromos. Um "palíndromo" e, de forma equivalente, "região palindrômica", conforme utilizado aqui, refere-se a uma sequência de ácido nucleico que é o seu próprio complemento reverso perfeito (isto é, uma sequência tal como ABCDEE'D'C'B'A' na qual A e A', B e B', C e C', D e D' e E

e E' são bases capazes de formar as pares de base nos moldes Watson-Crick normais, isto é, G-C, A-T e A-U). Conforme utilizado aqui, um "palíndromo" no sentido estrito exclui estrutura de sequência interveniente ou não nucleótido interveniente que não participa na formação dos pares de base nos moldes Watson-Crick.

O palíndromo pode ser um palíndromo 3' ou 5'. Os dois palíndromos podem ser o mesmo ou podem ser distintos. Assim, a região palindrômica 5' e a região palindrômica 3' não precisam de ser complementares uma da outra. De facto, elas podem ser completamente diferentes e emparelharem apenas com regiões palindrômicas noutros oligonucleótidos em vez de no mesmo oligonucleótido. Em alternativa, os palíndromos podem ser uma correspondência tal que podem formar uma interação de par de base intramolecular. Ambos palíndromos podem ter várias composições base (A, T, G ou C), apesar de nalgumas formas de realização um conteúdo superior em GC ser preferido para um palíndromo (seja 3' ou 5').

As duas regiões palindrômicas podem ter valores de estabilidade de duplexs diferentes. O valor de estabilidade do duplex é indicativo da força do duplex formado pelo palíndromo com o seu par num segundo oligonucleótido num emparelhamento intermolecular ou com ele próprio ou com o segundo palíndromo num emparelhamento intramolecular. Conforme utilizado aqui, "estabilidade do duplex" é uma medida da força de uma região palindrômica contendo complementaridade ou formadora de duplex quando se forma um duplex com a sua própria sequência complementar. A medida de estabilidade de duplex de uma molécula de cadeia dupla é dependente da concentração da cadeia total, composição base, temperatura, pH e sais do tampão. Um valor de estabilidade de duplex pode ser calculado pelo modelo termodinâmico desenvolvido por John SantaLucia, Jr. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. 95 1460 - 1465. Este programa de

dobragem está, por exemplo, disponível em <http://Ina-tm.com/> ou em <http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/hybrid/twostate.php>.

Um exemplo de um cálculo de estabilidade de duplex é baseado numa concentração de cadeia total de oligonucleótido de 0,1 μ M e concentração de sal 140 mM (sal fisiológico aproximado). A previsão da temperatura de fusão (T_m) é oligonucleótido ADN hibridizado contra nucleótidos de ADN de correspondência perfeita em solução. Um exemplo do cálculo utilizando a SEQ. ID N° 234 é mostrado a seguir.

SEQ. ID N° 234 TCGTCGACGATCGGCGCGCGCCG		
Palíndromo 5'	TCGTCGACGA	T_m : 41 °C
Palíndromo 3'	CGGCGCGCGCCG	T_m : 68 °C

No caso de modificação fosforotioato, a T_m prevista é deprimida por aproximadamente 1°C por modificação. Assim, numa molécula completamente fosforotioato a estabilidade do duplex corrigida para esta modificação seria

Palíndromo 5'	TCGTCGACGA	T_m : 32 °C
Palíndromo 3'	CGGCGCGCGCCG	T_m : 57 °C

A T_m real medida variará dentro de um intervalo de 5-10 °C. Por exemplo, a T_m real medida para a SEQ. ID N° 234 foi (0,04 mg/ml ODN em PBS):

Palíndromo 5'	TCGTCGACGA	T_m : 33,9°C
Palíndromo 3'	CGGCGCGCGCCG	T_m : 65,7 °C

Apesar da fórmula SantaLucia seja útil para calcular a estabilidade do duplex dos oligonucleótidos ela é artificialmente baixa para alguns oligonucleótidos que formam estruturas em gancho. Para a previsão da

estabilidade dos ganchos, o algoritmo Mfold é utilizado para dobragem dos ácidos nucleicos e previsão da hibridização conforme descrito por M. Zuker *Ácido nucleicos Res.* 31(13), 3406-15, (2003) que está disponível em <http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/dna/form1.cgi>.

SEQ. ID N°: 237 TCGTCGACGTTTCGGCGCCGTGCCG

Palíndromo 3' CGGCGCCGTGCCG Tm: 73 °C para gancho com 4 pares de base nos moldes Watson-Crick

Palíndromo 3' CGGCGCCGTGCCG Tm: 73 °C para gancho com 4 pares de base nos moldes Watson-Crick e pares de base G-T

O dímero correspondente tem uma Tm calculada de 42 °C e é, assim, menos favorecido do que as estruturas intramoleculares.

Um "duplex fraco" é considerado ter um valor de estabilidade de duplex de pelo menos 25 a 40. Um "duplex forte" é considerado ter um valor de estabilidade de duplex de pelo menos 40 a 60. Duplexs intramoleculares, tais como ganchos, normalmente requerem menos pares de base para obter o mesmo valor de estabilidade de duplex quando comparado com duplexs intermoleculares. Além disso, a estabilidade do duplex intramolecular (por exemplo, estabilidade de um gancho) é independente da concentração da cadeia de ODN.

Nalgumas formas de realização, a região palindrômica 5' é mais fraca do que a região palindrômica 3' na mesma molécula. Assim, a região palindrômica 5' pode ter uma estabilidade de duplex mais baixa quando complexada consigo própria do que a região palindrômica 3', possivelmente devido a um conteúdo inferior em GC. Em alternativa, em alguns casos o palíndromo 5' pode ter uma estabilidade do duplex superior à do palíndromo 3'.

Uma "região contendo complementaridade", conforme utilizado aqui, refere-se a uma região formadora de duplex que compreende um palíndromo perfeito ou um palíndromo

imperfeito. Um palíndromo imperfeito é uma sequência de ácidos nucleicos que inclui ambos nucleótidos capazes de formar as pares de base nos moldes Watson-Crick normais e nucleótidos, análogos de nucleótido ou outras estruturas que não participam na formação dos pares de base nos moldes Watson-Crick normais (por exemplo, uma sequência tal como ABCDE-S-E'D'C'B'A' na qual A e A', B e B', C e C', D e D' e E e E' são bases capazes de formar os pares de base nos moldes Watson-Crick normais e S é uma sequência não palindrômica ou um ligante não nucleotídico ou um ligante abásico (dEspaçador)). Exemplos de ligantes não nucleotídicos incluem, mas não se limitam a, dióis tais como 1,3-propaneodiol ou dodecano-1,12-diol, ciclohexanediol ou ligantes tais como colesterol, nitroindol, trietilenoglicol e hexaetilenoglicol. Em certas formas de realização, os nucleótidos, análogos de nucleótidos ou outras estruturas que não participam na formação dos pares de base nos moldes Watson-Crick normais interrompem um palíndromo, de outra forma, perfeito. Em certas formas de realização, os nucleótidos que não participam na formação dos pares de base nos moldes Watson-Crick normais podem formar pares de base não nos moldes Watson-Crick com outro nucleótido, por exemplo, G-T. Um par de bases não nos moldes Watson-Crick, conforme utilizado aqui, é qualquer par de base que não um par de base nos moldes Watson-Crick, incluindo, mas não limitado a, par de base Hoogsteen e um par de base designado de oscilação. Em certas formas de realização, os nucleótidos que não participam na formação dos pares de base nos moldes Watson-Crick normais são discordantes e não têm qualquer base nucleotídica ou análogo de base nucleotídica com que formar um par de base nos moldes Watson-Crick ou nos moldes não Watson-Crick, por exemplo, G oposto ao dEspaçador. Nalgumas formas de realização, o par de base não nos moldes Watson-Crick é G-T, G-A, G-G ou C-A. G-T é um par de base não nos

moldes Watson-Crick preferido, porque tem efeito estabilizador inferior na formação do duplex. Em certas formas de realização, os nucleótidos que não participam na formação de pares de base podem formar pares de base não convencionais com outro nucleótido, por exemplo, diaminopiridina pode formar um par de base com xantosina. Nalgumas ocasiões, a parte da cadeia dupla da molécula também pode conter pares de base não naturais (não convencionais) (por exemplo, diaminopiridina emparelhada com xantosina). Lutz MJ et al. (1998) Recognition of a non-standard base pair by thermostable DNA polymerases. *Bioorg Med Chem Lett* 8:1149-52. Em certas formas de realização, a região contendo complementaridade pode conter uma discordância. Uma "discordância", conforme utilizado aqui, refere-se a uma porção da região contendo complementaridade na qual uma ou mais bases na sequência não forma um par de base nos moldes Watson-Crick normal com a sua base oposta num duplex. Ma discordância pode resultar numa "saliência" na qual uma porção da região contendo complementaridade não participa na formação do duplex. Nalgumas formas de realização, a região contendo complementaridade pode conter duas discordâncias.

Numa forma de realização, um palíndromo imperfeito é uma "repetição invertida capaz de formar um gancho ou estrutura em haste e ansa". Este tipo de estrutura pode incluir uma sequência de nucleótidos que forma uma haste rica em GC ou gancho que tem 3 a 10 pares de base consecutivos de comprimento e inclui pelo menos uma base discordante ou sem correspondência. Em formas de realização individuais, a haste rica em GC tem 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 pares de base consecutivos de comprimento. Nalgumas formas de realização, a haste rica em GC inclui pelo menos 2, 3 ou 4 pares de base G-C. Noutra forma de realização, uma repetição invertida capaz de formar um gancho ou estrutura em haste e ansa refere-se a uma sequência de

nucleótidos que forma uma haste rica em AT ou gancho que tem 2 a 10 pares de base consecutivos de comprimento e inclui pelo menos uma base discordante ou sem correspondência. Em formas de realização individuais, a haste rica em AT tem 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 pares de base consecutivos de comprimento. Nalgumas formas de realização, a haste rica em AT inclui pelo menos 3, 4, 5 ou 6 A-T pares de base.

Nalgumas ocasiões, a base pelo menos sem correspondência ou discordante faz ponte com as extremidades da haste ou do gancho. Isto pode permitir a formação da estrutura secundária proporcionando um ponto flexível na molécula para as hastes para emparelharem com base e formarem um gancho. Em alternativa, a(s) base(s) sem correspondência ou discordante(s) podem estar na haste. Preferentemente, se a base discordante está na haste, então a haste tem pelo menos 3 pares de base de comprimento. As a(s) base(s) sem correspondência ou discordante(s) podem ser qualquer nucleótido. Nalgumas formas de realização, a base sem correspondência ou discordante é um T. Nucleótidos sem correspondência no final das cadeias duplas também são conhecidos como nucleótidos suspensos ou extremidades oscilatórias que podem estabilizar significativamente a formação do duplex ou a formação do gancho. Freier SM et al. (1983) Effects of 3' dangling end stacking on the stability of GGCC and CCGG double helixes. *Biochemistry* 22:6198-206.

A região contendo complementaridade tem tipicamente ou um valor de estabilidade de duplex de pelo menos 20 u pode incluir menos de 5 discordâncias/10 região de par de base e/ou 1-5 nucleótidos extra-palindrômicos (formação de saliência /interveniente) /10 região de par de base.

As regiões formadoras de duplex podem incluir um ou mais domínios estimulantes imunes tais como domínios de ativação do recetor 9 tipo Toll 9 (TLR9). O oligonucleótido

inclui pelo menos um domínio de ativação TLR9, posicionado na extremidade 5' da molécula. Nalgumas formas de realização, o domínio de ativação TLR9 em 5' é abrangido parcial ou completamente pela região formadora de duplex a 5', de tal forma que faz parte ou constitui toda a região formadora do duplex. Em alternativa, o domínio de ativação TLR9 em 5' pode ser diferente da região formadora de duplex a 5'. Quando estes dois domínios são diferentes, eles podem estar ligados diretamente um ao outro com uma ligação internucleotídica ou podem estar separados por um espaçador, tal como um ligante nucleotídico ou ligante não nucleotídico.

Um domínio de ativação TLR9 inclui qualquer motivo de sequência que é estimulante imune, produzindo um padrão de estimulação imune consistente com os padrões de ativação imune observados com a ativação do recetor TLR9. Estes motivos incluem, mas não se limitam a, YpR, CpG, TCG, TTCG, TTTCG, TYpR, UCG, TCG, TTYpR, TTTYpR, UUCG, UUUCG, TTT, TTTT, CpG metilado e CpI. Os nucleótidos do motivo podem incluir um esqueleto semi-macio ou estéreo específico.

Formas de realização dos oligonucleótidos CpG da invenção podem ser representadas pelas fórmulas seguintes:

5' XP₁SP₂T3'

e

5' XNSPT 3'

e

5' XPSNT 3'

e

5' XN₁SN₂T3'

X é um domínio de ativação TLR. P, P₁ e P₂ são palíndromos. S é um espaçador. T é uma cauda 3'. N, N₁ e N₂ são regiões contendo complementaridade que compreendem palíndromos imperfeitos. Nas fórmulas 5' refere-se à extremidade 5' livre do oligonucleótido e 3' refere-se à extremidade 3' livre do oligonucleótido.

Os oligonucleótidos imunoestimulantes da invenção podem incluir regiões ricas em A e T ou regiões ricas em G e C. Uma "região rica em A e T", conforme utilizado aqui, é uma em que os nucleótidos A e T estão em maior número do que os nucleótidos G e C na sequência. Em alternativa, uma "região rica em G e C", conforme utilizado aqui, é uma em que os nucleótidos G e C estão em maior número do que os nucleótidos A e T na sequência. Nalguns casos, os oligonucleótidos podem ter quatro ou mais nucleótidos G próximo da extremidade 3' da molécula.

Nalgumas formas de realização, a molécula inclui uma cauda 3'. A cauda 3' pode ter qualquer comprimento, mas preferentemente tem menos de 100 nucleótidos de comprimento. Esta cauda 3' pode ter qualquer conteúdo de base. Nalgumas formas de realização, a cauda 3' contém um ou mais domínios estimulantes imunes tais como motivos poli T ou CpG.

Um espaçador pode estar localizado entre as duas regiões formadoras de duplex. O espaçador pode ser um ligante flexível que é ou um ligante não nucleotídico ou "nucleótidos intervenientes", isto é, nucleótidos que não formam duplexs. Nalgumas formas de realização, "nucleótidos intervenientes", de acordo com a invenção, podem incluir entre 0-100 nucleótidos. Quando o espaçador é um espaçador de ácido nucleico pode ser qualquer nucleótido ou nucleótidos ou nucleósidos. Nalgumas formas de realização, é um espaçador T ou rico em T. Um "ligante não nucleotídico" ou de forma equivalente "espaçador não nucleotídico", conforme utilizado aqui, refere-se a qualquer elemento ligante que não é um nucleótido ou polímero do mesmo (isto é, um polinucleótido), em que um nucleótido inclui uma nucleobase purina ou pirimidina e um fosfato de açúcar. Um ligante não nucleotídico é, assim, qualquer ligante conhecido na técnica, incluindo, mas não limitado a, uma cadeia de carbono simples, um nucleótido

abásico (dEspaçador), isto é, uma unidade de fosfato de açúcar tipo nucleótido na qual a nucleobase é substituída por um átomo de hidrogénio, um polietilenoglicol, incluindo, mas não limitado a, um trietilenoglicol e um hexaetilenoglicol. O espaçador pode incluir um ou mais domínios estimulantes imunes tais como motivos poli T ou CpG. Nalgumas formas de realização, o ligante é uma ligação 3'-3' entre as regiões formadoras de duplex.

As regiões formadoras de duplex podem ser ligadas diretamente ou indiretamente. O termo "ligado diretamente", conforme utilizado aqui, refere-se a um oligonucleótido no qual os nucleosídeos do palíndromo estão anexos por uma ligação química fosfodiéster, tipo fosfodiéster ou fosforotioato. É possível que as duas regiões formadoras de duplex se sobreponham. Em algumas formas de realização, as regiões formadoras de duplex sobrepõem-se num ou mais nucleótidos. Quando as regiões formadoras de duplex se sobrepõem, elas são consideradas como estando diretamente ligadas. Em algumas formas de realização as regiões formadoras de duplex não se sobrepõem. O termo "ligado indiretamente", conforme utilizado aqui, refere-se a um oligonucleótido no qual os nucleosídeos da região formadora de duplex estão ligados através de um espaçador, conforme descrito anteriormente.

Os oligonucleótidos da invenção incluem pelo menos um dinucleótido YpR. Conforme utilizado aqui, um "dinucleótido YpR" é um no qual uma pirimidina é seguida de uma purina. Em certas formas de realização, a letra Y é utilizada para referir-se a um nucleótido que contém uma citosina ou uma citosina modificada. Uma cotisina modificada, conforme utilizado aqui, é um análogo da base pirimidina que ocorre naturalmente ou não naturalmente da citosina que pode substituir esta base sem debilitar a atividade imunoestimulante do oligonucleótido. As citosinas modificadas incluem, mas não se limitam a, citosinas 5-

substituídas (por exemplo, 5-metil-citosina, 5-fluoro-citosina, 5-cloro-citosina, 5-bromo-citosina, 5-iodo-citosina, 5-hidroxi-citosina, 5-hidroximetil-citosina, 5-difluorometil-citosina e 5-alquinil-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 anelares condensados (por exemplo, N,N'-propileno citosina ou fenoxazina) e uracilo e seus derivados (por exemplo, 5-fluoro-uracilo, 5-bromo-uracilo, 5-bromovinil-uracilo, 4-tio-uracilo, 5-hidroxi-uracilo, 5-propinil-uracilo). Algumas das citosinas preferidas incluem 5-metil-citosina, 5-fluoro-citosina, 5-hidroxi-citosina, 5-hidroximetil-citosina e N4-etil-citosina. Noutra forma de realização da invenção, a base citosina é substituída por uma base universal (por exemplo, 3-nitropirrol, P-base), um sistema anelar aromático (por exemplo, fluorobenzeno ou difluorobenzeno) ou um átomo de hidrogénio (dEspaçador).

A letra R é utilizada para referir-se a uma purina, incluindo, por exemplo, G e A. Nalgumas formas de realização, R é Z, em que Z é utilizada para referir uma guanina ou uma base guanina modificada. Uma guanina modificada, conforme utilizado aqui, é um análogo da base purina que ocorre naturalmente ou não naturalmente da guanina que pode substituir esta base sem debilitar a atividade imunoestimulante do oligonucleótido. Guaninas modificadas incluem, mas não se limitam a, 7-deazaguanina, guanina 7-deaza-7-substituída (tal como 7-deaza-7-(C2-C6)alquinilguanina), guanina 7-deaza-8-substituída, hipoxantina, guaninas N2-substituídas (por exemplo, N2-metilguanina), 5-amino-3-metil-3H,6H-tiazolo[4,5-d]pirimidina-2,7-diona, 2,6-diaminopurina, 2-aminopurina, purina, indol, adenina, adeninas substituídas (por exemplo, N6-metil-adenina, 8-oxo-adenina) guanina 8-substituída (por

exemplo, 8-hidroxiguanina e 8-bromoguanina) e 6-tioguanina. Noutra forma de realização da invenção, a base guanina é substituída por uma base universal (por exemplo, 4-metil-indol, 5-nitro-indol e K-base), um sistema anelar aromático (por exemplo, benzimidazol ou dicloro-benzimidazol, ácido 1-metil-1H-[1,2,4]triazol-3-carboxílico amida) ou um átomo de hidrogénio (dEspaçador).

Em certas formas de realização da invenção, os oligonucleótidos imunoestimulantes incluem um motivo YpR que é um dinucleótido CpG. Um dinucleótido CpG pode ser metilado ou não metilado. Um oligonucleótido imunoestimulante que contém pelo menos um dinucleótido CpG não metilado é uma molécula de ácido nucleico que contém uma sequência de dinucleótido citosina-guanina não metilada (isto é, uma citidina 5' não metilada seguida de guanosina 3' e ligada por uma ligação fosfato) e que ativa o sistema imune; tal oligonucleótido imunoestimulante é um oligonucleótido CpG. Os oligonucleótidos CpG foram descritos num número de patentes emitidas, pedidos de patente publicados e noutras publicações, incluindo nas Patentes U.S. N°s 6 194 388; 6 207 646; 6 214 806; 6 218 371; 6 239 116; e 6 339 068. Um oligonucleótido imunoestimulante que contém pelo menos um dinucleótido CpG metilado é um oligonucleótido que contém uma sequência de dinucleótido citosina-guanina metilada (isto é, uma citidina 5' metilada seguida de uma guanosina 3' e ligada por uma ligação fosfato) e que ativa o sistema imune.

Nalgumas formas de realização, o oligonucleótido tem uma das estruturas mostradas no Quadro 1:

Quadro 1. Sequências de Oligonucleótidos

T-C-G-T-C-G-A-C-G-A-T*T*T-T-A-C-G-A-C-G-T-C-G-T-T*T*T	SEQ. ID N° 1
T-C-G-T-C-G-A-C-G-A-T-T-T-T-A-C-G-A-C-G-T-C-G-T-T-T-T	SEQ. ID N° 2
T-C-G-T-C-G-A-C-G-A-A-C-G-A-C-G-T-C-G-T	SEQ. ID N° 3

T-C-G-T-C-G-A-C-G-A-T*T*T-T-T-C-G-T-C-G-A-C-G-A-T*T*T	SEQ. ID N° 4
T-C-G-T-C-G-A-C-G-A-T-T-T-T-T-C-G-T-C-G-A-C-G-A-T-T-T	SEQ. ID N° 5
T-C-G-T-C-G-A-C-G-A-T-C-G-T-C-G-A-C-G-A	SEQ. ID N° 6
C*G*C*G*C*G*C*G*C*G*C*G*C*G*C*G*C*G	SEQ. ID N° 7
G*A*A*A*A*C*G*C*T*C*G*A*C*C*T*T*C*G*A*T*bi ot	SEQ. ID N° 8
A*G*C*T*C*C*A*T*G*G*T*G*C*T*C*A*C*T*G	SEQ. ID N° 9
T*C*T*C*C*C*A*G*C*G*T*G*C*G*C*C*A*T	SEQ. ID N° 10
T*C*C*A*T*G*A*C*G*T*T*C*C*T*G*A*C*G*T*T	SEQ. ID N° 11
T*C*C*A*G*G*A*C*T*T*C*T*C*T*C*A*G*G*T*T	SEQ. ID N° 12
T*C*C*A*C*G*A*C*G*T*T*T*T*C*G*A*C*G*T*T	SEQ. ID N° 13
T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*G*A*C*G*T*T*T*T*G*A*C*G*T*T	SEQ. ID N° 14
T*C*C*T*G*A*C*G*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*C* C	SEQ. ID N° 15
T*C*G*C*G*T*G*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T*T*T* G*A*C*G*T*T	SEQ. ID N° 16
T*C*G*C*G*A*C*G*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*C* G	SEQ. ID N° 17
dig- C*C*G*G*C*C*G*G*C*C*G*G*C*C*G*G*C*C*G*G	SEQ. ID N° 18
dig- C*G*C*G*C*G*C*G*C*G*C*G*C*G*C*G*C*G*C*G	SEQ. ID N° 19
T*C*C*A*G*G*A*C*T*T*C*T*C*T*C*A*G*G*T*T*T* T*T*T	SEQ. ID N° 20
G*T*G*C*T*C*G*A*G*G*A*T*G*C*G*C*T*T*C*G*C	SEQ. ID N° 21
G*C*C*G*A*G*G*T*C*C*A*T*G*T*C*G*T*A*C*G*C	SEQ. ID N° 22
T-C-G-C-G-T-G-C-G-T-T-T-T-G-T-C-G-T-T-T-T- G-A-C-G-T-T	SEQ. ID N° 23
A*C*C*G*A*T*A*C*C*G*G*T*G*C*C*G*G*T*G*A*C* G*G*C*A*C*C*A*C*G	SEQ. ID N° 24

A*C*C*G*A*T*A*A*C*G*T*T*G*C*C*G*G*T*G*A*C*G*G*C*A*A*C*C*A*C*G	SEQ. ID N° 25
A*C*C*G*A*T*G*A*A*C*G*T*C*G*C*C*G*G*T*G*A*C*G*G*C*A*A*C*C*A*C*G	SEQ. ID N° 26
C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G*C*G*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G*C*G	SEQ. ID N° 27
T*C*G*A*T*C*G*T*T*T*T*T*T*C*G*T*G*C*G*T*T*T*T*T	SEQ. ID N° 28
T*C*G*T*C*C*A*G*G*A*A*C*T*T*C*T*C*T*C*A*G*G*T*T	SEQ. ID N° 29
T*C*G*T*C*G*T*C*C*A*G*G*A*A*C*T*T*C*T*C*T*C*T*C*A*G*G*T*T	SEQ. ID N° 30
T*C*G*T*G*A*A*C*G*G*G*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G*C*C	SEQ. ID N° 31
A*C*G*A*A*C*G*T*C*G*T*C*G*G*C*G*G*C*C*G*C*C*G	SEQ. ID N° 32
G*G*G-G-A-C-G-A-C-G-T-C-G-T-G-C*G*G*C*G*G*C*C*G*C*C*G	SEQ. ID N° 33
G*G*G*G*A*A*C*G*A*A*C*G*T*C*G*T*G*C*G*G*C*G*G*C*C*G*C*C*G	SEQ. ID N° 34
C*C-A*C-G*A*A*C-G*T*C-G*T*C-G-A-A-G*A*A*C-G*A*A*C-G*T*C-G*T-G*G	SEQ. ID N° 35
C*T-G*C*A*G-C*T-G-C*A*G-C*T-G-C*A*G-C*T-G*C*A*G	SEQ. ID N° 36
C*G*G-C*C-G*C*T-G*C*A-G-C*G-G*C*C-G*C*T-G*C*A*G	SEQ. ID N° 37
C*A*T*G*A*A*C*G*T*T*T*T*T*G*A*T*G*T*T	SEQ. ID N° 38
A*T*G*A*A*C*G*T*T*T*T*T*G*A*T*G*T*T	SEQ. ID N° 39
T*G*A*A*C*G*T*T*T*T*T*G*A*T*G*T*T	SEQ. ID N° 40
A*T*G*A*A*C*G*T*T*T*T*T*G*A*T*G*T*T*G*T	SEQ. ID N° 41
T*C*C*A*T*G*A*A*C-G-T*T*T*T*T*G*A*T*G*T*T	SEQ. ID N° 42
T*C*C*A*T*G*A-A-C-G-T*T*T*T*T*G*A*T*G*T*T	SEQ. ID N° 43
T*C*C*A*T*G*A*A*C*G*T*T*T*T*T*G*A*T-G-T*T	SEQ. ID N° 44
T*C*C*A*T*G*A*A-C-G-T*T*T*T*T*G*A*T-G*T*T	SEQ. ID N° 45

T*C*C*A*T*G*A-C-G-T*T*T*T*T*G*A*T-G*T*T	SEQ. ID N° 46
A*T*G*A*C-G*T*T*T*T*T*G*A*T*G*T*T*G*T	SEQ. ID N° 47
A*T*G*A*C*G*T*T*T*T*T*G*A*T-G*T*T*G*T	SEQ. ID N° 48
A*T*G*A*C-G*T*T*T*T*T*G*A*T-G*T*T*G*T	SEQ. ID N° 49
A*T*G*A-C-G-T*T*T*T*T*G*A-T-G-T*T*G*T	SEQ. ID N° 50
T*C*C*A*T*G*C*G*T*T*T*T*T*G*A*A*T*G*T*T	SEQ. ID N° 51
T*C*C*A*T*G*A*C*G*T*C*T*T*T*G*A*T*G*T*C	SEQ. ID N° 52
A-C-G-A-C-G-T-C-G-T-T-C-A-C-G-A-C-G-T-C-G-T-chol	SEQ. ID N° 53
A-C-G-A-C-G-T-C-G-T-G-G-C-C-A-C-G-A-C-G-T-C-G-T-D-D-D	SEQ. ID N° 54
A-C-G-A-C-G-T-C-G-T-D-D-D-D-A-C-G-A-C-G-T-C-G-T-D-D-D	SEQ. ID N° 55
D-D-D-A-C-G-A-C-G-T-C-G-T-D-D-D-D-A-C-G-A-C-G-T-C-G-T-D-D-D	SEQ. ID N° 56
D-D-D-A-C-G-A-C-G-T-C-G-T-D-D-D-D-A-C-G-A-C-G-T-C-G-T-chol	SEQ. ID N° 57
G*G*G-A-C-G-A-C-G-T-C-G-T-G*G*C*C-A-C-G-A-C-G-T-C-G-T-C*C*C	SEQ. ID N° 58
C*C*C-A-C-G-A-C-G-T-C-G-T-G*G*G	SEQ. ID N° 59
C*C*C*C-A-C-G-A-C-G-T-C-G-T-G*G*G*G	SEQ. ID N° 60
T*C*G*A*T*C*G*T*T*T*T-T-C-G*T*G*C*G*T*T*T*T	SEQ. ID N° 61
T*C*G*A*T*C*G*T*T*T-T-T-C-G-T*G*C*G*T*T*T*T	SEQ. ID N° 62
T*C*G*A*T*C*G*T*T-T-T-T-C-G-T-G*C*G*T*T*T*T	SEQ. ID N° 63
T*C*G*A*T*C*G-T-T-T-T-T-C*G*T*G*C*G*T*T*T*T	SEQ. ID N° 64
A*T-G*A*C-G*T*T*T*T-T-G*A*C-G*T*T	SEQ. ID N° 65
A*C-G*A*C-G*T*T*T*T-T-G*A*T-G*T*T	SEQ. ID N° 66
A*C-G*A*C-G*T*T*T*T-C-G*A*C-G*T*T	SEQ. ID N° 67
A*T-G*A*T-G*T*T*T*T-T-G*A*T-G*T*T	SEQ. ID N° 68
A*T-G*A*C-G*T*T*T*T-G-A*T*G-T*T	SEQ. ID N° 69

A*T-G*A*C-G*T*T*T*G*T-G*A*T-G*T*T	SEQ. ID N° 70
T*T-G*A*C-G*T*T*T*T*T-G*A*T-G*T*T	SEQ. ID N° 71
A*T-G*A*T-G*T*T*T*T*T-G*A*T-G*T*T	SEQ. ID N° 72
A*T-G*A*G-C*T*T*T*T*G-T*A*T-G*T*T	SEQ. ID N° 73
T*C*G*A*C*G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*G*C*C*G*C*C*G	SEQ. ID N° 74
T*C*C*T*G*A*C*G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*G*C*C*G*C*C*G	SEQ. ID N° 75
T*C*C*T*G*A*C*G*T*T*T*C*G*G*C*G*G*C*C*G*C*C*G	SEQ. ID N° 76
T*C*C*A*T*G*A*C*G*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*C	SEQ. ID N° 77
T*C*C*T*G*A*C*G*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*C	SEQ. ID N° 78
T*C*G*A*C*G*T*T*T-T-C-G-G-C*G*C*G*C*G*C*C*G	SEQ. ID N° 79
T*C*G*A*C*G*T*T*T-T-C-G-G-C*G*G*C*C*G*C*C*G	SEQ. ID N° 80
T*C*G*A*C*G*T*C*G-A-C-G-T-T-A-G-G-G-T-T-A*G*G*G	SEQ. ID N° 81
A*C*G*A*C*G*T*C*G-T-T-A-G-G-G-T-T-A*G*G*G	SEQ. ID N° 82
G*T*C-G*G*C-G*T*T-G*A*C	SEQ. ID N° 83
A-C-G-A-C-G-T-C-G-T-C-G-D-D-D-D-C-G-G-C-C-G-C-C-G	SEQ. ID N° 84
A-C-G-A-C-G-T-C-G-T-C-G-D-D-D-D*C*G*G*C*C*G*C*C*G	SEQ. ID N° 85
T-C-G-T-C-G-A*C*G*A*C*G*T*C*G*T*C*G	SEQ. ID N° 86
T-C-G-T-C-G-A-C-G-A-C-G-T-C-G-T-C-G-D-D-D-D	SEQ. ID N° 87
A-C-G-A-C-G-T-C-G-T-T*T*T*T-A-C-G-A-C-G-T-C-G-T-teg	SEQ. ID N° 88
A*C*G*A*C*G*T*C*G*T*D*D*D*D*A*C*G*A*C*G*T*C*G*T*D*D*D	SEQ. ID N° 89
D*D*D*A*C*G*A*C*G*T*C*G*T*D*D*D*D*A*C*G*A*C*G*T*C*G*T*D*D*D	SEQ. ID N° 90

A-C-G-A-C-G-T-C-G-T-T*T*T*T-A-C-G-A-C-G-T-C-G-T-D-D-D	SEQ. ID N° 91
A-C-G-A-C-G-T-C-G-T-T*T*T*T-A-C-G-A-C-G-T-C-G-T-T*T*T	SEQ. ID N° 92
A*C-G-A-C-G-T-C-G-T-T*T*T*T-A-C-G-A-C-G-T-C-G-T-T*T*T	SEQ. ID N° 93
A*C-G-A-C-G-T-C-G-T-T*T*T*T-A-C-G-A-C-G-T-C-G*T	SEQ. ID N° 94
A-C-G-A-C-G-T-C-G-T-D-D-D-D-A-C-G-A-C-G-T-C-G-T-L	SEQ. ID N° 95
A-C-G-A-C-G-T-C-G-T-L-A-C-G-A-C-G-T-C-G-T-L	SEQ. ID N° 96
A-C-G-A-C-G-T-C-G-T-teg-teg-A-C-G-A-C-G-T-C-G-T-teg	SEQ. ID N° 97
C-G-A-C-G-T-C-G-T-D-D-D-D-A-C-G-A-C-G-T-C-G-D-D-D	SEQ. ID N° 98
A-C-G-A-C-G-T-C-G-D-D-D-D-C-G-A-C-G-T-C-G-T-D-D-D	SEQ. ID N° 99
C-G-A-C-G-T-C-G-D-D-D-D-C-G-A-C-G-T-C-G-D-D-D	SEQ. ID N° 100
T-C-G-A-C-G-T-C-G-T-D-D-D-D-A-C-G-A-C-G-T-C-G-A-D-D-D	SEQ. ID N° 101
A-C-G-T-C-G-T-C-G-T-D-D-D-D-A-C-G-A-C-G-A-C-G-T-D-D-D	SEQ. ID N° 102
T-C-G-T-C-G-A-C-G-T-D-D-D-D-A-C-G-T-C-G-A-C-G-A-D-D-D	SEQ. ID N° 103
T-C-G-A-C-G-T-C-G-T-D-D-D-D-A-C-G-A-C-G-T-C-G-T-D-D-D	SEQ. ID N° 104
A-C-G-A-C-G-T-C-G-T-D-D-D-D-A-C-G-T-C-G-T-C-G-T-D-D-D	SEQ. ID N° 105
A-C-G-A-C-G-T-T-D-D-D-D-A-A-C-G-T-C-G-T-D-D-D	SEQ. ID N° 106
A-C-G-T-C-G-T-D-D-D-D-A-C-G-A-C-G-T-D-D-D	SEQ. ID N° 107

G-G-C-G-G-C-C-G-D-D-D-D-C-G-G-C-C-G-C-C-D-D-D	SEQ. ID N° 108
G-C-G-G-C-C-G-G-D-D-D-D-C-C-G-G-C-C-G-C-D-D-D	SEQ. ID N° 109
A-C-G-T-C-G-T-D-D-D-D-A-C-G-A-C-G-T-C-G-T-D-D-D	SEQ. ID N° 110
D-A-C-G-A-C-G-T-C-G-T-D-D-D-D-A-C-G-A-C-G-T-C-G-T-D	SEQ. ID N° 111
A*C-G-A-C-G-T-C-G-T-C-G-A-A-G-A-C-G-A-C-G-T-C-G-T-D-D-T	SEQ. ID N° 112
T*C-G-A-C-G-T-C-G-T-C-G-A-A-G-A-C-G-T-C-G-T-C-G-T-D-D-T	SEQ. ID N° 113
C*C*A-C-G-A-C-G-T-C-G-T-C-G-A-A-G-A-C-G-A-C-G-T-C-G-T*G*G	SEQ. ID N° 114
T*C*C*A*D*G*A*C*G*T*T*T*T*T*G*A*T*G*T*T	SEQ. ID N° 115
T*C*C*A*T*G*A*C*G*T*T*D*T*T*G*A*T*G*T*T	SEQ. ID N° 116
T*C*C*A*J*G*A*C*G*T*T*T*T*T*G*A*T*G*T*T	SEQ. ID N° 117
T*C*C*A*T*G*A*C*G*T*T*J*T*T*G*A*T*G*T*T	SEQ. ID N° 118
T*C*C*A*T*G*A*C*G*T*T*T*T*T*G*A*T*G*T*T*cy3	SEQ. ID N° 119
J*J*J*J*J*G*A*C*G*T*T*T*T*T*G*A*T*G*T*T	SEQ. ID N° 120
T*C*C*A*J*G*A*C*G*T*T*J*T*T*G*A*T*G*T*T	SEQ. ID N° 121
T*C*C*A*D*G*A*C*G*T*T*D*T*T*G*A*T*G*T*T	SEQ. ID N° 122
A-C-G-A-C-G-T-C-G-T-D-D-D-D-A-C-G-A-C-G-T-C-G-T-D-D-D-rU	SEQ. ID N° 123
A-C-G-A-C-G-T-C-G-T-D-D-D-D-A-C-G-A-C-G-T-C-G-T-D-D-D-rG	SEQ. ID N° 124
A-C-G-A-C-G-T-C-G-T-D-D-D-D-A-C-G-A-C-G-T-C-G-T-D-D-D-rA	SEQ. ID N° 125
D-D-D-A-C-G-A-C-G-T-C-G-T-D-D-D-D-A-C-G-A-C-G-T-C-G-T-D-D-D-rU	SEQ. ID N° 126
A-C-G-A-C-G-T-C-G-T-D-D-D-D-A-C-G-A-C-G-T-C-G-T-D-D-D-rA2-rA2-rA2-rA	SEQ. ID N° 127
T*C*G*A*T*G*A*C*G*T*T*C*C*T*G*A*C*G*T*T	SEQ. ID N° 128

T-T-T-A-C-G-A-C-G-T-C-G-T-D-D-D-D-A-C-G-A-C-G-T-C-G-T-D-D-D-rU	SEQ. ID N° 129
(T*C-G-A-C-G-T-C-G-T-) (vitE-)doub-teg	SEQ. ID N° 130
T*C*G*A*C-G*T*T*T*T*C-G*G*C*G*G*C*C-G*C*C*G	SEQ. ID N° 131
T*C*G*A*C-G*T*T*T*T*C-G*G*C*G*C*G*C-G*C*C*G	SEQ. ID N° 132
T*C-G*C-G*A*C-G*T*T*T*C-G*G*C*G*C-G*C*G*C*C*G	SEQ. ID N° 133
T*C*G*C-G*A*C*G*T*T*T*C-G*G*C*G*C*G*C*G	SEQ. ID N° 134
T*C*G*C-G*A*C*G*T*T*T*C*G*G*C-G*C*G*C*G*C*G	SEQ. ID N° 135
T*C*G*C-G*A*C*G*T*T*T*C*G*G*C*G*C-G*C*G*C*G	SEQ. ID N° 136
T*C*G*C*G*A*C-G*T*T*T*C*G*G*C*G*C-G*C*G*C*G	SEQ. ID N° 137
T*C*G*C*G*A*C-G*T*T*T*C*G*G*C-G*C*G*C*G*C*G	SEQ. ID N° 138
T*C*G*C-G*A*C*G*T*T*T*C-G*G*C*G*C-G*C*G*C*G	SEQ. ID N° 139
T*C*G*C*G*A*C-G*T*T*T*C-G*G*C*G*C-G*C*G*C*G	SEQ. ID N° 140
T*C*G*C*G*A*C-G*T*T*T*C*G*C*G*C-G*C*G*C*G	SEQ. ID N° 141
D*C*C*A*T*G*A*C*G*T*T*T*T*T*G*A*T*G*T*T	SEQ. ID N° 142
T*D*C*A*T*G*A*C*G*T*T*T*T*T*G*A*T*G*T*T	SEQ. ID N° 143
T*C*D*A*T*G*A*C*G*T*T*T*T*T*G*A*T*G*T*T	SEQ. ID N° 144
T*C*C*D*T*G*A*C*G*T*T*T*T*T*G*A*T*G*T*T	SEQ. ID N° 145
T*C*C*A*T*G*A*C*G*T*T*T*T*T*D*G*A*T*G*T*T	SEQ. ID N° 146
T*C*C*A*T*G*A*C*G*T*T*T*T*D*T*G*A*T*G*T*T	SEQ. ID N° 147
T*C*G*A*A*C-G*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G	SEQ. ID N° 148
T*C*G*T*C*G*A*A*A-C-G*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G	SEQ. ID N° 149

T*C*G*T*C*G*A*A*C- G*T*T*C*G*G*C*G*C*T*G*C*G*C*C*G	SEQ. ID N° 150
T*C*G*C*G*A*C- G*T*T*C*G*T*T*G*C*G*C*G*C*G*C*C*G	SEQ. ID N° 151
T*A*C*G*T*C-G*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*C*G	SEQ. ID N° 152
T*T*C*G*C*G*A*C- G*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*C*G	SEQ. ID N° 153
T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*C- G*T*C*G*C*G*A*C*G*T	SEQ. ID N° 154
T*A*G*C-G*T*G*C-G*T*T*T*T*G*A*C- G*T*T*T*T*T*T*T	SEQ. ID N° 155
T*A*G*C-G*A*G*C-G*T*T*T*T*G*A*C- G*T*T*T*T*T*T*T	SEQ. ID N° 156
T*T*G*C-G*A*G*C-G*T*T*T*T*G*A*C- G*T*T*T*T*T*T*T	SEQ. ID N° 157
A*T*G*C-G*T*G*C-G*T*T*T*T*G*A*C- G*T*T*T*T*T*T*T	SEQ. ID N° 158
T*T*A*C-G*T*G*C-G*T*T*T*T*G*A*C- G*T*T*T*T*T*T*T	SEQ. ID N° 159
T*T*G*C-A*T*G*C-G*T*T*T*T*G*A*C- G*T*T*T*T*T*T*T	SEQ. ID N° 160
T*T*G*C-G*T*A*C-G*T*T*T*T*G*A*C- G*T*T*T*T*T*T*T	SEQ. ID N° 161
T*T*G*C-G*T*G*C-A*T*T*T*T*G*A*C- G*T*T*T*T*T*T*T	SEQ. ID N° 162
T*T*G*C-G*T*G*C-G*A*T*T*T*G*A*C- G*T*T*T*T*T*T*T	SEQ. ID N° 163
T*T*G*C-G*C*G*C-G*T*T*T*T*G*A*C- G*T*T*T*T*T*T*T	SEQ. ID N° 164
T*T*G*C-G*T*G*C-G*C*T*T*T*G*A*C- G*T*T*T*T*T*T*T	SEQ. ID N° 165
T*T*G*C-G*T*G*C-G*T*T*T*C*G*A*C- G*T*T*T*T*T*T*T	SEQ. ID N° 166

T*C*G*T*C-G*A*A*C*G*T*T*C- G*G*C*G*C*T*G*C*G*C*C*G	SEQ. ID N° 167
T*C*G*T*C-G*A*A*C*G*T*T*C-G*G*C- G*C*T*G*C*G*C*C*G	SEQ. ID N° 168
T*C*G*T*C-G*A*A*C*G*T*T*C-G*G*C*G*C*T*G*C- G*C*C*G	SEQ. ID N° 169
T*C*G*T*C*G*A*A*C-G*T*T*C*G*G*C- G*C*T*G*C*G*C*C*G	SEQ. ID N° 170
T*C*G*T*C-G*G*A*C*G*T*T*C- G*G*C*G*C*T*G*C*G*C*C*G	SEQ. ID N° 171
T*C*G*C*G*A*C-G*T*T*C*G*T*T*G*C- G*C*G*C*G*C*C*G	SEQ. ID N° 172
T*C*G*C-G*A*C*G*T*T*C-G*T*T*G*C- G*C*G*C*G*C*C*G	SEQ. ID N° 173
T*C-G*C*G*A*C*G*T*T*C-G*T*T*G*C*G*C- G*C*G*C*C*G	SEQ. ID N° 174
T*C*G*C*G*A*C-G*T*T*T*T*G*C*G*C-G*C*G*C	SEQ. ID N° 175
T*C*G*C*G*A*C-G*T*C*G*T*T*G*C- G*C*G*C*G*C*C*G	SEQ. ID N° 176
T*C*G*C*G*A*C-G*T*T*C*G*A*A*G*C- G*C*G*C*G*C*C*G	SEQ. ID N° 177
T*C*G*C*G*A*C-G*A*A*C*G*T*T*G*C- G*C*G*C*G*C*C*G	SEQ. ID N° 178
T-C-G-A-C-G-T-C-G-T-D-D-D-D-T-C-G-A-C-G-T- C-G-T-D-D-D	SEQ. ID N° 179
T*C*G*T*C*G*T*T*A*G*C*T*C*G*T*T*A*G*C*T*C* G*T*T	SEQ. ID N° 180
T*C*G*T*C*G*T*T*A*C*G*T*A*A*T*T*A*C*G*T*C* G*T*T	SEQ. ID N° 181
T*C*G*T*C*G*T*T*A*C*G*T*C*G*T*T*A*C*G*T*A* A*T*T	SEQ. ID N° 182
T*C*G*T*C*G*T*T*A*C*G*T*A*A*T*T*A*C*G*T*A* A*T*T	SEQ. ID N° 183
T*C*G*A*C*G*T*C*G-A-C*G*T*G*A*C*G*G*G	SEQ. ID N° 184

(T-C-G-A-C-G-T-C-G-T-T-) 2doub-but	SEQ. ID N° 185
(T-C-G-A-C-G-T-C-G-T-T) 2doub-chol	SEQ. ID N° 186
(T-C-G-A-C-G-T-C-G-T-T-T-) 2doub-chol	SEQ. ID N° 187
T-C-G-A-C-G-T-C-G-T-T-T-chol-T-T-C-G-A-C-G-T-C-G-T-T-but	SEQ. ID N° 188
T*C*G*C-G*A*C*G*T*T*C-G*G*C*G*C-G*C*T*G*C*C*G	SEQ. ID N° 189
T*C*G*C-G*A*C*G*T*T*C-G*G*C*G*C-G*T*C*G*C*C*G	SEQ. ID N° 190
T*C*G*C-G*A*C*G*T*T*C-G*G*C*G*G*C-T*C*G*C*C*G	SEQ. ID N° 191
T*C*G*C*G-A*C*G*T*T*C-G*G*C*G*C-G*T*C*G*C*C*G	SEQ. ID N° 192
T*C*G*C*G-A*C*G*T*T*C-G*G*C*G*G*C-T*C*G*C*C*G	SEQ. ID N° 193
T*C*G-C*G*A*C*G*T*T*C-G*G*C*G*C-G*T*C*G*C*C*G	SEQ. ID N° 194
T*C*G-C*G*A*C*G*T*T*C-G*G*C*G*G*C-T*C*G*C*C*G	SEQ. ID N° 195
(T-C-G-A-C-G-T-C-G-T-) (vitE-)	SEQ. ID N° 196
T*C-G*A*C-G*T*C-G*A*C*G*T*G*A*C*G*G*G	SEQ. ID N° 197
T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*C*G*T*G*A*C*G*G*G	SEQ. ID N° 198
T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*C*G*T*G*A*C*G*T*C	SEQ. ID N° 199
T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*C*G*T*G*A*C*G	SEQ. ID N° 200
(T-C-G-A-C-G-T-C-G-A-) (vitE-)	SEQ. ID N° 201
T*C*G*T*C*G*T*T*A*C*G*T*A*A*C*T*A*C*G*T*C*G*T*T	SEQ. ID N° 202
T*C*G*T*C*G*T*T*A*C*G*T*A*A*C*G*A*C*G*T*C*G*T*T	SEQ. ID N° 203
T*C*G*T*C*G*T*T*A*C*G*T*A*A*C*G*A*C*G*A*C*G*T*T	SEQ. ID N° 204
T*C*G*T*C*G*T*T*A*G*C*T*A*A*T*T*A*G*C*T*C*G*T*T	SEQ. ID N° 205

T*C*G*T*C*G*T*T*A*C*G*T*A*A*T*T*A*G*C*T*C*G*T*T	SEQ. ID N° 206
C*C*C*A*T*G*A*C*G*T*T*C*C*T*G*A*C*G*T*T	SEQ. ID N° 207
G*C*C*A*T*G*A*C*G*T*T*C*C*T*G*A*C*G*T*T	SEQ. ID N° 208
A*C*C*A*T*G*A*C*G*T*T*C*C*T*G*A*C*G*T*T	SEQ. ID N° 209
T*G*G*A*T*G*A*C*G*T*T*C*C*T*G*A*C*G*T*T	SEQ. ID N° 210
T*T*T*A*T*G*A*C*G*T*T*C*C*T*G*A*C*G*T*T	SEQ. ID N° 211
T*A*A*A*T*G*A*C*G*T*T*C*C*T*G*A*C*G*T*T	SEQ. ID N° 212
C*C*A*T*G*A*C*G*T*T*C*C*T*G*A*C*G*T*T	SEQ. ID N° 213
C*A*T*G*A*C*G*T*T*C*C*T*G*A*C*G*T*T	SEQ. ID N° 214
A*T*G*A*C*G*T*T*C*C*T*G*A*C*G*T*T	SEQ. ID N° 215
T*G*A*C*G*T*T*C*C*T*G*A*C*G*T*T	SEQ. ID N° 216
T-C-G-A-C-G-T-C-G-A-D-D-D-D-T-C-G-A-C-G-T-C-G-A-chol	SEQ. ID N° 217
teg-iA-iG-iC-iT-iG-iC-iA-iG-iC-iT-D-D-D-D-T-C-G-A-C-G-T-C-G-A-chol	SEQ. ID N° 218
T*C-G*C-G*A*C-G*T*T*C-G*G*C-G*C-G*C-G*C*C-G	SEQ. ID N° 219
T*C-G*T*C-G*A*C-G*T*T*C-G*G*C*G*C-G*C*G*C*C*G	SEQ. ID N° 220
T*C-G*G*A*C-G*T*T*C-G*G*C*G*C-G*C*G*C*C*G	SEQ. ID N° 221
T*C-G*G*A*C-G*T*T*C-G*G*C*G*C*G*C*C*G	SEQ. ID N° 222
T*C-G*C-G*A*C-G*T*T*C-G*G*C*G*C*G*C*C*G	SEQ. ID N° 223
T*C-G*C-G*A*C-G*T*T*C-G*C-G*C-G*C-G*C-G	SEQ. ID N° 224
T*C-G*A*C-G*T*T*C-G*G*C*G*C-G*C*G*C*C*G	SEQ. ID N° 225
T*C-G*A*C-G*T*T*C-G*G*C*G*C*G*C*C*G	SEQ. ID N° 226
T*C-G*C-G*A*C-G*T*T*C-G*G*C*G*C*C*G	SEQ. ID N° 227
T*C-G*C-G*A*C-G*T*T*C-G*G*C*C*G	SEQ. ID N° 228
T*C-G*A*C-G*T*T*C-G*G*C*G*C*C*G	SEQ. ID N° 229
T*C-G*T*C-G*A*C-G*T*T*C-G*G*C*G-C*G*C*C*G	SEQ. ID N° 230
T*C-G*T*C-G*A*C-G*T*T*C-G*G*C-G*C*C*G	SEQ. ID N° 231
T*C-G*A*C-G*A*C-G*T*T*C-G*G*C*G*C-G*C*G*C*C*G	SEQ. ID N° 232

T*C-G*A*C-G*T*C-G*T*T*C-G*G*C*G*C- G*C*G*C*C*G	SEQ. ID N° 233
T*C-G*T*C-G*A*C-G*A*T*C-G*G*C*G*C- G*C*G*C*C*G	SEQ. ID N° 234
T*C-G*T*C-G*A*C-G*A*T*C-G*G*C*G-C*G*C*C*G	SEQ. ID N° 235
T*C-G*T*C-G*A*C-G*T*T*C-G*C*C*G*C- G*C*G*G*C*G	SEQ. ID N° 236
T*C-G*T*C-G*A*C-G*T*T*C-G*G*C*G*C*C- G*T*G*C*C*G	SEQ. ID N° 237
T*C-G*T*C-G*A*C-G*T*T*C-G*A*C*T*C- G*A*G*T*C*G	SEQ. ID N° 238
T*C-G*T*C-G*T*T*A*C-G*T*A*A*C-G*A*C*G*A*C- G*T*T	SEQ. ID N° 239
T*C*G*T*C-G*T*T*A*C-G*T*A*A*C- G*A*C*G*A*C*G*T*T	SEQ. ID N° 240
T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*C*G*T*G*A*C*G*T*T	SEQ. ID N° 241
T*C*G*T*C*G*A*C*G*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*C*G	SEQ. ID N° 242
T*C*G*T*C*G*A*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C* C*G	SEQ. ID N° 243
A-C-G-A-C-G-T-C-G-T-D-D-D-D-A-C-G-A-C-G-T- C-G-T-D-D-D-irU	SEQ. ID N° 244
T*C-G*T*C-G*A*C-G*A*T*C-G*G*C*G*C*C- G*T*G*C*C*G	SEQ. ID N° 245
T*C-G*T*C-G*A*C-G*A*C-G*G*C*G*C*C- G*T*G*C*C*G	SEQ. ID N° 246
T*C-G*T*C-G*A*C-G*A*C-G*C*G*C*C-G*T*G*C*G	SEQ. ID N° 247
T*C*G*T*C*G*A*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*C*G*T*G* C*C*G	SEQ. ID N° 248
T*C*G*T*C-G*A*C-G*A*T*C-G*G*C*G*C*C- G*T*G*C*C*G	SEQ. ID N° 249
T*C*G*T*C-G*A*C*G*A*T*C-G*G*C*G*C*C- G*T*G*C*C*G	SEQ. ID N° 250
T*C*G*T*C*G*A*C*G*A-T- C*G*G*C*G*C*C*G*T*G*C*C*G	SEQ. ID N° 251

T*C*G*T*C-G*A*C-G*A*T*C-G*G*C*G*C- G*C*G*C*C*G	SEQ. ID N° 252
T*C*G*T*C-G*A*C*G*A*T*C-G*G*C*G*C- G*C*G*C*C*G	SEQ. ID N° 253
T*C*G*T*C*G*A*C*G*A-T- C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G	SEQ. ID N° 254
T*C*G*A*C*G*T*C*G-A-C*G*T*G*A*C*G*T*T	SEQ. ID N° 255
T*C*G*A*C-G*T*C*G*A*C-G*T*G*A*C*G*T*T	SEQ. ID N° 256
T*C*G*A*C-G*T*C*G*A*C*G*T-G*A*C*G*T*T	SEQ. ID N° 257
T*C*G*T*C-G*A*C*G*A*C-G*T*G*T*C*G*A*T	SEQ. ID N° 258
T*C*G*A*C*G-T*C*G*A*C*G-T*G*A*C*G*T*T	SEQ. ID N° 259
T*C*G*A-C*G*T*C*G-A*C*G*T*G-A*C*G*T*T	SEQ. ID N° 260
T*C*G*T*C*G*A-C*G*A*T*C*G*G*C*G- C*C*G*T*G*C*C*G	SEQ. ID N° 261
T*C*G*T*C*G*A-C*G*A*C*G*G*C*G*C- C*G*T*G*C*C*G*T	SEQ. ID N° 262
T*C*G*T*C*G*A*C-G*A*C*G*G*C*G*C*C- G*T*G*C*C*G*T	SEQ. ID N° 263
T*C*G*T*C-G*A*C-G*A*T*C-G*G*C*G*C*C- G*T*G*C*C*G*T	SEQ. ID N° 264
T*C-G*T*C-G*A*C-G*T*T*C-G*G*C*G*C*C- G*T*G*C*C*G*T	SEQ. ID N° 265
T*C-G*T*C-G*A*C-G*T*C-G*G*C*G*C*C- G*T*G*C*C*G*T	SEQ. ID N° 266
T*C-G*T*C-G*A*C-G*C-G*G*C*G*C*C- G*T*G*C*C*G*T	SEQ. ID N° 267
T*C*G*T*C*G*A-C*G*C*G*G*C*G- C*C*G*T*G*C*C*G*T	SEQ. ID N° 268
T*C*G*T*C-G*A*C*G*A-A*G*T*C-G*A*C*G*A*T	SEQ. ID N° 269
T*C*G*T*C-G*A*C*G*A*G*A-A*T*C*G*T*C- G*A*C*G*A*T	SEQ. ID N° 270
T*C*G*T*C-G*T*A*C-G*G*C*G*C*C- G*T*G*C*C*G*T	SEQ. ID N° 271

T*C*G*T*C*G*A*C-G*A*T*C*G*G*C- G*C*C*G*T*G*C*C*G	SEQ. ID N° 272
T*C*G*T*C*G*A-C*G*A*T*C*G*G*C*G- C*C*G*T*G*C*C*G	SEQ. ID N° 273
T*C*G*T*C*G*A-C*G*A*T*C*G-G*C*G*C- C*G*T*G*C*C*G	SEQ. ID N° 274
T*C*G*T*C*G*A-C*G*A*C*G*G*C*G*C- C*G*T*G*C*C*G*T	SEQ. ID N° 275
T*C*G*T*C-G*A*C-G*A*T*C-G*G*C*G*C*C- G*T*G*C*C*G*T	SEQ. ID N° 276
T*C*G*T*C*G*A-C*G*A*T*C*G*G*C*G- C*C*G*T*G*C*C*G*T	SEQ. ID N° 277
T*C*G*T*C*G*A*C-G*A*C*G*G*C*G*C- C*G*T*G*C*C*G*T	SEQ. ID N° 278.
T*C-G*T*C-G*A*C-G*T*T*C-G*G*C*G*C*C- G*T*G*C*C*G*T	SEQ. ID N° 279
T*C-G*T*C-G*A*C-G*T*C-G*G*C*G*C*C- G*T*G*C*C*G*T	SEQ. ID N° 280
T*C*G*T*C-G*A*C*G*A-A*G*T*C-G*A*C*G*A*T	SEQ. ID N° 281
T*C*G*T*C-G*A*C*G*A*G*A-A*T*C*G*T*C- G*A*C*G*A*T	SEQ. ID N° 282
T*C*G*T*C-G*A*C*G*A*C-G*T*G*T*C*G*A*T	SEQ. ID N° 283
T*C*G*A*C-G*T*C*G*A-A*G*A*C-G*T*C*G*A*T	SEQ. ID N° 284
T*C*G*A*C-G*T*C*G*A*G*A-A*T*C*G*A*C- G*T*C*G*A*T	SEQ. ID N° 285
T*C*G*T*C-G*A*C-G*A*C*G*G*C*G-A*A*G*C*C*G	SEQ. ID N° 286
T*C*G*T*C-G*A*C-G*A*C*G*G*C*G- A*A*G*C*C*G*T	SEQ. ID N° 287
T*C*G*T*C*G-A*C*G*A*C*G-T*G*T*C*G*A*T	SEQ. ID N° 288
T*C*G*T*C*G*A*C*G*A*C*G*T*G*T*C*G*A*T	SEQ. ID N° 289
T*C*G*A*C-G*T*C*G*A*C-G*T*G*A*C*G-T*T*G*T	SEQ. ID N° 290
T*C<G*T*C-G*A*C-G*A*T*C-G*G*C*G*C- G*C*G*C*C*G-but	SEQ. ID N° 291

T*C-G*T*C<G*A*C-G*A*T*C-G*G*C*G*C- G*C*G*C*C*G-but	SEQ. ID N° 292
T*C-G*T*C-G*A*C*G*A*T*C-G*G*C*G*C- G*C*G*C*C*G-iT	SEQ. ID N° 293
iT-T*C-G*T*C-G*A*C*G*A*T*C-G*G*C*G*C- G*C*G*C*C*G-iT	SEQ. ID N° 294
T*C-G*T*C-G*A*C-G*A*T*C-G*A*C*G*C- G*C*G*T*C*G	SEQ. ID N° 295
T*C-G*T*C-G*A*C-G*A*T*C-A*A*C*G*C- G*C*G*T*T*G	SEQ. ID N° 296
T*C-G*T*C-G*A*C-G*A*T*C-G*G*C*A*C- G*T*G*C*C*G	SEQ. ID N° 297
T*C-G*T*C-G*A*C-G*A*T*C-G*G*C*A*T- A*T*G*C*C*G	SEQ. ID N° 298
T*C-G*T*C-G*A*C-G*A*T*G-C*C*G*C*G- C*G*C*G*G*C	SEQ. ID N° 299
T*C*G*T*C*G*A*C*G*A*T*G*C*C*G*C*G*C*G*C*G* G*C	SEQ. ID N° 300
T*C- G*T*C*G*A*C*G*A*T*G*C*C*G*C*G*C*G*C*G*G*C	SEQ. ID N° 301
T*C*G*T*C- G*A*C*G*A*T*G*C*C*G*C*G*C*G*C*G*G*C	SEQ. ID N° 302
T*C- G*T*C*G*A*C*G*A*T*G*C*C*G*C*G*C*T*G*C*G*G* C	SEQ. ID N° 303
T*C- G*T*C*G*T*A*C*G*A*T*G*C*C*G*C*G*C*G*C*G*G* C	SEQ. ID N° 304
T*C- G*T*C*G*T*A*C*G*A*T*G*C*C*G*C*G*C*T*G*C*G* G*C	SEQ. ID N° 305
T*C*G*T*C*G*A*C*G*A*T- G*C*C*G*C*G*C*G*C*G*G*C	SEQ. ID N° 306

T*C*G*T*C*G*A*C*G*A*T-G- C*C*G*C*G*C*G*C*G*G*C	SEQ. ID N° 307
T*C*G*T*C- G*A*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G-iT	SEQ. ID N° 308
T*C- G*T*C*G*A*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G-iT	SEQ. ID N° 309
T*C*G*T*C*G*A*C*G*A*T*C- G*G*C*G*C*G*C*G*C*G-iT	SEQ. ID N° 310
T*C-G*T*G-C*A*C-G*A*T*C-G*G*C*G*C- G*C*G*C*C*G	SEQ. ID N° 311
T*Z-G*T*C-G*A*C-G*A*T*C-G*G*C*G*C- G*C*G*C*C*G	SEQ. ID N° 312
T*C-G*T*Z-G*A*C-G*A*T*C-G*G*C*G*C- G*C*G*C*C*G	SEQ. ID N° 313
T*C-G*T*C-G*A*Z-G*A*T*C-G*G*C*G*C- G*C*G*C*C*G	SEQ. ID N° 314
T*C-G*T*C-G*A*C-G*A*T*Z-G*G*C*G*C- G*C*G*C*C*G	SEQ. ID N° 315
T*C-G*A*C*G*T*C-G*A*C*G*T*C-G*A*C*G	SEQ. ID N° 316
T-C-G-A-C-G-T-C-G-A-C-G-T-C-G-A-C-G	SEQ. ID N° 317
T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*C*G	SEQ. ID N° 318
T*C- G*T*C*G*A*C*G*T*T*C*G*G*C*G*C*G*T*G*C*C*G-iT	SEQ. ID N° 319
T*C*G*T*C- G*A*C*G*T*T*C*G*G*C*G*C*G*T*G*C*C*G-iT	SEQ. ID N° 320
T*C*G*T*C*G*A*C*G*T*T-C- G*G*C*G*C*G*T*G*C*C*G-iT	SEQ. ID N° 321
G*C*C*G*C*G-C*G*C*G*G-C*iT*iA*iG-iC*iA*iG- iC*iT*iG-iC*iT	SEQ. ID N° 322
C*G*G*C*G*C-G*C*G*C*G-iT*iA*iG-iC*iA*iG- iC*iT*iG-iC*iT	SEQ. ID N° 323

G*C*C*G*C*G*C*G*C*G*G*C*iT*iA*iG*iC*iA*iG- iC*iT*iG*iC*iT	SEQ. ID N° 324
C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*C*G*iT*iA*iG*iC*iA*iG- iC*iT*iG*iC*iT	SEQ. ID N° 325
C*G*G*C*G*C*C- G*T*G*C*C*G*iT*iT*iG*iC*iA*iG- iC*iT*iG*iC*iT	SEQ. ID N° 326
G*C*C*G*T*G-C*C*G*C*G*G- C*iT*iT*iG*iC*iA*iG-iC*iT*iG*iC*iT	SEQ. ID N° 327
C*G*G*C*G*C*C*G*T*G*C*C*G*iT*iT*iG*iC*iA*i G-iC*iT*iG*iC*iT	SEQ. ID N° 328
G*C*C*G*T*G*C*C*G*C*G*G*C*iT*iT*iG*iC*iA*i G-iC*iT*iG*iC*iT	SEQ. ID N° 329
T*C*G*G*C*G*C-G*C*G*C*C-G*A*iT*iA*iG- iC*iA*iG-iC*iT*iG-iC*iT	SEQ. ID N° 330
T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*C*G*A*iT*iA*iG*iC*iA *iG-iC*iT*iG*iC*iT	SEQ. ID N° 331
T*C*G*G*C*G*C*C- G*T*G*C*C*G*iT*iT*iG*iC*iA*iG- iC*iT*iG*iC*iT	SEQ. ID N° 332
T*C*G*G*C*G*C*C*G*T*G*C*C*G*iT*iT*iG*iC*iA *iG-iC*iT*iG*iC*iT	SEQ. ID N° 333
CGGCGCX ₁ GCGCCG	SEQ. ID N° 334
T*C_G*T*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C* C*G	SEQ. ID N° 335
T*C*G*T*C*G*A*C*G*A*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G* G	SEQ. ID N° 336
T*C*G*T*C*G*A*C*G*A*J*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C* C*G	SEQ. ID N° 337
T*C*G*T*C*G*A*C*G*A*L*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C* C*G	SEQ. ID N° 338
T*C*G*T*C*G*A*C*G*A*D*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C* C*G	SEQ. ID N° 339
G*G*G-G-A-C-G-A-C-G-T-C-G-T-G-G*G*G*G*G*G	SEQ. ID N° 340

T*C-G-A-C-G-T-C-G-T-G-G*G*G*G	SEQ. ID N° 341
T*C*C*A*G*G*A*C*T*T*C*T*C*T*C*A	SEQ. ID N° 342
T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*C*G	SEQ. ID N° 343
T*C*G*T*C- mG*mA*C*mG*mA*T*C*mG*mG*C*mG*C*mG*C*mG*C*C*3mG	SEQ. ID N° 344
T*C*mG*T*C*mG*mA*C*mG*mA*T*C*mG*mG*C*mG*C*mG*C*mG*C*C*3mG	SEQ. ID N° 345
T*C*G*T*C-mG*mA*C-mG*mA*T*C-mG*mG*C*mG*C-mG*C*mG*C*C*3mG	SEQ. ID N° 346
T*C-mG*T*C-mG*mA*C-mG*mA*T*C-mG*mG*C*mG*C-mG*C*mG*C*C*3mG	SEQ. ID N° 347

Símbolos utilizados no quadro 1:

*	Ligação internucleotídica estabilizada
-	Ligação fosfodiéster
chol	Colesterol
vitE	Vitamina E
biot	Biotina
teg	Trietilenoglicol
dig	Digoxigenina
but	butirato
J	1,3-propano-diol
L	hexaetilenoglicol
D	D espaçador (1'2'-dideoxirribose, Glen Research. Sterling, VA)
mN	Nucleosídeo 2'-O-metilo
iN	nucleótido inverso (orientação inversa: 3' e 5' trocados)
doub-	dobrador
Z	5-metil-desoxicitidina
rN	Ribonucleosídeo
Cy3	Cloreto de bis-hidroxipropil-3,3,3',3'-tetrametil-4,5-benzindocarbocianina (Glen Research)

Conforme discutido anteriormente, a medida da estabilidade do duplex de uma molécula de cadeia dupla está dependente da concentração da cadeia total, composição em base, temperatura, pH e sais tampão. Em condições fisiológicas, a formação de um duplex é preferida em relação a trechos de pares não emparelhados. Se mais de uma sequência formadora de duplex, palindrômica ou contendo complementaridade está presente numa molécula, será preferida a agregação potencial de várias moléculas em condições fisiológicas. A agregação conduz a uma mistura complexa de estruturas de oligonucleótido de hierarquia mais elevada que são difíceis de analisar e também cria um problema em relação à consistência lote-para-lote das soluções de dosagem do produto do fármaco final. Para prevenir tal agregação, poderiam ser utilizados elevação da temperatura, pH ou redução de sais de tampão. Contudo, quando as moléculas são formuladas para o tratamento pretendido de animais ou humanos, a elevação da temperatura, pH ou redução de sais de tampão não pode ser utilizada, pois as condições fisiológicas (temperatura ambiente, valor osmótico fisiológico ou pH neutro) têm de ser mantidas. A invenção também inclui composições para responder a estes problemas.

Assim, em alguns aspetos a divulgação refere-se a uma composição de oligonucleótidos que formam duplexs que são formulados de uma maneira a reduzir a agregação *in vitro*, sem inibir a auto-montagem *in vivo* em concatêmeros. Foi descoberto que um tampão com baixo conteúdo em sal e um soluto podem ser utilizados para manter os oligonucleótidos que formam duplexs num estado substancialmente homogêneo ou não agregado. Nestas formulações farmacêuticas, os compostos são mais úteis e mais práticos para desenvolvimento terapêutico e são mais aceitáveis para as agências reguladoras, porque as estruturas são mais fáceis

de analisar e é mais simples produzir mais lotes consistentes para dosagem. Tais formulações são mais úteis para as soluções de dosagem farmacêutica, porque evitam os concatâmeros complexos que complicam a análise do fármaco e reduzem a consistência lote-para-lote.

Nalgumas formas de realização, são utilizadas moléculas que contêm duas ou mais regiões formadoras de duplex ou palindrômicas com temperaturas de fusão significativamente diferentes. Em certas condições, a formação do duplex mais fraco (isto é, o que tem menor estabilidade de duplex) pode ser prevenida, ao passo que a formação do duplex mais forte é mantida, para que *in vitro*, os compostos formem duplexs em vez de concatâmeros, mas a atividade *in vivo* possa ser mantida.

Assim, os oligonucleótidos imunoestimulantes da invenção podem ser utilizados em composições adequadas para administração a um sujeito. Os oligonucleótidos que formam duplexs podem ser utilizados na preparação de uma solução de dosagem de oligonucleótidos que compreendem dissolver ditos oligonucleótidos num tampão hipo-osmolal, tal como um tampão com baixo conteúdo em sal, e adicionar um soluto. Um "soluto", conforme utilizado aqui, é um ingrediente que, quando adicionado à solução na concentração adequada, resulta numa formulação aproximadamente isotónica na qual os oligonucleótidos estão presentes numa forma substancialmente homogênea. Nalgumas formas de realização, o soluto é um componente formador isotónico. Exemplos de solutos adequados incluem, mas não se limitam a, álcoois tais como aminoácidos e sacarídeos. Aminoácidos úteis como solutos podem ter uma cadeia lateral hidrofóbica, tal como a isoleucina ou cadeia lateral carregada, tal como a lisina. Nalgumas formas de realização, o aminoácido é glicina. Sacarídeos incluem, mas não se limitam a, dextrose, frutose, lactose, sacarose, ribose, arabinose ou um dissacarídeo.

Conforme utilizado aqui, o termo "substancialmente homogêneo" refere-se a uma solução na qual a maioria das moléculas não está presente em concatâmeros de elevada massa molecular. Assim, pelo menos 50% das moléculas na solução não fazem parte de um concatâmero com elevada massa molecular. Noutras formas de realização pelo menos 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, 2% ou 1% das moléculas na solução não fazem parte de um concatâmero com elevada massa molecular. Os oligonucleótidos que não fazem parte do concatâmero podem estar presentes na forma monomérica ou dimérica.

Nalgumas formas de realização, a composição inclui oligonucleótidos que têm todos a mesma sequência. Assim, cópias múltiplas da mesma sequência oligonucleotídica estão presentes na composição. Em alternativa, a composição pode compreender uma mistura de oligonucleótidos de diferentes sequências que têm pelo menos uma sequência formadora de duplex em comum com outros oligonucleótidos na mistura. Tipicamente, uma composição incluindo diferentes sequências oligonucleotídicas inclui pelo menos dois oligonucleótidos diferentes com sequências formadoras de duplex complementares, de tal modo que as sequências formadoras de duplex nos diferentes oligonucleótidos são complementares uma da outra e podem formar pares de base. Os emparelhamentos de base pode ser um emparelhamento de base perfeito ou pode incluir imperfeições, tais como saliências ou discordâncias.

Obviamente, oligonucleótidos adicionais que não participam na formação do concatâmero podem ser incluídos na composição inclua ou não a composição um único oligonucleótido com sequências formadoras de duplex que são capazes de emparelhar bases com sequências formadoras de duplex no oligonucleótido da mesma sequência ou de múltiplas sequências oligonucleotídicas.

As composições da invenção são amplamente aplicáveis à formulação de oligonucleótidos. Elas não se limitam à

formulação de oligonucleótidos imunoestimulantes. Por exemplo, as composições da invenção podem ser utilizadas para formular ADN terapêutico, tal como oligonucleótidos antissenso ou ARN, tal como oligonucleótidos ARNsi. Nalgumas formas de realização, as composições são úteis para formular oligonucleótidos imunoestimulantes.

Os oligonucleótidos imunoestimulantes em geral têm um comprimento no intervalo de entre 6 e 100 nucleótidos. Nalgumas formas de realização, o comprimento está no intervalo de 6-40, 13-100, 13-40, 13-30, 15-50 ou 15-30 nucleótidos ou no intervalo de qualquer número inteiro entre estes.

Os termos "ácido nucleico" e "oligonucleótido" são utilizados em alternância para significar múltiplos nucleótidos (isto é, moléculas incluindo um açúcar (por exemplo, ribose ou desoxirribose) ligados a um grupo fosfato e a uma base orgânica intercambiável, que é ou uma pirimidina substituída (por exemplo, citosina (C), timina (T) ou uracilo (U)) ou uma purina substituída (por exemplo, adenina (A) ou guanina (G)). Conforme utilizado aqui, os termos "ácido nucleico" e "oligonucleótido" referem-se a oligorribonucleótidos, bem como oligodesoxirribonucleótidos. Os termos "ácido nucleico" e "oligonucleótido" também incluirão polinucleosídeos (isto é, um polinucleótido menos o fosfato) e qualquer outra base orgânica contendo polímero. Moléculas de ácido nucleico podem ser obtidas a partir de fontes de ácido nucleico existentes (por exemplo, genómicas ou ADNc), mas são preferentemente sintéticas (por exemplo, produzidas por síntese de ácido nucleico).

Os termos "ácido nucleico" e "oligonucleótido", conforme utilizados aqui, abrangerão moléculas de ácido nucleico e oligonucleótidos da invenção, bem como análogos de oligonucleótido da invenção. Os termos "oligodesoxinucleótido" e, de forma equivalente, "ODN",

conforme utilizado aqui, abrangerão oligodesoxinucleótidos não modificados da invenção, bem como análogos de oligodesoxinucleótidos da invenção.

Os termos "ácido nucleico" e "oligonucleótido" também abrangem ácidos nucleicos ou oligonucleótidos com substituições ou modificações, tais como nas bases e/ou açúcares. Por exemplo, eles incluem ácidos nucleicos com açúcares como esqueleto que são anexos covalentemente a grupos orgânicos de baixa massa molecular que não um grupo hidroxilo na posição 2' e outro que não um grupo fosfato ou grupo hidroxil na posição 5'. Assim, ácidos nucleicos modificados podem incluir um grupo ribose 2'-O-alquilado. Além disso, ácidos nucleicos modificados podem incluir açúcares, tais como arabinose ou 2'-fluoroarabinose, em vez de ribose. Assim, os ácidos nucleicos podem ser heterogêneos na composição do esqueleto contendo, assim, qualquer combinação possível de unidades de polímero ligadas juntas tais como péptidos-ácidos nucleicos (que têm um esqueleto tipo péptido com bases de ácido nucleico). Nalgumas formas de realização, o oligonucleótido pode ter uma ou mais modificações, em que cada modificação está localizada numa ponte internucleosídica fosfodiéster particular e/ou numa unidade β -D-ribose particular e/ou numa posição de base nucleosídica natural particular em comparação com um oligonucleótido da mesma sequência que é composta por ADN natural. Outros exemplos são descritos com mais detalhe a seguir.

Os oligonucleótidos imunoestimulantes da presente invenção podem abranger várias modificações e substituições químicas, em comparação com ARN e ADN natural, envolvendo uma ponte internucleosídica fosfodiéster, uma unidade β -D-ribose e/ou uma base nucleosídica natural (tal como adenina, guanina, citosina, timina ou uracilo). Exemplos de modificações químicas são conhecidos da pessoa habilitada e são descritos, por exemplo, em Uhlmann E et al. (1990) Chem

Rev 90:543; "Protocols for Oligonucleotides and Analogs" Synthesis and Properties & Synthesis and Analytical Techniques, S. Agrawal, Ed, Humana Press, Totowa, USA 1993; Crooke ST et al. (1996) Annu Rev Pharmacol Toxicol 36:107-29; e Hunziker J et al. (1995) Mod Synth Methods 7:331-417. Um oligonucleótido, de acordo a invenção, pode ter uma ou mais modificações, em que cada modificação está localizada numa ponte internucleosídica fosfodiéster particular e/ou numa unidade β -D-ribose particular e/ou numa posição de base nucleosídica natural particular em comparação com um oligonucleótido da mesma sequência que é composto de ADN ou ARN natural.

Por exemplo, os oligonucleótidos podem incluir um ou mais modificações e em que cada modificação é independentemente selecionada de:

- a) a substituição de uma ponte internucleosídica fosfodiéster localizada na extremidade 3' e/ou 5' de um nucleosídeo por uma ponte internucleosídica modificada,
- b) a substituição de ponte fosfodiéster localizada na extremidade 3' e/ou 5' de um nucleosídeo por uma ponte defosfo,
- c) a substituição de uma unidade fosfato de açúcar do esqueleto de fosfato de açúcar por outra unidade,
- d) a substituição de uma unidade β -D-ribose por uma unidade de açúcar modificada e
- e) a substituição de uma base nucleosídica natural por uma base nucleosídica modificadora.

Mais exemplos detalhados para a modificação química de um oligonucleótido são como se seguem.

Os oligonucleótidos podem incluir ligações internucleotídicas modificadas, tais como aquelas descritas em a ou b anteriormente. Estas ligações modificadas podem ser parcialmente resistentes à degradação (por exemplo, são estabilizadas). Uma molécula de oligonucleótido estabilizada significará um oligonucleótido que é

relativamente resistente à degradação *in vivo* (por exemplo, através de uma exo- ou endonuclease) resultando de tais modificações.

Oligonucleótidos com ligações fosforotioato, nalgumas formas de realização, podem proporcionar atividade máxima e protegem o oligonucleótido da degradação por exo- e endonucleases intracelulares. Uma ponte internucleosídica fosfodiéster localizada na extremidade 3' e/ou 5' de um nucleosídeo pode ser substituída por uma ponte internucleosídica modificada, em que a ponte internucleosídica modificada é, por exemplo, selecionada de fosforotioato, fosforoditioato, NR^1R^2 -fosforamidato, boranofosfato, α -hidroxibenzilo fosfonato, fosfato-(C_1 - C_{21})-O-alkil éster, fosfato-[(C_6 - C_{12})aril-(C_1 - C_{21})-O-alkil]éster, pontes (C_1 - C_8)alkilfosfonato e/ou (C_6 - C_{12})arilfosfonato, (C_7 - C_{12})- α -hidroximetil-aril (por exemplo, revelado no documento WO 95/01363), em que (C_6 - C_{12})aril, (C_6 - C_{20})aril e (C_6 - C_{14})aril são opcionalmente substituídos por halogénio, alquilo, alcoxi, nitro, ciano e onde R^1 e R^2 são, independentemente um do outro, hidrogénio, (C_1 - C_{18})-alkil, (C_6 - C_{20})-aril, (C_6 - C_{14})-aril-(C_1 - C_8)-alkil, preferentemente hidrogénio, (C_1 - C_8)-alkil, preferentemente (C_1 - C_4)-alkil e/ou metoxietilo ou R^1 e R^2 formam, juntamente com o átomo de azoto que os transporta, um anel heterocíclico co 5-6 membros que pode conter adicionalmente um heteroátomo adicional do grupo O, S e N.

A substituição de uma ponte fosfodiéster localizada na extremidade 3' e/ou 5' de um nucleosídeo por uma ponte defosfo (as pontes defosfo estão descritas, por exemplo, em Uhlmann E e Peyman A em "Methods in Molecular Biology", Volume 20, "Protocols for Oligonucleotides and Analogs", S. Agrawal, Editor, Humana Press, Totowa 1993, Capítulo 16, páginas 355 ff), em que uma ponte defosfo é, por exemplo, selecionada de pontes defosfo formacetal, 3'-tioformacetal, metilhidroxilamina, óximo, metilenodimetil-hidrazo,

dimetilenossulfona e/ou grupos sililo.

Uma unidade fosfato de açúcar (isto é, uma β -D-ribose e ponte fosfodiéster internucleotídica formam em conjunto uma unidade fosfato de açúcar) de um esqueleto fosfato de açúcar (isto é, um esqueleto fosfato de açúcar é composta de unidade de fosfato de açúcar) pode ser substituída por outra unidade, em que a outra unidade é, por exemplo, adequada para construir um oligómero "derivado de morfolino" (conforme descrito, por exemplo, em Stirchak EP et al. (1989) Nucleic Acids Res 17:6129-41), que é, por exemplo, a substituição por uma unidade derivada de morfolino; ou para construir um ácido nucleico poliamida ("ADN"; conforme descrito por exemplo, em Nielsen PE et al. (1994) Bioconjug Chem 5:3-7), que é, por exemplo, a substituição por uma unidade do esqueleto PNA, por exemplo, por 2-aminoetilglicina. O oligonucleótido pode ter outras modificações e substituições de esqueleto carboidrato, tais como ácidos nucleicos peptídicos com grupos fosfato (PHONA), ácidos nucleicos encerrados (LNA) e oligonucleótidos com secções do esqueleto com ligantes alquilo ou ligantes amino. O ligante alquilo pode ser ramificado ou não ramificado, substituído ou não substituído e quiralmente puro ou uma mistura racémica.

Uma unidade β -ribose ou uma unidade β -D-2'-desoxirribose podem ser substituídas por uma unidade de açúcar modificada, em que a unidade de açúcar modificada é, por exemplo, selecionada de β -D-ribose, α -D-2'-desoxirribose, L-2'-desoxirribose, 2'-F-2'-desoxirribose, 2'-F-arabinose, 2'-O-(C₁-C₆)alquil-ribose, preferentemente 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, 2'-NH₂-2'-desoxirribose, β -D-xilo-furanose, α -arabinofuranose, 2,4-didesoxi- β -D-eritro-hexo-pirano e carbocíclico (descrito, por exemplo, em Froehler (1992) J Am Chem Soc 114:8320) e/ou análogos de açúcar de cadeia

aberta (descrito, por exemplo, em Vandendriessche et al. (1993) Tetrahedron 49:7223) e/ou análogos de biciclo-açúcar (descrito, por exemplo, em Tarkov M et al. (1993) Helv Chim Acta 76:481).

Nalgumas formas de realização, o açúcar é 2'-O-metilribose, particularmente para um ou ambos nucleótidos ligados por uma ligação internucleosídica fosfodiéster ou tipo fosfodiéster.

As moléculas imunoestimulantes de ácido nucleico da presente invenção podem incluir esqueletos quiméricos. Para fins da presente invenção, um esqueleto quimérico refere-se a um esqueleto parcialmente estabilizado, em que pelo menos uma ligação internucleotídica é fosfodiéster ou tipo fosfodiéster e em que pelo menos uma outra ligação internucleotídica é uma ligação internucleotídica estabilizada, em que a pelo menos uma ligação fosfodiéster ou tipo fosfodiéster e a pelo menos uma ligação estabilizada são diferentes. Uma vez que as ligações boranofosfonato foram relatadas como sendo estáveis em relação às ligações fosfodiéster, para fins da natureza quimérica do esqueleto, as ligações boranofosfonato podem ser classificadas como tipo fosfodiéster ou como estabilizadas, dependendo do contexto. Por exemplo, um esqueleto quimérico, de acordo com a presente invenção poderia numa forma de realização incluir pelo menos uma ligação fosfodiéster (fosfodiéster ou tipo fosfodiéster) e pelo menos uma ligação boranofosfonato (estabilizada). Noutra forma de realização, um esqueleto quimérico, de acordo com a presente invenção poderia incluir ligações boranofosfonato (fosfodiéster ou tipo fosfodiéster) e fosforotioato (estabilizada). Uma "ligação internucleotídica estabilizada" significará uma ligação internucleotídica que é relativamente resistente à degradação *in vivo* (por exemplo, através de uma exo- ou endonuclease), comparada com uma ligação internucleotídica

fosfodiéster. Ligações internucleotídicas estabilizadas preferidas incluem, sem limitação, fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonato e não metilfosforotioato. Outras ligações internucleotídicas estabilizadas incluem, sem limitação: peptídicas, alquilo, defosfo e outras, conforme descrito anteriormente.

Em particular, ligações internucleotídicas fosfodiéster ou tipo fosfodiéster envolvem "dinucleótidos internos". Um dinucleótido interno, em geral, significará qualquer par de nucleótidos adjacentes ligados por uma ligação internucleotídica, na qual nenhum dos nucleótidos no par de nucleótidos é um nucleótido terminal, isto é, nenhum dos nucleótidos no par de nucleótidos é um nucleótido que define a extremidade 5' ou 3' do oligonucleótido. Assim, um oligonucleótido linear que tem n nucleótidos de comprimento tem um total de $n-1$ dinucleótidos e apenas $n-3$ dinucleótidos internos. Cada ligação internucleotídica num dinucleótido interno é uma ligação internucleotídica interna. Assim, um oligonucleótido linear que tem n nucleótidos Assim, um oligonucleótido linear $n-1$ ligações internucleotídicas e apenas $n-3$ ligações internucleotídicas internas. As ligações internucleotídicas fosfodiéster ou tipo fosfodiéster estrategicamente colocadas referem-se, portanto, as ligações internucleotídicas fosfodiéster ou tipo fosfodiéster posicionadas entre qualquer par de nucleótidos na sequência de ácido nucleico. Nalgumas formas de realização, as ligações internucleotídicas fosfodiéster ou tipo fosfodiéster não estão posicionadas entre qualquer par de nucleótidos mais próximo da extremidade 5' ou 3'.

Uma ligação internucleotídica fosfodiéster é o tipo de ligação característica de ácidos nucleicos encontrados na natureza. A ligação internucleotídica fosfodiéster inclui um átomo de fósforo flanqueado por dois átomos de oxigénio que fazem ponte e ligados também por dois átomos de

oxigénio adicionais, um carregado e o outro não carregado. A ligação internucleotídica fosfodiéster é particularmente preferida quando é importante reduzir a meia vida do tecido do oligonucleótido.

Uma ligação internucleotídica tipo fosfodiéster é um grupo que forma ponte contendo fósforo que é quimicamente e/ou diastereomericamente semelhante a fosfodiéster. Medidas de semelhança a fosfodiéster incluem suscetibilidade a digestão por nuclease e capacidade de ativar a ARNase H. Assim, por exemplo, oligonucleótidos fosfodiéster, mas não fosforotioato, são suscetíveis de digestão por nuclease, enquanto que ambos oligonucleótidos fosfodiéster e fosforotioato ativam ARNase H. Numa forma de realização preferida, a ligação internucleotídica tipo fosfodiéster é ligação boranofosfato (ou de forma equivalente boranofosfonato). Patente U.S. Nº 5 177 198; Patente U.S. Nº 5 859 231; Patente U.S. Nº 6 160 109; Patente U.S. Nº 6 207 819; Sergueev et al., (1998) JAm Chem Soc 120:9417-27. Noutra forma de realização preferida, a ligação internucleotídica tipo fosfodiéster é fosforotioato diastereomericamente puro Rp. Pensa-se que fosforotioato diastereomericamente puro Rp é mais suscetível de digestão por nuclease e é melhor em ativar a ARNase H do que o fosforotioato diastereomericamente puro Rp misturado. Estereoisómeros de oligonucleótidos CpG são o sujeito do pedido de patente U.S. co-pendente 09/361 575 submetido a 27 de julho de 1999 e pedido PCT publicado PCT PCT/US99/17100 (documento WO 00/06588). De notar que para os fins da presente invenção, o termo "ligação internucleotídica tipo fosfodiéster" exclui especificamente as ligações internucleotídicas fosforotioato e metilfosfonato.

Esqueletos modificados, tais como os fosforotioatos, podem ser sintetizados utilizando técnicas automatizadas empregando químicas tanto fosforamidato ou H-fosfonato.

Podem ser feitos aril- e alquil-fosfonatos, por exemplo, conforme descrito na Patente U.S. N° 4 469 863; e podem ser preparados alquilfosfotriésteres (em que a unidade oxigénio carregada é alquilada conforme descrito na Patente U.S. N° 5 023 243 e Patente Europeia N° 092 574) por síntese automática em fase sólida, utilizando reagentes disponíveis comercialmente. Os métodos para fazer outras modificações e substituições de esqueleto de ADN foram descritos. Uhlmann E et al. (1990) Chem Rev 90: 544; Goodchild J (1990) Bioconjugate Chem 1: 165. Os métodos para a preparação de oligonucleótidos quiméricos também são conhecidos. Por exemplo patentes emitidas para Uhlmann et al descreveram tais técnicas.

Oligonucleótidos modificados com esqueletos mistos podem ser sintetizados utilizando um sintetizador de ADN comercialmente disponível e química de fosforamideto padrão. (FE Eckstein, "Oligonucleotides e Analogues - A Practical Approach" IRL Press, Oxford, Reino Unido, 1991, e MD Matteucci e MH Caruthers, Tetrahedron Lett 21, 719 (1980).). Após o acoplamento, ligações PS são introduzidas por sulfuração utilizando o reagente de Beaucage (RP Iyer, W. Egan, JB Regan e Beaucage SL, J. Am. Chem. Soc. 112, 1253 (1990)) (0,075 M em acetonitrilo) ou fenil dissulfureto de acetilo (PADS) seguido de capeamento com anidrido acético, de 2,6-lutidina em tetra-hidrofurano (1: 1: 8; v: v: v) e N-metilimidazol (16% em tetra-hidrofurano). Este passo de proteção é realizado após a reação de sulfuração para minimizar a formação de ligações fosfodiéster (PO) indesejáveis nas posições onde uma ligação fosforotioato deveria estar localizada. No caso da introdução de uma ligação fosfodiéster, por exemplo, num dinucleótido CpG, o intermediário de fósforo-III é oxidado por tratamento com uma solução de iodo em água / piridina. Após a clivagem do suporte sólido e desproteção final por tratamento com amónia concentrada (15 horas a 50 °C), os

ODN são analisados por HPLC numa coluna de fase GenPak™ (Millipore-Waters) utilizando um gradiente de NaCl (tampão A, por exemplo: 10 mM de NaH₂PO₄ em acetonitrilo / água = 1:4 / v: v, pH 6,8; tampão B: 10 mM de NaH₂PO₄, 1,5 M de NaCl em acetonitrilo / água = 1:4 / v: v, 5 para 60% de B em 30 minutos a 1 ml / min), ou por eletroforese capilar em gel. O ODN pode ser purificado por HPLC ou por FPLC numa coluna de Alto Desempenho de Fase (Amersham Pharmacia). As frações homogêneas de HPLC são combinadas e dessalinizadas através de uma coluna C18 ou por ultrafiltração. O ODN foi analisado por espectrometria de massa MALDI-TOF para confirmar a massa calculada.

Os ácidos nucleicos da invenção também podem incluir outras modificações. Estas incluem análogos de ADN não-iônicos, tais como alquil- e aril-fosfatos (em que o fosfonato de oxigénio carregado é substituído por um grupo alquilo ou arilo), fosfodiéster e alquilfosfotriésteres, em que a unidade oxigénio carregada é alquilada. Os ácidos nucleicos que contêm diol, tal como tetraetilenoglicol ou hexaetilenoglicol, tanto num como em ambos os terminais, também têm demonstrado ser substancialmente resistentes à degradação por nuclease.

Os ácidos nucleicos também incluem purinas e pirimidinas substituídas, tais como C-5 pirimidina propina e bases de purina modificadas de 7-desaza-7-substituídas. Wagner RW et al. (1996) Nat Biotechnol 14: 840-4. As purinas e pirimidinas incluem, mas não estão limitadas a adenina, citosina, guanina, timina e uracilo e outras nucleobases que ocorrem naturalmente e que não ocorrem naturalmente, porções aromáticas substituídas e não substituídas.

Uma base modificada é qualquer base que é quimicamente distinta das bases de ocorrência natural geralmente encontradas no ADN e ARN, tal como T, C, G, A e U, mas que partilham as estruturas químicas básicas com estas bases de

ocorrência natural. A base nucleosídica modificada pode ser, por exemplo, selecionada de entre hipoxantina, uracilo, dihidrouracilo, pseudouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-aminouracilo, 5- (C 1 -C 6) -alquiluracil, 5- (C 2 - C 6) -alqueniluracil, 5- (C 2 -C 6) -alquiniluracil, 5- (hidroximetil) uracilo, 5-clorouracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-hidroxicitosina, 5- (C 1 -C 6) -alquilcitosina, 5- (C 2 -C 6) -alquenilcitosina, 5- (C 2 -C 6) -alquinilcitosina, 5-clorocitosina, 5-fluorocitosina, 5-bromocitosina, N2--dimetilguanine, 2, 4-diamino-purina, 8-azapurina, uma 7-deazapurina substituída, de preferência, 7-desaza-7-substituídas e/ou 7-desaza-8-purina substituída, 5-hidroximetilcitosina, N4-alquilcitosina, por exemplo, N4-etilcitosina, 5-hidroxideoxicitidina, 5-hidroximetildeoxicitidina, N4-alquildeoxicitidina, por exemplo, N4-etildeoxicitidina, 6-tiodeoxiguanosina e Desoxirribonucleosídeos de nitropirrol, C5-propinilpirimidina e diaminopurina por exemplo, 2,6-diaminopurina, inosina, 5-metil-citosina , 2-aminopurina, 2-amino-6-cloropurina, hipoxantina ou outras modificações de uma bases nucleosídicas naturais. Esta lista destina-se a constituir um exemplo e não deve ser interpretada como sendo limitante.

Nas fórmulas particulares descritas aqui podem ser incorporadas bases modificadas. Por exemplo, uma citosina pode ser substituída por uma citosina modificada. Uma citosina modificada, tal como utilizada aqui, é uma base de pirimidina de ocorrência natural ou de ocorrência não natural análoga da citosina, que pode substituir esta base sem prejudicar a atividade imunoestimulante do oligonucleótido. Citosinas modificadas incluem, mas não se limitam a, 5-citosinas substituídas (por exemplo, 5-metil-citosina, 5-fluoro-citosina, 5-cloro-citosina, 5-bromo-citosina, 5-iodo-citosina, 5-hidroxi-citosina, 5-hidroximetil-citosina, 5-difluorometil-citosina e 5-

alcinil-citosina não substituída ou substituída), citosinas 6-substituídas (por exemplo, 6-hidroxi-citosina) citosinas, N4-substituídas (por exemplo, N4-etil-citosina), 5-aza-citosina, 2-mercapto-citosina, isocitosina, pseudo-isocitosina, análogos de citosina com sistemas de anéis condensados (por exemplo, N, N'-propileno-citosina ou fenoxazina), e uracilo e seus derivados (por exemplo, 5-fluorouracilo, 5-bromo-uracilo, 5-bromovinil-uracilo, 4-tio-uracilo, 5-hidroxi-uracilo, 5-propinil-uracilo). Algumas das citosinas preferidos incluem 5-metil-citosina, 5-fluoro-citosina, 5-hidroxi-citosina, 5-hidroximetil-citosina e N4-etil-citosina. Noutra forma de realização da invenção, a base de citosina é substituída por uma base universal (por exemplo, 3-nitropirrol, P-base), um sistema de anel aromático (por exemplo, fluorobenzeno ou difluorobenzeno) ou um átomo de hidrogénio (dEspaçador).

Uma guanina pode ser substituída com uma base guanina modificada. Uma guanina modificada, conforme utilizado aqui, é uma base de guanina que ocorre naturalmente ou que não ocorre naturalmente análoga da purina, que pode substituir esta base sem prejudicar a atividade imunoestimulante do oligonucleótido. Guaninas modificadas incluem, mas não se limitam a, 7-desazaguanina, guanina 7-desaza-7-substituídas (tais como 7-desaza-7- (C2-C6) alquinilguanina), guanina 7-desaza-8-substituída, hipoxantia, guaninas N2-substituídas (por exemplo, N2-metil-guaninas), 5-amino-3-metil-3H, 6H-tiazolo [4,5-d] pirimidina-2,7-diona, 2,6-diaminopurina, 2-aminopurina, purina, indol, adenina, adeninas substituídas (por exemplo, N6-metil-adenina, 8-oxo-adenina) guanina, 8-substituída (por exemplo, 8-hidroxiguanina e 8-bromoguanina) e 6-tioguanina. Noutra forma de realização da invenção, a base de guanina é substituída por uma base universal (por exemplo, 4-metil-indol, 5-nitro-indol e K-base), um sistema de anel aromático (por exemplo, benzimidazol ou

diclorobenzimidazol, ácido 1-metil-1H- [1,2,4] triazolamida de 3-carboxílico) ou um átomo de hidrogénio (dEspaçador).

Os oligonucleótidos imunoestimulantes também podem conter uma ou mais ligações invulgares entre os nucleótidos ou frações análogas de nucleótidos. A ligação internucleosídica normal é a ligação 3'5'. Todas as outras ligações são consideradas como ligações internucleosídicas invulgares, como ligações 2'5', 5'5', 3'3', 2'2' e 2'3'. Deste modo, a nomenclatura 2 'para 5' é escolhida de acordo com o átomo de carbono da ribose. No entanto, se são empregues frações de açúcares não naturais, tais como análogos de açúcar de anel expandido (por exemplo, açúcar, hexanose, ciclohexeno ou piranose) ou análogos de açúcar bi- ou tricíclicos, então esta nomenclatura muda de acordo com a nomenclatura do monómero. Nos análogos 3 '-desoxi-β-D-ribopiranose (também chamados de p-ADN) os mononucleótidos estão ligados, por exemplo, através de uma ligação 4'2'.

Em princípio, as ligações entre as diferentes partes de um oligonucleótido ou entre diferentes oligonucleótidos, respetivamente, podem ocorrer através de todas as partes da molécula, desde que não interfira negativamente com o reconhecimento pelo seu recetor. De acordo com a natureza do ácido nucleico, a ligação pode envolver a fração de açúcar (SU), a nucleobase heterocíclica (Ba) ou o esqueleto de fosfato (Ph). Assim, as ligações do tipo Su-Su, Su-Ph, Su-Ba, Ba-Ba, Ba-Su, Ba-Ph, Ph-Ph, Ph-Su, e Ph-BA são possíveis. Se os oligonucleótidos são adicionalmente modificados por certos substituintes não-nucleotídicos, a ligação também pode ocorrer através das partes modificadas dos oligonucleótidos. Essas modificações também incluem ácidos nucleicos modificados, por exemplo, PNA, LNA ou análogos de oligonucleótidos morfolino.

As ligações são de preferência compostas de C, H, N, O, S, B, P, e halogénio, que contém 3-300 átomos. Um

exemplo de 3 átomos é uma ligação acetal (ODN1-3'-O-CH₂-O-3'-ODN2; Froehler e Matteucci) que liga, por exemplo, o grupo 3'-hidroxilo de um nucleótido com o grupo 3'-hidroxido de um segundo oligonucleótido. Um exemplo com cerca de 300 átomos é PEG-40 (polietilenoglicol tetraconta). Ligações preferidas são ligações fosfodiéster, fosforotioato, metilfosfonato, fosforamidato, boranofosfonato, amida, éter, tioéter, acetal, tioacetal, ureia, tioureia, sulfona-amida, base de Schiff e dissulfureto. Outra possibilidade é a utilização do Sistema de bioconjugação Solulink (TriLink BioTechnologies, San Diego, CA).

Os oligonucleótidos imunoestimulantes da invenção também podem ser conjugados com um grupo lipofílico. Um "grupo lipofílico", tal como utilizado aqui, é um grupo químico funcional com uma afinidade química a lípidos ou moléculas não polares. Nalgumas formas de realização, o grupo lipofílico é o colesterol.

Os oligonucleótidos imunoestimulantes da presente invenção são úteis para induzir uma resposta imune do tipo Th1. Pensa-se serem de utilização particular em qualquer condição que apela para a administração prolongada ou repetida de oligonucleótido imunoestimulante para qualquer finalidade. Em conformidade, os oligonucleótidos imunoestimulantes da presente invenção são úteis como adjuvantes para vacinas, e são úteis no tratamento de doenças, incluindo o cancro, doenças infecciosas, alergia e asma.

O cancro é uma doença que envolve o crescimento descontrolado (ou seja, divisão) de células. Alguns dos mecanismos conhecidos que contribuem para a proliferação descontrolada de células cancerosas incluem a independência do fator de crescimento, a não deteção de mutação genómica, e sinalização celular inadequada. A capacidade de células cancerígenas para ignorarem comandos normais de crescimento pode resultar num aumento da taxa de proliferação. Embora

as causas do cancro não tenham sido firmemente estabelecidas, existem alguns fatores conhecidos por contribuir, ou pelo menos predispor um indivíduo, para o cancro. Tais fatores incluem determinadas mutações genéticas (por exemplo, mutação do gene BRCA para cancro de mama, a APC para cancro do cólon), a exposição a agentes suspeitos de causar cancro ou agentes cancerígenos (por exemplo, o amianto, radiação UV) e disposição familiar para tipos específicos de cancro, como o cancro de mama.

O cancro pode ser um cancro maligno ou não maligno. Os cancros ou tumores incluem, mas não se limitam a, cancro do trato biliar; cancro no cérebro; cancro de mama; cancro do colo do útero; coriocarcinoma; cancro do cólon; cancro endometrial; cancro do esófago; cancro gástrico; neoplasias intra-epiteliais; linfomas; cancro do fígado; cancro do pulmão (por exemplo, células pequenas e células não pequenas); melanoma; neuroblastomas; cancro bucal; cancro do ovário; cancro do pâncreas; cancro da próstata; cancro retal; sarcomas; cancro da pele; cancro testicular; cancro de tiróide; e cancro renal, bem como outros carcinomas e sarcomas. Numa forma de realização, o cancro é leucemia de células pilosas, leucemia mieloide crónica, leucemia de células T cutâneas, mieloma múltiplo, linfoma folicular, melanoma maligno, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células renais, carcinoma da próstata, carcinoma da bexiga ou carcinoma do cólon.

Um sujeito que tem um cancro é um sujeito que tem células cancerosas detetáveis. Um "sujeito em necessidade" do tratamento do cancro é um sujeito que tem células cancerosas detetáveis ou é um sujeito em risco de desenvolver um cancro.

Um sujeito em risco de desenvolver um cancro é aquele que tem um risco maior que o normal de probabilidade de desenvolver cancro. Esses sujeitos incluem, por exemplo, sujeitos com uma anomalia genética que tem demonstrado

estar associada a uma maior probabilidade de desenvolver um cancro, indivíduos com uma predisposição familiar para cancro, os indivíduos expostos a agentes causadores de cancro (ou seja, agentes cancerígenos), como o tabaco, amianto, ou outras toxinas químicas, e indivíduos previamente tratados para o cancro e em remissão aparente.

Os oligonucleótidos imunoestimulantes CpG podem também ser administrados em conjunto com um tratamento tradicional anti-cancro. "Tratamento anti-cancro tradicional", como aqui utilizado, refere-se a medicamentos contra o cancro, radiação e procedimentos cirúrgicos. Tal como utilizado aqui, um "medicamento contra cancro" refere-se a um agente que é administrado a um sujeito com a finalidade de tratamento de um cancro. Tal como utilizado aqui, "tratamento de cancro" inclui a prevenção do desenvolvimento de um cancro, reduzindo os sintomas de cancro, e/ou inibe o crescimento de um cancro estabelecido. Noutros aspetos, o medicamento contra cancro é administrado a um sujeito em risco de desenvolver um cancro com o objetivo de reduzir o risco de desenvolver o cancro. Vários tipos de medicamentos para o tratamento do cancro são descritos aqui. Para efeitos desta especificação, os medicamentos contra cancro são classificados como agentes quimioterapêuticos, agentes imunoterapêuticos, vacinas para o cancro, a terapia hormonal, e modificadores da resposta biológica. Nalgumas formas de realização, o medicamento anti-cancro pode ser ligado ao oligonucleótido imunoestimulante.

Além disso, os métodos da divulgação pretendem abranger a utilização de mais de um medicamento contra cancro juntamente com os oligonucleótidos imunoestimulantes CpG. Como um exemplo, se for caso disso, os oligonucleótidos imunoestimulantes CpG podem ser administrados com um agente quimioterapêutico e um agente imunoterapêutico ou com um agente antiangiogénico. A

combinação da ODN CpG de classe P e um agente antiangiogénico pode incluir múltiplas combinações com uma ou mais outras terapêuticas anticancerígenas. Em alternativa, o medicamento contra cancro pode abranger um agente imunoterapêutico e uma vacina contra o cancro, ou um agente quimioterapêutico e uma vacina contra o cancro, ou um agente quimioterapêutico, um agente imunoterapêutico e uma vacina contra o cancro todos administrados a um sujeito com a finalidade de tratamento de um sujeito com um cancro ou em risco de desenvolver um cancro. Nalgumas formas de realização, o tratamento compreende adicionalmente um anticorpo.

O agente quimioterapêutico pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em metotrexato, vincristina, adriamicina, cisplatina, sem açúcar contendo chloroetilnitrosoureas, 5-fluorouracilo, mitomicina C, bleomicina, doxorubicina, Dacar-Bazine, taxol, fragilina, meglamina ABL, valrubicina, carmustina e poliferposano, MMI270, BAY 12-9566, inibidor da transferase farnesil RAS, inibidor de transferase farnesil, 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, InceI / VX-710, VX-853, ZD0101, ISI641, ODN 698, TA 2516 / Marmi-stat, BB2516 / Marmistat, CDP 845, D2163, PD183805, DX8951f, Lemonal DP 2202, FK 317, Picibanil / OK-432, AD 32 / Valrubicina, derivado de Metastron / estrôncio, Temodal / temozolomida, Evacet / doxorubicina lipossomal, Yewtaxan / Paclitaxel, Taxol / Paclitaxel, Xeload / Capecitabina, furtulon / doxifluridina, Cyclopax / paclitaxel oral, Oral Taxóide, SPU-077 / Cisplatina, HMR 1275 / Flavopiridol, CP-358 (774) / EGFR, CP-609 (754) / inibidor de oncogene RAS, BMS-182751 / platina oral, UFT (Tegafur / Uracilo), Ergamisol / Levamisol, Eniluracilo / 776C85 / potenciador 5-FU, Campto

/ Levamisol, Camptosar / Irinotecano, Tumodex / Ralitrexed, Leustatina / cladribina, Paxex / Paclitaxel, Doxil / doxorubicina lipossomal, Caelyx / Doxorubicina lipossomal, Fludara / fludarabina, Pharmarubicin / epirubicina, DepoCyt, ZD1839, LU 79.553 / Bis-Naphtalimide, LU 103793 / Dolastatina, Caetyx / doxorubicina lipossomal, Gemzar / gemcitabina, ZD 0473 / AnorMED, YM 116, sementes de iodo, inibidores de CDK4 e CDK2, inibidores de PARP, D4809 / Dexifosamida, Ifes / Mesnex / Ifosamida, Vumon / teniposido, Paraplatina / Carboplatina, Plantinol / cisplatina, Vepesid / etoposido, ZD 9331, Taxotere / Docetaxel, pró-fármaco de arabinoside guanina, análogo de taxano, nitrosoureas, agentes alquilantes, tais como ciclofosfamida e melfelano, Aminoglutetimida, Asparaginase, Busulfan, Carboplatina, Clorombucil, cisplatina, citarabina HCl, Dactinomicina, Daunorubicina HCl, Estramustina fosfato de sódio, Etoposido (VP16-213), Floxuridina, Fluorouracilo (5-FU), Flutamida, Hidroxiureia (hidroxicarbamida), Ifosfamida, Interferão Alfa-2a, Alfa-2b, acetato de Leuprolido (LHRH-análogo do fator de libertação), Lomustina (CCNU), Meclorotamina-HCl (mostarda de azoto), Mercaptopurina, Mesna, Mitotano (o.p'-DDD), HCl Mitoxantrona, octreotida, Plicamicina, HCl Procarbazona, Estreptozocina, citrato de tamoxifeno, Tioguanina, Tiotepa, sulfato Vinblastina, Amsacrina (m-AM-SA), Azacitidina, Eritropoietina, Hexametilmelamina (HMM), Interleucina 2, Mitoguazona (metil-GAG; metil glioxal bis-guanil-hidrazona; MGBG), Pentostatina (2'deoxicoformicina), Semustina (metil-CCNU), Teniposido (VM-26) e sulfato de Vindesina, mas não é tão limitada.

A imunoterapêutica ou agente antiangiogénico pode ser selecionado a partir do grupo consistindo de Rituxan, Ributaxina, Herceptina, Quadramet, Panorex, IDEC-Y2B8, BEC2, C225, Oncolym, a SMART M195, ATRAGEN, OvaRex, Bexxar, LDP -03, ior t6, MDX-210, MDX-11, MDX-22, OV103, 3622W94,

anti-VEGF, anti-CTLA-4, Avastina, anti-EGFR, Iressa, Zenapax, MDX-220, MDX-447, MELIMMUNE-2, MELIMMUNE-1, CEACIDE, Pretarget, NovoMAb-G2, TNT, Gliomab-H, GNI-250, EMD-72000, LymphoCide, CMA 676, Monopharm-C, 4B5, ior egf.r3, ior c5, BABS, anti-FLK-2, MDX-260, anticorpo ANA Abanticorpo SMART 1D10, anticorpo SMART ABL 364 e ImmuRAIT-CEA, mas não é tão limitada.

A vacina contra o cancro pode ser seleccionada a partir do grupo consistindo em EGF, vacinas de cancro anti-idiotípicas, antigénio gp75, vacina de melanoma GMK, vacina conjugada gangliósido MGv, Her2 / neu, OvaRex, M-Vax, O-Vax, L Vax, teratopo STN-KHL, BLP25 (MUC-1), vacina idiотípica lipossomal, Melacina, vacinas de antigénio de proteína recombinante ou peptídica, vacinas toxina / antigénio, vacina baseada no MVA, PACIS, vacina BCG, TA-HPV, TA-CIN, DISC-vírus, conjugados de um ou mais antigénios associados a tumores com outras proteínas ou moléculas estimulantes imunes e ImmuCyst / TheraCys, mas não é tão limitada.

A utilização de oligonucleótidos imunoestimulantes CpG em conjunto com agentes imunoterapêuticos, tais como os anticorpos monoclonais, capaz de aumentar a sobrevivência a longo prazo, através de um número de mecanismos, incluindo aumento significativo da ADCC (como discutido acima), ativação das células NK e um aumento dos níveis de IFN- α . Os ácidos nucleicos, quando utilizados em combinação com anticorpos monoclonais, servem para reduzir a dose do anticorpo necessária para alcançar um resultado biológico.

Nos casos em que o oligonucleótido CpG é administrado com um antigénio, o sujeito pode ser exposto ao antigénio. Tal como aqui utilizado, o termo "exposto a" refere-se quer o passo ativo de contactar o sujeito com um antigénio ou a exposição passiva do sujeito para o antigénio in vivo. Os métodos para a exposição ativa de um indivíduo a um antigénio são bem conhecidos na técnica. Em geral, um

antigénio é administrado diretamente ao indivíduo por quaisquer meios, tais como intravenosa, intramuscular, oral, transdérmica, mucosal, intranasal, intratraqueal, ou subcutânea. O antigénio pode ser administrado sistemicamente ou localmente. Os métodos para a administração do antigénio e o oligonucleótido imunoestimulante CpGs são descritos com mais detalhe a seguir. Um sujeito é exposto passivamente a um antigénio, se um antigénio se torna disponível para a exposição às células imunitárias do corpo. Um sujeito pode ser exposto passivamente a um antigénio, por exemplo, por entrada de um patogénico estranho no organismo ou pelo desenvolvimento de uma célula de tumor que expressa um antigénio estranho na sua superfície.

Os métodos em que um indivíduo é exposto passivamente a um antigénio podem estar particularmente dependentes da altura da administração do oligonucleótido imunoestimulante CpG. Por exemplo, num indivíduo em risco de desenvolver um cancro ou uma doença infecciosa ou uma resposta alérgica ou asmática, o sujeito pode ser administrado o oligonucleótido imunoestimulante CpG regularmente quando o risco é maior, por exemplo, durante a temporada de alergia ou depois da exposição a um agente causador de cancro. Além disso, o oligonucleótido imunoestimulante CpG pode ser administrado a viajantes antes de viajar para terras estrangeiras onde estejam em risco de exposição a agentes infecciosos. Da mesma forma que o oligonucleótido imunoestimulante CpG pode ser administrado a soldados ou civis em riscos de exposição a armas biológicas para induzir uma resposta sistémica ou mucosa imune ao antigénio quando e se o indivíduo é exposto a ela.

Um antigénio, tal como utilizado aqui, é uma molécula capaz de provocar uma resposta imune. Os antigénios incluem, mas não se limitam a, células, extratos de células, proteínas, polipéptidos, péptidos,

polissacarídeos, conjugados de polissacarídeos, imitações peptídicas e não peptídicas de polissacarídeos e outras moléculas, moléculas pequenas, lípidos, glicolípidos, hidratos de carbono, vírus e extratos virais e organismos multicelulares, tais como parasitas e alergénios. O termo antigénio inclui praticamente qualquer tipo de molécula que é reconhecida pelo sistema imune do hospedeiro como sendo estranha. Os antigénios incluem, mas não estão limitados a, antigénios de cancro, antigénios microbianos e os alergénios.

Um antigénio do cancro, tal como utilizado aqui, é um composto, tal como um péptido ou proteína, associado a um tumor ou a uma superfície de células de cancro e que é capaz de provocar uma resposta imune quando expresso na superfície de uma célula apresentadora de antigénios no contexto de uma molécula de MHC. Antigénios do cancro podem ser preparados a partir de células cancerígenas ou por preparação de extratos brutos de células cancerígenas, por exemplo, conforme descrito em Cohen PA et al. (1994) Cancer Res 54: 1055-8, purificando parcialmente os antigénios, por tecnologia recombinante, ou por síntese de novo de antigénios conhecidos. Antigénios de cancros incluem, mas não estão limitados a, antigénio que são expressos de forma recombinante, uma sua porção imunogénica, ou um tumor completo ou uma célula de tumor inteira. Tais antigénios podem ser isolados ou preparados recombinantemente ou por quaisquer outros meios conhecidos na técnica.

Tal como utilizados aqui, os termos "antigénio do cancro" e "antigénio de tumor" são utilizados indiferentemente para se referir a antigénios que são expressos diferencialmente em células cancerígenas e, assim, podem ser explorados de modo a dirigir-se as células cancerígenas. Antigénios de cancro são antigénios que potencialmente podem estimular respostas imunes aparentemente específicas do tumor. Alguns destes

antigénios são codificados, apesar de não necessariamente expressos, pelas células normais. Estes antigénios podem ser caracterizados como aqueles que são normalmente silenciosos (isto é, não expresso) nas células normais, os que são expressos somente em certas fases de diferenciação e aqueles que são provisoriamente expressos como antigénios embrionários e fetais. Outros antigénios de cancro são codificados por genes mutantes celulares, tais como oncogenes (por exemplo, oncogene ras ativado), genes supressores (por exemplo, mutante p53), ou proteínas de fusão resultantes de deleções internas ou translocações cromossómicas. Outros antigénios de cancro podem ainda ser codificados por genes virais, como os transportados em vírus de tumor de ARN e ADN.

Os sintomas da asma incluem episódios recorrentes de pieira, falta de ar e aperto no peito e tosse, decorrentes de obstrução ao fluxo aéreo. Inflamação das vias respiratórias associadas com asma podem ser detetadas através da observação de um certo número de alterações fisiológicas, tais como, desnudação do epitélio das vias respiratórias, a deposição de colagénio por baixo da membrana basal, o edema, a acivação de mastócitos, a infiltração de células inflamatórias, incluindo neutrófilos, eosinófilos e linfócitos. Como um resultado da inflamação das vias aéreas, os pacientes com asma muitas vezes experimentam hiper-responsividade, limitação do fluxo de ar, sintomas respiratórios, doença e cronicidade. Limitações do fluxo de ar incluem broncoconstrição aguda, edema das vias aéreas, a formação de tampão mucoso, e remodelação das vias aéreas, características que muitas vezes levam a obstrução brônquica. Nalguns casos de asma, pode ocorrer fibrose submembranar, conduzindo a anormalidades persistentes na função pulmonar.

A investigação ao longo dos últimos anos revelou que a asma resulta provavelmente de complexas interações entre

células inflamatórias, mediadoras e outras células e tecidos residentes nas vias aéreas. Os mastócitos, eosinófilos, células epiteliais, macrófagos, e células T ativadas desempenham um papel importante no processo inflamatório associado com asma (Djukanovic et al, Am Rev. Respir Dis, 142:434-457; 1990). Acredita-se que estas células podem influenciar a função das vias aéreas através da secreção de mediadores pré-formados e recém-sintetizados que podem atuar direta ou indiretamente sobre o local do tecido. Foi também reconhecido que as subpopulações de linfócitos T (Th2) desempenham um papel importante na regulação da inflamação alérgica das vias aéreas pela libertação de citocinas seletiva e que estabelece cronicidade da doença (Robinson et al, N. Engl J. Med.; 326: 298-304; 1992).

A asma é uma doença complexa que surge em diferentes fases de desenvolvimento e pode ser classificada de acordo com o grau de sintomas de aguda, subaguda ou crónica. Uma resposta inflamatória aguda está associada com um recrutamento inicial de células para a via aérea. A resposta inflamatória subaguda envolve o recrutamento de células, bem como a ativação de células residentes causando um padrão mais persistente de inflamação. Resposta inflamatória crónica é caracterizada por um nível contínuo de danos em células e um processo de reparação em curso, o que pode resultar em alterações permanentes nas vias aéreas.

Um "sujeito que tem asma" é um sujeito que tem um distúrbio do sistema respiratório caracterizado pela inflamação, estreitamento das vias aéreas e aumento da reatividade das vias aéreas à inalação de agentes. A asma está frequentemente, embora não exclusivamente, associada a sintomas atópicos ou alérgicos. Um iniciador é uma composição ou condição ambiental que desencadeia a asma. Os iniciadores incluem, mas não estão limitados a, alergénios,

temperaturas frias, exercício, infecções virais, SO₂.

Os oligonucleótidos também são úteis para rediregir uma resposta imune a uma resposta imunológica de tipo Th2 para uma resposta imune do tipo Th1. Isto resulta na produção de um ambiente de Th1 / Th2 relativamente equilibrada. A redireção de uma resposta imunitária de Th2 para uma resposta imune do tipo Th1 pode ser avaliada medindo os níveis de citocinas produzidos em resposta ao ácido nucleico (por exemplo, através da indução de células monocíticas e outras células para produzir citocinas Th1, incluindo IFN- α). O redirecionamento ou reequilíbrio da resposta imunológica de tipo Th2 para uma de uma resposta Th1 é particularmente útil para o tratamento de asma. Por exemplo, uma quantidade eficaz para tratar a asma pode ser essa quantidade útil para rediregir um tipo de resposta Th2 que está associada com asma para uma resposta de tipo Th1 ou um ambiente de Th1 / Th2 equilibrada. Citocinas Th2, especialmente IL-4 e IL-5, estão elevadas nas vias aéreas dos asmáticos. Os oligonucleótidos imunoestimulantes CpG aqui descritos causam um aumento de citocinas Th1 que ajuda a reequilibrar o sistema imunológico, prevenir ou reduzir os efeitos adversos associados a uma resposta imunitária predominantemente Th2.

O redirecionamento de uma resposta imunitária de Th2 para uma resposta imune do tipo Th1, também pode ser avaliado através da medição dos níveis de isotipos específicos de imunoglobulina. Por exemplo, em ratinhos de IgG2a está associada a uma resposta imune do tipo Th1, e IgG1 e IgE estão associados com uma resposta imunitária de Th2.

Tal como utilizado aqui, "asma agravada por infecção viral" refere-se ao aumento dos sintomas da asma e / ou gravidade do sintoma durante ou depois de uma infecção viral. Infecções respiratórias virais podem exacerbar os sintomas e / ou o desenvolvimento de asma, especialmente em

crianças pequenas, aumentando a quantidade de citocinas TH2 presentes. Infecções virais respiratórias causadas por rinovírus, coronavírus, parainfluenza, influenza e vírus sincicial respiratório (RSV) são gatilhos comuns de ataques de asma e pode causar aumento da respiração ofegante e sintomas em pacientes com asma.

Os oligonucleótidos imunoestimulantes da presente invenção podem ser utilizados para tratar a remodelação das vias aéreas em pacientes com asma ou alergia. Remodelação dos tecidos estruturais e funcionais nos pulmões é um fator de morbidade significativa para os asmáticos crônicos. Tal como utilizado aqui, "remodelação das vias respiratórias" refere-se às alterações no tecido do pulmão que ocorrem com a inflamação crônica presente nos pulmões dos doentes asmáticos crônicos. Estas alterações podem incluir o aumento da deposição de colagénio e de saliências do músculo liso das vias aéreas, hiperplasia de mastócitos e de células caliciformes e hipertrofia das células epiteliais. Como resultado destas alterações a estrutura das paredes das vias aéreas pode mudar, causando obstrução que em alguns casos não pode ser completamente invertida com tratamento. Em vez de, ou além de, asma um indivíduo em necessidade de tratamento para a remodelação das vias aéreas pode ter a doença pulmonar obstrutiva crônica ou é um fumador. Nalgumas formas de realização o sujeito está livre de sintomas de asma.

Os oligonucleótidos imunoestimulantes da presente invenção podem ser usadas para tratar a alergia. Uma "alergia" refere-se a hipersensibilidade adquirida a uma substância (alergénio). As condições alérgicas incluem, mas não se limitam a eczema, "rinite alérgica" ou coriza, febre dos fenos, conjuntivite, alergia ocular, a asma brônquica, a urticária (urticária) e alergias alimentares, e outras dermatites atópicas condições atópica; anafilaxia; alergia a medicamentos; angioedema; e conjuntivite alérgica. As

doenças alérgicas em cães incluem, mas não estão limitados a dermatite sazonal; dermatite perene; rinite; conjuntivite; asma alérgica; e reações medicamentosas. As doenças alérgicas em gatos incluem, mas não estão limitados a dermatite e doenças respiratórias; e alergénicos alimentares. As doenças alérgicas em cavalos incluem mas não estão limitados a doenças respiratórias, tais como "arfa" e dermatite. As doenças alérgicas em primatas não humanos incluem, mas não se limitam a asma alérgica, alergia ocular, e a dermatite alérgica.

A alergia é uma doença associada à produção de anticorpos de uma classe particular de imunoglobulina, IgE contra alergénios. O desenvolvimento de uma resposta mediada por IgE a aeroalergénios comuns é também um fator que indica a predisposição para o desenvolvimento de asma. Se um alergénio encontra uma IgE específica, que está ligado a um recetor Fc de IgE na superfície de basófilos de um (que circula no sangue) ou de células mastro (dispersos por todo o tecido sólido), a célula torna-se ativada, resultando na produção e libertação de mediadores tais como a histamina, serotonina e mediadores lipídicos. As doenças alérgicas incluem, mas não estão limitados a rinite (febre dos fenos), asma, urticária e dermatite atópica.

Um sujeito que tem uma alergia é um sujeito que está a experimentar atualmente ou já teve anteriormente uma reação alérgica em resposta a um alergénio.

Um indivíduo em risco de desenvolver uma alergia ou asma é um sujeito que foi identificado como tendo uma alergia ou asma no passado, mas que ainda não está a experienciar a doença ativa, bem como um indivíduo que é considerado como estando em risco de desenvolver asma ou alergia devido a fatores genéticos ou ambientais. Um indivíduo em risco de desenvolver alergia ou asma pode também incluir um indivíduo que tem o risco de exposição a um alergénio ou um risco de desenvolver asma, ou seja,

alguém que foi vítima de um ataque de asma anteriormente ou tem uma predisposição para crises de asma. Por exemplo, um indivíduo em risco pode ser um indivíduo que planeia viajar para uma área em que um determinado tipo de alergénio ou iniciador asmático é encontrado ou pode até ser qualquer indivíduo que viva numa área onde um alergénio foi identificado. Se o sujeito desenvolve respostas alérgicas a um antígeno particular e pode ser exposto ao antígeno, isto é, durante a temporada de pólen, então esse indivíduo está em risco de exposição ao antígeno.

Atualmente, as doenças alérgicas são geralmente tratadas pela injeção de pequenas doses de antígeno, seguido de subsequente aumento da dosagem de antígeno. Acredita-se que este procedimento induz a tolerância para o alergénio para evitar reações alérgicas mais. Estes métodos, no entanto, podem levar vários anos para serem eficazes e estão associados com o risco de efeitos secundários, tais como o choque anafilático. Os métodos da divulgação podem ser combinados com tratamentos tradicionais para a alergia para aumentar a sua eficácia e diminuir grandemente o tempo necessário para os efeitos se apresentarem em pacientes.

Os sintomas da reação alérgica podem variar, dependendo da localização dentro do corpo onde a IgE reage com o antígeno. Se a reação ocorre ao longo do epitélio respiratório os sintomas são espirros, tosse e reações asmáticas. Se a interação ocorre no trato digestivo, tal como no caso de alergias alimentares, dor abdominal e diarreia são comuns. Reações sistémicas, por exemplo, após uma picadura de abelha, podem ser graves e muitas vezes fatais.

A hipersensibilidade de tipo retardado, também conhecida como reação de alergia de tipo IV é uma reação alérgica caracterizada por um período de atraso de, pelo menos, 12 horas desde a invasão do antígeno no sujeito

alérgico até ao aparecimento da reação inflamatória ou imunitária. Os linfócitos T (linfócitos T sensibilizados) de indivíduos numa condição alérgica reagem com o antigénio, desencadeando os linfócitos T a libertarem linfocinas (fator inibidor da migração de macrófagos (MIF), fator ativador de macrófagos (MAF), o fator mitogénico (MF), fator reativo cutâneo (SRF), fator quimiotático, fator acelerador da neovascularização, etc.), que funcionam como mediadores da inflamação, e a atividade biológica destas linfocinas, em conjunto com os efeitos diretos e indiretos de linfócitos que surgem localmente e outras células inflamatórias imunes, dá origem à reação de alergia do tipo IV. Reações alérgicas tardias incluem a reação tipo tuberculina, reação de rejeição do homoenxerto, reação de proteção de tipo dependente de células, reação de hipersensibilidade de dermatite de contacto, e semelhantes, que são conhecidos como sendo mais fortemente reprimidas por agentes esteroides. Consequentemente, agentes esteroides são eficazes contra doenças que são causadas por reações alérgicas tardias. O uso prolongado de agentes esteroides em concentrações atualmente sendo utilizadas podem, no entanto, levar ao sério efeito colateral conhecido como dependência de esteroides. Os métodos da divulgação resolvem alguns destes problemas, fornecendo doses mais baixas e em menor número para ser administradas.

A hipersensibilidade imediata (ou resposta anafilática) é uma forma de reação alérgica que se desenvolve muito rapidamente, isto é, dentro de segundos ou minutos da exposição do paciente ao alergénio causador, e é mediada por anticorpos IgE feitos pelos linfócitos B. Em pacientes não alérgicos, não há nenhum anticorpo IgE de relevância clínica; mas, numa pessoa que sofre de doenças alérgicas, o anticorpo IgE mediam a hipersensibilidade imediata, sensibilizando os mastócitos que são abundantes na pele, os órgãos linfoides, nas membranas do olho, nariz

e boca e no trato respiratório e intestinos.

Os mastócitos possuem recetores de superfície para IgE, e os anticorpos IgE em pacientes que sofrem de alergia, tornam-se ligados a eles. Conforme discutido resumidamente acima, quando a IgE ligada é subseqüentemente contactada pelo alergénio adequado, o mastócito é provocado a desgranular e libertar várias substâncias chamadas mediadores bioativos, como a histamina, para o tecido circundante. É a atividade biológica destas substâncias que é responsável pelos sintomas clínicos típicos da hipersensibilidade imediata; nomeadamente, a contração do músculo liso das vias aéreas ou no intestino, a dilatação dos vasos sanguíneos pequenos e o aumento da sua permeabilidade à água e proteínas do plasma, a secreção de muco espesso e viscoso, e na pele, vermelhidão, inchaço e a estimulação de terminações nervosas, resultando em comichão ou dor.

A lista de alergénios é enorme e pode incluir pólenes, venenos de insetos, pelos de animais, pó, esporos de fungos e fármacos (por exemplo, penicilina). Exemplos de origem natural, alergénios de plantas e animais incluem mas não estão limitados a, proteínas específicas aos seguintes géneros: *Canine* (*Canis familiaris*); *Dermatophagoides* (por exemplo, *Dermatophagoides farinae*); *Felis* (*Felis domesticus*); *Ambrosia* (*Ambrosia artemisiifolia*; *Lolium* (por exemplo, *Lolium perenne* ou *Lolium multiflorum*); *Cryptomeria* (*cryptomeria japonica*); *Alternaria* (*Alternaria alternata*); *Alder*; *Alnus* (*Alnus gultinoasa*); *Betula* (*Betula verrucosa*); *Quercus* (*Quercus alba*); *Olea* (europa *Olea*); *Artemisia* (*Artemisia vulgaris*); *Plantago* (por exemplo, *Plantago lanceolata*); *Parietaria* (por exemplo, *Parietaria officinalis* ou *Parietaria judaica*); *Blattella* (por exemplo, *Blattella germanica*); *Apis* (por exemplo, *Apis multiflorum*); *Cupressus* (por exemplo, *Cupressus sempervirens*, *Cupressus macrocarpa arizonica* e *Cupressus*); *Juniperus* (por exemplo,

sabinoïdes Juniperus, Juniperus virginiana, communis Juniperus e Juniperus ashei); *Thuja* (por exemplo, *Thuja 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 exemplo, *Festuca elatior*); *Poa* (por exemplo, *Poa pratensis* ou *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, *Phalaris arundinacea*); *Paspalum* (por exemplo, *Paspalum notatum*); *Sorghum* (por exemplo, *Sorghum halepensis*); e *Bromus* (por exemplo, *Bromus inermis*).

O alergénio pode ser substancialmente purificado. O termo substancialmente purificado, tal como utilizado no presente documento refere-se a um antigénio, ou seja, um polipeptídeo que é substancialmente livre de outras proteínas, lípidos, hidratos de carbono ou outros materiais com os quais está naturalmente associado. Um perito na especialidade pode purificar antigénios polipeptídicos utilizando técnicas padrão para purificação de proteínas. O polipéptido substancialmente puro irá muitas vezes produzir uma única banda principal num gel de poliacrilamida não redutor. No caso de polipéptidos parcialmente glicosilados ou aqueles que têm vários codões de iniciação, podem haver várias bandas sobre um gel de poliacrilamida não redutor, mas estas formarão um padrão distinto para esse polipéptido. A pureza do antigénio polipeptídico pode também ser determinada por análise da sequência de aminoácidos amino-terminal. Outros tipos de antigénios, tais como polissacarídeos, moléculas pequenas, mimetizantes, etc, estão incluídos no âmbito da invenção e

podem, opcionalmente, ser substancialmente puros.

Os oligonucleótidos imunoestimulantes CpG podem ser combinados com um modulador imune adicional, tal como um adjuvante para modular uma resposta imune. O oligonucleótido imunoestimulante CpG e outro agente terapêutico podem ser administrados simultaneamente ou sequencialmente. Quando os outros agentes terapêuticos, são administrados simultaneamente, eles podem ser administrados na mesma ou em diferentes formulações, mas são administrados ao mesmo tempo. Os outros agentes terapêuticos são administrados sequencialmente com o outro e com o oligonucleótido imunoestimulante CpG, quando a administração de outros agentes terapêuticos e o oligonucleótido imunoestimulante CpG é temporalmente separada. Mais especificamente, o oligonucleótido imunoestimulante CpG pode ser administrado antes ou depois da administração (ou exposição a) de pelo menos um outro agente terapêutico. A separação no tempo entre a administração destes compostos pode ser uma questão de minutos, ou pode ser mais longa. Outros agentes terapêuticos incluem, mas não estão limitados a adjuvantes, citoquinas, anticorpos, antigénios, etc.

As composições da invenção podem também ser administradas com adjuvantes não ácidos nucleicos. Um adjuvante não ácido nucleico é uma molécula ou composto exceto para os oligonucleótidos imunoestimulantes CpG descritos no presente documento, que podem estimular a resposta imune humoral e/ou celular. Adjuvantes não ácidos nucleicos incluem, por exemplo, adjuvantes que criam um efeito de depósito, adjuvantes estimuladores imunes, e adjuvantes que criam um efeito de depósito e estimulam o sistema imunológico.

Os oligonucleótidos CpG imunoestimuladores são também úteis como adjuvantes das mucosas. Foi descoberto anteriormente que tanto a imunidade da mucosa e a sistémica

são induzidas pela administração mucosa de ácidos nucleicos CpG. Assim, os oligonucleótidos podem ser administrados em combinação com outros adjuvantes de mucosa.

As respostas imunes também podem ser induzidas ou aumentadas pela co-administração ou expressão linear de citocinas (Bueler & Mulligan, 1996; Chow *et al.*, 1997; Geissler *et al.*, 1997; Iwasaki *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1997) ou moléculas co-estimuladoras, tais como B7 (Iwasaki *et al.*, 1997; Tsuji *et al.*, 1997) com os oligonucleótidos imunoestimulantes CpG. O termo citocina é utilizado como um nome genérico para um grupo diverso de proteínas e péptidos solúveis que atuam como reguladores humorais em concentrações nano a picomolares e que, quer em condições normais ou patológicas, modulam as atividades funcionais das células e tecidos individuais. Estas proteínas também mediam interações diretas entre células e regulam os processos que ocorrem no ambiente extracelular. Exemplos de citocinas incluem, mas não se limitam a, interleucina-1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, fator de estimulação de colónias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), fator de estimulação de colónias de granulócitos (G-CSF), IFN- γ , IFN- α , IFN- β , fator de necrose tumoral (TNF α), TGF- β , ligando Flt-3, e o ligando de CD40. Além de citocinas os oligonucleótidos CpG podem ser utilizados em combinação com anticorpos contra certas citocinas, tais como anti-IL-10 e anti-TGF- β , assim como inibidores da ciclooxigenase, por exemplo, inibidores da COX-1 e COX-2.

Os oligonucleótidos CpG imunoestimuladores são também úteis para o tratamento e prevenção de distúrbios inflamatórios. Tal como utilizado no presente documento, o termo "doença inflamatória" refere-se a uma condição associada com uma reação de antígeno inespecífica do sistema imune inato que envolve a acumulação e ativação de leucócitos e de proteínas do plasma no local de infeção,

exposição a toxina, ou a lesão celular. As citocinas que são características da inflamação incluem o fator de necrose tumoral (TNF- α), a interleucina 1 (IL-1), IL-6, IL-12, o interferão alfa (IFN- α), o interferão beta (IFN- β), e quimiocinas. Distúrbios inflamatórios incluem, por exemplo, asma, alergia, rinite alérgica, doença cardiovascular, doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC), bronquiectasia, colecistite crónica, tuberculose, tiroidite de Hashimoto, sépsis, arcoidose, silicose e outras pneumoconioses, e um corpo estranho implantado numa ferida, mas não são tão limitados.

Os oligonucleótidos imunoestimulantes CpG são também úteis para o tratamento e prevenção de doenças autoimunes. Doença autoimune é uma classe de doenças em que os anticorpos próprios de um sujeito reagem com tecido hospedeiro ou em que as células efectoras imunes T são autoreativas a auto-péptidos endógenos e causam a destruição do tecido. Assim, uma resposta imunitária é montada contra antigénios próprios de um sujeito, referidos como auto-antigénios. Doenças autoimunes incluem, mas não estão limitadas a artrite reumatoide, psoríase, doenças inflamatórias do intestino, colite ulcerativa, doença de Crohn, esclerose múltipla, lúpus eritematoso sistémico (LES), encefalomielite autoimune, miastenia gravis (MG), tiroidite de Hashimoto, síndrome de Goodpasture, pênfigo (por exemplo, o pênfigo vulgaris), doença de Grave, anemia hemolítica autoimune, púrpura trombocitopénica autoimune, esclerodermia com anticorpos anticolagénio, doença mista do tecido conjuntivo, polimiosite, anemia perniciosa, doença idiopática de Addison, infertilidade associada à autoimunidade, glomerulonefrite (por exemplo, glomerulonefrite crescente, glomerulonefrite proliferativa), penfigoide bolhoso, síndrome de Sjögren, resistência à insulina, e diabetes mellitus autoimune.

Um "auto-antigénio", tal como aqui utilizado refere-se

a um antígeno de um tecido normal do hospedeiro. Tecido hospedeiro normal não inclui as células cancerosas. Assim, uma resposta imune montada contra um auto-antígeno, no contexto de uma doença autoimune, é uma resposta imunitária indesejável e contribui para danos e destruição de tecido normal, enquanto uma resposta imunitária montada contra um antígeno de cancro é uma resposta imune desejável e contribui para a destruição do tumor ou cancro. Assim, em alguns aspetos da invenção direcionados ao tratamento de distúrbios autoimunes, não é recomendado que os oligonucleótidos imunoestimuladores CpG sejam administrados com antígenos próprios, particularmente aqueles que são os alvos da doença autoimune.

Noutros casos, os oligonucleótidos imunoestimulantes CpG podem ser administrados com doses baixas de auto-antígenos. Um número de estudos em animais demonstrou que a administração mucosa de doses baixas de antígeno pode conduzir a um estado de hiporeactividade imune ou "tolerância". O mecanismo ativo parece ser um desvio imune mediado por citocinas a partir de uma Th1 no sentido de uma resposta predominantemente Th2 e Th3 (isto é, dominada por TGF- β). A supressão ativa com baixa dose de administração do antígeno também pode suprimir uma resposta imune não relacionada (supressão circunstante) que é de interesse considerável na terapêutica de doenças autoimunes, por exemplo, artrite reumatoide e lúpus. Supressão circunstante envolve a secreção de Th1 contrarreguladoras, supressores de citocinas no ambiente local onde pró-inflamatórios e citocinas Th1 são libertadas tanto num modo antígeno-específico ou não antígeno-específico. "Tolerância", conforme utilizado no presente documento é utilizado para referir-se a este fenómeno. Com efeito, a tolerância oral tem sido eficaz no tratamento de um número de doenças autoimunes em animais, incluindo: a encefalomielite autoimune experimental (EAE),

miastenia gravis autoimune experimental, artrite induzida por colagénio (CIA) e diabetes mellitus dependente de insulina. Nestes modelos, a prevenção e supressão da doença autoimune estão associadas com uma mudança nas respostas humorais e celulares específicas de antígeno a partir de uma resposta de Th1 para Th2/Th3.

A divulgação também inclui métodos para a indução ativação imune inata não antígeno-específica e resistência de amplo espectro a desafios infecciosos utilizando os oligonucleótidos imunoestimulantes CpG. O termo ativação imunitária inata, conforme utilizado no presente documento refere-se à ativação de outras células imunes que não as células B de memória e, por exemplo, pode incluir a ativação de neutrófilos, monócitos, macrófagos, células dendríticas, células NK, e/ou outras células do sistema imunológico que pode responder de uma forma independente de antígeno. Uma resistência de amplo espectro a desafios infecciosos é induzida porque as células imunitárias estão sob a forma ativa e estão preparadas para responder a qualquer composto ou microrganismo invasor. As células não têm de estar especificamente preparadas contra um determinado antígeno. Isto é particularmente útil em armas biológicas, e as outras circunstâncias descritas acima, tais como os viajantes.

Noutras formas de realização, o oligonucleótido é entregue ao sujeito numa quantidade eficaz para induzir a expressão de citocina ou quimiocina. Opcionalmente, a citocina ou quimiocina é selecionada a partir do grupo consistindo de IL-6, TNF α , IFN- α , IFN- γ e IP-10. Noutras formas de realização, o oligonucleótido é entregue ao sujeito numa quantidade eficaz para mudar a resposta imune para uma resposta tendencialmente Th1 a partir de uma resposta tendencialmente Th2.

Os oligonucleótidos imunoestimulantes da presente invenção podem ser utilizados para tratar ou prevenir

doenças infecciosas. Uma "doença infecciosa", conforme utilizada na presente invenção, refere-se a um distúrbio resultante da invasão de um hospedeiro, superficialmente, localmente, ou sistemicamente, por um organismo infeccioso. Os organismos infecciosos incluem bactérias, vírus, fungos e parasitas. Deste modo, "doença infecciosa" inclui infecções bacterianas, infecções virais, infecções fúngicas e infecções parasitárias.

As bactérias são organismos unicelulares que se multiplicam assexuadamente por fissão binária. Eles são classificados e denominados com base na sua morfologia, reações de coloração, os requisitos nutricionais e metabólicos, a estrutura antigénica, composição química, e homologia genética. As bactérias podem ser classificadas em três grupos com base nas suas formas morfológicas, esférica (cocos), bastonete linear (bacilos) e bastonete curvo ou em espiral (*vibro*, *campylobacter*, *espirilo*, e *spirochaete*). As bactérias são também mais frequentemente caracterizadas com base nas suas reações de coloração em duas classes de organismos, bactérias gram-positivas e gram-negativas. Gram refere-se ao método de coloração, que é vulgarmente realizado em laboratórios de microbiologia. Os organismos Gram-positivos retêm a coloração seguindo o procedimento de coloração e aparecem com uma cor violeta forte. Organismos gram-negativos não retêm a coloração, mas retêm a contra coloração e, portanto, aparecem de cor rosa. O Pedido de Patente Não-Provisional U.S N° 09/801.839, publicado em 8 de março de 2001, enumera uma série de bactérias, as infecções das quais a presente invenção tem a intenção de prevenir e tratar.

As bactérias Gram-positivas incluem, mas não estão limitadas a, espécies de *Pasteurella*, espécies de *Staphylococcus*, espécies de *Streptococcus*. As bactérias Gram-negativas incluem, mas não estão limitados a, *Escherichia coli*, espécies de *Pseudomonas*, e espécies de

Salmonella. Exemplos específicos de bactérias infecciosas incluem mas não estão limitados a, *Helicobacter pylori*, *Borrelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacteria* sps (por exemplo, *M tuberculosis*, *M avium*, *M intracellulare*, *M kansasii*, *M gordonae*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus* do grupo A), *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* do Grupo B), *Streptococcus* (grupo viridans), *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus* (sps anaeróbias.), *Streptococcus pneumoniae*, *Campylobacter* sp. patogénica, *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*, *moniliformis* *Streptobacillus*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Leptospira*, *Rickettsia*, e *Actinomyces israelii*.

Exemplos de fungos incluem *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Chlamydia trachomatis*, *Candida albicans*.

Outros organismos infecciosos (ou seja, protistas) incluem *Plasmodium* spp. como o *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium vivax* e *Toxoplasma gondii*. Parasitas com origem no sangue e/ou dos tecidos incluem *Plasmodium* spp., *Babesia microti*, *divergens* *Babesia*, *Leishmania tropica*, *Leishmania* spp., *Leishmania braziliensis*, *Leishmania donovani*, *Trypanosoma gambiense* e *Trypanosoma rhodesiense* (doença do sono Africana), *Trypanosoma cruzi* (doença de Chagas), e *Toxoplasma gondii*. Parasitas são organismos que dependem de outros organismos para sobreviver e, assim, devem entrar, ou infectar, um outro organismo para continuar o seu ciclo de vida. O organismo infectado, ou seja, o hospedeiro, proporciona

nutrição e habitat para o parasita. Embora, no sentido mais lato do termo, parasita pode incluir todos os agentes infecciosos (isto é, bactérias, vírus, fungos, protozoários e helmintos), de um modo geral, o termo é utilizado para referir-se apenas a protozoários, helmintos, artrópodes e ectoparasitas (por exemplo, carraças, ácaros, etc). Protozoários são organismos unicelulares que se podem replicar tanto a nível intracelular e extracelular, particularmente no sangue, trato intestinal ou na matriz extracelular de tecidos. Helmintos são organismos multicelulares que quase sempre são extracelulares (à exceção de *Trichinella spp.*). Os helmintos normalmente requerem saída de um hospedeiro primário e transmissão num hospedeiro secundário, a fim de se replicarem. Em contraste a estas classes acima mencionadas, ectoparasitas artrópodes formam uma relação parasitária com a superfície externa do corpo do hospedeiro.

Outros micro-organismos clinicamente relevantes foram amplamente descritos na literatura, por exemplo, ver CGA Thomas, Medical Microbiology, Bailliere Tindall, Grã-Bretanha de 1983.

Os oligonucleótidos da invenção podem ser administrados a um indivíduo com um agente antimicrobiano. Um agente antimicrobiano, tal como aqui utilizado, refere-se a um composto que ocorre naturalmente, ou sintético, que é capaz de matar ou inibir microrganismos infecciosos. O tipo de agente antimicrobiano útil de acordo com a invenção irá depender do tipo de microrganismo com o qual o indivíduo está infetado ou em risco de ficarem infetados. Os agentes antimicrobianos incluem, mas não estão limitados a agentes antibacterianos, agentes antivirais, agentes antifúngicos e agentes antiparasitário. Frases como "agente anti-infeccioso", "agente antibacteriano", "agente antiviral", "agente antifúngico", "agente antiparasitário" e "parasiticida" têm significados bem estabelecido para

aqueles de vulgar perícia na especialidade e são definidos em textos médicos padrão. Resumidamente, os agentes antibacterianos matam ou inibem as bactérias, e incluem antibióticos, bem como outros compostos sintéticos ou naturais que têm funções semelhantes. Os antibióticos são moléculas de baixa massa molecular que são produzidos como metabolitos secundários por células, tais como microorganismos. Em geral, os antibióticos interferem com uma ou mais funções ou estruturas que são específicas para o microrganismo e que não estão presentes em células hospedeiras bacterianas. Os agentes antivirais podem ser isolados a partir fontes naturais ou sintetizados e são úteis para matar ou inibir vírus. Os agentes antifúngicos são usados para tratar infecções fúngicas superficiais, bem como infecções fúngicas sistêmicas oportunistas e primárias. Agentes antiparasitários matam ou inibem parasitas.

Exemplos de agentes antiparasitários, também referidos como parasiticidas úteis para administração a seres humanos incluem, mas não estão limitados a albendazol, anfotericina B, benznidazol, bitionol, cloroquina HCl, fosfato de cloroquina, clin-damycin, dehydroemetine, dietilcarbamazina, furoato de diloxanida, eflornithine, furazolidona, glicocorticóides, halofan-trígono, iodoquinol, ivermectina, mebendazol, mefloquina, antimoniato de meglumina, melarsoprol, metrifonato, metronidazol, niclosamida, nifurtimox, oxamniquine, paromomycin, pentamidine isethionate, piperazina, praziquantel, fosfato de primaquina, proguanil, pamoato pirantel, pirimetanmina-sulfonamidas, pirimetanmina-sulfadoxina, HCl quinacrine, sulfato de quinina, quinidina gluconato, espiamicina, estibogluconato de sódio (antimônio gluconato de sódio), suramin, tetra-ciclina, doxiciclina, tiabendazol, tinidazole, trimetoprima sulfametoxazol, e triparsamida alguns dos os quais são utilizados sozinhos ou em combinação com outros.

Os agentes antibacterianos matam ou inibem o crescimento ou a função de bactérias. Uma grande classe de agentes antibacterianos é antibiótica. Antibióticos, que são eficazes para matar ou inibir uma grande variedade de bactérias, são referidos como antibióticos de espectro largo. Outros tipos de antibióticos são predominantemente eficazes contra as bactérias da classe gram-positiva ou gram-negativa. Estes tipos de antibióticos são referidos como antibióticos de espectro estreito. Outros antibióticos que são eficazes contra um único organismo ou doença e não contra outros tipos de bactérias são designados como antibióticos de espectro limitado. Os agentes antibacterianos são por vezes classificados com base em seu principal modo de ação. Em geral, os agentes antibacterianos são inibidores da síntese da parede celular, inibidores da membrana celular, inibidores da síntese de proteínas, síntese de ácido nucleico ou inibidores funcionais, e inibidores competitivos.

Os agentes antifúngicos são úteis para o tratamento e prevenção de fungos infecciosos. Os agentes antifúngicos são por vezes classificados pelo seu mecanismo de ação. Alguns agentes antifúngicos funcionam como inibidores da parede celular por inibição da síntese da glicose. Estes incluem, mas não estão limitados a, basiungin / BCE. Outros agentes antifúngicos funcionam por meio de desestabilizar a integridade da membrana. Estes incluem, mas não estão limitados a, imidazóis, como o clotrimazol, sertaconazol, fluconazol, itraconazol-ITRA, cetoconazol, miconazol, e voriconazole, bem como o FK 463, a anfotericina B, BAY 38-9502, MK 991, pradimicina, UK 292, butenafina, e terbinafina. Outros agentes anti-fúngicos funcionam quebrando a quitina (por exemplo, quitinase) ou imunossupressão (501 creme).

Em algumas formas de realização o tratamento antimicrobiano pode incluir um antígeno microbiano. Um

antigénio microbiano é um antigénio de um microrganismo e inclui, mas não se limita a vírus, bactérias, parasitas e fungos. Tais antigénios incluem o microrganismo intacto bem como isolados naturais e os seus fragmentos ou derivados do mesmo e também compostos sintéticos que são idênticos ou semelhantes aos antigénios de microrganismos naturais e induzem uma resposta imunitária específica para o microrganismo. Um composto é semelhante a um antigénio microrganismo natural se induz uma resposta imunitária (humoral e/ou celular) a um antigénio de microrganismo natural. Tais antigénios são utilizados rotineiramente na técnica e são bem conhecidos dos vulgares peritos na especialidade.

Os oligonucleótidos imunoestimulantes da presente invenção podem ser usados para tratar ou prevenir a infeção viral. Os vírus são pequenos agentes infecciosos que geralmente contêm um núcleo de ácido nucleico e uma proteína de revestimento, mas não são organismos vivos independentemente. Os vírus também podem assumir a forma de ácidos nucleicos infecciosos que falta uma proteína. Um vírus não pode sobreviver na ausência de uma célula viva no interior da qual pode replicar. Os vírus entram nas células específicas que vivem ou por endocitose ou injeção direta de ADN (fago) e multiplicar, causando doença. O vírus multiplicados podem então ser libertado e infetar as células adicionais. Alguns vírus são vírus contendo ADN e outros são vírus contendo ARN.

Os exemplos de vírus que foram encontrados em seres humanos incluem, mas não estão limitados a: Retroviridae (por exemplo, vírus da imunodeficiência humana, tais como VIH-1 (também referido como HTLV-III, LAV ou HTLV-III / LAV, ou HIV-III; e outros isolados, como HIV-LP; Picornaviridae (por exemplo, vírus da poliomielite, vírus da hepatite A; enterovírus, vírus Cocksackie humanos, ecovírus, rinovírus); Calciviridae (por exemplo, estirpes

que causam gastroenterite); Togaviridae (por exemplo, vírus da encefalite equina, vírus da rubéola); Flaviviridae (por exemplo, os vírus da dengue, vírus da encefalite, vírus da febre amarela); Coronaviridae (por exemplo, o coronavírus); Rhabdoviridae (por exemplo, vírus estomatite vesicular, o vírus da raiva); Filoviridae (por exemplo, vírus ebola); Paramyxoviridae (por exemplo, vírus parainfluenza, vírus da papeira, vírus do sarampo, vírus sincicial respiratório); Orthomyxoviridae (por exemplo, vírus da gripe); Bunyaviridae (por exemplo, vírus Hantaan, vírus bunya, vírus e phleboviruses Nairo); Arena viridae (vírus da febre hemorrágica); Reoviridae (por exemplo, reovírus, orbiviruses e rotavírus); Bornaviridae; Hepadna-viridae (vírus da hepatite B); Parvoviridae (parvovírus); Papovaviridae (vírus do papiloma, vírus políoma); Adenoviridae (maioria dos adenovírus); Herpesviridae (vírus herpes simplex (HSV) 1 e 2, vírus varicela-zoster, citomegalovírus (CMV), vírus do herpes; Poxviridae (vírus da varíola, vírus vaccinia, vírus pox); e Iridoviridae (por exemplo, o vírus da peste suína Africano); e vírus não classificadas (por exemplo, o agente de hepatite delta (que se pensa ser um satélite defeituoso de vírus da hepatite B), Hepatite C; Norwalk e vírus relacionados, e astroviruses).

Os oligonucleótidos imunoestimulantes da presente invenção podem ser administrados simultaneamente com um tratamento antiviral tradicional. Em algumas formas de realização o agente antiviral e o oligonucleótido CpG da invenção estão ligados. Os agentes antivirais são compostos que impedem a infecção de células por vírus ou a replicação do vírus na célula. Existem muitos medicamentos antivirais menos do que os medicamentos antibacterianos, porque o processo de replicação viral é tão intimamente relacionado com a replicação do ADN no interior da célula hospedeira, que os agentes antivirais não específicos, muitas vezes são

tóxicos para o hospedeiro. Existem várias etapas no processo de infecção viral, que pode ser bloqueada ou inibida por agentes antivirais. Estas fases incluem, fixação do vírus à célula hospedeira (imunoglobulina ou péptidos de ligação), desencapsulamento do vírus (por exemplo, amantadina), síntese e tradução de ARNm viral (por exemplo, interferão), a replicação de ADN ou ARN viral (por exemplo, análogos de núcleos idos), a maturação de novas proteínas de vírus (por exemplo, inibidores da protease), e brotamento e libertação do vírus.

Os análogos de nucleótidos são compostos sintéticos que são semelhantes aos nucleótidos, mas que têm uma desoxirribose incompleta ou anormal ou grupo ribose. Uma vez que os análogos de nucleótidos estão na célula, são fosforilados, produzindo o trifosfato de forma que compete com nucleídeos normais para incorporação no ADN ou ARN viral. Uma vez que a forma trifosfato do análogo de nucleótido é incorporado na cadeia crescente de ácido nucleico, que provoca associação irreversível com a polimerase viral e, assim, a terminação da cadeia. Análogos de nucleótidos incluem, mas não estão limitados a, aciclovir (usado no tratamento do vírus herpes simplex e o vírus da varicela-zoster), ganciclovir (útil para o tratamento de infecção por citomegalovírus), idoxuridina, ribavirina (útil para o tratamento do vírus sincicial respiratório), didesoxiinosina, didesoxicitidina, zidovudina (azidotimidina), imiquimod e resiquimod.

Os interferões são citocinas que são secretadas por células infetadas por vírus, bem como células do sistema imunológico. A função interferões por ligação a recetores específicos em células adjacentes às células infetadas, fazendo com que a mudança de célula, que protege de infecção pelo vírus. α e β -interferão também induz a expressão de moléculas de Classe I e Classe II de MHC na superfície de células infetadas, o que resulta em aumento da apresentação

de antígeno para a célula hospedeira de reconhecimento imunológico. α e β -interferões estão disponíveis como formas recombinantes e têm sido utilizados para o tratamento de infecção de hepatite B crónica e C. Nas dosagens que são eficazes para a terapia antiviral, os interferões têm efeitos secundários graves, tais como febre, mal-estar e perda de peso.

Outros agentes antivirais úteis na invenção incluem, mas não estão limitados a, imunoglobulinas amantadina, interferões, análogos de nucleósidos e inibidores de protease. Os exemplos específicos de antivirais incluem, mas não estão limitados a Acemanano; Aciclovir; Aciclovir de sódio; Adefovir; Alovudina; Alvircept Sudotox; Amantadina Cloridrato; Aranotin; Arildone; Atevirdina Mesilato; Avridina; Cidofovir; Cipamfilina; Cloridrato de citarabina; Delavirdina Mesilato; Desci-clovir; Didanosina; Disoxaril; Edoxudine; Enviradene; Enviroxima; Famciclovir; Famotina Cloridrato; Fiacitabina; Fialuridina; Fosarilato; Sódio Foscarnet; Sódio Fosfonet; Ganciclovir; Ganciclovir de sódio; Idoxuridina; Cetoxal; Lamivudina; Lobucavir; Memotina Cloridrato; Metisazona; A nevirapina; Penciclovir; Pirodavir; Ribavirina; Rimantajantar Cloridrato; Saquinavir Mesilato; Somantadina Cloridrato; Sorivudina; Statolon; Estavudina; Tilorone Hydro-cloreto; Trifluridina; Valaciclovir Cloridrato; Vidarabina; Fosfato vidarabina; Vidarabina Fosfato de Sódio; Viroxima; Zalcitabina; Zidovudina; e Zinviroxime.

Os oligonucleótidos imunoestimulantes CpG podem ser administrados diretamente ao indivíduo ou podem ser administrados em conjunção com um complexo de administração de ácido nucleico. Um complexo de administração de ácido nucleico entende-se uma molécula de ácido nucleico associado a (por exemplo, ionicamente ou covalentemente ligado a, ou encapsulado dentro de) um meio alvo (por exemplo, uma molécula que resulta numa maior ligação à

célula alvo de afinidade). Exemplos de complexos de entrega de ácidos nucleicos incluem os ácidos nucleicos associados com um esterol (por exemplo, colesterol), um lípido (por exemplo, um lípido catiónico, virossoma ou lipossoma), ou um agente de ligação específico da célula alvo (por exemplo, um ligando reconhecido por células alvo específicas recetor). Os complexos preferidos podem ser suficientemente estáveis in vivo para prevenir o desacoplamento significativo antes da internalização pela célula alvo. No entanto, o complexo pode ser clivável sob condições apropriadas dentro da célula de modo que o oligonucleótido é libertado numa forma funcional.

O oligonucleótido imunoestimulante CpG e/ou o antígeno e/ou outros agentes terapêuticos podem ser administrados sozinhos (por exemplo, em tampão de solução salina ou) ou utilizando quaisquer veículos de entrega conhecidos na técnica. Por exemplo os seguintes veículos de entrega tem sido descrito: Os cocleados; Emulsomes; ISCOMs; Os lipossomas; Vetores de bactérias vivas (por exemplo, Salmonella, Escherichia coli, Bacillus Calmette-Guerin, Shigella, Lactobacillus); Vetores virais ao vivo (por exemplo, vaccinia, adenovirus, Herpes Simplex); Microesferas; Vacinas de ácido nucleico; Polímeros (por exemplo, carboximetilcelulose, quitosano); Anéis de polímero; Fluoreto de Sódio; As plantas transgênicas; Virossomos; Partículas semelhantes a vírus. Outros veículos de entrega são conhecidos na técnica.

O termo "quantidade eficaz" refere-se geralmente à quantidade necessária ou suficiente para realizar um efeito biológico desejado. Por exemplo, uma quantidade eficaz de um oligonucleótido imunoestimulante CpG administrada com um antígeno, para induzir a imunidade da mucosa é a quantidade necessária para causar em resposta a um antígeno após exposição ao antígeno, enquanto a quantidade necessária para a indução de imunidade sistêmica

é que quantidade necessária para causar o desenvolvimento de anticorpos IgG em resposta a um antigénio após exposição ao antigénio. Combinado com os ensinamentos aqui proporcionados, por escolha entre os vários compostos ativos e fatores tais como potência, biodisponibilidade relativa, peso corporal do doente, gravidade de efeitos secundários adversos e modo de administração preferida de pesagem, um regime eficaz de tratamento profilático ou terapêutico pode ser planeado que não provoca toxicidade substancial e ainda é inteiramente eficaz para tratar o indivíduo em particular. A quantidade eficaz para qualquer aplicação particular pode variar dependendo de fatores tais como a doença ou condição a ser tratada, o oligonucleótido imunoestimulante CpG em particular a ser administrado o tamanho do indivíduo, ou a gravidade da doença ou condição. Um vulgar perito na especialidade pode determinar empiricamente a quantidade eficaz de um oligonucleótido CpG imunoestimulador em particular e/ou antigénio e/ou outro agente terapêutico sem necessidade de experimentação indevida.

Doses objeto dos compostos aqui descritos para entrega local ou da mucosa variam tipicamente de cerca de 10 µg a 10 g por cada administração, que, dependendo da aplicação pode ser dada diariamente, semanalmente ou mensalmente e qualquer outra quantidade de tempo entre as mesmas ou como de outro modo exigido. Mais tipicamente, as doses locais ou mucosais variam de cerca de 1 mg a 500 mg por administração, e mais tipicamente desde cerca de 1 mg a 100 mg, com 2 - 4 dias administrações ser espaçados ou semanas de intervalo. Mais tipicamente, as doses de estimulantes imunitárias variar de 10 µg a 100 mg por administração, e mais tipicamente 100 µg a 10 mg, com as administrações diárias ou semanais. Assunto doses dos compostos aqui descritos para entrega parenteral (isto é, SC ou IM) com a finalidade de induzir uma resposta imunitária específica

para o antigénio, em que os compostos são entregues com um antigénio mas não um outro agente terapêutico são tipicamente mais ou menos no mesmo intervalo de doses ou um pouco menor do que a dose eficaz da mucosa (isto é, NO, sublingual, oral, intravaginal, rectal, etc.) para adjuvante de vacina ou aplicações estimulantes imunitárias. As doses dos compostos aqui descritos para entrega parenteral com o fim de induzir uma resposta imune inata ou para aumentar ADCC ou para induzir uma resposta imunitária específica do antigénio quando os oligonucleótidos imunoestimulantes CpG são administrados em combinação com outros agentes terapêuticos ou em veículos de entrega especializados variam normalmente desde cerca de 100 µg a 10 g por cada administração, que, dependendo da aplicação pode ser dada diariamente, semanalmente ou mensalmente e qualquer outra quantidade de tempo entre as mesmas ou como de outro modo exigido. Mais tipicamente, as doses parenterais para estes fins variam de cerca de 1 mg a 5 g por cada administração, e mais tipicamente desde cerca de 1 mg a 1 g, com 2 - 4 dias administrações ser espaçados ou semanas de intervalo. Em algumas formas de realização, no entanto, as doses parenterais para estes fins podem ser usados no intervalo de 5 a 10.000 vezes mais elevada do que as doses típicas descritas acima. Dependendo da aplicação, a duração da dosagem necessária só pode ser uma ou algumas doses, ou para o tratamento de condições crónicas, a dosagem pode ser, por muitos anos numa base diária, semanal ou mensal.

Para qualquer composto aqui descrito, a quantidade terapêuticamente eficaz pode ser inicialmente determinada a partir de modelos animais. Uma dose terapêuticamente eficaz também pode ser determinada a partir de dados humanos para outros oligonucleótidos CpG que foram testados em humanos (ensaios clínicos humanos estão em curso) e para os compostos que são conhecidos por apresentar atividades

farmacológicas semelhantes, tais como outros adjuvantes, por exemplo, LT e outros antigénios para fins de vacinação. Doses mais elevadas podem ser necessárias para a administração parentérica. A dose aplicada pode ser ajustada com base na biodisponibilidade relativa, massa corporal, e potência do composto administrado. Ajustar a dose para conseguir eficácia máxima com base nos métodos descritos acima e outros métodos como é bem conhecido na técnica está bem dentro das capacidades de qualquer especialista na matéria.

As formulações da invenção são administradas em soluções farmacêuticamente aceitáveis, que podem rotineiramente conter concentrações farmacêuticamente aceitáveis de sal, agentes tamponantes, conservantes, veículos compatíveis, adjuvantes e opcionalmente outros ingredientes terapêuticos. Algumas formulações podem conter um álcool, por exemplo um sacárido (por exemplo dextrose), ou um aminoácido.

Para uso em terapêutica, uma quantidade eficaz do que o oligonucleótido imunoestimulante CpG e/ou outros agentes terapêuticos podem ser administrados a um indivíduo por qualquer modo que proporciona o composto desejado com a superfície, por exemplo, local, das mucosas e sistêmica. A administração da composição farmacêutica da presente invenção pode ser realizada por quaisquer meios conhecidos dos peritos na técnica. As vias preferidas de administração incluem, mas não estão limitadas a, oral, parentérica, intravenosa, intramuscular, subcutânea, intralesional, intratumoral, intranasal, sublingual, intratraqueal, inalação, ocular, vaginal, retal.

Para a administração oral, os compostos (isto é, oligonucleótidos CpG imunoestimuladores, antigénios e/ou outros agentes terapêuticos) podem ser formulados prontamente por combinação do composto ativo (s) com veículos farmacêuticamente aceitáveis bem conhecidos na

técnica. Tais veículos permitem que os compostos da invenção sejam formulados como comprimidos, pílulas, drageias, cápsulas, líquidos, géis, xaropes, pastas, suspensões e semelhantes, para ingestão oral por um paciente a ser tratado. As preparações farmacêuticas para utilização oral podem ser obtidas como excipiente sólido, opcionalmente moendo uma mistura resultante, e processando a mistura de grânulos, após adição de auxiliares adequados, se desejado, para obter comprimidos ou núcleos de drageias. Os excipientes adequados são, em particular, cargas tais como açúcares, incluindo lactose, sacarose, manitol, ou sorbitol; preparações de celulose tais como, por exemplo, amido de milho, amido de trigo, amido de arroz, amido de batata, gelatina, goma de tragacanto, metil-celulose, hidroxipropilmetilcelulose, carboximetilcelulose de sódio, e/ou polivinilpirrolidona (PVP). Se desejado, podem ser adicionados agentes de desintegração, tais como a pirrolidona de polivinilo de ligação cruzada, agar, ou ácido algínico ou um seu sal tal como alginato de sódio. Opcionalmente, as formulações orais também podem ser formuladas em soro fisiológico ou tampões para neutralizar as condições ácidas internas ou podem ser administradas sem qualquer veículo.

Os núcleos das drageias são fornecidos com revestimentos adequados. Para esta finalidade, podem ser utilizadas soluções concentradas de açúcar, que podem opcionalmente conter goma-arábica, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenoglicol, 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 das drageias para identificação ou para caracterizar diferentes combinações de doses de compostos ativos.

As preparações farmacêuticas que podem ser utilizadas

oralmente incluem cápsulas duras feitas de gelatina, bem como cápsulas moles, seladas feitas de gelatina e um plastificante, tal como glicerol ou sorbitol. As cápsulas duras podem conter os ingredientes ativos em mistura com uma carga tal como lactose, aglutinantes tais como amidos e/ou lubrificantes tais como talco ou estearato de magnésio e, opcionalmente, estabilizadores. Em cápsulas moles, os compostos ativos podem ser dissolvidos ou suspensos em líquidos adequados, tais como óleos gordos, parafina líquida, ou polietilenoglicóis líquidos. Além disso, podem ser adicionados estabilizantes. As microsferas formuladas para administração oral podem também ser utilizadas. Tais microesferas foram bem definidas na técnica. Todas as formulações para administração oral deveriam estar em dosagens adequadas para tal administração.

Para administração oral, as composições podem tomar a forma de comprimidos ou pastilhas formulados de modo convencional.

Os compostos podem ser administrados por inalação para o trato pulmonar, especialmente para os brônquios e, mais particularmente, para os alvéolos do pulmão profundo, utilizando dispositivos de inalação padrão. Os compostos podem ser administrados sob a forma de apresentação de pulverização de aerossol a partir de embalagens pressurizadas ou de um nebulizador, com a utilização de um propulsante adequado, por exemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono ou outro gás adequado. No caso de um aerossol pressurizado, a unidade de dosagem pode ser determinada proporcionando uma válvula para entregar uma quantidade medida. Um aparelho de inalação pode ser usado para administrar os compostos a um sujeito. Um aparelho de inalação, tal como aqui utilizado, é qualquer dispositivo para administração de um aerossol, tais como a forma de pó seco dos compostos. Este tipo de equipamento é bem

conhecido na técnica e foi descrito em detalhe, tal como a descrição encontrada em Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, 1995, Mac Publishing Company, Easton, Pennsylvania, páginas 1676-1692. Muitas Patentes U.S. também descrevem dispositivos de inalação, tal como a Patente U.S. No. 6.116.237.

"Pó" tal como aqui utilizado refere-se a uma composição que consiste em partículas sólidas finamente dispersas. De preferência, os compostos são de fluxo relativamente livre e capazes de serem dispersos num dispositivo de inalação e subsequentemente inalados por um sujeito de modo que os compostos atingem os pulmões para permitir a penetração nos alvéolos. Um "pó seco" refere-se a uma composição em pó que tem um teor de humidade de tal modo que as partículas são prontamente dispersáveis num dispositivo de inalação para formar um aerossol. O teor de humidade é geralmente inferior a cerca de 10% em peso (% p) de água, e em algumas formas de realização é inferior a cerca de 5% p e de preferência menos do que cerca de 3% p. O pó pode ser formulado com polímeros ou, opcionalmente, pode ser formulado com outros materiais tais como lipossomas, albumina e/ou outros veículos.

Dosificadores de aerossol e sistemas de distribuição podem ser selecionados para uma aplicação terapêutica particular, por um perito na especialidade, tal como descrito, por exemplo, em Gonda, I. "Aerosols for delivery of therapeutic and diagnostic agents to the respiratory tract", em Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 6:273-313 (1990), e em Moren, "Aerosol dosage forms and formulations," em Aerosols in Medicine. Principles, Diagnosis and Therapy, Moren, et al., Eds., Elsevier, Amsterdam, 1985.

Os compostos, quando desejável administrá-los sistemicamente, podem ser formulados para administração parentérica por injeção, por exemplo, por injeção de bólus

ou infusão contínua. As formulações para injeção podem ser apresentadas em formas farmacêuticas unitárias, por exemplo, em ampolas ou em recipientes multi-dose, com um conservante adicionado. As composições podem tomar formas tais como suspensões, soluções ou emulsões em veículos oleosos ou aquosos, e podem conter agentes de formulação tais como agentes de suspensão, estabilizantes e/ou dispersantes.

As formulações farmacêuticas para administração parentérica incluem soluções aquosas dos compostos ativos numa forma solúvel em água. Adicionalmente, as suspensões dos compostos ativos podem ser preparadas como suspensões de injeção oleosas apropriadas. Os solventes ou veículos lipofílicos adequados incluem óleos gordos tais como óleo de sésamo, ou ésteres de ácidos gordos sintéticos, tais como oleato de etilo ou triglicéridos, ou lipossomas. As suspensões aquosas para injeção podem conter substâncias que aumentam a viscosidade da suspensão, tais como carboximetilcelulose sódica, sorbitol, ou dextrano. Opcionalmente, a suspensão pode também conter estabilizantes 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 pó para constituição com um veículo adequado, por exemplo, água estéril isenta de pirogénios, antes da utilização.

Os compostos podem também ser formulados em composições retais ou vaginais, tais como supositórios ou enemas de retenção, por exemplo, contendo bases de supositórios convencionais tais como manteiga de cacau ou outros glicéridos.

Em adição às formulações anteriormente descritas, os compostos também podem ser formulados como uma preparação de depósito. Tais formulações de ação prolongada podem ser

formuladas com materiais poliméricos ou hidrofóbicos adequados (por exemplo, como uma emulsão num óleo aceitável) ou resinas de troca iônica, ou como derivados fracamente solúveis, por exemplo, como um sal fracamente solúvel.

As composições farmacêuticas podem também incluir veículos ou excipientes em fase sólida ou de gel adequados. Exemplos de tais veículos ou excipientes incluem, mas não estão limitados a, carbonato de cálcio, fosfato de cálcio, vários açúcares, amidos, derivados de celulose, gelatina, e polímeros, tais como polietilenoglicóis.

Formas de preparações farmacêuticas líquidas ou sólidas adequadas são, por exemplo, soluções aquosas ou salinas para inalação, microencapsuladas, incluídas num coclear, revestidas sobre partículas de ouro microscópicas, contidas em lipossomas, nebulizadas, aerossóis, granulados para implantação na pele ou secos sobre um objeto afiado para ser raspado na pele. As composições farmacêuticas também incluem grânulos, pós, comprimidos, comprimidos revestidos, (micro) cápsulas, supositórios, xaropes, emulsões, suspensões, cremes, gotas ou preparações de libertação prolongada de compostos ativos, em cuja preparação excipientes e aditivos e/ou auxiliares tais como desintegrantes, aglutinantes, agentes de revestimento, agentes de dilatação, lubrificantes, aromatizantes, edulcorantes ou solubilizantes são usualmente utilizados como descrito acima. As composições farmacêuticas são apropriadas para utilização numa variedade de sistemas de distribuição de fármacos. Para uma breve revisão de métodos para a distribuição de fármacos, veja-se Langer R (1990) Science 249:1527-33.

Os oligonucleótidos imunoestimuladores CpG e opcionalmente outros agentes terapêuticos e/ou antigénios podem ser administrados *per se* (puro) ou na forma de um sal farmacêuticamente aceitável. Quando usados em medicina, os

sais deveriam ser farmacêuticamente aceitáveis, mas sais não farmacêuticamente aceitáveis podem ser convenientemente utilizados para preparar sais farmacêuticamente aceitáveis destes. Tais sais incluem, mas não estão limitados a, aqueles preparados a partir dos seguintes ácidos: clorídrico, bromídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, p-toluenosulfônico, tartárico, cítrico, metanosulfônico, fórmico, malônico, succínico, naftaleno-2-sulfônico, e benzenossulfônico. Além disso, estes sais podem ser preparados como sais de metais alcalinos ou alcalinoterrosos, tais como sais de sódio, potássio ou cálcio do grupo ácido carboxílico.

Agentes de tamponamento adequados incluem: ácido acético e um sal (1-2% p/v); ácido cítrico e um sal (1-3% p/v); ácido bórico e um sal (0,5-2,5% p/v); e ácido fosfórico e um sal (0,8-2% p/v). Os 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 farmacêuticas da invenção contêm uma quantidade eficaz de um oligonucleótido imunoestimulante CpG e, opcionalmente, antigénios e/ou outros agentes terapêuticos, opcionalmente incluídos num veículo farmacêuticamente aceitável. O termo veículo farmacêuticamente aceitável significa uma ou mais cargas sólidas ou líquidas, diluentes ou substâncias de encapsulamento compatíveis, que são adequados para administração a um ser humano ou outro animal vertebrado. O termo veículo denota um ingrediente orgânico ou inorgânico, natural ou sintético, com o qual o ingrediente ativo é combinado para facilitar a aplicação. Os componentes das composições farmacêuticas são também capazes de serem misturados com os compostos da presente invenção, e uns com os outros, de uma maneira tal que não há uma interação que prejudique substancialmente a eficácia farmacêutica

desejada.

A presente invenção é ainda ilustrada pelos seguintes Exemplos, os quais de modo nenhum deveriam ser entendidos como ainda mais limitantes.

EXEMPLOS

Introdução:

Os novos oligonucleótidos CpG de classe P desta invenção são um subconjunto dos oligonucleótidos CpG de Classe C descritos anteriormente. Os ODN de classe P melhorados diferem daqueles por virtude da surpreendentemente elevada atividade de secreção de IFN- α e Th1 e citocinas tipo Th1 e quimiocina *in vitro*, bem como *in vivo*. Estes são também superiores às classes C anteriormente descritas na sua potência para induzir a produção de outras citocinas/quimiocinas e ativação celular. Agrawal et al. descreveram oligonucleótidos antissentido possuindo uma sequência que é complementar a uma sequência alvo de ácido nucleico, mais uma estrutura em haste e ansa 3', tornando por último o ODN estável à degradação por nuclease. A estrutura em haste e ansa 3' de Agrawal et al. não é parte da sequência de reconhecimento. Os nossos ODN CpG de classe P de palíndromo duplo são parcialmente auto-complementares nos dois palíndromos. Apesar dos palíndromos 3' nestes ODN serem potencialmente capazes de formar uma estrutura em haste e ansa 3', acredita-se que a formação de concatêmeros é provavelmente a estrutura mais ativa em células, e que a capacidade de uma possível haste e ansa aumentar a estabilidade contra nucleases não contribui de forma importante para a atividade de ODN única.

Os novos compostos desta invenção podem ser utilizados para tratar doenças nas quais a estimulação imune ou modulação imune tipo Th1 seria vantajosa. As áreas de aplicação são, particularmente, doenças infecciosas, cancro, asma e alergias. Embora o tratamento de doenças virais,

tais como hepatite B e C, citomegalovirus (CMV), papiloma vírus, VIH e vírus Herpes simplex (HSV) são de particular interesse, os compostos da presente invenção podem ser utilizados para tratar a maioria das doenças causadas por quaisquer patógenos, incluindo *Leishmania*, *Listeria* e Carbúnculo. Além da indução da secreção de IFN-alfa e IFN-gama, o novo ODN pode ser utilizado como adjuvantes de vacinas, quando uma resposta imune Th1 é necessária. Os compostos da presente invenção podem ser utilizados para a profilaxia e terapia, quer como uma terapia isolada ou em combinação com outros agentes terapêuticos ou dispositivos médicos.

Até agora, não têm sido descritas composições que resolvam de forma diferenciada a formação de agregados ou duplicados de oligonucleótidos com sequências de bases complementares. As espécies químicas descritas anteriormente para a prevenção da formação de agregados foram limitadas a monossacarídeos e poliálcoois. Nenhuma combinação de mais de um aditivo químico de uma ou mais do que uma espécie química tem sido descrita para a prevenção da formação de agregados ou duplicados de oligonucleótidos. Os exemplos seguintes ilustram novos oligonucleótidos e formulações de oligonucleótidos.

Materiais e Métodos

Oligodesoxinucleótidos (ODNs)

Todos os ODNs foram comprados em Biospring (Frankfurt, Alemanha) ou Sigma-Ark (Darmstadt, Alemanha), e foram controlados quanto a identidade e pureza por Coley Pharmaceutical GmbH (Langenfeld, Alemanha). Os ODNs foram dissolvidos em Tris-EDTA 0,5 x (5 mM de Base Tris, 0,5 mM de EDTA, pH 8,0) e armazenados a -20 °C. Para a incubação de células, os ODNs foram diluídos em solução salina tamponada com fosfato (Sigma, Alemanha). Todas as diluições foram realizadas utilizando reagentes isentos de pirogênios.

Purificação celular

Preparações da camada leucocitária sanguínea periférica de doadores humanos saudáveis do sexo masculino e feminino foram obtidos a partir do Banco de Sangue da Universidade de Düsseldorf (Alemanha) e a partir destas, as células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram purificadas por centrifugação sobre Ficoll®-Hypaque (Sigma). As PBMC purificadas foram usadas quer frescas (para a maioria dos ensaios) ou foram suspensas em meio de congelamento e armazenadas a -70 °C. Quando necessário, alíquotas destas células foram descongeladas, lavadas e ressuspensas em meio de cultura RPMI 1640 (BioWhittaker, Bélgica) suplementado com 5% (v/v) de soro AB humano inativado pelo calor (BioWhittaker, Bélgica) ou 10% (v/v) de FCS inativado pelo calor, 2 mM de L-glutamina (BioWhittaker), 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina (Invitrogen (Karlsruhe, Alemanha)).

Indução de citocinas em PBMC

As células mononucleares de sangue periférico humano foram incubadas com CpG ODN durante 48 horas a concentrações indicadas. A secreção de IFN-α por PBMC humanas foi medida.

Deteção de citocinas

PBMC frescas foram semeadas em placas de 96 poços de fundo redondo de 5×10^6 / ml, e incubadas com as concentrações de ODN como indicado numa incubadora humidificada a 37 °C. Os sobrenadantes da cultura foram recolhidos e, se não fossem usado imediatamente, congelado a -20 °C até serem necessárias. As quantidades de citocinas nos sobrenadantes foram avaliadas utilizando kits de ELISA comercialmente disponíveis ou em casa ELISA desenvolvido utilizando anticorpos disponíveis comercialmente.

Cromatografia de Exclusão por Tamanho (SEC)

Foi realizada cromatografia por exclusão de tamanho

(SEC) utilizando uma coluna Superdex® 75 10/300 (# 17-5174-01; GE Healthcare, Munique, Alemanha) a uma Taxa de fluxo de 0,4-1 ml/min. Tampão de amostra e tampão de corrida foram idênticos. O tampão consistia de tampão fosfato 10 mM (pH 7,5) suplementado com cloreto de sódio 20 mM e a percentagem indicada (p/p) de aditivo químico. A cromatografia foi realizada à temperatura ambiente.

Todos os ODN-teste foram injetados em concentrações de 1 mg/mL a 30 mg/mL em tampão da respectiva execução. Antes da administração ao HPLC, as amostras foram aquecidas a 95 °C durante 5 minutos e deixada a arrefecer até à temperatura ambiente. Isto foi realizado para permitir condições de incubação semelhantes para as amostras antes da cromatografia. O volume de injeção foi de 0,1-5 µl, dependendo da concentração da amostra.

Um padrão de referência foi utilizado para determinar os tempos de execução de monómeros de diferentes comprimentos. A ODN dímero-formação foi utilizada para determinar o tempo de execução de um ODN-dímero. Para cada condição de tampão, os tempos de funcionamento obtidas com o padrão ODN foram comparados com os tempos de execução do teste-ODN e os valores percentuais de teste-ODN-monómero e teste-ODN-dímero foram calculadas pela área sob as curvas de integrações.

Não foram observados agregados nas condições investigadas para estes tampões, exceto que a dextrose não mostrou agregados inferiores a 10 mg/mL.

As análises SEC das frações foram realizadas utilizando uma série Bomba Binária 1100 (G1312A), 1100 Series Sampler Bem-Plate (G1367A), 1100 Series Micro Vacuum-Degasser (G1379A) e um 1100 Series MWD (G1365B) (todos os instrumentos fabricados pela Agilent Technologies, Boeblingen, Alemanha) ou utilizando um sistema de HPLC Beckman (Sistema Solvente Gold® 126 Módulo, Sistema Gold® 508 Amostrador automático, e Detetor de

Sistema Gold® 168, fabricado por BeckmanCoulter GmbH, Krefeld, Alemanha).

A análise dos dados foi realizada através da integração das OD 260 sinais resultantes usando o software do aparelho.

Condições cromatográficas :	
Coluna:	10/300 Superdex 75
Temp. de Coluna:	25 °C
Temp. de autoamostrador:	25 °C
Fase móvel:	10 mM tampão fosfato pH 7,5; 20 mM de NaCl + aditivo
Deteção do comprimento de onda:	260 nm
Caudal:	0,4 - 1 ml / min
Volume de Injeção:	0,1-5 mL
Tempo de execução:	45 minutos

Gradiente :			
Tempo	Fluxo	% A	% B
Inicial	0,7-1	100	0
45 min	0,7-1	100	0

Deteção de citocinas no Plasma

Ratinhos BALB / c (n = 5) foram injetados por via subcutânea (SC) ou intravenosa (IV) com a concentração indicada de ODN ou 100 µl de PBS. As amostras de plasma foram recolhidas às 3 horas após a injeção e utilizado para o ensaio de citocina/quimiocina por ELISA.

Estudos de Vacina

Ratinhos fêmea BALB / c (n = 10 / gp) foram imunizados com HBsAg (1 µg) sozinho ou com ODN (10 µg). Os animais foram sangrados em 4 semanas pós-imunização e HBsAg títulos totais específicos IgG foram determinados pelo ponto final ELISA.

Para a comparação de diferentes vias de injeção ODN (5 mg/mL) em PBS ou solução de dextrose a 5% tamponado foram aquecidos a 95 °C durante 5 minutos e, em seguida,

arrefecida até à temperatura ambiente. Ratinhos BALB/c (n = 5/po) foram injetados IV com 500 µg de ODN, sangrados a 3 horas e injeções de plasma testadas para o IFN-alfa.

Quadro 2: Exemplos de oligonucleótidos

Sequência	Tipo de Oligo	SEQ. ID Nº
T*C*C*A*G*G*A*C*T*T*C*T*C*T*C*A*G*G*T*T	Controlo não-CpG	SEQ. ID Nº 12
T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T	Classe B	SEQ. ID Nº 336
5'T*C*C*T*G*G*C*G*G*G*G*A*A*G*T3'	Classe S	SEQ. ID Nº 337
T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*G*A*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T:	Classe B	SEQ. ID Nº 338
*G*C*T*G*C*T*T*T*T*G*T*G*C*T*T*T*T*G*T*G*C*T*T	Controlo não-CpG	SEQ. ID Nº 339
G*G*G-G-A-C-G-A-C-G-T-C-G-T-G-G*G*G*G*G*G:	Classe A	SEQ. ID Nº 340
T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*G*C*C*G*C*C*G	Classe C	SEQ. ID Nº 341
T*C*G*C*G*A*C*G*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G*C*C*G	Classe C	SEQ. ID Nº 342
T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T*C*G*G*T*T*T*T*T*C*G*T*T*T*T	Classe B	SEQ. ID Nº 343
5'T*C-G-A-C-G-T-C-G-7-G-G*G*G*G 3'	Classe A	SEQ. ID Nº 344
T*C*G*T*C-G*T*T*T*T*A*C-G*G*C*G*C*C-G*T*G*C*C*G	Classe C	SEQ. ID Nº 345
T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*A*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G	Classe C	SEQ. ID Nº 346
T*C-G*C-G*A*C-G*T*T*C-G*G*C*G*C-G*C*G*C*C*G	Classe P	SEQ. ID Nº 133
T*T*T*C_G*T*C_G*T*T*T*C_G*T*C_G*T*T	Classe B	SEQ. ID Nº 347

T*C-G*T*C-G*A*C-G*T*T*C-G*G*C*G*C-G*G*C*G*C*G	Classe P	SEQ. ID N° 220
T*C-G*T*C-G*T*C-G*T*T*C-G*G*C*G*C-G*G*C*G*C*G		SEQ. ID N° 348
T*C-G*A*C-G*T*T*C-G*G*C*G*C*G		SEQ. ID N° 230
T'C-G'T'C-G'A'C-G'T'T'C-G'G'C-G"C'C'G	Classe P	SEQ. ID N° 231
T*C-G*T*C-G*A*C-G*A*T*C-G*G*C*G*C-G*G*C*G*C*G	Classe P	SEQ. ID N° 234
T*C-G*T*C-G*A*C-G*T*T*C-G*G*C*G*C-C-G*T*G*C*G	Classe P	SEQ. ID N° 237
T*C-G*T*C-G*A*C-G*T*T*C-G*A*C*T*C-G*A*G*T*C*G	Classe P	SEQ. ID N° 238
T*C-G*T*C-G*A*C-G*A*T*C-G*G*C*G*C*C-G*T*G*C*G	Classe P	SEQ. ID N° 245
T*C-G*T*C-G*A*C-G*A*C-G*G*C*G*C*C-G*T*G*C*G	Classe P	SEQ. ID N° 246
T*C-G*T*C-G*A*C-G*A*C-G*C*G*C*C-G*T*G*C*G	Classe P	SEQ. ID N° 247
T*C*G*T*C*G*A*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*C*G*T*G*C*G	Classe P	SEQ. ID N° 248
T*C*G*T*C-G*A*C-G*A*T*C-G*G*C*G*C*C-G*T*G*C*G	Classe P	SEQ. ID N° 249
T*C*G*T*C-G*A*C*G*A*T-C-G*G*C*G*C*C-G*T*G*C*G	Classe P	SEQ. ID N° 250
T*C-G*T*C*G*A*C*G*A-T-C*G*G*C*G*C*G*T*G*C*G	Classe P	SEQ. ID N° 251
T*C*G*T*C-G*A*C-G*A*T*C-G*G*C*G*C-G*G*C*G*C*G	Classe P	SEQ. ID N° 252
T*C*G*T*C-G*A*C*G*A*T*C-G*G*C*G*C-G*G*C*G*C*G	Classe P	SEQ. ID N° 253
T*C*G*T*C*G*A*C*G*A-T-C*G*G*C*G*C*G*G*C*G	Classe P	SEQ. ID N° 254

T*C*G*A*C-G*T*C*G*A*C*G*T- G*A*C*G*T*T	Classe C	SEQ. ID N° 257
---	----------	-------------------

Exemplo 1: indução de IFN- α por oligonucleótidos CpG de classe P (duplo palindrômicos) em PBMC humano

ODN duplos palindrômicos foram observados para ser mais potentes indutores de IFN- α do que Classe ODN C- nos estudos realizados. A Figura 1 mostra os gráficos que ilustram a indução de IFN- α com vários ODN, incluindo B, C e P-classes, bem como os controles não-CpG. Na classe P-ODN, em alguns casos, bases a 5' faziam parte da região palindrômica, como em SEQ. ID N° 234; no entanto, a 5' de base ou bases não tem que fazer parte da região 5' palindrômica, como em SEQ. ID N° 220. O ODN atividade mantida quando o espaçador entre palíndromos era tão curto quanto um nucleótido. Por exemplo, o er SPAC na SEQ. ID N° 234 é 'T'. D-espaçadores e espaçadores não-nucleótidos também foram eficazes.

Os ODN eram mais eficazes quando o comprimento da região palindrômica 3' foi pelo menos 10 nucleótidos. O palíndromo 3' poderia conter emparelhamentos de bases A / T e ainda ser eficaz. A Figura 2 apresenta gráficos que ilustram a indução de IFN- α com vários ODN de classe P. Além disso, os ODN com um palíndromo região imperfeita / contendo complementaridade foram capazes de induzir IFN- α desde que fossem suficientemente longos. Nas experiências realizadas, tais ODN eram eficazes se a região contendo complementaridade tivesse 10 nucleótidos ou mais, como na SEQ. ID N° 247 (Figura 3).

Exemplo 2: ODN CpG de classe P induziu a produção de citocina e quimiocina plasma superior aos de classe C convencionais.

ODN de Classe C Convencional, tais como SEQ. ID N° 341 foram mostrados para estimular a Th1 como citocinas e quimiocinas respostas *in vivo* em ratinhos. Comparação de

IL-12 e IP-10 no plasma após aplicação subcutânea (SC) revelou uma IL-12 e resposta IP-10 dependente de dose para a P-Classe CpG ODN SEQ ID NOs: 234 e 237, que foi significativamente maior em comparação com SEQ. ID N° 341 (Figura 4). Não CpG controlar SEQ. ID N° 339 não induziu a produção de citocina ou quimiocina.

Exemplo 3: ODN CpG de classe P mais forte a estimular a produção de IFN- α mediante administração *in vivo* .

Como demonstrado no Exemplo 1, ODN de classe P- de CpG produziu a mais alta produção de IFN- α por estimulação de PBMC humano quando comparado com outras classes de CpG ODN tais como o B-C- e classes. Uma observação semelhante foi feita quando CpG ODN de diferentes classes foram injetadas em ratinhos e os níveis plasmáticos de IFN- α foram medidos. Em comparação com as outras classes (SEQ. ID N° 344: A-Classe; SEQ ID NOs: 336, 347, 343: B-Classe; SEQ ID NOs: 346, 257: Classe C) P-ODN classe estimulou o IFN forte produção - α sobre SC, bem como por via intravenosa (IV) administração (Figura 5). Não CpG controle SEQ. ID N° 339 não induziu a produção de IFN- α .

Exemplo 4: ODN CpG de classe P estimulam fortes respostas imunes adaptativas.

ODN CpG estimulam as respostas imune inata e adaptativa. ODN de classe P de SEQ. ID N°s 234 e 237 estimularam fortes respostas de anticorpo (Ab) quando adicionados a HbsAg, com classe P de SEQ. ID N° 234 a estimularem as respostas mais fortes quando comparada com Ab das classes C e A (Figura 6). A resposta Ab era ainda semelhante ao ODN de classe B que são conhecidos por estimular mais fortes respostas Ab *in vivo* .

Exemplo 5: Formação de concatêmero e formulação de ODN CpG de classe P

Na concepção do sistema de duplo palíndromo P-ODN CpG classe, o comprimento das duas palíndromos e o teor de GC foram determinantes importantes de atividade

biológica. Destruição de qualquer palíndromo foi encontrada para reduzir a atividade biológica do ODN. Comprimentos entre 10 e 16 bases apresentaram a maior atividade biológica, embora ODN entre 8 e 20 ou mesmo 4 e 30 bases de comprimento mostrou atividade. Em alguns casos palíndromos ter, pelo menos, 50% de teor de GC, mais preferido pelo menos 70%, e o mais preferido 100%. No entanto, palíndromos com 0-49% de conteúdo GC também podem ser eficazes, especialmente se houver base de açúcar ou modificações ou alterações para uma ou mais ligações internucleotídicas que estabilizam a formação de dímero. A Figura 7 mostra um exemplo de um ODN Classe P que forma concatâmero de duplo-palíndromo (SEQ. ID N° 234).

Formulação do ODN imunoestimulante pode afetar a extensão da formação de concatâmero. Formulação do ODN imunoestimulador em 5% de dextrose evitada a formação de concatâmeros no produto farmacológico final, o que simplificará o processo de desenvolvimento de drogas, enquanto ainda assim, a absorção de células e formação de estruturas concatâmero com atividade biológica completa dentro de células do sistema imunológico. Embora as formulações que evitem a formação de estruturas ordenadas maior no produto em frasco tenham certas vantagens práticas, o ODN pode ser dada em qualquer formulação farmacológica.

A SEQ. ID N° 234, que contém duas regiões palindrômicas, é descrita para mostrar elevada de IFN- α atividade de indução; no entanto, cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) revelou a presença de grandes agregados em solução de PBS, impedindo caracterização exata da molécula nesta solução. Substituindo o cloreto de sódio ou outros sais de tampão com uma variedade de produtos químicos pode impedir a agregação de esta e outras moléculas. 5% (p/v) de solução de dextrose em água é uma solução de aceitação clínica, e serviu como um ponto de

partida para a análise. Para reduzir o teor de sal, mas em grande parte a manter a força osmótica, 130 mM de NaCl em solução de PBS foi substituída com 5% (p/p) de espécies químicas tão diferentes como açúcares, álcoois e ácidos aminados.

A Figura 8 mostra a formação de duplex por SEQ. ID N° 234 em várias soluções a 5% tal como medido por cromatografia de exclusão (SEC). Surpreendentemente, a formação de duplex por alguns tipos de palíndromos foi impedida, enquanto que a formação de duplex por outros foi mantida. Através da realização de SEC nos respetivos tampões, a prevenção da formação de cadeia dupla na palíndromo rica em AT em SEQ. ID N° 234 e foi observado 237, bem como uma desestabilização da cadeia dupla no palíndromo rico em GC de N°s 234 e 341. Concluiu-se que, para as moléculas que contêm dois ou mais regiões de formação duplex com estabilidade significativamente diferente duplex, formação do duplex com estabilidade mais baixa pode ser impedida, enquanto a formação de cadeias duplas de alta estabilidade foi mantida nestas soluções. Esta observação defendeu redução estabilidade duplex como o principal efeito responsável por esse fenômeno. Na Figura 8 as barras representam valores de% de área de pico para o pico de dímero. A percentagem de ODN monomérico pode ser calculada usando a fórmula: $100 - (\% \text{ da área do pico de dímero})$. Não se observaram agregados para estes tampões.

O Quadro 3 mostra dados que demonstram que a SEQ. ID N° 234 mostrando a prevenção da formação do duplex com menor estabilidade tanto em tampão de tampão de glicina e de dextrose, mas não em 1XPBS. Tampão de dextrose: Dextrose a 5%, 20 mM de NaCl, 10 mM tampão fosfato pH ~ 7,2. Tampão de glicina: 5% de glicina, 20 mM de NaCl, 10 mM tampão fosfato pH ~ 7,2. Concentração ODN era 5×10^{-6} M (0,04 mg/mL). Comprimento de onda (1): 260 nm. A gama de

temperaturas foi de 20 °C a 90 °C *. As temperaturas de fusão para Tm1 de Dextrose e tampões de glicina foram abaixo de 25 °C e não puderam ser determinadas utilizando o intervalo de temperatura experimental.

Quadro 3

	1xPBS		Tampão Dextrose		Tampão Glicina		
	Tm1	Tm 1	Tm 2	Tm 1	Tm 2	Tm 1	Tm2
Seq. 234	33,9	°C	65,7	°C	*)	53,6	°C

Os ensaios indicam que este efeito não se deveu apenas à redução do cloreto de sódio, mas pelo menos algumas das espécies químicas testadas (isto é, sacarídeos (dextrose; frutose); dissacarídeos (lactose); monoálcoois (etanol; isopropanol); dióis (propanodiol); poliálcoois (glicerol, manitol, sorbitol) e aminoácidos (isoleucina; glicina; treonina) causaram uma redução adicional na estabilidade do duplex. A isoleucina, em particular, reduziu a formação de duplex de baixo ponto de fusão em concentrações tão baixas como 1%. p/p. Este efeito pode ser ainda mais melhorado através da combinação de adição de uma baixa percentagem de isoleucina com outros aditivos químicos das espécies descritas. Outros aminoácidos com cadeias laterais hidrofóbicas devem ser igualmente eficazes, tais como por exemplo, valina, leucina, fenilalanina, pralina, tirosina e triptofano, ou aminoácidos com cadeias laterais carregadas, tais como o glutamato, o aspartato, e lisina.

Os efeitos inesperados descritos acima permitiram a resolução de formação de agregados de oligonucleótidos formadores de duplexs, resultando em propriedades de soluções homogêneas. Surpreendentemente, os ODN CpG investigados mantiveram a sua atividade de estimulação imunológica quando aplicado com as novas formulações. Isto permite que as moléculas que contêm dois ou mais regiões de formação duplex com estabilidade semelhante duplex a ser formuladas de modo a suprimir completamente a hibridação,

resultando em soluções de dosagem do medicamento em que o oligonucleótido está presente na sua forma monomérica. Além disso, a formação de L-tétrade de oligonucleótidos foi diminuída pelo novo tipo de formulação. Usando a formulação aqui descrita, as soluções de dosagem homogêneas têm sido observados para oligonucleótidos contendo L-tétrade formando sequências, tais como para CpG de Classe A SEQ. ID N° 344 ou CpG de classe S SEQ. ID N° 337, que também contém um palíndromo, indicando que as composições contendo uma ou mais das espécies químicas acima mencionadas podem ser utilizadas para impedir a formação de agregados para estas extensões de base.

Exemplo 6: ODN de classe P formulados em 5% dextrose que evitam a formação de concatâmeros dentro do produto do fármaco final estimulam as respostas mais fortes de citocina tipo Th1 e quimiocina com indução SC e IV.

Existem diferenças entre a estimulação de citocinas tipo Th1 na administração *in vivo* através de diferentes vias. Por exemplo, ODN de classe A, tais como as SEQ. ID N° 344 e 340 estimularam IFN- α significativo no plasma apenas no momento da administração IV, ao passo que os níveis de IFN- α foram baixos ou próximos do fundo no momento da injeção SC. Em contraste, os ODN da classe P estimularam os níveis mais altos de IFN- α no momento da administração por ambas as vias, IV e SC (Figura 9). Além disso, a formulação de ODN de classe P da SEQ. ID N° 234 em 5% dextrose estimulou uma resposta de IFN- α mais forte comparada com a formulação em PBS no momento da injeção IV.

Exemplo 7. ODN de classe P com um ligante entre o domínio de ativação TLR e a região formadora de duplex podem estimular a secreção aumentada de INF- α .

Para determinar o efeito de vários ligantes na atividade estimulante imune dos ODN de classe P, um espaçador abásico (D-espaçador), 1,3-propano-diol, hexaetilenoglicol foram incorporados em ODN de classe P da

SEQ. ID N° 243. PBMC foram incubados com o ODN a concentrações entre 0,1 μ M e 1 μ M durante 48 horas e um ensaio ELISA foi realizado nos sobrenadantes. A inclusão de hexaetilenoglicol resultou numa ligeira diminuição da potência (Figura 10). A inclusão de 1,2-propano-diol ou um espaçador abásico conduziu a uma ligeira diminuição na potência mas a um aumento na produção de IFN- α sobre CpG não controlo (SEQ. ID N° 343), classe A (SEQ. ID N° 340 e 341) e classe C (SEQ. ID N° 343), conforme medido por um aumento na produção de IFN- α (Figura 10a). Todas as modificações resultaram numa diminuição da produção de IL-10 (Figura 10b) e IL-6 (Figura 10c).

Exemplo 8. ODN de classe P com modificação 2'-O-metilo estimulam secreção de IFN- α aumentada

Modificações de ribose e desoxirribose nos oligonucleótidos podem influenciar a atividade do oligonucleótido. Para determinar o efeito de resíduos de açúcar modificados na atividade de ODN de classe P, foram adicionados grupos O-etilo à posição 2' das frações de açúcar em vários locais na sequência (ver Quadro 1). PBMCs humanos foram incubados com o ODN durante 48 horas a concentrações de ODN que oscilaram entre 0,01 e 1 μ M. Os sobrenadantes foram analisados por ELISA. Conforme mostrado na Figura 11, todos os ODN modificados (SEQs. ID N°s 344-347) mostraram uma ligeira diminuição na potência, mas uma indução elevada de produção de IFN- α comparada com um controlo não modificado da mesma sequência base (SEQ. ID N° 234).

LISTA DE SEQUÊNCIAS

<110> Coley Pharmaceutical Group, Inc. Coley
Pharmaceutical Group, GmbH

<120> Composições e métodos para formulações de
oligonucleótidos

<130> C1041.70046W000

<140> Por atribuir

<141> 15-02-2007

<150> 60/773.505 <151> 15-02-2006

<150> 60/858.240 <151> 09-11-2006

<160> 348

<170> PatentIn versão 3.3

<210> 1

<211> 27

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 1

tcgtcgacga ttttacgacg tcgtttt 27

<210> 2

<211> 27

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 2

tcgtcgacga ttttacgacg tcgtttt 27

<210> 3
<211> 20
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 3
tcgtcgacga acgacgtcgt 20

<210> 4
<211> 27
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 4
tcgtcgacga tttttcgtcg acgattt 27

<210> 5
<211> 27
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 5
tcgtcgacga tttttcgtcg acgattt 27

<210> 6

<211> 20
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 6
tcgtcgacga tcgtcgacga 20

<210> 7
<211> 20
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 7
cgcgcgcgcg cgcgcgcgcg 20

<210> 8
<211> 20
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 8
gagaacgctc gaccttcgat 20

<210> 9
<211> 19
<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 9

agctccatgg tgctcactg 19

<210> 10

<211> 18

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 10

tctcccagcg tgcgccat 18

<210> 11

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 11

tccatgacgt tcctgacgtt 20

<210> 12

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 12

tccaggactt ctctcaggtt 20

<210> 13

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 13

tccacgacgt tttcgacgtt 20

<210> 14

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 14

tcgtcgtttt gacgttttga cggt 24

<210> 15

<211> 22

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 15
 tcctgacggt cggcgcgcgc cc 22

 <210> 16
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 16
 tcgctgcgt tttgtcggtt tgacgtt 27

 <210> 17
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 17
 tcgacggtt cggcgcgcgc cg 22

 <210> 18
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 18

ccggccggcc ggccggccgg 20

<210> 19

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 19

cgcgcgcgcg cgcgcgcgcg 20

<210> 20

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 20

tccaggactt ctctcaggtt tttt 24

<210> 21

<211> 21

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 21

gtgctcgagg atgcgcttcg c 21

<210> 22

<211> 21

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 22

gccgaggtcc atgtcgtacg c 21

<210> 23

<211> 27

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 23

tcgcgtgcgt tttgtcgttt tgacgtt 27

<210> 24

<211> 30

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 24

accgataccg gtgccggtga cggcaccacg 30

<210> 25

<211> 30

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 25

accgataacg ttgccggtga cggcaccacg 30

<210> 26

<211> 30

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 26

accgatgacg tcgccggtga cggcaccacg 30

<210> 27

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 27

cggcgcgcgc cgcggcgcgc gccg 24

<210> 28

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 28

tcgatcggttt ttcgtgcgtt ttt 23

<210> 29

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 29

tcgtccagga cttctctcag gtt 23

<210> 30

<211> 26

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 30

tcgtcgtcca ggacttctct caggtt 26

<210> 31

<211> 22

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 31

tcgtgacggg cggcgcgcg c c 22

<210> 32

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> n é a, c, g o t

<400> 32

acgacgtcgt ncggcggccg ccg 23

<210> 33

<211> 27

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 33

ggggacgacg tcgtgcggcg gccgccg 27

<210> 34

<211> 27

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 34

ggggacgacg tcgtgcggcg gccgccg 27

<210> 35

<211> 29

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 35

ccacgacgtc gtcgaagacg acgtcgtgg 29

<210> 36

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 36

ctgcagctgc agctgcagct gcag 24

<210> 37

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 37

cggccgctgc agcggccgct gcag 24

<210> 38

<211> 18

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 38

catgacgttt ttgatgtt 18

<210> 39

<211> 17

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 39

atgacgtttt tgatgtt 17

<210> 40

<211> 16

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 40

tgacgttttt gatgtt 16

<210> 41

<211> 19

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 41

atgacgtttt tgatgttgt 19

<210> 42

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 42

tccatgacgt ttttgatgtt 20

<210> 43

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 43

tccatgacgt ttttgatggt 20

<210> 44

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 44

tccatgacgt ttttgatggt 20

<210> 45

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 45

tccatgacgt ttttgatggt 20

<210> 46

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 46

tccatgacgt ttttgatggt 20

<210> 47
<211> 19
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 47
atgacgtttt tgatgttgt 19

<210> 48
<211> 19
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 48
atgacgtttt tgatgttgt 19

<210> 49
<211> 19
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 49
atgacgtttt tgatgttgt 19

<210> 50
<211> 19

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 50

atgacgtttt tgatgttgt 19

<210> 51

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 51

tccatgcgtt tttgaatgtt 20

<210> 52

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 52

tccatgacgt ctttgatgtc 20

<210> 53

<211> 21

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 53

acgacgtcgt tccgacgtcg t 21

<210> 54

<211> 27

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (25)..(27)

<223> onde n é espaçador d

<400> 54

acgacgtcgt ggccacgacg tcgtnnn 27

<210> 55

<211> 27

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (11)..(14)

<223> onde n é espaçador d

<220>

<221> misc_feature

<222> (25)..(27)

<223> onde n é espaçador d

<400> 55

acgacgtcgt nnnnacgacg tcgtnnn 27

<210> 56

<211> 30

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> onde n é espaçador d

<220>

<221> misc_feature

<222> (14)..(17)

<223> onde n é espaçador d

<220>

<221> misc_feature

<222> (28)..(30)

<223> onde n é espaçador d

<400> 56

nnnacgacgt cgtnnnnacg acgtcgtnnn 30

<210> 57
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(3)
 <223> onde n é espaçador d

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(17)
 <223> onde n é espaçador d

<400> 57
 nnnacgacgt cgtnnnnacg acgtcgt 27

<210> 58
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 58
 gggacgacgt cgtggccacg acgtcgtccc 30

<210> 59
 <211> 16
 <212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 59

cccacgacgt cgtggg 16

<210> 60

<211> 18

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 60

ccccacgacg tcgtgggg 18

<210> 61

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 61

tcgatcgttt ttcgtgcgtt ttt 23

<210> 62

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 62

tcgatcgttt ttcgtgcggtt ttt 23

<210> 63

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 63

tcgatcgttt ttcgtgcggtt ttt 23

<210> 64

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 64

tcgatcgttt ttcgtgcggtt ttt 23

<210> 65

<211> 17

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 65
atgacgtttt tgacgtt 17

<210> 66
<211> 17
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 66
acgacgtttt tgatgtt 17

<210> 67
<211> 17
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 67
acgacgtttt cgacgtt 17

<210> 68
<211> 17
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 68

atgatgtttt tgatggt 17

<210> 69

<211> 16

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 69

atgacgtttt gatggt 16

<210> 70

<211> 17

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 70

atgacgtttg tgatggt 17

<210> 71

<211> 17

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 71

ttgacgtttt tgatggt 17

<210> 72
<211> 17
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 72
atgatgtttt tgatggt 17

<210> 73
<211> 17
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 73
atgagctttt gtatggt 17

<210> 74
<211> 22
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 74
tcgacgtttt cggcggccgc cg 22

<210> 75
<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 75

tcctgacgtt ttcggcggcc gccg 24

<210> 76

<211> 22

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 76

tcctgacgtt cggcggccgc cg 22

<210> 77

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 77

tccatgacgt tcggcgcgcg ccc 23

<210> 78

<211> 21

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 78

tcctgacgtt cggcgcgcgc c 21

<210> 79

<211> 22

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 79

tcgacgtttt cggcgcgcgc cg 22

<210> 80

<211> 22

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 80

tcgacgtttt cggcggcgc cg 22

<210> 81

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 81

tcgacgtcga cgtaggggtt aggg 24

<210> 82

<211> 21

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 82

acgacgtcgt tagggtagg g 21

<210> 83

<211> 12

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 83

gtcggcgttg ac 12

<210> 84

<211> 25

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(16)
 <223> onde n é espaçador d

<400> 84
 acgacgtcgt cgnnnncggc cgccg 25

<210> 85
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(16)
 <223> onde n é espaçador d

<400> 85
 acgacgtcgt cgnnnncggc cgccg 25

<210> 86
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 86
 tcgtcgacga cgtcgtcg 18

<210> 87
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(22)
 <223> onde n é espaçador d

<400> 87
 tcgtcgacga cgtcgtcgnn nn 22

<210> 88
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 88
 acgacgtcgt ttttacgacg tcgt 24

<210> 89
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(14)
 <223> onde n é espaçador d

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (25)..(27)
 <223> onde n é espaçador d

<400> 89
 acgacgtcgt nnnnacgacg tcgtnnn 27

<210> 90
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(3)
 <223> onde n é espaçador d

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(17)
 <223> onde n é espaçador d

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (28)..(30)
 <223> onde n é espaçador d

<400> 90
nnnacgacgt cgtnnnnacg acgtcgtnnn 30

<210> 91
<211> 27
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(27)
<223> onde n é espaçador d

<400> 91
acgacgtcgt ttttacgacg tcgtnnn 27

<210> 92
<211> 27
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 92
acgacgtcgt ttttacgacg tcgtttt 27

<210> 93
<211> 27
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 93

acgacgtcgt ttttacgacg tcgtttt 27

<210> 94

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 94

acgacgtcgt ttttacgacg tcgt 24

<210> 95

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (11)..(14)

<223> onde n é espaçador d

<400> 95

acgacgtcgt nnnnacgacg tcgt 24

<210> 96

<211> 20
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 96
acgacgtcgt acgacgtcgt 20

<210> 97
<211> 20
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 97
acgacgtcgt acgacgtcgt 20

<210> 98
<211> 25
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(12)
<223> onde n é espaçador d

<220>

<221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> n é a, c, g o t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(25)
 <223> onde n é espaçador d

<400> 98
 cgacgtcgtn nnnacgacgt cgnnn 25

<210> 99
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(12)
 <223> onde n é espaçador d

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> n é a, c, g o t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(25)
 <223> onde n é espaçador d

<400> 99
acgacgtcgn nncgacgtc gtann 25

<210> 100
<211> 23
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(11)
<223> onde n é espaçador d

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> n é a, c, g o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(23)
<223> onde n é espaçador d

<400> 100
cgacgtcgann nncgacgtcg ann 23

<210> 101
<211> 27
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (11)..(14)

<220>

<221> misc_feature

<222> (11)..(14)

<223> n é a, c, g o t

<220>

<221> misc_feature

<222> (25)..(27)

<220>

<221> misc_feature

<222> (25)..(27)

<223> n é a, c, g o t

<400> 101

tcgacgtcgt nnnnacgacg tcgannn

27

<210> 102

<211> 27

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (11)..(14)

<223> onde n é espaçador d

<220>

<221> misc_feature

<222> (25)..(27)

<223> onde n é espaçador d

<400> 102

acgtcgtcgt nnnnacgacg acgtnnn 27

<210> 103

<211> 27

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (11)..(14)

<223> onde n é espaçador d

<220>

<221> misc_feature

<222> (25)..(27)

<223> onde n é espaçador d

<400> 103

tcgtcgacgt nnnnacgtcg acgannn 27

<210> 104

<211> 27

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(14)
 <223> onde n é espaçador d

<220>
 <221> misc_feature 25
 <222> (25)..(27)
 <223> onde n é espaçador d

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (25)..(27)
 <223> n é a, c, g o t

<400> 104
 tcgacgtcgt nnnnacgacg tcgtnnn 27

<210> 105
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(14)
 <223> onde n é espaçador d

<220>

<221> misc_feature
 <222> (25)..(27)
 <223> onde n é espaçador d

<400> 105
 acgacgtcgt nnnnacgtcg tcgtnnn 27

<210> 106
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(12)
 <223> onde n é espaçador d

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(23)
 <223> onde n é espaçador d

<400> 106
 acgacgttnn nnaacgtcgt nnn 23

<210> 107
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(11)
 <223> onde n é espaçador d

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(21)
 <223> onde n é espaçador d

<400> 107
 acgtcgtnnn nacgacgtnn n 21

<210> 108
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(12)
 <223> onde n é espaçador d

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(23)
 <223> onde n é espaçador d

<400> 108
 ggcggccggn nncggccgcc nnn 23

<210> 109
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(12)
 <223> onde n é espaçador d

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(23)
 <223> onde n é espaçador d

<400> 109
 gcggccggnn ncccgccgc nnn 23

<210> 110
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(11)
 <223> onde n é espaçador d

<220>

<221> misc_feature
 <222> (22)..(24)
 <223> onde n é espaçador d

<400> 110
 acgtcgtnnn nacgacgtcg tnnn 24

<210> 111
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> onde n é espaçador d

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(15)
 <223> onde n é espaçador d

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> onde n é espaçador d

<400> 111
 nacgacgtcg tnnnnacgac gtcgtn 26

<210> 112
 <211> 28

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (26)..(27)

<223> onde n é espaçador d

<400> 112

acgacgtcgt cgaagacgac gtcgtnt 28

<210> 113

<211> 28

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (26)..(27)

<223> onde n é espaçador d

<400> 113

tcgacgtcgt cgaagacgac gtcgtnt 28

<210> 114

<211> 29

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 114

ccacgacgtc gtcgaagacg acgtcgtgg 29

<210> 115

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> onde n é espaçador d

<400> 115

tccangacgt ttttgatggt 20

<210> 116

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 116

tccatgacgt tdttgatggt 20

<210> 117

<211> 19

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 117

tccagacggt tttgatggt 19

<210> 118

<211> 19

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 118

tccatgacgt tttgatggt 19

<210> 119

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 119

tccatgacgt ttttgatggt 20

<210> 120

<211> 15

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 120

gacgtttttg atgtt 15

<210> 121

<211> 18

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 121

tccagacgtt ttgatgtt 18

<210> 122

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> onde n é espaçador d

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> onde n é espaçador d

<400> 122
tccangacgt tnttgatggt 20

<210> 123
<211> 28
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(14)
<223> onde n é espaçador d

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(28)
<223> onde n é espaçador d

<400> 123
acgacgtcgt nnnnacgacg tcgtnnnu 28

<210> 124
<211> 28
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<220>
<221> misc_feature

<222> (11)..(14)

<223> onde n é espaçador d

<220>

<221> misc_feature

<222> (25)..(27)

<223> onde n é espaçador d

<220>

<221> misc_feature

<222> (28)..(28)

<223> onde g é um ribonucleósido

<400> 124

acgacgtcgt nnnnacgacg tcgtnnng 28

<210> 125

<211> 28

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (11)..(14)

<223> onde n é espaçador d

<220>

<221> misc_feature

<222> (25)..(27)

<223> onde n é espaçador d

<220>

<221> misc_feature
 <222> (28)..(28)
 <223> onde a é um ribonucleósido

<400> 125
 acgacgtcgt nnnnacgacg tcgtnnna 28

<210> 126
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(3)
 <223> onde n é espaçador d

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(17)
 <223> onde n é espaçador d

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (28)..(30)
 <223> onde n é espaçador d

<400> 126
 nnnacgacgt cgtnnnnacg acgtcgtnnn u 31

<210> 127
 <211> 31

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (11)..(14)

<223> onde n é espaçador d

<220>

<221> misc_feature

<222> (25)..(27)

<223> onde n é espaçador d

<220>

<221> misc_feature

<222> (28)..(31)

<223> onde a é um ribonucleósido

<400> 127

acgacgtcgt nnnnacgacg tcgtnnnaaa a 31

<210> 128

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 128

tcgatgacgt tcctgacgtt 20

<210> 129
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(17)
 <223> onde n é espaçador d

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (28)..(30)
 <223> onde n é espaçador d

<400> 129
 tttagcgacgt cgtnnnnacg acgtcgtnnn u 31

<210> 130
 <211> 10
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 130
 tcgacgtcgt 10

<210> 131
 <211> 22
 <212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 131

tcgacgtttt cggcggccgc cg 22

<210> 132

<211> 22

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 132

tcgacgtttt cggcgcgcgc cg 22

<210> 133

<211> 22

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 133

tcgcgacgtt cggcgcgcgc cg 22

<210> 134

<211> 22

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 134

tcgcgacgtt cggcgcgcgc cg 22

<210> 135

<211> 22

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 135

tcgcgacgtt cggcgcgcgc cg 22

<210> 136

<211> 22

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 136

tcgcgacgtt cggcgcgcgc cg 22

<210> 137

<211> 22

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 137
tcgcgacgtt cggcgcgcgc cg 22

<210> 138
<211> 22
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 138
tcgcgacgtt cggcgcgcgc cg 22

<210> 139
<211> 22
<212> ADN
<213> Sequência artificial '

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 139
tcgcgacgtt cggcgcgcgc cg 22

<210> 140
<211> 22
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 140

tcgcgacgtt cggcgcgcg cg 22

<210> 141

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 141

tcgcgacgtt cgcgcgcgcg 20

<210> 142

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> onde n é espaçador d

<400> 142

nccatgacgt ttttgatggt 20

<210> 143

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> onde n é espaçador d

<400> 143

tncatgacgt ttttgatggt 20

<210> 144

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> onde n é espaçador d

<400> 144

tcnatgacgt ttttgatggt 20

<210> 145

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<220>

```

<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> onde n é espaçador d

<400> 145
tccttgacgt ttttgatggt      20

<210> 146
<211> 20
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> onde n é espaçador d

<400> 146
tccatgacgt tttngatggt      20

<210> 147
<211> 20
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> onde n é espaçador d

```

<400> 147

tccatgacgt ttntgatgtt 20

<210> 148

<211> 21

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 148

tcgaacgttc ggcgcgcgcc g 21

<210> 149

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 149

tcgtcgaacg ttcggcgcgc gccg 24

<210> 150

<211> 25

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 150

tcgtcgaacg ttcggcgctg cgccg 25

<210> 151

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 151

tcgcgacgtt cgttgcgcgc gccg 24

<210> 152

<211> 21

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 152

tacgtcgttc ggcgcgcgcc g 21

<210> 153

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 153

ttcgcgacgt tcggcgcgcg ccg 23

<210> 154
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 154
 tcggcgcgcg ccgtcgcgac gt 22

 <210> 155
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 155
 tagcgtgcgt tttgacgttt tttt 24

 <210> 156
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 156
 tagcgagcgt tttgacgttt tttt 24

 <210> 157
 <211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 157

ttgcgagcgt tttgacgttt tttt 24

<210> 158

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 158

atgcgtgcgt tttgacgttt tttt 24

<210> 159

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 159

ttacgtgcgt tttgacgttt tttt 24

<210> 160

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 160

ttgcatgcgt tttgacgttt tttt 24

<210> 161

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 161

ttgcgtacgt tttgacgttt tttt 24

<210> 162

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 162

ttgcgtgcat tttgacgttt tttt 24

<210> 163

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 163

ttgcgtgcga tttgacgttt tttt 24

<210> 164

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 164

ttgcgcgcgt tttgacgttt tttt 24

<210> 165

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 165

ttgcgtgcgc tttgacgttt tttt 24

<210> 166

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 166
 ttgcgtgcgt ttcgacgttt tttt 24

<210> 167
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 167
 tcgtcgaacg ttcggcgctg cgccg 25

<210> 168
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 168
 tcgtcgaacg ttcggcgctg cgccg 25

<210> 169
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 169
 tcgtcgaacg ttcggcgctg cgccg 25

<210> 170

<211> 25

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 170

tcgtcgaacg ttcggcgctg cgccg 25

<210> 171

<211> 25

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 171

tcgtcggacg ttcggcgctg cgccg 25

<210> 172

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 172

tcgcgacggtt cggtgcgcgc gccg 24

<210> 173

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 173

tcgcgacggtt cgttgcgcgc gccg 24

<210> 174

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 174

tcgcgacggtt cgttgcgcgc gccg 24

<210> 175

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 175

tcgcgacggtt ttgcgcgcgc 20

<210> 176

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 176

tcgcgacgtc gttgcgcgcg ccg 23

<210> 177

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 177

tcgcgacggtt cgaagcgcgc gccg 24

<210> 178

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 178

tcgcgacgaa cgttgcgcgc gccg 24

<210> 179

<211> 27

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(14)
<223> onde n é espaçador d

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(27)
<223> onde n é espaçador d

<400> 179
tcgacgtcgt nnnntcgacg tcgtnnn 27

<210> 180
<211> 24
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 180
tcgtcgtttag ctcgtttagct cgtt 24

<210> 181
<211> 24
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 181
tcgtcggttac gtaattacgt cggt 24

<210> 182
<211> 24
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 182
tcgtcggttac gtcgttacgt aatt 24

<210> 183
<211> 24
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 183
tcgtcggttac gtaattacgt aatt 24

<210> 184
<211> 19
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 184
tcgacgtcga cgtgacggg 19

<210> 185
<211> 11
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 185
tcgacgtcgt t 11

<210> 186
<211> 11
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 186
tcgacgtcgt t 11

<210> 187
<211> 12
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 187
tcgacgtcgt tt 12

<210> 188

<211> 24
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 188
 tcgacgtcgt ttttcgacgt cggt 24

 <210> 189
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 189
 tcgacgacgtt cggcgcgctg ccg 23

 <210> 190
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 190
 tcgacgacgtt cggcgcgctcg ccg 23

 <210> 191
 <211> 23
 <212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 191

tcgcgacgtt cggcggctcg ccg 23

<210> 192

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 192

tcgcgacgtt cggcgcgctcg ccg 23

<210> 193

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 193

tcgcgacgtt cggcggctcg ccg 23

<210> 194

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 194

tcgcgacggtt cggcgcgctcg ccg 23

<210> 195

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 195

tcgcgacggtt cggcggctcg ccg 23

<210> 196

<211> 10

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 196

tcgacgctcgt 10

<210> 197

<211> 19

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 197
tcgacgtcga cgtgacggg 19

<210> 198
<211> 19
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 198
tcgacgtcga cgtgacggg 19

<210> 199
<211> 19
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 199
tcgacgtcga cgtgacgtc 19

<210> 200
<211> 17
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 200

tcgacgtcga cgtgacg 17

<210> 201

<211> 10

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 201

tcgacgtcga 10

<210> 202

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 202

tcgtcggttac gtaactacgt cggt 24

<210> 203

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 203

tcgtcggttac gtaacgacgt cggt 24

<210> 204

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 204

tcgtcgttac gtaacgacga cggt 24

<210> 205

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 205

tcgtcgttag ctaattagct cggt 24

<210> 206

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 206

tcgtcgttac gtaattagct cggt 24

<210> 207

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 207

cccatgacgt tcctgacgtt 20

<210> 208

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 208

gccatgacgt tcctgacgtt 20

<210> 209

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 209

accatgacgt tcctgacgtt 20

<210> 210

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 210

tggatgacgt tcctgacgtt 20

<210> 211

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 211

tttatgacgt tcctgacgtt 20

<210> 212

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 212

taaatgacgt tcctgacgtt 20

<210> 213

<211> 19

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 213

cctgacggtt cctgacggtt 19

<210> 214

<211> 18

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 214

catgacgttc ctgacggtt 18

<210> 215

<211> 17

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 215

atgacgttcc tgacggtt 17

<210> 216

<211> 16

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 216

tgacgttcct gacgtt 16

<210> 217

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 217

tcgacgtcga ddddtcgacg tcga 24

<210> 218

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(10)

<223> onde os nucleósidos são nucleósidos inversos

<220>

<221> misc_feature

<222> (11)..(14)

<223> n é a, c, g o t

<400> 218

agctgcagct nnnntcgacg tcga 24

<210> 219

<211> 22

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 219

tcgcgacgtt cggcgcgcg cg 22

<210> 220

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 220

tcgtcgacgt tcggcgcgcg ccg 23

<210> 221

<211> 21

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 221

tcggacgttc ggcgcgcgcc g 21

<210> 222

<211> 19

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 222

tcggacgttc ggcgcgccg 19

<210> 223

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 223

tcgcgacgtt cggcgcgccg 20

<210> 224

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 224

tcgcgacgtt cgcgcgcgcg 20

<210> 225

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 225

tcgacgttcg gcgcgcgccg 20

<210> 226

<211> 18

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 226

tcgacgttcg gcgcgcgccg 18

<210> 227

<211> 18

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 227

tcgcgacgtt cggcgccg 18

<210> 228

<211> 16

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 228

tcgcgacggtt cggccg 16

<210> 229

<211> 16

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 229

tcgacgttcg gcgccg 16

<210> 230

<211> 21

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 230

tcgtcgacgt tcggcgcgcc g 21

<210> 231

<211> 19

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 231

tcgtcgacgt tcggcgccg 19

<210> 232

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 232

tcgacgacgt tcggcgcgcg ccg 23

<210> 233

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 233

tcgacgtcgt tcggcgcgcg ccg 23

<210> 234

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 234

tcgtcgacga tcggcgcgcg ccg 23

<210> 235

<211> 21

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 235

tcgtcgacga tcggcgcgcc g 21

<210> 236

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 236

tcgtcgacgt tcgccgcgcg gcg 23

<210> 237

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 237

tcgtcgacgt tcggcgccgt gccg 24

<210> 238

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 238

tcgtcgacgt tcgactcgag tcg 23

<210> 239

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 239

tcgtcggttac gtaacgacga cggt 24

<210> 240

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 240

tcgtcggttac gtaacgacga cggt 24

<210> 241

<211> 19

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 241

tcgacgtcga cgtgacgtt 19

<210> 242

<211> 21

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 242

tcgtcgacgt tcggcgcgcc g 21

<210> 243

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 243

tcgtcgacga tcggcgcgcg ccg 23

<210> 244

<211> 28

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (11)..(14)

<223> onde n é espaçador d

<220>

<221> misc_feature

<222> (25)..(27)

<223> onde n é espaçador d

<220>

<221> misc_feature

<222> (28)..(28)

<223> onde o ribonucleósido é um ribonucleósido inverso

<400> 244

acgacgtcgt nnnnacgacg tcgtnnnu 28

<210> 245

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 245

tcgtcgacga tcggcgccgt gccg 24

<210> 246

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 246

tcgtcgacga cggcgccgtg ccg 23

<210> 247

<211> 21

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 247

tcgtcgacga cgcgccgtgc g 21

<210> 248

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 248

tcgtcgacga tcggcgccgt gccg 24

<210> 249

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 249

tcgtcgacga tcggcgccgt gccg 24

<210> 250

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 250

tcgtcgacga tcggcgccgt gccg 24

<210> 251

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 251

tcgtcgacga tcggcgccgt gccg 24

<210> 252

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 252
tcgtcgacga tcggcgcgcg ccg 23

<210> 253
<211> 23
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 253
tcgtcgacga tcggcgcgcg ccg 23

<210> 254
<211> 23
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 254
tcgtcgacga tcggcgcgcg ccg 23

<210> 255
<211> 19
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 255

tcgacgtcga cgtgacgtt 19

<210> 256

<211> 19

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 256

tcgacgtcga cgtgacgtt 19

<210> 257

<211> 19

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 257

tcgacgtcga cgtgacgtt 19

<210> 258

<211> 19

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 258

tcgtcgacga cgtgtcgat 19

<210> 259
<211> 19
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 259
tcgacgtcga cgtgacgtt 19

<210> 260
<211> 19
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 260
tcgacgtcga cgtgacgtt 19

<210> 261
<211> 24
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 261
tcgtcgacga tcggcgccgt gccg 24

<210> 262
<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 262

tcgtcgacga cggcgccgtg ccgt 24

<210> 263

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 263

tcgtcgacga cggcgccgtg ccgt 24

<210> 264

<211> 25

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 264

tcgtcgacga tcggcgccgt gccgt 25

<210> 265

<211> 25

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 265

tcgtcgacgt tcggcgccgt gccgt 25

<210> 266

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 266

tcgtcgacgt cggcgccgtg ccgt 24

<210> 267

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 267

tcgtcgacgc ggcgccgtgc cgt 23

<210> 268

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 268

tcgtcgacgc ggcgccgtgc cgt 23

<210> 269

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 269

tcgtcgacga agtcgacgat 20

<210> 270

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 270

tcgtcgacga gaatcgtcga cgat 24

<210> 271

<211> 22

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 271
tcgtcgtacg gcgccgtgcc gt 22

<210> 272
<211> 24
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 272
tcgtcgacga tcggcgccgt gccg 24

<210> 273
<211> 24
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 273
tcgtcgacga tcggcgccgt gccg 24

<210> 274
<211> 24
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 274
tcgtcgacga tcggcgccgt gccg 24

<210> 275

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 275

tcgtcgacga cggcgccgtg ccgt 24

<210> 276

<211> 25

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 276

tcgtcgacga tcggcgccgt gccgt 25

<210> 277

<211> 25

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 277

tcgtcgacga tcggcgccgt gccgt 25

<210> 278

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 278

tcgtcgacga cggcgccgtg ccgt 24

<210> 279

<211> 25

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 279

tcgtcgacgt tcggcgccgt gccgt 25

<210> 280

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 280

tcgtcgacgt cggcgccgtg ccgt 24

<210> 281

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 281

tcgtcgacga agtcgacgat 20

<210> 282

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 282

tcgtcgacga gaatcgtcga cgat 24

<210> 283

<211> 19

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 283

tcgtcgacga cgtgtcgat 19

<210> 284

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 284

tcgacgtcga agacgtcgat 20

<210> 285

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 285

tcgacgtcga gaatcgacgt cgat 24

<210> 286

<211> 21

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 286

tcgtcgacga cggcgaagcc g 21

<210> 287

<211> 22

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 287
tcgtcgacga cggcgaagcc gt 22

<210> 288
<211> 19
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 288
tcgtcgacga cgtgtcgat 19

<210> 289
<211> 19
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 289
tcgtcgacga cgtgtcgat 19

<210> 290
<211> 21
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 290

tcgacgtcga cgtgacgttg t 21

<210> 291

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 291

tcgtcgacga tcggcgcgcg ccg 23

<210> 292

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 292

tcgtcgacga tcggcgcgcg ccg 23

<210> 293

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (24)..(24)

<223> onde t é um nucleósido inverso

<400> 293

tcgtcgacga tcggcgcgcg ccgt 24

<210> 294

<211> 25

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (25)..(25)

<223> onde t é um nucleósido inverso

<400> 294

ttcgtcgacg atcggcgcgcg gccgt 25

<210> 295

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 295

tcgtcgacga tcgacgcgcg tcg 23

<210> 296

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 296

tcgtcgacga tcaacgcgcg ttg 23

<210> 297

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 297

tcgtcgacga tcggcacgtg ccg 23

<210> 298

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 298

tcgtcgacga tcggcatatg ccg 23

<210> 299

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 299

tcgtcgacga tgccgcgcgc ggc 23

<210> 300

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 300

tcgtcgacga tgccgcgcgc ggc 23

<210> 301

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 301

tcgtcgacga tgccgcgcgc ggc 23

<210> 302

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 302
tcgtcgacga tgccgcgcgc ggc 23

<210> 303
<211> 24
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 303
tcgtcgacga tgccgcgctg cggc 24

<210> 304
<211> 24
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 304
tcgtcgtagc atgccgcgcg cggc 24

<210> 305
<211> 25
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 305

tcgtcgtacg atgccgcgct gcggc 25

<210> 306

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 306

tcgtcgacga tgccgcgcgc ggc 23

<210> 307

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 307

tcgtcgacga tgccgcgcgc ggc 23

<210> 308

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (24)..(24)

<223> onde t é um nucleósido inverso

<400> 308

tcgtcgacga tcggcgcgcg ccgt 24

<210> 309

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (24)..(24)

<223> onde t é um nucleósido inverso

<400> 309

tcgtcgacga tcggcgcgcg ccgt 24

<210> 310

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (24)..(24)

<223> onde t é um nucleósido inverso

<400> 310

tcgtcgacga tcggcgcgcg ccgt 24

<210> 311

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 311

tcgtgcacga tcggcgcgcg ccg 23

<210> 312

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> onde n é 5-metil-desoxicitidina

<400> 312

tngtcgacga tcggcgcgcg ccg 23

<210> 313

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> onde n é 5-metil-desoxicitidina

<400> 313

tcgtngacga tcggcgcgcg ccg 23

<210> 314

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> onde n é 5-metil-desoxicitidina

<400> 314

tcgtcganga tcggcgcgcg ccg 23

<210> 315

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<220>

<221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> onde n é 5-metil-desoxicitidina

<400> 315
 tcgtcgacga tnggcgcgcg ccg 23

<210> 316
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 316
 tcgacgtcga cgtcgacg 18

<210> 317
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 317
 tcgacgtcga cgtcgacg 18

<210> 318
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 318

tcgacgtcga cgtcgacg 18

<210> 319

<211> 25

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (25)..(25)

<223> onde t é um nucleósido inverso

<400> 319

tcgtcgacgt tcggcgccgt gccgt 25

<210> 320

<211> 25

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (25)..(25)

<223> onde t é um nucleósido inverso

<400> 320

tcgtcgacgt tcggcgccgt gccgt 25

<210> 321

<211> 25

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (25)..(25)

<223> onde t é um nucleósido inverso

<400> 321

tcgtcgacgt tcggcgccgt gccgt 25

<210> 322

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)..(23)

<223> onde os nucleósidos são nucleósidos inversos

<400> 322

gccgcgcgcg gctagcagct gct 23

<210> 323

```

<211> 23
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(23)
<223> onde os nucleósidos são nucleósidos inversos

<400> 323
cggcgcgcgc cgtagcagct gct          23

<210> 324
<211> 23
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(23)
<223> onde os nucleósidos são nucleósidos inversos

<400> 324
gccgcgcgcg gctagcagct gct          23

<210> 325
<211> 23
<212> ADN
<213> Sequência artificial

```

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)..(23)

<223> onde os nucleósidos são nucleósidos inversos

<400> 325

cggcgcgcgc cgtagcagct gct 23

<210> 326

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (14)..(24)

<223> onde os nucleósidos são nucleósidos inversos

<400> 326

cggcgcgcgtg ccgttgcagc tgct 24

<210> 327

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(24)
 <223> onde os nucleósidos são nucleósidos inversos

<400> 327
 gccgtgccgc ggcttgcagc tgct 24

<210> 328
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(24)
 <223> onde os nucleósidos são nucleósidos inversos

<400> 328
 cggcgccgtg ccgttgcagc tgct 24

<210> 329
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<220>
 <221> misc_feature

<222> (14)..(24)

<223> onde os nucleósidos são nucleósidos inversos

<400> 329

gccgtgccgc ggcttgcagc tgct 24

<210> 330

<211> 25

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (15)..(25)

<223> onde os nucleósidos são nucleósidos inversos

<400> 330

tcggcgcgcg ccgatagcag ctgct 25

<210> 331

<211> 25

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (15)..(25)

<223> onde os nucleósidos são nucleósidos inversos

<400> 331

tcggcgcgcg ccgatagcag ctgct 25

<210> 332

<211> 25

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (15)..(25)

<223> onde os nucleósidos são nucleósidos inversos

<400> 332

tcggcgccgt gccgttgcag ctgct 25

<210> 333

<211> 25

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (15)..(25)

<223> onde os nucleósidos são nucleósidos inversos

<400> 333

tcggcgccgt gccgttgcag ctgct 25

<210> 334
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> onde n é um ligante

<400> 334
 cggcgcngcg ccg 13

<210> 335
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 335
 tcgtcgacgt tcggcgcgcg ccg 23

<210> 336
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 336
tcgtcgacga cggcgcgcg cgc cg 22

<210> 337
<211> 23
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> n é a, c, g o t

<400> 337
tcgtcgacga ncggcgcgcg ccg 23

<210> 338
<211> 23
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> n é a, c, g o t

<400> 338
tcgtcgacga ncggcgcgcg ccg 23

<210> 339

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> onde n é espaçador d

<400> 339

tcgtcgacga ncggcgcgcg ccg 23

<210> 340

<211> 21

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 340

ggggacgacg tcgtgggggg g 21

<210> 341

<211> 15

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 341

tcgacgtcgt ggggg 15

<210> 342

<211> 16

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 342

tccaggactt ctctca 16

<210> 343

<211> 22

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 343

tcgtcggtttt cggcgcgcg cg 22

<210> 344

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(7)
 <223> onde os nucleósidos são 2'-O-metil nucleósidos

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(10)
 <223> onde os nucleósidos são 2'-O-metil nucleósidos

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(14)
 <223> onde os nucleósidos são 2'-O-metil nucleósidos

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> onde o nucleósido é 2'-O-metil nucleósido

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> onde o nucleósido é 2'-O-metil nucleósido

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(20)
 <223> onde o nucleósido é 2'-O-metil nucleósido

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(23)
 <223> onde o nucleósido é 2'-O-metil nucleósido

<400> 344
 tcgtcgacga tcggcgcgcg ccg 23

<210> 345

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> onde o nucleósido é 2'-O-metil nucleósido

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(7)

<223> onde os nucleósidos são 2'-O-metil nucleósidos

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(10)

<223> onde os nucleósidos são 2'-O-metil nucleósidos

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)..(14)

<223> onde os nucleósidos são 2'-O-metil nucleósidos

<220>

<221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> onde o nucleósido é 2'-O-metil nucleósido

<220>

<221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> onde o nucleósido é 2'-O-metil nucleósido

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(20)
 <223> onde o nucleósido é 2'-O-metil nucleósido

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(23)
 <223> onde o nucleósido é 2'-O-metil nucleósido

<400> 345
 tcgtcgacga tcggcgcgcg ccg 23

<210> 346
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(7)
 <223> onde os nucleósidos são 2'-O-metil nucleósidos

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(10)
 <223> onde os nucleósidos são 2'-O-metil nucleósidos

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(14)
 <223> onde os nucleósidos são 2'-O-metil nucleósidos

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> onde o nucleósido é 2'-O-metil nucleósido

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> onde o nucleósido é 2'-O-metil nucleósido

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(20)
 <223> onde o nucleósido é 2'-O-metil nucleósido

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(23)
 <223> onde o nucleósido é 2'-O-metil nucleósido

<400> 346
 tcgtcgacga tcggcgcgcg ccg 23

<210> 347
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> onde o nucleósido é 2'-O-metil nucleósido

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(7)

<223> onde os nucleósidos são 2'-O-metil nucleósidos

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(10)

<223> onde os nucleósidos são 2'-O-metil nucleósidos

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)..(14)

<223> onde os nucleósidos são 2'-O-metil nucleósidos

<220>

<221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> onde o nucleósido é 2'-O-metil nucleósido

<220>

<221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> onde o nucleósido é 2'-O-metil nucleósido

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> onde o nucleósido é 2'-O-metil nucleósido

<220>

<221> misc_feature

<222> (23)..(23)

<223> onde o nucleósido é 2'-O-metil nucleósido

<400> 347

tcgtcgacga tcggcgcgcg ccg 23

<210> 348

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 348

tcgtcgtcgt tcggcgcgcg ccg 23

DOCUMENTOS REFERIDOS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de documentos referidos pelo autor do presente pedido de patente foi elaborada apenas para informação do leitor. Não é parte integrante do documento de patente europeia. Não obstante o cuidado na sua elaboração, o IEP não assume qualquer responsabilidade por eventuais erros ou omissões.

Documentos de patentes referidos na descrição

- US 6194388 B [0007] [0064]
- US 6207646 B [0007] [0064]
- US 6214806 B [0007] [0064]
- US 6218371 B [0007] [0064]
- US 6239116 B [0007] [0064]
- US 6339068 B [0007] [0064]
- US 31327301 P [0007]
- US 10224523 B [0007]
- US 0226468 W [0007]
- WO 03015711 A [0007]
- WO 2004016805 A2 [0007]
- WO 9501363 A [0082]
- US 5177198 A [0090]
- US 5859231 A [0090]
- US 6160109 A [0090]
- US 6207819 B [0090]
- US 36157599 A [0090]
- US 9917100 W [0090]
- WO 0006588 A [0090]
- US 4469863 A [0091]
- US 5023243 A [0091]
- EP 092574 A [0091]
- US 80183901 A [0148]
- US 6116237 A [0175]

- US 60773505 B [0220]
- US 60858240 B [0220]

Documentos de não patente citados na descrição

- TOKUNAGA, T. et al. *Jpn. J. Cancer Res*, 1988, vol. 79, 682-686 [0005]
- TOKUNAGA, T. et al. *JNCI*, 1984, vol. 72, 965-962 [0005]
- MESSINA, J.P. et al. *J. Immunol*, 1991, vol. 147, 1759-1764 [0005]
- KRIEG. *Applied Oligonucleotide Technology*. John Wiley and Sons, Inc, 431-448 [0005]
- KRIEG et al. *Nature*, 1995, vol. 374, 546-549 [0005] [0006]
- KRIEG. *Biochim. Biophys. Acta*, 1999, vol. 93321, 1-10 [0005]
- YAMAMOTO et al. *J Immunol*, 1992, vol. 148, 4072-4076 [0005]
- IHO et al. *J Immunol*, 1999, vol. 163, 3642-3652 [0005]
- HARTMANN et al. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 1999, vol. 96, 9305-10 [0005] [0006]
- PISETSKY. *J. Immunol.*, 1996, vol. 156, 421-423 [0006]
- HACKER et al. *EMBO J.*, 1998, vol. 17, 6230-6240 [0006]
- LIPFORD et al. *Trends in Microbiol.*, 1998, vol. 6, 496-500 [0006]
- YI et al. *J. Immunol.*, 1998, vol. 160, 5898-5906 [0006]
- LIANG. *J. Clin. Invest.*, 1996, vol. 98, 1119-1129 [0006]
- KANDIMALLA et al. summarizes structural and chemical characteristics of CpG oligonucleotides that are important for molecular recognition. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, 2002, vol. 4 (2 [0007]
- VOLLMER et al. *Eur. J. Immunol.*, 2004, vol. 34, 251-262 [0008]
- KERKMANN et al. *J Biol Chem*, 2005, vol. 280 (9), 8086-93 [0010]

- **JOHN SANTALUCIA, JR.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1998, vol. 95, 1460-1465 [0040]
- **M. ZUKER.** *Nucleic Acids Res.*, 2003, vol. 31 (13), 3406-15,
<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/dna/form1.cgi> [0044]
- **LUTZ MJ et al.** Recognition of a non-standard base pair by thermostable DNA polymerases. *Bioorg Med Chem Lett*, 1998, vol. 8, 1149-52 [0050]
- **FREIER SM et al.** Effects of 3' dangling end stacking on the stability of GGCC and CCGG double helixes. *Biochemistry*, 1983, vol. 22, 6198-206 [0052]
- **UHLMANN E et al.** *Chem Rev*, 1990, vol. 90, 543 [0078]
- **Protocols for Oligonucleotides and Analogs. Synthesis and Properties & Synthesis and Analytical Techniques.** Humana Press, 1993 [0078]
- **CROOKE ST et al.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, vol. 36, 107-29 [0078]
- **HUNZIKER J et al.** *Mod Synth Methods*, 1995, vol. 7, 331-417 [0078]
- **Methods in Molecular Biology. UHLMANN E.** *Protocols for Oligonucleotides and Analogs.* Humana Press, 1993, vol. 20, 355 ff [0083]
- **STIRCHAK EP et al.** *Nucleic Acids Res*, 1989, vol. 17, 6129-41 [0084]
- **NIELSEN PE et al.** *Bioconjug Chem*, 1994, vol. 5, 3-7 [0084]
- **FROEHLER.** *J Am Chem Soc*, 1992, vol. 114, 8320 [0085]
- **VANDENDRIESSCHE et al.** *Tetrahedron*, 1993, vol. 49, 7223 [0085]
- **TARKOV M et al.** *Helv Chim Acta*, 1993, vol. 76, 481 [0085]
- **SERGUEEV et al.** *JAm Chem Soc*, 1998, vol. 120, 9417-27 [0090]
- **UHLMANN E et al.** *Chem Rev*, 1990, vol. 90, 544 [0091]
- **GOODCHILD J.** *Bioconjugate Chem*, 1990, vol. 1, 165 [0091]

- **F. E. ECKSTEIN.** Oligonucleotides and Analogues - A Practical Approach. IRL Press, 1991 [0092]
- **M.D. MATTEUCCI ; M.H. CARUTHERS.** *Tetrahedron Lett.*, 1980, vol. 21, 719 [0092]
- **R. P. IYER ; W. EGAN ; J. B. REGAN ; S. L. BEAUCAGE.** *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, vol. 112, 1253 [0092]
- **WAGNER RW et al.** *Nat Biotechnol*, 1996, vol. 14, 840-4 [0094]
- **COHEN PA et al.** *Cancer Res*, 1994, vol. 54, 1055-8 [0116]
- **DJUKANOVIC et al.** *Am. Rev. Respir. Dis*, 1990, vol. 142, 434-457 [0119]
- **ROBINSON et al.** *N. Engl. J. Med.*, 1992, vol. 326, 298-304 [0119]
- **C.G.A THOMAS.** *Medical Microbiology*, 1983 [0152]
- Remington: The Science and Practice of Pharmacy. Mac Publishing Company, 1995, 1676-1692 [0175]
- **GONDA, I.** Aerosols for delivery of therapeutic and diagnostic agents to the respiratory tract. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, vol. 6, 273-313 [0177]
- Aerosol dosage forms and formulations. **MOREN et al.** *Aerosols in Medicine. Principles, Diagnosis and Therapy.* Elsevier, 1985 [0177]
- **LANGER R.** *Science*, 1990, vol. 249, 1527-33 [0184]

Lisboa, 12 de Novembro de 2015

REIVINDICAÇÕES

1. Um oligonucleótido imunoestimulante que compreende:
um domínio de ativação TLR a 5' e pelo menos duas regiões palindrômicas, sendo uma região palindrômica uma região palindrômica 5' com pelo menos 6 nucleótidos de comprimento e estando ligada a uma região palindrômica 3' com pelo menos 8 nucleótidos de comprimento através de um espaçador,
em que o oligonucleótido inclui pelo menos um dinucleótido CpG não metilado, em que o oligonucleótido tem a formula 5' XP₁SP₂T 3', em que X é o domínio de ativação TLR, P₁ é um palíndromo, S é um espaçador, P₂ é um palíndromo e
T é uma cauda 3' de 0-100 nucleótidos de comprimento, em que S é um ácido nucleico tendo um comprimento de 1-50 nucleótidos,
em que um "palíndromo" ou "região palindrômica" é uma sequência de ácido nucleico com o seu próprio complemento reverso perfeito.
2. O oligonucleótido imunoestimulante da reivindicação 1, em que X é TCG, TTCG, TTTCG, TYpR, TTYpR, TTTYpR, UCG, UUCG, UUUCG, TTT ou TTTT.
3. O oligonucleótido imunoestimulante da reivindicação 1, em que as duas regiões palindrômicas estão ligadas por um espaçador que é um ácido nucleico tendo o comprimento de 1 nucleótido.
4. Um oligonucleótido imunoestimulante que compreende:
um domínio de ativação TLR a 5' e pelo menos duas regiões palindrômicas, sendo uma região palindrômica uma região palindrômica 5' com pelo menos 6 nucleótidos de comprimento e estando ligada a uma região palindrômica 3'

com pelo menos 8 nucleótidos de comprimento através de um espaçador,

em que o oligonucleótido inclui pelo menos um dinucleótido CpG não metilado em que o oligonucleótido tem a fórmula 5' XP₁SP₂T3', em que X é o domínio de ativação TLR, P₁ é um palíndromo, S é um espaçador, P₂ é um palíndromo e T é uma cauda 3' de 0-100 nucleótidos de comprimento, em que S é um espaçador não nucleótido.

5. O oligonucleótido imunoestimulante da reivindicação 4, em que o espaçador não nucleótido é um D-espaçador.

6. O oligonucleótido imunoestimulante da reivindicação 4, em que o espaçador não nucleótido é um ligante selecionado a partir do grupo que consiste em dióis, colesterol, nitroindol, trietilenoglicol e hexaetilenoglicol.

7. Um oligonucleótido imunoestimulante que compreende:
um domínio de ativação TLR a 5' e pelo menos duas regiões contendo complementaridade, uma região contendo complementaridade 5' e uma 3', tendo cada região contendo complementaridade pelo menos 8 nucleótidos de comprimento e estando ligada uma à outra seja diretamente ou através de um espaçador,
em que o oligonucleótido inclui pelo menos um dinucleótido CpG não metilado,
e em que pelo menos uma das regiões contendo complementaridade é um palíndromo imperfeito, e em que o domínio de ativação TLR está imediatamente a 5' em relação à região contendo complementaridade 5'.

8. O oligonucleótido imunoestimulante da reivindicação 7, em que o oligonucleótido tem a fórmula 5' XNSPT 3', em que X é o domínio de ativação TLR, N é um palíndromo imperfeito, P é um palíndromo, S é um espaçador e T é uma

cauda 3' com 0-100 nucleótidos de comprimento.

9. O oligonucleótido imunoestimulante da reivindicação 7, em que o oligonucleótido tem a fórmula 5' XPSNT 3', em que X é o domínio de ativação TLR, N é um palíndromo imperfeito, P é um palíndromo, S é um espaçador e T é uma cauda 3' com 0-100 nucleótidos de comprimento.

10. O oligonucleótido imunoestimulante de qualquer uma das reivindicações 1 a 7, em que pelo menos um dos oligonucleótidos imunoestimulantes compreende um resíduo de açúcar modificado 2'.

11. O oligonucleótido imunoestimulante da reivindicação 10, em que o resíduo de açúcar modificado 2' é um resíduo de açúcar modificado 2'-O-metilo.

12. Uma composição que compreende:
uma mistura de oligonucleótidos que formam duplexs de qualquer uma das reivindicações anteriores, formulada num tampão com baixo teor em sal e incluindo um soluto.

13. Um oligonucleótido de qualquer uma das reivindicações 1-11 ou uma composição da reivindicação 12 para utilização no tratamento de cancro.

14. Utilização de um oligonucleótido de qualquer uma das reivindicações 1-11 ou uma composição da reivindicação 12 no fabrico de um medicamento para utilização no tratamento de cancro.

15. Um oligonucleótido de qualquer uma das reivindicações 1-11 ou uma composição da reivindicação 12 para utilização no tratamento de asma.

16. Um oligonucleótido de qualquer uma das reivindicações 1-11 ou uma composição da reivindicação 12 para utilização no tratamento de alergia.

17. Um oligonucleótido de qualquer uma das reivindicações 1-11 ou uma composição da reivindicação 12 para utilização no tratamento de uma doença infecciosa.

18. Um oligonucleótido de qualquer uma das reivindicações 1-11 ou uma composição da reivindicação 12 para modular uma resposta imune num sujeito

19. O oligonucleótido ou composição para utilização de acordo com a reivindicação 18,
em que o oligonucleótido ou composição é para entrega ao sujeito numa quantidade eficaz para induzir a expressão de citocina e/ou quimiocina.

20. O oligonucleótido ou composição para utilização de acordo com a reivindicação 19,
em que a citocina e/ou quimiocina é seleccionada a partir do grupo que consiste em IFN- α , IFN- β , IL-28, IL-29, IFN- ω , TNF- α , IL-10, IL-6, IFN- , IP-10, MCP-1, IL-3 e IL-12.

Lisboa, 12 de Novembro de 2015

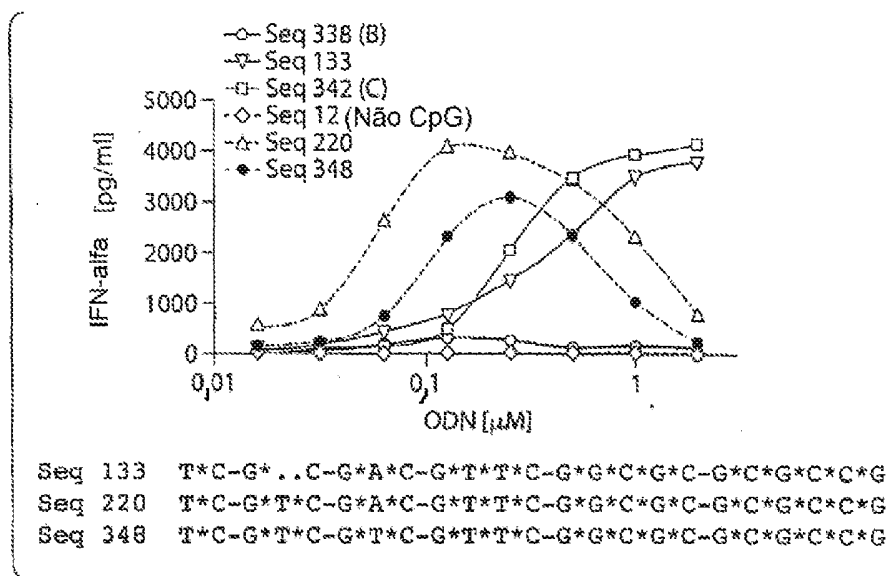


Fig. 1A

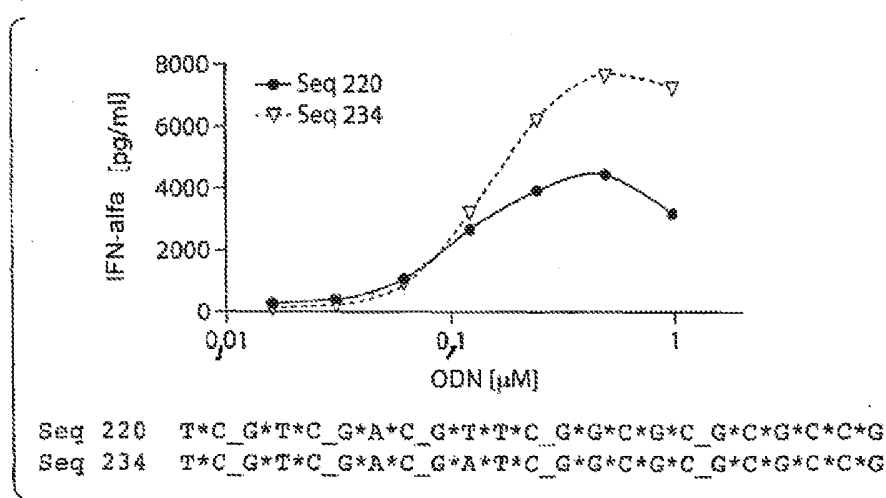


Fig. 1B

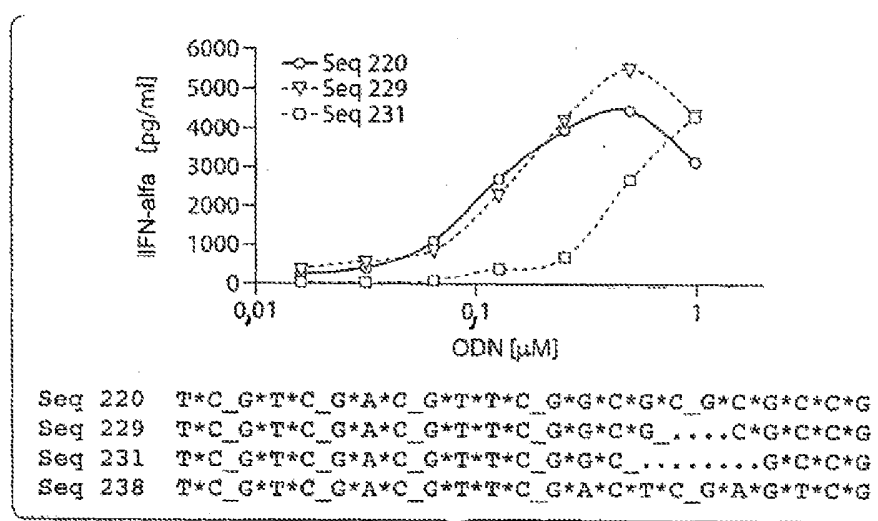


Fig. 2A

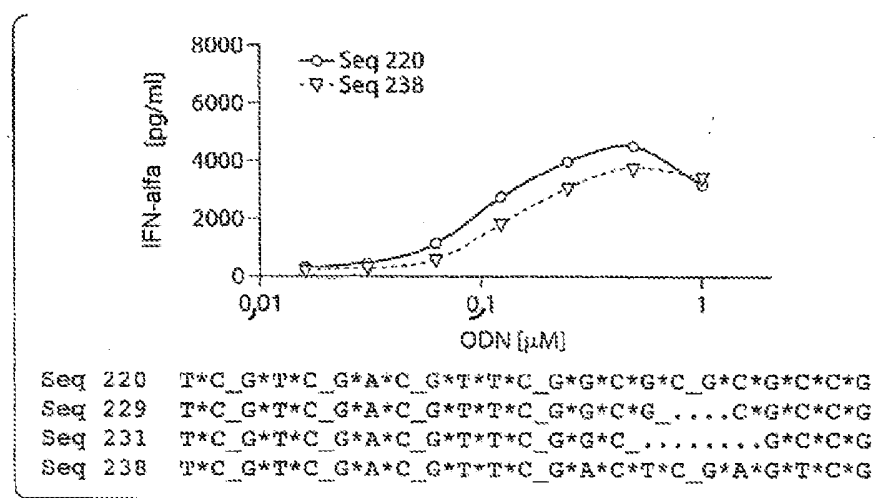
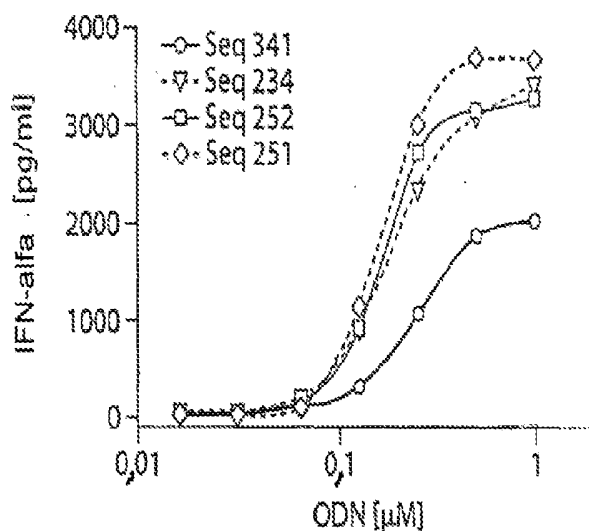
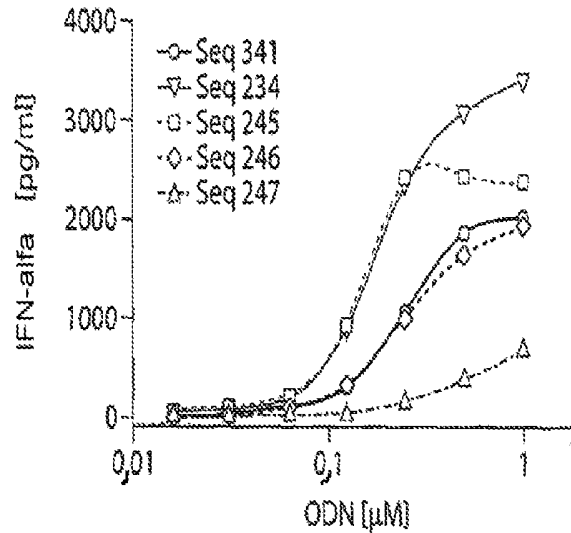


Fig. 2B



Seq 220 T*C_G*T*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G
 Seq 234 T*C_G*T*C_G*A*C_G*A*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G
 Seq 252 T*C*G*T*C_G*A*C_G*A*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G
 Seq 253 T*C*G*T*C_G*A*C*G*A*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G
 Seq 254 T*C*G*T*C*G*A*C*G*A_T_C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*C*G
 Seq 245 T*C_G*T*C_G*A*C_G*A*T*C_G*G*C*G*C_C_G*T*G*C*C*G
 Seq 246 T*C_G*T*C_G*A*C_G*A*..C_G*G*C*G*C_C_G*T*G*C*C*G
 Seq 247 T*C_G*T*C_G*A*C_G*A*..C_..G*C*G*C_C_G*T*G*C*..G
 Seq 248 T*C*G*T*C*G*A*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*C*G*T*G*C*C*G
 Seq 249 T*C*G*T*C_G*A*C_G*A*T*C_G*G*C*G*C_C_G*T*G*C*C*G
 Seq 250 T*C*G*T*C_G*A*C*G*A*T*C_G*G*C*G*C_C_G*T*G*C*C*G
 Seq 251 T*C*G*T*C*G*A*C*G*A_T_C*G*G*C*G*C*C*G*T*G*C*C*G

Fig. 3A



Seq 220 T*C_G*T*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G
 Seq 234 T*C_G*T*C_G*A*C_G*A*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G
 Seq 252 T*C*G*T*C_G*A*C_G*A*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G
 Seq 253 T*C*G*T*C_G*A*C_G*A*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G
 Seq 254 T*C*G*T*C*G*A*C*G*A_T_C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*C*G
 Seq 245 T*C_G*T*C_G*A*C_G*A*T*C_G*G*C*G*C_C_G*T*G*C*C*G
 Seq 246 T*C_G*T*C_G*A*C_G*A*..C_G*G*C*G*C_C_G*T*G*C*C*G
 Seq 247 T*C_G*T*C_G*A*C_G*A*..C...G*G*C*G*C_C_G*T*G*C*..G
 Seq 248 T*C*G*T*C*G*A*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C_C*G*T*G*C*C*G
 Seq 249 T*C*G*T*C_G*A*C_G*A*T*C_G*G*C*G*C_C_G*T*G*C*C*G
 Seq 250 T*C*G*T*C_G*A*C*G*A*T*C_G*G*C*G*C_C_G*T*G*C*C*G
 Seq 251 T*C*G*T*C*G*A*C*G*A_T_C*G*G*C*G*C_C*G*T*G*C*C*G

Fig. 3B

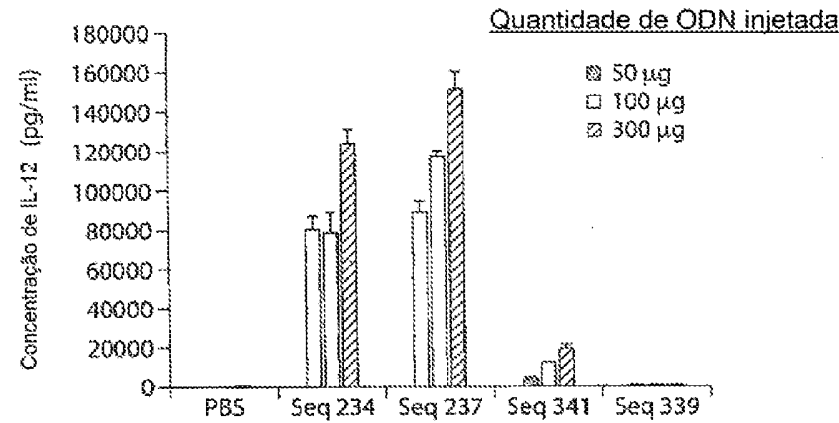


Fig. 4A

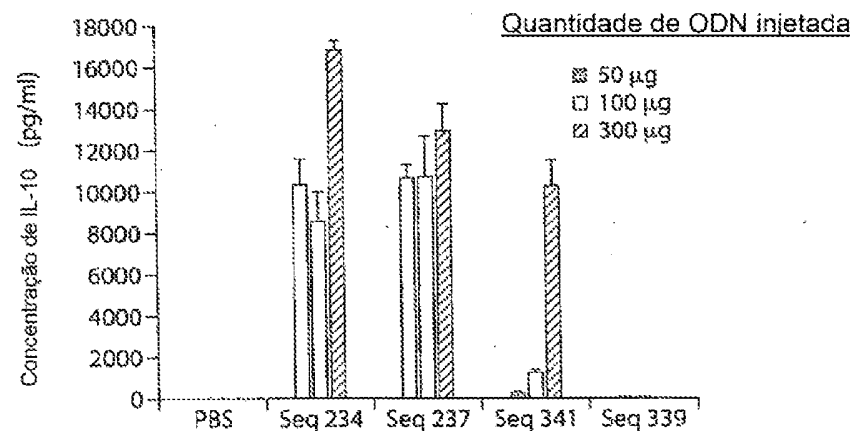


Fig. 4B

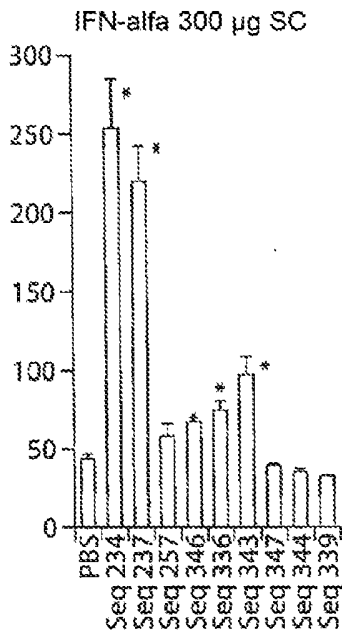


Fig. 5A

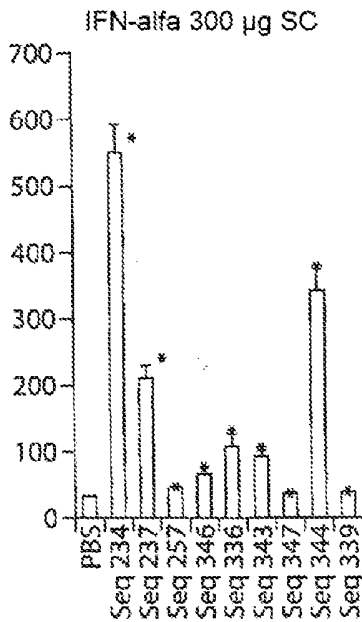


Fig. 5B

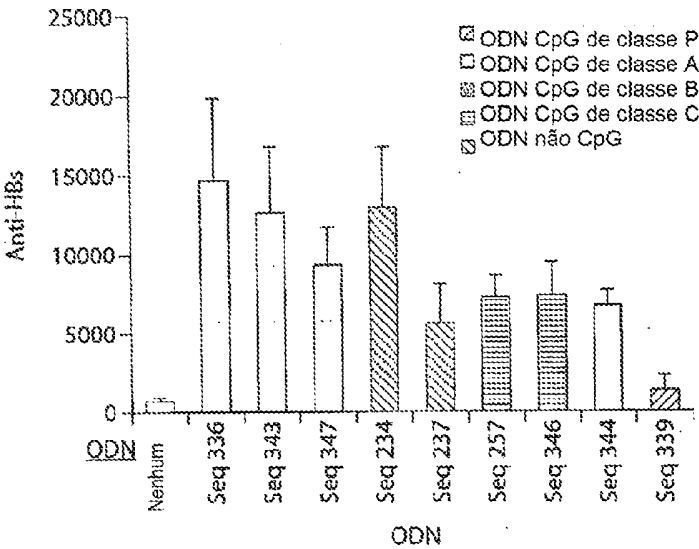


Fig. 6

Exemplo de ODN de classe P formador de concatêmero de palíndromo dupla: SEQ. ID N.º 234

(5'-T-C-G-T-C-G-A-C-G-A-T-C-G-G-C-G-C-G-C-G-3'
palíndromo 5' em itálico; palíndromo 3' sublinhada)

Exemplo de estrutura de concatêmero (omissão das ligações internucleotídicas para clareza)

5'-TCGTCGACGATCGGGCGGGCGCG 3' 5'-TCGTCGACGATCGGGCGGGCGCG 3'
3'-GCCGGCGGGCTAGCAGCTGCT GCCGGCGGGCTAGCAGCTGCT -5'
5'-TCGTCGACGATCGGGCGGGCGCG

Fig. 7

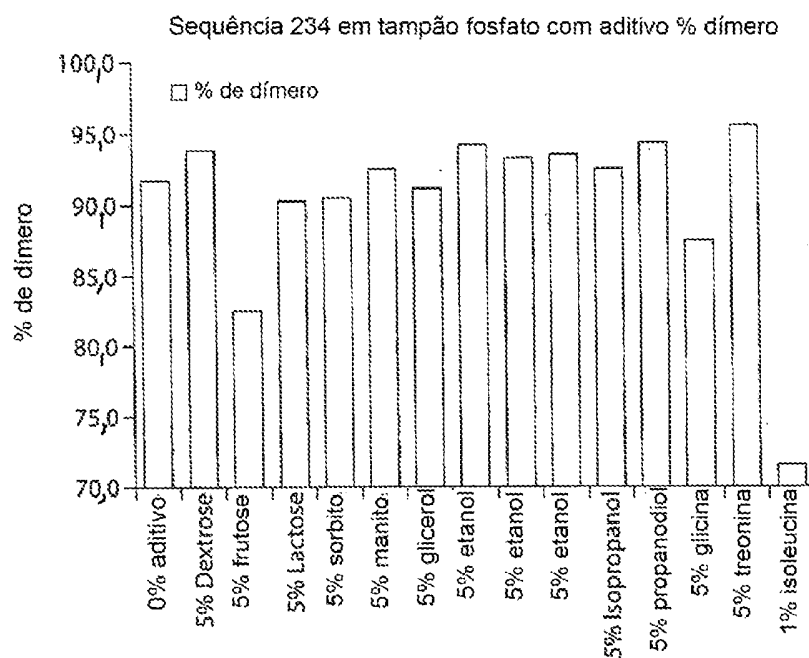


Fig. 8

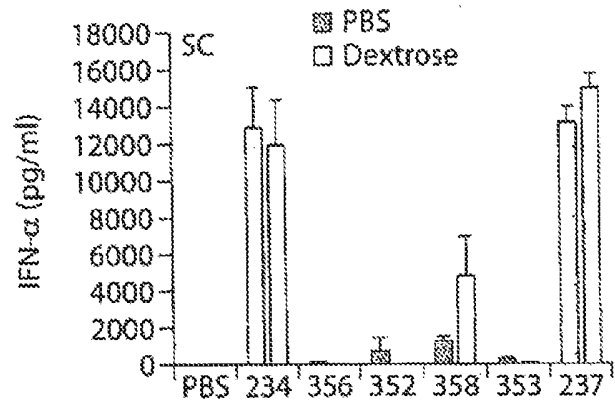


Fig. 9A

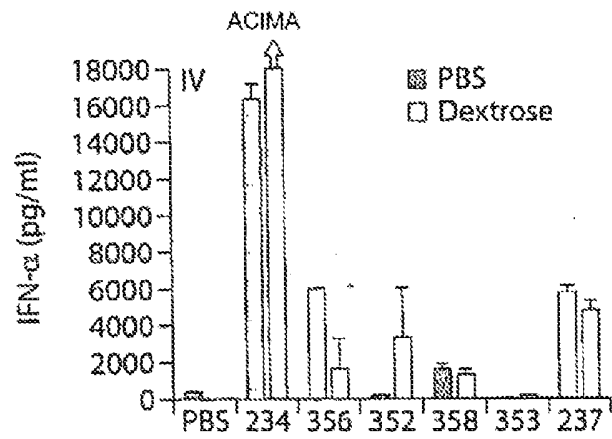


Fig. 9B

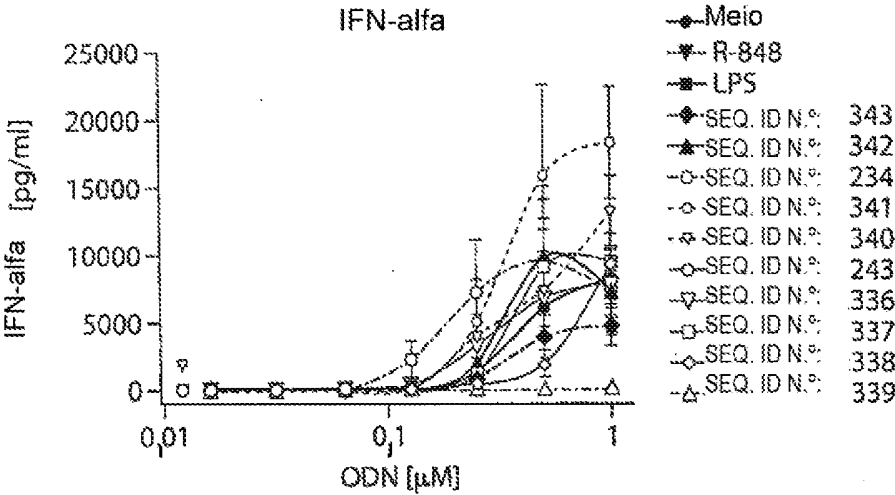


Fig. 10A

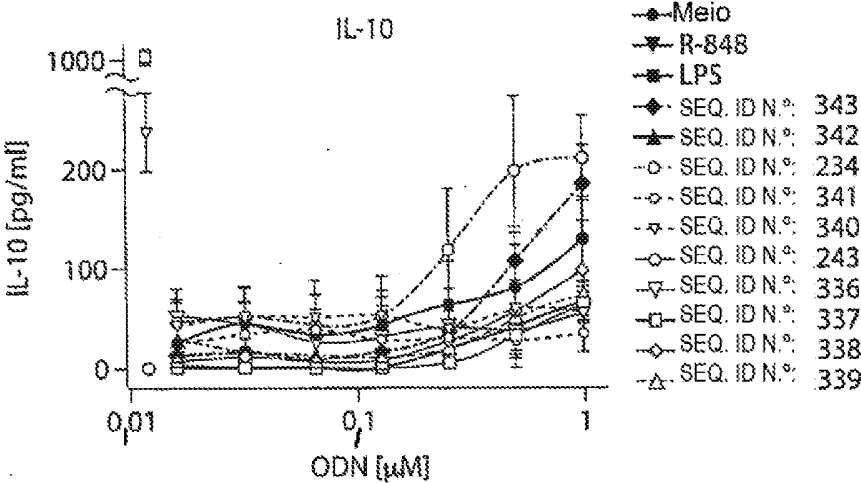


Fig. 10B

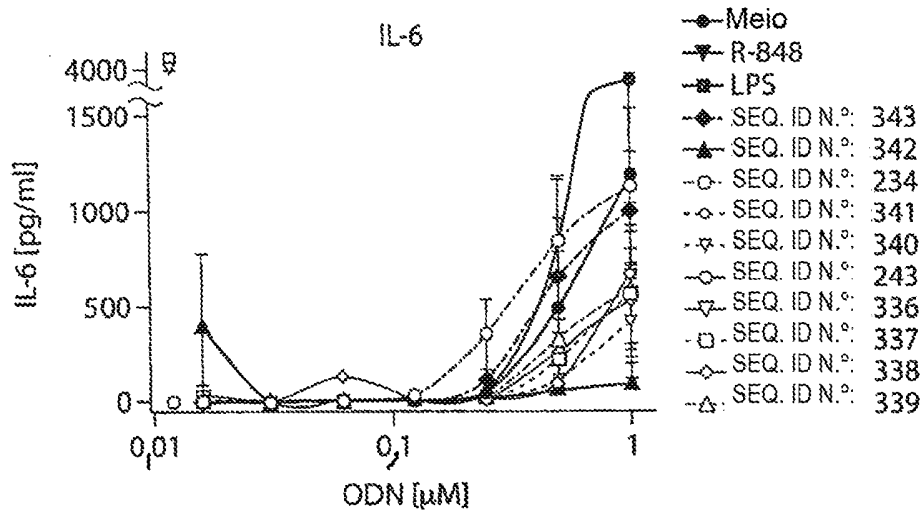


Fig. 10C

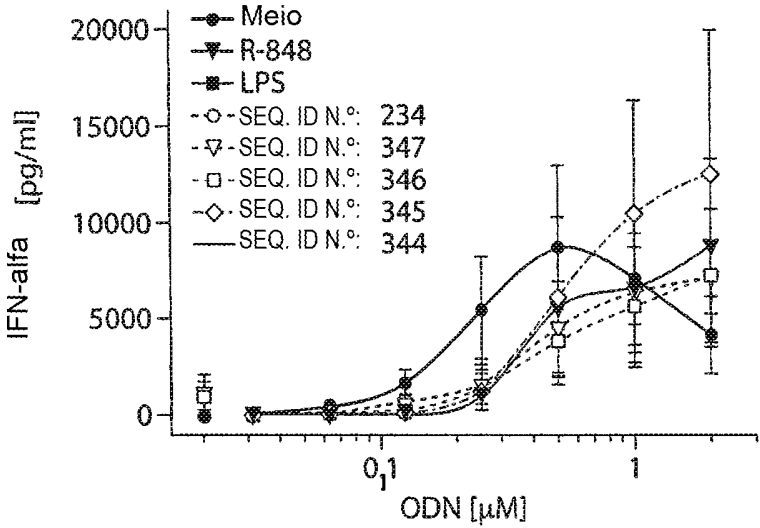


Fig. 11