

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

(21) **PI 0610449-5 A2**

(22) Data de Depósito: 10/04/2006
(43) Data da Publicação: 10/01/2012
(RPI 2140)



(51) *Int.Cl.:*
A61K 31/7088

(54) **Título:** MÉTODOS PARA TRATAR ASMA EXARCEBADA POR DOENÇA INFECCIOSA

(30) **Prioridade Unionista:** 08/04/2005 US 60/669.548

(73) **Titular(es):** COLEY PHARMACEUTICAL GROUP, INC.,
SANOFI-AVENTIS U.S. LLC

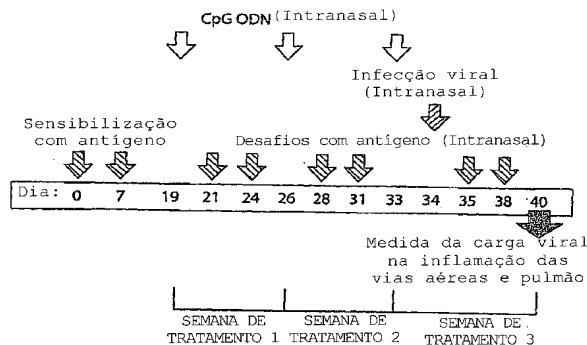
(72) **Inventor(es):** ARTHUR M. KRIEG, GEORGE TILO DE
SANCTIS, JOHN A. SCHMIDT JR, RAYMOND ANTHONY JUPP,
STEPHEN LESLIE UNDERWOOD

(74) **Procurador(es):** Nellie Anne Daniel Shores

(86) **Pedido Internacional:** PCT US2006013193 de
10/04/2006

(87) **Publicação Internacional:** WO 2006/110607de
19/10/2006

(57) **Resumo:** MÉTODOS PARA TRATAR ASMA EXACERBADA POR DOENÇA INFECCIOSA Métodos para tratar asma exacerbada por vírus com- reendendo administrar a um indivíduo asmático uma quantida- e eficaz de um oligonucleotideo CpG.



Pet 020070157400
Pi 0610449-5

"MÉTODOS PARA TRATAR ASMA EXACERBADA POR DOENÇA
INFECCIOSA"

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção se refere de um modo geral a
5 métodos de tratar asma que é exacerbada por doença
infecciosa usando oligonucleotídeos imunoestimulatórios,
assim como suas composições.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

DNA bacteriano tem efeitos imunoestimulatórios
10 para ativar células B e células destruidoras naturais, mas o
DNA de vertebrados não os tem (Tokunaga, T., et al., 1988.
Jpn. J. Cancer Res. 79: 682-686; Tokunaga, T., et al., 1984,
JNCI 72: 955-962; Messina, J.P., et al., 1991, J. Immunol.
147:1759-1764; e revisto em Krieg, 1998, em: Applied
15 Oligonucleotide Technology, CA. Stein e A.M. Krieg, (Eds.),
John Wiley and Sons, Inc., New York, NY, pp. 431-448). É
agora entendido que esses efeitos imunoestimulatórios de DNA
bacteriano são um resultado da presença de dinucleotídeos
CpG não-metilados em contextos de base particulares (porções
20 CpG), os quais são comuns em DNA bacteriano, porém metilado
e sub-representados em DNA de vertebrados (Krieg et al, 1995
Nature 374: 546-549; Krieg, 1999 Biochim. Biophys. Acta
93321: 1-10). Os efeitos imunoestimulatórios do DNA
bacteriano podem ser mimetizados com oligodesoxinucleotídeos
25 sintéticos (ODN) contendo essas porções CpG. Tais ODN CpG
têm efeitos altamente estimulatórios nos leucócitos de
humanos e de murinos, incluindo a proliferação de células B;
a secreção de citocina e de imunoglobulina; a atividade

lítica de células destruidoras naturais (NK) e a secreção de IFN- γ ; e a ativação de células dendríticas (DCs) e outras células apresentadoras de antígenos para expressar moléculas coestimulatórias e secretar citocinas, especialmente as citocinas tipo Th1 que são importantes na promoção do desenvolvimento de respostas de células T tipo Th1. Esses efeitos imunoestimulatórios da estrutura fosfodiéster natural ODN CpG são altamente CpG específicos no fato de que os efeitos são dramaticamente reduzidos se a porção CpG é metilada, alterada para uma GpC ou, de outra forma, eliminada ou alterada (Krieg et al, 1995 Nature 374: 546-549; Hartmann et al, 1999 Proc. Natl. Acad. Sci USA 96: 9305-10).

Em estudos iniciais, acreditou-se que a porção CpG imunoestimulatória seguia a fórmula purina-purina-CpG-pirimidina-pirimidina (Krieg et al, 1995 Nature 374: 546-549; Pissetsky, 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). Entretanto, agora é claro que os linfócitos de camundongos respondem muito bem às porções CpG de fosfodiéster que não seguem essa "fórmula" (Yi et al., 1998 J. Immunol. 160: 5898-5906) e o mesmo é verdade a respeito das células B humanas e das células dendríticas (Hartmann et al, 1999 Proc. Natl. Acad. Sci USA 96:9305-10; Liang, 1996 J. Clin. Invest. 98: 1119-1129).

Várias classes diferentes de oligonucleotídeos CpG foram recentemente descritos. Uma classe é potente para ativar células B, mas é relativamente fraca na indução do

INF- α e na ativação das células NK; Essa classe foi nomeada como classe B. Os oligonucleotídeos CpG da classe B tipicamente são completamente estabilizados e incluem um dinucleotídeo CpG não-metilado em certos contextos de base preferidos. Ver, por exemplo, as Patentes Americanas Nos. 6.194.388; 6.207.646; 6.214.806; 6.218.371; 6.239.116; e 6.339.068. Outra classe de oligonucleotídeos CpG ativa células B e células NK e induz o IFN- α ; essa classe foi nomeada de classe C. Os oligonucleotídeos CpG de classe C, conforme primeiramente categorizados, são tipicamente completamente estabilizados, incluem uma sequência do tipo classe B e um quase palíndromo ou palíndromo rico em GC. Essa classe foi descrita no Pedido de Patente provisório americano co-pendente 60/313.273, requerido em 17 de agosto de 2001, e US10/224.523, requerido em 19 de agosto de 2002, e o Pedido de Patente PCT relacionado PCT/US02/26468, publicado sob o Número de Publicação Internacional WO 03/015711.

RESUMO DA INVENÇÃO

Foi descoberto aqui que oligonucleotídeos CpG (ODN CpG) são particularmente eficazes no combate a infecções, e particularmente para vírus do trato respiratório superior, que são uma causa de exacerbações de asma. Em alguns aspectos da invenção, o ODN da classe C são particularmente eficazes para executar os métodos. Conforme mostrado nos Exemplos abaixo, ODN CpG de classe C induziu um painel de genes associados com o IFN no camundongo, incluindo aqueles para proteínas antivirais e protegeu contra a inflamação das

vias aéreas exacerbada por antígeno combinado e por exposições a vírus.

Em alguns aspectos, a invenção se refere a um método para tratar asma exacerbada por vírus, pela
5 administração a um indivíduo asmático de uma quantidade eficaz de um oligonucleotídeo CpG da classe C para tratar asma exacerbada por vírus.

Em outros aspectos, a invenção se refere a um método para tratar asma exacerbada por vírus pela
10 identificação de um indivíduo asmático em risco de infecção viral, e a administração ao indivíduo asmático de uma quantidade eficaz de um oligonucleotídeo CpG para tratar asma exacerbada por vírus. O indivíduo pode ser identificado por um médico. Em outras modalidades, o indivíduo é
15 identificado baseando-se na exposição a um fator de risco para infecção viral.

De acordo com outros aspectos, a invenção é um método para tratar asma exacerbada por vírus pela administração a um indivíduo asmático sofrendo de uma
20 terapia de asma não-CpG de uma quantidade eficaz de um oligonucleotídeo CpG para tratar asma exacerbada por vírus. A terapia para asma não-CpG pode ser uma terapia esteróide. Em algumas modalidades, a terapia de asma não-CpG é administrada num momento diferente do que o do
25 oligonucleotídeo CpG. Em outras modalidades, a terapia de asma não-CpG é administrada ao mesmo tempo em que o oligonucleotídeo CpG.

Um método para tratar asma exacerbada por doença

infecciosa pela identificação de um indivíduo asmático em risco de infecção, e a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de um oligonucleotídeo CpG para tratar asma exacerbada por doença infecciosa é fornecido de acordo com outros aspectos da invenção.

Em outro aspecto, a invenção é um método para tratar asma exacerbada por vírus, pela identificação de um fator de risco para infecção viral e a administração a um indivíduo asmático de uma quantidade eficaz de um oligonucleotídeo CpG para tratar asma exacerbada por vírus durante o período de tempo quando o indivíduo asmático está em risco de infecção viral. Em algumas modalidades, o fator de risco é a estação de influenza. Em outras modalidades, o fator de risco é uma viagem para um destino com um alto risco de exposição viral.

Em algumas modalidades, a asma exacerbada por vírus é causada por um vírus respiratório. Opcionalmente, o vírus respiratório não é RSV. Em outras modalidades, a asma exacerbada por vírus é causada pelo vírus influenza.

O oligonucleotídeo CpG, em algumas modalidades, é um oligonucleotídeo da classe C. O oligonucleotídeo da classe C pode ser opcionalmente um oligonucleotídeo semi-maleável, tal como, por exemplo, SEQ ID NO: 10.

Um método para tratar a asma exacerbada por vírus, pela identificação de um indivíduo asmático em risco de infecção viral, e a administração ao indivíduo asmático de um oligonucleotídeo CpG numa quantidade que é sub-terapêutica para tratar infecção viral, em que o

oligonucleotídeo CpG é eficaz para reduzir o acúmulo de células imunes também é fornecido. A célula imune pode ser, por exemplo, um neutrófilo ou um eosinófilo.

Em outros aspectos, a invenção é um método para
5 tratar asma exacerbada por vírus, pela identificação de um indivíduo asmático em risco de infecção viral, e a administração ao indivíduo asmático de pelo menos três doses de oligonucleotídeo CpG, em que pelo menos três doses de oligonucleotídeo CpG são temporalmente separadas uma da
10 outra por pelo menos três dias. Em algumas modalidades, as doses são separadas uma das outras por 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, um mês, um ano ou por um valor inteiro entre eles.

O uso de um oligonucleotídeo da invenção para
15 estimular uma resposta imune e ou o tratamento de asma exacerbada por vírus também é fornecido como um aspecto da invenção.

Um método para produzir um medicamento de um oligonucleotídeo da invenção para estimular uma resposta
20 imune e ou o tratamento da asma exacerbada por vírus também é fornecido.

Cada uma das limitações da invenção pode englobar várias modalidades da invenção. É, conseqüentemente, antecipado que cada uma das limitações da invenção
25 envolvendo qualquer elemento ou combinações de elementos pode ser incluída em cada aspecto da invenção. Essa invenção não está limitada em seu pedido aos detalhes de construção e de disposição dos componentes estabelecidos na seguinte

descrição ou ilustrados nos desenhos. A invenção está apta a outras modalidades e de ser praticada ou de ser executada de várias formas. Também, a fraseologia e terminologia usada aqui é para o propósito da descrição e não deve ser considerada como limitante. O uso de "incluindo", "compreendendo" ou "tendo", "contendo", "envolvendo" e variações suas aqui é tencionado para englobar os itens listados depois e seus equivalentes, assim como itens adicionais.

10 BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

As figuras são somente ilustrativas e não são necessárias para a aptidão da invenção aqui revelada.

Figura 1 é um esquema de uma agenda de estudo abreviada mostrando algumas das condições experimentais executadas no Exemplo 1 e 2.

Figura 2 é um esquema de uma agenda de estudo detalhada mostrando uma condição experimental executada no Exemplo 1 (#3).

Figura 3 é uma série de gráficos representando a indução de IFN- α (Figura 3a), IFN- γ (Figura 3b) e IP-10 (Figura 3c), e uma segunda série de gráficos representando a supra-regulação da para a 2',5'-oligoadenilato sintetase (Figura 3d), Mx1 (Figura 3e) e indoleamina 2,3-dioxigenase (Figura 3f) no pulmão de camundongo. Os eixos x representam μg de oligonucleotídeo por Kg de camundongo. Os eixos y representam citocina em pg/mL (Figuras 3a - 3c) ou a quantidade de RNA como proporção de RNA GAPDH (Figuras 3d-3f).

Figura 4a é um gráfico demonstrando o título da proteína nuclear viral em pulmões de camundongo. O eixo x representa μg de oligonucleotídeo por Kg de camundongo (infectado ou não-infectado) e o eixo y representa a absorvância. Figuras 4b e 4c são gráficos mostrando os neutrófilos e as células mononucleares, respectivamente, que estão presentes no fluido de lavagem broncoalveolar. Os eixos x representam μg de oligonucleotídeo por Kg de camundongo (infectado ou não-infectado) e os eixos y representam as quantidades de células $\times 10^3/\text{mL}$.

Figura 5 é uma série de gráficos demonstrando as células totais acumuladas em resposta ao tratamento, incluindo leucócitos totais (Figura 5^a), neutrófilos (Figura 5b) e células mononucleares (Figura 5c) no fluido de lavagem broncoalveolar em camundongos infectados com vírus e desafiados com antígeno. Os eixos x representam as categorias de desafio dos camundongos e os eixos y representam as quantidades de células $\times 10^6/\text{mL}$ (5^a) ou $\times 10^3/\text{mL}$ (5b e 5c).

Figura 6a é um gráfico representando o aumento induzido por metacolina na resistência das vias aéreas. O eixo x representa mg/mL de metacolina e o eixo y representa a resistência das vias aéreas como % de controle não-desafiado. Figura 6b mostra a resistência das vias aéreas de linha de base. Figura 6c mostra as áreas sob a curva dose-resposta de metacolina. Os resultados estão apresentados como a média $\pm$ SEM ($n = 7 - 9$).). * $P < 0,05$ com o grupo indicado (teste bilateral de Mann-Whitney).

Figura 7 é uma série de gráficos representando as células totais acumuladas em resposta ao tratamento, incluindo leucócitos totais (Figura 7a), eosinófilos (Figura 7b), neutrófilos (Figura 7c) e células mononucleares (Figura 7d), assim como o peso corporal de camundongo (Figura 7e). Os eixos x representam categorias de desafio dos camundongos.

Figura 8 é uma série de gráficos demonstrando a indução das citocinas associadas com TLR-9 nas vias aéreas de camundongo *in vivo*. Figura 8a mostra o IFN α , Figura 8b mostra o IFN γ , Figura 8c mostra IP-10, Figura 8d mostra a IL-6 e Figura 8e mostra a IL-12p40. Os resultados são apresentados como a média $\pm$ SEM (n = 10). Os eixos x representam μ g de oligonucleotídeo por Kg de camundongo e os eixos y representam a concentração de citocina em pg/mL.

Figura 9 é uma série de gráficos demonstrando a indução de citocinas *ex vivo*. Figura 9a mostra a IL-5, Figura 9b mostra a IL-13 e a Figura 9c mostra o IFN γ . Os resultados estão apresentados como a média $\pm$ SEM (n = 7-8). *P < 0,05 comparado com o grupo tratado com veículo (teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn para múltiplas comparações). Os eixos x representam μ g de oligonucleotídeo por Kg de camundongo e os eixos y representam a concentração de citocina em pg/mL.

Figura 10 são dois gráficos mostrando a supressão de acúmulos de eosinófilos induzidos por antígeno e linfócitos nas vias aéreas de camundongos *in vivo* pela SEQ ID NO: 10. Figura 10a mostra a produção de IgE e a Figura

10b mostra a produção de IgG2a. Os resultados estão apresentados como a média $\pm$ SEM (n = 9-10). *P < 0,05 comparado com o grupo tratado com veículo (teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn para múltiplas
5 comparações). Os eixos x representam μ g de oligonucleotídeo por Kg de camundongo (sintetizado ou não-sintetizado) e os eixos y representam unidades de absorvância como uma medição do título do anticorpo do soro.

Figura 11 são quatro gráficos demonstrando os
10 acúmulos de eosinófilos e linfócitos nas vias aéreas do camundongo *in vivo* depois da administração da SEQ ID NO: 10. Figura 11a mostra os leucócitos totais presentes, Figura 11b mostra os eosinófilos, Figura 11c mostra células T CD4 positivas e Figura 11d mostra as células B. Os resultados
15 estão apresentados como a média $\pm$ SEM (n = 6). *P < 0,05 comparado com o grupo tratado com veículo (teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn para múltiplas comparações). Os eixos x representam μ g de oligonucleotídeo por Kg de camundongo (sintetizado ou não-sintetizado) e os
20 eixos y representam a quantidade de células.

DESCRIÇÃO DETALHADA

O receptor tipo Toll 9 (TLR9) permite que populações discretas das células imunes reconheçam oligonucleotídeos ou oligodesoxinucleotídeos CpG não-
25 metilados (ODN CpG) e ativem mecanismos de defesa do hospedeiro e iniciem efeitos imunes, resultando nas respostas do tipo Th2 suprimidas. Classes diferentes de ODN CpG foram descritos com base na estrutura e nas

características de atividade. ODN CpG de classe C geralmente têm uma sequência estimulatória de extremidade 5' contendo pelo menos uma porção CpG, e um palíndromo rico em GC. ODN CpG da classe C induz títulos muito altos de interferon alfa 5 (IFN α) das células imunes.

De acordo com alguns aspectos da invenção, foi descoberto que os ODN CpG da classe C são de valor particular como uma nova terapia para as infecções do trato respiratório superior e preferivelmente infecções virais uma vez que elas exacerbam asma alérgica. Os dados apresentados nos exemplos abaixo demonstraram que quando dosados nas vias aéreas de camundongos, o ODN CpG de classe C pode induzir genes associados com o IFN conhecidos por terem atividades imunomodificadoras e/ou antivirais. Particularmente, 2'5'-oligoadenilato sintetase e Mx1 (homólogo de camundongo de MxA) são conhecidos por terem uma atividade antiviral marcante. Em nossos modelos de camundongos, um ODN CpG de classe C mostrou efeitos protetores contra a infecção por influenza, e suprimiu a inflamação das vias aéreas exacerbadas induzida pelo desafio de antígeno combinado e pela infecção por influenza.

Conseqüentemente, em alguns aspectos a invenção se refere a métodos para tratar asma exacerbada por doença infecciosa e, em particular, asma exacerbada por vírus. Infecções bacterianas, virais e fúngicas exacerbam e/ou induzem a asma. Asma exacerbada por doença infecciosa é uma condição a qual ocorre num indivíduo asmático. O indivíduo asmático, um o qual tenha sido diagnosticado com asma ou é,

de outra forma, suscetível à asma, quando exposto a um agente infeccioso, experimenta uma resposta asmática ou um ataque asmático existente/em andamento é piorada.

Conseqüentemente, a invenção num aspecto envolve a descoberta de que oligonucleotídeos imunoestimulatórios CpG são úteis no tratamento de asma exacerbada por doenças infecciosas.

Em algumas modalidades, o indivíduo está em risco de infecção viral. Um indivíduo em risco de infecção viral é um o qual tenha qualquer risco de se expor a um patógeno causador de infecção. Por exemplo, um indivíduo em risco pode ser um indivíduo o qual esteja planejando viajar para uma área onde um tipo particular de agente infeccioso é descoberto ou ele pode ser um indivíduo o qual pode conter organismos infecciosos ou diretamente para o organismo ou mesmo qualquer indivíduo vivendo numa área onde um organismo infeccioso ou um alérgeno tenha sido identificado. Indivíduos em risco de desenvolver infecção também incluem populações gerais para as quais uma agência médica recomenda a vacinação com um antígeno de um organismo infeccioso particular. Um indivíduo em risco de infecção viral pode ser identificado por uma variedade de formas, tais como por um trabalhador da medicina. Trabalhadores da medicina incluem doutores, enfermeiros, técnicos e quaisquer outros praticantes no campo médico. O indivíduo em risco de uma infecção viral também pode ser identificado baseando-se na exposição a um fator de risco para infecção viral.

Em aspectos da invenção o método para identificar

um fator de risco para infecção viral é direcionado em indivíduos sob tratamento em antecipação à exposição a um agente viral ou estação (por exemplo, em antecipação da estação de influenza e de frio). Tais tempos sazonais são
5 geralmente conhecidos e, mais especificamente determinados com base anual.

Um indivíduo com uma infecção é um indivíduo que foi exposto a um patógeno infeccioso e tem níveis agudos ou crônicos detectáveis do patógeno no corpo. Uma doença
10 infecciosa, conforme aqui utilizada, é uma doença que surge da presença de um microrganismo estranho no corpo.

Um indivíduo em risco de desenvolver asma inclui aqueles indivíduos que foram identificados como tendo asma, mas que não têm a doença ativa durante o tratamento com
15 oligonucleotídeo imunoestimulatório CpG, assim como indivíduos que são considerados como estando em risco de desenvolver essas doenças devido a fatores genéticos ou ambientais.

Citocinas Th2, especialmente IL-4 e IL-5 são altas
20 nas vias aéreas de indivíduos asmáticos. Essas citocinas promovem importantes aspectos da resposta inflamatória asmática, incluindo a mudança do isotipo IgE, quimiotaxia e ativação de eosinófilo e crescimento de mastócitos. Citocinas Th1, especialmente IFN- γ e IL-12, podem suprimir a
25 formação de clones Th2 e a produção de citocinas Th2. Asma se refere a um distúrbio do sistema respiratório caracterizado por inflamação, estreitamento das vias aéreas e reatividade aumentada das vias aéreas a agentes inalados.

Asma está freqüentemente, embora não exclusivamente, associada com sintomas atópicos ou alérgicos.

Um indivíduo deve significar um humano ou animal vertebrado incluindo, mas sem se limitar, a um cachorro, gato, cavalo, vaca, porco, ovelha, cabra, peru, galinha, primata, por exemplo, macaco, e peixe (espécies de aquacultura), por exemplo, salmão.

Conforme aqui utilizado, o termo tratar, tratado ou tratando, quando usado em relação a um distúrbio tal como uma doença infecciosa ou asma se refere a um tratamento profilático o qual aumenta a resistência de um indivíduo ao desenvolvimento da doença (por exemplo, a uma infecção com um patógeno) ou, em outras palavras, diminui a probabilidade de que um indivíduo irá desenvolver a doença (por exemplo, ficar infectado com o patógeno) assim como um tratamento depois de o indivíduo ter desenvolvido a doença para combater a doença (por exemplo, reduzir ou eliminar a infecção) ou prevenir que a doença fique pior.

Exemplos de vírus que foram encontrados em humanos incluem, mas não estão limitados, ao: *Retroviridae* (por exemplo, vírus da imunodeficiência humana, tal como HIV-1 (também referido como HDTV-III, LAVE ou HTLV-III/LAV, ou HIV-III; e outros isolados, tais como HIV-LP; *Picornaviridae* (por exemplo, vírus da polio, vírus da hepatite A; enterovírus, vírus da Cocksackie humano, rinovírus, ecovírus); *Calciviridae* (por exemplo, cepas que causam gastroenterite); *Togaviridae* (por exemplo, vírus da encefalite eqüina, vírus de rubéola); *Flaviridae* (por

exemplo, vírus da dengue, vírus da encefalite, vírus da febre amarela); *Coronaviridae* (por exemplo, coronavírus); *Rhabdoviridae* (por exemplo, vírus da estomatite vesicular, vírus da raiva); *Filoviridae* (por exemplo, vírus ebola);
 5 *Paramyxoviridae* (por exemplo, vírus parainfluenza, vírus da caxumba, vírus de sarampo, vírus sincicial respiratório); *Orthomyxoviridae* (por exemplo, vírus influenza); *Bunyaviridae*, por exemplo, vírus Hantaan, bungavírus, phlebovírus e Nairo vírus); *Arenaviridae* (vírus da febre
 10 hemorrágica); *Reoviridae* (por exemplo, reovírus, orbidivírus e rotavírus); *Birnaviridae*; *Hepadnaviridae* (vírus da hepatite B); *Parvoviridae* (parvovírus); *Papovaviridae* (papiloma vírus, polioma vírus); *Adenoviridae* (a maioria dos adenovírus); *Herpesviridae* (vírus herpes simplex (HSV) 1 e
 15 2, vírus varicela zoster, citomegalovírus (CMV), herpes vírus; *Poxviridae* (vírus da varíola, vírus vaccinia, pox vírus); e *Iridoviridae* (por exemplo, vírus da febre suína africana); e vírus não-classificados (por exemplo, o agente da hepatite delta (considerado como sendo um satélite
 20 defeituoso do vírus da hepatite B), os agentes da hepatite não-A, não-B (classe 1 = transmitido internamente; classe 2 = transmitido parentalmente (isto é, hepatite C); Norwalk e vírus relacionado, e astrovírus).

Tanto bactérias gram-negativas quanto gram-
 25 positivas servem como antígenos em animais vertebrados. Tais bactérias gram-positivas incluem, mas não se limitam, a espécies de *Pasteurella*, espécies de *Staphylococci* e espécies de *Streptococcus*. Bactérias gram-negativas incluem,

mas não estão limitadas, a *Escherichia coli*, espécies de *Pseudomonas* e espécies de *Salmonella*. Exemplos específicos de bactérias infecciosas incluem, mas não estão limitadas, a *Helicobacter pylori*, *Borelia burgdorferi*, *Legionella*
 5 *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* (estreptococos do grupo A),
 10 *Streptococcus agalactiae* (estreptococos do grupo B), *Streptococcus* (grupo viridans), *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus* (anaeróbico sps.), *Streptococcus pneumoniae*, *Campylobacter patogenicus* sp., *Enterococcus* sp., *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*,
 15 *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium* sp., *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Bacteroides* sp., *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*,
 20 *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Leptospira*, *Rickettsia* e *Actinomyces israelii*.

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

Outros organismos infecciosos (isto é, protistas) incluem *Plasmodium* spp., tais como *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, and *Plasmodium vivax*

e *Toxoplasma gondii*. Parasitas teciduais e/ou mantidos no sangue incluem *Plasmodium* spp., *Babesia microti*, *Babesia divergens*, *Leishmania tropica*, *Leishmania* spp., *Leishmania braziliensis*, *Leishmania donovani*, *Trypanosoma gambiense* e
5 *Trypanosoma rhodesiense* (doença do sono africana), *Trypanosoma cruzi* (doença de Chagas) e *Toxoplasma gondii*.

Outros microrganismos medicinalmente relevantes foram descritos extensivamente na literatura, ver, por exemplo, C.G.A Thomas, Medical Microbiology, Bailliere
10 Tindall, Grã-Bretanha 1983, o conteúdo total do qual é por meio disto incorporado por referência.

Em alguns exemplos, a asma exacerbada por vírus é causada por um vírus respiratório e, particularmente, um vírus respiratório superior tal como influenza.
15 Opcionalmente, o vírus respiratório pode não ser RSV (vírus sincicial respiratório).

O método para tratar asma exacerbada por vírus também pode incluir o uso de uma combinação de oligonucleotídeos CpG com antimicrobianos numa terapia de
20 asma CpG, tal como um medicamento para asma. O terapêutico alternativo, isto é, o medicamento para asma ou antimicrobiano, pode ser administrado num momento diferente do que o oligonucleotídeo CpG ou ao mesmo tempo como o oligonucleotídeo CpG.

25 Ao indivíduo asmático é administrada uma quantidade eficaz de um oligonucleotídeo CpG para tratar asma exacerbada por vírus. Se uma combinação de terapêuticos for administrada, o oligonucleotídeo CpG pode ser

administrado ao indivíduo numa quantidade eficaz para prevenir infecção viral e o medicamento para asma pode ser administrado ao indivíduo quando os sintomas de alergia ou asma aparecerem. Conseqüentemente, o oligonucleotídeo CpG
5 pode ser administrado ao indivíduo e, a seguir, o medicamento para asma pode ser subseqüentemente administrado ao indivíduo ou eles podem ser administrados juntamente ao mesmo tempo.

Os oligonucleotídeos CpG contêm seqüências
10 específicas descobertas como eliciadoras de uma resposta imune. Essas seqüências específicas que eliciam uma resposta imune são referidas como "porções imunoestimulatórias", e os oligonucleotídeos que contêm porções imunoestimulatórias são referidos como "moléculas de oligonucleotídeo
15 imunoestimulatórias" e, equivalentemente, "oligonucleotídeos imunoestimulatórios". Os oligonucleotídeos imunoestimulatórios da invenção incluem, dessa forma, pelo menos uma porção imunoestimulatória. Numa modalidade preferida, a porção imunoestimulatória é uma "porção
20 imunoestimulatória interna". O termo "porção imunoestimulatória interna" se refere à posição da seqüência da porção numa seqüência de oligonucleotídeo mais longa, a qual é mais longa no comprimento do que a seqüência da porção em pelo menos em nucleotídeo ligado tanto à
25 extremidade 5' quanto à extremidade 3' da seqüência da porção imunoestimulatória.

Os oligonucleotídeos CpG incluem pelo menos um dinucleotídeo CpG não-metilado. Um oligonucleotídeo contendo

pelo menos um dinucleotídeo CpG não-metilado é uma molécula de oligonucleotídeo a qual contém uma sequência de dinucleotídeo citosina-guanina não-metilada (isto é, DNA CpG'' ou DNA contendo uma cisotina 5' seguida por uma guanina 3' e ligada por uma ligação fosfato) e ativa o sistema imune. O oligonucleotídeo CpG inteiro pode ser não-metilado ou porções podem ser não-metiladas mas pelo menos o C do 5' CG 3' deve ser não-metilado.

Os métodos da invenção podem incluir o uso de oligonucleotídeos imunoestimulatórios CpG de classe A, classe B e classe C. Como para os oligonucleotídeos CpG, foi recentemente descrito que há diferentes classes de oligonucleotídeos CpG. Uma classe é potente para ativar células B, mas é relativamente fraca na indução da ativação de IFN- α e de células NK; essa classe foi nomeada de classe B. Os oligonucleotídeos CpG de classe B tipicamente são completamente estabilizados e incluem um dinucleotídeo CpG não-metilado em certos contextos de bases preferidas. Ver, por exemplo, Patentes Americanas Nos. 6.194.388; 6.207.646; 6.214.806; 6.218.371; 6.239.116; e 6.339.068. Outra classe é potente para induzir a ativação de IFN- α e de células NK, mas é relativamente fraca no estímulo das células B; essa classe foi nomeada classe a. Os oligonucleotídeos CpG de classe A tipicamente têm sequências poli-G estabilizadas nas extremidades 5' e 3' e uma sequência contendo dinucleotídeo CpG fosfodiéster palindrômica de pelo menos 6 nucleotídeos. Ver, por exemplo, o pedido de patente publicado PCT/US00/26527 (WO 01/22990).

Ainda outra classe de oligonucleotídeos CpG ativa as células B e as células NK e induz o IFN- α ; essa classe foi nomeada de classe C. Os oligonucleotídeos de classe C, como primeiros caracterizados, tipicamente são completamente estabilizados, incluem uma sequência do tipo classe B e um palíndromo ou quase palíndromo rico em CG. Essa classe foi descrita no Pedido de Patente Americana 10/224.523, requerido em 19 de agosto de 2002, e em US 10/978.282, requerido em 29 de outubro de 2004, os conteúdos inteiros dos quais são aqui incorporados por referência.

Oligonucleotídeos imunoestimulatórios CpG "de classe A" foram descritos no Pedido de Patente Não-Provisório Americano No: 09/672.126 e no Pedido PCT Publicado PCT/US00/26527 (WO 01/22990), ambos requeridos em 27 de setembro de 2000, assim como em USP 6.207.646 B1. Esses oligonucleotídeos são caracterizados pela capacidade de induzir altos níveis de interferon-alfa enquanto possuindo efeitos mínimos na ativação de células B. Os oligonucleotídeos imunoestimulatórios CpG de classe A não necessariamente contêm um hexâmero palíndromo GACGTC, AGCGCT ou AACGTT descrito por Yamamoto e colegas. Yamamoto S et al. J Immunol 148: 4072-6 (1992).

Oligonucleotídeos imunoestimulatórios CpG de classe B ativam fortemente as células B humanas, porém têm efeitos mínimos induzindo o interferon α . Oligonucleotídeos imunoestimulatórios CpG de classe B foram descritos em USPs 6.194.388 B1 e em 6.239.116 B1, requeridos em 27 de fevereiro de 2001 e em 29 de maio de 2001, respectivamente.

Numa modalidade a invenção fornece um oligonucleotídeo CpG de classe B representado por pelo menos a fórmula:



- 5 em que X_1 , X_2 , X_3 e X_4 são nucleotídeos. Numa modalidade X_2 é adenina, guanina ou timina. Em outra modalidade X_3 é citosina, adenina ou timina.

Em outra modalidade a invenção fornece um oligonucleotídeo CpG de classe B isolado representado por
10 pelo menos a fórmula:



- em que X_1 , X_2 , X_3 e X_4 são nucleotídeos e N é qualquer nucleotídeo e N_1 e N_2 são seqüências de oligonucleotídeo compostas de cerca de 0 - 25 N's cada. Numa modalidade $X_1\text{X}_2$
15 é um dinucleotídeo selecionado do grupo consistindo de: GpT, GpG, GpA, ApA, ApT, ApG, CpT, CpA, CpG, TpA, TpT e TpG; e $X_3\text{X}_4$ é um dinucleotídeo selecionado do grupo consistindo de TpT, ApT, TpG, ApG, CpG, TpC, ApC, CpC, TpA, ApA e CpA. Preferivelmente, $X_1\text{X}_2$ é GpA ou GpT e $X_3\text{X}_4$ é TpT. Em outras
20 modalidades X_1 ou X_2 ou ambas são purinas e X_3 ou X_4 ou ambas são pirimidinas ou $X_1\text{X}_2$ é GpA e X_3 ou X_4 ou ambas são pirimidinas. Em outra modalidade preferida $X_1\text{X}_2$ é um dinucleotídeo selecionado do grupo consistindo de: TpA, ApA, ApC, ApG, e GpG. Em ainda outra modalidade, $X_3\text{X}_4$ é um
25 dinucleotídeo selecionado do grupo consistindo de: TpT, TpA, TpG, ApA, ApG, GpA e CpA. $X_1\text{X}_2$ em outra modalidade é um dinucleotídeo selecionado do grupo consistindo de: TpT, TpG, ApT, GpC, CpC, CpT, TpC, GpT e CpG; X_3 é um nucleotídeo

selecionado do grupo consistindo de A e T e X_4 é um nucleotídeo, mas em que quando X_1X_2 é TpC, GpT ou CpG, X_3X_4 não é TpC, ApT ou ApC. Em algumas modalidades o oligonucleotídeo tem um 5'TC.

5 Em outra modalidade preferida o oligonucleotídeo CpG tem a sequência 5' TCN₁TX₁X₂CGX₃X₄ 3' (SEQ ID NO 56). Os oligonucleotídeos CpG da invenção em algumas modalidades incluem X_1X_2 selecionado do grupo consistindo de GpT, GpG, GpA e ApA e X_3X_4 é selecionado do grupo consistindo de TpT, 10 CpT e TpC.

As seqüências de oligonucleotídeo CpG de classe B da invenção são aquelas amplamente descritas acima assim como reveladas nos Pedidos de Patente Publicados PCT/US95/01570 e PCT/US97/19791, e USP 6.194.388 B1 e USP 15 6.239.116 B1, publicados em 27 de fevereiro de 2001 e em 29 de maio de 2001, respectivamente. Seqüências exemplares incluem, mas não estão limitadas àquelas reveladas nesses últimos pedidos e patentes.

Os oligonucleotídeos imunoestimulatórios de classe 20 C contêm pelo menos duas porções distintas e têm efeitos estimulatórios únicos e desejáveis nas células do sistema imune. Alguns desses ODN têm tanto uma sequência CpG "estimulatória" tradicional quanto uma porção "rica em GC" ou "neutralizante de células B". Essa combinação de porções 25 de oligonucleotídeos tem efeitos imunoestimulantes que caem em algum lugar entre aqueles efeitos associados com ODN CpG de "classe B", os quais são fortes indutores da ativação de células B e da ativação de células dendríticas (DC), e

aqueles efeitos associados com ODN CpG de classe A os quais são fortes indutores de IFN- α e de ativação de células destruidoras naturais (NK), porém relativamente fracos indutores de ativação de células B e DC. Enquanto que ODN CpG de classe B preferidos têm estruturas fosforotioato e ODN CpG de classe A preferidos têm estruturas misturadas ou quiméricas, a classe C de oligonucleotídeos imunoestimulatórios de porção de combinação podem ter ou estruturas estabilizadas, por exemplo, fosforotioato, quiméricas, ou estruturas fosfodiéster, e em algumas modalidades preferidas, eles têm estruturas semi-maleáveis.

O domínio ou porção estimulatória pode ser definida por uma fórmula: 5' X_1DCGHX_2 3'. D é um nucleotídeo diferente de C. C é citosina. G é guanina. H é um nucleotídeo diferente de G.

X_1 e X_2 são quaisquer seqüências de oligonucleotídeo de 0 a 10 nucleotídeos de extensão. X_1 pode incluir um CG, em cujo caso existe preferivelmente um T imediatamente precedendo esse CG. Em algumas modalidades DCG é TCG. X_1 é preferivelmente de 0 a 6 nucleotídeos de comprimento. Em algumas modalidades X_2 não contém quaisquer porções poli G ou poli A. Em outras modalidades, o oligonucleotídeo estimulatório tem uma seqüência poli-T na extremidade 5' ou na extremidade 3'. Conforme aqui utilizado, "poli-A" ou "poli-T" devem se referir a um trecho de quatro ou mais A's ou T's consecutivos respectivamente, por exemplo, 5' AAAA 3' ou 5' TTTT 3'. Conforme aqui utilizado, "extremidade poli-G" deve se referir a um trecho

de quatro ou mais G's consecutivos, por exemplo, 5' GGGG 3', ocorrendo na extremidade 5' ou na extremidade 3' de um oligonucleotídeo. Conforme aqui utilizado, "oligonucleotídeo poli-G" deve se referir a um oligonucleotídeo com a fórmula

5 5' $X_1X_2GGGX_3X_4$ 3', em que X_1 , X_2 , X_3 e X_4 são nucleotídeos e preferivelmente pelo menos um de X_3 e X_4 é uma G.

Alguns esquemas preferidos para o domínio estimulatório da célula B sob essa fórmula compreendem TTTTTCG, TCG, TTCG, TTTCG, TTTTCG, TCGT, TTCGT, TTTCGT,

10 TCGTCGT.

A segunda porção do oligonucleotídeo é referida ou como P ou N e está posicionada imediatamente 5' ao X_1 ou imediatamente 3' ao X_2 .

N é uma seqüência neutralizante de célula B que

15 começa com um trinucleotídeo CGG e é pelo menos 10 nucleotídeos de comprimento. Uma porção neutralizante de célula B inclui pelo menos uma seqüência CpG na qual o CG é precedido por uma C ou seguido por uma G (Krieg AM et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95: 12631-12636) ou é uma CG

20 contendo seqüência de DNA na qual a C da CG é metilada. Conforme aqui utilizado, "CpG" deve se referir a uma citosina 5' (C) seguida por uma guanina 3' (G) e ligada por uma ligação fosfato. Pelo menos a C da 5' CG 3' deve não ser metilada. Porções neutralizantes são porções as quais têm

25 algum grau de capacidade imunoestimulatória quando presentes numa porção diferente não-estimulatória mas, a qual quando presente no contexto de outras porções imunoestimulatórias, servem para reduzir o potencial imunoestimulatório das

outras porções.

P é uma seqüência contendo palíndromo rico em GC de pelo menos 10 nucleotídeos de extensão. Conforme aqui utilizado, "palíndromo" e, equivalentemente, "seqüência
5 palindrômica" deve se referir a uma repetição invertida, isto é, uma seqüência tal como ABCDEE'D'C'B'A' na qual A e A', B e B', etc. são bases capazes de formar os pares de bases usuais Watson-Crick.

Conforme aqui utilizado, "palíndromo rico em GC"
10 deve se referir a um palíndromo com uma composição de base de pelo menos dois terços de G's e C's. Em algumas modalidades o domínio rico em GC é preferivelmente 3' em relação ao "domínio estimulatório de células B". No caso de um palíndromo rico em GC de 10 bases de extensão, o
15 palíndromo contém desta forma pelo menos 8 G's e C's. No caso de um palíndromo rico em GC de 12 bases de extensão, o palíndromo também contém pelo menos 8 G's e C's. no caso de um palíndromo rico em GC 14-mer, pelo menos dez bases do palíndromo são G's e C's. Em algumas modalidades, o
20 palíndromo rico em GC é composto exclusivamente de G's e C's.

Em algumas modalidades o palíndromo rico em GC tem uma composição de base de pelo menos 81 por cento de G's e C's. No caso de tal palíndromo rico em GC de 10 bases de
25 extensão, o palíndromo deste modo é composto exclusivamente de G's e C's. no caso de tal palíndromo rico em GC de 12 bases de extensão, é preferível que pelo menos dez bases (83 por cento) do palíndromo sejam G's e C's. Em algumas

modalidades preferidas, um palíndromo rico em GC de 12 bases é composto exclusivamente de G's e C's. No caso de um palíndromo rico em GC 14-mer, pelo menos doze bases (86 por cento) do palíndromo são G's e C's. Em algumas modalidades

5 preferidas, um palíndromo rico em GC de 14 bases de extensão é composto exclusivamente de G's e C's. As C's de um palíndromo rico em GC podem ser não-metiladas ou elas podem ser metiladas.

Em geral, este domínio tem pelo menos 3 Cs e Gs,

10 mais preferivelmente 4 de cada, e mais preferivelmente 5 ou mais de cada. O número de Cs e Gs nesse domínio não precisa ser idêntico. É preferível que as Cs e Gs sejam dispostos de forma que elas sejam capazes de formar um duplex auto-complementar, ou palíndromo, tal como CCGCGCGC. Esse pode

15 ser interrompido por As ou Ts, mas é preferível que a auto-complementaridade seja pelo menos parcialmente conservada como, por exemplo, nas porções CGACGTTCGTCG (SEQ ID NO: 49) ou CGGCGCCGTGCCG (SEQ ID NO: 50). Quando a complementaridade não é preservada, é preferível que os pares de base não-

20 complementares sejam TG. Numa modalidade preferida não há mais do que 3 bases consecutivas que não sejam parte do palíndromo, preferivelmente não mais do que 2, e mais preferivelmente somente uma. Em algumas modalidades, o palíndromo rico em GC inclui pelo menos um trímero CGG, pelo

25 menos um trímero CCG ou pelo menos um tetrâmero CGCG. Em outras modalidades, o palíndromo rico em GC não é CCCCCCGGGGGG (SEQ ID NO: 51) ou GGGGGGCCCCC (SEQ ID NO: 52), CCCCCGGGGG (SEQ ID NO: 53) ou GGGGGCCCCC (SEQ ID NO:

54).

Pelo menos uma das G's da região rica em GC pode ser substituída com uma inosina (I). Em algumas modalidades, P inclui mais do que uma I.

5 Em certas modalidades, o oligonucleotídeo imunoestimulatório tem uma das seguintes fórmulas 5' NX_1DCGHX_2 3', 5' X_1DCGHX_2N 3', 5' PX_1DCGHX_2 3', 5' X_1DCGHX_2P 3', 5' $X_1DCGHX_2PX_3$ 3', 5' $X_1DCGHPX_3$ 3', 5' $DCGHX_2PX_3$ 3', 5' $TCGHX_2PX_3$ 3', 5' $DCGHPX_3$ 3', ou 5' $DCGHP$ 3'.

10 Em outros aspectos, a invenção fornece oligonucleotídeos imunoestimulatórios os quais são definidos por uma fórmula: 5' N_1PyGN_2P 3'. N_1 é qualquer seqüência de 1 a 6 nucleotídeos de extensão. Py é uma pirimidina. G é guanina. N_2 é qualquer seqüência de 0 a 30 nucleotídeos de
15 extensão. P é um palíndromo rico em GC contendo seqüência de pelo menos 10 nucleotídeos de extensão.

N_1 e N_2 podem conter mais de 50% de pirimidinas, e mais preferivelmente mais do que 50% de T. N_1 pode incluir uma CG, em cujo caso existe preferivelmente uma T
20 imediatamente precedendo essa CG. Em algumas modalidades N_1PyG é TCG (tal como ODN 5376, o qual é um 5' TCGG) e mais preferivelmente uma $TCGN_2$, onde N_2 não é G.

N_1PyGN_2P pode incluir um ou mais nucleotídeos de inosina (I). Ou a C ou a G em N_1 podem ser substituídas por
25 inosina, mas a CpI é preferível à IpG. Para substituições de inosina tais como IpG, a atividade ótima pode ser alcançada com o uso de uma estrutura quimérica ou "semi-maleável", onde a ligação entre a IG ou a CI é fosfodiéster. N_1 pode

incluir pelo menos uma porção CI, TCI, IG ou TIG.

Em certas modalidades N₁PyGN₂ é uma sequência selecionada do grupo consistindo de TTTTTCG, TCG, TTCG, TTTCG, TTTTCG, TCGT, TTCGT, TTTCGT e TCGTCGT.

5 ODN de classe C também são descritos no Pedido de Patente Americano Número de Série 10/978.283, requerido em 28 de outubro de 2004. Os ácidos nucleicos nesse ponto descritos são todos incorporados por referência.

Alguns exemplos não-limitantes de
10 oligonucleotídeos CpG úteis de acordo com a invenção incluem:

SEQ ID N°	Sequência
1	T*C G*C G*T*C G*T*T*C G*G*C*G*C G*C*G*C*C*G
2	T*C G*T*C G*A*C G*T*T*C G*G*C*G*C G*C*G*C*C*G
3	T*C G*G*A*C G*T*T*C G*G*C*G*C G*C*G*C*C*G
4	T*C G*G*A*C G*T*T*C G*G*C*G*C*G*C*C*G
5	T*C G*C G*T*C G*T*T*C G*G*C*G*C*G*C*C*G
6	T*C G*A*C G*T*T*C G*G*C*G*C G*C*G*C*C*G
7	T*C G*A*C G*T*T*C G*G*C*G*C*G*C*C*G
8	T*C G*C G*T*C G*T*T*C G*G*C*G*C*C*G
9	T*C G*C G*A*C G*T*T*C G*G*C*G*C G*C*G*C*C*G
10	T*C G*T*C G*T*C G*T*T*C G*G*C*G*C G*C*G*C*C*G
11	T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*G*A*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T
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
13	T*C*G*T*C G*T*T*T*T*A*C G*G*C*G*C*C G*T*G*C*C*G
14	T*C G*T*C G*T*T*T*T*G*A*C G*T*T*T*T*G*T*C G*T*T

15	T*C G*T*C G*A*C G*T*T*C G*G*C*G*C G*C*G*C*C*G
16	T*C G A C G T C G T G G*G*G*G
17	T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*C*G*T*G*A*C*G*T*G
18	T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*C*G*T*G*A*C*G
19	T*T*C G*T*C G*T*T*T*T G*T*C G*T*T
20	T*T*T*C G*T*C G*T*T*T*T*C G*T*C G*T*T
21	T*C*G*T*C G*T*A*C G*G*C*G*C*C G*T*G*C*C*G
22	T*C*G*T*C G*T*T*A*C G*G*C*G*C*C G*T*G*C*C*G
23	T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*C*G*T*G*A*C*G*T*T
24	T*C*G*T*C G*A*C G*A*T*C G*G*C*G*C*C G*T*G*C*G*C*G
25	T*C*G*T*C*G*A*C*G*A T C*G*G*C*G*C*C*G*T*G*C*C*G
26	T*C*G*A*C G*T*C*G*A*C G*T*G*A*C*G*T*T
27	T*C*G*A*C G*T*C*G*A*C*G*T G*A*C*G*T*T
28	T*C*G*T*C G*T*T*T*A*C G*G*C*G*C*C G*T*G*C*C*G*T
29	T*C G*T*C G*T*T*T*T*G*A*C G*T*T*T*T*G*T*C G*T*T
30	T*C G*T*T*T*T*G*A*C G*T*T*T*T*G*T*C G*T*T
31	T*C G*T*T*T*T*G*A*C G*T*T
32	T*C G*T*C G*T*T*T T*G*A*C G*T*T*T*T*G*T*C G*T*T
33	T*C G*T*C G*T*T*T T*G*A*C G*T*T*T T*G*T*C G*T*T
34	T*C G*T*C G*T T*T T*G A*C G*T T*T T*G T*C G*T*T
35	T C G T C G T T T T G A C G T T T T G T C G T T
36	G*T*C G*T*T*T*T*G*A*C G*T*T*T*T*G*T*C G*T*T
37	T*C G*T*C G*T*T*T*T*G*A*C G*T*T*T*T*G*T*C
38	T*C G*T*C G*T*T*T*T*G*A*C
39	G*T*T*T*T*G*A*C G*T*T*T*T*G*T*C
40	G*T*T*T*T*G*A*C G*T*T*T*T*G*T*C G*T*T
41	G*T*C G*T*T*T*T*G*A*C G*T*T

42	T*C G*T*T*T*T*G*A*C G*T*T*T*T*G*T*C
43	G*T*C G*T*T*T*T*G*A*C G*T*T*T*T*G*T*C
44	G*T*C G*T*T*T*T*G*A*C
45	C G*T*C G*T*T*T*T*G*A*C G*T*T*T*T*G*T*C G*T*T
46	T*C*G*A*T*C*G*T*T*T*T T C G*T*G*C*G*T*T*T*T
47	T*C*G*C*G*A*C G*T*T*C*G*C*G*C G*C*G*C*G
48	T*C G*G*A*C G*T*T*C G*G*C*G*C*G*C*C*G
49	CGACGTTTCGTCTG
50	CGGCGCCGTGCCG
51	CCCCCGGGGGG
52	GGGGGGCCCCCC
53	CCCCCGGGGG
54	GGGGGGCCCCC
55	T*G C*T*C G*T*C GT*T*C G*G*C*G*C G*C*G*C*G
56	TCXTXXCGXX
57	T*C G*T*C G*T*T*C G*G*C*G*C*G*C*C*G

As moléculas de oligonucleotídeo imunestimulatórias podem ter uma estrutura quimérica. Para propósitos da presente invenção, uma estrutura quimérica se refere a uma estrutura parcialmente estabilizada, em que pelo menos uma ligação internucleotídeo é fosfodiéster ou tipo fosfodiéster, e em que pelo menos uma outra ligação internucleotídeo é uma ligação internucleotídeo 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 reportadas como sendo estabilizadas em relação a

ligações fosfodiéster, para propósitos da natureza química da estrutura, ligações boranofosfonato podem ser classificadas ou como tipo fosfodiéster ou como estabilizadas, dependendo do contexto. Por exemplo, uma

5 estrutura quimérica de acordo com a presente invenção poderia numa modalidade incluir pelo menos uma ligação fosfodiéster (fosfodiéster ou tipo fosfodiéster) e pelo menos uma ligação boranofosfonato (estabilizada). Em outra modalidade uma estrutura quimérica de acordo com a presente

10 invenção poderia incluir boranofosfonato (fosfodiéster ou tipo fosfodiéster) e ligações fosforotioato (estabilizadas). Uma "ligação internucleotídeo estabilizada" deve significar uma ligação internucleotídeo que é relativamente resistente à degradação *in vivo* (por exemplo, via uma *exo-* ou

15 *endonuclease*) em comparação com uma ligação internucleotídeo fosfodiéster. Ligações internucleotídeo estabilizadas preferidas incluem, sem limitação, fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonato e metilfosforotioato. Outras ligações internucleotídeo estabilizadas incluem, sem

20 limitação: peptídeo, alquil, defosfo, e outras conforme descritas acima.

Estruturas modificadas tais como fosforotioatos, podem ser sintetizadas usando técnicas automatizadas empregando ou químicas de fosforoamidato ou H-fosfonato.

25 Aril- e alquilfosfonatos podem ser feitos, por exemplo, conforme descrito na Patente Americana No. 4.469.863; e alquilfosfotriésteres (nos quais a porção de oxigênio carregada é alquilada conforme descrito na Patente Americana

No. 5.023.243, e na Patente Européia No. 092.574) podem ser preparados por síntese de fase sólida automatizada usando reagentes comercialmente disponíveis. Métodos para fazer outras modificações e substituições estruturais no DNA foram descritos. Uhlmann E et al. (1990) Chem Rev 90: 544; Goodchild J (1990) Bioconjugate Chem 1: 165. Métodos para preparar oligonucleotídeos quiméricos também são conhecidos. Por exemplo, patentes emitidas para Uhlmann et al descreveram tais técnicas.

10 ODN modificado de estrutura misturada pode ser sintetizado usando um sintetizador de DNA disponível e química de fosforoamidita padrão. (F. E. Eckstein, "Oligonucleotides and Analogues - A Practical Approach" IRL Press, Oxford, RU, 1991, e M. D. Matteucci e M. H. Caruthers, Tetrahedron Lett. 21, 719 (1980)). Depois do acoplamento, ligações PS são introduzidas por sulfurização usando o reagente Beaucage (R. P. Iyer, W. Egan, J. B. Regan e S. L. Beaucage, J. Am. Chem. Soc. 112, 1253 (1990)) (0.075 M em acetonitrila) ou fenilacetildissulfeto (PADS) seguido
15 pelo completamento com anidrido acético, 2,6-lutidina em tetraidrofurano (1:1:8, v:v:v) e N-metilimidazol (16% em tetraidrofurano). Esse passo de completamento é efetuado depois da reação de sulfurização para minimizar a formação de ligações fosfodiéster (PO) indesejáveis nas posições onde
20 uma ligação fosforotioato deva estar localizada. No caso da introdução de uma ligação fosfodiéster, por exemplo, num dinucleotídeo CpG, o fósforo III intermediário é oxidado pelo tratamento com uma solução de iodo em água/piridina.

Depois da clivagem a partir do suporte sólido e da desproteção final pelo tratamento com amônia concentrada (15h a 50 °C), os ODNs são analisados por HPLC numa coluna Gen-Pak Fax (Millipore-Waters) usando um gradiente de NaCl (por exemplo, tampão A: NaH_2PO_4 10 mM em acetonitrila/água = 1:4/v:v pH 6,8; tampão B: NaH_2PO_4 10 mM, NaCl 1,5 M em acetonitrila/água = 1:4/v:v, 5 a 60% de B em 30 minutos a 1 mL/min) ou por eletroforese de gel capilar. O ODN pode ser purificado por HPLC ou por FPLC numa coluna Source High Performance (Amersham Pharmacia). 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 oligonucleotídeos da invenção também podem incluir outras modificações. Essas incluem análogos de DNA não-iônicos, tais como alquil- e arilfosfatos (nos quais o oxigênio fosfonato carregado é substituído por um grupo alquil ou aril), fosfodiéster e alquilfosfotriésteres, nos quais a porção de oxigênio carregada é alquilada. Oligonucleotídeos os quais contêm diol, tal como tetraetilenoglicol ou hexaetilenoglicol, e qualquer um ou em ambos os terminais também foram demonstrados por serem substancialmente resistentes à degradação da nuclease.

Em algumas modalidades os oligonucleotídeos podem ser oligonucleotídeos maleáveis ou semi-maleáveis. Um oligonucleotídeo maleável é um oligonucleotídeo imunoestimulatório com uma estrutura parcialmente estabilizada, na qual ligações internucleotídeo fosfodiéster

ou semelhantes à fosfodiéster ocorrem somente na e imediatamente adjacentes a pelo menos um dinucleotídeo pirimidina-purina interno (YZ). Preferivelmente YZ é YG, um dinucleotídeo pirimidina-guanosina (YG). O pelo menos um
 5 dinucleotídeo YZ interno por si só tem uma ligação internucleotídeo fosfodiéster ou tipo fosfodiéster. Uma ligação internucleotídeo fosfodiéster ou tipo fosfodiéster ocorrendo imediatamente adjacente a pelo menos um dinculeotídeo YZ interno pode ser 5', 3' ou tanto 5' quanto
 10 3' a pelo menos um dinucleotídeo YZ interno.

Particularmente, ligações internucleotídeo fosfodiéster ou tipo fosfodiéster envolvem "dinucleotídeos internos". Um dinucleotídeo interno em geral deve significar qualquer par de nucleotídeos adjacentes conectados por uma
 15 ligação internucleotídeo, na qual nenhum nucleotídeo no par de nucleotídeos é um nucleotídeo terminal, isto é, nenhum nucleotídeo no par de nucleotídeos é um nucleotídeo definindo a extremidade 5' ou 3' do oligonucleotídeo. Dessa forma, um oligonucleotídeo linear que é n nucleotídeos de
 20 extensão tem um total de n-1 dinucleotídeos e somente n-3 dinucleotídeos internos. Cada ligação internucleotídeo num dinucleotídeo interno é uma ligação internucleotídeo interna. Dessa forma, um oligonucleotídeo linear que é n nucleotídeos de extensão tem um total de n-1 ligações
 25 internucleotídicas e somente n-3 ligações internucleotídicas internas. As ligações internucleotídicas fosfodiéster ou tipo fosfodiéster estrategicamente colocadas, conseqüentemente, se referem a ligações internucleotídicas

fosfodiéster ou tipo fosfodiéster posicionadas entre qualquer par de nucleotídeos na sequência de oligonucleotídeo. Em algumas modalidades as ligações internucleotídicas fosfodiéster ou tipo fosfodiéster não
5 estão posicionadas entre qualquer par de nucleotídeos mais próximo da extremidade 5' ou 3'.

Preferivelmente uma ligação internucleotídica fosfodiéster ou tipo fosfodiéster ocorrendo imediatamente adjacente a pelo menos um dinucleotídeo YZ interno é por si
10 só uma ligação internucleotídica interna. Dessa forma, para uma sequência N_1YZN_2 , em que N_1 e N_2 são cada um, independentemente do outro, qualquer nucleotídeo individual, o dinucleotídeo YZ tem uma ligação fosfodiéster ou semelhante à fosfodiéster, e, além disso, (a) N_1 e Y estão
15 ligados por uma ligação internucleotídica fosfodiéster ou semelhante à fosfodiéster quando N_1 é um nucleotídeo interno, (b) Z e N_2 estão ligados por uma ligação internucleotídica fosfodiéster ou semelhante à fosfodiéster quando N_2 é um nucleotídeo interno, ou (c) N_1 e Y estão
20 ligados por uma ligação internucleotídica fosfodiéster ou tipo fosfodiéster quando N_1 é um nucleotídeo interno e Z e N_2 estão ligados por uma ligação internucleotídica fosfodiéster ou semelhante à fosfodiéster quando N_2 é um nucleotídeo interno.

25 Acredita-se que oligonucleotídeos maleáveis de acordo com a presente invenção sejam relativamente suscetíveis à clivagem da nuclease em comparação com oligonucleotídeos completamente estabilizados. Sem pretender

estar ligado a uma teoria ou mecanismo particular, acredita-se que oligonucleotídeos maleáveis da invenção sejam cliváveis a fragmentos sem atividade imunoestimulatória ou com atividade imunoestimulatória reduzida em relação aos oligonucleotídeos maleáveis de comprimento total. Acredita-se que a incorporação de pelo menos uma ligação internucleotídica sensível à nuclease, particularmente próxima do meio do oligonucleotídeo, proporcione um "desligamento" (off-switch) o qual altera a farmacocinética do oligonucleotídeo de forma a reduzir a duração da atividade imunoestimulatória máxima do oligonucleotídeo. Isso pode ser de valor particular nos tecidos e em aplicações clínicas nas quais seja desejável evitar injúrias relacionadas com a inflamação local crônica ou imunoestimulação, por exemplo, do rim.

Um oligonucleotídeo semi-maleável é um oligonucleotídeo imunoestimulatório com uma estrutura parcialmente estabilizada, na qual ligações internucleotídicas fosfodiéster ou semelhantes à fosfodiéster ocorrem somente dentro de pelo menos um dinucleotídeo pirimidina-purina interno (YZ). Oligonucleotídeos semi-maleáveis geralmente possuem potência imunoestimulatória aumentada em relação aos oligonucleotídeos imunoestimulatórios completamente estabilizados correspondentes. Devido à maior potência dos oligonucleotídeos semi-maleáveis, oligonucleotídeos semi-maleáveis podem ser usados, em alguns exemplos, em concentrações efetivas mais baixas e ter doses efetivas mais

baixas do que oligonucleotídeos imunoestimulatórios completamente estabilizados para alcançar um efeito biológico desejado.

Acredita-se que as propriedades precedentes dos
5 oligonucleotídeos semi-maleáveis geralmente aumentam com a "dose" crescente de ligações internucleotídicas fosfodiéster ou tipo fosfodiéster envolvendo dinucleotídeos YZ internos. Dessa forma acredita-se, por exemplo, que geralmente para uma dada seqüência oligonucleotídica com cinco
10 dinucleotídeos YZ internos, um oligonucleotídeo com cinco ligações internucleotídicas YZ fosfodiéster ou tipo fosfodiéster internas seja mais imunoestimulatório do que um oligonucleotídeo com quatro ligações internucleotídicas YG fosfodiéster ou tipo fosfodiéster internas, o qual por sua vez seja mais imunoestimulatório do que um oligonucleotídeo
15 com três ligações internucleotídicas YZ fosfodiéster ou tipo fosfodiéster internas, o qual por sua vez seja mais imunoestimulatório do que um oligonucleotídeo com duas ligações internucleotídicas YZ fosfodiéster ou tipo fosfodiéster internas, o qual por sua vez seja mais imunoestimulatório do que um oligonucleotídeo com uma
20 ligação internucleotídica YZ fosfodiéster ou tipo fosfodiéster interna. Importantemente acredita-se que a inclusão de mesmo uma ligação internucleotídica YZ fosfodiéster ou tipo fosfodiéster interna seja vantajosa em
25 relação à ausência de ligação internucleotídica YZ fosfodiéster ou tipo fosfodiéster interna. Além da quantidade de ligações internucleotídicas fosfodiéster ou

tipo fosfodiéster, a posição ao longo da extensão do oligonucleotídeo também pode afetar a potência.

Os oligonucleotídeos maleáveis e semi-maleáveis geralmente incluirão, além das ligações fosfodiéster ou tipo
5 fosfodiéster em posições internas preferidas, extremidades 5' e 3' que são resistentes à degradação. Tais extremidades resistentes à degradação podem envolver qualquer modificação adequada que resulte numa resistência aumentada contra a digestão da exonuclease em relação às extremidades não-
10 modificadas correspondentes. Por exemplo, as extremidades 5' e 3' podem ser estabilizadas pela inclusão ali de pelo menos uma modificação fosfato da estrutura. Numa modalidade preferida, a pelo menos uma modificação fosfato da estrutura em cada extremidade é independentemente uma ligação
15 internucleotídica fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonato ou metilfosforotioato. Em outra modalidade, a extremidade resistente à degradação inclui uma ou mais unidades nucleotídicas conectadas por ligações peptídicas ou amida na extremidade 3'.

20 Uma ligação internucleotídica fosfodiéster é o tipo de ligação característica de oligonucleotídeos encontrados na natureza. A ligação internucleotídica fosfodiéster inclui um átomo de fósforo flanqueado por dois átomos de oxigênio fazendo uma ponte e ligados também por
25 dois átomos de oxigênio adicionais, um carregado e o outro não-carregado. Ligação internucleotídica fosfodiéster é particularmente preferida quando é importante reduzir a meia-vida do tecido do oligonucleotídeo.

Uma ligação internucleotídica tipo fosfodiéster é um grupo que faz ponte contendo fósforo que é quimicamente e/ou diastereoisomericamente similar ao fosfodiéster. Medidas de similaridade em relação ao fosfodiéster incluem

5 suscetibilidade à digestão pela nuclease e capacidade de ativar a RNase H. Dessa forma, por exemplo fosfodiéster, mas não o fosforotioato, oligonucleotídeos são suscetíveis à digestão pela nuclease, enquanto que tanto os oligonucleotídeos fosfodiéster quanto fosforotioato ativam a

10 RNase H. Numa modalidade preferida a ligação internucleotídica tipo fosfodiéster é a ligação boranofosfato (ou equivalentemente, boranofosfonato). Patente Americana No. 5.177.198; Patente Americana No. 5.859.231; Patente Americana No. 6.160.109; Patente

15 Americana No. 6.207.819; Sergueev et al, (1998) J Am Chem Soc 120: 9417-27. Em outra modalidade preferida a ligação internucleotídica tipo fosfodiéster é fosforotioato Rp diastereoisomericamente puro. Acredita-se que fosforotioato Rp diastereoisomericamente puro seja mais suscetível à

20 digestão pela nuclease e seja melhor na ativação da RNase H do que o fosforotioato Sp misturado ou diastereoisomericamente puro. Estereoisômeros de oligonucleotídeos CpG são o assunto do Pedido de Patente Americano co-pendente 09/361.575, requerido em 27 de julho

25 de 1999, e do Pedido PCT publicado PCT/US99/17100 (WO 00/06588). É para ser notado que para propósitos da presente invenção, o termo "ligação internucleotídica tipo fosfodiéster" especificamente exclui ligações

internucleotídicas fosforoditioato e metilfosfonato.

Conforme descrito acima, os oligonucleotídeos maleáveis e semi-maleáveis da invenção podem ter ligações tipo fosfodiéster entre C e G. Um exemplo de uma ligação
5 tipo fosfodiéster é uma ligação fosforotioato numa conformação R_p . A p-quiralidade oligonucleotídica tem efeitos aparentemente opostos na atividade imune de um oligonucleotídeo CpG, dependendo do ponto de tempo no qual a atividade é medida. Num ponto de tempo inicial de 40
10 minutos, o estereoisômero R_p , mas não o S_p do oligonucleotídeo CpG fosforotioato induz a fosforilação JNK nas células do baço de camundongo. Ao contrário, quando ensaiado no ponto de tempo tardio de 44 h, o estereoisômero S_p mas não o R_p é ativo no estímulo da proliferação das
15 células do baço. Essa diferença na cinética e bioatividade dos estereoisômeros R_p e S_p não resulta de qualquer diferença na absorção celular, mas ao contrário mais provavelmente é devido a dois papéis biológicos opostos da p-quiralidade. Primeiro, a atividade intensificada do estereoisômero R_p em
20 comparação com o S_p para estimular as células imunes em pontos de tempo iniciais indica que o R_p pode ser mais eficaz na interação com o receptor CpG, TLR9, ou na indução das vias de sinalização à jusante. Por outro lado, a degradação mais rápida dos oligonucleotídeos PS R_p em
25 comparação com o S_p resulta numa duração muito curta de sinalização, de forma que os oligonucleotídeos PS S_p aparentam ser mais biologicamente ativos quando testados em pontos de tempo tardios.

Um feito surpreendentemente forte é alcançado pela p-quiralidade no próprio dinucleotídeo CpG. Em comparação com o oligonucleotídeo CpG estereo-aleatório, o congênero no qual o dinucleotídeo CpG individual foi ligado no R_p foi
5 levemente mais ativo, enquanto que o congênero contendo uma ligação Sp foi quase inativo para induzir a proliferação das células do baço.

O tamanho (isto é, a quantidade de resíduos de nucleotídeos ao longo da extensão do oligonucleotídeo) do
10 oligonucleotídeo imunoestimulatório também pode contribuir para a atividade estimulatória do oligonucleotídeo. Para facilitar a absorção nas células os oligonucleotídeos imunoestimulatórios preferivelmente têm uma extensão mínima de 6 resíduos de nucleotídeos. Oligonucleotídeos de qualquer
15 tamanho maior do que 6 nucleotídeos (mesmo de muitos kb de extensão) são capazes de induzir uma resposta imune de acordo com a invenção se suficiente porções imunoestimulatórias estiverem presentes, uma vez que oligonucleotídeos maiores são degradados dentro das células.
20 Acredita-se pelos presentes inventores que oligonucleotídeos semi-maleáveis tão curtos quanto 4 nucleotídeos também podem ser imunoestimulatórios se eles podem ser distribuídos para o interior da célula. Em certas modalidades preferidas de acordo com a presente invenção, os oligonucleotídeos
25 imunoestimulatórios estão entre 4 e 100 nucleotídeos de comprimento. Em modalidades típicas os oligonucleotídeos imunoestimulatórios estão entre 6 e 40 nucleotídeos de extensão. Em certas modalidades de acordo com a presente

invenção, os oligonucleotídeos imunoestimulatórios estão entre 6 e 19 nucleotídeos de extensão. Os oligonucleotídeos estimulatórios geralmente têm uma extensão na faixa de entre 4 e 100 e, em algumas modalidades, 8 e 40. A extensão pode
5 estar na faixa entre 16 e 24 nucleotídeos.

O termo "oligonucleotídeo" também engloba oligonucleotídeos com substituições ou modificações, tais como nas bases e/ou açúcares. Por exemplo, eles incluem oligonucleotídeos com açúcares estruturais que estão
10 covalentemente ligados a grupos orgânicos de baixo peso molecular diferentes de um grupo hidroxila na posição 2' e diferentes de um grupo fosfato ou grupo hidroxila na posição 5'. Dessa forma, oligonucleotídeos modificados podem incluir um grupo ribose 2'-O-alquilado. Além disso,
15 oligonucleotídeos modificados podem incluir açúcares tais como arabinose ou 2'-fluorarabinose ao invés de ribose. Dessa forma, os oligonucleotídeos podem ser heterogêneos na composição da estrutura, contendo dessa forma qualquer combinação possível de unidades de polímero ligadas juntas,
20 tais como peptídeo-ácidos nucleicos (os quais têm uma estrutura aminoácido com bases de oligonucleotídeo).

Oligonucleotídeos também incluem purinas e pirimidinas substituídas tais como bases modificadas de purina 7-deaza-7-substituída e de propina pirimidina C-5.
25 Wagner RW et al. (1996) Nat Biotechnol 14: 840-4. Purinas e pirimidinas incluem, mas não estão limitadas, a adenina, citosina, guanina, timina, 5-metilcitosina, 5-hidroxicitosina, 5-fluorcitosina, 2-aminopurina, 2-amino-6-

cloropurina, 2,6-diamoinopurina, hipoxantina e outras nucleobases de ocorrência natural e não-natural, porções aromáticas substituídas e não-substituídas. Outras tais modificações são bem conhecidas pelos indivíduos versados na
5 técnica.

Os oligonucleotídeos imunoestimulatórios da presente invenção podem englobar várias modificações e substituições químicas, em comparação com DNA e RNA natural, envolvendo uma ponte internucleotídica fosfodiéster, uma
10 unidade β -D-ribose e/ou uma base de nucleotídeo natural (adenina, guanina, citosina, timina, uracil). Exemplos de modificações químicas são conhecidas pela pessoa versada e estão descritas, por exemplo, em Uhlmann E et al. (1990) Chem Rev 90: 543; "Protocols for Oligonucleotides and
15 Analogs" Synthesis and Properties & Synthesis and Analytical Techniques, S. Agrawal, Ed, Humana Press, Totowa, EUA 1993 ; Crooke ST et al. (1996) Aram Rev Pharmacol Toxicol 36: 107-129; e Hunziker J et al. (1995) Mod Synth Methods 7: 331-417. Um oligonucleotídeo de acordo com a invenção pode ter
20 uma ou mais modificações, em que cada modificação está localizada numa ponte internucleotídica fosfodiéster particular e/ou numa unidade β -D-ribose particular e/ou numa posição de base de nucleotídeo natural particular em comparação com um oligonucleotídeo da mesma sequência a qual
25 é composta de RNA ou DNA natural.

Por exemplo, a invenção se refere a um oligonucleotídeo o qual pode compreender uma ou mais modificações e em que cada modificação é independentemente

selecionada de:

- a) a substituição de uma ponte internucleotídica fosfodiéster localizada na extremidade 3' e/ou 5' de um nucleotídeo por uma ponte internucleotídica modificada,
- b) a substituição de uma ponte fosfodiéster localizada na extremidade 3' e/ou 5' de um nucleotídeo por uma ponte defosfo,
- c) a substituição de uma unidade fosfato de açúcar da estrutura 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 de nucleotídeo natural por uma base de nucleotídeo modificada.

Exemplos mais detalhados para a modificação química de um oligonucleotídeo são como se segue.

Uma ponte internucleotídica fosfodiéster localizada na extremidade 3' e/ou 5' de um nucleotídeo pode ser substituída por uma ponte internucleotídica modificada, em que a ponte internucleotídica modificada é, por exemplo, selecionada a partir de pontes fosforotioato, fosforoditioato, NR^1R^2 -fosforoamidato, boranofosfato, α -hidroxibenzilfosfonato, éster fosfato-(C_1 - C_{21})-O-alquílico, fosfato-(C_6 - C_{12}) aril-(C_1 - C_{21})-O-alquil]éster, alquilfosfonato (C_1 - C_8) e/ou arilfosfonato (C_6 - C_{12}), (C_7 - C_{12})- α -hidroximetilaril (por exemplo, revelado na WO 95/01363), em que aril (C_6 - C_{12}), aril (C_6 - C_{20}) e aril (C_6 - C_{14}) são

opcionalmente substituídos por halogênio, alquil, alcóxi, nitro, ciano, e onde R^1 e R^2 são, independentemente um do outro, hidrogênio, alquil (C_1 - C_{18}), aril (C_6 - C_{20}), aril (C_6 - C_{14})-alquil (C_1 - C_8), preferivelmente hidrogênio, alquil (C_1 - C_8), preferivelmente alquil (C_1 - C_4) e/ou metoxietil, ou R^1 e R^2 formam, juntamente com o átomo de nitrogênio que os carrega, um anel heterocíclico de 5 - 6 membros o qual pode adicionalmente conter um outro heteroátomo a partir do grupo O, S e N.

A substituição de uma ponte fosfodiéster localizada na extremidade 3' e/ou 5' de um nucleotídeo por uma ponte defosfo (pontes defosfo estão descritas, por exemplo, em Uhlmann E e Peyman A em "Methods in Molecular Biology", Vol. 20, "Protocols for Oligonucleotides and Analogs", S. Agrawal, Ed., Humana Press, Totowa 1993, Capítulo 16, pp. 355 ff), em que uma ponte defosfo é, por exemplo, selecionada das pontes defosfo formacetal, 3'-tioformacetal, metilidroxilamina, oxima, metilenodimetilidrazo, dimetilenosulfona e/ou grupos silil.

Uma unidade de fosfato de açúcar (isto é, uma β -D-ribose e uma ponte internucleotídica fosfodiéster juntamente formando uma unidade de fosfato de açúcar) a partir da estrutura de fosfato de açúcar (isto é, uma estrutura de fosfato de açúcar é composta de unidades de fosfato de açúcar) pode ser substituída por outra unidade, em que a outra unidade é, por exemplo, adequada para acumular um oligômero "derivado de morfolino" (conforme descrito, por exemplo, em Stirchak EP et al. (1989) Oligonucleotides Res

17: 6129-41), isto é, por exemplo, a substituição por uma unidade derivada de morfolino; ou para acumular um oligonucleotídeo de poliamida ("PNA"; conforme descrito, por exemplo, em Nielsen PE et al. (1994) Bioconjug Chem 5: 3-7), isto é, por exemplo, a substituição por uma unidade de estrutura de PNA, por exemplo, por 2-aminoetilglicina.

Uma unidade de β -ribose ou uma unidade β -D-2'-desoxirribose pode ser substituída 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-alkuil-(C₁-C₆)-ribose, preferivelmente 2'-O-alkuil-(C₁-C₆)-ribose é 2'-O-metilribose, 2'-O-alkenil-(C₂-C₆)-ribose, 2'-[O-alkuil(C₁-C₆)-O-alkuil-(C₁-C₆)]-ribose, 2'-NH₂-2'-desoxirribose, β -D-xilofuranose, α -arabinofuranose, 2,4-dideóxi- β -D-eritroexopiranosose e carbocíclico (descrito, por exemplo, em Froehler J (1992) Am Chem Soc 114: 8320) e/ou análogos de açúcar de cadeia aberta (descritos, por exemplo, em Vandendriessche et al. (1993) Tetrahedron 49: 7223) e/ou por análogos de bicicloaçúcares (descritos, por exemplo, em Tarkov M et al. (1993) HeIv Chim Acta 76:481).

Em algumas modalidades, o açúcar é 2'-O-metilribose, particularmente para um ou ambos os nucleotídeos ligados por uma ligação internucleotídica fosfodiéster ou tipo fosfodiéster.

Oligonucleotídeos também incluem purinas e pirimidinas substituídas tais como propina pirimidina C-5 e bases 7-deaza-7-substituídas de purina modificadas. Wagner

RW et al. (1996) Nat Biotechnol 14: 840-4. Purinas e pirimidinas incluem, mas não estão limitadas, a adenina, citosina, guanina e timina, e outras nucleobases de ocorrência natural ou não-natural, porções aromáticas
5 substituídas e não-substituídas.

Uma base modificada é qualquer base a qual é quimicamente distinta das bases de ocorrência natural tipicamente encontrada no DNA e no RNA, tais como T, C, G, A e U, mas as quais compartilham estruturas químicas básicas
10 com essas bases de ocorrência natural. A base de nucleotídeo modificada por ser, por exemplo, selecionada de hipoxantina, uracil, diidrouracil, pseudouracil, 2-tiouracil, 4-tiouracil, 5-aminouracil, 5-alquil-(C₁-C₆)-uracil, 5-alquenil-(C₂-C₆)-uracil, 5-alquinil-(C₂-C₆)-uracil, 5-
15 (hidroximetil)uracil, 5-clorouracil, 5-fluoruracil, 5-bromouracil, 5-hidroxicitosina, 5-alquil-(C₁-C₆)-citocina, 5-alquenil-(C₂-C₆)-citocina, 5-alquinil-(C₂-C₆)-citocina, 5-clorocitosina, 5-fluorcitosina, 5-bromocitosina, N²-dimetilguanina, 2,4-diaminopurina, 8-azapurina, uma 7-
20 deazapurina substituída, preferivelmente 7-deaza-7-substituída e/ou purina 7-deaza-8-substituída, 5-hidroximetilcitosina, N4-alquilcitosina, por exemplo, N4-etilcitosina, 5-hidroxidesoxicitidina, 5-hidroximetildesoxicitidina, N4-alquildesoxicitidina, por
25 exemplo, N4-etildesoxicitidina, 6-tiodesoxiguanosina e desoxirribonucleotídeos do nitropirrol, C5-propinilpirimidina e diaminopurina, por exemplo, 2,6-diaminopurina, inosina, 5-metilcitosina, 2-aminopurina, 2-

amino-6-cloropurina, hipoxantina ou outras modificações de bases nucleotídicas naturais. Essa lista é tencionada para ser exemplar e não é para ser interpretada como sendo limitante.

5 Em fórmulas particulares aqui descritas é definido um grupo de bases modificadas. Por exemplo, a letra Y é usada para se referir a um nucleotídeo contendo uma citosina ou uma citosina modificada. Uma citosina modificada, conforme aqui utilizada é uma base de pirimidina de
 10 ocorrência natural ou de ocorrência não-natural análoga de citosina a qual pode substituir essa base sem impedir a atividade imunoestimulatória do oligonucleotídeo. Citosinas modificadas incluem, mas não estão limitadas, a citosinas 5-substituídas (por exemplo, 5-metilcitosina, 5-fluorcitosina, 5-clorocitosina, 5-bromocitosina, 5-iodocitosina, 5-hidroxicitosina, 5-hidroximetilcitosina, 5-difluormetilcitosina e 5-alquilcitosina não-substituída ou substituída), citosinas 6-substituídas, citosinas N4-substituídas (por exemplo, N4-etilcitosina), 5-azacitosina,
 15 2-mercaptocitosina, isocitosina, pseudoisocitosina, análogos de citosina com sistemas de anéis condensados (por exemplo, N,N'-propilenocitosina ou fenoxazina), e uracil e seus derivados (por exemplo, 5-fluoruracil, 5-bromouracil, 5-bromoviniluracil, 4-tiouracil, 5-hidroxiuracil, 5-propiniluracil). Algumas das citosinas preferidas incluem 5-metilcitosina, 5-fluorcitosina, 5-hidroxicitosina, 5-hidroximetilcitosina e N4-etilcitosina. Em outra modalidade da invenção, a base de citosina é substituída por uma base

universal (por exemplo, 3-nitropirrol, P-base), um sistema de anel aromático (por exemplo, fluorbenzeno ou difluorbenzeno) ou um átomo de hidrogênio (dSpacer).

A letra Z é usada para se referir a uma base de guanina ou de guanina modificada. Uma guanina modificada, conforme aqui utilizada, é análogo de guanina de base de purina de ocorrência natural ou de ocorrência não-natural o qual pode substituir essa base sem prejudicar a atividade imunoestimulatória do oligonucleotídeo. Guaninas modificadas incluem, mas não estão limitadas, a 7-deazaguanina, guanina 7-deaza-7-substituída (tal como 7-deaza-7-alquinil-(C₂-C₆)-guanina, 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-metiladenina, 8-oxoadenina), guanina 8-substituída (por exemplo, 8-hidroxiguanina e 8-bromoguanina) e 6-tioguanina. Em outra modalidade da invenção, a base de guanina é substituída por uma base universal (por exemplo, 4-metilindol, 5-nitroindol e base K), um sistema de anel aromático (por exemplo, benzimidazol ou diclorobenzimidazol, amida do ácido 1-metil-1H-[1,2,4]triazol-3-carboxílico) ou um átomo de hidrogênio (dSpacer).

Os oligonucleotídeos podem ter uma ou mais extremidades 5' acessíveis. É possível criar oligonucleotídeos modificados com duas tais extremidades 5'. Isso pode ser alcançado, por exemplo, ligando dois

oligonucleotídeos através de uma ligação 3'-3' para gerar um oligonucleotídeo com uma ou duas extremidades 5' acessíveis. A ligação 3'-3' pode ser uma ponte fosfodiéster, fosforotioato ou qualquer outra internucleotídica modificada. Métodos para conseguir tais ligações são conhecidos na técnica. Por exemplo, tais ligações foram descritas em Seliger, H.; et al, Oligonucleotide analogs with terminal 3'-3'- and 5'-5'-internucleotidic linkages as antisense inhibitors of viral gene expression, *Nucleotides & Nucleotides* (1991), 10 (1-3), 469-77 e Jiang, et al., Pseudo-cyclic oligonucleotides: in vitro and in vivo properties, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (1999), 7(12), 2727- 2735.

Adicionalmente, oligonucleotídeos 3'-3' ligados onde a ligação entre os nucleotídeos 3'-terminais não é uma ponte fosfodiéster, fosforotioato ou outra modificada, podem ser preparados pelo uso de um espaçador adicional, tal como uma porção tri- ou tetraetilenoglicolfosfato (Durand, M. et al, Triple-helix formation by an oligonucleotide containing one (dA)₁₂ and two (dT)₁₂ sequences bridged by two hexaethylene glycol chains, *Biochemistry* (1992), 31(38), 9197-204, Patente Americana No. 5658738, e Patente Americana No. 5668265). Alternativamente, o ligante não-nucleotídico pode ser derivado de um etanodiol, propanodiol ou a partir de uma unidade desoxirribose abásica (dSpacer) (Fontanel, Marie Laurence et al., Sterical recognition by T4 polynucleotide kinase of non-nucleosidic moieties 5'-attached to oligonucleotides; *Oligonucleotides Research*

(1994), 22(11), 2022-7) usando química de fosforoamidita padrão. Os ligantes não-nucleotídicos podem ser incorporados uma ou múltiplas vezes, ou combinados uns com os outros permitindo para qualquer distância desejável entre as extremidades 3' dos dois ODNs a serem ligados.

Os oligonucleotídeos são parcialmente resistentes à degradação (por exemplo, são estabilizados). Uma "molécula de oligonucleotídeo estabilizada" deve significar um oligonucleotídeo que é relativamente resistente à degradação *in vivo* (por exemplo, através de uma *exo-* ou *endonuclease*). A estabilização do oligonucleotídeo pode ser conseguida através de modificações de estrutura. Oligonucleotídeos com ligações fosforotioato proporcionam máxima atividade e protegem o oligonucleotídeo da degradação por *exo-* e *endonucleases* intracelulares. Outros oligonucleotídeos modificados incluem oligonucleotídeos fosfodiéster modificados, combinações de oligonucleotídeo fosfodiéster e fosforotioato, metilfosfonato, metilfosforotioato, fosforoditioato, *p-etóxi* e suas combinações.

Estruturas modificadas tais como fosforotioatos podem ser sintetizadas usando técnicas automatizadas empregando ou químicas de fosforoamidato ou de H-fosfonato. Aril- e alquilfosfonatos podem ser feitos, por exemplo, conforme descrito na Patente Americana No. 4.469.863; e alquilfosfotriésteres (nos quais a porção de oxigênio carregada é alquilada conforme descrito na Patente Americana No. 5.023.243 e na Patente Européia No. 092.574) podem ser preparados por síntese de fase sólida automatizada usando

reagentes comercialmente disponíveis. Métodos para fazer outras modificações e substituições na estrutura do DNA foram descritos (por exemplo, Uhlmann, E. e Peyman, A., Chem. Rev. 90: 544, 1990; Goodchild, J., Bioconjugate Chem. 5 :165, 1990).

Outros oligonucleotídeos estabilizados incluem: análogos de DNA não-iônicos, tais como alquil- e arilfosfatos (nos quais o oxigênio fosfonato carregado é substituído por um grupo alquil ou aril), fosfodiéster e 10 alquilfosfotriésteres, nos quais a porção de oxigênio carregada é alquilada. Oligonucleotídeos os quais contêm diol, tal como tetraetilenoglicol ou hexaetilenoglicol, em qualquer um ou em ambos os terminais também foram demonstrados como sendo substancialmente resistentes à 15 degradação por nuclease.

Os oligonucleotídeos estimulatórios também podem conter uma ou mais ligações incomuns entre o nucleotídeo ou as porções análogas de nucleotídeo. A ligação internucleosídica comum é uma ligação 3'5'. Todas as outras 20 ligações são consideradas como sendo ligações internucleosídicas incomuns, tais como ligações 2'5'-, 5'5'-, 3'3'-, 2'2'-, 2'3'. A nomenclatura 2' a 5' é escolhida de acordo com o átomo de carbono da ribose. Entretanto, se porções de açúcar não-naturais forem empregadas, tais 25 análogos de açúcar expandidos de anel (por exemplo, hexanose, cicloexeno ou piranose) ou análogos de açúcar bi- ou tricíclicos, então essa nomenclatura muda de acordo com a nomenclatura do monômero. Em análogos 3'-desóxi- β -D-

ribopirranose (também chamado de p-DNA), os mononucleotídeos são, por exemplo, conectados através de uma ligação 4'2'-.

Se o oligonucleotídeo contém uma ligação 3'3'-, então este oligonucleotídeo pode ter duas extremidades 5'- não-ligadas. Semelhantemente, se o oligonucleotídeo contém uma ligação 5'5'-, então este nucleotídeo pode ter duas extremidades 3'- não-ligadas. A acessibilidade de extremidades não-ligadas de nucleotídeos pode ser melhor acessível por seus receptores. Ambos os tipos de ligações incomuns (3'3'- e 5'5') foram descritas por Ramalho Ortigao et al. (Antisense Research and Development (1992) 2, 129-46), por meio do que oligonucleotídeos com uma ligação 3'3'- foram reportados para apresentar estabilidade aumentada para a clivagem por nucleases.

Diferentes tipos de ligações podem também ser combinadas numa molécula a qual pode levar à ramificação do oligômero. Se uma parte do oligonucleotídeo estiver conectada na extremidade 3' através de uma ligação 3'3'- a uma segunda parte de oligonucleotídeo e a extremidade 2'- através de uma ligação 2'3'- a uma terceira parte da molécula, isso resulta, por exemplo, num oligonucleotídeo ramificado com três extremidades 5'- (ramificado 3'3'-, 2'3'-).

A princípio, ligações entre diferentes partes de um oligonucleotídeo ou entre diferentes oligonucleotídeos, respectivamente, podem ocorrer através de todas as partes da molécula, contanto que isso não interfira negativamente com o reconhecimento por seu receptor. De acordo com a natureza

do oligonucleotídeo, a ligação pode envolver a porção do açúcar (Su), a nucleobase heterocíclica (Ba) ou a estrutura fosfato (Ph). Dessa forma, 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 oligonucleotídeos são ainda modificados por certos substituintes não-nucleotídicos, a ligação também pode ocorrer através das partes modificadas dos oligonucleotídeos. Essas modificações também incluem oligonucleotídeos modificados, por exemplo, PNA, LNA ou análogos de oligonucleotídeo morfolino.

As ligações são preferivelmente compostas de C, H, N, O, S, B, P e halogênio, contendo 3 a 300 átomos. Um exemplo com 3 átomos é uma ligação acetal (ODN1 -3 '-O- CH₂-O-3'-ODN2) conectando, por exemplo, o grupo 3'-hidróxi do nucleotídeo ao grupo 3'-hidróxi de um segundo oligonucleotídeo. Um exemplo com cerca de 300 átomos é PEG-40 (tetracontapoli(etilenoglicol)). Ligações preferidas são ligações fosfodiéster, fosforotioato, metilfosfonato, fosforamidato, boranofosfonato, amida, éter, tioéter, acetal, tioacetal, uréia, tiouréia, sulfonamida, base de Schiff e dissulfeto. Também é possível usar o sistema de bioconjugação Solulink, isto é, (www.trilinkbiotech.com).

Se o oligonucleotídeo for composto de duas ou mais partes de sequência, essas partes podem ser idênticas ou diferentes. Conseqüentemente, num oligonucleotídeo com uma ligação 3'3'-, as sequências podem ser 5'-ODN1-3'3'-ODN1-5' idênticas ou 5'-ODN1-3'3'-ODN2-5' diferentes. Além disso, a modificação química das várias partes de oligonucleotídeo,

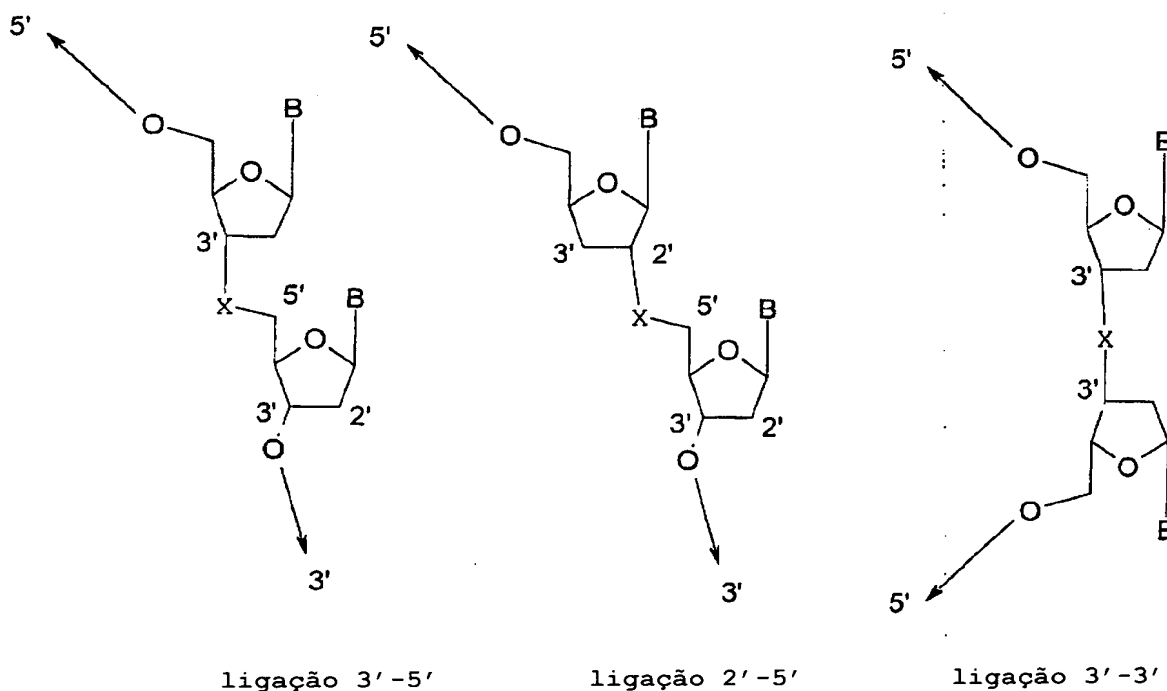
assim como o ligante que as conecta pode ser diferente. Uma vez que a absorção de oligonucleotídeos curtos aparenta ser menos eficiente do que aquela de oligonucleotídeos longos, a ligação de duas ou mais seqüências curtas resulta na
5 imunestimulação melhorada. A extensão dos oligonucleotídeos curtos é preferivelmente de 2 - 20 nucleotídeos, mais preferivelmente de 3 - 16 nucleotídeos, mas mais preferivelmente de 5 - 10 nucleotídeos. Preferidos são os oligonucleotídeos ligados os quais têm duas ou mais
10 extremidades 5'- não-ligadas.

As seqüências parciais de oligonucleotídeo também podem estar ligadas por ligantes não-nucleotídicos, particularmente ligantes abásicos (dSpacers), unidades de trietilenoglicol ou unidades de hexaetilenoglicol. Ligantes
15 adicionalmente preferidos, tais como aminoligantes C3, C6, C12, e também ligantes alquiltiol, tais como ligantes tiol C3 ou C6. Os oligonucleotídeos também podem estar ligados por resíduos aromáticos os quais podem ser adicionalmente substituídos por grupos alquil ou alquil substituídos. Os
20 oligonucleotídeos podem também conter uma unidade Doubler ou Trebler (www.glenres.com), particularmente aqueles nucleotídeos com uma ligação 3'3'-. A ramificação dos oligonucleotídeos por unidades doubler, trebler ou outra multiplicadora leva a dendrímeros os quais são uma outra
25 modalidade dessa invenção. Os oligonucleotídeos também podem conter unidades ligantes resultantes dos reagentes modificadores de peptídeos ou de reagentes modificadores de oligonucleotídeos (www.glenres.com). Além disso, eles também

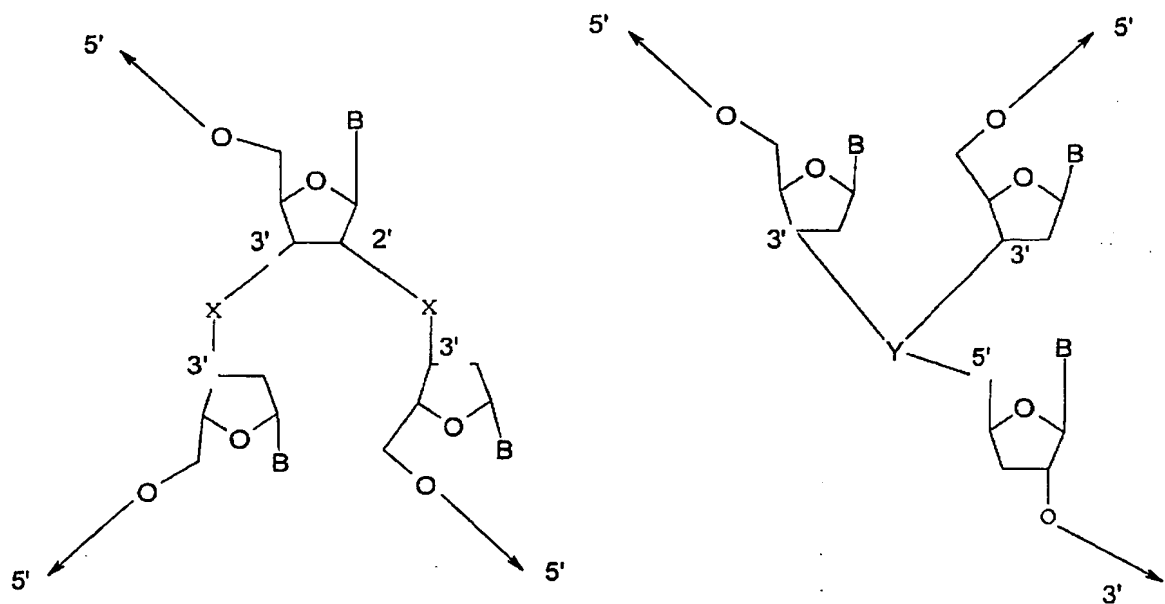
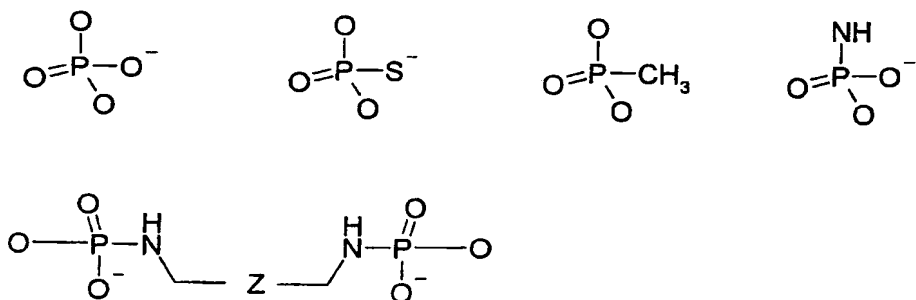
contêm um ou mais resíduos de aminoácidos naturais ou não-naturais os quais estão conectados por ligações peptídicas (amida).

Outra possibilidade para ligar oligonucleotídeos é através da ligação cruzada das bases heterocíclicas (Verma e Eckstein; Annu. Rev. Biochem. (1998) 67: 99-134; página 124). Uma ligação entre a porção do açúcar de uma parte de sequência com a base heterocíclica de outra parte de sequência (Iyer et al. Curr. Opin. Mol. Therapeutics (1999) 1: 344-358; página 352) também pode ser usada.

Os diferentes oligonucleotídeos são sintetizados por métodos estabelecidos e podem ser ligados juntos on-line durante a síntese de fase sólida. Alternativamente, eles podem ser ligados juntos após a síntese das seqüências parciais individuais.



X é, por exemplo:



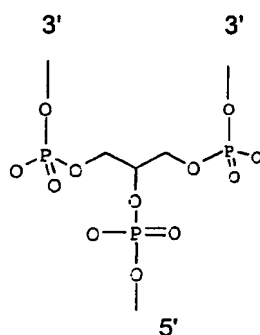
ramificado - 3'3', 2'3'

ramificado através de ligante

X é, por exemplo:



Y é, por exemplo:



Oligonucleotídeos imunoestimulatórios CpG podem ser combinados com outros agentes terapêuticos. O oligonucleotídeo imunoestimulatório CpG e outro agente terapêutico pode ser administrado simultaneamente ou

5 seqüencialmente. Quando os outros agentes terapêuticos são administrados simultaneamente, eles podem ser administrados nas mesmas formulações ou em formulações separadas, mas são administrados ao mesmo tempo. Os outros agentes terapêuticos são administrados seqüencialmente um com o outro e com

10 oligonucleotídeo imunoestimulatório CpG, quando a administração dos outros agentes terapêuticos e o oligonucleotídeo imunoestimulatório CpG é temporariamente separada. A separação no tempo entre a administração desses compostos pode ser uma questão de minutos ou ela pode ser

15 mais longa. Outros agentes terapêuticos incluem, mas não estão limitados, a antimicrobianos e medicamentos anti-asma.

Os oligonucleotídeos da invenção podem ser administrados a um indivíduo com um agente antimicrobiano. Um agente antimicrobiano, conforme usado aqui, se refere a

20 um composto de ocorrência natural ou sintético o qual é capaz de matar ou de 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 infectado ou em risco de ficar infectado. Agentes antimicrobianos incluem, mas não estão limitados, a agentes antibacterianos, agentes antivirais, agentes antifúngicos e agentes antiparasíticos. Frases tais como "agente anti-infectivo", "agente antibacteriano", "agente antiviral", "agente antifúngico", "agente antiparasítico" e "parasiticida" têm significados bem estabelecidos para aqueles normalmente versados na técnica e são definidos em textos médicos padronizados. Resumidamente, agentes antibacterianos matam ou inibem bactérias, e incluem antibióticos assim como outros compostos sintéticos ou naturais com funções similares. Antibióticos são moléculas de baixo peso molecular as quais são produzidas como metabólitos secundários pelas células, tais como microrganismos. Em geral, antibióticos interferem com uma ou mais funções ou estruturas bacterianas as quais são específicas para o microrganismo e as quais não estão presentes em células hospedeiras. Agentes antivirais podem ser isolados a partir de fontes naturais ou sintetizados e são úteis para matar ou inibir vírus. Agentes antifúngicos são usados para tratar infecções fúngicas superficiais assim como infecções fúngicas sistêmicas oportunistas e primárias. Agentes antiparasíticos matam ou inibem parasitas.

Exemplos de agentes antiparasíticos, também referidos como parasiticidas úteis para administração

humana, incluem, mas não estão limitados a albendazol, anfotericina B, benznidazol, bitionol, HCl cloroquina, fosfato de cloroquina, clindamicina, desidroemetina, dietilcarbamazina, furoato de diloxanida, eflornitina, 5 furazolidona, glicocorticóides, halofantrina, iodoquinol, mebendazol, mefloquina, antimoniato de meglumina, melarsoprol, metrifonato, metronidazol, niclosamida, nifurtimox, oxamniquina, paromomicina, isetionato de pentamidina, piperazina, praziquantel, fosfato de 10 primaquina, proguanil, pamoato de pirantel, pirimetanmina-sulfonamidas, pirimetanmina-sulfadoxina, HCl quinacrina, sulfato de quinina, gluconato de quinidina, espiamicina, estibogluconato de sódio (gluconato de antimônio sódico), suramina, tetraciclina, doxiciclina, tiabendazol, tinidazol, 15 trimetoprima-sulfametoxazol e triparasmina, alguns dos quais são usados sozinhos ou em combinação com outros.

Agentes antibacterianos matam ou inibem o crescimento ou função de bactérias. Uma grande classe de agentes antibacterianos é os antibióticos. Antibióticos, os 20 quais são eficazes para matar ou inibir uma ampla faixa de bactérias, são referidos como antibióticos de amplo espectro. Outros tipos de antibióticos são predominantemente eficazes contra as bactérias da classe gram-positiva ou gram-negativa. Esses tipos de antibióticos são referidos 25 como antibióticos de espectro estreito. Outros antibióticos os quais são eficazes contra um único organismo ou doença e não contra outros tipos de bactérias são referidos como antibióticos de espectro limitado. Agentes antibacterianos

são algumas vezes classificados baseando-se na sua forma primária de ação. Em geral, agentes antibacterianos são inibidores da síntese da parede celular, inibidores da membrana celular, inibidores da síntese de proteína, 5 inibidores funcionais ou da síntese de oligonucleotídeo e inibidores competitivos.

Agentes antivirais são compostos os quais previnem a infecção de células por vírus ou a replicação do vírus numa célula. Existem muito menos fármacos antivirais do que 10 fármacos antibacterianos porque o processo de replicação viral é tão intimamente relacionado com a replicação do DNA numa célula hospedeira que agentes antivirais não-específicos poderiam geralmente ser tóxicos para o hospedeiro. Existem vários estágios no processo de infecção 15 viral os quais podem ser bloqueados ou inibidos por agentes antivirais. Esses estágios incluem a ligação do vírus à célula hospedeira (imunoglobulina ou peptídeos de ligação), descapsulamento do vírus (por exemplo, amantadina), síntese ou tradução de RNAm viral (por exemplo, interferon), 20 replicação de RNA ou DNA viral (por exemplo, análogos de nucleotídeo), maturação de novas proteínas de vírus (por exemplo, inibidores da protease) e desenvolvimento e liberação dos vírus.

Análogos de nucleotídeo são compostos sintéticos 25 os quais são similares a nucleotídeos, mas os quais têm um grupo desoxirribose ou ribose incompleto ou anormal. Uma vez que os análogos de nucleotídeo estão na célula, eles são fosforilados, produzindo o trifosfato formado o qual compete

com nucleotídeos normais para incorporação no DNA ou RNA viral. Uma vez que a forma trifosfato do análogo de nucleotídeo é incorporada na cadeia crescente de oligonucleotídeo, ela causa a associação irreversível com a polimerase viral e, dessa forma, termina a cadeia; Análogos de nucleotídeo incluem, mas não estão limitados, a aciclovir (usado para o tratamento de vírus herpes simplex e vírus varicela-zoster), ganciclovir (útil para o tratamento do citomegalovírus), idoxuridina, ribavirina (útil para o tratamento do vírus sincicial respiratório), dideoxiinosina, dideoxicitidina, zidovudina (azidotimidina), imiquinod e resimiquimod.

Os interferons são citocinas as quais são secretadas por células infectadas por vírus assim como por células imunes. Os interferons funcionam pela ligação a receptores específicos nas células adjacentes às células infectadas, causando a alteração na célula a qual a protege da infecção pelo vírus. Interferon α e β também induzem a expressão das moléculas de MHC de classe I e de classe II na superfície das células infectadas, resultando numa apresentação de antígeno aumentada para o reconhecimento da célula imune do hospedeiro. Interferons α e β estão disponíveis como formas recombinantes e foram usados para o tratamento de infecção de hepatite B e C crônica. Nas dosagens as quais são eficazes para terapia antiviral, interferons têm efeitos colaterais severos tais como febre, mal-estar e perda de peso.

Agentes antivirais úteis na invenção incluem, mas

não estão limitados, a imunoglobulinas, amantadina, interferons, análogos de nucleotídeo e inibidores da protease. Exemplos específicos de antivirais incluem, mas não estão limitados, a Acemannan; Aciclovir; Aciclovir sódico; Adefovir; Alovudina; Alvircept Sudotox; Cloridrato de Amantadina; Aranotina; Arildona; Mesilato de Ateviridina; Aviridina; Cidofovir; Cipamfilina; Cloridrato de Citabarina; Mesilato de Delavirdina; Desciclovir; Didanosina; Disoxaril; Edoxudina; Enviroxina; Famciclovir; Cloridrato de Famotina; Fiacitabina; Fialuridina; Fosarilato; Foscarnet sódico; Fosfonet sódico; Ganciclovir; Ganciclovir sódico; Idoxuridina; Cetoxal; Lamivudina; Lobucavir; Cloridrato de Memotina; Metisazona; Nevirapina; Penciclovir; Pirodavir; Ribavirina; Cloridrato de Rimantadina; Mesilato de Saquinavir; Cloridrato de Somantadina; Sorivudina; Statolon; Estavudina; Cloridrato de tilorona; Trifluridina; Cloridrato de valaciclovir; Vidarabina; Fosfato de vidarabina; Fosfato de sódio de vidarabina; Viroxina; Zalcitabina; Zidovudina; e Ziniviroxina.

Agentes antifúngicos são úteis para o tratamento e prevenção de fungos infecciosos. Agentes antifúngicos são algumas vezes classificados por seu mecanismo de ação. Alguns agentes antifúngicos agem como inibidores da parede celular pela inibição da glicose sintase. Esses incluem, mas não estão limitados, a basiungina/ECB. Outros agentes antifúngicos funcionam pela desestabilização da integridade da membrana. Esses incluem, mas não estão limitados, a imidazóis, tais como clotrimazol, sertaconzol, fluconazol,

itraconazol, cetoconazol, miconazol e voriconazol, assim como FK 463, anfotericina B, BAY 38-9502, MK 991, pradimicina, UK 292, butenafina e terbinafina. Outros agentes antifúngicos funcionam pela quebra da quitina (por exemplo, quitinase) ou imunossupressão (creme 501).

Um "medicamento de asma" conforme aqui utilizado, é uma composição de matéria a qual reduz os sintomas, inibe a reação asmática ou previne o desenvolvimento de uma reação asmática. Vários tipos de medicamentos para o tratamento da asma estão descritos em Guidelines For The Diagnosis and Management of Asthma, Expert Panel Report 2, Publicação NIH No. 97/4051, 19 de julho de 1997, os conteúdos totais da qual são aqui incorporados por referência. O resumo dos medicamentos conforme descrito na publicação NIH está descrito abaixo.

Medicamentos de asma incluem, mas não está limitado, a esteróides, inibidores da PDE-4, broncodilatador/agonistas beta-2, abridores do canal de K+, antagonistas de VLA-4, antagonistas da neuroquina, inibidores da síntese de TXA2, xantaninas, antagonistas do ácido araquidônico, inibidores da 5 lipoxigenase, antagonistas do receptor A2 de tromboxina, antagonistas do receptor do tromboxano A2, inibidor das proteínas de ativação 5-lipox e inibidores da protease.

Broncodilatador/agonistas beta 2 são uma classe de compostos a qual causa a broncodilatação ou relaxamento do músculo liso. Broncodilatador/agonistas beta 2 incluem, mas não estão limitados, a salmeterol, salbutamol, albuterol,

terbutalina, D2522/formoterol, fenoterol, bitolterol, metilxantinas de pirbuerol e orciprenalina. Agonistas β_2 de longa ação e broncodilatadores são compostos os quais são usados para prevenção prolongada dos sintomas além das terapias antiinflamatórias. Eles funcionam causando broncodilatação, ou relaxamento do músculo liso, seguido da ativação da adenilato ciclase e aumento no AMP cíclico produzindo o antagonismo funcional da broncoconstrição. Esses compostos também inibem a liberação do mediador das células de mastócitos, o decréscimo da permeabilidade vascular e o aumento da depuração mucociliar. Agonistas β_2 de longa ação incluem, mas não estão limitados, a salmeterol e albuterol. Esses compostos são geralmente usados juntamente com corticosteróides e geralmente não são usados sem qualquer terapia inflamatória. Eles foram associados com efeitos colaterais tais como taquicardia, tremor do músculo esquelético, hipocalemia e prolongamento do intervalo QTc na overdose.

Metilxantinas, incluindo, por exemplo, teofilina foram usadas para controle prolongado e prevenção dos sintomas. Esses compostos causam broncodilatação resultante da inibição da fosfodiesterase e, provavelmente, do antagonismo da adenosina. Também se acredita que esses compostos possam efetuar a infiltração eosinofílica na mucosa bronquial e diminuir a quantidade de linfócitos T no epitélio. Toxicidades agudas relacionadas com a dose são um problema particular com esses tipos de compostos. Como resultado, a concentração de soro de rotina deve ser

monitorada para contabilizar pela toxicidade e faixa terapêutica estreita que aparece a partir das diferenças individuais na depuração metabólica. Efeitos colaterais incluem taquicardia, náusea, vômito, taquiarritmias, 5 estimulação do sistema nervoso central, dor de cabeça, apreensão, hematêmese, hiperglicemia e hipocalemia. Agonistas β_2 de curta ação/broncodilatadores relaxam o músculo liso das vias aéreas, causando o aumento no fluxo de ar. Esses tipos de compostos são um fármaco preferido para o 10 tratamento dos sistemas asmáticos agudos. Anteriormente, agonistas β_2 de ação curta foram prescritos numa base de programação regular para melhorar os sintomas de asma globais. Relatórios posteriores, entretanto, sugeriram que o uso regular dessa classe de fármacos produziu a diminuição 15 significativa no controle da asma e da função pulmonar (Sears, et al. Lancet; 336: 1391-6, 1990). Outros estudos mostraram que o uso regular de alguns tipos de agonistas β_2 não produziram efeitos danosos num período de quatro meses, mas também não produziu efeitos demonstráveis (Drazen, et 20 al., N. Eng. J. Med.; 335: 841-7, 1996). Como resultado desses estudos, o uso diário de agonistas β_2 de curta ação não é geralmente recomendado. Agonistas β_2 de curta ação incluem, mas não estão limitados, a albuterol, bitolterol, pirbuterol e terbutalina. Alguns dos efeitos adversos 25 associados com a mastration de agonistas β_2 de curta ação incluem taquicardia, tremor do músculo esquelético, hipocalemia, ácido láctico aumentado, dor de cabeça e hiperglicemia.

Os oligonucleotídeos imunoestimulatórios CpG podem ser diretamente administrados ao indivíduo ou podem ser administrados juntamente com um complexo de distribuição de ácido nucléico. Um complexo de distribuição de ácido nucléico deve significar uma molécula de ácido nucléico associada com (por exemplo, ionicamente ou covalentemente ligada a; ou encapsulada num) uma forma de alvejamento (por exemplo, uma molécula que resulta numa ligação de afinidade mais elevada à célula alvo. Exemplos de complexos de distribuição de ácido nucléico incluem oligonucleotídeos associados com um esteroide (por exemplo, colesterol), um lipídeo (por exemplo, um lipídeo catiônico, virossoma ou lipossoma) ou um agente de ligação específico de célula alvo (por exemplo, um ligante reconhecido por um receptor específico de célula alvo). Complexos preferidos podem ser suficientemente estáveis *in vivo* para prevenir o desacoplamento significativo antes da internalização pela célula alvo. Entretanto, o complexo pode ser clivável sob condições apropriadas na célula de forma que o ácido nucléico esteja liberado numa forma funcional.

Veículos de distribuição ou dispositivos de distribuição para distribuir antígeno e oligonucleotídeos em superfícies foram descritos. O oligonucleotídeo imunoestimulatório CpG e/ou o antígeno e/ou outros terapêuticos podem ser administrados sozinhos (por exemplo, em salina ou tampão) ou usando quaisquer veículos de distribuição conhecidos na técnica. Por exemplo, os seguintes veículos de distribuição foram descritos:

coquelatos, emulssomas, ISCOMs; Lipossomas; Vetores bacterianos vivos (por exemplo, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Bacillus calmatte-guerin*, *Shigella*, *Lactobacillus*); vetores virais vivos (por exemplo, vaccinia, adenovírus, herpes simplex); microesferas; vacinas de oligonucleotídeo; polímeros; anéis de polímero; proteossomas; fluoreto de sódio; plantas transgênicas; virossomas; partículas semelhantes a vírus. Outros veículos de distribuição são conhecidos na técnica e alguns exemplos adicionais são fornecidos abaixo na discussão de vetores.

O termo quantidade efetiva de um oligonucleotídeo imunoestimulatório CpG se refere à quantidade necessária ou suficiente para realizar um efeito biológico desejado. Por exemplo, uma quantidade eficaz é aquela quantidade suficiente para reduzir ou prevenir a indução adicional da carga viral para evitar a exacerbação da asma. Combinado com os ensinamentos fornecidos aqui, pela escolha dentre os vários compostos ativos e pesando fatores tais como potência, biodisponibilidade relativa, peso corporal do paciente, severidade dos efeitos colaterais adversos e modo preferido de administração, um regime de tratamento terapêutico ou profilático efetivo pode ser planejado, o qual não cause uma toxicidade substancial e ainda seja completamente efetivo para tratar o indivíduo particular. A quantidade efetiva para qualquer aplicação particular pode variar dependendo de tais fatores como a doença ou condição sendo tratada, o oligonucleotídeo imunoestimulatório CpG particular sendo administrado o tamanho do indivíduo, ou a

severidade da doença ou condição. Um indivíduo normalmente versado na técnica pode determinar empiricamente a quantidade eficaz de um oligonucleotídeo imunoestimulatório CpG e/ou outro agente terapêutico sem necessitar de
5 experimentação inadequada.

As referidas doses dos compostos aqui descritas para distribuição para a mucosa ou local tipicamente variam de cerca de 0,1 µg até 10 mg por administração, a qual dependendo da aplicação poderia ser dada diariamente,
10 semanalmente ou mensalmente e qualquer outra quantidade de tempo entre essas. Mais tipicamente, as doses da mucosa ou locais variam de cerca de 10 µg até cerca de 5 mg por administração, e mais tipicamente de cerca de 100 µg até 1 mg, com 2 - 4 administrações sendo espaçadas em dias ou
15 semanas uma da outra. Mais tipicamente, as doses imunoestimulantes variam de 1 µg até 10 mg por administração, e mais tipicamente de 10 µg até 1 mg, com administrações diárias ou semanais. Doses referidas dos compostos aqui descritos para distribuição parenteral para o
20 propósito de induzir uma resposta imune podem ser tipicamente 5 a 10.000 vezes mais altas do que a dose para a mucosa eficaz, e mais tipicamente de 10 a 1.000 vezes mais elevada, e mais tipicamente de 20 a 100 vezes mais elevada. Doses dos compostos aqui descritos para distribuição
25 parenteral para o propósito de induzir uma resposta imune inata ou para induzir uma resposta imune quando os oligonucleotídeos imunoestimulatórios CpG são administrados em combinação com outros agentes terapêuticos ou em veículos

de distribuição especializados tipicamente variam de cerca de 0,1 µg até 10 mg por administração, a qual dependendo da aplicação poderia ser dada diariamente, semanalmente ou mensalmente e qualquer outra quantidade de tempo entre essas. Mais tipicamente, doses parenterais para esses propósitos variam de cerca de 10 µg até 5 mg por administração, e mais tipicamente de cerca de 100 µg até 1 mg, com 2 - 4 administrações sendo espaçadas dias ou semanas umas das outras. Em algumas modalidades, entretanto, doses parenterais para esses propósitos podem ser usadas numa faixa de 5 a 10.000 vezes maior do que as doses típicas descritas acima. Os oligonucleotídeos podem ser administrados em doses múltiplas em períodos prolongados de tempo.

Para qualquer composto aqui descrito, a quantidade terapeuticamente eficaz pode ser inicialmente determinada a partir de modelos animais. Uma dose terapeuticamente eficaz também pode ser determinada a partir de dados humanos para oligonucleotídeos CpG os quais foram testados em humanos (testes clínicos humanos foram iniciados) e para compostos os quais são conhecidos por exibir atividades farmacológicas similares, tais como outros adjuvantes, por exemplo, LT e outros antígenos para propósitos de vacinação. Doses mais elevadas podem ser requeridas para administração parenteral. A dose aplicada pode ser ajustada baseando-se na potência e na biodisponibilidade relativa do composto administrado. O ajuste da dose para alcançar a máxima eficácia baseando-se nos métodos descritos acima e outros métodos como são bem

conhecidos na técnica está dentro das capacidades do artesão normalmente habilitado.

As formulações da invenção são administradas em soluções farmaceuticamente aceitáveis, as quais podem
5 rotineiramente conter concentrações farmaceuticamente aceitáveis de sal, agentes tamponantes, conservantes, veículos compatíveis, adjuvantes e opcionalmente outros ingredientes terapêuticos.

Para uso na terapia, uma quantidade eficaz do
10 oligonucleotídeo imunoestimulatório pode ser administrada a um indivíduo por qualquer modo que distribua o oligonucleotídeo à superfície desejada, por exemplo, através da mucosa ou sistemicamente. A administração de uma composição farmacêutica da presente invenção pode ser
15 efetuada por quaisquer meios conhecidos pelo artesão habilitado. Vias preferidas de administração incluem, mas não estão limitadas, às vias oral, parenteral, intramuscular, intranasal, sublingual, intratraqueal, inalatória, ocular, vaginal e retal.

20 Para administração oral, os compostos (isto é, oligonucleotídeos imunoestimulatórios CpG e outros agentes terapêuticos) podem ser formulados prontamente pela combinação do(s) composto(s) ativo(s) com veículos farmaceuticamente aceitáveis bem conhecidos na técnica. Tais
25 veículos capacitam os compostos da invenção a serem formulados como comprimidos, pílulas, drágeas, cápsulas, líquidos, géis, xaropes, pastas, suspensões e semelhantes, para ingestão oral por um indivíduo a ser tratado.

Preparações farmacêuticas para uso oral podem ser obtidas como excipiente sólido, opcionalmente moendo uma mistura resultante e processando a mistura de grânulos, depois de adicionar adjuvantes adequados, caso desejado, para obter comprimidos ou núcleos de drágeas. Excipientes adequados são, particularmente, fibras tais como açúcares, incluindo lactose, sacarose, manitol ou sorbitol; preparações de celulose tais como, por exemplo, amido de milho, amido de trigo, amido de arroz, amido de batata, gelatina, goma tragacanto, metilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose, carboximetilcelulose sódica e/ou polivinilpirrolidona (PVP). Caso desejado, agentes desintegrantes podem ser adicionados, tais como a polivinilpirrolidona ligada de forma cruzada, agar ou ácido algínico ou um sal seu tal como alginato de sódio. Opcionalmente as formulações orais podem também ser formuladas em salina ou tampões, isto é, EDTA para neutralizar condições ácidas internas ou podem ser administradas sem quaisquer veículos.

Também especificamente contempladas são as formas de dosagem orais do componente ou dos componentes acima. O componente ou componentes podem ser quimicamente modificados de forma que a distribuição oral do derivado seja eficaz. Geralmente, a modificação química contemplada é a ligação de pelo menos uma porção à própria molécula do componente, onde a referida porção permite (a) a inibição da proteólise; e (b) o acúmulo na corrente sanguínea do estômago ou intestino. Também desejado é o aumento na estabilidade total do componente ou componentes e o aumento no tempo de

circulação no corpo. Exemplos de tais porções incluem: polietilenoglicol, copolímeros de etilenoglicol e propilenoglicol, carboximetilcelulose, dextrana, álcool polivinílico, polivinilpirrolidona e poliprolina. Abuchowski e Davis, 1981, "Soluble Polymer-Enzyme Adducts" em: Enzymes as Drugs, Hosenberg and Roberts, eds., Wiley-Interscience, Nova Iorque, NY, pp. 367-383; Newmark, et al., 1982, J. Appl. Biochem. 4:185-189. Outros polímeros que poderiam ser usados são poli-1,3-dioxolano e poli-1,3,6-tioxocano. Preferidos para o uso farmacêutico, conforme indicado acima, são as porções de polietilenoglicol.

Para o componente (ou derivado) o local de liberação pode ser o estômago, o intestino delgado (o duodeno, o jejuno ou o íleo) ou o intestino grosso. Um indivíduo versado na técnica tem formulações disponíveis as quais não dissolvem no estômago, ainda irão liberar o material no duodeno ou em outros lugares do intestino. Preferivelmente, a liberação irá evitar os efeitos deletérios do ambiente estomacal, seja pela proteção do oligonucleotídeo (ou derivado) ou pela liberação do material biologicamente ativo além do ambiente estomacal, tal como no intestino.

Para assegurar a completa resistência gástrica um revestimento impermeável a um pH de pelo menos 5,0 é essencial. Exemplos dos ingredientes inertes mais comuns que são usados como revestimentos entéricos são trimelitato de acetato de celulose (CAT), ftalato de hidroxipropilcelulose (HPMCP), HPMCP 50, HPMCP 55, ftalato de acetato de

polivinila (PVAP), Eudragit L30D, Aquateric, ftalato de acetato de celulose (CAP), Eudragit L, Eudragit S e laca purificada. Esses revestimentos podem ser usados como filmes misturados.

5 Um revestimento ou mistura de revestimentos também pode ser usado em comprimidos, os quais não são tencionados para proteção contra o estômago. Isso pode incluir revestimentos de açúcar ou revestimentos os quais tornam o comprimido mais fácil de ser engolido. Cápsulas podem
10 consistir de uma cápsula dura (tal como gelatina) para distribuição do terapêutico seco, isto é, pó; para formas líquidas, uma cápsula de gelatina mole pode ser usada. O material do envoltório das cápsulas poderia ser amido espesso ou outro papel comestível. Para pílulas, pastilhas,
15 comprimidos moldados ou comprimidos triturados, técnicas de massificação úmida podem ser usadas.

O terapêutico pode ser incluído na formulação como multiparticulados finos na forma de grânulos ou péletes de tamanho de partícula de cerca de 1 mm. A formulação do
20 material para a administração da cápsula pôde também ser como um pó, plugues levemente compressos ou mesmo como comprimidos. O terapêutico pode ser preparado por compressão.

Corantes e agentes flavorizantes também podem ser
25 incluídos. Por exemplo, o oligonucleotídeo (ou derivado) pode ser formulado (tal como por lipossoma ou por encapsulamento de microesfera) e, a seguir, ainda contido num produto comestível, tal como um refresco contendo

corantes e agente flavorizantes.

Uma pessoa pode diluir ou aumentar o volume do terapêutico com um material inerte. Esses diluentes poderiam incluir carboidratos, especialmente manitol, a-lactose, lactose anidra, celulose, sacarose, dextranas modificadas e amido. Certos sais inorgânicos podem também ser usados como enchimentos incluindo trifosfato de cálcio, carbonato de magnésio e cloreto de sódio. Alguns diluentes comercialmente disponíveis são Fast-Flo, Emdex, STA-Rx 1500, Emcompress e Avicell.

Desintegrantes podem ser incluídos na formulação do terapêutico numa forma de dosagem sólida. Materiais usados como desintegrantes incluem, mas não estão limitados, a amido, incluindo o desintegrante comercial baseado em amido, Explotab. Glicolato de amido sódico, Amberlite, carboximetilcelulose sódica, ultramilopectina, alginato de sódio, gelatina, casca de laranja, carboximetilcelulose ácida, esponja natural e bentonita podem todos ser usados. Outra forma dos desintegrantes são as resinas de troca catiônica insolúveis. Gomas em pó podem ser usadas como desintegrantes e como ligantes e essas podem incluir gomas em pó tais como agar, Karaya ou tragacanto. Ácido algínico e seu sal de sódio são todos úteis como desintegrantes.

Ligantes podem ser usados para manter o agente terapêutico unido para formar um comprimido duro e incluem materiais a partir de produtos naturais tais como acácia, tragacanto, amido e gelatina. Outros incluem metilcelulose (MC), etilcelulose (EC) e carboximetilcelulose (CMC),

polivinilpirrolidona (PVP) e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) poderiam ser ambos usados em soluções alcoólicas para granular o terapêutico.

Um agente anti-friccional pode ser incluído na
5 formulação do terapêutico para prevenir a aderência durante o processo de formulação. Lubrificantes podem ser usados como uma camada entre o terapêutico e a parede da matriz e esses pode incluir, mas não estão limitados; o ácido esteárico incluindo seus sais de magnésio e cálcio,
10 politetrafluoretileno (PTFE), parafina líquida, óleos vegetais e ceras. Lubrificantes solúveis também podem ser usados tais como laurilsulfato de sódio, laurilsulfato de magnésio, polietilenoglicol de vários pesos moleculares, Carbowax 4000 e 6000.

15 Glidantes que devem melhorar as propriedades de fluxo do fármaco durante a formulação e para ajudar no rearranjo durante a compressão devem ser adicionados. Os glidantes podem incluir amido, talco, sílica pirogênica e silicoaluminato hidratado.

20 Para ajudar a dissolução do terapêutico no ambiente aquoso um tensoativo deve ser adicionado como um agente umidificante. Tensoativos podem incluir detergentes aniônicos tais como laurilsulfato de sódio, sulfossuccinato de sódio dioctílico e sulfonato de sódio dioctílico.
25 Detergentes catiônicos podem ser usados e poderiam incluir cloreto de benzalcônio ou cloreto de benzetônio. A lista de detergentes não-iônicos potenciais que poderiam ser incluídos na formulação como tensoativos são lauromacrogol

400, estearato de polioxol 40, polioxietileno de óleo de castóreo hidrogenado 10, 50 e 60, monoestearato de glicerol, polissorbato 40, 60, 65 e 80, éster do ácido graxo de sacarose, metilcelulose e carboximetilcelulose. Esses
5 tensoativos poderiam estar presentes na formulação do oligonucleotídeo ou derivado ou sozinhos ou como uma mistura em diferentes proporções.

Preparações farmacêuticas as quais podem ser usadas oralmente incluem cápsulas de ajuste de compressão
10 feitas de gelatina, assim como cápsulas maleáveis, fechadas feitas de gelatina e um plastificante, tal como glicerol ou sorbitol. As cápsulas de ajuste de compressão podem conter os ingredientes ativos em mistura com um enchimento tal como lactose, ligantes tais como amidos e/ou lubrificantes tais
15 como talco ou estearato de magnésio e, opcionalmente, estabilizantes. Em cápsulas maleáveis, os compostos ativos podem ser dissolvidos ou suspensos em líquidos adequados, tais como óleos graxos, parafina líquida ou polietilenoglicóis líquidos. Além disso, podem ser
20 adicionados estabilizantes. Microesferas formuladas para administração oral também podem ser usadas. Tais microesferas foram bem definidas na técnica. Todas as formulações para administração oral devem estar em dosagens adequadas para tal administração.

25 Para administração bucal, as composições podem tomar a forma de comprimidos ou pastilhas formuladas de forma convencional.

Para administração por inalação, os compostos para

uso de acordo com a presente invenção podem ser convenientemente distribuídos na forma de apresentação de um borrifo de aerossol a partir de embalagens pressurizadas ou um nebulizador, com o uso de um propelente adequado, por exemplo, diclorodifluormetano, triclorofluormetano, diclorotetrafluoretano, dióxido de carbono ou outro gás adequado. No caso de um aerossol pressurizado a unidade de dosagem pode ser determinada fornecendo uma válvula para distribuir uma quantidade medida. Cápsulas e cartuchos de, por exemplo, gelatina para uso num inalador ou num insuflador pode ser formulados contendo uma mistura de pó do composto e uma base de pó adequada tal como lactose ou amido.

Também aqui contemplada é a distribuição pulmonar dos oligonucleotídeos (ou de seus derivados). O oligonucleotídeo (ou derivado) é distribuído aos pulmões de um mamífero durante a inalação e transpassa pelo epitélio pulmonar beirando a corrente sanguínea. Outros relatórios de moléculas inaladas incluem Adjei et al., 1990, Pharmaceutical Research, 7: 565-569; Adjei et al., 1990, International Journal of Pharmaceutics, 63: 135-144 (acetato de leuprolide); Braquet et al., 1989, Journal of Cardiovascular Pharmacology, 13 (suppl. 5): 143-146 (endotelina-1); Hubbard et al., 1989, Annals of Internal Medicine, Vol. III, pp. 206-212 (antitripsina al); Smith et al., 1989, J. Clin. Invest. 84: 1145-1146 (proteinase al); Oswein et al., 1990, "Aerosolization of Proteins", Proceedings of Symposium on Respiratory Drug Delivery II,

Keystone, Colorado, March, (hormônio do crescimento humano recombinante); Debs et al., 1988, J. Immunol. 140: 3482-3488 (interferon g e fator de necrose tumoral alfa) e Platz et al., Patente Americana No. 5.284.656 (fator estimulante de colônia de granulócito). Um método e composição para a distribuição pulmonar de fármacos para efeito sistêmico estão descrito na Patente Americana No. 5.451.569, publicada em 19 de setembro de 1995, para Wong et al.

Contemplados para uso na prática dessa invenção são uma ampla faixa de dispositivos mecânicos projetados para distribuição pulmonar de produtos terapêuticos, incluindo mas sem se limitar a nebulizadores, inaladores de dose medida e inaladores de pó, todos os quais são familiares aos indivíduos versados na técnica.

Alguns exemplos específicos de dispositivos comercialmente disponíveis adequados para a prática dessa invenção são o nebulizador Ultravent, produzido por Mallinckrodt, Inc., St. Louis, Missouri; o nebulizador Acorn II, produzido por Marquest Medical Products, Englewood, Colorado; o inalador de dose medida Ventolin, produzido pela Glaxo Inc., Research Triangle Park, Carolina do Norte; e o inalador de pó Spinhaler, produzido pela Fisons Corp., Bedford, Massachusetts.

Todos os tais dispositivos requerem o uso de formulações adequadas para a dispensação de oligonucleotídeo (ou derivado). Tipicamente, cada formulação é específica para o tipo de dispositivo empregado e pode envolver o uso de um material propelente apropriado, além dos diluentes

comuns, adjuvantes e/ou veículos úteis na terapia. Também, o uso de lipossomas, microcápsulas ou microesferas, complexos de inclusão ou outros tipos de veículos são contemplados. Oligonucleotídeo quimicamente modificado também pode ser
5 preparado em diferentes formulações dependendo do tipo de modificação química ou do tipo de dispositivo empregado.

Formulações adequadas para uso com um nebulizador, seja de jato ou ultrassônico, irão tipicamente compreender oligonucleotídeo (ou derivado) dissolvido em água numa
10 concentração de cerca de 0,1 a 25 mg de oligonucleotídeo biologicamente ativo por mL de solução. A formulação também pode incluir um tampão e um açúcar simples (por exemplo, para a estabilização do oligonucleotídeo e para a regulação da pressão osmótica). A formulação do nebulizador também
15 pode conter um tensoativo, para reduzir ou prevenir a agregação induzida de superfície do oligonucleotídeo causada pela atomização da solução na formação do aerossol.

Formulações para uso com um dispositivo inalador de dose medida irão geralmente compreender um pó finamente
20 dividido contendo o oligonucleotídeo (ou derivado) suspenso num propelente com a ajuda de um tensoativo. O propelente pode ser qualquer material convencional empregado para esse propósito, tal como um clorofluorcarbono, um hidroclorofluorcarbono, um hidrofluorcarbono ou um
25 hidrocarboneto, incluindo triclorofluormetano, diclorodifluormetano, diclorotetrafluoretanol e 1,1,1,2-tetrafluoretano ou suas combinações. Tensoativos adequados incluem trioleato de sorbitan e lecitina de soja. Ácido

oléico também pode ser útil como um tensoativo.

Formulações para dispensação a partir de um dispositivo inalador de pó compreenderão um pó seco finamente dividido contendo oligonucleotídeo (ou derivado) e
5 podem também incluir um agente volumoso, tal como lactose, sorbitol, sacarose ou manitol em quantidades as quais facilitam a dispersão do pó a partir do dispositivo, por exemplo, 50 a 90% em peso da formulação. O oligonucleotídeo (ou derivado) deve ser mais vantajosamente preparado na
10 forma particulada com um tamanho de partícula médio de menos de 10 μ m (ou microns), mais preferivelmente de 0,5 a 5 μ m, para uma distribuição mais eficaz do pulmão distal.

A distribuição nasal de uma composição farmacêutica da presente invenção também é contemplada. A
15 distribuição nasal permite a passagem de uma composição farmacêutica da presente invenção para a corrente sanguínea diretamente após a administração do produto terapêutico para o nariz, sem a necessidade para a deposição do produto no pulmão. Formulações para distribuição nasal incluem aquelas
20 com dextrana e ciclodextrana.

Para administração nasal, um dispositivo útil é uma garrafa pequena e dura à qual um pulverizador de dose medida é ligado. Numa modalidade, a dose medida é distribuída pela retirada da composição farmacêutica da
25 presente solução da invenção numa câmara de volume definido, cuja câmara tem uma abertura dimensionada para aerossolizar e formulação de aerossol pela formação de um borrifo quando um líquido na câmara é comprimido. A câmara é comprimida

para administrar a composição farmacêutica da presente invenção. Numa modalidade específica, a câmara é uma disposição de um pistão. Tais dispositivos são comercialmente disponíveis.

5 Alternativamente, uma garrafa de compressão plástica com uma abertura ou orifício dimensionado para aerossolizar uma formulação de aerossol pela formação de um borrifo quando comprimida é usada. A abertura é geralmente encontrada no topo da garrafa, e o topo é geralmente tampado
10 para se ajustar parcialmente nas passagens nasais para a administração eficiente da formulação aerossol. Preferivelmente, o inalador nasal irá fornecer uma quantidade medida da formulação aerossol, para administração de uma dose medida do fármaco.

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

25 Formulações farmacêuticas para administração parenteral incluem soluções aquosas dos compostos ativos na forma solúvel em água. Adicionalmente, suspensões dos compostos ativos podem ser preparadas como suspensões de

injeção oleosa apropriadas. Solventes ou veículos lipofílicos adequados incluem óleos graxos tais como óleo de sésamo, ou ésteres de ácido graxo sintéticos, tais como oleato de etila ou triglicerídeos, ou lipossomas. Suspensões de injeção aquosa podem conter substâncias as quais aumentam a viscosidade da suspensão, tais como carboximetilcelulose sódica, sorbitol ou dextrana. Opcionalmente, a suspensão também pode conter estabilizantes ou agentes adequados os quais 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 livre de pirogênio estéril, antes do uso.

os compostos também podem ser formulados nas composições retais ou vaginais tais como supositórios ou enemas de retenção, por exemplo, contendo bases de supositório convencionais tais como manteiga de cacau ou outros glicerídeos.

Além das formulações descritas anteriormente, os compostos também podem ser formulados como preparação de depósito. Tais formulações de longa ação podem ser formuladas com materiais poliméricos ou hidrofóbicos adequados (por exemplo, como uma emulsão num óleo aceitável) ou resinas trocadoras de íons, ou como derivados frugalmente solúveis, por exemplo, como um sal frugalmente solúvel.

As composições farmacêuticas também podem compreender veículos ou excipientes em fase gel ou sólida 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 preparação farmacêuticas líquidas ou sólidas adequadas são, por exemplo, soluções aquosas ou salinas para inalação, microencapsuladas, encoquelatos, revestidas em partículas de ouro microscópicas, contidas em lipossomas, nebulizadas, aerossóis, péletes para implante na pele ou secas num objeto pontudo para serem arranhadas na pele. As composições farmacêuticas também incluem grânulos, pós, comprimidos, comprimidos revestidos, (micro) cápsulas, supositórios, xaropes, emulsões, suspensões, cremes, gotas ou preparações com liberação prolongada dos compostos ativos, em cuja preparação excipientes e aditivos e/ou auxiliares tais como desintegrantes, ligantes, agentes de revestimento, agentes de intumescência, lubrificantes, flavorizantes, adoçantes ou solubilizantes são costumeiramente usados conforme descrito acima. As composições farmacêuticas são adequadas para uso numa variedade de sistemas de distribuição de fármacos. Para uma breve revisão dos métodos para distribuição de fármacos, ver Langer, Science 249: 1527-1533, 1990, o qual é incorporado aqui por referência.

Os oligonucleotídeos imunoestimulatórios CpG e opcionalmente outros terapêuticos podem ser administrados per se (puros) ou na forma de um sal farmaceuticamente aceitável. Quando usados na medicina os sais devem ser farmaceuticamente aceitáveis, mas sais não-farmaceuticamente

aceitáveis podem ser convenientemente usados para preparar seus sais farmaceuticamente aceitáveis. Tais sais incluem, mas não estão limitados, àqueles preparados a partir dos seguintes ácidos: clorídrico, bromídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maléico, acético, salicílico, p-toluenossulfônico, tartárico, cítrico, metanossulfônico, fórmico, malônico, succínico, naftaleno-2-sulfônico e benzenossulfônico. Também, tais sais podem ser preparados como sais de metal alcalino ou alcalino terroso, tais como sais de sódio, potássio ou cálcio do grupo ácido carboxílico.

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

O termo veículo farmaceuticamente aceitável significa um ou mais substâncias de enchimento, diluentes ou encapsulantes sólidas ou líquidas compatíveis, as quais são adequadas para administração a um 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 também são capazes de ser misturados com os compostos da presente invenção e uns com os outros, de uma forma tal que não haja interação a

qual possa substancialmente impedir a eficiência farmacêutica desejada.

A presente invenção é ainda ilustrada pelos seguintes exemplos, os quais de nenhuma alguma devem ser
 5 construídos como limitantes adicionais. Os conteúdos totais de todas as referências (incluindo referências de literatura, patentes publicadas, pedidos de patente publicados e pedidos de patente co-pendentes) citados por todo esse pedido são por meio disto expressamente
 10 incorporados por referência.

EXEMPLOS

Exemplo 1

1. Indução dos genes associados com IFN e IFN α por um ODN CpG de classe C (SEQ ID NO: 10)

15 *Métodos:* Camundongos (machos, BALB/c) receberam SEQ ID NO: 10 (100 μ g/Kg nas Figuras 3a - 3c ou 10, 100 ou 1000 μ g/Kg nas Figuras 3d - 3f) ou salina por instilação intranasal. As proteínas secretadas (IFN α , IFN γ e IP10) foram ensaiadas no fluido de lavagem broncoalveolar 15 horas
 20 depois, ou a expressão gênica no tecido pulmonar foi analisada por PCR em tempo real 30 horas mais tarde.

Resultados: ODN CpG de classe C induziu a secreção de IFN α , IFN γ e de proteína induzível por interferon 10 (IP-10). Os resultados estão mostrados na Figura 3.

25 Uma vez que o ODN CpG estimulou a secreção de IFN α nas vias aéreas de camundongos, nós investigamos se o gene induzível por interferon para indoleamina 2,3-dioxigenase foi expresso no pulmão. Quando instilado nas vias aéreas, o

ODN CpG não aumentou a expressão do RNAm para essa enzima imunomoduladora (Fig. 3f). Mx1, e indoleamina 2,3-dioxigenase foram também supra-regulados no pulmão de camundongo (Figuras 3d e 3e).

5 2 . Efeitos antivirais do ODN CpG de classe C

Devido ao fato das infecções virais do trato respiratório serem uma causa principal de exacerbações de asma, um modelo de camundongo foi estabelecido no qual a inflamação das vias aéreas é exacerbada pelo desafio de
10 antígeno combinado e pela infecção viral.

Métodos: Os camundongos receberam duas administrações de SEQ ID NO: 10 em 30, 100 ou 300 µg/Kg, 4 dias de distância, por instilação intranasal em 40 µL de salina. Dois dias depois da última dose, os camundongos
15 foram infectados com vírus influenza (influenza do tipo A, subtipo H1N1, cepa adaptada em camundongo PR8, 200 EID50, em 40 µL de salina) por instilação intranasal.

A carga viral no pulmão (imunoensaio de enzima Takara Biomedical para proteína nuclear) e a inflamação das
20 vias aéreas (contagens de células recuperadas por lavagem broncoalveolar) foram avaliadas 6 dias depois da infecção viral.

Resultados: Pré-tratamento com a SEQ ID NO: 10 reduziu a carga de vírus influenza no pulmão (Figura 4a) e o
25 acúmulo de leucócitos induzido por vírus (incluindo neutrófilos e células mononucleares) nas vias aéreas (Figuras 4b e 4c). Os resultados estão mostrados na Figura 4.

3. Efeitos protetores de ODN CpG de classe C contra hiperatividade e inflamação das vias aéreas induzida por vírus e antígeno

Métodos Os camundongos foram sensibilizados com antígeno (barata, 10 µg, intraperitoneal com adjuvante de hidróxido de alumínio) e, a seguir, desafiadas duas vezes por semana por três semanas com antígeno intranasal (10 µg em 40 µL de salina). Os camundongos foram infectados com vírus influenza por instilação intranasal antes do último par de desafios de antígeno. Alternativamente, camundongos separados receberam o desafio de antígeno sozinho ou somente a infecção viral.

SEQ ID NO: 10 (100 µg/Kg) foi administrada intranasalmente uma vez por semana, dois dias antes do primeiro desafio com antígeno da semana. A inflamação das vias aéreas (contagens de células recuperadas por lavagem broncoalveolar) e hiperatividade das vias aéreas à metacolina inalada (Sigma, St. Louis, MO, EUA) foram avaliadas 48 horas depois do último desafio com antígeno. Os camundongos foram anestesiados com pentobarbitona de sódio (60 mg/Kg, intraperitoneal) e ventilados mecanicamente através de uma cânula traqueal. As células foram recuperadas das vias aéreas por lavagem broncoalveolar efetuada com 1 mL de meio RPMI 1640 contendo 10% de soro bovino fetal (ambos da Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) instilado através de uma cânula traqueal. A resistência das vias aéreas foi calculada a partir das medições do fluxo de ar pulmonar e da pressão intratraqueal usando programa de computador de mecânica

respiratória (Buxco Research Systems, Wilmington, NC, EUA). Depois de registrar a linha de base da resistência das vias aéreas, as concentrações crescentes de aerossol de metacolina (5 - 100 mg/mL por 5 segundos, em intervalos de 5 minutos) foram distribuídas através da cânula traqueal. A broncoconstrição resultante foi medida como um aumento na resistência das vias aéreas. Para cada animal, a área sob a curva de dose-resposta da metacolina foi calculada.

Análise de dados: Significância estatística das diferenças entre as médias do grupo de tratamento e o grupo de controle não-tratado foram determinadas usando o teste de Mann-Whitney ou o teste de comparação múltipla Kruskal-Wallis (* $P < 0,05$).

Resultados: Os camundongos que foram desafiados com antígeno e infectados com vírus mostraram um acúmulo mais severo de leucócitos (incluindo neutrófilos e células mononucleares) nas vias aéreas do que os camundongos que foram ou somente desafiados com antígeno ou somente infectados com vírus (Figuras 5a - 5c).

Esses camundongos também desenvolveram hiper-reatividade das vias aéreas. Quando dosados nas vias aéreas uma vez por semana por três semanas, o ODN CpG protegeu os camundongos contra a inflamação das vias aéreas exacerbada e a queda no peso corporal, e quase completamente preveniu o aumento na linha de base na resistência das vias aéreas e o desenvolvimento da hiper-reatividade das vias aéreas (Figuras 6a - 6c).

Exemplo 2

Foi demonstrado que o oligodesoxinucleotídeo CpG da classe C pode suprimir a carga de vírus influenza e a inflamação das vias aéreas induzida por vírus em camundongos. No Exemplo 2 os efeitos protetores da SEQ ID NO: 10 contra a inflamação das vias aéreas exacerbada induzida por infecção com vírus influenza e desafio de antígeno combinados foram examinados.

Métodos

10 1. Administrações de antígeno e vírus:

Camundongos (BALB/c machos) foram sensibilizados nos dias de estudo 0 e 7 com antígeno (barata, 10 µg, intraperitoneal) com adjuvante de hidróxido de alumínio (Pierce Alum).

15 Os camundongos foram desafiados com antígeno pela exposição ao antígeno administrado intranasalmente (10 µg em 40 µL de salina), duas vezes em cada semana por três semanas consecutivas. O primeiro desafio foi no dia de estudo 21.

20 Os camundongos foram infectados com vírus influenza (influenza tipo A, subtipo H1N1 cepa adaptada em camundongo PR8, 200 EID₅₀, em 40 µL de salina) por instilação intranasal no dia de estudo 34 (isto é, antes do último par de antígeno desafiar).

25 Alternativamente, grupos separados de camundongos receberam somente o desafio com antígeno ou somente a infecção com vírus.

2. Tratamento com SEQ ID NO: 10:

SEQ ID NO: 10 (100 µg/Kg) foi administrada

intranasalmente uma vez a cada semana, dois dias antes do primeiro desafio com antígeno da semana.

3. Pontos finais:

5 A inflamação das vias aéreas foi avaliada 48 horas depois do último desafio com antígeno. As células nas vias aéreas foram recuperadas por lavagem broncoalveolar. As contagens de célula diferencial foram feitas por microscopia de luz a partir de preparações de citocentrífuga manchadas com coloração de Wright-Giemsa.

10

Resumo do protocolo de estudo

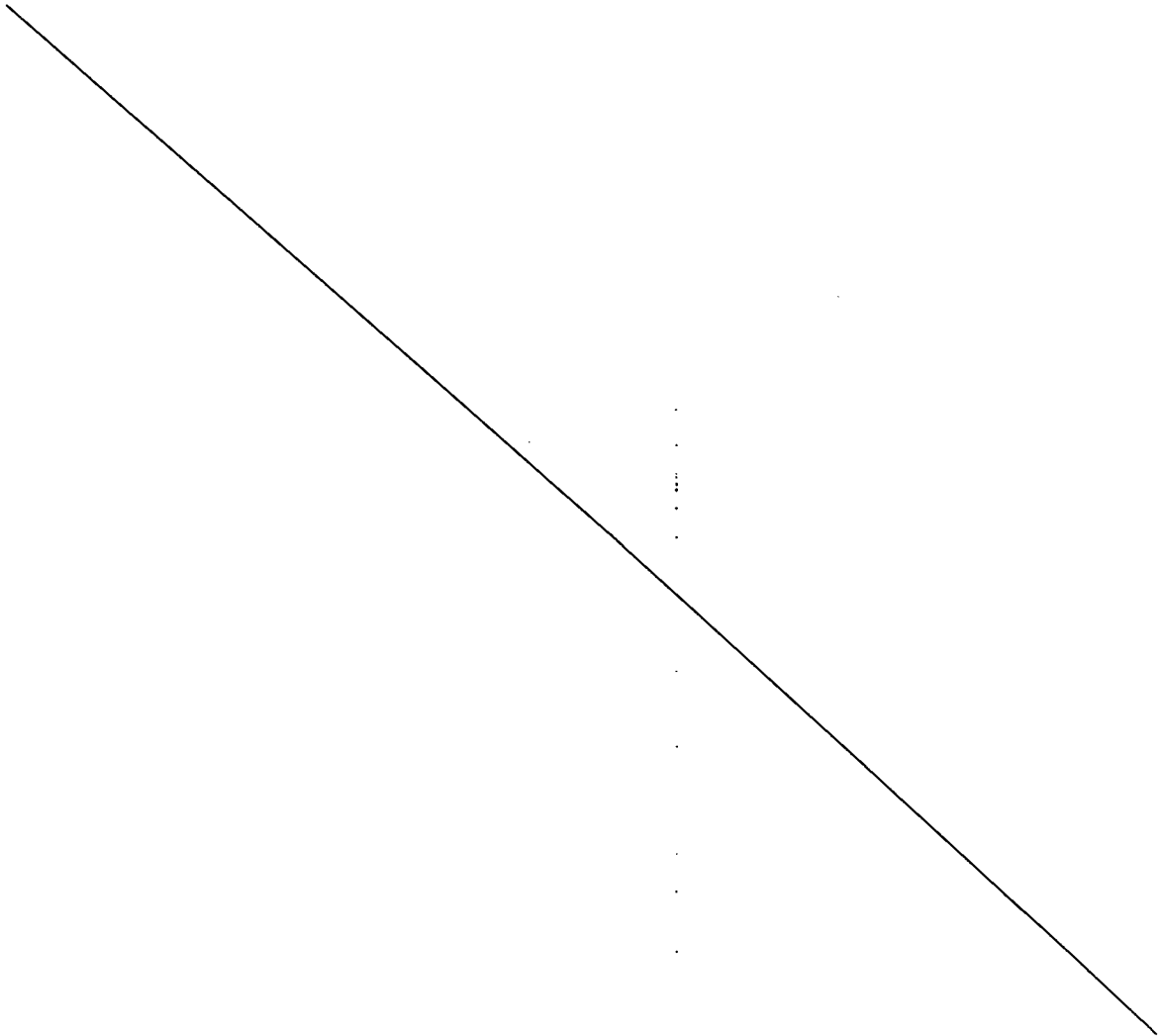


TABELA 2

	Sensibilização com antígeno	Desafio com antígeno	Desafio com antígeno	Vírus ↓	Ponto final
Dias:	0	7	19	21	24
	↓	↓	ODN ↓	↓	↓
			26	28	31
			ODN ↓	↓	↓
			33	35	38
			terceira semana de tratamento	↓	↓
			segunda semana de tratamento	↓	↓
			primeira semana de tratamento	↓	↓

Resultados

Caracterização da inflamação das vias aéreas induzida por vírus e antígeno

A infecção somente com vírus influenza o somente
5 com desafio de antígeno causou, cada uma, um aumento na
quantidade total de leucócitos no fluido de lavagem
broncoalveolar (Figura 7). Em camundongos infectados com
vírus, esse acúmulo de células incluiu uma neutrofilia
marcante, enquanto que em camundongos desafiados com
10 antígeno, o acúmulo incluiu uma eosinofilia marcante.

Quando comparados com camundongos que receberam
somente o desafio com antígeno, aqueles que foram desafiados
com antígeno e infectados com vírus mostraram um acúmulo
exacerbado de leucócitos no fluido de lavagem broncoalveolar
15 (Figura 7). Esse acúmulo aumentado incluiu tanto neutrófilos
quanto células mononucleares. Entretanto, esses camundongos
apresentaram eosinofilia reduzida.

Efeitos da SEQ ID NO: 10:

Tratamento com SEQ ID NO: 10 (100 µg/Kg) não
20 suprimiu a neutrofilia induzida por vírus (Figura 7). Essa
descoberta foi esperada nessa dose. Foi determinado que uma
dose mais elevada de 300 µg/Kg geralmente demonstra melhores
efeitos antivirais.

Ao contrário, SEQ ID NO: 10 (100 µg/Kg) suprimiu
25 significativamente a infiltração celular induzida por
antígeno (Figura 7).

Uma importante descoberta desse estudo foi que a
SEQ ID NO: 10 (100 µg/Kg) suprimiu significativamente a

inflamação da via aérea exacerbada induzida em camundongos que foram tanto infectados com vírus quanto desafiados com antígeno. Os acúmulos exacerbados de neutrófilos e células mononucleares foram ambos suprimidos (Figura 7).

5 Além da inflamação das vias aéreas exacerbada, os camundongos que foram tanto infectados com vírus quando desafiados com antígeno apresentaram uma perda significativa de peso corporal. Isso foi significativamente suprimido em camundongos tratados com SEQ ID NO: 10.

10 Exemplo 3

Indução das citocinas associadas com TLR-9 a partir de esplenócitos de camundongo *in vitro*, e em pulmão de camundongo *in vivo*

15 A capacidade da SEQ ID NO: 10 de induzir a secreção das citocinas associadas com a TLR-9 a partir de esplenócitos de murino *in vitro* foi examinada.

Métodos

Estímulo de citocinas a partir de esplenócitos *in vitro*

20 Esplenócitos foram reunidos a partir de 6 camundongos e incubados com ODNs (0,1, 1 ou 10 µg/mL) por 36 horas. As células foram isoladas mecanicamente empurrando gentilmente baços de camundongo cortados através de uma peneira celular (tamanho de poro de 70 µm). Células (1 x 25 10⁷, reunidas a partir de 6 camundongos) foram incubadas (37 °C, CO₂ 5%) em 1 mL de meio (RPMI 1640 contendo soro bovino fetal 10%, ambos da Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). SEQ ID NO: 10 ou o ODN de controle (com porções CpG revertidas) ou

qualquer um dos dois domínios da SEQ ID NO: 10 (seqüência estimulatória e palíndromo de extremidade 5') foram adicionados para produzir concentrações de 0,1, 1 ou 10 µg/mL. Depois da incubação por 24 horas, o meio de cultura foi ensaiado conforme descrito abaixo para citocinas secretadas (IFN α , IFN γ , proteína induzível por interferon [IP]-10, IL-6, IL-10 e TNF α).

Estímulo das citocinas nas vias aéreas de camundongos

Camundongos receberam a SEQ ID NO: 10 (10 - 1000 µg/Kg) ou veículo (40 µL de salina) distribuídos nas vias aéreas por instilação intranasal executada sob anestesia branda com isoflurano. Vinte e quatro horas mais tarde, a lavagem broncoalveolar foi efetuada através de uma cânula traqueal usando 1 mL de salina. As concentrações de citocina (IFN α , IFN γ , IP-10, IL-6 e IL-12p40) no fluido de lavagem broncoalveolar foram ensaiadas.

Resultados

Conforme mostrado na Tabela um, a SEQ ID NO: 10 induziu a secreção de citocinas associadas com TLR9 a partir de esplenócitos de murino isolados. Ao contrário, um ODN de controle com porções CpG revertidas, a seqüência estimulatória de extremidade 5' da SEQ ID NO: 10 sozinha ou o palíndromo sozinha não teve atividade marcante. Os títulos mais altos de cada citocina foram induzidos com ODNs a 10 µg/mL (dados a partir de concentrações mais baixas não estão mostrados). n.d. = não-detectado (< 12 pg/mL). Conseqüentemente, a SEQ ID NO: 10 induziu secreções de IFN α ,

IFN γ , IP-10, IL-6, IL-10 e TNF α de um modo dependente de concentração. Os títulos mais altos de cada citocina forma induzidos com a SEQ ID NO: 10 a 10 μ g/mL.

Para avaliar a importância das porções CpG corretamente ordenadas para essa atividade biológica da SEQ ID NO: 10, o ensaio foi repetido com um ODN com a mesma sequência que a SEQ ID NO: 10, mas com porções CpG revertidas na sequência estimulatória da extremidade 5' (SEQ ID NO: 55). O oligonucleotídeo de controle quase não mostrou capacidade de induzir essas citocinas associadas com TLR9. A sequência estimulatória de extremidade 5' da SEQ ID NO: 10 sozinha, ou o palíndromo sozinho, também não teve atividade marcante demonstrando que uma molécula intacta com ambos esses domínios é requerida para atividade (seqüências mostradas na Tabela 3).

TABELA 3

ODN	Título de Citocina (pg/ml) induzido por ODN (10 μ g/ml)					
	IFN α	IFN γ	IP-10	IL-6	IL-10	TNF α
Somente meio	34,4	n.d.	21,9	64,8	n.d.	n.d.
<u>SEQ ID NO:10</u>	<u>199,0</u>	<u>539,9</u>	<u>111,1</u>	<u>11531,5</u>	<u>113,1</u>	<u>71,1</u>
ODN de Controle	22,1	n.d.	22,4	537,5	n.d.	n.d.
Somente seqüência estimulatória	19,5	n.d.	17,9	427,1	n.d.	21,0
Somente palíndromo	18,8	n.d.	17,7	59,0	n.d.	n.d.

Foi, a seguir, investigado se a SEQ ID NO: 10 poderia induzir citocinas associadas com TLR9 quando dosada nas vias aéreas de camundongos *in vivo*. SEQ ID NO: 10 induziu a secreção da IFN α , IFN γ , IL-10, IL-6 e IL-12p40 conforme demonstrado pelas concentrações crescentes dessas citocinas no fluido de lavagem broncoalveolar (Fig. 8).

Exemplo 4

SEQ ID NO: 10 induz o desvio imune para longe de uma resposta Th2 à sensibilização por antígeno

Para determinar se a SEQ ID NO: 10 pode suprimir uma resposta Th2 à sensibilização de antígeno quando injetado no coxim da pata do camundongo, juntamente com um antígeno sensibilizador (ovalbumina), os camundongos foram reestimulados com antígeno num ensaio de recordação *ex vivo*.

Métodos

Os camundongos foram sintetizados com antígeno 10 μ g de ovalbumina de grau V, Sigma, St Louis, MO, EUA) injetados na parte traseira direita do coxim da pata. Antígeno foi injetado ou sozinho, ou juntamente com a SEQ ID NO: 10 (10 - 1000 μ g/Kg). Em cada caso, o volume de injeção total foi de 20 μ L. Seis dias depois, a drenagem do o nodo linfático popliteal foi removida e uma suspensão celular foi preparada empurrando gentilmente os nodos através de uma peneira celular (tamanho do poro de 70 μ m). Um ensaio de recordação de antígeno foi executado *ex vivo* pela incubação (37 °C, CO₂ 5%) de 1 x 10⁶ células do nodo linfático não-fracionadas em 220 μ L de meio (RPMI 1640 contendo 10% de soro bovino fetal, ambos da Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA)

na presença ou ausência de antígeno (ovalbumina, 10 µg/mL). Depois da incubação por 36 horas, o meio de cultura foi ensaiado conforme descrito abaixo para as citocinas secretadas (IL-5, IL-13 e IFN γ).

5 *Resultados*

As células do nodo linfático a partir de camundongos sensibilizados secretaram IL-5, IL-3 e IFN γ (Fig. 9). As células incubadas na ausência de antígeno, ou com um antígeno de controle (barata) ao qual os camundongos não foram sensibilizados, não secretaram títulos detectáveis de qualquer uma dessas citocinas (< 19 pg/mL). Células isoladas de animais tratados com SEQ ID NO: 10 apresentaram secreção induzidas por antígeno atenuadas das citocinas Th2 IL-5 e IL-13. Ao contrário, a secreção de IFN γ de citocina Th1 foi marcadamente aumentada (Fig. 9C). As células incubadas na ausência de antígeno, ou com um antígeno de controle (barata) ao qual os camundongos não foram sensibilizados, não secretaram títulos detectáveis de qualquer uma dessas citocinas (< 10 pg/mL).

20 Exemplo 5

SEQ ID NO: 10 suprime a produção de IgE induzida por antígeno e estimula a produção de IgG2a no camundongo *in vivo*.

Foi depois determinado se a SEQ ID NO: 10 poderia alterar o perfil da produção de imunoglobulina quando dosada para camundongos no momento da sensibilização do antígeno.

Métodos

Os camundongos foram sensibilizados com antígeno

duas vezes, com 7 dias de distância, com antígeno intraperitoneal (10 µg de ovalbumina grau V, Sigma, St. Louis, MO, EUA) dissolvido em adjuvante de hidróxido de alumínio (0,2 mL, Pierce Imject Alum, Rockford, IL, EUA). Os
5 camundongos receberam a SEQ ID NO: 10 (1 - 1000 µg/Kg) ou veículo de controle (salina, 10 mL/Kg) por injeção intraperitoneal dois dias antes de cada uma das duas sensibilizações, e no dia de cada sensibilização. Os camundongos foram sangrados por punctura cardíaca 12 dias
10 depois da segunda sensibilização. Soro foi coletado por centrifugação e avaliado como se segue para IgE e IgG2a específica para ovalbumina.

ELISAs foram executados em placas de microtitulação (Nunc, Rochester, NY, EUA), com lavagens
15 usando polissorbato 20 0,05% (Sigma, St. Louis, MO, EUA) em salina tamponada com fosfato (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) entre cada um dos seguintes passos. As placas foram revestidas com ovalbumina (150 µL de 100 µg/mL) em tampão de ligação (NaHCO₃ 0,1 M, Sigma) por 15 horas a 4 °C. As placas
20 foram, a seguir, bloqueadas com diluente de ensaio (200 µL/poço, Pharmingen, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA) por 2 horas a 20 °C. Amostras de soro (diluídas 1 em 40 em diluente de ensaio, 100 µL/poço) foram adicionadas e deixadas por 2 horas a 20 °C. IgG2a ou IgE anti-camundongo
25 de rato conjugada com biotina (Pharmingen) (2 µg/mL em diluente de ensaio, 100 µL/poço) foram adicionados e deixados por 2 horas a 4 °C. Peroxidase de rábano silvestre conjugada com estreptavidina (Pharmingen, diluído 1:1000 em

diluyente de ensaio, 100 μ L/poço) foi, a seguir, adicionada e deixada por 1 hora a 20 °C. Reagente substrato de tetrametilbenzidina (Pharmlngen, 100 μ L/poço) foi adicionado por 30 minutos a 20 °C e a reação foi, a seguir, interrompida com ácido sulfúrico 2 N (50 μ L/poço). Absorvância a 450 nm foi medida usando um espectrofotômetro (Spectramax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA).

Resultados

SEQ ID NO: 10 suprimiu a produção de IgE antígeno-específica (85% de supressão com uma dose de 1000 μ g/Kg) e potencializou a produção de IgG2a proporcionando evidências adicionais do desvio imune para longe de uma resposta Th2 ao antígeno (Fig. 10).

Exemplo 6

SEQ ID NO: suprime o acúmulo de eosinófilos e linfócitos induzido por antígeno nas vias aéreas de camundongos *in vivo*.

Exemplos 4 e 5 demonstram que a SEQ ID NO: 10 é capaz de suprimir as respostas imunes Th2. Conseqüentemente, os efeitos protetores da SEQ ID NO: 10 num modelo de camundongo de inflamação das vias aéreas induzida por antígeno foram examinados.

Métodos

Os camundongos foram sensibilizados com antígeno intraperitoneal (barata) e, a seguir, desafiados com antígeno duas vezes por semana por 2 semanas com antígeno instilado nas vias aéreas. Durante cada uma das 2 semanas de desafio, os camundongos foram tratados uma vez com SEQ ID

NO: 10 ou veículo (Veh) instilado nas vias aéreas. Alternativamente, os camundongos foram não-tratados (Untr). Lavagem broncoalveolar foi efetuada 48 horas depois do último desafio com antígeno e as células recuperadas foram
5 contadas. Leucócitos (a) e eosinófilos (b) totais foram contados com um contado de células automatizado.

Resultados

Uma vez que esse modelo experimental compartilha características de excelente qualidade de asma alérgica, os
10 efeitos protetores da SEQ ID NO: 10 para essa indicação foram examinados. Quando dosado nas vias aéreas uma vez a cada semana durante duas semanas, a SEQ ID NO: 10 suprimiu os acúmulos de eosinófilos, de células T e de células B que foram induzidos pelo desafio de antígeno intrapulmonar (Fig.
15 11). Na dose mais elevada testada (300 µg/Kg), SEQ ID NO: 10 suprimiu os acúmulos dessas células por 78%, 65% e 79%, respectivamente.

Conclusões:

Tanto em crianças quanto em adultos com asma
20 existente, infecções com vírus do trato respiratório são importantes precipitantes para a obstrução e ofegação das vias aéreas. os processos inflamatórios envolvidos são complexos. Entretanto, o recrutamento de células mononucleares e neutrófilos induzidos por vírus e a ativação
25 estão implicadas no agravamento da obstrução das vias aéreas que contribui para essas exacerbações de asma. Os dados apresentados aqui demonstram que o ODN CpG, particularmente ODN de classe C, suprime de maneira marcante os acúmulos

exacerbados de neutrófilos e de células mononucleares induzidos nos camundongos por infecção viral e desafio de antígeno combinado.

A especificação escrita antecedente é considerada
5 como sendo suficiente para capacitar uma pessoa versada na técnica a praticar a invenção. A presente invenção não é para ser limitada no escopo pelos exemplos fornecidos, uma vez que os exemplos são tencionados como uma única ilustração de um aspecto da invenção e outras modalidades
10 funcionalmente equivalentes estão dentro do escopo da invenção. Várias modificações da invenção, além daquelas mostradas e aqui descritas, ficarão aparentes para os indivíduos versados na técnica a partir da descrição precedente e caem dentro do escopo das reivindicações em
-
- 15 anexo. As vantagens e objetos da invenção não estão necessariamente englobados por cada modalidade da invenção.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Coley Pharmaceutical Group, Inc.

Sanofi-Aventis U.S.P. LLC

<120> "MÉTODOS PARA TRATAR ASMA EXACERBADA POR DOENÇA INFECCIOSA"

<130> C1037.70062W000

<140> Ainda não designado.

<141> 2006-04-10

<150> 60/669.548

<151> 80-04-2005

<160> 56

<170> PatentIn versão 3.3

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo Sintético

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (1) . . (2)

<223> em que a ligação internucleotídeo é uma ligação internucleotídeo
estabilizada

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (3) . . (4)

<223> em que a ligação internucleotídeo é uma ligação internucleotídeo estabilizada

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (5) . . (7)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (8) . . (11)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (12) . . (16)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (17) . . (22)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<400> 1

tcgcgctcggtt cggcgcgcgcgc cg

22

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo Sintético

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (1) . . (2)

<223> em que a ligação internucleotídeo é uma ligação internucleotídeo estabilizada

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (3) . . (5)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (6) . . (8)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (9) . . (12)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (13) . . (17)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (18) . . (23)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<400> 2

tcgtcgacgt tcggcgcgcg ccg

23

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo Sintético

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (1) . . (2)

<223> em que a ligação internucleotídeo é uma ligação internucleotídeo estabilizada

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (3) . . (6)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (7) . . (10)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (11) . . (15)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (16) . . (21)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<400> 3

tcggacgttc ggcgcgcgcc g

21

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo Sintético

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (1) . . (2)

<223> em que a ligação internucleotídeo é uma ligação internucleotídeo estabilizada

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (3) . . (6)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (7) . . (10)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (11) . . (19)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<400> 4

tcggacgttc ggcgcgccg

19

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo Sintético

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (1) . . (2)

<223> em que a ligação internucleotídeo é uma ligação internucleotídeo estabilizada

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (3) . . (4)

<223> em que a ligação internucleotídeo é uma ligação internucleotídeo estabilizada

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (5) . . (7)

<223> em que a ligação internucleotídeo é uma ligação internucleotídeo estabilizada

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (8) . . (11)

<223> em que a ligação internucleotídeo é uma ligação internucleotídeo estabilizada

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (12) . . (20)

<223> em que a ligação internucleotídeo é uma ligação internucleotídeo estabilizada

<400> 5

togcgtcggtt cggcgcgcgcg

20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo Sintético

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (1) . . (2)

<223> em que a ligação internucleotídeo é uma ligação internucleotídeo estabilizada

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (3) . . (5)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (6) . . (9)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (10) . . (14)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (15) . . (20)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<400> 6

tcgacgttcg gcgcgcgccg

20

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo Sintético

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (1) . . (2)

<223> em que a ligação internucleotídeo é uma ligação internucleotídeo estabilizada

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (3) . . (5)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (6) . . (9)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo Estabilizadas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (7) . . (18)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<400> 7

tcgacgttcg gcgcgccg

<210> 8

<211> 18

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo Sintético

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (1) . . (2)

<223> em que a ligação internucleotídeo é uma ligação internucleotídeo
estabilizada

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (3) . . (4)

<223> em que a ligação internucleotídeo é uma ligação internucleotídeo
estabilizada

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (5) . . (7)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo
estabilizadas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (8) . . (11)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo
estabilizadas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (12) . . (18)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<400> 8

tcgcgctcggtt cggcgcgcg

18

<210> 9

<211> 22

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo Sintético

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (1) . . (2)

<223> em que a ligação internucleotídeo é uma ligação internucleotídeo estabilizada

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (3) . . (4)

<223> em que a ligação internucleotídeo é uma ligação internucleotídeo estabilizada

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (5) . . (7)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (8) . . (11)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (12) . . (16)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (17) . . (22)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<400> 9

tcgcgcacgtt cggcgcgcgc cg

22

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo Sintético

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (1) . . (2)

<223> em que a ligação internucleotídeo é uma ligação internucleotídeo estabilizada

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (3) . . (5)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (6) . . (8)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (9) . . (12)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (13) . . (17)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (18) . . (23)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<400> 10

tcgctcgtcgt tcggcgcgcg ccg

23

<210> 11

<211> 24

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo Sintético

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (1) . . (24)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<400> 11

tcgtcgtttt gacgttttgt cgtt

24

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo Sintético

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (1) . . (24)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<400> 12

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo Sintético

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (1) . . (5)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (6) . . (12)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (13) . . (18)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (19) . . (24)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<400> 13

tcgtcgtttt acggcgccgt gccg

<210> 14

<211> 24

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo Sintético

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (1) . . (2)

<223> em que a ligação internucleotídeo é uma ligação internucleotídeo estabilizada

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (3) . . (5)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (6) . . (13)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (14) . . (21)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (22) . . (24)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<400> 14

tcgtcgtttt gacgttttgt cggt

24

<210> 15

<211> 23

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo Sintético

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (1) . . (2)

<223> em que a ligação internucleotídeo é uma ligação internucleotídeo estabilizada

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (3) . . (5)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (6) . . (8)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (9) . . (12)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (13) . . (17)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (18) . . (23)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<400> 15

tcgtcgacgt tcggcgcgcg ccg

23

<210> 16

<211> 15

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo Sintético

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (1) . . (2)

<223> em que a ligação internucleotídeo é uma ligação internucleotídeo estabilizada

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (12) . . (15)

<223> em que a ligação internucleotídeo é uma ligação internucleotídeo
estabilizada

<400> 16

tcgacgtcgt ggggg

15

<210> 17

<211> 19

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo Sintético

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (1) . . (19)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo
estabilizadas

<400> 17

tcgacgtcga cgtgacgtg

19

<210> 18

<211> 17

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo Sintético

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (1) . . (17)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo
estabilizadas

<400> 18

tcgacgtcga cgtgacg

17

<210> 19

<211> 17

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo Sintético

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (1) . . (3)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo
estabilizadas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (4) . . (6)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo
estabilizadas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (7) . . (11)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo
estabilizadas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (12) . . (14)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (15) . . (17)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<400> 19

ttcgtcgttt tgtcgtt

17

<210> 20

<211> 18

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo Sintético

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (1) . . (4)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (5) . . (7)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (8) . . (12)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (13) . . (15)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (16) . . (18)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<400> 20

tttcgctcggtt tcgctcggtt

18

<210> 21

<211> 21

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo Sintético

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (1) . . (5)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (6) . . (9)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (10) . . (15)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (16) . . (21)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<400> 21

tcgtcgtacg gcgccgtgcc g

21

<210> 22

<211> 22

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo Sintético

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (1) . . (5)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (6) . . (10)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (11) . . (16)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (17) . . (22)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<400> 22

tcgtcgttac ggcgccgtgc cg

22

<210> 23

<211> 19

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo Sintético

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (1) . . (19)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<400> 23

tcgacgtcga cgtgacggtt

19

<210> 24

<211> 24

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo Sintético

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (1) . . (5)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (6) . . (8)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

⋮

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (9) . . (12)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (13) . . (18)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (19) . . (24)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo
estabilizadas

<400> 24

tcgtcgacga tcggcgccgt gccg

24

<210> 25

<211> 24

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo Sintético

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (1) . . (10)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo
estabilizadas

⋮

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (12) . . (24)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo
estabilizadas

<400> 25

tcgtcgacga tcggcgccgt gccg

24

<210> 26

<211> 19

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo Sintético

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (1) . . (5)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (6) . . (11)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (12) . . (19)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo
: estabilizadas
.

<400> 26

tcgacgtcga cgtgacgtt

19

<210> 27

<211> 19

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo Sintético

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (1) . . (5)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (6) . . (13)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (14) . . (19)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<400> 27

tcgacgtcga cgtgacggtt

19

<210> 28

<211> 24

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo Sintético

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (1) . . (5)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (6) . . (11)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (12) . . (17)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (18) . . (24)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações internucleotídeo estabilizadas

<400> 28

tcgtcgttta cggcgcgctg ccgt

24

<210> 29

<211> 24

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo Sintético

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (1) . . (2)

<223> em que a ligação internucleotídeo é uma ligação fosforotioato internucleotídicas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (3) . . (5)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações fosforotioato internucleotídicas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (6) . . (13)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações fosforotioato internucleotídicas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (14) . . (21)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações fosforotioato internucleotídicas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (22) . . (24)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações fosforotioato internucleotídicas

<400> 29

tcgtcgtttt gacgttttgt cgtt

24

<210> 30

<211> 21

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo Sintético

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (1) . . (2)

<223> em que a ligação internucleotídeo é uma ligação fosforotioato
internucleotídica

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (3) . . (10)

<223> em que a ligação internucleotídeo é uma ligação fosforotioato
internucleotídica

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (11) . . (18)

<223> em que a ligação internucleotídeo é uma ligação fosforotioato
internucleotídica

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (19) . . (21)

<223> em que a ligação internucleotídeo é uma ligação fosforotioato
internucleotídica

<400> 30

tcgttttgac gttttgtcgt t

21

<210> 31

<211> 13

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo Sintético

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (1) . . (2)

<223> em que a ligação internucleotídeo é uma ligação fosforotioato internucleotídica

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (3) . . (10)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações fosforotioato internucleotídicas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (11) . . (13)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações fosforotioato internucleotídicas

<400> 31

tcgttttgac gtt

13

<210> 32

<211> 24

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo Sintético

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (1).. (2)

<223> em que a ligação internucleotídeo é uma ligação fosforotioato internucleotídica

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (3) . . (5)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações fosforotioato internucleotídicas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (6) . . (9)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações fosforotioato internucleotídicas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (10) . . (13)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações fosforotioato internucleotídicas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (14) . . (21)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações fosforotioato internucleotídicas

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (22) . . (24)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações fosforotioato internucleotídicas

<400> 32

tcgtcgtttt gacgttttgt cggt

24

<210> 33

<211> 24

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo Sintético

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (1) . . (2)

<223> em que a ligação internucleotídeo é uma ligação fosforotioato

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (3) . . (5)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações fosforotioato

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (6) . . (9)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações fosforotioato

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (10) . . (13)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações fosforotioato

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (14) . . (17)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações fosforotioato

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (18) . . (21)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações fosforotioato

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (22) . . (24)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações fosforotioato

<400> 33

tcgtcgtttt gacgttttgt cgtt

24

<210> 34

<211> 24

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo Sintético

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (1) . . (2)

<223> em que a ligação internucleotídeo é uma ligação fosforotioato

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (3) . . (5)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações fosforotioato

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (6) . . (7)

<223> em que a ligação internucleotídeo é uma ligação fosforotioato

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (8) . . (9)

<223> em que a ligação internucleotídeo é uma ligação fosforotioato

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (10) . . (11)

<223> em que a ligação internucleotídeo é uma ligação fosforotioato

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (12) . . (13)

<223> em que a ligação internucleotídeo é uma ligação fosforotioato

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (14) . . (15)

<223> em que a ligação internucleotídeo é uma ligação fosforotioato

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (16) . . (17)

<223> em que a ligação internucleotídeo é uma ligação fosforotioato

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (18) . . (19)

<223> em que a ligação internucleotídeo é uma ligação fosforotioato

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (20) . . (21)

<223> em que a ligação internucleotídeo é uma ligação fosforotioato

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (22) . . (24)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações fosforotioato

<400> 34

tcgtcgtttt gacgttttgt cggt

24

<210> 35

<211> 24

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo Sintético

<400> 35

tcgtcgtttt gacgttttgt cggt

24

<210> 36

<211> 22

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo Sintético

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (1) . . (3)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações fosforotioato

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (4).. (11)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações fosforotioato

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (12) . . (19)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações fosforotioato

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (20) . . (22)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações fosforotioato

<400> 36

gtcgttttga cgttttggtcg tt

22

<210> 37

<211> 21

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo Sintético

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (1) . . (2)

<223> em que a ligação internucleotídeo é uma ligação fosforotioato

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (3) . . (5)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações fosforotioato

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (6) . . (13)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações fosforotioato

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (14) . . (21)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações fosforotioato

<400> 37

tcgtcgtttt gacgttttgt c

21

<210> 38

<211> 13

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo Sintético

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (1) . . (2)

<223> em que a ligação internucleotídeo é uma ligação fosforotioato

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (3) . . (5)

<223> em que a ligação internucleotídeo é uma ligação fosforotioato

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (6) . . (13)

<223> em que a ligação internucleotídeo é uma ligação fosforotioato

<400> 38

tcgtcgtttt gac

13

<210> 39

<211> 16

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo Sintético

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (1) . . (8)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações fosforotioato

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (9) . . (16)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações fosforotioato

:

.

<400> 39

gttttgacgt tttgtc

16

<210> 40

<211> 19

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo Sintético

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (1) . . (8)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações fosforotioato

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (9) . . (16)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações fosforotioato

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (17) . . (19)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações fosforotioato

<400> 40

gttttgacgt tttgtcggt

19

<210> 41

<211> 14

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo Sintético

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (1) . . (3)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações fosforotioato

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (4) . . (11)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações fosforotioato

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (12) . . (14)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações fosforotioato

<400> 41

gtcgttttga cggt

14

<210> 42

<211> 18

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo Sintético

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (1) . . (2)

<223> em que a ligação internucleotídeo é uma ligação fosforotioato

⋮
⋮

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (3) . . (10)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações fosforotioato

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (11) . . (18)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações fosforotioato

<400> 42

tcgttttgac gttttgtc

18

<210> 43

<211> 19

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo Sintético

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (1) . . (3)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações fosforotioato

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (4) . . (11)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações fosforotioato

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (12) . . (19)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações fosforotioato

<400> 43

gtcgttttga cgttttgtc

19

<210> 44

<211> 11

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo Sintético

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (1) . . (3)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações fosforotioato

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (4) . . (11)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações fosforotioato

<400> 44

gtcgttttga c

11

<210> 45

<211> 23

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo Sintético

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (2) . . (4)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações fosforotioato

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (5) . . (12)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações fosforotioato

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (13) . . (20)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações fosforotioato

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (21) . . (23)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações fosforotioato

<400> 45

cgtcgttttg acgttttggtc gtt

23

<210> 46

<211> 23

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo Sintético

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (1) . . (11)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações fosforotioato

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (14) . . (23)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações fosforotioato

<400> 46

tcgatcgttt ttcgtgcgtt ttt

23

<210> 47

<211> 20

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo Sintético

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (1) . . (7)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações fosforotioato

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (8) . . (15)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações fosforotioato

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (16) . . (20)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações fosforotioato

<400> 47

tcgcgacgtt cgcgcgcgcg

20

<210> 48

<211> 19

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo Sintético

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (1) . . (2)

<223> em que a ligação internucleotídeo é uma ligação fosforotioato

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (3) . . (6)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações fosforotioato

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (7) . . (10)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações fosforotioato

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (11) . . (19)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações fosforotioato

<400> 48

tcggacgttc ggcgcgccg

19

<210> 49

<211> 12

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo Sintético

<400> 49

cgacgttcgt cg

12

<210> 50

<211> 13

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo Sintético

<400> 50

cggcgccgtg ccg

13

<210> 51

<211> 12

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo Sintético

<400> 51

ccccccgggg gg

12

<210> 52

<211> 12

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo Sintético

<400> 52

ggggggcccc cc

12

<210> 53

<211> 10

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo Sintético

<400> 53

cccccggggg

10

<210> 54

<211> 10

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo Sintético

<400> 54

gggggcccc

10

<210> 55

<211> 23

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo Sintético

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (1) . . (2)

<223> em que a ligação internucleotídeo é uma ligação fosforotioato

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (3) . . (5)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações fosforotioato

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (6) . . (8)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações fosforotioato

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (9) . . (12)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações fosforotioato

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (13) . . (17)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações fosforotioato

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (18) . . (23)

<223> em que as ligações internucleotídeo são ligações fosforotioato

<400> 55

tgctcgtcgt tcggcgcgcg ccg

23

<210> 56

<211> 34

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Oligonucleotídeo Sintético

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (3) . . (28)

<223> Onde n é qualquer nucleotídeo e onde qualquer um ou mais n pode estar ausente

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (29) . . (30)

<223> Onde n é qualquer nucleotídeo

<220>

<221> Característica "misc"

<222> (33) . . (34)

<223> Onde n é qualquer nucleotídeo

<400> 56

tcnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnntnn cgnn



REIVINDICAÇÕES

1. Método para tratar asma exacerbada por vírus,
CARACTERIZADO pelo fato de que compreende:

5 administrar a um indivíduo asmático uma quantidade
eficaz de um oligonucleotídeo CpG de classe C para tratar
asma exacerbada por vírus.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1,
CARACTERIZADO pelo fato de que a asma exacerbada por vírus é
causada por um vírus respiratório.

10 3. Método, de acordo com a reivindicação 2,
CARACTERIZADO pelo fato de que o vírus respiratório não é
VSR.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1,
CARACTERIZADO pelo fato de que a asma exacerbada por vírus é
15 causada pelo vírus influenza.

5. Método, de acordo com a reivindicação 1,
CARACTERIZADA pelo fato de que o indivíduo é identificado
por um profissional da área médica.

20 6. Método, de acordo com a reivindicação 1,
CARACTERIZADO pelo fato de que o indivíduo é identificado
com base na exposição a um fator de risco para infecção vi-
ral.

7. Método, de acordo com a reivindicação 1,
CARACTERIZADO pelo fato de que o método inclui a etapa de
25 identificação de um indivíduo asmático em risco de uma in-
fecção viral.

8. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o oligonucleotídeo de classe C é um oligonucleotídeo semi-maleável.

9. Método, de acordo com a reivindicação 1, **5 CARACTERIZADO** pelo fato de que o oligonucleotídeo de classe C é SEQ ID No: 10.

10. Método para tratar asma exacerbada por vírus, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende:

identificar um indivíduo asmático em risco de uma
10 infecção viral, e

administrar ao indivíduo asmático uma quantidade eficaz de um oligonucleotídeo para tratar asma exacerbada por vírus.

11. Método, de acordo com a reivindicação 10, **15 CARACTERIZADO** pelo fato de que a asma exacerbada por vírus é causada por um vírus respiratório.

12. Método, de acordo com a reivindicação 11, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o vírus respiratório não é VSR.

20 13. Método, de acordo com a reivindicação 10, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a asma exacerbada por vírus é causada pelo vírus influenza.

14. Método, de acordo com a reivindicação 10, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o fator de risco é a estação
25 de influenza.

15. Método, de acordo com a reivindicação 10, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o fator de risco é a viagem para um destino com alto risco de exposição viral.

16. Método, de acordo com a reivindicação 10, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o oligonucleotídeo CpG é um oligonucleotídeo de classe C.

17. Método, de acordo com a reivindicação 16, **5 CARACTERIZADO** pelo fato de que o oligonucleotídeo de classe C é um oligonucleotídeo semi-maleável.

18. Método, de acordo com a reivindicação 16, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o oligonucleotídeo de classe C é SEQ ID No:10.

10 19. Método para tratar asma exacerbada por vírus, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

administrar a um indivíduo asmático submetido a uma terapia de asma não-CpG uma quantidade eficaz de oligonucleotídeo CpG para tratamento da asma exacerbada por vírus.
15 rus.

20. Método, de acordo com a reivindicação 19, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a terapia de asma não-CpG é uma terapia com esteróide.

21. Método, de acordo com a reivindicação 19, **20 CARACTERIZADO** pelo fato de que a terapia de asma não-CpG é administrada em um tempo diferente do oligonucleotídeo CpG.

22. Método, de acordo com a reivindicação 19, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a terapia de asma não-CpG é administrada ao mesmo tempo do oligonucleotídeo CpG.

25 23. Método, de acordo com a reivindicação 19, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o oligonucleotídeo CpG é um oligonucleotídeo de classe C.

24. Método, de acordo com a reivindicação 23, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o oligonucleotídeo de classe C é um oligonucleotídeo semi-maleável.

25. Método, de acordo com a reivindicação 23, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o oligonucleotídeo de classe C é SEQ ID No:10.

26. Método para tratar uma doença infecciosa de asma exacerbada, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

identificar um indivíduo asmático com risco de infecção viral, e

administrar ao indivíduo asmático uma quantidade eficaz de oligonucleotídeo CpG para tratar asma exacerbada por doença infecciosa.

27. Método para tratar asma exacerbada por vírus, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

identificar um indivíduo asmático com risco de infecção viral, e

administrar ao indivíduo asmático um oligonucleotídeo CpG em uma quantidade que é sub-terapêutica para o tratamento da infecção viral, em que o oligonucleotídeo CpG é eficaz na redução da acumulação de célula imune.

28. Método, de acordo com a reivindicação 27, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a célula imune é um neutrófilo.

29. Método, de acordo com a reivindicação 27, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a célula imune é um eosinófilo.

30. Método para tratar asma exacerbada por vírus,
CARACTERIZADO pelo fato de que compreende:

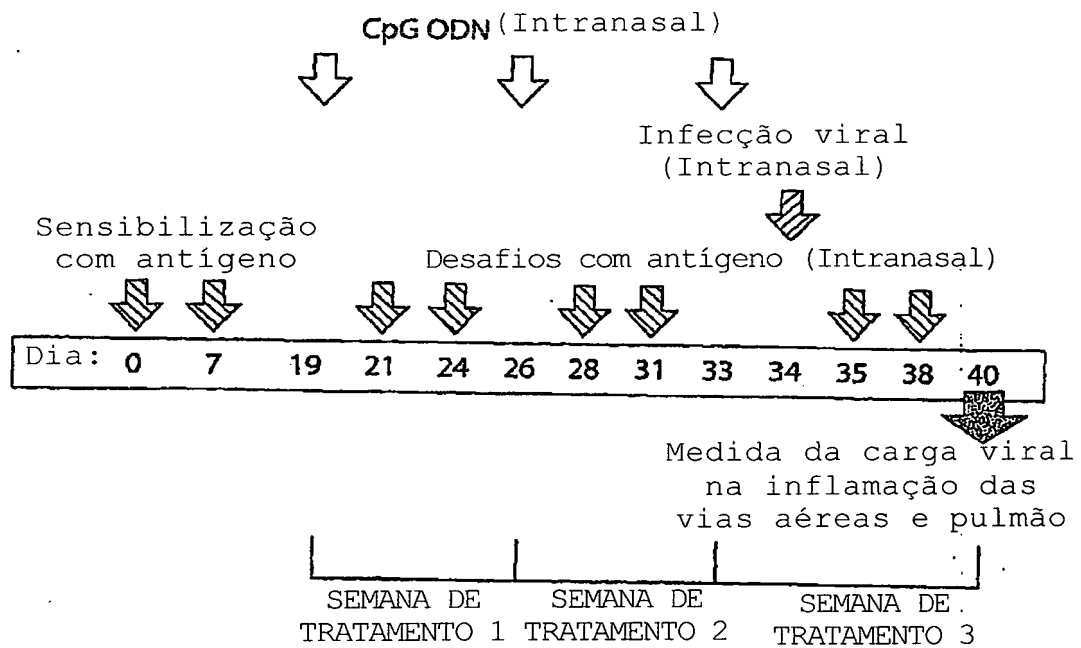
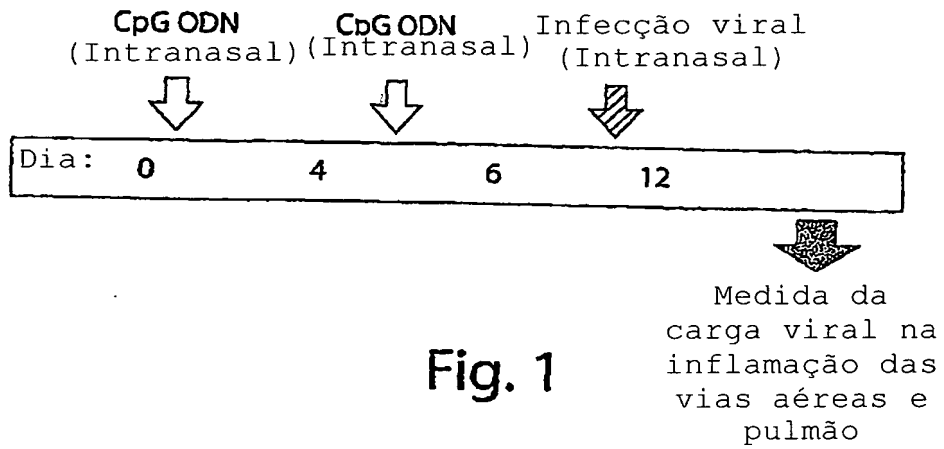
identificar um indivíduo asmático com risco de infecção viral, e

5 administrar ao indivíduo asmático pelo menos três doses de oligonucleotídeo CpG, em que as pelo menos três doses de oligonucleotídeo CpG são temporariamente separadas entre si por pelo menos três dias.

31. Método para tratar asma exacerbada por vírus,
10 **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

identificar um fator de risco de infecção viral, e

administrar a um indivíduo asmático uma quantidade eficaz de oligonucleotídeo CpG para tratar asma exacerbada por vírus durante um período de tempo no qual o indivíduo
15 asmático está em risco de infecção viral.



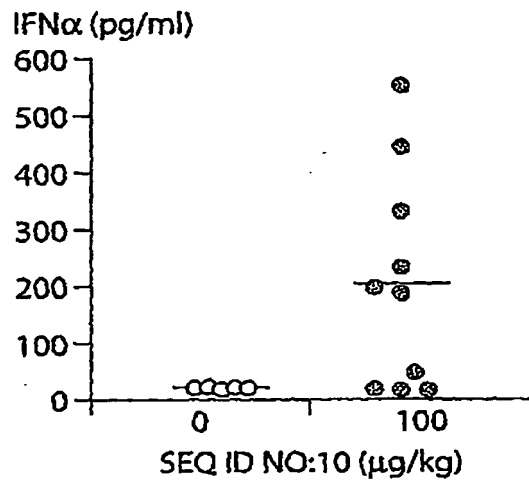


Fig. 3a

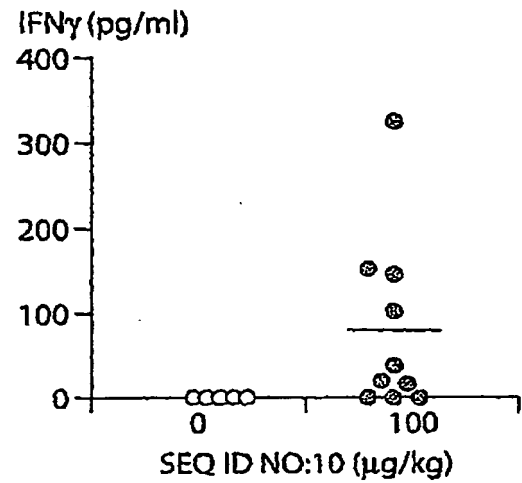


Fig. 3b

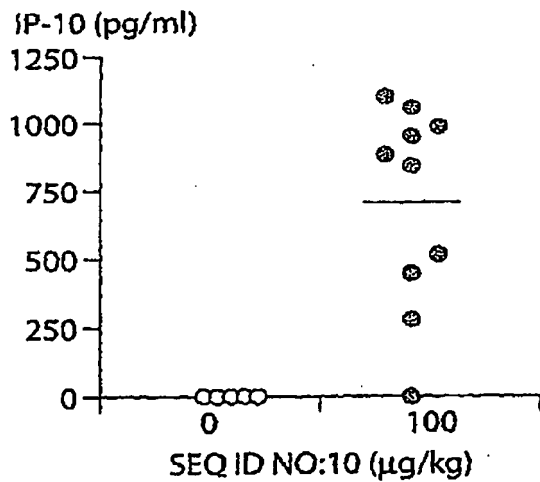


Fig. 3c

Oligoadenilato sintetase 2'5'
(Proporção de GAPDH)

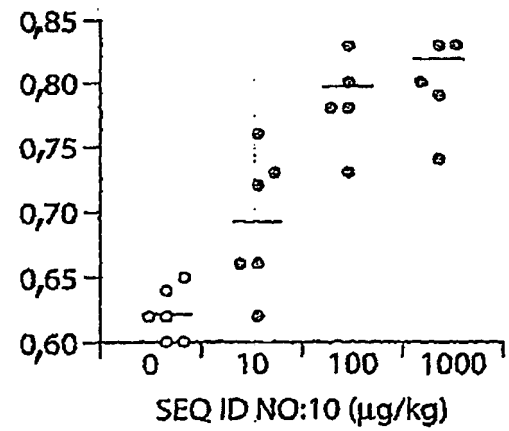


Fig. 3d

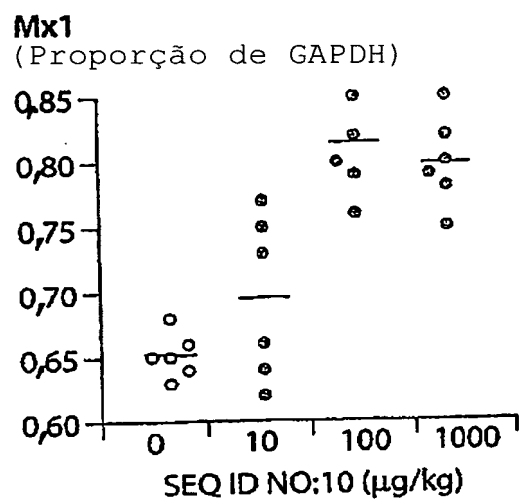


Fig. 3e

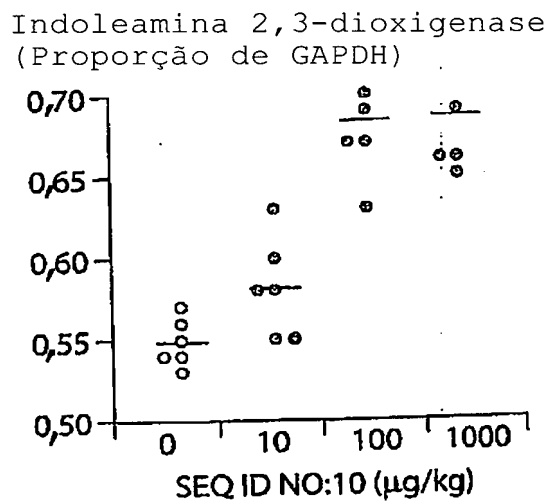


Fig. 3f

Título de proteína nuclear viral no pulmão
(Proporção de GAPDH)

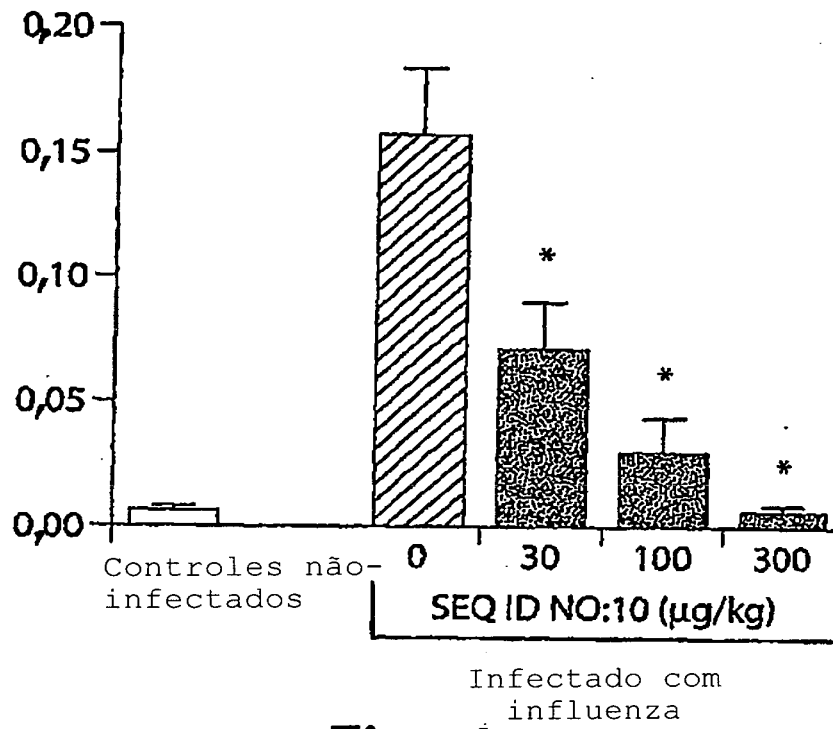


Fig. 4a

Neutrófilos no fluido de lavagem broncoalveolar, $\times 10^3/\text{mL}$

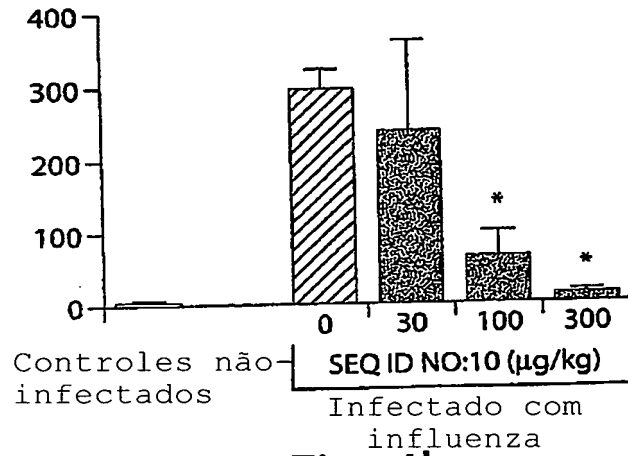


Fig. 4b

Células mononucleares no fluido de lavagem broncoalveolar, $\times 10^3/\text{mL}$

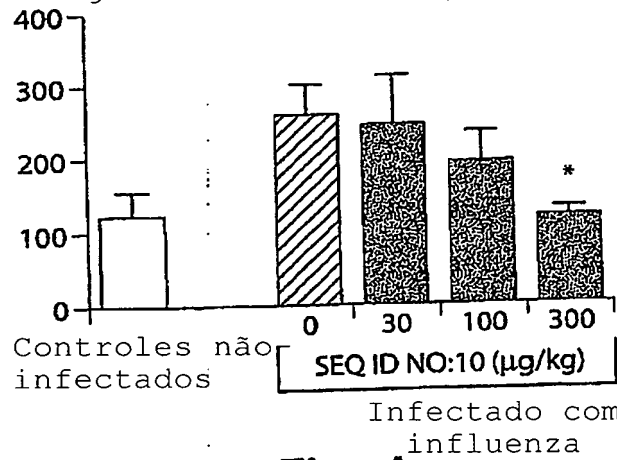


Fig. 4c

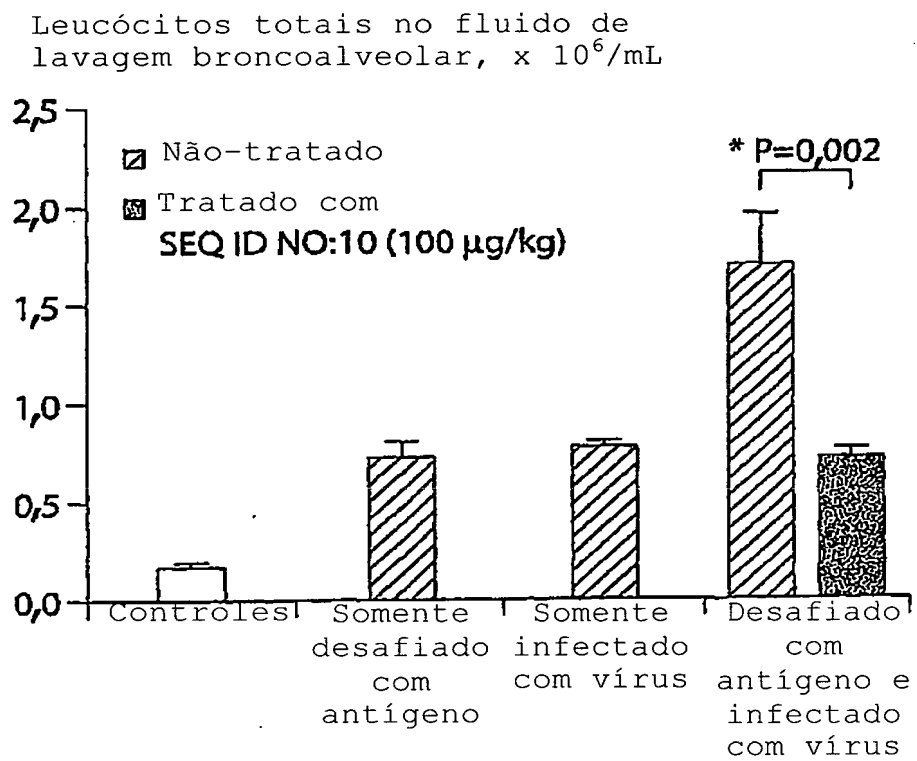


Fig. 5a

Neutrófilos no fluido de lavagem
broncoalveolar, $\times 10^3/\text{mL}$

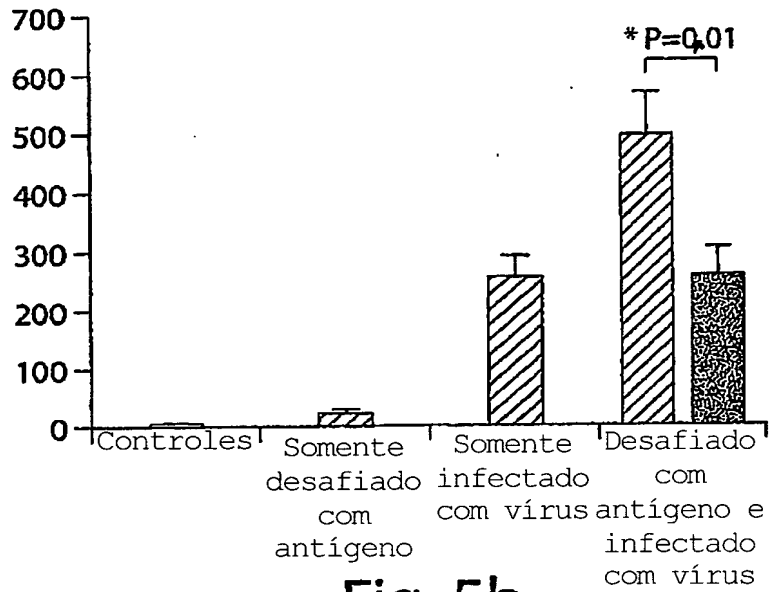


Fig. 5b

Células mononucleares no fluido de
lavagem broncoalveolar, $\times 10^3/\text{mL}$

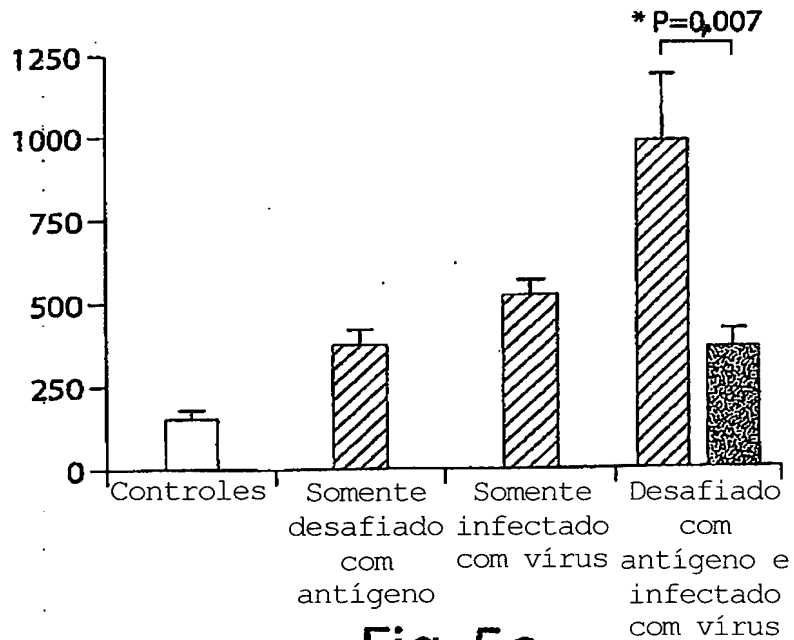


Fig. 5c

Aumento induzido por metacolina na resistência das vias aéreas (% de linha de base de controle não-desafiado)

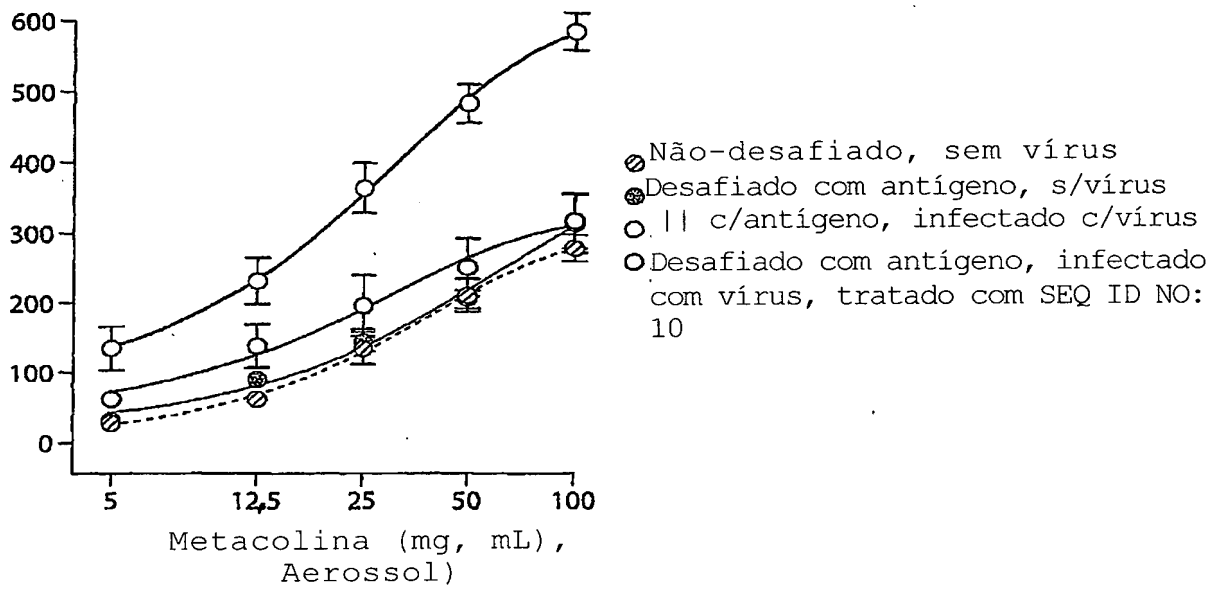
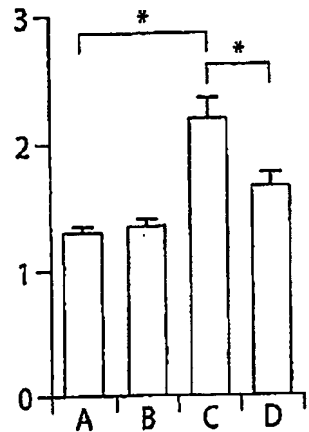


Fig. 6a

Linha de base da
resistência das vias

(RL_{AVERAGE})



A Não desafiado, sem vírus, tratado com veículo aéreas

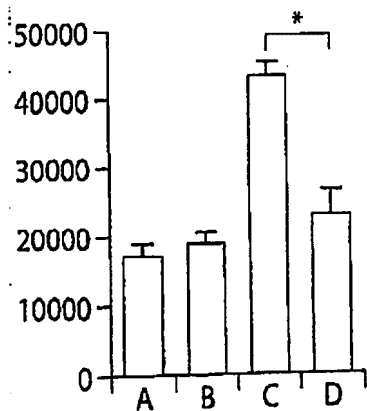
B Desafiado com antígeno, sem vírus, tratado com veículo

C Desafiado com antígeno, infectado com vírus, tratado com veículo

D Desafiado com antígeno, infectado com vírus, tratado com SEQ ID NO: 10

Fig. 6b

Resistência das vias aéreas (área sob a curva dose-resposta da metacolina)



A Não desafiado, sem vírus, tratado com veículo aéreas

B Desafiado com antígeno, sem vírus, tratado com veículo

C Desafiado com antígeno, infectado com vírus, tratado com veículo

D Desafiado com antígeno, infectado com vírus, tratado com SEQ ID NO: 10

Fig. 6c

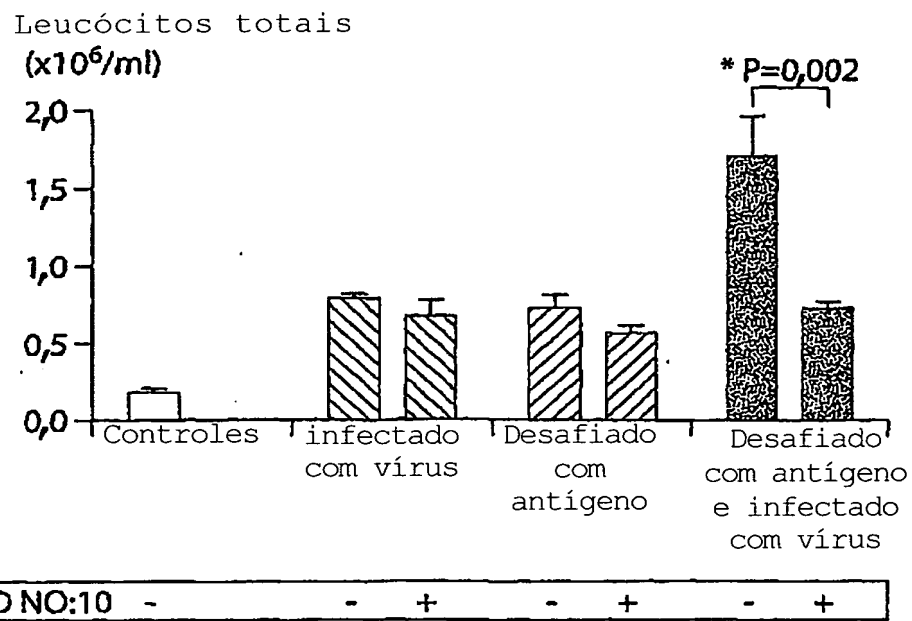


Fig. 7a

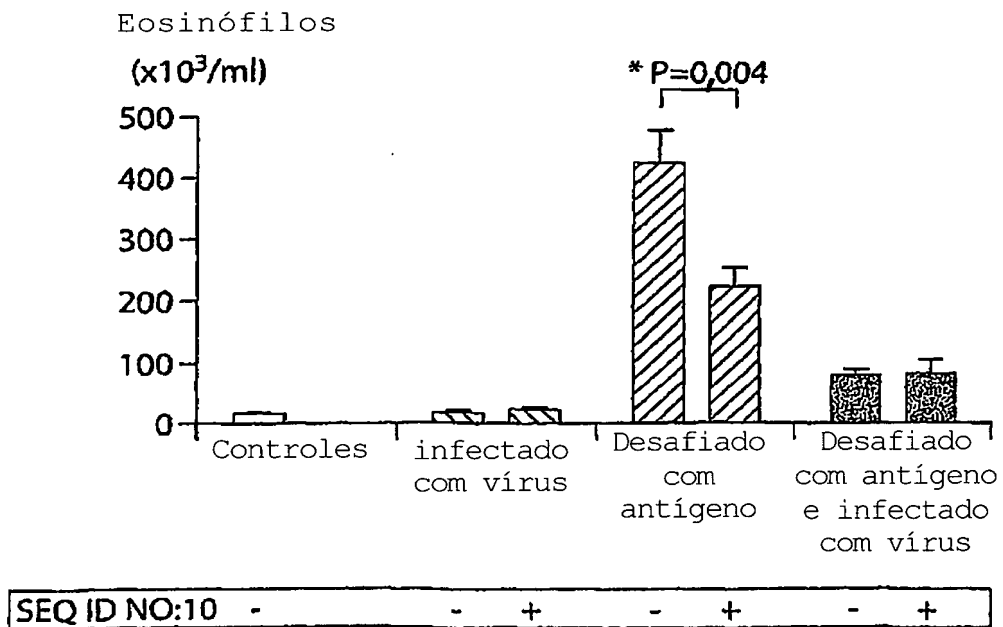
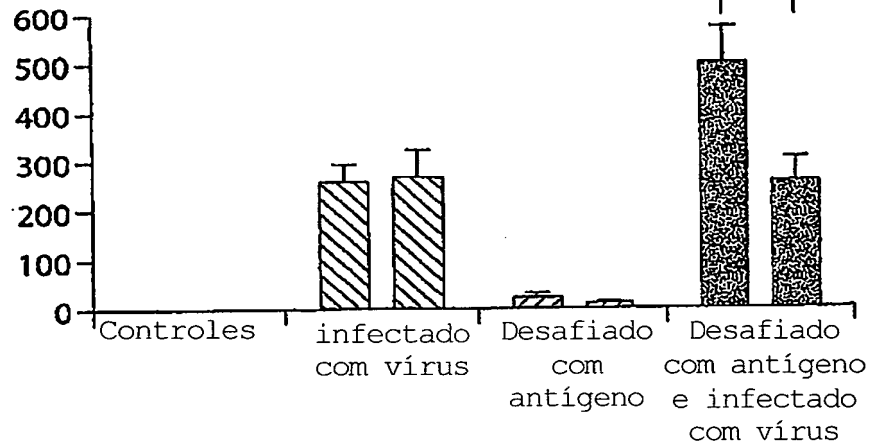


Fig. 7b

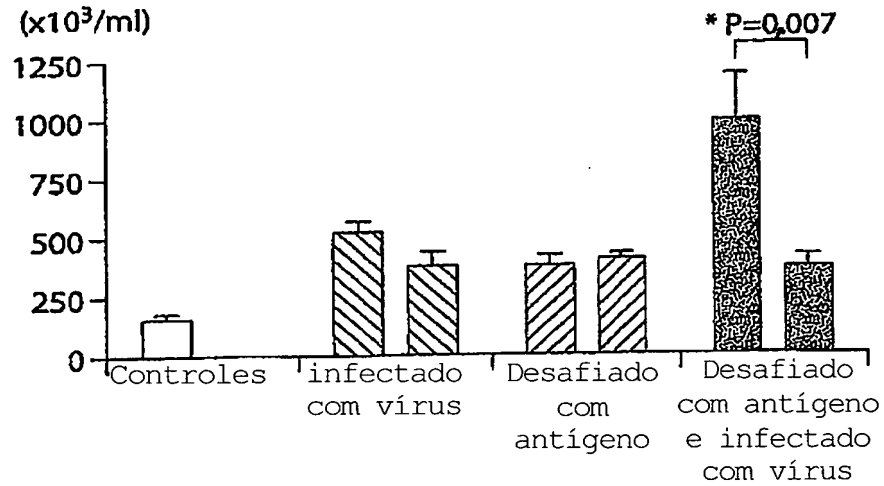
Neutrófilos

 $(\times 10^3/\text{ml})$ 

SEQ ID NO:10	-	-	+	-	+	-	+
--------------	---	---	---	---	---	---	---

Fig. 7c

Células mononucleares

 $(\times 10^3/\text{ml})$ 

SEQ ID NO:10	-	-	+	-	+	-	+
--------------	---	---	---	---	---	---	---

Fig. 7d

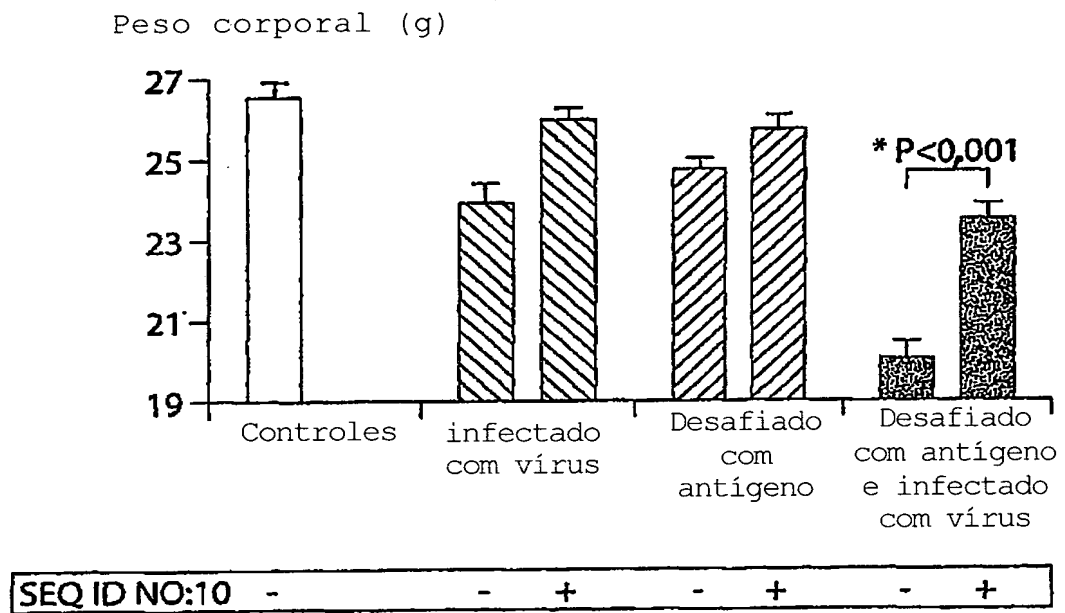


Fig. 7e

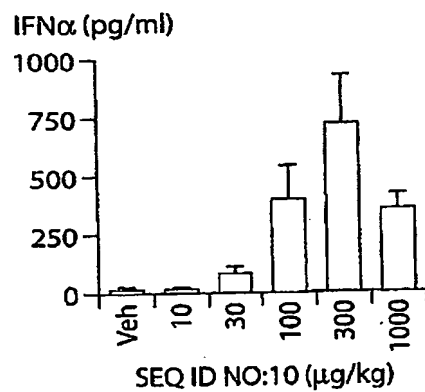


Fig. 8a

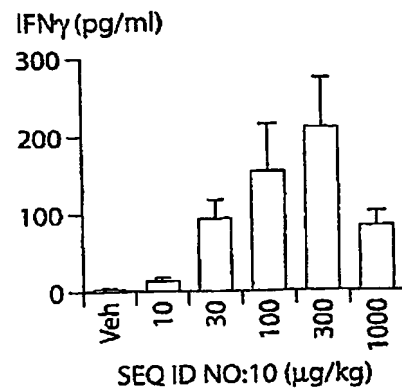


Fig. 8b

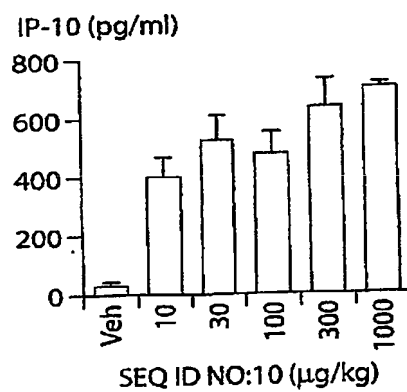


Fig. 8c

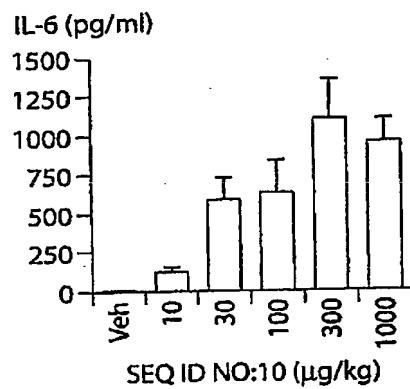


Fig. 8d

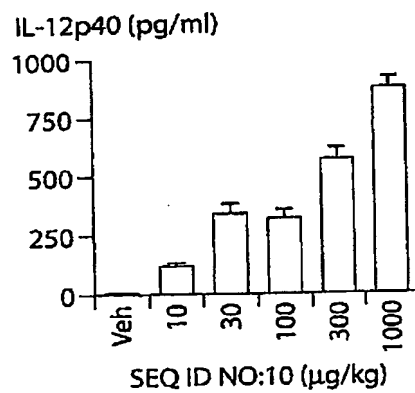


Fig. 8e

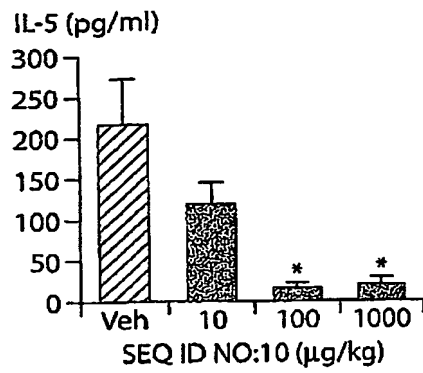


Fig. 9a

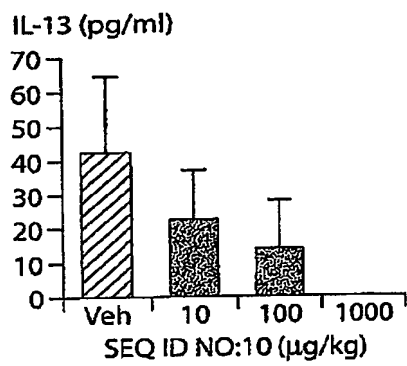


Fig. 9b

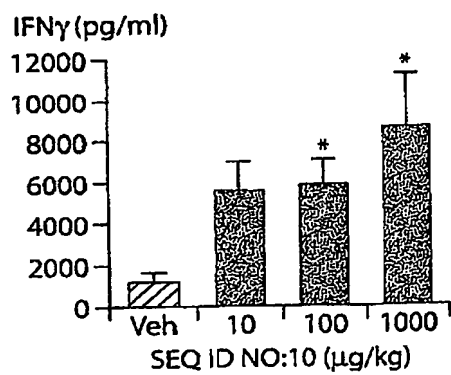


Fig. 9c

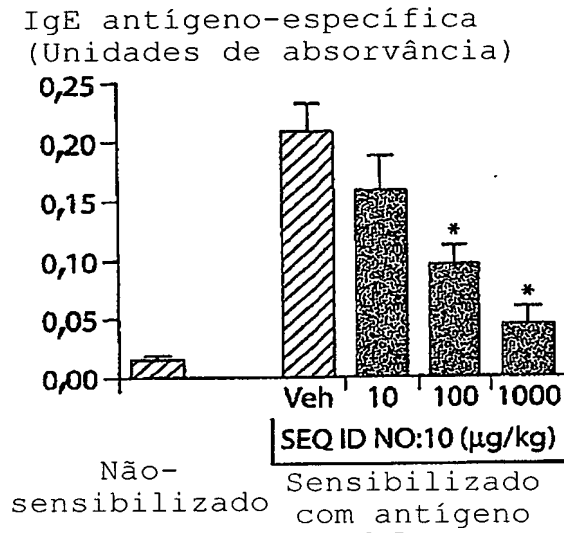


Fig. 10a

IgG2a antígeno-específica
(Unidades de absorvância)

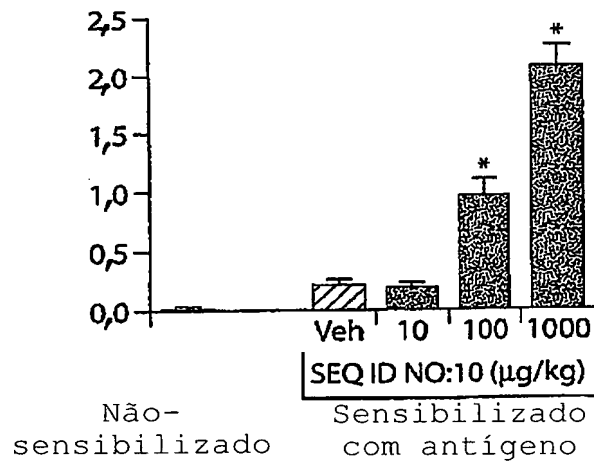


Fig. 10b

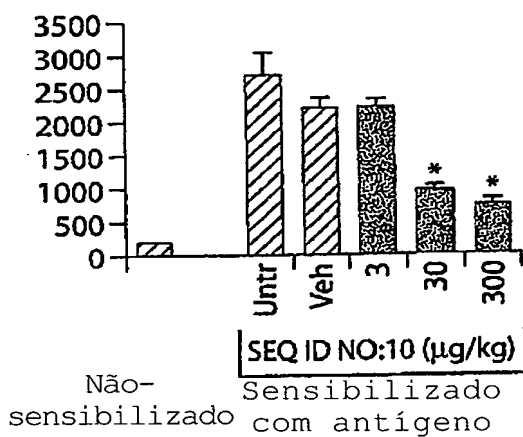
Leucócitos totais ($\times 10^3/\text{ml}$)

Fig. 11a

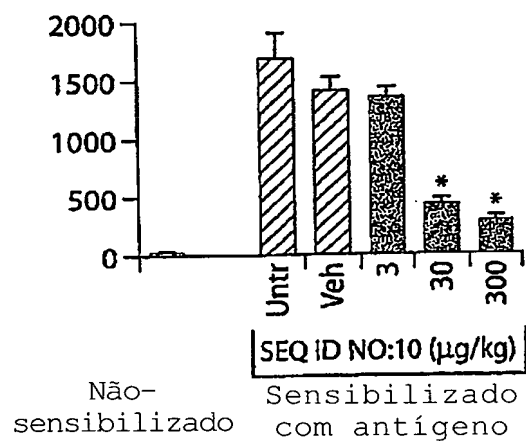
Eosinófilos ($\times 10^3/\text{ml}$)

Fig. 11b

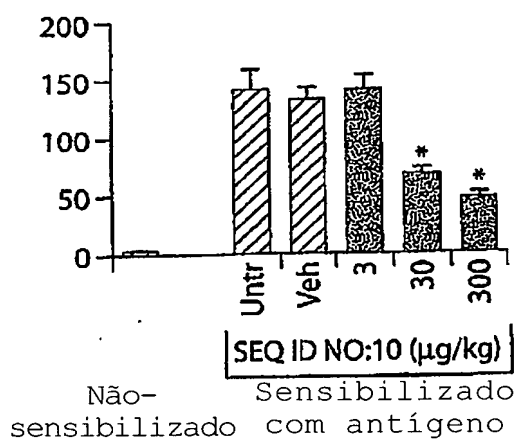
CD4⁺ Células T ($\times 10^3/\text{ml}$)

Fig. 11c

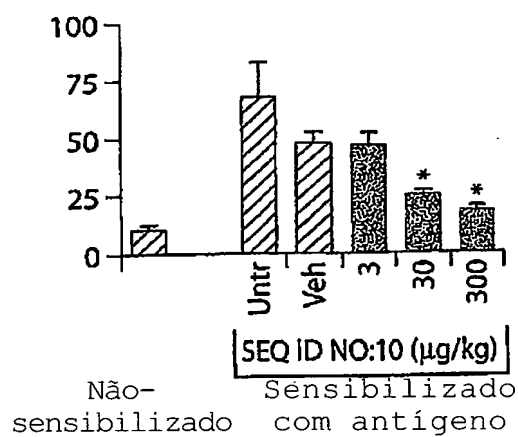
Células B ($\times 10^3/\text{ml}$)

Fig. 11d

RESUMO

"MÉTODOS PARA TRATAR ASMA EXACERBADA POR DOENÇA INFECCIOSA"

Métodos para tratar asma exacerbada por vírus compreendendo administrar a um indivíduo asmático uma quantidade eficaz de um oligonucleotídeo CpG.