



(11) Número de Publicação: **PT 1077722 E**

(51) Classificação Internacional:

A61K 39/39 (2006.01) **A61K 31/70** (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01) **A61K 9/00** (2006.01)

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

(22) Data de pedido: **1999.05.21**

(30) Prioridade(s): **1998.05.22 US 86393 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2001.02.28**

(45) Data e BPI da concessão: **2006.08.09**
012/2006

(73) Titular(es):

COLEY PHARMACEUTICAL GROUP, INC.

93 WORCESTER STREET, SUITE 101,

WELLESLEY MASSACHUSETTS 02481

US

OTTAWA HEALTH RESEARCH INSTITUTE

CA

(72) Inventor(es):

HEATHER L. DAVIS

CA

MICHAEL J. MCCLUSKIE

CA

(74) Mandatário:

MANUEL ANTÓNIO DURÃES ROCHA

AV. CONSELHEIRO FERNANDO DE SOUSA 11, 15º 1070-072

LISBOA

PT

(54) Epígrafe: **PRODUTOS E COMPOSIÇÕES PARA UTILIZAÇÃO NA INDUÇÃO DA IMUNIDADE MUCOSAL**

(57) Resumo:

DESCRIÇÃO

PRODUTOS E COMPOSIÇÕES PARA UTILIZAÇÃO NA INDUÇÃO DA IMUNIDADE MUCOSAL

Campo da Invenção

A presente invenção relaciona-se com produtos e composições para utilização na indução da imunidade mucosal. Em particular, a invenção relaciona-se com a utilização de oligonucleótidos imunoestimuladores contendo um motivo CpG só ou em combinação com outros adjuvantes mucosais para induzir a imunidade mucosal.

Antecedentes da Invenção

Foram identificados dois compartimentos distintos do sistema imunológico: (i) o sistêmico, que compreende a medula óssea, o baço e os nódulos linfáticos, e (ii) o mucosal que compreende o tecido linfóide associado com as superfícies mucosais e glândulas de secreção externa (McGhee et al., 1992). As superfícies mucosais são associadas com os tractos gastrointestinal (GI), gênito-urinário (GU) e respiratório. Cada compartimento está associado tanto com as respostas humorais (anticorpos) como as mediadas por células (células T citotóxicas), no entanto, há diferenças na natureza das respostas imunológicas induzidas em cada compartimento. Os anticorpos associados com o compartimento sistêmico são predominantemente do isotipo IgG, que funcionam para neutralizar os agentes patogénicos no sistema circulatório. Em contraste, os anticorpos nas mucosas são principalmente os anticorpos secretórios IgA (S-IgA), que funcionam para evitar a entrada do agente patogénico no organismo por meio da superfície da mucosa (Lamm et

al., 1992). A imunidade sistémica não pode impedir a entrada de organismos patogénicos nas superfícies das mucosas.

A imunização sistémica eficaz (isto é, a administração de antigénio ao compartimento sistémico) induzirá a imunidade sistémica mas, de um modo geral, não produz respostas de imunidade mucosal. Em contraste, os antigénios administrados nas superfícies mucosais desencadeiam respostas tanto mucosais (em sítios locais e, algumas vezes, em sítios distantes) como sistémicas (Haneberg et al., 1994, Gallichan e Rosenthal, 1995).

A maior parte das vacinas desenvolvidas até a presente data são administradas por via parentérica, por exemplo, por meio de injeções intramusculares (IM) ou intradérmicas (ID) e, como tal, induzem a principalmente a imunidade sistémica. No entanto, a área combinada da superfície mucosal é mais de 200 vezes maior do que a da pele e é o sítio principal de transmissão de numerosas doenças infecciosas. Deste modo, as estratégias actuais de vacinação permitem que o agente patogénico penetre no organismo e só o combate quando o mesmo está em circulação. As taxas de infecção e de morbilidade poderiam ser reduzidas se pudesse ser induzida a imunidade mucosal eficaz. Além disso, há indícios de que as vacinas mucosais podem ter uma gama de idade de recipientes mais ampla. Finalmente, as vacinas mucosais são administradas, muitas vezes, por meios não invasivos (por exemplo, gotas nasais, pulverizador nasal, nebulizador inalado), deste modo, as mesmas são mais fáceis e menos dispendiosas para administrar, têm menos necessidade de pessoal treinado e nenhum risco de ferimento por agulha ou contaminação cruzada (para apreciações ver Mestecky et al., 1992, Staats et al., 1994, O. Hagan, 1994).

Conforme mencionado acima, a marca de qualidade da imunidade mucosal é a produção local de anticorpos S-IgA. Estes constituem

>80% de todos os anticorpos em tecidos associados a mucosas e são induzidos, transportados e regulados por mecanismos bastante diferentes daqueles da resposta sistémica. O IgA é de suprema importância para a defesa do hospedeiro porque actua não apenas para resistir aos agentes patogénicos estritamente mucosais como também a muitos microrganismos que inicialmente colonizam as superfícies das mucosas porém, subsequentemente, provocam doença sistémica. Parece haver três sítios de defesa mucosal mediados por IgA: (i) no lúmen, onde o S-IgA pode neutralizar os vírus, toxinas bacterianas e enzimas e actuar como uma barreira mucosal para evitar ligação viral, aderência microbiana e adsorção de antígeno; (ii) no interior de células epiteliais onde o IgA dimérico pode ligar-se ao antígeno intracelular; (iii) no interior da lâmina própria onde o IgA dimérico pode complexar com o antígeno e o complexo imunológico assim formado, transportado para o lúmen (Lamm *et al.*, 1992).

Muitas vacinas em desenvolvimento são compostas de antígenos sintéticos ou recombinantes (péptidos ou polipéptidos). Estes são considerados mais seguros do que os agentes patogénicos tradicionais atenuados ou inteiros desactivados, porém os mesmos são frequentemente imunogénicos deficientes e necessitam de adjuvantes para intensificar a imunidade específica. Para a administração sistémica, os precipitados de alumínio (alúmen) podem ser adicionados aos antígenos para aumentar as respostas imunológicas. O alúmen é actualmente o único adjuvante licenciado para utilização em seres humanos na maior parte dos países, incluindo os EUA, no entanto, não é adequado para administração a superfícies mucosais. Deste modo, a maioria das vacinas mucosais utilizadas na actualidade contém organismos vivos atenuados, e tem-se obtido pouco sucesso com a administração mucosal de vacinas de subunidades.

A toxina da cólera (CT) é o adjuvante mucosal mais vulgarmente utilizado em modelos animais. A CT é a enterotoxina principal produzida pelo *Vibrio cholerae*. É uma proteína polimérica de 84 kilodalton consistindo em duas subunidades, uma subunidade monomérica A e uma subunidade B em forma de anel pentamérico. A subunidade B liga os gangliósidos GM1 na superfície de células eucarióticas e permite a inserção da subunidade A no interior do citosol, onde este ADP-ribosila as proteínas reguladoras ligantes de GTP associadas com a adenilato ciclase (Spangler, 1992).

A CT intensifica a apresentação de antígeno por macrófagos, células epiteliais e células B, promove a diferenciação e troca de isotipo em células B e tem efeitos inibitórios e estimulatórios complexos sobre a proliferação das células T e a produção da linfocina (Snider, 1995). Alguns grupos informam que a CT pode activar, de forma selectiva, células T CD4+ do tipo Th2 ao mesmo tempo que inibem as células do tipo Th1 (Takahashi et al., 1996,) ao passo que outros registam a activação tanto das células T CD4+ do tipo Th1 como Th2 (Hornquist e Lycke, 1993). As diferenças podem ser devido a inúmeros factores incluindo a via de imunização e a natureza do antígeno.

A endotoxina termolábil *Escherichia coli* (toxina lábil, LT) é estreitamente relacionada do ponto de vista estrutural e funcional à CT e tem propriedades adjuvantes semelhantes (Lycke et al., 1992). A LT pode conferir imunidade a antígenos co-administrados que por si só não são imunogénicos quando administrados por vias mucosais; este efeito adjuvante é observado quer a LT seja simplesmente misturada quer seja fisicamente acoplada com o antígeno I (Holmgren et al., 1993).

Embora muito eficazes como adjuvantes mucosais em modelos animais, a CT e a LT são altamente tóxicas, e especialmente em

seres humanos. Foram desenvolvidos mutantes geneticamente destoxificados tanto da CT como da LT, utilizando mutagénese sítio dirigida, que, pelo menos em modelos animais parecem ser menos tóxicas e, no entanto, retêm alguma adjuvantividade (por exemplo, a LTK63 é a LT com uma única substituição na serina-63) (Rappuoli et al., 1995, Douce et al., 1994, Pizza et al., 1994, De Haan et al., 1996). No entanto, o nível de adjuvantividade parece ser proporcional ao nível de toxicidade retida e, assim sendo, há uma necessidade evidente para um adjuvante mucosal seguro e eficaz. Lipford et al., (*Eur. J. Immunol.* 1997, 27:2340-2344) informam que os oligonucleótidos contendo CpG podem actuar como adjuvantes para respostas imunológicas tanto humorais como celulares. Os oligonucleótidos e antigénios (OVA e o péptido sintético SIINFEKL) foram injectados nas almofadas plantares traseiras de murinos. Foram estudados os anticorpos do plasma e a actividade CTL dos nódulos linfáticos.

O Pedido Publicado PCT No. WO 98/14210 regista métodos para tratar a asma alérgica utilizando ácidos nucleicos que codificam os antigénios iniciadores da asma. Estes ácidos nucleicos são administrados a tecidos que contêm altas concentrações de células que apresentam antigénio. Esta capacidade expressa mas não segrega os antigénios codificados nas células que apresentam o antigénio alegadamente aumenta a tolerância ao antigénio.

Sumário da Invenção

A presente invenção relaciona-se com produtos para induzir respostas imunológicas utilizando oligonucleótidos contendo dinucleótidos CpG imunoestimuladores. Num aspecto, a invenção é uma composição para induzir uma resposta imunológica mucosal. Este aspecto compreende a utilização de um oligonucleótido, tendo uma sequência que inclui, pelo menos, a seguinte fórmula:



em que C é não metilado e X_1 , X_2 , X_3 e X_4 são nucleótidos, para a preparação de uma composição para administração a uma superfície mucosal de um indivíduo que está também exposto a um antigénio, a fim de induzir uma resposta imunológica mucosal ao referido antigénio no referido indivíduo.

Numa forma de realização o antigénio não é codificado num vector de ácido nucleico. Numa outra forma de realização o antigénio é codificado por um vector de ácido nucleico.

Em algumas formas de realização da invenção o oligonucleótido tem um esqueleto seleccionado do grupo que consiste num esqueleto de fosfodiéster e um esqueleto quimérico. Noutras formas de realização o oligonucleótido tem um esqueleto de fosforotioato. Nas formas de realização em que o oligonucleótido tem um esqueleto de fosforotioato e em que o antigénio é codificado por um vector de ácido nucleico e o CpG é um oligonucleótido é uma forma de realização preferida, mas não limitada, que o plasmídeo e os oligonucleótidos são administrados com um sistema de dispersão coloidal. Nalgumas formas de realização o sistema de dispersão coloidal é seleccionado do grupo que consiste em complexos macromoleculares, nanocápsulas, microesferas, esférulas e sistemas à base de lípidos. Noutras formas de realização o plasmídeo e o oligonucleótido são revestidos com partículas de ouro de são administrados com uma pistola para injeção de gene (*gene-gun*).

Um produto para induzir uma resposta imunológica mucosal num indivíduo é proporcionado em outros aspectos. Este aspecto é um produto que compreende um oligonucleótido, tendo uma sequência que inclui pelo menos a seguinte fórmula:



em que C é não metilado e X_1 , X_2 , X_3 e X_4 são nucleótidos, um antigénio e uma hormona para utilização simultânea, separada ou sequencial para induzir uma resposta imunológica mucosal num indivíduo ao referido antigénio.

Numa forma de realização o antigénio e o oligonucleótido são administrados a uma superfície mucosal do indivíduo. Noutra forma de realização a hormona é administrada por via sistémica. Numa forma de realização a hormona é codificada por um vector de ácido nucleico.

Noutros aspectos, a invenção abrange composições para induzir uma resposta imunológica. Estes aspectos compreendem a utilização de um nucleótido, tendo uma sequência que inclui pelo menos a seguinte fórmula.



em que C é não metilado e X_1 , X_2 , X_3 e X_4 são nucleótidos, para a preparação de uma composição para administração a uma superfície mucosal de um indivíduo que também está exposto a um antigénio, para induzir uma resposta imunológica mucosal ao referido antigénio no referido indivíduo. As composições podem ser administradas por via oral, intranasal, ocular, vaginal ou rectal.

Nalgumas formas de realização o antigénio é administrado por via oral, intranasal, ocular, vaginal ou rectal. Noutras formas de realização o antigénio é administrado simultaneamente com o oligonucleótido. Preferencialmente, o oligonucleótido é

administrado numa quantidade eficaz para induzir a imunidade mucosal.

A administração das composições e produtos da invenção resulta numa indução da imunidade mucosal. A imunidade mucosal pode ser induzida num sítio local e/ou remoto. Nalgumas formas de realização a imunidade mucosal é induzida num sítio local e noutras a imunidade mucosal é induzida num sítio remoto, ou ambos.

A fim de induzir uma resposta imunológica mucosal o oligonucleótido CpG pode ser administrado com uma dose inicial, uma dose de reforço ou ambas. Por exemplo, o oligonucleótido CpG pode ser administrado com uma dose preparatória de antigénio. Noutra forma de realização o oligonucleótido CpG é administrado com uma dose de reforço do antigénio. Nalgumas formas de realização o indivíduo é administrado com uma dose preparatória do antigénio e oligonucleótido CpG antes da dose de reforço. Ainda noutra forma de realização o indivíduo é administrado com uma dose de reforço de antigénio e oligonucleótido CpG depois da dose preparatória.

Num outro aspecto a invenção relaciona-se com a utilização de uma composição para induzir uma resposta imunológica sistémica. Este aspecto abrange a utilização de uma oligonucleótido, tendo uma sequência que inclui pelo menos a seguinte fórmula:



em que C é não metilado e X_1 , X_2 , X_3 e X_4 são nucleótidos e um antigénio que não é codificado num vector de ácido nucleico, para a preparação de um medicamento para administração simultânea, separada ou sequencial a uma superfície mucosal de um indivíduo para induzir uma resposta imunológica ao referido antigénio. Numa

forma de realização o antigénio não produz uma resposta imunológica sistémica quando administrado só à superfície mucosal.

De acordo com outro aspecto da invenção é proporcionado um produto para induzir uma resposta imunológica sistémica. Este aspecto engloba um oligonucleótido, tendo uma sequência que inclui pelo menos a seguinte fórmula:



em que C é não metilado e X_1 , X_2 , X_3 e X_4 são nucleótidos e um adjuvante não oligonucleótido para administração simultânea, separada ou sequencial a uma superfície mucosal de um indivíduo que está exposto a um antigénio, para induzir uma resposta imunológica ao referido antigénio.

Numa forma de realização o antigénio é administrado a uma superfície mucosal. Noutra forma de realização o antigénio não é codificado num vector de ácido nucleico.

O indivíduo pode estar activamente exposto ao antigénio ou passivamente exposto ao antigénio. Numa forma de realização da utilização dos produtos e composições aqui descritos o indivíduo está activamente exposto ao antigénio e o antigénio é administrado a uma superfície mucosal. Noutras formas de realização o antigénio é administrado simultaneamente com o oligonucleótido. O antigénio pode ser administrado só ou em associação com um sistemas de dispersão coloidal. Nalgumas formas de realização o sistema de dispersão coloidal é seleccionado do grupo que consiste em complexos macromoleculares, nanocápsulas, microesferas, esférulas e sistemas à base de lípidos. Os sistemas à base de lípidos incluem, opcionalmente, emulsões óleo-em-água, micelas, micelas mistas ou lipossomas.

Noutras formas de realização o indivíduo é passivamente exposto ao antigénio através do contacto ambiental. O indivíduo que é passivamente exposto ao antigénio em alguns ambientes é um indivíduo em risco de desenvolver uma reacção alérgica, uma doença infecciosa ou um cancro. Noutras formas de realização o indivíduo tem uma doença infecciosa, um cancro, uma alergia ou é um asmático.

O antigénio que é passiva ou activamente administrado ao indivíduo é qualquer tipo de antigénio conhecido na técnica e inclui, por exemplo, células, extractos de células, proteínas, polipéptidos, péptidos, polissacáridos, conjugados de polissacáridos, péptidos imitadores de polissacáridos, lípidos, glicolípidos, hidratos de carbono, alergénios, vírus e extractos virais e organismos multicelulares, tais como parasitas. Numa forma de realização o antigénio é derivado de um organismo infeccioso seleccionado do grupo que consiste em bactérias infecciosas, vírus infecciosos, parasitas infecciosos e fungos infecciosos.

A utilização dos produtos ou composições da invenção pode também incluir o passo de administrar um adjuvante não oligonucleótido em associação com o antigénio. Os adjuvantes mucosais não oligonucleótidos podem incluir, por exemplo, a toxina da cólera, derivados da toxina da cólera, toxina lábil, derivados de toxina lábil, alúmen, MLP, MDP, saponinas, tais como QS21, citocinas, formulações de emulsões óleo-em-água e outras, tais como MF59, SAF, Montanide ISA 720 e PROVAX, polímeros PCPP e ISCOMS.

Noutras formas de realização a utilização dos produtos ou composições inclui o passo de administrar ao indivíduo uma citocina ou uma molécula co-estimulatória B-7.

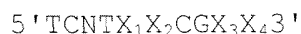
Nalgumas formas de realização, o oligonucleótido é administrado a um indivíduo por via oral, mucosal, ocular, vaginal, rectal ou por inalação.

O oligonucleótido pode ser modificado. Por exemplo, nalgumas formas de realização, pelo menos um nucleótido tem uma modificação no esqueleto de fosfato. A modificação no esqueleto de fosfato pode ser uma modificação do fosforotioato ou do fosforoditioato. Nalgumas formas de realização a modificação do esqueleto de fosfato ocorre no lado 5' do nucleótido ou no lado 3' do oligonucleótido.

O oligonucleótido pode ser de qualquer tamanho. Preferencialmente, o oligonucleótido tem 8 a 100 nucleótidos. Noutras formas de realização o oligonucleótido tem 8 a 40 nucleótidos de comprimento.

Nalgumas formas de realização X_1X_2 são nucleótidos seleccionados do grupo que consiste em: GpT, GpG, GpA, ApA, ApT, ApG, CpT, CpA, CpG, TpA, TpT e TpG; e X_3X_4 são nucleótidos seleccionados do grupo que consiste em: TpT, CpT, ApT, TpG, ApG, CpG, TpC, ApC, CpC, TpA, ApA e CpA. Preferencialmente, X_1X_2 são GpA ou GpT e X_3 e X_4 são TpT. Noutras formas de realização preferidas X_1 ou X_2 ou ambos são purinas e X_3 ou X_4 são ambas pirimidinas ou X_1X_2 são GpA e X_3 ou X_4 são ambas pirimidinas. Numa forma de realização X_2 é um T e X_3 é uma pirimidina. O nucleótido pode ser isolado ou sintético.

Nalgumas formas de realização o oligonucleótido tem uma sequência que inclui pelo menos a seguinte fórmula:



em que X_1 , X_2 , X_3 e X_4 são nucleótidos, N é uma sequência de ácido nucleico composta de cerca de 0-25 nucleótidos.

Noutros aspectos, a invenção inclui composições farmacêuticas para a administração de oligonucleótidos CpG por via oral, intranasal, ocular, vaginal ou rectal. Num aspecto a composição é uma formulação oral de um oligonucleótido CpG num tampão para neutralizar os ácidos biológicos. Num outro aspecto a composição é uma formulação intranasal de um oligonucleótido CpG num aerossol. Noutros aspectos a composição é uma formulação vaginal ou rectal de um oligonucleótido CpG num supositório ou outro veículo adequado para administração ao tecido vaginal ou rectal. Noutro aspecto a composição é uma formulação ocular de um oligonucleótido CpG numa solução compatível com o olho. Tais formulações estão aqui descritas, bem como em *Remingtons Pharmaceutical Sciences*.

Cada uma das limitações da invenção pode englobar várias formas de realização da invenção. Deste modo, é levado em consideração que cada uma das limitações da invenção que engloba qualquer um elemento ou combinações de elementos pode ser incluída em cada aspecto da invenção.

Breve Descrição dos Desenhos

A **Figura 1** é um gráfico de barras que representa o efeito de diferentes adjuvantes em titulações totais de IgG anti-HBS, em que murganhos BALB/c foram imunizados por inalação IN com HBsAg (1 ou 10 µg) sem ou em combinação com toxina da cólera (CT) e/ou adjuvantes de oligonucleótido CpG (motivo #1826, SEQ. ID No. 90).

A **Figura 2** é um gráfico que representa o efeito de diferentes adjuvantes sobre as titulações totais de IgG anti-HBS, em que murganhos BALB/c foram imunizados por inalação IN com HBsAg (1 µg)

sem ou em combinação com toxina da cólera (CT) e/ou adjuvantes de oligonucleótido CpG (motivo #1826, SEQ. ID No. 90) e às 8 semanas os murganhos receberam doses de reforço da mesma maneira que as doses preparatórias.

A **Figura 3** é um gráfico de barras que representa o efeito de diferentes adjuvantes sobre o isotipo IgG anti-HBs, em que murganhos BALB/c foram imunizados por inalação IN com HBsAg (1 µg) sem ou em combinação com toxina da cólera (CT) e/ou adjuvantes de oligonucleótido CpG (motivo #1826, SEQ. ID No. 90) (1 µg) e às 8 semanas os murganhos receberam doses de reforço da mesma maneira que as doses preparatórias.

A **Figura 4** é um gráfico de barras que representa o efeito de diferentes adjuvantes sobre a resposta CTL específica para HBsAg, em que murganhos BALB/c foram imunizados por inalação IN com HBsAg (10 µg) sem ou em combinação com toxina da cólera (CT) e/ou adjuvantes de oligonucleótido CpG (motivo #1826, SEQ. ID No. 90) em doses diferentes (1 ou 10 µg) e quatro semanas depois da imunização os murganhos foram mortos por overdose de Halotano, os esplenócitos foram isolados e a actividade CTL específica para HBsAg foi medida.

A **Figura 5** é um gráfico de barras que representa o efeito de diferentes adjuvantes sobre as titulações IgA anti-HBs em lavagens de pulmões, em que murganhos BALB/c foram imunizados por inalação IN com HBsAg (1 ou 10 µg) sem ou em combinação com toxina da cólera (CT) e/ou adjuvantes de oligonucleótido CpG (motivo #1826, SEQ. ID No. 90) em doses diferentes (1 ou 10 µg) e quatro semanas depois da imunização (ou depois do reforço para o grupo marcado com *) os murganhos foram mortos por overdose de Halotano e os pulmões foram lavados com 1 mL de TBS.

A **Figura 6** é um gráfico de barras que representa o efeito de diferentes adjuvantes sobre as titulações IgA anti-HBs em soluções de sedimentos fecais, em que murganhos BALB/c foram imunizados por inalação IN com HBsAg (1 ou 10 µg) sem ou em combinação com toxina da cólera (CT) e/ou adjuvantes de oligonucleótido CpG (motivo #1826, SEQ. ID No. 90) em doses diferentes (1 ou 10 µg) e quatro semanas depois da imunização (ou depois do reforço para o grupo marcado com *) os murganhos foram isolados durante 24 horas e os sedimentos fecais foram colhidos e re-suspensos em TBS a 0,1 mg/mL.

A **Figura 7** é um gráfico que representa o efeito de diferentes adjuvantes sobre as titulações totais de IgA anti-HBs, em que murganhos BALB/c foram imunizados por inalação IN com HBsAg (1 ou 10 µg) sem ou em combinação com toxina da cólera (CT), a enterotoxina termolábil (LT) *Escherichia coli*, a subunidade B da toxina da cólera (CTB), um mutante destoxificado da enterotoxina termolábil *Escherichia coli* (LTK63), o oligonucleótido CpG (motivo #1826, SEQ. ID No. 90) ou oligonucleótidos de controlo não CpG (motivo #1982, SEQ. ID No. 90) como adjuvantes (1, 10 ou 500 µg). Nos grupos que responderam, todos os murganhos deram titulações >10, excepto no caso de 10 µg de LT onde apenas 1/5 dos murganhos responderam.

A **Figura 8** é um gráfico de barras que representa o efeito de diferentes estratégias de preparação/reforço sobre as titulações totais de IgG anti-HBs em que murganhos BALB/c foram imunizados: (i) por injeção IM com HBsAg (1 µg) em associação com alúmen mais oligonucleótido CpG (motivo #1826, SEQ. ID No. 90) e receberam dose de reforço às 4 semanas como as doses preparatórias ou por inalação IN com HBsAg (1 µg) sem ou em combinação com toxina da cólera (CT) e/ou oligonucleótido CpG (motivo #1826, SEQ. ID No.); ou (ii) por inalação IN com HBsAg (1 µg) sem ou em combinação com toxina da cólera (CT) e/ou oligonucleótido CpG (motivo #1826, SEQ. ID No.90)

e receberam dose de reforço às 4 semanas como as doses preparatórias ou por injeção IM com HBsAg (1 µg) em combinação com alúmen mais oligonucleótido CpG (motivo #1826, SEQ. ID No. 90). Os números em cima de cada barra representam a proporção entre IgGa/IgG1.

A **Figura 9** é um gráfico de barras que representa o efeito de diferentes estratégias de preparação/reforço com adjuvantes diferentes sobre a resposta CTL específica para HBsAg, em que murganhos BALB/c foram imunizados: (i) por injeção IM com HBsAg (1 µg) em associação com alúmen mais oligonucleótido CpG (motivo #1826, SEQ. ID No. 90) e receberam dose de reforço às 4 semanas como as doses preparatórias ou por inalação IN com HBsAg (1 µg) sem ou em combinação com toxina da cólera (CT) e/ou oligonucleótido CpG (motivo #1826, SEQ. ID No. 90); ou (ii) por inalação IN com HBsAg (1 µg) sem ou em combinação com toxina da cólera (CT) e/ou oligonucleótido CpG (motivo #1826, SEQ. ID No. 90) e receberam dose de reforço às 4 semanas como as doses preparatórias ou por injeção IM com HBsAg (1 µg) em combinação com alúmen mais oligonucleótido CpG (motivo #1826, SEQ. ID No. 90) e 4 semanas depois do reforço os murganhos foram mortos por overdose de Halotano, os esplenócitos foram isolados e a actividade CTL específica para HBsAg foi medida.

A **Figura 10** é um gráfico de barras que representa o efeito de diferentes estratégias de preparação/reforço com adjuvantes diferentes sobre a proliferação de células T específica para HBsAg, em que murganhos BALB/c foram imunizados: (i) por injeção IM com HBsAg (1 µg) em associação com alúmen mais oligonucleótido CpG (motivo #1826, SEQ. ID No. 90) e receberam dose de reforço às 4 semanas como as doses preparatórias ou por inalação IN com HBsAg (1 µg) sem ou em combinação com toxina da cólera (CT) e/ou oligonucleótido CpG (motivo #1826, SEQ. ID No. 90); ou (ii) por inalação IN com HBsAg (1 µg) sem ou em combinação com toxina da

cólera (CT) e/ou oligonucleótido CpG (motivo #1826, SEQ. ID No.90) e receberam dose de reforço às 4 semanas como as doses preparatórias ou por injeção IM com HBsAg (1 µg) em combinação com alúmen mais oligonucleótido CpG (motivo #1826, SEQ. ID No. 90) e 4 semanas depois do reforço os murganhos foram mortos por overdose de Halotano, os esplenócitos foram isolados e a proliferação de células T específica para HBsAg foi medida.

A **Figura 11** é um gráfico de barras que representa o efeito de diferentes estratégias de preparação/reforço com adjuvantes diferentes sobre titulações de IgA anti-HBs em lavagens de pulmão, em que murganhos BALB/c foram imunizados: (i) por injeção IM com HBsAg (1 µg) em associação com alúmen mais oligonucleótido CpG (motivo #1826, SEQ. ID No. 90) e receberam dose de reforço às 4 semanas como as doses preparatórias ou por inalação IN com HBsAg (1 µg) sem ou em combinação com toxina da cólera (CT) e/ou oligonucleótido CpG (motivo #1826, SEQ. ID No. 90); ou (ii) por inalação IN com HBsAg (1 µg) sem ou em combinação com toxina da cólera (CT) e/ou oligonucleótido CpG (motivo #1826, SEQ. ID No.90) e receberam dose de reforço às 4 semanas como as doses preparatórias ou por injeção IM com HBsAg (1 µg) em combinação com alúmen mais oligonucleótido CpG (motivo #1826, SEQ. ID No. 90). Quatro semanas depois do reforço os murganhos foram mortos por overdose de Halotano e os pulmões foram lavados com 1 mL de TBS.

A **Figura 12** é um gráfico de barras que representa o efeito de diferentes estratégias de preparação/reforço com adjuvantes diferentes sobre titulações de IgA anti-HBs em saliva, em que murganhos BALB/c foram imunizados: (i) por injeção IM com HBsAg (1 µg) em associação com alúmen mais oligonucleótido CpG (motivo #1826, SEQ. ID No. 90) e receberam dose de reforço às 4 semanas como as doses preparatórias ou por inalação IN com HBsAg (1 µg) sem ou em combinação com toxina da cólera (CT) e/ou oligonucleótido CpG

(motivo #1826, SEQ. ID No. 90); ou (ii) por inalação IN com HBsAg (1 µg) sem ou em combinação com toxina da cólera (CT) e/ou oligonucleótido CpG (motivo #1826, SEQ. ID No. 90) e receberam dose de reforço às 4 semanas como as doses preparatórias ou por injeção IM com HBsAg (1 µg) em combinação com alúmen mais oligonucleótido CpG (motivo #1826, SEQ. ID No. 90). Quatro semanas depois do reforço os murganhos foram injectados com 100 µL de solução de cloridrato de Policarpina a 0,5% e a saliva foi colhida.

A **Figura 13** é um gráfico de barras que representa o efeito de diferentes estratégias de preparação/reforço com adjuvantes diferentes sobre titulações de IgA anti-HBs em soluções de sedimento fecal, em que murganhos BALB/c foram imunizados: (i) por injeção IM com HBsAg (1 µg) em associação com alúmen mais oligonucleótido CpG (motivo #1826, SEQ. ID No. 90) e receberam dose de reforço às 4 semanas como as doses preparatórias ou por inalação IN com HBsAg (1 µg) sem ou em combinação com toxina da cólera (CT) e/ou oligonucleótido CpG (motivo #1826, SEQ. ID No. 90); ou (ii) por inalação IN com HBsAg (1 µg) sem ou em combinação com toxina da cólera (CT) e/ou oligonucleótido CpG (motivo #1826, SEQ. ID No. 90) e receberam dose de reforço às 4 semanas como as doses preparatórias ou por injeção IM com HBsAg (1 µg) em combinação com alúmen mais oligonucleótido CpG (motivo #1826, SEQ. ID No. 90). Quatro semanas depois do reforço os murganhos foram isolados durante 24 horas e os sedimentos fecais foram colhidos e re-suspensos em TBS a 0,1 mg/mL.

Breve Descrição das Tabelas

A **Tabela 1** enumera as sequências de oligonucleótidos imunoestimulatórias.

A **Tabela 2** enumera o efeito de diferentes adjuvantes sobre isotipos de anticorpos específicos para HBsAg.

^aMurganhos BALB/c foram imunizados por inalação IN com HBsAg (1 µg) sem ou em combinação com toxina da cólera (CT), a enterotoxina termolábil (LT) *Escherichia coli*, a subunidade B da toxina da cólera (CTB), um mutante destoxificado da enterotoxina termolábil (LT) *Escherichia coli* (LTK63) e/ou o oligonucleótido CpG (motivo #1826, SEQ. ID No. 90) (1 a 10 µg) como adjuvantes.

^bOs valores representam a média geométrica do grupo (GMT) da titulação de diluição do ponto final de ELISA para os anticorpos IgG1 ou IgG2a específicos para HBsAg em plasma colhido 4 semanas depois da imunização. As titulações foram definidas como a diluição mais alta no plasma resultando num valor de absorvância duas vezes aquela do plasma não imunizado com um valor de corte de 0,05.

^cSão registadas as proporções entre IgG2a e IgG1 (IgG2a:IgG1) com um valor >1 indicando uma resposta predominantemente semelhante a Th-1.

^dN/A: Não aplicável, uma vez que não foram detectadas quaisquer respostas ao anticorpo.

^e=: Todos os murganhos imunizados com estas combinações de adjuvantes morreram em 96 horas.

A **Tabela 3** enumera o efeito de diferentes adjuvantes sobre as respostas IgA específicas para HBsAg.

^aMurganhos BALB/c foram imunizados por inalação IN com HBsAg (1 µg) sem ou em combinação com toxina da cólera (CT) a enterotoxina termolábil (LT) *Escherichia coli*, a subunidade B da toxina da

cólera (CTB), um mutante destoxificado da enterotoxina termolábil (LT) *Escherichia coli* (LTK63), e/ou oligonucleótido CpG (motivo #1826, SEQ. ID No. 90) (1 a 10 µg) como adjuvantes. Todos os grupos continham 5 murganhos, salvo indicado em contrário.

^bOs valores representam a média geométrica das titulações \pm o erro padrão da média (GMT \pm SEM) da titulação de diluição do ponto final de ELISA para os anticorpos IgA específicos para HBsAg em lavagem de pulmão ou soluções fecais colhidas 4 semanas depois da imunização.

^cAs titulações de IgA em lavagens de pulmão foram definidas como a diluição mais alta no plasma que resultou num valor de absorvância (OD 450) duas vezes aquela das lavagens de pulmão não imunizadas com um valor de corte de 0,05.

^dAs titulações de IgA em extractos fecais foram expressas como OD 450 $\times 10^3$ acima da base (extracto fecal não imunizado). A seroconversão foi definida como uma titulação do ponto final para IgG total >100 .

^e=: Todos os murganhos imunizados com estas combinações de adjuvantes morreram em 96 horas.

A **Tabela 4** apresenta as diferentes estratégias mucosais/parentéricas para a dose preparatória/reforço utilizadas para imunizar murganhos BALB/c e resume os resultados relativos a qual método induziu as resposta imunológicas sistémicas e mucosais específicas para o antigénio.

Descrição Pormenorizada da Invenção

A invenção relaciona-se com produtos e composições para utilização na indução de imunidade, compreendendo oligonucleótidos CpG imunoestimulatórios. Um aspecto da invenção é baseado na verificação de que os oligonucleótidos CpG actuam como adjuvantes mucosais potentes para induzir respostas imunológicas tanto em sítios locais como remotos contra um antigénio administrado ao tecido mucosal. Esta verificação é impressionante mesmo tendo em vista as verificações anteriores de que o oligonucleótido CpG é um adjuvante potente para a administração sistémica, uma vez que com a administração sistémica só a proteína induz respostas imunológicas detectáveis, mas com a administração mucosal só a proteína não induz uma resposta imunológica. Conforme demonstrado nos Exemplos adiante, tanto a imunidade sistémica como a mucosal são induzidas pela administração de oligonucleótidos CpG. A imunidade sistémica induzida em resposta aos oligonucleótidos CpG incluíram tanto respostas humorais como respostas mediadas por célula para antigénios específicos que não eram capazes de induzir a imunidade sistémica quando administrados sós à mucosa. Além disso, tanto os oligonucleótidos CpG como a toxina da cólera (CT, um adjuvante mucosal que induz uma resposta semelhante a Th2) induziram a CTL. Isto é surpreendente, uma vez que com a imunização sistémica, a presença de anticorpos semelhantes a Th2 é normalmente associada com uma falta de CTL (Schirmbeck *et al.*, 1995.).

Além disso, verificou-se que os oligonucleótidos CpG induzem uma resposta mucosal tanto em sítios locais (por exemplo, o pulmão) como remotos (por exemplo, o tracto intestinal inferior). Embora o oligonucleótido CpG fosse semelhante à CT para a indução dos anticorpos sistémicos (IgG) e anticorpos mucosais locais (IgA), níveis significativos de anticorpos IgA foram induzidos a um sítio mucosal distante apenas por oligonucleótido CpG e não por CT. Isto

foi surpreendente, uma vez que a CT é geralmente considerada como sendo um adjuvante mucosal altamente eficaz. Uma outra maneira em que o oligonucleótido CpG foi superior à CT foi no que diz respeito à resposta do tipo Th. Conforme foi indicado anteriormente (Snider, 1995), a CT induz, de forma predominante, o isotipo IgG1 de anticorpos, que são indicativos da resposta do tipo Th2. Em contraste, o oligonucleótido CpG era mais Th1 com anticorpos predominantemente IgG2a, especialmente depois do reforço ou quando os dois adjuvantes eram combinados. De um modo geral, os anticorpos do tipo Th1 têm melhores capacidades neutralizantes e, além disso, a resposta Th2 no pulmão é altamente indesejável, uma vez que esta é associada à asma (Kay, 1996, Hogg, 1997). Deste modo, a utilização do oligonucleótido CpG como adjuvante mucosal tem benefícios que outros adjuvantes mucosais não conseguem obter.

O descobrimento do oligonucleótido CpG como um adjuvante mucosal seguro e eficaz é também vantajoso pelo facto de que, embora a CT seja um adjuvante mucosal altamente eficaz, é muito tóxica para utilização em seres humanos. Um murganho (~20 g de peso corporal) pode tolerar o efeito tóxico de até 10 µg de CT, no entanto, uma dose tão pequena quanto 1-5 µg causará grave diarreia num ser humano (~70 Kg de peso corporal) (Jertborn *et al.*, 1992). Os animais que inalam o oligonucleótido CpG não apresentaram, a curto prazo, sinais de sofrimento em relação àqueles que receberam só HBsAg e todos recuperaram rapidamente sem qualquer efeito duradouro aparente. O oligonucleótido CpG é bem tolerado em altas doses (por exemplo, superior a 100 µg), quando administrado de forma sistémica ou mucosal. Deste modo, num aspecto, a invenção é uma composição para induzir uma resposta imunológica mucosal num indivíduo. Este aspecto abrange a utilização de oligonucleótido tendo uma sequência que inclui, pelo menos, a seguinte fórmula:



em que C é não metilado e X_1 , X_2 , X_3 e X_4 são nucleótidos, para a preparação de uma composição para administração a uma superfície mucosal de um indivíduo que está também exposto a um antigénio, para induzir uma resposta imunológica mucosal ao referido antigénio no referido indivíduo. O oligonucleótido, aqui referido como o oligonucleótido ou o oligonucleótido CpG, não é um vector plásmico. Estas distinções são esclarecidas nas definições apresentadas adiante.

O oligonucleótido CpG é particularmente útil como uma vacina profilática para a indução da imunidade mucosal de um indivíduo em risco de desenvolver uma infecção com um organismo infeccioso ou um indivíduo em risco de desenvolver uma alergia ou cancro. Um "indivíduo em risco", conforme utilizado neste contexto, é um indivíduo que tem qualquer risco de exposição a um agente patogénico ou alergénio infeccioso causador de infecção ou de desenvolver cancro. Por exemplo, um indivíduo em risco pode ser quem está a planear viajar para um área onde é encontrado um tipo em particular de agente infeccioso ou alergénio ou pode ser um indivíduo que, pelo seu estilo de vida ou procedimentos médicos, está exposto a fluidos corporais que podem conter organismos infecciosos ou mesmo qualquer indivíduo que vive numa área onde foi identificado um organismo infeccioso ou um alergénio. Os indivíduos em risco de desenvolver infecção também incluem as populações em geral às quais uma entidade médica recomenda a vacinação com um antigénio de organismo infeccioso em particular. Se o antigénio for um alergénio e o indivíduo desenvolve respostas alérgicas àquele antigénio em particular e o indivíduo é exposto ao antigénio, isto é, durante a estação do pólen, então aquele indivíduo está em risco de exposição ao antigénio. Os indivíduos em risco de desenvolver cancro incluem aqueles com uma predisposição genética ou previamente tratados contra o cancro e aqueles expostos a agentes

carcinogêneos, tais como o tabaco, o amianto e outras toxinas químicas ou excessiva luz solar e outros tipos de radiação.

Para além da utilização do oligonucleótido CpG para o tratamento profilático, a invenção também abrange a utilização do oligonucleótido CpG para o tratamento de um indivíduo que tem uma infecção, uma alergia ou um cancro.

Um "indivíduo que tem uma infecção" é um indivíduo que foi exposto a um agente patogénico infeccioso e tem níveis agudos ou crónicos do patogénio no organismo. O oligonucleótido CpG pode ser utilizado com um antigénio para construir uma resposta imunológica mucosal específica ao antigénio, que é capaz de reduzir o nível ou erradicar o patogénio infeccioso. Uma doença infecciosa, conforme utilizado neste contexto, é uma doença que surge da presença de um microrganismo estranho no corpo. É particularmente importante desenvolver estratégias de vacina e tratamentos eficazes para proteger as superfícies mucosais do corpo, que são os sítios principais de entrada do agente patogénico.

Um "indivíduo que tem uma alergia" é um indivíduo que tem ou está em risco de desenvolver uma reacção alérgica em resposta a um alergénio. Uma "alergia" refere-se à hipersensibilidade adquirida a uma substância (o alergénio). As condições alérgicas incluem, mas não se limitam a eczema, rinite alérgica ou coriza, febre do feno, conjuntivite, asma brônquica, urticária (erupções da pele) e alergia a alimentos, e outros estados atópicos.

Actualmente, as doenças alérgicas são geralmente tratadas pela injeção de pequenas doses de antigénio seguida pelo subsequente aumento da dosagem de antigénio. Crê-se que este procedimento induz à tolerância ao alergénio para evitar reacções alérgicas futuras. Estes métodos, no entanto, podem levar vários

anos para tornarem-se eficazes e são associados com o risco de efeitos secundários tais como choque anafilático. Os métodos da invenção evitam estes problemas.

As alergias são causadas, de um modo geral, pela geração de anticorpo IgE contra alérgenos inofensivos. As citocinas que são induzidas pela administração mucosal de oligonucleótido CpG não metilado são, predominantemente, de uma classe chamada "Th1" (exemplos são IL-12 e IFN- γ) e estes induzem respostas imunológicas tanto humorais quanto celulares. Os tipos de anticorpos associados com a resposta Th1 são geralmente mais protectores porque os mesmos têm altas capacidades de neutralização e opsonização. O outro tipo importante de resposta imunológica, que está associada com a produção das citocinas IL-4, IL-5 e IL-10, são chamadas de respostas imunológicas Th2. As respostas Th2 abrangem unicamente os anticorpos e estes têm menos efeito protector contra a infecção e alguns isotipos Th2 (por exemplo, IgE) estão associados com a alergia. De um modo geral, parece que as doenças alérgicas são mediadas pelas respostas imunológicas do tipo Th2, enquanto as respostas do tipo Th1 proporcionam a melhor protecção contra infecção, embora as respostas Th1 excessivas sejam associadas com doenças autoimunes. Com base na capacidade dos oligonucleótidos CpG de deslocarem a resposta imunológica num indivíduo de uma resposta Th2 (que está associada com a produção de anticorpos IgE e alergia) para uma resposta Th1 (que é protectora contra as reacções alérgicas), uma dose eficaz para induzir uma resposta imunológica mucosal de um oligonucleótido CpG pode ser administrada a um indivíduo para tratar ou evitar uma alergia.

Desde modo, o oligonucleótido CpG tem uma utilidade terapêutica significativa no tratamento de estados alérgicos, tais como a asma. As citocinas Th2, especialmente a IL-4 e a IL-5 são elevadas nas vias aéreas de indivíduos asmáticos. Estas citocinas

promovem aspectos importantes da resposta inflamatória asmática, incluindo a troca do isotipo IgE, quimiotaxia de eosinófilo e activação e crescimento de mastócitos. As citocinas Th1, especialmente a IFN- γ e a IL-12, podem suprimir a formação de clones de Th2 e a produção de citocinas Th2. O termo "asma" refere-se a um distúrbio do sistema respiratório caracterizado por inflamação, estreitamento das vias aéreas e reactividade aumentada das vias aéreas a agentes inalados. A asma é frequentemente, embora não exclusivamente, associada com sintomas atópicos ou alérgicos.

Um "indivíduo com cancro" é um indivíduo que tem células cancerosas detectáveis. O cancro pode ser um cancro maligno ou não maligno. Os cancros ou tumores incluem, mas não se limitam ao cancro do tracto biliar; cancro do cérebro; cancro da mama; cancro cervical; coriocarcinoma; cancro do cólon; cancro endometrial; cancro esofageano; cancro gástrico; neoplasmas intraepiteliais; linfomas; cancro do fígado; cancro do pulmão (por exemplo, da célula pequena e da células não pequena); melanoma; neuroblastomas; cancro oral; cancro ovariano; cancro do pâncreas; cancro da próstata; cancro rectal; sarcomas; cancro da pele; cancro testicular; cancro da tiróide; e cancro renal, bem como outros carcinomas e sarcomas.

Um "indivíduo" pode significar um ser humano, um animal vertebrado incluindo mas não limitado a um cão, gato, cavalo, vaca, porco, ovelha, cabra, galinha, primata, por exemplo, o macaco, peixe (da espécie de aquacultura), por exemplo o salmão, rato e murganho.

Um oligonucleótido CpG é um oligonucleótido que inclui, pelo menos, um dinucleótido CpG não metilado. Um oligonucleótido que contém pelo menos um dinucleótido CpG não metilado é uma molécula de ácido nucleico que contém uma sequência de dinucleótido

citossina-guanina não metilada (isto é, "Cpg ADN" ou ADN contendo uma citossina 5' seguida por guanossina 3' e ligada por uma ligação fosfato) e activa o sistema imunológico. Os oligonucleótidos CpG podem ser de fita dupla ou de fita simples. De um modo geral, as moléculas de fita dupla são mais estáveis *in vivo*, ao passo que as moléculas de fita simples têm actividade imunológica aumentada.

Os termos "ácido nucleico" e "oligonucleótido" são utilizados de forma alternada para significar nucleótidos múltiplos (por exemplo, ribose ou desoxirribose) ligados a um grupo fosfato e a uma base orgânica permutável, que é uma pirimidina substituída (por exemplo, citossina (C), timina (T) ou uracil (U)) ou uma purina substituída (por exemplo, adenina (A) ou guanina (G)). Conforme utilizado neste contexto, os termos referem-se a oligorribonucleótidos bem como oligodesoxirribonucleótidos. Os termos incluirão também polinucleósidos (isto é, um polinucleótido menos o fosfato) e qualquer outro polímero contendo base orgânica. As moléculas de ácido nucleico podem ser obtidas de fontes de ácido nucleico existentes (por exemplo, genómico ou cADN) mas, preferencialmente, são sintéticas (por exemplo, produzidas por síntese de oligonucleótido). A totalidade do oligonucleótido CpG pode ser não metilada ou porções podem ser não metiladas mas, pelo menos o C do 5'CG 3' tem de ser não metilado.

Vários aspectos da invenção podem ser conseguidos por meio da administração de um oligonucleótido contendo CpG ao indivíduo para induzir uma resposta imunológica mucosal. Conforme utilizado neste contexto, um "oligonucleótido CpG" e um "vector de expressão plasmídeo" são mutuamente exclusivos. Os termos "oligonucleótido CpG" ou "ácido nucleico CpG" são utilizados para referir a qualquer ácido nucleico contendo CpG excepto para um vector plasmídeo contendo CpG. Um vector de expressão plasmídeo é uma molécula de ácido nucleico que inclui, pelo menos, um promotor e um gene que

codifica um péptido ou fragmento de péptido. O vector de expressão de plasmídeo inclui uma sequência de ácido nucleico que codifica o péptido que é operativamente ligado a uma sequência de expressão de gene que dirige a expressão do péptido no interior de uma célula eucariótica. A "sequência de expressão de gene" é qualquer sequência reguladora de nucleótido, tal como uma sequência promotora ou a combinação promotora-intensificadora, que facilita a transcrição e tradução eficiente do péptido ao qual está operativamente ligada. A sequência de expressão de gene pode, por exemplo, ser um um promotor de mamífero ou viral, tal como um promotor constitutivo ou induzível. Tais construções são bem conhecidas dos especialistas na técnica.

Numa forma de realização preferida a invenção proporciona um oligonucleótido CpG representado, pelo menos pela fórmula:



em que, pelo menos um nucleótido separa CpGs consecutivos; X_1 é adenina, guanina ou timina; X_2 é citosina, adenina ou timina; N é qualquer nucleótido e N_1 e N_2 são sequências de ácido nucleico compostas de cerca de 0-25 Ns cada uma.

Numa outra forma de realização a invenção proporciona um oligonucleótido CpG isolado representado, pelo menos, pela fórmula:



em que, pelo menos um nucleótido separa CpGs consecutivos; X_1X_2 são nucleótidos seleccionados do grupo que consiste em: GpT, GpG, GpA, ApA, ApT, ApG, CpT, CpA, CpG, TpA, TpT e TpG; e X_3X_4 são nucleótidos seleccionados do grupo que consiste em: TpT, CpT, ApT, TpG, ApG, CpG, TpC, ApC, CpC, TpA, ApA e CpA; N é qualquer

nucleótido e N_1 e N_2 são sequências de ácido nucleico compostas de cerca de 0-25 Ns cada uma. Preferencialmente, X_1X_2 são GpA ou GpT e X_3X_4 são TpT. Noutras formas de realização preferidas X_1 ou X_2 ou ambos são purinas e X_3 ou X_4 ou ambos são pirimidinas ou X_1X_2 são GpA e X_3 ou X_4 ou ambos são pirimidinas. Numa forma de realização preferida o N_1 e N_2 do ácido nucleico não contêm um quadmer CCGG ou CGCG ou mais de um trímero CCG ou CGG. O efeito de um quadmer CCGG ou CGCG ou mais de um trímero CCG ou CGG depende, em parte, do status do esqueleto do oligonucleótido. Por exemplo, se o oligonucleótido tiver um esqueleto de fosfodiéster ou um esqueleto quimérico a inclusão destas sequências no oligonucleótido terão apenas um efeito mínimo, se tiverem algum efeito sobre a actividade biológica do oligonucleótido. Se o esqueleto for completamente de fosforotioato ou significativamente de fosfotioato, então, a inclusão destas sequências pode ter mais influência sobre a actividade biológica ou a cinética da actividade biológica. No caso em que o oligonucleótido CpG é administrado em associação com um antigénio que é codificado num vector de ácido nucleico, é preferido que o esqueleto do oligonucleótido CpG seja de fosfodiéster ou quimérico. Pode ser completamente de fosfotioato se o oligonucleótido for administrado directamente à célula. A célula pode ter um problema em captar um oligonucleótido completamente de fosfotioato na presença de um vector plasmídeo. Deste modo, quando tanto um vector como um oligonucleótido são administrados a um indivíduo, é preferido que o oligonucleótido tenha um esqueleto de fosfodiéster ou quimérico ou que tenha um esqueleto de fosfotioato mas que seja associado a um veículo que o administre directamente à célula. Tais veículos são conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, lipossomas e pistolas para injeção de genes.

Numa outra forma de realização preferida o oligonucleótido CpG tem a sequência 5'TCN₁TX₁X₂CGX₃X₄3'.

Preferencialmente, os oligonucleótidos CpG da invenção incluem X_1X_2 seleccionados do grupo que consiste em GpT, GpG, GpA e ApA e X_3X_4 é seleccionado do grupo que consiste em TpT, CpT e TpC. Para facilitar a captação dentro das células, os oligonucleótidos que contêm CpG, preferencialmente, têm na gama de 8 a 30 bases de comprimento. No entanto, os ácidos nucleicos de qualquer tamanho maior de 8 nucleótidos (mesmo de muitos kb de comprimento) são capazes de induzir uma resposta imunológica de acordo com a invenção se estiverem presentes suficientes motivos imunoestimulatórios, uma vez que ácidos nucleicos maiores são degradados em oligonucleótidos no interior das células. Os oligonucleótidos sintéticos preferidos não incluem um quadmer CCGG ou CGCG ou mais de um trímero CCG ou CGG próximo ou nos terminais 5' e/ou 3'. São também preferidos os oligonucleótidos estabilizados, em que o oligonucleótido incorpora uma modificação de esqueleto de fosfato, conforme discutido em mais pormenor adiante. A modificação pode ser, por exemplo, uma modificação de fosforotioato ou fosforoditioato. Preferencialmente, a modificação do esqueleto de fosfato ocorre na extremidade 5' do ácido nucleico, por exemplo, nos dois primeiros nucleótidos da extremidade 5' do oligonucleótido. Além disso, a modificação do esqueleto de fosfato pode ocorrer na extremidade 3' do ácido nucleico, por exemplo, nos últimos cinco nucleótidos da extremidade 3' do ácido nucleico. Alternativamente, o oligonucleótido pode ser completa ou parcialmente modificado.

Preferencialmente, o oligonucleótido CpG está na gama de entre 8 e 100 e, mais preferencialmente, entre 8 e 30 nucleótidos de tamanho. Alternativamente, os oligonucleótidos CpG podem ser produzidos em larga escala em plasmídeos e degradados em oligonucleótidos.

O oligonucleótido CpG pode ser administrado directamente ao indivíduo ou pode ser administrado em associação com um complexo de administração de ácido nucleico. Um "complexo de administração de ácido nucleico" terá o significado de uma molécula de ácido nucleico associada a (por exemplo, ligada de forma iónica ou covalente; ou encapsulada no interior de) um meio selectivo (por exemplo, uma molécula que resulta em ligação de afinidade mais alta à célula alvo (por exemplo, as superfícies de células dendríticas e/ou a captação celular aumentada pelas células alvo). Exemplos de complexos de administração de ácido nucleico incluem ácidos nucleicos associados a: um esteroide (por exemplo, colesterol), um lípido (por exemplo, um lípido catiónico, virossoma ou lipossoma) ou um agente de ligação específico para a célula alvo (por exemplo, um ligando reconhecido pelo receptor específico para a célula alvo). Os complexos preferidos podem ser suficientemente estáveis *in vivo* a fim de evitar o desacoplamento significativo antes da internalização pela célula alvo. No entanto, o complexo pode ser clivável sob certas condições no interior da célula, de modo que o ácido nucleico seja libertado numa forma funcional.

Foram descritos veículos de administração para administrar o antigénio às superfícies mucosais. O oligonucleótido CpG e/ou o antigénio pode ser administrado só (por exemplo, em solução salina ou tampão) ou utilizando quaisquer veículos de administração conhecidos na técnica. Por exemplo, foram descritos os seguintes veículos de administração: Coplexos (Gould-Fogerite *et al.*, 1994, 1996); Emulsões (Vancott *et al.*, 1998, Lowell *et al.*, 1997); ISCOMs (Mowat *et al.*, 1993, Carlsson *et al.*, 1991, Hu *et al.*, 1998, Morein *et al.*, 1999); Lipossomas (Childers *et al.*, 1999, Michalek *et al.*, 1989, 1992, de Haan 1995a, 1995b); Vectores bacterianos vivos (por exemplo, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Bacillus calmette-guerin*, *Shigella*, *Lactobacillus*) (Hone *et al.*, 1996, Pouwels *et al.*, 1998, Chatfield *et al.*, 1993, Stover *et al.*, 1991,

Nugent et al., 1998); Vectores virais vivos (por exemplo, Vaccinia, adenovírus, Herpes Simplex) (Gallichan et al., 1993, 1995, Moss et al., 1996, Nugent et al., 1998, Flexner et al., 1988, Morrow et al., 1999); Micro esferas (Gupta et al., 1998, Jones et al., 1996, Maloy et al., 1994, Moore et al., 1995, O'Hagan et al., 1994, Eldridge et al., 1989); Vacinas de ácido nucleico (Fynan et al., 1993, Kuklin et al., 1997, Sasaki et al., 1998, Okada et al., 1997, Ishii et al., 1997); Polímeros (por exemplo, carboximetilcelulose, quitosano) (Hamajima et al., 1998, Jabbal-Gill et al., 1998); Anéis poliméricos (Wyatt et al., 1998); Proteossomas (Vancott et al., 1998, Lowell et al., 1988, 1996, 1997); Fluoreto de sódio (Hashi et al., 1998); Plantas transgênicas (Tacket et al., 1998, Mason et al., 1998, Haq et al., 1995); Virossomas (Gluck et al., 1992, Mengiardi et al., 1995, Cryz et al., 1998); Partículas semelhantes a vírus (Jiang et al., 1999, Leibl et al., 1998). Outros veículos de administração são conhecidos da técnica e alguns exemplos adicionais são fornecidos adiante na discussão dos vectores.

Uma "sequência palindrômica" significará uma repetição invertida (isto é, uma sequência tal como ABCDEE'D'C'B'A' em que A e A' são bases capazes de formar os pares de bases usuais Watson-Crick. Estas sequências podem formar estruturas de fita dupla *in vivo*. Numa forma de realização o oligonucleótido CpG contém uma sequência palindrômica. Uma sequência palindrômica, conforme utilizado neste contexto, refere-se a um palíndromo em que o CpG é parte do palíndromo e, preferencialmente, é o centro do palíndromo. Numa outra forma de realização o oligonucleótido CpG é livre de um palíndromo. Um oligonucleótido CPG que é livre de um palíndromo é um em que o dinucleótido CpG não é parte de um palíndromo. Tal oligonucleótido pode incluir um palíndromo em que o CpG não é parte do palíndromo.

Uma "molécula de ácido nucleico estabilizada" significará uma molécula de ácido nucleico que é relativamente resistente à degradação *in vivo* (por exemplo, via uma *exo-* ou *endo-nuclease*). A estabilização pode ser uma função do comprimento ou esqueleto secundário. Os oligonucleótidos CpG que têm dezenas a centenas de kbs de comprimento são relativamente resistentes à degradação *in vivo*. Para oligonucleótidos CpG mais curtos, a estrutura secundária pode estabilizar e aumentar o seu efeito. Por exemplo, se a extremidade 3' de um oligonucleótido tem auto-complementaridade com uma região a montante, de modo que possa dobrar-se e formar um tipo de estrutura em "stem-loop," então, o oligonucleótido torna-se estabilizado e, deste modo, exibe mais actividade.

Os oligonucleótidos estabilizados preferidos da presente invenção têm um esqueleto modificado. Foi demonstrado que a modificação do esqueleto do oligonucleótido proporciona actividade acentuada dos oligonucleótidos CpG quando administrados *in vivo*. As construções CpG, incluindo pelo menos duas ligações de fosforotioato na extremidade 5' do oligonucleótido em ligações múltiplas de fosforotioato na extremidade 3', preferencialmente 5, proporciona actividade proximal e protege o oligonucleótido de degradação por *exo-* e *endo-nucleases* intracelulares. Outros nucleótidos modificados incluem oligonucleótido de fosfodiéster modificado, combinações de oligonucleótido de fosfodiéster e combinações destas.

Cada uma destas combinações e seus efeitos em particular sobre células imunocompetentes está discutido em mais pormenor no Pedido de Publicação de Patente Publicado PCT No. WO98/18810, que reivindica prioridade aos documentos Número de Série U.S. 08/738.652 e 08/960.774, depositados em 30 de Outubro de 1996 e 30 de Outubro de 1997, respectivamente. Crê-se que estes oligonucleótidos modificados podem demonstrar mais actividade

estimulatória devido à resistência intensificada à nuclease, captação celular aumentada, ligação proteica aumentada e/ou localização intracelular alterada.

Tantos os nucleótidos de fosforotioato como de fosfodiéster contendo motivos CpG são activos na células imunocompetentes. No entanto, com base na concentração necessária para induzir os efeitos CpG-específicos, os oligonucleótidos CpG de esqueleto de fosforotioato resistentes à nuclease são mais potentes (2 µg/mL para o fosforotioato vs. um total de 90 µg/mL para fosfodiéster).

Outros oligonucleótidos estabilizados incluem: análogos de ADN não iónicos, tais como fosfatos de alquilo e arilo (em que o oxigénio fosfonato carregado é substituído por um grupo alquilo ou arilo), fosfodiéster e alquilfosfotriésteres, em que a unidade oxigénio carregada é alquilada. Foi também demonstrado que os oligonucleótidos que contêm diol, tais como tetraetilenoglicol ou hexaetilenoglicol, em cada ou em ambos os terminais são substancialmente resistentes à degradação por nuclease.

As sequências de ácido nucleico da invenção que são úteis como adjuvantes mucosais são aquelas amplamente descritas e reveladas no Pedido de Publicação de Patente Publicado PCT No. WO98/18810, que reivindica prioridade aos documentos Número de Série U.S. 08/738.652 e 08/960.774, depositados em 30 de Outubro de 1996 e 30 de Outubro de 1997, respectivamente. As sequências exemplificativas incluem, mas não são limitadas àquelas sequências imunoestimulatórias ilustradas na Tabela 1.

Tabela 1 - sequências

GCTAGACGTTAGCGT;	(SEQ ID NO: 1)
GCTAGATGTTAGCGT;	(SEQ ID NO: 2)
GCTAGACGTTAGCGT;	(SEQ ID NO: 3)
GCTAGACGTTAGCGT;	(SEQ ID NO: 4)
GCATGACGTTGAGCT;	(SEQ ID NO: 5)
ATGGAAGGTCCAGCGTTCTC;	(SEQ ID NO: 6)
ATCGACTCTCGAGCGTTCTC;	(SEQ ID NO: 7)
ATCGACTCTCGAGCGTTCTC;	(SEQ ID NO: 8)
ATCGACTCTCGAGCGTTCTC;	(SEQ ID NO: 9)
ATGGAAGGTCCAACGTTCTC;	(SEQ ID NO: 10)
GAGAACGCTGGACCTTCCAT;	(SEQ ID NO: 11)
GAGAACGCTCGACCTTCCAT;	(SEQ ID NO: 12)
GAGAACGCTCGACCTTCGAT;	(SEQ ID NO: 13)
GAGAACGCTGGACCTTCCAT;	(SEQ ID NO: 14)
GAGAACGATGGACCTTCCAT;	(SEQ ID NO: 15)
GAGAACGCTCCAGCACTGAT;	(SEQ ID NO: 16)
TCCATGTCGGTCCTGATGCT;	(SEQ ID NO: 17)
TCCATGTCGGTCCTGATGCT;	(SEQ ID NO: 18)
TCCATGACGTTTCCTGATGCT;	(SEQ ID NO: 19)
TCCATGTCGGTCCTGCTGAT;	(SEQ ID NO: 20)
TCAACGTT;	(SEQ ID NO: 21)
TCAGCGCT;	(SEQ ID NO: 22)
TCATCGAT;	(SEQ ID NO: 23)
TCTTCGAA;	(SEQ ID NO: 24)
CAACGTT;	(SEQ ID NO: 25)
CCAACGTT;	(SEQ ID NO: 26)
AACGTTCT;	(SEQ ID NO: 27)
TCAACGTC;	(SEQ ID NO: 28)
ATGGACTCTCCAGCGTTCTC;	(SEQ ID NO: 29)
ATGGAAGGTCCAACGTTCTC;	(SEQ ID NO: 30)
ATCGACTCTCGAGCGTTCTC;	(SEQ ID NO: 31)

ATGGAGGCTCCATCGTTCTC;	(SEQ ID NO: 32)
ATCGACTCTCGAGCGTTCTC;	(SEQ ID NO: 33)
ATCGACTCTCGAGCGTTCTC;	(SEQ ID NO: 34)
TCCATGTCGGTCCTGATGCT;	(SEQ ID NO: 35)
TCCATGCCGGTCCTGATGCT;	(SEQ ID NO: 36)
TCCATGGCGGTCCTGATGCT;	(SEQ ID NO: 37)
TCCATGACGGTCCTGATGCT;	(SEQ ID NO: 38)
TCCATGTCGATCCTGATGCT;	(SEQ ID NO: 39)
TCCATGTCGCTCCTGATGCT;	(SEQ ID NO: 40)
TCCATGTCGTCCCTGATGCT;	(SEQ ID NO: 41)
TCCATGACGTGCCTGATGCT;	(SEQ ID NO: 42)
TCCATAACGTTCCCTGATGCT;	(SEQ ID NO: 43)
TCCATGACGTCCCTGATGCT;	(SEQ ID NO: 44)
TCCATCACGTGCCTGATGCT;	(SEQ ID NO: 45)
GGGGTCAACGTTGACGGGG;	(SEQ ID NO: 46)
GGGGTCAGTCGTGACGGGG;	(SEQ ID NO: 47)
GCTAGACGTTAGTGT;	(SEQ ID NO: 48)
TCCATGTCGTTCCCTGATGCT;	(SEQ ID NO: 49)
ACCATGGACGATCTGTTTCCCCTC;	(SEQ ID NO: 50)
TCTCCCAGCGTGCGCCAT;	(SEQ ID NO: 51)
ACCATGGACGAACTGTTTCCCCTC;	(SEQ ID NO: 52)
ACCATGGACGAGCTGTTTCCCCTC;	(SEQ ID NO: 53)
ACCATGGACGACCTGTTTCCCCTC;	(SEQ ID NO: 54)
ACCATGGACGTACTGTTTCCCCTC;	(SEQ ID NO: 55)
ACCATGGACGGTCTGTTTCCCCTC;	(SEQ ID NO: 56)
ACCATGGACGTTCTGTTTCCCCTC;	(SEQ ID NO: 57)
CACGTTGAGGGGCAT;	(SEQ ID NO: 58)
TCAGCGTGCGCC;	(SEQ ID NO: 59)
ATGACGTTCCCTGACGTT;	(SEQ ID NO: 60)
TCTCCCAGCGGGCGCAT;	(SEQ ID NO: 61)
TCCATGTCGTTCCCTGTCGTT;	(SEQ ID NO: 62)
TCCATAGCGTTCCCTAGCGTT;	(SEQ ID NO: 63)
TCGTGCTGTCTCCCCTTCTT;	(SEQ ID NO: 64)

TCCTGACGTTCCCTGACGTT;	(SEQ ID NO: 65)
TCCTGTCGTTCCCTGTCGTT;	(SEQ ID NO: 66)
TCCATGTCGTTTTTTGTCGTT;	(SEQ ID NO: 67)
TCCTGTCGTTCCCTTGTCTGTT;	(SEQ ID NO: 68)
TCCTTGTCTGTTCCCTGTCGTT;	(SEQ ID NO: 69)
TCCTGTCGTTTTTTTTGTCGTT;	(SEQ ID NO: 70)
TCGTCGCTGTCTGCCCTTCTT;	(SEQ ID NO: 71)
TCGTCGCTGTTGTCTGTTTCTT;	(SEQ ID NO: 72)
TCCATGCGTGCGTGCGTTTT;	(SEQ ID NO: 73)
TCCATGCGTTGCGTTGCGTT;	(SEQ ID NO: 74)
TCCACGACGTTTTTCGACGTT;	(SEQ ID NO: 75)
TCGTCGTTGTCTGTTGTCTGTT;	(SEQ ID NO: 76)
TCGTCGTTTTTGTCTGTTTTGTCTGTT;	(SEQ ID NO: 77)
TCGTCGTTGTCTGTTTTGTCTGTT;	(SEQ ID NO: 78)
GCGTGCGTTGTCTGTTGTCTGTT;	(SEQ ID NO: 79)
TGTCTGTTGTCTGTTGTCTGTT;	(SEQ ID NO: 80)
TGTCTGTTGTCTGTTGTCTGTTGTCTGTT;	(SEQ ID NO: 81)
TGTCTGTTGTCTGTTGTCTGTT;	(SEQ ID NO: 82)
TCGTCGTCGTCGTT;	(SEQ ID NO: 83)
TGTCTGTTGTCTGTT;	(SEQ ID NO: 84)
TCCATAGCGTTCCTAGCGTT;	(SEQ ID NO: 85)
TCCATGACGTTCCCTGACGTT;	(SEQ ID NO: 86)
GTCGYT;	(SEQ ID NO: 87)
TGTCTGYT;	(SEQ ID NO: 88)
AGCTATGACGTTCCAAGG;	(SEQ ID NO: 89)
TCCATGACGTTCCCTGACGTT;	(SEQ ID NO: 90)
ATCGACTCTCGAACGTTCTC;	(SEQ ID NO: 92)
TCCATGTCGGTCCCTGACGCA;	(SEQ ID NO: 93)
TCTTCGAT;	(SEQ ID NO: 94)
ATAGGAGGTCCAACGTTCTC;	(SEQ ID NO: 95)

O índice de estimulação de um ADN CpG imunoestimulatório em particular pode ser testado em vários ensaios de células imunocompetentes. Preferencialmente, o índice de estimulação do oligonucleótido CpG no que diz respeito à proliferação de células B é de, pelo menos 5, preferencialmente, pelo menos 10, mais preferencialmente, pelo menos 15 e mais preferencialmente, pelo menos cerca de 20, conforme determinado pela incorporação de ^3H uridina numa cultura de célula B de murino, que tenha sido contactada com 20 μM de oligonucleótido durante 20 h a 37°C e tenha sido pulsada com 1 μCi de ^3H uridina; e colhida e contada 4 h mais tarde, conforme descrito em pormenor no Pedido de Publicação de Patente Publicado PCT No. WO98/18810, que reivindica prioridade aos documentos Número de Série U.S. 08/738.652 e 08/960.774, depositados em 30 de Outubro de 1996 e 30 de Outubro de 1997, respectivamente. Para utilização *in vivo*, por exemplo, é importante que o oligonucleótido CpG seja capaz de induzir, de forma efectiva, a expressão de IgA.

O oligonucleótido CpG pode ser administrado em associação com outro adjuvante mucosal. Foi verificado, de acordo com a invenção que a combinação de um oligonucleótido CpG e um adjuvante mucosal produziu uma resposta imunológica sinérgica. Quando o oligonucleótido CpG é administrado em associação com outro adjuvante, o oligonucleótido CpG pode ser administrado antes, depois e/ou simultaneamente com o outro adjuvante mucosal. Por exemplo, o oligonucleótido CpG pode ser administrado com uma dose preparatória de antigénio. Cada ou ambos os adjuvantes podem, então, ser administrados com a dose de reforço. Alternativamente, o oligonucleótido pode ser administrado com uma dose de reforço de antigénio. Cada ou ambos os adjuvantes podem, então, ser administrados com a dose preparatória.

Verificou-se, além disso, que a imunidade mucosal pode ser induzida desde que uma das dosagens de oligonucleótido CpG seja administrada a uma superfície mucosal. Outras doses podem ser administradas por via sistémica ou mucosal, sem afectar a indução da resposta imunológica. Por exemplo, o indivíduo pode ser administrado com uma dose de preparação por meio da administração mucosal do antigénio e oligonucleótido CpG, com ou sem outros adjuvantes mucosais e administrado com uma dose de reforço por uma via parentérica (por exemplo, intramuscular, intradérmica ou subcutânea) de administração só do antigénio, com os oligonucleótidos CpG, com um adjuvante não oligonucleótido ou uma combinação de adjuvantes que pode ou não incluir o oligonucleótido CpG. Alternativamente, a dose preparatória pode ser dada por via parentérica e o reforço por via mucosal, utilizando a invenção. Todas estas abordagens da invenção abrangem a administração de, pelo menos, uma dose, seja preparatória ou de reforço ou ambas, à superfície mucosal. As outras doses de oligonucleótido CpG podem ser administradas por via mucosal ou sistémica.

Uma "dose de preparação" é a primeira dose do antigénio administrada ao indivíduo. No caso de um indivíduo que tem uma infecção a dose preparatória pode ser a exposição inicial do indivíduo ao micróbio infeccioso (exposição passiva) e, deste modo, a administração intencional subsequente do antigénio (exposição activa) com oligonucleótido CpG torna-se a dose de reforço. Uma "dose de reforço" é uma segunda ou terceira, etc., dose de antigénio administrada a um indivíduo que já tenha sido exposto ao antigénio. Em alguns casos a dose preparatória administrada com o oligonucleótido CpG é tão eficaz que não é necessária uma dose de reforço para proteger um indivíduo em risco de infecção de ser infectado.

O indivíduo é exposto ao antígeno. Conforme utilizado neste contexto, o termo "exposto" refere-se tanto ao passo activo de pôr o indivíduo em contacto com um antígeno como a exposição passiva do indivíduo ao antígeno *in vivo*. Os métodos para a exposição activa de um indivíduo a um antígeno são bem conhecidos na técnica. De um modo geral, um antígeno é administrado directamente ao indivíduo por qualquer meio, tal como por administração intravenosa, intramuscular, oral, transdérmica, mucosal, intranasal, intratraqueal ou subcutânea. O antígeno pode ser administrado sistémica ou localmente. Os métodos para a administração do antígeno e do oligonucleótido CpG estão descritos em mais pormenor adiante. Um indivíduo é exposto passivamente a um antígeno se o antígeno ficar disponível para exposição nas células imunocompetentes no organismo. Um indivíduo pode ser exposto passivamente a um antígeno. Por exemplo, pela entrada de um patógeno estranho no organismo ou pelo desenvolvimento de uma célula tumoral que expressa um antígeno estranho sobre a sua superfície. Quando um indivíduo é exposto passivamente a um antígeno, é preferido, em algumas formas de realização, que o oligonucleótido CpG seja um oligonucleótido de 8-100 nucleótidos de comprimento e/ou tenha um esqueleto de fosfato modificado.

Os métodos em que um indivíduo é exposto passivamente a um antígeno podem ser particularmente dependentes do sincronismo do oligonucleótido CpG. Por exemplo, num indivíduo em risco de desenvolver um cancro ou uma doença infecciosa ou uma resposta alérgica ou asmática, o indivíduo pode ser administrado com o oligonucleótido CpG regularmente quando o risco for maior, isto é, durante a estação de alergia ou depois de exposição a uma agente causador de cancro. Além disso, o oligonucleótido CpG pode ser administrado a viajantes antes dos mesmos viajarem para terras estrangeiras onde estejam em risco de exposição a agentes infecciosos. Do mesmo modo, o oligonucleótido CpG pode ser

administrado a soldados ou civis em riscos de exposição a armas biológicas para induzir uma resposta imunológica mucosal ao antígeno quando e se o indivíduo for exposto às mesmas.

Um "antígeno" conforme utilizado neste contexto, é uma molécula capaz de provocar uma resposta imunológica. Os antígenos incluem, mas não se limitam a células, extractos celulares, proteínas, polipéptidos, péptidos, polissacáridos, conjugados de polissacáridos, péptidos imitadores de polissacáridos, lípidos, glicolípidos, hidratos de carbono, vírus e extractos virais e organismos multicelulares, tais como parasitas e alergénios. O termo antígeno inclui, de forma ampla, qualquer tipo de molécula que é reconhecida por um sistema imunológico hospedeiro como sendo estranha. Os antígenos incluem, mas não se limitam a antígenos do cancro, antígenos microbianos e alergénios.

Um "antígeno do cancro", conforme utilizado neste contexto, é um composto, tal como um péptido ou proteína, associado a um tumor ou superfícies de células de cancro e que é capaz de provocar uma resposta imunológica quando expresso na superfície de uma célula que apresenta antígeno no contexto de uma molécula MHC. Os antígenos do cancro podem ser preparados a partir de células de cancro, seja pela preparação de extractos de células de cancro em bruto, por exemplo, conforme descrito em Cohen, et al., 1994, *Cancer Research*, 54:1055, purificando parcialmente os antígenos, por meio de tecnologia recombinante, seja pela síntese de novo de antígenos conhecidos. Os antígenos do cancro incluem antígenos que são recombinantemente uma porção imunogénica ou um tumor inteiro ou cancro. Tais antígenos podem ser isolados ou preparados de forma recombinante ou por qualquer outro meio conhecido na técnica.

Um "antigénio microbiano", conforme utilizado neste contexto, é um antigénio de um microrganismo e inclui, mas não se limita a vírus infecciosos, bactérias infecciosas, parasitas infecciosos e fungos infecciosos. Tais antigénios incluem o microrganismo intacto, bem como isolados naturais e fragmentos ou derivados do mesmo e também compostos sintéticos que são idênticos ou semelhantes aos antigénios de microrganismos naturais e induzem uma resposta imunológica específica para aquele microrganismo. Um composto é semelhante a um antigénio de microrganismo natural se o mesmo induzir uma resposta imunológica (humoral e/ou celular) a um antigénio de microrganismo natural. Tais antigénios são utilizados na técnica, de forma rotineira, e são bem conhecidos daqueles com conhecimento corrente da técnica.

Exemplos de vírus infecciosos que foram encontrados em seres humanos incluem, mas não se limitam a: *Retroviridae* (por exemplo, os vírus da imunodeficiência humana, tais como o HIV-1 (também referidos como HTLV-III, LAV ou HTLV-III/LAV ou HIV-III; e outros isolados, tais como o HIV-LP; *Picornaviridae* (por exemplo, os vírus da poliomielite, vírus da hepatite A; enterovírus, vírus de Cocksackie humano, rinovírus, ecovírus); *Calciviridae* (por exemplo, estirpes que provocam a gastroenterite); *Togaviridae* (por exemplo, vírus da encefalite equina, vírus da 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); *Coronaviridae* (por exemplo, coronavírus); *Rhabdoviridae* (por exemplo, vírus da estomatite vesicular, vírus da raiva); *Filoviridae* (por exemplo, vírus da ébola); *Paramyxoviridae* (por exemplo, vírus da parainfluenza, vírus da parotidite epidémica, vírus do sarampo, vírus sincicial respiratório); *Orthomyxoviridae* (por exemplo, vírus da influenza); *Bunyaviridae* (por exemplo, vírus Hantaan, vírus bunga, flebovírus e vírus Nairo); *Arenaviridae*

(vírus da febre hemorrágica); *Reoviridae* (por exemplo, reovírus, orbivírus e rotavírus); *Birnaviridae*; *Hepadnaviridae* (vírus da Hepatite B); *Parvovirida* (parvovírus); *Papovaviridae* (vírus do papiloma, vírus polioma); *Adenoviridae* (a maioria dos adenovírus); *Herpesviridae* (vírus herpes simplex (HSV) 1 e 2, vírus varicella-zoster, citomegalovírus (CMV), herpes vírus; *Poxviridae* (vírus da varíola, vírus da vaccinia, pox- vírus); e *Iridoviridae* (por exemplo, vírus da febre do suíno Africano); e vírus não classificados (por exemplo, os agentes etiológicos das encefalopatias espongiformes, o agente da hepatite delta (que se crê seja um satélite defeituoso do vírus da hepatite B), os agentes da hepatite não A, não B (classe 1 = transmitida internamente; classe 2 = transmitida parentericamente (isto é, a Hepatite C); vírus de Norwalk, vírus relacionados e astrovírus).

Tanto as bactérias gram-negativas como as gram-positivas servem como antigénios em animais vertebrados. Tais bactérias gram-positivas incluem, mas não se limitam à espécie *Pasteurella*, espécie *Staphylococci* e espécie *Streptococcus*. As bactérias gram-negativas incluem, mas não se limitam a *Escherichia coli*, espécie *Pseudomonas* e espécie *Salmonella*. Exemplos específicos de bactérias infecciosas incluem mas não se limitam a: *Helicobacter pylori*, *Borelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacteria* sps (por exemplo, *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. gordonae*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus* Grupo A), *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* Grupo B), *Streptococcus* (grupo viridans), *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus* (sps. anaeróbica), *Streptococcus pneumoniae*, *Campylobacter* sp. patogénica, *Enterococcus* sp., *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium* sp., *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium*

tetani, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasturella multocida*, *Bacteroides* sp., *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Leptospira*, *Rickettsia* e *Actinomyces israeli*.

Exemplos de fungos infecciosos incluem: *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Chlamydia trachomatis*, *Candida albicans*. Outros organismos infecciosos (isto é, protistas) incluem: *Plasmodium* tal como *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium vivax* e *Toxoplasma gondii*.

Outros microrganismos relevantes do ponto de vista médico foram extensamente descritos na literatura, por exemplo, ver, C.G.A Thomas, *Medical Microbiology*, Bailliere Tindall, Grã Bretanha 1983.

Embora muitos dos antigénios microbianos descritos acima relacionem-se a distúrbios humanos, a invenção é também útil para tratar outros vertebrados não humanos. Os vertebrados não humanos são também capazes de desenvolver infecções que podem ser evitadas ou tratadas com os oligonucleótidos CpG aqui descritos. Por exemplo, para além do tratamento e doenças infecciosas humanas, os métodos da invenção são úteis para tratar infecções de animais.

Conforme utilizado neste contexto, o termo "tratar", "tratado" ou "tratamento", quando utilizado em relação a uma doença infecciosa, refere-se a um tratamento profilático que aumenta a resistência de um indivíduo (um indivíduo em risco de infecção) à infecção com um patógeno ou, em outras palavras, diminui a possibilidade do indivíduo ficar infectado com o patógeno, bem como um tratamento depois do indivíduo (um indivíduo que tenha sido infectado) ter sido infectado a fim de combater a infecção, por

exemplo, reduzir ou eliminar a infecção ou evitar que a mesma se torne pior.

Muitas vacinas para o tratamento de vertebrados não humanos são descritas em Bennett, K. *Compendium of Veterinary Products*, 3rd ed. North American Compendiums, Inc., 1995. Conforme discutido acima, os antigénios incluem micróbios infecciosos tais como vírus, bactérias e fungos e fragmentos destes, derivados de fontes naturais ou sinteticamente. Os vírus infecciosos tanto dos vertebrados humanos como não humanos incluem os retrovírus, vírus ARN e vírus ADN. Este grupo de retrovírus inclui tanto retrovírus simples como retrovírus complexos. Os retrovírus simples incluem os subgrupos de retrovírus tipo B, retrovírus tipo C e retrovírus tipo D. Um exemplo de um retrovírus tipo B é o vírus do tumor mamário em murganho (MMTV). Os retrovírus tipo C incluem subgrupos do grupo A tipo C (incluindo o vírus do sarcoma de Rous (RSV), o vírus da leucemia aviária (ALV) e o vírus da mieloblastose aviária (AMV)) e grupo B tipo C (incluindo o vírus da leucemia murina (MLV), vírus da leucemia felina (FeLV), vírus do sarcoma murino (MSV), vírus da leucemia do macaco gibão (GALV), vírus da necrose do baço (SNV), vírus da reticuloendoteliose (RV) e vírus de sarcoma de símio (SSV)). Os retrovírus tipo D incluem vírus Mason-Pfizer de macaco (MPMV) e retrovírus símio tipo 1 (SRV-1). Os retrovírus complexos incluem os subgrupos de lentivírus, vírus da leucemia de células T e os vírus espumantes. Os lentivírus incluem o HIV-1, mas incluem também o HIV-2, SIV, o Visna vírus, o vírus da imunodeficiência felina (FIV) e o vírus da anemia infecciosa equina (EIAV). Os vírus da leucemia de células T incluem HTLV-1, HTLV-II, o vírus da leucemia de células T símia (STLV) e o vírus da leucemia bovina (BLV). Os vírus espumantes incluem o vírus espumante humano (HFV), o vírus espumante símio (SFV) e o vírus espumante bovino (BFV).

Exemplos de outros vírus ARN que são antigénios em animais vertebrados incluem, mas não se limitam aos seguintes: membros da família *Reoviridae*, incluindo o género *Orthoreovirus* (serotipos múltiplos tanto de retrovírus de mamíferos como aviários), o género *Orbivirus* (vírus da língua azul, vírus *Euglenagee*, vírus *Kemerovo*, vírus da doença equina Africana e vírus da febre do carrapato do Colorado), o género *Rotavirus* (rotavírus humano, vírus da diarreia viral bovina, rotavírus murino, rotavírus símio, rotavírus bovino ou ovino, rotavírus aviário); a família *Picomaviridae*, incluindo o género *Enterovirus* (poliovírus, vírus *Coxsackie A* e *B*, vírus entérico citopático humano órfão (ECHO), vírus da hepatite A, enterovírus símios, vírus da encefalomielite murina (ME), Poliovírus muris, enterovírus bovino, enterovírus porcino, o género *Cardiovirus* (vírus da encefalomiocardite (EMC), mengovírus), o género *Rinovirus* (rinovírus humano incluindo pelo menos 113 subtipos; outros rinovírus), o género *Aptovirus* (Febre aftosa (FMDV); a família *Calciviridae*, incluindo o vírus da exantema vesicular suína, vírus do leão marinho de São Miguel, picornavírus felino e vírus de Norwalk; a família *Togaviridae*, incluindo o género *Alfavirus* (vírus da encefalite equina oriental, vírus da floresta de Semliki, vírus *Sindbis*, vírus *Chikungunya*, vírus *O'Nyong-Nyong*, vírus do rio Ross, vírus da encefalite equina Venezuelana, vírus da encefalite equina oriental), o género *Flavivirus* (vírus da febre amarela transmitido por mosquito, vírus da dengue, vírus da encefalite japonesa, vírus da encefalite de St. Louis, vírus da encefalite do Vale Murray, vírus do Oeste do Nilo, vírus *Kunjin*, vírus transmitido por carrapatos da Europa Central, vírus transmitidos por carrapatos do Extremo Oriente, vírus da floresta de Kyasanur, vírus *Louping III*, vírus *Powassan*, vírus da febre hemorrágica de Omsk), o género *Rubivirus* (vírus da Rubéola), o género *Pestivirus* (vírus da doença Mucosal, vírus hog-cólera, vírus da doença de Border); a família *Bunyaviridae*, incluindo o género *Bunyavirus* (vírus *Bunyamwera* e vírus relacionados, vírus da

encefalite da Califórnia), o género *Flebovirus* (vírus siciliano da febre de papatasii, vírus da febre do vale do Rift), o género *Nairovirus* (vírus da febre hemorrágica da Crimeia-Congo, vírus da doença do carneiro de Nairobi) e o género *Uukuvirus* (Uukuniemi e vírus relacionados); a família *Orthomyxoviridae*, incluindo o género *Influenzavirus* (influenzavirus tipo A, muitos subtipos humanos); *Influenzavirus* de suínos e *Influenzavirus* aviários e equinos; *Influenza* tipo B (muitos subtipos humanos) e *Influenza* tipo C (possível género separado); a família *Paramyxoviridae*, incluindo o género *Paramyxovirus* (parainfluenzavirus tipo 1, vírus Sendai, vírus por Hemadsorption, parainfluenzavirus tipos 2 a 5, vírus da doença de Newcastle, vírus da parotidite epidémica), o género *Morbillivirus* (vírus do sarampo, vírus da panencefalite esclerosante subaguda, vírus da raiva, vírus Rinderpest), o género *Pneumovirus* (vírus sincicial respiratório (RSV), vírus sincicial respiratório bovino e vírus da pneumonia de murganhos); vírus da floresta, vírus Sindbis, vírus Chikungunya, vírus O'Nyong-Nyong, vírus do rio Ross, vírus da encefalite equina Venezuelana, vírus da encefalite equina oriental), o género *Flavivirus* (vírus da febre amarela transmitido por mosquito, vírus da dengue, vírus da encefalite japonesa, vírus da encefalite de St. Louis, vírus da encefalite do Vale Murray, vírus do Oeste do Nilo, vírus Kunjin, vírus transmitido por carrapatos da Europa Central, vírus transmitidos por carrapatos do Extremo Oriente, vírus da floresta de Kyasanur, vírus Louping III, vírus Powassan, vírus da febre hemorrágica de Omsk), o género *Rubivirus* (vírus da Rubéola), o género *Pestivirus* (vírus da doença Mucosal, vírus hog-cólera, vírus da doença de Border); a família *Bunyaviridae*, incluindo o género *Bunyavirus* (vírus Bunyamwera e vírus relacionados, vírus da encefalite da Califórnia), o género *Flebovirus* (vírus siciliano da febre de papatasii, vírus da febre do vale do Rift), o género *Nairovirus* (vírus da febre hemorrágica da Crimeia-Congo, vírus da doença do carneiro de Nairobi) e o género *Uukuvirus* (Uukuniemi e

vírus relacionados); a família *Orthomyxoviridae*, incluindo o género *influenzavírus* (*influenzavírus* tipo A, muitos subtipos humanos); *influenzavírus* de suínos e *influenzavírus* aviários e equinos; *influenza* tipo B (muitos subtipos humanos) e *influenza* tipo C (possível género separado); a família *Paramyxoviridae*, incluindo o género *Paramyxovirus* (*parainfluenzavírus* tipo 1, vírus Sendai, vírus por Hemadsorption, *parainfluenzavírus* tipos 2 a 5, vírus da doença de Newcastle, vírus da parotidite epidémica), o género *Morbillivírus* (vírus do sarampo, vírus da panencefalite esclerosante subaguda, vírus da raiva, vírus Rinderpest), o género *Pneumovírus* (vírus sincicial respiratório (RSV), vírus sincicial respiratório bovino e vírus da pneumonia de murganhos); a família *Rhabdoviridae*, incluindo o género *Vesiculovírus* (VSV), Chandipura vírus vírus, Flanders-Hart Park), o género *Lyssavírus* (vírus da raiva), *Rhabdovírus* de peixes e dois *Rhabdovírus* prováveis (vírus Marburg e vírus Ebola); a família *Arenaviridae*, incluindo o vírus da coriomeningite linfocítica (LCM), vírus do complexo Tacaribe e vírus Lassa; a família *Coronaviridae*, incluindo o vírus da bronquite infecciosa (IBV), vírus da hepatite do murganho, coronavírus entérico humano e peritonite infecciosa Felina (coronavírus Felino).

Os vírus ADN ilustrativos que são antigénios em animais vertebrados incluem, mas não se limitam a: família *Poxviridae*, incluindo o género *Orthopoxvírus* (variola maior, variola menor, variola do macaco, variola da vaca, variola do búfalo, variola do coelho, Ectromelia), o género *Leporipoxvírus* (Mixoma, Fibroma), o género *Avipoxvírus* (pox aviária, outros poxvírus aviário), o género *Capripoxvírus* (variola do carneiro, variola da cabra), o género *Suipoxvírus* (variola do suíno), o género *Parapoxvírus* (vírus da dermatite postular contagiosa, pseudo-variola bovina, vírus da estomatite papular bovina); a família *Iridoviridae* (vírus da febre suína africana, vírus de sapo 2 e 3, vírus *Lymphocystis* de peixe);

a família *Herpesviridae*, incluindo os alfa-herpesvírus (herpes simplex tipos 1 e 2, varicela-zóster, vírus do aborto equino, herpesvírus equino 2 e 3, vírus da pseudo-raiva, vírus da ceratoconjuntivite infecciosa bovina, vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina, vírus da rinotraqueíte felina, vírus da laringotraquite infecciosa), os beta-herpesvírus (citomegalovírus humano e citomegalovírus de suínos, macacos e roedores); os gama-herpesvírus (vírus Epstein-Barr (EBV), vírus da doença de Marek, herpes saimiri, herpesvírus de ateles, herpesvírus sylvilagus, herpesvírus do porquinho-da-índia, vírus do tumor de Lucke); a família *Adenoviridae*, incluindo o género Mastadenovírus (subgrupos humanos A,B,C,D,E e não agrupados; adenovírus símios (pelo menos 23 serotipos), hepatite canina infecciosa e adenovírus bovino, de porcos, carneiros, sapos e muitas outras espécies, o género Aviadenovírus (adenovírus aviário); e adenovírus não cultiváveis; a família *Papoviridae*, incluindo o género Papilomavírus (vírus do papiloma humano, vírus do papiloma bovino, vírus do papiloma Shope de coelho e vários vírus de papilomas patogénicos de outras espécies), o género Poliomavírus (poliomavírus, agente "vacuolating" símio (SV-40), agente "vacuolating" de coelho (RKV), vírus K, vírus BK, vírus JC e outros vírus de polioma de primatas, tais como vírus do papiloma Linfotrófico); a família *Parvoviridae* incluindo o género de vírus adeno-associados, o género Parvovírus (vírus da panleucopenia felina, parvovírus bovino, parvovírus canino, vírus da doença aleutiana da marta, etc.). Finalmente, os vírus ADN podem incluir vírus que não se encaixam nas famílias acima, tais como os vírus das doenças de Kuru e Creutzfeldt-Jacob e agentes neuropáticos infecciosos crónicos (vírus CHINA).

Cada uma das listas anteriores são ilustrativas e não pretendem ser limitativas.

Para além da utilização dos oligonucleótidos CpG para induzir uma resposta imunológica específica para o antigénio em humanos, os produtos ou composições das formas de realização preferidas são particularmente bem adequados para o tratamento de aves, tais como galinhas, frangos, perus, patos, gansos, codornizes e faisões. As aves são alvos primários para muitos tipos de infecções.

As aves chocadas são expostas a microrganismos patogénicos logo depois do nascimento. Embora estas aves sejam inicialmente protegidas com patogénios por anticorpos maternos, esta protecção é apenas temporária e o sistema imunológico imaturo da própria ave tem de começar a proteger a ave contra os agentes patogénicos. Geralmente, é desejável evitar infecção em aves jovens quando as mesmas são mais susceptíveis. É também desejável prevenir contra infecção em aves mais velhas, especialmente quando as aves estão abrigadas em lugares fechados, que levam à rápida propagação da doença. Deste modo, é desejável administrar às aves o oligonucleótido CpG e o adjuvante não ácido nucleico da invenção para aumentar uma resposta imunológica específica para o antigénio quando o antigénio está presente.

Um exemplo de uma infecção comum em galinhas é o vírus da anemia infecciosa das galinhas (CIAV). O CIAV foi isolado pela primeira vez no Japão em 1979 durante uma investigação de uma interrupção de vacinação contra a doença de Marek (Yuasa *et al.*, 1979, *Avian Dis.* 23:366-385). Desde aquele tempo, o CIAV foi detectado em aviários comerciais na maior parte dos países produtores de aves (van Bulow *et al.*, 1991, pp.690-699) em *Diseases of Poultry*, 9th edition, Iowa State University Press).

A infecção por CIAV resulta numa doença clínica, caracterizada pela anemia, hemorragia e imunossupressão em galinhas jovens susceptíveis. A atrofia do timo e da medula óssea e lesões

consistentes de galinhas infectadas com CIAV são também características da infecção por CIAV. A depleção de linfócitos no timo e, ocasionalmente, na bursa de Fabricius, resulta em imunossupressão e aumentada susceptibilidade a infecções virais, bacterianas ou fúngicas secundárias que, então, complicam o curso da doença. A imunossupressão pode provocar doença agravada depois da infecção com um ou mais dos vírus da doença de Marek (MDV), vírus da doença bursal infecciosa, vírus da reticuloendoteliose, adenovírus ou reovírus. Foi registado que a patogénese do MDV é intensificada pelo CIAV (DeBoer et al., 1989, p. 28 em *Proceedings of the 38th Western Poultry Diseases Conference*, Tempe, Ariz.). Além disso, foi registado que o CIAV agrava os sinais da doença bursal infecciosa (Rosenberger et al., 1989, *Avian Dis.* 33:707-713). As galinhas desenvolvem uma resistência com a idade à doença induzida experimentalmente devido a CAA. Isto é essencialmente completo em torno da idade de 2 semanas, porém, aves mais velhas são ainda susceptíveis a infecção (Yuasa, N. et al., 1979 *supra*; Yuasa, N. et al., *Avian Diseases* 24, 202-209, 1980). No entanto, se as aves forem infectadas duplamente com CAA e um agente imunossupressor (IBDV, MDV, etc.) a resistência com a idade contra a doença é retardada (Yuasa, N. et al., 1979 e 1980 *supra*; Bulow von V. et al., *J. Veterinary Medicine* 33, 93-116, 1986). As características do CIAV que podem potenciar a transmissão da doença incluem a alta resistência à desactivação ambiental e alguns desinfectantes comuns. O impacto económico da infecção por CIAV na indústria de aves é clara a partir do facto de que 10% a 30% das aves infectadas em surtos de doença, morrem.

A vacinação de aves, como de outros animais vertebrados, pode ser realizada em qualquer idade. Normalmente, as vacinações são realizadas até 12 semanas de idade para um microrganismo vivo e entre 14-18 semanas para um microrganismo desactivado ou outro tipo de vacina. Para a vacinação *in ovo*, a vacinação pode ser realizada

na última quarta parte do desenvolvimento do embrião. A vacina pode ser administrada por via subcutânea, por pulverização, por via oral, intraocular, intratraqueal, nasal ou por meio de outros métodos de administração mucosal aqui descritos. Deste modo, o oligonucleótido CpG da invenção pode ser administrado a aves e outros vertebrados não humanos utilizando esquemas de vacinação de rotina e o antigénio é administrado depois de um período de tempo apropriado conforme aqui descrito.

Bovídeos e gado são também susceptíveis a infecção. A doença que afecta estes animais pode produzir graves perdas económicas, especialmente entre os bovídeos. Os métodos da invenção podem ser utilizados para proteger contra infecção em gado, tal como vacas, cavalos, porcos, ovelhas e cabras.

As vacas podem ser infectadas com vírus de bovídeos. O vírus da diarreia viral bovina (BVDV) é um pequeno vírus ARN envelopado de fita positiva e é classificado, juntamente com o vírus da cólera suína (HOCV) e o vírus da doença de fronteira de ovinos (BDV), no género pestivirus. Embora os Pestivirus tenham sido anteriormente classificados na família *Togaviridae*, alguns estudos sugerem a sua reclassificação na família *Flaviviridae*, juntamente como os flavivirus e grupos de vírus da Hepatite C (HCV) (Francki, et al., 1991).

O BVDV, que é um importante agente patogénico de bovídeos que pode ser distinguido, com base em análise de cultura de célula, nos biótipos citopatogénicos (CP) e não citopatogénicos (NCP). O biótipo NCP é mais disseminado, embora ambos os tipos possam ser encontrados em gado. Se uma vaca grávida torna-se infectada com uma estirpe de NCP, a vaca por dar a luz a um vitelo persistentemente infectado e especificamente imunotolerante que espalhará o vírus durante toda a sua vida. O bovídeo persistentemente infectado pode

sucumbir à doença mucosal e ambos os biótipos podem, então, ser isolados do animal. As manifestações clínicas podem incluir aborto, teratogénese e problemas respiratórios, doença mucosal e diarreia suave. Além disso, tem sido descrita grave trombocitopenia associada com a epidemia do rebanho que pode resultar na morte do animal e as estirpes associadas com esta doença parecem mais virulentas do que o BVDV clássico.

O herpesvírus equino (EHV) compreende um grupo de agentes biologicamente distintos do ponto de vista antigénico que provocam uma diversidade de infecções em cavalos que variam de doença subclínica a fatal. Estas incluem o herpesvírus Equino-1 (EHV-1), um agente patogénico sempre presente em cavalos. O EHV-1 está associado com a epidemia de abortos, doença do tracto respiratório e distúrbios do sistema nervoso central. A infecção primária do tracto respiratório superior de cavalos jovens resulta numa doença febril que persiste por 8 a 10 dias. As éguas imunologicamente experientes podem ser reinfectadas através do tracto respiratório sem que a doença se torne evidente, de modo que o aborto ocorre, geralmente, sem aviso. A síndrome imunológica é associada com doença respiratória ou aborto e pode afectar animais de qualquer sexo em qualquer idade, levando à descoordenação, fraqueza e posterior paralisia (Telford, E.A.R. *et al.*, *Virology* 189, 304-316, 1992). Outros EHV's incluem EHV-2 ou citomegalovírus equino, EHV-3, vírus exantema coital equino e EHV-4, anteriormente classificado como EHV-1 do subtipo 2.

Ovelhas e cabras podem ser infectadas por uma variedade de microrganismos perigosos incluindo visna-maedi.

Os primatas, tais como os símios e macacos podem ser infectados pelo vírus da imunodeficiência dos símios. Foi registado que vacinas de vírus de célula desactivada e de célula livre

inteira contra a imunodeficiência dos símios oferecem protecção em macacos (Stott et al., (1990) *Lancet* 36:1538-1541; Desrosiers et al., PNAS EUA (1989) 86:6353-6357; Murphey-Corb et al., (1989) *Science* 246:1293-1297; e Carlson et al., (1990) *AIDS Res. Human Retroviruses* 6:1239-1246). Uma vacina recombinante de HIV gp120 foi registada por oferecer protecção em chimpanzés (Berman et al., (1990) *Nature* 345:622-625).

Os gatos, tanto domésticos como selvagens, são susceptíveis à infecção com uma variedade de microrganismos. Por exemplo, a peritonite infecciosa felina é uma doença que ocorre tanto em gatos domésticos como selvagens, tais como leões, leopardos, chitas e jaguares. Quando é desejável evitar infecções com este e outros tipos de organismos patogénicos em gatos, os produtos e composições da invenção podem ser utilizados para vacinar os gatos para os proteger contra infecção.

Os gatos domésticos podem tornar-se infectados com vários retrovírus, incluindo, mas não limitado ao vírus da leucemia felina (FeLV), vírus do sarcoma felino (FeSV), oncornavírus endógeno tipo C (RD-114) e vírus formador de sincícia felina (FeSFV). Destes, o FeLV é o patogénio mais significativo, provocando diversos sintomas, incluindo neoplasmas linfo-reticulares e mielóides, anemias, distúrbios imuno-mediados e uma síndrome de imunodeficiência que é semelhante à síndrome da imunodeficiência adquirida humana (SIDA). Recentemente, um mutante de replicação defeituosa particular, designado como FeLV-SIDA foi mais particularmente associado às propriedades imunossupressoras.

A descoberta do lentivirus T-linfotrópico felino (também referido como imunodeficiência felina) foi primeiro registada em Pedersen et al., (1987) *Science* 235:790-793. As características do FIV foram registadas em Yamamoto et al., (1988) *Leukemia, December*

Supplement 2:204S-215S; Yamamoto et al., (1988) *Am. J. Vet. Res.* 49:1246-1258; e Ackley et al., (1990) *J. Virol.* 64:5652-5655. A clonagem e a análise das sequências do FIV foram registradas em Olmsted et al., (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 86:2448-2452 e 86:43554360.

A peritonite infecciosa felina (FIP) é uma doença esporádica que ocorre de forma imprevisível em *Felidae* domésticos e selvagens. Embora a FIP seja, principalmente, uma doença de gatos domésticos, foi diagnosticada em leões, leopardos, chitas e jaguares. Os gatos selvagens menores que já foram afligidos com a FIP incluem o lince e o caracal, o gato das areias e o gato de Pallas. Nos gatos domésticos, a doença ocorre, predominantemente, em animais jovens, embora gatos de todas as idades sejam susceptíveis. Uma incidência de pico ocorre entre 6 e 12 meses de idade. Um declínio em incidência é observado de 5 a 13 anos de idade, seguido por uma incidência aumentada em gatos de 14 a 15 anos de idade.

As doenças virais, bacterianas e parasíticas em peixes de barbatanas, moluscos ou outras formas de vida aquática representam um sério problema para a indústria de aquacultura. Devido à alta densidade de animais nos tanques de incubação ou áreas de produção de formas marinhas encerradas, as doenças infecciosas podem erradicar uma grande porção da população, por exemplo, das dependências de peixes de barbatanas, moluscos ou outras formas de vida aquática. A prevenção da doença é um remédio mais desejável às ameaças aos peixes do que a intervenção, uma vez que a doença está em progresso. A vacinação dos peixes é o único método preventivo que pode oferecer proteção a longo prazo através da imunidade. As vacinações à base de ácido nucleico estão descritas na Patente US No. 5.780.448 publicada por Davis.

O sistema imunológico dos peixes tem muitas características semelhantes ao sistema imunológico dos mamíferos, tais como a presença de células B, células T, linfocinas, complemento e imunoglobulinas. Os peixes têm subclasses de linfócitos com funções que, em muitos aspectos, parecem semelhantes àqueles das células B e T dos mamíferos. As vacinas podem ser administradas por imersão ou por via oral.

As espécies em aquacultura incluem, mas não se limitam a peixes de barbatana, moluscos e outros animais aquáticos. Os peixes de barbatanas incluem todos os peixes vertebrados que podem ser peixes de ossos ou cartilagem, tais como, por exemplo, os salmonídeos, a carpa, o peixe-gato, o cantarilho rabo-amarelo, o garapau e o robalo. Os salmonídeos são uma família de peixes de barbatanas que inclui a truta (incluindo a truta arco-íris), o salmão, e o salvelino ártico. Exemplos de moluscos incluem, mas não se limitam a berbigões, lagostas, camarões, caranguejos e ostras. Outros animais aquáticos cultivados incluem, mas não se limitam a enguias, lulas e polvos.

Os polipéptidos de patogénios virais de aquacultura incluem, mas não se limitam a glucoproteína (G) ou nucleoproteína (N) de vírus da septicemia hemorrágica viral (VHSV); proteínas G ou N do vírus da necrose hematopoiética infecciosa (IHNV); proteínas estruturais VP1, VP2, VP3 ou N do vírus da necrose pancreática infecciosa (IPNV); proteína G da viremia de primavera da carpa (SVC); e uma proteína associada a membrana, proteína tegumina ou capsid ou glicoproteína do vírus do peixe-gato pontuado (CCV).

Os péptidos de patogénios bacterianos incluem, mas não se limitam a uma proteína de membrana externa regulada com ferro, (IROMP), ou uma proteína de membrana externa (OMP) e uma proteína A de *Aeromonas salmonicida* que provoca furunculose, a proteína p57 de

Renibacterium salmonarum que provoca a doença bacteriana do fígado (BKD), antígeno associado à superfície principal (msa), uma citotoxina expressa na superfície (mpr), uma hemolisina expressa na superfície (ish,) e um antígeno flagelar de *Yersiniosis*; uma proteína extracelular (EPC), uma proteína de membrana externa regulada com ferro (IROMP) e uma proteína estrutural de *Pasteurellosis*; uma proteína OMP e flagelar de *Vibrios anguillarum* e *V. ordalii*; uma proteína flagelar, uma proteína OMP, *aroA* e *purA* de *Edwardsiella ictaluri* e *E. tarda*; e antígeno de superfície de *Ichthyophthirius*; e uma proteína estrutural e reguladora de *Cytophaga columnari*; e uma proteína estrutural e reguladora de *Rickettsia*.

Os polipéptidos de um patógeno parasítico incluem, mas não se limitam ao antígeno de superfície de *Ichthyophthirius*.

Um "alergénio" refere-se a uma substância (antígeno) que pode induzir uma resposta alérgica ou asmática num indivíduo susceptível. A lista de alergénios é enorme e pode incluir pólenes, insectos venenosos, pó de dander de animal, esporos fungais e fármacos (por exemplo, a penicilina). Exemplos de alergénios naturais, animais e plantas incluem, mas não se limitam a proteínas específicas aos seguintes géneros: *Canine* (*Canis familiaris*); *Dermatophagoides* (por exemplo, *Dermatophagoides farinae*); *Felis* (*Felis domesticus*); *Ambrosia* (*Ambrosia artemisiifolia*); *Lolium* (por exemplo, *Lolium perenne* ou *Lolium multiflorum*); *Cryptomeria* (*Cryptomeria japonica*); *Alternaria* (*Alternaria alternata*); *Alder*; *Alnus* (*Alnus glutinosa*); *Betula* (*Betula verrucosa*); *Quercus* (*Quercus alba*); *Olea* (*Olea europaea*); *Artemisia* (*Artemisia vulgaris*); *Plantago* (por exemplo, *Plantago lanceolata*); *Parietaria* (por exemplo, *Parietaria officinalis* ou *Parietaria judaica*); *Blattella* (por exemplo, *Blattella germanica*); *Apis* (por exemplo, *Apis mellifera*); *Cupressus* (por exemplo, *Cupressus sempervirens*,

Cupressus arizonica e *Cupressus macrocarpa*); *Juniperus* (por exemplo, *Juniperus sabinoides*, *Juniperus virginiana*, *Juniperus communis* e *Juniperus ashei*); *Thuja* (por exemplo, *Thuja orientalis*); *Chamaecyparis* (por exemplo, *Chamaecyparis obtusa*); *Periplaneta* (por exemplo, *Periplaneta americana*); *Agropyron* (por exemplo, *Agropyron repens*); *Secale* (por exemplo, *Secale cereale*); *Triticum* (por exemplo, *Triticum aestivum*); *Dactylis* (por exemplo, *Dactylis glomerata*); *Festuca* (por exemplo, *Festuca elatior*); *Poa* (por exemplo, *Poa pratensis* ou *Poa compressa*); *Avena* (por exemplo, *Avena sativa*); *Holcus* (por exemplo, *Holcus lanatus*); *Anthoxanthum* (por exemplo, *Anthoxanthum odoratum*); *Arrhenatherum* (por exemplo, *Arrhenatherum elatius*); *Agrostis* (por exemplo, *Agrostis alba*); *Phleum* (por exemplo, *Phleum pratense*); *Phalaris* (por exemplo, *Phalaris arundinacea*); *Paspalum* (por exemplo, *Paspalum notatum*); *Sorghum* (por exemplo, *Sorghum halepensis*); e *Bromus* (por exemplo, *Bromus inermis*).

O antígeno pode ser um antígeno que é codificado por um vector de ácido nucleico ou pode não ser codificado num vector de ácido nucleico. No primeiro caso, o vector de ácido nucleico é administrado ao indivíduo e o antígeno é expresso *in vivo*. No segundo caso, o antígeno é administrado directamente ao indivíduo. Um "antígeno não codificado num vector de ácido nucleico" conforme utilizado neste contexto, refere-se a qualquer tipo de antígeno que não é um ácido nucleico. Por exemplo, em alguns aspectos da invenção, o antígeno não codificado num vector de ácido nucleico é um polipéptido. Modificações mínimas das sequências de aminoácido primárias também podem resultar num polipéptido que tem actividade antigénica substancialmente equivalente em comparação com o polipéptido equivalente não modificado. Tais modificações podem ser deliberadas, tais como a mutagénese dirigida pelo sítio, ou podem ser espontâneas. Todos os polipéptidos produzidos por estas modificações estão incluídas aqui, desde que ainda exista

antigenicidade. O polipéptido pode ser, por exemplo, um polipéptido viral. Um exemplo não limitativo de um antígeno útil de acordo com a invenção é o antígeno de superfície da hepatite B. Experiências utilizando este antígeno estão descritas nos Exemplos adiante.

O termo "substancialmente purificado", conforme utilizado neste contexto refere-se a um polipéptido que é substancialmente livre de outras proteínas, lípidos, hidratos de carbono e outros materiais com os quais está naturalmente associado. Um especialista na técnica pode purificar polipéptidos virais ou bacterianos utilizando técnicas padrão para purificação de proteínas. O polipéptido substancialmente puro muitas vezes produzirá uma única banda principal sobre um gel de poliacrilamida não redutor. No caso de polipéptidos parcialmente glicosilados ou aqueles que têm vários codons de partida, pode haver várias bandas sobre um gel de poliacrilamida não redutor, mas estes formarão um padrão distinto para aquele péptido. A pureza do polipéptido viral ou bacteriano também pode ser determinada por meio da análise de sequência de aminoácido do terminal amino.

A invenção também utiliza polinucleótidos que codificam os polipéptidos antigénicos. É previsto que o antígeno possa ser administrado ao indivíduo numa molécula de ácido nucleico que codifique para o antígeno, de tal modo que o antígeno tem de ser expresso *in vivo*. Tais antígenos administrados ao indivíduo num vector de ácido nucleico são referidos como "antígenos codificados por um vector de ácido nucleico". O ácido nucleico que codifica o antígeno está ligado operativamente a uma sequência de expressão de gene que dirige a expressão do ácido nucleico do antígeno no interior de uma célula eucariótica. A "sequência de expressão de gene" é qualquer sequência nucleótida reguladora, tal como uma sequência promotora ou combinação de promotora-intensificadora, que facilita a transcrição e a translação eficiente do ácido nucleico

do antígeno ao qual está ligada operativamente. A sequência de expressão do gene pode, por exemplo, ser um promotor mamífero ou viral, tal como um promotor constitutivo ou indutível. Os promotores mamíferos constitutivos incluem, mas não se limitam aos promotores para os seguintes genes: hipoxantina fosforibosil transferase (HPTR), adenosina deaminase, piruvato cinase, o promotor β -actina e outros promotores constitutivos. Os promotores virais exemplificativos que funcionam de forma constitutiva em células eucarióticas incluem, por exemplo, os promotores de citomegalovírus (CMV), vírus símio (por exemplo SV40), vírus do papiloma, adenovírus, vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus do sarcoma Rous, citomegalovírus, repetições do terminal longo (LTR) do vírus da leucemia de Moloney e outros retrovírus e a timidina cinase promotora do vírus herpes simplex. Outros promotores constitutivos são conhecidos daqueles com conhecimento corrente da técnica. Os promotores úteis como sequências de expressão de gene da invenção também incluem os promotores indutíveis. Os promotores indutíveis são expressos na presença de um agente de indução. Por exemplo, o promotor metalotioneína é induzido a promover a transcrição e a tradução na presença de certos íons de metal. Outros promotores indutíveis são conhecidos daqueles com conhecimento corrente da técnica.

De um modo geral, a sequência de expressão do gene inclui, conforme necessário, as sequências não transcritoras 5' e não tradutoras 5' envolvidas com a iniciação de transcrição e tradução, respectivamente, tal como um TATA-box, sequência de coroamento (capping), sequência CAAT e outras. Especialmente, tais sequências não transcritoras 5' incluirão uma região promotora que inclui uma sequência promotora para o controle transcripcional do ácido nucleico do antígeno unido funcionalmente. As sequências de expressão de gene, opcionalmente, incluem sequências

intensificadoras ou sequências activadoras a montante, conforme desejado.

O ácido nucleico do antígeno é funcionalmente ligado à sequência de expressão do gene. Conforme utilizado neste contexto, a sequência do ácido nucleico do antígeno e a sequência de expressão do gene são referidas como sendo "ligadas funcionalmente" quando as mesmas estão ligadas de forma covalente, de tal modo a colocar a expressão ou transcrição e/ou tradução da sequência de codificação de antígeno sob a influência ou controlo da sequência de expressão de gene. Duas sequências de ADN são referidas como funcionalmente ligadas se a indução de um promotor na sequência de expressão de gene 5' resulta na transcrição da sequência do antígeno e se a natureza da ligação entre as duas sequências de ADN não (1) resulta na introdução de uma mutação de deslocação de estrutura, (2) interfere com a capacidade da região promotora de dirigir a transcrição da sequência do antígeno, ou (3) interfere com a capacidade do transcrito de ARN correspondente de ser traduzido numa proteína. Deste modo, uma sequência de expressão de gene seria ligada funcionalmente a uma sequência de ácido nucleico do antígeno se a sequência de expressão do gene fosse capaz de efectuar a transcrição daquela sequência de ácido nucleico do antígeno de tal modo que o transcrito resultante é traduzido na proteína ou polipéptido desejado.

O ácido nucleico do antígeno da invenção pode ser administrado ao sistema imunológico só ou em associação com um vector. No seu sentido mais lato, um "vector" é qualquer veículo capaz de facilitar a transferência do ácido nucleico do antígeno para as células do sistema imunológico de modo que o antígeno possa ser expresso e apresentado sobre a superfície da célula imunológica. De um modo geral, o vector transporta o ácido nucleico para as células imunológicas com degradação reduzida em relação ao

grau de degradação que resultaria na ausência do vector. Opcionalmente, o vector inclui a sequência de expressão de gene acima descrita para aumentar a expressão do ácido nucleico do antigénio nas células imunocompetentes. De um modo geral, os vectores úteis na invenção incluem, mas não se limitam a plasmídeos, fagemídeos, vírus, outros veículos derivados de fontes virais ou bacterianas que foram manipulados pela inserção ou incorporação das sequências de ácido nucleico do antigénio. Os vectores virais são um tipo preferido de vector e incluem, mas não se limitam a sequências de ácido nucleico dos seguintes vírus: retrovírus, tal como o vírus da leucemia murina de Monoley, vírus do sarcoma murino de Harvey, vírus do tumor mamário murino e vírus do sarcoma de Rous; adenovírus, vírus adeno-associados; vírus do tipo SV40; vírus políoma; vírus Epstein-Barr; vírus papiloma; vírus herpes; vírus vaccinia; vírus pólio; e vírus ARN, tais como um retrovírus. Pode-se prontamente utilizar outros vectores não indicados, mas conhecidos na técnica.

Os vectores virais preferidos têm como base os vírus eucarióticos não citopáticos nos quais os genes não essenciais foram substituídos pelo gene de interesse. Os vírus não citopáticos incluem os retrovírus, cujo ciclo de vida envolve a transcrição reversa de ARN viral genómica em ADN com a subsequente integração proviral no ADN celular hospedeiro. Os retrovírus foram aprovados para ensaios terapêuticos em gene humano. Os mais úteis são aqueles retrovírus que têm replicação deficiente (isto é, capazes de dirigir a síntese das proteínas desejadas, mas incapazes de fabricar uma partícula infecciosa). Tais vectores de expressão viral geneticamente alterados têm utilidade geral para a transdução de genes *in vivo* de alta eficiência. Protocolos padrão para produzir retrovírus de replicação deficiente (incluindo os passos da incorporação de material genético exógeno num plasmídeo, transferência de uma embalagem de células revestida com plasmídeo,

produção de retrovírus recombinantes pela embalagem da linha de célula, recolha de partículas virais de meios de cultura de tecido e infecção da célula alvo com partículas virais) são proporcionados em Kriegler, M., *"Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual"*, W.H: Freeman Co.O., Nova Iorque (1990) e Murry, E.J. ed. *"Methods in Molecular Biology"*, vol. 7, Humana Press, Inc., Cliffton, Nova Jérсия (1991).

Um vírus preferido para certas aplicações é o vírus adeno-associado, um vírus de ADN de fita dupla. O vírus adeno-associado pode ser geneticamente modificado para ser de replicação deficiente e é capaz de infectar uma ampla variedade de tipos de células e espécies. Tem outras vantagens, tais como a estabilidade térmica e de solvente lípido; alta frequência de transdução em células de linhagens diversas, incluindo células hemopoiéticas; e falta de inibição a superinfecção permitindo, deste modo séries múltiplas de transduções. Alegadamente, o vírus adeno-associado pode integrar-se ao ADN celular humano de uma maneira específica para o sítio, minimizando, deste modo, a possibilidade de mutagénesse insercional e variabilidade de expressão de gene inserido característica da infecção retroviral. Além disso, as infecções por vírus adeno-associados do tipo selvagem foram seguidas em cultura de tecido para mais de 100 passagens na ausência de pressão selectiva, implicando que a integração genómica do vírus adeno-associado é um evento relativamente estável. O vírus adeno-associado também pode funcionar de uma maneira extracromossomal.

Outros vectores incluem vectores plasmídeos. Os vectores plasmídeos foram extensamente descritos na técnica e são bem conhecidos dos especialistas. Ver, Por exemplo, Sambrook et al., *"Molecular Cloning: A Laboratory Manual"*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. Nos últimos anos, verificou-se que os vectores plasmídeos são particularmente vantajosos para

administrar genes a células *in vivo*, devido à sua incapacidade de replicar no interior de um genoma hospedeiro e integrar-se a ele. Estes plasmídeos, no entanto, tendo um promotor compatível com a célula hospedeira, podem expressar um péptido a partir de um gene funcionalmente codificado no interior do plasmídeo. Alguns plasmídeos geralmente utilizados incluem pBR322, pUC18, pUC19, pRC/CMV, SV40 e pBlueScript. Outros plasmídeos são bem conhecidos daqueles com conhecimento corrente da técnica. Além disso, os plasmídeos podem ser concebidos à medida utilizando enzimas de restrição e reacções de ligação para remover e adicionar fragmentos específicos de ADN.

Foi descoberto, recentemente, que os plasmídeos portadores de gene podem ser administrados ao sistema imunológico utilizando bactérias. Formas modificadas de bactéria, tais como a *Salmonella* podem ser transfectadas com o plasmídeo e utilizadas como veículos de administração. Os veículos de administração de bactérias podem ser administrados a um indivíduo hospedeiro por via oral ou por outros meios de administração. As bactérias administram o plasmídeo às células imunológicas, por exemplo, as células dendríticas, provavelmente atravessando a barreira intestinal. Foram estabelecidos altos níveis de protecção imunológica utilizando esta metodologia. Tais métodos de administração são úteis para os aspectos da invenção que utilizam a administração sistémica de antigénio, oligonucleótido CpG e/ou hormona.

O oligonucleótido CpG pode actuar de uma maneira sinérgica com outros adjuvantes mucosais para intensificar as respostas imunológicas. O oligonucleótido CpG e o adjuvante mucosal podem ser administrados simultaneamente ou sequencialmente. Quando os adjuvantes são administrados simultaneamente, os mesmos podem ser administrados na mesma formulação ou em formulações separadas, mas são administrados ao mesmo tempo. Os adjuvantes são administrados

sequencialmente quando a administração de pelo menos dois adjuvantes é temporalmente separada. A separação no tempo entre a administração dos dois adjuvantes pode ser uma questão de minutos ou pode ser mais prolongada.

Conforme ilustrado na secção de Exemplos, as titulações de soro IgG anti-HBs, que está associado com a imunidade sistémica em murganhos imunizados com oligonucleótido CpG mais CT foram pelo menos 50 vezes maiores do que só com CT ou só com oligonucleótido CpG (Figura 1). Além disso, titulações com 1 µg dos dois adjuvantes juntos produziram resultados melhores do que 10 µg de cada adjuvante isolado. Estes resultados indicam uma acção sinérgica dos dois adjuvantes. Resultados semelhantes também foram obtidos com CpG e LT. Tal sinergia foi verificada tanto para as respostas humorais (Figuras 1-3) como para as respostas mediadas por célula (CTL e proliferação de célula T) (Figura 4). Do mesmo modo, a proporção do isotipo de anticorpos IgG2a foi de cerca de 10 vezes maior com CpG ODN do que CT, indicando uma influência maior de Th1 de CpG ODN em comparação com CT. Além disso, a combinação de CpG ODN e CT deu uma proporção 50 vezes maior de IgG2a:IgG1 do que a CT isolada. Tomados em conjunto, estes resultados indicam uma forte sinergia das respostas imunológicas humorais da combinação de adjuvantes, no que diz respeito tanto à resistência e Th1-bias como das respostas imunológicas celulares (Figura 3).

A marca de qualidade da imunidade mucosal é a presença de anticorpos secretórios IgA em associação com as superfícies mucosais. Os anticorpos IgA são essenciais para evitar a entrada do agente patogénico no corpo. A imunização IN de murganhos só com HBsAg, 1 ou 10 µg, não conseguiu induzir qualquer IgA detectável em lavagens de pulmões. Nem foi encontrado qualquer IgA significativo com uma alta dose de antigénio e baixa dose (1 µg) de CT ou CpT ODN. No entanto, havia IgA significativo com uma alta dose de

antigénio e baixa dose tanto de CT como de CpG ODN ou uma baixa dose de antigénio e uma baixa dose dos adjuvantes combinados. De facto, os níveis de IgA com 1 µg de cada um de CpG ODN e CT combinados foram mais elevados do que com 10 µg de cada um deles isolados, quando administrados com 10 µg de HBsAg (Figura 5). Além disso, o IgA em extractos fecais, que indica a indução da imunidade mucosal em sítios distantes, foi detectado apenas com os adjuvantes combinados (Figura 6). Estes resultados indicam que o CpG ODN é um adjuvante potente para a indução da imunidade mucosal e que há uma forte resposta sinérgica quando utilizado com outro adjuvante mucosal, tal como a CT.

Foram encontrados resultados semelhantes quando a LT foi utilizada no lugar da CT (Figura 7, Tabelas 2 e 3). A CT e a LT, que têm relação próxima com considerável homologia estrutural e funcional, são ambas excessivamente tóxicas para utilização em seres humanos. No entanto, há inúmeras derivações de CT e LT que retêm alguma actividade do adjuvante e, no entanto, são muito menos tóxicas. Um exemplo é a subunidade B da CT (CTB) que é não tóxica, uma vez que a toxicidade está associada à subunidade A. Outro exemplo é a LTK63, um mutante geneticamente destoxificado de LT sem actividade enzimática tóxica. Embora estes adjuvantes estejam a ser utilizados em ensaios clínicos humanos, nenhum foi tão forte quanto o CpG ODN para a indução de imunidade sistémica (soro IgG) quando utilizou-se 1 µg de cada (Figura 7). Houve também um efeito sinérgico quando o CpG ODN e a CTB ou LTK63 foram utilizados em conjunto, no entanto, isto foi mais observável em relação ao Th1-bias do que à força da resposta do anticorpo (Figura 7 e Tabela 2). A combinação de CpG ODN e LTK63 também incluía IgA em lavagens de pulmões, embora nenhum adjuvante, por si só, induzisse IgA a concentrações baixas (Tabela 3).

A forte adjuvantividade e a baixa toxicidade do oligonucleótido CpG quando administrado a uma superfície mucosal tem implicações importantes. Permitirá que muitos antígenos sejam administrados às superfícies mucosais para a indução de fortes respostas imunológicas sistêmicas. A administração não invasiva de vacina é desejável para a imunização de crianças, animais, programas de vacinação em massa e também para evitar o risco de ferimento com picada de agulha. Tais vacinas deveriam ser administradas por via intranasal, por meio de gotas nasais ou pulverização nasal ou com um sistema de administração, ou deveriam ser administradas por outras vias (oral, rectal, ocular) a outras superfícies mucosais, incluindo com sistemas de administração diferentes.

A interacção sinérgica do oligonucleótido CpG com os adjuvantes mucosais tem importantes implicações no desenvolvimento das vacinas. Devido à resposta sinérgica é agora possível utilizar doses mais baixas e menos tóxicas de adjuvantes mucosais, tais como a CT, ou outras toxinas relacionadas ou suas subunidades, em conjunto com o oligonucleótido CpG para obter respostas imunológicas ainda melhores com menos toxicidade. Por exemplo, seria possível utilizar o oligonucleótido CpG em combinação com mutantes geneticamente modificados menos tóxicos de CT ou LT, para uma vacina altamente eficaz de toxicidade aceitável. Não só poderia a abordagem de adjuvante combinado ser utilizada vantajosamente com toxinas diferentes, como também com formas de antígeno diferentes e sistemas de administração diferentes a várias vias mucosais. Uma quantidade eficaz, conforme utilizado em relação a este aspecto da invenção, é uma quantidade que produz uma resposta imunológica sinérgica. Uma quantidade sinérgica é aquela quantidade que produz uma resposta imunológica contra um antígeno específico que é maior do que a soma dos efeitos individuais tanto do CpG como do adjuvante mucosal isoladamente.

A invenção também pode ser utilizada em combinação com estratégias de imunização parentérica (por exemplo, injeção intramuscular, intradérmica ou subcutânea) que são normalmente utilizadas para a indução de respostas imunológicas sistêmicas. Extraordinariamente, os murganhos imunizados com HBsAg e tendo o oligonucleótido CpG como pelo menos um adjuvante, quando administrados com uma dose de preparação por via parentérica (IM) e com uma dose de reforço por uma via mucosal (IN) ou com dose de preparação IN e de reforço IM tinham IgG até 10 vezes mais alto (isto é, a resposta humoral sistêmica) do que quando tanto a dose de preparação como a de reforço foram pela via IM (Figura 8). As respostas imunológicas celulares também foram mais fortes com as abordagens combinadas parentérica/mucosal do que só IN ou só IM, conforme indicado por CTL mais forte (Figura 9) e proliferação mais elevada de células T (Figura 10). Enquanto a dose de preparação e de reforço IN produz boas respostas mucosais a dose de preparação e de reforço IM não produz respostas mucosais detectáveis (Figuras 11-13). A abordagem da dose de preparação IM e dose de reforço IN também produz IgA significativo em lavagens de pulmões (Figura 11) e saliva (Figura 12), mas não nas fezes (Figura 13).

Os adjuvantes mucosais úteis de acordo com a invenção são os adjuvantes mucosais não oligonucleótidos. Um "adjuvante mucosal não oligonucleótido", conforme utilizado neste contexto, é um adjuvante que não seja o oligonucleótido CpG que é capaz de induzir uma resposta imunológica mucosal num indivíduo quando administrado a uma superfície mucosal em associação com um antigénio. Os adjuvantes mucosais incluem, mas não se limitam a toxinas bacterianas: por exemplo, a toxina da cólera (CT), derivados da CT incluindo, mas não limitado a CT subunidade B (CTB) (Wu *et al.*, 1998, Tochikubo *et al.*, 1998); CTD53 (Val a Asp) (Fontana *et al.*, 1995); CTK97 (Val a Lys) (Fontana *et al.*, 1995); CTK104 (Tyr a Lys)

(Fontana et al., 1995); CTD53/K63 (Val a Asp, Ser a Lys) (Fontana et al., 1995); CTH54 (Arg a His) (Fontana et al., 1995); CTN107 (His a Asn) (Fontana et al., 1995); CTE114 (Ser a Glu) (Fontana et al., 1995); CTE112K (Glu a Lys) (Yamamoto et al., 1997a); CTS61F (Ser a Phe) (Yamamoto et al., 1997a, 1997b); CTS106 (Pro a Lys) (Douce et al., 1997, Fontana et al., 1995); e CTK63 (Ser a Lys) (Douce et al., 1997, Fontana et al., 1995), toxina Zonula occludens, zot, a enterotoxina termolábil *Escherichia coli*, Toxina Lábil (LT), derivados da LT incluindo mas não limitado a LT subunidade B (LTB) (Verweij et al., 1998); LT7K (Arg a Lys) (Komase et al., 1998, Douce et al., 1995); LT61F (Ser a Phe) (Komase et al., 1998); LT112K (Glu a Lys) (Komase et al., 1998); LT118E (Gly a Glu) (Komase et al., 1998); LT146E (Arg a Glu) (Komase et al., 1998); LT192G (Arg a Gly) (Komase et al., 1998); LTK63 (Ser a Lys) (Marchetti et al., 1998, Douce et al., 1997, 1998, Di Tommaso et al., 1996); e LTR72 (Ala a Arg) (Giuliani et al., 1998), toxina Pertussis, PT. (Lycke et al., 1992, Spangler BD, 1992, Freytag e Clemments, 1999, Roberts et al., 1995, Wilson et al., 1995) incluindo PT-9K/129G (Roberts et al., 1995, Cropley et al., 1995); Derivados de toxina (ver adiante) (Holmgren et al., 1993, Verweij et al., 1998, Rappuoli et al., 1995, Freytag e Clements, 1999); Derivados do lípido A (por exemplo, o lípido monofosforilo A, MPL) (Sasaki et al., 1998, Vancott et al., 1998; Derivados de dipéptido muramilo (MDP) (Fukushima et al., 1996, Ogawa et al., 1989, Michalek et al., 1983, Morisaki et al., 1983); Proteínas da membrana externa bacteriana (por exemplo, proteína A da superfície externa (OspA) lipoproteína de *Borrelia burgdorferi*, proteína da membrana externa de *Neisseria meningitidis*) (Marinaro et al., 1999, Van de Verg et al., 1996); Emulsões óleo-em-água (por exemplo, MF59) (Barchfield et al., 1999, Verschoor et al., 1999, O'Hagan, 1998); Sais de alumínio (Isaka et al., 1998, 1999); e Saponinas (por exemplo, QS21) Aquila Biopharmaceuticals, Inc., Worster, MA) (Sasaki et al., 1998, MacNeal et al., 1998), ISCOMS, MF-59 (uma

emulsão de esqualeno-em-água estabilizada com Span 85 e Tween 80; Chiron Corporation, Emeryville, CA.); a série Seppic ISA de adjuvantes Montanide (por exemplo, Montanide ISA 720; AirLiquide, Paris, França); PROVAX (uma emulsão óleo-em-água contendo um detergente estabilizador e um agente formador de micelas; IDEC Pharmaceuticals Corporation, San Diego, CA); Syntex Adjuvant Formulation (SAF; Syntex Chemicals, Inc., Boulder, CO.); poli[di(carboxilatofenoxi)fosfazeno (polímero PCPP; Virus Research Institute, EUA) e factor de alongamento de Leishmania (Corixa Corporation, Seattle, WA).

Embora a administração mucosal de antígeno seja considerada um pré-requisito para a indução de fortes respostas imunológicas mucosais, é possível induzir forte imunidade mucosal a antígenos administrados sistemicamente, modulando a resposta imune com hormonas esteróides, tais como as descritas para 1,25-di-hidroxi vitamina D₃ [1,25(OH)₂D₃] (Daynes *et al.*, 1996). A invenção inclui também métodos para a administração de oligonucleótido CpG só ou em combinação com outros adjuvantes mucosais e antígeno a indivíduos tratados com hormonas. Cada um dos compostos pode ser administrado em conjunto ou separadamente, por via sistémica ou mucosal. Nalgumas formas de realização o oligonucleótido CpG e o antígeno e, opcionalmente, outros adjuvantes mucosais são administrados por via mucosal e a hormona é administrada por via sistémica. A hormona pode ser dada por via parentérica (por exemplo, injeção subcutânea) ou por via mucosal (por exemplo, por via oral).

As respostas imunológicas mucosais também podem ser induzidas com a co-administração de citocinas com os oligonucleótidos CpG. As respostas imunológicas também podem ser aumentadas por meio da expressão co-linear de citocinas (Bueler & Mulligan, 1996; Chow *et al.*, 1997; Geissler *et al.*, 1997; Iwasaki *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1997) ou moléculas co-estimulatórias B-7 (Iwasaki *et al.*, 1997;

Tsuji et al., 1997). As citocinas podem ser administradas directamente com os oligonucleótidos CpG ou podem ser administradas na forma de um vector de ácido nucleico que codifica a citocina, de tal modo que a citocina pode ser expressa *in vivo*. Numa forma de realização, quando o CpG é administrado na forma de um vector de expressão de plasmídeo, o vector pode codificar a citocina e uma administração separada de citocina não é necessária. O termo "citocina" é utilizado como um nome genérico para um variado grupo de proteínas e péptidos solúveis que actuam como reguladores humorais em concentrações nano- a picomolar e que, seja sob condições normais ou patológicas, modulam as actividades funcionais de células e tecidos individuais. Estas proteínas também mediam as interacções directamente entre as células e regulam os processos que têm lugar no ambiente extracelular. Exemplos de citocinas incluem, mas não se limitam a IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, factor estimulador de colónia granulócito-macrófago (G-CSF), interferão- γ (γ -INF), factor de necrose tumoral (TNF) TGF- β , ligando FLT-3 e ligando CG40.

As citocinas desempenham um papel em dirigir a resposta da célula T. As células auxiliares (CD4+) conduzem a resposta imunológica de mamíferos através da produção de factores solúveis que actuam sobre outras células do sistema imunológico, incluindo outras células T. A maior parte das células auxiliares CD4+ maduras expressam um de dois perfis de citocinas: Th1 ou Th2. As células Th1 expressam IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, GM-CSF e baixos níveis de TNF- α . O subconjunto TH1 promove a hipersensibilidade retardada, imunidade mediada por célula e troca de classe de imunoglobulina para IgG_{2a}. O subconjunto Th2 induz a imunidade humoral activando as células B, promovendo a produção de anticorpos e incluindo a troca de classe para IgG₁ e IgE. Em algumas formas de realização é preferido que a citocina seja uma citocina Th1.

Surpreendentemente, verificou-se que os oligonucleótidos CpG induzem a imunidade mucosal em sítios remotos bem como em sítios locais. Um "sítio remoto", conforme utilizado neste contexto, é um tecido mucosal que está situado numa região do corpo diferente do tecido mucosal à qual o oligonucleótido CpG foi administrado. Por exemplo, se o oligonucleótido CpG for administrado por via intranasal, um sítio remoto seria o revestimento mucosal do intestino.

Para utilização na presente invenção, os ácidos nucleicos podem ser sintetizados de novo utilizando qualquer um de uma série de procedimentos conhecidos na técnica. Por exemplo, o método de b-cianoetil fosforamidite (Beaucage, S. L., e Caruthers, M. H., *Tet. Let.* 22:1859, 1981); o método nucleósido H-fosfonato (Garegg et al., *Tet. Let.* 27:4051-4054, 1986; Froehler et al., *Nucl. Acid. Res.* 14:5399-5407, 1986; Garegg et al., *Tet. Let.* 27:4055-4058, 1986, Gaffney et al., *Tet. Let.* 29:2619-2622, 1988). Estas químicas podem ser realizadas por meio de uma variedade de sintetizadores automáticos de oligonucleótido disponíveis no mercado. Alternativamente, os dinucleótidos CpG podem ser produzidos em larga escala em plasmídeos (ver Sambrook, T., et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., 1989) e separados em pedaços menores ou administrados inteiros. Depois de ser administrado a um indivíduo o plasmídeo pode ser degradado em oligonucleótidos. Os oligonucleótidos podem ser preparados a partir de sequências de ácido nucleicos existentes (por exemplo, genómico ou cADN) utilizando técnicas conhecidas, tais como aquelas que utilizam enzima de restrição, exonucleases e endonucleases.

Para utilização *in vivo*, os ácidos nucleicos são, preferencialmente, relativamente resistentes à degradação (por exemplo, por meio de endo- e exo-nucleases). As estruturas

secundárias, tais como *stem loops*, podem estabilizar os ácidos nucleicos contra a degradação. Alternativamente, a estabilização do ácido nucleico pode ser conseguida por meio de modificações do esqueleto de fosfato. Um tipo de ácido nucleico estabilizado tem, pelo menos, um esqueleto de fosforotioato modificado. Os fosforotioatos podem ser sintetizados utilizando técnicas automáticas que utilizam seja a química de fosforamidato seja de H-fosfonato. Os fosfonatos de arilo e alquilo podem ser feitos, por exemplo, conforme descrito na Patente US No. 4.469.863; e os alquilfosfotriésteres (em que o a unidade do oxigénio carregado é alquilada conforme descrito na Patente US No. 5.023.243 e na Patente Europeia No. 092.574) podem ser preparados por meio de síntese automática da fase sólida utilizando reagentes disponíveis comercialmente. Foram descritos métodos para fazer outras modificações e substituições ao esqueleto do ADN (Uhlmann, E. e Peyman, A., *Chem. Rev.* 90:544, 1990; Goodchild, J., *Bioconjugate Chem.* 1:165, 1990).

Os ácidos nucleicos contendo um CpG não metilado apropriado podem ser eficazes em qualquer vertebrado. Os ácidos nucleicos diferentes contendo um CpG não metilado podem provocar uma estimulação imunológica óptima dependendo da espécie de mamífero. Deste modo, um oligonucleótido que provoca estimulação óptima em seres humanos pode não causar estimulação óptima num murganho e vice-versa. Um especialista na matéria pode identificar os oligonucleótidos óptimos, úteis para uma espécie em particular de mamíferos de interesse utilizando os ensaios de rotina aqui descritos e/ou conhecidos na técnica, utilizando a orientação aqui fornecida.

O termo "quantidade eficaz" de um oligonucleótido CpG refere-se à quantidade necessária ou suficiente para realizar um efeito biológico desejado. Por exemplo, uma quantidade eficaz de um

oligonucleótido contendo, pelo menos, um CpG não metilado para induzir a imunidade mucosal é aquela quantidade necessária para provocar o desenvolvimento de IgA em resposta a um antigénio após exposição ao antigénio. Em combinação com os ensinamentos aqui proporcionados, seleccionando entre os vários compostos activos e ponderando factores, tais como a potência, biodisponibilidade relativa, peso corporal do doente, gravidade dos efeitos secundários e modo de administração preferido, pode-se planear um regime de tratamento profiláctico ou terapêutico eficaz que não provoca toxicidade substancial e, ainda assim, é totalmente eficaz para tratar o indivíduo em particular. A quantidade eficaz para qualquer aplicação em particular pode variar dependendo de factores, tais como a doença ou estado a ser tratado, o oligonucleótido CpG específico a ser administrado (por exemplo, o número de motivos de CpG não metilados ou a sua localização no ácido nucleico), o antigénio, o tamanho do indivíduo ou a gravidade da doença ou estado. Um especialista na técnica pode determinar, de forma empírica, a quantidade eficaz de um oligonucleótido CpG e antigénio em particular sem necessitar experimentação indevida.

A posologia dos compostos aqui descritos, tipicamente, variam de cerca de 80 mg/dia a 16.000 mg/dia, mais tipicamente, de cerca de 800 mg/dia a 8000 mg/dia e, mais tipicamente, de cerca de 800 mg/dia a 4000 mg/dia. Definido em termos de peso corporal do indivíduo, as dosagens típicas variam de cerca de 1 a 200 mg/kg/dia, mais tipicamente, de cerca de 10 a 100 mg/kg/dia e, mais tipicamente, de cerca de 10 a 50 mg/kg/dia. Definido em termos de áreas de superfície corporal do indivíduo, as dosagens típicas variam de cerca de 40 a 8000 mg/m²/dia, mais tipicamente, de cerca de 400 a 4000 mg/m²/dia e, mais tipicamente, de cerca de 400 a 2000 mg/m²/dia.

Em algumas formas de realização, pelo menos 50 µg do CpG é administrado a um indivíduo. Em outras formas de realização, pelo menos 75 µg, 100 µg, 200 µg, 300 µg, 400 µg, 500 µg, e cada número inteiro entre estes, do CpG é administrado ao indivíduo.

Para qualquer composto aqui descrito a quantidade terapeuticamente eficaz pode ser inicialmente determinada a partir de ensaios de cultura de células. Por exemplo, a quantidade eficaz de oligonucleótido CpG útil para induzir a imunidade mucosal pode ser avaliada por meio dos ensaios *in vitro* descritos acima, no que diz respeito ao índice de estimulação. O índice de estimulação pode ser utilizado para determinar como a quantidade eficaz do oligonucleótido em particular, para o indivíduo em particular e a dosagem podem ser ajustadas para cima e para baixo para atingir os níveis desejados no indivíduo. As quantidades terapeuticamente eficazes também podem ser determinadas a partir de dados humanos para oligonucleótidos CpG que foram testados em seres humanos (ensaios clínicos com humanos foram iniciados) e para os compostos que são conhecidos por exibirem actividades farmacológicas semelhantes, tais como outros adjuvantes mucosais, por exemplo, a LT e outros antigénios com a finalidade de vacinação. A dose aplicada pode ser ajustada com base na biodisponibilidade relativa e potência do composto administrado. Ajustar a dose para atingir a eficácia máxima com base nos métodos descritos acima e outros métodos, conforme são bem conhecidos na técnica, está bem nas habilidades do técnico com conhecimento corrente.

As formulações da invenção são administradas em soluções farmaceuticamente aceitáveis, que podem conter, rotineiramente, concentrações de sal farmaceuticamente aceitáveis, agentes tamponizantes, conservantes, veículos compatíveis, adjuvantes e, opcionalmente, outras substâncias terapêuticas.

Para utilização em terapêutica, uma quantidade eficaz do oligonucleótido CpG pode ser administrada a um indivíduo por qualquer modo que administre o oligonucleótido a uma superfície mucosal. A "administração" da composição farmacêutica da presente invenção pode ser realizada por qualquer meio conhecido do técnico qualificado. As vias de administração preferidas incluem, mas não se limitam à via oral, intranasal, intratraqueal, inalação, ocular, vaginal e rectal.

Para a administração oral, os compostos (isto é, os oligonucleótidos CpG, antigénio, adjuvante mucosal) podem ser prontamente formulados combinando o(s) composto(s) activo(s) com veículos farmacêuticamente aceitáveis bem conhecidos na técnica. Tais veículos permitem que os compostos da invenção sejam formulados como comprimidos, pílulas, drageias, cápsulas, líquidos, géis, xaropes, suspensões espessas, suspensões e outros semelhantes, para a ingestão oral por um indivíduo a ser tratado. As preparações farmacêuticas para utilização oral podem ser obtidas como excipientes sólidos, opcionalmente moendo uma mistura resultante e processando a mistura de grânulos, após adicionar auxiliares adequados, se desejado, para obter comprimidos ou núcleos de drageias. Os excipientes adequados são, em particular, enchimentos tais como açúcares, incluindo lactose, sacarose, manitol ou sorbitol; preparações de celulose tais como, for exemplo, amido de milho, amido de trigo, amido de arroz, amido de batata, gelatina, goma tragacanto, metilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose, carboximetilcelulose de sódio, e/ou polivinilpirrolidona (PVP). Se desejado, pode-se adicionar agentes desintegrantes, tais como polivinilpirrolidona reticulada, agar ou ácido algínico ou um seu sal, tal como o alginato de sódio. Opcionalmente, as formulações orais também podem ser formuladas em solução salina ou tampões para neutralizar as condições ácidas internas.

Os núcleos das drageias são proporcionados com revestimentos adequados. Para esta finalidade, pode-se utilizar soluções de açúcar concentrado que, opcionalmente, podem conter goma arábica, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenoglicol e/ou dióxido de titânio, soluções de laca e solventes orgânicos adequados ou misturas de solventes. Corantes ou pigmentos podem ser adicionados aos revestimentos dos comprimidos ou drageias ou para caracterizar as combinações diferentes de doses do composto activo.

As preparações farmacêuticas que podem ser utilizadas oralmente incluem cápsulas com vedação de encaixe feitas de gelatina, bem como cápsulas vedadas, macias feitas de gelatina e um plasticizante, tal como glicerol ou sorbitol. As cápsulas com vedação de encaixe podem conter a substância activa em mistura com enchimento tal como lactose, ligantes, tais como amidos e/ou lubrificantes tais como talco ou estearato de magnésio e, opcionalmente, estabilizantes. Nas cápsulas macias, os compostos activos podem ser dissolvidos ou suspensos em líquidos adequados, tais como óleos gordos, parafina líquida ou polietilenoglicóis líquidos. Além disso, pode-se adicionar estabilizantes. Pode-se também utilizar microesferas formuladas para a administração oral. Tais microesferas foram bem definidas na técnica. Todas as formulações para administração oral devem ser em dosagens adequadas para tal administração.

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

Para administração por inalação, os compostos para utilização de acordo com a presente invenção podem ser convenientemente administrados na forma de uma apresentação de pulverizador de aerossol a partir de embalagens pressurizadas ou um nebulizador,

com a utilização de propulsor adequado, por exemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluorometano, dióxido de carbono ou outro gás adequado. No caso de um aerossol pressurizado a unidade de dosagem pode ser determinada proporcionando uma válvula para administrar uma quantidade medida. Podem ser formuladas cápsulas e cartuchos, por exemplo de gelatina, para utilização num inalador ou insuflador contendo uma mistura de pó do composto e uma base de pó adequada, tal como lactose ou amido.

Quando é desejável a administração sistémica, os compostos podem ser formulados para administração parentérica por meio de injeção, por exemplo, por injeção bolus ou perfusão contínua. As formulações para injeção podem ser apresentadas na forma de dosagem unitária, por exemplo, em ampolas em recipientes múltiplos com um conservante adicionado. As composições pode tomar formas tais como suspensões, soluções ou emulsões em veículos oleosos ou aquosos e podem conter agentes formulatórios tais como agentes de suspensão, de estabilização e/ou de dispersão.

As formulações farmacêuticas para administração parentérica incluem soluções aquosas dos compostos activos em forma solúvel em água. Além disso, as suspensões dos compostos activos podem ser preparadas como suspensões oleosas apropriadas para injeções. Os solventes ou veículos lipófilos adequados incluem óleos gordos como óleo de sésamo ou ésteres de ácido gordo sintéticos, tais como oleato de etilo ou triglicéridos ou lipossomas. As suspensões aquosas para injeções podem conter substâncias que aumentam a viscosidade da suspensão, tais como carboximetilcelulose de sódio, sorbitol ou dextrano. Opcionalmente, a suspensão também pode conter estabilizantes adequados ou agentes que aumentam a solubilidade dos compostos para permitir a preparação de soluções altamente concentradas.

Alternativamente, os compostos activos podem ser na forma de pó para constituição com um veículo adequado, por exemplo água estéril livre de pirogénio, antes da utilização.

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

Além das formulações descritas anteriormente, os compostos também podem ser formulados como uma preparação de depósito. Tais formulações de actuação prolongada podem ser formuladas com materiais poliméricos ou hidrófobos adequados (por exemplo, como uma emulsão num óleo aceitável) ou resinas de troca de iões ou como derivados pouco solúveis, por exemplo, como sais pouco solúveis.

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

As formas adequadas de preparação farmacêutica líquida ou sólida são, por exemplo, soluções aquosas ou salinas para inalação, microencapsuladas, espirais, revestidas em partículas microscópicas de ouro, contidas em lipossomas, nebulizadas, aerossóis, grânulos para implantação na pele ou secas sobre um objecto afiado para ser arranhado na pele. As composições farmacêuticas também incluem grânulos, pós, comprimidos, comprimidos revestidos, (micro)cápsulas, supositórios, xaropes, emulsões, suspensões, cremes, gotas ou preparações com libertação prolongada dos

compostos activos, em cuja preparação os excipientes e aditivos e/ou auxiliares tais como desintegrantes, aglutinantes, agentes de revestimento, agentes de dilatação, lubrificantes, aromatizantes, edulcorantes ou solubilizantes são habitualmente utilizados, conforme descrito acima. As composições farmacêuticas são adequadas para utilização numa variedade de sistemas de administração de fármaco. Para uma breve análise dos presentes métodos para administração de fármaco, ver Langer, *Science*, 249:1527-1533, 1990.

Os oligonucleótidos CpG e antigénios podem ser administrados *per se* (como tal) ou na forma de um sal farmacêuticamente aceitável. Quando utilizados em medicamentos os sais devem ser farmacêuticamente aceitáveis, mas sais não farmacêuticamente aceitáveis podem ser utilizados de forma conveniente para preparar os seus sais farmacêuticamente aceitáveis. Tais sais incluem, mas não se limitam àqueles preparados a partir dos seguintes ácidos: clorídrico, bromídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, p-tolueno sulfónico, tartárico, cítrico, metano sulfónico, fórmico, malónico, succínico, naftaleno-2-sulfónico e benzeno sulfónico. Além disso, tais sais podem ser preparados como sais de metal alcalino ou alcalino terrosos, tais como sais de sódio, potássio ou cálcio do grupo do ácido carboxílico.

Os agentes tamponizantes 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 uma sal (0,8-2% p/v). Os conservantes adequados incluem cloreto de benzalcónio (0,003-0,03% p/v); clorobutanol (0,3-0,9% p/v); parabenos (0,01-0,25% p/v) e timerosal (0,004-0,02% p/v).

As composições farmacêuticas da invenção contêm uma quantidade eficaz de um oligonucleótido CpG e antigénios incluídos

num veículo farmacêuticamente aceitável. O termo "veículo farmacêuticamente aceitável" significa um ou mais enchimentos compatíveis, sólidos ou líquidos, diluentes ou substâncias encapsulantes que são adequadas para a administração a um ser humano ou outro animal vertebrado. O termo "veículo" indica uma substância orgânica ou inorgânica, natural ou sintética com a qual a substância activa é combinada para facilitar a aplicação. Os componentes para as composições farmacêuticas são também capazes de ser misturadas com os compostos da presente invenção e uns com os outros de uma maneira tal que não haja interacção, o que reduziria, de forma substancial, a eficácia farmacêutica desejada.

Os oligonucleótidos CpG ou antigénios úteis na invenção podem ser administrados em misturas com adjuvante(s) mucosal(is) adicional(is). Uma mistura pode consistir em várias adjuvantes mucosais para além do oligonucleótido CpG ou vários antigénios.

Estão disponíveis várias vias de administração. O modo seleccionado, em particular, dependerá, naturalmente, dos adjuvantes ou antigénios em particular seleccionados, o estado em particular a ser tratado e a dosagem necessária para a eficácia terapêutica. Os métodos desta invenção, de um modo geral, podem ser praticados utilizando qualquer modo de administração que seja aceitável do ponto de vista médico, significando qualquer modo que produza níveis eficazes de uma resposta imunológica sem causar efeitos adversos clinicamente inaceitáveis. Os modos preferidos de administração estão discutidos acima.

As composições podem ser apresentadas, convenientemente, em forma de dosagem unitária e podem ser preparadas por meio de quaisquer métodos bem conhecidos na técnica de farmácia. Todos os métodos incluem o passo de pôr os compostos em associação com um veículo que constitui uma ou mais substâncias acessórias. De um

modo geral, as composições são preparadas pondo os compostos de forma uniforme e íntima em associação com um veículo líquido, um veículo sólido finamente dividido, ou ambos, e, depois, se necessário, modelar o produto. As unidades de doses líquidas são frascos ou ampolas. Para o tratamento de um doente, dependendo da actividade do composto, maneira de administração, finalidade da imunização (isto é, profilática ou terapêutica), natureza e gravidade do distúrbio, idade e peso corporal do doente, podem ser necessárias doses diferentes. A administração de uma certa dose pode ser realizada por administração única na forma de uma unidade de dose individual ou então várias unidades de dose menores. A administração múltipla de doses a intervalos específicos de semanas ou meses de diferença é normal para reforçar as respostas específicas para o antigénio.

Outros sistemas de administração podem incluir sistemas de administração de libertação programada, libertação retardada ou libertação sustentada. Tais sistemas podem evitar administrações repetidas dos compostos, aumentando a conveniência para o doente e para o médico. Muitos tipos de sistemas de administração de libertação estão disponíveis e são conhecidos daqueles com conhecimento corrente da técnica. Estes incluem sistemas à base de polímeros, tais como poli(láctido-glicólido), copolioxalatos, policaprolactonas, poliesteramidas, poliortoésteres, ácido poli-hidroxibutírico e polianidridos. As microcápsulas para os polímeros mencionados contendo fármacos estão descritas, por exemplo, na Patente US No. 5.075.109. Os sistemas de administração também incluem sistemas não poliméricos que são: lípidos que incluem esteróis, tais como colesterol, éster de colesterol e ácidos gordos ou gorduras neutras, tais como, mono- di- e tri-glicéridos; sistemas de libertação de hidrogel; sistemas silásticos; sistemas à base de péptidos; revestimentos de cera; comprimidos prensados utilizando aglutinantes e excipientes convencionais; implantes parcialmente

fundidos e outros. Exemplos específicos incluem, mas não se limitam a: (a) sistemas erosionais, em que um agente da invenção é contido no interior de uma matriz, tais como aqueles descrito nas Patentes US Nos. 4.452.775, 4.675.189 e 5.736.152 e (b) sistemas difusionais, em que um componente activo penetra a uma taxa controlada a partir de um polímero, tal como descrito nas Patentes US Nos. 3.854.480, 5.133.974 e 5.407.686. Além disso, pode-se utilizar hardware de sistemas de administração à base de bomba, alguns dos quais estão adaptados para implante.

A presente invenção é ilustrada, adicionalmente, por meio dos seguintes Exemplos, os quais, de modo algum, devem ser interpretados como mais limitativos.

Exemplos

Exemplo 1: Materiais e Métodos

1. Materiais e Animais

Murganhos. Todas as experiências foram realizadas utilizando murganhos fêmeas BALB/c de 6-8 semanas de idade com 5-10 murganhos por experiência ou grupo de controlo. Para as imunizações intranasais, os murganhos foram ligeiramente anestesiados com Halothane® (Halocarbon Laboratories, River Edge, N.J.).

Adjuvantes: Os murganhos foram imunizados por administração IN de 1 µg de HBsAg (proteína HBV S derivada de plasma, subtipo ad, Genzyme Diagnostics, San Carlos, CA), isoladamente ou combinada com 1 ou 10 µg de CT (purificada de *Vibrio cholerae*, Sigma, St. Louis, MO), LT (purificada de *Escherichia coli*, Sigma), CTB (purificada de *Vibrio cholerae*, Sigma), LTK63 (mutante de LT portando um Ser-Lys na

posição 63, generosamente fornecida pelo Dr. Rino Rappuoli, IRIS, Chiron S.p.A., Itália) e/ou CpG ODN (5'-TCCATGACGTTTCCTGACGTT-3', CpG ODN #1826 SEQ ID NO. 90) ou ODN de controlo não CpG (5'TCCAGGACTTCTCTCAGGTT-3', CpG ODN #1982 SEQ ID NO. 91) (Hybridon Specialty Products, Milford, MA). O antigénio e adjuvante(s) perfizeram um volume total de 150 µL com NaCl 0,15 M e foram administrados por inalação IN. Os ODN foram re-suspensos em Tris 10 mM (pH 7,0), EDTA 1 mM para armazenagem a +4EC antes da diluição em solução salina para imunização. O nível de LPS no ODN era indetectável (<1 ng/mg) por teste do Limulus (Whittaker Bioproducts, Walkersville, MD).

2. Imunização Mucosal

Cada animal foi imunizado com 1 ou 10 Fg de proteína HBV S derivada de plasma (HBsAg, subtipo ad, Genzyme Diagnostics, San Carlos, CA), que foi administrada isoladamente ou em combinação com 1 ou 10 µg de CT ou LT ou derivado destas e/ou oligonucleótido CpG #1826. Os derivados de CT eram a subunidade B de CT (CTB). Os derivados destoxificados de LT foram todos produzidos por mutações genéticas que afectaram a subunidade A ou a actividade enzimática e incluíam a LTK63. Todas as vacinas foram administradas num volume total de 150 µL, que foram aplicados como gotículas directamente sobre ambas as narinas externas de murganhos ligeiramente anestesiados. A alguns murganhos foram dadas doses de reforço de maneira idêntica, 8 semanas depois da dose de preparação. Todos os grupos experimentais continham 5 ou 10 murganhos.

3. Colheita de amostras

Plasma: O plasma foi recuperado dos murganhos em tempos variados depois da imunização (1, 2, 4 e 8 semanas depois da dose

de preparação e 1, 2 e 4 semanas depois do reforço) por sangramento retro-orbital e armazenado a -20°C até testado.

Sedimentos fecais: Os sedimentos fecais foram colhidos dos murganhos em tempos variados depois da imunização (1, 2, 4 e 8 semanas depois da dose de preparação e 1, 2 e 4 semanas depois do reforço). Os murganhos foram isolados em gaiolas individuais sem dormir durante um período de 24 horas, a seguir ao qual os sedimentos fecais foram colhidos e pesados em alíquotas de 0,1 mg. Um mL de TBS (Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,15 M, pH 7,5) e 0,1 Fg de azeto de sódio (Sigma) foram adicionados por 0,1 mg de material fecal. Deixou-se que as amostras re-hidratassem durante 30 minutos à TA, depois foram centrifugadas a 6000 rpm durante 15 minutos para remover os detritos fecais e os sobrenadantes foram colhidos e armazenados a -20°C até testadas para avaliação de S-IgA por ELISA.

Lavagens de pulmões: As lavagens de pulmões foram realizadas em murganhos 4 semanas depois da dose de preparação de imunização ou reforço. Uma seringa de 0,33 cc de insulina com uma agulha 29G12/2 acoplada (Becton Dickenson, Franklin Lakes, NJ) foi utilizada para realizar a lavagem dos pulmões. Um mL de TBS foi aspirado para dentro da seringa e um pedaço de tubo de polietileno (PE) que era 1 cm mais longo do que a agulha foi acoplado (PE20, ID=0,38 mm, Becton Dickenson). O murganho foi morto por sobredose de anestésico e a traqueia foi imediatamente exposta por meio de uma incisão anterior na linha mediana feita utilizando uma tesoura cirúrgica de ponta fina (Fine Science Tools Inc., North Vancouver, BC). Uma pequena incisão foi, então, feita na traqueia e um grampo (Fine Science Tools Inc., North Vancouver, BC) foi colocado acima da mesma. O tubo de PE foi passado alguns mm abaixo da traqueia pela incisão e um segundo grampo foi colocado imediatamente abaixo da incisão para manter o tubo de PE em posição na traqueia. A solução

de TBS foi instilada lentamente aos pulmões, depois, retirada três vezes (80% de recuperação esperada). As amostras recuperadas foram centrifugadas a 13.000 rpm durante 7 minutos e os sobrenadantes foram colhidos e armazenados a -20°C até serem testados por ELISA.

4. Avaliação das respostas imunológicas

Resposta humoral sistêmica: Foram detectados anticorpos específicos para HBsAg (anti-HBs) no plasma do murganho e quantificados por ensaio ELISA de diluição de ponto final (em triplicata) para os animais individuais descritos anteriormente (Davis et al., 1998). Em resumo, placas de 96 poços de poliestireno (Corning) revestidas de um dia para o outro (TA) com plasma derivado de partículas de HBsAg (conforme utilizado para a imunização) (100 Fl de 1 Fg/mL em carbonato de sódio-tampão bicarbonato 0,05 M, pH 9,6) foram incubados com o plasma durante 1 hora a 37°C. Os anticorpos capturados foram, então, detectados com IgG, IgG1 ou IgG2a anti-mouse de cabra conjugados com peroxidase de rábano silvestre (HRP) (1:4000 em PBS-Tween, PBS a 10%: 100 Fl/poço; Southern Biotechnology Inc., Birmingham, AL), seguido pela adição de solução de dicloridrato de o-fenilenodiamina (PPD, Sigma), 100 Fl/poço durante 30 minutos à TA no escuro. A reação foi interrompida pela adição de H₂SO₄ 4 N, 50 Fl/poço.

As titulações da diluição de ponto final foram definidas como a diluição no plasma mais alta que resultou de um valor de absorvância (OD 450) duas vezes maior do que a do plasma não imune com um valor de corte de 0,05. As titulações anti-HBs de murganhos sensíveis (titulações de ponto final >10) foram expressas como a média SEM de valores de animais individuais, que eram, eles mesmos, a média de ensaios em triplicata.

Resposta humoral mucosal: Isto foi realizado nos sobrenadantes fecais ou lavagens de pulmão recuperadas como para o plasma (acima) excepto que as amostras foram incubadas em placas revestidas durante duas horas a 37°C e os anticorpos capturados foram detectados com IgA anti-mouse de cabra conjugado com HRP (1:1000 em PBS-Tween, PBS a 10%: 100 Fl/poço; Southern Biotechnology Inc.). Os sedimentos fecais ou as soluções de lavagem de pulmão não imunes foram utilizadas para determinar os valores de controlo negativo. Para as soluções de lavagens de pulmão foram registadas titulações de diluição de ponto final (conforme descrito acima), ao passo que para as soluções de sedimentos fecais, os valores de absorvância (OD 450) superiores aos da solução de sedimentos fecais não imunes foram calculados e expressos como a média SEM dos valores OD 450 individuais, que eram, eles próprios, a média de ensaios em triplicata.

Avaliação das respostas CTL: foram removidos os baços dos murganhos 4 semanas após a imunização de preparação ou reforço. Foi realizado ensaio *in vitro* da actividade citolítica específica para HBsAg, conforme descrito anteriormente (Davis et al., 1998). Em resumo, foram preparadas suspensões de células únicas e suspensas em meio de cultura de tecido (RPMI 1640, FBS a 10%, Life Technologies, Grand Island, NY, suplementado com solução de penicilina-estreptomicina, 1000 U/mL, 1 mg das concentrações finais, respectivamente, Sigma). Os esplenócitos (3×10^7) foram co-cultivados durante 5 dias (37EC, CO₂ a 5%) com $1,5 \times 10^6$ células estimuladoras da expressão de HBsAg singenésico (P815-preS, generosamente fornecido por F. V. Chisari, Scripps Institute, La Jolla, CA) que tinham sido anteriormente desactivados por irradiação (20000 rad). Células efectoras foram colhidas, lavadas, diluídas serialmente e cultivadas com 5×10^4 de células alvo (P815S) que expressam HBsAg marcadas com ⁵¹Cr em placas de cultura de 96 poços de fundo redondo (37EC, CO₂ a 5%, 4 horas). O

sobrenadante (100 F1) foi removido para contagem da radiação (gama). A libertação espontânea foi determinada incubando as células alvo sem células efectoras e a libertação total pela adição de 100 F1 de HCl 2 N para as células alvo. A percentagem da lise foi calculada como $[(\text{libertação experimental} - \text{libertação espontânea}) / (\text{libertação total} - \text{libertação espontânea})] \times 100$. A percentagem específica de lise foi calculada como % de lise com P815S - % de lise com células P815. A actividade da CTL para murganhos sensíveis [% da lise específica > 10 em efectora:alvo (E:T) de 25:1] foram expressas como a média SEM dos valores de animais individuais, que eram, eles próprios, a média de ensaios em triplicata.

5. Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o programa GraphPAD InStat (Graph PAD Software, San Diego). O significado estatístico da diferença entre dois grupos foi determinado a partir da média e desvios padrão pelo ensaio-t de duas vias de Student e entre três ou mais grupos por análise de 1 factor de variância (ANOVA) seguido pelo ensaio de Tukey para teste de comparação múltipla. As diferenças não foram consideradas significativas com $p > 0,05$.

Exemplo 2. Respostas humorais sistémicas após a imunização mucosal

Murganhos BALB/c imunizados numa única ocasião por inalação IN de HBsAg sem adjuvante não tiveram anticorpos IgG anti-HBs detectáveis no seu plasma com 1 µg de HBsAg e apenas titulações extremamente baixas (<20) em alguns murganhos com 10 µg de antigénio (Figura 1).

Em contraste, as titulações de IgG anti-HBs foram consideravelmente superiores quando o HBsAg foi administrado em combinação seja com oligonucleótido CpG, seja com CT como adjuvante (Figura 1). Com uma baixa dose de adjuvante (1 µg) e uma dose baixa ou alta de antígeno (1 ou 10 µg de HBsAg) verificou-se que o CpG oligonucleótido é equivalente à CT para a indução de IgG anti-HBs no plasma ($p = 0,73$ com 1 µg de HBsAg e $0,13$ com 10 µg de HBsAg). O oligonucleótido CpG e a CT também eram equivalentes com uma alta dose de adjuvante (10 µg) e alta dose de antígeno (10 µg de HBsAg) ($p = 0,08$), no entanto, com uma dose maior de antígeno, a dose maior de CT foi superior para o oligonucleótido CpG ($p = 0,01$) (Figura 1). Estes resultados indicam que o oligonucleótido CpG é essencialmente igual à CT para a intensificação das respostas imunológicas sistêmicas com a administração mucosal (IN) de um antígeno proteína.

Uma baixa dose combinada de oligonucleótido CpG e CT (1 µg de cada) produziu uma resposta humoral sistêmica melhor do que 10 µg de oligonucleótido CpG isolado ($p = 0,01$) e era igual àquela com 10 µg de CT isolada ($p = 0,22$), quando adicionada a uma dose de 1 µg de HBsAg. Além disso, com uma dose 10 µg de HBsAg, os adjuvantes combinados (1 µg de cada) induziram as titulações de IgG anti-HBs tão altas quanto aquelas com 10 µg de cada adjuvante isolado (CT, $p = 0,27$; oligonucleótido CpG, $p = 0,09$) (Figura 1). Estas descobertas indicam que o oligonucleótido CpG pode actuar de forma sinérgica com a CT quando administrado a tecido mucosal para induzir fortes respostas humorais sistêmicas e, deste modo, permitir que seja administrada uma dose mais baixa de adjuvante.

As titulações de anticorpos foram também aumentadas em cerca de 10 vezes pela administração de uma dose de reforço às 8 semanas. As titulações pós-reforço de IgG no plasma eram equivalentes para CT e oligonucleótido CpG utilizados isoladamente, e eram 5-10 vezes

mais altas do que com ambos os adjuvantes juntos (Figura 2). Estes resultados indicam que o efeito do adjuvante de oligonucleótido CpG isolado ou em combinação com CT pode ser intensificado pelo reforço.

A avaliação do plasma para isotipos de anticorpos IgG depois de uma única imunização mucosal demonstrou predominantemente anticorpos IgG1 (semelhantes a Th2) com CT e anticorpos IgG1/IgG2a misturados (Th0) com o oligonucleótido CpG isolado ou em combinação com CT. A proporção de isotipos de anticorpos IgG2a era de cerca de 10 vezes maior com CpG ODN do que CT, indicando uma maior influência de Th1 de CpG ODN em comparação com CT. Além disso, a combinação de CpG ODN e CT produziu uma proporção 50 vezes maior de IgG2a:IgG1 do que a CT isolada (Figura 3). A seguir ao reforço, os anti-HBs ainda era predominantemente IgG1 com CT e misturados com oligonucleótido CpG, embora neste último caso, a proporção de IgG2a era agora mais elevada. Surpreendentemente, o anti-HBs no plasma depois do reforço com o oligonucleótido CpG e CT era agora predominantemente IgG2a (semelhante a Th-1) (Figura 3). Estas descobertas indicam que o oligonucleótido CpG como um adjuvante mucosal estimula uma resposta semelhante a Th1, mesmo na presença de um forte adjuvante semelhante a Th2 como a CT.

Foram encontrados resultados semelhantes quando utilizou-se LT em lugar da CT (Figura 7, Tabelas 2 e 3). A CT e a LT, que têm relação próxima com considerável homologia estrutural e funcional são ambas excessivamente tóxicas para utilização em seres humanos. No entanto, há várias derivações de CT e LT que retêm alguma actividade adjuvante, e no entanto, são muito menos tóxicas. Um exemplo é a subunidade B da CT (CTB) que é não tóxica, uma vez que a toxicidade está associada à subunidade A. Outro exemplo é a LTK63, um mutante geneticamente destoxificado da LT com actividade enzimática não tóxica. Embora estes adjuvantes sejam utilizados em

ensaios clínicos humanos, nenhum era tão forte quanto o CpG ODN para a indução da imunidade sistémica (IgG no soro) quando cada uma foi utilizada a 1 µg (Figura 7). Houve também um efeito sinérgico quando o CpG ODN e a CTB ou LTJ63 foram utilizados em conjunto, no entanto, isto foi mais evidente para o Th1-bias do que para a força da resposta do anticorpo (Figura 7 e Tabela 2).

Exemplo 3: Respostas CTL sistémicas após a imunização mucosal

Apenas baixos níveis de CTL foram induzidos com HBsAg isolado, no entanto a adição seja do oligonucleótido CpG seja da CT aumentou, de forma significativa, a actividade da CTL específica para HBsAg. As respostas CTL foram equivalentes para CT e oligonucleótido CpG, independentemente da dose. No entanto, a combinação de CT e oligonucleótido CpG (1 µg de cada) aumentou as respostas CTL em aproximadamente duas vezes (Figura 4).

Exemplo 4: Respostas humorais mucosais após a imunização mucosal

Não foram detectados anticorpos S-IgA anti-HBs nas lavagens de pulmão dos murganhos imunizados com 1 ou 10 µg de HBsAG isolado. Do mesmo modo não foram detectados IgA anti-HBs com a dose baixa de antígeno combinado com uma dose baixa (1 µg) de oligonucleótido CpG ou CT ou com uma dose alta de oligonucleótido CpG; apenas titulações baixas foram detectadas com a dose baixa do antígeno e dose alta de CT (Figura 5). No entanto, quando baixas doses tanto do oligonucleótido CpG como da CT (1 µg de cada) foram utilizadas em conjunto com a dose baixa do antígeno, puderam ser detectados níveis significativos de S-IgA específico para HBsAg nas lavagens de pulmão (Figura 5).

Com uma dose de antígeno mais alta (10 µg), o S-IgA foi detectado nas lavagens de pulmão de murganhos administrados tanto com a dose baixa como a dose alta de CT e/ou oligonucleótido CpG. As titulações de IgA foram significativamente mais altas com 1 µg dos dois adjuvantes juntos do que com 10 µg de CT ou oligonucleótido CpG isolados ($p = 0,0003$ e $<0,0001$, respectivamente) (Figura 5). As titulações de IgA aumentaram aproximadamente dez vezes depois do reforço com ambos os adjuvantes. Deste modo, o oligonucleótido CpG pode induzir a imunidade mucosal local específica contra o antígeno administrado por via intranasal. Além disso, de forma semelhante ao verificado para a resposta sistémica (acima), o oligonucleótido CpG actua de uma maneira sinérgica com a CT para a indução da imunidade mucosal.

Detectou-se IgA também nos sedimentos fecais dos murganhos imunizados com HBsAg e 10 µg de oligonucleótido CpG. Em contraste, apenas níveis muito baixos foram detectados nos murganhos imunizados com HBsAg em combinação com CT (1 ou 10 µg), (Figura 6). Destes modo, o oligonucleótido CpG pode induzir a imunidade mucosal em sítios mucosais distantes.

Exemplo 5: Resposta Imunológica Mucosal e Sistémica a outros Adjuvantes Mucosais

Respostas imunológicas sistémicas

A administração IN de HBsAg (1 µg) sem adjuvante não induziu anticorpos IgG anti-HBs detectáveis no plasma de quaisquer murganhos (0/15). Em contraste, as titulações elevadas de IgG anti-HBs foram induzidas em todos os murganhos quando o HBsAg foi administrado em combinação com CpG, CT ou LT como adjuvante (Figura 7, Tabela 2). A uma baixa dose (1 µg) LT, CT e CpG produzem titulações equivalentes de IgG anti-HBs ($p = 0,22$). A uma dose alta

(10 µg) LT e CT produzem titulações mais altas do que CpG, no entanto 5/10 murganhos que receberam esta dose de LT morreram em 10 dias. Não foi detectado IgG anti-HBs detectável com uma dose baixa (1 µg) de CTB ou LTK63, no entanto, uma dose alta (10 µg) de CTB produziu baixo IgG anti-HBs nas titulações por ELISA de ponto final e uma dose alta (10 µg) de LTK produziu níveis tão bons de IgG anti-HBs quanto uma dose alta (10 µg) de CpG ($P = 0,97$) (Figura 7, Tabelas 2 e 3).

Quando utilizados juntos, o CpG e tanto a LT como a CT (1 µg cada), parecem ter um efeito sinérgico, uma vez que as titulações anti-HBs foram de 5 a 10 vezes mais altas do que com qualquer um dos três adjuvantes isolados (Figura 7). De facto, o CpG mais a LT (1 µg de cada) produziram uma resposta melhor do que 10 µg de CpG ou LT isolados ($p = 0,007$, $0,015$ respectivamente) e a resposta com CpG mais CT (1 µg de cada) foi igual àquela com 10 µg de CT isolada ($p = 0,65$). Em contraste, não houve efeito sinérgico com LYK63 mais CpG (1 µg de cada) para titulações de IgG anti-HBs, que foram equivalentes àsquelas com 1 µg de CpG isolado ($p = 0,40$). Surpreendentemente, a CTB mais o CpG (1 µg de cada) produziram titulações mais baixas de anti-HBs do que 1 µg de CpG isolado ($p = 0,0079$) (Figura 7). Os efeitos dos adjuvantes com CpG ODN foram devidos ao motivo CpG, em vez de um efeito não específico do esqueleto ODN, uma vez que os murganhos imunizados com 1 µg de HBsAg mais 10 µg de ODN não CpG não tiveram titulações (7/10) de anticorpo IgG anti-HBs ou tiveram titulações muito baixas (3/10) (dados não ilustrados).

Os anticorpos eram predominantemente IgG1 (semelhante a Th2) com CT, CTB e LT e IgG1/IgG2a (Th1/Th2) misturados com LTK63. A uma dose baixa (1 µg) as respostas com CpG foram IgG1/IgG2a (Th1/Th2) misturados, mas a uma dose mais alta (10 µg) forma mais Th1 (IgG2a >>IgG1). As respostas foram Th1/Th2 misturados com CT/CpG ou

CTB/CpG e mais Th1 com LT/CpG. A uma dose baixa (1 µg) as respostas de LTK63/CpG foram Th1/Th2, mas a uma dose mais alta (10 µg de cada) foram mais Th1 (Tabela 3). Deste modo, a co-administração de CpG com outros adjuvantes deslocaram as respostas na direcção de uma resposta mais semelhante a Th1, conforme indicado por uma maior proporção de anticorpos IgG2a.

Respostas imunológicas mucosais

Quando os adjuvantes foram utilizados isoladamente, apenas os murganhos que receberam LT ou LTK63 tiveram IgA detectável nas lavagens de pulmão, no entanto, quando o CpG ODN foi também incluído com a CT ou LT um número maior de animais respondeu ou as titulações foram mais altas do que com doses comparáveis isoladas, sugerindo um efeito sinérgico. O CpG isolado não induziu o IgA. Nem a CTB isolada ou combinada com CpG (Tabela 3).

Apenas poucos adjuvantes por si mesmos (LT e CpG) induziram IgA nas fezes e apenas em alguns animais. Não foi detectado IgA significativo com CT, CTB, LTK63 ou ODN não CpG. O CpG e a LT em conjunto, resultaram em IgA nas fezes de uma proporção maior de animais do que qualquer adjuvante isolado sugerindo uma efeito aditivo e sinérgico. Nenhum destes efeitos ficou evidente com outras combinações (Tabela 3).

Tabela 2: Efeito do adjuvante sobre isotipos de anticorpo específico para HBsAg

Adjuvante ^a	Dose (µg)	Resposta Anti-HBs		
		IgG2a ^b	IgG1 ^b	IgG2a:IgG1 ^c
Nenhum	-	0	0	NA ^d
CT	1	36	1632	0,02
CT	10	406	3849	0,1
CTB	1	0	0	NA
CTB	10	6	59	0,1
LT	1	226	6457	0,04
LT	10	895	2024	0,44
LTK63	1	0	0	NA
LTK63	10	231	455	0,5
CpG ODN	1	146	403	0,4
CpG ODN	10	529	41	13,4
ODN de controle	1	0	0	NA
ODN de controle	10	0	0	NA
CT + CpG ODN	1 cada	3376	2374	1,4
CTB + CpG ODN	1 cada	0	0	NA
LT + CpG ODN	1 cada	6268	1438	4,4
LKT63 + CpG ODN	1 cada	185	272	0,7
CT + ODN de controle	1 cada	402	5087	0,08
CT + CpG ODN	10 cada	= ^e	=	=
CTB + CpG ODN	10 cada	227	208	1,1
LT + CpG ODN	10 cada	=	=	=
LTK63 + CpG ODN	10 cada	3170	413	7,7

Tabela 3: Efeito de adjuvante sobre respostas IgA específicas para HBsAg

Adjuvante ^a	Dose (µg)	Resposta anti-HBs			
		Pulmão		Fecal	
		IgA ^c	No. de respon- dedores	IgA ^d	No. de respon- dedores
Nenhum	-	0	0	0	0
CT	1	0	0	0	0
CT	10	0	0	0	0
CTB	1	0	0	0	0
CTB	10	0	0	0	0
LT	1	160 ± 68	5	100.200	2
LT	10	17 ± 5	3/3 (2 mortos)	200 ± 50	3/3 (2 mortos)
LTK63	1	0	0	0	0
LTK63	10	26 ± 6	4	0	0
CpG ODN	1	0	0	100	1
CpG ODN	10	0	0	0	0
ODN de controlo	1	0	0	0	0
ODN de controlo	10	0	0	0	0
CT + CpG ODN	1 cada	17,49	2	120	1
CTB + CpG ODN	1 cada	0	0	0	0
LT + CpG ODN	1 cada	232 ± 34	5	150 ± 20	4
LKT63 + CpG ODN	1 cada	14	1	0	0
CT + ODN de controlo	1 cada	0	0	0	0
CT + CpG ODN	10 cada	= ^e	=	=	=
CTB + CpG ODN	10 cada	17	1	0	0
LT + CpG ODN	10 cada	=	=	=	=
LTK63 + CpG ODN	10 cada	28 ± 46	3/4	130	1/4

Tabela 4: Sumários dos efeitos de estratégias de dose de preparação/reforço diferentes em respostas imunológicas específicas para HBsAg

Dose de preparação	Reforço	IgA			IgG	CTL	TCP
		L	S	F			
Ag IM + alúmen + CpG	Nenhum				X		X
	Ag IM + alúmen + CpG			X	X	X	X
	Ag IN	X	X		X	X	X
	Ag IN + CT	X	X		X	X	X
	Ag IN + CpG	X	X		X	X	X
		X	X	X	X	X	X
Ag IN					X		
Ag IN + CT	Ag IM + alúmen + CpG			X	X	X	X
Ag IN + CpG					X	X	X
Ag IN + CT + CpG		X	X	X	X	X	X
Ag IN + CT + CpG	Ag IN + CT + CpG	X	X	X	X	X	X
Ag IN + CT + CpG	Nenhum				X		X

Ag: 1 µg de HBsAg

CpG: 1 µg #1826,

CT: 1 µg,

alúmen: 25 µg

L: pulmão, corte GMT = 10

S: saliva, corte $OD_{450} \times 10^3 = 100$

F: fecal, corte $OD_{450} \times 10^3 = 100$

CTL, corte 20% em E:T 100:1

TCP, corte 2500 cpm

REFERÊNCIAS

- Alpar H. O., Ozsoy Y., Bowen J., Eyles J. E., Conway B. R., Williamson E. D. Potential of particulate carriers for the mucosal delivery of DNA vaccines. *Biochemical Society Transactions* 1997; 25(2):337S.
- Ballas, Z. K., W. L. Rasmussen, e A. M. Krieg. 1996. Induction of natural killer activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. *J. Immunol.* 157, 1840.
- Bird, A. P. CpG islands as gene markers in the vertebrate nucleus. 1987. *Trends in Genetics* 3:342.
- Bowersock T L. Shalaby W. S. Levy M. Samuels M. L. Lallone R. White M. R. Borie D L. Lehmyer J. Park K. Evaluation of an orally administered vaccine, using hydrogels containing bacterial exotoxins of *Pasteurella haemolytica*, in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 1994; 55: 502-9.
- Bueler H. e Mulligan R. C. Induction of antigen-specific tumor immunity by genetic and cellular vaccines against MAGE: enhanced tumor protection by coexpression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and B7-1. 1996; 2; 545-555.
- Chace, J. H., N. A. Hooker, K. L. Mildenstein, A. M. Krieg e J. S. Cowdery. 1997. Bacterial DNA-induced NK cell IFN-[gamma] production is dependent on macrophage secretion of IL-12. *Clin. Immunol. Immunopath.*, 84:185.

- Chow Y. H., Huang W. L., Chi W. K., Chu Y. D., Tao M. H. Improvement of hepatitis B virus DNA vaccines by plasmids coexpressing hepatitis B surface antigen and interleukin-2. *Journal of Virology* 1997; 71(1):169-78.
- Cong Y. Weaver C. T. Elson C. O. The mucosal adjuvanticity of cholera toxin involves enhancement of costimulatory activity by selective up-regulation of B7.2 expression. *J. Immunol.* 1997; 159: 5301-8.
- Constant S. L. Bottomly K. Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. *Ann. Rev. Immunol.* 1997; 15: 297-322.
- Cowdery, J. S., J. H. Chace e A. M. Krieg. 1996. Bacterial DNA induces in vivo interferon-[gamma] production by NK cells and increases sensitivity to endotoxin. *J. Immunol.* 156:4570.
- Davis H. L., Weeratna R, Waldschmidt T J, Schorr J and Krieg A M. CpG DNA is a potent adjuvant in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. *J. Immunol.* 1998; 160: 870-876.
- de Haan L. Verweij W. R. Feil I. K. Lijnema T. H. Hol W. G. Agsteribbe E. Wilschut J. Mutants of the Escherichia coli heat-labile enterotoxin with reduced ADP-ribosylation activity or no activity retain the immunogenic properties of the native holotoxin. *Infect. Immun.* 1996; 64: 5413-6.
- DeLong R. Stephenson K. Loftus T. Fisher M. Alahari S. Nolting A. Juliano R L. Characterization of complexes of oligonucleotides with polyamidoamine starburst dendrimers and

- effects on intracellular delivery. *J. Pharmac. Sci.* 1997; 86: 762-4.
- Douce G. Turcotte C. Cropley I. Roberts M. Pizza M. Domenghini M. Rappuoli R. Dougan G. Mutants of *Escherichia coli* heat-labile toxin lacking ADP-ribosyltransferase activity act as nontoxic, mucosal adjuvants. *PNAS.* 1995; 92: 1644-8.
- Eldridge J., Staas J K., Meulbroek J. A., McGhee J. R. Biodegradable microspheres as a vaccine delivery system. *Molecular Immunology* 1991; 28: 287-294.
- Gallichan W. S., Rosenthal K. L. Specific secretory immune responses in the female genital tract following intranasal immunization with a recombinant adenovirus expressing glycoprotein B of herpes simplex virus. *Vaccine* 1995; 13(16):1589-95.
- Geissler M., Gesien A., Tokushige K., Wands J. R. Enhancement of cellular and humoral immune responses to hepatitis C virus core protein using DNA-based vaccines augmented with cytokine-expressing plasmids. *J Immunol* 1997; 158(3):1231-7.
- Gregoriadis G. Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems. *Trends Biotech.* 1995; 13: 527-537.
- Halpern, M. D., R. J. Kurlander e D. S. Pisetsky. 1996. Bacterial DNA induces murine interferon-[gamma] production by stimulation of interleukin-12 and tumor necrosis factor-[alpha]. *Cell. Immunol.* 167:72.

- Haneberg B., Kendall D., Amerongen H. M., Apter F. M., Kraehenbuhl J. P. e Neutra M. R. Induction of specific immunoglobulin A in the small intestine, colon-rectum, and vagina measured by a new method for collection of secretions from local mucosal surfaces. *Infect. Immun.* 1994; 15-23.
- Hogg J. C. The pathology of asthma. *APMIS.* 1997; 105; 10: 735-45.
- Holmgren J., Lycke N., Czerkinsky C. Cholera toxin and cholera B subunit as oral-mucosal adjuvant and antigen vector systems. *Vaccine* 1993; 11:1179-1184.
- Homquist E. Lycke N. Cholera toxin adjuvant greatly promotes antigen priming of T cells. *Eur. J. Immunol.* 1993; 23: 213643.
- Kay A. B. TH2-type cytokines in asthma. *Ann. NY Acad. Sci.* 1996; 796: 1-8.
- Kim J. J., Ayyavoo V., Bagarazzi M. L., Chattergoon M. A., Dang K., Wang B., Boyer J. D. e Weiner D. B. In vivo engineering of a cellular immune response by coadministration of IL-12 expression vector with a DNA immunogen. *J. Immunol.* 1997; 158: 816-26.
- Klinman D. M., Yamshchikov G. e Ishigatsubo Y. Contribution of CpG motifs to the immunogenicity of DNA vaccines. *J. Immunol.* 1997; 158: 3635-3659.
- Klinman, D., A. K. Yi, S. L. Beaucage, J. Conover e A. M. Krieg. 1996. CpG motifs expressed by bacterial DNA rapidly induce lymphocytes to secrete IL-6, IL-12 and IFN. *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA USA* 93:2879.

- Krieg, A. M., A. K. Yi, S. Matson, T. J. Waldschmidt, G. A. Bishop, R. Teasdale, G. Koretzky, and D. Klinman. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. 1995. *Nature* 374:546.
- Krieg, A. M. 1996An innate immune defense mechanism based on the recognition of CpG motifs in microbial DNA. *J. Lab. Clin. Med.* 128:128.
- Kukowska-Latallo J. F. Bielinska A. U. Johnson J. Spindler R. Tomalia D. A. Baker J. R. Jr. Efficient transfer of genetic material into mammalian cells using Starburst polyamidoamine dendrimers. *PNAS*. 1996; 93: 4897-902.
- Lamm M. E., Mazanec M. B., Nedrud J. G., Kaetzel C. S. Mechanisms of IgA-mediated mucosal defense. *Vaccine Res.* 1992; 1:169-173.
- Lycke N., Tsuji T. e Holmgren J. The adjuvant effect of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins is linked to their ADP-ribosyltransferase activity. *Eur. J. immunol.* 1992; 22: 2277-2281.
- Maloy K. J. Donachie A. M. Mowat A. M. Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses by oral or parenteral immunization with ISCOMS. *Eur. J. Immunol.* 1995; 25: 2835-41.
- Mannino R. J. e Gould-Fogerite S. Lipid matrix-based vaccines for mucosal and systemic immunization. In: *Vaccine Design; The subunit and adjuvant approach.* (ed. Powell M F and Newman M J) Plenum Press, N.Y. 1995; 363-387.

- McGhee J. R., Mestecky J., Dertzbaugh M. T., Eldridge J. H., Hirasawa M., Kiyono H. The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. *Vaccine* 1992; 10:75-88.
- Messina, J. P., G. S. Gilkeson e D. S. Pisetsky. 1991. Stimulation of in vitro murine lymphocyte proliferation by bacterial DNA. *J. Immunol.* 147:1759.
- Mestecky J., McGhee J. R. Prospects for human mucosal vaccines. In: Ciardi J E, ed. Genetically Engineered vaccines. N.Y.: Plenum Press, 1992:13-23.
- O'Hagan D. T. Oral immunization and the common mucosal immune system. In: O'Hagan D T, ed. Novel Delivery Systems for Oral Vaccines. Boca Raton: CRC Press, 1994:1-24.
- O'Hagan D. T., Rahman D., Jeffery H., Sharif S., Challacombe S. J. Controlled release microparticles for oral immunization. *Int. J. Pharm.* 1994; 108: 133-139.
- Pizza M. Fontana M. R. Giuliani M. M. Domenighini M. Magagnoli C. Giannelli V. Nucci D. Hol W. Manetti R. Rappuoli R. A genetically detoxified derivative of heat-labile Escherichia coli enterotoxin induces neutralizing antibodies against the A subunit. *J. Exp. Med.* 1994; 180: 2147-53.
- Rappuoli R. Douce G. Dougan G. Pizza M. Genetic detoxification of bacterial toxins: a new approach to vaccine development. *Int Arch Allergy Immunol.* 1995; 108: 327-33.

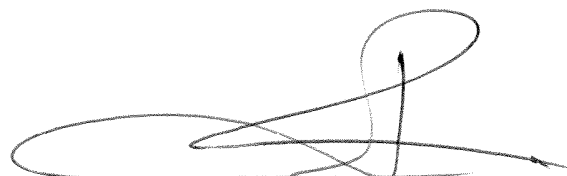
- Sato Y. Roman M. Tighe H. Lee D. Corr M. Nguyen M. D. Silverman G. J. Lotz M. Carson D. A. Raz E. Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. *Science*. 1996; 273: 352-4.
- Schirmbeck R., Melber K., Kuhrober A., Janowicz Z. A. e Reimann J. Immunization with soluble hepatitis B virus surface protein elicits murine H-2 class I-restricted CD8+ cytotoxic T lymphocyte responses in vivo. *J. Immunol.* 1994; 152: 1110-1119.
- Sjolander A., Lovgren Bengtsson K., Johansson M., Morein B. Kinetics, localization and isotype profile of antibody responses to immune stimulating complexes (ISCOMS) containing human influenza virus envelope glycoproteins. *Scand. J. Immunol.* 1996; 43:164-72.
- Sjolander A. van't Land B. Lovgren Bengtsson K. Iscoms containing purified Quillaja saponins upregulate both Th1-like and Th2-like immune responses. *Cell. Immunol.* 1997; 177: 69-76.
- Snider D. P. The mucosal adjuvant activities of ADP-ribosylating bacterial enterotoxins. *Crit. Rev. Immunol.* 1995; 15: 317-48.
- Spangler B. D. Structure and function of cholera toxin and the related Escherichia coli heat-labile enterotoxin. *Microbiol. Rev.* 1992; 56: 622-647.
- Staats H. F., Jackson R J, Marinaro M, Takahashi I, Kiyono H, McGhee J R. Mucosal immunity to infection with implications for vaccine development. *Current Biology.* 1994; 6:572-583.

- Tokunaga, T., H. Yamamoto, S. Shimada, H. Abe, T. Fukuda, Y. Fujisawa, Y. Furutani, O. Yano, T. Kataoka, T. Sudo, N. Makiguchi e T. Suganuma. 1984. Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from mycobacterium bovis GCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *JNCI* 72:955.
- Tsuji T., Hamajima K., Ishii N., Aoki I., Fukushima J., Xin K. Q., Kawamoto S., Sasaki S., Matsunaga K., Ishigatsubo Y., Tani K., Okubo T. e Okuda K. Immunomodulatory effects of a plasmid expressing B7-2 on human immunodeficiency virus-1-specific cell-mediated immunity induced by a plasmid encoding the viral antigen. *Eur. J. Immunol.* 1997; 27: 782-7.
- Valodas, J., Davies, J. K., Wright, P. J., Strugnell R. A. Intranasal immunization with liposomes induces strong mucosal immune responses in mice. *Eur. J. Immunol.* 1995; 25: 969-975.
- Weeratna R., Brazolot Millan C. L., Krieg A. M. e Davis H. L. Reduction of antigen expression from DNA vaccines by co-administered oligodeoxynucleotides. *Anti. Nucl. Acid Res.* (in press).
- Yamamoto, S., T. Yamamoto, S. Shimada, E. Kuramoto, O. Yano, T. Kataoka e T. Tokunaga. 1992. DNA from bacteria, but not from vertebrates, induces interferons, activates natural killer cells and inhibits tumor growth. *Microbiol. Immunol* 36:983.
- Yi, A. K., Cowdery, J. S., J. H. Chace e A. M. Krieg. 1996. IFN- γ promotes IL-6 and Ig-M secretion in response to CpG motifs in bacterial DNA and ODN. *J. Immunol.*, 156:558.

A memória descritiva escrita precedente é considerada como suficiente para permitir que um especialista na técnica pratique a invenção. A presente invenção não é para ser limitada em âmbito pelos exemplos fornecidos, uma vez que os exemplos destinam-se como uma simples ilustração de um aspecto da invenção.

Lisboa, 30 de Outubro de 2006.

Pela Requerente
O Agente Oficial



Gonçalo da Cunha Ferreira
Adjunto do Agente Oficial da
Propriedade Industrial
Av.ª Conselheiro Fernando de Sousa, 11-15.º
1070-072 LISBOA - PORTUGAL

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> Ottawa Civic Hospital Loeb Research Institute

<120> Métodos e Produtos para Induzir Imunidade Mucosal

<130> C1040/7006WO/HCL

<150> US 60/086.393

<151> 21-05-1991

<160> 95

<170> FastSEQ para Windows versão 3.0

<210> 1

<211> 15

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 1

gctagacggt agcgt

<210> 2

<211> 15

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 2

gctagatggtt agcgt

<210> 3

<211> 15

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<221> base modificada

<222> (7)...(7)

<223> m5c

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 3

gctagacgtt agcgt

<210> 4

<211> 15

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<221> base modificada

<222> (13)...(13)

<223> m5c

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 4

gctagacggt agcgt

<210> 5

<211> 15

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 5

gcatgacggt gagct

<210> 6

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 6

atggaaggct cagcgttctc

<210> 7

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 7

atcgactctc gagcggttctc

<210> 8

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<221> base modificada

<222> (3)...(3)

<223> m5c

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 8

atcgactctc gagcggttctc

<210> 9

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<221> base modificada

<222> (18)...(18)

<223> m5c

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 9

atcgactctc gagcgttctc

<210> 10

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 10

atggaaggtc caacgttctc

<210> 11

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 11

gagaacgctg gaccttccat

<210> 12

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 12

gagaacgctc gaccttccat

<210> 13

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 13

gagaacgctc gaccttcgat

<210> 14

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<221> base modificada

<222> (14)...(14)

<223> m5c

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 14

gagaacgctg gaccttccat

<210> 15
<211> 20
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 15
gagaacgatg gaccttccat

<210> 16
<211> 20
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 16
gagaacgctc cagcactgat

<210> 17
<211> 20
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 17
tccatgtcgg tcctgatgct

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

<220>
<221> base modificada
<222> (12)...(12)
<223> m5c

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 18
tccatgtcgg tcttgatgct

<210> 19
<211> 20
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 19
tccatgacgt tcttgatgct

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

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 20

tccatgtcgg tcttgctgat

<210> 21

<211> 8

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 21

tcaacggt

<210> 22

<211> 8

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 22

tcagcgct

<210> 23

<211> 8

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 23

tcatcgat

<210> 24

<211> 8

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 24

tcttcgaa

<210> 25

<211> 8

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 25

caacgtt

<210> 26

<211> 8

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 26

ccaacggtt

<210> 27

<211> 8

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 27

aacgttct

<210> 28

<211> 8

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 28

tcaacgtc

<210> 29

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 29

atggactctc cagcgttctc

<210> 30

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 30

atggaaggtc caacgttctc

<210> 31

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 31

atcgactctc gagcgcttctc

<210> 32

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 32

atggaggctc catcgttctc

<210> 33

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<221> base modificada

<222> (14)...(14)

<223> m5c

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 33

atcgactctc gagcggttctc

<210> 34

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<221> base modificada

<222> (18)...(18)

<223> m5c

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 34

atcgactctc gagcgttctc

<210> 35

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 35

tccatgtcgg tcctgaatgct

<210> 36

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 36

tccatgccgg tcctgatgct

<210> 37

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 37

tccatggcgg tcctgatgct

<210> 38

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 38

tccatgacgg tcctgatgct

<210> 39

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 39

tccatgtcga tcctgatgct

<210> 40

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 40

tccatgtcgc tcctgatgct

<210> 41

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 41

tccatgtcgt ccctgatgct

<210> 42

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 42

tccatgacgt gcctgatgct

<210> 43

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 43

tccataacgt tcctgatgct

<210> 44

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 44

tccatgacgt ccctgatgct

<210> 45

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 45

tccatcacgt gcctgatgct

<210> 46

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 46

ggggtcaacg ttgcgggg

<210> 47

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 47

ggggtcagtc gtgacgggg

<210> 48

<211> 15

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 48
gctagacggt agtgt

<210> 49
<211> 20
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 20
tccatgtcgt tctgtatgct

<210> 50
<211> 24
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 50
accatggacg atctgtttcc cctc

<210> 51
<211> 18
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 51

tctcccagcg tgcgccat

<210> 52

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 52

accatggacg aactgtttcc cctc

<210> 53

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 53

accatggacg agctgtttcc cctc

<210> 54

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 54

accatggacg acctgtttcc cctc

<210> 55

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 55

accatggacg tactgtttcc cctc

<210> 56

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 56

accatggacg gtctgtttcc cctc

<210> 57

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 57

accatggacg ttctgtttcc cctc

<210> 58

<211> 15

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 58

cacgttgagg ggcat

<210> 59

<211> 12

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 59

tcagcgtgcg cc

<210> 60

<211> 17

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 60

atgacgttcc tgacgtt

<210> 61

<211> 17

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 61

tctcccagcg ggcgcat

<210> 62

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 62

tccatgtcgt tcctgtcgtt

<210> 63

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 63

tccatagcgt tcctagcgtt

<210> 64

<211> 21

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 64

tcgtcgctgt ctccccttct t

<210> 65

<211> 19

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 65

tcctgacgtt cctgacgtt

<210> 66

<211> 19

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 66

tcctgtcgtt cctgtcgtt

<210> 67

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 67

tccatgtcgt ttttgtcgtt

<210> 68

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 68

tcctgtcgtt ccttgtcgtt

<210> 69

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 69

tccttgctgct tcctgctgctt

<210> 70

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 70

tcctgctgctt ttttgctgctt

<210> 71

<211> 21

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 71

tcgctgctgt ctgcccttct t

<210> 72

<211> 21

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 72

tcgtcgtcgt tgcgtttct t

<210> 73

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 73

tccatgcgtg cgtgcgtttt

<210> 74

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 74

tccatgcgtt gcgttgcggt

<210> 75

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 75

tccacgacgt ttctcgacgtt

<210> 76

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 76

tcgtcgttgt cgttgtcggt

<210> 77

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 77

tcgtcgttttt gtcgttttgt cggt

<210> 78

<211> 22

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 78

tcgtcgttgt cgttttgtccg tt

<210> 79

<211> 21

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 79

gcgtgcgttg tcgttgctcg t

<210> 80

<211> 21

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 80

tgtcgtttgt cgtttgctcg t

<210> 81

<211> 25

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 81

tgtcggttgtc gttgtcggttg tcggt

<210> 82

<211> 19

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<400> 82

tgtcggttgtc gttgtcggtt

<210> 83

<211> 14

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 83

tcgtcgtcgt cggt

<210> 84

<211> 13

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 84

tgtcggttgtc gtt

<210> 85

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 85

tccatagcgt tcctagcgtt

<210> 86

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 86

tccatgacgt tcctgacgtt

<210> 87

<211> 6

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 87

gtcgyt

<210> 88

<211> 7

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 88

tgtcgyt

<210> 89

<211> 18

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 89

agctatgacg ttccaagg

<210> 90
<211> 20
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 90
tccatgacgt tcttgacgtt

<210> 91
<211> 20
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 91
tccaggactt ctctcaggtt

<210> 92
<211> 20
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 92

atcgactctc gaacgttctc

<210> 93

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 93

tccatgtcgg tcctgacgca

<210> 94

<211> 8

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 94

tcttcgat

<210> 95

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético imunoestimulatório

<400> 95

ataggaggtc caacgttctc

REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de um oligonucleótido tendo uma sequência incluindo, pelo menos a seguinte fórmula:



caracterizada por C ser não metilado e X_1 , X_2 , X_3 e X_4 serem nucleótidos, para a preparação de uma composição para administração a uma superfície mucosal de um indivíduo que está também exposto a um antigénio, para induzir uma resposta imunológica mucosal ao referido antigénio no referido indivíduo.

2. Utilização de acordo com a reivindicação 1 **caracterizada por** a composição ser administrada por via oral.
3. Utilização de acordo com a reivindicação 1 **caracterizada por** a composição ser administrada por via intranasal.
4. Utilização de acordo com a reivindicação 1 **caracterizada por** a composição ser administrada por via rectal.
5. Utilização de acordo com a reivindicação 1 **caracterizada por** a composição ser administrada por via vaginal.
6. Utilização de acordo com a reivindicação 1 **caracterizada por** a composição ser administrada por via ocular.
7. Utilização de acordo com a reivindicação 1 **caracterizada por** a composição ser administrada por inalação.

8. Utilização de acordo com a reivindicação 1 **caracterizada por** tanto o antígeno como a composição serem administrados por via oral.
9. Utilização de acordo com a reivindicação 1 **caracterizada por** tanto o antígeno como a composição serem administrados por via intranasal.
10. Utilização de acordo com a reivindicação 1 **caracterizada por** tanto o antígeno como a composição serem administrados por via rectal.
11. Utilização de acordo com a reivindicação 1 **caracterizada por** tanto o antígeno como a composição serem administrados por via vaginal.
12. Utilização de acordo com a reivindicação 1 **caracterizada por** tanto o antígeno como a composição serem administrados por via ocular.
13. Utilização de um oligonucleótido de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** o antígeno não ser codificado num vector de ácido nucleico.
14. Utilização de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 13, **caracterizada por** o indivíduo ser exposto ao antígeno de forma activa.
15. Utilização de acordo com a reivindicação 14, **caracterizada por** o antígeno ser administrado por via intranasal.
16. Utilização de acordo com a reivindicação 14, **caracterizada por** o antígeno ser administrado por via vaginal.

17. Utilização de acordo com a reivindicação 14, **caracterizada por** o antígeno ser administrado por via rectal.
18. Utilização de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 17, **caracterizada por** o antígeno ser administrado simultaneamente com a composição.
19. Utilização de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 7, **caracterizada por** o indivíduo ser exposto ao antígeno de forma passiva.
20. Utilização de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 19, **caracterizada por** a composição ser administrada numa quantidade eficaz para induzir a imunidade mucosal.
21. Utilização de acordo com a reivindicação 20, **caracterizada por** o indivíduo ser um asmático ou em risco de desenvolver uma reacção alérgica, uma doença infecciosa ou cancro.
22. Utilização de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 21, **caracterizada por** a composição ser administrada em conjunto com uma citocina, ou um molécula co-estimuladora B-7.
23. Utilização de um oligonucleótido de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** a composição ser administrada a uma superfície mucosal de um indivíduo, simultaneamente com um antígeno.
24. Utilização de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 23, **caracterizada por** a imunidade mucosal ser induzida num sítio remoto.
25. Utilização de acordo com a reivindicação 14 ou reivindicação 23, **caracterizada por** um adjuvante não oligonucleótido mucosal ser administrado em conjunto com o antígeno.

26. Utilização de acordo com qualquer das reivindicações 14, 23 ou 25, **caracterizada por** um reforço do oligonucleótido ser administrado ao indivíduo.
27. Utilização de acordo com a reivindicação 26, **caracterizada por** um reforço do adjuvante não oligonucleótido ser também administrado ao indivíduo.
28. Utilização de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 27, **caracterizada por** X_1X_2 serem nucleótidos seleccionados do grupo que consiste em: GpT, GpG, GpA, ApA, ApT, ApG, CpT, CpA, CpG, TpA, TpT e TpG; e X_3X_4 serem nucleótidos seleccionados do grupo que consiste em: TpT, CpT, ApT, TpG, ApG, CpG, TpC, ApC, CpC, TpA, ApA e CpA.
29. Produto compreendendo um oligonucleótido que tem uma sequência que inclui, pelo menos a seguinte fórmula:



- caracterizada por** C ser não metilado e X_1 , X_2 , X_3 e X_4 serem nucleótidos, um antigénio e uma hormona para utilização simultânea, separada ou sequencial para induzir uma resposta imunológica mucosal num indivíduo ao referido antigénio.
30. Produto de acordo com a reivindicação 29, **caracterizado por** o antigénio e o oligonucleótido serem administrados a uma superfície mucosal do indivíduo.
31. Produto de acordo com a reivindicação 29 ou 30, **caracterizado por** a hormona ser administrada por via sistémica.

32. Utilização de um oligonucleótido que tem uma sequência que inclui, pelo menos, a seguinte fórmula:



caracterizada por C ser não metilado e $X_1X_2X_3$ e X_4 serem nucleótidos e um antígeno que não é codificado num vector de ácido nucleico, para a preparação de um medicamento para administração simultânea, separada ou sequencial a uma superfície mucosal de um indivíduo para induzir uma resposta imunológica ao referido antígeno.

33. Utilização de acordo com a reivindicação 32, **caracterizada por** o antígeno não produzir uma resposta imunológica sistêmica quando administrado à superfície mucosal isolado.

34. Utilização de acordo com a reivindicação 14 ou 33, **caracterizada por** o antígeno ser administrado em conjunto com um sistema de dispersão coloidal.

35. Utilização de acordo com a reivindicação 32, **caracterizada por** um adjuvante mucosal não oligonucleótido ser administrado em conjunto com o antígeno e o oligonucleótido.

36. Produto compreendendo um oligonucleótido que tem uma sequência que inclui, pelo menos, a seguinte fórmula:



caracterizada por C ser não metilado e X_1 , X_2 , X_3 e X_4 serem nucleótidos e um adjuvante mucosal não oligonucleótido para administração simultânea, separada ou sequencial a uma superfície mucosal de um indivíduo que está exposto a um

antigénio, para induzir uma resposta imunológica ao referido antigénio.

37. Produto compreendendo um oligonucleótido que tem uma sequência que inclui, pelo menos, a seguinte fórmula:



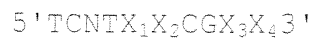
caracterizada por C ser não metilado e X_1 , X_2 , X_3 e X_4 serem nucleótidos, um adjuvante mucosal não oligonucleótido para administração simultânea, separada ou sequencial a uma superfície mucosal de um indivíduo.

38. Produto de acordo com a reivindicação 37, **caracterizado por** o indivíduo ser exposto de forma activa ao antigénio e o antigénio ser administrado em conjunto com um sistema de dispersão coloidal.
39. Utilização de acordo com a reivindicação 34 ou produto de acordo com a reivindicação 38, **caracterizado por** o sistema de dispersão coloidal ser seleccionado do grupo que consiste em complexos macromoleculares, nanocápsulas, microesferas, esférulas e sistemas à base de lípidos.
40. Utilização ou produto de acordo com a reivindicação 39, **caracterizado por** o sistema à base de lípidos ser seleccionado do grupo que consiste em emulsões óleo-em-água, micelas, micelas mistas e lipossomas.
41. Produto de acordo com a reivindicação 38, **caracterizado por** o antigénio ser administrado a uma superfície mucosal.
42. Utilização de acordo com a reivindicação 26 ou 35 ou produto de acordo com a reivindicação 41, **caracterizado por** o adjuvante não oligonucleótido ser seleccionado do grupo que consiste em toxina da cólera, derivados da toxina da

cólera, enterotoxina termolábil, derivados da enterotoxina termolábil, alúmen, MLP, MDP, saponinas, tais como QS21, citocinas, óleo-em-água e outras formulações de emulsão, tais como MF59, SAF, Montanide ISA 720 e PROVAX, polímeros PCPP e ISCOMS.

43. Utilização de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 28 ou produto de acordo com qualquer das reivindicações 29 a 31 ou 36 a 42, **caracterizado por** o oligonucleótido ter 8 a 100 nucleótidos de comprimento.
44. Utilização de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 28 ou 43 ou produto de acordo com qualquer das reivindicações 29 a 31 ou 36 a 42, **caracterizado por** o oligonucleótido:
 - (a) incluir uma modificação de esqueleto de fosfato que é um fosforotioato ou modificação de fosforoditioato; ou
 - (b) ter um esqueleto quimérico.
45. Utilização ou produto de acordo com a reivindicação 44, **caracterizado por** a modificação do esqueleto de fosfato ocorrer na extremidade da extremidade 5' do oligonucleótido e/ou na extremidade 3' do nucleótido.
46. Utilização de acordo com qualquer das reivindicações 32 ou 35 ou 39 a 43 ou produto de acordo com qualquer das reivindicações 29 a 31 ou 36 a 42, **caracterizado por** X_1X_2 serem nucleótidos seleccionados do grupo que consiste em: GpT, GpG, GpA e ApA; e X_3X_4 serem nucleótidos seleccionados do grupo que consiste em: TpT, CpT ou TpC.
47. Utilização de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 28, 32 a 35 ou 39 a 43 ou produto de acordo com qualquer das reivindicações 29 a 31 ou 36 a 42, **caracterizado por** o

oligonucleótido ter uma sequência que inclui a seguinte fórmula:



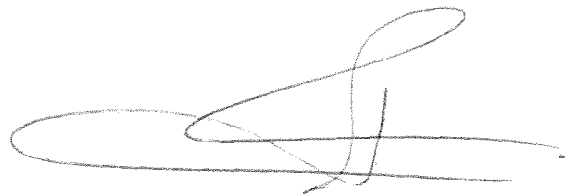
em que C é não metilado e X_1 , X_2 , X_3 e X_4 são nucleótidos e N é uma sequência de ácido nucleico composta de cerca de 0-25 nucleótidos.

48. Utilização de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 28, 32 a 35 ou 39 a 43 ou produto de acordo com qualquer das reivindicações 29 a 31 ou 36 a 42, **caracterizado por** o antígeno ser seleccionado do grupo que consiste em células, extractos de células, proteínas, polipéptidos, péptidos, polissacáridos, conjugados de polissacáridos, péptidos imitadores de polissacáridos, lípidos, glicolípidos, hidratos de carbono, alergénios, vírus e extractos virais e organismos multicelulares, tais como parasitas.
49. Utilização de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 28, 32 a 35 ou 39 a 43 ou produto de acordo com qualquer das reivindicações 29 a 31 ou 36 a 42, **caracterizado por** o antígeno ser um alergénio.
50. Utilização de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 28, 32 a 35 ou 39 a 43 ou produto de acordo com qualquer das reivindicações 29 a 31 ou 36 a 42, **caracterizado por** o antígeno ser derivado de um organismo infeccioso seleccionado do grupo que consiste em bactérias infecciosas, vírus infecciosos, parasitas infecciosos e fungos infecciosos.
51. Produto de acordo com a reivindicação 36, **caracterizado por** o antígeno não ser codificado num vector de ácido nucleico.

52. Utilização de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado por** o antígeno ser administrado a uma superfície mucosal.
53. Utilização de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 28, 32 a 35 ou 39 a 43 ou produto de acordo com qualquer das reivindicações 29 a 31 ou 36 a 42, **caracterizado por** o antígeno ser um péptido.
54. Utilização de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 28, 32 a 35 ou 39 a 43 ou produto de acordo com qualquer das reivindicações 29 a 31 ou 36 a 42, **caracterizado por** o antígeno ser uma proteína.

Lisboa, 30 de Outubro de 2006.

Pela Requerente
O Agente Oficial



Gonçalo da Cunha Ferreira
Advogado do Ar.º nº 113, nº 1 do
Escritório de Indústrias
da Rua do Carmo, 111-113
1000-000 Lisboa - Portugal

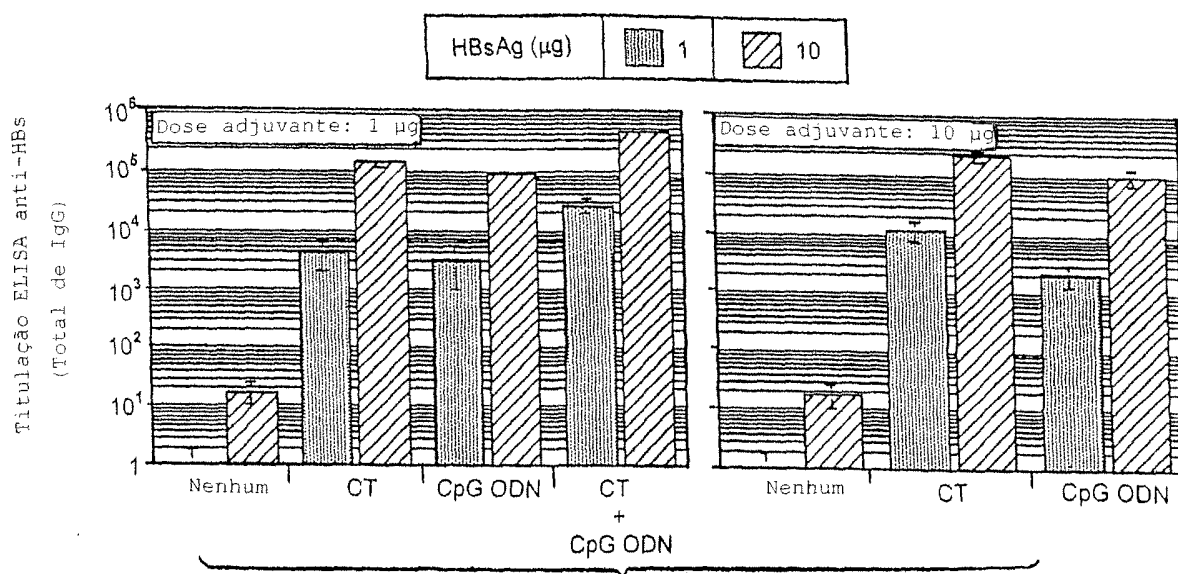


FIG. 1

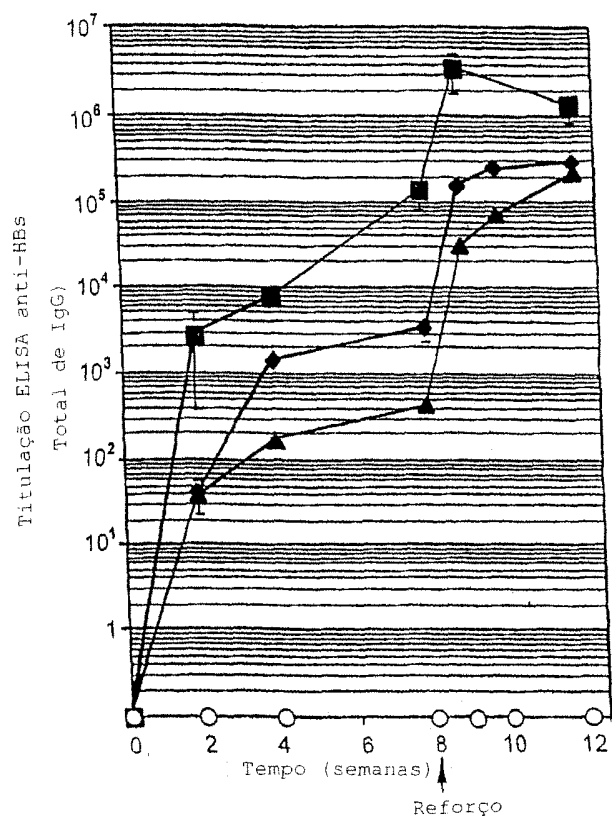
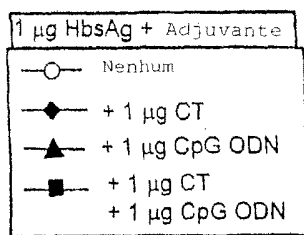


FIG. 2

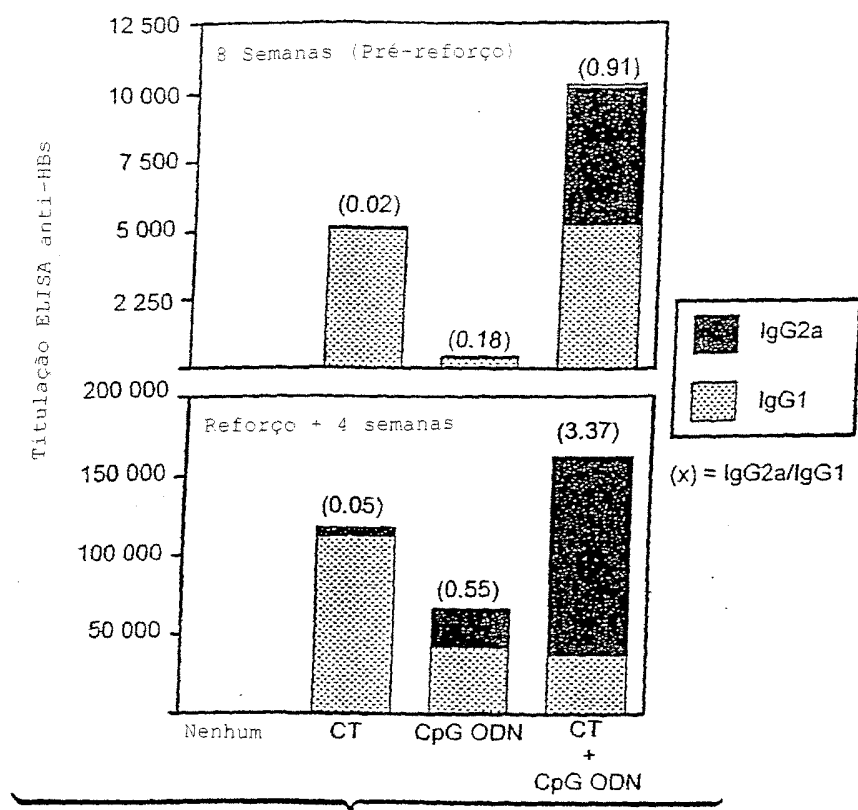


FIG. 3

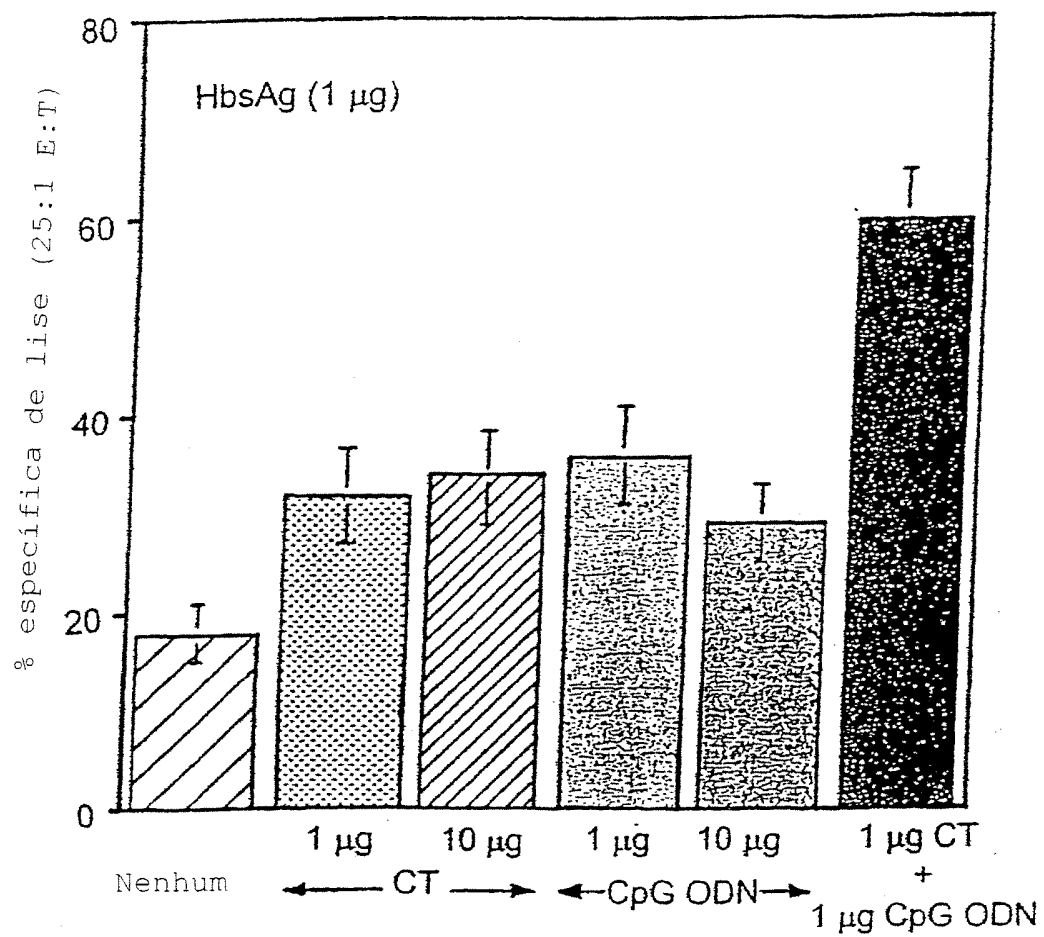


FIG. 4

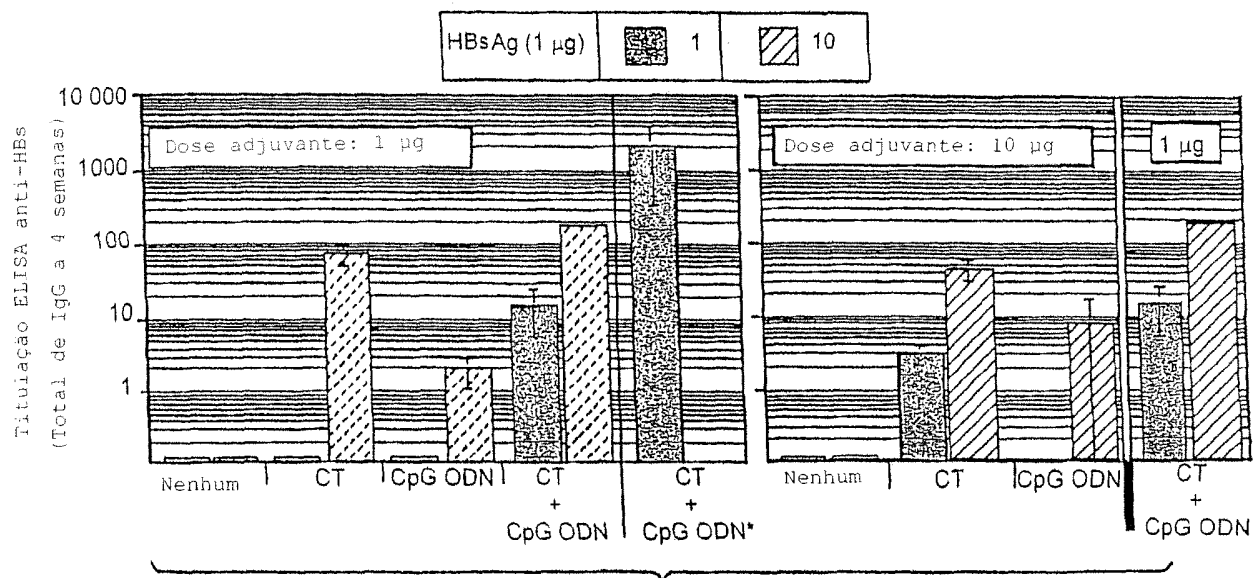


FIG. 5

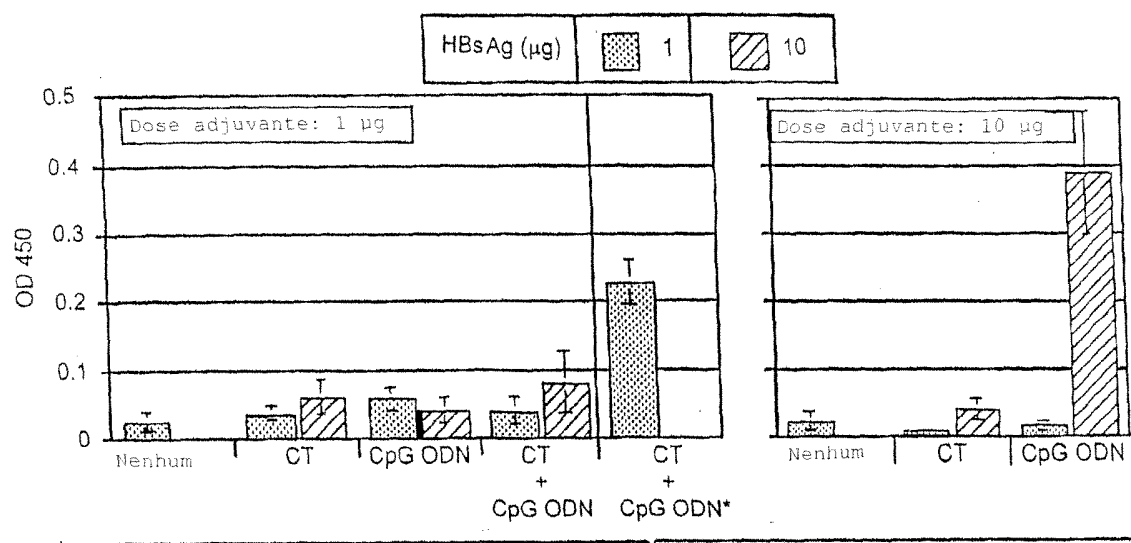


FIG. 6

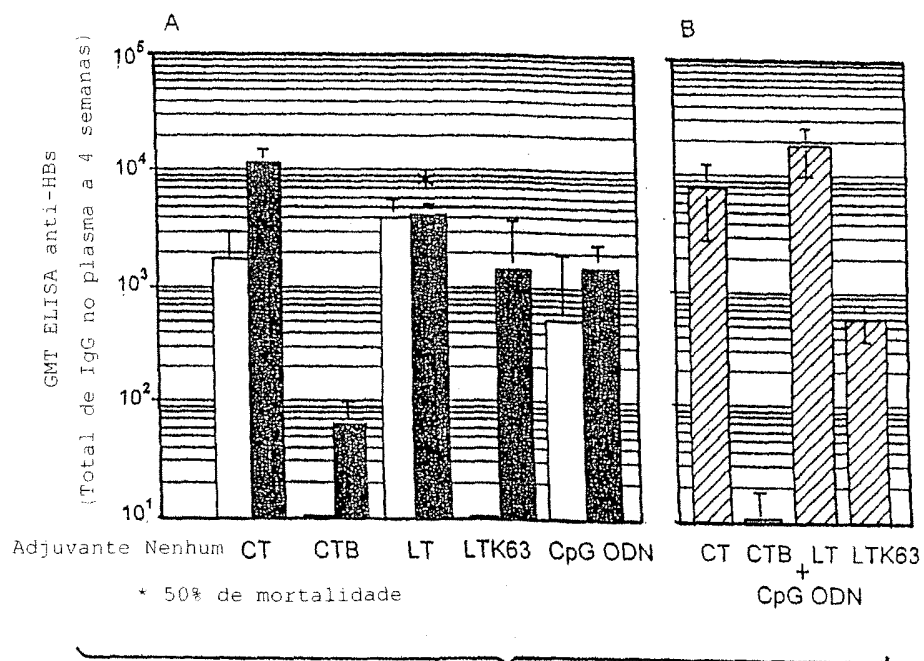


FIG. 7

ODN (#1826), CT, HBsAg (SAD):

Todos a 1 µg

Alúmen: 25 µg

(x)=lgG2a/lgG1

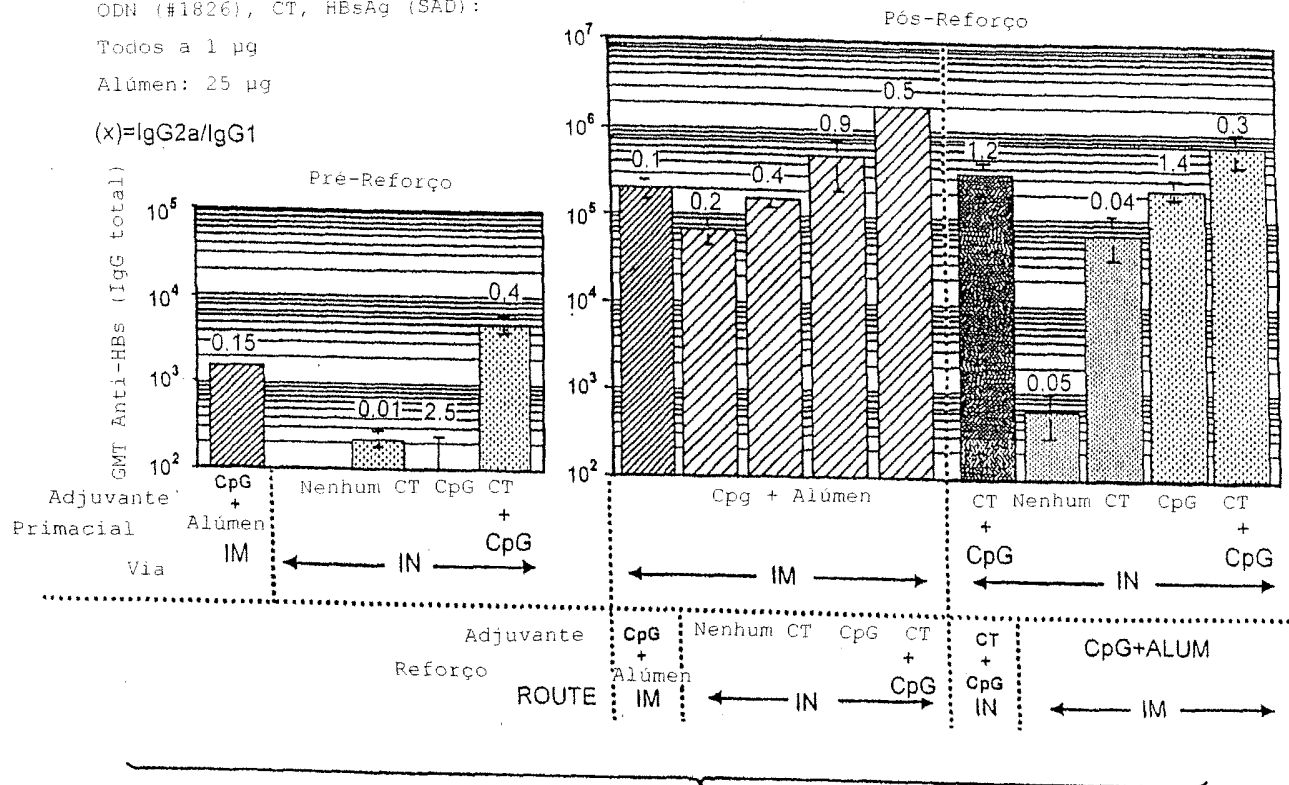


FIG. 8

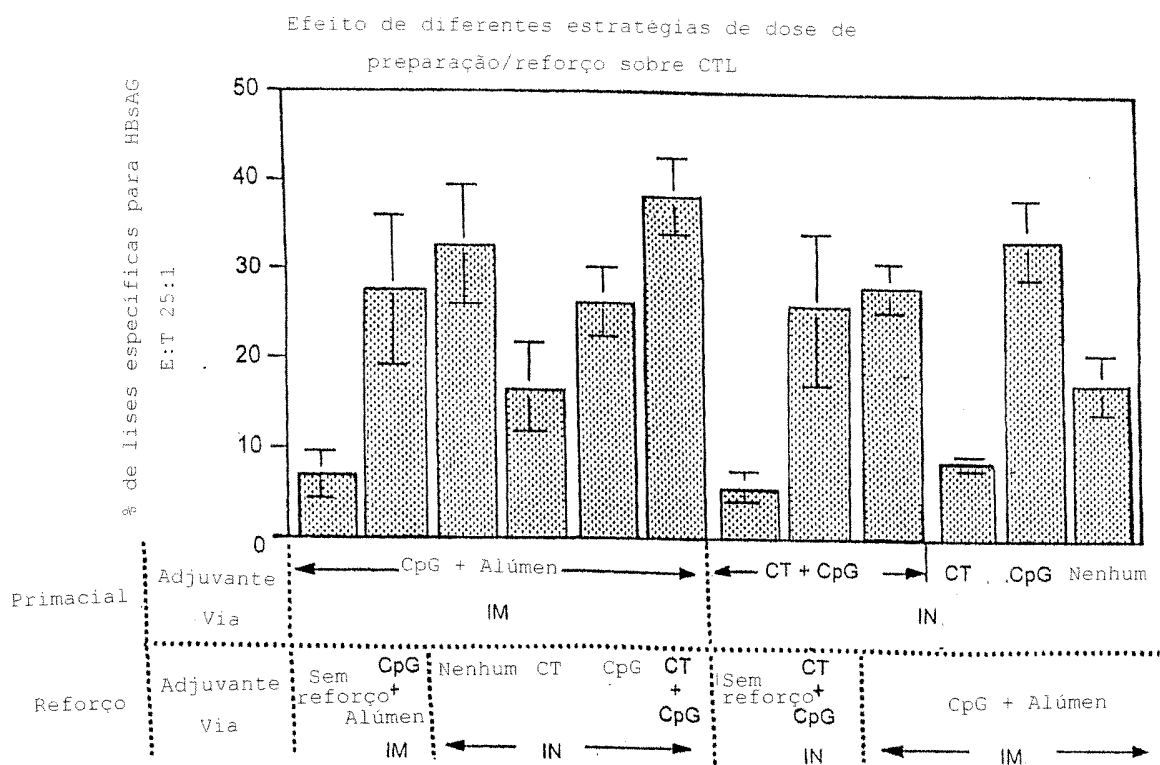


FIG. 9

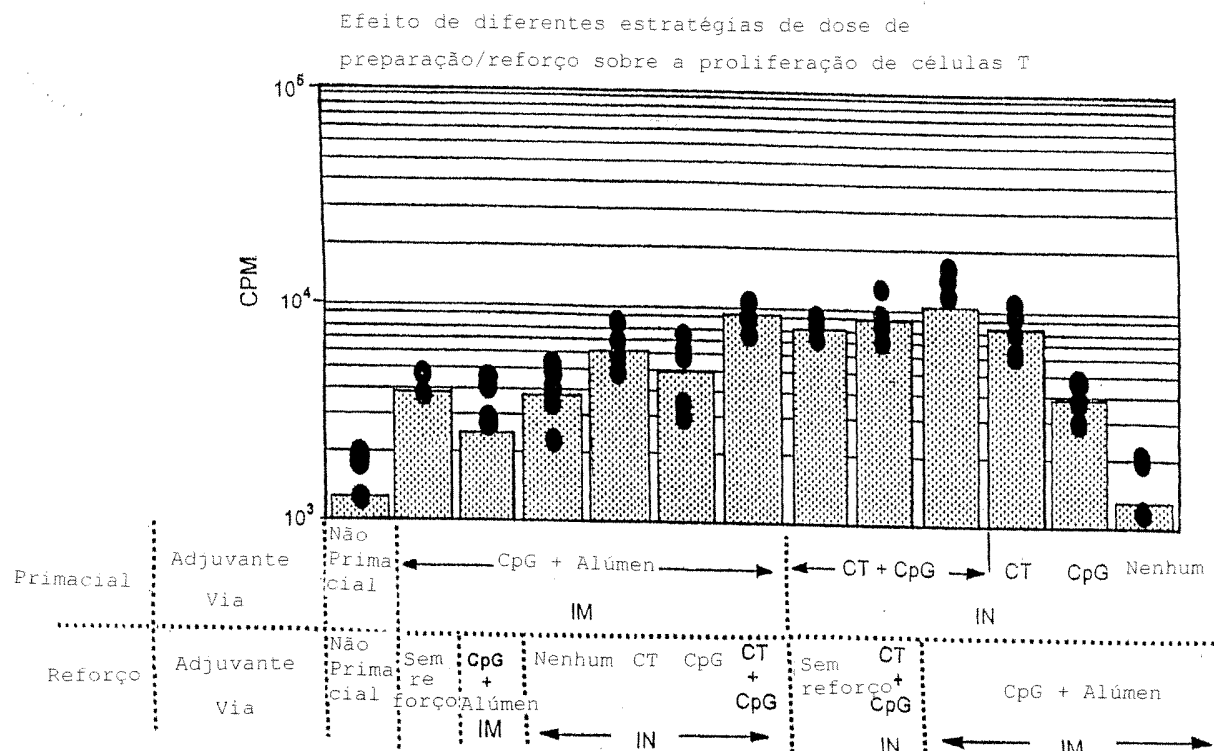


FIG. 10

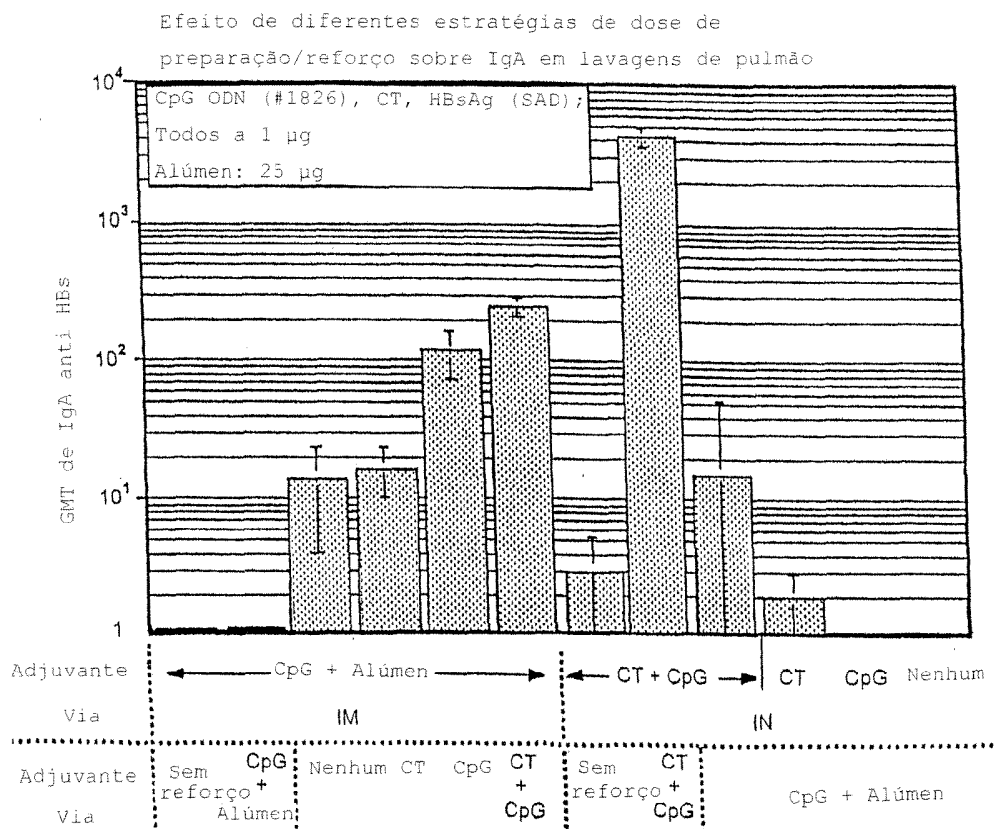


FIG. 11

Efeito de diferentes estratégias de dose de
preparação/reforço sobre IgA específico para HBsAg em
saliva

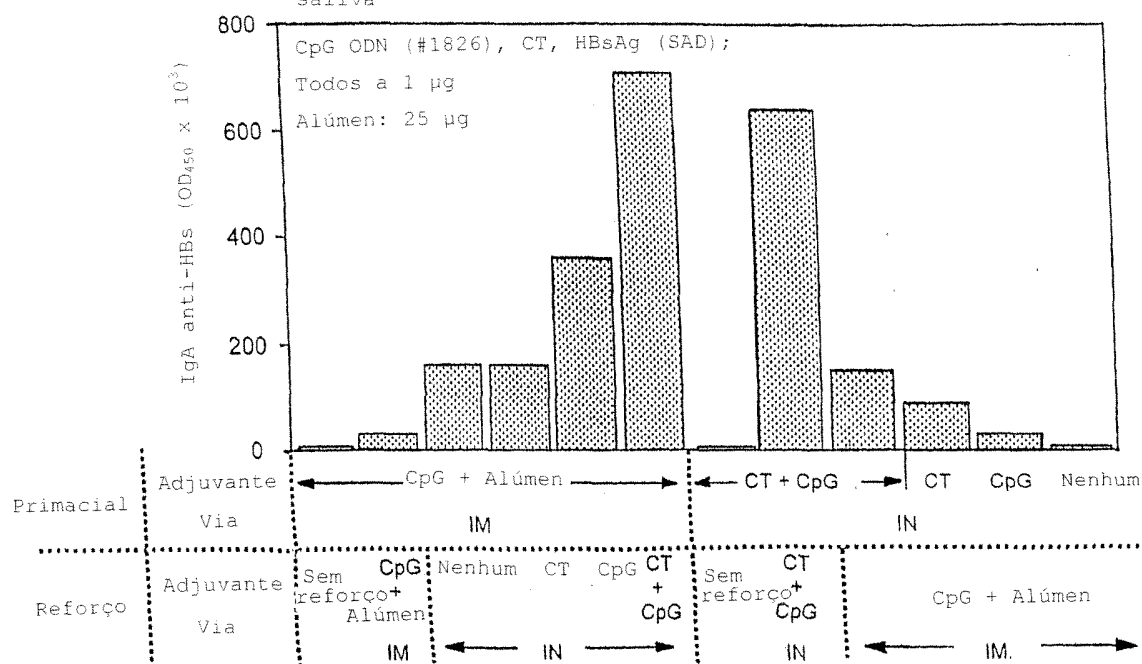


FIG. 12

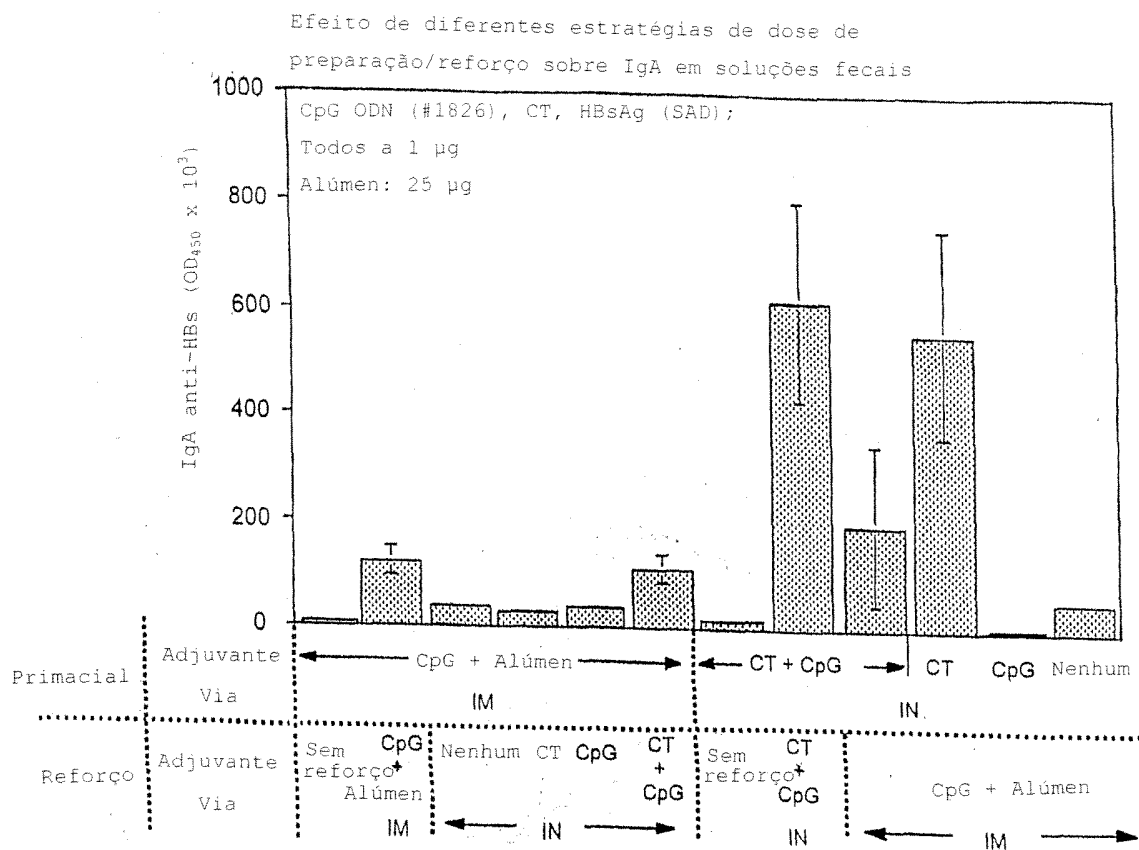


FIG. 13