

(11) Número de Publicação: **PT 2170353 E**

(51) Classificação Internacional:

A61P 37/08 (2015.01) **A61K 47/48** (2015.01)

A61K 31/7125 (2015.01) **A61K 45/06**

(2015.01)

A61P 35/00 (2015.01) **A61P 31/00** (2015.01)

A61P 11/06 (2015.01) **A61P 37/00** (2015.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2008.05.15**

(30) Prioridade(s): **2007.05.18 US 930764 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2010.04.07**

(45) Data e BPI da concessão: **2015.06.03**
181/2015

(73) Titular(es):

ADIUTIDE PHARMACEUTICALS GMBH

**ALT FECHENHEIM 34 60386 FRANKFURT AM
MAIN**

DE

(72) Inventor(es):

EUGEN UHLMANN

DE

MARION JURK

DE

(74) Mandatário:

JOÃO LUÍS PEREIRA GARCIA

RUA CASTILHO, 167 2º 1070-050 LISBOA

PT

(54) Epígrafe: **ANÁLOGOS DE OLIGONUCLEOTÍDEO MODIFICADOS POR FOSFATO COM
ATIVIDADE IMUNOESTIMULANTE**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO REFERE-SE A OLIGONUCLEOTÍDEOS INCLUINDO PELO MENOS UMA MODIFICAÇÃO DO ESQUELETO E UM DINUCLEOTÍDEO PIRIMIDINA-PURINA. A INVENÇÃO TAMBÉM SE REFERE A COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS E MÉTODOS DE UTILIZAÇÃO DAS MESMAS

RESUMO

ANÁLOGOS DE OLIGONUCLEOTÍDEO MODIFICADOS POR FOSFATO COM ATIVIDADE IMUNOESTIMULANTE

A invenção refere-se a oligonucleotídeos incluindo pelo menos uma modificação do esqueleto e um dinucleotídeo pirimidina-purina. A invenção também se refere a composições farmacêuticas e métodos de utilização das mesmas.

DESCRIÇÃO

ANÁLOGOS DE OLIGONUCLEOTÍDEO MODIFICADOS POR FOSFATO COM ATIVIDADE IMUNOESTIMULANTE

CAMPO DA INVENÇÃO

A invenção refere-se a oligonucleotídeos com pelo menos uma ligação fosfonoacetato ou tipo fosfonoacetato como revelado na reivindicação 1.

ANTECEDENTES E MÉTODOS DE UTILIZAÇÃO

O ADN bacteriano tem efeitos estimulantes imunes para ativar células B e células exterminadoras naturais, mas o ADN de vertebrados não tem (Tokunaga, T., et al., 1988. Jpn. J. Cancer Res. 79:682-686; Tokunaga, T., et al., 1984, JNCI 72:955-962; Messina, J.P. et al., 1991, J. Immunol. 147:1759-1764; e revisto em Krieg, 1998, Em: Applied Oligonucleotide Technology, C.A. Stein e A.M. Krieg, (Eds.), John Wiley and Sons, Inc., Nova Iorque, NI, páginas 431-448). Compreende-se agora que estes efeitos imunoestimulantes de ADN bacteriano são um resultado da presença de dinucleotídeos CpG não metilados em contextos de base particulares (motivos CpG), que são comuns em ADN bacteriano, mas metilados e subrepresentados em ADN de vertebrados (Krieg et al., 1995 Nature 374:546-549; Krieg, 1999 Biochim. Biophys. Acta 93321:1-10). Os efeitos imunoestimulantes de ADN bacteriano podem ser imitados com oligodesoxinucleotídeos sintéticos (ODN) contendo estes motivos CpG. Tais ODN CpG têm efeitos altamente estimulantes em leucócitos humanos e murinos, induzindo a proliferação de células B; secreção de citocinas e imunoglobulinas; actividade lítica de células exterminadoras naturais (NK) e secreção de IFN- γ ; e ativação de células dendríticas (DCs) e outras células apresentadoras de antígenos para expressar moléculas co-estimulantes e segregar citocinas, especialmente as

citocinas tipo Th1 que são importantes na promoção do desenvolvimento de respostas de células T tipo Th1. Estes efeitos imunoestimulantes dos ODN CpG com esqueleto fosfodiéster nativo são altamente específicos de CpG, uma vez que os efeitos são dramaticamente reduzidos se o motivo CpG é metilado, mudado para um GpC ou de outra forma eliminado ou alterado (Krieg et al., 1995 Nature 374:546-549; Hartmann et al., 1999 Proc. Natl. Acad. Sci USA 96:9305-10).

Em estudos iniciais, pensava-se que o motivo CpG imunoestimulante seguia a fórmula purina-purina-CpG-pirimidina-pirimidina (Krieg et al., 1995 Nature 374:546-549; Pisetsky, 1996 J. Immunol. 156:421-423; Hacker et al., 1998 EMBO J. 17:6230-6240; Lipford et al., 1998 Trends in Microbiol. 6:496-500). No entanto, é agora evidente que os linfócitos do ratinho respondem bastante bem a motivos CpG fosfodiéster que não seguem esta "fórmula" (Yi et al., 1998 J. Immunol. 160:5898-5906) e o mesmo é verdadeiro para células humanas B e células dendríticas (Hartmann et al., 1999 Proc. Natl. Acad. Sci USA 96:9305-10; Liang, 1996 J. Clin. Invest. 98:1119-1129).

Têm sido feitas uma variedade de modificações no esqueleto fosfodiéster de oligonucleotídeos imunoestimulantes. Modificações no fósforo incluíram espécies carregadas neutralmente, bem como positivamente e negativamente, tais como espécies de fosforotioato (PS). Oligonucleotídeos PS mostram uma boa atividade imunoestimulante que só é superada pelos ODN semi-macios, na qual a ligação internucleotídica em CpG é uma ligação fosfodiéster (PO). É geralmente assumido que os substituintes no átomo de fósforo têm de ter tamanho e carga semelhantes para se obter uma atividade comparável.

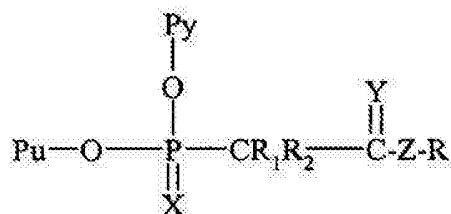
O documento WO 2006/116458 revela oligorribonucleotídeos CpG modificados com atividade imunoestimulante melhorada. ORN são rapidamente degradados

e são lábeis a nucleases. O documento WO 2006/116458 providencia oligorribonucleotídeos quimicamente modificados e análogos de ORN caracterizados pela sua estabilidade a nucleases melhorada e a sua atividade biológica melhorada (página 4, I. 11-20). ORN modificados com ligação internucleotídica fosfonoacetato e também fosfonocarboxilato são propostos na fórmula (I). Não são dados exemplos de ODNs com a referida modificação do esqueleto.

SUMÁRIO

A invenção refere-se a um oligonucleotídeo que contém uma ou mais modificações que despoletam uma capacidade imunoestimuladora melhorada. Em particular, a invenção é baseada na descoberta de que os oligonucleotídeos com pelo menos um motivo pirimidina-purina (Py-Pu) correspondente à fórmula I (abaixo) são altamente eficazes na mediação de uma resposta imune. Estes oligonucleotídeos são úteis terapeuticamente e profilaticamente para induzir uma resposta imune e para tratar doenças e distúrbios, tais como cancro e infeções virais.

Num aspeto, a invenção é uma composição contendo um oligonucleotídeo imunoestimulante com pelo menos um dinucleotídeo pirimidina-purina modificado de acordo com a Fórmula I:



Fórmula I

em que R é hidrogénio (H), C1-C4-alquilo, metoxietilo, pivaloílo oximetilo, pivaloílo oxibenzilo, tioetilo ou S-pivaloílo ou um sal fisiologicamente aceitável do mesmo; X, Y e Z são oxigénio (O) ou enxofre (S); R1 e R2 são H ou C1-C4 alquilo; Py é um análogo de nucleosídeo ou nucleosídeo

com uma base citosina; Pu é um análogo de nucleosídeo ou nucleosídeo com uma base guanina, em que o oligonucleotídeo imunoestimulante é um ligando TLR9 e em que o oligonucleotídeo é ADN.

Nalgumas modalidades, o oligonucleotídeo imunoestimulante inclui ainda um segundo dinucleotídeo pirimidina-purina, em que o segundo dinucleotídeo pirimidina-purina obtido tem uma ligação fosforotioato. Noutra modalidade o oligonucleotídeo imunoestimulante inclui ainda, pelo menos, um segundo dinucleotídeo pirimidina-purina, em que o segundo dinucleotídeo pirimidina-purina obtido tem uma ligação fosfodiéster. Ainda noutra modalidade, o oligonucleotídeo imunoestimulante inclui ainda, pelo menos, um segundo dinucleotídeo pirimidina-purina, em que o segundo dinucleotídeo pirimidina-purina tem uma ligação fosforotioato e compreende ainda pelo menos um terceiro dinucleotídeo pirimidina-purina, em que o terceiro dinucleotídeo pirimidina-purina tem uma ligação fosfodiéster.

Nalgumas modalidades pelo menos um nucleotídeo do oligonucleotídeo imunoestimulante tem um resíduo de açúcar modificado selecionado a partir do grupo que consiste essencialmente em 2'-fluoro-2'-desoxirribose, 2'-amino-2'-desoxirribose, 2'-O-alkil-ribose ou 3'-O-alkil-ribose. Nalgumas modalidades o oligonucleotídeo imunoestimulante contém pelo menos uma ligação internucleotídica selecionada do grupo que consiste nas ligações 2'-5', 5'-5', 3'-3', 2'-2' ou 2'-3'. Nalgumas modalidades o oligonucleotídeo imunoestimulante é um oligonucleotídeo de classe B, classe C, classe P, classe T ou classe E.

Nalgumas modalidades, a composição compreende ainda um agente antibacteriano, um agente anticancerígeno, um agente antiviral, um medicamento para a asma ou para a alergia ou um medicamento para uma doença auto-imune. Noutra

modalidade um ou mais dos dinucleotídeos pirimidina-purina é um dinucleotídeo C-G. Numa modalidade o segundo dinucleotídeo pirimidina-purina é um dinucleotídeo C-G. Ainda noutra modalidade o oligonucleotídeo imunoestimulante inclui pelo menos dois dinucleotídeos C-G. E ainda noutra modalidade o oligonucleotídeo imunoestimulante inclui pelo menos três dinucleotídeos C-G. Numa modalidade o oligonucleotídeo imunoestimulante inclui pelo menos uma ligação internucleotídica fosforotioato. Noutra modalidade o oligonucleotídeo imunoestimulante inclui pelo menos uma ligação internucleotídica fosfodiéster. Nalgumas modalidades o oligonucleotídeo imunoestimulante é formulado com um antígeno.

Outro aspeto da invenção providencia uma composição contendo um oligonucleotídeo imunoestimulante tal como definido nas reivindicações, com pelo menos uma ligação internucleotídica fosfonoacetato ou tipo fosfonoacetato, em que o esqueleto de oligonucleotídeo é quimérico e um veículo farmacêutico para utilização como um medicamento para estimular uma resposta imune. Numa modalidade, o sujeito tem uma infeção bacteriana e a composição é administrada numa quantidade eficaz para tratar a infeção bacteriana.

Numa modalidade o oligonucleotídeo imunoestimulante é qualquer um ou mais dos oligonucleotídeos imunoestimulantes aqui descritos. Em modalidades particulares o oligonucleotídeo imunoestimulante não é um antissenso, ribozima ou aptâmero. Numa modalidade, o oligonucleotídeo imunoestimulante é formulado com um antígeno.

Outro aspeto da invenção providencia o oligonucleotídeo imunoestimulante descrito nas reivindicações e um veículo farmacêutico para utilização no tratamento do cancro. Numa modalidade o oligonucleotídeo é entregue por uma via selecionada do grupo que consiste em oral, nasal, sublingual, intravenosa, subcutânea, mucosal,

respiratória, injeção direta e dérmica. Noutra modalidade um protocolo terapêutico é administrado ao sujeito. Numa modalidade o protocolo terapêutico é cirurgia. Noutra modalidade o protocolo terapêutico é radiação. Ainda noutra modalidade o protocolo terapêutico é um medicamento. Ainda noutra modalidade o oligonucleotídeo é formulado. Numa outra modalidade o oligonucleotídeo está associado com uma molécula alvo.

Outro aspeto da invenção providencia o oligonucleotídeo imunoestimulante descrito nas reivindicações e um veículo farmacêutico para utilização no tratamento duma infeção. Numa modalidade o oligonucleotídeo é entregue por uma via selecionada do grupo que consiste em oral, nasal, sublingual, intravenosa, subcutânea, mucosal, respiratória, injeção direta e dérmica. Numa modalidade a doença infecciosa é uma infeção bacteriana. Noutra modalidade a infeção é uma infeção viral. Ainda noutra modalidade a infeção é uma infeção parasitária. Noutra modalidade a infeção é uma infeção fúngica.

Numa modalidade o oligonucleotídeo é um oligonucleotídeo de classe A. Noutra modalidade o oligonucleotídeo é um oligonucleotídeo imunoestimulante de classe B. Ainda noutra modalidade o oligonucleotídeo é um oligonucleotídeo imunoestimulante de classe C. Ainda noutra modalidade o oligonucleotídeo é um oligonucleotídeo imunoestimulante de classe P. Noutra modalidade o oligonucleotídeo é um oligonucleotídeo imunoestimulante de classe T. Ainda noutra modalidade o oligonucleotídeo é um oligonucleotídeo imunoestimulante de classe E. Numa modalidade o oligonucleotídeo é um híbrido de ADN/ARN e o oligonucleotídeo contém um dinucleotídeo CG com uma ligação fosfodiéster.

Outro aspeto da invenção providencia uma composição contendo um oligonucleotídeo imunoestimulante tal como definido nas reivindicações, com pelo menos uma ligação

internucleotídica tipo fosfonoacetato, em que o esqueleto de oligonucleotídeo é quimérico e um veículo farmacêutico para utilização no tratamento da asma. Nalgumas modalidades o oligonucleotídeo imunoestimulante é um oligonucleotídeo de classe B, classe C, classe P, classe T ou classe E. Noutras modalidades o oligonucleotídeo é um híbrido de ADN/ARN e a ligação internucleotídica no dinucleotídeo CG é uma ligação fosfodiéster. Noutra modalidade o oligonucleotídeo é entregue por uma via selecionada do grupo que consiste em oral, nasal, sublingual, intravenosa, subcutânea, mucosal, respiratória, injeção direta e dérmica.

Outro aspeto da invenção providencia uma composição contendo um oligonucleotídeo imunoestimulante como definido nas reivindicações com pelo menos uma ligação internucleotídica tipo fosfonoacetato, em que o esqueleto de oligonucleotídeo é quimérico e um veículo farmacêutico para utilização no tratamento da alergia. Nalgumas modalidades o oligonucleotídeo imunoestimulante é um oligonucleotídeo de classe B, classe C, classe P, classe T ou classe E. Noutras modalidades o oligonucleotídeo é um híbrido de ADN/ARN e a ligação internucleotídica no dinucleotídeo CG é uma ligação fosfodiéster. Noutra modalidade o oligonucleotídeo é entregue por uma via selecionada do grupo que consiste em oral, nasal, sublingual, intravenosa, subcutânea, mucosal, respiratória, injeção direta e dérmica.

Outro aspeto da invenção é uma composição contendo um oligonucleotídeo imunoestimulante com pelo menos uma ligação fosfonoacetato ou tipo fosfonoacetato, em que o esqueleto de oligonucleotídeo é quimérico e o oligonucleotídeo é ligado a pelo menos um agente terapêutico. Numa modalidade o agente terapêutico é um segundo oligonucleotídeo e o segundo imunoestimulante está ligado ao oligonucleotídeo imunoestimulante para formar uma

estrutura ramificada. Noutra modalidade o agente terapêutico é um segundo oligonucleotídeo e o segundo oligonucleotídeo está ligado ao oligonucleotídeo imunoestimulante para formar uma ligação 3'-3'. E ainda noutra modalidade o agente terapêutico é um segundo oligonucleotídeo e o segundo oligonucleotídeo e o oligonucleotídeo imunoestimulante formam dendrímeros. Ainda noutra modalidade o agente terapêutico é um agente anti-viral. Numa outra modalidade o agente terapêutico é um agente anti-cancerígeno. Numa modalidade a ligação entre o oligonucleotídeo e o agente terapêutico é covalente. Numa modalidade a ligação entre o oligonucleotídeo e o agente terapêutico é não covalente. Numa modalidade a composição contém um antígeno.

Também é providenciada como um aspeto da invenção, a utilização de um oligonucleotídeo da invenção para estimular uma resposta imune.

Também é providencido um método para o fabrico de um medicamento de um oligonucleotídeo da invenção para estimular uma resposta imune.

Cada uma das limitações da invenção pode abranger várias modalidades da invenção. Está, portanto, previsto que cada uma das limitações da invenção que envolva qualquer elemento ou combinações de elementos pode ser incluída em cada aspeto da invenção. Esta invenção não está limitada na sua aplicação aos pormenores de construção e à disposição dos componentes apresentados na descrição seguinte ou ilustrados nos desenhos. A invenção está habilitada a outras modalidades e de ser praticada ou de ser realizada de várias maneiras. Além disso, a fraseologia e a terminologia aqui utilizadas são para propósitos de descrição e não devem ser consideradas como limitantes. A utilização de "incluindo", "compreendendo" ou "tendo", "contendo", "envolvendo", e as suas variações, destinam-se a abranger os itens listados em seguida e seus

equivalentes, bem como os itens adicionais.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

As figuras são apenas ilustrativos e não são necessárias para possibilitar a invenção aqui revelada.

A Figura 1 é um gráfico que mostra a comparação de modificações do esqueleto de oligonucleotídeos de classe B (ODN) com sequências idênticas e fosfodiéster (PO) (SEQ. ID N.º 7, linha vermelha), fosforotioato (PS) (SEQ. ID N.º 3, linha vermelha pontilhada), metilfosfonato (P-Me) (SEQ. ID N.º 12, linha preta) ou fosfonoacetato (PA) (SEQ. ID N.º 8, linha preta tracejada). A figura mostra que o ODN com modificação PA induziu atividade de TLR9 humano em células 293 HEK transfectadas por TLR9 em maior extensão numa concentração mais baixa de ODN em comparação com outras modificações do esqueleto medidas pelo ensaio de luciferase. O eixo dos yy é o índice de estimulação e o eixo dos xx é o logaritmo da concentração de ODN em μM .

A Figura 2 é um gráfico que mostra a indução de interferon alfa ($\text{IFN-}\alpha$) em PBMCs humanos após estimulação com ODN PA. A produção de $\text{IFN-}\alpha$ de ODN semi-macios com uma (SEQ. ID N.ºs 9-10) ou duas (SEQ. ID N.º 11) modificações PA num motivo CpG foi comparada com um ODN semi-macio com a mesma sequência (SEQ. ID N.º 2), conforme medido por ensaio de ELISA. O eixo dos yy é a concentração de $\text{IFN-}\alpha$ em pg/ml e o eixo dos xx é a concentração de oligonucleotídeo em μM .

A Figura 3 são três gráficos que mostram a estimulação de TLR9 em células 293 HEK transfectadas por TLR9 após estimulação com ODN de classe B conforme medido pelo ensaio de luciferase. A Figura 3a mostra uma comparação da estimulação de TLR9 por ODN da mesma sequência, com um único motivo CpG que compreende uma

modificação PS (SEQ. ID N.º 13), PO (SEQ ID N.º 14) ou PA (SEQ. ID N.º 15) no esqueleto. A Figura 3b mostra a comparação de três ODN da mesma sequência contendo dois motivos CpG, em que em cada um dos motivos CpG contém um esqueleto de PS ou de PA. ODN quer com uma (SEQ. ID N.º 17) ou duas (SEQ. ID N.º 18) modificações PA num motivo CpG foram comparados com a estimulação por um oligonucleotídeo PS da mesma sequência (SEQ. ID N.º 16). A Figura 3c mostra a estimulação de TLR9 por ODN com a mesma sequência contendo múltiplos motivos CpG. ODN semi-macios com uma (SEQ. ID N.º 9-10) ou duas (SEQ. ID N.º 11) modificações PA num motivo CpG foram comparados com a estimulação por um oligonucleotídeo PS da mesma sequência (SEQ. ID N.º:5). O eixo dos yy é o índice de estimulação relativo e o eixo dos xx é o log da concentração de ODN em μM .

A Figura 4 é um gráfico que mostra a estimulação de TLR9 em células 293 HEK transfectadas por TLR9 após a estimulação com ODN semi-macios de classe C de sequência idêntica, mas com diferentes modificações do esqueleto nos motivos CpG, conforme medido pelo ensaio de luciferase (SEQ. ID N.ºs 19-22, ver Quadro 4). O eixo dos yy é o índice de estimulação e o eixo dos xx é o log da concentração de ODN em μM .

A Figura 5 são três gráficos que mostram a estimulação de TLR9 em células 293 HEK transfectadas por TLR9 após estimulação com ODN contendo múltiplos motivos CpG. A Figura 5a compara a capacidade de quatro ODN de classe B (SEQ. ID N.ºs 23-26, ver Quadro 5) para estimular TLR9 com modificações PA em diferentes combinações dos quatro motivos CpG. Foram também testados um ODN PS de classe B completo (SEQ. ID N.º 1) e um ODN de classe C (SEQ. ID N.º 4). A Figura 5b compara a capacidade de três ODN de classe B (SEQ. ID N.ºs 27-29, ver Quadro

5) para estimular TLR9 com modificações PA em diferentes combinações dos três motivos CpG. Foram também testados um ODN PS de classe B completo (SEQ. ID N.º 1) e um ODN de classe C (SEQ. ID N.º 4). A Figura 5c mostra uma comparação da capacidade de três ODN de classe C para estimular TLR9 com modificações PA em um (SEQ. ID N.ºs 30-31) ou dois ou em ambos (SEQ. ID N.º 32) motivos CpG. Foi também testado um ODN PS de classe C completo da mesma sequência (SEQ. ID N.º 33). O eixo dos yy é o índice de estimulação relativa e o eixo dos xx é o log da concentração de ODN em μM .

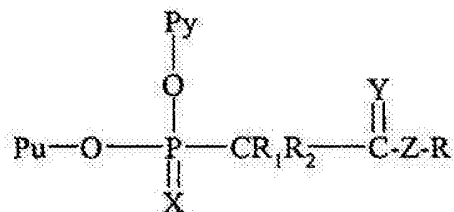
DESCRIÇÃO DETALHADA

A invenção é baseada, em parte, na descoberta de um tipo de oligonucleotídeo estabilizado que mostra uma capacidade imunoestimulante melhorada. As modificações do esqueleto do oligonucleotídeo, tais como modificações fosforotioato, resultam muitas vezes em oligonucleotídeos com estabilidade aumentada. Em alguns casos, a modificação do esqueleto pode resultar na redução da capacidade para estimular a atividade de TLR9, sacrificando assim alguma da potência de oligonucleotídeos não estabilizados. Foi descoberto pelos inventores que oligonucleotídeos imunoestimulantes com uma modificação específica do esqueleto não só aumentaram a estabilidade, mas também melhoraram a capacidade de estimular a produção de interferon- α (IFN- α) e induzir a ativação de TLR9. Como resultado, estas moléculas têm potência reforçada.

A invenção refere-se genericamente a oligonucleotídeos imunoestimulantes que contêm certas modificações do esqueleto, bem como a oligonucleotídeos imunoestimulantes relacionados e composições. Os oligonucleotídeos imunoestimulantes da invenção são úteis em qualquer situação ou aplicação que exige uma composição ou método para estimular ou aumentar uma resposta imune. Os

oligonucleotídeos da invenção são de utilização particular na preparação de composições farmacêuticas, incluindo adjuvantes, vacinas e outros medicamentos para utilização no tratamento de uma variedade de condições patológicas, incluindo cancro, doenças infecciosas, alergia e asma, doença inflamatória e auto-imune. A invenção em certos aspetos refere-se assim a composições imunoestimulantes que incluem oligonucleotídeos imunoestimulantes da invenção, bem como métodos para a sua utilização. Também, como revelado abaixo, os oligonucleotídeos da invenção são de utilização particular em métodos para a ativação de uma célula imune, vacinando um sujeito, tratando um sujeito que tem ou está em risco de ter uma deficiência do sistema imune, uma infecção, cancro, uma condição alérgica, ou doença inflamatória ou auto-imune.

Os oligonucleotídeos imunoestimulantes da invenção compreendem dinucleotídeos pirimidina-purina (Py-PU) descritos pela Fórmula I:



em que R é hidrogénio (H), C1-C4-alquilo, metoxietilo, pivaloílo oximetilo, pivaloílo oxibenzilo, tioetilo ou S-pivaloílo ou um sal fisiologicamente tolerado do mesmo; X, Y e Z são oxigénio (O) ou enxofre (S); R1 e R2 são H ou C1-C4 alquilo; Py é um nucleosídeo ou um análogo de nucleosídeo com uma base citosina e Pu é um nucleosídeo ou um análogo de nucleosídeo com uma base guanina.

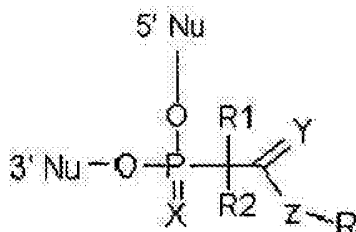
O termo "oligonucleotídeo imunoestimulante", ou o equivalente, "ácido nucleico imunoestimulante" no contexto desta invenção refere-se a qualquer ácido nucleico com pelo menos um dinucleotídeo imunoestimulante Py-Pu da invenção e é capaz de ativar uma célula imune. Nalgumas modalidades da

invenção, o dinucleotídeo pirimidina-purina pode ser um dinucleotídeo CpG. Em tal caso, pelo menos o C do dinucleotídeo CpG é tipicamente, mas não necessariamente, não metilado. Ácidos nucleicos imunoestimulantes compreendendo dinucleotídeo pirimidina-purina são descritos num certo número de patentes emitidas e pedidos de patentes publicados, incluindo Paentes U.S. N.ºs. 6 194 388; 6 207 646; 6 218 371; 6 239 116; 6 339 068; 6 406 705; e 6 429 199. Nalguns aspetos da invenção é desejável que o oligonucleotídeo imunoestimulante tenha mais de um dinucleotídeo imunoestimulante Py-Pu.

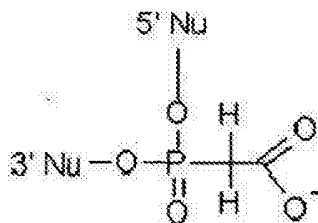
Um oligonucleotídeo imunoestimulante contendo pelo menos um dinucleotídeo Py-Pu é uma molécula de ácido nucleico que contém uma sequência dinucleotídica de citosina-guanina correspondente à fórmula I e que ativa o sistema imune. Um exemplo não limitante de um ácido nucleico imunoestimulante contendo pelo menos um dinucleotídeo Py-Pu é um ácido nucleico que contém uma sequência dinucleotídica de citosina-guanina não metilada (isto é, uma citidina 5' não metilada seguido por uma guanosina 3' e ligado por uma ligação fosfonoacetato ou tipo fosfonoacetato). Um dinucleotídeo "C-G" é descrito como um dinucleotídeo de acordo com a fórmula 5'-Py-Pu-3', em que Py é C ou um C modificado e Pu é G ou um G modificado. Os oligonucleotídeos imunoestimulantes da presente invenção podem conter múltiplos dinucleotídeos C-G. Um ou mais dos dinucleotídeos C-G pode ter uma ligação internucleotídica fosfonoacetato ou tipo fosfonoacetato.

Os oligonucleotídeos imunoestimulante atuam como ligandos TLR9. Tal como aqui utilizado, o termo "ligando TLR9" refere-se a qualquer agente que é capaz de induzir um aumento na sinalização de TLR9 (isto é, um agonista de TLR9). Ligandos TLR9 incluem especificamente, sem limitação, moléculas de ácido nucleico CpG imunoestimulantes.

Nalguns aspectos da invenção os oligonucleotídeos imunoestimulantes contêm ligações internucleotídicas fosfonoacetato ou tipo fosfonoacetato. Nalgumas modalidades as ligações ocorrem apenas dentro de pelo menos um dinucleotídeo Py-Pu interno. Noutras modalidades as ligações ocorrem dentro de múltiplos dinucleotídeos Py-Pu ou em menos de todos os dinucleotídeos Py-Pu. Também é possível no contexto da invenção que ligações internucleotídicas fosfonoacetato ou tipo fosfonoacetato ocorram fora do dinucleotídeo imunoestimulante Py-Pu. Ligações fosfonoacetato e tipo fosfonoacetato são descritas pela fórmula I e pelas fórmulas abaixo:



ligação tipo fosfonoacetato



ligação fosfonoacetato

em que R, R1, R2, Y, e Z são definidos como descrito acima, e Nu é qualquer nucleotídeo.

Os oligonucleotídeos imunoestimulantes podem ter modificações adicionais do esqueleto, para além da ligação fosfonoacetato ou tipo fosfonoacetato no dinucleotídeo Py-Pu. Uma ligação internucleotídica estabilizada é uma ligação internucleotídica que é relativamente resistente à degradação *in vivo* (por exemplo, através de uma exo ou endonuclease), em comparação com uma ligação internucleotídica fosfodiéster. Além das ligações

fosfonoacetato e tipo fosfonoacetato, os oligonucleotídeos podem conter outras ligações internucleotídicas estabilizadas, incluindo, sem limitação, fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonato e metilfosforotioato. Outras ligações internucleotídicas estabilizadas incluem, sem limitação: péptido, alquilo e defosfo. Ligações internucleotídicas fosfonoacetato, tal como outras ligações estabilizadas, reduziram a suscetibilidade à digestão por nuclease e aumentaram a capacidade de ativar ARNase H. Assim, por exemplo, os oligonucleotídeos fosfodiéster, mas não fosfonoacetato, são suscetíveis à digestão por nuclease, enquanto ambos os oligonucleotídeos fosfodiéster e fosfonoacetato ativam ARNase H. Nalgumas modalidades o oligonucleotídeo imunoestimulante Py-Pu inclui pelo menos uma ligação internucleotídica fosfodiéster.

Os oligonucleotídeos imunoestimulantes podem incluir, para além de ligações internucleotídicas fosfonoacetato ou tipo fosfonoacetato em posições internas preferidas, extremidades 5' e 3' que são resistentes à degradação. Tais extremidades resistentes à degradação podem envolver qualquer modificação adequada que resulta num aumento da resistência contra a digestão por exonuclease e relação às extremidades não modificadas correspondentes. Por exemplo, as extremidades 5' e 3' podem ser estabilizadas pela inclusão de pelo menos uma modificação fosfato do esqueleto. Numa modalidade, pelo menos uma modificação fosfato do esqueleto em cada extremidade é uma ligação internucleotídica, independentemente, fosforotioato, fosforoditioato, fosfonoacetato, tipo fosfonoacetato, metilfosfonato ou metilfosforotioato. Noutra modalidade, a extremidade resistente à degradação inclui uma ou mais unidades de nucleotídeos ligados por ligações peptídicas ou de amido na extremidade 3'.

Os termos "ácido nucleico" e "oligonucleotídeo" também englobam ácidos nucleicos ou oligonucleotídeos com

substituições ou modificações, tais como nas bases e/ou açúcares. Por exemplo, eles incluem ácidos nucleicos que possuem esqueletos de açúcar que estão covalentemente ligados a grupos orgânicos de baixo peso molecular que não um grupo hidroxilo na posição 2' e diferente de um grupo fosfato ou um grupo hidroxil na posição 5'. Assim, os ácidos nucleicos modificados podem incluir um grupo desoxirribose 2'-O-alquilado. Além disso, os ácidos nucleicos modificados podem incluir açúcares tais como arabinose ou 2'-fluoroarabinose em vez de desoxirribose. Assim, os ácidos nucleicos podem ser heterogêneos na composição do esqueleto contendo, assim, qualquer combinação possível de unidades de polímero ligadas entre si, tais como os ácidos nucleicos-péptidos (que têm um esqueleto de aminoácidos com bases de ácidos nucleicos). No contexto da presente invenção, os oligonucleotídeos não são oligonucleotídeos antissenso, ribozimas, ou aptâmeros.

Os ácidos nucleicos também incluem purinas e pirimidinas substituídas, tais como C-5 propina pirimidina e bases modificadas de 7-deaza-7-purina substituída (Wagner RW et al., (1996) Nat Biotechnol 14:840-4). Purinas e pirimidinas incluem, mas não se limitam a, adenina, citosina, guanina, timina, 5-metilcitosina, 5-hidroxicitosina, 5-fluorocitosina, 2-aminopurina, 2-amino-6-cloropurina, 2,6-diaminopurina, hipoxantina, e outras nucleobases que ocorrem naturalmente ou não naturalmente, frações aromáticas substituídas e não substituídas. Outras tais modificações são bem conhecidas daqueles com habilitação na arte.

Os oligonucleotídeos imunoestimulantes da invenção podem incluir motivos e propriedades de outras classes de ODN tais como classe A, classe B, classe C, classe T, classe P e classe E desde que incluam dinucleotídeo pirimidina-purina modificado de acordo com a Fórmula I. ODN de "classe B" são potentes na ativação de células B, mas

são relativamente fracos na indução de IFN- α e na ativação das células NK. Os ácidos nucleicos CpG de classe B normalmente são totalmente estabilizados e incluem um dinucleotídeo CpG não metilado dentro de certos contextos de base preferidos. Ver, por exemplo, Patentes U.S. N.ºs 6 194 388; 6 207 646; 6 214 806; 6 218 371; 6 239 116; e 6 339 068. Outra classe é potente na indução de IFN- α e na ativação das células NK, mas é relativamente fraca na estimulação de células B; esta classe foi denominada de classe A. Os ácidos nucleicos CpG de "classe A" tipicamente tem sequências poli-G estabilizadas nas extremidades 5' e 3' e uma sequência contendo dinucleotídeo CpG fosfodiéster palindrômica com pelo menos 6 nucleotídeos. Ver, por exemplo, o pedido de patente publicado PCT/US00/26527 (documento WO 01/22990). Ainda uma outra classe de ácidos nucleicos de CpG ativa as células B e as células NK e induz o IFN- α ; esta classe foi chamada de "classe C". Os ácidos nucleicos CpG de classe C, conforme caracterizados inicialmente, tipicamente são totalmente estabilizados, incluem uma sequência tipo classe B e um palíndromo ou quase palíndromo rico em GC. Esta classe foi descrita no pedido de patente provisória U.S. 60/313 273, submetido a 17 de agosto de 2001, US10/224 523 submetido a 19 de agosto de 2002. Estes ácidos nucleicos motivos de combinação têm efeitos imunoestimulantes que se situam algures entre aqueles efeitos associados aos ODN CpG de classe B tradicionais, que são indutores potentes da ativação de células B e da ativação de células dendríticas (DC), e aqueles efeitos associados com uma classe mais recentemente descrita de ácidos nucleicos imunoestimulantes (ODN CpG de classe B), que são fortes indutores de IFN- α e da ativação de células exterminadoras naturais (NK), mas indutores relativamente pobres de ativação de células B e de DC. Krieg AM et al., (1995) Nature 374:546-9; Balias ZK et al., (1996) J Immunol 157:1840-5; Yamamoto S et al., (1992) J

Immunol 148:4072-6. Enquanto ODN CpG de classe B da arte antecedente têm muitas vezes esqueletos fosforotioato e ODN CpG de classe A da arte antecedente têm esqueletos mistos ou quiméricos, a classe C dos ácidos nucleicos imunoestimulantes motivos de combinação pode ter estabilizado, por exemplo, esqueletos fosforotioato, quimérico ou fosfodiéster, e nalguns casos, têm esqueletos semi-macios. As modificações de fosfonato ou tipo fosfonato podem ser incorporadas em cada um destes tipos de moléculas.

Oligonucleotídeos de "classe T" induzem secreção de níveis mais baixos de IFN- α quando não modificados como nos presentes ODNs da invenção e citocinas e quimiocinas relacionadas com IFN do que oligonucleotídeos de classe B ou de classe C, enquanto mantêm a capacidade para induzir níveis de IL-10 semelhantes aos dos oligonucleotídeos de classe B. Ver, por exemplo, Pedido de Patente U.S. Série N.º 11/099 683. Outra classe, os oligonucleotídeos de classe P, tem a capacidade de, em alguns casos, induzir níveis muito mais elevados de secreção de IFN- α do que a classe C. Os oligonucleotídeos "classe P" têm a capacidade de se auto-organizarem espontaneamente em concatâmeros quer *in vitro* e/ou *in vivo*. Sem estar ligado por qualquer teoria particular para o método de ação destas moléculas, uma hipótese potencial é que esta propriedade confere aos oligonucleotídeos de classe P a capacidade de reticular TLR9 de forma superior dentro de determinadas células imunes, induzindo um padrão distinto de ativação imune em comparação com as classes anteriormente descritas de oligonucleotídeos CpG. Ver, por exemplo, Pedido de Patente U.S. Série N.º 11/706 561. Os oligonucleotídeos da "classe E" são uma subclasse dos oligonucleotídeos de classe A, B, C, T ou P que compreendem ainda a sequência $R_3\text{Py-Pu } R_4$, em que R_3 e R_4 são cada um análogo de nucleotídeo substituído lipofílico, em que Py é um nucleotídeo pirimidina e em que

Pu é uma purina ou um resíduo abásico. Análogos de nucleotídeos lipofílicos preferidos são, por exemplo, 5-cloro-uracilo, 5-bromo-uracilo, 5-iodo-uracilo, 5-etil-uracilo, 5-propil-uracilo, 2,4-difluoro-tolueno e 3-nitropirrol.

Esqueletos modificados tais como aqueles com ligações fosfonoacetato ou tipo fosfonoacetato e outros podem ser sintetizados utilizando técnicas automatizadas que empregam químicas tanto fosforamidato como H-fosfonato. A síntese é descrita por exemplo, no pedido de patente internacional WO 02/32912. A síntese de oligonucleotídeos com ligações fosfonoacetato e tipo fosfonoacetato é descrita, por exemplo, na Patente U.S. N.º 6 693 187. Podem ser feitos aril- e alquil-fosfonatos, por exemplo, como descrito na Patente U.S. N.º 4 469 863; e alquilfosfotriésteres (em que a fração de oxigénio carregada é alquilada como descrito na Patente U.S. N.º 5 023 243 e Patente Europeia N.º 092 574) podem ser preparados por síntese em fase sólida automatizada, utilizando reagentes disponíveis comercialmente. Os métodos para fazer outras modificações e substituições do esqueleto de ADN têm sido descritos (Uhlmann, E. et al., (1990) Chem Ver 90:544; Goodchild, J. (1990) Bioconjugate Chem 1:165). Os métodos para a preparação de oligonucleotídeos quiméricos também são conhecidos. Por exemplo, as patentes emitidas para Uhlmann et al., descreveram tais técnicas.

Os oligonucleotídeos da presente invenção são ADN. Numa modalidade os oligonucleotídeos imunoestimulantes da invenção são moléculas híbridas de ADN/ARN compreendendo um esqueleto misto de ribose e desoxirribose. Os oligonucleotídeos híbridos ADN/ARN apresentam frequentemente atividades aumentadas numa variedade de aplicações dependentes de células T e a estimulação com estes oligonucleotídeos muitas vezes resulta na indução de um perfil diferente de moléculas associadas à resposta

imune, tais como citocinas. Numa modalidade estes oligonucleotídeos híbridos ADN/ARN são de cadeia simples. Noutra modalidade a totalidade ou parte do oligonucleotídeo é de cadeia dupla.

Numa modalidade os oligonucleotídeos imunoestimulantes da invenção estão na forma de moléculas covalentemente fechadas em forma de halteres com ambas as estruturas primária e secundária. Numa modalidade tais oligorribonucleotídeos cíclicos incluem dois laços de cadeia simples ligados por um segmento interveniente de cadeia dupla. Numa modalidade pelo menos, um laço de cadeia simples inclui um motivo de ADN imunoestimulante da invenção. Outras moléculas covalentemente fechadas em forma de halteres da invenção incluem moléculas de ADN/ARN quimérico em que, por exemplo, o segmento de cadeia dupla é, pelo menos parcialmente, ADN (por exemplo, quer dsADN homodimérico ou ADN:ARN heterodimérico) e, pelo menos, um laço de cadeia simples inclui um motivo de ADN imunoestimulante da invenção. Em alternativa, o segmento de cadeia dupla da molécula quimérica é ADN.

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

Os oligonucleotídeos imunoestimulantes da presente invenção podem abranger várias modificações e substituições químicas, em comparação com o ARN e o ADN naturais, envolvendo uma ponte internucleotídica fosfodiéster, uma unidade de β -D-ribose e/ou uma base nucleotídica natural

(adenina, guanina, citosina, timina, uracilo). Exemplos de modificações químicas são conhecidos daqueles habilitados e são descritos, por exemplo, em Uhlmann, E. et al., (1990) Chem Rev 90:543; "Protocols for Oligonucleotides and Analogs" Synthesis and Properties & Synthesis and Analytical Techniques, S. Agrawal, Editor, Humana Press, Totowa, EUA 1993; Crooke, S.T. et al., (1996) Annu Rev Pharmacol Toxicol 36:107-129; e Hunziker, J. et al., (1995) Mod Synth Methods 7:331-417. Um oligonucleotídeo de acordo com a invenção pode ter uma ou mais modificações, em que cada modificação está localizada numa ponte internucleotídica fosfodiéster particular e/ou numa unidade de β -D-ribose particular e/ou numa posição particular de base nucleotídica natural em comparação com um oligonucleotídeo da mesma sequência que é composto de ADN ou ARN naturais.

Por exemplo, a invenção refere-se a um oligonucleotídeo que pode compreender uma ou mais modificações e em que cada modificação é independentemente selecionada de:

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

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

Uma ponte internucleotídica fosfodiéster localizada na extremidade 3' e/ou na 5' de um nucleotídeo pode ser substituída por uma ponte internucleotídica modificada, em que a ponte internucleotídica modificada é, por exemplo, selecionada a partir de pontes fosforotioato, fosforoditioato, NR^1R^2 -fosforamidato, boranofosfato, α -hidroxibenzilfosfona, fosfato-(C_1 - C_{21})-O-alkiléster, fosfato-[(C_6 - C_{12})aril-(C_1 - C_{21})-O-alkil]éster, (C_1C_8)alkilfosfonato e/ou (C_6 - C_{12})arilfosfonato, (C_7 - C_{12})- α -hidroximetil-aril (por exemplo, revelado no documento WO 95/01363), em que (C_6 - C_{12})arilo, (C_6 - C_{20})arilo e (C_6 - C_{14})arilo são opcionalmente substituídos por halogénio, alquilo, alcoxi, nitro, ciano e onde R^1 e R^2 são, independentemente um do outro, hidrogénio, (C_1 - C_{18})-alquilo, (C_6 - C_{20})-arilo, (C_6 - C_{14})-aril-(C_1 - C_8)-alquilo, preferencialmente hidrogénio, (C_1 - C_8)-alquilo, preferencialmente (C_1 - C_4)-alquilo e/ou metoxietilo ou R^1 e R^2 formam, juntamente com o átomo de hidrogénio que os transporta, um anel heterocíclico com 5-6 membros que pode adicionalmente conter um heteroátomo adicional do grupo O, S e N.

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

Uma unidade de fosfato de açúcar (isto é, uma β -D-ribose e ponte internucleotídica fosfodiéster juntas que

formam uma unidade fosfato de açúcar) a partir do esqueleto fosfato de açúcar (isto é, um esqueleto fosfato de açúcar é composto de unidades de fosfato de açúcar) pode ser substituída por outra unidade, em que a outra unidade é, por exemplo, adequada para construir um oligómero "derivado de morfolino" (conforme descrito, por exemplo, em Stirchak EP et al., (1989) *Nucleic Acids Res* 17:6129-41), que é, por exemplo, a substituição por uma unidade derivada de morfolino; ou para construir um ácido nucleico poliamida ("PNA"; conforme descrito, por exemplo, em Nielsen PE et al., (1994) *Bioconjug Chem* 5:3-7), que é, por exemplo, a substituição por uma unidade esqueleto PNA, por exemplo, por 2-aminoetilglicina.

Uma unidade β -D-ribose ou uma unidade β -D-2'-desoxirribose pode ser substituída por uma unidade de açúcar modificada, em que a unidade de açúcar modificada é, por exemplo, selecionada a partir de α -D-2'-desoxirribose, α -L-2'-desoxirribose, β -L-2'-desoxirribose, β -L-ribose, 2'-F-2'-desoxirribose, 2'-F-2'-deoxi-arabinose, 2'-O-(C₁-C₆)alquil-ribose, preferencialmente 2'-O-(C₁-C₆)alquil-ribose é 2'-O-metilribose, 2'-O-(C₂-C₆)alquenil-ribose, 2'-[O-(C₁-C₆)alquil-O-(C₁-C₆)alquil]-ribose, 2'-NH₂-2'-desoxirribose, β -D-xilo-furanose, α -arabinofuranose, 2,4-dideoxi- β -D-eritro-hexo-pirano e análogos de açúcar carbocíclicos (descritos, por exemplo, em Froehler, J. (1992) *Am Chem Soc* 114:8320) e/ou de cadeia aberta (descritos, por exemplo, em Vandendriessche et al., (1993) *Tetrahedron* 49:7223) e/ou análogos de bicicloaçúcar (descritos, por exemplo, em Tarkov, M. et al., (1993) *Helv Chim Acta* 76:481).

Nalgumas modalidades, o açúcar é 2'-O-metilribose, 2'-desoxirribose, 2'-fluoro-2'-desoxirribose, 2'-amino-2'-desoxirribose, 2'-O-alquil-ribose ou 3'-O-alquil-ribose e/ou 2'-O-4'-C-alquilenos ribose, tal como 2'-O-4'-C-metileno ribose (também chamada LNA).

Ácidos nucleicos também incluem purinas e pirimidinas substituídas, tais como bases modificadas de pirimidina C-5 propina e 7-deaza-7-purina substituída (Wagner, R.W. et al., (1996) Nat Biotechnol 14:840-4). Purinas e pirimidinas incluem, mas não se limitam a, adenina, citosina, guanine e timina e outras nucleobases que ocorrem naturalmente e não naturalmente, frações aromáticas substituídas e não substituídas.

Uma base modificada é qualquer base que é quimicamente diferente das bases que ocorrem naturalmente encontradas tipicamente no ADN e ARN, tais como T, C, G, A e U, mas que partilham estruturas químicas básicas com estas bases que ocorrem naturalmente. A base nucleotídica modificada pode ser, por exemplo, selecionada de hipoxantina, uracilo, dihidrouracilo, pseudouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-aminouracilo, 5-(C1-C6)-alquiluracilo, 5-(C2-C6)-alqueniluracilo, 5-(C2-C6)-alquiniluracilo, 5-(hidroximetil)uracilo, 5-clorouracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-iodo-uracilo, 2,4-difluorotolueno e 3-nitropirrol, 5-hidroxicitosina, 5-(C1-C6)-alquilocitosina, 5-(C2-C6)-alquenilocitosina, 5-(C2-C6)-alquinilocitosina, 5-clorocitosina, 5-fluorocitosina, 5-bromocitosina, N2-dimetilguanina, 2,4-diamino-purina, 8-azapurina, uma 7-deazapurina substituída, preferencialmente 7-deaza-7-substituída e/ou 7-deaza-8-purina substituída, 5-hidroximetilcitosina, N4-alquilocitosina, por exemplo, N4-etilcitosina, 5-hidroxideoxicitidina, 5-hidroximetildeoxicitidina, N4-alquildeoxicitidina, por exemplo, N4-etildeoxicitidina, 6-tiodeoxiguanosina e desoxirribonucleotídeos de nitropirrol, C5-propinilpirimidina e diaminopurina, por exemplo, 2,6-diaminopurina, inosina, 5-metilcitosina, 2-aminopurina, 2-amino-6-cloropurina, hipoxantina ou outras modificações de bases nucleotídicas naturais. Pretende-se que esta lista seja exemplificativa e não deve ser interpretada como

limitante.

Aqui, "Py" é utilizado para se referir a um nucleotídeo que contém uma citosina ou uma citosina modificada. Uma citosina modificada, conforme utilizado aqui, é um análogo de base pirimidina da citosina que ocorre naturalmente ou não naturalmente que pode substituir esta base sem prejudicar a atividade imunoestimulante do oligonucleotídeo. Citosinas modificadas incluem, mas não se limitam a, 5-citosinas substituídas (por exemplo, 5-metil-citosina, 5-fluorocitosina, 5-clorocitosina, 5-bromocitosina, 5-iodocitosina, 5-hidroxicitosina, 5-hidroximetilcitosina, 5-difluorometilcitosina e 5-alquínilcitosina não substituída ou substituída), 6-citosinas substituídas, N4-citosinas substituídas (por exemplo, N4-etilcitosina), 5-aza-citosina, 2-mercaptop-citosina, isocitosina, pseudo-isocitosina, análogos de citosina com sistemas de anel condensado (por exemplo, N,N'-propilenocitosina ou fenoxazina) e uracilo e seus derivados (por exemplo, 5-fluoro-uracilo, 5-bromo-uracilo, 5-bromovinil-uracilo, 4-tio-uracilo, 5-hidroxi-uracilo, 5-propinil-uracilo). Algumas das citosinas preferidas incluem 5-metil-citosina, 5-fluoro-citosina, 5-hidroxi-citosina, 5-hidroximetil-citosina e N4-etil-citosina. Noutra modalidade da invenção, a base citosina é substituída por uma base universal (por exemplo, 3-nitropirrol, P-base), um sistema de anel aromático (por exemplo, fluorobenzeno ou difluorobenzeno) ou um átomo de hidrogénio (dEspaçador).

Aqui, "Pu" é uma base guanina ou uma guanina modificada. Uma guanina modificada, conforme utilizado aqui, é um análogo de base purina da guanina que ocorre naturalmente ou não naturalmente que pode substituir esta base sem prejudicar a atividade imunoestimulante do oligonucleotídeo. Guaninas modificadas incluem, mas não se limitam a, 7-deazaguanina, 7-deaza-7-guanina substituída (tal como 7-deaza-7-(C2-C6)alquínilguanina), 7-deaza-8-

guanina substituída, hipoxantina, N2-guaninas substituídas (por exemplo, N2-metilguanina), 5-amino-3-metil-3H,6H-tiazolo[4,5-d]pirimidina-2,7-diona, 2,6-diaminopurina, 2-aminopurina, purina, indol, adenina, adeninas substituídas (por exemplo, N6-metiladenina, 8-hidroxiadenina) 8-guanina substituída (por exemplo, 8-hidroxiguanina e 8-bromoguanina) e 6-tioguanina. Noutra modalidade da invenção, a base guanina é substituída por uma base universal (por exemplo, 4-metilindol, 5-nitro-indol e K-base), um sistema de anel aromático (por exemplo, benzimidazol ou diclorobenzimidazol, ácido 1-metil-1H-[1,2,4]triazol-3-carboxílico amida) ou um átomo de hidrogénio (dEspaçador).

A invenção também abrange oligonucleotídeos com ligações internucleotídicas invulgares, incluindo ligações internucleotídicas 5'-5', 2'-2', 2'-3' e 2'-5'. Nalguns aspetos da invenção, é vantajoso para os oligonucleotídeos terem uma ou mais extremidades 5' acessíveis. É possível criar possíveis oligonucleotídeos modificados com duas tais extremidades 5'. Isto pode ser conseguido, por exemplo, anexando dois oligonucleotídeos através de uma ligação 3'-3' para gerar um oligonucleotídeo com uma ou mais extremidades 5' acessíveis. A ligação 3'-3' pode ser uma ponte internucleotídica fosfodiéster, fosforotioato, fosfonoacetato ou qualquer outra modificada. Métodos para conseguir tais ligações são conhecidos na arte. Por exemplo, tais ligações foram descritas em Seliger, H. et al. Oligonucleotide analogs with terminal 3'-3'- and 5'-5'-internucleotidic linkages as antisense inhibitors of viral gene expression, *Nucleotides & Nucleotides* (1991), 10(1-3), 469-77 e Jiang et al., Pseudo-cyclic oligonucleotides: in vitro and in vivo properties, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (1999), 7(12), 2727-2735.

Numa modalidade tais ligações invulgares são excluídas do motivo de ADN imunoestimulante, mesmo apesar de uma ou

mais de tais ligações poder ocorrer noutro sítio dentro do polímero. Para polímeros com extremidades livres, a inclusão de uma ligação internucleotídica 3-3' pode resultar num polímero com duas extremidades 5' livres. Por oposição, para polímeros com extremidades livres, a inclusão de uma ligação internucleotídica 5'-5' pode resultar num polímero com duas extremidades 3' livres.

Além disso, ácidos nucleicos ligados por 3'3'-, 5'-5'-, 2'-2'-, 2'-3'- e 2'-5' onde a ligação não é uma ponte fosfodiéster, fosforotioato, fosfonoacetato ou outra modificada, podem ser preparados utilizando um espaçador adicional, tal como fração fosfato tri ou tetra-etilenoglicol (Durand, M. et al., Triple-helix formation by an oligonucleotide containing one (dA)₁₂ and two (dT)₁₂ sequences bridged by two hexaethylene glycol chains, *Biochemistry* (1992), 31(38), 9197-204, Patente U.S. N.º 5658738 e Patente U.S. N.º 5668265). Em alternativa, o ligante não nucleotídico pode ser derivado a partir de etanodiol, propanodiol ou a partir de uma unidade de desoxirribose abásica (dEspaçador) (Fontanel, Marie Laurence et al., Sterical recognition by T4 polynucleotide kinase of non-nucleosidic moieties 5'-attached to oligonucleotides; *Nucleic Acids Research* (1994), 22(11), 2022-7) utilizando química fosforamidita convencional. Os ligantes não nucleotídicos podem ser incorporados uma vez ou múltiplas vezes ou combinados uns com os outros permitindo qualquer distância desejável entre as extremidades 3' dos dois ODNs a serem ligados.

O oligonucleotídeo pode conter uma unidade duplicadora ou trebler (Glen Research, Sterling, VA), em particular aqueles análogos de oligodesoxirribonucleotídeos modificados com uma ligação 3'-3'. Uma unidade duplicadora numa modalidade pode ser baseada em 1,3- bis-[5-(4,4'-dimetoxitritiloxi)pentilamido]propil-2-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita. Uma unidade trebler numa

modalidade pode ser baseada na incorporação de Tris-2,2,2-[3-(4,4'-dimetoxitritiloxi)propiloximetil]etil-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita. A ramificação dos análogos de oligorribonucleotídeos modificados por múltiplas unidades duplicadoras, trebler ou outras multiplicadoras conduz a dendrímeros que são uma modalidade adicional desta invenção. Análogos de oligorribonucleotídeos modificados ramificados podem conduzir a reticulação de recetores, particularmente para combinações de ARN e ADN imunoestimulante, tais como TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 com efeitos imunes distintos comparados com as formas não ramificadas dos análogos. Além disso, a síntese de análogos ramificados, ou de outra forma multiméricos, pode estabilizar o ADN contra a degradação e pode permitir que sequências de ADN fracamente ou parcialmente eficazes possam exercer um nível terapeuticamente útil de atividade imune. Os análogos de oligodesoxirribonucleotídeos modificados também podem conter unidades ligantes resultantes de reagentes modificadores de péptidos ou reagentes modificadores de oligonucleotídeos (Glen Research). Além disso, os análogos de oligodesoxirribonucleotídeos modificados podem conter um ou mais resíduos de aminoácidos naturais ou não naturais que são ligados ao polímero por ligações peptídicas (amida).

As ligações internucleotídicas 3'-5', 5'-5', 3'-3', 2'-2', 2'-3' e 2'-5' podem ser diretas ou indiretas. Ligações diretas neste contexto referem-se a uma ligação fosfato ou fosfato modificada, conforme revelado aqui, sem uma fração ligante interveniente. Uma fração ligante interveniente é uma fração orgânica diferente de uma ligação fosfato ou fosfato modificada, conforme revelado aqui, que pode incluir, por exemplo, polietilenoglicol, trietilenoglicol, hexaetilenoglicol, dEspaçador (isto é, um desoxinucleotídeo abásico), unidade duplicadora ou unidade

trebler.

As ligações são preferencialmente compostas de C, H, N, O, S, B, P e halogênio, contendo 3 a 300 átomos. Um exemplo com 3 átomos é uma ligação acetal (ODN1-3'-O-CH₂-O-3'-ODN2) que liga, por exemplo, o grupo 3'-hidroxi de um nucleotídeo ao grupo 3'-hidroxi de um segundo oligonucleotídeo. Um exemplo com cerca de 300 átomos é PEG-40 (tetraenta polietilenoglicol). Ligações preferidas são ligações fosfodiéster, fosforotioato, metilfosfonato, fosforamidato, boranofosfonato, amida, éter, tioéter, acetal, tioacetal, ureia, tioureia, sulfonamida, Base de Schiff e dissulfido. Também é possível utilizar o Sistema de Bioconjugação Solulink, isto é, (www.trilinkbiotech.com).

Se o oligonucleotídeo é composto de duas ou mais partes de sequência, estas partes podem ser idênticas ou diferentes. Assim, num oligonucleotídeo com uma ligação 3'3', as sequências podem ser 5'-ODN1-3'3'-ODN1-5' idênticas ou 5'-ODN1-3'3'-ODN2-5' diferentes. Além disso, a modificação química das várias partes oligonucleotídicas, bem como o ligante que as liga, pode ser diferente. Uma vez que a captação de oligonucleotídeos curtos parece ser menos eficiente do que a de oligonucleotídeos longos, a ligação de duas ou mais sequências curtas resulta em estimulação imune melhorada. O comprimento dos oligonucleotídeos curtos é preferencialmente 2-20 nucleotídeos, mais preferencialmente 3-16 nucleotídeos, mas mais preferencialmente 5-10 nucleotídeos. São preferidos oligonucleotídeos ligados que têm duas ou mais extremidades 5' não ligadas.

As sequências parciais oligonucleotídicas também podem ser ligadas por ligantes não nucleotídicos. Um "ligante não nucleotídico", conforme utilizado aqui, refere-se a qualquer elemento ligante que não é um nucleotídeo ou polímero do mesmo (isto é, um polinucleotídeo), em que um

nucleotídeo inclui uma nucleobase purina ou pirimidina e um fosfato de açúcar, em particular ligantes abásicos (dEspaçadores), unidades de trietilenoglicol ou unidades de hexaetilenoglicol. Ligantes adicionalmente preferidos são ligantes alquilamino, tais como aminoligantes C3, C6, C12 e também ligantes alquiltiol, tais como ligantes C3 ou C6 tiol. Os oligonucleotídeos também podem ser ligados por resíduos aromáticos que podem ainda ser substituídos por grupos alquilo ou alquilo substituídos.

Para facilitar a captação pelas células, os oligonucleótidos imunoestimulantes têm em certas formas de realização um comprimento no intervalo de 3 a 100 bases. Em algumas formas de realização, os oligonucleótidos têm um comprimento de 7-100 bases. Tipicamente, os ácidos nucleicos de um tamanho maior de 6 nucleótidos (inclusive de muitas kb de comprimento) são capazes de induzir uma resposta imune de acordo com a invenção se estiverem presentes os suficientes motivos imunoestimulantes. No entanto, a capacidade imunoestimulante melhorada dos oligonucleótidos modificados da invenção proporcionam moléculas de um comprimento muito mais curto. Em algumas formas de realização os oligonucleótidos imunoestimulantes têm 3-6 bases de comprimento. Os oligonucleótidos podem ser mais longos de 100 nucleótidos. Por exemplo, podem ter 120, 150, 200 ou inclusive mais longos em algumas circunstâncias.

Outros oligonucleótidos estabilizados incluem: análogos de ADN não iónicos, tais como alquil e aril fosfatos (em que o resíduo de oxigénio fosfonato com carga é substituído com um grupo alquilo ou arilo), fosfodiéster e alquiltiosfosfotriésteres, em que o resíduo de oxigénio com carga está alquilado. Os ácidos nucleicos que contêm diol, tal como tetraetilenoglicol ou hexaetilenoglicol, num ou ambos extremidades mostraram ser substancialmente resistentes à degradação por nucleases.

Os oligonucleótidos imunoestimulantes Py-Pu da presente invenção são úteis para estimular uma resposta imune num indivíduo que tem necessidade de tal tratamento. Um indivíduo que necessita tal tratamento é um indivíduo que tem ou está em risco de ter uma doença autoimune ou uma condição patológica inflamatória, um indivíduo que tem ou está em risco de ter cancro, um indivíduo com cancro submetido a tratamento quimioterápico ou radiação, um indivíduo que tem ou está em risco de contrair uma infeção viral, bacteriana, ou parasitária, um indivíduo que tem asma, um indivíduo que tem uma alergia ou rinite alérgica, um indivíduo que tem ou está em risco de ter aterosclerose, ou um indivíduo submetido a um transplante de tecido ou de órgãos.

Um indivíduo em risco de desenvolver um cancro é o que tem uma alta probabilidade de desenvolver um cancro. Estes indivíduos incluem, por exemplo, indivíduos que têm uma anormalidade genética, a presença da qual foi demonstrado que tem uma relação correlativa com uma alta probabilidade de desenvolver um cancro e indivíduos expostos a agentes causadores de cancro tais como o tabaco, asbestos, ou outras toxinas químicas, ou um indivíduo que foi tratado anteriormente para o cancro e está em remissão aparente. Quando um indivíduo em risco de desenvolver um cancro é tratado com um antigénio específico para o tipo de cancro ao qual o indivíduo está em risco de desenvolver e um oligonucleótido e um oligonucleótido imunoestimulante PypPu, o indivíduo pode ser capaz de destruir as células cancerosas que se desenvolvem. Se começar a formar um tumor no indivíduo, o indivíduo desenvolverá uma resposta imune contra o antigénio tumoral. Um indivíduo que tem um cancro é um indivíduo que tem células cancerosas detetáveis. O cancro pode ser um cancro maligno ou não maligno. "Cancro" conforme é utilizado no presente documento refere-se ao crescimento incontrolado de células que interfere com o

funcionamento normal dos órgãos e sistemas corporais. Quando os cancros migram de sua localização original e semeiam órgãos vitais podem eventualmente dar lugar à morte do indivíduo através da deterioração funcional dos órgãos afetados. Os cancros hematopoiéticos, tais como a leucemia, são capazes de superar os compartimentos hematopoiéticos num indivíduo, ocasionando desta maneira uma falha hematopoiética (em forma de anemia, trombocitopenia ou neutropenia) causando em último termo a morte. O indivíduo pode ser tratado com o oligonucleótido Py-Pu só ou em combinação com antigénio ou outros agentes terapêuticos.

Uma metástase é uma região de células cancerosas, distinta da localização primária do tumor, que é o resultado da disseminação das células cancerosas do tumor primário a outras partes do corpo. No momento do diagnóstico da massa tumoral primária, o indivíduo pode ser rastreado para a presença de metástase. As metástases são detetadas com mais frequência por meio da utilização só ou combinada de scâneres por imagem de ressonância magnética (MRI), scâneres de tomografia computadorizada (CT), contagens sanguíneas e de plaquetas, estudos da função hepática, raios x de tórax e scâneres ósseos para o controlo de sintomas específicos.

Os cancros incluem, mas não se limitam a, carcinoma de células basais, cancro de condutos biliares; cancro de bexiga; cancro de ossos; cancro de cérebro e sistema nervoso central (SNC); cancro de mama; cancro de colo uterino; coriocarcinoma, cancro de colon e reto; cancro de tecido conjuntivo; cancro de sistema digestivo; cancro endometrial; cancro esofágico; cancro de olhos; cancro da cabeça e pescoço; neoplasia intra-epitelial; cancro de rim; cancro de laringe; leucemia; cancro de fígado; cancro de pulmão (por exemplo, de células pequenas e células não pequenas); linfoma que inclui o linfoma de Hodgkin e não Hodgkin; melanoma; mieloma; neuroblastoma; cancro da

cavidade oral (por exemplo, de lábios, língua, boca e faringe); cancro de ovário; cancro pancreático; cancro de próstata; retinoblastoma; rabdomiossarcoma; cancro rectal; cancro do sistema respiratório; sarcoma; cancro de pele; cancro de estômago; cancro testicular; cancro de tiroide; cancro uterino; cancro; cancro do sistema urinário, assim como outros carcinomas, adenocarcinomas, e sarcomas.

Um indivíduo que tem uma infeção é um indivíduo que foi exposto a um agente patogénico infeccioso e tem níveis detetáveis agudos ou crónicos do agente patogénico no corpo. Os oligonucleótidos imunoestimulantes Py-Pu podem ser utilizados com ou sem um antigénio para organizar uma resposta imune sistémica ou mucosa específica do antigénio que seja capaz de reduzir o nível ou de erradicar o agente patogénico infeccioso. Uma doença infecciosa, conforme é utilizado no presente documento, é uma doença que é produzida pela presença de um micro-organismo alheio no corpo. É particularmente importante desenvolver estratégias eficazes de vacinação e tratamentos para proteger as superfícies mucosas do corpo, que são o local primário de entrada patogénica. Um indivíduo que está em risco de ter uma infeção é um indivíduo que se espera que entre em contacto com um micro-organismo. Exemplos não limitantes de tais indivíduos são os trabalhadores da área sanitária ou os que viajam a partes do mundo onde a incidência de infeção pelo micro-organismo é alta.

Um indivíduo que tem uma alergia é um indivíduo que tem uma reação alérgica em resposta a um alérgeno. Uma alergia refere-se a adquirir hipersensibilidade a uma substância (alérgeno). As condições alérgicas incluem mas não se limitam a eczema, rinite alérgica ou coriza, febre do feno, conjuntivite, asma brônquial, urticária e alergias alimentares, e outras condições patológicas atópicas.

As alergias são causadas em geral por a geração de anticorpos IgE contra os alérgenos não prejudiciais. As

citoquinas que são induzidas pelos oligonucleótidos imunoestimulantes CpG são predominantemente de uma classe denominada Th1 (são exemplos a IL-12, IP-10, IFN- α e IFN- γ) e estas induzem respostas tanto humorais como celulares. O outro tipo principal de resposta imune, que foi associada à produção de citocinas IL-4 e IL-5, denomina-se resposta imune Th2. Em geral, parece que as doenças alérgicas são mediadas por respostas imunes de tipo Th2. Com base na capacidade dos oligonucleótidos imunoestimulantes CpG para mudar a resposta imune num indivíduo de uma predominantemente Th2 (que se associa à produção de anticorpos IgE e alergia) a uma resposta equilibrada Th2/Th1 (que é protetora contra as reações alérgicas), pode ser administrado a um indivíduo uma dose eficaz para induzir uma resposta imune de oligonucleótido imunoestimulante CpG para tratar ou prevenir a asma e a alergia.

Portanto, os oligonucleótidos imunoestimulantes Py-Pu têm uma utilidade terapêutica significativa no tratamento de afecções alérgicas e não alérgicas tais como a asma. As citocinas Th2, especialmente a IL-4 e IL-5 são elevadas nas vias aéreas de indivíduos asmáticos. Estas citocinas promovem aspetos importantes da resposta inflamatória asmática, que incluem a mudança do isotipo IgE, quimiotaxia de eosinófilos e ativação e crescimento de mastócitos. As citocinas Th1, especialmente IFN- γ e IL-12, podem suprimir a formação de clones Th2 e a produção de citocinas Th2. A asma refere-se a um distúrbio do sistema respiratório caracterizado por inflamação, estreitamento das vias aéreas e aumento da reatividade das vias aéreas a agentes inalados. A asma está associada frequentemente, embora não exclusivamente com sintomas atópicos ou alérgicos.

Os oligonucleótidos imunoestimulantes da presente invenção podem ser úteis para tratar condições patológicas que implicam uma resposta imune inata ou uma resposta imune

tipo Th1, que inclui a inflamação, dermatite atópica, rejeição aguda e crónica de aloenxerto, doença do hospedeiro contra o enxerto (GvHD), certas doenças autoimunes, e sepse. A invenção pode ser utilizada para tratar tais condições patológicas em vista da inibição seletiva da sinalização TLR que pode ser conseguida de acordo com a invenção.

As doenças autoimunes podem ser classificadas em geral como mediada por anticorpo, mediada por célula T, ou uma combinação das mediadas por anticorpo e mediadas por células T. Acredita-se que as combinações do adaptador ODN e o ligando TLR da invenção são úteis para tratar vários tipos de autoimunidade que implicam a imunidade mediada por anticorpos ou mediada por células T, incluindo a diabetes mellitus dependente de insulina (tipo I), artrite reumatoide, esclerose múltipla, lúpus eritematoso sistémico (LES), doença inflamatória intestinal (isto é, doença de Crohn e colite ulcerativa). Existem modelos animais disponíveis para estas doenças autoimunes e são úteis para valorar a eficácia das combinações da invenção nestas doenças. Outras doenças autoimunes incluem, sem limitação, alopecia areata, hemofilia adquirida, espondilite anquilosante, síndrome de anti-fosfolípidos, hepatite autoimune, anemia hemolítica autoimune, síndrome de Behcet, cardiomiopatia, dermatite de doença celíaca, síndrome de disfunção imune fadiga crónica (CFIDS), polineuropatia desmielinizante inflamatória crónica, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome CREST, doença de aglutininas por frio, lúpus discoide, crioglobulinemia mista essencial, fibromialgia, fibromiosite, síndrome de Guillein-Barré, fibrose pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática, nefropatia de IgA, artrite juvenil, liquen plano, miastenia gravis, poliarterite nodosa, policondrite, síndromes poliglandulares, dermatomiosite, agamaglobulinemia primária, cirrose biliar

primária, psoríase, fenómeno de Raynaud, síndrome de Reiter, sarcoidose, síndrome de pessoa rígida, artrite de Takayasu, arterite temporal/arterite de células gigantes, uveíte, vasculite, e vitiligo.

Em várias doenças autoimunes observam-se frequentemente anticorpos contra auto-antígenos. Por exemplo, para autoanticorpos do lúpus eritematoso foram descritos ADN ou ARN de cadeia simples e cadeia dupla. Vallin, H. et al., (1999) J Immunol 163:6306-13; Hoet, R.M. et al., (1999) J Immunol 163:3304-12; van Venrooij (1990) J Clin Invest 86:2154-60. Os níveis de autoanticorpos que estão no soro dos pacientes autoimunes se encontram com muita frequência que se correlacionam com a gravidade da doença. O padrão de autoanticorpos que são produzidos, por exemplo no LES humano, sugerem que as partículas macromoleculares intactas, tais como complexos que contêm ADN ou ARN, poderiam ser imunogénicas por elas mesmas, e portanto, poderiam aparecer anticorpos anti-ácido nucleico. Lotz, M. et al., (1992) Mol Biol Rep 16:127; Mohan C et al., (1993) J Exp Med 177:1367-81. Tal ADN ou ARN libertado, por exemplo, das células apoptóticas ou o ADN ou ARN contido nos micróbios que estão presentes no soro de pacientes autoimunes, poderiam ser responsáveis da inflamação que contribui à doença autoimune. Fatenejad, S. (1994) J Immunol 152:5523-31; Malmegrim, K.C. et al., (2002) Isr Med Assoc J 4:706-12; Newkirk, M.M. et al., (2001) Arthritis Res 3:253-8. Além disso poderiam ser identificadas sequências que contêm CpG no soro LES que induz uma resposta imune eficaz dominada pela secreção de IFN- α que se pensa que contribui ao desenvolvimento de doenças autoimunes. Magnusson, M. et al., (2001) Scand J Immunol 54:543-50; Rönnblom, L. et al., (2001) J Exp Med 194:F59-63. Além disso, os epítomos para os anticorpos anti-ARN poderiam ser identificados e estão compostos por sequências ricas em G, U. Tsai, D.E. et al., (1992) Proc

Natl Acad Sci USA 89:8864-8; Tsai, D.E. et al., (1993) J Immunol 150:1137-45. As sequências ricas em G, U parece que são ligandos naturais para o TLR7 e TLR8 e, portanto, podem mediar nas respostas estimulantes imunes que em princípio poderiam contribuir às doenças autoimunes ou ao desenvolvimento de doenças autoimunes. Documento PCT/US03/10406. Dada a importância da estimulação imune mediada pelo ADN CpG ou ARN rico em G, U que são alvos para os anticorpos, a presente invenção proporciona um método para tratar uma condição patológica associada com a imunoestimulação mediada por ADN CpG ou ARN num indivíduo que tem ou está em risco de ter uma doença autoimune.

Um indivíduo significará um ser humano ou um animal vertebrado que inclui mas não se limita a cão, gato, cavalo, vaca, porco, ovelha, cabra, peru, Frango, primata, por exemplo, um macaco, e peixes (espécies de aquicultura), por exemplo, salmão. Preferentemente o indivíduo é um mamífero, e mais preferentemente um ser humano. Portanto a invenção pode ser utilizada também para tratar o cancro e tumores, infeções, e asma/alergia em indivíduos não humanos. O cancro é uma das causas que produzem a morte nos animais de estimação (isto é, cães e gatos).

Conforme é utilizado no presente documento, o termo tratar, tratado, ou tratamento quando se utiliza com respeito a um distúrbio tal como uma doença infecciosa, cancro, alergia, ou asma, refere-se a um tratamento profilático que aumenta a resistência de um indivíduo a desenvolver a doença (por exemplo, a infeção com um agente patogénico) assim como ao tratamento depois de que o indivíduo desenvolve a doença com a finalidade de lutar contra a doença (por exemplo, reduzir ou eliminar a infeção) ou evitar que a doença se torne pior.

Os oligonucleótidos imunoestimulantes Py-Pu podem ser administrados como parte de um protocolo terapêutico, só ou em conjunto com outras terapêuticas ou medicamentos.

Conforme é utilizado no presente documento, um "protocolo terapêutico" refere-se a procedimentos que incluem mas não se limitam a cirurgia, radiação, administração de um medicamento terapêutico. Um medicamento terapêutico que administra-se como parte de um protocolo terapêutico pode ser formulado ou associado com uma molécula de direção. Uma "molécula de direção" conforme é utilizado no presente documento refere-se a qualquer moléculas tal como um antígenos que dirigirá o oligonucleótido imunoestimulante a um determinado sítio sobre ou numa células. Numa forma de realização o oligonucleótido imunoestimulante se conjuga com uma molécula de direção. Em outra forma de realização a molécula de direção administra-se juntamente com o oligonucleótido imunoestimulante sem conjugação. Em alguns casos a molécula de direção e o oligonucleótido imunoestimulante podem estar incluídos num veículo de fornecimento tal como um lipossoma. Em outros casos a molécula de direção está fixada ao exterior do veículo de fornecimento.

Nos casos em que o oligonucleótido Py-Pu administra-se com um antígeno, o indivíduo pode ser exposto ao antígeno. Conforme é utilizado no presente documento, o termo exposto refere-se ou à etapa de por em contacto o indivíduo com o antígeno ou à exposição passiva do indivíduo ao antígeno *in vivo*. Os métodos para a exposição ativa de um indivíduo a um antígeno conhecem-se bem na técnica. Em geral, um antígeno administra-se diretamente ao indivíduo por qualquer meio tal como por administração intravenosa, intramuscular, oral, transdérmica, mucosa, intranasal, intratraqueal, ou subcutânea. O antígeno pode ser administrado local ou sistemicamente. Os métodos para administrar o antígeno e o oligonucleótidos imunoestimulantes Py-Pu descrevem-se com mais detalhe posteriormente. Um indivíduo é exposto passivamente a um antígeno se o antígeno está disponível para sua exposição

às células imunes do corpo. Um indivíduo pode estar exposto passivamente a um antigénio, por exemplo, por entrada de um agente patogénico alheio no corpo ou pelo desenvolvimento de uma célula tumoral que expressa um antigénio alheio em sua superfície.

Os métodos pelos quais um indivíduo é exposto passivamente a um antigénio pode ser dependente particularmente do momento de administração do oligonucleótido imunoestimulante Py-Pu. Por exemplo, num indivíduo em risco de desenvolver um cancro ou uma doença infecciosa ou uma resposta alérgica ou asmática, pode ser administrado ao indivíduo o oligonucleótido imunoestimulante Py-Pu com uma base regular quando o risco é maior, isto é, durante a estação de alergia ou após a exposição a um agente causador de cancro. Adicionalmente, o oligonucleótido imunoestimulante Py-Pu pode ser administrado aos viajantes antes de que viagem a países estrangeiros em que estão em risco de ser expostos a agentes infecciosos. Igualmente, o oligonucleótido imunoestimulante Py-Pu pode ser administrado aos soldados ou civis em risco de exposição a armas biológicas que induzem uma resposta imune mucosa ou sistémica ao antigénio quando e se o indivíduo for exposto a este.

Um antigénio é uma molécula capaz de provocar uma resposta imune. Os antigénios incluem, por não se limitam a células, extratos celulares, proteínas, polipéptidos, péptidos, polissacáridos, conjugados de polissacáridos, miméticos peptídicos e não peptídicos de polissacáridos e outras moléculas, moléculas pequenas, lípidos, glucolípidos, hidratos de carbono, vírus e extratos virais e organismos multicelulares tais como parasitos e alérgenos. O termo antigénio inclui amplamente qualquer tipo de molécula que é reconhecida por um sistema imune hospedeiro como alheio. Os antigénios incluem mas não se limitam a antigénios de cancro, antigénios microbianos, e

alérgenos.

Um antígeno de cancro conforme é utilizado no presente documento é um composto, tal como um péptido ou proteína, que se associa a uma superfície celular de um tumor ou um cancro e que é capaz de provocar uma resposta imune quando se expressa na superfície de uma células apresentadora de antígeno no contexto de uma molécula do MHC. Os antígenos do cancro podem ser preparados a partir de células cancerosas ou por preparação de extratos brutos de células cancerosas, por exemplo, conforme é descrito em Cohen, et al., 1994, Cancer Research, 54:1055, por purificação parcial de antígenos, por tecnologia recombinante, ou por síntese de novo de antígenos conhecidos. Os antígenos de cancro incluem mas não se limitam a antígenos que se expressam recombinantemente, uma parte imunogénica de, ou um tumor ou cancro completo. Tais antígenos podem ser isolados ou preparados recombinantemente ou por qualquer outro meio conhecido na técnica.

Um antígeno microbiano conforme é utilizado no presente documento é um antígeno de um micro-organismo e inclui mas não se limita a vírus, bactérias, parasitos, e fungos. Tais antígenos incluem o micro-organismo intacto assim como isolados naturais e fragmentos ou derivados do mesmo e também compostos sintéticos que são idênticos ou similares aos antígenos de micro-organismos naturais e induzem uma resposta imune específica para esse micro-organismo. Um composto é similar a um antígeno de micro-organismo natural induz-se uma resposta imune (humoral e/ou celular) contra um antígeno de micro-organismos. Tais antígenos são utilizados rotineiramente na técnica e conhecem-se bem na técnica.

Os vírus são pequenos agentes infecciosos que geralmente contêm um centro de ácido nucleico e um envoltório proteico, mas não são organismos de vida

independente. Os vírus também podem ter forma de ácidos nucleicos infecciosos que não possuem proteína. Um vírus não pode sobreviver em ausência de uma célula viva em que possa se replicar. Os vírus entram em células vivas específicas ou por endocitose ou por injeção direta do SADN (fago) e se multiplicam, produzindo uma doença. O vírus multiplicado pode ser libertado então e infectar células adicionais. Alguns vírus são vírus que contêm ADN e outros são vírus que contêm ARN. Os vírus ADN incluem a catapoxas, Herpes, Adeno, Papova, Parvo e Hepadna. Os vírus ARN incluem Picorna, Calici, Astro, Toga, Flavi, Corona, Paramixo, Ortimixo, Bunya, Arena, Rabdo, Filo, Borna, Reo, e Retro. Em alguns aspectos, a invenção pretende tratar doenças em que estão implicados os priões na progressão da doença, por exemplo, encefalopatia espongiforme bovina (isto é, doença das vacas loucas, BSE) ou tremedeira infecciosa em animais, ou doença de Creutzfeldt-Jakob em seres humanos.

Os vírus incluem mas não se limitam a, enterovírus (que incluem mas não se limitam a, vírus da família *Picornaviridae*, tais como o vírus de pólio, o vírus Cocksackie, vírus echo), rotavírus, adenovírus, e vírus da hepatite, tais como a hepatite A, B, C, D e E. Exemplos específicos de vírus que foram encontrados em seres humanos incluem mas não se limitam a: *Retroviridae* (por exemplo, vírus da imunodeficiência humana, tais como HIV-1 (também denominado HTLV-III, LAV HELV-III/LAV, ou HIV-III; e outros isolados, tais como HIV-LP; *Picornaviridae* (por exemplo, vírus pólio, vírus da hepatite A; enterovírus, vírus Cocksackie humano, rhinovírus, echovírus); *Caliciviridae* (por exemplo, estirpes que causam gastroenterite); *Togaviridae* (por exemplo, vírus da encefalite equina, vírus de rubéola); *Flaviviridae* (por exemplo, vírus do dengue, vírus de encefalite, vírus da febre amarela); *Coronaviridae* (por exemplo, coronavírus); *Rhabdoviridae* (por exemplo, vírus da estomatite vesicular, vírus de raiva); *Filoviridae*

(por exemplo, vírus de ébola); *Paramyxoviridae* (por exemplo, vírus de parainfluenza, vírus da caxumba, vírus do sarampo, vírus sincicial respiratório); *Orthomyxoviridae* (por exemplo, vírus de gripe); *Bunyaviridae* (por exemplo, vírus Hantaan, vírus bunya, flebovírus e vírus Nairo); *Arenaviridae* (vírus da febre hemorrágica); *Reoviridae* (por exemplo, reovírus, orbivírus e rotavírus); *Birnaviridae*; *Hepadnaviridae* (vírus de Hepatite B); *Parvoviridae* (parvovírus); *Papovaviridae* (papilomavírus, vírus polioma); *Adenoviridae* (a maioria de adenovírus); *Herpesviridae* (vírus do Herpes Simples (HSV) 1 E 2, vírus do herpes zóster, citomegalovírus (CMV)); *Poxviridae* (vírus de varicela, vírus vaccinia, vírus de viruela); *Iridoviridae* (por exemplo, vírus de febre suína africana); e outros vírus de laringotraqueobronquite aguda, alfavírus, herpesvírus associado ao sarcoma de Kaposi, vírus da doença de Newcastle, vírus Nipah, vírus Norwalk, Papilomavírus, vírus de parainfluenza, vírus de gripe, vírus do SARS, vírus do Nilo ocidental.

Tanto as bactérias gram negativas como as bactérias gram positivas são agentes infecciosos em animais vertebrados. Tais bactérias gram positivas incluem, mas não se limitam a *Escherichia coli*, espécies de *Pseudomonas*, e espécies de *Salmonella*. Exemplos específicos de bactérias infecciosas incluem mas não se limitam a *Helicobacter pylori*, *Borrelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, esp. de *Mycobacteria* (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* (*Grupo B Streptococcus*), *Streptococcus* (grupo viridans), *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus* (esps. anaeróbicas), *Streptococcus pneumoniae*, patógeno *Campylobacter* sp., *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 incluem *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Chlamydia trachomatis*, *Candida albicans*.

Outros organismos infecciosos (isto é, protistas) incluem *Plasmodium* spp, tais como *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, e *Plasmodium vivax* e *Toxoplasma gondii*. Parasitas da sangue e/ou os tecidos incluem *Plasmodium* spp., *Babesia microti*, *Babesia divergens*, *Leishmania tropica*, *Leishmania* spp., *Leishmania braziliensis*, *Leishmania donovani*, *Trypanosoma gambiense* and *Trypanosoma rhodesiense* (doença do sueño africana), *Trypanosoma cruzi* (doença de Chagas), e *Toxoplasma gondii*.

Foram descritos extensamente outros micro-organismos medicamente relevantes na bibliografia, por exemplo, veja-se C.G.A. Thomas, *Medical Microbiology*, Bailliere Tindall, Gran Bretaña 1983.

Um alérgeno refere-se a uma substância (antigénio) que pode induzir uma resposta alérgica ou asmática num indivíduo suscetível. A lista de alérgenos é enorme e pode incluir pólenes, venenos de insetos, pó de caspa animal, esporas fúngicas e fármacos (por exemplo, penicilina). Exemplos de alérgenos naturais, animais e vegetais incluem mas não se limitam a proteínas específicas dos seguintes géneros: *Canine* (*Canis familiaris*); *Dermatophagoides* (por exemplo, *Dermatophagoides farinae*); *Felis* (*Felis domesticus*); *Ambrosia* (*Ambrosia artemisiifolia*); *Lolium* (por exemplo, *Lolium perenne* ou *Lolium multiflorum*); *Cryptomeria* (*Cryptomeria japonica*); *Alternaria* (*Alternaria alternata*);

Alder, *Alnus* (*Alnus gultinoasa*); *Betula* (*Betula verrucosa*); *Quercus* (*Quercus alba*); *Olea* (*Olea europa*); *Artemisia* (*Artemisia vulgaris*); *Plantago* (por exemplo, *Plantago lanceolata*); *Parietaria* (por exemplo, *Parietaria officinalis* ou *Pariefaria judaica*); *Blattella* (por exemplo, *Blattella germanica*); *Apis* (por exemplo, *Apis multiflorum*); *Cupressus* (por exemplo, *Cupressus sempervirens*, *Cupressus arizonica* and *Cupressus macrocarpa*); *Juniperus* (por exemplo, *Juniperus sabinoides*, *Juniperus virginiana*, *Juniperus communis* and *Juniperus ashei*); *Thuya* (por exemplo, *Thuya orienfalis*); *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 pratense* 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*).

Os oligonucleótidos imunoestimulantes Py-Pu da presente invenção podem ser administrados sós ou combinados com qualquer outro agente terapêutico tais como adjuvantes para aumentar respostas imunes. O oligonucleótido imunoestimulante e os outros agentes terapêuticos podem ser administrados simultaneamente ou sequencialmente como parte de um protocolo terapêutico. Quando os outros agentes terapêuticos são administrados simultaneamente podem ser administrados na mesma formulação ou em formulações separadas, mas são administrados ao mesmo tempo. Os outros

agentes terapêuticos são administrados sequencialmente com outro e com o oligonucleótido imunoestimulante, quando a administração dos outros agentes terapêuticos e o oligonucleótido imunoestimulante está separada no tempo. A separação no tempo entre as administrações destes compostos pode ser uma questão de minutos ou pode ser mais longa. Outros agentes terapêuticos incluem mas não se limitam a adjuvantes, citocinas, anticorpos, antigénios, medicamentos, etc. Em alguns casos pode ser vantajosos para os oligonucleótidos imunoestimulantes Py-Pu que se ligam a um agente terapêutico ou medicamento. Esta ligação pode ser covalente ou não covalente. Uma ligação covalente é em que o agente e o oligonucleótido está ligado por meio de uma ligação covalente. A ligação covalente entre o oligonucleótido e o antigénio pode ser qualquer tipo de ligação covalente, siempre que o oligonucleótido imunoestimulante e o antigénio quando se ligam mantenham uma atividade funcional medível de cada componente individual. A ligação covalente pode ser direta ou indireta, por exemplo, por meio de um resíduo ligante. O oligonucleótido imunoestimulante ligado covalentemente e o antigénio pode ser processado numa célula para libertar um do outro. Nesta forma o fornecimento a uma célula de qualquer componente pode estar aumentada em comparação com seu fornecimento se for administrada como uma preparação por separado ou componente separado.

Um ligação não covalente é em que não existe ligação covalente, tal como a associação por meio de uma ligação de hidrogénio ou dentro de um veículo de fornecimento tal como uma micropartícula.

Os oligonucleótidos da invenção podem ser administrados a um indivíduo com um agente anti-microbiano, Um agente antimicrobiano, conforme é utilizado no presente documento, refere-se a um composto de origem natural ou sintética que é capaz de destruir ou inibir micro-

organismos infecciosos. O tipo de agente antimicrobiano útil de acordo com a invenção dependerá do tipo de micro-organismo com o qual infeta-se o indivíduo ou está em risco de se infectar. Os agentes antimicrobianos incluem mas não se limitam a agentes antibacterianos, agentes antivirais, agentes antifúngicos e agentes antiparasitários. As frases tais como "agente anti-infeccioso", "agente antibacteriano", "agente antiviral", "agente antifúngico", "agente antiparasitário" e "parasiticida" têm significados bem estabelecidos pelos peritos na especialidade e definem-se nos textos médicos de referência. Em resumo, os agentes antibacterianos destroem ou inibem bactérias, e incluem antibióticos tais como outros compostos sintéticos ou naturais que têm funções similares. Os antibióticos são moléculas de baixa massa molecular que são produzidas como metabolitos secundários por células, tais como micro-organismos. Em geral os antibióticos interferem com uma ou mais funções bacterianas ou estruturas que são específicas para o micro-organismo e que não estão presentes nas células hospedeiras. Os agentes antivirais podem ser isolados a partir de fontes naturais ou podem ser sintetizadas e são úteis para destruir ou inibir vírus. Os agentes antifúngicos são utilizados para tratar as infecções fúngicas superficiais assim como infecções fúngicas sistêmicas oportunistas ou primárias. Os agentes antiparasitários destroem ou inibem parasitos.

Exemplos de agentes antiparasitários, também referidos como parasiticidas úteis para a administração humana incluem mas não se limitam a albendazol, anfotericina B, benznidazol, bitionol, HCl de cloroquina, fosfato de cloroquina, clindamicina, deshidroemetina, dietilcarbamazina, furoato de diloxanida, eflornitina, furazolidina, gluococorticoides, halofantrina, yodoquinol, ivermectina, mebendazol, mefloquina, antimoniato de meglumina, melarsoprol, metrifonato, metronidazol,

niclosamida, nifurtimox, oxamniquina, paromomicina, isetionato de pentamidina, piperazina, praziquantel, fosfato de primaquina, proguanil, pamoato de pirantel, pirimetamina-sulfadoxina, HCl de quinacrina, sulfato de quinina, gluconato de quinidina, espiamicina, estibogluconato sódico (gluconato de antimônio sódio), suramin, tetraciclina, doxiciclina, tiabendazol, tinidazol, trimetoprim-sulfametoxazol, e triparsamida alguns dos quais são utilizados solos ou em combinação com outros.

Os agentes antibacterianos destroem ou inibem o crescimento ou a função das bactérias. Uma grande classe de agentes antibacterianos são antibióticos. Os antibióticos que são eficazes para destruir ou inibir um amplo intervalo de bactérias, denominam-se antibióticos de amplo espectro. Outros tipos de antibióticos são eficazes predominantemente contra as bactérias da classe gram-positiva ou gram-negativa. Estes antibióticos denominam-se antibióticos de espectro estreito. Outros antibióticos que são eficazes contra um único organismo ou doença e não contra outros tipos de bactéria, denominam-se antibióticos de espectro limitado. Os agentes antibacterianos classificam-se às vezes com base em seu modo de ação primário. Em geral, os agentes antibacterianos são inibidores da síntese da parede celular, inibidores da membrana celular, inibidores da síntese proteica, da síntese de ácido nucleico ou inibidores funcionais, e inibidores competitivos.

Os agentes antivirais são compostos que previnem a infecção e as células pelos vírus ou a replicação do vírus na célula. Existem muito menos fármacos antivirais que fármacos antibacterianos devido a que o processo de replicação viral está tão intimamente relacionada com a replicação de ADN na células hospedeiras que os agentes antivirais não específicos com frequência seriam tóxicos para o hospedeiro. Existem vários estágios no processo de infecção viral que podem ser bloqueados ou inibidos pelos

agentes antivirais. Estes estágios incluem, a fixação do vírus na célula hospedeiro (imunoglobulina ou péptidos de ligação), descobrimento do vírus (por exemplo, amantadina), síntese ou tradução do ARNm viral (por exemplo, interferón), replicação do ARN ou ADN viral (por exemplo os análogos de nucleótidos), a maturação de novas proteínas virais (por exemplo, inibidores de proteases), e gemação e libertação do vírus.

Os análogos de nucleótidos são compostos sintéticos que são similares aos nucleótidos, mas que têm um grupo desoxirribose ou ribose anormal. Uma vez que os análogos de nucleótidos estão na células, são fosforilados, produzindo o trifosfato formado que compete com os nucleótidos normais no ARN ou ADN viral. Uma vez que a forma trifosfato do análogo de nucleótido incorpora-se na cadeia de ácido nucleico em crescimento, produz a associação irreversível com a polimerase viral e, portanto, a terminação da cadeia. Os análogos de nucleótido incluem, mas não se limitam a Aciclovir (que se utiliza para o tratamento do vírus do herpes simples e o vírus varicela-zóster, ganciclovir (útil no tratamento de citomegalovírus), idoxuridina, Ribavirina (útil para o tratamento do vírus sincicial respiratório), didesoxinosina, didesoxicitidina, zidovudina (azidotimidina), imiquimod, e resiquimod.

Os interferones são citocinas que são secretadas pelas células infetadas por vírus assim como células imunes. Os interferões funcionam se ligando a recetores específicos nas células adjacentes a as células infetadas, produzindo a mudança na células que a protege da infeção por vírus. O interferão α e β também induz a expressão de moléculas do MHC Classe I e Classe II na superfície das células infetadas, o que resulta num aumento de apresentação de antígeno pelas células de reconhecimento imune do hospedeiro. Os interferões α e β estão disponíveis como formas recombinantes e têm sido utilizados para o

tratamento da infecção por hepatite B e C. As dosagens que são eficazes para terapêutica antiviral, os interferões têm efeitos secundários graves tal como febre, fraqueza e perda de peso.

Os agentes antivirais úteis na invenção incluem mas não se limitam a imunoglobulinas, amantadina, interferões, análogos de nucleótidos, e inibidores de proteases. Exemplos específicos de antivirais incluem mas não se limitam a Acemannan; Aciclovir; Aciclovir Sódico; Adefovir; Alovudina; Alvircept Sudotox; Hidrocloruro de Amantadina; Aranotin; Arildone; Mesilato de Atevirdina; Avridina; Cidofovir; Cipamfilina; Hidrocloruro de Citarabina; Mesilato de Delavirdina; Desciclovir; Didanosina; Disoxaril; Edoxudina; Enviroxina; Famciclovir; Hidrocloruro de Famotina; Fiacitabina; Fialuridina; Fosarilato; Foscarnet Sódico; Fosfonet Sódico; Ganciclovir; Ganciclovir Sódico; Idoxuridina; Ketoxal; Lamivudina; Lobucavir; Hidrocloruro de Memotina; Metisazona; Nevirapine; Penciclovir; Pirodavir; Ribavirin; Hidrocloruro de Rimantadina; Mesilato de Saquinavir; Hidrocloruro de Somantadina; Sorivudina; Statolon; Stavudina; Hidrocloruro de Tilorona; Trifluridina; Hidrocloruro de Valaciclovir; Vidarabina; Fosfato de Vidarabina; Vidarabine Sódica Fosfato; Viroxina; Zalcitabina; Zidovudina; e Zinviroxina.

Os agentes antifúngicos são úteis para o tratamento e prevenção de fungos infecciosos. Os agentes antifúngicos às vezes são classificados pelo seu mecanismo de ação. Alguns agentes antifúngicos funcionam como inibidores da parede celular inibindo a glicose sintase. Estes incluem, mas não se limitam a, basiungin/ECB. Outros agentes antifúngicos funcionam desestabilizando a integridade de membrana. Estes incluem, mas não se limitam a, imidaazóis, tais como clotrimazol, sertaconazol, Fluconazol, itraconazol, ketoconazol, miconazol, e voriconazol, assim como FK 452, anfotericina B, BAY 38-9502, MK 991, pradimicina, UK 292,

butenafina, e terbinafina. Outros agentes antifúngicos funcionam rompendo a quitina (por exemplo, quitinase) ou imunossupressão (crema 501).

Os oligonucleótidos imunoestimulantes Py-Pu podem ser administrados com um medicamento para a asma. Os medicamentos para a asma incluem, mas não se limitam a, inibidores PDE-4, broncodilatadores/agonistas beta-2, abridores do canal do K⁺, antagonistas VLA-4, antagonistas de neuroquina, inibidores da síntese de tromboxano A₂ (TXA₂), antagonistas do ácido araquidônico, inibidores da 5 lipoxigenase, antagonistas do recetor TXA₂, antagonistas do TXA₂, inibidor de proteínas de ativação 5-lipox e inibidores de proteases.

Os broncodilatadores/agonistas β_2 são uma Classe de compostos que produzem broncodilatação ou relaxamento do músculo liso. Os broncodilatadores/agonistas β_2 incluem mas não se limitam a salmeterol, salbutamol, albuterol, terbutalina, D2522/formoterol, fenoterol, bitolterol, pirbuerol metilxantinas e orciprenalina. Os agonistas β_2 de ação prolongada e os broncodilatadores são compostos que são utilizados para a prevenção a longo prazo de sintomas além das terapêuticas anti-inflamatórias. Os agonistas β_2 de ação prolongada incluem mas não se limitam a, salmeterol e albuterol. Estes compostos são utilizados habitualmente em combinação com corticosteroides e em geral não são utilizados sem uma terapêutica inflamatória. Foram associados a efeitos secundários tais como taquicardia, tremores de musculatura esquelética, hipocaliemia, e prolongação do intervalo QT em sobredose.

Metilxantinas, que incluem por exemplo, teofilina, que tem sido utilizada para o controlo a longo prazo e a prevenção dos sintomas. Estes compostos produzem broncodilatação que resulta da inibição da fosfodiesterase e provavelmente o antagonismo de adenosina. As toxicidades agudas relacionadas com a dose são um problema particular

com estes tipos de compostos. Como resultado, deve-se controlar a concentração no soro rotineiramente com o fim de levar em consideração a toxicidade e o intervalo terapêutico estreito que ocorre pelas diferenças individuais na depuração metabólica. Os efeitos secundários incluem taquicardia, taquiarritmias, náuseas e vômitos, estimulação do sistema nervoso central, dores de cabeça, convulsões, hematemese, hiperglicemia e hipocaliemia. Os agonistas β_2 de ação curta incluem mas não se limitam a albuterol, bitolterol, pirbuterol e terbutalina. Alguns dos efeitos adversos associados com a administração de agonistas β_2 de ação curta incluem taquicardia, tremores do músculo esquelético, hipocaliemia, aumento de ácido láctico, dor de cabeça, e hiperglicemia.

O cromolin sódico e nedocromil são utilizados como medicações de controle a longo prazo para prevenir primariamente os sintomas de asma que aparecem com o exercício ou os sintomas alérgicos que aparecem com os alérgenos. Acredita-se que estes compostos bloqueiam as reações precoces e tardias aos alérgenos interferindo a função do canal de cloreto. Também estabilizam as membranas de mastócitos e inibem a ativação e libertação de mediadores dos eosinófilos e células epiteliais. Necessita-se um período de quatro a seis semanas de administração para conseguir o máximo benefício.

Os anticolinérgicos são utilizados em geral para o alívio do broncoespasmo agudo. Acredita-se que estes compostos funcionam por inibição competitiva dos receptores colinérgicos muscarínicos. Os anticolinérgicos incluem, mas não se limitam a, brometo de ipratrópio. Estes compostos somente invertem o broncoespasmo mediado colinergicamente e não modifica nenhuma reação ao antigénio. Os efeitos secundários incluem secura de boca e secreções respiratórias, aumento de sibilâncias em alguns indivíduos, e visão borrosa se for pulverizado nos olhos.

Os oligonucleótidos imunoestimulantes da invenção podem ser administrados também juntamente com uma terapêutica antialérgica. Os métodos convencionais para tratar ou prevenir a alergia incluem a utilização de anticorpos neutralizantes anti-IgE. Os antihistamínicos e outros fármacos que bloqueiam os efeitos de mediadores químicos da reação alérgica ajudam a regular a gravidade dos sintomas alérgicos mas não previnem a reação alérgica e não têm efeito sobre as respostas alérgicas posteriores. As terapêuticas de dessensibilização levam-se a cabo dando pequenas doses de um alérgeno, habitualmente por injeção sob a pele com a finalidade de induzir uma resposta de tipo IgG contra o alérgeno. Acredita-se que a presença de um anticorpo IgG ajuda a neutralizar a produção de mediadores que resultam da indução de anticorpos IgE. Inicialmente, o indivíduo é tratado com uma dose de alérgeno muito baixa para evitar a indução de uma reação grave e a dose é aumentada lentamente. Este tipo de terapêutica é perigosa devido a que ao indivíduo é administrado realmente os compostos que produzem a resposta alérgica e pode dar como resultado reações alérgicas graves.

Os medicamentos para a alergia incluem, mas não se limitam a, anti-histamínicos, corticosteroides, e indutores de prostaglandinas bem conhecidas na técnica e que são utilizados comumente para o tratamento de alergia. Os anti-histamínicos incluem mas não se limitam a, acrivastina, astemizol, azatadina, azelastina, betastastina, bromfeniramina, buclizina, cetirizina, análogos da cetirizina, clorfeniramina, clemastina, CS 560, ciproheptadina, desloratadina, dexclorfeniramina, ebastina, epinastina, fexofenadina, HSR 609, hidroxizina, levocabastina, loratadina, metaescopolamina, mizolastina, norastemizol, fenindamina, prometazina, pirilamina, terfenamida, e tranilast.

Os corticosteroides incluem, mas não se limitam a,

metilprednisolona, prednisolona, prednisona, beclometasona, budesonida, dexametasona, flunisolida, propionato de fluticasona, e triamcinolona. Embora a dexametasona é um corticosteroide que tem uma ação anti-inflamatória, não se utiliza habitualmente para o tratamento da alergia ou o asma em forma inalada porque é altamente absorvido e tem efeitos secundários supressores a longo prazo à dose eficaz. A dexametasona pode ser utilizada, no entanto, que pode ser utilizada de acordo com a invenção para tratar a alergia ou a asma porque quando administra-se em combinação com uma composição da invenção pode ser administrado a uma dose baixa para reduzir os efeitos secundários. Alguns dos efeitos secundários associados à utilização dos corticosteroides incluem tosse, disfonia, aftas orais (candidíase), e a altas doses, efeitos sistémicos tais como supressão adrenal, intolerância à glicose, osteoporose, necrose asséptica do osso, formação de cataratas, supressão do crescimento, hipertensão, fraqueza muscular, afinamento da pele e facilidade para hematomas. Barnes & Peterson (1993) Am Rev Respir Dis 148:S1-S26; e Kamada AK et al., (1996) Am J Respir Crit Care Med 153:1739-48.

A composição imunoestimulante da invenção também pode ser administrada juntamente com uma terapêutica anti-cancro. As terapêuticas anti-cancro incluem medicamentos contra o cancro, radiação, e procedimentos cirúrgicos. Conforme é utilizado no presente documento, um "medicamento contra o cancro" refere-se a um agente que administra-se a um indivíduo com o fim de tratar um cancro. Conforme é utilizado no presente documento, "tratar um cancro" inclui a prevenção do desenvolvimento de um cancro, reduzir os sintomas de cancro, e/ou inibir o crescimento de um cancro estabelecido. Em outros aspetos, o medicamento contra o cancro administra-se a um indivíduo em risco de desenvolver um cancro com fim de reduzir o risco de desenvolver o cancro. Descrevem-se no presente documento vários tipos de

medicamentos para o tratamento do cancro. Para os fins desta especificação, os medicamentos contra o cancro se classificam como agentes quimioterápicos, agentes imunoterápicos, vacinas contra o cancro, terapêutica hormonal, e modificadores da resposta biológica.

Adicionalmente, os métodos da invenção pretende-se que abranjam a utilização de mais de um medicamento contra o cancro juntamente com os oligonucleótidos imunoestimulantes Py-Pu. Como exemplo, quando for apropriado, os oligonucleótidos imunoestimulantes Py-Pu podem ser administrados com um agente quimioterápico e um agente imunoterápico. De maneira alternativa, o medicamento anticancro pode abranger um agente imunoterápico e uma vacina contra o cancro, ou um agente quimioterápico e uma vacina contra o cancro, ou um agente quimioterápico, um agente imunoterápico e uma vacina contra o cancro administrados a um indivíduo com o fim de tratar um indivíduo que tem um cancro ou está em risco de desenvolver um cancro.

O agente quimioterápico pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em metotrexato, vincristina, adriamicina, cisplatino, cloroetilureias que não contêm açúcar, 5-fluorouracilo, mitomicina C, bleomicina, doxorubicina, dacarbacina, taxol, frailina, Meglamina GLA, valrubicina, carmustina, e poliferposan, MMI270, BAY 12-9566, inibidor da RAS farnesil transferase, inibidor da farnesil transferase, MMP, MTA/LY231514, LY264618/Lometexol, Glamolec, CI-994, TNP-470, Hicamtina/Topotecan, PKC412, Valspodar/PSC833, Novantrona/Mitoxantrona, Metaret/Suramin, Batismastat, E7070, BCH-4556, CS CS-682, 9-AC, AG3340, AG3433, InceINX-710, VX-853, ZD0101, IS1641, ODN 698, TA 2516/Marmistat, BB2516/Marmistat, CDP 845, D2163, PD183805, DX8951f, Lemonal DP 2202, FK 317, Picibanil/OK-432, AD32Nalrubicin, Metastron/ derivado de estroncio, Temodal/Temozolomida,

Evacet/ doxorubicina lipossômica, Yewtaxan/Paclitaxel,
 Taxol/Paclitaxel, Xeload/Capecitabina,
 Furtulon/Doxifluridina, Cyclopax/oral paclitaxel, Taxoide
 Oral, SPU-077/Cisplatino, HMR 1275/Flavopiridol, CP-358
 (774)/EGFR, CP-609 (754)/ inibidor do oncogén RAS, BMS-
 182751/ platino oral, UFT (Tegafur/Uracilo),
 Ergamisol/Levamisol, potenciador Eniluracilo/776C85/5FU,
 Campto/Levamisol, Camptosar/irinotecan, Tumodex/Ralitrexed,
 Leustatin/Cladribina, Paxex/Paclitaxel, Doxil/liposomal
 doxorubicina, Caelix/liposomal doxorubicina,
 Fludara/Fludarabina, Farmarubicina/Epirubicina, DepoCyt,
 ZD1839, LU 79553/Bis-Naftalimida, LU 103793/Dolastaina,
 Caetyx/ doxorubicina lipossômica, Gemzar/Gemcitabina, ZD
 0473/Anormed, YM 116, sementes de iodo, inibidores de CDK4
 e CDK2, inibidores de PARP, D4809/Dexifosamida,
 Ifes/Mesnex/Ifosamida, Vumon/Teniposide,
 Paraplatino/Carboplatino, Plantinol/cisplatino,
 Vepesida/Etopósido, ZD 9331, Taxotere/ Docetaxel,
 profármaco de arabinósido de guanina, análogo de Taxano,
 nitrosoureas, agentes alquilantes tais como melfalan e
 ciclofosfamida, Aminoglutetimida, Asparaginase, Busulfan,
 Carboplatino, Clorambucil, HCl Citarabina, Dactinomicina,
 Daunorubicina HCl, fosfato sódico de Estramustina,
 Etopósido (VP16-213), Floxuridina, Fluorouracilo (5-FU),
 Flutamida, Hidroxiureia (hidroxicarbamida), Ifosfamida,
 Interferão Alfa-2a, Alfa-2b, acetato de Leuprolida (análogo
 do fator de libertação de LHRH, Lomustina (CCNU), HCl de
 Mecloretamina (mostaza nitrogenada), Mercaptopurina, Mesna,
 Mitotano (o.p'-DDD), HCl de Mitoxantrona, Octreotida,
 Plicamicina, HCl de Procarbazona, Estreptozocina, citrato
 de Tamoxifeno, Tioguanina, Tiotepa, sulfato de Vinblastina,
 Amsacrina (m-AMSA), Azacitidina, Eritropoyetina,
 Hexametilmelamina (HMM), Interleucina 2, Mitoguazona
 (metil-GAG; metil glioxal bis-guanilhidrazona; MGBG),
 Pentostatina (2'-desoxicoformicina), Semustina (metil-CCNU),

Tenipósido (VM-26) e sulfato de Vindesina, mas não está limitado.

O agente imunoterápico pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em 3622W94, 4B5, anticorpos ANA, anti-FLK-2, anti-VEGF, ATRAGEN, AVASTIN (bevacizumab; Genentech), BABS, BEC2, BEXXAR (tositumomab; Glaxo-SmithKline), C225, CAMPATH (alemtuzumab; Genzyme Corp.), CEACIDE, CMA 676, EMD-72000, ERBITUX (cetuximab; ImClone Systems, Inc.), Gliomab-H, GNI-250, HERCEPTIN (trastuzumab; Genentech), IDEC-Y2B8, ImmuRAITCEA, ior c5, ior egf.r3, ior t6, LDP-03, LymphoCide, MDX-11, MDX-22, MDX-210, MDX-220, MDX-260, MDX-447, MELIMMUNE-1, MELIMMUNE-2, Monopharm-C, NovoMab-G2, Oncolym, OV103, Ovarex, Panorex, Pretarget, Quadramet, Ributaxin, RITUXAN (rituximab; Genentech), Anticorpo SMART 1D10, SMART ABL 364 Ab" SMART M 195, TNT, e ZENAPAX (daclizumab; Roche), mas não está limitado.

A vacina contra o cancro pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em EGF, vacinas contra o cancro Anti-idiotípicas, antigénio Gp75, vacina GMK de melanoma, vacina MGv gangliósido conjugado, Her2/neu, Ovarex, M-Vax, O-Vax, L-Vax, STn-KHL terátoto, BLP25 (MUC-1), vacina idiopática liposómica, Melacina, vacinas antigénio peptídico, vacinas tosen/antigénio, vacina baseada em MVA, PACIS, vacina BCG, TA-HPV, TA-CIN, vírus DISC e ImmuCyst/TheraCys, mas não está limitada.

A utilização de oligonucleótidos imunoestimulantes Py-Pu juntamente com agentes imunoterápicos tais como anticorpos monoclonais é capaz de aumentar a sobrevivência a longo prazo por meio de vários mecanismos que incluem o aumento significativo de ADCC (como foi exposto anteriormente), a ativação das células citolíticas naturais (NK) e um aumento dos níveis de IFN α . Os ácidos nucleicos quando são utilizados em combinação com anticorpos monoclonais servem para reduzir a dose do anticorpo necessária para conseguir um resultado biológico.

Conforme é utilizado no presente documento, as expressões antigénio de cancro e antigénio tumoral são utilizados de maneira intercambiável para se referir a antigénios que se expressam diferencialmente por células cancerosas e que desta maneira podem ser explorados com o fim de serem direcionados a células cancerosas. Os antigénios de cancro são antigénios que estimulam potencialmente respostas imunes específicas do tumor aparentemente. Alguns destes antigénios codificam-se, embora não se expressam necessariamente em células normais. Estes antigénios podem ser caracterizados como os que são silentes normalmente (isto é, não se expressam) em células normais, os que se expressam somente em certos estágios de diferenciação e os que se expressam temporariamente tais como os antigénios embrionários e fetais. Outros antigénios do cancro são codificados por genes celulares mutantes, tais como os oncogenes (por exemplo, o oncogene RAS ativado, genes supressores (por exemplo o p53 mutante), proteínas de fusão que resultam de eliminações internas ou translocações cromossómicas. Outros antigénios de cancro são codificados por genes virais tais como os que são portados nos ARN e ADN de vírus tumorais.

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

Os oligonucleótidos imunoestimulantes Py-Pu também são úteis como adjuvantes mucosos. Descobriu-se anteriormente que a imunidade tanto sistémica como mucosa é induzida pelo

fornecimento mucoso de ácidos nucleicos Py-Pu. Portanto, os oligonucleótidos podem ser administrados com outros adjuvantes mucosos.

As respostas imunes também podem ser induzidas ou aumentadas pela co-administração ou a 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-estimulantes B-7 (Iwasaki et al., 1997; Tsuji et al., 1997) com os oligonucleótidos imunoestimulantes Py-Pu. O termo citocina utiliza-se como um nome genérico para um grupo diverso de proteínas e péptidos solúveis que agem como reguladores humorais a concentrações nano ou picomolares e que, sob condições normais ou patológicas, modulam as atividades funcionais de células e tecidos individuais. Estas proteínas também mediam nas interações entre as células diretamente 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, IL-18, factor estimulante de colónias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), fator estimulante de colónias de granulócitos (G-CSF), interferão- γ (γ -IFN), IFN- α , tumor necrose fator (TNF), TGF- β , FLT-3, e ligando CD40. As citocinas têm um papel na direção da resposta das células T. As células T (CD4+) auxiliares orquestram a resposta imune dos mamíferos por meio da produção de fatores solúveis que agem em outras células do sistema imune, incluindo outras células T. A maioria das células T CD4+ auxiliares expressam um de dois perfis de citocinas Th1 ou Th2. Em algumas formas de realização prefere-se que a citocina seja uma citocina Th1.

Os oligonucleótidos também são úteis para rediregir uma resposta imune de uma resposta imune Th2 a uma resposta imune Th1. Isto resulta na produção de um ambiente equilibrado Th1/Th2. O redirecionamento de uma resposta

imune de Th2 a Th1 pode ser avaliado medindo os níveis de citocinas produzidas em resposta ao ácido nucleico (por exemplo, induzindo células monocíticas e outras células que produzem citocinas Th1, que incluem IL-12, IFN- α e GM-CSF). O redirecionamento ou reequilíbrio da resposta imune de resposta Th2 a Th1 é particularmente útil para o tratamento ou prevenção da asma. Por exemplo, uma quantidade eficaz para tratar a asma pode ser essa quantidade; útil para o redirecionamento de um tipo Th2 de resposta imune que se associa com asma a um tipo de resposta Th1 ou um ambiente Th1/Th2 equilibrado. As citocinas Th2, especialmente IL-4 e IL-5 estão elevadas nas vias aéreas de indivíduos asmáticos. Os oligonucleótidos imunoestimulantes Py-Pu da invenção produzem um aumento de citocinas Th1 que ajuda a reequilibrar o sistema imune, prevenindo ou reduzindo os efeitos adversos associados com uma resposta imune predominantemente Th2.

Os oligonucleótidos da invenção também podem ser úteis para tratar o remodelamento da via aérea. O remodelamento da via aérea resulta da proliferação das células de músculo liso e/ou o engrossamento da submucosa das vias aéreas, e em último termo produz o estreitamento das vias aéreas que ocasiona a restrição do fluxo de ar. Os oligonucleótidos da invenção podem prevenir além disso o remodelamento e possivelmente inclusive reduzir o crescimento tissular resultante do processo de remodelamento.

Os oligonucleótidos também são úteis para melhorar a sobrevivência, diferenciação, ativação e maturação de células dendríticas. Os oligonucleótido imunoestimulante CpG têm a capacidade única de promover a sobrevivência celular, diferenciação, ativação e maturação de células dendríticas.

Os oligonucleótidos imunoestimulantes Py-Pu podem ser administrados ao indivíduo diretamente ou podem ser

administrados juntamente com um complexo de fornecimento de ácido nucleico. Um complexo de fornecimento de ácido nucleico significaria uma molécula de ácido nucleico associado a (por exemplo, ligado ionicamente ou covalentemente a; ou encapsulado com) um meio de direcionamento (por exemplo, uma molécula que resulta numa ligação de alta afinidade à células alvo). Exemplos de complexos de fornecimento de ácido nucleico incluem ácidos nucleicos associados a esterol (por exemplo, colesterol, um lípido (por exemplo, um lípido catiónico, virossoma ou lipossoma), ou um agente de ligação específico de uma células alvo (por exemplo, um ligando reconhecido pelo recetor específico da células alvo). Os complexos preferidos podem ser os suficientemente estável in vivo para prevenir um desacoplamento significativo antes da internalização pela célula alvo. No entanto, o complexo pode ser clivado sob condições apropriadas na célula de forma que o oligonucleótido é libertado numa forma funcional.

Foram descritos os veículos de fornecimento ou dispositivos de fornecimento para fornecer o antigénio e oligonucleótidos a as superfícies. O oligonucleótido imunoestimulante Py-Pu e/ou o antigénio e/ou outros agentes terapêuticos podem ser administrados sós (por exemplo, em solução salina ou tampão) ou utilizando quaisquer dos veículos de fornecimento conhecidos na técnica. Num aspeto da invenção proporciona-se uma composição farmacêutica que inclui a composição de quaisquer dos aspetos anteriores da invenção, em associação a um veículo de fornecimento que é escolhido de um lípido catiónico, um lipossoma, um vetor bacteriano vivo (por exemplo, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Bacillus calmatte-guerin*, *Shigella*, *Lactobacillus*), um vetor viral vivo (por exemplo, vaccinia, adenovírus, Herpes simples), um cocleado, um virossoma, um complexo imunoestimulante (ISCOM), uma micropartícula, uma

microsfera, uma nanosfera, uma vesícula unilamelar (LUV), uma vesícula multilamelar, uma emulsão de óleo em água, uma emulsão de água em óleo, um emulsoma, um péptido policationico, uma microsfera, uma vacina de ácido nucleico, um polímero, um anel polimérico, um proteossoma, fluoreto de sódio, ou uma planta transgênica e, opcionalmente um veículo farmacêuticamente aceitável. Numa forma de realização de acordo com este aspecto da invenção a composição farmacêutica inclui um antigénio. Em outra forma de realização de acordo com este e aspecto da invenção a composição farmacêutica inclui um anti-infeccioso, cancro, asma, alergia, ou inflamação ou outro medicamento.

Numa forma de realização o oligonucleótido imunoestimulante administra-se com um lípido cationico e o lípido cationico é DOTAP (metil-sulfato de N-[1-(2,3-dioleoiloxi) propil]-N,N,N-trimetilamonio). Outros agentes com propriedades semelhantes incluem o tráfego ao compartimento endossómico que pode ser utilizado em lugar de ou além do DOTAP. Outras formulações de lípidos incluem, por exemplo, como EFFECTENE™ (um lípido não lipossómico com um potenciador condensador de ADN especial) e SUPERFECT™ (uma nova tecnologia de ação dendrimerica). Os lipossomas estão disponíveis comercialmente em Gibco BRL, por exemplo, como LIPOFECTIN™ e LIPOFECTACE™, que estão formados por lípidos cationicos tais como cloreto de N-[1-(2, 3 dioleiloxi)-propil]-N, N, N-trimetilamónio (DOTMA) e brometo de dimetil dioctadecilamónio (DDAB). Os métodos para fabricar lipossomas conhecem-se bem na técnica e foram descritos em muitas publicações. Os lipossomas também foram revisados em Gregoriadis G (1985) Trends Biotechnol 3:235-241.

Os lipossomas se podem dirigir a um tecido em particular acoplando o lipossoma a um ligando específico tal como um anticorpo monoclonal, açúcar, glucolípido, ou proteína. Os ligandos que podem ser úteis para dirigir um

lipossoma a uma células imune incluem, mas não se limitam a; moléculas intactas ou fragmentos que interagem com recetores específicos de células imunes e moléculas, tais como anticorpos, que interagem com os marcadores celulares de superfície das células imunes. Tais ligandos podem ser identificados facilmente por ensaios de ligação bem conhecidos pelos peritos na especialidade. Em outras formas de realização mais, o lipossoma pode ser dirigido ao cancro por acoplamento com um dos anticorpos imunoterápicos expostos anteriormente. Adicionalmente, o vetor pode ser acoplado a um péptido dirigido nuclear, que dirigirá o vetor ao núcleo da célula hospedeiro.

Numa forma de realização, o veículo é uma micropartícula biocompatível ou um implante que é adequado para o implante ou administração ao recetor mamífero. Implantes biodegradáveis exemplares que são úteis de acordo com este método descrevem-se no Pedido internacional publicado 95/24929, intitulado "Polymeric Gene Delivery System". O documento WO 95/24929 descreve uma matriz polimérica biocompatível, preferentemente biodegradável para conter um gene exógeno sob o controlo de um promotor apropriado. A matriz polimérica pode ser utilizada para conseguir uma libertação sostenida do agente terapêutico no indivíduo.

A matriz polimérica preferentemente está em forma de uma micropartícula tal como uma microsfera (em que o ácido nucleico e/ou o outro agente terapêutico se dispersa através de uma matriz polimérica sólida) ou uma microcápsula (em que ácido nucleico e/ou o outro agente terapêutico é armazenado no centro de uma estrutura polimérica). Outras formas de matriz polimérica para conter o agente terapêutico incluem películas, revestimentos, géis, implantes e endoprótese. O tamanho e a composição do dispositivo de matriz polimérico seleciona-se para que resulte em cinéticas de libertação favoráveis no tecido no

que a matriz é introduzido. O tamanho da matriz polimérica seleciona-se de acordo com o método de fornecimento a ser usado, tipicamente em injeção num tecido ou na administração de uma suspensão por aerossol nas áreas nasal e/ou pulmonar. Preferentemente quando se utiliza uma via em aerossol utiliza-se a matriz polimérica e o ácido nucleico e/ou o outro agente terapêutico estão abrangidos num veículo tensioativo. A composição de matriz polimérica pode ser selecionada para ter ambas taxas de degradação favoráveis e também para ser formada de um material que é bioadesivo, para aumentar a efetividade mais da transferência quando a matriz administra-se numa superfície nasal e/ou pulmonar que suporta uma lesão. A composição da matriz também pode ser selecionada para não se degradar, mas o bastante, para libertar por difusão durante um período extenso de tempo. Em algumas formas de realização preferidas, o ácido nucleico administra-se ao indivíduo por meio de um implante enquanto que o outro agente terapêutico administra-se de forma aguda. As microsferas biocompatíveis que são adequados para o fornecimento, tal como o fornecimento oral ou mucoso, são reveladosn em Chickering et al., (1996) Biotech Bioeng 52:96-101 and Mathiowitz, E. et al., (1997) Nature 386:410-414 e Pedido de patente PCT WO97/03702.

Tanto as matrizes poliméricas não biodegradáveis como biodegradáveis podem ser utilizadas para fornecer o ácido nucleico e/ou o outro agente terapêutico ao indivíduo. Preferem-se as matrizes biodegradáveis. Tais polímeros podem ser polímeros naturais ou sintéticos. O polímero seleciona-se com base no período de tempo durante o qual se deseja que se liberte, geralmente da ordem de algumas horas a um ano ou mais. Tipicamente, a libertação durante um período varia desde entre poucas horas e três a doze meses é a mais desejável, particularmente para os agentes de ácido nucleico. O polímero opcionalmente está em forma de

um hidrogel que pode absorver até aproximadamente 90% de seu peso em água, e além disso, opcionalmente está reticulado com iões multivalentes ou outros polímeros.

Os polímeros bioadesivos de particular interesse incluem os hidrogéis biodegradáveis descritos por H.S. Sawhney, C.P. Pathak e J.A. Hubell in *Macromolecules*, (1993) 26:581-587. Estes incluem os ácidos polihialurônicos, caseína, gelatina, glutina, polianídridos, ácido poliacrílico, alginato, quitosano, poli(metil metacrilatos), poli(etil metacrilatos), poli(butilmetacrilato), poli(isobutil metacrilato), poli(hexilmetacrilato), poli(isodecil metacrilato), poli(lauril metacrilato), poli(fenil metacrilato), poli(metil acrilato), poli(isopropil acrilato), poli(isobutil acrilato), e poli(octadecil acrilato).

A expressão quantidade eficaz de um oligonucleótido imunoestimulante Py-Pu refere-se à quantidade necessária ou suficiente para realizar um efeito biológico desejado. Por exemplo, uma quantidade eficaz de oligonucleótido imunoestimulante Py-Pu administrado com um antigénio para induzir imunidade mucosa é a quantidade necessária para causar o desenvolvimento de IgA em resposta de um antigénio ao ser exposto ao antigénio, enquanto que a quantidade necessária para produzir o desenvolvimento de imunidade é a quantidade necessária para produzir o desenvolvimento de IgG em resposta a um antigénio ao ser exposto ao antigénio. Combinando com os ensinamentos proporcionados no presente documento, escolhendo entre vários compostos ativos e considerando fatores tais como a potência. A biodisponibilidade relativa, o peso corporal do paciente, a gravidade dos efeitos secundários adversos e o modo de administração preferido, pode ser planejado um regime de tratamento terapêutico ou profilático eficaz cujas doses não produzam uma toxicidade substancial e ainda seja completamente eficaz para tratar um indivíduo particular. A

quantidade eficaz para qualquer aplicação particular pode variar dependendo de tais fatores como a doença ou condição patológica a ser tratada, o oligonucleótido imunoestimulante Py-Pu particular que ser administrado, o tamanho do indivíduo, ou a gravidade da doença ou condição patológica. Um perito na especialidade pode determinar empiricamente a quantidade eficaz de um oligonucleótido imunoestimulante Py-Pu particular e/ou antigénio e/ou outro agente terapêutico sem necessidade de experimentação desnecessária.

As doses do indivíduo dos compostos descritos no presente documento para o fornecimento mucoso ou local tipicamente variam desde aproximadamente 0,1 µg a 10 mg por administração, que dependendo da aplicação poderia ser dada diariamente, semanalmente, ou mensalmente e qualquer outra quantidade de tempo entre estas. Mais tipicamente as doses locais ou mucosas variam de aproximadamente 10 µg a 5 mg por administração, e mais tipicamente desde aproximadamente 100 µg a 1 mg, com 2 -4 administrações que se espacem com uma separação de dias ou semanas. Mais tipicamente, as doses imunoestimulantes variam de 1 µg a 10 mg por administração, e mais tipicamente de 10 µg a 1 mg, com administrações diárias ou semanais. As doses do indivíduo dos compostos descritos no presente documento para o fornecimento parentérico para os fins de indução de uma resposta imune específica do antigénio, em que os compostos são fornecidos com um antigénio mas nenhum outro agente terapêutico são tipicamente de 4 a 10.000 vezes maiores, e mais tipicamente de 20 a 100 vezes maiores. As doses dos compostos descritos no presente documento para o fornecimento parentérico para o fim de induzir uma resposta imune inata ou para aumentar a ADCC ou para induzir uma resposta imune específica do antigénio quando são administrados oligonucleótidos imunoestimulantes Py-Pu em combinação com outros agentes terapêuticos ou em veículos

de fornecimento especializados, tipicamente varia desde aproximadamente 0,1 µg até 10 mg por administração que depende da aplicação poderiam ser dados diariamente, semanalmente ou mensalmente e qualquer outra quantidade de tempo entre elas. Mais tipicamente as dose parentéricas para estes fins varia de aproximadamente 10 µg a 5 mg por administração, e mais tipicamente desde aproximadamente 100 µg até 1 mg, com 2-4 administrações espaçadas uma separação de dias ou semanas. Em algumas formas de realização, no entanto, as doses parentéricas para estes fins podem ser utilizadas num intervalo de 5 a 10.000 vezes mais alto que as dose típicas descritas anteriormente.

Para qualquer composto descrito no presente documento a quantidade terapêuticamente eficaz pode ser determinada inicialmente a partir de modelos animais. Uma dose terapêuticamente eficaz também pode ser determinada a partir dos sato para os oligonucleótidos Py-Pu que tenham sido testados em seres humanos (foram iniciados ensaios clínicos com seres humanos) e para os compostos que se sabe que mostram atividades farmacológicas semelhantes, tais como outros adjuvantes, por exemplo LT e outros antigénios com fines vacinais. Podem ser necessárias doses maiores para a administração parentérica. A dose aplicada pode ser ajustada com base na biodisponibilidade relativa e a potência do composto administrado. Ajustando a dose para conseguir a máxima eficácia com base nos métodos descritos anteriormente e outros métodos que se conhecem bem na técnica está bem nas capacidades do perito na especialidade.

Os oligonucleótidos imunoestimulantes Py-Pu podem ser formulados. As formulações da invenção são administradas em soluções farmacêuticamente aceitáveis que podem conter concentrações farmacêuticamente aceitáveis de sais, agentes tamponantes, conservantes, veículos compatíveis, adjuvantes e opcionalmente outros ingredientes terapêuticos.

Para utilização em terapêutica pode ser administrado uma quantidade eficaz de oligonucleótido imunoestimulante Py-Pu a um indivíduo por qualquer modo que forneça o oligonucleótido à superfície desejada, por exemplo, mucosa, sistêmica. A administração da composição farmacêutica da presente invenção pode ser conseguida por qualquer meio conhecidos pelo perito. As vias de administração incluem mas não se limitam a oral, parentérica, intramuscular, intravenosa, subcutânea, mucosa, intranasal, sublingual, intratraqueal, inalação, ocular, vaginal, dérmica, rectal, e por injeção direta.

Para a administração oral, os compostos (isto é os oligonucleótidos imunoestimulantes Py-Pu, antigénios e outros agentes terapêuticos) podem ser formulados facilmente combinando o composto ativo com veículos farmacêuticamente aceitáveis bem conhecidas na técnica. Tais veículos capacitam aos compostos da invenção para ser formulado como comprimidos, pílulas, drágeas, cápsulas, líquidos, géis, xaropes, creme, suspensões e semelhantes. Para a ingestão oral por um indivíduo a ser tratado. As preparações farmacêuticas para utilização oral podem ser obtidas como um excipiente sólido, opcionalmente moendo uma mistura resultante, e processando a mistura de grânulos após adicionar auxiliares adequados, se for desejado, para obter comprimidos ou centros de drágeas. Os excipientes adequados são, em particular, cargas tais como açúcares, que incluem lactose, sacarose, manitol ou sorbitol; preparações de celulose tais como, por exemplo, amido de milho, amido de trigo, amido de arroz, amido de batata, gelatina, goma de tragacanto, metil celulose, hidroxipropilmetil celulose, carboximetilcelulose sódica, e/ou polivinilpirrolidona (PVP). Se for desejado podem ser adicionados agentes desintegrantes, tais como polivinil pirrolidona reticulada, agar, ou ácido algínico ou um sal dos mesmos tais como alginato de sódio. Opcionalmente as

formulações orais podem ser formuladas também em solução salina ou tampões, isto é, EDTA para neutralizar as condições ácidas internas ou pode ser administrado sem nenhum veículo.

Também se contempla especificamente as formas farmacêuticas oral dos oligonucleótidos anteriores. Os oligonucleótidos podem ser modificados quimicamente de maneira que o fornecimento oral seja eficaz. Geralmente, a modificação química contemplada é a ligação de pelo menos um resíduo aos oligonucleótidos mesmos, em que o dito resíduo permite (a) a inibição da proteólise; e (b) a captação na corrente sanguínea a partir do estômago ou o intestino. Também se deseja o aumento da estabilidade total dos oligonucleótidos e o aumento do tempo em circulação no corpo. Os exemplos de tais resíduos incluem: polietilenoglicol, copolímeros como o etilenoglicol e propilenoglicol, carboximetil celulose, dextrano, álcool polivinílico, polivinil pirrolidona e poliprolina. Abuchowski and Davis, 1981, "Soluble Polymer-Enzyme Adducts" em: *Enzymes as Drugs*, Hocenberg and Roberts, eds., Wiley-Interscience, Nova Iorque, NY, pp. 367-383; Newmark, et al., 1982, *J. Appl. Biochem.* 4:185-189. Outros polímeros que poderiam ser utilizados utilizar são poli-1,3-dioxolano e poli-1,3,6-tioxocano. Os preferidos para utilização farmacêutica, como se indica anteriormente são os resíduos de polietilenoglicol.

Para os oligonucleótidos o lugar de libertação pode ser o estômago, o intestino delgado (o duodeno, o jejuno, ou o íleo), ou o intestino grosso. Um perito na especialidade tem formulações disponíveis que não se dissolvem no estômago, que libertarão o material no duodeno ou qualquer lugar do intestino. Preferentemente, a libertação evitará os efeitos prejudiciais do ambiente do estômago, seja por proteção do oligonucleótido ou por libertação do material biologicamente ativo mais além do

ambiente do estômago, tal como no intestino.

Para garantir a resistência gástrica completa é essencial um revestimento impermeável pelo menos a pH 5,0. Exemplos dos ingredientes inertes mais comuns que são utilizados como revestimentos entéricos são trimetilato de acetato de celulose (CAT), ftalato de hidroxipropilmetilcelulose (HPMCP), HPMCP 50, HPMCP 55, ftalato de acetato de polivinilo (PVAP), Eudragit L30D, Aquateric, ftalato de acetato de celulose (CAP), Eudragit L, Eudragit S, e Shellac. Estes revestimentos podem ser utilizados como películas misturadas.

Também pode ser utilizado um revestimento ou mistura de revestimentos em comprimidos, que não são concebidos para a proteção contra o estômago. Estes podem incluir revestimentos de açúcar, ou revestimentos que tornam o comprimido mais fácil de engolir. As cápsulas podem consistir de um revestimento dura (tal como gelatina) para fornecimento terapêutico em seco isto é, pó; para as formas líquidas, pode ser utilizada um revestimento mole de gelatina. O material de revestimento dos papéis pode ser de amido espesso e outro papel comestível. Para as pílulas, pastilhas de chupar, comprimidos moldáveis ou comprimidos triturados, podem ser utilizadas técnicas de humectação massiva.

O agente terapêutico pode ser incluído na formulação como multi-partículas finas ou aglomerados de partículas com um tamanho aproximado de 1 mm. A formulação do material para administração em cápsulas poderia ser como um pó, plugues ligeiramente comprimidos ou inclusive como comprimidos. O agente terapêutico pode ser preparado por compressão.

Podem ser incluídos todos os agentes colorantes e aromatizantes. Por exemplo, pode ser formulado o oligonucleótido (tal como por encapsulação em lipossoma ou microsfera) e depois contido além disso num produto

comestível, tal como uma bebida refrigerada que contém agentes colorantes e aromatizantes.

Pode ser diluído ou aumentar o volume do agente terapêutico com um material inerte. Estes diluentes poderiam incluir hidratos de carbono, especialmente manitol, a-lactose, lactose anidra, celulose, sacarose, dextranos modificados e amido. Também podem ser utilizados certos sais inorgânicos como cargas que incluem trifosfato de cálcio, carbonato de magnésio, e cloreto de sódio. Alguns diluentes disponíveis comercialmente são Fast-Flo, Emdex, STA-Rx 1500, Emcompress e Avicell.

Podem ser incluídos desintegrantes na formulação do agente terapêutico numa forma farmacêutica sólida. Os materiais utilizados como desintegrantes incluem mas não se limitam a amido, que incluem o desintegrante comercial baseado em amido, Explotab. Podem ser utilizados glucolato de amido de sódio, Amberlite, carboximetilcelulose de sódio, ultramillopectina, alginato de sódio, gelatina, casca de laranja, carboximetil celulose ácida, esponja natural e bentonita. Outra forma de desintegrantes são as resinas de permuta catiónica insolúveis. Podem ser utilizados as gomas em pó como desintegrantes e como aglutinantes e estas podem incluir gomas em pó tais como agar, Karaya ou tragacanto. O ácido algínico e seu sal de sódio também são úteis como desintegrantes.

Podem ser utilizados aglutinantes para manter o agente terapêutico juntamente para formar um comprimido duro e inclui materiais de produtos naturais tais como goma arábica, tragacanto, amido e gelatina. Outros incluem a metil celulose (MC), etil celulose (EC) e carboximetilcelulose (CMC), poderiam ser utilizadas tanto polivinil pirrolidona (PVP) como hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) em soluções alcoólicas para granular o agente terapêutico.

Pode ser incluído qualquer agente anti-fricção na

formulação do agente terapêutico para evitar que se atasque durante o processo de formulação. Podem ser utilizados lubrificantes como uma lâmina entre o agente terapêutico e a parede colorante, e estes podem incluir mas sem se limitar a ácido esteárico incluindo seus sais de magnésio e cálcio, politetrafluoroetileno (PTFE), parafina líquida, óleos vegetais e ceras. Os lubrificantes solúveis também podem ser utilizados tais como lauril sulfato de sódio, lauril sulfato de magnésio, polietilenoglicol de vários pesos moleculares, Carbowax 4000 e 6000.

Podem ser adicionados agentes de deslizamento que podem melhorar as propriedades de fluxo do fármaco durante a formulação e ajudar à re-colocação durante a compressão. Os agentes de deslizamento podem incluir amido, talco, silício pirogênico e silicoaluminato hidratado.

Para ajudar à dissolução do agente terapêutico num ambiente aquoso pode ser adicionado um tensioativo como agente humectante. Os tensioativos podem incluir os detergentes aniônicos tais como lauril sulfato de sódio, sulfosuccinato dioctil de sódio e sulfonato dioctil de sódio. Podem ser utilizados detergentes catiónicos e poderia ser incluído cloreto de benzalcónio ou cloreto de benzetónio. A lista potencial de detergentes não iónicos que poderiam ser incluídos na formulação como tensioativos são lauromacrogol 400, polioxil 40 estearato, óleo de rícino hidrogenado polioxietileno 10, 50 e 60, monoestearato de glicerol, polisorbato 40, 60, 65, e 80, éster de ácido gordo, sacarose, metil celulose, e carboxi metil celulose. Estes tensioativos poderiam estar presentes na formulação do oligonucleótido ou sós ou como uma mistura em diferentes relações.

As preparações farmacêuticas que podem ser utilizados por via oral incluem cápsulas duras de ajuste a pressão feitas de gelatina, assim como cápsulas moles vedadas feitas de gelatina e um plastificante, tal como glicerol ou

sorbitol. As cápsulas duras de ajuste a pressão podem conter os princípios ativos misturados com uma carga tal como lactose, aglutinantes tais como amidos e/ou lubrificantes tais como o talco ou o estearato de magnésio e, opcionalmente, estabilizantes. Nas cápsulas moles, os ingredientes ativos podem ser dissolvidos ou suspensos em líquidos adequados, tais como óleos gordos, parafina líquida, ou polietilenoglicóis líquidos. Além disso, podem ser adicionados estabilizadores. Também podem ser utilizados microsferas formuladas para administração oral. Tais microsferas foram bem definidas na técnica. Todas as formulações para administração oral deveriam estar em dosagens adequadas para tal administração.

Para a administração bucal, as composições podem ter forma de comprimidos ou pastilhas para chupar formuladas de maneira convencional

Para a administração ou inalação, os compostos para utilização de acordo com a presente invenção podem ser fornecidos convenientemente em forma de uma apresentação de um pulverizador em aerossol em envases pressurizados ou um nebulizador, com a utilização de um propulsor adequado, por exemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido carbónico ou outro gás adequado. No caso de um aerossol pressurizado a unidade de dosagem pode ser determinada proporcionando uma válvula para fornecer uma quantidade medida. As cápsulas e cartuchos de, por exemplo, gelatina para utilização num inalador ou insuflador podem ser formulados que contenham uma mistura de pó do composto e uma base de pó adequada tal como lactose ou amido.

Também se contempla no presente documento o fornecimento pulmonar dos oligonucleótidos. O oligonucleótido é fornecido aos pulmões de um mamífero enquanto inala e atravessa através do revestimento epitelial na corrente sanguínea. Outros relatórios de

moléculas inaladas incluem Adjei et al., 1990, *Pharmaceutical Research*, 7:565-569; Adjei et al., 1990, *International Journal of Pharmaceutics*, 63:135-144 (leuprolide acetate); Braquet et al., 1989, *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 13(suppl. 5):143-146 (endotelina-1); Hubbard et al., 1989, *Annals of Internal Medicine*, Vol. III, pp. 206-212 (al-antitripsina); Smith et al., 1989, *J. Clin. Invest.* 84:1145-1146 (a-1-proteinase); Oswein et al., 1990, "Aerossolization of Proteins," *Proceedings of Symposium on Respiratory Drug Delivery II*, Keystone, Colorado, March, (hormona de crescimento humana recombinante); Debs et al., 1988, *J. Immunol.* 140:3482-3488 (interferão-g e fator de necrose tumoral alfa) e Platz et al., Patente U.S. Nº 5.284.656 (fator estimulante de colónias de granulócitos).

Contemplam-se para utilização na prática da presente invenção um amplo intervalo de dispositivos mecânicos projetados para o fornecimento pulmonar dos produtos terapêuticos, que incluem mas não se limitam a nebulizadores, inaladores de dose medidas, e inaladores de pó, todos os quais são familiares para os peritos na especialidade.

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

Todos tais dispositivos necessitam a utilização de formulações adequadas para a dispersão do oligonucleótido. Tipicamente, cada formulação é específica do tipo de dispositivo que se utilize e pode implicar a utilização de

um material propulsor apropriado, além dos diluentes, adjuvantes e/ou veículos habituais úteis em terapêutica. Também se contempla a utilização de lipossomas, microcápsulas ou microsferas, complexos de inclusão, ou outros tipos de veículos. O oligonucleótido modificado quimicamente pode também ser preparado em diferentes formulações dependendo do tipo de modificação química ou o tipo de dispositivo usado.

As formulações adequadas para utilização com um nebulizador, seja em jato ou ultrassônico, compreenderá tipicamente o oligonucleótido dissolvido em água a uma concentração de aproximadamente 0,1 a 25 mg de oligonucleótido biologicamente ativo por ml de solução. A formulação pode incluir também um tampão e um açúcar simples (por exemplo, para a estabilização do oligonucleótido e a regulação da pressão osmótica). A formulação do nebulizador pode conter também um tensioativo, para reduzir ou evitar a agregação induzida na superfície do oligonucleótido causada pela atomização da solução que forma o aerossol.

As formulações para utilização num dispositivo inalador de dose medida geralmente compreenderão um pó finamente dividido que contenha o oligonucleótido suspenso num propulsor com a ajuda de um tensioativo. O propulsor pode ser qualquer material usado convencionalmente para este fim, tal como um clorofluorocarbono, um hidroclorofluorocarbono, um hidrofluorocarbono, ou um hidrocarbono, incluindo triclorofluorometano, diclorodifluorometano, diclorotetrafluoroetanol, e 1,1,1,2,-tetrafluoroetano, ou combinações dos mesmos. Os tensioativos adequados incluem trioleato de sorbitano e lecitina de soja. O ácido oleico pode ser também útil como tensioativo.

As formulações para a dispersão desde um dispositivo inalador em pó compreenderá um pó seco finamente dividido

que contenha o oligonucleótido e pode incluir também um agente de volume, tal como a lactose, sorbitol, sacarose, ou manitol em quantidades que facilitem a dispersão do pó a partir do dispositivo, por exemplo, de 50 a 90% por peso da formulação. O oligonucleótido deveria ser preparado mais vantajosamente em forma de partículas com um tamanho médio de partícula de menos de 10 μm (ou micras), mais preferentemente de 0,5 a 5 μm , para o fornecimento mais eficaz ao pulmão distal.

Também se contempla o fornecimento nasal de uma composição farmacêutica da presente invenção. O fornecimento nasal permite a passagem da composição farmacêutica da presente invenção à corrente sanguínea diretamente após a administração do produto terapêutico no nariz, sem necessitar o depósito do produto no pulmão. As formulações para o fornecimento nasal incluem aquelas com dextrano ou ciclodextrano.

Para a administração nasal, um dispositivo útil é uma pequena garrafa dura na qual se fixa um pulverizador de dose medida. Numa forma de realização, a dose medida é fornecida metendo a composição farmacêutica da presente invenção numa câmara com um volume definido, cuja câmara tem uma abertura dimensionada para fazer de aerossol e pulverizar a formulação formando um pulverizador quando se comprime o líquido na câmara. A câmara é comprimida para administrar a composição da presente invenção. Numa forma de realização específica, a câmara é uma disposição em pistão. Tais dispositivos estão disponíveis comercialmente.

De maneira alternativa, utiliza-se uma garrafa de plástico que se aperta com uma abertura ou orifício dimensionado para aerossolizar uma formulação de aerossol para formar um pulverizador quando se aperta. A abertura habitualmente está na parte superior da garrafa, e a parte superior está geralmente tapada para que se ajuste parcialmente nas passagens nasais para a administração

eficaz da formulação em aerossol. Preferentemente, o inalador nasal proporcionará uma quantidade medida da formulação em aerossol, para a administração de uma dose medida do fármaco.

Os compostos quando for desejado ser fornecidos por via sistêmica, podem ser formulados para administração parentérica por injeção, por exemplo, por injeção em bólus ou infusão contínua. As formulações para injeção podem ser apresentadas em formas farmacêuticas unitárias, por exemplo, em ampolas ou em embalagens multi-dose, com um conservante adicionado. As composições podem tomar formas tais como suspensões, soluções ou emulsões em veículos oleosos ou aquosos, e pode conter agentes de formulação tais como agentes de suspensão, estabilizantes e/ou agentes dispersantes.

As formulações farmacêuticas para administração parentérica incluem as soluções aquosas dos princípios ativos em forma hidrossolúvel, Adicionalmente as suspensões dos princípios ativos podem ser preparados como injeções de suspensões oleosas adequadas. Os solventes ou veículos lipofílicos adequados incluem óleos gordos tais como óleo de sésamo ou ésteres de ácidos gordos sintéticos, tais como oleato de etilo ou triglicéridos, ou lipossomas. As suspensões aquosas para injeção podem conter substâncias que aumentem a viscosidade da suspensão, tal como carboximetil celulose de sódio, sorbitol ou dextrano. Opcionalmente, a suspensão pode conter também estabilizantes adequados ou agentes que aumentem a solubilidade dos compostos para permitir a preparação de soluções altamente concentradas.

De maneira alternativa, os compostos ativos podem estar em forma de pó para sua constituição com um veículo adequado, por exemplo, água estéril livre de pirogênios, antes de utilização.

Os compostos podem ser formulados também em composições rectais ou vaginais tais como supositórios ou

enemas de contenção, por exemplo, que contenham bases de supositórios tais como manteiga de cacau ou outros glicéridos.

Além das formulações descritas previamente, os compostos podem ser formulados também como uma preparação de depósito. Tais formulações de ação prologada podem ser formuladas com materiais poliméricos ou hidrófobos adequados, por exemplo, como uma sal solúvel com moderação.

As composições farmacêuticas também podem compreender veículos ou excipientes sólidos em fase de 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 polímero tais como polietilenoglicóis.

As formas de preparação farmacêutica sólida ou líquida adequada são, por exemplo, soluções aquosas ou salinas para inalação, microencapsuladas, encocladadas, revestidas em partículas de ouro microscópicas, contidas em lipossomas, nebulizadas, em aerossol, aglomerados para implantação na pele, ou secas num objeto punzante para arañarse na pele. As composições farmacêuticas também incluem grânulos, pós, comprimidos revestidos, (micro)cápsulas, supositórios, xaropes, emulsões, suspensões, cremes, gotas ou preparações com libertação prolongada dos princípios ativos, em que os excipientes da preparação e os aditivos ou auxiliares tais como desintegrantes, aglutinantes, agentes de revestimento, agentes carga, lubrificantes, aromatizantes, edulcorantes ou solubilizantes são utilizados a medida conforme é descrito anteriormente. As composições farmacêuticas são adequadas para utilização numa variedade de sistemas de fornecimento de fármacos. Para uma revisão resumida dos métodos de fornecimento de fármacos, veja-se Langer, Science 249:1527-1533, 1990.

Os oligonucleótidos imunoestimulantes Py-Pu e opcionalmente outros agentes terapêuticos e/ou antigénios

podem ser administrados per se (puro) ou em forma de um sal farmaceuticamente aceitável. Quando se usam em medicinas os sais tem que ser aceitáveis farmaceuticamente, mas os sais não aceitáveis farmaceuticamente podem ser utilizados convenientemente para preparar sais farmaceuticamente aceitáveis dos mesmos. Tais sais incluem mas não se limitam a, os preparados dos seguintes ácidos: clorídrico, bromídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, p-toluenossulfónico, tartárico, cítrico, metanossufónico, fórmico, malónico, succínico, naftalen-2-sulfónico, e benzensulfónico. Também tais sais podem ser preparados como sais de metais alcalinos ou metais alcalino terrosos, tais como de sais de sódio, potássio, ou cálcio do grupo ácido carboxílico.

Os agentes tamponantes adequados incluem: ácido acético e sal (1-2% p/v); ácido cítrico e sal (1-3% p/v); ácido bórico e sal (0,5-2,5% p/v); e ácido fosfórico e um 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 imunoestimulante Py-Pu e opcionalmente antigénios e/ou outros agentes terapêuticos opcionalmente incluídos num veículo farmaceuticamente aceitável. O termo farmaceuticamente aceitável significa um ou mais de cargas, diluentes ou substâncias encapsulantes sólidos ou líquidos compatíveis que são adequados para a administração a um ser humano ou outro animal vertebrado. O termo veículo denota um ingrediente orgânico ou inorgânico, natural ou sintético, com o qual se combina o princípio ativo para facilitar a aplicação. Os componentes das composições farmacêuticas também são capazes de se combinar com os compostos da presente invenção, e uns com outros, de maneira tal que não

haja interação que altere substancialmente a eficácia farmacêutica desejada.

A presente invenção ilustra-se além disso com os seguintes Exemplos.

Exemplos

Materiais e métodos

Oligodesoxinucleótidos (ODN) e reagentes

Todos os ODN foram sintetizados seguindo protocolos químicos de fosforamidita de desproteção rápida e controlou-se em quanto à identidade e pureza por Coley Pharmaceutical GmbH e tinha níveis de endotoxinas indetetáveis (<0,1 EU/ml) medidos com o ensaio Limulus ((BioWhittaker, Verviers, Belgium). Os ODN foram suspensos em Tris-EDTA livre de endotoxinas estéril (Sigma, Deisenhofen, Alemanha) e armazenou-se e manipulou-se em condições assépticas para evitar tanto a contaminação microbiana como de endotoxinas. Todas as diluições foram levadas a cabo utilizando Tris-EDTA livre de endotoxinas.

Ensaio TLR9

Transfetaram-se células HEK293 por meio de eletroporação com vetores que expressavam TLR9 humano e um plasmídeo indicador 6xNF- κ B-luciferase. Os transfetantes estáveis (3×10^4 células/poço) incubaram-se com quantidades indicadas de ODN durante 16 h a 37 °C numa incubadora humidificada. Cada ponto de dados foi feito por triplicado. As células foram lisadas e testadas em quanto à atividade do gene de luciferase (utilizando o kit BriteLite de Perkin-Elmer, Zaventem, Belgium). Os índices de estimulação foram calculados em referência à atividade do gene indicador de meio sem adição de ODN.

Purificação celular

Foram obtidas preparações da camada leucocítica de sangue periférica de doadores humanos sanos do Blood Bank of the University of Düsseldorf (Alemanha) e purificaram-se as PBMC por centrifugação no Ficoll-Hypaque (Sigma). As

células foram cultivadas numa incubadora humidificada a 37 °C em meio RPMI 1640 suplementado com 5% (v/v) de soro AB inativado por calor (BioWhittaker) ou 10% (v/v) de FCS inativado por calor, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina (todos de Sigma).

Deteção de citoquinas

Foram suspensas as PBMC a uma concentração de 5×10^6 células/ml e foram adicionadas a placas de fundo arredondado de 96 poços (250 µl/poço). As PBMC incubaram-se com vários ODN, ORN ou concentrações de nucleósidos e foram colhidos os sobrenadantes (SN) da cultura após os pontos de tempo indicados. Se não fossem usadas imediatamente, eram armazenadas os SN a -20 °C até que fossem necessárias. Para as experiências inibidoras, as células foram estimuladas com a concentração indicada de ligando TLR e foram adicionados nucleósidos ou ORN. Em algumas experiências, o segundo ORN modificado era adicionado uma hora depois do início da cultura celular. As quantidades de citoquinas no SN eram avaliadas utilizando um ELISA no laboratório desenvolvido para IFN- α desenvolvido utilizando anticorpos disponíveis comercialmente (PBL, New Brunswick, NJ, USA).

Exemplo 1: Modificação de estrutura de fosfonoacetato no motivo CpG que dava como resultado um aumento da ativação de TLR9

Sabe-se que os oligonucleótidos que contêm motivos CpG não metilados são capazes de estimular respostas imunes por meio da rota do recetor tipo Toll 9 (TLR9). Os oligonucleótidos (ODN) fosforotioato (PS) mostram uma forte atividade imunoestimulante que somente é desbancada pelos ODN semi-moles, em que a ligação internucleótido em CpG é uma ligação fosfodiéster (PO). Foi assumido em geral que os substituintes no átomo de fósforo devem ter uma carga e tamanho similar para obter uma atividade comparável. Para investigar esta relação mais completamente, transfetaram-se células HEK 293 com TLR9 humano incubaram-se com ODN que

compreendiam modificações na estrutura PO (SEC ID N° 7), PS (SEC ID N° 6), P-Me (SEC ID N° 12) e fosfonoacetato (PA) (SEC ID N° 8) no motivo CpG. A SEC ID N° 3 é uma ODN classe B com atividade conhecida. A atividade TLR9 foi medida pelo ensaio de luciferase utilizando um plasmídeo indicador 6xNF- κ B-luciferase. A comparação de PS com P-Me (metil fosfonato) demonstra no entanto, que a carga não tem um papel dominante para a ativação da atividade de TLR9 (Figura 1). Além disso, o aumento do tamanho do substituintes no fósforo de PO a PS diminuía significativamente a ativação da atividade de TLR9. Portanto, era muito surpreendente que a introdução de uma ligação PA (maior que PO e P-Me) dava como resultado na melhor atividade TLR9 observada pelos depositante em quanto a uma modificação d fosfato (Figura 1). O quadro 1 mostra um resumo das sequências de ODN testadas.

Quadro 1

Seq ID N°	Sequência	Descrição
3	T*C-G*T*C-G*T*T*T*T*G*T*C-G*T*T*T*T*G*T*C-G*T*T	classe B
6	T*G*T*C*G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T	PS classe B
7	T*G*T*C-G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T	PO classe B
8	T*G*T*C<G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T	PA classe B
12	T*G*T*C\$G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T	P-Me classe B
<	ligação fosfonoacetato internucleótido	
*	ligação fosforotioato internucleótido	
-	ligação fosfodiéster internucleótido	
\$	ligação metilfosfonato internucleótido	

Exemplo 2: Modificação da estrutura fosfonoacetato no motivo CpG que resulta no aumento de produção de IFN- α

Para investigar o efeito da modificação PA em células humanas, foram isoladas PBMC humanas do sangue completo e incubaram-se com ODN classe B com sequência idêntica, mas variando nos locais de modificação PA. Os ODN eram ou sem modificar (Seq ID N° 33), modificado no primeiro motivo CpG (Seq ID N° 8), modificado no segundo motivo CpG (Seq ID N° 9), ou foram modificados ambos os motivos CpG o primeiro e o segundo (Seq ID N° 10). Após a incubação durante 24 horas, foi medida a concentração de IFN- α com um ensaio ELISA. Os três ODN com modificações PA induziam mais IFN- α que o ODN sem modificar. A Seq ID N° 10 com duas modificações parecia induzir ligeiramente mais IFN- α que o ODN modificado uma vez (Figura 2). O Quadro 2 mostra um resumo das sequências de ODN testadas.

Quadro 2

Seq ID N°	Sequência	Descrição
2	T*C-G*T*C-G*T*T*T-G*C-G*T*C-G*T*T	Classe B
9	T*C<G*T*C-G*T*T*T-G*C-G*T*C-G*T*T	Classe B
10	T*C-G*T*C<G*T*T*T-G*C-G*T*C-G*T*T	Classe B
11	T*C<G*T*C<G*T*T*T-G*C-G*T*C-G*T*T	Classe B
<	ligação fosfonoacetato internucleótido	
*	ligação fosforotioato internucleótido	
-	ligação fosfodiéster internucleótido	
§	ligação metilfosfonato internucleótido	

Exemplo 3: Modificação de estrutura fosfonoacetato no motivo CpG de ODN classe B que dá como resultado o aumento de ativação TLR9

Foram levados a cabo ensaios de luciferase para comparar diretamente o efeito de várias modificações do motivo CpG sobre a ativação de TLR9. O ODN com sequência idêntica com modificação de estrutura PS (Seq ID N° 13), PO (Seq ID N° 14), ou PA (Seq ID N° 15) no motivo CpG foram testados em quanto à capacidade de ativar TLR9 em células HEK 293 transfetadas com TLR9. Como mostra a Figura 3a, o ODN com a modificação PA era um antagonista mais forte de TLR9 que o ODN com modificação PS, embora tão forte como o ODN com a modificação PO.

Foi levado a cabo um ensaio de luciferase similar com ODN tinha ou uma estrutura completamente PS (Seq ID N° 16), tinha uma modificação PA no primeiro motivo CpG (Seq ID N° 17), ou tinha uma modificação PA em ambos motivos CpG primeiro e segundo (Seq ID N° 18). Conforme é mostrado na Figura 3b, ambos ODN com a modificação PA dava como resultado um aumento da ativação TLR9 por encima do resultado do ODN PS. O ODN com modificações nos dois motivos CpG mostrava a maior ativação TLR9.

O mesmo ensaio foi levado a cabo para comparar a atividade induzida por um ODN de classe B totalmente fosforotioato (Seq ID N° 5), um ODN classe B semi-mole com modificação PA no primeiro (o mais 5') motivo CpG (Seq ID N° 9), um ODN com uma modificação PA no segundo motivo CpG (Seq ID N° 10) e um ODN no qual foram modificados ambos os motivos CpG com uma ligação PA internucleótido (Seq ID N° 11). Conforme é mostrado na Figura 3c, a estimulação pelos três ODN modificados PA resultavam num aumento da ativação TLR9 comparada com a Seq ID N° 5. A Quadro 3 resume os ODN testados.

Quadro 3

Seq ID N°	Sequência	Descrição
5	T*C*G*T*C*G*T*T*T*G*C*G*T*C*G*T*T	PS Classe B
9	T*C<G*T*C-G*T*T*T-G*C-G*T*C-G*T*T	PA 1Classe B
10	T*C-G*T*C<G*T*T*T-G*C-G*T*C-G*T*T	PA 2Classe B
11	T*C<G*T*C<G*T*T*T-G*C-G*T*C-G*T*T	PA 1&2Classe B
13	T*C*G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T	PS Classe B
14	T*C-G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T	PO Classe B
15	T*C<G*T*T*T*T*T*T*7*T*T*T*T*T*T*T*T	PA Classe B
16	T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T	PS Classe B
17	T*C<G*T*C*G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T	PA Classe B
18	T*C<G*T*C<G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T	PA x 2Classe B
<	ligação fosfonoacetato internucleótido	
*	ligação fosforotioato internucleótido	
-	ligação fosfodiéster internucleótido	

Exemplo 4 Modificação em estrutura fosfonoacetato no motivo CpG de ODN classe C que da como resultado a ativação de TLR9

O ODN classe C semi-mole de fosfonoacetato modificado foram testados em quanto à capacidade para ativar TLR9. Incubaram-se células HEK293 transfetadas com TLR9 de idêntica sequência, mas com variação nas modificações da estrutura nos motivos CpG, com ODN classe C e foi medida a atividade TLR9 pelo ensaio de luciferase. Os ODN com

modificações PA em várias posições foram comparados (veja-se o Quadro 4). A Figura 4 mostra que a atividade mais forte era do ODN com PA.

Quadro 4

Seq ID N°	Sequência	Descrição
19	T*C*G*T*C<G`T*T*T*T*A*C-G*G*C*G*C*C-G*T*G*C*C*G-but	Classe C
20	T*C-GT*C<G*T*T*T" T*A*C-G*G*C*G*C*C-G*T*G*C*C*G-but	Classe C
21	T*C<G*T*C-G*T*T*T*T*A*C-G*G*C*G*C*C-G*T*G*C*C*G-but	Classe C
20	T*C*G*T*C-G*T*T*T*T*A-C<G*G*C*G*C*C-G*T*G*C*C*G-but	Classe C
<	ligação fosfonoacetato internucleótido	
*	ligação fosforotioato internucleótido	
-	ligação fosfodiéster internucleótido	
but	butirato	

Exemplo 5: Posicionamento da modificação da estrutura do fosfonoacetato que afeta a potência e a eficácia

Para investigar mais o efeito da modificação sobre a capacidade de ODN para ativar TLR9, foram feitos mais modificações no motivo CpG de ODN de classe B e classe C e foram testados em quanto à capacidade para estimular TLR9 em células HEK293 transfectadas com TLR9. O ODN de classe B Seq ID N° 1 modificou-se com um PA no 1° motivo CpG (Seq ID N° 23), o 2° motivo CpG (Seq ID N° 24), o 3° motivo CpG (Seq ID N° 25) ou o 4° motivo CpG (Seq ID N° 26). Conforme é mostrado na Figura 5a, a modificação PA no 1° CpG aumentava a potência e a eficácia da força do sinal dependente de TLR9, e a modificação PA do 2° e 3° CpG tinham potência aumentada. A modificação PA no 4° CpG reduzia tanto a potência como a eficácia.

Os derivados da Seq ID N° 1 com mais de um motivo CpG

modificado PA foram testados então, em que ou o 1° e o 2° (Seq ID N° 27), 2° e 4° (Seq ID N° 28) ou 1°, 2°, e 4° (Seq ID N° 29) CpG foram modificados. Conforme é mostrado na Figura 5b, a modificação PA no 1° e 2° CpG aumentava a potência e a eficácia da ativação de TLR9, enquanto que a modificação do 2° e 4°, ou 1°, 2° e 4° tinham um efeito mínimo sobre a potência e a eficácia.

Os derivados de ODN classe C Seq ID N° 33 com modificação PA em diferentes posições também foram testados em quanto à capacidade de ativar TLR9. Foi feita a modificação PA no 1° motivo CpG (Seq ID N° 30), o 2° motivo CpG (Seq ID N° 31), ou ambos motivos CpG 1° e 2° (Seq ID N° 32). Conforme é mostrado na figura 5c, a modificação PA no 1° ou o 1° e 2° CpG aumentava a potência e eficácia de ativação de TLR9, enquanto que a modificação PA no 2° CpG não tinha influência na potência e a eficácia. A Quadro 5 mostra um resumo dos ODN testados. Conjuntamente estes dados indicam que o ODN com modificação pelo menos no motivo CpG resultava na ativação TLR9 mais potente.

Quadro 5

Seq ID N°	Sequência	Descrição
1	T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T*T*C*G*G*T*C*G*T*T*T*T	Classe B
4	T*C*G*T*C-G*T*T*T*T*A*C-G*G*C*G*C*C-G*T*G*C*C*G	Classe C
23	T*C<G*T*C*G*T*T*T*T*T*T*C*G*G*T*C*G*T*T*T*T	Classe B
24	T*C*G*T*C<G*T*T*T*T*T*T*C*G*G*T*C*G*T*T*T*T	Classe B
25	T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T*T*C<G*G*T*C*G*T*T*T*T	Classe B
26	T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T*T*C*G*G*T*C<G*T*T*T*T	Classe B
27	T*C<G**T*C<G*T*T*T*T*T*T*T*C*G*G*T*C*G*T*T*T*T	Classe B
28	T*C*G*T*C<G*T*T*T*T*T*T*T*C*G*G*T*C<G*T*T*T*T	Classe B
29	T*C<G*T*C<G*T*T*T*T*T*T*T*C*G*G*T*C<G*T*T*T*T	Classe B
30	T*C<G*T*C*G*T*T*T*T*T*T*C`G*G*C*G*C*G*C*G*C*C*3mG	Classe C
31	T*C*G*T*C<G*T*T*T*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*C*3mG	Classe C
32	T*C<G*T*C<G*T*T*T*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*C*3mG	Classe C
33	T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*C*3mG	Classe C

<	ligação PA internucleótido	
*	ligação PS internucleótido	
-	ligação PO internucleótido	
3mG	3'-O-metil-G	

Equivalentes

A especificação escrita anterior considera-se suficiente para capacitar a um perito na especialidade por em prática a invenção.

LISTA DE SEQUÊNCIAS

<110> Pfizer, Inc., et al.

<120> **ANÁLOGOS DE OLIGONUCLEOTÍDEO MODIFICADOS POR FOSFATO COM ATIVIDADE IMUNOESTIMULANTE**

<130> PC 31820

<150> 60/930.764

<151> 18-05-2007

<160> 33

<170> PatentIn versão 3.4

<210> 1

<211> 21

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Classe B

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<400> 1
 tcgtcgtttt tcggtcgttt t 21

<210> 2
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Classe B

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(5)
 <223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(9)
 <223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(11)

<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(14)

<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>

<221> mist-feature

<222> (15)..(17)

<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> Lista de sequências de ligações internucleotídicas de fosfodiéster

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(6)

<223> Ligações internucleotídicas de fosfodiéster

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(10)

<223> Ligações internucleotídicas de fosfodiéster

<220>

<221> misc_feature

<222> (11)..(12)

<223> Ligações internucleotídicas de fosfodiéster

<220>

<221> misc_feature

<222> (14)..(15)

<223> Ligações internucleotídicas de fosfodiéster

<400> 2

tcgtcgtttg cgtcggt 17

<210> 3

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Classe B

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(5)

<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(13)

<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>

<221> misc_feature

<222> (14)..(21)

<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>

```

<221> misc_feature
<222> (22)..(24)
<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(3)
<223> Ligações internucleotídicas de fosfodiéster

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(6)
<223> Ligações internucleotídicas de fosfodiéster

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(14)
<223> Ligações internucleotídicas de fosfodiéster

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(22)
<223> Ligações internucleotídicas de fosfodiéster

<400> 3
tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt                24

<210> 4
<211> 24
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Classe C

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(5);
<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(12)
<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(18)
<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(24)
<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(6)
<223> Ligações internucleotídicas de fosfodiéster

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(13)
<223> Ligações internucleotídicas de fosfodiéster

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(19)
<223> Ligações internucleotídicas de fosfodiéster

<400> 4

tcgtcgtttt acggcgccgt gccg 24

<210> 5

<211> 17

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> PS Classe B

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (17)

<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<400> 5

tcgtcgtttg cgtcgtt 17

<210> 6

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> PS Classe B

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (20)

<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<400> 6

tggtcgttttt tttttttttt 20

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

<220>
 <223> PO Classe B

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (4)
 <223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5) .. (20)
 <223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4) .. (5)
 <223> Ligação internucleotídicas de fosfodiéster

<400> 7
 tgtcgttttt tttttttttt 20

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

<220>
 <223> PA Classe B

<220>

```

<221> misc_feature
<222> (1)..(4)
<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(20)
<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(5)
<223> Ligação internucleotídica de fosfonoacetato

<400> 8
tgtcgttttt tttttttttt      20

<210> 9
<211> 17
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> PA 1 Classe B

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(2)
<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(5)
<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

```

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6) .. (9)
 <223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10) .. (11)
 <223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (12) .. (14)
 <223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (15) .. (17)
 <223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2) .. (3)
 <223> Ligação internucleotídica de fosfonoacetato

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5) .. (6)
 <223> Ligação internucleotídicas de fosfodiéster

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9) .. (10)
 <223> Ligação internucleotídicas de fosfodiéster

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(12)
 <223> Ligação internucleotídicas de fosfodiéster

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(15)
 <223> Ligação internucleotídicas de fosfodiéster

<400> 9
 tcgtcgtttg cgtcgtt 17

<210> 10
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> PA 2 Classe B

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(5)
 <223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(9)
 <223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(11)
<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(14)
<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(17)
<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(6)
<223> Ligação internucleotídica de fosfonoacetato

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(3)
<223> Ligação internucleotídicas de fosfodiéster

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(10)
<223> Ligação internucleotídicas de fosfodiéster

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(12)
<223> Ligação internucleotídicas de fosfodiéster

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14) .. (15)
 <223> Ligação internucleotídicas de fosfodiéster

<400> 10
 tcgtcgtttg cgtcggtt 17

<210> 11
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> PA 1 e 2 Classe B

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (2)
 <223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3) .. (5)
 <223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6) .. (9)
 <223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10) .. (11)

<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(14)

<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>

<221> misc_feature

<222> (15)..(17)

<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> Ligação internucleotídica de fosfonoacetato

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(6)

<223> Ligação internucleotídica de fosfonoacetato

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(10)

<223> Ligação internucleotídicas de fosfodiéster

<220>

<221> misc_feature

<222> (11)..(12)

<223> Ligação internucleotídicas de fosfodiéster

<220>

<221> misc_feature

<222> (14)..(15)

<223> Ligação internucleotídicas de fosfodiéster

<400> 11

tcgtcgtttg cgtcggtt 17

<210> 12

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> P-Me Classe B

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (4)

<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>

<221> misc_feature

<222> (5) .. (20)

<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>

<221> misc_feature

<222> (4) .. (5)

<223> Ligação internucleotídica de metil-fosfonato

<400> 12

tgtcgttttt tttttttttt 20

<210> 13

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> PS Classe B

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(20)

<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<400> 13

tcgtttttttt ttttttttttt 20

<210> 14

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> PO Classe B

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(20)

<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> Ligação internucleotídicas de fosfodiéster

<400> 14
tcgtttttttt tttttttttt 20

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

<220>
<223> PA Classe B

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(2)
<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>
<221> mist_feature
<222> (3)..(20)
<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(3)
<223> Ligação internucleotídica de fosfonoacetato

<400> 15
tcgtttttttt tttttttttt 20

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

<220>

<223> PS Classe B

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(20)

<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<400> 16

tcgtcgtttt tttttttttt 20

<210> 17

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> PA Classe B

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(20)

<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> Ligação internucleotídica de fosfonoacetato

<400> 17

tcgtcgtttt tttttttttt 20

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

 <220>
 <223> PA Classe B x 2

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (2)
 <223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3) .. (5)
 <223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6) .. (20)
 <223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2) .. (3)
 <223> Ligação internucleotídica de fosfonoacetato

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5) .. (6)
 <223> Ligação internucleotídica de fosfonoacetato

 <400> 18

tcgtcgtttt tttttttttt 20

<210> 19

<211> 25

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Classe C

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(5)

<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(12)

<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)..(18)

<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>

<221> misc_feature

<222> (19)..(24)

<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(6)

<223> Ligação internucleotídica de fosfonoacetato

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(13)
<223> Ligações internucleotídicas de fosfodiéster

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(19)
<223> Ligações internucleotídicas de fosfodiéster

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(25)
<223> n é butirato

<400> 19
tcgtcgtttt acggcgccgt gccgn          25

<210> 20
<211> 25
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Classe C

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(2)
<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(5)
<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(12)
<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(18)
<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(24)
<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(6)
<223> Ligação internucleotídica de fosfonoacetato

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(3)
<223> Ligações internucleotídicas de fosfodiéster

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(13)
<223> Ligações internucleotídicas de fosfodiéster

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(19)
<223> Ligações internucleotídicas de fosfodiéster

<220>

<221> misc_feature

<222> (25)..(25)

<223> n é butirato

<400> 20

tcgtcgtttt acggcgccgt gccgn 25

<210> 21

<211> 25

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Classe C

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(5)

<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(12)

<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)..(18)

<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>

<221> misc_feature

<222> (19)..(24)

<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> Ligação internucleotídica de fosfonoacetato

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(6)

<223> Ligações internucleotídicas de fosfodiéster

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(13)

<223> Ligações internucleotídicas de fosfodiéster

<220>

<221> misc_feature

<222> (18)..(19)

<223> Ligações internucleotídicas de fosfodiéster

<220>

<221> misc_feature

<222> (25)..(25)

<223> n é butirato

<400> 21

tcgtcgtttt acggcgccgt gccgn

25

<210> 22
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Classe C

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(5)
 <223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(11)
 <223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(18)
 <223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(24)
 <223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> Ligação internucleotídica de fosfonoacetato

 <220>
 <221> misc_feature

<222> (5) .. (6)

<223> Ligações internucleotídicas de fosfodiéster

<220>

<221> misc_feature

<222> (11) .. (12)

<223> Ligações internucleotídicas de fosfodiéster

<220>

<221> misc_feature

<222> (18) .. (19)

<223> Ligações internucleotídicas de fosfodiéster

<220>

<221> misc_feature

<222> (25) .. (25)

<223> n é butirato

<400> 22

tcgtcgtttt acggcgccgt gccgn 25

<210> 23

<211> 21

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Classe B

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (2)

<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>

<221> misc_feature
<222> (3) .. (21)
<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>
<221> misc_feature
<222> (2) .. (3)
<223> Ligação internucleotídica de fosfonoacetato

<400> 23
tcgtcgtttt tcggtcgttt t 21

<210> 24
<211> 21
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Classe B

<220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (5)
<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>
<221> misc_feature
<222> (6) .. (21)
<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>
<221> misc_feature
<222> (5) .. (6)
<223> Ligação internucleotídica de fosfonoacetato

<400> 24

tcgtcgtttt tcggtcgttt t 21

<210> 25

<211> 21

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Classe B

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (12)

<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>

<221> misc_feature

<222> (13) .. (21)

<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>

<221> misc_feature

<222> (12) .. (13)

<223> Ligação internucleotídica de fosfonoacetato

<400> 25

tcgtcgtttt tcggtcgttt t 21

<210> 26

<211> 21

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Classe B

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(16)

<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>

<221> misc_feature

<222> (17)..(21)

<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>

<221> misc_feature

<222> (16)..(17)

<223> Ligação internucleotídica de fosfonoacetato

<400> 26

tcggtcggtttt tcggtcggttt t 21

<210> 27

<211> 21

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Classe B

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>

<221> misc_feature

<222> (3) .. (5)
 <223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6) .. (21)
 <223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2) .. (3)
 <223> Ligação internucleotídica de fosfonoacetato

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5) .. (6)
 <223> Ligação internucleotídica de fosfonoacetato

 <400> 27
 tcgtcgtttt tcggtcgttt t 21

 <210> 28
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Classe B

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (5)
 <223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

 <220>

<221> misc_feature
 <222> (6) .. (16)
 <223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (17) .. (21)
 <223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5) .. (6)
 <223> Ligação internucleotídica de fosfonoacetato

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (16) .. (17)
 <223> Ligação internucleotídica de fosfonoacetato

<400> 28
 tcgtcgtttt tcggtcgttt t 21

<210> 29
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Classe B

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (2)
 <223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(5)
 <223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(16)
 <223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(21)
 <223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> Ligação internucleotídica de fosfonoacetato

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> Ligação internucleotídica de fosfonoacetato

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(17)
 <223> Ligação internucleotídica de fosfonoacetato

<400> 29
 tcgtcgtttt tcggtcgttt t 21

<210> 30
 <211> 22

<212> ADN
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Classe C

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(22)
 <223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> Ligação internucleotídica de fosfonoacetato

 <220>
 <221> mist_feature
 <222> (22)..(22)
 <223> n é 3-O-metil-G

 <400> 30
 tcgtcgtttg cggcgcgcgc cn 22

 <210> 31
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

 <220>

<223> Classe C

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(5)

<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(22)

<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(6)

<223> Ligação internucleotídica de fosfonoacetato

<220>

<221> misc_feature

<222> (22)..(22)

<223> n é 3-O-metil-G

<400> 31

tcgtcggtttt cggcgcgcgcg cn 22

<210> 32

<211> 22

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Classe C

<220>

<221> misc_feature

```

<222> (1) .. (2)
<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>
<221> misc_feature
<222> (3) .. (5)
<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>
<221> misc_feature
<222> (6) .. (22)
<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>
<221> misc_feature
<222> (2) .. (3);
<223> Ligação internucleotídica de fosfonoacetato

<220>
<221> misc_feature
<222> (5) .. (6)
<223> Ligação internucleotídica de fosfonoacetato

<220>
<221> misc_feature
<222> (22) .. (22)
<223> n é 3-O-metil-G

<400> 32
tcgtcgtttt cggcgcgcgc cn          22

<210> 33
<211> 22
<212> ADN
<213> Sequência artificial

```

<220>

<223> Classe C

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(22)

<223> Ligações internucleotídicas de fosforotioato

<220>

<221> misc_feature

<222> (22)..(22)

<223> n é 3-O-metil-G

<400> 33

tcgtcgtttt cggcgcgcgc cn 22

DOCUMENTOS REFERIDOS NA DESCRIÇÃO

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

Documentos de patente referidos na descrição

- WO 2006116458 A [0005]
- US 6194388 B [0026] [0034]
- US 6207646 B [0026] [0034]
- US 6218371 B [0026] [0034]
- US 6239116 B [0026] [0034]
- US 6339068 B [0026] [0034]
- US 6406705 B [0026]
- US 6429199 B [0026]
- US 6214806 B [0034]
- US 0026527 W [0034]
- WO 0122990 A [0034]
- US 31327301 P [0034]
- US 10224523 B [0034]
- US 099683 A [0035]
- US 706561 A [0035]
- WO 0232912 A [0036]
- US 6693187 B [0036]
- US 4469863 A [0036]
- US 5023243 A [0036]
- EP 092574 A [0036]
- WO 9501363 A [0043]
- US 5658738 A [0054]
- US 5668265 A [0054]
- US 0310406 W [0072]
- WO 9524929 A [0123]
- WO 9703702 A [0124]

- US 5284656 A [0148]
- US 5451569 A, Wong [0148]
- US 60930764 B [0183]

Documentos de não patente citados na descrição

- **TOKUNAGA, T. et al.** *Jpn. J. Cancer Res.*, 1988, vol. 79, 682-686 [0002]
- **TOKUNAGA, T. et al.** *JNCI*, 1984, vol. 72, 955-962 [0002]
- **MESSINA, J.P. et al.** *J. Immunol.*, 1991, vol. 147, 1759-1764 [0002]
- **KRIEG.** *Applied Oligonucleotide Technology.* John Wiley and Sons, Inc, 1998, 431-448 [0002]
- **KRIEG et al.** *Nature*, 1995, vol. 374, 546-549 [0002] [0003]
- **KRIEG.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1999, vol. 93321, 1-10 [0002]
- **HARTMANN et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 1999, vol. 96, 9305-10 [0002] [0003]
- **PISETSKY.** *J. Immunol.*, 1996, vol. 156, 421-423 [0003]
- **HACKER et al.** *EMBO J.*, 1998, vol. 17, 6230-6240 [0003]
- **LIPFORD et al.** *Trends in Microbiol.*, 1998, vol. 6, 496-500 [0003]
- **YI et al.** *J. Immunol.*, 1998, vol. 160, 5898-5906 [0003]
- **LIANG.** *J. Clin. Invest.*, 1996, vol. 98, 1119-1129 [0003]
- **WAGNER RW et al.** *Nat Biotechnol*, 1996, vol. 14, 840-4 [0033]
- **KRIEG AM et al.** *Nature*, 1995, vol. 374, 546-9 [0034]
- **BALLAS ZK et al.** *J Immunol*, 1996, vol. 157, 1840-5 [0034]
- **YAMAMOTO S et al.** *J Immunol*, 1992, vol. 148, 4072-6 [0034]
- **UHLMANN, E. et al.** *Chem Rev*, 1990, vol. 90, 544 [0036]

- **GOODCHILD, J.** *Bioconjugate Chem*, 1990, vol. 1, 165 [0036]
- **UHLMANN, E. et al.** *Chem Rev*, 1990, vol. 90, 543 [0040]
- **Protocols for Oligonucleotides and Analogs. Synthesis and Properties & Synthesis and Analytical Techniques.** Humana Press, 1993 [0040]
- **CROOKE, S.T. et al.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1996, vol. 36, 107-129 [0040]
- **HUNZIKER, J. et al.** *Mod Synth Methods*, 1995, vol. 7, 331-417 [0040]
- **Methods in Molecular Biology. UHLMANN E ; PEYMAN A.** *Protocols for Oligonucleotides and Analogs.* Humana Press, 1993, vol. 20, 355 ff [0044]
- **STIRCHAK EP et al.** *Nucleic Acids Res*, 1989, vol. 17, 6129-41 [0045]
- **NIELSEN PE et al.** *Bioconjug Chem*, 1994, vol. 5, 3-7 [0045]
- **FROEHLER, J.** *Am Chem Soc*, 1992, vol. 114, 8320 [0046]
- **VANDENDRIESSCHE et al.** *Tetrahedron*, 1993, vol. 49, 7223 [0046]
- **TARKOV, M. et al.** *Helv Chim Acta*, 1993, vol. 76, 481 [0046]
- **WAGNER, R.W. et al.** *Nat Biotechnol*, 1996, vol. 14, 840-4 [0048]
- **SELIGER, H et al.** Oligonucleotide analogs with terminal 3'-3'- and 5'-5'-internucleotidic linkages as antisense inhibitors of viral gene expression. *Nucleotides & Nucleotides*, 1991, vol. 10 (1-3), 469-77 [0052]
- **JIANG et al.** Pseudo-cyclic oligonucleotides: in vitro and in vivo properties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 1999, vol. 7 (12), 2727-2735 [0052]
- **DURAND, M. et al.** Triple-helix formation by an oligonucleotide containing one (dA)₁₂ and two (dT)₁₂ sequences bridged by two hexaethylene glycol chains.

- Biochemistry*, 1992, vol. 31 (38), 9197-204 [0054]
- **FONTANEL, MARIE LAURENCE et al.** Sterical recognition by T4 polynucleotide kinase of non-nucleosidic moieties 5'-attached to oligonucleotides. *Nucleic Acids Research*, 1994, vol. 22 (11), 2022-7 [0054]
 - **VALLIN, H. et al.** *J Immunol*, 1999, vol. 163, 6306-13 [0072]
 - **HOET, R.M. et al.** *J Immunol*, 1999, vol. 163, 3304-12 [0072]
 - **VEN VENROOIJ.** *J Clin Invest*, 1990, vol. 86, 2154-60 [0072]
 - **LOTZ, M. et al.** *Mol Biol Rep*, 1992, vol. 16, 127 [0072]
 - **MOHAN C et al.** *J Exp Med*, 1993, vol. 177, 1367-81 [0072]
 - **FATENEJAD, S.** *J Immunol*, 1994, vol. 152, 5523-31 [0072]
 - **MALMEGRIM, K.C. et al.** *Isr Med Assoc J*, 2002, vol. 4, 706-12 [0072]
 - **NEWKIRK, M.M. et al.** *Arthritis Res*, 2001, vol. 3, 253-8 [0072]
 - **MAGNUSSON, M. et al.** *Scand J Immunol*, 2001, vol. 54, 543-50 [0072]
 - **RÖNNBLÖM, L. et al.** *J Exp Med*, 2001, vol. 194, F59-63 [0072]
 - **TSAI, D.E et al.** *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, vol. 89, 8864-8 [0072]
 - **TSAI, D.E. et al.** *J Immunol*, 1993, vol. 150, 1137-45 [0072]
 - **COHEN et al.** *Cancer Research*, 1994, vol. 54, 1055 [0079]
 - **C.G.A. THOMAS.** *Medical Microbiology*, Bailliere Tindall, Great Britain, 1983 [0086]
 - **BARNES ; PETERSON.** *Am Rev Respir Dis*, 1993, vol. 148, S1-S26 [0105]

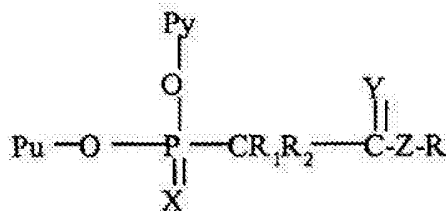
- **KAMADA AK et al.** *Am J Respir Crit Care Med*, 1996, vol. 153, 1739-48 [0105]
- **GREGORIADIS G.** *Trends Biotechnol*, 1985, vol. 3, 235-241 [0121]
- **CHICKERING et al.** *Biotech Bioeng*, 1996, vol. 52, 96-101 [0124]
- **MATHIOWITZ, E. et al.** *Nature*, 1997, vol. 386, 410-414 [0124]
- **H.S. SAWHNEY ; C.P. PATHAK ; J.A. HUBELL.** *Macromolecules*, 1993, vol. 26, 581-587 [0126]
- Soluble Polymer-Enzyme Adducts. **ABUCHOWSKI ; DAVIS.** *Enzymes as Drugs*. Wiley-Interscience, 1981, 367-383 [0133]
- **NEWMARK et al.** *J. Appl. Biochem.*, 1982, vol. 4, 185-189 [0133]
- **ADJEI et al.** *Pharmaceutical Research*, 1990, vol. 7, 565-569 [0148]
- **ADJEI et al.** *International Journal of Pharmaceutics*, 1990, vol. 63, 135-144 [0148]
- **BRAQUET et al.** *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 1989, vol. 13 (5), 143-146 [0148]
- **HUBBARD et al.** *Annals of Internal Medicine*. 1989, vol. III, 206-212 [0148]
- **SMITH et al.** *J. Clin. Invest.*, vol. 84, 1145-1146 [0148]
- **OSWEIN et al.** *Aerosolization of Proteins. Proceedings of Symposium on Respiratory Drug Delivery II, Keystone, Colorado, March 1990* [0148]
- **DEBS et al.** *J. Immunol.*, 1988, vol. 140, 3482-3488 [0148]
- **LANGER.** *Science*, 1990, vol. 249, 1527-1533 [0164]

Lisboa, 3 de Agosto de 2015

REIVINDICAÇÕES

1. Um oligonucleotídeo imunoestimulante, com pelo menos um dinucleotídeo pirimidina-purina modificado de acordo com a Fórmula I,

Fórmula I



em que

R é hidrogénio (H), C1-C4-alquilo, metoxietilo, pivaloílo oximetilo, pivaloílo oxibenzilo ou S-pivaloílo tioetilo ou um sal fisiologicamente tolerado do mesmo; X, Y e Z são oxigénio (O) ou enxofre (S); R₁ e R₂ são H ou C1-C4 alquilo; Py é um nucleosídeo ou um análogo de nucleosídeo com uma base citosina e Pu é um nucleosídeo ou um análogo de nucleosídeo com uma base guanina, em que o oligonucleotídeo imunoestimulante é um ligando TLR9, e em que o oligonucleotídeo é ADN.

2. O oligonucleotídeo imunoestimulante da reivindicação 1, em que o oligonucleotídeo inclui um esqueleto que é quimérico.

3. O oligonucleotídeo imunoestimulante da reivindicação 1, que ainda contém pelo menos um segundo dinucleotídeo pirimidina-purina, em que o segundo dinucleotídeo pirimidina-purina tem uma ligação fosfodiéster ou uma ligação fosforotioato e contém ainda pelo menos um terceiro dinucleotídeo pirimidina-purina, em que o terceiro dinucleotídeo pirimidina-purina tem uma ligação fosfodiéster.

4. O oligonucleotídeo imunoestimulante da reivindicação 1, em que pelo menos um nucleotídeo do oligonucleotídeo imunoestimulante tem um resíduo de açúcar modificado selecionado a partir do grupo que consiste essencialmente em 2'-fluoro-2'-desoxirribose, 2'-amino-2' desoxirribose, 2'-0-alquil-ribose, 2'-0-metil-ribose, 2'-amino-2'-desoxirribose, 2'-0-4'-C-alquileno ribose ou 3'-0-alquil-ribose.

5. O oligonucleotídeo imunoestimulante da reivindicação 1 em que o oligonucleotídeo imunoestimulante contém pelo menos uma ligação internucleotídica selecionada do grupo que consiste em ligações 2'-5', 5'-5', 3'-3', 2'-2' ou 2'-3'.

6. O oligonucleotídeo imunoestimulante da reivindicação 1 contém ainda um antígeno, um agente antibacteriano, um agente anticancerígeno, um agente antiviral, um medicamento contra a asma ou a alergia ou um medicamento contra uma doença auto-imune.

7. O oligonucleotídeo imunoestimulante de qualquer das reivindicações 1 a 6, em que dito pelo menos um dinucleotídeo pirimidino-purina modificado de acordo com a Fórmula I é um dinucleotídeo C-G com uma ligação internucleotídeo fosfonoacetato.

8. O oligonucleotídeo imunoestimulante da reivindicação 1, com uma sequência selecionada do grupo que consiste ns SEQ. ID N.ºs 8-11, 15, 17-21 e 23-3.

9. Uma composição que contém um oligonucleotídeo imunoestimulante da reivindicação 1 com pelo menos uma ligação internucleotídica fosfonoacetato ou tipo fosfonoacetato, em que o esqueleto do oligonucleotídeo é

quimérico, e um veículo farmacêutico para utilização como um medicamento para estimular uma resposta imune.

10. O oligonucleotídeo imunoestimulante da reivindicação 1 e um veículo farmacêutico para utilização no tratamento do cancro.

11. O oligonucleotídeo imunoestimulante da reivindicação 1 e um veículo farmacêutico para utilização no tratamento de uma infeção.

12. Uma composição que contém um oligonucleotídeo imunoestimulante de acordo com a reivindicação 1 com pelo menos uma ligação internucleotídica tipo fosfonoacetato, em que o esqueleto é oligonucleotídeo quimérico e um veículo farmacêutico para utilização no tratamento de asma.

13. Uma composição que contém um oligonucleotídeo imunoestimulante de acordo com a reivindicação 1 com pelo menos uma ligação internucleotídica tipo fosfonoacetato, em que o esqueleto é oligonucleotídeo quimérico e um veículo farmacêutico para utilização no tratamento da alergia.

14. Uma composição que contém:
um oligonucleotídeo imunoestimulante de acordo com a reivindicação 1 com pelo menos uma ligação fosfonoacetato ou tipo fosfonoacetato e em que o esqueleto do oligonucleotídeo é quimérico, em que o oligonucleotídeo está ligado a pelo menos um agente terapêutico.

15. A composição da reivindicação 14, em que o agente terapêutico é um segundo oligonucleotídeo e o segundo oligonucleotídeo está ligado ao oligonucleotídeo imunoestimulante para formar uma estrutura ramificada.

16. A composição da reivindicação 14, em que o agente terapêutico é um segundo oligonucleotídeo e o segundo oligonucleotídeo está ligado ao oligonucleotídeo imunoestimulante para formar uma ligação 3'-3'.

17. A composição da reivindicação 14, em que o agente terapêutico é um segundo oligonucleotídeo e o segundo oligonucleotídeo e o oligonucleotídeo imunoestimulante formam dendrímeros.

Lisboa, 3 de Agosto de 2015

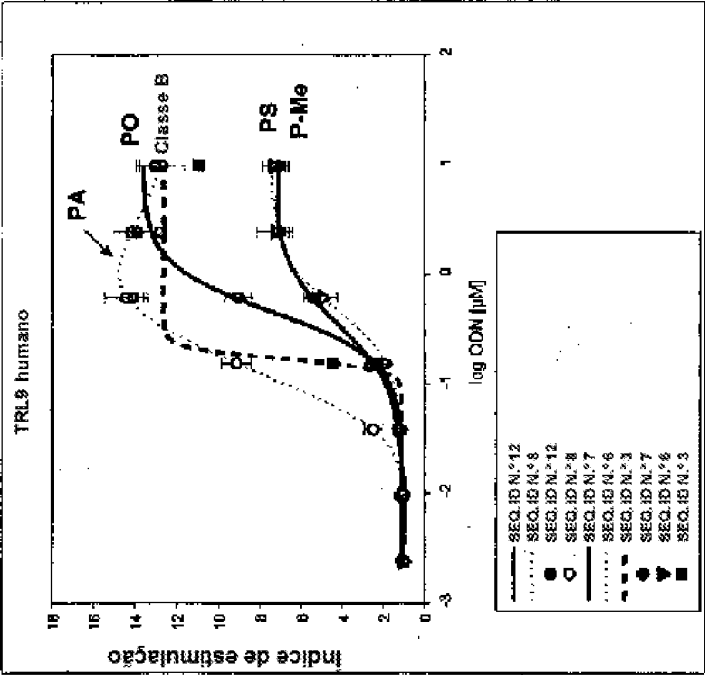


Figura 1

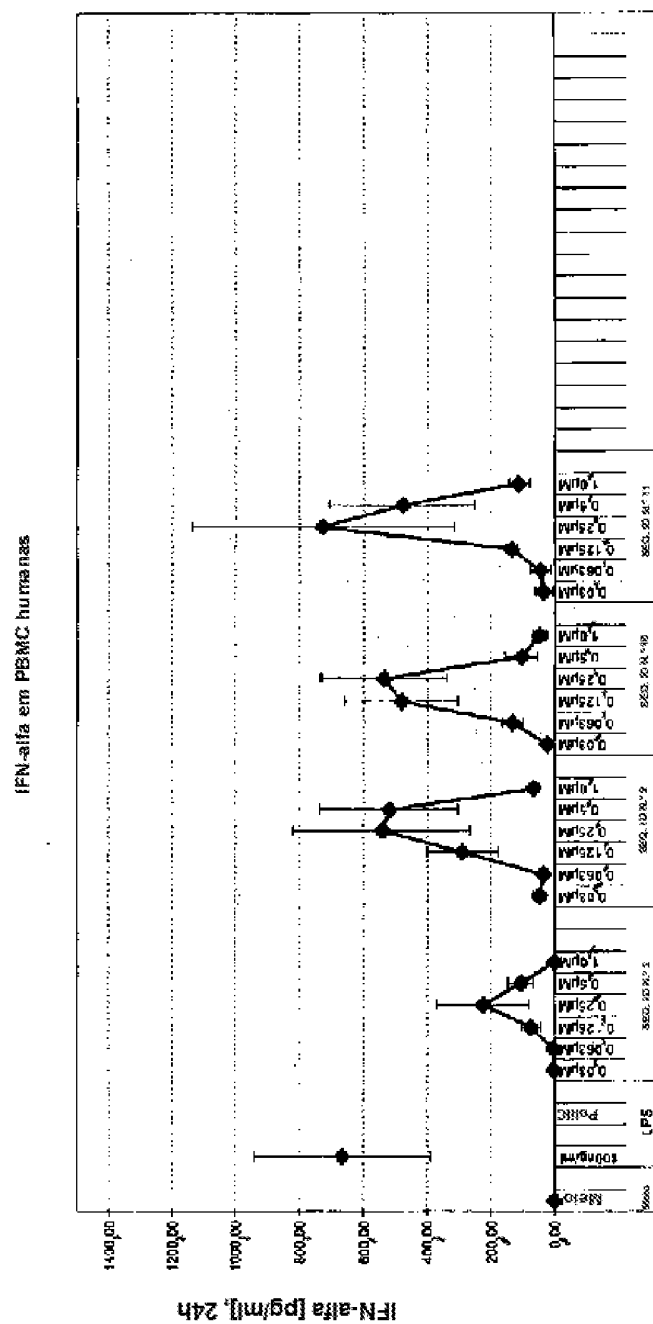


Figure 2

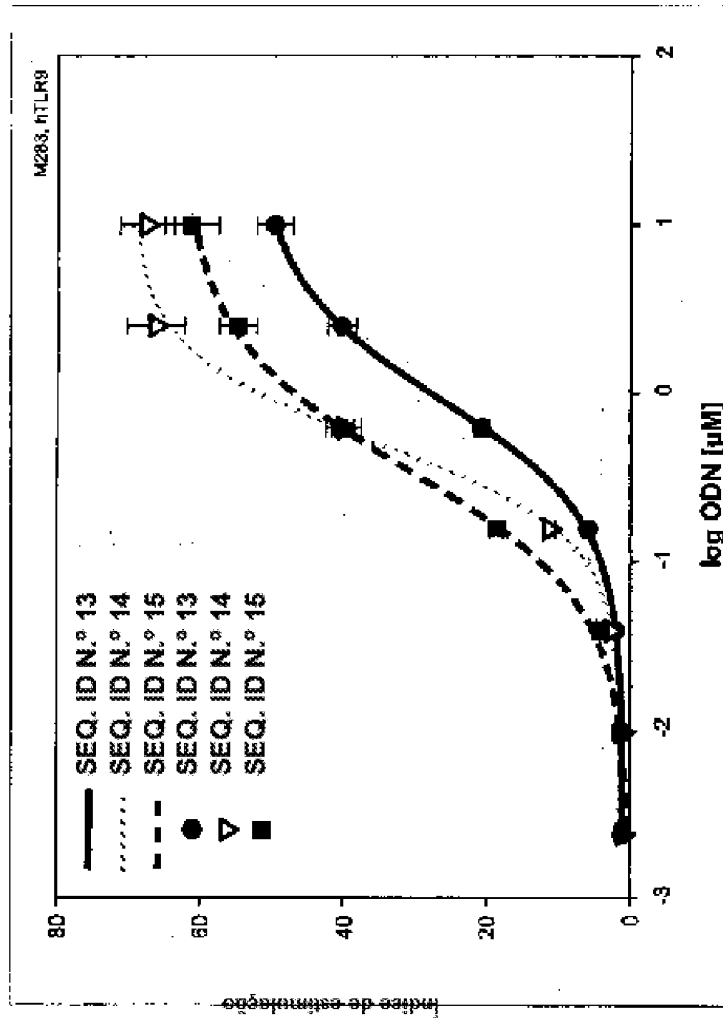


Figura 3a

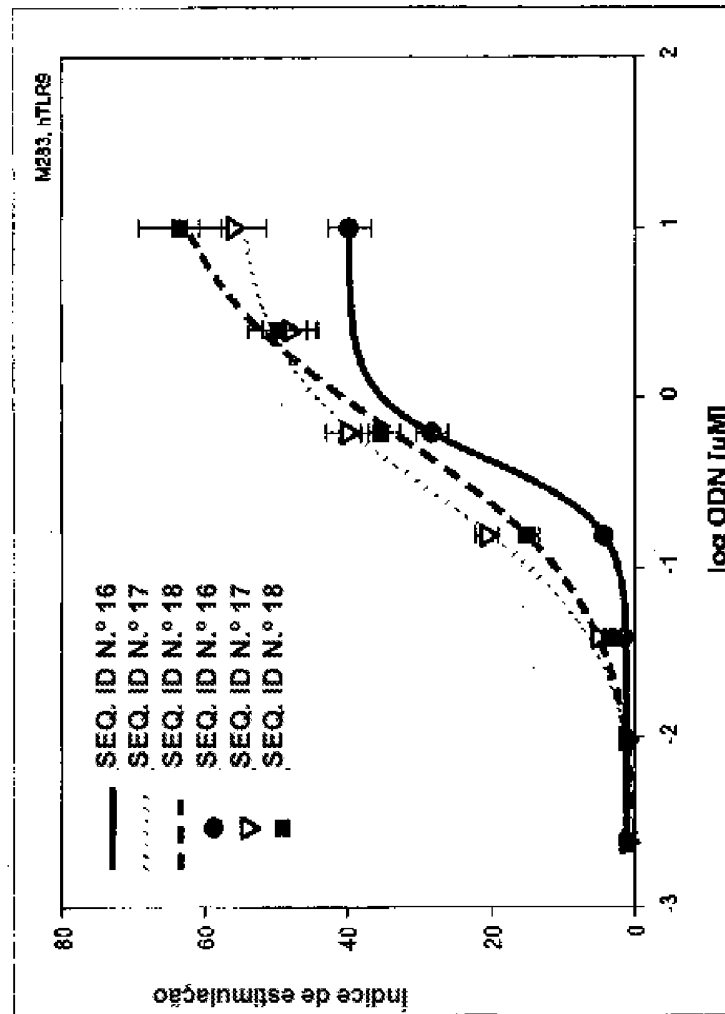


Figura 3b

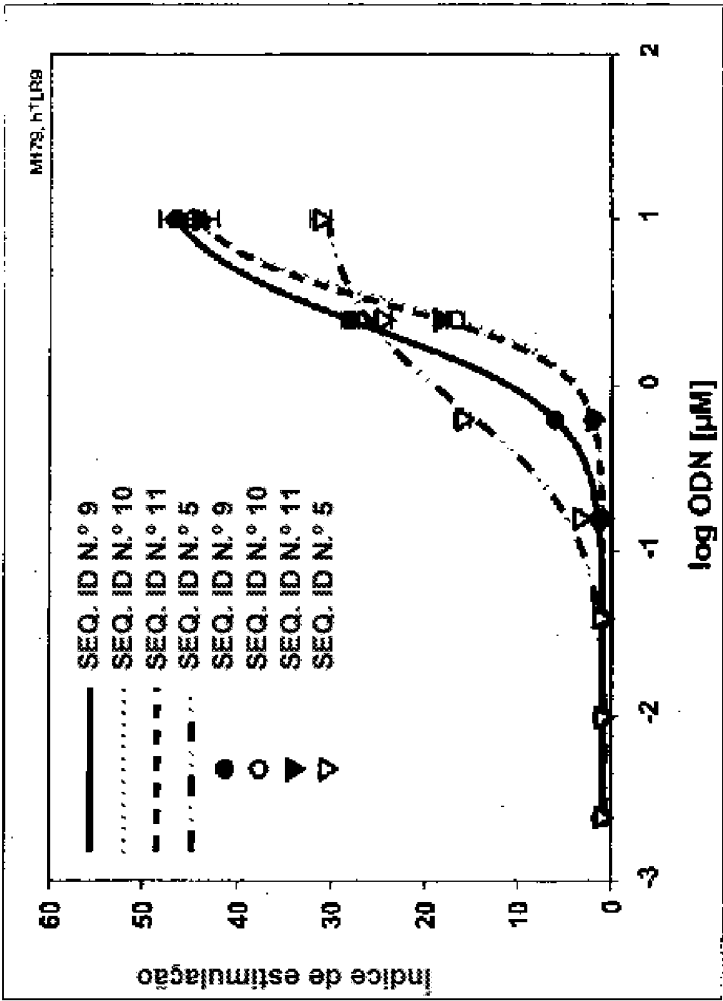


Figura 3c

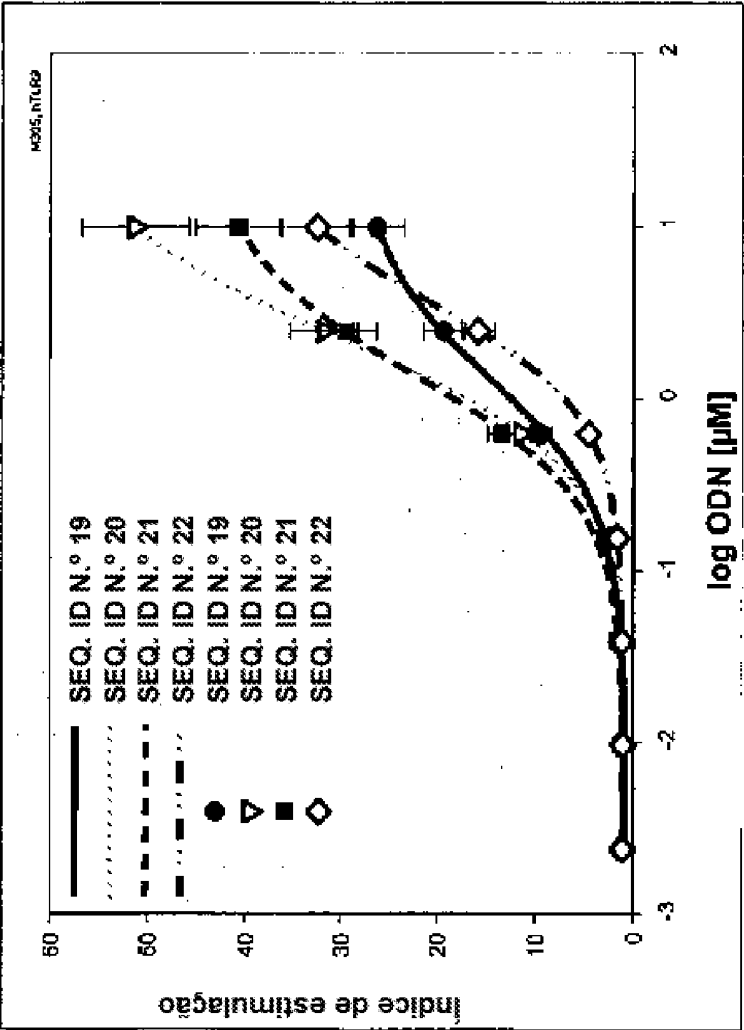


Figura 4

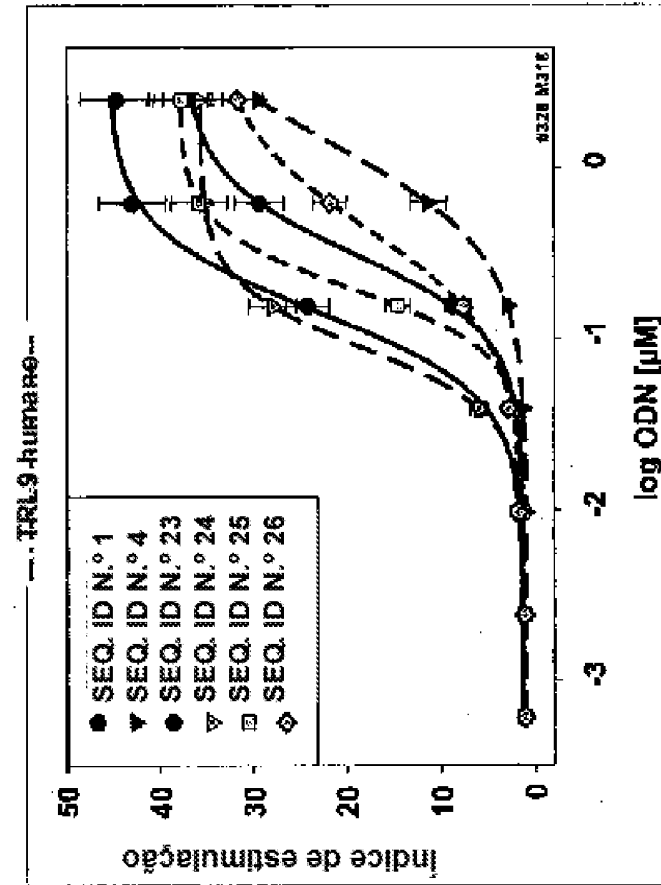


Figura 5a

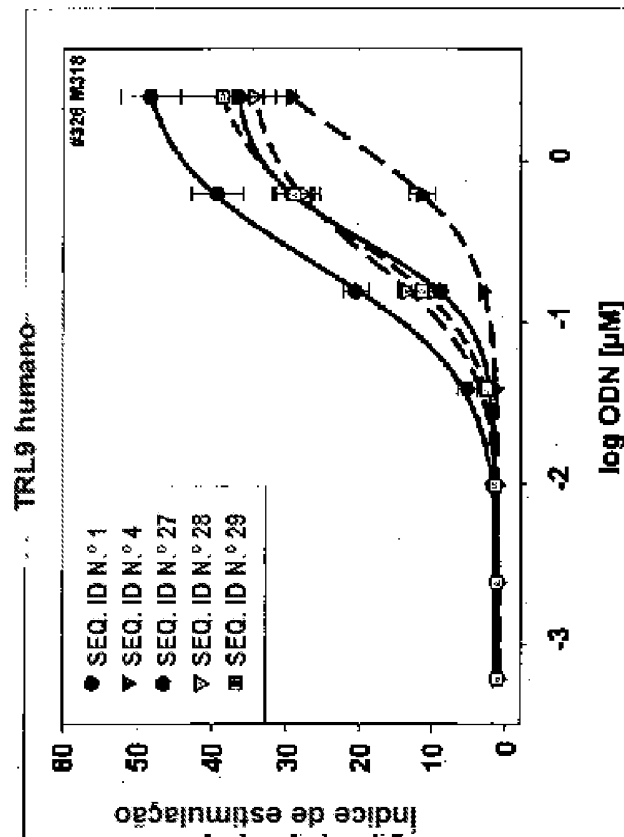


Figura 5b

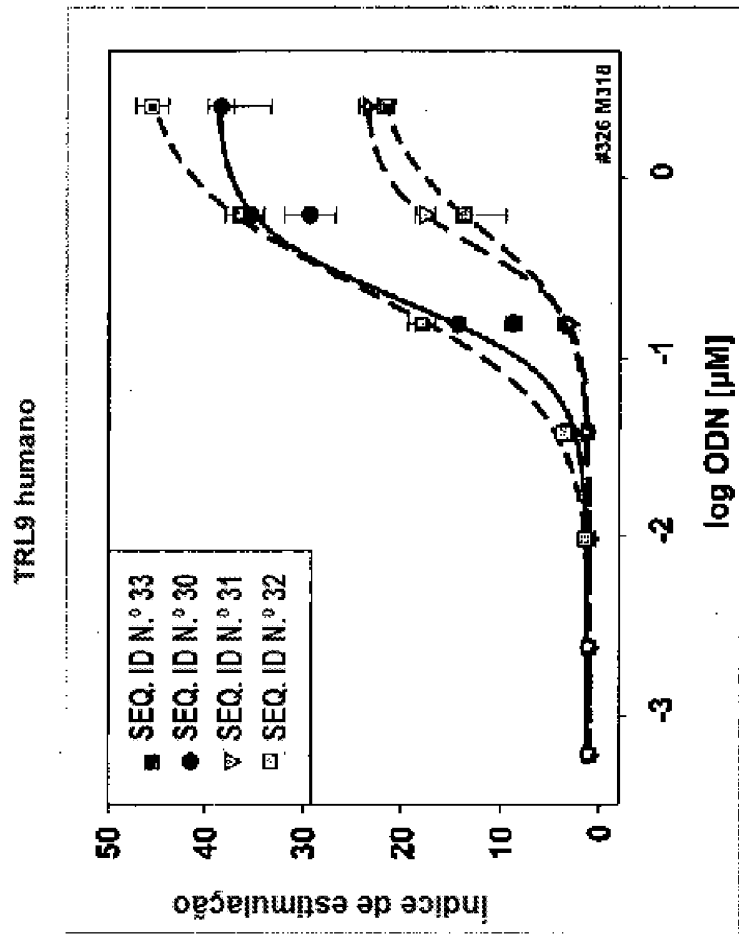


Figura 5c