

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

(22) Data de pedido: 2008.08.06	(73) Titular(es): CHANGCHUN HUAPU BIOTECHNOLOGY CO., LTD.
(30) Prioridade(s):	1002 SI. VA. BUIL. 1198 SILICON VAL.STREET
(43) Data de publicação do pedido: 2010.02.17	NAT.HIGH-TECHN.IND.DEV.AREA CHANG., JILIN PROVINCE CHANGCHUN, JILIN 130021 CN
(45) Data e BPI da concessão: 2014.05.07 136/2014	(72) Inventor(es): LIYING WANG CN DALI HU CN RAN SUN CN YONGLI YU CN
	(74) Mandatário: JOSÉ RAUL DE MAGALHÃES SIMÕES RUA CASTILHO, 167 - 2.º 1070-050 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **OLIGONUCLEOTÍDEOS E UTILIZAÇÃO DOS MESMOS**

(57) Resumo:

UM OLIGONUCLEOTÍDEO COM UMA SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA DE 5'-CCTCCTCCTCCTCCTCCTCCT-3' INIBE A PROLIFERAÇÃO DE PBMC HUMANA ATIVADA PELO AGONISTA DE TLR9 E A PRODUÇÃO DE INTERFERÃO DA PBMC HUMANA INDUZIDA PELO AGONISTA DE TLR9, HSV-1, VÍRUS DA GRIPE E SORO DE PACIENTES SLE E SALVA OS RATINHOS DE CHOQUE LETAL MEDIADO POR CITOCINA. ESTE OLIGONUCLEOTÍDEO PODE SER UTILIZADO COMO UM REMÉDIO PARA O TRATAMENTO DE LÚPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO (SLE), SEPSIA, SÍNDROMES DE DISFUNÇÃO DE ÓRGÃOS MÚLTIPLOS E OUTROS DISTÚRBIOS MEDIADOS IMUNES.

RESUMO

OLIGONUCLEOTÍDEOS E UTILIZAÇÃO DOS MESMOS

Um oligonucleotídeo com uma sequência nucleotídica de 5'-cctcctcctcctcctcctcctcct-3' inibe a proliferação de PBMC humana ativada pelo agonista de TLR9 e a produção de interferão da PBMC humana induzida pelo agonista de TLR9, HSV-1, vírus da gripe e soro de pacientes SLE e salva os ratinhos de choque letal mediado por citocina. Este oligonucleotídeo pode ser utilizado como um remédio para o tratamento de lúpus eritematoso sistêmico (SLE), sepsia, síndromes de disfunção de órgãos múltiplos e outros distúrbios mediados imunes.

DESCRIÇÃO

OLIGONUCLEOTÍDEOS E UTILIZAÇÃO DOS MESMOS

CAMPO DA REVELAÇÃO

A presente invenção refere-se à utilização de um oligonucleotídeo para preparar um remédio para tratar distúrbios mediados imunes.

TÉCNICA ANTECEDENTE

A presente invenção providencia a utilização de um oligonucleotídeo que tem uma sequência nucleotídica que se ajusta à fórmula de $(5'CT3')_n$, por exemplo, a sequência de 5'-cctcctcctcctcctcctcctcct-3' (SEQ. ID N.º 1) para preparar um remédio para tratar um distúrbio mediado imune.

O sistema imune protegé o corpo humano de infeções bacterianas, parasíticas, fúngicas, virais e do crescimento de células tumorais. Contudo, a resposta imune pode, por vezes, ser indesejada e causar distúrbio mediado imune. O distúrbio inclui doença autoimune, rejeição de enxerto, hipersensibilidade, doenças associadas com a sobre-estimulação do sistema imune do hospedeiro por micróbios e doença mediada pelo recetor do tipo Toll (TLR).

As doenças autoimunes resultam de uma resposta imune adaptativa e resposta imune inata ou ambas contra antígenos endógenos e/ou exógenos. Substâncias estranhas, derivadas de bactérias, parasitas, fungos ou vírus, podem imitar auto-proteínas e estimular o sistema imune para lançar respostas a uma auto-células e tecido, resultando nas doenças, incluindo, mas não limitadas a, lúpus eritematoso sistémico (SLE) e artrite reumatóide. A rejeição de enxerto

é uma consequência de transplante de órgão ou tecido causada pela resposta imune no recetor do transplante (hospedeiro) ao órgão/tecido transplantado. Quando são transplantados enxertos a um sujeito incluindo de rim, pâncreas, coração, pulmão, medula óssea, córnea e pele, o sujeito pode lançar uma resposta imune (rejeição) contra os enxertos. A hipersensibilidade é uma resposta imune inapropriada com efeitos deletérios, resultando em lesão significativa do tecido ou mesmo na morte. A hipersensibilidade divide-se em quatro tipos (por exemplo, Tipos I, II, III e IV. Doença associada com a sobre-estimulação do sistema imune do hospedeiro por micróbios é despoletada pela infeção por vírus, tais como vírus da gripe e outros micróbios. No caso do vírus da gripe e da infeção causada por bactérias Gram-negativas, uma resposta imune excessiva aos invasores parece constituir um fator fatal nos pacientes. A resposta caracteriza-se pela sobre-produção de citocinas. Estudos sobre a síndrome de choque séptico demonstram que a sobre-produção/produção aberrante de citocinas pode conduzir a rápida mortalidade devido ao choque letal mediado por citocinas (Slifka MK, et al. J Mol Med. 2000; 78(2):74-80). O choque séptico como consequência de infeção por gram-negativas é a causa principal de mortalidade em pacientes severamente doentes. A produção exagerada de conhecidas é conhecida por contribuir para a sepsia caracterizada por choque letal mediado por citocinas (Espat NJ, et al. J Surg Res. Julho de 1995; 59 (1):153-8). Síndromes de disfunção de órgãos múltiplos (MODS) são uma causa principal de morbidade e mortalidade na sepsia e choque severos. O choque letal mediado por citocinas resultante da sobre-produção de citocinas hospedeiras é considerado um mecanismo principal que conduz a MODS (Wang H, et al. Am J Emerg Med. Julho de 2008; 26 (6):711-5). Doença mediada por recetor do tipo Toll (TLR) é um distúrbio causado pela ativação de recetores do tipo Toll

(TLRs). Os TLRs são uma família de recetores que reconhecem estruturas moleculares derivadas de micróbios (padrões moleculares associados a patógenos ou PAMPs). As células imunes que expressam o TLR são ativadas na ligação dos PAMPs. Os TLRs reconhecem uma gama de produtos derivados de patógenos e ativados. Lipopolissacarídeo (LPS) de bactéria reconhecido pelo TLR4, ácido lipotecóico e lipopéptidos diacilados pelo dímero TLR2-TLR6, lipopéptidos triacilados pelo dímero TLR2-TLR1, oligonucleotídeo contendo CpG (CpG ODN) sintetizado ou derivado de vírus ou bactérias por TLR9, flagelina bacteriana por TLR5, zimosano pelo dímero TLR2-TLR6, proteína F de vírus sincicial respiratório (RSV) por TLR4, ARN de cadeia duplas derivado de vírus (ARNds) e poli I:C, um análogo sintético de ARNds por TLR3; ADN viral por TLR9, ARN viral de cadeia simpels (VSV e vírus da gripe) por TLR7 e TLR8 (Foo Y. Liew, et al. *Nature Reviews Immunology*. Volume 5, junho de 2005, 446-458). Em anos recentes, a ativação de TLR foi associada à patogénese de algumas doenças incluindo sepsia, cardiomiopatia dilatada, diabetes, encefalomielite autoimune experimental, lúpus eritematoso sistémico, aterosclerose, asma, doença pulmonar obstrutiva crónica e falha de órgão (Foo Y. Liew, et al. *Nature Review Immunology*, Volume 5, 2005, 446-458). A ativação de TLR9 por auto ADN desempenha um papel importante no desenvolvimento de doenças autoimunes, tais como SLE (Christensen SR, et al. *Immunity* 2006; 25:417-28) e artrite reumatóide (Leadbetter EA, et al. *Nature* 2002; 416:603-7; Boule MW, et al. *J Exp Med* 2004; 199:1631-40). Além disso, a produção elevada de interferões (IFNs) resultante da ativação de TLR-9 foi reportada como contribuindo para o desenvolvimento de lúpus eritematoso sistémico (Barrat FJ, et al. *J Exp Med* 2005; 202:1131-9; Wellmann U, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:9258-63).

TLR9, inibe a produção de interferão da PBMC humana induzida pelo agonista de TLR9, HSV-1, vírus da gripe e soro de pacientes SLE, e salva os ratinhos de choque induzido pela citocina. Logo, este oligonucleotídeo é útil como um remédio para o tratamento de distúrbios mediados imunes.

Os oligonucleotídeos da invenção inibem a ativação de TLR9. Foi documentado que o agonista de TLR9 ativa tanto a resposta imune inata como adaptativa (Arthur M. Krieg. *Nature Reviews Drug Discovery*, Volume 5. Junho de 2006, 471-484). Oligonucleotídeo que contém CpG (CpG ODN) é um agonista de TLR9 [D.M. Klinman, *Nat. Rev., Immunol.* 4 (2004) 249- 258]. Os oligonucleotídeos da invenção inibem a proliferação e a produção de interferão da PBMC humana estimuladas por CpG ODN, indicando que o oligonucleotídeo da invenção pode ser utilizado como um remédio para o tratamento de doenças relacionadas com a ativação de TLR9. Porque se reportou a ativação de TLR9 como contribuindo para o desenvolvimento de SLE (Barrat FJ, et al. *J Exp Med* 2005; 202:1131-9; Wellmann U, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:9258-63; Christensen SR, et al. *Immunity* 2006; 25:417-28) e de artrite reumatóide (Leadbetter EA, et al. *Nature* 2002; 416:603-7; Boule MW, et al. *J Exp Med* 2004; 199:1631-40), o oligonucleotídeo da invenção pode ser utilizado como um remédio para o tratamento de SLE e artrite reumatóide através da inibição da ativação de TLR9.

O oligonucleotídeo da invenção inibe a produção de interferão da PBMC humana induzida pelo agonista de TLR9, HSV-1, vírus da gripe e soro de pacientes SLE. Porque a produção elevada de interferões foi reportada como contribuindo para o desenvolvimento de SLE (Barrat FJ, et al. *J Exp Med* 2005; 202:1131-9; Wellmann U, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:9258-63), o oligonucleotídeo da

invenção pode ser utilizado como um remédio para o tratamento de SLE através da inibição da produção de IFN.

Os oligonucleotídeos da invenção inibem a produção de interferão da PBMC humana induzida pelo vírus da gripe (PR8). Uma vez que o vírus influenza foi documentado como sendo capaz de ativar TLR7 e TLR8 (Wang JP, et al. Blood. 10 de junho de 2008. [Epub em impressão]), o oligonucleotídeo da invenção pode ser utilizado como um remédio para o tratamento de doença mediada pelo recetor do tipo Toll (TLR) através da inibição de TLR7 ou de TLR8.

Os oligonucleotídeos da invenção inibem a produção de interferão da PBMC humana induzida pelo HSV-1. Uma vez que o HSV-1 foi documentado como ativando o TLR9 (Hubertus Hochrein et al. PNAS, 101, 11416-11421), o oligonucleotídeo da invenção pode ser utilizado como um remédio para o tratamento de doença mediada pelo recetor do tipo Toll (TLR)s incluindo, mas não limitado a, SLE através da inibição da ativação de TLR9.

Para estudar a atividade *in vivo* do oligonucleotídeo da invenção, foi utilizado um modelo de ratinho de choque letal mediado por citocinas. O modelo de ratinho foi criado injetando CpG ODN em ratinhos pré-sensibilizados a D-galactosamina (D-Gal). Depois da sua criação, o modelo de ratinho morreu em 12 a 24 h. Análises das citocinas plasmáticas revelaram sobre-produção de fator de necrose tumoral (TNF) alfa e interleucina-12 (IL-12) e interferão gama (IFN-gama) (Marshall AJ, et al. Infect Immun. Abril de 1998; 66(4):1325-33; Peter M, Bode K, et al. Immunology. Janeiro de 2008;123(1):118-28). Utilizando o modelo, demonstramos que o oligonucleotídeo da invenção pode salvar ratinhos de choque letal mediado por citocinas. Porque o choque letal mediado por citocinas contribui para o choque

séptico (Slifka MK, et al. J Mol Med. 2000;78(2):74-80; Espat NJ, et al. J Surg Res. Julho de 1995;59(1):153-8) e síndromes de disfunção de órgãos múltiplos (MODS) (Wang H, et al. Am J Emerg Mod. Julho de 2008;26(6):711-5), o oligonucleotídeo da invenção pode ser utilizado como um remédio no tratamento de sepsia e MOGS salvando o hospedeiro de choque letal mediado por citocinas.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A menos que, de outra forma, indicado, todos os termos na invenção têm o mesmo significado como normalmente entendidos por alguém com habilitação comum na arte a que a revelação pertence. Os termos singulares "um," "uma," e "o/a" incluem referentes no plural, a menos que o contexto indique o contrário. Da mesma forma, a palavra "ou" pretende-se que inclua "e", a menos que o contexto indique o contrário. Em caso de conflito, a presente especificação, incluindo explicações de termos, prevalecerá. Além disso, os materiais, métodos e exemplos são ilustrativos apenas e não se pretende que sejam limitantes. Tratar, tratando ou tratamento terão o mesmo significado sem referência à gramática. Da mesma forma, prevenir, prevenindo ou prevenção terão o mesmo significado sem referência à gramática.

"Oligonucleotídeo": Um oligonucleotídeo significa múltiplos nucleotídeos (isto é, moléculas que compreendem um açúcar (por exemplo, desoxirribose) ligado a um grupo fosfato e a uma base orgânica intercambiável, que é ou uma pirimidina substituída (Py) (por exemplo, citosina (C), timina (T)) ou uma purina substituída (Pu) (por exemplo, adenina (A) ou guanina (G)). O termo oligonucleotídeo, conforme utilizado aqui, refere-se a oligodesoxirribonucleotídeo (ODN). O oligonucleotídeo pode

ser obtido a partir de fontes de ácido nucleico existentes (por exemplo, genómico ou ADNc), mas são preferencialmente sintéticos. O oligonucleotídeo da invenção pode ser sintetizado por uma variedade de sintetizadores de ácidos nucleicos automatizados disponíveis no mercado. Estes oligonucleotídeos são referidos como oligonucleotídeos sintéticos.

"Modificação química": O oligonucleotídeo revelado na invenção pode abranger várias modificações químicas, em comparação com o ADN natural, envolvendo uma ponte internucleosídica fosfodiéster, uma unidade de ribose e/ou uma base nucleosídica natural (adenina, guanina, citosina, timina). As modificações podem ocorrer durante ou depois da síntese do oligonucleotídeo. Durante a síntese, as bases modificadas podem ser incorporadas internamente ou na sua extremidade. Depois da síntese, a modificação pode ser realizada utilizando os grupos ativos (através de um modificador amino, através dos grupos hidroxilo 3' ou 5', ou através do grupo fosfato). A pessoa habilitada conhece exemplos de modificações químicas. Um oligonucleotídeo, de acordo com a invenção, pode ter uma ou mais modificações, em que cada modificação está localizada numa ponte internucleosídica fosfodiéster particular e/ou numa unidade de ribose particular e/ou numa posição de base nucleosídica natural particular em comparação com um oligonucleotídeo da mesma sequência, que é composto de ADN natural. A modificação química inclui "modificação da estrutura dorsal" do oligonucleotídeo da invenção. Conforme utilizado aqui, a estrutura dorsal modificada do oligonucleotídeo da invenção inclui, mas não se limita a, "estrutura dorsal fosforotioato" que se refere a uma estrutura dorsal fosfato açúcar estabilizada de uma molécula de ácido nucleico na qual um oxigénio fosfato que não faz ponte é substituído por enxofre pelo menos numa ligação internucleotídica. Numa

forma de realização, um oxigénio fosfato que não faz ponte é substituído por enxofre em cada uma ligação internucleotídica. Outras modificações de estrutura dorsal indicam a modificação com análogos do ADN não-iónicos, tais como alquil- e aril-fosfonatos (nos quais o oxigénio fosfonato carregado é substituído por um grupo alquilo ou arilo), fosfodiéster e alquilfosfotriésteres, nos quais a fração de oxigénio carregada é alquilada. Noutros exemplos, o oligonucleotídeo pode ser uma quimera fosforotioato/fosfodiéster. A modificação química também inclui as substituições de base do oligonucleotídeo revelado na invenção. As purinas e pirimidinas substituídas podem ser C-5 propina pirimidina e purina 7-deaza-7-substituída. As purinas e pirimidinas substituídas incluem, mas não se limitam a, adenina, citosina, guanina e timina, e outras nucleobases que ocorrem natural e não naturalmente. A modificação química do oligonucleotídeo da invenção ainda inclui a modificação das bases do oligonucleotídeo. Uma base modificada é qualquer base que é quimicamente diferente das bases que ocorrem naturalmente tipicamente encontradas no ADN, tais como T, C, G e A, mas que partilham estruturas químicas básicas com estas bases que ocorrem naturalmente. O oligonucleotídeo da invenção pode ser modificado utilizando derivados da citidina. O termo "derivado da citidina" refere-se a um nucleotídeo tipo citidina (excluindo a citidina) e o termo "derivado da timidina" refere-se a um nucleotídeo tipo timidina (excluindo a timidina). Além disso, os oligonucleotídeos da invenção podem ser modificados quimicamente ligando um diol, tal como tetraetilenoglicol ou hexaetilenoglicol, em cada um ou em ambos os terminais do oligonucleotídeo.

"Distúrbio mediado imune": Um distúrbio mediado imune é uma doença causada por uma resposta imune indesejada num sujeito. O distúrbio inclui doença autoimune, rejeição de

enxerto, hipersensibilidade, doenças associadas com a sobre-estimulação do sistema imune do hospedeiro por micróbios e doenças associadas com a ativação do TLR. O oligonucleotídeo revelado na invenção pode ser utilizado como um remédio para tratar o distúrbio mediado imune.

"Resposta imune": Uma resposta de uma célula do sistema imune, tal como uma célula B, célula T, célula exterminadora natural, célula dendrítica, neutrófilo e macrófago a um estímulo. A resposta inclui resposta imune inata e resposta imune adaptativa (específica ou adquirida). A resposta imune adaptativa (específica ou adquirida) inclui resposta imune humoral e resposta imune celular.

"Prevenir ou tratar distúrbio mediado imune": Conforme utilizado aqui, prevenir refere-se ao total desenvolvimento de um distúrbio mediado imune num sujeito; tratar refere-se à intervenção terapêutica num sujeito para melhorar um sinal ou sintoma de, parar a progressão de, ou eliminar a condição patológica do distúrbio mediado imune.

"Sujeito": Conforme utilizado aqui, um sujeito refere-se a um vertebrado humano ou não humano. Vertebrados não humanos são primatas não humanos, animais de gado e animais de companhia. O oligonucleotídeo da invenção pode ser administrado para prevenir ou/e tratar distúrbio mediado imune num sujeito.

"Doenças autoimunes": O termo "doença autoimune" refere-se a uma doença causada por uma quebra da auto-tolerância, de tal modo que o sistema imune adaptativo e inato responde a auto-antígenos e medeia a lesão celular e do tecido. Doenças autoimunes são caracterizadas frequentemente pelo seu envolvimento de órgão único ou

tipos de células únicos ou envolvimento de órgãos múltiplos ou sistemas de tecidos. Doenças autoimunes também têm sido referidas como doenças do "colagénio," ou "colagénio-vasculares" ou do "tecido conetivo". Distúrbios autoimunes são associados com frequência a reações de hipersensibilidade. Os oligonucleotídeos da invenção podem ser úteis para tratar e/ou prevenir vários tipos de doenças autoimunes. Exemplos específicos, não limitantes de distúrbios autoimunes são lúpus eritematoso sistémico, diabetes mellitus dependente de insulina (tipo I), artrite inflamatória, artrite reumatóide, esclerose múltipla, hepatite autoimune, hepatite agressiva crónica, anemia hemolítica autoimune, trombocitopenia autoimune, gastrite atrófica autoimune de anemia perniciososa, encefalomielite autoimune, orquite autoimune, hemofilia adquirida, espondilite anquilosante, síndrome antifosfolipídica, síndrome de Behçet, cardiomiopatia, polineuropatia desmielinante inflamatória crónica, penfigóide cicatricial, doença da aglutinina fria, polimiositedermatomiosite, lúpus discóide, oftalmia simpatética, crioglobulinemia mista essencial, fibromialgia, fibromiosite, síndrome de Guillain-Barré, fibrose pulmonar iodopática, púrpura trombocitopénica iodopática, nefropatia IgA, artrite juvenil, esclerose sistémica, poliartrite nodosa, policondrite, dermatomiosite, agamaglobulinemia primária, cirrose biliar primária, hiperimunoglobulina E, esclerose sistémica progressiva, psoríase, síndrome de Reiter, sarcoidose, síndrome do homem rígido, uveíte, vasculite, vitiligo, tiroidite de Hashimoto, doença de Goopasture, anemia perniciososa, doença de Addison, dermatomiosite, síndrome de Sjogren, dermatomiosite, miastenia grave, doença de Grave, uveíte, encefalomielite alérgica, glomerulonefrite e afins (N Engl J Med, Volume 345, N.º 5, 2 de agosto de 2001, páginas 340-350). ADN ou ARN libertado de micróbios contendo ADN ou ARN poderiam estimular a

produção de auto-anticorpo específico de complexos contendo auto ARN ou ADN e, conseqüentemente, conduzir a uma doença autoimune, incluindo, mas não limitadas a, SLE.

"Hipersensibilidade": A hipersensibilidade refere-se aos distúrbios em que a lesão de tecido ocorre como resultado de uma resposta humoral ou mediada pela célula aos antígenos de origem endógena ou exógena e foi classificada em quatro tipos. A hipersensibilidade de tipo I (frequentemente referida como reações de hipersensibilidade anafiláticas, de tipo imediato, atópico, reagénico, mediadas pela IgE ou alergia) geralmente resulta da libertação de substâncias farmacologicamente ativas, tais como a histamina, substância de reação lenta de anafilaxia (SRS-A) e fator quimiostático eosinofílico (ECF) formam basófilos sensíveis a IgE e mastócitos após contacto com um antígeno exógeno específico. A hipersensibilidade de tipo I inclui, mas não se limita a, asma extrínseca alérgica, rinite alérgica sazonal e anafilaxia sistémica. A hipersensibilidade de tipo II (também referida como reação de hipersensibilidade citotóxica, dependente do complemento citolítico ou estimulante de célula) resulta quando o anticorpo reage com componentes antigénicos das células ou elementos do tecido ou com um antígeno ou hapteno, que se uniu intimamente às células ou ao tecido. A hipersensibilidade de tipo II inclui, mas não se limita a, anemia hemolítica autoimune, eritroblastose fetal e doença de Goodpasture. A hipersensibilidade de tipo III (também referida como reações de hipersensibilidade do complexo tóxico, complexo solúvel ou do complexo imune) resulta da deposição de complexos antígeno-anticorpo circulantes solúveis em vasos ou em tecidos, com reações inflamatórias agudas concomitantes no local da deposição do complexo imune. A hipersensibilidade de tipo III inclui, mas não se limita a, reação de Arthurs, doença do soro, eritematose

lúpus sistémico e certos tipos de glomerulonefrite. A hipersensibilidade de tipo IV (frequentemente chamada reações de hipersensibilidade celular, mediada pela célula, retardada ou do tipo tuberculina) é causada por linfócitos T sensíveis que resultam do contacto com um antígeno específico. A hipersensibilidade de tipo IV inclui, mas não se limita a, dermatite de contacto e rejeição de aloenxerto (Richard A. et al. Immunology, 5ª Edição, 2003, W.H. FREEMAN AND COMPANY).

"Doenças associadas com a sobre-estimulação do sistema imune do hospedeiro por micróbios": A invasão microbiana, quando severa, pode causar, por vezes, resposta inflamatória sistémica num sujeito, conduzindo a doenças associadas com a sobre-estimulação do sistema imune do hospedeiro por micróbios. Os eventos no desenvolvimento das doenças, tais como no caso da influenza A (H5N1) ou infeção bacteriana, incluem os níveis no sangue significativamente elevados de fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina 1 (IL-1), IL-6, IL-12, interferão α (IFN- α), interferão β (IFN- β), interferão γ , proteína 10 induzível de interferão quimiocinas, proteína 1 quimioatractiva monócito, interleucina-8, interleucina-1 β e proteína 1 quimioatractiva monócito. Tais respostas podem resultar em choque letal mediado por citocinas que é responsável em parte pela sepsia, ARDS e falha de múltiplos órgãos observadas em muitos pacientes (O Comité de Redação da Consultoria da Organização Mundial de Saúde (WHO) sobre a Influenza Humana A/H5. Avian Influenza A (H5N1) Infection in Humans. N Engl J Med 2005; 353:1374-85). O nível significativamente elevado no sangue de citocinas seguido de infeção microbiana é designado por hipercitocinémia (hipercitocinémia) ou uma tempestade de citocina. A investigação sugeriu que os pacientes que contraíram gripe das aves ou SARS podem precisar de fármacos que suprimem a

resposta imune além de fármacos anti-virais. O oligonucleotídeo da invenção pode ser utilizado para tratar e/ou prevenir as doenças associadas com a estimulação do sistema imune do hospedeiro por micróbios num sujeito. Os micróbios causadores de doenças incluem, mas não se limitam a, vírus, bactérias, fungos, parasitas e agentes etiológicos de encefalopatias espongiiformes. Os vírus que causam as doenças associadas com a sobre-estimulação do sistema imune do hospedeiro por micróbios incluem: SARS CoV, vírus da influenza, vírus da gripe das aves H1V-1, vírus da polio, vírus da hepatite A; enterovírus, vírus da Cocksackie humano, rinovírus, ecovírus, vírus da encefalite equina, vírus da rubéola, vírus do dengue, vírus da encefalite, vírus da febre amarela, coronavírus, vírus da estomatite vesicular, vírus da raiva, vírus do Ébola, vírus da parainfluenza, vírus da papeira, vírus do sarampo, vírus sincicial respiratório, vírus da influenza, vírus Hantan, bungavírus, flebovírus, Nairovírus, vírus da febre hemorrágica; reovírus, orbivírus e rotavírus, vírus da hepatite B, parvovírus, vírus do papiloma, vírus do polioma, adenovírus, vírus do herpes simples (HSV) 1 e HSV-2, vírus da varicela zóster, citomegalovírus (CMV), herpesvírus, vírus da varíola, vírus vaccinia, poxvírus, vírus da febre suína Africana, os agentes etiológicos de encefalopatias espongiiformes, vírus da hepatite delta, vírus da hepatite C, vírus da doença dos pés e mãos e vírus da gripe aviária. As bactérias que podem causar as doenças associadas com a sobre-estimulação do sistema imune do hospedeiro por micróbios incluem: *Helicobacter pyloris*, *Borelia burgdorferi*, *Legionella pneumophilia*, *Mycobacteria* spp. (tais como, *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. E intracellulare*, *M. kansaii*, *M. gordonae*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus* Grupo A, *Streptococcus* Grupo B, *Streptococcus*, *Streptococcus*

faecalis, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus* (espécies anaeróbias), *Streptococcus pneumoniae*, *Campylobacter* sp. patógeno, *Enterococcus* sp., *Haemophilus influenzae*, *Bacillus antracis*, *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* e *Actinomyces israelii*. Os fungos que podem causar as doenças associadas com a sobre-estimulação do sistema imune do hospedeiro por micróbios incluem, mas não se limitam a, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Chlamydia trachomatis*, *Candida albicans*. Os parasitas que podem causar as doenças associadas com a sobre-estimulação do sistema imune do hospedeiro por micróbios incluem: *Plasmodium falciparum* e *Toxoplasma gondii*.

"Rejeição de enxerto": A rejeição de enxerto é um distúrbio mediado imune causado por transplante de órgão ou tecido, Transplante significa a transferência de transplantes (enxertos) de um dador para um recetor. Os enxertos são as células vivas, tecidos ou órgãos transplantados de um dador para um recetor. Um auto-enxerto é um enxerto transferido do tecido do próprio de um local para outro; um enxerto singénico (iso-enxerto) é um enxerto entre gémeos idênticos; um enxerto alogénico (homo-enxerto) é um enxerto entre membros da mesma espécie geneticamente diferentes; e um enxerto xenogénico (hetero-enxerto) é um transplante entre membros de espécies diferentes. Quando um sujeito é o recetor de um enxerto alogénico ou de um enxerto xenogénico, o corpo pode produzir uma resposta imune contra o tecido do dador. Nesta situação, existe uma necessidade clara de suprimir a resposta imune, para evitar

a rejeição do enxerto (Richard A. et al. Immunology, 5ª Edição, 2003, W.H. FREEMAN AND COMPANY). Os oligonucleotídeos da presente invenção são úteis quando administrados para a prevenção da rejeição de enxerto. Exemplos dos enxertos são coração, rim, fígado, medula óssea, pele, córnea, pulmão, pâncreas, intestino delgado, membro, músculo, nervo, duodeno, intestino delgado, célula ilhota do pâncreas e afins. Em alguns casos, o recetor pode ser um animal conforme definido no "sujeito" da invenção.

"Doença mediada pelo recetor do tipo Toll (TLR)s": Uma doença mediada pelo recetor do tipo Toll (TLR) significa um distúrbio mediado imune relacionado com a ativação de membros da família TLR. A doença inclui, mas não se limita a, as doenças incluem, mas não se limitam a, sepsia associada com a ativação de TLR4 por lipopolissacarídeos (LPS), cardiomiopatia dilatada associada com a ativação de TLR2, 3, 4, 9, diabetes associados com a ativação de TLR2, 3, 4, 9, encefalomielite autoimune experimental associada com a ativação de TLR3, lúpus eritematoso sistémico associado com a ativação de TLR9, aterosclerose associada com a ativação de TLR4, asma associada com a ativação de TLR4 por LPS, doença pulmonar obstrutiva crónica associada com a ativação de TLR4, EAE associado com a ativação de TLR4 e falha de órgãos associada com a ativação de TLR4 (Foo Y et al. Nature Review Immunology, Volume 5, 2005, 446-458). ADN contendo CpG (um agonista de TLR9) derivado de um agente infeccioso contendo ácido nucleic poderia ser identificado a partir de soro de SLE que induz uma resposta imune eficiente dominada pela secreção de IFN- α que se pensa contribuir para o desenvolvimento de SLE. Os oligonucleotídeos da presente invenção podem ser administrados para tratar e/ou prevenir a doença mediada pelo recetor do tipo Toll (TLR)s incluindo, mas não se limitando a, SLE num sujeito.

"CpG ODN": Foi documentado que o agonista de TLR9 ativa tanto respostas imunes inatas como adaptativas (Arthur M. Krieg. *Nature Reviews Drug Discovery*, Volume 5. Junho de 2006, 471-484). Oligonucleotídeos contendo CpG (CpG ODN) é um agonista de TLR9 [D.M. Klinman, *Nat. Rev., Immunol.* 4 (2004) 249-258]. Com base nas características funcionais, CpG ODNs são divididos em três tipos (Tomoki Ito, et al. *Blood*, 2006, Volume 107, Número 6: 2423-2431). CpG ODN de tipo A ativa células dendríticas plasmacitóides humanas (pDCs) para produzir uma grande quantidade de interferão de tipo I (IFN- α/β) e ativa fortemente células exterminadoras naturais (células NK). CpG ODN de tipo B ativa primariamente células B, resultando na sua proliferação e secreção de anticorpos. CpG ODN de tipo C partilham as atividades de ambos CpG ODN de tipo A e B. Como um agonista de TLR9, CpG ODN, tais como CpG 2216 ou CpG 2006 ou CpG C274, podem ser endocitosados num compartimento celular onde são expostos a e ativam TLR9. Em pDC, a ativação de TLR9 inicia uma resposta imune inata rápida que se caracteriza pela secreção de citocinas pró-inflamatórias [IL-6, fator de necrose tumoral- α (TNF α)], a secreção de interferão do tipo I (IFN) e a secreção da secreção de quimiocinas induzíveis de IFN. Através de ambas vias dependente e independente de IFN, as células imunes inatas incluindo as células exterminadoras naturais (NK), monócitos e neutrófilos são ativadas secundariamente pelo pDC. As células B ativadas através de TLR9 têm uma sensibilidade grandemente aumentada à estimulação por antígeno e diferenciam-se de forma eficiente em células secretoras de anticorpo e, portanto, contribuem para a resposta imune adaptativa, especialmente resposta imune humoral. pDC ativado através de TLR9 segrega IFN α , que conduz a migração e agrupamento de pDC para os nódulos linfáticos e outros tecidos linfóides secundários onde o pDC ativa células T ingênuas e de memória, assiste na

apresentação cruzada de antígenos de proteínas solúveis a linfócito T citotóxico CD8+ (CTL) e promove fortes respostas de células T CD4 e CD8 celulares desviadas para TH1. Com base nos resultados mencionados anteriormente, é óbvio que os agentes que antagonizam a atividade de CpG ODN podem ser utilizados para tratar ou prevenir o distúrbio mediado imune inibindo tanto a resposta imune inata como a adaptativa.

"Veículo farmacêuticamente aceitável": Um veículo farmacêuticamente aceitável indica um ou mais preenchedores sólidos ou líquidos, diluentes ou substâncias encapsulantes que são adequadas para administrar o oligonucleotídeo da invenção a um sujeito. O veículo pode ser orgânico, inorgânico, natural ou sintético. O veículo inclui qualquer e toda a solução, diluente, solvente, meios de dispersão, lipossoma, emulsões, revestimentos, agentes antibacterianos e anti-fúngicos, agentes retardadores isotônicos e de absorção e qualquer outro veículo adequado para administrar o oligonucleotídeo da invenção e a sua utilização é bem conhecida na arte. Os veículos farmacêuticamente aceitáveis são selecionados dependendo do modo particular de administração do oligonucleotídeo. As formulações parentéricas normalmente compreendem fluídos injetáveis que incluem fluídos farmacêuticamente e fisiologicamente aceitáveis tais como água, solução salina fisiológica, soluções salinas equilibradas, dextrose aquosa, glicerol ou afins como um veículo. Para composições sólidas (por exemplo, formas em pó, pastilha, comprimido ou cápsula), veículos sólidos não tóxicos convencionais podem incluir, por exemplo, graus farmacêuticos de manitol, lactose, amido ou estearato de magnésio. Além de veículos biologicamente neutros, composições farmacêuticas a serem administradas podem conter quantidades menores de substâncias auxiliares não tóxicas, tais como agentes humidificantes ou

emulsionantes, conservantes e agentes tamponantes do pH e afins, por exemplo, acetato de sódio ou monolaurato de sorbitano.

"Quantidade terapeuticamente eficaz": Para tratar ou prevenir um distúrbio mediado imune, uma quantidade terapeuticamente eficaz de um oligonucleotídeo da invenção é administrada a um sujeito. A "quantidade terapeuticamente eficaz" de um dos oligonucleotídeos significa uma quantidade suficiente do oligonucleotídeo utilizado para conseguir um resultado desejado para tratar ou prevenir um distúrbio mediado imune num sujeito. Os oligonucleotídeos da presente invenção podem ser empregues na forma pura ou em veículos farmacêuticamente aceitáveis. Em alternativa, os oligonucleotídeos podem ser administrados como composições farmacêuticas. A "quantidade" na invenção referir-se-á a uma dose. A dose pode ser determinada por técnicas convencionais bem conhecidas daqueles habilitados na arte e podem variar dependendo de fatores incluindo, mas não limitados a, tamanho ou/e estado de saúde global do sujeito ou da severidade da doença. A introdução do oligonucleotídeo da invenção pode ser realizada como um único tratamento ou ao longo de uma série de tratamentos. As doses ao sujeito do oligonucleotídeo da invenção para administração oscilam entre cerca de 1 µg a 100 mg por administração. Contudo, doses para o tratamento de distúrbio mediado imune podem ser utilizadas num intervalo de 10 a 1000 vezes superior às doses descritas anteriormente. As doses mais preferidas podem ser ajustadas para providenciar o efeito terapêutico ótimo por aqueles habilitados na arte, por exemplo, pelo médico de serviço no âmbito de um julgamento médico sensato.

"Via de administração": Para utilização clínica, os oligonucleotídeos da invenção podem ser administrados

isoladamente ou formulados numa composição farmacêutica através de qualquer via de administração adequada que é eficaz para atingir o resultado terapêutico desejado. A "via" de administração do oligonucleotídeo da invenção significará a administração ou inalação entérica, parentérica e tópica. As vias de administração entéricas do oligonucleotídeo da invenção incluem oral, gástrica, intestinal e retal. A via parentérica inclui injeção intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intratecal, subcutânea, administração local, vaginal, tópica, nasal, mucosal e pulmonar. A via de administração tópica do oligonucleotídeo da invenção indica a aplicação do oligonucleotídeo externamente à epiderme, à cavidade bucal e ao ouvido, olho e nariz.

"Composição farmacêutica": Uma composição farmacêutica significará a composição que compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz do oligonucleotídeo da invenção com ou sem um veículo farmacêuticamente aceitável. As composições farmacêuticas podem compreender um ou mais oligonucleotídeos da invenção. A composição inclui, mas não se limita a, soluções aquosas ou salinas, partículas, aerossóis, bolas, grânulos, pós, tabletes, tabletes revestidas, (micro) cápsulas, supositórios, xaropes, emulsões, suspensões, cremes, gotas e outras composições farmacêuticas adequadas para utilização numa variedade de sistemas de entrega de fármacos. As composições podem ser administradas por via parentérica, oral, retal, intravaginal, intraperitoneal, tópica (numa forma de dosagem como pós, unguentos, géis, gotas ou adesivo transdérmico), bucal ou como um vaporizador oral ou nasal. Em todos os casos, a composição tem de ser estéril e estável em condições de fabrico e armazenamento e preservada contra contaminação microbiana. Composições farmacêuticas desta invenção para injeção parentérica

compreendem soluções, dispersões, suspensões ou emulsões aquosas ou não aquosas estéreis farmacologicamente aceitáveis, bem como pós estéreis para reconstituição em soluções ou dispersões injetáveis estéreis imediatamente antes da utilização. O oligonucleotídeo da invenção pode ser suspenso num veículo aquoso, por exemplo, numa solução tampão isotónica a um pH de cerca de 3,0 a cerca de 8,0, preferencialmente a um pH de cerca de 3,5 a cerca de 7,4, 3,5 a 6,0, ou 3,5 a cerca de 5,0. A solução tampão inclui tampões citrato de sódio-ácido cítrico e fosfato de sódio-ácido fosfórico e acetato de sódio-ácido acético. Para administração oral, a composição será formulada com veículos comestíveis para formar pós, tabletes, pastilhas, drageias, cápsulas, líquidos, géis, xaropes, pastas fluídas, suspensões e afins. Para composições sólidas, veículos sólidos não tóxicos convencionais podem incluir graus farmacêuticos de manitol, lactose, amido ou estearato de magnésio. Para administração bucal, a composição será tabletes ou losangos de forma convencional. Para inalação, a composição será um vaporizador aerossol de pacotes pressurizados ou um nebulizador ou um pó seco e pode ser selecionada por alguém habilitado na arte. Em alguns casos, para prolongar o efeito do oligonucleotídeo da invenção, os oligonucleotídeos da invenção também são administrados de forma adequada por sistemas de libertação prolongada. O oligonucleotídeo da invenção pode ser utilizado numa suspensão líquida de material cristalino ou amorfo com baixa solubilidade em água para retardar a libertação do oligonucleotídeo. Em alternativa, a libertação retardada de uma forma do fármaco administrado por via parentérica do oligonucleotídeo é conseguida dissolvendo ou suspendendo o oligonucleotídeo em materiais hidrofóbicos (tais como um veículo oleoso aceitável). Formas de depósito injetáveis são feitas apanhando o oligonucleotídeo em lipossomas ou em microemulsões ou noutras matrizes de polímero semi-

permeáveis biodegradáveis tais como polilactido-poliglicólido, poli (ortoésteres) e poli (anidridos).

"Ingredientes ativos": Os oligonucleotídeos da invenção podem ser utilizados isoladamente, em combinação com eles próprios, num veículo farmacologicamente aceitável, em combinação com um ou mais ingredientes ativos adicionais. A administração do oligonucleotídeo da invenção e ingredientes ativos adicionais pode ser sequencial ou simultânea. Os ingredientes ativos incluem agentes anti-inflamatórios não esteroidais, esteróides, agente imunossupressor não específico, modificador da resposta biológica, composto químico, molécula pequena, molécula de ácido nucleico e antagonistas de TLR. Os ingredientes ativos também indicam os agentes que suprimem a ativação imune antagonizando quimiocinas, induzindo a geração de células T reguladoras (células T CD4+CD25+), inibindo um complemento, metaloproteases da matriz e óxido nítrico sintase, bloqueando fatores co-estimulantes e inibindo as cascatas de sinalização nas células imunes. Os agentes anti-inflamatórios não esteroidais incluem, mas não se limitam a, diclofenac, diflunisal, etodolac, flurbiprofeno, ibuprofeno, indometacina, quetoprofeno, quetorolac, nabumetona, naproxeno, oxaprozina, piroxicam, sulindac, tonetina, celecoxib e rofecoxib. Os esteróides incluem, mas não se limitam a, cortisona, dexametasona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona, prednisona e triamcinolona. Um agente imunossupressor não específico significa o agente utilizado para prevenir o desenvolvimento de distúrbio mediado imune. Os agentes imunossupressores não específicos incluem, mas não se limitam a, ciclofosfamida, ciclosporina, metotrexato, esteróides, FK506, tacrolimo, ácido micofenólico e sirolimo. O modificador da resposta biológica inclui um antagonista do recetor da interleucina-1 recombinante

(Kineret ou anakima), uma proteína de fusão p75 TNF- α recetor-IgG1 solúvel (etanercept ou Enbrel) ou um anticorpo monoclonal contra TNF- α (infliximab ou RemicadeX). Os agentes também incluem Interferão beta-1a, interleucina-10 e TGF β .

"Veículo de entrega": Os oligonucleotídeos da invenção podem ser administrados em/com um veículo de entrega ou numa forma ligada com um veículo. O veículo inclui, mas não se limita a, esterol (por exemplo, colesterol), cocleatos, emulssomas, ISCOMs; um lípido (por exemplo, um lípido catiónico, um lípido aniónico), lipossomas; etilenoglicol (PEG); vetores bacterianos vivos (por exemplo, *Salmonella*, *Escherichia coli*, bacilo Calmette-Gurin, *Shigella*, *Lactobacillus*), vetores virais vivos (por exemplo, Vaccinia, adenovírus, Herpes simples), virossomas, partículas tipo vírus, microsferas, vacinas de ácidos nucleicos, polímeros (por exemplo, carboximetilcelulose, quitosano), anéis de polímero e um agente alvo que reconhece a célula alvo por recetores específicos.

"Peguilação": A peguilação é o processo de anexação covalente de cadeias de polímero poli (etilenoglicol) a outra molécula, normalmente um fármaco ou uma proteína terapêutica. A peguilação é conseguida de forma rotineira pela incubação de um derivado reativo de PEG com o agente alvo. O agente peguilado pode "mascarar" o agente do sistema immune do hospedeiro, aumentar o tamanho hidrodinâmico do agente que prolonga o seu tempo circulatório. Os oligonucleotídeos da invenção podem ser peguilados.

SUMÁRIO BREVE DE FORMAS DE REALIZAÇÃO ESPECÍFICAS

A presente invenção está dirigida à utilização de um

oligonucleotídeo de acordo com a reivindicação 1.

Numa primeira forma de realização, a presente invenção providencia um oligonucleotídeo com uma sequência nucleotídica de 5'-cctcctcctcctcctcctcctcct-3' (SEQ. ID N.º 1) e os oligonucleotídeos que se ajustam à fórmula de (5' CCT 3') n.

A presente invenção providencia um remédio para tratar distúrbio mediado imune utilizando o oligonucleotídeo da invenção. O distúrbio mediado imune é lúpus eritematoso sistémico, sepsia, síndrome da disfunção de órgãos múltiplos ou psoríase.

Aqui é descrito um remédio para tratar distúrbio mediado imune utilizando os oligonucleotídeos da invenção inibindo a ativação de TLR e a produção de IFN induzida pelo vírus de ADN, vírus de ADN, soro de pacientes com SLE e salvando um sujeito de choque letal mediado por citocinas.

Numa forma de realização adicional, a presente invenção providencia um remédio para tratar distúrbio mediado imune administrando o oligonucleotídeo da invenção isoladamente ou com um veículo farmacologicamente aceitável a um sujeito através da via da administração ou inalação entérica, parentérica e tópica.

Além disso, a presente invenção descreve uma composição que compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz dos oligonucleotídeos da invenção para o tratamento de distúrbio mediado imune.

Noutra forma de realização, a presente invenção providencia um remédio para o tratamento de distúrbio

mediado imune administrando os oligonucleotídeos da invenção isoladamente ou em combinação com ingredientes ativos adicionais.

Noutra forma de realização, a presente invenção providencia um remédio para o tratamento de distúrbio mediado imune administrando o oligonucleotídeo da invenção em veículos de entrega.

Assim, num aspeto, a presente invenção providencia o oligonucleotídeo inclui uma sequência que se ajusta à fórmula de (5' CCT 3')_n, em que 5' CCT 3' é uma unidade de repetição e n é um número inteiro de 2 a 50, preferencialmente, é 5'-cctcctcctcctcctcctcctcct-3' (SEQ. ID N.º 1).

Numa forma de realização preferida, a estrutura dorsal fosfato do oligonucleotídeo pode ser parcial ou completamente fosforotioato-modificada ou não modificada.

Numa outra forma de realização preferida, o oligonucleotídeo pode ser desenvolvido nos seus derivados adicionando um ou vários nucleotídeos a cada extremidade do oligonucleotídeo e alterando uma ou várias bases no oligonucleotídeo.

Numa outra forma de realização preferida, o oligonucleotídeo constitui uma parte de outras moléculas de ADN, plasmídeo ou vetores virais.

Numa forma de realização ainda mais preferida, o oligonucleotídeo pode sofrer modificação química.

Noutro aspeto, a presente invenção providencia a utilização do oligonucleotídeo anterior para preparar um

remédio para tratar um distúrbio mediado imune num sujeito. Preferencialmente, o sujeito é um vertebrado humano ou não humano.

Numa forma de realização mais preferida, o tratamento de distúrbio mediado imune é realizado por um mecanismo selecionado de um grupo que compreende inibir a proliferação de células imunes ativadas com agonista de recetor do tipo Toll 9, inibindo a ativação de recetor do tipo Toll 9, inibindo a produção de interferão e salvando um sujeito de choque letal mediado por citocinas.

Preferencialmente, o distúrbio mediado imune é lúpus eritematoso sistémico (SLE) que é tratado inibindo a ativação de TLR9 e a produção de interferão induzida pelo agonista de TLR9s, vírus e o soro de paciente com SLE, o distúrbio mediado imune é sepsia que é tratado salvando um sujeito de choque letal mediado por citocinas, ou o distúrbio mediado imune é síndrome de disfunção de órgãos múltiplos que é tratado salvando um sujeito de choque letal mediado por citocinas.

Noutro aspeto, a presente invenção providencia um remédio para administrar a um sujeito com, ou em risco de desenvolver, o distúrbio mediado imune que compreende o oligonucleotídeo anterior.

Preferencialmente, o remédio compreende, ainda, um veículo farmacologicamente aceitável e/ou ingredientes ativos adicionais. E mais preferencialmente, o remédio está numa forma para administrar através da via incluindo a administração ou inalação entérica, parentérica e tópica.

Numa forma de realização preferida, o oligonucleotídeo pode ser peguilado.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 mostra gráficos que representam a inibição de SAT05f na proliferação da PBMC humana estimulada por CpG 2006 e CpG C274.

A Figura 2 mostra um gráfico que representa a inibição de SAT05f na produção de interferão a partir da PBMC humana estimulada por CpG C274.

A Figura 3 mostra gráficos que representam a inibição de SAT05f na produção de interferão a partir de PBMCs humanas estimuladas com vírus do tipo vírus herpes simples 1 e vírus da gripe (A) Comparação da atividade anti-vírica entre o interferão (IFN) induzida pelo HSV-1 inativo e o interferão (IFN)- α humano recombinante. 'IU' representa a unidade internacional. (B) Efeito inibidor de SAT05F na produção de IFN a partir da PBMC humana (hPB-MC) estimulada por HSV-1 inativo. (C) O efeito dose de SAT05F na produção de IFN a partir de PBMCs humanas estimuladas por HSV-1. (D) Comparação da atividade anti-vírica entre o interferão (IFN) induzida pelo PR8 inativo e interferão (IFN)- α humano recombinante. (E) Efeito inibidor de SAT05F na produção de IFN a partir de PBMC humana estimulada com PR8 inativo. (F) O efeito dose de SAT05F na produção de IFN a partir de PBMC humana estimulada com PR8 inativo. São mostrados os dados de uma experiência representativa de três. HSV-1 representa o vírus do tipo vírus herpes simples 1. PR8 representa vírus da gripe (H1N1/PR8).

A Figura 4 é um gráfico que mostra que SAT05F inibe a produção de interferão a partir de PBMCs humanas estimuladas com soro de pacientes com SLE.

A Figura 5 é um gráfico que mostra que SAT05F salva ratinhos de choque letal mediado por citocinas.

EXEMPLOS

A invenção será agora descrita com maior detalhe nos Exemplos seguintes. Mas a invenção não se limita a estes Exemplos. Nestes Exemplos, aqui, as experiências que utilizam kits e reagentes disponíveis comercialmente foram realizadas de acordo com os protocolos anexos, a menos que indicado o contrário. O artesão habilitado apreciará que os oligonucleotídeos da presente invenção podem facilmente ser aplicados para tratar um distúrbio mediado imune. A presente invenção será agora demonstrada pelos seguintes exemplos não limitantes.

Todos os reagentes utilizados para manipular os oligonucleotídeos (ODNs) nos exemplos seguintes estavam livres de pirogênio. A endotoxina nas preparações de ODN foi testada utilizando o ensaio do lisado do amebócito de *Limulus* (Associates of Cape Cod, Inc). PBMC humanas (hPBMC), utilizadas nas amostras seguintes, foram isoladas a partir de concentrados leucocitários (O Centro de Sangue da província de Jilin, China) por centrifugação em gradiente de densidade Ficoll-Hypaque (Pharmacia) (P. M. Daftarian et al., (1996): *Journal of Immunology*, 157, 12-20). As células foram cultivadas em IMDM suplementado com 10% (v/v) soro bovino fetal inativado por calor (FBS; GIBCO) e antibióticos (100 IU de penicilina/ml e 100 IU de estreptomicina/ml) a 37°C numa incubadora humidificadora 5% CO₂. A viabilidade das células foi de 95-99%, conforme determinado por exclusão por azul de tripano.

Exemplo 1

Efeito de SAT05f na proliferação induzida por CpGODN da PBMC humana

Os oligonucleotídeos (ODNs) utilizados no exemplo foram sintetizados em Sangon Biotech Company (Xangai, China) e foram CpG2006 (5'-tcgtcgttttgcgttttgcggtt-3'), CpG C274 (5'-tcgtcgaacgttcgagatgat 3'), A151 (5'-ttagggtttagggtttagggtttaggg-3') (Hidekazu Shirota, et al. The Journal of Immunology, 2005, 174: 4579-4583), SAT05f (5'-cctcctcctcctcctcctcctcct-3') e ODN Controlo (5'-gtagagattaggca-3').

CpG2006 (Dominique De Wit, et al. Blood, 2004, Volume 103, Número 3:1030-103) é um protótipo de CpG ODN de tipo B. CpG C274 (Omar Duramad, et al. The Journal of Immunology, 2005, 174: 5193-5200) é um protótipo de CpG ODN de tipo C.

Foi utilizado o ensaio de incorporação de timidina [³H] para testar se SAT05f inibia a proliferação de PBMC humana estimulada por CpG2006 ou CpG C274. Resumidamente, PBMCs humana (5310⁵/poço) foram colocadas em placas em placas com fundo em U e com 96 poços (Costar) e cultivadas com CpG2006 (1 µg/ml) ou CpG C274 (1 µg/ml) na presença de SAT05f ou A151 ou ODN Controlo durante 48 h, seguido de pulsação com timidina [³H] (New England Nuclear, Boston, MA) durante 16 h. As células foram colhidas em filtros de fibra de vidro e detetadas num contador de cintilação. A proliferação das células em poços triples foi expressa como cpm médias (contagens por minuto) ± SD.

Conforme mostrado na Figura 1, SAT05f inibe a proliferação de PBMCs humana estimulada com CpG ODN 2006 ou CpG ODN C274. O efeito inibidor é mais forte do que o induzido pelo A151. ODN Controlo não pode induzir a inibição. Uma vez que o CpG ODN, incluindo CpG2006 ou CpG C274, é um agonista de TLR9 [D.M. Klinman, Nat. Rev., Immunol. 4 (2004) 249-258], os dados indicam que SAT05f

inibe a ativação de TLR9 e pode ser utilizado para tratar as doenças relacionadas com a ativação de TLR9 e outras doenças mediadas pelo recetor do tipo Toll (TLR)s.

Exemplo 2

Efeito de SAT05f na produção de interferão induzida por CpGODN a partir de PBMC humana

<Método Experimental >

Células Vero E6 (linha de células de rim de macaco verde Africano, Coleção de Culturas Tipo Americana) foram cultivadas a 37°C numa incubadora humidificadora 5% CO₂ e mantidas em IMDM suplementado com 10% (v/v) soro bovino fetal inativado por calor (FBS; GIBCO) e antibióticos (100 IU de penicilina/ml e 100 IU de estreptomicina/ml).

Um bioensaio de interferão (IFN) utilizando células Vero E6 e VSV foi realizado para testar se SAT05f inibia a produção de IFN a partir de PBMC humana estimulada por CpG C274. Os ODNs incluindo CpG C274, A151, SAT05f e ODN Controlo foram sintetizados em Sangon Biotech Company (Xangai, China). As sequências de CpG C274, A151, SAT05f e ODN Controlo estão indicadas como no exemplo 1. CpG C274 é um protótipo de CpG ODN de tipo C e partilha as atividades de ambos CpG ODN de tipo A e de tipo B. CpG ODN de tipo A é capaz de ativar células dendríticas plasmacitóides humanas (pDCs) para produzir grandes quantidades de interferão tipo I. PBMCs humana (5×10^5 /poço) foram colocadas em placas em placas com fundo em U e com 96 poços (Costar) e cultivadas com CpG C274 (1 µg/ml) na presença de SAT05f ou A151 ou ODN Controlo durante 48 h e os sobrenadantes foram depois recolhidos para ensaiar a sua atividade IFN. Células Vero E6 (3×10^4 /poço) foram semeadas em placas com fundo raso com

96 poços e cultivadas durante 24 h para confluirem. As células foram depois incubadas com 100 µl dos sobrenadantes durante 18 h e depois desafiadas com 10X TCID₅₀ (50% doses infecciosas de cultura de tecidos) de VSV por mais 48 h. Vírus da estomatite vesicular (VSV) foi crescido em células Vero E6. Depois da titulação, o vírus foi armazenado em aliquotas a -70°C até utilização. Após coloração com 0,5% violeta de cristal, o efeito citopático do vírus foi examinado utilizando Leitor de Placa Microtítulo Multi-poços a 578 nm e expresso como valores OD.

< Resultados Experimentais >

Conforme mostrado na Figura 2, SAT05f inibe a produção de IFN a partir de PBMC humana estimulada com CpG C274. Uma vez que a produção elevada de IFNs resultante da ativação de TLR-9 foi reportada como contribuindo para o desenvolvimento de lúpus eritematoso sistémico (SLE) (Barrat FJ, et al. *J Exp Med* 2005; 202:1131-9; Wellmann U, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:9258-63), os dados indicam que SAT05f pode ser utilizado como um remédio para tratar SLE e outras doenças mediadas pelo recetor do tipo Toll (TLR)s inibindo a produção elevada de IFN.

Exemplo 3. Efeito inibidor de SAT05F na produção de interferão a partir de PBMC humanas estimuladas com vírus tipo vírus herpes simples 1 e vírus da gripe

< Método Experimental >

Células Vero E6 foram cultivadas conforme descrito no exemplo 2. HSV-1 (vírus tipo vírus herpes simples 1) e PR8 (H1N1/PR8, um vírus da gripe utilizado em laboratório) foram originalmente obtidos a partir do Departamento de Imunologia, Medical College of Norman Bethune, Universidade

de Jilin, Changchun. HSV-1 (MOI=200) foi propagado em células Vero E6 e PR8 (MOI=3) foi propagado em células MDCK (células de rim canino Madin-Darby, ATCC). As células MDCK foram mantidas em IMDM suplementado com 10% (v/v) soro bovino fetal inativado por calor (FBS; GIBCO) e antibióticos (100 IU de penicilina/ml e 100 IU de estreptomicina/ml). HSV-1 em IMDM suplementado com 2% (v/v) FBS foi inativado por calor a 70°C num banho de água durante 10 min e PR8 em IMDM v 2% (v/v) FBS foi inativado por calor a 56°C num banho de água durante 30 min.

Os ODNs incluindo SAT05F e CTRLODN (indicados como CTRL na Figura 3) com sequência nucleotídica de 5'-aaaaataaaaataaaaataaaaat-3' foram sintetizados por Takara Co (Dalian, China). A sequência de SAT05F é indicada como no exemplo 1.

PBMCs humana (5310^6 /ml) foram cultivadas numa placa com 96 poços com HSV-1 inativado ou PR8 inativado na ausência ou presença de SAT05F ou de ODN controle (CTRL ODN) a 37°C durante 48 h. Os sobrenadantes foram depois colhidos para ensaio. As células Vero E6 foram semeadas em placas com fundo raso com 96 poços (3×10^4 /poço) e cultivadas durante 24 h para confluírem. As células foram incubadas com 100 µl dos sobrenadantes diluídos (1:20 diluído para o HSV-1 induzido e 1:80 diluído para o PR8 induzido) durante 16 h e depois desafiadas com 103TCID₅₀ (50% doses infecciosas da cultura de tecidos) de VSV por mais 48 h. Após coloração com 0,5% violeta de cristal, os efeitos citopáticos foram examinados utilizando Leitor de Placa Microtítulo Multi-poços a 570 nm e expressos como valor médio de OD ± SD. São mostrados os dados de uma experiência representativa de três.

< Resultados Experimentais >

Conforme mostrado na Figura 3-A, vírus HSV-1 inativado poderia induzir IFN que protegia as células Vero E6 do ataque de VSV tal como o fez o interferão IFN- α humano recombinante. Conforme mostrado na Figura 3-B, SAT05F inibiu a produção de IFN a partir da PBMC humana (hPBMC) estimulada por vírus HSV-1 inativado. A análise do efeito da dose revelou que SAT05F poderia de forma significativa a produção de IFN a partir da PBMC humana estimulada com HSV-1 inativado de uma maneira dependente da dose. SAT05F a 1 $\mu\text{g/ml}$ é eficiente na mediação da inibição (Figura 3-C). Conforme mostrado na Figura 3-D, vírus da gripe (PR8) inativado poderia induzir IFN eficiente para proteger as células Vero E6 do ataque do VSV como o fez interferão IFN- α humano recombinante. Conforme mostrado na Figura 3-E, SAT05F inibiu a produção de interferão (IFN) a partir da PBMC humana (hPBMC) estimulada pelo vírus da gripe inativado (PR8). A análise do efeito da dose revelou que SAT05F a 2 $\mu\text{g/ml}$ foi eficiente na inibição da produção de IFN a partir de PBMC humana estimulada com PR8 inativado e a inibição atinge o máximo quando SAT05F foi utilizada a 4 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 3-F).

Foi demonstrado que o vírus da gripe reconhece e ativa TLR7 (Wang JP, et al. Blood. 2008 Jun 10. [Epub em impressão]), e que o HSV-1 reconhece e ativa TLR9 (Hubertus Hochrein et al. PNAS, 101, 11416-11421), estimulando a produção de IFN. Juntamente com os resultados do exemplo, os oligonucleotídeos da invenção podem ser utilizado como um remédio no tratamento de doenças mediadas pelo recetor do tipo Toll (TLR) tais como SLE inibindo a ativação de TLR7 ou de TLR9 e a produção de IFN induzida pelo vírus.

Exemplo 4.

O efeito inibidor de SAT05F na produção de interferão a partir de PBMCs humana estimulada com soro de pacientes com SLE.

<Método Experimental>

Soros anti-ADNds-positivos de pacientes com SLE foram obtidos a partir do Departamento de Reumatologia, China-Japan Union Hospital, Universidade de Jilin. ODNs incluindo SAT05F e CTRL-ODN (indicado como CTRL na Figura 4) com a sequência de 5'-AAAAATAAAAATAAAAATAAAAT-3' foram sintetizados por Takara Co (Dalian, China). A sequência de SAT05F é indicada como no exemplo 1.

PBMCs humana (5310^6 /ml) foram cultivadas numa placa com 96 poços com soro anti-ADNds-positivo diluído 1:1 de paciente com SLE na ausência ou presença de SAT05F ou CTRL ODN durante 48 h. PBMCs humana incubadas com apenas meio ou com soro anti-ADNds-negativo de dador de sangue saudável foram definidas como controlos. Os sobrenadantes foram recolhidos para ensaiar a sua atividade IFN. As células Vero foram incubadas com o sobrenadante recolhido (diluído 1:5) durante 16 h. e depois atacadas por 10TCID₅₀ de VSV durante 48 h. Após coloração com 0,5% violeta de cristal, os efeitos citopáticos foram examinados utilizando um leitor de placa microtítulo multi-poços a 570 nm.

< Resultados Experimentais >

Conforme indicado na Figura 4, o soro de paciente com SLE estimula a produção de IFN a partir da PBMC humana e SAT05F inibe a produção de IFN a partir da PBMC humana estimulada com o soro de paciente com SLE. São mostrados os

dados de uma experiência representativa de três. Está bem estabelecido que a produção elevada de IFNs contribui para o desenvolvimento de SLE (Barrat FJ, et al. J Exp Med 2005; 202:1131-9; Wellmann U, et al. Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102:9258-63). Foi demonstrado que fatores que induzem IFN endógeno foram reportados existirem no soro do paciente com SLE (Kwok SK, et al. Arthritis Res Ther. 2008;10(2):R29), pacientes com SLE com um indutor de produção de IFN circulante, soros de paciente com SLE frequentemente induzem a produção de IFN em culturas de PBMC de dadores de sangue saudáveis (Vallin H, et al Clin Exp Immunol. Janeiro de 1999;115(1):196-202), e que anticorpos de ADN anti-cadeia dupla ou complexos de anticorpos ADN-anti-ADN funcionam como indutores de IFN-alfa endógeno no paciente com SLE e contribuem para a patogênese de SLE (Vallin H, et al. J Immunol. 1 de dezembro de 1999;163(11):6306-13). Em conjunto, os dados indicam que SAT05F pode ser utilizada para o tratamento de pacientes com SLE inibindo a produção de IFN,

Exemplo 5

O efeito de SAT05F no salvamento de ratinhos de choque letal mediado por citocinas

<Método Experimental>

Para elucidar as funções *in vivo* de SAT05F, um modelo de choque letal mediado por citocinas foi induzido com a referência de um método geral (Peter M, et al. Immunology. Janeiro de 2008;123(1):118-28; Marshall AJ, et al. Infect Immun. Abril de 1998; 66(4):1325-33)..

Ratinhos fêmea BALB/C (2061 g de peso) obtidos do Centro Animal Experimental, Medical College of Norman

Bethune, Universidade de Jilin) foram dados livre acesso a alimento e água durante a experiência. As experiências decorreram de acordo com a legislação local.

Oligonucleotídeos incluindo SAT05F com a sequência de 5'-cctcctcctcctcctcctcctcct-3', CTRL-ODN com a sequência de 5'-aaaaataaaaataaaaataaaaat-3' e CpG-ODN 1826 (1826) com a sequência de 5'-tccat-gacgttcctgacgtt-3' [Sanjai Kumar, et al. *Infection and Immunity*, Fevereiro de 2004, páginas 949-957, Volume 72, N.º 2] foram sintetizados por Takara Co (Dalian, China).

D-galactosamina (D-(+)-Galactosamina HCL, D-GALN) foi de DeBioCbem, Nanjing, China.

Os ratinhos BALB/C, cinco em cada grupo, foram divididos em grupos de D-GALN+1826, D-GALN+1826+SAT05F, D-GALN+1826+CTRL-ODN. Os ratinhos foram injetados intraperitonealmente (i.p.) com 500 µl de D-galactosamina (32 mg/ml em PBS). 1,5h mais tarde, os ratinhos foram injetados intraperitonealmente (i.p.) com 1826 (10 µg/ por ratinho em PBS) e subsequentemente injetados (i.p.) com 50 µg de SAT05F (em PBS) (no grupo D-GALN+1826+SAT05F) ou CTRL-ODN (no grupo D-GALN+1826+CTRL-ODN). No grupo D-GALN+1826, os ratinhos foram injetados apenas com D-galactosamina e 1826. Os ratinhos foram monitorizados e a letalidade foi registada.

<Resultados Experimentais>

Conforme indicado na Figura 5, no grupo D-GALN+1826 ou no grupo D-GALN+1826+CTRL-ODN do modelo, todos os cinco ratinhos estavam mortos em 24 após a injeção de D-galactosamina, Comparativamente, em 168 horas após a injeção de D-galactosamina, todos os cinco ratinhos no

grupo D-GALN+1826+SAT05F sobreviveram, demonstrando que SAT05F pode salvar os ratinhos que receberam D-galactosamina e 1826. Foi documentado que ratinhos pré-sensibilizados a D-galactosamina poderiam ser criados em modelos animais de choque letal mediado por citocinas injetando CpG OD (Peter M, et al. Immunology. Janeiro de 2008;123(1):118-28). Conforme aparentemente mostrados nestes resultados, os dados indicam que SAT05F é supressora *in vivo* e inibe o choque letal mediado por citocinas. São mostrados os dados de uma experiência representativa de duas.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Changchun Huapu Biotechnology Co., Ltd.

<120> Oligonucleotídeo e uso do mesmo

<130>

<160> 6

<170> PatentIn versão 3.1

<210> 1

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<400> 1

cctcctcctc ctcctcctcc tcct 24

<210> 2

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<400> 2

tcgctcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 3

<211> 21

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

EP2154144B1

<400> 3

tcgtcgaacg ttcgagatga t 21

<210> 4

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<400> 4

ttagggttag ggtaggggtt aggg 24

<210> 5

<211> 15

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<400> 5

gtagagatt aggca 15

<210> 6

<211> 22

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<400> 6

aaaaataaaa ataaaataaa at 22

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para a conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento de Patente Europeia. Embora tenha sido tomado muito cuidado na compilação das referências, não se poderão excluir erros e omissões e o IEP não assume qualquer responsabilidade neste sentido.

Documentos de Patente citados na descrição

- WO 2006028742 A [0005]

Literatura não relacionada com patentes referida na descrição

- SLIFKA MK et al. *J Mol Med.*, 2000, vol. 78 (2), 74-80 [0004]
- ESPAT NJ et al. *J Surg Res.*, July 1995, vol. 59 (1), 153-8 [0004] [0013]
- WANG H et al. *Am J Emerg Med.*, July 2008, vol. 26 (6), 711-5 [0004]
- FOO Y. LIEW et al. *Nature Reviews Immunology*, June 2005, vol. 5, 446-458 [0004]
- FOO Y. LIEW et al. *Nature Review Immunology*, 2005, vol. 5, 446-458 [0004]
- CHRISTENSEN SR et al. *Immunity*, 2006, vol. 25, 417-28 [0004] [0009]
- LEADBETTER EA et al. *Nature*, 2002, vol. 416, 603-7 [0004] [0009]
- BOULE MW et al. *J Exp Med*, 2004, vol. 199, 1631-40 [0004] [0009]
- BARRAT FJ et al. *J Exp Med*, 2005, vol. 202, 1131-9 [0004] [0009] [0010] [0062] [0071]

- **WELLMANN U et al.** *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, vol. 102, 9258-63 [0004] [0009] [0010] [0062] [0071]
- Inhibitors of TLR-9 act on multiple cell subsets in mouse and man in vitro and prevent death in vivo from systemic inflammation. **DURAMAD, OMAR et al.** *THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY*. The American Association of Immunologists, vol. 174, 5193-5200 [0006]
- **ARTHUR M. KRIEG.** *Nature Reviews Drug Discovery*, June 2006, vol. 5, 471-484 [0009] [0026]
- **D.M. KLINMAN.** *Nat. Rev., Immunol.*, 2004, vol. 4, 249-258 [0009] [0026]
- **WANG JP et al.** *Blood*, 10 June 2008 [0011] [0067]
- **HUBERTUS HOCHREIN et al.** *PNAS*, vol. 101, 11416-11421 [0012] [0067]
- **MARSHALL AJ et al.** *Infect Immun.*, April 1998, vol. 66 (4), 1325-33 [0013] [0072]
- **PETER M ; BODE K.** *Immunology*, January 2008, vol. 123 (1), 118-28 [0013]
- **SLIFKA MK.** *J Mol Med.*, 2000, vol. 78 (2), 74-80 [0013]
- **WANG H et al.** *Am J Emerg Mod.*, July 2008, vol. 26 (6), 711-5 [0013]
- *N Engl J Med*, 02 August 2001, vol. 345 (5), 340-350 [0021]
- **RICHARD A. et al.** *Immunology*. W.H. FREEMAN AND COMPANY, 2003 [0022] [0024]
- The Writing Committee of the World Health Organization (WHO) Consultation on Human Influenza A/H5. Avian Influenza A (H5N1) Infection in Humans. *N Engl J Med*, 2005, vol. 353, 1374-85 [0023]
- **FOO Y et al.** *Nature Review Immunology*, 2005, vol. 5, 446-458 [0025]
- **TOMOKI ITO et al.** *Blood*, 2006, vol. 107 (6), 2423-2431 [0026]
- **P. M. DAFTARIAN et al.** *Journal of Immunology*, 1996, vol. 157, 12-20 [0055]

- **HIDEKAZU SHIROTA et al.** *The Journal of Immunology*, 2005, vol. 174, 4579-4583 [0056]
- **DOMINIQUE DE WIT et al.** *Blood*, 2004, vol. 103 (3), 1030-103 [0057]
- **OMAR DURAMAD et al.** *The Journal of Immunology*, 2005, vol. 174, 5193-5200 [0057]
- **D.M. KLINMAN.** *Nat. Rev., Immunol.*, 2004, vol. 4, 249-258 [0059]
- **KWOK SK et al.** *Arthritis Res Ther.*, 2008, vol. 10 (2), R29 [0071]
- **VALLIN H et al.** *Clin Exp Immunol.*, January 1999, vol. 115 (1), 196-202 [0071]
- **VALLIN H et al.** *J Immunol.*, 01 December 1999, vol. 163 (11), 6306-13 [0071]
- **PETER M et al.** *Immunology*, January 2008, vol. 123 (1), 118-28 [0072] [0077]
- **SANJAI KUMAR et al.** *Infection and Immunity*, February 2004, vol. 72 (2), 949-957 [0074]

Lisboa, 11 de Julho de 2014

REIVINDICAÇÕES

1. A utilização de um oligonucleotídeo para preparar um remédio para tratar um distúrbio mediado imune num sujeito, em que o oligonucleotídeo inclui uma sequência que se ajusta à fórmula de (5' CCT 3')_n, em que 5' CCT 3' é uma unidade de repetição e n é um número inteiro de 2 a 50 e o distúrbio mediado imune é lúpus eritematoso sistémico, sepsia, síndromes de disfunção de órgãos múltiplos ou psoríase.
2. A utilização da reivindicação 1, em que o sujeito é um vertebrado humano ou não humano.
3. A utilização da reivindicação 1, em que o tratamento do distúrbio mediado imune é realizado por um mecanismo selecionado de um grupo que compreende inibir a proliferação de células imunes ativadas com agonista do recetor de tipo Toll 9, inibindo a ativação do recetor de tipo Toll 9, inibindo a produção de interferão e salvando um sujeito de choque letal mediado por citocinas.
4. A utilização da reivindicação 1, em que o distúrbio mediado imune é lúpus eritematoso sistémico (SLE) que é tratado inibindo a ativação de TLR9 e a produção de interferão induzida pelo agonista de TLR9s, vírus e o soro de paciente com SLE, o distúrbio mediado imune é sepsia que é tratada salvando de choque letal mediado por citocinas, ou o distúrbio mediado imune é síndromes de disfunção de órgãos múltiplos que é tratado salvando um sujeito de choque letal mediado por citocinas.
5. Um oligonucleotídeo incluindo uma sequência que se ajusta à fórmula de (5' CCT 3')_n, para utilização no tratamento de um sujeito com, ou em risco de desenvolver, o

distúrbio mediado imune,

em que

5' CCT 3' é uma unidade de repetição e n é um número inteiro de 2 a 50 e o distúrbio mediado imune é lúpus eritematoso sistémico, sepsia, síndromes de disfunção de órgãos múltiplos ou psoríase.

6. O oligonucleotídeo para utilização de acordo com a reivindicação 5, em que o oligonucleotídeo é administrado com um veículo farmacologicamente aceitável e/ou ingredientes ativos adicionais.

7. O oligonucleotídeo para utilização de acordo com a reivindicação 6, em que o oligonucleotídeo pode ser peguado.

8. O oligonucleotídeo para utilização de acordo com a reivindicação 7, em que o oligonucleotídeo está numa forma para administrar através da via incluindo a administração ou inalação entérica, parentérica e tópica.

Lisboa, 11 de Julho de 2014

Figura 1

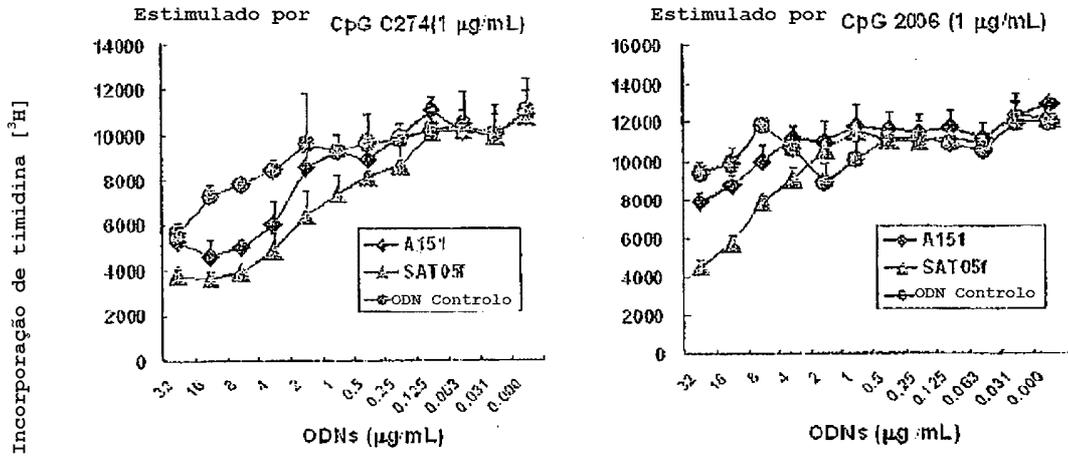


Figura 2

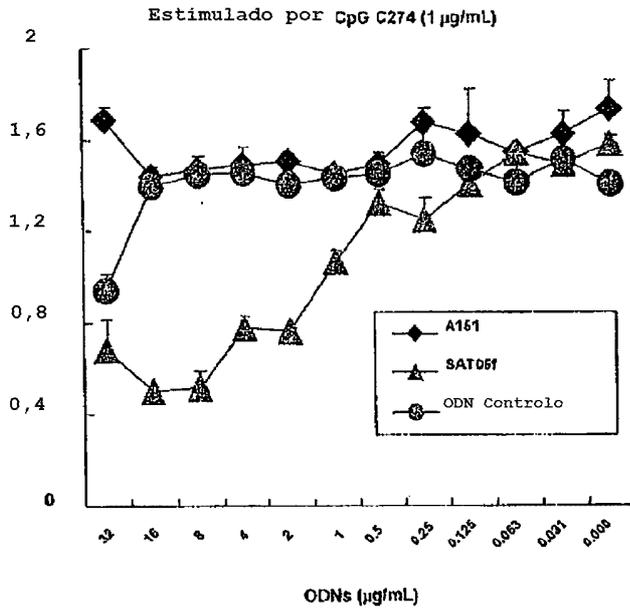


Figura 3

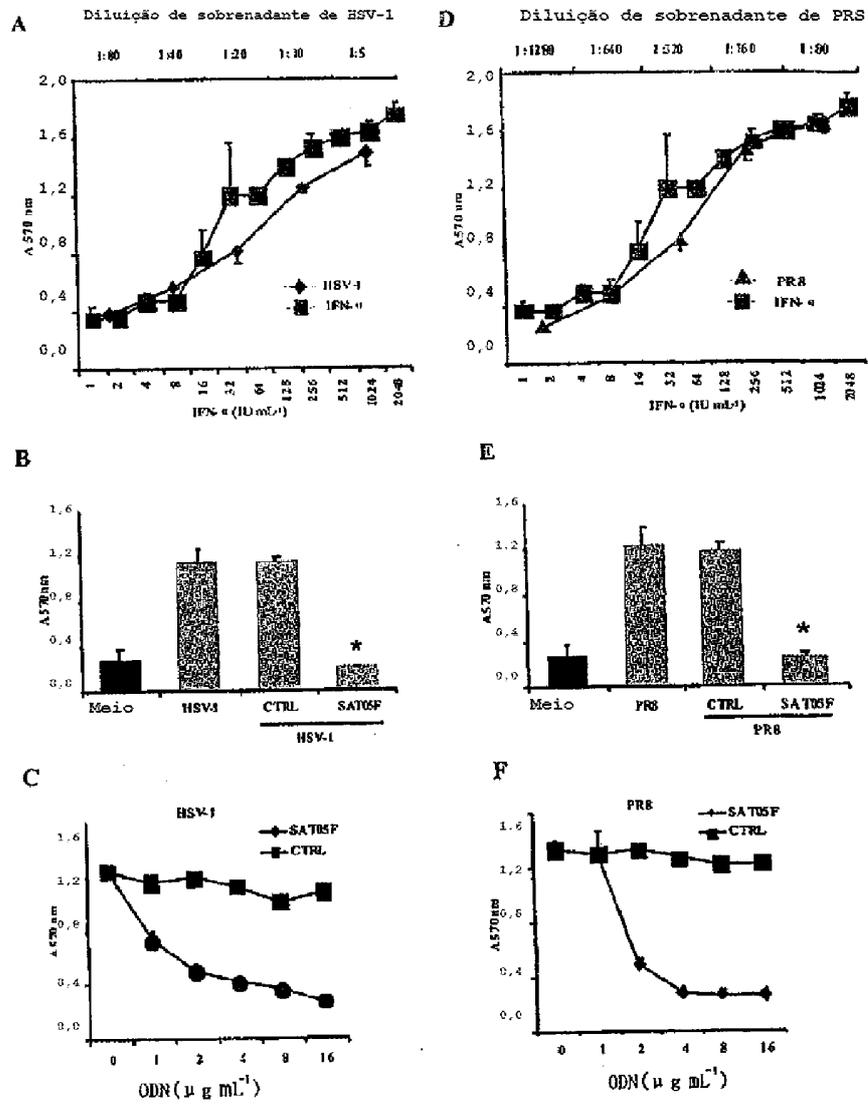


Figura 4

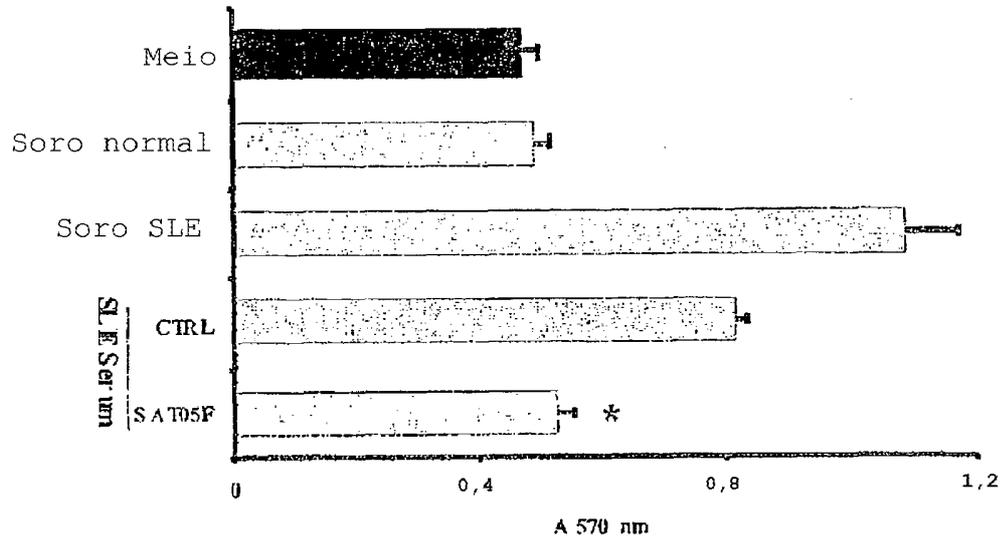


Figura 5

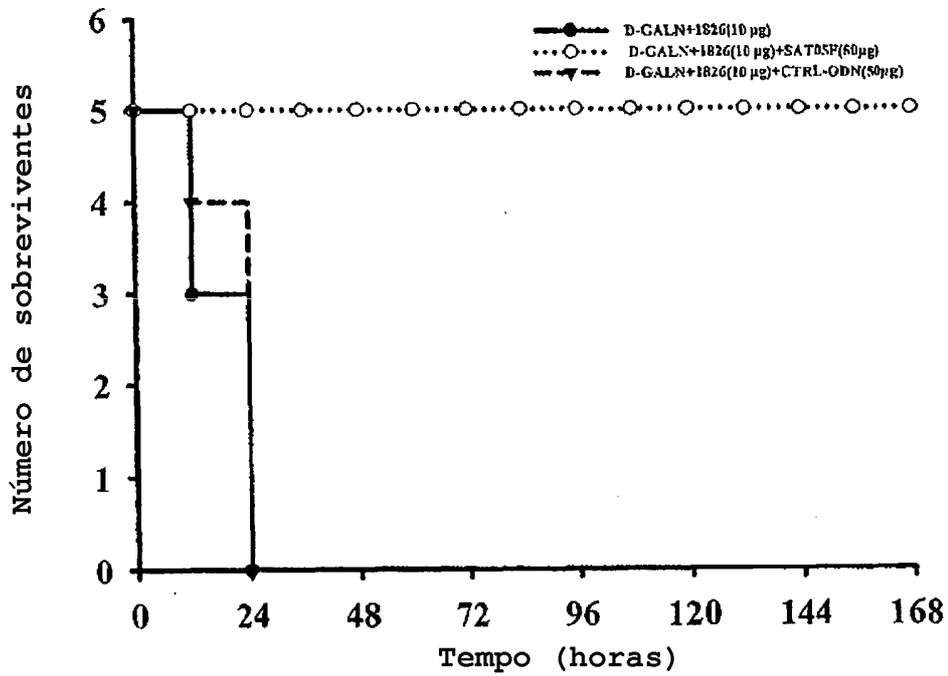


Figure 3

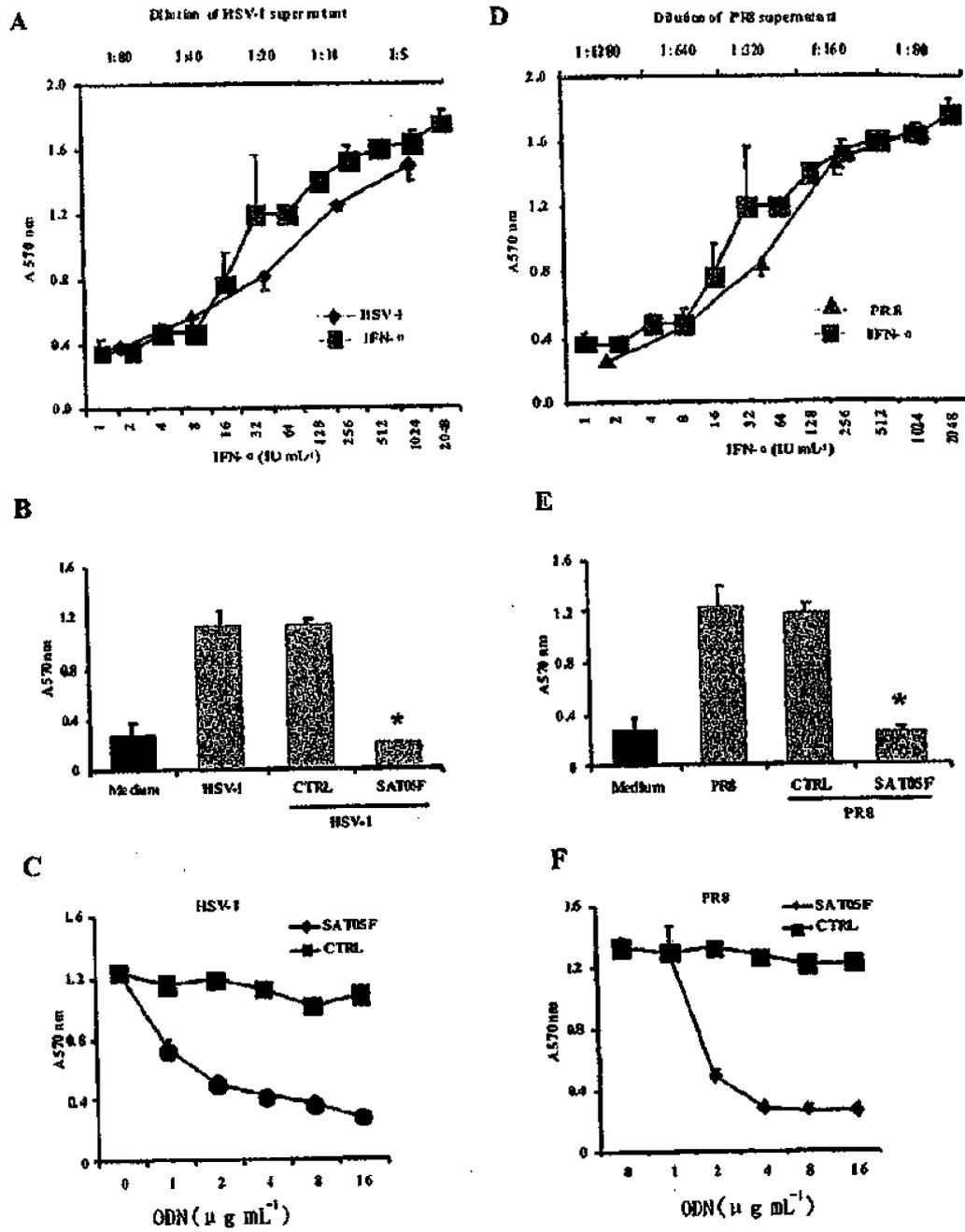


Figure 4

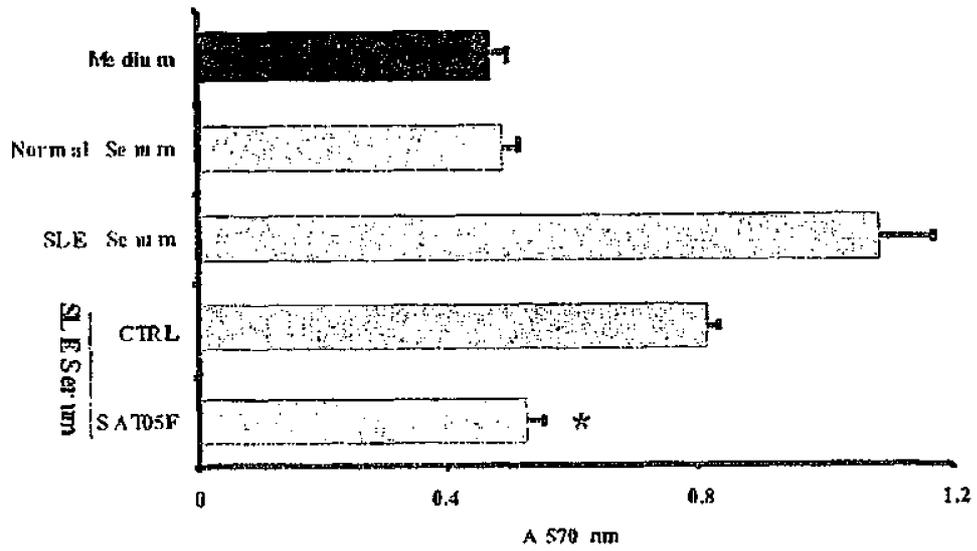


Figure 5

