



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112019021520-4 A2



(22) Data do Depósito: 13/04/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 04/08/2020

(54) **Título:** OLIGONUCLEOTÍDEO, COMPOSTO, POLINUCLEOTÍDEO IMUNOMODULADOR, COMPOSIÇÃO, CONJUGADO, MÉTODO PARA MODULAR UM RECEPTOR, MÉTODO DE TRATAMENTO DE UM TUMOR, MÉTODO DE TRATAMENTO DE CÂNCER, MÉTODO PARA TRATAR UM TUMOR, MÉTODO DE PREVENÇÃO DE CÂNCER, MÉTODO PARA INDUZIR UMA RESPOSTA IMUNE

(51) **Int. Cl.:** C12N 15/117.

(30) **Prioridade Unionista:** 14/04/2017 US 62/485,748; 27/07/2017 US 62/537,925.

(71) **Depositante(es):** TOLLNINE, INC..

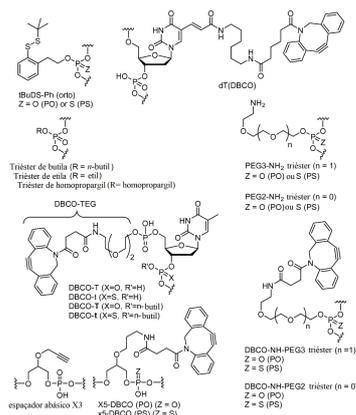
(72) **Inventor(es):** SUKUMAR SAKAMURI; CURT. W. BRADSHAW; SON LAM; JOSEPH STOCK; EDWARD HYUNGSUK HA; LAXMAN ELTEPU; DINGGUO LIU; BIN LIU; GIUSEPPE DELLO IACONO; BRYAN R. MEADE; AYMAN KABAKIBI.

(86) **Pedido PCT:** PCT EP2018059554 de 13/04/2018

(87) **Publicação PCT:** WO 2018/189382 de 18/10/2018

(85) **Data da Fase Nacional:** 14/10/2019

(57) **Resumo:** SÃO DIVULGADOS POLINUCLEOTÍDEOS IMUNOMODULADOS. OS POLINUCLEOTÍDEOS IMUNOMODULADOS PODEM CONTER URIDINA 5 MODIFICADA, CITIDINA 5 MODIFICADA, UM TOTAL DE 6 A 16 NUCLEOTÍDEOS E/OU UM OU MAIS ESPAÇADORES ABÁSICOS E/OU FOSFOTRIÉSTERES INTERNUCLEOSÍDEOS. TAMBÉM SÃO DIVULGADOS CONJUGADOS CONTENDO UMA PORÇÃO DE DIRECIONAMENTO E UM OU MAIS POLINUCLEOTÍDEOS IMUNOMODULADORES. OS POLINUCLEOTÍDEOS E CONJUGADOS IMUNOMODULADOS PODEM AINDA CONTER UMA OU MAIS PORÇÕES AUXILIARES. TAMBÉM SÃO DIVULGADAS COMPOSIÇÕES CONTENDO OS POLINUCLEOTÍDEOS IMUNOMODULADOS OU OS CONJUGADOS CONTENDO UM OU MAIS FOSFOROTIOATOS DE INTERNUCLEOSÍDEO ENRIQUECIDOS ESTEREOQUIMICAMENTE. SÃO DIVULGADAS AINDA COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO OS POLINUCLEOTÍDEOS IMUNOMODULADOS OU OS CONJUGADOS E MÉTODOS DE SEU USO.



**OLIGONUCLEOTÍDEO, COMPOSTO, POLINUCLEOTÍDEO IMUNOMODULADOR,
COMPOSIÇÃO, CONJUGADO, MÉTODO PARA MODULAR UM RECEPTOR, MÉTODO
DE TRATAMENTO DE UM TUMOR, MÉTODO DE TRATAMENTO DE CÂNCER,
MÉTODO PARA TRATAR UM TUMOR, MÉTODO DE PREVENÇÃO DE CÂNCER,
MÉTODO PARA INDUZIR UMA RESPOSTA IMUNE**

[0001] Este pedido reivindica o benefício dos Pedidos Provisórios. 62/485.748 e 62/537.925, depositados em 14 de abril e 27 de julho de 2017, respectivamente; a divulgação de cada um dos quais é incorporada aqui por referência na sua totalidade.

CAMPO DE INVENÇÃO

[0002] Esta invenção refere-se a composições e métodos para modular a resposta do sistema imunológico. É fornecido aqui um polinucleotídeo imunomodulador. Também é aqui fornecido um polinucleotídeo imunomodulador compreendendo uma uridina 5 modificada ou uma citidina 5 modificada e com um comprimento variando de aproximadamente 6 a 16 nucleotídeos. É ainda aqui fornecido um conjugado compreendendo uma fração alvo e um ou mais polinucleotídeos imunomoduladores. É fornecida aqui uma composição farmacêutica compreendendo um polinucleotídeo imunomodulador ou um conjugado com uma fração alvo e um ou mais polinucleotídeos imunomoduladores. São aqui fornecidos métodos de uso para o tratamento de uma doença, como o câncer.

ANTECEDENTES

[0003] Os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) são moléculas associadas a vários patógenos e são reconhecidos por receptores *toll-like* (TLRs) e outros receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) ativando respostas imunes

inatas. A capacidade dos PAMPs de recrutar o sistema imunológico na ausência de patógenos fornece uma estratégia para o tratamento de uma variedade de doenças que envolvem destruição celular (por exemplo, terapia anticâncer) através do uso de resposta inata do sistema imunológico. Uma classe de PAMPs que foi investigada para uma variedade de aplicações terapêuticas é polinucleotídeos imunoestimulantes, como CpG ODN (por exemplo, agatolimod). Pensa-se que os CDNs de CpG mediam a dimerização do TLR9 nas células imunes (por exemplo, células B, monócitos e células dendríticas plasmocitóides (pDCs)) para regular positivamente citocinas (por exemplo, interferon do tipo I e interleucinas), ativando assim células assassinas naturais.

[0004] Os ODNs CpG são geralmente divididos em três classes: classe A, classe B e classe C. Os ODNs CpG classe A normalmente contêm caudas de poli-G com esqueleto base de fosforotioato nas terminações 3' e 5' e uma sequência palindrômica central, incluindo um esqueleto de fosfato. Os ODNs de CpG de classe A normalmente contêm CpG na sequência do palíndromo central. ODNs de CpG de classe B normalmente incluem esqueleto base totalmente fosforotioato, e a sequência na extremidade 5' do ODN de CpG de classe B é frequentemente crítica para a ativação do TLR9. ODNs de CpG de classe C incluem coluna vertebral totalmente fosforotioato com uma sequência de extremidade 3' permitindo a formação de um duplex. CpG ODNs são frequentemente suscetíveis à degradação no soro. Assim, a farmacocinética de CpG ODNs pode ser um dos fatores limitantes no seu desenvolvimento como terapêutica. Além disso, os CDNs de CpG frequentemente exibem distribuição desigual de tecido *in vivo*, com locais primários de acumulação no fígado, rim e baço. Essa distribuição pode provocar

atividade fora do alvo e toxicidade local associada aos PAMPs. Assim, aplicações terapêuticas de CpG ODNs podem ser facilitadas abordando os desafios farmacocinéticos/farmacodinâmicos aqui descritos.

[0005] Por conseguinte, há uma necessidade de novos polinucleotídeos imunomodulados.

SUMARIO DA INVENÇÃO

[0006] Em geral, a presente invenção refere-se à polinucleotídeos imunomodulados (por exemplo, imunoestimulantes) e conjugados contendo uma porção de segmentação e um ou mais polinucleotídeos imunomodulados (por exemplo, imunoestimulantes).

[0007] Em um aspecto, divulgados são os polinucleotídeos imunomodulados. O polinucleotídeo imunomodulador pode ser um polinucleotídeo imunoestimulador. Alternativamente, o polinucleotídeo imunomodulador pode ser um polinucleotídeo imunossupressor.

[0008] Em algumas formas de realização, o polinucleotídeo imunomodulador contém um ou mais (por exemplo, 1 ou 2) espaçadores abásicos ou fosfotriésteres. Em formas de realização particulares, o polinucleotídeo imunomodulador contém um ou mais (por exemplo, 1 a 5) fosfotriésteres internucleosídeos. Em outras formas de realização, pelo menos um dos fosfotriésteres internucleosídeos contém um grupo conjugador. Em ainda outras formas de realização, o polinucleotídeo imunomodulador contém ainda um fosfoéster terminal (por exemplo, um fosfoéster 5'-terminal ou um fosfoéster 3'-terminal). Em outras formas de realização, o polinucleotídeo imunomodulador inclui um 5'-Cap ou

3'-Cap. Em ainda outras formas de realização, o polinucleotídeo imunomodulador contém o 5'-Cap que é um tampão 5'-5'. Em ainda outras formas de realização, 5'-5'Cap contém um grupo conjugador ligado covalentemente a um fosfato internucleosídeo, fosforotioato internucleosídeo ou fosforoditioato internucleosídeo. Em algumas formas de realização, o polinucleotídeo imunomodulador inclui o 3'-Cap contendo um grupo conjugante covalentemente ligado a um fosfato internucleosídeos, internucleosídeos de fosforotioato, fosforoditioato ou internucleosídeos.

[0009] Em outras formas de realização, o polinucleotídeo imunomodulador contém um grupo 5'Cap que é monofosfato, difosfato, trifosfato, uma porção auxiliar, um fosfodiéster terminal, um fosfotriéster terminal, um 5'-5' Cap ou um grupo -OR', onde R' é um grupo bioreversível, um grupo não bioreversível ou um grupo O-protetor. Em ainda outras formas de realização, o grupo 5' Cap é monofosfato ou o fosfodiéster terminal, incluindo alquil C₁₋₆ opcionalmente substituído, ligado a fosfato, fosforotioato ou fosforoditioato. Em ainda outras formas de realização, o polinucleotídeo imunomodulador contém um grupo 3' Cap que é monofosfato, difosfato, trifosfato, uma porção auxiliar, um fosfodiéster terminal, um fosfotriéster terminal e um grupo -OR', em que R' é um grupo bioreversível, um grupo não bioreversível ou um grupo O-protetor. Em algumas formas de realização, o grupo 3' Cap é monofosfato ou o fosfodiéster terminal compreendendo alquil C₁₋₆ opcionalmente substituído ligado a fosfato, fosforotioato ou fosforoditioato.

[0010] Em formas de realização particulares, o polinucleotídeo imunomodulador contém um ou mais (por exemplo,

1 ou 2) espaçadores abásicos. Em outras formas de realização, pelo menos um dos espaçadores abásicos é um espaçador abásico internucleosídeo. Em ainda outras formas de realização, pelo menos um dos espaçadores abásicos é um espaçador abásico do terminal 3'. Em ainda outras formas de realização, pelo menos um dos espaçadores abásicos compreende um grupo conjugador.

[0011] Em certas formas de realização, o polinucleotídeo imunomodulador contém uma uridina 5 modificada (por exemplo, 5-halouridina (por exemplo, 5-bromouridina ou 5-iodouridina) ou citidina 5 modificada). Em outras formas de realização, a uridina modificada em 5 (por exemplo, 5-halouridina (por exemplo, 5-bromouridina ou 5-iodouridina)) é pelo menos um dos dois nucleosídeos do terminal 5' ou está presente em uma sequência imunoestimulante (ISS) na polinucleotídeo imunomodulador. Em ainda outras formas de realização, a uridina modificada em 5 (por exemplo, 5-halouridina) inclui uma posição 3' ligada a um fosfato de fosfodiéster internucleosídeo. A uridina modificada em 5 (por exemplo, 5-halouridina) inclui uma posição 3' ligada a um fosforotioato de fosfodiéster internucleosídeo. E ainda outras formas de realização, a uridina modificada em 5 (por exemplo, 5-halouridina) é o terminal 5'. Como também, a uridina 5 modificada é 5-bromouridina. E, o polinucleotídeo imunomodulador contém citidina e guanossina como segundo e terceiro nucleosídeos ou como terceiro e quarto nucleosídeos.

[0012] Em formas de realização particulares, o polinucleotídeo imunomodulador contém uma sequência imunoestimuladora no terminal 5'. Em certas formas de realização, pelo menos um dos fosfotriésteres internucleosídeos está ligado a um átomo de carbono 3' de um nucleosídeo com um

átomo de carbono 5' que está ligado a uma sequência imunoestimuladora do terminal 5'.

[0013] Em outras formas de realização, o polinucleotídeo imunomodulador compreende um total de 6 a 16 (por exemplo, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ou 16) nucleotídeos. E ainda outras formas de realização, pelo menos 10% (por exemplo, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80% ou pelo menos 90%) dos grupos de ligação internucleosídeos no polinucleotídeo imunomodulador contêm fosforotioatos. E ainda outras formas de realização, pelo menos 50% dos grupos de ligação internucleosídeos no polinucleotídeo imunomodulador contêm fosforotioatos.

[0014] Em algumas formas de realização, o polinucleotídeo imunomodulador inclui um grupo conjugador ligado covalentemente a uma nucleobase no polinucleotídeo imunomodulador.

[0015] Em certas formas de realização, o polinucleotídeo imunomodulador inclui uma ou mais porções auxiliares. Em formas de realização particulares, o polinucleotídeo imunomodulador inclui uma porção de conjugação contendo pelo menos uma das porções auxiliares. Em algumas formas de realização, pelo menos uma das porções auxiliares contém um poli (etileno glicol) (PEG) com um peso molecular de 100 Da a 2.500 Da. Em outras formas de realização, cada PEG contém independentemente um total de pelo menos 3 unidades repetitivas de etileno glicol. E ainda outras formas de realização, cada PEG contém independentemente um total de pelo menos 20 unidades repetitivas de etileno glicol. Cada PEG contém independentemente um total de 50 ou menos unidades de repetição de etileno glicol. E, o polinucleotídeo imunomodulador contém de um a oito PEGs.

[0016] Em formas de realização particulares, o polinucleotídeo imunomodulador é um polinucleotídeo aqui divulgado (por exemplo, na Tabela 2).

[0017] Em outro aspecto, são divulgados polinucleotídeos imunomoduladores hibridados contendo um polinucleotídeo imunomodulador hibridado com um polinucleotídeo complementar.

[0018] Ainda em outro aspecto, são divulgadas composições contendo um polinucleotídeo imunomodulador, em que o polinucleotídeo imunomodulador contém pelo menos um fosforotioato de internucleosídeo estereoquimicamente enriquecido.

[0019] Em algumas formas de realização, pelo menos um fosforotioato de internucleosídeo estereoquimicamente enriquecido é disposto entre um nucleosídeo 5'-terminal e citidina de CpG em uma sequência imunoestimulante no polinucleotídeo imunomodulador. Em outras formas de realização, um fosforotioato de internucleosídeo estereoquimicamente enriquecido conecta o primeiro e o segundo nucleosídeos no polinucleotídeo imunomodulador. Ainda outras formas de realização, um fosforotioato de internucleosídeo estereoquimicamente enriquecido é ligado ao átomo de carbono 5' da citidina de CpG em uma sequência imunoestimulante no polinucleotídeo imunomodulador. Ainda outras formas de realização, um fosforotioato de internucleosídeo estereoquimicamente enriquecido conecta o quarto e o quinto nucleosídeos no polinucleotídeo imunomodulador. Em certas formas de realização, o fosforotioato de internucleosídeo estereoquimicamente enriquecido é *S*-estereogênico. Em formas de

realização particulares, o fosforotioato de internucleosídeo estereoquimicamente enriquecido é *R*-estereogênico.

[0020] Ainda em outro aspecto, são divulgados conjugados contendo uma fração de direcionamento e um ou mais polinucleotídeos imunomoduladores.

[0021] Em algumas formas de realização, a porção de direcionamento é uma porção de ligação ao antígeno, um polipeptídeo, um aptâmero ou um grupo incluindo uma ou mais moléculas pequenas. Em certas formas de realização, a porção de direcionamento é uma porção de ligação ao antígeno (por exemplo, um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo). Em outras formas de realização, o anticorpo ou o fragmento de anticorpo inclui um Q-terminal, N-terminal ou C-terminal, onde o(s) polinucleotídeo(s) imunomodulador(es) estão independentemente ligados covalentemente ao Q-terminal do N-terminal ou C-terminal. E ainda outras formas de realização, o Q-terminal é disposto em uma cadeia pesada ou cadeia leve do anticorpo ou do fragmento de anticorpo.

[0022] Em formas de realização particulares, o polinucleotídeo imunomodulador é como divulgado em outros aspectos.

[0023] Em certas formas de realização, pelo menos um dos polinucleotídeos imunomodulados contém uma uridina 5 modificada ou citidina 5 modificada. Em outras formas de realização, pelo menos um dos polinucleotídeos imunomodulados compreende uma uridina modificada em 5 que é 5-halouridina, 5-alciniluridina ou 5-heterocicliciluridina. E ainda outras formas de realização, a uridina modificada em 5 é 5-halouridina (por exemplo, 5-

bromouridina ou 5-iodouridina). Em algumas formas de realização, a uridina modificada em 5 é um dos dois nucleotídeos do terminal 5' de pelo menos um dos polinucleotídeos imunomodulados. Em outras formas de realização, a uridina modificada em 5 compreende uma posição 3' ligada a um fosfato internucleosídeo fosfóide. A uridina modificada em 5 compreende uma posição 3' ligada a um fosforotioato de fosfootioato internucleosídeo. Ainda em outras formas de realização, pelo menos um dos polinucleotídeos imunomodulados contém citidina e guanossina como o segundo e o terceiro nucleosídeos. Em formas de realização particulares, pelo menos um dos polinucleotídeos imunomodulados contém citidina e guanossina como o terceiro e quarto nucleosídeos.

[0024] Em algumas formas de realização, pelo menos um dos polinucleotídeos imunomodulados contém um total de 6 a 16 (por exemplo, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ou 16) nucleotídeos.

[0025] Em outras formas de realização, pelo menos um dos polinucleotídeos imunomodulados contém um ou mais espaçadores abásicos ou fosfotriésteres internucleosídeos. E ainda outras formas de realização, pelo menos um espaçador abásico ou pelo menos um fosfotriéster contém o ligante.

[0026] Em formas de realização particulares, pelo menos um dos polinucleotídeos imunomodulados contém um ou mais (por exemplo, 1 ou 2) espaçadores abásicos. Em outras formas de realização, pelo menos um dos espaçadores abásicos é um espaçador abásico internucleosídeo. E ainda outras formas de realização, pelo menos um dos espaçadores abásicos é um espaçador abásico do terminal 3'.

[0027] Em certas formas de realização, pelo menos um dos polinucleotídeos imunomodulados contém um ou mais (por exemplo, 1 a 5) fosfotriésteres internucleosídeos.

[0028] Em algumas formas de realização, o conjugado contém ainda uma ou mais porções auxiliares ligadas ao ligante. Em outras formas de realização, pelo menos uma das porções auxiliares contém um poli (etileno glicol) (PEG) com um peso molecular de 100 Da a 2.500 Da. E ainda outras formas de realização, cada PEG contém independentemente um total de pelo menos 3 (por exemplo, pelo menos 5, pelo menos 6, pelo menos 7, pelo menos 8, pelo menos 9, pelo menos 10, pelo menos 12, pelo menos 12, pelo menos 14, pelo menos 16, pelo menos 18 ou pelo menos 20) unidades de repetição de etileno glicol. E ainda outras formas de realização, cada PEG contém independentemente um total de 50 ou menos (por exemplo, 45 ou menos, 40 ou menos, 35 ou menos ou 30 ou menos) unidades de repetição de etileno glicol. Em certas formas de realização, o conjugado contém de um a oito PEGs.

[0029] Em formas de realização particulares, um grupo Cap 5' em pelo menos um dos polinucleotídeos imunomodulados é monofosfato, difosfato, trifosfato, uma fração auxiliar, um fosfodiéster terminal, um fosfotriéster terminal ou um grupo -OR', em que R' é um grupo bioreversível, um grupo não-bioreversível, ou um grupo O-protetor. Em outras formas de realização, o grupo Cap 5' é monofosfato ou o fosfodiéster terminal contendo alquil C₁₋₆ opcionalmente substituído, ligado a fosfato, fosforotioato ou fosforoditioato. Em ainda outras formas de realização, o grupo Cap 3' em pelo menos um dos polinucleotídeos imunomodulados é monofosfato, difosfato,

trifosfato, uma fração auxiliar, um fosfodiéster terminal, um fosfotriéster terminal ou um grupo -OR', em que R' é um grupo bioreversível, um grupo não bioreversível ou um grupo O-protetor. Em outras formas de realização, o grupo Cap 3' é monofosfato ou o fosfodiéster terminal contendo C₁₋₆ alquil opcionalmente substituído, ligado a fosfato, fosforotioato ou fosforoditioato.

[0030] Em certas formas de realização, pelo menos um dos polinucleotídeos imunomodulados contém uma nucleobase ligada ao ligante.

[0031] Em outras formas de realização, o conjugado contém de um a seis (por exemplo, 1 a 4) polinucleotídeos imunomodulados. E ainda outras formas de realização, o conjugado contém apenas um polinucleotídeo imunomodulador. Em ainda formas de realização, o conjugado contém apenas dois polinucleotídeos imunomodulados. Como também, o conjugado contém uma fração de direcionamento.

[0032] Em algumas formas de realização, o polinucleotídeo imunomodulador contém uma sequência imunoestimulante humana dentro de quatro nucleotídeos do terminal 5'. Em certas formas de realização, a sequência imunoestimulante humana dentro de quatro nucleotídeos do terminal 5' do polinucleotídeo imunomodulador inclui citidina com um átomo de carbono 5' ligado a um fosfoéster substituído por um nucleosídeo.

[0033] Em formas de realização particulares, pelo menos um dos polinucleotídeos imunomodulados contém uma uridina 5 modificada ou citidina 5 modificada.

[0034] Em certas formas de realização, pelo menos um dos polinucleotídeos imunomodulados é hibridizado com seu complemento.

[0035] Em outras formas de realização, pelo menos um dos polinucleotídeos imunomodulados contém pelo menos um fosforotioato de internucleosídeo estereoquimicamente enriquecido.

[0036] Em um aspecto adicional, são divulgadas composições que contêm um conjugado incluindo uma fração alvo e um ou mais polinucleotídeos imunomodulados, cada um dos polinucleotídeos imunomodulados incluindo independentemente um ligante, em que a fração alvo está ligada covalentemente ao ligante e pelo menos um dos polinucleotídeos imunomodulados contendo pelo menos um fosforotioato de internucleosídeo enriquecido estereoquimicamente.

[0037] Em algumas formas de realização, pelo menos um fosforotioato de internucleosídeo estereoquimicamente enriquecido é disposto entre um nucleosídeo 5'-terminal e a citidina de CpG em uma sequência imunoestimulante no polinucleotídeo imunomodulador. Em certas formas de realização, pelo menos um fosforotioato de internucleosídeo estereoquimicamente enriquecido é ligado ao átomo de carbono 5' da citidina de CpG em uma sequência imunoestimulante no polinucleotídeo imunomodulador. Em formas de realização particulares, pelo menos um fosforotioato de internucleosídeo estereoquimicamente enriquecido conecta o primeiro e o segundo nucleosídeos no polinucleotídeo imunomodulador. Em outras formas de realização, pelo menos um fosforotioato de internucleosídeo estereoquimicamente enriquecido conecta o quarto e o quinto

nucleosídeos no polinucleotídeo imunomodulador. Em ainda outras formas de realização, o fosforotioato de internucleosídeo estereoquimicamente enriquecido é *S*-estereogênico. E o fosforotioato de internucleosídeo estereoquimicamente enriquecido é *R*-estereogênico.

[0038] Ainda em outro aspecto, são divulgadas composições farmacêuticas contendo um veículo farmacêuticamente aceitável e o polinucleotídeo imunomodulador da invenção, a composição estereoquimicamente enriquecida da invenção ou o conjugado da invenção.

[0039] Ainda em outro aspecto, são divulgados métodos de modular um receptor endossômico do tipo Toll (*toll-like*) em uma célula que compreende o receptor endossômico do tipo Toll, entrando em contato com a célula com o polinucleotídeo imunomodulador da invenção, a composição da invenção, o conjugado de a invenção, ou a composição farmacêutica da invenção sob condições que permitem que os polinucleotídeos imunomodulados sejam transportados para a célula, onde, após o contato, é modulada a atividade do receptor endossômico do tipo Toll.

[0040] Em algumas formas de realização, o polinucleotídeo imunomodulador é um polinucleotídeo imunoestimulador e o método é para agonizar um receptor endossômico do tipo Toll.

[0041] Em formas de realização particulares, o polinucleotídeo imunomodulador é um polinucleotídeo imunossupressor e o método é para antagonizar um receptor endossômico do tipo Toll.

[0042] Em outro aspecto, são divulgados métodos de indução de uma ou mais citocinas em uma célula apresentadora de antígeno

contendo um receptor endossômico do tipo Toll, entrando em contato com a célula apresentadora de antígeno com o polinucleotídeo imunomodulador da invenção, a composição da invenção, o conjugado da invenção ou a composição farmacêutica da invenção sob condições que permitem que um ou mais polinucleotídeos imunomodulados sejam transportados para a célula, onde, após o contato, o nível de pelo menos uma citocina na célula é aumentado, onde a porção alvo tem como alvo a célula apresentadora de antígeno e onde o polinucleotídeo imunomodulador é um polinucleotídeo imunoestimulador.

[0043] Em algumas formas de realização, a célula apresentadora de antígeno é uma célula B. Em certas formas de realização, pelo menos uma das uma ou mais citocinas é uma citocina inflamatória. Em formas de realização particulares, a célula apresentadora de antígeno é uma célula dendrítica plasmocitóide, e onde a fração alvo tem como alvo a célula dendrítica plasmocitóide. Em certas formas de realização, a célula apresentadora de antígeno é um macrófago. Em outras formas de realização, pelo menos uma das citocinas é um interferon do tipo I. E ainda outras formas de realização, o receptor do tipo Toll é TLR9.

[0044] E ainda em outro aspecto, são divulgados métodos de tratamento de um tumor líquido em um paciente, administrando ao paciente uma quantidade eficaz do polinucleotídeo imunomodulador da invenção, a composição da invenção, o conjugado da invenção ou o produto farmacêutico composição da invenção, onde a fração alvo tem como alvo células B e onde o polinucleotídeo imunomodulador é um polinucleotídeo imunoestimulador que é um agonista de TLR9.

[0045] Em certas formas de realização, o tumor líquido é um tumor hematológico (por exemplo, o tumor hematológico é um linfoma). Em formas de realização particulares, o linfoma é um linfoma de células B não-Hodgkin. Em outras formas de realização, o linfoma é linfoma de células do manto, linfoma difuso de grandes células B, linfoma folicular, leucemia linfocítica crônica ou mieloma múltiplo.

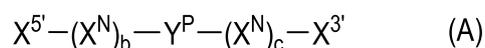
[0046] Ainda em outro aspecto, são divulgados métodos de tratamento de um tumor sólido em um paciente, administrando ao paciente o polinucleotídeo imunomodulador da invenção, a composição da invenção, o conjugado da invenção ou a composição farmacêutica da invenção, em que a fração alvo tem como alvo células dendríticas plasmocitóides e onde o polinucleotídeo imunomodulador é um polinucleotídeo imunoestimulador que é um agonista de TLR9. Em algumas formas de realização, o método para o tratamento de um tumor sólido em um paciente compreende a administração ao paciente de um polinucleotídeo imunomodulador como aqui divulgado, em que o polinucleotídeo imunomodulador tem como alvo a célula B no paciente.

[0047] Deve ser entendido que a presente invenção também fornece usos dos polinucleotídeos imunomodulados da invenção, conjugados da invenção, composições da invenção ou composições farmacêuticas da invenção na fabricação de produtos (por exemplo, medicamentos) para os objetivos aqui descritos (por exemplo, para o tratamento de um tumor líquido ou sólido em um paciente). É também para ser entendido que a presente invenção também proporciona a utilização dos polinucleotídeos imunomoduladores do invento, os conjugados da invenção, as composições da invenção, ou composições farmacêuticas da

invenção para os fins aqui descritos (por exemplo, para o tratamento de um líquido ou tumor sólido em um paciente). Além disso, deve ser entendido que a presente invenção também fornece os polinucleotídeos imunomodulados da invenção, conjugados da invenção, composições da invenção ou composições farmacêuticas da invenção para uso de acordo com os propósitos aqui descritos (por exemplo, para tratar uma tumor líquido ou sólido em um paciente).

[0048] Em qualquer aspecto da invenção, o ligante pode ser como aqui divulgado (por exemplo, de acordo com qualquer uma das fórmulas (II), (V) e (VI) - (XV)). Em qualquer aspecto da invenção, o grupo conjugador pode ser como aqui divulgado.

[0049] É fornecido aqui um oligonucleotídeo de Fórmula (A):



ou um estereoisômero, uma mistura de dois ou mais diastereômeros, um tautômero ou uma mistura de dois ou mais tautômeros; ou um sal, solvato ou hidrato farmacêuticamente aceitável do mesmo; em que:

cada X^N é, independentemente, um nucleotídeo;

X^3 é um nucleotídeonucleotídeo terminal 3';

X^5 é um nucleotídeonucleotídeo terminal 5';

Y^P é um fosfotriéster internucleosídeos; e

b e c são cada um, um número inteiro variando de aproximadamente 0 a 25; com a condição de que sua soma não seja inferior a 5;

em que o oligonucleotídeo compreende um nucleotídeo com uma nucleobase modificada.

[0050] Também é aqui fornecido um oligonucleotídeo com uma sequência de $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$ ou um estereoisômero, uma mistura de dois ou mais diastereômeros, um tautômero ou uma mistura de dois ou mais tautômeros dos mesmos; ou um sal, solvato ou hidrato farmacologicamente aceitável do mesmo; em que:

x é um número inteiro que varia de 1 a 4;

N^1 está ausente ou 2'-desoxitimidina;

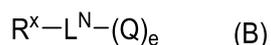
N^2 é uma 2'-desoxirribonucleotídeo com uma nucleobase modificada;

N^3 é 2'-desoxiadenosina ou 2'-desoxitimidina, cada uma compreendendo, opcionalmente, um 3'-fosfotriéster;

N^4 é 2'-desoxiadenosina ou 2'-desoxitimidina; e

N^5 é 2'-desoxitimidina que compreende, opcionalmente, um 3'-fosfotriéster.

[0051] Adicionalmente é aqui fornecido um composto de Fórmula (B):



ou um estereoisômero, uma mistura de dois ou mais diastereômeros, um tautômero ou uma mistura de dois ou mais tautômeros; ou um sal, solvato ou hidrato farmacologicamente aceitável do mesmo; em que:

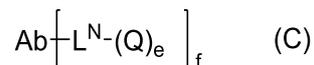
R^x é um grupo conjugante;

L^N é um vinculador;

cada Q é independentemente um oligonucleotídeo compreendendo um fosfotriéster; e

e é um número inteiro de 1, 2, 3 ou 4.

[0052] É ainda fornecido aqui um composto de Fórmula (C):



ou um estereoisômero, uma mistura de dois ou mais diastereômeros, um tautômero ou uma mistura de dois ou mais tautômeros; ou um sal, solvato ou hidrato farmaceuticamente aceitável do mesmo; em que:

Ab é um anticorpo;

cada L^{N} é independentemente um vinculador;

cada Q é independentemente um oligonucleotídeo compreendendo um fosfotriéster;

cada e é independentemente um número inteiro de 1, 2, 3 ou 4; e

f é um número inteiro de 1, 2, 3 ou 4.

[0053] Em um aspecto, são aqui fornecidos métodos para o tratamento de câncer em um indivíduo com câncer, compreendendo a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um imunocombinado CpG-Ab ao sujeito, em que o imunocombinado CpG-Ab não se liga a um antígeno associado a um tumor (TAA). Em algumas formas de realização, o imunocombinado CpG-Ab se liga especificamente a um antígeno alvo associado a uma célula imune normal que expressa pelo menos um receptor do tipo Toll. Em algumas formas de realização, a célula imune normal expressa TLR9. Em algumas formas de realização, a célula imune normal é uma célula apresentadora de antígeno (APC). Em algumas formas de realização, a APC é uma célula B, uma célula dendrítica ou um macrófago. Em algumas formas de realização, o antígeno alvo é selecionado do grupo que consiste em uma molécula de MHC, uma

molécula co-estimulatória de células T, uma molécula de ponto de verificação imune, um antígeno específico de células B, um antígeno específico de células dendríticas e um antígeno específico de macrófagos. Em algumas formas de realização, a molécula de MHC é selecionada dentre as moléculas de MHC de classe I e MHC de classe II. Em algumas formas de realização, a molécula coestimuladora de células T é selecionada da lista que consiste em OX40, CD2, CD27, CDS, ICAM-1, LFA-1/CD11a/CD18, ICOS/CD278, 4-1BB/CD137, GITR, CD30, CD40, BAFFR, HVEM, CD7, LIGHT, NKG2C, SLAMF7, NKp80, CD160, B7-H3 e CD83. Em algumas formas de realização, a molécula de ponto de verificação imune é selecionada da lista que consiste em PD-1, PD-L1, PD-L2, TIM-1, TIM-3, LAG-3, CEACAM-1, CEACAM-5, CLTA-4, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD47, CD160, 2B4, CD172a e TGFR. Em algumas formas de realização, o antígeno alvo é selecionado do grupo que consiste em CD1, CD2, CD3, CD5, CD6, CD9, CD11, CD14, CD17, CD17, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD22, CD23, CD24, CD25, CD26, CD27, CD30, CD32, CD37, CD38, CD39, CD40, CD44, CD45R (B220), CD49, CD52, CD55, CD56, CD64, CD66 (antígeno carcinoembriônico, CEA), CD68, CD70, CD74, CD79b, CD80, CD93, CD115, CD123, CD126, CD127, CD137, CD138, CD163, CD196, CD197, CD200R, CD205, CD206, CD207, CD208, CD209, CD267, CD269, CD274, CD300a, CD301, CD303, CD304, CD319, CD336, C335 CLEC6, CLEC9a, CXCL16, CX3CR1 e DC-STAMP. Em algumas formas de realização, os imunoconjugados de CpG-Ab compreendem um polinucleotídeo imunoestimulador selecionado a partir da Tabela 2. Em algumas formas de realização, os imunoconjugados de CpG-Ab compreendem um polinucleotídeo imunoestimulador selecionado a partir do grupo que consiste em p236, p238, p243, p246, p275, p276, p308, p313, p347, p361,

p362, p425, p433, p434, p435, p436, p437, p438, p477, p478, p479, p480, p481, p482, p483, p484, p485, p486, p487, p488 e p489 . Em algumas m formas de realização, os imunocombinados CpG-Ab não são combinados com um epítoto de célula T. Em algumas formas de realização, o epítoto da célula T é um epítoto da ovalbumina (OVA). Em algumas formas de realização, o câncer é um tumor sólido. Em algumas formas de realização, o câncer é um tumor líquido. Em algumas formas de realização dos métodos aqui fornecidos, o câncer é um câncer recorrente. Em algumas formas de realização dos métodos aqui fornecidos, a administração ou coadministração é através da administração sistêmica. Em algumas formas de realização dos métodos aqui fornecidos, a quantidade eficaz terapêutica do imunocombinado CpG-Ab não é eficaz para ativar a via do complemento no sujeito. Em algumas formas de realização dos métodos aqui fornecidos, a quantidade não é eficaz para ativar o complemento C3 no sujeito.

[0054] Em algumas formas de realização, aqui fornecidos, são métodos de tratamento de câncer em um sujeito com câncer, compreende administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de um imunocombinado CpG-Ab ao sujeito, em que o imunocombinado CpG-Ab se liga especificamente a um antígeno associado a um tumor (TAA), em que o TAA não é um antígeno selecionado do grupo que consiste em CD19, CD20, CD22, exportação 7, Her2, Src, EGFR, CD52, CXCR-4, Muc-1 e DNA. Em algumas formas de realização, a ligação do imunocombinado CpG-Ab ao TAA facilita a internalização do imunocombinado CpG-Ab em uma célula cancerígena que expressa o TAA. Em algumas formas de realização, a ligação do imunocombinado CpG-Ab ao TAA facilita o transporte do imunocombinado CpG-Ab para o endossoma da célula cancerígena

que expressa o TAA. Em algumas formas de realização, a ligação do imunoconjugado CpG-Ab ao TAA facilita a ativação de uma via de sinalização TLR9 em uma célula cancerígena que expressa o TAA. Em algumas formas de realização, o TAA e o TLR9 estão localizados na mesma membrana celular da célula cancerosa que expressa o TAA. Em algumas formas de realização, o TAA e o TLR9 estão localizados na membrana celular da célula cancerosa que expressa o TAA. Em algumas formas de realização, o TAA e o TLR9 estão localizados na membrana endossômica da célula cancerosa que expressa o TAA. Em algumas formas de realização, a ligação do imunoconjugado CpG-Ab ao TAA induz apoptose da célula cancerosa que expressa o TAA. Em algumas formas de realização, o TAA não é expresso por uma célula imune normal. Em algumas formas de realização, o TAA é expresso por uma célula imune normal. Em algumas formas de realização, a célula imune normal é uma célula apresentadora de antígeno (APC). Em algumas formas de realização, o TAA é selecionado dentre o grupo que consiste em CD8, CD11b, CD11c, CD14, CD33, CD40, CD123, CD157, CD168, CD169, CD172a, CD200, CD204, CD205, CD301, CD302, CD303, CD304 e CD206 . Em algumas formas de realização, o imunoconjugado CpG-Ab não é conjugado com o TAA ou qualquer outro TAA expresso pelo câncer. Em algumas formas de realização, os imunoconjugados de CpG-Ab compreendem um polinucleotídeo imunoestimulador selecionado a partir da Tabela 2. Em algumas formas de realização, os imunoconjugados de CpG-Ab compreendem um polinucleotídeo imunoestimulador selecionado a partir do grupo que consiste em p236, p238, p243, p246, p275, p276, p308 , p313, p347, p361, p362, p425, p433, p434, p435, p436, p437, p438, p477, p478, p479, p480, p481, p482, p483, p484, p485, p486, p487, p488

e p489. Em algumas formas de realização, o imunocombinado CpG-Ab não é combinado com um epítoto de célula T. Em algumas formas de realização, o epítoto da célula T é ovalbumina (OVA). Em algumas formas de realização, o câncer é um tumor sólido. Em algumas formas de realização, o câncer é um tumor líquido. Em algumas formas de realização dos métodos aqui fornecidos, o câncer é um câncer recorrente. Em algumas formas de realização dos métodos aqui fornecidos, a administração ou coadministração é através da administração sistêmica. Em algumas formas de realização dos métodos aqui fornecidos, a quantidade eficaz terapêutica do imunocombinado CpG-Ab não é eficaz para ativar a via do complemento no sujeito. Em algumas formas de realização dos métodos aqui fornecidos, a quantidade não é eficaz para ativar o complemento C3 no sujeito.

[0055] Em algumas formas de realização, são aqui fornecidos métodos de tratamento de um câncer refratário ou resistente à imunoterapia em um sujeito com câncer refratário ou resistente à imunoterapia, compreendendo a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um imunocombinado de CpG-Ab ao sujeito. Em algumas formas de realização, o imunocombinado CpG-Ab não se liga a um antígeno associado ao tumor. Em algumas formas de realização, o imunocombinado CpG-Ab se liga especificamente a um antígeno alvo associado a uma célula imune normal que expressa pelo menos um receptor do tipo Toll. Em algumas formas de realização, o imunocombinado CpG-Ab se liga especificamente a um antígeno associado ao tumor. Em algumas formas de realização, o câncer é resistente ao tratamento com um modulador de ponto de verificação imune. Em algumas formas de realização, o método compreende ainda coadministrar ao sujeito

o modulador do ponto de verificação imune. Em algumas formas de realização, os imunocjugados CpG-Ab compreendem um polinucleotídeo imunoestimulador selecionado a partir da Tabela 2. Em algumas formas de realização, os imunocjugados CpG-Ab compreendem um polinucleotídeo imunoestimulador selecionado a partir do grupo que consiste em p236, p238, p243, p246, p275, p276, p308 , p313, p347, p361, p362, p425, p433, p434, p435, p436, p437, p438, p477, p478, p479, p480, p481, p482, p483, p484, p485, p486, p487, p488 e p489 como mostrado na tabela 2 . Em algumas formas de realização, o câncer é um tumor sólido. Em algumas formas de realização, o câncer é um tumor líquido. Em algumas formas de realização dos métodos aqui fornecidos, o câncer é um câncer recorrente. Em algumas formas de realização dos métodos aqui fornecidos, a administração ou coadministração é através da administração sistêmica. Em algumas formas de realização dos métodos aqui fornecidos, a quantidade eficaz terapêutica do imunocjugado CpG-Ab não é eficaz para ativar a via do complemento no sujeito. Em algumas formas de realização dos métodos aqui fornecidos, a quantidade não é eficaz para ativar o complemento C3 no sujeito.

[0056] Em algumas formas de realização, são aqui fornecidos métodos de prevenção de câncer em um indivíduo em necessidade, compreendendo a administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um imunocjugado CpG-Ab ao sujeito, em que o imunocjugado CpG-Ab se liga especificamente a um antígeno alvo associado com uma célula imune normal expressando pelo menos um receptor do tipo Toll. Em algumas formas de realização, esse método compreende ainda a coadministração de um antígeno associado a um tumor com o imunocjugado CpG-Ab. Em algumas

formas de realização, o imunocombinado CpG-Ab não é combinado com o antígeno associado ao tumor. Em algumas formas de realização, a célula imune normal expressa TLR9. Em algumas formas de realização, a célula imune normal é uma célula apresentadora de antígeno (APC). Em algumas formas de realização, os imunocombinados de CpG-Ab compreendem um polinucleotídeo imunoestimulador selecionado a partir da Tabela 2. Em algumas formas de realização, os imunocombinados de CpG-Ab compreendem um polinucleotídeo imunoestimulador selecionado a partir do grupo que consiste em p236, p238, p243, p246, p275, p276, p308 , p313, p347, p361, p362, p425, p433, p434, p435, p436, p437, p438, p477, p478, p479, p480, p481, p482, p483, p484, p485, p486, p487, p488 e p489 como mostrado na tabela 2 . Em algumas formas de realização, o câncer é um tumor sólido. Em algumas formas de realização, o câncer é um tumor líquido. Em algumas formas de realização dos métodos aqui fornecidos, o câncer é um câncer recorrente. Em algumas formas de realização dos métodos aqui fornecidos, a administração ou coadministração é através da administração sistêmica. Em algumas formas de realização dos métodos aqui fornecidos, a quantidade eficaz terapêutica do imunocombinado CpG-Ab não é eficaz para ativar a via do complemento no sujeito. Em algumas formas de realização dos métodos aqui fornecidos, a quantidade não é eficaz para ativar o complemento C3 no sujeito.

[0057] Em algumas formas de realização, são aqui fornecidos métodos de prevenção de câncer em um indivíduo em necessidade, compreendendo a coadministração de uma quantidade terapêutica eficaz de um imunocombinado CpG-Ab com uma vacina contra câncer, em que o imunocombinado CpG-Ab se liga especificamente a um

antígeno alvo associado a uma célula imune normal que expressa pelo menos um receptor do tipo Toll. Em algumas formas de realização, o imunocombinado CpG-Ab é formulado como um adjuvante da vacina contra o câncer. Em algumas formas de realização, o câncer é um tumor sólido. Em algumas formas de realização, o câncer é um tumor líquido. Em algumas formas de realização dos métodos aqui fornecidos, o câncer é um câncer recorrente. Em algumas formas de realização dos métodos aqui fornecidos, a administração ou coadministração é através da administração sistêmica. Em algumas formas de realização dos métodos aqui fornecidos, a quantidade eficaz terapêutica do imunocombinado CpG-Ab não é eficaz para ativar a via do complemento no sujeito. Em algumas formas de realização dos métodos aqui fornecidos, a quantidade não é eficaz para ativar o complemento C3 no sujeito.

[0058] Em algumas formas de realização, são aqui fornecidos métodos para induzir uma resposta imune adaptativa em um sujeito, compreendendo a administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um imunocombinado CpG-Ab ao sujeito, em que o imunocombinado CpG-Ab se liga especificamente a um antígeno alvo associado com uma célula imune normal expressando pelo menos um receptor do tipo Toll. Em algumas formas de realização, o sujeito tem câncer. Em algumas formas de realização, o antígeno alvo não é um TAA. Em algumas formas de realização, o antígeno alvo é um TAA que não é um antígeno selecionado do grupo que consiste em CD19, CD20, CD22, STAT3, exportar 7, Her2, Src, EGFR, CD52, CXCR-4, Muc-1 e DNA. Em algumas formas de realização, o sujeito tem uma doença infecciosa. Em algumas formas de realização, a célula imune normal expressa TLR9. Em algumas formas de realização, a

célula imune normal é uma célula apresentadora de antígeno (APC). Em algumas formas de realização, a resposta imune adaptativa é dependente de células T CD8+. Em algumas formas de realização, os imunocombinados CpG-Ab compreendem um polinucleotídeo imunostimulador selecionado a partir da Tabela 2. Em algumas formas de realização, os imunocombinados CpG-Ab compreendem um polinucleotídeo imunostimulador selecionado a partir do grupo que consiste em p236, p238, p243, p246, p275, p276, p308 , p313, p347, p361, p362, p425, p433, p434, p435, p436, p437, p438, p477, p478, p479, p480, p481, p482, p483, p484, p485, p486, p487, p488 e p489 como mostrado na tabela 2 . Em algumas formas de realização, o câncer é um tumor sólido. Em algumas formas de realização, o câncer é um tumor líquido. Em algumas formas de realização dos métodos aqui fornecidos , o câncer é um câncer recorrente. Em algumas formas de realização dos métodos aqui fornecidos, a administração ou coadministração é através da administração sistêmica. Em algumas formas de realização dos métodos aqui fornecidos, a quantidade eficaz terapêutica do imunocombinado CpG-Ab não é eficaz para ativar a via do complemento no sujeito. Em algumas formas de realização dos métodos aqui fornecidos, a quantidade não é eficaz para ativar o complemento C3 no sujeito.

[0059] Em algumas formas de realização, são aqui fornecidos métodos de tratamento de câncer em um sujeito com câncer, compreendendo administrar ao sujeito uma quantidade terapêutica eficaz de um imunocombinado CpG-Ab selecionado na Tabela 6. Em algumas formas de realização, o imunocombinado CpG-Ab se liga a um antígeno associado ao tumor (TAA). Em algumas formas de realização, os imunocombinados CpG-Ab se ligam a um antígeno

alvo diferente do TAA. Em algumas formas de realização, os imunoconjugados CpG-Ab se ligam ao antígeno alvo associado a uma célula imune normal que expressa um receptor de TLR. Em algumas formas de realização, os imunoconjugados CpG-Ab são selecionados do grupo que consiste em imunoconjugados CpG-Ab compreendendo p236, p238, p243, p246, p275, p276, p308, p313, p347, p361, p362, p425, p433, p434, p435, p436, p437, p438, p477, p478, p479, p480, p481, p482, p483, p484, p485, p486, p487, p488 e p489, como mostrado na Tabela 2. Em algumas formas de realização, compreendendo ainda a coadministração de uma quantidade terapêutica eficaz de pelo menos um agente terapêutico de câncer adicional. Em algumas formas de realização, pelo menos um agente terapêutico de câncer adicional é selecionado a partir de um segundo TAA, uma molécula co-estimulatória de células T e um modulador de ponto de verificação imune. Em algumas formas de realização, o segundo TAA é o mesmo que o TAA. Em algumas formas de realização, o segundo TAA é diferente do TAA. Em algumas formas de realização, a molécula coestimuladora de células T é selecionada da lista que consiste em OX40, CD2, CD27, CDS, ICAM-1, LFA-1/CD11a/CD18, ICOS/CD278, 4-1BB/CD137, GITR, CD30, CD40, BAFFR, HVEM, CD7, LIGHT, NKG2C, SLAMF7, NKp80, CD160, B7-H3 e CD83 ou um ligante do mesmo. Em algumas formas de realização, a molécula co-estimulatória de células T é um anticorpo anti-OX40, anticorpo anti-ICOS/CD278 ou anticorpo anti-4-1BB/CD137 ou um fragmento de ligação a antígeno. Em algumas formas de realização, em que o modulador de ponto de verificação imune é um inibidor de moléculas de ponto de verificação imune selecionadas da lista que consiste em PD-1, PD-L1, PD-L2, TIM-3, LAG-3, CEACAM-1, CEACAM-5, CLTA-4, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD47, CD160, 2B4,

CD172a e TGF β R. Em algumas formas de realização, o modulador do ponto de verificação imune é um anticorpo anti-CD47, anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-PD-L1 ou um seu fragmento de ligação ao antígeno. Em algumas formas de realização, o câncer é um tumor sólido. Em algumas formas de realização, o câncer é um tumor líquido. Em algumas formas de realização dos métodos aqui fornecidos, o câncer é um câncer recorrente. Em algumas formas de realização dos métodos aqui fornecidos, a administração ou coadministração é através da administração sistêmica. Em algumas formas de realização dos métodos aqui fornecidos, a quantidade eficaz terapêutica do imunoconjugado CpG-Ab não é eficaz para ativar a via do complemento no sujeito. Em algumas formas de realização dos métodos aqui fornecidos, a quantidade não é eficaz para ativar o complemento C3 no sujeito.

[0060] Em algumas formas de realização de qualquer um dos métodos aqui fornecidos, em que o imunoconjugado CpG-Ab compreende um oligonucleotídeo de Fórmula (A) como definido acima. Em algumas formas de realização de qualquer um dos métodos aqui fornecidos, em que o imunoconjugado CpG-Ab compreende um composto de Fórmula (B) como definido acima. Em algumas formas de realização de qualquer um dos métodos aqui fornecidos, em que o imunoconjugado CpG-Ab é um composto de Fórmula (C) como definido acima.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0061] O arquivo do aplicativo contém pelo menos um desenho executado em cores. Cópias desta patente ou pedido de patente

com desenhos coloridos serão fornecidas pelo Escritório mediante solicitação e pagamento da taxa necessária.

[0062] A FIG. 1A é uma série de estruturas que mostram abreviações com as estruturas correspondentes. As abreviações são aquelas usadas na Tabela 2.

[0063] A FIG. 1B é uma série de estruturas que mostram abreviações com estruturas correspondentes. As abreviações são aquelas usadas na Tabela 2.

[0064] A FIG. 2 é uma imagem de um gel desnaturante manchado com brometo de etídio de ODNs de CpG de fita simples (faixas **A** (p145) e **D** (p88)) e ODNs de CpG de fita dupla recozidos (faixas **B** (p88/p144) e **C** (p88/p145)).

[0065] A FIG. 3A é uma imagem de géis redutores manchados com brometo de etídio de um anticorpo anti-CD38 marcado com Q antes (faixas **A**) e após a conjugação mediada por transglutaminase de camundongo com um polinucleotídeo p76, p77, p78, p79, p80, p81 e p82 correspondendo às faixas **B** , **C** , **D** , **E** , **F** , **G** e **H.**, respectivamente. HC + 1 indica bandas de uma cadeia pesada de anticorpo anti-CD38 marcado com Q conjugado com um polinucleotídeo HC indica bandas de um anticorpo marcado com Q Cadeia pesada de anticorpo -CD38. LC indica uma cadeia leve de anticorpo anti-CD38.

[0066] A FIG. 3B é uma imagem de géis redutores manchados com brometo de etídio de um anticorpo anti-CD38 marcado com Q antes (faixa **A**) e após a conjugação mediada por transglutaminase microbiana com um polinucleotídeo p83, p84, p85, p86, p87 e p88 correspondendo às faixas **B**, **C**, **D**, **E**, **F** e **G**, respectivamente. HC + 1 indica bandas de uma cadeia pesada de anticorpo anti-CD38

marcada com Q conjugada com um polinucleotídeo. HC indica bandas de uma cadeia pesada de anticorpo anti-CD38 marcada com Q. LC indica uma cadeia leve de anticorpo anti-CD38.

[0067] A FIG. 4A é uma imagem de um gel desnaturante manchado com brometo de etídio de um anti-CD38 marcado com Q conjugado com um ligante de azida antes (faixa **A**) e após conjugação através da cicloadição dipolar a um polinucleotídeo de fita simples (pista **B**, um conjugado Dar1 com p88) ou a um polinucleotídeo de fita dupla (faixas **C**, **D**, **E** e **F**). A faixa **C** corresponde ao primeiro pico AEX isolado para o conjugado de anticorpo anti-CD38 marcado com Q ligado por uma cicloadição 1,3-dipolar isenta de metal à CpG de cadeia dupla p88/p145. A faixa **D** corresponde ao segundo pico AEX isolado para o conjugado de anticorpo anti-CD38 marcado com Q ligado por uma cicloadição 1,3-dipolar isenta de metal à CpG de cadeia dupla p88/p145. A faixa **E** corresponde ao primeiro pico AEX isolado para o conjugado de anticorpo anti-CD38 marcado com Q ligado por uma cicloadição 1,3-dipolar isenta de metal à CpG de cadeia dupla p88/p144. A faixa **F** corresponde ao segundo pico AEX isolado para o conjugado de anticorpo anti-CD38 marcado com Q ligado por uma cicloadição 1,3-dipolar isenta de metal à CpG de cadeia dupla p88/p144.

[0068] A FIG. 4B é um gráfico mostrando vestígios de AEX-HPLC para uma mistura bruta contendo conjugado rituximab-p19 mostrando sinais com base na absorbância a 280 nm e a 260 nm. Existem três picos correspondentes ao conjugado rituximab-p19.

[0069] A FIG. 4C é um gráfico que mostra um composto de traços AEX-HPLC para: a mistura bruta, p19 e rituximab-p19 AEX picos 1, 2 e 3, que são enumerados na FIG. 4B.

[0070] A FIG. 4D é uma imagem de um gel de tris-glicina SDS PAGE 6% desnaturante comparando rituximabe-PEG₂₄-N₃ (faixa **A**), mistura de reação de conjugação bruta (faixa **B**) e picos 1 de rituximab-p19 AEX isolados (faixa **C**), 2 (faixa **D**) e 3 (pista **E**).

[0071] A FIG. 5 é um gráfico que mostra a eficácia dos polinucleotídeos imunoestimulantes murinos para induzir IL-6 dependente da dose em esplenócitos murinos. Os dados ilustrados indicam que, para a sequência polinucleotídica murina imunoestimulante de p18, pelo menos 15 fosforotioatos são preferíveis para alcançar a atividade imunoestimulante. Na ausência de porções de direcionamento conjugadas, um esqueleto de fosforotioato é uma característica importante que controla a eficácia de polinucleotídeos imunoestimulantes para induzir IL-6.

[0072] A FIG. 6 é um gráfico que mostra a eficácia dos imunoconjugados da invenção e CpG 7909 na ativação de NFκB dependente da dose nas células Ramos Blue, conforme medido pelos níveis de fosfatases alcalinas após 5,5 h de tratamento. O eixo x fornece a concentração (nM) do conjugado na escala logarítmica.

[0073] A FIG. 7 é um gráfico que mostra a eficácia dos imunoconjugados e CpG 7909 na ativação de NFκB dependente da dose nas células Ramos Blue, conforme medido pelos níveis de fosfatases alcalinas após 24 h de tratamento e 2,5 h de incubação QB. O eixo x fornece o log da concentração (M) dos conjugados na escala linear.

[0074] A FIG. 8 é um gráfico que mostra a eficácia dos imunoconjugados na ativação de NFκB dependente da dose nas células Ramos Blue, conforme medido pelos níveis de fosfatases

alcalinas após 48 h de tratamento e 2,5 h de incubação QB. O eixo x fornece o log da concentração (M) dos conjugados na escala linear.

[0075] A FIG. 9 é um gráfico comparando a eficácia dos polinucleotídeos p1 e p6 na ativação de NFκB dependente da dose nas células Ramos Blue, conforme medido pelos níveis de fosfatases alcalinas.

[0076] A FIG. 10 é um gráfico que mostra a eficácia dos imunocombinados na ativação de NFκB dependente da dose nas células Ramos Blue, conforme medido pelos níveis de fosfatases alcalinas.

[0077] A FIG. 11 é um gráfico que mostra a eficácia dos imunocombinados na ativação de NFκB dependente da dose nas células Ramos Blue, conforme medido pelos níveis de fosfatases alcalinas.

[0078] A FIG. 12 é um gráfico que mostra a eficácia dos imunocombinados na ativação de NFκB dependente da dose nas células Ramos Blue, conforme medido pelos níveis de fosfatases alcalinas.

[0079] A FIG. 13 é um gráfico que mostra a eficácia dos imunocombinados na ativação de NFκB dependente da dose nas células Ramos Blue, conforme medido pelos níveis de fosfatases alcalinas.

[0080] A FIG. 14 é um gráfico que mostra a eficácia dos imunocombinados na ativação de NFκB dependente da dose em células Ramos Blue, como medido pelos níveis de fosfatases alcalinas.

[0081] A FIG. 15 é um gráfico que mostra a eficácia dos imunocjugados na indução dependente da dose de IL-6 em células DB. O eixo y mostra o multiplicador para o aumento da secreção de IL6 normalizada para os níveis de PPIB.

[0082] A FIG. 16 é um gráfico que mostra a eficácia dos imunocjugados na indução dependente da dose de NFkB nas células Ramos-Blue. Esta figura compara os conjugados com um polinucleotídeo (Dar1) ou dois polinucleotídeos (Dar2) para ativar NFkB.

[0083] A FIG. 17 é um gráfico que mostra a eficácia dos imunocjugados na indução dependente da dose de IL-6 em células DB. Esta figura compara os conjugados com um polinucleotídeo (Dar1) ou dois polinucleotídeos (Dar2) para induzir IL6. O eixo y mostra o multiplicador para o aumento da secreção de IL6 normalizada para os níveis de PPIB.

[0084] A FIG. 18 é um gráfico que mostra a eficácia dos imunocjugados contendo polinucleotídeos imunoestimulantes de comprimento variável na ativação de NFkB em células Ramos-Blue, conforme medido pela leitura da fosfatase alcalina.

[0085] A FIG. 19 é um gráfico que mostra a eficácia dos imunocjugados contendo polinucleotídeos imunoestimulantes de comprimento variável na ativação de NFkB em células Ramos-Blue, conforme medido pela leitura da fosfatase alcalina.

[0086] A FIG. 20 é um gráfico que mostra a comparação da atividade imunoestimulante de conjugados contendo polinucleotídeos com 5-iodo-2-desoxiuridina 5'-terminal que está ligada a um fosfato fosfodiéster internucleosídeo com a atividade imunoestimulante de conjugados contendo

polinucleotídeos com 5'-terminal 5 iodo-2-desoxiuridina que está ligada a um fosforotioato de fosfodiéster internucleosídeo. As atividades imunoestimulantes foram avaliadas através da medição da ativação do NFκB nas células Ramos-Blue, medida pela leitura da fosfatase alcalina.

[0087] A FIG. 21 é um gráfico que mostra a comparação da atividade imunoestimulante de conjugados contendo polinucleotídeos com 5-terminal 5-iodo-2-desoxiuridina 5'-terminal que está ligada a um fosfato fosfodiéster internucleosídeo com a atividade imunoestimulante de conjugados contendo polinucleotídeos com 5'-terminal 5- iodo-2-desoxiuridina que está ligada a um fosforotioato de fosfodiéster internucleosídeo. As atividades imunoestimulantes foram avaliadas através da medição da ativação do NFκB nas células Ramos-Blue, medida pela leitura da fosfatase alcalina.

[0088] A FIG. 22 é um gráfico que mostra a comparação das atividades imunoestimulantes de conjugados contendo uma ou mais 5-iodo-2-desoxiuridinas. As atividades imunoestimulantes foram avaliadas através da medição da ativação do NFκB nas células Ramos-Blue, medida pela leitura da fosfatase alcalina.

[0089] A FIG. 23 é um gráfico que mostra a comparação das atividades imunoestimulantes de conjugados contendo ou sem 5-iodo-2-desoxiuridina. As atividades imunoestimulantes foram avaliadas através da medição da ativação do NFκB nas células Ramos-Blue, medida pela leitura da fosfatase alcalina.

[0090] A FIG. 24 é um gráfico que mostra a comparação das atividades imunoestimulantes de conjugados contendo fosfotriésteres internucleosídeos que são à base de fosfato ou

à base de fosforotioato. A atividade imunoestimulante foi avaliada através da medição da ativação do NFκB nas células Ramos-Blue, medida pela leitura da fosfatase alcalina.

[0091] A FIG. 25 é um gráfico que mostra a comparação das atividades imunoestimulantes de conjugados contendo fosfotriésteres internucleosídeos que são à base de fosfato ou à base de fosforotioato. A atividade imunoestimulante foi avaliada através da medição da ativação do NFκB nas células Ramos-Blue, medida pela leitura da fosfatase alcalina.

[0092] A FIG. 26A é um gráfico que mostra a comparação das atividades imunoestimulantes de conjugados contendo um ou mais fosfotriésteres internucleosídeos baseados em fosforotioato. A atividade imunoestimulante foi avaliada através da medição da ativação do NFκB nas células Ramos-Blue, medida pela leitura da fosfatase alcalina.

[0093] A FIG. 26B é um gráfico que mostra a comparação das atividades imunoestimulantes de conjugados contendo um ou mais fosfotriésteres internucleosídeos baseados em fosforotioato. A atividade imunoestimulante foi avaliada através da medição da ativação do NFκB nas células Ramos-Blue, medida pela leitura da fosfatase alcalina.

[0094] A FIG. 27 é um gráfico que mostra a comparação das atividades imunoestimulantes de conjugados contendo um anticorpo e um ou mais polinucleotídeos imunoestimulantes. A atividade imunoestimulante foi avaliada através da medição da ativação do NFκB nas células Ramos-Blue, medida pela leitura da fosfatase alcalina.

[0095] A FIG. 28 é um gráfico que mostra a comparação da citotoxicidade dependente celular (CDC) de polinucleotídeos imunoestimulantes conjugados através de um Q-terminal da cadeia pesada ou um Q-terminal da cadeia leve em um anticorpo. O ensaio CDC foi realizado em células Daudi incubadas com os conjugados em soros humanos, e a citotoxicidade foi medida por fluorescência.

[0096] A FIG. 29 é um gráfico que mostra a comparação das atividades imunoestimulantes de conjugados com porções auxiliares. A atividade imunoestimulante foi avaliada através da medição da ativação do NFκB nas células Ramos-Blue, medida pela leitura da fosfatase alcalina. O designador entre parênteses indica a estrutura da porção ligante/auxiliar usada no conjugado, nenhuma AM indica que o conjugado SB-189 não contém uma porção auxiliar.

[0097] A FIG. 30 é um gráfico que mostra a comparação das atividades CDC de conjugados com porções auxiliares. O ensaio CDC foi realizado em células Daudi incubadas com os conjugados em soros humanos, e a citotoxicidade foi medida por fluorescência.

[0098] A FIG. 31 é um gráfico que mostra a indução de IL6 em células de linfoma de células B de camundongo A20 usando conjugados contendo um polinucleotídeo imunoestimulador humano reativo a murinos truncado (p275) ligado através de um marcador Q a um anticorpo anti-CD22 murino.

[0099] A FIG. 32 é um gráfico que mostra a indução de IL6 em células de linfoma de células B de camundongo A20 usando conjugados contendo um polinucleotídeo imunoestimulador humano

reativo a murinos truncado (p275) ligado através de um marcador Q a um anticorpo anti-CD22 murino.

[00100] A FIG. 33A é um gráfico que mostra a indução de IL6 em células de linfoma de células B de camundongo A20 usando conjugados contendo polinucleotídeos imunoestimulantes ou um polinucleotídeo imunoestimulador não conjugado.

[00101] A FIG. 33B é um gráfico que mostra a indução de IL6 em células de linfoma de células B de camundongo A20 por conjugados contendo um anticorpo CD22 anti-camundongo e um polinucleotídeo imunoestimulador na presença de concentração variável do anticorpo CD22 anti-camundongo livre.

[00102] A FIG. 34A é um gráfico que mostra a indução de interferon- α no PBMC humano por CpG-2336, um CpG ODN de classe A.

[00103] A FIG. 34B é um gráfico que mostra a indução de interferon- α em PBMC humano usando o conjugado SB-340. O anticorpo anti-BDCA2, SB-341 e p246 foram usados como controles nesta experiência. O eixo Y fornece densidade óptica em unidades arbitrárias no comprimento de onda de 450 nm.

[00104] A FIG. 34C é um gráfico que mostra a indução de interferon- α em células plasmocitóides purificadas usando o conjugado SB-342. Anticorpo anti-BDCA2, anticorpo anti-BDCA4 e SB-343 foram usados como controles nesta experiência.

[00105] A FIG. 35 é um gráfico que mostra a comparação da atividade imunoestimuladora dos polinucleotídeos com várias modificações no terminal 5' e testadores internucleosídeos.

[00106] A FIG. 36 é um gráfico que mostra a comparação da atividade imunoestimuladora dos polinucleotídeos com várias modificações no terminal 5' e testadores internucleosídeos.

[00107] A FIG. 37A é um gráfico que mostra a progressão do crescimento do volume tumoral após a inoculação de um camundongo com células de linfoma de células B de camundongo A20 e a administração intratumoral subsequente tripla de um veículo (solução salina) ou de um polinucleotídeo imunoestimulador da invenção (p326) e um controle (p18). Os tempos de administração são indicados com as setas no eixo X.

[00108] A FIG. 37B é um gráfico que mostra a progressão do crescimento do volume tumoral após a inoculação de um camundongo com células de linfoma de células B de camundongo A20 e a administração subsequente, tripla e intravenosa de um veículo (solução salina), um polinucleotídeo imunoestimulador (p3), um anticorpo anti-CD22 (CD22) ou conjugados SB-338, SB-339 ou SB-344. Os tempos de administração são indicados com as setas no eixo X.

[00109] A FIG. 38A é um gráfico que mostra a progressão do crescimento do volume tumoral após a inoculação de um camundongo com células de linfoma de células B de camundongo A20 e a administração intratumoral subsequente, tripla, de um veículo (solução salina) ou um polinucleotídeo imunoestimulador.

[00110] A FIG. 38B é um gráfico que mostra os valores de volume do tumor no dia 20 após a inoculação de um camundongo com células de linfoma de células B de camundongo A20 e a administração intratumoral subsequente, tripla e de um veículo (solução salina) ou um polinucleotídeo imunoestimulador.

[00111] A FIG. 39A é um gráfico que mostra a progressão do crescimento do volume tumoral após a inoculação de um camundongo com células de linfoma de células B de camundongo A20 e (i) a administração intravenosa subsequente, única e única de um conjugado da invenção (SB-337), ou (ii) a administração intratumoral tripla subsequente de um veículo (solução salina) ou de um polinucleotídeo imunoestimulador.

[00112] A FIG. 39B é um gráfico que mostra os valores do volume do tumor no dia 20 após a inoculação de um camundongo com células de linfoma de células B de camundongo A20 e (i) a administração intravenosa subsequente, única e única de um conjugado da invenção (SB-337), ou (ii) administração subsequente, tripla e intratumoral de um veículo (solução salina) ou de um polinucleotídeo imunoestimulador.

[00113] A FIG. 40 é um gráfico que mostra as taxas de sobrevivência (%) para camundongos Balb/c inoculados com células de linfoma de camundongo A20 e subsequentemente tratados com solução salina, anticorpos livres, conjugados de polinucleotídeos imunoestimuladores de anticorpos ou polinucleotídeos imunoestimulantes livres. O grupo controle são camundongos Balb/c não-inoculados e não tratados. As linhas identificadas como CD22-10 e CD22-3 fornecem taxas de sobrevivência dos camundongos (%) para os regimes de tratamento: 10 mg/kg do anticorpo livre anti-camundongo CD22 e 3 mg/kg do anticorpo livre anti-camundongos CD22, respectivamente. As linhas identificadas como SB-337-10 e SB-337-3 fornecem taxas de sobrevivência dos camundongos(%) para os regimes de tratamento: 10 mg/kg de SB-337 e 3 mg/kg de SB-337, respectivamente.

[00114] A FIG. 41A é uma imagem de um gel desnaturante de amostras de polinucleotídeos incubados no soro de camundongo a 37 °C por até 24 horas.

[00115] A FIG. 41B é uma imagem de um gel desnaturante de amostras de polinucleotídeos incubadas em soro de camundongos a 37 °C durante até 24 horas.

[00116] A FIG. 41C é uma imagem de um gel desnaturante de amostras de polinucleotídeos incubadas em soro de camundongo a 37 °C durante até 24 horas.

[00117] A FIG. 41D é uma imagem de um gel desnaturante de amostras de polinucleotídeos incubados em soro de macaco a 37 °C por até 24 horas.

[00118] A FIG. 41E é uma imagem de um gel desnaturante de amostras de polinucleotídeos incubados em soro humano a 37 °C por até 24 horas.

[00119] A FIG. 42 é um gráfico que mostra o efeito de fosfodiésteres internucleosídeos à base de fosfato e fosforotioato no terminal 5' de um polinucleotídeo imunoestimulador na estabilidade do polinucleotídeo no soro de camundongo a 80%.

[00120] A FIG. 43 é um gráfico que mostra as proporções de p246 degradado e p246 intacto em um experimento de envelhecimento em 80% de soro de camundongo.

[00121] A FIG. 44 é um gráfico que mostra o efeito das estruturas nucleotídicas do terminal 5' na estabilidade dos polinucleotídeos no soro de camundongo a 80%.

[00122] A FIG. 45 é um gráfico que mostra o efeito das estruturas nucleotídicas do terminal 5' na estabilidade dos polinucleotídeos no soro de 80% de camundongo, 80% de soro de primatas não humanos (NHP) e 80% de soro humano. Os dados do soro do camundongo são marcados com um asterisco, pois esses dados foram obtidos em um estudo separado.

[00123] A FIG. 46A ilustra o esquema experimental como descrito no Exemplo 6, em que camundongos que tinham linfoma de células B disseminado receberam doses intravenosas de CpG-Ab (CpG ODN conjugado a um mAb anti-CD22 de camundongo).

[00124] A FIG. 46B mostra a taxa de sobrevivência de camundongos com linfoma de células B disseminado que foram tratados nos dias 1, 3 e 5 com (i) 3mg/kg de conjugado de CpG (p313)-mAb (CD22) (diamante fechado); (ii) 10 mg/kg de CpG-mAb (CD22) (triângulo fechado); (iii) CpG ODN nu (triângulo aberto); (iv) 10 mg/kg de mAb CD22 (quadrado fechado); (v) 10 mg/kg de conjugado de controle GpC-mAb (quadrado aberto); ou (vi) solução salina (círculo fechado).

[00125] A FIG. 46C mostra as taxas de sobrevivência de camundongos que sobreviveram ao primeiro desafio de tumor e subsequentemente submetidos a um segundo desafio de tumor no dia 47. Nenhum tratamento foi dado ao sobrevivente após o segundo desafio de tumor. Sobreviventes tratados com 10 mg/kg de CpG-mAb (CD22) nos dias 1, 3 e 5 (triângulo para baixo); sobreviventes tratados com 3 mg/kg de CpG-mAb (CD22) nos dias 1, 3 e 5 (diamante); segundo grupo de controle desafiado com células tumorais no dia 47 e tratado com solução salina (triângulo ascendente).

[00126] A FIG. 46D mostra a experiência em que os camundongos que sobreviveram aos primeiro e segundo desafios de tumor foram subsequentemente submetidos a um terceiro desafio de tumor no dia 90. Nenhum tratamento foi dado aos sobreviventes após o segundo ou terceiro desafio de tumor. Um terceiro grupo controle foi desafiado com células tumorais no dia 90 e tratado com solução salina. Os volumes tumorais dos sobreviventes (quadrado) e do grupo controle (círculo) foram monitorados entre o dia 90 e o dia 120.

[00127] A FIG. 47A ilustra o esquema experimental como descrito no Exemplo 7, em que camundongos com linfoma de células B sólido receberam doses intravenosas de CpG-Ab (CpG ODN conjugado a um mAb anti-CD22 de camundongo).

[00128] A FIG. 47B mostra o volume do tumor de camundongos com linfoma de células B sólido que foram tratados nos dias 9, 12 e 14 com (i) 3 mg/kg de CpG-mAb (CD22) (diamante aberto); (ii) 10 mg/kg de CpG-mAb (CD22) (triângulo fechado grande); (iii) CpG ODN nu (triângulo aberto); (iv) 10 mg/kg de mAb CD22 (quadrado fechado); (v) 10 mg/kg de conjugado de controle GpC-mAb (pequeno quadrado fechado) ou (vi) solução salina (círculo fechado).

[00129] A FIG. 47C mostra o volume do tumor de camundongos com linfoma de células B sólido que foram tratados com SB-337 DAR1 a 10 mg/kg ou SB-337 DAR2 a 10 mg/kg em comparação com os controles (solução salina e SB-339).

[00130] A FIG. 47D mostra o volume do tumor de camundongos com linfoma de células B sólido que foram tratados com SB-337 PEG₂₄BisDAR1 a 10 mg/kg ou SB-337 PEG₂₄BisDAR2 a 10 mg/kg em comparação com os controles (solução salina e SB -339).

[00131] A FIG. 47E mostra o volume do tumor de camundongos com linfoma de células B sólido que foram tratados com PD-1 a 10 mg/kg, PD-1 a 10 mg/kg mais SB-337 DAR1 a 3 mg/kg; ou PD-1 a 10 mg/kg mais SB-337 DAR2 a 3 mg/kg em comparação com um controle salino.

[00132] A FIG. 47F mostra o efeito de p347, SB-337 DAR1 e SB-337 DAR2 nos pesos de camundongos em comparação com os controles (solução salina e mCD22).

[00133] A FIG. 48A ilustra o esquema experimental como descrito no Exemplo 8, em que camundongos com carcinoma de cólon sólido receberam doses intravenosas de células B CpG-Ab direcionadas (CpG ODN conjugado a um mAb anti-CD22 de camundongo) isoladamente ou em combinação com anti-PD-1 anticorpo.

[00134] A FIG. 48B mostra o volume do tumor de camundongos com modelo de linfoma de células B sólido após receber (i) 3 mg/kg de CpG-mAb (CD22) (triângulo ascendente); (ii) anticorpo anti-PD-1 (quadrado fechado); (iii) 3 mg/kg de CpG-mAb (CD22) em combinação com anticorpo anti-PD-1 (triângulo para baixo); e (iv) solução salina (círculo fechado).

[00135] A FIG. 49A mostra o volume do tumor em camundongos Balb/C imunocompetentes com linfoma de células B sólido após receber (i) 10 mg/kg de CpG-mAb (CD22) (triângulo) ou solução salina (círculo).

[00136] A FIG. 49B mostra o volume do tumor em camundongos Nu/Nu comprometidos imunologicamente com linfoma de células B sólido após receber (i) 10 mg/kg de CpG-mAb (CD22) (quadrado), (ii) CpG ODN nú (triângulo) ou (iii) solução salina (círculo).

[00137] A FIG. 49C mostra o volume do tumor em camundongos SCID imunocomprometidos com linfoma de células B sólido após receber (i) 10 mg/kg de CpG-mAb (CD22) (quadrado), (ii) CpG ODN nu (triângulo) ou (iii) solução salina solução (círculo).

[00138] A FIG. 50A mostra a taxa de sobrevivência de camundongos com linfoma de células B solúveis após receber (i) CpG-mAb (CD22) sozinho (círculo aberto); (ii) tratamento com depleção de células T CpG-mAb (CD22) e CD4 + (quadrado aberto); (iii) tratamento de depleção de células T CD4 + (quadrado fechado); ou (iv) solução salina (círculo fechado).

[00139] A FIG. 50B mostra a taxa de sobrevivência de camundongos com linfoma de células B solúveis após receber (i) CpG-mAb (CD22) sozinho (círculo aberto); (ii) tratamento de depleção de células CpG-mAb (CD22) e *natural killer* (NK) (quadrado aberto); (iii) tratamento de depleção de células NK (quadrado fechado); ou (iv) solução salina (círculo fechado).

[00140] A FIG. 50C mostra a taxa de sobrevivência de camundongos com linfoma de células B solúveis após receber (i) CpG-mAb (CD22) sozinho (círculo aberto); (ii) tratamento com depleção de células T CpG-mAb (CD22) e CD8 + (quadrado aberto); (iii) tratamento de depleção de células T CD8 + (quadrado fechado); ou (iv) solução salina (círculo fechado).

[00141] A FIG. 51A mostra o volume do tumor em camundongos com linfoma de células B sólido após receber CpG-mAb (CD22) (quadrado) ou solução salina (círculo). Os camundongos foram sacrificados e o tumor foi colhido no dia 17 para digestão.

[00142] A FIG. 51B mostra a porcentagem de células vivas CD4 + ou CD8 + em tumores colhidos de camundongos com linfoma de

células B sólido tratado com (i) CpG-Ab (quadrado) ou (ii) solução salina (círculo).

[00143] A FIG. 51C mostra a correlação entre a porcentagem de células tumorais CD8 + e o volume do tumor em camundongos tratados com (i) CpG-Ab (quadrado) ou (ii) solução salina (círculo).

[00144] A FIG. 52A mostra o volume do tumor em camundongos com linfoma de células B sólido após receber (i) CpG-mAb (CD22) sozinho (círculo aberto); (ii) anticorpo anti-PD-1 sozinho (quadrado fechado); (iii) CpG-mAb (CD22) em combinação com anticorpo anti-PD-1 (quadrado aberto); ou (iv) solução salina (círculo fechado).

[00145] A FIG. 52B mostra o volume do tumor em camundongos com linfoma de células B sólido após receber (i) CpG-mAb (CD22) sozinho (círculo aberto); (ii) anticorpo anti-PD-L1 sozinho (triângulo fechado); (iii) CpG-mAb (CD22) em combinação com anticorpo anti-PD-L1 (triângulo aberto); ou (iv) solução salina (círculo fechado).

[00146] A FIG. 52C mostra o volume do tumor em camundongos com linfoma de células B sólido após receber (i) CpG-mAb (CD22) sozinho (círculo aberto); (ii) anticorpo anti-PD-1 sozinho (quadrado fechado); (iii) CpG-mAb (CD22) em combinação com anticorpo anti-PD-1 (quadrado aberto); (iv) CpG-mAb (CD22) em combinação com anticorpo anti-PD-1 e tratamento de depleção de células T CD8 +; ou (v) solução salina (círculo fechado).

[00147] A FIG. 53A mostra o volume médio do tumor em camundongos com linfoma de células B sólido após receber (i) anticorpo anti-PD-1 sozinho (quadrado); (ii) CpG-mAb (CD22) em

combinação com anticorpo anti-PD-1 (diamante); ou (iii) solução salina (círculo).

[00148] A FIG. 53B mostra os volumes tumorais em camundongos individuais com linfoma de células B sólido após receber apenas o anticorpo anti-PD-1.

[00149] A FIG. 53C mostra os volumes tumorais em camundongos individuais com linfoma de células B sólido após receber o tratamento combinado de anticorpo CpG-mAb (CD22)/anticorpo anti-PD-1.

[00150] A FIG. 53D mostra o volume do tumor de sobreviventes do primeiro desafio de tumor (triângulo para cima) e um grupo de controle naive (triângulo para baixo) após o segundo desafio de tumor.

[00151] A FIG. 54A mostra o volume do tumor em camundongos com linfoma de células B sólido após receber (i) (i) anticorpo anti-OX40 sozinho (triângulo); (ii) CpG-mAb (CD22) em combinação com anticorpo anti-OX40 (diamante); ou (iii) solução salina (círculo).

[00152] A FIG. 54B mostra o volume do tumor em camundongos com linfoma de células B sólido após receber (i) (i) anticorpo anti-ICOS sozinho (quadrado); (ii) CpG-mAb (CD22) em combinação com anticorpo anti-ICOS (triângulo); ou (iii) solução salina (círculo).

[00153] A FIG. 54C mostra o volume do tumor em camundongos com linfoma de células B sólido após receber (i) anticorpo anti-4-1BB sozinho (diamante); (ii) CpG-mAb (CD22) em combinação com anticorpo anti-4-1BB (triângulo); ou (iii) solução salina (círculo).

[00154] A FIG. 55A mostra o volume do tumor em camundongos com carcinoma do cólon após receber (i) 10 mg/kg de CpG-mAb (CD22) ou (ii) solução salina em cada um dos dias 10, 13 e 16.

[00155] A FIG. 55B mostra o número de células secretoras de IFN-gama em 10^6 esplenócitos isolados de camundongos tratados com (i) CpG-mAb (CD22) ou (ii) solução salina, antes ou depois de estimular as células com o antígeno AH1.

[00156] A FIG. 56A mostra o volume médio do tumor em camundongos com linfoma de células B sólido após receber doses intravenosas de (i) 10 mg/kg de CpG-Ab (PD-L1) (diamante); (ii) 10 mg/kg de CpG-Ab (CD205) (triângulo); ou (iii) solução salina em cada um dos dias 10, 12 e 14.

[00157] A FIG. 56B mostra os volumes tumorais em camundongos individuais com linfoma de células B após receber doses intravenosas de 10 mg/kg de CpG-Ab (CD205) nos dias 10, 12 e 14.

[00158] A FIG. 56C mostra os volumes do tumor em camundongos individuais com linfoma de células B após receber doses intravenosas de 10 mg/kg de CpG-Ab (PD-L1) nos dias 10, 12 e 14.

[00159] A FIG. 56D mostra o volume tumoral dos sobreviventes do primeiro desafio tumoral que foram tratados com CpG-Ab (CD205) (quadrado) ou tratados com CpG-Ab (PD-L1) (triângulo) e um grupo de controle naive (círculo) após o segundo desafio tumoral dado no dia 38.

[00160] A FIG. 57A mostra o volume médio do tumor em camundongos com linfoma de células B sólido após receber doses intravenosas de (i) 10 mg/kg de CpG-Ab (CD205) (triângulo); (ii) 10 mg/kg de anticorpo anti-CD205 (quadrado); (iii) 10 mg/kg de

IgG de camundongo (círculo aberto); ou (iv) solução salina (círculo fechado), em cada um dos dias 10, 12 e 14.

[00161] A FIG. 57B mostra os volumes tumorais em camundongos individuais com linfoma de células B sólido após receber doses intravenosas de 10 mg/kg de anticorpo anti-CD205 em cada um dos dias 10, 12 e 14.

[00162] A FIG. 57C mostra os volumes do tumor em camundongos individuais com linfoma de células B sólido após receber doses intravenosas de 10 mg/kg de CpG-Ab (CD205) em cada um dos dias 10, 12 e 14.

[00163] A FIG. 57D mostra os volumes tumorais em camundongos individuais com linfoma de células B sólido após receber doses intravenosas de 10 mg/kg de anticorpo IgG2a de camundongo em cada um dos dias 10, 12 e 14.

[00164] A FIG. 58 mostra a ativação de NF κ B em células Ramos humanas após tratamento com anticorpo anti-CD38 conjugado com p246 (quadrados fechados), com anticorpo anti-CD38 conjugado com p4 (círculos fechados), com p246 não conjugado (quadrados abertos) ou com p4 não conjugado (círculos abertos).

[00165] A FIG. 59 mostra a ativação do complemento (conforme medido pela liberação de C3) após a incubação do soro de macaco com Zymosan (triângulo invertido; controle positivo), p1 (círculos fechados) ou dois polinucleotídeos imunoestimulantes contendo CpG, conforme aqui fornecido (quadrados fechados e triângulos fechados).

[00166] A FIG. 60A mostra a progressão média do crescimento do volume tumoral de camundongos com xenoenxertos de células de linfoma de células B de camundongo A20 após doses intravenosas

de (i) solução salina (círculo fechado); (ii) 3 mg/kg de CpG-Ab (4523-CD22; SB-337) (quadrado); (iii) 3 mg/kg de CD19-mAb (triângulo fechado); (iv) 3 mg/kg de CpG-Ab (4523-CD19; SB-388) (diamante fechado); (v) 1,9 µg/CpG nu de camundongo (P347) (triângulo para cima); (vi) 19 µg/CpG nu de camundongo (p347) (triângulo aberto); (vii) 190 µg/CpG nu de camundongo (P347) (diamante aberto); em cada um dos dias 10, 12 e 14.

[00167] A FIG. 60B mostra o volume médio de tumor no dia 20 de camundongos com xenoenxertos de células de linfoma de células B de camundongo A20 após doses intravenosas de (i) solução salina (sólida); (ii) 3 mg/kg de CpG-Ab (SB-337) (xadrez); (iii) 3 mg/kg de CD19-mAb (horizontal); (iv) 3 mg/kg de CpG-Ab (SB-388) (vertical); (v) 1,9 µg/CpG nu de camundongo (P347) (diagonal para baixo); em cada um dos dias 10, 12 e 14.

[00168] A FIG. 60C mostra a alteração de peso corporal média com a alteração de peso do tumor removida no dia 20 de camundongos com xenoenxertos de células de linfoma de células B de camundongo A20 após doses intravenosas de (i) solução salina (cheia); (ii) 3 mg/kg de CpG-Ab (SB-337) (xadrez); (iii) 3 mg/kg de CD19-mAb (horizontal); (iv) 3 mg/kg de CpG-Ab (SB-388) (vertical); (v) 1,9 µg/CpG nu de camundongo (P347) (diagonal para baixo); (vi) 19 µg/CpG nu de camundongo (P347) (grade); (vii) 190 µg/CpG nu de camundongo (P347) (diagonal para cima); em cada um dos dias 10, 12 e 14.

[00169] A FIG. 61A mostra a progressão média do crescimento do volume tumoral de camundongos após re-desafio com melanoma B16F10 após dosagem intratumoral de (i) solução salina (círculo fechado); ou (ii) p347 (quadrado fechado); nos dias 7, 9, 11 e 13 e desafie novamente no dia 14.

[00170] A FIG. 61B mostra as metástases pulmonares de camundongos após re-desafio com melanoma B16F10 após dosagem intratumoral de solução salina (painel superior) ou p347 (painel inferior); nos dias 7, 9, 11 e 13 e desafia novamente no dia 14.

[00171] A FIG. 61C mostra a progressão média do crescimento do volume tumoral de camundongos inoculados com xenoenxertos colorretais CT26 após dosagem intratumoral de (i) solução salina (triângulo para cima); ou (ii) p347 (triângulo descendente); nos dias 7, 10, 12 e 14.

[00172] A FIG. 62A mostra a progressão média do crescimento do volume tumoral de camundongos deficientes em células B genéticas usando o modelo colorretal CT26 após a administração intravenosa de (i) solução salina (círculo); ou (ii) 10 mg/kg de CpG-mAb (SB-337) (quadrado); em cada um dos dias 10, 12 e 14.

[00173] A FIG. 62B mostra a progressão média do crescimento do volume tumoral de camundongos empobrecidos de células B anti-CD20 mAb usando modelo colorretal CT26 após a administração intravenosa de (i) solução salina (círculo); ou (ii) 10 mg/kg de CpG-mAb (SB-337) (quadrado); em cada um dos dias 10, 12 e 14.

[00174] A FIG. 63A mostra a progressão média do crescimento do volume tumoral de camundongos usando um modelo singeneico colorretal MC38 após a dosagem de (i) solução salina (círculo); (ii) 10 mg/kg de anti-CD22 (triângulo para cima); (iii) 10 mg/kg de anti-PD-L1 (triângulo descendente); (iv) 10 mg/kg de CD22-CpG (SB-337) (quadrado); ou (v) 10 mg/kg de CD22-CpG (SB-337) + 10 mg/kg de anti-PD-L1 (diamante). Anti-CD22 e CD22-CpG foram dosados por via intravenosa nos dias 10, 12 e 14; o anti-PD-L1

foi administrado por via intraperitoneal nos dias 10, 13 e 17.

* $p = 0,01$; ** $p = 0,001$.

[00175] A FIG. 63B mostra a progressão do crescimento do volume tumoral de cada camundongo usando um modelo singeneico colorretal MC38 após a administração de soro fisiológico nos dias 10, 12 e 14

[00176] A FIG. 63C mostra a progressão do crescimento do volume do tumor de cada camundongo usando um modelo singeneico colorretal MC38 após a administração intravenosa de 10 mg/kg de mAb anti-CD22 nos dias 10, 12 e 14.

[00177] A FIG. 63D mostra a progressão do crescimento do volume tumoral de cada camundongo usando um modelo singeneico colorretal MC38 após dosagem intraperitoneal de 10 mg/kg de anti-PD-L1 nos dias 10, 13 e 17.

[00178] A FIG. 63E mostra a progressão do crescimento do volume tumoral de cada camundongo usando um modelo singeneico colorretal MC38 após dosagem intravenosa de 10 mg/kg de CD22-CpG (SB-337) nos dias 10, 12 e 14.

[00179] A FIG. 63F mostra a progressão do crescimento do volume tumoral de cada camundongo usando um modelo singeneico colorretal MC38 após dosagem intravenosa de 10 mg/kg de CD22-CpG (SB-337) nos dias 10, 12 e 14, mais dosagem intraperitoneal de 10 mg/kg de anti-PD-L1 nos dias 10, 13 e 17.

[00180] A FIG. 64A mostra a progressão média do crescimento do volume tumoral de camundongos usando um modelo de melanoma B16F10 após a administração de (i) solução salina (círculo); (ii) 10 mg/kg de anti-CD22 (quadrado); (iii) 10 mg/kg de CD22-CpG (SB-337) (triângulo); ou (iv) 10 mg/kg de CD22-CpG (SB-337) + 10

mg/kg de anti-PD-L1 (diamante) nos dias 10, 12 e 14. Os anti-CD22 e CD22-CpG foram dosados por via intravenosa; o anti-PD-L1 foi administrado por via intraperitoneal. ** p = 0,08; *** p = 0,03.

[00181] A FIG. 64B mostra a progressão média do crescimento do volume tumoral de camundongos usando um modelo de carcinoma de pulmão LLC1 Lewis após a administração de (i) solução salina (círculo); (ii) 10 mg/kg de CD22-CpG (SB-337) (círculo); (iii) 10 mg/kg de anti-PD1 (quadrado); (iv) 10 mg/kg de CD22-CpG (SB-337) + 10 mg/kg de anti-PD1 (triângulo para cima) (v) 10 mg/kg de anti-PD-L1 (triângulo para baixo); (vi) 10 mg/kg de CD22-CpG + 10 mg/kg de anti-PD-L1 (diamante). Anti-CD22 e CD22-CpG foram dosados por via intravenosa nos dias 7, 10 e 13; anti-PD-L1 e anti-PD1 foram administrados por via intraperitoneal nos dias 7, 10 e 14. ** p = 0,023.

[00182] A FIG. 65A mostra a progressão média do crescimento do volume tumoral de camundongos usando o modelo colorretal CT26 após a administração intravenosa de (i) solução salina (círculo); (ii) 10 mg/kg de CD22-CpG (SB-337) (triângulo); ou (iii) 10 mg/kg de DEC205-CpG (SB-3096) em cada um dos dias 12, 17, 20 e 24.

[00183] FIG. 65B shows the tumor volume growth progression of each mouse using the CT26 colorectal model following intravenous dosing of saline on each of Days 12, 17, 20, and 24.

[00184] A FIG. 65C mostra a progressão do crescimento do volume tumoral de cada camundongo usando o modelo colorretal CT26 após a administração intravenosa de 10 mg/kg de CD22-CpG (SB-337) em cada um dos dias 12, 17, 20 e 24.

[00185] A FIG. 65D mostra a progressão do crescimento do volume do tumor de cada camundongo usando o modelo colorretal CT26 após a administração intravenosa de 10 mg/kg de DEC205-CpG (SB-3096) em cada um dos dias 12, 17, 20 e 24.

[00186] A FIG. 66A mostra a progressão média do crescimento do volume tumoral de camundongos usando um modelo colorretal CT26 após a administração de (i) solução salina (pequeno círculo); (ii) depleção de CD4 (grande círculo); (iii) 3 mg/kg de CD22-CpG (SB-337) (quadrado); ou (iv) depleção de CD4 + 3 mg/kg de CD22-CpG (SB-337) (diamante). A CD22-CpG foi administrada por via intravenosa nos dias 10, 13; e 15. A depleção de CD4 foi realizada usando anti-CD4.

[00187] A FIG. 66B mostra a progressão média do crescimento do volume tumoral de camundongos usando um modelo de linfoma A20 após a administração de (i) solução salina (círculo); (ii) depleção de CD4 (triângulo para cima); (iii) 3 mg/kg de CD22-CpG (SB-337) (quadrado); ou (iv) depleção de CD4 + 3 mg/kg de CD22-CpG (SB-337) (triângulo para baixo). A CD22-CpG foi administrada por via intravenosa nos Dias 10, 12; e 14. A depleção de CD4 foi realizada usando anti-CD4

[00188] A FIG. 67A mostra a intensidade média de fluorescência (MFI) de CD40, CD70, CD80, CD86, MHC-I, MHC II e 4-1 expressão da superfície BBL em células CD19 +/B220 + B após incubação *in vitro* com 1nM CD22 Ab (quadriculado) ; 1nM CpG (SB-4715) (linha horizontal); ou 1nM CpG-Ab (SB-337) (linha vertical).

[00189] A FIG. 67B mostra a intensidade média de fluorescência (MFI) da expressão de superfície de CD40, CD80, CD86 e MHC II em células CD19 +/B220 + B após dosagem *in vivo* com solução salina

(sólido); 10 mg/kg CD22 Ab (quadriculado); 10 mg/kg de CpG (SB-4715) (linha horizontal); ou 10 mg/kg de CpG-Ab (SB-337) (linha vertical).

[00190] A FIG. 68A mostra a porcentagem de células T ativadas (CD71 +, CD3 +) em relação à população total de células T (CD3 +) em camundongos tratados com (i) solução salina (sólida); (ii) Ab (anti-CD22) (xadrez); (iii) CpG-Ab (SB-337) (horizontal); ou (iv) CpG (SB-4715) (vertical).

[00191] A FIG. 68B mostra a porcentagem de células T ativadas (Ki67 +, CD3 +) em relação à população total de células T (CD3 +) em camundongos tratados com (i) solução salina (sólida); (ii) Ab (anti-CD22) (xadrez); (iii) CpG-Ab (SB-337) (horizontal); ou (iv) CpG (SB-4715) (vertical).

[00192] A FIG. 69A mostra a progressão média do crescimento do volume tumoral de camundongos usando o modelo colorretal CT26 após a administração intravenosa de (i) solução salina (círculo); (ii) 10 mg/kg de CD22-CpG (SB-337) (quadrado); (iii) 10 mg/kg CD22 (triângulo para cima); ou (iv) CpG livre (P347) (triângulo descendente) em cada um dos dias 10, 12, 14.

[00193] A FIG. 69B mostra a progressão média do crescimento do volume tumoral de camundongos usando o modelo colorretal CT26 após células linfonodais de drenagem transferidas adotivamente de camundongos tratados com (i) solução salina (pequeno círculo); (ii) 10 mg/kg de CD22-CpG (SB-337) (pequeno quadrado); (iii) 10 mg/kg CD22 (pequeno triângulo ascendente); ou (iv) CpG livre (P347) (pequeno triângulo descendente); ou células linfonodais não drenantes de camundongos tratados com (v) solução salina (diamante); (vi) 10 mg/kg de CD22-CpG (SB-337)

(círculo grande); (vii) 10 mg/kg CD22 (quadrado grande); ou (viii) CpG livre (P347) (triângulo para cima grande).

[00194] A FIG. 69C mostra o volume médio de tumor no dia 24 para camundongos usando o modelo colorretal CT26 após células de linfonodo de drenagem transferidas adotivamente de camundongos tratados com (i) solução salina (diagonal estreita para cima); (ii) 10 mg/kg de CD22-CpG (SB-337) (diagonal estreita para baixo); (iii) 10 mg/kg CD22 (grade); ou (iv) CpG livre (P347) (diagonal larga para baixo); ou células de linfonodos não drenantes de camundongos tratados com (v) solução salina (sólida); (vi) 10 mg/kg de CD22-CpG (SB-337) (xadrez); (vii) 10 mg/kg CD22 (horizontal); ou (viii) CpG livre (P347) (vazio).

[00195] A FIG. 70A mostra a concentração plasmática de IL-6 em camundongos 'naive' tratados intravenosamente com (i) solução salina (sólida); (ii) 10 mg/kg de Ab (CD22) (xadrez); (iii) 5,7 µg/de CpG livre de dose (p347) (horizontal); ou (iv) 10 mg/kg de CpG-mAb (SB-337) (vertical).

[00196] A FIG. 70B mostra a concentração plasmática de IL-1β em camundongos naives tratados intravenosamente com (i) solução salina (sólida); (ii) 10 mg/kg de Ab (CD22) (xadrez); (iii) 5,7 µg/de CpG livre de dose (p347) (horizontal); ou (iv) 10 mg/kg de CpG-mAb (SB-337) (vertical).

[00197] A FIG. 70C mostra a concentração plasmática de IL-10 em camundongos naive tratados intravenosamente com (i) solução salina (sólida); (ii) 10 mg/kg de Ab (CD22) (xadrez); (iii) 5,7 µg/de CpG livre de dose (p347) (horizontal); ou (iv) 10 mg/kg de CpG-mAb (SB-337) (vertical).

[00198] A FIG. 70D mostra a concentração plasmática de IL-12p70 em camundongos 'naive' tratados intravenosamente com (i) solução salina (sólida); (ii) 10 mg/kg de Ab (CD22) (xadrez); (iii) 5,7 µg/de CpG livre de dose (Sp347) (horizontal); ou (iv) 10 mg/kg de CpG-mAb (SB-337) (vertical).

[00199] A FIG. 70E mostra a concentração plasmática de IFN γ em camundongos 'naive' tratados intravenosamente com (i) solução salina (sólida); (ii) 10 mg/kg de Ab (CD22) (xadrez); (iii) 5,7 µg/de CpG livre de dose (p347) (horizontal); ou (iv) 10 mg/kg de CpG-mAb (SB-337) (vertical).

[00200] A FIG. 70F mostra a concentração plasmática de TNF α em camundongos naive tratados intravenosamente com (i) solução salina (sólida); (ii) 10 mg/kg de Ab (CD22) (xadrez); (iii) 5,7 µg/de CpG livre de dose (p347) (horizontal); ou (iv) 10 mg/kg de CpG-mAb (SB-337) (vertical).

[00201] A FIG. 71A mostra a porcentagem de células B (B220 +) em relação à célula total no baço de camundongos usando o modelo colorretal CT26 após a administração intravenosa de (i) solução salina (círculo); ou (ii) 10 mg/kg de CpG-mAb (SB-337) (quadrado) em cada um dos dias 10, 13 e 17. * p <0,05

[00202] A FIG. 71B mostra a porcentagem de células do centro germinativo (GC) (B220+, IgDlo, Fas+) em relação à célula total no baço de camundongos usando o modelo colorretal CT26 após a administração intravenosa de (i) solução salina (círculo); ou (ii) 10 mg/kg de CpG-mAb (SB-337) (quadrado) em cada um dos dias 10, 13 e 17. * p <0,05

[00203] A FIG. 71C mostra a porcentagem de células T *follic helper* (Tfh) (CD4+, CXCR5+, PD-1+) em relação à célula total no

baço de camundongos usando o modelo colorretal CT26 após a administração intravenosa de (i) solução salina (círculo); ou (ii) 10 mg/kg de CpG-mAb (SB-337) (quadrado) em cada um dos dias 10, 13 e 17. * p <0,05

[00204] A FIG. 71D mostra a alteração relativa da medida na IL-21 de camundongos usando o modelo colorretal CT26 após a administração intravenosa de (i) solução salina; ou (ii) 10 mg/kg de CpG-mAb (SB-337) em cada um dos dias 10, 13 e 17. * p <0,05

[00205] A FIG. 71E mostra a alteração relativa da medida na Bcl-6 de camundongos usando o modelo colorretal CT26 após a administração intravenosa de (i) solução salina; ou (ii) 10 mg/kg de CpG-mAb (SB-337) em cada um dos dias 10, 13 e 17. * p <0,05

[00206] A FIG. 71F mostra a alteração relativa da medida na IRF-4 de camundongos usando o modelo colorretal CT26 após a administração intravenosa de (i) solução salina; ou (ii) 10 mg/kg de CpG-mAb (SB-337) em cada um dos dias 10, 13 e 17. * p <0,05

[00207] A FIG. 72A mostra a alteração relativa da medida na IL-6 no baço de camundongos usando o modelo colorretal CT26 após a administração intravenosa de (i) solução salina; ou (ii) 3 mg/kg de CpG-mAb (SB-337) em cada um dos dias 10, 13 e 17.

[00208] A FIG. 72B mostra a alteração relativa da medida na IL-10 no baço de camundongos usando o modelo colorretal CT26 após a administração intravenosa de (i) solução salina; ou (ii) 3 mg/kg de CpG-mAb (SB-337) em cada um dos dias 10, 13 e 17.

[00209] A FIG. 72C mostra a alteração relativa da medida na IL-1 β no baço de camundongos usando o modelo colorretal CT26 após a administração intravenosa de (i) solução salina; ou (ii) 3 mg/kg de CpG-mAb (SB-337) em cada um dos dias 10, 13 e 17.

[00210] A FIG. 72D mostra a mudança relativa da medida de TNF α no baço de camundongos usando o modelo colorretal CT26 após a administração intravenosa de (i) solução salina; ou (ii) 3 mg/kg de CpG-mAb (SB-337) em cada um dos dias 10, 13 e 17.

[00211] A FIG. 73A mostra a alteração relativa da medida na IL-6 no linfonodo de drenagem de camundongos usando o modelo colorretal CT26 após a administração intravenosa de (i) solução salina; ou (ii) 3 mg/kg de CpG-mAb (SB-337) em cada um dos dias 10, 13 e 17.

[00212] A FIG. 73B mostra a alteração relativa da medida na IL-10 no linfonodo de drenagem de camundongos usando o modelo colorretal CT26 após a administração intravenosa de (i) solução salina; ou (ii) 3 mg/kg de CpG-mAb (SB-337) em cada um dos dias 10, 13 e 17.

[00213] A FIG. 73C mostra a alteração relativa da medida na IL-1 β no linfonodo de drenagem de camundongos usando o modelo colorretal CT26 após a administração intravenosa de (i) solução salina; ou (ii) 3 mg/kg de CpG-mAb (SB-337) em cada um dos dias 10, 13 e 17.

[00214] A FIG. 73D mostra a alteração relativa da medida de TNF α no linfonodo de drenagem de camundongos usando o modelo colorretal CT26 após a administração intravenosa de (i) solução salina; ou (ii) 3 mg/kg de CpG-mAb (SB-337) em cada um dos dias 10, 13 e 17.

[00215] A FIG. 74A mostra a concentração de IgM em camundongos usando o modelo colorretal CT26 após a administração intravenosa de (i) solução salina; ou (ii) 3 mg/kg de CpG-mAb (SB-337) em cada um dos dias 10, 13 e 16. * p < 0,05.

[00216] A FIG. 74B mostra a concentração de IgG2a em camundongos usando o modelo colorretal CT26 após a administração intravenosa de (i) solução salina; ou (ii) 3 mg/kg de CpG-mAb (SB-337) em cada um dos dias 10, 13 e 16. * p <0,05

[00217] A FIG. 74C mostra a concentração de IgG em camundongos usando o modelo colorretal CT26 após a administração intravenosa de (i) solução salina; ou (ii) 3 mg/kg de CpG-mAb (SB-337) em cada um dos dias 10, 13 e 16. * p <0,05

[00218] A FIG. 75 mostra o esquema e a quantificação de IgG2a anti-AH1 de camundongo no soro de camundongos tratados por via intravenosa com solução salina (círculo) ou 3 mg/kg de CpG-mAb (SB-337) (quadrado) medido usando um anti-inflamatório secundário disponível no mercado anticorpos IgG2a-HRP de camundongo, 2° Ab1; ou medição do tratamento com solução salina (triângulo para baixo) ou 3 mg/kg de CpG-mAb (SB-337) (diamante) usando um segundo anticorpo secundário IgG2a-HRP anti-camundongo disponível no mercado, 2° Ab2.

[00219] A FIG. 76A mostra a porcentagem de células B reguladoras (Bregs; CD19⁺, B220⁺, CD1d^{hi}) em relação ao total de células B (B220⁺) no baço de camundongos após a administração intravenosa semanal de (i) solução salina (círculo); ou (ii) 10 mg/kg de CpG-mAb (SB-337) (quadrado). * p <0,001

[00220] A FIG. 76B mostra a porcentagem de células B reguladoras (Bregs; CD19⁺, B220⁺, CD1d^{hi}) em relação ao total de células no baço de camundongos após a administração intravenosa semanal de (i) solução salina (círculo); ou (ii) 10 mg/kg de CpG-mAb (SB-337) (quadrado). * p <0,001

[00221] A FIG. 77A mostra a porcentagem de células dendríticas mielóides do baço (mDC; B220⁻, CD11C⁺; DEC205^{hi}) em relação ao total de células nos linfonodos do baço de camundongos usando o modelo colorretal CT26 tratado intravenosamente com (i) solução salina (círculo); (ii) 10 mg/kg de CpG-mAb (SB-337) (quadrado); ou (iii) 10 mg/kg de CpG; (triângulo) em cada um dos dias 14, 17 e 30. * p = 0,0002, & p = 0,003, # p = 0,002.

[00222] A FIG. 77B mostra a porcentagem de células dendríticas mielóides de linfonodos agrupados (LN) (mDC; B220⁻, CD11C⁺; CD8⁺) em relação ao total de células de camundongos usando o modelo colorretal CT26 tratado por via intravenosa com (i) solução salina (círculo); (ii) 10 mg/kg de CpG-mAb (SB-337) (quadrado); ou (iii) 10 mg/kg de CpG (triângulo); em cada um dos dias 14, 17 e 30. As amostras foram coletadas de linfonodos drenados (dLN) e linfonodos não drenados (ndLN).

[00223] A FIG. 78A mostra a progressão média do crescimento do volume tumoral de camundongos usando o modelo colorretal CT26 após o tratamento com (i) solução salina (círculo); (ii) depleção de células dendríticas plasmocitóides (pDC) (triângulo descendente); (iii) 3 mg/kg de CD22-CpG (SB-337) (quadrado); ou (iv) depleção de pDC + 3 mg/kg CD22-CpG (SB-337) (triângulo para cima) em cada um dos dias 10, 13 e 15.

[00224] A FIG. 78B mostra a progressão média do crescimento do volume tumoral de camundongos usando o modelo de linfoma A20 após o tratamento com (i) solução salina (pequeno círculo); (ii) depleção de células dendríticas plasmocitóides (pDC) (diamante); (iii) 3 mg/kg de CD22-CpG (SB-337) (quadrado); ou (iv) depleção de pDC + 3 mg/kg CD22-CpG (SB-337) (círculo grande) em cada um dos dias 10, 12 e 14.

[00225] A FIG. 79A mostra a alteração relativa da medida na expressão gênica de genes de células T de camundongos usando o modelo colorretal CT26 após a administração intravenosa de (i) solução salina (sólida); ou (ii) 3 mg/kg de CpG-mAb (SB-337) (xadrez) em cada um dos dias 10, 12 e 14.

[00226] A FIG. 79B mostra a alteração relativa da medida na expressão gênica dos genes de macrófagos de camundongos usando o modelo colorretal CT26 após a administração intravenosa de (i) solução salina (sólida); ou (ii) 3 mg/kg de CpG-mAb (SB-337) (horizontal) em cada um dos dias 10, 12 e 14.

[00227] A FIG. 79C mostra a alteração relativa da medida na expressão gênica de genes de citocinas de camundongos usando o modelo colorretal CT26 após a administração intravenosa de (i) solução salina (sólida); ou (ii) 3 mg/kg de CpG-mAb (SB-337) (vertical) em cada um dos dias 10, 12 e 14.

[00228] A FIG. 79D mostra a alteração relativa da medida da expressão gênica dos genes da enzima apoptótica de camundongos usando o modelo colorretal CT26 após a administração intravenosa de (i) solução salina (sólida); (ii) 3 mg/kg de CpG-mAb (SB-337) (diagonal para cima); (iii) anti-PD-L1 (diagonal para baixo); (iv) 3 mg/kg de CpG-mAb + anti-PD-L1 (SB-337) (grade) em cada um dos dias 10, 12 e 14.

[00229] A FIG. 80A mostra uma curva de resposta à dose para a concentração de IL-6 de células B primárias humanas em resposta ao tratamento *in vitro* com (i) CpG (p425) (quadrado); (ii) CpG-mAb (SB-430) (triângulo); ou (iii) Ab (diamante) por 24 a 72 horas.

[00230] A FIG. 80B mostra uma curva de resposta à dose para a intensidade média de fluorescência (MFI) da expressão do MHC II em células humanas B primárias em resposta ao tratamento *in vitro* com (i) CpG (p425) (triângulo); ou (ii) CpG-Ab (SB-430) (círculo) por 24-72 horas.

[00231] A FIG. 80C mostra uma curva de resposta à dose para a intensidade média de fluorescência (MFI) da expressão de CD86 em células humanas B primárias em resposta ao tratamento *in vitro* com (i) CpG (p425) (triângulo); ou (ii) CpG-Ab (SB-430) (círculo) por 24-72 horas.

[00232] A FIG. 80D mostra uma curva de resposta à dose para a intensidade média de fluorescência (MFI) da expressão de CD70 em células humanas B primárias em resposta ao tratamento *in vitro* com (i) CpG (p425) (triângulo); ou (ii) CpG-Ab (SB-430) (círculo) por 24-72 horas.

[00233] A FIG. 80E mostra uma curva de resposta à dose para a intensidade média de fluorescência (MFI) da expressão de CD20 em células humanas B primárias em resposta ao tratamento *in vitro* com (i) CpG (p425) (triângulo); ou (ii) CpG-Ab (SB-430) (círculo) por 24-72 horas.

[00234] A FIG. 81 mostra uma curva de resposta à dose para a concentração de IL-6 de esplenócitos humanos primários em resposta ao tratamento *in vitro* com (i) hCD22-hCpG (SB-430) (quadrado); (ii) CpG 7909 humano livre (triângulo descendente); ou (iii) Solstício CpG humano livre (p425) (seta para cima) por 24 horas

[00235] A FIG. 82A mostra o esquema do experimento com modelo de camundongo humanizado usando células mononucleares do sangue

periférico humano fresco injetadas intraperitonealmente (IP) (hPBMC) antes do transplante subcutâneo de células de linfoma de Daudi Burkitt e tratamento intravenoso (IV) em cada um dos dias 12, 14 e 16 .

[00236] A FIG. 82B mostra a progressão média do crescimento do volume tumoral em um modelo de camundongo humanizado injetado intraperitonealmente com células mononucleares do sangue periférico humano fresco antes do transplante subcutâneo de células do linfoma de Daudi Burkitt e tratamento intravenoso (IV) com (i) solução salina (círculo); (ii) 5 mg/kg de hCD22 Ab (quadrado); (iii) 5,7 µg/dose de CpG (p425) (triângulo aberto); ou (iv) 5 mg/kg de hCD22-CpG (SB-430) (triângulo fechado), em cada um dos dias 12, 14 e 16.

[00237] A FIG. 83 mostra perfis farmacocinéticos do conjugado de anticorpo CpG SB-337 DAR1 em camundongos administrados por via intravenosa ou subcutânea.

[00238] A FIG. 84 mostra perfis farmacocinéticos do conjugado de anticorpo CpG SB-337 DAR1 em camundongos administrados por via intravenosa.

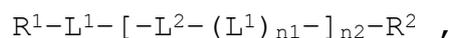
[00239] A FIG. 85 mostra perfis farmacocinéticos do conjugado de anticorpo CpG SB-337 DAR1 em camundongos administrados por via intravenosa.

[00240] A FIG. 86 mostra perfis farmacocinéticos dos conjugados de anticorpo CpG SB-337 DAR1 e SB-337 DAR2 em camundongos administrados por via intravenosa.

[00241] As FIGS. 87A e 87B mostram perfis farmacocinéticos de conjugados de anticorpo CpG em camundongos administrados por via intravenosa.

DESCRIÇÃO DETALHADA**Definições**

[00242] O termo "espaçador abásico", como aqui utilizado, representa um grupo divalente da seguinte estrutura:



(I)

em que:

n1 é 0 ou 1,

n2 é um número inteiro de 1 a 6,

R¹ representa uma ligação a um nucleosídeo no polinucleotídeo imunomodulador,

R² representa uma ligação a um nucleosídeo no polinucleotídeo imunomodulador ou a um grupo volumoso,

cada L¹ é independentemente um fosfodiéster ou um fosfotriéster, e

cada L² é um análogo do açúcar,

providenciou que,

se o espaçador não básico é um internucleosídeo, espaçador abásico, cada n1 é 1, e R² representa uma ligação a um nucleosídeo, e

se o espaçador não básico é um terminal, o espaçador abásico, cada n1 representa, independentemente, 0 ou 1, e R² representa uma ligação a um grupo terminal.

[00243] O termo "about", conforme usado aqui, representa um valor que é $\pm 10\%$ do valor recitado.

[00244] O termo "alcano-tetraoil", como usado aqui, representa um grupo de hidrocarboneto saturado de cadeia tetravalente, acíclica, de cadeia linear ou ramificada, com 1 a 16 carbonos, a menos que especificado de outra forma alcano-tetraoil pode ser opcionalmente substituído como descrito para alquilo.

[00245] O termo "alcano-trioil", como aqui utilizado, representa um grupo de hidrocarbonetos saturados trivalentes, acíclicos, de cadeia linear ou ramificada, com 1 a 16 carbonos, a menos que especificado de outra forma. Alcano-trioil pode ser opcionalmente substituído como descrito para alquil.

[00246] O termo "alcanoil", como aqui utilizado, representa hidrogénio ou um grupo alquilo que está ligado ao grupo molecular parental através de um grupo carbonil e é exemplificado por formil (isto é, um grupo carboxialdeído), acetil, propionil, butiril e *iso*- butiril. Grupos alcanoil não substituídos contêm de 1 a 7 carbonos. O grupo alcanoilo pode ser não substituído de substituído (por exemplo , alcanoil C₁₋₇ opcionalmente substituído alcanoil), tal como aqui descrito para o grupo alquilo. A terminação "-oil" pode ser adicionada a outro grupo aqui definido, por exemplo, aril, cicloalquil e heterociclil, para definir "arilil", "cicloalcanoil" e "(heterociclil) oil". Esses grupos representam um grupo carbonil ligado a aril, cicloalquil ou heterociclil, respectivamente. Cada um de "ariloil", "cicloalcanoil" e "(heterociclil) oil" pode ser opcionalmente substituído como definido para "aril", "cicloalquil" ou "heterociclil", respectivamente.

[00247] O termo "alcenil", como usado aqui, representa grupos hidrocarbonetos monovalentes acíclicos de cadeia linear ou ramificada, contendo uma, duas ou três ligações duplas carbono-carbono. Exemplos não limitativos dos grupos alcenil incluem etenil, prop-1-enil, prop-2-enil, 1-metiletetil, but-1-enil, but-2-enil, but-3-enil, 1-metilprop-1-enil, 2-metilprop-1-enil e 1-metilprop-2-enil. Grupos alquênil podem ser opcionalmente substituídos como aqui definido para alquil.

[00248] O termo "alquilenil", como usado aqui, refere-se a um grupo alcenil de cadeia linear ou ramificada com um hidrogênio removido, tornando assim este grupo divalente. Exemplos não limitativos dos grupos alquilenil incluem eten-1,1-diil; eten-1,2-diil; prop-1-en-1,1-diil; prop-2-en-1,1-diil; prop-1-en-1,2-diil; prop-1-en-1,3-diil; prop-2-en-1,1-diil; prop-2-en-1,2-diil; but-1-en-1,1-diil; but-1-en-1,2-diil; but-1-en-1,3-diil; but-1-en-1,4-diil; but-2-en-1,1-diil; but-2-en-1,2-diil; but-2-en-1,3-diil; but-2-en-1,4-diil; but-2-en-2,3-diil; but-3-en-1,1-diil; but-3-en-1,2-diil; but-3-en-1,3-diil; but-3-en-2,3-diil; buta-1,2-dien-1,1-diil; buta-1,2-dien-1,3-diil; buta-1,2-dien-1,4-diil; buta-1,3-dien-1,1-diil; buta-1,3-dien-1,2-diil; buta-1,3-dien-1,3-diil; buta-1,3-dien-1,4-diil; buta-1,3-dien-2,3-diil; buta-2,3-dien-1,1-diil; e buta-2,3-dien-1,2-diil. O grupo alquênilileno podem ser não substituídos ou substituídos (por exemplo, alquilenilileno opcionalmente substituído) como descrito para o alquilo.

[00249] O termo "alcóxi", como usado aqui, representa um substituinte químico de fórmula -OR, em que R é um grupo alquil C₁₋₆, a menos que especificado de outra forma. Em algumas formas de realização, o grupo alquil pode ser ainda mais substituído

como aqui definido. O termo "alcóxi" pode ser combinado com outros termos aqui definidos, por exemplo, aril, cicloalquil ou heterociclil, para definir um grupo "aril alcóxi", "cicloalquil alcóxi" e "(heterociclil) alcóxi". Esses grupos representam um alcóxi que é substituído por aril, cicloalquil ou heterociclil, respectivamente. Cada um dos "aril alcóxi", "cicloalquil alcóxi" e "(heterociclil) alcóxi" pode opcionalmente substituir como definido aqui para cada porção individual.

[00250] O termo "alquil", conforme usado aqui, refere-se a um grupo hidrocarboneto saturado de cadeia linear ou ramificada acíclica que, quando não substituído, possui de 1 a 12 carbonos, a menos que especificado de outra forma. Em certas formas de realização preferidas, o alquil não substituído tem de 1 a 6 carbonos. Grupos alquil são exemplificados por metil; etilo; n- e isopropilo; n-, sec-, iso- e terc-butilo; neopentil e similares, e podem ser opcionalmente substituídos, valência permitindo, com um, dois, três ou, no caso de grupos alquil de dois carbonos ou mais, quatro ou mais substituintes independentemente selecionados do grupo que consiste em: amino; arilo; ariloxi; azido; cicloalquil; cicloalcóxi; cicloalcenilo; cicloalquininilo; aréola; heterociclil; (heterociclil) oxi; hidroxil; nitro; tiol; silil; ciano; = O; = S; = NR', em que R' é H, alquil, aril ou heterociclil. Cada um dos substituintes pode ser ele próprio não substituído ou, se a valência permitir, substituído por substituintes não substituídos aqui definidos para cada grupo respectivo.

[00251] O termo "alquilamino", tal como aqui utilizado, refere-se a um grupo possuindo a fórmula $-N(R^{N1})_2$ ou NHR^{N1} , em que R^{N1} representa um grupo alquilo, como aqui definido. A porção

alquil de alquilamino pode ser opcionalmente substituída conforme definido para alquil. Cada substituinte opcional no alquilamino substituído pode ele próprio não ser substituído ou, se a valência permitir, ser substituído por substituintes não substituídos aqui definidos para cada grupo respectivo.

[00252] O termo "alquilcicloalquileno", conforme usado aqui, refere-se a um grupo hidrocarboneto divalente saturado que é um alquilcicloalcano, no qual duas valências substituem dois átomos de hidrogênio. De preferência, pelo menos uma das duas valências está presente na porção cicloalcano. As porções alcano e cicloalcano podem ser opcionalmente substituídas como grupos individuais, como aqui descrito.

[00253] O termo "alquileno", como usado aqui, refere-se a um grupo hidrocarboneto saturado divalente que é um hidrocarboneto saturado de cadeia linear ou ramificada, no qual duas valências substituem dois átomos de hidrogênio. A valência do alquileno aqui definida não inclui os substituintes opcionais. Exemplos não limitativos do grupo alquileno incluem metileno, etano-1,2-diil, etano-1,1-diil, propano-1,3-diil, propano-1,2-diil, propano-1,1-diil, propano-2,2-diil, butano-1,4-diil, butano-1,3-diil, butano-1,2-diil, butano-1,1-diil e butano-2,2-diil, butano-2,3-diilo. O termo " C_{x-y} alquileno" representa grupos alquileno tendo entre x e y carbonos. Valores exemplares para x são 1, 2, 3, 4, 5 e 6, e valores exemplares para y são 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12. O alquileno pode ser opcionalmente substituído como aqui descrito para alquil.

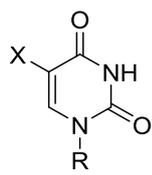
[00254] O termo "alquilsulfenil", como usado aqui, representa um grupo de fórmula $-S-(\text{alquil})$. Alquilsulfenil pode ser opcionalmente substituído como definido para alquil.

[00255] O termo "alquilsulfinil", como aqui utilizado, representa um grupo de fórmula $-S(O)-(alquil)$. Alquilsulfinil pode ser opcionalmente substituído como definido para alquil.

[00256] O termo "alquilsulfonil", como usado aqui, representa um grupo de fórmula $-S(O)_2-(alquil)$. Alquilsulfonil pode ser opcionalmente substituído como definido para alquil.

[00257] O termo "alquinil", conforme usado aqui, representa grupos hidrocarbonetos monovalentes de cadeia linear ou ramificada de dois a seis átomos de carbono contendo pelo menos uma ligação tripla carbono-carbono e é exemplificado por etinil, 1-propinil e semelhantes. Os grupos alcinil podem ser não substituídos ou substituídos (por exemplo, alcinil opcionalmente substituído) como definido para alquil.

[00258] O termo "5-alciniluridina", como usado aqui, representa um nucleosídeo, no qual a nucleobase é 5-alciniluracil da seguinte estrutura:



, em que R é uma ligação ao carbono anomérico da pentafuranose do nucleosídeo e X é alquinil. Em algumas formas de realização, X é etinil ou propinil (por exemplo, X é etinil).

[00259] O termo "alcinileno", como usado aqui, refere-se a um substituinte divalente de cadeia linear ou cadeia ramificada, incluindo uma ou duas ligações triplas carbono-carbono e contendo apenas C e H quando não substituído. Exemplos não limitativos dos grupos alcinileno incluem etin-1,2-diil; prop-1-in-1,3-diilo; prop-2-in-1,1-diilo; but-1-in-1,3-diilo; but-1-in-1,4-diilo; but-2-in-1,1-diilo; but-2-in-1,4-diilo; but-3-in-

1,1-diilo; but-3-in-1,2-diilo; but-3-in-2,2-diilo; e buta-1,3-diin-1,4-diil. O grupo alcinileno pode ser não substituído ou substituído (por ex., Alcinileno opcionalmente substituído) tal como descrito para os grupos alcinilo.

[00260] O termo "amino", conforme usado aqui, representa $-N(R^{N1})_2$, onde, se o amino não é substituído, ambos os R^{N1} são H; ou, se de amino é substituído, cada R^{N1} é, independentemente, H, $-OH$, $-NO_2$, $-N(R^{N2})_2$, $-SO_2OR^{N2}$, $-SO_2R^{N2}$, $-SOR^{N2}$, $-COOR^{N2}$, um grupo *N*-protetor, alquil, alquenil, alcinil, alcóxi, aril, arilalquil, ariloxi, cicloalquil, cicloalcenil, heteroalquil ou heterociclil, desde que pelo menos um R^{N1} não seja H e onde cada R^{N2} seja independentemente H, alquil, ou aril. Cada um dos substituintes pode ele próprio não ser substituído ou substituído por substituintes não substituídos aqui definidos para cada grupo respectivo. Em algumas formas de realização, amino é amino não substituído (isto é, $-NH_2$) ou amino substituído (por exemplo, $-NHR^{N1}$), em que R^{N1} representa, independentemente, $-OH$, $-SO_2OR^{N2}$, $-SO_2R^{N2}$, $-SOR^{N2}$, $-COOR^{N2}$, alquil opcionalmente substituído ou aril opcionalmente substituído, e cada R^{N2} pode ser alquil opcionalmente substituído ou aril opcionalmente substituído. Em algumas formas de realização, amino substituído pode ser alquilamino, no qual os grupos alquil são opcionalmente substituídos, como aqui descrito, por alquil. Em certas formas de realização, um grupo amino é $-NHR^{N1}$, no qual R^{N1} é alquil opcionalmente substituído. Exemplos não limitativos de $-NHR^{N1}$, nos quais R^{N1} é alquil opcionalmente substituído, incluem: alquilamino opcionalmente substituído, um aminoácido proteogênico, um aminoácido não proteogênico, um éster alquil

C₁₋₆ de um aminoácido proteogênico e um éster alquil C₁₋₆ de um aminoácido não proteogênico.

[00261] O termo "aminoalquil", como usado aqui, representa um alquil substituído com um, dois ou três grupos amino, conforme aqui definido. O aminoalquil pode ainda ser opcionalmente substituído como descrito para grupos alquil.

[00262] O termo "areno-tetraal", como usado aqui, representa um grupo tetravalente que é um grupo aril, no qual três átomos de hidrogênio são substituídos por valências. O areno-tetraalilo pode ser opcionalmente substituído, como aqui descrito, para arilo.

[00263] O termo "aril", como usado aqui, representa um sistema de anel carbocíclico mono-, bicíclico ou multicíclico com um ou dois anéis aromáticos. O grupo aril pode incluir de 6 a 10 átomos de carbono. Todos os átomos dentro de um grupo aril carbocíclico não substituído são átomos de carbono. Exemplos não limitativos de grupos aril carbocíclicos incluem fenil, naftil, 1,2-dihidronaftil, 1,2,3,4-tetra-hidronaftil, fluorenil, indanil, indenil, etc. O grupo aril pode ser não substituído ou substituído por um, dois, três, quatro ou cinco substituintes selecionados independentemente do grupo que consiste em: alquil; alcenilo; alcinilo; alcóxi; alquilsulfinil; alquilsulfenilo; alquilsulfonilo; amino; aril; ariloxi; azido; cicloalquil; cicloalcóxi; cicloalcenilo; cicloalquininilo; aréola; heteroalquil; heterociclílico; (heterociclílico) oxi; hidroxil; nitro; tiol; silil; e ciano. Cada um dos substituintes pode ele próprio não ser substituído ou substituído por substituintes não substituídos aqui definidos para cada grupo respectivo.

[00264] O termo "arilalquil", como usado aqui, representa um grupo alquil substituído por um grupo aril. As porções aril e alquil podem ser opcionalmente substituídas como grupos individuais, como aqui descritos.

[00265] O termo "aril alquilenos", como usado aqui, representa um grupo aril alquil, no qual um átomo de hidrogênio é substituído por uma valência. O aril alquilenos pode ser opcionalmente substituído, como aqui descrito, por aril alquil.

[00266] O termo "arileno", como usado aqui, representa um grupo aril, no qual um átomo de hidrogênio é substituído por uma valência. O arileno pode ser opcionalmente substituído, como aqui descrito, por aril.

[00267] O termo "ariloxi", conforme usado aqui, representa um substituinte químico de fórmula -OR, em que R é um grupo aril, a menos que especificado de outra forma. No ariloxi opcionalmente substituído, o grupo aril é opcionalmente substituído como descrito aqui para aril.

[00268] O termo "fração auxiliar", como aqui utilizado, representa um grupo monovalente contendo um polímero hidrofílico, um polímero carregado positivamente ou um álcool de açúcar.

[00269] O termo "N opcionalmente substituído", como aqui utilizado, representa um grupo -N (R^{N1}) divalente ou um grupo -N=trivalente. O grupo aza pode ser não substituído, onde R^{N1} é H ou ausente, ou substituído, onde R^{N1} é como definido para "amino", exceto R^{N1} não é H. Dois grupos de aza podem ser conectados para formar "diaza".

[00270] O termo "amino protegido com N opcionalmente substituído", como usado aqui, representa amino substituído, como aqui definido, no qual pelo menos um substituinte é um grupo protetor de N e o outro substituinte é H, se amino protegido com N é não substituído, ou um substituinte diferente de H, se o amino protegido em N for substituído.

[00271] O termo "azido", tal como aqui utilizado, representa um grupo $-N_3$ grupo.

[00272] O termo "grupo volumoso", conforme usado aqui, representa qualquer substituinte ou grupo de substituintes conforme definido aqui, em que a ligação radical ao dissulfeto é um átomo de carbono que carrega um átomo de hidrogênio ou menos se o radical é sp^3 - hibridado carbono ou suporta nenhum átomo de hidrogênio se o radical é sp^2 com hibridação de carbono. O radical não é carbono hibridado com sp . O grupo volumoso se liga ao dissulfeto apenas através de um átomo de carbono.

[00273] O termo "5'-5'cap", como usado aqui, representa um grupo de fórmula $R'-Nuc^1-O-(L^P)_n-$, em que R' é fosfato, fosforotioato, fosforoditioato, fosfotriéster, fosfodiéster, hidroxil ou hidrogênio; Nuc^1 é um nucleosídeo; cada L^P é independentemente $-P(=X^{E1}) (-X^{E2} -R^{E2A})-O-$; e n é 1, 2 ou 3;

onde cada X^{E1} e cada X^{E2} é independentemente O ou S, e cada R^{E2A} é independentemente hidrogênio, um grupo bioreversível, um grupo não bioreversível, uma fração auxiliar, um grupo conjugador, um grupo conjugador, um ligante ligado a uma fração alvo ou um ligante ligado a uma porção de direcionamento e uma ou mais (por exemplo, 1 a 6) porções auxiliares; e

onde R' está ligado ao carbono 3' do nucleosídeo e -O- está ligado ao carbono 5' do nucleosídeo.

[00274] O termo "grupo de proteção", conforme aqui utilizado, representa um grupo monovalente ou divalente situado no terminal 5' ou 3' de um polinucleotídeo. O grupo de nivelamento é um fosfoéster terminal; difosfato; trifosfato; uma porção auxiliar; um grupo bioreversível; um grupo não bioreversível; Cap 5' (por exemplo, cap 5'-5'); suporte sólido; um ligante ligado a uma porção de direcionamento e opcionalmente a uma ou mais (por exemplo, 1 a 6) porções auxiliares; ou um grupo -OR' onde R' é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogénio, um grupo Bioreversível, grupo não-bioreversível, suporte sólido, e O grupo protetor. Grupo-OR', difosfato, trifosfato, grupo bioreversível, grupo não bioreversível, suporte sólido e fração auxiliar são exemplos de grupos de fixação monovalentes. Um fosfoéster terminal é um exemplo de um grupo volumoso que pode ser monovalente, se o fosfoéster terminal não incluir um ligante a uma porção de direcionamento ou divalente, se o fosfoéster terminal incluir um ligante a uma porção de direcionamento. Um ligante ligado a uma porção de direcionamento (com nossa porção sem partes auxiliares) é um exemplo de um grupo de limitação divalente.

[00275] O termo "carbocíclico", como aqui utilizado, representa uma estrutura monocíclica, bicíclica ou tricíclica C₃₋₁₆ opcionalmente substituída, na qual os anéis, que podem ser aromáticos ou não aromáticos, são formados por átomos de carbono. As estruturas carbocíclicas incluem cicloalquil, cicloalcenil, cicloalquinil e certos grupos aril.

[00276] O termo "carbonil", conforme usado aqui, representa um grupo $-C(O)-$.

[00277] A expressão " C_{x-y} ", como aqui utilizada, indica que o grupo, cujo nome segue imediatamente a expressão, quando não substituído, contém um total de x a y átomos de carbono. Se o grupo for um grupo composto (por exemplo, aril alquil), C_{x-y} indica que a porção cujo nome segue imediatamente a expressão, quando não substituída, contém um total de x a y átomos de carbono. Por exemplo, $(C_{6-10}\text{-aril})-C_{1-6}\text{-alquil}$ é um grupo no qual a porção aril, quando não substituída, contém um total de 6 a 10 átomos de carbono e a porção alquila, quando não substituída, contém um total de 1 a 6 átomos de carbono.

[00278] O termo "ciano", como usado aqui, representa o grupo $-CN$.

[00279] O termo "reação de cicloadição", conforme usado aqui, representa a reação de dois componentes nos quais um total de $[4n+2]$ π elétrons estão envolvidos na formação de ligações quando não há ativação, ativação por um catalisador químico ou ativação usando energia térmica, e n é 1, 2 ou 3. Uma reação de cicloadição também é uma reação de dois componentes nos quais $[4n]$ π elétrons estão envolvidos, há ativação fotoquímica e n é 1, 2 ou 3. Desejavelmente, elétrons $[4n+2]$ π estão envolvidos na formação das ligações, e $n=1$. As reações representativas de cicloadição incluem a reação de um alceno com um 1,3-dieno (reação de Diels-Alder), a reação de um alceno com um carbonil α, β -insaturado (reação hetero de Diels-Alder) e a reação de um alceno com um composto azido (por exemplo, cicloadição de Huisgen).

[00280] O termo "cicloalcenilo", tal como aqui utilizado, refere-se a um grupo carbocíclico aromático possuindo pelo menos uma ligação dupla no anel e comportando de três a dez átomos de carbono (por ex., Um grupo C₃-C₁₀, cicloalcenilo), a menos especificado de outra forma. Exemplos não limitativos de cicloalquênil incluem cicloprop-1-enil, cicloprop-2-enil, ciclobut-1-enil, ciclobut-2-enil, ciclopent-1-enil, ciclopent-2-enil, ciclopent-3-enil, norbornen-1-il, norbornen-2-il, norbornen-5-il e norbornen-7-il. O grupo cicloalcenilo pode ser não substituído ou substituído (por ex., cicloalcenilo opcionalmente substituído) como descrito para cicloalquilo.

[00281] O termo "cicloalcenilalquil", como usado aqui, representa um grupo alquil substituído por um grupo cicloalcenil, cada um como aqui definido. As porções cicloalcenil e alquil podem ser substituídas como os grupos individuais aqui definidos.

[00282] O termo "cicloalquileno", como usado aqui, representa um grupo divalente que é um grupo cicloalcenil, no qual um átomo de hidrogênio é substituído por uma valência. O cicloalquileno pode ser opcionalmente substituído como aqui descrito para cicloalquil. Um exemplo não limitativo de cicloalquileno é cicloalceno-1,3-diil.

[00283] O termo "cicloalcóxi", como usado aqui, representa um substituinte químico de fórmula -OR, em que R é um grupo cicloalquil, a menos que especificado de outra forma. Em algumas formas de realização, o grupo cicloalquil pode ser ainda mais substituído como aqui definido.

[00284] O termo "cicloalquilo", tal como aqui utilizado, refere-se a um grupo alquilo cíclico possuindo de três a dez átomos de carbono (por ex., um grupo C₃-C₁₀cicloalquilo), a menos que especificado de outra forma. Os grupos cicloalquil podem ser monocíclicos ou bicíclicos. Grupos cicloalquil bicíclicos podem ser do tipo biciclo [pq0] alquil, em que cada um de p e q é, independentemente, 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7, desde que a soma de p e q seja 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8. Alternativamente, os grupos cicloalquil bicíclicos podem incluir estruturas de cicloalquil em ponte, por exemplo, biciclo [pqr] alquil, em que r é 1, 2 ou 3, cada um de p e q é, independentemente, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6, desde que a soma de p, q e r é 3, 4, 5, 6, 7 ou 8. O grupo cicloalquil pode ser um grupo espirocíclico, por exemplo, espiro [pq] alquil, em que cada um de p e q é, independentemente, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7, desde que a soma de p e q seja 4, 5, 6, 7, 8, ou 9. Exemplos não limitativos de cicloalquil incluem ciclopropil, ciclobutil, ciclopentil, ciclo-hexil, ciclo-heptil, 1-biciclo [2.2.1.] heptil, 2-biciclo [2.2.1.] heptil, 5-biciclo [2.2.1.] heptil, 7-biciclo [2.2.1.] heptil e decalinil. O grupo cicloalquil pode estar não substituído ou substituído (por ex. com um, dois, três, quatro ou cinco substituintes selecionados independentemente de entre o grupo que consiste em, cicloalquilo opcionalmente substituído): alquilo; alcenilo; alcinilo; alcóxi; alquilsulfinil; alquilsulfenilo; alquilsulfonilo; amino; arilo; ariloxi; azido; cicloalquil; cicloalcóxi; cicloalcenilo; cicloalquininilo; aréola; heteroalquil; heterociclil; (heterociclil)oxi; hidroxil; nitro; tiol; silil; ciano; =O; =S; =NR', em que R' é H, alquil, aril ou heterociclil. Cada um dos substituintes pode ele próprio não ser substituído ou

substituído por substituintes não substituídos aqui definidos para cada grupo respectivo.

[00285] O termo "cicloalquil alquil", como usado aqui, representa um grupo alquil substituído por um grupo cicloalquil, cada um como aqui definido. As porções cicloalquil e alquil podem ser opcionalmente substituídas como os grupos individuais aqui descritos.

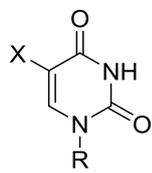
[00286] O termo "cicloalquilenos", como usado aqui, representa um grupo divalente que é um grupo cicloalquil, no qual um átomo de hidrogênio é substituído por uma valência. Um exemplo não limitativo de cicloalquilenos é cicloalcano-1,3-diil. Cicloalquilenos pode ser opcionalmente substituído como aqui descrito para cicloalquil.

[00287] O termo "cicloalquinil", como usado aqui, refere-se a um grupo carbocíclico monovalente tendo uma ou duas ligações triplas carbono-carbono e tendo de oito a doze carbonos, a menos que especificado de outra forma. Cicloalquinil pode incluir uma ligação ou ponte transanular. Exemplos não limitativos de cicloalquinil incluem ciclooctinil, ciclonoínil, ciclodecínil e ciclodecadiínil. O grupo cicloalquinil pode ser não substituído ou substituído (por exemplo, cicloalquinil opcionalmente substituído) como definido para cicloalquil.

[00288] O termo "grupo di-hidropiridazina", como usado aqui, representa um grupo divalente que pode ser obtido por meio de cicloadição entre o grupo 1,2,4,5-tetrazina e um cicloalcenil estirado.

[00289] O termo "halo", como usado aqui, representa um halogênio selecionado a partir de bromo, cloro, iodo e flúor.

[00290] O termo "5-halouridina", como usado aqui, representa um nucleosídeo, no qual a nucleobase é 5-halouracil da seguinte estrutura:



, em que R é uma ligação ao carbono anomérico da pentafuranose do nucleosídeo e X é fluoro, cloro, bromo, iodo. Em algumas formas de realização, X é bromo ou iodo.

[00291] O termo "heteroalcano-tetralil", como aqui utilizado, refere-se a um grupo alcano-tetralil interrompido uma vez por um heteroátomo; duas vezes, cada vez, independentemente, por um heteroátomo; três vezes, cada vez, independentemente, por um heteroátomo; ou quatro vezes, cada vez, independentemente, por um heteroátomo. Cada heteroátomo é, independentemente, O, N ou S. Em algumas formas de realização, o heteroátomo é O ou N. Um heteroalcano-tetralil não substituído C_{x-y} contém de X a Y átomos de carbono, bem como os heteroátomos, conforme aqui definido. O grupo heteroalcano-tetralil pode ser não substituído ou substituído (por exemplo, heteroalcano-tetralil opcionalmente substituído), como descrito para heteroalquil.

[00292] O termo "heteroalcano-triil", como aqui utilizado, refere-se a um grupo alcano-triil interrompido uma vez por um heteroátomo; duas vezes, cada vez, independentemente, por um heteroátomo; três vezes, cada vez, independentemente, por um heteroátomo; ou quatro vezes, cada vez, independentemente, por um heteroátomo. Cada heteroátomo é, independentemente, O, N ou S. Em algumas formas de realização, o heteroátomo é O ou N. Um C_{x-y} heteroalcano-triil não substituído contém de X a Y átomos de carbono, bem como os heteroátomos como aqui definidos. O grupo

heteroalcano-triil pode ser não substituído ou substituído (por exemplo, heteroalcano-triil opcionalmente substituído), como descrito para o heteroalquil.

[00293] O termo "heteroalquil", conforme aqui utilizado, refere-se a um grupo alquil, alcenil ou alcinil interrompido uma vez por um ou dois heteroátomos; duas vezes, de cada vez, independentemente, por um ou dois heteroátomos; três vezes, cada vez, independentemente, por um ou dois heteroátomos; ou quatro vezes, cada vez, independentemente, por um ou dois heteroátomos. Cada heteroátomo é, independentemente, O, N ou S. Em algumas formas de realização, o heteroátomo é O ou N. Nenhum dos grupos heteroalquil inclui dois átomos de oxigênio ou enxofre contíguos. O grupo heteroalquil pode ser não substituído ou substituído (por exemplo, heteroalquil opcionalmente substituído). Quando o heteroalquil é substituído e o substituinte está ligado ao heteroátomo, o substituinte é selecionado de acordo com a natureza e a valência do heteroátomo. Assim, o substituinte ligado ao heteroátomo, valência o permitam, é selecionado a partir do grupo que consiste em =O, -N(R^{N2})₂, -SO₂OR^{N3}, -SO₂R^{N2}, -SOR^{N3}, -COOR^{N3}, um grupo N - protetor, alquil, alquenil, alcinil, aril, cicloalquil, cicloalcenil, cicloalquinil, heterociclil ou ciano, em que cada R^{N2} é independentemente H, alquil, cicloalquil, cicloalcenil, cicloalquinil, aril ou heterociclil e cada R^{N3} é independentemente alquil, cicloalquil, cicloalcenil, cicloalquinil, aril ou heterociclil. Cada um desses substituintes pode ser ele próprio não substituído ou substituído por substituintes não substituídos aqui definidos para cada grupo respectivo. Quando heteroalquil é substituído e

o substituinte está ligado ao carbono, o substituinte é selecionado dentre os descritos para o alquil, desde que o substituinte no átomo de carbono ligado ao heteroátomo não seja Cl, Br ou I. Entende-se que os átomos de carbono são encontrados nos terminais de um grupo heteroalquil.

[00294] O termo "heteroariloxi", conforme usado aqui, refere-se a uma estrutura -OR, na qual R é heteroaril. O heteroariloxi pode ser opcionalmente substituído como definido para heterociclil.

[00295] O termo "heterociclil", conforme usado aqui, representa um sistema de anel monocíclico, bicíclico, tricíclico ou tetracíclico que possui anéis fundidos ou em ponte de 5, 6, 7 ou 8 membros, a menos que especificado de outra forma, contendo um, dois, três ou quatro heteroátomos selecionados independentemente do grupo que consiste em nitrogênio, oxigênio e enxofre. O heterociclil pode ser aromático ou não aromático. O heterociclil de 5 membros não aromático possui zero ou uma ligação dupla, os grupos heterociclil de 6 e 7 membros não aromáticos têm de zero a duas ligações duplas e os grupos heterociclil de 8 membros não aromáticos têm de zero a duas ligações duplas e/ou zero ou uma ligação tripla carbono-carbono. Grupos heterociclil incluem de 1 a 16 átomos de carbono, a menos que especificado de outra forma. Certos grupos heterociclil podem incluir até 9 átomos de carbono. Grupos heterociclil não aromáticos incluem pirrolinil, pirrolidinil, pirazolinil, pirazolidinil, imidazolinil, imidazolidinil, piperidinil, homopiperidinil, piperazinil, piridazinil, oxazolidinil, isoxazolidinil, morfolinil, tiomorfolinil, tiazolidinil, isotiazolidinil, tiazolidinilo, tetra-hidrofuranilo, di-

hidrofurano, tetra-hidrotienil, di-hidrotienil, di-hidroindolil, tetra-hidroquinolil, tetra-hidroisoquinolil, piranil, di-hidropiranil, ditiazolil, etc Se o sistema de anel heterocíclico tem pelo menos uma estrutura de ressonância aromática ou, pelo menos, um tautômero aromático, tal estrutura é um heterocíclico aromático (isto é , heteroarilo). Exemplos não limitativos de grupos heteroaril incluem benzimidazolil, benzofuril, benzotiazolil, benzotienil, benzoxazolil, furil, imidazolil, indolil, isoindazolil, isoquinolinil, isotiazolil, isotiazolil, isoxazolil, oxidazolil, piridazolil, pirazolil, quinolinil, tiadiazolil (por exemplo , 1,3,4-tiadiazole), tiazolil, tienil, triazolil, tetrazolil, etc. O termo "heterocíclico" também representa um composto heterocíclico possuindo uma estrutura multicíclico em ponte em que um ou mais átomos de carbono e/ou heteroátomos liga dois membros não adjacentes de um anel monocíclico, por exemplo, quinuclidina, tropanos ou diaza-biciclo [2.2.2] octano. O termo "heterociclil" inclui grupos bicíclicos, tricíclicos e tetracíclicos nos quais qualquer um dos anéis heterocíclicos acima é fundido com um, dois ou três anéis carbocíclicos, por exemplo . , um anel aril, um anel ciclohexano, um anel ciclohexeno, um anel ciclopentano, um anel ciclopenteno ou outro anel heterocíclico monocíclico. Exemplos de heterocíclicos fundidos incluem 1,2,3,5,8,8a-hexa-hidroindolizina; 2,3-di-hidrobenzofurano; 2,3-di-hidroindol; e 2,3-di-hidrobenzotiofeno. O grupo heterociclil pode ser não substituído ou substituído por um, dois, três, quatro ou cinco substituintes selecionados independentemente do grupo que consiste em: alquil; alcenil; alcinilo; alcóxi; alquilsulfinil; alquilsulfenil; alquilsulfonil; amino; aril; ariloxi; azido;

cicloalquil; cicloalcóxi; cicloalcenil; cicloalquininil; aréola; heteroalquil; heterociclilo; (heterociclil) oxi; hidroxi; nitro; tiol; silil; ciano; = O; = S; = NR', em que R' é H, alquil, aril ou heterociclil. Cada um dos substituintes pode ele próprio não ser substituído ou substituído por substituintes não substituídos aqui definidos para cada grupo respectivo.

[00296] O termo "heterociclilalquil", como usado aqui, representa um grupo alquil substituído por um grupo heterociclil, cada um como aqui definido. As porções heterociclil e alquil podem ser opcionalmente substituídas como os grupos individuais aqui descritos.

[00297] O termo "(heterociclil) aza", conforme usado aqui, representa um substituinte químico da fórmula $-N(R^{N1})(R^{N2})$, em que R^{N1} é um grupo heterociclil e R^{N2} é H, -OH, -NO₂, -N(R^{N2})₂, -SO₂OR^{N2}, -SO₂R^{N2}, -SOR^{N2}, -COOR^{N2}, uma N-protetor do grupo, alquil, alcenil, alcinil, alcóxi, aril, arilalquil, ariloxi, cicloalquil, cicloalcenil, heteroalquil ou heterociclil. De preferência, R^{N2} é H.

[00298] O termo "heterociclileno", como usado aqui, representa um grupo heterociclil, no qual um átomo de hidrogênio é substituído por uma valência. O heterociclileno pode ser opcionalmente substituído de uma maneira descrita para heterociclil. Um exemplo não limitativo de heterociclileno é o heterociclo-1,3-diil.

[00299] O termo "(heterociclil) oxi", conforme usado aqui, representa um substituinte químico da fórmula -OR, em que R é um grupo heterociclil, a menos que especificado de outra forma.

(Heterociclíil) oxi pode ser opcionalmente substituído de uma maneira descrita para heterociclíil.

[00300] Os termos "hidroxil" e "hidroxi", como aqui utilizados de forma intercambiável, representam um grupo -OH.

[00301] O termo "polinucleotídeo imunomodulador", tal como aqui utilizado, representa uma construção polinucleotídica contendo um total de 6 a 50 nucleosídeos contíguos ligados covalentemente entre si por grupos de ligação internucleosídicos selecionados independentemente do grupo que consiste em fosfoésteres internucleosídeos e, opcionalmente, espaçadores abásicos internucleosídicos. Os polinucleotídeos imunomoduladores são tapados nos terminais 5'e 3' com grupos 5'e 3', respectivamente. Os polinucleotídeos imunomodulados são capazes de modular uma resposta imune inata, conforme determinado por, por exemplo, uma alteração na ativação de NFκB ou uma alteração na secreção de pelo menos uma citocina inflamatória ou pelo menos um interferon tipo I em uma célula apresentadora de antígeno ao qual um polinucleotídeo imunomodulador foi entregue (por exemplo, em comparação com outra célula apresentadora de antígeno na qual um polinucleotídeo imunomodulador não foi entregue). O polinucleotídeo imunomodulador pode conter um grupo conjugador ou, se o polinucleotídeo imunomodulador fizer parte de um conjugado, um ligante ligado a uma porção de direcionamento e opcionalmente a uma ou mais (por exemplo, 1 a 6) porções auxiliares (por exemplo, polietileno glicóis). O grupo conjugador ou o ligante pode ser parte do fosfotriéster ou do grupo volumoso terminal.

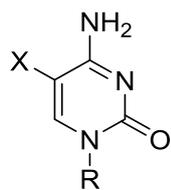
[00302] O termo "polinucleotídeo imunoestimulador", conforme usado aqui, representa um polinucleotídeo imunomodulador capaz de ativar uma resposta imune inata, conforme determinado por, por exemplo, um aumento na ativação de NFκB ou um aumento na secreção de pelo menos uma citocina inflamatória ou pelo menos um interferon do tipo I em uma célula apresentadora de antígeno na qual um polinucleotídeo imunoestimulador foi entregue (por exemplo, em comparação com outra célula apresentadora de antígeno na qual um polinucleotídeo imunoestimulador não foi entregue). Em algumas formas de realização, o polinucleotídeo imunoestimulador contém pelo menos uma sequência de citidina-p-guanosina (CpG), na qual p é um fosfodiéster internucleosídeo (por exemplo, fosfato ou fosforotioato) ou um fosfotriéster ou fosfotiotriéster internucleosídeo. Como aqui utilizado, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG pode existir naturalmente, como CDNs ODNs de origem bacteriana ou viral, ou sintéticos. Por exemplo, em algumas formas de realização, a sequência CpG no polinucleotídeo imunoestimulador contém 2'-desoxirribose. Em algumas formas de realização, a sequência de CpG no polinucleotídeo imunoestimulador não é metilada. Em algumas formas de realização, o polinucleotídeo imunoestimulador é um oligonucleotídeo de Fórmula (A), como aqui fornecido. Em algumas formas de realização, o polinucleotídeo imunoestimulador é composto da Fórmula (B) como aqui fornecido.

[00303] O termo "polinucleotídeo imunossupressor", conforme usado aqui, representa um polinucleotídeo imunomodulador capaz de antagonizar uma resposta imune inata, conforme determinado por, por exemplo, uma redução na ativação de NFκB ou uma redução na secreção de pelo menos uma citocina inflamatória ou pelo menos

um interferon do tipo I em uma célula apresentadora de antígeno na qual um polinucleotídeo imunossupressor foi entregue (por exemplo, em comparação com outra célula apresentadora de antígeno na qual um polinucleotídeo imunossupressor não foi entregue).

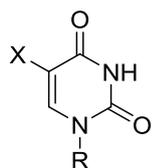
[00304] O termo "grupo de ligação internucleosídeo", como usado aqui, representa um fosfoéster internucleosídeo ou um espaçador básico internucleosídeo.

[00305] O termo "citidina 5 modificada", como usado aqui representa um nucleotídeo, no qual a nucleobase possui a seguinte estrutura:



, em que R é uma ligação ao carbono anomérico da pentafuranose do nucleotídeo e X é halogênio, alcenil, alcenil, alquil, cicloalquil, heterociclil ou aril. Em algumas formas de realização, a citidina 5 modificada é a 5-halo citidina (por exemplo, 5-iodo citidina ou 5-bromo citidina). Em outras formas de realização, a citidina 5 modificada é a 5-alcenil citidina.

[00306] O termo "uridina modificada em 5", conforme usado neste documento, representa um nucleotídeo, no qual a nucleobase possui a seguinte estrutura:



, em que R é uma ligação ao carbono anomérico da pentafuranose do nucleotídeo e X é halogênio, alquil, alcenil, alcenil, cicloalquil, heterociclil ou aril, desde que a uridina 5 modificada não seja timidina. Em algumas formas de realização,

a uridina modificada em 5 é 5-halouridina (por exemplo, 5-iodouridina ou 5-bromouridina). Em outras formas de realização, a uridina modificada em 5 é a 5-alcinil uridina. Em algumas formas de realização, a uridina modificada em 5 é um nucleotídeo contendo 2-desoxirribose.

[00307] O termo "nitro", tal como aqui utilizado, representa um -NO₂ grupo.

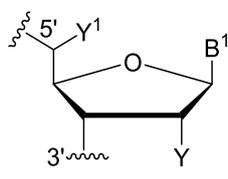
[00308] O termo "não bioreversível", conforme usado neste documento, refere-se a um grupo químico que é resistente à degradação sob condições existentes dentro de um endossoma. Grupos não bioreversíveis não contêm tioésteres e/ou dissulfetos.

[00309] O termo "nucleobase", como usado aqui, representa um anel heterocíclico contendo nitrogênio ligado à posição 1 'da fração de açúcar de um nucleotídeo ou nucleotídeo. As nucleobases podem ser não modificadas ou modificadas. Conforme usado aqui, as nucleobases "não modificadas" ou "naturais" incluem as bases de purina adenina (A) e guanina (G) e as bases de pirimidina timina (T), citosina (C) e uracilo (U). As nucleobases modificadas incluem outras nucleobases sintéticas e naturais, como 5-metilcitosina (5-me-C ou m5c), 5-hidroximetil-citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metil e outros derivados alquilados de adenina e guanina, 2-propil e outros derivados alquil da adenina e guanina, 2-tiouracil, 2-tiotimina e 2-tiocitosina, 5- halouracil e citosina, 5-propinil uracil e citosina, 6-azo uracil, 6-azo uracil, citosina e timina, 5-uracil (pseudouracil) , 4-tiouracil, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquil, 8-hidroxil e outras adeninas e guaninas 8 substituídas, 5-halo particularmente 5-iodo, 5-bromo, 5-

trifluorometil e outros Uracilos e citosinas 5-substituídos, 5-alcinil (por exemplo, 5-etinil) uracil, 5-acetamido-uracil, 7-metilguanina e 7-metiladenina, 8-azaguanina e 8-azaadenina, 7-desazaguanina e 7-deazaadenina e 3-deazaguanina e 3-desazaadenina. Nucleobases adicionais incluem as divulgadas na Pat. No. 3.687.808; os divulgados na *The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering*, páginas 858-859, Kroschwitz, JI, ed. John Wiley & Sons, 1990; os divulgados por Englisch *et.al.*, *Angewandte Chemie, International Edition*, 1991, 30, 613; e os divulgados por Sanghvi, Y. S., capítulo 15, *Antisense Research and Applications*, páginas 289 302 (Crooke *et.al.*, ed., CRC Press, 1993). Certas nucleobases são particularmente úteis para aumentar a afinidade de ligação dos polinucleotídeos hibridados da invenção, incluindo pirimidinas 5-substituídas, 6-azapirimidinas e purinas substituídas em N-2, N-6 e O-6, incluindo 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracil e 5-propinilcitosina. Foi demonstrado que as substituições de 5-metilcitosina aumentam a estabilidade do duplex de ácido nucleico em 0,6-1,2 °C (Sanghvi et al. , Eds., *Antisense Research and Applications* 1993, CRC Press, Boca} Raton, páginas 276-278). Estes podem ser combinados, em formas de realização particulares, com modificações de açúcar 2'-O-metoxietil. As patentes dos Estados Unidos que ensinam a preparação de algumas dessas nucleobases modificadas, bem como outras nucleobases modificadas, incluem, mas não estão limitadas a, as patentes US 3.687.808 mencionadas acima; 4.845.205; 5.130.302; 5.134.066; 5.175.273; 5.367.066; 5.432,272; 5.457.187; 5.459.255; 5.484.908; 5.502,177; 5.525.711; 5.552.540; 5.587.469; 5.594.121; 5.596.091; 5.614.617; e 5.681.941. Para os fins desta

divulgação, "nucleobases modificadas", como aqui utilizado, representa ainda nucleobases, naturais ou não naturais, que incluem um ou mais grupos de proteção, como aqui descrito.

[00310] O termo "nucleotídeo", como usado aqui, representa uma combinação de pentafuranose-nucleobase. O pentafuranose é 2-desoxirribose ou uma sua versão modificada, na qual a posição 2 é substituída com OR, R, halo (por exemplo, F), SH, SR, NH₂, NHR, NR₂ ou CN, em que R representa um C₁₋₆ alquil opcionalmente substituído (por exemplo, C₁₋₆alquil ou (C₁₋₆ alcóxi)-C₁₋₆-alquil) ou opcionalmente substituído (C₆₋₁₄ aril)-C₁₋₄-alquil. Em certas formas de realização, a posição 2 é substituída por OR ou F, em que R é alquil C₁₋₆ ou (alcóxiC₁₋₆)-alquil C₁₋₆. A pentafuranose está ligada a uma nucleobase no carbono anomérico. Em algumas formas de realização, o termo "nucleotídeo" refere-se a um grupo divalente com a seguinte estrutura:



, em que B¹ é uma nucleobase; Y é H, halogênio (por exemplo, F), hidroxil, alcóxi C₁₋₆ opcionalmente substituído (por exemplo, metóxi ou metóxi-tóxi) ou um grupo hidroxila protegido; Y¹ representa H ou C₁₋₆ alquil (por exemplo, metil); e cada um dos 3'e 5' indica a posição de um vínculo com outro grupo.

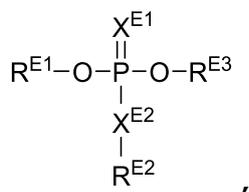
[00311] O termo "nucleotídeo", conforme usado aqui, refere-se a um nucleotídeo que está ligado a um fosfato, fosforotioato ou fosforoditioato.

[00312] O termo "oxo", como aqui utilizado, representa um átomo de oxigênio bivalente (por ex., a estrutura de oxo pode ser mostrado como =O).

[00313] O termo "paciente", como aqui utilizado, representa um animal humano ou não-humano (por ex., um mamífero). Em algumas formas de realização, o sujeito pode estar sofrendo de um tumor (por exemplo, um tumor líquido ou um tumor sólido), conforme determinado por um profissional qualificado (por exemplo, um médico ou um enfermeiro) com ou sem conhecimento na técnica de teste de laboratório (s) de amostra(s) do paciente.

[00314] O termo "Ph", como usado aqui, representa fenil.

[00315] O termo "fosfoéster", como usado aqui, representa um grupo que contém um fosfato, fosforotioato ou fosforoditioato, no qual, pelo menos uma valência é covalentemente ligada a um substituinte não hidrogênio, desde que pelo menos um não hidrogênio substituinte é um grupo contendo pelo menos um nucleotídeo. Um fosfoéster, no qual uma e apenas uma valência está covalentemente ligada a um grupo contendo um nucleotídeo, é um fosfoéster terminal. Um fosfoéster, no qual duas valências estão covalentemente ligadas a grupos contendo nucleotídeo, é um fosfoéster internucleosídeo. Um fosfoéster pode ser um grupo da seguinte estrutura:



Onde

cada um dos X^{E1} e X^{E2} é independentemente O ou S;

cada ou R^{E1} e R^{E3} é independentemente hidrogênio ou uma ligação a um nucleotídeo; um análogo de açúcar de um espaçador abásico; um grupo bioreversível; um grupo não bioreversível; uma

porção auxiliar; um grupo conjugador; um ligante ligado a uma fração alvo; um ligante ligado a uma porção de direcionamento e uma ou mais (por exemplo, 1 a 6) porções auxiliares; ou o átomo de fósforo em um grupo de fórmula $-P(=X^{E1}) (-X^{E2}-R^{E2A})-O-$,

em que R^{E2A} é hidrogênio, um grupo bioreversível, um grupo não bioreversível, uma porção auxiliar, um grupo conjugador, um ligante ligado a uma porção de direcionamento ou um ligante ligado a uma porção de direcionamento e um ou mais (por exemplo, 1 a 6) porções auxiliares; e

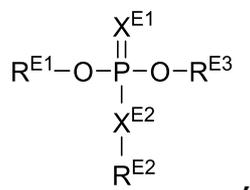
R^{E2} é hidrogênio, um grupo bioreversível, um grupo não bioreversível, uma porção auxiliar, um grupo conjugador, um ligante ligado a uma porção de direcionamento ou um ligante ligado a uma porção de direcionamento e um ou mais (por exemplo, 1 a 6) porções auxiliares;

desde que pelo menos um de R^{E1} e R^{E3} é uma ligação a um grupo contendo pelo menos um nucleotídeo.

Se cada um de R^{E1} e R^{E3} é independentemente uma ligação a um grupo contendo pelo menos um nucleotídeo, a fosfoéster é um fosfoéster internucleosídeos. Se um de R^{E1} e R^{E3} é uma ligação a um grupo que não contém um nucleotídeo, a fosfoéster é um fosfoéster terminal.

[00316] O termo "fosfodiéster", conforme usado neste documento, refere-se a um fosfoéster, no qual duas das três valências são substituídas por substituintes que não são hidrogênio, enquanto a valência restante é substituída por hidrogênio. O fosfodiéster consiste em fosfato, fosforotioato ou fosforoditioato; uma ou duas ligações ao(s) nucleotídeo(s), espaçador(s) abásico(s) e/ou grupo(s) fosforil(es); e, se o

fosfodiéster contiver apenas uma ligação a um nucleotídeo, um espaçador abásico ou um grupo fosforil, um grupo selecionado independentemente do grupo que consiste em um grupo bioreversível; um grupo não bioreversível; uma porção auxiliar; um grupo conjugador; um ligante ligado a uma fração alvo; e um ligante ligado a uma porção de direcionamento e uma ou mais (por exemplo, 1 a 6) porções auxiliares. Um fosfodiéster terminal inclui uma ligação a um grupo contendo um nucleotídeo e um grupo selecionado do grupo que consiste em um grupo bioreversível; um grupo não bioreversível; uma porção auxiliar; um grupo conjugador; um grupo fosforilo; e um ligante ligado a uma porção de direcionamento e, opcionalmente, a uma ou mais (por exemplo, 1 a 6) porções auxiliares. Um fosfodiéster internucleosídeo inclui duas ligações a grupos contendo nucleotídeo. Um fosfodiéster pode ser um grupo da seguinte estrutura:



Onde

cada um dos X^{E1} e X^{E2} é independentemente O ou S;

cada um dos R^{E1} e R^{E3} é independentemente hidrogênio ou uma ligação a um nucleosídeo; um análogo de açúcar de um espaçador abásico; um grupo bioreversível; um grupo não bioreversível; uma porção auxiliar; um grupo conjugador; um ligante ligado a uma fração alvo; um ligante ligado a uma porção de direcionamento e uma ou mais (por exemplo, 1 a 6) porções auxiliares; ou o átomo de fósforo em um grupo de fórmula $-P(=X^{E1})(-X^{E2}-R^{E2A})-O-$,

em que R^{E2A} é hidrogênio, um grupo bioreversível, um grupo não bioreversível, uma porção auxiliar, um grupo conjugador, um ligante ligado a uma porção de direcionamento ou um ligante ligado a uma porção de direcionamento e um ou mais (por exemplo, 1 a 6) porções auxiliares; e

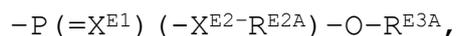
R^{E2} é hidrogênio, um grupo bioreversível, um grupo não bioreversível, uma porção auxiliar, um grupo conjugador, um ligante ligado a uma porção de direcionamento ou um ligante ligado a uma porção de direcionamento e um ou mais (por exemplo, 1 a 6) porções auxiliares;

desde que um e apenas um de R^{E1} , R^{E2} e R^{E3} seja hidrogênio; e

desde que pelo menos um de R^{E1} e R^{E3} é uma ligação a um grupo contendo pelo menos um nucleosídeo.

[00317] Se ambos os R^{E1} e R^{E3} são ligações a grupos que contenham pelo menos um nucleosídeo, a fosfodiéster é um fosfoditer internucleosídeos. Se um e apenas um de R^{E1} e R^{E3} é uma ligação a um grupo contendo um nucleosídeo, a fosfodiéster é um fosfodiéster terminal.

[00318] O termo "fosforil", como usado aqui, refere-se a um substituinte de fórmula



Onde

cada um dos X^{E1} e X^{E2} é independentemente O ou S;

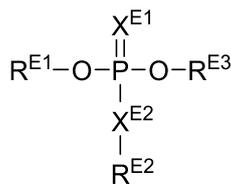
R^{E2A} é hidrogênio, um grupo bioreversível, um grupo não bioreversível, uma porção auxiliar, um grupo conjugador, um

ligante ligado a uma porção de direcionamento ou um ligante ligado a uma porção de direcionamento e um ou mais (por exemplo, 1 a 6) porções auxiliares; e

R^{E3A} é hidrogênio ou uma valência aberta.

[00319] Quando um grupo é identificado como ligado a um fosforil, o grupo é ligado ao átomo de fósforo do fosforil.

[00320] O termo "fosfotriéster", como usado aqui, refere-se a um fosfoéster, no qual todas as três valências são substituídas por substituintes que não sejam hidrogênio. O fosfotriéster consiste em fosfato, fosforotioato ou fosforoditioato; uma ou duas ligações ao(s) nucleosídeo(s) ou espaçador(s) abásico(s) e/ou grupo(s) fosforil (es); e um ou dois grupos selecionados independentemente do grupo que consiste em um grupo bioreversível; um grupo não bioreversível; uma porção auxiliar; um grupo conjugador; e um ligante ligado a uma porção de direcionamento e, opcionalmente, a uma ou mais (por exemplo, 1 a 6) porções auxiliares. Um fosfotriéster terminal inclui uma ligação a um grupo contendo um nucleosídeo e dois grupos selecionados independentemente do grupo que consiste em um grupo bioreversível; um grupo não bioreversível; uma porção auxiliar; um grupo conjugador; um grupo fosforilo; e um ligante ligado a uma porção de direcionamento e, opcionalmente, a uma ou mais (por exemplo, 1 a 6) porções auxiliares. Em algumas formas de realização, um fosfotriéster terminal contém 1 ou 0 ligantes ligados a uma porção de direcionamento e, opcionalmente, a uma ou mais (por exemplo, 1 a 6) porções auxiliares. Um fosfotriéster internucleosídeo inclui duas ligações a grupos contendo nucleosídeo. Um fosfotriéster pode ser um grupo da seguinte estrutura:



Onde

cada um dos X^{E1} e X^{E2} é independentemente O ou S;

cada R^{E1} e R^{E3} é independentemente uma ligação a um nucleosídeo; um análogo de açúcar de um espaçador abásico; um grupo bioreversível; um grupo não bioreversível; uma porção auxiliar; um grupo conjugador; um ligante ligado a uma fração alvo; um ligante ligado a uma porção de direcionamento e uma ou mais (por exemplo, 1 a 6) porções auxiliares; ou o átomo de fósforo em um grupo de fórmula $-P(=X^{E1})(-X^{E2}-R^{E2A})-O-$,

onde R^{E2A} é hidrogênio; um grupo bioreversível; um grupo não bioreversível; uma porção auxiliar; um grupo conjugador; um ligante ligado a uma fração alvo; ou um ligante ligado a uma porção de direcionamento e uma ou mais (por exemplo, 1 a 6) porções auxiliares; e

R^{E2} é um grupo bioreversível; um grupo não bioreversível; uma porção auxiliar; um grupo conjugador; um ligante ligado a uma fração alvo; ou um ligante ligado a uma porção de direcionamento e uma ou mais (por exemplo, 1 a 6) porções auxiliares;

desde que pelo menos um de R^{E1} e R^{E3} é uma ligação a um grupo contendo pelo menos um nucleosídeo.

Se tanto R^{E1} e R^{E3} são ligações a grupos que contenham pelo menos um nucleosídeo, a fosfotriéster é um fosfotriéster internucleosídeos. Se um e apenas um de R^{E1} e R^{E3} é uma ligação a

um grupo contendo um nucleosídeo, a fosfotriéster é um fosfotriéster terminal.

[00321] O termo "condições fisiológicas", conforme usado aqui, refere-se às condições que podem existir dentro de uma célula apresentadora de antígeno profissional, mamífera e viva. As condições fisiológicas incluem temperaturas aproximadas de 35 °C a 42 °C e pH aquoso aproximado entre 6 a 8.

[00322] O termo "grupo protetor", como usado aqui, representa um grupo destinado a proteger um hidroxil, um amino ou um carbonil de participar de uma ou mais reações indesejáveis durante a síntese química. O termo "grupo de proteção O", como aqui utilizado, representa um grupo destinado a proteger um grupo hidroxil ou carbonil de participar de uma ou mais reações indesejáveis durante a síntese química. O termo "N grupo protetor", como aqui utilizado, representa um grupo destinado a proteger um azoto contendo (por ex., um grupo amino ou hidrazina) grupo de participar em uma ou mais reações indesejáveis durante a síntese química. Grupos de proteção O e N comumente usados são divulgados em Greene, "Protective Groups in Organic Synthesis", 3ª Edição (John Wiley & Sons, Nova York, 1999), que é incorporado aqui por referência. Grupos protetores O e N exemplificativos incluem grupos alcanoil, arilil ou carbamil, tais como formil, acetil, propionil, pivaloil, t-butilacetil, 2-cloroacetil, 2-bromoacetil, trifluoroacetil, tricloroacetil, ftalacil, o-nitrofenoxil, clorobutiril, benzoílo, 4-clorobenzoílo, 4-bromobenzoílo, t-butildimetilsilil, tri-iso-propilsililximetil, 4,4'-dimetoxitritil, isobutiril, fenoxiacetil, 4-isopropilpeenoxiametil, 4-isopropilpeenoxiametil, dimetil-fenil-metil-etil-4-clorobutiril, benzoil, 4-clorobenzoil, 4-

bromobenzoil, *t*-butildimetilsilil, tri-*iso*-propilsililximetil, 4,4'-dimetoxitritil, isobutiril, fenoxiacetil, 4-isopropilpeenoxi-metil-dimetil-metil-etil-fenil-metil-fenil-metil-etil-4-clorobutiril.

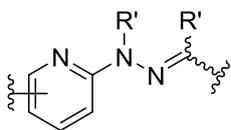
[00323] Grupos protetores de O exemplares para proteger grupos contendo carbonil incluem, mas não estão limitados a: acetais, acilais, 1,3-ditianes, 1,3-dioxanos, 1,3-dioxolanos e 1,3-ditiolanos.

[00324] Outros grupos protetores de O incluem, mas não estão limitados a: éteres alquil, aril e aril-alquil substituídos (por exemplo, tritil; metiltiometil; metoximetil; benziloximetil; siloximetil; 2,2,2, -tricloroetoximetil; tetra-hidropiranyl; tetra-hidrofuranil; etoxietil; 1- [2- (trimetilsilil) etoxi] etil; 2-trimetilsililetil; éter *t*-butílico; *p*-clorofenil, *p*-metoxifenil, *p*-nitrofenil, benzil, *p*-metoxibenzil e nitrobenzil); éteres silílicos (por exemplo, trimetilsilil; trietilsilil; triisopropilsilil; dimetilisopropilsilil; *t*-butildimetilsilil; *t*-butildifenilsilil; tribenzilsilil; trifenilsilil; e difenilmetil silil); carbonatos (por exemplo, metil, metoximetil, 9-fluorenilmetil; etil; 2,2,2-tricloroetil; 2- (trimetilsilil) etil; vinil, alil, nitrofenil; benzil; metoxibenzil; 3,4-dimetoxibenzil; e nitrobenzil).

[00325] Outros grupos de proteção N incluem, mas não estão limitados a, auxiliares quirais, como D, L ou D, L-aminoácidos protegidos ou desprotegidos, como alanina, leucina, fenilalanina e semelhantes; grupos contendo sulfonil, como benzenossulfonil, *p*-toluenossulfonil e semelhantes; grupos formadores de carbamato, tais como benziloxicarbonil, *p*-clorobenziloxicarbonil, *p* metoxibenziloxicarbonil, *p*-

nitrobenziloxicarbonil, 2-nitrobenziloxicarbonil, p
 bromobenziloxicarbonil, 3,4-dimetoxibenziloxicarbonil, 3,4-
 dimetoxicarbonilcarbonil, 3,4-dimetoxicarbonilcarbonil 4,5-
 dimetoxibenziloxicarbonil, 3,4,5 trimetoxibenziloxicarbonil, 1-
 (p-bifenilil) -1-metiletoxicarbonil, α , α -dimetil-3,5
 dimetoxibenziloxicarbonil, benzidriloxicarbonil, t-
 butiloxicarbonilcarbonil, di-isopropilcarbonil, di-
 isopropilcarbonil, di-isopropilcarbonil, di-isopropilcarbonil,
 di-isopropil-oxicarbonil, , aliloxicarbonil, 2,2,2, -
 tricloroetoxicarbonil, fenoxicarbonil, 4-nitrofenoxicarbonil,
 fluorenil-9-metoxicarbonil, ciclopentiloxicarbonil,
 adamantiloxicarbonil, ciclo-hexiloxicarbonil, fenil-metil,
 benzil, metil, metil, metil, metil, metil, metil, metil, metil,
 metil, metil, metil, metil, metil, metil, metil, metil, etil,
 grupos semelhantes e sililo, tais como trimetilsililo, e
 semelhantes. Grupos N-protetores úteis são formil, acetil,
 benzoil, pivaloil, t-butilacetil, alanil, fenilsulfonil, benzil,
 t-butiloxicarbonil (Boc) e benziloxicarbonil (Cbz).

[00326] O termo "pirid-2-il-hidrazona", conforme usado aqui,
 representa um grupo da estrutura:



, onde cada R' é independentemente H ou alquil C1-6
 opcionalmente substituído. A pirid-2-il-hidrazona pode ser não
 substituída (isto é, cada R' é H).

[00327] O termo "enriquecido estereoquimicamente", como usado
 aqui, refere-se a uma preferência estereoquímica local por uma
 configuração estereoisomérica do grupo recitado sobre a
 configuração estereoisomérica oposta do mesmo grupo. Assim, um

polinucleotídeo contendo um fosforotioato estereoquimicamente enriquecido é uma fita, na qual um fosforotioato de estereoquímica predeterminada está presente em preferência a um fosforotioato da estereoquímica oposta. Esta preferência pode ser expressa numericamente usando uma razão diastereomérica para o fosforotioato da estereoquímica predeterminada. A razão diastereomérica para o fosforotioato da estereoquímica predeterminada é a razão molar dos diastereômeros com o fosforotioato identificado com a estereoquímica predeterminada em relação aos diastereômeros com o fosforotioato identificado com a estereoquímica oposta. A razão diastereomérica para o fosforotioato da estereoquímica predeterminada pode ser maior ou igual a 1,1 (por exemplo, maior que ou igual a 4, maior ou igual a 9, maior ou igual a 19 ou maior ou igual a 39).

[00328] O termo "Q-terminalQ-terminal", conforme usado aqui, refere-se a uma porção de um polipeptídeo contendo resíduo de glutamina que, após reação mediada por transglutaminase com um composto contendo -NH₂ amina, fornece um conjugado contendo a porção de polipeptídeo, em qual o resíduo de glutamina inclui uma cadeia lateral modificada para incluir a amida ligada ao composto. Etiquetas Q são conhecidas na arte. Exemplos não limitativos de tags Q são LLQGG e GGGLLQGG.

[00329] O termo "cicloalcenil estirado", como usado aqui, refere-se a um grupo cicloalcenil que, se a valência aberta foi substituída por H, tem uma energia de deformação do anel de pelo menos 16 kcal/mol.

[00330] O termo "análogo do açúcar", conforme usado aqui, representa um grupo divalente ou trivalente que é um monossacarídeo C₃₋₆ ou alditol C₃₋₆ (por exemplo, glicerol), que

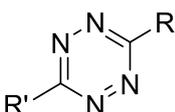
é modificado para substituir dois grupos hidroxila por ligações ao oxigênio átomos de fosfato, fosforotioato ou fosforoditioato, ou um grupo de nivelamento. Um análogo de açúcar não contém uma nucleobase capaz de se envolver em ligação de hidrogênio com uma nucleobase em uma cadeia complementar. Um análogo do açúcar é cíclico ou acíclico. Outras modificações opcionais incluídas em um análogo do açúcar são: uma substituição de um, dois ou três dos demais grupos hidroxila ou átomos de hidrogênio ligados ao carbono por H; alquil C₁₋₆ opcionalmente substituído; -LinkA (-T) p, conforme aqui definido; um grupo conjugador; - (CH₂) t₁ - ORZ, em que t₁ é um número inteiro de 1 a 6, e RZ é alquil C₁₋₆ opcionalmente substituído, alcenil C₂₋₆ opcionalmente substituído, alquinil C₂₋₆ opcionalmente substituído, alquinil C₂₋₆ opcionalmente substituído, aril C₆₋₁₄ opcionalmente substituído, opcionalmente C₃₋₈ cicloalquil substituído, (C₁₋₉ heterociclil) - C₁₋₆-alquil opcionalmente substituído (C₆₋₁₀ aril) -C₁₋₆-alquil opcionalmente substituído (C₃₋₈ cicloalquil) -C₁₋₆- alquilo; introdução de uma ou duas insaturações (por exemplo, uma ou duas ligações duplas); e substituição de um, dois ou três hidrogênios ou grupos hidroxila por substituintes como definidos para alquil, alcenil, cicloalquil, cicloalcenil ou heterociclil. Exemplos não limitativos de análogos de açúcar são alquilenil C₂₋₆ opcionalmente substituído, alquenilenil C₂₋₆ opcionalmente substituído, cicloalcano-1,3-diil C₅ opcionalmente substituído, cicloalqueno-1,3-diil C₅ cicloalqueno-1,3-diil opcionalmente substituído, heterociclo-1,3- opcionalmente substituído diil (por exemplo, pirrolidina-2,5-diil opcionalmente substituído, tetra-hidrofuran-2,5-diil opcionalmente substituído ou tetra-hidrotiofeno-2,5-diil opcionalmente substituído) ou

opcionalmente substituído (alquil C₁₋₄)-(C₃₋₈ cicloalquilenos) (por exemplo, (alquil C₁) opcionalmente substituído (cicloalquilenos C₃)).

[00331] O termo "sulfeto", como usado aqui, representa um grupo -S- ou = S divalente. O dissulfeto é -S-S-.

[00332] O termo "fração alvo", conforme usado aqui, representa uma fração (por exemplo, uma molécula pequena, por exemplo, um carboidrato) que se liga ou associa ou complexa reativamente especificamente a um receptor ou outra fração receptiva associada a uma determinada célula alvo população (por exemplo, uma célula apresentadora de antígeno (APC; por exemplo, uma APC profissional (por exemplo, célula B, pDC ou macrófago)). Um conjugado da invenção contém uma fração de direcionamento. A fração alvo pode ser um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno ou um seu derivado manipulado (por exemplo, Fc_{ab} ou uma proteína de fusão (por exemplo, scFv)). A porção alvo pode ser um polipeptídeo. Alternativamente, a fração alvo pode ser uma molécula pequena (por exemplo, manose) ou um aglomerado de moléculas pequenas (por exemplo, um aglomerado de manoses). Um conjugado da invenção que inclui a porção de direcionamento pode exibir K_d inferior a 100 nM para o alvo, ao qual a porção de direcionamento se liga. O K_d é medido usando métodos conhecidos na técnica, por exemplo, usando ressonância plasmônica de superfície (SPR), por exemplo, usando o sistema BIACORE™ (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido).

O termo "grupo 1,2,4,5-tetrazina", como usado aqui, representa um grupo da seguinte fórmula

[00333]  , onde R 'é alquil opcionalmente substituído, aril opcionalmente substituído, cicloalquil opcionalmente substituído, heterociclil opcionalmente substituído; e R "é alquileno opcionalmente substituído, heteroalquileno opcionalmente substituído, arileno opcionalmente substituído, cicloalquileno opcionalmente substituído, heterociclileno opcionalmente substituído ou um grupo -Ra - Rb-, no qual cada Ra e Rb é independentemente alquileno opcionalmente substituído, heteroalquileno opcionalmente substituído, arileno opcionalmente substituído, cicloalquileno opcionalmente substituído ou heterociclileno opcionalmente substituído.

[00334] O termo "efeito terapêutico" refere-se a um efeito local ou sistêmico em um indivíduo, particularmente mamíferos, e mais particularmente humanos, causado por uma substância farmacologicamente ativa. O termo significa, assim, qualquer substância destinada a ser utilizada no diagnóstico, cura, mitigação, tratamento ou prevenção de doenças ou no aprimoramento do desenvolvimento e condições físicas ou mentais desejáveis em um animal ou humano. O termo "quantidade terapêuticamente eficaz" ou "dose terapêuticamente eficaz", como aqui utilizado, representa a quantidade de um polinucleotídeo imunomodulador ou um conjugado necessário para melhorar, tratar ou pelo menos parcialmente interromper os sintomas de uma doença a ser tratada. Os valores efetivos para esse uso dependem da gravidade da doença e do peso e estado geral do sujeito. Tipicamente, as dosagens usadas *in vitro* podem fornecer orientação útil nas quantidades úteis para administração *in vivo*

da composição farmacêutica, e modelos animais podem ser usados para determinar dosagens eficazes para o tratamento de uma doença específica.

[00335] O termo "tiocarbonil", como usado aqui, representa um grupo C(=S).

[00336] O termo "tioheterociclileno", como usado aqui, representa um grupo -S-R-, em que R é heterociclileno. O tioheterociclileno pode ser opcionalmente substituído de uma maneira descrita para heterociclilil.

[00337] O termo "tiol", como usado aqui, representa um grupo -SH.

[00338] O termo "tratamento", usado em referência a uma doença ou condição em um paciente, destina-se a obter resultados benéficos ou desejados, por exemplo, resultados clínicos, em um paciente, administrando o polinucleotídeo ou conjugado da invenção para o paciente. Os resultados benéficos ou desejados podem incluir alívio ou melhoria de um ou mais sintomas de uma doença ou condição; diminuição da exten

são de uma doença ou condição; estabilização (isto é, não piora) de uma doença ou condição; prevenção da propagação de uma doença ou condição; atrasar ou retardar o progresso de uma doença ou condição; palição de uma doença ou condição; e remissão (parcial ou total). "Paliar" uma doença ou condição significa que a extensão e/ou manifestações clínicas indesejáveis da doença ou condição são diminuídas e/ou o andamento da progressão é mais lento, em comparação com a extensão ou extensão de tempo na ausência do tratamento com o polinucleotídeo ou conjugado da invenção.

[00339] O termo "triazolocicloalcenileno", conforme usado aqui, refere-se aos heterocicliclilenóis que contêm um anel de 1,2,3-triazol fundido a um anel de 8 membros, todos os átomos endocíclicos dos quais são átomos de carbono e átomos de ponta de ponte átomos de carbono hibridizados com sp^2 . Os triazocicloalcenilenos podem ser opcionalmente substituídos de uma maneira descrita para heterocicliclil.

[00340] O termo "triazoloheterocicliclileno", conforme usado aqui, refere-se aos heterocicliclilenóis que contêm um anel 1,2,3-triazol fundido a um anel de 8 membros contendo pelo menos um heteroátomo. Os átomos da cabeça de ponte no triazoloheterocicliclileno são átomos de carbono. Os triazoloheterocicliclilenos podem ser opcionalmente substituídos de uma maneira descrita para heterocicliclil.

[00341] Deve ser entendido que os termos "polinucleotídeo imunomodulador", "polinucleotídeo imunoestimulador", "polinucleotídeo imunossupressor" e "conjugado" abrangem sais do polinucleotídeo imunomodulador, polinucleotídeo imunomodulador, polinucleotídeo imunomodulador, polinucleotídeo imunoestimulador, polinucleotídeo imunoestimulante, conjugado imunossupressor. Por exemplo, os termos "polinucleotídeo imunomodulador", "polinucleotídeo imunoestimulador", "polinucleotídeo imunossupressor" e "conjugado" englobam a forma neutra protonada (fração P-XH, onde X é O ou S) de um fosfato, fosforotioato, ou fosforoditioato e a forma iônica desprotonada (porção PX, onde X é O ou S) de um fosfato, fosforotioato ou fosforoditioato. Por conseguinte, deve ser entendido que os fosfoésteres e fosfodiésteres descritos como tendo um ou mais de RE1, RE2 e RE3 como hidrogênio abrangem sais, nos quais o

fosfato, fosforotioato ou fosforoditioato está presente em uma forma iônica desprotonada.

[00342] Os termos "resposta imune inata" e "imunidade inata" são reconhecidos na técnica e referem-se ao mecanismo de defesa não específico que o sistema imunológico de um corpo inicia após o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos, que envolvem diferentes formas de atividades celulares, incluindo produção de citocinas e morte celular através de várias vias. Como aqui utilizado, as respostas imunes inatas incluem respostas celulares a um polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG mediado pelo receptor 9 (TLR9), que inclui, sem limitação, aumento da produção de citocinas de inflamação (por exemplo, interferon tipo I ou produção de IL-10), ativação da via NFκB, aumento da proliferação, maturação, diferenciação e/ou sobrevivência de células imunes e, em alguns casos, indução de apoptose celular. A ativação da imunidade inata pode ser detectada usando métodos conhecidos na técnica, como medir a ativação (NF)-κB.

[00343] Os termos "resposta imune adaptativa" e "imunidade adaptativa" são reconhecidos na técnica e referem-se ao mecanismo de defesa específico ao antígeno que o sistema imunológico de um corpo inicia após o reconhecimento de um antígeno específico, que inclui resposta humoral e mediada por células respostas. Como aqui utilizado, as respostas imunes adaptativas incluem respostas celulares que são desencadeadas e/ou aumentadas por um polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG. Em algumas formas de realização, o polinucleotídeo imunoestimulador ou uma porção dele é o alvo do antígeno da resposta imune adaptativa específica do antígeno. Em outras

formas de realização, o polinucleotídeo imunoestimulador não é o alvo do antígeno da resposta imune adaptativa específica do antígeno, mas, no entanto, aumenta a resposta imune adaptativa. A ativação de uma resposta imune adaptativa pode ser detectada usando métodos conhecidos na técnica, como medir a produção de anticorpos específicos ao antígeno, ou o nível de citotoxicidade mediada por células específicas do antígeno.

[00344] O termo "receptor do *Toll-like*" (ou "TLR") é reconhecido na técnica e refere-se a uma família de receptores de reconhecimento de padrões que foram inicialmente identificados como sensores do sistema imunológico inato que reconhecem patógenos microbianos. Os TLRs reconhecem estruturas distintas nos micróbios, geralmente chamados de "PAMPs" (padrões moleculares associados a patógenos). A ligação do ligante aos TLRs invoca uma cascata de vias de sinalização intracelular que induzem uma resposta imune inata e/ou resposta imune adaptativa. Como usado aqui, o termo "receptor do tipo Toll" ou "TLR" também se refere a um fragmento funcional de uma proteína do receptor do tipo Toll expressa por uma célula. Em humanos, dez TLRs foram identificados, incluindo TLR-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7/8 e -9. D'Arpa e Leung, *adv. Wound Care*, 6: 330-343 (2017), cujo conteúdo é incorporado aqui por referência na sua totalidade. Os genes humanos que codificam TLRs são conhecidos.

[00345] O receptor 9 do tipo Toll (TLR9), também designado como CD289 (conjunto de diferenciação 289), é um membro da família do receptor do tipo Toll (TLR). Du *et.al.*, *Eur. Cytokine Netw.*, 11: 362-371 (2000), cujo conteúdo é aqui incorporado por referência na sua totalidade. O TLR9 é um receptor importante expresso em células do sistema imunológico, incluindo células

dendríticas (DCs), linfócitos B, macrófagos, células assassinas naturais e outras células apresentadoras de antígenos. A ativação do TLR9 aciona cascatas de sinalização que preenchem a imunidade inata e adaptativa. Martinez-Campos *et.al.*, *Viral Immunol.*, 30: 98-105 (2016); Notley *et.al.*, *Sci. Rep.* 7: 42204 (2017); o conteúdo de cada um dos quais é incorporado aqui por referência na sua totalidade. Os agonistas naturais de TLR-9 incluem oligodesoxinucleotídeos contendo citosina-guanina não metilados (CpG) (CpG ODNs). O uso do achado do ligando TLR-9 na presente divulgação inclui, mas não está limitado a, ODNs CpG naturalmente existentes ou sintéticos e outros polinucleotídeos imunoestimulantes contendo CpG e/ou imunoconjugados, conforme aqui fornecido. A ativação da via de sinalização TLR9 pode ser detectada usando métodos conhecidos na técnica, como medir o recrutamento do antígeno de diferenciação mielóide 88 (MyD88), ativação do fator nuclear (NF)- κ B, c-Jun N-terminal kinase (JNK), e vias de sinalização da proteína cinase ativada por mitogênio p38 (MAPK), ativação do fator regulador de interferon- γ , nível de expressão de uma ou mais citocinas, como interferons do tipo I (IFNs), interleucina (IL)-6, IL-10 e IL-12, ativação de uma ou mais populações de células imunes, como células NK, células T *natural killer*, monócitos e nível de respostas de linfócitos citotóxicos (CTL) e T helper-1 (Th1) e o nível de secreção de imunoglobulinas.

[00346] O termo "célula que expressa TLR", conforme usado aqui, refere-se a uma célula que expressa um receptor do tipo Toll e é capaz de ativar a via de sinalização do receptor do tipo Toll após a ligação do receptor do tipo Toll a um agonista. O receptor do tipo Toll pode ser expresso na superfície celular e/ou na

membrana de um ou mais compartimentos intracelulares da célula, como o endossomo ou o fagossomo. Uma célula que expressa TLR pode expressar ainda um ou mais antígenos de superfície celular que não o receptor do tipo Toll. Certas células imunes expressam TLRs, e a ativação da via de sinalização de TLR nas células imunes provoca uma resposta imune inata e/ou uma resposta imune adaptativa. As células imunológicas ativadas pela via de sinalização TLR podem ajudar a eliminar outras células doentes do corpo. Certas células doentes (por exemplo, células cancerígenas ou células infectadas por vírus) expressam TLRs, e a ativação da via de sinalização de TLR nas células doentes pode resultar na morte da célula doente, como via apoptose induzida. Exemplos de células que expressam TLR9 incluem, mas não estão limitados a, células dendríticas (DCs), células B, células T, células de Langerhans, queratinócitos, mastócitos, células endoteliais, células de miofibroblastos e fibroblastos primários. A determinação de se uma célula expressa qualquer receptor do tipo Toll (por exemplo, TLR9) pode ser realizada usando métodos conhecidos na técnica, como a detecção de mRNA do receptor do tipo Toll em uma célula.

[00347] O termo "célula imune" é reconhecido na técnica, conforme aqui utilizado, refere-se a qualquer célula envolvida em um mecanismo de defesa do hospedeiro, como células que produzem citocinas pró-inflamatórias e células que participam de dano e/ou doença de tecido patogênese. Exemplos de células imunes incluem, mas não se limitam a, células T, células B, células assassinas naturais, neutrófilos, mastócitos, macrófagos, células apresentadoras de antígeno (APC), basófilos e eosinófilos.

[00348] O termo "célula apresentadora de antígeno" ou "APC" é reconhecido na técnica e refere-se a um grupo heterogêneo de células imunes que medeia a resposta imune celular processando e apresentando antígenos para reconhecimento por certos linfócitos, como células T. Tipos exemplares de células apresentadoras de antígeno incluem, mas não estão limitados a, células apresentadoras profissionais de antígeno, incluindo, por exemplo, células B, monócitos, células dendríticas e células de Langerhans, bem como outras células apresentadoras de antígeno, incluindo, por exemplo, queratinócitos endoteliais células, astrócitos, fibroblastos e oligodendrócitos. Como usado aqui, o termo "célula apresentadora de antígeno" inclui células apresentadoras de antígeno encontradas *in vivo* e aquelas encontradas em culturas de células *in vitro* derivadas das células *in vivo*. Como usado neste documento, as células apresentadoras de antígeno também incluem uma APC modificada artificialmente, como geneticamente modificada para expressar um receptor do tipo Toll (por exemplo, TLR9) ou para modular o nível de expressão de um receptor do tipo Toll (por exemplo, TLR9).

[00349] O termo "células dendríticas" ou "DC" é reconhecido na técnica e refere-se a um grupo heterogêneo de células especializadas em detecção e apresentação de antígenos (APCs). As DC humanas são divididas em três subconjuntos principais: DC plasmocitóide (pDC), DC mielóide (mDC) e DC derivada de monócitos (MDDC). Schraml *et.al.*, Curr. Opin. Immunol., 32: 13-20 (2015); cujo conteúdo é incorporado aqui por referência na sua totalidade. Subconjuntos de DCs podem ser identificados com base em diferentes padrões de expressão de TLR. A título de exemplo, o subconjunto mielóide ou "convencional" de DC (mDC) expressa

TLRs 1-8 quando estimulados e uma cascata de marcadores de ativação (por exemplo, CD80, CD86, MHC classe I e II, CCR7), pró-inflamatórios citocinas e quimiocinas são produzidas. Um resultado desta estimulação e expressão resultante é a iniciação de células T CD4 + e CD8 + específicas do antígeno. Essas DCs adquirem uma capacidade aprimorada de captar antígenos e apresentá-los de forma apropriada às células T. O subconjunto plasmocitóide de DC (pDC) expressa TLR7 e TLR9 após a ativação, com uma ativação resultante de células NK e células T.

[00350] O termo "antígeno", conforme usado neste documento, refere-se a uma molécula ou um fragmento antigênico capaz de provocar uma resposta imune, incluindo tanto uma resposta imune inata quanto uma resposta imune adaptativa. Como aqui utilizado, os antígenos podem ser proteínas, peptídeos, polissacarídeos, lipídios, ácidos nucleicos, especialmente RNA e DNA, nucleotídeos e outras substâncias biológicas ou bioquímicas. O termo "provocar uma resposta imune" refere-se à estimulação de células imunes *in vivo* em resposta a um estímulo, como um antígeno. A resposta imune consiste em resposta imune celular, por exemplo, estimulação de células T e macrófagos e resposta imune humoral, por exemplo, estimulação de células B e complemento e produção de anticorpos. A resposta imune pode ser medida usando técnicas bem conhecidas na arte, incluindo, mas não se limitando a, imunoenaios de anticorpos, ensaios de proliferação e outros.

[00351] Os termos "fragmento antigênico" e "fragmento de ligação ao anticorpo" são usados aqui de forma intercambiável. Um fragmento antigênico como aqui utilizado é capaz de complexar com uma molécula de ligação ao antígeno, por exemplo, um

anticorpo, em uma reação específica. A reação específica aqui referida indica que o antígeno ou fragmento antigênico reagirá, de maneira altamente seletiva, com seu anticorpo correspondente e não com a multidão de outros anticorpos que podem ser evocados por outros antígenos. A especificidade de tal reação é determinada pela presença de um ou mais epítomos (determinantes imunogênicos) no antígeno. Como aqui utilizado, um antígeno ou seu fragmento antigênico pode ter um epítomo ou ter mais de um epítomo.

[00352] O termo "epítomo de célula T", conforme usado aqui, refere-se a quaisquer epítomos de antígenos produzidos por uma célula T.

[00353] O termo "antígeno associado ao tumor" ou "TAA", conforme usado aqui, refere-se a um antígeno expresso por uma célula cancerígena ou no estroma de um tumor sólido em um paciente com câncer que recebe o tratamento ou cuidados preventivos, conforme aqui fornecido (por exemplo, receber uma dose terapêutica de um polinucleotídeo imunoestimulador ou um imunocombinado CpG-Ab). O TAA pode ou não ser direcionado no tratamento ou nos cuidados preventivos aqui fornecidos. O TAA não precisa ser superexpresso, alterado ou mal regulado nas células cancerígenas, mas pode ter os mesmos recursos que o TAA teria em uma célula normal. Em algumas formas de realização, o TAA pode ser superexpresso, mutado ou mal regulado em células cancerígenas. O TAA pode ser uma proteína, ácido nucleico, lipídeo ou outro antígeno. O TAA pode ser um TAA expresso na superfície celular, um TAA intracelular ou um TAA intranuclear. No contexto de um tumor sólido, o TAA pode ser expresso no estroma de uma massa tumoral sólida. O termo "estroma", conforme

usado aqui, refere-se a componentes em uma massa sólida de tumor que não seja uma célula cancerígena. Por exemplo, o estroma pode incluir fibroblastos, células epiteliais, outros componentes dos vasos sanguíneos ou componentes da matriz extracelular. Como usado aqui, o termo "estroma" não inclui componentes do sistema imunológico, como células imunológicas (por exemplo, células B, células T, células dendríticas, macrófagos, células assassinas naturais e similares). Vários TAAs são conhecidos na técnica. A identificação do TAA pode ser realizada usando métodos conhecidos na técnica, tais como divulgados em Zhang *et.al.*, *Methods Mol. Biol.* 520: 1-10 (2009); cujo conteúdo é aqui incluído por referência.

[00354] O termo "anticorpo", conforme usado neste documento, refere-se a um polipeptídeo da família de imunoglobulinas que é capaz de se ligar a um antígeno correspondente de maneira não covalente, reversível e de maneira específica. Por exemplo, um anticorpo IgG de ocorrência natural é um tetrâmero que compreende pelo menos duas cadeias pesadas (H) e duas leves (L) interconectadas por ligações dissulfeto. Cada cadeia pesada é composta por uma região variável da cadeia pesada (aqui abreviada como VH) e uma região constante da cadeia pesada. A região constante da cadeia pesada é composta por três domínios, CH1, CH2 e CH3. Cada cadeia leve é composta por uma região variável da cadeia leve (aqui abreviada como VL) e uma região constante da cadeia leve. A região constante da cadeia leve é composta por um domínio, CL. As regiões VH e VL podem ainda ser subdivididas em regiões de hiper variabilidade, denominadas regiões determinantes de complementaridade (CDR), intercaladas com regiões mais conservadas, denominadas regiões estruturais (FR).

Cada VH e VL é composto por três CDRs e quatro FRs dispostos do terminal amino ao terminal carbóxi na seguinte ordem: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 e FR4. As regiões variáveis das cadeias pesada e leve contêm um domínio de ligação que interage com um antígeno. As regiões constantes dos anticorpos podem mediar a ligação da imunoglobulina a tecidos ou fatores hospedeiros, incluindo várias células do sistema imunológico (por exemplo, células efectoras) e o primeiro componente (Clq) do sistema de complemento clássico.

[00355] Como aqui utilizado, os anticorpos incluem, mas não estão limitados a, anticorpos monoclonais, anticorpos humanos, anticorpos humanizados, anticorpos camelídeos, anticorpos quiméricos e anticorpos anti-idiotípicos (anti-Id) (incluindo, por exemplo, anticorpos anti-Id anticorpos da invenção). Os anticorpos podem ser de qualquer isótipo/classe (por exemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY) ou subclasse (por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2).

[00356] As cadeias leve e pesada são divididas em regiões de homologia estrutural e funcional. Os termos "constante" e "variável" são usados funcionalmente. A este respeito, será apreciado que os domínios variáveis das porções da cadeia leve (VL) e pesada (VH) determinam o reconhecimento e a especificidade do antígeno. Por outro lado, os domínios constantes da cadeia leve (CL) e da cadeia pesada (CH1, CH2 ou CH3) conferem propriedades biológicas importantes, tais como secreção, mobilidade transplacentária, ligação ao receptor Fc, ligação ao complemento e similares. Por convenção, a numeração dos domínios da região constante aumenta à medida que se tornam mais distais do local de ligação ao antígeno ou do terminal amino do

anticorpo. O terminal N é uma região variável e no terminal C é uma região constante; os domínios CH3 e CL compreendem realmente os domínios terminal carbóxi da cadeia pesada e leve, respectivamente.

[00357] Como aqui utilizado, dependendo do contexto, o termo "anticorpo" também pode se referir a um fragmento de ligação ao antígeno de uma molécula de anticorpo. O termo "fragmento de ligação ao antígeno", como usado aqui, refere-se a uma ou mais partes de um anticorpo que retêm a capacidade de interagir especificamente com (por exemplo, por ligação, impedimento estérico, estabilização/desestabilização, distribuição espacial) um epítipo de um antígeno. Exemplos de fragmentos de ligação incluem, mas não estão limitados a, Fvs de cadeia única (scFv), Fvs ligados a dissulfeto (sdFv), fragmentos Fab, fragmentos F (ab'), um fragmento monovalente que consiste em VL, VH, CL e Domínios CH1; um fragmento F (ab) 2, um fragmento bivalente compreendendo dois fragmentos Fab ligados por uma ponte dissulfeto na região de dobradiça; um fragmento Fd que consiste nos domínios VH e CH1; um fragmento Fv consistindo nos domínios VL e VH de um único braço de um anticorpo; um fragmento de dAb (Ward *et.al.*, Nature, 341: 544-546 (1989)), que consiste em um domínio VH ou VL; um anticorpo de domínio único (VHH) e uma região determinante de complementaridade isolada (CDR) ou outros fragmentos de ligação ao epítipo de um anticorpo.

[00358] O termo "liga-se especificamente", "liga-se seletivamente" ou semelhante refere-se a uma interação química entre duas moléculas, compostos, células e/ou partículas em que a primeira entidade se liga à segunda entidade-alvo com maior especificidade e afinidade do que ele se liga a uma terceira

entidade que não é um destino. Em algumas formas de realização, "ligação específica" pode se referir a uma afinidade da primeira entidade para a segunda entidade de destino que é pelo menos 10 vezes, pelo menos 50 vezes, pelo menos 100 vezes, pelo menos 500 vezes, pelo menos 1000 vezes ou mais que a afinidade para a terceira entidade não alvo. Em algumas formas de realização, "ligação específica" é usada no contexto da descrição da interação entre um antígeno (ou um fragmento antigênico do mesmo) e um anticorpo (ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo). Em formas de realização particulares, "ligação específica" refere-se à ligação do anticorpo a um antígeno predeterminado com uma constante de dissociação (KD) de 10^{-5} M ou menos, 10^{-6} M ou menos ou 10^{-7} M ou menos, ou ligação de um anticorpo para um antígeno predeterminado com uma KD que é pelo menos duas vezes menor que a sua KD para ligação a um antígeno inespecífico que não seja o antígeno predeterminado. Em algumas formas de realização, a ligação específica pode ser usada para determinar a presença do antígeno predeterminado em uma população heterogênea de proteínas e outros produtos biológicos, por exemplo, em uma amostra biológica, por exemplo, uma amostra de sangue, soro, plasma ou tecido. Assim, sob certas condições de imunoensaio designadas, os anticorpos ou agentes de ligação com uma especificidade de ligação específica se ligam a um antígeno específico pelo menos duas vezes o fundo e não se ligam substancialmente em quantidade significativa a outros antígenos presentes na amostra. Em uma modalidade, sob condições de imunoensaio designadas, o anticorpo ou agentes de ligação com uma especificidade de ligação específica se ligam a um antígeno específico pelo menos duas, três, quatro, cinco, seis, sete,

oito, nove ou dez vezes o fundo e não substancialmente se ligam em quantidade significativa a outros antígenos presentes na amostra. A ligação específica a um anticorpo ou agente de ligação sob tais condições pode exigir que o anticorpo ou agente tenha sido selecionado por sua especificidade para uma proteína específica. Como desejado ou apropriado, esta seleção pode ser alcançada subtraindo anticorpos que reagem de maneira cruzada com moléculas de outras espécies (por exemplo, camundongo ou camundongo) ou outros subtipos. Alternativamente, em algumas formas de realização, são selecionados anticorpos ou fragmentos de anticorpos que reagem de maneira cruzada com certas moléculas desejadas.

[00359] O termo "câncer" ou "tumor" refere-se à presença de células que possuem características típicas de células causadoras de câncer, como proliferação descontrolada, imortalidade, potencial metastático, rápido crescimento e taxa de proliferação e certas características morfológicas características. Em algumas formas de realização, essas células exibem essas características em parte ou na totalidade devido à expressão e atividade de inibidores do ponto de verificação imune, como PD-1, PD-L1 e/ou CTLA-4. As células cancerígenas geralmente estão na forma de um tumor sólido, que é detectável com base na massa do tumor, por exemplo, por procedimentos como tomografia computadorizada, ressonância magnética, raio-x, ultrassonografia ou palpação e/ou detectável por causa de a expressão de um ou mais antígenos específicos para câncer em uma amostra obtida de um paciente. Em algumas formas de realização, um tumor sólido não precisa ter dimensões mensuráveis. As células cancerígenas podem também na forma de um tumor líquido, cujas

células cancerígenas podem existir sozinhas ou disseminadas dentro de um animal. Conforme usado aqui, os termos "tumor disseminado" e "tumor líquido" são usados de forma intercambiável e incluem, sem limitação, leucemia e linfoma e outros cânceres de células sanguíneas.

[00360] O termo "leucemia" refere-se a um tipo de câncer no sangue ou medula óssea **caracterizado** por um aumento anormal de glóbulos brancos imaturos chamados "blastos". Leucemia é um termo amplo que abrange um espectro de doenças. Por sua vez, faz parte de um grupo ainda mais amplo de doenças que afetam o sangue, medula óssea e sistema linfóide, todos conhecidos como neoplasias hematológicas. As leucemias podem ser divididas em quatro classificações principais: leucemia linfocítica aguda (ou linfoblástica) (LLA), leucemia mielóide aguda (ou mielóide ou não linfática) (LMA), leucemia linfocítica crônica (LLC) e leucemia mielóide crônica (LMC). Outros tipos de leucemia incluem leucemia de células cabeludas (HCL), leucemia prolinocítica de células T (T-PLL), leucemia linfocítica granular grande e leucemia de células T adulta.

[00361] O termo "linfoma" refere-se a um grupo de tumores de células sanguíneas que se desenvolvem a partir de células linfáticas. As duas principais categorias de linfomas são os linfomas de Hodgkin (HL) e os linfomas não-Hodgkin (NHL). Os linfomas incluem qualquer neoplasia dos tecidos linfáticos. As principais classes são os cânceres dos linfócitos, um tipo de glóbulo branco que pertence à linfa e ao sangue e penetra nos dois.

[00362] Como usado aqui, o termo "câncer" inclui cânceres pré-malignos e malignos, e também inclui tumores primários (por

exemplo, aqueles cujas células não migraram para locais no corpo do sujeito que não sejam o local do tumor original) e tumores secundários (por exemplo, aqueles decorrentes de metástases, migração de células tumorais para locais secundários diferentes do local do tumor original), câncer recorrente e câncer refratário.

[00363] Os termos "recorrência do câncer" e "recaída do câncer" são usados de forma intercambiável e se referem ao retorno de um sinal, sintoma ou doença após uma remissão. As células cancerígenas recorrentes podem reaparecer no mesmo local do tumor primário ou em outro local, como no câncer secundário. As células cancerígenas podem reaparecer na mesma forma doente que o câncer primário ou em uma forma doente diferente. Por exemplo, em algumas formas de realização, um câncer primário é um tumor sólido e o câncer recorrente é um tumor líquido. Em outras formas de realização, um câncer primário é um tumor líquido e o câncer recorrente é um tumor sólido. Em ainda outras formas de realização, o câncer primário e o câncer recorrente são ambos tumores sólidos ou ambos líquidos. Em algumas formas de realização, o tumor recorrente expressa pelo menos um antígeno associado ao tumor que também é expresso pelo tumor primário.

[00364] O termo "câncer refratário", conforme usado neste documento, refere-se a um câncer que não responde a um tratamento, por exemplo, um câncer resistente no início do tratamento (por exemplo, tratamento com imunoterapia) ou um câncer que pode tornar-se resistente durante o tratamento. Os termos "responder", "resposta" ou "capacidade de resposta" se referem a uma resposta anticâncer, por exemplo no sentido de redução do tamanho do tumor ou inibição do crescimento do tumor.

Os termos também podem se referir a um prognóstico aprimorado, por exemplo, refletido por um aumento no tempo de recorrência, que é o período até a primeira recorrência censurando o segundo câncer primário como um primeiro evento ou morte sem evidência de recorrência ou um aumento na sobrevida geral, que é o período entre o tratamento e a morte por qualquer causa. Responder ou ter uma resposta significa que há um desfecho benéfico atingido quando exposto a um estímulo. Alternativamente, um sintoma negativo ou prejudicial é minimizado, atenuado ou atenuado pela exposição a um estímulo. Será apreciado que avaliar a probabilidade de um tumor ou sujeito exibir uma resposta favorável é equivalente a avaliar a probabilidade de o tumor ou sujeito não exibir resposta favorável (isto é, exibirá uma falta de resposta ou não responderá).

[00365] Como usado aqui, os cânceres incluem, mas não estão limitados a, câncer de células B, por exemplo, mieloma múltiplo, macroglobulinemia de Waldenström, doenças da cadeia pesada, como, por exemplo, doença da cadeia alfa, doença da cadeia gama e cadeia mu doença, gammapatia monoclonal benigna e amiloidose imunocítica, melanomas, câncer de mama, câncer de pulmão, câncer de brônquio, câncer colorretal, câncer de próstata, câncer de pâncreas, câncer de estômago, câncer de ovário, câncer de bexiga, câncer de cérebro ou sistema nervoso central, sistema nervoso periférico câncer, câncer de esôfago, câncer de colo uterino ou endometrial, câncer de cavidade oral ou faringe, câncer de fígado, câncer de rim, câncer de testículo, câncer de vias biliares, câncer de intestino delgado ou apêndice, câncer de glândula salivar, câncer de tireóide, glândula adrenal câncer, osteossarcoma, condrosarcoma, câncer de tecidos hematológicos e

similares. Outros exemplos não limitativos de tipos de câncer aplicáveis aos métodos abrangidos pela presente invenção incluem sarcomas e carcinomas humanos, por exemplo, fibrossarcoma, mixossarcoma, lipossarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogênico, cordoma, angiossarcoma, endoteliosarcoma, linfangiossarcoma, linfangiosarcoma, linfangioarioma, linfangioarcoma, sinossocarcoma, Tumor de Ewing, leiomiossarcoma, rabdomiossarcoma, carcinoma do cólon, câncer colorretal, câncer de pâncreas, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma basocelular, adenocarcinoma, carcinoma da glândula sudorípara, carcinoma papilar, carcinoma papilífero, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogênico, carcinoma de células renais, hepatoma, carcinoma do ducto biliar, câncer de fígado, coriocarcinoma, sominoma, carcinoma embrionário, tumor de Wilms, câncer cervical, câncer ósseo, tumor cerebral, câncer testicular, carcinoma pulmonar, pulmão de pequenas células carcinoma, carcinoma da bexiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craniofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma; leucemias, por exemplo, leucemia linfocítica aguda e leucemia mielocítica aguda (mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica e eritroleucemia); leucemia crônica (leucemia mielocítica crônica (granulocítica) e leucemia linfocítica crônica); e policitemia vera, linfoma (doença de Hodgkin e doença não-Hodgkin), mieloma múltiplo, macroglobulinemia de Waldenstrom e doença da cadeia pesada. Em algumas formas de realização, os cânceres são de natureza

epitelial e incluem, entre outros, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer cervical, câncer de cólon, câncer ginecológico, câncer renal, câncer de laringe, câncer de pulmão, câncer de boca, câncer de cabeça e pescoço, câncer de ovário câncer, câncer de pâncreas, câncer de próstata ou câncer de pele. Em outras formas de realização, o câncer é câncer de mama, câncer de próstata, câncer de pulmão ou câncer de cólon. Em ainda outras formas de realização, o câncer epitelial é câncer de pulmão de células não pequenas, carcinoma de células renais não papilares, carcinoma cervical, carcinoma ovariano (por exemplo, carcinoma ovariano seroso) ou carcinoma de mama. Os cânceres epiteliais podem ser caracterizados de várias outras maneiras, incluindo, mas não se limitando a, células serosas, endometrioides, mucinosas, claras, Brenner ou indiferenciadas.

[00366] O termo "terapia do câncer" ou "agente terapêutico do câncer", conforme usado aqui, refere-se às terapias ou agentes que podem exercer efeito antitumoral ou ter uma atividade antitumoral. Esse efeito antitumoral ou atividade antitumoral pode ser exibido como uma redução na taxa de proliferação de células tumorais, viabilidade ou atividade metastática. Uma maneira possível de mostrar atividade antitumoral é mostrar um declínio na taxa de crescimento de células anormais que surge durante a terapia ou estabilidade ou redução do tamanho do tumor. Essa atividade pode ser avaliada usando modelos de tumor aceitos *in vitro* ou *in vivo*, incluindo, entre outros, modelos de xenoenxerto, modelos de aloenxerto, modelos MMTV e outros modelos conhecidos conhecidos na técnica para investigar a atividade antitumoral.

[00367] Conforme usado neste documento, o termo "prevenir", "prevenir" ou "prevenir" qualquer doença ou distúrbio significa a prevenção do início, recorrência ou disseminação, no todo ou em parte, da doença ou condição descrita aqui. ou um sintoma do mesmo.

[00368] Como aqui utilizado, um sujeito está "precisando" de um tratamento se esse indivíduo se beneficiaria biologicamente, medicamente ou na qualidade de vida de tal tratamento.

[00369] O termo "agente terapêutico" é reconhecido na técnica e refere-se a qualquer substância que, mediante administração a um indivíduo em necessidade, seja biologicamente, fisiologicamente ou farmacologicamente ativa e atue local ou sistemicamente para exercer um efeito terapêutico benéfico. o sujeito.

[00370] O termo "imunocombinado" ou "anticorpo-droga-combinado (ADC)", conforme aqui utilizado, refere-se à ligação de uma fração de ligação ao antígeno (por exemplo, um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo) com um polinucleotídeo imunomodulador como aqui descrito . A ligação pode ser ligações covalentes ou interações não covalentes e pode incluir quelação. Vários ligantes, conhecidos na técnica ou aqui fornecidos, podem ser empregados para formar o imunocombinado. Em algumas formas de realização, o imunocombinado é um combinado da Fórmula (C) conforme aqui fornecido.

[00371] O termo "fração de ligação ao antígeno", conforme aqui utilizado, refere-se a uma fração capaz de se ligar especificamente a um antígeno e inclui, mas não está limitado a, anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno.

[00372] O termo "imunoconjugado CpG-Ab" ou "CpG-Ab", conforme aqui utilizado, refere-se à ligação de um anticorpo (Ab) ou um seu fragmento de ligação ao antígeno a um polinucleotídeo imunostimulador contendo CpG, como aqui descrito.

[00373] O termo "agonista de células T", conforme aqui utilizado, refere-se a qualquer agente que estimule seletivamente a proliferação, diferenciação e/ou sobrevivência de células T a partir de uma população inicial de células mista. Assim, a população celular resultante é enriquecida com um número aumentado de células T em comparação com a população inicial de células. Os agonistas de células T que encontram uso na presente divulgação incluem, mas não estão limitados a, moléculas de antígeno que se ligam especificamente a receptores de células T (TCRs), bem como moléculas co-estimuladoras de células T. Exemplos de moléculas co-estimuladoras de células T incluem, entre outros, OX40, CD2, CD27, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278), 4-1BB (CD137), GITR, CD30, CD40, BAFFR, HVEM, CD7, LIGHT, NKG2C, SLAMF7, NKp80, CD160, B7-H3 e CD83. Em formas de realização particulares, o agonista de células T é um anticorpo contra uma molécula co-estimuladora de células T. Em formas de realização particulares, o agonista de células T é um antígeno associado a um tumor (TAA). Em formas de realização particulares, o agonista de células T é um antígeno patogênico.

[00374] Como usado aqui, um "ponto de verificação imune" ou "molécula de ponto de verificação imune" é uma molécula no sistema imunológico que modula um sinal. Uma molécula de ponto de verificação imune pode ser uma molécula de ponto de verificação estimulante, isto é, aumentar um sinal ou molécula de ponto de verificação inibitório, isto é, diminuir um sinal.

Em formas de realização específicas, o ponto de verificação imune é uma proteína expressa pelas células T ou pelas células apresentadoras de antígeno (APC). Certos tipos de células cancerígenas expressam proteínas do ponto de verificação imune para evitar a liberação imune. O uso de moduladores do ponto de verificação imune para inibir a interação entre a proteína do ponto de verificação imune expressa pelas células cancerígenas e a proteína do ponto de verificação imune expressa pelas células T provou ser eficaz em certos tratamentos contra o câncer.

[00375] Como usado aqui, um "modulador de ponto de verificação imune" é um agente capaz de alterar a atividade de um ponto de verificação imune em um sujeito. Em certas formas de realização, um modulador de ponto de verificação imune altera a função de uma ou mais moléculas de ponto de verificação imune, incluindo, entre outras, PD-1, PD-L1, PD-L2, TIM-3, LAG-3, CEACAM-1, CEACAM-5, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, CD47, 2B4 e TGFR. O modulador do ponto de verificação imune pode ser um agonista ou um antagonista do ponto de verificação imune. Em algumas formas de realização, o modulador do ponto de verificação imune é uma proteína de ligação do ponto de verificação imune (por exemplo, um anticorpo, fragmento Fab de anticorpo, anticorpo divalente, conjugado de droga anticorpo, scFv, proteína de fusão, anticorpo bivalente ou anticorpo tetraivalente). Em outras formas de realização, o modulador do ponto de verificação imune é uma molécula pequena. Numa modalidade particular, o modulador do ponto de verificação imune é um anticorpo anti-PD1 ou anti-PD-L1.

[00376] O termo "entrega direcionada" ou a forma verbal "alvo", conforme aqui utilizado, refere-se ao processo que promove a

chegada de um agente entregue (como um polinucleotídeo imunoestimulador) a um órgão, tecido, célula e/ou intracelular específico compartimento (referido como o local de destino) mais do que qualquer outro órgão, tecido, célula ou compartimento intracelular (referido como o local não-alvo). A entrega direcionada pode ser detectada usando métodos conhecidos na técnica, por exemplo, comparando a concentração do agente entregue em uma população celular alvo com a concentração do agente entregue em uma população celular não alvo após administração sistêmica. Conforme fornecido neste documento, a entrega direcionada resulta em pelo menos 2 vezes maior concentração em um local direcionado em comparação com um local não-alvo. A entrega direcionada pode ser alcançada por ligação específica da porção de direcionamento a uma porção receptora associada a uma célula direcionada. Como aqui utilizado, uma porção receptora associada a uma célula alvo pode estar localizada na superfície ou dentro do citosol da célula alvo. Em algumas formas de realização, a fração receptora é um antígeno associado à célula alvo.

[00377] O termo "anormal" quando usado no contexto de organismos, tecidos, células ou componentes dos mesmos, refere-se aos organismos, tecidos, células ou componentes dos mesmos que diferem em pelo menos uma característica observável ou detectável (por exemplo, idade, tratamento, hora do dia etc.) dos organismos, tecidos, células ou componentes dos mesmos que exibem a característica respectiva "normal" (esperada). Características normais ou esperadas para um tipo de célula ou tecido podem ser anormais para um tipo diferente de célula ou

tecido. Em algumas formas de realização, uma célula anormal é uma célula cancerígena.

[00378] O termo "terapia de combinação" refere-se à administração de dois ou mais agentes terapêuticos para tratar uma condição ou distúrbio (por exemplo, câncer) descrito na presente divulgação. Essa administração abrange a co-administração desses agentes terapêuticos de uma maneira substancialmente simultânea, como a administração de uma única formulação com uma proporção fixa de agentes terapêuticos ou em formulações separadas (por exemplo, cápsulas e/ou formulações intravenosas) para cada agente terapêutico. Além disso, essa administração também abrange o uso de cada tipo de agente terapêutico de maneira sequencial ou separada, aproximadamente ao mesmo tempo ou em momentos diferentes. Essa administração também abrange cada componente sendo formulado como uma formulação separada que pode ser administrada em momentos diferentes e/ou através de diferentes vias de administração. Em qualquer caso, o regime de tratamento da terapia combinada proporcionará efeitos terapêuticos benéficos no tratamento das condições ou distúrbios aqui descritos.

[00379] Como usado neste documento, o termo "co-administração" ou "co-administração" e semelhantes se refere ao ato de administrar dois ou mais agentes terapêuticos (por exemplo, um imunocombinado e um modulador de ponto de verificação imune), compostos, terapias, ou similares, na mesma época. A coadministração pode se referir à administração simultânea, onde os diferentes agentes terapêuticos da presente divulgação, por exemplo, um imunocombinado, agonistas de células T, moduladores de pontos de verificação imunes ou outros quimioterapêuticos,

podem ser combinados na mesma formulação ou formulados separadamente para administração simultânea. a um assunto. A co-administração também pode se referir à administração sequencial. A ordem ou sequência de administração dos diferentes agentes terapêuticos da invenção, por exemplo, um imunocombinado, agonistas de células T, moduladores de pontos de verificação imunes ou outros quimioterapêuticos pode variar e não está confinada a nenhuma sequência específica. A coadministração também pode se referir à situação em que dois ou mais agentes são administrados em diferentes regiões do corpo ou através de diferentes esquemas de administração, por exemplo, onde um primeiro agente é administrado sistemicamente e um segundo agente é administrado intratumoralmente, ou onde um primeiro agente é administrado intratumoralmente e um segundo agente é administrado sistemicamente no sangue ou proximamente ao tumor. A co-administração também pode se referir a dois ou mais agentes administrados através do mesmo esquema de entrega, por exemplo, onde um primeiro agente é administrado intratumoralmente e um segundo agente é administrado intratumoralmente.

[00380] "Injeção intratumoral" refere-se à administração de um agente conforme aqui fornecido diretamente na massa celular do tumor e/ou no microambiente do tumor. Como aqui utilizado, o microambiente tumoral inclui o meio de neoplasia que cria um ambiente estrutural e/ou funcional para o processo neoplásico sobreviver, expandir ou se espalhar. Um microambiente tumoral é constituído pelas células, moléculas, fibroblastos, matriz extracelular e vasos sanguíneos que circundam e alimentam uma ou mais células neoplásicas que formam o tumor. Exemplos de células ou tecidos no microambiente tumoral incluem, entre outros,

vasculatura tumoral, linfócitos infiltrantes de tumor, células reticulares de fibroblastos, células progenitoras endoteliais (EPC), fibroblastos associados ao câncer, pericitos, outras células estromais, componentes dos extracelulares matriz (MEC), células dendríticas, células apresentadoras de antígeno, células T, células T reguladoras, macrófagos, neutrófilos e outras células imunes localizadas próximas a um tumor. Exemplos de funções celulares que afetam o microambiente tumoral incluem, entre outros, produção de citocinas e/ou quimiocinas, resposta a citocinas, processamento de antígenos e apresentação do antígeno peptídico, regulação da quimiotaxia e migração de leucócitos, regulação da expressão gênica, ativação do complemento, regulação das vias de sinalização, citotoxicidade mediada por células, imunidade mediada por células, respostas imunes humorais e outras respostas imunes inatas ou adaptativas. Medindo o efeito da modulação dessas funções celulares

[00381] Os termos "sujeito", "paciente", "indivíduo" e similares são usados de forma intercambiável neste documento e referem-se a qualquer animal ou células dele, *in vitro* ou *in vivo*, alteráveis aos métodos aqui fornecidos. Em certas formas de realização não limitativas, o paciente, sujeito ou indivíduo é um mamífero, como um ser humano, ou outros animais, como animais selvagens (como garças, cegonhas, guindastes, etc.), gado (como patos, gansos), etc.) ou animais experimentais (como orangotangos, macacos, camundongos, camundongos, coelhos, porquinhos-da-índia, marmotas, esquilos à terra, etc.).

[00382] O termo "sobrevivência", usado no contexto do câncer, inclui qualquer um dos seguintes: sobrevivência até a mortalidade, também conhecida como sobrevivência geral (em que

a referida mortalidade pode ser independente da causa ou relacionada ao tumor); "Sobrevivência livre de recorrência" (em que o termo recorrência deve incluir recorrência localizada e distante); sobrevivência livre de metástases; sobrevida livre de doença (em que o termo doença deve incluir câncer e doenças associadas a ele). A duração da referida sobrevivência pode ser calculada por referência a um ponto de partida definido (por exemplo, tempo de diagnóstico ou início do tratamento) e ponto final (por exemplo, morte, recorrência ou metástase). Além disso, os critérios para eficácia do tratamento podem ser expandidos para incluir resposta à quimioterapia, probabilidade de sobrevivência, probabilidade de metástase dentro de um determinado período de tempo e probabilidade de recorrência do tumor.

[00383] A invenção fornece polinucleotídeos imunomodulados (por exemplo, imunoestimulantes) e conjugados contendo uma fração alvo e um ou mais polinucleotídeos imunomodulados (por exemplo, imunoestimulantes). Os polinucleotídeos imunomodulados podem conter uridina 5 modificada ou citidina 5 modificada. A inclusão de uridina modificada em 5 (por exemplo, 5-etinil-uridina) na extremidade 5' dos polinucleotídeos imunomoduladores (por exemplo, entre os dois nucleosídeos 5'-terminais) pode melhorar as propriedades imunomoduladoras dos polinucleotídeos. Os polinucleotídeos imunomodulados podem ser mais curtos (por exemplo, contêm um total de 6 a 16 nucleotídeos ou 12 a 14 nucleotídeos) do que os CDN normais de CpG, que têm 18 a 28 nucleotídeos de comprimento. Os polinucleotídeos imunomodulados mais curtos da invenção (por exemplo, aqueles que contêm um total de 6 a 16 nucleotídeos ou 12 a 14 nucleotídeos) podem reter a

atividade imunomoduladora dos ODNs CpG típicos mais longos e podem exibir maior atividade imunomoduladora (por exemplo, conforme medido por A ativação de NFκB ou as alterações nos níveis de expressão de pelo menos uma citocina (por exemplo, IL-6 ou IL-10), em comparação com CDNs mais longos de CpG. Vantajosamente, os polinucleotídeos imunomodulados mais curtos são mais fáceis e econômicos de preparar, pois a síntese envolveria menos etapas de síntese de polinucleotídeos do que a síntese de um CDN normal de CpG de comprimento total. Os polinucleotídeos imunomoduladores podem conter um ou mais espaçadores abásicos e/ou fosfotriésteres internucleosídeos.

[00384] Os polinucleotídeos imunomodulados da invenção podem exibir estabilidade (por exemplo, estabilidade contra nucleases) que é superior à dos CpG ODNs contendo principalmente fosfato de internucleosídeo (por exemplo, mais de 50% de fosfatos de internucleosídeo) sem sacrificar substancialmente sua atividade imunoestimulante. Este efeito pode ser conseguido, por exemplo, incorporando pelo menos 50% (por exemplo, pelo menos 70%) de fosforotioatos ou fosforoditioatos de internucleosídeos ou através da inclusão de fosfotriésteres de internucleosídeos e/ou espaçadores abásicos de internucleosídeos. Os fosfotriésteres e os espaçadores abásicos também são convenientes para a conjugação com uma porção de direcionamento. Os fosfotriésteres à base de fosfato e espaçadores abásicos também podem ser utilizados para redução da atividade fora do alvo, em relação aos polinucleotídeos com esqueletos totalmente fosforotioato. Sem desejar estar vinculado pela teoria, este efeito pode ser alcançado reduzindo a entrega automática sem interromper a entrega mediada pela porção alvo para as células alvo. Por

consequente, um polinucleotídeo da invenção pode incluir 15 ou menos fosforotioatos internucleosídeos contíguos (por exemplo, 14 ou menos, 13 ou menos, 12 ou menos, 11 ou menos ou 10 ou menos fosforotioatos internucleosídeos contíguos). Por exemplo, um polinucleotídeo imunoestimulador contendo um total de 12 a 16 nucleosídeos pode conter 10 ou menos fosforotioatos internucleosídeos contíguos.

[00385] O polinucleotídeo imunoestimulador da invenção pode conter um total de 50 ou menos nucleosídeos (por exemplo, 30 ou menos, 28 ou menos ou 16 ou menos nucleosídeos). O polinucleotídeo imunoestimulador da invenção pode conter um total de pelo menos 6 nucleosídeos (por exemplo, 10 ou mais ou 12 ou mais nucleosídeos). Por exemplo, o polinucleotídeo imunoestimulador da invenção pode conter um total de 6 a 30 nucleosídeos (por exemplo, um total de 6 a 28 nucleosídeos, um total de 6 a 20 nucleosídeos, um total de 6 a 16 nucleosídeos, um total de 10 a 20 nucleosídeos, um total de 10 a 16 nucleosídeos, um total de 12 a 28 nucleosídeos, um total de 12 a 20 nucleosídeos ou um total de 12 a 16 nucleosídeos).

[00386] O polinucleotídeo imunoestimulador da invenção pode incluir um ou mais fosfotriésteres (por exemplo, fosfotriésteres internucleosídeos) e/ou fosforotioatos (por exemplo, de 1 a 6 ou de 1 a 4), por exemplo, em um ou ambos os terminais (por exemplo, dentro do seis nucleosídeos do terminal 5' ou os seis nucleosídeos do terminal 3'). A inclusão de um ou mais fosfotriésteres internucleosídeos e/ou fosforotioatos pode melhorar a estabilidade do polinucleotídeo, reduzindo a taxa de degradação mediada por exonuclease.

[00387] Em certas formas de realização, o polinucleotídeo imunoestimulador da invenção contém um fosfotriéster ou um fosfodiéster terminal, em que o fosfotriéster ou o fosfodiéster terminal inclui um ligante ligado a uma fração alvo ou a um grupo conjugado e opcionalmente a um ou mais (por exemplo, 1 a 6) porções auxiliares. Em formas de realização particulares, o polinucleotídeo imunoestimulador contém apenas um ligante. Em algumas formas de realização, o polinucleotídeo imunoestimulador contém apenas um grupo conjugador.

[00388] O polinucleotídeo da invenção (por exemplo, polinucleotídeo imunoestimulador) pode ser um polinucleotídeo hibridado incluindo uma fita e seu complemento parcial ou total. Os polinucleotídeos hibridados podem ter pelo menos 6 pares de bases complementares (por exemplo, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 ou 23), até o número total de nucleotídeos presentes na fita mais curta incluída. Por exemplo, a porção hibridada do polinucleotídeo hibridado pode conter 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 ou 23 pares de bases.

[00389] Os conjugados da invenção contém uma fração alvo e um ou mais polinucleotídeos imunomodulados (por exemplo, imunoestimulantes) polinucleotídeos (por exemplo, de 1 a 6 ou de 1 a 4 (por exemplo, 1 ou 2) imunomodulados. Nos conjugados, cada um dos polinucleotídeos imunomodulados inclui independentemente um ligante. Uma porção de direcionamento é covalentemente ligada ao ligante. O ligante pode ser ligado a uma nucleobase, espaçador abásico, fosfato, fosforotioato ou fosforoditioato no polinucleotídeo imunomodulador. As células alvo dos conjugados da invenção são APCs profissionais (por exemplo, células B, pDCs

ou macrófagos). A fração alvo pode ser uma fração de ligação ao antígeno (por exemplo, um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno), um polipeptídeo, um aptâmero ou um grupo incluindo uma ou mais moléculas pequenas (por exemplo, manose). Nos conjugados da invenção, uma fração alvo pode ser um anticorpo ou um fragmento de anticorpo. Um conjugado da invenção pode conter um anticorpo ou um fragmento de anticorpo e um ou mais polinucleotídeos imunomoduladores ligados covalentemente a um marcador Q no anticorpo ou no fragmento de anticorpo. A etiqueta Q pode ser terminal-N ou terminal-C. O marcador Q pode ser disposto na cadeia pesada ou leve do anticorpo ou no fragmento de anticorpo. A utilização de entrega dirigida à porção dos polinucleotídeos imunomodulados da invenção para tecidos e células especificamente direcionados pode superar as desvantagens da distribuição tipicamente desigual de polinucleotídeos imunomoduladores *in vivo*. Além disso, a entrega com base na porção de direcionamento dos polinucleotídeos imunomoduladores da invenção pode ser vantajosa para administração sistêmica ou para administração a um tecido alvo de polinucleotídeos imunomoduladores, pois a administração sistêmica e a administração a um tecido alvo podem produzir uma distribuição indesejável do imunomodulador polinucleotídeos através da circulação sanguínea *in vivo*, enquanto que um conjugado da invenção pode sofrer a entrega intracelular predominantemente no tecido ou células alvo, mesmo quando administrado sistemicamente. As vantagens relacionadas à distribuição podem ser particularmente pronunciadas em conjugados contendo polinucleotídeos imunomoduladores curtos (por exemplo, polinucleotídeos imunomoduladores contendo um

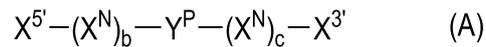
total de 6 a 16 nucleosídeos (por exemplo, um total de 10 a 16 ou 12 a 16 nucleosídeos)).

[00390] Os conjugados da invenção podem ainda conter uma ou mais (por exemplo, de 1 a 6) porções auxiliares (por exemplo, polietileno glicóis (PEGs)). A fração auxiliar pode fazer parte de um grupo de capeamento, grupo bioreversível ou grupo não bioreversível. As porções auxiliares podem ser ligadas aos ligantes (por exemplo, aos ligantes ligados a fosfatos, fosforotioatos ou fosforoditioatos nos polinucleotídeos imunomoduladores (por exemplo, imunoestimulantes)). A inclusão das porções auxiliares (por exemplo, PEGs) nos conjugados da invenção pode melhorar as propriedades farmacocinéticas e/ou de biodistribuição dos conjugados em relação a um conjugado de referência sem essas porções auxiliares.

[00391] Um ou mais dos polinucleotídeos imunomodulados da invenção podem ser conjugados com uma porção de direcionamento (por exemplo, uma porção de ligação ao antígeno) que tem como alvo uma célula apresentadora de antígeno (APC; por exemplo, uma APC profissional (por exemplo, célula B , pDC ou macrófago)). Entrega dos polinucleotídeos imunomodulados da invenção ou conjugados da invenção a uma célula (por exemplo, uma célula apresentadora de antígeno (APC; por exemplo, uma APC profissional (por exemplo, célula B, pDC ou macrófago))) contendo um número endossômico O receptor do tipo (por exemplo, TLR9) pode ser usado para agonizar (para polinucleotídeos imunoestimulantes) ou antagonizar (para polinucleotídeos imunossuppressores) o receptor endossômico do tipo Toll na célula. Sem estar limitado pela teoria, a ativação de um receptor endossômico do tipo Toll pode induzir citocinas pró-

inflamatórias (por exemplo, IL-6, IL-10 e/ou interferon tipo I); acredita-se que esta atividade seja útil para o tratamento de vários tumores (por exemplo, tumores sólidos e líquidos em um paciente).

[00392] Em uma modalidade, é aqui fornecido um oligonucleotídeo de Fórmula (A):



ou um estereoisômero, uma mistura de dois ou mais diastereômeros, um tautômero ou uma mistura de dois ou mais tautômeros; ou um sal, solvato ou hidrato farmacologicamente aceitável do mesmo; em que:

cada X^N é, independentemente, um nucleotídeo;

$X^{3'}$ é um nucleotídeo terminal 3';

$X^{5'}$ é um nucleotídeo terminal 5';

Y^P é um fosfotriéster internucleosídeos; e

b e c são cada um, um número inteiro variando de aproximadamente 0 a 25; com a condição de que sua soma não seja inferior a 5;

em que o oligonucleotídeo compreende um nucleotídeo com uma nucleobase modificada.

[00393] Em certas formas de realização, b é um número inteiro que varia aproximadamente de 1 a aproximadamente 15. Em certas formas de realização, b é um número inteiro de aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9,

aproximadamente 10, aproximadamente 11, aproximadamente 12, aproximadamente 13, aproximadamente 14 ou aproximadamente 15. Em certas formas de realização, b é um número inteiro de aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 11 ou aproximadamente 14. Em certas formas de realização, b é um número inteiro de aproximadamente 3. Em certas formas de realização, b é um número inteiro de aproximadamente 4. Em certas formas de realização, b é um número inteiro de aproximadamente 11. Em certas formas de realização, b é um número inteiro de aproximadamente 14.

[00394] Em certas formas de realização, c é um número inteiro que varia de 0 a aproximadamente 10. Em certas formas de realização, c é um número inteiro de aproximadamente 0, aproximadamente 1, aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9 ou aproximadamente 10. Em certas formas de realização, c é um número inteiro de aproximadamente 0 ou aproximadamente 8. Em certas formas de realização, c é um número inteiro de aproximadamente 0. Em certas formas de realização, c é um número inteiro de aproximadamente 8 .

[00395] Em certas formas de realização, b é um número inteiro de aproximadamente 3 e c é um número inteiro de aproximadamente 8. Em certas formas de realização, b é um número inteiro de aproximadamente 4 e c é um número inteiro de aproximadamente 8. Em certas formas de realização, b é um número inteiro de aproximadamente 11 e c é um número inteiro de aproximadamente 0. Em certas formas de realização, b é um número inteiro de aproximadamente 14 e c é um número inteiro de aproximadamente 0.

[00396] Em certas formas de realização, b e c juntos no total estão variando aproximadamente de 5 a aproximadamente 20. Em certas formas de realização, b e c juntos no total variam de aproximadamente 5 a aproximadamente 15. Em certas formas de realização, b e c juntos no total são aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 11, aproximadamente 12, aproximadamente 13, aproximadamente 14 ou aproximadamente 15. Em certas formas de realização, b e c juntos no total são aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 11, aproximadamente 12, aproximadamente 13 ou aproximadamente 14. Em certas formas de realização, b e c juntos no total são aproximadamente 11. Em certas formas de realização, b e c juntos no total são aproximadamente 12. Em certas formas de realização, b e c juntos no total são aproximadamente 14.

[00397] Em certas formas de realização, cada X^N é independentemente um 2'-desoxirribonucleotídeo ou um ribonucleotídeo 2' modificado. Em certas formas de realização, cada X^N é independentemente 2'-desoxiadenosina (A), 2'-desoxiguananosina (G), 2'-desoxicitididina (C), uma 5-halo-2'-desoxicitidina, 2'-desoxitimidina (T), 2'-desoxiuridina (U), 5-halo-2'-desoxiuridina, 2'-fluororribonucleotídeo, 2'-metoxirribonucleotídeo ou 2'-(2-metoxietoxi) ribonucleotídeo. Em certas formas de realização, cada X^N é independentemente um 2'-desoxirribonucleotídeo. Em certas formas de realização, cada X^N é independentemente 2'-desoxiadenosina, 2'-desoxiguananosina, 2'-desoxicitididina, 5-halo-2'-desoxicitidina, 2'-desoxitimidina, 2'-desoxiuridina ou 5-halo-2'-deoxiuridina. Em

certas formas de realização, cada X^N é cada X^N é independentemente 2'-desoxiadenosina, 2'-desoxiguananosina, 2'-desoxicitidina, 2'-desoxitimidina, 5-bromo-2'-desoxiuridina ou 5-iodo-2'-desoxiuridina.

[00398] Em certas formas de realização, $X^{3'}$ é um 2'-desoxirribonucleotídeo ou um ribonucleotídeo 2'modificado. Em certas formas de realização, $X^{3'}$ é um 2'-desoxirribonucleotídeo. Em certas formas de realização, $X^{3'}$ é 2'-desoxiadenosina, 2'-desoxiguananosina, 2'-desoxicitidina, uma 5-halo-2'-desoxicitidina, 2'-desoxitimidina, 2'-desoxiuridina, 5-halo-2'-desoxiuridina, um 2'-fluororribonucleotídeo, um 2'-metoxirribonucleotídeo ou um 2'-(2-metoxietoxi)ribonucleotídeo. Em certas formas de realização, $X^{3'}$ é 2'-desoxiadenosina, 2'-desoxiguananosina, 2'-desoxicitidina, uma 5-halo-2'-desoxicitidina, 2'-desoxitimidina, 2'-desoxiuridina ou 5-halo-2'-desoxiuridina. Em certas formas de realização, $X^{3'}$ é 2'-desoxitimidina. Em certas formas de realização, $X^{3'}$ é um 2'-desoxirribonucleotídeo com uma base de pirimidina substituída. Em certas formas de realização, $X^{3'}$ é um 2'-desoxirribonucleotídeo com uma base de pirimidina substituída em 5. Em certas formas de realização, $X^{3'}$ é 2'-desoxitimidina, 5-halo-2'-desoxicitidina ou 5-halo-2'-desoxituridina. Em certas formas de realização, $X^{3'}$ é 2'-desoxitimidina, 5-bromo-2'-desoxicitidina, 5-iodo-2'-desoxicitidina, 5-bromo-2'-desoxiuridina ou 5-iodo-2'-desoxiuridina. Em certas formas de realização, $X^{3'}$ é 2'-desoxitimidina, 5-bromo-2'-desoxiuridina ou 5-iodo-2'-desoxiuridina. Em certas formas de realização, $X^{3'}$ é um nucleotídeo terminal compreendendo um grupo de cobertura 3'. Em certas formas de realização, o grupo de cobertura 3' é um

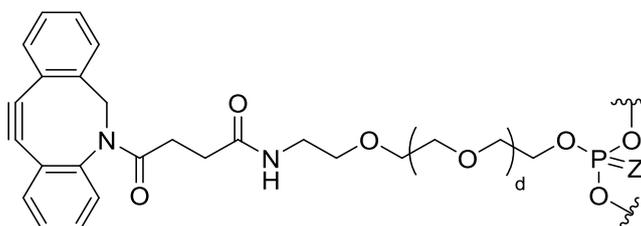
fosfoéster terminal. Em certas formas de realização, o grupo de cobertura 3' é 3-hidroxil-propilfosforil (isto é, $-P(O_2)-CH_2CH_2CH_2OH$).

[00399] Em certas formas de realização, $X^{5'}$ é um 2'-desoxirribonucleotídeo ou um ribonucleotídeo 2' modificado. Em certas formas de realização, $X^{5'}$ é um 2'-desoxirribonucleotídeo. Em certas formas de realização, $X^{5'}$ é 2'-desoxiadenosina, 2'-desoxiguananosina, 2'-desoxicitidina, uma 5-halo-2'-desoxicitidina, 2'-desoxitimidina, 2'-desoxiuridina, 5-halo-2'-desoxiuridina, um 2'-fluororribonucleotídeo, um 2'-metoxirribonucleotídeo ou um 2'-(2-metoxietoxi)ribonucleotídeo. Em certas formas de realização, $X^{5'}$ é 2'-desoxiadenosina, 2'-desoxiguananosina, 2'-desoxicitidina, uma 5-halo-2'-desoxicitidina, 2'-desoxitimidina, 2'-desoxiuridina ou 5-halo-2'-desoxiuridina. Em certas formas de realização, $X^{5'}$ é um 2'-desoxirribonucleotídeo com uma base de pirimidina substituída. Em certas formas de realização, $X^{5'}$ é um 2'-desoxirribonucleotídeo com uma base de pirimidina substituída em 5. Em certas formas de realização, $X^{5'}$ é 2'-desoxitimidina, 5-halo-2'-desoxitimidina ou 5-halo-2'-desoxiuridina. Em certas formas de realização, $X^{5'}$ é uma 5-halo-2'-desoxicitidina. Em certas formas de realização, $X^{5'}$ é uma 5-halo-2'-desoxiuridina. Em certas formas de realização, $X^{5'}$ é 2'-desoxitimidina, 5-bromo-2'-desoxicitidina, 5-iodo-2'-desoxicitidina, 5-bromo-2'-desoxiuridina ou 5-iodo-2'-desoxiuridina. Em certas formas de realização, $X^{5'}$ é 2'-desoxitimidina, 5-bromo-2'-desoxiuridina ou 5-iodo-2'-desoxiuridina. Em certas formas de realização, $X^{5'}$ é 5-bromo-2'-desoxiuridina. Em certas formas de realização, $X^{5'}$ é 5-iodo-2'-desoxiuridina. Em certas formas de realização, $X^{5'}$ tem

um grupo 3'-fosforotato. Em certas formas de realização, X^{5'} tem um grupo 3'-fosforotato com uma quiralidade de Rp. Em certas formas de realização, X^{5'} tem um grupo 3'-fosforotato com uma quiralidade de Sp.

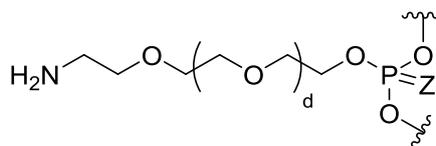
[00400] Em certas formas de realização, YP é um fosfotiotiéster internucleosídeo.

[00401] Em certas formas de realização, Y^P é:



em que Z é O ou S; e d é um número inteiro variando de aproximadamente 0 a aproximadamente 50. Em certas formas de realização, Z é O. Em certas formas de realização, Z é S. Em certas formas de realização, d é um número inteiro variando de aproximadamente 0 a aproximadamente 10. Em certas formas de realização, d é um número inteiro variando de aproximadamente 0 a aproximadamente 5. Em certas formas de realização, d é um número inteiro de aproximadamente 0, aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4 ou aproximadamente 5. Em certas formas de realização, d é um número inteiro de aproximadamente 0, aproximadamente 1 ou aproximadamente 3.

[00402] Em certas formas de realização, Y^P é:



em que Z é O ou S; e d é um número inteiro variando de aproximadamente 0 a aproximadamente 50. Em certas formas de realização, Z é O. Em certas formas de realização, Z é S. Em certas formas de realização, d é um número inteiro variando de aproximadamente 0 a aproximadamente 10. Em certas formas de realização, d é um número inteiro variando de aproximadamente 0 a aproximadamente 5. Em certas formas de realização, d é um número inteiro de aproximadamente 0, aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4 ou aproximadamente 5. Em certas formas de realização, d é um número inteiro de aproximadamente 0, aproximadamente 1 ou aproximadamente 3.

[00403] Em certas formas de realização, o oligonucleotídeo de Fórmula (A) compreende um fosfotriéster internucleosídeo adicional. Numa modalidade, o fosfotriéster internucleosídeo adicional é um alquilfosfotriéster C₁₋₆. Noutra modalidade, o fosfotriéster internucleosídeo adicional é etilfosfotriéster.

[00404] Em certas formas de realização, o oligonucleotídeo de Fórmula (A) compreende uma 5-halo-2'-desoxiuridina. Em uma modalidade, a 5-halo-2'-desoxiuridina é 5-fluoro-2'-desoxiuridina, 5-bromo-2'-desoxiuridina ou 5-iodo-2'-desoxiuridina. Em outra modalidade, a 5-halo-2'-desoxiuridina é 5-bromo-2'-desoxiuridina ou 5-iodo-2'-desoxiuridina. Em ainda outra modalidade, a 5-halo-2'-desoxiuridina é 5-fluoro-2'-desoxiuridina. Em ainda outra modalidade, a 5-halo-2'-desoxiuridina é 5-bromo-2'-desoxiuridina. Em ainda outra modalidade, a 5-halo-2'-desoxiuridina é 5-iodo-2'-desoxiuridina.

[00405] Em certas formas de realização, o oligonucleotídeo de Fórmula (A) compreende três ou mais 2'-desoxicitidinas. Em certas formas de realização, o oligonucleotídeo de Fórmula (A) compreende três 2'-desoxicitidinas.

[00406] Em certas formas de realização, o oligonucleotídeo de Fórmula (A) compreende quatro ou mais 2'-desoxiguananosinas. Em certas formas de realização, o oligonucleotídeo de Fórmula (A) compreende quatro 2'-desoxiguananosinas.

[00407] Em certas formas de realização, o oligonucleotídeo de Fórmula (A) compreende três 2'-desoxicitidinas e quatro 2'-desoxiguananosinas. Em certas formas de realização, o oligonucleotídeo de Fórmula (A) compreende um, dois ou três dinucleotídeos CG. Em certas formas de realização, o oligonucleotídeo de Fórmula (A) compreende três dinucleotídeos CG.

[00408] Em certas formas de realização, o oligonucleotídeo de Fórmula (A) compreende três ou mais 2'-desoxitimidinas. Em certas formas de realização, o oligonucleotídeo de Fórmula (A) compreende três, quatro, cinco, seis, sete ou oito 2'-desoxitimidinas. Em certas formas de realização, o oligonucleotídeo de Fórmula (A) compreende três, quatro, cinco ou oito 2'-desoxitimidinas.

[00409] Em certas formas de realização, o oligonucleotídeo de Fórmula (A) não compreende uma 2'-desoxiadenosina. Em certas formas de realização, o oligonucleotídeo de Fórmula (A) compreende uma ou duas 2'-desoxiadenosinas.

[00410] Em certas formas de realização, o oligonucleotídeo de Fórmula (A) tem um comprimento variando de cerca de 5 a cerca de

20 ou de cerca de 6 a cerca de 15 nucleotídeos. Em certas formas de realização, o oligonucleotídeo de Fórmula (A) tem um comprimento de cerca de 6, cerca de 7, cerca de 8, cerca de 9, cerca de 10, cerca de 11, cerca de 11, cerca de 12, cerca de 13, cerca de 14 ou cerca de 15. Em certas formas de realização, o oligonucleotídeo de Fórmula (A) tem um comprimento de cerca de 10, cerca de 11, cerca de 12, cerca de 13, cerca de 14 ou cerca de 15.

[00411] Em certas formas de realização, o oligonucleotídeo de Fórmula (A) compreende um ou mais fosforotioatos de internucleosídeos. Em certas formas de realização, todos os fosfoésteres internucleosídeos no oligonucleotídeo da Fórmula (A) são fosforotioatos internucleosídeos. Em certas formas de realização, o oligonucleotídeo de Fórmula (A) compreende um ou mais fosforotioatos de internucleosídeo quirais.

[00412] Em certas formas de realização, o oligonucleotídeo de Fórmula (A) é p275, p276, p313 ou p347. Em certas formas de realização, o oligonucleotídeo de Fórmula (A) é p236, p238, p243, p246, p308, p361, p362 ou p425. Em certas formas de realização, o oligonucleotídeo de Fórmula (A) é p236, p238, p243, p246, p275, p276, p308, p313, p347, p361, p362, p425, p433, p434, p435, p436, p437, p438, p477, p478, p479, p480, p481, p482, p483, p484, p485, p486, p487, p488 ou p489.

[00413] Em certas formas de realização, o oligonucleotídeo de Fórmula (A) é um oligonucleotídeo imunomodulador.

[00413] Em certas formas de realização, o oligonucleotídeo de Fórmula (A) é um oligonucleotídeo imunomodulador.

[00414] Em uma modalidade, é aqui proporcionado um oligonucleotídeo com uma sequência de $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$ ou um estereoisômero, uma mistura de dois ou mais diastereômeros, um tautômero ou uma mistura de dois ou mais tautômeros dos mesmos; ou um sal, solvato ou hidrato farmacêuticamente aceitável do mesmo; em que:

x é um número inteiro que varia de 1 a 4;

N^1 está ausente ou 2'-desoxitimidina;

N^2 é uma 2'-desoxirribonucleotídeo com uma nucleobase modificada;

N^3 é 2'-desoxiadenosina ou 2'-desoxitimidina, cada uma compreendendo, opcionalmente, um 3'-fosfotriéster;

N^4 é 2'-desoxiadenosina ou 2'-desoxitimidina;

N^5 é 2'-desoxitimidina que compreende, opcionalmente, um 3'-fosfotriéster; e

C é 2'-desoxicitidina e G é 2'-desoxiganosina.

[00415] Em certas formas de realização, em $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$, x é um número inteiro de 1, 2, 3 ou 4. Em certas formas de realização, em $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$, x é um número inteiro de 1. Em certas formas de realização, em $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$, x é um número inteiro de 4.

[00416] Em certas formas de realização, em $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$, N^1 está ausente. Em certas formas de realização, em $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$, N^1 é 2'-desoxitimidina.

[00417] Em certas formas de realização, em $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$, N^2 é um 2'-desoxirribonucleotídeo com uma base de pirimidina substituída. Em certas formas de realização,

em $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$, N^2 é um 2'-desoxirribonucleotídeo com uma base de pirimidina substituída em 5. Em certas formas de realização, em $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$, N^2 é uma 5-halo-2'-desoxicitidina ou uma 5-halo-2'-desoxiuridina. Em certas formas de realização, em $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$, N^2 é 5-bromo-2'-desoxiuridina ou 5-iodo-2'-desoxiuridina.

[00418] Em certas formas de realização, em $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$, N^3 é 2'-desoxiadenosina compreendendo um 3'-fosfotriéster. Em certas formas de realização, em $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$, N^3 é 2'-desoxitimidina. Em certas formas de realização, em $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$, N^3 é 2'-desoxitimidina compreendendo um 3'-fosfotriéster.

[00419] Em certas formas de realização, em $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$, N^4 é 2'-desoxiadenosina. Em certas formas de realização, em $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$, N^4 é 2'-desoxitimidina.

[00420] Em certas formas de realização, em $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$, N^5 é 2'-desoxitimidina. Em certas formas de realização, em $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$, N^5 é 2'-desoxitimidina compreendendo um 3'-fosfotriéster.

[00421] Em certas formas de realização, o oligonucleotídeo de $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$ compreende um ou mais fosforotioatos internucleosídeos. Em certas formas de realização, o oligonucleosídeo de $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$ compreende, pelo menos, um fosforotioatos quirais internucleosídeos.

[00422] Em certas formas de realização, o oligonucleotídeo de $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$ é p275, p276 ou p313. Em certas formas de realização, o oligonucleotídeo de $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$ é p236, p238, p243, p246, p308, p361, p362 ou p425. Em certas formas de

realização, o oligonucleotídeo de $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$ é p236, p238, p243, p246, p275, p276, p308, p313, p347, p361, p362, p425, p433, p434, p435, p436, p437, p438, p477, p478, p479, p480, p481, p482, p483, p484, p485, p486, p487, p488 ou p489.

▪ **Polinucleotídeos imunoestimulantes**

[00423] Os polinucleotídeos imunoestimulantes da invenção podem funcionar como PAMPs e podem ativar a resposta imune inata ou estimular a resposta imune adaptativa, acionando a sinalização de TLR9 (por exemplo, como agonistas de TLR9). As sequências que podem ser usadas nos polinucleotídeos imunoestimulantes da invenção são aquelas conhecidas na técnica por polinucleotídeos CpG de classe B, ou suas modificações, incluindo 5-halouridina ou 5-alquiluridina ou versões truncadas (por exemplo, aquelas que contêm um total de 6 a 16 nucleosídeos). Os polinucleotídeos imunoestimuladores truncados da invenção (por exemplo, aqueles que contêm um total de 6 a 16 nucleosídeos) podem conter uma sequência polinucleotídica CpG classe B truncada (por exemplo, uma sequência polinucleotídica CpG classe B, da qual um ou mais nucleotídeos 3'-terminais são eliminados ou um ou mais dos nucleotídeos intra-sequência excisados).

[00424] O polinucleotídeo imunoestimulador da invenção contém pelo menos uma sequência imunoestimulante (ISS). Por exemplo, um polinucleotídeo imunoestimulador da invenção pode conter 1, 2, 3 ou 4 ISS. A ISS nos polinucleotídeos imunoestimulantes depende do organismo alvo. A característica comum do ISS usado nos polinucleotídeos imunoestimulantes da invenção é a sequência citidina-p-guanosina, na qual p é um fosfodiéster internucleosídeo (por exemplo, fosfato ou fosforotioato) ou um

fosfotriéster internucleosídeo. De preferência, citidina e guanossina na ISS contêm 2'-desoxirribose. Em algumas formas de realização, o polinucleotídeo imunoestimulador da invenção contém 1, 2 ou 3 ISSs humanos. Por exemplo, o ISS humano pode ser CG ou NCG, onde N é uridina, citidina ou timidina, ou uma versão modificada de uridina ou citidina, conforme divulgado aqui (por exemplo, uma 5-halouridina (por exemplo, 5-iodouridina ou 5-bromouridina), uma 5-alciniluridina (por exemplo, 5-etiniluridina ou 5-propiniluridina), 5-heteroariluridina ou 5-halocitidina); e G é guanossina ou uma sua versão modificada, como aqui divulgado (por exemplo, 7-desazaguanossina). De preferência, o ISS humano é NCG (por exemplo, onde N é 5-halouridina). Em algumas formas de realização, o ISS humano é UCG (por exemplo, onde U é 5-alciniluridina (por exemplo, 5-etiniluridina)). De preferência, um polinucleotídeo imunoestimulador da invenção que visa seres humanos contém um ISS dentro de quatro nucleotídeos contíguos que incluem um nucleotídeo no terminal 5' (por exemplo, um polinucleotídeo imunoestimulador da invenção contém um ISS no terminal 5'). O ISS murino é uma sequência nucleotídica hexamérica: Pu-Pu-CG-Py-Py, em que cada Pu é independentemente um nucleotídeo de purina e cada Py é independentemente um nucleotídeo de pirimidina.

[00425] Em algumas formas de realização, os nucleotídeos de flaqueamento de 5' em relação à CpG nos polinucleotídeos imunoestimulantes da invenção não contêm 2'-alcóxirribose. De preferência, os nucleotídeos de flaqueamento de 5' em relação à CpG nos polinucleotídeos imunoestimulantes da invenção contêm apenas 2'-desoxirribose como açúcares.

[00426] As características estruturais dos polinucleotídeos imunoestimulantes da invenção podem incluir: (1) alto teor de fosforotioatos (por exemplo, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70% ou pelo menos 80% dos nucleosídeos podem ser ligados por fosforotioatos), (2) ausência de caudas poli-G, (3) nucleosídeos nos polinucleotídeos imunoestimulantes podem conter 2'-desoxirriboses ou riboses modificadas em 2' (por exemplo, 2'-halo (por exemplo, 2'-fluoro) ou 2'-alcóxi opcionalmente substituído (por exemplo, 2'-metoxi)) e/ou (4) a inclusão da ISS do terminal 5' que é NCG, na qual N é uridina, citidina ou timidina, ou uma versão modificada de uridina ou citidina, conforme divulgado aqui (por exemplo, uma 5-halouridina (por exemplo, 5-iodouridina ou 5-bromouridina), uma 5-alciniluridina (por exemplo, 5-etiniluridina ou 5-propiniluridina), 5-heteroariluridina ou 5-halocitidina); e G é guanossina ou uma versão modificada da mesma, como aqui divulgado (por exemplo, 7-deazaguanossina).

[00427] Em algumas formas de realização, o conjugado contém uma porção de direcionamento (por exemplo, um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno) e um polinucleotídeo imunomodulador covalentemente ligado à porção de direcionamento.

▪ **Polinucleotídeos imunossupressores**

[00428] Um polinucleotídeo da invenção pode suprimir a resposta imune adaptativa reduzindo a ativação da sinalização de TLR9 (por exemplo, através do antagonismo de TLR9). Em algumas formas de realização, os polinucleotídeos imunossupressores da invenção incluem pelo menos dois 2'-alcóxinucleotídeos que são flanqueadores de 5' em relação a CpG, conforme descrito pela fórmula a seguir: N1-N2-CG, em que cada um de N1 e N2 é

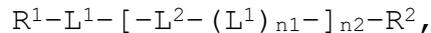
independentemente um nucleotídeo contendo 2'-alcóxirribose (por exemplo, 2'-metoxirribose).

Características estruturais dos polinucleotídeos

Espaçadores Abásicos

[00429] Os polinucleotídeos de imunomodulação aqui divulgados podem incluir um ou mais (por exemplo, um ou dois) espaçadores abásicos (por exemplo, espaçadores abásicos internucleosídeos e/ou espaçadores abásicos terminais). Quando o polinucleotídeo imunomodulador inclui dois ou mais espaçadores abásicos, as estruturas dos espaçadores abásicos podem ser iguais ou diferentes.

[00430] Um espaçador básico é de fórmula (I):



(I)

Onde

n_1 é 0 ou 1,

n_2 é um número inteiro de 1 a 6,

R^1 representa uma ligação a um nucleosídeo no polinucleotídeo imunomodulador,

R^2 representa uma ligação a um nucleosídeo no polinucleotídeo imunomodulador ou a um grupo volumoso,

cada L^1 é independentemente um fosfodiéster ou um fosfotriéster, e

cada L^2 é um análogo do açúcar.

[00431] Em formas de realização particulares, se o espaçador abásico é um internucleosídeo, espaçador abásico, n_1 é 1 e R^2 é

uma ligação a um nucleosídeo, e se o espaçador abásico é um terminal, espaçador abásico, n_1 é 0 ou 1, e R^2 é um vínculo com um grupo de limite.

[00432] Em algumas formas de realização, o espaçador abásico é um internucleosídeo, espaçador abásico ou um espaçador abásico do terminal 3'. Em certas formas de realização, cada dois grupos L^2 contíguos são separados por grupos L^1 (por exemplo, n_1 é 1 para L^1 disposto entre dois grupos L^2 contíguos).

[00433] Em certas formas de realização, o polinucleotídeo imunoestimulante contém um ISS disposto dentro de quatro nucleotídeos contíguos que incluem um nucleotídeo no terminal 5' do polinucleotídeo imunoestimulador,

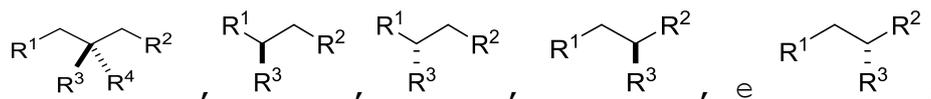
onde o ISS é NCG, onde N é uridina, citidina ou timidina, ou uma versão modificada de uridina ou citidina, conforme divulgado aqui (por exemplo, uma 5-halouridina (por exemplo, 5-iodouridina ou 5-bromouridina), uma 5-alciniluridina (por exemplo, 5-etiniluridina ou 5-propiniluridina), 5-heteroariluridina ou 5-halocitidina) e onde N e C estão ligados entre si através de um fosfodiéster ou fosfotriéster.

▪ *Análogos do Açúcar*

[00434] Um análogo de açúcar é um grupo divalente ou trivalente que é um monossacarídeo C_{3-6} ou alditol C_{3-6} (por exemplo, glicerol), que é modificado para substituir dois grupos hidroxila pelas ligações (i) a um átomo de oxigênio em um fosfoéster e (ii) a um átomo de oxigênio em outro fosfoéster ou a um grupo de capeamento. Um análogo do açúcar é cíclico ou acíclico. Outras modificações opcionais incluídas em um análogo do açúcar são: uma substituição de um, dois ou três dos demais

grupos hidroxila ou átomos de hidrogênio ligados ao carbono por H; alquil C₁₋₆ opcionalmente substituído; -LinkA (-T) p, conforme aqui definido; um grupo conjugador; - (CH₂)^{t1}-OR^Z, em que t1 é um número inteiro de 1 a 6, e R^Z é alquil C₁₋₆ opcionalmente substituído, alquenil C₂₋₆ opcionalmente substituído, alquinilC₂₋₆ opcionalmente substituído, alquinilC₂₋₆ opcionalmente substituído, aril C₆₋₁₄ opcionalmente substituído, opcionalmente cicloalquil C₃₋₈ substituído, (C₁₋₉heterociclil)-C₁₋₆-alquil opcionalmente substituído (C₆₋₁₀aril)-C₁₋₆-alquil ou opcionalmente substituído (C₃₋₈ cicloalquil)-C₁₋₆-alquil; introdução de uma ou duas insaturações (por exemplo, uma ou duas ligações duplas); e substituição de um, dois ou três hidrogênios ou grupos hidroxila por substituintes como definidos para alquil, alcenil, cicloalquil, cicloalcenil ou heterociclil. Em algumas formas de realização, R^Z é C₁₋₆ aminoalquil opcionalmente substituído (por exemplo, C₁₋₆ aminoalquil opcionalmente substituído contendo -NH₂).

[00435] Exemplos não limitativos de análogos de açúcar são alquileno C₂₋₆ opcionalmente substituído, alquenileno C₂₋₆ opcionalmente substituído, cicloalcano-1,3-diil C₅ opcionalmente substituído, cicloalqueno-1,3-diil C₅ opcionalmente substituído, heterociclo-1 opcionalmente substituído, 3-diil (por exemplo, pirrolidina-2,5-diil opcionalmente substituído, tetra-hidrofuran-2,5-diil opcionalmente substituído ou tetra-hidrotiofeno-2,5-diil opcionalmente substituído) ou opcionalmente substituído (alquil C₁₋₄)-(Cicloalquileno C₃₋₈) (por exemplo, (alquil C₁) opcionalmente substituído (cicloalquileno C₃). Exemplos não limitativos de análogos do açúcar são:



Onde

cada um de R^1 e R^2 representa, independentemente, uma ligação a um átomo de oxigênio em um fosfoéster ;

cada um de R^3 e R^4 representa independentemente H; alquil C_{1-6} opcionalmente substituído; $-(CH_2)_{t1}-OR^Z$; ou $-LinkA -R^T$;

onde $t1$ é um número inteiro de 1 a 6;

R^Z é C_{1-6} alquil opcionalmente substituído, C_{2-6} alquenil opcionalmente substituído, C_{2-6} alcenil opcionalmente substituído, C_{6-14} opcionalmente substituídos, aril C_{6-14} opcionalmente, C_{3-8} cicloalquil opcionalmente substituído, opcionalmente substituído (C_{1-9} heterociclil)- C_{1-6} - alquil, opcionalmente substituído (C_{6-10} aril)- C_{1-6} - alquil opcionalmente substituído (C_{3-8} cicloalquil)- C_{1-6} - alquil;

LinkA é vinculador; e

R^T é uma ligação a uma fração alvo; uma porção de conjugação; alquil C_{1-6} opcionalmente substituído, alcenil C_{2-6} opcionalmente substituído, alquinil C_{2-6} opcionalmente substituído, aril C_{6-14} opcionalmente substituído, aril C_{6-14} opcionalmente substituído, cicloalquil C_{3-8} opcionalmente substituído, (C_{1-9} heterociclil)- C_{1-6} -alquil opcionalmente substituído, (C_{6-10} aril)- C_{1-6} -alquil opcionalmente substituído ou (C_{3-8} cicloalquil)- C_{1-6} -alquil opcionalmente substituído.

[00436] Em certas formas de realização, R^Z é aminoalquil C_{1-6} opcionalmente substituído (por exemplo, aminoalquil C_{1-6} opcionalmente substituído contendo $-NH_2$).

Fosfoesters

[00437] Os polinucleotídeos imunomodulados da invenção podem conter um ou mais fosfotriésteres internucleosídeos e/ou um ou dois fosfodésteres terminais e/ou fosfotriésteres terminais. Um fosfotriéster pode conter um fosfato, fosforotioato ou fosforoditioato, no qual uma ou duas valências são substituídas por nucleosídeos e/ou espaçadores abásicos, e as demais valências são ligadas a um grupo bioreversível, um grupo não bioreversível, um ligante ligado a uma porção alvo, ou um grupo conjugador. Um fosfotriéster internucleosídeo é ligado a dois nucleosídeos e/ou espaçadores abásicos, e a valência restante é ligada a um grupo bioreversível, um grupo não bioreversível, um ligante ligado a uma fração alvo ou um grupo conjugador. Um fosfodiéster internucleosídeo é ligado a dois nucleosídeos e/ou espaçadores abásicos. Um fosfodiéster terminal contém um fosfato, fosforotioato ou fosforoditioato no terminal 5' ou 3' do polinucleotídeo imunomodulador, em que uma das duas valências restantes está ligada a um grupo bioreversível, um grupo não bioreversível, um ligante ligado a uma fração de direcionamento ou um grupo conjugador.

Ligantes e porções de conjugação

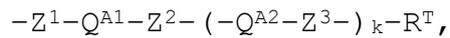
[00438] Os polinucleotídeos imunomodulados da invenção podem conter um ligante ligado a uma porção de direcionamento e, opcionalmente, uma ou mais porções auxiliares. O ligante tem um peso molecular de 43 Da a 10 kDa (por exemplo, de 100 Da a 8 kDa, de 100 Da a 7 kDa ou de 100 Da a 3 kDa). O ligante pode ser representado aqui como LinkA. O ligante pode ser um grupo multivalente, no qual a primeira valência está ligada a um internucleosídeo ou fosfato terminal, um internucleosídeo ou

fosforotioato terminal, um internucleosídeo ou fosforoditioato terminal, um espaçador abásico, um grupo de nivelamento ou uma nucleobase e uma segunda valência está ligado a uma porção de direcionamento. O ligante pode ainda incluir uma ou mais valências, cada uma das quais está independentemente ligada a uma fração auxiliar. Em algumas formas de realização (por exemplo, quando a porção de direcionamento é uma molécula pequena), o polinucleotídeo imunomodulador contém vários ligantes para várias partes de direcionamento. Em outras formas de realização (por exemplo, quando a porção de direcionamento é um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo), o polinucleotídeo imunomodulador pode conter um ligante a uma porção de direcionamento.

[00439] Os polinucleotídeos imunomodulados aqui divulgados podem incluir um grupo conjugador. Um grupo conjugador inclui pelo menos uma fração de conjugação que é um grupo funcional que é capaz de passar por uma reação de conjugação (por exemplo, uma reação de cicloadição (por exemplo, cicloadição dipolar), reação de amidação ou substituição aromática nucleofílica) ou é tornada capaz de sofrer uma reação de conjugação, após desproteção do grupo funcional. Após a reação com um grupo reativo complementar, o grupo conjugador produz o ligante no polinucleotídeo imunomodulador da invenção.

[00440] Em formas de realização particulares, o ligante ligado a uma fração alvo é parte de um fosfotriéster internucleosídeo. Em certas formas de realização, o ligante ligado a uma fração alvo é parte de um espaçador básico.

[00441] Em algumas formas de realização, o ligante (por exemplo, LinkA) ou um grupo conjugador é da fórmula (II):



(II)

Onde

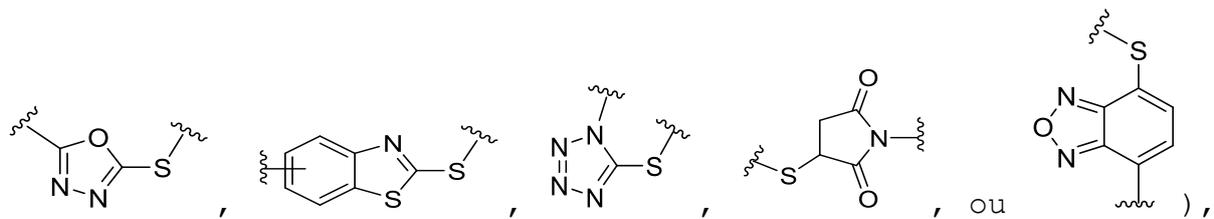
Z^1 é um grupo divalente, um grupo trivalente, um grupo tetravalente ou um grupo pentavalente, no qual uma valência está ligada a Q^{A1} , a segunda valência está aberta ou, se a fórmula (II) for para o ligante, está ligada a R^T , e cada uma das valências restantes, quando presente, está independentemente ligada a uma fração auxiliar;

Z^2 está ausente, um grupo divalente, um grupo trivalente, um grupo tetravalente ou um grupo pentavalente, no qual um de valência está ligado a Q^{A1} , a segunda valência está ligado a Q^{A2} ou R^T e cada uma das valências restantes, quando presentes, está independentemente ligado a uma fração auxiliar;

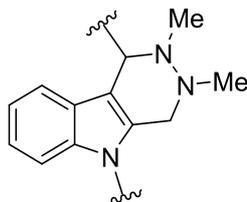
Z^3 está ausente, um grupo divalente, um grupo trivalente, um grupo tetravalente ou um grupo pentavalente, no qual um de valência está ligado a Q^{A2} , a segunda valência está ligada a R^T e cada uma das valências restantes, quando presente, é ligado independentemente a uma porção auxiliar; R^T está ausente ou está ligado a uma fração alvo; k é 0 ou 1.

[00442] Se a fórmula (II) for para o vinculador,

Q^{A1} e Q^{A2} estão independentemente ausentes, heteroalquileno C_{2-12} opcionalmente substituído (por exemplo, um heteroalquileno contendo $-C(O)-N(H)-$, $-N(H)-C(O)-$, $-S(O)_2-N(H)-$, or $-N(H)-S(O)_2-$), C_{1-12} tio-heterociclileno substituído (por exemplo,)

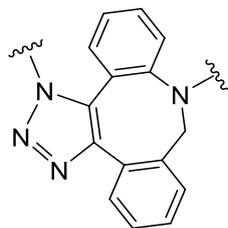
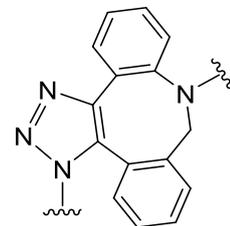


heterociclileno C₁₋₁₂ opcionalmente substituído (por exemplo,



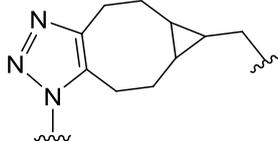
1,2,3-triazole-1,4-diil, ou ciclobut-3-eno-1,2-diona-3,4-diil, pirid-2-il-hidrazona, triazoloheterociclileno

C₆₋₁₆ opcionalmente substituído (por exemplo,)



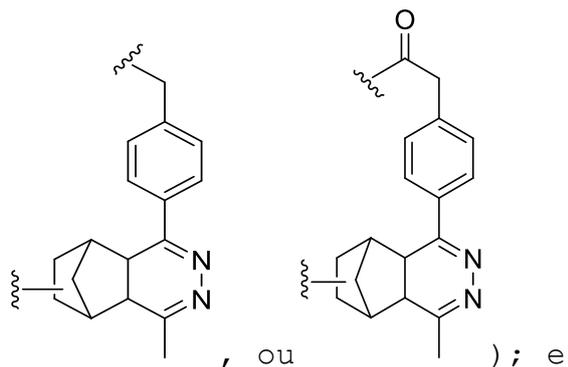
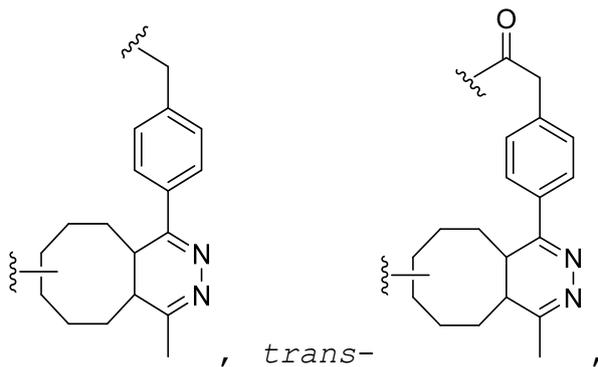
triazolocicloalquileno C₈₋₁₆ opcionalmente

substituído (por exemplo,)



ou um grupo di-

hidropiridazina (por exemplo,)



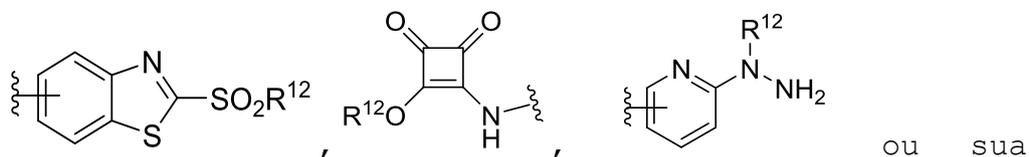
R^T é uma ligação a uma fração alvo;

desde que pelo menos um dos Q^{A1} e Q^{A2} esteja presente.

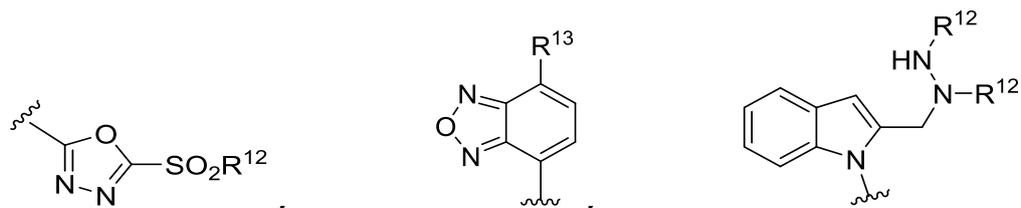
[00443] Se a fórmula (II) for para um grupo conjugador,

ou

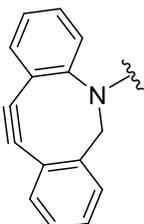
- (i) Q^{A2} está ausente e Q^{A1} é uma fração de conjugação, por exemplo, alquil C₂₋₁₂ opcionalmente substituído, amino protegido com N opcionalmente substituído, azido, N-maleimido, tiol protegido com S,



ou sua versão protegida por N

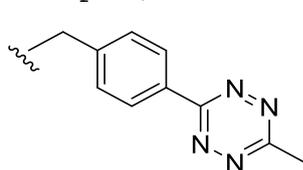


heterociclil C₆₋₁₆ opcionalmente substituído contendo uma ligação tripla carbono-carbono endocíclica (por

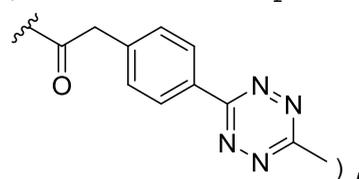


exemplo,

Grupo 1,2,4,5-tetrazina (por exemplo,

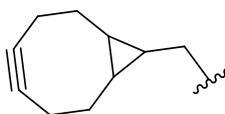


or



ou

cicloalquinil C₈₋₁₆ opcionalmente substituído (por



exemplo,

-NHR^{N1}, cicloalcenil estirado em

C₄₋₈ opcionalmente substituído (por exemplo,

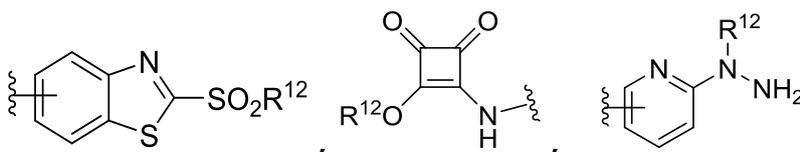
transciclococtenil ou norbornenil) ou alquil C₁₋₁₆

opcionalmente substituído contendo -COOR¹² ou -CHO; e

k é 0;

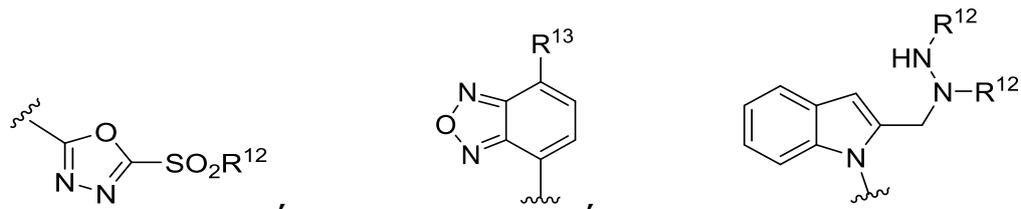
ou

- (ii) Q^{A1} é como definido para o ligante e Q^{A2} é uma fração de conjugação, por exemplo, alquinil C₂₋₁₂ opcionalmente substituído, amino protegido com N opcionalmente substituído, azido, N-maleimido, tiol protegido com S,

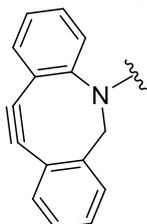


ou versão

protegida por N,

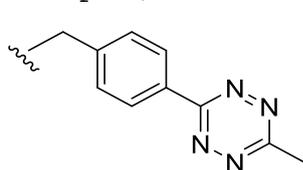


heterociclil C₆₋₁₆ opcionalmente substituído contendo uma ligação tripla carbono-carbono endocíclica (por

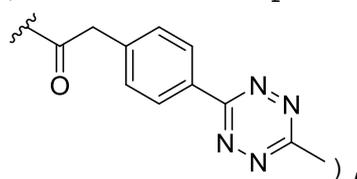


exemplo,

Grupo 1,2,4,5-tetrazina (por exemplo,

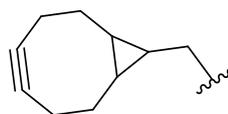


or



ou

cicloalquininil C₈₋₁₆ opcionalmente substituído (por



exemplo,

-NHR^{N1}, cicloalcenil estirado em

C₄₋₈ opcionalmente substituído (por exemplo,

transciclococtenil ou norbornenil) ou alquil C₁₋₆

opcionalmente substituído contendo -COOR¹² ou -CHO; e

k é 1;

Onde

R^{N1} é H, grupo N-protetor ou alquil C₁₋₆ opcionalmente substituído; cada R¹² é independentemente H ou alquil C₁₋₆ opcionalmente substituídos;

R¹³ é halogênio (por exemplo, F);

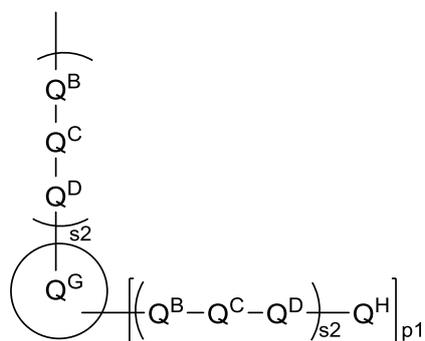
Z³ e R^T estão ausentes.

[00444] Em certas formas de realização, Z^1 tem um grupo de ramificação e dois segmentos divalentes, em que o grupo de ramificação é ligado a cada um dos dois segmentos divalentes,

Onde

um dos segmentos divalentes está ligado a um internucleosídeo ou fosfato terminal, um internucleosídeo ou fosforotioato terminal, um internucleosídeo ou fosforoditioato terminal, um espaçador abásico ou uma nucleobase, e o segmento divalente restante está ligado a Q^{A1} ;

o grupo de ramificação é C_{1-12} alcano-triil opcionalmente substituído ou C_{2-12} heteroalcano-triil opcionalmente substituído, em que duas valências são substituídas pelos segmentos divalentes e a valência restante é substituída por



Onde

p_1 é 1, 2 ou 3;

cada s_2 é independentemente um número inteiro de 0 a 10;

cada Q^B e cada Q^D está independentemente ausente, $-\text{CO}-$, $-\text{NH}-$, $-\text{O}-$, $-\text{S}-$, $-\text{SO}_2-$,

$-\text{OC}(\text{O})-$, $-\text{COO}-$, $-\text{NHC}(\text{O})-$, $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$, $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{NHCH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{O}-$ ou $-\text{OCH}_2-$; e

cada Q^C está independentemente ausente, alquileno C_{1-12} opcionalmente substituído, alcenileno C_{2-12} opcionalmente substituído, alquinileno C_{2-12} opcionalmente substituído, heteroalquileno C_{2-12} opcionalmente substituído, heterociclileno C_{1-9} opcionalmente substituído ou $-P(Z)(OH)-$, onde Z é O ou S ;

cada Q^G é independentemente C_{1-6} alcano-triil opcionalmente substituído, C_{1-6} alcano-tetralil opcionalmente substituído, C_{2-6} heteroalcano-triil opcionalmente substituído ou C_{2-6} heteroalcano-tetralil opcionalmente substituído; e

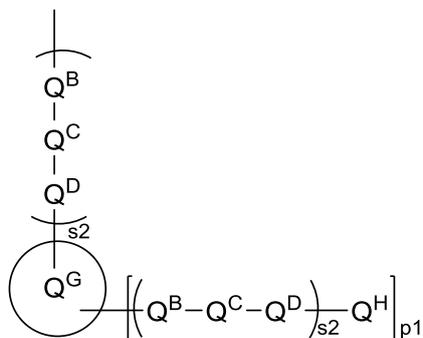
cada Q^H é independentemente R^{M1} ou $-Q^G[(-Q^B-Q^C-Q^D)_{s2}-R^{M1}]_{p1}$, em que cada R^{M1} é independentemente uma ligação a uma fração auxiliar.

[00445] Em certas formas de realização, Z^2 tem um grupo de ramificação e dois segmentos divalentes, em que o grupo de ramificação é ligado a cada um dos dois segmentos divalentes,

Onde

um dos segmentos divalentes está ligado a uma fração alvo ou Q^{A2} , e o segmento divalente restante está ligado a Q^{A1} ;

o grupo ramificado é C_{1-12} alcano-triil opcionalmente substituído ou C_{2-12} heteroalcano-triil opcionalmente substituído, em que duas valências são substituídas pelos segmentos divalentes e a valência restante é substituída por



Onde

p_1 é 1, 2 ou 3;

cada s_2 é independentemente um número inteiro de 0 a 10;

cada Q^B e cada Q^D está independentemente ausente, -CO-, -NH-, -O-, -S-, -SO₂-, -OC(O)-, -COO-, -NHC(O)-, -C(O)NH-, -CH₂-, -CH₂NH-, -NHCH₂-, -CH₂O- ou -OCH₂-; e

cada Q^C está independentemente ausente, alquileno C₁₋₁₂ opcionalmente substituído, alcenileno C₂₋₁₂ opcionalmente substituído, alquinileno C₂₋₁₂ opcionalmente substituído, heteroalquileno C₂₋₁₂ opcionalmente substituído, heterociclileno C₁₋₉ opcionalmente substituído ou -P(Z)(OH)-, onde Z é O ou S;

cada Q^G é independentemente C₁₋₆ alcano-triil opcionalmente substituído, C₁₆ alcano-tetralil opcionalmente substituído, C₂₋₆ heteroalcano-triil opcionalmente substituído ou C₂₋₆ heteroalcano-tetralil opcionalmente substituído; e

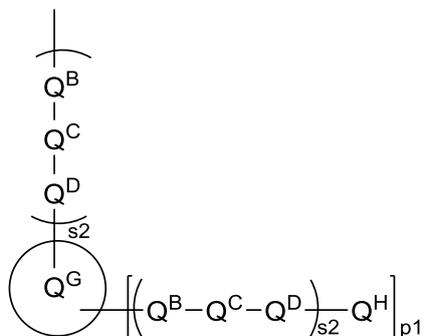
cada Q^H é independentemente R^{M1} ou $-Q^G[(-Q^B-Q^C-Q^D)s_2-R^{M1}]_{p_1}$, em que cada R^{M1} é independentemente uma ligação a uma fração auxiliar.

[00446] Em certas formas de realização, Z^3 tem um grupo de ramificação e dois segmentos divalentes, em que o grupo de ramificação é ligado a cada um dos dois segmentos divalentes,

Onde

um dos segmentos divalentes está ligado a uma fração de direcionamento e o restante segmento divalente está ligado a Q^{A2} ;

o grupo ramificado é C₁₋₁₂ alcano-triil opcionalmente substituído ou C₂₋₁₂ heteroalcano-triil opcionalmente substituído, em que duas valências são substituídas pelos segmentos divalentes e a valência restante é substituída por



Onde

p1 é 1, 2 ou 3;

cada s2 é independentemente um número inteiro de 0 a 10;

cada Q^B e cada Q^D está independentemente ausente, -CO-, -NH-, -O-, -S-, -SO₂-, -OC(O)-, -COO-, -NHC(O)-, -C(O)NH-, -CH₂-, -CH₂NH-, -NHCH₂-, -CH₂O- ou -OCH₂-; e

cada Q^C está independentemente ausente, alquileno C₁₋₁₂ opcionalmente substituído, alcenileno C₂₋₁₂ opcionalmente substituído, alquinileno C₂₋₁₂ opcionalmente substituído, heteroalquileno C₂₋₁₂ opcionalmente substituído, heterociclileno C₁₋₉ opcionalmente substituído ou -P(Z)(OH)-, onde Z é O ou S;

cada Q^G é independentemente C₁₋₆ alcano-triil opcionalmente substituído, C₁₋₆ alcano-tetralil opcionalmente substituído, C₂₋₆ heteroalcanano-triil opcionalmente substituído ou C₂₋₆ heteroalcano-tetralil opcionalmente substituído; e

cada Q^H é independentemente R^{M1} ou $-Q^G [(-Q^B-Q^C-Q^D)_{s2}-R^{M1}]_{p1}$, em que cada R^{M1} é independentemente uma ligação a uma fração auxiliar.

[00447] O segmento divalente em Z^1 , Z^2 ou Z^3 pode ser $-(-Q^B-Q^C-Q^D)_{s1}-$,

Onde

cada $s1$ é independentemente um número inteiro de 1 a 50 (por exemplo, de 1 a 30);

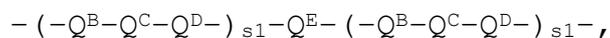
cada Q^B e cada Q^D está independentemente ausente, $-CO-$, $-NH-$, $-O-$, $-S-$, $-SO_2-$, $-OC(O)-$, $-COO-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NH-$, $-CH_2-$, $-CH_2NH-$, $-NHCH_2-$, $-CH_2O-$ ou $-OCH_2-$; e

cada Q^C está independentemente ausente, alquileno C_{1-12} opcionalmente substituído, alcenileno C_{2-12} opcionalmente substituído, alquinileno C_{2-12} opcionalmente substituído, heteroalquileno C_{2-12} opcionalmente substituído ou heterociclileno C_{1-9} opcionalmente substituído;

desde que pelo menos um de Q^B , Q^C e Q^D esteja presente.

[00448] Em certas formas de realização, pelo menos um Q^C está presente no segmento divalente. Em formas de realização particulares, o Q^C está presente em cada unidade monomérica do segmento divalente. Em algumas formas de realização, Z^1 é ligado através de um Q^C que está presente. Em outras formas de realização, pelo menos um de Q^B e Q^D está presente em cada unidade monomérica de Z^1 . Em ainda outras formas de realização, pelo menos um de Q^B e Q^D está presente em cada unidade monomérica de Z^2 . Em formas de realização particulares, apenas um de Z^1 , Z^2 e Z^3 , quando presente, contém um grupo de ramificação.

[00449] Em ainda outras formas de realização, um, dois ou três de Z^1 , Z^2 e Z^3 são independentemente



(III)

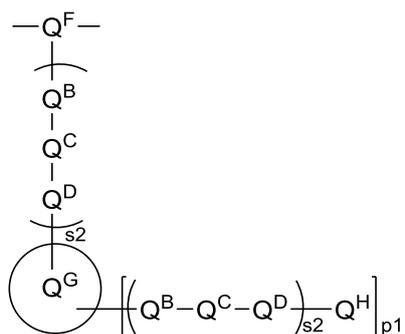
Onde

cada $s1$ é independentemente um número inteiro de 1 a 50 (por exemplo, de 1 a 30);

cada Q^B e cada Q^D está independentemente ausente, $-CO-$, $-NH-$, $-O-$, $-S-$, $-SO_2-$, $-OC(O)-$, $-COO-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NH-$, $-CH_2-$, $-CH_2NH-$, $-NHCH_2-$, $-CH_2O-$ ou $-OCH_2-$; e

cada Q^C está independentemente ausente, alquilenos $C1-12$ opcionalmente substituído, alcenileno $C2-12$ opcionalmente substituído, alquinileno $C2-12$ opcionalmente substituído, heteroalquilenos $C2-12$ opcionalmente substituído, heterociclílenos $C1-9$ opcionalmente substituído ou $-P(Z)(OH)-$, onde Z é O ou S ; e

Q^E está ausente ou um grupo ramificado de fórmula (IV):



Onde

$p1$ é 1, 2 ou 3;

cada $s2$ é independentemente um número inteiro de 0 a 10;

Q^F é C_{1-12} alcano-triilo opcionalmente substituído ou C_{2-12} -heteroalcano-triil opcionalmente substituído; e

cada Q^G é independentemente c_{1-6} alcano-triil opcionalmente substituído, C_{1-6} alcano-tetralil opcionalmente substituído, c_{2-6} heteroalcanano-triil opcionalmente substituído ou C_{2-6} heteroalcano-tetralil opcionalmente substituído; e

cada Q^H é independentemente R^{M1} ou $-Q^G[(-Q^B-Q^C-Q^D)s_2-R^{M1}]_{p1}$, em que cada R^{M1} é independentemente uma ligação a uma fração auxiliar.

[00450] Na fórmula (IV), Q^L está ausente, se p_1 é 1; e pelo menos um Q^G está presente, se p_1 for 2 ou 3.

[00451] Em formas de realização particulares, Z^1 está ligado a um terminal de internucleosídeos ou fosfato, um ou internucleosídeos fosforotioato terminais, um terminal de internucleosídeos ou fosforoditioato, um espaçador abásico, um grupo terminal, ou uma nucleobase através de um Q^C que está presente.

[00452] Em formas de realização particulares, pelo menos, um de Q^B , Q^C , Q^D , e Q^E está presente (por exemplo, pelo menos um Q^C está presente, Q^E está presente, ou Q^E está ausente) no estado bivalente segmento. Em certas formas de realização, cada Q^B e cada Q^D é independentemente ausentes, $-CO-$, $-NH-$, $-O-$, $-S-$, $-SO_2-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NH-$, $-CH_2-$, $-CH_2NH-$, $-NHCH_2-$, $-CH_2O-$ ou $-OCH_2-$.

[00453] Em algumas formas de realização, $-(-Q^B-Q^C-Q^D-)_{s1}-$ se combinam para formar um grupo:

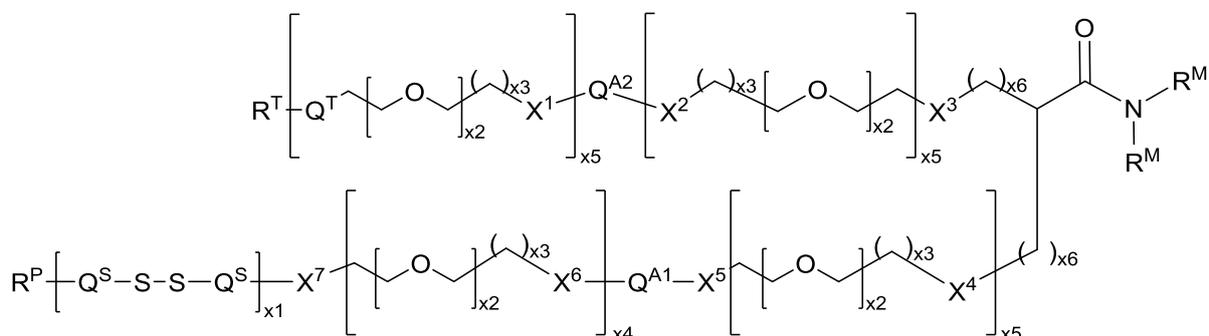


Onde

- (i) g_2 é um número inteiro de 1 a 50;
- (ii) g_1 é 1 e Q^B é $-NHCO-$, $-CONH-$, ou $-O-$; ou g_1 é 0 e Q^D é $-NHCO-$; e
- (iii) g_3 é 1 e Q^B é $-NHCO-$, $-CONH-$, ou $-O-$; ou g_3 é 0 e Q^D é $-CONH-$.

[00454] A porção de conjugação pode ser protegida até que uma porção auxiliar seja conjugada com o polinucleotídeo. Por exemplo, uma fração de conjugação protegida pode incluir $-COOR^{PGO}$ ou $-NHR^{PGN}$, em que R^{PGO} é um grupo O-protetor (por exemplo, um grupo protetor de carboxila) e R^{PGN} é um grupo protetor de N.

[00455] Em outras formas de realização, o Link A é



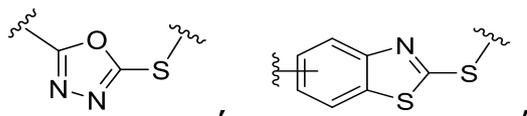
,

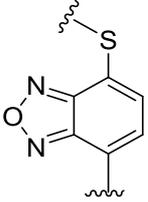
(V)

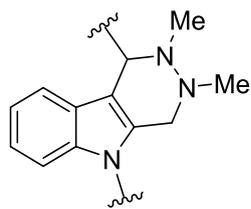
Onde

cada um dos Q^{A1} e Q^{A2} está ausente, independentemente heteroalquileno C_{2-12} opcionalmente substituído (por exemplo, um heteroalquileno contendo $-C(O)-N(H)-$, $-N(H)-C(O)-$, $-S(O)_2-N(H)-$, ou $-N(H)-SO_2-$), opcionalmente substituído, C_{1-12}

tioheterociclileno (por exemplo,

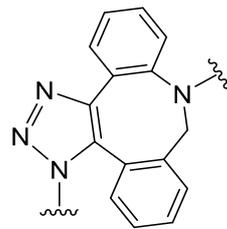


ou , opcionalmente substituído, C₁₋₁₂ heterociclileno (por exemplo, 1,2,3-triazol-1,4-diil ou

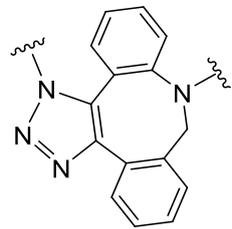


), ciclobut-3-eno-1,2-diona-3,4-diil, pirid-2-il-hidrazona, C₆₋₁₆ opcionalmente substituído

triazolocicloalcenileno (por exemplo,



ou



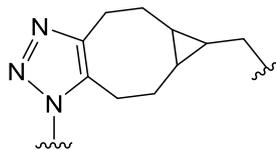
),

opcionalmente

substituído,

C₈₋₁₆

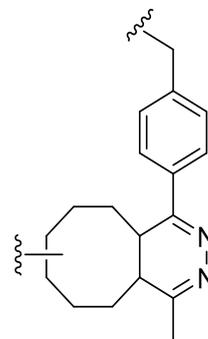
triazolocicloalcenileno (por exemplo,



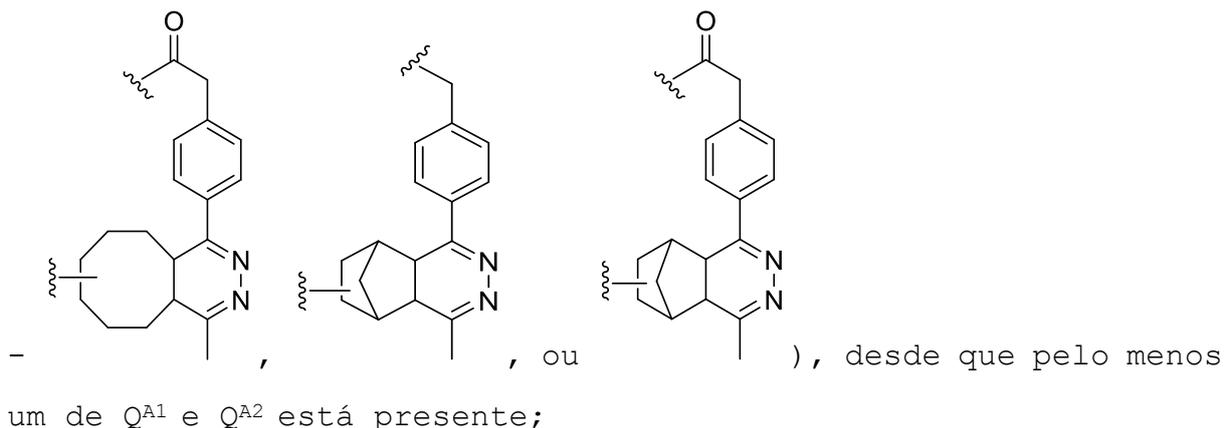
),

ou um

grupo hidropiridazina (por exemplo, *trans* -



, *trans*



R^T é uma ligação de uma porção de direcionamento;

R^P é uma ligação a um grupo de ligação internucleosídeos, uma nucleobase, um grupo de proteção, ou um espaçador abásico;

Q^T é -CO-, -NH-, -NH-CH₂-, ou CO-CH₂-;

cada Q^S é, independentemente, opcionalmente substituído, C₂₋₁₂ alquilenos, opcionalmente substituído, C₂₋₁₂ alquilenos, opcionalmente substituído, C₂₋₁₂ alcinilenos, opcionalmente substituído ou (C₆₋₁₀ aril) -C₁₋₆ alquilenos;

cada R^H representa, independentemente, H, metade auxiliar, -(CH₂)_{q7}-CO-N(R^{M1})₂, ou -C[-CH₂O-(CH₂)_{q7}-CO-N(R^{M1})₂]₃, em que cada q₇ é independentemente um número inteiro de 1 a 5, e cada R^{M1} é independentemente H ou uma fração auxiliar;

cada um de X¹, X³ e X⁵ está independentemente ausente, -O-, -NH-, -CH₂-NH-, -C(O)-, -C(O)-NH-, -NH-C(O)-, -NH-C(O)-NH-, -O-C(O)-NH-, -NH-C(O)-O-, -CH₂-NH-C(O)-NH-, -CH₂-O-C(O)-NH-, ou CH₂-NH-C(O)-O-;

X⁷ está ausente, -O-, -O-P(O)(OH)-O-, -O-P(S)(OH)-O-, -NH-, -CH₂-NH-, -C(O)-, -C(O)-NH-, -NH-C(O)-, -NH-C(O)-NH-, -O-C(O)-NH-, -NH-C(O)-O-, -CH₂-NH-C(O)-NH-, -CH₂-O-C(O)-NH-, ou CH₂-NH-C(O)-O-;

cada um de X^2 , X^4 e X^6 está ausente independentemente, $-O-$, $-NH-$, $-C(O)-$, $-C(O)-NH-$, $-NH-C(O)-$, $-NH-C(O)-NH-$, $-O-C(O)-NH-$ ou $-NH-C(O)-O-$;

x_1 e cada x_5 são independentemente 0 ou 1;

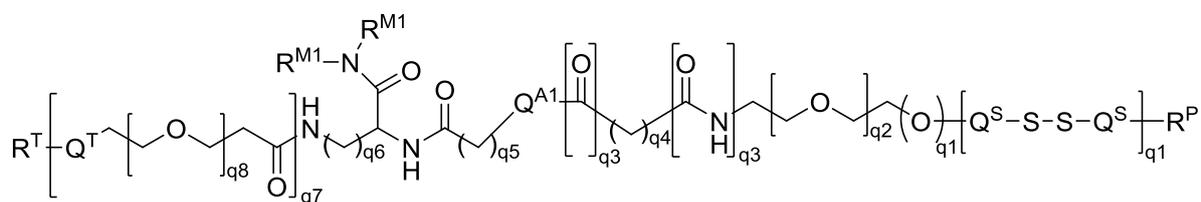
cada x_2 é independentemente um número inteiro de 0 a 50 (por exemplo, de 1 a 40 ou de 1 a 30);

cada x_3 é independentemente um número inteiro de 1 a 11;

x_4 é 0, 1 ou 2; e

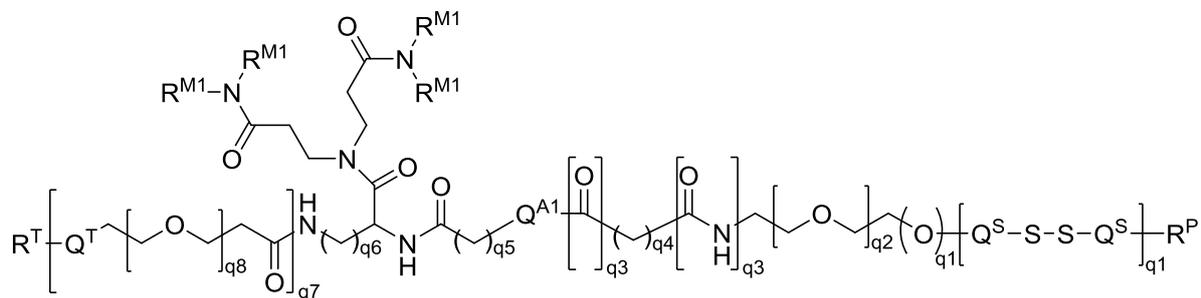
cada x_6 é independentemente um número inteiro de 0 a 10 (por exemplo, de 1 a 6), desde que a soma de ambos x_6 seja 12 ou menos.

[00456] Em ainda outras formas de realização, o LinkA é



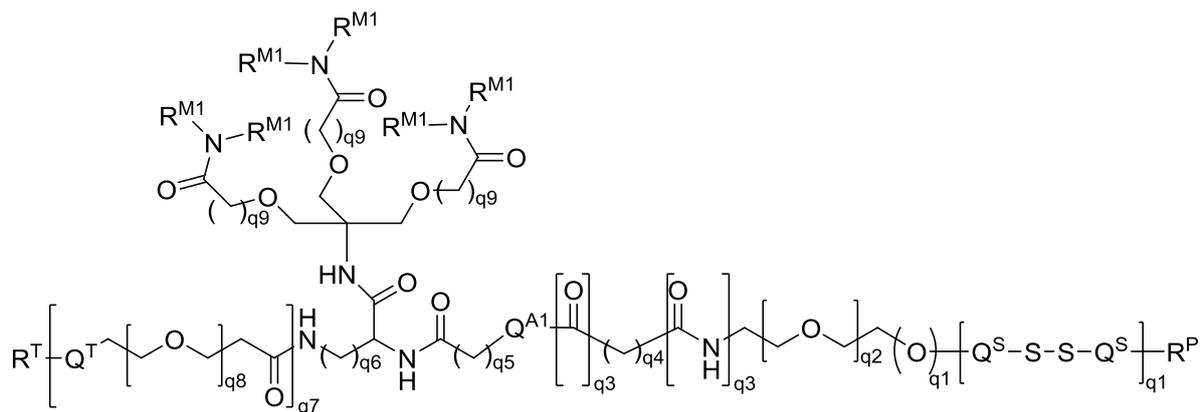
,

(VI)



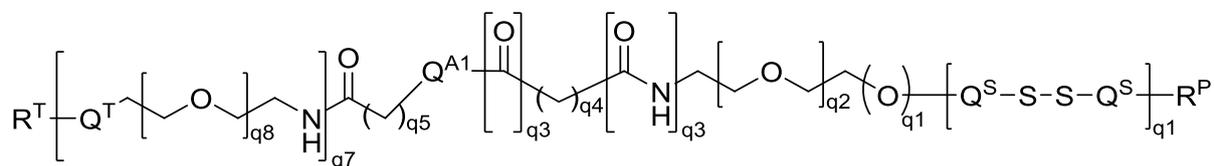
,

(VII)



,

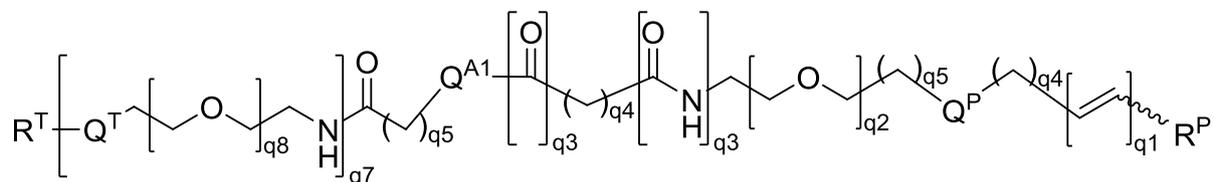
(VIII)



,

(IX)

or

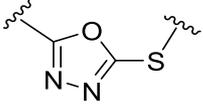
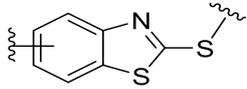


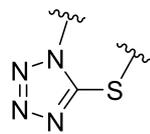
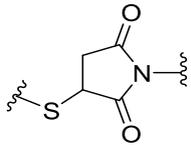
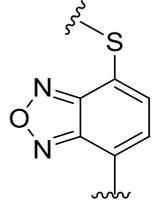
,

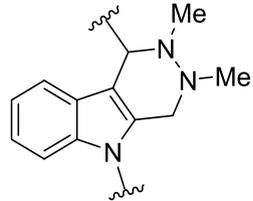
(X)

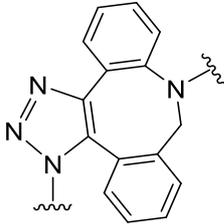
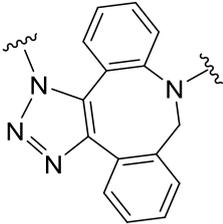
Onde

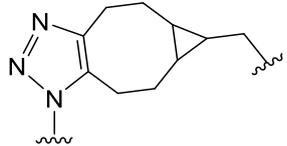
Q^{A1} é heteroalquileno C_{2-12} opcionalmente substituído (por exemplo, um heteroalquileno contendo $-C(O)-N(H)-$, $-N(H)-C(O)-$, $-S(O)_2-N(H)-$, ou $-N(H)-S(O)_2-$), opcionalmente substituído, C_{1-12}

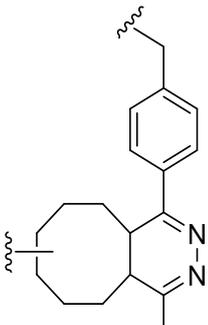
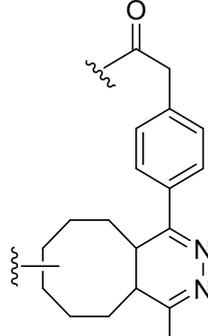
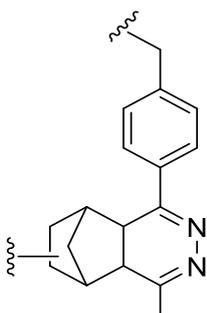
tioheterociclileno (por exemplo, , ,

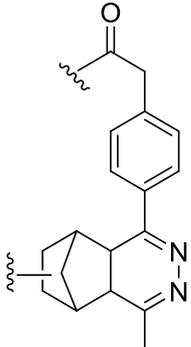


 , or 
) , opcionalmente substituído, C₁₋₁₂ heterociclileno (por exemplo, 1,2,3 -triazol-1,4-diil ou


) , ciclobut-3-eno-1,2-diona-3,4-diil ou pirid-2-il-hidrazona), triazoloheterociclileno C₆₋₁₆ opcionalmente

substituído (por exemplo,  ou )
 opcionalmente substituído, C₈₋₁₆ triazolocicloalcenileno (por

exemplo, 
) , ou um grupo hidropiridazina (por

exemplo, *trans* - 
 , *trans* - 
 , 
 ,

ou 
) ;

cada R^{M1} é independentemente H ou uma porção auxiliar;

R^T é uma ligação de uma porção de direcionamento;

R^P é uma ligação a um grupo de ligação internucleosídeos, uma nucleobase, um grupo de proteção, ou um espaçador abásico;

Q^T é $-CO-$, $-NH-$, $-NH-CH_2-$, ou $CO-CH_2-$;

Q^P é $-C(O)-N(H)-$, $-N(H)-C(O)-$, $-S(O)_2-N(H)-$ ou $-N(H)-S(O)_2-$;

cada Q^S é, independentemente, opcionalmente substituído, C_{2-12} alquileno, opcionalmente substituído, C_{2-12} alquileno, opcionalmente substituído, C_{2-12} alcinileno, opcionalmente substituído ou $(C_{6-10}$ aril) $-C_{1-6}$ alquileno;

cada um de q_1 , q_3 e q_7 é independentemente 0 ou 1;

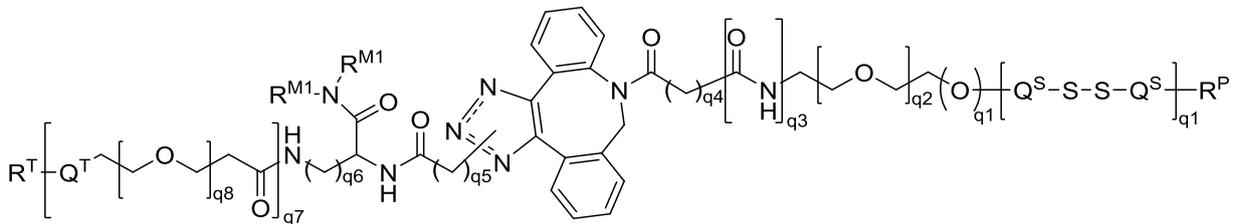
cada um de q_2 e q_8 é um número inteiro de 0 a 50 (por exemplo, de 1 a 40 ou de 1 a 30);

q_4 é um número inteiro de 0 a 10;

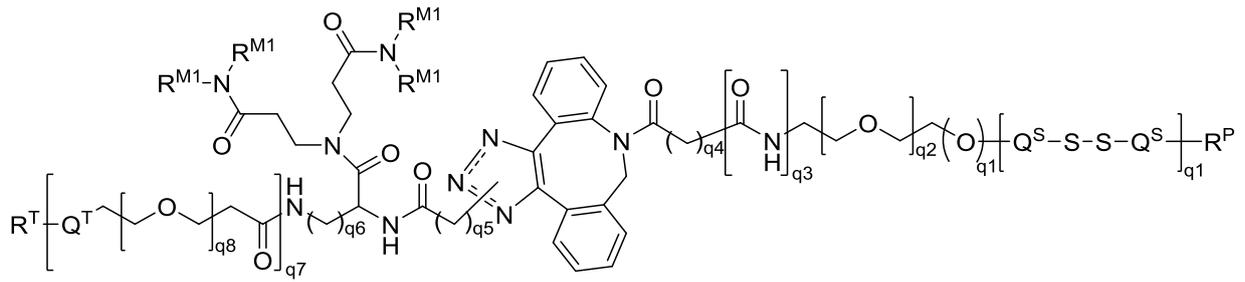
cada um de q_5 e q_6 é independentemente um número inteiro de 1 a 10 (por exemplo, de 1 a 6); e

q_9 é um número inteiro de 1 a 10.

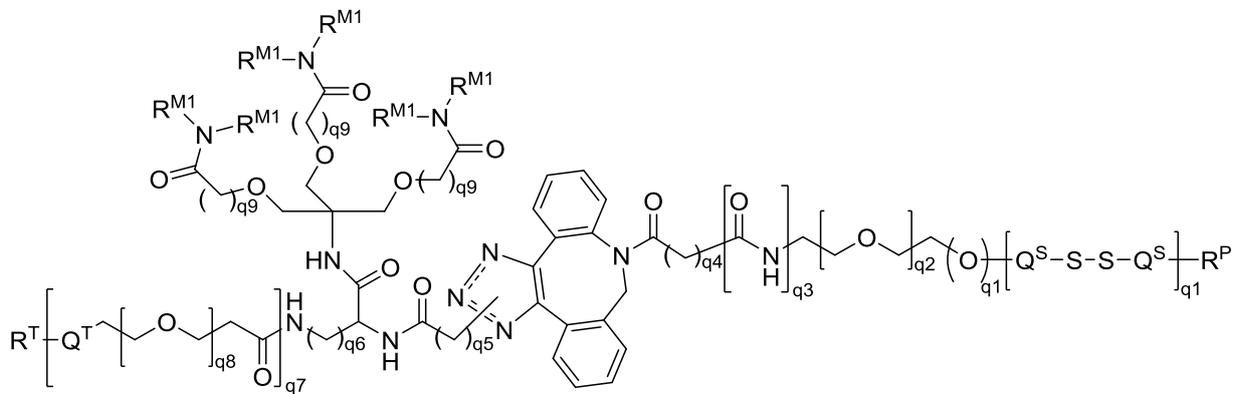
[00457] Em ainda outras formas de realização, o LinkA é



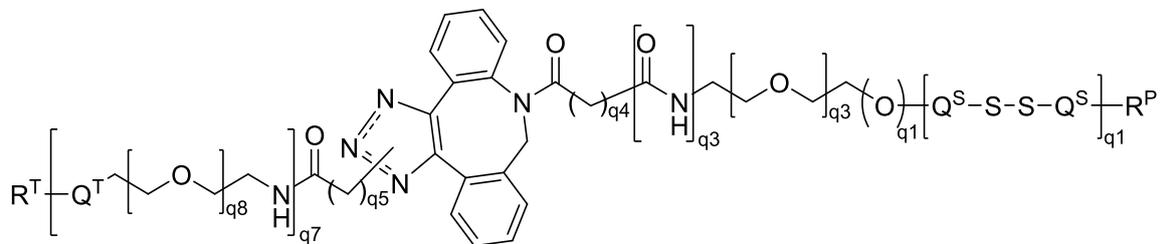
(XI)



(XII)

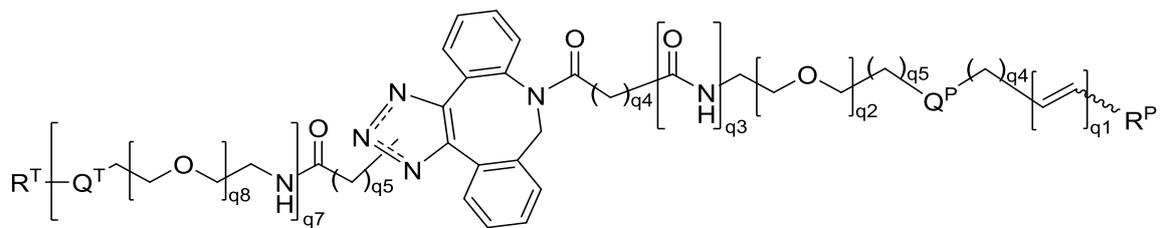


(XIII)



(XIV)

ou



(XV)

Onde

em cada fórmula estrutural, um --- representa uma ligação simples e o outro = representa uma ligação dupla;

cada R^{M1} é independentemente H ou uma porção auxiliar;

R^T é uma ligação de uma porção de direcionamento;

R^P é uma ligação a um grupo de ligação internucleosídeos, uma nucleobase, um grupo de proteção, ou um espaçador abásico;

Q^T é -CO- , $\text{-CO-CH}_2\text{-}$, -NH- , ou $\text{-NH-CH}_2\text{-}$;

Q^P é -C(O)-N(H)- , -N(H)-C(O)- , $\text{-S(O)}_2\text{-N(H)-}$ ou $\text{-N(H)-S(O)}_2\text{-}$;

cada Q^S é, independentemente, opcionalmente substituído, C_{2-12} alquilenos, opcionalmente substituído, C_{2-12} alquilenos, opcionalmente substituído, C_{2-12} alcinilenos, opcionalmente substituído ou (C_{6-10} aril) -C_{1-6} alquilenos;

cada um de q_1 , q_3 e q_7 é independentemente 0 ou 1;

cada um de q_2 e q_8 é um número inteiro de 0 a 50 (por exemplo, de 1 a 40 ou de 1 a 30);

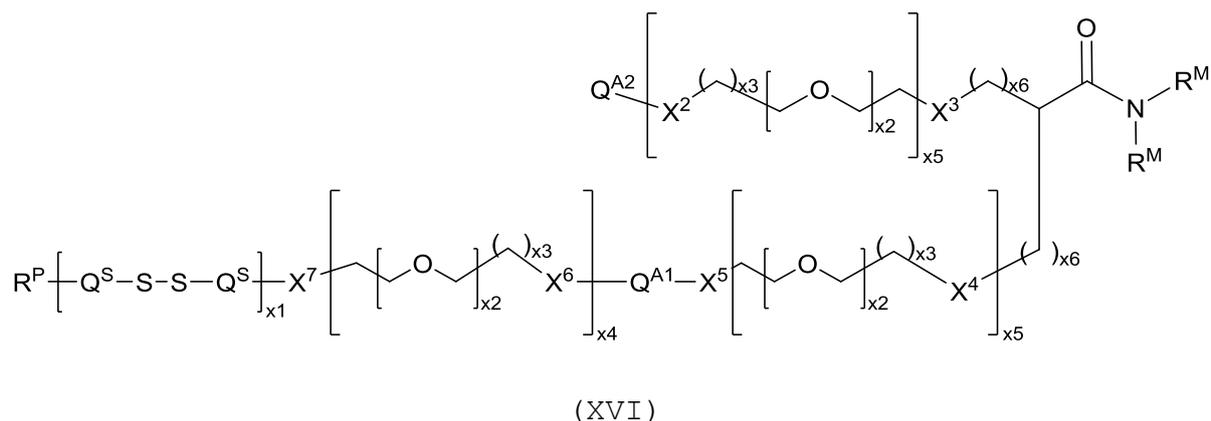
q_4 é um número inteiro de 0 a 10;

cada um de q_5 e q_6 é independentemente um número inteiro de 1 a 10 (por exemplo, de 1 a 6); e

q_9 é um número inteiro de 1 a 10.

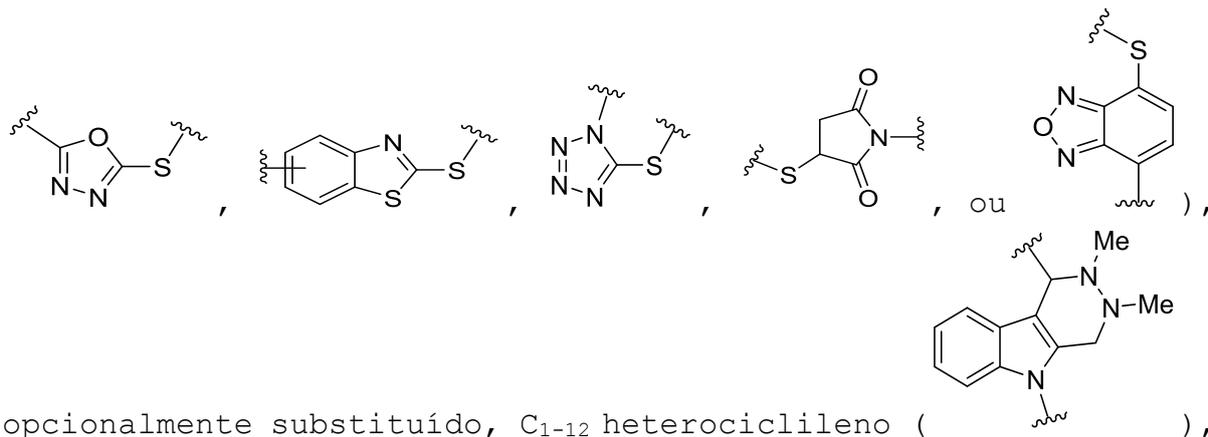
[00458] Em algumas formas de realização, q_5 é 0. Em outras formas de realização, q_5 é um número inteiro de 2 a 6.

[00459] Em formas de realização particulares, um grupo conjugador é:



Onde

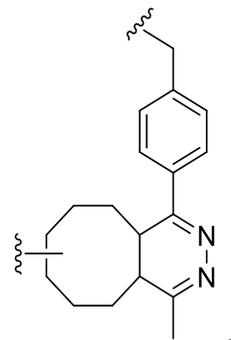
$\text{Q}^{\text{A}1}$ é independentemente heteroalquileno C_{2-12} opcionalmente substituído (por exemplo, um heteroalquileno contendo $-\text{C}(\text{O})-\text{N}(\text{H})-$, $-\text{N}(\text{H})-\text{C}(\text{O})-$, $-\text{S}(\text{O})_2-\text{N}(\text{H})-$, ou $-\text{N}(\text{H})-\text{S}(\text{O})_2-$), opcionalmente substituído, C_{1-12} tioheterociclileno (por exemplo,



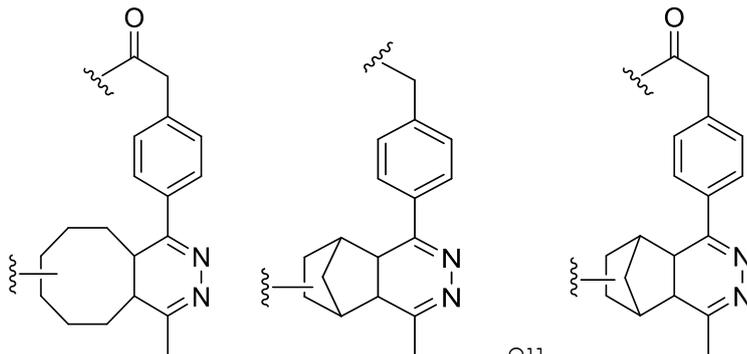
ciclobut-3-eno-1,2-diona-3,4-diil, pirid-2-il-hidrazona, triazoloheterociclileno C_{6-16} opcionalmente substituído (por

exemplo, ou), opcionalmente substituído,

C_{8-16} triazolocicloalcenileno (por exemplo,), ou

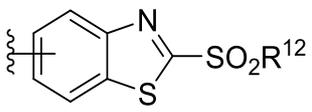
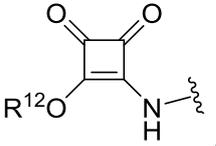


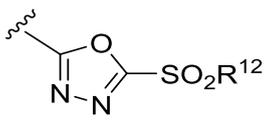
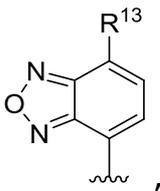
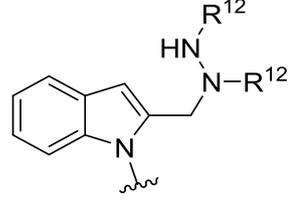
um grupo hidropiridazina (por exemplo, *trans* -



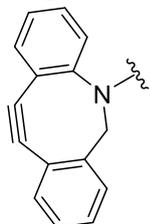
trans - , , ou);

Q^{A2} é C opcionalmente substituído C₂₋₁₂ alcinilo, tiol
opcionalmente substituído N-protegido amino, azido, N-maleimido,

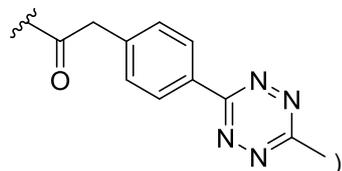
S-protegido, , ,  ou N-

protegido, , , ,

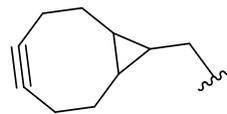
opcionalmente C substituído C₆₋₁₆ heterociclilo contendo uma
ligação tripla carbono-carbono endocíclica (por exemplo,

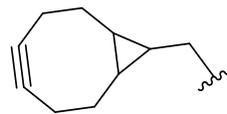


), grupo 1,2,4,5-tetrazina (por exemplo,



ou cicloalquil C₈₋₁₆



opcionalmente substituído (por exemplo, , $-\text{NHR}^{\text{N}1}$, C_{4-8} opcionalmente substituído cicloalcenilo tensas (por exemplo, *trans* -cyclooctenyl ou norbornenilo), ou C , opcionalmente substituído C_{1-16} alquilo contendo $-\text{COOR}^{12}$ ou $-\text{CHO}$;

$\text{R}^{\text{N}1}$ é H, grupo de protecção de N ou C, opcionalmente substituído C_{1-6} alquilo;

cada R^{12} é independentemente H ou C_{1-6} alquil opcionalmente substituído;

R^{13} representa halogéneo (por exemplo, F);

R^{P} é uma ligação a um grupo de ligação internucleosídeos, uma nucleobase, um grupo de protecção, ou um espaçador abásico;

cada Q^{S} é, independentemente, opcionalmente substituído, C_{2-12} alquilenos, opcionalmente substituído, C_{2-12} alquilenos, opcionalmente substituído, C_{2-12} alcinileno, opcionalmente substituído ou (C_{6-10} aril) $-\text{C}_{1-6}$ alquilenos;

cada R^{H} representa, independentemente, H, metade auxiliar, $-(\text{CH}_2)_{\text{Q}7}-\text{CO}-\text{N}(\text{R}^{\text{M}1})_2$, ou $-\text{C}[-\text{CH}_2\text{O}-(\text{CH}_2)_{\text{Q}7}-\text{CO}-\text{N}(\text{R}^{\text{M}1})_2]_3$, em que cada $\text{Q}7$ é independentemente um número inteiro de 1 a 5, e cada $\text{R}^{\text{M}1}$ é independentemente H ou fração auxiliar;

cada um de X^3 e X^5 está independentemente ausente, $-\text{O}-$, $-\text{NH}-$, $-\text{CH}_2-\text{NH}-$, $-\text{C}(\text{O})-$, $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-$, $-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-$, $-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-$, $-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-$, $-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{O}-$, $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-$, $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-$, ou $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{O}-$;

X^7 está ausente $-\text{O}-$, $-\text{O}-\text{P}(\text{O})(\text{OH})-\text{O}-$, $-\text{O}-\text{P}(\text{S})(\text{OH})-\text{O}-$, $-\text{NH}-$, $-\text{CH}_2-\text{NH}-$, $-\text{C}(\text{O})-$, $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-$, $-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-$, $-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-$, $-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-$

, -NH-C(O)-O-, -CH₂-NH-C(O)-NH-, -CH₂-O-C(O)-NH-, ou -CH₂-NH-C(O)-O-;

cada um de X², X⁴ e X⁶ está ausente independentemente, -O-, -NH-, -O-, -C(O)-, -C(O)-NH-, -NH-C(O)-, -NH-C(O)-NH-, -O-C(O)-NH-, ou -NH-C(O)-O-;

x₁ e cada x₅ são independentemente 0 ou 1;

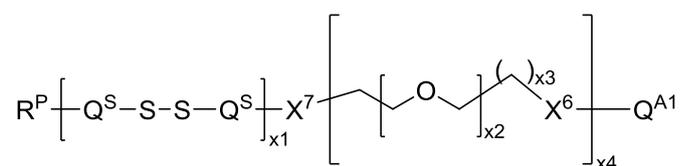
cada x₂ é independentemente um número inteiro de 0 a 50 (por exemplo, de 1 a 40 ou de 1 a 30);

cada x₃ é independentemente um número inteiro de 1 a 11;

x₄ é 0, 1 ou 2; e

cada x₆ é independentemente um número inteiro de 0 a 10 (por exemplo, de 1 a 6), desde que a soma de ambos x₆ seja 12 ou menos.

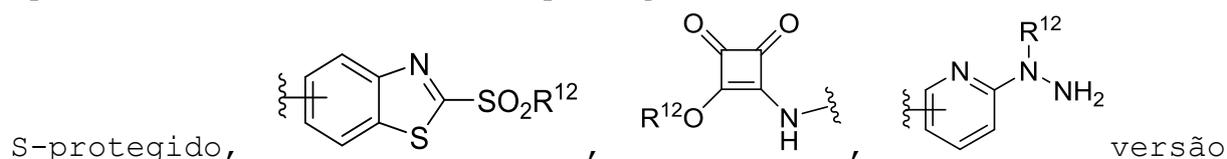
[00460] Em algumas formas de realização, um grupo conjugador é:



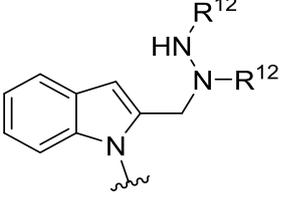
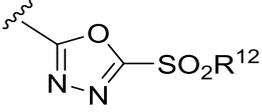
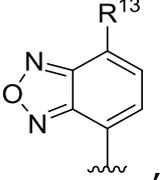
(XVII)

Onde

Q^{A1} é C opcionalmente substituído C₂₋₁₂ alcinilo, tiol opcionalmente substituído N-protetido amino, azido, N-maleimido,

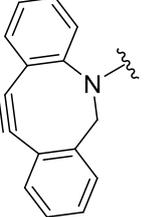


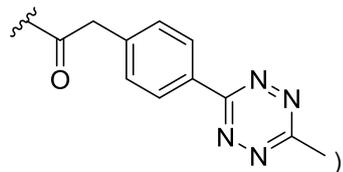
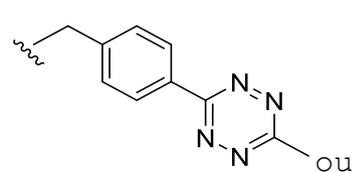
ou N-protegido do mesmo,

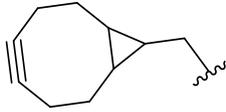




, opcionalmente substituído C₆₋₁₆ heterociclilo

contendo um ligação tripla carbono-carbono endocíclica (por

exemplo, ) , grupo 1,2,4,5-tetrazina (por exemplo,



opcionalmente substituído (por exemplo, ) , -NHR^{N1} , C₄₋₈ opcionalmente substituído cicloalcenilo tensas (por exemplo, *trans* -cyclooctenyl ou norbornenilo), ou C, opcionalmente substituído C₁₋₁₆ alquilo contendo -COOR¹² ou -CHO;

R^{N1} é H, grupo de protecção de N ou C, opcionalmente substituído C₁₋₆ alquilo;

cada R¹² é independentemente H ou C₁₋₆ alquil opcionalmente substituído ;

R¹³ representa halogéneo (por exemplo, F);

R^P é uma ligação a um grupo de ligação internucleosídeos, uma nucleobase, um grupo de protecção, ou um espaçador abásico;

cada Q^S é, independentemente, opcionalmente substituído, C_{2-12} alquilenos, opcionalmente substituído, C_{2-12} alquilenos, opcionalmente substituído, C_{2-12} alcinileno, opcionalmente substituído ou $(C_{6-10} \text{ aril}) - C_{1-6}$ alquilenos;

X^7 está ausente, $-O-$, $-NH-$, $-O-P(O)(OH)-O-$, $-O-P(S)(OH)-O-$,
 $-CH_2-NH-$, $-C(O)-$,
 $-C(O)-NH-$, $-NH-C(O)-$, $-NH-C(O)-NH-$, $-O-C(O)-NH-$, $-NH-C(O)-O-$, $-CH_2-NH-C(O)-NH-$,
 $-CH_2-O-C(O)-NH-$, ou $-CH_2-NH-C(O)-O-$;

X^6 está ausente, $-O-$, $-NH-$, $-O-$, $-C(O)-$, $-C(O)-NH-$, $-NH-C(O)-$, $-NH-C(O)-NH-$, $-O-C(O)-NH-$, ou $-NH-C(O)-O-$;;

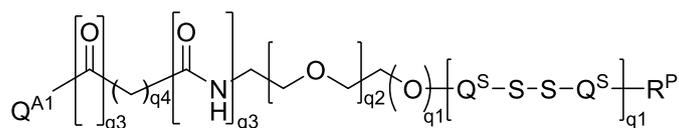
x_1 é independentemente 0 ou 1;

cada x_2 é independentemente um número inteiro de 0 a 50 (por exemplo, de 1 a 40 ou de 1 a 30);

cada x_3 é independentemente um número inteiro de 1 a 11; e

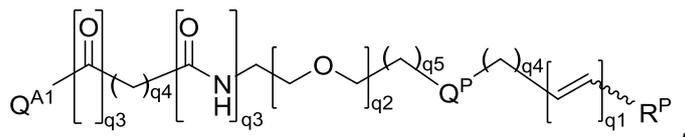
x_4 é 0, 1 ou 2.

[00461] Em certas formas de realização, um grupo conjugador é:



(XVIII)

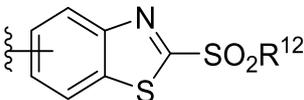
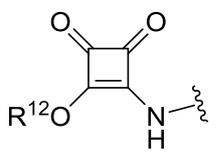
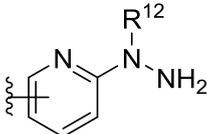
ou

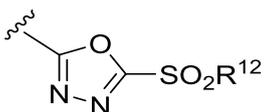
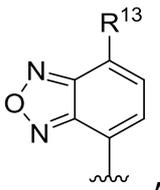


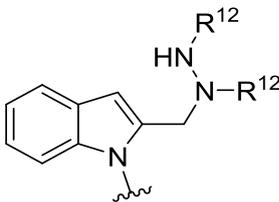
(XIX)

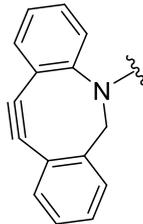
Onde

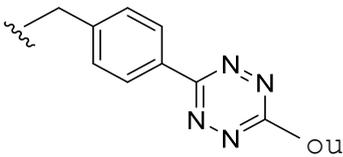
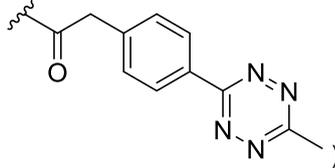
Q^{A1} é C opcionalmente substituído C_{2-12} alcinilo, tiol
opcionalmente substituído N-protegido amino, azido, N-maleimido,

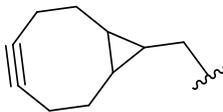
S-protegido, , ,  versão

ou N-protegido do mesmo, , ,

, opcionalmente substituído por C_{16-06}
heterociclilo contendo uma ligação tripla carbono-carbono

endocíclica (por exemplo, ) , grupo 1,2,4,5-tetrazina

(por exemplo,  ou ) ou
cicloalquil C_{8-16} opcionalmente substituído (por exemplo,

) , $-NHR^{N1}$, C_{4-8} opcionalmente substituído
cicloalcenilo tensas (por exemplo, *trans* -cyclooctenyl ou
norbornenilo), ou C, opcionalmente substituído C_{1-16} alquil
contendo $-COOR^{12}$ ou $-CHO$;

R^{N1} é H, grupo de protecção de N ou C, opcionalmente
substituído C_{1-6} alquil;

cada R^{12} é independentemente H ou C_{1-6} alquil opcionalmente substituído;

R^{13} representa halogéneo (por exemplo, F);

R^P é uma ligação a um grupo de ligação internucleosídeos, uma nucleobase, um grupo de protecção, ou um espaçador abásico;

Q^P é $-C(O)-N(H)-$, $-N(H)-C(O)-$, $-S(O)_2-N(H)-$, or $-N(H)-S(O)_2-$; ;

cada Q^S é, independentemente, opcionalmente substituído, C_{2-12} alquileno, opcionalmente substituído, C_{2-12} alquileno, opcionalmente substituído, C_{2-12} alcinileno, opcionalmente substituído ou $(C_{6-10}$ aril) $-C_{1-6}$ alquileno;

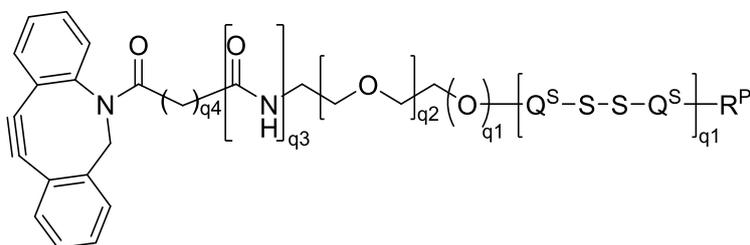
cada um de q_1 e q_3 é independentemente 0 ou 1;

q_2 é um número inteiro de 0 a 50 (por exemplo, de 1 a 40 ou de 1 a 30);

q_4 é um número inteiro de 0 a 10; e

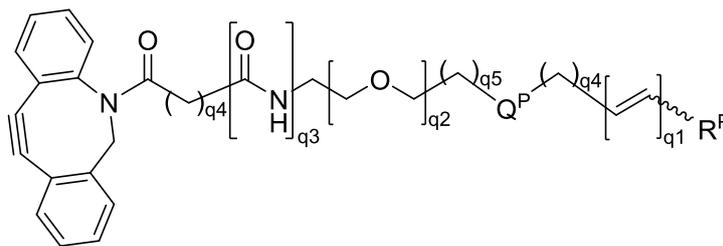
q_5 é um número inteiro de 1 a 10 (por exemplo, de 1 a 6).

[00462] Em ainda outras formas de realização, o grupo conjugador é:



(XX)

ou



(XXI)

Onde

R^P é uma ligação a um grupo de ligação internucleosídeos, uma nucleobase, um grupo de proteção, ou um espaçador abásico;

Q^P é $-C(O)-N(H)-$, $-N(H)-C(O)-$, $-S(O)_2-N(H)-$, or $-N(H)-S(O)_2-$

cada Q^S é, independentemente, opcionalmente substituído, C_{2-12} alquileno, opcionalmente substituído, C_{2-12} alquileno, opcionalmente substituído, C_{2-12} alcinileno, opcionalmente substituído ou $(C_{6-10}$ aril)- C_{1-6} alquileno;

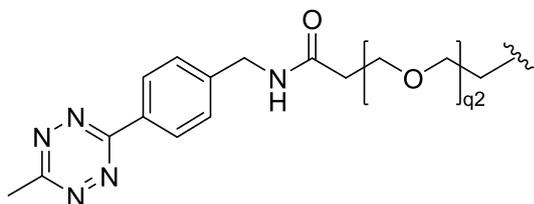
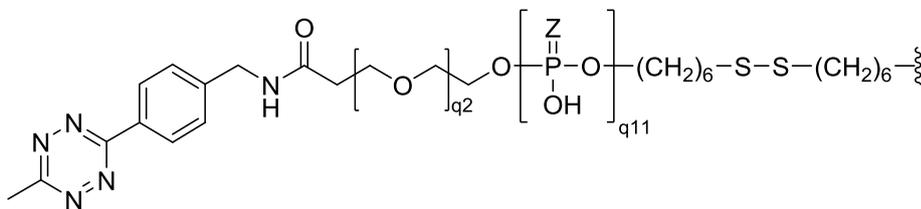
cada um de q_1 e q_3 é independentemente 0 ou 1;

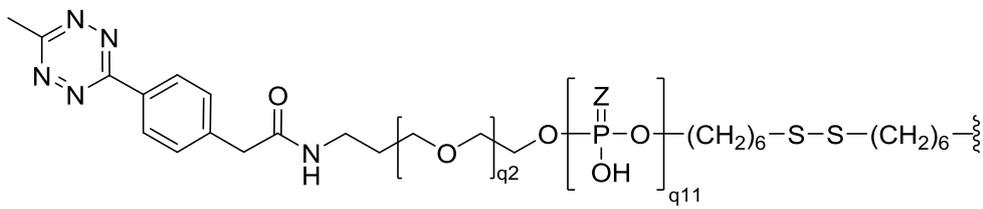
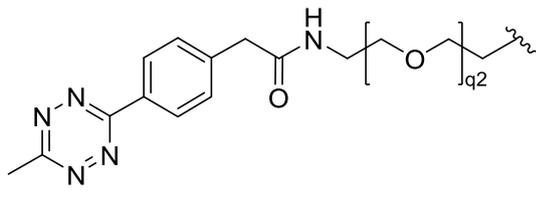
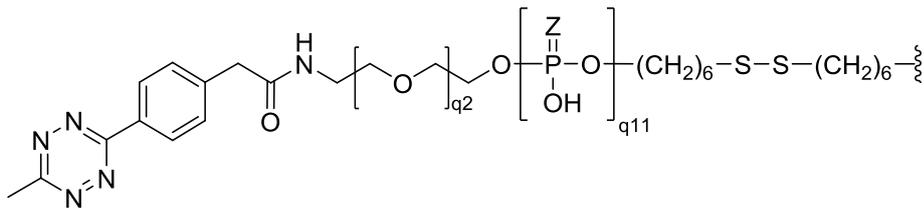
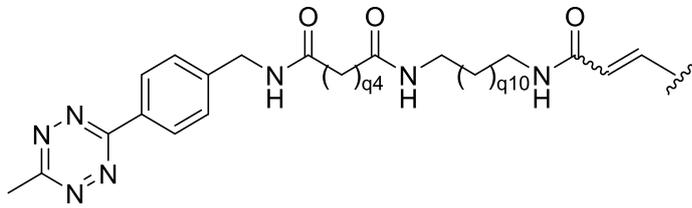
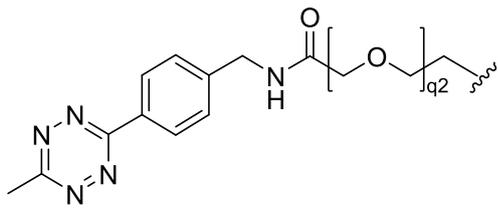
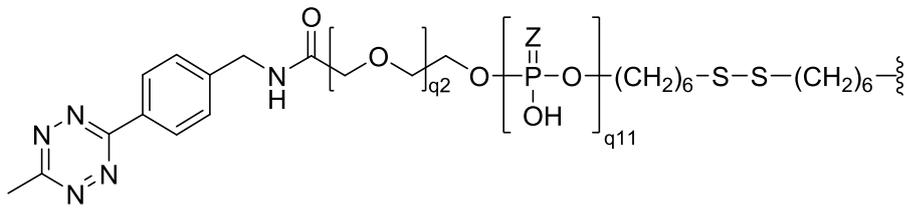
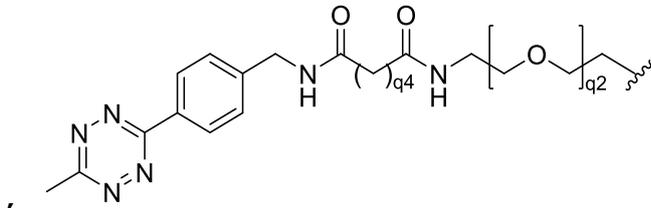
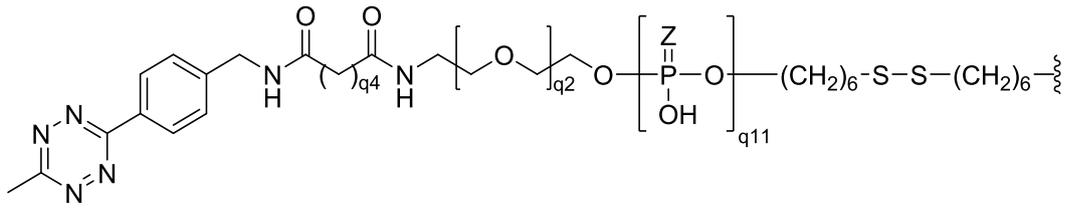
q_2 é um número inteiro de 0 a 50 (por exemplo, de 1 a 40 ou de 1 a 30);

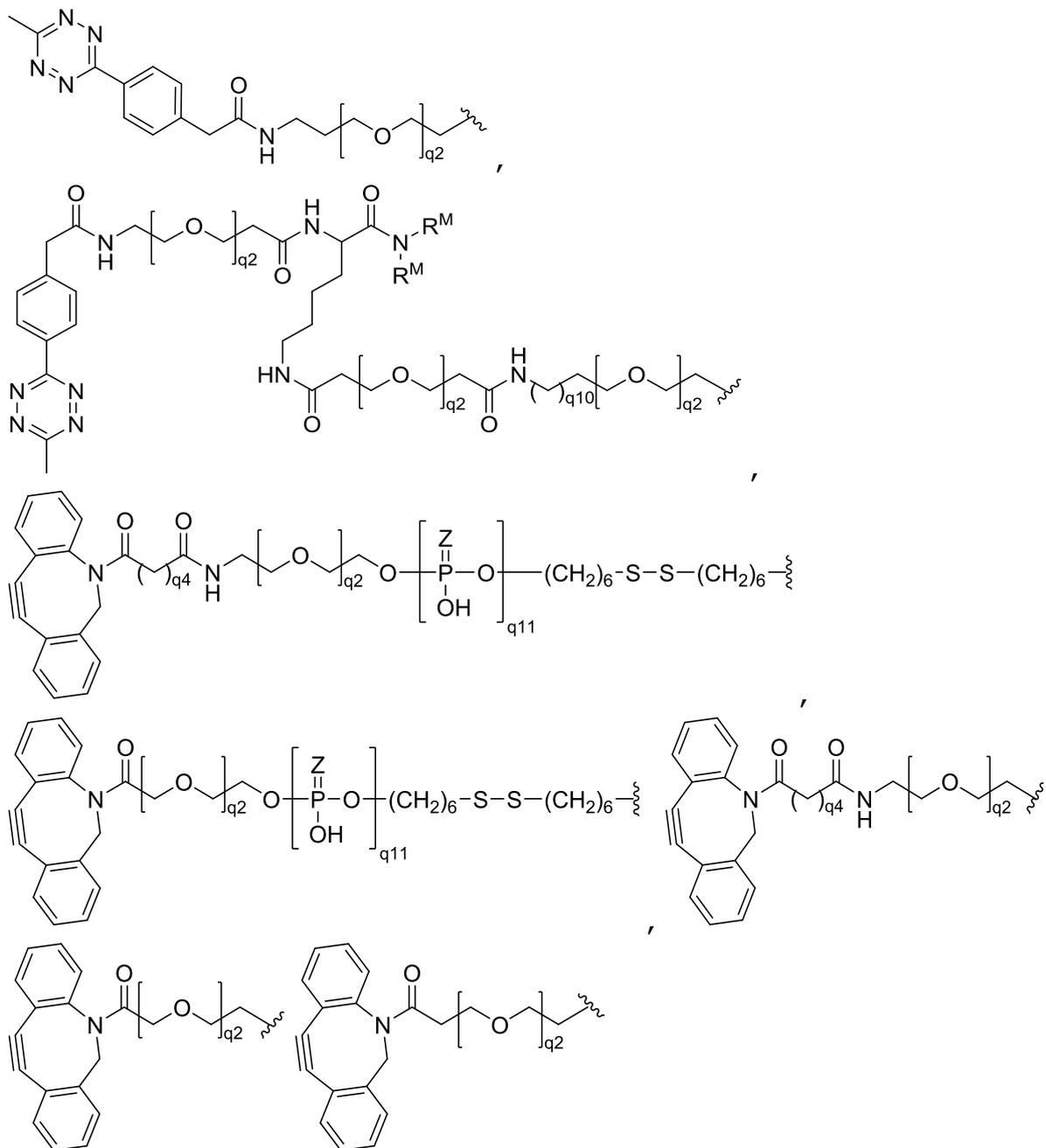
q_4 é um número inteiro de 0 a 10; e

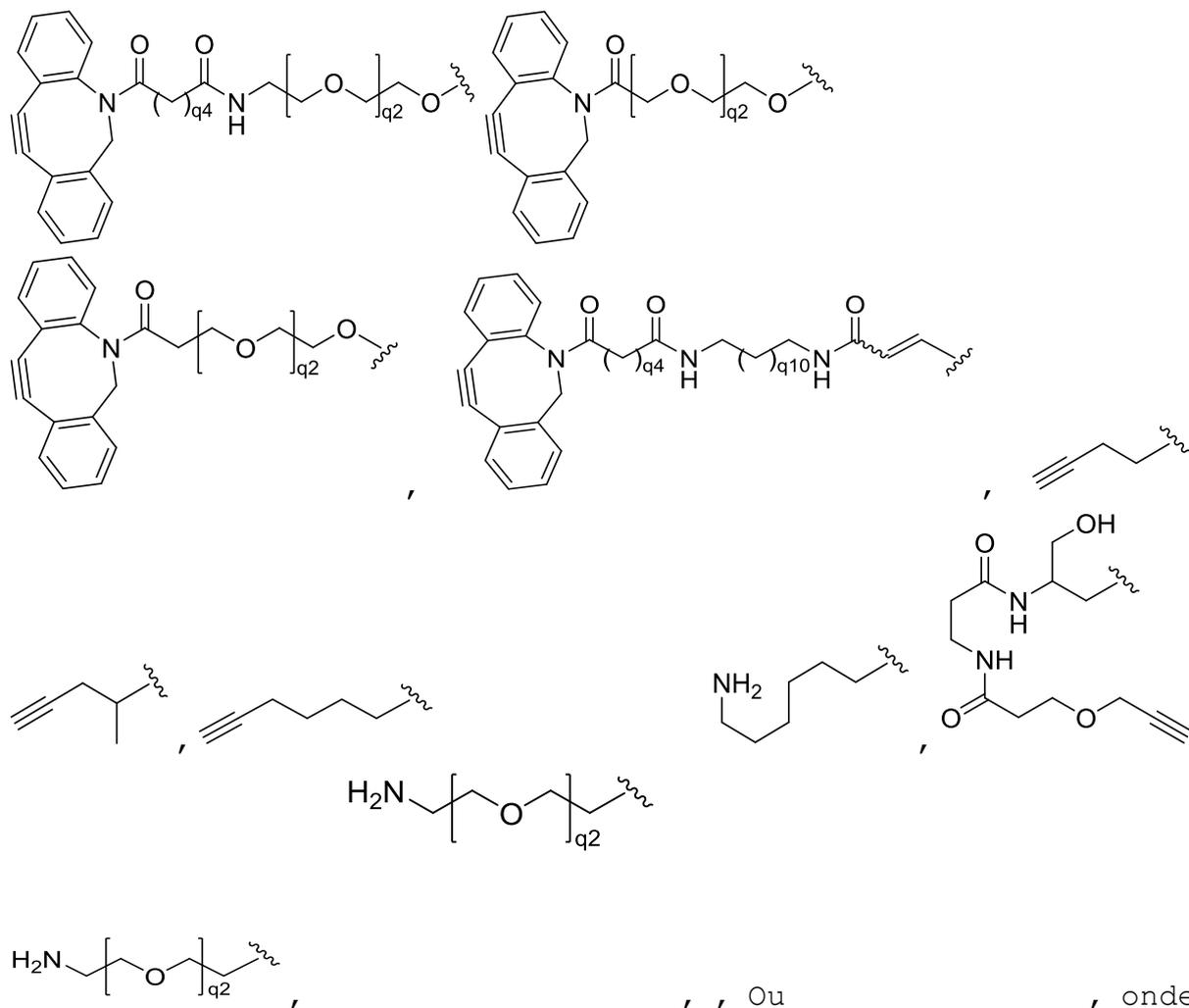
q_5 é um número inteiro de 1 a 10 (por exemplo, de 1 a 6).

[00463] Em certas formas de realização, um grupo conjugador é:



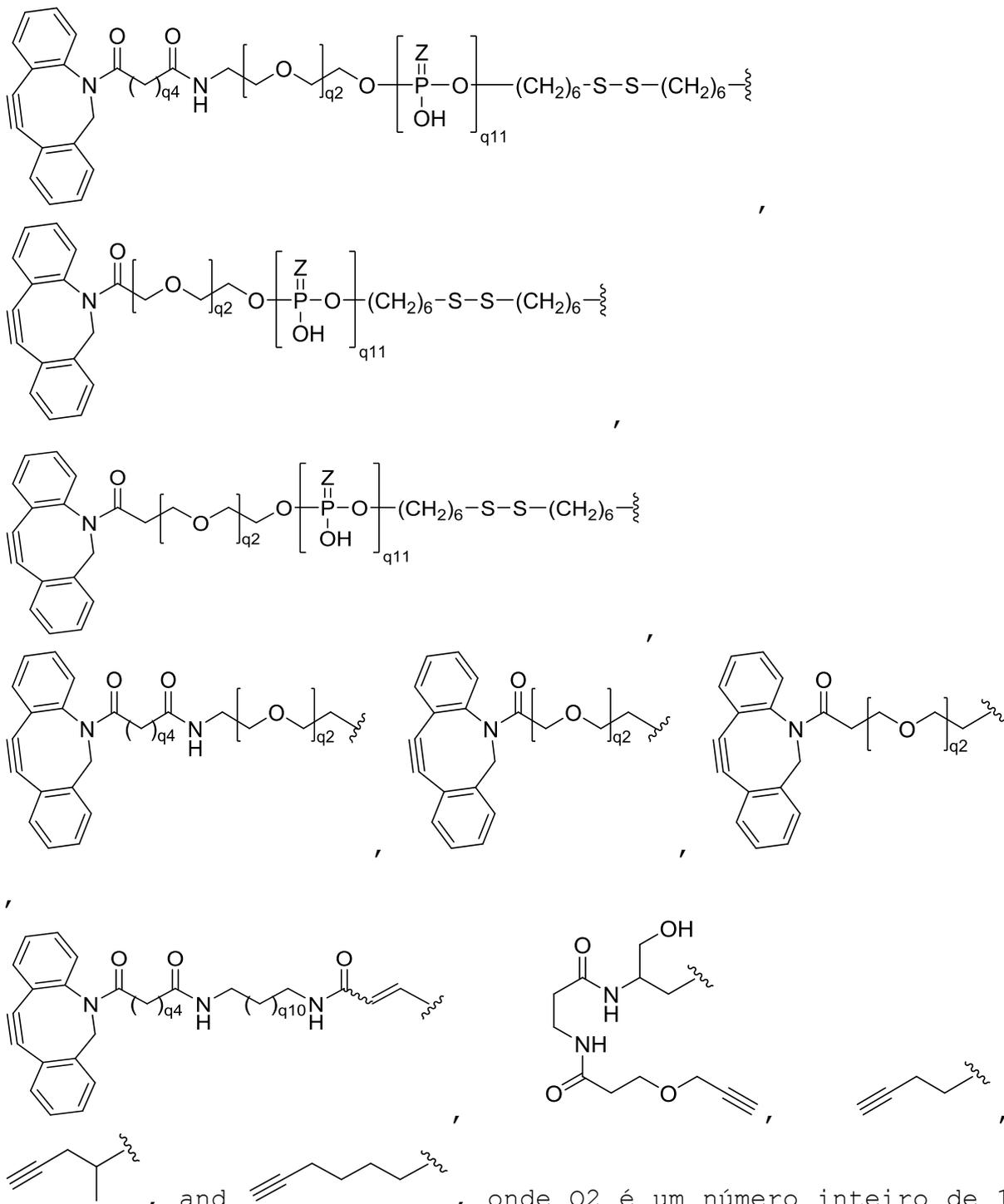


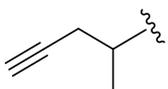




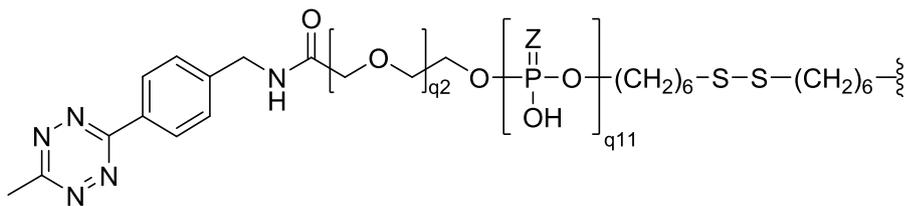
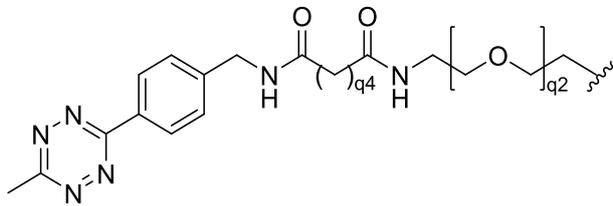
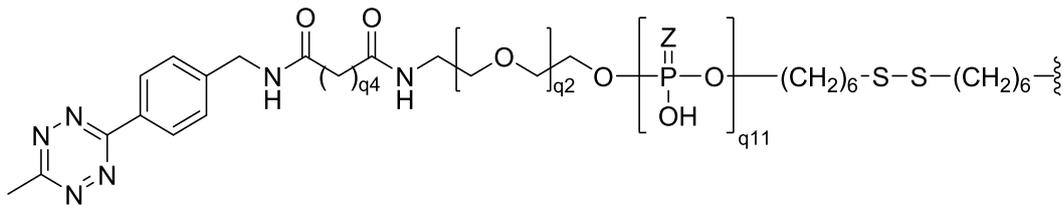
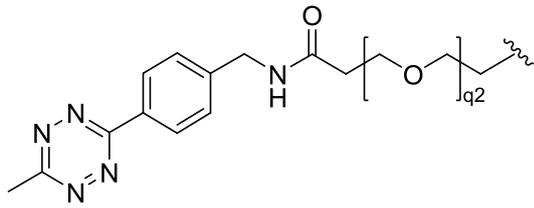
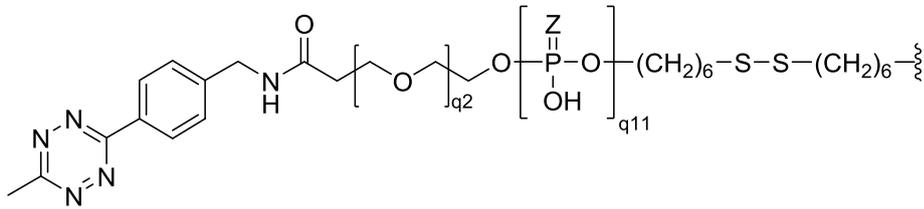
onde q_2 é um número inteiro de 1 a 50 (por exemplo, um número inteiro de 1 a 24 ou de 1 a 8 (por exemplo, 2 ou 3)), q_4 é um número inteiro de 0 a 10 (por exemplo, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8), q_{10} é um número inteiro de 0 a 8 (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6), q_{11} é 0 ou 1, Z é O ou S, e cada R^M é independentemente H, fração auxiliar, $-(CH_2)_{q_7}-CO-N(R^{M1})_2$, ou $-C[-CH_2O-(CH_2)_{q_7}-CO-N(R^{M1})_2]_3$ em que cada q_7 é independentemente um número inteiro de 1 a 5, e cada R^{M1} é independentemente H ou fração auxiliar.

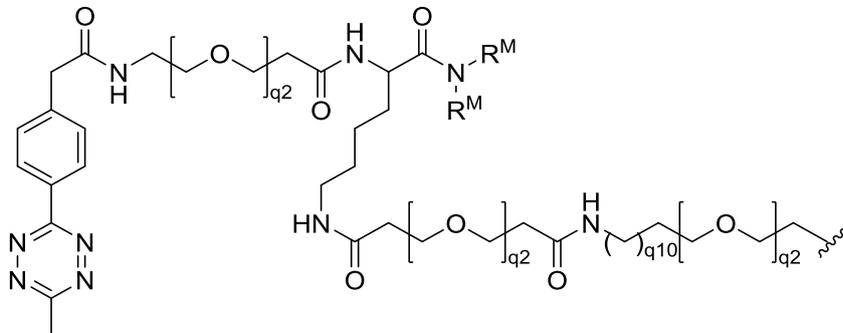
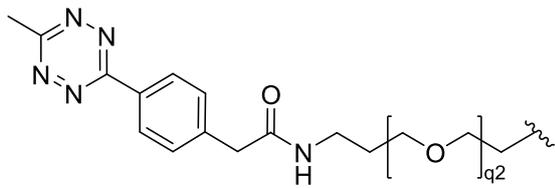
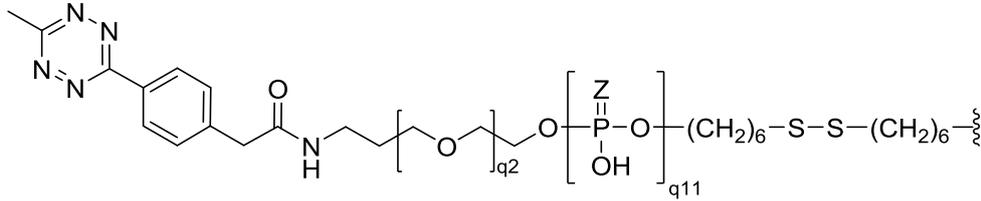
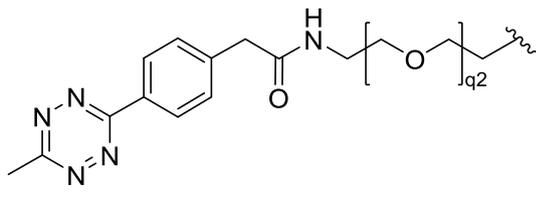
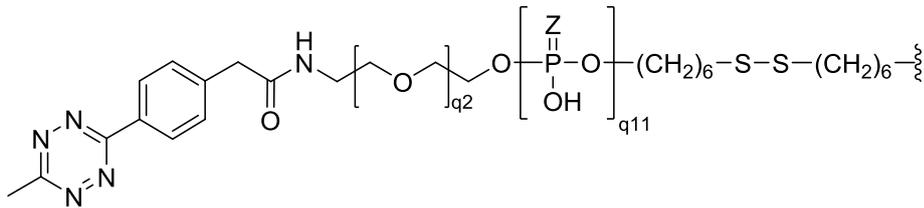
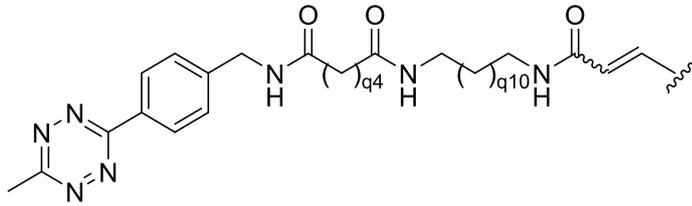
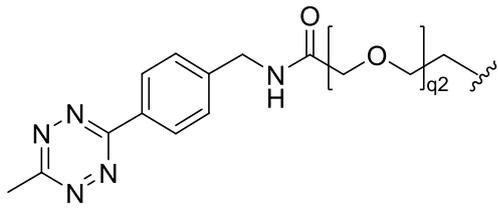
[00464] Os seguintes grupos conjugadores exemplares podem ser usados para conjugação com uma fração alvo através de uma cicloadição catalisada por metal:

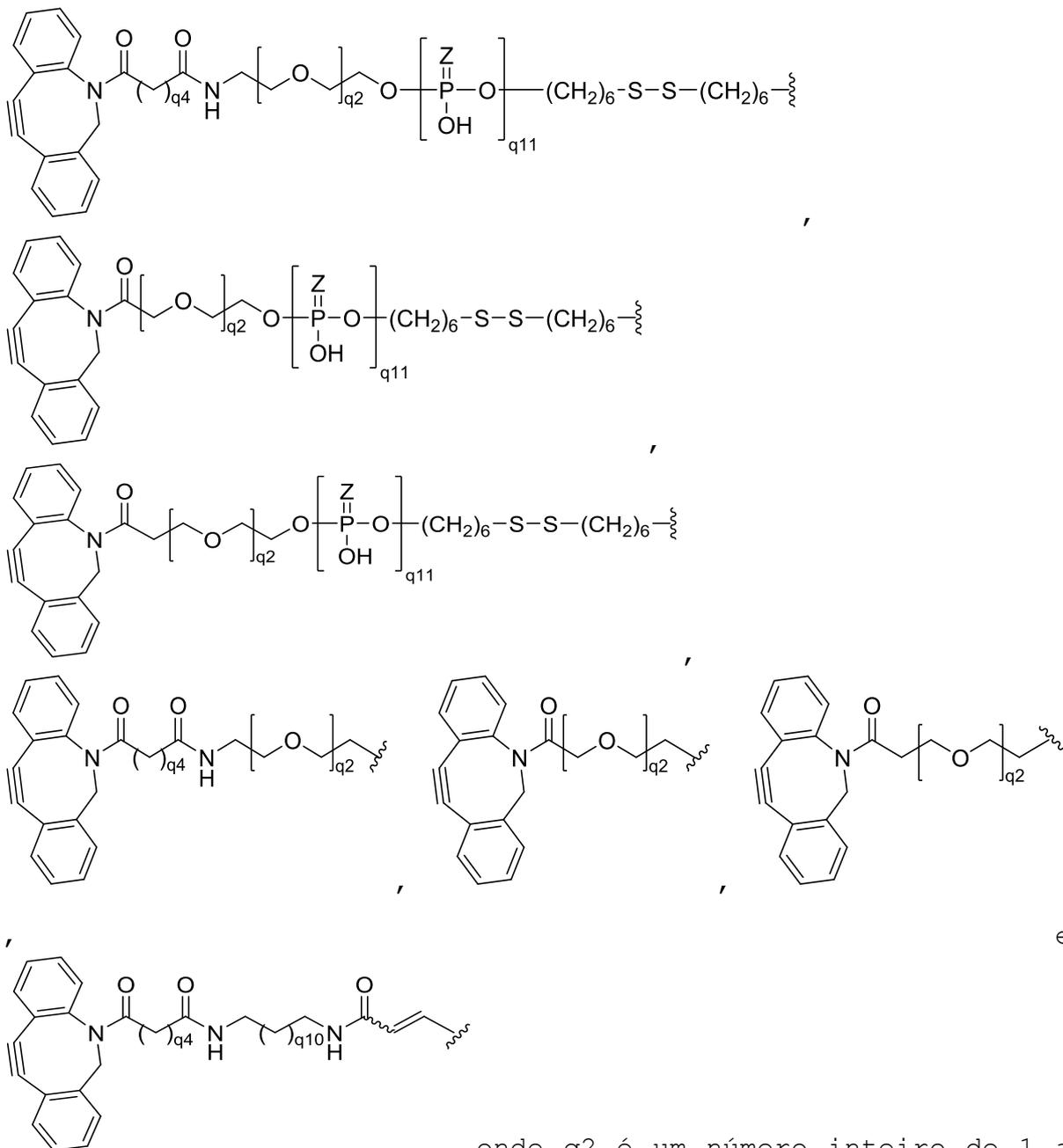


, and , onde Q_2 é um número inteiro de 1 a 50 (por exemplo, um inteiro de 1 a 24 ou de 1 a 8 (por exemplo, 2 ou 3)), Q_4 é um número inteiro de 0 a 10 (por exemplo, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8), q_{10} é um número inteiro de 0 a 8 (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6), q_{11} é 0 ou 1, e Z é O ou S.

[00465] Os seguintes grupos conjugadores exemplares podem ser usados para conjugação com uma porção de direcionamento por meio de uma cicloadição livre de metal:







e

onde q_2 é um número inteiro de 1 a 50 (por exemplo, um inteiro de 1 a 24 ou de 1 a 8 (por exemplo, 2 ou 3)), q_4 é um número inteiro a partir de 0 a 10 (por exemplo, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8), q_{10} é um número inteiro de 0 a 8 (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6), q_{11} é 0 ou 1, Z é O ou S, e cada R^M é, independentemente, H, uma metade auxiliar, $-(CH_2)_{q_7}-CO-N(R^{M1})_2$, ou $-C[-CH_2O-(CH_2)_{q_7}-CO-N(R^{M1})_2]_3$, onde cada q_7 representa, independentemente, um número inteiro de 1 a 5, e cada R^{M1} é independentemente H ou uma unidade auxiliar.

[00466] Os seguintes grupos conjugadores exemplares podem ser usados para conjugação com uma porção de direcionamento através da formação de amida:

$$\text{H}_2\text{N}-\left(\text{CH}_2\right)_{q12}-\text{S}^{\text{S}}$$
,
$$\text{H}_2\text{N}-\left[\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\right]_{q2}$$
, e
$$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\left[\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\right]_{q2}$$
onde $q2$ é um número inteiro de 0 a 50 (por exemplo, um número inteiro de 1 a 8 (por exemplo, 2 ou 3)) e $q12$ é um número inteiro de 1 a 11 (por exemplo, um número inteiro de 1 a 5 (por exemplo, 1, 2, 3, 4 ou 5)).

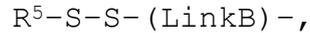
Grupos Bioreversíveis

[00467] Um grupo bioreversível é um substituinte monovalente com um peso molecular de 135 Da a 10 kDa (por exemplo, de 135 Da a 5 kDa, de 200 Da a 5 kDa ou de 200 Da a 2 kDa) e contendo dissulfeto (-S-S-). Em um grupo bioreversível, a menor cadeia de átomos que liga covalentemente o dissulfeto e a valência do grupo bioreversível pode ser de 2 a 10 átomos (por exemplo, de 2 a 6 átomos ou de 4 a 6 átomos (por exemplo, 4 ou 5 átomos)). O grupo bioreversível pode ser clivável intracelularmente em condições fisiológicas.

[00468] Um grupo bioreversível pode ser incluído nos fosfoésteres, por exemplo, para reduzir a carga negativa geral de um polinucleotídeo imunomodulador da invenção. A redução na carga negativa global de um polinucleotídeo imunomodulador pode aumentar a captação celular de um polinucleotídeo imunomodulador e/ou conjugado da invenção. Os polinucleotídeos imunomodulados da invenção podem incluir um ou mais grupos bioreversíveis em fosfoésteres e/ou espaçadores abásicos. Em algumas modalidades, um polinucleotídeo imunomodulador da invenção pode incluir de 1

a 6 grupos bioreversíveis (por exemplo, de 1 a 4 grupos bioreversíveis (por exemplo, 1, 2 ou 3 grupos bioreversíveis)).

[00469] Um grupo bioreversível pode ser na forma (XXII):



(XXII)

Em que

LinkB é um grupo divalente que contém um átomo de carbono hibridado com sp^3 ligado a fosfato, fosforotioato ou fosforoditioato e um átomo de carbono ligado a -S-S- e R^5 é alquil C_{1-6} opcionalmente substituído, aril C_{6-10} opcionalmente substituído, ou -LinkC $(-R^M)_r$, ou LinkB é um ligante trivalente contendo um átomo de carbono hibridado com sp^3 ligado a fosfato, fosforotioato ou fosforoditioato e um átomo de carbono ligado a -S-S-, no qual a terceira valência do LinkB combina com -S-S- e R^5 para formar heterociclileno C_{3-9} opcionalmente substituído;

LinkC é um grupo multivalente;

cada R^M é independentemente H, uma fração auxiliar ou $-Q^G [(-Q^B-Q^C-Q^D)_{s2}-R^{M1}]_{p1}$,

Onde

cada R^{M1} é independentemente H ou uma fração auxiliar,

cada Q^B e cada Q^D está independentemente ausente, -CO-, -NH-, -O-, -S-, -SO₂-, -OC(O)-, -COO-, -NHC(O)-, -C(O)NH-, -CH₂-, -CH₂NH-, -NHCH₂-, -CH₂O- ou -OCH₂-,

cada Q^C está independentemente ausente, alquileno C_{1-12} opcionalmente substituído, alcenileno C_{2-12} opcionalmente

substituído, alquinileno C₂₋₁₂ opcionalmente substituído, heteroalquileno C₂₋₁₂ opcionalmente substituído ou heterociclileno C₁₋₉ opcionalmente substituído,

cada Q^G é independentemente C₁₋₆ alcano-triil opcionalmente substituído, C₁₋₆ alcano-tetralil opcionalmente substituído, C₂₋₆ heteroalcano-triil opcionalmente substituído ou C₂₋₆ heteroalcano-tetralil opcionalmente substituído,

cada s₂ é independentemente um número inteiro de 0 a 10, e

p₁ é 2 ou 3;

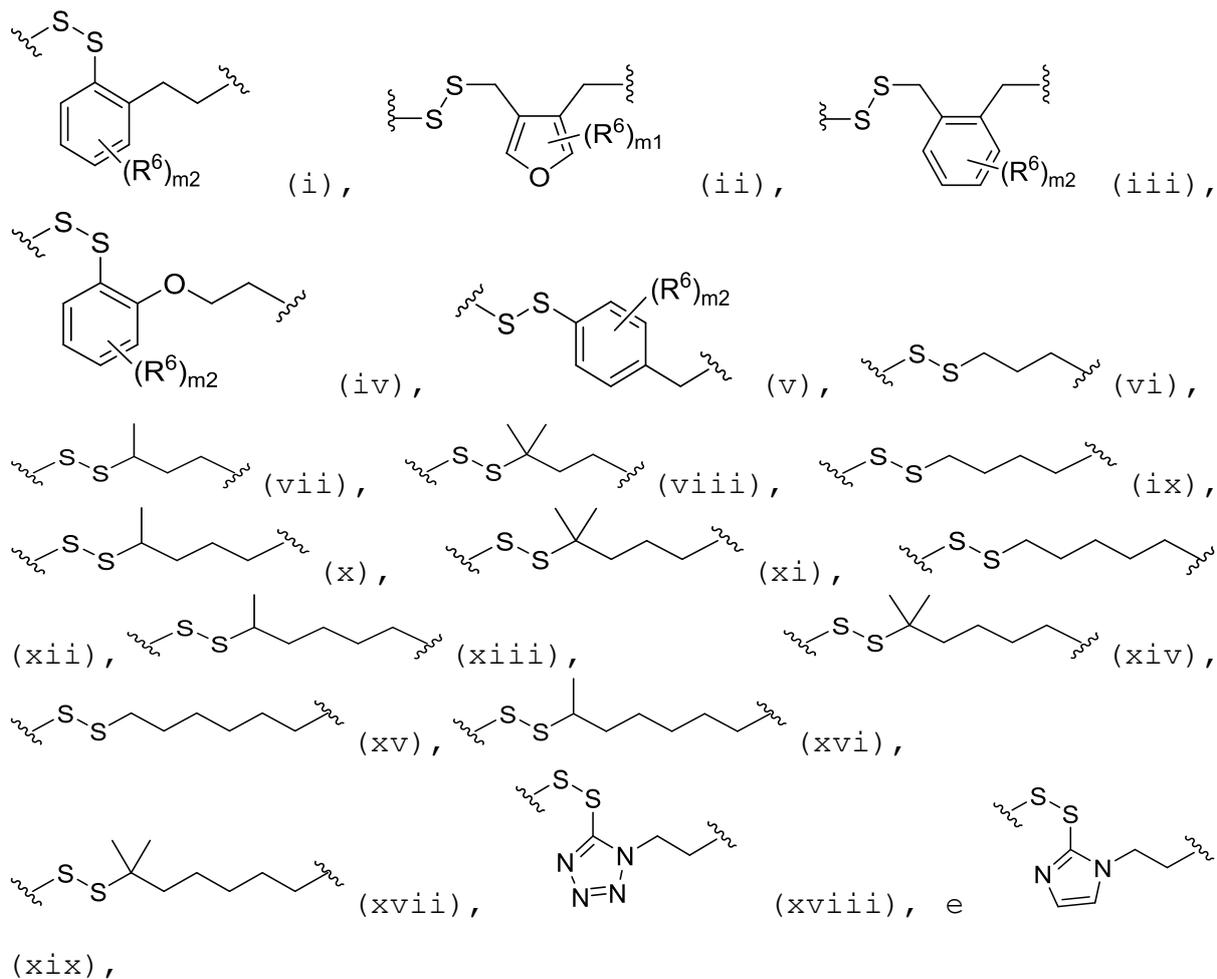
e

r é um número inteiro de 1 a 6 (por exemplo, 1, 2 ou 3).

[00470] Em certas modalidades, LinkB e/ou R⁵ inclui um grupo volumoso conectado a -S-S-. A inclusão de um grupo volumoso ligado a -S-S- pode melhorar a estabilidade da ligação enxofre-enxofre, por exemplo, durante a síntese de polinucleotídeos.

[00471] Em outras modalidades, o LinkB consiste em 1, 2 ou 3 grupos, sendo cada um dos grupos selecionados independentemente do grupo que consiste em alquileno C₁₋₁₂ opcionalmente substituído, alcenileno C₂₋₁₂ opcionalmente substituído, alquinileno C₂₋₁₂ opcionalmente substituído, arileno C₆₋₁₀ opcionalmente substituído, heteroalquileno C₂₋₁₂ opcionalmente substituído e heterociclileno C₁₋₉ opcionalmente substituído.

[00472] Em modalidades particulares, LinkB e -S-S- se combinam para formar uma estrutura selecionada do grupo que consiste em:



em que

cada R₆ é independentemente alcenoílo C₂₋₇; Alquilo C₁₋₆; Alcenoílo C₂₋₆; Alcinilo C₂₋₆; Alquil C₁₋₆ sulfinil; Arilo C₆₋₁₀; amino; (C₆₋₁₀ aril)-C₁₋₄-alquilo; Cicloalquil C₃₋₈; (Cicloalquil C₃₋₈)-alquil C₁₋₄; Cicloalcenoílo C₃₋₈; (C₃₋₈ cicloalcenoílo)-C₁₋₄-alquil; halo; Heterociclílo C₁₋₉; Heteroarilo C₁₋₉; (C₁₋₉ heterociclílo) oxi; (C₁₋₉ heterociclílo) aza; hidroxi; Tioalcóxi C₁₋₆; (CH₂)_qCO₂R^A, em que q é um número inteiro de zero a quatro e R^A é selecionado a partir do grupo que consiste em C₁₋₆ alquil, C₆₋₁₀ aril e (C₆₋₁₀ aril)-C₁₋₄-alquil; - (CH₂)_qCONR^BR^C, onde q é um número inteiro de zero a quatro e onde R^B e R^C são selecionados independentemente do grupo que consiste em hidrogênio, C₁₋₆ alquil, C₆₋₁₀ aril e (C₆₋₁₀ aril)-C₁₋₄-alquil; - (CH₂)_qSO₂R^D, em que q é um número inteiro

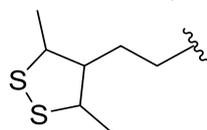
de zero a quatro e onde R^D é selecionado do grupo que consiste em C_{1-6} alquil, C_{6-10} aril e $(C_{6-10}$ aril)- C_{1-4} -alquil; $-(CH_2)_qSO_2NR^E R^F$, em que q é um número inteiro de zero a quatro e onde cada um de R^E e R^F é, independentemente, selecionado do grupo que consiste em hidrogênio, alquil, aril e $(C_{6-10}$ aril)- C_{1-4} -alquilo; tiol; ariloxi; cicloalcóxi; arilalcóxi; $(C_{1-9}$ heterociclil)- C_{1-4} -alquil; $(C_{1-9}$ heteroaril)- C_{1-4} -alquil; Sililo C_{3-12} ; ciano; ou $-S(O)R^H$ em que R^H é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, alquil C_{1-C_6} , aril C_{6-10} e $(\text{aril } C_{6-10})$ -alquil C_{1-4} ; ou dois grupos R^6 adjacentes, juntamente com os átomos aos quais cada um dos grupos R^6 está ligado, combinam-se para formar um grupo cíclico selecionado do grupo que consiste em C_6 aril, C_{2-5} heterociclil ou C_{2-5} heteroaril, em que o grupo cíclico é opcionalmente substituído com 1, 2 ou 3 substituintes selecionados a partir do grupo que consiste em C_{2-7} alcanoóilo; Alquilo C_{1-6} ; Alcenilo C_{2-6} ; Alcinilo C_{2-6} ; Alquil C_{1-6} sulfinil; Arilo C_{6-10} ; amino; $(C_{6-10}$ aril)- C_{1-4} -alquilo; Cicloalquil C_{3-8} ; $(\text{Cicloalquil } C_{3-8})$ -alquil C_{1-4} ; Cicloalcenilo C_{3-8} ; $(C_{3-8}$ cicloalcenil)- C_{1-4} -alquil; halo; Heterociclil C_{1-9} ; Heteroarilo C_{1-9} ; $(C_{1-9}$ heterociclil) oxi; $(C_{1-9}$ heterociclil) aza; hidroxil; Tioalcóxi C_{1-6} ; $(CH_2)_qCO_2R^A$, em que q é um número inteiro de zero a quatro e R^A é selecionado a partir do grupo que consiste em C_{1-6} alquil, C_{6-10} aril e $(C_{6-10}$ aril)- C_{1-4} -alquil; $-(CH_2)_qCONR^B R^C$, onde q é um número inteiro de zero a quatro e onde R^B e R^C são selecionados independentemente do grupo que consiste em hidrogênio, C_{1-6} alquil, C_{6-10} aril e $(C_{6-10}$ aril) - C_{1-4} -alquil; $-(CH_2)_qSO_2R^D$, em que q é um número inteiro de zero a quatro e onde R^D é selecionado do grupo que consiste em C_{1-6} alquil, C_{6-10} aril e $(C_{6-10}$ aril)- C_{1-4} -alquil; $-(CH_2)_qSO_2NR^E R^F$, em que q é um número

inteiro de zero a quatro e onde cada um de R^E e R^F é, independentemente, selecionado do grupo que consiste em hidrogênio, alquil, aril e (C₆₋₁₀ aril)-C₁₋₄-alquilo; tiol; ariloxi; cicloalcóxi; arilalcóxi; (C₁₋₉ heterociclil)-C₁₋₄-alquil; (C₁₋₉ heteroaril)-C₁₋₄-alquil; Sililo C₃₋₁₂; ciano; e -S(O) R^H em que R^H é selecionado do grupo que consiste em hidrogênio, alquil C₁₋₆, aril C₆₋₁₀ e (aril C₆₋₁₀)-alquil C₁₋₄;

m_1 é 0, 1 ou 2; e

m_2 é 0, 1, 2, 3 ou 4;

ou LinkB, -S-S-, e R^5 combinados formando um grupo contendo

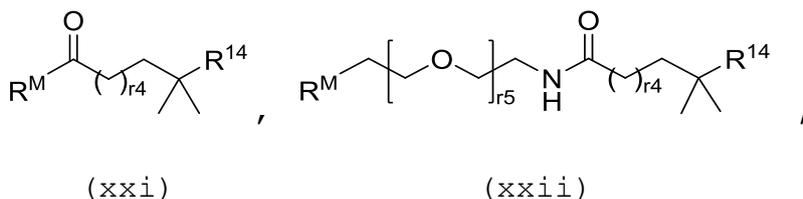


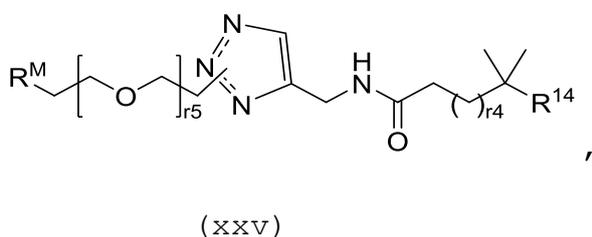
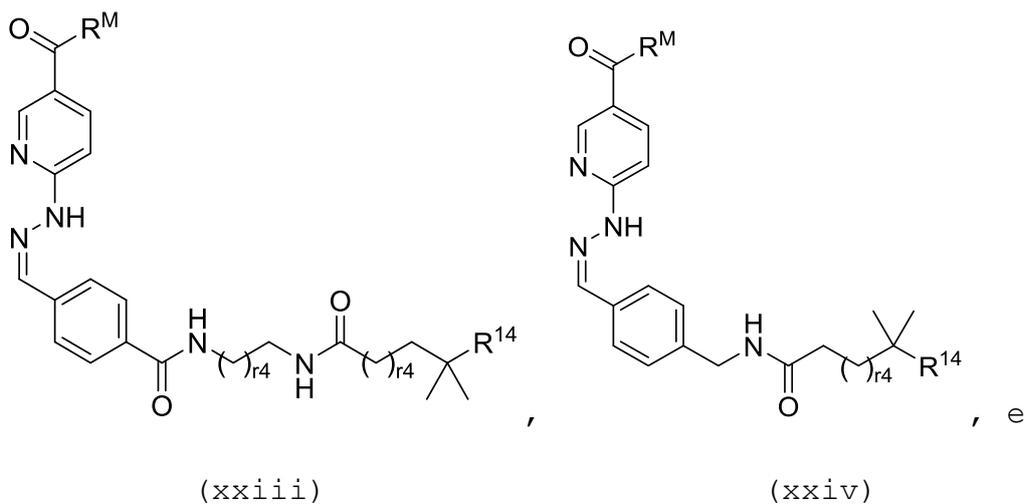
(xx).

[00473] Em ainda outras modalidades, o LinkC pode incluir de 0 a 3 monômeros multivalentes (por exemplo, alcano-triil C₁₋₆ opcionalmente substituído, alcano-tetrail C₁₋₆ opcionalmente substituído ou átomo de nitrogênio trivalente) e um ou mais monômeros divalentes (por exemplo, de 1 a 40), onde cada monômero divalente é independentemente alquilenos C₁₋₆ opcionalmente substituído; alquilenos C₂₋₆ opcionalmente substituído; alquilenos C₂₋₆ opcionalmente substituído; cicloalquilenos C₃₋₈ opcionalmente substituído; cicloalcenilenos C₃₋₈ opcionalmente substituído; arilenos C₆₋₁₄ opcionalmente substituído; heteroarilenos C₁₋₉ opcionalmente substituído com 1 a 4 heteroátomos selecionados de N, O e S; heterociclilenos C₁₋₉ opcionalmente substituído com 1 a 4 heteroátomos selecionados de N, O e S; imino; N opcionalmente substituído; O; ou S(O) m , em que m é 0, 1 ou 2. Em algumas modalidades, cada monômero é independentemente alquilenos C₁₋₆ opcionalmente substituído;

cicloalquilenos C_{3-8} opcionalmente substituído; cicloalcenileno C_{3-8} opcionalmente substituído; arileno C_{6-14} opcionalmente substituído; heteroarileno C_{1-9} opcionalmente substituído com 1 a 4 heteroátomos selecionados de N, O e S; heterociclileno C_{1-9} opcionalmente substituído com 1 a 4 heteroátomos selecionados de N, O e S; imino; N opcionalmente substituído; O; ou $S(O)_m$, onde m é 0, 1 ou 2 (por exemplo, m é 2). Em certas modalidades, cada monômero é independentemente alquilenos C_{1-6} opcionalmente substituído; cicloalquilenos C_{3-8} opcionalmente substituído; cicloalcenileno C_{3-8} opcionalmente substituído; arileno C_{6-14} opcionalmente substituído; heteroarileno C_{1-9} opcionalmente substituído com 1 a 4 heteroátomos selecionados de N, O e S; heterociclileno C_{1-9} opcionalmente substituído com 1 a 4 heteroátomos selecionados de N, O e S; N opcionalmente substituído; O; ou $S(O)_m$, onde m é 0, 1 ou 2 (por exemplo, m é 2). O ligante não bioreversível que conecta a fração auxiliar à fração de conjugação ou ao seu produto de reação pode incluir de 2 a 500 (por exemplo, 2 a 300, 2 a 200, 2 a 100 ou 2 a 50) desses monômeros. LinkC pode incluir um ou mais polietileno glicóis (por exemplo, os polietileno glicóis podem ter um peso molecular de 88 Da a 1 kDa (por exemplo, de 88 Da a 500 Da).

[00474] Os compostos que podem ser utilizados na preparação do grupo $-\text{LinkC}(-R^M)_r$ na fórmula (IIa) são descritos aqui e também no documento WO 2015/188197. Exemplos não limitativos de $-\text{LinkC}(-R^M)_r$ incluem:





em que

R^{14} é uma ligação para -S-S-,

R^M é uma fração auxiliar ou $-Q^G[(-Q^B-Q^C-Q^D)_{s2}-R^{M1}]_{p1}$,

Onde

cada R^{M1} é independentemente H ou uma fração auxiliar,

cada Q^B e cada Q^D está independentemente ausente, -CO-, -NH-, -O-, -S-, -SO₂-, -OC(O)-, -COO-, -NHC(O)-, -C(O)NH-, -CH₂-, -CH₂NH-, -NHCH₂-, -CH₂O- ou -OCH₂-,

cada Q^C está independentemente ausente, alquileno C₁₋₁₂ opcionalmente substituído, alcenileno C₂₋₁₂ opcionalmente substituído, alquinileno C₂₋₁₂ opcionalmente substituído, heteroalquileno C₂₋₁₂

opcionalmente substituído ou heterociclileno C₁₋₉ opcionalmente substituído;

cada Q^G é independentemente C₁₋₆ alcano-triil opcionalmente substituído, C₁₋₆ alcano-tetralil opcionalmente substituído, C₂₋₆ heteroalcano-triil opcionalmente substituído ou C₂₋₆ heteroalcano-tetralil opcionalmente substituído,

cada s₂ é independentemente um número inteiro de 0 a 10, e

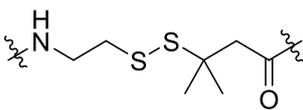
p₁ é 2 ou 3;

cada r₄ é independentemente um número inteiro de 1 a 6; e

cada r₅ é independentemente um número inteiro de 0 a 10.

[00475] Em certas modalidades, R^M é uma fração auxiliar. Em algumas modalidades, pelo menos um R^{M1} é uma fração auxiliar.

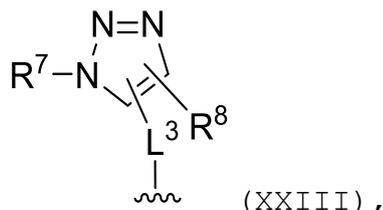
[00476] Em certas modalidades, o grupo ligante bioreversível

é  , em que uma extremidade do grupo está conectada a um polinucleotídeo e a outra extremidade está conectada a uma fração alvo (em uma modalidade, um anticorpo).

Grupos não bioreversíveis

[00477] Um grupo não bioreversível é um substituinte monovalente que não contém ligações cliváveis sob condições fisiológicas no soro ou em um endossoma (por exemplo, ésteres, tioésteres ou dissulfetos). O grupo não bioreversível pode ser alquil C₂₋₁₆ opcionalmente substituído; alquenil C₃₋₁₆ opcionalmente substituído; alquinil C₃₋₁₆ opcionalmente substituído; cicloalquil C₃₋₈ opcionalmente substituído;

cicloalcenilo C₃₋₈ opcionalmente substituído; (C₃₋₈ cicloalquil) -C₁₋₄-alquil opcionalmente substituído; (C₃₋₈ cicloalcenil) -C₁₋₄-alquil opcionalmente substituído; aril C₆₋₁₄ opcionalmente substituído; (C₆₋₁₄ aril) -C₁₋₄-alquilo opcionalmente substituído; heteroaril C₁₋₉ opcionalmente substituído com 1 a 4 heteroátomos selecionados dentre N, O e S; (C₁₋₉ heteroaril) -C₁₋₄-alquil opcionalmente substituído com 1 a 4 heteroátomos selecionados dentre N, O e S; heterociclil C₂₋₉ opcionalmente substituído com 1 a 4 heteroátomos selecionados de N, O e S, em que o heterociclil não contém uma ligação S-S; (C₂₋₉ heterociclil)-C₁₋₄-alquil opcionalmente substituído com 1 a 4 heteroátomos selecionados de N, O e S, em que o heterociclil não contém uma ligação S-S; ou



um grupo de fórmula (XXIII):

Onde

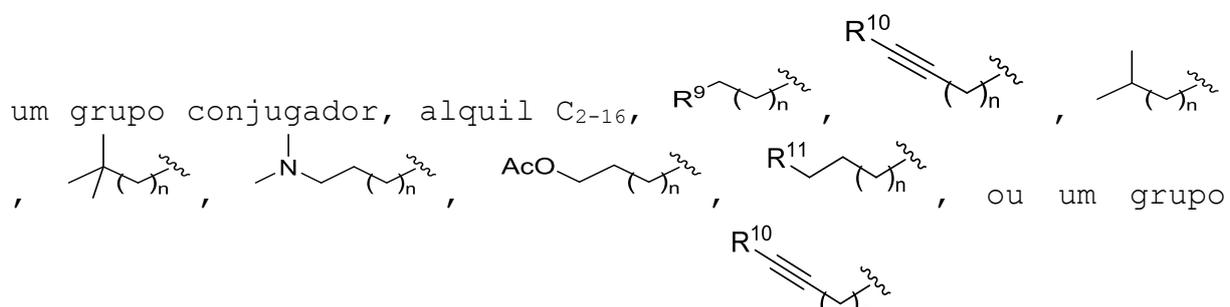
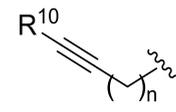
L³ é alquileno C₂₋₆;

R⁷ é alquil C₂₋₆ opcionalmente substituído; aril C₆₋₁₄ opcionalmente substituído; (C₆₋₁₄ aril) -C₁₋₄-alquilo opcionalmente substituído; cicloalquil C₃₋₈ opcionalmente substituído; (C₃₋₈ cicloalquil)-C₁₋₄-alquil opcionalmente substituído; heteroaril C₁₋₉ opcionalmente substituído com 1 a 4 heteroátomos selecionados a partir do grupo que consiste em N, O e S; (C₁₋₉ heteroaril)-C₁₋₄-alquil opcionalmente substituído com 1 a 4 heteroátomos selecionados do grupo que consiste em N, O e S; heterociclil C₂₋₉ opcionalmente substituído com 1 a 4 heteroátomos selecionados do grupo que consiste em N, O e S, em que o heterociclil não contém uma ligação S-S; (C₂₋₉

heterociclil)-C₁₋₄-alquil opcionalmente substituído com 1 a 4 heteroátomos selecionados de N, O e S, em que o heterociclil não contém uma ligação S-S; e um poli (etileno glicol) terminado com -OH, alcóxi C₁₋₆ ou -COOH; e

R₆ é H ou alquil C¹⁻⁶.

[00478] Um fosfotriéster não bioreversível pode ser um fosfato ou um fosforotioato substituído por um substituinte que é

um grupo conjugador, alquil C₂₋₁₆, , ou um grupo formado por reação de cicloadição de  com um substrato contendo azido,

onde

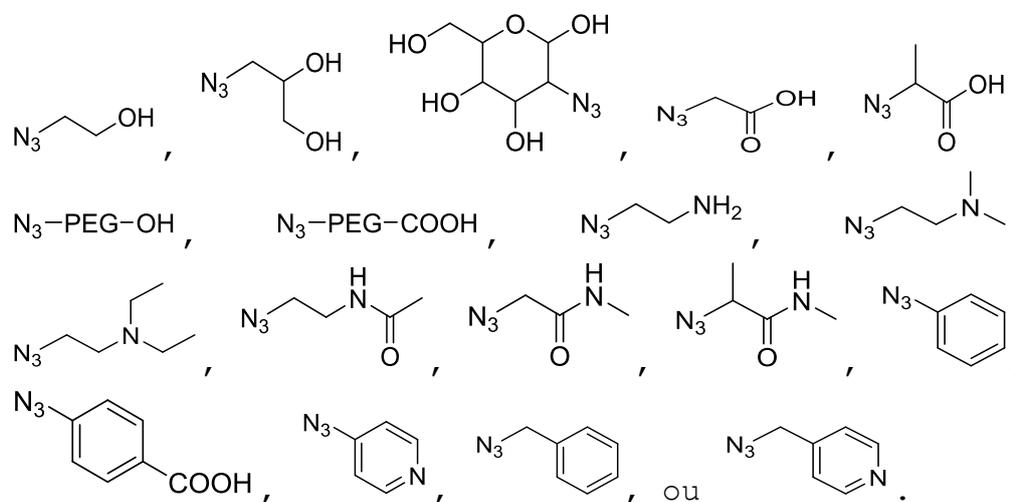
n é um número inteiro de 1 a 6;

R⁹ é aril C₆ opcionalmente substituído; heteroaril C₄₋₅ opcionalmente substituído que é um anel de seis membros contendo 1 ou 2 átomos de nitrogênio; ou heterociclil C₄₋₅ opcionalmente substituído que é um anel de seis membros contendo 1 ou 2 átomos de nitrogênio;

R¹⁰ é H ou C₁₋₆ alquil;

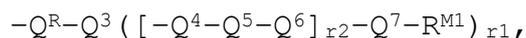
R¹¹ é um halogênio, -COOR^{11A} ou -CON(R^{11B})₂, em que cada um de R^{11A} e R^{11B} é independentemente H, alquil C₁₋₆ opcionalmente substituído, aril C₆₋₁₄ opcionalmente substituído, aril C₆₋₁₄ opcionalmente substituído, heteroaril C₁₋₉ opcionalmente substituído ou opcionalmente substituído Heterociclil C₂₋₉; e

o substrato contendo azido é



[00479] Em algumas modalidades, um grupo não bioreversível é $-\text{LinkD}(-\text{R}^{\text{M1}})_{r1}$, em que LinkD é um ligante multivalente, cada R^{M1} é independentemente H ou uma fração auxiliar e $r1$ é um número inteiro de 1 a 6.

[00480] Em algumas modalidades, $-\text{LinkD}(-\text{R}^{\text{M1}})_{r1}$ tem fórmula (XXIV):



(XXIV)

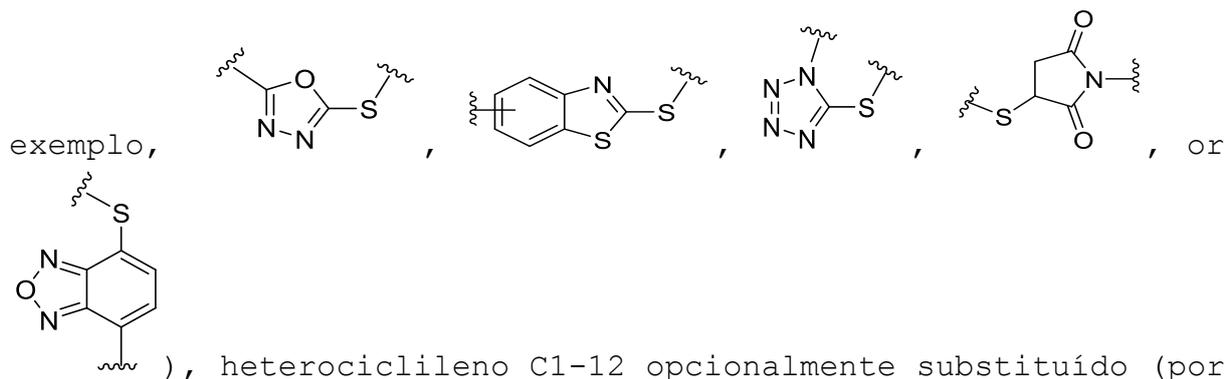
Onde

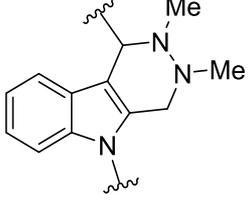
$r1$ é um número inteiro de 1 a 6;

cada $r2$ é independentemente um número inteiro de 0 a 50 (por exemplo, de 0 a 30), onde as unidades de repetição são iguais ou diferentes;

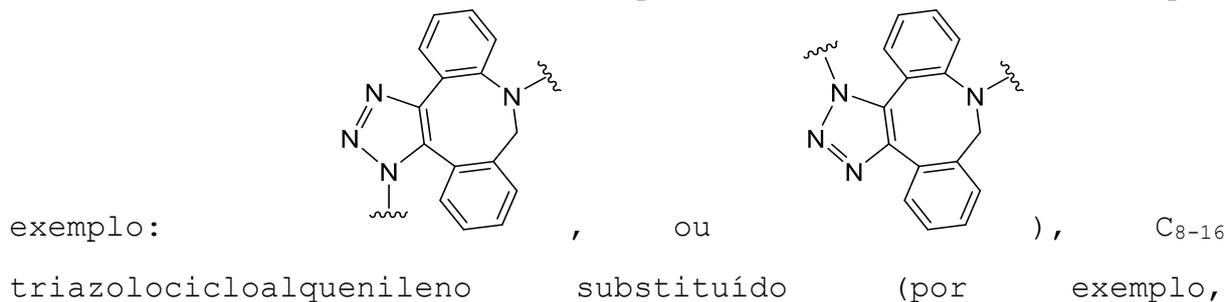
Q^{R} é $[-\text{Q}^4-\text{Q}^5-\text{Q}^6]_{r2}-\text{Q}^{\text{L}}-$, em que Q^{L} é heteroalquileno C_{2-12} opcionalmente substituído (por exemplo, um heteroalquileno contendo $-\text{C}(\text{O})-\text{N}(\text{H})-$, $-\text{N}(\text{H})-\text{C}(\text{O})-$, $-\text{S}(\text{O})_2-\text{N}(\text{H})-$ ou $-\text{N}(\text{H})-\text{S}(\text{O})_2-$

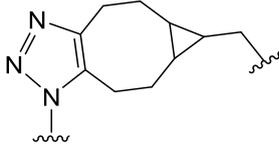
), C₁₋₁₂ tioheterociclileno opcionalmente substituído (por

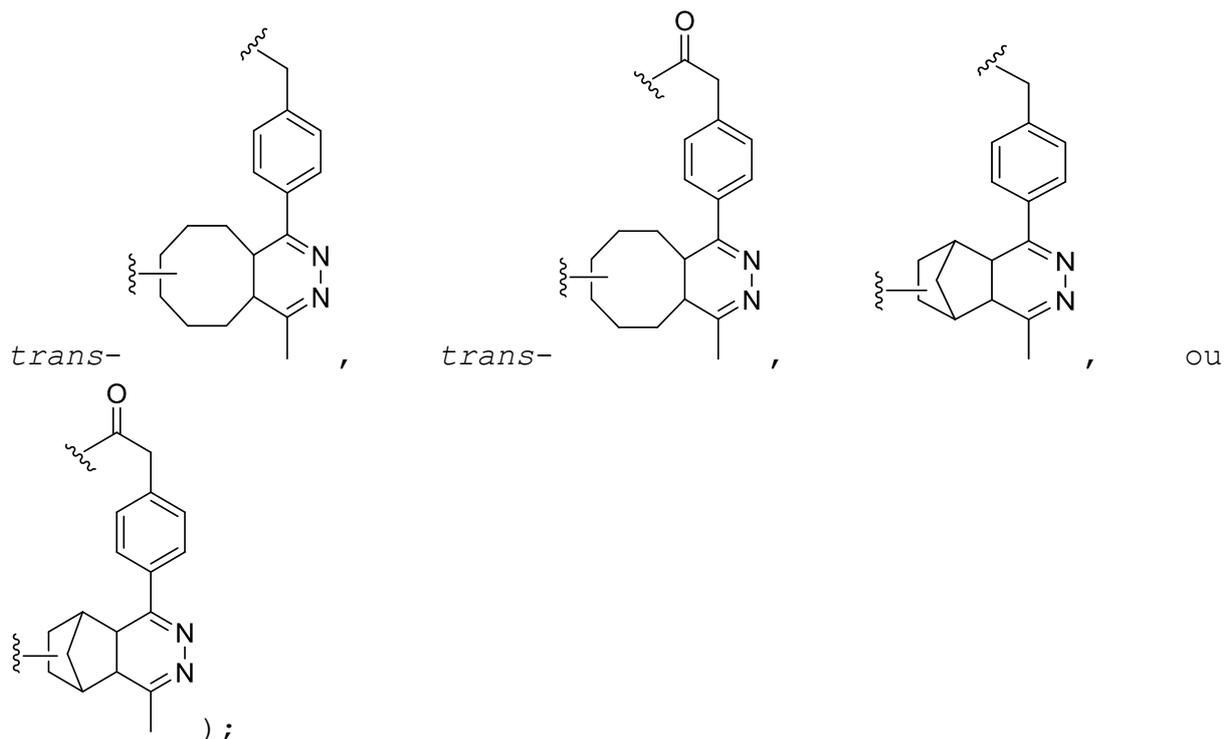


exemplo, 1,2,3-triazole-1,4-diil ou ), ciclobut-3-eno-1,2-diona-3,4-diil, pirid-2-il-hidrazona,

triazoloheterociclileno C₆₋₁₆ opcionalmente substituído (por



), ou um grupo di-hidropiridazina (por exemplo.,



Q^3 é um grupo linear (por exemplo, $[-Q^4-Q^5-Q^6]_{r2-}$), se $r1$ é 1 ou um grupo ramificado (por exemplo, $[-Q^4-Q^5-Q^6]_s-Q^8([-Q^4-Q^5-Q^6]_{r2-}(Q^8)_{r3})_{r4}$, em que $r3$ é 0 ou 1, $r4$ é 0, 1, 2 ou 3), se $r1$ é um número inteiro de 2 a 6; cada $r2$ é independentemente um número inteiro de 0 a 50 (por exemplo, de 0 a 30), onde as unidades de repetição são iguais ou diferentes;

cada Q^4 e cada Q^6 está independentemente ausente $-CO-$, $-NH-$, $-O-$, $-S-$, $-SO_2-$, $-OC(O)-$, $-COO-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NH-$, $-CH_2-$, $-CH_2NH-$, $-NHCH_2-$, $-CH_2O-$ ou $-OCH_2-$;

cada Q^5 está independentemente ausente, alquileno C_{1-12} opcionalmente substituído, alcenileno C_{2-12} opcionalmente substituído, alquinileno C_{2-12} opcionalmente substituído, heteroalquileno C_{2-12} opcionalmente substituído ou heterociclileno C_{1-9} opcionalmente substituído;

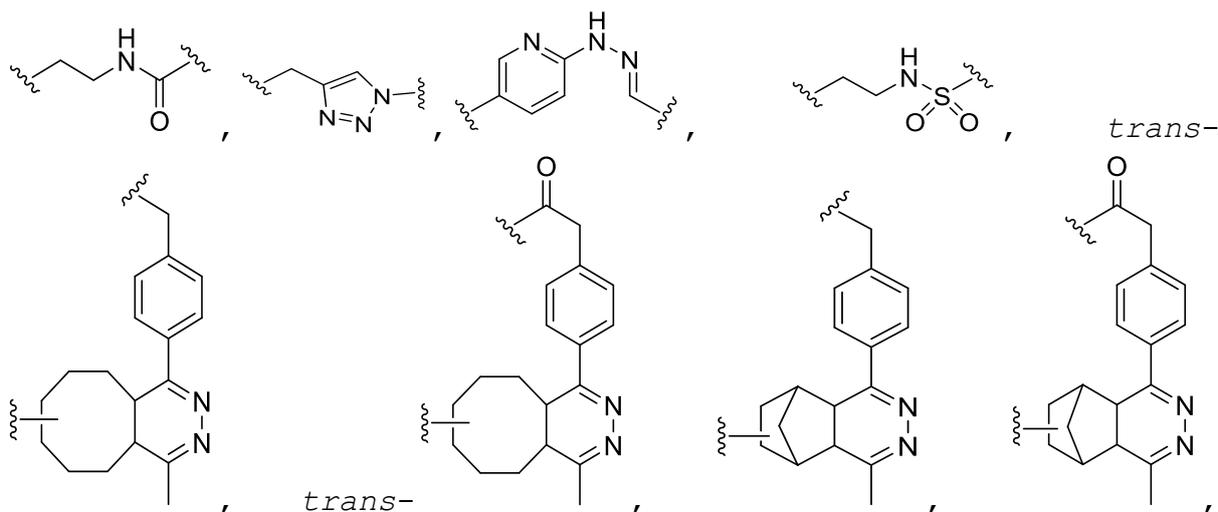
cada Q^7 está independentemente ausente, $-CO-$, $-NH-$, $-O-$, $-S-$, $-SO_2-$, $-CH_2-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-$, $-C(O)NH-$, $-NH-C(O)-$, $-NH-CH(R^a)-C(O)-$ ou $-C(O)-CH(R^a)-NH-$;

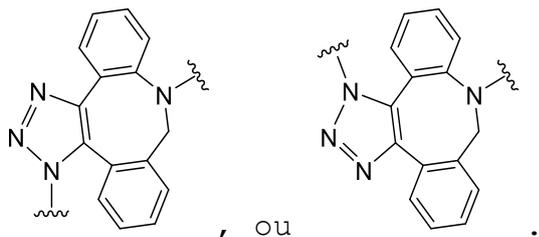
cada Q^8 é independentemente C_{1-6} alcano-triil opcionalmente substituído, C_{1-6} alcano-tetralil opcionalmente substituído, C_{2-6} heteroalcano-triil opcionalmente substituído ou C_{2-6} heteroalcano-tetralil opcionalmente substituído; e

cada R^a é independentemente H ou uma cadeia lateral de aminoácido; e

cada R^{M1} é independentemente H ou uma fração auxiliar.

[00481] Na fórmula (XXIV), pelo menos um dos Q^4 , Q^5 e Q^6 está presente. Na fórmula (XXIV), o LinkD pode incluir um único ponto de ramificação, se cada r_3 for 0, ou vários pontos de ramificação, se pelo menos um r_3 for 1. Na fórmula (XXIV), o Q^R pode ser $-Q^5-Q^4-Q^L-$, onde Q^5 é heteroalquileno C_{2-12} opcionalmente substituído ou alquileno C_{1-12} opcionalmente substituído, e Q^4 é $-CO-$, $-NH-$ ou $-O-$. Na fórmula (XXIV), Q^L pode ser:





[00482] Na fórmula (XXIV), Q^3 pode ser um grupo linear de fórmula $[-Q^4-Q^5-Q^6]_{r2}-$, em que Q^4 , Q^5 e Q^6 são como definidos para a fórmula (XXIV). Como alternativa, Q^3 pode ser um grupo ramificado $[-Q^4-Q^5-Q^6]_{r2}-Q^8([-Q^4-Q^5-Q^6]_{r2}-(Q^8)_{r3})_{r4}$, em que cada Q^8 é independentemente alcano-triil C_{1-6} opcionalmente substituído, alcano-tetralil C_{1-6} opcionalmente substituído, heteroalcano-triil C_{2-6} opcionalmente substituído ou heteroalcano-tetralilo C_{2-6} opcionalmente substituído;

Onde

cada $r2$ é independentemente um número inteiro de 0 a 50 (por exemplo, de 0 a 30), onde as unidades de repetição são iguais ou diferentes;

$r3$ é 0 ou 1;

$r4$ é 0, 1, 2 ou 3;

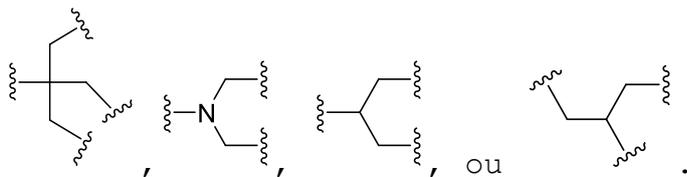
Onde,

quando $r3$ é 0, LinkD é um grupo trivalente ou tetravalente e,

quando $r3$ é 1, LinkD é um grupo tetravalente, pentavalente ou hexavalente.

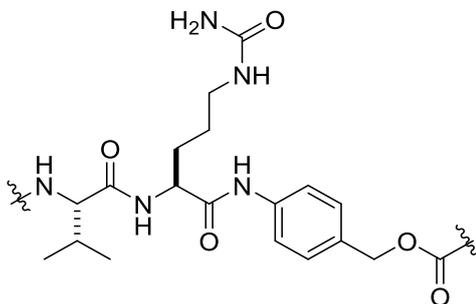
[00483] Em certas modalidades, $r3$ é 0.

[00484] Em algumas modalidades, Q^8 é:



[00485] Os compostos que podem ser utilizados na preparação do grupo $-\text{LinkD}(-\text{R}^{\text{M1}})_p$ na fórmula (I) são descritos aqui e no documento WO 2015/188197.

[00486] Em certas modalidades, o grupo ligante não-



bioreversível é em que uma extremidade do grupo está conectada a um polinucleotídeo e a outra extremidade está conectada a uma fração alvo (em uma modalidade, um anticorpo).

Porções Auxiliares

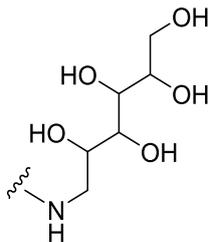
[00487] Uma fração auxiliar é um grupo monovalente contendo um corante ou um grupo hidrofílico ou uma combinação dos mesmos (por exemplo, um polímero hidrofílico (por exemplo, poli(etilenoglicol) (PEG)), um polímero carregado positivamente (por exemplo, poli(etileno)imina) ou um álcool de açúcar (por exemplo, glucitol)). Uma fração auxiliar pode ter um peso molecular teórico de 100 Da a 2,5 kDa (por exemplo, de 350 Da a 2,5 kDa, de 100 Da a 1.200 Da ou de 1 kDa a 2,5 kDa).

[00488] Os corantes podem ser incluídos nos grupos fosfoéster com o objetivo de visualizar a captação ou monitorar o movimento dos conjugados da invenção dentro de uma célula (por exemplo, usando Recuperação de fluorescência após fotobranqueamento

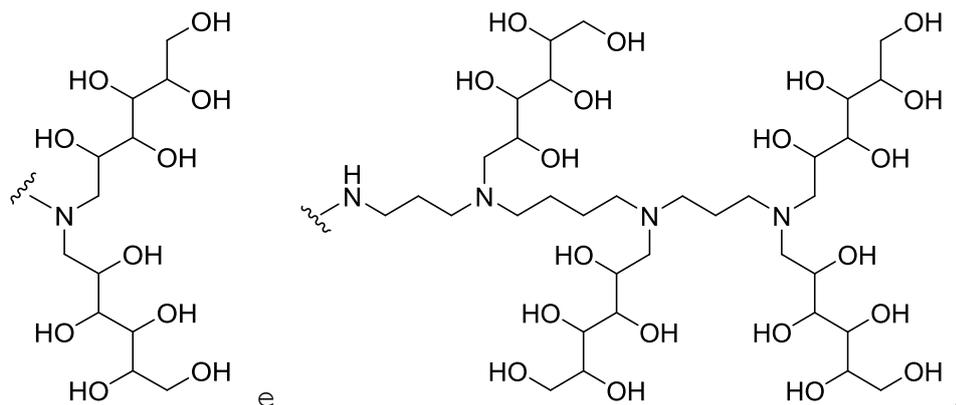
(FRAP)). Os corantes conhecidos na técnica podem ser incluídos como uma porção auxiliar ligada ao polinucleotídeo por meio de um fosfato ou fosforotioato no terminal 5 'ou 3' ou por meio de um fosfato ou fosforotioato que liga dois nucleosídeos consecutivos juntos. Exemplos não limitativos de estruturas úteis que podem ser usadas como corantes incluem FITC, RD1, alofocianina (APC), corante aCFTM (Biotium, Hayward, CA), BODIPY (Invitrogen™ 10 of Life Technologies, Carlsbad, CA), AlexaFluor® (Invitrogen™) de Life Technologies, Carlsbad, CA), DyLight Fluor (produtos de biologia de proteínas da Thermo Scientific Pierce, Rockford, IL), ATTO (ATTO-TEC GmbH, Siegen, Alemanha), FluoProbe (Interchim SA, Motluçon, França) e Abberior Probes (Abberior GmbH, Göttingen, Alemanha).

[00489] Polímeros hidrofílicos e polímeros com carga positiva que podem ser utilizados como porções auxiliares nos polinucleotídeos imunomodulados da invenção e nos conjugados da invenção são conhecidos na técnica. Um exemplo não limitativo de um polímero hidrofílico é o poli (etileno glicol). Um exemplo não limitativo de um polímero carregado positivamente é poli (etileno imina).

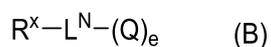
[00490] Uma fração auxiliar à base de álcool açucarado pode ser, por exemplo, glucitol terminado em amino ou um cluster de glucitol. A fração auxiliar de glucitol terminada em amino é:



Exemplos não limitativos de cluster de glucitol são:



[00491] Em uma modalidade, é aqui fornecido um composto de Fórmula (B):



ou um estereoisômero, uma mistura de dois ou mais diastereômeros, um tautômero ou uma mistura de dois ou mais tautômeros; ou um sal, solvato ou hidrato farmacologicamente aceitável do mesmo;

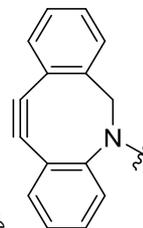
em que:

R_x é um grupo conjugador;

L^N é um vinculador;

cada Q é independentemente um oligonucleotídeo compreendendo um fosfotriéster; e

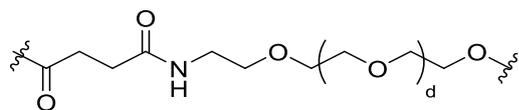
e é um número inteiro entre 1, 2, 3 ou 4.



[00492] Em certas modalidades, na Fórmula (B), R^x é .

[00493] Em certas modalidades, na Fórmula (B), o L^N é um ligante compreendendo um polietileno glicol.

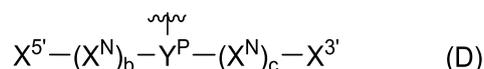
[00494] Em certas modalidades, na Fórmula (B), o L^N é



em que d é um número inteiro variando de cerca de 0 a cerca de 50. Em certas modalidades, d é um número inteiro variando de cerca de 0 a cerca de 10. Em certas modalidades, d é um número inteiro variando de cerca de 0 a cerca de 5. Em certas modalidades, d é um número inteiro de cerca de 0, cerca de 1 ou cerca de 3.

[00495] Em certas modalidades, na Fórmula (B), e é um número inteiro de 1.

Em certas modalidades, na Fórmula (B), cada Q tem independentemente a estrutura da Fórmula (D):



[00496] em que X^N , $X^{3'}$, $X^{5'}$, Y^P , b e c são cada um como definido aqui.

Segmentação por partes

[00497] As porções de direcionamento usadas nos conjugados da invenção podem ser usadas para direcionar células e tecidos específicos em um corpo para entrega direcionada do polinucleotídeo de carga útil conjugada. As células alvo dos conjugados da invenção são APCs profissionais (por exemplo, células B, pDCs ou macrófagos). A fração alvo pode ser uma fração de ligação ao antígeno (por exemplo, um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno), um polipeptídeo, um aptâmero ou um grupo incluindo uma ou mais moléculas pequenas (por exemplo, manose). As porções alvo nos conjugados da invenção

podem ser eficazes no tratamento do problema da distribuição desigual de tecidos de polinucleotídeos imunomoduladores *in vivo*.

Porções de ligação ao antígeno

[00498] Uma fração de ligação ao antígeno no conjugado da invenção pode ser um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno (por exemplo, F(ab)₂ ou Fab) ou um derivado manipulado do mesmo (por exemplo, Fcab ou uma proteína de fusão (por exemplo, scFv)). Um anticorpo humano ou quimérico (por exemplo, humanizado) pode ser usado como um anticorpo no conjugado da invenção.

[00499] A porção de ligação ao antígeno tem como alvo as células que possuem o antígeno de superfície que é reconhecido pela porção de ligação ao antígeno. Em particular, as APCs podem ser direcionadas pelas porções de ligação ao antígeno nos conjugados da invenção. As células B podem ser direcionadas por anticorpos anti-CD38, anti-CD79b, anti-CD30, anti-CD22 ou anti-CD20, anti-CD19 ou seus fragmentos de ligação ao antígeno ou seus derivados manipulados. As células dendríticas plasmocitóides (pDCs) podem ser direcionadas por anticorpos anti-DEC205, anti-CD304, anti-CD303, anti-CD40, anti-CD74, anti-BDCA2 ou anti-CD123 ou seus fragmentos de ligação ao antígeno ou seus derivados de engenharia. Os macrófagos podem ser direcionados por anticorpos anti-CD163, anti-CD40, anti-CD74, anti-CD206 ou anti-CD123 ou seus fragmentos de ligação ao antígeno ou seus derivados manipulados.

[00500] Exemplos não limitativos de anticorpos anti-CD38 são daratumumab, SAR650984, MOR202 ou qualquer um dos anticorpos

Ab79, Ab19, Ab43, Ab72 e Ab110 divulgados em WO 2012/092616, a divulgação desses anticorpos é aqui incorporada por referência. Um exemplo não limitativo de um anticorpo anti-CD79b é o huMA79b v28 divulgado no documento WO 2014/011521. Um exemplo não limitativo de um anticorpo anti-CD22 é 10F4 divulgado no US 2014/0127197. Um exemplo não limitativo de um anticorpo anti-CD20 é o rituximabe. Um exemplo não limitativo de um anticorpo anti-DEC205 é fornecido no documento US 2010/0098704, cujos anticorpos são aqui incorporados por referência. Exemplos não limitativos de anticorpos anti-CD40 são lucatumumab e dacetuzumab. Um exemplo não limitativo de um anticorpo anti-CD304 é o vesencumab.

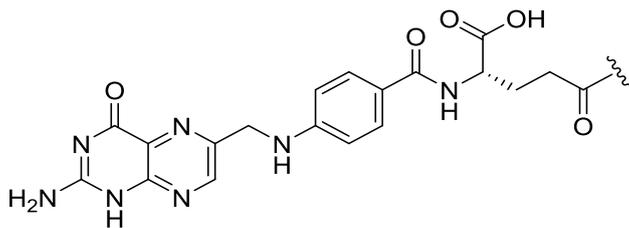
Polipeptídeos

[00501] A fração alvo pode ser um polipeptídeo que possui uma afinidade por células (por exemplo, tendo uma afinidade por um tipo de célula, por exemplo, uma célula plasmocitóide). Exemplos não limitativos de polipeptídeos são peptídeo RGD, glicoproteína do vírus da raiva (RVG) e peptídeo DC3.

Moléculas pequenas

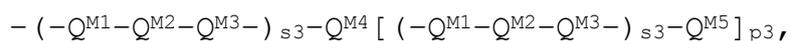
[00502] A fração alvo pode ser uma molécula pequena capaz de complexar um receptor expresso na superfície da célula alvo. Exemplos não limitativos de moléculas pequenas que podem ser usadas como porções alvo nos conjugados da invenção são folato, manose, ligante PSMA e aglomerados de manose.

[00503] O folato pode ser usado como uma porção de direcionamento. Nos conjugados da invenção, o folato pode ter a seguinte estrutura:



[00504] A manose ou um aglomerado de manose pode ser usado para direcionar os conjugados da invenção a células dendríticas plasmocitóides e macrófagos, pois essas células expressam o receptor de manose em sua superfície.

[00505] Os aglomerados de manose são conhecidos na técnica. A fração auxiliar de manose (por exemplo, um aglomerado de manose) pode ter a fórmula (XXV):



(XXV)

onde

p_3 é 1, 2 ou 3;

cada s_3 é independentemente um número inteiro de 0 a 50 (por exemplo, de 0 a 30);

cada Q^{M1} e cada Q^{M3} estão ausentes independentemente, -CO-, -NH-, -O-, -S-, -SO₂-, -OC(O)-, -COO-, -NHC(O)-, -C(O)NH-, -CH₂-, -CH₂NH-, -NHCH₂-, -CH₂O- ou -OCH₂-; e

cada Q^{M2} está independentemente ausente, alquileno C₁₋₁₂ opcionalmente substituído, alcenileno C₂₋₁₂ opcionalmente substituído, alquinileno C₂₋₁₂ opcionalmente substituído, heteroalquileno C₂₋₁₂ opcionalmente substituído ou heterociclileno C₁₋₉ opcionalmente substituído;

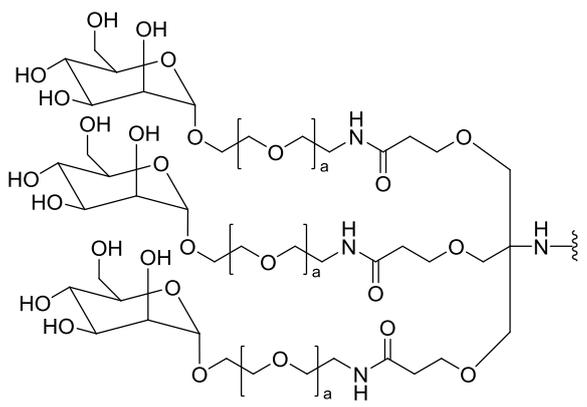
Q^{M4} está ausente (se p_3 é 1), alcano-triil C₁₋₆ opcionalmente substituído (se p_3 é 2), alcano-tetralil C₁₋₆ opcionalmente

substituído (se p_3 é 3), heteroalcano-triil C_{2-6} opcionalmente substituído (se p_3 é 2), ou C_{2-6} heteroalcano-tetralil opcionalmente substituído (se p_3 for 3);

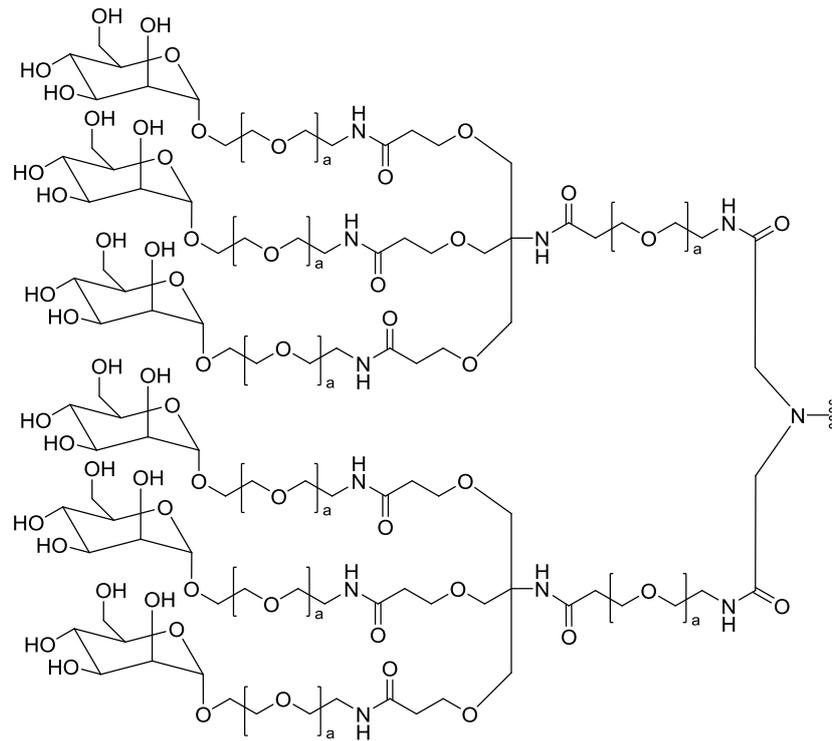
cada Q^{M5} é independentemente manose ou $-Q^{M6} [(-Q^{M1}-Q^{M2}-Q^{M3})_{s2}-R^{M2}]_{p1}$, em que cada R^{M2} é independentemente manose; e

cada Q^{M6} , se presente, é independentemente alcano-triil C_{1-6} opcionalmente substituído, alcano-tetralil C_{1-6} opcionalmente substituído, heteroalcano-triil C_{2-6} opcionalmente substituído ou heteroalcano-tetralil C_{2-6} opcionalmente substituído.

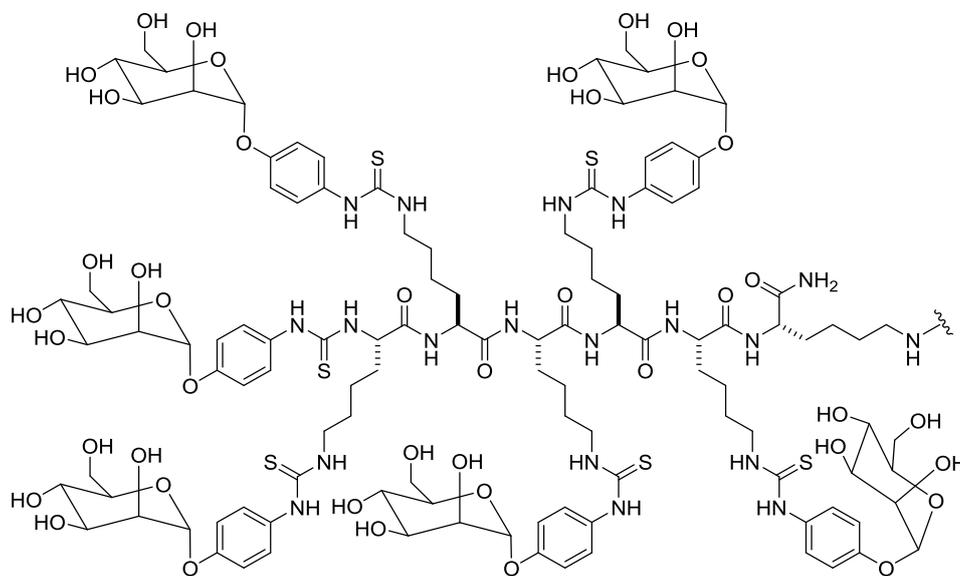
[00506] Exemplos não limitativos de grupos de manose são:



(XXVI)



(XXVII)



(XXVIII),

onde cada a é independentemente um número inteiro de 0 a 10.

Conjugados

[00507] Em uma modalidade, é aqui fornecido um conjugado da Fórmula (C):

$$\text{Ab} \left[\text{L}^{\text{N}}\text{-(Q)}_e \right]_f \quad (\text{C})$$

ou um estereoisômero, uma mistura de dois ou mais diastereômeros, um tautômero ou uma mistura de dois ou mais tautômeros; ou um sal, solvato ou hidrato farmaceuticamente aceitável do mesmo; em que Ab é uma fração alvo; f é um número inteiro de 1, 2, 3 ou 4; e L^N, Q e e são cada um como aqui definido.

[00508] Em certas modalidades, na Fórmula (C), Ab é um anticorpo. Em certas modalidades, na Fórmula (C), Ab é um anticorpo monoclonal.

[00509] Em certas modalidades, na Fórmula (C), f é um número inteiro de 1 ou 2. Em certas modalidades, na Fórmula (C), f é um número inteiro de 1.

[00510] Em certas modalidades, na Fórmula (C), e e f são cada um um número inteiro de 1.

O termo "DAR" refere-se a uma razão droga-anticorpo de um conjugado de anticorpo CpG, mais especificamente uma razão polinucleotídeo-anticorpo. Em uma modalidade, o conjugado de anticorpo CpG tem um DAR que varia de cerca de 1 a cerca de 20, de cerca de 1 a cerca de 10, de cerca de 1 a cerca de 8, de cerca de 1 a cerca de 4 ou de cerca de 1 a cerca de 2. Em outra modalidade, o conjugado de anticorpo CpG tem um DAR de cerca de 1, cerca de 2, cerca de 3, cerca de 4, cerca de 5, cerca de 6, cerca de 7 ou cerca de 8.

Preparação de conjugados

Conjugação

[00511] Reações úteis para conjugar uma fração de direcionamento a um ou mais polinucleotídeos imunomoduladores

são aqui descritas e são conhecidas na técnica (por exemplo, reações bio-ortogonais). Reações exemplares que podem ser usadas para formar essa ligação incluem a cicloadição de Huisgen (catalisada ou livre de metal) entre um grupo conjugado à base de azido e alcino (por exemplo, heterociclileno C₆₋₁₆ opcionalmente substituído que contém uma ligação tripla carbono-carbono endocíclica ou cicloalquinil C₈₋₁₆ opcionalmente substituído) para formar uma porção triazol; a reação de Diels-Alder entre um dienófilo e um dieno/hetero-dieno; formação de ligações através de outras reações pericíclicas, como a reação ene; formação de ligação amida ou tioamida; formação de ligação sulfonamida (por exemplo, com compostos azido); alquilação de álcool ou fenol (por exemplo, alquilação de Williamson), reações de condensação para formar o grupo oxima, hidrazona ou semicarbazida; reações de adição de conjugado por nucleófilos (por exemplo, amins e tióis); formação de ligação dissulfeto; e substituição nucleofílica (por exemplo, por um nucleófilo de amina, tiol ou hidroxil) em um carbonil (por exemplo, em um éster de ácido carboxílico ativado, como éster de pentafluorofenil (PFP) ou éster de tetrafluorofenil (TFP)) ou em um areno eletrofílico (por exemplo, S_NAr em um areno oligofluorado, um grupo fluorobenzonitrila ou grupo fluoronitrobenzeno). Em algumas modalidades, a reação de conjugação é uma cicloadição dipolar e a fração de conjugação inclui azido, heterociclileno C₆₋₁₆ opcionalmente substituído contendo uma ligação tripla carbono-carbono endocíclica ou cicloalquinil C₈₋₁₆ opcionalmente substituído. O grupo reativo complementar e o grupo conjugador são selecionados por sua complementaridade mútua. Por exemplo, uma azida pode ser usada em um grupo de conjugação e no grupo

reativo complementar, enquanto um alcino pode ser usado no outro grupo de conjugação e no grupo reativo complementar.

Reações de nucleófilo/eletrófilo

[00512] Nucleófilos e eletrófilos podem se envolver em reações de formação de ligação selecionadas a partir de, sem limitação, inserção por um eletrófilo em uma ligação CH, inserção por um eletrófilo em uma ligação OH, inserção por um eletrófilo em uma ligação NH, adição do eletrófilo através um alceno, adição do eletrófilo através de um alcino, adição a centros carbonílicos eletrofílicos, substituição em centros carbonílicos eletrofílicos, adição a cetenos, adição nucleofílica a isocianatos, adição nucleofílica a isotiocianatos, substituição nucleofílica em grupos silil eletrofílicos, deslocamento nucleofílico de um grupo de saída (por exemplo, um halogeneto ou um pseudo-halogeneto) em um halogeneto de alquila ou pseudo-halogeneto; adição/eliminação nucleofílica em um carbonil de um éster de ácido carboxílico ativado (por exemplo, éster de PFP ou éster de TFP), tioéster, anidrido ou halogeneto de acila; Adição de 1,4 conjugado de um nucleófilo a um grupo carbonil α , β -insaturado, abertura de anel nucleofílico de um epóxido, substituição aromática nucleofílica de um composto aromático deficiente em elétrons, adição nucleofílica a centros de fósforo ativado, substituição nucleofílica em centros de fósforo ativados, adição nucleofílica a centros de enxofre ativado e substituição nucleofílica em centros de enxofre ativado.

[00513] Um grupo conjugador nucleofílico pode ser alqueno opcionalmente substituído, alquino opcionalmente substituído, aril opcionalmente substituído, aril opcionalmente, heterociclil

opcionalmente substituído, hidroxil, amino, alquilamino, anilido ou tio.

[00514] Um grupo conjugador eletrofílico pode ser azida, carbonil ativado (por exemplo, éster de ácido carboxílico ativado (por exemplo, éster succinimidil ou éster sulfosuccinimidil), tioéster, anidrido ou halogeneto de acila), isocianato, tioisocianato, aceitador de Michael (por exemplo, maleimida) , halogeneto de alquila ou pseudo-halogeneto, epóxido, episulfeto, aziridina ou aril com deficiência de elétrons.

[00515] Por exemplo, a conjugação pode ocorrer por meio de uma reação de condensação para formar uma ligação que é uma ligação de hidrazona.

[00516] A conjugação pode envolver a formação de uma ligação amida, por exemplo, pela ativação de um grupo conjugador à base de carboxil (por exemplo, ácido carboxílico, éster ou $-\text{CONH}_2$) e reação subsequente com uma amina primária em um grupo conjugador. Os agentes ativadores podem ser várias carbodiimidias como: EDC (cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida), EDAC (cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida), DCC (diciclo-hexil carbodiimida), CMC (1-Ciclo-hexil-3-(2-morfolinoetil) carbodiimida), DIC (diisopropil carbodiimida) ou reagente K de Woodward (N-etil-3-fenilisoaxazólio-3'-sulfonato). A ativação do grupo conjugador à base de carboxila que é $-\text{CONH}_2$ pode ser alcançada usando uma transglutaminase. A reação de um grupo conjugador à base de NHS-Éster ativado com um grupo conjugador primário à base de amina também resulta na formação de uma ligação amida.

[00517] O polinucleotídeo pode conter um grupo conjugador à base de carbonil. A conjugação com a formação concomitante de uma amina secundária pode ser alcançada por meio de aminação redutora (por exemplo, reagindo um grupo de conjugação à base de amina com um grupo de conjugação à base de aldeído, seguido de uma redução com um doador de hidreto (por exemplo, cianoboro-hidreto de sódio ou triacetoxiboro-hidreto de sódio)).

[00518] A formação de éter também pode ser usada para conjugar uma porção de direcionamento a um ou mais polinucleotídeos para formar um conjugado da invenção. A formação da ligação éter pode envolver uma reação entre um grupo conjugador à base de epóxido com um grupo conjugador à base de hidróxi.

[00519] Os tióis também podem ser utilizados como grupos conjugadores. Por exemplo, a conjugação através da formação de ligações dissulfeto pode ser realizada por troca de tiol-dissulfeto mediada por piridildissulfeto. A introdução de grupos conjugadores à base de sulfidril é mediada, por exemplo, pelo reagente de Traut (2-iminotiolano) SATA (N-succinimidil S-acetiltioacetato, SATP (succinimidil acetiltiopropionato), SPDP (3-(2-piridilditio) propionato de N-succinimidil, propionato de SPDP (N-succinimidil 3-(2-piridilditio) succinimidiloxicarbonil- α -metil- α -(2-piridilditio) tolueno), N-acetil-homocisteinotiolactona, SAMSA (anidrido S-acetilmercaptoposuccínico), AMBH (hidrazida do ácido 2-acedamido-4-mercaptobutúrico) e cistamina (2,2') (etilamina)).

[00520] A formação da ligação tioéter pode ser realizada reagindo um grupo conjugador à base de sulfidril com grupos conjugadores à base de maleimida ou iodoacetil ou reagindo com grupos conjugadores à base de epóxido.

[00521] Os grupos conjugadores à base de maleimida podem ser introduzidos por SMCC (succinimidil-4- (N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato), sulfo-SMCC (4- (N-maleidometil) -ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidil, MBS (éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxissuccinimida), sulfo-MBS (éster de m-maleimidobenzoil-N-sulfo-hidroxi succinimida), SMPB (succinimidil-4- (p-maleidofenil) butirato), sulfo-SMPB (sulfossuccinimidil 4-) -maleimidofenil) butirato), GMBS (éster de N-a-maleimidobuturil-oxissuccinimida), sulfo GMBS (éster de N-a-maleimidobuturil-oxissulfossuccinimida).

[00522] A conjugação através da formação de uma ligação de carbamato pode ser realizada pela reação de um grupo conjugador à base de hidroxil com CDI (N, N'-carbonildiimidazol) ou DSC (carbonato de N, N'-dissuccinimidil) ou cloroformato de N-hidroxissuccinimidil e subsequente reação com um grupo conjugador à base de amina.

Reações de cicloadição

[00523] As reações de cicloadição podem ser usadas para formar a ligação covalente desejada. As reações representativas de cicloadição incluem, mas não estão limitadas a, a reação de um grupo conjugador à base de alceno com um grupo conjugador à base de 1,3-dieno (reação de Diels-Alder), a reação de um grupo conjugador à base de alceno com um α , grupo conjugador à base de carbonil β -insaturado (reação hetero de Diels-Alder) e a reação de um grupo conjugador à base de alcino com um grupo conjugador à base de azido (cicloadição de Huisgen, incluindo variantes catalisadas por metais e sem metais) para proporcionar uma porção de triazol. Exemplos selecionados e não limitativos de grupos conjugadores que incluem reagentes para reações de

cicloadição são: alcenos, alcinos, 1,3-dienos, α - β -carbonilas insaturadas, e azidas. Por exemplo, a cicloadição de Huisgen (reação de clique) entre azidas e alcinos tem sido usada para a funcionalização de diversas entidades biológicas.

[00524] O grupo conjugador tenso à base de alcino é um sistema de anel carbocíclico ou heterocíclico, incluindo uma ligação tripla endocíclica carbono-carbono (por exemplo, heterociclileno C₆₋₁₆ opcionalmente substituído contendo uma ligação tripla carbono-carbono endocíclica ou cicloalquinil C₈₋₁₆ opcionalmente substituído). Grupos conjugados à base de alcino tenso podem ser úteis para conjugar uma porção de direcionamento a um polinucleotídeo através de cicloadições dipolares livres de metal com um grupo conjugador de azido.

Reações de acoplamento

[00525] Grupos conjugados podem incluir, mas não estão limitados a, reagentes para hidrosililação, metatase cruzada de olefinas, adição de conjugado, acoplamento Stille, acoplamento Suzuki, acoplamento Sonogashira, acoplamento Hiyama e reação Heck. As frações de conjugação para essas reações incluem hidridosilanos, alcenos (por exemplo, alcenos ativados, como enonas ou enoatos), alcinos, halogenetos de arila, pseudo-halogenetos de arila (por exemplo, triflatos ou não -flatos), halogenetos de alquila e pseudo-halogenetos de alquila (por exemplo, triflatos, nonaflatos, e fosfatos). Os catalisadores para reações de acoplamento cruzado são bem conhecidos na técnica. Tais catalisadores podem ser complexos organometálicos ou sais metálicos (por exemplo, Pd(0), Pd(II), Pt(0), Pt(II), Pt(IV), Cu(I) ou Ru(II)). Aditivos, como ligantes (por exemplo, PPh₃, PCy₃, BINAP, dppe, dppf, SIMes ou SIPr) e sais de metais

(por exemplo, LiCl), podem ser adicionados para facilitar as reações de acoplamento cruzado.

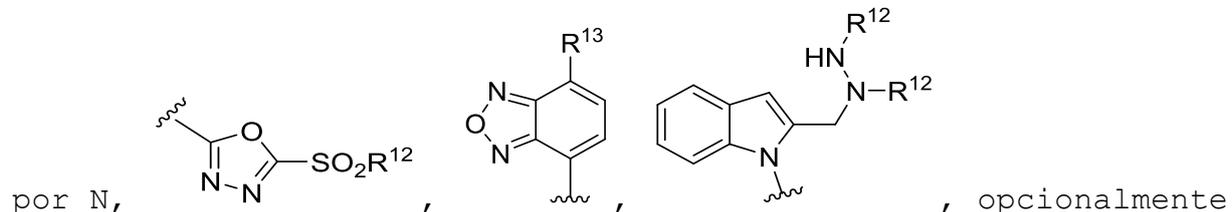
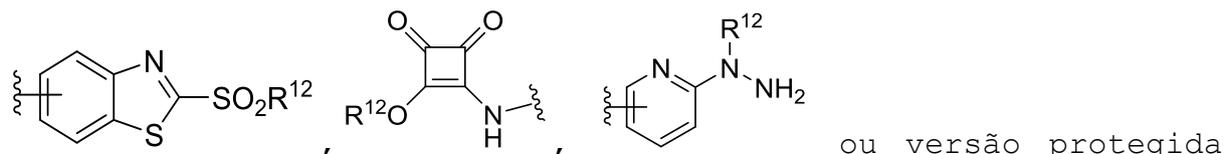
Preparação de polinucleotídeos imunomoduladores

[00526] Os polinucleotídeos imunomodulados podem ser preparados de acordo com métodos conhecidos na técnica de síntese química de polinucleotídeos, por exemplo, a partir de fosforamiditos de nucleosídeo. Exemplos não limitativos das sínteses de fosforamiditos de nucleosídeo e polinucleotídeos imunomodulados são fornecidos nos Exemplos. O fosforamidito pode incluir um grupo conjugador covalentemente ligado ao átomo P do fosforamidito.

Preparação de uma porção da Porção de Segmentação

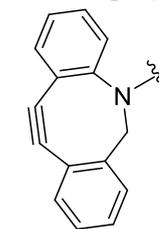
[00527] Uma porção de direcionamento pode ser conjugada com um ou mais polinucleotídeos através da formação de uma ligação entre um grupo conjugador no polinucleotídeo imunomodulador e um grupo reativo complementar ligado à porção de direcionamento. A fração alvo pode intrinsecamente possuir o grupo reativo complementar (por exemplo, um Q-terminalQ-terminal (por exemplo, LLQGG, GGLLQGG ou outra sequência Q-terminal conhecida na técnica) em um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno ou um derivado manipulado do mesmo), ou pode ser modificado para incluir um grupo reativo complementar (por exemplo, anexando o grupo reativo complementar ao Q-terminalQ-terminal). Os métodos de introdução de tais grupos reativos complementares em uma fração alvo são conhecidos na técnica.

[00528] O grupo reativo complementar pode incluir alquil C₂₋₁₂ opcionalmente substituído, amino protegido com N opcionalmente substituído, azido, N-maleimido, tiol protegido com S,



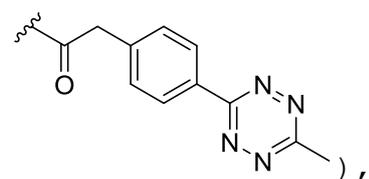
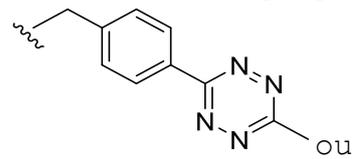
heterociclil substituído C6-16 contendo uma ligação tripla

carbono-carbono endocíclica (por exemplo



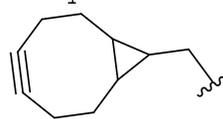
), grupo

1,2,4,5-tetrazina (por exemplo,



cicloalquil C8-16 opcionalmente

substituído (por exemplo,



estirado C4-8 opcionalmente substituído (por exemplo,

transciclooctenil ou norbornenil) ou alquil C1-16 opcionalmente

substituído contendo -COOR¹² ou -CHO;

Onde

R^{N1} é H, grupo N-protetor ou alquil C1-6 opcionalmente substituído;

cada R¹² é independentemente H, alquil C1-6 opcionalmente substituído ou grupo O-protetor (por exemplo, um grupo protetor de carboxil); e

R^{13} é halogênio (por exemplo, F).

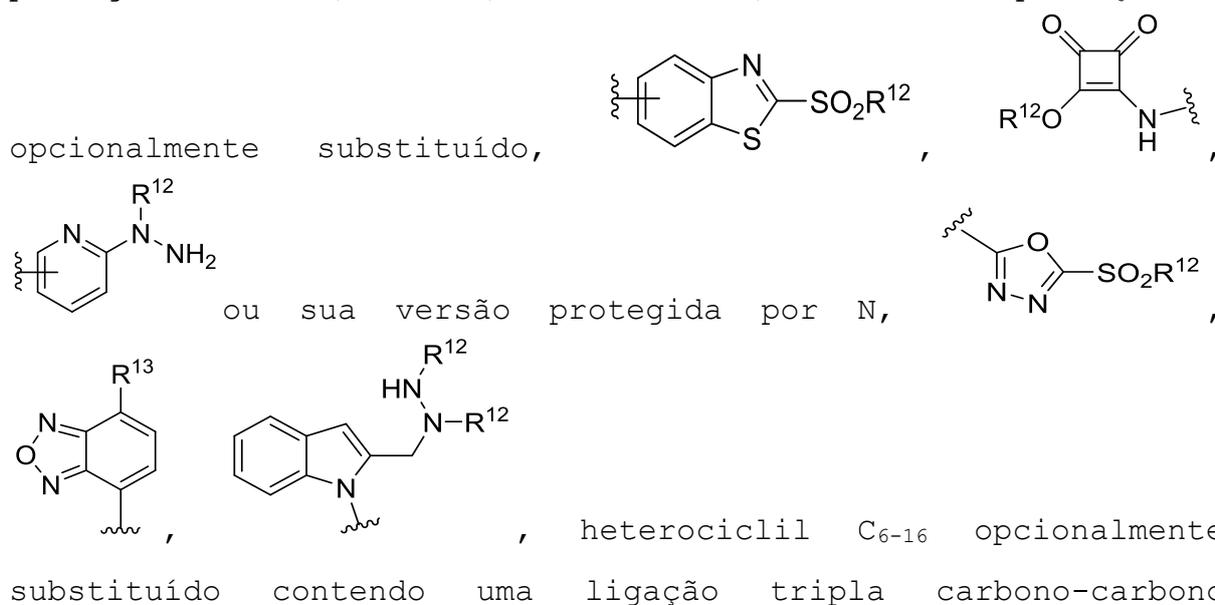
[00529] O grupo reativo complementar pode ser protegido até a reação de conjugação. Por exemplo, um grupo reativo complementar que é protegido pode incluir $-COOR^{PGO}$ ou $-NHR^{PGN}$, em que R^{PGO} é um grupo O-protetor (por exemplo, um grupo protetor de carboxila) e R^{PGN} é um grupo protetor de N.

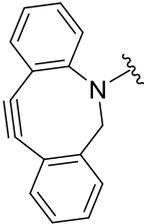
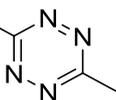
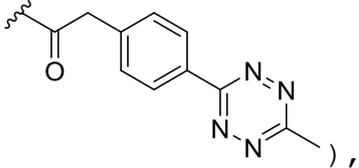
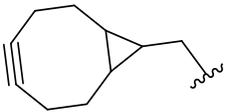
[00530] Em algumas modalidades, um grupo reativo complementar é um grupo $-Z^3-Q^{A3}$,

Onde

Z^3 é um grupo divalente, trivalente, tetravalente ou pentavalente, no qual uma das valências é substituída por Q^{A3} , uma das valências é aberta e cada uma das valências restantes, se presente, é substituída independentemente por uma porção auxiliar;

Q^{A3} é alquinil C_{2-12} opcionalmente substituído, amino protegido com N, azido, N-maleimido, tiol com proteção S



endocíclica (por exemplo, ) , grupo 1,2,4,5-tetrazina (por exemplo,  ou ) , opcionalmente substituído Cicloalquinil C₈₋₁₆ (por exemplo, ) , -NHR^{N1}, cicloalcenil estirado em C₄₋₈ opcionalmente substituído (por exemplo, transciclooctenil ou norbornenil) ou alquil C₁₋₁₆ opcionalmente substituído contendo -COOR¹² ou -CHO;

Onde

R^{N1} é H, grupo N-protetor ou alquil C₁₋₆ opcionalmente substituído;

cada R¹² é independentemente H, alquil C₁₋₆ opcionalmente substituído ou grupo O-protetor (por exemplo, um grupo protetor de carboxil); e

R¹³ é halogênio (por exemplo, F).

[00531] Em certas modalidades, Z³ consiste em um grupo de ramificação e dois segmentos divalentes, em que o grupo de ramificação é ligado a cada um dos dois segmentos divalentes,

Onde

um dos segmentos divalentes tem uma valência aberta e o restante segmento divalente é ligado ao QA³; e

o grupo ramificado consiste em um ou dois monômeros selecionados independentemente do grupo que consiste em alcanotriil C₁₋₁₂ opcionalmente substituído, alcanotetralil C₁₋₁₂

opcionalmente substituído, heteroalcano-triil C_{2-12} opcionalmente substituído e heteroalcano C_{2-12} opcionalmente substituído -tetraail, onde duas valências do grupo de ramificação estão ligadas aos dois segmentos divalentes e cada uma das valências restantes é substituída independentemente por uma porção auxiliar.

[00532] O segmento divalente em Z^3 pode ser $-(-Q^B-Q^C-Q^D-)_{s1}-$,

Onde

Cada $s1$ é um número inteiro independente de 1 a 50 (por exemplo, de 1 a 30);

cada Q^B e cada Q^D está independentemente ausente, $-CO-$, $-NH-$, $-O-$, $-S-$, $-SO_2-$, $-OC(O)-$, $-COO-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NH-$, $-CH_2-$, $-CH_2NH-$, $-NHCH_2-$, $-CH_2O-$ ou $-OCH_2-$; e

cada Q^C está independentemente ausente, alquilenos C_{1-12} opcionalmente substituído, alcenileno C_{2-12} opcionalmente substituído, alquinileno C_{2-12} opcionalmente substituído, heteroalquilenos C_{2-12} opcionalmente substituído ou heterociclicileno C_{1-9} opcionalmente substituído.

[00533] Em outras modalidades, pelo menos um de Q^B e Q^D está presente em cada unidade monomérica de Z^3 .

[00534] Em ainda outras modalidades, $-Z^3-Q^{A3}$ é

$-(-Q^B-Q^C-Q^D-)_{s1}-Q^E-(-Q^B-Q^C-Q^D-)_{s1}-Q^{A3}$,

(Vb)

Onde

cada $s1$ é independentemente um número inteiro de 1 a 50 (por exemplo, de 1 a 30);

Q^{A3} é como aqui descrito;

cada Q^B e cada Q^D está independentemente ausente, $-CO-$, $-NH-$, $-O-$, $-S-$, $-SO_2-$, $-OC(O)-$, $-COO-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NH-$, $-CH_2-$, $-CH_2NH-$, $-NHCH_2-$, $-CH_2O-$ ou $-OCH_2-$; e

cada Q^C está independentemente ausente, alquilenos C_{1-12} opcionalmente substituído, alcenilenos C_{2-12} opcionalmente substituído, alquinilenos C_{2-12} opcionalmente substituído, heteroalquilenos C_{2-12} opcionalmente substituído ou heterociclicilenos C_{1-9} opcionalmente substituído; e

Q^E está ausente ou é um grupo ramificado de fórmula (IV), como aqui descrito.

[00535] Em certas modalidades, cada Q^B e cada Q^D está independentemente ausente, $-CO-$, $-NH-$, $-O-$, $-S-$, $-SO_2-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NH-$, $-CH_2-$, $-CH_2NH-$, $-NHCH_2-$, $-CH_2O-$ ou $-OCH_2-$.

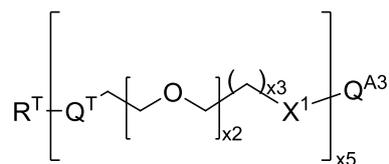
[00536] Em certas modalidades, $-(-Q^B-Q^C-Q^D)_{s1}-$ combinam para formar um grupo:



Onde

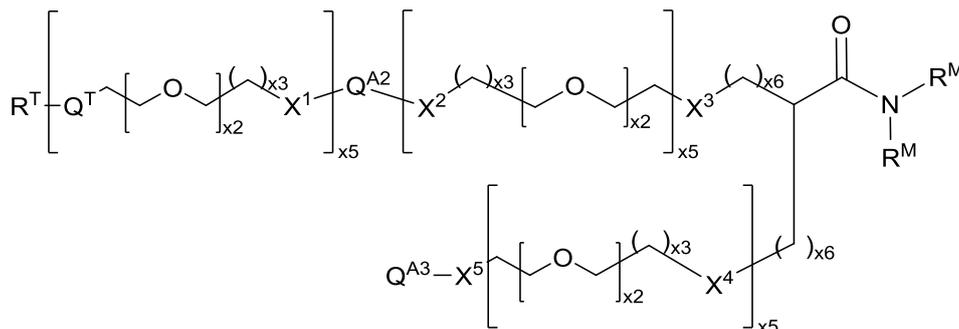
- (i) g_2 é um número inteiro de 1 a 50 (por exemplo, de 1 a 40 ou de 1 a 30);
- (ii) g_1 é 1 e Q^B é $-NHCO-$, $-CONH-$ ou $-O-$; ou g_1 é 0 e Q^D é $-NHCO-$; e
- (iii) g_3 é 1 e Q^B é $-NHCO-$, $-CONH-$ ou $-O-$; ou g_3 é 0 e Q^D é $-CONH-$.

[00537] Em outras modalidades, o grupo reativo complementar é:



(XXIX)

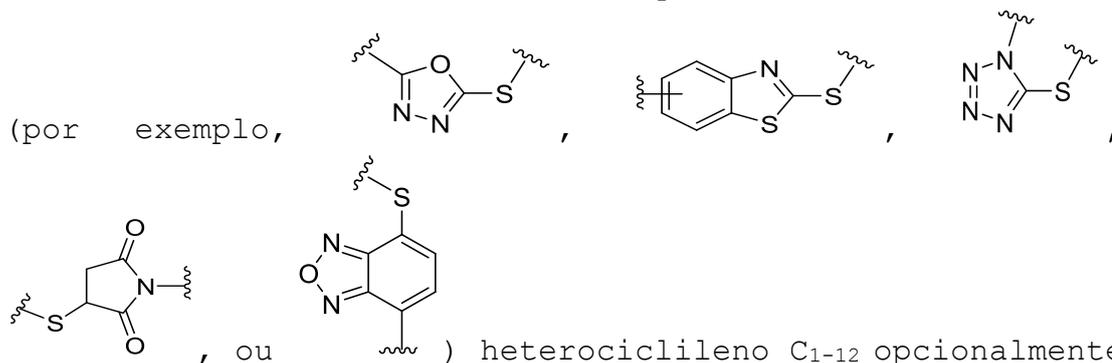
Ou



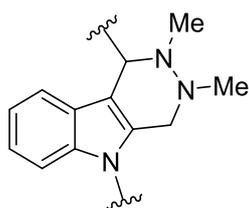
(XXX)

Onde

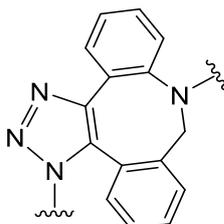
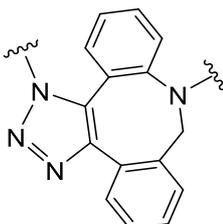
Q^{A2} está ausente, independentemente heteroalquileno C_{2-12} opcionalmente substituído (por exemplo, um heteroalquileno contendo $-\text{C}(\text{O})-\text{N}(\text{H})-$, $-\text{N}(\text{H})-\text{C}(\text{O})-$, $-\text{S}(\text{O})_2-\text{N}(\text{H})-$ ou $-\text{N}(\text{H})-\text{S}(\text{O})_2-$), C_{1-12} tiorheterociclileno opcionalmente substituído

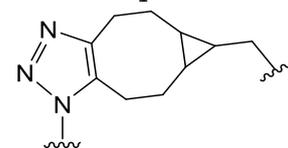


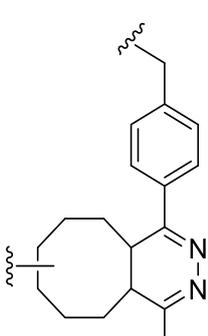
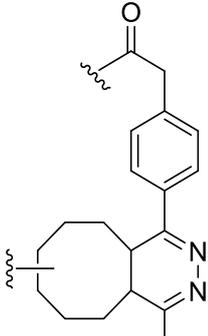
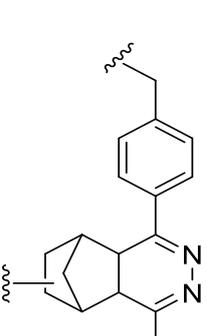
substituído (por exemplo, 1,2,3-triazole-1,4-diil ou

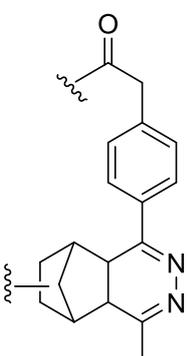


), ciclobut-3-eno-1,2-diona-3,4-diil, pirid-2-il-hidrazona, triazoloheterociclileno C_{6-16} opcionalmente

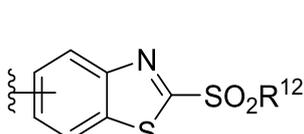
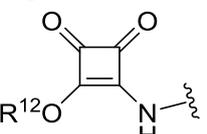
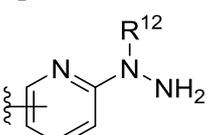
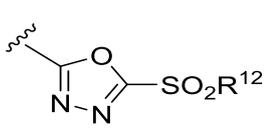
substituído (por exemplo,  ou ) ,
 triazolocicloalquileno C₈₋₁₆ opcionalmente substituído (por

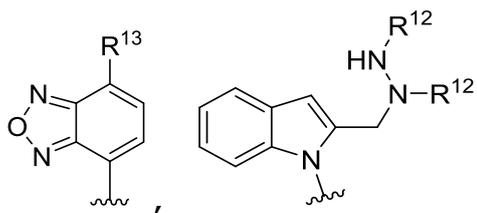
exemplo, ) , ou um grupo dihidropirazino (por

exemplo, *trans*-  , *trans*-  , 

, ou );

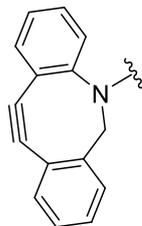
QA3 é alquilil C₂₋₁₂ opcionalmente substituído, amino protegido com N, azido, N-maleimido, tiol com proteção S

opcionalmente substituído,  ,  ,  ou a versão protegida N-,  ,



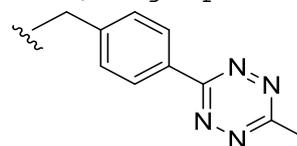
, heterociclil C₆₋₁₆ opcionalmente substituído contendo uma ligação tripla carbono-carbono

endocíclica (por exemplo,

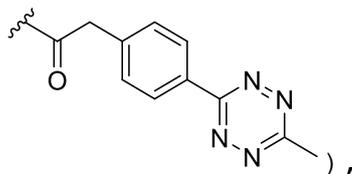


), grupo 1,2,4,5-

tetrazina (por exemplo,

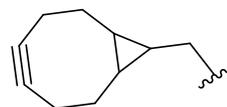


ou



), ou cicloalquil C₈₋₁₆ opcionalmente

substituído (por exemplo,



), -NHR^{N1},

cicloalquenil estirado em C₄₋₈ opcionalmente substituído

(por exemplo, transciclooctenil ou norbornenil) ou alquil

C₁₋₁₆ opcionalmente substituído contendo -COOR¹² ou -CHO;

R^{N1} é H, grupo N-protetor ou alquil C₁₋₆ opcionalmente substituído;

cada R¹² é independentemente H ou alquil C₁₋₆ opcionalmente substituído;

R¹³ é halogênio (por exemplo, F);

R^T é uma ligação a uma fração alvo;

Q^T é -CO-, -NH-, -NH-CH₂- ou -CO-CH₂-;

cada um de X¹, X³ e X⁵ está independentemente ausente, -O-, -NH-, -CH₂-NH-, -C(O)-, -C(O)-NH-, -NH-C(O)-, -NH-

C(O)-NH-, -O-C(O)-NH-, -NH-C(O)-O-, -CH₂-NH-C(O)-NH-, -CH₂-O-C(O)-NH- ou -CH₂-NH-C(O)-O-;

cada um de X² e X⁴ está independentemente ausente, -O-, -NH-, -C(O)-, -C(O)-NH-, -NH-C(O)-, -NH-C(O)-NH-, -O-C(O)-NH- ou -NH-C(O)-O-;

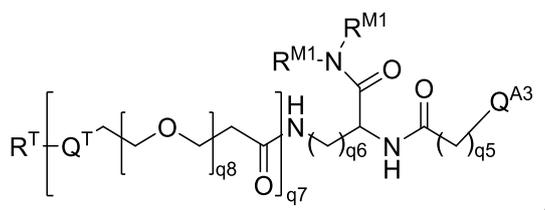
x₂ é um número inteiro de 0 a 50 (por exemplo, de 1 a 40 ou de 1 a 30);

x₃ é um número inteiro de 1 a 11; e

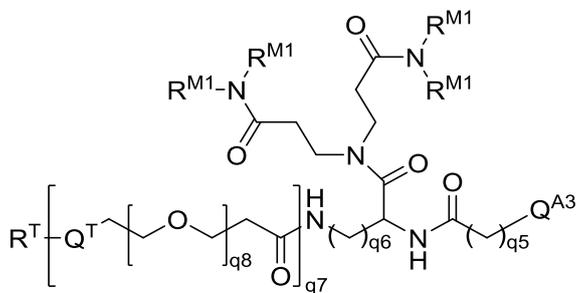
cada x₅ é independentemente 0 ou 1; e

cada x₆ é independentemente um número inteiro de 0 a 10 (por exemplo, de 1 a 6), desde que a soma de ambos x₆ seja 12 ou menos.

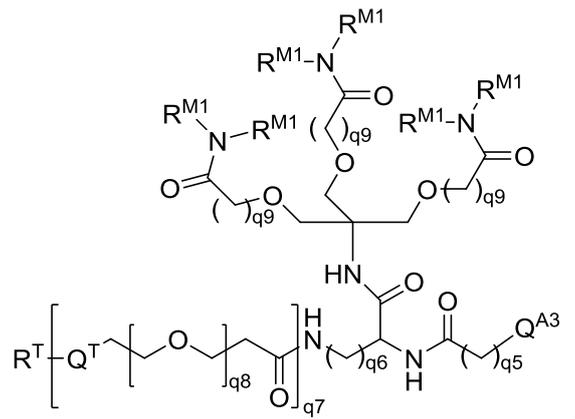
[00538] Em ainda outras modalidades, o grupo reativo complementar é:



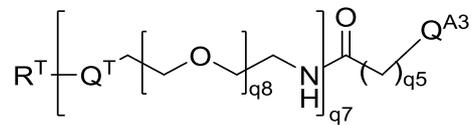
(XXXI)



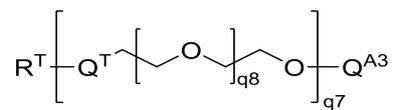
(XXXII)



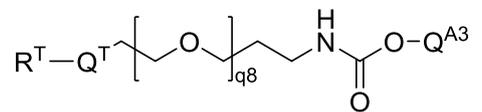
(XXXIII)



(XXXIV)

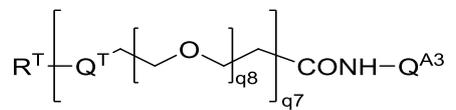


(XXXV)



(XXXVI)

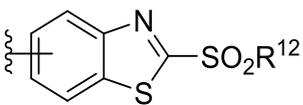
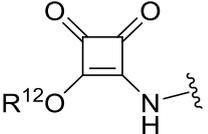
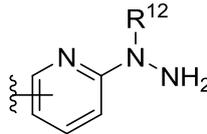
ou

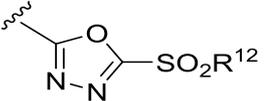
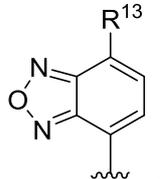


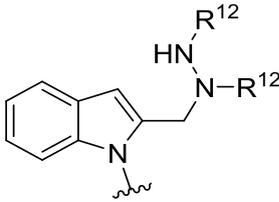
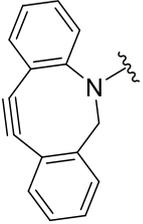
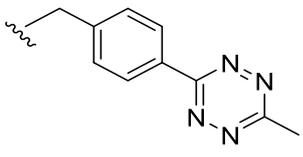
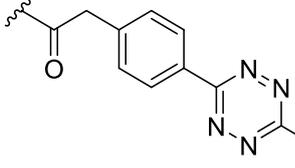
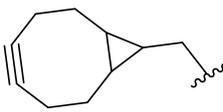
(XXXVII)

Onde

$\text{Q}^{\text{A}3}$ é alquilil C_{2-12} opcionalmente substituído, amino protegido com N opcionalmente substituído, azido, N-maleimido,

tiol protegido com S, , , ,

, ou a versão protegida por N, , ,

, heterociclil C₆₋₁₆ opcionalmente substituído contendo uma ligação tripla carbono-carbono endocíclica (por exemplo, ) , grupo 1,2,4,5-tetrazina (por exemplo,  ou ) , ou ou cicloalquil C₈₋₁₆ opcionalmente substituído (por exemplo, ) , -NHR^{N1}, cicloalquenil estirado em C₄₋₈ opcionalmente substituído (por

exemplo, *trans*-ciclooctenil ou norbornenil) ou alquil C₁₋₁₆ opcionalmente substituído contendo -COOR¹² ou -CHO;

cada R^{M1} é independentemente H ou uma porção auxiliar;

R^{N1} é H, grupo N-protetor ou alquil C₁₋₆ opcionalmente substituído;

cada R¹² é independentemente H ou alquil C₁₋₆ opcionalmente substituído;

R¹³ é halogênio (por exemplo, F);

Q^T é -CO-, -NH-, -NH - CH₂- ou -CO - CH₂-;

R^T é uma ligação a uma fração alvo;

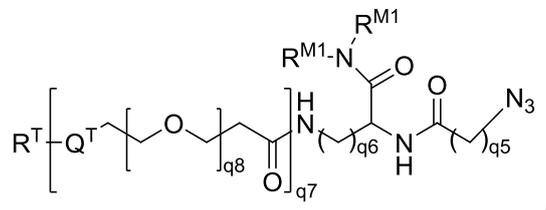
cada um de q₅ e q₆ é independentemente um número inteiro de 1 a 10 (por exemplo, de 1 a 6);

q₇ é 0 ou 1;

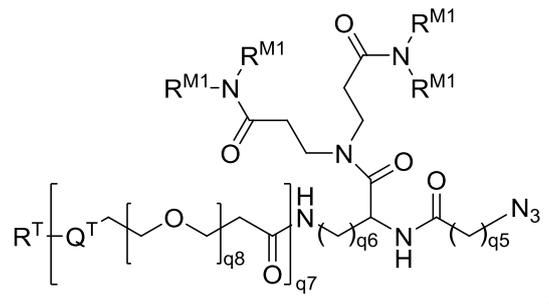
q₈ é um número inteiro de 0 a 50 (por exemplo, de 1 a 40 ou de 1 a 30); e

q₉ é um número inteiro de 1 a 10.

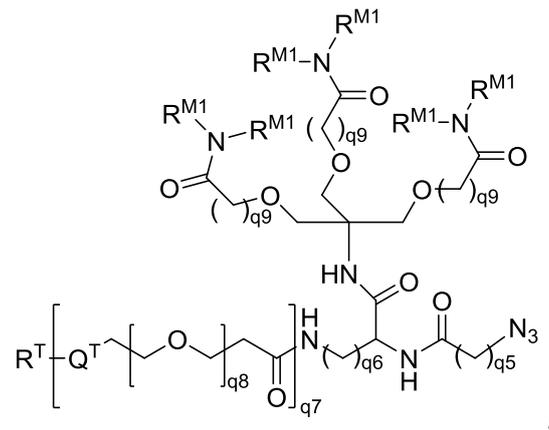
[00539] Em ainda outras modalidades, o grupo reativo complementar é:



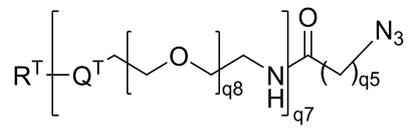
(XXXVIII)



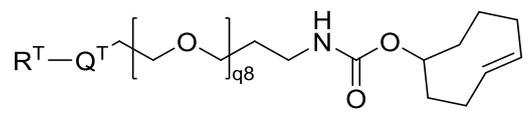
(XXXIX)



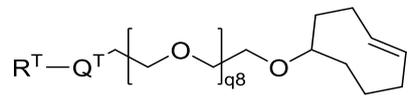
(XL)



(XLI)

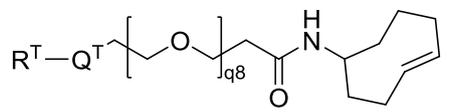


(XLII)



(XLIII)

ou



(XLIV)

Onde

cada R_{M1} é independentemente H ou uma porção auxiliar;

Q^T é -CO-, -NH-, -NH - CH₂- ou -CO - CH₂-;

R^T é uma ligação a uma fração alvo;

cada um de q_5 e q_6 é independentemente um número inteiro de 1 a 10 (por exemplo, de 1 a 6);

q_7 é 0 ou 1;

q_8 é um número inteiro de 0 a 50 (por exemplo, de 1 a 40 ou de 1 a 30); e

q_9 é um número inteiro de 1 a 10.

Suporte sólido

[00540] Os polinucleotídeos imunomodulados aqui divulgados podem ser ligados ao suporte sólido. Os suportes sólidos cliváveis que podem ser utilizados com os polinucleotídeos são conhecidos na técnica. Exemplos não limitativos de suporte sólido incluem, por exemplo, controlado por vidro ou poliestireno macroporoso ligado a uma fita através de um ligante clivável (por exemplo, ligante à base de succinato) conhecido na técnica (por exemplo, UNYLINKER™).

Métodos

[00541] Os conjugados da invenção podem ser utilizados para entrega seletiva de um polinucleotídeo imunomodulador a um APC profissional (por exemplo, uma célula B, um pDC ou um macrófago) usando uma fração de direcionamento que reconhece um receptor de superfície para o tipo de APC. Sem estar limitado pela teoria,

acredita-se que o conjugado da invenção possa ser transportado (por exemplo, por meio de transporte ativo) para um endossoma de um APC profissional (por exemplo, uma célula B, um pDC ou um macrófago), que expressa um ou mais receptores endossômicos do tipo Toll (por exemplo, TLR9). Assim, um polinucleotídeo imunoestimulador entregue ao endossomo pode agonizar o receptor endossômico do tipo Toll (por exemplo, TLR9). Da mesma forma, um polinucleotídeo imunossupressor entregue ao endossomo pode antagonizar o receptor endossômico do tipo Toll (por exemplo, TLR9).

Indutor de citocinas

[00542] Os receptores endossômicos do tipo Toll podem ser agonizados usando um polinucleotídeo imunoestimulador da invenção (por exemplo, fornecido em um conjugado da invenção) para induzir citocinas em APCs. Por exemplo, a agonização do TLR9 em uma célula B pode levar à ativação da secreção mediada por NF κ B de citocinas inflamatórias (por exemplo, IL-6 e IL-10), enquanto a agonização do TLR9 em um pDC ou macrófago pode induzir interferões do tipo I (por exemplo, , IFN α ou IFN β). A indução de uma citocina em uma APC pode ser determinada usando métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, um nível de citocina induzida na APC pode ser maior (por exemplo, pelo menos 1%, pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40% ou pelo menos 50% mais alto) após o contato da célula com um polinucleotídeo ou conjugado imunoestimulador da invenção (por exemplo, quando comparado a uma célula de referência, como uma célula de referência que difere da célula testada, em que o polinucleotídeo ou conjugado imunoestimulador ou invenção da invenção não foi entregue ao célula de referência).

Tratamento de tumores líquidos (hematológicos) e sólidos

[00543] Um polinucleotídeo imunoestimulador e/ou conjugado da invenção pode ser usado em um método de tratamento de um tumor líquido (por exemplo, hematológico) ou sólido. Sem desejar estar limitado pela teoria, pensa-se que a agonização do TLR9 e a indução de citocinas, como aqui descrito, podem estimular uma resposta imune inata ou adaptativa contra um tumor líquido ou sólido. Tipicamente, o TLR9 agonizante tem um efeito pró-proliferativo nas células B saudáveis. Em contraste, os polinucleotídeos imunoestimulantes do agonista TLR9 exibem efeito antiproliferativo nas células do linfoma B. O efeito antiproliferativo dos polinucleotídeos imunoestimulantes do agonista TLR9 não requer distribuição na célula do linfoma B. Em vez disso, o efeito antiproliferativo nas células do linfoma B pode ser induzido pela entrega de um polinucleotídeo imunoestimulador a outro APC (por exemplo, um APC saudável). Sem desejar ser limitado pela teoria, pensa-se que os polinucleotídeos imunoestimulantes da invenção podem induzir uma ou mais citocinas em uma APC (por exemplo, uma APC saudável), e uma ou mais citocinas induzidas podem ser transportadas para as células do linfoma B para induzir um efeito anti-proliferativo. Assim, os conjugados da invenção que visam células B e polinucleotídeos imunoestimulantes da invenção podem ser úteis no tratamento de tumores líquidos, por exemplo, linfomas de células B não-Hodgkin. Exemplos não limitativos de linfomas que podem ser tratados usando polinucleotídeos imunoestimulantes da invenção e seus conjugados são linfoma de células do manto, linfoma difuso de grandes células B, linfoma folicular, leucemia linfocítica crônica e mieloma múltiplo. A agonização de TLR9 em

pDCs e macrófagos pode induzir interferon tipo I (por exemplo, IFN α ou IFN β) e ativar células NK, que podem matar células tumorais (por exemplo, células tumorais sólidas). Assim, a resposta imune inata estimulada por um polinucleotídeo imunoestimulador ou conjugado da invenção pode resultar na degradação das células tumorais. Os produtos de degradação de células tumorais, isto é, antígenos associados a tumores, podem então ser recrutados por pDCs para iniciar células T CD8 + contra as células tumorais restantes, estimulando assim uma resposta imune adaptativa contra o tumor sólido.

[00544] Os conjugados da invenção podem abordar o problema da distribuição desigual de tecido de polinucleotídeos imunoestimulantes *in vivo*. Por conseguinte, um conjugado da invenção pode ser administrado a um paciente sistemicamente ou em um local que é remoto do local de ação alvo.

[00545] A sinalização de receptor tipo Toll (TLR) funciona como uma ponte entre imunidade inata e adaptativa. Agonistas de receptores do tipo Toll são capazes de induzir respostas imunes contra células doentes (como células cancerígenas ou células infectadas por patógenos) e, portanto, podem servir como um agente terapêutico para prevenir ou tratar essas doenças. Por conseguinte, em certos aspectos, são aqui fornecidos métodos de prevenção ou tratamento de uma doença utilizando um agonista do receptor de Toll (TLR). Tais métodos compreendem a administração a um sujeito em necessidade de um agente terapêutico capaz de ativar um TLR, em que após a administração do agonista do TLR, uma resposta imune contra a doença a ser tratada é induzida no sujeito. Em certas modalidades, a doença é selecionada a partir

de uma doença neoplásica, como câncer, e uma doença infecciosa, como uma infecção viral.

[00546] Em algumas modalidades, são aqui fornecidos métodos de tratamento de câncer em um sujeito com câncer, compreendendo administrar ao sujeito uma quantidade terapêuticamente eficaz de um agonista de TLR. Como descrito aqui, em várias modalidades, os tipos de câncer que podem ser tratados com sucesso com o presente método incluem câncer primário, câncer secundário, câncer recorrente e câncer refratário. Além disso, como aqui descrito, em várias modalidades, os tipos de câncer que podem ser tratados com sucesso com o presente método incluem tumor sólido e tumor líquido. O tratamento bem-sucedido de um câncer pode ser determinado pelo profissional responsável com base em padrões clínicos, como mostrado pela sobrevivência do câncer, regressão do câncer (por exemplo, redução do tamanho do tumor), remissão parcial ou completa do câncer, incluindo um fenótipo livre de câncer (ou seja, não células cancerígenas detectáveis em um paciente) resultou do tratamento.

[00547] Por conseguinte, em algumas modalidades, o método para prevenir ou tratar o câncer compreende administrar a um sujeito em necessidade uma quantidade terapêuticamente eficaz de um ou mais agonistas de TLR selecionados a partir de agonistas de TLR1, agonistas de TLR2, agonistas de TLR3, agonistas de TLR3, agonistas de TLR4, Agonistas de TLR5, agonistas de TLR6, agonistas de TLR7, agonistas de TLR8, agonistas de TLR9 e agonistas de TLR10. Exemplos não limitativos de agonistas de TLR que encontram uso na presente divulgação incluem, mas não estão limitados a Pam3Cys, um agonista de TLR1/2; CFA, um agonista de TLR2; MALP2, um agonista de TLR2; Pam2Cys, um agonista de TLR2;

FSL-I, um agonista de TLR-2; Hib-OMPC, um agonista de TLR-2; polirribossínico: ácido polirribocitídico (Poli 1: C), um agonista de TLR3; ácido poliadenosina-poliuridílico (poli AU), um agonista de TLR3; Ácido polinossínico-policitidílico estabilizado com poli-L-lisina e carboximetilcelulose (Hiltonol), um agonista de TLR3; LPS bacteriano um agonista de TLR4, flagelina bacteriana um agonista de TLR5; imiquimod, um agonista de TLR7; resiquimod, um agonista de TLR7/8; loxoribina, um agonista de TLR7/8; e CpG ODN não metilado, um agonista de TLR9. Agonistas de TLR adicionais conhecidos na técnica e que encontram uso na presente divulgação incluem ainda, mas não se limitam a fosfatos de aminoalquil glucosaminida (AGPs) que se ligam ao receptor TLR4, são conhecidos por serem úteis como adjuvantes de vacinas e agentes imunoestimuladores para estimular a produção de citocinas, ativação de macrófagos, promoção da resposta imune inata e aumento da produção de anticorpos em animais imunizados.

[00548] Agonistas adicionais de TLR conhecidos na técnica e que encontram uso na presente divulgação incluem ainda outros padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados a danos (DAMPs). (P. D'Arpa e K. Leung, Supra.) Exemplos de PAMPs incluem lipoproteínas, lipopolipeptídeos, peptidoglicanos, zimosan, lipopolissacarídeo, porinas neisseriais, flagelina, profilina, galactoceramida, dipeptídeo muramil. Peptidoglicanos, lipoproteínas e ácidos lipoteicóicos são componentes da parede celular de Gram-positivos. Os lipopolissacarídeos são expressos pela maioria das bactérias, sendo o MPL um exemplo. Flagelina refere-se ao componente estrutural dos flagelos bacterianos que

é secretado por bactérias patogênicas e comensais. A RT-Galactosilceramida (RT-GalCer) é um ativador de células T natural killer (NKT). O dipeptídeo muramil é um motivo peptidoglicano bioativo comum a todas as bactérias. Exemplos de DAMPs incluem proteínas secretadas através de um mecanismo de secreção não clássico envolvendo lisossomos secretores, por exemplo, caixa de grupo de alta mobilidade (HMGB) 1 e galectina-3; e moléculas libertadas por células necróticas, por exemplo, proteínas S100, HMGB1, IL-1a, galectina-3, HSP60, HSP70, HSP72, histonas e ácidos nucleicos; e moléculas da matriz extracelular, por exemplo, hialuronano, sulfato de heparina, fibronectina e constituintes da matriz degradados.

[00549] Os oligodesoxinucleotídeos (ODNs) contendo CpG são agonistas do TLR9 e ativam a imunidade inata e adaptativa contra o tumor. Como aqui descrito, os polinucleotídeos imunoestimulantes, incluindo CDNs de CpG naturalmente existentes e polinucleotídeos sintéticos contendo CpG, são contemplados como agentes terapêuticos para prevenir ou tratar o câncer.

[00550] Por conseguinte, em algumas modalidades, são aqui fornecidos métodos para o tratamento de câncer em um sujeito com câncer, compreendendo a administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG ao sujeito. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG administrado nos métodos acima para tratamento de câncer é capaz de ativar uma via de sinalização medicada com TLR após a administração. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG sai naturalmente. Exemplos de polinucleotídeos imunoestimulantes contendo CpG naturalmente existentes incluem,

sem limitação, ODNs de CpG de origem bacteriana ou viral. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG é sintetizado artificialmente. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG sintético tem a mesma sequência que sua contraparte natural. Em algumas modalidades, a sequência de um polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG sintético é diferente de um polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG naturalmente existente. Em algumas modalidades, um polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG é quimicamente modificado para conter uma ou mais entidades químicas que normalmente não são encontradas em ácidos nucleicos.

[00551] Em algumas modalidades, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG é um dos polipeptídeos imunoestimulantes listados na Tabela 2 da presente divulgação. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo contendo CpG é selecionado entre p236, p238, p243, p246, p275, p276, p308, p313, p347, p361, p362, p425, p433, p434, p435, p436, p437, p438, p477, p478, p479, p480, p481, p482, p483, p484, p485, p486, p487, p488 e p489. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG é p236. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG é p238. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG é p238. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG é p243. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG é p246. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG é p275. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG é

p276. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG é p308. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG é 313. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG é p347. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG é p361. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG é p362. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG é p425. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG é p433. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG é p434. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG é p435. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG é p436. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG é p437. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG é p438. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG é p477. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG é p478. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG é p479. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG é p480. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG é p481. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG é p482. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG é p483. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG é p484. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG é p485. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG é p486. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG é p487. Em algumas

modalidades, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG é p488. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG é p489.

[00552] Como fornecido neste documento, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG pode ser autônomo ou fazer parte de uma molécula ou complexo maior. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG não é conjugado, covalentemente ou não covalentemente, a um antígeno ou um seu fragmento antigênico. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG não é conjugado com um antígeno codificado e expresso por uma célula imune normal ou um fragmento antigênico do mesmo. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG não é conjugado com um antígeno de célula T ou com um epítipo do mesmo. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG não é conjugado com ovalbumina (OVA) ou um epítipo do mesmo. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG não é conjugado com o peptídeo epítipo da célula T Cryj2 do alérgeno do pólen do cedro japonês. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG não é conjugado com um antígeno associado ao tumor.

[00553] Em modalidades particulares, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG é conjugado a uma fração de direcionamento para entrega direcionada a um órgão, tecido, célula e/ou compartimento celular específicos após a administração ao sujeito. Em algumas modalidades, a fração alvo é um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo. Em algumas modalidades, a porção de direcionamento compreende uma porção química como aqui descrito.

[00554] Em algumas modalidades, a porção de direcionamento promove especificamente a chegada do polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG a uma célula ou população de células alvo mais do que outras células não-alvo. A entrega direcionada pode ser detectada usando métodos conhecidos na técnica, como medir a concentração celular do polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG em uma célula ou população de células direcionadas e compará-lo com a concentração celular do polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG em um componente não célula ou população celular segmentada. Por exemplo, marcadores celulares podem ser usados para identificar e purificar uma população celular específica. Outros métodos para detectar e medir a entrega direcionada dos polinucleotídeos imunoestimulantes contendo CpG são conhecidos dos especialistas na técnica e se enquadram no escopo da presente divulgação.

[00555] Em algumas modalidades, a fração alvo entrega mais polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG à célula ou população de células alvo do que uma célula ou população de células não-alvo em pelo menos 2 vezes. Em algumas modalidades, a porção alvo direciona mais polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG para a célula ou população de células alvo do que para uma célula ou população de células não-alvo em pelo menos 5 vezes. Em algumas modalidades, a fração alvo entrega mais polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG à célula ou população de células alvo do que a uma célula ou população de células não-alvo em pelo menos 10 vezes. Em algumas modalidades, a porção de direcionamento entrega mais polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG à célula ou população de células alvo do que a uma célula ou população de células não-alvo em

pelo menos 20 vezes. Em algumas modalidades, a porção alvo direciona mais polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG para a célula ou população de células alvo do que para uma célula ou população de células não-alvo em pelo menos 30 vezes. Em algumas modalidades, a porção alvo direciona mais polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG para a célula ou população de células alvo do que para uma célula ou população de células não-alvo em pelo menos 40 vezes. Em algumas modalidades, a porção de direcionamento entrega mais polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG à célula ou população de células alvo do que a uma célula ou população de células não-alvo em pelo menos 50 vezes. Em algumas modalidades, a fração de direcionamento entrega mais polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG à célula ou população de células alvo do que a uma célula ou população de células não-alvo em pelo menos 100 vezes. Em algumas modalidades, a porção alvo direciona mais polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG para a célula ou população de células alvo do que para uma célula ou população de células não-alvo em mais de 100 vezes.

[00556] Em algumas modalidades, a porção alvo direciona o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG a uma célula alvo, ligando-se especificamente a uma porção receptora localizada próxima, sobre e/ou dentro da célula alvo. Em algumas modalidades, a fração alvo é um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno, e a fração receptora é um antígeno produzido pela célula alvo ou um fragmento do antígeno. Em algumas modalidades, a porção receptora é um antígeno da superfície celular. Em algumas modalidades, a fração receptora está localizada dentro do citosol da célula alvo. Em algumas

modalidades, a porção receptora está associada a uma organela intracelular da célula alvo, como o endossoma ou o fagossomo. Em algumas modalidades, após a ligação da fração alvo, a célula alvo internaliza o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG. Em algumas modalidades, a fração receptora facilita a internalização do polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG. Em algumas modalidades, a célula alvo transporta ainda o polinucleotídeo imunoestimulador internalizado que contém CpG para um compartimento intracelular, como o endossoma ou o fagossomo. Em algumas modalidades, a fração receptora facilita o transporte do polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG.

[00557] Em algumas modalidades do método de tratamento de câncer, a célula alvo expressa pelo menos um receptor de Toll, como TLR 7 e/ou TLR9. Em algumas modalidades, a célula alvo é uma célula imune normal, como uma célula apresentadora de antígeno (APC). Em algumas modalidades, a célula alvo é uma célula cancerígena, como uma célula linfoma de célula B. Em algumas modalidades, a fração receptora está localizada na mesma membrana celular que o receptor do tipo Toll. Em algumas modalidades, tanto a fração receptora quanto o receptor do tipo Toll estão localizados na membrana celular da célula alvo. Em algumas modalidades, tanto a fração receptora quanto o receptor do tipo Toll estão localizados na membrana endossômica ou na membrana fagossômica da célula alvo. Em algumas modalidades, a ligação da porção de direcionamento à porção de recebimento facilita a ligação do polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG ao receptor TLR9 expresso pela célula alvo.

[00558] Em algumas modalidades, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG é conjugado com um anticorpo ou

seu fragmento de ligação ao antígeno para formar um imunoc conjugado CpG-Ab. Em algumas modalidades, a conjugação é através de ligação covalente, como através de uma molécula de ligante químico, conforme aqui fornecido. Em outras modalidades, a conjugação é através de ligação não covalente, como através da interação de ligação entre um ligante e seu receptor. Outros exemplos de ligação não covalente que podem ser usados em conexão com a presente divulgação incluem, mas não estão limitados a, interações eletrostáticas (por exemplo, complexos TAT ou Spermine ou Protamine) e interações biotina-avidina/estreptavidina.

[00559] Em algumas modalidades, o anticorpo é selecionado a partir de um anticorpo anti-CD20, anticorpo anti-CD22, anticorpo anti-CD30, anticorpo anti CD37, anticorpo anti-CD38, anticorpo anti-CD40, anticorpo anti-CD74, anti-CD79b anticorpo, anticorpo anti-CD205, anticorpo anti-CD274, anticorpo anti-CD303, anticorpo anti-CD304, anticorpo anti-CD19, anticorpo anti-CD1, anticorpo anti-CD2, anticorpo anti-CD3, anticorpo anti-CD5, anti-CD6 anticorpo, anticorpo anti-CD9, anticorpo anti-CD11, anticorpo anti-CD18, anticorpo anti-CD21, anticorpo anti-CD23, anticorpo anti-CD24, anticorpo anti-CD25, anticorpo anti-CD26, anticorpo anti-CD44, anti-CD45R anticorpo, anticorpo anti-CD49, anticorpo anti-CD66 (antígeno carcinoembrionico, CEA), anticorpo anti-CD93, anticorpo anti-CD52, anticorpo anti-CD56, anticorpo anti-CD123, anticorpo anti-CD138, anticorpo anti-CD163, anti-Anticorpo CD206. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo anti-CD20. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo anti-CD22. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo anti-CD30. Em algumas modalidades, o anticorpo é um

anticorpo anti-CD38. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo anti-CD40. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo anti-CD74. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo anti-CD76b. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo anti-CD205. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo anti-CD274. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo anti-CD303. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo anti-CD304. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo anti-CD19. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo anti-CD1. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo anti-CD2. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo anti-CD3. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo anti-CD5. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo anti-CD6. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo anti-CD9. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo anti-CD11. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo anti-CD18. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo anti-CD21. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo anti-CD23. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo anti-CD24. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo anti-CD25. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo anti-CD26. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo anti-304. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo anti-CD44. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo anti-CD45R. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo anti-CD49. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo anti-CD66 (antígeno carcinoembriônico, CEA). Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo anti-CD93. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo anti-CD52. Em

algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo anti-CD56. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo anti-CD123. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo anti-CD138. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo anti-CD163. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo anti-CD206.

Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo monoclonal. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo humano. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo humanizado.

[00560] Em algumas modalidades, o conjugado CpG-Ab é um dos imunoconjugados listados na Tabela 6-A ou 6-B da presente divulgação. Em algumas modalidades, o conjugado CpG-Ab é selecionado entre SB-342, SB-343, SB-341, SB-340, SB-179, SB-181, SB-186, SB-189, SB-228, SB- 229, SB-242, SB-263, SB-337, SB-267, SB-284, SB-312, SB-313, SB-347, SB-373, SB-382, SB-388, SB-389, SB-408, SB-416, SB-419, SB-421, SB-423, SB-426, SB-427, SB-428, SB-429 e SB-430, conforme mostrado nas Tabelas 6-A e 6-B.

[00561] O imunoconjugado CpG-Ab pode compreender um ou mais polinucleotídeos imunoestimulantes contendo CpG e um ou mais seus fragmentos de ligação a anticorpo ou antígeno. As razões moleculares entre o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno e o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG (razão Ab: CpG) no imunoconjugado podem variar de 1: 1 a 1: 100. Em algumas modalidades, a razão Ab: CpG do imunoconjugado CpG-Ab é de 1: 1. Em algumas modalidades, a razão Ab: CpG do imunoconjugado CpG-Ab é de 1: 2. Em algumas modalidades, a razão Ab: CpG do imunoconjugado CpG-Ab é de 1: 3. Em algumas modalidades, a razão Ab: CpG do imunoconjugado CpG-Ab é de 1: 4. Em algumas modalidades, a razão Ab: CpG do imunoconjugado CpG-

Ab é de 1: 5. Em algumas modalidades, a razão Ab: CpG do imunoconjugado CpG-Ab é de 1: 6. Em algumas modalidades, a razão Ab: CpG do imunoconjugado CpG-Ab é de 1: 7. Em algumas modalidades, a razão Ab: CpG do imunoconjugado CpG-Ab é de 1: 8. Em algumas modalidades, a razão Ab: CpG do imunoconjugado CpG-Ab é de 1: 9. Em algumas modalidades, a razão Ab: CpG do imunoconjugado CpG-Ab é 1:10. Em algumas modalidades, a proporção Ab: CpG do imunoconjugado CpG-Ab é 1:15. Em algumas modalidades, a proporção Ab: CpG do imunoconjugado CpG-Ab é 1:20. Em algumas modalidades, a razão Ab: CpG do imunoconjugado CpG-Ab é 1:30. Em algumas modalidades, a proporção Ab: CpG do imunoconjugado CpG-Ab é 1:40. Em algumas modalidades, a proporção Ab: CpG do imunoconjugado CpG-Ab é 1:50. Em algumas modalidades, a proporção Ab: CpG do imunoconjugado CpG-Ab é 1:60. Em algumas modalidades, a proporção Ab: CpG do imunoconjugado CpG-Ab é 1:70. Em algumas modalidades, a proporção Ab: CpG do imunoconjugado CpG-Ab é 1:80. Em algumas modalidades, a proporção Ab: CpG do imunoconjugado CpG-Ab é 1:90. Em algumas modalidades, a razão Ab: CpG do imunoconjugado CpG-Ab é de 1: 100.

[00562] Em algumas modalidades, o método para o tratamento de câncer compreende a administração a um sujeito com câncer de uma quantidade terapêutica eficaz de um imunoconjugado de CpG-Ab, em que após a administração ao sujeito, o imunoconjugado de CpG-Ab tem como alvo uma célula imunológica normal. Em algumas modalidades, os imunoconjugados CpG-Ab têm como alvo um ou mais tipos de células normais selecionadas a partir de células T, células B, células assassinas naturais, neutrófilos, mastócitos, macrófagos, células apresentadoras de antígeno (APC), basófilos

e eosinófilos. Em algumas modalidades, o imunoconjugado CpG-Ab tem como alvo um APC normal. Em algumas modalidades, os imunoconjugados CpG-Ab têm como alvo um ou mais tipos de APC normais selecionados de células B, monócitos, células dendríticas, células de Langerhans, queratinócitos, células endoteliais, astrócitos, fibroblastos e oligodendrócitos. Em algumas modalidades, o imunoconjugado CpG-Ab tem como alvo uma célula B normal. Em algumas modalidades, o imunoconjugado CpG-Ab tem como alvo uma célula dendrítica normal. Em algumas modalidades, o imunoconjugado CpG-Ab tem como alvo um macrófago normal. Em algumas modalidades, os imunoconjugados CpG-Ab direcionados a um ou mais tipos de células normais não têm como alvo uma célula anormal, como uma célula cancerígena.

[00563] Em algumas situações, o método de tratamento do câncer compreende a administração de um indivíduo com câncer de uma quantidade terapêutica eficaz de um imunoconjugado do CpG-Ab, em que após a administração do indivíduo ou o imunoconjugado do CpG-Ab tem como alvo uma célula imunológica normal. Em algumas amostras, os imunoconjugados CpG-Ab têm como alvo um ou mais tipos de células selecionadas a partir de células T, células B, células assassinas naturais, neutrófilos, mastócitos, macrófagos, células apresentadoras de antígeno (APC), basófilos e eosinófilos. Em algumas estatísticas, o CpG-Ab imunoconjugado tem como alvo um APC normal. Em algumas situações, os imunoconjugados CpG-Ab têm como alvo um ou mais tipos de APC normais selecionadas de células B, monócitos, células dendríticas, células de Langerhans, queratinócitos, células endoteliais, astrócitos, fibroblastos e oligodendrócitos. Em algumas situações, o CpG-Ab imunoconjugado tem como alvo uma

célula B normal. Em algumas situações, o CpG-Ab imunoconjugado tem como alvo uma célula dendrítica normal. Em algumas situações, o CpG-Ab imunoconjugado tem como alvo um macrófago normal. Em algumas situações, os imunoconjugados CpG-Ab direcionados para um ou mais tipos de células normais não têm como alvo uma célula anormal, como uma célula cancerígena.

[00564] Em algumas modalidades, o método para o tratamento de câncer compreende a administração a um sujeito com câncer de uma quantidade terapêutica eficaz de um imunoconjugado de CpG-Ab, em que o imunoconjugado de CpG-Ab tem como alvo uma célula anormal do câncer que está sendo tratado. Em algumas modalidades, essa célula anormal é uma célula cancerígena. Em algumas modalidades, essa célula anormal é uma célula estromal do tumor que está sendo tratado. Em algumas modalidades, o imunoconjugado CpG-Ab tem como alvo um ou mais tipos de células cancerígenas selecionadas a partir de câncer de células B, por exemplo, mieloma múltiplo, macroglobulinemia de Waldenström, doenças de cadeia pesada, como, por exemplo, doença da cadeia alfa, gama doença em cadeia e doença em cadeia mu, gammopatia monoclonal benigna e amiloidose imunocítica, melanomas, câncer de mama, câncer de pulmão, câncer de brônquio, câncer colorretal, câncer de próstata, câncer de pâncreas, câncer de estômago, câncer de ovário, câncer de bexiga, cérebro ou nervos centrais câncer de sistema, câncer de sistema nervoso periférico, câncer de esôfago, câncer de colo uterino ou endometrial, câncer de cavidade oral ou faringe, câncer de fígado, câncer de rim, câncer de testículo, câncer de vias biliares, câncer de intestino delgado ou apêndice, câncer de glândula salivar, câncer de glândula tireóide, câncer de glândula adrenal, osteossarcoma, condrosarcoma, câncer de

tecidos hematológicos e similares. Outros exemplos não limitativos de tipos de câncer aplicáveis aos métodos abrangidos pela presente invenção incluem sarcomas e carcinomas humanos, por exemplo, fibrossarcoma, mixossarcoma, lipossarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogênico, cordoma, angiossarcoma, endoteliosarcoma, linfangiossarcoma, linfangiosarcoma, linfangioarioma, linfangioarcoma, sinossocarcoma, , Tumor de Ewing, leiomiossarcoma, rabdomyossarcoma, carcinoma do cólon, câncer colorretal, câncer de pâncreas, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma basocelular, adenocarcinoma, carcinoma da glândula sudorípara, carcinoma papilar, carcinoma papilífero, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogênico, carcinoma de células renais, hepatoma, carcinoma do ducto biliar, câncer de fígado, coriocarcinoma, sominoma, carcinoma embrionário, tumor de Wilms, câncer cervical, câncer ósseo, tumor cerebral, câncer testicular, carcinoma pulmonar, pulmão de pequenas células carcinoma, carcinoma da bexiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craniofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma; leucemias, por exemplo, leucemia linfocítica aguda e leucemia mielocítica aguda (mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica e eritroleucemia); leucemia crônica (leucemia mielocítica crônica (granulocítica) e leucemia linfocítica crônica); e policitemia vera, linfoma (doença de Hodgkin e doença não-Hodgkin), mieloma múltiplo, macroglobulinemia de Waldenstrom e doença da cadeia pesada. Em algumas modalidades, os cânceres são de natureza epitelial e

incluem, entre outros, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer cervical, câncer de cólon, câncer ginecológico, câncer renal, câncer de laringe, câncer de pulmão, câncer de boca, câncer de cabeça e pescoço, câncer de ovário câncer, câncer de pâncreas, câncer de próstata ou câncer de pele. Em outras modalidades, o câncer é câncer de mama, câncer de próstata, câncer de pulmão ou câncer de cólon. Em ainda outras modalidades, o câncer epitelial é câncer de pulmão de células não pequenas, carcinoma de células renais não papilares, carcinoma cervical, carcinoma ovariano (por exemplo, carcinoma ovariano seroso) ou carcinoma de mama. Os cânceres epiteliais podem ser **caracterizados** de várias outras maneiras, incluindo, mas não se limitando a, células serosas, endometrioides, mucinosas, claras, Brenner ou indiferenciadas.

[00565] Em algumas modalidades, o método para o tratamento de câncer compreende a administração a um sujeito com câncer de uma quantidade terapêutica eficaz de um imunocombinado de CpG-Ab, em que o imunocombinado de CpG-Ab tem como alvo uma célula anormal do câncer que está sendo tratado e também tem como alvo um normal célula imune selecionada de células T, células B, células assassinas naturais, neutrófilos, mastócitos, macrófagos, células apresentadoras de antígeno (APC), basófilos e eosinófilos. Em algumas modalidades, o imunocombinado CpG-Ab que tem como alvo uma célula anormal do câncer sendo tratada também tem como alvo um APC normal selecionado a partir de células B, monócitos, células dendríticas, células de Langerhans, queratinócitos, células endoteliais, astrócitos, fibroblastos e oligodendrócitos. Em algumas modalidades, o imunocombinado CpG-Ab que tem como alvo uma célula anormal do câncer sendo tratada também tem como alvo uma célula que expressa um receptor TLR

selecionado de células dendríticas (DCs), células B, células T, células Langerhans, queratinócitos, mastócitos, células endoteliais, células de miofibroblasto e fibroblasto primário. Em modalidades particulares, essa célula anormal é uma célula imune cancerígena. Em modalidades particulares, essa célula anormal é uma célula de linfoma ou uma célula de leucemia. Em modalidades particulares, essa célula anormal é uma célula de linfoma de célula B, e os imunocombinados CpG-Ab têm como alvo a célula de linfoma de célula B e as células B normais no sujeito.

[00566] Em algumas modalidades, o método para tratamento de câncer compreende a administração a um sujeito com câncer de uma quantidade terapêutica eficaz de um imunocombinado de CpG-Ab, em que o polinucleotídeo imunestimulador contendo CpG ativa uma via de sinalização mediada por TLR9 após a chegada à célula alvo. Essa ativação pode ser através da ligação do polinucleotídeo imunestimulador contendo CpG ao receptor TLR9 expresso na superfície ou no citosol da célula alvo. Em algumas modalidades, a célula direcionada pelo imunocombinado CpG-Ab é capaz de internalizar o imunocombinado CpG-Ab. Em algumas modalidades, a célula direcionada pelo imunocombinado CpG-Ab é capaz de internalizar a porção polinucleotídica imunestimulante contendo CpG do imunocombinado. Em algumas modalidades, a célula direcionada pelo imunocombinado CpG-Ab é capaz de transportar o imunocombinado internalizado de CpG-Ab ou a porção polinucleotídica imunestimulante contendo CpG para uma organela intracelular que expressava um receptor TLR. Em algumas modalidades, a célula direcionada pelo imunocombinado CpG-Ab é capaz de transportar o imunocombinado CpG-Ab internalizado ou a

porção polinucleotídica imunoestimulante que contém CpG para o endossomo ou fagossomo da célula.

[00567] Em algumas modalidades, o método para o tratamento de câncer compreende a administração a um sujeito com câncer de uma quantidade terapêutica eficaz de um imunocjugado de CpG-Ab, em que o imunocjugado de CpG-Ab se liga especificamente a um antígeno associado a uma célula alvo. Como aqui descrito, um antígeno associado a uma célula alvo pode ser encontrado na superfície e/ou dentro do citosol da célula alvo. Em algumas modalidades, o imunocjugado CpG-Ab se liga especificamente a um antígeno presente na superfície de uma célula alvo. Em algumas modalidades, o imunocjugado CpG-Ab se liga especificamente a um antígeno presente no citosol de uma célula alvo. Em algumas modalidades, o imunocjugado CpG-Ab se liga especificamente a um antígeno presente na membrana de um compartimento intracelular ou organela de uma célula alvo. Em algumas modalidades, o imunocjugado CpG-Ab se liga especificamente a um antígeno que reside na membrana endossômica ou fagossômica da célula alvo. Em algumas modalidades, após a ligação pelo imunocjugado CpG-Ab, o antígeno alvo facilita a internalização do imunocjugado CpG-Ab ou do polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG na célula alvo. Em algumas modalidades, após a ligação pelo imunocjugado CpG-Ab, o antígeno alvo facilita o transporte do imunocjugado CpG-Ab ou do polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG para o endossoma da célula alvo. Em algumas modalidades, após a ligação pelo imunocjugado CpG-Ab, o antígeno alvo facilita a ligação do polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG ao TLR9 expresso pela célula alvo.

[00568] Em algumas modalidades, um antígeno associado a uma célula alvo é uma proteína codificada e expressa pela célula alvo. Nessas modalidades, o antígeno da proteína pode ser codificado por um gene endógeno (por exemplo, codificado pelo genoma da célula alvo) ou gene exógeno (por exemplo, codificado por um gene introduzido artificialmente na célula alvo) da célula alvo. Em outras modalidades, o antígeno alvo do imunocombinado CpG-Ab não é codificado ou expresso pela célula alvo. Em algumas modalidades, um antígeno associado a uma célula alvo é um antígeno exógeno absorvido pela célula alvo (por exemplo, um antígeno endocitado e processado por um APC).

[00569] Como exemplos não limitativos, em algumas modalidades, para direcionar uma célula imune normal, o antígeno alvo do imunocombinado CpG-Ab é codificado e expresso pela célula imune normal (por exemplo, um antígeno de célula B). Em algumas modalidades, o antígeno alvo do imunocombinado CpG-Ab é codificado por um gene endógeno da célula imune normal. Em algumas modalidades, o antígeno alvo do imunocombinado CpG-Ab é codificado por um gene exógeno introduzido na célula imune normal (por exemplo, um gene repórter). Em algumas modalidades, o antígeno alvo do imunocombinado CpG-Ab é um antígeno da doença captado e processado pela célula imune (por exemplo, um antígeno associado a um tumor ou um antígeno viral).

[00570] Como exemplos não limitativos, em algumas modalidades, para direcionar uma célula anormal (por exemplo, uma célula cancerígena ou uma célula infectada por patógeno), o antígeno alvo do imunocombinado CpG-Ab pode ser uma proteína codificada por um gene endógeno de a célula anormal. Em várias modalidades, o antígeno alvo do imunocombinado CpG-Ab é superexpresso, mutado

ou mal regulado na célula alvo. Em outras modalidades, o antígeno alvo do imunocombinado CpG-Ab tem as mesmas características que o antígeno teria em uma célula normal. Em outras modalidades, o antígeno alvo do imunocombinado CpG é codificado por um gene exógeno introduzido na célula anormal (por exemplo, através da infecção por patógenos).

[00571] Em algumas modalidades, o imunocombinado CpG-Ab se liga especificamente a um antígeno codificado e expresso por uma célula imune normal selecionada de células T, células B, células assassinas naturais, neutrófilos, mastócitos, macrófagos, células apresentadoras de antígeno (APC), basófilos e eosinófilos. Em algumas modalidades, o imunocombinado CpG-Ab se liga especificamente a um antígeno codificado e expresso por células apresentadoras de antígeno normais (APC) selecionadas a partir de células B, monócitos, células dendríticas, células Langerhans, queratinócitos, células endoteliais, astrócitos, fibroblastos e oligodendrócitos. Em algumas modalidades, o imunocombinado CpG-Ab se liga especificamente a um antígeno codificado e expresso por uma célula B normal. Em algumas modalidades, o imunocombinado CpG-Ab se liga especificamente a um antígeno codificado e expresso por uma célula dendrítica normal. Em algumas modalidades, o imunocombinado CpG-Ab se liga especificamente a um antígeno codificado e expresso por uma célula de macrófago.

[00572] Em algumas modalidades, o imunocombinado CpG-Ab se liga especificamente a um antígeno codificado e expresso por uma célula imune normal selecionada a partir de moléculas de ponto de verificação imune, moléculas co-estimulatórias de células T,

proteínas MHC (incluindo moléculas MHC de classe I e II) e outras antígenos específicos de células imunes.

[00573] Em modalidades particulares, as moléculas de ponto de verificação imune que encontram uso na presente divulgação incluem, mas não estão limitadas a, PD-1, PD-L1, PD-L2, TIM-3, LAG-3, CEACAM-1, CEACAM-5, CLTA-4, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD47, CD160, 2B4 e TGFR.

[00574] Em modalidades particulares, as moléculas co-estimulatórias de células T que encontram uso na presente divulgação incluem, mas não estão limitadas a, OX40, CD2, CD27, CDS, ICAM-1, LFA-1/CD11a/CD18, ICOS/CD278, 4-1BB/CD137, GITR, CD30, CD40, BAFRR, HVEM, CD7, LIGHT, NKG2C, SLAMF7, NKp80, CD160, B7-H3 e CD83.

[00575] Em modalidades particulares, os antígenos específicos de células B que encontram uso na presente divulgação incluem, mas não estão limitados a, B220/CD45R, B7-1/CD80, B7-2/CD86, BCMA/TNFRSF17, BLIMP1/PRDM1, C1q R1/CD93, CD117/c-kit, CD11b/Integrina alfa M, CD19, CD1c/BDCA-1, CD1d, CD20, CD21, CD23/Fc epsilon RII, CD24, CD25/IL-2 R alfa, CD27/TNFRSF7, CD34, CD37, CD38, CD40/TNFRSF5, CD43, CD5, CD69, CD72, CD83, CXCR4, CXCR5, DEP-1/CD148, EMMPRIN/CD147, FCRL3/FcRH3, Flt-3/Flk-2, HLA-DR, IgM, IL-10, IL-12R beta 2, IL-12/IL-35 p35, IL-21, IL-21R, IL-27R alfa/WSX-1/TCCR, IL-27/IL-35 Subunidade EBI3, IL-3R alfa/CD123, IL-4R alfa, IL-7R alfa/CD127, IRF4, MHC classe II (IA/IE), Neprilysin/CD10, Pax5/BSAP, Sca-1/Ly6, Siglec-2/CD22, STAT1, STAT3, Syndecan-1/CD138, TACI/TNFRSF13B, TGF-beta, TIM-1/KIM-1/HAVCR, TLR4. Em modalidades particulares, os antígenos específicos de células B são selecionados a partir de CD1, CD2, CD5, CD9, CD11, CD17, CD18, CD19, CD20, CD21/CD35, CD22, CD23,

CD24, CD25, CD27, CD30, CD40, CD45R/B220, CD69, CD70, CD78, CD79a (Ig α), CD79b (Ig β), CD80, CD86, CD93 (C1Rqp), CD137/4-1BB, CD138, CD252/OX40L, CD267, CD268/BAFF-R, CD279/PD1, CD319, PDL-2, Pax-5, IgD, IgM, Notch 2 e TLR4.

[00576] Em modalidades particulares, os antígenos específicos de células dendríticas encontrados na presente divulgação incluem, entre outros, B220/CD45R, BATF3, BST-2/Tetherin, CD11b/Integrina alfa M, CD11c, CD14, CD163, CD19, CD1c/BDCA-1, CD1d1, CD20, CD3, CD4, CD8, CLEC9a, CX3CR1, DC-SIGN/CD209, DEC-205/CD205, DLEC/CLEC4C/BDCA-2, E-caderina, EpCAM/TROP1, F4/80, Fc epsilon RI alfa, Fc gama RI/CD64, Fc gama RIA/CD64, Fc gama RIB/CD64, Fc gama RIII (CD16), Fc gama RIIIA/CD16a, Fc gama RIIIA/CD16a, Fc gama RIIIB/CD16b, GFI-1, HLA-DR, IFN-alfa, IFN-beta, IFN-gama, IGSF4A/SynCAM1, Ikaros, IL-1 beta/IL-1F2, IL-10, IL-12, IL-2, IL-23, IL-3 R alfa/CD123, IL-6, iNOS, Integrina alfa E/CD103, IRF4, IRF8, Langerin/CD207, Ly-6G (Gr-1), Ly-6G/Ly-6C (Gr-1), MHC classe II (IA/IE), MMR/CD206, NCAM-1/CD56, Neuropilin-1, NFIL3/E4BP4, Óxido nítrico, PU.1/Spi-1, SIRP alfa/CD172a, Spi-B, Trombomodulina/BDCA-3, TLR7, TLR9, TNF-alfa e XCR1. Antígenos de células dendríticas adicionais e anticorpos que se ligam especificamente a antígenos de células dendríticas são conhecidos na técnica, como os descritos em *Rafael Nuñez, Current Protocols in Cytometry (2001) 9.17.1-9.17.15; Hock et al., Immunology 83: 573-581; Jiang, W. et al. Nature 375: 151-155; e Bender et al., J. Immunol. Methods 196: 121-135; e M. Colli et al., Immunology. 2013 set; 140 (1): 22-30*, o conteúdo de cada um é incorporado aqui por referência na sua totalidade. Em modalidades particulares, antígenos específicos de células dendríticas são selecionados dentre CD1a, CD1b/c, CD4, CD8,

CD11b, CD11c, CD40, CD45R/B220, CD49d, CD80, CD83, CD85a, CD85f, CD85g/ILT7, CD85i, CD85j, CD86, CD123, CD197/CCR7, CD205, CD206, CD207, CD208, CD209, CD273/B7-DC/PD-L2, CD303/BDCA-2, CD304/neuropilin-1, marcador DC/33D1, F4/80, classe MHC I, fascinante, HLA-DR e Siglec H. Em modalidades particulares, antígenos específicos de células dendríticas são antígenos de células dendríticas plasmocitóides selecionados de CD1a, CD1b, CD1c, CD4, CD8, CD11b, CD11c, CD40, CD45R/B220, CD49d, CD80, CD83, CD85g/ILT7, CD86, CD123, CD197 (CCR7), CD273 (B7-DC, PD-L2), CD303 (BDCA-2), CD304 (Neuropilin-1), marcador DC (33D1), F4/80, HLA-DR, MHC Classe II, Siglec H.

[00577] Em modalidades particulares, os antígenos de superfície de macrófagos que encontram uso na presente divulgação incluem, mas não estão limitados a, Activina A, AIF-1/Iba1, Arginase 1/ARG1, B7-1/CD80, B7-2/CD86, Calcitonina R, CCL1/I-309/TCA-3, CCL11/Eotaxina, CCL14/HCC-1/HCC-3, delta CCL15/MIP-1, CCL16/HCC-4, CCL17/TARC, CCL18/PARC, CCL19/MIP-3 beta, CCL2/JE/MCP-1, CCL20/MIP-3 alfa, CCL22/MDC, CCL23/Ck beta 8-1, CCL23/MPIF-1, CCL24/Eotaxina-2/MPIF-2, CCL26/Eotaxina-3, CCL3/CCL4, CCL3/MIP-1 alfa, CCL4/MIP-1 beta, CCL5/RANTES, CCL8/MCP-2, CCR2, CCR5, CD11b/Integrina alfa M, CD11c, CD15/Lewis X, CD163, CD200 R1, CD200R1L, CD36/SR-B3, CD43, CD45, CD68/SR-D1, CLEC10A/CD301, COX-2, CX3CL1/Fractalkine, CX3CR1, CXCL1/GRO alfa/KC/CINC-1, CXCL10/IP-10/CRG-2, CXCL11/I-TAC, CXCL13/BLC/BCA-1, CXCL16, CXCL2/GRO beta/MIP-2/CINC-3, CXCL3/GRO gama/CINC-2/DCIP-1, CXCL5/ENA -70, CXCL5/ENA-74, CXCL5/ENA-78, CXCL9/MIG, CXCR1/IL-8 RA, CXCR2/IL-8 RB, DC-SIGN/CD209, DEC-205/CD205, Dectina-1/CLEC7A, Dectina-2/CLEC6A, EMR1, F4/80, Fc epsilon RI alfa, Fc gama RI/CD64, Fc gama

RIA/CD64, Fc gama RIB/CD64, Fc gama RII/CD32, Fc gama RIII (CD16), FIZZ1/RELM alfa, Galectina-3, GATA-6, G-CSF, ligando GITR/TNFSF18, GM-CSF, HLA-DR, ID2, IFN-gama, IFN-gama R1/CD119, IL-1 beta/IL-1F2, IL-1 RII, IL-10, IL-15, IL-17/IL-17A, IL-18/IL-1F4, IL-1ra/IL-1F3, IL-23, IL-4 R alfa, IL-6, IL-8/CXCL8, iNOS, Integrina alfa L/CD11a, IRF4, IRF5, LAMP-2/CD107b, Langerin/CD207, LILRB4/CD85k/ILT3, L-Selectin/CD62L, LXR alfa/NR1H3, Ly-6G (Gr-1), Ly-6G/Ly-6C (Gr-1), MARCO, M-CSF R/CD115, Mer, MFG-E8, MHC classe II (IA/IE), MMR/CD206, NFATC1, NGFI-B alfa/Nur77/NR4A1, PPAR delta/NR1C2, PPAR gama/NR1C3, RANK/TNFRSF11A, RUNX3/CBFA3, Siglec-1/CD169, Siglec-3/CD33, Siglec-F, SIGNR1/CD209b, SIRP alfa/CD172a, SLAM/CD150, SOCS-3, Sfingosina quinase 1/SPHK1, Sphingosine Kinase 2/SPHK2, SR-AI/MSR, SR-BI, STAT1, STAT6, TGF-beta, TIM-4, TLR1, TLR2, TLR4, TLR8, TNF-alfa, TRACP/PAP/ACP5, VCAM-1/CD106, VEGF e YM1/Quitinase 3, tipo 3. Em particular modalidades gerais, antígenos específicos de macrófagos são selecionados a partir de CD11a, CD11b, CD11c, CD14, CD15 (SSEA-1), CD16/32, CD33, CD64, CD68, CD80, CD85k (ILT3), CD86, CD105 (Endoglin), CD107b, CD115, CD163, CD195 (CCR5), CD282 (TLR2), CD284 (TLR4), F4/80, GITRL, HLA-DR, Mac-2 (Galectina-3), MHC Classe II.

[00578] Em modalidades particulares, os antígenos específicos de células T que encontram uso na presente divulgação incluem, mas não estão limitados a, CD3, CD4, CD8, CD25, CD127 e CD196/CCR6, CD197/CCR7, CD62L, CD69 e CD45RO.

[00579] Em modalidades particulares, os antígenos específicos das células auxiliares T foliculares que encontram uso na presente divulgação incluem, mas não estão limitados a, BCL-6, Stat-3, CD3, CD4, CD84, CD126/IL-6R α , CD150/SLAM), CD154/CD40L,

CD185/CXCR5, CD252/OX40L, CD278/ICOS, CD279/PD1 e TCR α/β . Em modalidades particulares, os antígenos específicos de células Th1 que encontram uso na presente divulgação incluem, mas não estão limitados a GM-CSF, IFN- γ , IL-2, T-bet, Marcadores Extracelulares, CD4, CD26, CD94, CD119, CD183, CD191 (CCR1), CD195 (CCR5), CD254 (TRANCE, RANKL), CD366 (Tim-3), IL-18R, receptor beta de linfotoxina beta (LT β R), TNF- α e TNF- β . Em modalidades particulares, os antígenos específicos de células Th2 que encontram uso na presente divulgação incluem, mas não estão limitados a, c-MAF, GATA3, GM-CSF, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, Marcadores extracelulares, CCR8, CD4, CD184 (CXCR4), CD193 (CCR3), CD194 (CCR4), CD197 (CCR7), CD278 (ICOS), CD294 (CRTH2), CD365 (Tim-1) e IL-1R. Em modalidades particulares, os antígenos específicos de células Th9 que encontram uso na presente divulgação incluem, mas não estão limitados a, GATA3, IRF4, Stat-6, CD3, CD4 e TCR α/β . Em modalidades particulares, os antígenos específicos de células Th17 que encontram uso na presente divulgação incluem, mas não estão limitados a, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, ROR α , ROR γ t, Stat-3, CD3, CD4, CD38, CD161/NK-1.1, CD194/CCR4, CD196/CCR6, IL-1R e TGF- β . Em modalidades particulares, os antígenos específicos de células Th22 que encontram uso na presente divulgação incluem, mas não estão limitados a, AHR, CCR10, CD3, CD \$, CD194/CCR4, CD196/CCR6 e TCR α/β . Em modalidades particulares, os antígenos específicos de células Treg que encontram uso na presente divulgação incluem, mas não estão limitados a, FOXP3, Helios, marcadores extracelulares, CD4, CD25, CD39, CD62L, CD73, CD103, CD134, CD152/CTLA-4, CD194/CCR4, CD223, FR4, GARP, GITR e TGF- β .

[00580] Em modalidades particulares, antígenos específicos de células assassinas naturais que encontram uso na presente divulgação incluem, mas não estão limitados a, CD11b, CD11c, CD16/32, CD49b, CD56 (NCAM), CD57, CD69, CD94, CD122, CD158 (Kir), CD161 (NK-1.1), CD244 (2B4), CD314 (NKG2D), CD319 (CRACC), CD328 (Siglec-7), CD335 (NKp46), Ly49, Ly108, V α 24-J α 18 TCR (iNKT), Granulicina, Granzyme e Perforin.

[00581] Em modalidades particulares, os antígenos específicos de células endoteliais que encontram uso na presente divulgação incluem, mas não estão limitados a, CD31, CD34, CD54, CD54, CD61, CD62E/E-Selectin, CD105/Endoglin, CD106/VCAM-1, CD144/VE - Caderina, CD146/MUC18, Mel-CAM, CD201/EPCR, CD202b/Tie2/Tek, CD309/VEGFR2 - Flk-1, Podoplanina e VEGFR3. Em modalidades particulares, os antígenos específicos de células basófilas que encontram uso na presente divulgação incluem, mas não estão limitados a, a proteína principal Pro-Major 1, CD13, CD44, CD54, CD54, CD63, CD69, CD107a, CD123, CD193/CCR3, CD203c, Fc ϵ RI α , IgE e TLR4. Em modalidades particulares, os antígenos específicos de células de astrócitos que encontram uso na presente divulgação incluem, mas não estão limitados a, S100B, CD40, CD80, CD86, CD88 e GFAP. Em modalidades particulares, os antígenos específicos de células eosinófilos que encontram uso na presente divulgação incluem, mas não estão limitados a, C3AR, CD15 (SSEA-1), CD23, CD49d, CD52, CD53, CD88, CD129, CD183, CD191, CD193, CD244 (2B4), CD294, CD305, Fc ϵ RI α , Galectin-9, MRP-14, Siglec-8 e Siglec-10. Em modalidades particulares, os antígenos específicos para mastócitos que encontram uso na presente divulgação incluem, mas não estão limitados a, CD117/C-kit, CD203c e Fc ϵ RI α . Em modalidades particulares, os antígenos

específicos de células de fibroblastos que encontram uso na presente divulgação incluem, mas não estão limitados a, CD10, CD29, CD47, CD81, CD91, CD121a.

[00582] Em modalidades particulares, o imunoconjugado CpG-Ab que se liga especificamente a um antígeno alvo associado a uma célula imune normal que é selecionada a partir de CD19, CD20, CD22, CD30, CD38, CD40, CD74, CD79b, CD205, CD274, CD303, e CD304. Em modalidades particulares, o imunoconjugado CpG-Ab que se liga especificamente a um antígeno alvo selecionado a partir de CD19, CD20, CD22, CD30, CD38, CD40, CD74, CD79b, CD205, CD274, CD303 e CD304.

[00583] Em algumas modalidades, o imunoconjugado CpG-Ab que se liga especificamente a um antígeno associado a uma célula imune normal (por exemplo, uma APC) não tem como alvo uma célula anormal. Em algumas modalidades, o imunoconjugado CpG-Ab que se liga especificamente a um antígeno associado a uma célula imune normal (por exemplo, uma APC) não se liga a um antígeno associado a uma célula anormal. Em algumas modalidades, o imunoconjugado CpG-Ab que se liga especificamente a um antígeno associado a uma célula imune normal (por exemplo, uma APC) não se liga a um antígeno associado ao tumor do câncer que está sendo tratado com o método aqui fornecido.

[00584] Em algumas modalidades, o imunoconjugado CpG-Ab se liga especificamente a um antígeno associado a uma célula que expressa TLR selecionada a partir de queratinócitos, células de Langerhans, células T, células B, células B, mastócitos, células endoteliais, células de miofibroblastos e células de fibroblastos primários. Em algumas modalidades, o imunoconjugado CpG-Ab que se liga especificamente a um antígeno

associado a uma célula que expressa TLR não tem como alvo uma célula anormal. Em algumas modalidades, o imunocombinado CpG-Ab que se liga especificamente a um antígeno associado a uma célula que expressa TLR não se liga a um antígeno associado a uma célula anormal. Em algumas modalidades, o imunocombinado CpG-Ab que se liga especificamente a um antígeno associado a uma célula que expressa TLR não se liga ao antígeno associado ao tumor do câncer que está sendo tratado com o método aqui fornecido.

[00585] Em algumas modalidades, o imunocombinado CpG-Ab se liga especificamente a um antígeno associado ao tumor do câncer que está sendo tratado pelo presente método. Exemplos de antígenos associados a tumores (TAAs) que podem ser direcionados pelo imunocombinado CpG-Ab da presente divulgação incluem, mas não estão limitados a, sequências compreendendo todas ou parte das sequências de EGFR, EGFRvIII, gp100 ou Pmel17, HER2/neu, mesotelina, CEA, MART-1/Melan-A, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MUC-1, GPNMB, HMW-MAA, TIM1, ROR1, CD19, gp100, Dipeptidil peptidase IV (DPPIV), proteína de ligação à adenosina deaminase (ADAbp), ciclofilina b, antígeno colorretal (CRC) - C017-1A/GA733, antígeno carcinoembrionário (CEA) e seus epítomos imunogênicos CAP-1 e CAP-2, etv6, aml1, Antígeno Prostático Específico (PSA) e seus epítomos imunogênicos PSA-1, PSA-2 e PSA-3, antígeno de membrana específico da próstata (PSMA), receptor de células T/cadeia CD3-zeta, família MAGE de antígenos tumorais (por exemplo, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, MAGE -Xp2 (MAGE-B2), MAGE-Xp3 (MAGE-B3), MAGE-Xp4 (MAGE-B4), MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE E-C4, MAGE-05), família GAGE de antígenos tumorais (por exemplo, GAGE-1, GAGE-

2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, GAGE-8, GAGE-9), BAGE, RAGE, LAGE-1, NAG, GnT-V, MUM-1, CDK4, tirosinase, p53, família MUC (por exemplo, MUC1, MUC16, etc; ver por exemplo Pat. No. 6.054.438; WO98/04727; ou WO98/37095), p21ras, RCAS1, alfa-fetoproteína, E-caderina, alfa-catenina, beta-catenina e gama-catenina, p120ctn, PRAME, NY-ESO-1, cdc27, proteína adenomatosa da polipose coli (APC), fodrin, Connexin 37, idiotipo Ig, p15, gp75, gangliosídeos GM2 e GD2, família Smad de antígenos tumorais glicogênio fosforilase cerebral, SSX-1, SSX-2 (HOM-MEL-40), SSX-1, SSX-4, SSX-5, SCP-1 e CT-7 e c-erbB-2 e antígenos virais, como os antígenos HPV-16 e HPV-18 E6 e E7 e o antígeno nuclear codificado por EBV (EBNA) -1, bem como marcadores (beta-galactosidase, luciferase..), β hCG, WT1, TRP-2, NY-BR-1, NY-CO-58, MN (gp250), telomerase e antígenos tumorais derivados de células germinativas. Os antígenos associados ao tumor também incluem os antígenos do grupo sanguíneo, por exemplo, antígenos Lea, Leb, LeX, LeY, H-2, B-1, B-2. O antígeno associado ao tumor pode ser identificado usando métodos conhecidos na técnica, tais como divulgados em *Zhang et al. Supra*.

[00586] Particularmente, em algumas modalidades, o imunoconjugado CpG-Ab se liga especificamente a um antígeno associado a um tumor selecionado a partir de CD19, CD20, CD22, CD25, CD30, CD33, CD38, CD40, CD44, CD45R (B220), CD49, CD52, CD56, CD70, CD74, CD79a, CD79b, CD93, CD123, CD138, CD163, CD205, CD206, CD274, CD303 e CD304, receptor de folato alfa, receptor de folato beta, mesotelina, PSMA, Her-2, EGFR, receptor de transferrina, integrina, cripto, EphA2, AGS-5, AGS-16, CanAg, EpCAM, receptor IL4, receptor IL2, Lewis Y, GPNMB.

[00587] Em outras modalidades, o imunoconjugado CpG-Ab não se liga a um antígeno associado a um tumor selecionado de CD19, CD20, CD22, portina 7, Her2, Src, EGFR, CD52, CXCR-4, Muc-1 e DNA.

[00588] Em algumas modalidades, o antígeno associado ao tumor está associado a uma ou mais células imunológicas normais. Em algumas modalidades, o antígeno associado ao tumor também está associado a uma ou mais células que expressam TLR. Em modalidades particulares, o antígeno associado ao tumor é uma proteína codificada e expressa por uma célula imune normal. Em modalidades particulares, a célula imune normal foi artificialmente manipulada para conter ou expressar o antígeno associado ao tumor. Em modalidades particulares, o antígeno associado ao tumor é um antígeno exógeno retomado e processado por um APC. Em modalidades particulares, o câncer é um câncer de células imunes, e o CpG-Ab imunoconjuga alvos de células imunes cancerígenas e células imunes normais por ligação específica ao antígeno associado ao tumor. Em modalidades particulares, o câncer é linfoma ou leucemia. Em modalidades particulares, o câncer é linfoma de células B.

[00589] Em algumas modalidades dos métodos de tratamento de câncer, como descrito aqui, o câncer sendo tratado com os métodos aqui divulgados é um tumor sólido. Em algumas modalidades, o câncer sendo tratado com os métodos aqui divulgados é um tumor líquido. Em modalidades particulares, o câncer sendo tratado com os métodos aqui divulgados é um linfoma ou uma leucemia. Em modalidades particulares, o câncer sendo tratado com os métodos aqui divulgados é selecionado da lista que consiste em linfoma de células do manto (MCL), linfoma difuso de grandes células B (DLBCL), linfoma de Burkitts, melanoma múltiplo (MM), leucemia

linfocítica crônica (LLC), leucemia mieloide aguda (LMA), linfoma linfocítico pequeno (LLL), leucemia de células ciliadas (HCL), linfoma linfoplasmocítico (LPL), linfoma do músculo esquelético (LME), linfoma da zona marginal esplênica (LME), linfoma da zona marginal esplênica (LME), linfoma do centro folicular (FCL)), câncer colorretal, câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC), câncer de cabeça e pescoço, câncer de mama, câncer de pâncreas, glioblastoma (GBM), câncer de próstata, câncer de esôfago, carcinoma de células renais, carcinoma hepático, câncer de bexiga e carcinoma gástrico.

[00590] Em algumas modalidades, o câncer sendo tratado com os métodos aqui divulgados é resistente a pelo menos uma imunoterapia. Em algumas modalidades, o método de tratamento de câncer compreende a co-administração a um sujeito com câncer (i) uma quantidade terapêutica eficaz do polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG ou do imunoconjugado CpG-Ab; e (ii) o agente imunoterapêutico ao qual o câncer a ser tratado demonstrou resistir ou não responder, quando o câncer é tratado apenas com o agente imunoterapêutico.

[00591] Em modalidades particulares, o câncer sendo tratado com os métodos aqui fornecidos demonstrou não responder a um tratamento com um modulador de ponto de verificação imune. Em modalidades particulares, o modulador do ponto de verificação imune é um inibidor da PD-1. Em modalidades particulares, o modulador do ponto de verificação imune é um inibidor de PD-L1. Em algumas modalidades, o método de tratamento de câncer compreende a co-administração a um sujeito com câncer (i) uma quantidade terapêutica eficaz do polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG ou do imunoconjugado CpG-Ab; e

(ii) uma quantidade eficaz terapêutica do inibidor de PD-1. Em algumas modalidades, o método de tratamento de câncer compreende a co-administração a um sujeito com câncer (i) uma quantidade terapêutica eficaz do polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG ou do imunoconjugado CpG-Ab; e (ii) uma quantidade eficaz terapêutica do inibidor de PD-L1. Em particular, em algumas modalidades, o inibidor de PD-1 é um anticorpo anti-PD-1 ou um seu fragmento de ligação ao antígeno. Em algumas modalidades, o inibidor de PD-L1 é um anticorpo anti-PD-L1 ou um seu fragmento de ligação ao antígeno.

[00592] Em certos aspectos, são fornecidos neste documento métodos de prevenção de câncer em um sujeito suscetível de desenvolver câncer, compreendendo a administração ao sujeito de uma quantidade terapêutica eficaz de um agonista de TLR, como aqui descrito. Em algumas modalidades, o método compreende a administração ao sujeito de uma quantidade terapêutica eficaz de um polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG ou um imunoconjugado CpG-Ab aqui descrito. Em modalidades particulares, o imunoconjugado CpG-Ab tem como alvo uma célula imune normal, como aqui descrito. Em modalidades particulares, o imunoconjugado CpG-Ab tem como alvo uma célula que expressa TLR como aqui descrito. Em modalidades particulares, o imunoconjugado CpG-Ab se liga especificamente a um antígeno associado a uma célula imune normal, como aqui descrito. Em modalidades particulares, o imunoconjugado CpG-Ab se liga especificamente a um antígeno associado a uma célula imune normal não se liga a um antígeno associado ao tumor do câncer que está sendo prevenido. Em modalidades particulares, o imunoconjugado CpG-Ab se liga especificamente a um antígeno associado a uma

célula que expressa TLR, como aqui descrito. Em modalidades particulares, o imunocjugado CpG-Ab se liga especificamente a um antígeno associado a uma célula que expressa TLR não se liga a um antígeno associado ao tumor do câncer que está sendo prevenido. Em modalidades particulares, o imunocjugado CpG-Ab se liga especificamente a um antígeno associado ao tumor do câncer, sendo impedido como aqui descrito. Em modalidades particulares, um antígeno associado ao tumor do câncer que está sendo prevenido também está associado a uma célula imune normal ou a uma célula que expressa TLR. Em modalidades particulares, o imunocjugado CpG-Ab não se liga especificamente a um antígeno selecionado de CD19, CD20, CD22, STAT3, exportina 7, Her2, Src, EGFR, CD52, CXCR-4, Muc-1 e DNA.

[00593] Em algumas modalidades, os métodos de prevenção de câncer compreendem ainda a administração a um sujeito suscetível ao desenvolvimento de câncer (i) uma quantidade terapêutica eficaz de um imunocjugado CpG-Ab e (ii) um antígeno associado ao tumor do câncer sendo prevenido. Em algumas modalidades, o antígeno associado ao tumor não é conjugado ao imunocjugado CpG-Ab. Em modalidades particulares, o antígeno associado ao tumor é formulado como uma vacina contra o câncer. Em modalidades particulares, o imunocjugado CpG-Ab é formulado como um adjuvante da vacina contra o câncer.

[00594] Em algumas modalidades, o câncer sendo prevenido ou tratado usando os métodos aqui fornecidos é um episódio de recorrência do câncer em um sujeito que está em remissão parcial ou completa de um câncer anterior. Em modalidades particulares, o câncer anterior é um câncer líquido e o câncer recorrente sendo prevenido ou tratado é um câncer líquido. Em modalidades

particulares, o câncer anterior é um câncer sólido e o câncer recorrente sendo prevenido ou tratado é um câncer sólido. Em modalidades particulares, o câncer anterior é um câncer líquido e o câncer recorrente sendo prevenido ou tratado é um câncer sólido. Em modalidades particulares, o câncer anterior é um câncer sólido e o câncer recorrente sendo prevenido ou tratado é um câncer líquido.

[00595] Em algumas modalidades, o câncer sendo prevenido ou tratado usando os métodos aqui fornecidos é o primeiro episódio de recorrência do câncer no sujeito depois que o sujeito mostrou remissão parcial ou completa. Em algumas modalidades, o câncer que está sendo prevenido ou tratado usando os métodos aqui fornecidos é o segundo episódio de recorrência do câncer no sujeito depois que o sujeito mostrou remissão parcial ou completa. Em algumas modalidades, o câncer que está sendo prevenido ou tratado usando os métodos aqui fornecidos é o terceiro episódio de recorrência do câncer no sujeito depois que o sujeito mostrou remissão parcial ou completa. Em algumas modalidades, o câncer que está sendo prevenido ou tratado usando os métodos aqui fornecidos é um episódio de recorrência de câncer subsequente ao terceiro episódio de recorrência de câncer no sujeito depois que o sujeito mostrou remissão parcial ou completa.

[00596] Em certos aspectos, são aqui fornecidos métodos para induzir uma resposta imune adaptativa em um sujeito em necessidade do mesmo, em que o método compreende administrar ao sujeito uma quantidade terapêutica eficaz de um agonista de TLR, como aqui descrito. Em modalidades particulares, o método de indução de uma resposta imune adaptativa compreende a

administração ao sujeito em necessidade de uma quantidade terapêutica eficaz de um polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG ou um imunoconjugado CpG-Ab aqui descrito. Em modalidades particulares, o imunoconjugado CpG-Ab tem como alvo uma célula imune normal, como aqui descrito. Em modalidades particulares, o imunoconjugado CpG-Ab tem como alvo uma célula que expressa TLR como aqui descrito. Em modalidades particulares, o imunoconjugado CpG-Ab tem como alvo uma célula doente selecionada a partir de uma célula cancerígena ou de uma célula infectada por patógeno. Em modalidades particulares, o imunoconjugado CpG-Ab se liga especificamente a um antígeno associado a uma célula imune normal, como aqui descrito. Em modalidades particulares, o imunoconjugado CpG-Ab se liga especificamente a um antígeno associado a uma célula imune normal não se liga a um antígeno da doença. Em modalidades particulares, o imunoconjugado CpG-Ab se liga especificamente a um antígeno associado a uma célula que expressa TLR, como aqui descrito. Em modalidades particulares, o imunoconjugado CpG-Ab se liga especificamente a um antígeno associado a uma célula que expressa TLR não se liga a um antígeno da doença. Em modalidades particulares, o imunoconjugado CpG-Ab se liga especificamente a um antígeno da doença como descrito aqui. Em modalidades particulares, o antígeno doente também está associado a uma célula imune normal ou a uma célula que expressa TLR. Em modalidades particulares, o antígeno doente é um antígeno associado a um tumor ou um antígeno patogênico. Em modalidades particulares, o imunoconjugado CpG-Ab não se liga especificamente a um antígeno selecionado de CD19, CD20, CD22, STAT3, exportina 7, Her2, Src, EGFR, CD52, CXCR-4, Muc-1 e DNA.

[00597] Em algumas modalidades dos métodos e usos aqui descritos, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG é administrado a um sujeito em necessidade do mesmo em uma dosagem que é suficiente para ativar a via de sinalização mediada por TLR9 no sujeito. Em algumas modalidades, o imunoconjugado CpG-Ab é administrado a um sujeito em necessidade do mesmo em uma dosagem que é suficiente para ativar a via de sinalização mediada por TLR9 em uma população de células alvo do imunoconjugado CpG-Ab. Como descrito aqui, em algumas modalidades, a população de células alvo do imunoconjugado CpG-Ab expressa TLR9. Em algumas modalidades, a população de células alvo do imunoconjugado CpG-Ab pode expressar o TLR9 na superfície celular da célula alvo, na membrana endossômica da célula alvo ou na superfície celular e na membrana endossômica da célula alvo.

[00598] Particularmente, em algumas modalidades dos métodos e usos aqui descritos, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG é administrado a um sujeito em necessidade do mesmo em uma dosagem que é eficaz para induzir um ou mais dos efeitos selecionados a partir de (a) ligação específica a um receptor TLR9 pelo polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG em uma célula alvo; (b) internalização eficiente do imunoconjugado CpG-Ab ou da sua porção polinucleotídica imunoestimulante contendo CpG por uma célula alvo; (c) ativar uma ou mais vias de sinalização na célula alvo; (d) induzir a secreção de uma ou mais citocinas inflamatórias pela célula alvo; (e) suprimir a secreção de uma ou mais citocinas inflamatórias pela célula alvo; (f) expressão positiva de um ou mais genes da célula alvo; (g) suprimir a expressão de um ou mais genes da célula alvo; (h) ativar células imunológicas normais direcionadas e (i) induzir

a apoptose de uma célula cancerígena direcionada, (j) induzir necrose da célula cancerígena direcionada.

[00599] Particularmente, em algumas modalidades dos métodos e usos aqui descritos, em que após a administração do imunoconjugado CpG-Ab, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG se liga especificamente a um receptor TLR9 da célula alvo. Particularmente, em algumas modalidades, a ligação do imunoconjugado CpG-Ab a um antígeno associado a uma célula alvo facilita a ligação específica do polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG a um receptor TLR9. Em algumas modalidades, o antígeno alvo do imunoconjugado CpG-Ab está localizado próximo ao receptor TLR9. Em modalidades particulares, o antígeno alvo e o receptor TLR9 localizam-se na membrana celular da célula alvo. Em modalidades particulares, o antígeno alvo e o receptor TLR9 localizam-se em uma membrana intracelular da célula alvo. Em modalidades particulares, o antígeno alvo e o receptor TLR9 localizam-se na membrana endossômica ou fagossômica da célula alvo. Em algumas modalidades, o antígeno alvo localiza-se na membrana celular e facilita a internalização do imunoconjugado CpG-Ab no citosol após a ligação ao imunoconjugado CpG-Ab.

[00600] Particularmente, em algumas modalidades dos métodos e usos aqui descritos, o método compreende a administração a um sujeito em necessidade de uma quantidade terapêutica eficaz de um imunoconjugado CpG-Ab visando uma célula imune normal, em que após a administração do CpG-Ab imunoconjugado, uma ou mais vias de sinalização imunogênica na célula alvo são ativadas. Em modalidades particulares, as vias de sinalização ativadas são uma ou mais selecionadas da via de sinalização fator nuclear

(NF) - κ B, a via de sinalização c-Jun N-terminal kinase (JNK), a via de sinalização AP1, a via de sinalização AP1, a via IRF3/7, e a via de sinalização da proteína cinase ativada por mitogênio p38 (MAPK). A ativação de uma via de sinalização celular pode ser detectada usando métodos conhecidos na técnica, como, sem limitação, a detecção da presença de um marcador molecular cuja expressão é especificamente induzida após a ativação da via de sinalização de interesse.

[00601] Particularmente, em algumas modalidades dos métodos e usos aqui descritos, o método compreende administrar a um sujeito em necessidade uma quantidade terapêutica eficaz de um imunocombinado de CpG-Ab visando uma célula imune normal, em que após a administração do CpG-Ab imunocombinado, a secreção de uma ou mais citocinas inflamatórias é induzida. Em modalidades particulares, as uma ou mais citocinas inflamatórias são selecionadas a partir de interferon do tipo I (IFN), interleucina (IL) -6, IL10, IL-12, IL-18 e fator de necrose tumoral (TNF).

[00602] Particularmente, em algumas modalidades dos métodos e usos aqui descritos, o método compreende a administração a um sujeito em necessidade de uma quantidade terapêutica eficaz de um imunocombinado CpG-Ab visando uma célula imune normal, em que após a administração do CpG-Ab imunocombinado, a expressão de uma ou mais proteínas adicionais é aumentada. Em modalidades particulares, as proteínas reguladas positivamente são uma ou mais selecionadas de moléculas apresentadoras de antígeno (por exemplo, MHC classe I e II), receptores de citocinas (por exemplo, receptores de IL-6, receptores de IL-10, receptores de IL-12, receptores de IL-12, receptor de TNF- α , Receptor TNF- β , receptor IFN- α , receptor IFN- β , IFN- γ), receptores de

quimiocinas (por exemplo, receptor de quimiocinas 7), moléculas co-estimulatórias de células T (por exemplo, CD3, CD28, CD27, CD30, CD40, CD80/B7-1, CD86/B7-2, CD134/OX-40, OX-40L, CD137/4-1BB, 4-1BBL, CD278/ICOS, B7-H3, B7h/B7RP-1, LIGHT etc.) e Proteínas reguladoras da maturação de células T (por exemplo, indoleamina 2,3-dioxigenase).

[00603] Particularmente, em algumas modalidades dos métodos e usos aqui descritos, o método compreende administrar a um sujeito em necessidade uma quantidade terapêutica eficaz de um imunocjugado de CpG-Ab visando uma célula imune normal, em que após a administração do CpG-Ab imunocjugado, proliferação, diferenciação, maturação e/ou sobrevivência de uma ou mais populações de células imunes normais são aumentadas. Em modalidades particulares, a uma ou mais populações aumentadas de células imunes normais são selecionadas a partir de células T CD4 +, células T CD8 +, células assassinas naturais, células auxiliares T, células B e APCs (incluindo mDCs). em algumas modalidades dos métodos e usos aqui descritos, o método compreende a administração a um sujeito em necessidade de uma quantidade terapêutica eficaz de um imunocjugado CpG-Ab visando uma célula imune normal, em que após a administração do imunocjugado CpG-Ab, proliferação, diferenciação, a maturação e/ou a sobrevivência de uma ou mais populações de células imunológicas normais são reduzidas. Em modalidades particulares, a uma ou mais populações reduzidas de células imunes normais é selecionada a partir de células B-reg e células T-reg.

[00604] Em modalidades particulares, após a administração do imunocjugado CpG-Ab, as atividades de apresentação de antígeno são aumentadas nas APCs no sujeito. Em algumas modalidades, o

APC é selecionado a partir de células B, monócitos, células dendríticas e células de Langerhans, queratinócitos, células endoteliais, astrócitos, fibroblastos e oligodendrócitos. Em modalidades particulares, o APC são células B. Em modalidades particulares, o APC são células dendríticas. Em modalidades particulares, o APC é macrófago. Em algumas modalidades, a célula dendrítica é pDC. Em modalidades particulares, as atividades de apresentação de antígeno aumentadas levam a uma apresentação mais eficiente de um antígeno associado ao tumor pelas APCs ativadas.

[00605] Em modalidades particulares, após a administração do imunocombinado CpG-Ab, a imunidade mediada por células T CD4 + específica para antígeno contra um ou mais antígenos associados ao tumor do câncer que está sendo tratado ou prevenido é aumentada. Em modalidades particulares, após a administração do imunocombinado CpG-Ab, a infiltração de tumor pela célula T CD4 + é aumentada. Em modalidades particulares, após a administração do imunocombinado CpG-Ab, a imunidade mediada por células T CD8 + específica do antígeno contra um ou mais antígenos associados ao tumor do câncer que está sendo tratado ou prevenido é aumentada. Em modalidades particulares, após a administração do imunocombinado CpG-Ab, a infiltração de tumor pela célula T CD8 + é aumentada. Em modalidades particulares, após a administração do imunocombinado CpG-Ab, aumenta a secreção de células B de imunoglobulina especificamente contra um ou mais antígeno associado ao tumor do câncer que está sendo tratado ou prevenido.

[00606] Particularmente, em algumas modalidades dos métodos e usos aqui descritos, o método compreende a administração a um sujeito em necessidade, de uma quantidade terapêutica eficaz de

um imunocjugado de CpG-Ab visando uma célula doente, em que após a administração do CpG-Ab imunocjugado, uma ou mais vias de sinalização apoptótica são induzidas apoptose desencadeadora da célula doente alvo. Em algumas modalidades, a célula doente é uma célula cancerígena.

[00607] Em algumas modalidades dos métodos e usos aqui descritos, o imunocjugado CpG-Ab é administrado a um sujeito em necessidade do mesmo em uma quantidade que não é eficaz para ativar o sistema de complemento no sujeito. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG é administrado a um sujeito em necessidade do mesmo em uma quantidade que não é eficaz para ativar o complemento C1 no sujeito. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG é administrado a um sujeito em necessidade do mesmo em uma quantidade que não é eficaz para ativar o complemento C3 no sujeito. A ativação do complemento pode ser detectada usando métodos conhecidos na técnica. Em algumas modalidades, o imunocjugado CpG-Ab é administrado a um indivíduo em necessidade do mesmo em uma quantidade que não é eficaz para a porção de anticorpo do imunocjugado CpG-Ab para induzir citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo no sujeito.

[00608] Como aqui descrito, agentes terapêuticos, conjugados ou composições compreendendo os polinucleotídeos contendo CpG podem ser usados em combinação com pelo menos um agente terapêutico adicional para prevenir ou tratar o câncer. Em algumas modalidades, essa terapia de combinação exibe um efeito terapêutico sinérgico que é melhor que o efeito separado de qualquer agente terapêutico isoladamente. Em algumas

modalidades, essas terapias combinadas exibem um efeito terapêutico sinérgico que é melhor do que a soma dos efeitos separados dos agentes terapêuticos isoladamente.

[00609] Por conseguinte, em certos aspectos, são aqui fornecidos métodos para prevenir ou tratar o câncer usando o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG em combinação com pelo menos um agente terapêutico contra o câncer adicional. Tais métodos compreendem a administração a um indivíduo em necessidade do mesmo (i) uma quantidade terapêuticamente eficaz do polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG e (ii) uma quantidade terapêuticamente eficaz de pelo menos um agente terapêutico contra o câncer adicional. Em modalidades particulares, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG é administrado como um polinucleotídeo independente. Em modalidades particulares, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG é administrado como um imunocombinado CpG-Ab. Em modalidades particulares, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG e os agentes terapêuticos adicionais são formulados na mesma composição. Em outras modalidades, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG e os agentes terapêuticos adicionais são formulados nas composições separadas.

[00610] Em algumas modalidades, o pelo menos um agente terapêutico de câncer adicional é selecionado a partir de agonistas de células T, moduladores de pontos de verificação imunes, agonistas de STING, agonistas de RIG-I, outros agonistas de receptores do tipo Toll.

[00611] Em algumas modalidades, o agente terapêutico contra o câncer adicional é uma molécula co-estimulatória de células T. Em algumas modalidades, a molécula co-estimulatória de célula T

é selecionada entre OX40, CD2, CD27, CDS, ICAM-1, LFA-1/CD11a/CD18, ICOS/CD278, 4-1BB/CD137, GITR, CD30, CD40, BAFR, HVEM, CD7, LIGHT, NKG2C, SLAMF7, NKp80, CD160, B7-H3 e CD83, ou um ligante do mesmo. Em algumas modalidades, um ligante de uma molécula co-estimulatória é um anticorpo que se liga especificamente à molécula co-estimulatória. Em modalidades particulares, o agente terapêutico contra o câncer adicional é selecionado a partir de um anticorpo anti-OX40, um anticorpo anti-OX40L, um anticorpo anti-ICOS, um anticorpo anti-CTLA4, um anticorpo anti-CD40L, um anticorpo anti-CD28, um anti-LFA1, um anticorpo anti-TIM1/TIM3, um anticorpo anti-PD1, um anticorpo anti-PDL1, um anticorpo anti-CD27 e um anticorpo anti-4-1BB.

[00612] Em algumas modalidades, o agente terapêutico do câncer adicional é um antígeno associado ao tumor produzido pelo câncer que está sendo prevenido ou tratado com o método. Em algumas modalidades, o câncer que está sendo prevenido ou tratado é leucemia, linfoma, melanoma, colorretal, mama, próstata, rim, pancreático, cabeça e pescoço, pele e câncer de cérebro, câncer de pulmão e o antígeno associado ao tumor é selecionado a partir de CD19, CD20, CD22, CD38, CD138, CD30, CD52, CD56, CD79, CD123, CD206, CD303, CD304, EGFR, receptor alfa de folato, receptor alfa de folato, receptor beta de folato, mesotelina, Her2, receptor de transferrina e PSMA. Em algumas modalidades, o agente terapêutico do câncer adicional é um modulador de ponto de verificação imune selecionado a partir de inibidores de PD-1, PD-L1, PD-L2, TIM-3, LAG-3, CEACAM-1, CEACAM-5, CLTA-4, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD47, CD160, 2B4, CD172a e TGFR. Em modalidades particulares, o agente terapêutico do câncer adicional é um inibidor de PD-1. Em modalidades particulares, o

agente terapêutico do câncer adicional é um inibidor de PD-L1. Em modalidades particulares, o agente terapêutico do câncer adicional é um inibidor de CD47. Em algumas modalidades, o agente terapêutico do câncer adicional é um anticorpo que se liga especificamente ao modulador do ponto de verificação imune. Em algumas modalidades, em modalidades particulares, o agente terapêutico contra o câncer adicional é um anticorpo anti-PD-1 ou um seu fragmento de ligação ao antígeno. Em modalidades particulares, o agente terapêutico contra o câncer adicional é um anticorpo anti-PD-L1 ou um seu fragmento de ligação ao antígeno. Em modalidades particulares, o agente terapêutico contra o câncer adicional é um anticorpo anti-CD47 ou um seu fragmento de ligação ao antígeno. Em modalidades particulares, o agente terapêutico de câncer adicional é um anticorpo anti-CD172a ou um fragmento de ligação a antígeno. Em modalidades particulares, o agente terapêutico de câncer adicional é um anticorpo anti-OX40 ou um fragmento de ligação a antígeno. o agente terapêutico do câncer é um anticorpo anti-TIM3 ou um seu fragmento de ligação ao antígeno. Em modalidades particulares, o agente terapêutico do câncer é um anticorpo anti-LAG3 ou um seu fragmento de ligação ao antígeno. Anticorpos anti-PD-1 e anti-PD-L1 e seus usos são descritos em, por exemplo, US20180030137, US9815898, US20170313776, US20170313774, US20170267762, WO2017019846, WO2018013017, US20180022809, US20180002423, WO201720002099, WO201720002099, WO201720002099, WO20172202035. Os anticorpos anti-CD47 e seus usos são descritos em, por exemplo, US9663575, US9803016, US20170283498, US20170369572, WO2017215585, WO2017196793 e WO2017049251.

[00613] Em algumas modalidades, o agente terapêutico contra o câncer adicional é um agonista da via STING. STING (estimulador de genes de interferon, também conhecido como TMEM173, MITA, ERIS e MPYS) é uma proteína transmembranar localizada no ER que sofre uma alteração conformacional em resposta à ligação direta de dinucleotídeos cíclicos (CDNs), resultando em uma cascata de sinalização a jusante envolvendo ativação de TBK1, fosforilação de IRF-3 e produção de IFN- β e outras citocinas. A via STING em células apresentadoras de antígeno hospedeiro residente em tumor está envolvida na indução de uma resposta espontânea de células T CD8 + contra antígenos associados a tumores. A ativação dessa via e a subsequente produção de IFN- β também contribuem para o efeito antitumoral. Em algumas modalidades, o agonista da via STING é ADU-S100. Os agonistas de STING adicionais e seus usos são descritos, por exemplo, nos documentos US20180028553, US20170319680, US20170298139, US20060040887, US20080286296, US20120041057, US20140205653, WO2014179335, WO 2014179760, US20150056224, WO2016096174, WO2017011444, WO2017027645, e WO2017027646.

[00614] Em algumas modalidades, o agente terapêutico do câncer adicional é um agonista da via RIG-I. O RIG-I (gene I indutível pelo ácido retinóico) é um membro dos receptores de reconhecimento de padrões que inicia o sistema imunológico inato de um hospedeiro para se defender contra micróbios patogênicos nas fases iniciais da infecção. Existem três membros da família de receptores do tipo (RIG-I): RIG-I, MDA5 (fator de diferenciação de melanoma 5) e LGP2 (laboratório de genética e fisiologia 2), que são expressos na maioria dos tipos de células e tecidos. O RIG-I funciona como um sensor citoplasmático para

o reconhecimento de uma variedade de vírus de RNA e a subsequente ativação da sinalização a jusante para direcionar a produção de IFN tipo I e expressões de genes antivirais. O RIG-I ativado recruta sua molécula adaptadora a jusante MAVS (também conhecida como IPS-1, CARDIF e VISA) por meio de interações mediadas por CARD-CARD. O conjunto oligomérico RIG-I CARD e a formação polimérica do MAVS, juntos, servem como uma plataforma de sinalização para complexos de proteínas que mediam a bifurcação da sinalização em dois ramos. Um ramo recruta fatores associados ao receptor do fator de necrose tumoral (TRAF) -2/6 e a proteína 1 que interage com o receptor para ativar subsequentemente o complexo IKK, resultando na ativação do NF-κB. O outro ramo sinaliza através do TRAF3 e ativa o complexo TANK/IKKγ/IKKε/TBK1, levando à fosforilação e dimerização dos fatores reguladores do interferon (IRF) -3 e -7 Liu et al., *Front Immunol.* 2017, 7: 662. A ativação dessa via contribui para o efeito antitumoral. Em algumas modalidades, o agonista da via RIG-I é RGT100. Os agonistas de RIG-I e seus usos são descritos em, por exemplo, US20170057978, US20170258897, US9381208, US9738680, US9650427, WO2017173427 e WO2017011622.

[00615] Em algumas modalidades, o agente terapêutico do câncer adicional é um agonista de receptor do tipo Toll selecionado entre agonista de TLR1, agonista de TLR2, agonista de TLR3, agonista de TLR4, agonista de TLR5, agonista de TLR6, agonista de TLR7, agonista de TLR8 e agonista de TLR10.

[00616] Em outras modalidades, em relação a um método de tratamento de câncer, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG é administrado (na forma autônoma ou como um imunocombinado CpG-Ab) em combinação com um ou mais agentes

terapêuticos ou procedimentos, por exemplo, em que o agente ou procedimento terapêutico adicional é selecionado a partir do grupo que consiste em quimioterapia, uma terapia anticâncer direcionada, um medicamento oncolítico, um agente citotóxico, uma terapia imunológica, uma citocina, procedimento cirúrgico, um procedimento de radiação, um ativador de uma molécula coestimulatória, um inibidor de uma molécula inibidora, uma vacina, uma imunoterapia celular e uma terapia com vírus oncolíticos.

[00617] Como fornecido neste documento, o polinucleotídeo contendo CpG (na forma autônoma ou como um conjugado CpG-Ab) pode ser administrado, por exemplo, por administração não parenteral ou parenteral. A administração parentérica pode incluir vias de administração intramuscular, intravenosa, intraarterial, intracraniana, subcutânea, intraorbital, intraventricular, intraespinal, intratecal, intraperitoneal, retal e tópica. A via tópica de administração pode incluir vias de administração transdérmica, intradérmica, bucal e sublingual. As composições farmacêuticas são formuladas de acordo com a via de administração selecionada. A administração parenteral pode ser por infusão contínua durante um período de tempo selecionado. Em modalidades particulares, a administração é subcutânea, intramuscular, intradérmica, mucosa, vaginal, cervical, peritumoral, intra-tumoral ou diretamente no(s) linfonodo(s) de drenagem do tumor. Os polinucleotídeos e/ou conjugados são desejavelmente administrados com um veículo farmacêuticamente aceitável. As formulações farmacêuticas dos polinucleotídeos e/ou conjugados aqui descritos, formuladas para o tratamento dos

distúrbios aqui descritos, também fazem parte da presente invenção.

[00618] A quantidade de dosagem real do polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG (tanto na forma autônoma quanto em conjugado de CpG-Ab) administrada a um sujeito pode ser determinada por fatores físicos e fisiológicos, como peso corporal, gravidade da condição, o tipo de doença a ser tratada, intervenções terapêuticas anteriores ou concomitantes, idiopatia do paciente e via de administração. A quantidade de dosagem real do polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG (na forma autônoma ou como um conjugado CpG-Ab) pode ser administrada em uma dose única ou em uma série de doses sequenciais. Dependendo da dosagem e da via de administração, o número de administrações de uma dosagem preferida e/ou uma quantidade eficaz pode variar de acordo com a resposta do sujeito. O profissional responsável pela administração determinará, em qualquer caso, a concentração de ingrediente(s) ativo(s) em uma composição, dose(s) apropriada(s) e esquema(s) para o indivíduo.

[00619] Em certas modalidades, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG é administrado em uma forma autônoma em uma dosagem que varia de 0,01 miligrama/kg de peso corporal a 1000 miligrama/kg de peso corporal, incluindo os pontos finais. Em outros exemplos não limitativos, uma dose também pode compreender de cerca de 0,01 miligrama/kg de peso corporal a cerca de 0,05 miligrama/kg de peso corporal. Em outros exemplos não limitativos, uma dose também pode compreender de cerca de 0,01 miligramas/kg de peso corporal, cerca de 0,05 miligramas/kg de peso corporal, cerca de 0,1 miligramas/kg de peso corporal, cerca de 0,2 miligramas/kg de peso corporal, cerca

de 0,3 miligramas/kg de peso corporal, cerca de 0,4 miligrama/kg de peso corporal, cerca de 0,5 miligramas/kg de peso corporal, cerca de 0,6 miligramas/kg de peso corporal, cerca de 0,7 miligramas/kg de peso corporal, cerca de 0,8 miligramas/kg de peso corporal, cerca de 0,9 miligramas/kg de peso corporal, cerca de 0,9 miligramas/kg de peso corporal, cerca de 1 miligrama/kg de peso corporal, cerca de 1 miligrama/kg de peso corporal, cerca de 2 miligramas/kg de peso corporal, cerca de 3 miligramas/kg de peso corporal, cerca de 4 miligramas/kg de peso corporal, cerca de 5 miligramas/kg de peso corporal, cerca de 6 miligramas/kg de peso corporal, cerca de 7 miligramas/kg de peso corporal, cerca de 8 miligramas/kg de peso corporal, cerca de 9 miligramas/kg de peso corporal, cerca de 10 miligramas/kg de peso corporal, cerca de 20 miligramas/kg de peso corporal, cerca de 30 miligramas/kg de peso corporal, cerca de 40 miligramas/kg de peso corporal, cerca de 50 miligramas/kg de peso corporal, cerca de 60 miligramas/kg de peso corporal, cerca de 70 miligramas/kg de peso corporal, cerca de 80 miligramas/kg de peso corporal, cerca de 90 miligramas/kg de peso corporal, cerca de 100 miligramas/kg de peso corporal, cerca de 200 miligramas/kg de peso corporal, cerca de 300 miligramas/kg de peso corporal, cerca de 400 miligramas/kg de peso corporal, cerca de 500 miligramas/kg de peso corporal, cerca de 500 miligramas/kg de peso corporal, cerca de 500 miligramas/kg de peso corporal, cerca de 700 miligramas/kg de peso corporal, cerca de 800 miligramas/kg de peso corporal, cerca de 900 miligramas/kg de peso corporal, cerca de 1000 miligramas/kg de peso corporal, ou mais por administração, e qualquer faixa nele derivada.

[00620] Em certas modalidades, o imunoconjugado CpG-Ab é administrado em uma dosagem que varia de cerca de 1 micrograma/kg de peso corporal a cerca de 500 miligramas/kg de peso corporal, incluindo os pontos finais. Em outros exemplos não limitativos, uma dose também pode compreender entre cerca de 1 micrograma kg de peso corporal, cerca de 5 microgramas/kg de peso corporal, cerca de 10 microgramas/kg de peso corporal, cerca de 50 microgramas/kg de peso corporal, cerca de 100 microgramas/kg de corpo peso, cerca de 200 microgramas/kg de peso corporal, cerca de 350 microgramas/kg de peso corporal, cerca de 500 microgramas/kg de peso corporal, cerca de 1 miligrama/kg de peso corporal, cerca de 5 miligramas/kg de peso corporal, cerca de 10 miligramas/kg de peso corporal, cerca de 10 miligramas/kg de peso corporal, cerca de 50 miligramas/kg de peso corporal, cerca de 100 miligramas/kg de peso corporal, cerca de 200 miligramas/kg de peso corporal, cerca de 350 miligramas/kg de peso corporal, cerca de 500 miligramas/kg de peso corporal, cerca de 500 miligramas/kg de peso corporal, cerca de 500 mg/kg de peso corporal, cerca de 1000 mg/kg de peso corporal ou mais por administração e qualquer faixa derivável nela. Em exemplos não limitativos de uma faixa derivável dos números listados aqui, uma faixa de cerca de 5 mg/kg/peso corporal a cerca de 100 mg/kg/peso corporal, cerca de 5 microgramas/kg/peso corporal a cerca de 500 miligramas/kg/peso corporal, etc., pode ser administrado com base nos números descritos acima.

[00621] Em modalidades particulares, o conjugado CpG-Ab é administrado em três doses seqüenciais, cada dose de cerca de 3 miligramas/kg/peso corporal por administração. Em modalidades

particulares, o conjugado CpG-Ab é administrado em três doses sequenciais, cada dose de cerca de 10 miligramas/kg/peso corporal por administração. Em modalidades particulares, as doses sequenciais são realizadas em intervalos de 48 horas.

[00622] Como fornecido neste documento, a terapia de combinação envolve a administração de dois ou mais agentes terapêuticos. Essa administração abrange a co-administração desses agentes terapêuticos de maneira substancialmente simultânea, como em uma única formulação que possui uma proporção fixa de ingredientes ativos ou em formulações separadas (por exemplo, cápsulas e/ou formulações intravenosas) para cada agente terapêutico. Além disso, essa administração também abrange a administração de cada tipo de agente terapêutico simultânea ou sequencialmente. Essa administração também abrange cada componente sendo formulado como uma formulação separada que pode ser administrada em diferentes locais ou através de diferentes vias de administração (por exemplo, intratumoralmente e/ou sistemicamente). Em qualquer caso, o regime de tratamento da terapia combinada pode ser determinado pelo médico responsável para fornecer efeitos benéficos no tratamento das condições ou distúrbios aqui descritos.

[00623] Em certas modalidades, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG ou o imunoconjugado CpG-Ab é administrado quase ao mesmo tempo que a administração do pelo menos um agente terapêutico contra o câncer adicional. Como exemplos não limitativos, a administração do polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG ou do imunoconjugado CpG-Ab e do pelo menos um agente terapêutico contra o câncer adicional pode ser simultânea, como 30 minutos um do outro, 25 minutos um do

outro, dentro de 20 minutos um do outro, dentro de 15 minutos um do outro, dentro de 10 minutos um do outro, dentro de 5 minutos um do outro ou dentro de um minuto um do outro.

[00624] Em certas modalidades, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG ou o imunoconjugado CpG-Ab é administrado sequencialmente com o pelo menos um agente terapêutico contra o câncer adicional. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG ou o imunoconjugado CpG-Ab é administrado antes da administração do pelo menos um agente terapêutico contra o câncer adicional. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG ou o imunoconjugado CpG-Ab é administrado após a administração do pelo menos um agente terapêutico contra o câncer adicional. Como exemplos não limitativos, a administração do polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG ou do imunoconjugado CpG-Ab e do pelo menos um agente terapêutico contra o câncer adicional pode ser separada por pelo menos 30 minutos um do outro, pelo menos 1 hora um do outro, pelo menos 6 horas um do outro, pelo menos 12 horas um do outro, pelo menos 24 horas um do outro, pelo menos 36 horas um do outro, pelo menos 48 horas um do outro, pelo menos 3 dias um do outro, pelo menos 1 semana um do outro, pelo menos 2 semanas um do outro, ou pelo menos 1 mês um do outro.

[00625] Em certas modalidades, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG é administrado antes da administração do modulador do ponto de verificação imune. Em tais métodos, o modulador do ponto de verificação imune pode ser administrado dentro de 48 horas após a administração do polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG, como dentro de

pelo menos ou pelo menos cerca de ou aproximadamente 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas , 3 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 20 horas, 22 horas, 24 horas, 30 horas, 36 horas, 40 horas ou 48 horas de administração do imunostimulador contendo CpG polinucleotídeo. Em alguns métodos e utilizações, o polinucleotídeo imunostimulador contendo CpG é administrado 6 horas a 30 horas ou 12 horas a 24 horas, cada uma inclusive, antes da administração do modulador do ponto de verificação imune. Em certas formas de realização, o modulador do ponto de verificação imune pode ser administrado dentro de 3 dias, 4 dias, 5 dias, 7 dias, 2 semanas, 3 semanas ou 4 semanas após a administração do polinucleotídeo imunostimulador contendo CpG. O momento e a ordem da administração podem ser determinados empiricamente, se necessário, para determinados moduladores do ponto de verificação imune. Nestas modalidades, o polinucleotídeo imunostimulador contendo CpG pode ser administrado na forma autônoma ou como um imunocombinado CpG-Ab.

[00626] Em certas modalidades, o polinucleotídeo imunostimulador contendo CpG e o modulador do ponto de verificação imune são administrados através de uma série de doses sequenciais. Em modalidades particulares, a primeira dose do polinucleotídeo imunostimulador contendo CpG e a primeira dose do modulador do ponto de verificação imune são administradas simultaneamente e a(s) dose(s) subsequente(s) do polinucleotídeo imunostimulador contendo CpG e a(s) dose(s) subsequente(s) do sistema imune modulador de ponto de verificação são administrados sequencialmente. Nestas modalidades, o polinucleotídeo imunostimulador contendo CpG pode ser

administrado na forma autônoma ou como um imunocjugado CpG-Ab.

[00627] Em certas modalidades, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG é administrado antes da administração de um agonista de células T. Em tais métodos, o agonista de células T pode ser administrado dentro de 48 horas após a administração do polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG, como dentro de pelo menos ou pelo menos cerca de ou aproximadamente 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 20 horas, 22 horas, 24 horas, 30 horas, 36 horas, 40 horas ou 48 horas de administração do imunoestimulador contendo CpG polinucleotídeo. Em alguns métodos e utilizações, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG é administrado 6 horas a 30 horas ou 12 horas a 24 horas, cada uma inclusive, antes da administração do agonista de células T. Em certas modalidades, o agonista de células T pode ser administrado dentro de 3 dias, 4 dias, 5 dias, 7 dias, 2 semanas, 3 semanas ou 4 semanas após a administração do polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG. O momento e a ordem da administração podem ser determinados empiricamente, se necessário, para agonistas de células T específicos. Nestas modalidades, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG pode ser administrado na forma autônoma ou como um imunocjugado CpG-Ab.

[00628] Em certas modalidades, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG e o agonista de células T são administrados através de uma série de doses sequenciais. Em modalidades particulares, a primeira dose do polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG e a primeira dose do agonista de

células T são administradas simultaneamente e as doses subsequentes do polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG e a(s) dose(s) subsequente(s) do agonista de células T são administrados sequencialmente. Nestas modalidades, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG pode ser administrado na forma autônoma ou como um imunocjugado CpG-Ab.

Tratamento de Doenças Autoimunes

[00629] O TLR9 antagonista pode ajudar a reduzir a secreção de citocinas pró-inflamatórias. Por conseguinte, os polinucleotídeos imunossupressores da invenção e seus conjugados podem ser úteis no tratamento de doenças caracterizadas pela superexpressão de citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, doenças autoimunes). Exemplos não limitativos de doenças autoimunes são: psoríase, artrite reumatóide, lúpus, síndrome de Guillain-Barre, vasculite, miastenia gravis, espondilite anquilosante, anemia hemolítica, poliarterite nodosa, doença púrpura trombocitopênica idiopática, síndrome do anticorpo antifosfolípido, doença de Crohn, doença primária colite ulcerosa, hepatite autoimune, esclerodermia, dermatomiosite e alopecia areata.

Composições Farmacêuticas

[00630] A entrega de um polinucleotídeo imunomodulador pode ser conseguida entrando em contato com uma célula com o polinucleotídeo imunomodulador ou o conjugado usando uma variedade de métodos conhecidos dos versados na técnica. Em modalidades particulares, o polinucleotídeo imunomodulador ou o conjugado da invenção pode ser formulado como uma composição

farmacêutica incluindo um excipiente farmacêuticamente aceitável e/ou um veículo farmacêuticamente aceitável. A composição farmacêutica pode estar na forma líquida ou sólida (por exemplo, liofilizada).

[00631] Para uso humano, o polinucleotídeo imunomodulador ou o conjugado da invenção pode ser administrado isoladamente ou em mistura com um veículo farmacêutico selecionado em relação à via de administração pretendida e à prática farmacêutica padrão. Assim, as composições farmacêuticas para uso de acordo com a presente invenção podem ser formuladas de maneira convencional usando um ou mais veículos, excipientes e auxiliares fisiologicamente aceitáveis que facilitam o processamento do conjugado da invenção em preparações que podem ser utilizadas farmacêuticamente.

[00632] Os transportadores ou excipientes usados com frequência incluem açúcares (por exemplo, lactose, manitol), proteína do leite, gelatina, amido, vitaminas, celulose e seus derivados, poli (etileno glicol) e solventes, como água estéril, álcoois, glicerol, e álcoois poli-hídricos. Os veículos intravenosos podem incluir reabastecedores de líquidos e nutrientes. Outros veículos farmacêuticamente aceitáveis incluem soluções aquosas, excipientes não tóxicos, incluindo sais, conservantes, tampões e similares, como descrito, por exemplo, em *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 21^a Ed., Gennaro, Ed., Lippencott Williams & Wilkins (2005) e *The United States Pharmacopeia: The National Formulary (USP 36 NF31)*, publicado em 2013. O pH e a concentração exata dos vários componentes da composição farmacêutica podem ser ajustados de

acordo com as práticas de rotina na arte. Veja Goodman e Gilman, em *Pharmacological Basis for Therapeutics*.

[00633] Ao fazer as composições farmacêuticas da invenção, o ingrediente ativo é tipicamente misturado com um excipiente (por exemplo, em formulações liofilizadas) ou diluído por um excipiente. Quando o excipiente serve como um diluente, pode ser um material sólido, semi-sólido ou líquido (por exemplo, solução salina tamponada com fosfato), que atua como veículo, transportador ou meio para o ingrediente ativo. Assim, as composições podem estar na forma de comprimidos, pós, elixires, suspensões, emulsões, soluções e xaropes. Como é conhecido na técnica, o tipo de diluente pode variar dependendo da via de administração pretendida. As composições resultantes podem incluir agentes adicionais, por exemplo, conservantes. As formulações podem incluir adicionalmente: agentes lubrificantes, por exemplo, talco, estearato de magnésio e óleo mineral; agentes molhantes; agentes emulsificantes e de suspensão; agentes conservantes, por exemplo, metil- e propil-hidroxi-benzoatos; agentes adoçantes; e agentes aromatizantes. Outros excipientes exemplares são descritos no *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 6ª Edição, Rowe et al., Eds., Pharmaceutical Press (2009). Os conservantes podem incluir agentes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes e gases inertes.

[00634] Essas composições farmacêuticas podem ser fabricadas de maneira convencional, por exemplo, por processos convencionais de mistura, dissolução, granulação, fabricação de drageias, levigações, emulsificação, encapsulamento, encapsulamento, retenção ou liofilização. Os métodos bem conhecidos na arte para fazer formulações são encontrados, por

exemplo, em *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 21st Ed., Gennaro, Ed., Lippencott Williams & Wilkins (2005) e *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, eds. J. Swarbrick e J. C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, Nova Iorque. A formulação adequada depende da via de administração escolhida. A formulação e preparação de tais composições é bem conhecida dos especialistas na técnica de formulação farmacêutica. Na preparação de uma formulação, um polinucleotídeo ou conjugado pode ser moído para fornecer o tamanho de partícula apropriado antes da combinação com os outros ingredientes.

Rota de administração

[00635] As composições farmacêuticas da invenção podem ser administradas local ou sistemicamente. As quantidades terapeuticamente eficazes variarão de acordo com fatores, como a extensão da progressão das doenças em um sujeito, a idade, sexo e peso do indivíduo. Os regimes de dosagem podem ser ajustados para fornecer a resposta terapêutica ideal. Por exemplo, várias doses divididas podem ser administradas diariamente ou a dose pode ser proporcionalmente reduzida conforme indicado pelas exigências da situação terapêutica.

[00636] As composições farmacêuticas da invenção podem ser administradas a um paciente em uma variedade de formas, dependendo da via de administração selecionada, como será entendido pelos especialistas na técnica. Os polinucleotídeos e/ou conjugados utilizados nos métodos aqui descritos podem ser administrados, por exemplo, por administração parentérica. A administração parentérica pode incluir vias de administração intramuscular, intravenosa, intra-arterial, intracraniana, subcutânea, intraorbital, intraventricular, intraespinal,

intratecal, intraperitoneal, retal e tópica. A via tópica de administração pode incluir vias de administração transdérmica, intradérmica, bucal e sublingual. As composições farmacêuticas são formuladas de acordo com a via de administração selecionada. A administração parenteral pode ser por infusão contínua durante um período de tempo selecionado. Os polinucleótídeos e/ou conjugados são desejavelmente administrados com um veículo farmacêuticamente aceitável. As formulações farmacêuticas dos polinucleotídeos e/ou conjugados aqui descritos, formuladas para o tratamento dos distúrbios aqui descritos, também fazem parte da presente invenção.

Formulações para administração parenteral

[00637] Um polinucleotídeo imunomodulador (por exemplo, imunoestimulador) e/ou conjugado da invenção aqui descrita pode ser administrado a um paciente em necessidade do mesmo em uma formulação parenteral farmacêuticamente aceitável (por exemplo, intravenosa, intramuscular ou subcutânea) como aqui descrito. A formulação farmacêutica também pode ser administrada parentericamente (por exemplo, por via intravenosa, intramuscular ou subcutânea) em formas de dosagem ou formulações contendo veículos e adjuvantes convencionais e não tóxicos farmacêuticamente aceitáveis. Em particular, as formulações adequadas para administração parentérica incluem soluções de injeção estéreis aquosas e não aquosas que podem conter antioxidantes, tampões, bacteriostáticos e solutos que tornam a formulação isotônica com o sangue do paciente; e suspensões estéreis aquosas e não aquosas que podem incluir agentes de suspensão e agentes espessantes. Por exemplo, para preparar tal composição, um polinucleotídeo ou conjugado imunomodulador da

invenção pode ser dissolvido ou suspenso em um veículo líquido parentericamente aceitável. Entre os veículos e solventes aceitáveis que podem ser empregados estão água, água ajustada a um pH adequado pela adição de uma quantidade adequada de ácido clorídrico, hidróxido de sódio ou um tampão adequado (por exemplo, solução salina tamponada com fosfato), 1,3-butanodiol, solução de Ringer e solução isotônica de cloreto de sódio. A formulação aquosa também pode conter um ou mais conservantes, por exemplo, p-hidroxibenzoato de metil, etil ou n-propil. Informações adicionais sobre formulações parentéricas podem ser encontradas, por exemplo, no Formulário Nacional de Farmacopeia dos Estados Unidos (USP-NF), aqui incorporado por referência.

[00638] A formulação parentérica do conjugado da invenção pode ser qualquer um dos quatro tipos gerais de preparações identificadas pelo USP-NF como adequadas para administração parenteral:

- 1) "Droga para injeção": a substância da droga (por exemplo, o conjugado da invenção) como um sólido seco (por exemplo, liofilizado) que será combinado com o veículo estéril apropriado para administração parenteral como uma injeção de droga;
- (2) "Emulsão injetável por fármaco": uma preparação líquida da substância medicamentosa (por exemplo, o conjugado da invenção) que é dissolvida ou dispersa em um meio de emulsão adequado;
- (3) "Suspensão injetável de medicamento": uma preparação líquida da substância farmacológica (por exemplo, o

conjugado da invenção) suspensa em um meio líquido adequado; e

- (4) "Droga para suspensão injetável": a substância da droga (por exemplo, o conjugado da invenção) como um sólido seco que será combinado com o veículo estéril apropriado para administração parenteral como uma suspensão injetável da droga.

[00639] As formulações exemplares para administração parentérica incluem soluções dos polinucleotídeos e/ou conjugados preparados em água adequadamente misturada com um surfactante, por exemplo, hidroxipropilcelulose. As dispersões também podem ser preparadas em glicerol, poli (etileno glicol) s, DMSO líquido e suas misturas com ou sem álcool e em óleos. Sob condições normais de armazenamento e uso, essas preparações podem conter um conservante para impedir o crescimento de microrganismos. Procedimentos e ingredientes convencionais para a seleção e preparação de formulações adequadas são descritos, por exemplo, em *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 21^a Ed., Gennaro, Ed., Lippencott Williams & Wilkins (2005) e *The United States Pharmacopeia : The National Formulary (USP 36 NF31)*, publicado em 2013.

[00640] Polímero de lactídeo biodegradável, biocompatível, copolímero de lactido/glicolídeo ou copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno podem ser utilizados para controlar a liberação do polinucleotídeo e/ou conjugado. Outros sistemas de administração parenteral potencialmente úteis para polinucleotídeos e/ou conjugados incluem partículas de copolímero de etileno-acetato de vinila, bombas osmóticas ou sistemas de infusão implantáveis. A formulação parentérica pode

ser formulada para liberação imediata ou para liberação prolongada/sustentada dos polinucleotídeos e/ou conjugados. Formulações exemplificativas para liberação parentérica de um polinucleotídeo ou conjugado incluem: soluções aquosas, pós para reconstituição, soluções co-solventes, emulsões de óleo/água, suspensões, microesferas e géis poliméricos.

[00641] Os exemplos a seguir destinam-se a ilustrar a invenção. Eles não pretendem limitar a invenção de forma alguma.

Exemplos

Exemplo 1: Síntese e purificação de nucleotídeos e polinucleotídeos

[00642] Sínteses exemplares de polinucleotídeos imunomoduladores e precursores para os mesmos são descritas abaixo.

Precursores

[00643] Os precursores úteis na preparação dos polinucleotídeos da invenção são fornecidos no documento WO 2015/188197 (por exemplo, fosforamiditos, porções de direcionamento e grupos bioreversíveis contendo cadeias PEG).

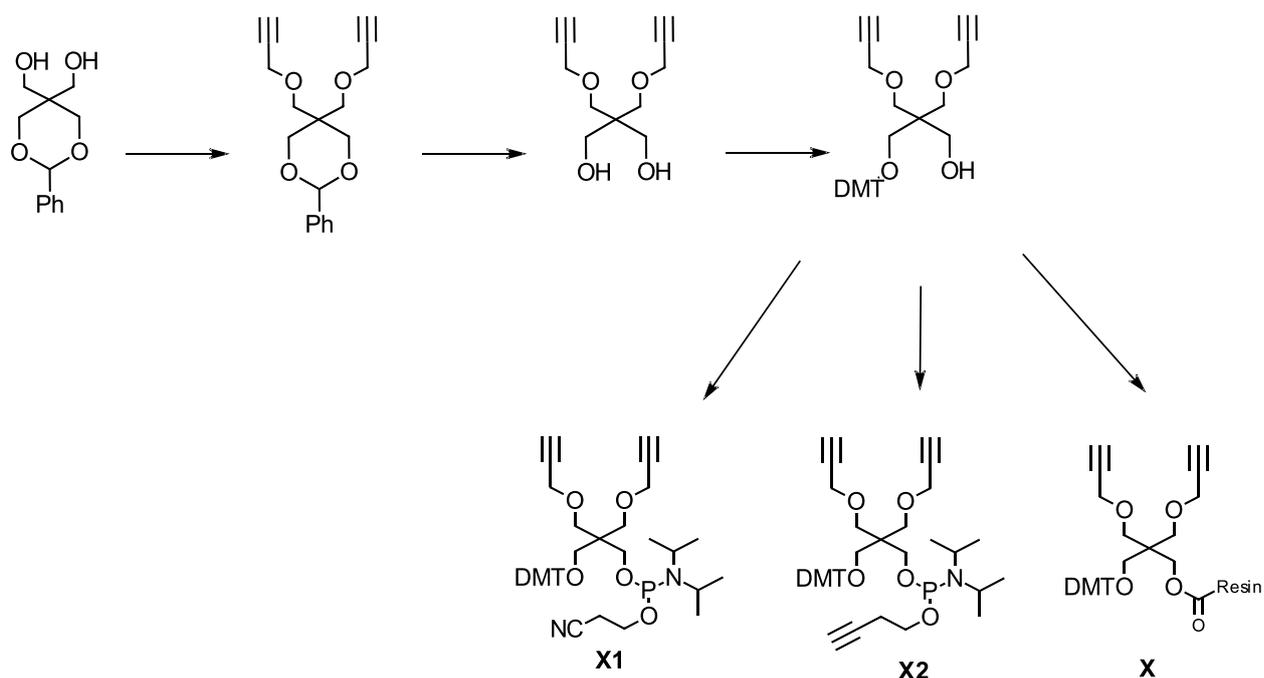
Fosforamiditos e outros monômeros

[00644] Intermediários contendo nucleossídeos úteis na síntese de polinucleotídeos da invenção são divulgados no documento WO 2015/188197 (por exemplo, compostos **U1-U54**, **A1-A15**, **C1-9** e **G1-G12** no documento WO 2015/188197).

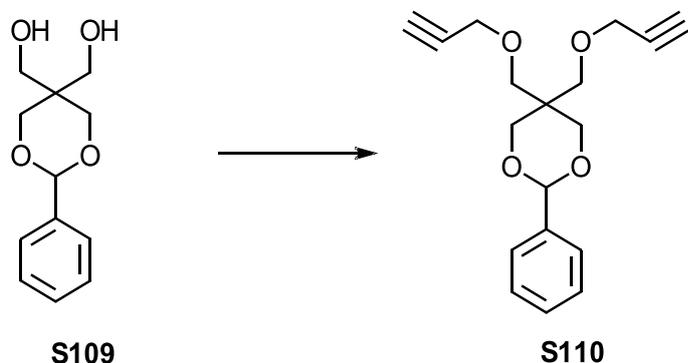
[00645] Os fosforamiditos comercialmente disponíveis foram adquiridos à Glen Research (Sterling, VA) ou ChemGenes (Wilmington, MA). Quando requerido, outros fosforamidos foram

vácuo para proporcionar um óleo, o qual foi purificado por cromatografia em SiO₂ para fornecer o FmocNH-PEG2-OH (**S108**, 55 g, 88% de rendimento). ESI + m/z calculado 371,4, encontrado 372,2 [M + H] +.

Síntese de Espaçador Abásico X1 e X2 - Esquema Geral



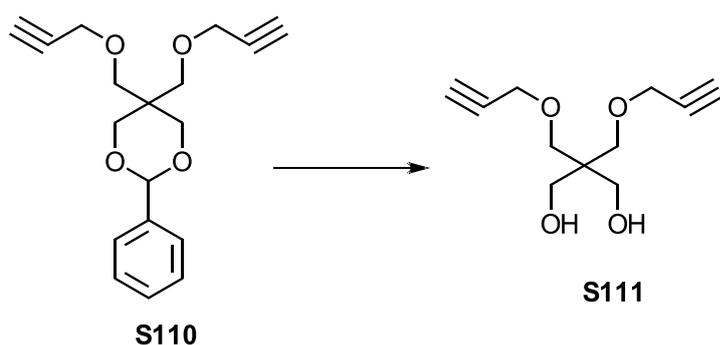
Composto S110



[00648] A uma suspensão de NaH (13,2 g, 60% em óleo mineral, 230,0 mmol) em THF (40 mL) sob argônio a 0°C foi adicionada uma solução de diol (S109, 4,92 g, 22,0 mmol) em THF (20 mL) gota

a gota; a mistura resultante foi aquecida até à temperatura ambiente e agitada durante 1 h. A mistura de reação foi resfriada a 0°C, uma solução de brometo de propargil (18,6 g, 158,4 mmol) em THF (25 mL) foi adicionada lentamente e a mistura resultante foi aquecida à temperatura ambiente e agitada durante a noite a 40°C. Depois que o produto foi consumido, como observado por TLC, a reação foi extinta por adição gota a gota de água a 0°C, e a mistura resultante foi extraída com diclorometano (50 mL x 2). As camadas orgânicas combinadas foram lavadas com salmoura e secas sobre Na₂SO₄ anidro, filtradas e evaporadas para dar um resíduo, que foi purificado por coluna flash de sílica gel usando o companheiro ISCO (hexano/acetato de etila, 0 - 30%) para dar 5,92 g (89,5%) do composto **S110** como um óleo. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃; ppm): δ7,49-7,47 (dd, J 8,0, 1,5 Hz, 2H), 7,38-7,34 (m, 3H), 5,43 (s, 1H), 4,21 (d, J 2,5 Hz, 2H), 4,12 (t, J 2,5 Hz, 4H), 4,10 (s, 1H), 3,91 (s, 1H), 3,89 (s, 1H), 3,37 (s, 2H); ESI MS para C₁₈H₂₀O₄ calculado 300,34, observado [M + H]⁺ 301,3.

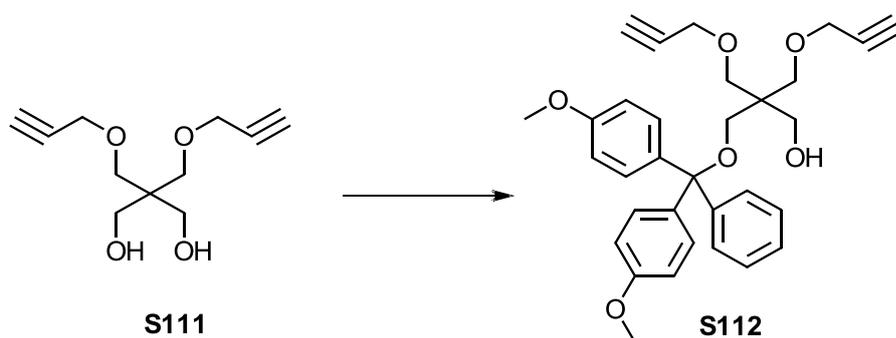
Composto S111



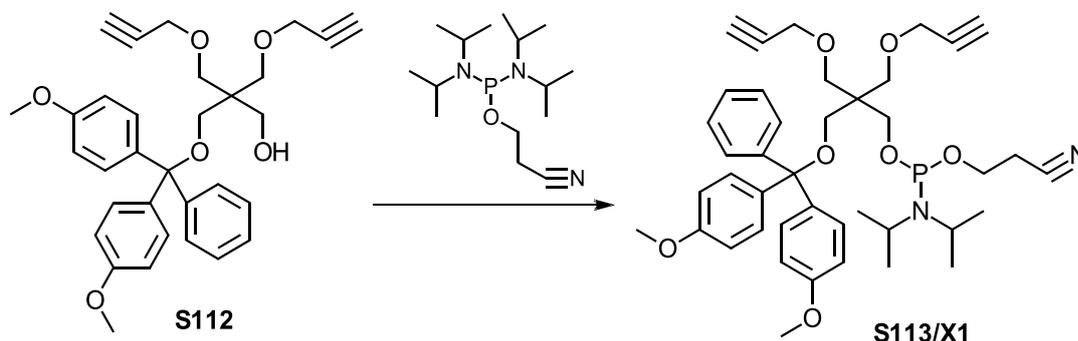
[00649] O composto bis-propargil **S110** (5,9 g, 19,64 mmol) foi dissolvido em mistura de ácido acético/água (60 mL, 75:25) e a reação foi continuada a 50 oC por 2 h. Após a conclusão da reação, a solução foi evaporada e co-evaporada com tolueno (2 x 20 mL). O resíduo foi purificado diretamente, sem qualquer

tratamento, utilizando a coluna flash de sílica gel usando o companheiro ISCO (hexano/acetato de etila, 20 - 80%) para dar 3,02 g (72,5%) do composto **S111** como um óleo. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 ; ppm): δ 4,15 (d, J 2,5 Hz, 4H), 3,68 (s, 4H), 3,59 (s, 4H), 2,44 (t, J 2,5 Hz, 2H), 2,30 - 2,40 (largo, 2H); ESI MS para $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}_4$ calculado 212,24, observado $[\text{M} + \text{H}]^+ 213,2$.

Composto S112

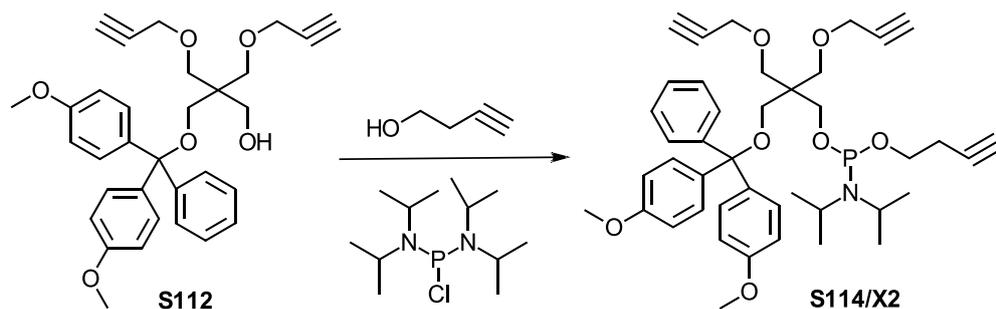


[00650] A uma solução de diol **S111** (3,0 g, 14,2 mmol), *N,N*-diisopropiletilamina (3,15 mL, 17,0 mmol) e DMAP (0,36 g, 2,83 mmol) em diclorometano (25 mL) a 0°C foram adicionados gota a gota, uma solução de cloreto de dimetoxitritil (4,8 g, 14,2 mmol) em diclorometano (40 mL) e a reação continuou à temperatura ambiente durante a noite. A mistura foi diluída com diclorometano e lavada com água seguida de salmoura, e as camadas orgânicas foram secas sobre Na_2SO_4 anidro, filtradas e evaporadas. O resíduo resultante foi purificado por coluna flash de sílica gel utilizando companheiro ISCO (hexano/acetato de etila, 0 - 40%) para dar 5,29 g (73%) do composto mono DMT protegido **S112** como um sólido branco. ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3 ; ppm): δ 7,4-7,42 (m, 2H), 7,32-7,31 (m, 4H), 7,28-7,25 (m, 2H), 6,84-6,81 (m, 4H), 4,09 (d, J 2,5 Hz, 4H), 3,79 (s, 6H), 3,67 (d, J 6,0 Hz, 2H), 3,64-3,56 (m, 4H), 3,13 (s, 2H), 2,39 (t, J 2,5 Hz, 2H); ESI MS para $\text{C}_{32}\text{H}_{34}\text{O}_6$ calculado 514,6, observado $[\text{M} + \text{Na}]^+ 537,4$,

Composto S113

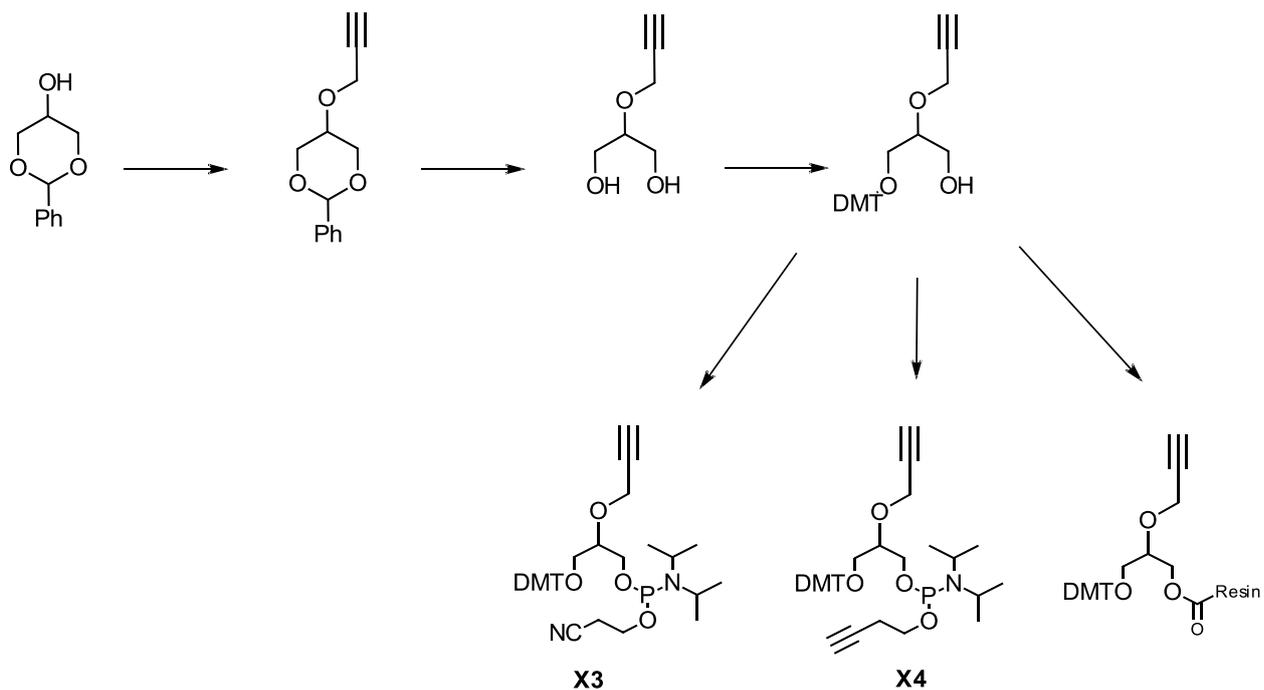
[00651] A uma solução do composto protegido por DMT **S112** (0,5 g, 0,98 mmol) em diclorometano (4 mL) foi adicionada gota a gota uma solução de 2'-cianoetil-*N,N,N',N'*-tetraisopropil fosforamidito (0,58 g, 1,95 mmol) em diclorometano (3 mL) à temperatura ambiente, seguido de 5-benziltio-1H-tetrazol (BTT; solução 0,25 M em acetonitrila, 0,78 mL, 0,18 mmol) sob atmosfera de argônio. A reação foi continuada até o material de partida desaparecer (2 h) e a mistura bruta foi diluída com 20 mL de diclorometano, lavada sequencialmente com solução saturada de NaHCO₃ (10 mL) e salmoura (10 mL), e seca sobre Na₂SO₄ anidro. O solvente foi evaporado in vácuo, e a mistura bruta foi purificada por cromatografia em coluna sobre sílica gel usando acetato de etila/hexano com 3% de trietilamina como co-solvente (gradiente de 0-30% no Combi Flash Rf Instrument) para dar 0,53 g de composto **S113** (75%) como um óleo. ESI MS para C₄₁H₅₁N₂O₇P Calculado 714,82, Observado 715,6 [M + H]⁺; 31P RMN (202 MHz, CDC13): δ147,89.

Composto S114

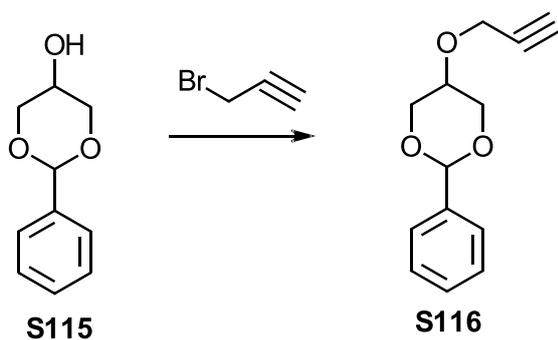


[00652] A uma solução de -78°C do composto protegido por DMT **S112** (0,98 g, 1,9 mmol) e N, N-diisopropiletilamina (0,39 mL, 2,09 mmol) em 8,0 mL de diclorometano seco sob atmosfera de árgon foi adicionado gota a gota um diclorometano (4,0 mL) de bis-(N, N-diisopropilamino) -clorofosfina (0,56 g, 2,09 mmol). A mistura de reação foi deixada aquecer até a temperatura ambiente enquanto a agitação foi mantida por 1 h. Uma solução de 3-butino-1-ol (0,14 g, 1,9 mmol) em 2,0 mL de diclorometano seco foi adicionada à temperatura ambiente; a mistura resultante foi agitada durante 10 minutos, altura em que foi adicionada uma solução 0,25M de ETT em acetonitrilo (4,6 mL, 1,15 mmol), e a agitação continuou durante mais 3 h. Após a conclusão da reação, como observado pelo desaparecimento do material de partida por TLC, a mistura bruta foi diluída com 20 mL de diclorometano e lavada sequencialmente com solução saturada de NaHCO_3 (10 mL) e salmoura (10 mL) e seca sobre Na_2SO_4 anidro. Os voláteis foram evaporados in vácuo, e a mistura bruta foi purificada por cromatografia em coluna sobre sílica gel usando acetato de etila/hexano com 3% de trietilamina como sistema solvente (gradiente de 0-40% no Combi Flash Rf Instrument) para dar 0,33 g do composto **S114** (25%) como um óleo. ESI MS para $\text{C}_{42}\text{H}_{52}\text{NO}_7\text{P}$ Calculado 713,83, Observado 714,7 $[\text{M} + \text{H}]^+$; ^{31}P RMN (202 MHz, CDCl_3): δ 146,89.

Síntese de Espaçador Abásico X3 e X4 - Esquema Geral:

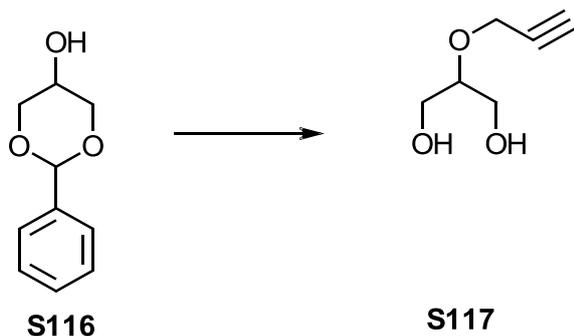


Composto S116



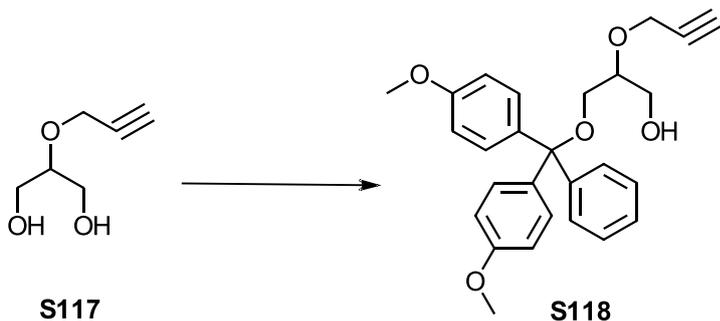
[00653] O composto **S116** foi preparado usando o protocolo descrito para o composto **S110** com 91% de rendimento como óleo. ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3 ; ppm): δ 7,51 (d, J 7,5 Hz, 2H), 7,37-7,32 (m, 3H), 5,56 (s, 1H), 3,37-3,35 (m, 4H), 4,10-4,07 (dd, J 13,0 Hz, J 2,5 Hz, 2H), 3,65-3,64 (m, 1H), 2,43-2,42 (t, J 6,5 Hz, 1H); ESI MS para $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_3$ calculado 218,24, observado $[\text{M} + \text{H}] + 219,2$.

Composto S117



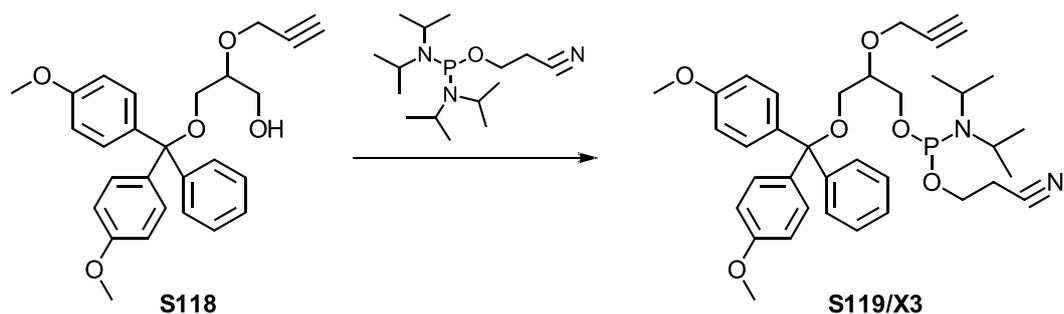
[00654] O composto **S117** foi preparado usando o protocolo descrito para o composto **S111** com 91% de rendimento como óleo. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 ; ppm): δ 4,33 (s, 2H), 3,83-3,70 (m, 5H), 2,48 (s, 1H), 2,04 (br, 2H); ESI MS para $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_3$ calculado 130,14, observado $[\text{M} + \text{Na}] + 153,0$.

Composto S118



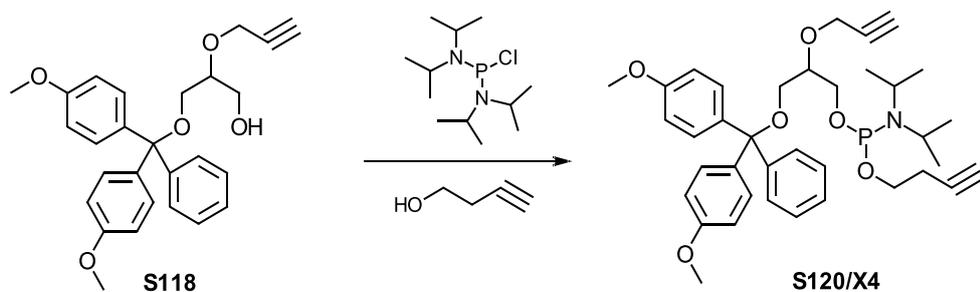
[00655] O composto **S118** foi preparado utilizando o protocolo descrito para o composto **S112** com 54% de rendimento como um sólido branco. ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3 ; ppm): δ 7,43 (d, J 7,5 Hz, 2H), 7,37-7,27 (m, 5H), 7,23-7,16 (m, 2H), 6,83 (d, J 9,0 Hz, 3H), 6,78-6,76 (dd J 8,5 Hz, 1H), 4,35-4,22 (m, 2H), 3,77 (s, 6H) 3,76-3,72 (m, 2H), 3,71-3,64 (m, 1H), 3,27- 3,19 (m, 2H), 2,48 (t, J 4,5 Hz, 1H), 2,03-1,96 (m, 1H); ESI MS para $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{O}_5$ calculado 432,50, observado $[\text{M} + \text{Na}] + 455,4$.

Composto S119



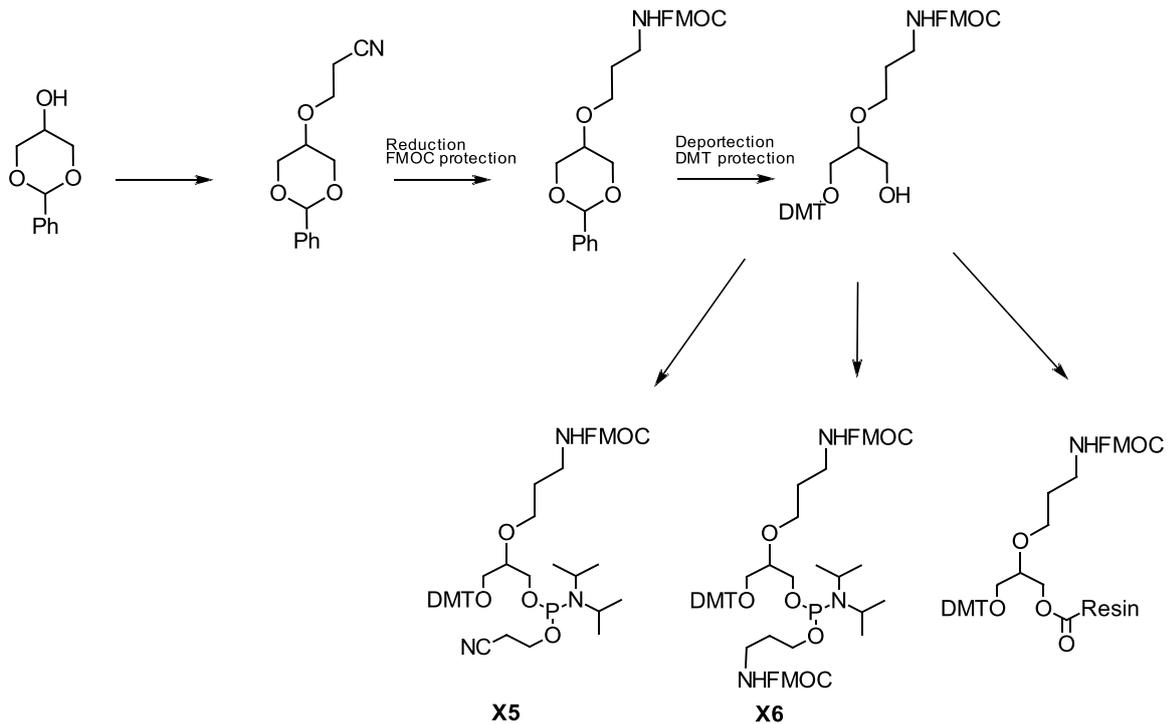
[00656] O composto **S119** foi preparado utilizando o protocolo descrito para o composto **S113** com 86% de rendimento como óleo. ESI MS para $C_{36}H_{45}N_2O_6P$ Calculado 432,72, Observado 433,5 [M + H]⁺; 31P RMN (202 MHz, $CDCl_3$): δ 149,05, 148,96.

Composto S120

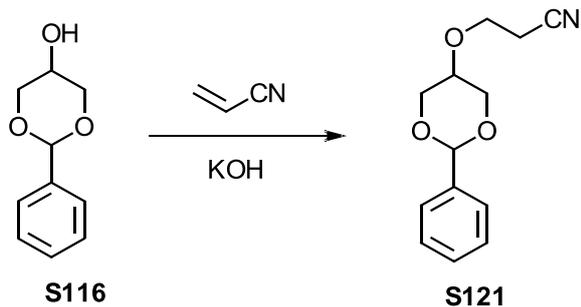


[00657] O composto **S120** foi preparado usando o protocolo descrito para o composto **S114** com 47% de rendimento como óleo. ESI MS para $C_{37}H_{46}NO_6P$ Calculado 431,73, Observado 432,5 [M + H]⁺; 31P RMN (202 MHz, $CDCl_3$): δ 147,80, 147,71.

Síntese de Espaçador Abásico X3 e X4 - Esquema Geral:



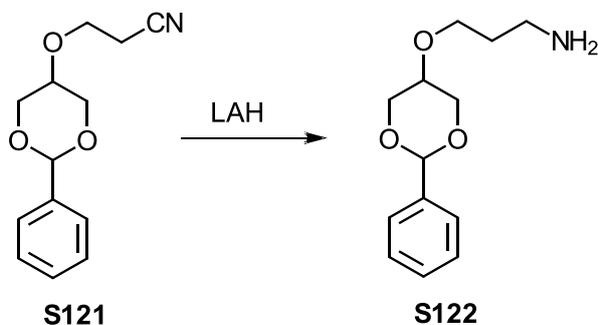
Composto S121



[00658] A uma solução de **S116** (4,0 g, 22,2 mmol) em dioxano (25 mL) foi adicionada uma solução de KOH (0,12 g, 2,2 mmol) dissolvida em quantidade mínima de água e a mistura resultante foi agitada por pelo menos 30 minutos em temperatura ambiente. A mistura foi resfriada a 0°C, uma solução de acrilonitrila (2,35 g, 44,4 mmol) em dioxano (15 mL) foi adicionada gota a gota e a mistura resultante foi deixada reagir à temperatura ambiente durante a noite. Os voláteis foram evaporados in vácuo, o resíduo foi diluído com água e o pH foi ajustado para quase neutro. O produto bruto foi extraído com acetato de etila (2 x 50 mL), e as camadas orgânicas combinadas foram lavadas com salmoura e

secas sobre Na_2SO_4 anidro, filtradas e evaporadas para dar um resíduo, que foi purificado por coluna de sílica gel flash usando o companheiro ISCO (diclorometano/metanol, 0 - 5%) para dar 3,1 g (60%) do composto **S121** como um sólido branco. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 ; ppm): δ 7,49 (d, J 7,0 Hz, 2H), 7,36-7,34 (m, 3H), 5,56 (s, 1H), 3,36 (d, J 13,0 Hz 2H), 4,10-4,07 (dd, J 13,0 Hz, J 2,0 Hz, 2H), 3,84 (t, J 6,5 Hz, 2H), 3,42 (m, 1H), 3,69 (t, J 6,5 Hz, 2H); ESI MS para $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{NO}_3$ calculado 233,2, observado $[\text{M} + \text{Na}] + 256,3$.

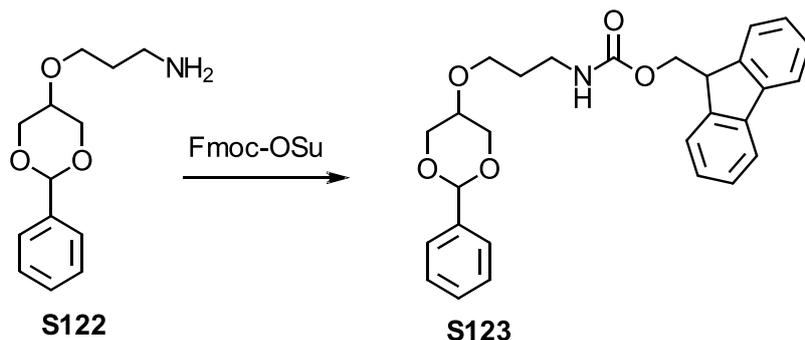
Composto S122



[00659] A uma suspensão de hidreto de alumínio e lítio (0,83 g, 4,0 mmol) em THF (10 mL) a 0°C foi adicionada gota a gota uma solução do composto **S121** (1,28 g, 5,5 mmol) em THF (15 mL), o resultado a mistura foi aquecida à temperatura ambiente e a agitação foi continuada durante 3 h. Após a conclusão da reação, a mistura de reação foi resfriada a 0°C e extinta por adição gota a gota de água conforme necessário (cerca de 2-3 mL). Foram adicionados 8 mL de água e o produto bruto foi extraído em acetato de etila (2 x 25 mL). As camadas orgânicas combinadas foram lavadas com salmoura, secas sobre Na_2SO_4 anidro, filtradas e evaporadas para dar o composto **S122**, que foi utilizado no passo subsequente sem purificação adicional. ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3 ; ppm): δ 7,49 (d, J 7,0 Hz, 2H), 7,40-7,32 (m, 3H), 5,55 (d, J 5,0

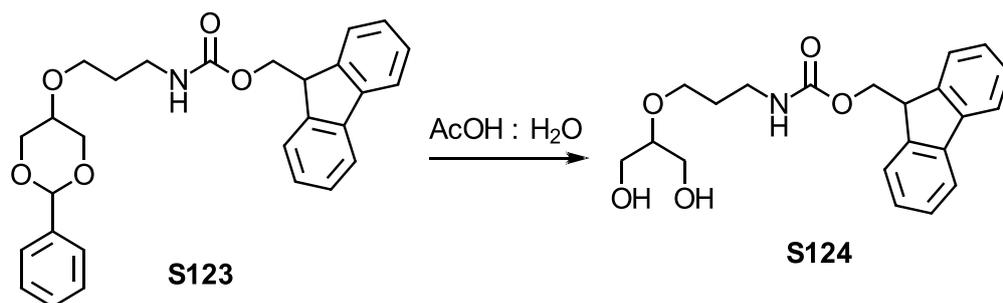
Hz, 1H), 4,34 (d, J 13,0 Hz, 1H), 4,20-4,11 (dd, J 12,0 Hz 4H), 4,05-4,03 (d, J 13,0 Hz, J 2,0 Hz, 1H), 3,66-3,62 (m, 2H), 3,27 (m, 1H), 2,86 (t, J 6,5 Hz, 1H), 2,16 (largo, 2H); ESI MS para $C_{13}H_{19}NO_3$ calculado 237,2, observado $[M + H]^+ 238,2$.

Composto S123



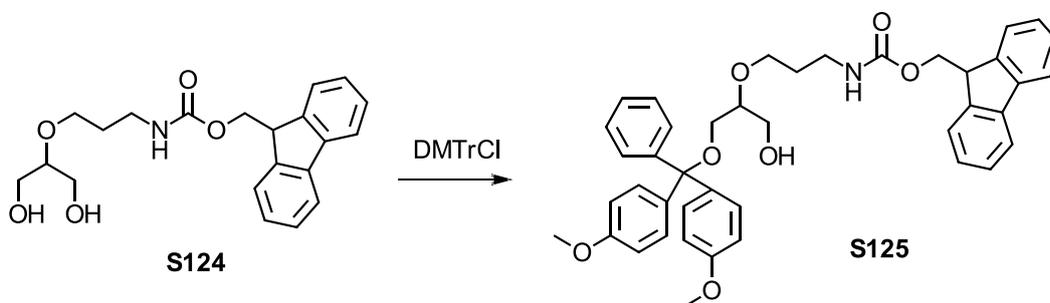
[00660] Ao composto **S122** (1,0 g, 4,2 mmol) e N, N-diisopropiletilamina (2,3 mL, 12,6 mmol) em diclorometano (8 mL) a 0°C foi adicionado gota a gota uma solução de Fmoc-OSu (1,7 g, 5,0 mmol), e a mistura resultante foi deixada reagir à temperatura ambiente por 3 h. Após a conclusão, a mistura de reação foi diluída com diclorometano (10 mL) e lavada com água seguida de salmoura. A camada orgânica foi separada, seca sobre Na_2SO_4 anidro, filtrada e evaporada para dar um resíduo. O resíduo foi purificado por coluna flash de sílica gel usando companheiro ISCO (hexano/acetato de etila, 0 - 50%) para dar 0,65 g (35%) do composto **S123** como um sólido branco. 1H RMN (500 MHz, $CDCl_3$; ppm): δ 7,75 (d, J 7,5 Hz, 2H), 7,58 (d, J 7,5 Hz, 2H), 7,51 (d, J 7,5 Hz, 2H), 7,37 (t, J 7,5 Hz, 2H), 7,31-7,26 (m, 5H), 5,57 (s, 1H), 5,48 (br, 1H), 4,46-4,32 (m, 4H), 4,15 (d, J 7,0 Hz, 1H), 4,06 (t, J 12,5 Hz 2H), 3,67 (m, 2H), 3,54 (m, 2H), 3,41 (s, 1H), 1,88 (t, J 6,0 Hz, 2H); ESI MS para $C_{28}H_{29}NO_5$ calculado 459,5, observado $[M + Na]^+ 482,5$.

Composto S124

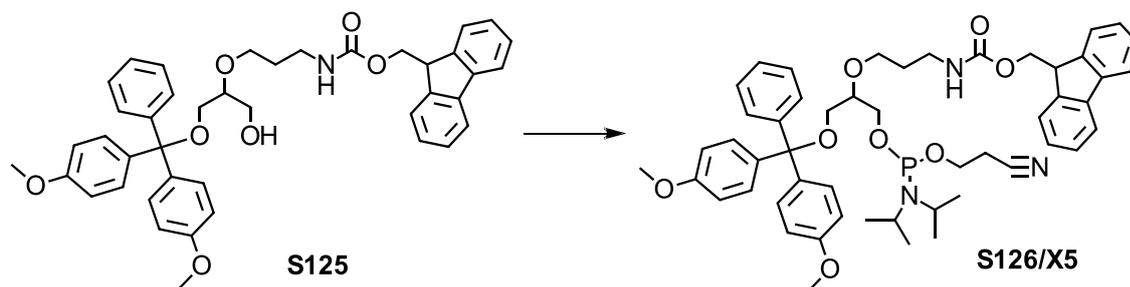


[00661] O composto **S124** foi preparado utilizando o protocolo descrito para o composto **S111** com rendimentos quantitativos como um óleo. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 ; ppm): δ 7,76 (d, J 7,5 Hz, 2H), 7,58 (d, J 7,5 Hz, 2H), 7,39 (t, J 7,5 Hz, 2H), 7,32 (t, J 7,5 Hz, 2H), 5,18 (br, 1H), 4,44 (d, J 6,5 Hz, 2H), 4,21 (t, J 6,5 Hz, 1H), 4,76-4,73 (dd, J 11,5, 3,5 Hz 2H), 3,67-60 (m, 4H), 3,42 (m, 1H), 3,37 (br, 2H), 2,07 (m, 2H), 1,75 (br, 2H); ESI MS para $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{NO}_5$ calculado 371,4, observado $[\text{M} + \text{Na}] + 394,3$.

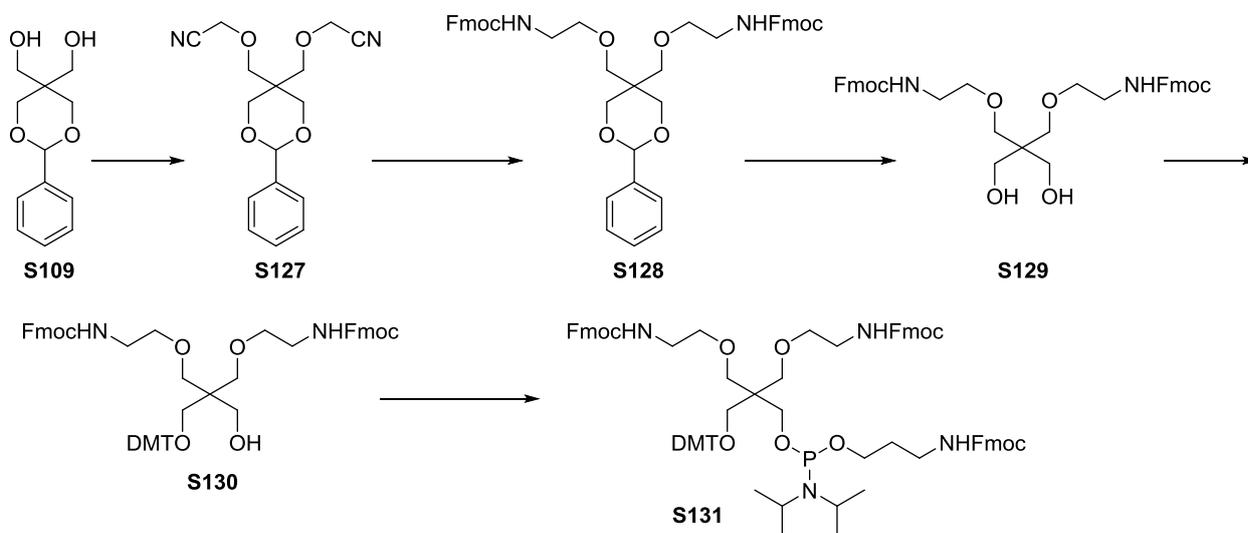
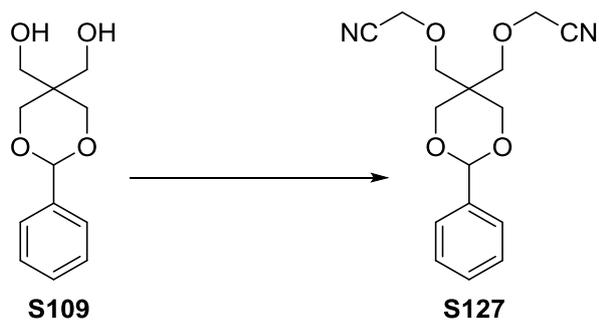
Composto S125



[00662] O composto **S125** foi preparado usando o protocolo descrito para o composto **S112** com 48% de rendimento do produto (S125) como um sólido branco. ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3 ; ppm): δ 7,75 (t, J 7,5 Hz, 2H), 7,58 (t, J 7,5 Hz, 2H), 7,40-7,38 (m, 3H), 7,32-27 (m, 7H), 7,18-7,16 (m, 3H), 6,83 (t, J 7,0 Hz, 4H), 5,16 (br, 1H), 4,44 (d, J 6,5 Hz, 2H), 4,20 (m, 1H), 3,80 (s, 3H), 3,79 (m, 1H), 3,76 (s, 3H), 3,74 (m, 2H), 3,66-3,62 (m, 4H), 3,43-3,37 (m, 2H), 2,31 (br, 1H) 1,76 (largo, 2H); ESI MS para $\text{C}_{42}\text{H}_{43}\text{NO}_7$ calculado 673,7, observado $[\text{M} + \text{Na}] + 696,7$.

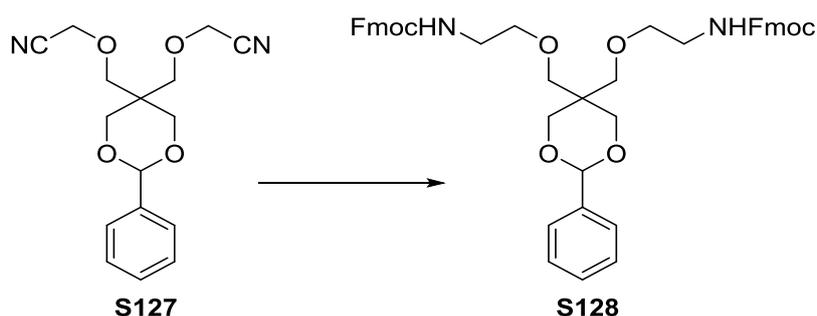
Composto S126

[00663] O composto **S126** foi preparado utilizando o protocolo descrito para o composto **S113** com 78% de rendimento do produto (S126) como um óleo. ESI MS para $C_{51}H_{60}N_3O_8P$ Calculado 874,0, Observado 896,9 [M + Na] +, 913,0 [M + K] +; ^{31}P RMN (202 MHz, $CDCl_3$; ppm): δ 148,90, 148,76.

Síntese do Abasic Spacer S131 - Esquema geral:**Composto S127**

[00664] A uma solução de **S109** (2,56 g, 11,4 mmol) em diclorometano (50 mL) sob argônio foram adicionados bromoacetonitrila (3,01 g, 25,1 mmol), óxido de prata (I) (5,28 g, 22,8 mmol) e iodeto de tetrabutylamônio (0,84 g, 2,28 mmol), e a mistura resultante foi agitada durante a noite. A mistura foi filtrada sobre Celite® e o filtrado foi evaporado para dar um resíduo preto, que foi submetido a purificação em coluna de sílica gel instantânea em companheiro ISCO (hexano/acetato de etila, 15 - 90%) para dar 1,34 g (39%) do composto desejado **S127** como um óleo viscoso. ESI MS para $C_{16}H_{18}N_2O_4$ calculado 302,3, observado $[M + H]^+ 303,3$.

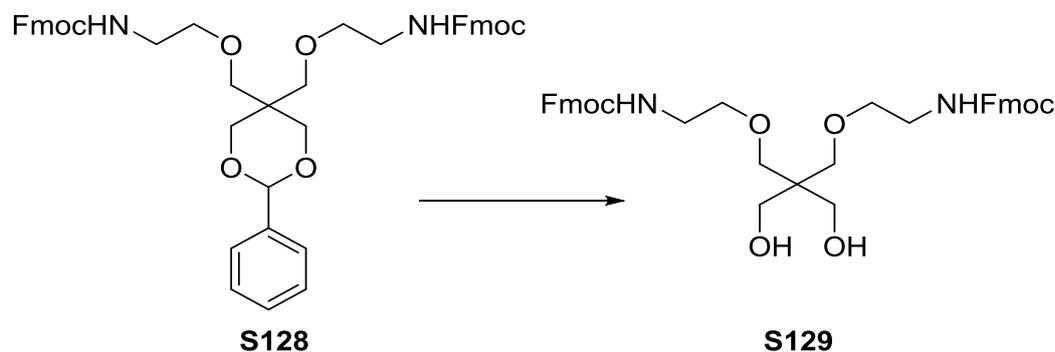
Composto S128



[00665] A uma solução do composto **S127** (1,34 g, 4,43 mmol) em THF (30 mL) foi adicionada uma solução de $LiAlH_4$ em THF (2M, 8,9 mL, 17,7 mmol) sob árgon e a mistura foi aquecida a 55 oC por 4 h. Outra porção de $LiAlH_4$ em THF (2M, 4 mL, 8,0 mmol) foi adicionada e a agitação continuou por 4 h. Após a conclusão da reação, a mistura foi arrefecida à temperatura ambiente e extinta com $Na_2SO_4 \cdot 10H_2O$. O sólido foi removido por filtração e lavado com acetato de etilo. O filtrado foi seco sobre Na_2SO_4 anidro. A mistura foi filtrada e evaporada para dar um resíduo, o qual foi dissolvido em diclorometano (20 mL). A esta solução foram adicionados Fmoc-OSu (1,5 g, 4,43 mmol) e DIEA (0,87 mL, 5,0

mmol). A mistura foi agitada por 1 h, depois evaporada para dar um resíduo, o qual foi submetido a purificação em coluna de sílica gel instantânea em um companheiro ISCO (hexano/acetato de etila, 20 - 90%) para dar 1,04 g (31%) do composto **S128** como uma espuma branca. ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3 ; ppm): δ 7,75 (4H, dd, J 7,5, 4,5 Hz), 7,58 (4H, t, J 7,0 Hz), 7,48 (2H, d, J 7,0 Hz), 7,41- 7,34 (7H, m), 7,32-7,26 (4H, m), 5,44 (1H, s), 5,15-5,05 (2H, m), 4,44 (2H, d, J 5,5 Hz), 4,38 (2H, d, J 6,0 Hz), 4,25-4,15 (2H, m), 4,10 (2H, d, J 11,5 Hz), 3,82 (2H, d, J 11,5 Hz), 3,78 (2H, s), 3,53 (2H, s), 3,42 (2H, s), 3,36-3,27 (4H, m), 3,25 (2H, s); ESI MS para $\text{C}_{46}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{O}_8$ calculado 754,9, observado [M + H] + 755,3.

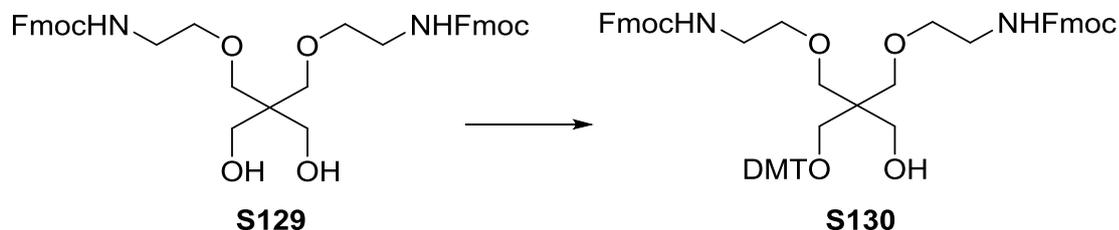
Composto S129



[00666] O composto **S128** (1,1 g, 1,51 mmol) foi dissolvido em uma mistura de $\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O}$ (10 mL, 3: 1), e a reação foi continuada a 55°C por 5 h. Após a conclusão da reação, os voláteis foram evaporados e co-evaporados com tolueno (2x 20 mL) e o resíduo foi submetido a purificação instantânea em coluna de sílica gel em um companheiro ISCO (hexano/acetato de etila, 30 - 100%) para dar 0,54 g (54%) do composto **S129** como espuma branca. ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3 ; ppm): δ 7,75 (4H, d, J 7,5 Hz), 7,58 (4H, d, J 7,5 Hz), 7,39 (4H, t, J 7,5 Hz), 7,30 (4H, t, J 7,5 Hz), 5,20-5,05 (2H, m), 4,41 (4H, d, J 6,5 Hz), 4,21 (4H, t, J 6,5 Hz), 3,64

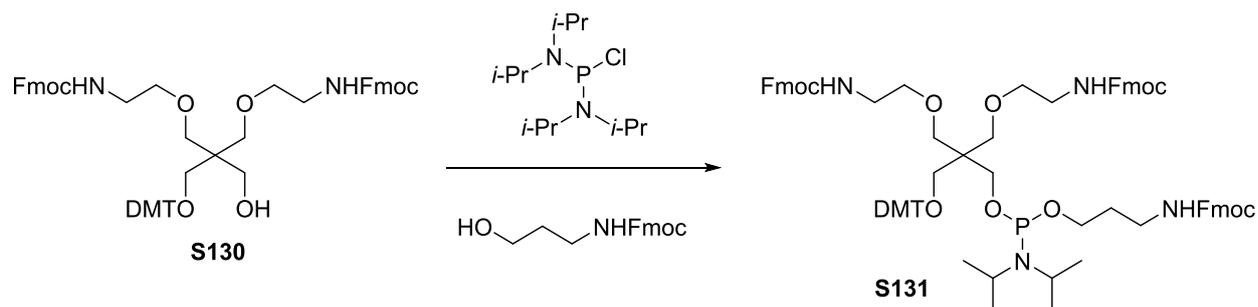
(4H, s), 3,48 (8H, s), 3,36 (4H, s); ESI MS para $C_{39}H_{42}N_2O_8$ calculado 666,7, observado $[M + H]^+ 667,3$.

Composto 130



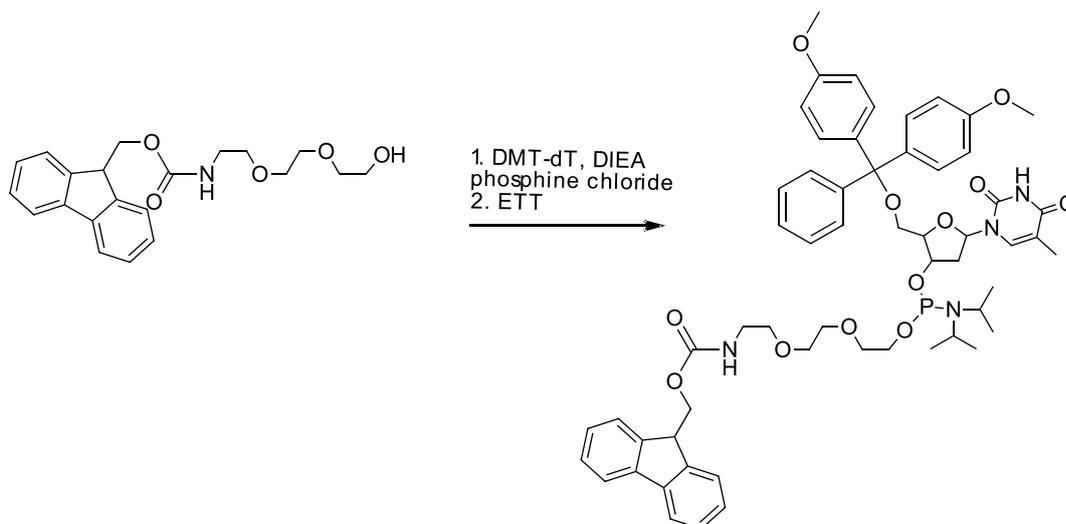
[00667] A uma solução de diol S129 (0,73 g, 1,1 mmol), DIPEA (0,19 mL, 1,1 mmol) e DMAP (0,013 g, 0,11 mmol) em diclorometano (6 mL) a 0°C foi adicionada uma solução de DMTrCl (0,34 g, 0,99 mmol) em diclorometano (1 mL) gota a gota. A mistura resultante foi aquecida à temperatura ambiente e agitada durante a noite. A mistura foi evaporada para dar um resíduo, que foi submetido à purificação instantânea em coluna de sílica gel em um ISCO (hexano/acetato de etila, 20 - 100%) para dar 0,47 g (44%) do composto protegido mono dimetoxitritil **S130** como uma espuma branca. ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3 ; ppm): δ 7,75 (4H, d, J 7,5 Hz), 7,58 (4H, d, J 7,5 Hz), 7,39 (4H, t, J 7,5 Hz), 7,32-7,25 (8H, m), 7,17 (4H, d, J 6,5 Hz), 6,83 (4H, d, J 6,5 Hz), 5,20-5,05 (2H, m), 4,41 (4H, d, J 6,5 Hz), 4,21 (4H, t, 6,5 Hz), 3,82 (6H, s), 3,64 (4H, s), 3,48 (8H, s), 3,36 (4H, s); ESI MS para $C_{60}H_{60}N_2O_{10}$ calculado 969,1, observado $[M + \text{Na}]^+ 991,3$.

Composto S131



[00668] Uma solução de bis- (N, N-diisopropilamino) - clorofosfina (0,085 g, 0,32 mmol) em CH₂Cl₂ seco (1,0 mL) foi adicionada gota a gota a uma solução de 3-Fmoc-amino-propan-1-ol (0,090 g, 0,30 mmol) e N, N-diisopropiletilamina (0,18 mL, 1,05 mmol) em CH₂Cl₂ seco (3,0 mL) a -78°C. A mistura de reação foi aquecida à temperatura ambiente e agitada por 1,5 h. Foi adicionada uma solução do composto **S130** (0,30 g, 0,30 mmol) em 1,0 mL de CH₂Cl₂ seco, e a mistura resultante foi agitada por 10 min. Uma solução de ETT (0,72 mL, 0,25 M em acetonitrila, 0,18 mmol) foi adicionada à mistura de reação e a mistura resultante foi agitada por 3 h. A mistura foi diluída com CH₂Cl₂ (20 mL) e lavada com bicarbonato de sódio aquoso saturado (20 mL) e salmoura (20 mL). A camada orgânica foi seca sobre sulfato de sódio anidro e o filtrado foi evaporado sob vácuo para produzir um resíduo, o qual foi submetido a purificação instantânea em coluna de gel de sílica em um companheiro ISCO usando acetato de etila/hexano com 3% de trietilamina como sistema co-solvente (Gradiente de 0-30%) para dar 0,12 g do produto **S131** (32%) como uma espuma branca. ESI MS para C₈₄H₉₁N₄O₁₃P Calculado 1395,6, Observado 1395,7 [M] +; 31P RMN (202 MHz, CDC13): δ146,41.

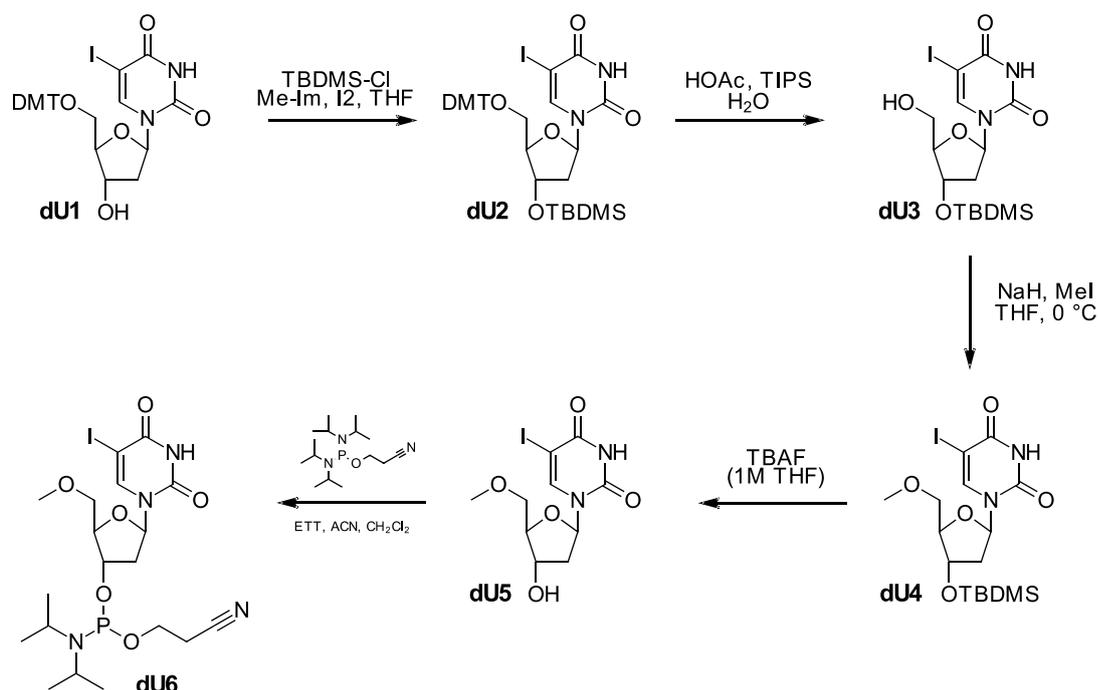
Composto dT4

**S108****dT4**

[00669] Síntese de fosforamidito de FmocNH-PEG2-hidroxil-diisopirilamino-dT (5'-DMT) (**dT4**). Uma suspensão com agitação de 5'-DMT-desoxitimidina (4,30 g, 7,89 mmol) e DIEA (1,51 mL, 8,68 mmol) em CH₂Cl₂ (40 mL) foi resfriada a -78 °C sob argônio. Uma solução de bis (diisopirilamino) clorofosfina (2,32 g, 8,68 mmol) em CH₂Cl₂ (10 mL) foi adicionada gota a gota. A mistura foi removida do banho de arrefecimento e agitada durante 1 h. FmocNH-Peg2-OH (S108, 2,93 g, 7,89 mmol) em CH₂Cl₂ (15 mL) foi adicionado à mistura de reação seguida por uma solução de ETT (0,25 M em acetonitrila, 18,9 mL). Após agitação durante a noite, a mistura foi concentrada in vácuo, redissolvida em EtOAc e lavada com solução sat. NaHCO₃ (aq.) e salmoura. A camada orgânica foi removida in vácuo para proporcionar uma espuma branca. Este material em bruto foi purificado por cromatografia em SiO₂ para proporcionar o fosforamidito em epígrafe (**dT4**, 4,1 g, 50% de rendimento).

[00670] O protocolo sintético descrito acima foi utilizado para a síntese de outros precursores de fosforamidita de diferentes testadores.

Composto dU6



[00671] A uma solução de **dU1** (3,3 g, 5,0 mmol), 1-metilimidazol (1,2 mL, 15,0 mmol) e iodo (1,9 g, 15,0 mmol) em THF (10 mL) em THF (10 mL) sob Ar(g) à temperatura ambiente foi adicionou-se uma solução de cloreto de terc-butildimetilsilil (0,8 g, 5,5 mmol) em THF (5 mL) gota a gota com agitação. A reação foi agitada à temperatura ambiente por 1 hora. A TLC confirmou a conclusão da reação. O solvente foi removido sob vácuo, o produto bruto foi dissolvido em acetato de etilo e lavado com aq. Na₂S₂O₃ (conc). Fase orgânica seca sobre Na₂SO₄, filtrada e evaporada. O produto bruto foi purificado por coluna flash de sílica gel usando um companheiro ISCO (hexanos/acetato de etila, 0-50%) para dar **dU2** como um sólido com rendimento quantitativo. RMN consistente com o publicado *Nucleic Acids Research*, **2011**, Vol. 39, No. 9, 3962-3971.

[00672] Uma solução de **dU2** (3,9 g, 5,0 mmol) dissolvida em uma solução aquosa de ácido acético a 80% (40 mL) com

triisopropilsilano (1,0 mL, 5,0 mmol) foi agitada à temperatura ambiente por 1 hora. A TLC confirmou a conclusão da reação. Remova o solvente sob vácuo. O produto bruto foi purificado por uma coluna flash de sílica gel utilizando um companheiro ISCO (hexanos/acetato de etilo, 0-60%) para dar 1 g (43%) do composto desejado **dU3** como um sólido. ESI MS para $C_{15}H_{25}IN_2O_5Si$ calculado 468,4, observado $[M + Na] + 491,0$.

[00673] A uma solução de **dU3** (1,0 g, 2,2 mmol) em THF (20 mL) sob Ar(g) e resfriada a 0°C em um banho de água gelada foi adicionado hidreto de sódio (60% de dispersão, 0,2 g, 4,7 mmol). A reação foi agitada por 30 minutos a 0°C. Foi adicionado iodometano (0,7 mL, 10,8 mmol) gota a gota e a reação foi agitada a 0 ° C por 3 horas. RP-HPLC/MS confirmou a conclusão da reação. A reação foi extinta com 20 mL de metanol a 0°C e aquecida à temperatura ambiente. Foi adicionado $NaHCO_3$ (aq.) (sat.) e a mistura foi extraída com CH_2Cl_2 . A fase orgânica foi seca sobre Na_2SO_4 , filtrada e o líquido concentrado sob vácuo. A purificação por cromatografia em coluna de sílica gel (hexanos/acetato de etilo, 0-50%) deu **dU4** sólido (0,6 g, 58% de rendimento). ESI MS para $C_{16}H_{27}IN_2O_5Si$ calculado 482,4, observado $[M + H] + 483,1$.

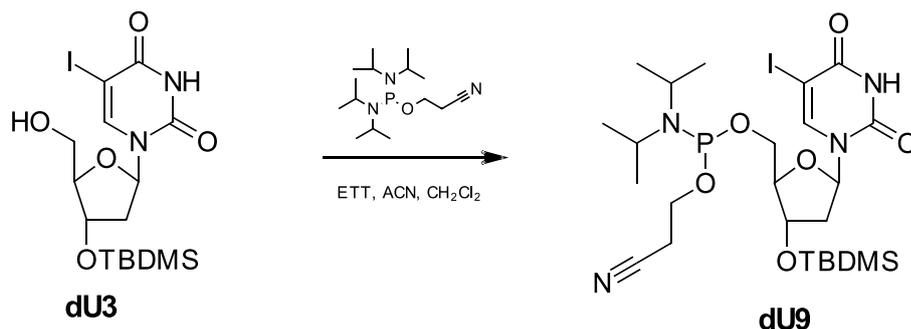
[00674] Fluoreto de *terc*-butilamônio (1 M THF, 3 mL, 3,0 mmol) foi adicionado gota a gota com agitação a uma solução resfriada (0°C) de **dU4** (0,6 g, 1,3 mmol) dissolvida em THF (20 mL) sob Ar (g) A solução arrefecida foi agitada durante 30 minutos e depois aquecida até à temperatura ambiente. Após 3,5 horas, RP-HPLC/MS confirmou a conclusão da reação. O produto em bruto foi purificado por cromatografia em coluna sobre sílica gel (diclorometano/metanol, 0-10%) para dar **dU5** sólido (0,4 g, 92%

de rendimento). ESI MS para $C_{10}H_{13}IN_2O_5$ calculado 368,1, observado $[M + H]^+ + 369,0$.

[00675] A uma solução **dU5** (0,4 g, 1,2 mmol) em diclorometano (5 mL) sob Ar(g) à temperatura ambiente foi adicionada uma solução de 2'-cianoetil-N,N,N',N'-tetraisopropil fosforamidito (0,4 mL, 1,3 mmol) em diclorometano (5 mL) gota a gota com agitação. A reação foi agitada por 30 minutos à temperatura ambiente. Foi adicionado etiltiotetrazole (solução 0,25 M em ACN, 2,9 mL, 0,7 mmol) e a reação foi continuada durante a noite. A TLC confirmou a conclusão da reação. O solvente foi removido in vácuo e a mistura bruta foi diluída com 20 mL de diclorometano, lavada sequencialmente com uma solução saturada de $NaHCO_3$ (10 mL) e salmoura (10 mL). Fase orgânica seca sobre Na_2SO_4 , filtrada e evaporada. A mistura bruta foi dissolvida em acetato de etila e purificada por coluna de sílica gel usando um companheiro Isco (hexanos/acetato de etila, 0-100%) para dar 0,3 g (49,9%) do composto desejado **dU6** como um sólido. ESI MS para $C_{19}H_{30}N_4O_6P$ Calculado 568,3, Observado 567,3 $[M-H]^-$; ^{31}P RMN (202 MHz, $CDCl_3$, ppm): 5149,25.

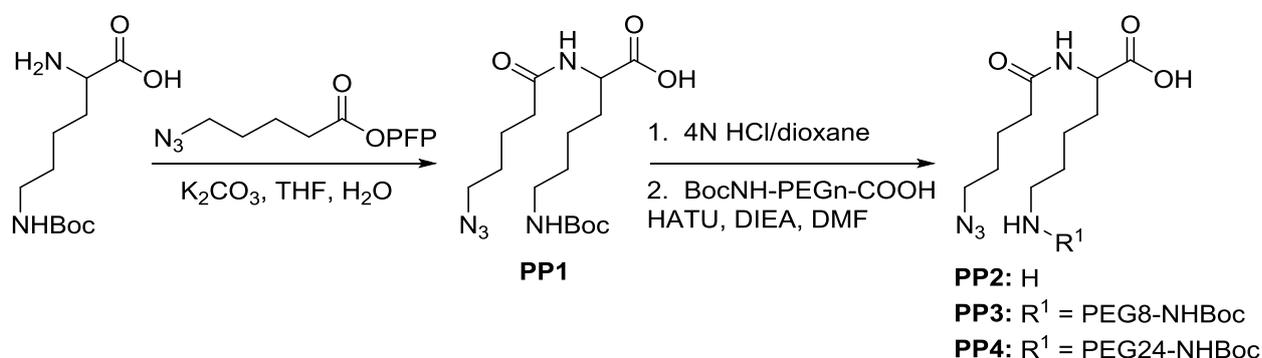
Composto dU9

[00676] O composto do título foi preparado por reação de **dU3** sob as codificações de reação padrão mostradas abaixo. ^{31}P -RMN (202 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 149,42, 149,31; MS ESI-m/z encontrado 667,1 $[M-H]^-$. MS ESI + m/z encontrado 669,2 $[M + H]^+$, 691,3 $[M + Na]^+$.



Preparação de Ligantes Ligados a Porções Auxiliares:

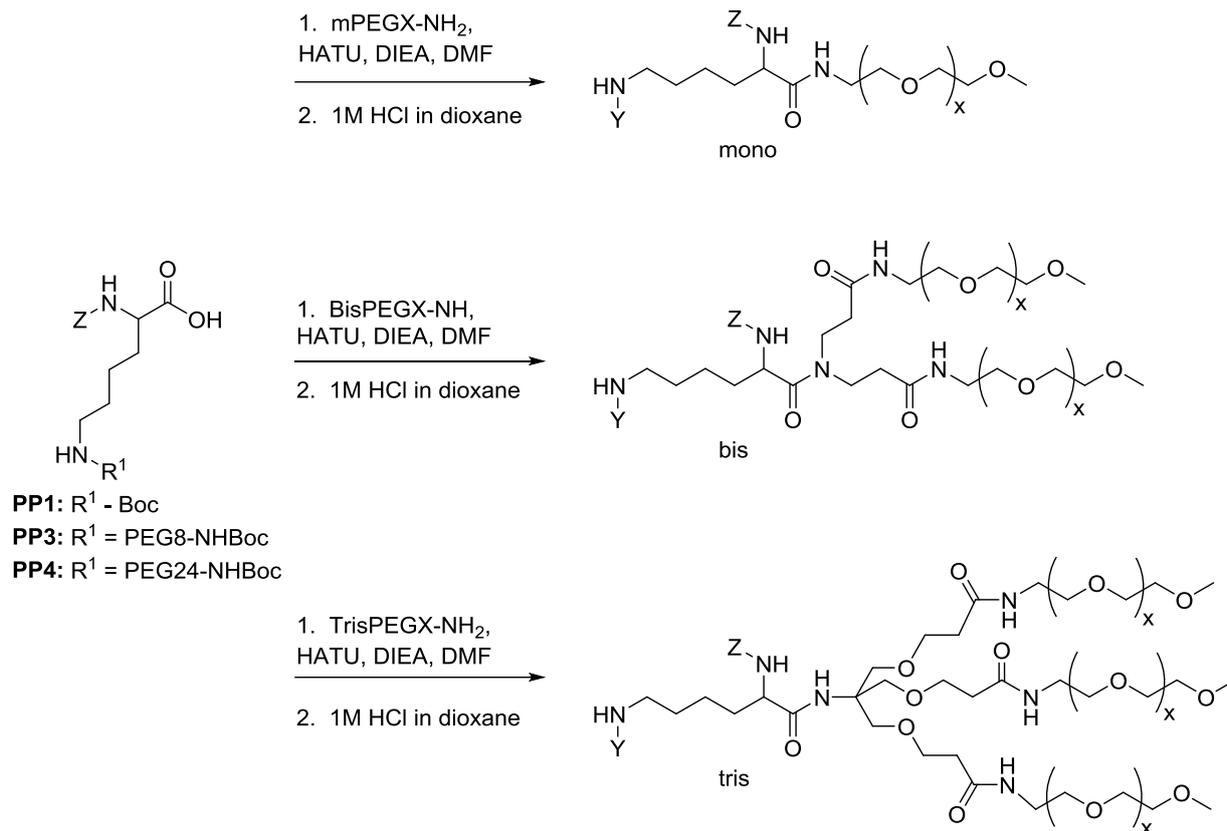
Compostos PP2, PP3 e PP4



[00677] *Preparação de (5-azidovaleril) -ε-N-Boc lisina (PP1).*

Dissolveu-se N-Boc-lisina (9,46 g, 38,4 mmol) e K₂CO₃ (2,67 g, 19,3 mmol) em THF:H₂O 1:1 (60 mL). Foi adicionado pentafluorofenil-5-azidovalerato (10,8 g, 34,9 mmol) em THF (10 mL), e a reação foi agitada durante a noite à temperatura ambiente. O produto desejado foi observado por RP-HPLC-MS, 394,2 [M + Na]. A reação foi acidificada a pH 5 por titulação com HCl 1N (aq.), e o produto foi extraído com EtOAc (3 x 100 mL). A camada orgânica foi lavada sequencialmente com H₂O (50 mL) e salmoura (50 mL). A camada orgânica foi seca sobre MgSO₄ e concentrada sob vácuo até um xarope grosso. O produto em bruto foi purificado por cromatografia em coluna sobre sílica gel para proporcionar o produto desejado **PP2** como agulhas brancas (8,1 g, 62% de rendimento). ESI MS + massa calculada C₁₆H₂₉N₅O₅: 371,4, encontrada: 394,2 [M + Na] +.

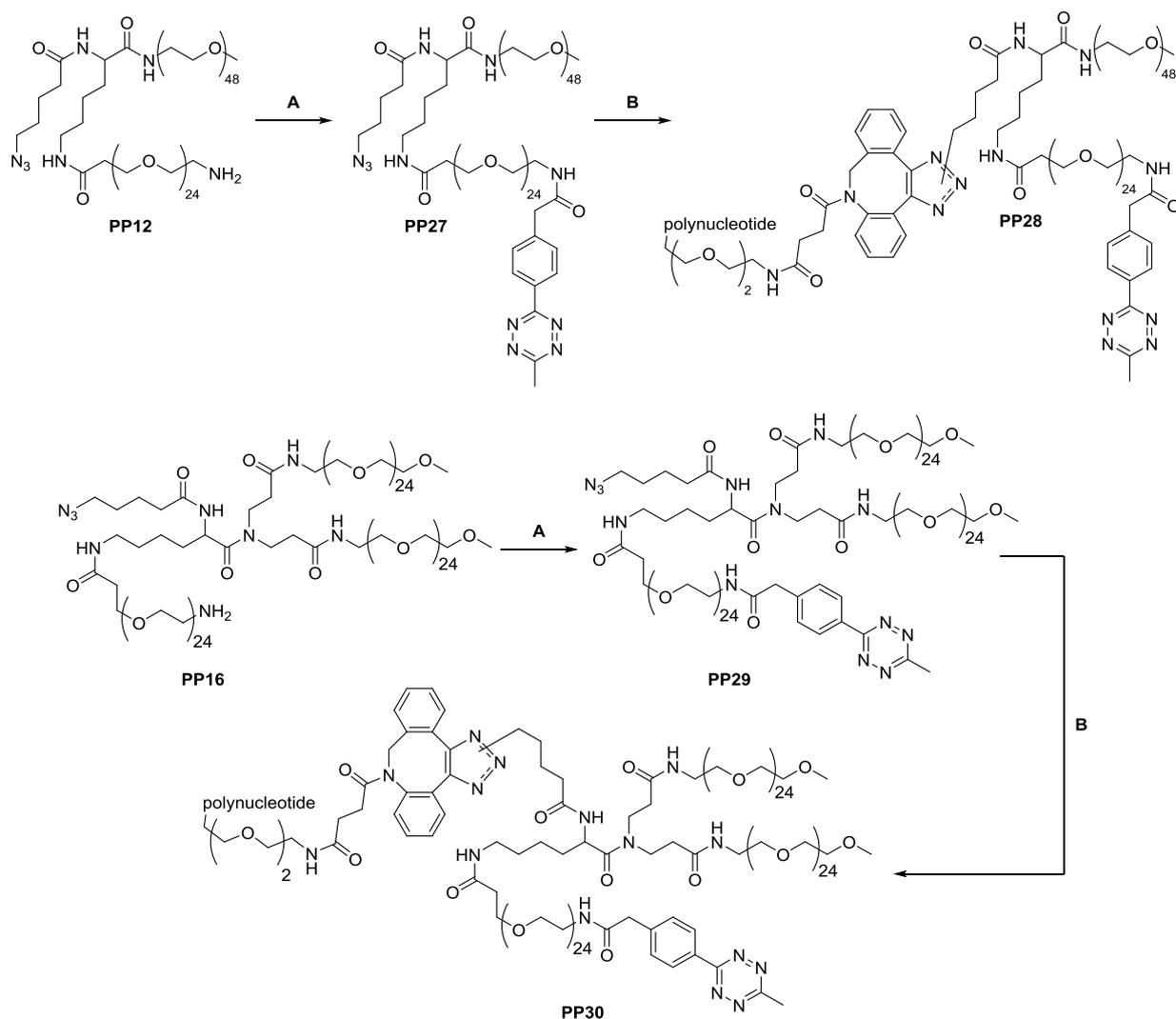
[00678] *Protocolo geral para pegilação de PP1: preparação de (5-azidovaleril) - ε-N- (NH-Boc PEG24) lisina (PP4).* O **PP1** (0,74 g, 2,0 mmol) foi tratado com HCl (2 mL, 4 N em dioxano) por 4 h. HPLC-MS mostrou desprotecção completa, 272,2 [M + H] +. A reacção foi diluída com H₂O: acetonitrila 1:1 (10 mL), congelada e liofilizada durante a noite para fornecer PP2 como um sólido branco com rendimento quantitativo. O ácido NHBoc-PEG24 (1,1 g, 0,88 mmol) em DMF (3 mL) foi ativado com HATU (0,34 g, 0,88 mmol), HOBT (0,14 g, 0,88 mmol) e DIEA (0,7 mL, 4,0 mmol), em seguida tratados com **PP2** (0,24 g, 0,8 mmol) por 2 horas. RP-HPLCMS mostrou formação do **PP4** desejado. O produto bruto foi purificado por RP-HPLC para proporcionar **PP4** como um sólido branco (0,55 g, 46% de rendimento). ESI MS + massa calculada C₆₇H₁₃₀N₆O₃₀: 1499,77, encontrada: 1499,9 [M + H] +, 1400,8 [M-Boc] +.



[00679] BisPegX-NH₂ e TrisPegX-NH₂ (onde X = vários comprimentos de PEG) foram preparados a partir de materiais de partida disponíveis comercialmente usando os procedimentos descritos em WO2015/188197.

[00680] *Protocolo geral para a pegilação de PP2, PP3 e PP4:* A lisina **PP1** (38 mg, 0,1 mmol) dissolvida em DMF (1 mL) foi tratada com HATU (37 mg, 0,1 mmol), N, N-diisopropiletilamina (49). mL, 0,3 mmol) e mPEG48-NH₂ (200 mg, 0,09 mmol). RP-HPLC-MS mostrou adição completa de PEG48 a **PP1**. O produto bruto foi purificado por RP-HPLC para proporcionar NHBoc **PP7** como um sólido branco (97 mg, 42% de rendimento). ESI MS + massa calculada C₁₁₃H₂₂₄N₆O₅₂: 2499,03, encontrada: 833,7 [M + 3H]³⁺, 625,6 [M + 4H]⁴⁺. O **PP7** foi desprotegido com HCl (2 mL, 4N em dioxano) por 4 h. A HPLC-MS mostrou desprotecção completa, como observado pelo desaparecimento do pico com uma massa do material de partida. A

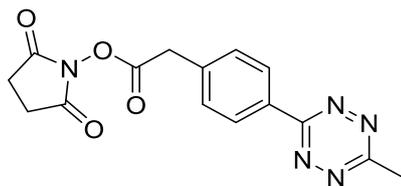
reação foi diluída com H₂O: acetonitrila 1: 1 (10 mL), congelada e liofilizada durante a noite para proporcionar quantitativamente um sólido branco **PP8**. ESI MS + massa calculada C₁₀₈H₂₁₆N₆O₅₀: 2398,88, encontrada: 1199,8 [M + 2H]²⁺, 800,3 [M + 3H]³⁺, 600,5 [M + 4H]⁴⁺, 480,6 [M + 5H]⁵⁺.



[00681] Nesse esquema, as condições são:

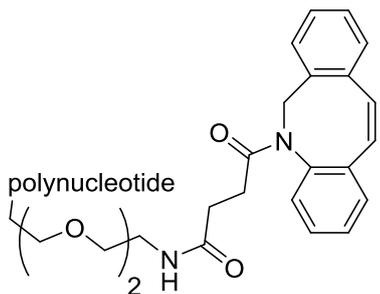
- A)** 6-metiltetrazina-OSu, HATU, base de Hünig, DMF; e
B) DBCO-CpG, acetonitrilo/H₂O;

em que 6-metil tetrazina-OSu tem a seguinte fórmula:



E

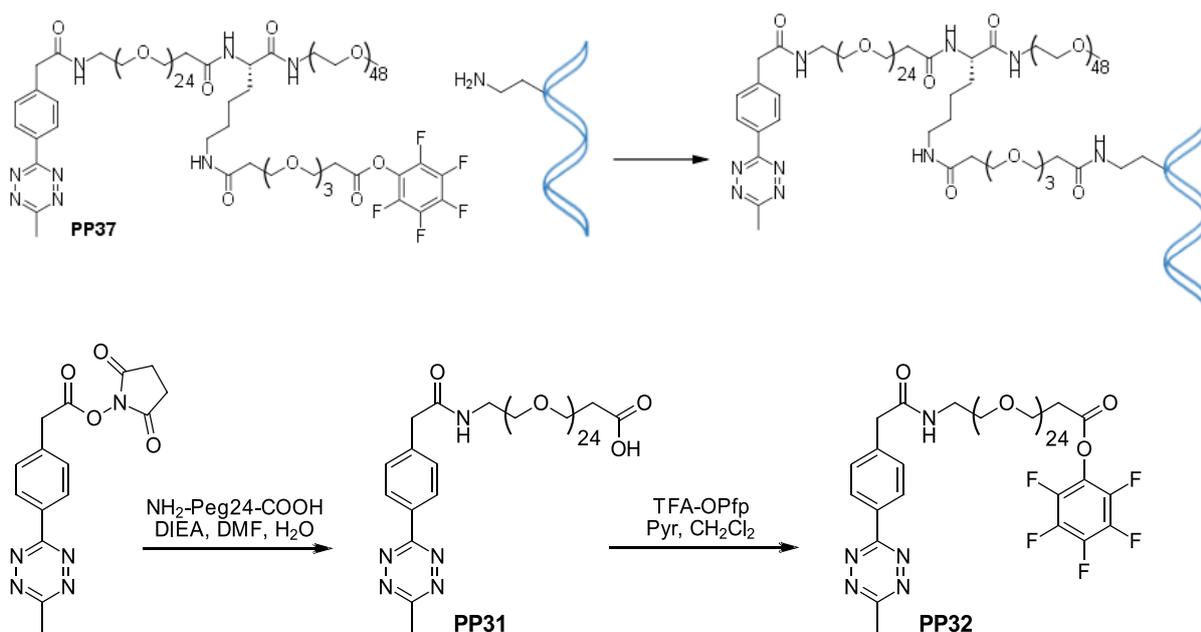
DBCO-CpG é o da seguinte fórmula:



Protocolo geral para preparação de ligantes carregados com polinucleotídeos (PP28 e PP30).

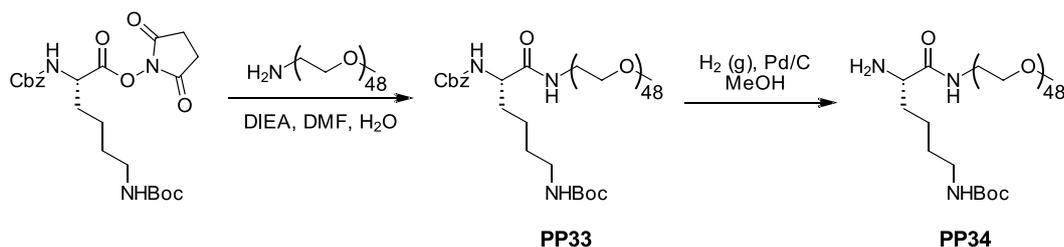
[00682] Cabo de conjugação de tetrazina de **PP12** e **PP16**: **PP12** (43 mg, 0,12 mmol) foi dissolvido em DMF (0,5 mL), tratado com HATU (4,6 mg, 0,12 mmol), DIEA (12,7 μ L, 0,73 mmol) e , após 5 min, com 6-metil-tetrazina-OSu (19,9 mg, 0,61 mmol). A reação bruta foi agitada por 30 min à temperatura ambiente. RP-HPLCMS mostrou acoplamento completo de 6-metil-tetrazina carboxilato a **PP12**. O produto bruto foi purificado por RP-HPLC e as frações reunidas foram liofilizadas para proporcionar PP27 como um sólido púrpura (39 mg, 85% de rendimento). ESI MS + massa calculada $C_{170}H_{325}N_{11}O_{76}$: 3739,47, encontrada: 833,7 $[M + 3H]^{3+}$, 625,6 $[M + 4H]^4$. O **PP27** puro foi tratado em DBCO-CpG em acetonitrila: água (1:1) e incubado a 37 °C por 1-2 horas e mais 1 hora à temperatura ambiente para dar **PP28**. O **PP28** foi purificado por AEX preparativo (20 mM de fosfato e 20 mM de fosfato-1M de brometo de sódio).

[00683] Rota alternativa de um pote para vinculadores carregados em CpG **PP28** e **PP30**. O **PP12** (400 nmol) é tratado com DBCO-CpG (420 nmol) em acetonitrila: água (1: 1) e incubado a 37 °C por 1-2 horas e depois 1 hora adicional à temperatura ambiente. Adiciona-se tetrazina-OSu (4000 nmol) em solução-mãe DMSO à solução bruta de **PP12**-DBCO-CpG e a solução púrpura é reagida por 3 horas à temperatura ambiente por 1-2 horas para obter **PP28**. O **PP28** bruto foi purificado por RP-HPLC preparativa (TEAA 50 mM em água e 10% de acetonitrila: água) ou AEX preparativo (fosfato 20 mM e fosfato 20 mM e brometo de sódio 1M).



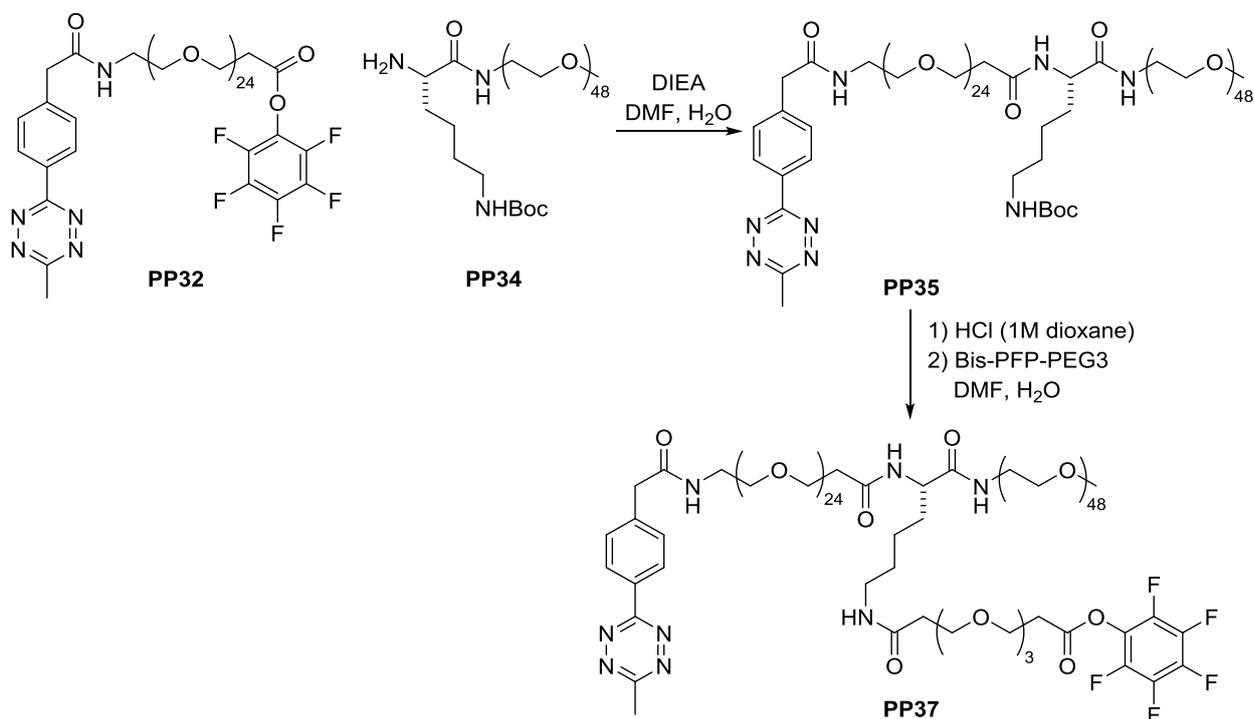
[00684] Preparação de Tetrazine-PEG24-OPFP (**PP32**). A uma solução de ácido amino-PEG24-carboxílico (1,0 g, 0,9 mmol) e diisopropiletilamina (0,8 mL, 4,4 mmol) em DMF/água (1: 1, 12 mL) sob Ar (g) foi adicionado éster metiltetrazinofenilacetil succinimidílico (370 mg, 1,1 mmol) em DMF (3 mL) gota a gota com agitação. A reação foi agitada à temperatura ambiente por 2 horas. RP-HPLC/MS indicou a formação do produto. O solvente foi

removido sob vácuo e o produto bruto foi purificado por RP-HPLC (modificador TFA) para fornecer **PP31**, 1,1 g (80%). ESI MS para $C_{62}H_{111}N_5O_{27}$ calculado 1358,56, observado $[M + H]^+$ 1358,8. A uma solução de **PP31** (109 mg, 0,08 mmol) em diclorometano (3 mL) sob Ar (g) foi adicionada piridina anidra (32 mg, 0,4 mmol) e trifluoroacetato de pentafluorofenil (67 mg, 0,24 mmol). A reação foi agitada à temperatura ambiente durante a noite. O solvente foi removido sob vácuo. O produto bruto foi redissolvido em EtOAc e lavado com aq. $NaHCO_3$ (5% p/v) (3x) e salmoura (1x). A fase orgânica foi seca sobre Na_2SO_4 , filtrada e concentrada in vácuo para dar **PP32** quantitativamente. Utilizado na próxima etapa sem purificação adicional. ESI MS para $C_{68}H_{110}F_5N_5O_{27}$ calculado 1524,61, observado $[M + 2H]^{2+}$ 763,0.



[00685] *Preparação de PP34.* A uma solução de mPEG48-amina (2,15 g, 1,00 mmol) e diisopropiletilamina (0,87 mL, 5,00 mmol) em DMF/água (1: 1, 10 mL) sob Ar (g) foi adicionado $N\alpha$ -Cbz- $N\epsilon$ - Éster succinimidílico de Boc-L-lisina (570 mg, 1,2 mmol) em DMF (5 mL) gota a gota com agitação. A mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente por 2 horas. RP-HPLC/MS indicou a formação do produto, PP33. A mistura de reação foi concentrada sob vácuo e purificada por cromatografia em sílica gel (CH_2Cl_2 : MeOH 0-10%). O **PP33** recuperado foi usado diretamente na próxima reação. ESI MS para $C_{116}H_{223}N_3O_{53}$ calculado 2508,0, observado $[M + 3H]^{3+}$ 836,7, $[M + 4H]^{4+}$ 627,9. Uma solução de PP33 (1,00 mmol) em MeOH foi lavada com nitrogênio (g) e paládio sobre carvão ativado

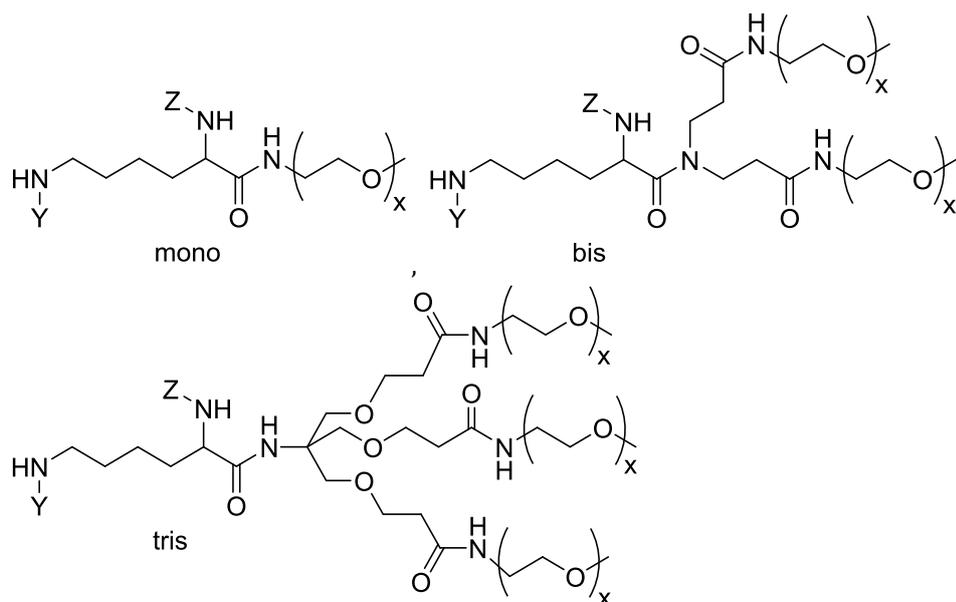
(10% em peso, catalítico) foi adicionado. A solução foi evacuada alternadamente e purgada com hidrogênio(g) (3X). RP-HPLC/MS após 2 horas mostrou formação de **PP34**. A mistura heterogênea foi filtrada através de um leito de Celite e lavada com grandes quantidades de metanol. A remoção do solvente sob vácuo, produziu **PP34** (2,0 g, 84% de rendimento, ao longo de 2 etapas). ESI MS para $C_{108}H_{217}N_3O_{51}$ calculado 2373,87, observado $[M + 3H]^{3+}$ 792,0.



[00686] *Preparação de **PP37***. A uma solução de **PP32** (124 mg, 0,08 mmol) e diisopropiletilamina (31 mg, 0,24 mmol) em DMF/água (1: 1, 10 mL) sob Ar (g) foi adicionado **PP34** (230 mg, 0,1 mmol) em DMF/água (1: 1, 10 mL) gota a gota com agitação. A reação foi agitada à temperatura ambiente por 2 horas e RP-HPLC/MS indicou a formação do produto **PP35**. O solvente foi removido sob vácuo e o **PP35** utilizado no passo seguinte sem purificação adicional. ESI MS para $C_{170}H_{326}N_8O_{77}$ calculado 3714,4, observado $[M + 4H]^{4+}$ 929,5, $[M + 5H]^{5+}$ 743,8. **PP35** bruto (0,08 mmol) tratado com HCl (4 N em dioxano, 5 mL) sob Ar (g). A reação foi agitada à

temperatura ambiente por 2 horas e RP-HPLC/MS indicou remoção completa do grupo protetor Boc. O solvente foi removido in vácuo e a amina foi acilada com uma solução de éster bis-Peg3-PFP (230 mg, 0,4 mmol) em DMF (5 mL) e diisopropiletilamina (140 uL, 0,8 mmol). Após 2 horas, RP-HPLC/MS indicou a formação do produto **PP37**. O solvente foi removido sob vácuo e o produto bruto foi purificado por RP-HPLC (modificador TFA) para fornecer **PP37** como um sal tetra-TFA, 31 mg com um rendimento de 8,7%. ESI MS para $C_{181}H_{333}F_5N_8O_{81}$ calculado 4012,56, observado $[M + 3H]^{3+}$ 1338,3, $[M + 4H]^{4+}$ 1004,0, $[M + 5H]^{5+}$ 803,4, $[M + 6H]^{6+}$ 669.

Lista dos vinculadores que contêm unidades auxiliares:



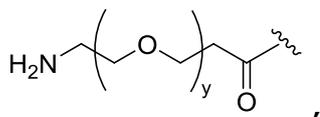
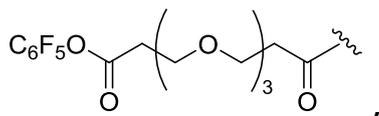
Ligante	Valencia	X	Y	Z (tether)	Formula	MS calc.	MS encontrado (ESI+)
PP6	mono	24	H	N ₃ - valeramide	C ₆₀ H ₁₂₀ N ₆ O ₂₆	1341.62	1341.7, 671.5

Ligante	Valencia	X	Y	Z (tether)	Formula	MS calc.	MS encontrado (ESI+)
PP8	mono	48	H	N ₃ - valeramide	C ₁₀₈ H ₂₁₆ N ₆ O ₅₀	2398.88	1199.8, 800.3, 600.5, 480.6
PP10	mono	48	CO-PEG08- NH ₂	N ₃ - valeramide	C ₁₂₇ H ₂₅₃ N ₇ O ₅₉	2822.38	1412.0, 941.7, 706.5, 565.4, 471.4
PP12	mono	48	CO-PEG24- NH ₂	N ₃ - valeramide	C ₁₅₉ H ₃₁₇ N ₇ O ₇₅	3527.21	1176.5, 882.6, 706.3
PP14	bis	24	CO-PEG08- NH ₂	N ₃ - valeramide	C ₁₃₄ H ₂₆₅ N ₉ O ₆₁	2978.56	1490.1, 993.7, 745.6, 596.7, 497.4
PP16	bis	24	CO-PEG24- NH ₂	N ₃ - valeramide	C ₁₆₆ H ₃₂₉ N ₉ O ₇₇	3683.39	1228.6, 921.7, 737.6, 615.0
PP18	bis	48	CO-PEG08- NH ₂	N ₃ - valeramide	C ₂₃₀ H ₄₅₇ N ₉ O ₁₀₉	5093.08	1247.2, 1019.6, 849.8, 728.6, 637.7
PP20	bis	48	CO-PEG24- NH ₂	N ₃ - valeramide	C ₂₆₂ H ₅₂₁ N ₉ O ₁₂₅	5797.93	1450.3, 1160.4, 967.1, 829.1, 725.8

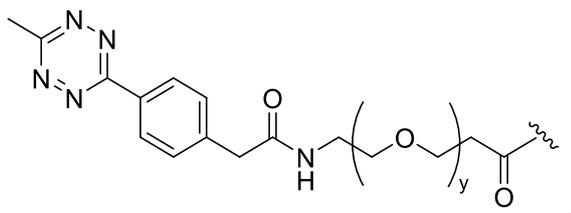
Ligante	Valencia	X	Y	Z (tether)	Formula	MS calc.	MS encontrado (ESI+)
PP22	tris	24	H	N ₃ - valeramide	C ₁₇₁ H ₃₃₉ N ₉ O ₈₀	3801.52	1268.0, 951.2, 761.2
PP24	tris	24	CO-PEG08- NH ₂	N ₃ - valeramide	C ₁₉₀ H ₃₇₆ N ₁₀ O ₈₉	4225.02	1409.3, 1057.0, 846.0, 705.2, 604.6
PP26	tris	24	CO-PEG24- NH ₂	N ₃ - valeramide	C ₂₂₂ H ₄₄₀ N ₁₀ O ₁₀₅	4929.87	1233.3, 968.8
PP27	mono	48	CO-PEG24- Tetrazine	N ₃ - valeramide	C ₁₇₀ H ₃₂₅ N ₁₁ O ₇₆	3739.47	1247.2, 935.7, 748.8, 624.1, 535.3
PP28	mono	48	CO-PEG24- Tetrazine	p313 + N ₃ - valeramide		8893.7	8891, deconvoluted ESI-
PP29	bis	24	CO-PEG24- Tetrazine	N ₃ - valeramide	C ₁₇₇ H ₃₃₇ N ₁₃ O ₇₈	3895.66	974.8, 780.0
PP30	bis	24	CO-PEG24- Tetrazine	p313 + N ₃ - valeramide		9049.9	9046, deconvoluted ESI-
PP37	mono	48	PFP-PEG3	CO-PEG24- Tetrazine	C ₁₈₁ H ₃₃₃ F ₅ N ₈ O ₈₁	4012.56	1338.3, 1004.0, 803.4, 669.6

Ligante	Valencia	X	Y	Z (tether)	Formula	MS calc.	MS encontrado (ESI+)
PP38	bis	48	CO-PEG24- Tetrazine	p313 + N ₃ - valeramide		11163.2	11159, deconvoluted ESI-
PP39	tris	24	CO-PEG24- Tetrazine	p313 + N ₃ - valeramide		10281.1	10292, deconvoluted ESI-

[00687] Na tabela acima, grupos identificados como Y ou Z tem as seguintes estruturas:

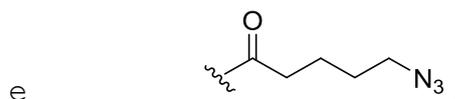
CO-PEG08-NH₂ (y = 8)CO-PEG24-NH₂ (y = 24)

PFP-PEG3



CO-PEG08-Tetrazina (y = 8)

CO-PEG24-Tetrazina (y = 24)

N₃-valeramida

[00688] Na tabela acima, o grupo Z identificado como "p313 + N₃-valeramida" refere-se a um produto de uma reação de cicloadição entre p313 e um ligante tendo N₃-valeramida como Z.

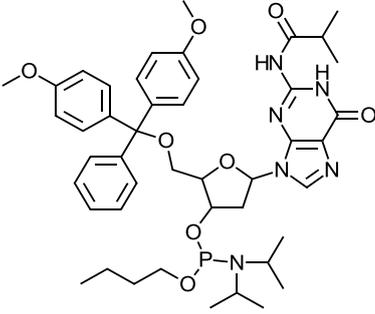
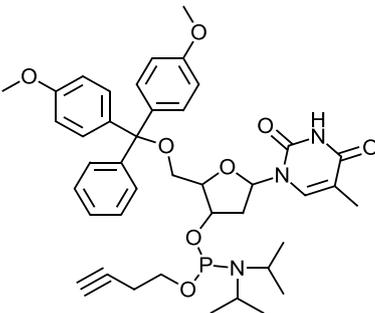
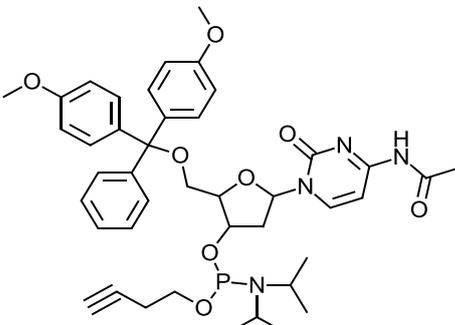
[00689] Os monômeros de fosforamidito mostrados na Tabela 1 foram sintetizados usando os procedimentos sintéticos padrão descritos aqui e no documento WO 2015/188197.

[00690] Os monômeros de oxazafosfolidina bicíclicos utilizados na síntese de oligonucleotídeo fosforotioato quiral foram

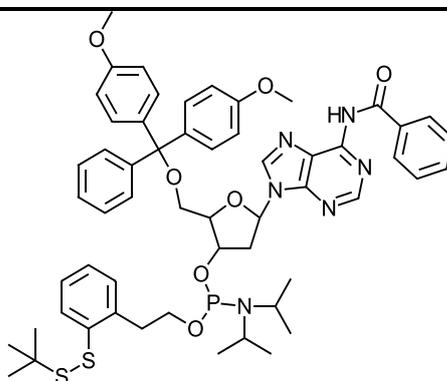
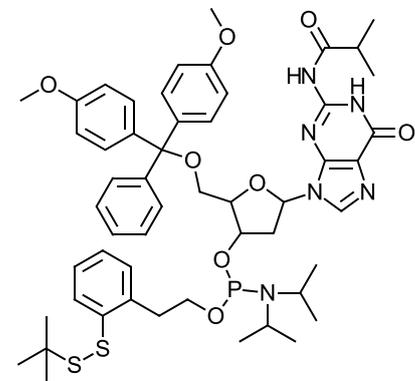
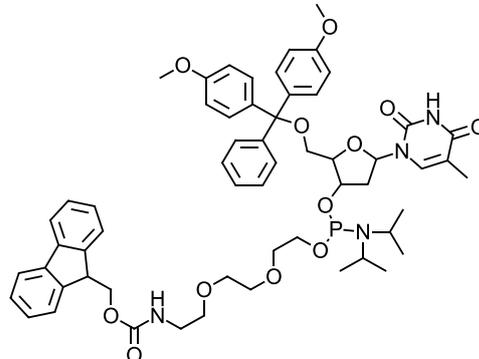
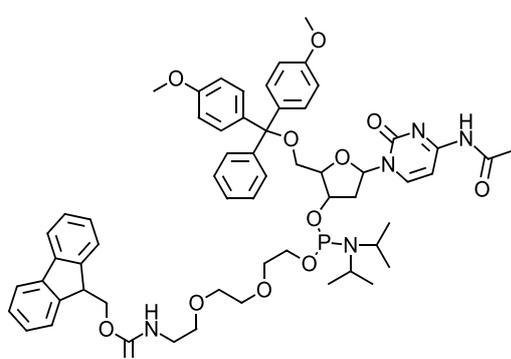
preparados usando o protocolo da literatura como relatado por Wada, *J. Am. Chem. Soc.* 130: 16031-16037, 2008.

Tabela 1

Composto #	Estrutura	³¹ P NMR (δ em ppm) e/ou ESI MS	Rendimento (%)
dT1		ESI MS calculado 747.8, observado 746.9 [M-H] ³¹ P NMR (202 MHz, CDCl ₃): δ147.50, 147.00	
dC1		-	
dA1		ESI MS calculado 860.97, observado 859.9 [M-H], 862.0 [M+H] ³¹ P NMR (202 MHz, CDCl ₃): δ147.47, 147.35	

Composto #	Estrutura	³¹ P NMR (δ em ppm) e/ou ESI MS	Rendi (%)
dG1		ESI MS calculado 842.96, observado 841.7 [M-H], 843.9 [M+H] ³¹ P NMR (202 MHz, CDCl ₃): δ147.05, 147.93	
dT2		ESI MS calculado 743.8, observado 742.8 [M-H], 744.7 [M+H] ³¹ P NMR (202 MHz, CDCl ₃): δ148.26, 147.77	
dC2		-	

Composto #	Estrutura	³¹ P NMR (δ em ppm) e/ou ESI MS	Rendi (%)
dA2		-	
dG2		-	
dT3		ESI MS calculado 916.1, observado 915.6 [M-H] ³¹ P NMR (202 MHz, CDCl ₃): δ147.72, 147.21	
dC3		-	

Composto #	Estrutura	³¹ P NMR (δ em ppm) e/ou ESI MS	Rendi (%)
dA3		-	-
dG3		-	-
dT4		ESI MS calculado 1045.2, observado 1046.3 [M+H] ³¹ P NMR (202 MHz, CDCl ₃): δ148.38, 148.27	
dC4		ESI MS calculado 1088.2, observado 1089.0 [M+H]	

Composto #	Estrutura	³¹ P NMR (δ em ppm) e/ou ESI MS	Rendimento (%)
		³¹ P NMR (202 MHz, CDCl ₃): δ149.29, 148.66	
dA4		ESI MS calculado 1158.3, observado 1157.5 [M-H], 1159.0 [M+H] ³¹ P NMR (202 MHz, CDCl ₃): δ148.38	
dG4		ESI MS calculado 1140.3, observado 1139.1 [M-H], 1141.2 [M+H] ³¹ P NMR (202 MHz, CDCl ₃): δ147.76	

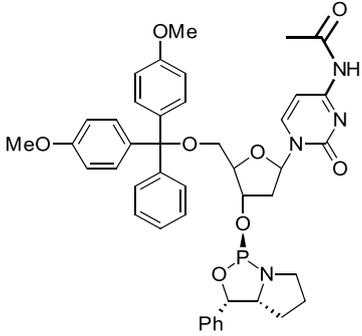
Composto #	Estrutura	³¹ P NMR (δ em ppm) e/ou ESI MS	Rendi (%)
dT5		ESI MS calculado 1011.2, observado 978.6 [M-H] ³¹ P NMR (202 MHz, CDCl ₃): δ147.51, 147.32	
dC5		-	
dA5		-	

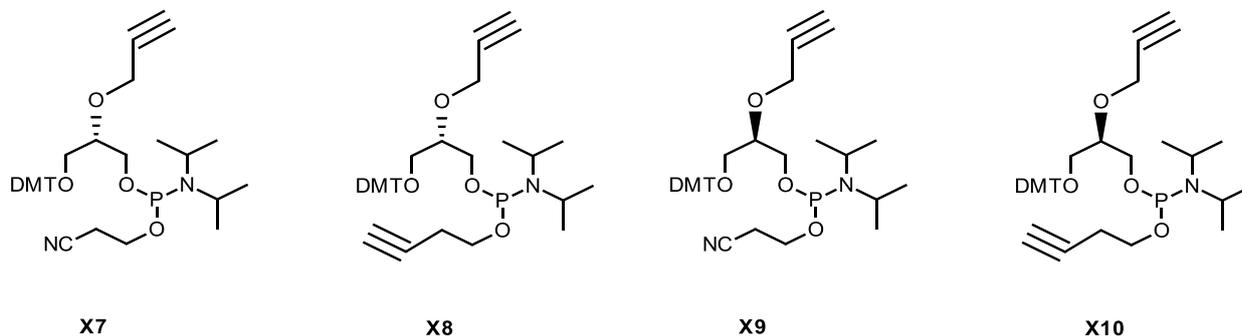
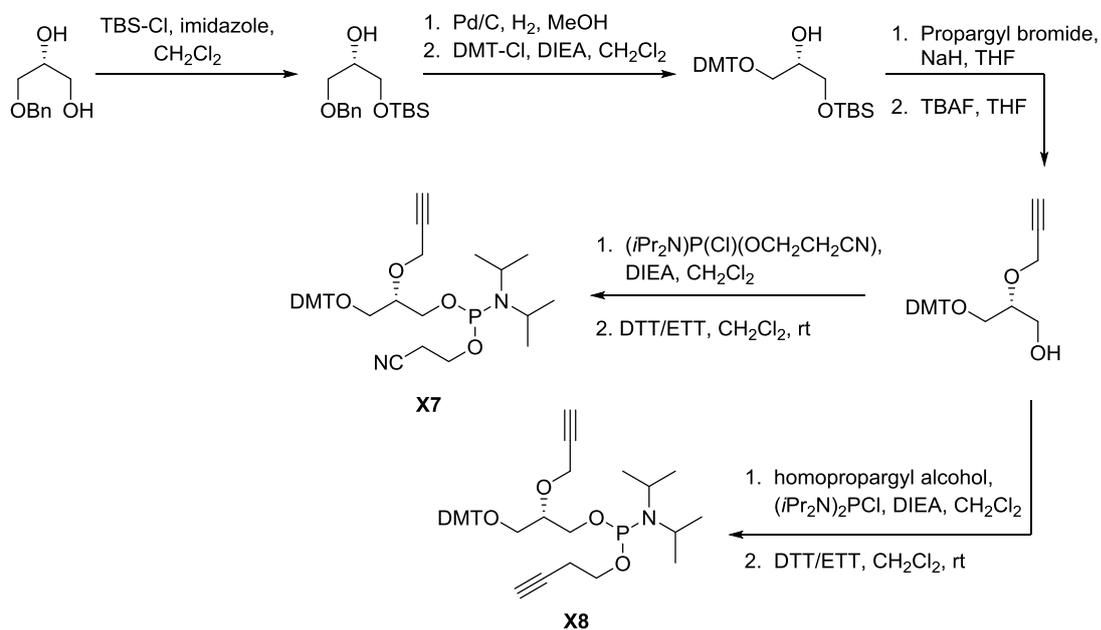
Composto #	Estrutura	³¹ P NMR (δ em ppm) e/ou ESI MS	Rendi (%)
dG5		-	
dT6		-	
dC6		-	

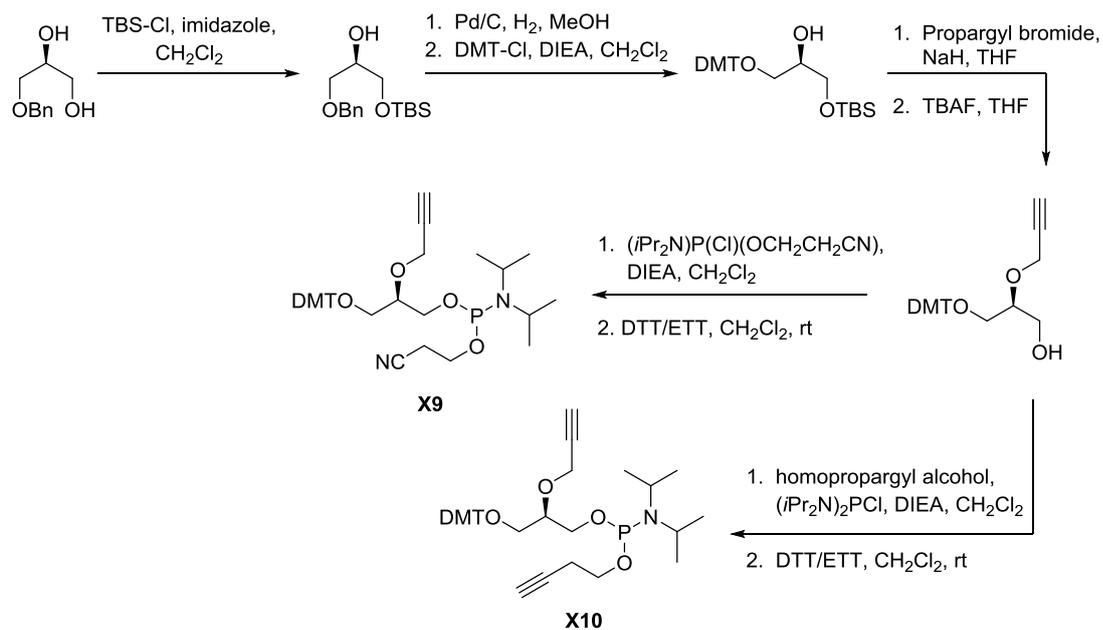
Composto #	Estrutura	³¹ P NMR (δ em ppm) e/ou ESI MS	Rendimento (%)
dA6		-	-
dG6		-	-
dT7		³¹ P NMR (202 MHz, CDCl ₃): δ 147.05 (d, <i>J</i> 8.08 Hz), 146.58 (d, <i>J</i> 8.08 Hz)	42

ESI MS calculado 992.45, observado 994.3 (M+H), 992.0 (M-H)

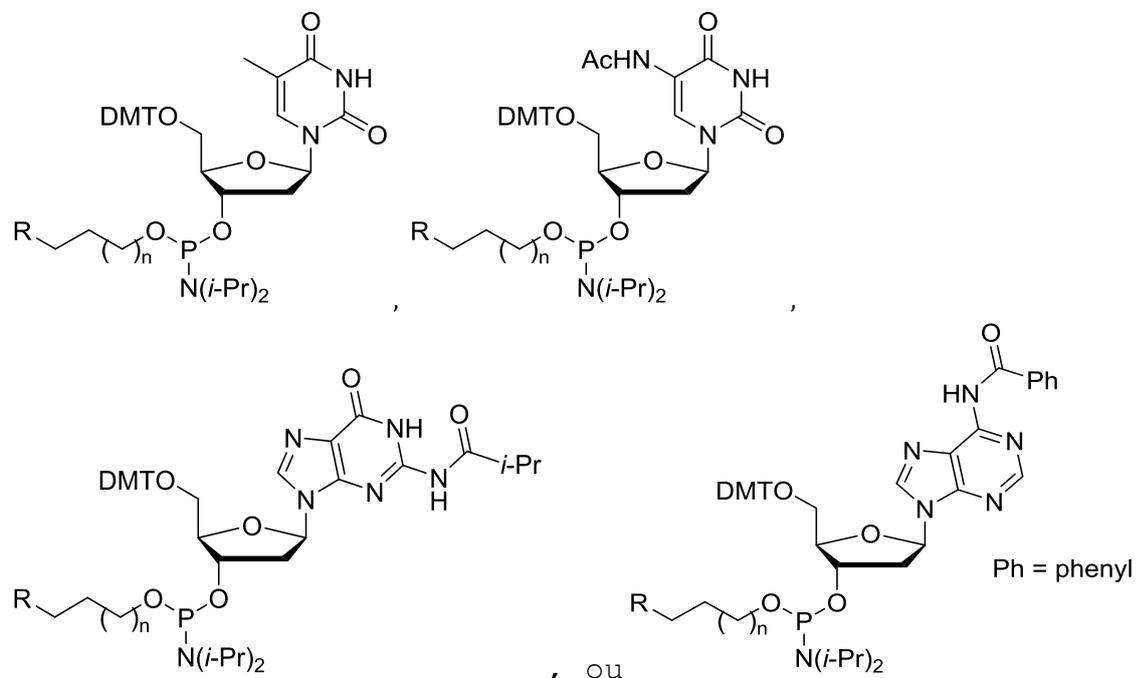
Composto #	Estrutura	³¹ P NMR (δ em ppm) e/ou ESI MS	Rendi (%)
dT8		³¹ P NMR (202 MHz, CDCl ₃): δ 147.80 ESI MS calculado 881.99, observado 880.9 (M-H), 904.9 (M+Na)	14
dU7 (Rp)		³¹ P NMR (202 MHz, CDCl ₃): δ 156.19 (s)	31
dU8 (Sp)		³¹ P NMR (202 MHz, CDCl ₃): δ 155.78 (s)	27
dC7 (Rp)		³¹ P NMR (202 MHz, CDCl ₃): δ 156.75 (s)	21

Composto #	Estrutura	³¹ P NMR (δ em ppm) e/ou ESI MS	Rendi (%)
dC8 (Sp)		³¹ P NMR (202 MHz, CDCl ₃): δ156.08 (s)	25

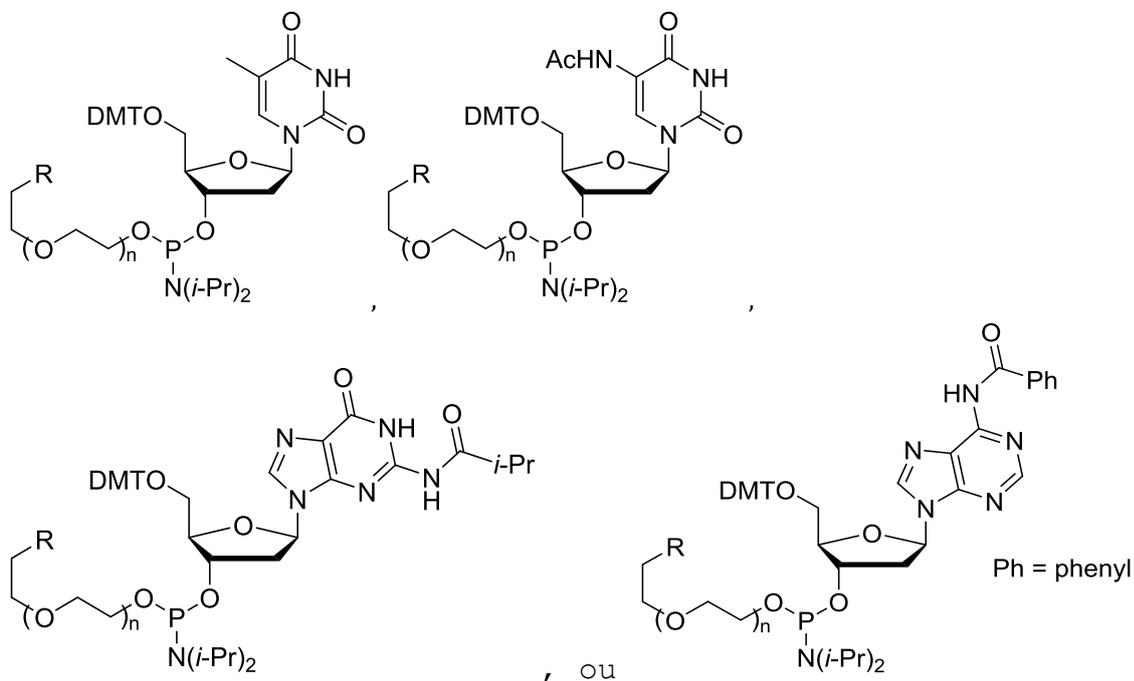
Espaçadores Abásicos Quirais - Compostos X7, X8, X9 e X10:**Síntese X7 e X8****Síntese X9 e X10**



[00691] A seguir, são apresentados mais fosforamiditos de nucleosídeos hidrofílicos que podem ser preparados usando métodos conhecidos na técnica e métodos aqui descritos:

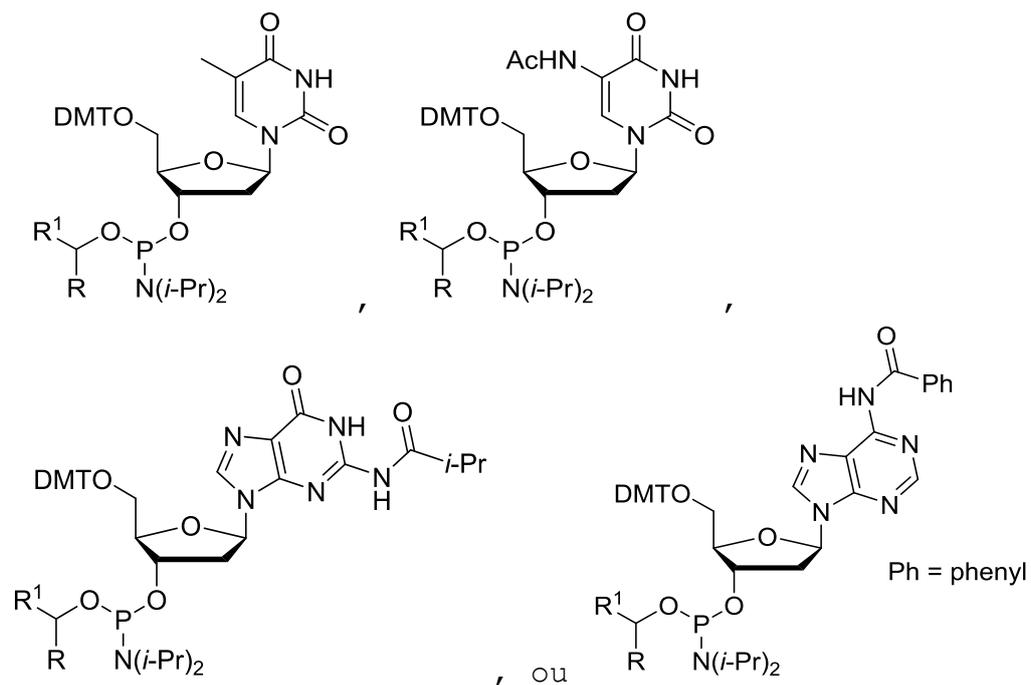


onde R é OH, amino opcionalmente substituído ou $-\text{CO}_2\text{R}^1$ (R^1 é H ou um contra-íon) e n é um número inteiro de 1 a 4;



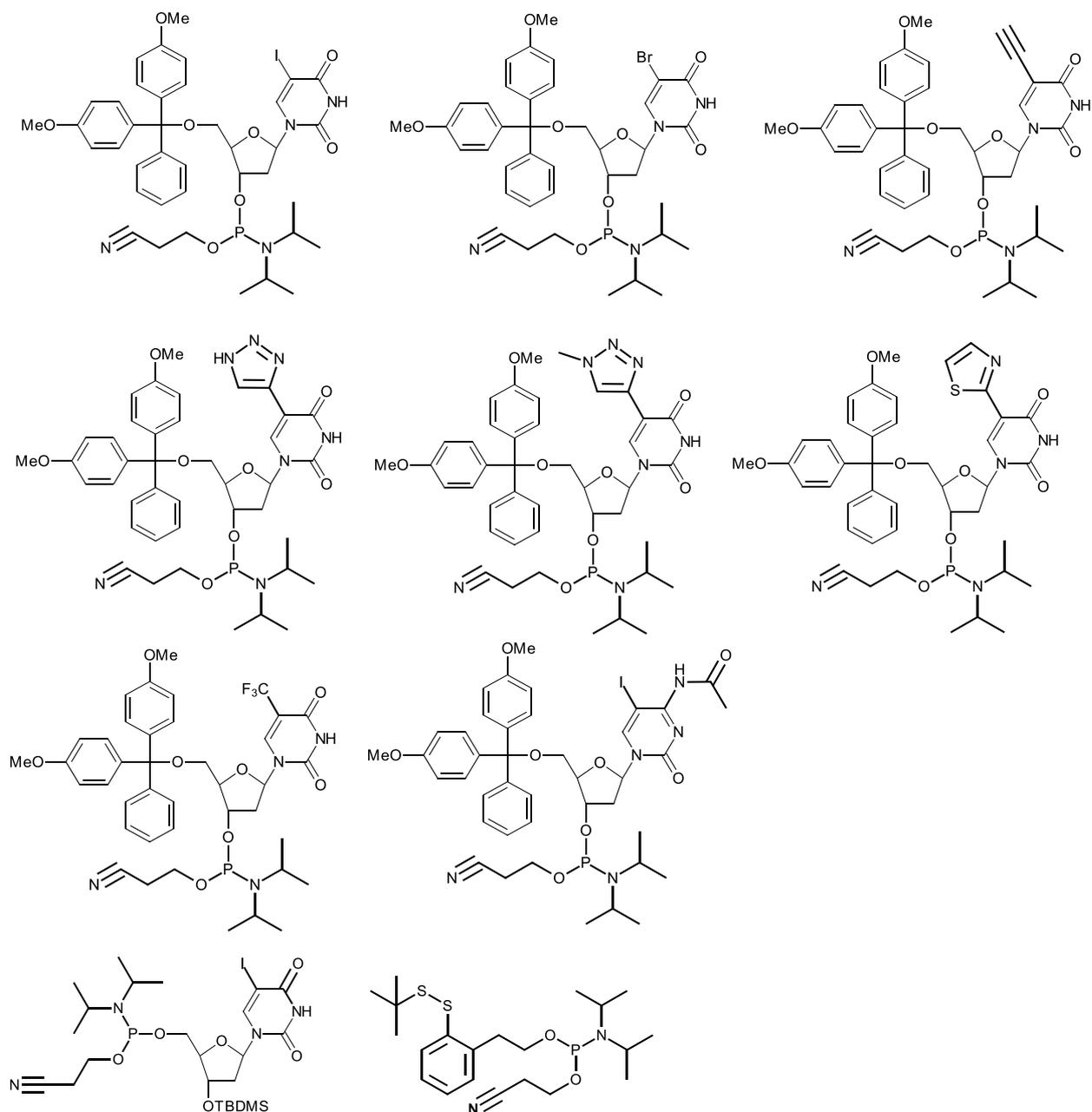
onde R é OH, OAc, OMe, amino opcionalmente substituído ou $-\text{CO}_2\text{R}^1$ (R^1 é H ou um contra-íon) e n é um número inteiro de 1 a 51.

[00692] A seguir, são apresentados mais fosforamiditos de nucleosídeo substituídos que podem ser preparados usando métodos conhecidos na técnica e métodos descritos aqui:



onde cada um de R e R¹ é independentemente H ou C₁₋₆ alquil opcionalmente substituído (por exemplo, Me, Et, *i*-Pr ou *n*-Bu).

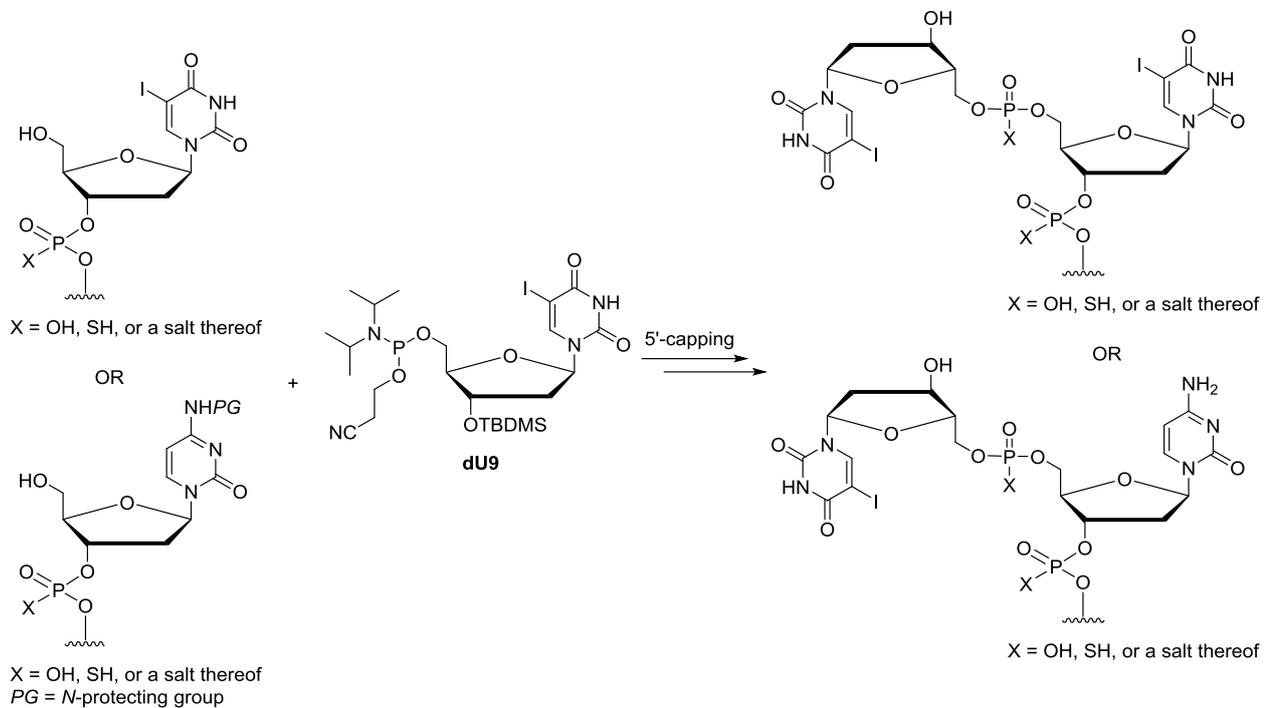
[00693] Os fosforamiditos a seguir são adquiridos da Glen Research (Sterling, VA) ou ChemGenes (Wilmington, MA) ou preparados usando os protocolos padrão aqui descritos:



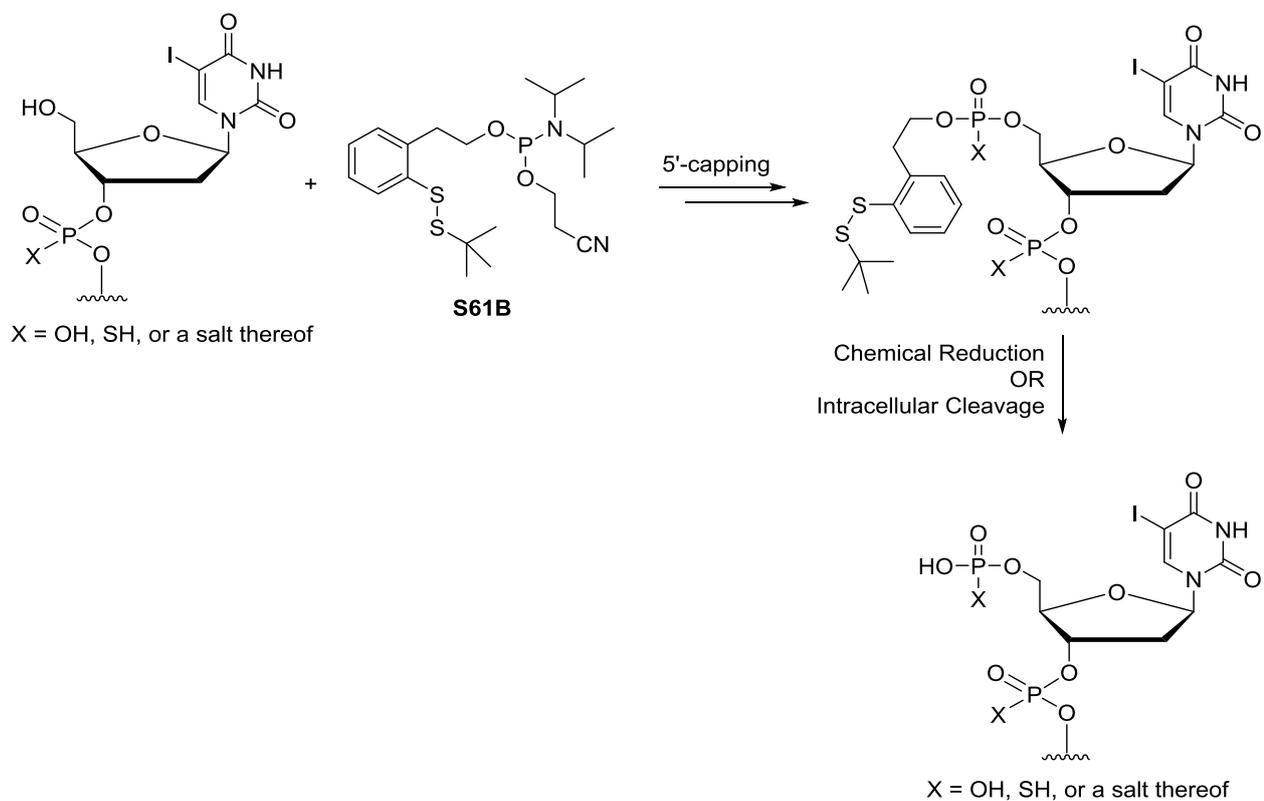
[00694] Esses intermediários podem ser utilizados na preparação de polinucleotídeos da invenção (por exemplo, polinucleotídeos contendo um nucleosídeo modificado no terminal 5'). Exemplos não limitativos de nucleosídeos modificados no terminal 5' são 5-halouridina, 5-alciniluridina, 5-heteroariluridina e 5-halocitidina.

Capping-5'

a) Capping-5'-5'



b) Capping 5'-fosfato e fósforotioato:



Síntese de pequenas porções de direcionamento baseadas em moléculas

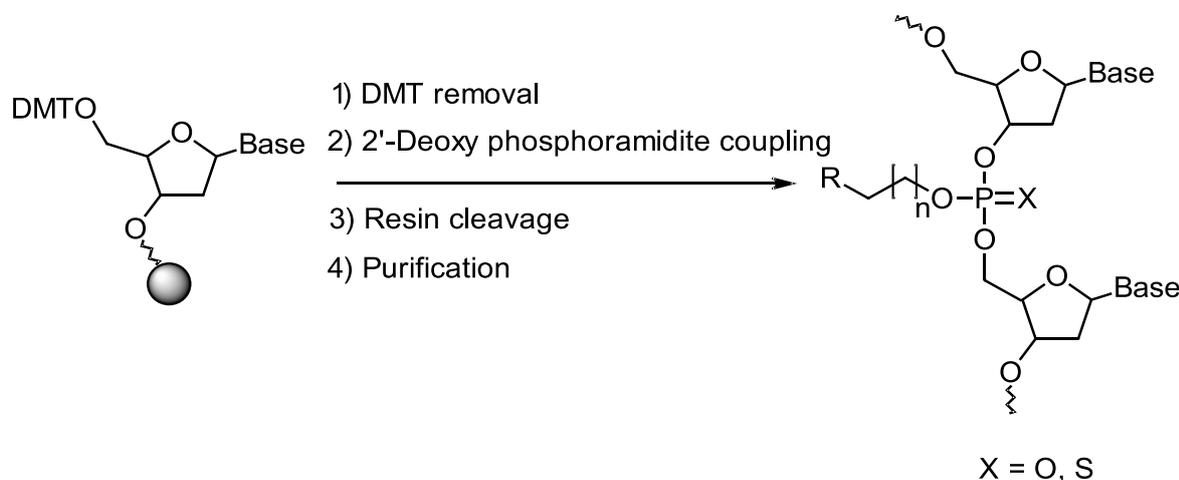
[00695] Compostos exemplares úteis para a preparação de porções de direcionamento baseadas em moléculas pequenas são descritos no documento WO 2015/188197 (por exemplo, compostos **M1-M30** descritos no documento WO 2015/188197).

Síntese de porções auxiliares de glucitol

[00696] Compostos exemplares úteis para a preparação de porções auxiliares à base de glucitol são descritos no documento WO 2015/188197 (por exemplo, compostos **POH1-POH10** descritos no documento WO 2015/188197).

Síntese geral de polinucleotídeos

Esquema geral



Detalhes Experimentais:

[00697] A síntese automatizada de polinucleotídeos (escala de 1 μmol) foi realizada no MerMade 6 ou 12 com os seguintes reagentes e solventes:

Oxidante - 0,02 M I_2 em THF/piridina/ H_2O (oxidação de 60 s por ciclo),

Reagente Sulfurizante II - derivado de ditiazol/piridina/acetonitrila (0,05 M, em 6: 4 piridina: acetonitrila) (60 s por ciclo)

Desbloqueio - 3% de ácido tricloroacético (2x desbloqueios de 40 s por ciclo),

Cap Mix A - THF/2,6-lutidina/Ac₂O (capeamento de 60 s por ciclo) e

Cap Mix B - 16% de metil imidazol em THF (60 s de tamponamento por ciclo)

[00698] Exceções às condições padrão de síntese de polinucleotídeos foram as seguintes:

- Foi utilizado suporte CPG com um linker não nucleosídico chamado Uny-linker.
- Todos os 2'-desoxirribose-fosforamiditos foram ressuspensos em 100 mM em acetonitrila anidro a 100% antes da síntese, exceto que alguns dos 2'-desoxi-fosforamiditos modificados foram dissolvidos a 100 mM na mistura THF/acetonitrila (1: 4) dependem de a solubilidade do material de partida.
- A ativação do fosforamidito foi realizada com um excesso molar de 2,5 vezes de 5-benziltio-1H-tetrazol (BTT). Os 2'-desoxirribose-fosforamiditos ativados foram acoplados para 2x 1 minuto de acoplamento por inserção e os fosforamiditos modificados foram acoplados para 2x 3 minutos de acoplamento por inserção.

- A sulfurização do esqueleto foi realizada com o Reagente Sulfurizante II 0,05 M em piridina/acetonitrila (6: 4) por 1 min.

Protocolo de desproteção e purificação de polinucleotídeos:

[00699] Após a síntese automatizada de polinucleotídeos, grupos sólidos de suporte e de proteção de bases (como A-Bz, C-Ac, G-iBu, etc.) e ésteres metílicos de fosfotriésteres foram clivados e desprotegidos em 1 mL de AMA (1 : 1: 36% de amônia aquosa e 40% de metilamina em metanol) por 2 h ou mais à temperatura ambiente, seguida de evaporação centrífuga.

[00700] Os sedimentos polinucleotídicos brutos foram ressuspensos em 100 µL de acetonitrila a 50%, aquecidos brevemente a 65°C e submetidos a vórtice minucioso.

[00701] Para purificação de polinucleotídeos, 100 µL de polinucleotídeos brutos foram injetados em RP-HPLC com os seguintes tampões/gradiente:

- Tampão A = TEAA 50 mM em água;
- Tampão B = 90% de acetonitrila; e
- Vazão = 1 mL/min;
- Gradiente:
 - o 0 - 2 min (100% de tampão A/0% de tampão B),
 - o 2 - 42 min (0% a 60% de tampão B) e
 - o 42 - 55 minutos (60% a 100% de tampão B).

Protocolo de conjugação e purificação de DBCO:

[00702] O éster DBCO NHS foi conjugado ao polinucleotídeo 2'-desoxi DMT bruto, como descrito aqui. O sedimento de

polinucleotídeo bruto foi suspenso em 45 μ L de DMSO, aquecido brevemente a 65°C e agitado em vórtex completamente. Foram adicionados 5 μ L de DIPEA, seguidos pelo éster DBCO-NHS (30 eq), que foi pré-dissolvido em DMSO (1M). A reação foi deixada repousar por 10 minutos ou até a formação do produto ser confirmada por MALDI. Total de 80 μ L de amostras de polinucleotídeos brutos foram injetados em RP-HPLC com os seguintes tampões/gradiente:

- Tampão A = TEAA 50 mM em água
- Tampão B = 90% de acetonitrila
- Vazão = 1 mL/min
- Gradiente:
 - o 0 - 2 min (90% de tampão A/10% de tampão B)
 - o 2 - 42 min (0% a 60% de tampão B)
 - o 42 - 55 minutos (60% a 100% de tampão B).

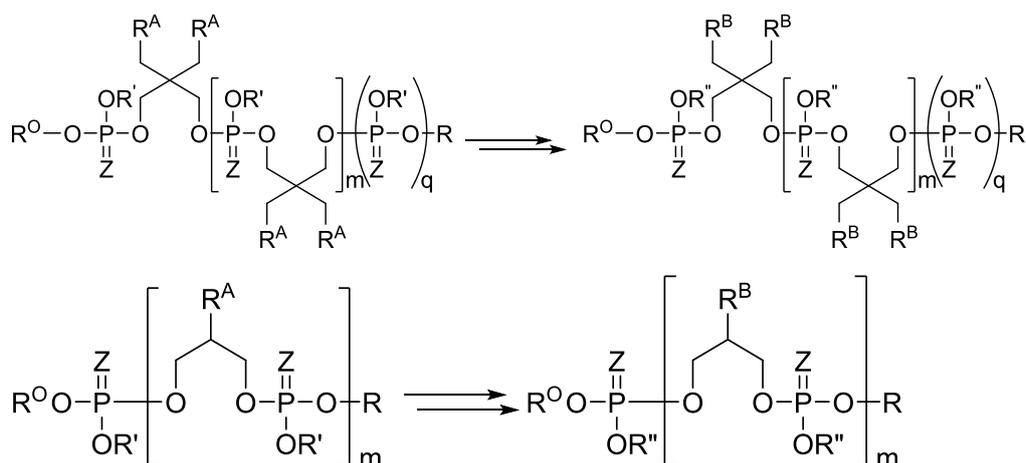
[00703] Entre os picos dominantes de RP-HPLC, foram coletadas frações de 0,5 mL e analisadas por espectrometria de massa MALDI-TOF para confirmar a presença da massa desejada. As frações purificadas selecionadas em massa foram congeladas e liofilizadas. Depois de secas, as frações foram ressuspensas, combinadas com as frações correspondentes, congeladas e liofilizadas.

[00704] Clivagem de DMT: pelotas liofilizadas foram suspensas em 20 μ L de acetonitrila a 50% e adicionadas 80 μ L de ácido acético, as amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 1 h, congeladas e liofilizadas. As amostras secas foram redissolvidas em acetonitrila a 20% e dessalinizadas através de

colunas NAP 10 (Sephadex™-G25 DNA Grade). As frações puras coletadas foram congeladas e liofilizadas para o produto final.

Esquemas Gerais de Conjugação Usando Espaçadores Abásicos:

[00705] *Reação ao clique - Esquema geral:*



Em que

Cada q é 0 ou 1;

cada m é um número inteiro de 0 a 5;

Z é O ou S;

R^O é uma ligação a um nucleosídeo em um polinucleotídeo;

R é uma ligação a H, um nucleosídeo em um polinucleotídeo, a um suporte sólido ou a um grupo de capeamento (por exemplo, $(CH_2)_3-OH$);

cada R' é independentemente H, $-Q^1-Q^{A1}$, um grupo bioreversível ou um grupo não bioreversível;

cada R'' é independentemente H, $-Q^1-Q^{A1}-Q^2-T$, um grupo bioreversível ou um grupo não bioreversível;

cada R^A é independentemente H ou $-OR^C$, onde R^C é $-Q^1-Q^{A1}$, um grupo bioreversível, um grupo não bioreversível ou uma ligação ao suporte sólido;

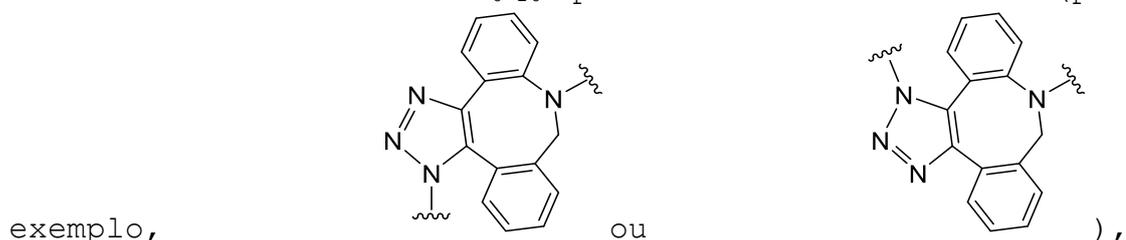
cada R^B é independentemente H ou $-OR^D$, onde R^D é $-Q^1-Q^{A1}-Q^2-T$, um grupo bioreversível ou um grupo não bioreversível;

Onde

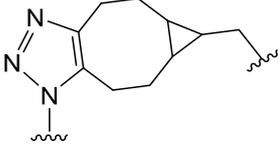
cada Q^1 é independentemente um grupo divalente, trivalente, tetravalente ou pentavalente, no qual uma valência está ligada ao Q^A ou Q^{A1} ; uma segunda valência é aberta e cada uma das valências restantes, quando presente, é independentemente ligada a uma fração auxiliar;

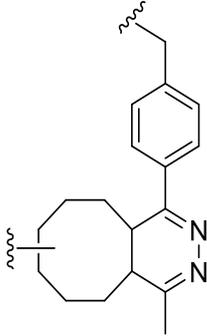
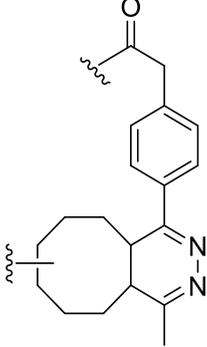
cada Q^2 é independentemente um grupo divalente, trivalente, tetravalente ou pentavalente, no qual uma valência está ligada ao controle de qualidade; uma segunda valência é ligada a T, e cada uma das valências restantes, quando presente, é independentemente ligada a uma fração auxiliar;

Q_A é 1,2,3-triazole-1,4-diil, triazoloheterociclileno C_{6-16} opcionalmente substituído (por

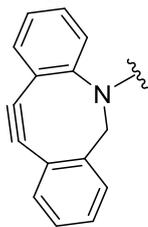


triazolocicloalcenileno C_{8-16} opcionalmente substituído (por

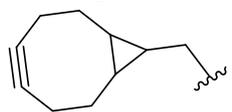
exemplo, ) ou um grupo di-hidropiridazina

(por exemplo, *trans*-  ou *trans*- );

Q^{A1} é alquinil C_{2-12} opcionalmente substituído, heterociclil C_{6-16} opcionalmente substituído que contém uma ligação tripla carbono-carbono endocíclica (por exemplo,



), cicloalquinil C_{8-16} opcionalmente substituído

(por exemplo, ) ou cicloalcenil estirado C_{4-8} opcionalmente substituído (por exemplo, *trans*-ciclooctenil); e

T é uma fração de segmentação,

desde que os materiais de partida contenham pelo menos um $-Q^1-Q^{A1}$ e os produtos contenham $-Q^1-Q^A-Q^2-T$; e

desde que os materiais e produtos de partida contenham 0 ou 1 ligações a um suporte sólido.

Métodos de conjugação

Reação Click catalisada por Cu

Preparação do complexo de cobre-THPTA

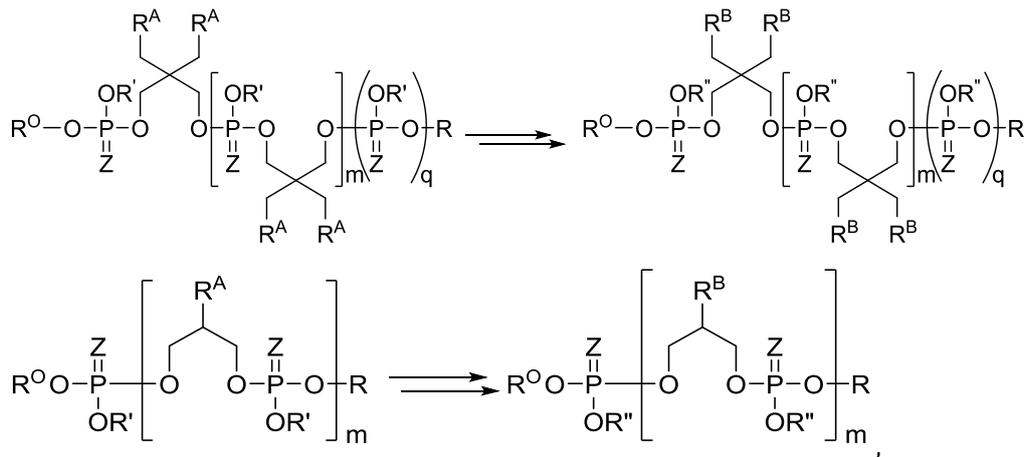
[00706] Uma solução aquosa 5 mM de sulfato de cobre penta-hidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e uma solução aquosa 10 mM de tris (3-hidroxi-propil-triazolil-metil) amina (THPTA) foram misturadas 1:1 (v/v) (razão molar 1:2) e deixado em temperatura ambiente por 1 hora. Este complexo pode ser usado para catalisar a cicloadição de Huisgen, por exemplo, como mostrado nos esquemas gerais de conjugação abaixo.

Procedimento geral (escala 100nM)

[00707] A uma solução de 710 μL de água e 100 μL de terc-butanol (10% do volume final) em um tubo Eppendorf de 1,7 mL foram adicionados 60 μL do complexo cobre-THPTA, seguidos por 50 μL de uma solução 2 mM do oligo, 60 μL de uma solução aquosa de ascorbato de sódio 20 mM e 20 μL de uma solução 10 mM de porção-azida. Após mistura completa, a solução foi deixada repousar à temperatura ambiente durante 1 hora. A conclusão da reação foi confirmada por análise em gel. A mistura de reação é adicionada a um frasco com tampa de rosca contendo 5-10 vezes o excesso molar de SiliaMetS[®] TAAcONa (sal de sódio EDTA ligado à resina). A mistura é agitada durante 1 hora. Esta mistura é então eluída através de uma coluna illustra[™]Nap[™]-10 Sephadex[™]. A solução resultante é então congelada e liofilizada durante a noite.

Conjugação por ligação de amida

[00708] A conjugação por amidação pode ser realizada sob as condições da reação de amidação conhecidas na técnica. Ver, por exemplo, Aaronson et al., *Bioconjugate Chem.* 22: 1723-1728, 2011.



Onde

cada q é 0 ou 1;

cada m é um número inteiro de 0 a 5;

Z é O ou S;

R^0 é uma ligação a um nucleosídeo em um polinucleotídeo;

R é uma ligação a H, um nucleosídeo em um polinucleotídeo, a um suporte sólido ou a um grupo de cobertura (por exemplo, $-(CH_2)_3-OH$);

cada R' é independentemente H, $-Q^1-Q^{A1}$, um grupo bioreversível ou um grupo não bioreversível;

cada R'' é independentemente H, $-Q^1-Q^A-Q^1-T$, um grupo bioreversível ou um grupo não bioreversível;

cada R^A é independentemente H ou $-OR^C$, onde R^C é $-Q^1-Q^{A1}$, um grupo bioreversível ou um grupo não bioreversível;

cada R^B é independentemente H ou $-OR^D$, onde R^D é $-Q^1-Q^A-Q^2-T$, um grupo bioreversível ou um grupo não bioreversível;

Onde

cada Q^1 é independentemente um grupo divalente, trivalente, tetravalente ou pentavalente, no qual uma

valência é ligada a Q^A ou Q^{A1} , a segunda valência é aberta e cada uma das valências restantes, quando presente, é ligada independentemente a uma fração auxiliar;

cada Q^2 é independentemente um grupo divalente, trivalente, tetravalente ou pentavalente, no qual uma valência é ligada a Q^A , a segunda valência é ligada a T e cada uma das valências restantes, quando presente, é ligada independentemente a uma porção auxiliar;

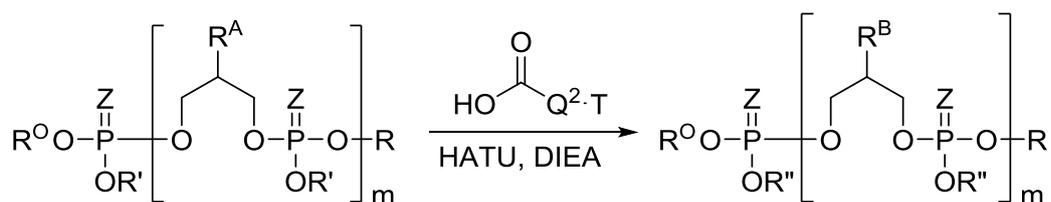
Q^A é heteroalquilenos C_{2-12} opcionalmente substituído contendo $-C(O)-N(H)-$ ou $-N(H)-C(O)-$;

Q^{A1} é $-NHR^{N1}$ ou $-COOR^{12}$, onde R^{N1} é H, N-grupo protetor, ou C_{1-6} alquil opcionalmente substituído, e R^{12} é H, C_{1-6} alquil opcionalmente substituído, ou grupo de proteção O; e

T é uma fração de segmentação,

desde que os materiais de partida contenham pelo menos um $-Q^1-Q^{A1}$ e os produtos contenham $-Q^1-Q^A-Q^2-T$.

[00709] *Conjugação em fase sólida*



Onde

cada m é um número inteiro de 0 a 5;

Z é O ou S;

R^0 é uma ligação a um nucleosídeo em um polinucleotídeo;

R é uma ligação a H, um nucleosídeo em um polinucleotídeo, a um suporte sólido ou a um grupo de cobertura (por exemplo, $-(\text{CH}_2)_3\text{-OH}$);

cada R' é independentemente H, $-\text{Q}^1\text{-Q}^{\text{A}1}$, um grupo bioreversível ou um grupo não bioreversível;

cada R'' é independentemente H, $-\text{Q}^1\text{-Q}^{\text{A}}\text{-Q}^1\text{-T}$, um grupo bioreversível ou um grupo não bioreversível;

cada R^A é independentemente H ou $-\text{OR}^{\text{C}}$, onde R^C é $-\text{Q}^1\text{-Q}^{\text{A}1}$, um grupo bioreversível ou um grupo não bioreversível;

cada R^B é independentemente H ou $-\text{OR}^{\text{D}}$, onde R^D é $-\text{Q}^1\text{-Q}^{\text{A}}\text{-Q}^2\text{-T}$, um grupo bioreversível ou um grupo não bioreversível;

Onde

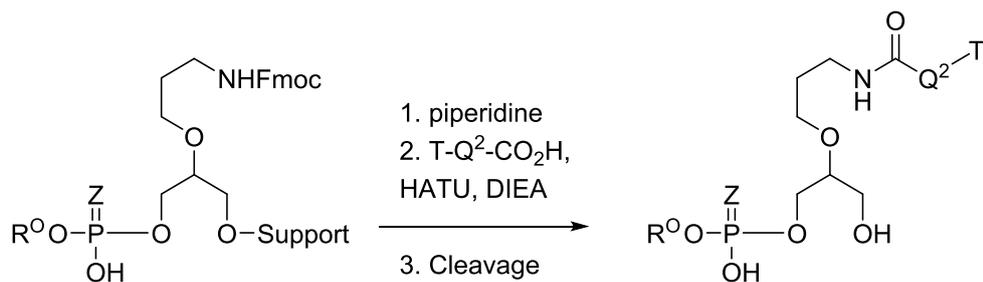
cada Q¹ é independentemente um grupo divalente, trivalente, tetravalente ou pentavalente, no qual uma valência é ligada a $-\text{NH-CO-}$ ou NH_2 , a segunda valência é aberta e cada uma das valências restantes, quando presente, é ligada independentemente a uma fração auxiliar;

cada Q² é independentemente um grupo divalente, trivalente, tetravalente ou pentavalente, no qual uma valência é ligada a $-\text{NH-CO-}$, a segunda valência é ligada a T e cada uma das valências restantes, quando presente, é ligada independentemente a uma porção auxiliar;

T é uma fração de segmentação,

desde que os materiais de partida contenham pelo menos um $-\text{Q}^1\text{-NH}_2$ e os produtos contenham $-\text{Q}^1\text{-NH-CO-Q}^2\text{-T}$.

[00710] *Conjugação em suporte*



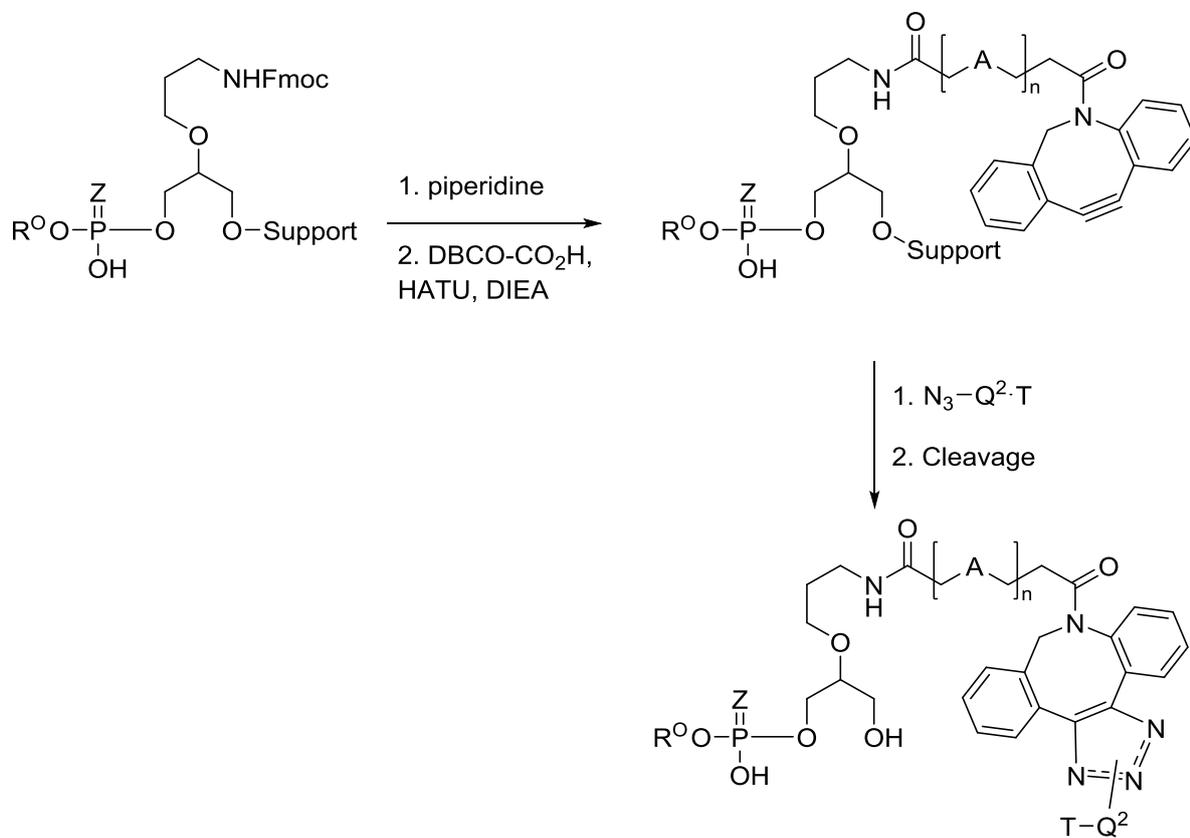
Onde

Z é O ou S;

R⁰ é uma ligação a um nucleosídeo em um polinucleotídeo;

cada Q² é independentemente um grupo divalente, trivalente, tetravalente ou pentavalente, no qual uma valência é ligada a -NH-CO-, a segunda valência é ligada a T e cada uma das valências restantes, quando presente, é ligada independentemente a uma porção auxiliar; e

T é uma fração de segmentação.



Onde

n é um número inteiro de 1 a 8;

A é O ou -CH₂-;

Z é O ou S;

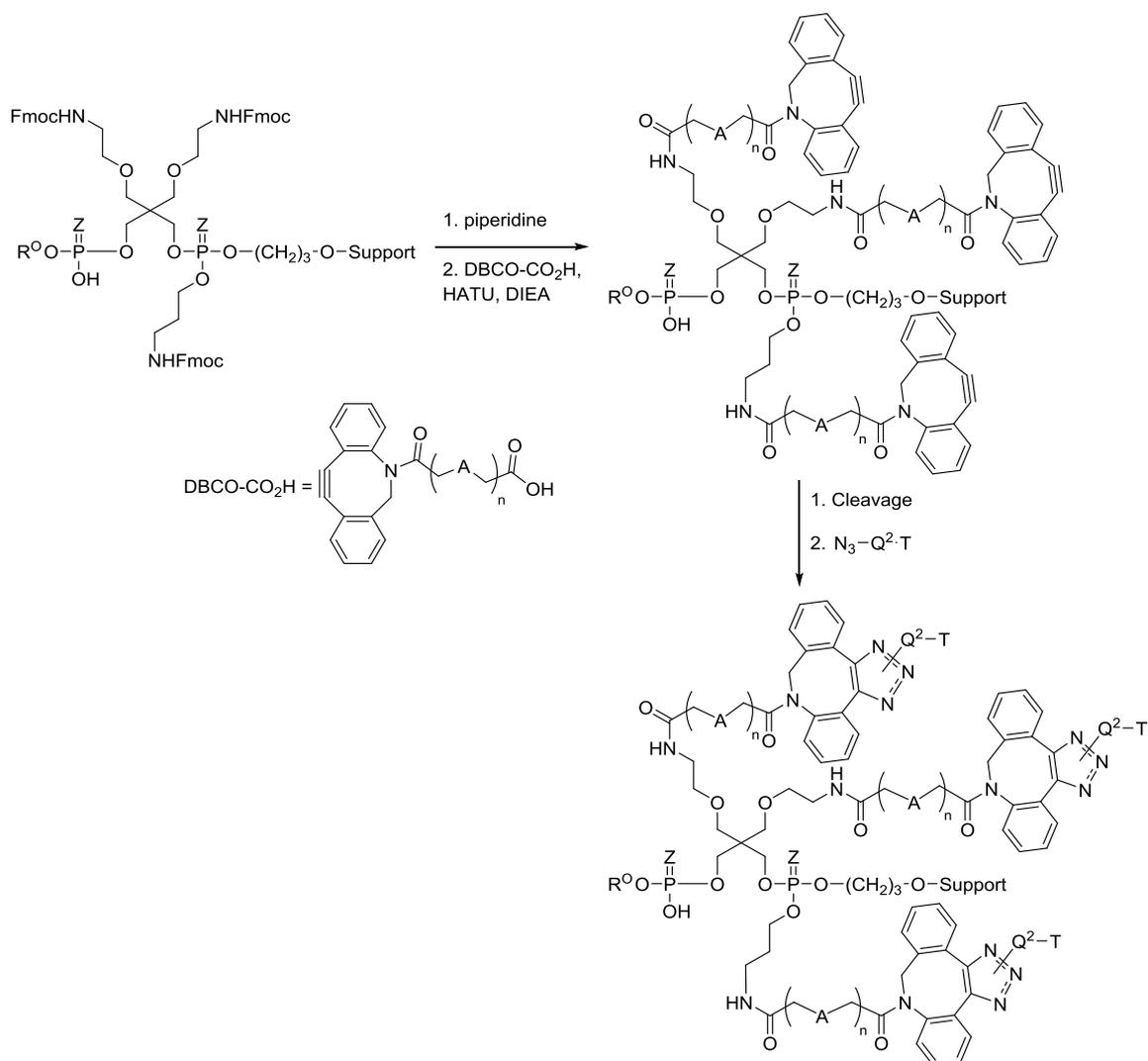
R⁰ é uma ligação a um nucleosídeo em um polinucleotídeo;

cada Q² é independentemente um grupo divalente, trivalente, tetravalente ou pentavalente; em que uma valência é ligada à azida ou triazol, uma segunda valência é ligada a T, e cada uma das valências restantes, quando presente, é independentemente ligada a uma fração auxiliar; e

T é uma porção de direcionamento.

cada Q^2 é independentemente um grupo divalente, trivalente, tetravalente ou pentavalente; em que uma valência é ligada à azida ou triazol, uma segunda valência é ligada a T, e cada uma das valências restantes, quando presente, é independentemente ligada a uma fração auxiliar; e

T é uma porção de direcionamento.



Onde

n é um número inteiro de 1 a 8;

A é O ou -CH₂-;

Z é O ou S;

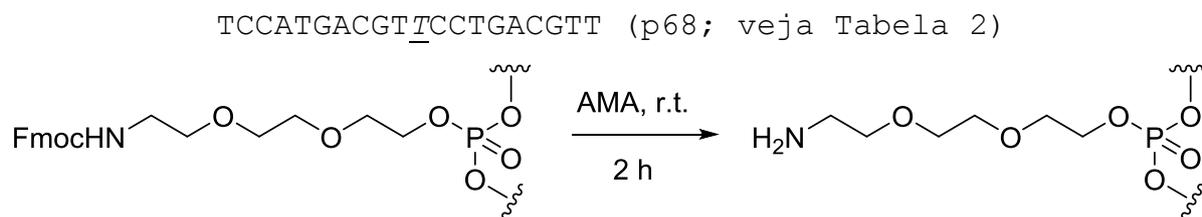
R⁰ é uma ligação a um nucleosídeo em um polinucleotídeo;

cada Q² é independentemente um grupo divalente, trivalente, tetravalente ou pentavalente; em que uma valência é ligada à azida ou triazol, uma segunda valência é ligada a T, e cada uma das valências restantes, quando presente, é independentemente ligada a uma fração auxiliar; e

T é uma porção de direcionamento.

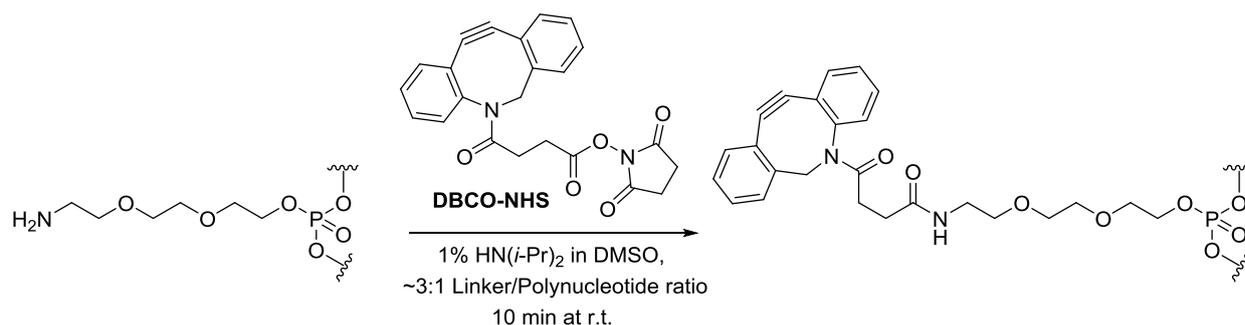
Exemplo representativo de desproteção Fmoc de um fosfotriéster:

[00711] Um polinucleotídeo incluindo um fosfotriéster com amina protegida por Fmoc foi sujeito a condições de desproteção, resultando em desproteção de Fmoc sem conversão observável do fosfotriéster em um fosfodiéster.



Conjugação DBCO-NHS a p68 - Exemplo representativo:

[00712] A conjugação de DBCO-NHS ao grupo amino no fosfotriéster foi concluída em 10 minutos à temperatura ambiente, como evidenciado pela análise espectrométrica de massa.



[00713] A purificação por RP-HPLC de p68 (ver Tabela 2) contendo um grupo conjugador de DBCO foi realizada usando as seguintes condições:

- Tampão A = TEAA 50 mM em água;
- Tampão B = 90% de acetonitrila; e
- Vazão = 1 mL/min;
- Gradiente:
 - o 0 - 2 min (100% de tampão A/0% de tampão B),
 - o 2 - 22 min (0% a 100% de tampão B) e
 - o 22 - 25 min (100% de tampão B).

[00714] Um procedimento semelhante pode ser usado para preparar um polinucleotídeo usando, por exemplo, fosforamiditos de nucleosídeo modificado em 2', como os aqui descritos. Esse procedimento é fornecido no pedido de patente internacional PCT/US2015/034749; a divulgação da síntese de oligonucleotídeo dissulfeto fosfotriéster em PCT/US2015/034749 é aqui incorporada por referência.

[00715] O procedimento geral descrito aqui foi seguido para preparar polinucleotídeos imunomodulados listados na Tabela 2.

TABELA 2

Composto #	Sequência (5' to 3')	SEQ ID NO:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
p1	Tcgtcgttttgcgttttg tcgtt	1	120	110	175	50	>1000					
p2	NH2-C6- tcgtcgttttgcgttttg tcgtt	2										
p3	NH2-C6-S-S-C6- tcgtcgttttgcgttttg tcgtt	3										
p4	DBCO- tcgtcgttttgcgttttg tcgtt	4	>1000		>1000							
p5	DBCO-C6-S-S-C6- tcgtcgttttgcgttttg tcgtt	5										

Composto #	Sequência (5' to 3')	SEQ ID NO:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
p6	TCGTCGTTTTGTCGTTTTG TCGTT	6			>1000	>1000	>1000					
p7	DBCO-C6-S-S-C6- TCGTCGTTTTGTCGTTTTG TCGTT	7										
p8	Tgctgctttttgtgcttttg tgctt	8			>1000	>1000	>1000					
p9	DBCO-C6-S-S-C6- tgctgctttttgtgcttttg tgctt	9										
p10	Tcgtcgtttttgtcgttttg tcgctt	10										
p11	TCGTCGTTTTGTCGTTTTG TCGTT	11										

Composto #	Sequência (5' to 3')	SEQ ID NO:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
p12	DBCO-C6-S-S-C6- tcgtcgttttgtcgttttg tcggt	12										
p13	DBCO-C6-S-S-C6- TCGTTCGTTTTGTCGTTTTG TCGTT	13										
p14	DBCO- tcgtcgttttgtcgttttg tcggt	14										
p15	DBCO- TCGTTCGTTTTGTCGTTTTG TCGTT	15										
p16	DBCO- tccatgacgttcctgacgt t	16										

Composto #	Sequência (5' to 3')	SEQ ID NO:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
p17	DBCO- TCCATGACGTTCCCTGACGT T	17										
p18	Tccatgacgttcctgacgt t	18			1000	>1000	40	22.6	24.4	26		
p19	DBCO- tccatgacgttcctgacgt t	19						>100 0		>1000		
p20	TCCATGACGTTCCCTGACGT T	20				>1000	>1000	>100 0				
p21	DBCO- TCCATGACGTTCCCTGACGT T	21										
p22	Tccatgagcttcctgagct t	22						>100 0	>1000			

Composto #	Sequência (5' to 3')	SEQ ID NO:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
	DBCO-	23										
p23	tccatgagcttcctgagct t											
p24	Dtcgtcgttttgtcgtttt gtcgtt	24	500		>1000							
p25	Tcgtcgttdttgtcgtttt gtcgtt	25	>1000		800							
p26	Tcgtcgttttgdtcgtttt gtcgtt	26	>1000		>1000							
p27	Tcgtcgttttgtcgttdtt gtcgtt	27	500		800							
p28	Tcgtcgttttgtcgttttg tcgtdt	28	300		800							
p29	Tcgcgacgttcgcccgaag ttcggta	29			300	>1000	>1000	92.8		58		

Composto #	Sequência (5' to 3')	SEQ ID NO:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
p30	DBCO- tcgcgacgttcgcccgcag ttcggta	30						183. 7		28		
p31	Tccatgacgttcctgatgc t	31			1000	>1000	40	29.6		27		
p32	DBCO- tccatgacgttcctgatgc t	32				>1000	>1000					
p33	Tcgacgttcgtcgttcgtc gttc	33			450			103. 2		275		
p34	DBCO- tcgacgttcgtcgttcgtc gttc	34										
p35	Tcgtcgttttgctgttttg tcgtt	35										

Composto #	Sequência (5' to 3')	SEQ ID NO:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
	DBCO-	36										
p36	tcgtcgttttg											
	tcg											
p37	Tccatgacgttcctgacgt	37						164.				
	t							3	180	28.3		
	DBCO-	38										
p38	tccatgacgttcctgacgt											
	t											
p39	tccatgacgttcctgacgt	39						122.				
	t-C3							2	130.8			
p40	TCCATGACGTTCCCTGACGT	40						>100				
	T							0				
p41	TCCATGACGTTCCCTGACGT	41						>100				
	T-C3							0				

Composto #	Sequência (5' to 3')	SEQ ID NO:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
p42	Tccatgacgttcctgacgt t	42						22.6	25.6			
p43	tccatgacgttcctgacgt t-C3	43						19.2				
p44	TCCATGACGTTCCCTGACGT T	44						>100 0				
p45	TCCATGACGTTCCCTGACGT T-C3	45										
p46	Tccatgacgttcctgacgt t	46						876				
p47	Tccatgacgttcctgacgt t	47						615				
p48	Tccatgacgttcctgacgt t	48						197. 2				

Composto #	Sequência (5' to 3')	SEQ ID NO:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
p49	Tccatgacg t tcctgacgt t	49						75.2				
p50	Tccatgacg t tcctgacgt t	50						71.3				
p51	Tccatgacg t tcctgacgt t	51						9.3				
p52	Tccatgacg t tcctgacgt t	52						29.1				
p53	GGgggacgatcgtcGGGGG G	53										
p54	Tcgtcgtcgttcgaacgac gttgat	54								816		
p55	Tcgtcgttttcggcgcgcg ccg	55								31.4		

Composto #	Sequência (5' to 3')	SEQ ID NO:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
p56	tcgcgaacgttcgccgcgt tcgaacgcgg	56								45.5		
p57	Tcgtcgacgatcggcgcgc gccg	57										
p58	<u>T</u> ccatgacgttcctgacgt t	58										
p59	Tcca <u>t</u> gacgttcctgacgt t	59										
p60	Tccatgacg <u>t</u> tcctgacgt t	60										
p61	Tccatgacgt <u>t</u> cctgacgt t	61										
p62	Tccatgacgttc <u>c</u> tgacgt t	62										

Composto #	Sequência (5' to 3')	SEQ ID NO:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
p63	Tccatgacgttcctgacg <u>t</u> t	63										
p64	Tccatgacgttcctgacgt <u>t</u>	64										
p65	<u>T</u> CCATGACGTTCCCTGACGT T	65										
p66	TCCA <u>T</u> GACGTTCCCTGACGT T	66										
p67	TCCATGACG <u>T</u> TCCTGACGT T	67										
p68	TCCATGACGT <u>T</u> CCTGACGT T	68										
p69	TCCATGACGTTCC <u>T</u> GACGT T	69										

Composto #	Sequência (5' to 3')	SEQ ID NO:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
p70	TCCATGACGTTCCCTGACG <u>T</u> T	70										
p71	TCCATGACGTTCCCTGACGT <u>T</u>	71										
p72	Tcgtcgttttgcgttttg tcgt <u>t</u>	72										
p73	TCGTCGTTTTGTCGTTTTG TCGT <u>T</u>	73										
p74	Tccatgacgttcctgatgc <u>t</u>	74										
p75	TCCATGACGTTCCCTGATGC <u>T</u>	75										
p76	<u>T</u> CGTCGTTTTGTCGTTTTG TCG <u>T</u> T	76										

Composto #	Sequência (5' to 3')	SEQ ID NO:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
p77	TCG <u>T</u> CGTTTTGTCGTTTTG TCG TT	77										
p78	TCGTCG <u>T</u> TTTGTCTTTTTG TCG TT	78										
p79	TCGTCGT <u>T</u> TTGTCTTTTTG TCG TT	79										
p80	TCGTCGTT <u>T</u> GTCTTTTTG TCG TT	80										
p81	TCGTCGTTT <u>T</u> GTCTTTTTG TCG TT	81										
p82	TCGTCGTTTTG <u>T</u> CGTTTTG TCG TT	82										
p83	TCGTCGTTTTGTCT <u>T</u> TTTG TCG TT	83										

Composto #	Sequência (5' to 3')	SEQ ID NO:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
p84	TCGTCGTTTTGTCGT <u>TTT</u> TCG TT	84										
p85	TCGTCGTTTTGTCGTT <u>TTG</u> TCG TT	85										
p86	TCGTCGTTTTGTCGTTT <u>TG</u> TCG TT	86										
p87	TCGTCGTTTTGTCGTTTTG <u>TCG</u> TT	87										
p88	TCGTCGTTTTGTCGTTTTG TCG <u>TT</u>	88										
p89	tccatGACGTTCC TGACG T T	89						>100				
p90	tccatgacgtTC CTGACG T T	90						1000				

Composto #	Sequência (5' to 3')	SEQ ID NO:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
p91	tccatgacgttcctgACGT T	91						49				
p92	tccatGACGTTCC TGACGT T	92						>100 0				
p93	tccatgacgtTCCTGACGT T	93						>100 0				
p94	tccatgacgttcctgACGT T	94						145				
p95	TCGTCGTTTTGTCGTTTTG TCGTT	95										
p96	TCGTCGTTTTGTCGTTTTG TCGTT	96										
p97	TCGTTCGTTTTGTCGTTTTG TCGTT	97										

Composto #	Sequência (5' to 3')	SEQ ID NO:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
p98	TCGTC <u>G</u> TTTTGTCGTTTTG TCG TT	98										
p99	TCGTCGTTTT <u>G</u> TTCGTTTTG TCG TT	99										
p100	TCGTCGTTTTGT <u>C</u> TTTTG TCG TT	100										
p101	TCGTCGTTTTGTC <u>G</u> TTTTG TCG TT	101										
p102	TCGTCGTTTTGTCGTTTT <u>G</u> TCG TT	102										
p103	TCGTCGTTTTGTCGTTTTG T <u>C</u> TT	103										
p104	TCGTCGTTTTGTCGTTTTG TC <u>G</u> TT	104										

Composto #	Sequência (5' to 3')	SEQ ID NO:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
p105	<u>T</u> CCATGACGTTCCCTGACG T T	105										
p106	T <u>C</u> CATGACGTTCCCTGACG T T	106										
p107	TCC <u>A</u> TGACGTTCCCTGACG T T	107										
p108	TCC <u>A</u> TGACGTTCCCTGACG T T	108										
p109	TCC <u>A</u> TGACGTTCCCTGACG T T	109										
p110	TCCAT <u>G</u> ACGTTCCCTGACG T T	110										
p111	TCCATG <u>A</u> CGTTCCCTGACG T T	111										

Composto #	Sequência (5' to 3')	SEQ ID NO:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
p112	TCCATGAC <u>C</u> GTTTCCTGACG T T	112										
p113	TCCATGAC <u>G</u> TTCCTGACG T T	113										
p114	TCCATGACG <u>T</u> TTCCTGACG T T	114										
p115	TCCATGACG <u>T</u> TTCCTGACG T T	115										
p116	TCCATGACG <u>T</u> TTCCTGACG T T	116										
p117	TCCATGACG <u>T</u> TTCCTGACG T T	117										
p118	TCCATGACG <u>T</u> TTCCTGACG T T	118										

Composto #	Sequência (5' to 3')	SEQ ID NO:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
p119	TCCATGACGTTCCCT <u>G</u> ACGT T	119										
p120	TCCATGACGTTCCCTG <u>A</u> CGT T	120										
p121	TCCATGACGTTCCCTGAC <u>G</u> T T	121										
p122	TCCATGACGTTCCCTGAC <u>C</u> T T	122										
p123	IR700- tccatgacgttcctgacg <u>t</u> t	123										
p124	IR700- TCCATGACGTTCCCTGACG <u>T</u> T	124										

Composto #	Sequência (5' to 3')	SEQ ID NO:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
p125	Tcgtcgttttcgtcgttttg tcgtt	125										
p126	DBCO- TCGTCGTTTTGTCGTTTTG TCGTT	126										
p127	DBCO- TCGTCGTTTTGTCGTTTTG TCGTT	127										
p128	TGCTGCTTTTGTGCTTTTG TGC <u>TT</u>	128										
p129	tcattgGAAAACGTTCTTC GGGGCGTTcctt	129										
p130	tcattgGAAAAGCTTCTTG CGGGGCTTcctt	130										

Composto #	Sequência (5' to 3')	SEQ ID NO:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
p131	TCATTGGAAAACGTTCTTC GGGGCGTTCTT	131										
p132	AAGAACGCCCCGAAGAACG TTTTCCAATGA	132										
p133	TCATTGGAAAACGTTCTTC GGGGCGTTCT T	133										
p134	AAGAACGCCCCGAAGAACG TTTTCCAAT G A	134										
p135	T CATTGGAAAACGTTCTTC GGGGCGTTCT T	135										
p136	A AAGAACGCCCCGAAGAACG TTTTCCAAT G A	136										
p137	T CATTGGAAAACGTTCTTC GGGGCGTTCTT	137										

Composto #	Sequência (5' to 3')	SEQ ID NO:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
p138	A AGAACGCCCCGAAGAACG TTTTCCAATGA	138										
p139	tccatGACGTTCCCTGAcgt t	139										
p140	TCCATGACGTTCCCTGAcgt t	140										
p141	tccatGACGTTCCCTGACGt t	141										
p142	tccatGACGTTCCCTGACGT T	142										
p143	tccatGACGTTCCCTGACG <u>T</u> T	143										
p144	AACGACAAAACGACAAAAC GACGA	144										

Composto #	Sequência (5' to 3')	SEQ ID NO:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
p145	AACGACAAAACGACAAAAC GACGA	145										
p146	TCGTCG_TTTGTCGTTTTG TCGtT	146										
p147	TCGTCG_TTTGTCGTTTTg tcgtT	147										
p148	TCGTCGTTTTGTCGTT_TG TCGtT	148										
p149	TCGTCGTTTTGTCGTT_TTg tcgtT	149										
p150	tcgtcGTTTTGTCGTTTTG TCG_TT	150										
p151	tcgtcgTTTTgtcgTTTTg tcgtT	151										

Composto #	Sequência (5' to 3')	SEQ ID NO:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
p152	tcgtcGTTTTGTCGTTTTG TCG <u>t</u> T	152										
p153	tcgtcGTTTTGTCGTTTTG TCG <u>tt</u>	153										
p154	tcgtcGTTTTGTCGTTTTG TCG <u>Tt</u>	154										
p155	TTCG <u>T</u> CGTTTTGTCGTTTT GTCG TT	155										
p156	TTTCG <u>T</u> CGTTTTGTCGTTT TGTCG TT	156										
p157	GTTTCG <u>T</u> CGTTTTGTCGTT TTGTCG TT	157										
p158	GT TT TCG <u>T</u> CGTTTTGTCGTT TTGTCG TT	158										

Composto #	Sequência (5' to 3')	SEQ ID NO:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
p159	G T TTCG <u>T</u> CGTTTTGTCGTT TTGTCG T T	159										
p160	G T TTCG <u>T</u> CGTTTTGTCGTT TTGTCG T T	160										
p161	TCG <u>T</u> CGTTTTGTCGTTTTG TCG T T-C3	161										
p162	TCGTCGTTTTGTCGTT <u>T</u>	162										
p163	<u>U</u> CGTCGTTTTGTCGTTTTG TCG <u>t</u> t-C3	163										
p164	C3- <u>U</u> CGTCGTTTTGTCGTTTTG TCG <u>T</u> T-C3	164										
p165	TCG <u>U</u> CGTTTTGTCGTTTTG TCG <u>T</u> T-C3	165										

Composto #	Sequência (5' to 3')	SEQ ID NO:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
	C3-	166										
p166	TCG <u>U</u> CGTTTTGTCGTTTTG											
	TCG <u>T</u> T-C3											
	C3-	167										
p167	<u>U</u> CG <u>U</u> CGTTTTGTCGTTTTG											
	TCG <u>T</u> T-C3											
	C3-	168										
p168	<u>U</u> CG <u>U</u> CGTTTTGTCGTTTTG											
	TCG <u>T</u> T-C3											
	C3-	169										
p169	<u>U</u> CG <u>T</u> CGTTTTGTCGTTTTG											
	TCG <u>T</u> T-C3											
	C3-	170										
p170	<u>U</u> CG <u>T</u> CGTTTTGTCGTTTTG											
	TCG <u>T</u> T-C3											
	C3-	171										
p171	TCG <u>T</u> CGTTTTGTCGTTTT											
	TCG <u>T</u> CGTTTTGTCGTT	172										

Composto #	Sequência (5' to 3')	SEQ ID NO:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
p173	TCG <u>T</u> CGTTTTGTCG	173										
p174	TCG <u>T</u> CGTTTTGT	174										
p175	<u>U</u> CG <u>T</u> CGTTTTGTCGTTTT	175										
p176	<u>U</u> TCG <u>T</u> CGTTTTGTCGTT	176										
p177	<u>U</u> CG <u>T</u> CGTTTTGTCG	177										
p178	<u>U</u> CG <u>T</u> CGTTTTGT	178										
p179	<u>U</u> CG <u>U</u> CGTTTTGTCGTTTTG TCG <u>T</u> T-C3	179										
p180	<u>U</u> CG <u>T</u> CGTTTTGTCGTTTTG TCG <u>T</u> T-C3	180										
p181	<u>U</u> CGTCG <u>T</u> TTTTGTCGTTTTG TCG <u>T</u> T-C3	181										
p182	<u>U</u> CG <u>T</u> CG <u>T</u> TTTTGTCGTTTTG TCG <u>T</u> T-C3	182										

Composto #	Sequência (5' to 3')	SEQ ID NO:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
p183	<u>UCGTCGTTTTGTCGTTTTG</u> TCGTT-C3	183										
p184	TCCATGACGTTCCCTGATGC <u>T</u> -C3	184										
p185	tccatgacgttcctgatgc <u>t</u> -C3	185										
p186	<u>tccatgacgttcctgatgc</u> t-C3	186										
p187	<u>UCGTCGTTTTGTCGTT</u> -C3	187										
p188	<u>UCGTCGTTGTCGTT</u> -C3	188										
p189	<u>UCGTCGTGTCGTT</u> -C3	189										
p190	<u>UCGTCGTTTCGTT</u> -C3	190										
p191	<u>UCGTCGTCGTT</u> -C3	191										

Composto #	Sequência (5' to 3')	SEQ ID NO:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
p192	<u>UGC</u> TGCTTTTGTGCTTTTG TGCTT	192										
p193	TCCATGACGTTCCCTGACGT <u>T</u> -C3	193										
p194	tccatgacgttcctgacgt <u>t</u> -C3	194										
p195	<u>TCCATGACGTTCCCTGACGT</u> T-C3	195										
p196	<u>tccatgacgttcctgacgt</u> t-C3	196										
p197	<u>TAACGACAAAACGACAAA</u> <u>CGACGA</u>	197										
p198	<u>AACGACAAAACGACAAAAC</u> <u>GACGA</u> T-C3	198										

Composto #	Sequência (5' to 3')	SEQ ID NO:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
p199	<u>UCGTCG</u> ttttgtCGTT-C3	199										
p200	<u>UCGTCG</u> ttttgtCGTT-C3	200										
p201	<u>UCGTCG</u> ttTTGTCGTT-C3	201										
p202	<u>UCGTCG</u> TtttGTCGTT-C3	202										
p203	<u>UCGTCG</u> TTTTgtCGTT-C3	203										
p204	<u>UCGTCG</u> TTTTGTCGTT-C3	204										
p205	<u>UCGTCG</u> TTTTTGTCGTT-C3	205										
p206	<u>UCGTCG</u> TTTTGTCGTT-C3	206										
p207	<u>UCGTCG</u> TTTTGTCGTT-C3	207										
p208	<u>UCGTCG</u> TTTTGTCGTT-C3	208										
p209	<u>UCGTCG</u> TT-C3	209										
p210	<u>UCGTCG</u> T-C3	210										
p211	<u>UCG</u> TTT-C3	211										

Composto #	Sequência (5' to 3')	SEQ ID NO:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
p212	<u>UCGTT</u> <u>T</u> -C3	212										
p213	<u>UCGTCGTGTCG</u> <u>TT</u> -C3	213										
p214	<u>UCGTCGTGTTTT</u> <u>T</u> -C3	214										
p215	<u>UCGTTTTGTCG</u> <u>T</u> -C3	215										
p216	<u>UCGTTTGTCG</u> <u>T</u> -C3	216										
p217	<u>UCGTTGTCG</u> <u>T</u> -C3	217										
p218	<u>UCGTGTCG</u> <u>T</u> -C3	218										
p219	<u>UGC</u> <u>TGCTTTTGCTT</u> -C3	219										
p220	<u>UCGTCGTTTTGTCG</u> <u>TT</u> -C3	220										
p221	<u>UCG</u> <u>T</u> CGTTTTGTCG <u>TT</u> -C3	221										
p222	GGGACGATCGTC <u>T</u>	222										
p223	ggGACGATCGTC <u>T</u> gg	223										
p224	ggGACGA <u>T</u> CGTCTgg	224										

Composto #	Sequência (5' to 3')	SEQ ID NO:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
p225	<u>UCG</u> <u>TCG</u> TGTCGTT-C3	225										
p226	<u>UCG</u> <u>TCG</u> T GTTCGTT-C3	226										
p227	<u>UCG</u> <u>TCG</u> T G TTCGTT-C3	227										
p228	<u>UCG</u> <u>TCG</u> TG T TCGTT-C3	228										
p229	<u>UCG</u> T CGTGT <u>C</u> GTT-C3	229										
p230	<u>UCG</u> T C GTGT <u>C</u> GTT-C3	230										
p231	<u>UCG</u> T C gtgt <u>C</u> GTT-C3	231										
p232	tcgtcgttttgtcgttttg tcg <u>t</u> T-C3	232										
p233	<u>u</u> cgtcgttttgtcgttttg tcg <u>t</u> T-C3	233										
p235	tcgtcgttttgtcg <u>t</u> T-C3	235										
p236	<u>u</u> cgtcgttttgtcg <u>t</u> T-C3	236										

Composto #	Sequência (5' to 3')	SEQ ID NO:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
p237	tcgtcgtgtcgt <u>T</u> -C3	237										
p238	<u>u</u> cgtcgtgtcgt <u>T</u> -C3	238										
p239	<u>U</u> CgtCgtgtCg <u>T</u> -C3	239										
p240	<u>U</u> CgtCgtgtCg <u>t</u> -C3	240										
p241	<u>U</u> Cgtcgtgtcgt <u>t</u> -C3	241										
p242	<u>u</u> cgtcgtgtcgt <u>t</u> -C3	242										
p243	<u>u</u> cgtcgtgtcgt <u>t</u> -C3	243										
p244	<u>U</u> Cg <u>t</u> cgtgtcgtt-C3	244										
p245	<u>u</u> cg <u>t</u> cgtgtcgtt-C3	245										
p246	<u>u</u> cg <u>t</u> cgtgtcgtt-C3	246										
p247	<u>U</u> Cg <u>t</u> cgttttgtcgttttg tcgtt-C3	247										

Composto #	Sequência (5' to 3')	SEQ ID NO:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
p248	<u>U</u> cg ₂ cgttttg ₂ cgttttg tcgtt-C3	248										
p249	<u>u</u> cg ₂ cgttttg ₂ cgttttg tcgtt-C3	249										
p250	<u>U</u> CGTCgtgtCG <u>T</u> T-C3	250										
p251	<u>U</u> CG <u>T</u> CgtgtCgtt-C3	251										
p252	<u>U</u> Cg <u>T</u> CgtgtCgtt-C3	252										
p253	<u>U</u> CG' <u>T</u> CgtgtCGTT-C3	253										
p254	<u>U</u> CG <u>T</u> CgtgtCG' TT-C3	254										
p255	<u>U</u> CG <u>T</u> CgtgtCGT' T-C3	255										
p256	<u>U</u> CG <u>T</u> CgtgtCGTT' -C3	256										
p257	<u>U</u> CG <u>T</u> CgtgtCGT' T' -C3	257										
p258	<u>U</u> CG <u>T</u> CgtgtCG' T' T' -C3	258										

Composto #	Sequência (5' to 3')	SEQ ID NO:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
p259	<u>UCGT'</u> CgtgtCG <u>TT</u> -C3	259										
p260	<u>UCGT</u> CgtgtCG <u>TT'</u> -C3	260										
p261	<u>UCGT'</u> CgtgtCG <u>TT'</u> -C3	261										
p262	<u>Ucg<u>u</u></u> cgtgtc <u>g</u> tt-C3	262										
p263	<u>Ucg</u> t <u>c</u> gtg <u>u</u> cgtt-C3	263										
p264	<u>TAA</u> <u>CGACACGACGA</u>	264										
p265	<u>AACGACACGACGA</u> <u>T</u>	265										
p266	<u>u</u> cgt <u>c</u> gtg <u>u</u> cgtt-C3	266										
p267	c <u>g</u> t <u>c</u> gtgtc <u>g</u> tt-C3	267										
p268	c <u>g</u> t <u>c</u> gtg <u>u</u> cgtt-C3	268										
p269	T <u>c</u> g <u>t</u> cgtgtc <u>g</u> tt-C3	269										
p270	t <u>c</u> g <u>t</u> cgtgtc <u>g</u> tt-C3	270										
p271	<u>Ucg</u> t <u>c</u> gtgtc <u>g</u> tt-C3	271										

Composto #	Sequência (5' to 3')	SEQ ID NO:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
p272	<u>ucg</u> tcgtgtcgtt-C3	272										
p273	<u>ugc</u> tgctgtgctt-C3	273										
p274	<u>ucg</u> agctgtcgtt-C3	274										
p275	<u>ucg</u> tcgtgacgtt-C3	275										
p276	<u>ucg</u> acgtgacgtt-C3	276										
p277	acgacgtgacgtt-C3	277										
p278	acgacgtgacg <u>tt</u> -C3	278										
p279	<u>ucn</u> gtcgtgtcgtt-C3	279										
p280	<u>ucg</u> tcn <u>gt</u> gtcgtt-C3	280										
p281	<u>ucg</u> tcgtgtcn <u>gt</u> t-C3	281										
p282	<u>ucn</u> gtcn <u>gt</u> gtcn <u>gt</u> t-C3	282										
p283	acn <u>g</u> acn <u>g</u> tgacn <u>g</u> t-C3	283										
p284	acn <u>g</u> acn <u>g</u> tgacn <u>g</u> <u>tt</u> -C3	284										

Composto #	Sequência (5' to 3')	SEQ ID NO:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
p285	<u>u</u> cg _t cg _t g _t cg _t T-OH	285										
p286	<u>u</u> cg _t cg _t g _t cg _t t-C3	286										
p287	<u>u</u> cg _t cg _t g _t cg _t T	287										
p288	<u>u</u> cg _t cg _t g _t cg _t t-C3	288										
p289	<u>u</u> cg _t cg _t g _t cg _t T	289										
p290	tcg _t cg _t g _t cg _t t-C3	290										
p291	tcg _t cg _t g _t cg _t T	291										
p292	<u>u</u> cg _t cg _t g _a c _g t _t -C3	292										
p293	<u>u</u> cg _a c _g t _g a _c g _t _t -C3	293										
p294	tccatg <u>u</u> cg _t tccttgat _t -C3	294										
p295	tccatg <u>u</u> cg _t tcctt _t -C3	295										
p296	tccatg <u>u</u> cg _t ttct _t -C3	296										

Composto #	Sequência (5' to 3')	SEQ ID NO:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
p297	tccatg <u>u</u> cg <u>t</u> -C3	297										
p298	t <u>u</u> cg <u>t</u> cg <u>t</u> gc <u>t</u> -C3	298										
p299	<u>uu</u> cg <u>t</u> cg <u>t</u> gc <u>t</u> -C3	299										
p300	u <u>u</u> cg <u>t</u> cg <u>t</u> gc <u>t</u> -C3	300										
p301	tcg <u>u</u> cg <u>t</u> gc <u>t</u> -C3	301										
p302	tcg <u>U</u> cg <u>t</u> gc <u>t</u> -C3	302										
p303	tcg <u>U</u> cg <u>t</u> gc <u>t</u> -C3	303										
p304	<u>u</u> cg <u>t</u> cg <u>t</u> gacg <u>t</u> -C3	304										
p305	<u>u</u> cgacg <u>t</u> gacg <u>t</u> -C3	305										
p306	C3-PO- <u>u</u> cg <u>t</u> cg <u>t</u> gc <u>t</u> -C3	306										
p307	fucg <u>t</u> cg <u>t</u> gc <u>t</u> -C3	307										
p308	bucg <u>t</u> cg <u>t</u> gc <u>t</u> -C3	308										

Composto #	Sequência (5' to 3')	SEQ ID NO:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
p309	C3-PS- <u>ucg</u> tcgtgtcgtt-C3	309										
p310	<u>ucg</u> tcgtgtcgtt-C3	310										
p311	ucgtcgtgtcgtt-C3	311										
p312	tcgucgtgtcgtt-C3	312										
p313	t <u>ucg</u> tcgtgacgtt-C3	313										
p314	u <u>ucg</u> tcgtgacgtt-C3	314										
p315	NH ₂ C6- <u>ucg</u> tcgtgacgtt-C3	315										
p316	C3-u <u>ucg</u> tcgtgacgtt- C3	316										
p317	tcgacgtg <u>ucg</u> tt-C3	317										
p318	tcgacgtgacgtt-C3	318										

Composto #	Sequência (5' to 3')	SEQ ID NO:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
p319	<u>ucg</u> acgtg <u>ucg</u> tt-C3	319										
p320	<u>ucg</u> ccatgacgtt-C3	320										
p321	<u>ucg</u> ccatg <u>ucg</u> tt-C3	321										
p322	tcg <u>ccatg</u> <u>ucg</u> tt-C3	322										
p323	bucg <u>tcgtg</u> acgtt-C3	323										
p324	catg <u>ucg</u> ttcctt <u>tc</u> -C3	324										
p325	tg <u>ucg</u> ttcctt <u>tc</u> -C3	325										
p326	tatg <u>ucg</u> ttcctt <u>tc</u> -C3	326										
p327	tccatgacgttcctt <u>tc</u> -C3	327										
p328	<u>ugc</u> tgctgagctt-C3	328										
p329	<u>ugc</u> agctgagctt-C3	329										
p330	fTcg <u>tcgtg</u> tcgtt-C3	330										
p331	ftcg <u>tcgtg</u> tcgtt-C3	331										

Composto #	Sequência (5' to 3')	SEQ ID NO:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
p332	<u>ucgt</u> <u>cg</u> <u>gtcgtt</u> -C3	332										
p333	<u>ucgt</u> <u>cg</u> <u>tg</u> <u>cg</u> <u>tt</u> -C3	333										
p334	<u>ucgt</u> <u>cg</u> <u>gtcgtt</u> -C3	334										
p335	<u>ucgt</u> <u>cg</u> <u>tg</u> <u>cg</u> <u>tt</u> -C3	335										
p336	<u>ucgt</u> <u>cg</u> <u>gtcgtt</u> -C3	336										
p337	<u>ucgt</u> <u>cg</u> <u>gtcgtt</u> -C3	337										
p338	tatg <u>ug</u> cttcctt-C3	338										
p339	bucg <u>tcgpt</u> gtcgp <u>tt</u> -C3	339										
p340	bucg <u>tcg</u> g <u>ptcgtpt</u> -C3	340										
p341	bucg <u>tcg</u> gtcgt <u>pt</u> -C3	341										
p342	bucg <u>tcg</u> g <u>ptcgtt</u> -C3	342										
p343	bucg <u>tcg</u> <u>pt</u> gtcgtt-C3	343										
p344	bucg <u>tcg</u> gtcgp <u>tp</u> -C3	344										

Composto #	Sequência (5' to 3')	SEQ ID NO:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
p345	<u>t</u> ugctgctgagctt-C3	345										
p346	t <u>u</u> gctgctgagctt-C3	346										
p347	t <u>u</u> gctgctgagctt-C3	347										
p348	<u>u</u> cg <u>t</u> cg <u>t</u> gtcgtt-C3	348										
p349	<u>u</u> cg <u>t</u> cg <u>t</u> gtcgtt-C3	349										
p350	<u>u</u> cg <u>t</u> cg <u>t</u> gtcgtt-C3	350										
p351	<u>u</u> cg <u>t</u> cg <u>t</u> gtcgtt-C3	351										
p352	<u>u</u> cg <u>t</u> cg <u>t</u> gtcgtt-C3	352										
p353	t <u>u</u> cgtcgtgacgtt-C3	353										
p354	t <u>u</u> gctgctgagctt-C3	354										
p355	<u>u</u> cg <u>T</u> cg <u>t</u> gtcgtt-C3	355										
p356	<u>u</u> cg <u>T</u> cg <u>t</u> gtcgtt-C3	356										
p357	<u>u</u> cg <u>T</u> cg <u>t</u> gtcgtt-C3	357										

Composto #	Sequência (5' to 3')	SEQ ID NO:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
p358	<u>ucgt</u> cggtgcg <u>tt</u> -C3	358										
p359	<u>ucgT</u> cggtgcg <u>tt</u> -C3	359										
p360	<u>ucgt</u> cggtgcg <u>Tt</u> -C3	360										
p361	<u>ucgT</u> cggtgcg <u>tt</u> -C3	361				102						
p362	<u>ucgT</u> cggtgcgT <u>tt</u> -C3	362				175						
p363	<u>ucgT</u> cggtgcG <u>tt</u> -C3	363				365						
p364	<u>ucgT</u> cggtC <u>egtt</u> -C3	364				523						
p365	<u>ucgT</u> cggtT <u>ecgtt</u> -C3	365				260						
p366	<u>ucgT</u> cggtG <u>tcgtt</u> -C3	366				390						
p367	<u>ucgT</u> cgT <u>egtcgtt</u> -C3	367				287						
p368	<u>ucgT</u> C <u>getgtcgtt</u> -C3	368				223						
p369	<u>ucgT</u> C <u>egtgtcgtt</u> -C3	369				242						
p370	<u>ucGeT</u> cggtgcg <u>tt</u> -C3	370				158						

Composto #	Sequência (5' to 3')	SEQ ID NO:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
p371	<u>u</u> Ceg <u>T</u> cggtgcgtt-C3	371			160							
p372	<u>u</u> cgTecgtg <u>T</u> cg-C3	372			194							
p373	t <u>u</u> cgtcgtgacgttX5-C3	373										
p374	t <u>u</u> cgtcgtgacgtX5t-C3	374										
p375	t <u>u</u> cgtcgtgacgX5tt-C3	375										
p376	t <u>u</u> cgtcgtgacX5gtt-C3	376										
p377	t <u>u</u> cgtcgtgaX5cgtt-C3	377										
p378	t <u>u</u> cgtcgtgX5acgtt-C3	378										
p379	t <u>u</u> cgtcgtX5gacgtt-C3	379										
p380	t <u>u</u> cgtcgX5tgacgtt-C3	380										
p381	t <u>u</u> cgtcX5gtgacgtt-C3	381										
p382	t <u>u</u> cgX5cgtgacgtt-C3	382										
p383	t <u>u</u> cgX5tcgtgacgtt-C3	383										

Composto #	Sequência (5' to 3')	SEQ ID NO:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
p384	t <u>u</u> cX5gtcgtgacgtt-C3	384										
p385	t <u>u</u> X5cgtcgtgacgtt-C3	385										
p386	tX5 <u>u</u> cgtcgtgacgtt-C3	386										
p387	X5t <u>u</u> cgtcgtgacgtt-C3	387										
p388	tucgx5cgtgacgtt-C3	388										
p389	tucgx5cgtgacgtt-C3	389										
p390	<u>Ue</u> cg <u>T</u> cgtgtcgtt-C3	390										533
p391	<u>Ue</u> Ceg <u>T</u> cgtgtcgtt-C3	391										1080
p392	<u>Ue</u> CeGe <u>T</u> cgtgtcgtt-C3	392										1691
p393	<u>u</u> cg <u>T</u> cgtgtCeGeTeTe-C3	393										2211
p394	<u>Ue</u> CeGe <u>T</u> cgtgtCeGeTeTe-C3	394										inat.

Composto #	Sequência (5' to 3')	SEQ ID NO:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
p395	<u>Ue</u> CeGe <u>T</u> CeGeTeGeTeCe GeTeTe-C3	395										
p396	<u>u</u> Ceg <u>T</u> CegtgtCegtt-C3	396			704							
p397	<u>ucg</u> <u>T</u> cGetGetcGett-C3	397			3494							
p398	<u>ucg</u> <u>T</u> cgTegTecgTet-C3	398			2423							
p399	<u>u</u> Ceg <u>T</u> cgTegTecgTet- C3	399			4261							
p400	<u>ucg</u> TecgTegTecg <u>T</u> t-C3	400			1805							
p401	<u>u</u> CegTecgTegTecg <u>T</u> t- C3	401			2509							
p402	<u>u</u> Ceg <u>T</u> cgtgtcGett-C3	402			356							
p403	<u>u</u> Ceg <u>T</u> cgtgtCegtt-C3	403			482							
p404	<u>u</u> Ceg <u>T</u> cgttgtcgtTet-C3	404			203							

Composto #	Sequência (5' to 3')	SEQ ID NO:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
p405	<u>C</u> eg <u>T</u> cgtTegtcgTet- C3	405			809							
p406	<u>C</u> eg <u>T</u> cgTetgtcgtTet- C3	406			510							
p407	<u>C</u> eg <u>T</u> cgtX3gtcgtTet- C3	407			286							
p408	<u>C</u> eg <u>T</u> cgX3gtcgtTet- C3	408			266							
p409	<u>C</u> eg <u>T</u> cgtTegtcgTet- C3	409			875							
p410	<u>C</u> eg <u>T</u> cgtX3gtcgtTet- C3	410			193							
p411	X3 <u>C</u> g <u>T</u> cgtgtcgtt-C3	411			124							
p412	<u>X</u> 3cg <u>T</u> cgtgtcgtt-C3	412			inat.							

Composto #	Sequência (5' to 3')	SEQ ID NO:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
p413	<u>uc</u> X3g <u>T</u> cggtgcgtt-C3	413			225							
p414	<u>ucg</u> X3 <u>T</u> cggtgcgtt-C3	414			131							
p415	<u>ucg</u> <u>T</u> X3cggtgcgtt-C3	415			124							
p416	<u>ucg</u> <u>T</u> cX3gtgcgtt-C3	416			85							
p417	<u>ucg</u> <u>T</u> cgX3tgcgtt-C3	417			92							
p418	<u>ucg</u> <u>T</u> cgX3gtgcgtt-C3	418			93							
p419	<u>ucg</u> <u>T</u> cgTgX3tcgtt-C3	419			189							
p420	<u>ucg</u> <u>T</u> cgTgtX3cgtt-C3	420			227							
p421	<u>ucg</u> <u>T</u> cgTgtcX3gtt-C3	421			95							
p422	<u>ucg</u> <u>T</u> cgTgtcgX3tt-C3	422			135							
p423	<u>ucg</u> <u>T</u> cgTgtcgtX3t-C3	423			202							
p424	<u>ucg</u> <u>T</u> cgTgtcgttX3-C3	424			113							
p425	bucg <u>T</u> cggtgcgtt-C3	425										

Composto #	Sequência (5' to 3')	SEQ ID NO:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
p426	<u>c</u> cgTcggtgcgtt-C3	426										
p427	<u>i</u> ucgTcggtgcgtt-C3	427										
p428	<u>i</u> UcgTcggtgcgtt-C3	428										
p429	od <u>u</u> cgTcggtgcgtt-c3	429										
p430	o <u>u</u> cgTcggtgcgtt-c3	430										
p431	ods <u>u</u> cgTcggtgcgtt-c3	431										
p432	s <u>u</u> cgTcggtgcgtt-c3	432										
p433	bu ^r cgTcggtgcgtt-C3	433										96
p434	bu ^s cgTcggtgcgtt-C3	434										125
p435	buc ^r gTcggtgcgtt-C3	435										148
p436	buc ^s gTcggtgcgtt-C3	436										112
p437	bu ^s c ^r gTcggtgcgtt-C3	437										
p438	bu ^s c ^s gTcggtgcgtt-C3	438										

Composto #	Sequência (5' to 3')	SEQ ID NO:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
p439	buCeg <u>T</u> cggtgcgtt-C3	439										
p440	buCeg <u>T</u> cggtgcgtt-C3	440										
p441	buCeg <u>T</u> CegtgtCegtt-C3	441										
p442	buCeg <u>T</u> cggtgcgTet-C3	442										
p443	buCeg <u>T</u> cgTegtgcgTet-C3	443										
p444	Biotin-AfAfCfGfAfCfAfCfGfAfCfGfAf	444										
p445	buCsig <u>T</u> cggtgcgtt-c3	445										
p446	bucg <u>T</u> cggtgcgTsit-c3	446										
p447	buCsig <u>T</u> CsigtgtCsigtt-c3	447										

Composto #	Sequência (5' to 3')	SEQ ID NO:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
p448	buCsig <u>tcgtg</u> tcgTsit-c3	448										
p449	buCsig <u>tcgtg</u> tsigtcgTsit-c3	449										
p450	t <u>ucgtcgtgacgtt</u> -c3	450										
p451	t <u>ucgacgtgacgtt</u> -c3	451						60			18	100
p452	t <u>ucgacgtt</u> -c3	452						inat				inat
								.			100	.
p453	t <u>uacgtt</u> -c3	453						inat			inat	inat
								.			.	.
p454	tacgtt-c3	454						inat			inat	inat
								.			.	.
p455	t <u>ucgtt</u> -c3	455						inat			inat	inat
								.			.	.

Composto #	Sequência (5' to 3')	SEQ ID NO:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
p456	tacg <u>t</u> -c3	456						inat			inat	inat
								.			.	.
p457	t <u>u</u> cg <u>t</u> -c3	457						inat			inat	inat
								.			.	.
p458	t <u>u</u> cg <u>u</u> cg <u>t</u> gacg <u>t</u> -c3	458									36	119
p459	t <u>u</u> cg <u>u</u> cg <u>t</u> -c3	459										inat
											132	.
p460	t <u>u</u> acg <u>u</u> -c3	460									inat	inat
											.	.
p461	tacg <u>u</u> -c3	461									inat	inat
											.	.
p462	t <u>u</u> cg <u>u</u> -c3	462										inat
											223	.

Composto #	Sequência (5' to 3')	SEQ ID NO:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
p463	g <u>u</u> cg <u>t</u> t-c3	463									inat	inat
											.	.
p464	gacg <u>t</u> t-c3	464									inat	inat
											.	.
p465	g <u>u</u> cg <u>u</u> t-c3	465									inat	inat
											.	.
p466	gacg <u>u</u> t-c3	466									inat	inat
											.	.
p469	tbucg <u>t</u> cg <u>t</u> gacg <u>t</u> t-c3	469										
p470	bucg <u>t</u> cg <u>t</u> g <u>t</u> cg-c3	470										
p471	bucg <u>t</u> cg <u>t</u> g <u>t</u> -c3	471										
p472	bucg <u>t</u> cg <u>t</u> g <u>t</u> -c3	472										
p473	bucg <u>t</u> cg <u>t</u> -c3	473										
p474	bucg <u>t</u> cg <u>t</u> -c3	474										

Composto #	Sequência (5' to 3')	SEQ ID NO:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
p475	bucg <u>T</u> t-c3	475										
p476	bucgt <u>T</u> -c3	476										
p477	t <u>ucgt</u> cgtagacgtmtm-c3	477										
p478	tmtm <u>ucgt</u> cgtagacgtt-c3	478										
p479	tmtm <u>ucgt</u> cgtagacgtmtm-c3	479										
p480	t <u>ucgt</u> cgtagacgt (m) t (m))-c3	480										
p481	t (m) t (m) <u>ucgt</u> cgtagacgtt-c3	481										
p482	t <u>uc^fgt</u> cgtagacgtt-c3	482									399	
p483	t <u>uc^sgt</u> cgtagacgtt-c3	483									577	
p484	t <u>u^rcg^t</u> cgtagacgtt-c3	484									410	

Composto #	Sequência (5' to 3')	SEQ ID NO:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
p485	t <u>u</u> ^o cg <u>t</u> cggtgacggtt-c3	485						245				
p486	t (m) t (m) <u>u</u> cg <u>t</u> cggtgacg t (m) t (m) -c3	486										
p487	bucg <u>t</u> cggtgctggt (m) - c3	487										
p488	bucg <u>t</u> cggtgctg (m) t (m)) -c3	488										
p489	bucg <u>t</u> cggtgctg (m) T- c3	489										

Na tabela 2, a coluna **A** fornece expressão de IL-6 em células DB (EC₅₀, nM); a coluna **B** fornece expressão de IL-10 em células DB (EC₅₀, nM); a coluna **C** fornece ativação de NFκB nas células azuis de Ramos (EC₅₀, nM); a coluna **D** fornece células Hela-hTLR9-NFκB-luc de ativação de NFκB (EC₅₀, nM); a coluna **E** fornece células Hela-mTLR9-NFκB-luc de ativação de NFκB (EC₅₀, nM); a coluna **F** fornece secreção de IL-6 em esplenócitos de camundongo (EC₅₀, nM); a coluna **G** fornece secreção de IL-6 nos esplenócitos de camundongo após 24 h de pré-incubação em plasma de 95% (EC₅₀, nM); a

coluna **H** fornece secreção de IL-6 em DC diferenciadas da medula óssea de camundongo (EC₅₀, nM); A coluna **I** fornece ativação de NFκB nas células HEK-Blue de camundongo após 2 h de transfecção com RNAiMax (EC₅₀, nM); e a Coluna **J** fornece ativação de NFκB em células HEK-Blue humanas após 2 h de transfecção com RNAiMax (EC₅₀, nM).

Os descritores principais para as sequências fornecidas nas Tabelas incluídas neste documento são os seguintes:

letras minúsculas = nucleosídeo-3'-fosforotioato; LETRA MAIÚSCULA = nucleosídeo-3'-fosfato; *letras minúsculas em itálico* = nucleosídeo com três 'tBuDS-Ph (orto) triéster (PS); *LETRA MAIÚSCULA EM ITÁLICO* = nucleosídeo com um 3 'tBuDS-Ph (orto) triéster (PO); dt = dT (DBCO); **negrito sublinhado t** = DBCO-C6-dT; **letras minúsculas em negrito** = nucleosídeo com um 3 'n-butyl triéster (PS); **LETRA MAIÚSCULA EM NEGRITO**: nucleosídeo com um 3 'n-butyléster (PO); ***letras minúsculas em negrito e itálico*** = nucleosídeo com um triéster 3 'de homopropargil (hPro) (PS); *letras minúsculas sublinhadas em itálico* = nucleosídeo com um triéster 3 'DBCO-NH-PEG2 (N1) (PS); LETRAS MAIÚSCULAS SUBLINHADAS EM ITÁLICO = nucleosídeo com um 3 'DBCO-NH-PEG2 triéster (N1) (PO); sublinhado duplo t = dT tri-PEG2-NH2 triéster (PS); sublinhado duplo T = dT triéster PEG2-NH₂ (PO); *letras minúsculas sublinhadas duplas em itálico* = nucleosídeo com um 3 'PEG2-NH2 triéster (N1) (PS); LETRAS MAIÚSCULAS SUBLINHADAS DUPLAS EM ITÁLICO = nucleosídeo com um 3 'PEG2-NH2 triéster (N1) (PO); **LETRAS MAIÚSCULAS EM NEGRITO E ITÁLICO EM UPPER CASE U** = 5-iodo-2'-desoxiuridina (PO); **letras minúsculas em negrito e itálico em upper case u** = 5-iodo-2'-desoxiuridina (PS); **NEGRITO SUBLINHADO** = 2'-fluoronucleotídeo (PO); um apóstrofo indica que o nucleotídeo identificado por uma letra à esquerda do apóstrofo contém uma ribose modificada com 2'-OME; ng sublinhado = 7-deaza-2'-desoxiguanosina (PS); sublinhado pT = PEG4 dT triéster (PO); sublinhado pt = tri-PEG4 dT (PS); fT = 5-trifluorometil-timidina (PO); fU = 5-fluoro-2'-desoxiuridina

(PO); bU = 5-bromo-2'-desoxiuridina (PO); ft = 5-trifluorometil-timidina (PS); fu = 5-fluoro-2'-desoxiuridina (PS); bu = 5-bromo-2'-desoxiuridina (PS); C3 = espaçador C₃-(CH₂)₃-OH (PO); c3 = espaçador C₃-(CH₂)₃-OH (PS); C6 = hexano-1,6-diilo; NH₂C6 = 6-amino-hex-1-ilo; Te = timidina com um 3 'triéster de etila (PO); Ge = guanósina com um 3 'triéster de etila (PO); Ce = citidina com um 3 'triéster de etila (PO); Ue = 5-iodouridina com um 3 'triéster de etila (PO); ue = 5-iodouridina com um 3 'triéster de etila (PS); iu = extremidade 5'-5 'com base na 5-iodo-2'-desoxiuridina (PS); iU = extremidade 5'-5 'com base na 5-iodo-2'-desoxiuridina (PO); X5 = X5-DBCO (PO); x5 = x5-DBCO (PS); X3 = X3 espaçador abásico (PO); e IR700 é um corante. Aqui, o descritor (PO) significa 3'-fosfato; e (PS) significa 3'-fosforotioato; od = fosfodiéster 5'-ortodissulfeto; o = 5'-fosfato (PO); ods = fosforotioato de 5'-ortodissulfureto; s = 5'-fosforotioato (PS); sobrescrito "r" = Rp PS; sobrescrito "s" = Sp PS; Af = 2'-fluoro-adenosina (PO); Csi = d-O-sililtriéster (PO); Tsi = dT O-sililtriéster (PO); tm = 2'-OMe timidina (PS); t (m) = 2'-OMOE timidina (PS). As estruturas são mostradas nas FIGs. 1A e 1B.

CpGs de cadeia dupla:

Recozimento e análise de gel:

[00716] O polinucleotídeo p88 (1 mL, estoque de 5 mM) foi adicionado a p144 (3,3 mL, estoque de 2 mM) com DPBS (24,7 mL). O polinucleotídeo p88 foi tratado com p145 de maneira semelhante. As misturas foram aquecidas a 65 ° C durante 10 min. A análise por TBE gel de uréia mostrou um recozimento completo do p88 (veja a Figura 2). Foi removido 1 µL de cada amostra, adicionado a 5 µL de tampão de carga de formamida e carregado por poço em um gel de TBE-uréia a 15%, 200 volts por 40 min, seguido por coloração com brometo de etídio (EtBr). Consulte a Tabela 2 para estruturas de p88, p144 e p145.

[00717] CpG de fita dupla usando p88/p144 - Exemplo representativo (1):

TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT (SEQ ID NO: 234)

AGCAGCAAAACAGCAAAACAGCAA

[00718] CpG de fita dupla usando p88/p145 - Exemplo representativo (1):

TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT (SEQ ID NO: 467)

AGCAGCAAAACAGCAAAACAGCAA

Exemplo 2: Preparação dos conjugados exemplares da invenção

[00719] Na preparação abaixo, os seguintes anticorpos foram utilizados: o anticorpo anti-CD38 é Ab79 divulgado em WO 2012/092616, a divulgação deste anticorpo é aqui incorporada por referência na sua totalidade; o anticorpo anti-CD79b é huMA79bv28 divulgado em WO 2014/011521, a divulgação deste anticorpo é aqui incorporada por referência na sua totalidade;

o anticorpo anti-CD30 é brentuximabe; o anticorpo anti-CD22 é 10F4 divulgado em US 20140127197, a divulgação deste anticorpo é aqui incorporada por referência na sua totalidade; e o anticorpo anti-CD20 é o rituximabe.

[00720] Outros anticorpos podem ser incorporados nos conjugados aqui descritos, por exemplo, o anticorpo anti-DEC205 pode ser um anticorpo divulgado no US 2010/0098704 (por exemplo, com a cadeia leve tendo a sequência:

```

      EIVLTQSPAT  LSLSPGERAT  LSCRASQSVS  SYLAWYQQKP  GQAPRLLIYD
ASNRATGIPA    RFSGSGSGTD    FTLTISSLEP    EDFAVYYCQQ    RRNWPLTFGG
GTKVEIKRTV    AAPSVFIFPP    SDEQLKSGTA    SVVCLLNNFY    PREAKVQWKV
DNALQSGNSQ    ESVTEQDSKD    STYLSSTLT    LSKADYEKHK    VYACEVTHQG
LSSPVTKSFN  RGEC (SEQ ID NO: 468); e a cadeia pesada tendo a
sequência:

```

```

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMYWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKYYAD
SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLWGWFYDYWGQGLTIVTSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGLLQGG) (SEQ ID NO: 490); o anticorpo anti-CD303
pode ter uma cadeia leve de sequência:

```

```

DIQLTQSPSSLSASVGRVTITCKASQSVDYDGDSYMWYQQKPGKAPKLLIYAASSTLESQVPS
S
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANEDPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD
E

```

QLKSGTASWCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSSTLTLTKAAY
E

KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 491), e uma cadeia pesada de sequência:

DVQLVESGGGLVLPKGGSLRLSCAASGFTTFSTYTMWVRQAPGKGLEWVATISPGDSFGYYYP
DSVQGRFTISRDNKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCTRDIIYNYGAWFAYWGQGLTVTVSSAS
TKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEA

LHNHYTQKSLSLSPGLLQGG (SEQ ID NO: 492); o anticorpo anti-CD40 pode ser lucatumumabe ou dacetuzumabe; o anticorpo anti-CD74 pode ser milatuzumab; o anticorpo anti-CD304 pode ser vesencumab; e o anticorpo anti-CD38 pode ser daratumumab, SAR650984 (Sanofi-Immunogen) ou MOR202 (Morphosys-Celgene). Estes anticorpos podem incluir um Q-terminal-Q-terminal (por exemplo, LLQGG (SEQ ID NO: 493) dentro da cadeia pesada ou GGGLLQGG (SEQ ID NO: 494) dentro da cadeia leve).

[00721] Outros anticorpos podem ser incorporados nos conjugados aqui descritos, por exemplo: o anticorpo anti-PD-L1 pode ser anticorpo descrito em mAbs (2016), 8, 593 e US8217149 com a cadeia leve tendo a sequência:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVSTAVAWYQQKPKAPKLLIYSASFLYSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKADAAPTIVSIFPPSS
EQLTSGGASVVCFLNNFYPPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKD
EYERHNSYTCEATHKTSTSPIVK SFNRNEC (SEQ ID NO: 495), e a sequência pesada:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYAD
 SVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSSAKTTAP
 SVYPLAPVCGDITGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSV
 TVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIKPPKI
 KDVLMIKSLPIVTCVAVVAVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYASTLRVVSALPIQ
 HQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKQVTLTCMVTD
 FMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSGYSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLH
 NHHTTKSFSRTPGLLQGG (SEQ ID NO: 496)

A. *Procedimento Geral para Conjugação de Anticorpo Q-terminal Mediado por Transglutaminase Microbial (mTG)*

Tabela 3. Configuração exemplar da conjugação mediada por transglutaminase

Molécula	Conc. (μM)	Volume (μL)	Ligante : Ab	Ab : mTG	Anticorpo (nmol)
Anticorpo anti-CD22 com marcação Q	99	253	-	-	25
N ₃ -PEG23-NH ₂	100000	25	100.0	-	-
mTG	20	125	-	10.0	-
Tampão Tris, pH 8.5	-	97	-	-	-
Volume final	-	500	-	-	-

Condições gerais para conjugação enzimática:

Concentração final de anticorpos = 50 μM

Relação anticorpo: Transglutaminase (mTG): 10: 1

Relação Linker: Ab: 100: 1

mTG MW = 38 kDa, 100 mU/mg, $\epsilon_{280} = 71850 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

2% p/v = 20 mg/mL = 5 μM em tampão tris

Tampão Tris: Tris 25 mM, NaCl 150 mM, pH 8,5

Solução de ligante no tampão tris ou DMSO

DMSO $\leq 5\%$ v/v do volume final

Protocolo Geral

[00722] A uma solução de um anticorpo marcado com Q (por exemplo, anticorpo anti-CD22 marcado com Q ou anticorpo anti-CD38 marcado com Q, designado como CD22-Q e CD38-Q, respectivamente) no tampão tris foi adicionado sequencialmente azido amino ligante e mTG. A mistura foi aquecida a 37°C por 2 h, altura em que o excesso de ligante e mTG foram removidos por troca de tampão com o anticorpo pendente azido-ligante (Ab-N₃) através de um concentrador de rotação Amicon 30kD usando DPBS como eluente. Uma amostra de Ab-N₃ foi então reduzida e caracterizada pelo grau de conjugação do ligante por RP-HPLC, como descrito abaixo. A cicloadição subsequente de Hüisgen de um alcino em um fosfotriéster do polinucleotídeo CpG com azido em Ab-N₃ forneceu um conjugado exemplar da invenção (ver Figuras 3A e 3B).

B. Procedimento geral para a conjugação de um anticorpo através do uso de ésteres de ácidos carboxílicos ativados (por exemplo, TFP ou PFP)

Tabela 4. Configuração exemplificativa para a conjugação da porção de ligação ao antígeno (por exemplo, anticorpo) com azido-PEG coberto com éster de TFP ou PFP-éster

Molécula	Conc. (μM)	Volume (μL)	Ligante : Ab	Anticorpo (nmol)
Porção de ligação ao antígeno contendo LC (por exemplo, rituximabe)	167	1700	-	28
TFP-PEGn-N ₃ or PFP-PEGn-N ₃ n = 3, 7, 11, 24, or 35	100000	8.5	3.0	-
DPBS	-	291	-	-
Volume final	-	2000	-	-

Protocolo Geral

[00723] A uma solução de um anticorpo no tampão DPBS, foi adicionado azido-PEG24-PFP, e a mistura resultante foi deixada durante a noite à temperatura ambiente, momento em que o excesso de azido-PEG24-PFP foi removido por tampão trocando o produto produzido Ab-N₃ através de um concentrador de rotação Amicon 30kD usando DPBS como eluente. Uma amostra de Ab-N₃ foi então reduzida

e caracterizada pelo grau de conjugação do ligante por RP-HPLC, como descrito abaixo. A cicloadição subsequente de Hüisgen de um alcino em um fosfotriéster do polinucleotídeo CpG com azido em Ab-N₃ forneceu um conjugado exemplar da invenção.

Protocolo de Conjugação de Polinucleotídeos Imunomoduladores de Anticorpo

[00724] Os polinucleotídeos CpG de dupla fita totalmente recozidos (p88/p144 e p88/p145) foram adicionados ao anticorpo anti-CD38Q-N3 (39 mL, 40 mM). A mistura foi aquecida a 37°C por 2 h e purificada por cromatografia em uma resina de troca aniônica (AEX). Dois picos principais foram coletados, concentrados através de um concentrador Amicon de 30 kD e analisados por gel desnaturante de tri-glicina, 200 volts por 1 h, seguido por coloração com brometo de etídio (ver Figura 4A).

Conjugado de Polinucleotídeo Imunomodulador de Anticorpo Anti-CD20

[00725] Um conjugado contendo rituximabe conjugado por meio do ligador TFP-PEG₂₄-N₃ a um polinucleotídeo imunoestimulador (p19), em que a porção de TFP foi ligada ao rituximabe e a azida foi ligada ao polinucleotídeo imunoestimulador. A mistura bruta do conjugado foi purificada por AEX-HPLC sob as seguintes condições:

Tampão A: fosfato de sódio 20 mM, iPrOH a 15% (aq.)

Tampão B: 20 mM de fosfato de sódio, 1M de brometo de sódio, 15% de iPrOH (aq.)

Coluna: Thermo Scientific Dionex DNASwift, 5 x 150 mm

10-95% de tampão B em 10 minutos, depois lave e reequilibre

Gradiente: 10 - 95% B em 10 minutos, lavagem 5 min 95% B

[00726] O traço AEX-HPLC da mistura bruta é mostrado na Figura 4B (as áreas de pico para os picos 1, 2 e 3 são 28%, 40% e 32%, respectivamente, da área total dos picos 1, 2 e 3). A Figura 4C mostra os traços combinados de HPLC para a mistura bruta e os picos isolados identificados pelos números 1, 2 e 3 na Figura 4B. A Figura 4D fornece comparação de rituximabe-PEG24-N3, a mistura de reação bruta e picos isolados 1, 2 e 3. Rituximabe-p19-DAR1 (proporção de droga-anticorpo = 1, ou seja, existe um anticorpo conjugado com um polinucleotídeo p19) foi identificado pelo seu peso molecular (MW = 155400).

[00727] Os procedimentos de conjugação aqui descritos foram utilizados para preparar conjugados exemplares da invenção listados na Tabela 6.

Quantificação de cadeia pesada não conjugada e conjugada por RP-HPLC

[00728] As amostras de Ab-N₃ foram analisadas antes da cicloadição de Huisgen para avaliar a eficiência da conjugação do ligante azido. Primeiro, a redução de Ab-N₃ (5 µM) com DTT (20 mM DTT) e 5 M guanidina-HCl foi realizada a 65°C por 30 min. Os produtos proteicos resultantes foram analisados por RP-HPLC sob as seguintes condições:

- Coluna: Busca difenil 5, 4,6 x 250 mm, 5 µm
- Temperatura da coluna: 60 ° C

- MPA: TFA a 0,1% em água, MPB: TFA a 0,1% em acetonitrila
- Gradiente: 35 - 50% MPB em 17 minutos
- Detecção a 280 nm

[00729] As porcentagens de cadeias pesadas não conjugadas e cadeias pesadas conjugadas (HC-N₃) são fornecidas na Tabela 5 e são baseadas nas porcentagens do total de áreas de pico para cadeias pesadas conjugadas e não conjugadas.

Tabela 5. Quantificação da extensão da conjugação do anticorpo HC

Reação	% HC não conjugado	% HC-N ₃
Anti-CD79b+ com etiqueta Q N ₃ -PEG23-NH ₂	13	86
anti-CD38 + com etiqueta Q N ₃ -PEG23-NH ₂	24	76
anti-CD22 + com etiqueta Q N ₃ -PEG23-NH ₂ (durante a noite, a TA)	23	77
Q-tagged anti-CD22 + N ₃ -PEG23-NH ₂ (durante a noite, a TA + 3 h, a 37 °C)	23	77

Conjugados com coluna vertebral de polinucleotídeo fosfato podem eluir mais rapidamente através da coluna de troca aniônica do que conjugados com coluna vertebral de fosforotioato

[00730] Conjugados contendo anticorpo anti-CD38 marcado com Q conjugado com um polinucleotídeo CpG foram preparados como aqui descrito. Nesta experiência, os polinucleotídeos CpG usados na síntese foram p19, p21 e p88. Os conjugados isolados foram submetidos à análise AEX-HPLC nas seguintes condições:

Método A: 10-95% de B em 10 minutos, depois lave e reequilibre

Método B: 10-50% de B em 10 minutos, depois lave e reequilibre

Coluna: Thermo Scientific Dionex DNASwift, analítico 5 x 150 mm

Tampão A: fosfato de sódio 20 mM, iPrOH a 15% (aq.)

Tampão B: fosfato de sódio 20 mM, brometo de sódio 1 M, i-PrOH a 15% (aq.)

[00731] Os tempos de retenção para os picos correspondentes ao conjugado SB-037 (anti-CD38Q-p19) no traço AEX-HPLC foram maiores que os correspondentes ao SB-038 (anti-CD38Q-p21).

Tabela 6-A

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	A	B	C	D	E	F
SB-001	CD22	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG8-N ₃	p4	5'-DBCO-TEG	4					
SB-003	CD22	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG8-N ₃	p5	5'-DBCO-TEG-C6-SS-C6	20					
SB-004	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG8-N ₃	p4	5'-DBCO-TEG	10	20	>10			
SB-005	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG8-N ₃	p5	5'-DBCO-TEG-C6-SS-C6	100					
SB-006	CD79b	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG8-N ₃	p4	5'-DBCO-TEG						
SB-007	CD79b	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG8-N ₃	p5	5'-DBCO-TEG-C6-SS-C6						
SB-008	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG8-N ₃	p7	5'-DBCO-TEG-C6-SS-C6	26	20	>10			

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	A	B	C	D	E	F
SB-009	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG8-N ₃	p9	5'-DBCO-TEG-C6- SS-C6	>20 0					
SB-010	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG8-N ₃	p12	5'-DBCO-TEG-C6- SS-C6						
SB-011	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG8-N ₃	p13	5'-DBCO-TEG-C6- SS-C6	75	40				
SB-012	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p24	dT (DBCO)	20					
SB-013	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p25	dT (DBCO)	100					
SB-014	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p26	dT (DBCO)	>20 0					
SB-015	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p27	dT (DBCO)	>20 0					
SB-016	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p28	dT (DBCO)	50					

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	A	B	C	D	E	F
SB-017	rituxima	LC-TFP-tag	TFP-PEG24-N ₃	p7	5'-DBCO-TEG-C6-	>20	>20				
	be				SS-C6	0	0				
SB-018	rituxima	LC-TFP-tag	TFP-PEG24-N ₃	p13	5'-DBCO-TEG-C6-	>20	>20				
	be				SS-C6	0	0				
SB-019	Rituxima be	LC-TFP-tag	TFP-PEG24-N ₃	p17	5'-DBCO-TEG						
SB-020	Rituxima be	LC-TFP-tag	TFP-PEG24-N ₃	p21	5'-DBCO-TEG						
SB-021	Rituxima be	LC-TFP-tag	TFP-PEG24-N ₃	p4	5'-DBCO-TEG	>20					
SB-02-1	CD22	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG8-N ₃	p4	5'-DBCO-TEG	>10		>10			
SB-022	Rituxima	LC-TFP-tag	TFP-PEG24-N ₃	p5	5'-DBCO-TEG-C6-	>20	>20				
	be				SS-C6	0	0				

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	A	B	C	D	E	F
SB-02-2	CD22	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG8-N ₃	p4	5'-DBCO-TEG	>10		>10			
SB-023	Rituxima be	LC-TFP-tag	TFP-PEG24-N ₃	p9	5'-DBCO-TEG-C6- SS-C6						
SB-024	Rituxima be	LC-TFP-tag	TFP-PEG24-N ₃	p12	5'-DBCO-TEG-C6- SS-C6						
SB-025	Rituxima be	LC-TFP-tag	TFP-PEG24-N ₃	p16	5'-DBCO-TEG						
SB-026	Rituxima be	LC-TFP-tag	TFP-PEG24-N ₃	p19	5'-DBCO-TEG						
SB-027	Rituxima be	LC-TFP-tag	TFP-PEG24-N ₃	p30	5'-DBCO-TEG						
SB-028	Rituxima be	LC-TFP-tag	TFP-PEG24-N ₃	p32	5'-DBCO-TEG						

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	A	B	C	D	E	F
SB-029	Rituxima be	LC-TFP-tag	TFP-PEG24-N ₃	p34	5'-DBCO-TEG						
SB-030	Rituxima be	LC-TFP-tag	TFP-PEG24-N ₃	p36	5'-DBCO-TEG	>20					
SB-031	Rituxima be	LC-TFP-tag	TFP-PEG24-N ₃	p38	5'-DBCO-TEG	0					
SB-032	CD79b	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p4	5'-DBCO-TEG						
SB-033	CD79b	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p19	5'-DBCO-TEG						
SB-034	CD79b	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p30	5'-DBCO-TEG						
SB-035	CD79b	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p32	5'-DBCO-TEG						
SB-036	CD79b	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p34	5'-DBCO-TEG						
SB-037	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p19	5'-DBCO-TEG	>10					
						0					

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	A	B	C	D	E	F
SB-038	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p21	5'-DBCO-TEG	70					
SB-039	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p23	5'-DBCO-TEG	18					
SB-040	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p30	5'-DBCO-TEG	12					
SB-041	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p34	5'-DBCO-TEG	20					
SB-042	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p38	5'-DBCO-TEG						
SB-043	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p71	3'-DBCO-NH-PEG2 triester						
SB-044	Rituximabe	LC-TFP-tag	TFP-PEG24-N ₃	p71	3'-DBCO-NH-PEG2 triester	>10 0					
SB-045	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p76	DBCO-NH-PEG2 triester			>10			
SB-046	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p77	DBCO-NH-PEG2 triester			0.1	0.2		

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	A	B	C	D	E	F
SB-047	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p78	DBCO-NH-PEG2 triester			0.05			
SB-048	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p79	DBCO-NH-PEG2 triester			0.6			
SB-049	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p80	DBCO-NH-PEG2 triester			0.04			
SB-050	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p81	DBCO-NH-PEG2 triester			0.1			
SB-051	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p82	DBCO-NH-PEG2 triester			0.09			
SB-052	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p83	DBCO-NH-PEG2 triester			0.4			
SB-053	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p84	DBCO-NH-PEG2 triester			0.1	0.3		

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	A	B	C	D	E	F
SB-054	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p85	DBCO-NH-PEG2 triester			0.09			
SB-055	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p86	DBCO-NH-PEG2 triester			0.1			
SB-056	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p87	DBCO-NH-PEG2 triester			0.05			
SB-057	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p88	DBCO-NH-PEG2 triester			0.1	0.3		
SB-058	Rituximabe	LC-TFP-tag	TFP-PEG24-N ₃	p76	DBCO-NH-PEG2 triester						
SB-059	Rituximabe	LC-TFP-tag	TFP-PEG24-N ₃	p77	DBCO-NH-PEG2 triester						
SB-060	Rituximabe	LC-TFP-tag	TFP-PEG24-N ₃	p78	DBCO-NH-PEG2 triester						

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	A	B	C	D	E	F
SB-061	Rituxima be	LC-TFP-tag	TFP-PEG24-N ₃	p79	DBCO-NH-PEG2 triester						
SB-062	Rituxima be	LC-TFP-tag	TFP-PEG24-N ₃	p80	DBCO-NH-PEG2 triester						
SB-063	Rituxima be	LC-TFP-tag	TFP-PEG24-N ₃	p81	DBCO-NH-PEG2 triester						
SB-064	Rituxima be	LC-TFP-tag	TFP-PEG24-N ₃	p82	DBCO-NH-PEG2 triester						
SB-065	Rituxima be	LC-TFP-tag	TFP-PEG24-N ₃	p83	DBCO-NH-PEG2 triester			2.4			
SB-066	Rituxima be	LC-TFP-tag	TFP-PEG24-N ₃	p84	DBCO-NH-PEG2 triester						
SB-067	Rituxima be	LC-TFP-tag	TFP-PEG24-N ₃	p85	DBCO-NH-PEG2 triester						

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	A	B	C	D	E	F
SB-068	Rituxima be	LC-TFP-tag	TFP-PEG24-N ₃	p86	DBCO-NH-PEG2 triester			0.24			
SB-069	Rituxima be	LC-TFP-tag	TFP-PEG24-N ₃	p87	DBCO-NH-PEG2 triester						
SB-070	Rituxima be	LC-TFP-tag	TFP-PEG24-N ₃	p88	DBCO-NH-PEG2 triester						
SB-071-2	CD22	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p7	5'-DBCO-TEG-C6- SS-C6	>10		>10			
SB-072-2	CD22	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p76	DBCO-NH-PEG2 triester	>10		>10			
SB-073-1	CD22	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p88	DBCO-NH-PEG2 triester	>10		>10			
SB-073-2	CD22	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p88	DBCO-NH-PEG2 triester	2.2	1.1	0.4			

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	A	B	C	D	E	F
SB-074	Rituxima be	LC-TFP-tag	TFP-PEG24-N ₃	p95	DBCO-NH-PEG2 triester						
SB-075	Rituxima be	LC-TFP-tag	TFP-PEG24-N ₃	p97	DBCO-NH-PEG2 triester						
SB-076	Rituxima be	LC-TFP-tag	TFP-PEG24-N ₃	p103	DBCO-NH-PEG2 triester						
SB-077	CD79b	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p88	DBCO-NH-PEG2 triester						
SB-078	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p95	DBCO-NH-PEG2 triester			1.9			
SB-079	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p97	DBCO-NH-PEG2 triester			1.6			
SB-080	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p100	DBCO-NH-PEG2 triester			>30			

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	A	B	C	D	E	F
SB-081	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p103	DBCO-NH-PEG2 triester			2.7			
SB-082	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG3-N ₃	p88	DBCO-NH-PEG2 triester						
SB-083	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG7-N ₃	p88	DBCO-NH-PEG2 triester						
SB-084	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG11-N ₃	p88	DBCO-NH-PEG2 triester						
SB-085	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG35-N ₃	p88	DBCO-NH-PEG2 triester						
SB-086	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p150	DBCO-NH-PEG2 triester			0.44			
SB-087	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p152	DBCO-NH-PEG2 triester			0.5			

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	A	B	C	D	E	F
SB-088	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p153	DBCO-NH-PEG2 triester			0.36			
SB-089	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p154	DBCO-NH-PEG2 triester			0.46			
SB-090	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p155	DBCO-NH-PEG2 triester			0.23			
SB-091	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p156	DBCO-NH-PEG2 triester			0.28			
SB-092	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p157	DBCO-NH-PEG2 triester			0.3			
SB-093	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p158	DBCO-NH-PEG2 triester			>10			
SB-094	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p159	DBCO-NH-PEG2 triester			>10			

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	A	B	C	D	E	F
SB-095	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p160	DBCO-NH-PEG2 triester			>10			
SB-096	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p161	DBCO-NH-PEG2 triester			0.33			
SB-097	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p162	DBCO-NH-PEG2 triester			0.53			
SB-098	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p163	DBCO-NH-PEG2 triester			0.12			
SB-099	rituximabe	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p163	DBCO-NH-PEG2 triester			0.14			
SB-100	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p164	DBCO-NH-PEG2 triester			1.2			
SB-101	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p165	DBCO-NH-PEG2 triester			0.11			

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	A	B	C	D	E	F
SB-102	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p166	DBCO-NH-PEG2 triester			0.25			
SB-103	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p167	DBCO-NH-PEG2 triester			0.06			
SB-104	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p168	DBCO-NH-PEG2 triester			0.29			
SB-105	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p169	DBCO-NH-PEG2 triester			0.05			
SB-106	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p170	DBCO-NH-PEG2 triester			0.34			
SB-107	rituximabe	LC-PFP	TFP-PEG24-N ₃	p163	DBCO-NH-PEG2 triester			0.55			
SB-108	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p179	DBCO-NH-PEG2 triester			0.12			

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	A	B	C	D	E	F
SB-109	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p179	DBCO-NH-PEG2 triester			0.11			
SB-110	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p180	DBCO-NH-PEG2 triester			0.1			
SB-111	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p180	DBCO-NH-PEG2 triester			0.11			
SB-112	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p181	DBCO-NH-PEG2 triester			0.07			
SB-113	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p182	DBCO-NH-PEG2 triester			0.12			
SB-114	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p183	DBCO-NH-PEG2 triester			0.1			
SB-115	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p183	DBCO-NH-PEG2 triester			0.09			

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	A	B	C	D	E	F
SB-116	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p171	DBCO-NH-PEG2 triester			0.44			
SB-117	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p172	DBCO-NH-PEG2 triester			0.52			
SB-118	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p173	DBCO-NH-PEG2 triester			0.91			
SB-119	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p174	DBCO-NH-PEG2 triester			1.5			
SB-120	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p175	DBCO-NH-PEG2 triester			0.07			
SB-121	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p176	DBCO-NH-PEG2 triester			0.11			
SB-122	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p176	DBCO-NH-PEG2 triester			0.08			

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	A	B	C	D	E	F
SB-123	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p176	DBCO-NH-PEG2 triester			0.05			
SB-124	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p176	DBCO-NH-PEG2 triester			0.05			
SB-125	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p176	DBCO-NH-PEG2 triester			0.05			
SB-126	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p177	DBCO-NH-PEG2 triester			0.12			
SB-127	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p178	DBCO-NH-PEG2 triester			0.34			
SB-128	Rituximabe	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p176	DBCO-NH-PEG2 triester			0.16			
SB-129	Rituximabe	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p176	DBCO-NH-PEG2 triester			0.16			

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	A	B	C	D	E	F
SB-130	Rituxima be	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p184	DBCO-NH-PEG2 triester			>10			
SB-131	Rituxima be	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p185	DBCO-NH-PEG2 triester			>10			
SB-132	rituxima be	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p186	DBCO-NH-PEG2 triester			>10			
SB-133	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p187	DBCO-NH-PEG2 triester			0.08			
SB-134	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p188	DBCO-NH-PEG2 triester			0.08			
SB-135	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p189	DBCO-NH-PEG2 triester			0.09			
SB-136	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p190	DBCO-NH-PEG2 triester			0.16			

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	A	B	C	D	E	F
SB-137	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p191	DBCO-NH-PEG2 triester			0.21			
SB-138	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p199	DBCO-NH-PEG2 triester			0.14			
SB-139	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p200	DBCO-NH-PEG2 triester			0.08			
SB-140	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p201	DBCO-NH-PEG2 triester			0.12			
SB-141	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p202	DBCO-NH-PEG2 triester			0.13			
SB-142	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p203	DBCO-NH-PEG2 triester			0.08			
SB-143	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p204	DBCO-NH-PEG2 triester			0.14			

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	A	B	C	D	E	F
SB-144	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p205	DBCO-NH-PEG2 triester			0.13			
SB-145	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p206	DBCO-NH-PEG2 triester			0.19			
SB-146	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p207	DBCO-NH-PEG2 triester			0.02			
SB-147	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p208	DBCO-NH-PEG2 triester			0.03			
SB-148	Rituximabe	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p088	DBCO-NH-PEG2 triester			0.42			
SB-149	rituximabe	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p151	DBCO-NH-PEG2 triester			21			
SB-150	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p200	DBCO-NH-PEG2 triester			0.12			

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	A	B	C	D	E	F
SB-151	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p201	DBCO-NH-PEG2 triester			0.07 2			
SB-152	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p209	DBCO-NH-PEG2 triester			0.41			
SB-153	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p210	DBCO-NH-PEG2 triester			0.71			
SB-154	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p211	DBCO-NH-PEG2 triester			1			
SB-155	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p212	DBCO-NH-PEG2 triester			0.75			
SB-156	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p213	DBCO-NH-PEG2 triester			0.25			
SB-157	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p214	DBCO-NH-PEG2 triester			0.22			

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	A	B	C	D	E	F
SB-158	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p215	DBCO-NH-PEG2 triester			0.11			
SB-159	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p216	DBCO-NH-PEG2 triester			0.24			
SB-160	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p217	DBCO-NH-PEG2 triester			0.37			
SB-161	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p218	DBCO-NH-PEG2 triester			0.7			
SB-162	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p219	DBCO-NH-PEG2 triester			n/a			
SB-163	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p222	DBCO-NH-PEG2 triester			>3			
SB-164	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p223	DBCO-NH-PEG2 triester			>3			

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	A	B	C	D	E	F
SB-165	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p224	DBCO-NH-PEG2 triester			>100 0			
SB-166	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p225	DBCO-NH-PEG2 triester			0.33			
SB-167	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p226	DBCO-NH-PEG2 triester			0.23			
SB-168	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p227	DBCO-NH-PEG2 triester			0.62			
SB-169	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p228	DBCO-NH-PEG2 triester			0.12			
SB-170	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p229	DBCO-NH-PEG2 triester			0.3			
SB-171	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p230	DBCO-NH-PEG2 triester			0.3			

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	A	B	C	D	E	F
SB-172	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p231	DBCO-NH-PEG2 triester			0.19			
SB-173	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p199	DBCO-NH-PEG2 triester			0.09			
SB-174	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p231	DBCO-NH-PEG2 triester			0.09			
SB-175	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p232	DBCO-NH-PEG2 triester			42			
SB-176	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p233	DBCO-NH-PEG2 triester			9.1			
SB-177	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p233	DBCO-NH-PEG2 triester			33			
SB-178	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p235	DBCO-NH-PEG2 triester			9.4			

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	A	B	C	D	E	F
SB-179	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p236	DBCO-NH-PEG2 triester			1.5			
SB-180	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p237	DBCO-NH-PEG2 triester			15			
SB-181	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p238	DBCO-NH-PEG2 triester			1			
SB-182	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p239	DBCO-NH-PEG2 triester			0.03			
SB-183	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p240	DBCO-NH-PEG2 triester			0.04			
SB-184	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p241	DBCO-NH-PEG2 triester			0.04			
SB-185	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p242	DBCO-NH-PEG2 triester			0.23			

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	A	B	C	D	E	F
SB-186	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p243	DBCO-NH-PEG2 triester			0.29			
SB-187	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p244	DBCO-NH-PEG2 triester			0.02			
SB-188	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p245	DBCO-NH-PEG2 triester			0.11			
SB-189	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p246	DBCO-NH-PEG2 triester			0.86			
SB-190	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p247	DBCO-NH-PEG2 triester			0.76			
SB-191	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p248	DBCO-NH-PEG2 triester			2.4			
SB-192	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p249	DBCO-NH-PEG2 triester			2.7			

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	A	B	C	D	E	F
SB-193	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p250	DBCO-NH-PEG2 triester			0.09			
SB-194	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p251	DBCO-NH-PEG2 triester			0.06			
SB-195	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p252	DBCO-NH-PEG2 triester			0.06			
SB-196	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p253	DBCO-NH-PEG2 triester			0.04			
SB-197	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p254	DBCO-NH-PEG2 triester			0.04			
SB-198	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p255	DBCO-NH-PEG2 triester			0.03			
SB-199	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p256	DBCO-NH-PEG2 triester			0.03			

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	A	B	C	D	E	F
SB-200	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p257	DBCO-NH-PEG2 triester			0.03 9			
SB-201	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p258	DBCO-NH-PEG2 triester			0.04 4			
SB-202	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p259	DBCO-NH-PEG2 triester			inat .			
SB-203	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p260	DBCO-NH-PEG2 triester			0.04 4			
SB-204	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p261	DBCO-NH-PEG2 triester			inat .			
SB-205	CD38	HC-Q-tag	PP6	p239	DBCO-NH-PEG2 triester			0.73			
SB-206	CD38	HC-Q-tag	PP6	p242	DBCO-NH-PEG2 triester			0.25			

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	A	B	C	D	E	F
SB-207	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p262	DBCO-NH-PEG2 triester			2.9			
SB-208	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p262	DBCO-NH-PEG2 triester			0.09			
SB-209	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p263	DBCO-NH-PEG2 triester			0.17			
SB-210	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG3-N ₃	p238	DBCO-NH-PEG2 triester			2.6			
SB-211	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG3-N ₃	p245	DBCO-NH-PEG2 triester			0.1			
SB-212	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG3-N ₃	p246	DBCO-NH-PEG2 triester			2.7			
SB-213	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG3-N ₃	p293	DBCO-NH-PEG2 triester			inat			

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	A	B	C	D	E	F
SB-214	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p267	DBCO-NH-PEG2 triester			93			
SB-215	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p268	DBCO-NH-PEG2 triester			>200			
SB-216	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p269	DBCO-NH-PEG2 triester			1.2			
SB-217	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p270	DBCO-NH-PEG2 triester			6.2*			
SB-218	CD38	HC-Q-tag	PP6	p246	DBCO-NH-PEG2 triester			3.2			
SB-219	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG3-N ₃	p275	DBCO-NH-PEG2 triester			3.7			
SB-220	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG3-N ₃	p276	DBCO-NH-PEG2 triester			3.4			

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	A	B	C	D	E	F
SB-221	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG3-N ₃	p243	DBCO-NH-PEG2 triester			4			
SB-222	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG3-N ₃	p245	DBCO-NH-PEG2 triester			~3.9			
SB-223	CD38	HC-Q-tag	PP6	p245	DBCO-NH-PEG2 triester			~7.5			
SB-224	ratoCD22	HC-Q-tag	PP6	p275	DBCO-NH-PEG2 triester					19	
SB-225	ratoCD22	HC-Q-tag	PP6	p276	DBCO-NH-PEG2 triester					13	
SB-226	ratoCD22	HC-Q-tag	PP6	p292	DBCO-NH-PEG2 triester					45*	
SB-227	ratoCD22	HC-Q-tag	PP6	p293	DBCO-NH-PEG2 triester					39*	

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	A	B	C	D	E	F
SB-228	ratoCD20	HC-Q-tag	PP6	p275	DBCO-NH-PEG2 triester					21	
SB-229	ratoCD20	HC-Q-tag	PP6	p276	DBCO-NH-PEG2 triester					13	
SB-230	ratoCD22	HC-Q-tag	PP6	p304	DBCO-NH-PEG2 triester					53*	
SB-231	ratoCD22	HC-Q-tag	PP6	p305	DBCO-NH-PEG2 triester					37*	
SB-232	ratoCD20	HC-Q-tag	PP6	p304	DBCO-NH-PEG2 triester					53*	
SB-233	ratoCD20	HC-Q-tag	PP6	p305	DBCO-NH-PEG2 triester					42*	
SB-234	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG3-N ₃	p298	DBCO-NH-PEG2 triester			5.7*			

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	A	B	C	D	E	F
SB-235	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG3-N ₃	p299	DBCO-NH-PEG2 triester			6.5*			
SB-236	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG3-N ₃	p300	DBCO-NH-PEG2 triester			4.4*			
SB-237	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG3-N ₃	p301	DBCO-NH-PEG2 triester			18*			
SB-238	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG3-N ₃	p302	DBCO-NH-PEG2 triester			9.1*			
SB-239	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG3-N ₃	p285	DBCO-NH-PEG2 triester			2.3			
SB-240	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG3-N ₃	p306	DBCO-NH-PEG2 triester			3.9*			
SB-241	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG3-N ₃	p307	DBCO-NH-PEG2 triester			n/a			

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	A	B	C	D	E	F
SB-242	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG3-N ₃	p308	DBCO-NH-PEG2 triester			4.5*			
SB-243	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG3-N ₃	p309	DBCO-NH-PEG2 triester			n/a			
SB-244	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG3-N ₃	p310	DBCO-NH-PEG2 triester			4.9			
SB-245	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p301	DBCO-NH-PEG2 triester			13*			
SB-246	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p301	DBCO-NH-PEG2 triester			7.6			
SB-247	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p302	DBCO-NH-PEG2 triester			3.5			
SB-248	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p303	DBCO-NH-PEG2 triester			n/a			

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	A	B	C	D	E	F
SB-249	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG3-N ₃	p243	DBCO-NH-PEG2 triester			6.2			
SB-250	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p298	DBCO-NH-PEG2 triester			7.1*			
SB-251	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p299	DBCO-NH-PEG2 triester			7.7*			
SB-252	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p300	DBCO-NH-PEG2 triester			5.1*			
SB-253	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p308	DBCO-NH-PEG2 triester			2.2			
SB-254	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p310	DBCO-NH-PEG2 triester			2.5			
SB-255	CD38	LC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p298	DBCO-NH-PEG2 triester			5.9*			

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	A	B	C	D	E	F
SB-256	CD38	LC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p300	DBCO-NH-PEG2 triester			4.2*			
SB-257	CD38	LC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p246	DBCO-NH-PEG2 triester			0.57			
SB-258	CD20	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p276	DBCO-NH-PEG2 triester						8.6
SB-259	ratoCD20	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p276	DBCO-NH-PEG2 triester						7.4
SB-260	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p311	DBCO-NH-PEG2 triester			3.6*			
SB-261	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p312	DBCO-NH-PEG2 triester			4.6*			
SB-262	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p306	DBCO-NH-PEG2 triester			3.1*			

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	A	B	C	D	E	F
SB-263	ratoCD20	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p313	DBCO-NH-PEG2 triester						4.9
SB-264	ratoCD20	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p314	DBCO-NH-PEG2 triester						4.9
SB-265	ratoCD20	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p316	DBCO-NH-PEG2 triester						14
SB-266	ratoCD22	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p314	DBCO-NH-PEG2 triester					1.7	
SB-267	CD20	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p313	DBCO-NH-PEG2 triester						8.9
SB-268	CD20	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p314	DBCO-NH-PEG2 triester						8.1
SB-269	CD20	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p316	DBCO-NH-PEG2 triester						12*

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	A	B	C	D	E	F
SB-270	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p330	DBCO-NH-PEG2 triester			2.0*			
SB-271	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p331	DBCO-NH-PEG2 triester			n/a			
SB-272	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG7-N ₃	p246	DBCO-NH-PEG2 triester			3.1			
SB-273	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG11-N ₃	p246	DBCO-NH-PEG2 triester			2.7			
SB-274	CD38	LC-Q-tag	NH ₂ -PEG3-N ₃	p246	DBCO-NH-PEG2 triester			3.1			
SB-275	CD38	LC-Q-tag	NH ₂ -PEG7-N ₃	p246	DBCO-NH-PEG2 triester			1.9			
SB-276	CD38	LC-Q-tag	NH ₂ -PEG11-N ₃	p246	DBCO-NH-PEG2 triester			1.2			

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	A	B	C	D	E	F
SB-277	ratoCD22	HC-Q-tag	PP6	p313	DBCO-NH-PEG2 triester					1.4	
SB-278	CD38	HC-Q-tag	PP10	p246	DBCO-NH-PEG2 triester			2.8			
SB-279	CD38	HC-Q-tag	PP14	p246	DBCO-NH-PEG2 triester			1.1			
SB-280	CD38	HC-Q-tag	PP18	p246	DBCO-NH-PEG2 triester			1.3			
SB-281	CD38	HC-Q-tag	PP24	p246	DBCO-NH-PEG2 triester			3.7			
SB-282	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p334	DBCO-C6-dT			1.2*			
SB-283	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p335	DBCO-C6-dT			1.9*			

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	A	B	C	D	E	F
SB-284	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p347	DBCO-NH-PEG2 triester			>30			
SB-285	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p348	DBCO-NH-PEG2 triester			>30			
SB-286	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p349	DBCO-NH-PEG2 triester			>30			
SB-287	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p350	DBCO-NH-PEG2 triester			3.7*			
SB-288	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p351	DBCO-NH-PEG2 triester			0.8			
SB-289	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p355	DBCO-NH-PEG2 triester			0.67			
SB-290	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p355	DBCO-NH-PEG2 triester			1.44			

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	A	B	C	D	E	F
SB-291	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p356	DBCO-NH-PEG2 triester			0.47			
SB-292	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p357	DBCO-NH-PEG2 triester			1.94			
SB-293	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p358	DBCO-NH-PEG2 triester			1.02			
SB-294	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p359	DBCO-NH-PEG2 triester			2.43			
SB-295	ratoCD22	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p373	X5-DBCO					44	
SB-296	ratoCD22	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p374	X5-DBCO					47	
SB-297	ratoCD22	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p375	X5-DBCO					103	
SB-298	ratoCD22	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p376	X5-DBCO					243	
SB-299	ratoCD22	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p377	X5-DBCO					64	

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	A	B	C	D	E	F
SB-300	ratoCD22	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p378	X5-DBCO					29	
SB-301	ratoCD22	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p379	X5-DBCO					10	
SB-302	ratoCD22	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p380	X5-DBCO					7	
SB-303	ratoCD22	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p381	X5-DBCO					13	
SB-304	ratoCD22	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p382	X5-DBCO					13	
SB-305	ratoCD22	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p383	X5-DBCO					25	
SB-306	ratoCD22	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p384	X5-DBCO					19	
SB-307	ratoCD22	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p385	X5-DBCO					ina	
SB-308	ratoCD22	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p386	X5-DBCO					t.	
SB-309	ratoCD22	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p387	X5-DBCO					28	
SB-309	ratoCD22	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p387	X5-DBCO					20	
SB-310	ratoCD22	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p388	x5-DBCO					8	

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	A	B	C	D	E	F
SB-311	ratoCD22	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p389	x5-DBCO					5*	
SB-312	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p361	DBCO-NH-PEG2 triester			0.67		1	
SB-313	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p362	DBCO-NH-PEG2 triester			0.85			
SB-314	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p363	DBCO-NH-PEG2 triester			1.09			
SB-315	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p364	DBCO-NH-PEG2 triester			1.77			
SB-316	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p365	DBCO-NH-PEG2 triester			1.33			
SB-317	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p366	DBCO-NH-PEG2 triester			2.84			

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	A	B	C	D	E	F
SB-318	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p367	DBCO-NH-PEG2 triester			2.17			
SB-319	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p368	DBCO-NH-PEG2 triester			1.33			
SB-320	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p369	DBCO-NH-PEG2 triester			0.76			
SB-321	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p370	DBCO-NH-PEG2 triester			0.84			
SB-322	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p371	DBCO-NH-PEG2 triester			0.5	6.7		
SB-323	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p372	DBCO-NH-PEG2 triester			0.66			
SB-324	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p390	DBCO-NH-PEG2 triester			3.9*			

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	A	B	C	D	E	F
SB-325	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p391	DBCO-NH-PEG2 triester			inat			
SB-326	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p392	DBCO-NH-PEG2 triester			inat			
SB-327	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p396	DBCO-NH-PEG2 triester			7.1*			
SB-328	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p397	DBCO-NH-PEG2 triester			inat			
SB-329	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p398	DBCO-NH-PEG2 triester			inat			
SB-330	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p399	DBCO-NH-PEG2 triester			inat			
SB-331	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p400	DBCO-NH-PEG2 triester			inat			

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	A	B	C	D	E	F
SB-332	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p404	DBCO-NH-PEG2 triester				10. 4		
SB-333	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p405	DBCO-NH-PEG2 triester				25. 8		
SB-334	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p407	DBCO-NH-PEG2 triester				7.1		
SB-335	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p409	DBCO-NH-PEG2 triester				51. 6		
SB-336	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p410	DBCO-NH-PEG2 triester				10. 3		
SB-337	ratoCD22	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p313	DBCO-NH-PEG2 triester					48	
SB-338	ratoCD22	HC-Q-tag	PP12	p313	DBCO-NH-PEG2 triester						

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	A	B	C	D	E	F
SB-339	ratoCD22	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p346	DBCO-NH-PEG2 triester						
SB-340	BDCA2	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p228	DBCO-NH-PEG2 triester						
SB-341	BDCA2	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p222	DBCO-NH-PEG2 triester						
SB-342	BDCA2	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p176	DBCO-NH-PEG2 triester						
SB-343	BDCA4	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p176	DBCO-NH-PEG2 triester						
SB-344	CD22	HC-Q-tag	PP16	p313	DBCO-NH-PEG2 triester						
SB-345	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p151	DBCO-NH-PEG2 triester						

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	A	B	C	D	E	F
SB-346	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p192	DBCO-NH-PEG2 triester						
SB-347	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p425	DBCO-NH-PEG2 triester					2.5	
SB-348	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p426	DBCO-NH-PEG2 triester					24	
SB-349	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p427	DBCO-NH-PEG2 triester					0.0	
SB-350	CD38	HC-Q-tag	NH ₂ -PEG23-N ₃	p428	DBCO-NH-PEG2 triester					16	
SB-351	CD38	HC-Q-tag	PP6	p243	DBCO-NH-PEG2 triester						
SB-352	CD38	HC-Q-tag	PP6	p245	DBCO-NH-PEG2 triester						

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	A	B	C	D	E	F
SB-353	CD38	HC-Q-tag	PP10	p308	DBCO-NH-PEG2 triester						
SB-354	CD38	HC-Q-tag	PP14	p308	DBCO-NH-PEG2 triester						
SB-355	CD38	HC-Q-tag	PP18	p308	DBCO-NH-PEG2 triester						
SB-356	CD38	HC-Q-tag	PP24	p308	DBCO-NH-PEG2 triester						
SB-357	ratoCD22	HC-Q-tag	PP6	p294	DBCO-NH-PEG2 triester						
SB-358	ratoCD22	HC-Q-tag	PP6	p295	DBCO-NH-PEG2 triester						
SB-359	ratoCD22	HC-Q-tag	PP6	p296	DBCO-NH-PEG2 triester						

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	A	B	C	D	E	F
SB-360	ratoCD22	HC-Q-tag	PP6	p297	DBCO-NH-PEG2 triester						
SB-361	ratoCD22	HC-Q-tag	PP26	p313	DBCO-NH-PEG2 triester						
SB-362	ratoCD22	HC-Q-tag	PP38	p313	DBCO-NH-PEG2 triester						
SB-363	ratoCD22	HC-Q-tag	PP27 + TCO	p313	DBCO-NH-PEG2 triester						
SB-364	ratoCD22	HC-Q-tag	PP29 + TCO	p313	DBCO-NH-PEG2 triester						
SB-365	ratoCD22	HC-Q-tag	PP39 + TCO	p313	DBCO-NH-PEG2 triester						

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	A	B	C	D	E	F
SB-366	ratoCD22	HC-Q-tag	PP39 + TCO	p313	DBCO-NH-PEG2 triester						

Na Tabela 6-A, a coluna **A** fornece expressão de IL-6 em células DB (EC_{50} , nM); a coluna **B** fornece expressão de IL-10 em células DB (EC_{50} , nM); a coluna **C** fornece células azuis de Ramos de ativação de NFκB (EC_{50} , nM); a coluna **D** fornece ativação de NFκB nas células azuis de Ramos após 24 horas de pré-incubação no soro de camundongo (EC_{50} , nM); a coluna **E** fornece indução de IL-6 por qPCR em células de linfoma A20 de camundongo (EC_{50} , nM); e a coluna **F** fornece indução de IL-6 em células de linfoma A20-hCD20 de camundongo (EC_{50} , nM). Todas as conjugações de DBCO/azido foram realizadas sob condições de reação de cicloadição 1,3-dipolar isenta de metal; DAR1 indica uma razão polinucleotídeo/anticorpo de 1; DAR2 indica uma proporção polinucleotídeo/anticorpo de 2; e n/a significa sem ativação. Na tabela 6-A, * indica ativação abaixo do ideal. Na tabela 6-A, CD38 representa um anticorpo anti-CD38; CD22 significa um anticorpo anti-CD22; CD79b significa um anticorpo anti-CD79b; mouseCD22 significa anticorpo anti-mouseCD22; BDCA2 significa anticorpo anti-BDCA2; e BDCA4 significa anticorpo anti-BDCA4. Na Tabela 6-A, o TCO é um grupo baseado em transciclooctenil ligado a uma fração alvo. O TCO tem uma estrutura ilustrada na FIG. 1B.

Tabela 6-B

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	Conjugação CpG	A	B	C	D	E
SB-367	CD38	HC-Q-tag	NH2-PEG23-N3	p429	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu					
SB-368	CD38	HC-Q-tag	NH2-PEG23-N3	p431	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu					
SB-369	CD38	HC-Q-tag	NH2-PEG23-N3	p433	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu	1				
SB-370	CD38	HC-Q-tag	NH2-PEG23-N3	p434	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu	1.5				

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	Conjugação CpG	A	B	C	D	E	
SB-371	CD38	HC-Q-tag	NH2-PEG23-N3	p435	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu	0.9					
SB-372	CD38	HC-Q-tag	NH2-PEG23-N3	p436	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu	2.2					
SB-373	CD38	HC-Q-tag	NH2-PEG23-N3	p438	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu	2.3					
SB-374	CD38	HC-Q-tag	NH2-PEG23-N3	p439	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu						

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	Conjugação CpG	A	B	C	D	E
SB-375	CD38	HC-Q-tag	NH2-PEG23-N3	p440	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu					
SB-376	CD38	HC-Q-tag	NH2-PEG23-N3	p441	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu					
SB-377	CD38	HC-Q-tag	NH2-PEG23-N3	p442	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu					
SB-378	ratoCD2 2	HC-Q-tag	NH2-PEG23-N3	p439	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu					

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	Conjugação CpG	A	B	C	D	E
SB-379	ratoCD2 2	HC-Q-tag	NH2-PEG23-N3	p440	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu					
SB-380	ratoCD2 2	HC-Q-tag	NH2-PEG23-N3	p441	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu					
SB-381	ratoCD2 2	HC-Q-tag	NH2-PEG23-N3	p442	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu					
SB-382	ratoCD2 2	HC-Q-tag	NH2-PEG23-N3	p425	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu					

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	Conjugação CpG	A	B	C	D	E	
SB-383	CD38	HC-Q-tag	NH2-PEG23-N3	p445	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu	0.6					
SB-384	CD38	HC-Q-tag	NH2-PEG23-N3	p446	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu	1					
SB-385	CD38	HC-Q-tag	NH2-PEG23-N3	p447	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu	6.9					
SB-386	CD38	HC-Q-tag	NH2-PEG23-N3	p448	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu	0.7					

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	Conjugação CpG	A	B	C	D	E	
SB-387	CD38	HC-Q-tag	NH2-PEG23-N3	p449	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu	inat	.				
SB-388	ratoCD19	HC-Q-tag	NH2-PEG12-N3	p313	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu						
SB-389	PDL-1	HC-Q-tag	NH2-PEG23-N3	p313	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu						
SB-390	ratoCD22	HC-Q-tag	NH2-PEG23-N3	p450	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu	inat	0.2	.			

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	Conjugação CpG	A	B	C	D	E
SB-391	ratoCD2 2	HC-Q-tag	NH2-PEG23-N3	p451	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu		inat .	0.05		
SB-392	ratoCD2 2	HC-Q-tag	NH2-PEG23-N3	p452	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu		inat .	inat .		
SB-393	ratoCD2 2	HC-Q-tag	NH2-PEG23-N3	p453	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu		inat .	inat .		
SB-394	ratoCD2 2	HC-Q-tag	NH2-PEG23-N3	p454	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu		inat .	inat .		

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	Conjugação CpG	A	B	C	D	E
SB-395	ratoCD2 2	HC-Q-tag	NH2-PEG23-N3	p455	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu					
SB-396	ratoCD2 2	HC-Q-tag	NH2-PEG23-N3	p456	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu					
SB-397	ratoCD2 2	HC-Q-tag	NH2-PEG23-N3	p457	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu					
SB-398	ratoCD2 2	HC-Q-tag	NH2-PEG23-N3	p458	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu					

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	Conjugação CpG	A	B	C	D	E
SB-399	ratoCD2 2	HC-Q-tag	NH2-PEG23-N3	p459	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu					
SB-400	ratoCD2 2	HC-Q-tag	NH2-PEG23-N3	p460	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu					
SB-401	ratoCD2 2	HC-Q-tag	NH2-PEG23-N3	p461	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu					
SB-402	ratoCD2 2	HC-Q-tag	NH2-PEG23-N3	p462	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu					

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	Conjugação CpG	A	B	C	D	E
SB-403	ratoCD2 2	HC-Q-tag	NH2-PEG123-N3	p463	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu					
SB-404	ratoCD2 2	HC-Q-tag	NH2-PEG23-N3	p464	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu					
SB-405	ratoCD2 2	HC-Q-tag	NH2-PEG23-N3	p465	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu					
SB-406	ratoCD2 2	HC-Q-tag	NH2-PEG23-N3	p466	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu					

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	Conjugação CpG	A	B	C	D	E
SB-407	ratoCD2 2	HC-Q-tag	NH2-PEG23-N3	p469	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu					
SB-408	ratoCD2 2	HC-Q-tag	NH2-PEG23-N3	p425	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu					
SB-409	CD38	HC-Q-tag	NH2-PEG23-N3	p470	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu	0.8				
SB-410	CD38	HC-Q-tag	NH2-PEG23-N3	p471	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu	inat .				

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	Conjugação CpG	A	B	C	D	E	
SB-411	CD38	HC-Q-tag	NH2-PEG23-N3	p472	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu	inat	.				
SB-412	CD38	HC-Q-tag	NH2-PEG23-N3	p473	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu	inat	.				
SB-413	CD38	HC-Q-tag	NH2-PEG23-N3	p474	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu	inat	.				
SB-414	CD38	HC-Q-tag	NH2-PEG23-N3	p475	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu	inat	.				

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	Conjugação CpG	A	B	C	D	E	
SB-415	CD38	HC-Q-tag	NH2-PEG23-N3	p476	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu	inat	.				
SB-416	humanoC D22	HC-Q-tag	NH2-PEG23-N3	p313	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu						
SB-417	ratoCD2 2	HC-Q-tag	NH2-PEG3-N3	p313	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu		2.2				
SB-418	ratoCD2 2	HC-Q-tag	NH2-PEG11-N3	p313	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu		2				

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	Conjugação CpG	A	B	C	D	E
SB-419	ratoDEC 205	HC-Q-tag	NH2-PEG12-N3	p313	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu					
SB-420	ratoCD2 2	HC-Q-tag	NH2-PEG3-N3	p480	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu		inat	.		
SB-421	ratoCD2 2	HC-Q-tag	NH2-PEG23-N3	p481	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu		0.8			
SB-422	humanoC D22	HC-Q-tag	NH2-PEG23-N3	p480	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu					

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	Conjugação CpG	A	B	C	D	E
SB-423	humanoC D22	HC-Q-tag	NH2-PEG23-N3	p481	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu					
SB-424	mouseCD 22	HC-Q-tag	NH2-PEG23-N3	p486	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu		inat .			
SB-425	humanoC D22	HC-Q-tag	NH2-PEG23-N3	p486	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu				4.7	4.1
SB-426	humanoC D22	HC-Q-tag	NH2-PEG23-N3	p308	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu				5.2	4.9

Composto conjugado #	Anticorpo (Ab)	Sítio de Conjugação -Ab	Grupo Reativo Complementar	Sequência	Grupo conjugador	Conjugação CpG	A	B	C	D	E
SB-427	humanoC D22	HC-Q-tag	NH2-PEG23-N3	p487	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu				6	5.7
SB-428	humanoC D22	HC-Q-tag	NH2-PEG23-N3	p488	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu				6.7	7
SB-429	humanoC D22	HC-Q-tag	NH2-PEG23-N3	p489	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu					
SB-430	humano CD22	HC-Q-tag	NH2-PEG23-N3	p425	DBCO-NH-PEG2 triester	Click livre de Cu					

Na Tabela 6-2, a coluna **A** fornece células azuis de Ramos de ativação de NFκB (EC₅₀, nM); a coluna **B** fornece secreção de IL-6 em esplenócitos de camundongo, DAR1 (EC₅₀, nm); a coluna **C** fornece secreção de IL-6 em esplenócitos de camundongo, DAR2 (EC₅₀, nm); a coluna **D** fornece ativação de NFκB nas células Daudi- NFκB-Luc, DAR1 (EC₅₀, nm); a coluna **E** fornece ativação de NFκB nas células Daudi- NFκB-Luc, DAR2 (EC₅₀, nm). Na tabela 6-2, CD38 representa um anticorpo anti-CD38; CD22 significa um anticorpo anti-CD22; ratoCD22 significa anticorpo anti-ratoCD22; DAR1 indica uma razão polinucleotídeo/anticorpo de 1; DAR2 indica uma proporção polinucleotídeo/anticorpo de 2.

Exemplo 3. Perfil in vitro e in vivo dos conjugados exemplares da invenção

[00732] *Células:* Células DB humanas, Daudi, Raji, Ramos, SUDHL10 e NCI-H929 e A20 de camundongo foram adquiridas da American Type Culture Collection (ATCC) e cultivadas em RPMI contendo 10% de FBS. As células Ramos-blue e HEK-Blue-hTLR9 foram adquiridas da Invivogen e foram mantidas de acordo com as recomendações do fornecedor. A expressão de TLR9 de todas as células foi confirmada por qPCR.

[00733] *Citometria de fluxo:* A expressão da superfície celular dos receptores de interesse foi medida por análise FACS usando o citômetro de fluxo CyFlow ML (Partec) e anticorpos disponíveis comercialmente (Biolegend, BD Biosciences, San Diego).

Perfil in vitro de polinucleotídeos ou conjugados imunoestimulantes:

[00734] Em algumas experiências, a atividade de polinucleotídeos imunoestimulantes ou seus conjugados foi avaliada usando células de linfoma humano ou de camundongo. Nestas experiências, os compostos de teste foram adicionados às células (1-4 x 10⁵/poço) em placas de 96 poços e incubados a 37 ° C, 5% de CO₂ por 24-72 h. No final do período de incubação, o meio de cultura foi removido e utilizado para avaliar a secreção de citocinas (células DB) ou a secreção de fosfatases alcalinas como medida da ativação de NFκB (células de Ramos-blue, HEK-Blue-hTLR9). As citocinas segregadas foram medidas por kits ELISA disponíveis no mercado. As células restantes foram lisadas, purificadas por RNA total e a expressão gênica de citocinas (IL-6 e IL-10) foi quantificada por qPCR e normalizada

para genes de manutenção da casa (B2M, GAPDH ou PPIB). A expressão gênica para outras citocinas (por exemplo, IL-8, IL-12a e IL-12b) também pode ser determinada usando métodos conhecidos na técnica, por exemplo, qPCR.

[00735] Em algumas experiências, os polinucleotídeos imunoestimulantes foram perfilados em células HeLa que expressam de maneira estável o TLR-9 humano ou de camundongo e um plasmídeo repórter NFkB-luciferase. A atividade intracelular da luciferase foi quantificada pela adição de luciferina (Britelite, Perkin Elmer) e o sinal de luminescência foi capturado usando o luminômetro Victor2 (Perkin Elmer).

[00736] Em algumas experiências, a atividade de polinucleotídeos imunoestimulantes foi avaliada usando esplenócitos de camundongo isolados recentemente. Os baços dos camundongos C57Bl6 foram colhidos em cubos através de filtros estéreis de 70 µm usando PBS gelado. As células foram então lavadas com PBS e os glóbulos vermelhos foram lisados utilizando tampão de lise RBC comercial. As células foram lavadas novamente com PBS a 4°C, ressuspensas em RPMI contendo 10% de FBS e semeadas em placas de 96 poços (2x10⁵ células/poço) e incubadas a 37°C, 5% de CO₂ por 2-4 h. Os compostos de teste foram então adicionados e incubados a 37°C, CO₂ a 5% por 24-72 h adicionais. O sobrenadante foi cuidadosamente removido e os níveis de citocinas foram quantificados por ELISA. As células foram lisadas, o RNA total foi purificado e a expressão gênica foi medida por qPCR usando métodos padrão

[00737] Em algumas experiências, os compostos de teste foram avaliados quanto à secreção de citocinas após incubação com células dendríticas diferenciadas da medula óssea de camundongos

(DC). Nestas experiências, células progenitoras primárias da medula óssea de camundongo foram isoladas dos fêmures e tíbias de camundongos C57Bl6 de acordo com os protocolos publicados. As células foram imediatamente lavadas com PBS a 4°C e os glóbulos vermelhos foram lisados usando um tampão de lise comercial. As células foram suspensas a $1,2 \times 10^6$ células/ml em RPMI contendo 10% de soro fetal de bezerro, semeadas em placas de 96 poços e diferenciadas em DCs com GM-CSF de mouse recombinante (100 ng/ml) e TNF α de mouse (10 ng/ml) ou com a adição de FLT3L por 7 dias. Os compostos de teste foram adicionados e incubados por 24-72 horas. A secreção de citocinas foi medida no sobrenadante da cultura por ELISA e as células foram lisadas e usadas para avaliar a expressão gênica por qPCR usando métodos padrão.

[00738] Em algumas experiências, os compostos de teste foram incubados em plasma a 95% de camundongos, camundongos, macacos ou humanos healthy para avaliar a estabilidade. Nessas experiências, o sangue (EDTA) foi coletado de pelo menos três indivíduos; o plasma foi isolado por centrifugação e reunido. Os compostos de teste foram adicionados no plasma em tubos fechados e incubados a 37°C por 1-72 horas, após o que os compostos foram diluídos em RPMI + 10% de FBS para as concentrações apropriadas e avaliados quanto à atividade funcional nos sistemas de teste descritos acima.

[00739] Em algumas experiências, o efeito dos compostos de teste na proliferação de linfócitos pode ser avaliado usando métodos conhecidos na técnica, por exemplo, usando o kit Cell Titer Glo (Promega) após a incubação com 1×10^5 células/poço para 1, 2, 4 ou 7 dias.

[00740] Em algumas experiências, o efeito dos compostos de teste na apoptose celular pode ser avaliado usando métodos conhecidos na técnica, por exemplo, pela expressão da superfície celular da anexina V por FACS usando o citômetro de fluxo CyFlow ML (Partec).

[00741] A atividade citotóxica dependente celular (CDC) dos conjugados da invenção foi avaliada como se segue. As células Daudi foram cultivadas em RPMI1640 GlutaMAX suplementado com 10% de FBS e Pen/Strep. As células Daudi foram plaqueadas em um formato de 96 poços por centrifugação de células, remoção do meio e ressuspensão em OPTIMEM suplementado com soro humano a 10% (SIGMA cat#S1764, LOT#SLBQ0752V, 46CH50) a uma concentração de $0,8 \times 10^6$ células/mL e volume de 50 μ L/poço. As placas de diluição de composto foram preparadas em OPTIMEM em concentração dupla, e 50 μ L por poço de diluição de composto foram adicionados, dando uma concentração final de soro humano a 5%. As culturas em placas foram incubadas a 37°C sob 5% de CO₂ por 2 horas. O reagente de viabilidade Alamar Blue (10 μ L/poço) foi adicionado e as culturas resultantes foram incubadas a 37°C sob 5% de CO₂ por 3-18h. Os resultados foram lidos em um leitor de placas usando fluorescência (EX560 e EM590).

[00742] A indução de citocinas dos conjugados da invenção em células mononucleares do sangue periférico humano (hPBMCs) foi avaliada como se segue. PBMCs humanas foram isoladas de LRS obtidas do San Diego Blood Bank. As células dendríticas plasmocitoides foram isoladas de hPBMCs com um kit MACs (Miltenyi Biotec) e imediatamente foram plaqueadas em um formato de 96 poços (5×10^4 células/densidade de poços) em RPMI completo. Os compostos foram adicionados após 2 horas e incubados a 37°C sob

5% de CO₂ por 20 horas. Após a incubação, os meios foram coletados e os níveis de citocinas foram determinados por ELISA (BioLegend).

[00743] Os resultados das experiências de criação de perfil *in vitro* estão resumidos nas Tabelas 2 e 6-23 e nas FIGs. 5-33.

[00744] A FIG. 5 mostra que o polinucleotídeo CpG não conjugado com um anticorpo requer espinha dorsal de fosforotioato para induzir citocina, conforme determinado pelos níveis da expressão de IL-6.

[00745] As FIGs. 6-8 fornecem uma comparação das atividades agonistas de TLR9 de conjugados exemplares da invenção e o polinucleotídeo CpG não conjugado com a espinha dorsal do fosforotioato.

[00746] As FIGs. 9-15 mostram (1) que os fosforotioatos são importantes para a atividade agonista de TLR9 de polinucleotídeos imunoestimulantes na ausência de uma porção de direcionamento conjugada e (2) que a conjugação de uma porção de direcionamento a um fosfato ligado ao nucleosídeo 5'-terminal de um CpG polinucleotídeo reduz sua atividade agonista de TLR9.

[00747] As FIGs. 16 e 17 mostram que um conjugado da invenção incluindo dois polinucleotídeos pode exibir atividade imunoestimulante, medida pela ativação de NFκB, que é mais alta em relação ao conjugado da invenção, incluindo um polinucleotídeo.

[00748] A Tabela 7 mostra que a inclusão de 5-iodouridina no terminal 5' aumenta a atividade dos polinucleotídeos imunoestimulantes.

Tabela 7

Conjugado	Polinucleotídeo	Sequência (5' to 3')	Conjugado	
			EC ₅₀ (nM)	Comprimento
SB-109	p179	<u>UCG</u> <u>UCG</u> T TTTTGTCGTTTTGTCG <u>TT</u> -C3	0.12	24
SB-110	p180	<u>UCG</u> T CGTTTTGTCGTTTTGTCG <u>TT</u> -C3	0.12	24
SB-112	p181	<u>UCG</u> T CG <u>TT</u> TTTGTCTGTTTTGTCG TT -C3	0.07	24
SB-113	p182	<u>UCG</u> T CG <u>TT</u> TTTGTCTGTTTTGTCG TT -C3	0.12	24
SB-096	p161	TCG <u>TCG</u> TTTTGTCGTTTTGTCG TT -C3	0.33	24
SB-114	p183	<u>UCG</u> <u>TCG</u> TTTTGTCGTTTTGTCG TT -C3	0.10	24
SB-098	p163	<u>UCG</u> T CGTTTTGTCGTTTTGTCG <u>tt</u> -C3	0.12	24
SB-057	p88	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCG <u>TT</u>	0.36	24

Tabela 8

Conjugado	Polinucleotídeo	Sequência (5' to 3')	Conjugado	
			EC ₅₀ (nM)	Comprimento
SB-098	p163	<u>UCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCG</u> <u>tt</u> -C3	0.16	24
SB-114	p183	<u>UCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCG</u> <u>TT</u> -C3	0.07	24
SB-120	p175	<u>UCGTCGTTTTGTCGTTTT</u>	0.05	18
SB-121	p176	<u>TCGTCGTTTTGTCGTT</u>	0.10	16
SB-126	p177	<u>UCGTCGTTTTGTCG</u>	0.05	14
SB-127	p178	<u>UCGTCGTTTTGT</u>	0.27	12
SB-116	p171	TCGTCGTTTTGTCGTTTT	0.44	18
SB-117	p172	TCGTCGTTTTGTCGTT	0.52	16
SB-118	p173	TCGTCGTTTTGTCG	0.91	14
SB-118	p174	TCGTCGTTTTGT	1.5	12
SB-097	p162	TCGTCGTTTTGTCGTT <u>TT</u>	0.53	18

Tabela 9

Conjugado	Polinucleotídeo	Sequência (5' to 3')	Conjugado	
			EC ₅₀ (nM)	Comprimento
SB-115	p183	<u>UCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCG</u> <u>TT</u> -C3	0.07	24
SB-121	p176	<u>TCGTCGTTTTGTCGTT</u>	0.10	16
SB-133	p187	<u>UCGTCGTTTGTCGTT</u> -C3	0.08	15
SB-134	p188	<u>UCGTCGTTGTCGTT</u> -C3	0.08	14
SB-135	p189	<u>UCGTCGTGTCGTT</u> -C3	0.08	13
SB-136	p190	<u>UCGTCGTTTCGTT</u> -C3	0.16	12

SB-137

p191

UCGTCGTCGTT-C3

0.21

11

[00750] A FIG. 18 mostra que conjugados contendo polinucleotídeos imunoestimulantes que possuem todos os fosfoésteres internucleosídeos baseados em fosforotioato exibem atividade comparável à de pi livre e que conjugados contendo polinucleotídeos imunoestimulantes curtos exibem atividade comparável à dos conjugados contendo polinucleotídeos imunoestimulantes completos. Os dados mostrados na FIG. 18 estão listados na Tabela 10.

Tabela 10

Conjugado	Polinucleotídeo	Sequência (5' to 3')	Conjugado	Comprimento
			EC ₅₀ (nM)	
SB-345	p151	tcgtcgttttgtcgttttgtcg <u>t</u> T	~200	24
SB-088	p153	tcgtcGTTTTGTCGTTTTGTCG <u>t</u> t	3.2	24
SB-057	p88	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCG <u>T</u> T	0.25	24
SB-115	p183	<u>UCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT</u> -C3	0.09	24
SB-123	p176	<u>UTCCTCGTTTTGTCGTT</u>	~0.06	16
SB-135	p189	<u>UCGTCGTGTCGTT</u> -C3	0.08	13
SB-346	p192	<u>UGCCTGCTTTTGTGCTTTTGTGCTT</u>	inativo	24
-	p1	tcgtcgttttgtcgttttgtcgtt	200	24

[00751] A FIG. 19 mostra que conjugados contendo polinucleotídeos imunoestimulantes mais curtos, com todos os fosfoésteres internucleosídeos que são baseados em fosforotioato, exibem atividade que é superior à do conjugado contendo polinucleotídeos imunoestimulantes mais longos, com todos os fosfoésteres internucleosídeos que são baseados em fosforotioato. Os dados mostrados na FIG. 19 estão resumidos na Tabela 11.

Tabela 11

Conjugado	Polinucleotídeo	Sequência (5' to 3')	Conjugado	Comprimento
			EC ₅₀ (nM)	
SB-175	p232	tcgtcgttttgtcgttttgtcg <u>t</u> T-C3	42	24

SB-176	p233	<u>u</u> cgtcgttttgtcgtttttgtcgtT-C3	9.1	24
SB-178	p235	tcgtcgttttgtcgtT-C3	9.5	16
SB-179	p236	<u>u</u> cgtcgttttgtcgtT-C3	<3	16
SB-180	p237	tcgtcgtgtagT-C3	15	13
SB-181	p238	<u>u</u> cgtcgtgtagT-C3	<3	13
-	p1	tcgtcgttttgtcgtttttgtcgtt	170	24

[00752] As FIGs. 20 e 21 mostram que polinucleotídeos imunoestimulantes que possuem fosfoester internucleosídeo à base de fosfato no ISS terminal 5' exibem atividade imunoestimulante mais alta do que polinucleotídeos imunoestimulantes que possuem fosfoester internucleosídeo à base de fosforotioato no ISS terminal 5'. Os dados mostrados nas FIGs. 20 e 21 estão resumidos na Tabela 12.

Tabela 12

Conjugado Polinucleotídeo Sequência (5' to 3')			Conjugado
			EC₅₀ (nM)
SB-181	p238	<u>u</u> cgtcgtgtagT-C3	1.00
SB-183	p240	<u>U</u> CgtCgtgtCgttt-C3	0.04
SB-184	p241	<u>U</u> Cgtcgtgtagtt-C3	0.04
SB-185	p242	<u>u</u> cgtcgtgtagtt-C3	0.09
SB-186	p243	<u>u</u> cgtcgtgtagtt-C3	0.49
SB-179	p236	<u>u</u> cgtcgttttgtcgtT-C3	1.55

SB-182	p239	<u>U</u> CgtCgtgtCgTT-C3	0.03
SB-187	p244	<u>U</u> Cgtcgtgtcgtt-C3	0.02
SB-188	p245	<u>U</u> cgtcgtgtcgtt-C3	0.04
SB-189	p246	<u>u</u> cgtcgtgtcgtt-C3	1.14

[00753] A FIG. 22 mostra que a sequência ISS humana do terminal 5' é preferencialmente UCG. Os dados mostrados na FIG. 22 estão resumidos na Tabela 13.

Tabela 13

Conjugado Polinucleotídeo Sequência (5' to 3')			Conjugado EC ₅₀ (nM)
SB-186	p243	<u>u</u> cgtcgtgtcgtt-C3	0.3
SB-185	p242	<u>U</u> cgtcgtgtcgtt-C3	0.2
SB-207	p262	<u>U</u> cg <u>u</u> cgtcgtcgtt-C3	2.9
SB-209	p263	<u>U</u> cgtcgtg <u>u</u> cgtt-C3	0.2
SB-215	p268	cgtcgtg <u>u</u> cgtt-C3	inativo

[00754] A FIG. 23 mostra que a inclusão de 5-iodouridina na ISS do terminal 5' tem um efeito intensificador mais forte na atividade imunoestimulante de um polinucleotídeo imunoestimulador. Os dados mostrados na FIG. 23 estão resumidos na Tabela 14.

Tabela 14

Conjugado Polinucleotídeo Sequência (5' to 3')			Conjugado
			EC ₅₀ (nM)
SB-186	p243	<u>u</u> cgtcgtgtcg <u>t</u> t-C3	0.3
SB-245	p301	tcg <u>u</u> cgtcgtgtcg <u>t</u> t-C3	>30
SB-261	p312	tcg <u>U</u> cgtcgtgtcg <u>t</u> t-C3	>30

[00755] As FIGs. 24 e 25 mostram que a atividade imunoestimuladora de polinucleotídeos contendo fosfotriésteres internucleosídeos à base de fosfato pode ser maior do que a dos polinucleotídeos correspondentes contendo fosfotriésteres internucleosídeos à base de fosforotioato. Os dados mostrados nas FIGs. 24 e 25 estão resumidos na Tabela 15.

Tabela 15

Conjugado Polinucleotídeo Sequência (5' to 3')			Conjugado
			EC ₅₀ (nM)
SB-189	p246	<u>u</u> cg <u>t</u> cgtcgtg <u>t</u> t-C3	0.34
SB-288	p351	<u>u</u> cg <u>t</u> cgtcgtg <u>t</u> t-C3	0.89
SB-289	p355	<u>u</u> cg <u>T</u> cgtcgtg <u>T</u> t-C3	0.67
SB-290	p355	<u>u</u> cg <u>T</u> cgtcgtg <u>t</u> t-C3	1.44
SB-291	p356	<u>u</u> cg <u>T</u> cgtcgtg <u>T</u> t-C3	0.47
SB-292	p357	<u>u</u> cg <u>t</u> cgtcgtg <u>t</u> t-C3	1.94
SB-293	p358	<u>u</u> cg <u>T</u> cgtcgtg <u>t</u> t-C3	1.02

SB-294

p359

ucgtcggtgcgTt-C3

2.43

[000756] A Tabela 16 mostra que as inserções de fosfotriéster são toleradas nos polinucleotídeos imunoestimulantes.

Tabela 16

Conjugado	Polinucleotídeo	Sequência (5' to 3')	Polinucleotídeo Conjugado	
			EC ₅₀ (nM)	EC ₅₀ (nM)
-	p1	tcgtcgttttgtcgttttgtcgtt	170	-
-	p246	<u>ucgt</u> cggtgcgtt-C3	104	-
SB-312	p361	<u>ucgT</u> cggtgcgtt-C3	102	0.67
SB-313	p362	<u>ucgT</u> cggtgcgTet-C3	175	0.85
SB-314	p363	<u>ucgT</u> cggtgcGett-C3	365	1.09
SB-315	p364	<u>ucgT</u> cggtgcCegtt-C3	523	1.77
SB-316	p365	<u>ucgT</u> cggtgTecgtt-C3	260	1.33
SB-317	p366	<u>ucgT</u> cggtGetcgtt-C3	390	2.84
SB-318	p367	<u>ucgT</u> cgTegtcgtt-C3	287	2.17
SB-319	p368	<u>ucgT</u> cGetgtcgtt-C3	223	1.33
SB-320	p369	<u>ucgT</u> Cegtgtcgtt-C3	242	0.76
SB-321	p370	<u>ucGeT</u> cggtgcgtt-C3	158	0.84
SB-322	p371	<u>uCegT</u> cggtgcgtt-C3	160	0.5
SB-323	p372	<u>ucgT</u> ecgtgcg <u>Tt</u> -C3	194	0.66

[00757] As Tabelas 17 e 18 mostram que as inserções espaçadoras básicas são toleradas nos polinucleotídeos imunoestimulantes.

Tabela 17

Polinucleotídeo	Sequência (5' to 3')	EC₅₀ (nM)
p371	<u>CegT</u> cggtgctcgtt-C3	189
p402	<u>CegT</u> cggtgctGctt-C3	356
p403	<u>CegT</u> cggtgCegtt-C3	482
p404	<u>CegT</u> cggtgctgTct-C3	203
p405	<u>CegT</u> cggtTegctgTct-C3	809
p406	<u>CegT</u> cgTctgctgctgTct-C3	510
p407	<u>CegT</u> cgTcX3gctgctgTct-C3	286
p408	<u>CegT</u> cgX3tgctgctgTct-C3	266
p409	<u>CegT</u> cgTctgctgctgTct-C3	875
p410	<u>CegT</u> cgTcX3gctgctt-C3	193
p361	<u>cgT</u> cggtgctcgtt-C3	102
p411	X3 <u>cgT</u> cggtgctcgtt-C3	124
p412	<u>X3cgT</u> cggtgctcgtt-C3	inactive
p413	<u>cgX3gT</u> cggtgctcgtt-C3	225
p414	<u>cgX3T</u> cggtgctcgtt-C3	131
p415	<u>cgTX3</u> cggtgctcgtt-C3	124
p416	<u>cgTcX3gT</u> cggtgctcgtt-C3	85
p417	<u>cgTcgX3tgT</u> cggtgctcgtt-C3	92
p418	<u>cgTcgTcX3gT</u> cggtgctcgtt-C3	93

p419	<u>ucgT</u> cggtgX3tcggt-C3	189
p420	<u>ucgT</u> cggtgtX3cggt-C3	227
p421	<u>ucgT</u> cggtgtcX3ggt-C3	95
p422	<u>ucgT</u> cggtgtcgX3tt-C3	135
p423	<u>ucgT</u> cggtgtcgtX3t-C3	202
p424	<u>ucgT</u> cggtgtcggtX3-C3	113

Tabela 18

Conjugado	Polinucleotídeo	Sequência (5' to 3')	Conjugado EC ₅₀ (nM)
SB-295	p373	t <u>ucg</u> tcgtgacggtX5-C3	44
SB-296	p374	t <u>ucg</u> tcgtgacgtX5t-C3	47
SB-297	p375	t <u>ucg</u> tcgtgacgX5tt-C3	103
SB-298	p376	t <u>ucg</u> tcgtgacX5ggt-C3	243
SB-299	p377	t <u>ucg</u> tcgtgaX5cggt-C3	64
SB-300	p378	t <u>ucg</u> tcgtgX5acggt-C3	29
SB-301	p379	t <u>ucg</u> tcgtX5gacggt-C3	10
SB-302	p380	t <u>ucg</u> tcgX5tgacggt-C3	7
SB-303	p381	t <u>ucg</u> tcX5gtgacggt-C3	13
SB-304	p382	t <u>ucg</u> tX5cgtgacggt-C3	13
SB-305	p383	t <u>ucg</u> X5tcgtgacggt-C3	25
SB-306	p384	t <u>uc</u> X5gtcgtgacggt-C3	19
SB-307	p385	t <u>u</u> X5cgtcgtgacggt-C3	inativo

SB-308	p386	tX5 <u>u</u> cgtcgtgacggtt-C3	28
SB-309	p387	X5t <u>u</u> cgtcgtgacggtt-C3	20
SB-310	p388	tucgx5cgtgacggtt-C3	8
SB-311	p389	tucgx5cgtgacggtt-C3	5*
SB-337	p313	t <u>u</u> cg <u>t</u> cgtgacggtt-C3	48

*Ativação sub-ótima

[00758] As FIGs. 26A e 26B mostram que o maior teor de fosfotriésteres internucleosídeos baseados em fosforotioato influencia a atividade imunoestimulante de polinucleotídeos imunoestimulantes. Este efeito é particularmente pronunciado nos polinucleotídeos imunoestimulantes que possuem fosfotriésteres internucleosídeos baseados em fosforotioato dispostos mais distalmente do terminal 3'. Os dados mostrados nas FIGs. 26A e 26B estão resumidos na Tabela 19.

Tabela 19

Conjugado	Polinucleotídeo	Sequência (5' to 3')	EC ₅₀ (nM)
SB-189	p246	<u>u</u> cg <u>t</u> cgtg <u>t</u> cgtt-C3	0.35
SB-284	p347	<u>u</u> cg <u>t</u> cgtg <u>t</u> cgtt-C3	2.46
SB-285	p348	<u>u</u> cg <u>t</u> cgtg <u>t</u> cgtt-C3	4.92
SB-286	p349	<u>u</u> cg <u>t</u> cgtg <u>t</u> cgtt-C3	3.74
SB-287	p350	<u>u</u> cg <u>t</u> cgtg <u>t</u> cgtt-C3	1.98
SB-288	p351	<u>u</u> cg <u>t</u> cgtg <u>t</u> cgtt-C3	0.80
SB-324	p390	<u>U</u> cg <u>T</u> cgtg <u>t</u> cgtt-C3	3.9

SB-325	p391	<u>Ue</u> Ceg <u>T</u> cggtgctggtt-C3	3.9*
SB-322	p371	<u>u</u> Ceg <u>T</u> cggtgctggtt-C3	1.1
SB-327	p396	<u>u</u> Ceg <u>T</u> CegtgtCegtt-C3	7.1*
SB-328	p397	<u>ucg</u> <u>T</u> cGetGetcGett-C3	6.6**
SB-329	p398	<u>ucg</u> <u>T</u> cgTegTecgTet-C3	5.6**
SB-330	p399	<u>u</u> Ceg <u>T</u> cgTegTecgTet-C3	9.4**
SB-331	p400	<u>ucg</u> TecgTegTecg <u>Tt</u> -C3	7.9**
SB-326	p392	<u>Ue</u> CeGe <u>T</u> cggtgctggtt-C3	ca. 3.2**

* ativação sub-ótima

** inativo

[00759] A Tabela 20 mostra que ligantes mais longos que ligam uma fração de direcionamento a um polinucleotídeo imunoestimulador podem aumentar a atividade imunoestimulante do conjugado em relação a um conjugado com um ligante mais curto.

Tabela 20

Conjugado	Polinucleotídeo	EC ₅₀ (nM)	(PEGx) *
SB-189	p246	0.3	23
SB-273	p246	2.7	11
SB-272	p246	3.1	7
SB-212	p246	3.1	3
SB-257	p246	0.2	23
SB-276	p246	1.2	11

SB-275	p246	1.9	7
SB-274	p246	3.1	3

* (PEGx) indica o número de unidades de etileno glicol no grupo reativo complementar anexado ao anticorpo.

[00760] A FIG. 27 mostra que a conjugação com uma cadeia pesada de anticorpo através do marcador Q pode fornecer conjugados exibindo atividade imunoestimulante superior em relação à conjugação com uma cadeia leve de anticorpo através do uso da química de PFP. Os dados mostrados na FIG. 27 estão resumidos na Tabela 21.

Tabela 21

Conjugado	Anticorpo	Polinucleotídeo	Conjugação	DAR*	EC ₅₀ (nM)
SB-099	Rituximabe	p163	HC Q-tag	2	0.48
SB-107	Rituximabe	p163	LC PFP	1	1.85
SB-107	Rituximabe	p163	LC PFP	2	1.88
SB-107	Rituximabe	p163	LC PFP	3	1.45
SB-107	rituximabe	p163	LC PFP	4	1.17

[00761] A FIG. 28 mostra que os conjugados de cadeia pesada de anticorpo podem exibir atividade imunoestimulante superior em relação aos conjugados de cadeia leve de anticorpo. Os dados mostrados na FIG. 28 estão resumidos na Tabela 22.

Tabela 22

Conjugado	Anticorpo	Polinucleotídeo	Conjugação	(PEGx) *	EC ₅₀ (nM)
--	anti-CD38	--	--	--	0.6
SB-189	anti-CD38	HC Q-tag	p246	23	0.9
SB-212	anti-CD38	HC Q-tag	p246	3	0.4
SB-257	anti-CD38	LC Q-tag	p246	23	>50
SB-274	anti-CD38	LC Q-tag	p246	3	>50

* (PEGx) indica o número de unidades de etileno glicol no grupo reativo complementar conectado ao anticorpo que é formado a partir de NH₂-PEGx-N₃.

[00762] A FIG. 29 mostra que a inclusão de porções auxiliares (por exemplo, poli(etileno glicol)s) pode aumentar a atividade imunoestimulante de um conjugado da invenção. Os dados mostrados na FIG. 29 estão resumidos na Tabela 23.

Tabela 23

Conjugado	Anticorpo	Polinucleotídeo	Conjugação	(PEGx) *	EC ₅₀ (nM)
SB-212	anti-CD38	HC Q-tag	p246	PEG3	3.7
SB-218	anti-CD38	HC Q-tag	p246	PP6	7.2
SB-278	anti-CD38	HC Q-tag	p246	PP10	2.8
SB-279	anti-CD38	HC Q-tag	p246	PP14	1.1
SB-280	anti-CD38	HC Q-tag	p246	PP18	1.3
SB-281	anti-CD38	HC Q-tag	p246	PP24	3.7

* (PEGx) indica o grupo reativo complementar usado nos conjugados.

[00763] A Tabela 24 mostra que a inclusão de porções auxiliares de PEG não influenciou significativamente a auto-entrega de polinucleotídeos imunoestimulantes não conjugados a uma porção de direcionamento. Os dados na Tabela 24 referem-se à secreção de IL6 em células A20, medida por ELISA, após 20 horas de incubação das células com os polinucleotídeos imunoestimulantes.

Tabela 24

Polinucleotídeo	Sequência (5' a 3')	(PEGx) *	EC ₅₀ (nM)
p313	t <u>u</u> cg <u>t</u> cgtgacgtt-C3	PP12	111
p313	t <u>u</u> cg <u>t</u> cgtgacgtt-C3	PP16	139
p313	t <u>u</u> cg <u>t</u> cgtgacgtt-C3	PP20	123
p313	t <u>u</u> cg <u>t</u> cgtgacgtt-C3	PP26	96
p347	t <u>u</u> gctgctgagctt-C3	-	39

* (PEGx) indica o grupo reativo complementar usado nos conjugados.

[00764] A FIG. 30 mostra que porções auxiliares podem influenciar a citotoxicidade dependente celular dos conjugados. Os dados mostrados na FIG. 30 está resumido na Tabela 25.

Table 25

Conjugado	Anticorpo	Conjugação	Polinucleotídeo	(PEGx) *	EC ₅₀ (nM)
SB-218	anti-CD38	HC Q-tag	p246	PP6	2.2
SB-278	anti-CD38	HC Q-tag	p246	PP10	7.7

SB-279	anti-CD38	HC Q-tag	p246	PP14	>100
SB-280	anti-CD38	HC Q-tag	p246	PP18	47
SB-281	anti-CD38	HC Q-tag	p246	PP24	0.5

* (PEGx) indica o grupo reativo complementar usado nos conjugados.

[00765] As FIGs. 31 e 32 mostram a indução de IL6 em células A20 de camundongo usando conjugados contendo polinucleotídeos imunoestimulantes truncados. O anticorpo utilizado nestes ensaios foi um anticorpo murino anti-CD20 ou anticorpo murino anti-CD22. O marcador Q foi utilizado para a conjugação dos polinucleotídeos com o anticorpo. Os dados mostrados nas FIGs. 31 e 32 estão resumidos na Tabela 26.

Table 26

Conjugado	Anticorpo	Polinucleotídeos	Sequência (5' a 3')	(PEGx) ¹	EC ₅₀ (nM)
SB-228	anti-CD20	p275	<u>u</u> cg <u>t</u> cgtgacg <u>t</u> t-C3	PP6	21
SB-229	anti-CD20	p276	<u>u</u> cg <u>a</u> cg <u>t</u> gacg <u>t</u> t-C3	PP6	13
SB-232	anti-CD20	p304	<u>u</u> cg <u>t</u> cg <u>t</u> gacg <u>t</u> t-C3	PP6	53*
SB-233	anti-CD20	p305	<u>u</u> cg <u>a</u> cg <u>t</u> gacg <u>t</u> t-C3	PP6	42*
SB-224	anti-CD22	p275	<u>u</u> cg <u>t</u> cg <u>t</u> gacg <u>t</u> t-C3	PP6	19
SB-225	anti-CD22	p276	<u>u</u> cg <u>a</u> cg <u>t</u> gacg <u>t</u> t-C3	PP6	13
SB-230	anti-CD22	p304	<u>u</u> cg <u>t</u> cg <u>t</u> gacg <u>t</u> t-C3	PP6	53*
SB-231	anti-CD22	p305	<u>u</u> cg <u>a</u> cg <u>t</u> gacg <u>t</u> t-C3	PP6	37*
SB-226	anti-CD22	p292	<u>u</u> cg <u>t</u> cg <u>t</u> gacg <u>t</u> t-C3	PP6	45*
SB-227	anti-CD22	p293	<u>u</u> cg <u>a</u> cg <u>t</u> gacg <u>t</u> t-C3	PP6	39*

¹ (PEGx) indica o grupo reativo complementar usado nos conjugados.

* indica ativação sub ótima

[00766] A FIG. 33A mostra a indução de IL6 em células A20 de camundongo usando conjugados exemplares e um polinucleotídeo imunoestimulador. O anticorpo utilizado nesses ensaios foi um anticorpo murino anti-CD22. O marcador Q foi utilizado para a conjugação dos polinucleotídeos com o anticorpo. Os dados mostrados na FIG. 33A estão resumidos na Tabela 27.

Tabela 27

Conjugado	Polinucleotídeos	Sequência (5' a 3')	(PEGx)*	EC₅₀ (nM)
SB-266	p314	u <u>u</u> cg <u>t</u> cggtgacggtt-C3	PEG23	1.70
SB-277	p313	t <u>u</u> cg <u>t</u> cggtgacggtt-C3	PP8	1.40
--	p313	t <u>u</u> cg <u>t</u> cggtgacggtt-C3	--	40.8

* (PEGx) indica o grupo reativo complementar usado nos conjugados. O PEG23 é um grupo reativo complementar formado a partir de NH₂-PEG23-N₃.

[00767] A FIG. 33B mostra que a atividade dos conjugados imunoestimulantes é antagonizada pela presença do anticorpo livre em excesso (0-10 vezes) direcionado ao mesmo receptor que aquele que é direcionado pelo anticorpo incluído no conjugado imunoestimulante. A secreção de IL6 foi usada para avaliar a eficiência imunoestimulante dos conjugados e polinucleotídeos não conjugados. Estes dados indicam que (1) a fração alvo melhora a atividade imunoestimulante dos polinucleotídeos da invenção e (2) a entrega intracelular dos polinucleotídeos imunoestimulantes nos conjugados da invenção é provavelmente mediada pelo receptor da superfície celular. Por conseguinte, o aumento na atividade imunoestimulante dos conjugados em relação aos polinucleotídeos não conjugados é provavelmente devido à melhoria na entrega intracelular dos polinucleotídeos imunoestimulantes

[00768] A FIG. 34A mostra a indução de interferon- α em PBMC humano por CpG-2336, um CpG ODN de classe A. FIG. 34B mostra a indução de interferon- α em PBMC humano usando o conjugado SB-340. O anticorpo anti-BDCA2, SB-341 e p246 foram usados como

controles nesta experiência. FIG. 34C mostra a indução de interferon- α em células plasmocitóides purificadas. O anticorpo anti-BCDA4 e seu conjugado (SB-343) foram utilizados como controle.

[00769] As FIGS. 35 e 36 mostram atividades imunoestimulantes de polinucleotídeos com vários tentadores de modificação de 5' e internucleosídeos às 24 h, conforme medido pela ativação de NF κ B usando QuantiBlue.

Perfil in vivo em um modelo de tumor sólido

As células de linfoma de células B de camundongo A20 foram adquiridas da American Type Culture Collection (ATCC) e cultivadas em meio RPMI contendo 10% de FBS. No dia da experiência, as células foram colhidas, ressuspensas em HBSS e inoculadas subcutaneamente (5×10^6 células por camundongo) em camundongos fêmeas Balb/c com 6-8 semanas de idade (Charles River). Após 10 dias, os camundongos foram randomizados, cada grupo com 8 a 10 camundongos recebeu três doses do artigo de teste (um polinucleotídeo imunoestimulador ou um conjugado), a cada dois dias (Q2D), por intratumoral (IT, 25 μ L) ou injeção intravenosa (IV, 100 μ L). O volume do tumor foi utilizado para avaliar a eficácia do tratamento. O volume do tumor foi calculado duas vezes por semana usando a fórmula: $V = (L \times W^2)/2$, onde V é o volume do tumor, L é o comprimento do tumor e W é a largura do tumor.

[00770] As FIGS. 37A e 37B mostram que o tratamento de um tumor com um polinucleotídeo imunoestimulador da invenção pode parar e até reverter o crescimento do tumor. Nestas experiências, os polinucleotídeos imunoestimulantes da invenção foram

administrados intratumoralmente ou intravenosamente às vezes identificados com setas ao longo dos eixos X dos gráficos. Estes dados também mostram que os conjugados são superiores em sua atividade antitumoral em relação aos componentes individuais livres dos conjugados. Os detalhes dos testes de perfil *in vivo* mostrados na FIG. 37B são fornecidos na tabela 28.

Tabela 28

Conjugado	Anticorpo	Polinucleotídeos	Sequência (5' a 3')	(PEGx) *	mg/kg	CpG nmol	Descrição
-	-	-	-	-	-	-	Salina
-	muCD22	-	-	-	9	-	Ab sozinho
SB-339	muCD22	p346	t <u>u</u> gctgctgagctt- C3	23	10	0.9	controle
SB-344	muCD22	p313	t <u>u</u> cgtcgtgacggtt- C3	PP16	10	0.9	-
SB-345	muCD22	p313	t <u>u</u> cgtcgtgacggtt- C3	PP12	10	0.9	-
-	-	p347	t <u>u</u> gctgctgagctt- C3		14.5 (µg/kg)	0.9	CpG sozinho

* (PEGx) indica o grupo reativo complementar usado nos conjugados.

[00771] A FIG. 38A mostra que o tratamento de um tumor com um polinucleotídeo imunoestimulador da invenção pode reduzir o crescimento do tumor, em comparação com polinucleotídeos imunoestimulantes não modificados ou polinucleotídeos imunoestimulantes sem ISS no terminal 5'. Nestas experiências,

os polinucleotídeos imunoestimulantes da invenção foram administrados intratumoralmente.

[00772] A FIG. 38B mostra os volumes do tumor no dia 20 após a inoculação subcutânea dos camundongos testados com células de linfoma de células B de camundongo A20 e administração intratumoral subsequente de três doses de solução salina, um polinucleotídeo imunoestimulador da invenção ou um polinucleotídeo imunoestimulador não modificado, como descrito acima. Nestas experiências, os polinucleotídeos imunoestimulantes da invenção foram administrados intratumoralmente.

[00773] A FIG. 39A mostra que a administração intravenosa de um conjugado da invenção pode ser tão eficaz no tratamento de um tumor quanto a administração intratumoral direta de um polinucleotídeo imunoestimulador não conjugado da invenção. Solução salina e polinucleotídeos imunoestimulantes não conjugados foram administrados intratumoralmente, e SB-337 foi administrado intravenosamente.

[00774] A FIG. 39B mostra os volumes do tumor no dia 20 após a inoculação subcutânea dos camundongos testados com células de linfoma de células B de camundongo A20 e administração subsequente de três doses de solução salina, um polinucleotídeo imunoestimulador ou um conjugado, como descrito acima. Solução salina e polinucleotídeos imunoestimulantes foram administrados intratumoralmente em três doses, e SB-337 foi administrado intravenosamente uma vez.

Perfil In vivo em um modelo de tumor líquido

[00775] As células de linfoma de células B de camundongo A20 foram adquiridas da American Type Culture Collection (ATCC) e cultivadas em meio RPMI contendo 10% de FBS. No dia da experiência, as células foram colhidas, ressuspensas em HBSS e inoculadas por via intravenosa (5×10^6 células por camundongo) em camundongos fêmeas Balb/c com 6-8 semanas de idade (Charles River). A partir do dia seguinte, 8-10 camundongos/grupo receberam três doses do artigo de teste (um polinucleotídeo imunoestimulador ou um conjugado), a cada dois dias (Q2D), por injeção intravenosa (I.V., 100 μ L). No dia 47, os camundongos sobreviventes foram novamente desafiados com (5×10^6 células A20 por camundongo). Um novo grupo controle foi adicionado correspondendo em idade e tamanho e foi inoculado com células tumorais de camundongo A20. Ninhadas não inoculadas e não tratadas foram incluídas como controle. A taxa de sobrevivência (%) foi monitorada para avaliar a eficácia do tratamento.

[00776] A FIG. 40 mostra as taxas de sobrevivência para populações de camundongos em tratamento com solução salina, conjugados da invenção ou polinucleotídeos imunoestimulantes. Os detalhes dos testes de perfil *in vivo* mostrados na FIG. 40 são fornecidos na tabela 29.

Tabela 29

Descrição	Anticorpo	Polinucleotídeo	Sequência (5' a 3')	(PEGx) *mg/kg	# de doses	CpG nmol/dose
Salina	-	-	-	-	3	-
-	muCD22	-	-	-	10	3
-	muCD22	-	-	-	3	3
SB-337	muCD22	p313	t <u>u</u> cg <u>t</u> cg <u>t</u> gacg <u>t</u> t-C3	23	10	3
SB-337	muCD22	p313	t <u>u</u> cg <u>t</u> cg <u>t</u> gacg <u>t</u> t-C3	23	3	3
SB-338	muCD22	p313	t <u>u</u> cg <u>t</u> cg <u>t</u> gacg <u>t</u> t-C3	PP12	10	1
SB-339	muCD22	p346	t <u>u</u> g <u>c</u> t <u>g</u> ctgagc <u>t</u> t-C3	23	10	3
-	-	p347	t <u>u</u> g <u>c</u> t <u>g</u> ctgagc <u>t</u> t-C3	-	3**	3
-	-	p18	tccatgacg <u>t</u> tcctgacg <u>t</u> t	-	3**	3

** µg/dose.

Exemplo 4. Estabilidade sérica de polinucleotídeos imunoestimulantes

[00777] *Protocolo:* 1 µL de solução-mãe 2 mM (polinucleotídeo CpG com um fosfotriéster) foi colocado em 19 µL de soro de camundongo fresco. Amostras de 20 µL foram colocadas em placas de PCR e aquecidas em termociclador a 37°C. Amostra de 2 µL removida nos momentos indicados, adicionada a 18 µL de tampão de carga de formamida e congelada antes da análise em gel. 2 µL foram carregados por poço em um gel de TBE-uréia a 15%, 200 volts por 30 min, seguido por coloração com brometo de etídio (ver FIGs. 41A e 41B). A estabilidade dos polinucleotídeos CpG

contendo fosfotriésteres também foi avaliada no soro de camundongo, soro de macaco e soro humano (ver FIGS. 41C, 41D e 41E).

Análises de estabilidade sérica de polinucleotídeos imunoestimulantes por AEX HPLC:

[00778] Um polinucleotídeo imunoestimulador (40 μ M em água) foi diluído para uma concentração final de 8 μ M em soro de camundongo a 80%. Aliquotas foram obtidas em pontos de tempo especificados (normalmente às 4h, 24h e 48h) e extintas com EDTA 1: 1 10 mM. As amostras foram analisadas por HPLC de troca aniônica em uma coluna DNAPac PA200, 4 x 250 mm a 60°C usando a fase móvel A: fosfato de sódio 20mM pH 8, isopropanol 15% v/v e fase móvel B: fosfato de sódio 20 mM pH 8, Brometo de sódio 1,5 M, 15% v/v isopropanol; gradiente de 20 - 98% da fase B móvel em 10 minutos; Caudal de 0,6 mL/min com detecção a 260 nm. No rastreamento por HPLC, o pico principal foi integrado para cada ponto no tempo e a% da área do pico em relação à amostra não envelhecida foi calculada. O mesmo método foi utilizado para analisar a estabilidade dos polinucleotídeos imunoestimulantes no soro de camundongo, soro de macaco e soro humano.

[00779] A FIG. 42 mostra que um polinucleotídeo imunoestimulador contendo um fosforotioato internucleosídeo ligado ao nucleosídeo 5'-terminal exibe maior estabilidade sérica do que um polinucleotídeo imunoestimulador contendo um fosfato internucleosídeo ligado ao nucleosídeo 5'-terminal. Como mostrado na Tabela 30, os polinucleotídeos imunoestimulantes com um fosfato internucleosídeo no terminal 5' podem exibir uma atividade imunoestimulante mais alta em relação aos polinucleotídeos imunoestimulantes com um fosforotioato

internucleosídeo no terminal 5', conforme medido pela ativação do NFκB.

Tabela 30

Conjugado	Polinucleotídeo	Sequência (5' a 3')	EC ₅₀ (nM)
--	p1	tcgtcgtttttgtcgtttttgtcggtt	200
SB-189	p246	<u>u</u> cg _t cg _t gtcgtt-C3	1.14
SB-188	p245	<u>U</u> cg _t cg _t gtcgtt-C3	0.04

[00780] A FIG. 43 mostra que os polinucleotídeos imunoestimulantes contendo 5-iodouridina podem sofrer degradação no soro ao longo do tempo através da perda de iodo, conforme determinado pela observação do aumento na área do pico de HPLC correspondente ao material com m/z menor que a massa do p246 intacto por 127 Da.

[00781] A FIG. 44 mostra que a 5-bromouridina pode fornecer polinucleotídeos imunoestimulantes com a combinação superior de estabilidade sérica e atividade imunoestimulante. Os dados mostrados na FIG. 44 está resumido na Tabela 31.

Tabela 31

Y-(PO/PS)-X-cg_tcg_tgtcgtt-C3

Conjugado	Polinucleotídeo	X	Y	(PO/PS)	EC ₅₀ (nM)
SB-189	p246	Iodo-dU	-	PS	0.8
SB-217	p270	dT	-	PS	>30**

SB-260	p311	dU	-	PS	37**
SB-253	p308	Bromo-dU	-	PS	2.3
SB-262	p306	Iodo-dU	C3	PO	3.1**
SB-270	p330	CF ₃ -dT	-	PO	2.0**
SB-271	p331	CF ₃ -dT	-	PS	inativo
SB-250	p298	Iodo-dU	dT	PS	7.1**
SB-251	p299	Iodo-dU	Iodo-dU	PS	7.7**
SB-252	p300	Iodo-dU	dU	PS	5.1**
SB-241	p307	Fluoro-dU	-	PS	inativo

** indica ativação sub ótima

Iodo-dU é 5-iodo-2'-desoxiuridina, dT é timidina, dU é 2'-desoxiuridina, CF₃-dT é 5-trifluorometil-timidina, Fluoro-dU é 5-fluoro-2'-desoxiuridina e C3 é um espaçador C3 - (CH₂)₃-OH.

[00782] A FIG. 45 mostra as estabilidades dos polinucleotídeos nos soros (primata não humano (NHP), humano ou camundongo), conforme medido pela porcentagem do polinucleotídeo intacto restante em intervalos de tempo predeterminados. Os dados na FIG. 43 está resumido na Tabela 32.

Tabela 32

Hora	p246			p308		
	NHP	Humano	Rato	NHP	Humano	Rato
0	100	100	100	100	100	100
24	58.0	73.9	42.3	98.5	95.4	99.9
38	37.8	57.9	27.0	94.9	92.3	87.5
72	21.0	45.1	15.3	97.7	90.4	81.4

Os valores citados nesta tabela são porcentagens dos polinucleotídeos intactos medidos em intervalos de tempo pré-determinados após o início da incubação.

Exemplos representativos de conjugados imunoestimulantes humanos

Tabela 33

SB #	Ab	PP#		Prolongador	Corrente	CpG
SB-205	CD38	PP6	mono	H	5-N ₃ -	p239
SB-206	CD38	PP6	mono	H	5-N ₃ -	p242
SB-351	CD38	PP6	mono	H	5-N ₃ -	p243
SB-352	CD38	PP6	mono	H	5-N ₃ -	p245
SB-218	CD38	PP6	mono	H	5-N ₃ -	p246
SB-278	CD38	PP10	mono	CO-PEG08-NH ₂	5-N ₃ -	p246
SB-279	CD38	PP14	bis	CO-PEG08-NH ₂	5-N ₃ -	p246
SB-280	CD38	PP18	bis	CO-PEG08-NH ₂	5-N ₃ -	p246

SB #	Ab	PP#		Prolongador	Corrente	CpG
SB-281	CD38	PP24	tris	CO-PEG08-NH ₂	5-N ₃ -	p246
SB-353	CD38	PP10	mono	CO-PEG08-NH ₂	5-N ₃ -	p308
SB-354	CD38	PP14	bis	CO-PEG08-NH ₂	5-N ₃ -	p308
SB-355	CD38	PP18	bis	CO-PEG08-NH ₂	5-N ₃ -	p308
SB-356	CD38	PP24	tris	CO-PEG08-NH ₂	5-N ₃ -	p308

Exemplos representativos de conjugados imunoestimulantes de murinho

Table 34

SB #	Ab	PP#		Prolongador	Corrente	CpG
SB-224	rato CD22Q	PP6	mono	H	5-N ₃ - valeramida	p275
SB-225	rato	PP6	mono	H	5-N ₃ -	p276
SB-226	rato	PP6	mono	H	5-N ₃ -	p292
SB-227	rato	PP6	mono	H	5-N ₃ -	p293
SB-357	rato	PP6	mono	H	5-N ₃ -	p294
SB-358	rato	PP6	mono	H	5-N ₃ -	p295
SB-359	rato	PP6	mono	H	5-N ₃ -	p296
SB-360	rato	PP6	mono	H	5-N ₃ -	p297
SB-230	rato	PP6	mono	H	5-N ₃ -	p304
SB-231	rato	PP6	mono	H	5-N ₃ -	p305
SB-277	rato	PP8	mono	H	5-N ₃ -	p313

SB #	Ab	PP#		Prolongador	Corrente	CpG
SB-338	rato	PP12	mono	CO-PEG24-NH2	5-N ₃ -	p313
SB-344	rato	PP16	bis	CO-PEG24-NH2	5-N ₃ -	p313
SB-361	rato	PP26	tris	CO-PEG24-NH2	5-N ₃ -	p313
SB-362	rato	PP38	mono	CO-PEG24-	5-N ₃ -	p313
SB-363	rato	PP27 +	mono	CO-PEG24-	5-N ₃ -	p313
SB-364	rato	PP29 +	bis	CO-PEG24-	5-N ₃ -	p313
SB-365	rato	PP39 +	bis	CO-PEG24-	5-N ₃ -	p313
SB-366	rato	PP39 +	tris	CO-PEG24-	5-N ₃ -	p313

* TCO é um grupo baseado em transciclooctenil ligado a uma fração alvo. O TCO tem uma estrutura ilustrada na FIG. 1B.

Exemplo 5

[00783] Este exemplo mostra que os polinucleotídeos CpG conjugados com anticorpos (CpG-Abs) aqui fornecidos são eficazes no tratamento de vários tumores líquidos e sólidos. O CpG-Abs direcionado especificamente para células B pode afetar as respostas imunes inatas e adaptativas em um indivíduo com câncer. Tais CpG-Abs direcionados para células B podem ser úteis para o tratamento de tumores que não são de células B (por exemplo, carcinoma do cólon), incluindo tumores que não expressam o alvo de CpG-Ab (por exemplo, CD22) e não expressam o alvo do Polinucleotídeo imunomodulador de CpG-Ab (por exemplo, agonista de TLR9). Além disso, o CpG-Abs direcionado para células apresentadoras de antígenos de células não B (APCs), como células dendríticas plasmocitóides ou macrófagos, é útil no tratamento

de tumores líquidos (por exemplo, linfoma). Foi observada uma ampla eficácia antitumoral de CpG-Abs após a administração sistêmica a um indivíduo. Verificou-se que o efeito antitumoral de CpG-Abs, incluindo CpG-Abs direcionado para células B, envolve imunidade mediada por células e depende da função de células T de um host, como a função de células T CD8 +. O CpG-Abs, incluindo, por exemplo, CpG-Abs direcionado para células B, aumentou a infiltração de tumores sólidos em células T CD4 + e CD8 +. Além disso, verificou-se que a CpG-Abs fornece imunidade antitumoral adaptativa e duradoura. Foram observados efeitos sinérgicos com inibidores do ponto de verificação, como anticorpos anti-PD1 e anticorpos anti-PD-L1. CpG-Ab foram projetados para ter um perfil de complemento limpo e, por exemplo, para não ativar o complemento C3.

Exemplo 6. O conjugado CpG-Ab de direcionamento de células B é eficaz no tratamento de linfomas de células B disseminados (líquidos).

[00784] Um modelo disseminado de doença de linfoma de células B (líquido) foi criado por injeção intravenosa de camundongos BALB/c imunes competentes (8-10 camundongos/grupo) com células de linfoma A20 (TLR9 +/CD22 +). Os compostos de teste foram administrados por via intravenosa nos dias 1, 3 e 5 após injeção celular e a sobrevivência dos animais foi monitorada por 40 dias.

[00785] Um polinucleotídeo imunoestimulador foi sintetizado e conjugado com um anticorpo monoclonal anti-CD22 de camundongo (mAb), como descrito nos Exemplos 1 e 2 acima. Este conjugado (SB-337, como mostrado na Tabela 6-A) é referido como CpG-mAb (CD22) nos exemplos a seguir. Um polinucleotídeo sintético substituindo o dinucleotídeo CpG por dinucleotídeos GpC foi

similarmente produzido e conjugado com o mAb anti-CD22 para servir como um conjugado de controle (SB-339) nas experiências a seguir.

[00786] Os camundongos foram injetados com células de linfoma A20 no dia 0, como descrito acima. Então, nos dias 1, 3 e 5 cada, os camundongos receberam injeções intravenosas de (i) 3 mg/kg de CpG-mAb (CD22); (ii) 10 mg/kg de CpG-mAb (CD22); (iii) CpG não conjugada (p347, como mostrado na Tabela 2); (iv) 10 mg/kg de mAb CD22 (CD22); ou (v) 10 mg/kg de GpC-mAb (conjugado de controle). Além disso, um grupo controle negativo recebeu apenas solução salina nos dias 1, 3 e 5. As taxas de sobrevivência dos grupos foram monitoradas por 40 dias.

[00787] Como mostrado na FIG. 46B, camundongos tratados com CpG-mAb tiveram sobrevida significativamente maior em comparação ao grupo controle negativo. O tratamento exibiu efeito dependente da dose. Particularmente, o grupo que recebeu 10 mg/kg de CpG-mAb (CD22) manteve 100% de sobrevida dentro da janela de observação de 40 dias, um pouco melhor que o resultado do grupo que recebeu 3 mg/kg de CpG-mAb (CD22), que manteve taxa de sobrevivência de 90%.

[00788] Além disso, o tratamento apenas com CpG ODN nu ou mAb anti-CD22 também prolongou a sobrevida do grupo em comparação com o grupo controle negativo que recebeu apenas a solução salina, embora ambos os grupos tenham morrido dentro da janela de observação de 40 dias. O tratamento com o controle GpC-mAb também prolongou a sobrevida do grupo em comparação com o controle negativo, efeito esse que pode ser atribuído ao componente mAb anti-CD22 do conjugado controle.

[00789] Estes dados sugerem que os conjugados CpG ODN e CpG-Ab que contêm o CpG ODN e um anticorpo direcionado a um antígeno de superfície de célula B, conforme aqui fornecido, são eficazes no tratamento de linfomas de células B disseminados.

[00790] Em seguida, os sobreviventes do primeiro desafio de tumor foram submetidos a um segundo desafio de tumor no dia 47. Particularmente, uma segunda dose de células de linfoma A20 (5×10^6 células) foi injetada por via intravenosa em sobreviventes tratados com 10 mg/kg ou 3 mg/kg de CpG-mAb (CD22) nos dias 1, 3 e 5. Um grupo de controle ingênuo recebeu a mesma dose de células de linfoma A20 no dia 47. A taxa de sobrevivência do grupo de camundongos continuou a ser monitorada por 43 dias (por exemplo, 90 dias no total após o primeiro desafio do tumor).

[00791] Como mostrado na FIG. 46C, consistente com o resultado do primeiro desafio tumoral, o grupo de controle ingênuo também morreu dentro de 40 dias após o recebimento das células A20 no dia 47 (isto é, morreu por volta do dia 85). Os grupos de tratamento de 10 mg/kg e 3 mg/kg exibiram taxas de sobrevivência significativamente melhores do que o grupo controle. Particularmente, como mostrado na FIG. 46C, o grupo de tratamento de 10 mg/kg manteve a taxa de sobrevivência de 100% e o grupo de tratamento de 3 mg/kg manteve a taxa de sobrevivência de 60% no final da janela de observação de 90 dias, mesmo que os camundongos não tenham recebido nenhum tratamento após o tratamento. última dose de CpG-mAb (CD22) no dia 5.

[00792] Em seguida, o efeito antitumoral prolongado foi monitorado ainda mais depois que os sobreviventes do primeiro e do segundo desafio do tumor foram submetidos a um terceiro desafio do tumor. Particularmente, um modelo sólido de doença de

linfoma de células B foi criado nos camundongos sobreviventes com a implantação de 5×10^6 células de linfoma A20 (TLR9⁺/CD22⁺) por via subcutânea no ombro do mouse no dia 90. Um grupo de controle ingênuo foi implantado com a mesma dose de células de linfoma A20 no dia 90. Os tamanhos dos enxertos de tumor foram monitorados por 30 dias (ou seja, entre o dia 90 e o dia 120).

[00793] Particularmente, como mostrado na FIG. 46D, o volume do tumor aumentou rapidamente no grupo controle, atingindo um tamanho acima de 3000 mm³ em 20 dias. Por outro lado, o grupo de sobreviventes permaneceu livre de tumor durante o período de observação de 30 dias, mesmo que os sobreviventes não tenham recebido nenhum tratamento adicional após a última dose de CpG-mAb (CD22) no dia 5. Essas experiências indicam que os sobreviventes de tumor solúveis também sobreviveu ao desafio do tumor sólido. Os sobreviventes adquiriram imunidade antitumoral que inibiu fortemente novos enxertos tumorais posteriormente.

[00794] Em conjunto, esses dados sugerem que os conjugados CpG-Ab aqui fornecidos são capazes de induzir imunidade adaptativa sustentada contra o tumor em um sujeito.

Exemplo 7. O conjugado CpG-Ab de direcionamento de células B é eficaz no tratamento de linfomas sólidos de células B.

[00795] Um modelo sólido de doença de linfoma de células B foi criado com a implantação de 5×10^6 células de linfoma A20 (TLR9⁺/CD22⁺) em camundongos BALB/c imunologicamente competentes. As células foram injetadas subcutaneamente no ombro do camundongo e o crescimento do tumor foi monitorado. O conjugado CpG-mAb (CD22) e o conjugado de controle GpC-mAb foram feitos como descrito acima.

[00796] Os camundongos foram implantados com células de linfoma A20 no dia 0, como descrito acima. Então, nos dias 9, 12 e 14 cada, os camundongos receberam injeções intravenosas de (i) 3 mg/kg de CpG-mAb (CD22); (ii) 10 mg/kg de CpG-mAb (CD22); (iii) CpG ODN nu; (iv) 10 mg/kg de mAb CD22 (quadrado fechado); ou (v) 10 mg/kg de GpC-mAb (conjugado de controle). Além disso, um grupo controle negativo recebeu apenas solução salina nos dias 9, 12 e 14. Os volumes tumorais dos grupos de camundongos foram monitorados por 23 dias. Os resultados são mostrados nas FIGS. 47B a 47E.

[00797] Como mostrado na FIG. 47B, camundongos tratados com CpG-mAb (CD22) apresentaram volume tumoral significativamente menor em comparação ao grupo controle negativo. Os volumes tumorais de todos os camundongos tratados com CpG-mAb (CD22) permaneceram abaixo de 2000 mm³ no final do período de 25 dias. O tratamento exibiu efeito dependente da dose. Particularmente, o grupo que recebeu 10 mg/kg de CpG-mAb (CD22) apresentou menor volume tumoral no final do período de 25 dias em comparação com o grupo que recebeu 3 mg/kg de CpG-mAb (CD22). Além disso, o tratamento apenas com CpG ODN nu também resultou em volumes tumorais significativamente menores que o grupo controle negativo, com o volume do tumor permanecendo abaixo de 2000 mm³ por pelo menos 20 dias.

Tomados em conjunto, estes dados sugerem que os conjugados CpG ODN e CpG-Ab contendo o CpG ODN e um anticorpo que visa um antígeno de superfície de célula B são eficazes no tratamento de linfomas sólidos de células B.

O efeito dos conjugados de CpG-mAb (CD22) nos pesos de camundongos também foram estudados e os resultados são mostrados na FIG. 47F.

Exemplo 8. O conjugado CpG-Ab de direcionamento de células B é eficaz no tratamento de carcinomas de células não-B.

[00798] Um modelo de doença do carcinoma do cólon foi criado através da implantação de $0,2 \times 10^6$ células CT26 (CD22-/PD-L1 (baixa)/TLR9-) por via subcutânea no flanco de camundongos BALB/c imunes competentes. O conjugado CpG-mAb (CD22) foi preparado como descrito acima.

[00799] Os camundongos foram implantados com células CT26 no dia 0 como descrito acima. Então, os camundongos receberam injeções intravenosas de (i) CpG-mAb (CD22) sozinho; (ii) anticorpo anti-PD-1 sozinho; (iii) CpG-mAb (CD22) em combinação com anticorpo anti-PD-1; ou (iv) solução salina. Particularmente, 3 mg/kg de CpG-mAb (CD22) foi inicialmente injetado no dia 5 e a dosagem foi repetida no dia 8 e no dia 11. 10 mg/kg de anti-PD-1 foi inicialmente injetada no dia 6 e a dosagem repetido nos dias 9 e 12. Os volumes tumorais dos grupos de camundongos foram monitorados por 18 dias.

[00800] Como mostrado na FIG. 48B, o tratamento com CpG-mAb (CD22) ou anti-PD-1 isoladamente, ou os dois agentes em combinação, todos reduziram significativamente o volume do tumor no final do período de observação em comparação ao grupo controle. O efeito antitumoral do tratamento combinado foi mais proeminente do que o tratamento apenas com anti-PD-1.

[00801] Juntos, esses dados sugerem que a administração sistemática do conjugado CpG-mAb (CD22) de células B é eficaz no

tratamento de tumores sólidos, mesmo que as próprias células de tumores sólidos não expressem TLR9 ou o alvo antigênico do Conjugado CpG-mAb (CD22). O efeito antitumoral pode ser atribuído à ativação das células B após a administração do conjugado de células B que visa o CpG-mAb (CD22). Além disso, uma terapia de combinação usando um anticorpo anti-PD-1 e um conjugado de CpG-mAb (CD22) de célula B é mais eficaz no tratamento do tumor sólido em comparação com o tratamento apenas com o anticorpo anti-PD-1.

Exemplo 9. Efeito antitumoral do conjugado CpG-Ab em sistemas imunitários competentes.

[00802] Em seguida, foram realizadas experiências para avaliar o efeito antitumoral de conjugados CpG-Ab em sistemas imuno-competentes e imuno-comprometidos. Modelos de linfoma de células B sólidos foram criados com a implantação de células de linfoma 5×10^6 A20 (TLR9⁺/CD22⁺) em camundongos BALB/c imunes competentes e camundongos Nu/Nu imuno-comprometidos e camundongos SCID, respectivamente. O conjugado CpG-mAb (CD22) foi preparado como descrito acima.

Cepa	T-cell imunidade	B-cell imunidade	NK Cell imunidade
Balb/C	+	+	+
Nu/Nu	-	+	+
SCID	-	-	+/-

[00803] No grupo imuno-competente, 10 mg/kg de CpG-mAb (CD22) foram administrados por via intravenosa nos dias 10, 12 e 14. Um

grupo controle negativo recebeu injeção intravenosa de apenas soluções salinas nos dias acima. Os volumes tumorais foram monitorados por 20 dias. Como mostrado na FIG. 49A, a administração intravenosa de CpG-mAb (CD22) resultou no fenótipo livre de tumor nos camundongos Balb/C imunocompetentes, enquanto o volume do tumor do grupo controle continuou a aumentar durante o período de observação.

[00804] Nos grupos imunocomprometidos, 10 mg/kg de CpG-mAb (CD22) ou CpG nua foram administrados por via intravenosa nos dias 8 e 11. Um grupo controle negativo recebeu i.v. injeção de apenas soluções salinas nos dias acima. Os volumes tumorais foram monitorados por 15 dias. Como mostrado nas FIGs. 49B e 49C, i.v. as administrações do CpG ODN nu ou do conjugado CpG-mAb (CD22) não afetaram o crescimento do tumor nos camundongos Nu/Nu comprometidos com o sistema imunológico ou nos camundongos SCID, em comparação ao grupo controle negativo.

[00805] Juntos, esses dados sugerem que o efeito antitumoral do conjugado CpG-Ab depende da imunidade das células T.

Exemplo 10. O efeito antitumoral do conjugado CpG-Ab é dependente de células T CD8⁺.

[00806] A seguir, foram realizadas experiências para examinar as atividades de linfócitos necessárias para o efeito antitumoral dos conjugados CpG-Ab. Particularmente, os efeitos antitumorais dos conjugados CpG-Ab foram avaliados em camundongos sem células T CD4⁺, camundongos com células T CD8⁺ e camundongos com células NK que foram alcançados por injeção intraperitoneal de anticorpo anti-CD4 (500 ug/rato em dias -2, -1, 0, 5, 8, 12), anticorpo anti-CD8 (100 ug/rato nos dias -2,

-1, 0, 5, 8, 12) ou anticorpo GM1 anti-asialo (25 ug/rato nos dias -2, -1, 0, 5, 8, 12), respectivamente. A depleção celular foi confirmada por análise FACS. Todos os anticorpos de depleção foram adquiridos à Bioexcell.

[00807] Os camundongos modelo de linfoma de células B disseminados foram criados como descrito acima. O conjugado CpG-mAb (CD22) foi preparado como descrito acima.

[00808] Nestas experiências de depleção de linfócitos, os camundongos foram injetados com células de linfoma A20 (5×10^6) no dia 0, como descrito acima. Então, nos dias 1, 3 e 5 cada, os camundongos receberam injeções intravenosas de (i) 3 mg/kg de CpG-mAb (CD22) e anticorpo anti-depleção de CD4, 500 ug/mouse nos dias -2, -1, 0, 5, 8, 12 para esgotar a célula T CD4⁺; (ii) 3 mg/kg de CpG-mAb (CD22) e 25 ug/camundongo de anticorpo GM1 anti-asialo nos dias -2, -1, 0, 5, 8, 12 para esgotar as células NK; e (iii) 3 mg/kg de CpG-mAb (CD22) e anticorpo anti-depleção de CD8, 100 ug/camundongo nos dias -2, -1, 0, 5, 8, 12 para esgotar e esgotar as células T CD8⁺. Além disso, um grupo controle positivo recebeu 3 mg/kg de CpG-mAb (CD22) nos dias 1, 3 e 5, e um grupo controle negativo recebeu apenas solução salina nos dias 1, 3 e 5. As taxas de sobrevivência dos grupos foram monitoradas por 85 dias.

[00809] Como mostrado na FIG. 50A, os camundongos receberam tratamento com CpG-mAb (CD22) mostraram sobrevida significativamente melhor em comparação com os grupos não tratados com CpG-mAb (CD22). A depleção de células T CD4⁺ não afetou significativamente a sobrevida. Particularmente, os dois grupos de camundongos tratados com CpG-mAb (CD22) (com e sem o tratamento de depleção de células T) mantiveram 50% de sobrevida

por pelo menos 85 dias após serem desafiados com células tumorais, enquanto os dois grupos de camundongos sem o tratamento com CpG-mAb (CD22) (com e sem o tratamento de depleção de células T) morreu em 40 dias.

[00810] A depleção de células NK ou CD8+ resultou em pior sobrevida em camundongos tratados com CpG-mAb (CD22). Como mostrado na FIG. 50B, o grupo que recebeu tratamentos de depleção de células CpG-mAb (CD22) e NK exibiu cerca de 90% de taxa de sobrevivência no dia 40 e cerca de 10% de taxa de sobrevivência no dia 85. Mais proeminentemente, como mostrado na FIG. 50C, mais de 90% dos camundongos esgotados de células T CD8+ morreram dentro de 30 dias, mesmo após o tratamento com CpG-mAb (CD22). Este resultado foi semelhante ao resultado observado no grupo controle (onde todos os camundongos morreram por volta do dia 30). Estes dados sugerem que o efeito antitumoral CpG-Ab é pelo menos dependente de células T CD8+.

Exemplo 11. Conjugado CpG-Ab aumenta a infiltração de tumor de células T.

[00811] Camundongos modelo de linfoma de células B sólidos foram criados como descrito acima. O conjugado CpG-mAb (CD22) foi preparado como descrito acima.

[00812] Os camundongos receberam administração intravenosa de 10 mg/kg de conjugado CpG-mAb (CD22) 10, 12 e 14 dias após serem desafiados com células de linfoma A20 por via subcutânea no dia 0. Os tumores colhidos no dia 17 foram subsequentemente digeridos por incubação em tampão de digestão contendo 1 mg/mL de collagenase IV, 100 U/mL de DNase I em HBSS a 37°C por 30 min. Em seguida, as células digeridas foram filtradas através de uma

peneira de 70 um, lavadas, incubadas em gelo com anticorpos anti-CD4-PE ou anti-CD8-PE e analisadas por FACS.

[00813] Como mostrado na FIG. 51A, o crescimento do tumor foi mais lento no grupo tratado com CpG-mAb (CD22) em comparação ao grupo controle. O volume do tumor no dia 17 dos camundongos tratados com CpG-mAb (CD22) foi significativamente menor do que os camundongos controle. Como mostrado na FIG. 51B, as porcentagens de células CD4+ e células CD8+ no tecido tumoral foram ambas significativamente mais altas no grupo tratado do que no grupo controle. Além disso, como mostrado na FIG. 51C, o volume do tumor correlaciona-se inversamente com a porcentagem de células CD8+ no tumor.

[00814] Juntos, esses dados sugerem que a administração sistêmica de conjugados CpG-Ab em camundongos com um tumor sólido pode aumentar significativamente a infiltração de células T no tumor. O aumento do número de células imunes, particularmente células T CD8+, no tumor e/ou microambiente do tumor facilita o ataque imunológico ao tumor e inibidores do crescimento do tumor.

Exemplo 12. Efeito sinérgico de conjugados de CpG-Ab e anticorpos de proteínas do ponto de verificação imune.

[00815] Foram realizadas experiências para avaliar o efeito antitumoral da terapia combinada usando ambos os conjugados CpG-Ab e um anticorpo de proteína do ponto de verificação imune.

[00816] Os camundongos modelo de linfoma de células B sólidos foram criados como descrito acima. O conjugado CpG-mAb (CD22)

foi preparado como descrito acima. O anticorpo anti-PD1 (clone J43) foi adquirido da Bioxcell e o anticorpo anti-PDL1 (atezolizumab) foi produzido internamente.

[00817] Os camundongos foram implantados com células de linfoma A20 no dia 0, como descrito acima. Então, os camundongos receberam injeções intravenosas de (i) CpG-mAb (CD22); (ii) injeção intraperitoneal de anticorpo anti-PD-1 ou anticorpo anti-PD-L1; (iii) CpG-mAb (CD22) em combinação com o anticorpo anti-PD-1 ou CpG-mAb (CD22) em combinação com o anticorpo anti-PD-L1; ou (iv) solução salina. Particularmente, para os grupos que receberam CpG-mAb (CD22) (isoladamente ou em combinação com o anticorpo proteico do ponto de verificação imune), uma primeira dose de 3 mg/kg de CpG-mAb (CD22) foi inicialmente administrada no dia 10 e depois a mesma a dosagem foi repetida nos dias 12 e 14. Além disso, para os grupos que receberam um anticorpo de proteína de ponto de verificação imune (sozinho ou em combinação com CpG-mAb (CD22)), uma primeira dose de 10 mg/kg de anticorpo de proteína de ponto de verificação imune foi inicialmente administrada em Dia 10 e, em seguida, a mesma dosagem foi repetida nos dias 13 e 16. Os volumes tumorais do grupo de camundongos foram monitorados.

[00818] Foi observado a partir desta experiência que o CpG-mAb (CD22) e o anticorpo da proteína do ponto de verificação imune produziram sinergicamente um efeito inibidor do tumor mais forte em comparação com o tratamento com qualquer um dos dois agentes separadamente. Particularmente, como mostrado nas FIGs. 52A e 52B, os camundongos tratados com a terapia de combinação tiveram tamanho de tumor significativamente menor em comparação com o

tratamento com CpG-mAb (CD22) ou o anticorpo do ponto de verificação imune sozinho.

[00819] Para examinar se o efeito sinérgico observado também depende da atividade das células T CD8+, um grupo adicional de camundongos recebeu (i) 10 mg/kg de CpG-mAb (CD22) em cada um dos dias 10, 12 e 14 (ii) 10 mg/kg de anticorpo anti-PD-1 em cada um dos dias 10, 13 e 16, e (iii) anticorpo antiCD8 (200 ug/camundongo, intraperitoneal, iniciando nos dias 0 e doseado duas vezes/semana durante a experiência para esgotar células T CD8+. Como mostrado na FIG. 52C, como o grupo controle tratado com solução salina, o volume tumoral desse grupo experimental aumentou rapidamente, sugerindo o efeito sinérgico na inibição do crescimento tumoral da terapia combinada usando CpG-mAb (CD22) e um o anticorpo da proteína do ponto de verificação imune também depende das células T CD8 +.

[00820] Além disso, os camundongos tratados com a terapia combinada usando ambos os anticorpos CpG-mAb (CD22) e anti-PD-1 e sobreviveram ao primeiro desafio tumoral foram submetidos a um segundo desafio tumoral. Particularmente, os sobreviventes do grupo de tratamento combinado receberam uma segunda dose de células A20 por via subcutânea no ombro no dia 30. O grupo sobrevivente não recebeu nenhum tratamento adicional após o segundo desafio do tumor. Um grupo de controle ingênuo recebeu a mesma dose de células tumorais. O volume do tumor foi ainda monitorado por 25 dias (isto é, entre o dia 30 e o dia 55).

[00821] Como mostrado nas FIGs. 53A a 53C, em contraste com o grupo controle ou o grupo tratado apenas com anticorpo anti-PD-1, a combinação CpG-Ab/anti-PD-1 inibiu significativamente o crescimento do tumor em todos os indivíduos durante o período de

observação. Além disso, o tratamento combinado regrediu tumores estadiados em dois indivíduos, começando em torno de D18.

Os sobreviventes do grupo de tratamento combinado foram submetidos ao segundo desafio tumoral, como descrito acima. Como mostrado na FIG. 53D, após o segundo desafio tumoral, o volume do tumor no grupo ingênuo controle aumentou rapidamente, atingindo um volume médio acima de 2000 mm³ em 20 dias. Por outro lado, o grupo sobrevivente permaneceu livre de tumor durante toda a janela de observação de 25 dias. Estes resultados sugerem que a terapia combinada que utiliza o conjugado CpG-Ab e um anticorpo proteico de ponto de verificação imune pode induzir imunidade adaptativa sustentada contra o tumor em um indivíduo.

Exemplo 13. Efeito sinérgico de conjugados de CpG-Ab e agonistas de células T.

[00822] Em seguida, foram realizadas experiências para avaliar o efeito antitumoral da terapia combinada usando ambos os conjugados CpG-Ab e um agonista de células T.

[00823] Os camundongos modelo de linfoma de células B sólidos foram criados como descrito acima. O conjugado CpG-mAb (CD22) foi preparado como descrito acima.

[00824] Os camundongos foram implantados com células de linfoma A20 no dia 0, como descrito acima. Então, os camundongos receberam injeções intravenosas de (i) CpG-mAb (CD22); (ii) injeção intraperitoneal de anticorpo anti-OX-40 (clone OX-86, 10 mg/kg, Bioxcell), anticorpo anti-ICOS (clone 7E.17G9, 10 mg/kg, Bioxcell) ou anti-4-1BB anticorpo (clone 3H3, 1 mg/kg, Bioxcell); (iii) CpG-mAb (CD22) em combinação com anticorpo anti-OX-40, CpG-mAb (CD22) em combinação com anticorpo anti-ICOS

ou CpG-mAb (CD22) em combinação com anticorpo anti-4-1BB; ou (iv) solução salina. Particularmente, para o grupo que recebeu CpG-mAb (CD22) (sozinho ou em combinação com um anticorpo estimulador de células T), uma primeira dose de 3 mg/kg de CpG-mAb (CD22) foi inicialmente administrada no dia 10 e, em seguida, a mesma dosagem foi repetida nos dias 12 e 14. Além disso, para o grupo que recebeu um anticorpo estimulador de células T (sozinho ou em combinação com CpG-mAb (CD22)), uma primeira dose do anticorpo estimulador de células T foi administrada no dia 10 e, em seguida, a mesma dosagem foi repetida nos dias 13 e 17. Os volumes tumorais do grupo de camundongos foram monitorados.

[00825] Foi observado nesta experiência que o CpG-mAb (CD22) e o anticorpo estimulador de células T produziram sinergicamente um efeito inibidor de tumor que não foi observado no tratamento apenas com o anticorpo estimulador de células T. Particularmente, como mostrado nas FIGs. 54A a 54C, os camundongos tratados com a terapia combinada apresentaram tamanho de tumor significativamente menor em comparação ao grupo controle negativo ou ao grupo tratado com o anticorpo estimulador de células T (anti-OX-40, anti-ICOS ou anti-4-1BB) sozinho.

Exemplo 14. O CpG-Ab de direcionamento de células B provoca resposta citotóxica específica de células T de antígeno tumoral em esplenócitos.

[00826] Um modelo de doença do carcinoma do cólon foi criado como descrito acima. O conjugado CpG-mAb (CD22) foi preparado como descrito acima.

[00827] Os camundongos foram implantados com células CT26 no dia 0 como descrito acima. Em seguida, os camundongos receberam

injeções intravenosas de 10 mg/kg de CpG-mAb (CD22) ou solução salina nos dias 10, 13 e 16. Os volumes tumorais dos grupos de camundongos foram monitorados por 17 dias. Como mostrado na FIG. 55A, o tratamento com o CpG-mAb (CD22) inibiu significativamente o crescimento do tumor em comparação com o grupo controle.

[00828] No dia 17 (24 horas após a última dose), os camundongos foram sacrificados, os esplenócitos foram isolados e plaqueados (4×10^5 células/poço) em placas ELISPOT revestidas com anticorpo anti-IFN-gama. As células foram desafiadas com um antígeno de superfície celular CT26 (peptídeo AH1) a 100 µg/ml por 24 horas a 37°C e as células T secretoras de IFN-gama foram contadas. Como mostrado na FIG. 55B, o número de células secretoras de IFN-gama aumentou significativamente no grupo tratado com CpG-mAb (CD22) em comparação com o controle. Estes dados sugerem que o conjugado de CpG-Ab direcionado para células B é capaz de induzir resposta de células T citotóxicas específicas para antígenos tumorais após administração a um sujeito.

Exemplo 15. Conjugados CpG-Ab Direcionando Células Dendríticas Provocam Imunidade Adaptativa Antitumoral.

[00829] Um modelo sólido de doença de linfoma de células B foi criado como descrito acima. O polinucleotídeo imunoestimulador com a sequência da SEQ ID NO: 313 (p313) foi sintetizado e conjugado com um anticorpo anti-CD205 ou um anticorpo anti-PD-L1, como descrito nos Exemplos 1 e 2. Esses conjugados são referidos como CpG-Ab (CD205) e CpG-Ab (PD-L1), respectivamente.

[00830] Os camundongos foram implantados com células A20 no dia 0 como descrito acima. Em seguida, os camundongos receberam

injeções intravenosas de (i) 10 mg/kg de CpG-Ab (CD205); (ii) 10 mg/kg de CpG-Ab (PD-L1); ou (iii) solução salina, nos dias 10, 12 e 14. Os volumes tumorais dos grupos de camundongos foram monitorados por cerca de 41 dias.

[00831] Como mostrado na FIG. 56A, o tratamento com o CpG-Ab (CD205) inibiu significativamente o crescimento do tumor em comparação com o grupo controle. Como mostrado adicionalmente na FIG. 56B, o conjugado CpG-Ab (CD205) regrediu o crescimento do tumor em todos os 8 indivíduos do grupo e resultou no fenótipo livre de tumor em 7 dos 8 indivíduos no total.

[00832] Como mostrado na FIG. 56C, o tratamento com CpG-Ab (PD-L1) regrediu o crescimento do tumor e resultou no fenótipo livre de tumor em 3 dos 8 indivíduos no total.

[00833] Além disso, os sobreviventes dos grupos tratados com os conjugados CpG-Ab foram submetidos a um segundo desafio tumoral. Particularmente, os sobreviventes receberam 5×10^6 de células A20 por via subcutânea no dia 37 sem tratamento adicional. Um grupo ingênuo de camundongos com linfoma de células B sólido recebeu a mesma dose de células A20. O volume tumoral dos grupos de camundongos foi observado por 17 dias após o segundo desafio. Como mostrado na FIG. 56D, o volume do tumor aumentou rapidamente no grupo controle, enquanto os sobreviventes do grupo de tratamento CpG-Ab (PD-L1) ou grupo de tratamento CpG-Ab (CD205) permaneceram livres de tumor durante toda a janela de observação de 17 dias.

[00834] Em um experimento separado, quatro grupos de camundongos com linfoma de células B sólido (8 indivíduos/grupo) foram tratados com doses intravenosas de (i) 10 mg/kg de

conjugado CpG-Ab (CD205); (ii) 10 mg/kg de anticorpo monoclonal anti-CD205 de camundongo; (iii) 10 mg/kg de IgG de camundongo ou (iv) solução salina, em cada um dos dias 10, 12 e 14. O volume do tumor dos grupos de camundongos foi monitorado por 27 dias.

[00835] Como mostrado na FIG. 57A e 57C, o tratamento com o conjugado CpG-Ab (CD205) regrediu o crescimento do tumor e acabou resultando no fenótipo livre de tumor em todos os 8 indivíduos do grupo de tratamento. Além disso, os tumores regrediram em camundongos tratados com anticorpo anti-DEC205 e anticorpo de controle IgG de camundongo. Talvez isso se deva ao fato de que ambos os anticorpos, como IgG2, possuem uma função efetora Fc ativa que resultou em atividade antitumoral moderada, embora nenhum dos camundongos estivesse livre de tumor. Assim, apesar do anticorpo anti-DEC205 mostrar atividade antitumoral, o conjugado CpG-CD205 foi significativamente mais eficaz, pois todos os camundongos estavam livres de tumor.

[00836] Juntos, esses dados sugerem que os conjugados CpG-Ab direcionados a células dendríticas podem provocar imunidade adaptativa sustentada contra o tumor após a administração a um sujeito.

Exemplo 16 Conjugados CpG-CD19 mostram boa eficácia

[00837] Um modelo sólido de doença de linfoma de células B foi criado através da implantação de 4×10^6 células de linfoma A20 em camundongos, como descrito acima. Resumidamente, as células foram injetadas subcutaneamente e o crescimento do tumor foi medido usando um paquímetro. O conjugado CpG-mAb e a CpG nua foram feitos como descrito acima.

[00838] Os camundongos foram implantados com células de linfoma A20 no dia 0. Os camundongos foram preparados durante 10 dias e depois tratados nos dias 10, 12 e 14, e o crescimento do tumor foi medido até o dia 20 (FIG. 60A). O tratamento incluiu injeções intravenosas de (i) 3 mg/kg de CpG-Ab (SB-337; p313 conjugado com CD22) (quadrado); (iii) 3 mg/kg de anti-CD19 (triângulo fechado); (iv) 3 mg/kg de CpG-Ab (SB-388; p313 conjugado com CD19) (diamante fechado); (v) 1,9 µg/CpG sem ratinho (p347) (triângulo ascendente); (vi) 19 µg/CpG sem ratinho (p347) (triângulo aberto); ou (vii) 190 µg/CpG livre de camundongo (p347) (diamante aberto). Além disso, um grupo controle negativo recebeu apenas solução salina (círculo fechado). Os volumes de tumor dos grupos de camundongos foram medidos usando um paquímetro a partir do dia 10 e continuados até o dia 20 (FIG. 60A). No dia 20, os camundongos foram sacrificados e o volume do tumor foi medido (FIG 60B). Os resultados indicaram que o conjugado CpG-Ab (SB-388) que continha p313 conjugado com CD19 exibia boa eficácia, e a eficácia foi semelhante ao conjugado CpG-Ab (SB-337) que continha o mesmo CpG (p313), mas foi conjugado com CD22.

[00839] Além disso, foi avaliada a alteração do peso corporal dos camundongos, descontando a alteração no peso do tumor (FIG. 60C). Os resultados preliminares de segurança indicaram que o CD19 CpG-Ab (SB-388) era menos tóxico do que sua dose equivalente de CpG, com base na alteração do peso corporal.

[00840] Nos exemplos atuais e seguintes, CpG-4715 corresponde a p347, como mostrado na Tabela 2; CpG-4523 corresponde a p313 como mostrado na Tabela 2. SB-1490 corresponde a SB-337 como

mostrado na Tabela 6-A; e SB-3055 corresponde a SB-388, como mostrado na FIG. 6-B.

Exemplo 17. A dosagem intratumoral de CpG4715 em tumores sólidos é eficaz.

[00841] Para avaliar a dosagem intratumoral de CpG em tumores sólidos, camundongos albinos C57Bl/6 (n = 8/grupo) foram inoculados subcutaneamente no flanco com 1×10^6 células de melanoma B16F10. Os tumores foram deixados crescer por sete dias e, em seguida, o p347 foi injetado intratumoralmente (30 μ g em 50 μ L de solução salina) nos dias 7, 9, 11 e 13. Como controle negativo, 50 μ L de solução salina foram injetados intratumoralmente no grupo tratado com solução salina. Os volumes tumorais foram monitorizados até o dia 27. Os resultados indicaram que p347 é eficaz em tipos de tumores sólidos, como indicado pelo menor volume tumoral em camundongos tratados com p347, em relação à solução salina (FIG. 61A).

[00842] Além disso, o efeito sistêmico da CpG foi monitorado ao desafiar novamente as células de melanoma B16F10 nos camundongos injetando 1×10^6 células de melanoma B16F10 por via intravenosa na veia da cauda no dia 14. Os volumes tumorais foram monitorados até o dia 27, após o que os camundongos foram sacrificados e seus pulmões foram excisados para avaliar as metástases tumorais. Os resultados revelaram que, ao desafiar novamente os camundongos injetando células de melanoma não tratadas na veia da cauda, havia menos metástases pulmonares no grupo tratado com p347 em comparação com o grupo tratado com solução salina (FIG. 61B). Coletivamente, esses resultados indicaram que a CpG fornece um efeito sistêmico e o efeito prolongado da ativação imune é capaz de reduzir o número total de metástases no pulmão.

[00843] Para determinar o mecanismo de ação referente ao efeito sistêmico com mais cuidado, foi utilizado o modelo de mouse colorretal CT-26, como descrito acima. Resumidamente, os tumores foram deixados crescer por sete dias e, em seguida, p347 foi injetado intratumoralmente (10 µg em 50 µL de solução salina) nos dias 7, 10, 12 e 14. Como controle negativo, 50 µL de solução salina foram injetados intratumoralmente em o grupo tratado com solução salina. Os volumes tumorais foram monitorados até o dia 21 (FIG. 61C). De acordo com o modelo de melanoma B16F10, a dosagem intratumoral de CpG4715 foi eficaz em tumores sólidos de CT26. Importante, os resultados indicados TLR9 hospedeiro são suficientes para a função do tratamento CpG, uma vez que as células CT26 são TLR9-.

Exemplo 18. O efeito antitumoral do conjugado CpG-Ab depende das células B.

[00844] Foram realizadas experiências para avaliar o papel das células B na atividade da CpG. Para este efeito, o modelo colorretal CT26 foi usado, como descrito acima, em camundongos knockout para Jh que são deficientes em células B genéticas (Igh-Jtm1DhuN? + N2; Taconic Biosciences, Inc) (FIG. 62A). Esses camundongos têm uma deleção dos segmentos J murinos endógenos do locus da cadeia pesada Ig, resultando na alteração drástica das células da linhagem B, tanto na progressão do desenvolvimento quanto na quantidade de células. Os camundongos não contêm linfócitos B maduros (portadores de imunoglobulinas) no baço, medula óssea, linfonodos, sangue periférico ou peritônio, e não possuem IgM ou IgG detectável nos soros.

[00845] CTeno xenoenxertos foram criados, como descrito acima. Os tumores foram cultivados por sete dias e, em seguida, os

camundongos foram tratados por via intravenosa com 10 mg/kg de CpG-mAb (CD22-CpG; SB-337) ou solução salina nos dias 10, 12 e 14 (FIG. 62A). O volume do tumor foi monitorado por 17 dias, sem diferença significativa entre os grupos salina e CpG-mAb. Isso indicou que as células B são necessárias para a atividade de CpG.

[00846] Os resultados foram ainda suportados usando um modelo colorretal CT-26 em um fundo de camundongo que tinha células B esgotadas pela administração de camundongos imunocompetentes com mAb anti-CD20 (FIG. 62B). O volume do tumor foi medido por 27 dias. O efeito antitumoral do grupo de tratamento com CpG-mAb foi reduzido significativamente em comparação com o tratamento sem depleção de células B. Esse resultado também confirmou que a atividade da CpG depende das células B.

Exemplo 19 A ativação de células B aprimora a atividade antitumoral de CpG em modelos de camundongos singeneicos

[00847] Foi realizado um modelo singênico de câncer colorretal usando células de câncer colorretal MC38 para avaliar o efeito da ativação de células B na atividade antitumoral de CpG. As células cancerígenas colorretais MC38 são negativas ao antígeno/TLR9. Resumidamente, foram inoculados subcutaneamente no flanco camundongos albinos fêmeas C57Bl/6 (n = 8/grupo) com $0,3 \times 10^6$ células MC38. Os xenoenxertos foram cultivados por 10 dias e, em seguida, os compostos de teste foram injetados com (i) solução salina (círculo); (ii) 10 mg/kg de anti-CD22 (triângulo para cima); (iii) 10 mg/kg de anti-PD-L1 (triângulo descendente); (iv) 10 mg/kg de CD22-CpG (SB-337) (quadrado); ou (v) 10 mg/kg de CD22-CpG (SB-337) + 10 mg/kg de anti-PD-L1 (diamante). Anti-CD22 e CD22-CpG foram dosados por via

intravenosa nos dias 10, 12 e 14; o anti-PD-L1 foi administrado por via intraperitoneal nos dias 10, 13 e 17 (FIG. 63A). Os volumes tumorais foram monitorados até o dia 17 (FIG. 63A).

[00848] Os resultados indicaram que o tratamento com 10 mg/kg de CD22-CpG (SB-337) (quadrado) reduziu significativamente o volume do tumor, em relação ao tratamento com solução salina (FIG. 63A). Da mesma forma, o tratamento com 10 mg/kg de CD22-CpG (SB-337) + 10 mg/kg de anti-PD-L1 (diamante) reduziu significativamente o volume do tumor, em comparação com os camundongos tratados com solução salina. Os resultados para os camundongos individuais para cada um dos tratamentos também são indicados (FIG. 63B-FIG. 63F).

[00849] Além disso, a avaliação da ativação das células B foi realizada usando o modelo de melanoma B16F10. Resumidamente, inocularam-se 1×10^6 células de melanoma B16F10 por via subcutânea no flanco de ratinhos e deixou-se o crescimento de tumores durante 10 dias. Os camundongos foram então doseados com (i) solução salina (círculo); (ii) 10 mg/kg de anti-CD22 (quadrado); (iii) 10 mg/kg de CD22-CpG (SB-337) (triângulo); ou (iv) 10 mg/kg de CD22-CpG (SB-337) + 10 mg/kg de anti-PD-L1 (diamante) nos dias 10, 12 e 14 (FIG. 64A). Anti-CD22 e CD22-CpG foram dosados por via intravenosa; O anti-PD-L1 (Atezolizumab) foi dosado por via intraperitoneal. Os resultados indicaram que o tratamento com CD22-CpG reduziu o volume do tumor ($p = 0,08$). Da mesma forma, o tratamento com CD22-CpG + anti-PD-L1 reduziu significativamente o volume do tumor ($p = 0,03$).

[00850] De acordo com os modelos colorretal e melanoma, camundongos inoculados com células de câncer de pulmão LLC1 Lewis apresentaram resultados semelhantes. Os camundongos foram

inoculados com células de câncer de pulmão LLC1 Lewis e a progressão média do crescimento do volume tumoral de camundongos foi seguida. A partir do dia 7, os camundongos foram tratados com (i) solução salina (círculo); (ii) 10 mg/kg de CD22-CpG (SB-337) (círculo); (iii) 10 mg/kg de anti-PD1 (quadrado); (iv) 10 mg/kg de CD22-CpG (SB-337) + 10 mg/kg de anti-PD1 (triângulo para cima) (v) 10 mg/kg de anti-PD-L1 (triângulo para baixo); (vi) 10 mg/kg de CD22-CpG + 10 mg/kg de anti-PD-L1 (diamante) (FIG. 64B). Anti-CD22 e CD22-CpG foram dosados por via intravenosa nos dias 7, 10 e 13; anti-PD-L1 e anti-PD1 foram administrados por via intraperitoneal nos dias 7, 10 e 14. Os resultados mostraram que os camundongos tratados com 10 mg/kg de CD22-CpG isoladamente ou em combinação com 10 mg/kg de anti-PD1 (triângulo para cima) ou em combinação com 10 mg/kg de anti-PD-L1 (diamante) exibiram uma redução significativa no volume do tumor ($p = 0,023$). Tomados em conjunto, estes resultados indicaram que o tratamento com CD22-CpG pode reduzir o volume do tumor LLC1.

Exemplo 20. Eficácia do direcionamento de CpG para células B ou células dendríticas

[00851] Foram realizadas experiências para comparar a eficácia de direcionar CpG para células B versus direcionar CpG para células dendríticas. Usando o modelo colorretal CT26, como descrito acima, os camundongos foram tratados por via intravenosa com CpG conjugado com CD22 (CD22-CpG; SB-337) para atingir células B, CpG conjugado com DEC205 (DEC205-CpG; SB-419) para direcionar células dendríticas ou solução salina. Os camundongos foram tratados com 10 mg/kg de CpG-Ab nos dias 12, 17, 20 e 24. Os volumes tumorais foram medidos e o volume médio

(FIG. 65A), bem como os volumes individuais de tumor para cada camundongo (FIG. 65B-65D) são apresentados. Os resultados revelam que o direcionamento de células B ou células dendríticas com um conjugado CpG-Ab é capaz de reduzir o volume do tumor.

Exemplo 21 A atividade de CpG-Ab é dependente de células T CD4 + no modelo colorretal CT26, mas não no modelo de linfoma A20

[00852] Para investigar o papel das células T no mecanismo de ação da CpG, dois modelos de camundongos foram empregados. No primeiro modelo, foram utilizadas células de câncer colorretal CT26. Resumidamente, os modelos de camundongo CT26 foram criados como descrito acima, e a progressão média do crescimento do volume tumoral de camundongos foi seguida após dosagem com (i) solução salina (pequeno círculo); (ii) depleção de CD4 (grande círculo); (iii) 3 mg/kg de CD22-CpG (SB-337) (quadrado); ou (iv) depleção de CD4 + 3 mg/kg de CD22-CpG (SB-337) (diamante). A CD22-CpG foi administrada por via intravenosa nos dias 10, 13; e 15 (FIG. 66A). A depleção de CD4 foi realizada usando o anticorpo anti-CD4 (clone GK1.5, 400ug/dose) injetado intraperitonealmente nos dias 10, 13 e 17. Os resultados desta experiência demonstraram que a depleção de células T CD4+ usando anticorpos CD4 inibe a atividade de CpG-Ab em um modelo de câncer colorretal CT26 (FIG. 66A)

[00853] Em contraste, a atividade de CpG-Ab não foi inibida após a depleção de células T CD4 + em um modelo de linfoma A20. Resumidamente, a progressão média do crescimento do volume tumoral de camundongos usando um modelo de linfoma A20 foi seguida após a dosagem dos camundongos com (i) solução salina (círculo); (ii) depleção de CD4 (triângulo para cima); (iii) 3 mg/kg de CD22-CpG (SB-337) (quadrado); ou (iv) depleção de CD4

+ 3 mg/kg de CD22-CpG (SB-337) (triângulo descendente) (FIG. 66B). A CD22-CpG foi administrada por via intravenosa nos Dias 10, 12; e 14. A depleção de CD4 foi realizada usando o anticorpo anti-CD4 (clone GK1.5, 400ug/dose) injetado intraperitonealmente nos dias 10, 13 e 17. Neste modelo, CD22-CpG reduziu o modelo de tumor, em relação à solução salina. No entanto, a depleção de CD4 não afetou a atividade da CpG-Ab.

Exemplo 22 CpG-Ab de células B induz co-estimuladores de células T de superfície

[00854] O papel da ativação de células T no CpG-Ab direcionado a células B (SB-1490) foi testado medindo a expressão de co-estimuladores de células T de superfície em células B que foram tratadas com anticorpo CpG (p347) ou CpG-Ab (SB-337). O baço do camundongo foi colhido e passado através de uma peneira de 70 microns para gerar uma suspensão de célula única. Os glóbulos vermelhos (RBC) foram lisados por incubação com tampão de lise de RBC por 5 min à temperatura ambiente e depois extinta com meio completo. As células B foram ainda isoladas por seleção negativa usando um kit de isolamento de células B de camundongo (Miltenyi Biotec). As células foram colhidas por centrifugação suave, lavadas e ressuspensas a uma concentração de 2×10^6 células/mL em RPMI contendo 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de penicilina/estreptomicina (PS). As células foram então semeadas em placas de 96 poços e tratadas com os compostos de teste na concentração indicada (1 nM) e incubadas a 37°C por 72 horas. As células foram então colhidas por centrifugação suave e ressuspensas em tampão FACS. Após centrifugação novamente, as células foram então ressuspensas em 500 µL de tampão FACS. O FcR Blocker de camundongo foi adicionado e incubado por 10 min em

temperatura ambiente. As células foram transferidas para gelo e os anticorpos FACS marcados apropriados (ver exemplos abaixo) foram adicionados e incubados em gelo por 30 min. Controles isotípicos não específicos foram utilizados. Em seguida, as células foram coletadas em tampão FACS em tubos Eppendorf. As células foram centrifugadas, lavadas uma vez com tampão FACS e depois re-centrifugadas. As células foram então novamente suspensas em 1 mL de tampão FACS novamente e depois mantidas em gelo até a análise pela máquina CyFlow ML FACS. Os dados foram analisados no software Flow Jo.

[00855] Os resultados da incubação *in vitro* de células B do baço de camundongo com anticorpo, conjugado CpG livre (SB-4715) ou CpG-Ab (SB-1490) revelaram que o conjugado CpG-Ab dirigido por célula B induz a superfície Co-estimuladores de células T, como CD40, CD70, CD80, CD86, MHC-I, MHC-II e 4-1 BBL (FIG. 67A).

[00856] Resultados semelhantes foram obtidos em camundongos tratados *in vivo*. Resumidamente, os camundongos foram tratados com 10 mg/kg, três vezes por semana, e as células B CD19 +/B220 + foram analisadas 3 dias após a dose final. Os baços/linfonodos de camundongo foram colhidos, lavados com PBS e passados através de uma peneira de 70 microns para gerar uma única suspensão de células. As células foram centrifugadas suavemente e depois ressuspensas em tampão FACS. Adicionou-se FcR Blocker (diluição 1:20) e incubou-se durante 10 minutos à temperatura ambiente. As células foram transferidas para gelo e os anticorpos FACS marcados apropriados (ou controles isotípicos não específicos) foram adicionados e incubados em gelo por 30 min. As células foram coletadas em tampão FACS em tubos Eppendorf. As células foram centrifugadas, depois lavadas uma vez com 1 mL de tampão

FACS, depois centrifugadas novamente. As células foram ressuspensas em 1 mL de tampão FACS novamente e depois mantidas em gelo até a análise pela máquina CyFlow ML FACS. Os dados foram analisados no software Flow Jo. O tratamento com CpG-Ab resultou no aumento da expressão da superfície de CD40, CD80, CD86 e MHC-II, em relação à solução salina (FIG. 67B).

Marcador	Nome	Isotipo	Fluoróforo
CD137L	4-1BBL	rat IgG2a	PE
CD252	OX40L	rat IgG2b	PE
CD274	PD-L1, B7H1	rat IgG2b	PE
CD275	ICOSL, B7H2	rat IgG2a	PE

Exemplo 23 CpG-Ab de células B induz a ativação de células T em tecidos linfóides secundários

[00857] A ativação de células T em tecidos linfóides secundários foi medida por FACS para avaliar o efeito funcional de conjugados de CpG-Ab direcionados a células B. Resumidamente, os camundongos Balb/c foram tratados com tratados com (i) solução salina (sólida); (ii) 10 mg/kg de Ab (anti-CD22) (xadrez); (iii) 10 mg/kg de CpG-Ab (SB-SB-337) (horizontal); ou (iv) uma dose equivalente de CpG (p347) (vertical), três vezes por semana. Três dias após a última dose, o baço e os gânglios linfáticos foram colhidos e as células T CD3 foram analisadas por FACS. Os baços/linfonodos de camundongo foram colhidos, lavados com PBS e passados por uma peneira de 70 um para gerar uma suspensão de célula única. As células foram centrifugadas suavemente e depois

ressuspensas em tampão FACS. Adicionou-se FcR Blocker (diluição 1:20) e incubou-se durante 10 minutos à temperatura ambiente. As células foram transferidas para gelo e os anticorpos FACS marcados apropriados (ou controles isotípicos não específicos) foram adicionados e incubados em gelo por 30 min. As células foram coletadas em tampão FACS em tubos Eppendorf. As células foram centrifugadas, depois lavadas uma vez com 1 mL de tampão FACS, depois centrifugadas novamente. As células foram ressuspensas em 1 mL de tampão FACS novamente e depois mantidas em gelo até a análise pela máquina CyFlow ML FACS. Os dados foram analisados no software Flow Jo

[00858] As células T ativadas foram quantificadas medindo a porcentagem de células CD71 +, CD3 +, em relação à população total de células T (CD3+) (FIG. 68A). As células T ativadas também foram quantificadas medindo a quantidade de células Ki67 +, CD3+, em relação à população total de células T (CD3+) (FIG. 68B). Os resultados do FACS revelaram que o conjugado de CpG-Ab direcionado às células B e, em menor extensão, o CpG livre, aumentam a porcentagem de células T ativadas nos tecidos linfóides secundários.

Exemplo 24 Células linfonodais transferidas adotivamente inibem o crescimento de tumores

[00859] Experiências para analisar melhor o papel da ativação de células T nos conjugados de CpG-Ab direcionados a células B foram realizadas usando o modelo de câncer colorretal de camundongo CT-26. O modelo colorretal do mouse CT-26 foi criado como descrito acima. Os tumores foram testados no dia 10 e os camundongos foram doseados por via intravenosa com (i) solução salina (círculo); (ii) 10 mg/kg de CD22-CpG (SB-337) (quadrado);

(iii) 10 mg/kg CD22 (triângulo para cima); ou (iv) CpG livre (p347) (triângulo descendente) nos dias 10, 12, 14 (FIG. 69A). O crescimento do tumor foi monitorado por 22 dias (32 dias a partir do dia da inoculação) (FIG. 69A). De acordo com os outros resultados descritos acima, o CD22-CpG resultou em volumes mais baixos de tumor, em relação aos outros grupos de tratamento.

[00860] No dia 32, os camundongos foram sacrificados e os gânglios linfáticos (drenantes e não drenantes) foram isolados e reunidos a partir de camundongos em cada grupo de tratamento. Os linfonodos foram passados através de uma peneira de 70 mm para gerar uma única suspensão de células. As células foram lavadas duas vezes com PBS gelado e contadas. Misturaram-se 1×10^7 células (aproximadamente 70% de células T) com $0,1 \times 10^6$ células CT-26 em tampão HBSS, e a mistura foi inoculada por via subcutânea nos flancos de camundongos ingênuos BalbC, conforme protocolo padrão. O volume do tumor foi monitorado nesses camundongos por 24 dias (FIG. 69B). Os resultados indicaram que as células linfonodais transferidas adotivamente inibem o crescimento do tumor (FIG. 69C)

Exemplo 25 CpG-Ab de células B induz resposta imune inata

[00861] O efeito dos conjugados de CpG-Ab direcionados às células B na resposta imune inata foi analisado por tratamento intravenoso de camundongos ingênuos com (i) solução salina (sólida); (ii) 10 mg/kg de Ab (CD22) (xadrez); (iii) 5,7ug CpG (p347) (horizontal); ou (iv) 10 mg/kg de CpG-mAb (SB-337). O sangue foi coletado da cauda nos momentos indicados e o soro foi isolado por centrifugação. Os níveis séricos de citocinas foram medidos por análise multiplex com base em esferas (LEGENDplex, Biolegend).

[00862] Após o tratamento dos camundongos, várias citocinas plasmáticas associadas à resposta imune inata (ou seja, IL-6, IL-10, IL-1 β , IL-12p70, IFN γ e TNF α) foram medidas 1 hora, 6 horas e 24 hora após o tratamento (FIG. 70A-70F). Os resultados indicaram que os conjugados de CpG-Ab direcionados a células B induzem um perfil de citocina favorável à ativação de células T, célula dendrítica (DC) e natural killer (NK). Notavelmente, as concentrações de IL-1 β (FIG. 70C) e IL-12p70 (FIG. 70D) foram altamente elevadas às 6 horas. Além disso, foi observado que a CpG livre aumentou fortemente os níveis de concentração plasmática de TNF α (FIG. 70F) em 1 hora, enquanto esse efeito não foi observado com o conjugado CpG-mAb, sugerindo que o CpG-mAb pode ter uma vantagem de segurança sobre a CpG livre.

Exemplo 26 CpG-Ab de células B induz diferenciação de células B e formação de centro germinativo

[00863] Para avaliar se a CpG-Ab de células B induz diferenciação de células B e formação de centro germinativo, o modelo de câncer colorretal CT-26 foi empregado de acordo com os métodos descritos acima. Resumidamente, os camundongos foram inoculados com células de câncer colorretal CT-26 e deixados crescer por 10 dias. Os camundongos foram então tratados por via intravenosa com solução salina ou 10 mg/kg de CpG-mAb (SB-1490) nos dias 10, 13 e 17 e foram sacrificados 24 horas após a última dose. Os baços foram preparados isolados de células únicas, como mencionado acima, e a porcentagem de células B (B220 +; FIG. 71A), células GC (B220 +, IgDlo, Fas +; FIG. 71B) e células auxiliares foliculares T (Tfh) (CD4 +, CXCR5 +, PD-1 +; FIG. 71C) em relação ao número total de células no baço foram determinadas usando análise FACS. Além disso, as alterações de

dobras relativas da expressão gênica de IL-21 (FIG. 71D), Bcl-6 (FIG. 71E) e IRF-4 (FIG. 71F) foram determinadas usando métodos padrão de qPCR. Os resultados demonstraram que o CpG-mAb aumentou significativamente a porcentagem de células B, células GC e células Tfh, além de aumentar significativamente os níveis de expressão de IL-21, Bcl-6 e IRF-4. Tomados em conjunto, estes resultados demonstraram que o conjugado de CpG-Ab com células B induz a diferenciação de células B e a formação de GC.

Exemplo 27 CpG-Ab de células B induz respostas imunológicas inatas e adaptativas

[00864] O efeito do tratamento com CpG-Ab de células B nas respostas imunes inatas e adaptativas foi medido usando o modelo de câncer colorretal CT-26. O modelo de mouse colorretal CT-26 foi criado como descrito acima. Para avaliar a resposta imune inata, os tumores foram inoculados por via subcutânea e cresceram por dez dias. Nos dias 10, 13 e 17, os camundongos foram tratados por via intravenosa com solução salina ou 3 mg/kg de CpG-mAb (SB-337) e foram sacrificados 24 horas após a última dose. As células foram isoladas do baço e dos linfonodos, e a expressão gênica de vários genes associados à resposta imune inata (isto é, IL-6, IL-10, IL-1 β e TNF α) foi medida por qPCR. Os resultados revelaram que o tratamento com o CpG-mAb aumentou a expressão de IL-6, IL-10 e IL-1 β no baço (FIG. 72A-C) e no linfonodo de drenagem (FIG. 73A-C). No entanto, o CpG-mAb não aumentou a expressão de TNF α no baço (figura 72D) ou no linfonodo de drenagem (figura 73D). Coletivamente, esses resultados demonstraram que o conjugado de CpG-Ab com células B induz a resposta imune inata.

[00865] Em seguida, o efeito do tratamento com CpG-Ab de células B na resposta imune adaptativa foi medido usando o modelo de tumor sólido CT-26. O modelo de mouse colorretal CT-26 foi criado como descrito acima. Para avaliar a resposta imune adaptativa, os tumores foram inoculados por via subcutânea e cresceram por dez dias. Nos dias 10, 13 e 16, os camundongos foram tratados por via intravenosa com solução salina ou 3 mg/kg de mAb CpG (SB-337) e os camundongos foram sacrificados no dia 24, o sangue foi coletado por punção cardíaca e os níveis séricos de IgM, IgG e IgG2a foram medidos por ELISA. Os soros foram coletados dos camundongos e os níveis de IgM, IgG e IgG2a foram medidos. Para os camundongos tratados com CpG-mAb, IgM (FIG. 74A), IgG (FIG. 74B), IgG2a (FIG. 74C) foram todos significativamente aumentados, em relação aos camundongos tratados com solução salina.

[00866] Os níveis dos anticorpos específicos para tumores foram ainda analisados através da realização de um ELISA utilizando o antígeno tumoral CT-26 AH1 como substrato. O peptídeo AH1 foi revestido em placets de 96 poços durante a noite e os poços foram então lavados três vezes com tampão de lavagem ELISA para remover o excesso de peptídeo. As amostras de soro de camundongo foram adicionadas e incubadas por 2 horas em temperatura ambiente. Os poços foram então lavados x3 novamente e a quantidade de IgG2a anti-AH1 de camundongo no soro foi medida usando dois anticorpos secundários IgG2a-HRP anti-camundongo disponíveis comercialmente disponíveis, 2° Ab1 e 2° Ab2 (FIG. 75). Os poços foram lavados novamente e uma solução de substrato TMB (100 µL) foi adicionada a cada poço. Depois que a placa foi incubada à temperatura ambiente por 15 a 30 minutos ou até que

a cor desejada fosse desenvolvida, uma solução de parada (100 µL) foi adicionada a cada poço e a placa foi lida a 450 nm. De acordo com a existência de mais IgG2a nos soros dos camundongos, o tratamento com CpG-mAb resultou em significativamente mais IgG2a específica de tumor nos soros. Estes resultados indicaram que a CpG-Ab de células B induz uma resposta adaptativa que produz uma mudança de classe para anticorpos específicos para tumores de alta afinidade.

Exemplo 28 CpG-Ab de células B reduz a população de B-reg

[00867] Foi analisado o efeito do conjugado CpG-Ab de células B direcionado sobre células B-reg esplênicas. Camundongos Balb/C (n = 8) foram tratados com solução salina ou 10 mg/kg de CpG-Ab (SB-337) nos dias 1, 4 e 7. Os camundongos foram sacrificados 14 dias após a última dose. A porcentagem de células Breg esplênicas (CD19 +, B220 +, CD1dhi) foi determinada em relação ao número de células B (B220 +) (FIG. 76A). Além disso, foi determinada a porcentagem de células B-reg esplênicas (CD19 +, B220 +, CD1dhi), em relação ao número total de células (FIG. 76B). A quantificação da porcentagem de células B-reg sob ambos os parâmetros revelou que o tratamento com CpG-mAb reduziu significativamente a população B-reg nos camundongos, em relação ao tratamento com solução salina (FIG. 76A e FIG. 76B). Estes resultados demonstraram que a CpG-Ab de células B reduz a população de B-reg.

Exemplo 29 CpG-Ab de células B expande a população DC em tecidos linfóides secundários

[00868] Para avaliar o efeito do tratamento com CpG-Ab direcionado por células B na população de células dendríticas em

tecidos linfóides secundários, foi utilizado o modelo de tumor sólido CT-26. Os camundongos foram tratados por via intravenosa com solução salina, 5,7 µg/dose de CpG (p347) ou 10 mg/kg de CpG-mAb (SB-337) nos dias 14, 17 e 20. As células dos baços foram isoladas como descrito acima. Foi calculada a porcentagem de células dendríticas mielóides do baço (mDC; B220-, CD11C +, DEC205hi), em relação ao número total de células. A quantificação da porcentagem de mDC do baço revelou que tanto o tratamento com CpG livre como com o CpG-mAb aumentaram significativamente a porcentagem de células mDC, em relação ao tratamento com solução salina ($p = 0,003$; $p = 0,0002$, respectivamente) (FIG. 77A). Além disso, a porcentagem de células mDC após o tratamento com CpG-Ab aumentou significativamente em relação à CpG livre ($p = 0,002$) (FIG. 77A). Tomados em conjunto, esses resultados demonstraram que o tratamento com CpG-Ab expande o pool de mDC no baço.

[00869] Além disso, foi determinada a porcentagem de células mDC de linfonodos reunidos (B220-, CD11C +, CD8 +). O tratamento de camundongos com CpG-mAb resultou em uma porcentagem aumentada de LN mDCs, tanto no linfonodo drenante (dLN) quanto no linfonodo não drenante (ndLN) (FIG. 77B). Contudo, o efeito não foi observado no tratamento com CpG livre (FIG. 77B), o que destaca o efeito diferencial entre o conjugado CpG-Ab e a CpG livre. Os resultados indicaram que os conjugados de CpG-Ab direcionados a células B podem expandir a população de células dendríticas no baço e nos gânglios linfáticos.

Exemplo 30 pDCs contribuem para a atividade CpG-Ab

[00870] Experimentos utilizando o modelo de câncer colorretal CT26 e o modelo de linfoma A20 foram realizados para determinar a contribuição das células dendríticas plasmocitóides (pDCs) na

atividade de CpG-Ab. No modelo colorretal CT-26, os tumores cresceram por 10 dias e, em seguida, os camundongos foram tratados por via intravenosa com solução salina ou 3 mg/kg de CD22-CpG (SB-337) nos dias 10, 13 e 15. Além disso, alguns os camundongos foram injetados intraperitonealmente com anticorpo PDCA1, clone BX444, (300 µg por camundongo), sozinho ou em combinação com CD22-CpG (SB-337) nos dias 10, 13 e 17 para esgotar as células pDC. A progressão do volume do tumor foi medida e os resultados indicaram que a depleção de pDC diminuiu a eficácia de CD22-CpG no modelo colorretal CT-26 (FIG. 78A).

[00871] O modelo de linfoma A20 produziu resultados semelhantes. Os tumores de linfoma A20 foram cultivados por 10 dias e, em seguida, os camundongos foram tratados por via intravenosa com solução salina, ou 3 mg/kg de CD22-CpG (SB-337) nos dias 10, 12 e 14. Além disso, alguns camundongos foram injetados por via intraperitoneal com anticorpo PDCA1, clone BX444 (300 µg por camundongo), sozinho ou em combinação com CD22-CpG (SB-337) nos dias 10, 13 e 17 para esgotar as células pDC. A progressão do volume do tumor foi medida e os resultados indicaram que a depleção de pDC diminuiu a eficácia de CD22-CpG no modelo de linfoma A20 (FIG. 78B). Tomados em conjunto, os resultados demonstraram que os pDCs contribuem para a atividade de CpG-Ab.

Exemplo 31 Infiltrados aumentados de tumor de células T com CpG-mAb

[00872] O efeito dos conjugados de CpG-mAb nos infiltrados de células T foi determinado usando o modelo de linfoma A20. Resumidamente, as células A20 foram inoculadas subcutaneamente em camundongos e nos dias 10, 13 e 17 os camundongos foram

tratados por via intravenosa com solução salina ou 3 mg/kg de CpG-mAb (SB-337) e os animais foram sacrificados 24 horas após a última dose . Em algumas experiências, os camundongos também foram tratados com 10 mg/kg de anti-PD-L1 (FIG. 79D). Os tumores dos camundongos foram removidos, homogeneizados a 4°C, o mRNA foi extraído por métodos padrão e a análise da expressão gênica foi realizada por qPCR para genes de células T, como CD3, CD4, CD8a e CD8b (FIG. 79A; macrófagos Genes, como CD38, GPR18, iNOS, FPR2, Egr2, Arg1, CD206, Adgre1, CD68 e Cd11b (FIG. 79B); genes de citocinas, como IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 , IL-13, IL-21, TNF α , IFN γ e TGF β (FIG. 79C); e genes de enzimas apoptóticas, como granzima B e perforina (FIG. 79D) .Análise da expressão do gene, em relação à peptidilpropil isomerase B Os resultados indicaram que o CpG-mAb aumentou a expressão dos genes das células T (FIG. 79A), dos macrófagos (FIG. 79B) e de certos genes de citocinas (FIG. 79C). O mAb e o CpG-mAb + anti-PD-L1 aumentaram a expressão de genes de enzimas apoptóticas (FIG. 79D) Coletivamente, o perfil de expressão gênica do tumor para os camundongos tratados com CpG-mAb foi consistente com a presença e/ou a ativação de anticorpos imunes. ce lls.

Exemplo 32 Atividade humana de CpG-Ab confirmada

[00873] O efeito dos conjugados CpG-Ab nas células B humanas primárias foi avaliado coletando e reunindo células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de três doadores. Resumidamente, o sangue enriquecido em leucócitos (câmaras LRS) foi obtido no San Diego Blood Bank. Os leucócitos foram isolados pelo protocolo padrão de centrifugação em gradiente de Ficoll. As células B foram ainda isoladas por seleção negativa usando um Kit de Isolamento de células B (Miltenyi). As células B (> 95%

puras) foram ressuspensas em RPMI contendo 10% de FBS e 1% de PS e semeadas em placas de 96 poços (1x10⁵ células/poço). As células foram tratadas com CpG (p425), CpG-Ab (SB-430) ou Ab (hCD22), como indicado, em uma faixa de concentrações e incubadas a 37°C por 48-72 horas.

[00874] Após o tratamento, o meio de cultura foi removido e os níveis de IL-6 secretados foram medidos por ELISA (FIG. 80A). As células foram então colhidas e os marcadores de superfície celular para MHC-II (FIG. 80B), CD86 (FIG. 80C), CD70 (FIG. 80D) e CD20 (FIG. 80E) foram medidos por FACS. Os resultados indicaram que as células B primárias humanas eram mais sensíveis ao tratamento com CpG-Ab, conforme determinado pela concentração de IL-6 secretada (FIG. 80A) e marcadores de superfície para MHC-II (FIG. 80B), CD86 (FIG. 80C), CD70 (FIG. 80D) e CD20 (FIG. 80E).

[00874] Além disso, os esplenócitos primários humanos foram analisados quanto à resposta ao tratamento com conjugados CpG-Ab e CpG livre. Os esplenócitos humanos primários foram adquiridos na Bioreclamation IVT. As células foram ressuspensas em RPMI contendo 10% de FBS e 1% de PS (2x10⁶ células/ml) e semeadas em placas de 96 poços. As células foram tratadas com hCD22-hCpG (SB-430), CpG p1 humana livre ou CpG humana livre (Solstice; p425) nas concentrações indicadas e incubadas a 37°C por 24 horas. O meio de cultura foi removido e a IL-6 secretada foi medida por ELISA. O tratamento com hCD22-hCpG foi capaz de aumentar a concentração de IL-6 em doses mais baixas do que CpG p1 livre ou CpG humano livre (solstício; p425) (FIG. 81). Os valores de EC50 foram de 0,51 nM, 818 nM e 338 nM,

respectivamente, o que forneceu mais evidências de que o hCpG-hAb poderia ativar os esplenócitos humanos.

[00876] Experiências foram conduzidas usando um modelo de camundongo humanizado em camundongos NCG. Este modelo foi criado pela edição seqüencial CRISPR/Cas9 dos locais *Prkdc* e *Il2rg* no mouse NOD/Nju, gerando um mouse coisogênico para o NOD/Nju. O NOD/Nju carrega uma mutação no gene *Sirpa* (*SIRP* α) que permite o enxerto de células-tronco hematopoiéticas estranhas. O nocaute *Prkdc* gera um fenótipo do tipo SCID sem a formação adequada de células T e células B. A nocaute do *Il2rg* gene exacerba ainda mais o fenótipo do tipo SCID, resultando adicionalmente em uma diminuição da produção de células NK. Os murgos foram tratados por via intraperitoneal com PBMC humano fresco e depois desafiados com injeção subcutânea de células Daudi ($2,5 \times 10^6$) dois dias depois (FIG. 82A). Nos dias 12, 14 e 16, os camundongos foram tratados com solução salina, 5 mg/kg de anticorpo hCD22, 5 mg/kg de hCD22-CpG (SB-430) ou 5,7 μ g/dose de CpG livre (p425). O volume médio do tumor foi seguido por 32 dias (FIG. 82B). Os resultados indicaram que os camundongos tratados com hCD22-CpG têm volumes tumorais menores, em relação aos outros grupos de tratamento. Coletivamente, esses resultados indicaram que os conjugados CpG-Ab são eficazes em células humanas.

Exemplo 33

[00877] Para demonstrar e comparar a eficácia do polinucleotídeo contendo CpG de acordo com a presente divulgação com sequências CpG naturalmente existentes, a atividade de NF κ B em células Ramos humanas foi medida depois que as células foram incubadas com o presente polinucleotídeo contendo CpG, quer na forma autônoma ou na forma conjugada e com uma sequência CpG de

classe B naturalmente existente na forma autônoma ou na forma conjugada. Como mostrado na FIG. 58B, o presente conjugado CpG-Ab apresentou atividade significativamente melhorada em comparação com a CpG classe B independente ou conjugada.

Exemplo 34

[00878] Para avaliar se o polinucleotídeo contendo CpG, de acordo com a presente divulgação, ativa a via do complemento, a liberação de C3 foi avaliada através da incubação de soro de macaco com zimosan (controle positivo), sequência CpG de classe B naturalmente existente (p1) ou duas CpG- contendo polinucleotídeos, como aqui fornecido. Como mostrado na FIG. 59, o polinucleotídeo imunoestimulador contendo CpG aqui fornecido não ativou a via do complemento.

Exemplo 35: Atividade biológica de conjugados de anticorpo CpG usando o ensaio de esplenócitos de camundongo

[00879] O baço de camundongo (BALB/c) foi colhido e passado através de uma peneira de 70 µm para gerar uma suspensão de célula única. Os glóbulos vermelhos foram lisados por incubação com tampão de lise RBC por 5 min à temperatura ambiente e depois extinta com meio completo 20: 1. As células foram colhidas por centrifugação suave, lavadas e ressuspensas em RPMI contendo 10% de FBS e 1% de PS (2×10^6 células/mL) e semeadas em placas de 9 poços. Os compostos de teste foram adicionados nas concentrações indicadas e incubados a 37°C por 24 horas. Os meios de cultura foram removidos e a IL-6 secretada foi medida por ELISA. Os resultados estão resumidos na tabela abaixo.

	P18	P347	SB-337 DAR1	SB-337 DAR2
EC ₅₀ (nM)	42	219	0.07	0.11

Exemplo 36: Estudos farmacocinéticos de conjugados de anticorpo CpG

[00880] Para uma única experiência de dosagem, um composto de teste foi administrado a camundongos (BALB/c) a 10 mg/kg IV ou SC. As amostras de soro foram coletadas em momentos pré-determinados para análise e os resultados são mostrados na FIG. 83

[00881] Para uma experiência de dosagem repetida, um composto de teste foi administrado a camundongos a 10 mg/kg IV nos dias 1, 7 e 14. As amostras de soro foram coletadas no dia 14 após a última injeção em pontos de tempo predeterminados para análise e a O perfil de PK foi comparado com outro conjunto de camundongos que receberam apenas uma dose única do composto de teste. Os resultados são mostrados na figura. 84

[00882] Em outro experimento de dosagem única, um conjugado de anticorpo CpG foi administrado a camundongos a 10 mg/kg IV. As amostras de soro foram coletadas em 0,08, 1, 6, 24, 48 e 120 horas após a administração. As amostras de soro foram analisadas pelo anticorpo e pelo conjugado CpG-anticorpo intacto. Os resultados são mostrados na figura. 85

[00883] Em ainda outra experiência de dosagem única, os conjugados CpG-anticorpo foram administrados a camundongos a 10 mg/kg IV. Os camundongos foram sacrificados às 0, 0,08, 1, 6 e 24 horas após a injeção. Amostras de soro, fígado e baço foram analisadas. Os resultados são mostrados na figura. 86

[00884] Em ainda outra experiência de dosagem única, os conjugados CpG-anticorpo foram administrados a camundongos a 10 mg/kg IV. As amostras de soro foram coletadas em momentos pré-determinados e os resultados são mostrados nas FIGS. 87A e 87B.

[00885] Nas experiências farmacêuticas acima, as amostras de soro foram analisadas usando ensaios ELISA. Para determinar a quantidade de um conjugado CpG-anticorpo intacto remanescente, as amostras de soro foram diluídas com uma sequência complementar de CpG biotinilada usando um tampão de bloqueio ELISA e depois incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente. As amostras de soro diluídas foram adicionadas a 100 µL a um poço em uma placa de 96 poços pré-revestida com estreptavidina. Depois que a placa foi incubada à temperatura ambiente por 60 minutos em um agitador de placas e lavada 3 vezes com um tampão de lavagem ELISA, um anticorpo IgG-HRP de cabra anti-rato (100 µL) a uma diluição otimizada no tampão de bloqueio ELISA foi adicionado a cada poço. Após a placa ter sido incubada à temperatura ambiente por 30 minutos em um agitador de placas e lavada 3 vezes com o tampão de lavagem ELISA, uma solução de substrato TMB (100 µL) foi adicionada a cada poço. A placa foi incubada à temperatura ambiente por 15 a 30 minutos ou até que a cor desejada fosse desenvolvida, e uma solução de parada (100 µL) foi então adicionada a cada poço. A placa foi lida a 450 nm. As concentrações intactas do conjugado CpG-anticorpo no soro foram calculadas utilizando uma curva padrão iniciando em 50 nM e diluídas em série no tampão de bloqueio ELISA. O mesmo protocolo foi também utilizado para determinar os conjugados de anticorpo CpG nos tecidos após a homogeneização dos tecidos.

[00886] Para analisar um anticorpo ou a porção de anticorpo de um conjugado CpG-anticorpo, uma placa de 96 poços foi revestida com um domínio extracelular de CD22 de camundongo diluído em PBS. A placa foi incubada a 4 ° C durante a noite, lavada 3 vezes com o tampão de lavagem ELISA e bloqueada com o tampão de bloqueio ELISA por pelo menos 60 minutos à temperatura ambiente. As amostras de soro foram diluídas com um fator de diluição otimizado no tampão de bloqueio ELISA. As amostras de soro diluídas foram adicionadas a 100 µL a um poço na placa de 96 poços. Depois que a placa foi incubada à temperatura ambiente por 60 minutos em um agitador de placas e lavada 3 vezes com o tampão de lavagem ELISA, um anticorpo IgG-HRP de cabra anti-camundongo (100 µL) a uma diluição otimizada no tampão de bloqueio ELISA foi adicionado a cada poço do prato. Após a placa ter sido incubada à temperatura ambiente por 30 minutos em um agitador de placas e lavada 3 vezes com o tampão de lavagem ELISA, uma solução de substrato TMB (100 µL) foi adicionada a cada poço. Após a placa ter sido incubada à temperatura ambiente por 15 a 30 minutos ou até que a cor desejada seja desenvolvida, uma solução de parada (100 µL) foi adicionada a cada poço. A placa foi lida a 450 nm. As concentrações de anticorpos CD22 no soro foram calculadas usando uma curva padrão iniciando em 50 nM e diluídas em série no tampão de bloqueio ELISA.

Outras modalidades

[00887] Várias modificações e variações da invenção descrita serão evidentes para os especialistas na técnica sem se afastar do escopo e espírito da invenção. Embora a invenção tenha sido descrita em conexão com modalidades específicas, deve ser entendido que a invenção como reivindicada não deve ser

indevidamente limitada a essas modalidades específicas. De fato, várias modificações dos modos descritos para a realização da invenção que são óbvias para os especialistas na técnica devem estar dentro do escopo da invenção.

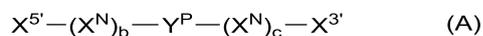
[00888] Outras modalidades estão nas reivindicações.

Listagem de Sequências

[00889] A presente especificação está sendo arquivada com uma cópia de formulário legível por computador (CRF) da Listagem de sequências. O CRF intitulado 14465-001-228_SEQLIST.txt, criado em 11 de abril de 2018 e com 116.262 bytes, é idêntico à cópia em papel da Listagem de Sequências e é incorporado aqui por referência em sua totalidade.

REIVINDICAÇÕES

1. Oligonucleotídeo fórmula (A):



ou um estereoisômero, uma mistura de dois ou mais diastereômeros, um tautômero ou uma mistura de dois ou mais tautômeros; ou um sal, solvato ou hidrato farmacologicamente aceitável do mesmo;

caracterizado por

um cada X^N é independentemente um nucleotídeo;

$X^{3'}$ é um nucleotídeo terminal 3';

$X^{5'}$ é um nucleotídeo terminal 5';

Y^P é um fosfotriéster internucleosídeo; e

b e c são cada um um número inteiro variando de cerca de 0 a cerca de 25; com a condição de que sua soma não seja inferior a 5;

em que o oligonucleotídeo compreende um nucleotídeo com uma nucleobase modificada.

2. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que b é um número inteiro que varia de cerca de 1 a cerca de 15.

3. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que b é um número inteiro de cerca de 3, cerca de 4, cerca de 11 ou cerca de 14.

4. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que b é um número inteiro de cerca de 3.

5. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que b é um número inteiro de cerca de 4.

6. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que b é um número inteiro de cerca de 11.

7. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que b é um número inteiro de cerca de 14.

8. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **caracterizado** pelo fato de que c é um número inteiro que varia de cerca de 0 a cerca de 10.

9. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **caracterizado** pelo fato de que c é um número inteiro de cerca de 0 ou cerca de 8.

10. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **caracterizado** pelo fato de que c é um número inteiro de cerca de 0.

11. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **caracterizado** pelo fato de que c é um número inteiro de cerca de 8.

12. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, **caracterizado** pelo fato de que a soma de b e c varia de cerca de 5 a cerca de 20.

13. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, **caracterizado** pelo fato de que a soma de b e c varia de cerca de 5 a cerca de 15.

14. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, **caracterizado** pelo fato de que a soma de

bec é de cerca de 8, cerca de 9, cerca de 10, cerca de 11, cerca de 12, cerca de 12, cerca de 13 ou cerca de 14.

15. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, **caracterizado** pelo fato de que a soma de bec é de cerca de 11 ou cerca de 14.

16. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, **caracterizado** pelo fato de que a soma de bec é de cerca de 11.

17. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, **caracterizado** pelo fato de que a soma de bec é de cerca de 14.

18. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, **caracterizado** pelo fato de que cada X^N é independentemente um 2'-desoxirribonucleotídeo.

19. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, **caracterizado** pelo fato de que cada X^N é independentemente 2'-desoxiadenosina, 2'-desoxiguananosina, 2'-desoxicitidina, uma 5-halo-2'-desoxicitidina, 2'-desoxitimidina, 2'-deoxiuridina ou uma 5-halo-2'-desoxiuridina.

20. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, **caracterizado** pelo fato de que cada X^N é independentemente 2'-desoxiadenosina, 2'-desoxiguananosina, 2'-desoxicitidina, 2'-desoxitimidina, 5-bromo-2'-desoxiuridina ou 5- iodo-2'-desoxiuridina.

21. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20, **caracterizado** pelo fato de que $X^{3'}$ é um 2'-desoxirribonucleotídeo.

22. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20, **caracterizado** pelo fato de que $X^{3'}$ é 2'-

desoxiadenosina, 2'-desoxiguananosina, 2'-desoxicitidina, uma 5-halo-2'-desoxicitidina, 2'-desoxitimidina, 2'- desoxiuridina ou uma 5-halo-2'-desoxiuridina.

23. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20, **caracterizado** pelo fato de que X^{3'} é 2'-desoxitimidina.

24. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20, **caracterizado** pelo fato de que X^{3'} é um ribonucleotídeo modificado em 2'.

25. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20, **caracterizado** pelo fato de que X^{3'} é um 2'-metoxi-ribonucleotídeo ou 2'-etoxi-metoxi-ribonucleotídeo.

26. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 25, **caracterizado** pelo fato de que X^{5'} é um 2'-desoxirribonucleotídeo.

27. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 25, **caracterizado** pelo fato de que X^{5'} é 2'-desoxiadenosina, 2'-desoxiguananosina, 2'-desoxicitidina, uma 5-halo-2'-desoxicitidina, 2'-desoxitimidina, 2'- desoxiuridina ou uma 5-halo-2'-desoxiuridina.

28. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 25, **caracterizado** pelo fato de que X^{5'} é um 2'-desoxirribonucleotídeo com uma base de pirimidina substituída.

29. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 25, **caracterizado** pelo fato de que X^{5'} é um 2'-desoxirribonucleotídeo com uma base de pirimidina substituída em 5.

30. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 25, **caracterizado** pelo fato de que X^{5'} é 2'-desoxitimidina, 5-halo-2'-desoxicitidina ou 5-halo-2'-desoxiuridina.

31. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 25, **caracterizado** pelo fato de que X^{5'} é uma 5-halo-2'-desoxicitididina.

32. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 25, **caracterizado** pelo fato de que X^{5'} é uma 5-halo-2'-desoxiuridina.

33. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 25, **caracterizado** pelo fato de que X^{5'} é 2'-desoxitimidina, 5-bromo-2'-desoxicitidina, 5-iodo-2'-desoxicitidina, 5-bromo-2'-desoxiuridina, ou 5-iodo-2'-desoxiuridina.

34. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 25, **caracterizado** pelo fato de que X^{5'} é 2'-desoxitimidina, 5-bromo-2'-desoxiuridina ou 5-iodo-2'-desoxiuridina.

35. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 34, **caracterizado** pelo fato de que X^{5'} tem um grupo 3'-fosforotioato.

36. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 35, **caracterizado** pelo fato de que o 3'-fosforotioato é quiral.

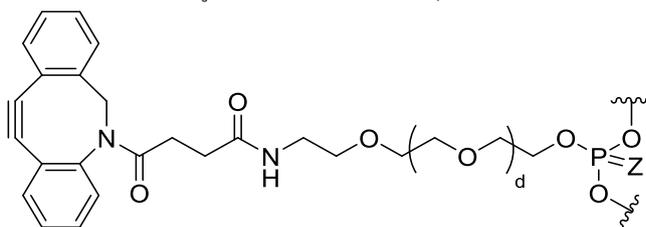
37. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 35, **caracterizado** pelo fato de que o 3'-fosforotioato tem uma quiralidade de Rp.

38. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 35, **caracterizado** pelo fato de que o 3'-fosforotioato tem uma quiralidade de Sp.

39. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 34, **caracterizado** pelo fato de que X^{5'} tem um grupo 3'-fosforotioato com quiralidade de Rp e X^{3'} é um 2'-metoxi ribonucleotídeo ou 2'-etoximetoxi ribonucleotídeo.

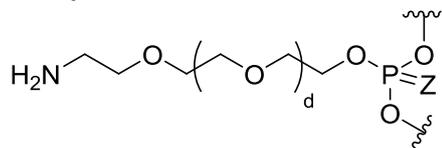
40. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 34, **caracterizado** pelo fato de que X^{5'} tem um grupo 3'-fosforotioato com quiralidade de Sp e X^{3'} é um 2'-metoxi ribonucleotídeo ou 2'-etoximetoxi ribonucleotídeo.

41. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 40, **caracterizado** pelo fato de que Y^P é:



em que Z é O ou S; e d é um número inteiro que varia de 0 a 50.

42. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 40, **caracterizado** pelo fato de que Y^P é:



em que Z é O ou S; e d é um número inteiro que varia de 0 a 50.

43. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 41 ou 42, **caracterizado** pelo fato de que Z é O.

44. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 41 ou 42, **caracterizado** pelo fato de que Z é S.

45. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 41 a 44, **caracterizado** pelo fato de que d é um número inteiro que varia de cerca de 0 a cerca de 10.

46. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 45, **caracterizado** pelo fato de que d é um número inteiro que varia de cerca de 0 a cerca de 5.

47. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 45, **caracterizado** pelo fato de que d é um número inteiro de cerca de 0, cerca de 1 ou cerca de 3.

48. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 47, **caracterizado** pelo fato de que compreende um fosfotriéster internucleosídeo adicional.

49. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 48, **caracterizado** pelo fato de que o fosfotriéster internucleosídeo adicional é um alquilfosfotriéster.

50. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 48, **caracterizado** pelo fato de que o fosfotriéster internucleosídeo adicional é etilfosfotriéster.

51. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 50, **caracterizado** pelo fato de que compreende uma 5-halo-2'-desoxiuridina.

52. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 51, **caracterizado** pelo fato de que a 5-halo-2'-desoxiuridina é 5-bromo-2'-desoxiuridina ou 5-iodo-2'-desoxiuridina.

53. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 52, **caracterizado** pelo fato de que compreende três ou mais 2'-desoxicitidinas.

54. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 53, **caracterizado** pelo fato de que compreende três 2'-desoxicitidinas.

55. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 54, **caracterizado** pelo fato de que compreende três ou mais 2'-desoxiguanosinas.

56. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 55, **caracterizado** pelo fato de que compreende quatro 2'-desoxiguanosinas.

57. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 56, **caracterizado** pelo fato de que compreende três 2'-desoxicitidinas e três 2'-desoxiguanosinas.

58. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 57, **caracterizado** pelo fato de que compreende três 2'-desoxicitidinas e quatro 2'-desoxiguanosinas.

59. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 58, **caracterizado** pelo fato de que compreende três ou mais 2'-desoxitimidinas.

60. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 59, **caracterizado** pelo fato de que compreende três, quatro, cinco, seis, sete ou oito 2'-desoxitimidinas.

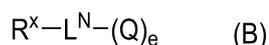
61. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 59, **caracterizado** pelo fato de que compreende três, quatro, cinco ou oito 2'-desoxitimidinas.

62. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 61, **caracterizado** pelo fato de que compreende zero, uma ou duas 2'-desoxiadenosinas.

63. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 62, **caracterizado** pelo fato de que compreende um ou mais fosforotioatos de internucleosídeos.

64. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 63, **caracterizado** pelo fato de que pelo menos um dos fosforotioatos internucleosídeos é quiral.

65. Composto de Fórmula (B):



ou um estereoisômero, uma mistura de dois ou mais diastereômeros, um tautômero ou uma mistura de dois ou mais tautômeros; ou um sal, solvato ou hidrato farmacologicamente aceitável do mesmo; **caracterizado** pelo fato de que:

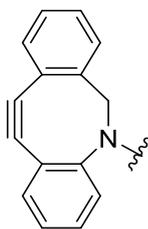
R^x é um grupo conjugador;

L^N é um vinculador;

cada Q é independentemente um oligonucleotídeo compreendendo um fosfotriéster; e

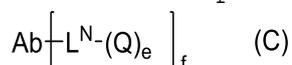
e é um número inteiro de 1, 2, 3 ou 4.

66. Composto de acordo com a reivindicação 65, **caracterizado** pelo fato de que R^x é



67. Composto, de acordo com a reivindicação 65, **caracterizado** pelo fato de que R^x é -NH₂.

68. Composto de Fórmula (C):



ou um estereoisômero, uma mistura de dois ou mais diastereômeros, um tautômero ou uma mistura de dois ou mais tautômeros; ou um sal, solvato ou hidrato farmacologicamente aceitável do mesmo;

caracterizado pelo fato de que:

Ab é um anticorpo;

cada L^N é independentemente um vinculador;

cada Q é independentemente um oligonucleotídeo compreendendo um fosfotriéster;

cada e é independentemente um número inteiro de 1, 2, 3 ou 4; e

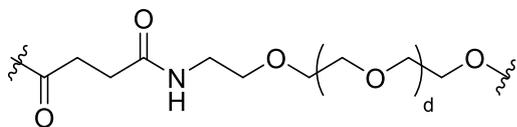
f é um número inteiro de 1, 2, 3 ou 4.

69. Composto, de acordo com a reivindicação 68, **caracterizado** pelo fato de que f é um número inteiro de 1 ou 2.

70. Composto, de acordo com a reivindicação 68, **caracterizado** pelo fato de que f é um número inteiro de 1.

71. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 70, **caracterizado** pelo fato de que L^N é um ligante compreendendo um polietileno glicol.

72. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 71, **caracterizado** pelo fato de que L^N é



, em que d é um número inteiro que varia de cerca de 0 a cerca de 50.

73. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 71, **caracterizado** pelo fato de que L^N é



, em que d é um número inteiro que varia de cerca de 0 a cerca de 50.

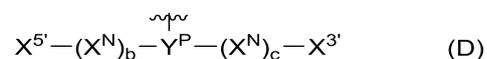
74. Composto, de acordo com a reivindicação 72 ou 73, **caracterizado** pelo fato de que d é um número inteiro que varia de cerca de 0 a cerca de 10.

75. Composto, de acordo com a reivindicação 74, **caracterizado** pelo fato de que d é um número inteiro que varia de cerca de 0 a cerca de 5.

76. Composto, de acordo com a reivindicação 74, **caracterizado** pelo fato de que d é um número inteiro de cerca de 0, cerca de 1 ou cerca de 3.

77. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 76, **caracterizado** pelo fato de que e é um número inteiro de 1.

78. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 77, **caracterizado** pelo fato de que cada Q tem independentemente a estrutura da Fórmula (D):



em que:

cada X^N é independentemente um nucleotídeo;

$X^{3'}$ é um nucleotídeo terminal 3';

$X^{5'}$ é um nucleotídeo terminal 5';

Y^P é um resíduo de um fosfotriéster internucleosídeo; e

b e c são cada um um número inteiro variando de cerca de 0 a cerca de 25; com a condição de que sua soma não seja inferior a 5;

em que o oligonucleotídeo compreende um nucleotídeo com uma nucleobase modificada.

79. Composto, de acordo com a reivindicação 78, **caracterizado** pelo fato de que b é um número inteiro que varia de cerca de 1 a cerca de 15.

80. Composto, de acordo com a reivindicação 78, **caracterizado** pelo fato de que b é um número inteiro de cerca de 3, cerca de 4, cerca de 11 ou cerca de 14.

81. Composto, de acordo com a reivindicação 78, **caracterizado** pelo fato de que b é um número inteiro de cerca de 3.

82. Composto, de acordo com a reivindicação 78, **caracterizado** pelo fato de que b é um número inteiro de cerca de 4.

83. Composto, de acordo com a reivindicação 78, **caracterizado** pelo fato de que b é um número inteiro de cerca de 11.

84. Composto, de acordo com a reivindicação 78, **caracterizado** pelo fato de que b é um número inteiro de cerca de 14.

85. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 78 a 84, **caracterizado** pelo fato de que c é um número inteiro que varia de cerca de 0 a cerca de 10.

86. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 78 a 84, **caracterizado** pelo fato de que c é um número inteiro de cerca de 0 ou cerca de 8.

87. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 78 a 84, **caracterizado** pelo fato de que c é um número inteiro de cerca de 0.

88. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 78 a 84, **caracterizado** pelo fato de que c é um número inteiro de cerca de 8.

89. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 78 a 88, **caracterizado** pelo fato de que a soma de bec varia de cerca de 5 a cerca de 20.

90. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 78 a 88, **caracterizado** pelo fato de que a soma de bec varia de cerca de 5 a cerca de 15.

91. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 78 a 88, **caracterizado** pelo fato de que a soma de bec é de cerca de 8, cerca de 9, cerca de 10, cerca de 11, cerca de 12, cerca de 13 ou cerca de 14.

92. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 78 a 91, **caracterizado** pelo fato de que cada X^N é independentemente um 2'-desoxirribonucleotídeo.

93. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 78 a 91, **caracterizado** pelo fato de que cada X^N é independentemente 2'-desoxiadenosina, 2'-desoxiguananosina, 2'-desoxicitidina, uma 5-halo-2'-desoxicitidina, 2'-desoxitimidina, 2'-deoxiuridina ou uma 5-halo-2'-desoxiuridina.

94. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 78 a 91, **caracterizado** pelo fato de que cada X^N é independentemente 2'-desoxiadenosina, 2'-desoxiguananosina, 2'-desoxicitidina, 2'-desoxitimidina, 5-bromo-2'-desoxiuridina ou 5- iodo-2'-desoxiuridina.

95. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 78 a 94, **caracterizado** pelo fato de que $X^{3'}$ é um 2'-desoxirribonucleotídeo.

96. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 78 a 91, **caracterizado** pelo fato de que $X^{3'}$ é 2'-desoxiadenosina, 2'-desoxiguananosina, 2'-desoxicitidina, uma 5-

halo-2'-desoxicitidina, 2'-desoxitimidina, 2'- desoxiuridina ou uma 5-halo-2'-desoxiuridina.

97. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 78 a 91, **caracterizado** pelo fato de que X^{3'} é 2'-desoxitimidina.

98. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 78 a 94, **caracterizado** pelo fato de que X^{3'} é um ribonucleotídeo 2'modificado.

99. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 78 a 94, **caracterizado** pelo fato de que X^{3'} é um 2'-metoxi-ribonucleotídeo ou 2'-etoxi-metoxi-ribonucleotídeo.

100. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 78 a 99, **caracterizado** pelo fato de que X^{5'} é um 2'-desoxirribonucleotídeo.

101. Composto, de acordo com a reivindicação 100, **caracterizado** pelo fato de que X^{5'} é 2'-desoxiadenosina, 2'-desoxiguanosina, 2'-desoxicitididina, 5-halo-2'-desoxicitididina, 2'-desoxitimidina, 2'-desoxitimidina, 2'-desoxiuridina ou 5-halo -2'-desoxiuridina.

102. Composto, de acordo com a reivindicação 100, **caracterizado** pelo fato de que X^{5'} é um 2'-desoxirribonucleotídeo com uma base de pirimidina substituída.

103. Composto, de acordo com a reivindicação 102, **caracterizado** pelo fato de que X^{5'} é um 2'-desoxirribonucleotídeo com uma base de pirimidina substituída em 5.

104. Composto, de acordo com a reivindicação 102, **caracterizado** pelo fato de que X^{5'} é 2'-desoxitimidina, 5-halo-2'-desoxititidina ou 5-halo-2'-desoxituridina.

105. Composto, de acordo com a reivindicação 102, **caracterizado** pelo fato de que X^{5'} é 2'-desoxitimidina, 5-bromo-2'-desoxicitidina, 5-iodo-2'-desoxicitidina, 5-bromo-2'-desoxituridina ou 5-iodo-2'-deoxiuridina.

106. Composto, de acordo com a reivindicação 102, **caracterizado** pelo fato de que X^{5'} é 2'-desoxitimidina, 5-bromo-2'-desoxiuridina ou 5-iodo-2'-desoxiuridina.

107. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 78 a 106, **caracterizado** pelo fato de que X^{5'} tem um grupo 3'-fosforotioato.

108. Composto, de acordo com a reivindicação 107, **caracterizado** pelo fato de que o 3'-fosforotioato é quiral.

109. Composto, de acordo com a reivindicação 107, **caracterizado** pelo fato de que o 3'-fosforotioato tem uma quiralidade de Rp.

110. Composto, de acordo com a reivindicação 107, **caracterizado** pelo fato de que o 3'-fosforotioato tem uma quiralidade de Sp.

111. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 78 a 107, **caracterizado** pelo fato de que X^{5'} tem um grupo 3'-fosforotioato com quiralidade de Rp e X^{3'} é um 2'-metoxi-ribonucleotídeo ou 2'-etoximetoxi-ribonucleotídeo.

112. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 78 a 107, **caracterizado** pelo fato de que X^{5'} tem um grupo 3'-fosforotioato com quiralidade de Sp e X^{3'} é um 2'-metoxi-ribonucleotídeo ou 2'-etoximetoxi-ribonucleotídeo.

113. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 78 a 112, **caracterizado** pelo fato de que compreende um fosfotriéster internucleosídeo adicional.

114. Composto, de acordo com a reivindicação 113, **caracterizado** pelo fato de que o fosfotriéster internucleosídeo adicional é um alquilfosfotriéster.

115. Composto, de acordo com a reivindicação 113, **caracterizado** pelo fato de que o fosfotriéster internucleosídeo adicional é etilfosfotriéster.

116. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 78 a 115, **caracterizado** pelo fato de que compreende uma 5-halo-2'-desoxiuridina.

117. Composto, de acordo com a reivindicação 116, **caracterizado** pelo fato de que a 5-halo-2'-desoxiuridina é 5-bromo-2'-desoxiuridina ou 5-iodo-2'-desoxiuridina.

118. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 78 a 117, **caracterizado** pelo fato de que compreende três ou mais 2'-desoxicitidinas.

119. Composto, de acordo com a reivindicação 118, **caracterizado** pelo fato de que compreende três 2'-desoxicitidinas.

120. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 78 a 119, **caracterizado** pelo fato de que compreende quatro ou mais 2'-desoxiguanosinas.

121. Composto, de acordo com a reivindicação 120, **caracterizado** pelo fato de que compreende quatro 2'-desoxiguanosinas.

122. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 78 a 121, **caracterizado** pelo fato de que compreende três 2'-desoxicitidinas e quatro 2'-desoxicitidinas.

123. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 78 a 122, **caracterizado** pelo fato de que compreende três ou mais 2'-desoxitimidinas.

124. Composto, de acordo com a reivindicação 123, **caracterizado** pelo fato de que compreende três, quatro, cinco, seis, sete ou oito 2'-desoxitimidinas.

125. Composto, de acordo com a reivindicação 123, **caracterizado** pelo fato de que compreende três, quatro, cinco ou oito 2'-desoxitimidinas.

126. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 78 a 125, **caracterizado** pelo fato de que compreende zero, uma ou duas 2'-desoxiadenosinas.

127. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 74 a 126, **caracterizado** pelo fato de que compreende um ou mais fosforotioatos internucleosídeos.

128. Composto, de acordo com a reivindicação 127, **caracterizado** pelo fato de que pelo menos um dos fosforotioatos internucleosídeos é quiral.

129. Oligonucleotídeo com uma sequência de $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$, **caracterizado** pelo fato de que:

x é um número inteiro que varia de 1 a 4;

N^1 está ausente ou 2'-desoxitimidina;

N^2 é um 2'-desoxirribonucleotídeo com uma nucleobase modificada;

N^3 é 2'-desoxiadenosina ou 2'-desoxitimidina, cada um opcionalmente compreendendo um 3'-fosfotriéster;

N^4 é 2'-desoxiadenosina ou 2'-desoxitimidina; e

N^5 é 2'-desoxitimidina opcionalmente compreendendo um 3'-fosfotriéster.

130. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 129, **caracterizado** pelo fato de que x é um número inteiro de 1 ou 4.

131. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 129 ou 130, **caracterizado** pelo fato de que x é um número inteiro de 1.

132. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 129 a 131, **caracterizado** pelo fato de que N^1 está ausente.

133. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 129 a 131, **caracterizado** pelo fato de que N^1 é 2'-desoxitimidina.

134. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 129 a 133, **caracterizado** pelo fato de que N^2 é um 2'-desoxirribonucleotídeo com uma base de pirimidina substituída.

135. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 134, **caracterizado** pelo fato de que N^2 é um 2'-desoxirribonucleotídeo com uma base de pirimidina substituída em 5.

136. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 134, **caracterizado** pelo fato de que N^2 é uma 5-halo-2'-desoxicitidina ou uma 5-halo-2'-desoxiuridina.

137. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 134, **caracterizado** pelo fato de que N^2 é 5-bromo-2'-desoxiuridina ou 5-iodo-2'-desoxiuridina.

138. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 129 a 137, **caracterizado** pelo fato de que N^3 é 2'-desoxiadenosina compreendendo um 3'-fosfotriéster.

139. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 129 a 137, **caracterizado** pelo fato de que N³ é 2'-desoxitimidina.

140. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 129 a 137, **caracterizado** pelo fato de que N³ é 2'-desoxitimidina compreendendo um 3'-fosfotriéster.

141. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 129 a 140, **caracterizado** pelo fato de que N⁴ é 2'-desoxiadenosina.

142. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 129 a 140, **caracterizado** pelo fato de que N⁴ é 2'-desoxitimidina.

143. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 129 a 142, **caracterizado** pelo fato de que N⁵ é 2'-desoxitimidina.

144. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 129 a 142, **caracterizado** pelo fato de que N⁵ é 2'-desoxitimidina compreendendo um 3'-fosfotriéster.

145. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 129 a 144, **caracterizado** pelo fato de que compreende um ou mais fosforotioatos de internucleosídeos.

146. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 145, **caracterizado** pelo fato de que pelo menos um dos fosforotioatos internucleosídeos é quirais.

147. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 129, **caracterizado** por ter a sequência da SEQ ID NO: p236, p238, p243, p246, p275, p276, p308, p313, p347, p361, p362, p425, p433, p434, p435, p436, p437, p438, p477, p478, p479, p480, p481, p482, p483, p484, p485, p486, p487, p488 ou p489.

148. Polinucleotídeo imunomodulador **caracterizado** pelo fato de que compreende um ou mais espaçadores abásicos ou fosfotriésteres internucleosídeos.

149. Polinucleotídeo imunomodulador de acordo com a reivindicação 148, **caracterizado** pelo fato de que o polinucleotídeo imunomodulador compreende uma 5-halouridina.

150. Polinucleotídeo imunomodulador, de acordo com a reivindicação 149, **caracterizado** pelo fato de que a 5-halouridina é pelo menos um dos dois nucleosídeos do terminal 5' ou está presente em uma sequência imunoestimuladora (ISS) no polinucleotídeo imunomodulador.

151. Polinucleotídeo imunomodulador da reivindicação 149 ou 150, **caracterizado** pelo fato de que a 5-halouridina é uma 5-bromouridina.

152. Polinucleotídeo imunomodulador, de acordo com a reivindicação 149 ou 150, **caracterizado** pelo fato de que a 5-halouridina é uma 5-iodouridina.

153. Polinucleotídeo imunomodulador de qualquer uma das reivindicações 149 a 152, **caracterizado** pelo fato de que a 5-halouridina compreende uma posição 3' ligada a um fosfodiéster fosfodiéster internucleosídeo.

154. Polinucleotídeo imunomodulador de qualquer uma das reivindicações 149 a 152, **caracterizado** pelo fato de que a 5-halouridina compreende uma posição 3' ligada a um fosforotioato de fosfodiéster internucleosídeo.

155. Polinucleotídeo imunomodulador **caracterizado** por compreender uma 5-bromouridina 5'-terminal.

156. Polinucleotídeo imunomodulador de qualquer uma das reivindicações 148 a 155, **caracterizado** pelo fato de que o

polinucleotídeo imunomodulador compreende um ou mais fosfotriésteres internucleosídeos.

157. Polinucleotídeo imunomodulador, de acordo com a reivindicação 156, **caracterizado** pelo fato de que o um ou mais fosfotriésteres internucleosídeos são de um a cinco fosfotriésteres internucleosídeos.

158. Polinucleotídeo imunomodulador da reivindicação 156 ou 157, **caracterizado** pelo fato de que pelo menos um dos fosfotriésteres internucleosídeos compreende um grupo conjugador.

159. Polinucleotídeo imunomodulador da reivindicação 156 ou 157, **caracterizado** pelo fato de que pelo menos um dos fosfotriésteres internucleosídeos é um fosfotiotriéster compreendendo um grupo conjugador.

160. Polinucleotídeo imunomodulador de qualquer uma das reivindicações 148 a 159, **caracterizado** pelo fato de que compreende ainda um fosfoéster terminal.

161. Polinucleotídeo imunomodulador, de acordo com a reivindicação 160, **caracterizado** pelo fato de que o fosfoéster terminal é um fosfoéster 5'-terminal.

162. Polinucleotídeo imunomodulador, de acordo com a reivindicação 160, **caracterizado** pelo fato de que o fosfoéster terminal é um fosfoéster 3'-terminal.

163. Polinucleotídeo imunomodulador de qualquer uma das reivindicações 160 a 162, **caracterizado** pelo fato de que o fosfoéster terminal compreende um grupo conjugador.

164. Polinucleotídeo imunomodulador da reivindicação 163, **caracterizado** pelo fato de que o fosfoéster terminal é um fosfotiotriéster compreendendo um grupo conjugador.

165. Polinucleotídeo imunomodulador de qualquer uma das reivindicações 148 a 164, **caracterizado** pelo fato de que compreende uma extremidade 5' ou extremidade 3'.

166. Polinucleotídeo imunomodulador, de acordo com a reivindicação 165, **caracterizado** pelo fato de que o polinucleotídeo imunomodulador compreende a extremidade 5' que é uma extremidade 5'-5'.

167. Polinucleotídeo imunomodulador, de acordo com a reivindicação 165, **caracterizado** pelo fato de que a extremidade 5'-5' compreende um grupo conjugador ligado covalentemente a um fosfato internucleosídeo, fosforotioato internucleosídeo ou fosforoditioato internucleosídeo.

168. Polinucleotídeo imunomodulador, de acordo com a reivindicação 165, **caracterizado** pelo fato de que o polinucleotídeo imunomodulador compreende a extremidade 3' compreendendo um grupo conjugador ligado covalentemente a um fosfato internucleosídeo, fosforotioato internucleosídeo ou fosforoditioato internucleosídeo.

169. Polinucleotídeo imunomodulador de qualquer uma das reivindicações 146 a 168, **caracterizado** pelo fato de que o polinucleotídeo imunomodulador compreende uma sequência imunoestimuladora no terminal 5'.

170. Polinucleotídeo imunomodulador, de acordo com a reivindicação 169, **caracterizado** pelo fato de que pelo menos um dos fosfotriésteres internucleosídeos está ligado a um átomo de carbono 3' de um nucleosídeo com um átomo de carbono 5' que está ligado a uma sequência imunoestimuladora no terminal 5'.

171. Polinucleotídeo imunomodulador de qualquer uma das reivindicações 148 a 170, **caracterizado** pelo fato de que o

polinucleotídeo imunomodulador compreende um ou mais espaçadores abásicos.

172. Polinucleotídeo imunomodulador de qualquer uma das reivindicações 148 a 172, **caracterizado** pelo fato de que o um ou mais espaçadores abásicos são um ou dois espaçadores abásicos.

173. Polinucleotídeo imunomodulador de qualquer uma das reivindicações 148 a 173, **caracterizado** pelo fato de que pelo menos um dos espaçadores abásicos é um espaçador abásico internucleosídeo.

174. Polinucleotídeo imunomodulador de qualquer uma das reivindicações 148 a 173, **caracterizado** pelo fato de que pelo menos um dos espaçadores abásicos é um espaçador abásico do terminal 3'.

175. Polinucleotídeo imunomodulador de qualquer uma das reivindicações 148 a 174, **caracterizado** pelo fato de que pelo menos um dos espaçadores abásicos compreende um grupo conjugador.

176. Polinucleotídeo imunomodulador de qualquer uma das reivindicações 148 a 175, **caracterizado** pelo fato de que o polinucleotídeo imunomodulador compreende um total de 6 a 16 nucleotídeos.

177. Polinucleotídeo imunomodulador de qualquer uma das reivindicações 148 a 176, **caracterizado** pelo fato de que pelo menos 50% dos grupos de ligação internucleosídeos no polinucleotídeo imunomodulador compreendem fosforotioatos.

178. Polinucleotídeo imunomodulador, de acordo com a reivindicação 177, **caracterizado** pelo fato de que pelo menos 80%

dos grupos de ligação internucleosídeos no polinucleotídeo imunomodulador compreendem fosforotioatos.

179. Polinucleotídeo imunomodulador de qualquer uma das reivindicações 148 a 178, **caracterizado** pelo fato de que compreende ainda um grupo conjugador ligado covalentemente a uma nucleobase no polinucleotídeo imunomodulador.

180. Polinucleotídeo imunomodulador da reivindicação 148 ou 179, **caracterizado** pelo fato de que o polinucleotídeo imunomodulador compreende citidina e guanossina como o segundo e o terceiro nucleosídeos.

181. Polinucleotídeo imunomodulador da reivindicação 148 ou 180, **caracterizado** pelo fato de que o polinucleotídeo imunomodulador compreende citidina e guanossina como o terceiro e quarto nucleosídeos.

182. Polinucleotídeo imunomodulador da reivindicação qualquer uma das reivindicações 148 a 181, **caracterizado** pelo fato de que compreende ainda uma ou mais porções auxiliares.

183. Polinucleotídeo imunomodulador de acordo com a reivindicação 182, **caracterizado** pelo fato de que o polinucleotídeo imunomodulador compreende uma fração de conjugação e em que a fração de conjugação compreende pelo menos uma das porções auxiliares.

184. Polinucleotídeo imunomodulador da reivindicação 182 ou 183, **caracterizado** pelo fato de que pelo menos uma das porções auxiliares compreende um poli (etileno glicol) (PEG) com um peso molecular de 100 Da a 2.500 Da.

185. Polinucleotídeo imunomodulador, de acordo com a reivindicação 183, **caracterizado** pelo fato de que cada PEG

compreende independentemente um total de pelo menos 3 unidades repetidoras de etileno glicol.

186. Polinucleotídeo imunomodulador da reivindicação 182 ou 185, **caracterizado** pelo fato de que cada PEG compreende independentemente um total de pelo menos 20 unidades repetitivas de etileno glicol.

187. Polinucleotídeo imunomodulador de qualquer uma das reivindicações 184 a 186, **caracterizado** pelo fato de que cada PEG compreende independentemente um total de 50 ou menos unidades repetidoras de etileno glicol.

188. Polinucleotídeo imunomodulador de qualquer uma das reivindicações 182 a 187, **caracterizado** pelo fato de que o polinucleotídeo imunomodulador compreende de um a oito PEGs.

189. Polinucleotídeo imunomodulador, de acordo com qualquer uma das reivindicações 148 a 188, **caracterizado** pelo fato de que compreende um grupo de capeamento 5' selecionado do grupo que consiste em monofosfato, difosfato, trifosfato, uma fração auxiliar, um fosfodiéster terminal, um fosfotriéster terminal, um 5'-5' cap e um grupo -OR', em que R' é selecionado do grupo que consiste em um grupo bioreversível, um grupo não bioreversível e um grupo O-protetor.

190. Polinucleotídeo imunomodulador, de acordo com a reivindicação 189, **caracterizado** pelo fato de que o grupo de cobertura 5' é monofosfato ou o fosfodiéster terminal compreendendo alquil C₁₋₆ opcionalmente substituído ligado a fosfato, fosforotioato ou fosforoditioato.

191. Polinucleotídeo imunomodulador, de acordo com qualquer uma das reivindicações 148 a 190, **caracterizado** pelo fato de que compreende um grupo de capeamento 3' selecionado do

grupo que consiste em monofosfato, difosfato, trifosfato, uma porção auxiliar, um fosfodiéster terminal, um fosfotriéster terminal e um grupo -OR', em que R' é selecionado do grupo que consiste em um grupo bioreversível, um grupo não bioreversível e um grupo O-protetor.

192. Polinucleotídeo imunomodulador, de acordo com a reivindicação 191, **caracterizado** pelo fato de que o grupo de cobertura 3' é monofosfato ou o fosfodiéster terminal compreendendo alquil C₁₋₆ opcionalmente substituído ligado a fosfato, fosforotioato ou fosforoditioato.

193. Polinucleotídeo imunomodulador de qualquer uma das reivindicações 148 a 192, **caracterizado** pelo fato de que compreende uma nucleobase ligada a uma fração de conjugação.

194. Polinucleotídeo imunomodulador hibridado **caracterizado** pelo fato de que compreende o polinucleotídeo imunomodulador de qualquer uma das reivindicações 148 a 193 hibridizado com um polinucleotídeo complementar.

195. Composição **caracterizada** pelo fato de que compreende o polinucleotídeo imunomodulador de qualquer uma das reivindicações 148 a 194, em que o polinucleotídeo imunomodulador compreende pelo menos um fosforotioato de internucleosídeo enriquecido estereoquimicamente.

196. Composição, de acordo com a reivindicação 195, **caracterizada** pelo fato de que pelo menos um fosforotioato de internucleosídeo estereoquimicamente enriquecido é disposto entre um nucleosídeo do terminal 5' e a citidina de CpG em uma sequência imunoestimulante no polinucleotídeo imunomodulador.

197. Composição, de acordo com a reivindicação 195 ou 196, **caracterizada** pelo fato de que o fosforotioato de

internucleosídeo estereoquimicamente enriquecido é *S*-estereogênico.

198. Composição, de acordo com a reivindicação 195 ou 196, **caracterizada** pelo fato de que o fosforotioato de internucleosídeo estereoquimicamente enriquecido é *R*-estereogênico.

199. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 195 ou 198, **caracterizada** pelo fato de que pelo menos um fosforotioato de internucleosídeo estereoquimicamente enriquecido está ligado ao átomo de carbono 5' da citidina de CpG em uma sequência imunestimulante no polinucleotídeo imunomodulador.

200. Composição, de acordo com a reivindicação 199, **caracterizada** pelo fato de que o fosforotioato de internucleosídeo estereoquimicamente enriquecido é *S*-estereogênico.

201. Composição, de acordo com a reivindicação 199, **caracterizada** pelo fato de que o fosforotioato de internucleosídeo estereoquimicamente enriquecido é *R*-estereogênico.

202. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 195 a 201, **caracterizada** pelo fato de que um fosforotioato de internucleosídeo estereoquimicamente enriquecido conecta o primeiro e o segundo nucleosídeos no polinucleotídeo imunomodulador.

203. Composição, de acordo com a reivindicação 202, **caracterizada** pelo fato de que o fosforotioato de internucleosídeo estereoquimicamente enriquecido é *S*-estereogênico.

204. Composição, de acordo com a reivindicação 202, **caracterizada** pelo fato de que o fosforotioato de internucleosídeo estereoquimicamente enriquecido é *R*-estereogênico.

205. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 195 a 204, **caracterizada** pelo fato de que um fosforotioato de internucleosídeo estereoquimicamente enriquecido conecta o quarto e o quinto nucleosídeos no polinucleotídeo imunomodulador.

206. Composição, de acordo com a reivindicação 205, **caracterizada** pelo fato de que o fosforotioato de internucleosídeo estereoquimicamente enriquecido é *S*-estereogênico.

207. Composição, de acordo com a reivindicação 205, **caracterizada** pelo fato de que o fosforotioato de internucleosídeo estereoquimicamente enriquecido é *R*-estereogênico.

208. Conjugado **caracterizado** pelo fato de que compreende um anticorpo ou um fragmento de anticorpo e um ou mais polinucleotídeos imunomoduladores, o anticorpo ou o fragmento de anticorpo compreendendo um marcador Q, e cada um dos polinucleotídeos imunomodulados independentemente, compreendendo um ligante covalentemente ligado ao marcador Q.

209. Conjugado, de acordo com a reivindicação 208, **caracterizado** pelo fato de que o marcador Q é um marcador Q no terminal N.

210. Conjugado, de acordo com a reivindicação 208, **caracterizado** pelo fato de que o marcador Q é um marcador Q do terminal C.

211. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 208 a 210, **caracterizado** pelo fato de que o marcador Q está disposto em uma cadeia pesada do anticorpo ou do fragmento de anticorpo.

212. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 208 a 210, **caracterizado** pelo fato de que o marcador Q está disposto em uma cadeia leve do anticorpo ou do fragmento de anticorpo.

213. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 208 a 212, **caracterizado** pelo fato de que pelo menos um dos polinucleotídeos imunomodulados compreende uma uridina 5 modificada ou citidina 5 modificada.

214. Conjugado **caracterizado** pelo fato de que compreende uma fração alvo e um ou mais polinucleotídeos imunomodulados, cada um dos polinucleotídeos imunomodulados compreendendo independentemente um ligante, em que a fração alvo está ligada covalentemente ao ligante, em que pelo menos um dos polinucleotídeos imunomodulados compreende uma uridina modificada em 5 ou citidina 5-modificada.

215. Conjugado, de acordo com a reivindicação 213 ou 214, **caracterizado** pelo fato de que pelo menos um dos polinucleotídeos imunomodulados compreende uma uridina 5 modificada.

216. Conjugado, de acordo com a reivindicação 215, **caracterizado** pelo fato de que a uridina 5 modificada é 5-halouridina, 5-alciniluridina ou 5-heterocicliluridina.

217. Conjugado, de acordo com a reivindicação 216, **caracterizado** pelo fato de que a uridina 5 modificada é 5-halouridina.

218. Conjugado, de acordo com a reivindicação 216 ou 217, **caracterizado** pelo fato de que a 5-halouridina é 5-bromouridina.

219. Conjugado, de acordo com a reivindicação 216 ou 217, **caracterizado** pelo fato de que a 5-halouridina é 5-iodouridina.

220. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 213 a 219, **caracterizado** pelo fato de que a uridina 5 modificada é um dos dois nucleotídeos do terminal 5' de pelo menos um dos polinucleotídeos imunomodulados.

221. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 213 a 220, **caracterizado** pelo fato de que a uridina modificada em 5 compreende uma posição 3' ligada a um fosfato de fosfoéster internucleosídeo.

222. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 213 a 220, **caracterizado** pelo fato de que a uridina modificada em 5 compreende uma posição 3' ligada a um fosforotioato de fosfotioato internucleosídeo.

223. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 208 a 222, **caracterizado** pelo fato de que pelo menos um dos polinucleotídeos imunomodulados compreende citidina e guanossina como o segundo e o terceiro nucleosídeos.

224. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 208 a 222, **caracterizado** pelo fato de que pelo menos um dos polinucleotídeos imunomodulados compreende citidina e guanossina como o terceiro e quarto nucleosídeos.

225. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 208 a 224, **caracterizado** pelo fato de que pelo

menos um dos polinucleotídeos imunomodulados compreende um total de 6 a 16 nucleotídeos.

226. Conjugado **caracterizado** pelo fato de que compreende uma fração alvo e um ou mais polinucleotídeos imunomodulados, cada um dos polinucleotídeos imunomodulados compreendendo independentemente um ligante, em que a fração alvo é ligada covalentemente ao ligante, pelo menos um dos polinucleotídeos imunomodulados compreendendo um total de 6 a 16 nucleotídeos.

227. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 208 a 226, **caracterizado** pelo fato de que pelo menos um dos polinucleotídeos imunomodulados compreende um ou mais espaçadores abásicos ou fosfotriésteres internucleosídeos.

228. Conjugado **caracterizado** pelo fato de que compreende uma porção de direcionamento e um ou mais polinucleotídeos imunomodulados, cada um dos polinucleotídeos imunomodulados compreendendo independentemente um ligante, em que a porção de direcionamento está ligada covalentemente ao ligante, pelo menos um dos polinucleotídeos imunomodulados compreendendo um ou mais espaçadores abásicos ou fosfotriésteres internucleosídeos.

229. Conjugado, de acordo com a reivindicação 228, **caracterizado** pelo fato de que pelo menos um espaçador abásico ou pelo menos um fosfotriéster compreende o ligante.

230. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 208 a 229, **caracterizado** pelo fato de que pelo menos um dos polinucleotídeos imunomodulados compreende um ou mais espaçadores abásicos.

231. Conjugado, de acordo com a reivindicação 239, **caracterizado** pelo fato de que o um ou mais espaçadores abásicos internucleosídeos são um ou dois espaçadores abásicos.

232. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 226 a 231, **caracterizado** pelo fato de que pelo menos um dos espaçadores abásicos é um espaçador abásico internucleosídeo.

233. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 226 a 232, **caracterizado** pelo fato de que pelo menos um dos espaçadores abásicos é um espaçador abásico do terminal 3'.

234. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 208 a 233, **caracterizado** pelo fato de que pelo menos um dos polinucleotídeos imunomodulados compreende um ou mais fosfotriésteres internucleosídeos.

235. Conjugado, de acordo com a reivindicação 243, **caracterizado** pelo fato de que o um ou mais fosfotriésteres internucleosídeos são de um a cinco fosfotriésteres internucleosídeos.

236. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 208 a 235, **caracterizado** pelo fato de que o conjugado compreende ainda uma ou mais porções auxiliares ligadas ao ligante.

237. Conjugado **caracterizado** pelo fato de que compreende uma porção de direcionamento, uma ou mais porções auxiliares e um ou mais polinucleotídeos imunomodulados, cada um dos polinucleotídeos imunomodulados compreendendo independentemente um ligante ligado à porção direcionada.

238. Conjugado, de acordo com a reivindicação 236 ou 237, **caracterizado** pelo fato de que pelo menos uma das porções auxiliares compreende um poli (etileno glicol) (PEG) com um peso molecular de 100 Da a 2.500 Da.

239. Conjugado, de acordo com a reivindicação 238, **caracterizado** pelo fato de que cada PEG compreende independentemente um total de pelo menos 3 unidades repetitivas de etileno glicol.

240. Conjugado, de acordo com a reivindicação 238 ou 239, **caracterizado** pelo fato de que cada PEG compreende independentemente um total de pelo menos 20 unidades repetitivas de etileno glicol.

241. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 238 a 240, **caracterizado** pelo fato de que cada PEG compreende independentemente um total de 50 ou menos unidades repetidoras de etileno glicol.

242. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 238 a 241, **caracterizado** pelo fato de que o conjugado compreende de um a oito PEGs.

243. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 208 a 242, **caracterizado** pelo fato de que a porção de direcionamento é uma porção de ligação ao antígeno, um polipeptídeo, um aptâmero ou um grupo incluindo uma ou mais moléculas pequenas.

244. Conjugado, de acordo com a reivindicação 243, **caracterizado** pelo fato de que a porção de direcionamento é uma porção de ligação ao antígeno.

245. Conjugado, de acordo com a reivindicação 243, **caracterizado** pelo fato de que a fração alvo é um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo.

246. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 208 a 245, **caracterizado** pelo fato de que um grupo de cobertura 5' em pelo menos um dos polinucleotídeos imunomodulados é selecionado a partir do grupo que consiste em monofosfato, difosfato, trifosfato, uma fração auxiliar, um fosfodiéster terminal, um fosfotriéster terminal e um grupo -OR', em que R' é selecionado do grupo que consiste em um grupo bioreversível, um grupo não bioreversível e um grupo O-protetor.

247. Conjugado, de acordo com a reivindicação 246, **caracterizado** pelo fato de que o grupo de cobertura 5' é monofosfato ou o fosfodiéster terminal compreendendo alquil C₁₋₆ opcionalmente substituído, ligado a fosfato, fosforotioato ou fosforoditioato.

248. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 208 a 257, **caracterizado** pelo fato de que um grupo de cobertura 3' em pelo menos um dos polinucleotídeos imunomodulados é selecionado a partir do grupo que consiste em monofosfato, difosfato, trifosfato, uma fração auxiliar, um fosfodiéster terminal, um fosfotriéster terminal e um grupo -OR', em que R' é selecionado do grupo que consiste em um grupo bioreversível, um grupo não bioreversível e um grupo O-protetor.

249. Conjugado, de acordo com a reivindicação 248, **caracterizado** pelo fato de que o grupo de cobertura 3' é monofosfato ou o fosfodiéster terminal compreendendo alquil C₁₋₆ opcionalmente substituído, ligado a fosfato, fosforotioato ou fosforoditioato.

250. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 208 a 249, **caracterizado** pelo fato de que pelo menos um dos polinucleotídeos imunomodulados compreende uma nucleobase ligada ao ligante.

251. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 208 a 250 **caracterizado** pelo fato de que o conjugado compreende de um a seis polinucleotídeos imunomodulados.

252. Conjugado, de acordo com a reivindicação 251, **caracterizado** pelo fato de que o conjugado compreende de um a quatro polinucleotídeos imunomodulados.

253. Conjugado, de acordo com a reivindicação 252, **caracterizado** pelo fato de que o conjugado compreende apenas um polinucleotídeo imunomodulador.

254. Conjugado, de acordo com a reivindicação 253, **caracterizado** pelo fato de que o conjugado compreende apenas dois polinucleotídeos imunomodulados.

255. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 208 a 254, **caracterizado** pelo fato de que o conjugado compreende uma fração alvo.

256. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 208 a 252, **caracterizado** pelo fato de que o polinucleotídeo imunomodulador compreende uma sequência imunoestimulante humana dentro de quatro nucleotídeos 5'-terminais.

257. Conjugado, de acordo com a reivindicação 246, **caracterizado** pelo fato de que a sequência imunoestimulante humana dentro de quatro nucleotídeos do terminal 5' do polinucleotídeo imunomodulador compreende citidina

compreendendo um átomo de carbono 5' ligado a um fosfoéster substituído por um nucleosídeo.

258. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 208 a 277, **caracterizado** pelo fato de que pelo menos um dos polinucleotídeos imunomodulados compreende uma uridina 5 modificada ou citidina 5 modificada.

259. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 208 a 258, **caracterizado** pelo fato de que pelo menos um dos polinucleotídeos imunomodulados é hibridizado com seu complemento.

260. Composição, **caracterizada** pelo fato de que compreende o conjugado de qualquer uma das reivindicações 208 a 259, em que pelo menos um dos polinucleotídeos imunomodulados compreende pelo menos um fosforotioato de internucleosídeo enriquecido estereoquimicamente.

261. Composição **caracterizada** pelo fato de que compreende um conjugado compreendendo uma fração alvo e um ou mais polinucleotídeos imunomodulados, cada um dos polinucleotídeos imunomodulados compreendendo independentemente um ligante, em que a fração alvo está ligada covalentemente ao ligante, pelo menos um dos polinucleotídeos imunomodulados compreendendo pelo menos um fosforotioato de internucleosídeo enriquecido estereoquimicamente.

262. Composição, de acordo com a reivindicação 260 ou 261, **caracterizada** pelo fato de que pelo menos um fosforotioato de internucleosídeo estereoquimicamente enriquecido é disposto entre um nucleosídeo do terminal 5' e a citidina de CpG em uma sequência imunoestimulante no polinucleotídeo imunomodulador.

263. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 260 a 262, **caracterizada** pelo fato de que o fosforotioato de internucleosídeo estereoquimicamente enriquecido é *S*-estereogênico.

264. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 260 a 263, **caracterizada** pelo fato de que o fosforotioato de internucleosídeo estereoquimicamente enriquecido é *R*-estereogênico.

265. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 260 a 264, **caracterizada** pelo fato de que pelo menos um fosforotioato de internucleosídeo estereoquimicamente enriquecido está ligado ao átomo de carbono 5' da citidina de CpG em uma sequência imunoestimulante no polinucleotídeo imunomodulador.

266. Composição, de acordo com a reivindicação 265, **caracterizada** pelo fato de que o fosforotioato de internucleosídeo estereoquimicamente enriquecido é *S*-estereogênico.

267. Composição, de acordo com a reivindicação 265, **caracterizada** pelo fato de que o fosforotioato de internucleosídeo estereoquimicamente enriquecido é *R*-estereogênico.

268. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 260 a 267, **caracterizada** pelo fato de que pelo menos um fosforotioato de internucleosídeo estereoquimicamente enriquecido conecta o primeiro e o segundo nucleosídeos no polinucleotídeo imunomodulador.

269. Composição, de acordo com a reivindicação 268, **caracterizada** pelo fato de que o fosforotioato de

internucleosídeo estereoquimicamente enriquecido é *S*-estereogênico.

270. Composição, de acordo com a reivindicação 268, **caracterizada** pelo fato de que o fosforotioato de internucleosídeo estereoquimicamente enriquecido é *R*-estereogênico.

271. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 260 a 270, **caracterizada** pelo fato de que pelo menos um fosforotioato de internucleosídeo estereoquimicamente enriquecido conecta o quarto e o quinto nucleosídeos no polinucleotídeo imunomodulador.

272. Composição, de acordo com a reivindicação 271, **caracterizada** pelo fato de que o fosforotioato de internucleosídeo estereoquimicamente enriquecido é *S*-estereogênico.

273. Composição, de acordo com a reivindicação 271, **caracterizada** pelo fato de que o fosforotioato de internucleosídeo estereoquimicamente enriquecido é *R*-estereogênico.

274. Composição farmacêutica **caracterizada** por compreender um transportador farmacêuticamente aceitável e o polinucleotídeo imunomodulador de qualquer uma das reivindicações 148 a 194, a composição de qualquer uma das reivindicações 185 a 207, o conjugado de qualquer uma das reivindicações 208 a 259 ou a composição de qualquer uma das reivindicações 260 a 273.

275. Método para modular um receptor endossômico do tipo Toll em uma célula **caracterizado** por compreender o receptor endossômico do tipo Toll, o método compreendendo o contato da

célula com o polinucleotídeo imunomodulador de qualquer uma das reivindicações 148 a 194, a composição de qualquer uma das reivindicações 195 a 207, o conjugado de qualquer uma das reivindicações 208 a 259, a composição de qualquer uma das reivindicações 260 a 273 ou a composição farmacêutica da reivindicação 283 em condições que permitem que os polinucleotídeos imunomodulados sejam transportados para a célula, em que, após o contato, a atividade do receptor endossômico do tipo Toll é modulada.

276. Método, de acordo com a reivindicação 275, **caracterizado** pelo fato de que o polinucleotídeo imunomodulador é um polinucleotídeo imunoestimulador e em que o método é para agonizar um receptor endossômico do tipo Toll.

277. Método, de acordo com a reivindicação 274, **caracterizado** pelo fato de que o polinucleotídeo imunomodulador é um polinucleotídeo imunossupressor e em que o método é para antagonizar um receptor endossômico do tipo Toll.

278. Método para induzir uma ou mais citocinas em uma célula apresentadora de antígeno compreendendo um receptor endossômico do tipo Toll, **caracterizado** pelo fato de que o método compreende o contato da célula apresentadora de antígeno com o polinucleotídeo imunomodulador de qualquer uma das reivindicações 148 a 194, a composição de qualquer uma das reivindicações 195 a 207, o conjugado de qualquer uma das reivindicações 208 a 259, a composição de qualquer uma das reivindicações 260 a 273 ou a composição farmacêutica da reivindicação 274, em condições que permitem que o um ou mais polinucleotídeos imunomodulados sejam transportados para o meio. célula, em que, após o contato, o nível de pelo menos uma

citocina na célula é aumentado e em que a fração alvo tem como alvo a célula apresentadora de antígeno,

em que o polinucleotídeo imunomodulador é um polunucleotídeo imunoestimulador.

279. Método, de acordo com a reivindicação 278, **caracterizado** pelo fato de que a célula apresentadora de antígeno é uma célula B.

280. Método, de acordo com a reivindicação 278 ou 279, **caracterizado** pelo fato de que pelo menos uma das uma ou mais citocinas é uma citocina inflamatória.

281. Método, de acordo com a reivindicação 278, **caracterizado** pelo fato de que a célula apresentadora de antígeno é uma célula dendrítica plasmocitóide e em que a fração alvo reconhece a célula dendrítica plasmocitóide.

282. Método, de acordo com a reivindicação 278, **caracterizado** pelo fato de que a célula apresentadora de antígeno é um macrófago.

283. Método, de acordo com a reivindicação 278, **caracterizado** pelo fato de que pelo menos uma das citocinas é um interferon do tipo I.

284. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 275 a 283, **caracterizado** pelo fato de que o receptor de Toll é TLR9.

285. Método de tratamento de um tumor líquido em um paciente, o método **caracterizado** por compreender a administração ao paciente de uma quantidade eficaz do polinucleotídeo imunomodulador de qualquer uma das reivindicações 1 a 45, a composição de qualquer uma das reivindicações 148 a 194, a composição de qualquer uma das reivindicações 195 a 205, o

conjugado de qualquer uma das reivindicações 208 a 259, a composição de qualquer uma das reivindicações 260 a 273, ou a composição farmacêutica da reivindicação 274, em que a fração alvo tem como alvo células B e em que a imunomodulação polinucleotídeo é um polinucleotídeo imunoestimulador que é um agonista de TLR9.

286. Método, de acordo com a reivindicação 285, **caracterizado** pelo fato de que o tumor líquido é um tumor hematológico.

287. Método, de acordo com a reivindicação 286, **caracterizado** pelo fato de que o tumor hematológico é um linfoma.

288. Método, de acordo com a reivindicação 287, **caracterizado** pelo fato de que o linfoma é uma célula B não-Hodgkin linfoma.

289. Método, de acordo com a reivindicação 288, **caracterizado** pelo fato de que o linfoma é linfoma de células do manto, linfoma difuso de grandes células B, linfoma folicular, leucemia linfocítica crônica ou mieloma múltiplo.

290. Método de tratamento de um tumor sólido em um paciente, **caracterizado** por compreender a administração ao paciente do polinucleotídeo imunomodulador de qualquer uma das reivindicações 148 a 194, a composição de qualquer uma das reivindicações 195 a 207, o conjugado de qualquer uma das reivindicações 208 a 259, a composição de qualquer uma das reivindicações 260 a 273, ou a composição farmacêutica da reivindicação 274, em que a fração alvo tem como alvo células dendríticas plasmocitóides e em que o polinucleotídeo imunomodulador é um polinucleotídeo imunoestimulador que é um agonista de TLR9.

291. Polinucleotídeo imunomodulador de acordo com qualquer uma das reivindicações 148 a 194, **caracterizado** pelo fato de que o polinucleotídeo imunomodulador é um polinucleotídeo imunoestimulador.

292. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 208 a 259, **caracterizado** pelo fato de que o polinucleotídeo imunomodulador é um polinucleotídeo imunoestimulador.

293. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 195 a 2207 e 260 a 273, **caracterizada** pelo fato de que o polinucleotídeo imunomodulador é um polinucleotídeo imunoestimulador.

294. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 274, **caracterizada** pelo fato de que o polinucleotídeo imunomodulador é um polinucleotídeo imunoestimulador.

295. Polinucleotídeo imunomodulador de qualquer uma das reivindicações 1 a 45, **caracterizado** pelo fato de que o polinucleotídeo imunomodulador é um polinucleotídeo imunossupressor.

296. Conjugado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 208 a 259, **caracterizado** pelo fato de que o polinucleotídeo imunomodulador é um polinucleotídeo imunossupressor.

297. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 195 a 207 e 260 a 273, **caracterizada** pelo fato de que o polinucleotídeo imunomodulador é um polinucleotídeo imunossupressor.

298. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 283, **caracterizada** pelo fato de que o polinucleotídeo imunomodulador é um polinucleotídeo imunossupressor.

299. Método de tratamento de câncer em um sujeito com câncer, **caracterizado** pelo fato de que compreende a administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz do polinucleotídeo imunomodulador de qualquer uma das reivindicações 148 a 194, a composição de qualquer uma das reivindicações 195 a 207, o conjugado de qualquer uma das reivindicações 208 a 259, a composição de qualquer uma das reivindicações 260 a 273, ou a composição farmacêutica da reivindicação 274 ao sujeito.

300. Método, de acordo com a reivindicação 299, **caracterizado** pelo fato de que o câncer é um tumor líquido.

301. Método, de acordo com a reivindicação 300, **caracterizado** pelo fato de que o tumor líquido é um tumor hematológico.

302. Método, de acordo com a reivindicação 301, **caracterizado** pelo fato de que o tumor hematológico é um linfoma.

303. Método, de acordo com a reivindicação 302, **caracterizado** pelo fato de que o linfoma é um linfoma de células B não Hodgkin, um linfoma de células do manto, um linfoma difuso de células B grandes, um linfoma folicular, uma leucemia linfocítica crônica ou mieloma múltiplo.

304. Método, de acordo com a reivindicação 299, **caracterizado** pelo fato de que o câncer é um tumor sólido.

305. Método, de acordo com a reivindicação 304, **caracterizado** pelo fato de que o tumor sólido é um carcinoma do cólon, um melanoma ou um câncer de cabeça e pescoço.

306. Método, de acordo com a reivindicação 299, **caracterizado** pelo fato de que a fração alvo é um anticorpo ou fragmento de anticorpo.

307. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 299 a 305, **caracterizado** pelo fato de que a fração alvo se liga a um antígeno em uma célula apresentadora de antígeno (APC).

308. Método, de acordo com a reivindicação 307, **caracterizado** pelo fato de que o APC é uma célula B, uma célula dendrítica plasmocitóide (pDC) ou um macrófago.

309. Método, de acordo com a reivindicação 307, **caracterizado** pelo fato de que o antígeno é CD19, CD20, CD22, CD30, CD38, CD79 ou CD79b. CD205, BDCA2, BDCA4 ou PD-L1.

310. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 299 a 309, **caracterizado** pelo fato de que o conjugado é administrado sistemicamente.

311. Método, de acordo com a reivindicação 310, **caracterizado** pelo fato de que o conjugado é administrado por injeção intravenosa (i.v.).

312. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 299 a 311, **caracterizado** pelo fato de que o polinucleotídeo imunomodulador é um agonista de TLR9.

313. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 299 a 312, **caracterizado** pelo fato de que a quantidade é eficaz para aumentar uma resposta imune adaptativa ao câncer.

314. Método, de acordo com a reivindicação 313, **caracterizado** pelo fato de que a quantidade é eficaz para aumentar a imunidade mediada por células.

315. Método, de acordo com a reivindicação 313, **caracterizado** pelo fato de que a quantidade é eficaz para aumentar o infiltrado de tumor de células T em um tumor sólido.

316. Método, de acordo com a reivindicação 315, **caracterizado** pelo fato de que a célula T é uma célula T CD4+ ou CD8+.

317. Método, de acordo com a reivindicação 313, **caracterizado** pelo fato de que a quantidade é eficaz para aumentar uma imunidade antitumoral sustentada no paciente.

318. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 299 a 317, **caracterizado** pelo fato de que a quantidade é eficaz para inibir o crescimento do tumor ou reduzir o tamanho do tumor no sujeito.

319. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 299 a 318, **caracterizado** pelo fato de que a administração do conjugado resulta em um aumento menor de uma citocina inflamatória no sujeito em relação a uma administração do polinucleotídeo imunomodulador em uma forma não conjugada.

320. Método, de acordo com a reivindicação 319, **caracterizado** pelo fato de que a citocina inflamatória é IL-6, IL-10 ou TNF γ .

321. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 299 a 320, **caracterizado** pelo fato de que a quantidade não é eficaz para ativar a via do complemento no sujeito.

322. Método, de acordo com a reivindicação 321, **caracterizado** pelo fato de que a quantidade não é eficaz para ativar o complemento C3 no sujeito.

323. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 299 a 322, **caracterizado** pelo fato de que o câncer é um inibidor do ponto de verificação ou câncer refratário ou recidivado.

324. Método, de acordo com a reivindicação 323, **caracterizado** pelo fato de que o inibidor do ponto de verificação é um inibidor de PD-1, inibidor de PD-L1 ou inibidor de CTLA-4.

325. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 299 a 324, **caracterizado** pelo fato de que compreende a administração de um inibidor de ponto de verificação ao sujeito.

326. Método, de acordo com a reivindicação 325, **caracterizado** pelo fato de que o inibidor de ponto de verificação é um inibidor de PD-1, um inibidor de PD-L1 ou um inibidor de CTLA-4.

327. Método, de acordo com a reivindicação 325, **caracterizado** pelo fato de que o inibidor do ponto de verificação é um anticorpo anti-PD1, um anticorpo anti-PD-L1 ou um anticorpo anti-CTLA-4.

328. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 299 a 327, **caracterizado** pelo fato de que compreende a administração de um agonista de células T ao sujeito.

329. Método, de acordo com a reivindicação 328, **caracterizado** pelo fato de que o agonista de células T é um agonista de OX-40, ICOS ou 4-1 BB.

330. Método de tratamento de um tumor que não é de célula B em um sujeito com câncer, **caracterizado** pelo fato de que compreende a administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz do polinucleotídeo imunomodulador de qualquer uma das reivindicações 1 a 45, a composição de qualquer uma das reivindicações 46-58, a conjugado de qualquer uma das reivindicações 148 a 194, composição de qualquer uma das reivindicações 195 a 207, conjugado de qualquer uma das reivindicações 208 a 259, composição de qualquer uma das reivindicações 260 a 273 ou composição farmacêutica da reivindicação 274 ao sujeito, em que a fração alvo se liga a um antígeno de células B.

331. Método para tratar um tumor sólido em um indivíduo com câncer, **caracterizado** pelo fato de que compreende a administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz do polinucleotídeo imunomodulador de qualquer uma das reivindicações 148 a 194, a composição de qualquer uma das reivindicações 195 a 207, o conjugado de qualquer uma das reivindicações das reivindicações 208 a 259, a composição de qualquer uma das reivindicações 260 a 273, ou a composição farmacêutica da reivindicação 274, em que a fração alvo se liga a um antígeno de célula B.

332. Método de tratamento de um tumor líquido em um sujeito com câncer, **caracterizado** pelo fato de compreender a administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz do polinucleotídeo imunomodulador de qualquer uma das reivindicações 148 a 194, a composição de qualquer uma das reivindicações 195 a 207, o conjugado de qualquer uma das reivindicações das reivindicações 208 a 259, a composição de

qualquer uma das reivindicações 260 a 273, ou a composição farmacêutica da reivindicação 274 ao sujeito, em que a fração alvo se liga a um antígeno APC.

333. Método, de acordo com a reivindicação 332, **caracterizado** pelo fato de que o antígeno APC é um antígeno pDC ou macrófago.

334. Método de tratamento de câncer em um sujeito com câncer, **caracterizado** pelo fato de compreender a administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz do polinucleotídeo imunomodulador de qualquer uma das reivindicações 148 a 194, a composição de qualquer uma das reivindicações 195 a 207, o conjugado de qualquer uma das reivindicações 208 a 259, a composição de qualquer uma das reivindicações 260 a 273, ou a composição farmacêutica da reivindicação 274 e um ponto de verificação inibidor do sujeito.

335. Método, de acordo com a reivindicação 354, **caracterizado** pelo fato de que o inibidor de ponto de verificação é um inibidor de PD-1, um inibidor de PD-L1 ou um inibidor de CTLA-4.

336. Método, de acordo com a reivindicação 335, **caracterizado** pelo fato de que o inibidor do ponto de verificação é um anticorpo anti-PD1, um anticorpo anti-PD-L1 ou um anticorpo anti-CTLA-4.

337. Método de tratamento de câncer em um sujeito com câncer, **caracterizado** pelo fato de compreender a administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz do polinucleotídeo imunomodulador de qualquer uma das reivindicações 148 a 194, a composição de qualquer uma das reivindicações 195 a 207, o conjugado de qualquer uma das reivindicações 208 a 259, a

composição de qualquer uma das reivindicações 260 a 273, ou a composição farmacêutica da reivindicação 274 e um agonista de células T.

338. Método, de acordo com a reivindicação 337, **caracterizado** pelo fato de que o agonista de células T é um agonista de OX-40, ICOS ou 4-1 BB.

339. Composição farmacêutica, **caracterizada** pelo fato de que compreende o polinucleotídeo imunomodulador de qualquer uma das reivindicações 148 a 194, a composição de qualquer uma das reivindicações 195 a 207, o conjugado de qualquer uma das reivindicações 208 a 259, a composição de qualquer uma das reivindicações 260 a 273, ou a composição farmacêutica da reivindicação 274, ou a composição farmacêutica da reivindicação 125 e um inibidor de ponto de verificação

340. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 339, **caracterizada** pelo fato de que compreende ainda um excipiente ou solvente farmacêuticamente aceitável.

341. Composição farmacêutica, **caracterizada** por compreender o polinucleotídeo imunomodulador de qualquer uma das reivindicações 148 a 194, a composição de qualquer uma das reivindicações 195 a 207, o conjugado de qualquer uma das reivindicações 208 a 259, a composição de qualquer uma das reivindicações 260 a 273, ou a composição farmacêutica da reivindicação 274 e um agonista de células T.

342. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 350, **caracterizada** pelo fato de que compreende ainda um excipiente ou solvente farmacêuticamente aceitável.

343. Polinucleotídeo imunomodulador de acordo com qualquer uma das reivindicações 148 a 194, composição de qualquer

uma das reivindicações 195 a 207, conjugado de qualquer uma das reivindicações 208 a 259, composição de qualquer uma das reivindicações 260 a 273 ou composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 274, **caracterizado** pelo fato de que a porção de direcionamento se liga a um antígeno APC e em que o conjugado é capaz de suprimir a proliferação de um tumor líquido ou um tumor sólido em um sujeito.

344. Polinucleotídeo imunomodulador de acordo com qualquer uma das reivindicações 148 a 194, composição de qualquer uma das reivindicações 195 a 207, conjugado de qualquer uma das reivindicações 208 a 259, composição de qualquer uma das reivindicações 260 a 273 ou composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 274, **caracterizado** pelo fato de que a porção de direcionamento se liga a um antígeno de células B e em que o conjugado é capaz de suprimir a proliferação de um tumor de células B em um sujeito.

345. Polinucleotídeo imunomodulador de qualquer uma das reivindicações 148 a 194, composição de qualquer uma das reivindicações 195 a 207, conjugado de qualquer uma das reivindicações 208 a 259, composição de qualquer uma das reivindicações 260 a 273 ou composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 274, **caracterizado** pelo fato de que a porção de direcionamento se liga a um antígeno de células B e em que o conjugado é capaz de suprimir a proliferação de um tumor que não é de célula B em um sujeito.

346. Polinucleotídeo imunomodulador de acordo com qualquer uma das reivindicações 148 a 194, composição de qualquer uma das reivindicações 195 a 207, conjugado de qualquer uma das reivindicações 208 a 259, composição de qualquer uma das

reivindicações 260 a 273 ou composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 274, **caracterizada** pelo fato de que a porção de direcionamento se liga a um antígeno de células B e em que o conjugado é capaz de suprimir a proliferação de um tumor sólido em um sujeito.

347. Polinucleotídeo imunomodulador de acordo com qualquer uma das reivindicações 148 a 194, composição de qualquer uma das reivindicações 195 a 207, conjugado de qualquer uma das reivindicações 208 a 259, composição de qualquer uma das reivindicações 260 a 273 ou composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 274, **caracterizada** pelo fato de que a porção de direcionamento se liga a um antígeno pDC ou macrófago e em que o conjugado é capaz de suprimir a proliferação de um tumor líquido em um sujeito.

348. Polinucleotídeo imunomodulador de acordo com qualquer uma das reivindicações 148 a 194, composição de qualquer uma das reivindicações 195 a 207, conjugado de qualquer uma das reivindicações 208 a 259, composição de qualquer uma das reivindicações 260 a 273 ou composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 274, **caracterizado** pelo fato de que a fração alvo se liga a um antígeno pDC ou macrófago e em que o conjugado é capaz de suprimir a proliferação de um tumor sólido em um sujeito.

349. Polinucleotídeo imunomodulador de acordo com qualquer uma das reivindicações 148 a 194, composição de qualquer uma das reivindicações 195 a 207, conjugado de qualquer uma das reivindicações 208 a 259, composição de qualquer uma das reivindicações 260 a 273 ou composição farmacêutica, de acordo

com a reivindicação 274, **caracterizado** pelo fato de que o conjugado é capaz de aumentar a imunidade mediada por células.

350. Polinucleotídeo imunomodulador de acordo com qualquer uma das reivindicações 148 a 194, composição de qualquer uma das reivindicações 195 a 207, conjugado de qualquer uma das reivindicações 208 a 259, composição de qualquer uma das reivindicações 260 a 273 ou composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 274, **caracterizado** pelo fato de que o conjugado é capaz de aumentar a infiltração de tumor de células T em um sujeito.

351. Polinucleotídeo imunomodulador de acordo com qualquer uma das reivindicações 148 a 194, composição de qualquer uma das reivindicações 195 a 207, conjugado de qualquer uma das reivindicações 208 a 259, composição de qualquer uma das reivindicações 260 a 273 ou composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 274, **caracterizado** pelo fato de que a célula T é uma célula T CD4+ ou CD8+.

352. Polinucleotídeo imunomodulador de acordo com qualquer uma das reivindicações 148 a 194, composição de qualquer uma das reivindicações 195 a 207, conjugado de qualquer uma das reivindicações 208 a 259, composição de qualquer uma das reivindicações 260 a 273 ou composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 274, **caracterizado** pelo fato de que o conjugado é capaz de aumentar a imunidade antitumoral adaptativa em um sujeito.

353. Polinucleotídeo imunomodulador de acordo com qualquer uma das reivindicações 148 a 194, composição de qualquer uma das reivindicações 195 a 207, conjugado de qualquer uma das reivindicações 208 a 259, composição de qualquer uma das

reivindicações 260 a 273 ou composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 274, **caracterizado** pelo fato de que o conjugado é capaz de estimular a secreção ou expressão de IFN γ em um sujeito.

354. Polinucleotídeo imunomodulador de acordo com qualquer uma das reivindicações 148 a 194, composição de qualquer uma das reivindicações 195 a 207, conjugado de qualquer uma das reivindicações 208 a 259, composição de qualquer uma das reivindicações 260 a 273 ou composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 274, **caracterizado** pelo fato de que o conjugado não ativa a via do complemento em um sujeito.

355. Polinucleotídeo imunomodulador de acordo com qualquer uma das reivindicações 148 a 194, composição de qualquer uma das reivindicações 195 a 207, conjugado de qualquer uma das reivindicações 208 a 259, composição de qualquer uma das reivindicações 260 a 273 ou composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 274, **caracterizado** pelo fato de que o conjugado não ativa o complemento C3 no sujeito.

356. Método de tratamento de câncer em um sujeito com câncer, **caracterizado** por compreender a administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um imunoconjugado CpG-Ab ao sujeito, em que o imunoconjugado CpG-Ab não se liga a um antígeno associado a um tumor (TAA).

357. Método, de acordo com a reivindicação 356, **caracterizado** pelo fato de que o imunoconjugado CpG-Ab se liga especificamente a um antígeno alvo associado a uma célula imune normal que expressa pelo menos um receptor do tipo Toll.

358. Método, de acordo com a reivindicação 357, **caracterizado** pelo fato de que a célula imune normal expressa TLR9.

359. Método, de acordo com a reivindicação 357 ou 358, **caracterizado** pelo fato de que a célula imune normal é uma célula apresentadora de antígeno (APC).

360. Método, de acordo com a reivindicação 359, **caracterizado** pelo fato de que o APC é uma célula B, uma célula dendrítica ou um macrófago.

361. Método, de acordo com a reivindicação 360, **caracterizado** pelo fato de que o antígeno alvo é selecionado a partir do grupo que consiste em uma molécula MHC, uma molécula co-estimulatória de células T, uma molécula de ponto de verificação imune, um antígeno específico de células B, um antígeno específico de antígeno de célula dendrítica e um específico de macrófago antígeno.

362. Método, de acordo com a reivindicação 361, **caracterizado** pelo fato de que a molécula de MHC é selecionada dentre as moléculas de MHC de classe I e MHC de classe II.

363. Método, de acordo com a reivindicação 361 ou 362, **caracterizado** pelo fato de que a molécula co-estimuladora de células T é selecionada da lista que consiste em OX40, CD2, CD27, CDS, ICAM-1, LFA-1/CD11a/CD18, ICOS/CD278, 4-1BB/CD137, GITR, CD30, CD40, BAFRR, HVEM, CD7, LIGHT, NKG2C, SLAMF7, NKp80, CD160, B7-H3 e CD83.

364. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 361 a 363, **caracterizado** pelo fato de que a molécula do ponto de verificação imune é selecionada da lista que consiste em PD-1, PD-L1, PD-L2, TIM-3, LAG-3, CEACAM-1,

CEACAM -5, CLTA-4, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD47, CD160, 2B4, CD172a e TGFR.

365. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 361 a 364, **caracterizado** pelo fato de que o antígeno alvo é selecionado do grupo que consiste em CD1, CD2, CD5, CD6, CD9, CD9, CD11, CD17, CD18, CD19, CD20, CD21, CD21, CD22, CD23, CD24. CD25, CD26, CD27, CD30, CD38, CD40, CD44, CD45R (B220), CD49, CD52, CD56, CD74, CD79b, CD93, CD123, CD138, CD163, CD205, CD206, CD274, CD303 e CD304.

366. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 356 a 363, **caracterizado** pelo fato de que os imunocombinados CpG-Ab compreendem um polinucleotídeo imunostimulador selecionado da Tabela 2.

367. Método, de acordo com a reivindicação 366, **caracterizado** pelo fato de que os imunocombinados CpG-Ab compreendem um polinucleotídeo imunostimulador selecionado a partir do grupo que consiste em p236, p238, p243, p246, p275, p276, p308, p313, p347, p361, p362, p425, p433, p434, p435, p436, p437, p438, p477, p478, p479, p480, p481, p482, p483, p484, p485, p486, p487, p488 e p489.

368. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 356 a 367, **caracterizado** pelo fato de que os imunocombinados CpG-Ab não são combinados com um epítipo de célula T.

369. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 356 a 367, **caracterizado** pelo fato de que o epítipo da célula T é um epítipo da ovalbumina (OVA).

370. Método de tratamento de câncer em um sujeito com câncer, **caracterizado** pelo fato de que compreende a

administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um imunoc conjugado CpG-Ab ao sujeito, em que o imunoc conjugado CpG-Ab se liga especificamente a um antígeno associado a um tumor (TAA), em que o TAA é não é um antígeno selecionado do grupo que consiste em CD19, CD20, CD22, STAT3, exportando 7, Her2, Src, EGFR, CD52, CXCR-4, Muc-1 e DNA.

371. Método, de acordo com a reivindicação 370, **caracterizado** pelo fato de que a ligação do imunoc conjugado CpG-Ab ao TAA facilita a internalização do imunoc conjugado CpG-Ab em uma célula cancerígena que expressa o TAA.

372. Método, de acordo com a reivindicação 370 ou 371, **caracterizado** pelo fato de que a ligação do imunoc conjugado CpG-Ab ao TAA facilita o transporte do imunoc conjugado CpG-Ab para o endossoma da célula cancerígena que expressa o TAA.

373. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 370 a 372, **caracterizado** pelo fato de que a ligação do imunoc conjugado CpG-Ab ao TAA facilita a ativação de uma via de sinalização TLR9 em uma célula cancerígena que expressa o TAA.

374. Método, de acordo com a reivindicação 373, **caracterizado** pelo fato de que o TAA e o TLR9 estão localizados na mesma membrana celular da célula cancerosa que expressa o TAA.

375. Método, de acordo com a reivindicação 374, **caracterizado** pelo fato de que o TAA e o TLR9 estão localizados na membrana celular da célula cancerosa que expressa o TAA.

376. Método, de acordo com a reivindicação 374, **caracterizado** pelo fato de que o TAA e o TLR9 estão localizados

na membrana endossômica da célula cancerígena que expressa o TAA.

377. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 370 a 376, **caracterizado** pelo fato de que a ligação do imunocombinado CpG-Ab ao TAA induz apoptose da célula cancerosa que expressa o TAA.

378. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 370 a 377, **caracterizado** pelo fato de que o TAA não é expresso por uma célula imune normal.

379. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 370 a 377, **caracterizado** pelo fato de que o TAA é expresso por uma célula imune normal.

380. Método, de acordo com a reivindicação 379, **caracterizado** pelo fato de que a célula imune normal é uma célula apresentadora de antígeno (APC).

381. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 370 a 380, **caracterizado** pelo fato de que o TAA é selecionado do grupo que consiste em CD8, CD11b, CD11c, CD14, CD33, CD40, CD123, CD157, CD168, CD169, CD172a, CD200, CD204, CD205 , CD301, CD302, CD303, CD304, CD205 e CD206.

382. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 370 a 381, **caracterizado** pelo fato de que o imunocombinado CpG-Ab não é conjugado ao TAA ou a qualquer outro TAA expresso pelo câncer.

383. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 370 a 382, **caracterizado** pelo fato de que os imunocombinados CpG-Ab compreendem um polinucleotídeo imunostimulador selecionado da Tabela 2.

384. Método, de acordo com a reivindicação 383, **caracterizado** pelo fato de que os imunocombinados CpG-Ab compreendem um polinucleotídeo imunostimulador selecionado a partir do grupo que consiste em p236, p238, p243, p246, p275, p276, p308, p313, p347, p361, p362, p425, p433, p434, p435, p436, p437, p438, p477, p478, p479, p480, p481, p482, p483, p484, p485, p486, p487, p488 e p489.

385. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 370 a 384, **caracterizado** pelo fato de que o imunocombinado CpG-Ab não está combinado com um epítipo de célula T.

386. Método, de acordo com a reivindicação 385, **caracterizado** pelo fato de que o epítipo da célula T é ovalbumina (OVA).

387. Método de tratamento de um câncer refratário ou resistente à imunoterapia em um sujeito com câncer refratário ou resistente à imunoterapia, **caracterizado** pelo fato de que compreende a administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um imunocombinado CpG-Ab ao sujeito.

388. Método, de acordo com a reivindicação 387, **caracterizado** pelo fato de que o imunocombinado CpG-Ab não se liga a um antígeno associado a um tumor.

389. Método, de acordo com a reivindicação 388, **caracterizado** pelo fato de que o imunocombinado CpG-Ab se liga especificamente a um antígeno alvo associado a uma célula imune normal que expressa pelo menos um receptor do tipo Toll.

390. Método, de acordo com a reivindicação 387, **caracterizado** pelo fato de que o imunocombinado CpG-Ab se liga especificamente a um antígeno associado a um tumor.

391. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 387 a 390, **caracterizado** pelo fato de que o câncer é resistente ao tratamento com um modulador de ponto de verificação imune.

392. Método, de acordo com a reivindicação 391, **caracterizado** pelo fato de que o método compreende ainda a co-administração ao sujeito do modulador do ponto de verificação imune.

393. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 387 a 392, **caracterizado** pelo fato de que os imunoconjugados CpG-Ab compreendem um polinucleotídeo imunoestimulador selecionado da Tabela 2.

394. Método, de acordo com a reivindicação 393, **caracterizado** pelo fato de que os imunoconjugados CpG-Ab compreendem um polinucleotídeo imunoestimulador selecionado a partir do grupo que consiste em p236, p238, p243, p246, p275, p276, p308, p313, p347, p361, p362, p425, p433, p434, p435, p436, p437, p438, p477, p478, p479, p480, p481, p482, p483, p484, p485, p486, p487, p488 e p489.

395. Método para prevenir o câncer em um sujeito em necessidade do mesmo, **caracterizado** pelo fato de que compreende a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um imunoconjugado CpG-Ab ao sujeito, em que o imunoconjugado CpG-Ab se liga especificamente a um antígeno alvo associado a uma célula imunológica normal que expressa pelo menos um receptor de Toll.

396. Método, de acordo com a reivindicação 395, **caracterizado** pelo fato de compreender ainda a co-administração

de um antígeno associado a um tumor com o imunoconjugado CpG-Ab.

397. Método, de acordo com a reivindicação 394, **caracterizado** pelo fato de que o imunoconjugado CpG-Ab não está conjugado com o antígeno associado ao tumor.

398. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 395 a 397, **caracterizado** pelo fato de que a célula imune normal expressa TLR9.

399. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 395 ou 398, **caracterizado** pelo fato de que a célula imune normal é uma célula apresentadora de antígeno (APC).

400. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 395 a 399, **caracterizado** pelo fato de que os imunoconjugados CpG-Ab compreendem um polinucleotídeo imunoestimulador selecionado da Tabela 2.

401. Método, de acordo com a reivindicação 400, **caracterizado** pelo fato de que os imunoconjugados CpG-Ab compreendem um polinucleotídeo imunoestimulador selecionado a partir do grupo que consiste em p236, p238, p243, p246, p275, p276, p308, p313, p347, p361, p362, p425, p433, p434, p435, p436, p437, p438, p477, p478, p479, p480, p481, p482, p483, p484, p485, p486, p487, p488 e p489.

402. Método de prevenção de câncer em um indivíduo em necessidade do mesmo, **caracterizado** pelo fato de que compreende a co-administração de uma quantidade terapêutica eficaz de um imunoconjugado CpG-Ab com uma vacina contra câncer, em que o imunoconjugado CpG-Ab se liga especificamente a um antígeno alvo associado a uma célula imune normal que expressa pelo menos um receptor do tipo Toll.

403. Método, de acordo com a reivindicação 402, **caracterizado** pelo fato de que o imunoc conjugado CpG-Ab é formulado como um adjuvante da vacina contra o câncer.

404. Método para induzir uma resposta imune adaptativa em um sujeito, **caracterizado** por compreender a administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um imunoc conjugado CpG-Ab ao sujeito, em que o imunoc conjugado CpG-Ab se liga especificamente a um antígeno alvo associado a uma célula imune normal que se expressa em pelo menos um receptor de Toll.

405. Método, de acordo com a reivindicação 404, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito tem câncer.

406. Método, de acordo com a reivindicação 405, **caracterizado** pelo fato de que o antígeno alvo não é um TAA.

407. Método, de acordo com a reivindicação 405, **caracterizado** pelo fato de que o antígeno alvo é um TAA que não é um antígeno selecionado do grupo que consiste em CD19, CD20, CD22, STA22, exportação em 7, Her2, Src, EGFR, CD52, CXCR-4, Muc-1 e DNA.

408. Método, de acordo com a reivindicação 405, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito tem uma doença infecciosa.

409. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 404 a 408, **caracterizado** pelo fato de que a célula imune normal expressa TLR9.

410. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 404 a 409, **caracterizado** pelo fato de que a célula imune normal é uma célula apresentadora de antígeno (APC).

411. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 404 a 410, **caracterizado** pelo fato de que a resposta imune adaptativa é dependente de células T CD8+.

412. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 404 a 411, **caracterizado** pelo fato de que os imunocombinados CpG-Ab compreendem um polinucleotídeo imunostimulador selecionado da Tabela 2.

413. Método, de acordo com a reivindicação 412, **caracterizado** pelo fato de que os imunocombinados CpG-Ab compreendem um polinucleotídeo imunostimulador selecionado do grupo que consiste em p236, p238, p243, p246, p275, p276, p308, p313, p347, p361, p362, p425, p433, p434, p435, p436, p437, p438, p477, p478, p479, p480, p481, p482, p483, p484, p485, p486, p487, p488 e p489.

414. Método de tratamento de câncer em um sujeito com câncer, **caracterizado** por compreender administrar ao sujeito uma quantidade terapêutica eficaz de um imunocombinado de CpG-Ab selecionado das Tabelas 6-A e 6-B.

415. Método, de acordo com a reivindicação 414, **caracterizado** pelo fato de que o imunocombinado CpG-Ab se liga a um antígeno associado a um tumor (TAA).

416. Método, de acordo com a reivindicação 414 ou 415, **caracterizado** pelo fato de que o imunocombinado CpG-Ab se liga a um antígeno alvo diferente do TAA.

417. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 414 a 416, **caracterizado** pelo fato de que o imunocombinado CpG-Ab se liga ao antígeno alvo associado a uma célula imune normal que expressa um receptor de TLR.

418. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 414 a 417, **caracterizado** pelo fato de que os imunoconjugados CpG-Ab são selecionados do grupo que consiste em imunoconjugados CpG-Ab compreendendo p236, p238, p243, p246, p275, p276, p308, p313, p347, p361, p362, p425, p433, p434, p435, p436, p437, p438, p477, p478, p479, p480, p481, p482, p483, p484, p485, p486, p487, p488 e p489.

419. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 356 a 418, **caracterizado** pelo fato de compreender ainda a co-administração de uma quantidade terapêutica eficaz de pelo menos um agente terapêutico contra o câncer adicional.

420. Método, de acordo com a reivindicação 419, **caracterizado** pelo fato de que pelo menos um agente terapêutico de câncer adicional é selecionado a partir de um segundo TAA, uma molécula co-estimulatória de células T e um modulador de ponto de verificação imune.

421. Método, de acordo com a reivindicação 420, **caracterizado** pelo fato de que o segundo TAA é o mesmo que o TAA.

422. Método, de acordo com a reivindicação 420, **caracterizado** pelo fato de que o segundo TAA é diferente do TAA.

423. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 420 a 422, **caracterizado** pelo fato de que a molécula coestimuladora de células T é selecionada da lista que consiste em OX40, CD2, CD27, CDS, ICAM-1, LFA-1/CD11a/CD18, ICOS/CD278, 4-1BB/CD137, GITR, CD30, CD40, BAFFR, HVEM, CD7, LIGHT, NKG2C, SLAMF7, NKp80, CD160, B7-H3 e CD83 ou um ligante destes.

424. Método, de acordo com a reivindicação 423, **caracterizado** pelo fato de que a molécula co-estimulatória de células T é um anticorpo anti-OX40, anticorpo anti-ICOS/CD278 ou anticorpo anti-4-1BB/CD137 ou um fragmento de ligação a antígeno.

425. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 418 a 424, **caracterizado** pelo fato de que o modulador do ponto de verificação imune é um inibidor de moléculas de ponto de verificação imune selecionadas da lista que consiste em PD-1, PD-L1, PD-L2, TIM-3, LAG-3, CEACAM-1, CEACAM-5, CLTA-4, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD47, CD160, 2B4, CD172a e TGFR.

426. Método, de acordo com a reivindicação 425, **caracterizado** pelo fato de que o modulador do ponto de verificação imune é um anticorpo anti-CD47, anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-PD-L1 ou um fragmento de ligação a antígeno.

427. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 356 a 426, **caracterizado** pelo fato de que o câncer é um tumor sólido.

428. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 354 a 426, **caracterizado** pelo fato de que o câncer é um tumor líquido.

429. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 356 a 428, **caracterizado** pelo fato de que o câncer é um câncer recorrente.

430. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 356 a 429, **caracterizado** pelo fato de que a administração ou co-administração é através da administração sistêmica.

431. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 356 a 430, **caracterizado** pelo fato de que a quantidade terapêutica eficaz do imunocombinado CpG-Ab não é eficaz para ativar a via do complemento no sujeito.

432. Método, de acordo com a reivindicação 431, **caracterizado** pelo fato de que a quantidade não é eficaz para ativar o complemento C3 no sujeito.

433. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 356 a 432, **caracterizado** pelo fato de que o imunocombinado CpG-Ab é um composto de acordo com a reivindicação 68.

434. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 356 a 433, **caracterizado** pelo fato de que o imunocombinado CpG-Ab compreende um oligonucleotídeo de acordo com a reivindicação 1.

435. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 356 a 434, **caracterizado** pelo fato de que o imunocombinado CpG-Ab compreende um composto de acordo com a reivindicação 65.

436. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 356 a 435, **caracterizado** pelo fato de que o imunocombinado CpG-Ab compreende um composto de acordo com a reivindicação 78.

437. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 356 a 436, **caracterizado** pelo fato de que o imunocombinado CpG-Ab é selecionado entre SB-342, SB-343, SB-341, SB-340, SB-179, SB-181, SB-186, SB-189, SB-228, SB-229, SB-242, SB-263, SB-337, SB-267, SB-284, SB-312, SB-313, SB-347, SB-

373, SB- 382, SB-388, SB-389, SB-408, SB-416, SB-419, SB-421,
SB-423, SB-426, SB-427, SB-428, SB-429 e SB-430.

FIG. 1A

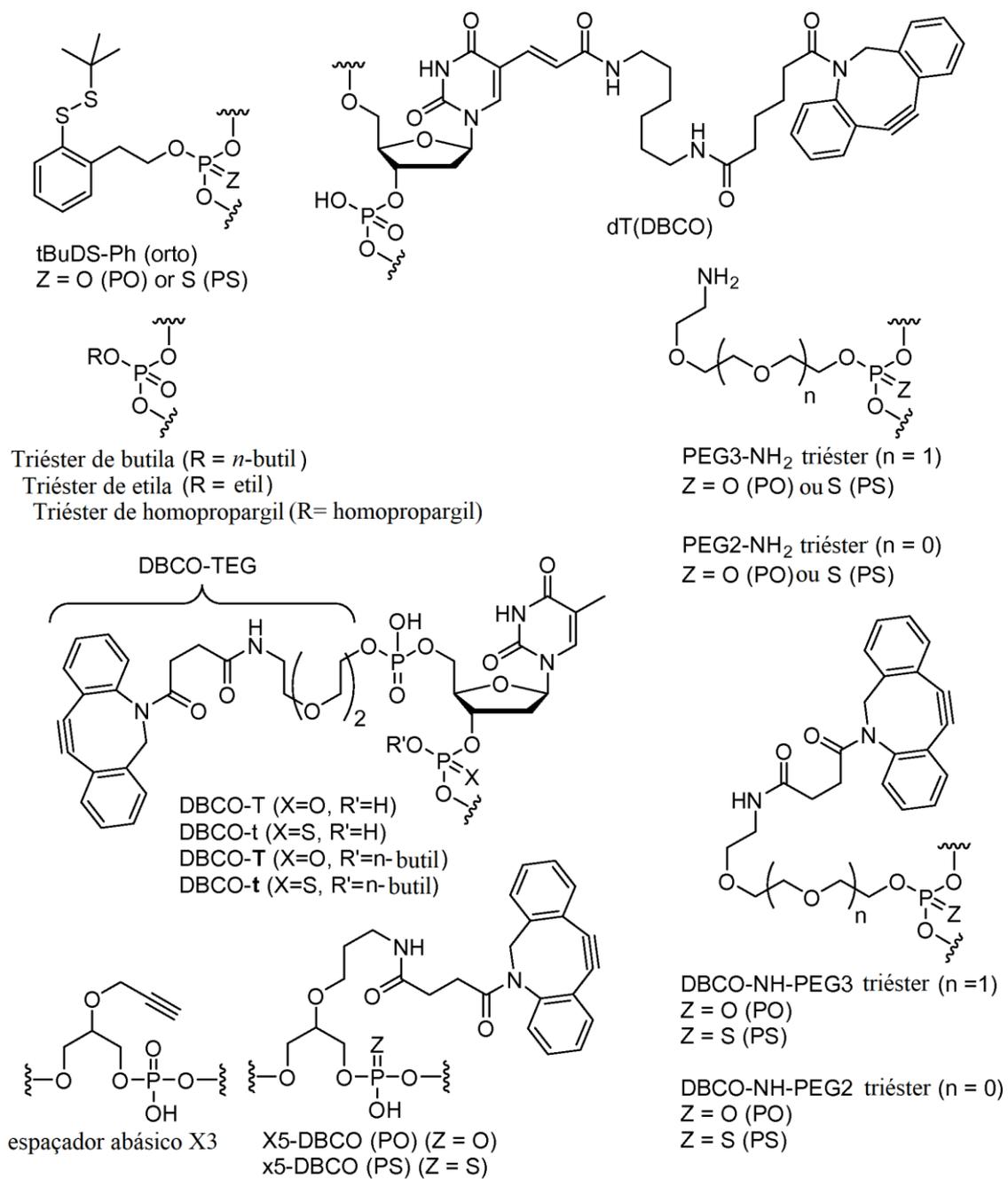


FIG. 1B

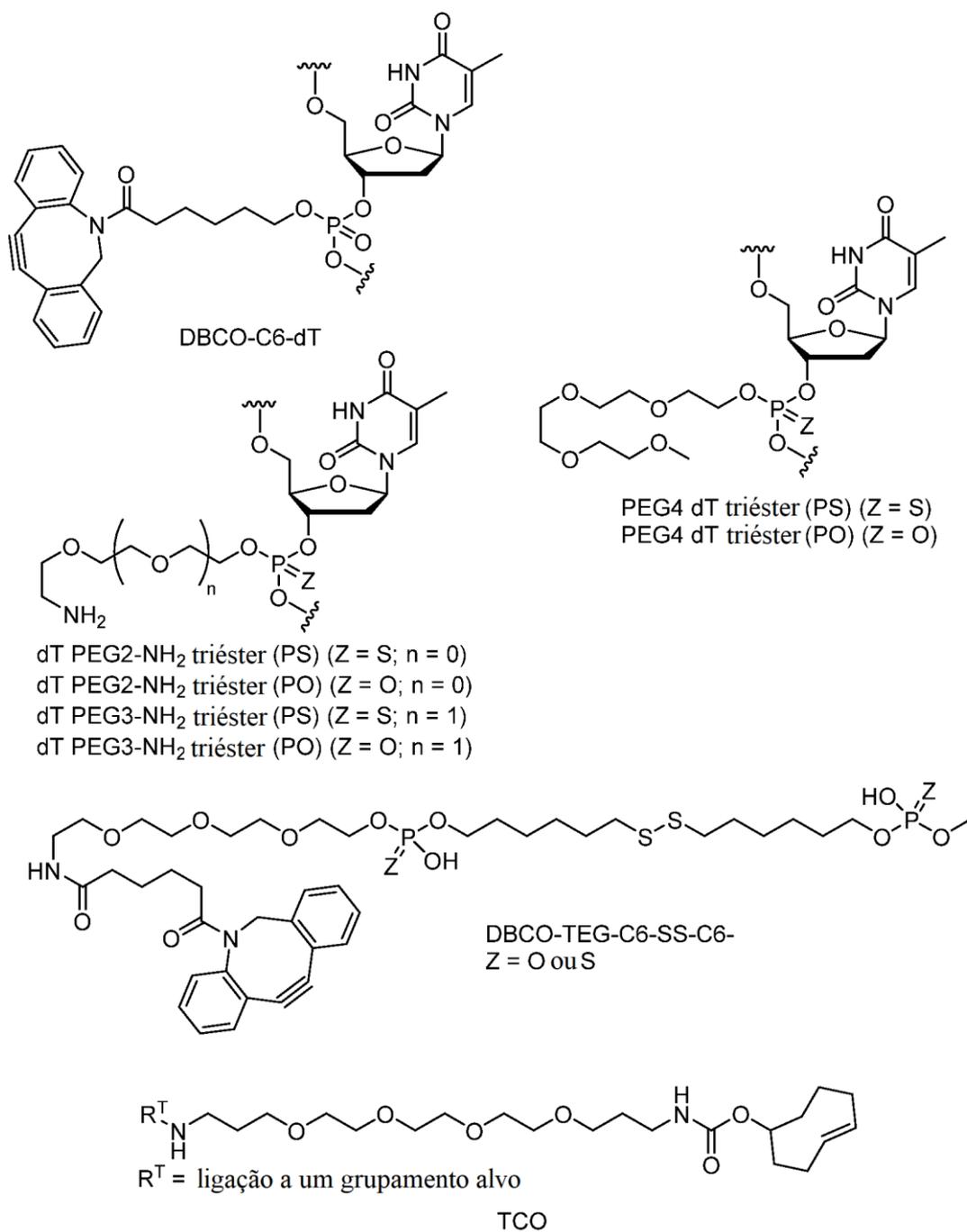


FIG. 2

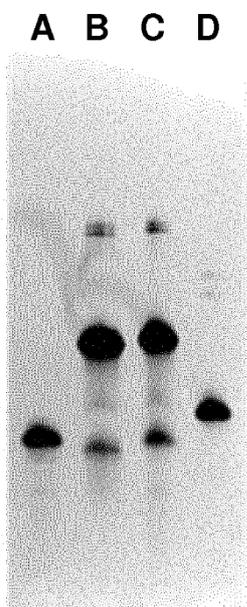


FIG. 3A

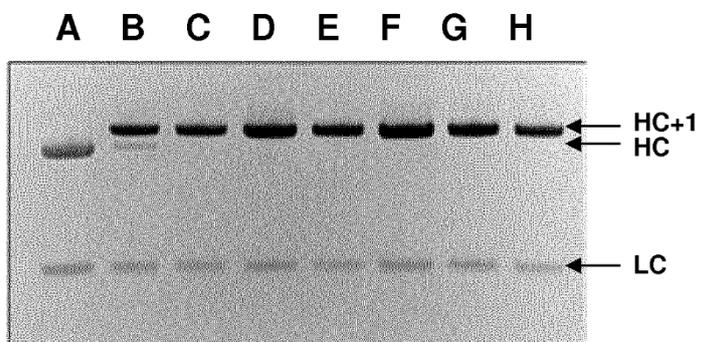
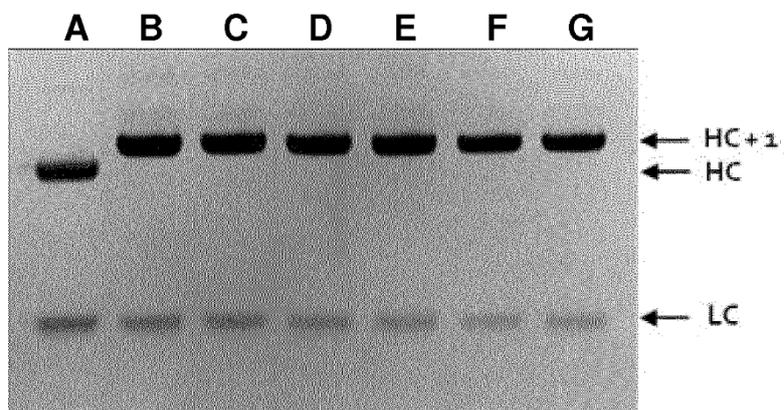


FIG. 3B



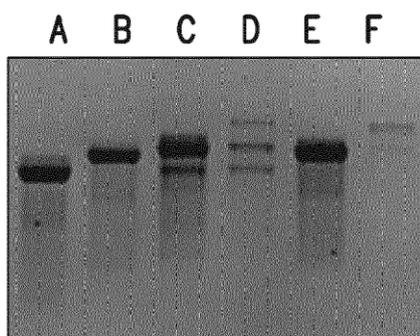


FIG. 4A

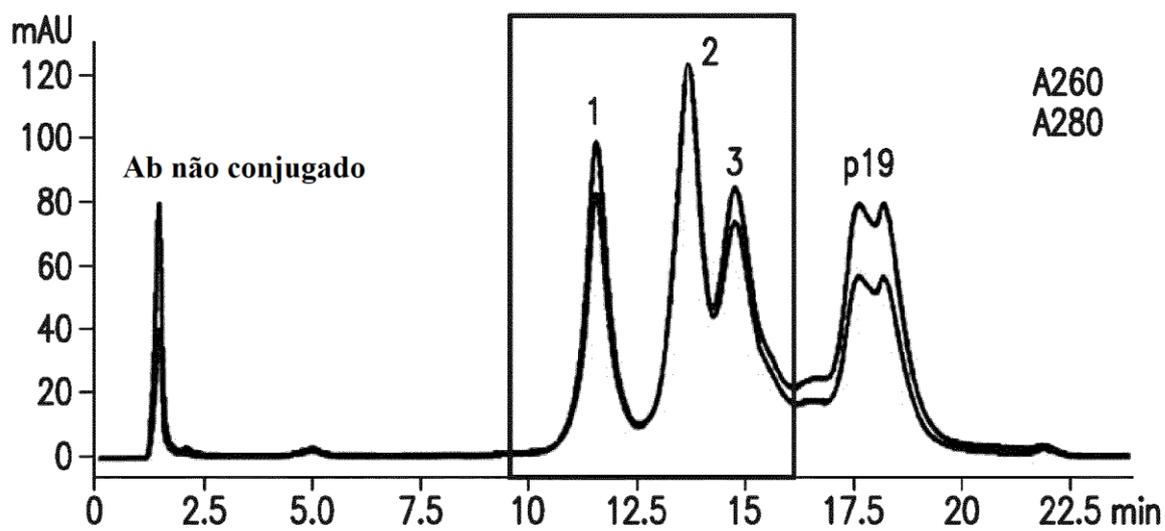


FIG. 4B

FIG. 4C

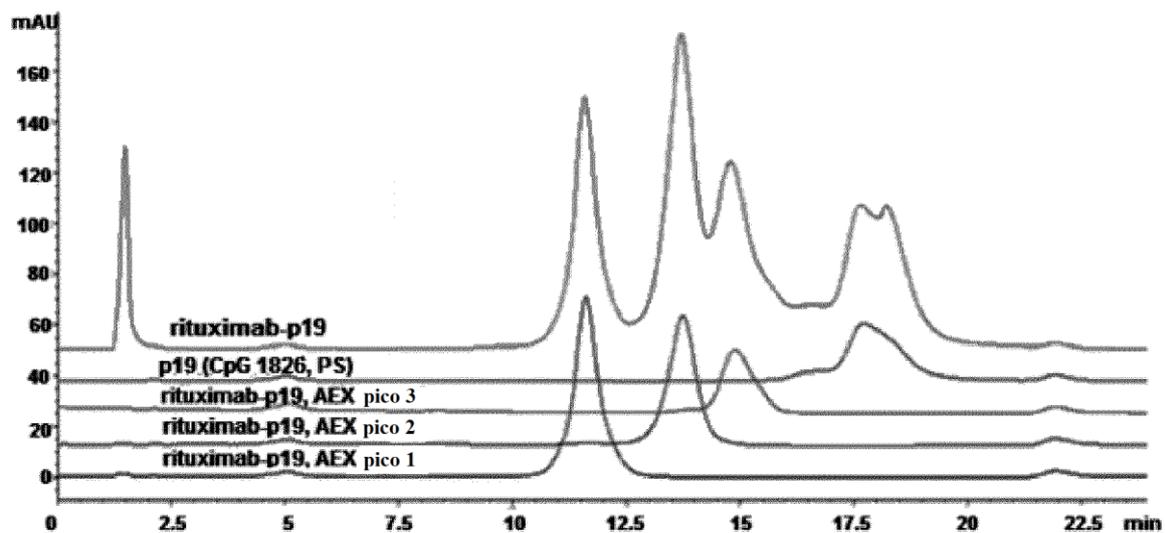


FIG. 4D

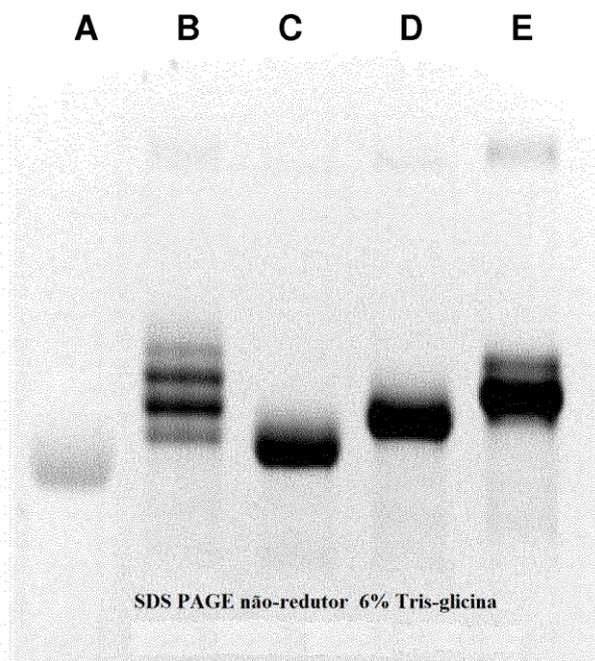


FIG. 5

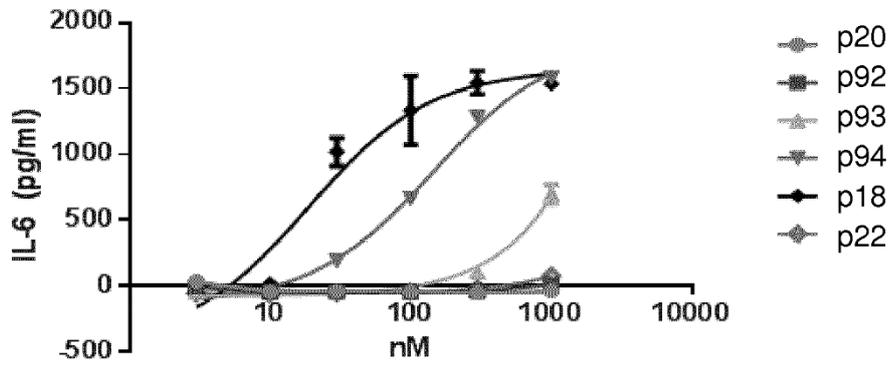


FIG. 6

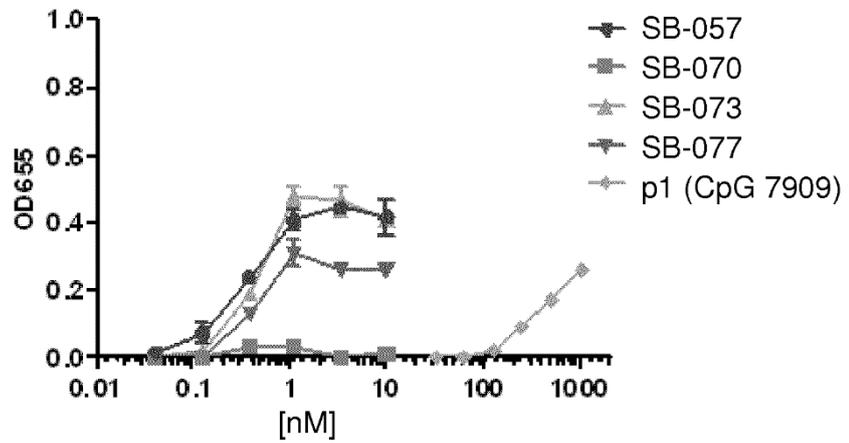


FIG. 7

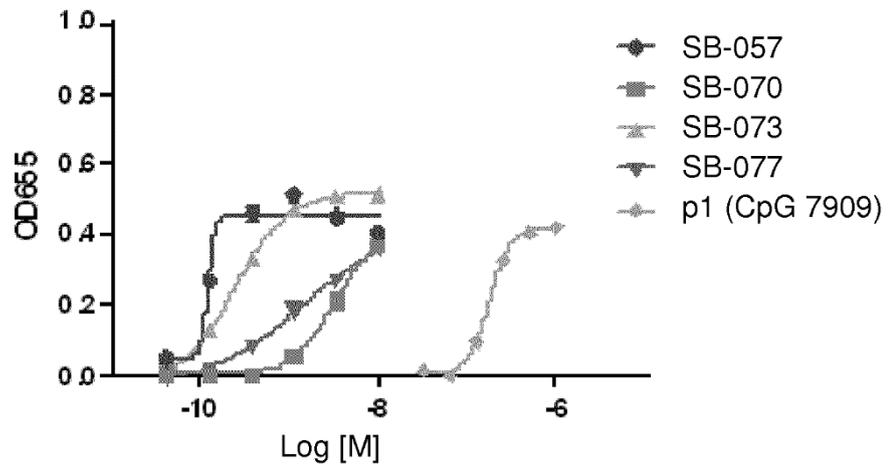


FIG. 8

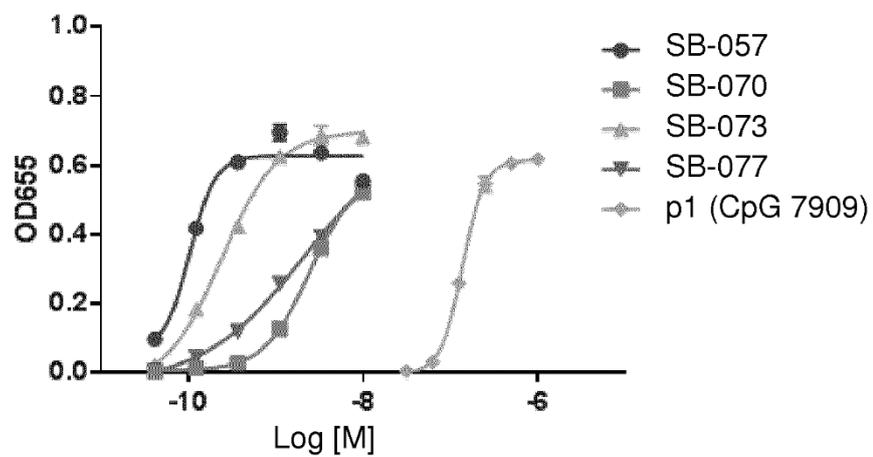


FIG. 9

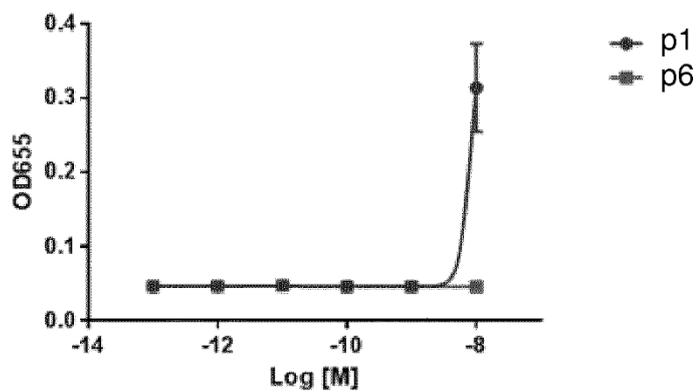


FIG. 10

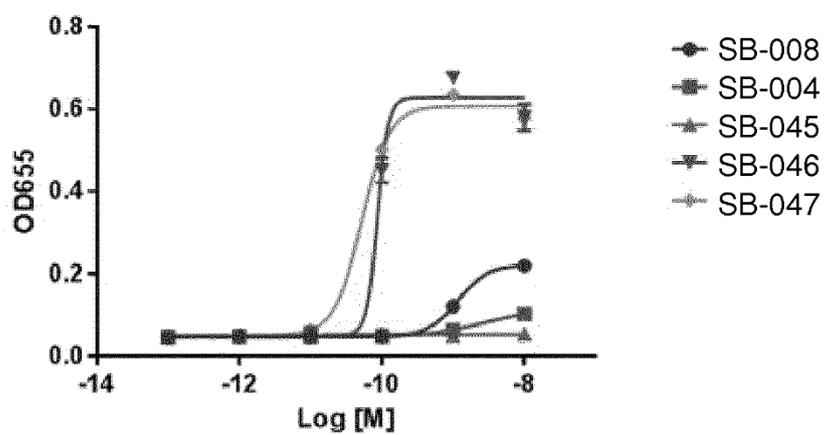


FIG. 11

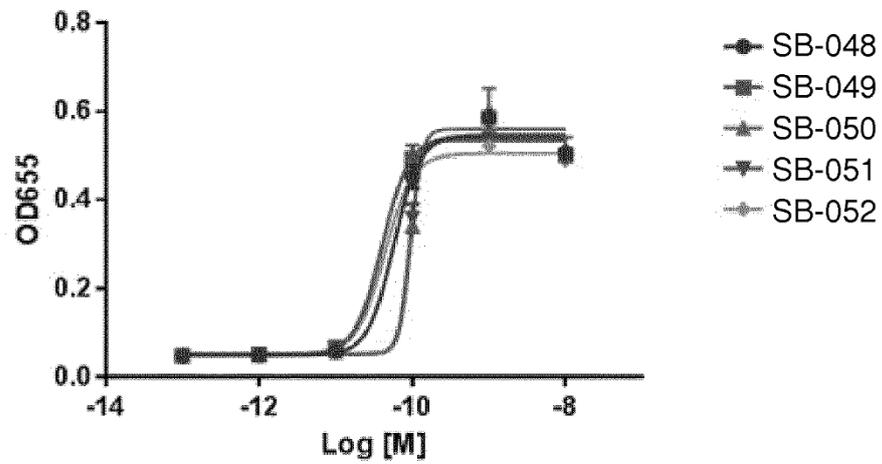


FIG. 12

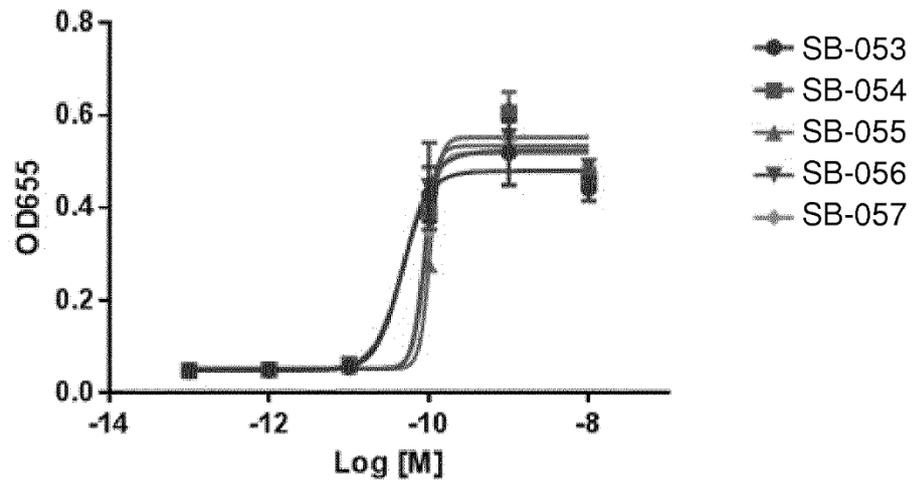


FIG. 13

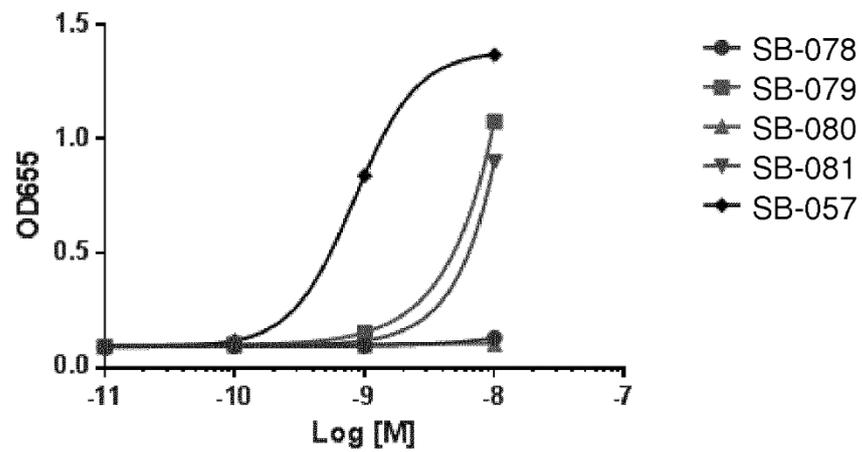


FIG. 14

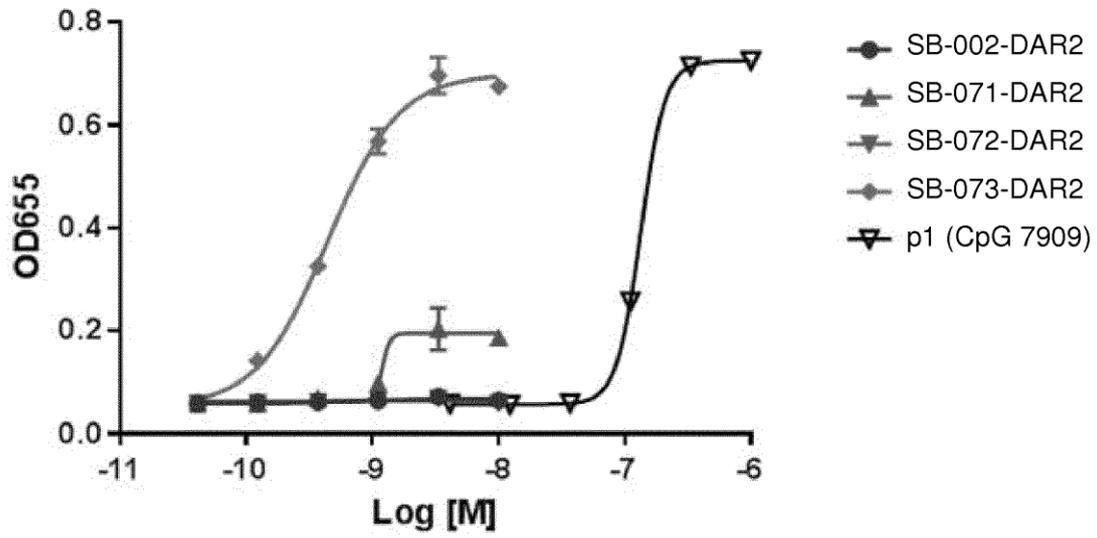


FIG. 15

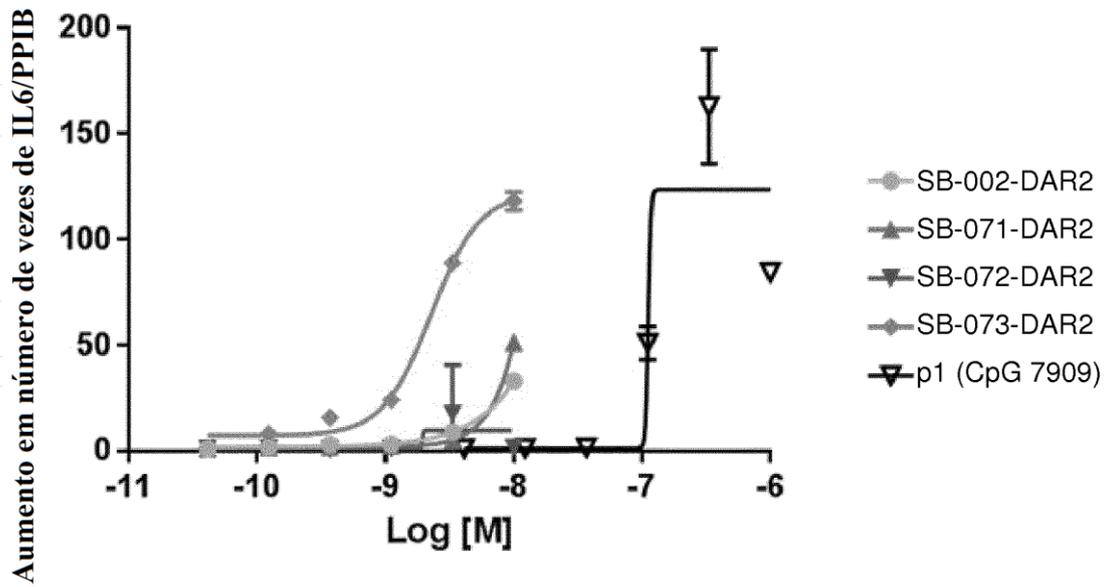


FIG. 16

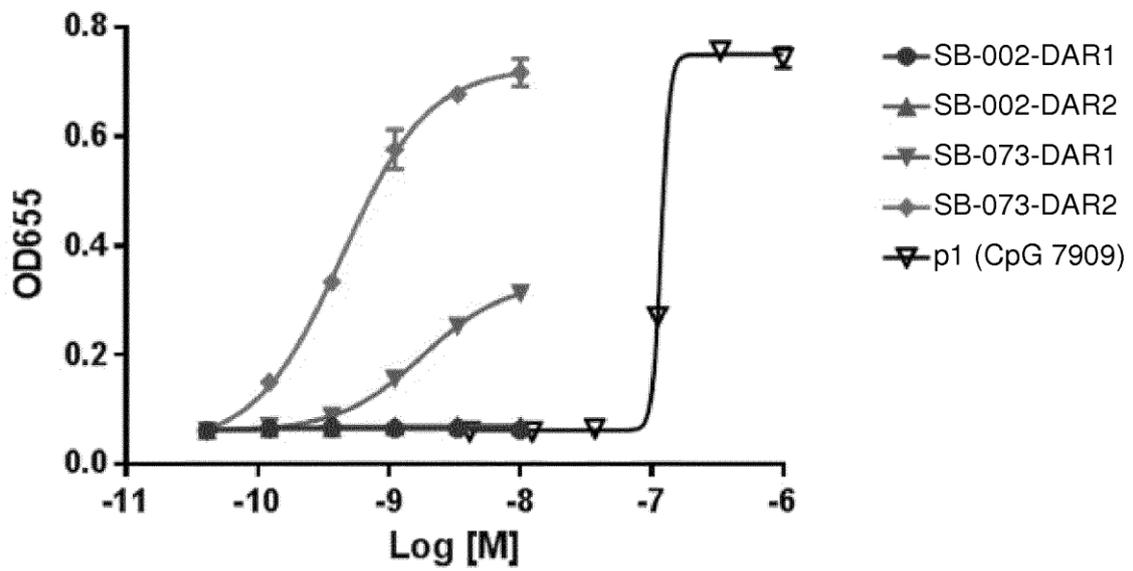


FIG. 17

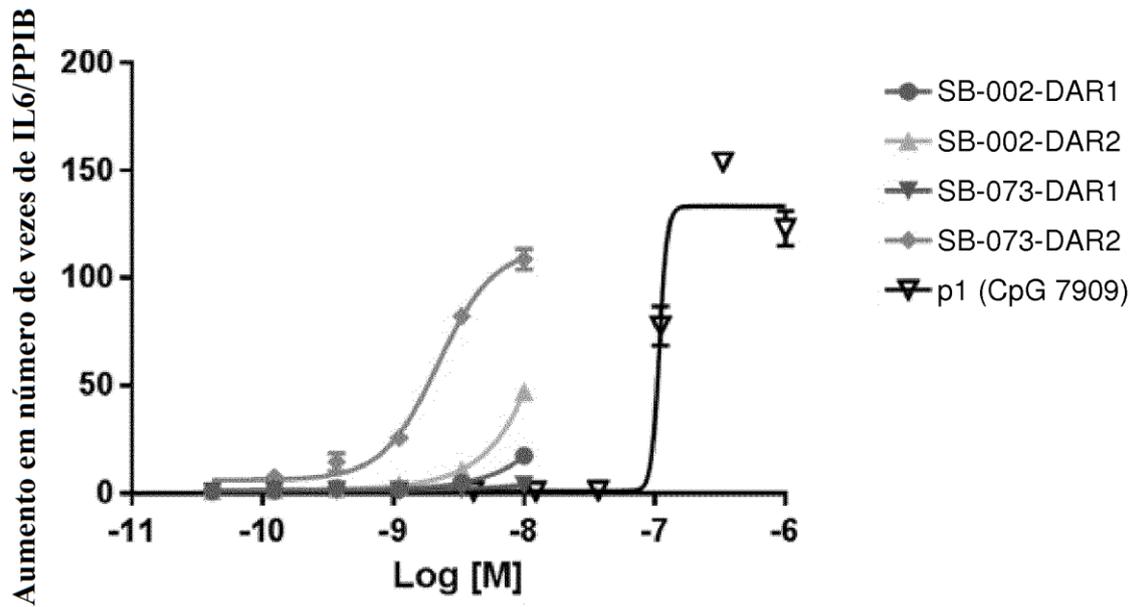


FIG. 18

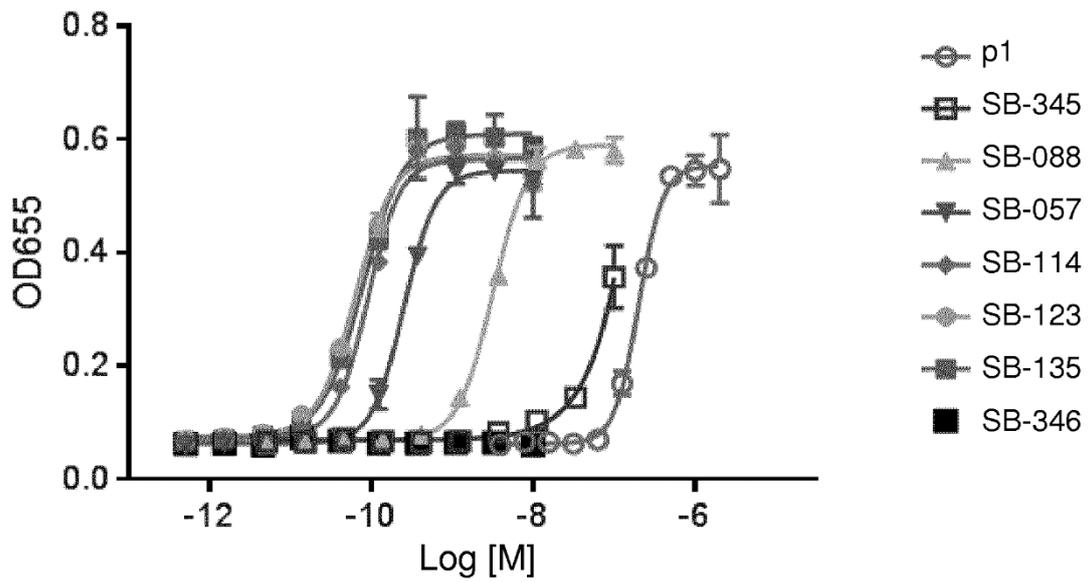


FIG. 19

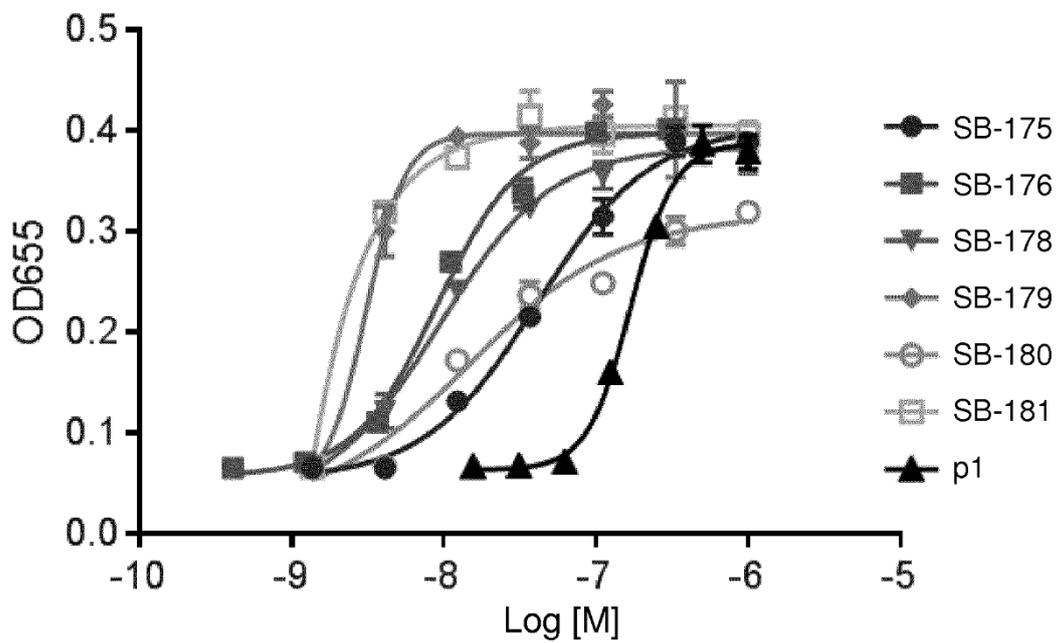


FIG. 20

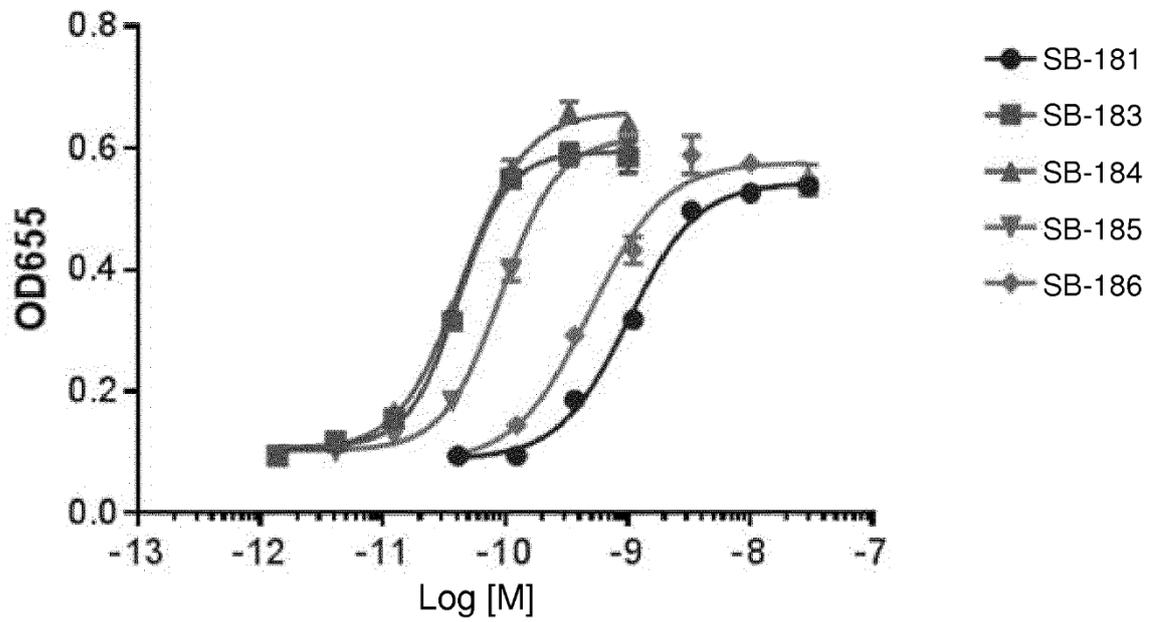


FIG. 21

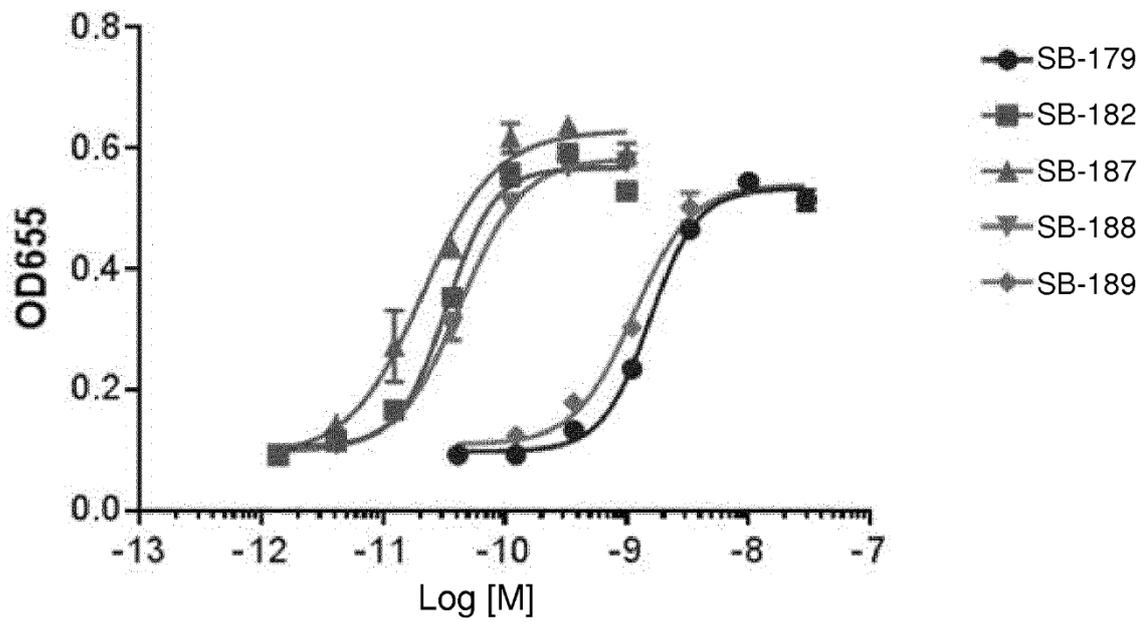


FIG. 22

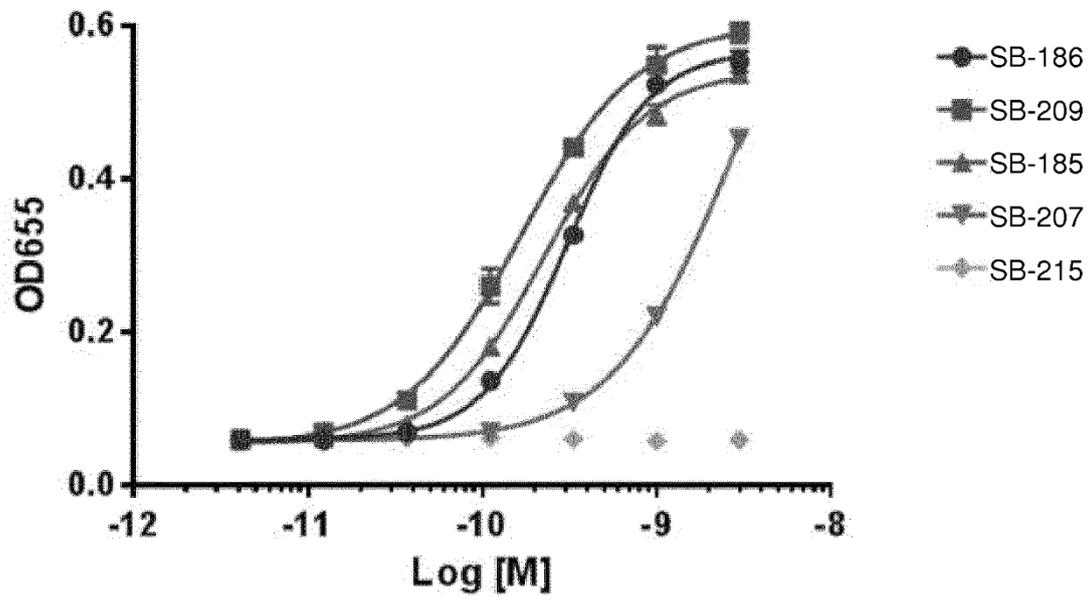


FIG. 23

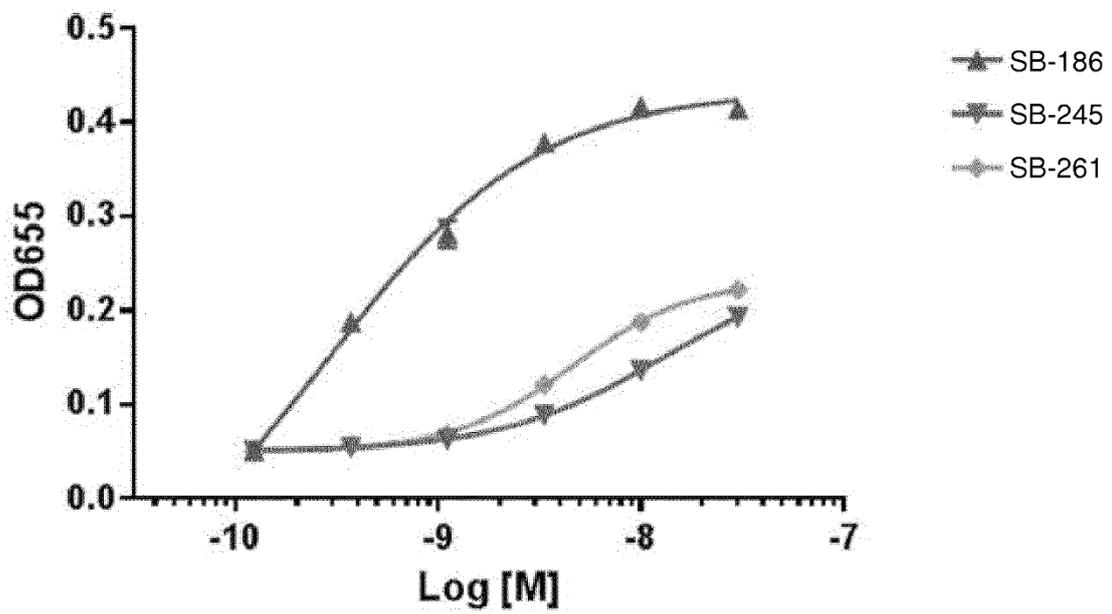


FIG. 24

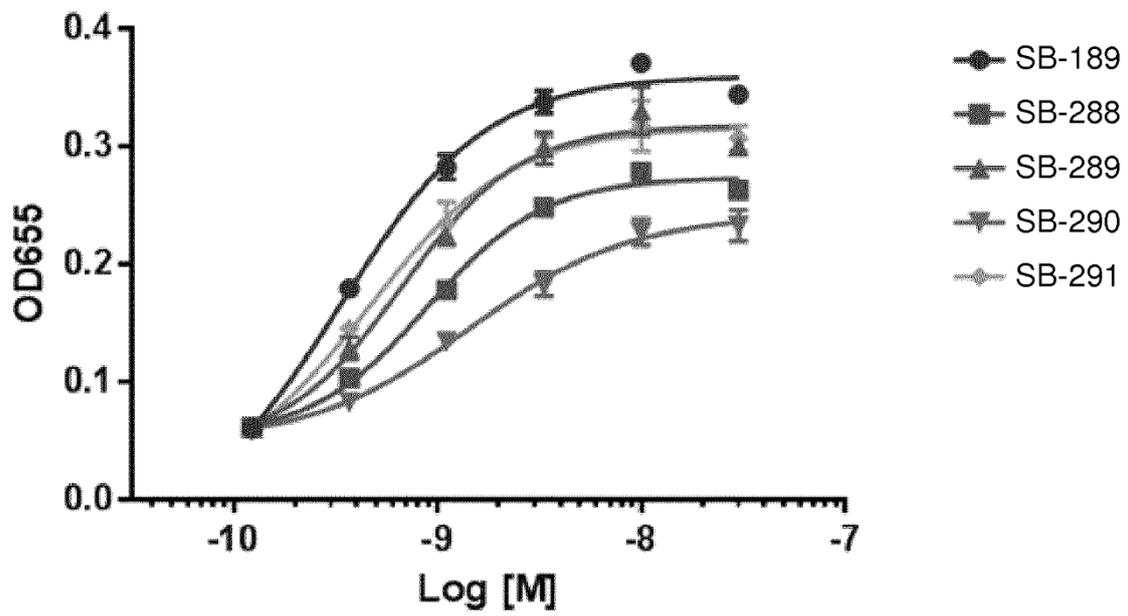


FIG. 25

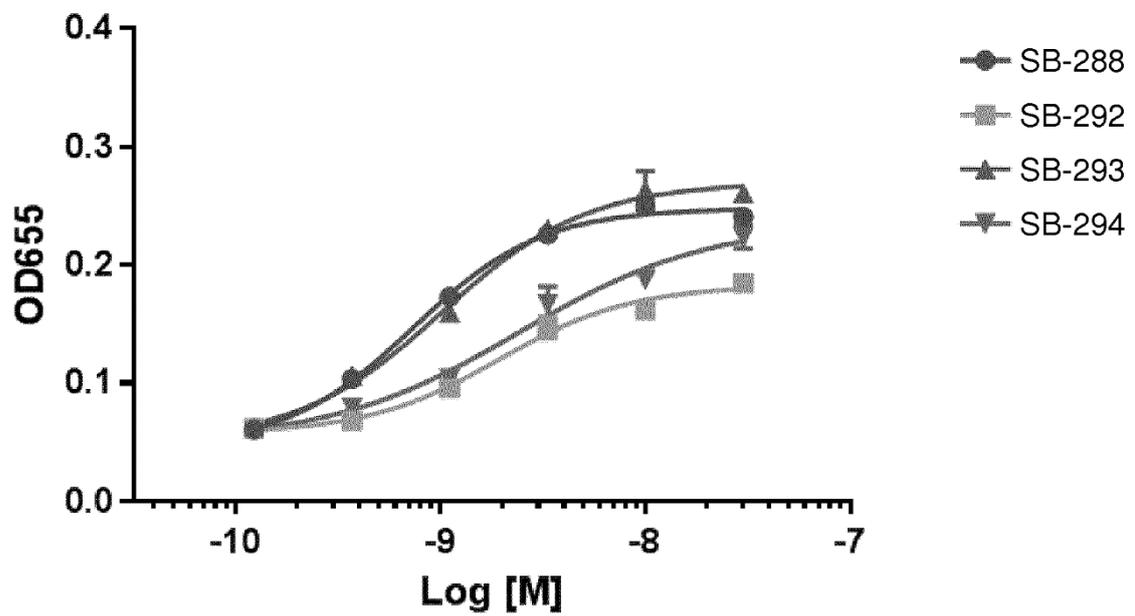


FIG. 26A

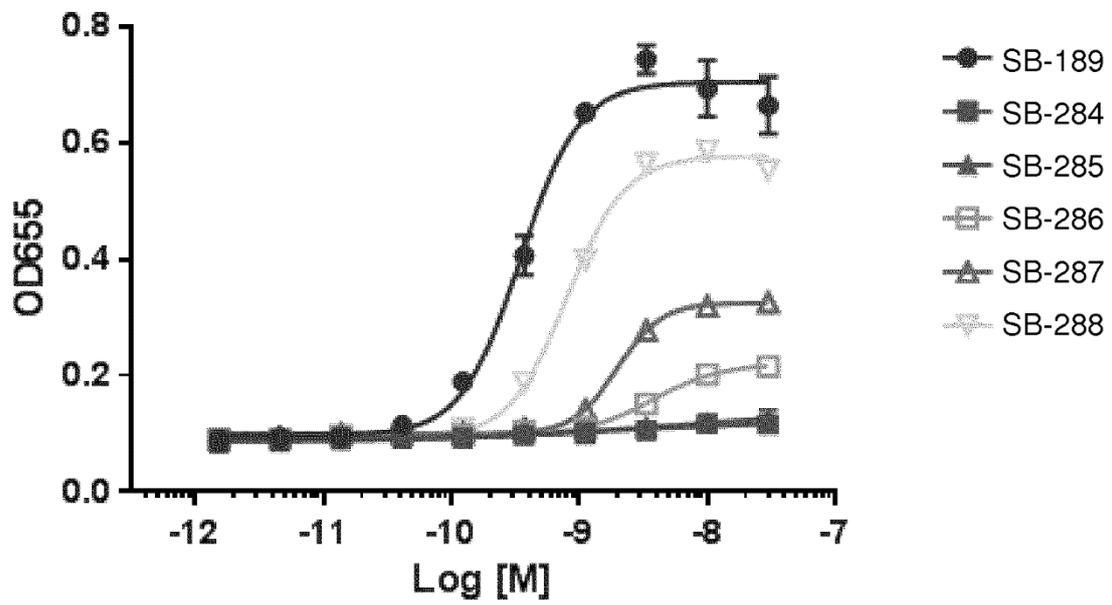


FIG. 26B

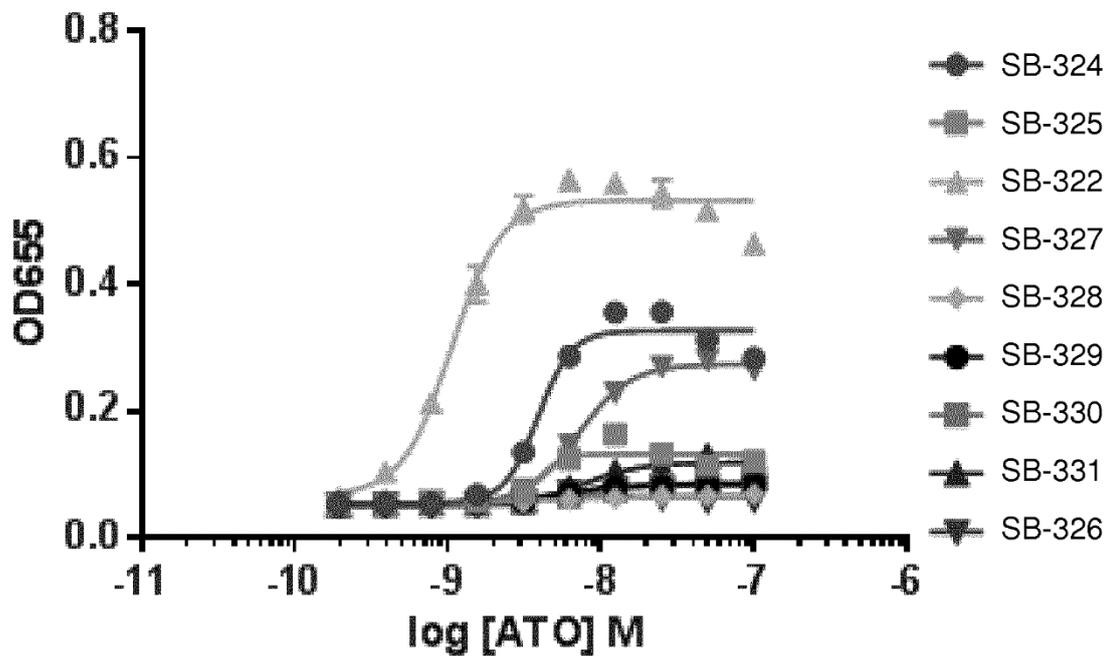


FIG. 27

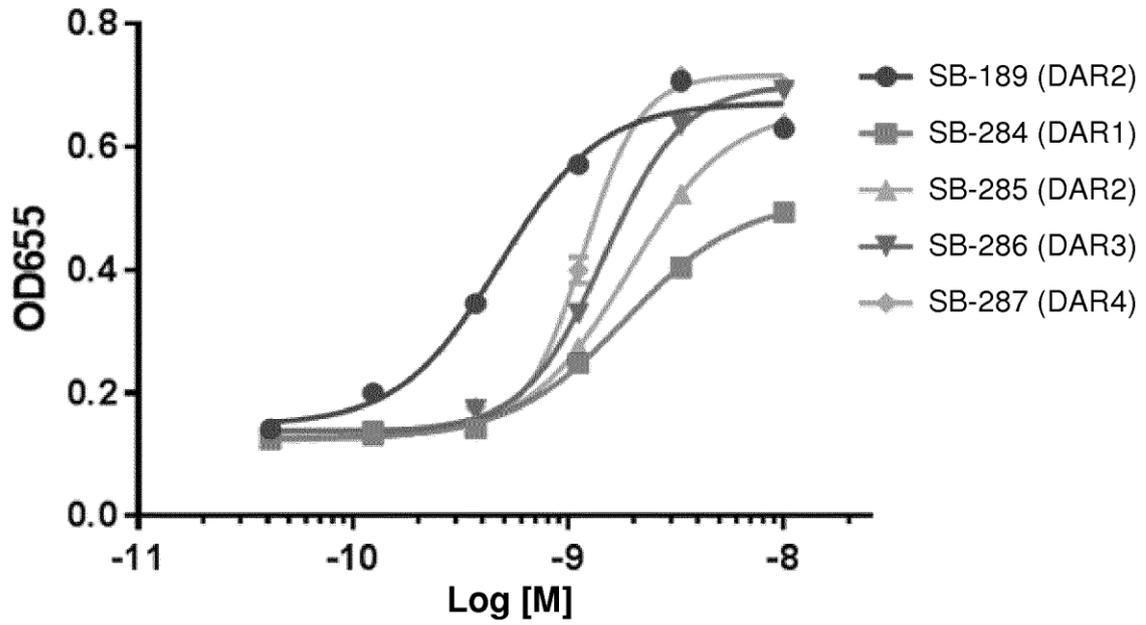


FIG. 28

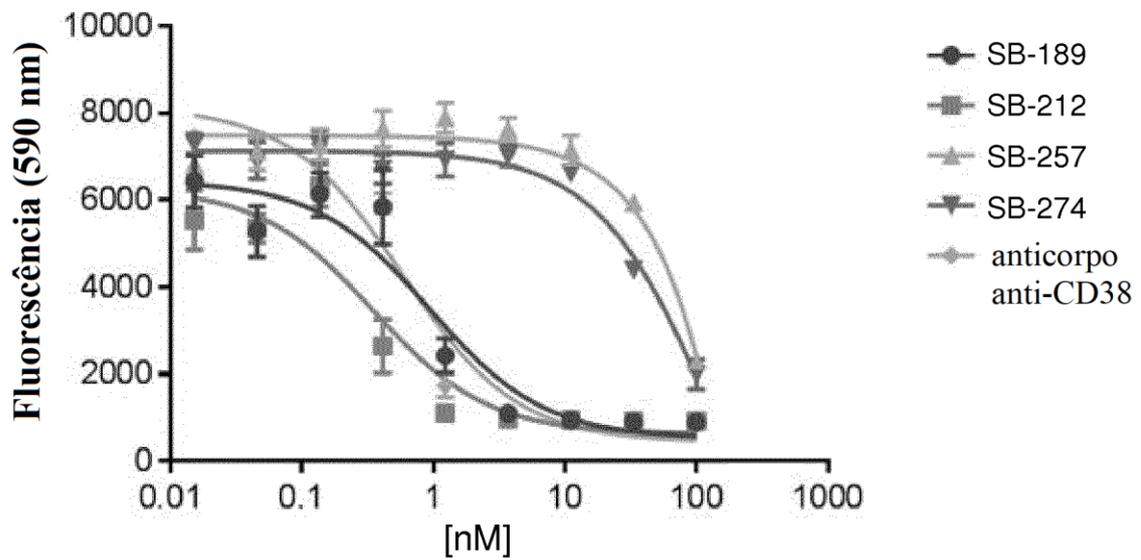


FIG. 29

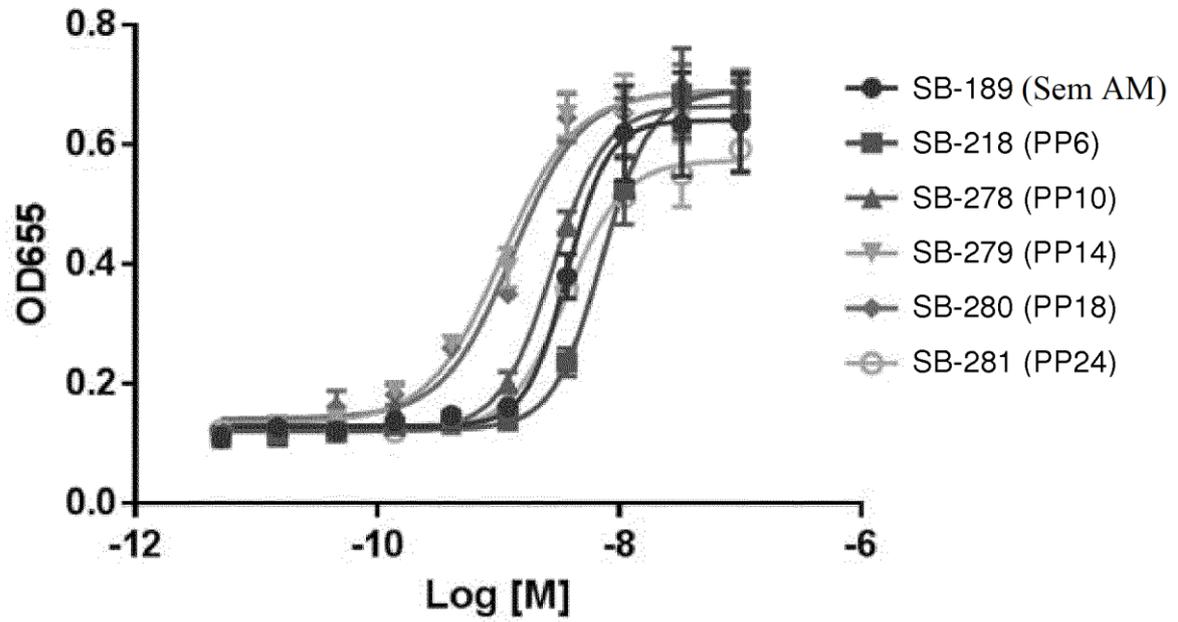


FIG. 30

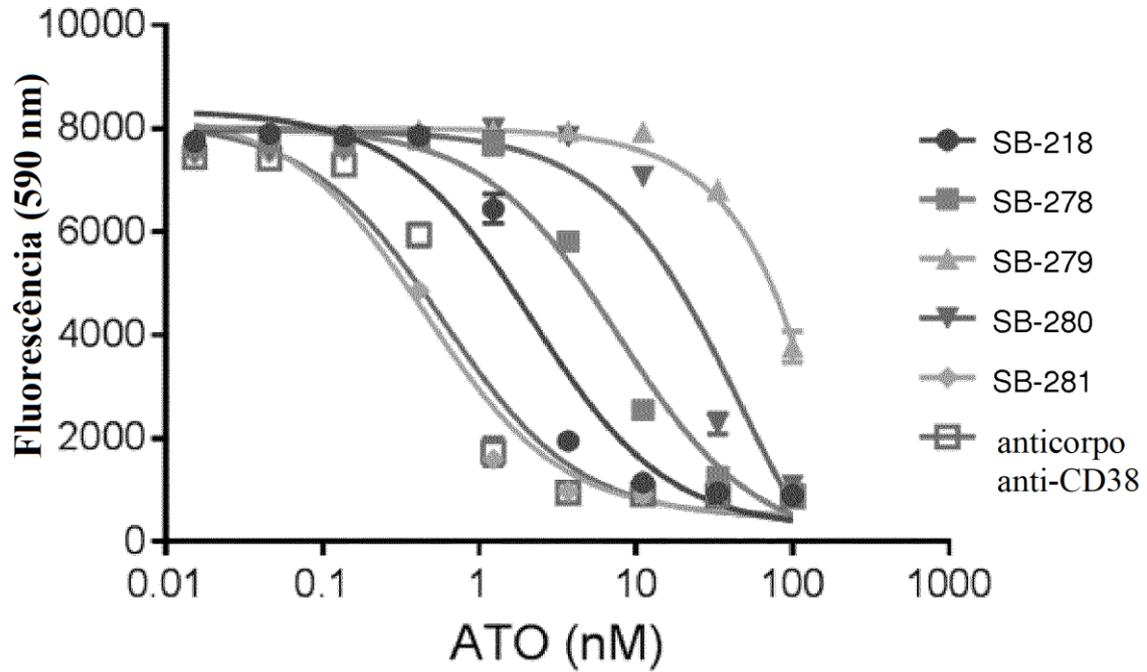


FIG. 31

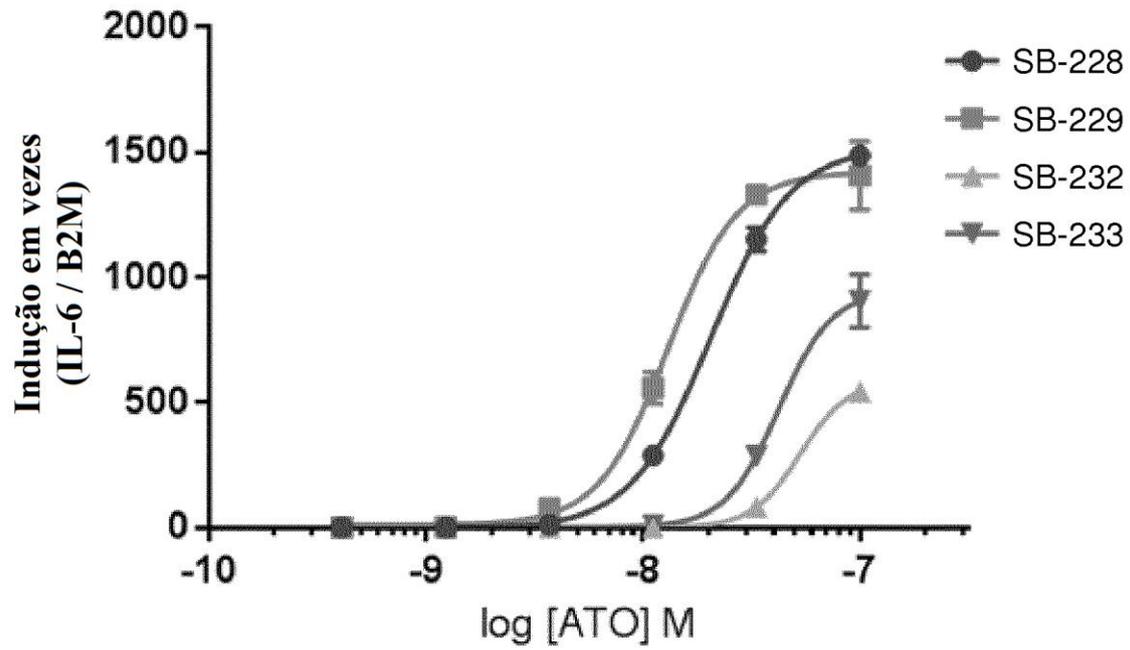


FIG. 32

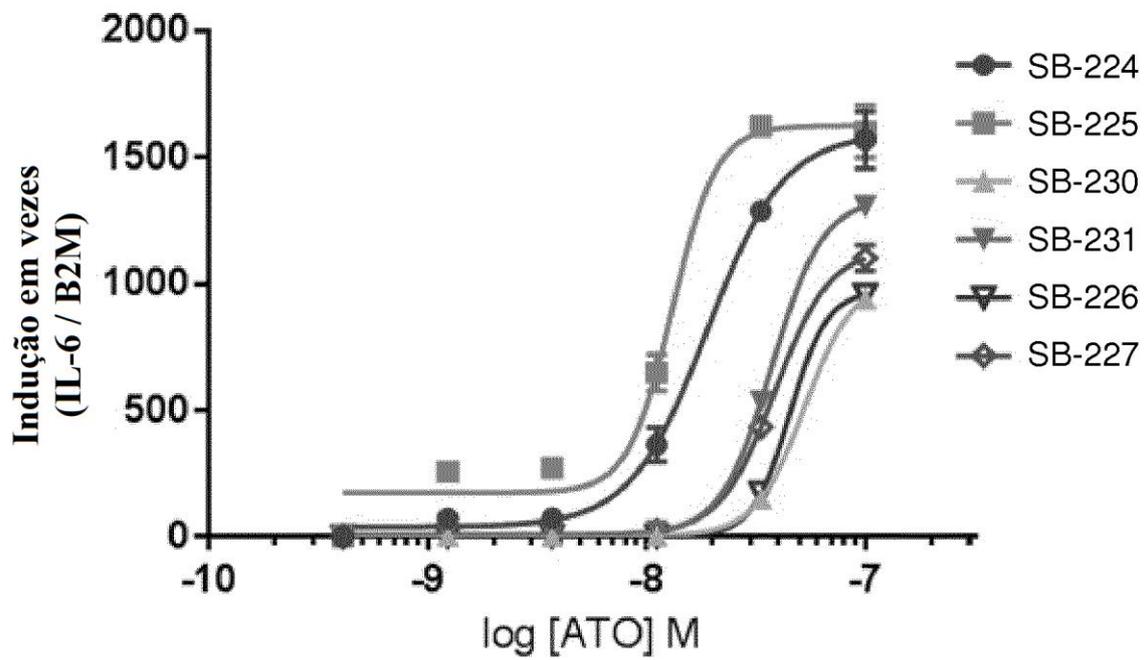


FIG. 33A

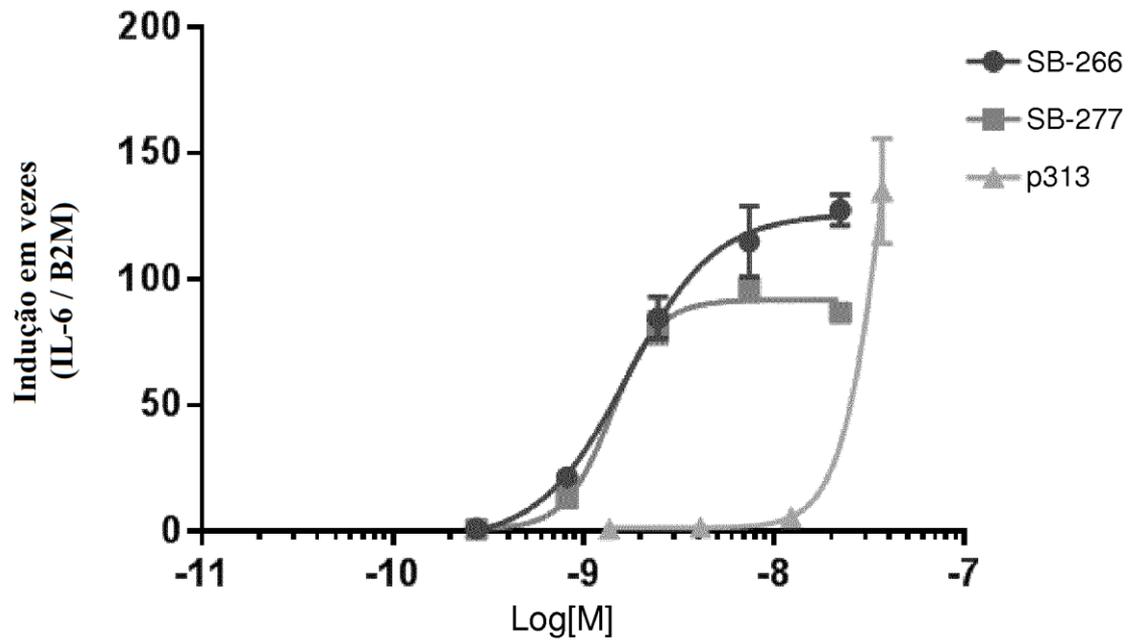


FIG. 33B

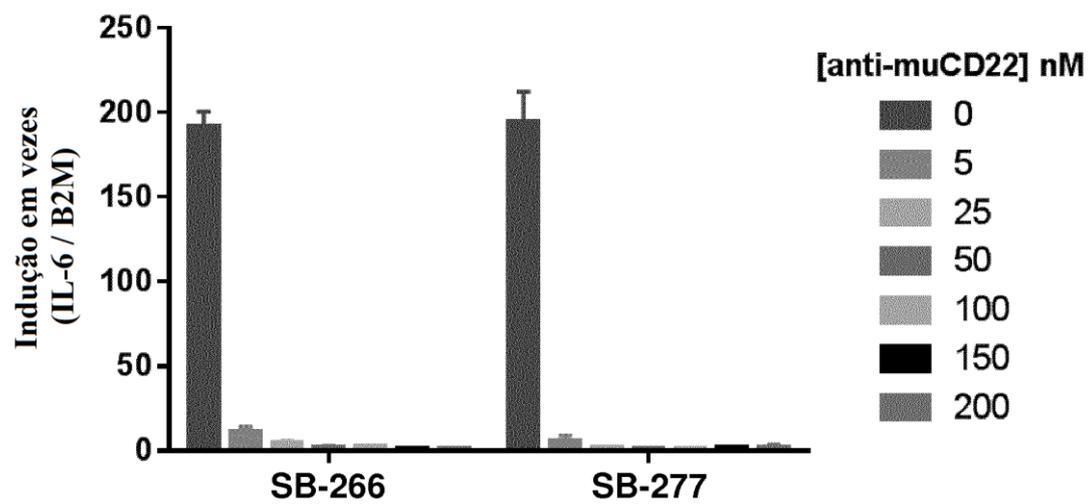


FIG. 34A

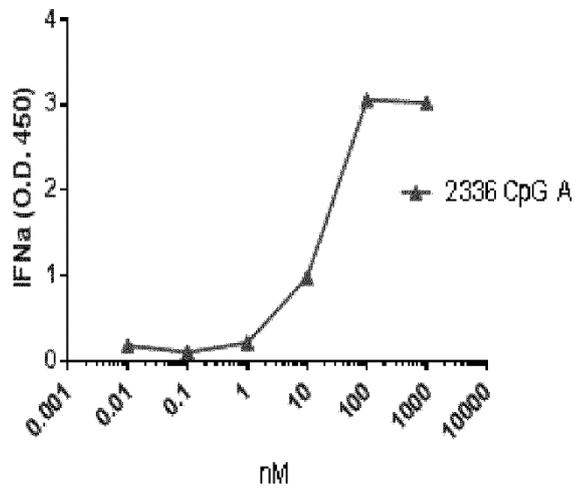


FIG. 34B

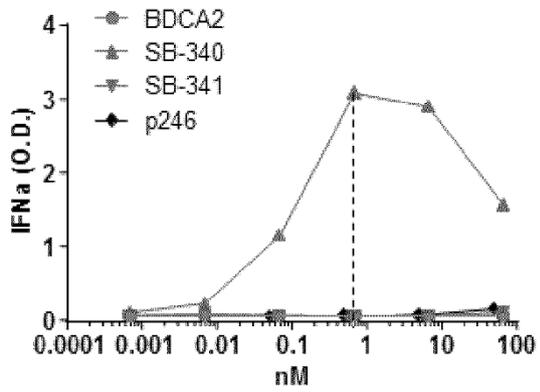


FIG. 34C

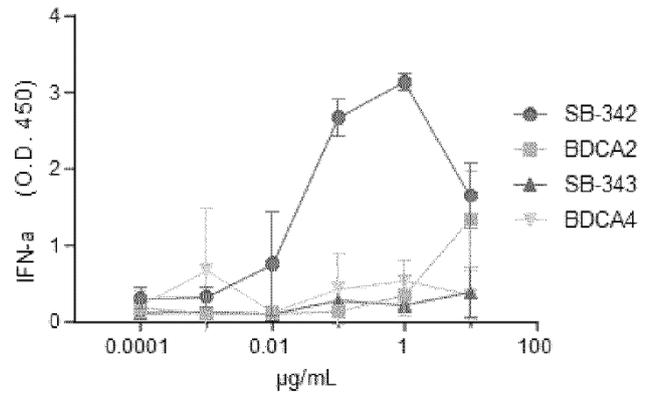


FIG. 35

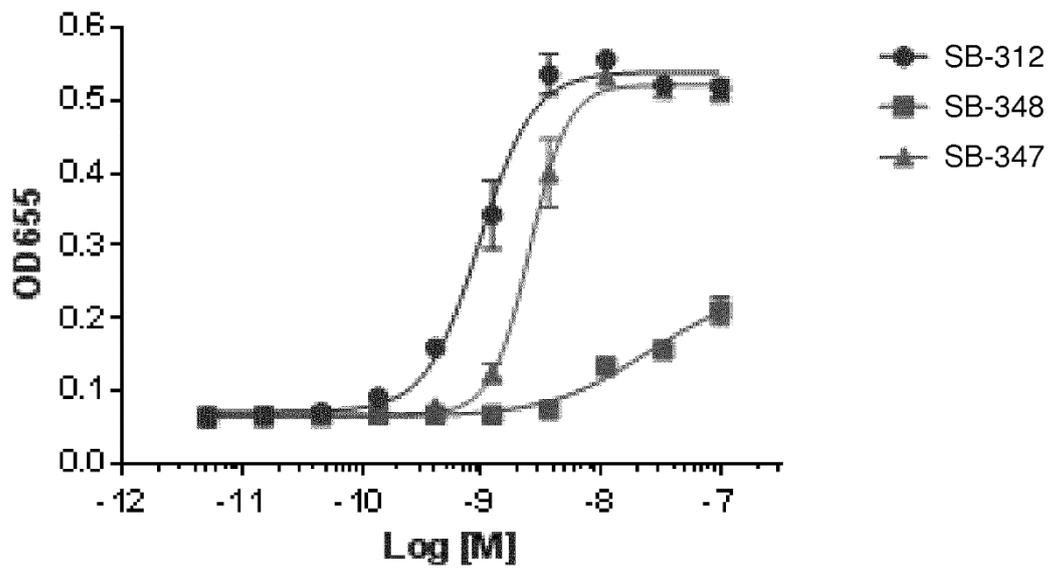


FIG. 36

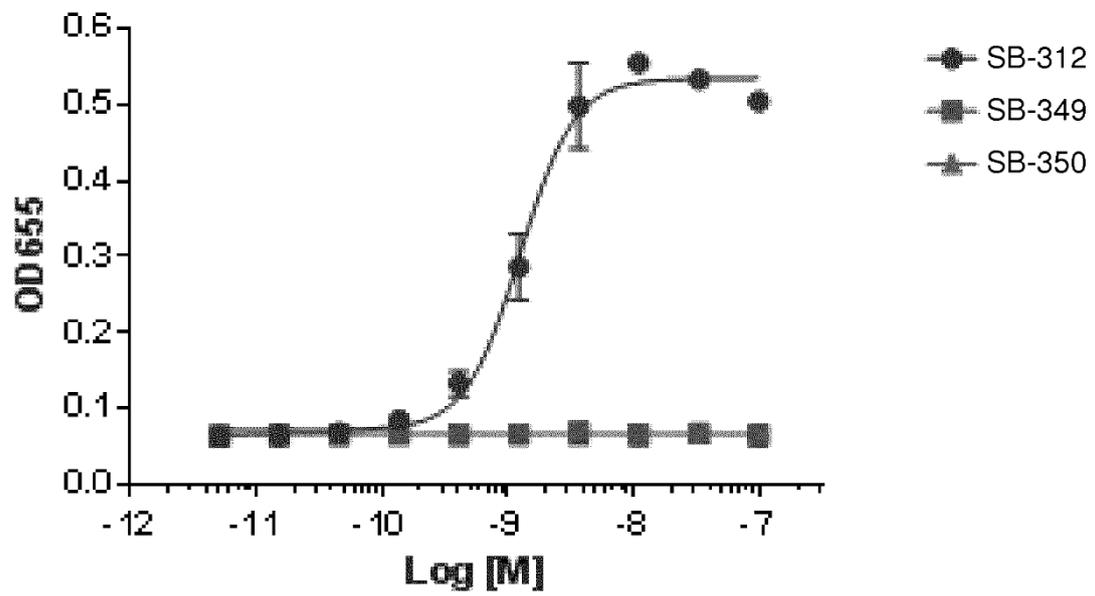


FIG. 37A

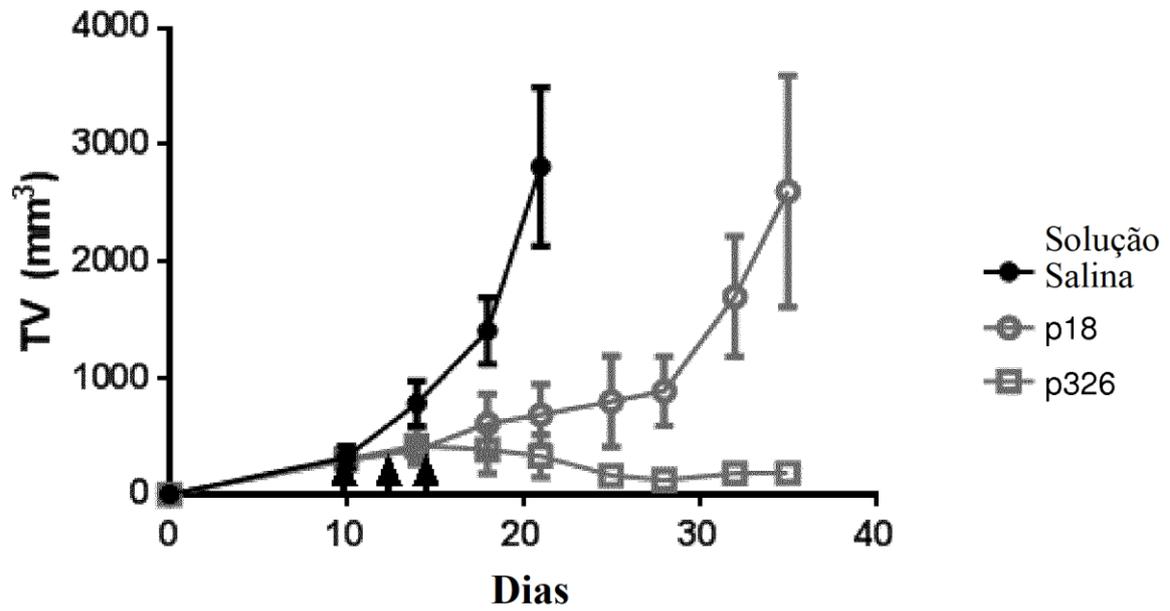


FIG. 37B

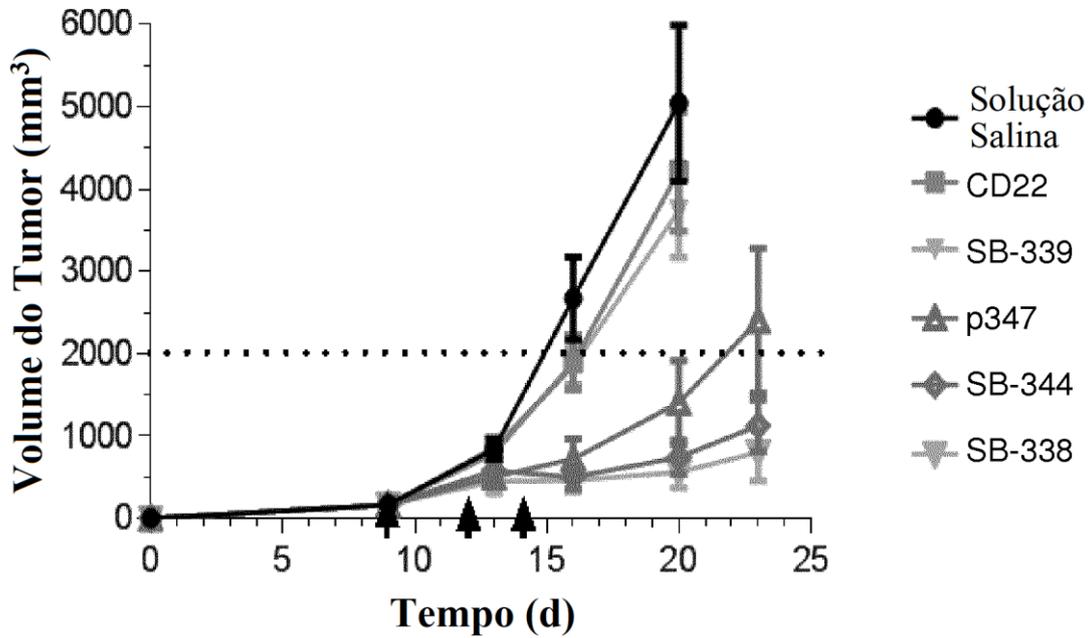


FIG. 38A

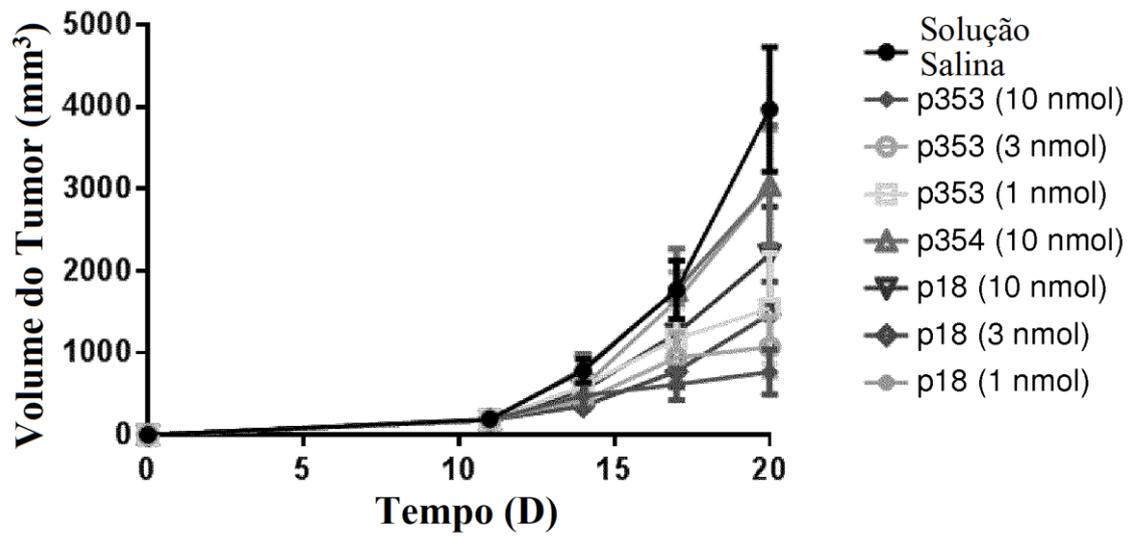


FIG. 38B

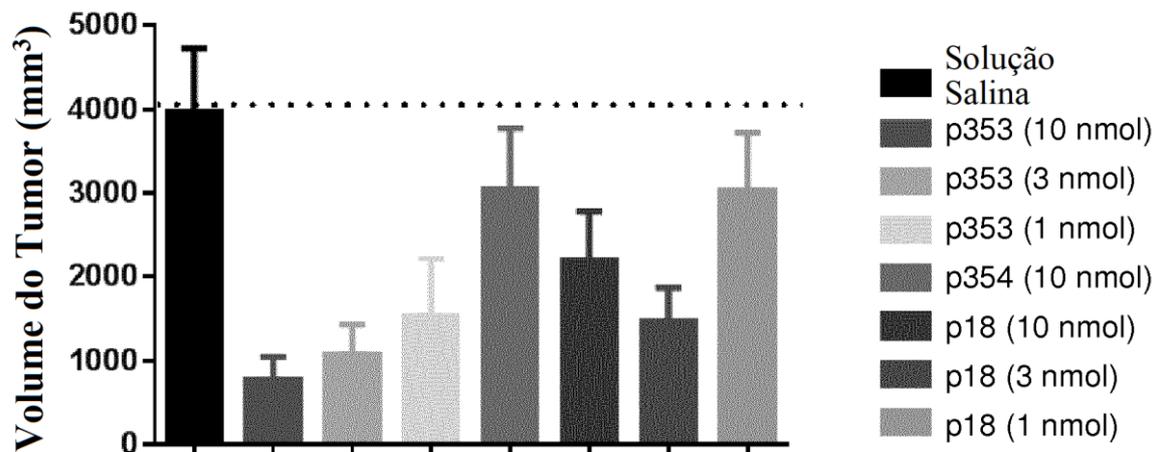


FIG. 39A

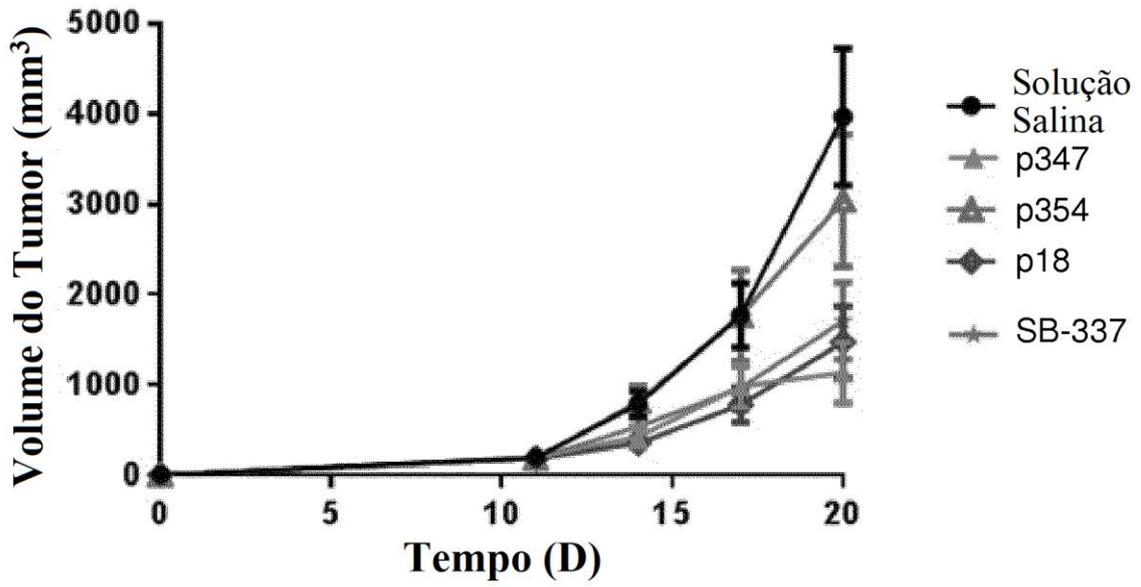


FIG. 39B

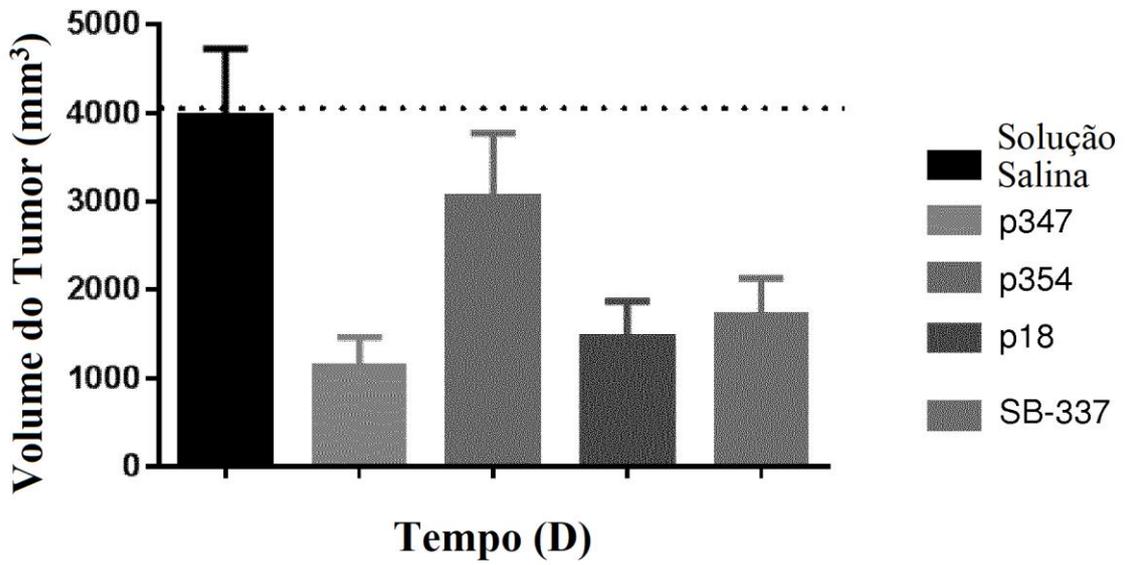


FIG. 40

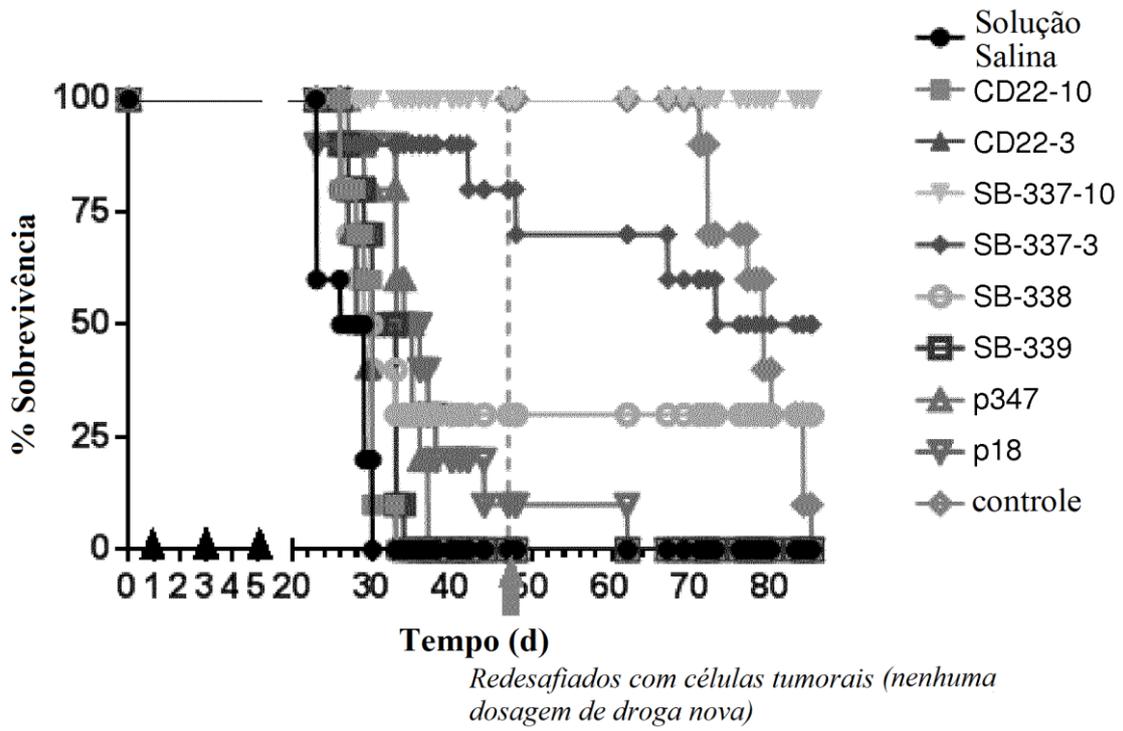


FIG. 41A

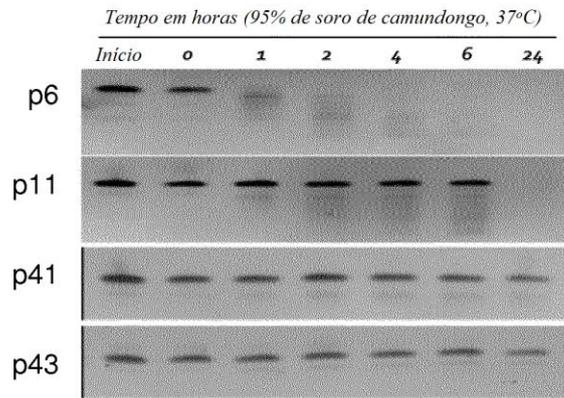


FIG. 41B

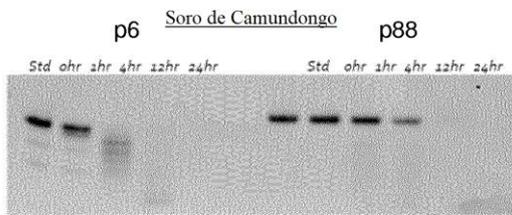


FIG. 41C



FIG. 41D

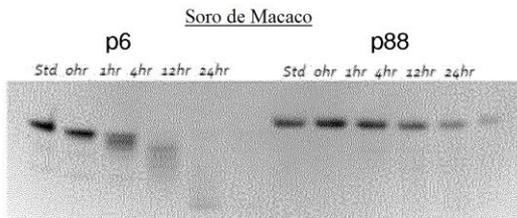


FIG. 41E

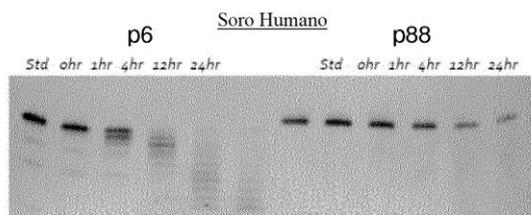


FIG. 42

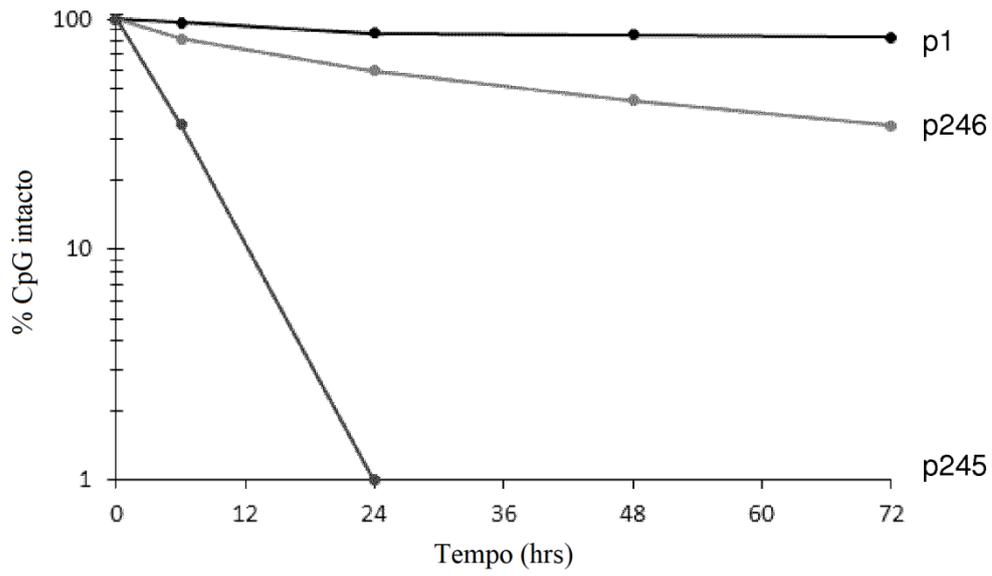


FIG. 43

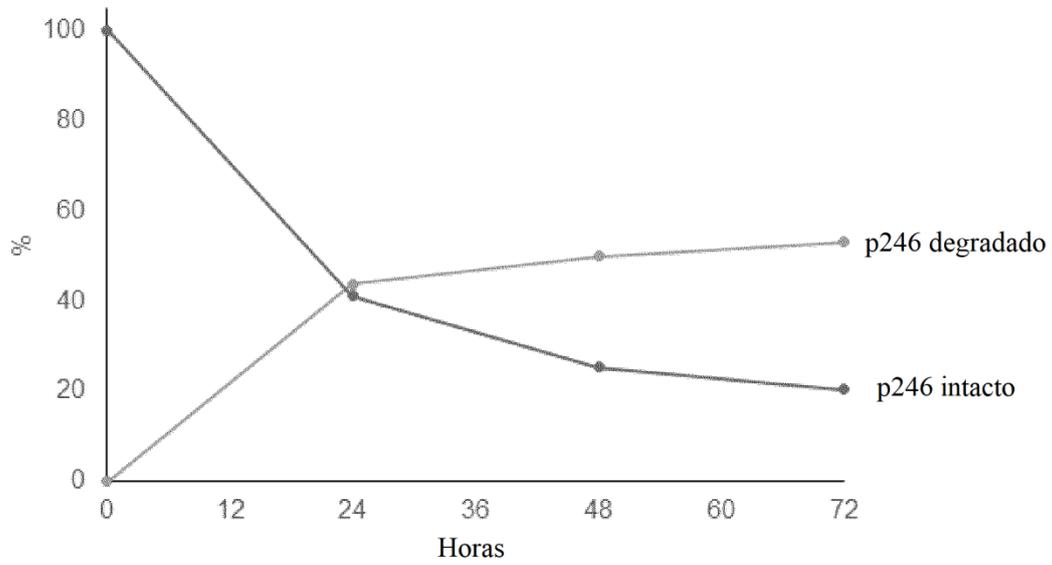


FIG. 44

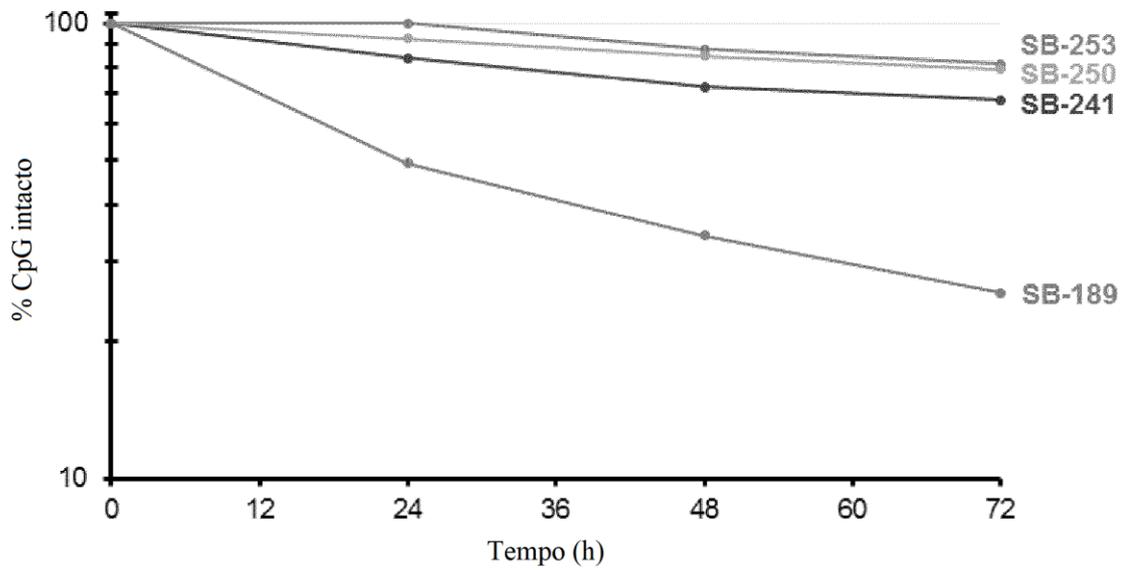
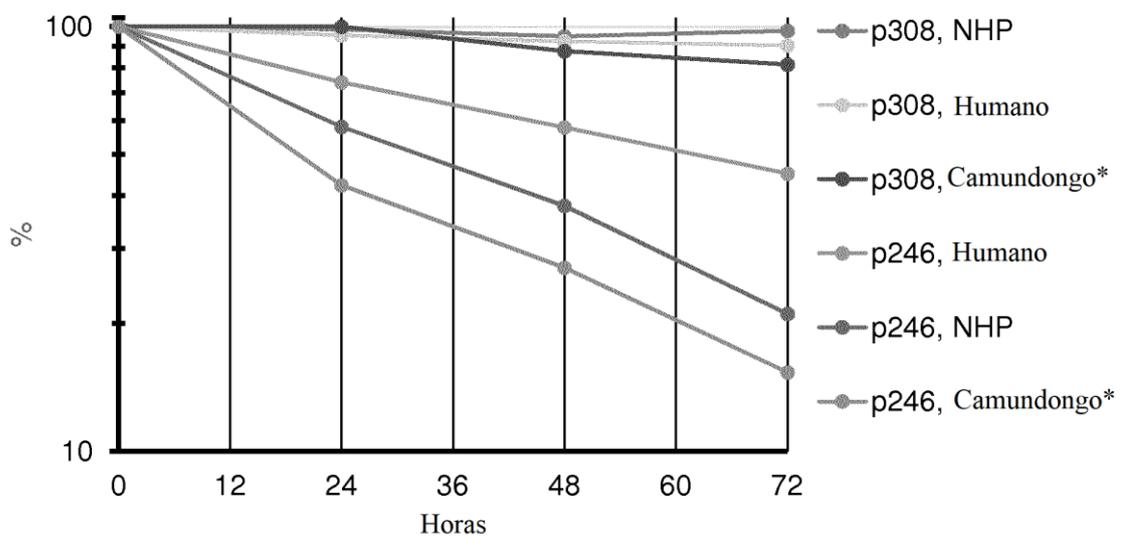


FIG. 45



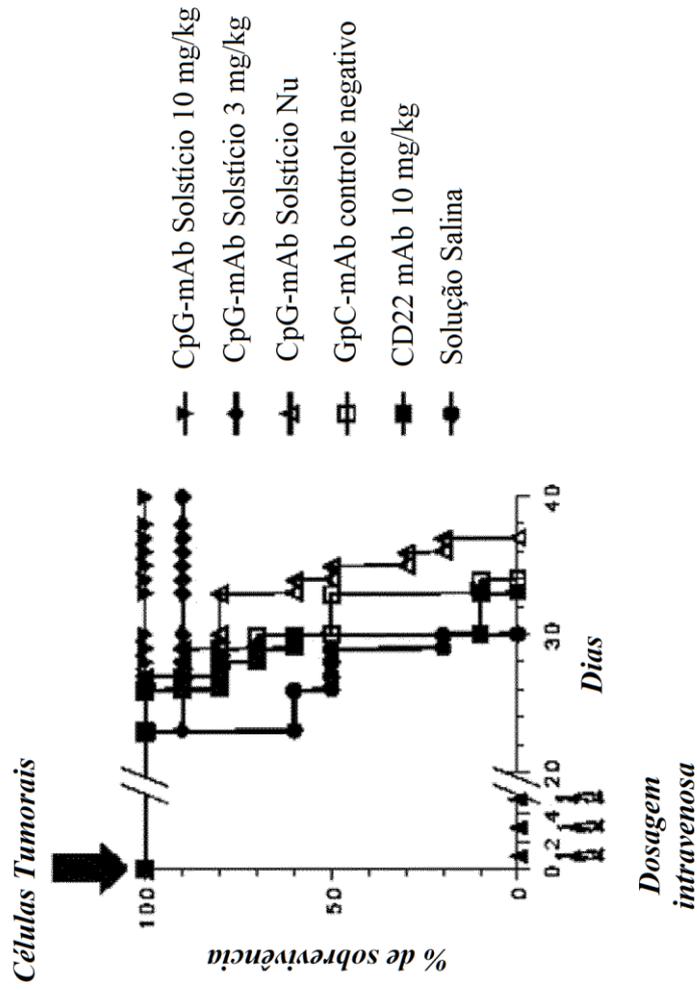


FIG. 46B

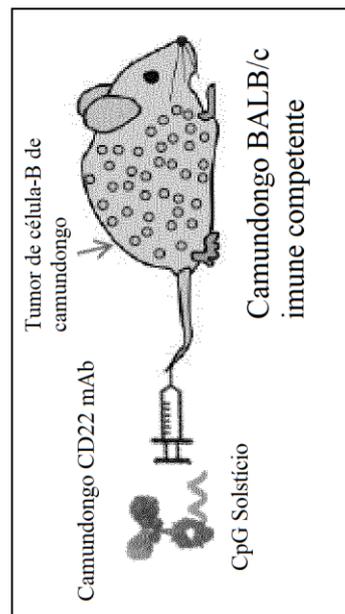


FIG. 46A

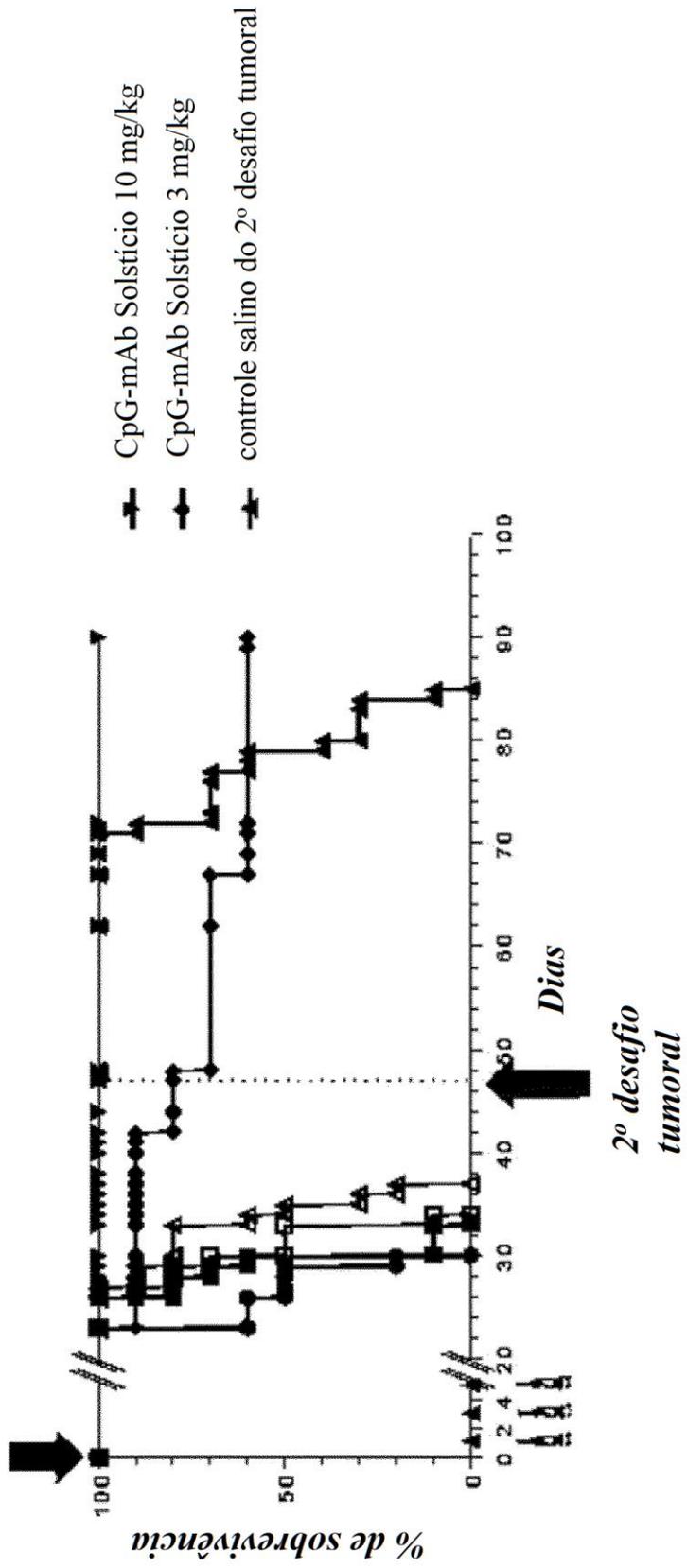


FIG. 46C

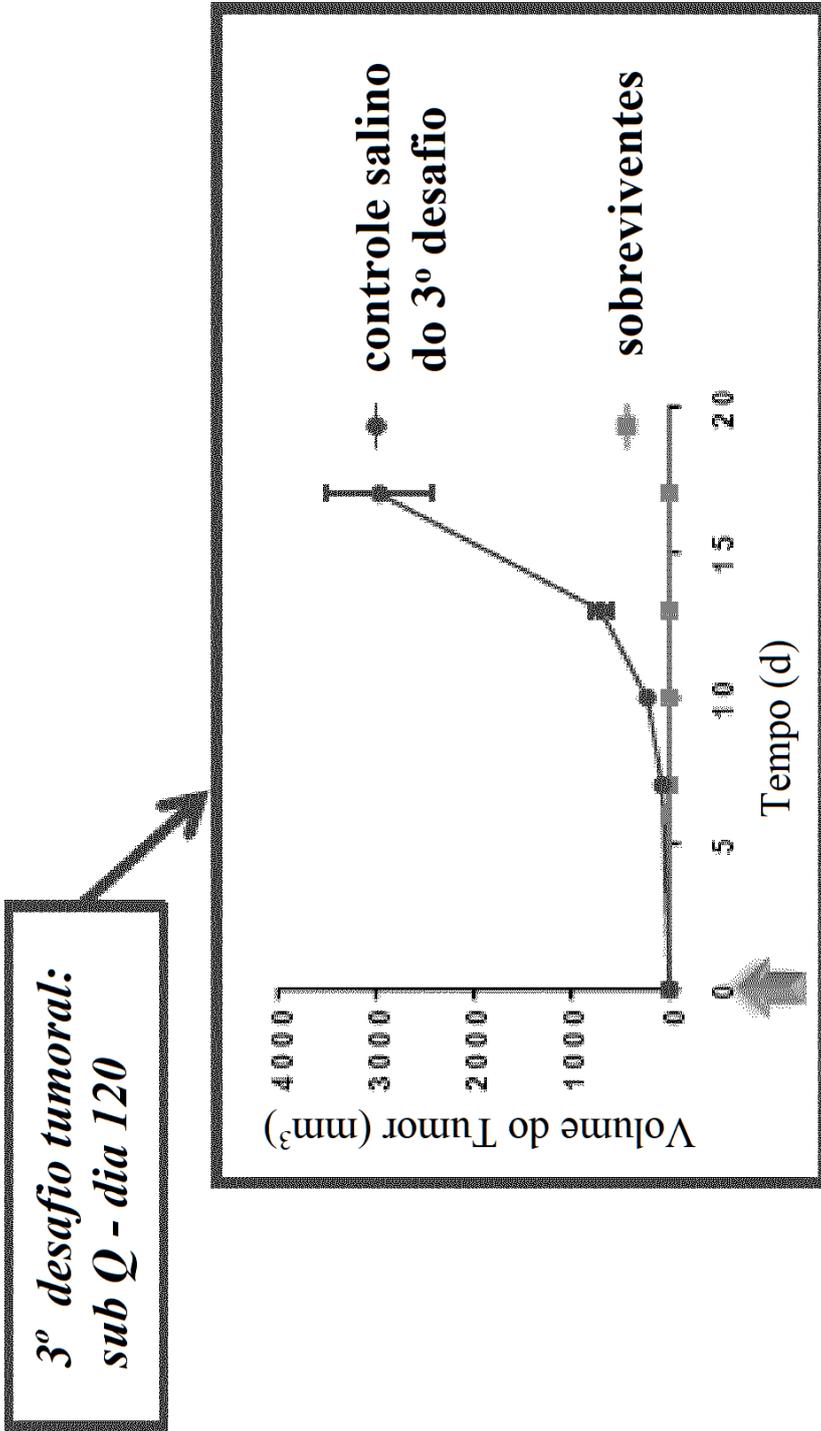


FIG. 46D

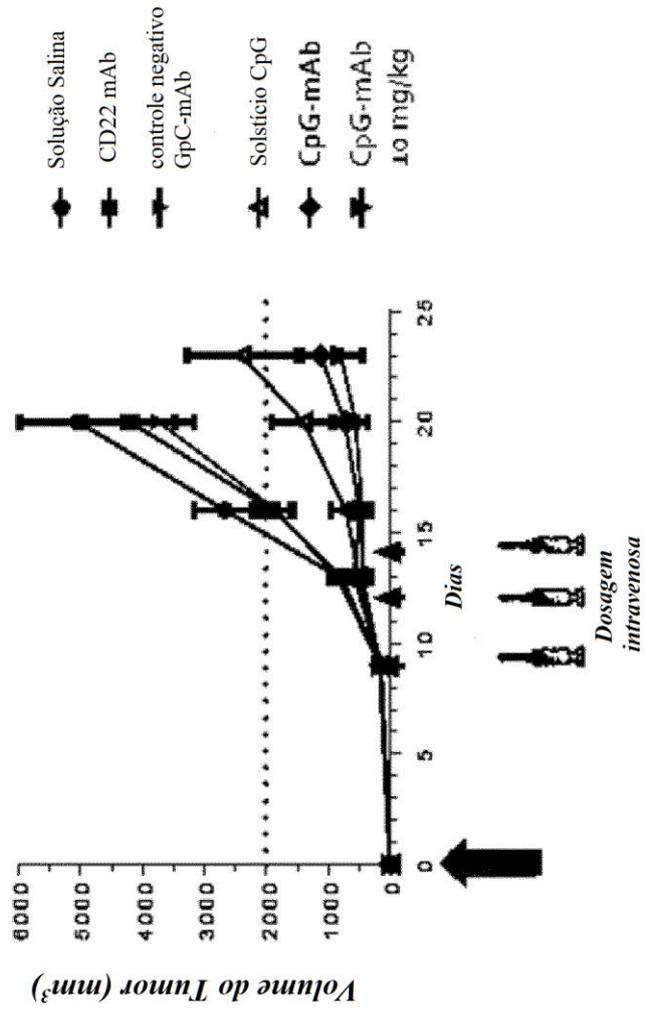


FIG. 47B

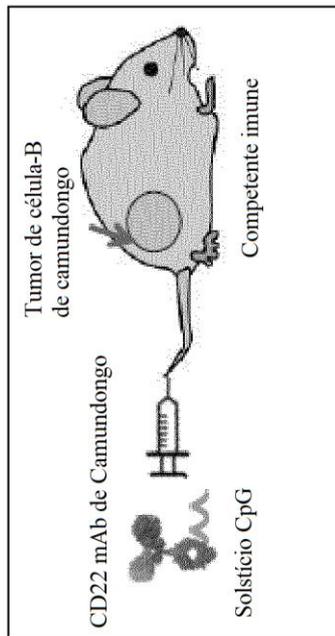


FIG. 47A

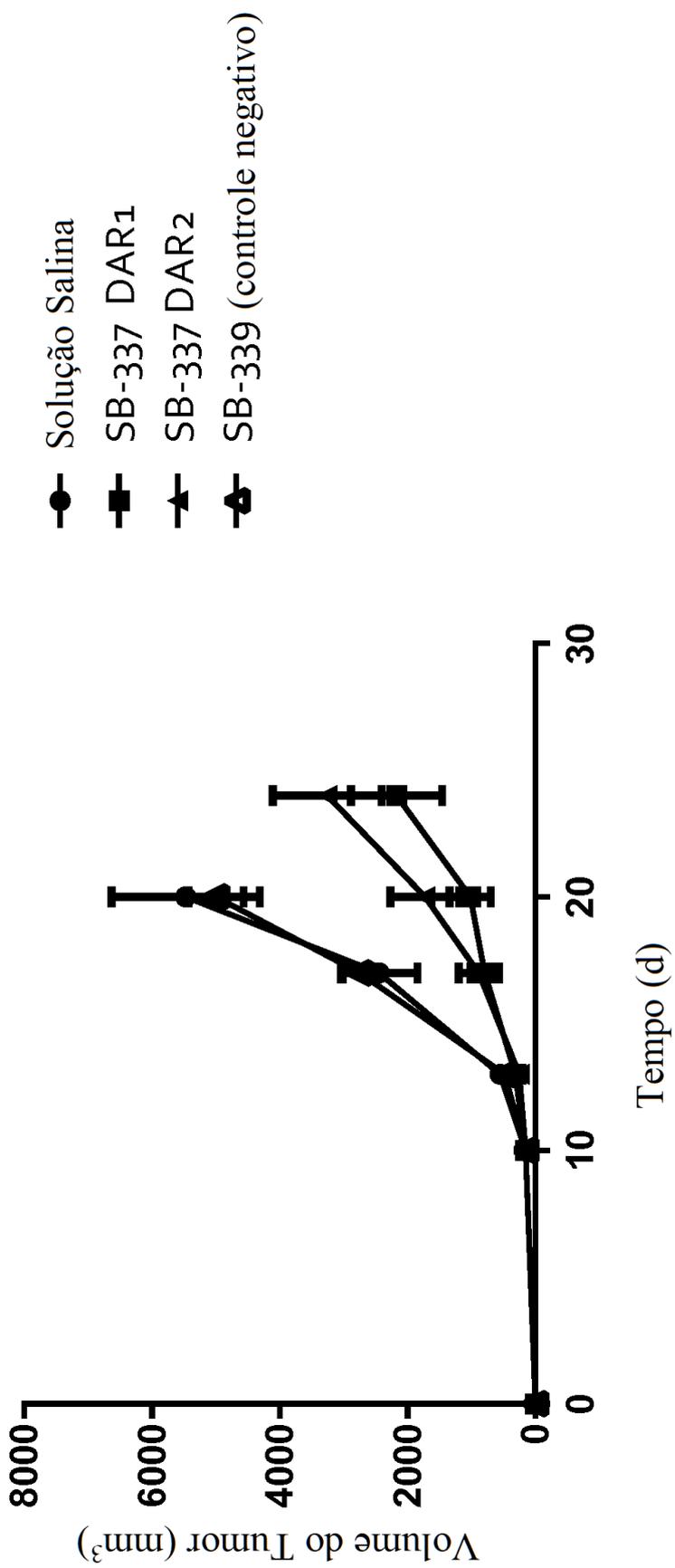


FIG. 47C

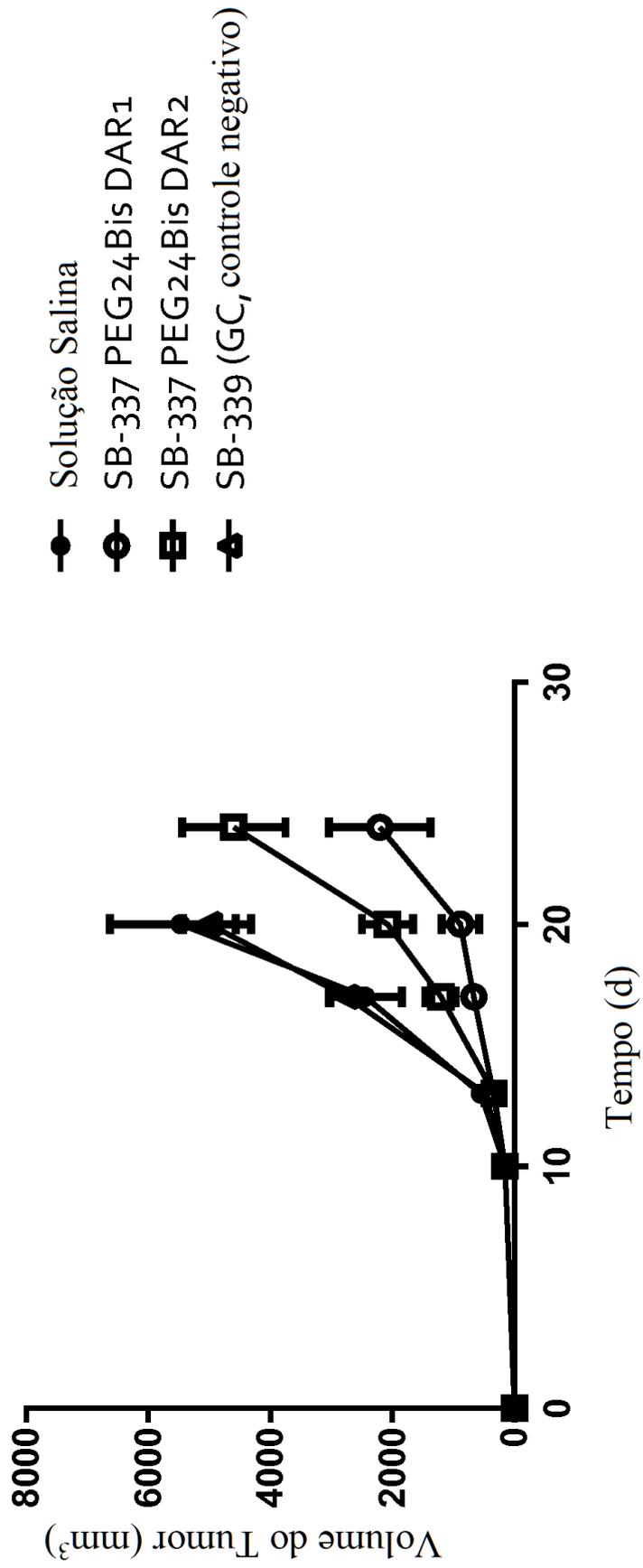


FIG. 47D

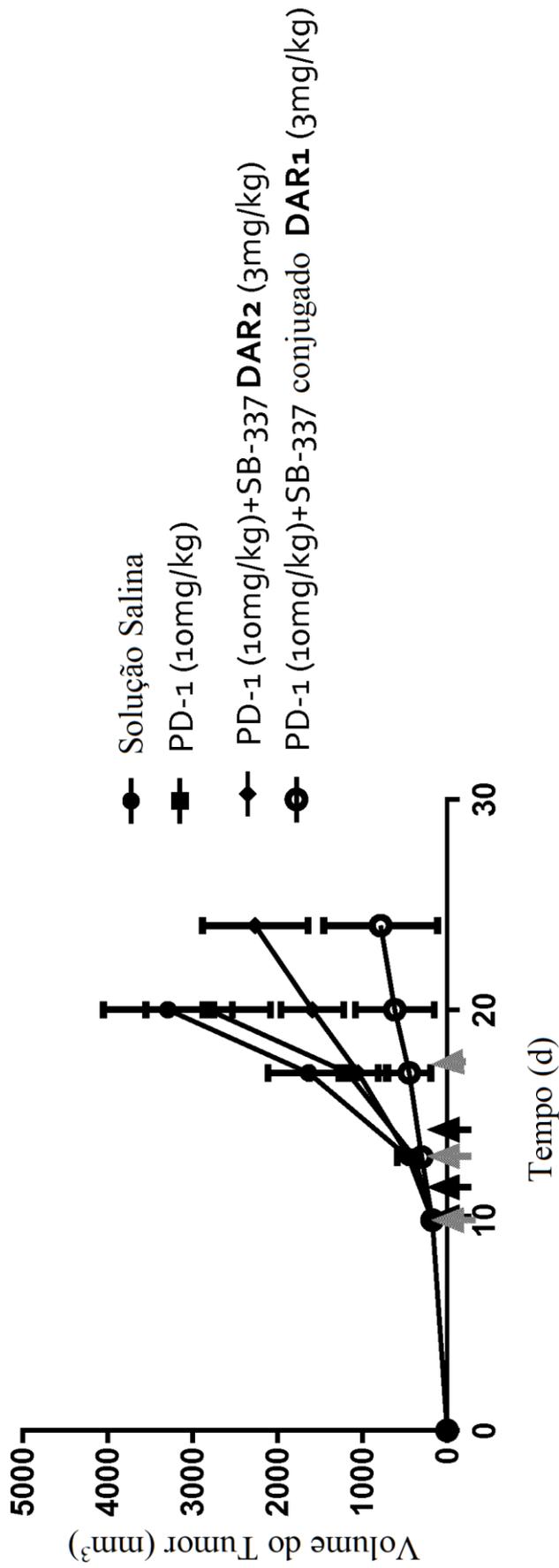


FIG. 47E

**Mudança de Peso Corporal
Comparação Dia 7 ao Dia 0**

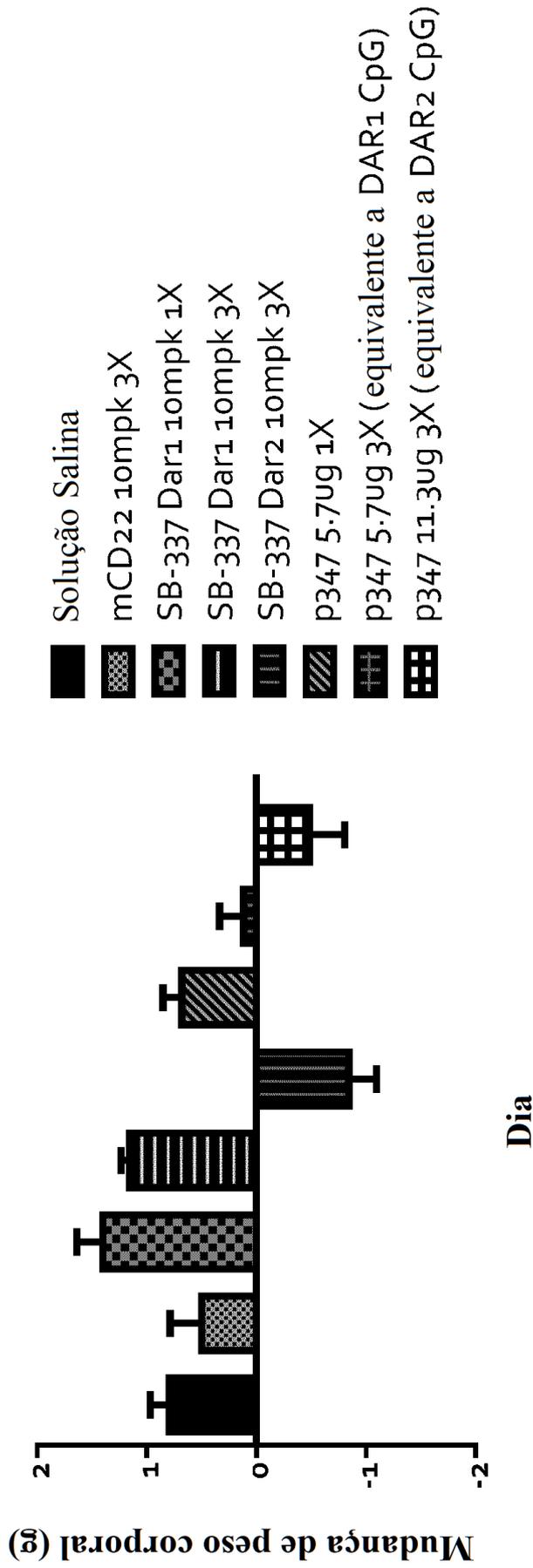


FIG. 47F

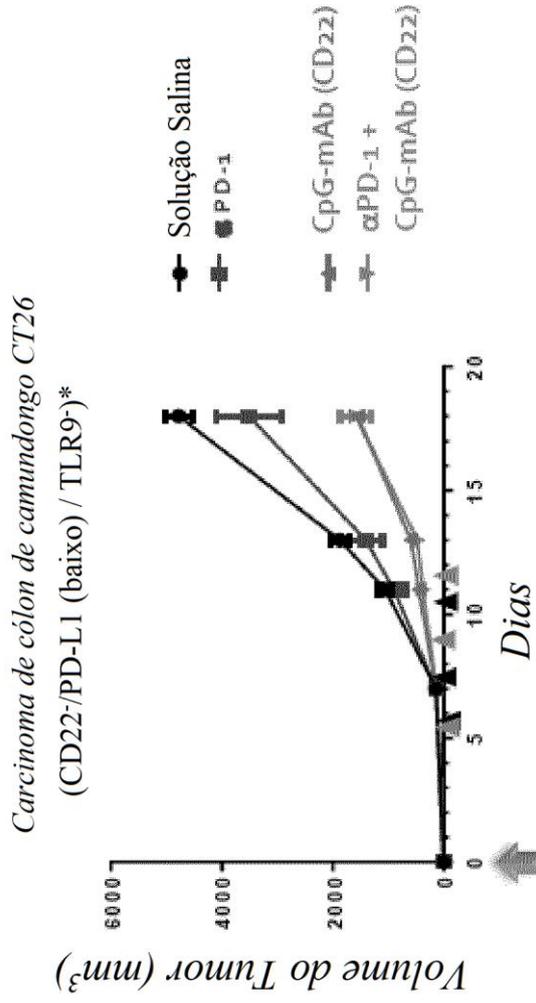


FIG. 48B

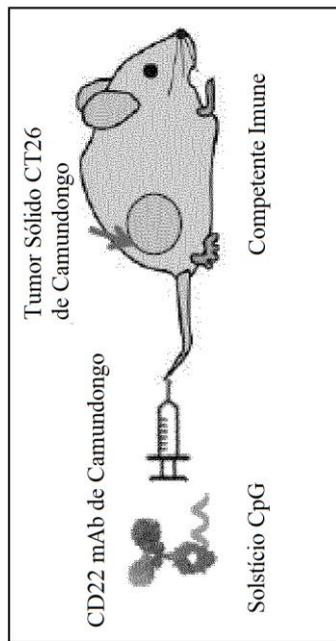


FIG. 48A

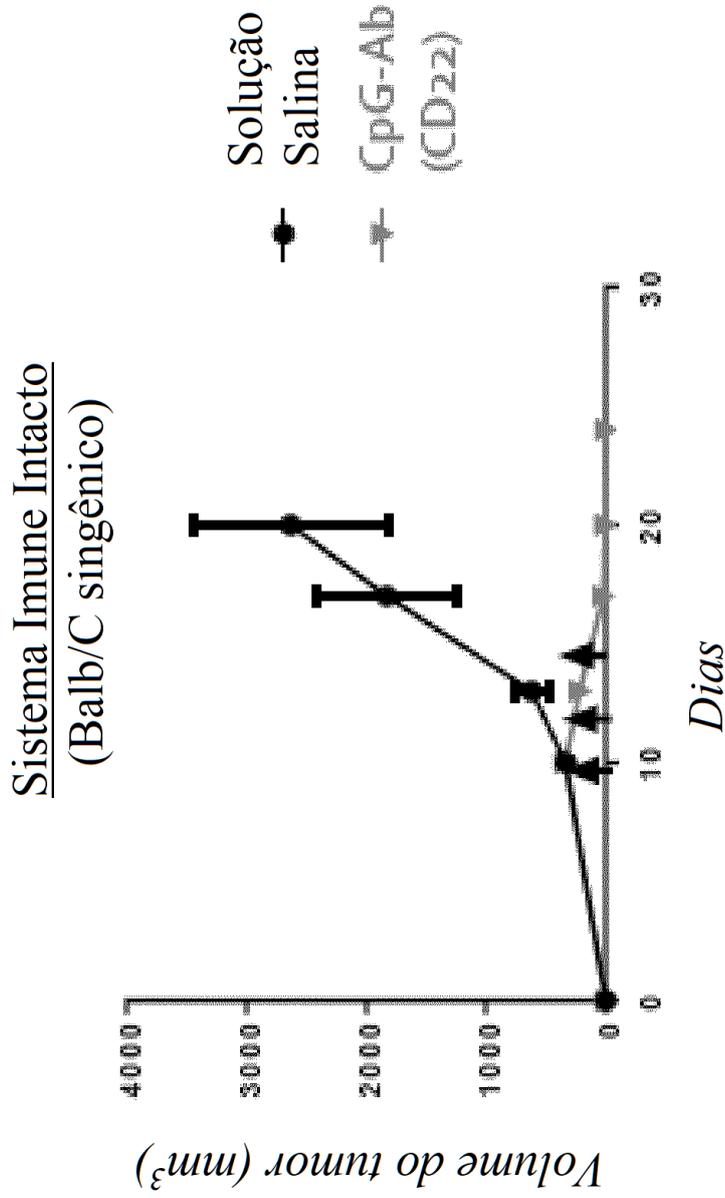


FIG. 49A

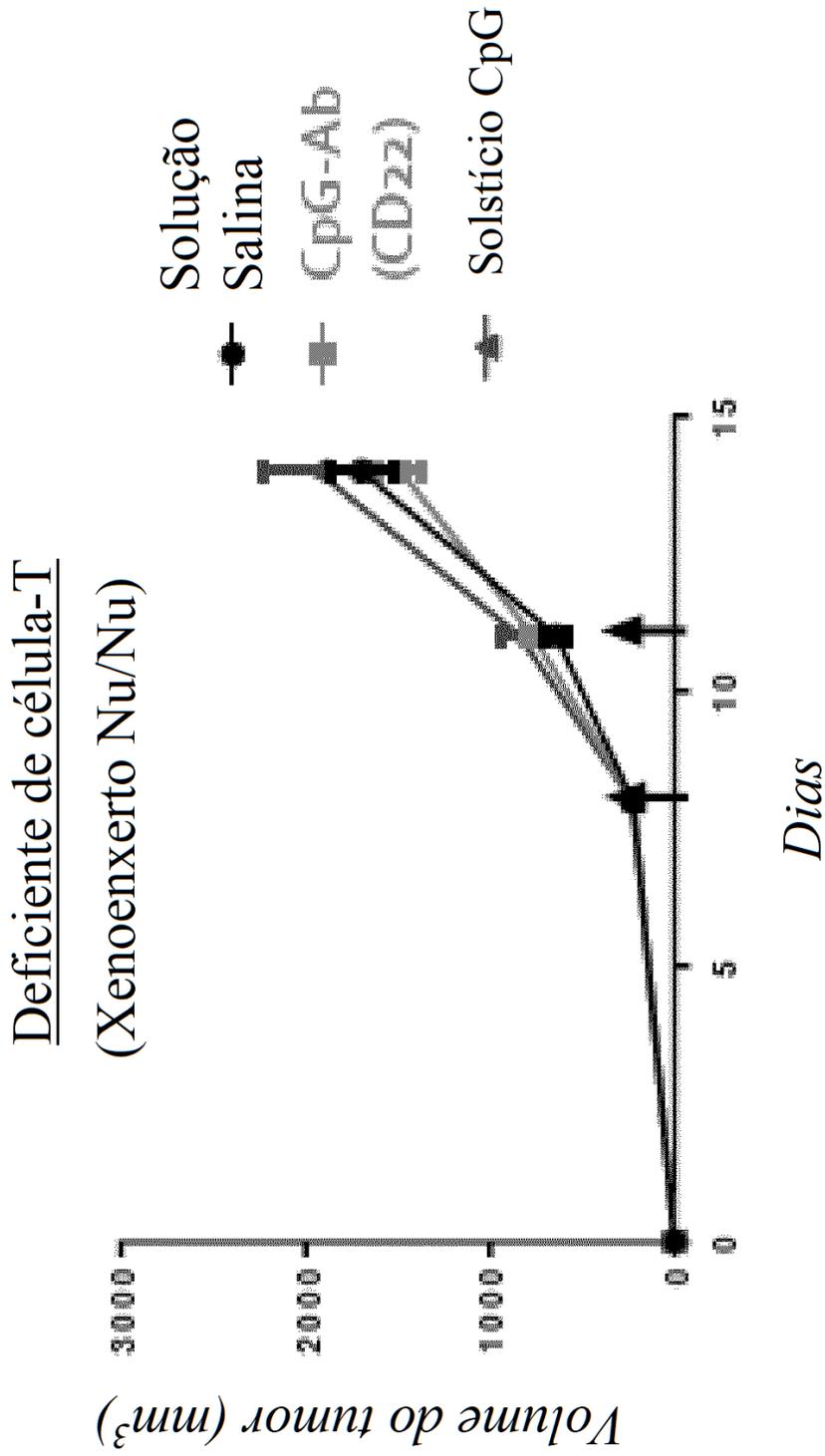


FIG. 49B

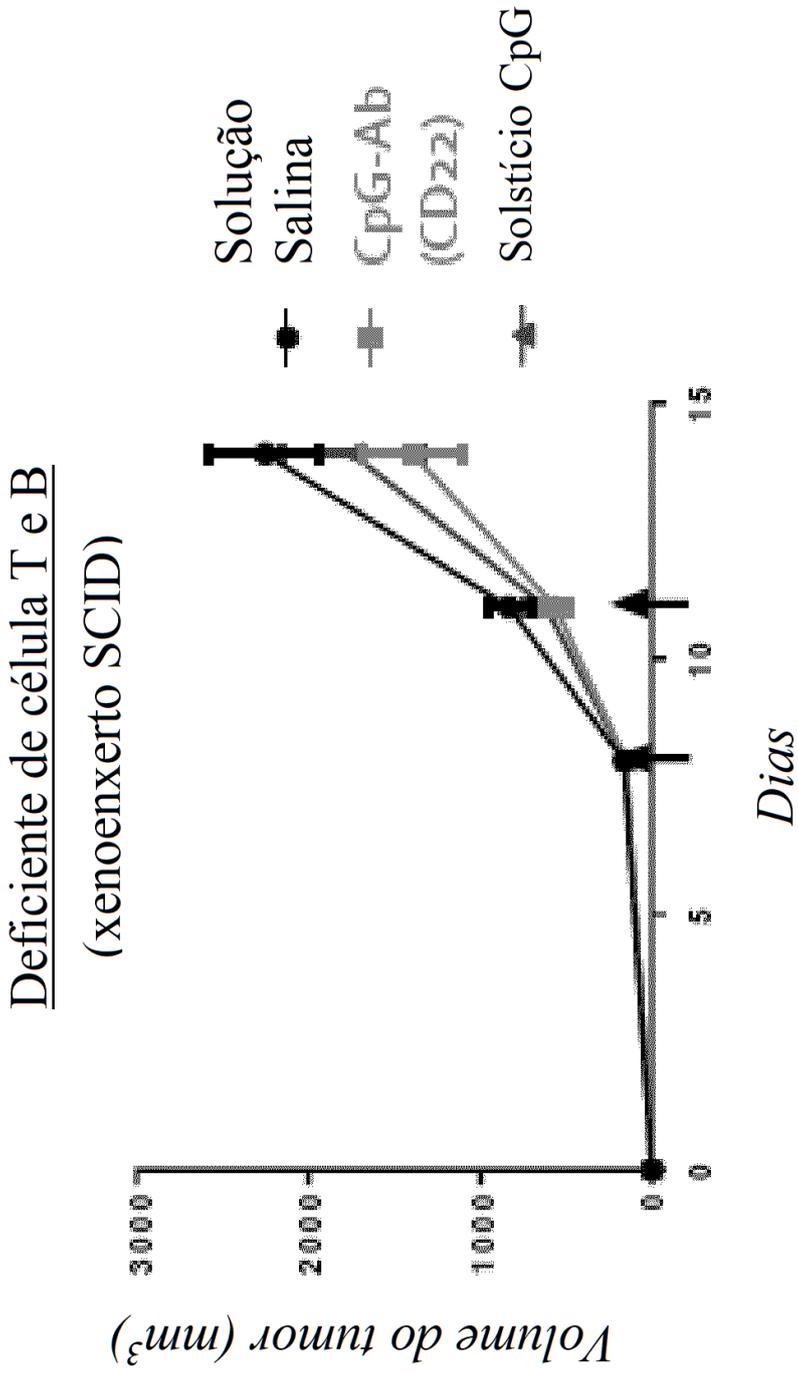


FIG. 49C

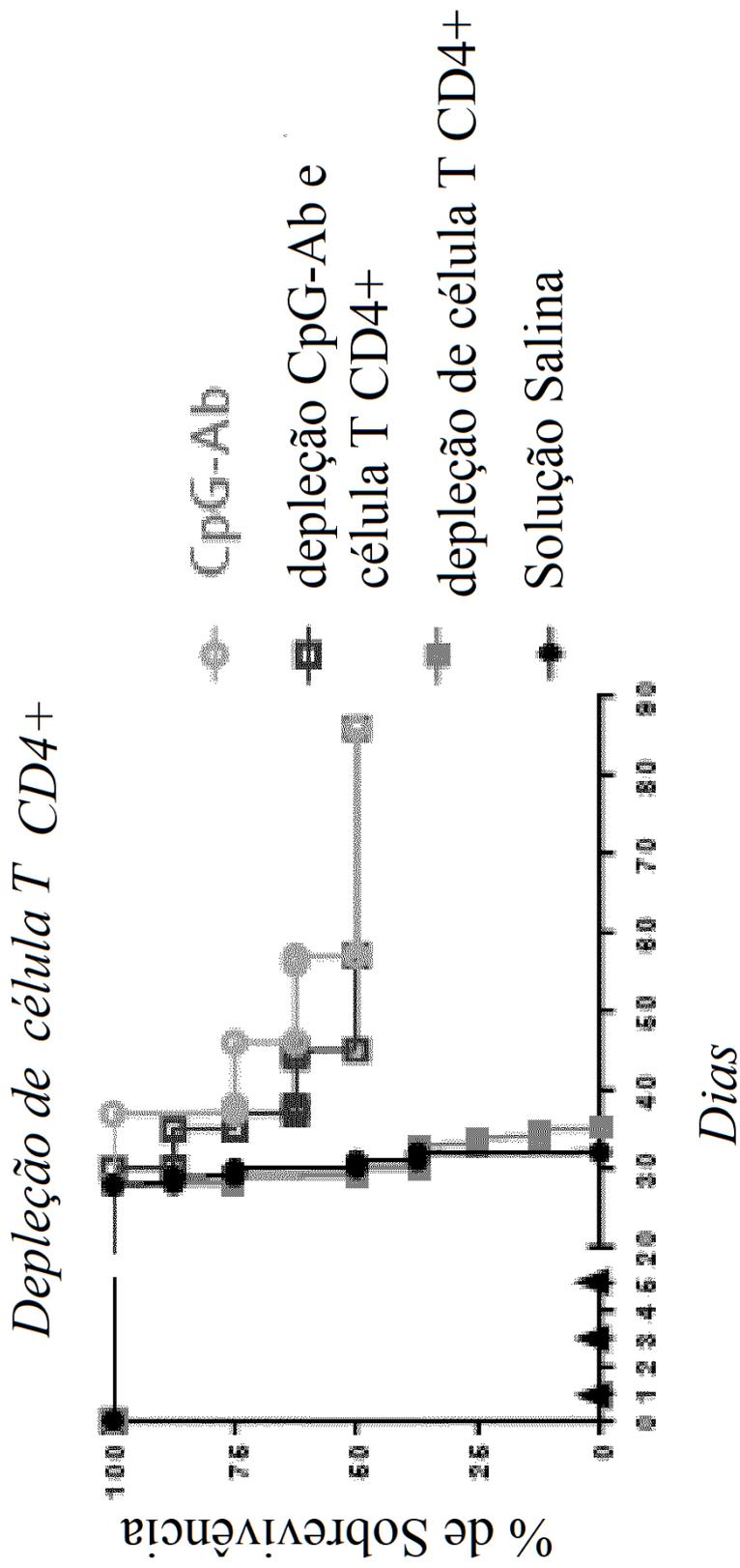


FIG. 50A

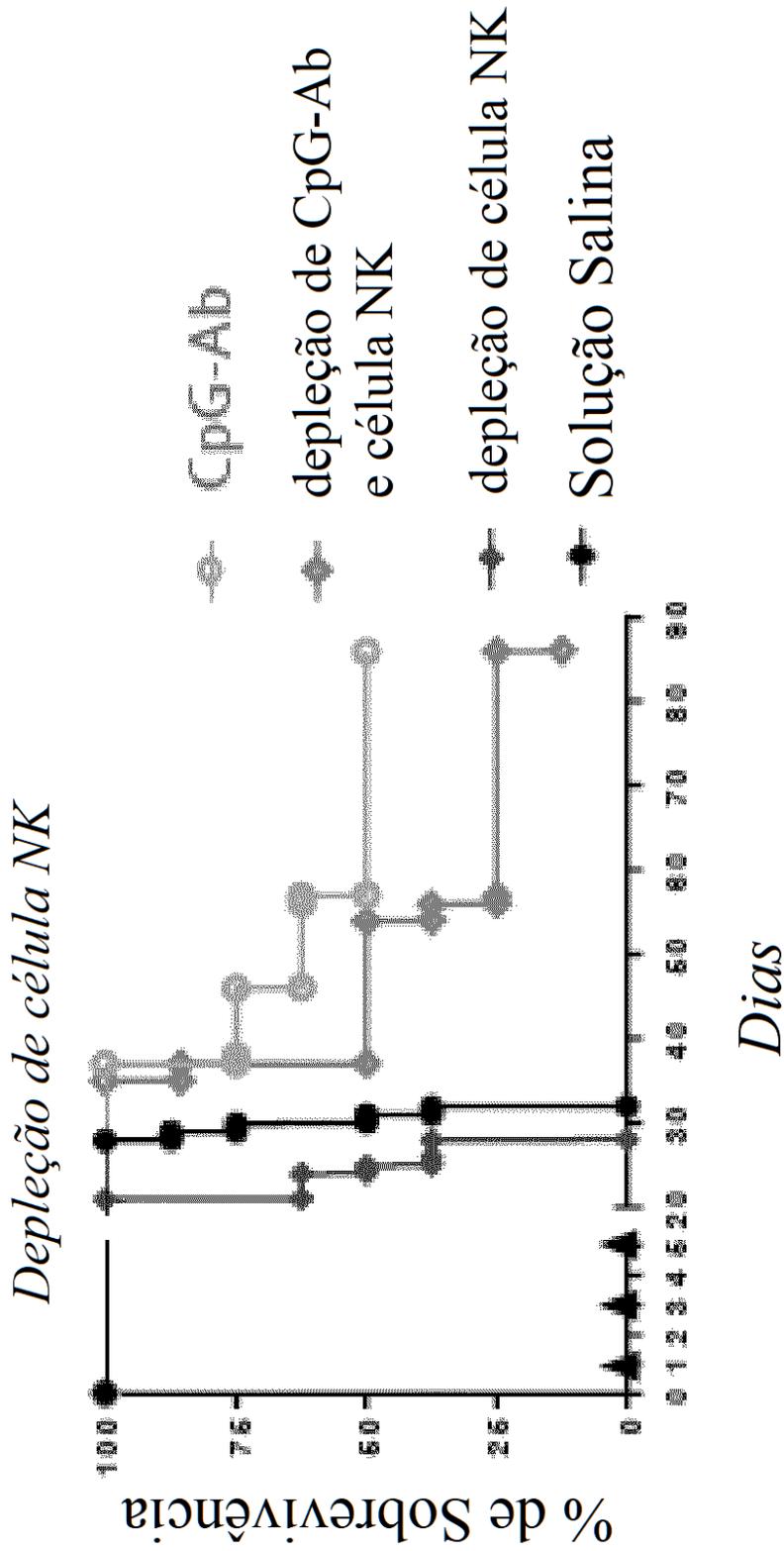


FIG. 50B

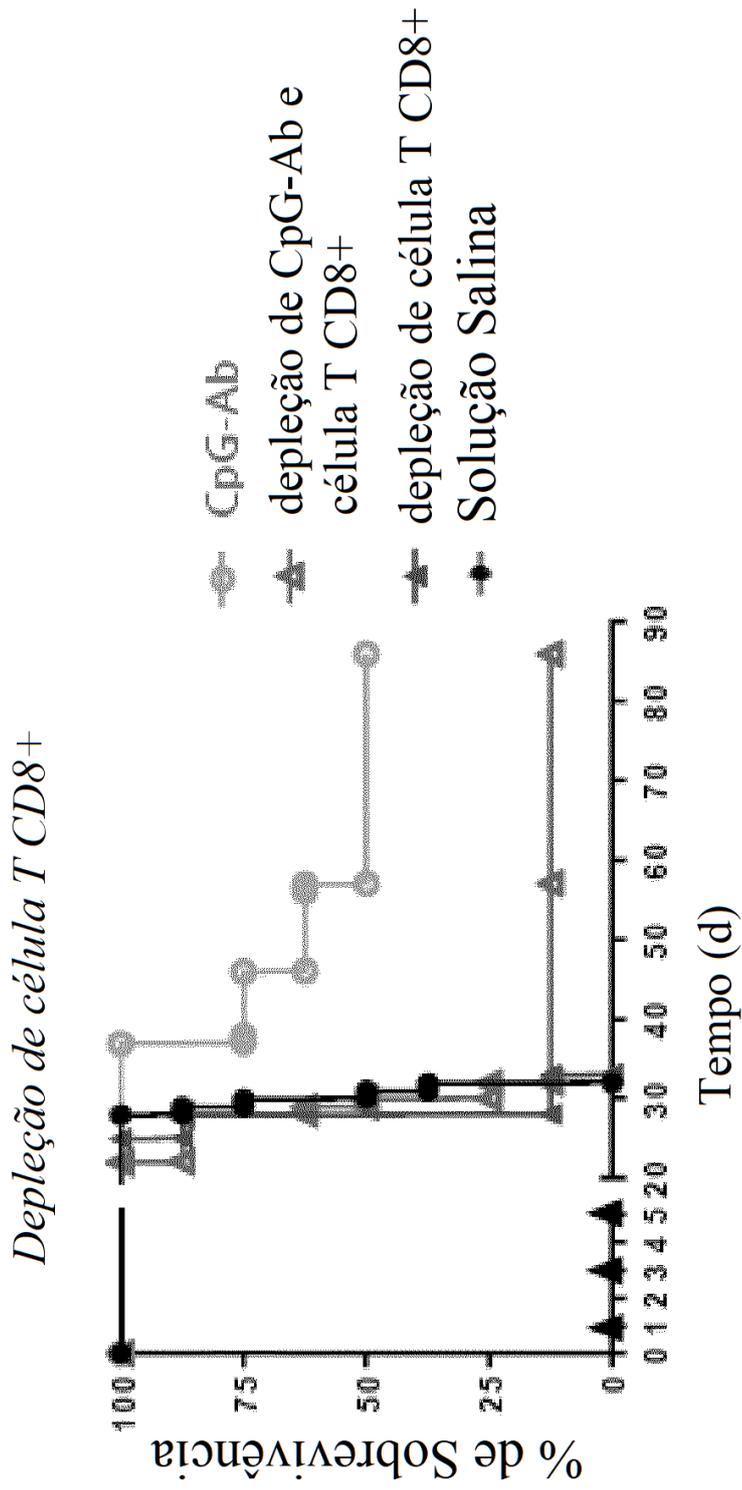


FIG. 50C

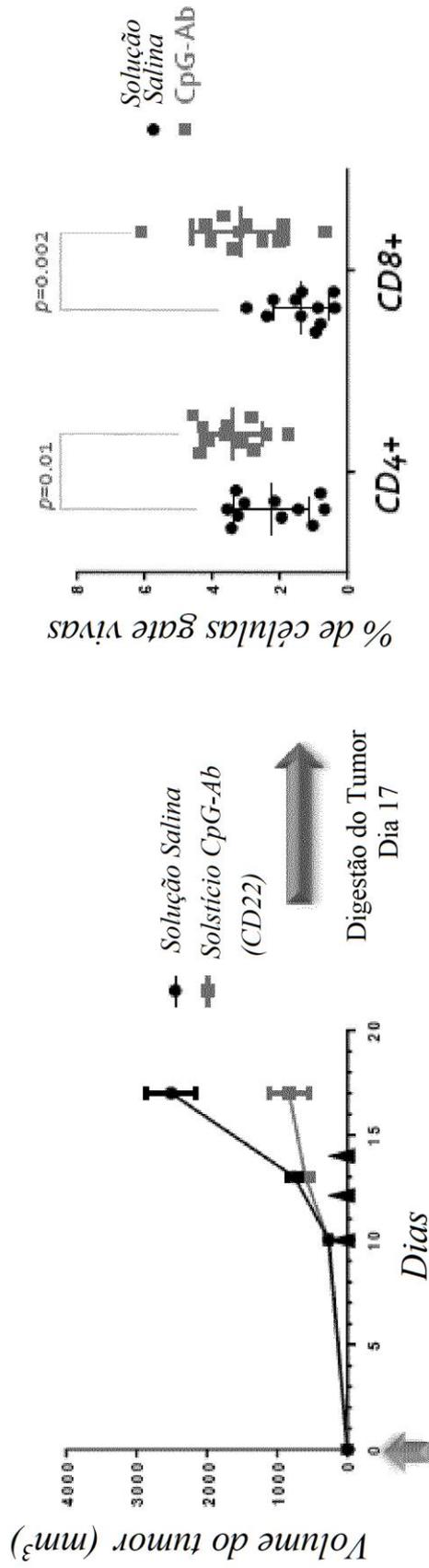


FIG. 51B

FIG. 51A

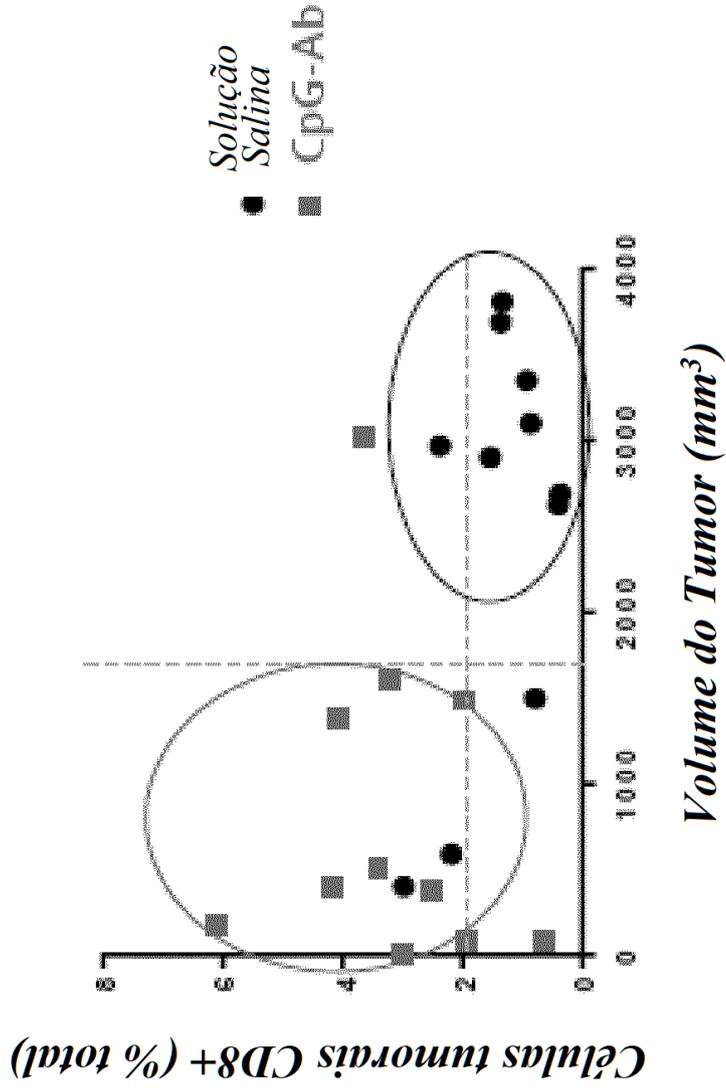


FIG. 51C

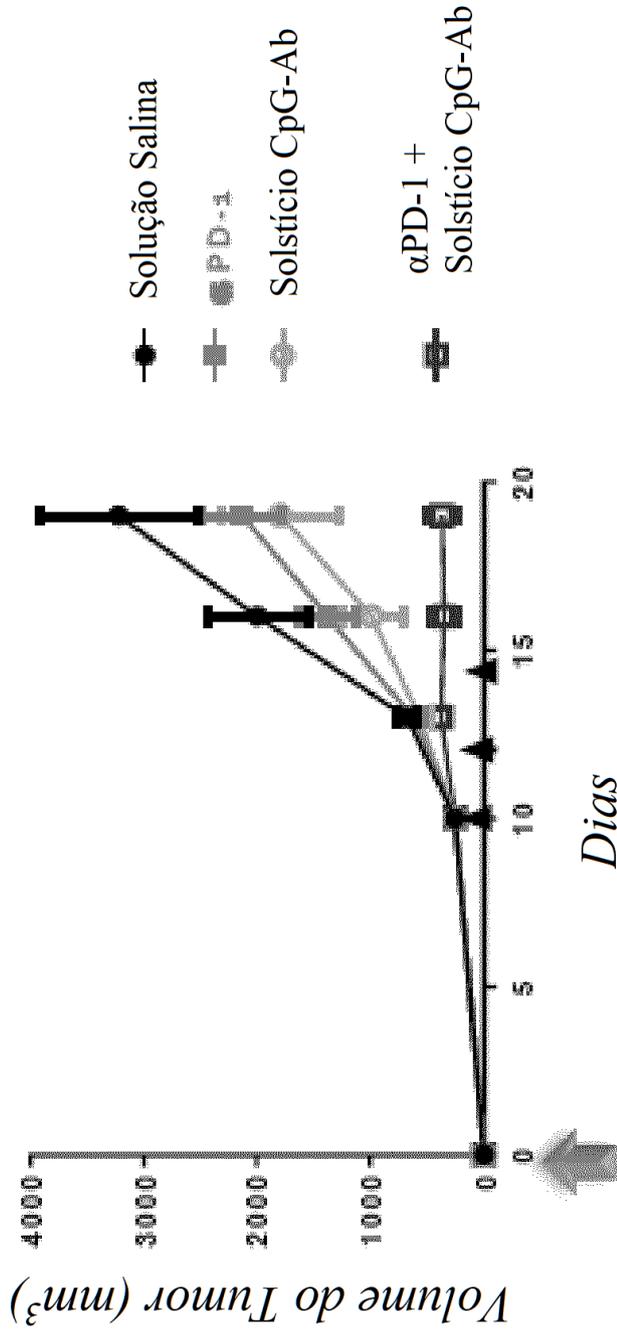


FIG. 52A

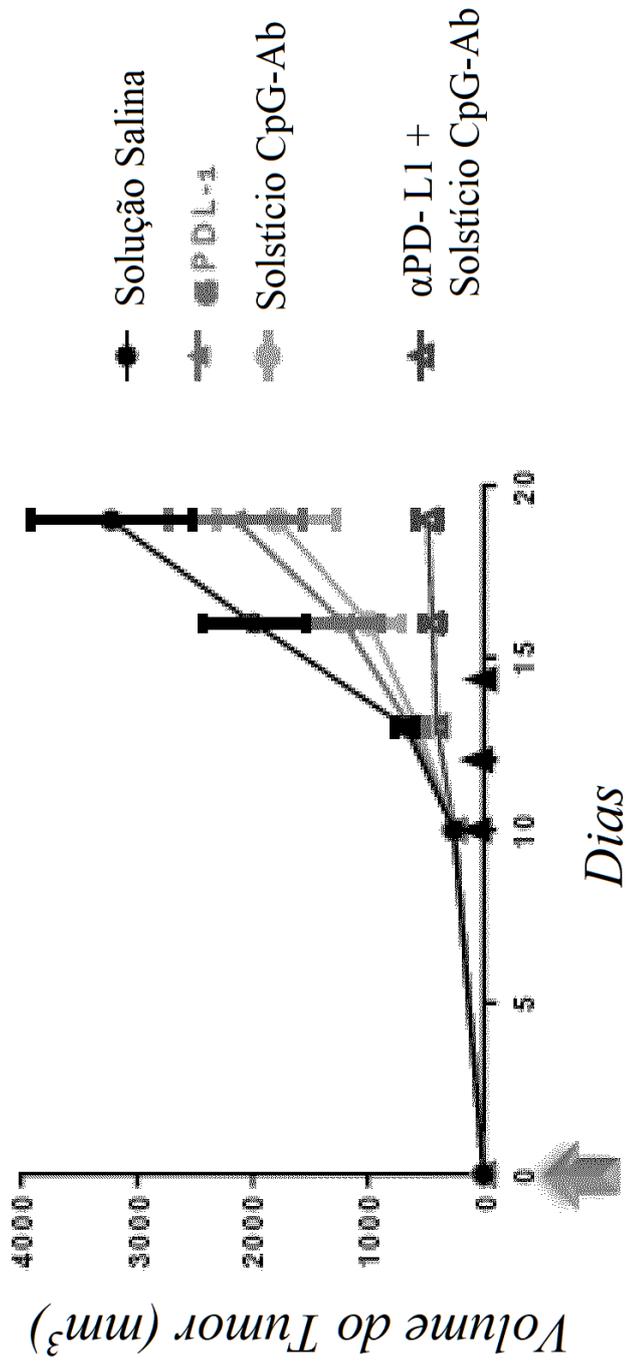


FIG. 52B

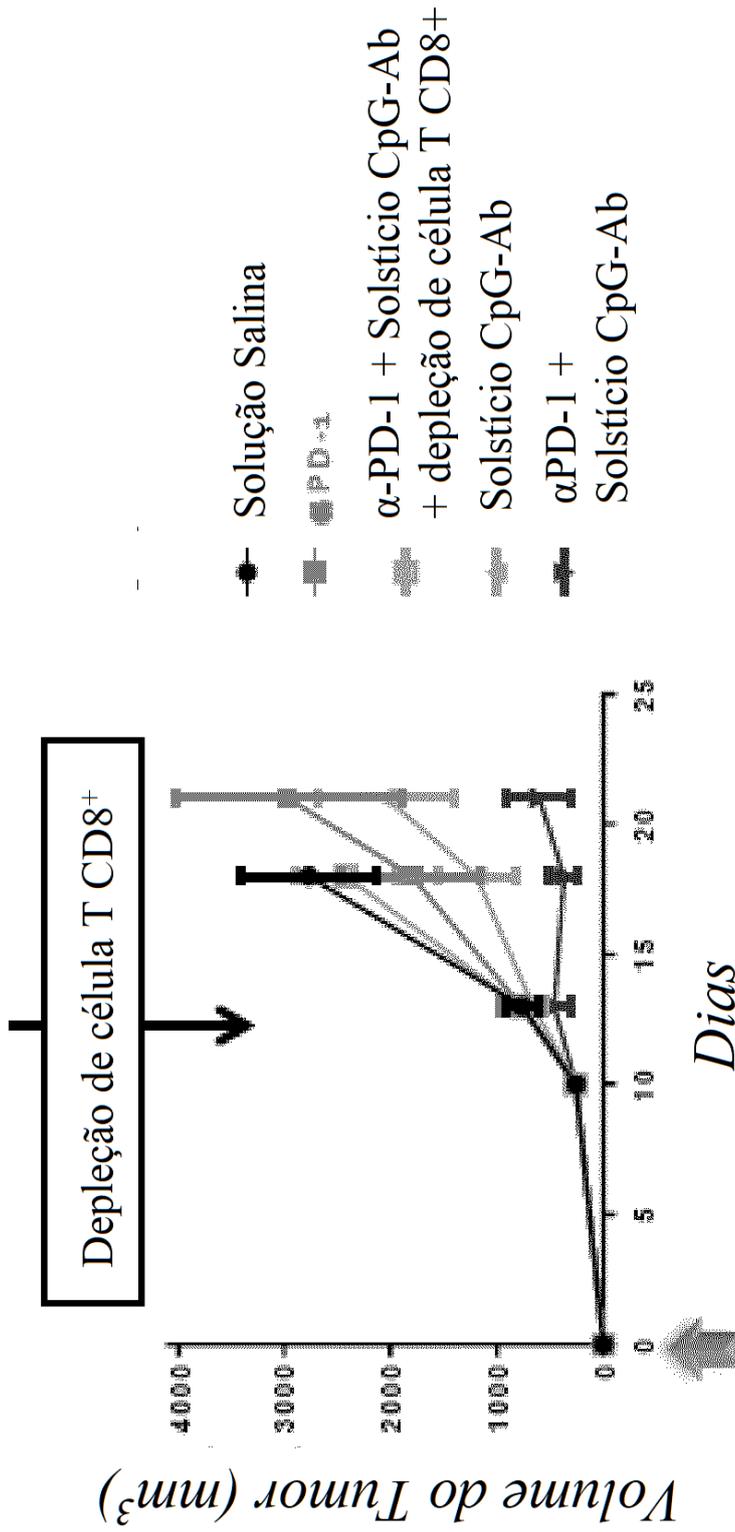


FIG. 52C

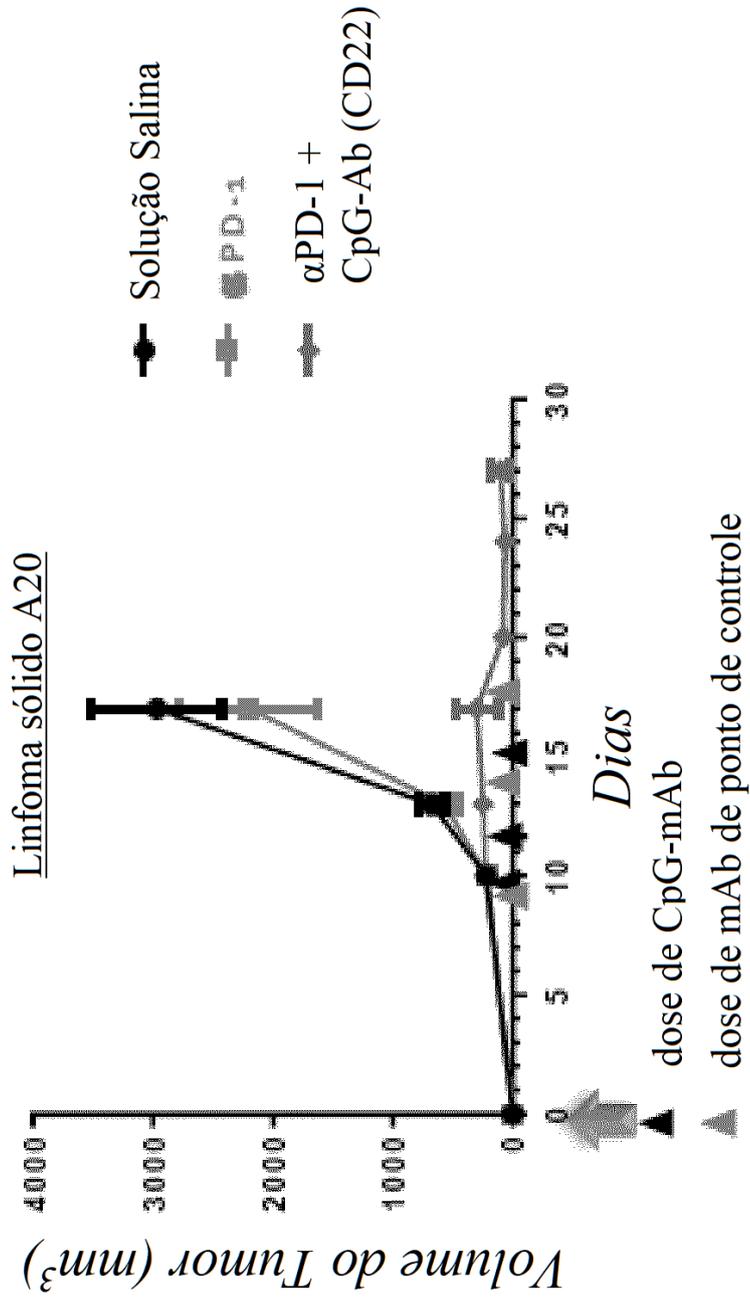


FIG. 53A

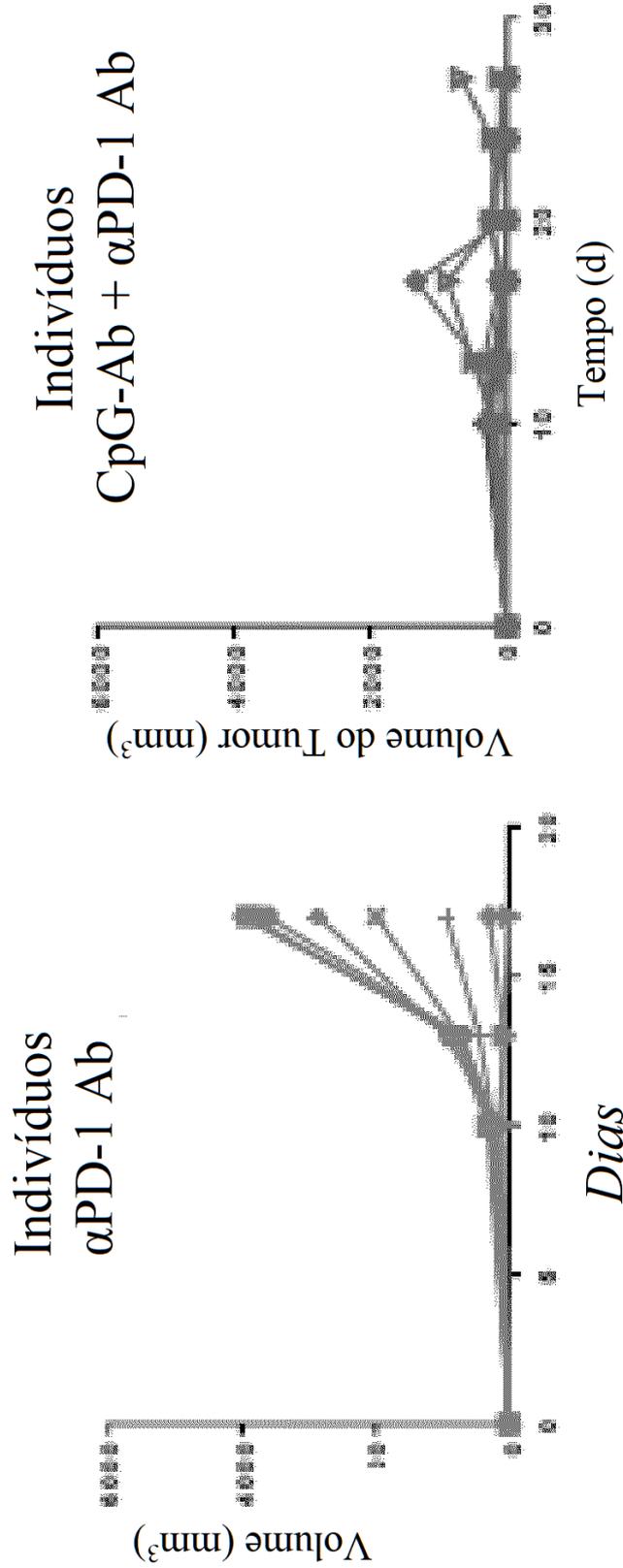


FIG. 53C

FIG. 53B

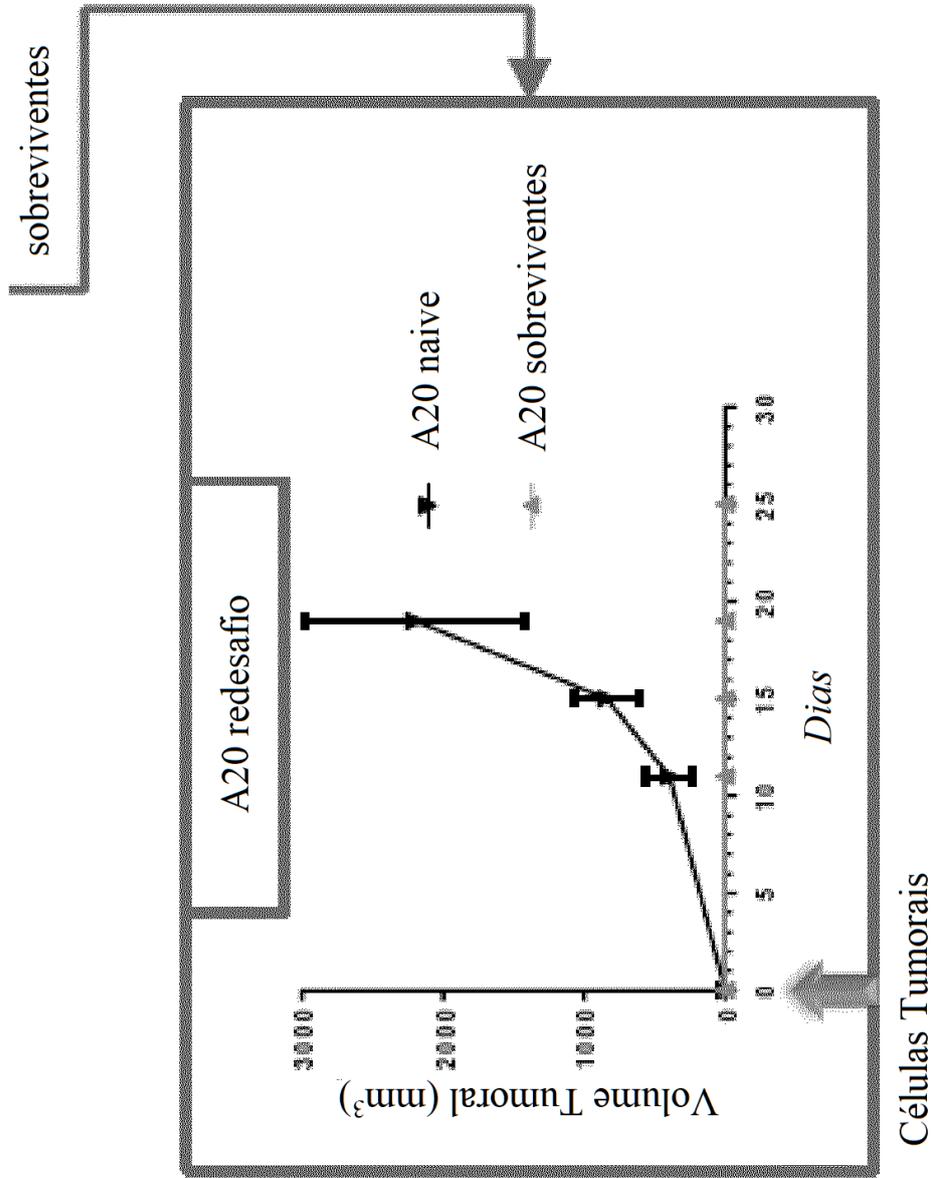


FIG. 53D

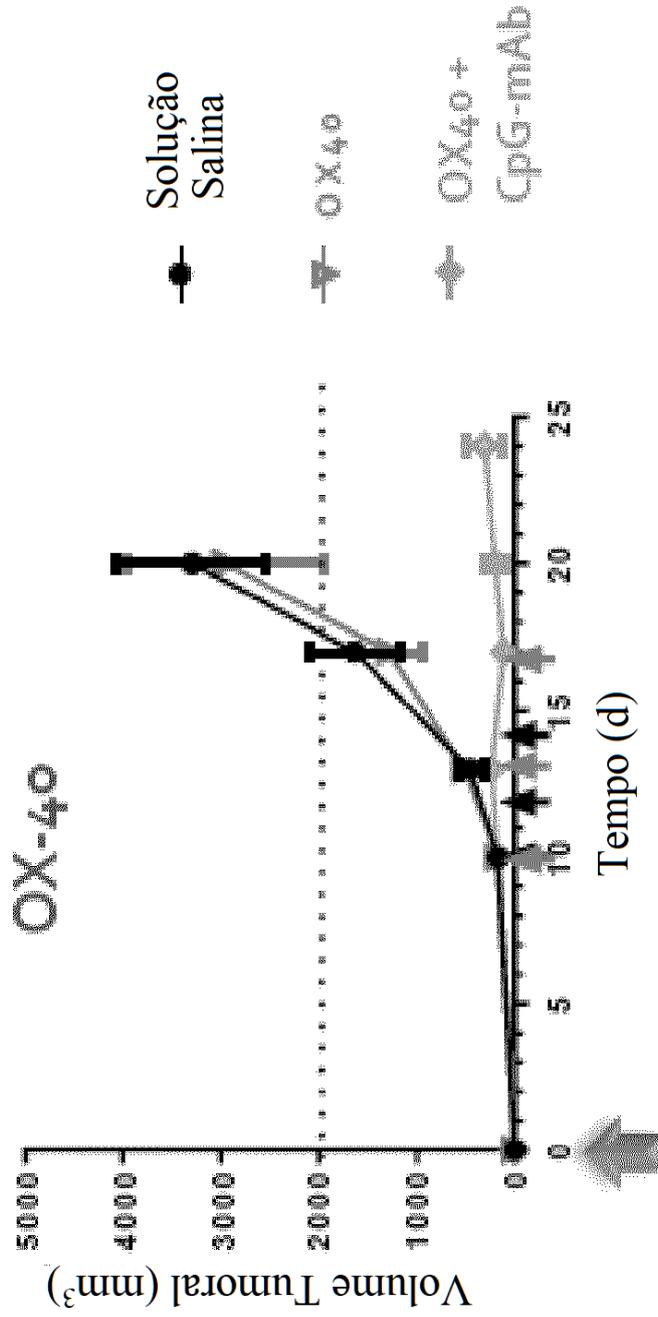


FIG. 54A

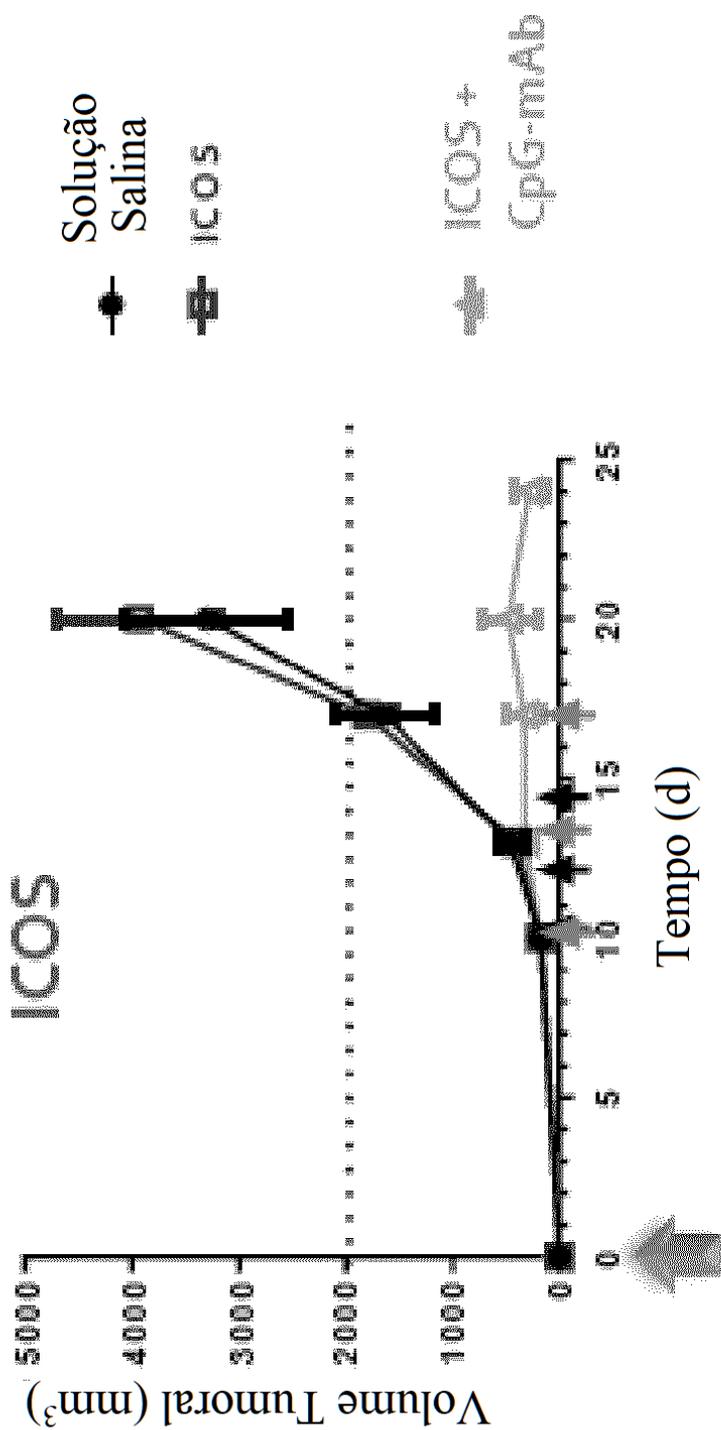


FIG. 54B

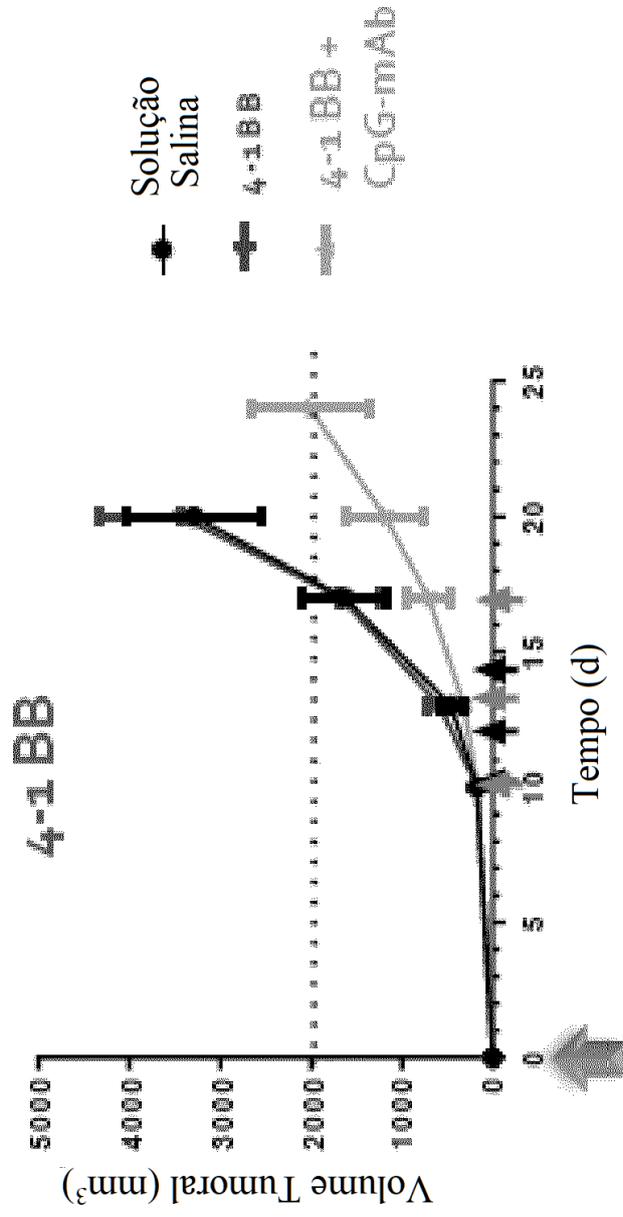


FIG. 54C

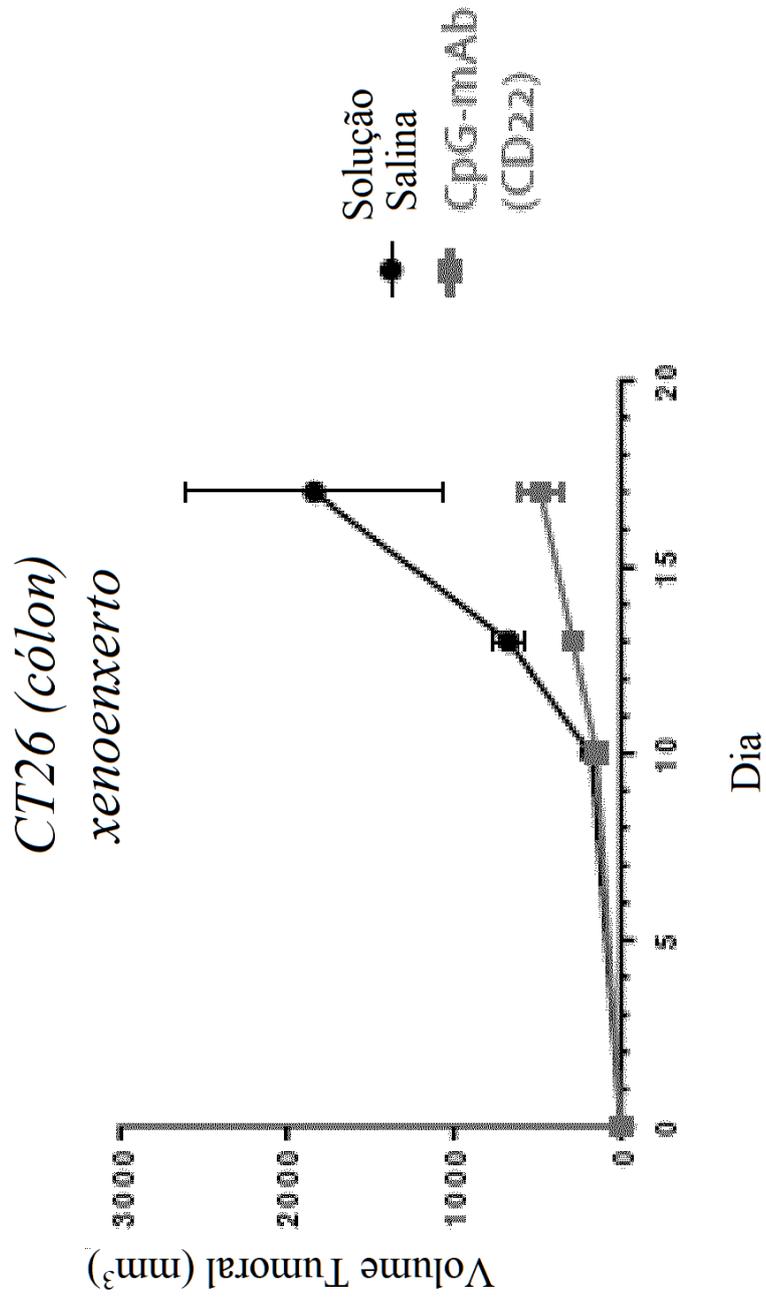
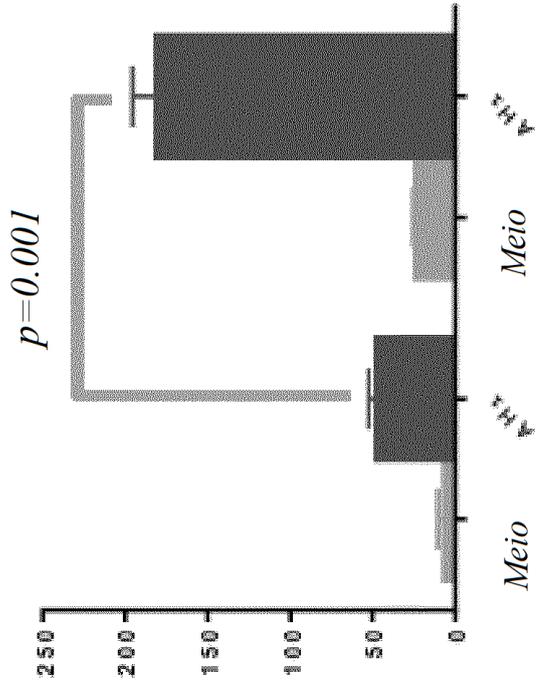


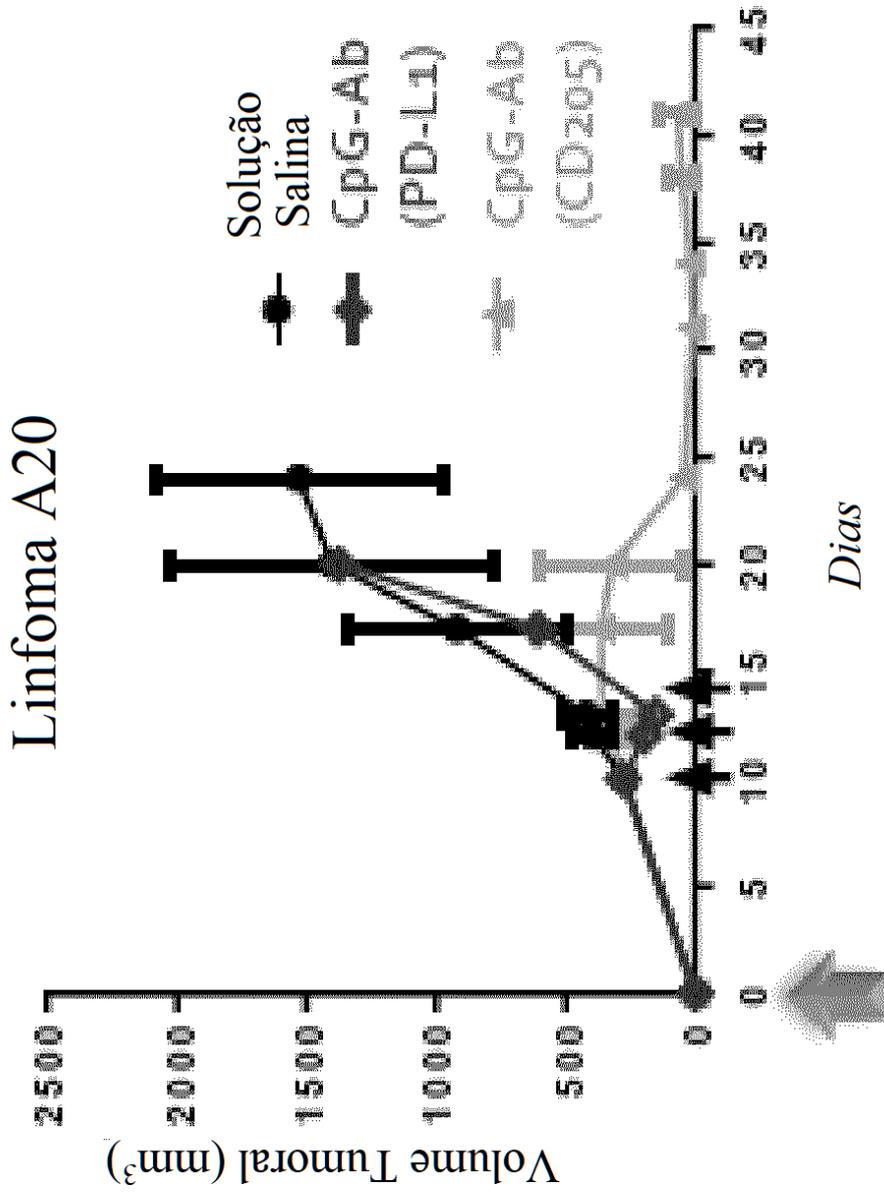
FIG. 55A

Razão de células secretoras de $INF\gamma/10^6$ esplenócitos



- 24 hrs após última dose, esplenócitos isolados
- Desafio com antígeno CT26 (AHI)
- Contagem de células T secretoras de $INF\gamma$ por ELISPOT

FIG. 55B

**FIG. 56A**

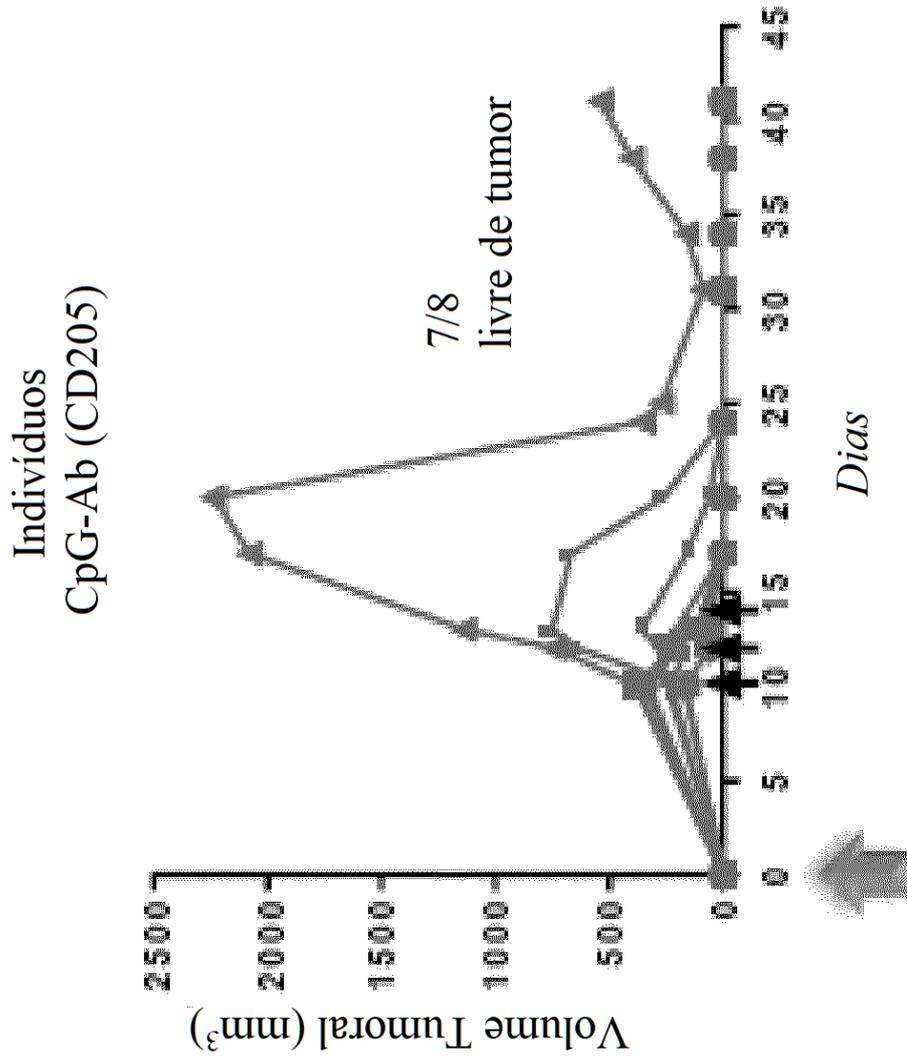
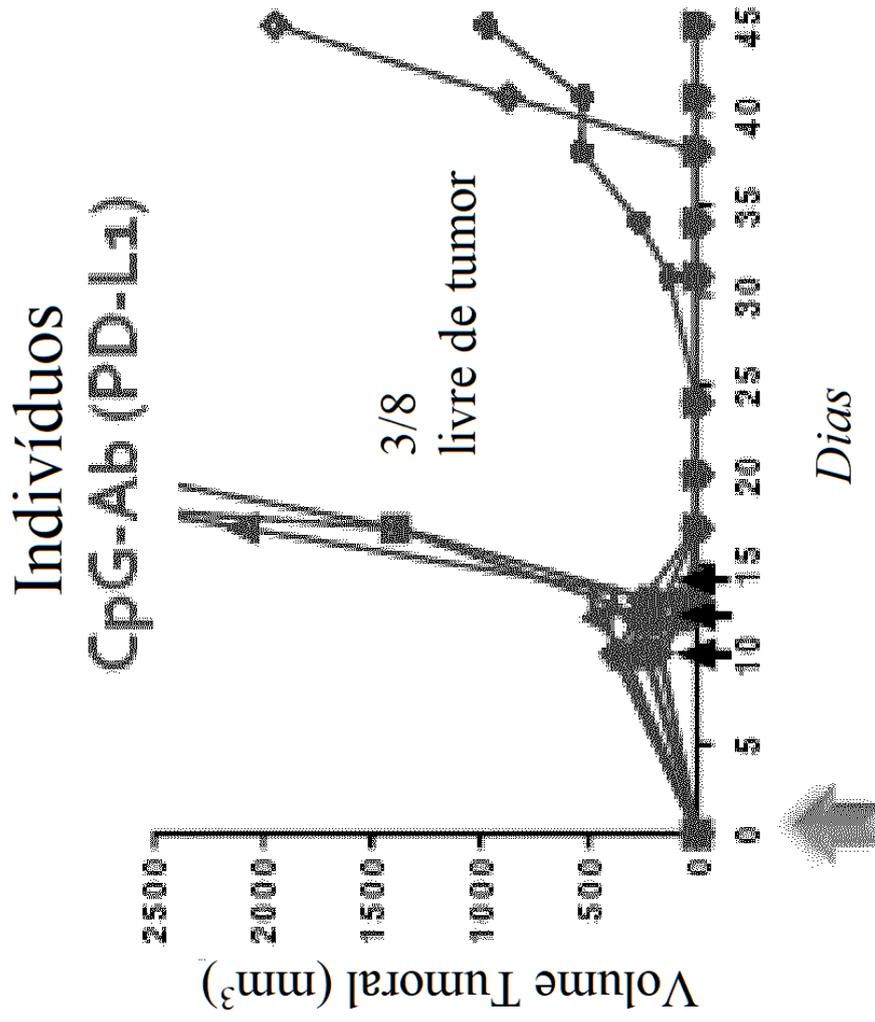


FIG. 56B

**FIG. 56C**

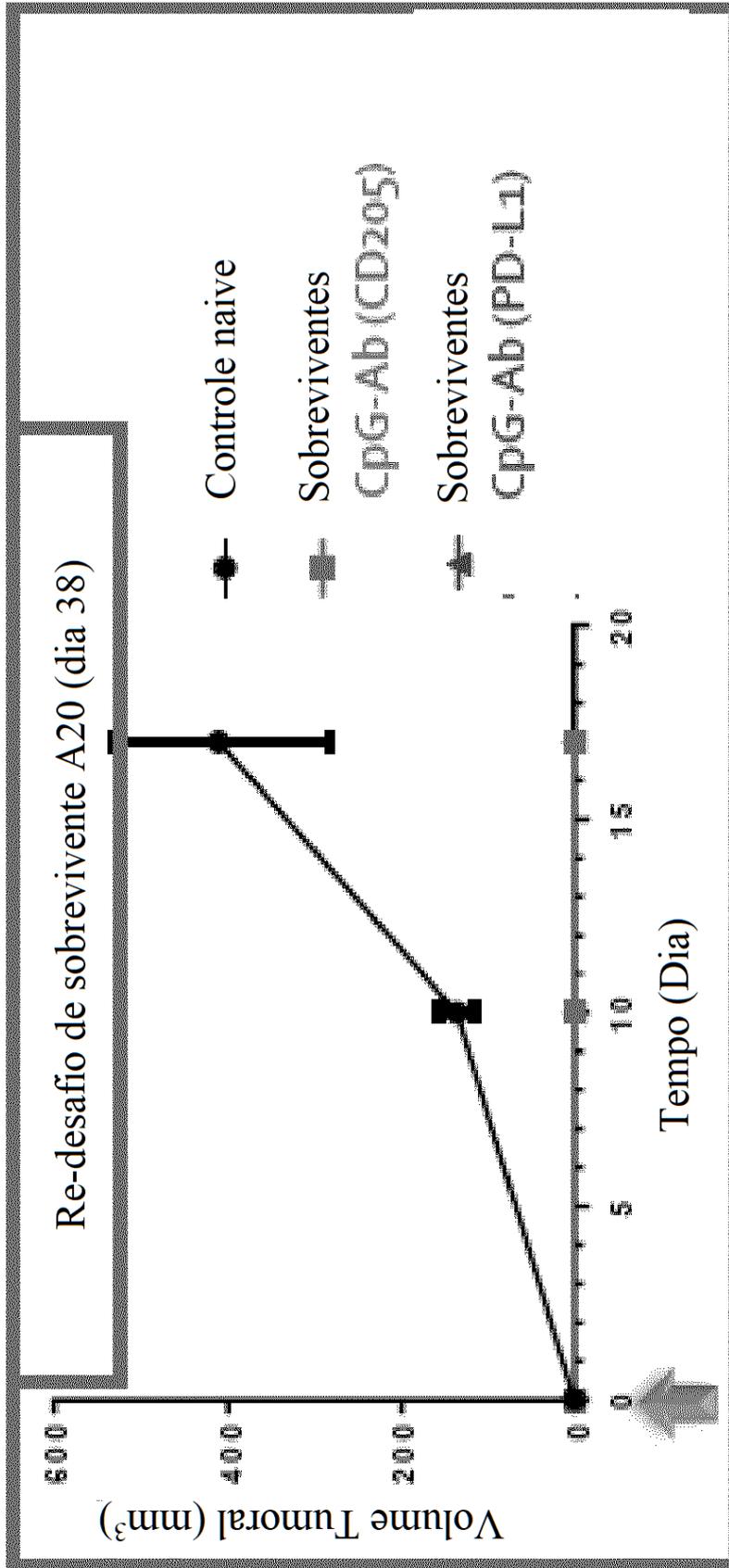


FIG. 56D

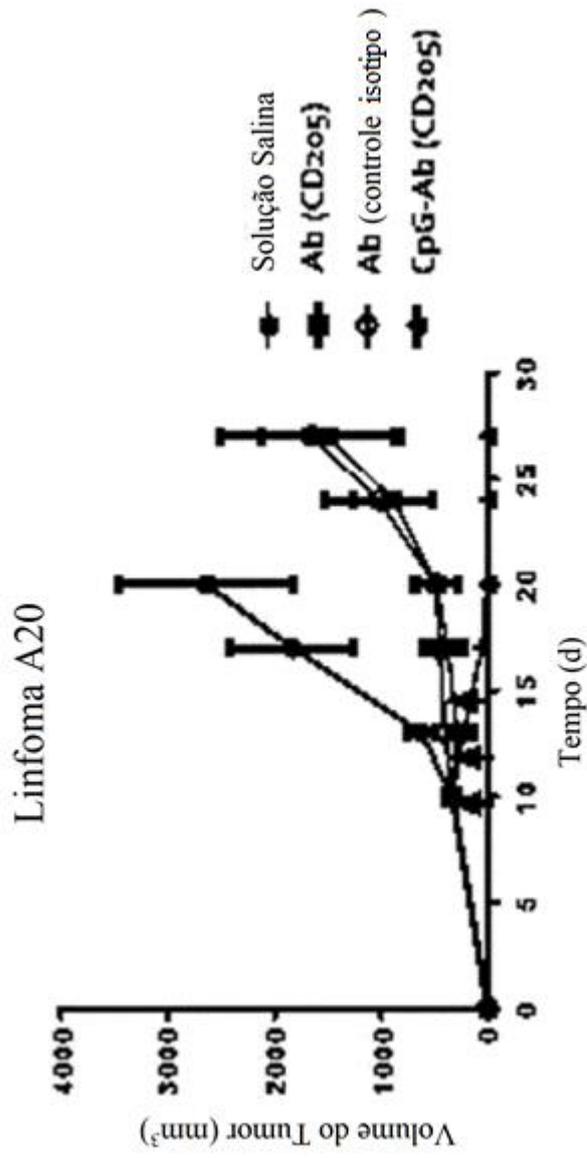


FIG. 57A

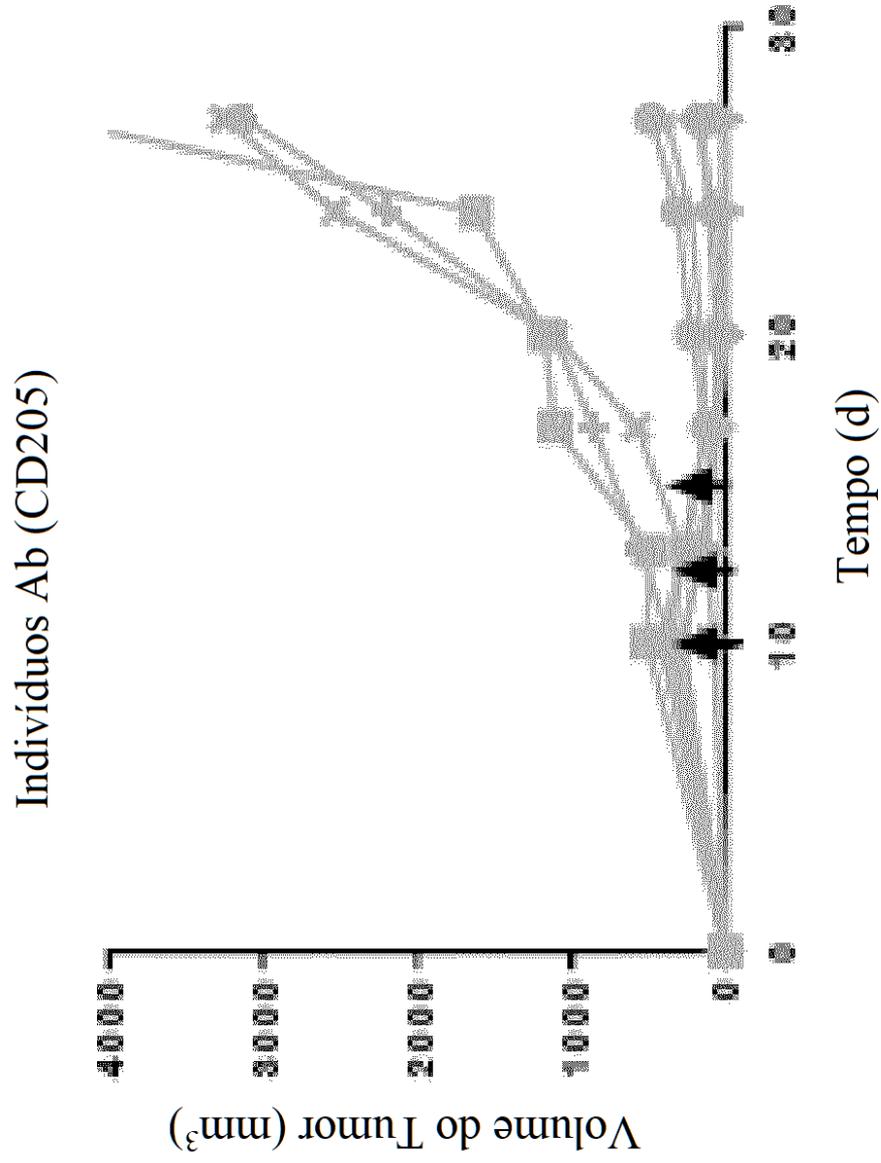


FIG. 57B

Indivíduos CpG-Ab (CD205)

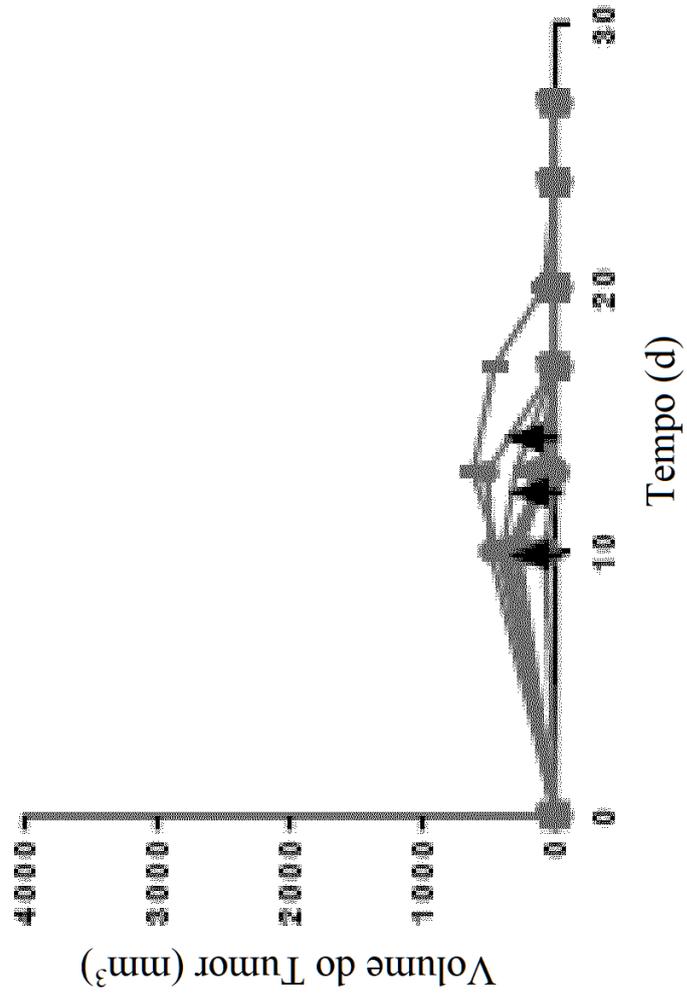


FIG. 57C

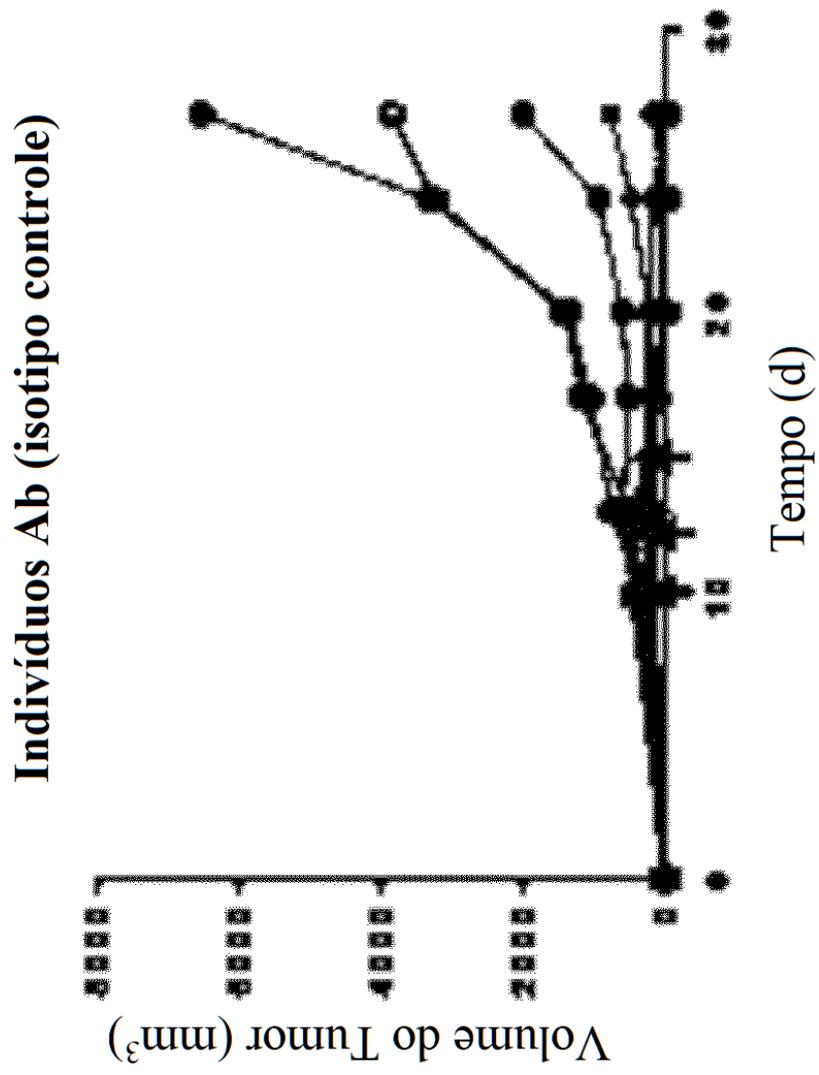


FIG. 57D

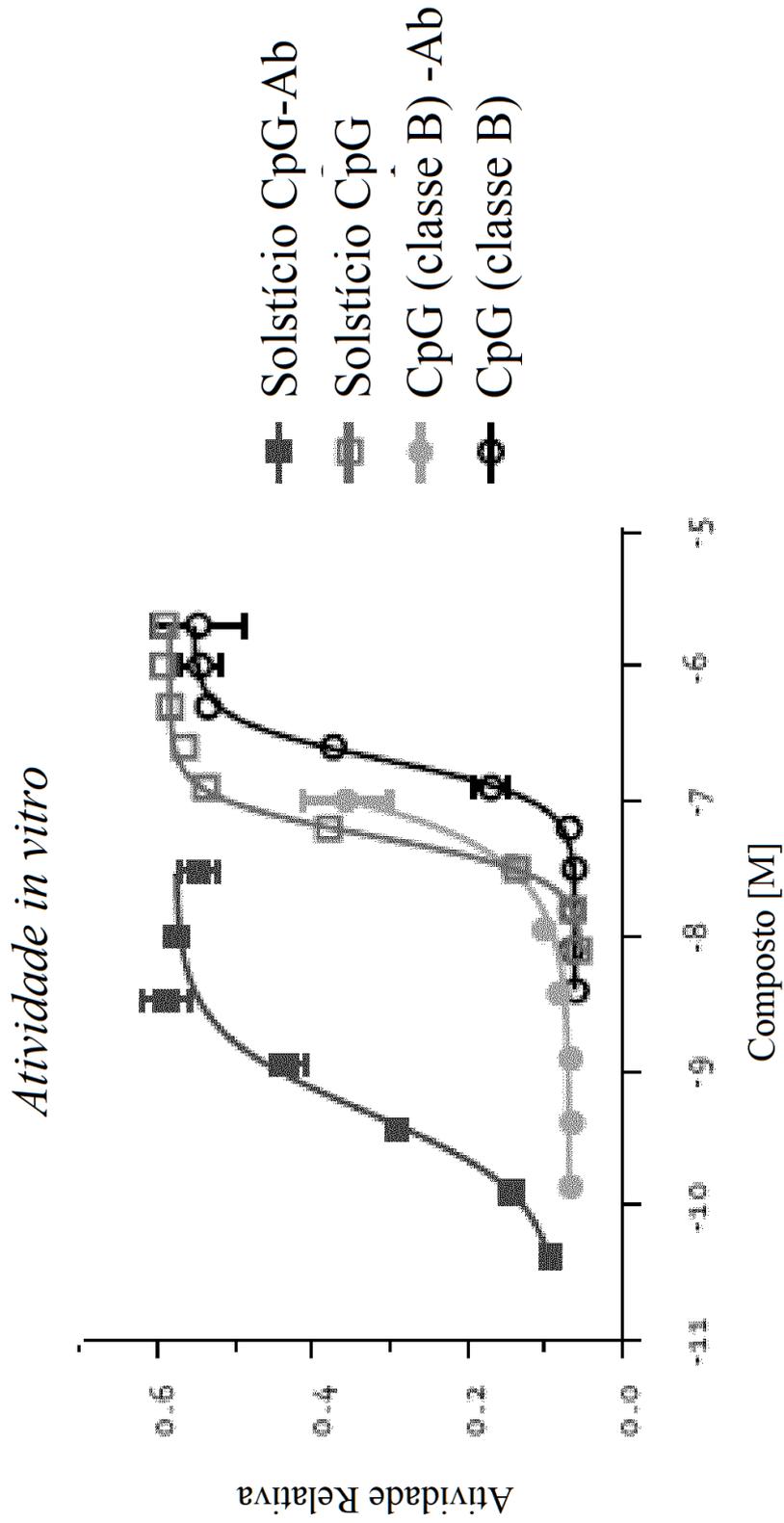


FIG. 58

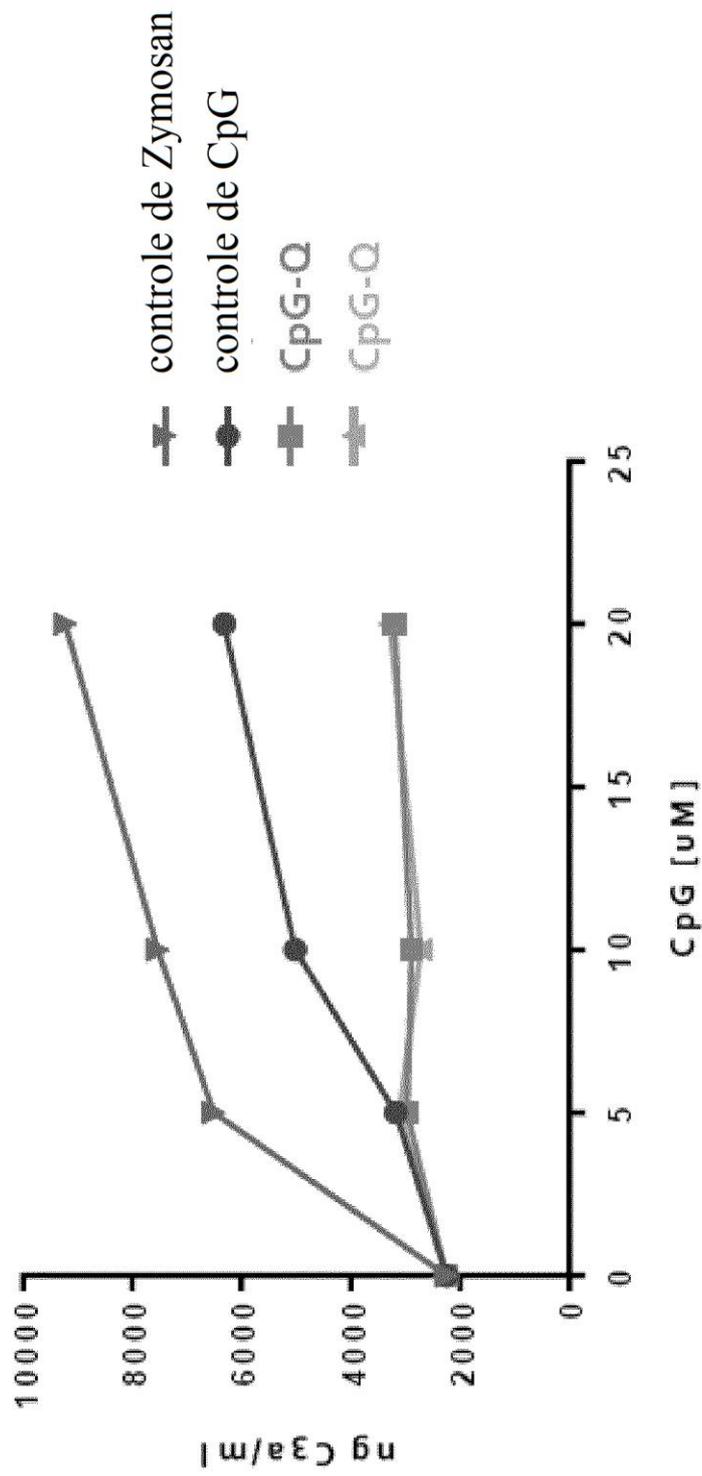


FIG. 59

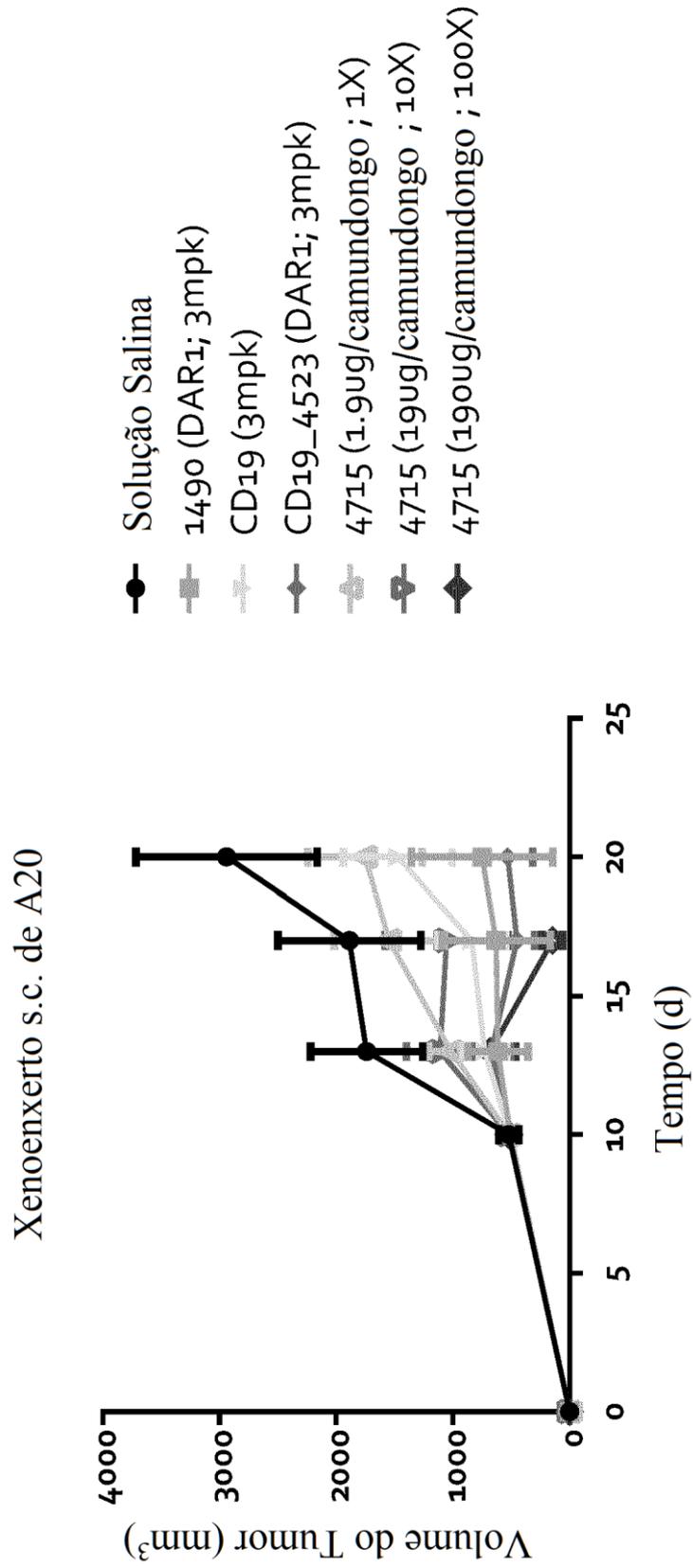


FIG. 60A

Xenoinxerto s.c. de A20
Dia 20

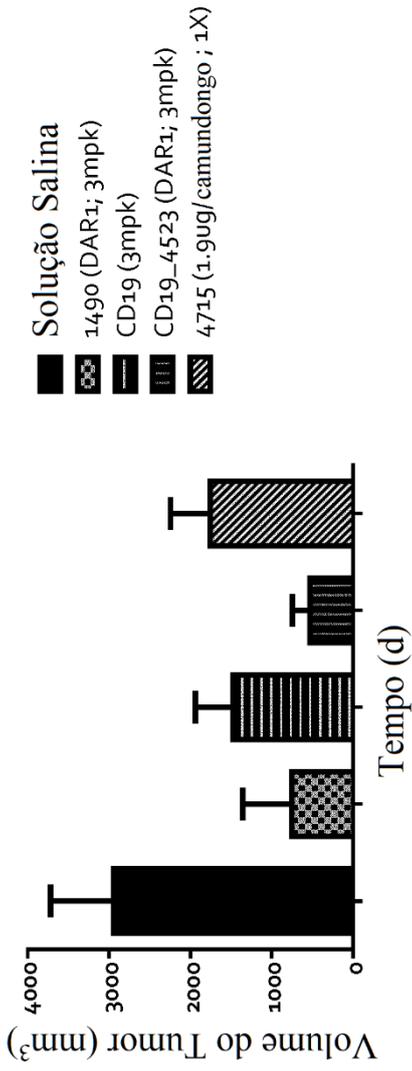


FIG. 60B

Mudança de Peso Corporal
c/ mudança de peso do tumor removida
Dia 20

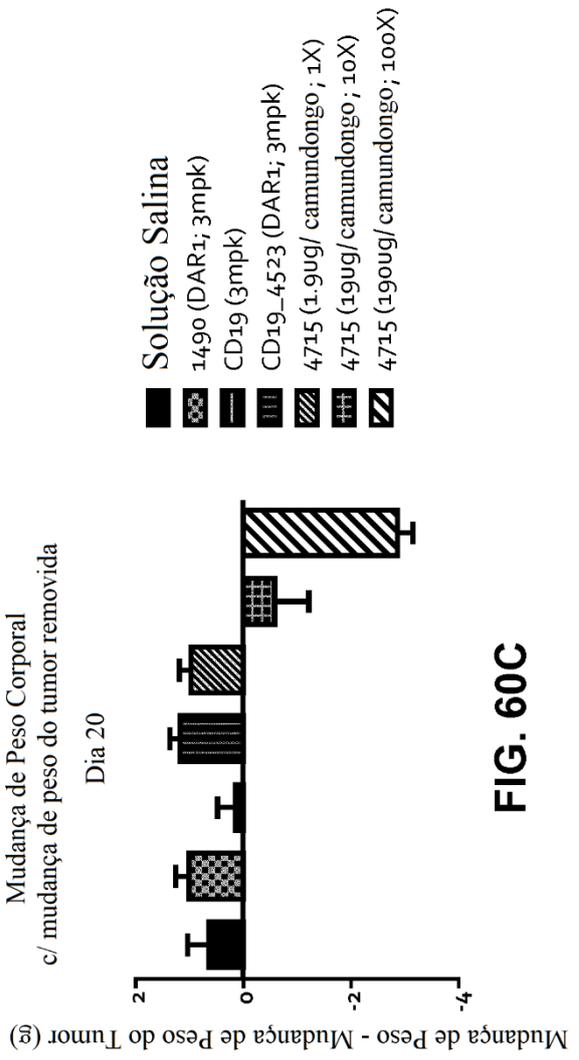


FIG. 60C

Metástase para pulmões do camundongo após re-desafio com B16F10



FIG. 61B

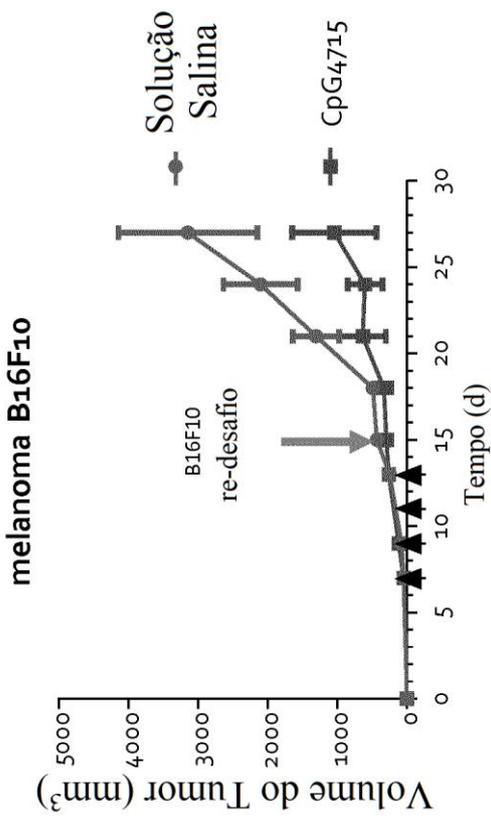


FIG. 61A

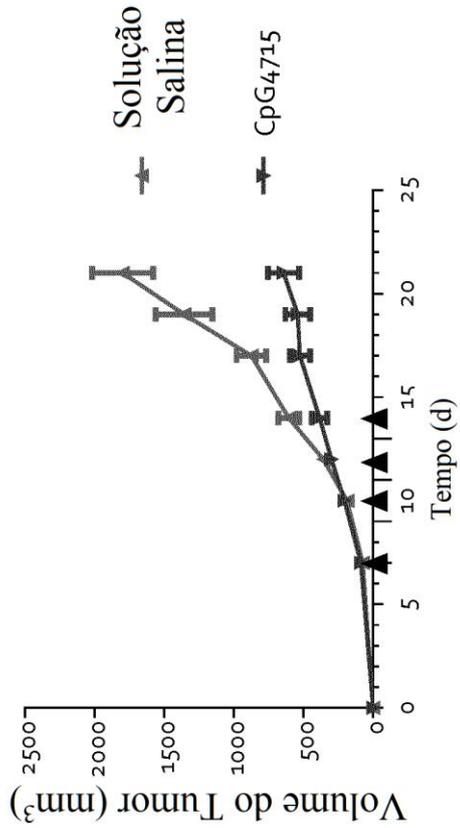


FIG. 61C

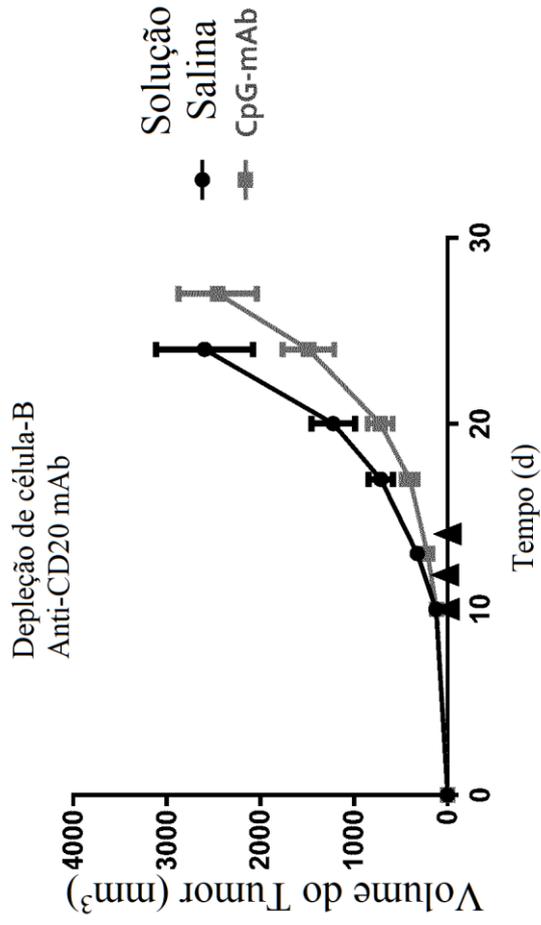


FIG. 62B

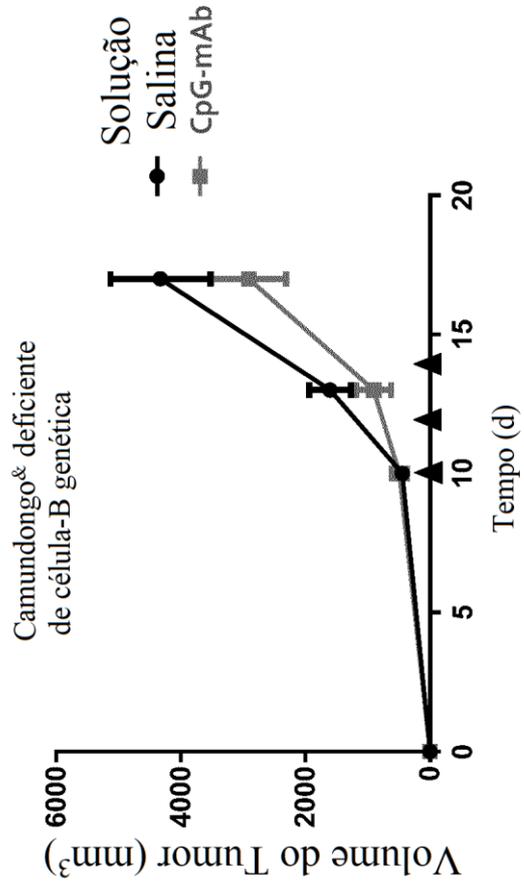


FIG. 62A

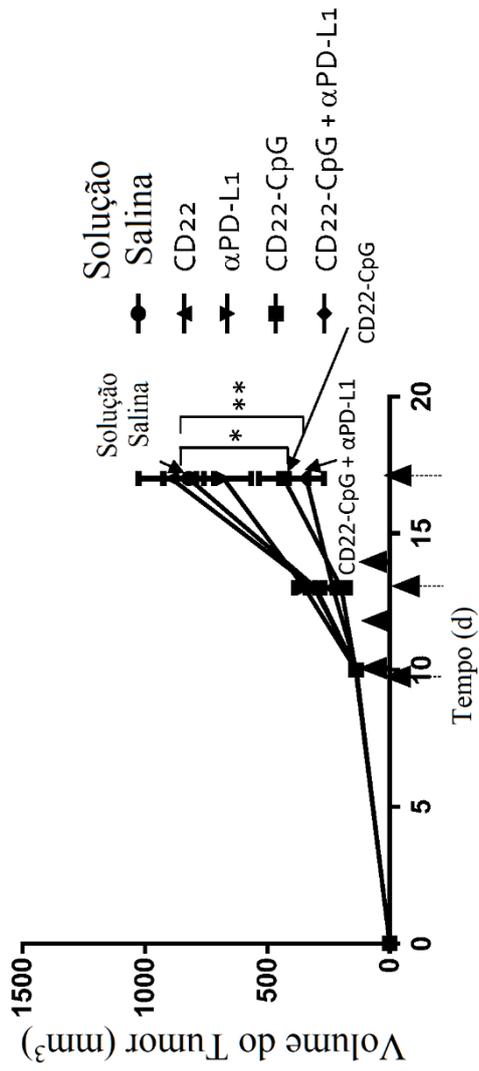


FIG. 63A

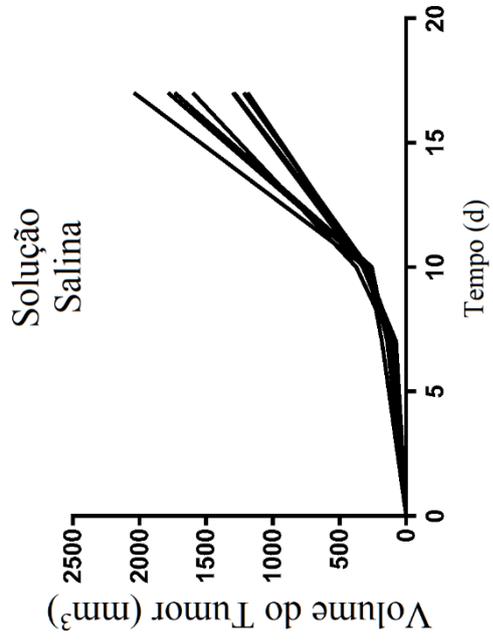


FIG. 63B

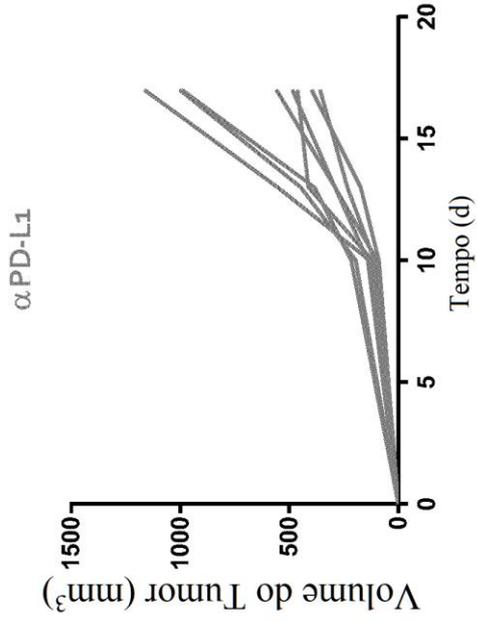


FIG. 63D

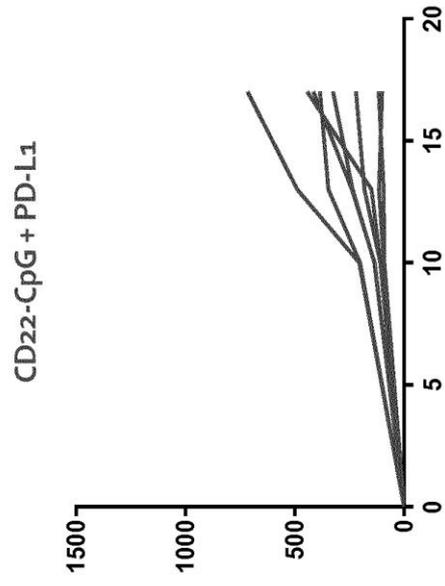


FIG. 63F

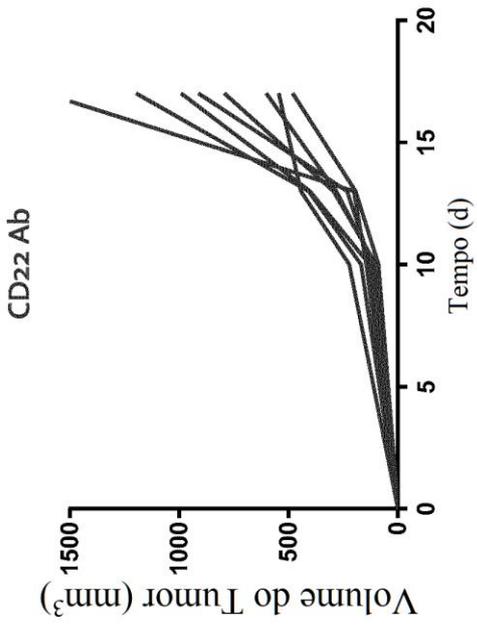


FIG. 63C

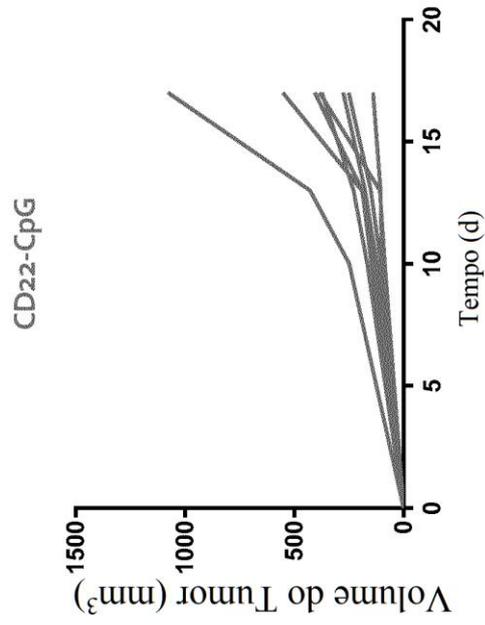


FIG. 63E

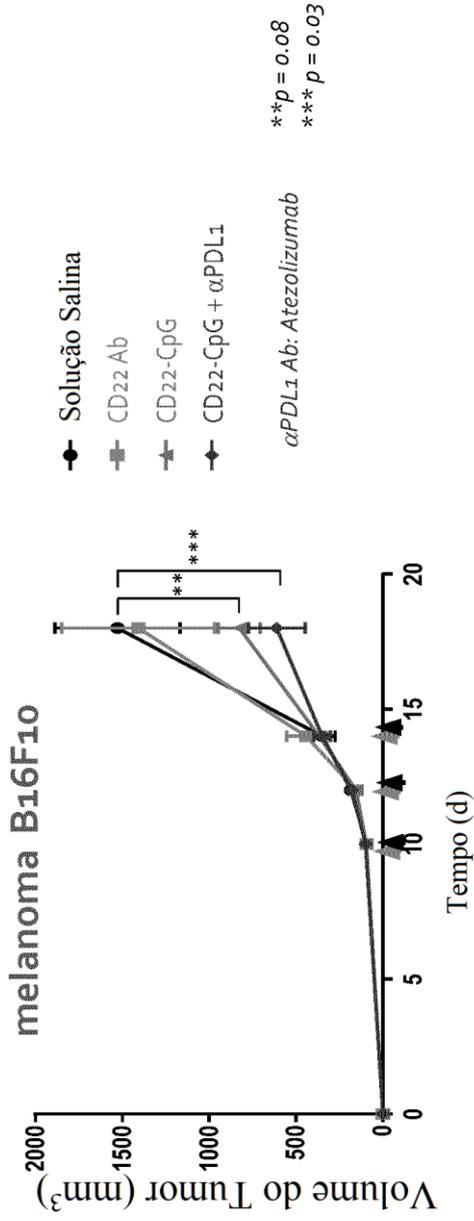


FIG. 64A

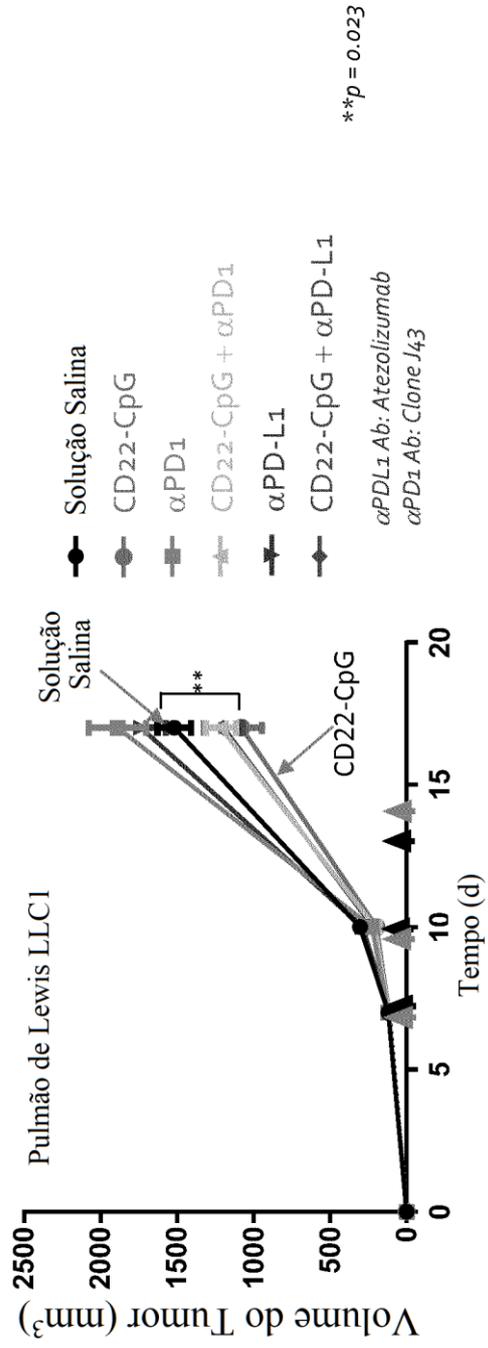


FIG. 64B

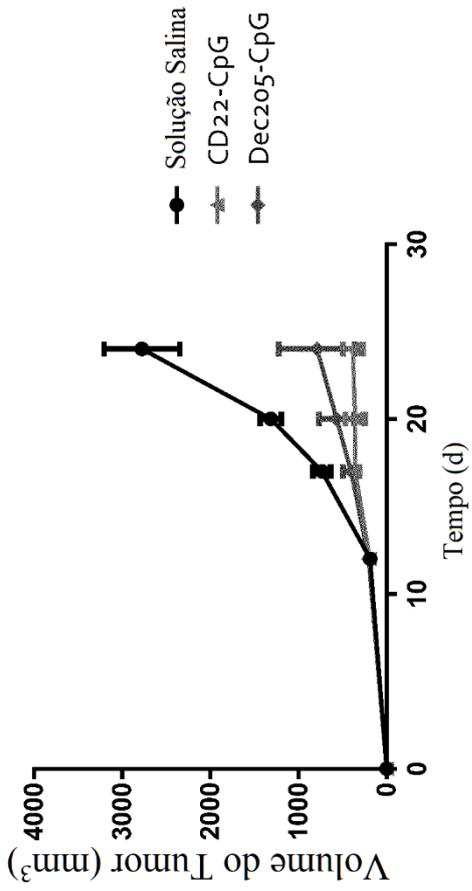


FIG. 65A

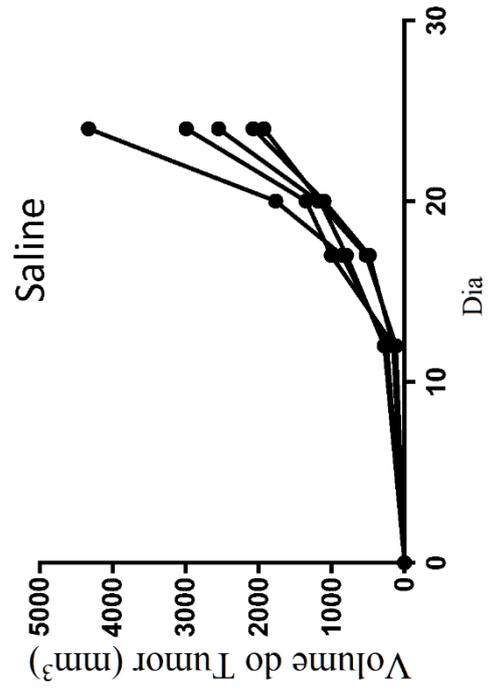


FIG. 65B

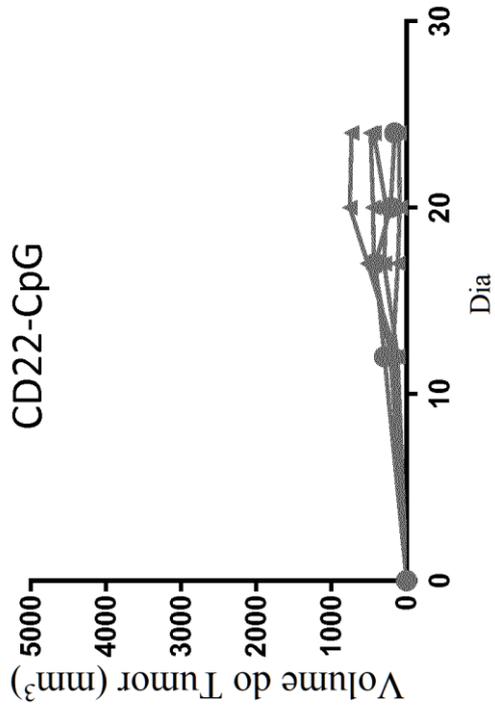


FIG. 65C

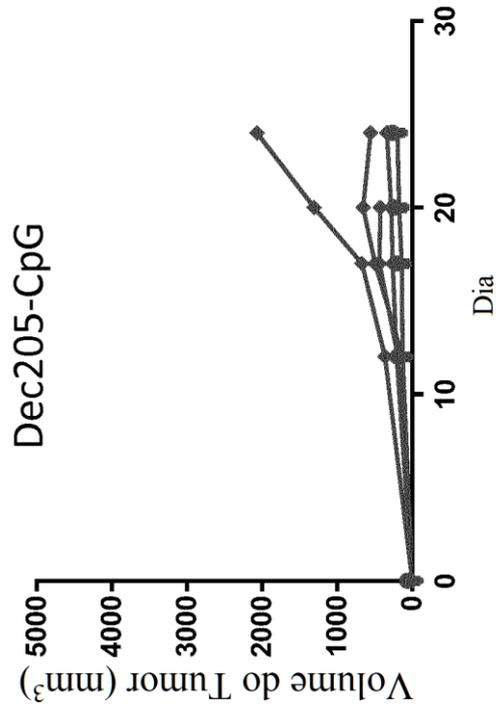


FIG. 65D

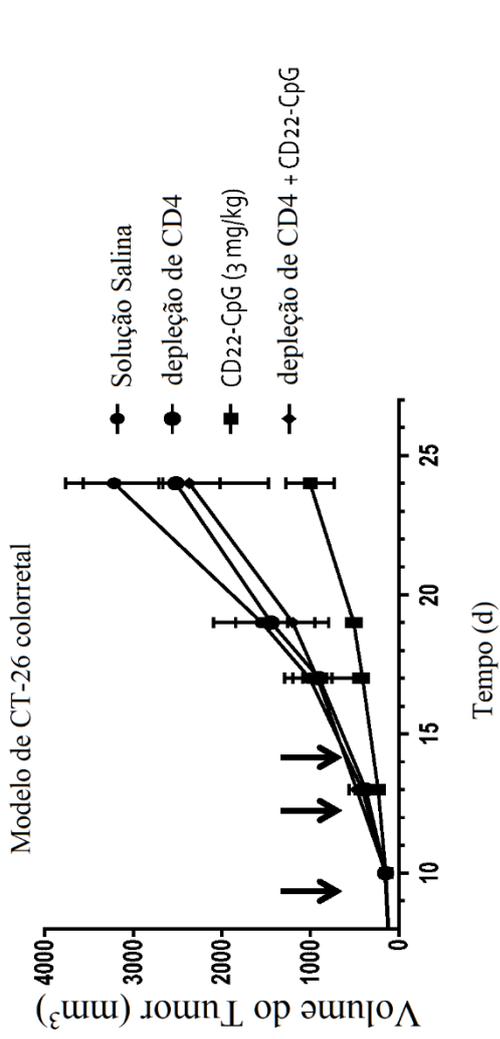


FIG. 66A

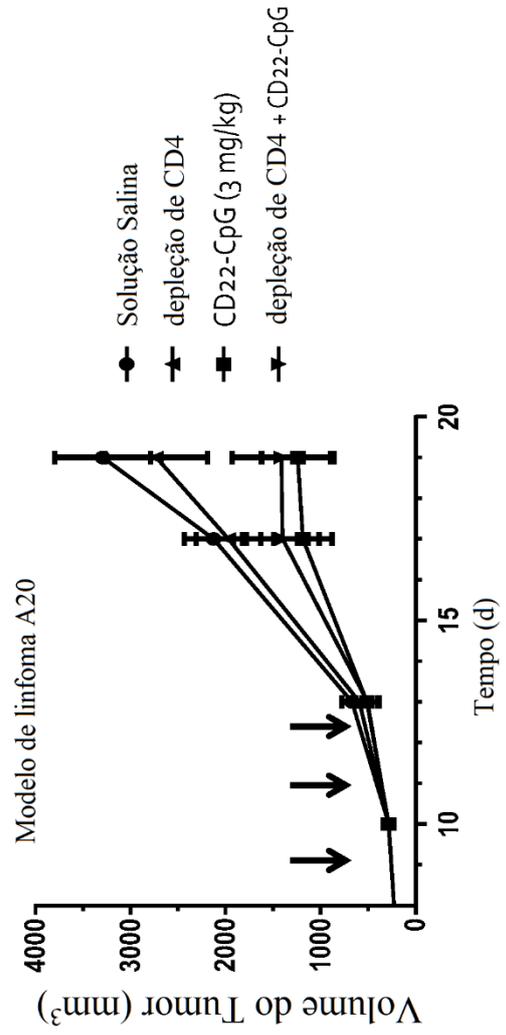


FIG. 66B

In vitro: incubação com células B do baço de camundongo (1 nM)

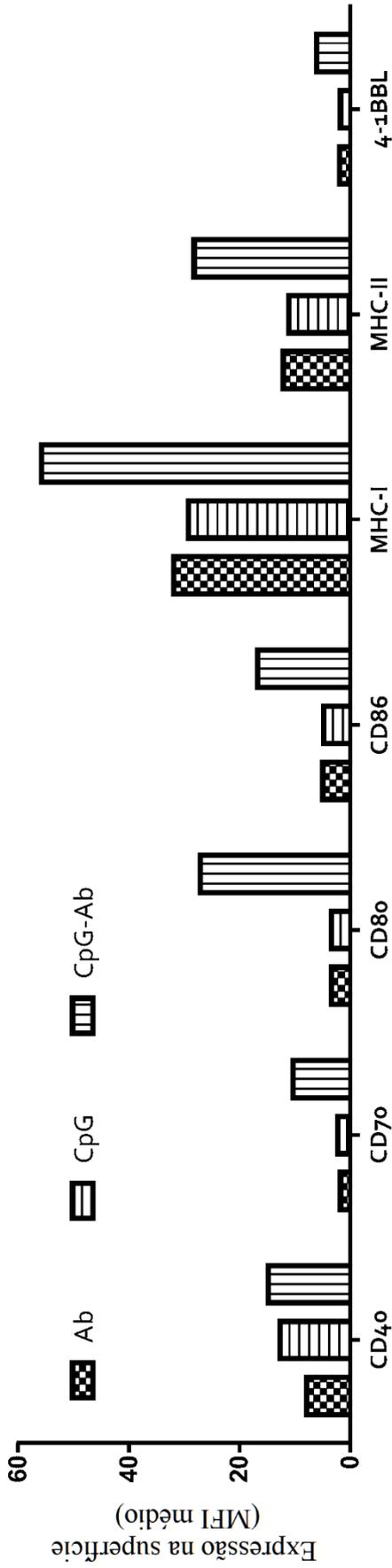


FIG. 67A

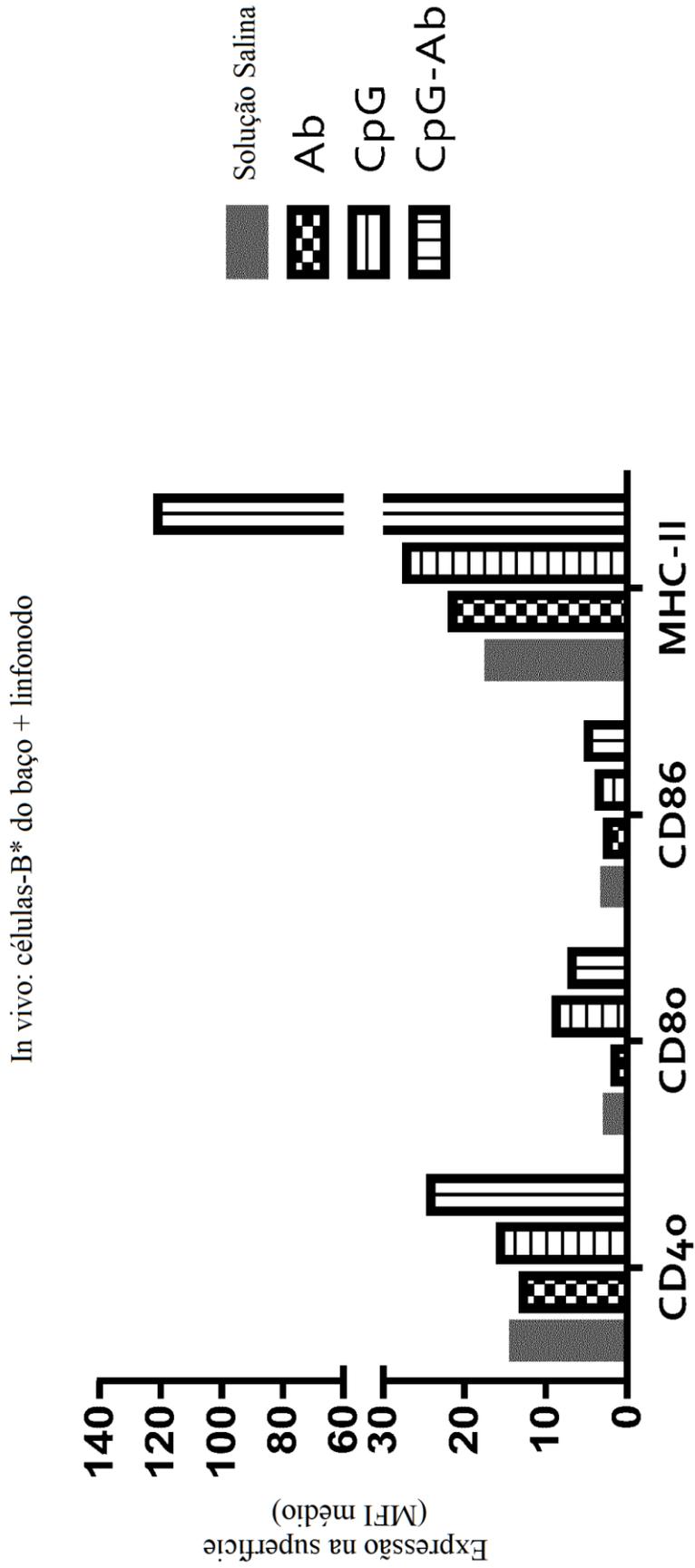


FIG. 67B

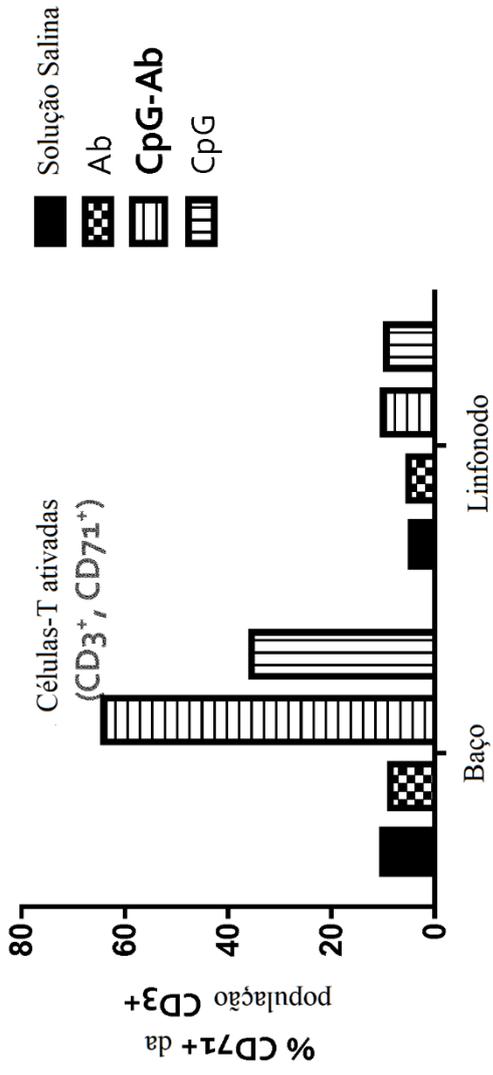


FIG. 68A

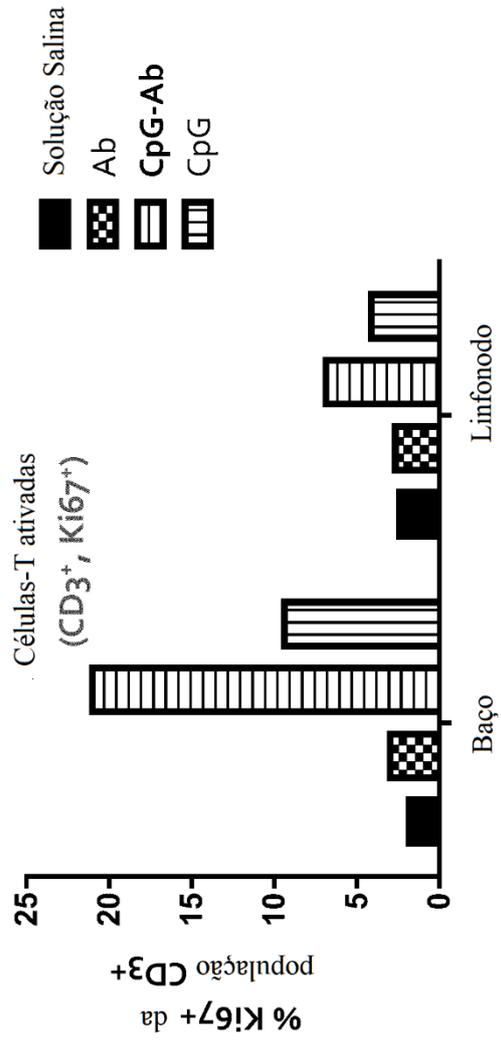


FIG. 68B

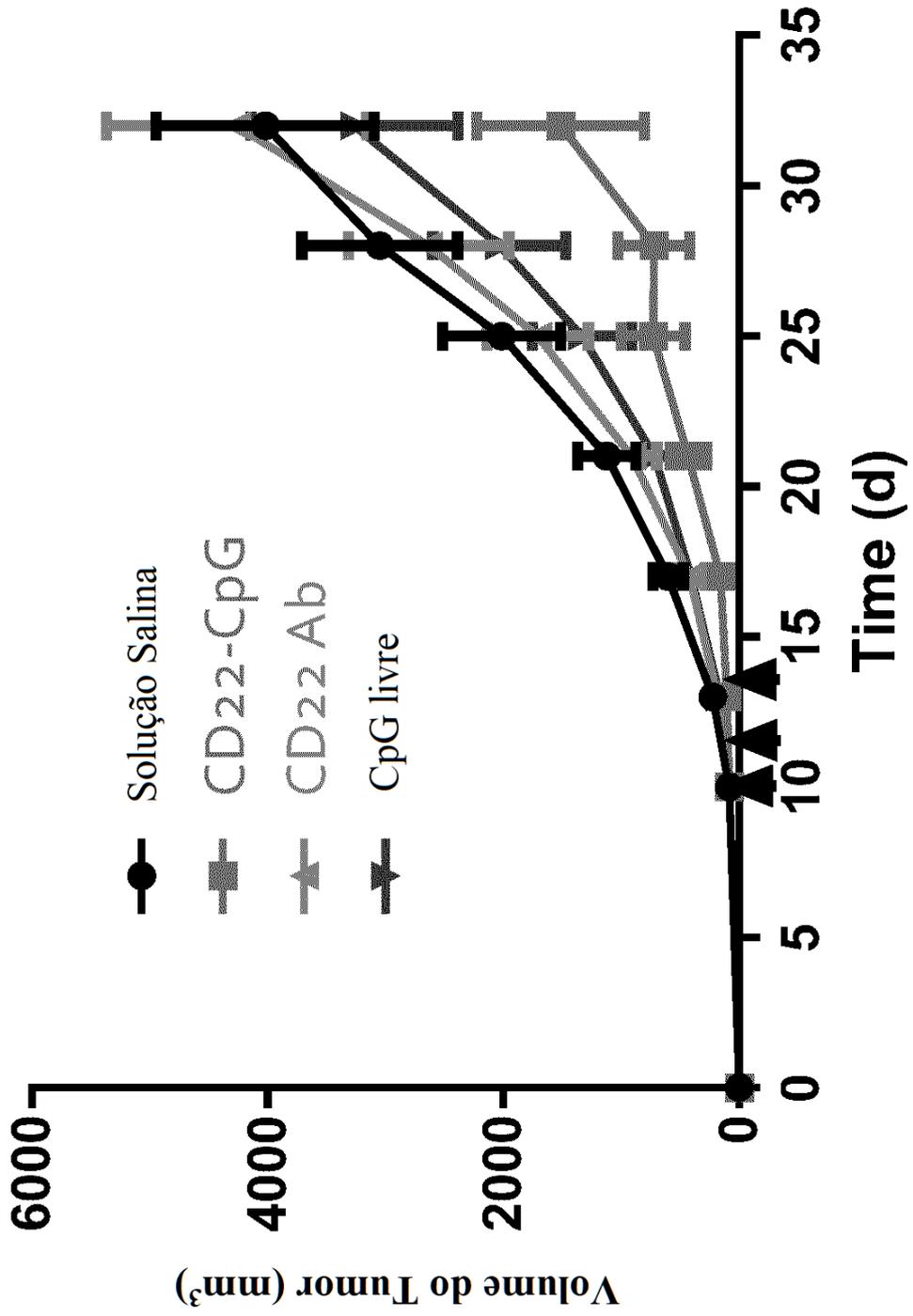


FIG. 69A

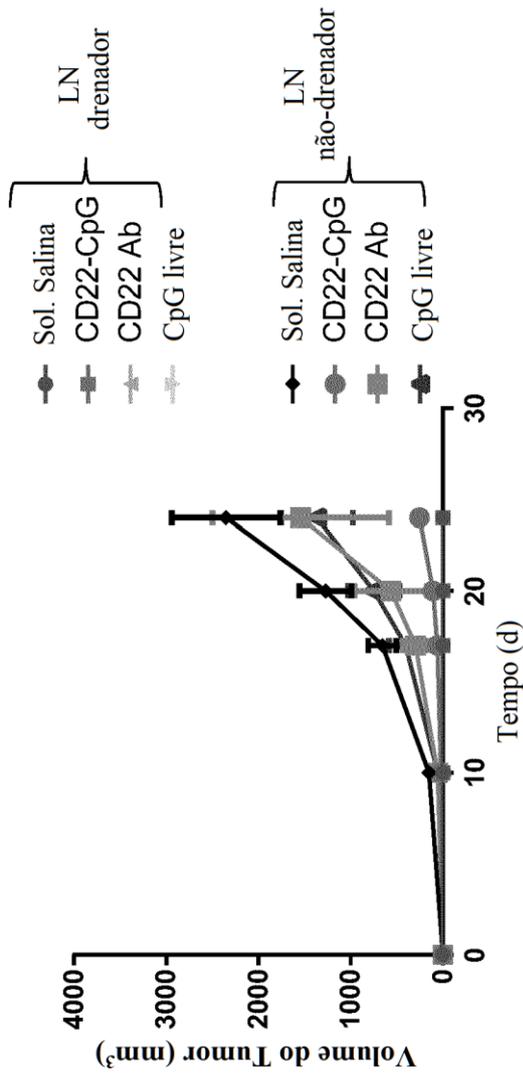


FIG. 69B

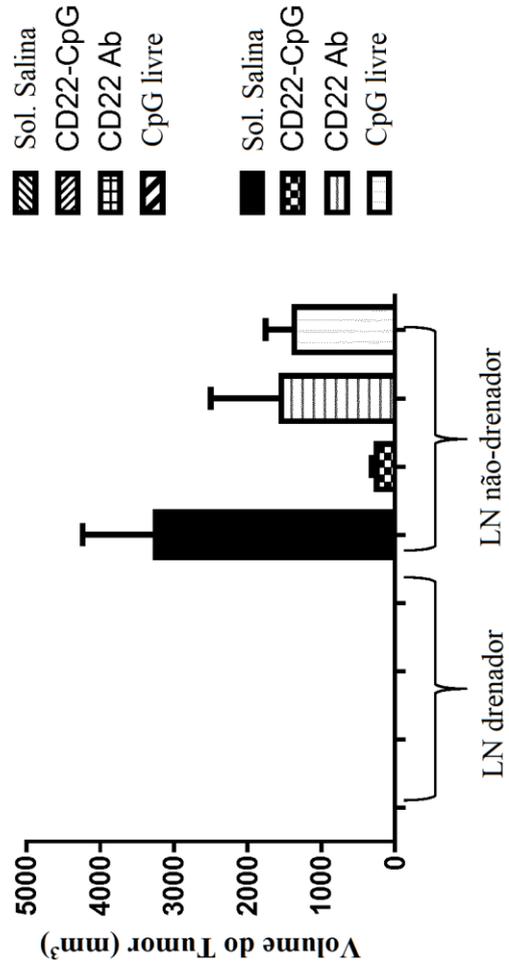


FIG. 69C

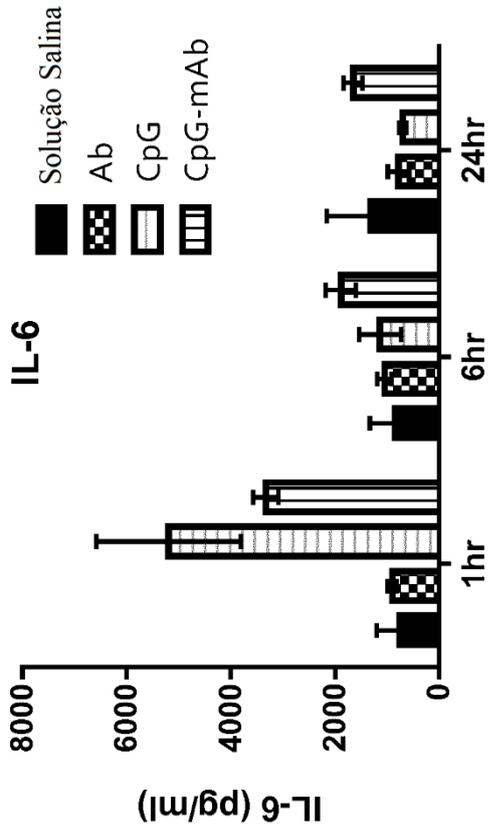


FIG. 70A

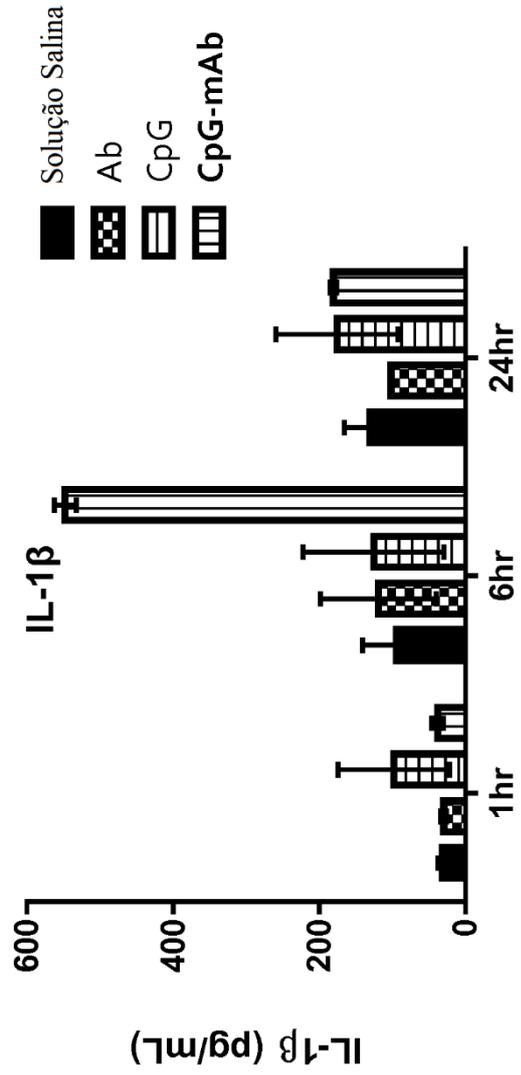


FIG. 70B

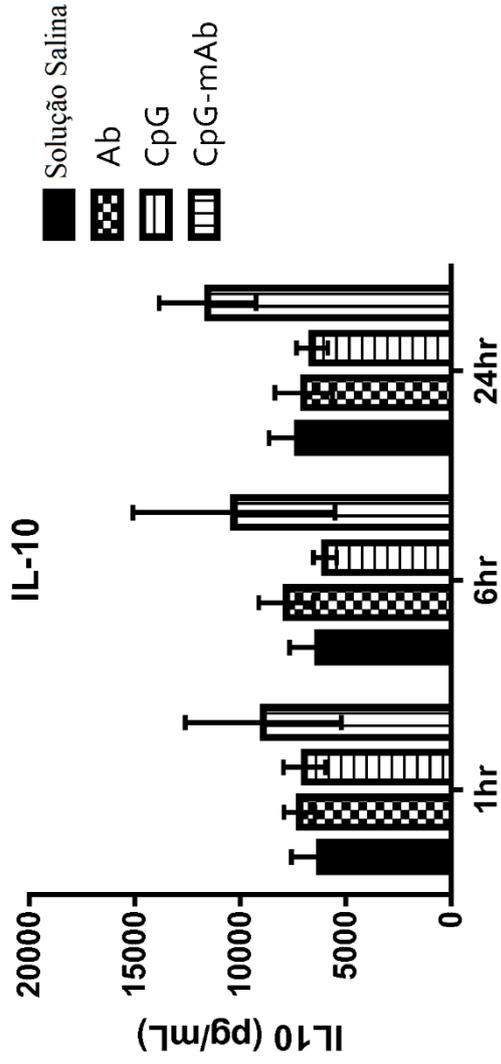


FIG. 70C

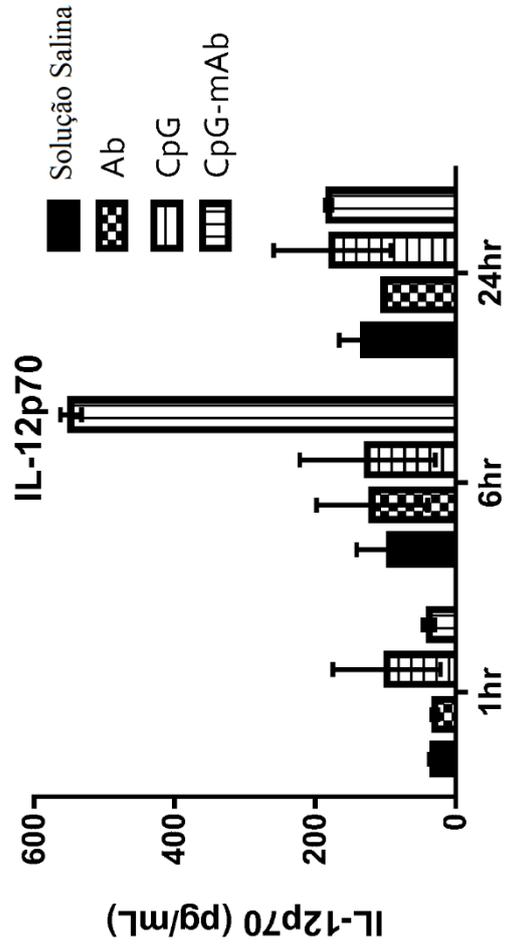


FIG. 70D

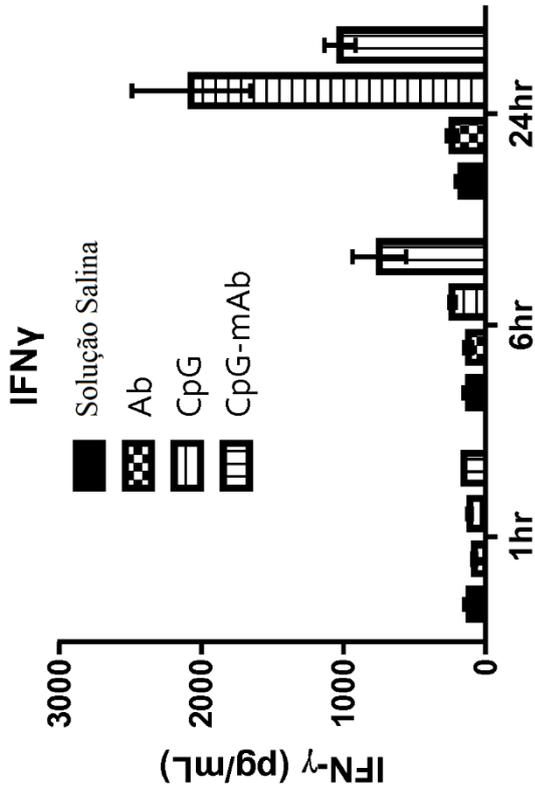


FIG. 70E

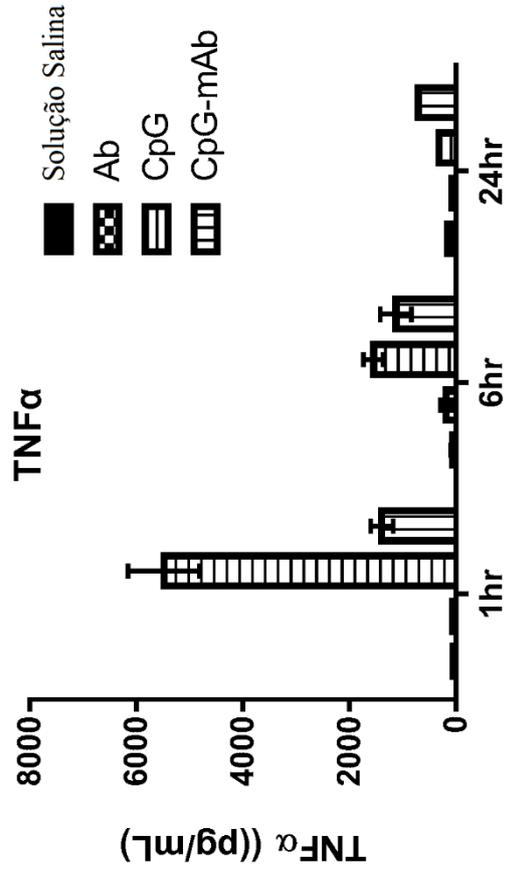


FIG. 70F

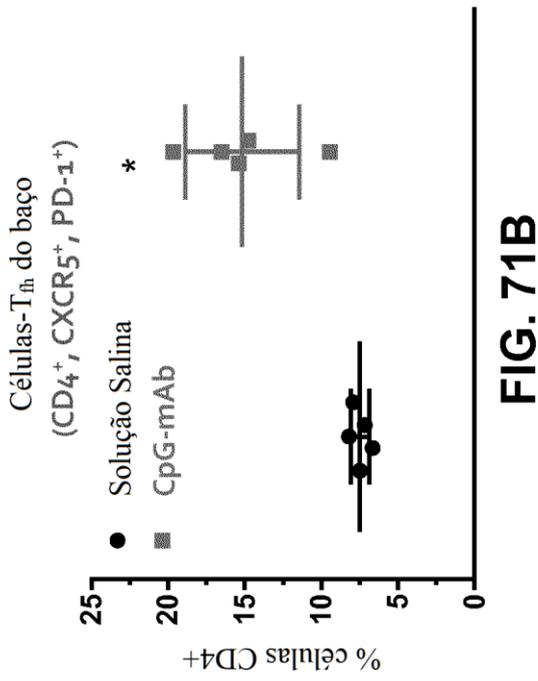


FIG. 71B

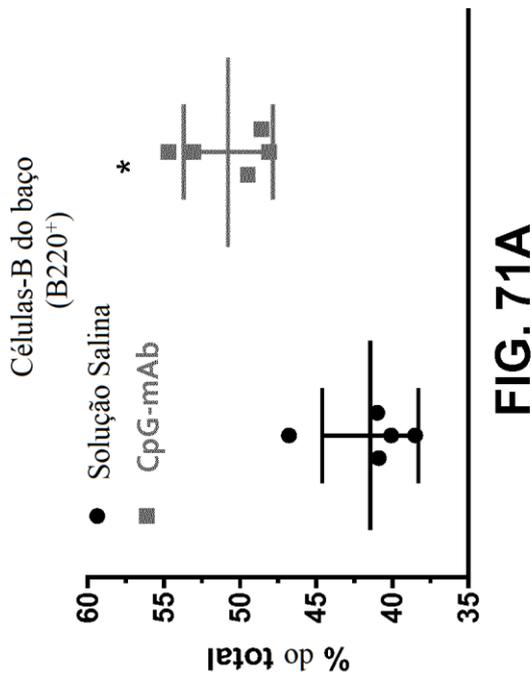


FIG. 71A

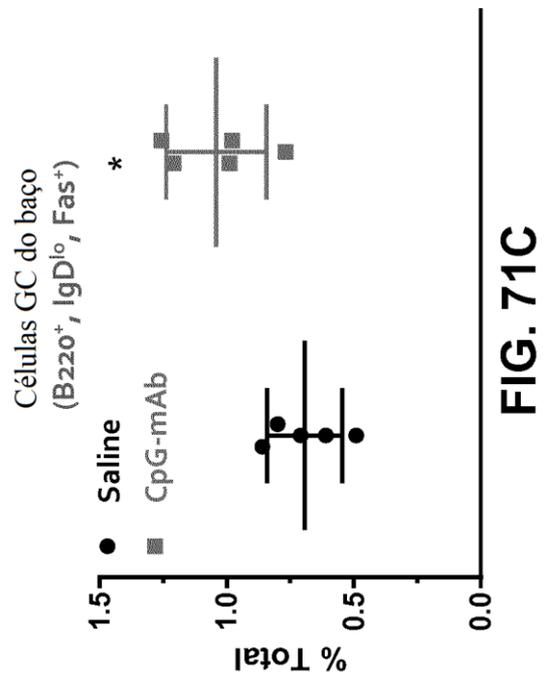


FIG. 71C

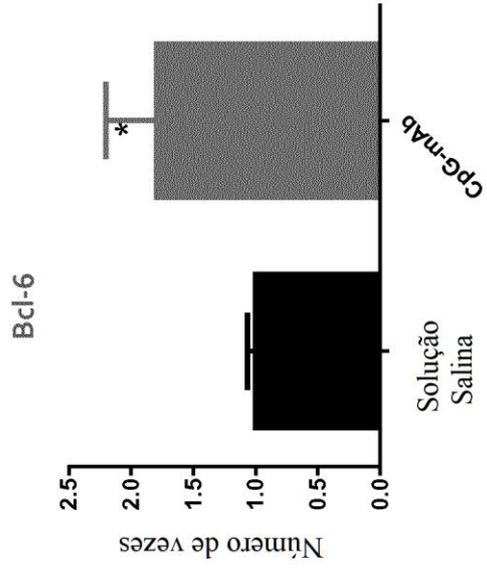


FIG. 71E

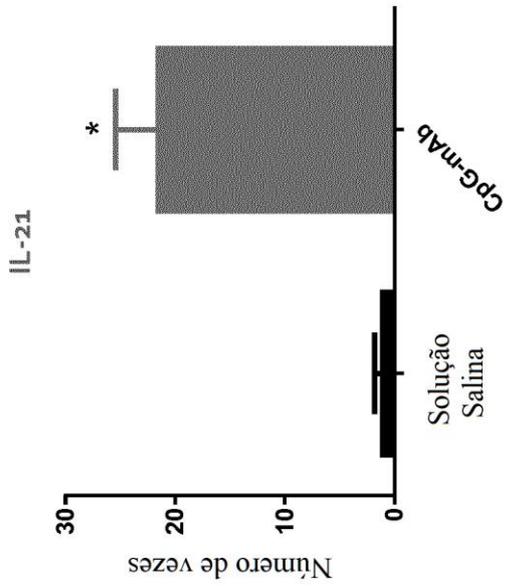


FIG. 71D

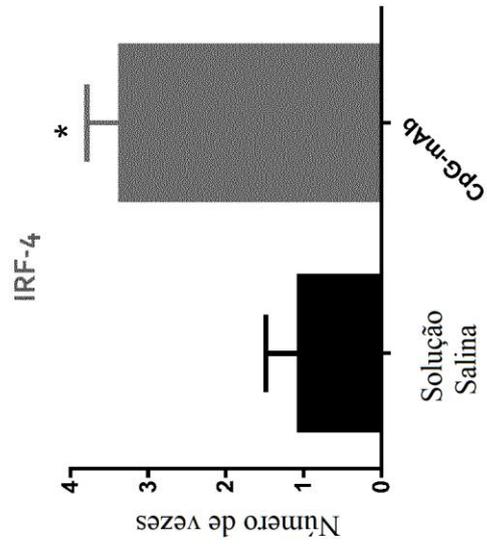


FIG. 71F

Baço

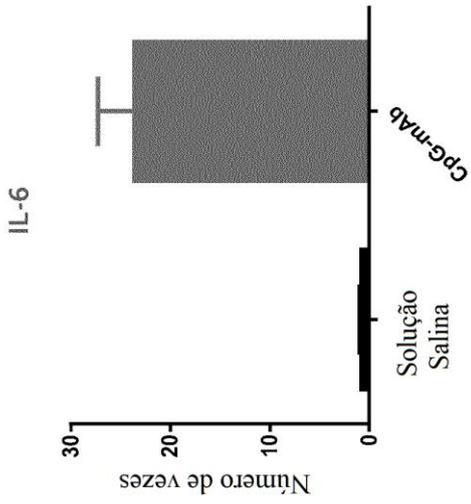


FIG. 72A

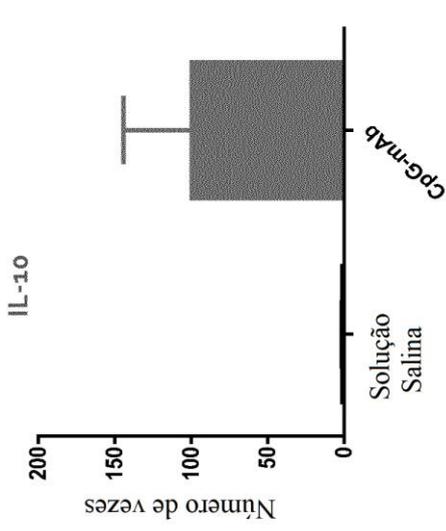


FIG. 72B

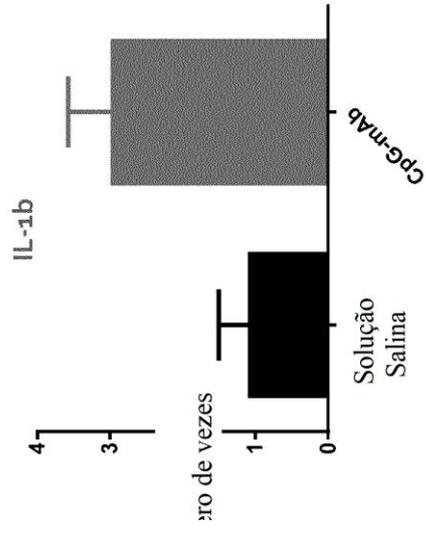


FIG. 72C

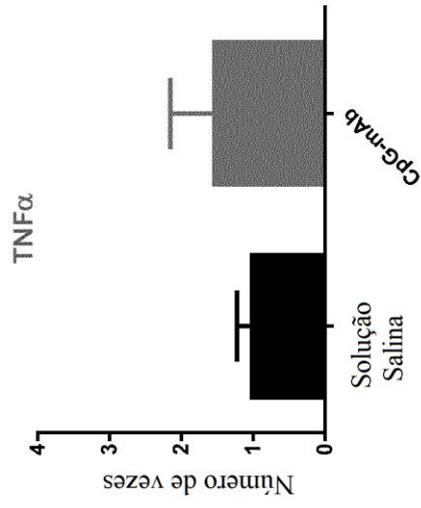


FIG. 72D

Linfonodo Drenador

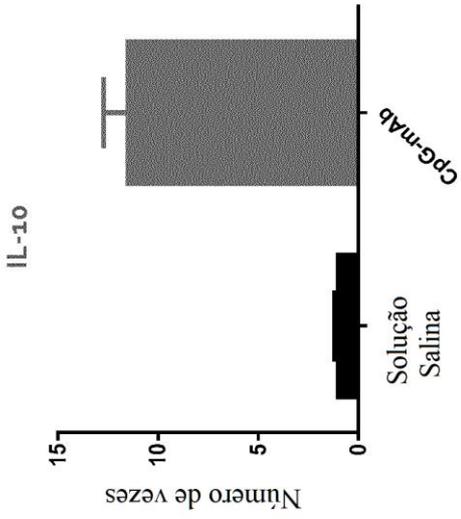


FIG. 73B

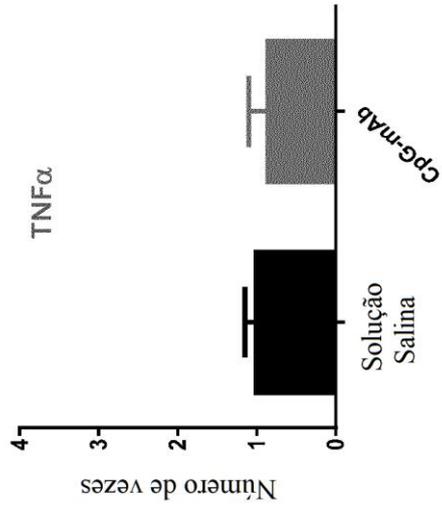


FIG. 73D

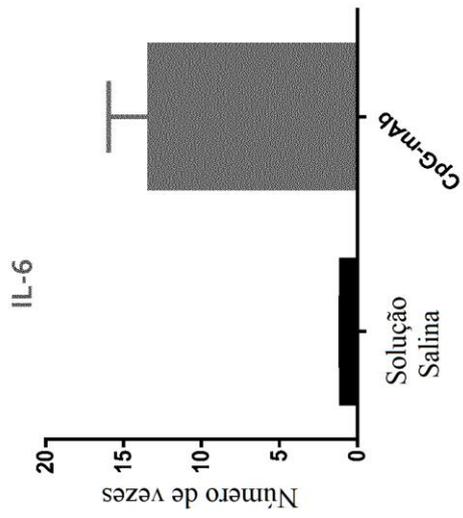


FIG. 73A

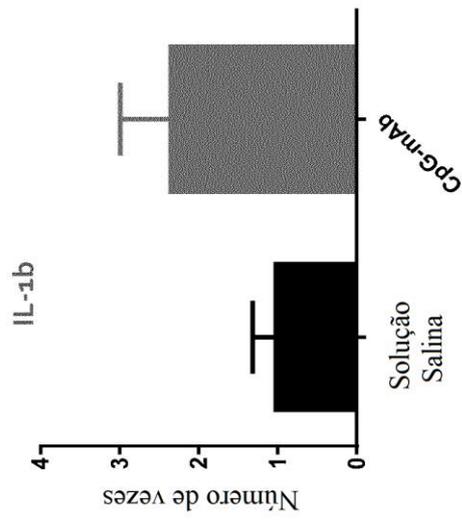


FIG. 73C

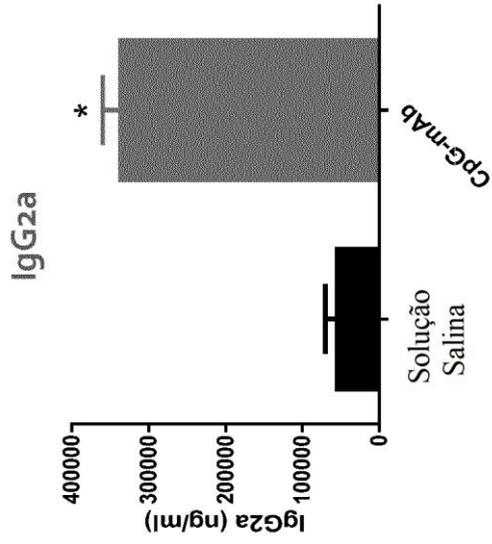


FIG. 74B

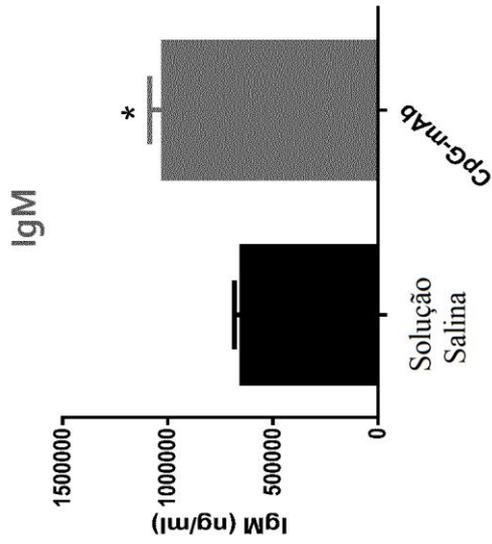


FIG. 74A

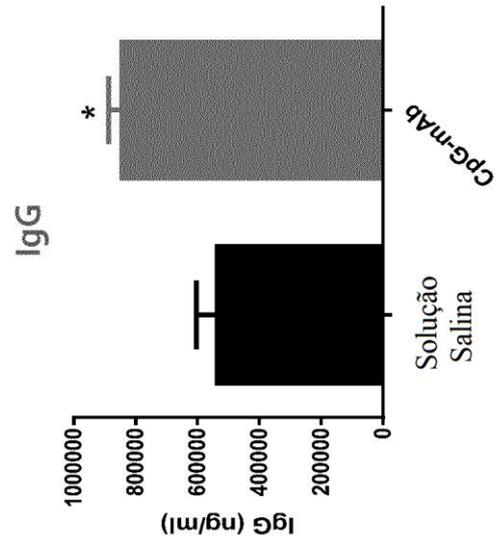


FIG. 74C

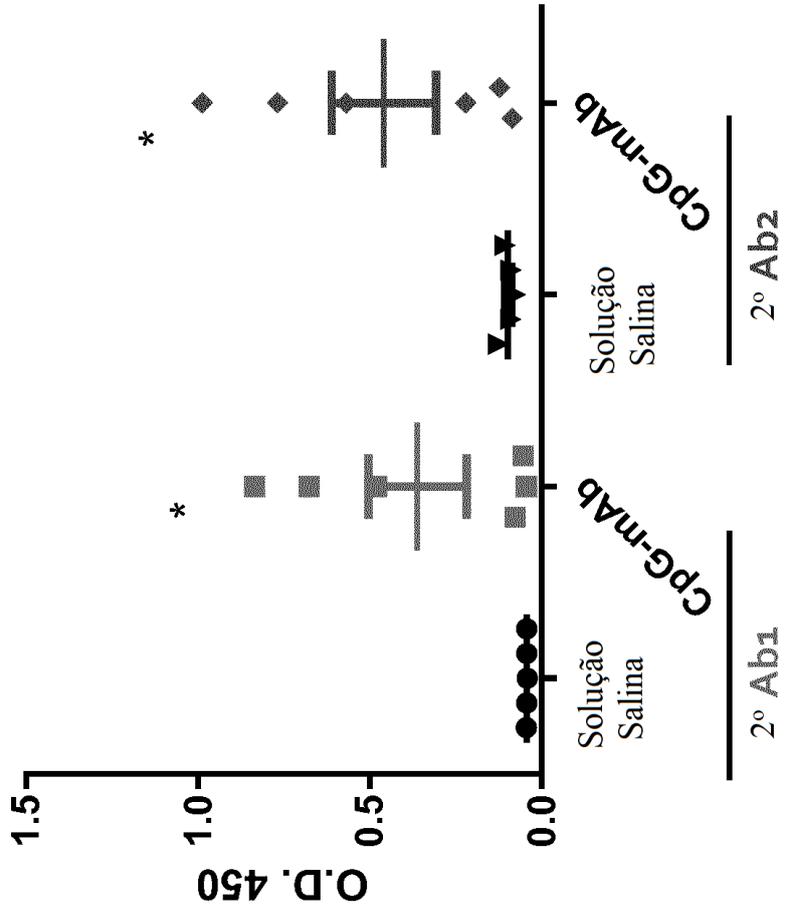
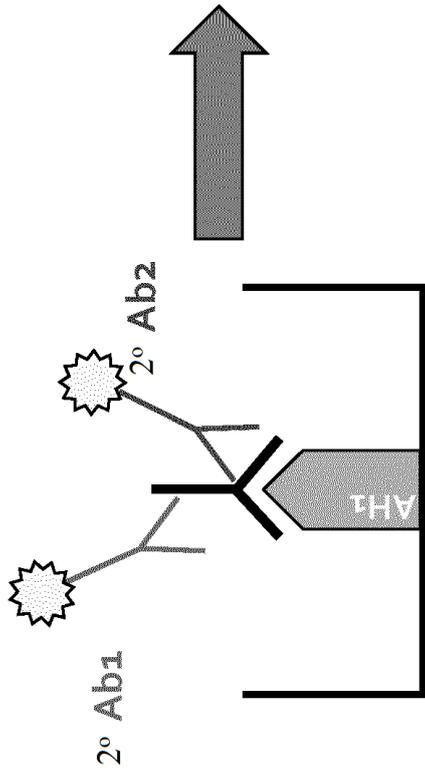


FIG. 75



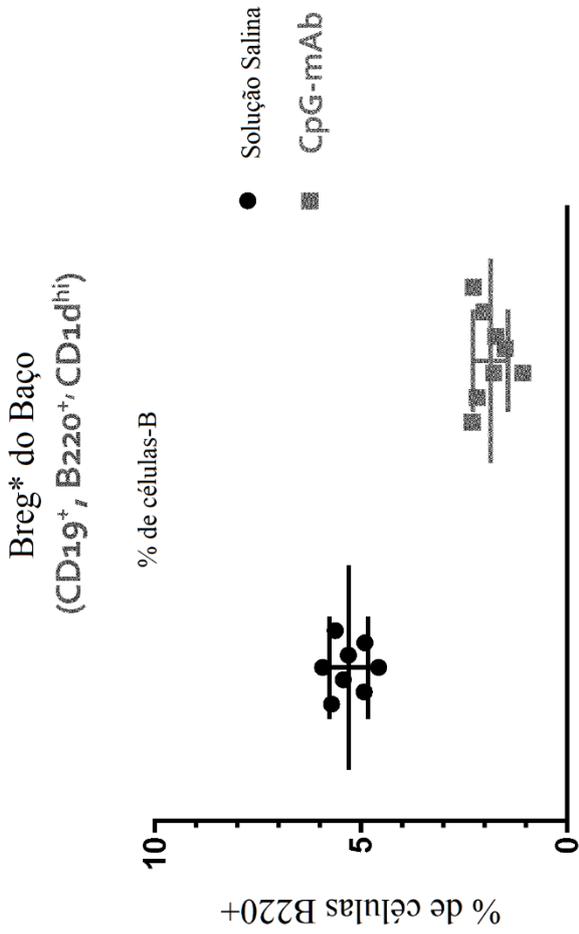


FIG. 76A

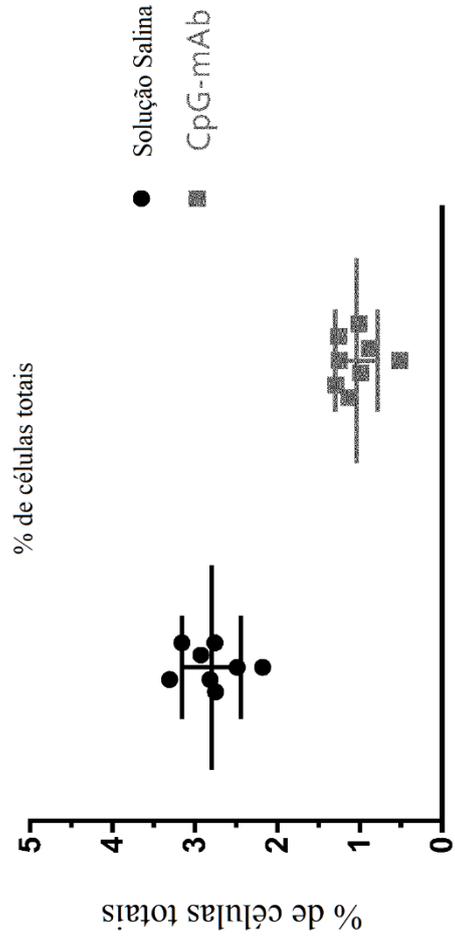


FIG. 76B

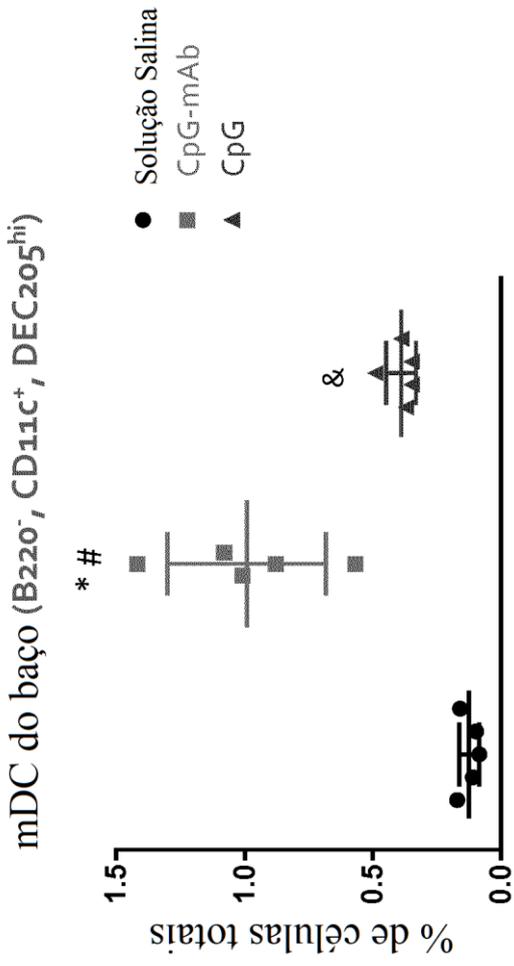


FIG. 77A

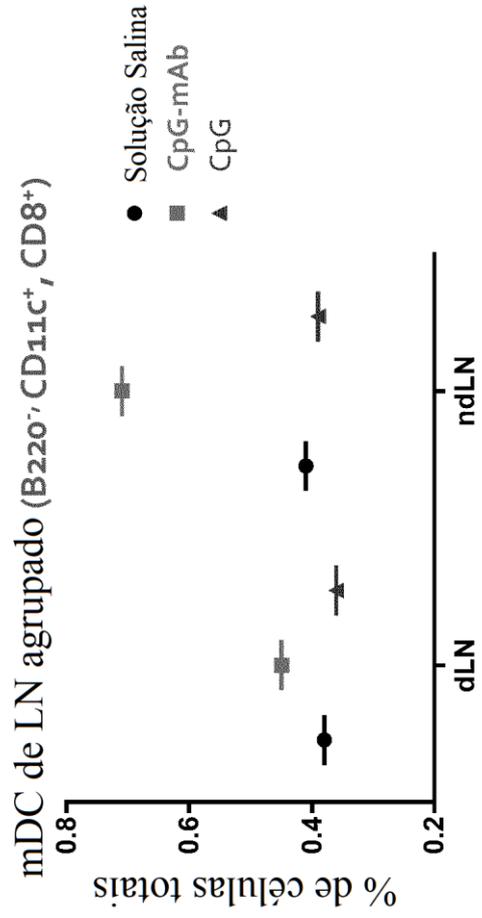


FIG. 77B

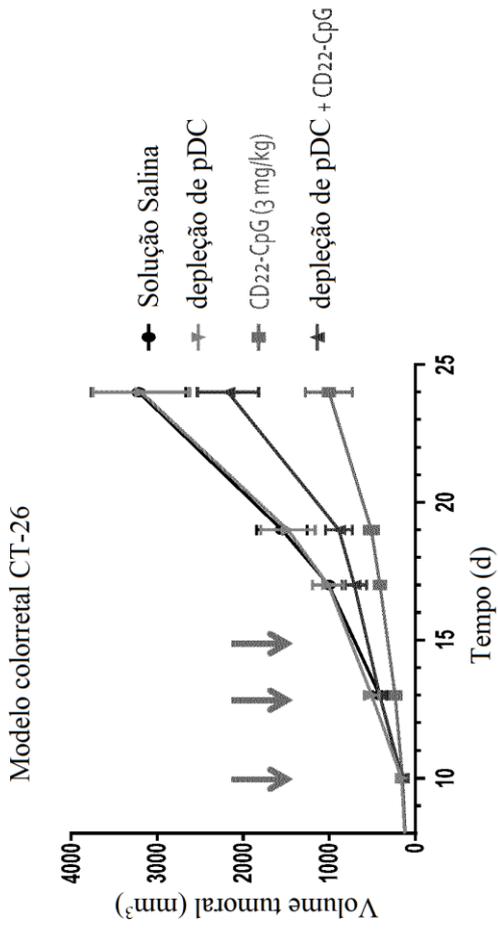


FIG. 78A

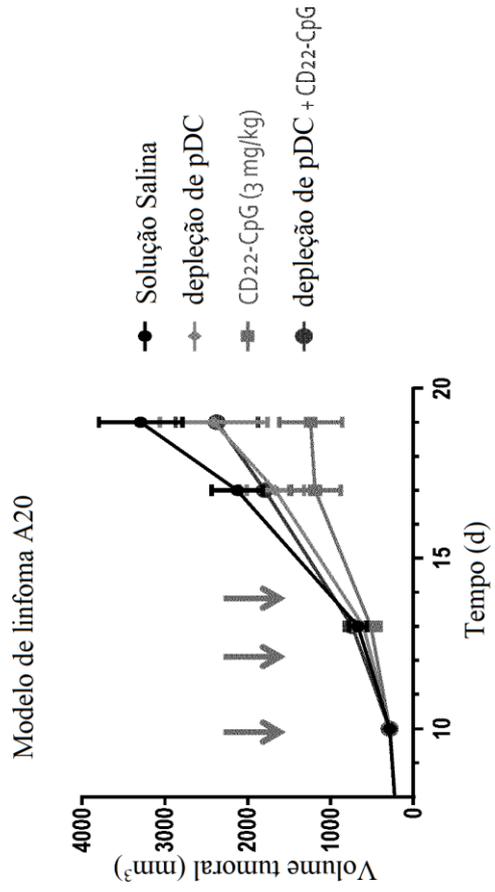


FIG. 78B

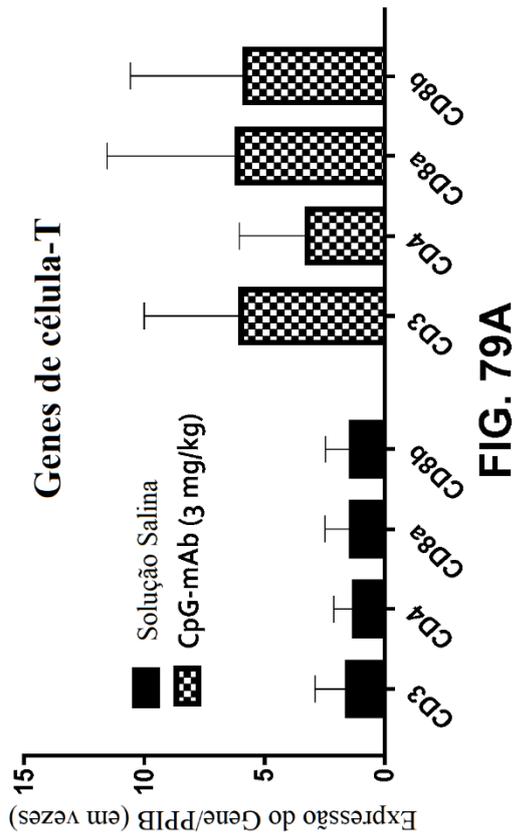


FIG. 79A

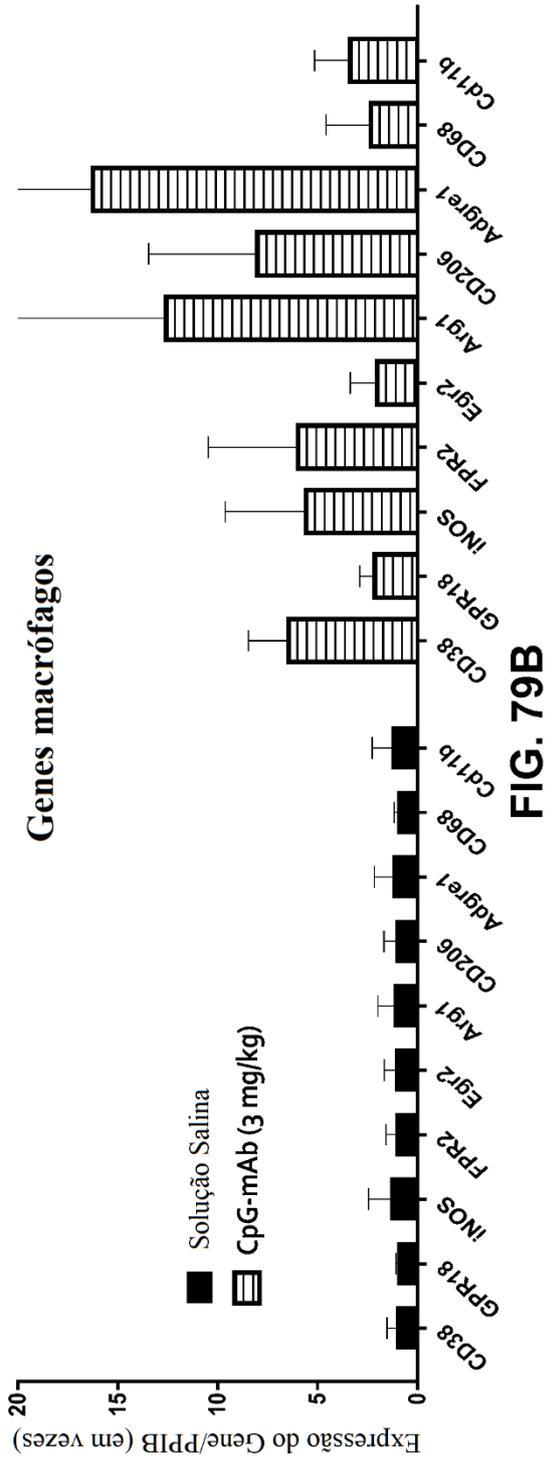
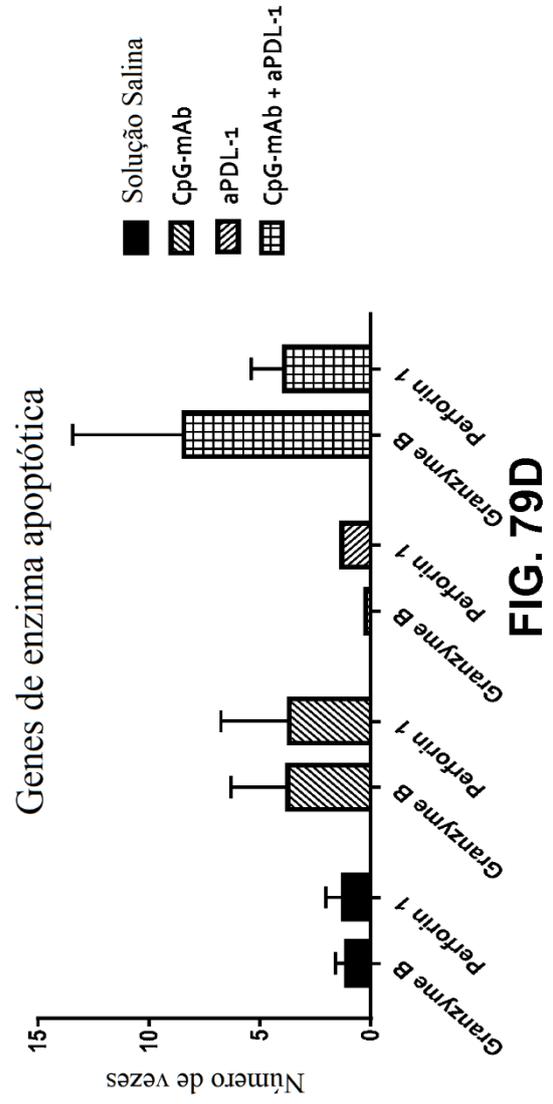
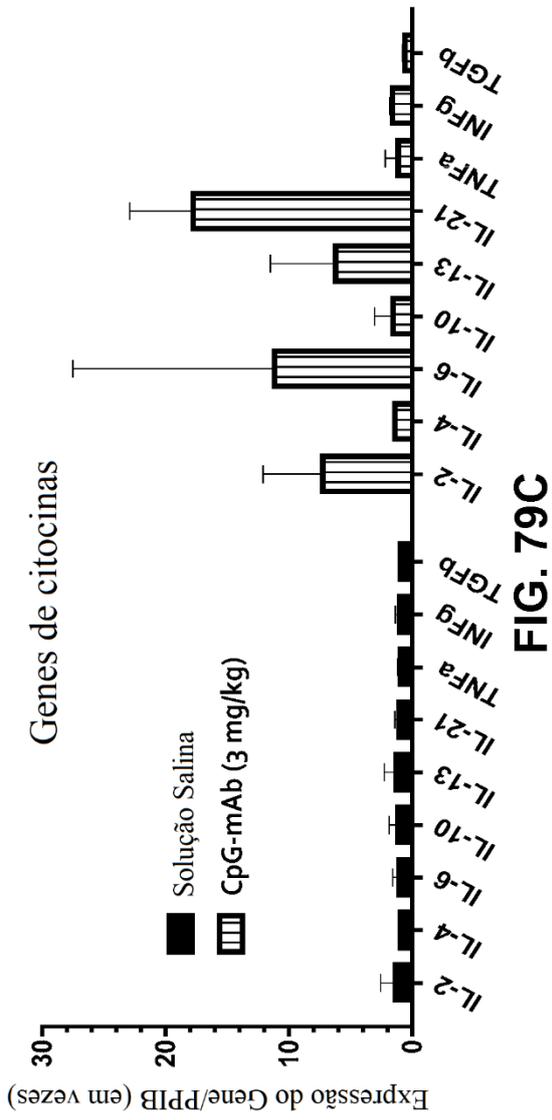


FIG. 79B



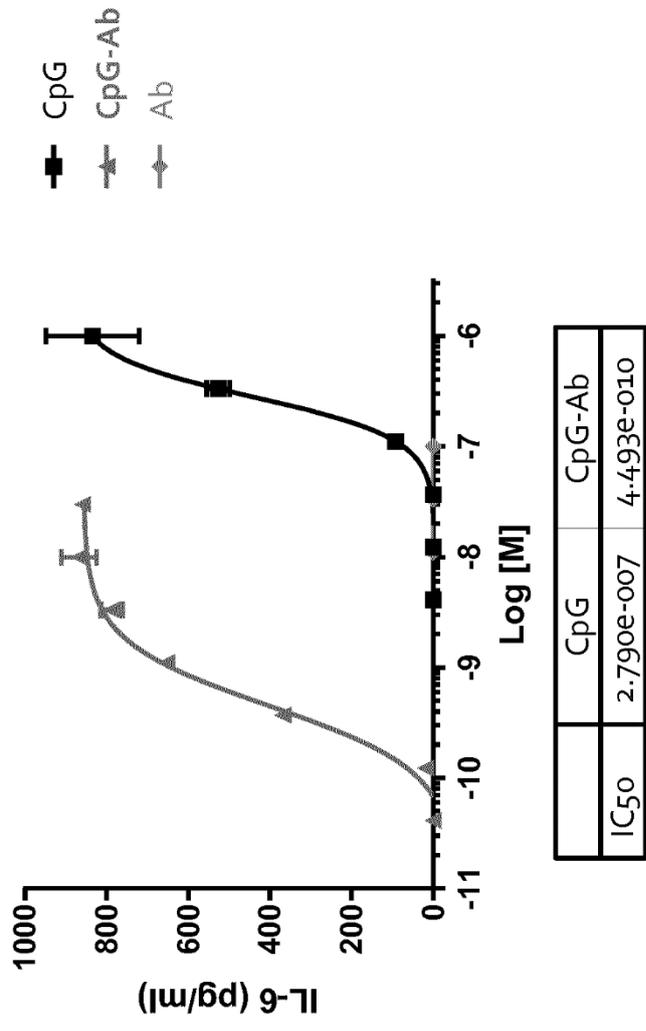


FIG. 80A

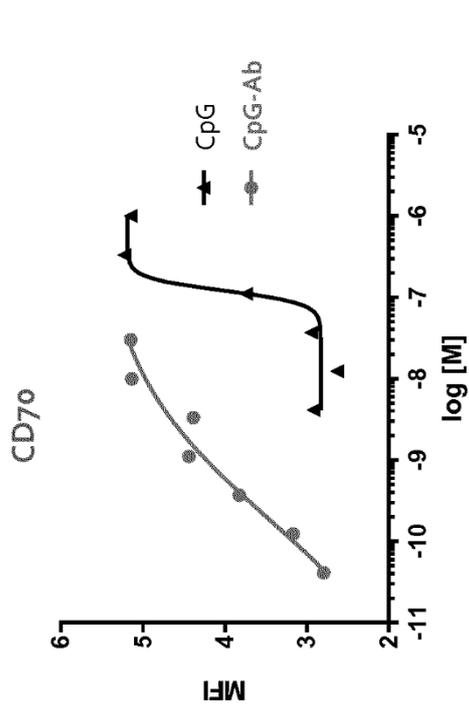


FIG. 80C

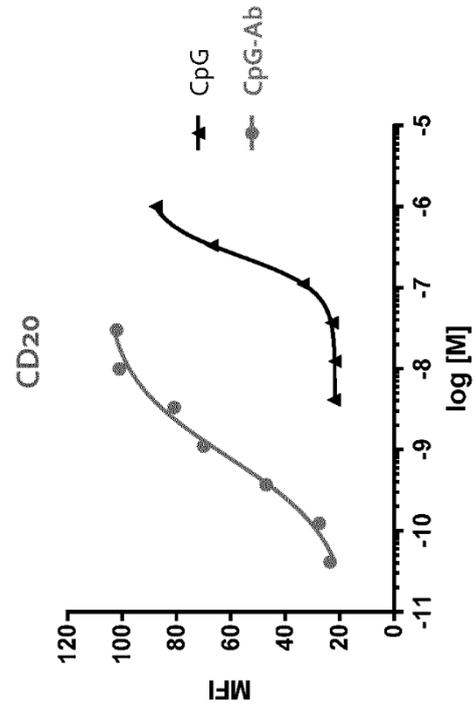


FIG. 80E

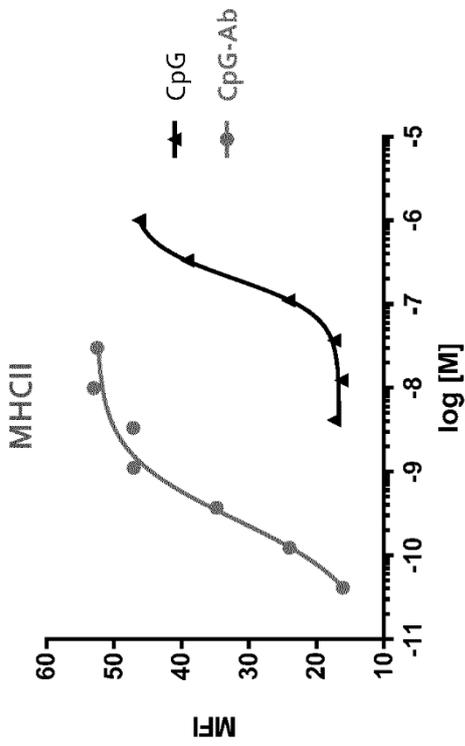


FIG. 80B

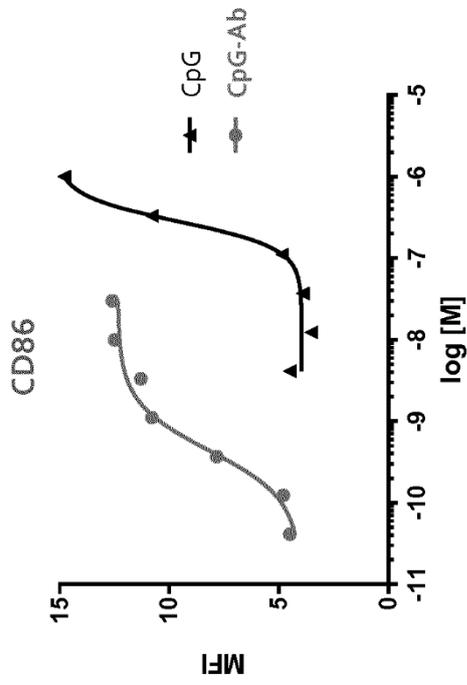


FIG. 80D

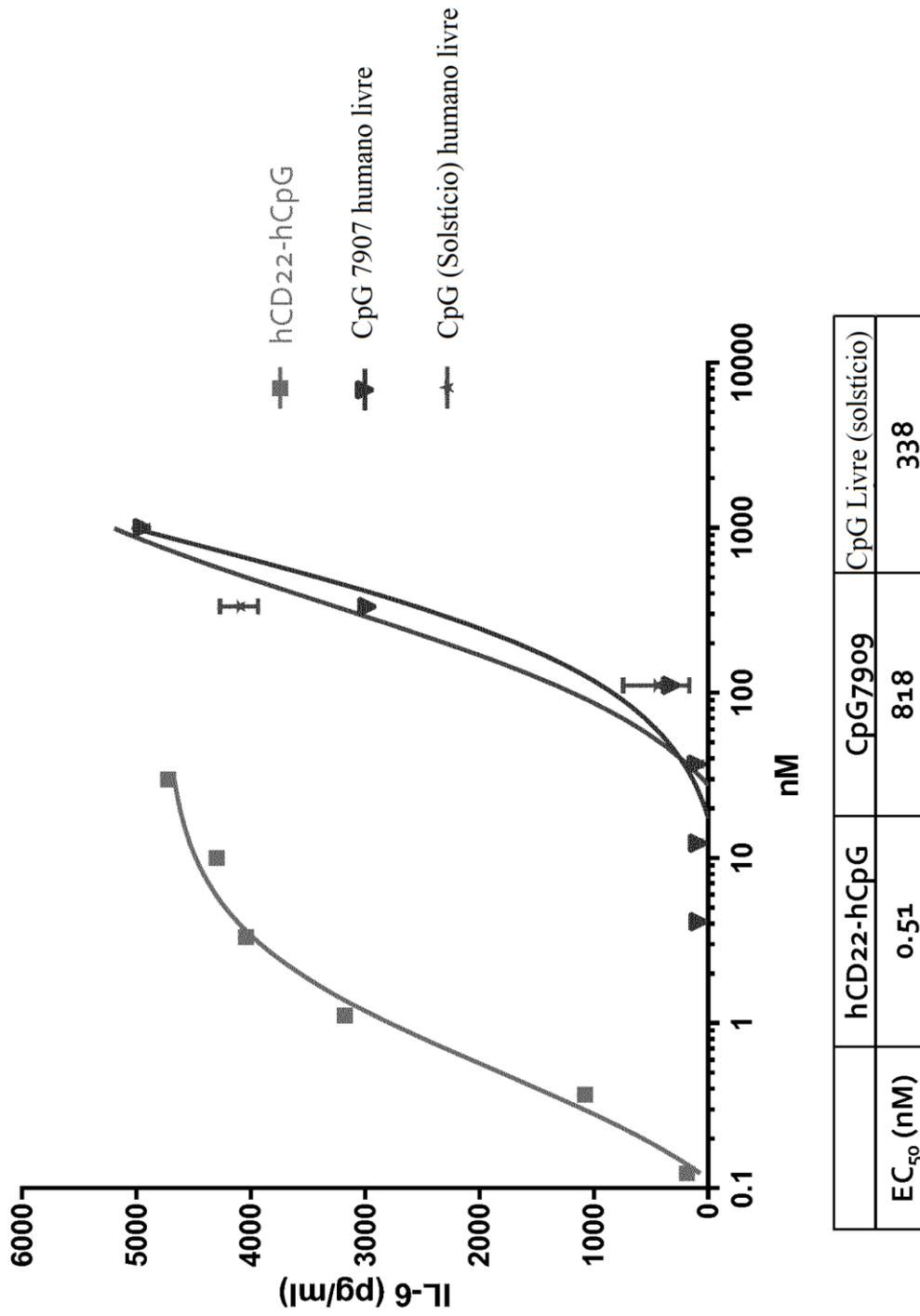


FIG. 81

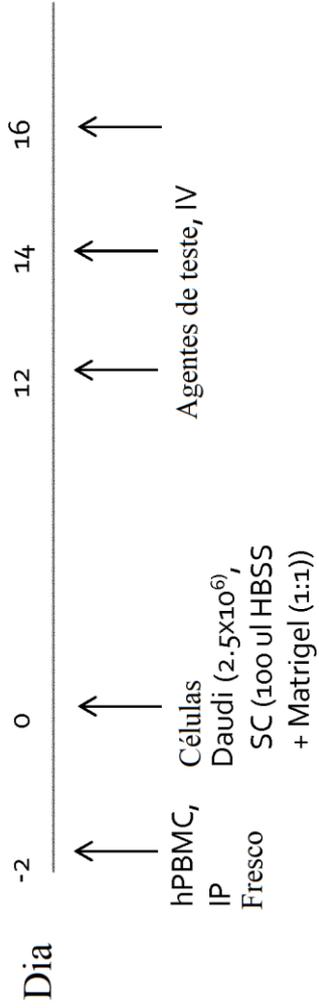


FIG. 82A

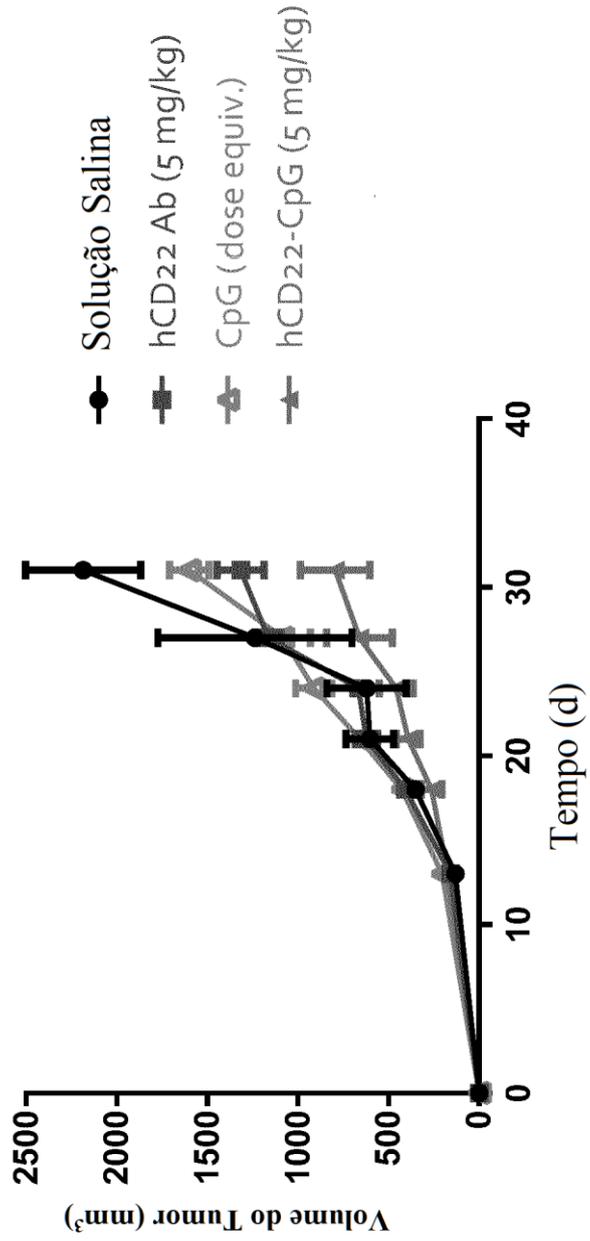


FIG. 82B

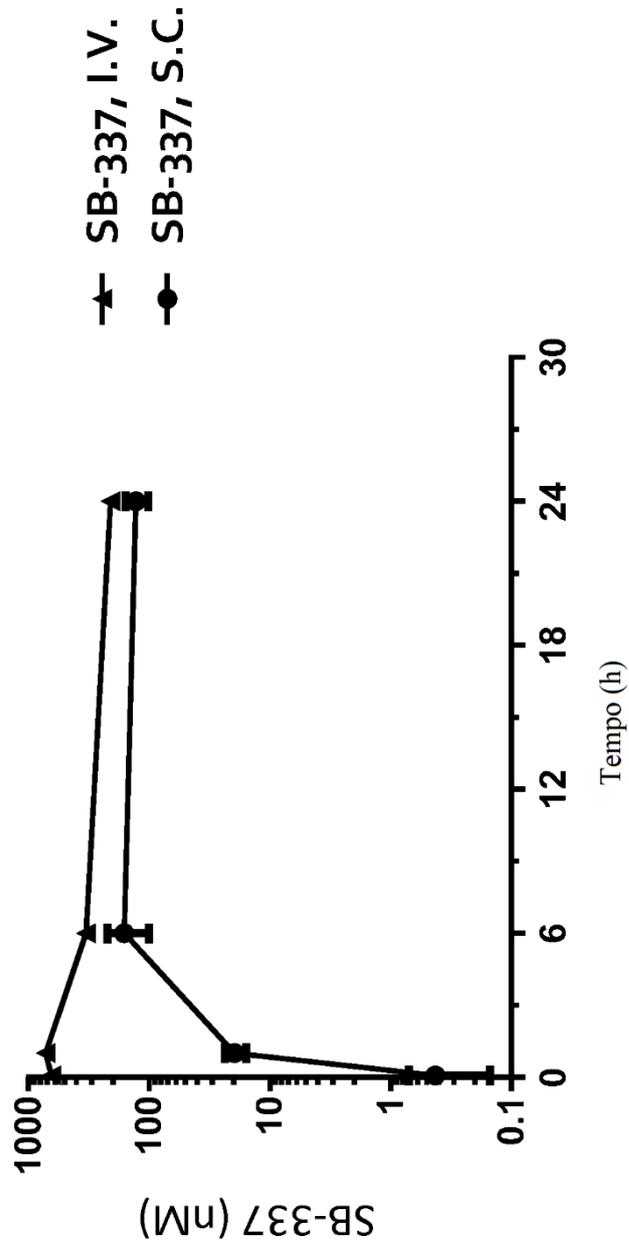


FIG. 83

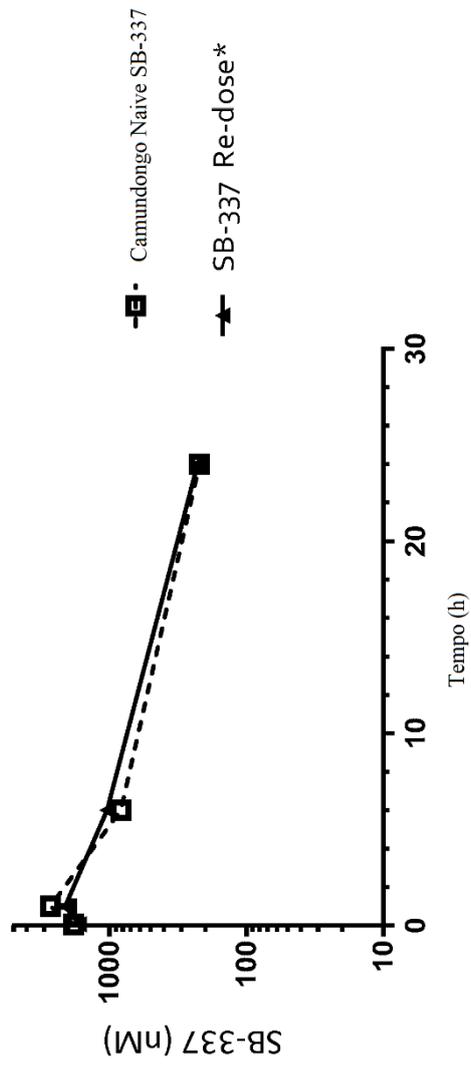


FIG. 84

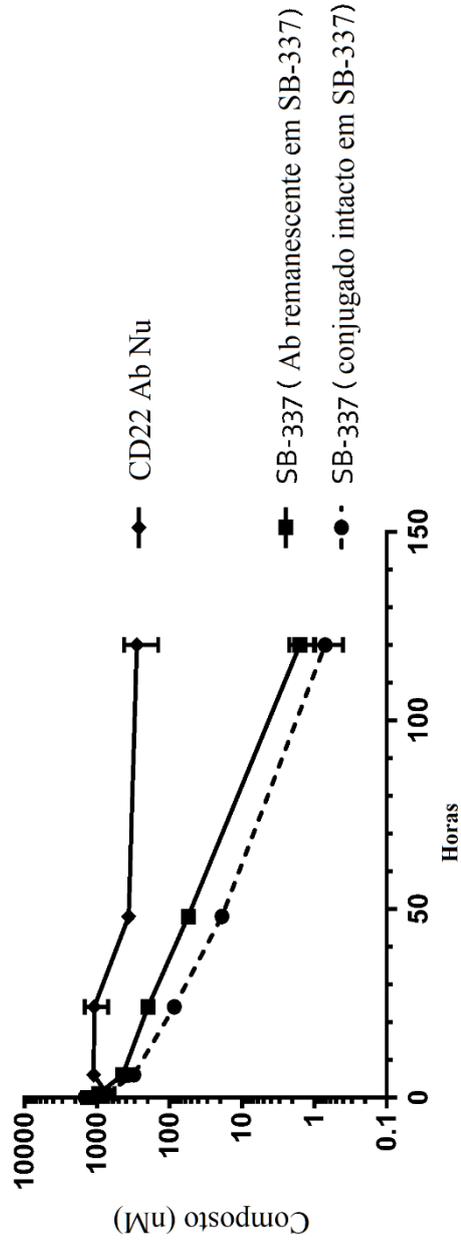


FIG. 85

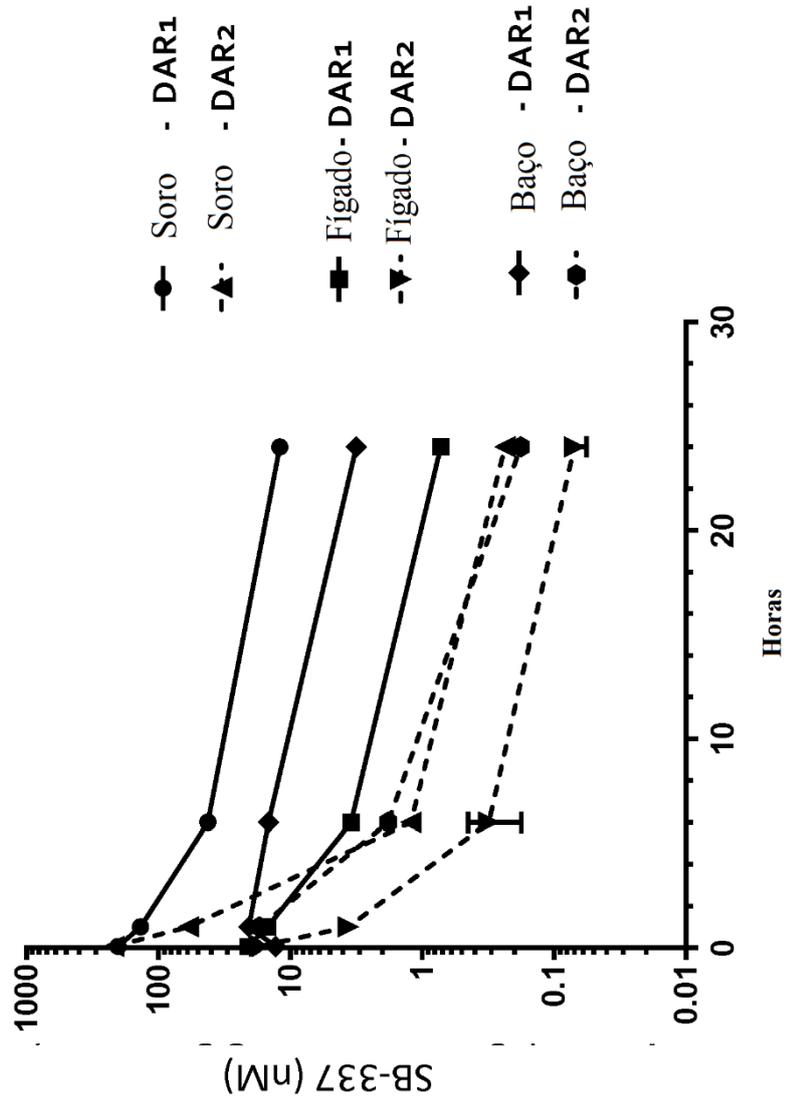


FIG. 86

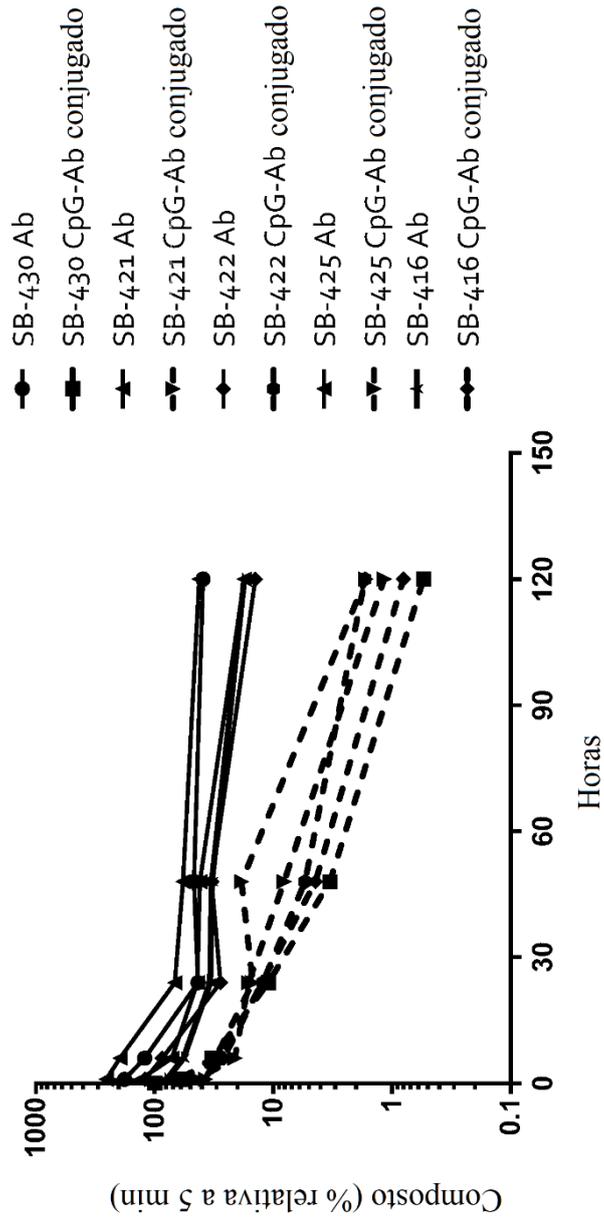


FIG. 87A

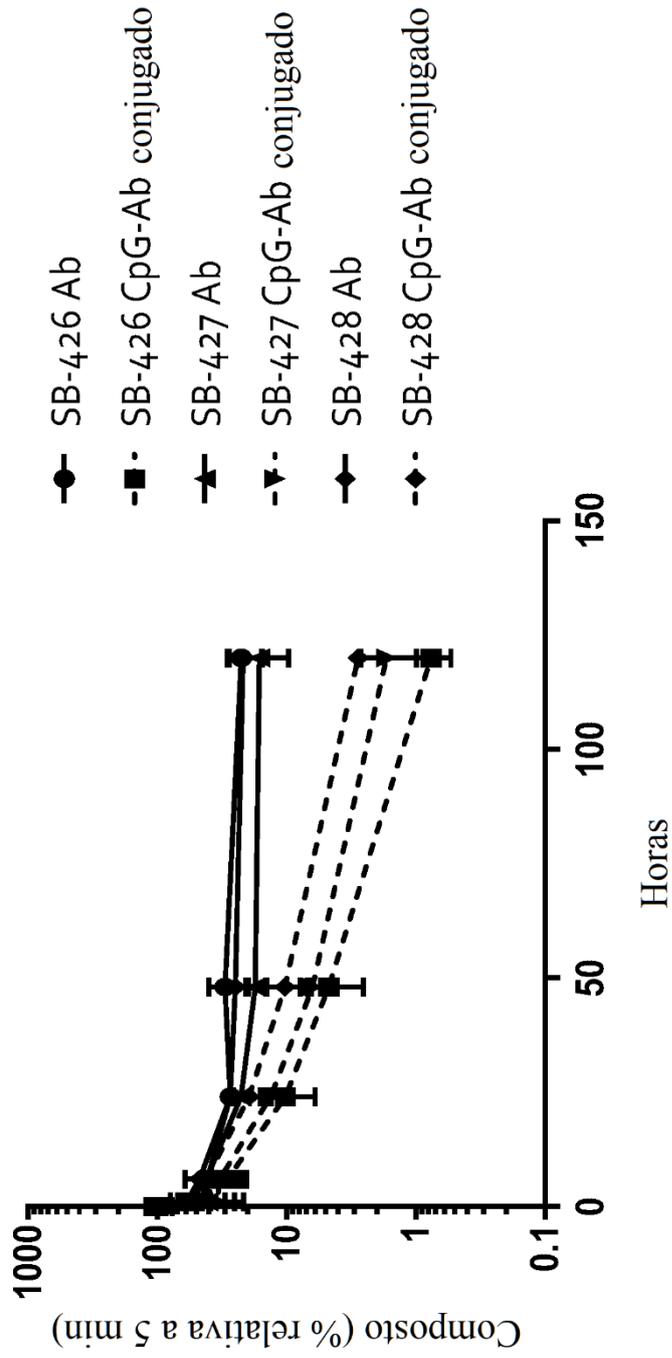


FIG. 87B

RESUMO

OLIGONUCLEOTÍDEO, COMPOSTO, POLINUCLEOTÍDEO IMUNOMODULADOR, COMPOSIÇÃO, CONJUGADO, MÉTODO PARA MODULAR UM RECEPTOR, MÉTODO DE TRATAMENTO DE UM TUMOR, MÉTODO DE TRATAMENTO DE CÂNCER, MÉTODO PARA TRATAR UM TUMOR, MÉTODO DE PREVENÇÃO DE CÂNCER, MÉTODO PARA INDUZIR UMA RESPOSTA IMUNE

São divulgados polinucleotídeos imunomodulados. Os polinucleotídeos imunomodulados podem conter uridina 5 modificada, citidina 5 modificada, um total de 6 a 16 nucleotídeos e/ou um ou mais espaçadores abásicos e/ou fosfotriésteres internucleosídeos. Também são divulgados conjugados contendo uma porção de direcionamento e um ou mais polinucleotídeos imunomoduladores. Os polinucleotídeos e conjugados imunomodulados podem ainda conter uma ou mais porções auxiliares. Também são divulgadas composições contendo os polinucleotídeos imunomodulados ou os conjugados contendo um ou mais fosforotioatos de internucleosídeo enriquecidos estereoquimicamente. São divulgadas ainda composições farmacêuticas contendo os polinucleotídeos imunomodulados ou os conjugados e métodos de seu uso.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: P4142 Listagem de Sequência(1597341.1).txt
- Data de Geração do Código: 13/12/2019
- Hora de Geração do Código: 20:36:13
- Código de Controle:
 - Campo 1: 8F0FBEB71BDC4AA8
 - Campo 2: EC6F703E000BC2EA