



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 201940192 A

(43)公開日：中華民國 108 (2019) 年 10 月 16 日

(21)申請案號：107144946

(22)申請日：中華民國 107 (2018) 年 12 月 13 日

(51)Int. Cl. : **A61K39/39 (2006.01)****C07H21/00 (2006.01)**

(30)優先權：2017/12/15 歐洲專利局 17207746.3
 2017/12/15 歐洲專利局 17207740.6
 2017/12/15 歐洲專利局 17207750.5

(71)申請人：德商拜耳動物保健有限公司 (德國) BAYER ANIMAL HEALTH GMBH (DE)
 德國

(72)發明人：伊爾格 湯瑪士 ILG, THOMAS (DE)

(74)代理人：何愛文；王仁君

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：47 項 圖式數：23 共 184 頁

(54)名稱

免疫刺激組成物

(57)摘要

本揭示內容是有關於在禽類物種體內有效引起免疫反應的免疫刺激組成物。更具體而言，這些免疫刺激組成物包含免疫調節劑組成物以及免疫刺激寡核苷酸，其等在投與時刺激類鐸受體 21。

The present disclosure relates to immunostimulatory compositions that are effective in eliciting immune responses in avian species. More specifically, these immunostimulatory compositions comprise an immunomodulator composition and an immunostimulatory oligonucleotide that when administered stimulate toll-like receptor 21.

指定代表圖：

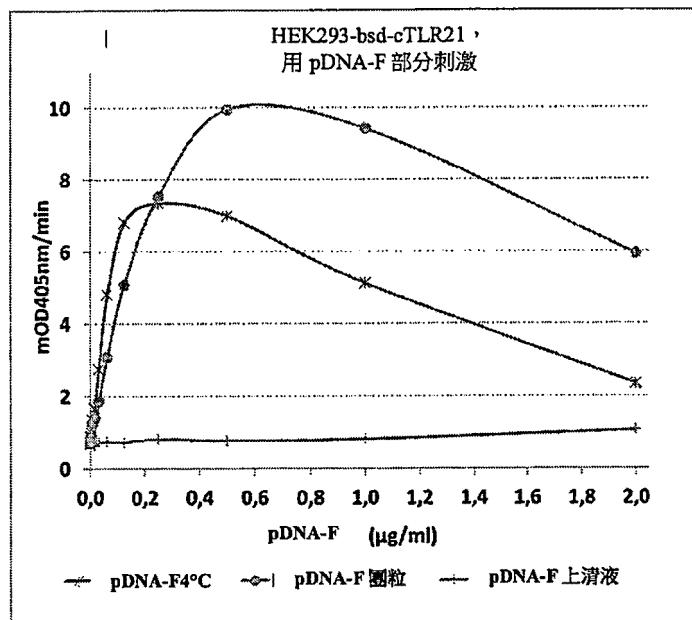


圖 4

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】（中文/英文）

免疫刺激組成物

IMMUNOSTIMULATORY COMPOSITIONS

涉及的相關申請案

【0001】 本申請案請求個別於2017年12月15日提申之歐洲專利申請案第EP17207740.6號、第EP17207746.3號，以及第EP17207750.5號的優先權以及權益，其等之揭示內容以其全文引用的方式併入本文。

序列表

【0002】 本申請案含有序列表，序列表已呈ASCII格式電子呈交並且以其全文引用的方式併入。在2018年11月30日產生的該份ASCII抄本被命名為BHC_168027_SL.txt且大小為92,167位元組。

【技術領域】

【0003】 本發明提供用於刺激類鐸受體蛋白21 (TLR21)的組成物以及方法。更具體而言，本文揭示免疫刺激寡核苷酸與組成物、製造免疫刺激寡核苷酸與組成物的方法，以及刺激TLR21的方法。

【先前技術】

【0004】 脊椎動物的免疫系統已發展出用於辨識侵入病原菌以及啟動細胞傳訊路徑以主動抵禦感染的分子機制。一些分子機制對於特定微生物具有特異性，並且涉及生物分子(諸如辨識病原菌之單一物種的表面抗原的抗體)。不幸的是，病原菌特異性防禦機制並不全然有效，因為一些動物直到已發生感染後才生成後天抗性，且在一些情況下病原菌已演化出侵入脊椎動物後天防禦的手段。

【0005】 脊椎動物也更為廣泛地辨識感染，而這個辨識產生非特異性免疫反應，諸如細胞激素表現上揚。當細胞受體結合至病原菌相關分子型態(PAMP)時可引起這樣的防禦。PAMP與宿主對PAMP之同源受體之間的這個交互作用可能引發免疫反應。舉例來說，類鐸受體蛋白21 (TLR21)是哺乳動物TLR9的雞功能性同源物，並且能夠辨識未甲基化CpG模體(motif)(在微生物中比在脊椎動物中有更高的CpG含量)。已知方法學透過投與具有未甲基化CpG模體的質體或寡核苷酸使這個非特異性免疫反應路徑發揮重要作用，而透過含CpG模體的核酸來活化TLR21已被證實會活化參與對抗微生物感染之免疫反應的細胞訊號。但是，單獨投與免疫刺激質體或寡核苷酸可能無法引起足夠抗衡感染的反應。

【0006】 大規模動物生產者急欲需要抗生素治療感染的替代方案。消費者針對無抗生素動物產品催促這些生產者，且同時因為抗生素抗性病原菌闡明了大型群體預防性投與抗生素的危險，增加感染發生率。同樣地，抗生素抗性在人類健康照護方面也變成是一個國家級緊急事件。醫院與醫生執業處變成藥物抗性細菌(諸如多重抗性金黃色葡萄球菌(MRSA))出現的地面零點。

【0007】 因此，需要用於引起對抗病原菌之非特異性免疫反應的免疫刺激組成物與方法。所揭示的方法及組成物是針對這些以及其他重要需求。

【發明內容】

【0008】 本文揭示包含免疫調節劑組成物的免疫刺激組成物，該免疫調節劑組成物包含核酸質體以及脂質體遞送媒劑；以及免疫刺激寡核苷酸，該免疫刺激寡核苷酸具有至少一個CpG模體以及一個在免疫刺激寡核苷酸的5'端處或鄰近免疫刺激寡核苷酸的5'端處的富含鳥嘌呤核苷酸序列。

【0009】 本文亦揭示用於製備免疫刺激組成物的方法，包含組合含有

核酸質體的免疫調節劑組成物與免疫刺激寡核苷酸以形成免疫刺激組成物、將該免疫刺激組成物離心以產生上清液與團粒；以及分離該團粒。

【0010】 進一步提供刺激TLR21的方法，包含向個體投與免疫刺激寡核苷酸以及免疫調節劑組成物，其中該免疫刺激寡核苷酸包含至少一個CpG模體與一個在免疫刺激寡核苷酸的5'端處或鄰近免疫刺激寡核苷酸的5'端處的富含鳥嘌呤核苷酸序列，且其中該免疫調節劑組成物包含非編碼核酸質體以及陽離子脂質遞送媒劑。

【0011】 亦揭示用於在個體體內引起免疫反應的方法，其是藉由向個體投與免疫刺激寡核苷酸以及免疫調節劑組成物，或包含免疫刺激寡核苷酸以及免疫調節劑組成物的免疫刺激組成物，其中該免疫刺激寡核苷酸具有至少一個CpG模體與一個在免疫刺激寡核苷酸的5'端處或鄰近免疫刺激寡核苷酸的5'端處的富含鳥嘌呤核苷酸序列，且其中該免疫調節劑組成物包含非編碼核酸質體以及陽離子脂質遞送媒劑。

【圖式簡單說明】

【0012】 當與附圖一起閱讀時會進一步了解發明內容以及以下的詳細說明。為了說明所揭示的組成物以及方法，圖式中顯示組成物以及方法的示意性具體例；但是，該等組成物以及方法並不限於揭示的特定具體例。在圖式中：

【0013】 圖1描述附接至一個四乙二醇連接子之膽固醇基部分的化學結構。

【0014】 圖2A及2B比較免疫刺激質體DNA、與陽離子脂質體複合之質體DNA以及免疫刺激寡核苷酸的免疫性。圖2A比較免疫刺激質體DNA（「pDNA」）以及與陽離子脂質體複合之pDNA（「pDNA-F」）的免疫性。圖2B比較pDNA、pDNA-F以及具有5'-膽固醇基修飾之免疫刺激寡核苷酸

GCGT3-TG4T (「5Chol-GCGT3-TG4T」)的免疫性。

【0015】 圖3A及3B比較免疫刺激質體DNA、與陽離子脂質體複合之免疫刺激質體DNA、免疫刺激寡核苷酸及其組合的免疫性。圖3A比較pDNA、pDNA-F、5Chol-GCGT3-TG4T、與5'Chol-GCGT3-TG4T組合之pDNA (「pDNA-5Chol-GCGT3-TG4T」), 以及與5Chol-GCGT3-TG4T組合之pDNA-F (「pDNA-F-5Chol-GCGT3-TG4T」)的免疫性，其中免疫刺激寡核苷酸呈nM濃度，而DNA與pDNA-F呈 μ g/ml濃度。圖3B描述pDNA、pDNA-F、5Chol-GCGT3-TG4T 、與 5'Chol-GCGT3-TG4T 組 合 之 pDNA (「pDNA-5Chol-GCGT3-TG4T」), 以及與5Chol-GCGT3-TG4T組合之pDNA-F (「pDNA-F-5Chol-GCGT3-TG4T」)之間的免疫性差異，其中，免疫刺激寡核苷酸呈pM濃度，而pDNA與pDNA-F呈ng/ml濃度；

【0016】 圖4說明pDNA-F部分在HEK293-bsd-cTLR21細胞中刺激TLR21-媒介之免疫反應的能力。具體來說，儲存在4°C下的pDNA-F的免疫性與經離心樣品之團粒中獲得之pDNA-F者(「pDNA-F團粒」)以及經離心樣品之上清液中獲得之pDNA-F者(「pDNA-F上清液」)相比較。

【0017】 圖 5A 及 5B 以圖描述分別在高濃度與低濃度下，pDNA-F-5Chol-GCGT3-TG4T 以 及 5Chol-GCGT3-TG4T 在 HEK293-bsd-cTLR21細胞中產生TLR21-媒介之免疫反應的能力。

【0018】 圖 6A 及 6B 是 分 別 將 高 濃 度 與 低 濃 度 之 pDNA-F-5Chol-GCGT3-TG4T在HEK293-bsd-cTLR21細胞中產生TLR21-媒介之免疫反應的能力與經離心pDNA-F樣品之團粒中獲得之5Chol-GCGT3-TG4T者(「pDNA-F 5Chol團粒」)和經離心pDNA-F樣品之上清液中獲得之5Chol-GCGT3-TG4T者(「pDNA-F 5Chol上清液」)相比較。

【0019】 圖7A及7B是分別將高濃度與低濃度之5Chol-GCGT3-TG4T

在HEK293-bsd-cTLR21細胞中產生TLR21-媒介之免疫反應的能力與經離心pDNA-F樣品之團粒中獲得之5Chol-GCGT3-TG4T者(「5Chol團粒」)和經離心pDNA-F樣品之上清液中獲得之5Chol-GCGT3-TG4T者(「5Chol上清液」)相比較。

【0020】 圖8A及8B是分別將高濃度與低濃度之5Chol-GCGT3-TG4T(「5Chol-GCGT3-TG4T 4°C」)在HEK293-bsd-cTLR21細胞中產生TLR21-媒介之免疫反應的能力與和5Chol-GCGT3-TG4T組合之pDNA-F者(「pDNA-F/5-Chol-GCGT3-TG4T」)相比較。

【0021】 圖9A及9B分別將高濃度與低濃度之與5Chol-GCGT3-TG4T組合的pDNA-F(「pDNA-F/5-Chol-GCGT3-TG4T」)在HEK293-bsd-cTLR21細胞中產生TLR21-媒介之免疫反應的能力與經離心pDNA-F樣品之團粒中獲得之與5Chol-GCGT3-TG4T組合的pDNA-F者(「pDNA-F/5-Chol-GCGT3-TG4T團粒」)和經離心pDNA-F樣品之上清液中獲得之與5Chol-GCGT3-TG4T組合的pDNA-F者(「pDNA-F/5-Chol-GCGT3-TG4T上清液」)相比較。

【0022】 圖10A及10B分別將高濃度與低濃度之與5Chol-GCGT3-TG4T組合之pDNA-F在HEK293-bsd-cTLR21細胞中產生TLR21-媒介之免疫反應的能力(「pDNA-F-5-Chol-GCGT3-TG4T」)與pDNA-F者和免疫刺激寡核苷酸5-Chol-GCGT3-TG4T者相比較。

【0023】 圖11A及11B分別將高濃度與低濃度之與5Chol-GCGT3-TG4T組合之pDNA-F在HEK293-bsd-cTLR21細胞中產生TLR21-媒介之免疫反應的能力(「pDNA-F-5-Chol-GCGT3-TG4T」)與經離心pDNA-F樣品之團粒中獲得之與5Chol-GCGT3-TG4T組合的pDNA-F者(「pDNA-F-5-Chol-GCGT3-TG4T團粒」)以及經離心pDNA-F樣品之上清液

中 獲 得 之 與 5Chol-GCGT3-TG4T 組 合 的 pDNA-F 者
(「pDNA-F-5-Chol-GCGT3-TG4T」)相比較。

【0024】 圖12A及12B分別比較高濃度與低濃度之pDNA-F、免疫刺激寡核昔酸 GCGT3-TG4T，以及與 GCGT3-TG4T 複合之 pDNA-F (「pDNA-F-GCGT3-TG4T」)在HEK293-bsd-cTLR21細胞中產生TLR21-媒介之免疫反應的能力。

【0025】 圖13A及13B分別將高濃度與低濃度之與免疫刺激寡核昔酸 GCGT3-TG4T 組 合 的 pDNA-F (「 pDNA-F-GCGT3-TG4T 」) 在 HEK293-bsd-cTLR21細胞中產生TLR-21媒介之免疫反應的能力與經離心 pDNA-F樣品之團粒中獲得之與免疫刺激寡核昔酸GCGT3-TG4T組合的 pDNA-F者(「pDNA-F-GCGT3-TG4T團粒」)以及經離心pDNA-F樣品之上清液中獲得之與免疫刺激寡核昔酸 GCGT3-TG4T 組 合 的 pDNA-F 者 (「pDNA-F-GCGT3-TG4T上清液」)相比較。

【0026】 圖14描述在免疫接種之後(pv)第14天(上圖)以及第21天(下圖)，ODN1 (GCGT3-TG4T-5Chol)的血球凝集抑制(HI)力價(Log2) (加上標準差)結果。星號表示顯著性程度(*=顯著，****=高度顯著)。

【0027】 圖15描述在整個研究期間，ODN1 (GCGT3-TG4T-5Chol)的平均HI力價(Log2) (加上標準差)結果。

【0028】 圖16描述在免疫接種之後第14天(上圖)以及第21天(下圖)，ODN2 (GCGT3-TG4T)的平均HI力價(Log2) (加上標準差)結果。星號表示顯著性程度(*=顯著，****=高度顯著)。

【0029】 圖17描述在整個研究期間，ODN2 (GCGT3-TG4T)的平均HI力價(Log2) (加上標準差)結果。

【0030】 圖18描述在免疫接種之後第14天(上圖)以及第21天(下圖)，

ODN3 (2006-PTO)的平均HI力價(Log2) (加上標準差)結果。星號表示顯著性程度(*=顯著，****=高度顯著)。

【0031】 圖19描述在整個研究期間，ODN3 (2006-PTO)的平均HI力價(Log2) (加上標準差)結果。

【0032】 圖20描述於免疫接種之後第14天(上圖)以及第21天(下圖)，陽性對照與陰性對照測試物的平均HI力價(Log2) (加上標準差)結果。星號表示顯著性程度(*=顯著，****=高度顯著)。

【0033】 圖21描述在整個研究期間，陽性對照與陰性對照測試物的平均HI力價(Log2) (加上標準差)結果。

【0034】 圖22描述相較於單獨NDV疫苗，在整個研究期間於ODN最優濃度下的平均HI力價(Log2) (加上標準差)結果。

【0035】 圖23描述相較於單獨NDV，在pv第14天(上圖)以及第21天(下圖)於ODN最優濃度下的平均HI力價(Log2) (加上標準差)結果。

【實施方式】

【0036】 透過參照形成本揭示內容一部分的以下詳細說明以及隨附圖式，可以更容易地理解所揭示的組成物以及方法。應理解，所揭示的組成物以及方法不限於本文所述及/或所示的特定組成物與方法，且本文所使用的術語僅是為了以例示的方式來說明特定具體例，而不希望是限制所請求的組成物與方法。

【0037】 除非另有明確說明，否則任何改良用的可能作用機制或模式或理由的說明表示僅為說明性，且所揭示的組成物以及方法不局限於任何此等暗示之改良用作用機制或模式或理由的正確性或不正確性。

【0038】 本文通篇之中，說明提到組成物以及使用組成物的方法。若揭示內容描述或請求與組成物相關的特徵或具體例，則此一特徵或具體例

同樣適用於使用該組成物的方法。相同地，若揭示內容說明或請求與使用某一組成物之方法有關的特徵或具體例，則此一特徵或具體例同樣適用於該組成物。

【0039】 表示數值範圍時，另一個具體例包括從一個特定數值及/或至其他特定數值。此外，提到範圍內所指明的數值時包括那個範圍內的各個與每個數值。所有的範圍都是包含性且可組合。若數值表示為近似值，則使用先行詞「約」將理解為該特定數值構成另一個具體例。除非上下文另有清楚指明，否則提到特定數值包括至少一個那個特定數值。

【0040】 要理解所揭示組成物以及方法的某些特徵(為清楚起見，在本文個別具體例的內文中說明)也可組合在單一具體例中提供。相反地，所揭示組成物以及方法的不同特徵(為簡明起見，在單一具體例的內文中說明)也可以分別或以任一種子組合提供。

【0041】 如本文所用，單數型「一(a、an)」以及「該(the)」包括複數型。

【0042】 「共投與」如本文所用意指投與免疫調節性組成物以及免疫刺激寡核苷酸以達到所期望的免疫刺激效用。免疫調節性組成物以及免疫刺激寡核苷酸可以做為個別組成物或者是一起做為單一組成物來共投與。若免疫調節性組成物以及免疫刺激寡核苷酸為個別組成物，則它們可以同時或依任何順序依序共投與。關於依序共投與，投與免疫調節性組成物與免疫刺激寡核苷酸之間可能延遲一分鐘、一小時或甚至一或多天。

【0043】 如本文所用，「融合」意指在兩個化學反應性物質之間產生化學鍵。在本揭示內容的上下文中，融合多半意指將特定要素併入寡核苷酸中。例如，胸嘧啶寡核苷酸的連串序列(run)可融合至寡核苷酸的3'端。

【0044】 如本文所用，「G-四聯體序列(G-quartet sequence)」意指鄰

近寡核苷酸之5'端的一段連續鳥嘌呤殘基，其使得寡核苷酸可以與其他G-四聯體序列反應而形成G-四聯體。G-四聯體提高核酸的免疫刺激性性質。例如，含有G-四聯體序列的寡核苷酸可能發生交互作用，產生G-四聯體。存在於基因之啟動子區域內的G-四聯體序列可能形成涉及調節基因表現的四級結構。然而G-四聯體序列不限於任何特定序列，G-四聯體序列的一個實例為TGGGGT。

【0045】 如本文所用，「G-線(G-wire)序列」、「G線(G wire、Gwire)序列」以及相關術語意指複數個(大多為兩個)的至少四個連續鳥嘌呤核苷酸。複數個鳥嘌呤核苷酸位在寡核苷酸的5'端處或鄰近寡核苷酸的5'端，被兩個或更多個非鳥嘌呤核苷酸(例如胸嘧啶)分隔開。G-線序列能夠與其他G-線序列交互作用而形成G-線結構。G-線結構可增進核酸的免疫刺激性性質。例示性G-線序列为GGGGTTGGGG (SEQ ID NO : 257)或GGGGTTGGGGTTT (SEQ ID NO : 258)。

【0046】 如本文所用，術語「富含鳥嘌呤核苷酸序列」、「富含鳥嘌呤序列」以及類似者意指含有一個連串序列的連續鳥嘌呤核苷酸(通常在四個至六個鳥嘌呤核苷酸之間)，或一個核酸區(通常是在具有鳥嘌呤核苷酸多過於腺嘌呤、胞嘧啶或胸嘧啶核苷酸之寡核苷酸的5'端處或鄰近5'端)。富含鳥嘌呤序列如本文揭示可提高寡核苷酸的免疫刺激性性質。G-四聯體以及G-線序列均為富含鳥嘌呤核苷酸序列的類型。

【0047】 術語「免疫調節性組成物」如本文所用意指一種包含至少一個免疫性核酸質體以及一個脂質體遞送媒劑的組成物。在本文揭示之組成物以及方法的一些態樣中，核酸質體可能並未編碼特定免疫原且可能基於核酸質體固有的特性而具有免疫性。在一些態樣中，脂質體遞送媒劑為陽離子性。

【0048】 「免疫性核酸質體」是一種核酸質體，當被脊椎動物免疫系統偵測到時，會引起免疫反應。一些免疫性核酸質體所包含的CpG二核苷酸模體百分率比一些脊椎動物生物體中天然存在的核酸質體序列還高。在不囿限於理論的情況下，咸信增加的CpG二核苷酸模體是存在於細菌衍生的核酸中，且因此這些富含CpG的核酸對於宿主免疫防禦作用來說是外來的。免疫性核酸質體可包含非天然核苷酸以及核苷酸的衍生物。

【0049】 「免疫刺激組成物」如本文所用意指一種包含免疫調節性組成物以及免疫刺激寡核苷酸的組成物。在一些態樣中，免疫刺激寡核苷酸與免疫調節性組成物包含單一調配物，其為免疫刺激組成物。在一些態樣中，免疫刺激寡核苷酸可以在物理上與免疫調節性組成物的脂質體遞送媒介結合。

【0050】 如本文所用，「插入」意指於寡核苷酸合成期間在特定位置處添加特定核苷酸。

【0051】 如本文所用，「平行位向」意指不同寡核苷酸之間的方向性交互作用。例如，以相同5'至3'方向定向的個別寡核苷酸是呈平行位向。

【0052】 如本文所用，「一致性百分率(percent identity)」以及類似術語是用來說明兩個或更多個核酸、聚核苷酸、蛋白質或多肽之間的序列關聯性，且在上下文應能理解並與包括下列的術語組合：(a)參考序列；(b)比較窗；(c)序列一致性；以及(d)序列一致性百分率。

(a) 「參考序列」是一種用作為序列比對基礎的限定序列。參考序列可以是指定序列的一個子集或整體；例如，全長cDNA或基因序列的一段，或完整cDNA或基因序列。

(b) 「比較窗」包括參考連續及指定的聚核苷酸序列段，其中該聚核苷酸序列可以與參考序列相比對，且其中相比於參考序列，該聚核苷

酸序列在比較窗中的部分可能包含添加、置換或刪除(亦即空位)以供用於兩個序列的最優比對(參考序列不包含添加、置換或刪除)。那些習於技藝者理解到，因為在聚核苷酸序列中納入空位來避開與參考序列讓人誤解的高度相似性，通常會引入空位罰分並且從匹配數予以扣除。

- (c) 關於比較用的序列比對方法為技藝中所熟知。可以透過下列方法來進行比較用序列的最優比對：Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.*, 2: 482, 1981的局部同源性演算法；Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 48: 443, 1970的同源性比對演算法；Pearson and Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 8: 2444, 1988的相似性研究方法；這些演算法的電腦運算實作，包括但不限於：Intelligenetics, Mountain View, Calif.的PC/Gene程式中的CLUSTAL、Wisconsin Genetics Software Package中的GAP、BESTFIT、BLAST、FASTA 以及 TFASTA (Genetics Computer Group (GCG), 7 Science Dr., Madison, Wis., USA)；CLUSTAL程式經Higgins and Sharp, *Gene*, 73: 237-244, 1988；Corpet, et al., *Nucleic Acids Research*, 16:881-90, 1988；Huang, et al., *Computer Applications in the Biosciences*, 8:1-6, 1992；與Pearson, et al., *Methods in Molecular Biology*, 24:7-331, 1994 充分說明。可用於數據庫相似性研究的BLAST程式家族包括：用於核苷酸查詢序列與核苷酸數據庫序列的BLASTN；用於核苷酸查詢序列與蛋白質數據庫序列的BLASTX；用於蛋白質查詢序列與核苷酸數據庫序列的TBLASTN；以及用於核苷酸查詢序列與核苷酸數據庫序列的TBLASTX。參見Current Protocols in Molecular Biology, Chapter 19, Ausubel, et al., Eds., Greene Publishing and

Wiley-Interscience, New York, 1995。上述程式的新版本或新程式在未來毫無疑問全都會可供利用，且可能與本揭示內容一起使用。

(d) 「序列一致性」表示透過在一個比較窗內比較兩個經最優比對序列所決定出來的數值，其中相比於參考序列，該聚核苷酸序列在比較窗中的部分可能包含添加、置換或刪除(亦即空位)以供用於兩個序列的最優比對(參考序列不包含添加、置換或刪除)。透過確定出現在兩個序列中的相同核酸鹼基的位置處的位置數目而產生相匹配位置數目，將相匹配位置數目除以比較窗中的總位置數目且將結果乘以100，得到序列一致性的百分率而算出這個百分率。

【0053】 「治療有效量」意指治療個體之免疫調節性組成物及/或免疫刺激寡核苷酸或免疫刺激組成物的量。

【0054】 「協同有效量」意指在治療個體時提供協同、或超過加成效果用之免疫調節性組成物與免疫刺激寡核苷酸的量。術語「個體」如本文所用意欲表示任何動物，但具體而言為禽類物種。「禽類物種」包括，但不限於雞、馴養火雞、水鳥以及任何其他食物來源野禽。

【0055】 如本文所用，「治療」以及類似術語意指降低感染之症狀的嚴重性及/或頻率、消除症狀及/或該症狀之潛在病因、降低症狀之頻率或可能性及/或其潛在病因，及/或改善或修復直接或間接由感染物造成的損害。

【0056】 在通篇說明書以及申請專利範圍中使用關於發明說明態樣的各種術語。除非另有指明，否則此等術語是以其在技藝中的通常含意提供。其他特別定義的術語被推論為與本文提供之定義相符。

【0057】 本文提供免疫刺激組成物，其包含含有核酸質體與脂質體遞送媒劑的免疫調節劑組成物，以及具有至少一個CpG模體和一個在免疫刺激寡核苷酸的5'端處或鄰近免疫刺激寡核苷酸的5'端的富含鳥嘌呤核苷酸序

列的免疫刺激寡核苷酸。

【0058】 如本文所述，免疫刺激寡核苷酸可與TLR21交互作用而引起免疫反應。免疫刺激寡核苷酸包含至少一個未甲基化二核苷酸CpG模體，其與宿主生物體體內所表現的病原菌辨識受體交互作用。免疫刺激寡核苷酸也具有富含鳥嘌呤核苷酸序列。這些序列可促使DNA股摺疊成四級結構或增進一或多個具有鳥嘌呤增加序列的免疫刺激寡核苷酸聚集。富含鳥嘌呤序列不必然僅指包含鳥嘌呤核苷酸，但其必須是富含鳥嘌呤核苷酸。如上文所述且在這些揭示內容中所例舉的富含鳥嘌呤序列通常是位在寡核苷酸末端處或者是鄰近寡核苷酸末端(的四個核苷酸內)。寡核苷酸序列以及結構的額外操作可進一步提高免疫刺激寡核苷酸刺激TLR21的能力。因此，本揭示內容的一個具體例包含含有至少一個免疫刺激寡核苷酸的免疫刺激組成物，該免疫刺激寡核苷酸具有至少一個CpG模體，以及一個始於免疫刺激寡核苷酸之5'端或免疫刺激寡核苷酸之5'端的四個核苷酸內的富含鳥嘌呤序列。

【0059】 在本揭示內容的一些態樣中，將鳥嘌呤核苷酸連串序列添加至含CpG之免疫刺激寡核苷酸的5'端可以明顯增進免疫刺激寡核苷酸的免疫性。不僅富含鳥嘌呤序列在免疫刺激寡核苷酸中的位置會影響TLR21活化升高，序列的含量也同樣有效果。為此，在本揭示內容的一些態樣中，富含鳥嘌呤序列包含複數個連續鳥嘌呤核苷酸。

【0060】 在一些具體例中，富含鳥嘌呤序列包含第一複數個連續鳥嘌呤核苷酸。在一些態樣中，該第一複數個鳥嘌呤核苷酸包含兩個至八個鳥嘌呤核苷酸。在一些態樣中，該第一複數個鳥嘌呤核苷酸包含兩個鳥嘌呤核苷酸。在一些態樣中，該第一複數個鳥嘌呤核苷酸包含三個鳥嘌呤核苷酸。在一些態樣中，該第一複數個鳥嘌呤核苷酸包含四個鳥嘌呤核苷酸。

在一些態樣中，該第一複數個鳥嘌呤核苷酸包含五個鳥嘌呤核苷酸。在一些態樣中，該第一複數個鳥嘌呤核苷酸包含六個鳥嘌呤核苷酸。在一些態樣中，該第一複數個鳥嘌呤核苷酸包含七個鳥嘌呤核苷酸。在一些態樣中，該第一複數個鳥嘌呤核苷酸包含八個鳥嘌呤核苷酸。在又其他態樣中，該第一複數個鳥嘌呤核苷酸包含超過八個鳥嘌呤核苷酸。

【0061】 在本發明的一些具體例中，寡核苷酸包含SEQ ID NO：16、17、18、19、20、21、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、77、78、81、82、85、86、89、90、92、93、96、97、100、102、104、106、108或143。在其他具體例中，富含鳥嘌呤序列包含TTAGGG、TTAGGGTTAGGG (SEQ ID NO：261)、TTTGCCCC、GGGGTTTT、GGGGTTTTGGGG (SEQ ID NO：262)、TTAGGG、TTAGGGTTAGGGTTTT (SEQ ID NO：263)、TGTGGGTGTGTGTGGG (SEQ ID NO：269)、GGAGG、TGGAGGC或TGGAGGCTGGAGGC (SEQ ID NO：264)。在又其他具體例中，寡核苷酸包含SEQ ID NO：110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、124、125、126、127、129、130、131、134、136、137或138。

【0062】 鳥嘌呤核苷酸的單一連串序列不是只有可以提高TLR21刺激的5'修飾。例如，富含腺嘌呤、胞嘧啶與胸嘧啶的序列也可以被添加至具有CpG模體之寡核苷酸的5'端並且使得TLR21刺激提高，儘管比富含鳥嘌呤序列在寡核苷酸5'端處列所引起的還低。雖然在寡核苷酸5'端之單一複數個鳥嘌呤殘基可引起TLR21刺激，但在富含鳥嘌呤序列中的額外複數個鳥嘌呤核苷酸可進一步提高寡核苷酸的刺激性性質。因此，在一些態樣中，本揭

示內容之寡核苷酸在第一複數個鳥嘌呤核苷酸與至少一個CpG模體之間包含第二複數個鳥嘌呤核苷酸。

【0063】 在一些態樣中，複數個鳥嘌呤核苷酸包含G-四聯體序列。在一些具體例中，第一複數個鳥嘌呤核苷酸、第二複數個鳥嘌呤核苷酸或兩者包含G-四聯體序列。如上文所定義，G-四聯體序列也允許寡核苷酸間的交互作用。在不局限於理論的情況下，在寡核苷酸5'端處的交互作用允許濃縮CpG二核苷酸模體以及對應提高受到TLR21辨識的機會。在一些具體例中，免疫刺激組成物進一步包含至少一個具有G-四聯體序列的額外寡核苷酸，其中該寡核苷酸以及該至少一個額外寡核苷酸於四級結構中具有平行位向。在一些態樣中，G-四聯體序列包含TGGGGT。

【0064】 可被添加至具有CpG模體之寡核苷酸5'端處或鄰近寡核苷酸5'端的另一個富含鳥嘌呤序列為G-線序列。在本揭示內容的一些態樣中，第一與第二複數個鳥嘌呤核苷酸包含G-線序列。在一些態樣中，G-線序列包含SEQ ID NO：257或258。在又其他態樣中，G-線序列包含SEQ ID NO：141、142、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203或GCGT-Gwire3。兩個複數個鳥嘌呤核苷酸可以被非鳥嘌呤核苷酸、核苷酸類似物或任何其他間隔子或連接子分隔開。例如，在本揭示內容的一些態樣中，第一複數個鳥嘌呤核苷酸以及第二複數個鳥嘌呤核苷酸被至少一個核苷酸分隔開。如本文所用，術語「間隔子」意指類似核苷酸模體之間(亦即兩個CpG模體之間或兩個富含鳥嘌呤核苷酸序列模體之間)的一個化學鍵聯(linkage)，而術語「連接子」意指不同核苷酸模體之間(亦即富含鳥嘌呤核苷酸序列與另一個核苷酸模體(例如CpG模體)之間)的一個化學鍵聯。術語「間隔子」以及「連接子」是用來清楚說明所述寡核苷酸

的態樣。但是，那些習於技藝者應明白，本文揭示關於間隔子的結構可與本文揭示關於連接子的結構互換，且反之亦然。

【0065】 在不囿限於任何特定理論的情況下，G-線序列可以使得寡核苷酸與其他具有G-線序列的寡核苷酸交互作用並且聚集。因為具有G-線序列之寡核苷酸聚集所採取的構形被稱為G-線構形，且這個寡核苷酸與其CpG模體的累積可能導致TLR21刺激提高。

【0066】 富含鳥嘌呤序列與CpG核苷酸模體可能被核苷酸、核苷酸類似物或其他連接子分隔開。因此，在本揭示內容的一些具體例中，寡核苷酸進一步在富含鳥嘌呤序列以及下游至少一個CpG模體之間包含一個連接子。如本文所用，「下游」表示 $5' \rightarrow 3'$ 方向，亦即「下游」核苷酸或模體是在比較序列要素 $3'$ 的核苷酸或模體。「上游」表示 $3' \rightarrow 5'$ 方向，亦即「上游」核苷酸或模體是在比較序列要素 $5'$ 的核苷酸或模體。連接子不必然直接鄰接富含鳥嘌呤序列或CpG模體；而是連接子必須為在兩個序列模體之間，不管富含尿嘌呤序列與連接子之間的插入序列，還有CpG模體與連接子之間的插入序列。在本揭示內容的一些具體例中，連接子包含至少三個核苷酸。連接子也可能不包含氮鹼基。例如，在一些態樣中，連接子是六乙二醇、丙二醇、三乙二醇或其衍生物。在其他實例中，具有連接子的寡核苷酸包含2006-PDE5dG4-X1或2006-PDE5dG4-X3。

【0067】 據信存在於本揭示內容之寡核苷酸中的二核苷酸CpG模體在雞隻體內是由TLR21所辨識的PAMP。儘管單一個CpG模體可刺激TLR21，存在於寡核苷酸上的多個CpG可能增加TLR21的刺激訊號強度。為此，在本發明的一些態樣中，至少一個CpG模體包含兩個、三個、四個或五個CpG模體。在一些態樣中，至少一個CpG模體包含六個或更多個CpG模體。在一些態樣中，至少一個CpG模體包含兩個CpG模體。在一些態樣中，

至少一個CpG模體包含三個CpG模體。在一些態樣中，至少一個CpG模體包含四個CpG模體。在一些具體例中，至少一個CpG模體包含四個CpG模體。

【0068】 在目前所揭示之寡核苷酸的一些具體例中，各個CpG模體與其他CpG模體可能被至少一個核苷酸或核苷酸類似物分隔開。在一些態樣中，該至少一個核苷酸是兩個或三個胸嘧啶核苷酸。在其他態樣中，該至少一個核苷酸是介於一個與四個核苷酸，雖然插入的核苷酸數目可能因為插入核苷酸序列而有不同。在一些態樣中，寡核苷酸包含SEQ ID NO : 217、218、219或220。鄰接CpG的核苷酸還有CpG模體本身組成CpG序列要素(例如XCGX，其中X = 任一種核苷酸)。在一些態樣中，本揭示內容的寡核苷酸包含的CpG序列要素為GCGA、GCGG、ACGC、CCGC、GCGT、TCGC或其任何組合。

【0069】 在本揭示內容的一些具體例中，CpG模體包含具有四個核苷酸的CpG序列。在一些態樣中，寡核苷酸包含至少兩個CpG序列要素。在一些態樣中，寡核苷酸包含至少三個CpG序列要素。在一些態樣中，寡核苷酸包含至少四個CpG序列要素。在一些態樣中，寡核苷酸包含至少五個CpG序列要素。在一些態樣中，寡核苷酸包含至少六個CpG序列要素。在一些態樣中，寡核苷酸包含超過八個、十個、十五個或甚至二十個CpG序列要素。

【0070】 在目前揭示之寡核苷酸的其他具體例中，CpG模體的每一者與每一個其他CpG模體是被一個間隔子或一個間隔子與至少一個核苷酸的組合分隔開。在一些態樣中，至少一個CpG模體與最接近的其他CpG模體是被一個間隔子或一個間隔子與至少一個核苷酸的組合分隔開，而至少兩個其他CpG模體彼此鄰接。儘管分隔開的CpG模體可能提高經設計寡核苷酸的免疫刺激能力，但了解到彼此鄰接的CpG模體仍然可以刺激TLR21。

【0071】 在線性上被用來分開CpG模體的間隔子可以是任何一種橋

接CpG模體之間的至少一部分寡核苷酸的鍵聯。間隔子可能包含，但不限於去氧核醣磷酸酯橋接、多碳鏈，或重複化學單元。間隔子的一個重要性質是與寡核苷酸的核苷酸骨架形成化學鍵的能力。因此，在一些具體例中，間隔子是去氧核醣磷酸酯橋接。去氧核醣磷酸酯橋接在一些態樣中可能包含氮鹼基，而在其他態樣中去氧核醣磷酸酯橋接為無鹼基。在一些態樣中，寡核苷酸包含SEQ ID NO：221，其包含無鹼基去氧核醣磷酸酯橋接。

【0072】 在本揭示內容的其他具體例中，間隔子包含碳鏈。碳鏈可能包含兩個至十二個碳原子。含有碳鏈的二醇可用作為末端醇基團，其可與寡核苷酸的末端醇基團及/或磷酸根基團反應。在一些具體例中，碳鏈包含兩個碳原子，且在一些態樣中，碳鏈是衍生自乙二醇。在一些具體例中，寡核苷酸包含ODN-X2，其中X2為乙二醇。

【0073】 本揭示內容的其他具體例提供包含三個碳原子的碳鏈。在這些具體例的一些態樣中，碳鏈是衍生自1,3-丙二醇。在一些具體例中，寡核苷酸包含CG-Gw2X2、CG-Gw2X2-2，或ODN-X3、CG-Gw2X2-1、CG-Gw2X2-3、CG-Gw2X2-4、CG-Gw2X2-5、CG-G4T16X2-1、CG-G4T16X2-2、CG-G4T16X2-3、CG-G4T16X2-4，或CG-G4T16X2-5，其中X2為三碳鏈；2006-PDE5dG4-X2，其中X2為衍生自丙二醇的三碳鏈；或SEQ ID NO：250，其中X4為衍生自丙二醇的三碳鏈。

【0074】 在本揭示內容的又其他具體例中，寡核苷酸包含碳鏈間隔子，其中碳鏈包含四個碳原子。在這些具體例的一些態樣中，碳鏈是衍生自1,4-丁二醇。在一些具體例中，寡核苷酸包含ODN-X4，其中X4為衍生自1,4-丁二醇的四碳鏈。

【0075】 在本揭示內容的又其他具體例，寡核苷酸包含具有一個重複化學單元的間隔子。例如，在一些具體例中，重複化學單元為乙二醇。重

複化學單元可能重複兩次至十二次。在一些具體例中，乙二醇重複六次。因此，在一些態樣中，寡核苷酸包含CCGC-Gw2X1，其中X1為衍生自六乙二醇的間隔子。

【0076】 儘管寡核苷酸3'端的鳥嘌呤核苷酸連串序列造成不多的(若有的話)TLR21刺激，其他寡核苷酸連串序列可能給予寡核苷酸提高的免疫性。特別地，在本揭示內容的一些態樣中，寡核苷酸可進一步包含三-胸嘧啶核苷酸3'末端。在一些態樣中，寡核苷酸包含SEQ ID NO: 204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214或215。

【0077】 關於本文揭示的各個寡核苷酸，習於技藝者應知道，核苷酸可以被核苷酸類似物置換。在一些具體例中，寡核苷酸包含磷酸二酯骨架，雖然本文揭示之寡核苷酸的其他具體例包含硫代磷酸酯骨架。在一些情況下，硫代磷酸酯骨架可能更容易且更節省成本來製造。

【0078】 在本揭示內容的一些具體例中，寡核苷酸可包含脂質部分，其可增加寡核苷酸的免疫性。免疫性增加的一個可能解釋應該是發揮提高寡核苷酸生物利用性的功能。在一些具體例中，脂質部分是在寡核苷酸的5'端處或鄰近寡核苷酸的5'端。這個脂質「帽」可防止降解、增加溶解度、增進寡核苷酸在醫藥組成物中的穩定性，或其任何組合。在一些態樣中，脂質部分為膽固醇基。

【0079】 免疫刺激寡核苷酸以及免疫刺激組成物的效力可以透過其半最大有效濃度(EC_{50})來進行特徵鑑定，半最大有效濃度是誘發最大反應之一半所需的濃度，這是透過投與組成物而達到。濃度越低，則寡核苷酸越有效。在本揭示內容的一些態樣中，免疫刺激組成物可具有在pM範圍內的 EC_{50} 。在一些態樣中， EC_{50} 是介於約0.1與100 pM。在一些態樣中， EC_{50} 是介於約100與200 pM。在一些態樣中， EC_{50} 是介於約200與300 pM。在一些

態樣中，EC₅₀是介於約300與400 pM。在一些態樣中，EC₅₀是介於約400與500 pM。在一些態樣中，EC₅₀是介於約500與600 pM。在一些態樣中，EC₅₀是介於約600與700 pM。在一些態樣中，EC₅₀是介於約700與800 pM。在一些態樣中，EC₅₀是介於約800與900 pM。在一些態樣中，EC₅₀是介於約900與1 nM。在又其他態樣中，EC₅₀少於約100 pM。

【0080】 關於免疫刺激組成物中的寡核苷酸濃度，在一些態樣中，寡核苷酸的濃度是介於約0.1與10 nM。在一些態樣中，寡核苷酸濃度是介於約10與20 nM。在一些態樣中，寡核苷酸濃度是介於約20與30 nM。在一些態樣中，寡核苷酸濃度是介於約30與40 nM。在一些態樣中，寡核苷酸濃度是介於約40與50 nM。在一些態樣中，寡核苷酸濃度是介於約50與60 nM。在一些態樣中，寡核苷酸濃度是介於約60與70 nM。在一些態樣中，寡核苷酸濃度是介於約70與80 nM。在一些態樣中，寡核苷酸濃度是介於約80與90 nM。在一些態樣中，寡核苷酸濃度是介於約90與100 nM。在又其他態樣中，寡核苷酸濃度少於約20 nM。

【0081】 在本揭示內容的一些具體例中，免疫刺激組成物可進一步包含至少一個具有G-線序列的額外寡核苷酸。因為G-線序列促使具有相同或類似G-線序列的其他寡核苷酸聚集，因此免疫刺激組成物的一個態樣進一步包含至少一個具有G-線序列的額外寡核苷酸。在免疫刺激組成物包含多個具有G-線序列的寡核苷酸的一些態樣中，寡核苷酸與該至少一個額外寡核苷酸具有G-線構形。

【0082】 依據本發明的一些態樣，寡核苷酸刺激TLR21的能力可進一步透過插入額外CpG模體而提高。在一些態樣中，至少一個CpG模體為複數個CpG模體，且該複數個CpG模體包含兩個、三個、四個或五個CpG模體。CpG模體之間的距離可能影響到寡核苷酸的TLR21刺激性性質。為此，所揭

示之寡核苷酸的一些態樣提供在CpG模體之間插入至少一個核苷酸或核苷酸類似物。該至少一個核苷酸可能是兩個或三個胸嘧啶核苷酸。

【0083】 其他具體例提供在每個CpG模體之間納入一個間隔子。間隔子必須能夠結合至一個相鄰核苷酸股的3'端還有另一寡核苷酸股的5'端。在一些態樣中，間隔子為去氧核糖磷酸酯橋接，其在一些態樣中可能無鹼基。

【0084】 在一些態樣中，間隔子可能包含碳鏈。在一些具體例中，碳鏈包含兩個碳原子。在一些態樣中，碳鏈是衍生自乙二醇。其他具體例提供包含三個碳原子的碳鏈。在一些態樣中，碳鏈是衍生自1,3-丙二醇。在一些具體例中，碳鏈包含四個碳原子，且在一些態樣中碳鏈是衍生自1,4-丁二醇。在又其他具體例中，間隔子包含重複化學單元。在一些態樣中，重複化學單元是乙二醇，且在一些態樣中間隔子是衍生自六乙二醇。

【0085】 在表1中鑑別出本揭示內容的代表性寡核苷酸。

表1：寡核苷酸序列(小寫字：PTO鍵，大寫字PDE鍵)

5Chol-GCGT3-TG 4T	SEQ ID NO : 1	XTGGGGTTTTTTGCGTTTGCGTTTGCGTT X = 5'-膽固醇基
2006-PTO	SEQ ID NO : 3	tcgtcgtttgcgtttgtcgtt
2006-PDE	SEQ ID NO : 4	TCGTCGTTTGTCTGTTGTCGTT
2006-PDE3dG1	SEQ ID NO : 5	TCGTCGTTTGTCTGTTGTCGTTG
2006-PDE3dG2	SEQ ID NO : 6	TCGTCGTTTGTCTGTTGTCGTTGG
2006-PDE3dG3	SEQ ID NO : 7	TCGTCGTTTGTCTGTTGTCGTTGGG
2006-PDE3dG4	SEQ ID NO : 8	TCGTCGTTTGTCTGTTGTCGTTGGGG
2006-PDE3dG5	SEQ ID NO : 9	TCGTCGTTTGTCTGTTGTCGTTGGGGGG
2006-PDE3dG6	SEQ ID NO : 10	TCGTCGTTTGTCTGTTGTCGTTGGGGGG
2006-PDE3dG7	SEQ ID NO : 11	TCGTCGTTTGTCTGTTGTCGTTGGGGGGGG
2006-PDE3dG8	SEQ ID NO : 12	TCGTCGTTTGTCTGTTGTCGTTGGGGGGGG
2006-PTO	SEQ ID NO : 3	tcgtcgtttgcgtttgtcgtt
2006-PDEV3	SEQ ID NO : 13	TCGTCGTTTGTCTGTTGTCGTT

2006-PDE5dG1	SEQ ID NO : 14	GTCGTCGTTTGTCTGTTTGTCTT
2006-PDE5dG2	SEQ ID NO : 15	GGTCGTCGTTTGTCTGTTTGTCTT
2006-PDE5dG3	SEQ ID NO : 16	GGGTCGTCGTTTGTCTGTTTGTCTT
2006-PDE5dG4	SEQ ID NO : 17	GGGGTCGTCGTTTGTCTGTTTGTCTT
2006-PDE5dG5	SEQ ID NO : 18	GGGGGTCGTCGTTTGTCTGTTTGTCTT
2006-PDE5dG6	SEQ ID NO : 19	GGGGGGTCGTCGTTTGTCTGTTTGTCTT
2006-PDE5dG7	SEQ ID NO : 20	GGGGGGGTCGTCGTTTGTCTGTTTGTCTT
2006-PDE5dG8	SEQ ID NO : 21	GGGGGGGGTCGTCGTTTGTCTGTTTGTCTT
2006-PDE5dA6	SEQ ID NO : 22	AAAAAAATCGTCGTTTGTCTGTTTGTCTT
2006-PDE5dC6	SEQ ID NO : 23	CCCCCCTCGTCGTTTGTCTGTTTGTCTT
2006-PDE5dT6	SEQ ID NO : 24	TTTTTTTCGTCGTTTGTCTGTTTGTCTT
2006-PDE5dG6-M e	SEQ ID NO : 25	GGGGGGTm5cGTm5cGTTTGTm5cGTTTGTm5cGTT <u>m5c</u> = 5-甲基-胞嘧啶
2006-PDE5dC6-G C	SEQ ID NO : 26	CCCCCCTGCTGCTTGTCTTGTGCTT
2006-PDE5dT6-C A	SEQ ID NO : 27	TTTTTTCATCATTGTCAATTGTCAATT
2006-PTO3dG5	SEQ ID NO : 28	tgggggtcgtcgtttgtcgtttgcgtt
2006-PTO5dG6	SEQ ID NO : 29	tcgtcgtttgcgtttgtcgttggggg
2006-PDE5dG6-A 1	SEQ ID NO : 30	AGGGGGTCGTCGTTTGTCTGTTTGTCTT
2006-PDE5dG6-A 2	SEQ ID NO : 31	GAGGGGGTCGTCGTTTGTCTGTTTGTCTT
2006-PDE5dG6-A 3	SEQ ID NO : 32	GGAGGGTCGTCGTTTGTCTGTTTGTCTT
2006-PDE5dG6-A 4	SEQ ID NO : 33	GGGAGGTCGTCGTTTGTCTGTTTGTCTT
2006-PDE5dG6-A	SEQ ID NO : 34	GGGGAGTCGTCGTTTGTCTGTTTGTCTT

5		
2006-PDE5dG6-A6	SEQ ID NO : 35	GGGGGATCGTCGTTGTCGTTGTCGTT
2006-PDE5dG6-A12	SEQ ID NO : 36	AAGGGGTCGTCGTTGTCGTTGTCGTT
2006-PDE5dG6-A23	SEQ ID NO : 37	GAAGGGTCGTCGTTGTCGTTGTCGTT
2006-PDE5dG6-A34	SEQ ID NO : 38	GGAAGGTCGTCGTTGTCGTTGTCGTT
2006-PDE5dG6-A45	SEQ ID NO : 39	GGGAAGTCGTCGTTGTCGTTGTCGTT
2006-PDE5dG6-A56	SEQ ID NO : 40	GGGAATCGTCGTTGTCGTTGTCGTT
2006-PDE5dG6-C1	SEQ ID NO : 41	CGGGGGTCGTCGTTGTCGTTGTCGTT
2006-PDE5dG6-C2	SEQ ID NO : 42	GCGGGGTCGTCGTTGTCGTTGTCGTT
2006-PDE5dG6-C3	SEQ ID NO : 43	GGCGGGTCGTCGTTGTCGTTGTCGTT
2006-PDE5dG6-C4	SEQ ID NO : 44	GGGCGGTCGTCGTTGTCGTTGTCGTT
2006-PDE5dG6-C5	SEQ ID NO : 45	GGGGCGTCGTCGTTGTCGTTGTCGTT
2006-PDE5dG6-C6	SEQ ID NO : 46	GGGGGCTCGTCGTTGTCGTTGTCGTT
2006-PDE5dG6-C12	SEQ ID NO : 47	CCGGGGTCGTCGTTGTCGTTGTCGTT
2006-PDE5dG6-C23	SEQ ID NO : 48	GCCGGGGTCGTCGTTGTCGTTGTCGTT

2006-PDE5dG6-C3 4	SEQ ID NO : 49	GGCCGGTCGTCGTTGTCGTTTGTCTT
2006-PDE5dG6-C4 5	SEQ ID NO : 50	GGGCCGTCGTCGTTGTCGTTTGTCTT
2006-PDE5dG6-C5 6	SEQ ID NO : 51	GGGGCCTCGTCGTTGTCGTTTGTCTT
2006-PDE5dG6-T1	SEQ ID NO : 52	TGGGGGTCGTCGTTGTCGTTTGTCTT
2006-PDE5dG6-T2	SEQ ID NO : 53	GTGGGGTCGTCGTTGTCGTTTGTCTT
2006-PDE5dG6-T3	SEQ ID NO : 54	GGTGGGTCGTCGTTGTCGTTTGTCTT
2006-PDE5dG6-T4	SEQ ID NO : 55	GGGTGGTCGTCGTTGTCGTTTGTCTT
2006-PDE5dG6-T5	SEQ ID NO : 56	GGGGTGTGTCGTTGTCGTTTGTCTT
2006-PDE5dG6-T6	SEQ ID NO : 57	GGGGGTTGTCGTTGTCGTTTGTCTT
2006-PDE5dG6-T1 2	SEQ ID NO : 58	TTGGGGTCGTCGTTGTCGTTTGTCTT
2006-PDE5dG6-T2 3	SEQ ID NO : 59	GTTGGGTCGTCGTTGTCGTTTGTCTT
2006-PDE5dG6-T3 4	SEQ ID NO : 60	GGTTGGTCGTCGTTGTCGTTTGTCTT
2006-PDE5dG6-T4 5	SEQ ID NO : 61	GGGTTGTCGTCGTTGTCGTTTGTCTT
2006-PDE5dG6-T5 6	SEQ ID NO : 62	GGGGTTGTCGTCGTTGTCGTTTGTCTT
2006-PDE5dG4-A 1	SEQ ID NO : 63	AGGGTCGTCGTTGTCGTTTGTCTT
2006-PDE5dG4-A 2	SEQ ID NO : 64	GAGGTCGTCGTTGTCGTTTGTCTT
2006-PDE5dG4-A 3	SEQ ID NO : 65	GGAGTCGTCGTTGTCGTTTGTCTT

2006-PDE5dG4-A 4	SEQ ID NO : 66	GGGATCGTCGTTGTCGTTGTCGTT
2006-PDE5dG4-C 1	SEQ ID NO : 67	CGGGTCGTCGTTGTCGTTGTCGTT
2006-PDE5dG4-C 2	SEQ ID NO : 68	GCGGTCGTCGTTGTCGTTGTCGTT
2006-PDE5dG4-C 3	SEQ ID NO : 69	GGCGTCGTCGTTGTCGTTGTCGTT
2006-PDE5dG4-C 4	SEQ ID NO : 70	GGGCTCGTCGTTGTCGTTGTCGTT
2006-PDE5dG4-T1	SEQ ID NO : 71	TGGGTCGTCGTTGTCGTTGTCGTT
2006-PDE5dG4-T2	SEQ ID NO : 72	GTGGTCGTCGTTGTCGTTGTCGTT
2006-PDE5dG4-T3	SEQ ID NO : 73	GGTGTTCGTCGTTGTCGTTGTCGTT
2006-PDE5dG4-T4	SEQ ID NO : 74	GGGTTTCGTCGTTGTCGTTGTCGTT
1668	SEQ ID NO : 75	TCCATGACGTTCCCTGATGCT
1668-3dG5	SEQ ID NO : 76	TCCATGACGTTCCCTGATGCTGGGG
1668-5dG4	SEQ ID NO : 77	GGGGTCCATGACGTTCCCTGATGCT
1668-5dG6	SEQ ID NO : 78	GGGGGGTCCATGACGTTCCCTGATGCT
1826	SEQ ID NO : 79	TCCATGACGTTCCCTGACGTT
1826-3dG5	SEQ ID NO : 80	TCCATGACGTTCCCTGACGTTGGGG
1826-5dG4	SEQ ID NO : 81	GGGGTCCATGACGTTCCCTGACGTT
1826-5dG6	SEQ ID NO : 82	GGGGGGTCCATGACGTTCCCTGACGTT
BW006	SEQ ID NO : 83	TCGACGTTCGTCGTTCGTCGTT
BW006-3dG5	SEQ ID NO : 84	TCGACGTTCGTCGTTCGTCGTTGGGG
BW006-5dG4	SEQ ID NO : 85	GGGGTCGACGTTCGTCGTTCGTCGTT
BW006-5dG6	SEQ ID NO : 86	GGGGGGTCGACGTTCGTCGTTCGTCGTT
D-SLO1	SEQ ID NO : 87	TCGCGACGTTCGCCCCGACGTTCGGTAGGGGG
D-SLO1-3dG5	SEQ ID NO : 88	TCGCGACGTTCGCCCCGACGTTCGGTAGGGGG

D-SLO1-5dG4	SEQ ID NO : 89	GGGGTCGCGACGTTCGCCCCACGTTCGGTA
D-SLO1-5dG6	SEQ ID NO : 90	GGGGGGTCGCGACGTTCGCCCCACGTTCGGTA
2395	SEQ ID NO : 91	TCGTCGTTTCGGCGCGCGCCG
2395-5dG4	SEQ ID NO : 92	GGGGTCGTCGTTTCGGCGCGCGCCG
2395-5dG6	SEQ ID NO : 93	GGGGGGTCGTCGTTTCGGCGCGCGCCG
M362	SEQ ID NO : 94	TCGTCGTCGTTCGAACGACGTTGAT
M362-3dG5	SEQ ID NO : 95	TCGTCGTCGTTCGAACGACGTTGATGGGGG
M362-5dG4	SEQ ID NO : 96	GGGGTCGTCGTCGTTCGAACGACGTTGAT
M362-5dG6	SEQ ID NO : 97	GGGGGGTCGTCGTCGTTCGAACGACGTTGAT
2007-PDE	SEQ ID NO : 98	TCGTCGTTGTCGTTTGTGTT
2007-PDE3dG5	SEQ ID NO : 99	TCGTCGTTGTCGTTTGTGTTGGGGG
2007-PDE5dG6	SEQ ID NO : 100	GGGGGGTCGTCGTTGTCGTTTGTGTT
CPG-202	SEQ ID NO : 101	GATCTCGCTCGCTCGCTAT
CPG-202-5dG6	SEQ ID NO : 102	GGGGGGGATCTCGCTCGCTCGCTAT
CPG-685	SEQ ID NO : 103	TCGTCGACGTCGTTCGTTCTC
CPG-685-5dG6	SEQ ID NO : 104	GGGGGGTCGTCGACGTCGTTCGTTCTC
CPG-2000	SEQ ID NO : 105	TCCATGACGTTCCCTGCAGTTCCCTGACGTT
CPG-2000-5dG6	SEQ ID NO : 106	GGGGGGTCCATGACGTTCCCTGCAGTTCCCTGACGTT
CPG-2002	SEQ ID NO : 107	TCCACGACGTTTCGACGTT
CPG-2002-5dG6	SEQ ID NO : 108	GGGGGGTCCACGACGTTTCGACGTT
2006-T4-PDE	SEQ ID NO : 109	TTTTTCGTCGTTTGTGCGTTTGTGTT
2006-HuTel-1	SEQ ID NO : 110	TTAGGGTCGTCGTTTGTGCGTTTGTGTT
2006-HuTel-2	SEQ ID NO : 111	TTAGGGTTAGGGTCGTCGTTTGTGCGTTTGTGTT
2006-PDE-Oxy1	SEQ ID NO : 112	TTTGGGGTCGTCGTTTGTGCGTTTGTGTT
2006-PDE-Oxy2	SEQ ID NO : 113	GGGGTTTTCGTCGTTTGTGCGTTTGTGTT
2006-PDE-Oxy3	SEQ ID NO : 114	GGGGTTTTGGGGTCGTCGTTTGTGCGTTTGTGTT
2006-T4-HuTel-1	SEQ ID NO : 115	TTAGGGTTTTCGTCGTTTGTGCGTTTGTGTT
2006-T4-HuTel-2	SEQ ID NO : 116	TTAGGGTTAGGGTTTCGTCGTTTGTGCGTTTGTGCGTT TT

2006-T4-ScerTel	SEQ ID NO : 117	TGTGGGTGTGTGGGTTTCGTCGTTGTCGTTT GTCGTT
2006-T4-cMyc	SEQ ID NO : 118	GGAGGTTTCGTCGTTGTCGTTGTCGTT
2006-T4-cMyc2	SEQ ID NO : 119	TGGAGGCTTTTCGTCGTTGTCGTTGTCGTT
2006-T4-cMyc3	SEQ ID NO : 120	TGGAGGCTGGAGGCTTTTCGTCGTTGTCGTTTGT CGTT
EA2-2006	SEQ ID NO : 121	GCTGCGAGGCGGGTGGGTGGGATCGTCGTTGTCGTT TTGTCGTT
EA2D-2006	SEQ ID NO : 122	GCTGCGGGCGGGTGGGTGGGATCGTCGTTGTCGTT
EA2a-2006	SEQ ID NO : 123	CGAGGCGGGTGGGTGGGATCGTCGTTGTCGTTTGT CGTT
EA2aD-2006	SEQ ID NO : 124	CGGGCGGGTGGGTGGGATCGTCGTTGTCGTTTGT GTT
HCV-2006	SEQ ID NO : 125	GGGCGTGGTGGGTGGGTTCGTCGTTGTCGTTTGT CGTT
HIV-93del-2006	SEQ ID NO : 126	GGGGTGGGAGGAGGGTTCGTCGTTGTCGTTTGT CGTT
Hema-2006	SEQ ID NO : 127	GGGGTCGGCGGGCCGGGTGTCGTCGTTGTCGTTT GTCGTT
Insu-2006	SEQ ID NO : 128	GGTGGTGGGGGGGGTTGGTAGGGTCGTCGTTTGT TTTGTGTCGTT
IonK-2006	SEQ ID NO : 129	GGGTTAGGGTTAGGGTAGGGTCGTCGTTTGT GTCGTT
Scle-2006	SEQ ID NO : 130	TGGGGGGGTGGGTGGGTTCGTCGTTGTCGTTTGT GTT
STAT-2006	SEQ ID NO : 131	GGGCGGGCGGGCGGGCTCGTCGTTTGT CGTT
TBA-2006	SEQ ID NO : 132	GGTTGGTGTGGTGGTCGTCGTTTGT CGTT
TNF-2006	SEQ ID NO : 133	GGTGGATGGCGCAGTCGGTCGTCGTTTGT CGTT
apVEGF-D-2006	SEQ ID NO : 134	TGGGGGTGGACGGGCCGGGTTCGTCGTTTGT CGTT
apVEGF-2006	SEQ ID NO : 135	TGTGGGGGTGGACGGGCCGGGTTCGTCGTTTGT CGTT
HTR-2006	SEQ ID NO : 136	GGGTTAGGGTTAGGGTAGGGTCGTCGTTTGT CGTT
bcl-2-2006	SEQ ID NO : 137	GGGCGCGGGAGGAAGGGGGCGGGTCGTCGTTTGT CGTT
c-myc-2006	SEQ ID NO : 138	AGGGTGGGGAGGGTGGGATCGTCGTTTGT CGTT

c-kit87-2006	SEQ ID NO : 139	AGGGAGGGCGCTGGGAGGAGGGTCGTCGTTTGTCTGTT TTGTCGTT
vegf-2006	SEQ ID NO : 140	GGGGCGGGCCGGGGCGGGGTCGTCGTTTGTCTGTTT GTCGTT
2006-PDE-Gwire1	SEQ ID NO : 141	GGGGTTGGGGTCGTCGTTTGTCTGTTTGTCTGTT
2006-PDE-Gwire2	SEQ ID NO : 142	GGGGTTGGGGTTTTCGTCGTTTGTCTGTTTGTCTGTT
2006PDE5dG4-T1-6	SEQ ID NO : 143	TGGGGTTCGTCGTTTGTCTGTTTGTCTGTT
1-ACGA	SEQ ID NO : 144	TTTTTTTACGATTT
2-GCGA	SEQ ID NO : 145	TTTTTTTGCATTT
3-CCGA	SEQ ID NO : 146	TTTTTTTCCGATTT
4-TCGA	SEQ ID NO : 147	TTTTTTTTCGATTT
5-ACGG	SEQ ID NO : 148	TTTTTTTACGGTTT
6-GCGG	SEQ ID NO : 149	TTTTTTTGCCTTT
7-CCGG	SEQ ID NO : 150	TTTTTTTCCGGTTT
8-TCGG	SEQ ID NO : 151	TTTTTTTTCGGTTT
9-ACGC	SEQ ID NO : 152	TTTTTTTACGCTTT
10-GCGC	SEQ ID NO : 153	TTTTTTTGCCTTT
11-CCGC	SEQ ID NO : 154	TTTTTTTCCGCTTT
12-TCGC	SEQ ID NO : 155	TTTTTTTTCGCTTT
13-ACGT	SEQ ID NO : 156	TTTTTTTACGTTTT
14-GCGT	SEQ ID NO : 157	TTTTTTTGCCTTT
15-CCGT	SEQ ID NO : 158	TTTTTTTCCGTTTT
16-TCGT	SEQ ID NO : 159	TTTTTTTTCGTTTT
17-ACGA-5dG6	SEQ ID NO : 160	GGGGGGTTTTTTTACGATTT
18-GCGA-5dG6	SEQ ID NO : 161	GGGGGGTTTTTTTGCATTT
19-CCGA-5dG6	SEQ ID NO : 162	GGGGGGTTTTTTCCGATTT
20-TCGA-5dG6	SEQ ID NO : 163	GGGGGGTTTTTTTCGATTT
21-ACGG-5dG6	SEQ ID NO : 164	GGGGGGTTTTTTACGGTTT
22-GCGG-5dG6	SEQ ID NO : 165	GGGGGGTTTTTTGCCTTT
23-CCGG-5dG6	SEQ ID NO : 166	GGGGGGTTTTTTCCGGTTT
24-TCGG-5dG6	SEQ ID NO : 167	GGGGGGTTTTTTTCGGTTT
25-ACGC-5dG6	SEQ ID NO : 168	GGGGGGTTTTTTACGCTTT
26-GCGC-5dG6	SEQ ID NO : 169	GGGGGGTTTTTTGCCTTT
27-CCGC-5dG6	SEQ ID NO : 170	GGGGGGTTTTTTCCGCTTT
28-TCGC-5dG6	SEQ ID NO : 171	GGGGGGTTTTTTTCGCTTT
29-ACGT-5dG6	SEQ ID NO : 172	GGGGGGTTTTTTACGTTTT
30-GCGT-5dG6	SEQ ID NO : 173	GGGGGGTTTTTTGCCTTT
31-CCGT-5dG6	SEQ ID NO : 174	GGGGGGTTTTTTCCGTTTT
32-TCGT-5dG6	SEQ ID NO : 175	GGGGGGTTTTTTTCGTTTT

33-ACGA-Gwire2	SEQ ID NO : 176	GGGGTTGGGGTTTTTTTTTACGATTT
34-GCGA-Gwire2	SEQ ID NO : 177	GGGGTTGGGGTTTTTTTTTGCAGATT
35-CCGA-Gwire2	SEQ ID NO : 178	GGGGTTGGGGTTTTTTTTCCGATTT
36-TCGA-Gwire2	SEQ ID NO : 179	GGGGTTGGGGTTTTTTTTTCGATTT
37-ACGG-Gwire2	SEQ ID NO : 180	GGGGTTGGGGTTTTTTTTTACGGTTT
38-GCGG-Gwire2	SEQ ID NO : 181	GGGGTTGGGGTTTTTTTTTGCAGTTT
39-CCGG-Gwire2	SEQ ID NO : 182	GGGGTTGGGGTTTTTTTTCCGGTTT
40-TCGG-Gwire2	SEQ ID NO : 183	GGGGTTGGGGTTTTTTTTTCGGTTT
41-ACGC-Gwire2	SEQ ID NO : 184	GGGGTTGGGGTTTTTTTTTACGCTTT
42-GCGC-Gwire2	SEQ ID NO : 185	GGGGTTGGGGTTTTTTTTGCAGCTTT
43-CCGC-Gwire2	SEQ ID NO : 186	GGGGTTGGGGTTTTTTTTCCGCTTT
44-TCGC-Gwire2	SEQ ID NO : 187	GGGGTTGGGGTTTTTTTTTCGCTTT
45-ACGT-Gwire2	SEQ ID NO : 188	GGGGTTGGGGTTTTTTTTTACGTTTT
46-GCGT-Gwire2	SEQ ID NO : 189	GGGGTTGGGGTTTTTTTTTGCAGTTT
47-CCGT-Gwire2	SEQ ID NO : 190	GGGGTTGGGGTTTTTTTTTCCGTTTT
48-TCGT-Gwire2	SEQ ID NO : 191	GGGGTTGGGGTTTTTTTTTCGTTTT
GCGT-Gwire2-GC	SEQ ID NO : 192	GGGGTTGGGGTTTTTTTTGGCTTTT
GCGT-Gwire2-TG	SEQ ID NO : 193	GGGGTTGGGGTTTTTTTTTGTGTTTT
GCGT-Gwire2-CA	SEQ ID NO : 194	GGGGTTGGGGTTTTTTTTGCATTTT
GCGT-Gwire2-T1	SEQ ID NO : 195	GGGGTTGGGGTTTTTTTTTGCAGTTT
GCGT-Gwire2-T2	SEQ ID NO : 196	GGGGTTGGGGTTTTTTTTGCAGTTT
GCGT-Gwire2-T3	SEQ ID NO : 197	GGGGTTGGGGTTTTTTTTGCAGTTT
GCGT-Gwire2-T4	SEQ ID NO : 198	GGGGTTGGGGTTTTTTTTGCAGTTT
GCGT-Gwire2-T5	SEQ ID NO : 199	GGGGTTGGGGTTTTTTGCAGTTT
GCGT-Gwire2-T6	SEQ ID NO : 200	GGGGTTGGGGTTTTGCAGTTT
GCGT-Gwire2-eT1	SEQ ID NO : 201	GGGGTTGGGGTTTTTTTTGCAGTTT
GCGT-Gwire2-eT2	SEQ ID NO : 202	GGGGTTGGGGTTTTTTTTGCAGTTT
GCGT-Gwire2-eT3	SEQ ID NO : 203	GGGGTTGGGGTTTTTTTTGCAGTTT
GCGT-Gwire3	SEQ ID NO : 224	GGGGTTGGGGTTGGGGTTTTTTTTGCAGTTT
GCGT-Gwire2-do	SEQ ID NO : 204	GGGGTTGGGGTTTTTTTTGCAGTTTGCAGTTT
GCGT-Gwire2-tri	SEQ ID NO : 205	GGGGTTGGGGTTTTTTTTGCAGTTTGCAGTTTGC GTTTT
GCGA-Gwire2	SEQ ID NO : 177	GGGGTTGGGGTTTTTTTTGCAGTTT
GCGA-Gwire2-do	SEQ ID NO : 206	GGGGTTGGGGTTTTTTTTGCAGTTTGCAGTTT
GCGA-Gwire2-tri	SEQ ID NO : 207	GGGGTTGGGGTTTTTTTTGCAGTTTGCAGTTTGC ATTT
ACGC-Gwire2	SEQ ID NO : 184	GGGGTTGGGGTTTTTTTTTACGCTTT
ACGC-Gwire2-do	SEQ ID NO : 208	GGGGTTGGGGTTTTTTTTTACGCTTTACGCTTT
ACGC-Gwire2-tri	SEQ ID NO : 209	GGGGTTGGGGTTTTTTTTTACGCTTTACGCTTTACG CTTT
TCGC-Gwire2	SEQ ID NO : 187	GGGGTTGGGGTTTTTTTTTCGCTTT
TCGC-Gwire2-do	SEQ ID NO : 210	GGGGTTGGGGTTTTTTTTTCGCTTTACGCTTT

TCGC-Gwire2-tri	SEQ ID NO : 211	GGGGTTGGGGTTTTTTTTTCGCTTCGCTTCG CTTT
CCGC-Gwire2	SEQ ID NO : 186	GGGGTTGGGGTTTTTTTTCCGCTTT
CCGC-Gwire2-do	SEQ ID NO : 212	GGGGTTGGGGTTTTTTTTCCGCTTCGCTTT
CCGC-Gwire2-tri	SEQ ID NO : 213	GGGGTTGGGGTTTTTTTTCCGCTTCGCTTCG CTTT
GCGG-Gwire2-mo	SEQ ID NO : 181	GGGGTTGGGGTTTTTTTTGCGGTTT
GCGG-Gwire2-do	SEQ ID NO : 214	GGGGTTGGGGTTTTTTTTGCGGTTTGCGGTTT
GCGG-Gwire2-tri	SEQ ID NO : 215	GGGGTTGGGGTTTTTTTTGCGGTTTGCGGTTGCG GTTT
CG-Gw2-T0	SEQ ID NO : 216	GGGGTTGGGGTTTTTTTCGCGCGTTT
CG-Gw2-T1	SEQ ID NO : 217	GGGGTTGGGGTTTTTTTCGTCGTCGTTT
CG-Gw2-T2	SEQ ID NO : 218	GGGGTTGGGGTTTTTTTCGTTCGTCGTTT
CG-Gw2-T3	SEQ ID NO : 219	GGGGTTGGGGTTTTTTTCGTTCGTTCGTTT
CG-Gw2-T4	SEQ ID NO : 220	GGGGTTGGGGTTTTTTTCGTTTCGTTTCGTTT
CG-Gw2-abase	SEQ ID NO : 221	GGGGTTGGGGTTTTTTTCGXCXCGTTT X=無鹼基位點
CG-Gw2X1	SEQ ID NO : 222**	GGGGTTGGGGTTTTTTTCGX1CGX1CGTTT X1=C18
CG-Gw2X2	SEQ ID NO : 223**	GGGGTTGGGGTTTTTTTCGX2CGX2CGTTT X2=C3
CG-Gw2X2-1	SEQ ID NO : 225**	GGGGTTGGGGTTTTTTTCGX2CGTTT X2=C3
CG-Gw2X2-2	SEQ ID NO : 223**	GGGGTTGGGGTTTTTTTCGX2CGX2CGTTT X2=C3
CG-Gw2X2-3	SEQ ID NO : 226**	GGGGTTGGGGTTTTTTTCGX2CGX2CGX2CGTTT X2=C3
CG-Gw2X2-4	SEQ ID NO : 227**	GGGGTTGGGGTTTTTTTCGX2CGX2CGX2CGX2CGTT T X2=C3
CG-Gw2X2-5	SEQ ID NO : 228**	GGGGTTGGGGTTTTTTTCGX2CGX2CGX2CGX2CGX2 CGTTT X2=C3
CG-G4T16X2-1	SEQ ID NO : 229**	TGGGGTTTTTTTCGX2CGTTT X2=C3
CG-G4T16X2-2	SEQ ID NO : 230**	TGGGGTTTTTTTCGX2CGX2CGTTT X2=C3
CG-G4T16X2-3	SEQ ID NO : 231**	TGGGGTTTTTTTCGX2CGX2CGX2CGTTT X2=C3
CG-G4T16X2-4	SEQ ID NO : 232**	TGGGGTTTTTTTCGX2CGX2CGX2CGX2CGTTT X2=C3
CG-G4T16X2-5	SEQ ID NO : 233**	TGGGGTTTTTTTCGX2CGX2CGX2CGX2CGX2CGTTT X2=C3

ODN-X2	SEQ ID NO : 234**	GGGGTTGGGGTTTTTCGX2CGX2CGTTT (X2 =乙二醇)
ODN-X3	SEQ ID NO : 223**	GGGGTTGGGGTTTTTCGX3CGX3CGTTT (X3 =丙二醇)
ODN-X4	SEQ ID NO : 235**	GGGGTTGGGGTTTTTCGX4CGX4CGTTT (X4 =丁二醇)
ODN-X6	SEQ ID NO : 236**	GGGGTTGGGGTTTTTCGX6CGX6CGTTT (X6 =己二醇)
ODN-X9	SEQ ID NO : 237**	GGGGTTGGGGTTTTTCGX9CGX9CGTTT (X9 =壬二醇)
ODN-X12	SEQ ID NO : 238**	GGGGTTGGGGTTTTTCGX12CGX12CGTTT (X12 =十二烷二醇)
ODN-Xab	SEQ ID NO : 239	GGGGTTGGGGTTTTTCGXabCGXabCGTTT (Xab = d 間隔子(無鹼基))
ODN-XtrEG	SEQ ID NO : 240**	GGGGTTGGGGTTTTTCGXtrCGXtrCGTTT (Xtr =三乙二醇)
ACGC-Gw2X1	SEQ ID NO : 241**	GGGGTTGGGGTTTTTACGCX1ACGCX1ACGCTTT X1 = C18 (HEG*)
CCGC-Gw2X1	SEQ ID NO : 242**	GGGGTTGGGGTTTTTCCGCX1CCGCX1CCGCTTT X1 = C18 (HEG*)
ACGC-Gw2X2	SEQ ID NO : 243**	GGGGTTGGGGTTTTTACGCX2ACGCX2ACGCTTT X2 =丙二醇
CCGC-Gw2X2	SEQ ID NO : 244**	GGGGTTGGGGTTTTTCCGCX2CCGCX2CCGCTTT X2 =丙二醇
ACGC-G4T16-X2	SEQ ID NO : 245**	TGGGGTTTTTACGCX2ACGCX2ACGCTTT X2 =丙二醇
CCGC-G4T16-X2	SEQ ID NO : 246**	TGGGGTTTTTCCGCX2CCGCX2CCGCTTT X2 =丙二醇
2006-PDE5dG4-X 1	SEQ ID NO : 247**	GGGGX1TCGTCGTTTGTCTGTTGTCGTT X1 = C18 (HEG*)
2006-PDE5dG4-X 2	SEQ ID NO : 248**	GGGGX2TCGTCGTTTGTCTGTTGTCGTT X2 =丙二醇
2006-PDE5dG4-X 3	SEQ ID NO : 249**	GGGGX3GGGGTCGTCGTTTGTCTGTTGTCGTT X3 = C18 (HEG*)
2006-PDE5dG4-X 4	SEQ ID NO : 250**	GGGGX4GGGGTCGTCGTTTGTCTGTTGTCGTT X4 =丙二醇
2006-T4-5dTG4T	SEQ ID NO : 251	TGGGGTTTTTCGTCGTTTGTCTGTTGTCGTT
2006-T4TG4T-3C	SEQ ID NO : 251	TGGGGTTTTTCGTCGTTTGTCTGTTGTCGTTX 3'-膽固醇基
5Chol-GCGT3-TG 4T	SEQ ID NO : 1	XTGGGGTTTTTGCCTTTGCCTTTGCCTTTGCCTTT X = 5'-膽固醇基
GCGT3-TG4T	SEQ ID NO : 252	TGGGGTTTTTGCCTTTGCCTTTGCCTTTGCCTTT
GCGT-3-Gw2-5Ch	SEQ ID NO : 253	XGGGGTTGGGGTTTTTGCCTTTGCCTTTGCCTTTGCG

ol		TTTT 5'-膽固醇基
GCGT-3-Gw2	SEQ ID NO : 253	GGGGTTGGGGTTTTTTGCGTTTGCGTTTGCGT TTT
GCGT3-5Chol	SEQ ID NO : 254	XTTTTTTTGCGTTTGCGTTTGCGTT X = 5'-膽固醇基
GCGT3	SEQ ID NO : 254	TTTTTTGCGTTTGCGTTTGCGTT
5Chol-CCGC3-Gw2	SEQ ID NO : 255	XGGGGTTGGGGTTTTTTCCGCTTTCCGCTTTCCG CTTT X = 5'-膽固醇基
CCGC3-Gw2	SEQ ID NO : 255	GGGGTTGGGGTTTTTTCCGCTTTCCGCTTTCCG TTT
5Chol-CCGC3	SEQ ID NO : 256	XTTTTTTCCGCTTTCCGCTTTCCGCTTT X = 5'-膽固醇基
CCGC3	SEQ ID NO : 256	TTTTTTTCCGCTTTCCGCTTTCCGCTTT

*六乙二醇
**如本文所稱，序列名稱(例如「CG-Gw2X1」等)意指在本表中所示的完整序列，包括 X1、X2、X3、X4、X6、X9、X12，以及 Xtr 非核苷酸-連接子。

【0086】 本文所述的免疫性核酸質體富含CpG模體。在一些態樣中，相較於在脊椎動物核酸序列中所發現的CpG模體頻率，免疫性核酸質體含有超過20% CpG模體。

【0087】 在一些態樣中，本揭示內容是有關於不包含抗生素抗性基因的免疫性核酸質體。在一些態樣中，質體不包含編碼全長或可篩檢功能性或可篩選性的核酸序列。舉例來說，本文所述的pGCMB75.6質體不包含任何全長或可篩檢功能性或可篩選性標記基因。pGCMB75.6質體的序列提供於SEQ ID NO : 265中(表1A)。在一些態樣中，本文所述的質體不編碼免疫原。

【0088】 在一些態樣中，免疫性質體可能包含編碼可篩檢或可篩選標記基因的核酸序列，該可篩檢或可篩選標記基因不為抗生素抗性基因。例如，本文所述的pLacZMB75.6質體包含LacZ基因作為可篩選標記。pLacZMB75.6的序列提供於SEQ ID NO : 268中。在又其他態樣中，質體將含有抗生素抗性基因。例如，pMB75.6包含編碼對抗生素康黴素具有抗性的

核酸序列。pMB75.6的序列提供於SEQ ID NO : 266中。

【0089】 應理解到，pMB75.6、pGCMB75.6或pLacZMB75.6質體的核苷酸序列可能在不會有害地影響其免疫刺激性性質的情況下有某種程度的變化。在一些態樣中，提供免疫性核酸質體，其包含與pGCMB75.6的序列(SEQ ID NO : 265)具有至少89%序列一致性的核酸序列或由其組成。在一些態樣中，免疫性質體包含與pGCMB75.6的序列(SEQ ID NO : 265)具有至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列一致性的核酸序列。在一些態樣中，免疫性核酸質體包含pGCMB75.6的序列(SEQ ID NO : 265)。

【0090】 在一些態樣中，提供免疫性核酸質體，其包含與pLacZMB75.6的序列(SEQ ID NO:268)具有至少84%序列一致性的核酸序列或由其組成。在一些態樣中，免疫性質體包含與pLacZMB75.6的序列(SEQ ID NO : 268)具有至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列一致性的核酸序列或由其組成。在一些態樣中，免疫性核酸質體包含具有pLacZMB75.6之序列(SEQ ID NO : 268)的質體。

【0091】 在一些態樣中，提供免疫性核酸質體，其包含與SEQ ID NO : 266的序列具有至少80%序列一致性的核酸序列。在一些態樣中，免疫性質體包含與SEQ ID NO : 266的序列具有至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、

至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列一致性的核酸序列或由其組成。在一些態樣中，免疫性核酸質體包含SEQ ID NO：266的序列。

【0092】 在一些態樣中，提供免疫性核酸質體，其包含與pMB75.6_AscI的序列(SEQ ID NO：267)具有至少80%序列一致性的核酸序列。在一些態樣中，免疫性質體包含與SEQ ID NO：267的序列具有至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列一致性的核酸序列或由其組成。在一些態樣中，免疫性核酸質體包含SEQ ID NO：267的序列。

表1A：質體序列

pGCMB75.6 (SEQ ID NO : 265)	
tgaccgcccc a cgacccccc g cccattgacg tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg	60
ccaataggga ctttccattg acgtcaatgg gtggagtatt tacggtaaac tgcccacttg	120
gcagtagacatc aagtgtatca tatgccaagt ccgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa	180
tggcccgccct ggcattatgc ccagtagatc accttacggg actttcctac ttggcagtagc	240
atctacgtat tagtcategc tattaccatg gtgatgcggt tttggcagta catcaatggg	300
cgtggatagc ggttgactc acggggattt ccaagtctcc accccattga cgtcaatggg	360
agtttgggg ggcaccaaaa tcaacgggac tttccaaaat gtcgtaccaa ctccgccccca	420
ttgacgcaaa tgggcggtag gcgtgtacgg tgggagggtct atataagcag agctcgttt	480
gtgaaccgtc agatcgccctg gagacgccc atcagctgtt ttgacctcca tagaagacac	540
cgggaccgat ccagcctccc ctcgaagccg atctgataac ggtaccgata agctggcggc	600
cgattaagct acagaagttg gtcgtgaggc actgggcagg taagtatcaa ggttacaaga	660

cagggttaag gagaccaata gaaaactgggc ttgtcgagac agagaagact cttgcgttc	720
tgataggcac ctattggtct tactgacatc cactttgcct ttctctccac aggtgtccac	780
tcccagggttc aattacagct cttaagcagc cgcaagctt gatatcgaatt cctgcagccc	840
gggggatcca ctagttctag agcggccgcc accgcgggtgg agctcgaatt atcagatcga	900
ttaataacta tgctcaaaaa ttgtgtacct ttagctttt aatttgtaaa ggggttaata	960
aggaatattt gatgtatagt gccttgacta gagatcataa tcagccatac cacatttgc	1020
gagggtttac ttgctttaaa aaacccccc cacctcccc tgaacctgaa acataaaaatg	1080
aatgcaattt gttgtttaaa cttgtttatt gcagcttata atggttacaa ataaagcaat	1140
agcatcacaa atttcacaaa taaagcattt ttttcaactgc attctagttg tggtttgc	1200
aaactcatca atgtatctt tcatgtctgg atcatcagat ctgcgggtct ccctatacg	1260
agtcgttattt atttcgataa gccaggttaa cctgcattaa tgaatcgcc aacgcgcggg	1320
gagaggcggg ttgcgttattt ggccgttcc cgttccctcg ctcactgact cgctgcgc	1380
ggcgttccgg ctgcggcgag cggatcagc tcactcaaag gcggtaatac gtttatccac	1440
agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa	1500
ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgaaaa ccataggctc cgccccctg acgagcatca	1560
caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg aaacccgaca ggactataaa gataccaggc	1620
gtttccccctt ggaagctccc tcgtgcgc tcctgttccg accctgccc ttaccggata	1680
cctgtccgc tttctccctt cgggaagcgt ggccgtttct catacgctac gctgttaggt	1740
tctcagttcg gtgttaggtcg ttgcgtccaa gctggctgt gtgcacgaac ccccccgtca	1800
ccccgaccgc tgccgcctt cggtaacta tcgtcttgc tccaaacccgg taagacacga	1860
cttatcgcca ctggcagcag ccactggtaa caggattagc agagcgaggt atgttaggcgg	1920
tgctacagag ttcttgaagt ggtggctaa ctacggctac actagaagaa cagtatttgg	1980
tatctgcgt ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg	2040
caaacaacc accgctggta gcgggggttt ttttgcgc aagcagcaga ttacgcgcag	2100
aaaaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg gggctgacg ctcagtgaa	2160
cgaaaaactca cgttaaggga ttttggcat gggcgccat aggctttgc aaagatcgat	2220
caagagacag gatgaggatc gtttgcagc ttttattct gactgcaacg ggcaataagt	2280
ctctgtgtgg attaaaaaaaaa gagtgtctga tagcagcttc tgaactgggtt acctgcccgt	2340
agtaaattaa aattttattt acttaggtca ctaaggcgcc ttgcgttgc gttgcgtcg	2400

gatatcatca gggcagaccc gttacatccc cctaacaagg tgtataaaaga gaaatactat	2460
ctcattggcg ttgcccgcac ctgacagtgc gacgttggc tgcgtccgtc gaccaacgg	2520
accgaggtaa cagcccaatc tatccatgtat ctcggccagg ccgggtcggc cggtatgcag	2580
cccggtcggt gtatgaagcc attaaggagc cgaccaggcg cgaccggcg gccggtcacg	2640
ctgcctctgc tgaaggctgc ctgtcaactcc ctgcgcggcg tacccggcgt ttcatcgag	2700
taggctccgg atcgcgaccc cggacgggccc ctgggcccag gagcggccta tgacaaatgc	2760
cgggttagcga tccggcattc agcattgact ggcacggat ccagtcctt caggagcctt	2820
atgccgaccc tagcaaaaaa tgagcccgag ccgatcgca gttgtatcc ggtcccgccg	2880
attgcccggtc gcgatgacgg tcctgtgtaa gcgttatcgt taccaattgt ttaagaagta	2940
tatacgctac gaggtacttg ataacttctg cgtacatac atgaggtttt gtataaaaaat	3000
ggcgggcgat atcaacgcag tgcagaat ccgaaacagt ctgcggact ctggggttcg	3060
aaatgaccga ccaagcgacg cccaacctgc catcagcaga ttgcattcc accgcccgcct	3120
tctatgaaag gttgggcttc ggaatcgaaa tccggacgc cggctggatg atcctccagc	3180
gcggggatct catgctggag ttcttcgccc accctaggcg cgctcatgag cggatacata	3240
tttgaatgta tttagaaaaaa taaacaaata ggggttccgc gcacattcc ccggaaatgt	3300
ccacctaaat tgtaagcgaaatattttgt taaaattcgc gttaaatttt tgtaatca	3360
gctcattttt taaccaatag gccgaaatcg gcaaaatccc ttataaatca aaagaataga	3420
ccgagatagg gttgagtgtt gttccagttt ggaacaagag tccactatta aagaacgtgg	3480
actccaaacgt caaaggcgaa aaaaccgtct atcaggcgaa tggcccacta cgtgaaccat	3540
caccctaatac aagtttttg gggtcgaggt gccgtaaagc actaaatcg aaccctaaag	3600
ggagcccccg atttagagct tgacggggaa agccggcgaa cgtggcgaga aaggaaggaa	3660
agaaagcgaa aggagcgccc gctaggcgcc tggcaagtgt agcggtcacg ctgcgcgtaa	3720
ccaccacacc cggccgcgtt aatgcgcgc tacaggcgcc gtcccttgc ccattcaggc	3780
tgcgcaactg ttgggaaggcgatcgggtgc gggccttgc gctattacgc cagctggcgaa	3840
aaggggatgt tgctgcaagg cgattaagtt gggtaacgccc agggtttcc cagtcacgac	3900
gttgtaaaac gacggccagt gagcgcgcgt aatacgactc actataggc gaattgggtaa	3960
ccggggcccccc cctcgagcag gatctataca ttgaatcaat attggcaatt agccatatta	4020
gtcattgggtt atatagcata aatcaatattt ggctattggc cattgcatac gttgtatcta	4080
tatcataata tgtacattta tattggctca tgtccaatat gaccgcccattt ttgacattga	4140

ttattgacta gttattaata gtaatcaatt acggggtcat tagttcatag cccatatatg	4200
gagttccgcg ttacataact tacgtaaat gccccgcctg gc	4242
pMB75.6	
(SEQ ID NO : 266)	
ctaaattgt a agcgtaata ttttgtaaa attcgctta aattttgtt aaatcagctc	60
attttttaac caataggccg aaatcgca aatccctt aatcaaaag aatagaccga	120
gatagggtt g agtgttgtc cagttggaa caagagtcca ctattaaaga acgtggactc	180
caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc	240
ctaatcaagt ttttgggt cgaggtgccc taaagacta aatcggaacc ctaaaggag	300
cccccgattt agagcttgac gggaaagcc ggcgaacgtg gcgagaaagg aagggaaagaa	360
agcgaaagga gcggcgcta gggcgctggc aagttagcg gtcacgctgc gcgttaaccac	420
cacacccgccc gcgcttaatg cgccgctaca gggcgctgtcc cattcgccat tcaggctg	480
caactgttgg gaagggcgat cggcgccggc ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg	540
gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt aacgcccagg tttcccaagt cacgacgttg	600
taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtataa cgactcaact tagggcgaat tgggtaccgg	660
gccccccctc gagcaggatc tatacattga atcaatattt gcaattagcc atattatca	720
ttggttatatac agcataaaatc aatattggct attggccatt gcatacgttgc tatctatatac	780
ataatatgt a catttatatt ggctcatgtc caatatgacc gcatgttga cattgattat	840
tgactagtta ttaatagtaa tcaattacgg ggtcatttagt tcataccca tataatggagt	900
tcccgcttac ataacttacg gtaaatggcc cgctggctg accgccccaaac gaccccccggc	960
cattgacgtc aataatgacg tatgttccca tagtaacgccc aataggact ttccattgac	1020
gtcaatgggt ggagtattta cggtaaactg cccacttggc agtacatcaa gtgtatcata	1080
tgccaagtcc gccccctatt gacgtcaatg acggtaaatg gccccctgg cattatgccc	1140
agtacatgac cttacggac ttccctactt ggcagttacat ctacgttata gtcacgtctca	1200
ttaccatgggt gatgcgggtt tggcagtaca tcaatggcg tggatagcg tttgactcac	1260
ggggatttcc aagtctccac cccattgacg tcaatggag tttgtttgg cacaaaaatc	1320
aacgggactt tccaaaaatgt cgtaacaact ccggccatt gacgcaaatg ggcggtaggc	1380
gtgtacggtg ggaggtctat ataagcagag ctcgttttagt gaaccgtcag atcgccctgga	1440
gacgccccatcc acgctgtttt gacccatca gaagacaccg ggaccgatcc agcctccct	1500

cgaagccgat ctgataacgg taccgataag ctggcggccg attaagctac agaagtttgt	1560
cgtgaggcac tgggcaggta agtatacagg ttacaagaca ggttaagga gaccaataga	1620
aactgggctt gtcgagacag agaagactct tgcgttctg ataggcacct attggctta	1680
ctgacatcca ctttgcctt ctctccacag gtgtccactc ccaggttcaa ttacagctct	1740
taagcagccg caagcttgat atcgaattcc tgcagcccg gggatccact agttctagag	1800
cggccgcccac cgccgtggag ctgcattat cagatcgatt aataactatg ctcaaaaatt	1860
gtgtacctt agcttttaa tttgtaaagg ggttaataag gaatatttga tgtatagtgc	1920
cttgactaga gatcataatc agccatacca catttgtaga ggtttactt gctttaaaaaa	1980
acctcccaca cctccccctg aacctgaaac ataaaatgaa tgcaattgtt gttgttaact	2040
tgtttattgc agcttataat ggttacaaat aaagcaatag catcacaaat ttcacaaata	2100
aagcattttt ttcactgcat tctagttgtg gtttgcctaa actcatcaat gtatcttatac	2160
atgtctggat catcagatct gcccgtctcc ctatagttag tcgttattaaat ttcgataagc	2220
caggttaacc tgcattaatg aatcgccaa cgcgcgggaa gaggcggtt gcgtattggg	2280
cgctcttccg cttcctcgct cactgactcg ctgcgtcgg tcgttcggct gcggcgagcg	2340
gtatcagctc actcaaaggc ggtaatacgg ttatccacag aatcagggga taacgcagga	2400
aagaacatgt gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg	2460
gcgttttcc ataggctccg cccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag	2520
aggtggcgaa acccgacagg actataaaga taccaggcg tttccctgg aagctccctc	2580
gtgcgtctc ctgttccgac cctgccgtt accggatacc tgtccgcctt tctcccttcg	2640
ggaagcgtgg cgcttctca tagtcacgc tgttaggtatc tcagttcggt gtaggtcg	2700
cgctccaagc tggctgtgt gcacgaaccc cccgttcagc ccgaccgctg cgccttatcc	2760
ggtaactatc gtcttgagtc caacccggta agacacgact tatcgccact ggcagcagcc	2820
actggtaaca ggattagcag agcgaggtat gtaggcggtg ctacagagtt cttgaagtgg	2880
tggcctaact acggctacac tagaagaaca gtatggta tctgcgtct gctgaagcca	2940
gttaccttcg gaaaaagagt tgtagctct tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc	3000
ggtggttttt ttgtttgca gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat	3060
cctttgatct ttctacggg gtctgacgct cagtgaaacg aaaactcacg ttaaggatt	3120
ttggtcatga gcgcgcctag gctttgcaa agatcgatca agagacagga tgaggatcgt	3180
ttcgcatgat tgaacaagat ggattgcacg caggttctcc ggccgcttgg gtggagaggc	3240

tattcggctta tgactgggca caacagacaa tcggctgctc tgatgccgcgtgtcagcgca gggcgcccg gttcttttgc aactgcaaga cgaggcagcg cggctatcgt ggctggccac gacggcggtt cttgcgcag ctgtgctcga cgttgtcact gaagcggaa gggactggct gctattggc gaagtgcgg ggcaggatct cctgtcatct caccttgctc ctgcccggaa agtatccatc atggctgatg caatgcggcg gctgcatacg cttgatccgg ctacctgccc attcgaccac caagcgaaac atcgcatcga gcgagcacgt actcggatgg aagccggct tgcgatcag gatgatctgg acgaagagca tcaggggctc ggcgcagccg aactgttcgc caggctcaag gcgagcatgc ccgacggcgaa ggatctcgctc gtgacccatg gcgatgcctg cttgcccgaat atcatggtgg aaaaatggcccg ctttctgga ttcatcgact gtggccggct gggtgtggcg gaccgctatc aggacatagc gttggctacc cgtgatattg ctgaagagct tggcggcgaa tgggctgacc gcttcctcgatc gctttacggatcgc cgcattcgca ggcgcattcgcc ttctatcgcc ttcttgcgaa gttcttctga gcgggactct ggggttcgaa atgaccgacc aagcgacgccc caacctgcca tcacgagatt tcgattccac cgccgccttc tatgaaaggt tgggcttgg aatcgtttc cgggacgcgcg gctggatgat cctccagcgc gggatctca tgctggagtt cttcgcccac cctaggcgcg ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg ggttccgcgc acattcccc gaaaagtgcc ac	3300 3360 3420 3480 3540 3600 3660 3720 3780 3840 3900 3960 4020 4080 4140 4200 4242
--	--

pMB75.6_AscI

(SEQ ID NO : 267)

tgaccgccccca acgaccccccggccattgacgtcaataatgatcgatgttccatagtaacgc ccaatagggatcttccatttgc acgtcaatgg gtggaggatttacggtaaac tgcccacttgc gcagtacatc aagtgtatca tatgccaagt ccgcggccctatgcacgtcaatgg tggccgcctt ggcattatgc ccagtacatgc accttacggg actttcctac ttggcagttac atctacgtat tagtcatcgcttattaccatgtgtatgcgggttttgcagttacatcaatgg cgtggatagc ggtttgactc acggggatttccaatctcc accccattgacgtcaatgg agtttggggatcttgcacccaaaatcaacgggac tttccaaaatgtcgtaacaa ctccgcggcc ttgacgcaaa tggcggttag gcgtgtacgg tggaggtctatataagcag agctcgat gtgaaccgatc agatcgccctg gagacgcccattacgctgtt ttgacccatca tagaagacac cgggaccgatccagcctccccctcgaagccgatctgtataac ggtaccgata agctggcgcc	60 120 180 240 300 360 420 480 540 600
---	---

cgattaagct acagaagttg gtcgtgaggc actgggcagg taagtatcaa ggttacaaga	660
caggtttaag gagaccaata gaaactgggc ttgtcgagac agagaagact cttgcgttc	720
tgataggcac ctattggtct tactgacatc cactttgcct ttctctccac aggtgtccac	780
tcccagggttc aattacagct cttaagcagc cgcaagcttg atatcgatt cctgcagccc	840
gggggatcca ctagttctag agcggccgccc accgcggtgg agctcgaatt atcagatcga	900
ttaataacta tgctcaaaaa ttgtgtacct ttagctttt aatttgtaaa ggggttaata	960
aggaatattt gatgtatagt gccttgacta gagatcataa tcagccatac cacatttgc	1020
gaggtttac ttgctttaaa aaacctccca cacctcccc tgaacctgaa acataaaatg	1080
aatgcatttgc ttgttgttaa cttgtttatt gcagcttata atggttacaa ataaagcaat	1140
agcatcacaa atttcacaaa taaagcattt ttttcactgc attctagttg tggtttgc	1200
aaactcatca atgtatctta tcatgtctgg atcatcagat ctgcggctc ccctatagtg	1260
agtcgtatta atttcgataa gccaggtaa cctgcattaa tgaatcggcc aacgcgcggg	1320
gagaggcggt ttgcgtattt ggcgccttc cgcttcctcg ctcactgact cgctgcgctc	1380
ggtcgttcgg ctgcggcggc cggatcagc tcactcaaag gcggtaatac gtttatccac	1440
agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccagggaa	1500
ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgaaaaa ccataggctc cgccccctg acgagcatca	1560
caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg aaacccgaca ggactataaa gataccaggg	1620
gtttccccctt ggaagctccc tcgtgcgtc tcctgttccg accctgccgc ttaccggata	1680
cctgtccggcc tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct catacgctac gctgttaggtt	1740
tctcagttcg gtgttaggtcg ttgcgtccaa gtcggctgt gtgcacgaac cccccgttca	1800
ccccgaccgc tgcgccctat ccggtaacta tcgtcttgcg tccaaccgg taagacacga	1860
cttacgcaca ctggcagcag ccactggtaa caggattgc agagcgaggt atgtaggcgg	1920
tgctacagag ttcttgaagt ggtggctaa ctacggctac actagaagaa cagtattttgg	1980
tatctgcgt ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg	2040
caaacaaacc accgctggta gcggtggttt ttttggcgc aagcagcaga ttacgcgcag	2100
aaaaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg gggctctgacg ctcagtggaa	2160
cggaaaactca cgttaaggga ttttggcat gggcgccct aggctttgc aaagatcgat	2220
caagagacag gatgaggatc gtttcgcattt attgaacaag atggattgca cgcaggctct	2280
ccggccgctt ggggtggagag gctattcggc tatgactggg cacaacagac aatcgctgc	2340

tctgatgccc	ccgtgttccg	gatgtcagcg	caggggcgcc	cggttctttt	tgtcaagacc	2400
gacctgtccg	gtgcctgaa	tgaactgcaa	gacgaggcag	cgcggctatc	gtggctggcc	2460
acgacggcgc	ttccttgcgc	agctgtgctc	gacgttgc	ctgaagcggg	aagggactgg	2520
ctgctattgg	gcgaagtgcc	ggggcaggat	ctcctgtcat	ctcaccttgc	tcctgccgag	2580
aaagtatcca	tcatggctga	tgcaatgcgg	cggctgcata	cgcttgcata	ggctacactgc	2640
ccattcgacc	accaagcgaa	acatcgcatc	gagcgagcac	gtactcggat	ggaagccggt	2700
cttgcgatc	aggatgatct	ggacgaagag	catcaggggc	tcgcgccagc	cgaactgttc	2760
gccaggctca	aggcgagcat	gcccgcggc	gaggatctcg	tcgtgaccca	tggcgatgcc	2820
tgcttgcga	atatcatggt	ggaaaatggc	cgctttctg	gattcatcga	ctgtggccgg	2880
ctgggtgtgg	cggaccgcta	tcaggacata	gcgttggcta	cccgtgatat	tgctgaagag	2940
cttggcggcg	aatgggctga	ccgcttcctc	gtgcttacg	gtatgcgcgc	tcccgattcg	3000
cagcgcatcg	ccttctatcg	ccttcttgac	gagttcttct	gagcgggact	ctggggttcg	3060
aaatgaccga	ccaagcgacg	cccaacctgc	catcacgaga	tttcgattcc	accgcgcgcct	3120
tctatgaaag	gttgggcttc	ggaatcgttt	tccggacgc	eggctggatg	atcctccagc	3180
gcggggatct	catgctggag	ttcttcgccc	accctaggcg	cgctcatgag	cggatacata	3240
tttgaatgta	tttagaaaaaa	taaacaata	ggggttccgc	gcacatttcc	ccgaaaagtg	3300
ccacctaata	tgtaaagcgtt	aatatttgt	taaaattcgc	gttaaatttt	tgttaaatca	3360
gctcattttt	taaccaatag	gccgaaatcg	gcaaaatccc	ttataaatca	aaagaataga	3420
ccgagatagg	gttgagtgtt	gttccagttt	ggaacaagag	tccactatta	aagaacgtgg	3480
actccaaacgt	caaagggcga	aaaaccgtct	atcagggcga	tggcccaacta	cgtgaaccat	3540
caccctaatac	aagttttttgc	gggtcgaggt	gccgtaaagc	actaaatcgg	aaccctaaag	3600
ggagcccccg	attttagagct	tgacggggaa	agccggcgaa	cgtggcgaga	aaggaaggga	3660
agaaagcgaa	aggagcgggc	gctagggcgc	tggcaagtgt	agcggtcacg	ctgcgcgtaa	3720
ccaccacacc	cggccgcgtt	aatgcgcgc	tacagggcgc	gtcccattcg	ccattcaggc	3780
tgcgcaactg	ttgggaaggg	cgatcggtgc	gggccttttc	gctattacgc	cagctggcga	3840
aagggggatg	tgctgcaagg	cgattaagtt	ggtaacgccc	agggtttcc	cagtcacgac	3900
gttgtaaaac	gacggccagt	gagcgcgcgt	aatacgactc	actatagggc	gaattgggta	3960
ccggggccccc	cctcgagcag	gatctataca	ttgaatcaat	attggcaatt	agccatatta	4020
gtcattggtt	atatacgata	aatcaatatt	ggctattggc	cattgcatac	gttgtatcta	4080

tatcataata tgtacattta tattggctca tgtccaatat gaccgccatg ttgacattga	4140
ttattgacta gttattaata gtaatcaatt acggggctat tagtcatag cccatataatg	4200
gagttccgcg ttacataact tacggtaaat ggccgcctg gc	4242
pLacZMB75.6	
(SEQ ID NO : 268)	
tgaccgcccc a cgacccccc cccattgacg tcaataatga cgtatgttcc catagttaacg	60
ccaataggga ctttccattt acgtcaatgg gtggagtatt tacggtaaac tgcccacttg	120
gcagtacatc aagtgtatca tatgccaagt ccgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa	180
tggccgcct ggcattatgc ccagtacatg accttacggg actttcctac ttggcagttac	240
atctacgtat tagtcatcgc tattaccatg gtgatgcgtt tttggcagta catcaatggg	300
cgtggatagc gttttgactc acggggattt ccaagtctcc accccattga cgtcaatggg	360
agtttgggg ggcaccaaaa tcaacggac tttccaaaaat gtcgtaacaa ctccgcccc	420
ttgacgcaaa tgggcggtag gcgtgtacgg tgggaggctt atataagcag agctcggttta	480
gtgaaccgtc agatcgccctg gagacgccccat ccacgcttt ttgacctcca tagaagacac	540
cgggaccgat ccagcctccc ctcgaagccg atctgataac ggtaccgata agctggcggc	600
cgattaagct acagaagttt gtcgtgaggc actgggcagg taagtatcaa ggttacaaga	660
caggttaag gagaccaata gaaactgggc ttgtcgagac agagaagact cttgcgtttc	720
tgataggcac ctattggctt tactgacatc cactttgcct ttctctccac aggtgtccac	780
tcccaagggttc aattacagct cttaagcagc cgccaaaaaca aaattcctca aaaatcatca	840
tcgaatgaat ggtgaaataa ttccctgaa taactgttagt gttttcaggg cgccggataaa	900
taattaacta tgctcaaaaa ttgtgtacct ttagctttt aatttgtaaa ggggttaata	960
aggaatattt gatgtatagt gccttgacta gagatcataa tcagccatac cacatttgc	1020
gagggtttac ttgctttaaa aaacctcccc cacctcccc tgaacctgaa acataaaaatg	1080
aatgcaattt gttttgttaa cttgtttatt gcagcttata atggttacaa ataaagcaat	1140
agcatcacaa atttcacaaa taaagcattt ttttcactgc attctagttg tggttgtcc	1200
aaactcatca atgtatctt tcatgtctgg atcatcagat ctgccggctt ccctatagtg	1260
agtcgttata atttcgataa gccaggttaa cctgcattaa tgaatcggcc aacgcgcggg	1320
gagaggcggg ttgcgtattt ggcgccttc cgcttcctcg ctcactgact cgctgcgttc	1380
ggtcgttccgg ctgcggcgag cggtatcagc tcactcaaag gcgtaataac gtttatccac	1440

agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccagggaa	1500
ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgaaaaa ccataggctc cgccccctg acgagcatca	1560
caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg aaacccgaca ggactataaa gataccaggc	1620
gtttccccct ggaagctccc tcgtgcgc tcctgttccg accctgccgc ttaccggata	1680
cctgtccgccc tttctccctt cgggaagcgt ggcgccttct catagctcac gctgttaggta	1740
tctcagttcg gtgttaggtcg ttcgcgtccaa gctgggctgt gtgcacgaac cccccgttca	1800
gcccgaccgc tgcgccattat ccggtaacta tcgttgcg tccaaacccgg taagacacga	1860
cttatcgcca ctggcagcag ccactggtaa caggattagc agagcgaggt atgtaggcgg	1920
tgctacagag ttcttgaagt ggtggctaa ctacggctac actagaagaa cagtatttgg	1980
tatctgcgt ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaaga gttggtagct cttgatccgg	2040
caaacaacc accgctggta gcgggggttt ttttgggc aagcagcaga ttacgcgcag	2100
aaaaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg gggctgacg ctcagtggaa	2160
cgaaaaactca cgtaaggga ttttggcat gggcgccct aggctttgc aaagatcgat	2220
caagagacag gatgaggatc gtttcgcagc ttttcattct gactgcaacg ggcaataagt	2280
ctctgtgtgg attaaaaaaaaa gagtgtctga tagcagcttc tgaactgggtt acctgccgtg	2340
agtaaattaa aattttattt acttaggtca ctaaggcgcc ttgcgttag gttgcgtcg	2400
gatatcatca gggcagaccg gttacatccc cctaacaagc tgtataaaga gaaataactat	2460
ctcattggcg ttgcccccac ctgacagtgc gacgttgggc tgcgtccgtc gaccaacgg	2520
accgaggtaa cagcccaatc tatccatgat ctcggccagg cccggctggc cgttatgcag	2580
cccggtcggtt gtagtggcc attaaggagc cgaccggcg cgaccggcg gccggtcacg	2640
ctgcctctgc tgaaggctgc ctgtcactcc ctgcggccggc tacccgggt ttcatcgag	2700
taggctccgg atcgcgaccc cggacggcc ctggggccag gagcggccta tgacaaatgc	2760
cgggttagcga tccggcattc agcattgact ggcgcacggat ccagtccttg caggagcctt	2820
atgccgaccc tagcaaaaaaa tgagcccgag ccgatcgca gttgtatcc ggtcccgccg	2880
attgcgggtc gcgatgacgg tcctgtgtaa gcgttatcgt taccattgt ttaagaagta	2940
tatacgctac gaggtacttg ataacttctg cgtacatac atgaggtttt gtataaaaat	3000
ggcggggcgat atcaacgcag tgtcagaaat ccgaaacagt ctgcggact ctgggggtcg	3060
aaatgaccga ccaagcgacg cccaaacctgc catcaccgaga ttccgattcc accgcccgcct	3120
tctatgaaag gttgggcttc ggaatcgaaa tccgggacgc cggctggatg atcctccagc	3180

gcggggatct catgctggag ttcttcgccc accctaggcg cgctcatgag cggatacata	3240
tttgaatgta ttttagaaaaaa taaacaaata ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagtg	3300
ccacctaaat tgtaagcggt aatattttgt taaaattcgc gttaaatttt tgttaaatca	3360
gctcattttt taaccaatag gccgaaatcg gcaaaatccc ttataaatca aaagaataga	3420
ccgagatagg gttgagtgtt gttccagttt ggaacaagag tccactatta aagaacgtgg	3480
actccaacgt caaaggcgca aaaaccgtct atcagggcgta tggcccacta cgtgaaccat	3540
caccctaatac aagtttttg ggtcgaggt gccgtaaagc actaaatcgg aaccctaaag	3600
ggagcccccg atttagagct tgacgggaa agccggcgaa cgtggcgaga aaggaaggga	3660
agaaagcgaa aggagcgggc gctagggcgc tggcaagtgt agcggtcacg ctgcgcgtaa	3720
ccaccacacc cgccgcgcctt aatgcgcgc tacagggcgc gtcccatcgc ccattcaggc	3780
tgcgcaactg ttgggaaggg cgatcggtgc gggcctcttc gctattacgc cagctggcgaa	3840
aagggggatg tgctgcaagg cgattaagtt gggtaacgcc agggtttcc cagtcacgac	3900
gttgtaaaac gacggccagt gagcgcgcgt aatacgactc actatagggc gaattgggta	3960
ccggggcccccc cctcgaggc gacggtatcg ataagcttga tatcgaattc ctgcagcccc	4020
ggggatccac tagttctaga gcggccgcca ccgcggtgga gctccagctt ttgttccctt	4080
tagtgagggt taattgcgcg cttggcgtaa tcatggtcat agctgtttcc tgtgtgaaat	4140
tgttatccgc tcacaattcc acacaacata cgagccggaa gcataaagtg taaagcctgg	4200
ggtgccataat gagtgagcta actcacatta attgcgttgc gc	4242

【0093】 本文進一步提供能夠刺激免疫反應的免疫性核酸或免疫性質體，其包括在高度嚴苛條件下雜交至SEQ ID NO : 265、SEQ ID NO : 266、SEQ ID NO : 267或SEQ ID NO : 268的核酸序列。適宜的核酸序列包括那些與本文所述的核酸序列同源、實質上相似或一致者。在一些態樣中，同源核酸序列將與SEQ ID NO : 265或對應互補序列具有至少約75%、76%、77%、78%、79%、80% 81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的一致性百分率。在其他態樣中，同源核酸序列將與SEQ ID NO : 268或對應互補序列具有至少約75%、76%、77%、78%、79%、80% 81%、82%、83%、

84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列相似性。在其他態樣中，同源核酸序列將與SEQ ID NO : 266或對應互補序列具有至少約75%、76%、77%、78%、79%、80% 81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列相似性。在其他態樣中，同源核酸序列將與SEQ ID NO : 267或對應互補序列具有至少約75%、76%、77%、78%、79%、80% 81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列相似性。序列相似性可以使用一些技藝中已知的演算法(諸如Altschul, S. F., et al., J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990中所述的BLAST)來進行計算。因為遺傳密碼的簡併性，核酸可能在序列上與上文所述核酸序列有差異。一般來說，參考序列將會是18個核苷酸，更經常是30個或更多個核苷酸，且基於比較目的可能包含組成物的整個核酸序列。

【0094】 本文預期可雜交至SEQ ID NO : 265、SEQ ID NO : 266、SEQ ID NO : 267或SEQ ID NO : 268的核酸。嚴苛雜交條件包括諸如在50°C或更高溫度下以及0.1X SSC (15 mM氯化鈉/1.5 mM檸檬酸鈉)下的條件。另一個實例為在42°C下於50%甲醯胺、5X SSC (150 mM NaCl、15 mM檸檬酸三鈉)、50 mM磷酸鈉(pH 7.6)、5X鄧哈特氏溶液(Denhardt's solution)、10%硫酸葡聚糖以及20 µg/ml經變性剪切鮭精DNA的溶液中培育過夜，然後在約65°C下於0.1X SSC中洗滌。例示性嚴苛雜交條件是在如上文特定條件的至少約80%、85%、90%或95%下般嚴苛的雜交條件。其他嚴苛雜交條件為技藝中已知的並且也可以用來鑑定本揭示內容之核酸同源物(*Current Protocols in Molecular Biology*, Unit 6, pub. John Wiley & Sons, N.Y. 1989)。

【0095】 要理解到，免疫性核酸質體的核苷酸序列可能在不會有害地

影響其免疫刺激性質的情況下有某種程度的變化。這樣一種變異核酸質體分子的核酸序列通常將會差異達一或多個核苷酸。序列改變可能是置換、插入、刪除或其組合。用於選殖基因之突變誘發技術為技藝中已知的。關於定位突變誘發的方法可以在Gustin et al., *Biotechniques* 14:22, 1993 ; Barany, *Gene* 37:111-23, 1985 ; Colicelli et al., *Mol. Gen. Genet.* 199:537-9, 1985 ; 與Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, CSH Press 1989, pp. 15.3-15.108中找到，且全部併入本文做為參考資料。歸納來說，本發明是有關於能夠在個體體內刺激先天性免疫反應的核酸質體分子，以及其變異體或突變體。還有，本發明含括由所述核酸編碼的中間RNA，還有由本文所述核酸質體編碼的任何所得胺基酸序列。

【0096】 在一些態樣中，若免疫性核酸質體的核苷酸序列相對於SEQ ID NO : 265、266、267或268中所提供的序列有所變化，則免疫性核酸質體中的CpG二核苷酸較佳地維持不變。或者，若免疫性質體的核苷酸序列改變以使得CpG二核苷酸消除，則免疫性核酸質體的序列可能在另一個位置處改變而使得核酸質體中的CpG二核苷酸總數維持相同。除了那些已存在於免疫性核酸質體中的CpG二核苷酸以外，可以引入更多CpG二核苷酸。因此，舉例來說，本文所述的免疫性核酸質體包含至少約200個、至少約220個、至少約240個、至少約260個、至少約270個、至少約275個、至少約280個、至少約283個、至少約285個，或至少約288個CpG二核苷酸。在一些具體例中，免疫性核酸質體可包含283個CpG二核苷酸。在一些具體例中，除了那些已存在於pGCMB75.6或pLacZMB75.6的核苷酸序列中的CpG二核苷酸以外，可將CpG二核苷酸引入質體中。

【0097】 在一些態樣中，若免疫性核酸質體的核苷酸序列相對於本文所提供的序列有所變化，則免疫性核酸的CpG模體類型可能變成調節細胞質

核酸監視分子(亦即TLR21及/或TLR9)的後續活化。例如，可增加免疫刺激CpG模體的數目，以對免疫性核酸質體做出反應而提高至少一個細胞質核酸監視分子的活化。或者，可增加一些非免疫刺激CpG模體的數目以減少至少一個細胞質核酸監視分子的活化。在一些態樣中，刺激性以及非刺激性CpG模體的數目可能受到調整以提高至少一個細胞質核酸監視分子的活化並且減少至少一個細胞質核酸監視分子的活化。

【0098】 適宜的免疫性核酸質體分子包括本文所述免疫性編碼與非編碼核酸中的任一者。編碼核酸序列編碼蛋白質或肽的至少一部分，而非編碼序列並未編碼蛋白質或肽的任一部份。依據本發明，「非編碼」核酸可能包括轉錄單元的調節區，諸如啟動子區。術語「空載體」可與術語「非編碼」交替使用，且特別意指不存在蛋白質編碼部分的核酸序列，諸如不具有基因插入物的質體載體。表現由本文所述核酸質體編碼的蛋白質對於誘發免疫反應來說並不是必要的；因此，質體不必然含有任何可操作地連接至轉錄控制序列的編碼序列。但是，可透過將至少一個核酸序列(DNA或RNA)納入免疫調節性組成物得到更多優點(亦即抗原特異性以及提高免疫性)，該核酸序列編碼免疫原及/或細胞激素。編碼免疫原及/或細胞激素的這樣一個核酸序列可能被納入本文所述的免疫性核酸質體，或可能納入組成物中的一個不同核酸(例如不同的質體)內。

【0099】 在本文所述免疫調節性組成物的一些具體例中，免疫調節性組成物包含一個脂質體遞送媒劑以及本文所述免疫性核酸質體中的至少一者。適宜的免疫調節性組成物描述於美國專利申請公開案第2012/0064151 A1與2013/0295167 A1中，其內容均以全文引用的方式併入。

【0100】 適宜的脂質體遞送媒劑包含脂質組成物，其能夠將核酸分子遞送至待治療個體的組織。在一些具體例中，脂質體遞送媒劑可能能夠在

個體體內維持穩定歷時一段足以遞送核酸分子及/或生物劑的時間量。舉例來說，脂質體遞送媒劑在接受者個體體內穩定歷時至少約五分鐘、歷時至少約1小時，或歷時至少約24小時。

【0101】 如本文所述的脂質體遞送媒劑包含脂質組成物，其能夠與細胞的細胞膜融合以將核酸分子遞送至細胞內。若核酸分子編碼一或多個蛋白質，則核酸：脂質體複合體在一些態樣中具有至少約1皮克(pg)表現蛋白質/毫克(mg)總組織蛋白質/微克(μg)遞送核酸的轉染效率。例如，核酸：脂質體複合體的轉染效率可以是至少約10 pg表現蛋白質/mg總組織蛋白質/μg遞送核酸；或至少約50 pg表現蛋白質/mg總組織蛋白質/μg遞送核酸。複合體的轉染效率可以低至1毫沙克(fg)表現蛋白質/mg總組織蛋白質/μg遞送核酸，其中上文數量較佳。

【0102】 在一些具體例中，本發明脂質體遞送媒劑的直徑是介於約100與500奈米(nm)。例如脂質體遞送媒劑的直徑可以是介於約150與450 nm或介於約200與400 nm。

【0103】 適宜的脂質體包括任一種脂質體，諸如那些例如常用於習於技藝者熟知的基因遞送方法中者。在一些具體例中，脂質體遞送媒劑包含多層囊泡(MLV)脂質、擠壓脂質，或兩者。在一些態樣中，脂質體遞送媒劑為陽離子性。用於製備MLV的方法為技藝中已知。在一些態樣中，脂質體遞送媒劑包含具有聚陽離子脂質組成物(亦即陽離子脂質體)的脂質體，及/或具有膽固醇骨架結合聚乙二醇的脂質體。例示性陽離子脂質體組成物包括，但不限於N-[1-(2,3-二油基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化銨(DOTMA)以及膽固醇、N-[1-(2,3-二油醯基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化銨(DOTAP)以及膽固醇、1-[2-(油醯基氧基)乙基]-2-油基-3-(2-羥基乙基)-氯化咪唑啉(DOTIM)以及膽固醇、二甲基雙十八烷基溴化銨(DDAB)以及膽固醇，與其

組合。在一些態樣中，脂質體遞送媒劑包含選自由以下組成之群的脂質對：N-[1-(2,3-二油基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化銨(DOTMA)以及膽固醇；N-[1-(2,3-二油醯基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化銨(DOTAP)以及膽固醇；1-[2-(二油醯基氧基)乙基]-2-油基-3-(2-羥基乙基)氯化咪唑啉(DOTIM)以及膽固醇；與二甲基雙十八烷基溴化銨(DDAB)以及膽固醇。在一些態樣中，用作為遞送媒劑的脂質體組成物包括DOTIM以及膽固醇。

【0104】 可使用技藝中的標準方法或如美國專利第6,693,086號(其內容以全文引用的方式併入)中所述達到將脂質體與本文所述免疫性核酸質體複合。要添加至脂質體之核酸質體的適宜濃度包括有效將足量免疫性核酸質體遞送至個體中以引起全身性免疫反應的濃度。例如，約0.1 μg 至約10 μg 的免疫性核酸質體可以與8 nmol脂質體合併、約0.5 μg 至約5 μg 的免疫性核酸質體可以與8 nmol脂質體合併，或約1.0 μg 的免疫性核酸質體可以與8 nmol脂質體合併。組成物中的免疫性核酸質體與脂質的比率(μg 免疫性核酸質體 : nmol脂質)可以是以重量計至少約1 : 1免疫性核酸質體 : 脂質(例如，1 μg 免疫性核酸質體 : 1 nmol脂質)。例如，免疫性核酸質體與脂質的比率可以是至少約1 : 5、至少約1 : 10，或至少約1 : 20。本文表示的比率是基於組成物中的脂質量，而不是基於組成物中的脂質總量。本發明組成物中的免疫性核酸質體與脂質的比率適宜在以重量計約1 : 1至約1 : 80免疫性核酸質體 : 脂質；以重量計約1 : 2至約1 : 40免疫性核酸質體 : 脂質；以重量計約1 : 3至約1 : 30免疫性核酸 : 脂質；或以重量計約1 : 6至約1 : 15免疫性核酸質體 : 脂質。

【0105】 免疫調節性組成物的濃度若升高至超過閾值，可能有毒性。為此，免疫調節性組成物的濃度如預期在本揭示內容中為無毒的，亦即呈低於這個閾值的程度。「細胞毒性」如本文所用意指異常的細胞狀態，諸如

無法成長、生長延遲、顯微外觀不正常，及/或免疫反應性下降。在一些態樣中，免疫調節性組成物的濃度介於約0.1與約250 ng/ml。在一些態樣中，濃度介於約0.1與約200 ng/ml。在一些態樣中，免疫調節性組成物的濃度介於約0.1與約150 ng/ml。在其他態樣中，免疫調節性組成物的濃度介於約0.1與約100 ng/ml。在又其他態樣中，免疫調節性複合體的濃度介於約0.1與約50 ng/ml。在其他態樣中，免疫調節性組成物的濃度介於約1與約250 ng/ml。在一些態樣中，免疫調節性組成物的濃度介於約10至約250 ng/ml。在一些態樣中，免疫調節性組成物的濃度介於約50與約250 ng/ml。在一些態樣中，免疫調節性組成物的濃度介於約100與約250 ng/ml。在一些態樣中，免疫調節性組成物的濃度介於約150與約250 ng/ml。在又其他態樣中，免疫調節性組成物的濃度介於約200與約250 ng/ml。在一些具體例中，免疫調節性組成物的濃度大約為或少於120 ng/ml。在一些態樣中，免疫調節性組成物的濃度為非細胞毒性。

【0106】 本文進一步提供包含如上文所述免疫刺激組成物以及醫藥上可接受載劑的醫藥組成物。免疫調節性組成物可以在免疫刺激寡核苷酸之前、同時或之後投與。用於個別免疫調節性組成物以及免疫刺激寡核苷酸的醫藥載劑可能不必然是相同的載劑。醫藥上可接受載劑調整組成以供透過某一種選自以下的路徑投與：靜脈內、肌肉內、乳房內、皮內、腹膜內、皮下、藉由噴霧、藉由氣溶膠、卵內、黏膜、穿皮、藉由浸入、經口、眼內、氣管內、鼻內、肺、直腸或那些習於技藝者已知的其他方式。醫藥上可接受載劑可以是稀釋劑、佐劑、賦形劑或媒劑，免疫刺激組成物或免疫調節性組成物與免疫刺激寡核苷酸可與其一起投與。此等媒劑可以是液體，諸如水與油，包括那些石油、動物、植物或合成來源的液體，諸如花生油、大豆油、礦物油、芝麻油以及類似者。例如，可使用0.4%食鹽水以

及0.3%甘油。這些溶液為無菌的且通常不含顆粒物質。它們可以透過習知的已知滅菌技術(例如過濾)而被滅菌。若需要的話，組成物可含有醫藥上可接受輔助物質以近似生理條件，諸如pH調節劑以及緩衝劑、安定劑、增稠劑、潤滑劑與著色劑等。本發明分子在此等醫藥調配物中的濃度可能大大地改變，亦即以重量計從少於約0.5%通常到至少約1%，至多達15或20%，且主要將根據選定的特定投與模式基於所需劑量、流體體積、黏度等來選定。舉例而言，在例如Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, Troy, D.B. ed., Lipincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA 2006, Part 5, Pharmaceutical Manufacturing pp 691-1092 (特別是參見pp. 958-989)中描述了適當的媒劑以及調配物(包括其他人類蛋白質，例如人類血清白蛋白)。

【0107】 本文亦提供用於製備上文所述免疫刺激組成物的方法，包含將免疫調節劑組成物與免疫刺激寡核苷酸組合而形成免疫刺激組成物；將該免疫刺激組成物離心以產生上清液與團粒；以及分離團粒。

【0108】 離心免疫刺激組成物將使得免疫刺激組成物沉降。可以透過將上清液倒出、抽出上清液或以其他方式移除上清液來分離團粒，只要保留團粒部分即可。預期將會在移除上清液期間損失一些團粒。還有，即便在離心之後可能還有一些免疫刺激組成物留在上清液中。在這樣的一個情況下，上清液可能保有免疫刺激性性質。若免疫刺激活性是因為存在免疫刺激組成物而保留在上清液中，則希望在團粒中有幾乎全部的免疫刺激組成物的話，便要使用更高的離心速度。例如，若上清液在8,000 rpm下離心後含有免疫刺激組成物，則增高離心至14,000 rpm可離下剩餘的免疫刺激組成物。

【0109】 本文亦提供用於刺激類鐸受體21 (TLR21)的方法，包含投與

免疫刺激寡核苷酸以及免疫調節劑組成物，其中該免疫刺激寡核苷酸包含至少一個CpG模體與一個在免疫刺激寡核苷酸的5'端處或鄰近5'端的富含鳥嘌呤核苷酸序列，且其中該免疫調節劑組成物包含一個非編碼核酸質體與一個陽離子脂質遞送媒劑。

【0110】 免疫刺激寡核苷酸以及免疫調節劑組成物可透過某一種選自以下的路徑投與：靜脈內、肌肉內、乳房內、皮內、腹膜內、皮下、藉由噴霧、藉由氣溶膠、卵內、黏膜、穿皮、藉由浸入、經口、眼內、氣管內、鼻內、肺、直腸或那些習於技藝者已知的其他方式。在一些態樣中，免疫調節劑組成物以及免疫刺激寡核苷酸以協同有效量存在。投與免疫刺激組成物以及免疫調節劑組成物可以是依序或同時。

【0111】 免疫調節劑組成物的濃度若高於250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 時可能有細胞毒性，而這個細胞毒性可能甚至抵銷免疫調節劑的免疫刺激效用。在本揭示內容的一些態樣中，免疫調節劑的濃度為約200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。投與免疫刺激寡核苷酸時，不會在10 μM 或低於10 μM 範圍觀察到細胞毒性程度。即使患者可以忍受更高濃度的免疫刺激寡核苷酸。在本揭示內容的一些態樣中，免疫刺激寡核苷酸的濃度介於約10 μM 與0.5 μM 。在一些態樣中，免疫刺激寡核苷酸的濃度為約2 μM ，且在一些態樣中，免疫調節劑組成物的濃度大於免疫刺激寡核苷酸的濃度。由於細胞毒性在投與免疫調節劑組成物時是一個限制要素，在一些態樣中，免疫調節劑組成物是以非細胞毒性量存在。

【0112】 在本文呈現之方法的每一個態樣中，免疫調節劑組成物以及免疫刺激寡核苷酸可以是如上文所述的任一個具體例或態樣。

【0113】 亦提供用於在個體體內引起免疫反應的方法，包含投與本文所述之免疫刺激組成物的任一個具體例。納入本揭示內容的其他具體例包括用於在個體體內引起免疫反應的方法，包含投與本文所述的免疫刺激寡

核苷酸以及免疫調節劑組成物。

實例

【0114】 提供以下實例以便進一步說明本文所揭示的一些具體例。該等實例希望用於說明，而不是限制所揭示的具體例。

【0115】 下面實例中使用的免疫調節劑組成物是包含陽離子脂質(DOTIM與膽固醇)以及非編碼DNA (pMB75.6) (SEQ ID NO : 266)的組成物。陽離子脂質組份為[1-[2-[9-(Z)-十八-基氧基]]-2-[8](Z)-十七基]-3-[羥基乙基]氯化咪唑啉(DOTIM)以及合成中性脂質膽固醇，經調配而產生直徑大約200 nm的脂質體(參見美國專利第6,693,086號)。非編碼DNA組份為在大腸桿菌中所生產的4292個鹼基對非編碼DNA質體(pMB75.6) (SEQ ID NO : 266)，其帶負電，與帶正電(陽離子)脂質體締合(參見美國專利第6,693,086號)。在實例中，術語「免疫刺激核酸質體」是指pMB75.6。

實例1：組合TLR21-活性寡去氧核苷酸以及免疫調節劑組成物

【0116】 探究免疫調節劑組成物對TLR21的活性。具體來說，將HEK293-NF κ B-bsd-cTLR21細胞於45 μ l生長培養基中以10,000個細胞/孔植入384孔盤。這些細胞暴露於溶解在生長培養基中的寡核苷酸並且在37°C下培育3至4天。每孔10 μ l培養物上清液被轉移至384孔盤且添加50 mM NaHCO₃/Na₂CO₃、2 mM MgCl₂、5mM對-硝基苯基磷酸(pNP) pH 9.6，並透過在405 nm下的光學密度暫時變化(mOD405nm/min)的動力學測量來測定反應速率。

【0117】 單獨免疫刺激核酸質體經證明在所考量的濃度範圍中不具活性(2 μ g/ml與更低)，而脂質體調配的免疫刺激核酸質體(pDNA-F)顯示有微弱但清楚的訊號(鐘形曲線)，指出其與TLR21交互作用(圖2A)。然而，TLR21刺激性活性相較於5-Chol-GCGT3-TG4T (SEQ ID NO : 1)低好幾個量

級(圖2A與2B)，5-Chol-GCGT3-TG4T是一個針對與其受體交互作用進行最優化的寡核苷酸配位體。

表2：ODN序列

免疫刺激寡核苷酸	SEQ ID NO	序列
5Chol-GCGT3-TG4T (ODN1)	SEQ ID NO : 1	XTGGGGTTTTTGCCTTTGCCTTTGCCTTT X = 5'-膽固醇基
GCGT3-TG4T (ODN2)	SEQ ID NO : 252	TGGGGTTTTTGCCTTTGCCTTTGCCTTT
2006-PTO (ODN3)	SEQ ID NO : 3	tcgtcgtttgtcgtttgcgtt

【0118】 免疫調節劑組成物pDNA-F對TLR21的活性暗示著，這個受體更可能是免疫調節劑組成物之活體內作用的一個組份，但因為免疫調節劑組成物對TLR21來是一個弱配位體，因而這個受體可能不是唯一且主要的同源受體。

實例2：組合5-Chol-GCGT3-TG4T與免疫刺激核酸質體以及免疫調節劑組成物

【0119】 製備單獨免疫刺激核酸以及免疫調節劑組成物的200 $\mu\text{g/ml}$ 溶液與5-Chol-GCGT3-TG4的2 μM 溶液，並在4°C下培育歷時2小時。接著，從這個溶液，製備連續1：2稀釋品，並且依據實例1中的程序從20 nM質體濃度(與2 $\mu\text{g/ml}$ 質體濃度)開始投與至HEK293-bsd-cTLR21細胞，且與只含5-Chol-GCGT3-TG4T的樣品進行比較。所有樣品顯示強烈的TLR21刺激活性，其中單一樣品顯示的峰值略高而EC₅₀為2.44 pM (圖3A，表3)。相較於單獨5-Chol-GCGT3-TG4T (2.11 pM)，5-Chol-GCGT3-TG4T除了顯示略低的V_{max}以外，與免疫刺激核酸質體的組合(其本身為全然不具活性)導致EC₅₀些微改變(圖3A，表3)。相反地，含脂質體的樣品(免疫刺激寡核苷酸5-Chol-GCGT3-TG4T與免疫調節劑組成物)在較高濃度下顯示活性為最大

且訊號下降極多(圖3A)。但是，更為嚴密檢驗低濃度(pM)顯露出限定的活性穩定期，EC₅₀計算為1.04 pM (圖3B，表3)。在這個濃度範圍內，免疫調節劑組成物也是全然不具活性(圖3B)，且本身並非EC₅₀偏低的原因。

表3：半最大有效濃度(EC₅₀)以及最大訊號速度(V_{max})

免疫刺激劑	EC ₅₀ (pM)	V _{max} 毫 OD 405nm/min (mOD405/min)
5-Chol-GCGT3-TG4T	2.44	338
5-Chol-GCGT3-TG4T-pDNA 組合	2.11	260
5-Chol-GCGT3-TG4T-pDNA-F 組合	1.04	254

【0120】 結果暗示，TLR21-刺激性ODN 5-Chol-GCGT3-TG4T以及非細胞毒性濃度的免疫刺激核酸質體或免疫調節劑組成物的組合產生具活性的混合物。再者，TLR21-刺激性ODN 5-Chol-GCGT3-TG4T與免疫調節劑組成物相對於TLR21活化的EC₅₀為協同性。

實例3：免疫調節劑組成物的離心以及TLR21活性

【0121】 在4°C下，以14,000 rpm在4°C下於Eppendorf桌上型離心器中離心200 μg/ml質體濃度的免疫調節劑組成物溶液。為供比較，非離心等份試樣在4°C下儲存歷時2小時。移除並儲存上清液，同時將團粒再懸浮於等體積中。在2 mg/ml質體含量處開始準備滴定品以用於如實例1中所述的TLR21分析，因為在早前已確立免疫調節劑組成物具有一些微弱TLR21刺激活性(參見實例1)。

【0122】 免疫調節劑組成物的離心產生團粒，而團粒難以利用抽吸予以再懸浮。在離心之後，於團粒中發現所有免疫調節劑組成物的全部TLR21刺激活性，而上清液沒有TLR21活性(圖4)。經再懸浮的脂質體就TLR21刺激來說，相較於儲存在4°C下的脂質體展現出更高的EC₅₀。這個效用是因為

脂質體在離心之後的變化(例如不完全再懸浮/分散)。

實例4：組合5-Chol-GCGT3-TG4T與免疫調節劑組成物

【0123】 製備具有 200 $\mu\text{g/ml}$ 質體濃度以及 2 μM 5-Chol-GCGT3-TG4T的免疫調節劑組成物/5-Chol-GCGT3-TG4T溶液。也製備 2 μM 的 5-Chol-GCGT3-TG4T 溶液。樣品均在 4°C 下培育歷時 2 小時。以 14,000 rpm 在 4°C 下於 Eppendorf 桌上型離心器中離心這些溶液的 100 μl 等份試樣歷時 2 小時以供用於實例 5，同時培育剩餘物儲存在 4°C 下以供進行依據本實例 4 的分析。兩個樣品均顯示強效的 TLR21 刺激活性，但這個免疫調節劑組成物/5-Chol-GCGT3-TG4T 組合在較高濃度下顯示強烈降低訊號(圖 5A)，很可能是免疫調節劑組成物細胞毒性的結果。當樣品的免疫調節劑組成物組份被認為是處於低毒性濃度下，則對應 V_{\max} 值相似(圖 5B，表 4)。然而，組合免疫調節劑組成物/5-Chol-GCGT3-TG4T 的 EC_{50} 計算值比單獨 5-Chol-GCGT3-TG4T 者低 4 倍(圖 5B，表 4)。

表4：半最大有效濃度(EC_{50})以及最大訊號速度(V_{\max})

免疫刺激劑	EC_{50} (μM)	V_{\max} 毫 OD 405nm/min (mOD405/min)
5-Chol-GCGT3-TG4T	3.2	158
5-Chol-GCGT3-TG4T (離心上清液)	2.5	160
5-Chol-GCGT3-TG4T (離心團粒)	819	184
5-Chol-GCGT3-TG4T-pDNA-F 組合	0.62	160
5-Chol-GCGT3-TG4T-pDNA-F 組合 (離心上清液)	5145	184
5-Chol-GCGT3-TG4T-pDNA-F 組合 (離心團粒)	1.81	140

實例 5：免疫調節劑組成物 /5-Chol-GCGT3-TG4T 與 5-Chol-GCGT3-TG4T 的離心

【0124】 製備具有 200 $\mu\text{g/ml}$ 質體濃度以及 2 μM

5-Chol-GCGT3-TG4T的免疫調節劑組成物/5-Chol-GCGT3-TG4T溶液。也製備2 μM 的5-Chol-GCGT3-TG4T溶液。樣品均在4°C下培育歷時2小時。以14,000 rpm在4°C下於Eppendorf桌上型離心器中離心這些溶液的100 μl 等份試樣歷時2小時。移除並儲存上清液，同時將團粒再懸浮於100 μl 中。接著，從這些溶液，製備連續1：2稀釋品，並且從20 nM質體濃度(與2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 質體濃度)開始投與至HEK293-bsd-cTLR21細胞，且與只含5-Chol-GCGT3-TG4T的樣品進行比較。

【0125】 免疫調節劑組成物/5-Chol-GCGT3-TG4T組合的離心產生清楚可見的團粒，而就5-Chol-GCGT3-TG4T來說未觀察到可見團粒。免疫調節劑組成物/5-Chol-GCGT3-TG4T組合團粒(「pDNA-F 5Chol團粒」)難以再懸浮，但在如實例1中所述的TLR21分析中，其含有差不多所有刺激活性(圖6A與6B)，其中僅在上清液中偵測到痕量(「pDNA-F 5Chol上清液」)(圖6B，表4)，雖然EC₅₀比原有樣品更高(「pDNA-fF-Chol- GCGT3-TG4T」)(表4)。這個結果暗示，在與免疫調節劑組成物混合之後，5-Chol-GCGT3-TG4T在數量上與脂質體部分物理結合。單獨5-Chol-GCGT3-TG4T在離心時幾乎在上清液中維持唯一(估算99%，表4)，如同由可溶性化合物所預期(圖7A與7B)。

實例6：組合5-Chol-GCGT3-TG4T與免疫調節劑組成物

【0126】 製備具有200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 質體濃度以及2 μM 5-Chol-GCGT3-TG4T的免疫刺激組成物。也製備2 μM 的5-Chol-GCGT3-TG4T溶液。樣品均在4°C下培育歷時2小時。以14,000 rpm在4°C下於Eppendorf桌上型離心器中離心這些溶液的100 μl 等份試樣歷時2小時以供用於實例7，同時培育剩餘物儲存在4°C下以供進行依據本實例6的分析。移除並儲存上清液，同時將團粒再懸浮於200 μl 中。接著，從這些溶液，

進行連續1：2稀釋品，並且依據實例1中的程序投與至HEK293-bsd-cTLR21細胞以供TLR21分析。起始質體濃度為20 nM (與2 μ g/ml質體濃度)，且與只含5-Chol-GCGT3-TG4T的樣品進行比較。

【0127】 樣 品 (「5-Chol-GCGT3-TG4T」) 與
 「pDNA-F/5-Chol-GCGT3-TG4T」)均顯示強力的TLR21刺激活性，但免疫調節劑組成物/5-Chol-GCGT3-TG4T組合(「pDNA-F/5-Chol-GCGT3-TG4T」)在更高濃度下顯示強烈地降低訊號(圖8A)，可能是免疫調節劑組成物細胞毒性的結果。若含有免疫調節劑組成物的樣品的刺激活性被認為是處於低毒性濃度，則對應 V_{max} 值非常相似(圖8B，表5)。但是，組合免疫調節劑組成物 /5-Chol-GCGT3-TG4T 的 EC_{50} 計 算 值 比 單 獨 5-Chol-GCGT3-TG4T (「5-Chol-GCGT3-TG4T」)者低2倍(圖8B，表5)。

表5：半最大有效濃度(EC_{50})以及最大訊號速度(V_{max})

免疫刺激劑	EC_{50} 皮莫耳(pM)	V_{max} 毫 OD 405nm/min (mOD405/min)
5-Chol-GCGT3-TG4T	2.2	120
5-Chol-GCGT3-TG4T (離心上清液)	2.7	153
5-Chol-GCGT3-TG4T (離心團粒)	530	139
5-Chol-GCGT3-TG4T-pDNA-F 組合	0.94	113
5-Chol-GCGT3-TG4T-pDNA-F 組合 (離心上清液)	14983	224
5-Chol-GCGT3-TG4T-pDNA-F 組合 (離心團粒)	8.96	116

實例7：免疫調節劑組成物/5-Chol-GCGT3-TG4T與

5-Chol-GCGT3-TG4T的離心

【0128】 免疫調節劑組成物/5-Chol-GCGT3-TG4T組合的離心產生清

楚可見的團粒，而就5-Chol-GCGT3-TG4T來說沒有可見團粒。免疫調節劑組成物/5-Chol-GCGT3-TG4T組合團粒難以再懸浮，但在如實例1中所述的TLR21分析中，其(「pDNA-F/5-Chol-GCGT3-TG4T團粒」)含有差不多所有刺激活性(圖9B)，其中僅在上清液中偵測到痕量(「pDNA-F/5-Chol-GCGT3-TG4T上清液」)(圖9B，表5)，雖然EC₅₀比原有樣品更高(表5)。這個結果暗示，在與免疫調節劑組成物混合之後，5-Chol-GCGT3-TG4T與脂質體部分物理結合。將兩個部分與未離心免疫調節劑組成物/5-Chol-GCGT3-TG4T(「pDNA-F/5-Chol-GCGT3-TG4T」)相比較。

實例8：組合5-Chol-GCGT3-TG4T與免疫調節劑組成物

【0129】製備具有200 μg/ml質體濃度以及2 μM 5-Chol-GCGT3-TG4T的免疫調節劑組成物溶液。也製備2 μM的5-Chol-GCGT3-TG4T樣品。樣品均在4°C下培育歷時2小時。以14,000 rpm在4°C下於Eppendorf桌上型離心器中離心這些溶液的100 μl等份試樣歷時2小時以供用於實例9，同時培育剩餘物儲存在4°C下以供進行依據此實例8的分析。移除並儲存上清液，同時將團粒再懸浮於100 μl中。接著，從這些溶液，製備連續1:2稀釋品，並依據實例1中的程序從20 nM質體濃度(與2 μg/ml質體濃度)開始投與至HEK293-bsd-cTLR21細胞，且與只含5-Chol-GCGT3-TG4T的樣品進行比較。

【0130】樣品均顯示強力的TLR21刺激活性，但5-Chol-GCGT3-TG4T/免疫調節劑組成物組合(「pDNA-F/5-Chol-GCGT3-TG4T」)在較高濃度下顯示強烈降低訊號(圖10A)，與免疫調節劑本身(「pDNA-F」)相似，且可能是免疫調節劑組成物細胞毒性的結果。免疫刺激寡核苷酸(「5-Chol-GCGT3-TG4T」)在較高濃度

下展現出比含有免疫調節劑組成物的樣品更大的刺激活性。當樣品之免疫調節劑組成物組份的刺激活性被認為是處於低毒性濃度，則對應 V_{max} 值非常相似(圖10B，表6)。但是，組合免疫調節劑組成物/5-Chol-GCGT3-TG4T (「pDNA-F/5-Chol-GCGT3-TG4T」)的 EC_{50} 計算值比單獨 5-Chol-GCGT3-TG4T (「5-Chol-GCGT3-TG4T」)者低4倍(圖10B，表6)。單獨免疫調節劑組成物(「Bay 98-F」)僅顯示出最低活性，其加成效用無法解釋免疫調節劑組成物 /5-Chol-GCGT3-TG4T 的活性相對於單獨 5-Chol-GCGT3-TG4T有所增加。

表6：半最大有效濃度(EC_{50})以及最大訊號速度(V_{max})：

免疫刺激劑	EC_{50} 皮莫耳(pM)	V_{max} 毫 OD 405nm/min (mOD405/min)
5-Chol-GCGT3-TG4T	2.47	53
5-Chol-GCGT3-TG4T-pDNA-F 組合	0.59	51
5-Chol-GCGT3-TG4T-pDNA-F 組合 (離心上清液)	22.0	47
5-Chol-GCGT3-TG4T-pDNA-F 組合 (離心團粒)	1.06	47

實例9：免疫調節劑組成物的離心

【0131】 免疫調節劑組成物/5-Chol-GCGT3-TG4T組合的離心產生清楚可見的團粒，而就5-Chol-GCGT3-TG4T來說觀察到無可見團粒。免疫調節劑組成物/5-Chol-GCGT3-TG4T組合團粒(「pDNA-F/5-Chol-GCGT3-TG4T團粒」)難以再懸浮，但在如實例1中所述的TLR21分析中，其含有> 95%的刺激活性(圖11B)，雖然 EC_{50} 比原有樣品更高，其中僅在上清液(「pDNA-F/5-Chol-GCGT3-TG4T上清液」)中偵測到少部分(< 5%) (圖11B，表6)，且在低免疫調節劑組成物濃度(「pDNA-F/5-Chol-GCGT3-TG4T」)下

僅略少於未離心樣品。這個結果暗示，在與免疫調節劑組成物混合之後，5-Chol-GCGT3-TG4T在數量上與脂質體部分物理結合。

實例10：組合GCGT3-TG4T與免疫調節劑組成物

【0132】 製備具有200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 質體濃度以及2 μM GCGT3-TG4T (SEQ ID NO : 252；與5-Chol- GCGT3-TG4T (SEQ ID NO : 1)相同但不具有膽固醇基修飾的寡核苷酸序列)的免疫調節劑組成物溶液。也製備2 μM 的GCGT3-TG4T樣品，且樣品均在4°C下培育歷時2小時。以14,000 rpm在4°C下於Eppendorf桌上型離心器中離心這些溶液的100 μl 等份試樣歷時2小時以供用於實例11，同時培育剩餘物儲存在4°C下以供進行依據此實例10的分析。移除並儲存上清液，同時將團粒再懸浮於100 μl 中。接著，從這些溶液，製備連續1 : 2稀釋品，並依據實例1中的程序從20 nM質體濃度(與2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 質體濃度)開始投與至HEK293-bsd-cTLR21細胞，且與只含GCGT3-TG4T的樣品進行比較。

【0133】 樣品均顯示強力的TLR21刺激活性，但GCGT3-TG4T/免疫調節劑組成物組合(「pDNA-F/5-Chol-GCGT3-TG4T」)在較高濃度下顯示強烈降低訊號(圖12A)，可能是免疫調節劑組成物細胞毒性的結果。當樣品的免疫調節劑組成物組份的刺激活性被認為處於低毒性濃度，則對應 V_{\max} 值非常相似(圖12B，表7)。但是，組合免疫調節劑組成物/GCGT3-TG4T的 EC_{50} 計算值比單獨GCGT3-TG4T者低了超過4倍(表7)。單獨免疫調節劑組成物(「pDNA-F」)僅顯示出最低活性，其加成效用無法解釋免疫調節劑組成物/GCGT3-TG4T的活性相對於單獨GCGT3-TG4T有所增加。

表7：半最大有效濃度(EC_{50})以及最大訊號速度(V_{\max})

免疫刺激劑	EC_{50} 皮莫耳(pM)	V_{\max} 毫 OD 405nm/min (mOD405/min)
GCGT3-TG4T	324	56

GCGT3-TG4T-pDNA-F 組合	69.4	51
GCGT3-TG4T-pDNA-F 組合 (離心上清液)	860	43
GCGT3-TG4T-pDNA-F 組合 (離心團粒)	252	36

實例11：免疫調節劑組成物/GCGT3-TG4T的離心

【0134】 免疫調節劑組成物/GCGT3-TG4T組合的離心產生清楚可見的團粒。免疫調節劑組成物/GCGT3-TG4T組合團粒難以再懸浮，但在如實例1中所述的TLR21分析中，其(「pDNA-F/GCGT3-TG4T團粒」)含有超過 $>3\times$ 刺激活性(圖13B)，雖然EC₅₀比原有樣品(「pDNA-F/GCGT3-TG4T」)比上清液(「pDNA-F/GCGT3-TG4T上清液」)更高(圖13B，表7)。這個結果暗示，在與免疫調節劑組成物混合之後，GCGT3-TG4T在數量上與脂質體部分物理締合，雖然或許不如膽固醇基衍生的5-Chol- GCGT3-TG4T般有效率。

【0135】 那些習於技藝者將能理解到，可對本發明的較佳具體例進行許多變化以及修飾，且此等變化以及修飾可在不偏離本發明精神的情況下進行。因此，只要落入本發明的真正精神與範疇內，期望隨附申請專利範圍含括所有這些等效變化。

【0136】 本篇文件中所引用或所述的各專利案、專利申請案以及公開案的揭示內容以其整體併入本文做為參考資料。

實例12：免疫刺激劑在雞隻的新城病免疫接種模型中的活體內效力研究

【0137】 為了確定ODN1、ODN2與ODN3作為免疫刺激劑的穩定性以及效力，以三種不同濃度下測試每一者。

【0138】 探究以下免疫刺激劑：

ODN1 : [CholTEG]-TGGGGTTTTTGCCTTTGCGTTTGCCTT
TT (「5Chol-GCGT3-TG4T」) (SEQ ID NO : 1) ([CholTEG]=5'-三乙二

醇連結的膽固醇基修飾) ,

ODN2 : TGGGGTTTTTGCCTTTGCCTTTGCCTTTGCCTTT

(「GCGT3-TG4T」)(SEQ ID NO : 252) ,

ODN3 : tcgtcgtttgcgtttgtcg (「2006-PTO」)(SEQ ID NO : 3) 。

【0139】 依據表9，將各免疫刺激劑添加至油乳液中，該油乳液含有次優濃度的不活化新城病病毒(NDV)。關於製備次優NDV疫苗，將NDV抗原批次在NDV陰性尿囊液(AF)中稀釋50倍。在SPF層雞(Leghorn)中測試ODN1、ODN2以及ODN3組合次優劑量的新城病疫苗的效力。測量血清反應並且與沒有免疫刺激劑的相似次優NDV疫苗進行比較。在免疫接種之後於不同時間點測定抗體力價，以探究添加免疫刺激劑是否會導致較早的免疫反應。為測定三種ODN的最優劑量，各者以三個不同劑量(100 ng、1000 ng與5000 ng)補充至次優NDV疫苗，產生九個免疫刺激劑組。除了這九個免疫刺激劑組以外，在本研究中併入五個對照組，其由下列組成：不具有免疫刺激劑的次優NDV疫苗組、未稀釋NDV疫苗組、陰性對照組(免疫刺激劑組合佐劑)以及兩個具有呈不同濃度之聚肌苷酸：聚胞苷酸(聚I : C)的陽性對照組(表8)。

【0140】 測試下列參數：雞隻的健康狀態(數據未示出)以及依據血球凝集抑制(HI)分析的血清學。

表8：研究設計

測試物 / 對照物	治療組	數目(n)
次優 NDV+ ODN1 100ng	T01	10
次優 NDV+ ODN1 1000 ng	T02	10
次優 NDV+ ODN1 5000 ng	T03	10
次優 NDV+ ODN2 100 ng	T04	10
次優 NDV+ ODN2 1000 ng	T05	10

次優 NDV+ ODN2 5000 ng	T06	10
次優 NDV+ ODN3 100 ng	T07	10
次優 NDV+ ODN3 1000 ng	T08	10
次優 NDV+ ODN3 5000 ng	T09	10
次優 NDV	T10	10
最優 NDV (未稀釋疫苗)	T11	10
ODN1 5000 ng + 佐劑*	T12a	3
ODN2 5000 ng + 佐劑*	T12b	3
ODN3 5000 ng + 佐劑*	T12c	3
僅佐劑(Stimune)*	T12d	1
次優 NDV+ 10 µg 聚I:C	T13	9
次優 NDV+ 100 µg 聚I:C	T14	9

*3 隻動物被分派為每個免疫刺激劑組合佐劑(Stimune)的對照。一隻動物僅接受佐劑。所有動物為 3 週齡。

所有動物在 5 週齡時接種疫苗。所有的免疫接種是在第 0 天透過肌肉內注射來施行。

在第 0 天(接種疫苗前)、第 7 天、第 14 天以及第 21 天執行採血/血清學。

所有動物每天都進行臨床評分。

【0141】 依據研究設計，參與治療組T01-T14的雞隻接受測試物或對照物。在T13與T14組別中，因為在研究開始之前損失兩隻動物，每組為九隻而不是十隻雞接受免疫接種。

【0142】 分配至治療組T01、T02、T03、T04、T05、T06、T07、T08 以及T09的雞隻以含有3種不同免疫刺激劑(ODN)中之一者的次優NDV懸浮液進行免疫接種，每一種ODN呈三種不同濃度(100、1000、5000 ng/劑量)。關於油包水乳液的製備，將NDV抗原懸浮液與免疫刺激劑(水相)和佐劑 Stimune (油相)以4：5的比率一起調配(表9)。

表9：測試物以及對照物的製備

組	名稱	水相				油相		
		NDV 批次 (µl)	Neg. AF (µl)	Stimune 600 ng/µl	水相總體 積 (ml)	添加至 Stimune 的 水相體積	Stimune (ml)	總計 (ml)

				(μ l)		(ml)		
T01	ODN1 100 ng	100	4896	4	5	4	5	9
T02	ODN1 1000 ng	100	4862	38	5	4	5	9
T03	ODN1 5000 ng	100	4712	188	5	4	5	9
T04	ODN2 100 ng	100	4896	4	5	4	5	9
T05	ODN2 1000 ng	100	4862	38	5	4	5	9
T06	ODN2 5000 ng	100	4712	188	5	4	5	9
T07	ODN3 100 ng	100	4896	4	5	4	5	9
T08	ODN3 1000 ng	100	4862	38	5	4	5	9
T09	ODN3 5000 ng	100	4712	188	5	4	5	9
T10	次優疫苗	100	4900	0	5	4	5	9
T11	未稀釋疫苗	5000	0	0	5	4	5	9
T12a	ODN1 5000 ng 於 Stimune 中	-	2887	113	3	2	2.5	4.5
T12b	ODN2 5000 ng 於 Stimune 中	-	2887	113	3	2	2.5	4.5
T12c	ODN3 5000 ng 於 Stimune 中	-	2887	113	3	2	2.5	4.5
T12d	稀釋緩衝液(PBS)於 Stimune 中	-	2887	113	3	0.8	1	1.8
T13	聚 I : C 10 μ g	100	4877	23	5	4	5	9
T14	聚 I : C 100 μ g	100	4675	225	5	4	5	9

ODN 製備成 600 ng/ μ l

		100 μ M ODN (μ l)	稀釋緩衝液(μ l)	原液 600 ng/ μ l 體積(μ l)
ODN1	GCGT3-TG4T-5Chol (SEQ ID NO : 1, 參見)	204	196	400

表 1)				
ODN2	GCGT3-TG4T (SEQ ID NO : 252, 參見表 1)	216	184	400
ODN3	2006-PTO (SEQ ID NO : 3, 參見表 1)	312	88	400
聚 I : C 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$				
		凍乾粉末(mg)	生理鹽溶液(ml)	原液 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 體積(μl)
對照	聚 I : C (P0913)	10	1	1000
Lot # :	116M4118V		#16TK5011	10 min 50°C, 60 min RT (再黏合)
				儲存於-20°C 下

【0143】 分配至對照組T10的雞隻用次優NDV懸浮液(沒有免疫刺激劑)於佐劑(Stimune)中以4 : 5的比率進行免疫接種。

【0144】 分配至對照組T11的雞隻用未稀釋NDV懸浮液(沒有免疫刺激劑)於佐劑(Stimune)中以4 : 5的比率進行免疫接種。

【0145】 分配至T12組的雞隻以免疫刺激劑1 (3隻雞)、免疫刺激劑2 (3隻雞)以及免疫刺激劑3 (3隻雞)於佐劑(Stimune)中以4 : 5的比率進行免疫接種。一隻雞用稀釋緩衝液(專用)於佐劑(Stimune)中進行免疫接種。

【0146】 分配至對照組T13的雞隻(n=9)以及分配至對照組T14的雞隻(n=9)用NDV的次優NDV懸浮液組合兩種濃度(10,000 ng和100 μg)的聚I : C 在佐劑(Stimune)中以4 : 5的比率進行免疫接種。

測試物或對照物投與

【0147】 將儲存在-70°C 下的不活化NDV病毒株Ulster懸浮液解凍且在陰性尿囊液中稀釋50倍以產生次優疫苗劑量。依據研究設計添加免疫刺激劑。所得水相與Stimune以4 : 5的比率依據表9中所示疫苗製備方案進行混合。製備期間，除了Stimune佐劑以外，所有疫苗成分均放置在融冰上。在製備之後直接注射已調配好的疫苗(0.5 ml, 肌肉內)。

【0148】自抵達當日至研究結束，透過有經驗的生物技術人員每天監控一般健康狀態。

血清血液採樣

【0149】在研究第0天(免疫接種之前)、第7天、第14天以及第21天從所有雞隻收集用於血清學的血液樣品。血液樣品標示研究號碼、專屬樣品鑑別碼以及收集日期。取決於抽取血液體積之量，將血清分成兩個約0.5 ml的等份試樣並儲存於-20 ±5°C下。

血球凝集抑制(HI)分析

【0150】簡言之，將連續稀釋的血清與8 HAU (血球凝集單位)的NDV病毒株Ulster在室溫下一起培育歷時60分鐘。在每一次分析之前對HAU進行滴定。之後，添加雞紅血球並且在4°C下培育歷時45分鐘之後對凝集進行評分。於每個分析中納入陰性對照血清以及三個陽性對照血清(低、中與高抗體力價)。

【0151】HI力價結果表示為完全抑制凝集之最高血清稀釋度的倒數，其在對數上被轉換成最終Log2力價。

統計學

【0152】依據動物歸納經對數轉換的HI結果(參見表62-65)。根據治療組別來計算抗體力價的平均值以及標準差。利用非參數曼惠二式t-檢定來進行統計分析。

結果

【0153】在所有組別中觀察到沒有與免疫接種相關的臨床症狀或不良事件，在整個研究期期間所有雞隻看起來都健康。

【0154】但是，有兩隻雞因為啄鬥行為(pecking behaviour)在研究開始之前6天起被評為有小傷。在免疫接種當天，這些雞隻被分派至聚I：C組

T13 (#11658)以及T14 (#11676)。在免疫接種之後一週內恢復。

ODN1，GCGT3-TG4T-5Chol

【0155】 表示為100 ng、1000 ng以及5000 ng ODN1劑量組的Log2力價的個別HI結果顯示於表10中。與經稀釋NDV疫苗組的平均力價相比，這些組別的平均HI力價以及標準差顯示於圖14 (免疫接種之後(pv)第14與21天)以及圖15 (所有數據)中。

【0156】 相較於經稀釋NDV疫苗，GCGT3-TG4T-5Chol組顯示HI力價明顯較高(平均HI力價：4.8 Log2/SD 1.0)。在pv第14天，全部三個劑量的實際情況為：100 ng：平均HI力價6.2 Log2/SD 1.4 ($p=0.0214$)，1000 ng：平均HI力價6.9 Log2/SD 1.1 ($p=0.0003$)以及5000 ng：平均HI 5.9 Log2/SD 0.7 ($p=0.0243$)。

【0157】 然而在pv第21天，當與NDV疫苗相比(HI力價6.2 Log2/SD1.0)，所有濃度均觀察到沒有明顯差異；100 ng：平均HI力價6.9 Log2 /SD 0.8 ($p=0.1995$)；1000 ng：平均HI力價7.3 Log2/SD 0.9 ($p=0.0527$)；以及5000 ng：平均HI 6.7 Log2/SD 0.9 ($p=0.4523$)(圖14)，儘管1000 ng濃度非常接近顯著性。

表10：

結果 組別	duplo HI	動物	HI 1		HI 2		HI 1		HI 2		HI 3		HI 1		HI 2		HI 3		平均
			d0	d0	平均	d7	d7	平均	d14	d14	d14	平均	d21	d21	d21	平均			
T01	GCGT3-TG4T-5Chol 100 ng	11402	0	0	0	1	1	1	7	7	7	7.0	7	7	7	7	7.0		
		11404	0	0	0	0	0	0	7	7	7	7.0	7	7	7	7	7.0		
		11406	0	0	0	0	0	0	3	4	4	3.7	6	6	6	6	6.0		
		11408	0	0	0	0	0	0	7	8	8	7.7	8	9	7	8	8.0		
		11410	0	0	0	0	0	0	5	6	6	5.7	7	7	7	7	7.0		
		11412	0	0	0	0	0	0	6	6	8	6.7	6	6	6	6	6.0		
		11414	0	0	0	0	0	0	5	5	6	5.3	7	7	6	6	6.7		
		11416	0	0	0	0	0	0	8	7	8	7.7	8	8	8	8	8.0		
		11418	0	0	0	0	0	0	5	4	4	4.3	6	6	6	6	6.0		
		11420	0	0	0	0	0	0	8	7	7	7.3	7	7	8	7.3			
		平均 SD			0.0 0.0			0.1 0.3				6.2 1.4					6.9 0.8		
T02	GCGT3-TG4T-5Chol 1000 ng	11422	0	0	0	0	0	0	7	6	7	6.7	6	6	6	6	6.0		
		11424	0	0	0	0	0	0	8	7	7	7.3	9	7	8	8	8.0		
		11426	0	0	0	0	0	0	6	5	5	5.3	6	6	6	6	6.0		
		11428	0	0	0	0	0	0	7	7	7	7.0	7	7	7	7	7.0		
		11430	0	0	0	1	1	1	10	9	10	9.7	8	8	9	9	8.3		
		11432	0	0	0	0	0	0	7	6	7	6.7	7	7	7	7	7.0		
		11434	0	0	0	0	0	0	7	6	6	6.3	7	7	7	7	7.0		
		11436	0	0	0	0	0	0	7	6	7	6.7	8	7	9	8	8.0		
		11438	0	0	0	0	0	0	7	6	6	6.3	7	7	7	7	7.0		
		11440	0	0	0	0	0	0	7	7	7	7.0	8	8	9	8.3			
		平均 SD			0.0 0.0			0.1 0.3				6.9 1.1					7.3 0.9		
T03	GCGT3-TG4T-5Chol 5000 ng	11442	0	0	0	0	0	0	6	6	7	6.3	7	7	8	7	7.3		
		11444	0	0	0	0	0	0	5	5	5	5.0	6	6	6	6	6.0		
		11446	0	0	0	0	0	0	5	4	5	4.7	5	5	6	6	5.3		
		11448	0	0	0	0	0	0	7	7	7	7.0	8	8	9	8.3			
		11450	0	0	0	0	0	0	6	5	5	5.3	6	6	7	6	6.3		
		11452	0	0	0	0	0	0	6	5	6	5.7	7	7	7	7	7.0		
		11454	0	0	0	0	0	0	7	6	6	6.3	7	6	7	6	6.7		
		11456	0	0	0	0	0	0	6	6	6	6.0	6	6	6	6	6.0		
		11458	0	0	0	0	0	0	6	5	6	5.7	6	6	7	6	6.3		
		11460	0	0	0	0	0	0	7	6	7	6.7	7	7	8	7	7.3		
		平均 SD			0.0 0.0			0.0 0.0				5.9 0.7					6.7 0.9		

ODN2，GCGT3-TG4T

【0158】 表示為100 ng、1000 ng以及5000 ng ODN1劑量組的Log₂力價的個別HI結果顯示於表11中。與經稀釋NDV疫苗組的平均力價相比，這些組別的平均HI力價以及標準差顯示於圖16 (pv第14與21天)以及圖17 (所有數據)中。

【0159】 相較於經稀釋NDV疫苗，ODN2，GCGT3-TG4T組顯示HI力價明顯較高(平均HI力價：4.8 Log₂/SD 1.0)。在免疫接種之後第14天，全部三種劑量的實際情況為：100 ng：平均HI力價7.1 Log₂/SD 1.2 (p=0.0003)，1000 ng：平均HI力價6.4 Log₂/SD 0.7 (p=0.0027)以及5000 ng：平均HI力價6.1 Log₂/SD 1.1 (p=0.0236)。在第21天，當與NDV疫苗相比較時(HI力價6.2 Log₂/SD 1.0)，僅於100 ng劑量觀察到顯著差異，其中平均HI力價為7.6 Log₂/SD 0.8 (p=0.0083)。1000 ng與5000 ng的平均HI力價分別為7.1 Log₂/0.6

($p=0.0696$)與 $7.2 \text{ Log}_2/\text{SD} 1.0$ ($p=0.0956$)(圖16)。

表11：

T04	GCGT3-TG4T 100 ng	11462	0	0	0	0	0	0	7	6	7	6.7	7	7	8	7.3
		11464	0	0	0	0	0	0	8	7	8	7.7	7	8	8	7.7
		11466	0	0	0	0	0	0	7	6	6	6.3	8	8	7	7.7
		11468	0	0	0	0	0	0	8	7	8	7.7	8	9	8	8.3
		11470	0	0	0	0	0	0	7	6	7	6.7	7	7	7	7.0
		11472	0	0	0	0	0	0	10	10	9	9.7	10	9	8	9.0
		11474	0	0	0	0	0	0	7	6	6	6.3	7	7	7	7.0
		11476	0	0	0	0	0	0	6	5	5	5.3	7	7	6	6.7
		11478	0	0	0	0	0	0	8	6	6	6.7	7	7	7	7.0
		11480	0	0	0	0	0	0	9	8	7	8.0	9	9	8	8.7
		平均 SD			0.0 0.0			0.0 0.0				7.1 1.2				7.6 0.8
T05	GCGT3-TG4T 1000 ng	11482	0	0	0	0	0	0	6	6	6	6.0	7	7	7	7.0
		11484	0	0	0	0	0	0	6	6	7	6.3	7	7	7	7.0
		11486	0	0	0	0	0	0	6	6	6	6.0	7	7	7	7.0
		11488	0	0	0	0	0	0	6	8	6	6.7	8	8	8	8.0
		11490	0	0	0	0	0	0	5	5	5	5.0	6	6	6	6.0
		11492	0	0	0	0	0	0	7	7	7	7.0	7	7	8	7.3
		11494	0	0	0	0	0	0	7	7	7	7.0	7	7	7	7.0
		11496	0	0	0	0	0	0	6	6	6	6.0	7	8	7	7.3
		11498	0	0	0	0	0	0	8	7	7	7.3	9	7	8	8.0
		11500	0	0	0	0	0	0	7	6	6	6.3	7	6	7	6.7
		平均 SD			0.0 0.0			0.0 0.0				6.4 0.7				7.1 0.6
T06	GCGT3-TG4T 5000 ng	11502	0	0	0	0	0	0	8	7	7	7.3	10	8	9	9.0
		11504	0	0	0	0	0	0	7	7	6	6.7	8	7	7	7.3
		11506	0	0	0	0	0	0	7	6	6	6.3	7	6	7	6.7
		11508	0	0	0	0	0	0	6	5	5	5.3	8	6	7	7.0
		11510	0	0	0	0	0	0	8	7	7	7.3	9	8	8	8.3
		11512	0	0	0	0	0	0	8	6	7	7.0	9	7	8	8.0
		11514	0	0	0	0	0	0	5	5	5	5.0	6	6	7	6.3
		11516	0	0	0	0	0	0	7	6	6	6.3	7	7	7	7.0
		11518	0	0	0	0	0	0	6	5	5	5.3	7	6	8	7.0
		11520	0	0	0	0	0	0	4	4	4	4.0	6	5	6	5.7
		平均 SD			0.0 0.0			0.0 0.0				6.1 1.1				7.2 1.0

ODN3, 2006-PTO

【0160】 表示為100 ng、1000 ng以及5000 ng ODN1劑量組的測量

Log2力價的個別HI結果顯示於表12中。在三重複HI分析進行期間，動物11570於第21天觀察到異常結果，這非常有可能是由於抽吸誤差所致(未添加足夠的AF)，且因而最終分析刪去這個結果(表12中被強調)。故，就這隻動物還有日期來說，平均HI力價是基於二重複測量結果。

【0161】 與經稀釋NDV疫苗組的平均力價相比，這些組別的平均HI力價以及標準差顯示於圖18 (pv第14與21天)以及圖19 (所有數據)中。

【0162】 相較於經稀釋NDV疫苗，ODN3, 2006-PTO組顯示HI力價明顯較高(平均HI力價： $4.8 \text{ Log}_2/\text{SD} 1.0$)。在免疫接種之後第14天，兩個劑

量的實際情況為：1000 ng：平均HI力價：6.3 Log2/SD 1.2 (p=0.0081)以及5000 ng：平均HI力價：6.2 Log2/SD 0.8 (p=0.0059)。100 ng劑量的平均HI力價為5.3 Log2/SD 0.5 (p=0.2090)。在pv第21天，僅在5000 ng測量到顯著差異：平均HI力價7.3 Log2/SD 0.6 (p=0.0296)。當與NDV疫苗(HI力價6.2 Log2/SD 1.0)相比較時，在100 ng與1000 ng劑量下觀察到沒有顯著差異，其中平均HI力價分別為6.6 Log2/SD 0.5 (p=0.7183)以及6.8 Log2/SD 1.1 (p=0.1685)(圖18)。

表12：

T07	2006-PTO 100 ng	11522	0	0	0	0	0	6	5	5	5.3	6	6	6	6.0
		11524	0	0	0	0	0	5	5	6	5.3	6	6	6	6.0
		11526	0	0	0	0	0	6	5	6	5.7	7	7	7	7.0
		11528	0	0	0	0	0	5	5	5	5.0	6	7	6	6.3
		11530	0	0	0	0	0	6	5	7	6.0	7	7	7	7.0
		11532	0	0	0	0	0	5	5	5	5.0	5	6	6	5.7
		11534	0	0	0	0	0	5	5	6	5.3	7	7	7	7.0
		11536	0	0	0	0	0	5	5	6	5.3	7	7	7	7.0
		11538	0	0	0	0	0	4	4	5	4.3	7	6	7	6.7
		11540	0	0	0	0	0	6	5	6	5.7	7	7	7	7.0
		平均 SD			0.0 0.0			0.0 0.0			5.3 0.5				6.6 0.5
T08	2006-PTO 1000 ng	11542	0	0	0	0	0	6	5	6	5.7	6	6	7	6.3
		11544	0	0	0	0	0	6	4	6	5.3	7	7	7	7.0
		11546	0	0	0	0	0	4	4	5	4.3	4	5	4	4.3
		11548	0	0	0	0	0	5	5	6	5.3	6	6	7	6.3
		11550	0	0	0	0	0	7	7	7	7.0	7	7	8	7.3
		11552	0	0	0	0	0	7	7	8	7.3	7	7	8	7.3
		11554	0	0	0	0	0	8	8	9	8.3	8	8	9	8.3
		11556	0	0	0	0	0	6	6	6	6.0	6	6	6	6.0
		11558	0	0	0	0	0	7	7	7	7.0	7	7	8	7.3
		11560	0	0	0	0	0	7	7	7	7.0	8	8	8	8.0
		平均 SD			0.0 0.0			0.0 0.0			6.3 1.2				6.8 1.1
T09	2006-PTO 5000 ng	11562	0	0	0	0	0	6	6	6	6.0	7	7	8	7.3
		11564	0	0	0	0	0	6	6	7	6.3	7	7	8	7.3
		11566	0	0	0	0	0	6	6	7	6.3	7	7	7	7.0
		11568	0	0	0	0	0	6	6	7	6.3	7	7	7	7.0
		11570	0	0	0	0	0	5	5	6	5.3	7	7	7	7.0
		11572	0	0	0	0	0	6	6	7	6.3	7	8	8	7.7
		11574	0	0	0	0	0	5	5	6	5.3	6	7	7	6.7
		11576	0	0	0	0	0	8	8	9	8.3	8	10	9	9.0
		11578	0	0	0	0	0	6	6	7	6.3	7	7	7	7.0
		11580	0	0	0	1	1	5	5	7	5.7	7	7	8	7.3
		平均 SD			0.0 0.0			0.1 0.3			6.2 0.8				7.3 0.6

對照組

【0163】 表示為10 μ g以及100 μ g聚I:C劑量組、經稀釋與未稀釋NDV疫苗以及陰性對照組的Log2力價的個別HI結果顯示於表13中。與經稀釋NDV疫苗組的平均力價相比，這些組別的平均HI力價以及標準差顯示於圖

20 (pv第14與21天)以及圖21 (所有數據)中。

【0164】 關於聚I : C陽性對照組，當與NDV疫苗(6.2 Log2/SD 1.0)相較時，僅於第21天在100 μg 劑量下觀察到HI力價顯著較高(HI力價7.5 Log2/SD 0.4)。10 μg 與100 μg 劑量組在pv第14天的平均HI力價分別為5.8 Log2/SD 1.3 ($p=0.1859$)與5.5 Log2/SD 0.8 ($p=0.1609$)。10 μg 劑量組在pv第21天pv的平均HI力價為6.4 Log2/SD 1.3 ($p=0.7273$)。相較於在免疫接種之後第14與21天的經稀釋NDV組(分別為4.8/SD 1.0與6.2 Log2/ SD 1.0)，未稀釋NDV疫苗(8.3/SD 0.5以及8.5 Log2/SD 0.7)與陰性對照組之間觀察到顯著差異($p<0.0001$)(圖20)。

表13：

T10	次優疫苗 (1:50)	11582	0	0	0	0	0	4	4	4	4.0	6	5	6	5.7		
		11584	0	0	0	0	0	5	6	5	5.3	7	7	7	7.0		
		11586	0	0	0	0	0	5	5	6	5.3	5	5	6	5.3		
		11588	0	0	0	0	0	6	6	7	6.3	7	6	8	7.0		
		11590	0	0	0	0	0	4	4	5	4.3	6	6	6	6.0		
		11592	0	0	0	0	0	5	5	5	5.0	7	7	8	7.3		
		11594	0	0	0	0	0	4	4	5	4.3	6	7	8	7.0		
		11596	0	0	0	0	0	6	6	7	6.3	7	7	8	7.3		
		11598	0	0	0	0	0	4	4	4	4.0	4	4	5	4.3		
		11600	0	0	0	0	0	3	3	4	3.3	5	5	6	5.3		
		平均 SD			0.0 0.0			0.0 0.0			4.8 1.0				6.2 1.0		
T11	未稀釋疫苗	11602	0	0	0	0	0	8	8	8	8.0	9	9	10	9.3		
		11604	0	0	0	0	0	9	9	8	8.7	8	9	10	9.0		
		11606	0	0	0	0	0	7	7	8	7.3	8	8	9	8.3		
		11608	0	0	0	0	0	8	9	9	8.7	9	9	10	9.3		
		11610	0	0	0	0	0	9	9	9	9.0	10	9	10	9.7		
		11612	0	0	0	0	0	8	8	9	8.3	8	8	8	8.0		
		11614	0	0	0	0	0	9	8	9	8.7	8	7	8	7.7		
		11616	0	0	0	0	0	8	8	8	8.0	7	8	8	7.7		
		11618	0	0	0	2	3	2.5	9	8	8	8.3	8	8	9	8.3	
		11620	0	0	0	0	0	8	8	8	8.0	8	8	8	8.0		
		平均 SD			0.0 0.0			0.3 0.8			8.3 0.5				8.5 0.7		
T12	陰性對照	11622	0	0	0	0	0	0	1	1	0.7	0	0	1	0.3		
		11624	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0	0	0	0.0		
		11626	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0	0	0	0.0		
		11628	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0	0	0	0.0		
		11630	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0	0	0	0.0		
		11632	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0	0	0	0.0		
		11634	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0	0	0	0.0		
		11636	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0	0	0	0.0		
		11638	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0	0	0	0.0		
		11640	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0	0	0	0.0		
		平均 SD			0.0 0.0			0.0 0.0			0.1 0.2				0.0 0.1		
T13	聚 I : C 10 µg	11642	0	0	0	0	0	4	4	4	4.0	4	4	4	4.0		
		11644	0	0	0	0	0	6	6	6	6.0	7	7	7	7.0		
		11646	0	0	0	0	0	7	7	8	7.3	8	8	8	8.0		
		11648	0	0	0	0	0	5	4	5	4.7	5	6	6	6.0		
		11650	0	0	0	0	0	5	5	5	5.0	6	6	6	6.0		
		11652	0	0	0	0	0	7	7	7	7.0	7	7	7	7.0		
		11654	0	0	0	0	0	6	6	7	6.3	7	7	7	7.0		
		11656	0	0	0	0	0	4	4	4	4.0	5	5	5	5.0		
		11658	0	0	0	0	0	8	7	8	7.7	8	8	8	8.0		
		平均 SD			0.0 0.0			0.0 0.0			5.8 1.3				6.4 1.3		
T14	聚 I : C 100 µg	11660	0	0	0	0	0	4	4	4	4.0	7	7	7	7.0		
		11662	0	0	0	0	0	4	4	5	4.3	7	7	7	7.0		
		11664	0	0	0	0	0	5	5	5	5.0	7	7	7	7.0		
		11666	0	0	0	0	0	6	6	6	6.0	7	7	8	7.3		
		11668	0	0	0	0	0	6	6	7	6.3	8	8	8	8.0		
		11670	0	0	0	0	0	6	6	6	6.0	7	7	8	7.3		
		11672	0	0	0	0	0	6	6	5	5.7	7	8	9	8.0		
		11674	0	0	0	0	0	6	6	5	5.7	8	8	8	8.0		
		11676	0	0	0	1	0	0.5	7	7	6	6.7	8	8	8	8.0	
		平均 SD			0.0 0.0			0.1 0.2			5.5 0.8				7.5 0.4		

結論

【0165】目標是要研究三種不同免疫刺激劑的佐劑活性。這是透過在用含有次優濃度不活化NDV與不同濃度之三種免疫刺激劑之一者的油乳液疫苗來免疫接種之後測量血清學反應進行測試。

【0166】探究以下免疫刺激劑：

ODN1 : [CholTEG]-TGGGGTTTTTGCCTTTGCGTTTTGCGTTTT

(「GCGT3-TG4T-5Chol」) (SEQ ID NO : 1) ([CholTEG]=5'-三乙二醇連
結的膽固醇基修飾) ,

ODN2 : TGGGGTTTTTTGCGTTTGCGTTTGCGTTT

(「GCGT3-TG4T」) (SEQ ID NO : 252) ,

ODN3 : tcgtcgtttgcgtttgtcgtt (「2006-PTO」) (SEQ ID NO :
3) 。

【0167】 ODN1以及ODN2免疫的骨架是磷酸二酯連接，而ODN3的骨
架是硫代磷酸酯連接。各個ODN的效力是分別在三種不同濃度下進行測
定：100 ng、1000 ng與5000 ng，它們被補充至次優NDV疫苗中。

【0168】 在第0天(免疫接種之前)、免疫接種後第7天、第14天及第21
天測量血清學反應，以探究添加這些免疫刺激劑是否也會引起較早的免疫
反應。在第0天以及免疫接種後(pv)第7天，偵測到沒有對抗NDV的抗體含
量，除了在第7天於未稀釋NDV疫苗組中的一隻動物(#11618)以外。

【0169】 以Log2 HI力價表示的血清學反應顯示，未稀釋與次優NDV
疫苗之間在pv第14與21天有顯著差異($p<0.0001$)，表示50倍的稀釋係數就足
以產生次優疫苗劑量。

【0170】 在整個研究期間陰性對照組維持陰性，表示免疫刺激劑在沒
有NDV疫苗的情況下不會造成非特異性免疫反應。

【0171】 相較於原生NDV疫苗，陽性對照聚I : C 100 μ g劑量組在第
21天顯示HI力價明顯較高($p=0.0053$)，表示這個劑量組可用作為有效的陽性
對照組。

【0172】 當相較於經稀釋NDV疫苗時，GCGT3-TG4T-5Chol (ODN1)
組在pv第14天時就所有三個劑量均顯示HI力價明顯較高：100 ng
($p=0.0214$)、1000 ng ($p=0.0003$)以及5000 ng ($p=0.0243$)。然而在pv第21天，

觀察到沒有顯著差異。

【0173】 當相較於經稀釋NDV疫苗時，GCGT3-TG4T (ODN2)組在pv第14天時就所有三個劑量均顯示HI力價明顯較高：100 ng (p=0.0003)、1000 ng (p=0.0027)以及5000 ng (p=0.0236)。在第21天，僅於100 ng劑量組測量到顯著差異(p=0.0083)。

【0174】 相較於經稀釋NDV疫苗，2006-PTO (ODN3)組在pv第14天時就兩個劑量顯示HI力價明顯較高：1000 ng (p=0.0081)以及5000 ng (p=0.0059)。在pv第21天，僅於5000 ng劑量組測量到顯著差異(p=0.0296)。

【0175】 總結，當分別與原生NDV疫苗在pv第14天與第21天的2.3 Log2與1.4 Log2相比較時，在100 ng GCGT3-TG4T (ODN2)劑量組觀察到最高的平均HI力價7.1 Log2 (pv第14天)以及7.6 Log2 (pv第21天)，指出力價增加。

【0176】 1000 ng GCGT3-TG4T-5Chol (ODN1)劑量組在pv第14天與第21天的力價分別為6.9 Log2與7.3 Log2，與ODN2組幾乎相似。在pv第14天，ODN1與ODN2組之間觀察到沒有顯著差異(p=0.7513)。

【0177】 5000 ng 2006-PTO (ODN3)劑量組在pv第14天與第21天的力價分別為6.2 Log2與7.3 Log2。在pv第14天，ODN3組明顯(p=0.0300)不同於ODN1與ODN2組(圖22及圖23)。

【0178】 在pv第21天，所有ODN組別之間未顯示有顯著差異。

【0179】 因此，這些結果指明：所有ODN都能夠明顯增加血清學反應，特別在是免疫接種之後第14天，也指明免疫較早發生。

具體例

【0180】 關於更多說明，在下面提供本揭示內容的額外非限制性具體例。

【0181】 舉例而言，具體例1是一種免疫刺激組成物，其包含：

 免疫調節劑組成物，其包含核酸質體以及脂質體遞送媒劑；以及

 免疫刺激寡核苷酸，其具有至少一個CpG模體以及在該免疫刺激寡核苷酸的5'處或鄰近5'端的富含鳥嘌呤核苷酸序列。

【0182】 具體例2是具體例1之免疫刺激組成物，其中該免疫調節劑組成物以及免疫刺激寡核苷酸以協同有效量存在。

【0183】 具體例3是具體例1或2之免疫刺激組成物，其中該免疫刺激寡核苷酸包含細胞質核酸監視分子的配位體。

【0184】 具體例4是具體例3之免疫刺激組成物，其中該免疫細胞質核酸監視分子為類鐸受體(TLR)。

【0185】 具體例5是具體例3或4之免疫刺激組成物，其中細胞質核酸監視分子為TLR21。

【0186】 具體例6是前面具體例中任一項之免疫刺激組成物，其中該免疫調節劑組成物具有約200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的核酸濃度。

【0187】 具體例7是前面具體例中任一項之免疫刺激組成物，其中免疫刺激寡核苷酸的濃度介於約10 μM 與0.5 μM 。

【0188】 具體例8是具體例7之免疫刺激組成物，其中免疫刺激寡核苷酸的濃度為約2 μM 。

【0189】 具體例9是前面具體例中任一項之免疫刺激組成物，其中免疫調節劑組成物的核酸質體濃度大於免疫刺激寡核苷酸的濃度。

【0190】 具體例10是前面具體例中任一項之免疫刺激組成物，其中免疫調節劑組成物以非細胞毒性量存在。

【0191】 具體例11是前面具體例中任一項之免疫刺激組成物，其進一步包含醫藥載劑。

【0192】 具體例12是前面具體例中任一項之免疫刺激組成物，其中該脂質體遞送媒劑包含多層囊泡脂質、擠壓脂質或兩者。

【0193】 具體例13是前面具體例中任一項之免疫刺激組成物，其中該脂質體遞送媒劑為陽離子性。

【0194】 具體例14是具體例13之免疫刺激組成物，其中陽離子脂質體遞送媒劑包含選自由下列組成之群的脂質對：N-[1-(2,3-二油基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化銨(DOTMA)以及膽固醇；N-[1-(2,3-二油醯基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化銨(DOTAP)以及膽固醇；1-[2-(油醯基氧基)乙基]-2-油基-3-(2-羥基乙基)-氯化咪唑啉(DOTIM)以及膽固醇；與二甲基雙十八烷基溴化銨(DDAB)以及膽固醇。

【0195】 具體例15是前面具體例中任一項之免疫刺激組成物，其中該核酸質體為非編碼。

【0196】 具體例16是前面具體例中任一項之免疫刺激組成物，其中該核酸質體為細菌衍生的。

【0197】 具體例17是前面具體例中任一項之免疫刺激組成物，其中該核酸質體具免疫性。

【0198】 具體例18是具體例1-17中任一項之免疫刺激組成物，其中該核酸質體與SEQ ID NO：265具有至少75%序列一致性。

【0199】 具體例19是具體例1-17中任一項之免疫刺激組成物，其中該核酸質體與SEQ ID NO：266具有至少75%序列一致性。

【0200】 具體例20是具體例1-17中任一項之免疫刺激組成物，其中該核酸質體與SEQ ID NO：268具有至少75%序列一致性。

【0201】具體例21是前面具體例中任一項之免疫刺激組成物，其中該富含鳥嘌呤核苷酸序列包含第一複數個鳥嘌呤核苷酸。

【0202】具體例22是具體例21之免疫刺激組成物，其中第一複數個鳥嘌呤核苷酸包含三至八個鳥嘌呤核苷酸。

【0203】具體例23是具體例21或22之免疫刺激組成物，其中該免疫刺激寡核苷酸包含SEQ ID NO：16、17、18、19、20、21、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、77、78、81、82、85、86、89、90、92、93、96、97、100、102、104、106、108、143或1。

【0204】具體例24是具體例21或22之免疫刺激組成物，其在第一複數個鳥嘌呤核苷酸下游進一步包含第二複數個鳥嘌呤核苷酸。

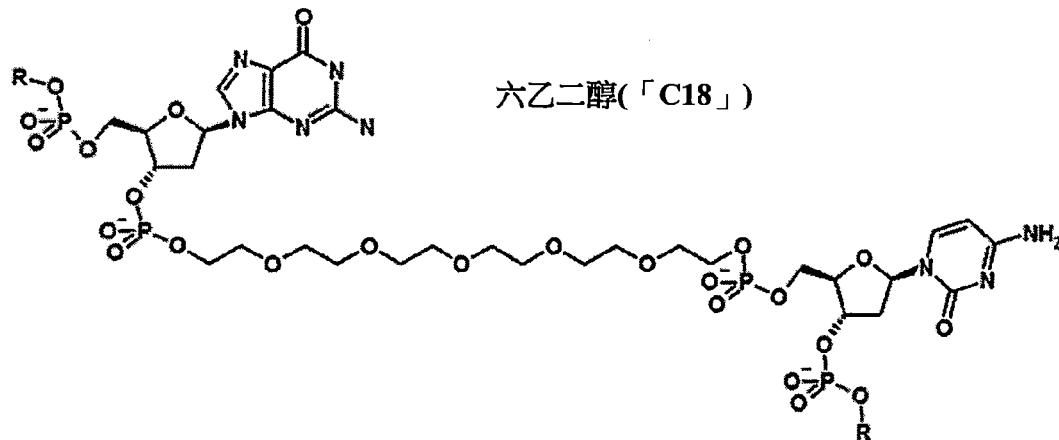
【0205】具體例25是具體例24之免疫刺激組成物，其中該免疫刺激寡核苷酸包含SEQ ID NO：141、142、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203，或GCGT-Gwire3。

【0206】具體例26是具體例24或25之免疫刺激組成物，其中該第一複數個鳥嘌呤核苷酸以及第二複數個鳥嘌呤核苷酸被至少兩個核苷酸分隔開。

【0207】具體例27是具體例21至26中任一項之免疫刺激組成物，其中第一複數個鳥嘌呤核苷酸以及至少一個CpG模體被至少3個核苷酸分隔開。

【0208】具體例28是具體例21至27之免疫刺激組成物，其中第一複數個鳥嘌呤核苷酸以及至少一個CpG模體被六乙二醇、四乙二醇、丙二醇或其衍生物分隔開。

【0209】具體例29是具體例28之免疫刺激組成物，其中六乙二醇的結構為：



【0210】具體例30是前面具體例中任一項之免疫刺激組成物，其中該免疫刺激寡核苷酸進一步包含複數個CpG模體，複數個CpG模體的每一個CpG模體與複數個CpG模體的其他者是被一個間隔子分隔開。

【0211】具體例31是具體例30之免疫刺激組成物，其中該間隔子包含至少一個核苷酸或核苷酸類似物。

【0212】具體例32是具體例31之免疫刺激組成物，其中該間隔子包含去氧核糖磷酸酯橋接。

【0213】具體例33是具體例32之免疫刺激組成物，其中去氧核糖磷酸酯橋接為無鹼基。

【0214】具體例34是具體例31之免疫刺激組成物，其中該間隔子包含一個碳鍵。

【0215】具體例35是具體例34之免疫刺激組成物，其中該碳鍵是衍生自1,3-丙二醇。

【0216】具體例36是具體例31之免疫刺激組成物，其中該間隔子包含重複化學單元。

【0217】具體例37是具體例36之免疫刺激組成物，其中該重複化學單

元為乙二醇。

【0218】 具體例38是前面具體例中任一項之免疫刺激組成物，其中該免疫刺激寡核苷酸包含至少一個核苷酸類似物。

【0219】 具體例39是前面具體例中任一項之免疫刺激組成物，其中該免疫刺激寡核苷酸進一步包含磷酸二酯骨架。

【0220】 具體例40是具體例1-38中任一項之免疫刺激系組成物，其中該免疫刺激寡核苷酸進一步包含硫代磷酸酯骨架。

【0221】 具體例41是前面具體例中任一項之免疫刺激組成物，其中該免疫刺激寡核苷酸包含一脂質部分。

【0222】 具體例42是具體例41之免疫刺激組成物，其中該脂質部分為膽固醇基。

【0223】 具體例43是具體例41至42中任一項之免疫刺激組成物，其中該脂質部分在免疫刺激寡核苷酸的5'端處或鄰近5'端。

【0224】 具體例44是前面具體例中任一項之免疫刺激組成物，其在5'端、3'端或兩者處包含CpG序列要素。

【0225】 具體例45是具體例44之免疫刺激組成物，其具有至少兩個CpG序列要素。

【0226】 具體例46是具體例44或45之免疫刺激組成物，其中CpG序列要素為GCGA、GCGG、ACGC、CCGC、GCGT或TCGC。

【0227】 具體例47是製備前面具體例中任一項之免疫刺激組成物的方法，包含：

組合免疫調節劑組成物以及免疫刺激寡核苷酸，以形成免疫刺激組成物；

將該免疫刺激組成物離心以產生上清液與團粒；以及

分離該團粒。

【0228】具體例48是用於刺激類鐸受體21 (TLR21)的方法，包含：

投與免疫刺激寡核苷酸以及免疫調節劑組成物，其中該免疫刺激寡核苷酸具有至少一個CpG模體以及在該免疫刺激寡核苷酸的5'端處或鄰近5'端的富含鳥嘌呤核苷酸序列，且其中該免疫調節劑組成物包含非編碼核酸質體以及脂質遞送媒劑。

【0229】具體例49是具體例48之方法，其中該免疫調節劑組成物以及免疫刺激寡核苷酸以協同有效量存在。

【0230】具體例50是具體例48或49之方法，其中該免疫刺激寡核苷酸包含TLR21的配位體。

【0231】具體例51是具體例48至50中任一項之方法，其中該免疫調節劑組成物的核酸質體濃度為約200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

【0232】具體例52是具體例48至51中任一項之方法，其中該免疫刺激寡核苷酸的濃度介於約10 μM 與0.5 μM 。

【0233】具體例53是具體例52之方法，其中免疫刺激寡核苷酸的濃度為約2 μM 。

【0234】具體例54是具體例48至53中任一項之方法，其中免疫調節劑組成物的核酸質體濃度大於免疫刺激寡核苷酸的濃度。

【0235】具體例55是具體例48至54中任一項之方法，其中免疫調節劑組成物以非細胞毒性量存在。

【0236】具體例56是具體例48至55中任一項之方法，其中該免疫調節劑組成物進一步包含醫藥載劑。

【0237】具體例57是具體例48至56中任一項之方法，其中該脂質體遞送媒劑包含多層囊泡脂質、擠壓脂質或兩者。

【0238】 具體例58是具體例48至57中任一項之方法,其中該脂質體遞送媒劑為陽離子性。

【0239】 具體例59是具體例58之方法,其中陽離子脂質體遞送媒劑包含選自由下列組成之群的脂質對:N-[1-(2,3-二油基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化銨(DOTMA)以及膽固醇;N-[1-(2,3-二油醯基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化銨(DOTAP)以及膽固醇;1-[2-(油醯基氧基)乙基]-2-油基-3-(2-羥基乙基)-氯化咪唑啉(DOTIM)以及膽固醇;與二甲基雙十八烷基溴化銨(DDAB)以及膽固醇。

【0240】 具體例60是具體例48至59中任一項之方法,其中該核酸質體為非編碼的。

【0241】 具體例61是具體例48至60中任一項之方法,其中該核酸質體為細菌衍生的。

【0242】 具體例62是具體例48至61中任一項之方法,其中該核酸質體具免疫性。

【0243】 具體例63是具體例48至62中任一項之方法,其中該核酸質體與SEQ ID NO: 265具有至少75%序列一致性。

【0244】 具體例64是具體例48至62中任一項之方法,其中該核酸質體與SEQ ID NO: 266具有至少75%序列一致性。

【0245】 具體例65是具體例48至62中任一項之方法,其中該核酸質體與SEQ ID NO: 268具有至少75%序列一致性。

【0246】 具體例66是具體例48至65中任一項之方法,其中該富含鳥嘌呤核苷酸序列包含第一複數個鳥嘌呤核苷酸。

【0247】 具體例67是具體例66之方法,其中第一複數個鳥嘌呤核苷酸包含三至八個鳥嘌呤核苷酸。

【0248】 具體例68是具體例66或67之方法,其中該免疫刺激寡核苷酸包含SEQ ID NO : 1、16、17、18、19、20、21、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、77、78、81、82、85、86、89、90、92、93、96、97、100、102、104、106、108或143。

【0249】 具體例69是具體例48至68中任一項之方法,其中該免疫刺激寡核苷酸在第一複數個鳥嘌呤核苷酸下游進一步包含第二複數個鳥嘌呤核苷酸。

【0250】 具體例70是具體例69之方法,其中該免疫刺激寡核苷酸包含SEQ ID NO : 141、142、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203,或GCGT-Gwire3。

【0251】 具體例71是具體例69或70之方法,其中該第一複數個鳥嘌呤核苷酸、第二複數個鳥嘌呤核苷酸或兩者在活體外、活體內或活體內活體外兩者促使四級結構形成。

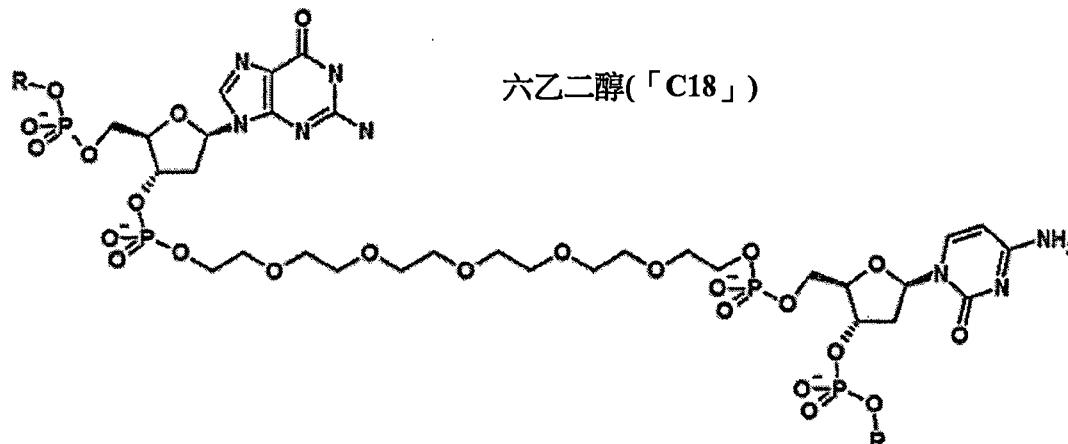
【0252】 具體例72是具體例70或71之方法,其中該第一及第二複數個鳥嘌呤核苷酸促使具有G-線構形的四級結構形成。

【0253】 具體例73是具體例70至72中任一項之方法,其中該第一複數個鳥嘌呤核苷酸與第二複數個鳥嘌呤核苷酸被至少兩個核苷酸分隔開。

【0254】 具體例74是具體例67至73中任一項之方法,其中第一複數個鳥嘌呤核苷酸以及至少一個CpG模體被至少3個核苷酸分隔開。

【0255】 具體例75是具體例67至73中任一項之方法,其中第一複數個鳥嘌呤核苷酸以及至少一個CpG模體被一個六乙二醇分隔開。

【0256】具體例76是具體例75之方法，其中該六乙二醇的結構為：



【0257】具體例77是具體例48至76中任一項之方法，其中該免疫刺激寡核苷酸進一步包含複數個CpG模體，複數個CpG模體的每一個CpG模體是被一個間隔子分隔開。

【0258】具體例78是具體例77之方法，其中該間隔子包含至少一個核苷酸或核苷酸衍生物。

【0259】具體例79是具體例78之方法，其中該間隔子包含去氧核糖磷酸酯橋接。

【0260】具體例80是具體例79之方法，其中去氧核糖磷酸酯橋接為無鹼基。

【0261】具體例81是具體例78之方法，其中該間隔子包含一個碳鏈。

【0262】具體例82是具體例81之方法，其中該碳鏈是衍生自1,3-丙二醇。

【0263】具體例83是具體例78之方法，其中該間隔子包含重複化學單元。

【0264】具體例84是具體例83之方法，其中該重複化學單元為乙二醇。

【0265】具體例85是具體例48至84中任一項之方法，其中該免疫調節

劑組成物、該免疫刺激寡核苷酸或兩者進一步包含至少一個核苷酸類似物。

【0266】 具體例86是具體例48至85中任一項之方法，其中該免疫刺激寡核苷酸進一步包含磷酸二酯骨架。

【0267】 具體例87是具體例48至85中任一項之方法，其中該免疫刺激寡核苷酸進一步包含硫代磷酸酯骨架。

【0268】 具體例88是具體例48至87中任一項之方法，其中該免疫刺激寡核苷酸包含脂質部分。

【0269】 具體例89是具體例88之方法，其中該脂質部分提高免疫刺激寡核苷酸的生物可利用性。

【0270】 具體例90是具體例88或89之方法，其中該脂質部分為膽固醇基。

【0271】 具體例91是具體例88至90中任一項之方法，其中該脂質部分在免疫刺激寡核苷酸的5'端處或鄰近5'端。

【0272】 具體例92是具體例48至91中任一項之方法，其在5'端、3'端或兩者處包含CpG序列要素。

【0273】 具體例93是具體例92之方法，其具有至少兩個CpG序列要素。

【0274】 具體例94是具體例92或93之方法，其中CpG序列要素為GCGA、GCGG、ACGC、CCGC、GCGT或TCGC。

【0275】 具體例95是具體例48至94中任一項之方法，其中該免疫調節劑組成物與該免疫刺激寡核苷酸同時投與。

【0276】 具體例96是在個體體內引起免疫反應的方法，包含向該個體投與具體例1至46中任一項之免疫刺激組成物。

【0277】 具體例97是一種免疫刺激組成物，其包含：

核酸質體以及脂質體遞送媒劑；以及
包含SEQ ID NO：1的免疫刺激寡核苷酸。

【0278】具體例98是具體例97之免疫刺激組成物，其中該核酸質體與SEQ ID NO：265具有至少75%序列一致性。

【0279】具體例99是具體例97之免疫刺激組成物，其中該核酸質體與SEQ ID NO：266具有至少75%序列一致性。

【0280】具體例100是具體例97之免疫刺激組成物，其中該核酸質體與SEQ ID NO：268具有至少75%序列一致性。

【0281】具體例101是具體例97-100中任一項之免疫刺激組成物，其中該脂質體遞送媒劑包含多層囊泡脂質、擠壓脂質或兩者。

【0282】具體例102是具體例101之免疫刺激組成物，其中該脂質體遞送媒劑為陽離子性。

【0283】具體例103是具體例102之免疫刺激組成物，其中陽離子脂質體遞送媒劑包含選自由下列組成之群的脂質對：N-[1-(2,3-二油基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化銨(DOTMA)以及膽固醇；N-[1-(2,3-二油醯基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化銨(DOTAP)以及膽固醇；1-[2-(油醯基氧基)乙基]-2-油基-3-(2-羥基乙基)-氯化咪唑啉(DOTIM)以及膽固醇；與二甲基雙十八烷基溴化銨(DDAB)以及膽固醇。

【0284】具體例104是具體例97-103中任一項之免疫刺激組成物，其中該免疫刺激寡核苷酸進一步包含5'膽固醇基修飾。

【0285】具體例105是具體例104之免疫刺激組成物，其中該5'膽固醇基修飾包含三乙二醇連接子。

【0286】當介紹本揭示內容之要素或其較佳具體例(等)時，冠詞「一(a、an、the)」與「該(said)」意欲表示有一或多個該要素。術語「包含」、「包

括」以及「具有」意欲為含括性且表示除了所列出的要素以外可能有其他要素。

【0287】 關於上文，應理解達到揭示內容的數個目標以及獲得其他有利結果。

【0288】 ,因為可對上文的產物以及方法在不偏離揭示內容的範疇下做出各種變化，期望上面說明含括的所有一切應了解為說明性而不具有限制性涵義。

【符號說明】

無

【生物材料寄存】

國內寄存資訊【請依寄存機構、日期、號碼順序註記】

無

國外寄存資訊【請依寄存國家、機構、日期、號碼順序註記】

無

【序列表】(請換頁單獨記載)

序列表

<110> BAYER ANIMAL HEALTH GMBH

<120> 免疫刺激組成物

<130> BHC 168027

<140>

<141>

<150> EP 17207750.5

<151> 2017-12-15

<150> EP 17207746.3

<151> 2017-12-15

<150> EP 17207740.6

<151> 2017-12-15

<160> 269

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<220>

<223> /註解="5'-經膽固醇基修飾"

<400> 1

tggggttttt tttgcgtttt tgcgttttt cgtttt

36

<210> 2

<400> 2

000

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<220>

<221> 其他特徵

<222> (1)...(24)

<223> /註解="核苷酸之間的硫代磷酸酯鍵聯"

<400> 3

tcgtcgaaaa gtcgttttgtt cgaa

24

<210> 4
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 4
 tcgtcgaaaa gtcgttttgtt cgaa

24

<210> 5
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 5
 tcgtcgaaaa gtcgttttgtt cgatgg

25

<210> 6
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 6
 tcgtcgaaaa gtcgttttgtt cgatgg

26

<210> 7
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 7
 tcgtcgaaaa gtcgttttgtt cgatgggg

27

<210> 8
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源

<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 8
tcgtcgaaaa gtcgttttgt cgtttgggg

28

<210> 9
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註解="人工序列的說明: 合成寡核苷酸"

<400> 9
tcgtcgaaaa gtcgttttgt cgtttgggg

29

<210> 10
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 10
tcgtcgaaaa gtcgttttgt cgtttgggggg

30

<210> 11
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 11
tcgtcgaaaa gtcgttttgt cgtttgggggg g

31

<210> 12
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 12
tcgtcgaaaa gtcgttttgt cgtttgggggg gg

32

<210> 13
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 13
 tcgtcgttt gtcgtttgt cgtt

24

<210> 14
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 14
 gtcgtcgttt tgtcgttttg tcgtt

25

<210> 15
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 15
 ggtcgtcgtt ttgtcgttt gtcgtt

26

<210> 16
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 16
 gggtcgtcgt ttgtcgttt tgtcgtt

27

<210> 17
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 17
 ggggtcgtcg ttttgtcgtt ttgtcgtt

28

<210> 18

<211> 29
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 18
 gggggtcgtc gttttgtcgt tttgtcggt

29

<210> 19
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 19
 ggggggtcgt cgttttgcgt ttttgcgtt

30

<210> 20
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 20
 ggggggggtcgt tcgttttgcgt gttttgtcgt t

31

<210> 21
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 21
 ggggggggtcgt tcgttttgcgt cgttttgcgt tt

32

<210> 22
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 22
 aaaaaatcgt cgttttgcgt ttttgcgtt

30

<210> 23
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 23
 cccccctcgt cgtttgcgt ttttgcgtt 30

<210> 24
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 24
 ttttttcgt cgtttgcgt ttttgcgtt 30

<210> 25
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<220>
 <221> 經修飾鹼基
 <222> (8)..(8)
 <223> 5-甲基-胞嘧啶

<220>
 <221> 經修飾鹼基
 <222> (11)..(11)
 <223> 5-甲基-胞嘧啶

<220>
 <221> 經修飾鹼基
 <222> (19)..(19)
 <223> 5-甲基-胞嘧啶

<220>
 <221> 經修飾鹼基
 <222> (27)..(27)
 <223> 5-甲基-胞嘧啶

<400> 25
 ggggggtcgt cgtttgcgt ttttgcgtt 30

<210> 26
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 26
 ccccccgtct gcttttgat ttttgatgtt

30

<210> 27
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 27
 tttttttcat cattttgat ttttgatgtt

30

<210> 28
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<220>
 <221> 其他特徵
 <222> (1)..(30)
 <223> /註解="核苷酸之間的硫代磷酸酯鍵聯"

<400> 28
 tgggggtcgat cgatggatcgat ttttgatgtt

30

<210> 29
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<220>
 <221> 其他特徵
 <222> (1)..(29)
 <223> /註解="核苷酸之間的硫代磷酸酯鍵聯"

<400> 29
 tcgtcgatgtt gtcgtttgtt cgatgggggg

29

<210> 30
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 30
 agggggtcgt cgttttgtcg ttttgtcgtt 30

<210> 31
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 31
 gaggggtcgt cgttttgtcg ttttgtcgtt 30

<210> 32
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 32
 ggagggtcgt cgttttgtcg ttttgtcgtt 30

<210> 33
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 33
 gggagggtcgt cgttttgtcg ttttgtcgtt 30

<210> 34
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 34	30
ggggagtcgt cgtttgtcg ttttgcgtt	
<210> 35	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 來源	
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"	
<400> 35	30
ggggatcgt cgtttgtcg ttttgcgtt	
<210> 36	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 來源	
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"	
<400> 36	30
aagggtcgt cgtttgtcg ttttgcgtt	
<210> 37	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 來源	
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"	
<400> 37	30
gaagggtcgt cgtttgtcg ttttgcgtt	
<210> 38	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 來源	
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"	
<400> 38	30
ggaagggtcgt cgtttgtcg ttttgcgtt	
<210> 39	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"
 <400> 39
 gggaagtcgt cgtttgtcg ttttgtcgtt 30

<210> 40
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"
 <400> 40
 ggggaatcgt cgtttgtcg ttttgtcgtt 30

<210> 41
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"
 <400> 41
 cgggggtcgt cgtttgtcg ttttgtcgtt 30

<210> 42
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"
 <400> 42
 gcgggggtcgt cgtttgtcg ttttgtcgtt 30

<210> 43
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"
 <400> 43
 ggcgggggtcgt cgtttgtcg ttttgtcgtt 30

<210> 44
 <211> 30

<212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 44
 gggcggtcgt cgtttgtcg ttttgcgtt 30

<210> 45
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 45
 ggggcgtcgt cgtttgtcg ttttgcgtt 30

<210> 46
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 46
 gggggctcgt cgtttgtcg ttttgcgtt 30

<210> 47
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 47
 ccggggctcgt cgtttgtcg ttttgcgtt 30

<210> 48
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 48
 gccgggtcgt cgtttgtcg ttttgcgtt 30

<210> 49
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 49
 ggccggtcgt cgttttgtcg ttttgcgtt 30

<210> 50
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 50
 gggccgtcgt cgttttgtcg ttttgcgtt 30

<210> 51
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 51
 ggggcgtcgt cgttttgtcg ttttgcgtt 30

<210> 52
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 52
 tgggggtcgt cgttttgtcg ttttgcgtt 30

<210> 53
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 53	30
gtggggtcgt cgtttgtcg ttttgcgtt	
<210> 54	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 來源	
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"	
<400> 54	30
gggggttcgt cgtttgtcg ttttgcgtt	
<210> 55	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 來源	
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"	
<400> 55	30
gggtggtcgt cgtttgtcg ttttgcgtt	
<210> 56	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 來源	
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"	
<400> 56	30
gggggttcgt cgtttgtcg ttttgcgtt	
<210> 57	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 來源	
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"	
<400> 57	30
gggggttcgt cgtttgtcg ttttgcgtt	
<210> 58	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	

<221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 58
 ttgggtcgt cgtttgcg tttgtcg 30
 <210> 59
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 59
 gttgggtcgt cgtttgcg tttgtcg 30
 <210> 60
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 60
 gggtgggtcgt cgtttgcg tttgtcg 30
 <210> 61
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 61
 gggtgggtcgt cgtttgcg tttgtcg 30
 <210> 62
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 62
 gggtttcgt cgtttgcg tttgtcg 30
 <210> 63
 <211> 28
 <212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 63

agggtcgtcg ttttgcgtt ttgtcggtt

28

<210> 64

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 64

agggtcgtcg ttttgcgtt ttgtcggtt

28

<210> 65

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 65

ggagtcgtcg ttttgcgtt ttgtcggtt

28

<210> 66

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 66

gggatcgtcg ttttgcgtt ttgtcggtt

28

<210> 67

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 67

cgggtcgtcg ttttgcgtt ttgtcggtt

28

<210> 68		
<211> 28		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<221> 來源		
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"		
<400> 68		
gcggtcgtcg ttttgcgtt ttgtcggt	28	
<210> 69		
<211> 28		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<221> 來源		
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"		
<400> 69		
ggcgtcgtcg ttttgcgtt ttgtcggt	28	
<210> 70		
<211> 28		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<221> 來源		
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"		
<400> 70		
gggctcgtcg ttttgcgtt ttgtcggt	28	
<210> 71		
<211> 28		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<221> 來源		
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"		
<400> 71		
tgggtcgtcg ttttgcgtt ttgtcggt	28	
<210> 72		
<211> 28		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<221> 來源		
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"		
<400> 72		

gtggtcgtcg ttttgcgtt ttgtcgtt

28

<210> 73
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 73
 ggtgtcgtcg ttttgcgtt ttgtcgtt

28

<210> 74
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 74
 gggttcgtcg ttttgcgtt ttgtcgtt

28

<210> 75
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 75
 tccatgacgt tcctgatgct

20

<210> 76
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 76
 tccatgacgt tcctgatgct ggggg

25

<210> 77
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源

<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 77
ggggtccatg acgttcctga tgct

24

<210> 78
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 78
ggggggtcca tgacgttcct gatgct

26

<210> 79
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 79
tccatgacgt tcctgacggt

20

<210> 80
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 80
tccatgacgt tcctgacggtt ggggg

25

<210> 81
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 81
ggggtccatg acgttcctga cggtt

24

<210> 82
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 82
 ggggggtcca tgacgttccct gacgtt 26

<210> 83
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 83
 tcgacgttgc tcgttcgtcg ttc 23

<210> 84
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 84
 tcgacgttgc tcgttcgtcg ttcggggg 28

<210> 85
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 85
 ggggtcgacg ttctcgatc gtcgttc 27

<210> 86
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 86
 ggggggtcga cgttcgtcgat tcgtcgatc 29

<210> 87

<211> 26
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 87
 tcgcgacgtt cgcccgacgt tcggta

26

<210> 88
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 88
 tcgcgacgtt cgcccgacgt tcggtagggg g

31

<210> 89
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 89
 ggggtcgcga cgttcgcccg acgttcggta

30

<210> 90
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 90
 ggggggtcgc gacgttcgcc cgacgttcgg ta

32

<210> 91
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 91
 tcgtcggtttt cggcgcgccg cg

22

<210> 92	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 來源	
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"	
<400> 92	26
ggggtcgtcg ttttcggcgc gcgccg	
<210> 93	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 來源	
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"	
<400> 93	28
ggggggtcgt cgttttcggc gcgcgccg	
<210> 94	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 來源	
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"	
<400> 94	25
tcttcgtcgt tcgaacgacg ttgat	
<210> 95	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 來源	
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"	
<400> 95	30
tcttcgtcgt tcgaacgacg ttgatgggg	
<210> 96	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 來源	
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"	

<400> 96	29
ggggtcgtcg tcgttcgaac gacgttgat	
<210> 97	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 來源	
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"	
<400> 97	31
gggggtcgt cgtcgttcga acgacgttga t	
<210> 98	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 來源	
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"	
<400> 98	22
tcgtcggtt cgttttgcgt tt	
<210> 99	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 來源	
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"	
<400> 99	27
tcgtcggtt cgttttgcgt ttggggg	
<210> 100	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 來源	
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"	
<400> 100	28
gggggtcgt cgttgcgtt ttgtcgat	
<210> 101	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

<220>		
<221>	來源	
<223>	/註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"	
<400> 101		19
gatctcgctc	gctcgctat	
<210> 102		
<211> 25		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<221>	來源	
<223>	/註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸e"	
<400> 102		25
gggggggatc	tcgctcgctc	gctat
<210> 103		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<221>	來源	
<223>	/註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"	
<400> 103		21
tcgtcgacgt	cgttcgttct	c
<210> 104		
<211> 27		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<221>	來源	
<223>	/註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"	
<400> 104		27
ggggggtcgt	cgacgtcggt	cgttctc
<210> 105		
<211> 29		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<221>	來源	
<223>	/註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"	
<400> 105		29
tccatcgacgt	tcctgcagtt	cctgacgtt
<210> 106		
<211> 35		

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 106
gggggttcca tgacgttccct gcagttccctg acgtt

35

<210> 107
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 107
tccacgacgt ttgcacgtt

20

<210> 108
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 108
gggggttcca cgacgttttc gacgtt

26

<210> 109
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 109
tttttcgtcg ttttgcgtt ttgtcggtt

28

<210> 110
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 110
tttaggtcgt cgttttgtcg ttttgcgtt

30

<210> 111		
<211> 36		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<221> 來源		
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"		
<400> 111		36
tttagggttag ggtcgctcg tt tggtcgttt gtcgtt		
<210> 112		
<211> 32		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<221> 來源		
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"		
<400> 112		32
ttttgggttc gtcgtttgt cgtttgtcg tt		
<210> 113		
<211> 32		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<221> 來源		
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"		
<400> 113		32
ggggtttttc gtcgtttgt cgtttgtcg tt		
<210> 114		
<211> 36		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<221> 來源		
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"		
<400> 114		36
ggggttttgg ggtcgctcg tt tggtcgttt gtcgtt		
<210> 115		
<211> 34		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<221> 來源		
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"		

<400> 115		
ttagggttt tcgtcgttt gtcgtttgt cgtt		34
<210> 116		
<211> 40		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<221> 來源		
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"		
<400> 116		
ttagggttag gtttttcgt cgttttgct ttttgcgtt		40
<210> 117		
<211> 44		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<221> 來源		
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"		
<400> 117		
tgtgggtgtg tgtgggttt tcgtcgttt gtcgtttgt cgtt		44
<210> 118		
<211> 33		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<221> 來源		
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"		
<400> 118		
ggagggtttt cgtcggtttg tcgtttgtc gtt		33
<210> 119		
<211> 35		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<221> 來源		
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"		
<400> 119		
tggaggcttt ttgcgtcgttt tgctgttttg tcgtt		35
<210> 120		
<211> 42		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		

<221> 來源

<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 120

tgaggctgg aggcttttc gtcgtttgt cgtttgtcg tt

42

<210> 121

<211> 46

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 121

gctgcgaggc ggggtgggtgg gatcgatcg ttgtcggtt gtcgtt

46

<210> 122

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 122

gctgcggcg ggtgggtggg atcgatcg ttgtcggtt tcgtt

45

<210> 123

<211> 42

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 123

cgaggcggtt ggggtggatcg gtcgtttgt cgtttgtcg tt

42

<210> 124

<211> 41

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 124

cgggcggtt ggtggatcg tcgtttgtc gttttgtcg t

41

<210> 125

<211> 42

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 125

ggcggtggtg ggtggggttc gtcgtttgt cgtttgtcg tt

42

<210> 126

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 126

gggtgggag gagggttcgt cgtttgtcg ttttgtcgtt

40

<210> 127

<211> 44

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 127

gggtcgggc gggccgggtg tcgtcggtt gtcgtttgt cgtt

44

<210> 128

<211> 48

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 128

ggtgtgggg ggggttgta gggttcgtcg ttttgtcgtt ttgtcgtt

48

<210> 129

<211> 44

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 129

gggttaggt taggtaggg tcgtcggtt gtcgtttgt cgtt

44

<210> 130	
<211> 41	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 來源	
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"	
<400> 130	41
tgggggggtg ggtgggttcg tcgtttgtc gttttgtcgt t	
<210> 131	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 來源	
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"	
<400> 131	40
gggcgggccccg gcgggctcgt cgtttgtcgt tttgtcgtt	
<210> 132	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 來源	
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"	
<400> 132	39
ggttgggtgtg gttgggtcgtc gttttgtcgt tttgtcgtt	
<210> 133	
<211> 42	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 來源	
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"	
<400> 133	42
ggtggatggc gcagtcggtc gtcgtttgt cgtttgtcgt tt	
<210> 134	
<211> 44	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 來源	
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"	
<400> 134	

tgggggtgga cgggccgggt tcgtcgaaaa gtcgttttgt cgtt	44
<p><210> 135 <211> 46 <212> DNA <213> 人工序列</p>	
<p><220> <221> 來源 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"</p>	
<400> 135 tgtgggggtg gacgggccgg gttcgtcgaa ttgtcgaaaa gtcgtt	46
<p><210> 136 <211> 45 <212> DNA <213> 人工序列</p>	
<p><220> <221> 來源 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"</p>	
<400> 136 gggtaggtt tagggttagg gtcgtcgaaa ttgtcgaaaa tcgtt	45
<p><210> 137 <211> 47 <212> DNA <213> 人工序列</p>	
<p><220> <221> 來源 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"</p>	
<400> 137 gggcgccggaa ggaaggggggc gggtcgtcgaaa ttgtcgaaaa tcgtt	47
<p><210> 138 <211> 43 <212> DNA <213> 人工序列</p>	
<p><220> <221> 來源 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"</p>	
<400> 138 agggtggggaa gggtggggat cgtcgaaaa ttgtttgtc gtt	43
<p><210> 139 <211> 46 <212> DNA <213> 人工序列</p>	
<p><220> <221> 來源</p>	

<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 139
aggaggaggcg ctgggaggag ggtcgctgtt ttgtcgaaaa gtcgtt 46

<210> 140
<211> 44
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 140
ggggcgggcc gggggcgaaaa tcgtcgaaaa gtcgtttgtt cgtt 44

<210> 141
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 141
ggggtttgggg tcgtcgaaaa gtcgtttgtt cgtt 34

<210> 142
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 142
ggggtttgggg tttttcgtcg ttttgcgtt ttgtcgaa 38

<210> 143
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 143
tggggtttcgtt cgttttgtcg ttttgcgtt 30

<210> 144
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"
 <400> 144
 tttttttacg attt 14

<210> 145
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"
 <400> 145
 ttttttgcg attt 14

<210> 146
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"
 <400> 146
 ttttttccg attt 14

<210> 147
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"
 <400> 147
 ttttttttcg attt 14

<210> 148
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"
 <400> 148
 tttttttacg gttt 14

<210> 149

<211> 14
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 149
 tttttttgcg gttt

14

<210> 150
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 150
 tttttttccg gttt

14

<210> 151
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 151
 ttttttttcg gttt

14

<210> 152
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 152
 tttttttacg cttt

14

<210> 153
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 153
 tttttttgcg cttt

14

<210> 154
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 154
 tttttttccg cttt

14

<210> 155
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 155
 ttttttttcg cttt

14

<210> 156
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 156
 ttttttttacg tttt

14

<210> 157
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 157
 ttttttttgcg tttt

14

<210> 158
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 158	14
tttttttccg tttt	
<210> 159	
<211> 14	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 來源	
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"	
<400> 159	14
tttttttccg tttt	
<210> 160	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 來源	
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"	
<400> 160	20
gggggggtttt ttacgattt	
<210> 161	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 來源	
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"	
<400> 161	20
gggggggtttt ttgcgattt	
<210> 162	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 來源	
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"	
<400> 162	20
gggggggtttt ttccgattt	
<210> 163	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"
 <400> 163
 ggggggtttt tttcgattt 20

<210> 164
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"
 <400> 164
 ggggggtttt tttacggttt 20

<210> 165
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"
 <400> 165
 ggggggtttt ttgcggttt 20

<210> 166
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"
 <400> 166
 ggggggtttt ttccggttt 20

<210> 167
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"
 <400> 167
 ggggggtttt tttcggttt 20

<210> 168
 <211> 20

<212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 168
 ggggggtttt tttagcttt

20

<210> 169
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 169
 ggggggtttt tttagcgcttt

20

<210> 170
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 170
 ggggggtttt tttagcgcttt

20

<210> 171
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 171
 ggggggtttt tttagcgcttt

20

<210> 172
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 172
 ggggggtttt tttagcttt

20

<210> 173
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 173
 ggggggtttt tttgcgtttt

20

<210> 174
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 174
 ggggggtttt tttccgtttt

20

<210> 175
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 175
 ggggggtttt ttttcgtttt

20

<210> 176
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 176
 ggggttgggg ttttttttt tacgattt

28

<210> 177
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 177	28
ggggttgggg tttttttt tgcgattt	
<210> 178	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 來源	
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"	
<400> 178	28
ggggttgggg tttttttt tccgattt	
<210> 179	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 來源	
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"	
<400> 179	28
ggggttgggg tttttttt ttcgattt	
<210> 180	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 來源	
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"	
<400> 180	28
ggggttgggg tttttttt tacggttt	
<210> 181	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 來源	
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"	
<400> 181	28
ggggttgggg tttttttt tgcggttt	
<210> 182	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	

<221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 182
 ggggttgggg tttttttt tccggttt

28

<210> 183
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 183
 ggggttgggg tttttttt ttccgttt

28

<210> 184
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 184
 ggggttgggg tttttttt tacgcttt

28

<210> 185
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 185
 ggggttgggg tttttttt tgcgcttt

28

<210> 186
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 186
 ggggttgggg tttttttt tccgcttt

28

<210> 187
 <211> 28
 <212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 187

ggggttgggg tttttttttt ttgcgttt

28

<210> 188

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 188

ggggttgggg tttttttttt tacgtttt

28

<210> 189

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 189

ggggttgggg tttttttttt tgcgtttt

28

<210> 190

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 190

ggggttgggg tttttttttt tccgtttt

28

<210> 191

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 191

ggggttgggg tttttttttt ttgcgttt

28

<210> 192
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 192
 ggggttgggg tttttttt tggctttt

28

<210> 193
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 193
 ggggttgggg tttttttt tgtgtttt

28

<210> 194
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 194
 ggggttgggg tttttttt tgcatttt

28

<210> 195
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 195
 ggggttgggg tttttttt gcgtttt

27

<210> 196
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 196

ggggttgggg ttttttttgc gtttt

26

<210> 197
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 197
 ggggttgggg ttttttttgc gtttt

25

<210> 198
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 198
 ggggttgggg ttttttttgcg tttt

24

<210> 199
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 199
 ggggttgggg tttttttgcgt ttt

23

<210> 200
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 200
 ggggttgggg tttttgcgtt tt

22

<210> 201
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源

<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 201

ggggttgggg tttttttt tgcgtt

27

<210> 202

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 202

ggggttgggg tttttttt tgcgtt

26

<210> 203

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 203

ggggttgggg tttttttt tgcgtt

25

<210> 204

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 204

ggggttgggg tttttttt tgcgtttgc gttt

35

<210> 205

<211> 43

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 205

ggggttgggg tttttttt tgcgtttgc gttttgcgt ttt

43

<210> 206

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"
 <400> 206
 ggggttgggg ttttttttt tgcgatttgc gattt 35

<210> 207
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"
 <400> 207
 ggggttgggg ttttttttt tgcgatttgc gatttgcgtt tt 42

<210> 208
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"
 <400> 208
 ggggttgggg ttttttttt tacgctttac gcttt 35

<210> 209
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"
 <400> 209
 ggggttgggg ttttttttt tacgctttac gctttacgct tt 42

<210> 210
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"
 <400> 210
 ggggttgggg ttttttttt ttgcgttttc gcttt 35

<210> 211

<211> 42		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<221> 來源		
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"		
<400> 211		42
ggggttgggg tttttttt ttgcgtttc gctttcgct tt		
<210> 212		
<211> 35		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<221> 來源		
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"		
<400> 212		35
ggggttgggg tttttttt tccgcttcc gcttt		
<210> 213		
<211> 42		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<221> 來源		
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"		
<400> 213		42
ggggttgggg tttttttt tccgcttcc gctttccgct tt		
<210> 214		
<211> 35		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<221> 來源		
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"		
<400> 214		35
ggggttgggg tttttttt tgcggtttgc ggttt		
<210> 215		
<211> 42		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<221> 來源		
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"		
<400> 215		42
ggggttgggg tttttttt tgcggtttgc ggtttgcggt tt		

<210> 216
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 216
 ggggttgggg ttttttttcg cgcgtt

27

<210> 217
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 217
 ggggttgggg ttttttttcg tcgtcgtt

29

<210> 218
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 218
 ggggttgggg ttttttttcg ttcgttcg t

31

<210> 219
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 219
 ggggttgggg ttttttttcg ttcgttcg ttt

33

<210> 220
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 220 ggggttgggg tttttttcg ttttcgttt cgttt	35
<210> 221 <211> 29 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 來源 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"	
<220> <221> 經修飾鹼基 <222> (21)..(21) <223> 無鹼基位點	
<220> <221> 經修飾鹼基 <222> (24)..(24) <223> 無鹼基位點	
<400> 221 ggggttgggg tttttttcg ncgncttt	29
<210> 222 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 來源 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"	
<400> 222 ggggttgggg tttttttcg	20
<210> 223 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 來源 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"	
<400> 223 ggggttgggg tttttttcg	20
<210> 224 <211> 34 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 來源	

<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 224

ggggttgggg ttggggtttt tttttttcg tttt

34

<210> 225

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 225

ggggttgggg ttttttttcg

20

<210> 226

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 226

ggggttgggg ttttttttcg

20

<210> 227

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 227

ggggttgggg ttttttttcg

20

<210> 228

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 228

ggggttgggg ttttttttcg

20

<210> 229

<211> 15

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 229
 tggggttttt tttcg 15

<210> 230
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 230
 tggggttttt tttcg 15

<210> 231
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 231
 tggggttttt tttcg 15

<210> 232
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 232
 tggggttttt tttcg 15

<210> 233
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 233
 tggggttttt tttcg 15

<210> 234

<211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 234
 ggggttgggg ttttttttcg 20

<210> 235
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 235
 ggggttgggg ttttttttcg 20

<210> 236
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 236
 ggggttgggg ttttttttcg 20

<210> 237
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 237
 ggggttgggg ttttttttcg 20

<210> 238
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 238
 ggggttgggg ttttttttcg 20

<210> 239
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<220>
 <221> 經修飾鹼基
 <222> (21)..(21)
 <223> 無鹼基位點

<220>
 <221> 經修飾鹼基
 <222> (24)..(24)
 <223> 無鹼基位點

<400> 239
 ggggttgggg tttttttcg ncgncttt

29

<210> 240
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 240
 ggggttgggg tttttttcg

20

<210> 241
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明合成寡核苷酸"

<400> 241
 ggggttgggg ttttttttac gc

22

<210> 242
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 242

ggggttgggg tttttttcc gc

22

<210> 243
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 243
 ggggttgggg ttttttttac gc

22

<210> 244
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 244
 ggggttgggg ttttttttcc gc

22

<210> 245
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 245
 tggggttttt tttacgc

17

<210> 246
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 246
 tggggttttt tttccgc

17

<210> 247
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源

<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 247
tcgtcgaaaa gtcgttttgtt cgtt

24

<210> 248
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 248
tcgtcgaaaa gtcgttttgtt cgtt

24

<210> 249
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 249
ggggtcgtcg ttttgcgtt ttgtcgaa

28

<210> 250
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 250
ggggtcgtcg ttttgcgtt ttgtcgaa

28

<210> 251
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<220>
<223> /註解="May be 3'-經膽固醇基修飾"

<400> 251
tggggttttt tcgtcgaaaa gtcgttttgtt cgtt

34

<210> 252

<211> 36
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 252
 tggggttttt ttgcgttt tgcttttg cgtttt

36

<210> 253
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<220>
 <223> /註解="可為5'-經膽固醇基修飾"

<400> 253
 ggggttgggg ttttttttgc gttttgcgt tttgcgttt t

41

<210> 254
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<220>
 <223> /註解="可為5'-經膽固醇基修飾"

<400> 254
 tttttttgcg tttttgcgtt tttgcgtttt

30

<210> 255
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明: 合成寡核苷酸"

<220>
 <223> /註解="可為5'-經膽固醇基修飾"

<400> 255
 ggggttgggg ttttttttcc gctttccgc tttccgcctt t

41

<210> 256
 <211> 30

<212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸
 <220>
 <223> /註解="可為5'-經膽固醇基修飾"

<400> 256
 ttttttccg cttttccgct tttccgcttt

30

<210> 257
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 257
 ggggttgggg

10

<210> 258
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 258
 ggggttgggg tttt

14

<210> 259

<400> 259
 000

<210> 260

<400> 260
 000

<210> 261
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 來源
 <223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 261
 ttagggttag gg

12

<210> 262		
<211> 12		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<221> 來源		
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"		
<400> 262		
ggggttttgg gg	12	
<210> 263		
<211> 16		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<221> 來源		
<223> /註解="人工序列的說明: 合成寡核苷酸"		
<400> 263		
t tagggtag gtttt	16	
<210> 264		
<211> 14		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<221> 來源		
<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"		
<400> 264		
tggaggctgg aggc	14	
<210> 265		
<211> 4242		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<221> 來源		
<223> /註解="人工序列的說明:合成聚核苷酸"		
<400> 265		
tgaccgcccc acgacccccc cccattgacg tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg	60	
ccaataggga ctttccatgg acgtcaatgg gggggatatt tacggtaaac tgcccacttg	120	
gcagtacatc aagtgtatca tatgccaagt ccgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa	180	
tggcccgccct ggcattatgc ccagtacatg accttacggg actttccatc ttggcagttac	240	
atctacgtat tagtcatcgc tattaccatg gtgtatgcggg ttggcagta catcaatggg	300	
cgtggatagc gggttgactc acggggattt ccaagtctcc accccattga cgtcaatggg	360	

agtttgtttt ggcaccaaaa tcaacggac tttccaaaat gtcgtaacaa ctccgcccc	420
ttgacgcaaa tggcggtag gcgtgtacgg tggagggtct atataagcag agctcgttt	480
gtgaaccgtc agatcgctg gagacgccc ccacgctgtt ttgacctcca tagaagacac	540
cgggaccgat ccagcctccc ctcgaagccg atctgataac ggtaccgata agctggcggc	600
cgatataagct acagaagttg gtcgtgaggc actggcagg taagtatcaa ggttacaaga	660
caggtttaag gagaccaata gaaactgggc ttgtcgagac agagaagact cttgcgtttc	720
tgatagggcac ctattggct tactgacatc cacttgcct ttctctccac aggtgtccac	780
tcccaggttc aattacagct cttaaagcagc cgcaagcttg atatcgaatt cctgcagccc	840
gggggatcca ctatgttctag agcggccgccc acccggtgg agctcgaattt atcagatcga	900
ttaataacta tgctcaaaaa ttgtgtacct ttagctttt aatttgtaaa ggggttaata	960
aggaatattt gaigtatagt gccttgacta gagatcataa tcagccatac cacatttga	1020
gaggttttac ttgctttaaa aaacctccca cacccccc tgaacctgaa acataaaatg	1080
aatgcatttgc ttgttgtttaa ctgttttattt gcagcttata atggttacaa ataaagcaat	1140
agcatcacaa atttcacaaa taaagcattt ttttcactgc attctagttt tggtttgtcc	1200
aaactcatca atgtatctt tcatgtctgg atcatcagat ctgcccgttcc ccctatacg	1260
agtcgttattt atttcataaa gccaggtaa cctgcattaa tgaatcggcc aacgcgcggg	1320
gagaggcggg ttgcgttattt ggcgccttcc cgcttcctcg ctcaactgact cgctgcgttc	1380
ggtcgttccgg ctgcggcgag cggtatcagc tcactcaaag gcgtaataac ggttatccac	1440
agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa	1500
ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc cgccccccctg acgagcatca	1560
caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg aaacccgaca ggactataaa gataccaggc	1620
gtttccccctt ggaagctccc tcgtgcgttc tcctgttccg accctgccc ttaccggata	1680
cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt ggcgccttctt catagctcac gctgttaggtt	1740
tctcagttcg gtgttaggtcg ttgcgtccaa gctggcgtgt gtgcacgaac ccccccgttca	1800
gcccgcaccgc tgccgccttat ccggtaacta tcgtcttgc tccaacccgg taagacacga	1860
cttacgcctt cttggcagcag ccactggtaa caggattagc agagcgaggt atgttaggcgg	1920
tgctacagag ttcttgaagt ggtggcttaa ctacggctac actagaagaa cagtattttgg	1980
tatctgcgtt ctgctgaagc cagttaccctt cgaaaaaaga gttggtagct ctgtatccgg	2040
caaacaaacc accgctggta gcggtggttt ttttggcgttgc aagcagcaga ttacgcgcag	2100
aaaaaaaaagga tctcaagaag atccttttgc ctgtatccgg gggctgtacg ctcagtgaa	2160
cgaaaaactca cgtaaggaa ttttggcgttgc gggcgccctt aggttttgc aaagatcgat	2220

caagagacag gatgaggatc gtttcgcagc ttttcatctt gactgcaacg ggcataaagt	2280
ctctgtgtgg attaaaaaaaaa gagtgtctga tagcagcttc tgaactggtt acctgcccgt	2340
agtaaattaa aattttattt acttaggtca ctaaggcgcc ttgcgcgtgag gttgcgtcg	2400
gatatcatca gggcagaccc gttacatccc cctaacaagc tgtataaaga gaaatactat	2460
ctcatggcg ttgcccgcac ctgacagtgc gacgttggc tgcgtccgtc gaccaacgg	2520
accgaggtaa cagcccaatc tatccatgtat ctggccagg ccgggtcgcc cggtatgcag	2580
ccggctcggt gtaatgaagcc attaaggagc cgacccagcg cgaccggcg gccggtcac	2640
ctgcctctgc tgaagcctgc ctgtcactcc ctgcgcggcg taccggccgt tctcatcgag	2700
taggctccgg atcgcgaccc cggacggcc ctggcccgag gagccgccta tgacaaatgc	2760
cggtagcga tccggcattc agcattgact ggcacggat ccagtccctt caggagccct	2820
atgcccaccg tagcaaaaaaa tgagccccgag ccgatcgcga gttgtatcc ggtcccgccg	2880
attgccggtc gcgatgacgg tcctgtgtaa gcgttatcg taccattgt ttaagaagta	2940
tatacgctac gaggtacttg ataacttctg cgtacatac atgagggtttt gtataaaaat	3000
ggccggcgat atcaacgcag tgtcagaaat ccgaaacagt ctgcggact ctggggttcg	3060
aaatgaccga ccaagcgcacg cccaacctgc catcacgaga tttcgattcc accggccct	3120
tctatgaaag gttgggcttc ggaatcgaaa tccgggacgc cggctggatg atccctccagc	3180
gcggggatct catgctggag ttcttcgccc accctaggcg cgctcatcgag cgatacata	3240
tttgaatgta ttttagaaaaaa taaacaaataa ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagt	3300
ccacctaataat tgtaagcgaa atattttgt taaaattcgc gttaaatttt ttttaatca	3360
gctcattttt taaccaatag gccgaaatcg gcaaaatccc ttataaatca aaagaataga	3420
ccgagatagg gttgagtgtt gttccagttt ggaacaagag tccactatta aagaacgtgg	3480
actccaaacgt caaaggcgaa aaaaccgtct atcaggcgaa tggccacta cgtgaaccat	3540
caccctaatac aagtttttttgggtcgaggt gccgtaaagg actaaatcgg aaccctaaag	3600
ggagcccccg atttagagct tgacgggaa agccggcgaa cgtggcgaga aaggaaggaa	3660
agaaagcgaa aggagcgggc gctagggcgc tggcaaggtt agcggtcacg ctgcgcgtaa	3720
ccaccacacc cggcgccctt aatgcgcgc tacagggcgc gtcccaattcg ccattcaggc	3780
tgcgcaactg ttgggaaggcgatcggtgc gggcctcttc gctatiaacgc cagctggcgaa	3840
aagggggatg tgctgcaagg cgatggatggtaacgccc agggtttcc cagtcacgac	3900
gttgtaaaac gacggccagt gagcgcgcgt aatacgactc actataggc gaattggta	3960
ccggggccccc cctcgagcag gatctataca ttgaatcaat attggcaatt agccatatta	4020
gtcatgggtt atatagcata aatcaatatt ggctattggc cattgcatac gttgtatcta	4080

tatcataata tgtacattta tattggctca tgtccatat gaccgccatg ttgacattga	4140
ttattgacta gttattaata gtaatcaatt acggggtcat tagttcatag cccatataatg	4200
gagttccgcg ttacataact tacggtaaat ggcccgcctg gc	4242

<210> 266

<211> 4242

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註解="人工序列的說明:合成聚核苷酸"

<400> 266

ctaaattgt a agcgtaata ttttgtaaa attcggtta aattttgtt aatcagctc	60
attttttaac caataggccg aaatcgcaa aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga	120
gatagggttt agtgttgttc cagttggaa caagagtcca ctattaaaga acgtggactc	180
caacgtcaaa gggcgaaaaaa ccgtctatca gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc	240
ctaatcaagt tttttgggt cgaggtgccg taaagcacta aatcggaacc ctaaagggag	300
cccccgattt agagcttgac ggggaaagcc ggcgaacgtg gcgagaaagg aagggaaagaa	360
agcgaaagga gcgggchgcta gggcgctggc aagtgtagcg gtcacgctgc gcgttaaccac	420
cacacccgccc gcgcttaatg cgccgctaca gggcgcttcc cattcgccat tcaggctg	480
caactgttgg gaagggcgat cggtgccggc ctcttcgcta ttacgcccagc tggcgaaagg	540
gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt aacgccaggg ttttcccagt cacgacgtt	600
taaaacgacg gccagtggcgcg cgcgtataa cgactcacta tagggcgaat tgggtaccgg	660
ccccccccc gggcggatc tatacattga atcaatattt gcaatttgcg atattatgtca	720
ttggttatat agcataaaatc aatattggct attggccatt gcatacggt tatctatatc	780
ataatatgt a catttatatt ggctcatgtc caatatgacc gccatgttga cattgattat	840
tgactagtttta ttaatagtaa tcaattacgg ggtcattatgt tcatagccca tatatggagt	900
tccgcgttac ataacttacg gttaatggcc cgccctggctg accggccaaac gacccccc	960
cattgacgtc aataatgacg tatgttccca tagtaacgcc aataggact ttccattgac	1020
gtcaatgggt ggagtattta cggtaaactg cccacttggc agtacatcaa gtgtatcata	1080
tgccaagtcc gccccctatt gacgtcaatg acggttaatg gcccgcctgg cattatgccc	1140
agtacatgac cttacggac ttccctactt ggcagttacat ctacgttata gtcatcgcta	1200
ttaccatgggt gatgcgggtt tggcagttaca tcaatggcg tggatagccg ttgtactcac	1260
ggggatttcc aagtctccac cccatttgcg tcaatggcg tttgttttgg caccaaaaatc	1320

aacgggactt tccaaaatgt cgtaacaact ccgccccatt gacgcaaatg ggccgttagc	1380
gtgtacggtg ggaggtctat ataagcagag ctcgtttagt gaaccgtcag atccctgg	1440
gacgccatcc acgctgttt gacctccata gaagacaccg ggaccgatcc agcctccc	1500
cgaagccgat ctgataacgg taccgataag ctggcggccg attaagctac agaagttgg	1560
cgtgaggcac tgggcaggta agtatcaagg ttacaagaca ggttaagga gaccaataga	1620
aactggcctt gtcgagacag agaagactct tgcgtttctg ataggcacctt attggctta	1680
ctgacatcca cttgcctt ctctccacag gtgtccactc ccaggttcaa ttacagctct	1740
taagcagccg caagcttgat atcgaattcc tgcagccgg gggatccact agttctagag	1800
cggccgcccac cgccgtggag ctcgaattat cagatcgatt aataactatg ctcaaaaatt	1860
gtgtaccttt agcttttaa ttgttaagg ggttaataag gaatatttga tgtatagtgc	1920
cttgactaga gatcataatc agccatacca catttgtaga ggtttactt gctttaaaaa	1980
acctcccaca cctccccctg aacctgaaac ataaaatgaa tgcaattgtt gttttaact	2040
tgtttaatgc agcttataat ggttacaaat aaagcaatag catcacaat ttacaaaata	2100
aagcattttt ttcactgcat tctagttgtt gtttgtccaa actcatcaat gtatcttata	2160
atgtctggat catcagatct gccggctcctt ctagtgcggat tcgttataat ttgcataagc	2220
caggtaacc tgcattaaatg aatcgccaa cgccggggaa gaggcggtt gcgtattggg	2280
cgctttccg cttccctcgct cactgactcg ctgcgctcg tcgttccggct gcggcgagcg	2340
gtatcagctc actcaaaggc ggttacacgg ttatccacag aatcagggga taacgcagga	2400
aagaacatgt gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc cgcttgctg	2460
gcgttttcc ataggctccg ccccccgtac gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag	2520
aggtggcgaa acccgacagg actataaaga taccaggcgat ttcccccgg aagctccctc	2580
gtgcgctctc ctgttccgac cctggccgtt accggatacc tgtccgcctt tctccctcg	2640
ggaagcgigg cgctttctca tagctcacgc ttaggtatc tcagttcggt ttaggtcgat	2700
cgctccaagc tggctgtgt gcacgaaccc cccgttcagc ccgaccgctg cgccttatcc	2760
ggtaactatc gtcttgagtc caaccggta agacacgact tatgcactt ggcagcagcc	2820
actggtaaca ggatttagcag agcgaggtat ttaggcgggtt ctacagagtt ctgttgtgg	2880
tggcttaact acggctacac tagaagaaca gtatgttgc tctgcgtct gctgaaggcca	2940
gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc	3000
ggtggtttttt ttgtttgcaaa gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat	3060
ccttgcgttct ttctacggg gtctgacgct cagtgaaacg aaaactcact ttaaggatt	3120
ttggtcatga gcgcgcctag gcttttgcgaa agatcgatca agagacagga tgaggatcg	3180

tttcgcatgt tgaacaagat ggattgcacg caggttctcc ggccgcgtgg gtggagaggc 3240
tattcggcta tgactggca caacagacaa tcggctgctc tgatgccgcc gtgttccggc 3300
tgtcagcgca ggggcgcccc gttcttttgc tcaagaccga cctgtccggc gcccgtaaatg 3360
aactgcaaga cgagggcagcg cggctatcggt ggctggccac gacgggcgtt cttgcgcag 3420
ctgtgctcga cgttgtcact gaagcgggaa gggactggct gctattggc gaagtgcggg 3480
ggcaggatct cctgtcatct caccttgctc ctgcccggaa agtacccatc atggctgatg 3540
caatgcggcg gctgcatacg ctgtatccgg ctacctgccc attcgaccac caagcgaaac 3600
atcgcatcga gcgagcacgt actcggatgg aagccggctc tgcgtatcag gatgatctgg 3660
acgaagagca tcaggggctc gcgcagccg aactgttcgc caggctcaag gcgagcatgc 3720
ccgacggcgaa ggatctcgctc gtgacccatg gcgtatgcctg cttgccgaat atcatggtgg 3780
aaaatggccg ctttctgga ttcatcgact gtggccggct gggtgtggcg gaccgctatc 3840
aggacatagc gtggctacc cgtgatattgc ctgaagagct tggcggcgaa tggctgacc 3900
gcttcctcggt gctttacggat atcgccgcctc ccgattcgca gcgcattcgcc ttctatcgcc 3960
ttcttgcacga gttcttctga gcgggactctc ggggttcgaa atgaccgacc aagcgacgcc 4020
caacctgcca tcacgagatt tcgattccac cgccgccttc tatgaaaggt tgggcttcgg 4080
aatcgtttc cgggacgcgc gctggatgat cctccagcgc ggggatctca tgctggagtt 4140
cttcgcccac cctaggcgcg ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata 4200
aacaatagg ggttccgcgc acatttcccc gaaaagtgcc ac 4242

<210> 267
<211> 4242
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註解="人工序列的說明:合成聚核苷酸"

<400> 267
tgaccgcccc acgaccggcc cccattgacg tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg 60
ccaataggg ctttccattg acgtcaatgg gtggaggatt tacggtaaac tgcccaacttg 120
gcagttacatc aagtgtatca tatgccaagt ccggccctta ttgacgtcaa tgacggtaaa 180
tggcccgctt ggcattatgc ccagttacatg accttacggg actttcttac ttggcagttac 240
atctacgtat tagtcatcgcttattaccatg gtgatgcgtt tttggcagta catcaatggg 300
cgtggatagc gggtttgactc acggggattttt ccaagttctcc accccattga cgtcaatggg 360
agtttgggg ggcacccaaaa tcaacgggac ttccaaaaat gtcgtaacaa ctccggccca 420
tttgcaccaaa tggggcggtag gcgtgtacgg tgggagggtct atataaggcag agctcggttta 480

gtgaaccgtc agatgcctg gagacgccat ccacgctgtt ttgacctcca tagaagacac	540
cgggaccgat ccagcctccc ctcaagccg atctgataac ggtaccgata agctggcggc	600
cgattaagct acagaagttg gtcgtgaggc actgggcagg taagtatcaa ggttacaaga	660
caggttaag gagaccaata gaaactggc ttgtcgagac agagaagact cttgcgttc	720
tgataggcac ctattggct tactgacatc cactttgcct ttctctccac aggtgtccac	780
tcccaggttc aattacagct cttaagcagc cgcaagcttg atatcgaaatt cctgcagccc	840
gggggatcca ctatgtctag agcggccgcc accgcgggtgg agctcgaaatt atcagatcg	900
ttaataacta tgctcaaaaa ttgtgtacct ttagctttt aattttaaaa ggggttaata	960
aggaatattt gatgtatagt gccttgacta gagatcataa tcagccatac cacatttgc	1020
gaggttttac ttgccttaaa aaacctccca cacctcccc tgaacctgaa acataaaatg	1080
aatgcatttg ttgtgttaa ctgttttatt gcagcttata atggttacaa ataaagcaat	1140
agcatcacaa atttcacaaa taaagcattt ttttcaactgc attctagttg tggttgtcc	1200
aaactcatca atgtatctt tcatgtctgg atcatcagat ctgcggctc ccctatagtg	1260
agtcgttatta atttcgataa gccaggttaa cctgcattaa tgaatcgcc aacgcgcggg	1320
gagaggcggc ttgcgtattt ggcgccttc cgcttcctcg ctcactgact cgctgcgc	1380
ggtcgttcgg ctgcggcgag cggtatcagc tcactcaaag gcggtaatac ggttatccac	1440
agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggcaggaa	1500
ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgtttt ccataggctc cgccccctg acgagcatca	1560
caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg aaacccgaca ggactataaa gataccaggc	1620
tttccccctt ggaagctccc tcgtgcgc tcctgttccg accctgccc ttaccggata	1680
cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt ggcgccttct catagctcac gctgttaggt	1740
tctcagttcg gtgttaggtcg ttgcgtccaa gctggcgtgt gtgcacgaac ccccggtca	1800
gcccgcaccgc tgcccttat ccggtaacta tcgtcttgc tccaacccgg taagacacga	1860
cttatcgcca ctggcagcag ccactggtaa caggattagc agagcgaggt atgttaggcgg	1920
tgctacagag ttcttgaagt ggtggctaa ctacggctac actagaagaa cagtatttgg	1980
tatctgcgt ctgcgtgaagc cagttaccctt cggaaaaaga gttggtagct ctgtatccgg	2040
caaacaaacc accgctggta gcgggggttt ttgttttgc aagcagcaga ttacgcgcag	2100
aaaaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg gggctgtacg ctcatggaa	2160
cggaaaactca cgttaaggga ttttggtcat gggcgccctt aggctttgc aaagatcgat	2220
caagagacag gatgaggatc gtttcgcattt attgaacaag atggatgcg cgcaggctc	2280
ccggccgctt ggggtggagag gctattcgcc tatgactggg cacaacagac aatcggtgc	2340

tctgatgccg ccgtgttccg gctgtcagcg caggggcgcc cggttcttt tgtcaagacc	2400
gacctgtccg gtgcctgaa tgaactgcaa gacgaggcag cgccgctatc gtggctggcc	2460
acgacggcg ttccttgcgc agctgtgctc gacgttgtca ctgaagcggg aaggactgg	2520
ctgctattgg gcbaagtgcc gggcaggat ctccgtcat ctcaccttgc tcctgccgag	2580
aaagtatcca tcatggctga tgcaatgcgg cggctgcata cgcttgatecc ggctacactgc	2640
ccattcgacc accaagcgaa acatcgcatc gagcggcac gtactcgat ggaagccggt	2700
cttgcgatc agatgatct ggacgaagag catcagggc tcgcgccagc cgaactgttc	2760
gccaggctca aggcgagcat gcccgcggc gaggatctcg tcgtgaccca tggcgatgcc	2820
tgcttgccga atatcatggt ggaaaatggc cgctttctg gattcatgta ctgtggccgg	2880
ctgggtgtgg cggaccgcta tcaggacata gcgttggcta cccgtatgat tgctgaagag	2940
cttggcggcg aatgggctga cgccttcctc gtgccttacg giatgcgcgc tcccgattcg	3000
cagcgcatcg ccttctatcg ctttcttgc gagttcttct gaggcggact ctgggttgc	3060
aaatgaccga ccaagcgacg cccaaacctgc catcacgaga ttgcatttcc accgcgcct	3120
tctatgaaag gtgggcttc ggaatcgtt tccggacgc cggctggatg atcctccagc	3180
cggggatct catgctggag ttcttcgccc accctaggcg cgctcatgag cggatacata	3240
tttgaatgta tttagaaaaaa taaacaaata ggggttccgc gcacatttcc cggaaaagtg	3300
ccacctaata ttaaccaatag gccgaaatcg gcaaaatccc ttataaatca aaagaataga	3360
ccgagatagg gttagtgtt gttccagttt ggaacaagag tccacttta aagaacgtgg	3420
actccaaacgt caaaggcgaa aaaaccgtct atcagggcgaa tggccacta cgtgaaccat	3480
caccctaatac aagtttttg gggtcgaggt gccgtaaagc actaaatcg aaccctaaag	3540
ggagcccccg atttagagct tgacgggaa agccggcgaa cgtggcgaga aaggaaggga	3600
agaaagcgaa aggagcgggc gctagggcgc tggcaagtgt acgcgtcacg ctgcgcgtaa	3660
ccaccacacc cgccgcgcctt aatgcgcgc tacagggcgc gtcccatcg ccattcaggc	3720
tgcgcaactg ttgggaaggg cgatcggtgc gggcttcctc gctattacgc cagctggcgaa	3780
aaggggatg tgctgcaagg cgatggat gggtaacgcc agggttttcc cagtcacgac	3840
gttgtaaaac gacggccagt gagcgcgcgt aatcgactc actatagggc gaattggta	3900
ccggggcccc cctcgagcag gatctataca ttgaatcaat attggcaatt agccatatta	3960
gtcatgggtt atatagcata aatcaatatt ggctattggc cattgcatac gttgtatcta	4020
tatcataata tgtacattta tattggctca tgtccaatat gaccgcccgt ttgacattga	4080
ttattgacta gtatataa gtaatcaatt acgggtcat tagttcatag cccatataatg	4140
	4200

gagttccgcg ttacataact tacgtaaat ggcccgcctg gc 4242

<210> 268

<211> 4242

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註解="人工序列的說明:合成聚核苷酸"

<400> 268

tgaccgccc	acgacccccc	cccattgacg	tcaataatga	cgtatgttcc	catagtaacg	60
ccaataggga	cttccattg	acgtcaatgg	gtggaggtatt	tacgtaaac	tgcccacttg	120
gcagtacatc	aagtgtatca	tatgccaagt	ccgcccccta	ttgacgtcaa	tgacggtaaa	180
tggccgcct	ggcattatgc	ccagtagatg	accttacggg	actttctac	ttggcagtagc	240
atctacgtat	tagtcatcgc	tattaccatg	gtgatgcgg	tttggcagta	catcaatggg	300
cgtggatagc	ggtttgactc	acggggattt	ccaagtctcc	accccattga	cgtcaatggg	360
agtttggttt	ggcaccaaaa	tcaacgggac	tttccaaaat	gtcgtaacaa	ctccgcccc	420
ttgacgcaaa	tggcggtag	gcgtgtacgg	tgggaggtct	atataagcag	agctcgttt	480
gtgaaccgtc	agatgcctg	gagacgccc	ccacgctgtt	ttgacctcca	tagaagacac	540
cgggaccgat	ccagcctccc	ctcgaagccg	atctgataac	ggtaccgata	agctggcggc	600
cgtttaagct	acagaagttg	gtcgtgaggc	actgggcagg	taagtatcaa	ggttacaaga	660
caggtttaag	gagaccaata	gaaactggc	ttgtcgagac	agagaagact	cttgcgttcc	720
tgtatggcac	ctattggtct	tactgacatc	cactttgcct	ttctctccac	aggtgtccac	780
tcccagggttc	aattacagct	cttaagcagc	cgc当地aca	aaattcctca	aaaatcatca	840
tcgaatgaat	ggtgaaataa	tttccctgaa	taactgttagt	gttttcaggg	cgc当地ataa	900
taatttaacta	tgctcaaaaa	ttgtgtacct	ttagctttt	aatttgtaaa	ggggttaata	960
aggaatattt	gatgtatagt	gccttgacta	gagatcataa	tcagccatac	cacatttgta	1020
gaggttttac	ttgctttaaa	aaacctcccc	cacccccc	tgaacctgaa	acataaaaatg	1080
aatgcaattt	ttgttggtaa	cttggattt	gcagctata	atggttacaa	ataaagcaat	1140
agcatcacaa	atttcacaaa	taaagcattt	ttttcactgc	attctagttg	tgggggttcc	1200
aaactcatca	atgtatctt	tcatgtctgg	atcatcagat	ctgcccgtct	ccctatagtg	1260
agtcgttata	atttcgataa	gccaggttaa	cctgcattaa	tgaatcggcc	aacgcgcggg	1320
gagaggcgg	ttgcgtattt	ggcgctttc	cgcttcctcg	ctcactgact	cgctgcgc	1380
ggtcgttccg	ctgcggcgag	cggtagcgc	tcaactcaaag	gcggtaatac	ggttatccac	1440

agaatcaggg gataacgcag	1500
gaaagaacat gtgagcaaaa	
ggccagcaaa aggccaggaa	
ccgtaaaaag gccgcgttgc	1560
tggcgaaaaa ccataggctc	
cgccccctg acgagcatca	
caaaaatcga cgctcaagtc	1620
agaggtggcg aaacccgaca	
ggactataaa gataccaggc	
gtttccccct ggaagctccc	1680
tcgtgcgctc tcctgttccg	
accctgccgc ttaccggata	
cctgtccgcc tttctccctt	1740
cggaaagcgt ggcgtttct	
catagctcac gctgttaggt	
tctcagttcg gtgttaggtcg	1800
ttcgctccaa gctgggcgt	
gtgcacgaac ccccccgtca	
gccccgaccgc tgcgccttat	1860
ccggtaacta tcgtctttag	
tccaaacccgg taagacacga	
cttatcgcca ctggcagcag	1920
ccactggtaa caggattagc	
agagcgaggt atgttaggcgg	
tgctacagag ttcttgaagt	1980
ggtggcctaa ctacggctac	
actagaagaa cagtatttgg	
tatctgcgt ctgcgtgaagc	2040
cagttacctt cgaaaaaaga	
gttggtagct ctgtatccgg	
caaacaacc accgctggta	2100
gccccgtgtt tttgtttgc	
aagcagcaga ttacgcgcag	
aaaaaaagga tctcaagaag	2160
atccctttagt ctttctacg	
gggtctgacg ctcaagtggaa	
cgaaaaactca cgtaaggga	2220
ttttggicat gggcgccct	
aggctttgc aaagatcgat	
caagagacag gatgaggatc	2280
gtttcgacg ttttcattct	
gactgcaacg ggcaataagt	
ctctgtgtgg attaaaaaaaaa	2340
gagtgtctga tagcagctc	
tgaactgggtt acctgccgt	
agtaaattaa aattttattt	2400
acttaggtca ctaaggcgcc	
ttgcgtctgag gtgcgtcgt	
gatatacatca gggcagaccc	2460
gttacatccc cctaacaagc	
tgtataaaaga gaaatactat	
ctcaatggcg ttgcccccac	2520
ctgacagtgc gacgttggc	
tgcgtccgtc gaccaacgg	
accgaggtaa cagccaaatc	2580
tatccatgtat ctggccagg	
ccgggtcgcc cgttatgcag	
cccggtcggt gtagaagcc	2640
attaggagc cgacccagcg	
cgaccggcg gccggtcacg	
ctgcctctgc tgaagccgtc	2700
ctgtcactcc ctgcgcggcg	
tacccgcccgt tctcatcgag	
taggctccgg atcgcgaccc	2760
cggacgggccc ctgggcccag	
gagcggcccta tgacaaatgc	
cgggtagcga tccggcattc	2820
agcattgact gcgcacggat	
ccagtccttg caggagcctt	
atgccgaccc tagcaaaaaaa	2880
tgagcccgag ccgatcgca	
gttgtgatcc ggtcccgccg	
attgccggcgc gcgatgacgg	2940
tcctgtgtaa gcgttatcgt	
taccaattgt ttaagaagta	
tatacgctac gaggtacttg	3000
ataacttctg cgtacatac	
atgaggtttt gtataaaaat	
ggcggggcgt atcaacgcag	3060
tgtcagaat ccgaaacagt	
ctgcgggact ctggggttcg	
aaatgaccga ccaagcgacg	3120
cccaacctgc catcacgaga	
tttcgattcc accgcccgcct	
tctatgaaag gttgggcttc	3180
ggaatcggtt tccgggacgc	
cggtctggatg atccctccagc	
gcggggatct catgctggag	3240
ttcttcgcccc accctaggcg	
cgctcatgag cgatatacata	
tttgaatgtat ttagaaaaaa	3300
taaacaataa ggggtccgc	
gcacatttcc ccgaaaagtgc	

ccacctaata t gtaagcggt aatattttgt taaaatttcgc gttaaatttt t gttaaatca	3360
gctcattttt taaccaatag gccgaaatcg gcaaaatccc ttataaatca aaagaataga	3420
ccgagatagg gttgagtgtt gttccagttt ggaacaagag tccactatta aagaacgtgg	3480
actccaaacgt caaagggcga aaaaccgtct atcagggcga tggccacta cgtgaaccat	3540
caccctaatac aagtttttg gggtcgaggt gccgtaaagc actaaatcgg aaccctaaag	3600
ggagcccccg aittagagct tgacgggaa agccggcga cgtggcgaga aaggaaggga	3660
agaaagcgaa aggagcgggc gctagggcgc tggcaagtgt agcggtcacg ctgcgcgtaa	3720
ccaccacacc cgccgcgc tt aatgcgcgc tacagggcgc gtcccatcg ccattcaggc	3780
tgcgcaactg ttgggaaggg cgatcggtgc gggcctttc gctattacgc cagctggcga	3840
aagggggatg tgctgcaagg cgattaagtt gggtaacgcc agggtttcc cagtcacgac	3900
gttgtaaaac gacggccagt gagcgcgcgt aatacgactc actataggc gaattggta	3960
ccggggcccc cctcgaggc gacggtatcg ataagcttga tatcgaattc ctgcagcccg	4020
ggggatccac tagttctaga gcggccgcca cgcgggtgga gctccagctt ttgttccctt	4080
tagtgagggt taattgcgcg cttggcgtaa tcatggtcat agctgttcc tgtgtgaaat	4140
tgttatccgc tcacaattcc acacaacata cgagccggaa gcataaagtg taaagcctgg	4200
gggcctaata gagtgagcta actcacatta attgcgttgc gc	4242

<210> 269

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註解="人工序列的說明:合成寡核苷酸"

<400> 269

tgtgggtgtg tgtggg

16

201940192

201940192

發明摘要

【發明名稱】（中文/英文）

免疫刺激組成物

IMMUNOSTIMULATORY COMPOSITIONS

【中文】

本揭示內容是有關於在禽類物種體內有效引起免疫反應的免疫刺激組成物。更具體而言，這些免疫刺激組成物包含免疫調節劑組成物以及免疫刺激寡核苷酸，其等在投與時刺激類鐸受體21。

【英文】

The present disclosure relates to immunostimulatory compositions that are effective in eliciting immune responses in avian species. More specifically, these immunostimulatory compositions comprise an immunomodulator composition and an immunostimulatory oligonucleotide that when administered stimulate toll-like receptor 21.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 4 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

申請專利範圍

1. 一種免疫刺激組成物，其包含：
 - a) 免疫調節劑組成物，其包含核酸質體以及脂質體遞送媒劑；以及
 - b) 免疫刺激寡核苷酸，其具有至少一個CpG模體(motif)以及在免疫刺激寡核苷酸的5'處或鄰近5'端的富含鳥嘌呤核苷酸序列。
2. 如請求項1之免疫刺激組成物，其中該免疫調節劑組成物以及免疫刺激寡核苷酸以協同有效量存在。
3. 如請求項1或2之免疫刺激組成物，其中該免疫刺激寡核苷酸包含細胞質核酸監視分子的配位體。
4. 如請求項3之免疫刺激組成物，其中免疫細胞質核酸監視分子為類鐸受體(TLR)。
5. 如請求項3或4之免疫刺激組成物，其中該細胞質核酸監視分子為TLR21。
6. 如前述請求項中任一項之免疫刺激組成物，其中免疫調節劑組成物的核酸質體濃度大於免疫刺激寡核苷酸的濃度。
7. 如前述請求項中任一項之免疫刺激組成物，其進一步包含醫藥載劑。
8. 如前述請求項中任一項之免疫刺激組成物，其中該脂質體遞送媒劑包含多層囊泡脂質、擠壓脂質或兩者。
9. 如前述請求項中任一項之免疫刺激組成物，其中該脂質體遞送媒劑為陽離子性。
10. 如請求項8之免疫刺激組成物，其中陽離子脂質體遞送媒劑包含選自由下列組成之群的脂質對：N-[1-(2,3-二油基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化銨(DOTMA)以及膽固醇；N-[1-(2,3-二油醯基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化銨(DOTAP)以及膽固醇；1-[2-(油醯基氧基)乙基]-2-油基-3-(2-羥基乙基)-氯化咪唑啉(DOTIM)以及膽固醇；與二甲基雙十八烷基溴化銨(DDAB)以及膽固

醇。

11. 如前述請求項中任一項之免疫刺激組成物，其中該核酸質體為非編碼的。
12. 如請求項1至11中任一項之免疫刺激組成物，其中該核酸質體與SEQ ID NO：265具有至少75%序列一致性。
13. 如請求項1至11中任一項之免疫刺激組成物，其中該核酸質體與SEQ ID NO：266具有至少75%序列一致性。
14. 如請求項1至11中任一項之免疫刺激組成物，其中該核酸質體與SEQ ID NO：268具有至少75%序列一致性。
15. 如前述請求項中任一項之免疫刺激組成物，其中該富含鳥嘌呤核苷酸序列包含第一複數個鳥嘌呤核苷酸。
16. 如請求項15之免疫刺激組成物，其中第一複數個鳥嘌呤核苷酸包含三至八個鳥嘌呤核苷酸。
17. 如請求項15或16之免疫刺激組成物，其中該免疫刺激寡核苷酸包含SEQ ID NO：16、17、18、19、20、21、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、77、78、81、82、85、86、88、89、90、92、93、96、97、100、102、104、106、108、143或1。
18. 如請求項15或16之免疫刺激組成物，其在第一複數個鳥嘌呤核苷酸下游進一步包含第二複數個鳥嘌呤核苷酸。
19. 如請求項18之免疫刺激組成物，其中該免疫刺激寡核苷酸包含SEQ ID NO：141、142、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、192、193、194、195、196、197、198、199、200、

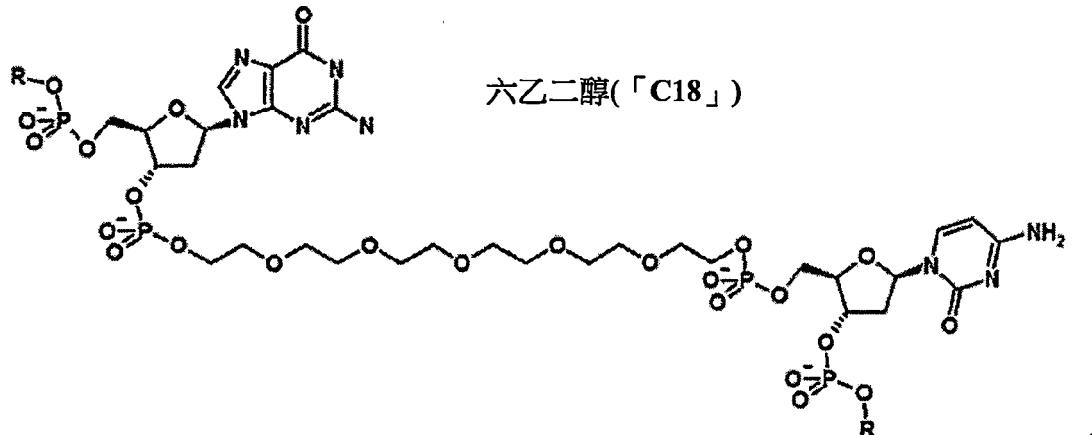
201、202、203，或GCGT-Gwire3。

20. 如請求項18或19之免疫刺激組成物，其中該第一複數個鳥嘌呤核苷酸以及第二複數個鳥嘌呤核苷酸被至少兩個核苷酸分隔開。

21. 如請求項15至20中任一項之免疫刺激組成物，其中第一複數個鳥嘌呤核苷酸以及至少一個CpG模體被至少3個核苷酸分隔開。

22. 如請求項15至21中任一項之免疫刺激組成物，其中第一複數個鳥嘌呤核苷酸以及至少一個CpG模體被六乙二醇、四乙二醇、丙二醇或其衍生物分隔開。

23. 如請求項22之免疫刺激組成物，其中六乙二醇的結構為：



24. 如前述請求項中任一項之免疫刺激組成物，其中該免疫刺激寡核苷酸進一步包含複數個CpG模體，複數個CpG模體的每一個CpG模體與複數個CpG模體的其他者是被一個間隔子分隔開。

25. 如請求項24之免疫刺激組成物，其中該間隔子包含至少一個核苷酸或核苷酸類似物。

26. 如請求項25之免疫刺激組成物，其中該間隔子包含去氧核醣磷酸酯橋接。

27. 如請求項26之免疫刺激組成物，其中去氧核醣磷酸酯橋接為無鹼基。

28. 如請求項25之免疫刺激組成物，其中該間隔子包含一個碳鏈。

29. 如請求項28之免疫刺激組成物，其中該碳鏈是衍生自1,3-丙二醇。
30. 如請求項25之免疫刺激組成物，其中該間隔子包含重複化學單元。
31. 如請求項30之免疫刺激組成物，其中該重複化學單元為乙二醇。
32. 如請求項1至31任一項之免疫刺激組成物，其中該免疫刺激寡核苷酸進一步包含硫代磷酸酯骨架。
33. 如前述請求項中任一項之免疫刺激組成物，其中該免疫刺激寡核苷酸包含一個脂質部分。
34. 如請求項33之免疫刺激組成物，其中該脂質部分為膽固醇基。
35. 如請求項33至34中任一項之免疫刺激組成物，其中該脂質部分在免疫刺激寡核苷酸的5'端處或鄰近5'端。
36. 如前述請求項中任一項之免疫刺激組成物，其在5'端、3'端或兩者處包含CpG序列要素。
37. 如請求項36之免疫刺激組成物，其具有至少兩個CpG序列要素。
38. 如請求項36或37之免疫刺激組成物，其中CpG序列要素為GCGA、GCGG、ACGC、CCGC、GCGT或TCGC。
39. 一種用於製備前述請求項中任一項之免疫刺激組成物的方法，其包含：
組合免疫調節劑組成物以及免疫刺激寡核苷酸，以形成免疫刺激組成物；
將該免疫刺激組成物離心，以產生上清液與團粒；以及
分離該團粒。
40. 一種用於刺激類鐸受體21 (TLR21)的方法，其包含：
投與免疫刺激寡核苷酸以及免疫調節劑組成物，其中該免疫刺激寡核苷酸具有至少一個CpG模體以及在該免疫刺激寡核苷酸的5'端處或鄰近5'端的富含鳥嘌呤核苷酸序列，且其中該免疫調節劑組成物包含非編碼核酸質體以及脂質遞送媒劑。

41. 如請求項40之方法，其中該免疫調節劑組成物以及免疫刺激寡核苷酸以協同有效量存在。
42. 如請求項40或41之方法，其中該免疫刺激寡核苷酸包含TLR21的配位體。
43. 一種在個體體內引起免疫反應的方法，其包含向該個體投與如請求項1至38中任一項之免疫刺激組成物。
44. 一種免疫刺激組成物，其包含：
 - a. 核酸質體以及脂質體遞送媒劑；以及
 - b. 包含SEQ ID NO：1的免疫刺激寡核苷酸。
45. 如請求項44之免疫刺激組成物，其中該核酸質體與選自下列組成之群的序列具有至少75%序列一致性：SEQ ID NO：265、SEQ ID NO：266、SEQ ID NO：268。
46. 如請求項44至45中任一項之免疫刺激組成物，其中該免疫刺激寡核苷酸進一步包含一個5'膽固醇基修飾。
47. 如請求項46之免疫刺激組成物，其中該5'膽固醇基修飾包含三乙二醇連接子。

圖式

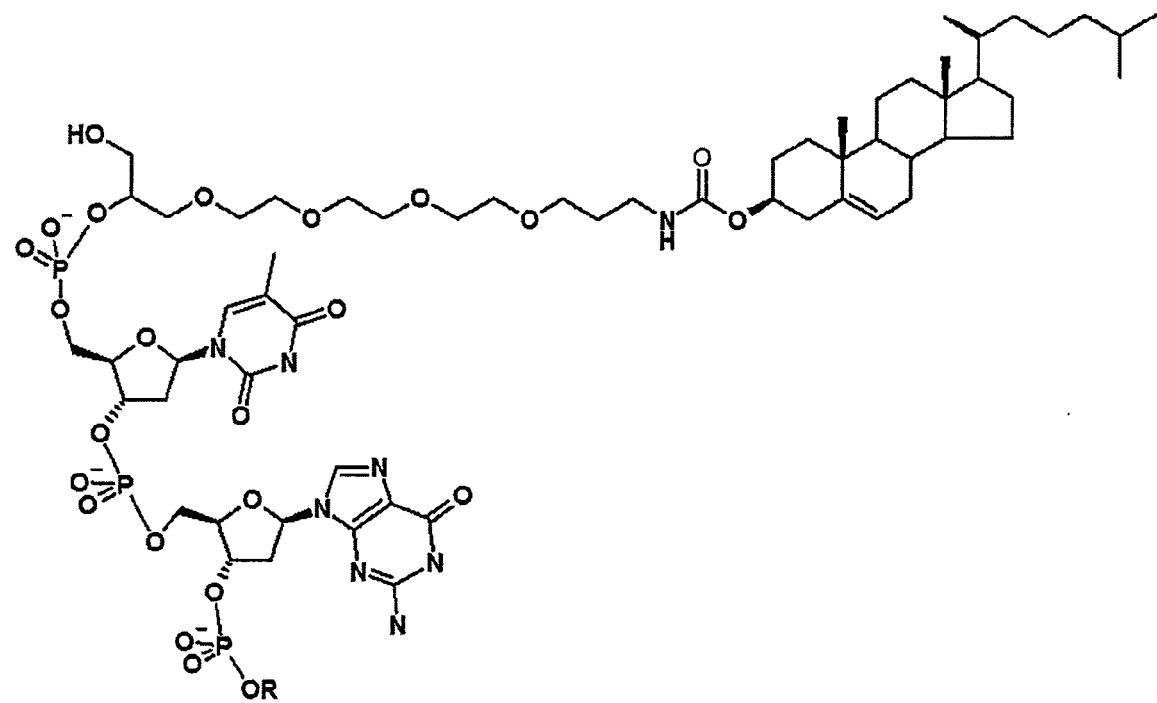


圖 1

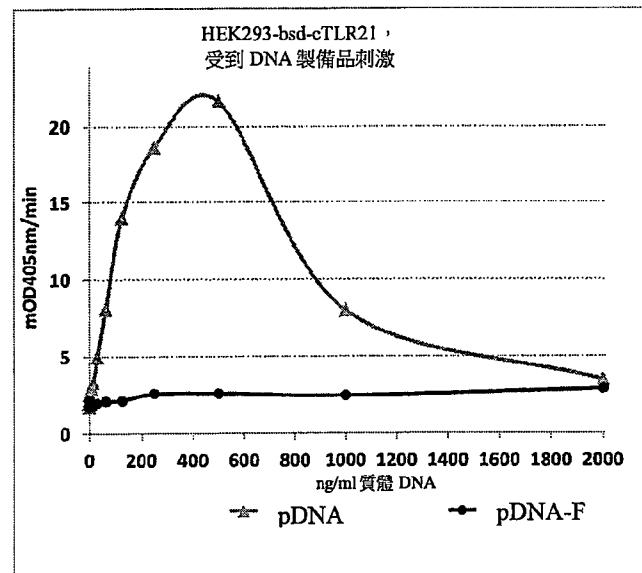


圖 2A

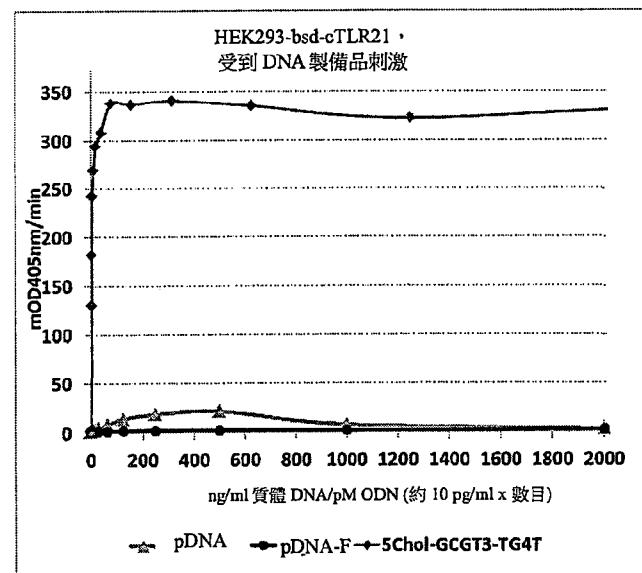


圖 2B

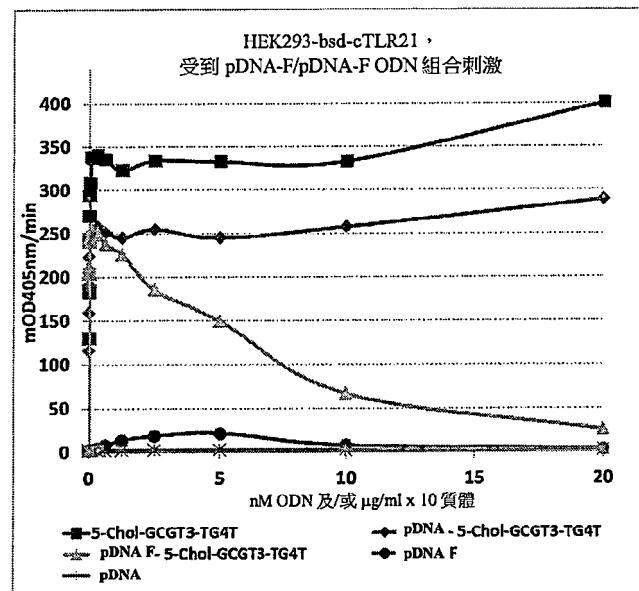


圖 3A

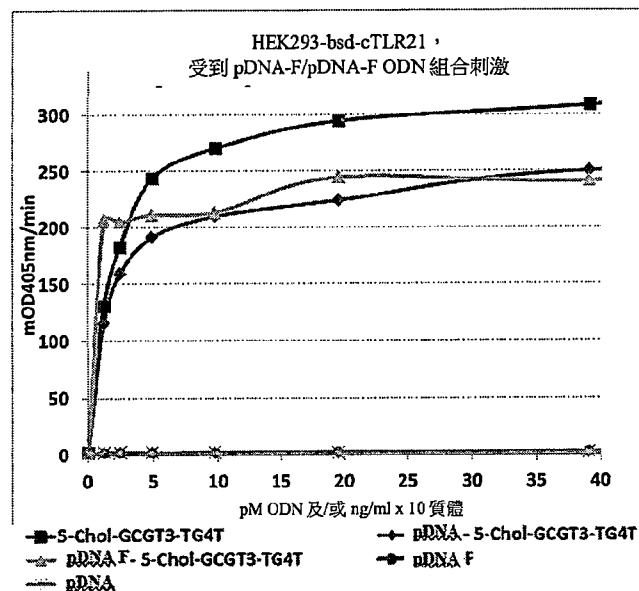


圖 3B

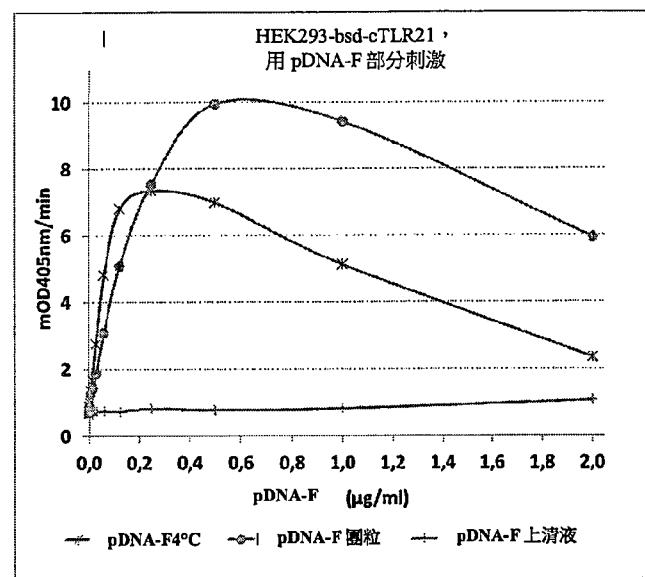


圖 4

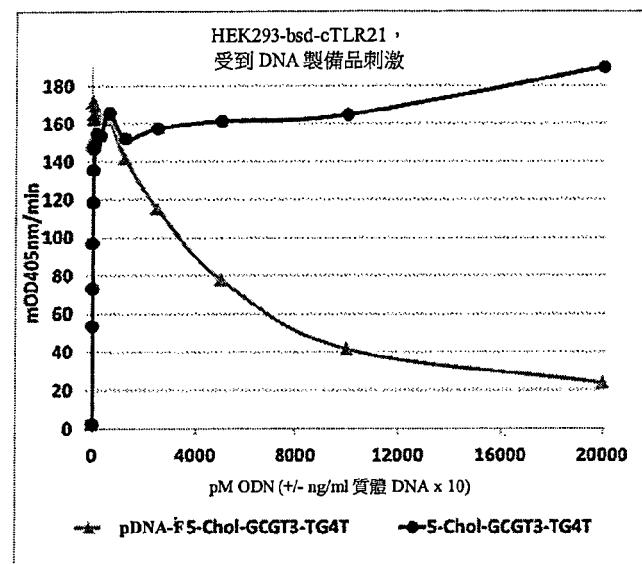


圖 5A

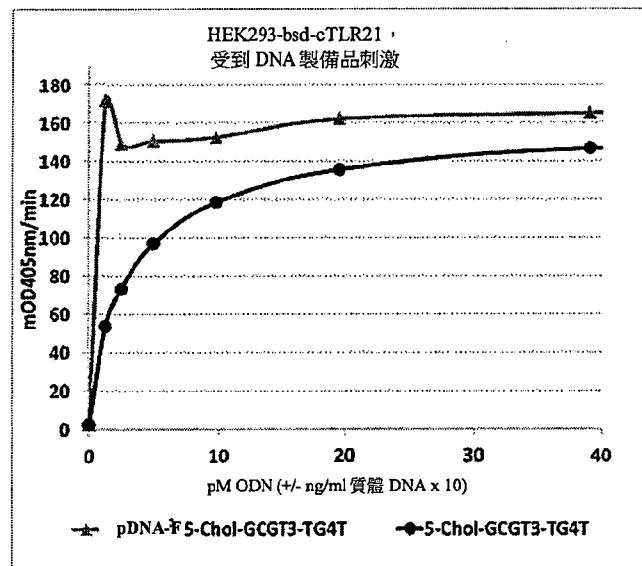


圖 5B

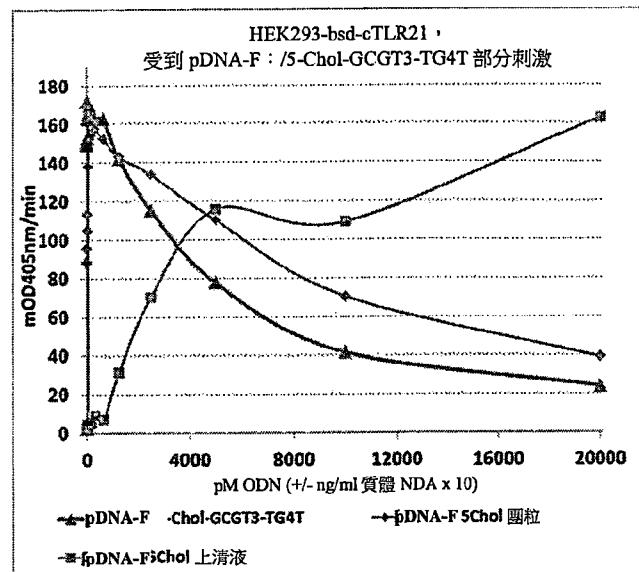


圖 6A

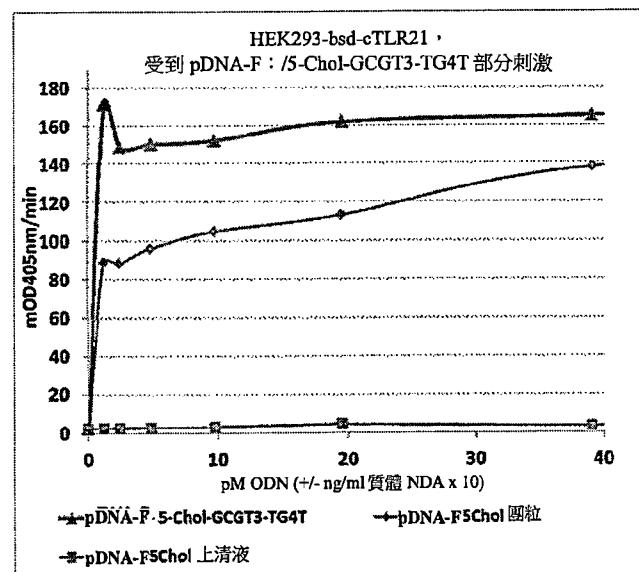


圖 6B

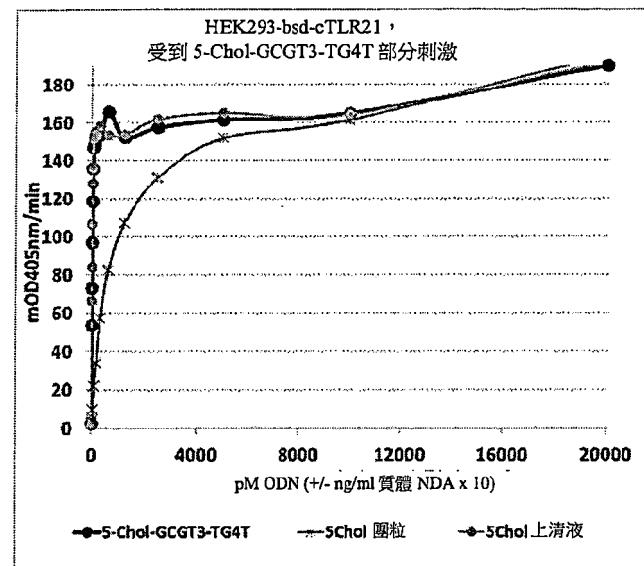


圖 7A

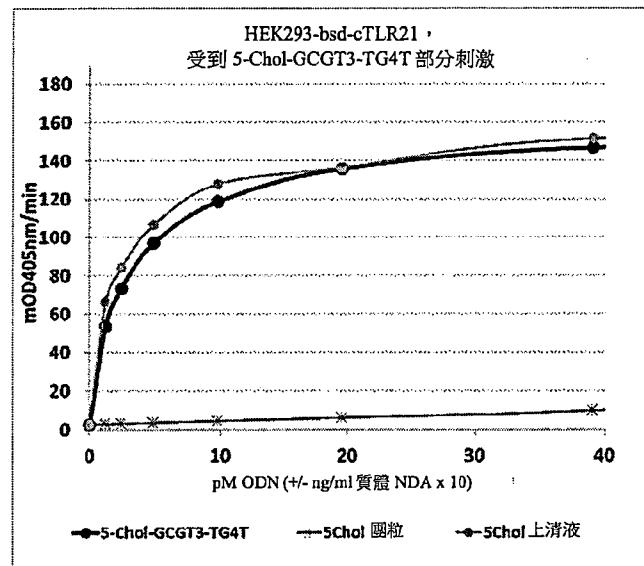


圖 7B

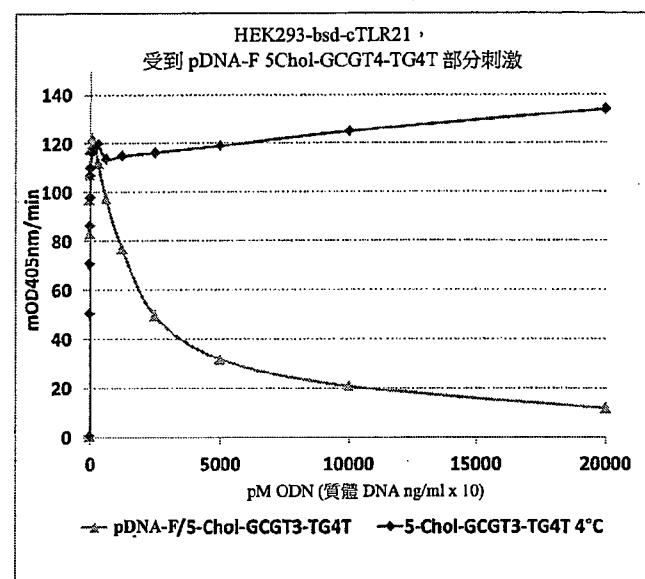


圖 8A

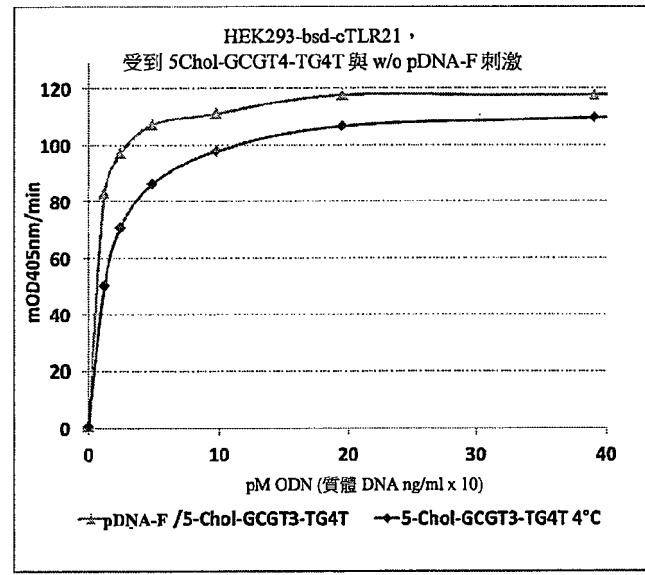


圖 8B

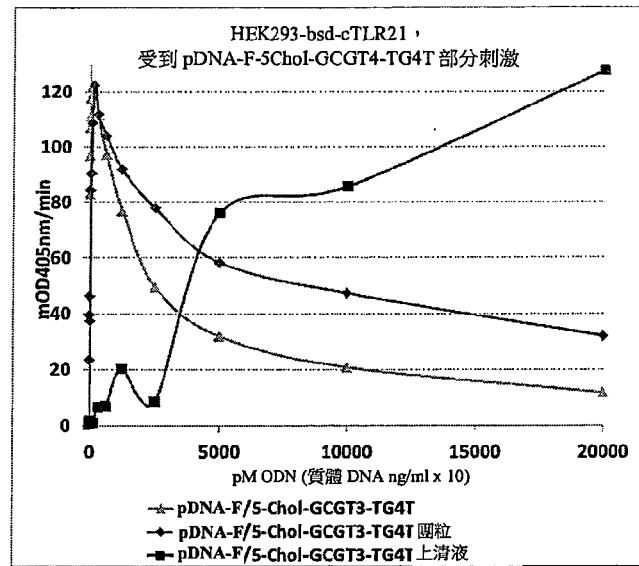


圖 9A

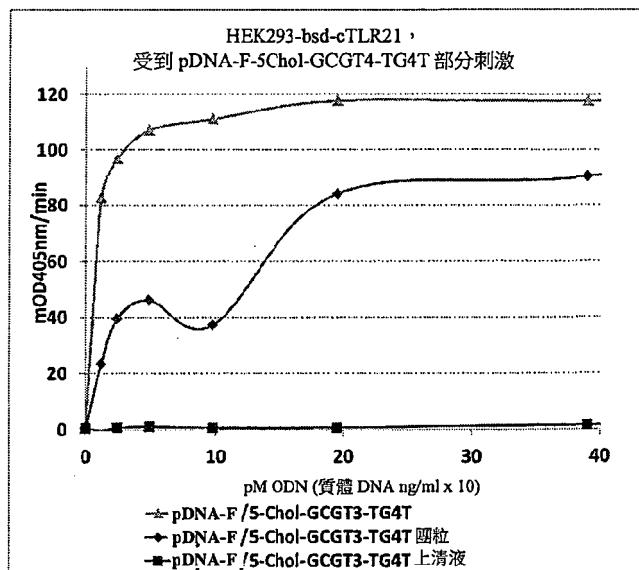


圖 9B

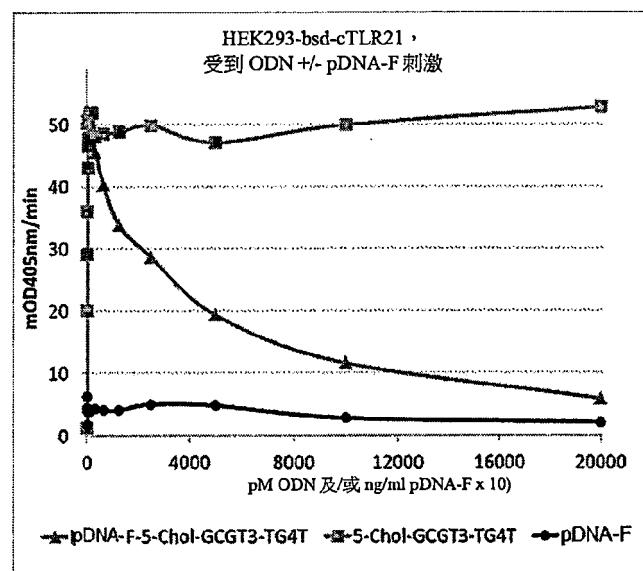


圖 10A

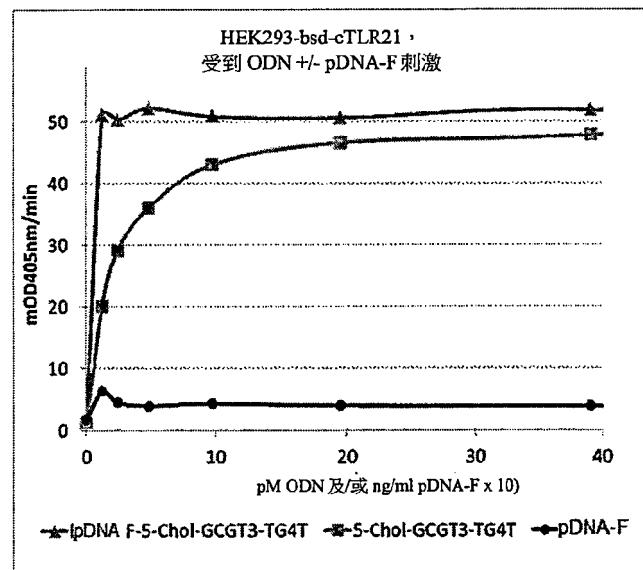


圖 10B

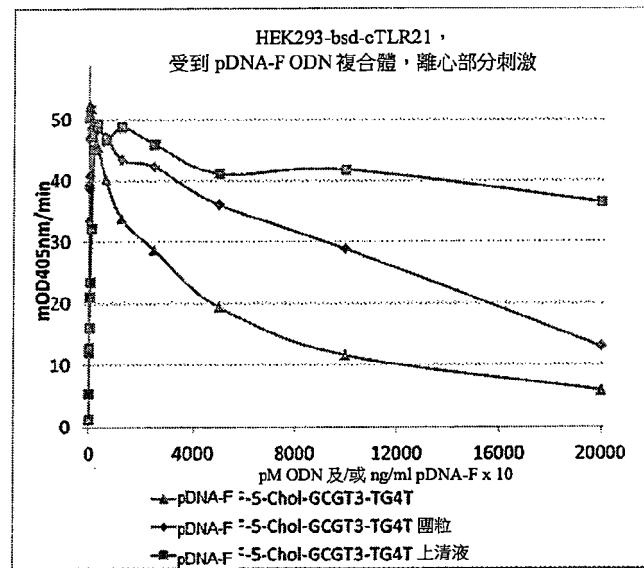


圖 11A

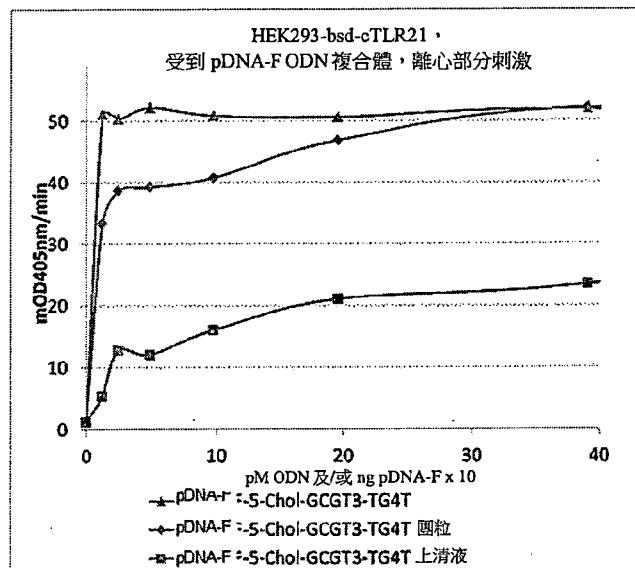


圖 11B

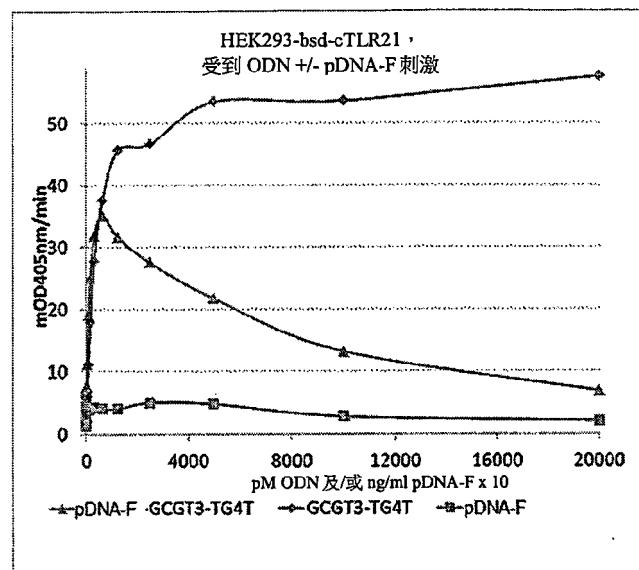


圖 12A

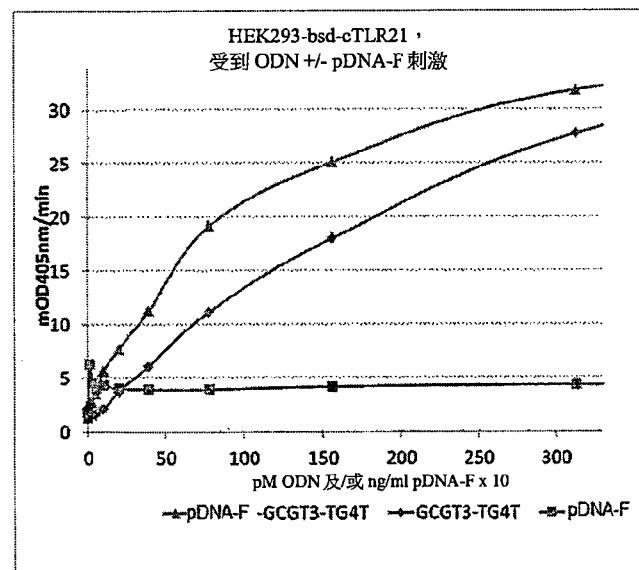


圖 12B

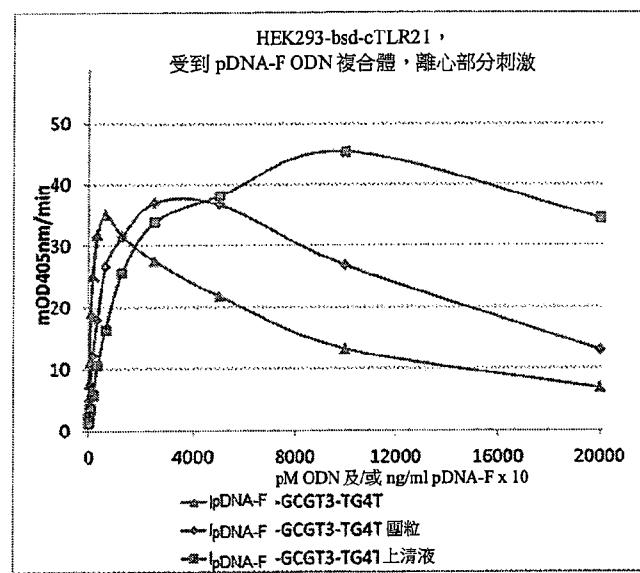


圖 13A

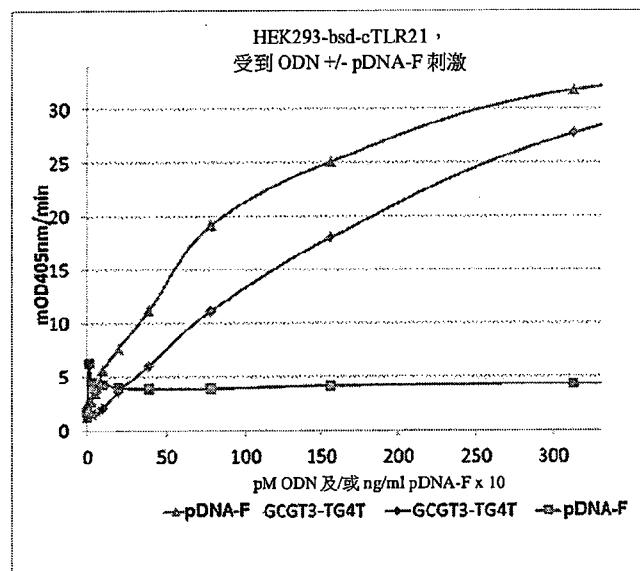


圖 13B

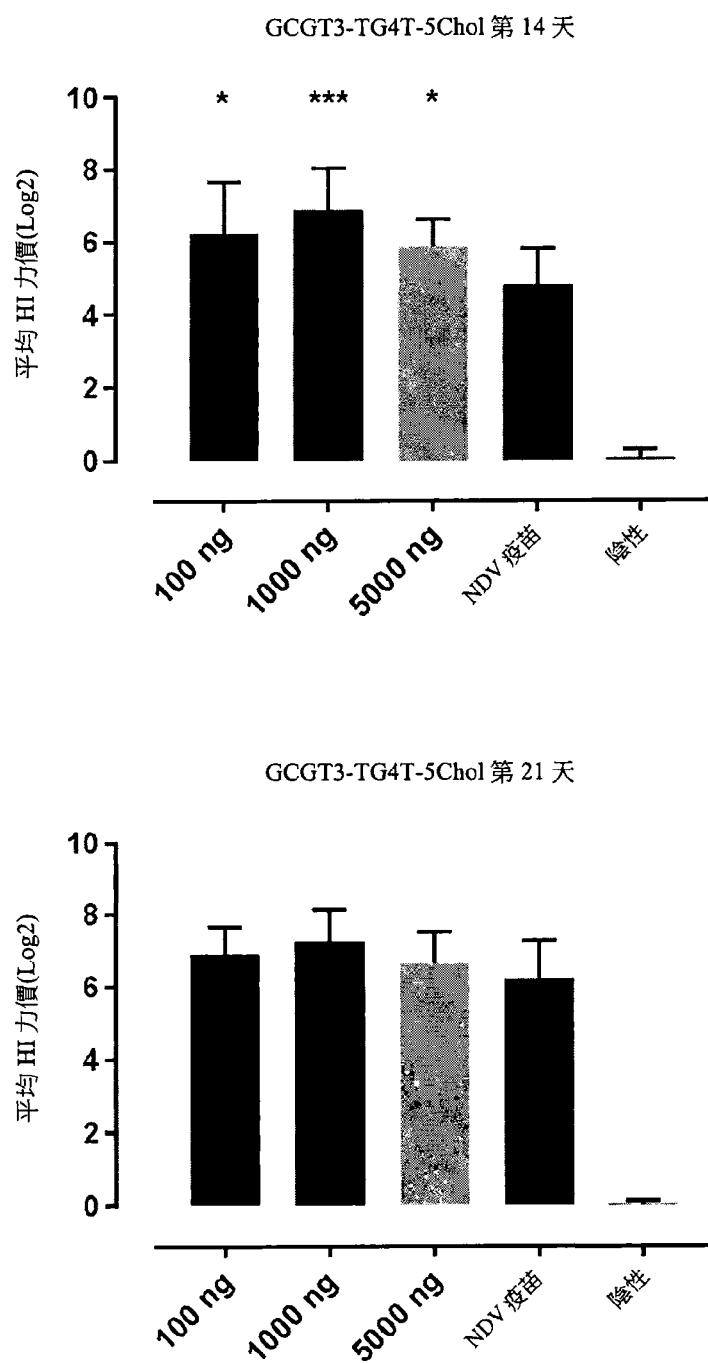


圖 14

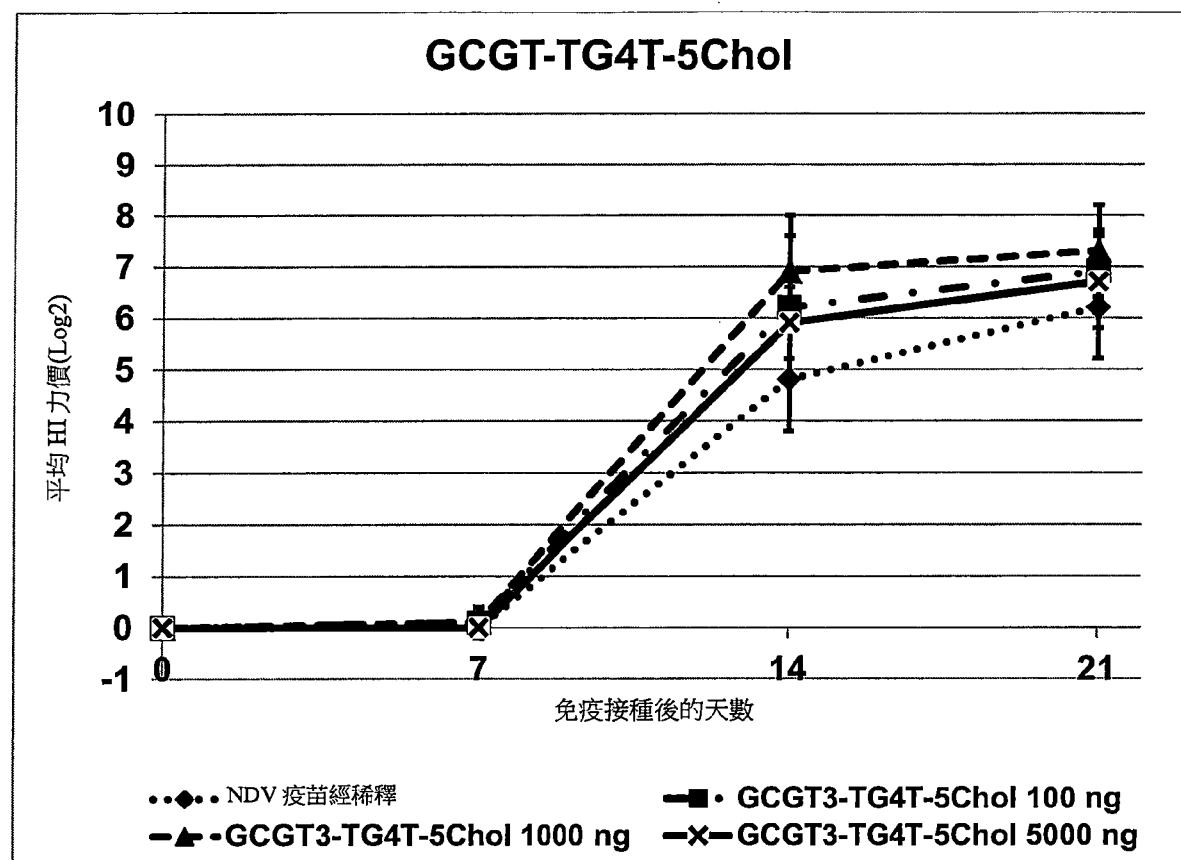


圖 15

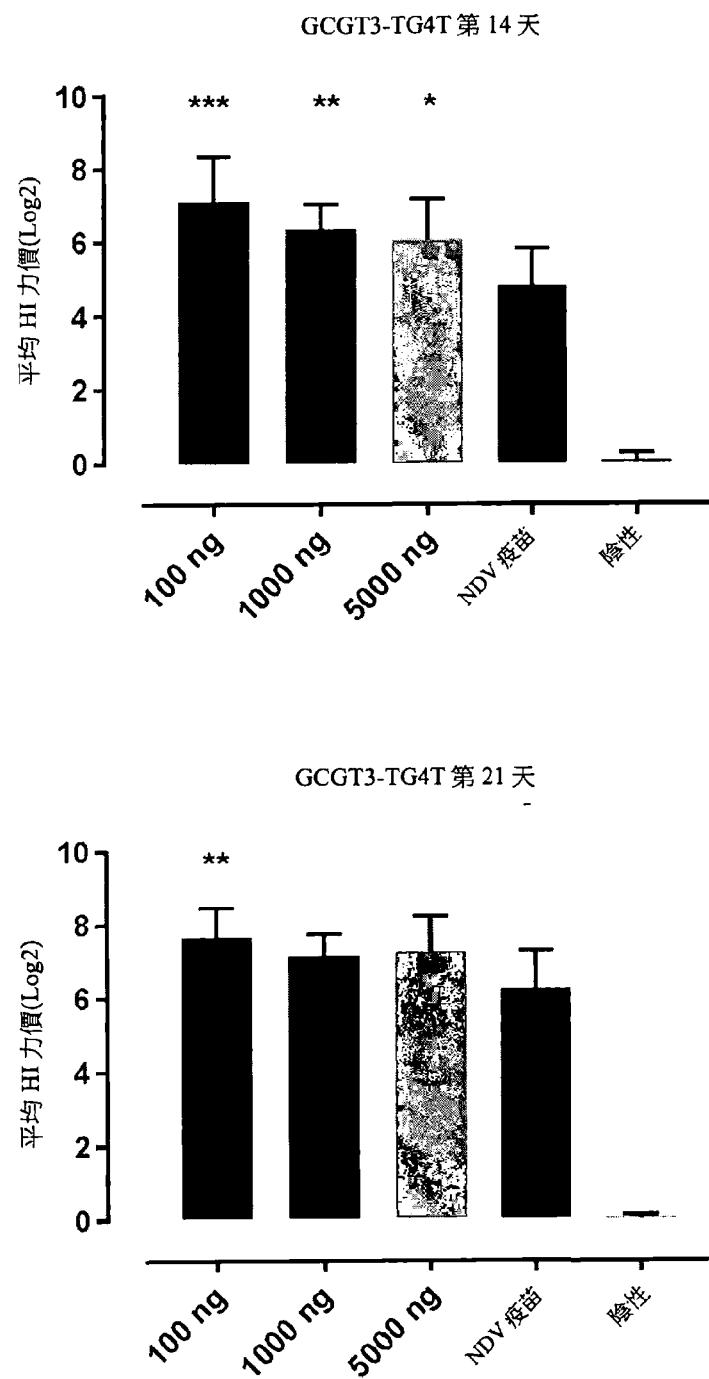


圖 16

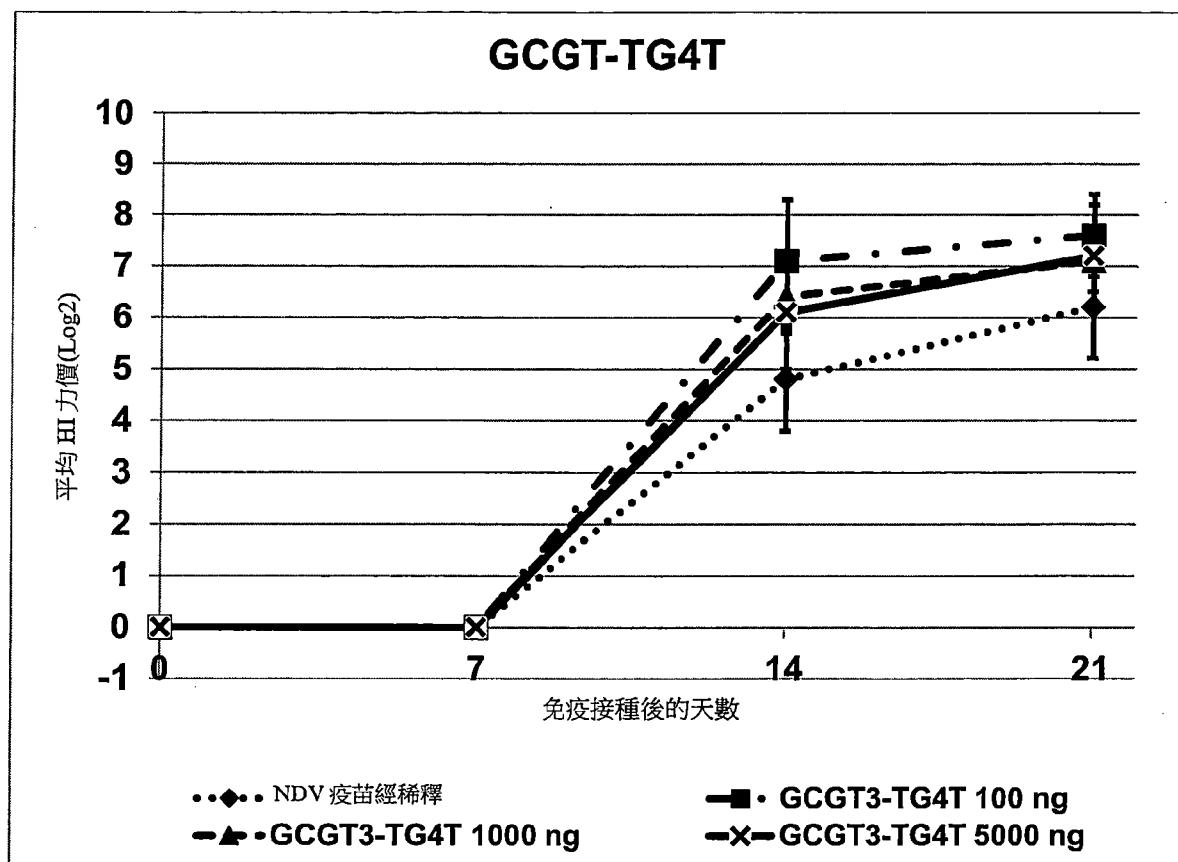


圖 17

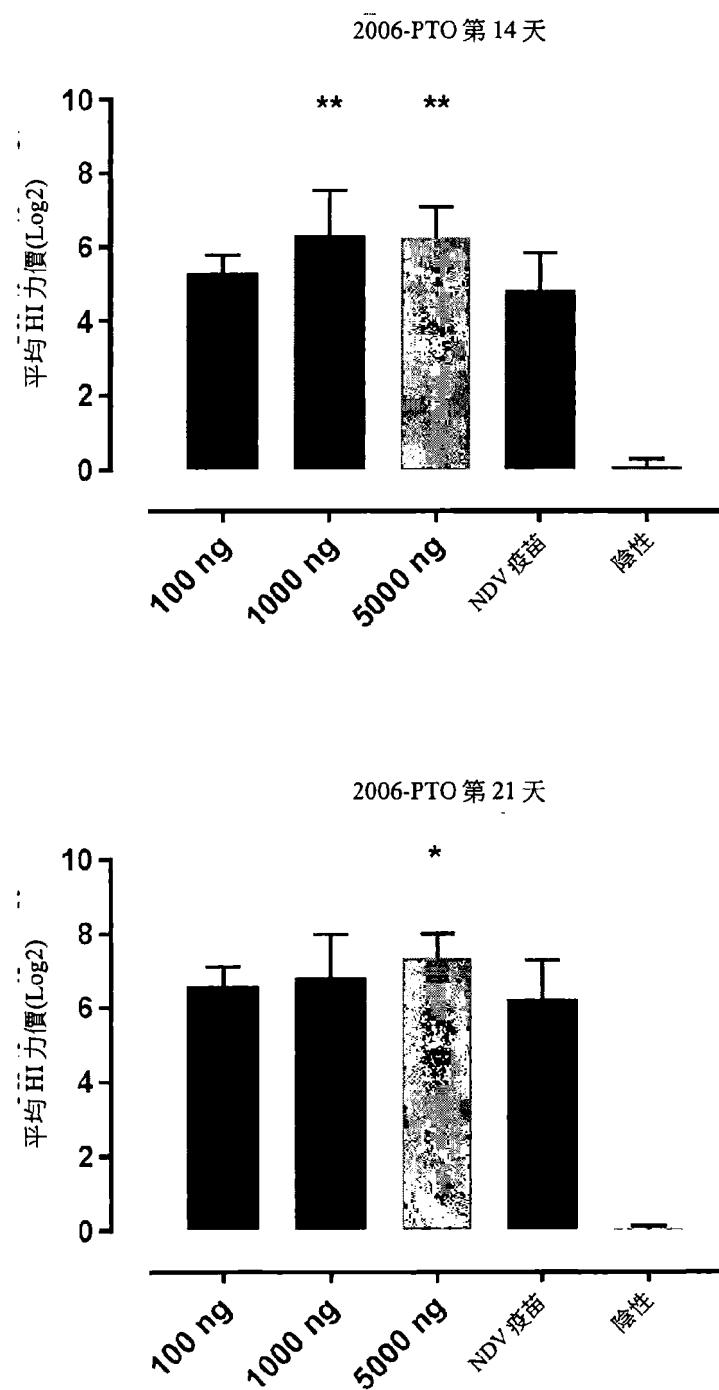


圖 18

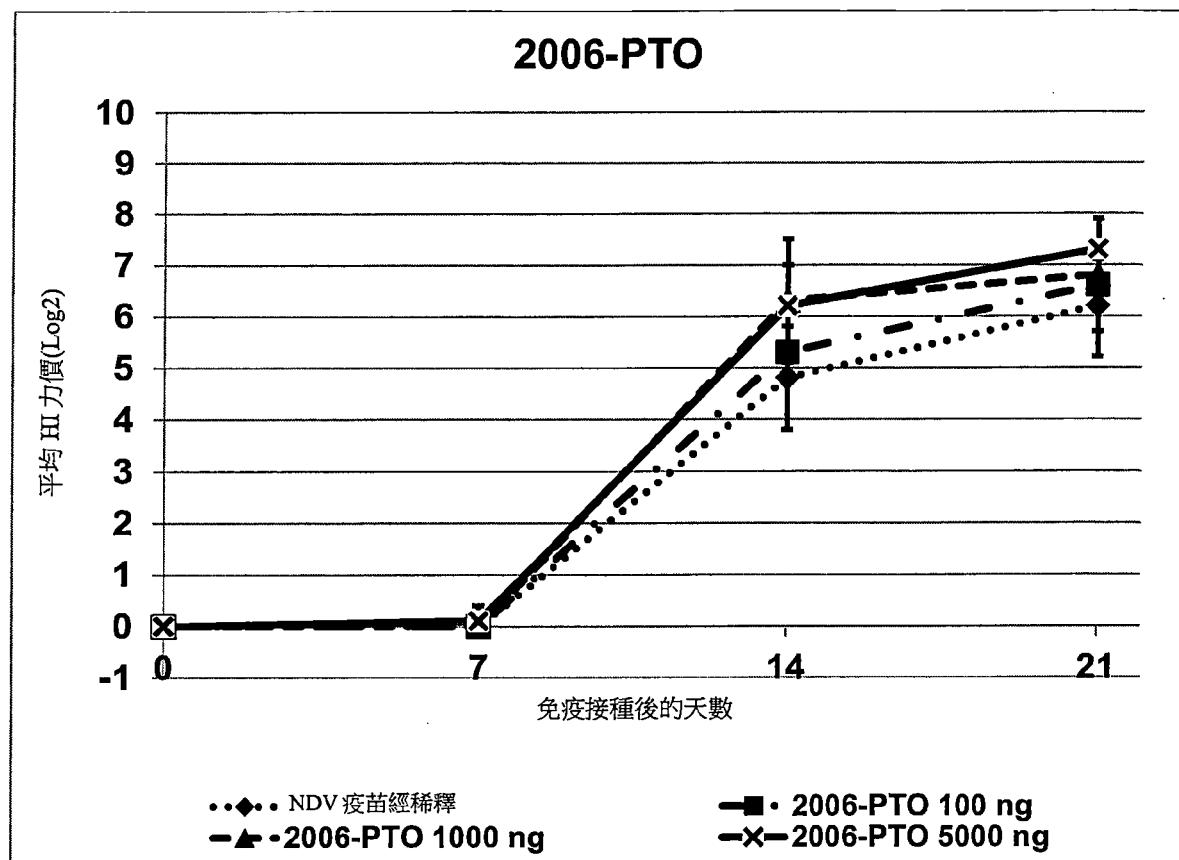


圖 19

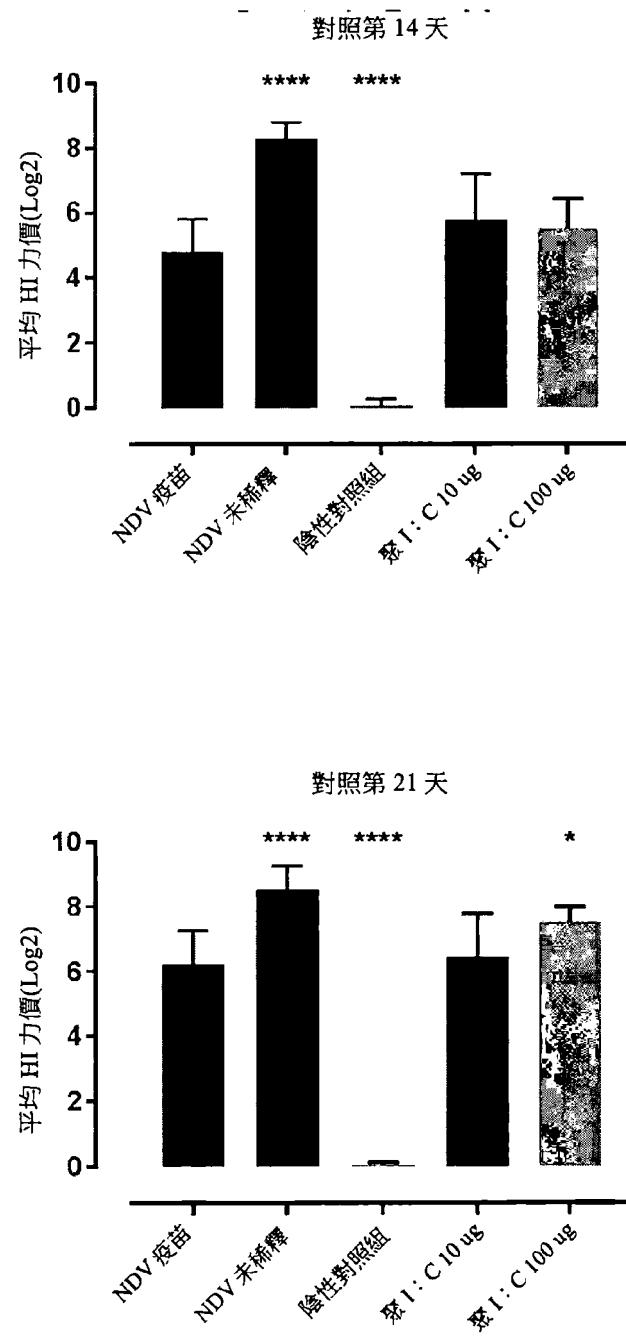


圖 20

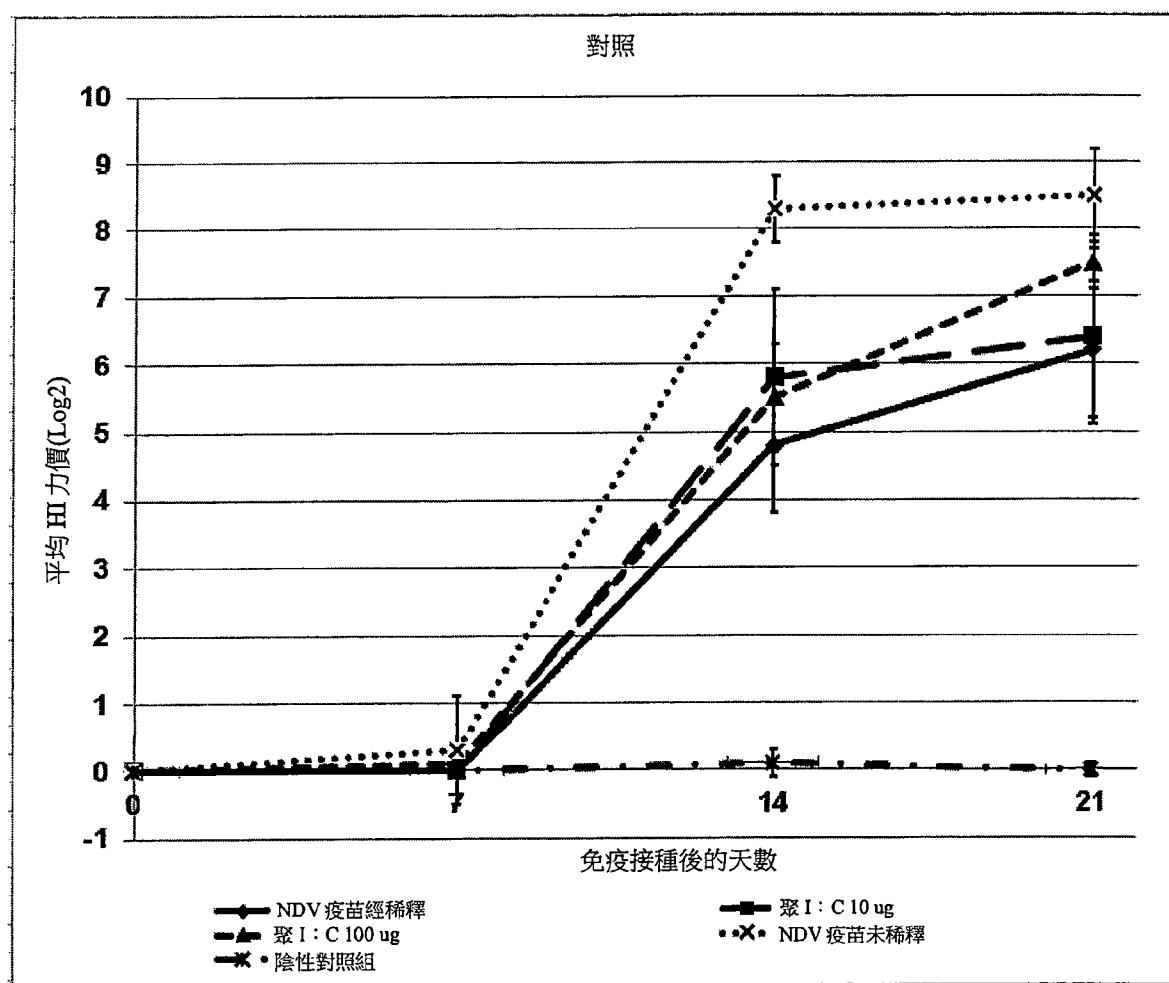


圖 21

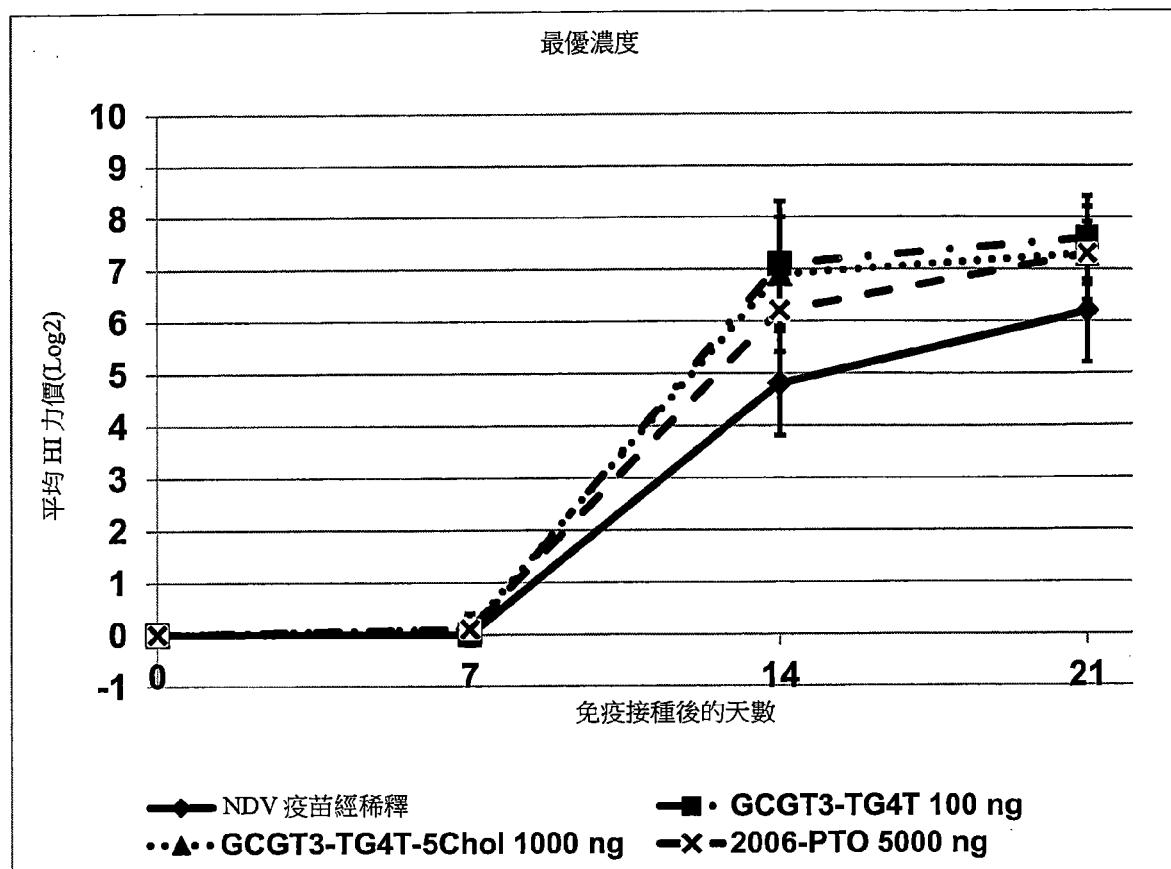


圖 22

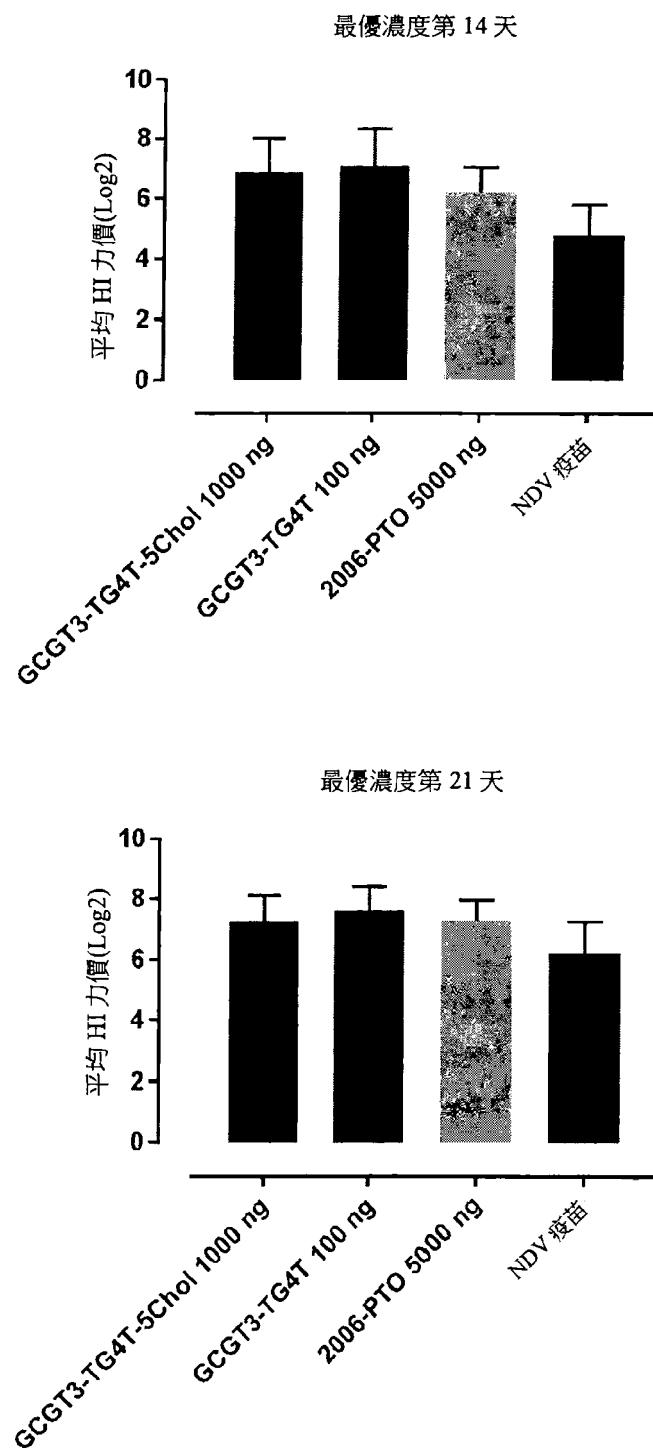


圖 23