



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102921003 B

(45) 授权公告日 2014. 11. 26

(21) 申请号 201210319965. 8 *A61K 48/00* (2006. 01)
(22) 申请日 2008. 07. 07 *A61P 11/00* (2006. 01)
(30) 优先权数据 *A61P 11/06* (2006. 01)
60/948, 529 2007. 07. 09 US *A61P 17/00* (2006. 01)
60/957, 195 2007. 08. 22 US *A61P 29/00* (2006. 01)
60/981, 161 2007. 10. 19 US *A61P 31/00* (2006. 01)
61/015, 284 2007. 12. 20 US *A61P 35/00* (2006. 01)
A61P 37/02 (2006. 01)
(62) 分案原申请数据 *A61P 37/08* (2006. 01)
200880106124. 0 2008. 07. 07

(73) 专利权人 艾德拉药物股份有限公司
地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 埃坎巴 . R. 坎迪马拉 兰涛
王大庆 莱克什米 . 巴加特
苏迪尔 . 阿格拉沃尔

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105
代理人 罗天乐

(56) 对比文件

US 2007105801 A1, 2007. 05. 10,
US 2007142315 A1, 2007. 06. 21,

审查员 黄琦

(51) Int. Cl.

A61K 39/39 (2006. 01)
A61K 31/7088 (2006. 01)
A61K 39/00 (2006. 01)
A61K 39/395 (2006. 01)
A61K 45/00 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书33页
序列表51页 附图32页

(54) 发明名称

稳定化免疫调控性 RNA (SIMRA) 化合物

(57) 摘要

本发明涉及稳定化免疫调控性 RNA (SIMRA) 化合物。更具体地, 本发明提供新型稳定化寡核糖核苷酸作为免疫调节剂用于免疫疗法应用的治疗用途。本发明提供了新的基于 RNA 的寡核糖核苷酸, 其具有改善的核酸酶和 RNA 酶稳定性, 而且具有经由 TLR7 和 / 或 TLR8 的免疫调控活性。

1. 如下所示的 SIMRA 化合物：
5' -AUGCUGCGCUG-M-GUCGCGUCGUA-5' ；
其中 M 为顺，顺 - 环己烷三醇。
2. 一种组合物，其包含权利要求 1 的 SIMRA 化合物和生理学可接受的载体。
3. 权利要求 1 的 SIMRA 化合物在制备用于在脊椎动物中产生免疫应答的药物中的用途，其中产生免疫应答包括对所述脊椎动物施用权利要求 1 的 SIMRA 化合物，其中所述脊椎动物是哺乳动物，所述免疫应答是 TLR7/8 介导的免疫应答。
4. 权利要求 3 的用途，其中所述治疗还包括施用一种或多种化疗化合物、靶向治疗剂、抗体、DNA 疫苗、蛋白疫苗、肽疫苗、抗原、或佐剂。
5. 权利要求 4 的用途，其中所述佐剂是明矾。
6. 权利要求 1 的 SIMRA 化合物在制备用于治疗性处理患有会受益于调控免疫应答的疾病或病症的脊椎动物的药物中的用途，其中所述处理包括对所述脊椎动物施用药学有效量的权利要求 1 的 SIMRA 化合物。
7. 权利要求 6 的用途，其中所述疾病或病症是癌症、自身免疫性病症、炎性病症、传染病、皮肤病症、变态反应、哮喘、或由病原体引起的疾病。
8. 权利要求 7 的用途，其中所述炎性病症是气道炎症。
9. 权利要求 6 的用途，其中所述处理进一步包括施用一种或多种化疗化合物、靶向治疗剂、抗体、DNA 疫苗、蛋白疫苗、肽疫苗、抗原、或佐剂。
10. 权利要求 9 的用途，其中所述佐剂是明矾。
11. 权利要求 1 的 SIMRA 化合物在制备用于预防性处理患有会受益于调控免疫应答的疾病或病症的脊椎动物的药物中的用途，其中所述处理包括对所述脊椎动物施用药学有效量的权利要求 1 的 SIMRA 化合物。
12. 权利要求 11 的用途，其中所述疾病或病症是癌症、自身免疫性病症、炎性病症、传染病、皮肤病症、变态反应、哮喘、或由病原体引起的疾病。
13. 权利要求 12 的用途，其中所述炎性病症是气道炎症。
14. 权利要求 11 的用途，其中所述处理进一步包括施用一种或多种化疗化合物、靶向治疗剂、抗体、DNA 疫苗、蛋白疫苗、肽疫苗、抗原、或佐剂。
15. 权利要求 14 的用途，其中所述佐剂是明矾。
16. 权利要求 2 的组合物，还包含一种或多种化疗化合物、靶向治疗剂、抗体、DNA 疫苗、蛋白疫苗、肽疫苗、抗原、或佐剂。
17. 权利要求 16 的组合物，其中所述佐剂是明矾。

稳定化免疫调控性 RNA (SIMRA) 化合物

[0001] 本申请是申请日为 2008 年 7 月 7 日、申请号为 200880106124.0 (国际申请号为 PCT/US2008/069335)、发明名称为“稳定化免疫调控性 RNA (SIMRA) 化合物”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请要求 2007 年 7 月 9 日提交的美国临时申请流水号 60/948,529 ;2007 年 8 月 22 日提交的美国临时申请流水号 60/957,195 ;2007 年 10 月 19 日提交的美国临时申请流水号 60/981,161 ;和 2007 年 12 月 20 日提交的美国临时申请流水号 61/015,284 的权益。通过提及而将这些申请的内容完整收入本文。

发明领域

[0004] 一般而言,本发明涉及免疫学和使用寡核糖核苷酸作为免疫调控剂的免疫疗法应用的领域。更具体地,本发明涉及免疫调控性 RNA 组合物和使用它们经由 To11 样受体 8 (TLR8)、To11 样受体 7 (TLR7) 及 TLR7 和 TLR8 二者调控免疫应答的方法。

[0005] 发明背景

[0006] 基于应答中牵涉的细胞子集,免疫应答牵涉先天性和适应性应答两者。例如,经典的细胞介导的功能(诸如迟发型超敏感性和细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 活化)中牵涉的 T 辅助 (Th) 细胞是 Th1 细胞,而作为 B 细胞活化的辅助细胞牵涉的 Th 细胞是 Th2 细胞。免疫应答的类型受到响应抗原暴露而生成的细胞因子和趋化因子的影响。细胞因子通过影响 T 辅助细胞 1 (Th1) 和 T 辅助细胞 2 (Th2) 的平衡(其直接影响发生的免疫应答的类型)而为控制免疫应答提供一种手段。若平衡朝向更高数目的 Th1 细胞,则发生细胞介导的免疫应答,包括细胞毒性 T 细胞 (CTL) 活化。在平衡朝向更高数目的 Th2 细胞时,则发生体液的或抗体的免疫应答。这每一种免疫应答导致不同的一组细胞因子自 Th1 和 Th2 细胞分泌。由 Th1 和 Th2 细胞分泌的细胞因子的差异可能是这两种 T 细胞子集的不同生物学功能的结果。

[0007] Th1 细胞牵涉身体对抗原(例如病毒感染、细胞内病原体、和肿瘤细胞)的先天性应答。对抗原的初始应答可以是自抗原呈递细胞(例如活化的巨噬细胞和树突细胞)分泌 IL-12 和伴随的 Th1 细胞活化。活化 Th1 细胞的结果是某些细胞因子(例如 IL-2、IFN- γ 和其它细胞因子)的分泌和伴随的抗原特异性 CTL 的活化。已知 Th2 细胞响应细菌、寄生物、抗原和变应原而活化,并且可经由分泌某些细胞因子(例如 IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10、IL-13 和其它细胞因子)和趋化因子而介导身体的适应性免疫应答(例如免疫球蛋白生成和嗜曙红细胞活化)。这些细胞因子中某些的分泌可导致 B 细胞增殖和抗体生成升高。另外,这些细胞因子中的某些可刺激或抑制其它细胞因子的释放(例如 IL-10 抑制自 Th1 细胞分泌 IFN- γ 和自树突细胞分泌 IL-12)。最后,Th1 和 Th2 细胞之间的平衡及响应选定的刺激物而释放的细胞因子和趋化因子能在身体的免疫系统如何响应疾病中具有重要的作用。例如,IFN- α 可抑制丙型肝炎,而 MIP-1 α 和 MIP-1 β (分别也称为 CCL3 和 CCL4) 可抑制 HIV-1 感染。Th1/Th2 免疫应答的最佳平衡呈现使用免疫系统治疗和预防多种疾病的机会。

[0008] 在哺乳动物中,可以通过例如引入细菌或含有非甲基化 CpG 二核苷酸的合成 DNA 来诱导 Th1 免疫应答,该免疫应答源自于特定寡核苷酸序列(例如非甲基化的 CpG)被呈递给某些免疫细胞上称为样式识别受体 (PRR) 的受体。这些 PRR 中的某些是 Toll 样受体 (TLR)。

[0009] 在响应微生物感染而诱导先天性免疫应答中紧密牵涉 TLR。在脊椎动物中,TLR 由已知识别病原体相关分子样式的十种蛋白质(TLR1 至 TLR10)的一个家族组成。在这十种蛋白质中,已知 TLR3、7、8、和 9 位于细胞内的内体中,而且识别核酸(DNA 和 RNA)和小分子诸如核苷和核酸代谢物。已知 TLR3 和 TLR9 分别识别存在于病毒的和细菌的和合成的 DNA 中的核酸诸如 dsRNA 和非甲基化 CpG 二核苷酸。已经显示了,细菌 DNA 活化免疫系统,并产生抗肿瘤活性(Tokunaga T 等, *J. Natl. Cancer Inst.* (1984)72:955-962; Shimada S 等, *Jpn. H cancer Res*, 1986, 77, 808-816; Yamamoto S 等, *Jpn. J. Cancer Res.*, 1986, 79, 866-73; Messina, J 等, *J. Immunolo.* (1991)147:1759-1764)。使用含有 CpG 二核苷酸的反义寡核苷酸的其它研究已经显示了免疫应答的刺激(Zhao Q 等, *Biochem. Pharmacol.* 1996, 26, 173-82)。随后的研究显示了 TLR9 识别存在于细菌的和合成的 DNA 中的非甲基化 CpG 基序(Hemmi H 等, *Nature.* (2000)408:740-5)。对含有 CpG 的硫代磷酸酯寡核苷酸的其它修饰也能影响它们经由 TLR9 起作用 and 调控免疫应答的能力(参见例如 Zhao 等, *Biochem. Pharmacol.* (1996)51:173-182; Zhao 等, *Biochem Pharmacol.* (1996)52:1537-1544; Zhao 等, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* (1997)7:495-502; Zhao 等, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (1999)9:3453-3458; Zhao 等, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (2000)10:1051-1054; Yu 等, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (2000)10:2585-2588; Yu 等, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (2001)11:2263-2267; 及 Kandimalla 等, *Bioorg. Med. Chem.* (2001)9:807-813)。另外,结构活性关系研究已经容许鉴定如下的合成基序和新的基于 DNA 的结构,它们诱导的特异性免疫应答序型 (profile) 与那些源自于非甲基化 CpG 二核苷酸的截然不同(Kandimalla ER 等, *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2005)102:6925-30. Kandimalla ER 等, *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2003)100:14303-8. Cong YP 等, *Biochem Biophys Res Commun.* (2003)310:1133-9. Kandimalla ER 等, *Biochem Biophys Res Commun.* (2003)306:948-53. Kandimalla ER 等, *Nucleic Acids Res.* (2003)31:2393-400. Yu D 等, *Bioorg Med Chem.* (2003)11:459-64. Bhagat L 等, *Biochem Biophys Res Commun.* (2003)300:853-61. Yu D 等, *Nucleic Acids Res.* (2002)30:4460-9. Yu D 等, *J Med Chem.* (2002)45:4540-8. Yu D 等, *Biochem Biophys Res Commun.* (2002)297:83-90. Kandimalla ER 等, *Bioconjug Chem.* (2002)13:966-74. Yu D, K 等, *Nucleic Acids Res.* (2002)30:1613-9. Yu D 等, *Bioorg Med Chem.* (2001)9:2803-8. Yu D 等, *Bioorg Med Chem Lett.* (2001)11:2263-7. Kandimalla ER 等, *Bioorg Med Chem.* (2001)9:807-13. Yu D 等, *Bioorg Med Chem Lett.* (2000)10:2585-8. Putta MR 等, *Nucleic Acids Res.* (2006)34:3231-8)。然而,直到最近,TLR7 和 TLR8 的天然配体仍是未知的。

[0010] 已经显示了,TLR7 和 8 识别病毒的和合成的单链 RNA 及小分子,包括多种核苷(Diebold, S. S. 等, *Science* v:303, 1529-1531 (2004))。Diebold 等(*Science*, 303:1529-1531 (2004)) 显示了,对流感病毒的 IFN- α 应答要求流感基因组 RNA

的内体识别及通过 TLR7 和 MyD88 的信号传导,而且鉴定了 ssRNA 为一种 TLR7 配体。某些合成化合物,即咪唑喹诺酮(imidazoquinolones)、咪喹莫特(imiquimod)(R-837)和雷西莫特(resiquimod)(R-848)是 TLR7 和 TLR8 的配体(Hemmi H 等,(2002)Nat Immunol 3:196-200;Jurk M 等,(2002)Nat Immunol 3:499)。另外,已经显示了某些鸟苷类似物诸如 7-脱氮 -G、7-硫 -8-氧 -G(TOG)、和 7-烯丙基 -8-氧 -G(洛索立宾(loxoribine))在高浓度时活化 TLR7(Lee J 等,Proc Natl Acad Sci USA. 2003, 100:6646-51)。然而,还已知这些小分子例如咪喹莫特经由其它受体起作用(Schon MP 等,(2006)J. Invest Dermatol., 126, 1338-47)。

[0011] TLR7 或 TLR8 识别和潜在地广泛范围的刺激性 ssRNA 分子缺乏任何已知的特定 ssRNA 基序提示,TLR7 和 TLR8 能识别自身的和病毒的 RNA 两者。最近显示了,某些富含 GU 的寡核糖核苷酸在与 N-[1-(2, 3-二油酰氧基)丙基]-N, N, N-三甲基铵甲基硫酸盐(DOTAP)或其它脂质剂复合时是免疫刺激性的,并且经由 TLR7 和 TLR8 起作用(Heil 等,Science, 303:1526-1529(2004);Lipford 等,W003/086280;Wagner 等,W098/32462)。然而, RNA 分子已经被使用了很多年,例如作为核酶和更新近地,作为 siRNA 和微小 RNA,而且作为核酶、siRNA、和微小 RNA 采用的 RNA 含有 GU 二核苷酸。另外,已经显示了,多种这些 RNA 分子在脂质存在的情况中经由 TLR 刺激而引起免疫应答(Kariko 等,Immunity(2005) 23:165-75;Ma Z 等,Biochem Biophys Res Commun., (2005) 330, 755-9)。然而,这些 RNA 分子的不稳定性阻碍了许多领域(例如人类疾病的预防和治疗)中使用和应用这些分子的进展。

[0012] 含有核糖或脱氧核糖的寡核苷酸和寡脱氧核苷酸已经在极其多种领域中使用,包括但不限于诊断探测、PCR 引发、基因表达的反义抑制、siRNA、微小 RNA、适体、核酶、和基于 Toll 样受体(TLR)的免疫治疗剂。最近,许多出版物已经证明了寡脱氧核苷酸作为免疫调控剂的用途,以及它们在对许多疾病诸如变态反应、哮喘、自身免疫、癌症和传染病的免疫疗法应用中单独的或作为佐剂的用途。

[0013] DNA 寡核苷酸受到 TLR9 识别,而 RNA 寡核苷酸受到 TLR7 和 / 或 TLR8 识别的实情最可能是由于 DNA 和 RNA 之间的结构构造差异。然而,DNA 和 RNA 之间的化学差异也使 DNA 在化学和酶方面远比 RNA 更稳定。

[0014] RNA 被普遍存在的胞外核糖核酸酶(RNA 酶)快速降解,这确保少许的(若有的话)自体 ssRNA 到达抗原呈递细胞。外切核酸酶对核酸的降解主要是 3' - 核酸酶消化的,及较小比例经由 5' - 外切核酸酶作用的。在外切核酸酶消化外, RNA 还能被 RNA 酶的内切核酸酶活性降解。目前为止,基于 RNA 的分子不得与脂质复合来提供针对核酸酶的稳定性。

[0015] 虽然这些核糖核酸酶提供预防自身免疫反应性的必要功能,但是它们还给为用于免疫疗法而设计的任何合成 ssRNA 分子呈现了一个实质性问题,即核糖核酸酶会快速降解合成的和天然的 ssRNA 两者。为了克服此障碍,已经如下尝试了保护 ssRNA 分子免于降解,即在脂质体中包囊 ssRNA,用聚乙撑亚胺将其缩合(condense),或将其与诸如 N-[1-(2, 3-二油酰氧基)-丙基]-N, N, N-三甲基铵甲基硫酸盐(DOTAP)等分子复合。然而,这些保护措施是对仍然不稳定的 ssRNA 应用的第二手措施,而且这些保护措施对 ssRNA(天然的或合成的)的体内效力和免疫调控活性的影响仍然不清楚。

[0016] Agrawal 等(11/697, 422)记载了一类新的 SIMRA 组合物。然而,开发别的化合物仍然是一项挑战,所述化合物保留裸 RNA,使得其继续被识别为 TLR7 和 / 或 TLR8 的配体,同

时改善其稳定性,使得它能成为在体内有用的分子。理想地,可以经由设计天性稳定的基于 RNA 的分子来应对此挑战,所述分子能充当新型免疫治疗剂,其会在许多临床相关应用中找到应用,诸如在共施用改善疫苗接种的效果或者在引起或增强免疫应答有益时,治疗和/或预防疾病,例如癌症、自身免疫性疾病、气道炎症、炎性疾病、传染病、皮肤病症、变态反应、哮喘或由病原体引起的疾病。

[0017] 发明概述

[0018] 在第一个方面,本发明提供了新型稳定化免疫调控性 RNA (“SIMRA”) 化合物(下文有进一步定义)及其用于诱导和/或增强免疫应答的用途。依照本发明的新型化学实体提供了诱导和/或增强免疫应答的化合物,其在诱导免疫应答方面实质上更有效且对于降解实质上更不敏感。依照本发明的方法使得能够为免疫疗法应用使用 SIMRA 来改变细胞因子和/或趋化因子序型。

[0019] 在第一个方面的一个实施方案中,本发明提供了一种作为 TLR8 激动剂的 SIMRA 化合物。

[0020] 在第一个方面的另一个实施方案中,本发明提供了一种作为 TLR7 和 TLR8 二者激动剂的 SIMRA 化合物。

[0021] 在第一个方面的又一个实施方案中,本发明提供了一种作为 TLR7 激动剂的 SIMRA 化合物。

[0022] 在第一个方面的又一个实施方案中,本发明提供了一种作为佐剂的 SIMRA 化合物。

[0023] 在第二个方面,本发明提供了药物组合物。这些组合物包含本发明的任一种 SIMRA 组合物和生理学可接受的或药学可接受的载体。

[0024] 在第三个方面,本发明提供了一种用于在脊椎动物中产生免疫应答的方法,该方法包括给所述脊椎动物施用药学有效量的至少一种依照本发明的 SIMRA 化合物。

[0025] 在第四个方面,本发明提供了一种用于治疗性处理患有会受益于诱导和/或增强免疫应答的疾病或病症(例如癌症、自身免疫性疾病、气道炎症、炎性疾病、传染病、皮肤病症、变态反应、哮喘或由病原体引起的疾病)的脊椎动物的方法,该方法包括给患有此类病症或疾病的患者施用药学有效量的至少一种依照本发明的 SIMRA 化合物。

[0026] 在第五个方面,本发明提供了一种用于在脊椎动物中预防会受益于诱导和/或增强免疫应答的疾病或病症(例如癌症、自身免疫性疾病、气道炎症、炎性疾病、传染病、皮肤病症、变态反应、哮喘或由病原体引起的疾病)的方法,该方法包括给易患此类病症或疾病的脊椎动物施用药学有效量的至少一种依照本发明的 SIMRA 化合物。

[0027] 在第六个方面,本发明提供了一种如下的方法,即分离能够生成细胞因子或趋化因子的细胞(例如免疫细胞、PBMC),在标准细胞培养条件下培养此类细胞,用至少一种本发明的 SIMRA 化合物离体处理此类细胞,使得所分离的细胞生成或分泌水平升高的细胞因子或趋化因子,并给需要细胞因子或趋化因子疗法以预防或治疗疾病的患者施用或再施用经处理的细胞。

[0028] 在本发明这个方面的一个进一步的实施方案中,给需要细胞因子或趋化因子疗法以预防或治疗疾病的患者施用与一种或多种 SIMRA 化合物组合的分离的、经 SIMRA 处理的细胞。

[0029] 具体地,本发明涉及下述:

[0030] 1. 一种 SIMRA 化合物,其选自 SIMRA#1 至 SIMRA#189 组成的组。

[0031] 2. 一种组合物,其包含项 1 的 SIMRA 化合物和生理学可接受载体。

[0032] 3. 一种用于在脊椎动物中产生免疫应答的方法,该方法包括给所述脊椎动物施用依照项 1 的 SIMRA 化合物。

[0033] 4. 一种用于治疗性处理患有会受益于调控免疫应答的疾病或病症的脊椎动物的方法,该方法包括给所述脊椎动物施用药学有效量的依照项 1 的 SIMRA 化合物。

[0034] 5. 项 4 的方法,其中所述疾病或病症是癌症、自身免疫性病症、气道炎症、炎性病症、传染病、皮肤病症、变态反应、哮喘或由病原体引起的疾病。

[0035] 6. 依照项 4 的方法,其进一步包括施用一种或多种化疗化合物。

[0036] 7. 依照项 4 的方法,其进一步包括施用靶向治疗剂。

[0037] 8. 依照项 4 的方法,其进一步包括施用抗体。

[0038] 9. 依照项 4 的方法,其进一步包括施用 DNA 疫苗。

[0039] 10. 依照项 4 的方法,其进一步包括施用蛋白质疫苗。

[0040] 11. 依照项 4 的方法,其进一步包括施用肽疫苗。

[0041] 12. 依照项 4 的方法,其进一步包括施用抗原。

[0042] 13. 依照项 4 的方法,其进一步包含佐剂。

[0043] 14. 一种用于预防性处理患有会受益于调控免疫应答的疾病或病症的脊椎动物的方法,该方法包括给所述脊椎动物施用药学有效量的依照项 1 的 SIMRA 化合物。

[0044] 15. 项 14 的方法,其中所述疾病或病症是脊椎动物中的癌症、自身免疫性病症、气道炎症、炎性病症、传染病、皮肤病症、变态反应、哮喘或由病原体引起的疾病。

[0045] 16. 依照项 15 的方法,其进一步包括施用一种或多种化疗化合物。

[0046] 17. 依照项 15 的方法,其进一步包括施用靶向治疗剂。

[0047] 18. 依照项 15 的方法,其进一步包括施用抗体。

[0048] 19. 依照项 15 的方法,其进一步包括施用 DNA 疫苗。

[0049] 20. 依照项 15 的方法,其进一步包括施用蛋白质疫苗。

[0050] 21. 依照项 15 的方法,其进一步包括施用肽疫苗。

[0051] 22. 依照项 15 的方法,其进一步包括施用抗原。

[0052] 23. 依照项 15 的方法,其进一步包括施用佐剂。

[0053] 附图简述

[0054] 依照实施例 1 合成本发明的 SIMRA 化合物。图 1 是用于本发明 SIMRA 化合物的平行合成的合成方案。DMTr=4,4'-二甲氧基三苯甲基;CE=氰乙基。

[0055] 图 2A 描绘了依照实施例 2 处理和表达的 TLR8 的 HEK293 细胞中的 NF- κ B 活性。简言之,用 150 μ g/ml TLR8 激动剂刺激 HEK293 细胞达 18 小时,并使用 SEAP (分泌型人胚胎碱性磷酸酶)测定法来测定 NF- κ B 水平。数据表明,依照本发明的 SIMRA 的施用产生独特的 TLR 介导的免疫应答序型。

[0056] 图 2B 描绘了依照实施例 2 处理和表达的 TLR8 的 HEK293 细胞中的 NF- κ B 活性。简言之,用 150 μ g/ml TLR8 激动剂刺激 HEK293 细胞达 20 小时,并使用 SEAP 测定法来测定 NF- κ B 水平。数据表明,依照本发明的 SIMRA 的施用产生独特的 TLR 介导的免疫应

答序型。

[0057] 图 2C-图 2E 描绘了依照实施例 2 处理和表达的 TLR8 的 HEK293 细胞中的 NF- κ B 活性。简言之,用 150 μ g/ml TLR8 激动剂刺激 HEK293 细胞达 18 小时,并使用 SEAP 测定法来测定 NF- κ B 水平。数据表明,依照本发明的 SIMRA 的施用产生独特的 TLR 介导的免疫应答序型。

[0058] 图 2F 描绘了依照实施例 2 处理和表达的 TLR8 的 HEK293 细胞中的 NF- κ B 活性。简言之,用 0、20、50、100、200、或 300 μ g/ml 激动剂刺激 TLR8 的 HEK293 细胞达 18 小时。使用 SEAP 测定法来测定 NF- κ B 水平。数据表明,依照本发明的 SIMRA 的施用产生独特的 TLR 介导的免疫应答序型。

[0059] 图 2G 描绘了依照实施例 2 处理和表达的 TLR7 的 HEK293 细胞中的 NF- κ B 活性。简言之,用 0、20、50、100、200、或 300 μ g/ml 激动剂刺激 TLR7 的 HEK293 细胞达 18 小时。使用 SEAP 测定法来测定 NF- κ B 水平。数据表明,依照本发明的 SIMRA 的施用产生独特的 TLR 介导的免疫应答序型。

[0060] 图 2H、图 2J 和图 2L 描绘了依照实施例 2 处理和表达的 TLR8 的 HEK293 细胞中的 NF- κ B 活性。简言之,用 0、20、50、100、200、或 300 μ g/ml 激动剂刺激 TLR8 的 HEK293 细胞达 18 小时。使用 SEAP 测定法来测定 NF- κ B 水平。数据表明,依照本发明的 SIMRA 的施用产生独特的 TLR 介导的免疫应答序型。

[0061] 图 2I、图 2K 和图 2M 描绘了依照实施例 2 处理和表达的 TLR7 的 HEK293 细胞中的 NF- κ B 活性。简言之,用 0、20、50、100、200、或 300 μ g/ml 激动剂刺激 TLR7 的 HEK293 细胞达 18 小时。使用 SEAP 测定法来测定 NF- κ B 水平。数据表明,依照本发明的 SIMRA 的施用产生独特的 TLR 介导的免疫应答序型。

[0062] 图 3A-图 3C 描绘了来自依照实施例 3 处理和表达的人 PBMC 的细胞因子和趋化因子浓度。简言之,自新鲜获得的健康人志愿者的血液分离 PBMC,并用 50 μ g/ml 剂量的 TLR7/8 激动剂培养 24 小时,收集上清液,并通过 Luminex 多重测定法来分析细胞因子和趋化因子水平。数据表明,依照本发明的 SIMRA 的施用产生独特的 TLR 介导的细胞因子和趋化因子序型。

[0063] 图 4A-图 4C 描绘了来自依照实施例 3 处理和表达的人 PBMC 的细胞因子和趋化因子浓度。简言之,自新鲜获得的健康人志愿者的血液分离 PBMC,并用 200 μ g/ml 剂量的 TLR7/8 激动剂培养 24 小时,收集上清液,并通过 Luminex 多重测定法来分析细胞因子和趋化因子水平。数据表明,依照本发明的 SIMRA 的施用产生独特的 TLR 介导的细胞因子和趋化因子序型。

[0064] 图 4D-图 4AA 描绘了来自依照实施例 3 处理和表达的人 PBMC 的细胞因子和趋化因子浓度。简言之,自新鲜获得的健康人志愿者的血液分离 PBMC,并用浓度渐增的 TLR7/8 激动剂培养 24 小时,收集上清液,并通过 Luminex 多重测定法来分析细胞因子和趋化因子水平。数据表明,依照本发明的 SIMRA 的施用产生独特的、剂量依赖性的、TLR 介导的细胞因子和趋化因子序型。

[0065] 图 5A-图 5C 描绘了来自依照实施例 3 分离、处理、和分析的人类浆细胞树突细胞(plasmacytoid dendritic cell, pDC)的细胞因子和趋化因子浓度。简言之,自新鲜获得的健康人志愿者的血液 PBMC 分离 pDC,并用 50 μ g/ml 剂量的 TLR7/8 激动剂培养 24 小时,收

集上清液,并通过 Luminex 多重测定法来分析细胞因子和趋化因子水平。数据表明,依照本发明的 SIMRA 的施用产生独特的 TLR 介导的细胞因子和趋化因子序型。

[0066] 图 5D 描绘了来自依照实施例 3 分离、处理、和分析的人类浆细胞树突细胞 (pDC) 的细胞因子和趋化因子浓度。简言之,自新鲜获得的健康人志愿者的血液 PBMC 分离 pDC,并用 50 μ g/ml 或 200 μ g/ml 剂量的 TLR7/8 激动剂培养 24 小时,收集上清液,并通过 Luminex 多重测定法来分析细胞因子和趋化因子水平。数据表明,依照本发明的 SIMRA 的施用产生独特的 TLR 介导的细胞因子和趋化因子序型。

[0067] 图 6A、图 6B、图 6C、图 6E 和图 6F 描绘了来自依照实施例 3 处理和分析的人类浆细胞树突细胞 (pDC) 的细胞因子和趋化因子浓度。简言之,自新鲜获得的健康人志愿者的血液 PBMC 分离 pDC,并用 200 μ g/ml 剂量的 TLR7/8 激动剂培养 24 小时,收集上清液,并通过 Luminex 多重测定法来分析细胞因子和趋化因子水平。数据表明,依照本发明的 SIMRA 的施用产生独特的 TLR 介导的细胞因子和趋化因子序型。

[0068] 图 6D 描绘了来自依照实施例 3 处理和分析的人类浆细胞树突细胞 (pDC) 的细胞因子和趋化因子浓度。简言之,自新鲜获得的健康人志愿者的血液 PBMC 分离 pDC,并用 100 μ g/ml 剂量的 TLR7/8 激动剂培养 24 小时,收集上清液,并通过 Luminex 多重测定法来分析细胞因子和趋化因子水平。数据表明,依照本发明的 SIMRA 的施用产生独特的 TLR 介导的细胞因子和趋化因子序型。

[0069] 图 7A-图 7C 描绘了来自依照实施例 3 处理和分析的人髓样树突细胞 (myeloid dendritic cell, mDC) 的细胞因子和趋化因子浓度。简言之,自新鲜获得的健康人志愿者的血液 PBMC 分离 mDC,并用 50 μ g/ml 剂量的 TLR7/8 激动剂培养 24 小时,收集上清液,并通过 Luminex 多重测定法来分析细胞因子和趋化因子水平。数据表明,依照本发明的 SIMRA 的施用产生独特的 TLR 介导的细胞因子和趋化因子序型。

[0070] 图 8A 和图 8B 描绘了依照实施例 4 处理和分析 C57BL/6 小鼠后 2 小时,C57BL/6 小鼠 (n=3) 中的血清细胞因子诱导。简言之,给 C57BL/6 小鼠皮下注射 25mg/kg 剂量的 TLR7/8 激动剂,并在施用激动剂后 2 小时,对血清分析细胞因子和趋化因子水平,并呈现 IL-12 水平。数据表明,依照本发明的 SIMRA 的体内施用产生独特的 TLR 介导的细胞因子和趋化因子序型。

[0071] 图 9A 和图 9B 描绘了依照实施例 4 处理和分析 BALB/c 小鼠后 2 小时, BALB/c 小鼠 (n=3) 中的血清细胞因子诱导。简言之,给 BALB/c 小鼠皮下注射 25mg/kg 剂量的 TLR7/8 激动剂,并在施用激动剂后 2 小时,对血清分析细胞因子和趋化因子水平,并呈现 IL-12 水平。数据表明,依照本发明的 SIMRA 的体内施用产生独特的 TLR 介导的细胞因子和趋化因子序型。

[0072] 图 9C-图 9F 描绘了依照实施例 4 处理和分析 BALB/c 小鼠后 2 小时, BALB/c 小鼠 (n=3) 中的血清细胞因子诱导。简言之,给 BALB/c 小鼠皮下注射 10mg/kg 或 25mg/kg 剂量的 TLR7/8 激动剂,并在施用激动剂后 2 小时,对血清分析细胞因子和趋化因子水平,并呈现 IL-12 水平。数据表明,依照本发明的 SIMRA 的体内施用产生独特的 TLR 介导的细胞因子和趋化因子序型。

[0073] 图 10A-图 10H 描绘了依照实施例 5 处理的来自表 2 的例示性 SIMRA 化合物的血清稳定性。简言之,将约 0.5 个 OD 的例示性 SIMRA 化合物个别地在含 1% 人血清的 PBS 中

于 37° C 温育 30 分钟。30 分钟温育结束时,在阴离子交换 HPLC 上分析 SIMRA 化合物以测定保留的全长 SIMRA 化合物与血清处理前存在的 SIMRA 化合物量相比的百分比。

[0074] 发明详述

[0075] 本发明涉及寡核糖核苷酸作为免疫调控剂用于免疫疗法应用的治疗用途。具体地,本发明提供了具有改善的体内稳定性的基于 RNA 的寡核苷酸,其经由单独的 TLR7、TLR7 和 TLR8 二者、或单独的 TLR8 调控免疫应答(SIMRA 化合物)。通过启动多种多样的先天性和获得性免疫应答机制,例如经由用稳定的 TLR7 和 / 或 TLR8 激动剂或者 SIMRA 化合物活化树突细胞和其它抗原呈递细胞,所得的细胞因子序型能导致对病原体、受感染的细胞或肿瘤细胞的破坏以及抗原特异性抗体和 CTL 应答的发生。如此,本发明提供了一组多种多样的 SIMRA 化合物,每种具有其自己的独特免疫调节特征。因此,能针对不同医学适应症定制免疫应答的范围和性质,即提供具有针对该适应症的想要的一组免疫调控特征的 SIMRA 化合物。通过提及而将本文中所引用的授权专利、专利申请、和参考文献收入本文,其程度如同具体地和个别地指明通过提及而收录每一篇一样。在本文中所引用的任何参考文献的任何教导与本说明书之间不一致的情况下,对本发明来说以后者为准。

[0076] 本发明提供了用于使用 SIMRA 化合物来增强免疫应答的方法。此类方法会在免疫疗法应用中找到应用,诸如但不限于成人和儿科人类和兽医应用中癌症、自身免疫性疾病、哮喘、呼吸变态反应、食物变态反应、皮肤变态反应、和细菌、寄生虫和病毒感染的治疗。如此,本发明进一步提供了对免疫疗法具有最佳水平的免疫调控效果的新型 SIMRA 化合物及用于制备和使用此类化合物的方法。另外,本发明的 SIMRA 化合物作为佐剂或者与可用于治疗疾病或状况且不降低 SIMRA 化合物的免疫调控效果的药剂组合用于预防和治疗疾病是有用的。

[0077] 定义

[0078] 术语“2’-取代的核糖核苷”或“2’-取代的阿拉伯糖苷(arabinoside)”一般包括如下的核糖核苷或阿拉伯糖核苷,其中戊糖模块 2’位置的羟基被取代而生成 2’-取代的或 2’-O-取代的核糖核苷。在某些实施方案中,所述取代是用含有 1-6 个饱和的或不饱和的碳原子的低级烷基、用卤素原子、或用具有 6-10 个碳原子的芳基进行的,其中所述烷基或芳基可以是未取代的或者可以是取代的,例如用卤素、羟基、三氟甲基、氰基、硝基、酰基、酰氧基、烷氧基、羧基、羧烷氧基(carboalkoxy)、或氨基取代。本发明的阿拉伯糖核苷包括但不限于阿拉伯糖 -G、阿拉伯糖 -C、阿拉伯糖 -U、阿拉伯糖 -A。2’-O-取代的核糖核苷或 2’-O-取代的阿拉伯糖核苷的例子包括但不限于 2’-氨基、2’-氟、2’-烯丙基、2’-O-羟基和 2’-炔丙基核糖核苷或阿拉伯糖核苷、2’-O-甲基核糖核苷或 2’-O-甲基阿拉伯糖核苷和 2’-O-甲氧基乙氧基核糖核苷或 2’-O-甲氧基乙氧基阿拉伯糖核苷。

[0079] 术语“3’”在用于方向时一般指多核苷酸或寡核苷酸中位于同一多核苷酸或寡核苷酸中另一区域或位置 3’(朝向糖的 3’位置)的区域或位置。

[0080] 术语“5’”在用于方向时一般指多核苷酸或寡核苷酸中位于同一多核苷酸或寡核苷酸中另一区域或位置 5’(朝向糖的 5’位置)的区域或位置。

[0081] 术语“约”一般意味着确切的数目不是至关重要的。如此,寡核糖核苷酸中核糖核苷残基的数目不是至关重要的,而且涵盖少一个或两个核糖核苷或阿拉伯糖核苷残基或者多一个至数个核糖核苷或阿拉伯糖核苷残基的寡核糖核苷酸作为上文所述每一个实施方案的

等同方案。

[0082] 术语“佐剂”一般指如下物质,其在被添加至诸如疫苗或抗原等免疫原性剂时在暴露于该混合物的受体宿主中增强或加强针对所述药剂的免疫应答。

[0083] 术语“气道炎症”一般包括但不限于由传染性变应原引起的呼吸道炎症,包括哮喘。

[0084] 术语“变应原”一般指抗原或在暴露于受试者后引发变态反应的分子(通常是蛋白质)的抗原性部分。典型的是,受试者对变应原是过敏的,如通过例如风团(wheal)和潮红(flare)测试或本领域已知的任何方法所指出的。即使只有一小部分受试者在暴露于该分子后展现出变应性(例如 IgE)免疫应答,也说该分子是变应原。

[0085] 术语“变态反应”一般包括但不限于食物变态反应、呼吸变态反应和皮肤变态反应。

[0086] 术语“抗原”一般指受到抗体或 T 细胞抗原受体识别和选择性结合的物质。抗原可以包括但不限于肽、蛋白质、核苷、核苷酸及其组合。抗原可以是天然的或合成的,而且一般诱导对该抗原特异性的免疫应答。

[0087] 术语“自身免疫性病症”一般指其中“自身”抗原遭受免疫系统攻击的病症。

[0088] 阻断 3' 或 5' 降解或者“帽”或“加帽”意味着寡核糖核苷酸的 3' 或 5' 端附着于另一分子(例如接头或其它非 RNA 核苷酸)以充分抑制核酸酶降解(例如 3' 外切核酸酶降解)。

[0089] 术语“载体”一般涵盖任何赋形剂、稀释剂、填充剂、盐、缓冲剂、稳定剂、增溶剂、油、脂、含脂的囊泡、微球体、脂质体封装、或本领域公知用于药物配制剂的其它物质。应当理解,载体、赋形剂、或稀释剂的特征会取决于用于特定应用的施用路径。含有这些物质的药学可接受配制剂的制备记载于例如《Remington's Pharmaceutical Sciences》,第 18 版, A. Gennaro 编, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990。

[0090] 术语“共施用”一般指在足够近的时间里施用至少两种不同物质以调控免疫应答。共施用包括同时施用至少两种不同物质。

[0091] 术语“互补的”一般意味着具有与核酸杂交的能力。所述杂交通常是互补链之间氢键键合的结果(优选形成 Watson-Crick 或 Hoogsteen 碱基对),虽然其它模式的氢键键合以及碱基堆积也能导致杂交。

[0092] 术语“免疫调控性寡核糖核苷酸”一般指在给诸如鱼类、鸟类或哺乳类等脊椎动物施用时诱导或遏制免疫应答的寡核糖核苷酸。

[0093] 术语“与... 组合”一般意味着在治疗同一患者的同一疾病的过程中,而且包括以任意次序施用 SIMRA 化合物和可用于治疗疾病或状况且不降低 SIMRA 化合物的免疫调控效果的药剂,包括同时施用或共施用,以及相隔几秒钟至数天的时间上有间隔的次序。此类组合处理还可包括超过一次的 SIMRA 化合物和 / 或独立的所述药剂的施用。SIMRA 化合物和所述药剂的施用可以通过相同或不同的路径的。

[0094] 术语“个体”或“受试者”一般指哺乳动物,诸如人。哺乳动物一般包括但不限于人、非人灵长类、大鼠、小鼠、猫、犬、马、牛(cattle)、奶牛(cows)、猪、绵羊和家兔。

[0095] 术语“线性合成”一般指在免疫调控性寡核糖核苷酸的一端开始并线性进展至另一端的合成。线性合成容许将相同或不同(就所掺入的长度、碱基组成和 / 或化学修饰而言)

的单体单元掺入免疫调控性寡核糖核苷酸。

[0096] 术语“接头”一般指能借助共价或非共价键合经由糖、碱基、或主链附着至寡核糖核苷酸的任何模块。接头可用于附着两个或更多个核苷，或者可附着至寡核糖核苷酸的 5' 和 / 或 3' 末端核苷酸。所述接头可以是非核苷酸接头或核苷酸接头。

[0097] 术语“经过修饰的核苷”一般是包括经过修饰的杂环碱基、经过修饰的糖模块、或其任意组合的核苷。在一些实施方案中，经过修饰的核苷是非天然嘧啶或嘌呤核苷，如本文所述。为了本发明，经过修饰的核苷、嘧啶或嘌呤类似物或非天然存在的嘧啶或嘌呤可互换使用，指包括非天然存在的碱基和 / 或非天然存在的糖模块的核苷。为了本发明，如果某碱基不是鸟嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤或尿嘧啶，那么认为该碱基是非天然的。在一些实施方案中，经过修饰的核苷是 2'-取代的核糖核苷和阿拉伯糖核苷或 2'-脱氧-2'-取代的阿拉伯糖核苷，可以将它们替代入寡核糖核苷酸的选定位置中以提高稳定性而不干扰 TLR7 或 TLR8 活性。

[0098] 术语“调控”或“刺激”一般指变化，诸如响应的升高或响应的定性差异，这可以源于对响应的引发和 / 或增强。

[0099] 术语“非核苷酸接头”一般指能借助共价或非共价键合附着至寡核糖核苷酸的、核苷酸连接以外的化学模块。优选的是，所述非核苷酸接头的长度是约 2 埃至约 200 埃，而且可以是顺式或反式取向。

[0100] 术语“核苷酸连接”一般指经由它们的糖(例如 3'-3'、2'-3'、2'-5'、3'-5')接合两个核苷的化学连接，其由相邻核苷间的磷酸酯、非磷酸酯、带电荷的、或中性的基团(例如磷酸二酯、硫代磷酸酯或二硫代磷酸酯)组成。

[0101] 术语“肽”一般指长度和组成足以影响生物学应答(例如抗体生成或细胞因子活性，无论该肽是否是半抗原)的多肽。术语“肽”可以包括经过修饰的氨基酸(无论是天然存在的还是非天然存在的)，其中所述修饰包括但不限于磷酸化、糖基化、PEG 化、脂化(lipidization) 和甲基化。

[0102] 术语“药学可接受的”或“生理学可接受的”一般指不干扰依照本发明的化合物的效力和与生物学系统(诸如细胞、细胞培养物、组织、或生物体)相容的物质。优选的是，所述生物学系统是活的生物体，诸如脊椎动物。

[0103] 术语“药学有效量”一般指足以实现期望生物学效应(诸如有益结果)的量。如此，“药学有效量”会取决于施用它的背景。药学有效量可以在一次或多次预防性或治疗性施用中施用。

[0104] 术语“SIMRA”一般指由 TLR7 和 / 或 TLR8 识别为配体的稳定化的免疫调控性 RNA 化合物，其中所述化合物可含有单链 RNA(ssRNA) 和 / 或双链 RNA(dsRNA)，和用于保护或稳定其 3' 末端的修饰(例如通过阻断 3' 降解或通过为 3' 末端加帽或通过连接两条或更多条寡核糖核苷酸的 3' 末端)，倘若 SIMRA 在体内比未经修饰的寡核糖核苷酸更加稳定且如此实现(affect) 它的免疫调控能力。SIMRA 可含有经过修饰的寡核糖核苷酸。SIMRA 化合物还可含有用于保护其 5' 末端以进一步改善寡核糖核苷酸稳定性的修饰(例如通过阻断 5' 降解或给 5' 末端加帽)。SIMRA 可以是线性的或分支的，其中核酸是经由例如磷酸二酯、硫代磷酸酯或备选连接相连接的核糖核苷聚合物。SIMRA 可以由共价附着至核糖残基或其衍生物的嘌呤(腺嘌呤(A) 或鸟嘌呤(G) 或其衍生物(例如 7-脱氮-G、阿拉伯糖-G 和阿拉伯

糖 -A)) 或嘧啶(胞嘧啶 (C) 或尿嘧啶 (U) 或其衍生物(例如阿拉伯糖 -C 和阿拉伯糖 -U)) 碱基组成。

[0105] 术语“治疗”或“处理”一般指旨在获得有益的或期望的结果(其可以包括症状的缓和或者疾病进展的延迟或改善)的办法。

[0106] 术语“病毒性疾病”一般指具有病毒作为其起病性因子的疾病,包括但不限于乙肝、丙肝、流感、获得性免疫缺陷综合征 (AIDS)、和带状疱疹。

[0107] 在第一个方面,本发明提供了新的 SIMRA 化合物。本发明人已经发现了修饰免疫调控性寡核糖核苷酸以保护其 3' 末端(例如通过阻断 3' 降解或者给 3' 末端加帽或者通过连接两条或更多条寡核糖核苷酸的 3' 末端)令人惊讶地影响其免疫调控能力。另外,已确定这种保护令人惊讶地改善寡核糖核苷酸的稳定性,不再需要脂质联合或其它保护手段。进一步地,在保护 3' 末端外或者与保护 3' 末端组合,阻断 5' 降解或给 5' 末端加帽还能改善寡核糖核苷酸的稳定性。

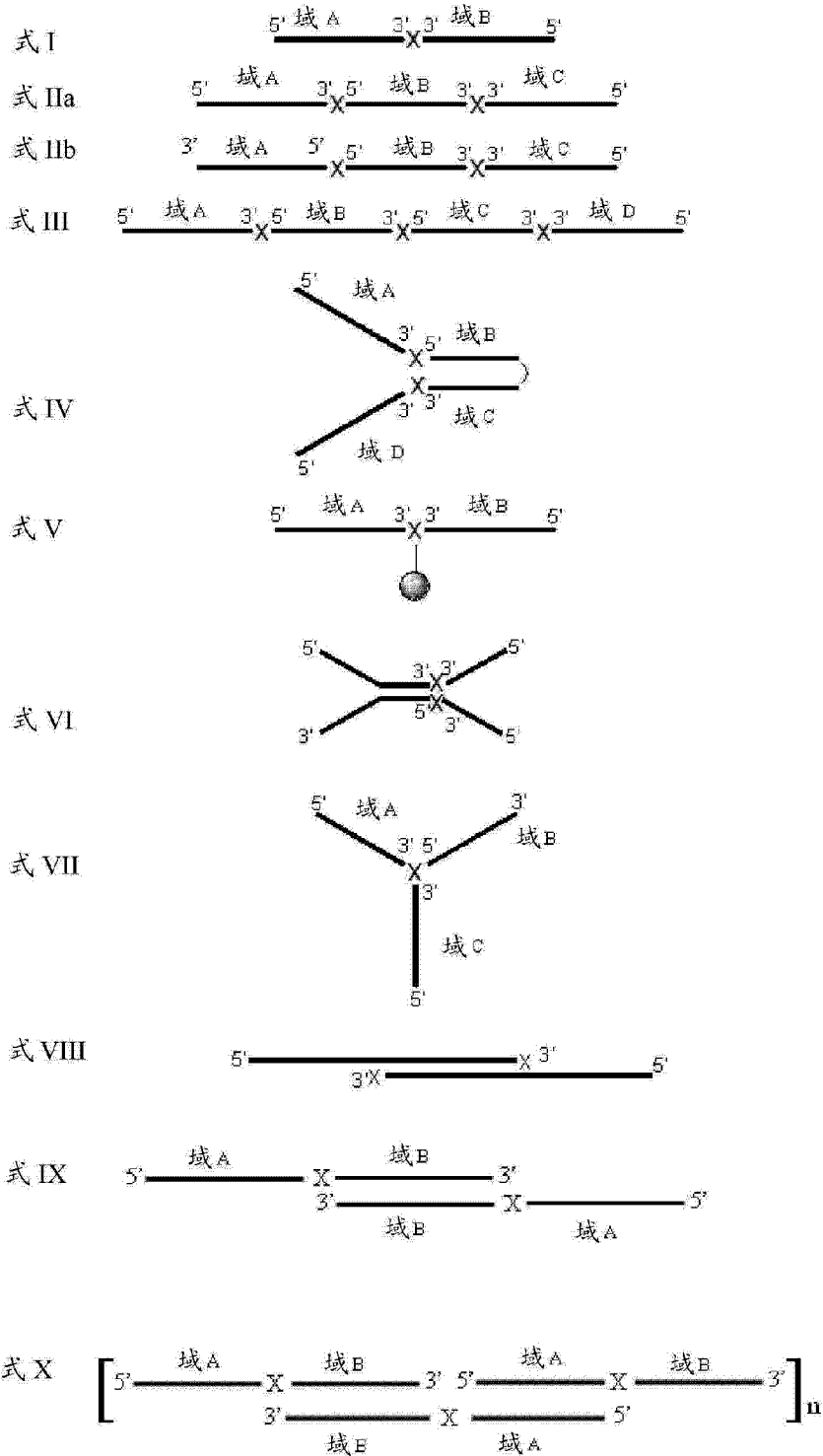
[0108] 在本发明中,演示了用新型 SIMRA 化合物活化 TLR8,并诱导独特的免疫应答(例如细胞因子和 / 或趋化因子序型的变化)。此外,在此类人 TLR8 活化性 RNA 中掺入某些化学修饰还能活化 TLR7,导致独特的免疫应答和细胞因子和 / 或趋化因子序型的变化。如此,本发明人令人惊讶地发现了,通过使用经修饰的化学结构(包括经修饰的碱基、经修饰的糖、主链、接头、连接和 / 或帽)作为免疫调控性寡核糖核苷酸的一部分能经由活化 TLR8 和 / 或 TLR7 来调控与之相关的细胞因子和 / 或趋化因子序型。

[0109] 在一个实施方案中,本发明提供了一种免疫调控性化合物,其包含至少两条基于 RNA 的寡核苷酸,这些寡核苷酸在它们的 3' 末端、或核苷间连接、或者官能化的核碱基或糖处与非核苷酸接头连接。本发明的此实施方案可以具有至少一个易接近的 5' 末端,其可以是加帽的或未加帽的。已经确定了,此结构为 SIMRA 化合物提供了进一步的稳定性(例如抑制外切核酸酶活性)而无需脂质联合或其它保护。“易接近的 5' 末端”意味着 SIMRA 的 5' 端不以阻止 SIMRA 化合物经由 TLR7 和 / 或 TLR8 调控免疫应答的方式修饰。

[0110] 本发明这个方面的另一个实施方案包含至少两条寡核糖核苷酸,其中所述免疫调控性化合物具有如下的结构,包括但不限于那些如表 1 式 I-X 中所详述的。

[0111] 表 1 :寡核糖核苷酸式 I-X

[0112]



[0113] 域 A、B、C、和 D 的长度可以独立为约 2 个至约 35 个核糖核苷酸，且在一些实施方案中为约 2 个至约 20 个、或约 2 个至约 12 个、或约 2 个至约 11 个、或约 2 个至约 8 个核糖核苷酸。域 A、B、C、和 / 或 D 可以是或者可以不是相同的。域 A、B、C、和 D 可以独立为具有或没有自我互补域、同源 (homo) 或异源 (hetero) 核糖核苷酸序列、或者接头的 5'-3' 或 2'-5' RNA。“n”可以为 1 至无限的数目。

[0114] “X”是连接域 A、B、C、和 / 或 D 或给域 A、B、C、和 / 或 D 加帽的接头，其可以是由 3' 或 5' 连接、磷酸酯基团、核碱基、非 RNA 核苷酸、或非核苷酸接头，其可以是脂肪族的、芳香族的、芳基、环状的、手性的、非手性的、肽、碳水化合物、脂质、脂肪酸、单 -、三 - 或六聚乙

二醇、或杂环模块、或其组合。

[0115] 在又一个实施方案中,本发明提供了 SIMRA 化合物,其包含至少两条通过非核苷酸接头连接的寡核糖核苷酸,其中免疫调控性寡核糖核苷酸的序列可以是至少部分自我互补的。正如本领域技术人员会认识到的,所述寡核糖核苷酸的互补序列容许分子间氢键键合,由此给予寡核糖核苷酸二级结构。别的寡核糖核苷酸能结合在一起,由此创建依照本发明的寡核糖核苷酸的链或多聚物。

[0116] 类似的考虑适用于有不同碱基序列的免疫调控性寡核糖核苷酸之间的分子间碱基配对。如此,在一起使用众多免疫调控性寡核糖核苷酸的情况中,所述众多免疫调控性寡核糖核苷酸可以但非必须包括彼此至少部分互补的序列。在一个实施方案中,所述众多免疫调控性寡核糖核苷酸包括具有第一序列的免疫调控性寡核糖核苷酸和具有第二序列的免疫调控性寡核糖核苷酸,其中所述第一序列和所述第二序列至少 50% 互补。例如,如在至少 50% 互补的两条 8 聚物之间的,它们可以形成 4、5、6、7、或 8 个 G-C、A-U、和 / 或 G-U 摆动碱基对。此类碱基对可以但非必然牵涉位于互补的免疫调控性寡核糖核苷酸任一末端的碱基。互补程度可取决于免疫调控性寡核糖核苷酸之间的比对,并且此比对可以包括或不包括单个或多个核苷突出端。在其它实施方案中,互补程度是至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、或甚至 100%。

[0117] 正如本领域技术人员会认可的,因为域的序列是互补的,容许分子间氢键键合,所以所描绘的免疫调控性化合物可具有二级结构。此外,如从式 I 至 X 能想到的,别的连接的基于 RNA 的寡核苷酸能经由分子间氢键键合而结合,由此创建链或多聚物,其中可以掺入任意数目的连接的基于 RNA 的寡核苷酸。

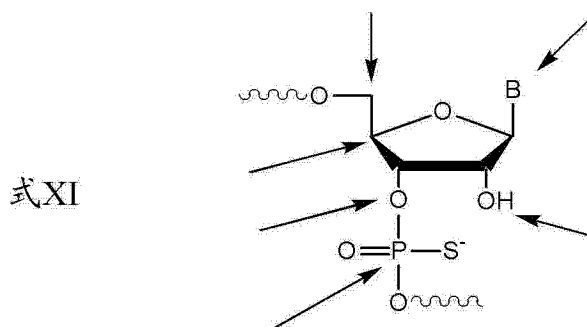
[0118] 在另一个实施方案中,本发明提供了一种免疫调控性化合物,其包含至少两条基于 RNA 的寡核苷酸,所述寡核苷酸在它们的 3' 或 5' 末端处,或者经由核苷间连接或官能化的核碱基或糖连接至非核苷酸接头,且其中将接头(例如帽)附着至至少一个 5' 末端。已经确定了此结构为 SIMRA 化合物提供了进一步的稳定性(例如抑制外切核酸酶活性)。SIMRA 的 5' 端不以阻止 SIMRA 化合物经由 TLR7 和 / 或 TLR8 调控免疫应答的方式修饰。

[0119] 在一些实施方案中,寡核糖核苷酸各自独立具有约 2 个至约 35 个核糖核苷残基。如此,在某些实施方案中,寡核糖核苷酸可以独立长 2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个、10 个、11 个、12 个、13 个、14 个、15 个、16 个、17 个、18 个、19 个、20 个、21 个、22 个、23 个、24 个、25 个、26 个、27 个、28 个、29 个、30 个、31 个、32 个、33 个、34 个或 35 个核糖核苷酸。优选地,寡核糖核苷酸为约 4 个至约 30 个核糖核苷残基,更优选约 4 个至约 20 个核糖核苷残基,或者约 4 个至约 11 个核糖核苷残基。在一些实施方案中,免疫调控性寡核糖核苷酸包含具有约 1 个至约 18 个、或约 1 个至约 11 个、或约 5 个至约 14 个核糖核苷残基的寡核糖核苷酸。在一些实施方案中,所述寡核糖核苷酸中的一个或多个具有 11 个核糖核苷酸或约 8 个至约 14 个核糖核苷酸或约 10 个至约 12 个核糖核苷酸。在免疫调控性寡核糖核苷酸的背景下,优选的实施方案具有约 1 个至约 35 个核糖核苷酸,优选约 5 个至约 26 个核糖核苷酸,更优选约 13 个至约 26 个核糖核苷酸。优选地,免疫调控性寡核糖核苷酸包含至少一个磷酸二酯、硫代磷酸酯、或二硫代磷酸酯核糖核苷间连接。

[0120] 在例示性的实施方案中,每个核糖核苷单元包括杂环碱基和呋喃戊糖基(pentofuranosyl)、海藻糖、阿拉伯糖、2'-脱氧-2'-取代的阿拉伯糖、2'-O-取代的

核糖或阿拉伯糖、或己糖糖基团。核糖核苷残基可以通过多种已知的核糖核苷间连接中的任一种彼此偶联。此类核糖核苷间连接包括但不限于磷酸二酯 (phosphodiester)、硫代磷酸酯 (phosphorothioate)、二硫代磷酸酯 (phosphorodithioate)、烃基磷酸酯 (alkylphosphonate)、烃基硫代磷酸酯 (alkylphosphonothioate)、磷酸三酯 (phosphotriester)、氨基磷酸酯 (phosphoramidate)、硅氧烷 (siloxane)、碳酸酯 (carbonate)、羰烷氧基 (carboalkoxy)、氨基乙酸酯 (acetamidate)、氨基甲酸酯 (carbamate)、吗啉代 (morpholino)、硼代 (borano)、硫醚 (thioether)、桥接氨基磷酸酯 (bridged phosphoramidate)、桥接亚甲基磷酸酯 (bridged methylene phosphonate)、桥接硫代磷酸酯 (bridged phosphorothioate)、和砜 (sulfone) 核苷间连接。下文式 XI 中指出了偶联核糖核苷酸的可能位点, 其中 B 代表杂环碱基。

[0121]



[0122] 本发明的 SIMRA 化合物可以包括天然存在的核糖核苷、经修饰的核糖核苷、或其混合物。

[0123] 在本发明中, 新的 SIMRA 化合物受到人 TLR8 识别, 并且在此人 TLR8 活化性 RNA 中掺入某些化学修饰能使它们受到人 TLR7 识别并诱导免疫应答。此类化学修饰包括但不限于鸟嘌呤类似物, 诸如 7-脱氮 -G、ara-G、6-硫 -G、肌苷、异 -G、洛索立宾 (loxoribine)、TOG (7-硫 -8-氧) -G、8-溴 -G、8-羟基 -G、5-氨基间型霉素 (aminofmycin) B、氧间型霉素 (Oxofmycin)、7-甲基 -G、9-对 -氯苯基 -8-氮 -G、9-苯基 -G、9-己基 -鸟嘌呤、7-脱氮 -9-苄基 -G、6-氯 -7-脱氮鸟嘌呤、6-甲氧基 -7-脱氮鸟嘌呤、8-氮 7-脱氮 -G (PPG)、2-(二甲基氨基) 鸟苷、7-甲基 -6-硫鸟苷、8-苄氧基鸟苷、9-脱氮鸟苷、和 1-(B-D-呋喃核糖基) -2-氧 -7-脱氮 -8-甲基 -嘌呤。化学修饰还包括但不限于腺嘌呤类似物, 诸如 9-苄基 -8-羟基 -2-(2-甲氧基乙氧基) 腺嘌呤、2-氨基 -N2-O-、甲基腺苷、8-氮 -7-脱氮 -A、7-脱氮 -A、ara-A、Vidarabine (阿糖腺苷)、2-氨基腺苷、N1-甲基腺苷、8-氮腺苷、5-碘杀结核菌素。化学修饰还包括但不限于胞嘧啶和尿嘧啶类似物, 诸如假尿苷、arc-C、ara-U、5-甲基胞苷、4-硫尿苷、N4-乙基尿苷、zebularine、5-氨基烯丙基尿苷、N3-甲基尿苷、5-氟尿苷。

[0124] 依照本发明的“免疫调控性寡核糖核苷酸”是如下的 SIMRA 化合物, 其包含至少两条在它们的 3' - 或 2' - 端或官能化核糖或官能化核糖核碱基处经非核苷酸或核苷酸接头共价或非共价连接的寡核糖核苷酸。下文列出了接头的数个例子。非共价连接包括但不限于静电相互作用、疏水相互作用、 π -叠加相互作用和氢键键合。

[0125] 在其它实施方案中, 所述非核苷酸接头是具有容许附着至寡核糖核苷酸的官能团的有机模块。此类附着优选是通过稳定的共价连接。作为一个非限制性例子, 所述接头可

以附着至核苷酸上的任何合适位置。在一些优选的实施方案中,所述接头附着至 3'-羟基。在此类实施方案中,所述接头优选包含羟基官能团,其优选依靠基于磷酸酯的连接(像磷酸二酯、硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、甲基膦酸酯)或非基于磷酸酯的连接附着至 3'-羟基。

[0126] 在一些实施方案中,所述非核苷酸接头是小分子、大分子或生物分子,包括但不限于多肽、抗体、脂质、抗原、变应原、和寡糖。在一些其它实施方案中,所述非核苷酸接头是小分子。为了本发明,小分子是分子量小于 1,000Da 的有机模块。在一些实施方案中,所述小分子具有小于 750Da 的分子量。

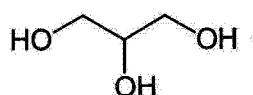
[0127] 在一些实施方案中,所述小分子是脂肪族或芳香族碳氢化合物(烃),二者任选可以在连接寡核糖核苷酸或附着于寡核糖核苷酸的线性链中包括一个或多个官能团,包括但不限于羟基、氨基、硫醇、硫醚、醚、酰胺、硫代酰胺、酯、脲、或硫脲。所述小分子可以是环状的或无环的。小分子接头的例子包括但不限于氨基酸、碳水化合物、环糊精、金刚烷(adamantane)、胆固醇、半抗原和抗生素。然而,出于描述非核苷酸接头的目的,术语“小分子”并非意图包括核苷。

[0128] 在一些实施方案中,所述非核苷酸接头是烃基接头或氨基接头。所述烃基接头可以是分支的或不分支的,环状的或无环的,取代的或未取代的,饱和的或不饱和的,手性的、非手性的或外消旋的混合物。所述烃基接头可以具有约 2 个至约 18 个碳原子。在一些实施方案中,此类烃基接头具有约 3 个至约 9 个碳原子。一些烃基接头包括一个或多个官能团,包括但不限于羟基、氨基、硫醇、硫醚、醚、酰胺、硫代酰胺、酯、脲、和硫醚。此类烃基接头可包括但不限于 1-丙醇、1,2-丙二醇、1,3-丙二醇、1,2,3-丙三醇、三甘醇、六甘醇、聚乙二醇接头(例如 $[-O-CH_2-CH_2-]_n$ ($n=1-9$))、甲基接头、乙基接头、丙基接头、丁基接头、或己基接头。在一些实施方案中,此类烃基接头可包括肽或氨基酸。

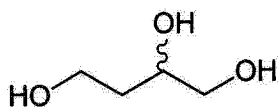
[0129] 在一些实施方案中,所述非核苷酸接头可以包括但不限于表 2 所列那些。

[0130] 表 2:代表性的非核苷酸接头

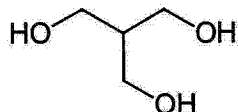
[0131]



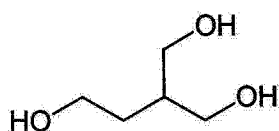
甘油(1,2,3-丙三醇)



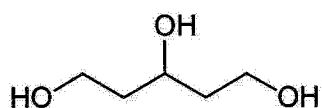
1,2,4-丁三醇



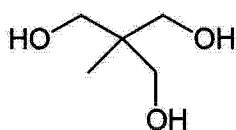
2-(羟甲基)-1,3-丙二醇



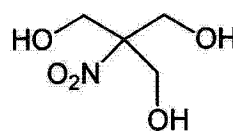
2-(羟甲基)1,4-丁二醇



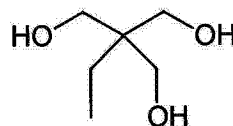
1,3,5-戊三醇



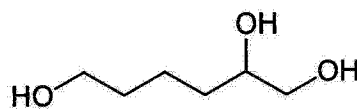
1,1,1-三(羟甲基)乙烷



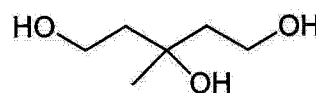
1,1,1-三(羟甲基)硝基甲烷



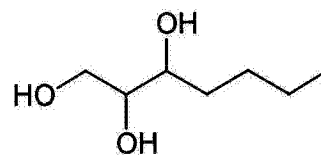
1,1,1-三(羟甲基)丙烷



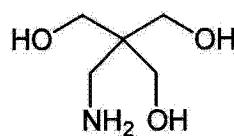
1,2,6-己三醇



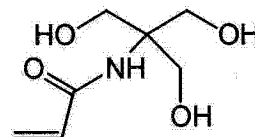
3-甲基-1,3,5-戊三醇



1,2,3-庚三醇



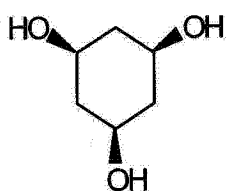
2-氨基-2-(羟甲基)-1,3-丙二醇



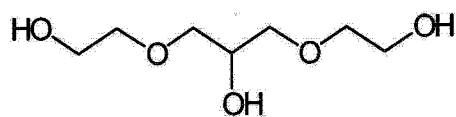
N-[三(羟甲基)甲基]丙烯酰胺

[0132] 表 2 :续

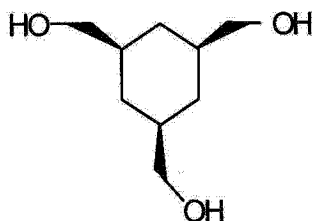
[0133]



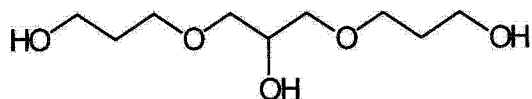
顺-1,3,5-环己烷三醇



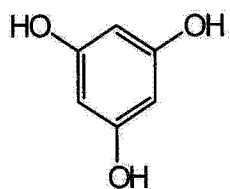
1,3-二(羟基乙氧基)-2-羟基-丙烷



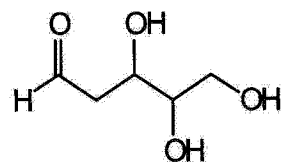
顺-1,3,5-三(羟甲基)环己烷



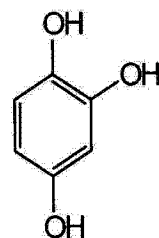
1,3-二(羟基丙氧基)-2-羟基-丙烷



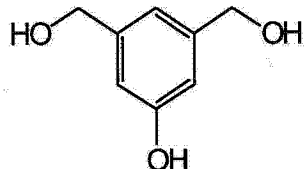
1,3,5-三羟基-苯



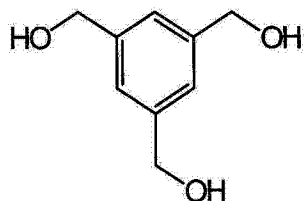
2-脱氧-D-核糖



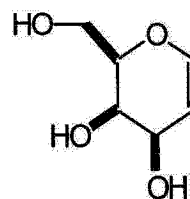
1,2,4-三羟基-苯



3,5-二(羟甲基)苯酚



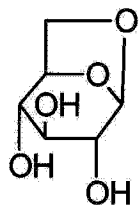
1,3,5-三(羟甲基)苯



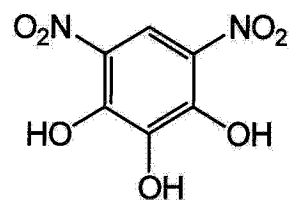
D-半乳糖缩醛(D-Galactool)

[0134] 表 2 : 续

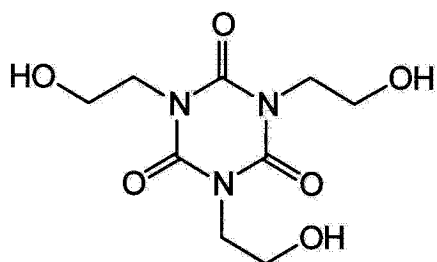
[0135]



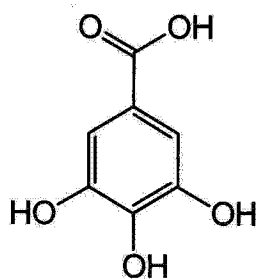
1,6-脱水-β-D-葡萄糖



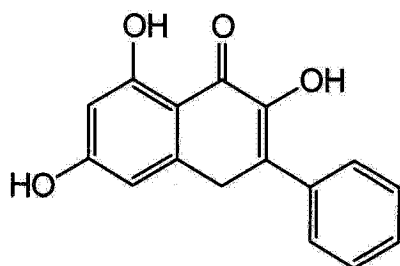
4,6-硝基连苯三酚



1,3,5-三(2-羟乙基)-氰尿酸



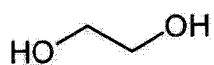
没食子酸



3,5,7-三羟基黄酮

[0136] 表 2 :续

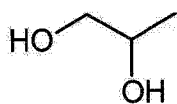
[0137]



乙二醇



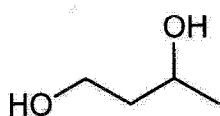
1,3-丙二醇



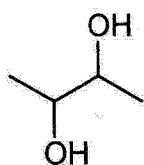
1,2-丙二醇



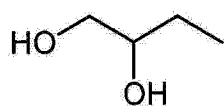
1,4-丁二醇



1,3-丁二醇



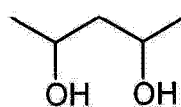
2,3-丁二醇



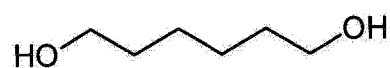
1,4-丁二醇



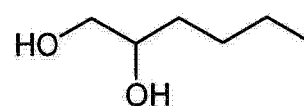
1,5-戊二醇



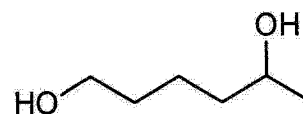
2,4-戊二醇



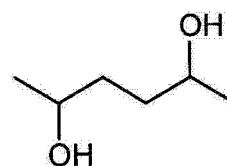
1,6-己二醇



1,2-己二醇



1,5-己二醇



2,5-己二醇

[0138] 表 2 : 续

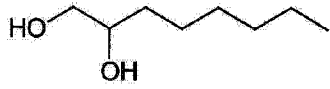
[0139]



1,7-庚二醇



1,8-辛二醇



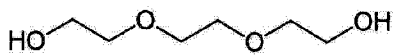
1,2-辛二醇



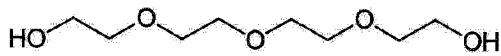
1,9-壬二醇



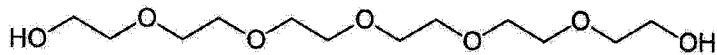
1,12-十二烷二醇



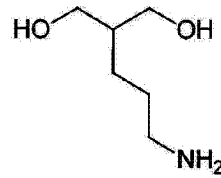
三甘醇



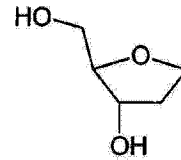
四甘醇



六甘醇



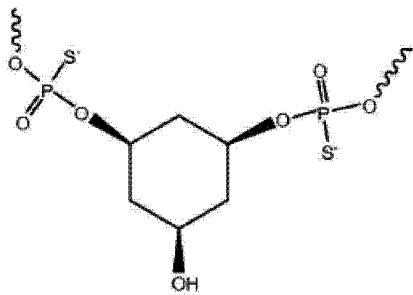
2-(1-氨基丙基)-1,3-丙二醇



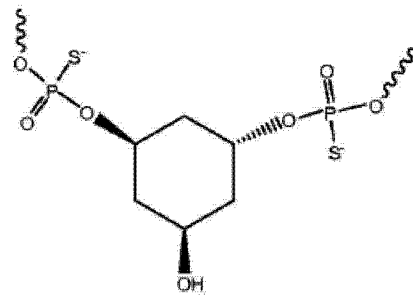
1,2-脱氧核糖

[0140] 表 2 :续

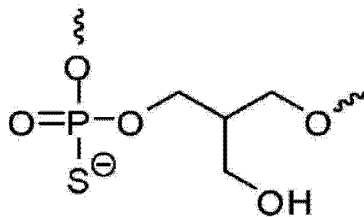
[0141]



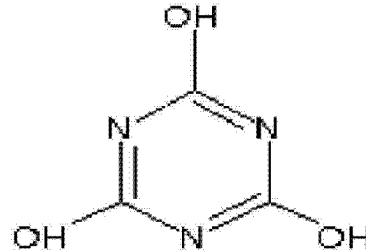
顺,顺-环己烷三醇接头



顺,反-环己烷三醇接头



1,3,4-异丁三醇



氰尿酸

[0142] 在一些实施方案中,所述小分子接头是甘油或式 $\text{HO}-(\text{CH}_2)_o-\text{CH}(\text{OH})-(\text{CH}_2)_p-\text{OH}$ 的甘油同系物,其中 o 和 p 独立为 1 至约 6、1 至约 4、或 1 至约 3 的整数。在一些其它实施方案中,所述小分子接头是 1,3-二氨基-2-羟基丙烷的衍生物。一些此类衍生物具有式 $\text{HO}-(\text{CH}_2)_m-\text{C}(\text{O})\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{NHC}(\text{O})-(\text{CH}_2)_m-\text{OH}$, 其中 m 是 0 至约 10、0 至约 6、2 至约 6、或 2 至约 4 的整数。

[0143] 一些依照本发明的非核苷酸接头容许附着超过两条寡核糖核苷酸,如表 1 所描绘的。例如,小分子接头甘油具有三个羟基,可供寡核糖核苷酸共价附着。因此,一些依照本发明的免疫调控性寡核糖核苷酸包含超过两条经非核苷酸接头连接的寡核糖核苷酸(例如域 C 等,别的域包含如上文为域 A、B、C、和 D 定义的寡核糖核苷酸)。

[0144] 在本发明这个方面的又一个实施方案中, SIMRA 可含有三条或更多条在它们的 3' 或 5' 端处、或经由核苷间连接或官能化核碱基或糖连接至两个或更多个接头的寡核糖核苷酸,如表 1 所描绘的。本发明这个方面的寡核糖核苷酸可具有相同或不同的序列。本发明这个方面的接头可以是相同的或不同的。

[0145] 本发明的免疫调控性寡核糖核苷酸可以方便地使用自动化合成仪和亚氨基磷酸酯法合成。在一些实施方案中,免疫调控性寡核糖核苷酸是通过线性合成法合成的。

[0146] 另一种合成模式是“平行合成”,其中自中央接头模块向外进行合成(见图 1)。可以使用附着于固体支持物的接头来进行平行合成,如美国专利 No. 5, 912, 332 中所记载的。或者,可以使用通用固体支持物(诸如附着有磷酸酯的受控孔径玻璃)。

[0147] 免疫调控性寡核糖核苷酸的平行合成相对于线性合成具有数项优点:(1) 平行合成容许掺入相同的单体单元;(2) 与线性合成不同,所有单体单元都是在同一时间合成的,由此合成步骤的数目和合成所需要的时间与单体单元的是相同的;和(3) 合成步骤的减少提高了最终的免疫调控性寡核糖核苷酸产物的纯度和产率。

[0148] 在通过线性合成或平行合成方案进行的合成结束时,可以用浓氨水溶液或像亚氨基磷酸酯供应商推荐的那样(如果掺入有经过修饰的核苷的话)方便地使免疫调控性寡核

糖核苷酸脱保护。将产物免疫调控性寡核糖核苷酸优选通过反相 HPLC 纯化,脱三苯甲基化,脱氧和透析。

[0149] 表 3 显示了依照本发明的基于 RNA 的免疫调控性寡核糖核苷酸。除非另有规定,所有核苷是核糖核苷。

[0150] 表 3 :稳定化的基于 RNA 的免疫调控性寡核糖核苷酸 (SIMRA) 序列

[0151]

SIMRA# (SEQ ID NO.)	序列和修饰
1	5'-YUUCUG ₁ CUUCUG ₁ -X-G ₁ UCUUCG ₁ UCUUY-5'
2	5'-UG ₁ CUG ₁ CCUUUG ₁ -X-G ₁ UUUCCG ₁ UCG ₁ U-5'
3	5'-UG ₁ CUG ₁ CCUUUG ₁ -Z-G ₁ UUUCCG ₁ UCG ₁ U-5'
4	5'-G ₁ UCCUUUG ₁ CUG ₁ -X-G ₁ UCG ₁ UUUCCUG ₁ -5'
5	5'-L ₁ UGCUGCUUGUG-X-GUGUUCGUCGUL ₁ -5'
6	5'-LUGCUGCCUUUG-m-GUUUCCGUCGUL-5'
7	5'-G ₁ UCCUUUG ₁ CUUG ₁ -M-G ₁ UUCG ₁ UUCUG ₁ -5'
8	5'-UUCUG ₁ CUUCUG ₁ -M-G ₁ UCUUCG ₁ UCUU-5'
9	5'-G ₁ UCCUUUG ₁ CUG ₁ -m-G ₁ UCG ₁ UUUCCUG ₁ -5'
10	5'-YUUGACGUUGAC-m-CAGUUGCAGUUY-5'
11	5'-YGUGCCUGAUGA-X-AGUAGUCCGUGY-5'
12	5'-AUGCUGCGCUG-M-GUCGCGUCGUA-5'
13	5'-UGCUGCUUG ₂ UG-X-GUG ₂ UUCGUCGU-5'
14	5'-UG ₂ CUGCUUGUG-X-GUGUUCGUCG ₂ U-5'
15	5'-UG ₂ CUG ₂ CUUG ₂ UG ₂ -X-G ₂ UG ₂ UUCG ₂ UCG ₂ U-5'
16	5'-UG ₂ CUG ₂ CUUG ₂ UG ₂ -m-G ₂ UG ₂ UUCG ₂ UCG ₂ U-5'
17	5'-UG ₂ CUG ₂ CUUG ₂ UG ₂ -M-G ₂ UG ₂ UUCG ₂ UCG ₂ U-5'
18	5'-UG ₂ CUG ₂ CCUUUG ₂ -M-G ₂ UUUCCG ₂ UCG ₂ U-5'
19	5'-UG ₂ CUG ₂ CCUUUG ₂ -m-G ₂ UUUCCG ₂ UCG ₂ U-5'
20	5'-UG ₂ CUG ₂ CCUUUG ₂ -X-G ₂ UUUCCG ₂ UCG ₂ U-5'
21	5'-UGC ₁ UGC ₁ UUGUG-X-GUGUUC ₁ GUC ₁ GU-5'
22	5'-UGC ₁ UGC ₁ UUGUG-m-GUGUUC ₁ GUC ₁ GU-5'
23	5'-UGC ₁ UGC ₁ UUGUG-M-GUGUUC ₁ GUC ₁ GU-5'
24	5'-UGC ₁ UGC ₁ UUC ₁ UG-X-GUC ₁ UUC ₁ GUC ₁ GU-5'
25	5'-UGC ₁ UGC ₁ C ₁ UUUG-M-GUUUC ₁ C ₁ GUC ₁ GU-5'
26	5'-UGC ₁ UGC ₁ C ₁ UUUG-m-GUUUC ₁ C ₁ GUC ₁ GU-5'
27	5'-UGC ₁ UGC ₁ C ₁ UUUG-X-GUUUC ₁ C ₁ GUC ₁ GU-5'
28	5'-UGCUGCU ₁ U ₁ CU ₁ G-X-GU ₁ CU ₁ U ₁ CGUCGU-5'
29	5'-YUGCUGCU ₁ U ₁ CU ₁ G-X-GU ₁ CU ₁ U ₁ CGUCGUY-5'
30	5'-UGUUGUGUGA ₁ C-X-CA ₁ GUGUGUUGU-5'
31	5'-UG ₂ CUG ₂ CUUG ₂ UG ₂ -m-G ₂ UG ₂ UUCG ₂ UCG ₂ U-5'

[0152]

32	5'-UGC ₁ UGC ₁ UUGUG-m-GUGUUC ₁ GUC ₁ GU-5'
33	5'-UGC ₁ UGC ₁ C ₁ UUUG-X-GUUUC ₁ C ₁ GUC ₁ GU-5'
34	5'-GAUUGUGACGU-X-UGCAGUGUUAG-5'
35	5'-CUGAAGCUUGU-X-UGUUCGAAGUC-5'
36	5'-UG ₂ CUG ₂ CUUG ₂ UG ₂ -M-G ₂ UG ₂ UUCG ₂ UCG ₂ U-5'
37	5'-YUGCUGCUUGUG-X-GUGUUCGUCGUY-5'
38	5'-UG ₁ CUG ₁ CUUCUG ₁ -X-G ₁ UCUUCG ₁ UCG ₁ U-5'
39	5'-UG ₃ CUG ₃ CUUCUG ₃ -X-G ₃ UCUUCG ₃ UCG ₃ U-5'
40	5'-UG ₃ CUG ₃ CCUUUG ₃ -m-G ₃ UUUCCG ₃ UCG ₃ U-5'
41	5'-YUGACGAUGAGU-X-UGAGUAGCAGUY-5'
42	5'-UGCUGCU ₁ U ₁ CU ₁ G-X-GU ₁ CU ₁ U ₁ CGUCGU-5'
43	5'-UGC ₁ UGC ₁ C ₁ UUUG-m-GUUUC ₁ C ₁ GUC ₁ GU-5'
44	5'-UG ₁ CUG ₁ CUUCUG ₁ -6Eg-M-6Eg-G ₁ UCUUCG ₁ UCG ₁ U-5'
45	5'-YUGACGACGCUU-X-UUCGCAGCAGUY-5'
46	5'-YUGACGACUGCU-X-UCGUCAGCAGUY-5'
47	5'-YUGACGACUUGC-X-CGUUCAGCAGUY-5'
48	5'-YUGCGCGAACUU-X ₃ -UUCAAGCGCGUY-5'
49	5'-AG ₁ UG ₁ UUUUCUG ₁ -X-G ₁ UCUUUUG ₁ UG ₁ A-5'
50	5'-UG ₁ CUG ₁ CUUUUG ₁ -X-G ₁ UUUUCG ₁ UCG ₁ U-5'
51	5'-UG ₁ UUG ₁ UUUG ₁ UG ₁ -X-G ₁ UG ₁ UUUG ₁ UUG ₁ U-5'
52	5'-UG ₁ AUG ₁ AAG ₁ CUU-X-UUCG ₁ AAG ₁ UAG ₁ U-5'
53	5'-YUGCUGCUUGAA-X-AAGUUCGUCGUY-5'
54	5'-YUUGACUGAUGA-X-AGUUGUCAGUUY-5'
55	5'-UGCUGCUUUUG-X-GUUUUCGUCGU-5'
56	5'-UGUUGUUUGUG-X-GUGUUUGUUGU-5'
57	5'-UGUUCGAACAC-X-CACAAGCUUGU-5'
58	5'-UUGACGUUGAC-X-CAGUUGCAGUU-5'
59	5'-UUGACGUUGAC-Z-CAGUUGCAGUU-5'
60	5'-UUGACGUUGAC-M-CAGUUGCAGUU-5'
61	5'-UUGACGUUGAC-m-CAGUUGCAGUU-5'
62	5'-GUGCCUGAUGA-X-AGUAGUCCGUG-5'
63	5'-CCGAUGCCGAC-X-CAGCCGUAGCC-5'
64	5'-CCGAUGCAUCG-X-GCUACGUAGCC-5'
65	5'-GUGCCUGAUGA-Z-AGUAGUCCGUG-5'

[0153]

66	5'-GUGCCUGAUGA-M-AGUAGUCCGUG-5'
67	5'-GUGCCUGAUGA-m-AGUAGUCCGUG-5'
68	5'-CCGAUGCCGAC-Z-CAGCCGUAGCC-5'
69	5'-CCGAUGCCGAC-M-CAGCCGUAGCC-5'
70	5'-CCGAUGCCGAC-m-CAGCCGUAGCC-5'
71	5'-CCGAUGCAUCG-Z-GCUACGUAGCC-5'
72	5'-CCGAUGCAUCG-M-GCUACGUAGCC-5'
73	5'-CCGAUGCAUCG-m-GCUACGUAGCC-5'
74	5'-AGCACAACUGU-X-UGUCAACACGA-5'
75	5'-AAAAAAAAAAAA-X-AAAAAAAAAAAA-5'
76	5'-YCACUGUUGAGA-X-AGAGUUGUCACY-5'
77	5'-YAACUGUUGACC-X-CCAGUUGUCAAY-5'
78	5'-YCAACGACCUGU-X-UGUCCAGCAACY-5'
79	5'-CACUG ₁ UUG ₁ AG ₁ A-X-AG ₁ AG ₁ UUG ₁ UCAC-5'
80	5'-AACUG ₁ UUG ₁ ACC-X-CCAG ₁ UUG ₁ UCAA-5'
81	5'-CAACG ₁ ACCUG ₁ U-X-UG ₁ UCCAG ₁ CAAC-5'
82	5'-AUGCUGCGCUG-X-GUCGCGUCGUA-5'
83	5'-AUGCUGCGCUG-Z-GUCGCGUCGUA-5'
84	5'-AUGCUGCGCUG-m-GUCGCGUCGUA-5'
85	5'-AACUGUUGACC-X-CCAGUUGUCA-5'
86	5'-CACUGUUGAGA-X-AGAGUUGUCAC-5'
87	5'-GCACACUUGUU-X-UUGUUCACACG-5'
88	5'-UGUUGUGUGAC-X-CAGUGUGUUGU-5'
89	5'-CCGAUGCAUCG-X-GCUACGUAGCC-5'
90	5'-AACGAACCGAC-X-CAGCCAAGCAA-5'
91	5'-YCAACGACCUGU-X-UGUCCAGCAACY-5'
92	5'-LCAACGACCUGU-X-UGUCCAGCAACL-5'
93	5'-CGUUGUGAUGA-X-AGUAGUGUUGC-5'
94	5'-ACGAUUGUGAC-X-CAGUGUUAGCA-5'
95	5'-ACUUUGACGAU-X-UAGCAGUUUCA-5'
96	5'-CGAUGCGAUGA-X-AGUAGCGUAGC-5'
97	5'-ACGUCUGACGA-X-AGCAGUCUGCA-5'
98	5'-AACUGCUGGAU-X-UAGGUCGUCAA-5'
99	5'-UUGGACUCCAG-X-GACCUCAGGUU-5'

[0154]

100	5'-UCGACUCCAG-X-GACCUUCAGCU-5'
101	5'-CCGACUUGGAC-X-CAGGUUCAGCC-5'
102	5'-AAGACUGAACU-X-UCAAGUCAGAA-5'
103	5'-YUG ₂ CUG ₂ CCUUUG ₂ -X-G ₂ UUUCCG ₂ UCG ₂ UY-5'
104	5'-YUG ₂ CUG ₂ CCUUUG ₂ -M-G ₂ UUUCCG ₂ UCG ₂ UY-5'
105	5'-YUG ₂ CUG ₂ CCUUUG ₂ -m-G ₂ UUUCCG ₂ UCG ₂ UY-5'
106	5'-LUG ₂ CUG ₂ CCUUUG ₂ -X-G ₂ UUUCCG ₂ UCG ₂ UL-5'
107	5'-LUG ₂ CUG ₂ CCUUUG ₂ -M-G ₂ UUUCCG ₂ UCG ₂ UL-5'
108	5'-LUG ₂ CUG ₂ CCUUUG ₂ -m-G ₂ UUUCCG ₂ UCG ₂ UL-5'
109	5'-L ₁ UG ₂ CUG ₂ CCUUUG ₂ -X-G ₂ UUUCCG ₂ UCG ₂ UL ₁ -5'
110	5'-L ₁ UG ₂ CUG ₂ CCUUUG ₂ -M-G ₂ UUUCCG ₂ UCG ₂ UL ₁ -5'
111	5'-L ₁ UG ₂ CUG ₂ CCUUUG ₂ -m-G ₂ UUUCCG ₂ UCG ₂ UL ₁ -5'
112	5'-G ₁ UCCUUG ₁ CUUG ₁ -m-G ₁ UUCG ₁ UUCUG ₁ -5'
113	5'-UUCUG ₁ CUUCUG ₁ -m-G ₁ UCUUCG ₁ UCUU-5'
114	5'-UG ₁ CUG ₁ CCUUUG ₁ -M-G ₁ UUUCCG ₁ UCG ₁ U-5'
115	5'-UG ₁ CCUUUG ₁ CUG ₁ -M-G ₁ UCG ₁ UUUCCG ₁ U-5'
116	5'-UG ₁ CUG ₁ CUUCUG ₁ -M-G ₁ UCUUCG ₁ UCG ₁ U-5'
117	5'-UG ₁ C ₁ UG ₁ C ₁ C ₁ UUUG ₁ -X-G ₁ UUUC ₁ C ₁ G ₁ UC ₁ G ₁ U-5'
118	5'-UG ₁ C ₁ UG ₁ C ₁ UUC ₁ UG ₁ -X-G ₁ UC ₁ UUC ₁ G ₁ UC ₁ G ₁ U-5'
119	5'-YUGCUGCUUCUG-6Eg-M-6Eg-GUCUUCGUCGUY-5'
120	5'-UGGCUUGACGC-X-CGCAGUUCGGU-5'
121	5'-UGCUGCUUGAA-X-AAGUUCGUCGU-5'
122	5'-UGACGAUGAGU-X-UGAGUAGCAGU-5'
123	5'-UGAUGAGGACU-X-UCAGGAGUAGU-5'
124	5'-UGUUGAGGAAC-X-CAAGGAGUUGU-5'
125	5'-UGCGAGACUGC-X-CGUCAGAGCGU-5'
126	5'-GUUGAACGACU-X-UCAGCAAGUUG-5'
127	5'-UGACUGAUGAC-X-CAGUAGUCAGU-5'
128	5'-UGUUGAACGAC-X-CAGCAAGUUGU-5'
129	5'-UGAGCGUGAAC-X-CAAGUGCGAGU-5'
130	5'-UG ₁ G ₁ CUUG ₁ ACG ₁ C-X-CG ₁ CAG ₁ UUCG ₁ G ₁ U-5'
131	5'-UG ₁ ACG ₁ AUG ₁ AG ₁ U-X-UG ₁ AG ₁ UAG ₁ CAG ₁ U-5'
132	5'-UG ₁ UUG ₁ AG ₁ G ₁ AAC-X-CAAG ₁ G ₁ AG ₁ UUG ₁ U-5'
133	5'-UG ₁ UUG ₁ AACG ₁ AC-X-CAG ₁ CAAG ₁ UUG ₁ U-5'

[0155]

134	5'-YUGCGAGACUGC-X-CGUCAGAGCGUY-5'
135	5'-YUGAGCGUGAAC-X-CAAGUGCGAGUY-5'
136	5'-YUUGAGCUGGAC-X-CAGGUCGAGUUY-5'
137	5'-YGUUGAGGAACU-X-UCAAGGAGUUGY-5'
138	5'-YUGAUGAAGCUU-X-UUCGAAGUAGUY-5'
139	5'-YUUGACGAUGAG-X-GAGUAGCAGUUY-5'
140	5'-YUUGUUGAACGA-X-AGCAAGUUGUUY-5'
141	5'-YUUGAACGACUU-X-UUCAGCAAGUUY-5'
142	5'-YUGAUGGAACGA-X-AGCAAGGUAGUY-5'
143	5'-UG ₁ CUG ₁ CCUUUG ₁ -M-G ₁ UUUCCG ₁ UCG ₁ U-5'
144	5'-UG ₁ CUG ₁ CCUUUG ₁ -Y-M-Y-G ₁ UUUCCG ₁ UCG ₁ U-5'
145	5'-UG ₁ CUG ₁ CCUUUG ₁ -3Eg-M-3Eg-G ₁ UUUCCG ₁ UCG ₁ U-5'
146	5'-UG ₁ CUG ₁ CCUUUG ₁ -4Eg-M-4Eg-G ₁ UUUCCG ₁ UCG ₁ U-5'
147	5'-UG ₁ CUG ₁ CCUUUG ₁ -6Eg-M-6Eg-G ₁ UUUCCG ₁ UCG ₁ U-5'
148	5'-YUGCUGCUUGUG-Y-M-Y-GUGUUCGUCGUY-5'
149	5'-YUGCUGCUUGUG-3Eg-M-3Eg-GUGUUCGUCGUY-5'
150	5'-YUGCUGCUUGUG-4Eg-M-4Eg-GUGUUCGUCGUY-5'
151	5'-CAACGAACCCU-X-UCCCAAGCAAC-5'
152	5'-UGCUGCUGCUG-X-GUCGUCGUCGU-5'
153	5'-UGAAGCUUGAA-X-AAGUUCGAAGU-5'
154	5'-UGAACGUGAAC-X-CAAGUGCAAGU-5'
155	5'-YUGC ₄ UGC ₄ UUGUG-X-GUGUUC ₄ GUC ₄ GUY-5'
156	5'-UG ₁ C ₄ UG ₁ C ₄ UUC ₄ UG ₁ -X-G ₁ UC ₄ UUC ₄ G ₁ UC ₄ G ₁ U-5'
157	5'-YUG ₁ ACG ₁ AUG ₁ AG ₁ U-X-UG ₁ AG ₁ UAG ₁ CAG ₁ UY-5'
158	5'-G ₁ UCCUUG ₁ CUUG ₁ -X ₁ -G ₁ UUCG ₁ UCCUG ₁ -5'
159	5'-UUCUG ₁ CUUCUG ₁ -X ₁ -G ₁ UCUUCG ₁ UCUU-5'
160	5'-UG ₁ CCUUUG ₁ CUG ₁ -X ₂ -G ₁ UCG ₁ UUUCCG ₁ U-5'
161	5'-UG ₁ CUG ₁ CUUCUG ₁ -X ₂ -G ₁ UCUUCG ₁ UCG ₁ U-5'
162	5'-PUUCUG ₁ CUUCUG ₁ -m-G ₁ UCUUCG ₁ UCUUP-5'
163	5'-PUG ₁ CCUUUG ₁ CUG ₁ -M-G ₁ UCG ₁ UUUCCG ₁ UP-5'
164	5'-UG ₁ CUG ₁ CUUC ₁ UG ₁ -X ₁ -G ₁ UC ₁ UUCG ₁ UCG ₁ U-5'
165	5'-UG ₁ CUG ₁ CUUC ₁ UG ₁ -X ₃ -G ₁ UC ₁ UUCG ₁ UCG ₁ U-5'
166	5'-C ₂ UGAAGC ₂ UUGU-X-UGUUC ₂ GAAGUC ₂ -5'
167	5'-CU ₂ GAAGCU ₂ U ₂ GU ₂ -X-U ₂ GU ₂ U ₂ CGAAGU ₂ C-5'

[0156]

168	5'-YAACUG ₂ UUG ₂ ACC-X-CCAG ₂ UUG ₂ UCAAY-5'
169	5'-L ₁ UG ₂ G ₂ CUUG ₂ ACG ₂ C-X-CG ₂ CAG ₂ UUCG ₂ G ₂ UL ₁ -5'
170	5'-YUGACGCUGACU-X-UGACGCUGACUY-5'
171	5'-YUGACUGCGACU-X-UCAGCGUCAGUY-5'
172	5'-YUGCGAACGCUU-X-UUCGCAAGCGUY-5'
173	5'-YUGCGACUGACU-X ₃ -UCAGUCAGCGUY-5'
174	5'-YUGCGCUGAACU-X ₃ -UCAAGUCGCGUY-5'
175	5'-YUGCUGACGACU-X ₃ -UCAGCAGUCGUY-5'
176	5'-YUGCUUGAACGC-X ₃ -CGCAAGUUCGUY-5'
177	5'-YUUGCUGAACGC-X ₃ -CGCAAGUCGUUY-5'
178	5'-UG ₁ CUG ₁ CCUUUG ₁ -Y-X-Y-G ₁ UUCCG ₁ UCG ₁ U-5'
179	5'-YUGUUGUGUGAC-X-CAGUGUGUUGUY-5'
180	5'-YUGCUGCCUUUG-X-GUUUCCGUCGUY-5'
181	5'-YUGCUGCUGCUG-X-GUCGUCGUCGUY-5'
182	5'-YUGUUGUGUGAC-Z-CAGUGUGUUGUY-5'
183	5'-EUUGAACGACUU-X-UUCAGCAAGUUE-5'
184	5'-EUGUUGUGUGAC-X-CAGUGUGUUGUE-5'
185	5'-EUGCUGCCUUUG-X-GUUUCCGUCGUE-5'
186	5'-EUGCUGCUGCUG-X-GUCGUCGUCGUE-5'
187	5'-U ₁ GCU ₁ GCUUGUG-X-GUGUUCGUCGU ₁ -5'
188	5'-U ₁ GCU ₁ GCUUGUG-X-GUGUUCGU ₁ CGU ₁ -5'
189	5'-U ₁ GCU ₁ GCU ₁ U ₁ GU ₁ G-X-GU ₁ GU ₁ U ₁ CGU ₁ CGU ₁ -5'

[0157] G₁=7-脱氮-rG; G₂=ara-G; G₃=7-脱氮-ara-G; C₁=ara-C; C₂=2'-F-C; C₄=5-甲基-C; A₁=ara-A; U₁=ara-U; U₂=2'-F-U; M=顺, 顺-环己烷三醇接头; m=顺, 反-环己烷三醇; Z=1, 3, 5-戊三醇接头; X=甘油接头; X₁=1, 2, 4-丁三醇接头; X₂=氰尿酸; X₃=异丁三醇接头; Y=1, 3-丙二醇; L=1, 5-戊二醇; L₁=1', 2'-二脱氧核糖; 6Eg=六甘醇接头; 3Eg=三甘醇接头; 4Eg=四甘醇接头; P=硫代磷酸酯; E=乙二醇。

[0158] 在第二个方面, 本发明提供了包含依照本发明的 SIMRA 化合物和药学可接受载体的药物配制剂。

[0159] 在第三个方面, 本发明提供了用于在脊椎动物中产生 TLR7 和 / 或 TLR8 介导的免疫应答的方法, 此方法包括给所述脊椎动物施用依照本发明的 SIMRA 化合物。在一些实施方案中, 所述脊椎动物是哺乳动物。在优选的实施方案中, 给需要免疫调控的脊椎动物施用 SIMRA 化合物。

[0160] 在第四个方面, 本发明提供了用于治疗性处理患有疾病或病症的患者的方法, 此方法包括给所述患者施用依照本发明的 SIMRA 化合物。在各种实施方案中, 要治疗的疾病或病症是可能想要免疫调控的。例如但不限于癌症、自身免疫性病症、传染病、气道炎症、炎

性病症、变态反应、哮喘、或由病原体引起的疾病。病原体包括细菌、寄生物、真菌、病毒、类病毒和朊病毒。

[0161] 在第五个方面,本发明提供了用于预防疾病或病症的方法,此方法包括给患者施用依照本发明的 SIMRA 化合物。在各种实施方案中,要预防的疾病或病症是可能想要免疫调控的。例如但不限于癌症、自身免疫性病症、气道炎症、炎性病症、传染病、变态反应、哮喘、或由病原体引起的疾病。病原体包括细菌、寄生物、真菌、病毒、类病毒、和朊病毒。

[0162] 在第六个方面,本发明提供了一种预防或治疗病症的方法,此方法包括分离能够生成细胞因子或趋化因子的细胞(包括但不限于免疫细胞、B 细胞、T 调节性细胞、B 细胞、PBMC、pDC 和淋巴样细胞);在标准细胞培养条件下培养此类细胞,用 SIMRA 离体处理此类细胞,使得所分离的细胞生成或分泌水平升高的细胞因子或趋化因子,并给需要细胞因子或趋化因子治疗以预防或治疗疾病的患者施用或再施用经处理的细胞。本发明的这个方面会依照标准过继性细胞免疫疗法技术来产生活化的免疫细胞。

[0163] 在本发明这个方面的一些实施方案中,可以自患有或不患有疾病或病症的受试者分离能够生成细胞因子或趋化因子的细胞。此分离可以包括鉴定和选择,并且可以使用标准细胞分离规程(包括下文的具体实施例中所列出的那些)来实施。依照标准细胞培养规程并使用标准细胞培养条件(其可以包括下文的具体实施例中所列出的培养规程和条件)来培养此类分离的细胞。在本发明的这个实施方案的又一个方面,在存在至少一种 SIMRA 的情况中培养分离的细胞, SIMRA 的量和培养的时限足以与在没有所述一种或多种 SIMRA 的情况中培养的分细胞相比诱导、提高或增强细胞因子和 / 或趋化因子的生成和 / 或分泌。此时间可以从若干分钟至若干小时、至若干天。此类分离的、经 SIMRA 处理的细胞可用于给供体再施用或者给第二位组织学相容患者施用,其中此供体或第二患者需要诱导、提高或增强细胞因子和 / 或趋化因子的生成和 / 或分泌。例如,给患有癌症、自身免疫性病症、气道炎症、炎性病症、传染病、变态反应、哮喘、或由病原体引起的疾病的供体再施用或者给患有癌症、自身免疫性病症、气道炎症、炎性病症、传染病、变态反应、哮喘、或由病原体引起的疾病的第二患者施用。可以使用包括导管或注射施用或任何其它有效路径的多种方式来实现此再施用或施用。本发明的这个方面还可应用于可能具有有限的或不完全的启动免疫应答的能力的患者或免疫受损的患者(例如受 HIV 感染的患者或骨髓移植的患者)。本发明的这个方面还可应用于与给施用或再施用分离的、经 SIMRA 处理的细胞的患者进行 SIMRA 施用的组合。

[0164] 在依照本发明的任何方法中, SIMRA 化合物能通过单独地或与任何其它对治疗或预防疾病或疾患有用的、不降低 SIMRA 化合物的免疫调控效果的药剂组合地产生直接免疫调控效果而以各种方式起作用。在依照本发明的任何方法中,对治疗或预防疾病或疾患有用的药剂包括但不限于疫苗、抗原、抗体(优选单克隆抗体)、细胞毒剂、变应原、抗生素、siRNA、微小 RNA、反义寡核苷酸、TLR 激动剂(例如 TLR9 激动剂和 / 或 TLR7 激动剂和 / 或 TLR8 激动剂)、化疗剂(传统的化疗和现代的靶向疗法二者)、靶向治疗剂、活化的细胞、肽、蛋白质、基因疗法载体、肽疫苗、蛋白质疫苗、DNA 疫苗、佐剂、和共刺激分子(例如细胞因子、趋化因子、蛋白质配体、反式激活因子、肽或包含经修饰氨基酸的肽)、或其组合。例如,在癌症的治疗中,可以将 SIMRA 化合物与一种或多种化疗化合物、靶向治疗剂和 / 或单克隆抗体组合施用。或者,所述药剂可包括编码抗原或变应原的 DNA 载体。或者,所述 SIMRA 化合物

可以与其它佐剂组合施用以增强针对所述 SIMRA 化合物的免疫应答的特异性或强度。

[0165] 在依照本发明的任何方法中, SIMRA 化合物的施用(单独的或与任何其它药剂组合的)可通过任何合适路径来进行,包括但不限于胃肠外 (parenteral)、粘膜投递 (mucosal delivery)、口服 (oral)、舌下 (sublingual)、经皮 (transdermal)、表面 (topical)、吸入 (inhalation)、鼻内 (intranasal)、气溶胶 (aerosol)、眼内 (intraocular)、气管内 (intratracheal)、直肠内 (intrarectal)、阴道 (vaginal)、通过基因枪 (gene gun)、皮肤贴片 (dermal patch) 或滴眼剂 (eye drop) 或漱口水 (mouthwash) 形式。SIMRA 化合物的治疗性组合物的施用可使用已知规程以有效减轻疾病的症状或替代标志物的药学有效量和时限来进行。例如, SIMRA 化合物用于治疗疾病和 / 或病症的药学有效量可以是缓和或减轻症状, 或者延迟或改善肿瘤、癌症、或细菌、病毒或真菌感染所必需的量。作为疫苗佐剂使用的药学有效量可以是对加强受试者对疫苗或抗原的免疫应答有用的量。在施用调控针对共施用的抗原的免疫应答的组合物的背景中, SIMRA 化合物和抗原的药学有效量是足以与在单独施用该抗原时所获得的免疫应答相比实现想要的调控的量。任何具体应用的有效量可以随诸如所治疗的疾病或疾患、所施用的具体寡核苷酸、受试者的体型、或疾病或疾患的严重程度等因素而变化。本领域技术人员能凭经验决定具体寡核苷酸的药学有效量而没有过度实验的必要。

[0166] 在系统性施用时, 优选以足够剂量施用治疗性组合物以使 SIMRA 化合物的血液水平达到约 0.0001 微摩尔至约 10 微摩尔。对于局部施用, 比这低得多的浓度可以是有效的, 而且可耐受高得多的浓度。优选的是, SIMRA 化合物的总剂量的范围为约 0.001mg 每名患者每天至约 200mg 每 kg 体重每天。可能希望对个体同时地或顺序地施用治疗有效量的一种或多种本发明治疗性组合物作为单次处理事件。

[0167] SIMRA 化合物可任选是与一种或多种变应原和 / 或抗原(自身的或外来的)、免疫原性蛋白质或肽相连接的, 诸如匙孔藻血蓝蛋白 (KLH)、霍乱毒素 B 亚基、或任何其它免疫原性载体蛋白。SIMRA 化合物还可与其它化合物(例如佐剂) 组合使用, 包括但不限于 TLR 激动剂(例如 TLR2 激动剂和 TLR9 激动剂)、弗氏不完全佐剂、KLH、单磷酸基脂质 A (MPL)、明矾、和皂苷(包括 QS-21 和咪喹莫特 (imiquimod)), 或其组合。

[0168] 依照本发明这个方面的方法对于免疫系统的模型研究是有用的。所述方法对于人或动物疾病的预防性或治疗性处理也是有用的。例如, 所述方法对于儿科和兽医疫苗应用是有用的。

[0169] 以下实施例旨在进一步例示本发明的某些例示性实施方案, 并非意图限制本发明的范围。

实施例

[0170] 实施例 1: 免疫调控性寡核糖核苷酸的合成

[0171] 在自动化 DNA/RNA 合成仪上使用亚氨基磷酸酯化学法化学合成免疫调控性寡核糖核苷酸。N-乙酰基保护的(除 U 外) 2'-O-TBDMS RNA 单体(A、G、C 和 U) 购自 Sigma-Aldrich。7-脱氮-G、肌苷购自 ChemGenes Corporation。0.25M 5-乙硫基-1H-四唑、PAC-酞 Cap A 和 Cap B 购自 Glen Research。二氯甲烷 (DCM) 中的 3% 三氯乙酸 (TCA) 和 5% 3H-1, 2-苯并二硫醇-3-酮-1, 1-二氧化物 (Beaucage 试剂) 均自行制备。

- [0172] 使用标准 RNA 合成方案以 1-2 μ M 规模合成免疫调控性寡核糖核苷酸。
- [0173] 切割和碱基脱保护
- [0174] 自固体支持物切割免疫调控性寡核糖核苷酸,并在甲胺和氢氧化铵溶液中除去外-环-胺的保护基团。在 SpeedVac 中完全干燥所得溶液。
- [0175] IE HPLC 纯化
- [0176] 通过离子交换 HPLC 来纯化免疫调控性寡核糖核苷酸。使用 Dionex DNAPac 100 柱。将粗制的免疫调控性寡核糖核苷酸溶液注射入 HPLC 中。实施上文的梯度,并收集级分。混合所有含有超过 90% 期望产物的级分,然后通过 RotoVap 将溶液浓缩至几乎干的。添加不含 RNA 酶的水使终体积为 10ml。
- [0177] C-18 反相脱盐
- [0178] 如下清洗购自 Waters 的 tC-18Sep-Pak 筒(cartridge),即用 10ml 乙腈流过,接着 10ml 0.5M 乙酸钠流过该筒。然后将 10ml 免疫调控性寡核糖核苷酸溶液加载至该筒上。然后使用 15ml 水来洗去盐。最后使用 1ml 在水中的 50% 乙腈来洗脱免疫调控性寡核糖核苷酸。将该溶液放置在 SpeedVac 中达 30 分钟。将剩余溶液流过 0.2 微米过滤器过滤,然后冻干。然后将固体在不含 RNA 酶的水中再溶解以得到想要的浓度。在低于 0° C 贮存终溶液。通过毛细管电泳、离子交换 HPLC 和 PAGE 分析来对寡核糖核苷酸分析纯度,并通过 MALDI-ToF 质谱术来分析分子量。
- [0179] 实施例 2:用表达 TLR 的 HEK293 细胞进行的测定法的方案
- [0180] 将 HEK293 或 HEK293XL/人 TLR7 或者 HEK293 或 HEK293XL/人 TLR8 细胞 (Invivogen, San Diego, CA) 在 5%CO₂ 培养箱中在 48 孔板中在补充有 10% 热灭活 FBS 的 250 μ l/孔 DMEM 中培养。
- [0181] 报告基因转化
- [0182] 将稳定表达人 TLR7 或 TLR8 的 HEK293 或 HEK293XL 细胞 (Invivogen, San Diego, CA) 在 5%CO₂ 培养箱中在 48 孔板中在补充有 10% 热灭活 FBS 的 250 μ l/孔 DMEM 中培养。在 80% 汇合时,在培养基中存在 4 μ l/ml Lipofectamine (Invitrogen, Carlsbad, CA) 的情况中用 400ng/ml SEAP (分泌形式的人类胚胎碱性磷酸酶) 报告质粒 (pNifty2-Seap) (Invivogen) 瞬时转染培养物。将质粒 DNA 和 Lipofectamine 在不含血清的培养基中分开稀释,并于室温温育 5 分钟。温育后,混合稀释的 DNA 和 Lipofectamine,并将混合物于室温温育 20 分钟。将含有 100ng 质粒 DNA 和 1 μ l Lipofectamine 的 25 μ l DNA/Lipofectamine 混合物的等分试样添加至细胞培养板的每个孔,并继续培养 4 小时。
- [0183] IMO 处理
- [0184] 转染后,用新鲜培养基更换培养液。用 0、20、50、100、150、200、或 300 μ g/ml TLR7 或 TLR8 激动剂,即 SIMRA 刺激表达人 TLR7 或 TLR8 的 HEK293 或 HEK29XL 细胞,并继续培养 18 小时-20 小时。SIMRA 处理结束时,自每项处理采集 30 μ l 培养物上清液,并遵照制造商的方案 (Invivogen) 用于 SEAP 测定法。
- [0185] SEAP (分泌形式的人类胚胎碱性磷酸酶) 测定法
- [0186] 简言之,将培养物上清液与对硝基苯基磷酸酯底物一起温育,并通过读板仪在 405nm 处测量所生成的黄色。数据显示为 NF- κ B 活性相对于 PBS 对照的倍数增加。(Putta MR 等, Nucleic Acids Res., 2006, 34:3231-8)。

[0187] 实施例 3 :人细胞培养方案

[0188] 人 PBMC 分离

[0189] 通过 Ficoll 密度梯度离心法 (Histopaque-1077, Sigma) 自新鲜采集的健康志愿者血液 (CBR Laboratories, Boston, MA) 分离外周血单个核细胞 (PBMC)。

[0190] 人 pDC 分离

[0191] 通过 Ficoll 密度梯度离心法 (Histopaque-1077, Sigma) 自新鲜采集的健康志愿者血液 (CBR Laboratories, Boston, MA) 分离外周血单个核细胞 (PBMC)。使用 BDCA4 细胞分离试剂盒 (Miltenyi Biotec) 依照制造商的指令通过正选择自 PBMC 分离 pDC。

[0192] 人 mDC 分离

[0193] 通过 Ficoll 密度梯度离心法 (Histopaque-1077, Sigma) 自新鲜采集的健康志愿者血液 (CBR Laboratories, Boston, MA) 分离外周血单个核细胞 (PBMC)。使用 BDCA4 细胞分离试剂盒 (Miltenyi Biotec) 依照制造商的指令通过正选择自 PBMC 分离髓样树突细胞 (mDC)。

[0194] 多重细胞因子测定法

[0195] 使用 5×10^6 个细胞 /ml, 在 48 孔板中分配人 PBMC。使用 1×10^6 个细胞 /ml, 在 96 孔皿中分配 pDC。以终浓度 20、50、100、200 或 300 μ g/ml 或如图中所指示的将在 DPBS (pH 7.4; Mediatech) 中溶解的 SIMRA 添加至细胞培养物。然后于 37° C 温育细胞达 24 小时, 并收集上清液用于 Luminex 多重测定法或 ELISA 测定法。在一式三份的孔中实施实验。通过三明治式 ELISA 来测量 IFN- α 、IL-6、或 TNF- α 水平。需要的试剂(包括细胞因子抗体和标准品)购自 PharMingen。

[0196] 在 Luminex 100/200 仪器上使用 Biosource 人多重细胞因子测定法试剂盒来实施 Luminex 多重测定法, 并使用由 Applied Cytometry Systems (Sacramento, CA) 供应的 StarStation 软件来分析数据。

[0197] 实施例 4 :用 TLR9 激动剂化合物处理的小鼠模型中的体内细胞因子分泌

[0198] 5-6 周龄的 C57BL/6 小鼠和 BALB/c 小鼠得自 Taconic Farms (Germantown, NY) 并依照 Idera Pharmaceutical 的 IACUC 批准的动物方案来饲养。以 25mg/kg (单剂) 给小鼠 (n=3) 皮下 (s.c) 注射表 3 的各稳定化免疫调控性基于 RNA 的寡核苷酸。施用免疫调控性寡核苷酸后 2 小时通过眶后采血来收集血清, 并通过三明治式 ELISA 或 Luminex 多重测定法测定细胞因子和趋化因子水平。结果显示在图 8A、图 8B、图 9A 和图 9B 中, 并且证明体内施用依照本发明的 SIMRA 寡核苷酸产生独特的细胞因子和趋化因子序型。所有试剂(包括细胞因子和趋化因子抗体和标准品)都购自 PharMingen (San Diego, CA)。

[0199] 实施例 5 :血清稳定性测定法

[0200] 将约 0.5 个 OD 的来自表 3 的例示性 SIMRA 化合物个别地于 37° C 在含 1% 人血清的 PBS 中温育 30 分钟。在 1% 人血清中温育 30 分钟后, 在阴离子交换 HPLC 上分析 SIMRA 化合物以测定与血清处理前存在的 SIMRA 化合物量相比保留的全长 SIMRA 化合物的百分比。结果显示在图 10A- 图 10H 中, 并且证明了对基于 RNA 的化合物进行的依照本发明的化学修饰能增强其稳定性。

[0201] 等同方案

[0202] 虽然出于澄清和理解的目的已经较为详细地描述了上述发明, 但是本领域技术人

员在阅读本公开内容后会领会,可以对形式和细节做各种改变而不背离本发明和所附权利要求的真正范围。

[0001]

序列表

<110> 艾德拉药物股份有限公司 (IDERA PHARMACEUTICALS, INC.)
 <120> 稳定化免疫调控性 RNA (SIMRA) 化合物
 <130> IDR-046PCT
 <140> PCT/US2008/069335
 <141> 2008-07-07
 <150> 60/948,529
 <151> 2007-07-09
 <150> 60/957,195
 <151> 2007-08-22
 <150> 60/981,161
 <151> 2007-10-19
 <150> 61/015,284
 <151> 2007-12-20
 <160> 192
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 11
 <212> RNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸
 <220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (5)..(5)
 <223> 7-脱氮-rG
 <220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (11)..(11)
 <223> 7-脱氮-rG
 <400> 1
 uucugcuucu g 11
 <210> 2
 <211> 11
 <212> RNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸
 <220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (2)..(2)
 <223> 7-脱氮-rG
 <220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (5)..(5)
 <223> 7-脱氮-rG
 <220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (11)..(11)

[0002]

<223> 7-脱氮-rG	
<400> 2	
ugcugccuuu g	11
<210> 3	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (2)..(2)	
<223> 7-脱氮-rG	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (5)..(5)	
<223> 7-脱氮-rG	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (11)..(11)	
<223> 7-脱氮-rG	
<400> 3	
ugcugccuuu g	11
<210> 4	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (1)..(1)	
<223> 7-脱氮-rG	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (8)..(8)	
<223> 7-脱氮-rG	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (11)..(11)	
<223> 7-脱氮-rG	
<400> 4	
guccuuugcu g	11
<210> 5	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 5	
ugcugcuugu g	11

[0003]

<210> 6	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 6	
ugcugccuuu g	11
<210> 7	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (1)..(1)	
<223> 7-脱氮-rG	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (7)..(7)	
<223> 7-脱氮-rG	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (11)..(11)	
<223> 7-脱氮-rG	
<400> 7	
guccuugcuu g	11
<210> 8	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (5)..(5)	
<223> 7-脱氮-rG	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (11)..(11)	
<223> 7-脱氮-rG	
<400> 8	
uucugcuucu g	11
<210> 9	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	

[0004]

<220>		
<221>	经修饰的碱基	
<222>	(1)..(1)	
<223>	7-脱氮-rG	
<220>		
<221>	经修饰的碱基	
<222>	(8)..(8)	
<223>	7-脱氮-rG	
<220>		
<221>	经修饰的碱基	
<222>	(11)..(11)	
<223>	7-脱氮-rG	
<400>	9	
	guccuuugcu g	11
<210>	10	
<211>	11	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400>	10	
	uugacguuga c	11
<210>	11	
<211>	11	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400>	11	
	gugccugaug a	11
<210>	12	
<211>	11	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400>	12	
	augcugcgeu g	11
<210>	13	
<211>	11	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220>		
<221>	经修饰的碱基	
<222>	(9)..(9)	
<223>	Ara-G	
<400>	13	

[0005]

ugcugcuugu g	11
<210> 14	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (2)..(2)	
<223> Ara-G	
<400> 14	
ugcugcuugu g	11
<210> 15	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (2)..(2)	
<223> Ara-G	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (5)..(5)	
<223> Ara-G	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (9)..(9)	
<223> Ara-G	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (11)..(11)	
<223> Ara-G	
<400> 15	
ugcugcuugu g	11
<210> 16	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (2)..(2)	
<223> Ara-G	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (5)..(5)	
<223> Ara-G	

[0006]

<220>		
<221>	经修饰的碱基	
<222>	(9)..(9)	
<223>	Ara-G	
<220>		
<221>	经修饰的碱基	
<222>	(11)..(11)	
<223>	Ara-G	
<400>	16	
	ugcugcuugu g	11
<210>	17	
<211>	11	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220>		
<221>	经修饰的碱基	
<222>	(2)..(2)	
<223>	Ara-G	
<220>		
<221>	经修饰的碱基	
<222>	(5)..(5)	
<223>	Ara-G	
<220>		
<221>	经修饰的碱基	
<222>	(9)..(9)	
<223>	Ara-G	
<220>		
<221>	经修饰的碱基	
<222>	(11)..(11)	
<223>	Ara-G	
<400>	17	
	ugcugcuugu g	11
<210>	18	
<211>	11	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220>		
<221>	经修饰的碱基	
<222>	(2)..(2)	
<223>	Ara-G	
<220>		
<221>	经修饰的碱基	
<222>	(5)..(5)	
<223>	Ara-G	
<220>		
<221>	经修饰的碱基	
<222>	(11)..(11)	
<223>	Ara-G	

[0007]

<400> 18 ugcugccuuu g	11
<210> 19 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220> <221> 经修饰的碱基 <222> (2)..(2) <223> Ara-G	
<220> <221> 经修饰的碱基 <222> (5)..(5) <223> Ara-G	
<220> <221> 经修饰的碱基 <222> (11)..(11) <223> Ara-G	
<400> 19 ugcugccuuu g	11
<210> 20 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220> <221> 经修饰的碱基 <222> (2)..(2) <223> Ara-G	
<220> <221> 经修饰的碱基 <222> (5)..(5) <223> Ara-G	
<220> <221> 经修饰的碱基 <222> (11)..(11) <223> Ara-G	
<400> 20 ugcugccuuu g	11
<210> 21 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220> <221> 经修饰的碱基 <222> (3)..(3)	

[0008]

<223> Ara-C	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (6)..(6)	
<223> Ara-C	
<400> 21	
ugcugcuugu g	11
<210> 22	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (3)..(3)	
<223> Ara-C	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (6)..(6)	
<223> Ara-C	
<400> 22	
ugcugcuugu g	11
<210> 23	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (3)..(3)	
<223> Ara-C	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (6)..(6)	
<223> Ara-C	
<400> 23	
ugcugcuugu g	11
<210> 24	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (3)..(3)	
<223> Ara-C	
<220>	

[0009]

<221> 经修饰的碱基	
<222> (6)..(6)	
<223> Ara-C	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (9)..(9)	
<223> Ara-C	
<400> 24	
ugcugcuucu g	11
<210> 25	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (3)..(3)	
<223> Ara-C	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (6)..(7)	
<223> Ara-C	
<400> 25	
ugcugccuuu g	11
<210> 26	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (3)..(3)	
<223> Ara-C	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (6)..(7)	
<223> Ara-C	
<400> 26	
ugcugccuuu g	11
<210> 27	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (3)..(3)	
<223> Ara-C	

[0010]

<220> <221> 经修饰的碱基 <222> (6)..(7) <223> Ara-C	
<400> 27 ugcugccuuu g	11
<210> 28 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220> <221> 经修饰的碱基 <222> (7)..(8) <223> Ara-U	
<220> <221> 经修饰的碱基 <222> (10)..(10) <223> Ara-U	
<400> 28 ugcugcuucu g	11
<210> 29 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220> <221> 经修饰的碱基 <222> (7)..(8) <223> Ara-U	
<220> <221> 经修饰的碱基 <222> (10)..(10) <223> Ara-U	
<400> 29 ugcugcuucu g	11
<210> 30 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220> <221> 经修饰的碱基 <222> (10)..(10) <223> Ara-A	
<400> 30 uguuguguga c	11

[0011]

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

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸

<220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (2)..(2)
 <223> Ara-G

<220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (5)..(5)
 <223> Ara-G

<220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (9)..(9)
 <223> Ara-G

<220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (11)..(11)
 <223> Ara-G

<400> 31
 ugcugcuugu g

11

<210> 32
 <211> 11
 <212> RNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸

<220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (3)..(3)
 <223> Ara-C

<220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (6)..(6)
 <223> Ara-C

<400> 32
 ugcugcuugu g

11

<210> 33
 <211> 11
 <212> RNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸

<220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (3)..(3)
 <223> Ara-C

[0012]

<220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (6).. (7)
 <223> Ara-C

 <400> 33
 ugcugccuuu g 11

 <210> 34
 <211> 11
 <212> RNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸

 <400> 34
 gauugugacg u 11

 <210> 35
 <211> 11
 <212> RNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸

 <400> 35
 cugaagcuug u 11

 <210> 36
 <211> 11
 <212> RNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸

 <220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (2).. (2)
 <223> Ara-G

 <220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (5).. (5)
 <223> Ara-G

 <220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (9).. (9)
 <223> Ara-G

 <220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (11).. (11)
 <223> Ara-G

 <400> 36
 ugcugcuugu g 11

 <210> 37
 <211> 11
 <212> RNA
 <213> 人工序列

 <220>

[0013]

<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 37	
ugcugcuugu g	11
<210> 38	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (2)..(2)	
<223> 7-脱氮-rG	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (5)..(5)	
<223> 7-脱氮-rG	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (11)..(11)	
<223> 7-脱氮-rG	
<400> 38	
ugcugcuucu g	11
<210> 39	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (2)..(2)	
<223> 7-脱氮-ara-G	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (5)..(5)	
<223> 7-脱氮-ara-G	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (11)..(11)	
<223> 7-脱氮-ara-G	
<400> 39	
ugcugcuucu g	11
<210> 40	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220>	

[0014]

<221> 经修饰的碱基	
<222> (2)..(2)	
<223> 7-脱氮-ara-G	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (5)..(5)	
<223> 7-脱氮-ara-G	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (11)..(11)	
<223> 7-脱氮-ara-G	
<400> 40	
ugcugccuuu g	11
<210> 41	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 41	
ugacgaugag u	11
<210> 42	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (7)..(8)	
<223> Ara-U	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (10)..(10)	
<223> Ara-U	
<400> 42	
ugcugcuucu g	11
<210> 43	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (3)..(3)	
<223> Ara-C	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (6)..(7)	
<223> Ara-C	

[0015]

<400> 43 ugcugccuuu g	11
<210> 44 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220> <221> 经修饰的碱基 <222> (2)..(2) <223> 7-脱氮-rG	
<220> <221> 经修饰的碱基 <222> (5)..(5) <223> 7-脱氮-rG	
<220> <221> 经修饰的碱基 <222> (11)..(11) <223> 7-脱氮-rG	
<400> 44 ugcugcuucu g	11
<210> 45 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 45 ugacgacguu u	11
<210> 46 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 46 ugacgacugc u	11
<210> 47 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 47 ugacgacuug c	11
<210> 48 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	

[0016]

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸

 <400> 48
 ugcgcgaacu u 11

 <210> 49
 <211> 11
 <212> RNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸

 <220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (2)..(2)
 <223> 7-脱氮-rG

 <220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (4)..(4)
 <223> 7-脱氮-rG

 <220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (11)..(11)
 <223> 7-脱氮-rG

 <400> 49
 aguguuuucu g 11

 <210> 50
 <211> 11
 <212> RNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸

 <220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (2)..(2)
 <223> 7-脱氮-rG

 <220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (5)..(5)
 <223> 7-脱氮-rG

 <220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (11)..(11)
 <223> 7-脱氮-rG

 <400> 50
 ugcugcuuuu g 11

 <210> 51
 <211> 11
 <212> RNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸

[0017]

<220>		
<221>	经修饰的碱基	
<222>	(2)..(2)	
<223>	7-脱氮-rG	
<220>		
<221>	经修饰的碱基	
<222>	(5)..(5)	
<223>	7-脱氮-rG	
<220>		
<221>	经修饰的碱基	
<222>	(9)..(9)	
<223>	7-脱氮-rG	
<220>		
<221>	经修饰的碱基	
<222>	(11)..(11)	
<223>	7-脱氮-rG	
<400>	51	
	uguuguuugu g	11
<210>	52	
<211>	11	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220>		
<221>	经修饰的碱基	
<222>	(2)..(2)	
<223>	7-脱氮-rG	
<220>		
<221>	经修饰的碱基	
<222>	(5)..(5)	
<223>	7-脱氮-rG	
<220>		
<221>	经修饰的碱基	
<222>	(8)..(8)	
<223>	7-脱氮-rG	
<400>	52	
	ugaugaagcu u	11
<210>	53	
<211>	11	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400>	53	
	ugcugcuuga a	11
<210>	54	
<211>	11	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	

[0018]

<400> 54 uugacugaug a	11
<210> 55 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 55 ugcuguuuuu g	11
<210> 56 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 56 uguuguuuuu g	11
<210> 57 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 57 uguucgaaca c	11
<210> 58 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 58 uugacguuga c	11
<210> 59 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 59 uugacguuga c	11
<210> 60 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	

[0019]

<400> 60 uugacguuga c	11
<210> 61 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 61 uugacguuga c	11
<210> 62 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 62 gugccuuga a	11
<210> 63 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 63 ccgaugccga c	11
<210> 64 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 64 ccgaugcauc g	11
<210> 65 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 65 gugccuuga a	11
<210> 66 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	

[0020]

<400> 66 gugccugaug a	11
<210> 67 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 67 gugccugaug a	11
<210> 68 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 68 ccgaugccga c	11
<210> 69 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 69 ccgaugccga c	11
<210> 70 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 70 ccgaugccga c	11
<210> 71 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 71 ccgaugcauc g	11
<210> 72 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	

[0021]

<400> 72 ccgaugcauc g	11
<210> 73 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 73 ccgaugcauc g	11
<210> 74 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 74 agcacaacug u	11
<210> 75 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 75 aaaaaaaaa a	11
<210> 76 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 76 cacuguugag a	11
<210> 77 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 77 aacuguugac c	11
<210> 78 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	

[0022]

<400> 78 caacgaccug u	ii
<210> 79 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220> <221> 经修饰的碱基 <222> (5)..(5) <223> 7-脱氮-rG	
<220> <221> 经修饰的碱基 <222> (8)..(8) <223> 7-脱氮-rG	
<220> <221> 经修饰的碱基 <222> (10)..(10) <223> 7-脱氮-rG	
<400> 79 cacuguugag a	ii
<210> 80 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220> <221> 经修饰的碱基 <222> (5)..(5) <223> 7-脱氮-rG	
<220> <221> 经修饰的碱基 <222> (8)..(8) <223> 7-脱氮-rG	
<400> 80 aacuguugac c	ii
<210> 81 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220> <221> 经修饰的碱基 <222> (5)..(5) <223> 7-脱氮-rG	
<220> <221> 经修饰的碱基	

[0023]

<222> (10).. (10)	
<223> 7-脱氮-rG	
<400> 81	
caacgaccug u	11
<210> 82	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 82	
augcugcgcu g	11
<210> 83	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 83	
augcugcgcu g	11
<210> 84	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 84	
augcugcgcu g	11
<210> 85	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 85	
aacuguugac c	11
<210> 86	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 86	
cacuguugag a	11
<210> 87	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	

[0024]

<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 87 gcacacuugu u	11
<210> 88 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 88 uguuguguga c	11
<210> 89 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 89 ccgaugcauc g	11
<210> 90 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 90 aacgaaccga c	11
<210> 91 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 91 caacgaccug u	11
<210> 92 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 92 caacgaccug u	11
<210> 93 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	

[0025]

<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 93 cguugugaug a	11
<210> 94 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 94 acgauuguga c	11
<210> 95 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 95 acuuugacga u	11
<210> 96 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 96 cgaugcgaug a	11
<210> 97 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 97 acgucgacg a	11
<210> 98 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 98 aacugcugga u	11
<210> 99 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	

[0026]

<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 99 uuggacucca g	11
<210> 100 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 100 ucgacucca g	11
<210> 101 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 101 ccgacuugga c	11
<210> 102 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 102 aagacugaac u	11
<210> 103 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220> <221> 经修饰的碱基 <222> (2)..(2) <223> Ara-G	
<220> <221> 经修饰的碱基 <222> (5)..(5) <223> Ara-G	
<220> <221> 经修饰的碱基 <222> (11)..(11) <223> Ara-G	
<400> 103 ugcugccuuu g	11
<210> 104	

[0027]

<211> 11
 <212> RNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸

 <220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (2)..(2)
 <223> Ara-G

 <220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (5)..(5)
 <223> Ara-G

 <220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (11)..(11)
 <223> Ara-G

 <400> 104
 ugcugccuuu g 11

 <210> 105
 <211> 11
 <212> RNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸

 <220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (2)..(2)
 <223> Ara-G

 <220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (5)..(5)
 <223> Ara-G

 <220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (11)..(11)
 <223> Ara-G

 <400> 105
 ugcugccuuu g 11

 <210> 106
 <211> 11
 <212> RNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸

 <220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (2)..(2)
 <223> Ara-G

 <220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (5)..(5)

[0028]

<223> Ara-G	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (11).. (11)	
<223> Ara-G	
<400> 106	
ugcugccuuu g	11
<210> 107	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (2).. (2)	
<223> Ara-G	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (5).. (5)	
<223> Ara-G	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (11).. (11)	
<223> Ara-G	
<400> 107	
ugcugccuuu g	11
<210> 108	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (2).. (2)	
<223> Ara-G	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (5).. (5)	
<223> Ara-G	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (11).. (11)	
<223> Ara-G	
<400> 108	
ugcugccuuu g	11
<210> 109	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	

[0029]

<220>		
<223>	人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220>		
<221>	经修饰的碱基	
<222>	(2)..(2)	
<223>	Ara-G	
<220>		
<221>	经修饰的碱基	
<222>	(5)..(5)	
<223>	Ara-G	
<220>		
<221>	经修饰的碱基	
<222>	(11)..(11)	
<223>	Ara-G	
<400>	109	
	ugcugccuuu g	11
<210>	110	
<211>	11	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220>		
<221>	经修饰的碱基	
<222>	(2)..(2)	
<223>	Ara-G	
<220>		
<221>	经修饰的碱基	
<222>	(5)..(5)	
<223>	Ara-G	
<220>		
<221>	经修饰的碱基	
<222>	(11)..(11)	
<223>	Ara-G	
<400>	110	
	ugcugccuuu g	11
<210>	111	
<211>	11	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220>		
<221>	经修饰的碱基	
<222>	(2)..(2)	
<223>	Ara-G	
<220>		
<221>	经修饰的碱基	
<222>	(5)..(5)	
<223>	Ara-G	
<220>		
<221>	经修饰的碱基	

[0030]

<222> (11).. (11)
 <223> Ara-G

 <400> 111
 ugcugccuuu g 11

 <210> 112
 <211> 11
 <212> RNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸

 <220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (1).. (1)
 <223> 7-脱氮-rG

 <220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (7).. (7)
 <223> 7-脱氮-rG

 <220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (11).. (11)
 <223> 7-脱氮-rG

 <400> 112
 guccuugcuu g 11

 <210> 113
 <211> 11
 <212> RNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸

 <220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (5).. (5)
 <223> 7-脱氮-rG

 <220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (11).. (11)
 <223> 7-脱氮-rG

 <400> 113
 uucugcuucu g 11

 <210> 114
 <211> 11
 <212> RNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸

 <220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (2).. (2)
 <223> 7-脱氮-rG

[0031]

<220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (5)..(5)
 <223> 7-脱氮-rG

<220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (11)..(11)
 <223> 7-脱氮-rG

<400> 114
 ugcugccuuu g 11

<210> 115
 <211> 11
 <212> RNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸

<220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (2)..(2)
 <223> 7-脱氮-rG

<220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (8)..(8)
 <223> 7-脱氮-rG

<220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (11)..(11)
 <223> 7-脱氮-rG

<400> 115
 ugccuuugcu g 11

<210> 116
 <211> 11
 <212> RNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸

<220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (2)..(2)
 <223> 7-脱氮-rG

<220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (5)..(5)
 <223> 7-脱氮-rG

<220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (11)..(11)
 <223> 7-脱氮-rG

<400> 116
 ugcugcuucu g 11

<210> 117
 <211> 11

[0032]

<212> RNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸

 <220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (2)..(2)
 <223> 7-脱氮-rG

 <220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (3)..(3)
 <223> Ara-C

 <220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (5)..(5)
 <223> 7-脱氮-rG

 <220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (6)..(7)
 <223> Ara-C

 <220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (11)..(11)
 <223> 7-脱氮-rG

 <400> 117
 ugcugccuuu g

11

<210> 118
 <211> 11
 <212> RNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸

 <220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (2)..(2)
 <223> 7-脱氮-rG

 <220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (3)..(3)
 <223> Ara-C

 <220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (5)..(5)
 <223> 7-脱氮-rG

 <220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (6)..(6)
 <223> Ara-C

 <220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (9)..(9)
 <223> Ara-C

 <220>
 <221> 经修饰的碱基

[0033]

<222> (11).. (11)	
<223> 7-脱氮-rG	
<400> 118	
ugcugcuucu g	11
<210> 119	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 119	
ugcugcuucu g	11
<210> 120	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 120	
uggcuugacg c	11
<210> 121	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 121	
ugcugcuuga a	11
<210> 122	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 122	
ugacgaugag u	11
<210> 123	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 123	
ugaugaggac u	11
<210> 124	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	

[0034]

<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 124 uguugaggaa c	11
<210> 125 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 125 ugcgagacug c	11
<210> 126 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 126 guugaacgac u	11
<210> 127 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 127 ugacugauga c	11
<210> 128 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 128 uguugaacga c	11
<210> 129 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 129 ugagcgugaa c	11
<210> 130 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	

[0035]

- <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (2)..(3)
 <223> 7-脱氮-rG
- <220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (7)..(7)
 <223> 7-脱氮-rG
- <220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (10)..(10)
 <223> 7-脱氮-rG
- <400> 130
 uggcuugacg c 11
- <210> 131
 <211> 11
 <212> RNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (2)..(2)
 <223> 7-脱氮-rG
- <220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (5)..(5)
 <223> 7-脱氮-rG
- <220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (8)..(8)
 <223> 7-脱氮-rG
- <220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (10)..(10)
 <223> 7-脱氮-rG
- <400> 131
 ugacgaugag u 11
- <210> 132
 <211> 11
 <212> RNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸
- <220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (2)..(2)
 <223> 7-脱氮-rG
- <220>
 <221> 经修饰的碱基

[0036]

<222> (5)..(5)	
<223> 7-脱氮-rG	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (7)..(8)	
<223> 7-脱氮-rG	
<400> 132	
uguugaggaa c	11
<210> 133	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (2)..(2)	
<223> 7-脱氮-rG	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (5)..(5)	
<223> 7-脱氮-rG	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (9)..(9)	
<223> 7-脱氮-rG	
<400> 133	
uguugaacga c	11
<210> 134	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 134	
ugcgagacug c	11
<210> 135	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 135	
ugagcgugaa c	11
<210> 136	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	

[0037]

<400> 136 uugagcugga c	11
<210> 137 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 137 guugaggaac u	11
<210> 138 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 138 ugaugaagcu u	11
<210> 139 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 139 uugacgauga g	11
<210> 140 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 140 uuguugaacg a	11
<210> 141 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 141 ugaacgacu u	11
<210> 142 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	

[0038]

<400> 142 ugauggaacg a	11
<210> 143 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220> <221> 经修饰的碱基 <222> (2)..(2) <223> 7-脱氮-rG	
<220> <221> 经修饰的碱基 <222> (5)..(5) <223> 7-脱氮-rG	
<220> <221> 经修饰的碱基 <222> (11)..(11) <223> 7-脱氮-rG	
<400> 143 ugcugccuuu g	11
<210> 144 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220> <221> 经修饰的碱基 <222> (2)..(2) <223> 7-脱氮-rG	
<220> <221> 经修饰的碱基 <222> (5)..(5) <223> 7-脱氮-rG	
<220> <221> 经修饰的碱基 <222> (11)..(11) <223> 7-脱氮-rG	
<400> 144 ugcugccuuu g	11
<210> 145 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220> <221> 经修饰的碱基 <222> (2)..(2)	

[0039]

<223> 7-脱氮-rG	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (5)..(5)	
<223> 7-脱氮-rG	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (11)..(11)	
<223> 7-脱氮-rG	
<400> 145	
ugcugccuuu g	11
<210> 146	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (2)..(2)	
<223> 7-脱氮-rG	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (5)..(5)	
<223> 7-脱氮-rG	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (11)..(11)	
<223> 7-脱氮-rG	
<400> 146	
ugcugccuuu g	11
<210> 147	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (2)..(2)	
<223> 7-脱氮-rG	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (5)..(5)	
<223> 7-脱氮-rG	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (11)..(11)	
<223> 7-脱氮-rG	
<400> 147	
ugcugccuuu g	11

[0040]

<210> 148	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 148	
ugcugcuugu g	11
<210> 149	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 149	
ugcugcuugu g	11
<210> 150	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 150	
ugcugcuugu g	11
<210> 151	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 151	
caacgaacc u	11
<210> 152	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 152	
ugcugcugu g	11
<210> 153	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 153	
ugaagcuuga a	11

[0041]

<210> 154	
<211> II	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 154	
ugaacgugaa c	11
<210> 155	
<211> II	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (3)..(3)	
<223> 5-methyl-C	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (6)..(6)	
<223> 5-methyl-C	
<400> 155	
ugcugcuugu g	11
<210> 156	
<211> II	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (2)..(2)	
<223> 7-脱氮-rG	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (3)..(3)	
<223> 5-methyl-C	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (5)..(5)	
<223> 7-脱氮-rG	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (6)..(6)	
<223> 5-methyl-C	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (9)..(9)	
<223> 5-methyl-C	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (11)..(11)	

[0042]

<223> 7-脱氮-rG	
<400> 156	
ugcugcuucu g	11
<210> 157	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (2)..(2)	
<223> 7-脱氮-rG	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (5)..(5)	
<223> 7-脱氮-rG	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (8)..(8)	
<223> 7-脱氮-rG	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (10)..(10)	
<223> 7-脱氮-rG	
<400> 157	
ugacgagag u	11
<210> 158	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (1)..(1)	
<223> 7-脱氮-rG	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (7)..(7)	
<223> 7-脱氮-rG	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (11)..(11)	
<223> 7-脱氮-rG	
<400> 158	
guccuugcuu g	11
<210> 159	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	

[0043]

<220>		
<223>	人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220>		
<221>	经修饰的碱基	
<222>	(5)..(5)	
<223>	7-脱氮-rG	
<220>		
<221>	经修饰的碱基	
<222>	(11)..(11)	
<223>	7-脱氮-rG	
<400>	159	
	uucugcuucu g	11
<210>	160	
<211>	11	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220>		
<221>	经修饰的碱基	
<222>	(2)..(2)	
<223>	7-脱氮-rG	
<220>		
<221>	经修饰的碱基	
<222>	(8)..(8)	
<223>	7-脱氮-rG	
<220>		
<221>	经修饰的碱基	
<222>	(11)..(11)	
<223>	7-脱氮-rG	
<400>	160	
	ugccuuugeu g	11
<210>	161	
<211>	11	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220>		
<221>	经修饰的碱基	
<222>	(2)..(2)	
<223>	7-脱氮-rG	
<220>		
<221>	经修饰的碱基	
<222>	(5)..(5)	
<223>	7-脱氮-rG	
<220>		
<221>	经修饰的碱基	
<222>	(11)..(11)	
<223>	7-脱氮-rG	
<400>	161	
	ugcugcuucu g	11

[0044]

<210> 162
 <211> 11
 <212> RNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸

<220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (5)..(5)
 <223> 7-脱氮-rG

<220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (11)..(11)
 <223> 7-脱氮-rG

<400> 162
 uucugcuucu g

11

<210> 163
 <211> 11
 <212> RNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸

<220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (2)..(2)
 <223> 7-脱氮-rG

<220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (8)..(8)
 <223> 7-脱氮-rG

<220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (11)..(11)
 <223> 7-脱氮-rG

<400> 163
 ugccuuugcu g

11

<210> 164
 <211> 11
 <212> RNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸

<220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (2)..(2)
 <223> 7-脱氮-rG

<220>
 <221> 经修饰的碱基
 <222> (5)..(5)
 <223> 7-脱氮-rG

[0045]

<220>		
<221>	经修饰的碱基	
<222>	(9)..(9)	
<223>	Ara-C	
<220>		
<221>	经修饰的碱基	
<222>	(11)..(11)	
<223>	7-脱氮-rG	
<400>	164	
	ugcugcuucu g	11
<210>	165	
<211>	11	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220>		
<221>	经修饰的碱基	
<222>	(2)..(2)	
<223>	7-脱氮-rG	
<220>		
<221>	经修饰的碱基	
<222>	(5)..(5)	
<223>	7-脱氮-rG	
<220>		
<221>	经修饰的碱基	
<222>	(9)..(9)	
<223>	Ara-C	
<220>		
<221>	经修饰的碱基	
<222>	(11)..(11)	
<223>	7-脱氮-rG	
<400>	165	
	ugcugcuucu g	11
<210>	166	
<211>	11	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220>		
<221>	经修饰的碱基	
<222>	(1)..(1)	
<223>	2'-F-C	
<220>		
<221>	经修饰的碱基	
<222>	(7)..(7)	
<223>	2'-F-C	
<400>	166	
	cugaagcuug u	11
<210>	167	
<211>	11	

[0046]

<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (2)..(2)	
<223> 2'-F-U	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (8)..(9)	
<223> 2'-F-U	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (11)..(11)	
<223> 2'-F-U	
<400> 167	
cugaagcuug u	11
<210> 168	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (5)..(5)	
<223> Ara-G	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (8)..(8)	
<223> Ara-G	
<400> 168	
aacuguugac c	11
<210> 169	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (2)..(3)	
<223> Ara-G	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (7)..(7)	
<223> Ara-G	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (10)..(10)	
<223> Ara-G	

[0047]

<400> 169 uggcuugacg c	11
<210> 170 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 170 ugacgcugac u	11
<210> 171 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 171 ugacugcgac u	11
<210> 172 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 172 ugcgaacgcu u	11
<210> 173 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 173 ugcgacugac u	11
<210> 174 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 174 ugcgcuaac u	11
<210> 175 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	

[0048]

<400> 175 ugcugacgac u	11
<210> 176 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 176 ugcuugaacg c	11
<210> 177 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 177 uugcugaacg c	11
<210> 178 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220> <221> 经修饰的碱基 <222> (2)..(2) <223> 7-脱氮-rG	
<220> <221> 经修饰的碱基 <222> (5)..(5) <223> 7-脱氮-rG	
<220> <221> 经修饰的碱基 <222> (11)..(11) <223> 7-脱氮-rG	
<400> 178 ugcugccuuu g	11
<210> 179 <211> 11 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 179 uguuguguga c	11
<210> 180 <211> 11 <212> RNA	

[0049]

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 180	
ugcugccuuu g	11
<210> 181	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 181	
ugcugcugcu g	11
<210> 182	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 182	
uguuguguga c	11
<210> 183	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 183	
uugaacgacu u	11
<210> 184	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 184	
uguuguguga c	11
<210> 185	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 185	
ugcugccuuu g	11
<210> 186	
<211> 11	
<212> RNA	

[0050]

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 186	
ugcugcugcu g	11
<210> 187	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (1)..(1)	
<223> Ara-U	
<400> 187	
ugcugcuugu g	11
<210> 188	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (1)..(1)	
<223> Ara-U	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (4)..(4)	
<223> Ara-U	
<400> 188	
ugcugcuugu g	11
<210> 189	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (1)..(1)	
<223> Ara-U	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (4)..(4)	
<223> Ara-U	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (7)..(8)	

[0051]

<223> Ara-U	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (10)..(10)	
<223> Ara-U	
<400> 189	
ugcugcuugu g	11
<210> 190	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 190	
uugacuguug a	11
<210> 191	
<211> 11	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 191	
ucagucgcag u	11
<210> 192	
<211> 10	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (2)..(2)	
<223> 7-脱氮-rG	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (5)..(5)	
<223> 7-脱氮-rG	
<220>	
<221> 经修饰的碱基	
<222> (10)..(10)	
<223> 7-脱氮-rG	
<400> 192	
ugcugccuug	10

SIMRA 化合物的平行合成

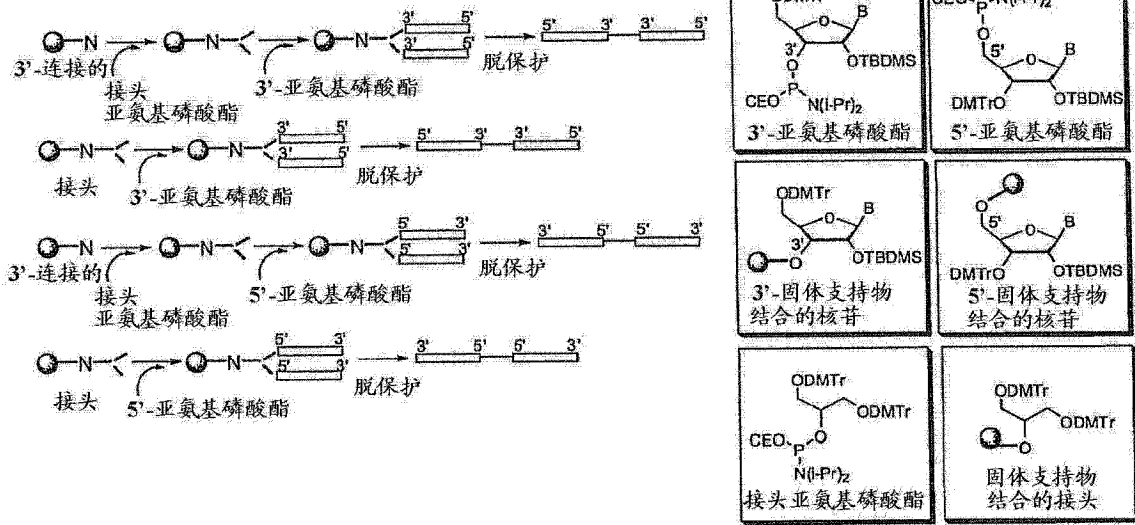


图 1

表达 hTLR8 的 HEK293 细胞的活化

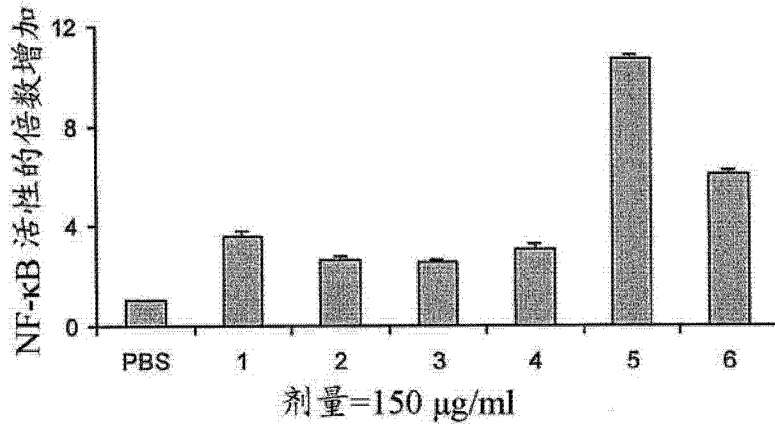


图 2A

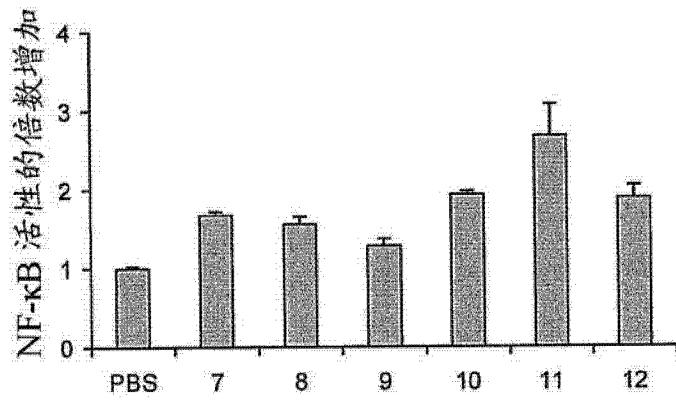


图 2B

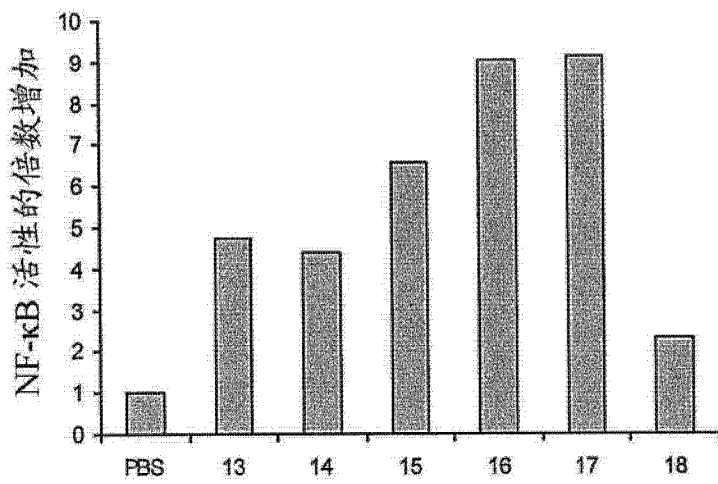


图 2C

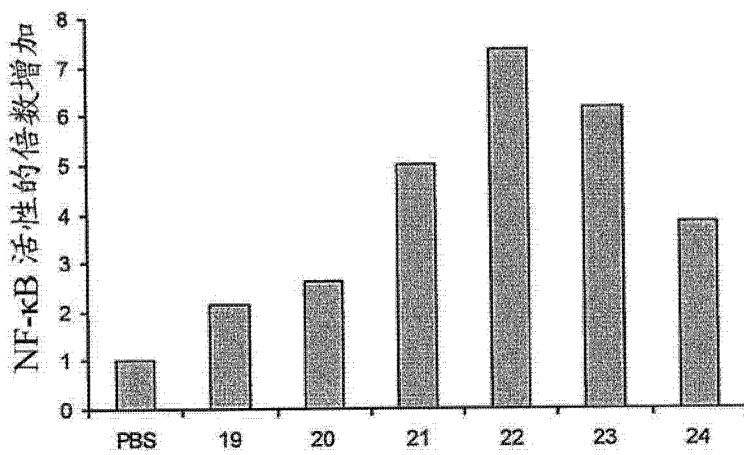


图 2D

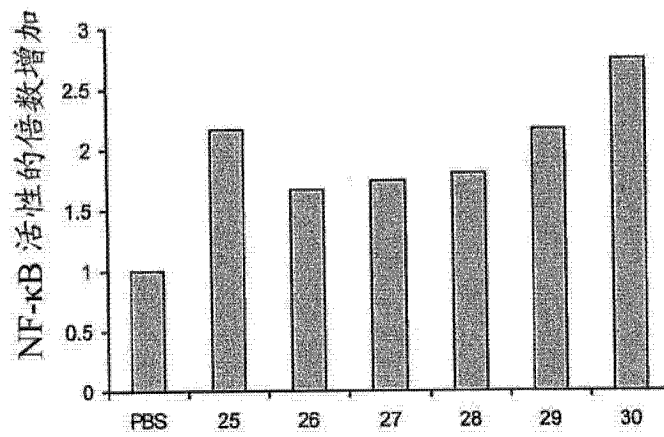


图 2E

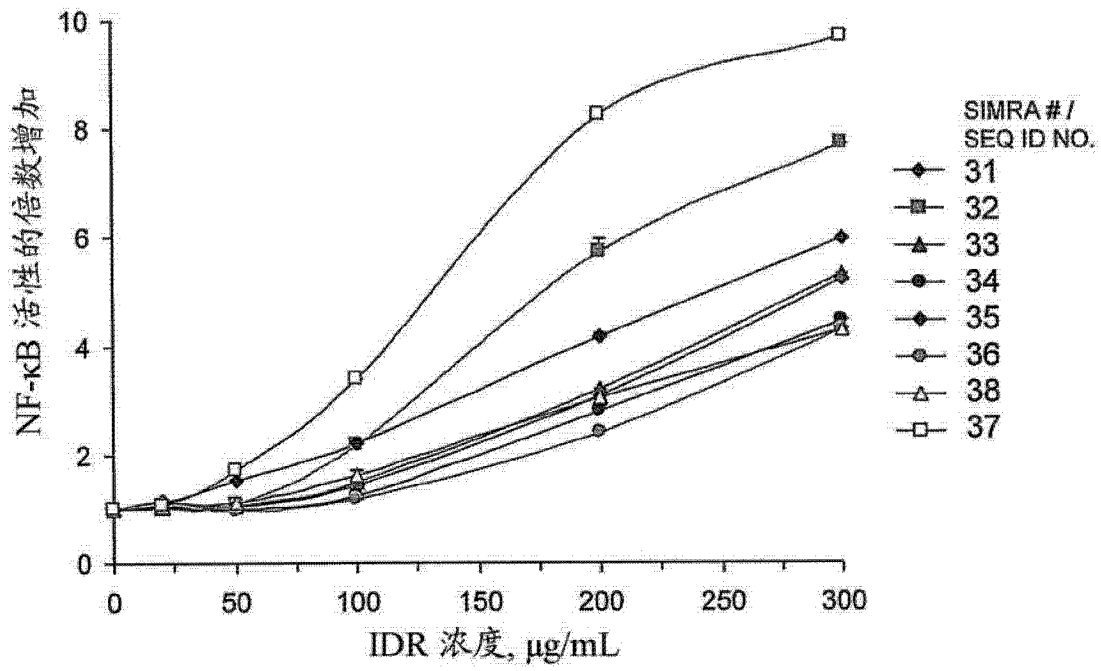


图 2F

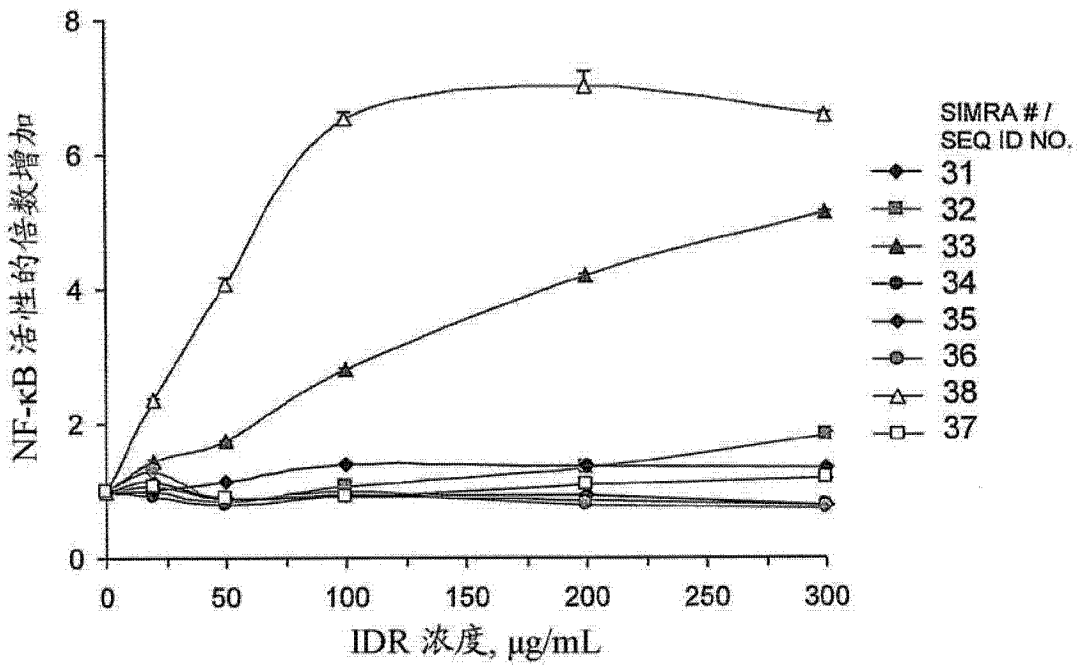


图 2G

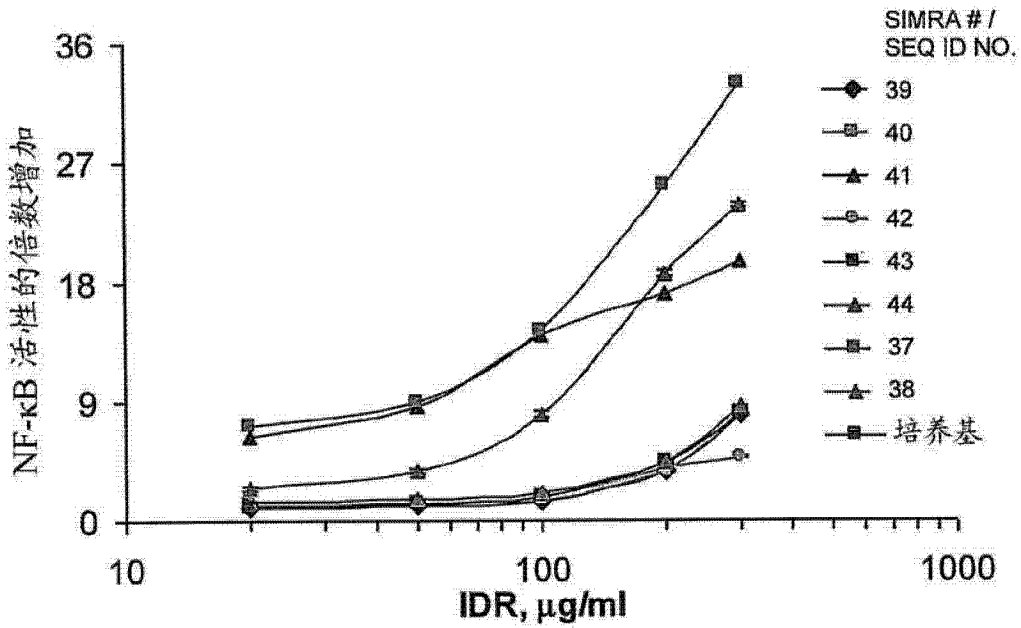


图 2H

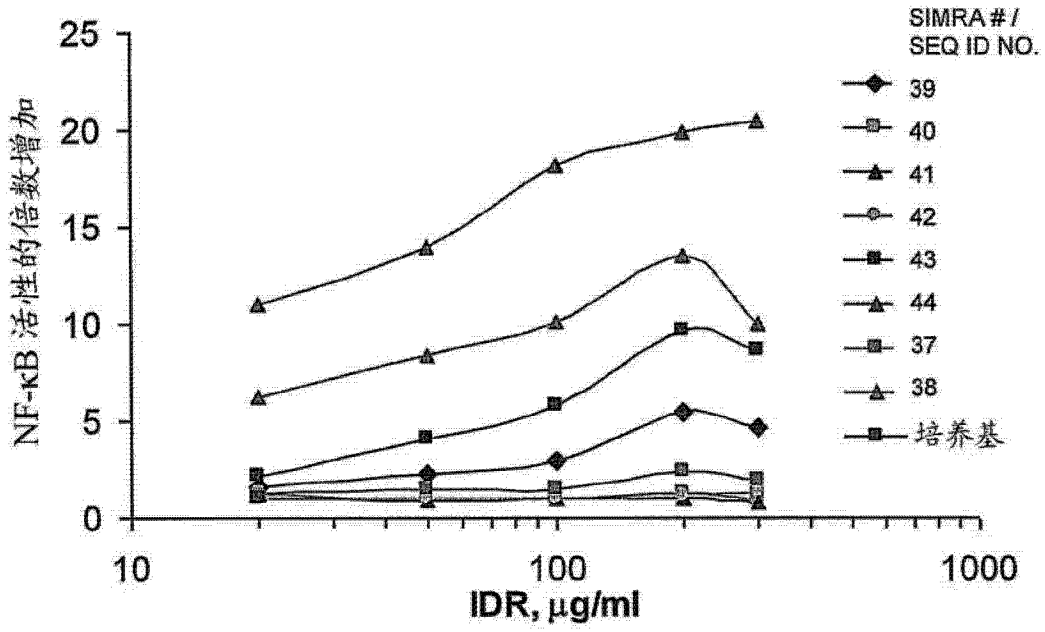


图 2I

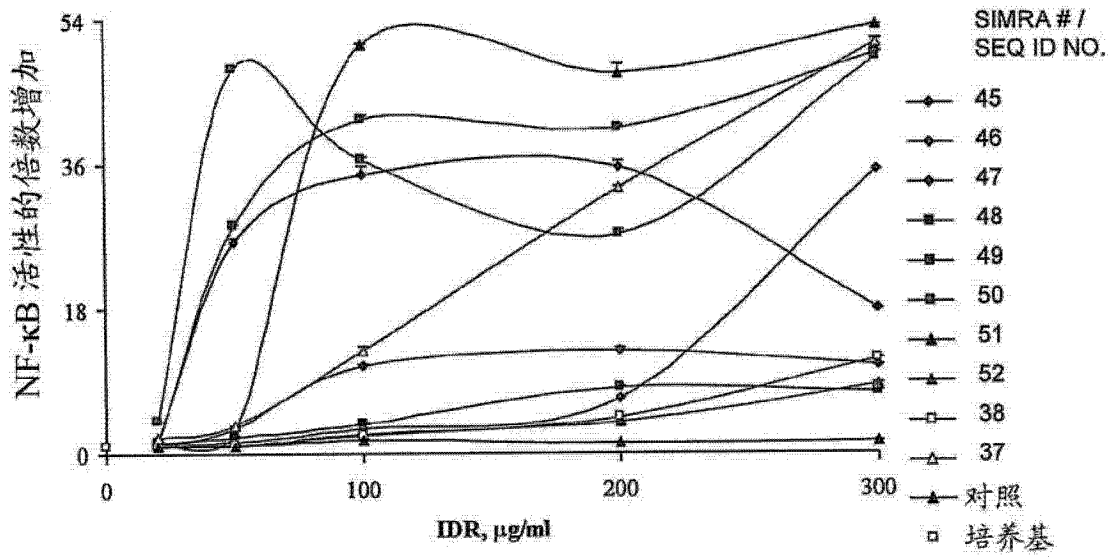


图 2J

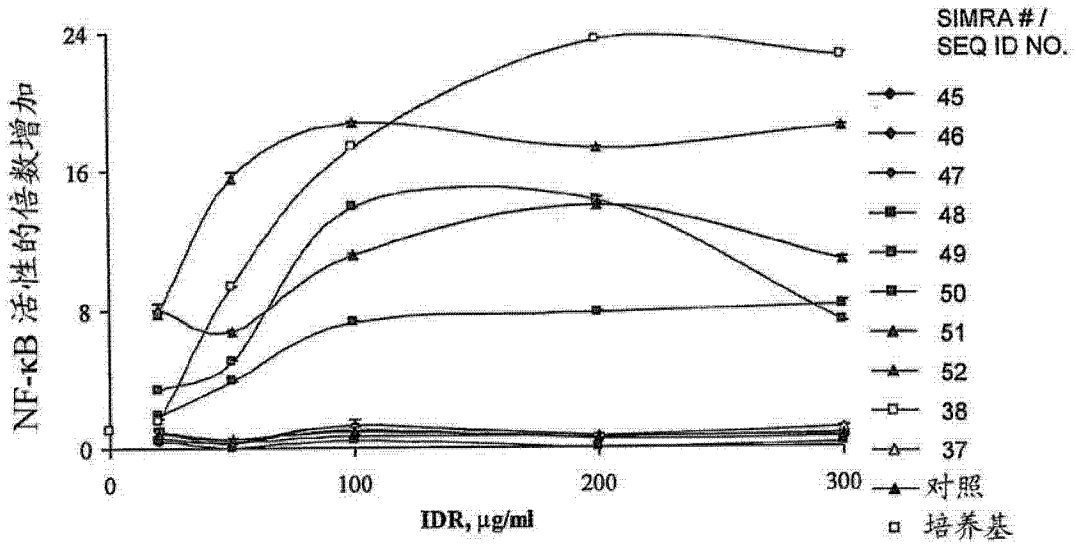


图 2K

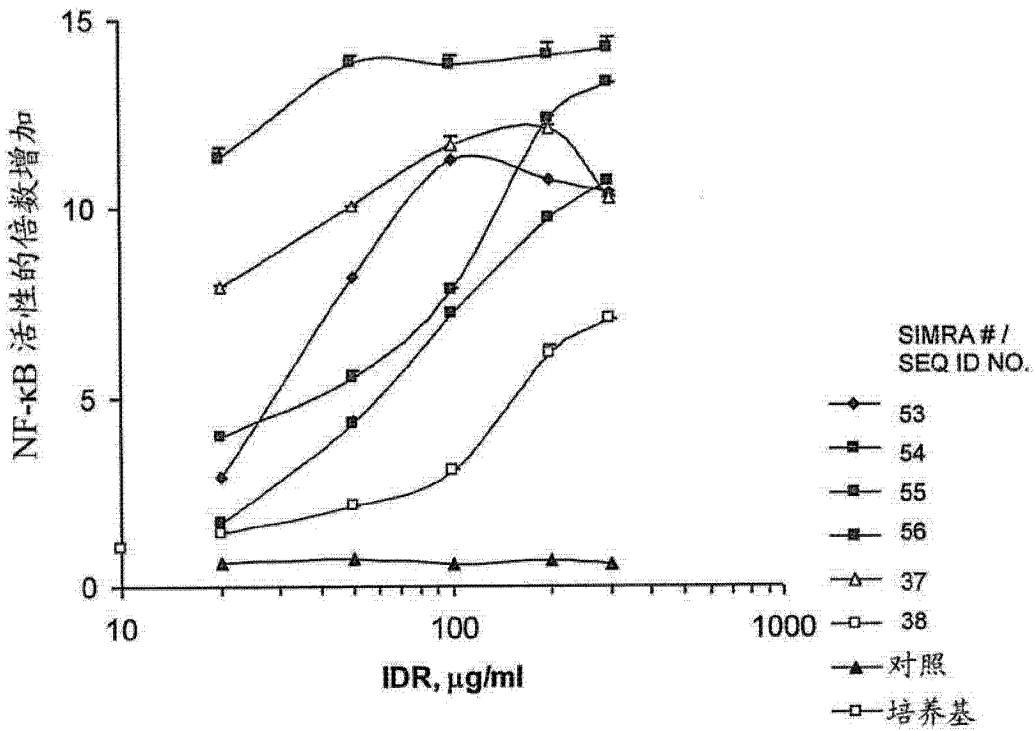


图 2L

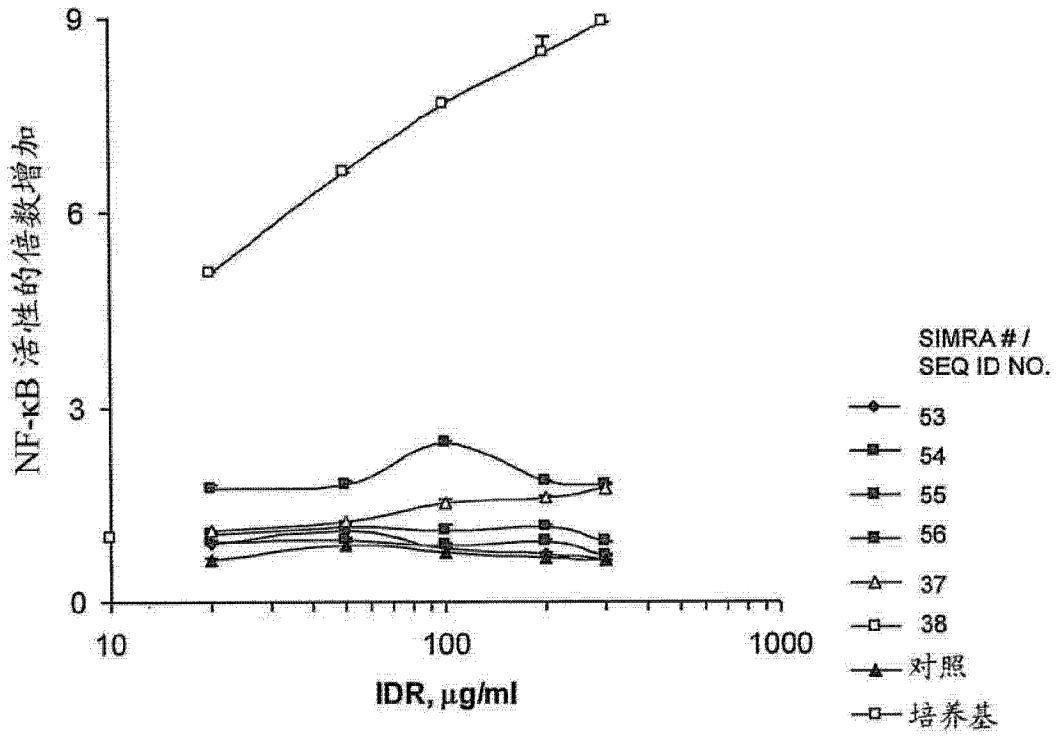


图 2M

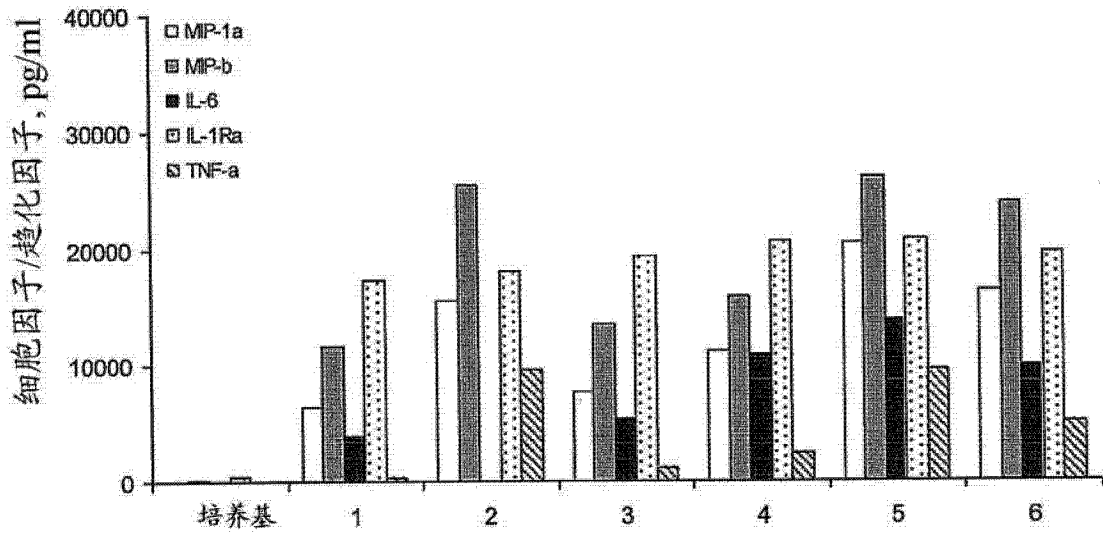


图 3A

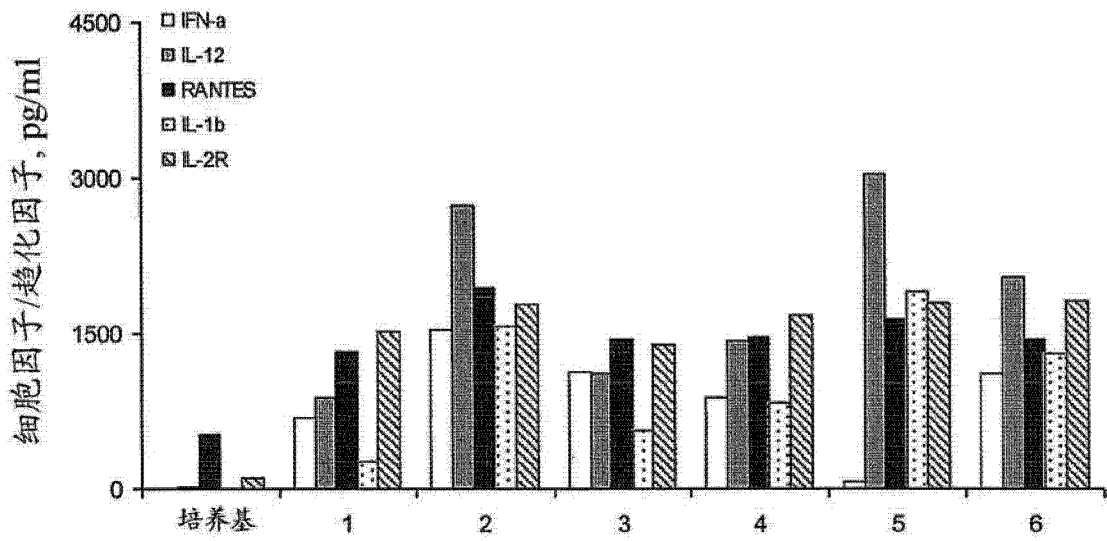


图 3B

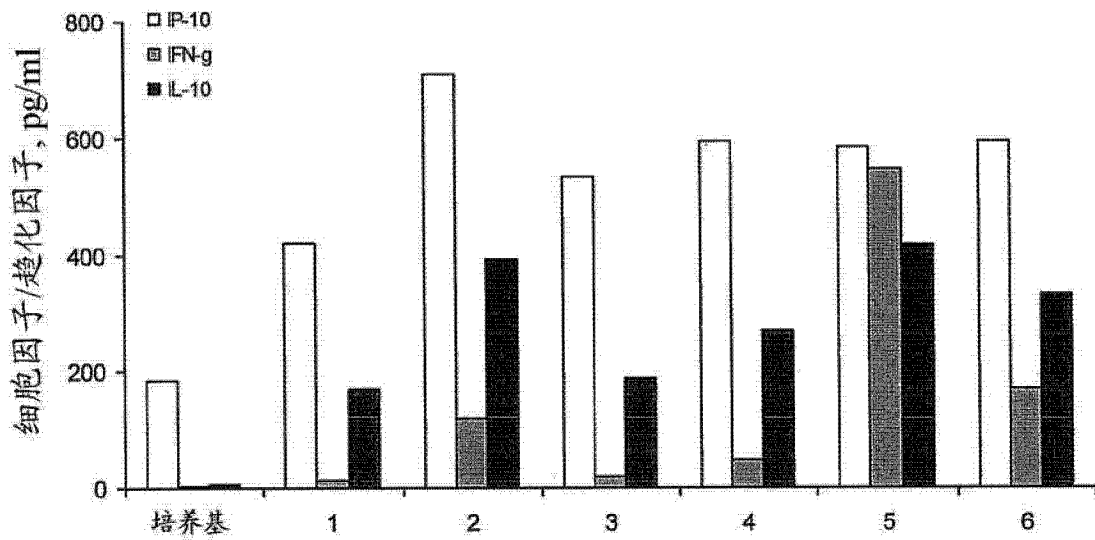


图 3C

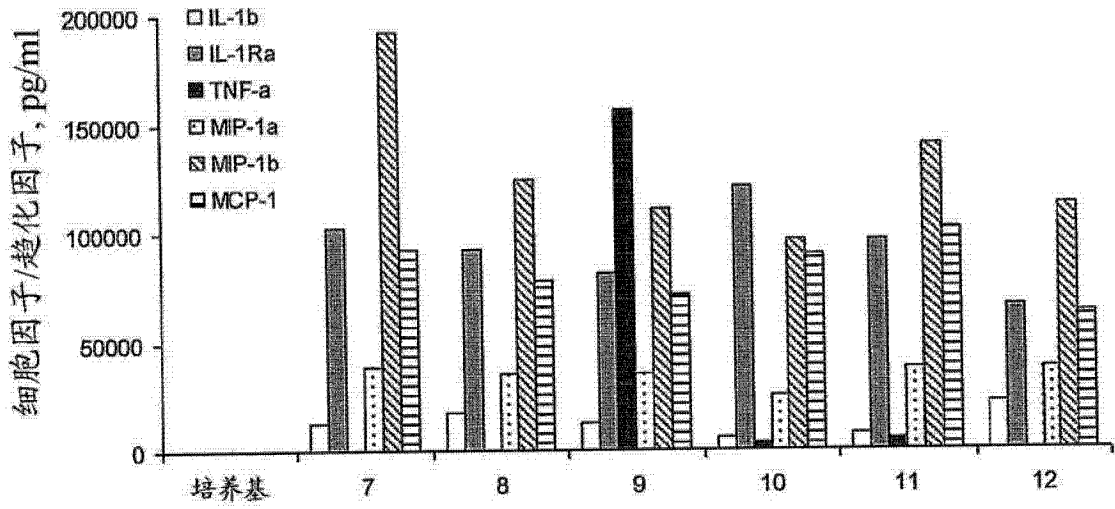


图 4A

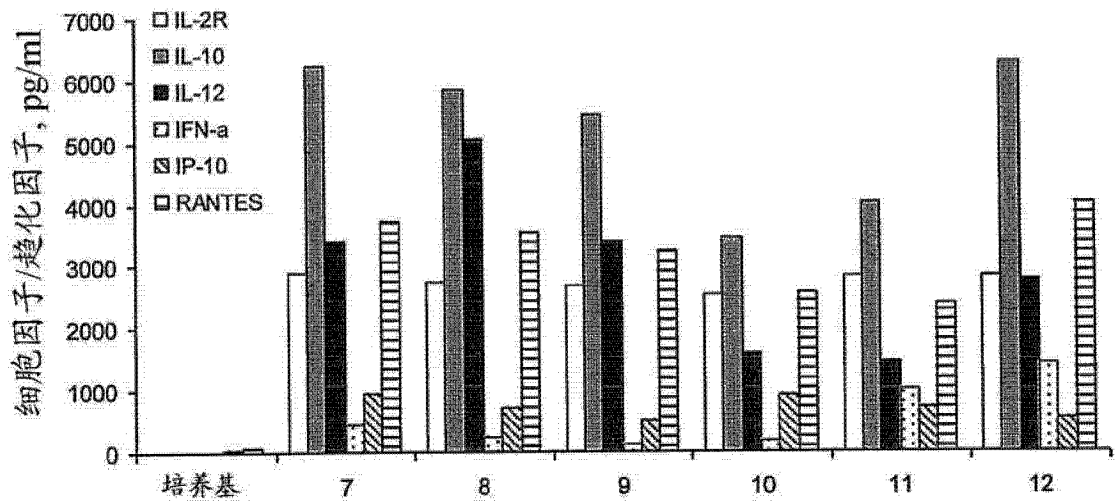


图 4B

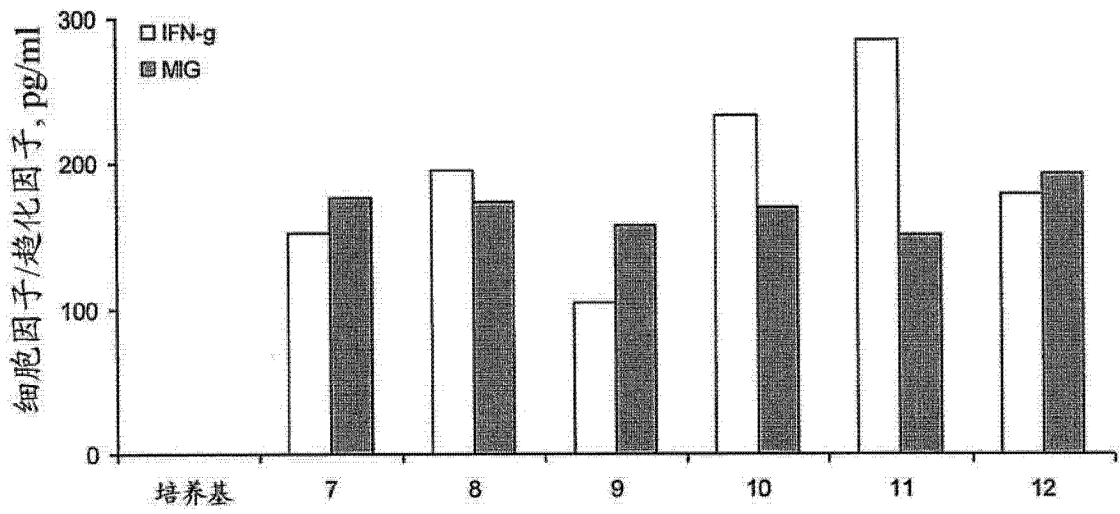


图 4C

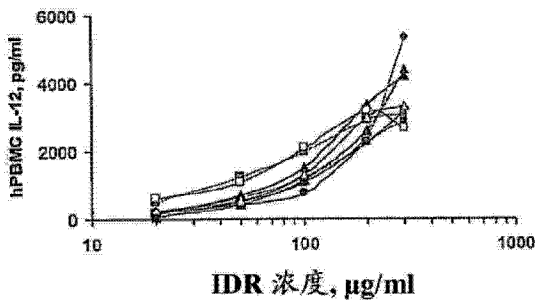


图 4D

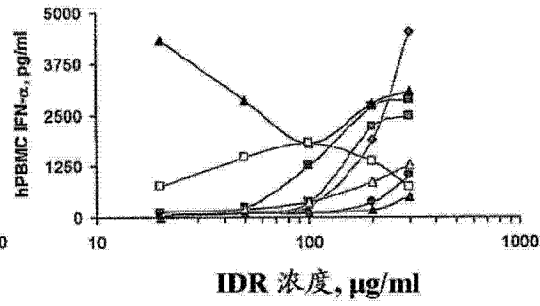


图 4E

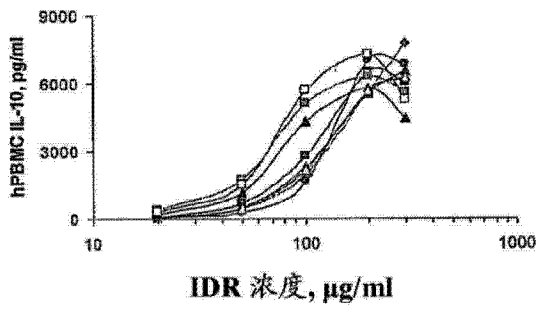


图 4F

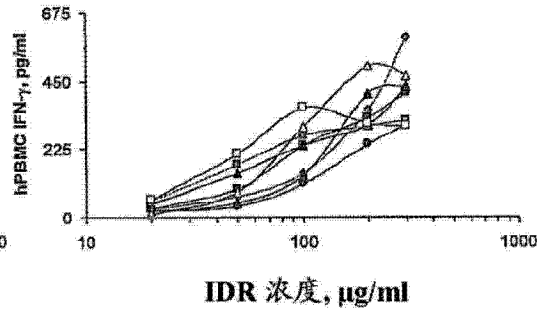


图 4G

- SIMRA # / SEQ ID NO.
- ◆ 31
 - 32
 - ▲ 33
 - 34
 - ▣ 35
 - ▲ 36
 - △ 37
 - 38
 - 培养基

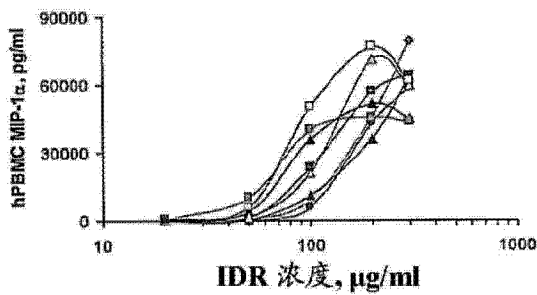


图 4H

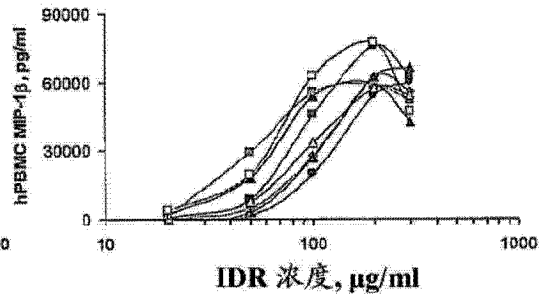


图 4I

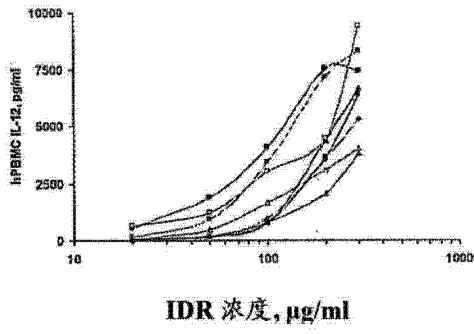


图 4J

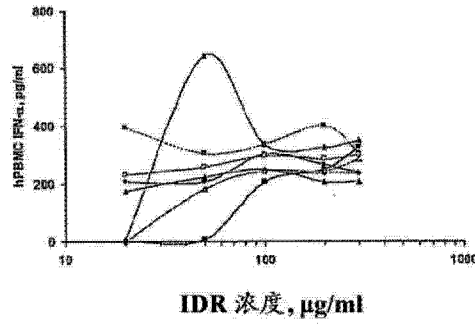


图 4K

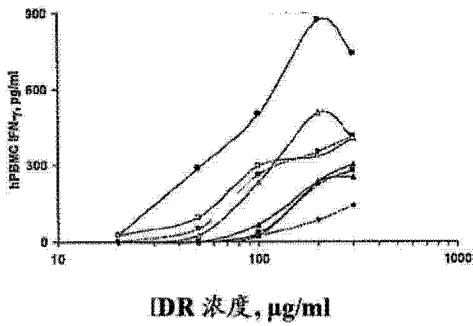


图 4L

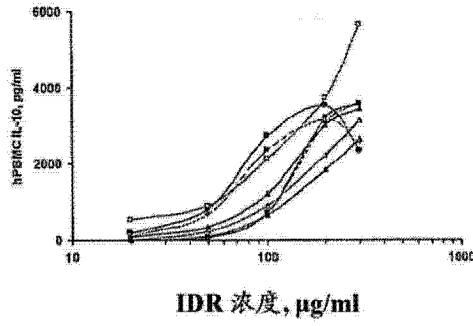


图 4M

- SIMRA # / SEQ ID NO.
- ◆ 39
 - 40
 - ▲ 41
 - 42
 - 43
 - ★ 44
 - △ 37
 - 38
 - 培养基

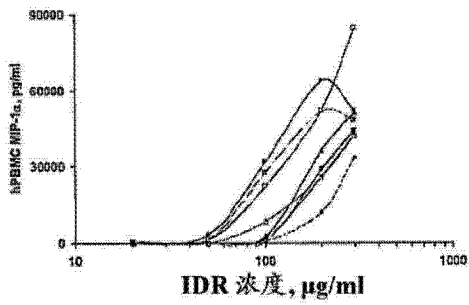


图 4N

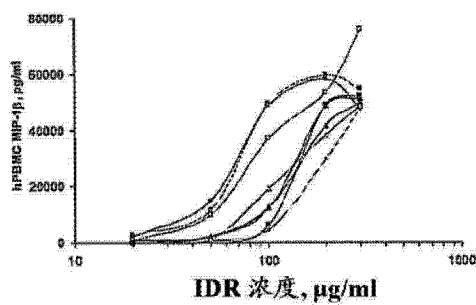


图 4O

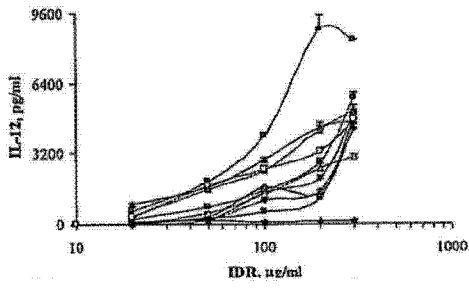


图 4P

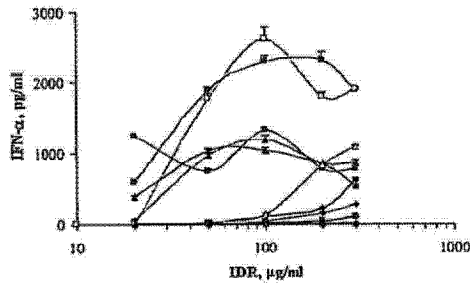


图 4Q

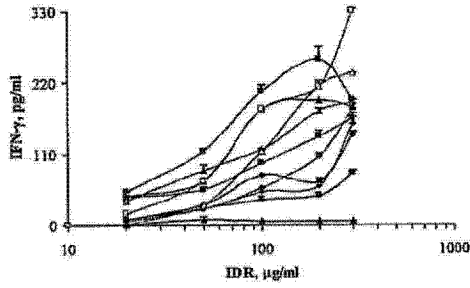


图 4R

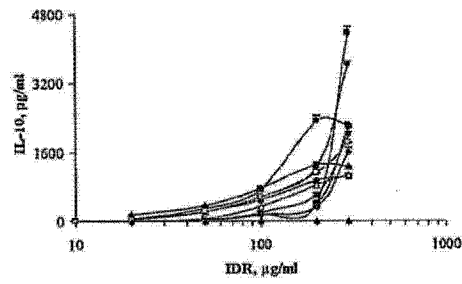


图 4S

- SIMRA # /
SEQ ID NO.
- ◆ 45
 - ◇ 46
 - ◇ 47
 - 48
 - 49
 - 50
 - ▲ 51
 - ▲ 52
 - △ 37
 - 38
 - ▲ 对照
 - 培养基

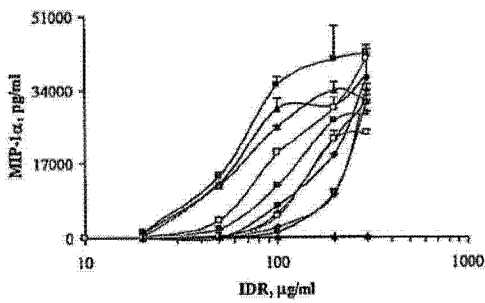


图 4T

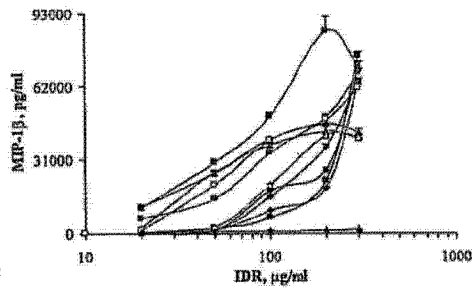


图 4U

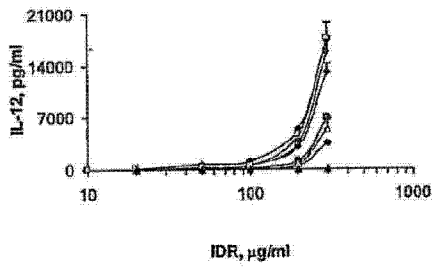


图 4V

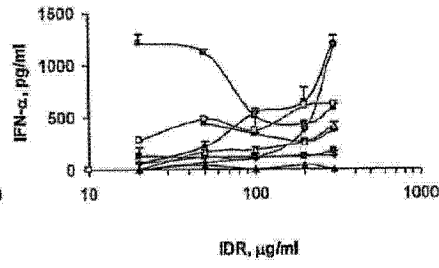


图 4W

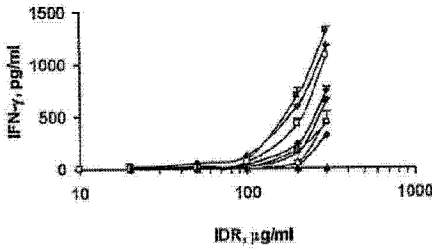


图 4X

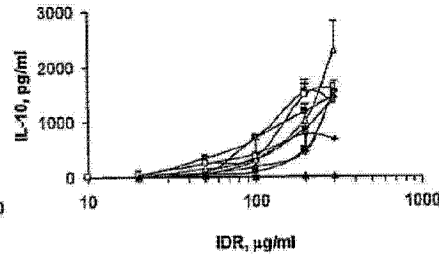


图 4Y

- SIMRA # /
SEQ ID NO.
- ◆ 53
 - 54
 - 55
 - ▣ 56
 - △ 37
 - 38
 - ▲ 对照
 - 培养基

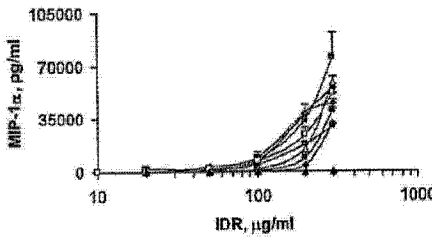


图 4Z

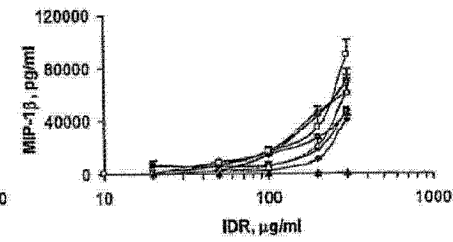


图 4AA

人pDC培养物中由TLR7/8激动剂诱导的细胞因子/趋化因子

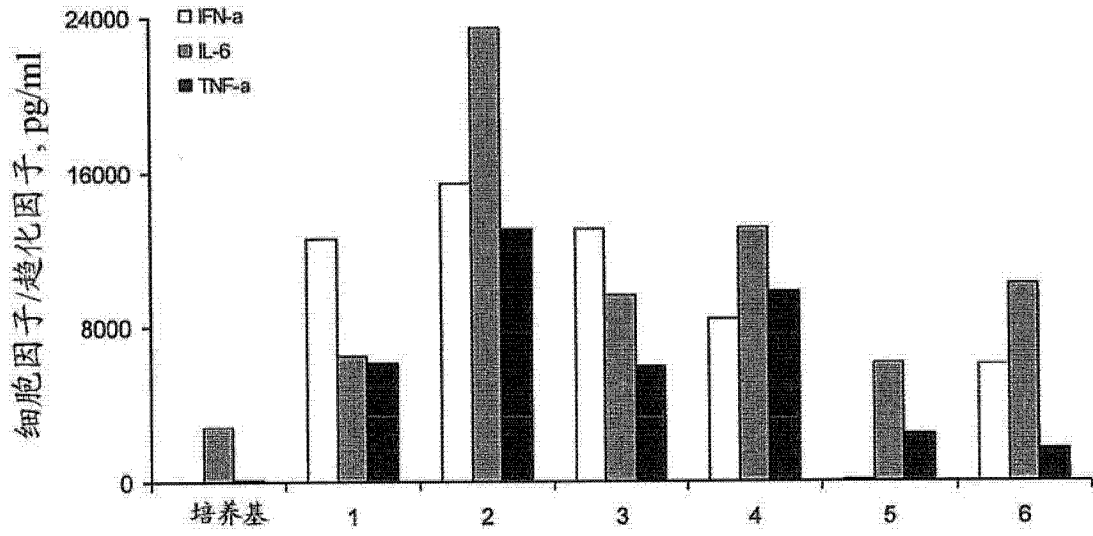


图 5A

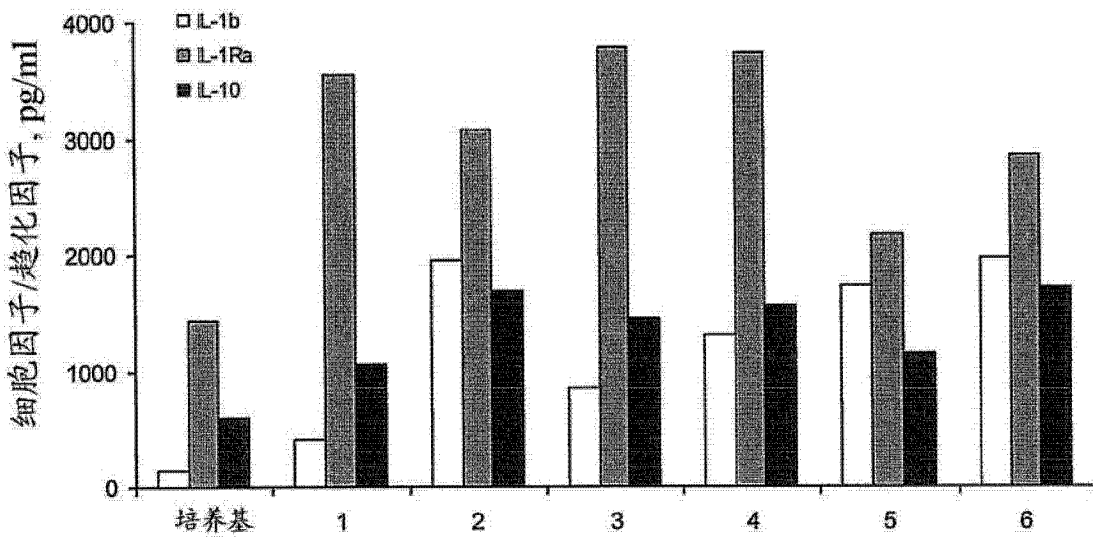


图 5B

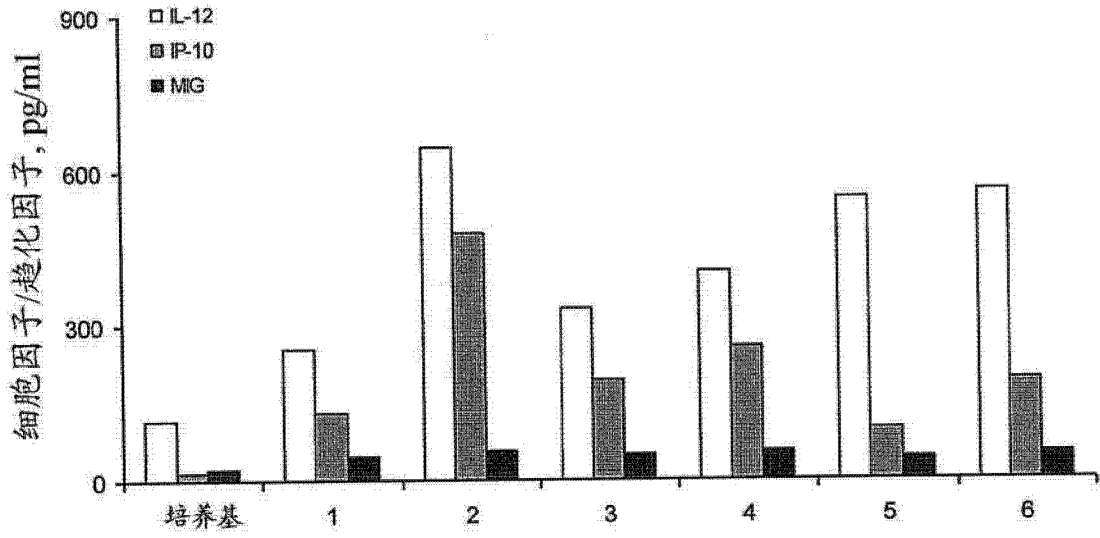


图 5C

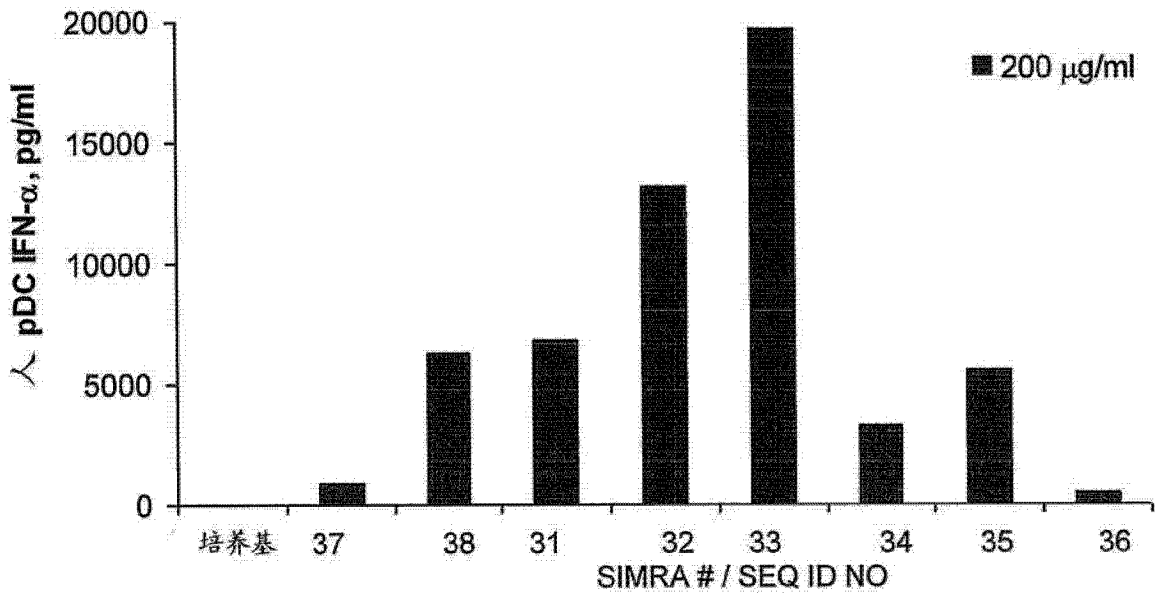


图 5D

人 pDC 培养物中由 TLR7/8 激动剂诱导的细胞因子/趋化因子

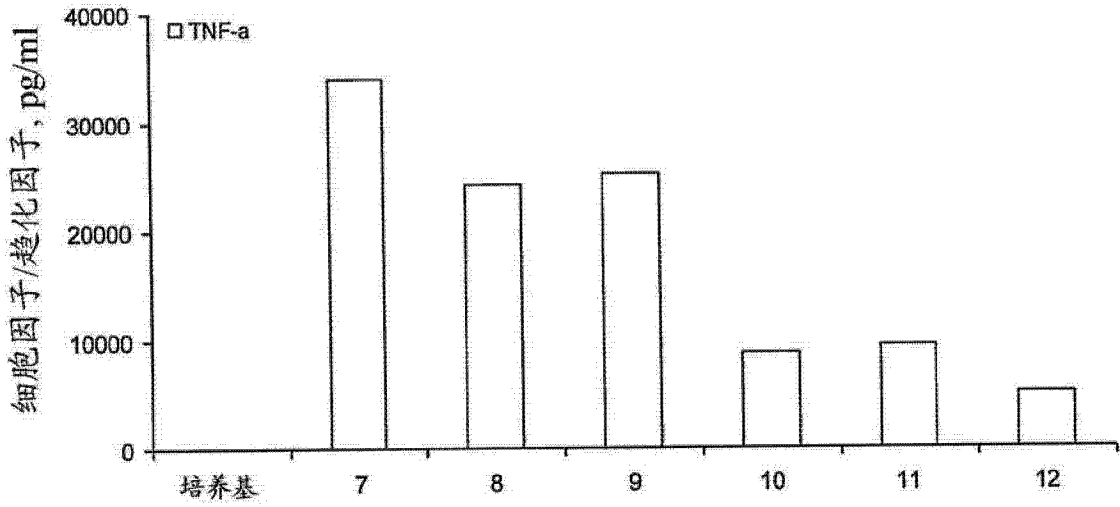


图 6A

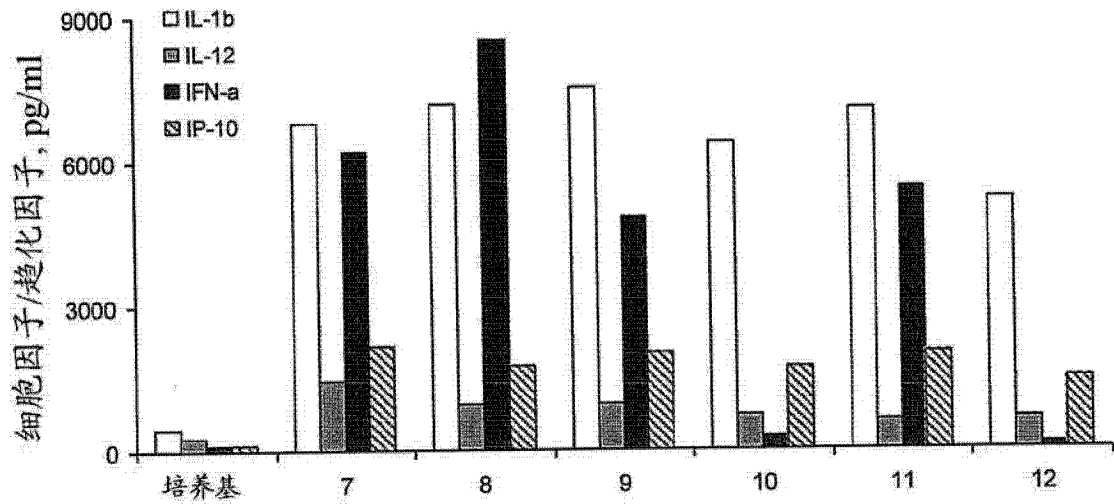


图 6B

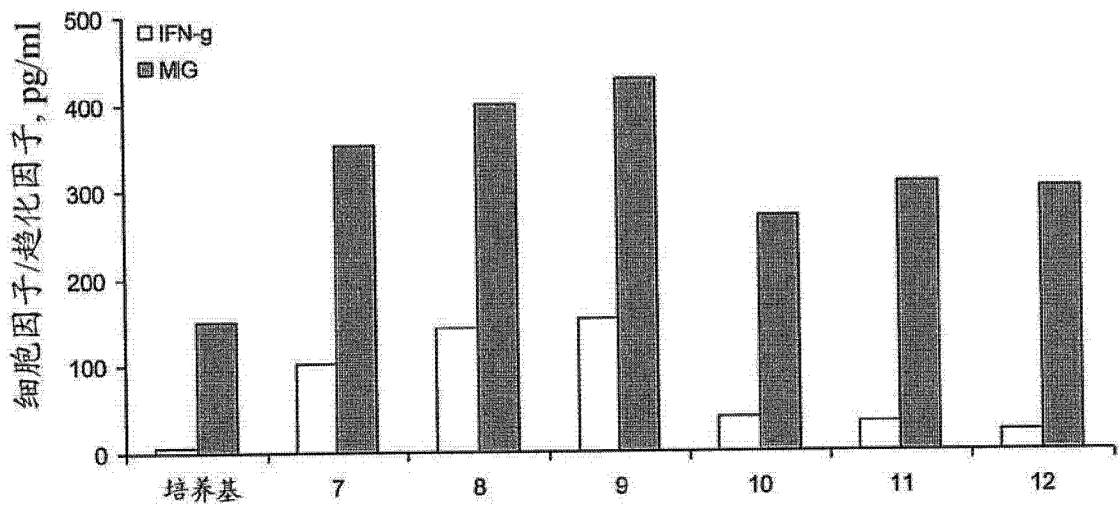


图 6C

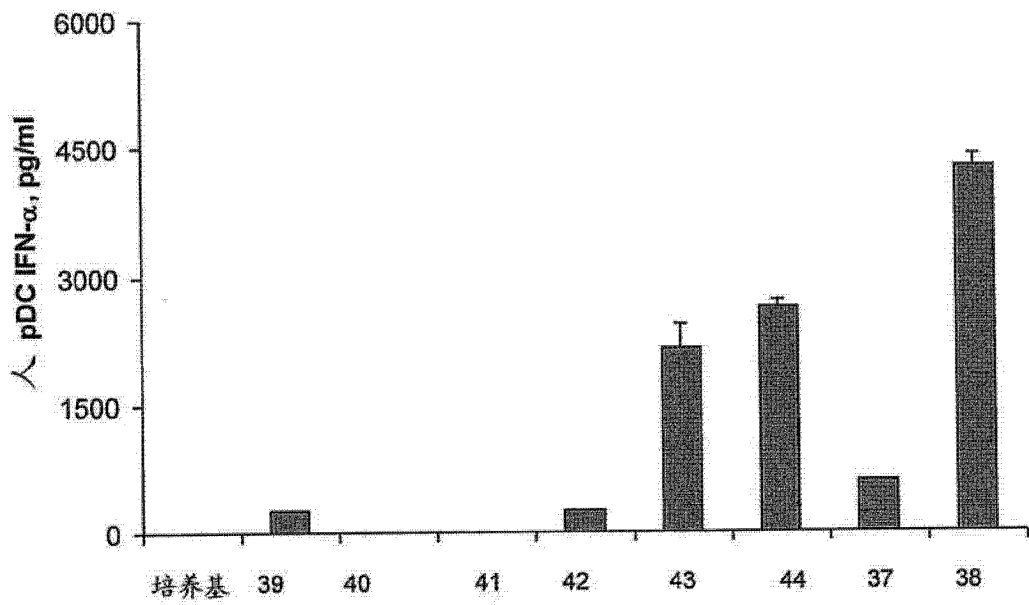


图 6D

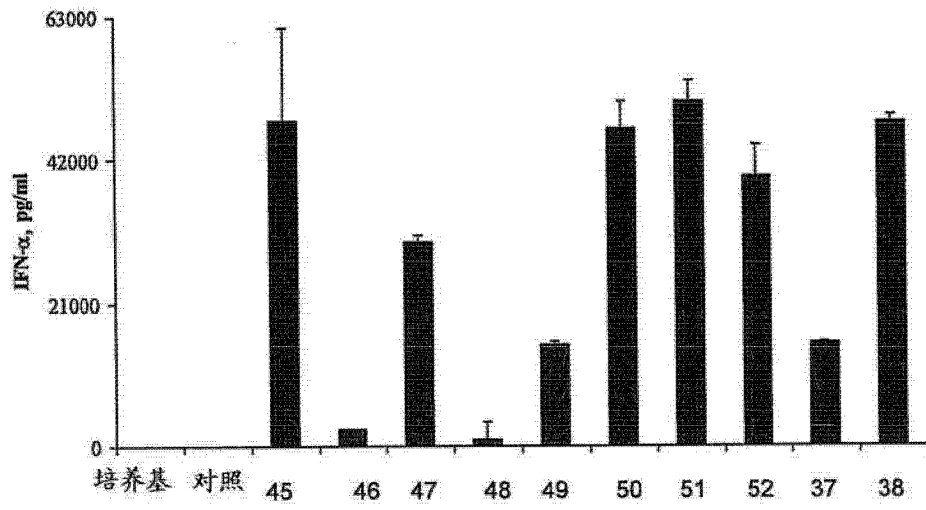


图 6E

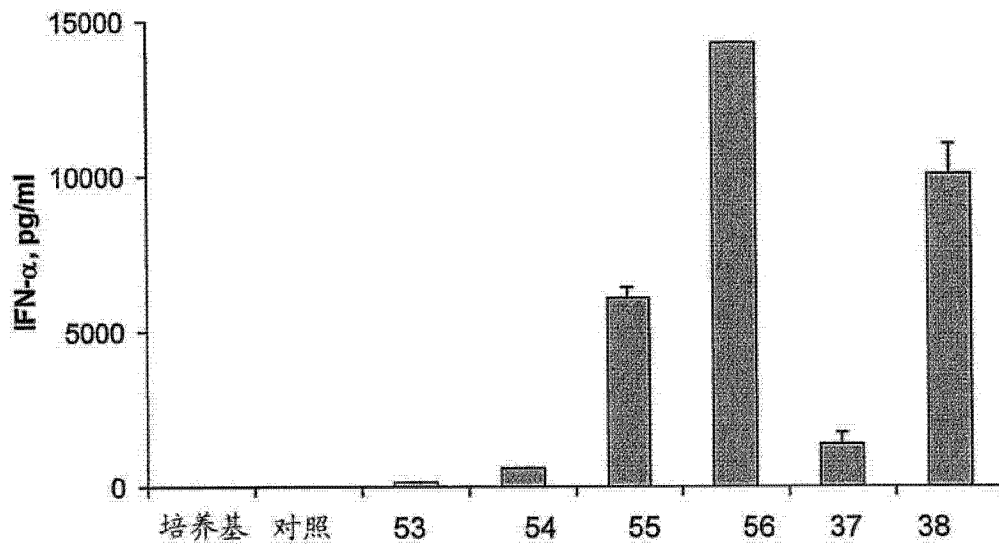


图 6F

人mDC培养物中由TLR7/8激动剂诱导的细胞因子/趋化因子

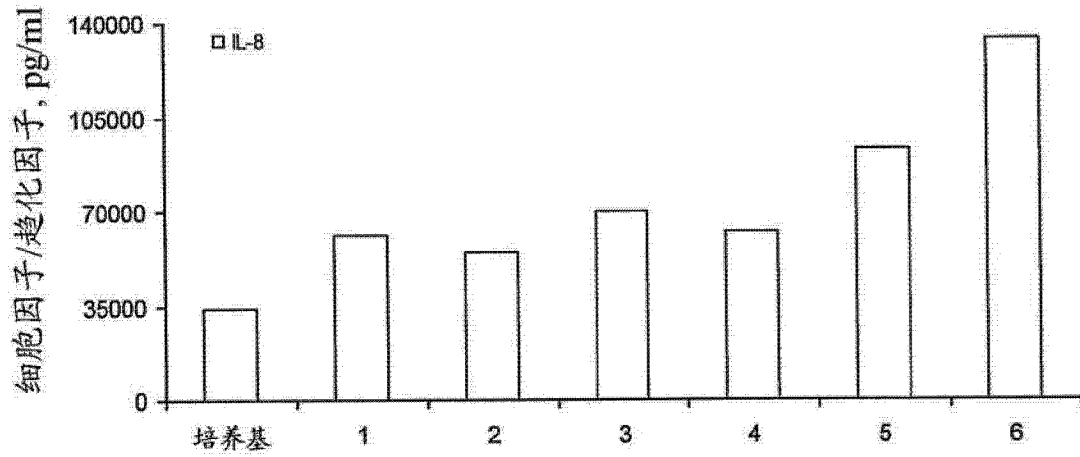


图 7A

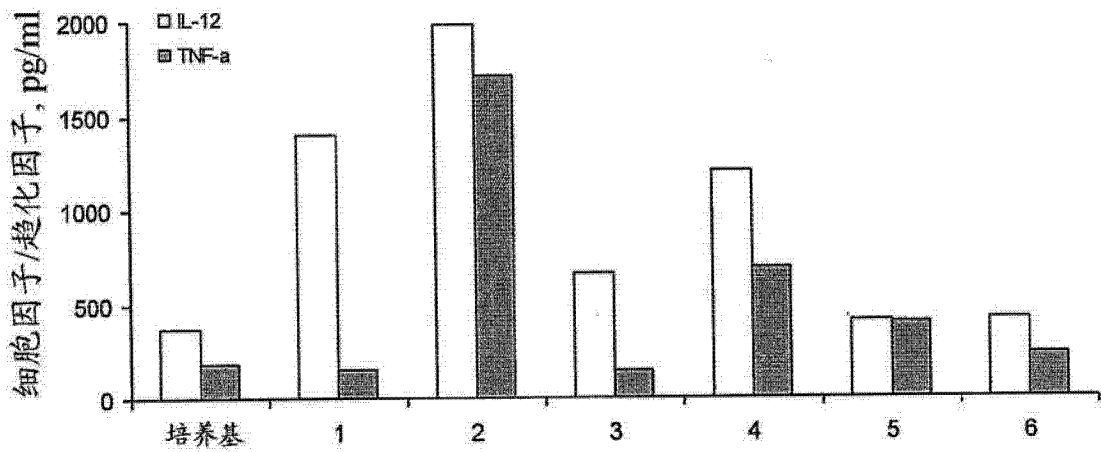


图 7B

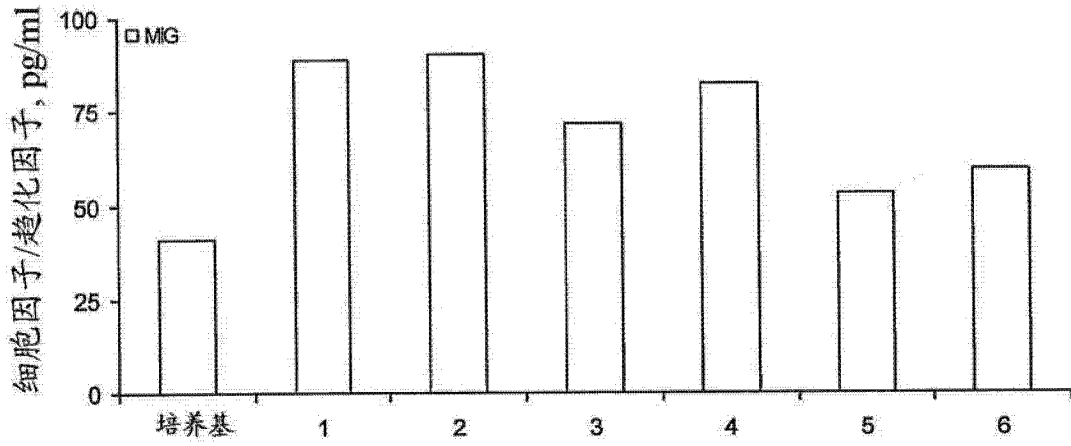


图 7C

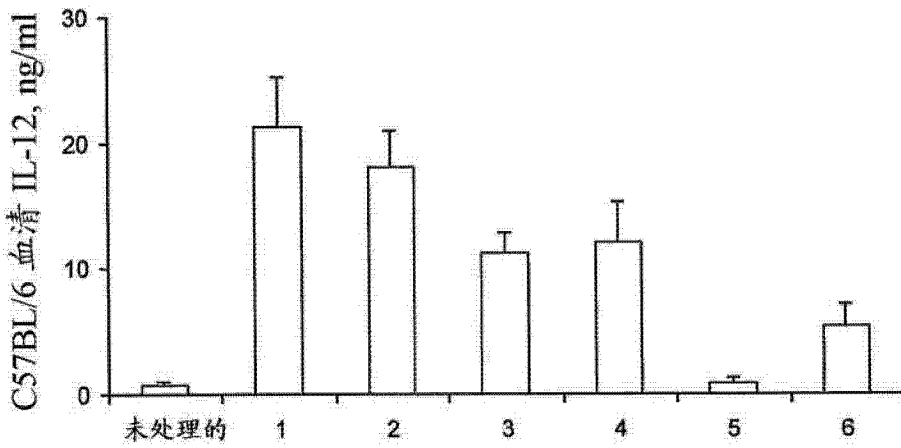


图 8A

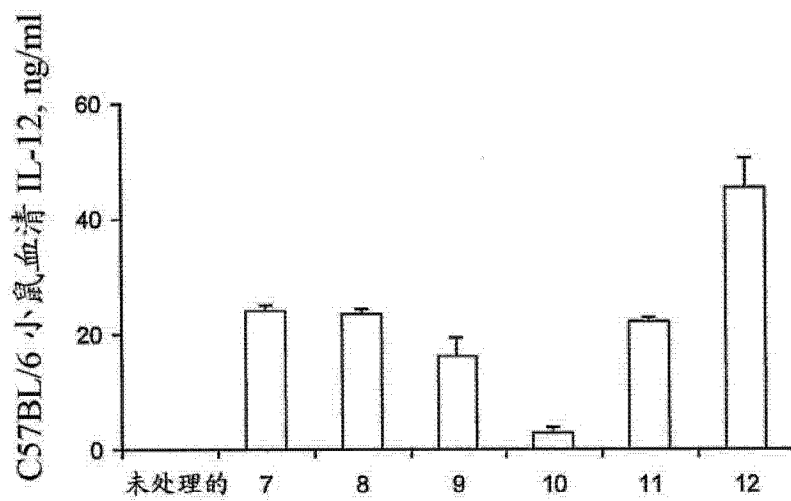


图 8B

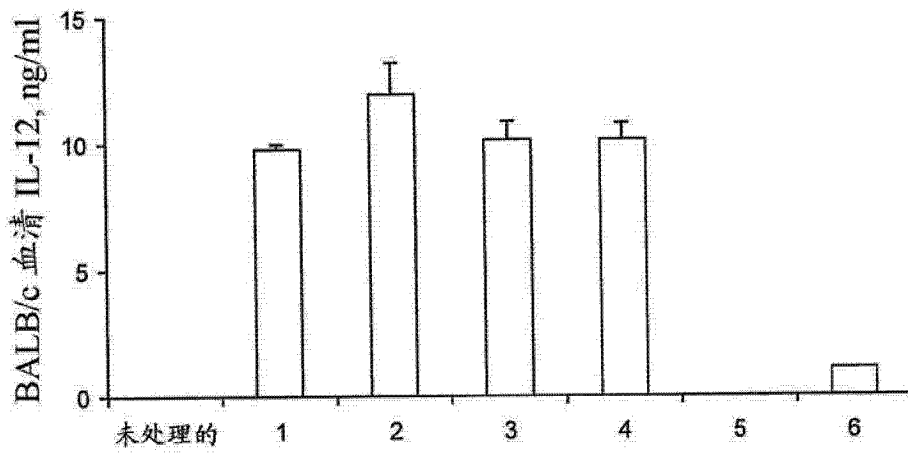


图 9A

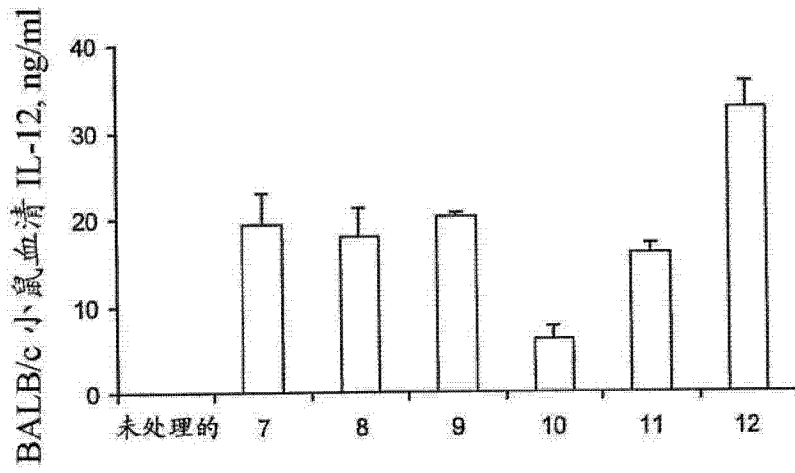


图 9B

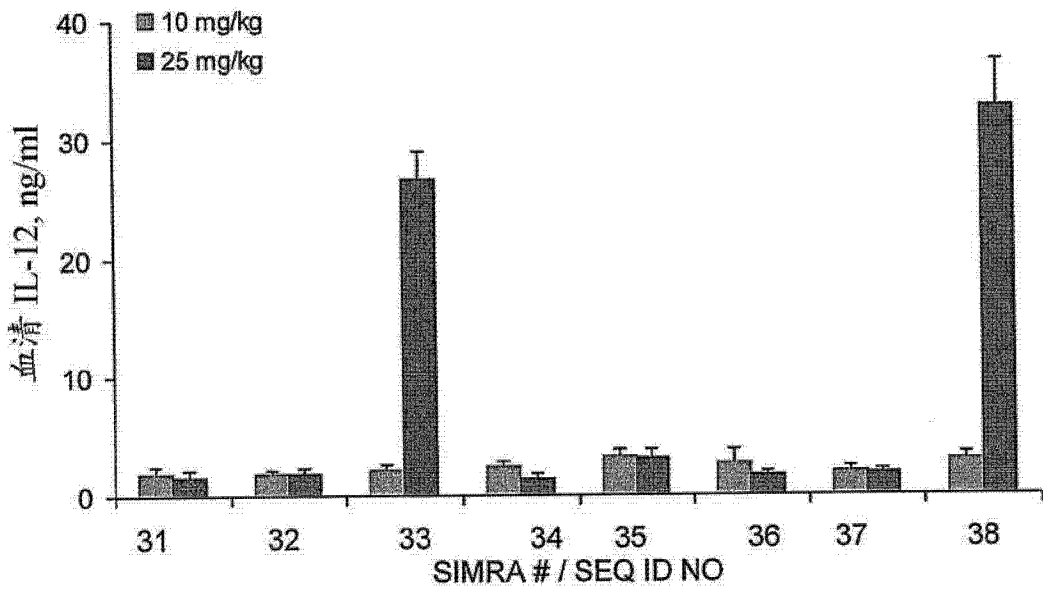


图 9C

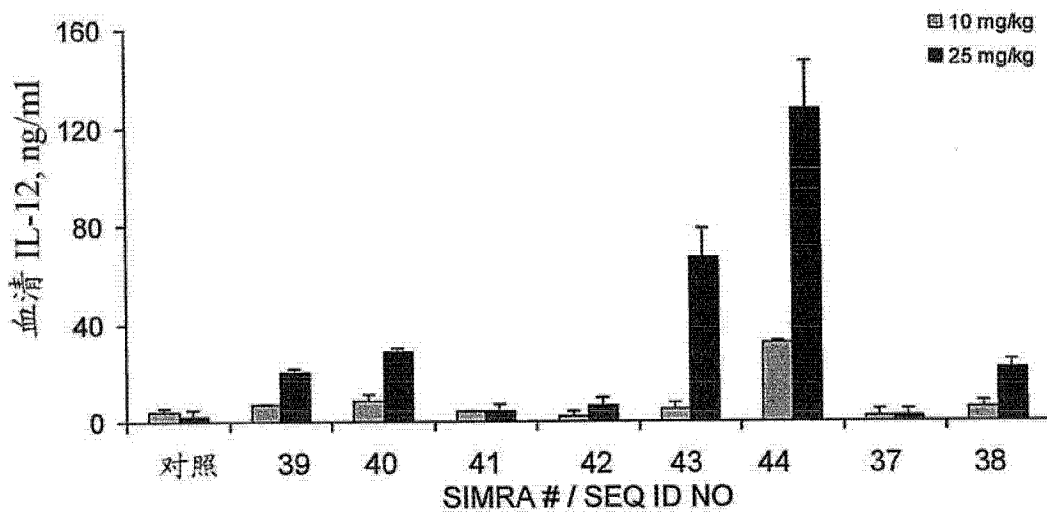


图 9D

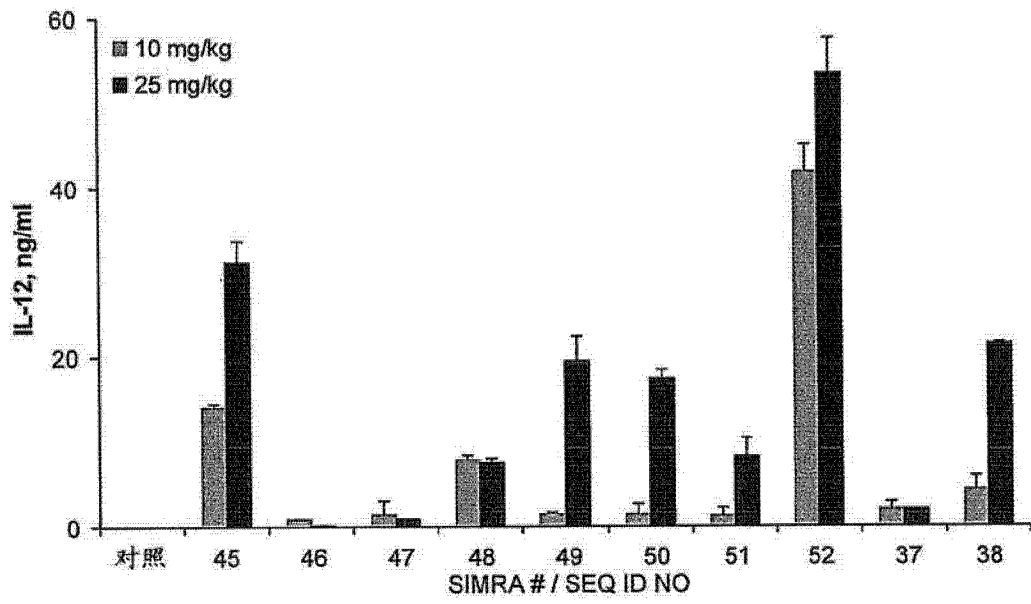


图 9E

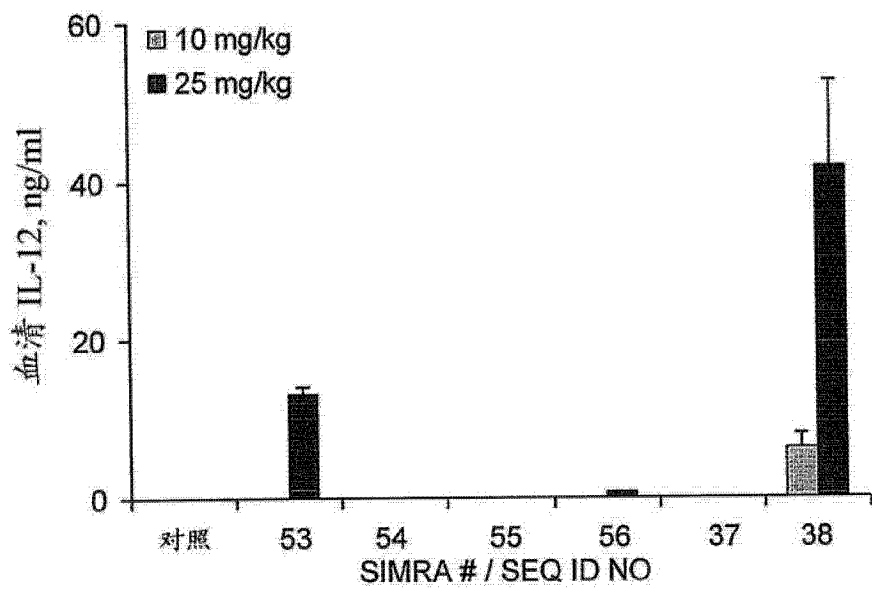


图 9F

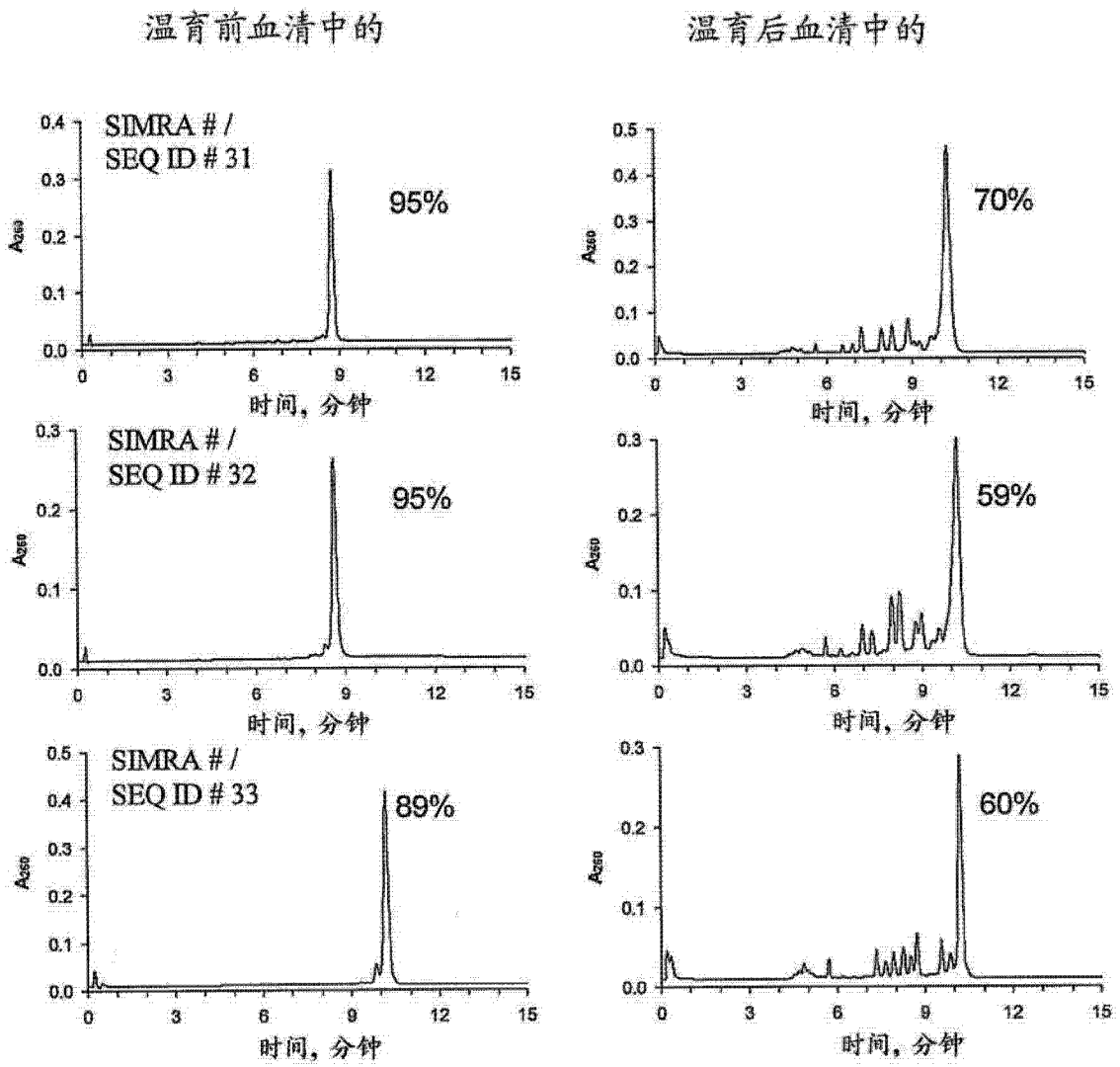


图 10A

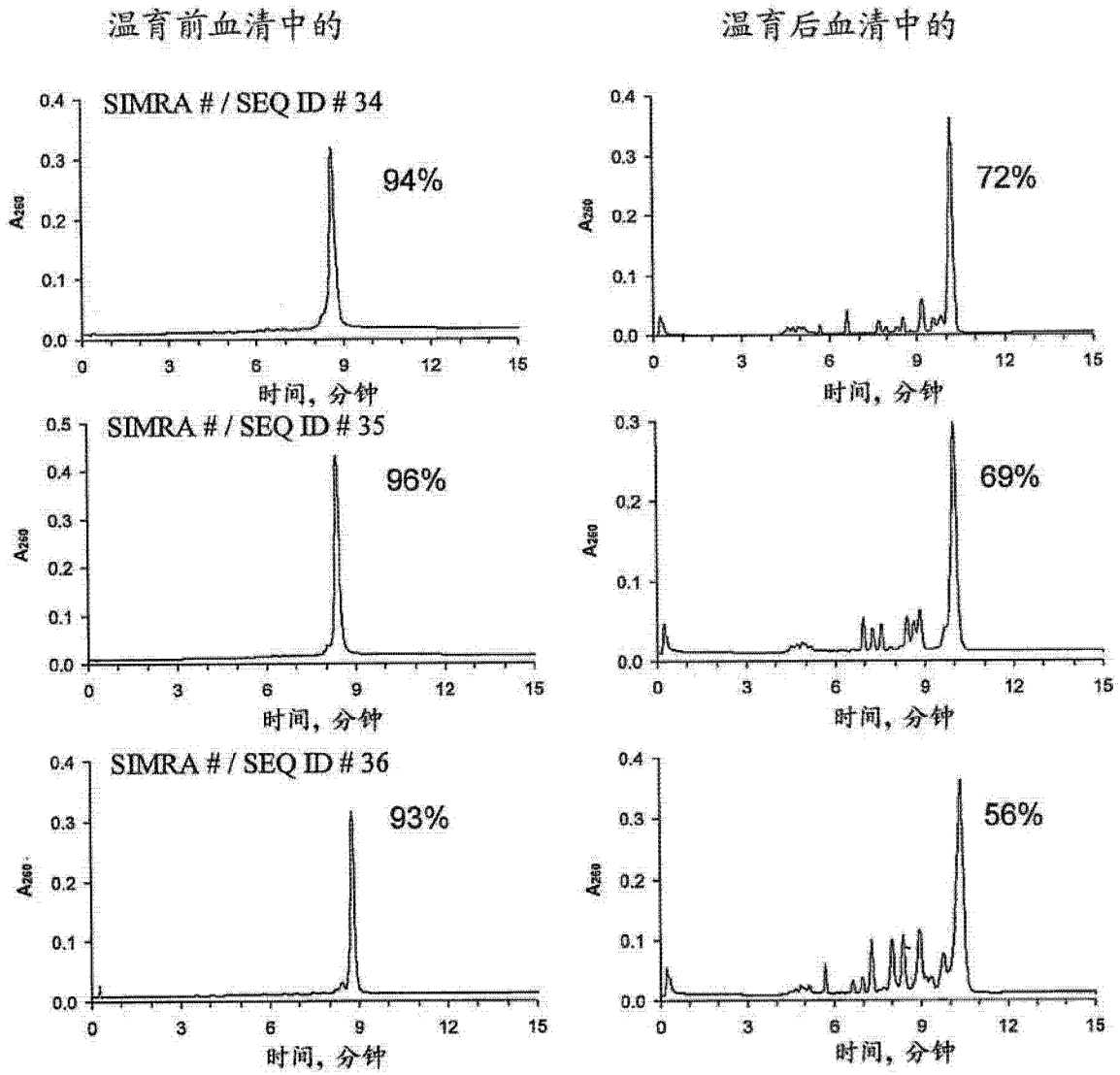


图 10B

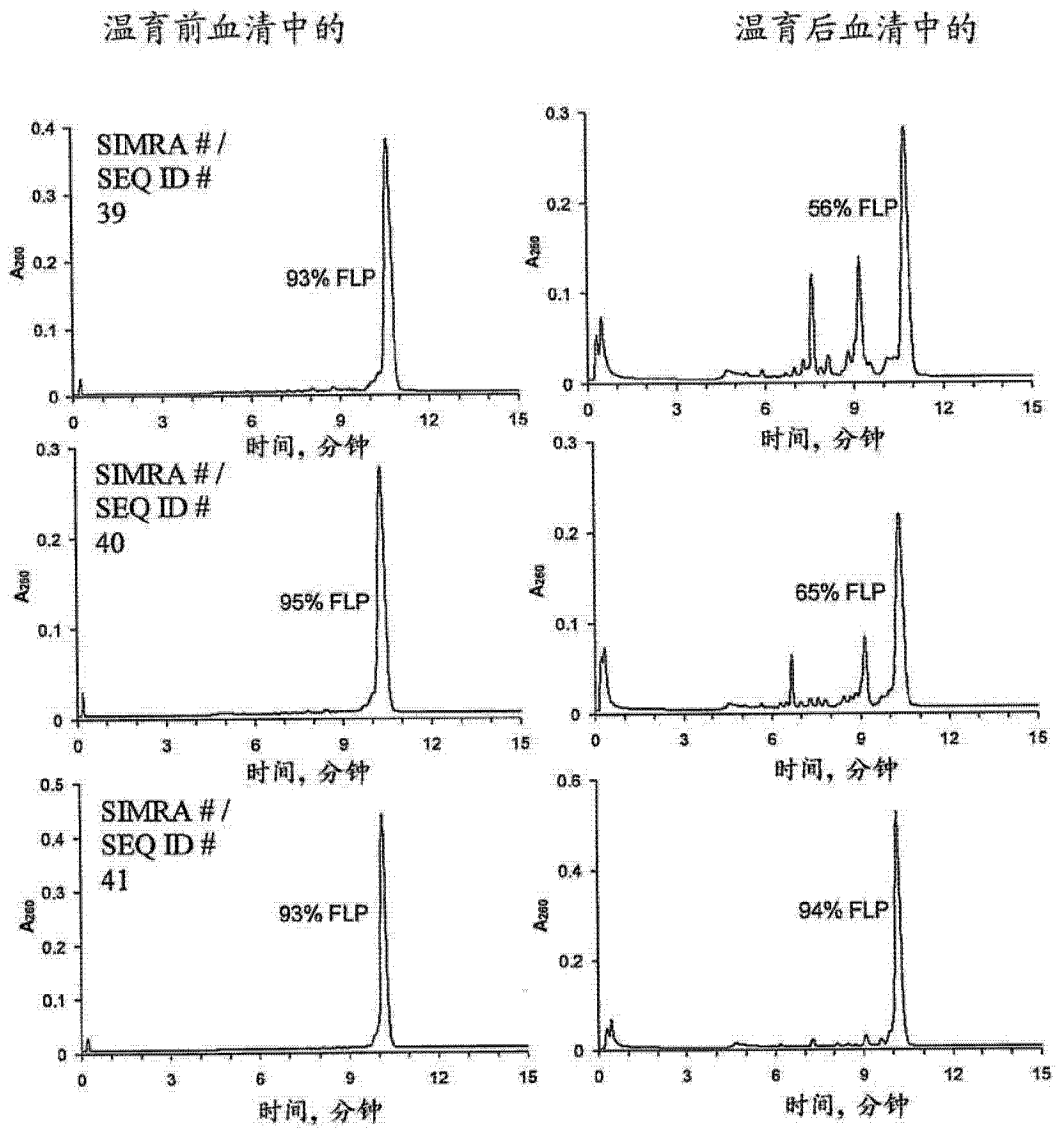


图 10C

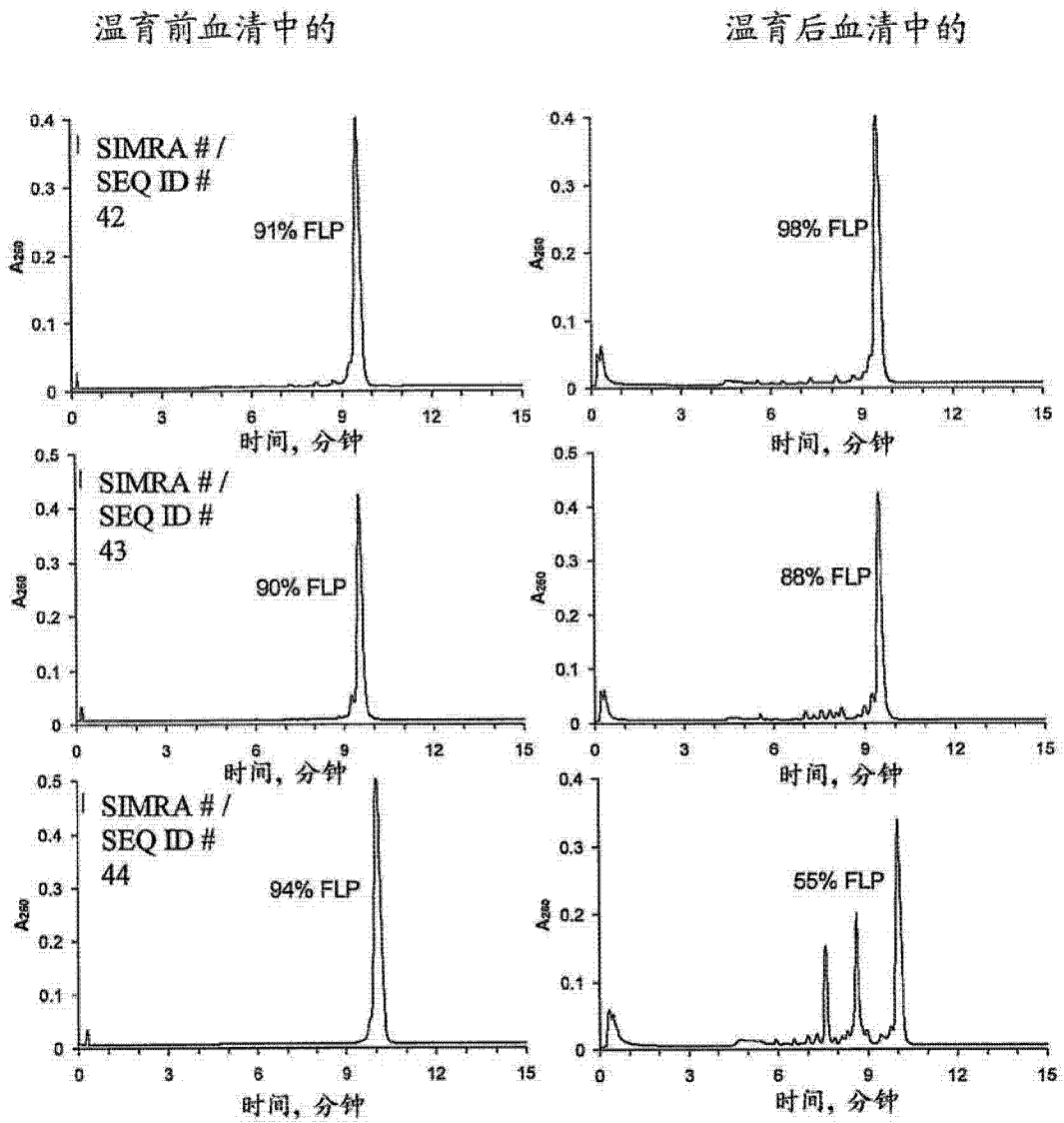


图 10D

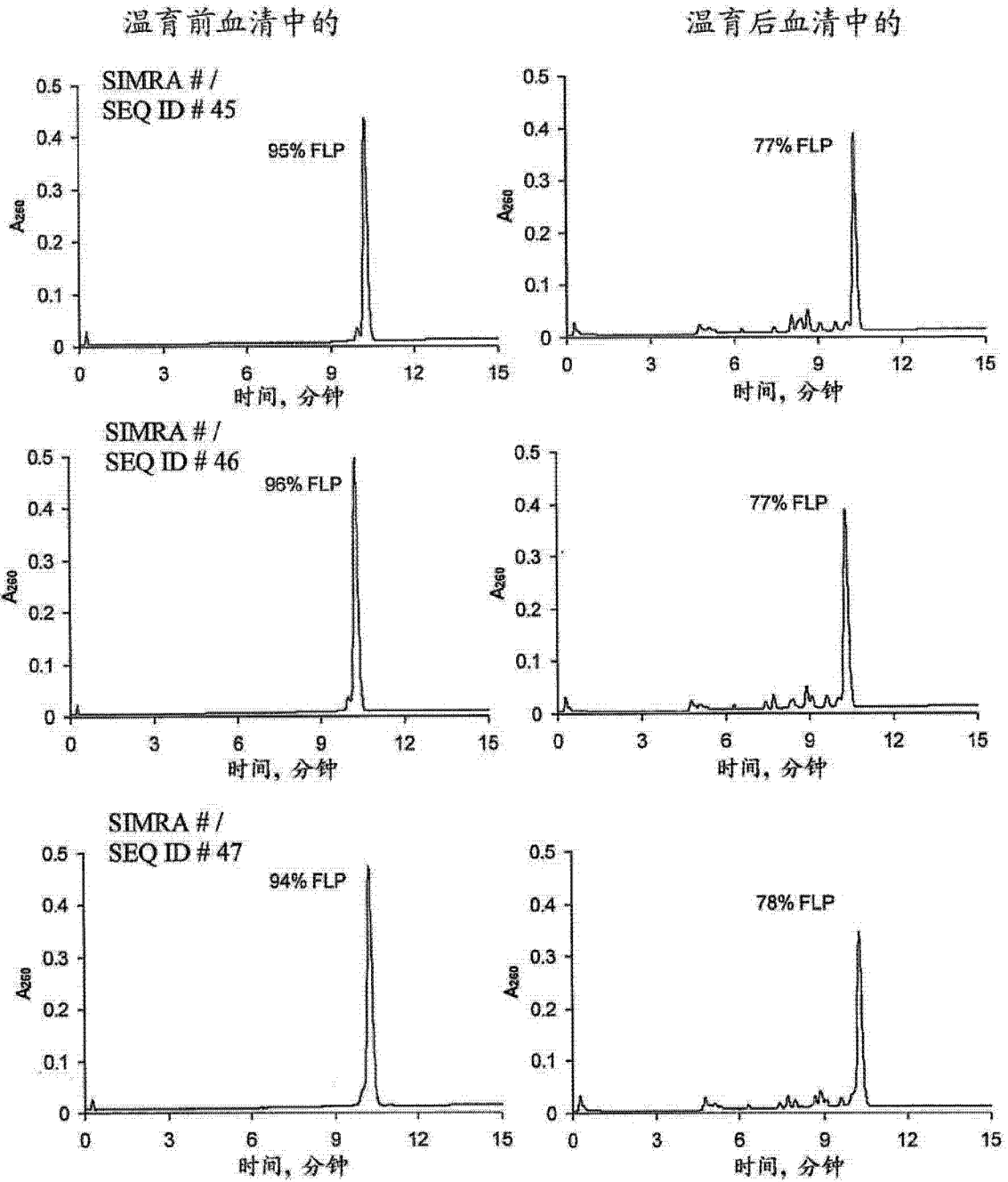


图 10E

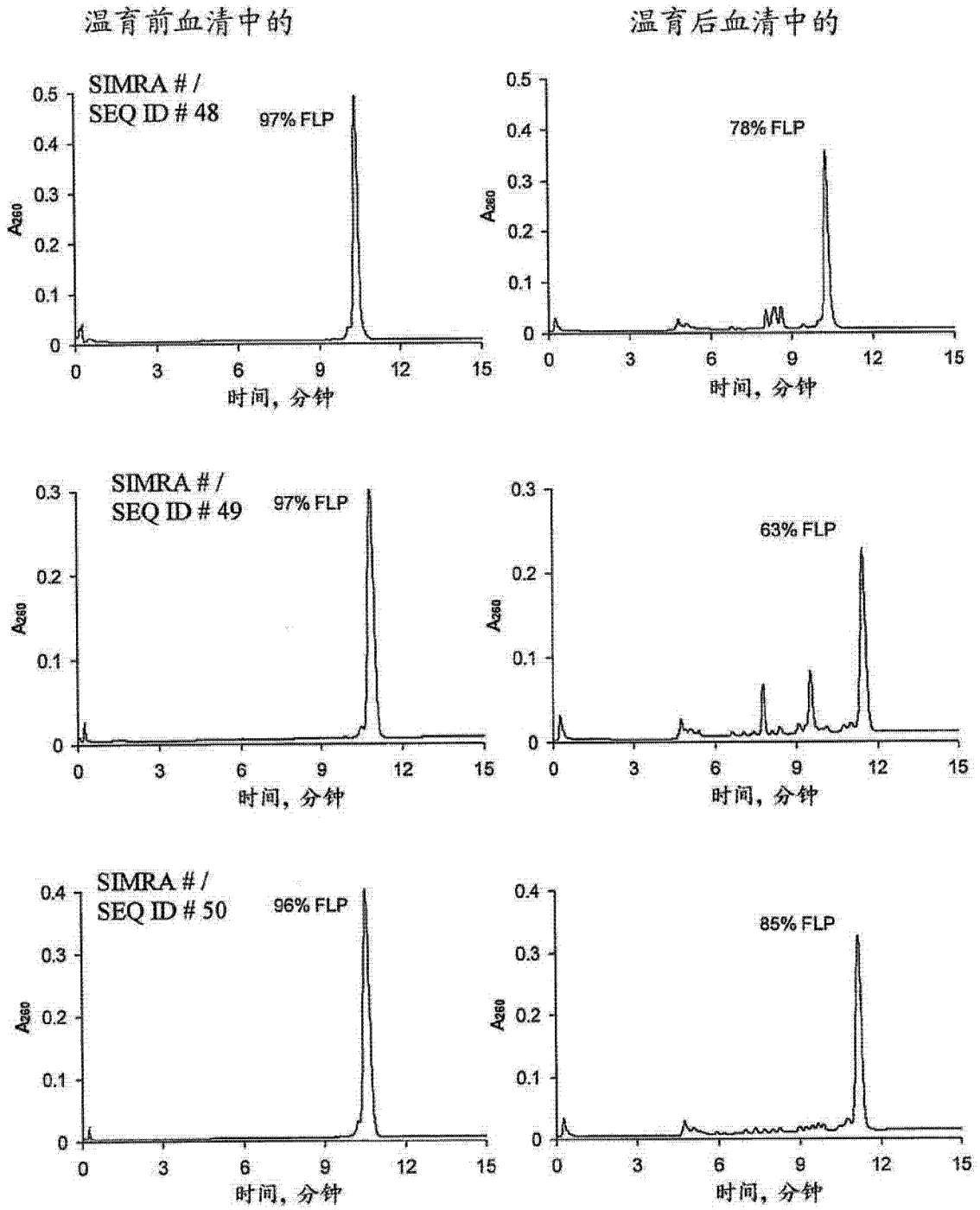


图 10F

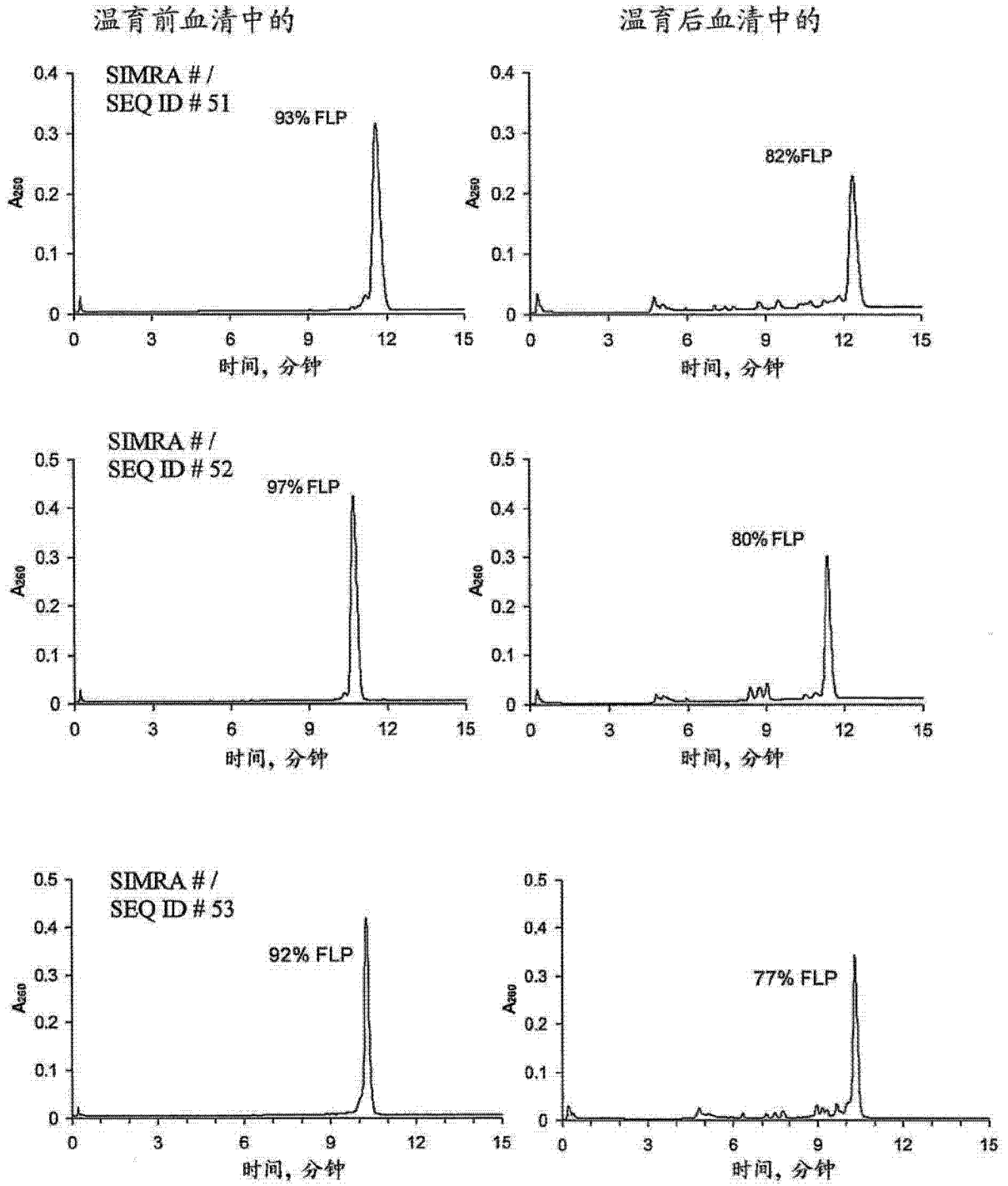


图 10G

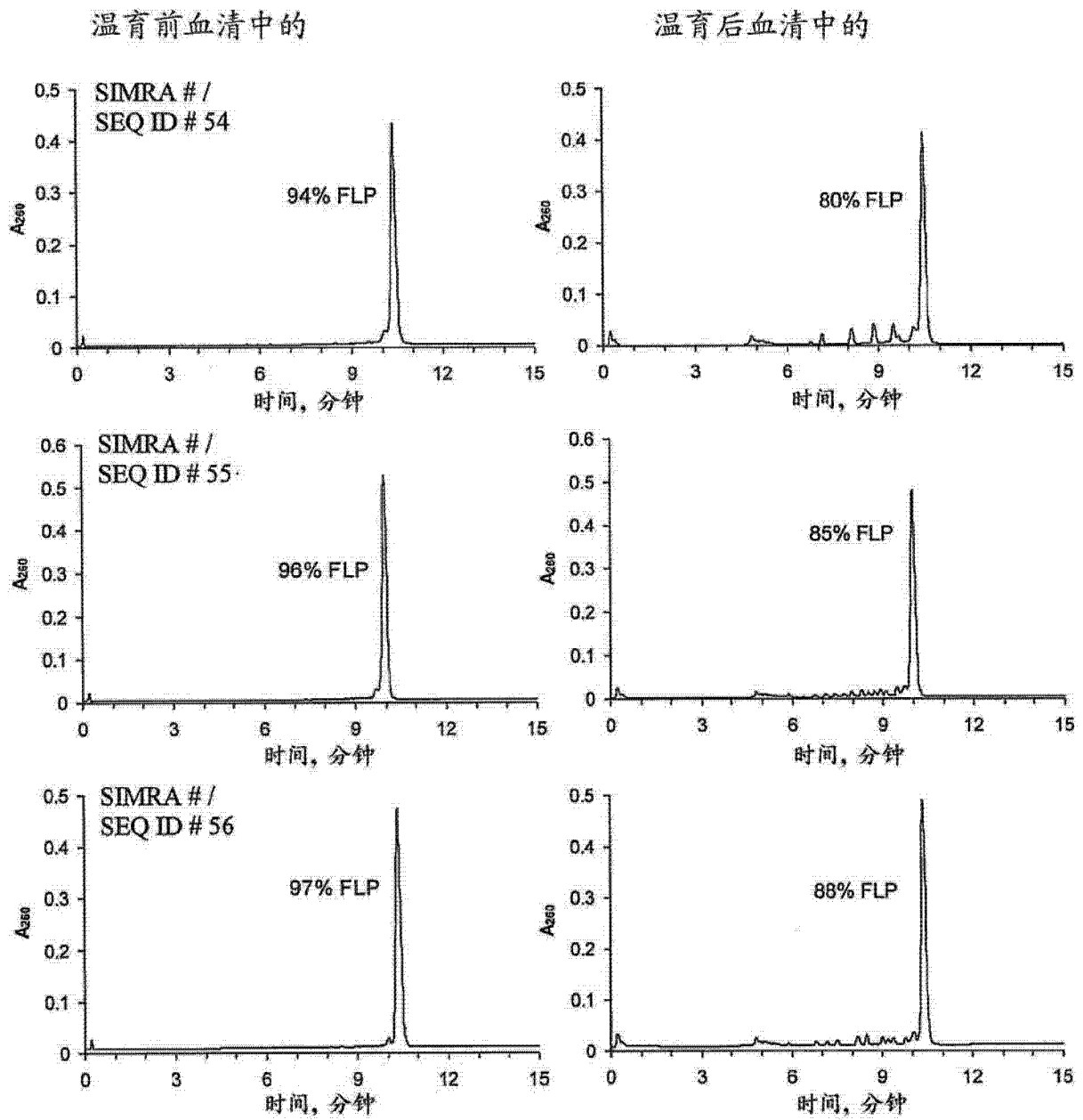


图 10H