(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119656298 A
(43)申请公布日 2025.03.21

(21)申请号 202411608245.2
(22)申请日 2018.12.07
(30)优先权数据
17207746.3 2017.12.15 EP
17207740.6 2017.12.15 EP
17207750.5 2017.12.15 EP
(62)分案原申请数据
201880089491.8 2018.12.07
(71)申请人 礼蓝动物保健有限公司
地址 德国莱茵河畔蒙海姆
(72)发明人 T·伊尔格
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
专利代理师 李唐 张华
(51)Int.Cl.
A61K 39/39(2006.01)
A61P 37/04(2006.01)

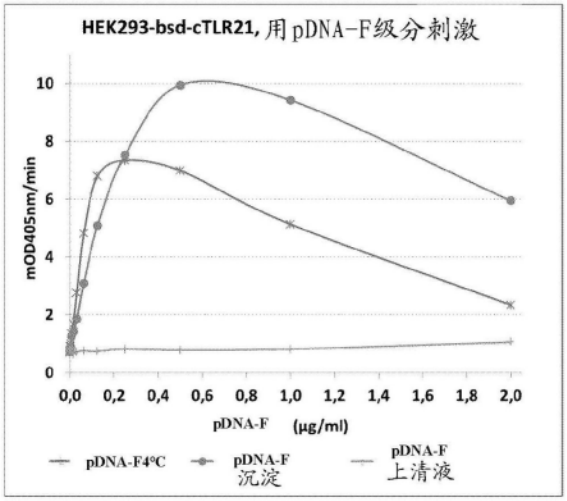
权利要求书1页 说明书59页
序列表（电子公布） 附图22页

(54)发明名称

免疫刺激性组合物

(57)摘要

本发明涉及免疫刺激性组合物。本公开涉及有效引发禽类物种中的免疫应答的免疫刺激性组合物。更具体地,这些免疫刺激性组合物包含免疫调节剂组合物和免疫刺激性寡核苷酸,其在施用时刺激toll-样受体21。



CN 119656298 A

1.免疫刺激性组合物,其包含:

a)包含核酸质粒和脂质体递送媒介物的免疫调节剂组合物;以及

b)免疫刺激性寡核苷酸,其具有至少一个CpG基序和所述免疫刺激性寡核苷酸的5'末端处或附近的鸟嘌呤核苷酸富集的序列。

2.权利要求1的免疫刺激性组合物,其中所述免疫调节剂组合物和所述免疫刺激性寡核苷酸以协同有效量存在。

3.权利要求1或2的免疫刺激性组合物,其中所述免疫刺激性寡核苷酸包含胞质核酸监视分子的配体。

4.权利要求3的免疫刺激性组合物,其中免疫胞质核酸监视分子是toll-样受体(TLR)。

5.权利要求3或4的免疫刺激性组合物,其中所述胞质核酸监视分子是TLR21。

6.前述权利要求中任一项的免疫刺激性组合物,其中所述免疫调节剂组合物的核酸质粒浓度大于所述免疫刺激性寡核苷酸的浓度。

7.前述权利要求中任一项的免疫刺激性组合物,其进一步包含药物载体。

8.前述权利要求中任一项的免疫刺激性组合物,其中所述脂质体递送媒介物包含多层囊泡脂质、挤出脂质或两者。

9.前述权利要求中任一项的免疫刺激性组合物,其中所述脂质体递送媒介物是阳离子的。

10.权利要求8的免疫刺激性组合物,其中阳离子脂质体递送媒介物包含选自以下的脂质对:N-[1-(2,3-二油烯基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)和胆固醇;N-[1-(2,3-二油酰基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTAP)和胆固醇;1-[2-(油酰基氧基)乙基]-2-油烯基-3-(2-羟基乙基)咪唑啉鎓氯化物(DOTIM)和胆固醇;以及二甲基双十八烷基溴化铵(DDAB)和胆固醇。

免疫刺激性组合物

本申请是申请日为2018年12月7日的中国专利申请201880089491.8“免疫刺激性组合物”的分案申请。

[0001] 相关申请的交叉引用

本申请要求各自在2017年12月15日提交的欧洲专利申请号EP17207740.6、EP17207746.3和EP17207750.5(其公开内容以其整体通过引用并入本文)的优先权和益处。

[0002] 序列表

本申请含有已经以ASCII格式电子提交且在此以其整体通过引用并入的序列表。所述ASCII拷贝,在2018年11月30日创建,命名为BHC_168027_SL.txt,且大小为92,167字节。

技术领域

[0003] 提供了用于刺激toll-样受体蛋白21(TLR21)的组合物和方法。更具体地,本文公开了免疫刺激性寡核苷酸和组合物,制备免疫刺激性寡核苷酸和组合物的方法以及刺激TLR21的方法。

背景技术

脊椎动物的免疫系统已经进化出识别入侵病原体和启动细胞信号传导途径以主动抵抗感染的分子机制。一些分子机制对特定微生物是特异性的,并且涉及生物分子,诸如识别单个病原体物种的表面抗原的抗体。不幸的是,病原体特异性的防御机制并不完全有效,因为一些动物直到感染开始后才发展任何获得性抗性,并且在一些情况下,该病原体已经进化出隐蔽手段用于逃避脊椎动物的获得性防御。

[0005] 脊椎动物也更普遍地识别感染,并且这种识别导致非特异性免疫应答,诸如细胞因子表达的小幅增加。当细胞受体结合病原体相关的分子模式(PAMPs)时,可以引发这种防御。PAMP和宿主对于PAMP的同源受体之间的这种相互作用可以引发免疫应答。例如,toll-样受体蛋白21(TLR21)是哺乳动物TLR9的鸡功能同源物,并且能够识别未甲基化的CpG基序,其在微生物中的CpG含量高于脊椎动物中。已知的方法通过施用具有未甲基化的CpG基序的质粒或寡核苷酸来利用这种非特异性免疫应答途径,并且已经显示通过含有CpG基序的核酸对TLR21的活化,来活化参与对微生物感染的免疫应答的细胞信号。然而,单独施用的免疫刺激性质粒或寡核苷酸可能无法引发足以抵抗感染的应答。

[0006] 大规模动物生产者迫切需要感染的抗生素治疗的替代方案。消费者向这些生产商施压以寻求不含抗生素的动物产品,并且同时,由于抗生素抗性的病原体导致的感染的发生率增加正在说明对大群体预防性施用抗生素的危险。类似地,抗生素抗性正在成为人类健康护理中的全国紧急状态。医院和医生办公室正在成为出现药物抗性细菌诸如多重抗性金黄色葡萄球菌(MRSA)的起点。

[0007] 因此,需要用于引发针对病原体的非特异性免疫应答的免疫刺激性组合物和方法。公开的方法和组合物针对这些和其他重要需求。

发明内容

本文公开了免疫刺激性组合物,其包含:包含核酸质粒和脂质体递送媒介物的免疫调节剂组合物;以及免疫刺激性寡核苷酸,其具有至少一个CpG基序和所述免疫刺激性寡核苷酸的5'末端处或附近的鸟嘌呤核苷酸富集的序列。

[0009] 本文还公开了用于制备免疫刺激性组合物的方法,其包括:将包含核酸质粒的免疫调节剂组合物和免疫刺激性寡核苷酸组合以形成免疫刺激性组合物,将所述免疫刺激性组合物离心以生成上清液和沉淀;和分离沉淀。

[0010] 进一步提供了刺激TLR21的方法,其包括将免疫刺激性寡核苷酸和免疫调节剂组合物施用于受试者,其中所述免疫刺激性寡核苷酸包含至少一个CpG基序和所述免疫刺激性寡核苷酸的5'末端处或附近的鸟嘌呤核苷酸富集的序列,且其中所述免疫调节剂组合物包含非编码核酸质粒和阳离子脂质递送媒介物。

[0011] 还公开了通过向受试者施用免疫刺激性寡核苷酸和免疫调节剂组合物或包含免疫刺激性寡核苷酸和免疫调节剂组合物的免疫刺激性组合物来引发受试者中的免疫应答的方法,其中所述免疫刺激性寡核苷酸具有至少一个CpG基序和所述免疫刺激性寡核苷酸的5'末端处或附近的鸟嘌呤核苷酸富集的序列,且其中所述免疫调节剂组合物包含非编码核酸质粒和阳离子脂质递送媒介物。

附图说明

当结合附图阅读时,进一步理解概述以及以下详述。为了举例说明公开的组合物和方法的目的,在附图中显示所述组合物和方法的示例性实施方案;然而,所述组合物和方法不限于公开的具体实施方案。在附图中:

图1举例说明附接至四乙二醇接头的胆固醇基部分的化学结构。

[0013] 图2A和2B比较免疫刺激性质粒DNA、与阳离子脂质体复合的质粒DNA和免疫刺激性寡核苷酸的免疫原性。图2A比较免疫刺激质粒性DNA("pDNA")和与阳离子脂质体复合的pDNA("pDNA-F")的免疫原性。图2B比较pDNA、pDNA-F和具有5'-胆固醇基修饰的免疫刺激性寡核苷酸GCGT3-TG4T("5Chol-GCGT3-TG4T")的免疫原性。

[0014] 图3A和3B比较免疫刺激性质粒DNA、与阳离子脂质体复合的免疫刺激性质粒DNA、免疫刺激性寡核苷酸及其组合的免疫原性。图3A比较pDNA、pDNA-F、5Chol-GCGT3-TG4T、与5'Chol-GCGT3-TG4T组合的pDNA("pDNA-5Chol-GCGT3-TG4T")和与5Chol-GCGT3-TG4T组合的pDNA-F("pDNA-F-5Chol-GCGT3-TG4T")的免疫原性,其中所述免疫刺激性寡核苷酸为nM浓度,且pDNA和pDNA-F为μg/ml浓度。图3B描绘pDNA、pDNA-F、5Chol-GCGT3-TG4T、与5'Chol-GCGT3-TG4T组合的pDNA("pDNA-5Chol-GCGT3-TG4T")和与5Chol-GCGT3-TG4T组合的pDNA-F("pDNA-F-5Chol-GCGT3-TG4T")之间的免疫原性的差异,其中所述免疫刺激性寡核苷酸为pM浓度,且pDNA和pDNA-F为ng/ml浓度。

[0015] 图4举例说明pDNA-F级分在HEK293-bsd-cTLR21细胞中刺激TLR21-介导的免疫应答的能力。具体地,将在4℃下储存的pDNA-F的免疫原性与在离心样品的沉淀("pDNA-F沉淀")和上清液("pDNA-F上清液")中获得的pDNA-F的免疫原性进行比较。

[0016] 图5A和5B分别描绘在高和低浓度下pDNA-F-5Chol-GCGT3-TG4T和5Chol-GCGT3-TG4T在HEK293-bsd-cTLR21细胞中生成TLR21-介导的免疫应答的能力。

[0017] 图6A和6B分别比较高浓度和低浓度的pDNA-F-5Chol-GCGT3-TG4T在HEK293-bsd-cTLR21细胞中生成TLR21-介导的免疫应答的能力与在离心的pDNA-F样品的沉淀(“pDNA-F 5Chol沉淀”)和上清液(“pDNA-F 5Chol Uberstand”)中获得的5Chol-GCGT3-TG4T的能力。

[0018] 图7A和7B分别比较高浓度和低浓度的5Chol-GCGT3-TG4T在HEK293-bsd-cTLR21细胞中生成TLR21-介导的免疫应答的能力与在离心的pDNA-F样品的沉淀(“5Chol沉淀”)和上清液(“5Chol Uberstand”)中获得的5Chol-GCGT3-TG4T的能力。

[0019] 图8A和8B分别比较高浓度和低浓度的5Chol-GCGT3-TG4T(“5Chol-GCGT3-TG4T4℃”)在HEK293-bsd-cTLR21细胞中生成TLR21-介导的免疫应答的能力和与5Chol-GCGT3-TG4T组合的pDNA-F(“pDNA-F/5-Chol-GCGT3-TG4T”)的能力。

[0020] 图9A和9B分别比较高浓度和低浓度的与5Chol-GCGT3-TG4T组合的pDNA-F(“pDNA-F/5-Chol-GCGT3-TG4T”)在HEK293-bsd-cTLR21细胞中生成TLR21-介导的免疫应答的能力与在离心的pDNA-F样品的沉淀(“pDNA-F/5-Chol-GCGT3-TG4T沉淀”)和上清液(“pDNA-F/5-Chol-GCGT3-TG4T上清液”)中获得的与5Chol-GCGT3-TG4T组合的pDNA-F的能力。

[0021] 图10A和10B分别比较高浓度和低浓度的与5Chol-GCGT3-TG4T组合的pDNA-F(“pDNA-F-5-Chol-GCGT3-TG4T”)在HEK293-bsd-cTLR21细胞中生成TLR21-介导的免疫应答的能力与pDNA-F和免疫刺激性寡核苷酸5-Chol-GCGT3-TG4T的能力。

[0022] 图11A和11B分别比较高浓度和低浓度的与5Chol-GCGT3-TG4T组合的pDNA-F(“pDNA-F-5-Chol-GCGT3-TG4T”)在HEK293-bsd-cTLR21细胞中生成TLR21-介导的免疫应答的能力与在离心的pDNA-F样品的沉淀(“pDNA-F-5-Chol-GCGT3-TG4T沉淀”)和上清液(“pDNA-F-5-Chol-GCGT3-TG4T”)中获得的与5Chol-GCGT3-TG4T组合的pDNA-F的能力。

[0023] 图12A和12B分别比较高浓度和低浓度的pDNA-F、免疫刺激性寡核苷酸GCGT3-TG4T和与GCGT3-TG4T复合的pDNA-F(“pDNA-F-GCGT3-TG4T”)在HEK293-bsd-cTLR21细胞中生成TLR21-介导的免疫应答的能力。

[0024] 图13A和13B分别比较高浓度和低浓度的与免疫刺激性寡核苷酸GCGT3-TG4T组合的pDNA-F(“pDNA-F-GCGT3-TG4T”)在HEK293-bsd-cTLR21细胞中生成TLR21-介导的免疫应答的能力与在离心的pDNA-F样品的沉淀(“pDNA-F-GCGT3-TG4T沉淀”)和上清液(“pDNA-F-GCGT3-TG4T上清液”)中获得的与免疫刺激性寡核苷酸GCGT3-TG4T组合的pDNA-F的能力。

[0025] 图14描绘在接种疫苗后(pv)第14天(上小图)和第21天(下小图),ODN1(GCGT3-TG4T-5Chol)的平均血凝抑制(HI)滴度(Log2)(与标准偏差)结果。星号指示显著性的水平(*＝显著至****＝高度显著)。

[0026] 图15描绘整个研究期间ODN1(GCGT3-TG4T-5Chol)的平均HI滴度(Log2)(与标准偏差)结果。

[0027] 图16描绘在接种疫苗后第14天(上小图)和第21天(下小图),ODN2(GCGT3-TG4T)的平均HI滴度(Log2)(与标准偏差)结果。星号指示显著性的水平(*＝显著至****＝高度显著)。

[0028] 图17描绘整个研究期间ODN2(GCGT3-TG4T)的平均HI滴度(Log2)(与标准偏差)结果。

[0029] 图18描绘在接种疫苗后第14天(上小图)和第21天(下小图),ODN3(2006-PTO)的平均HI滴度(Log2)(与标准偏差)结果。星号指示显著性的水平(*＝显著至****＝高度显著)。

[0030] 图19描绘整个研究期间ODN3(2006-PTO)的平均HI滴度(Log2)(与标准偏差)结果。

[0031] 图20描绘在接种疫苗后第14天(上小图)和第21天(下小图),阳性和阴性对照测试物品的平均HI滴度(Log2)(与标准偏差)结果。星号指示显著性的水平(*=显著至****=高度显著)。

[0032] 图21描绘整个研究期间阳性和阴性对照测试物品的平均HI滴度(Log2)(与标准偏差)结果。

[0033] 图22描绘与单独的NDV疫苗相比,整个研究期间ODN的最佳浓度下的平均HI滴度(Log2)(与标准偏差)结果。

[0034] 图23描绘与单独的NDV疫苗相比,pv第14天(上小图)和第21天(下小图),ODN的最佳浓度下的平均HI滴度(Log2)(与标准偏差)结果。

[0035] 说明性实施方案的详述

通过参考结合附图采用的以下详述,可以更容易地理解公开的组合物和方法,所述附图形成本公开的一部分。应理解,公开的组合物和方法不限于本文描述和/或显示的具体组合物和方法,并且本文使用的术语是为了仅通过实例的方式描述具体实施方案的目的,并且不意欲限制请求保护的组合物和方法。

[0036] 除非另有特别说明,否则关于可能的作用机制或模式或改进原因的任何描述仅仅意在是说明性的,并且公开的组合物和方法不应受任何此类建议的作用机制或模式或改进原因的正确性或不正确性的约束。

[0037] 在整个该文本中,描述涉及组合物和使用所述组合物的方法。在本公开描述或请求保护与组合物相关的特征或实施方案的情况下,这种特征或实施方案同样适用于使用所述组合物的方法。同样,在本公开描述或请求保护与使用组合物的方法相关的特征或实施方案的情况下,这种特征或实施方案同样适用于所述组合物。

[0038] 当表达值的范围时,另一个实施方案包括从一个特定值和/或至另一个特定值。此外,对范围内陈述的值的提及包括该范围内的各个和每个值。所有范围都是包括性的和可组合的。当通过使用先行词“约”将值表示为近似值时,应理解具体值形成另一个实施方案。对具体数值的提及至少包括该具体值,除非上下文另外清楚地指出。

[0039] 应理解,为了清楚起见本文在分开的实施方案的上下文中描述的公开的组合物和方法的某些特征也可以在单个实施方案中组合提供。相反,为了清楚起见在单个实施方案的上下文中描述的公开的组合物和方法的各种特征也可以分开或以任何子组合提供。

[0040] 如本文所用,单数形式“一(a)”、“一(an)”和“该(the)”包括复数。

[0041] 如本文所用的“共同施用”是指与免疫刺激性寡核苷酸组合施用免疫调节性组合物以获得期望的免疫刺激效果。免疫调节性组合物和免疫刺激性寡核苷酸可以作为分开的组合物或一起作为单一组合物共同施用。如果免疫调节性组合物和免疫刺激性寡核苷酸是分开的组合物,则它们可以同时或依次以任一顺序共同施用。对于依次共同施用,在免疫调节性组合物和免疫刺激性寡核苷酸的施用之间可能存在一分钟、一小时或者甚至一天或多天的延迟。

[0042] 如本文所用,“融合(fusing)”是指在两个化学反应性物质之间产生化学键。在本公开的上下文中,融合最经常是指将特定元件并入寡核苷酸中。例如,可以将一系列的胸腺嘧啶核苷酸融合至寡核苷酸的3’末端。

[0043] 如本文所用,“G-四联体序列”是指在寡核苷酸的5’末端附近的一段连续的鸟嘌呤残基,其使得所述寡核苷酸能够与其他G-四联体序列相互作用以形成G-四联体。所述G-四联体增强核酸的免疫刺激特性。例如,包含G-四联体序列的寡核苷酸可以相互作用,产生G-四联体。在基因的启动子区域中出现的G-四联体序列可以形成参与调节基因的表达的四级结构。尽管G-四联体序列不限于任何特定序列,但G-四联体序列的实例是TGGGGT。

[0044] 如本文所用,“G-线序列(G-wire sequence)”、“G线序列(G wire sequence)”、“G线序列(Gwire sequence)”和相关术语是指至少四个连续的鸟嘌呤核苷酸中的多个,最经常两个。位于寡核苷酸的5’末端处或附近的多个鸟嘌呤核苷酸被两个或更多个非鸟嘌呤核苷酸(即,胸腺嘧啶)分隔。G-线序列能够与其他G-线序列相互作用以形成G-线结构。G-线结构可以增强核酸的免疫刺激特性。示例性G-线序列是GGGGTTGGGG(SEQ ID NO:257)或GGGGTTGGGGTTTT(SEQ ID NO:258)。

[0045] 如本文所用,术语“鸟嘌呤核苷酸富集的序列”、“鸟嘌呤富集的序列”等是指这样的序列,其包含一段连续的鸟嘌呤核苷酸,通常4至6个鸟嘌呤核苷酸,或核酸的区域,通常在具有比腺嘌呤、胞嘧啶或胸腺嘧啶核苷酸更多的鸟嘌呤核苷酸的寡核苷酸的5’末端处或附近。如本文所公开的鸟嘌呤富集的序列可以增强寡核苷酸的免疫刺激特性。G-四联体和G-线序列是两种类型的鸟嘌呤核苷酸富集的序列。

[0046] 如本文所用的术语“免疫调节性组合物”是指至少包含免疫原性核酸质粒和脂质体递送媒介物的组合物。在目前公开的组合物和方法的一些方面,核酸质粒可以不编码特定的免疫原,并且可以基于核酸质粒的固有特性是免疫原性的。在一些方面,所述脂质体递送媒介物是阳离子的。

[0047] “免疫原性核酸质粒”是当被脊椎动物免疫系统检测时引发免疫应答的核酸质粒。与某些脊椎动物生物体中天然存在的核酸质粒序列相比,一些免疫原性核酸质粒包含增加百分比的CpG二核苷酸基序。不受理论的束缚,据信在细菌来源的核酸中存在增加的CpG二核苷酸基序,且因此,这种富含CpG的核酸对于宿主免疫防御似乎是外来的。免疫原性核酸质粒可以包含非天然存在的核苷酸和核苷酸衍生物。

[0048] 如本文所用的“免疫刺激性组合物”是指包含免疫调节性组合物和免疫刺激性寡核苷酸的组合物。在一些方面,免疫刺激性寡核苷酸和免疫调节性组合物构成单一制剂,其为免疫刺激性组合物。在一些方面,免疫刺激性寡核苷酸可以与免疫调节性组合物的脂质体递送媒介物物理缔合。

[0049] 如本文所用,“插入”是指在寡核苷酸的合成期间在特定位置添加特定的核苷酸。

[0050] 如本文所用,“平行取向”是指不同寡核苷酸之间的定向相互作用。例如,以相同的5’至3’方向取向的各个寡核苷酸呈平行取向。

[0051] 如本文所用,“百分比同一性”和类似术语用于描述两个或更多个核酸、多核苷酸、蛋白或多肽之间的序列关系,并且在如下术语的上下文中并与如下术语结合理解,所述术语包括:(a)参考序列,(b)比较窗口,(c)序列同一性和(d)序列同一性的百分比。

[0052] (a)“参考序列”是定义的序列,其用作序列比较的基础。参考序列可以是指定序列的子集或全部;例如,全长cDNA或基因序列的区段,或完整的cDNA或基因序列。

[0053] (b)“比较窗口”包括对多核苷酸序列的连续和指定区段的提及,其中可以将多核苷酸序列与参考序列进行比较,并且与参考序列(其不包含添加、替代或缺失)相比,比较窗

口中的多核苷酸序列的部分可以包含添加、取代或缺失(即缺口),用于两个序列的最佳比对。本领域技术人员理解,为了避免由于在多核苷酸序列中包含缺口而导致的与参考序列的误导性高相似性,通常引入缺口罚分并从匹配数中减去。

[0054] (c)用于比较的序列比对方法是本领域中众所周知的。用于比较的序列的最佳比对可以通过Smith和Waterman,Adv.Appl.Math.,2:482,1981的局部同源性算法;通过Needleman and Wunsch,J.Mol.Biol.,48:443,1970的同源性比对算法;通过Pearson and Lipman,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,8:2444,1988的相似性搜索方法;通过这些算法的计算机化执行来进行,所述计算机化执行包括但不限于:Intelligenetics,Mountain View,Calif.的PC/Gene程序中的CLUSTAL,Wisconsin Genetics Software Package,Genetics Computer Group(GCG),7Science Dr.,Madison,Wis.,USA中的GAP、BESTFIT、BLAST、FASTA和TFASTA;CLUSTAL程序由Higgins和Sharp,Gene,73:237-244,1988;Corpet,等人,Nucleic Acids Research,16:881-90,1988;Huang,等人,Computer Applications in the Biosciences,8:1-6,1992;和Pearson,等人,Methods in Molecular Biology,24:7-331,1994充分描述。可以用于数据库相似性搜索的BLAST程序家族包括:用于针对核苷酸数据库序列的核苷酸查询序列的BLASTN;用于针对蛋白数据库序列的核苷酸查询序列的BLASTX;用于针对核苷酸数据库序列的蛋白查询序列的TBLASTN;和用于针对核苷酸数据库序列的核苷酸查询序列的TBLASTX。参见,Current Protocols in Molecular Biology,Chapter 19,Ausubel,等人,编,Greene Publishing and Wiley-Interscience,New York,1995。上述程序的新版本或新程序一起无疑将在将来可用,并且可以与本公开一起使用。

[0055] (d)“百分比同一性”意指通过在比较窗口上比较两个最佳比对的序列而确定的值,其中与参考序列(其不包含添加、替代或缺失)相比,比较窗口中的多核苷酸序列的部分可以包含添加、取代或缺失(即缺口),用于两个序列的最佳比对。百分比通过如下计算:确定两个序列中出现相同核酸碱基的位置数以产生匹配位置数,将匹配位置数除以比较窗口中的位置总数,并且将结果乘以100以得到序列同一性的百分比。

[0056] “治疗有效量”是指治疗受试者的免疫调节性组合物和/或免疫刺激性寡核苷酸或免疫刺激性组合物的量。

[0057] “协同有效量”是指免疫调节性组合物和免疫刺激性寡核苷酸在治疗受试者中提供协同作用或大于累加作用的量。如本文所用的术语“受试者”意指任何动物,但特别是禽类物种。“禽类物种”包括但不限于鸡、家养火鸡、水禽和任何其他食物来源的禽类。

[0058] 如本文所用,“治疗”和类似术语是指降低感染症状的严重程度和/或频率,消除症状和/或所述症状的根本原因,降低症状和/或其根本原因的频率或可能性,和/或改善或补救由感染性病原体直接或间接引起的损害。

[0059] 在整个说明书和权利要求中使用涉及说明书的各方面的各种术语。向此类术语给予其在本领域中的普通含义,除非另外指出。其他特别定义的术语将以与本文提供的定义一致的方式解释。

[0060] 本文提供了免疫刺激性组合物,其包含:包含核酸质粒和脂质体递送媒介物的免疫调节剂组合物,以及免疫刺激性寡核苷酸,其具有至少一个CpG基序和所述免疫刺激性寡核苷酸的5’末端处或附近的鸟嘌呤核苷酸富集的序列。

[0061] 如本文所述的免疫刺激性寡核苷酸可以与TLR21相互作用以引发免疫应答。所述

免疫刺激性寡核苷酸包含至少一个未甲基化的二核苷酸CpG基序,其与宿主生物体中表达的病原体识别受体相互作用。所述免疫刺激性寡核苷酸还具有鸟嘌呤核苷酸富集的序列。这些序列可以促进DNA链折叠成四级结构,或者促进一种或多种具有增强的鸟嘌呤序列的免疫刺激性寡核苷酸的聚集。鸟嘌呤富集的序列不必仅由鸟嘌呤核苷酸构成,但其必须是富集的。如上所述并且在整个这些公开内容中所例举的鸟嘌呤富集的序列通常位于寡核苷酸末端(的四个核苷酸内)处或附近。对寡核苷酸序列和结构的额外操纵可以进一步增强所述免疫刺激性寡核苷酸刺激TLR21的能力。因此,本公开的一个实施方案包括包含至少一种免疫刺激性寡核苷酸的免疫刺激性组合物,所述免疫刺激性寡核苷酸包含至少一个CpG基序和起始于所述免疫刺激性寡核苷酸的5'末端的四个核苷酸处或之内的鸟嘌呤富集的序列。

[0062] 在本公开的一些方面,向含有CpG的免疫刺激性寡核苷酸的5'末端添加鸟嘌呤核苷酸延伸可以显著提高所述免疫刺激性寡核苷酸的免疫原性。不仅在所述免疫刺激性寡核苷酸中的鸟嘌呤富集的序列的位置影响TLR21活化的增强,而且序列的内容物也具有作用。由于该原因,在本公开的一些方面,鸟嘌呤富集的序列包含多个连续的鸟嘌呤核苷酸。

[0063] 在一些实施方案中,所述鸟嘌呤富集的序列包含第一多个连续的鸟嘌呤核苷酸。在一些方面,所述第一多个鸟嘌呤核苷酸包含两至八个鸟嘌呤核苷酸。在一些方面,所述第一多个鸟嘌呤核苷酸包含两个鸟嘌呤核苷酸。在一些方面,所述第一多个鸟嘌呤核苷酸包含三个鸟嘌呤核苷酸。在一些方面,所述第一多个鸟嘌呤核苷酸包含四个鸟嘌呤核苷酸。在一些方面,所述第一多个鸟嘌呤核苷酸包含五个鸟嘌呤核苷酸。在一些方面,所述第一多个鸟嘌呤核苷酸包含六个鸟嘌呤核苷酸。在一些方面,所述第一多个鸟嘌呤核苷酸包含七个鸟嘌呤核苷酸。在一些方面,所述第一多个鸟嘌呤核苷酸包含八个鸟嘌呤核苷酸。在还有其他方面,所述第一多个鸟嘌呤核苷酸包含多于八个鸟嘌呤核苷酸。

[0064] 在本发明的一些实施方案中,所述寡核苷酸包含SEQ ID NO:16、17、18、19、20、21、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、77、78、81、82、85、86、89、90、92、93、96、97、100、102、104、106、108或143。在其他实施方案中,所述鸟嘌呤富集的序列包含TTAGGG、TTAGGGTTAGGG(SEQ ID NO:261)、TTTTGGGG、GGGGTTTT、GGGGTTTTGGGG(SEQ ID NO:262)、TTAGGG、TTAGGGTTAGGGTTTT(SEQ ID NO:263)、TGTGGGTGTGTGTGGG(SEQ ID NO:269)、GGAGG、TGGAGGC或TGGAGGCTGGAGGC(SEQ ID NO:264)。在还有其他实施方案中,所述寡核苷酸包含SEQ ID NO:110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、124、125、126、127、129、130、131、134、136、137或138。

[0065] 鸟嘌呤核苷酸的单一延伸不是唯一可以增强TLR21刺激的5'修饰。例如,也可以将腺嘌呤、胞嘧啶和胸腺嘧啶富集的序列添加至具有CpG基序的寡核苷酸的5'末端,并且导致增强的TLR21刺激,尽管少于在所述寡核苷酸的5'末端的鸟嘌呤富集的序列引发的TLR21刺激。尽管在所述寡核苷酸的5'末端的单一多个鸟嘌呤残基可以引发TLR21刺激,但在鸟嘌呤富集的序列中的额外多个鸟嘌呤核苷酸可以进一步增强所述寡核苷酸的刺激特性。因此,在一些方面,本公开的寡核苷酸包含在所述第一多个鸟嘌呤核苷酸和所述至少一个CpG基序之间的第二多个鸟嘌呤核苷酸。

[0066] 在一些方面,多个鸟嘌呤核苷酸包含G-四联体序列。在一些实施方案中,所述第一

多个鸟嘌呤核苷酸、所述第二多个鸟嘌呤核苷酸或两者包含G-四联体序列。如上所定义的G-四联体序列也允许寡核苷酸之间的相互作用。不受理论的束缚,所述寡核苷酸的5'末端的相互作用允许CpG二核苷酸基序的浓缩和TRL21识别的相应增加的机会。在一些实施方案中,所述免疫刺激性组合物进一步包含具有G-四联体序列的至少一个额外寡核苷酸,其中所述寡核苷酸和所述至少一个额外寡核苷酸在四级结构中具有平行取向。在一些方面,所述G-四联体序列包含TGGGGT。

[0067] 可以在具有CpG基序的寡核苷酸的5'末端处或附近添加的另一种鸟嘌呤富集的序列是G-线序列。在本公开的一些方面,所述第一和第二多个鸟嘌呤核苷酸包含G-线序列。在一些方面,所述G-线序列包含SEQ ID NO:257或258。在还有其他方面,所述G-线序列包含SEQ ID NO:141、142、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203或GCGT-G线3。两种多个鸟嘌呤核苷酸可以被非鸟嘌呤核苷酸、核苷酸类似物或任何其他间隔基或接头分隔。例如,在本公开的一些方面,所述第一多个鸟嘌呤核苷酸和所述第二多个鸟嘌呤核苷酸被至少一个核苷酸分隔。如本文所用,术语"间隔基"是指相似的核苷酸基序之间、即两个CpG基序之间或两个鸟嘌呤核苷酸富集的序列基序之间的化学键,而术语"接头"是指不同的核苷酸基序之间、即鸟嘌呤核苷酸富集的序列和另一个核苷酸基序(例如CpG基序)之间的化学键。为了清楚起见,术语"间隔基"和"接头"用于描述正在讨论的寡核苷酸的方面。然而,本领域技术人员将理解,本文对于间隔基公开的结构可与本文对于接头公开的结构互换,且反之亦然。

[0068] 不受任何特定理论的束缚,G-线序列可能使得寡核苷酸与具有G-线序列的其他寡核苷酸相互作用并聚集。假设的通过具有G-线序列的寡核苷酸的聚集的构象被称为G-线构象,并且寡核苷酸及其CpG基序的这种聚集可以导致TLR21的刺激增强。

[0069] 鸟嘌呤富集的序列可以通过核苷酸、核苷酸类似物或其他接头与CpG核苷酸基序分隔。因此,在本公开的一些实施方案中,所述寡核苷酸进一步包含所述鸟嘌呤富集的序列和下游至少一个CpG基序之间的接头。如本文所用,"下游"意指呈5'→3'方向;即,"下游"核苷酸或基序是比较序列元件的3'的核苷酸或基序。"上游"意指呈3'→5'方向;即,"上游"核苷酸或基序是比较序列元件的5'的核苷酸或基序。所述接头不需要与所述鸟嘌呤富集的序列或CpG基序直接相邻;更确切地,所述接头必须位于两个序列基序之间,而不管所述鸟嘌呤富集的序列和所述接头之间以及所述CpG基序和所述接头之间的间插序列。在本公开的一些实施方案中,所述接头包含至少三个核苷酸。所述接头也可以不包含含氮碱基。例如,在一些方面,所述接头是六乙二醇、丙二醇、三乙二醇或其衍生物。在其他实例中,具有接头的寡核苷酸包含2006-PDE5dG4-X1或2006-PDE5dG4-X3。

[0070] 存在于本公开的寡核苷酸中的二核苷酸CpG基序据信是在鸡中被TLR21识别的PAMP。尽管甚至单个CpG基序可以刺激TLR21,但寡核苷酸上存在的多个CpG可以增加刺激的TLR21信号强度。由于该原因,在本发明的一些方面,所述至少一个CpG基序包含两个、三个、四个或五个CpG基序。在一些方面,所述至少一个CpG基序包含六个或更多个CpG基序。在一些方面,所述至少一个CpG基序包含两个CpG基序。在一些方面,所述至少一个CpG基序包含三个CpG基序。在一些方面,所述至少一个CpG基序包含四个CpG基序。在一些实施方案中,所述至少一个CpG基序包含四个CpG基序。

[0071] 在本公开的寡核苷酸的一些实施方案中,每个CpG基序可以通过至少一个核苷酸

或核苷酸类似物与其他CpG基序分隔。在一些方面,所述至少一个核苷酸是二至三个胸腺嘧啶核苷酸。在其他方面,所述至少一个核苷酸是一至四个核苷酸,尽管间插核苷酸的数目可以根据间插核苷酸的序列而不同。在一些方面,所述寡核苷酸包含SEQ ID NO:217、218、219或220。与CpG相邻的核苷酸-连同CpG基序本身-构成CpG序列元件(例如,XCGX,其中X=任何核苷酸)。在一些方面,本公开的寡核苷酸包含CpG序列元件,其是GCGA、GCGG、ACGC、CCGC、GCGT、TCGC或其任何组合。

[0072] 在本公开的一些实施方案中,所述CpG基序包含具有四个核苷酸的CpG序列元件。在一些方面,所述寡核苷酸包含至少两个CpG序列元件。在一些方面,所述寡核苷酸包含至少三个CpG序列元件。在一些方面,所述寡核苷酸包含至少四个CpG序列元件。在一些方面,所述寡核苷酸包含至少五个CpG序列元件。在一些方面,所述寡核苷酸包含至少六个CpG序列元件。在一些方面,所述寡核苷酸包含多于八个、十个、十五个或甚至二十个CpG序列元件。

[0073] 在本公开的寡核苷酸的其他实施方案中,所述CpG基序各自通过间隔基或间隔基和至少一个核苷酸的组合与每个其他CpG基序分隔。在一些方面,至少一个CpG基序通过间隔基或间隔基和至少一个核苷酸的组合与最接近的其他CpG基序分隔,而至少两个其他CpG基序与彼此相邻。尽管分隔的CpG基序可以增强设计的寡核苷酸的免疫刺激能力,但承认的是,与彼此相邻的CpG基序仍然可以刺激TLR21。

[0074] 用于线性分隔CpG基序的间隔基可以是在CpG基序之间桥接所述寡核苷酸的至少一部分的任何连接。所述间隔基可以包括,但不必限于,脱氧核糖磷酸酯桥、多碳链或重复的化学单元。间隔基的一种基本特性是与所述寡核苷酸的核苷酸主链形成化学键的能力。因此,在一些实施方案中,所述间隔基是脱氧核糖磷酸酯桥。在一些方面,所述脱氧核糖磷酸酯桥可以包含含氮碱基,而在其他方面,所述脱氧核糖磷酸酯桥是无碱基的。在一些方面,所述寡核苷酸包含SEQ ID NO:221,其包含无碱基的脱氧核糖磷酸酯桥。

[0075] 在本公开的其他实施方案中,所述间隔基包含碳链。所述碳链可以包含2至12个碳原子。可以使用包含碳链的二醇,因为末端醇基团可以与寡核苷酸的末端醇和/或磷酸酯基团反应。在一些实施方案中,所述碳链包含两个碳原子,且在一些方面,所述碳链衍生自乙二醇。在一些实施方案中,所述寡核苷酸包含ODN-X2,其中X2是乙二醇。

[0076] 本公开的其他实施方案提供了包含三个碳原子的碳链。在这些实施方案的一些方面,所述碳链衍生自1,3-丙二醇。在一些实施方案中,所述寡核苷酸包含CG-Gw2X2、CG-Gw2X2-2或ODN-X3、CG-Gw2X2-1、CG-Gw2X2-3、CG-Gw2X2-4、CG-Gw2X2-5、CG-G4T16X2-1、CG-G4T16X2-2、CG-G4T16X2-3、CG-G4T16X2-4或CG-G4T16X2-5,其中X2是三碳链;2006-PDE5dG4-X2,其中X2是衍生自丙二醇的三碳链;或SEQ ID NO:250,其中X4是衍生自丙二醇的三碳链。

[0077] 在本公开的还有其他实施方案中,所述寡核苷酸包含碳链间隔基,其中所述碳链包含四个碳原子。在这些实施方案的一些方面,所述碳链衍生自1,4-丁二醇。在一些实施方案中,所述寡核苷酸包含ODN-X4,其中X4是衍生自1,4-丁二醇的四碳链。

[0078] 在本公开的还有其他实施方案中,所述寡核苷酸包含具有重复的化学单元的间隔基。例如,在一些实施方案中,所述重复的化学单元是乙二醇。所述重复的化学单元可以重复两次至十二次。在一些实施方案中,乙二醇重复六次。因此,在一些方面,所述寡核苷酸包

含CCGC-Gw2X1,其中X1是衍生自六乙二醇的间隔基。

[0079] 尽管在寡核苷酸的3'末端上的鸟嘌呤核苷酸延伸导致很少(如果有的话)TLR21刺激,但其他核苷酸延伸可以为寡核苷酸赋予增强的免疫原性。具体地,在本公开的一些方面,所述寡核苷酸可以进一步包含三胸腺嘧啶核苷酸3'末端。在一些方面,所述寡核苷酸包含SEQ ID NO:204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214或215。

[0080] 对于本文公开的每种寡核苷酸,本领域技术人员将知道核苷酸可以取代为核苷酸类似物。在一些实施方案中,所述寡核苷酸包含磷酸二酯主链,尽管本文公开的寡核苷酸的其他实施方案包括硫代磷酸酯主链。在一些情况下,硫代磷酸酯主链可以更容易且更有成本效率地制造。

[0081] 在本发明的一些实施方案中,所述寡核苷酸可以包含脂质部分,其可以导致寡核苷酸的免疫原性增加。免疫原性增加的一种可能解释是脂质部分可以发挥功能以增强寡核苷酸的生物利用度。在一些实施方案中,所述脂质部分在所述寡核苷酸的5'末端处或附近。该脂质"帽"可以防止降解,增加溶解度,提高寡核苷酸在药物组合物中的稳定性,或其任何组合。在一些方面,所述脂质部分是胆固醇基。

[0082] 可以通过其半最大有效浓度(EC_{50})来表征所述免疫刺激性寡核苷酸和免疫刺激性组合物的功效,所半最大有效浓度(EC_{50})是诱导如下应答所必需的浓度的量度,所述应答是通过施用所述组合物可获得的最大应答的一半。该浓度越低,寡核苷酸越有效。在本公开的一些方面,所述免疫刺激性组合物可以具有pM范围内的EC_{50}。在一些方面,所述EC_{50}为约0.1至100pM。在一些方面,所述EC_{50}为约100至200pM。在一些方面,所述EC_{50}为约200至300pM。在一些方面,所述EC_{50}为约300至400pM。在一些方面,所述EC_{50}为约400至500pM。在一些方面,所述EC_{50}为约500至600pM。在一些方面,所述EC_{50}为约600至700pM。在一些方面,所述EC_{50}为约700至800pM。在一些方面,所述EC_{50}为约800至900pM。在一些方面,所述EC_{50}为约900至1nM。在还有其他方面,所述EC_{50}小于约100pM。

[0083] 关于免疫刺激性组合物中寡核苷酸的浓度,在一些方面,所述寡核苷酸的浓度为约0.1至10nM。在一些方面,所述寡核苷酸的浓度为约10至20nM。在一些方面,所述寡核苷酸的浓度为约20至30nM。在一些方面,所述寡核苷酸的浓度为约30至40nM。在一些方面,所述寡核苷酸的浓度为约40至50nM。在一些方面,所述寡核苷酸的浓度为约50至60nM。在一些方面,所述寡核苷酸的浓度为约60至70nM。在一些方面,所述寡核苷酸的浓度为约70至80nM。在一些方面,所述寡核苷酸的浓度为约80至90nM。在一些方面,所述寡核苷酸的浓度为约90至100nM。在还有其他方面,所述寡核苷酸的浓度小于约20nM。

[0084] 在本公开的一些实施方案中,所述免疫刺激性组合物可以进一步包含至少一种具有G-线序列的额外寡核苷酸。因为G-线序列促进具有相同或相似G-线序列的其他寡核苷酸的聚集,所以免疫刺激性组合物的一个方面进一步包含至少一种具有G-线序列的额外寡核苷酸。在其中所述免疫刺激性组合物包含具有G-线序列的多个寡核苷酸的一些方面,所述寡核苷酸和至少一个额外寡核苷酸具有G-线构象。

[0085] 根据本发明的一些方面,可以通过插入额外的CpG基序来进一步增强寡核苷酸刺激TLR21的能力。在一些方面,至少一个CpG基序是多个CpG基序,并且多个CpG基序包含两个、三个、四个或五个CpG基序。CpG基序之间的距离可以影响寡核苷酸的TLR21刺激特性。由于该原因,所公开的寡核苷酸的一些方面提供了在CpG基序之间插入至少一个核苷酸或核

苷酸类似物。所述至少一个核苷酸可以是二至三个胸腺嘧啶核苷酸。

[0086] 其他实施方案提供了在每个CpG基序之间包括间隔基。所述间隔基必须能够与一条相邻核苷酸链的3'末端键合,并且与另一核苷酸链的5'末端键合。在一些方面,所述间隔基是脱氧核糖磷酸酯桥,其在一些方面可以是无碱基的。

[0087] 在一些方面,所述间隔基可以包含碳链。在一些实施方案中,所述碳链包含两个碳原子。在一些方面,所述碳链衍生自乙二醇。其他实施方案提供了包含三个碳原子的碳链。在一些方面,所述碳链衍生自1,3-丙二醇。在一些实施方案中,所述碳链包含四个碳原子,并且在一些方面,所述碳链衍生自1,4-丁二醇。在还有其他实施方案中,所述间隔基包含重复的化学单元。在一些方面,所述重复的化学单元是乙二醇,并且在一些方面,所述间隔基衍生自六乙二醇。

[0088] 本公开的代表性寡核苷酸在表1中标识。

表1:寡核苷酸序列(小写:PTO键,大写PDE键)

5Chol-GCGT3-TG4T	SEQ ID NO:1	XTGGGGTTTTTTTTGCGTTTTTGCGTTTTTGCGTTTT X = 5'-胆固醇基
2006-PTO	SEQ ID NO:3	tcgtcgttttgtcgttttgtcgtt
2006-PDE	SEQ ID NO:4	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-PDE3dG1	SEQ ID NO:5	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTTG
2006-PDE3dG2	SEQ ID NO:6	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTTGG
2006-PDE3dG3	SEQ ID NO:7	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTTGGG
2006-PDE3dG4	SEQ ID NO:8	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTTGGGG
2006-PDE3dG5	SEQ ID NO:9	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTTGGGGG
2006-PDE3dG6	SEQ ID NO:10	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTTGGGGGG
2006-PDE3dG7	SEQ ID NO:11	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTTGGGGGGG
2006-PDE3dG8	SEQ ID NO:12	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTTGGGGGGGG
2006-PTO	SEQ ID NO:3	tcgtcgttttgtcgttttgtcgtt
2006-PDEV3	SEQ ID NO:13	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-PDE5dG1	SEQ ID NO:14	GTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-PDE5dG2	SEQ ID NO:15	GGTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-PDE5dG3	SEQ ID NO:16	GGGTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-PDE5dG4	SEQ ID NO:17	GGGGTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-PDE5dG5	SEQ ID NO:18	GGGGGTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-PDE5dG6	SEQ ID NO:19	GGGGGGTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-PDE5dG7	SEQ ID NO:20	GGGGGGGTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-PDE5dG8	SEQ ID NO:21	GGGGGGGGTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-PDE5dA6	SEQ ID NO:22	AAAAAATCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-PDE5dC6	SEQ ID NO:23	CCCCCCTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-PDE5dT6	SEQ ID NO:24	TTTTTTTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-PDE5dG6-Me	SEQ ID NO:25	GGGGGGTm5cGTm5cGTTTTGTm5cGTTTTGTm5cGTT m5c = 5-甲基-胞苷
2006-PDE5dC6-GC	SEQ ID NO:26	CCCCCCTGCTGCTTTTGTGCTTTTGTGCTT
2006-PDE5dT6-CA	SEQ ID NO:27	TTTTTTTCATCATTTTGTCATTTTGTCATT
2006-PTO3dG5	SEQ ID NO:28	tgggggtcgtcgttttgtcgttttgtcgtt
2006-PTO5dG6	SEQ ID NO:29	tcgtcgttttgtcgttttgtcgttggggg

2006-PDE5dG6-A1	SEQ ID NO:30	AGGGGGTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-PDE5dG6-A2	SEQ ID NO:31	GAGGGGTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-PDE5dG6-A3	SEQ ID NO:32	GGAGGGTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-PDE5dG6-A4	SEQ ID NO:33	GGGAGGTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-PDE5dG6-A5	SEQ ID NO:34	GGGGAGTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-PDE5dG6-A6	SEQ ID NO:35	GGGGGATCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-PDE5dG6-A12	SEQ ID NO:36	AAGGGGTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-PDE5dG6-A23	SEQ ID NO:37	GAAGGGTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-PDE5dG6-A34	SEQ ID NO:38	GGAAGGTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-PDE5dG6-A45	SEQ ID NO:39	GGGAAGTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-PDE5dG6-A56	SEQ ID NO:40	GGGGAATCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-PDE5dG6-C1	SEQ ID NO:41	CGGGGGTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-PDE5dG6-C2	SEQ ID NO:42	GCGGGGTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-PDE5dG6-C3	SEQ ID NO:43	GGCGGGTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-PDE5dG6-C4	SEQ ID NO:44	GGGCGGTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-PDE5dG6-	SEQ ID NO:45	GGGGCGTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT

C5		
2006-PDE5dG6-C6	SEQ ID NO:46	GGGGGCTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-PDE5dG6-C12	SEQ ID NO:47	CCGGGGTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-PDE5dG6-C23	SEQ ID NO:48	GCCGGGTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-PDE5dG6-C34	SEQ ID NO:49	GGCCGGTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-PDE5dG6-C45	SEQ ID NO:50	GGGCCGTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-PDE5dG6-C56	SEQ ID NO:51	GGGGCCTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-PDE5dG6-T1	SEQ ID NO:52	TGGGGGTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-PDE5dG6-T2	SEQ ID NO:53	GTGGGGTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-PDE5dG6-T3	SEQ ID NO:54	GGTGGGTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-PDE5dG6-T4	SEQ ID NO:55	GGGTGGTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-PDE5dG6-T5	SEQ ID NO:56	GGGGTGTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-PDE5dG6-T6	SEQ ID NO:57	GGGGGTTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-PDE5dG6-T12	SEQ ID NO:58	TTGGGGTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-PDE5dG6-T23	SEQ ID NO:59	GTTGGGTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-PDE5dG6-T34	SEQ ID NO:60	GGTTGGTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT

2006-PDE5dG6-T45	SEQ ID NO:61	GGGTTGTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-PDE5dG6-T56	SEQ ID NO:62	GGGGTTTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-PDE5dG4-A1	SEQ ID NO:63	AGGGTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-PDE5dG4-A2	SEQ ID NO:64	GAGGTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-PDE5dG4-A3	SEQ ID NO:65	GGAGTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-PDE5dG4-A4	SEQ ID NO:66	GGGATCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-PDE5dG4-C1	SEQ ID NO:67	CGGGTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-PDE5dG4-C2	SEQ ID NO:68	GCGGTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-PDE5dG4-C3	SEQ ID NO:69	GGCGTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-PDE5dG4-C4	SEQ ID NO:70	GGGCTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-PDE5dG4-T1	SEQ ID NO:71	TGGGTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-PDE5dG4-T2	SEQ ID NO:72	GTGGTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-PDE5dG4-T3	SEQ ID NO:73	GGTGTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-PDE5dG4-T4	SEQ ID NO:74	GGGTTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
1668	SEQ ID NO:75	TCCATGACGTTCCTGATGCT
1668-3dG5	SEQ ID NO:76	TCCATGACGTTCCTGATGCTGGGGG
1668-5dG4	SEQ ID NO:77	GGGGTCCATGACGTTCCTGATGCT

1668-5dG6	SEQ ID NO:78	GGGGGGTCCATGACGTTCCTGATGCT
1826	SEQ ID NO:79	TCCATGACGTTCCTGACGTT
1826-3dG5	SEQ ID NO:80	TCCATGACGTTCCTGACGTTGGGGG
1826-5dG4	SEQ ID NO:81	GGGGTCCATGACGTTCCTGACGTT
1826-5dG6	SEQ ID NO:82	GGGGGGTCCATGACGTTCCTGACGTT
BW006	SEQ ID NO:83	TCGACGTTCGTCGTTCGTCGTTC
BW006-3dG5	SEQ ID NO:84	TCGACGTTCGTCGTTCGTCGTTCGGGGG
BW006-5dG4	SEQ ID NO:85	GGGGTCGACGTTCGTCGTTCGTCGTTC
BW006-5dG6	SEQ ID NO:86	GGGGGGTCGACGTTCGTCGTTCGTCGTTC
D-SLO1	SEQ ID NO:87	TCGCGACGTTCGCCCGACGTTCGGTA
D-SLO1-3dG5	SEQ ID NO:88	TCGCGACGTTCGCCCGACGTTCGGTAGGGGG
D-SLO1-5dG4	SEQ ID NO:89	GGGGTCGCGACGTTCGCCCGACGTTCGGTA
D-SLO1-5dG6	SEQ ID NO:90	GGGGGGTCGCGACGTTCGCCCGACGTTCGGTA
2395	SEQ ID NO:91	TCGTCGTTTTCGGCGCGCGCCG
2395-5dG4	SEQ ID NO:92	GGGGTCGTCGTTTTCGGCGCGCGCCG
2395-5dG6	SEQ ID NO:93	GGGGGGTCGTCGTTTTCGGCGCGCGCCG
M362	SEQ ID NO:94	TCGTCGTCGTTCGAACGACGTTGAT
M362-3dG5	SEQ ID NO:95	TCGTCGTCGTTCGAACGACGTTGATGGGGG
M362-5dG4	SEQ ID NO:96	GGGGTCGTCGTCGTTCGAACGACGTTGAT
M362-5dG6	SEQ ID NO:97	GGGGGGTCGTCGTCGTTCGAACGACGTTGAT
2007-PDE	SEQ ID NO:98	TCGTCGTTGTCGTTTTGTCGTT
2007-PDE3dG5	SEQ ID NO:99	TCGTCGTTGTCGTTTTGTCGTTGGGGG
2007-PDE5dG6	SEQ ID NO:100	GGGGGGTCGTCGTTGTCGTTTTGTCGTT
CPG-202	SEQ ID NO:101	GATCTCGCTCGCTCGCTAT
CPG-202-5dG6	EQ ID NO:102	GGGGGGGATCTCGCTCGCTCGCTAT
CPG-685	SEQ ID NO:103	TCGTCGACGTCGTTCGTTCTC
CPG-685-5dG6	SEQ ID NO:104	GGGGGGTCGTCGACGTCGTTCGTTCTC
CPG-2000	SEQ ID NO:105	TCCATGACGTTCCTGCAGTTCCTGACGTT
CPG-2000-5dG6	SEQ ID NO:106	GGGGGGTCCATGACGTTCCTGCAGTTCCTGACGTT
CPG-2002	SEQ ID NO:107	TCCACGACGTTTTCGACGTT

CPG-2002-5dG6	SEQ ID NO:108	GGGGGGTCCACGACGTTTTCGACGTT
2006-T4-PDE	SEQ ID NO:109	TTTTTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-HuTel-1	SEQ ID NO:110	TTAGGGTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-HuTel-2	SEQ ID NO:111	TTAGGGTTAGGGTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-PDE-Oxy1	SEQ ID NO:112	TTTTGGGGTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-PDE-Oxy2	SEQ ID NO:113	GGGGTTTTTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-PDE-Oxy3	SEQ ID NO:114	GGGGTTTTGGGGTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-T4-HuTel-1	SEQ ID NO:115	TTAGGGTTTTTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-T4-HuTel-2	SEQ ID NO:116	TTAGGGTTAGGGTTTTTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-T4-ScerTel	SEQ ID NO:117	TGTGGGTGTGTGTGGGTTTTTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-T4-cMyc	SEQ ID NO:118	GGAGGTTTTTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-T4-cMyc2	SEQ ID NO:119	TGGAGGCTTTTTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-T4-cMyc3	SEQ ID NO:120	TGGAGGCTGGAGGCTTTTTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
EA2-2006	SEQ ID NO:121	GCTGCGAGGCGGGTGGGTGGGATCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
EA2D-2006	SEQ ID NO:122	GCTGCGGGCGGGTGGGTGGGATCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
EA2a-2006	SEQ ID NO:123	CGAGGCGGGTGGGTGGGATCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
EA2aD-2006	SEQ ID NO:124	CGGGCGGGTGGGTGGGATCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
HCV-2006	SEQ ID NO:125	GGGCGTGGTGGGTGGGGTTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
HIV-93del-2006	SEQ ID NO:126	GGGGTGGGAGGAGGGTTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
Hema-2006	SEQ ID NO:127	GGGGTCGGGCGGGCCGGGTGTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
Insu-2006	SEQ ID NO:128	GGTGGTGGGGGGGGTTGGTAGGGTTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
IonK-2006	SEQ ID NO:129	GGGTTAGGGTTAGGGTAGGGTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
Scle-2006	SEQ ID NO:130	TGGGGGGGTGGGTGGGTTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
STAT-2006	SEQ ID NO:131	GGGCGGGCGGGCGGGCTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
TBA-2006	SEQ ID NO:132	GGTTGGTGTGGTTGGTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
TNF-2006	SEQ ID NO:133	GGTGGATGGCGCAGTCGGTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
apVEGF-D-2006	SEQ ID NO:134	TGGGGGTGGACGGGCCGGGTTCGTCGTTTTGTCGTTTTGT

		CGTT
apVEGF-2006	SEQ ID NO:135	TGTGGGGGTGGACGGGCCGGGTTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
HTR-2006	SEQ ID NO:136	GGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
bcl-2-2006	SEQ ID NO:137	GGGCGCGGGAGGAAGGGGGCGGGTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
c-myc-2006	SEQ ID NO:138	AGGGTGGGGAGGGTGGGGATCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
c-kit87-2006	SEQ ID NO:139	AGGGAGGGCGCTGGGAGGAGGGTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
vegf-2006	SEQ ID NO:140	GGGGCGGGCCGGGGGCGGGGTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-PDE-G 线 1	SEQ ID NO:141	GGGGTTGGGGTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-PDE-G 线 2	SEQ ID NO:142	GGGGTTGGGGTTTTTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006PDE5dG4-T1-6	SEQ ID NO:143	TGGGGTTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
1-ACGA	SEQ ID NO:144	TTTTTTTACGATTT
2-GCGA	SEQ ID NO:145	TTTTTTTGCGATTT
3-CCGA	SEQ ID NO:146	TTTTTTTCCGATTT
4-TCGA	SEQ ID NO:147	TTTTTTTTCGATTT
5-ACGG	SEQ ID NO:148	TTTTTTTACGGTTT
6-GCGG	SEQ ID NO:149	TTTTTTTGCGGTTT
7-CCGG	SEQ ID NO:150	TTTTTTTCCGGTTT
8-TCGG	SEQ ID NO:151	TTTTTTTTCGGTTT
9-ACGC	SEQ ID NO:152	TTTTTTTACGCTTT
10-GCGC	SEQ ID NO:153	TTTTTTTGCGCTTT
11-CCGC	SEQ ID NO:154	TTTTTTTCCGCTTT
12-TCGC	SEQ ID NO:155	TTTTTTTTCGCTTT
13-ACGT	SEQ ID NO:156	TTTTTTTACGTTTT
14-GCGT	SEQ ID NO:157	TTTTTTTGCGTTTT
15-CCGT	SEQ ID NO:158	TTTTTTTCCGTTTT
16-TCGT	SEQ ID NO:159	TTTTTTTTCGTTTT
17-ACGA-5dG6	SEQ ID NO:160	GGGGGGTTTTTTTACGATTT
18-GCGA-5dG6	SEQ ID NO:161	GGGGGGTTTTTTTGCGATTT
19-CCGA-5dG6	SEQ ID NO:162	GGGGGGTTTTTTTCCGATTT
20-TCGA-5dG6	SEQ ID NO:163	GGGGGGTTTTTTTTCGATTT
21-ACGG-5dG6	SEQ ID NO:164	GGGGGGTTTTTTTACGGTTT
22-GCGG-5dG6	SEQ ID NO:165	GGGGGGTTTTTTTGCGGTTT
23-CCGG-5dG6	SEQ ID NO:166	GGGGGGTTTTTTTCCGGTTT
24-TCGG-5dG6	SEQ ID NO:167	GGGGGGTTTTTTTTCGGTTT
25-ACGC-5dG6	SEQ ID NO:168	GGGGGGTTTTTTTACGCTTT

26-GCGC-5dG6	SEQ ID NO:169	GGGGGGTTTTTTTGCGCTTT
27-CCGC-5dG6	SEQ ID NO:170	GGGGGGTTTTTTTCCGCTTT
28-TCGC-5dG6	SEQ ID NO:171	GGGGGGTTTTTTTTCGCTTT
29-ACGT-5dG6	SEQ ID NO:172	GGGGGGTTTTTTTACGTTTT
30-GCGT-5dG6	SEQ ID NO:173	GGGGGGTTTTTTTGCGTTTT
31-CCGT-5dG6	SEQ ID NO:174	GGGGGGTTTTTTTCCGTTTT
32-TCGT-5dG6	SEQ ID NO:175	GGGGGGTTTTTTTTCGTTTT
33-ACGA-G 线 2	SEQ ID NO:176	GGGGTTGGGGTTTTTTTTTTTACGATTT
34-GCGA-G 线 2	SEQ ID NO:177	GGGGTTGGGGTTTTTTTTTTTGCGATTT
35-CCGA-G 线 2	SEQ ID NO:178	GGGGTTGGGGTTTTTTTTTTTCCGATTT
36-TCGA-G 线 2	SEQ ID NO:179	GGGGTTGGGGTTTTTTTTTTTTCGATTT
37-ACGG-G 线 2	SEQ ID NO:180	GGGGTTGGGGTTTTTTTTTTTACGGTTT
38-GCGG-G 线 2	SEQ ID NO:181	GGGGTTGGGGTTTTTTTTTTTGCGGTTT
39-CCGG-G 线 2	SEQ ID NO:182	GGGGTTGGGGTTTTTTTTTTTCCGGTTT
40-TCGG-G 线 2	SEQ ID NO:183	GGGGTTGGGGTTTTTTTTTTTTCGGTTT
41-ACGC-G 线 2	SEQ ID NO:184	GGGGTTGGGGTTTTTTTTTTTACGCTTT
42-GCGC-G 线 2	SEQ ID NO:185	GGGGTTGGGGTTTTTTTTTTTGCGCTTT
43-CCGC-G 线 2	SEQ ID NO:186	GGGGTTGGGGTTTTTTTTTTTCCGCTTT
44-TCGC-G 线 2	SEQ ID NO:187	GGGGTTGGGGTTTTTTTTTTTTCGCTTT
45-ACGT-G 线 2	SEQ ID NO:188	GGGGTTGGGGTTTTTTTTTTTACGTTTT
46-GCGT-G 线 2	SEQ ID NO:189	GGGGTTGGGGTTTTTTTTTTTGCGTTTT
47-CCGT-G 线 2	SEQ ID NO:190	GGGGTTGGGGTTTTTTTTTTTCCGTTTT
48-TCGT-G 线 2	SEQ ID NO:191	GGGGTTGGGGTTTTTTTTTTTTCGTTTT
GCGT-G 线 2-GC	SEQ ID NO:192	GGGGTTGGGGTTTTTTTTTTTGGCTTTT
GCGT-G 线 2-TG	SEQ ID NO:193	GGGGTTGGGGTTTTTTTTTTTGTGTTTT
GCGT-G 线 2-CA	SEQ ID NO:194	GGGGTTGGGGTTTTTTTTTTTGCATTTT
GCGT-G 线 2-T1	SEQ ID NO:195	GGGGTTGGGGTTTTTTTTTTGCGTTTT
GCGT-G 线 2-T2	SEQ ID NO:196	GGGGTTGGGGTTTTTTTTTGCGTTTT
GCGT-G 线 2-T3	SEQ ID NO:197	GGGGTTGGGGTTTTTTTTGCGTTTT
GCGT-G 线 2-T4	SEQ ID NO:198	GGGGTTGGGGTTTTTTTGCGTTTT
GCGT-G 线 2-T5	SEQ ID NO:199	GGGGTTGGGGTTTTTTGCGTTTT
GCGT-G 线 2-T6	SEQ ID NO:200	GGGGTTGGGGTTTTTGCGTTTT
GCGT-G 线 2-eT1	SEQ ID NO:201	GGGGTTGGGGTTTTTTTTTTGCGTTT
GCGT-G 线 2-eT2	SEQ ID NO:202	GGGGTTGGGGTTTTTTTTTTGCGTT
GCGT-G 线 2-eT3	SEQ ID NO:203	GGGGTTGGGGTTTTTTTTTTGCGT
GCGT-G 线 3	SEQ ID NO:224	GGGGTTGGGGTTGGGGTTTTTTTTTTGCGTTTT
GCGT-G 线 2-do	SEQ ID NO:204	GGGGTTGGGGTTTTTTTTTTTGCGTTTTGCGTTTT
GCGT-G 线 2-tri	SEQ ID NO:205	GGGGTTGGGGTTTTTTTTTTTGCGTTTTGCGTTTTTGCGTTTT
GCGA-G 线 2	SEQ ID NO:177	GGGGTTGGGGTTTTTTTTTTTGCGATTT

GCGA-G 线 2-do	SEQ ID NO:206	GGGGTTGGGGTTTTTTTTTTTGCGATTTGCGATTT
GCGA-G 线 2-tri	SEQ ID NO:207	GGGGTTGGGGTTTTTTTTTTTGCGATTTGCGATTTGCGATTT
ACGC-G 线 2	SEQ ID NO:184	GGGGTTGGGGTTTTTTTTTTTACGCTTT
ACGC-G 线 2-do	SEQ ID NO:208	GGGGTTGGGGTTTTTTTTTTTACGCTTTACGCTTT
ACGC-G 线 2-tri	SEQ ID NO:209	GGGGTTGGGGTTTTTTTTTTTACGCTTTACGCTTTACGCTTT
TCGC-G 线 2	SEQ ID NO:187	GGGGTTGGGGTTTTTTTTTTTCGCTTT
TCGC-G 线 2-do	SEQ ID NO:210	GGGGTTGGGGTTTTTTTTTTTCGCTTTTCGCTTT
TCGC-G 线 2-tri	SEQ ID NO:211	GGGGTTGGGGTTTTTTTTTTTCGCTTTTCGCTTTTCGCTTT
CCGC-G 线 2	SEQ ID NO:186	GGGGTTGGGGTTTTTTTTTTTCCGCTTT
CCGC-G 线 2-do	SEQ ID NO:212	GGGGTTGGGGTTTTTTTTTTTCCGCTTTCCGCTTT
CCGC-G 线 2-tri	SEQ ID NO:213	GGGGTTGGGGTTTTTTTTTTTCCGCTTTCCGCTTTCCGCTTT
GCGG-G 线 2-mo	SEQ ID NO:181	GGGGTTGGGGTTTTTTTTTTTGCGGTTT
GCGG-G 线 2-do	SEQ ID NO:214	GGGGTTGGGGTTTTTTTTTTTGCGGTTTGCGGTTT
GCGG-G 线 2-tri	SEQ ID NO:215	GGGGTTGGGGTTTTTTTTTTTGCGGTTTGCGGTTTGCGGTTT
CG-Gw2-T0	SEQ ID NO:216	GGGGTTGGGGTTTTTTTTCGCGCGTTT
CG-Gw2-T1	SEQ ID NO:217	GGGGTTGGGGTTTTTTTTCGTCGTCGTTT
CG-Gw2-T2	SEQ ID NO:218	GGGGTTGGGGTTTTTTTTCGTTCGTTCGTTT
CG-Gw2-T3	SEQ ID NO:219	GGGGTTGGGGTTTTTTTTCGTTTCGTTTCGTTT
CG-Gw2-T4	SEQ ID NO:220	GGGGTTGGGGTTTTTTTTCGTTTTCGTTTTCGTTT
CG-Gw2-无碱基	SEQ ID NO:221	GGGGTTGGGGTTTTTTTTCGXCGXCGTTT X = 无碱基位点
CG-Gw2X1	SEQ ID NO:222**	GGGGTTGGGGTTTTTTTTCGX1CGX1CGTTT X1=C18
CG-Gw2X2	SEQ ID NO:223**	GGGGTTGGGGTTTTTTTTCGX2CGX2CGTTT X2=C3
CG-Gw2X2-1	SEQ ID NO:225**	GGGGTTGGGGTTTTTTTTCGX2CGTTT X2=C3
CG-Gw2X2-2	SEQ ID NO:223**	GGGGTTGGGGTTTTTTTTCGX2CGX2CGTTT X2=C3
CG-Gw2X2-3	SEQ ID NO:226**	GGGGTTGGGGTTTTTTTTCGX2CGX2CGX2CGTTT X2=C3
CG-Gw2X2-4	SEQ ID NO:227**	GGGGTTGGGGTTTTTTTTCGX2CGX2CGX2CGX2CGTTT X2=C3
CG-Gw2X2-5	SEQ ID NO:228**	GGGGTTGGGGTTTTTTTTCGX2CGX2CGX2CGX2CGX2CGTTT X2=C3
CG-G4T16X2-1	SEQ ID NO:229**	TGGGGTTTTTTTTCGX2CGTTT X2=C3
CG-G4T16X2-2	SEQ ID NO:230**	TGGGGTTTTTTTTCGX2CGX2CGTTT X2=C3
CG-G4T16X2-3	SEQ ID	TGGGGTTTTTTTTCGX2CGX2CGX2CGTTT

	NO:231**	X2=C3
CG-G4T16X2-4	SEQ ID NO:232**	TGGGGTTTTTTTTCGX2CGX2CGX2CGX2CGTTT X2=C3
CG-G4T16X2-5	SEQ ID NO:233**	TGGGGTTTTTTTTCGX2CGX2CGX2CGX2CGX2CGTTT X2=C3
ODN-X2	SEQ ID NO:234**	GGGGTTGGGGTTTTTTTTCGX2CGX2CGTTT (X2 = 乙二醇)
ODN-X3	SEQ ID NO:223**	GGGGTTGGGGTTTTTTTTCGX3CGX3CGTTT (X3 = 丙二醇)
ODN-X4	SEQ ID NO:235**	GGGGTTGGGGTTTTTTTTCGX4CGX4CGTTT (X4 = 丁二醇)
ODN-X6	SEQ ID NO:236**	GGGGTTGGGGTTTTTTTTCGX6CGX6CGTTT (X6 = 己二醇
ODN-X9	SEQ ID NO:237**	GGGGTTGGGGTTTTTTTTCGX9CGX9CGTTT (X9 = 壬二醇)
ODN-X12	SEQ ID NO:238**	GGGGTTGGGGTTTTTTTTCGX12CGX12CGTTT (X12 = 十二烷二醇)
ODN-Xab	SEQ ID NO:239	GGGGTTGGGGTTTTTTTTCGXabCGXabCGTTT (Xab = d间隔基(无碱基))
ODN-XtrEG	SEQ ID NO:240**	GGGGTTGGGGTTTTTTTTCGXtrCGXtrCGTTT (Xtr = 三乙二醇)
ACGC-Gw2X1	SEQ ID NO:241**	GGGGTTGGGGTTTTTTTTACGCX1ACGCX1ACGCTTT X1 = C18 (HEG*)
CCGC-Gw2X1	SEQ ID NO:242**	GGGGTTGGGGTTTTTTTTCCGCX1CCGCX1CCGCTTT X1 = C18 (HEG*)
ACGC-Gw2X2	SEQ ID NO:243**	GGGGTTGGGGTTTTTTTTACGCX2ACGCX2ACGCTTT X2 = 丙二醇
CCGC-Gw2X2	SEQ ID NO:244**	GGGGTTGGGGTTTTTTTTCCGCX2CCGCX2CCGCTTT X2 = 丙二醇
ACGC-G4T16-X2	SEQ ID NO:245**	TGGGGTTTTTTTTACGCX2ACGCX2ACGCTTT X2 = 丙二醇
CCGC-G4T16-X2	SEQ ID NO:246**	TGGGGTTTTTTTTCCGCX2CCGCX2CCGCTTT X2 = 丙二醇
2006-PDE5dG4-X1	SEQ ID NO:247**	GGGGX1TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT X1 = C18 (HEG*)
2006-PDE5dG4-X2	SEQ ID NO:248**	GGGGX2TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT X2 = 丙二醇
2006-PDE5dG4-X3	SEQ ID NO:249**	GGGGX3GGGGTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT X3 = C18 (HEG*)
2006-PDE5dG4-X4	SEQ ID NO:250**	GGGGX4GGGGTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT X4 = 丙二醇
2006-T4-5dTG4T	SEQ ID NO:251	TGGGGTTTTTTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT
2006-T4TG4T-3C	SEQ ID NO:251	TGGGGTTTTTTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTTX 3′-胆固醇基
5Chol-GCGT3-TG4T	SEQ ID NO:1	XTGGGGTTTTTTTTGCGTTTTTGCGTTTTTGCGTTTT X = 5′-胆固醇基

GCGT3-TG4T	SEQ ID NO:252	TGGGGTTTTTTTTGCGTTTTTGCGTTTTTGCGTTTT
GCGT-3-Gw2-5Chol	SEQ ID NO:253	XGGGGTTGGGGTTTTTTTTGCGTTTTTGCGTTTTTGCGTTTT 5′-胆固醇基
GCGT-3-Gw2	SEQ ID NO:253	GGGGTTGGGGTTTTTTTTGCGTTTTTGCGTTTTTGCGTTTT
GCGT3-5Chol	SEQ ID NO:254	XTTTTTTTGCGTTTTTGCGTTTTTGCGTTTT X = 5′-胆固醇基
GCGT3	SEQ ID NO:254	TTTTTTTGCGTTTTTGCGTTTTTGCGTTTT
5Chol-CCGC3-Gw2	SEQ ID NO:255	XGGGGTTGGGGTTTTTTTTCCGCTTTTCCGCTTTTCCGCTTT X = 5′-胆固醇基
CCGC3-Gw2	SEQ ID NO:255	GGGGTTGGGGTTTTTTTTCCGCTTTTCCGCTTTTCCGCTTT
5Chol-CCGC3	SEQ ID NO:256	XTTTTTTTCCGCTTTTCCGCTTTTCCGCTTT X = 5′-胆固醇基
CCGC3	SEQ ID NO:256	TTTTTTTCCGCTTTTCCGCTTTTCCGCTTT
*六乙二醇 **如本文所提及，序列名称(例如，“CG-Gw2X1”等)是指该表中显示的完整序列，包括X1、X2、X3、X4、X6、X9、X12和Xtr非核苷酸接头。		

[0089] 本文所述的免疫原性核酸质粒富含CpG基序。在一些方面,与在脊椎动物核酸序列中发现的CpG基序的频率相比,所述免疫原性核酸质粒含有超过20％ CpG基序。

[0090] 在一些方面,本公开涉及不包含抗生素抗性基因的免疫原性核酸质粒。在一些方面,所述质粒不包含编码全长或功能可选择或可筛选的标记的核酸序列。例如,本文所述的pGCMB75.6质粒不包含任何全长或功能可选择或可筛选的标记基因。pGCMB75.6的序列提供于SEQ ID NO:265(表1A)中。在一些方面,本文所述的质粒不编码免疫原。

[0091] 在一些方面,所述免疫原性质粒可以包含编码不是抗生素抗性基因的可选择或可筛选的标记基因的核酸序列。例如,本文所述的pLacZMB75.6质粒包含LacZ基因作为可筛选的标记。pLacZMB75.6的序列提供于SEQ ID NO:268中。在还有其他方面,所述质粒将含有抗生素抗性基因。例如,pMB75.6包含编码对抗生素卡那霉素的抗性的核酸序列。pMB75.6的序列提供于SEQ ID NO:266中。

[0092] 应当理解的是,可以在不显著不利影响其免疫刺激性特性的特定程度上改变pMB75.6、pGCMB75.6或pLacZMB75.6质粒的核苷酸序列。在一些方面,提供了免疫原性核酸质粒,其包含与pGCMB75.6的序列(SEQ ID NO:265)具有至少89％序列同一性的核酸序列或由其组成。在一些方面,所述免疫原性质粒包含与pGCMB75.6的序列(SEQ ID NO:265)具有至少75％、至少76％、至少77％、至少78％、至少79％、至少80％、至少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％序列同一性的核酸序列。在一些方面,所述免疫原性核酸质粒包含pGCMB75.6的序列(SEQ ID NO:265)。

[0093] 在一些方面,提供了免疫原性核酸质粒,其包含与pLacZMB75.6的序列(SEQ ID NO:268)具有至少84％序列同一性的核酸序列。在一些方面,所述免疫原性质粒包含与pLacZMB75.6的序列(SEQ ID NO:268)具有至少75％、至少76％、至少77％、至少78％、至少79％、至少80％、至少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少

96％、至少97％、至少98％或至少99％序列同一性的核酸序列，或由其组成。在一些方面，所述免疫原性核酸包含具有pLacZMB75.6的序列(SEQ ID NO:268)的质粒。

[0094] 在一些方面，提供了免疫原性核酸质粒，其包含与SEQ ID NO:266的序列具有至少80％序列同一性的核酸序列。在一些方面，所述免疫原性质粒包含与SEQ ID NO:266的序列具有至少75％、至少76％、至少77％、至少78％、至少79％、至少80％、至少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％序列同一性的核酸序列，或由其组成。在一些方面，所述免疫原性核酸质粒包含SEQ ID NO:266的序列。

[0095] 在一些方面，提供了免疫原性核酸质粒，其包含与pMB75.6_AscI的序列(SEQ ID NO:267)具有至少80％序列同一性的核酸序列。在一些方面，所述免疫原性质粒包含与SEQ ID NO:267的序列具有至少75％、至少76％、至少77％、至少78％、至少79％、至少80％、至少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％序列同一性的核酸序列，或由其组成。在一些方面，所述免疫原性核酸质粒包含SEQ ID NO:267的序列。

表1A:质粒序列

pGCMB75.6 (SEQ ID NO:265)	
tgaccgccca acgacccccg cccattgacg tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg	60
ccaataggga ctttccattg acgtcaatgg gtggagtatt tacggtaaac tgcccacttg	120
gcagtacatc aagtgtatca tatgccaagt ccgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa	180
tggcccgcct ggcattatgc ccagtacatg accttacggg actttcctac ttggcagtac	240
atctacgtat tagtcatcgc tattaccatg gtgatgcggt tttggcagta catcaatggg	300
cgtggatagc ggtttgactc acggggattt ccaagtctcc accccattga cgtcaatggg	360
agtttgtttt ggcaccaaaa tcaacgggac tttccaaaat gtcgtaacaa ctccgcccca	420
ttgacgcaaa tgggcggtag gcgtgtacgg tgggaggtct atataagcag agctcgttta	480
gtgaaccgtc agatcgcctg gagacgccat ccacgctgtt ttgacctcca tagaagacac	540
cgggaccgat ccagcctccc ctcgaagccg atctgataac ggtaccgata agctggcggc	600
cgattaagct acagaagttg gtcgtgaggc actgggcagg taagtatcaa ggttacaaga	660
caggtttaag gagaccaata gaaactgggc ttgtcgagac agagaagact cttgcgtttc	720
tgataggcac ctattggtct tactgacatc cactttgcct ttctctccac aggtgtccac	780
tcccaggttc aattacagct cttaagcagc cgcaagcttg atatcgaatt cctgcagccc	840
gggggatcca ctagttctag agcggccgcc accgcggtgg agctcgaatt atcagatcga	900
ttaataacta tgctcaaaaa ttgtgtacct ttagcttttt aatttgtaaa ggggttaata	960
aggaatattt gatgtatagt gccttgacta gagatcataa tcagccatac cacatttgta	1020
gaggttttac ttgctttaaa aaacctccca cacctccccc tgaacctgaa acataaaatg	1080
aatgcaattg ttgttgttaa cttgtttatt gcagcttata atggttacaa ataaagcaat	1140
agcatcacaa atttcacaaa taaagcattt ttttcactgc attctagttg tggtttgtcc	1200
aaactcatca atgtatctta tcatgtctgg atcatcagat ctgccggtct ccctatagtg	1260
agtcgtatta atttcgataa gccaggttaa cctgcattaa tgaatcggcc aacgcgcggg	1320

```
gagaggcggt ttgcgtattg ggcgctcttc cgcttcctcg ctcactgact cgctgcgctc  1380
ggtcgttcgg ctgcggcgag cggtatcagc tcactcaaag gcggtaatac ggttatccac  1440
agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa  1500
ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc cgccccctg acgagcatca  1560
caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg aaacccgaca ggactataaa gataccaggc  1620
gtttcccccct ggaagctccc tcgtgcgctc tcctgttccg accctgccgc ttaccggata  1680
cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct catagctcac gctgtaggta  1740
tctcagttcg gtgtaggtcg ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac cccccgttca  1800
gcccgaccgc tgcgccttat ccggtaacta tcgtcttgag tccaacccgg taagacacga  1860
cttatcgcca ctggcagcag ccactggtaa caggattagc agagcgaggt atgtaggcgg  1920
tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagaa cagtatttgg  1980
tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg  2040
caaacaaacc accgctggta gcggtggttt ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag  2100
aaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg gggtctgacg ctcagtggaa  2160
cgaaaactca cgttaaggga ttttggtcat gggcgcgcct aggcttttgc aaagatcgat  2220
caagagacag gatgaggatc gtttcgcagc ttttcattct gactgcaacg ggcaataagt  2280
ctctgtgtgg attaaaaaaa gagtgtctga tagcagcttc tgaactggtt acctgccgtg  2340
agtaaattaa aattttattg acttaggtca ctaaggcgcc ttgcgctgag gttgcgtcgt  2400
gatatcatca gggcagaccg gttacatccc cctaacaagc tgtataaaga gaaatactat  2460
ctcattggcg ttgcccgcac ctgacagtgc gacgttgggc tgcgtccgtc gaccaacggt  2520
accgaggtaa cagcccaatc tatccatgat ctcggccagg ccgggtcggc cgttatgcag  2580
cccggctcgg gtatgaagcc attaaggagc cgacccagcg cgaccgggcg gccggtcacg  2640
ctgcctctgc tgaagcctgc ctgtcactcc ctgcgcggcg tacccgccgt tctcatcgag  2700
taggctccgg atcgcgaccc cggacgggcc ctgggcccag gagcggccta tgacaaatgc  2760
cgggtagcga tccggcattc agcattgact gcgcacggat ccagtccttg caggagcctt  2820
atgccgaccg tagcaaaaaa tgagcccgag ccgatcgcga gttgtgatcc ggtcccgccg  2880
attgccggtc gcgatgacgg tcctgtgtaa gcgttatcgt taccaattgt ttaagaagta  2940
tatacgctac gaggtacttg ataacttctg cgtagcatac atgaggtttt gtataaaaat  3000
ggcgggcgat atcaacgcag tgtcagaaat ccgaaacagt ctgcgggact ctggggttcg  3060
aaatgaccga ccaagcgacg cccaacctgc catcacgaga tttcgattcc accgccgcct  3120
tctatgaaag gttgggcttc ggaatcgttt tccgggacgc cggctggatg atcctccagc  3180
gcggggatct catgctggag ttcttcgccc accctaggcg cgctcatgag cggatacata  3240
tttgaatgta tttagaaaaa taaacaaata ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagtg  3300
ccacctaaat tgtaagcgtt aatattttgt taaaattcgc gttaaatttt tgttaaatca  3360
gctcatttttt taaccaatag gccgaaatcg gcaaaatccc ttataaatca aaagaataga  3420
ccgagatagg gttgagtgtt gttccagttt ggaacaagag tccactatta aagaacgtgg  3480
actccaacgt caaagggcga aaaaccgtct atcagggcga tggcccacta cgtgaaccat  3540
caccctaatc aagttttttg gggtcgaggt gccgtaaagc actaaatcgg aaccctaaag  3600
```

ggagcccccg atttagagct tgacggggaa agccggcgaa cgtggcgaga aaggaaggga	3660
agaaagcgaa aggagcgggc gctagggcgc tggcaagtgt agcggtcacg ctgcgcgtaa	3720
ccaccacacc cgccgcgctt aatgcgccgc tacagggcgc gtcccattcg ccattcaggc	3780
tgcgcaactg ttgggaaggg cgatcggtgc gggcctcttc gctattacgc cagctggcga	3840
aaggggatg tgctgcaagg cgattaagtt gggtaacgcc agggttttcc cagtcacgac	3900
gttgtaaaac gacggccagt gagcgcgcgt aatacgactc actatagggc gaattgggta	3960
ccgggccccc cctcgagcag gatctataca ttgaatcaat attggcaatt agccatatta	4020
gtcattggtt atatagcata aatcaatatt ggctattggc cattgcatac gttgtatcta	4080
tatcataata tgtacattta tattggctca tgtccaatat gaccgccatg ttgacattga	4140
ttattgacta gttattaata gtaatcaatt acggggtcat tagttcatag cccatatatg	4200
gagttccgcg ttacataact tacggtaaat ggcccgcctg gc	4242

pMB75.6

(SEQ ID NO:266)

ctaaattgta agcgttaata ttttgttaaa attcgcgtta aatttttgtt aaatcagctc	60
atttttaac caataggccg aaatcggcaa aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga	120
gatagggttg agtgttgttc cagtttggaa caagagtcca ctattaaaga acgtggactc	180
caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc	240
ctaatcaagt tttttggggt cgaggtgccg taaagcacta aatcggaacc ctaaagggag	300
cccccgattt agagcttgac ggggaaagcc ggcgaacgtg gcgagaaagg aagggaagaa	360
agcgaaagga gcgggcgcta gggcgctggc aagtgtagcg gtcacgctgc gcgtaaccac	420
cacacccgcc gcgcttaatg cgccgctaca gggcgcgtcc cattcgccat tcaggctgcg	480
caactgttgg gaagggcgat cggtgcgggc ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg	540
gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt aacgccaggg ttttcccagt cacgacgttg	600
taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata cgactcacta tagggcgaat tgggtaccgg	660
gcccccccctc gagcaggatc tatacattga atcaatattg gcaattagcc atattagtca	720
ttggttatat agcataaatc aatattggct attggccatt gcatacgttg tatctatatc	780
ataatatgta catttatatt ggctcatgtc caatatgacc gccatgttga cattgattat	840
tgactagtta ttaatagtaa tcaattacgg ggtcattagt tcatagccca tatatggagt	900
tccgcgttac ataacttacg gtaaatggcc cgcctggctg accgcccaac gacccccgcc	960
cattgacgtc aataatgacg tatgttccca tagtaacgcc aatagggact ttccattgac	1020
gtcaatgggt ggagtattta cggtaaactg cccacttggc agtacatcaa gtgtatcata	1080
tgccaagtcc gccccctatt gacgtcaatg acggtaaatg gcccgcctgg cattatgccc	1140
agtacatgac cttacgggac tttcctactt ggcagtacat ctacgtatta gtcatcgcta	1200
ttaccatggt gatgcggttt tggcagtaca tcaatgggcg tggatagcgg tttgactcac	1260
ggggatttcc aagtctccac cccattgacg tcaatgggag tttgttttgg caccaaaatc	1320
aacgggactt tccaaaatgt cgtaacaact ccgccccatt gacgcaaatg ggcggtaggc	1380
gtgtacggtg ggaggtctat ataagcagag ctcgtttagt gaaccgtcag atcgcctgga	1440

```
gacgccatcc acgctgtttt gacctccata gaagacaccg ggaccgatcc agcctcccct    1500
cgaagccgat ctgataacgg taccgataag ctggcggccg attaagctac agaagttggt    1560
cgtgaggcac tgggcaggta agtatcaagg ttacaagaca ggtttaagga gaccaataga    1620
aactgggctt gtcgagacag agaagactct tgcgtttctg ataggcacct attggtctta    1680
ctgacatcca ctttgccttt ctctccacag gtgtccactc ccaggttcaa ttacagctct    1740
taagcagccg caagcttgat atcgaattcc tgcagcccgg gggatccact agttctagag    1800
cggccgccac cgcggtggag ctcgaattat cagatcgatt aataactatg ctcaaaaatt    1860
gtgtaccttt agctttttaa tttgtaaagg ggttaataag gaatatttga tgtatagtgc    1920
cttgactaga gatcataatc agccatacca catttgtaga ggttttactt gctttaaaaa    1980
acctcccaca cctcccccctg aacctgaaac ataaaatgaa tgcaattgtt gttgttaact    2040
tgtttattgc agcttataat ggttacaaat aaagcaatag catcacaaat ttcacaaata    2100
aagcattttt ttcactgcat tctagttgtg gtttgtccaa actcatcaat gtatcttatc    2160
atgtctggat catcagatct gccggtctcc ctatagtgag tcgtattaat ttcgataagc    2220
caggttaacc tgcattaatg aatcggccaa cgcgcgggga gaggcggttt gcgtattggg    2280
cgctcttccg cttcctcgct cactgactcg ctgcgctcgg tcgttcggct gcggcgagcg    2340
gtatcagctc actcaaaggc ggtaatacgg ttatccacag aatcagggga taacgcagga    2400
aagaacatgt gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg    2460
gcgtttttcc ataggctccg cccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag    2520
aggtggcgaa acccgacagg actataaaga taccaggcgt ttcccccctgg aagctccctc    2580
gtgcgctctc ctgttccgac cctgccgctt accggatacc tgtccgcctt tctcccttcg    2640
ggaagcgtgg cgctttctca tagctcacgc tgtaggtatc tcagttcggt gtaggtcgtt    2700
cgctccaagc tgggctgtgt gcacgaaccc cccgttcagc ccgaccgctg cgccttatcc    2760
ggtaactatc gtcttgagtc caacccggta agacacgact tatcgccact ggcagcagcc    2820
actggtaaca ggattagcag agcgaggtat gtaggcggtg ctacagagtt cttgaagtgg    2880
tggcctaact acggctacac tagaagaaca gtatttggta tctgcgctct gctgaagcca    2940
gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc    3000
ggtggttttt ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat    3060
cctttgatct tttctacggg gtctgacgct cagtggaacg aaaactcacg ttaagggatt    3120
ttggtcatga gcgcgcctag gcttttgcaa agatcgatca agagacagga tgaggatcgt    3180
ttcgcatgat tgaacaagat ggattgcacg caggttctcc ggccgcttgg gtggagaggc    3240
tattcggcta tgactgggca caacagacaa tcggctgctc tgatgccgcc gtgttccggc    3300
tgtcagcgca ggggcgcccg gttcttttttg tcaagaccga cctgtccggt gccctgaatg    3360
aactgcaaga cgaggcagcg cggctatcgt ggctggccac gacgggcgtt ccttgcgcag    3420
ctgtgctcga cgttgtcact gaagcgggaa gggactggct gctattgggc gaagtgccgg    3480
ggcaggatct cctgtcatct caccttgctc ctgccgagaa agtatccatc atggctgatg    3540
caatgcggcg gctgcatacg cttgatccgg ctacctgccc attcgaccac caagcgaaac    3600
atcgcatcga gcgagcacgt actcggatgg aagccggtct tgtcgatcag gatgatctgg    3660
acgaagagca tcaggggctc gcgccagccg aactgttcgc caggctcaag gcgagcatgc    3720
```

ccgacggcga ggatctcgtc gtgacccatg gcgatgcctg cttgccgaat atcatggtgg	3780
aaaatggccg cttttctgga ttcatcgact gtggccggct gggtgtggcg gaccgctatc	3840
aggacatagc gttggctacc cgtgatattg ctgaagagct tggcggcgaa tgggctgacc	3900
gcttcctcgt gctttacggt atcgccgctc ccgattcgca gcgcatcgcc ttctatcgcc	3960
ttcttgacga gttcttctga gcgggactct ggggttcgaa atgaccgacc aagcgacgcc	4020
caacctgcca tcacgagatt tcgattccac cgccgccttc tatgaaaggt tgggcttcgg	4080
aatcgttttc cgggacgccg gctggatgat cctccagcgc ggggatctca tgctggagtt	4140
cttcgcccac cctaggcgcg ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata	4200
aacaaatagg ggttccgcgc acatttcccc gaaaagtgcc ac	4242

pMB75.6_AscI

(SEQ ID NO:267)

tgaccgccca acgacccccg cccattgacg tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg	60
ccaataggga ctttccattg acgtcaatgg gtggagtatt tacggtaaac tgcccacttg	120
gcagtacatc aagtgtatca tatgccaagt ccgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa	180
tggcccgcct ggcattatgc ccagtacatg accttacggg actttcctac ttggcagtac	240
atctacgtat tagtcatcgc tattaccatg gtgatgcggt tttggcagta catcaatggg	300
cgtggatagc ggtttgactc acggggattt ccaagtctcc accccattga cgtcaatggg	360
agtttgtttt ggcaccaaaa tcaacgggac tttccaaaat gtcgtaacaa ctccgcccca	420
ttgacgcaaa tgggcggtag gcgtgtacgg tgggaggtct atataagcag agctcgttta	480
gtgaaccgtc agatcgcctg gagacgccat ccacgctgtt ttgacctcca tagaagacac	540
cgggaccgat ccagcctccc ctcgaagccg atctgataac ggtaccgata agctggcggc	600
cgattaagct acagaagttg gtcgtgaggc actgggcagg taagtatcaa ggttacaaga	660
caggtttaag gagaccaata gaaactgggc ttgtcgagac agagaagact cttgcgtttc	720
tgataggcac ctattggtct tactgacatc cactttgcct ttctctccac aggtgtccac	780
tcccaggttc aattacagct cttaagcagc cgcaagcttg atatcgaatt cctgcagccc	840
gggggatcca ctagttctag agcggccgcc accgcggtgg agctcgaatt atcagatcga	900
ttaataacta tgctcaaaaa ttgtgtacct ttagcttttt aatttgtaaa ggggttaata	960
aggaatattt gatgtatagt gccttgacta gagatcataa tcagccatac cacatttgta	1020
gaggttttac ttgctttaaa aaacctccca cacctccccc tgaacctgaa acataaaatg	1080
aatgcaattg ttgttgttaa cttgtttatt gcagcttata atggttacaa ataaagcaat	1140
agcatcacaa atttcacaaa taaagcattt ttttcactgc attctagttg tggtttgtcc	1200
aaactcatca atgtatctta tcatgtctgg atcatcagat ctgccggtct ccctatagtg	1260
agtcgtatta atttcgataa gccaggttaa cctgcattaa tgaatcggcc aacgcgcggg	1320
gagaggcggt ttgcgtattg ggcgctcttc cgcttcctcg ctcactgact cgctgcgctc	1380
ggtcgttcgg ctgcggcgag cggtatcagc tcactcaaag gcggtaatac ggttatccac	1440
agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa	1500
ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc cgccccctg acgagcatca	1560

caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg aaacccgaca ggactataaa gataccaggc 1620
gtttcccccc ggaagctccc tcgtgcgctc tcctgttccg accctgccgc ttaccggata 1680
cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct catagctcac gctgtaggta 1740
tctcagttcg gtgtaggtcg ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac cccccgttca 1800
gcccgaccgc tgcgccttat ccggtaacta tcgtcttgag tccaacccgg taagacacga 1860
cttatcgcca ctggcagcag ccactggtaa caggattagc agagcgaggt atgtaggcgg 1920
tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagaa cagtatttgg 1980
tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg 2040
caaacaaacc accgctggta gcggtggttt ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag 2100
aaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg gggtctgacg ctcagtggaa 2160
cgaaaactca cgttaaggga ttttggtcat gggcgcgcct aggcttttgc aaagatcgat 2220
caagagacag gatgaggatc gtttcgcatg attgaacaag atggattgca cgcaggttct 2280
ccggccgctt gggtggagag gctattcggc tatgactggg cacaacagac aatcggctgc 2340
tctgatgccg ccgtgttccg gctgtcagcg caggggcgcc cggttctttt tgtcaagacc 2400
gacctgtccg gtgccctgaa tgaactgcaa gacgaggcag cgcggctatc gtggctggcc 2460
acgacgggcg ttccttgcgc agctgtgctc gacgttgtca ctgaagcggg aagggactgg 2520
ctgctattgg gcgaagtgcc ggggcaggat ctcctgtcat ctcaccttgc tcctgccgag 2580
aaagtatcca tcatggctga tgcaatgcgg cggctgcata cgcttgatcc ggctacctgc 2640
ccattcgacc accaagcgaa acatcgcatc gagcgagcac gtactcggat ggaagccggt 2700
cttgtcgatc aggatgatct ggacgaagag catcaggggc tcgcgccagc cgaactgttc 2760
gccaggctca aggcgagcat gcccgacggc gaggatctcg tcgtgaccca tggcgatgcc 2820
tgcttgccga atatcatggt ggaaaatggc cgcttttctg gattcatcga ctgtggccgg 2880
ctgggtgtgg cggaccgcta tcaggacata gcgttggcta cccgtgatat tgctgaagag 2940
cttggcggcg aatgggctga ccgcttcctc gtgctttacg gtatcgccgc tcccgattcg 3000
cagcgcatcg ccttctatcg ccttcttgac gagttcttct gagcgggact ctggggttcg 3060
aaatgaccga ccaagcgacg cccaacctgc catcacgaga tttcgattcc accgccgcct 3120
tctatgaaag gttgggcttc ggaatcgttt tccgggacgc cggctggatg atcctccagc 3180
gcggggatct catgctggag ttcttcgccc accctaggcg cgctcatgag cggatacata 3240
tttgaatgta tttagaaaaa taaacaaata ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagtg 3300
ccacctaaat tgtaagcgtt aatattttgt taaaattcgc gttaaatttt tgttaaatca 3360
gctcattttt taaccaatag gccgaaatcg gcaaaatccc ttataaatca aaagaataga 3420
ccgagatagg gttgagtgtt gttccagttt ggaacaagag tccactatta aagaacgtgg 3480
actccaacgt caaagggcga aaaaccgtct atcagggcga tggcccacta cgtgaaccat 3540
caccctaatc aagtttttg gggtcgaggt gccgtaaagc actaaatcgg aaccctaaag 3600
ggagcccccg atttagagct tgacggggaa agccggcgaa cgtggcgaga aaggaaggga 3660
agaaagcgaa aggagcgggc gctagggcgc tggcaagtgt agcggtcacg ctgcgcgtaa 3720
ccaccacacc cgccgcgctt aatgcgccgc tacagggcgc gtcccattcg ccattcaggc 3780
tgcgcaactg ttgggaaggg cgatcggtgc gggcctcttc gctattacgc cagctggcga 3840

aaggggatg tgctgcaagg cgattaagtt gggtaacgcc agggttttcc cagtcacgac	3900
gttgtaaaac gacggccagt gagcgcgcgt aatacgactc actatagggc gaattgggta	3960
ccgggccccc cctcgagcag gatctataca ttgaatcaat attggcaatt agccatatta	4020
gtcattggtt atatagcata aatcaatatt ggctattggc cattgcatac gttgtatcta	4080
tatcataata tgtacattta tattggctca tgtccaatat gaccgccatg ttgacattga	4140
ttattgacta gttattaata gtaatcaatt acggggtcat tagttcatag cccatatatg	4200
gagttccgcg ttacataact tacggtaaat ggcccgcctg gc	4242
pLacZMB75.6 (SEQ ID NO:268)	
tgaccgccca acgacccccg cccattgacg tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg	60
ccaataggga ctttccattg acgtcaatgg gtggagtatt tacggtaaac tgcccacttg	120
gcagtacatc aagtgtatca tatgccaagt ccgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa	180
tggcccgcct ggcattatgc ccagtacatg accttacggg actttcctac ttggcagtac	240
atctacgtat tagtcatcgc tattaccatg gtgatgcggt tttggcagta catcaatggg	300
cgtggatagc ggtttgactc acggggattt ccaagtctcc accccattga cgtcaatggg	360
agtttgtttt ggcaccaaaa tcaacgggac tttccaaaat gtcgtaacaa ctccgcccca	420
ttgacgcaaa tgggcggtag gcgtgtacgg tgggaggtct atataagcag agctcgttta	480
gtgaaccgtc agatcgcctg gagacgccat ccacgctgtt ttgacctcca tagaagacac	540
cgggaccgat ccagcctccc ctcgaagccg atctgataac ggtaccgata agctggcggc	600
cgattaagct acagaagttg gtcgtgaggc actgggcagg taagtatcaa ggttacaaga	660
caggtttaag gagaccaata gaaactgggc ttgtcgagac agagaagact cttgcgtttc	720
tgataggcac ctattggtct tactgacatc cactttgcct ttctctccac aggtgtccac	780
tcccaggttc aattacagct cttaagcagc cgccaaaaca aaattcctca aaaatcatca	840
tcgaatgaat ggtgaaataa tttccctgaa taactgtagt gttttcaggg cgcggcataa	900
taattaacta tgctcaaaaa ttgtgtacct ttagcttttt aatttgtaaa ggggttaata	960
aggaatattt gatgtatagt gccttgacta gagatcataa tcagccatac cacatttgta	1020
gaggttttac ttgctttaaa aaacctccca cacctccccc tgaacctgaa acataaaatg	1080
aatgcaattg ttgttgttaa cttgtttatt gcagcttata atggttacaa ataaagcaat	1140
agcatcacaa atttcacaaa taaagcattt ttttcactgc attctagttg tggtttgtcc	1200
aaactcatca atgtatctta tcatgtctgg atcatcagat ctgccggtct ccctatagtg	1260
agtcgtatta atttcgataa gccaggttaa cctgcattaa tgaatcggcc aacgcgcggg	1320
gagaggcggt ttgcgtattg ggcgctcttc cgcttcctcg ctcactgact cgctgcgctc	1380
ggtcgttcgg ctgcggcgag cggtatcagc tcactcaaag gcggtaatac ggttatccac	1440
agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa	1500
ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc cgccccccctg acgagcatca	1560
caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg aaacccgaca ggactataaa gataccaggc	1620
gtttccccct ggaagctccc tcgtgcgctc tcctgttccg accctgccgc ttaccggata	1680

```
cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct catagctcac gctgtaggta     1740
tctcagttcg gtgtaggtcg ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac cccccgttca     1800
gcccgaccgc tgcgccttat ccggtaacta tcgtcttgag tccaacccgg taagacacga     1860
cttatcgcca ctggcagcag ccactggtaa caggattagc agagcgaggt atgtaggcgg     1920
tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagaa cagtatttgg     1980
tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg     2040
caaacaaacc accgctggta gcggtggttt ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag     2100
aaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg gggtctgacg ctcagtggaa     2160
cgaaaactca cgttaaggga ttttggtcat gggcgcgcct aggcttttgc aaagatcgat     2220
caagagacag gatgaggatc gtttcgcagc ttttcattct gactgcaacg ggcaataagt     2280
ctctgtgtgg attaaaaaaa gagtgtctga tagcagcttc tgaactggtt acctgccgtg     2340
agtaaattaa aattttattg acttaggtca ctaaggcgcc ttgcgctgag gttgcgtcgt     2400
gatatcatca gggcagaccg gttacatccc cctaacaagc tgtataaaga gaaatactat     2460
ctcattggcg ttgcccgcac ctgacagtgc gacgttgggc tgcgtccgtc gaccaacggt     2520
accgaggtaa cagcccaatc tatccatgat ctcggccagg ccgggtcggc cgttatgcag     2580
cccggctcgg gtatgaagcc attaaggagc cgacccagcg cgaccgggcg gccggtcacg     2640
ctgcctctgc tgaagcctgc ctgtcactcc ctgcgcggcg tacccgccgt tctcatcgag     2700
taggctccgg atcgcgaccc cggacgggcc ctgggcccag gagcggccta tgacaaatgc     2760
cgggtagcga tccggcattc agcattgact gcgcacggat ccagtccttg caggagcctt     2820
atgccgaccg tagcaaaaaa tgagcccgag ccgatcgcga gttgtgatcc ggtcccgccg     2880
attgccggtc gcgatgacgg tcctgtgtaa gcgttatcgt taccaattgt ttaagaagta     2940
tatacgctac gaggtacttg ataacttctg cgtagcatac atgaggtttt gtataaaaat     3000
ggcgggcgat atcaacgcag tgtcagaaat ccgaaacagt ctgcgggact ctggggttcg     3060
aaatgaccga ccaagcgacg cccaacctgc catcacgaga tttcgattcc accgccgcct     3120
tctatgaaag gttgggcttc ggaatcgttt tccgggacgc cggctggatg atcctccagc     3180
gcggggatct catgctggag ttcttcgccc accctaggcg cgctcatgag cggatacata     3240
tttgaatgta tttagaaaaa taaacaaata ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagtg     3300
ccacctaaat tgtaagcgtt aatattttgt taaaattcgc gttaaatttt tgttaaatca     3360
gctcatttttt taaccaatag gccgaaatcg gcaaaatccc ttataaatca aaagaataga     3420
ccgagatagg gttgagtgtt gttccagttt ggaacaagag tccactatta aagaacgtgg     3480
actccaacgt caaagggcga aaaaccgtct atcagggcga tggcccacta cgtgaaccat     3540
caccctaatc aagttttttg gggtcgaggt gccgtaaagc actaaatcgg aaccctaaag     3600
ggagcccccg atttagagct tgacggggaa agccggcgaa cgtggcgaga aaggaaggga     3660
agaaagcgaa aggagcgggc gctagggcgc tggcaagtgt agcggtcacg ctgcgcgtaa     3720
ccaccacacc cgccgcgctt aatgcgccgc tacagggcgc gtcccattcg ccattcaggc     3780
tgcgcaactg ttgggaaggg cgatcggtgc gggcctcttc gctattacgc cagctggcga     3840
aaggggatg tgctgcaagg cgattaagtt gggtaacgcc agggttttcc cagtcacgac     3900
gttgtaaaac gacggccagt gagcgcgcgt aatacgactc actatagggc gaattgggta     3960
ccgggccccc cctcgaggtc gacggtatcg ataagcttga tatcgaattc ctgcagcccg     4020
ggggatccac tagttctaga gcggccgcca ccgcggtgga gctccagctt ttgttccctt     4080
tagtgagggt taattgcgcg cttggcgtaa tcatggtcat agctgtttcc tgtgtgaaat     4140
tgttatccgc tcacaattcc acacaacata cgagccggaa gcataaagtg taaagcctgg     4200
ggtgcctaat gagtgagcta actcacatta attgcgttgc gc                       4242
```

[0096] 本文进一步提供了能够刺激免疫应答的免疫原性核酸或免疫原性质粒,其包括在高严格条件下与SEQ ID NO:265、SEQ ID NO:266、SEQ ID NO:267或SEQ ID NO:268杂交的核酸序列。合适的核酸序列包括与本文所述的核酸同源、基本上类似或相同的那些。在一些方面,同源的核酸序列将与SEQ ID NO:265或相应的互补序列具有至少约75%、76%、77%、

78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的百分比同一性。在其他方面,同源的核酸序列将与SEQ ID NO:268或相应的互补序列具有至少约75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列相似性。在其他方面,同源的核酸序列将与SEQ ID NO:266或相应的互补序列具有至少约75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列相似性。在其他方面,同源的核酸序列将与SEQ ID NO:267或相应的互补序列具有至少约75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列相似性。可以使用本领域中已知的许多算法,诸如Altschul,S.F.,等人,J.Mol.Biol.215:403-10,1990中描述的BLAST,计算序列相似性。所述核酸可以由于遗传密码的简并性而与上述核酸序列不同。通常,参考序列将为18个核苷酸,更通常为30或更多个核苷酸,并且可以包含组合物的整个核酸序列用于比较目的。

[0097] 本文考虑可以与SEQ ID NO:265、SEQ ID NO:266、SEQ ID NO:267或SEQ ID NO:268杂交的核酸。严格杂交条件包括诸如以下的条件:在50℃或更高和0.1X SSC(15mM氯化钠/1.5mM柠檬酸钠)下的杂交。另一个实例是在42℃下在50%甲酰胺、5X SSC(150mM NaCl,15mM柠檬酸三钠)、50mM磷酸钠(pH 7.6)、5X Denhardt氏溶液、10%硫酸葡聚糖和20μg/ml变性、剪切的鲑鱼精DNA的溶液中孵育过夜,随后在约65℃下在0.1XSSC中洗涤。示例性严格杂交条件是严格性为上述特定条件的至少约80%、85%、90%或95%的杂交条件。其他严格杂交条件是本领域中已知的,并且也可以用于鉴定本公开的核酸的同源物(Current Protocols in Molecular Biology,Unit 6,pub.John Wiley&Sons,N.Y.1989)。

[0098] 应当理解的是,可以在特定程度上改变免疫原性核酸质粒的核苷酸序列,而不显著不利影响其免疫原性特性。这种变体核酸质粒分子的核酸序列通常将相差一个或多个核苷酸。序列变化可以是取代、插入、缺失或其组合。用于诱变克隆的基因的技术是本领域中已知的。用于位点特异性诱变的方法可见于Gustin等人,Biotechniques 14:22,1993;Barany,Gene 37:111-23,1985;Colicelli等人,Mol.Gen.Genet.199:537-9,1985;和Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,CSH Press 1989,pp.15.3-15.108并且全部通过引用并入本文。总之,本发明涉及能够刺激受试者中的先天性免疫应答的核酸质粒分子及其变体或突变体。此外,本发明涵盖由所述核酸编码的中间RNA,以及由本文所述的核酸质粒编码的任何所得的氨基酸序列。

[0099] 在一些方面,在免疫原性核酸质粒的核苷酸序列不同于SEQ ID NO:265、266、267或268中提供的序列的情况下,免疫原性核酸质粒中的CpG二核苷酸优选保持完整。或者,如果改变免疫原性质粒的核苷酸序列、使得消除CpG二核苷酸,可以在另一位置改变免疫原性核酸质粒的序列,使得核酸质粒中的CpG二核苷酸的总数保持相同。还可以引入除了已经存在于免疫原性核酸质粒中的那些以外的另外的CpG二核苷酸。因此,例如,本文所述的免疫原性核酸质粒包含至少约200、至少约220、至少约240、至少约260、至少约270、至少约275、至少约280、至少约283、至少约285或至少约288个CpG二核苷酸。在一些实施方案中,所述免疫原性核酸质粒可以包含283个CpG二核苷酸。在一些实施方案中,除了pGCMB75.6或

pLacZMB75.6的核苷酸序列中已经存在的那些以外的CpG二核苷酸被引入质粒中。

[0100] 在一些方面,在免疫原性核酸质粒的核苷酸序列不同于本文提供的序列的情况下,改变免疫原性核酸中的CpG基序类型以调节所得的胞质核酸监视分子(即,TLR21和/或TLR9)的活化。例如,可以增加免疫刺激性CpG基序的数目以增强至少一种胞质核酸监视分子响应于免疫原性核酸质粒的活化。或者,可以增加非免疫刺激性CpG基序的数目,以减少至少一种胞质核酸监视分子的活化。在一些方面,可以修改刺激性和非刺激性CpG基序的数目以增强至少一种胞质核酸监视分子的活化,以及减少至少一种胞质核酸监视分子的活化。

[0101] 合适的免疫原性核酸质粒分子包括本文所述的免疫原性编码和非编码核酸中的任一种。编码核酸序列编码蛋白或肽的至少一部分,而非编码序列不编码蛋白或肽的任何部分。根据本发明,“非编码”核酸可以包括转录单位的调节区,诸如启动子区。术语“空载体”可以与术语“非编码”可互换使用,并且尤其是指不存在蛋白编码部分的核酸序列,例如不具有基因插入物的质粒载体。诱导免疫应答不需要表达由本文描述的核酸质粒编码的蛋白;因此,质粒不需要含有与转录控制序列可操作连接的任何编码序列。然而,通过在免疫调节性组合物中包括至少一种编码免疫原和/或细胞因子的核酸序列(DNA或RNA),可以获得进一步的优点(即,抗原特异性和增强的免疫力)。这种编码免疫原和/或细胞因子的核酸序列可以包含在本文所述的免疫原性核酸质粒中,或者可以包含在组合物中的分开的核酸(例如分开的质粒)中。

[0102] 在本文所述的免疫调节性组合物的一些实施方案中,所述免疫调节性组合物包含脂质体递送媒介物和至少一种本文所述的免疫原性核酸质粒。合适的免疫调节性组合物描述于美国专利申请公开号2012/0064151A1和2013/0295167A1,两者的内容通过引用以其整体并入本文。

[0103] 合适的脂质体递送媒介物包含能够将核酸分子递送至治疗受试者的组织的脂质组合物。在一些实施方案中,脂质体递送媒介物可能能够在受试者中保持稳定足够长的时间以递送核酸分子和/或生物剂。例如,所述脂质体递送媒介物在受体受试者中稳定至少约五分钟,至少约1小时或至少约24小时。

[0104] 如本文所述的脂质体递送媒介物包含脂质组合物,其能够与细胞的质膜融合以将核酸分子递送至细胞中。在一些方面,当核酸分子编码一种或多种蛋白时,核酸:脂质体复合物具有至少约1皮克(pg)表达的蛋白/毫克(mg)总组织蛋白/微克(μg)递送的核酸的转染效率。例如,核酸:脂质体复合物的转染效率可以是至少约10pg表达的蛋白/mg总组织蛋白/μg递送的核酸;或至少约50pg表达的蛋白/mg总组织蛋白/μg递送的核酸。该复合物的转染效率可以低至1飞克(fg)表达的蛋白/mg总组织蛋白/μg递送的核酸,其中上述量是更优选的。

[0105] 在一些实施方案中,本发明的脂质体递送媒介物直径为约100至500纳米(nm)。例如,所述脂质体递送媒介物的直径可以为约150至450nm或约200至400nm。

[0106] 合适的脂质体包括任何脂质体,诸如通常用于例如本领域技术人员已知的基因递送方法中的那些。在一些实施方案中,脂质体递送媒介物包含多层囊泡(MLV)脂质、挤出脂质或两者。在一些方面,所述脂质体递送媒介物是阳离子的。用于制备MLV的方法是本领域中众所周知的。在一些方面,脂质体递送媒介物包括具有聚阳离子脂质组成的脂质体(即,

阳离子脂质体)和/或具有与聚乙二醇缀合的胆固醇骨架的脂质体。示例性阳离子脂质体组合物包括,但不限于,N-[1-(2,3-二油烯基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)和胆固醇,N-[1-(2,3-二油酰基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTAP)和胆固醇,1-[2-(油酰基氧基)乙基]-2-油烯基-3-(2-羟基乙基)咪唑啉鎓氯化物(DOTIM)和胆固醇,以及二甲基双十八烷基溴化铵(DDAB)和胆固醇,及其组合。在一些方面,所述脂质体递送媒介物包含选自以下的脂质对:N-[1-(2,3-二油烯基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)和胆固醇;N-[1-(2,3-二油酰基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTAP)和胆固醇;1-[2-(油酰基氧基)乙基]-2-油烯基-3-(2-羟基乙基)咪唑啉鎓氯化物(DOTIM)和胆固醇;以及二甲基双十八烷基溴化铵(DDAB)和胆固醇。在一些方面,用作递送媒介物的脂质体组合物包括DOTIM和胆固醇。

[0107] 脂质体与本文所述的免疫原性核酸质粒的复合可以使用本领域标准的方法或如美国专利号6,693,086(其内容通过引用以其整体并入本文)中所述的方法实现。添加至脂质体中的核酸质粒的合适浓度包括对于将足够量的免疫原性核酸质粒递送至受试者中、使得引发全身免疫应答有效的浓度。例如,约0.1μg至约10μg的免疫原性核酸质粒可以与约8nmol脂质体组合,约0.5μg至约5μg的免疫原性核酸质粒可以与约8nmol脂质体组合,或约1.0μg免疫原性核酸质粒可以与约8nmol脂质体组合。组合物中免疫原性核酸质粒与脂质的比率(μg免疫原性核酸质粒:nmol脂质)可以是以重量计至少约1:1免疫原性核酸质粒:脂质(例如,1μg免疫原性核酸质粒:1nmol脂质)。例如,免疫原性核酸质粒与脂质的比率可以是至少约1:5,至少约1:10或至少约1:20。本文表示的比率基于组合物中脂质的量,而不是基于组合物中脂质的总量。在本发明的组合物中的免疫原性核酸质粒与脂质的比率合适地是约1:1至约1:80免疫原性核酸质粒:脂质(以重量计);约1:2至约1:40免疫原性核酸质粒:脂质(以重量计);约1:3至约1:30免疫原性核酸质粒:脂质(以重量计);或约1:6至约1:15免疫原性核酸质粒:脂质(以重量计)。

[0108] 免疫调节性组合物的浓度,如果升高至高于阈值,则可以是细胞毒性的。由于该原因,如本公开中所预期的免疫调节性组合物的浓度是无细胞毒性的,即,在低于该阈值的水平。如本文所用的“细胞毒性”是指异常的细胞状态,诸如不能旺盛生长,生长迟缓,显微外观不规则和/或免疫应答性下降。在一些方面,所述免疫调节性组合物的浓度为约0.1至约250ng/ml。在一些方面,所述浓度为约0.1至约200ng/ml。在一些方面,所述免疫调节性组合物的浓度为约0.1至约150ng/ml。在其他方面,所述免疫调节性组合物的浓度为约0.1至约100ng/ml。在还有其他方面,所述免疫调节性复合物的浓度为约0.1至约50ng/ml。在其他方面,所述免疫调节性组合物的浓度为约1至约250ng/ml。在一些方面,所述免疫调节性组合物的浓度为约10至约250ng/ml。在一些方面,所述免疫调节性组合物的浓度为约50至约250ng/ml。在一些方面,所述免疫调节性组合物的浓度为约100至约250ng/ml。在一些方面,所述免疫调节性组合物的浓度为约150至约250ng/ml。在还有其他方面,所述免疫调节性组合物的浓度为约200至约250ng/ml。在一些实施方案中,所述免疫调节性组合物的浓度为约或小于120ng/ml。在一些方面,所述免疫调节性组合物的浓度是无细胞毒性的。

[0109] 本文进一步提供了包含如上所述的免疫刺激性组合物和药学上可接受的载体的药物组合物。免疫调节性组合物可以在免疫刺激性寡核苷酸之前、同时或之后施用。用于单个免疫调节性组合物和免疫刺激性寡核苷酸的药物载体可以是但不必是相同的载体。药学

上可接受的载体使组合物适应通过选自以下的途径施用:静脉内、肌肉内、乳房内、皮内、腹膜内、皮下、通过喷雾、通过气溶胶、卵内(in ovo)、粘膜、经皮、通过浸入、口服、眼内、气管内、鼻内、肺、直肠或本领域技术人员已知的其他方式。一种或多种药学上可接受的载体可以是与免疫刺激性组合物或免疫刺激性组合物和免疫刺激性寡核苷酸一起施用的稀释剂、佐剂、赋形剂或媒介物。此类媒介物可以是液体,诸如水和油,包括石油、动物、植物或合成起源的那些,诸如花生油、大豆油、矿物油,芝麻油等。例如,可以使用0.4%盐水和0.3%甘氨酸。这些溶液是无菌的,且通常不含颗粒物质。它们可以通过常规的众所周知的灭菌技术(例如,过滤)进行灭菌。所述组合物可含有近似生理条件所需的药学上可接受的辅助物质,诸如pH调节和缓冲剂、稳定剂、增稠剂、润滑剂和着色剂等。在这种药物制剂中本发明的分子的浓度可以宽泛地变化,即按重量计从小于约0.5%,通常至至少约1%至高达15或20%,并且将主要基于需要的剂量、流体体积、粘度等根据所选的特定施用方式进行选择。包括其他人蛋白、例如人血清清蛋白的合适的媒介物和制剂,例如描述于例如Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第21版,Troy,D.B.编,Lipincott Williams and Wilkins,Philadelphia,PA2006,第5部分,Pharmaceutical Manufacturing第691-1092页,(尤其参见第958-989页)。

[0110] 本文还提供了用于制备上述免疫刺激性组合物的方法,其包括:组合所述免疫调节剂组合物和所述免疫刺激性寡核苷酸以形成免疫刺激性组合物;将所述免疫刺激性组合物离心以生成上清液和沉淀;和分离所述沉淀。

[0111] 离心免疫刺激性组合物将引起免疫刺激性组合物的沉降。可以通过倒出上清液、吸出上清液或通过其他方式除去上清液来实现沉淀的分离,只要保留一部分沉淀即可。还预期在除去上清液期间将损失一些沉淀。同样,甚至在离心后,一些免疫刺激性组合物也可能保留在上清液中。在这种情况下,上清液可以保留免疫刺激性特性。如果由于免疫刺激性组合物的存在而在上清液中保留免疫刺激活性,但期望沉淀中具有几乎所有免疫刺激性组合物,则应当使用更高的离心速度。例如,如果在以8,000rpm离心后上清液含有免疫刺激性组合物,则将离心增加至14,000rpm可能会使剩余的免疫刺激性组合物降低。

[0112] 本文还提供了用于刺激toll-样受体21(TLR21)的方法,其包括施用免疫刺激性寡核苷酸和免疫调节剂组合物,其中所述免疫刺激性寡核苷酸包含至少一个CpG基序和所述免疫刺激性寡核苷酸的5'末端处或附近的鸟嘌呤核苷酸富集的序列,且其中所述免疫调节剂组合物包含非编码核酸质粒和阳离子脂质递送媒介物。

[0113] 所述免疫刺激性寡核苷酸和所述免疫调节剂组合物可以通过选自以下的途径进行施用:静脉内,肌肉内,乳房内,真皮内,腹膜内,皮下,通过喷雾,通过气溶胶,卵内,粘膜,经皮,通过浸入,口服,眼内,气管内,鼻内,肺,直肠或本领域技术人员已知的其他方式。在一些方面,所述免疫调节剂组合物和所述免疫刺激性寡核苷酸以协同有效量存在。所述免疫刺激性组合物和所述免疫调节剂组合物的施用可以是依次的或同时的。

[0114] 当高于250μg/ml时,所述免疫调节剂组合物的浓度可以是细胞毒性的,并且这种细胞毒性可以远远抵消该免疫调节剂的任何免疫刺激作用。在本公开的一些方面,所述免疫调节剂的浓度为约200μg/ml。在施用所述免疫刺激性寡核苷酸的情况下,在10μM范围或以下未观察到细胞毒性水平。接受者可以耐受甚至更高浓度的免疫刺激性寡核苷酸。在本公开的一些方面,所述免疫刺激性寡核苷酸的浓度为约10μM至0.5μM。在一些方面,所述免

疫刺激性寡核苷酸的浓度为约2μM,并且在一些方面,所述免疫调节剂组合物的浓度大于所述免疫刺激性寡核苷酸的浓度。因为细胞毒性是施用所述免疫调节剂组合物的限制因素,所以在一些方面,所述免疫调节剂组合物以无细胞毒性量存在。

[0115] 在本文呈现的方法的每个方面,所述免疫调节剂组合物和所述免疫刺激性寡核苷酸可以是如上所述的任何实施方案或方面。

[0116] 还提供了用于引发受试者中的免疫应答的方法,其包括施用本文所述的免疫刺激性组合物的任何实施方案。本公开中包括的任何实施方案包括用于引发受试者中的免疫应答的方法,其包括施用本文所述的免疫刺激性寡核苷酸和免疫调节剂组合物。

具体实施方式

本申请还涉及以下实施方案:

1.免疫刺激性组合物,其包含:

a)包含核酸质粒和脂质体递送媒介物的免疫调节剂组合物;以及

b)免疫刺激性寡核苷酸,其具有至少一个CpG基序和所述免疫刺激性寡核苷酸的5'末端处或附近的鸟嘌呤核苷酸富集的序列。

2.实施方案1的免疫刺激性组合物,其中所述免疫调节剂组合物和所述免疫刺激性寡核苷酸以协同有效量存在。

3.实施方案1或2的免疫刺激性组合物,其中所述免疫刺激性寡核苷酸包含胞质核酸监视分子的配体。

4.实施方案3的免疫刺激性组合物,其中免疫胞质核酸监视分子是toll-样受体(TLR)。

5.实施方案3或4的免疫刺激性组合物,其中所述胞质核酸监视分子是TLR21。

6.前述实施方案中任一项的免疫刺激性组合物,其中所述免疫调节剂组合物的核酸质粒浓度大于所述免疫刺激性寡核苷酸的浓度。

7.前述实施方案中任一项的免疫刺激性组合物,其进一步包含药物载体。

8.前述实施方案中任一项的免疫刺激性组合物,其中所述脂质体递送媒介物包含多层囊泡脂质、挤出脂质或两者。

9.前述实施方案中任一项的免疫刺激性组合物,其中所述脂质体递送媒介物是阳离子的。

10.实施方案8的免疫刺激性组合物,其中阳离子脂质体递送媒介物包含选自以下的脂质对:N-[1-(2,3-二油烯基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)和胆固醇;N-[1-(2,3-二油酰基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTAP)和胆固醇;1-[2-(油酰基氧基)乙基]-2-油烯基-3-(2-羟基乙基)咪唑啉鎓氯化物(DOTIM)和胆固醇;以及二甲基双十八烷基溴化铵(DDAB)和胆固醇。

11.前述实施方案中任一项的免疫刺激性组合物,其中所述核酸质粒是非编码的。

12.实施方案1-11中任一项的免疫刺激性组合物,其中所述核酸质粒与SEQ ID NO.265具有至少75%序列同一性。

13.实施方案1-11中任一项的免疫刺激性组合物,其中所述核酸质粒与SEQ ID NO.266具有至少75%序列同一性。

14.实施方案1-11中任一项的免疫刺激性组合物,其中所述核酸质粒与SEQ ID NO:268具有至少75%序列同一性。

15.前述实施方案中任一项的免疫刺激性组合物,其中所述鸟嘌呤核苷酸富集的序列包含第一多个鸟嘌呤核苷酸。

16.实施方案15的免疫刺激性组合物,其中所述第一多个鸟嘌呤核苷酸包含三个至八个鸟嘌呤核苷酸。

17.实施方案15或16的免疫刺激性组合物,其中所述免疫刺激性寡核苷酸包含SEQ ID NO:16、17、18、19、20、21、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、77、78、81、82、85、86、89、90、92、93、96、97、100、102、104、106、108、143或1。

18.实施方案15或16的免疫刺激性组合物,其进一步包含在所述第一多个鸟嘌呤核苷酸下游的第二多个鸟嘌呤核苷酸。

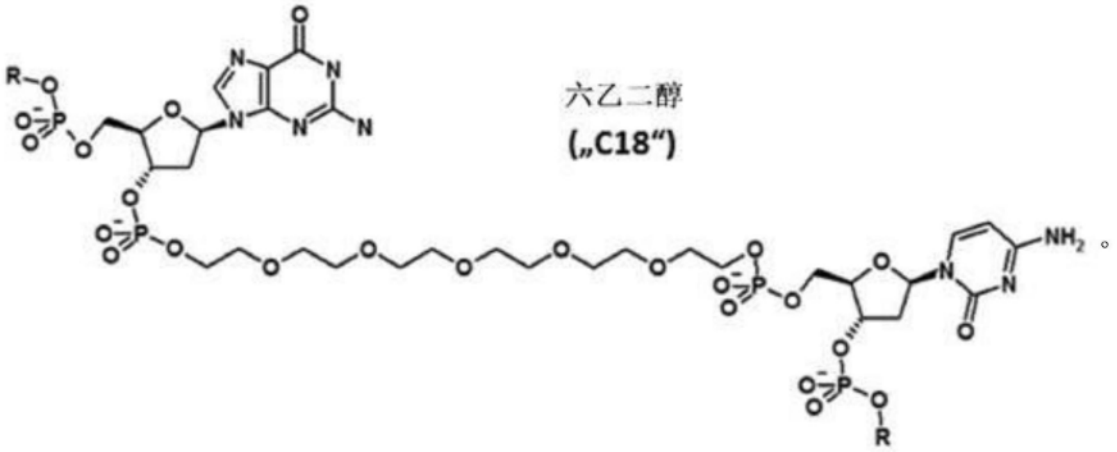
19.实施方案18的免疫刺激性组合物,其中所述免疫刺激性寡核苷酸包含SEQ ID NO:141、142、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203或GCGT-G线3。

20.实施方案18或19的免疫刺激性组合物,其中所述第一多个鸟嘌呤核苷酸和所述第二多个鸟嘌呤核苷酸被至少两个核苷酸分隔。

21.实施方案15至20中任一项的免疫刺激性组合物,其中所述第一多个鸟嘌呤核苷酸和所述至少一个CpG基序被至少3个核苷酸分隔。

22.实施方案15至21的免疫刺激性组合物,其中所述第一多个鸟嘌呤核苷酸和所述至少一个CpG基序被六乙二醇、四乙二醇、丙二醇或其衍生物分隔。

23.实施方案22的免疫刺激性组合物,其中所述六乙二醇的结构是:



24.前述实施方案中任一项的免疫刺激性组合物,其中所述免疫刺激性寡核苷酸进一步包含多个CpG基序,所述多个CpG基序中的每个CpG基序与所述多个CpG基序中的其他CpG基序通过间隔基分隔。

25.实施方案24的免疫刺激性组合物,其中所述间隔基包含至少一个核苷酸或核苷酸类似物。

26.实施方案25的免疫刺激性组合物,其中所述间隔基包含脱氧核糖磷酸酯桥。

27.实施方案26的免疫刺激性组合物,其中所述脱氧核糖磷酸酯桥是无碱基的。

28.实施方案25的免疫刺激性组合物,其中所述间隔基包含碳链。

29.实施方案28的免疫刺激性组合物,其中所述碳链衍生自1,3-丙二醇。

30.实施方案25的免疫刺激性组合物,其中所述间隔基包含重复的化学单元。

31.实施方案30的免疫刺激性组合物,其中所述重复的化学单元是乙二醇。

32.实施方案1-31中任一项的免疫刺激性组合物,其中所述免疫刺激性寡核苷酸进一步包含硫代磷酸酯主链。

33.前述实施方案中任一项的免疫刺激性组合物,其中所述免疫刺激性寡核苷酸包含脂质部分。

34.实施方案33的免疫刺激性组合物,其中所述脂质部分是胆固醇基。

35.实施方案33至34中任一项的免疫刺激性组合物,其中所述脂质部分在所述免疫刺激性寡核苷酸的5'末端处或附近。

36.前述实施方案中任一项的免疫刺激性组合物,其在5'末端、3'末端或两者处包含CpG序列元件。

37.实施方案36的免疫刺激性组合物,其具有至少两个CpG序列元件。

38.实施方案36或37的免疫刺激性组合物,其中所述CpG序列元件是GCGA、GCGG、ACGC、CCGC、GCGT或TCGC。

39.制备前述实施方案中任一项的免疫刺激性组合物的方法,其包括:

组合所述免疫调节剂组合物和所述免疫刺激性寡核苷酸以形成免疫刺激性组合物;

将所述免疫刺激性组合物离心以生成上清液和沉淀;和

分离所述沉淀。

40.用于刺激toll-样受体21(TLR21)的方法,其包括:

施用免疫刺激性寡核苷酸和免疫调节剂组合物,其中所述免疫刺激性寡核苷酸具有至少一个CpG基序和所述免疫刺激性寡核苷酸的5'末端处或附近的鸟嘌呤核苷酸富集的序列,且其中所述免疫调节剂组合物包含非编码核酸质粒和脂质递送媒介物。

41.实施方案40的方法,其中所述免疫调节剂组合物和所述免疫刺激性寡核苷酸以协同有效量存在。

42.实施方案40或41的方法,其中所述免疫刺激性寡核苷酸包含TLR21的配体。

43.引发受试者中的免疫应答的方法,其包括向所述受试者施用实施方案1至38中任一项的免疫刺激性组合物。

44.免疫刺激性组合物,其包含:

a.核酸质粒和脂质体递送媒介物;以及

b.包含SEQ ID NO:1的免疫刺激性寡核苷酸。

45.实施方案44的免疫刺激性组合物,其中所述核酸质粒与选自SEQ ID NO:265、SEQ ID NO:266、SEQ ID NO:268的序列具有至少75%序列同一性。

46.实施方案44-45中任一项的免疫刺激性组合物,其中所述免疫刺激性寡核苷酸进一步包含5'胆固醇基修饰。

47.实施方案46的免疫刺激性组合物,其中所述5'胆固醇基修饰包含三乙二醇接头。

实施例

[0117] 提供以下实施例以进一步描述本文公开的一些实施方案。所述实施例意欲举例说明而非限制公开的实施方案。

[0118] 在以下实施例中使用的免疫调节剂组合物是包含阳离子脂质(DOTIM和胆固醇)和非编码DNA(pMB75.6)(SEQ ID NO:266)的组合物。阳离子脂质成分是[1-[2-[9-(Z)-十八碳烯酰基氧基]]-2-[8](Z)-十七碳烯基]-3-[羟基乙基]咪唑啉鎓氯化物(DOTIM)和合成的中性脂质胆固醇,其被配制为产生直径近似200nm的脂质体(参见,美国专利号6,693,086)。非编码DNA组分是在大肠杆菌中产生的4292个碱基对的非编码DNA质粒(pMB75.6)(SEQ ID NO:266),其带负电荷,与带正电荷的(阳离子)脂质体缔合(参见,美国专利号6,693,086)。在实施例中,术语"免疫刺激性核酸质粒"是指pMB75.6。

[0119] 实施例1:将TLR21-活性寡脱氧核苷酸与免疫调节剂组合物组合探索免疫调节剂组合物对TLR21的活性。具体地,将HEK293-NFκB-bsd-cTLR21细胞以10,000个细胞/孔接种至384孔板中的45μl生长培养基中。将这些细胞暴露于溶解在生长培养基中的寡核苷酸,并在37℃下孵育3-4天。将每孔10μl培养物上清液转移至384孔板中,并添加90μl的50mM $NaHCO_3/Na_2CO_3$、2mM $MgCl_2$、5mM对硝基苯基磷酸酯(pNP)pH 9.6,并通过动力学测量405nM处的光密度的时间变化(mOD405nm/min)来测定反应速率。

[0120] 单独的免疫刺激性核酸质粒被证明在所考虑的浓度范围内(2μg/ml和更低)是无活性的,而脂质体配制的免疫刺激性核酸质粒(pDNA-F)显示微弱、但清晰的信号,具有钟形-曲线,表明其与TLR21的相互作用(图2A)。然而,与5-Chol-GCGT3-TG4T(SEQ ID NO:1)(针对与该受体相互作用而优化的寡核苷酸配体)相比,TLR21-刺激活性降低几个数量级(图2A和2B)。

[0121] 表2:ODN序列

免疫刺激性寡核苷酸	SEQ ID NO	序列
5Chol-GCGT3-TG4T (ODN1)	SEQ ID NO:1	XTGGGGTTTTTTTTGCGTTTTTGCGTTTTTGCGTTTT X = 5'-胆固醇基
GCGT3-TG4T (ODN2)	SEQ ID NO:252	TGGGGTTTTTTTTGCGTTTTTGCGTTTTTGCGTTTT
2006-PTO (ODN3)	SEQ ID NO:3	tcgtcgttttgtcgttttgtcgtt

。

[0122] 免疫调节剂组合物pDNA-F对TLR21的活性表明该受体确实可能是所述免疫调节剂组合物的体内作用的组分,但是因为所述免疫调节剂组合物是TLR21的相当弱的配体,所以该受体可能不是唯一且占主导地位的同源受体。

[0123] 实施例2:5-Chol-GCGT3-TG4T与免疫刺激性核酸质粒和免疫调节剂组合物的组合制备单独的免疫刺激性核酸质粒和免疫调节剂组合物的200μg/ml溶液和5-Chol-GCGT3-TG4T的2μM溶液,并在4℃下孵育2h。随后,从该溶液制备连续1:2稀释液,并根据实施例1中的方案,以20nM质粒浓度(和2μg/ml质粒浓度)开始向HEK293-bsd-cTLR21细胞施用,并与仅含有5-Chol-GCGT3-TG4T的样品进行比较。所有样品都显示强烈的TLR21刺激活性,其中唯一样品显示略微更高的峰值和2.44pM的EC_{50}(图3A,表3)。与单独的5-Chol-GCGT3-TG4T(2.11pM)相比,除了显示略微更低的V_{max},5-Chol-GCGT3-TG4T与免疫刺激性核酸质粒(其本身完全没有活性)的组合,导致EC_{50}的变化很小(图3A,表3)。相比之下,含有脂质体的样品

(免疫刺激性寡核苷酸5-Chol-GCGT3-TG4T和免疫调节剂组合物)在较高浓度下显示活性最大值和强信号降低(图3A)。然而,仔细检查低浓度(pM)揭示限定的活性平台,其中计算的EC_{50}为1.04pM(图3B,表3)。在该浓度范围内,所述免疫调节剂组合物也是完全无活性的(图3B),并且其本身不导致较低的EC_{50}。

[0124] 表3:半最大有效浓度(EC_{50})和最大信号速度(V_{max})

免疫刺激剂	EC_{50} (pM)	Vmax milliOD 405nm/min (mOD405/min)
5-Chol-GCGT3-TG4T	2.44	338
5-Chol-GCGT3-TG4T-pDNA 组合	2.11	260
5-Chol-GCGT3-TG4T-pDNA-F 组合	1.04	254

[0125] 结果表明,TLR21-刺激性ODN 5-Chol-GCGT3-TG4T和无细胞毒性浓度的免疫刺激性核酸质粒或免疫调节剂组合物的组合产生活性混合物。此外,关于TLR21活化的EC_{50},TLR21-刺激性ODN 5-Chol-GCGT3-TG4T和免疫调节剂组合物的组合是协同的。

[0126] 实施例3:离心免疫调节剂组合物和TLR21活性

将200μg/ml质粒浓度的免疫调节剂组合物溶液在4℃下在Eppendorf台式离心机中在4℃下以14,000rpm离心2小时。为了比较,将未离心的等分试样在4℃下存储2小时。取出并储存上清液,同时将沉淀重悬浮于等体积中。制备以2mg/ml质粒含量开始的滴定物,用于TLR21测定,如实施例1中所述,因为早先已经确定所述免疫调节剂组合物具有一些弱的TLR21刺激活性(参见实施例1)。

[0127] 所述免疫调节剂组合物的离心产生难以用移液管重悬浮的沉淀。离心后在沉淀中发现免疫调节剂组合物的所有TLR21刺激活性,并且上清液没有TLR21活性(图4)。与在4℃下储存的脂质体相比,重悬浮的脂质体对TLR21刺激表现出更高的EC_{50}。该作用可能是由于离心后脂质体的变化(例如,不完全重悬浮/分散)。

[0128] 实施例4:5-Chol-GCGT3-TG4T与免疫调节剂组合物的组合

制备具有200μg/ml质粒浓度和2μM 5-Chol-GCGT3-TG4T的免疫调节剂组合物/5-Chol-GCGT3-TG4T溶液。还制备5-Chol-GCGT3-TG4T的2μM溶液。将两份样品在4℃下孵育2小时。将这些溶液的100μl等分试样在Eppendorf台式离心机中在4℃下以14,000rpm离心2小时,以用于实施例5中,而将孵育的剩余部分储存在4℃下,用于根据此实施例4进行分析。两份样品均显示有效的TLR21刺激活性,但免疫调节剂组合物/5-Chol-GCGT3-TG4T组合在较高浓度下显示强烈降低的信号(图5A),这可能是免疫调节剂组合物细胞毒性的结果。当在低毒性浓度下考虑样品的免疫调节剂组合物组分时,各自的V_{max}值是相似的(图5B,表4)。然而,组合免疫调节剂组合物/5-Chol-GCGT3-TG4T的计算的EC_{50}比单独的5-Chol-GCGT3-TG4T的计算的EC_{50}低4倍(图5B,表4)。

[0129] 表4:半最大有效浓度(EC_{50})和最大信号速度(V_{max})

免疫刺激剂	EC_{50} (pM)	Vmax milliOD 405nm/min (mOD405/min)
5-Chol-GCGT3-TG4T	3.2	158
5-Chol-GCGT3-TG4T (离心上清液)	2.5	160
5-Chol-GCGT3-TG4T(离心沉淀)	819	184
5-Chol-GCGT3-TG4T-pDNA-F 组合	0.62	160
5-Chol-GCGT3-TG4T-pDNA-F 组合 (离心上清液)	5145	184
5-Chol-GCGT3-TG4T-pDNA-F 组合 (离心沉淀)	1.81	140

。

[0130] 实施例5:免疫调节剂组合物/5-Chol-GCGT3-TG4T和5-Chol-GCGT3-TG4T的离心制备具有200μg/ml质粒浓度和2μM 5-Chol-GCGT3-TG4T的免疫调节剂组合物/5-Chol-GCGT3-TG4T溶液。还制备5-Chol-GCGT3-TG4T的2μM溶液。将两份样品在4℃下孵育2小时。将这些溶液的100μl等分试样在Eppendorf台式离心机中以14,000rpm在4℃下离心2小时。取出并储存上清液,同时将沉淀重悬浮于100μl中。随后,从这些溶液制备连续1:2稀释液,并以20nM质粒浓度(和2μg/ml质粒浓度)开始向HEK293-bsd-cTLR21细胞施用,并与仅含有5-Chol-GCGT3-TG4T的样品进行比较。

[0131] 免疫调节剂组合物/5-Chol-GCGT3-TG4T组合的离心产生清晰可见的沉淀,而对于5-Chol-GCGT3-TG4T未观察到可见的沉淀。免疫调节剂组合物/5-Chol-GCGT3-TG4T组合沉淀(“pDNA-F 5Chol沉淀”)难以重悬浮,但在如实施例1中所述的TLR21测定中,其实际上含有所有刺激活性(图6A和6B),其中在上清液(“pDNA-F 5Chol上清液”)中仅检测到痕量(图6B,表4),尽管EC_{50}高于原始样品(“pDNA-f F-Chol-GCGT3-TG4T”)(表4)。该结果表明,在与免疫调节剂组合物混合之后,5-Chol-GCGT3-TG4T与脂质体级分在数量上物理缔合。单独的5-Chol-GCGT3-TG4T,当离心时,其几乎排他地(估计99%,表4)保留在上清液中,如从可溶性化合物所预期(图7A和7B)。

[0132] 实施例6:5-Chol-GCGT3-TG4T和免疫调节剂组合物的组合制备具有200μg/ml质粒浓度和2μM 5-Chol-GCGT3-TG4T的免疫刺激性组合物。还制备5-Chol-GCGT3-TG4T的2μM溶液。将两份样品在4℃下孵育2小时。将这些溶液的100μl等分试样在Eppendorf台式离心机中在4℃下以14,000rpm离心2小时,以用于实施例7中,而将孵育的剩余部分储存在4℃下,用于根据此实施例6进行分析。取出并储存上清液,同时将沉淀重悬浮于200μl中。随后,从这些溶液进行连续1:2稀释,并且根据实施例1中的方案,将其施用于HEK293-bsd-cTLR21细胞用于TLR21分析。起始质粒浓度为20nM(和2μg/ml质粒浓度),并且仅含有5-Chol-GCGT3-TG4T的样品进行比较。

[0133] 两份样品(“5-Chol-GCGT3-TG4T”和“pDNA-F/5-Chol-GCGT3-TG4T”)均显示有效的TLR21刺激活性,但免疫调节剂组合物/5-Chol-GCGT3-TG4T组合(“pDNA-F/5-Chol-GCGT3-TG4T”)在较高浓度下显示强烈降低的信号(图8A),这可能是免疫调节剂组合物细胞毒性的结果。当在低毒性浓度下考虑含有免疫调节剂组合物的样品的刺激活性时,各自的V_{max}值是非常相似的(图8B,表5)。然而,组合免疫调节剂组合物/5-Chol-GCGT3-TG4T的计算的EC_{50}比单独的5-Chol-GCGT3-TG4T(“5-Chol-GCGT3-TG4T”)的计算的EC_{50}低2倍(图8B,表5)。

[0134] 表5:半最大有效浓度(EC_{50})和最大信号速度(V_{max})

免疫刺激剂	EC_{50} 皮摩尔浓度(pM)	Vmax milliOD 405nm/min (mOD405/min)
5-Chol-GCGT3-TG4T	2.2	120
5-Chol-GCGT3-TG4T (离心上清液)	2.7	153
5-Chol-GCGT3-TG4T (离心沉淀)	530	139
5-Chol-GCGT3-TG4T-pDNA-F 组合	0.94	113
5-Chol-GCGT3-TG4T-pDNA-F 组合 (离心上清液)	14983	224
5-Chol-GCGT3-TG4T-pDNA-F 组合 (离心沉淀)	8.96	116

[0135] 实施例7:免疫调节剂组合物/5-Chol-GCGT3-TG4T和5-Chol-GCGT3-TG4T的离心免疫调节剂组合物/5-Chol-GCGT3-TG4T组合的离心产生清晰可见的沉淀,而对于5-Chol-GCGT3-TG4T未观察到可见的沉淀。免疫调节剂组合物/5-Chol-GCGT3-TG4T组合沉淀难以重悬浮,但在如实施例1中所述的TLR21测定中,其("pDNA-F/5-Chol-GCGT3-TG4T沉淀")实际上含有所有刺激活性(图9B),尽管EC_{50}高于原始样品(表5),其中在上清液("pDNA-F/5-Chol-GCGT3-TG4T上清液")中仅检测到痕量(图9B,表5)。该结果表明,在与免疫调节剂组合物混合之后,5-Chol-GCGT3-TG4T与脂质体级分物理缔合。将两种级分与未离心的免疫调节剂组合物/5-Chol-GCGT3-TG4T("pDNA-F/5-Chol-GCGT3-TG4T")进行比较。

[0136] 实施例8:5-Chol-GCGT3-TG4T与免疫调节剂组合物的组合

制备200μg/ml质粒浓度和2μM 5-Chol-GCGT3-TG4T的免疫调节剂组合物溶液。还制备2μM 5-Chol-GCGT3-TG4T样品。将两份样品在4℃下孵育2小时。将这些溶液的100μl等分试样在Eppendorf台式离心机中在4℃下以14,000rpm离心2小时,以用于实施例9中,而将孵育的剩余部分储存在4℃下,用于根据此实施例8进行分析。取出并储存上清液,同时将沉淀重悬浮于100μl中。随后,从这些溶液制备连续1:2稀释液,并根据实施例1的方案,以20nM质粒浓度(和2μg/ml质粒浓度)开始向HEK293-bsd-cTLR21细胞施用,并与仅含有5-Chol-GCGT3-TG4T的样品进行比较。

[0137] 两份样品均显示有效的TLR21刺激活性,但5-Chol-GCGT3-TG4T/免疫调节剂组合物组合("pDNA-F/5-Chol-GCGT3-TG4T")在较高浓度下显示强烈降低的信号(图10A),类似于所述免疫调节剂自身("pDNA-F")的信号并且可能是免疫调节剂组合物细胞毒性的结果。与含有免疫调节剂组合物的任一样品相比,免疫刺激性寡核苷酸("5-Chol-GCGT3-TG4T")在较高浓度下表现出更大的刺激活性。当在低毒性浓度下考虑样品的免疫调节剂组合物组分的刺激活性时,各自的V_{max}值是非常相似的(图10B,表6)。然而,组合免疫调节剂组合物/5-Chol-GCGT3-TG4T("pDNA-F/5-Chol-GCGT3-TG4T")的计算的EC_{50}比单独的5-Chol-GCGT3-TG4T("5-Chol-GCGT3-TG4T")的计算的EC_{50}低4倍(图10B,表6)。单独的免疫调节剂组合物("Bay 98-F")仅显示最小的活性,其累加作用不能解释免疫调节剂组合物/5-Chol-GCGT3-TG4T的活性相比于单独的5-Chol-GCGT3-TG4T增加。

[0138] 表6:半最大有效浓度(EC_{50})和最大信号速度(V_{max}):

免疫刺激剂	EC_{50}皮摩尔浓度(pM)	Vmax milliOD 405nm/min (mOD405/min)
5-Chol-GCGT3-TG4T	2.47	53
5-Chol-GCGT3-TG4T-pDNA-F 组合	0.59	51
5-Chol-GCGT3-TG4T-pDNA-F 组合 (离心上清液)	22.0	47
5-Chol-GCGT3-TG4T-pDNA-F 组合 (离心沉淀)	1.06	47

。

[0139] 实施例9:免疫调节剂组合物的离心

免疫调节剂组合物/5-Chol-GCGT3-TG4T组合的离心产生清晰可见的沉淀,而对于5-Chol-GCGT3-TG4T,没有观察到可见的沉淀。免疫调节剂组合物/5-Chol-GCGT3-TG4T组合沉淀("pDNA-F/5-Chol-GCGT3-TG4T沉淀")难以重悬浮,但在如实施例1中所述的TLR21测定中,其含有>95%的刺激活性(图11B),尽管EC_{50}高于原始样品,其中在上清液("pDNA-F/5-Chol-GCGT3-TG4T上清液")中仅检测到小部分(<5%)(图11B,表6),并且在低免疫调节剂组合物浓度("pDNA-F/5-Chol-GCGT3-TG4T")下仅略微少于未离心样品。该结果表明,在与免疫调节剂组合物混合之后,5-Chol-GCGT3-TG4T与脂质体级分在数量上物理缔合。

[0140] 实施例10:GCGT3-TG4T与免疫调节剂组合物的组合

制备200μg/ml质粒浓度和2μM GCGT3-TG4T(SEQ ID NO:252;寡核苷酸序列与5-Chol-GCGT3-TG4T(SEQ ID NO:1)相同的,但没有胆固醇基修饰)的免疫调节剂组合物溶液。另外,制备2μM GCGT3-TG4T样品,并且将两个样品在4℃下孵育2小时。将这些溶液的100μl等分试样在Eppendorf台式离心机中在4℃下以14,000rpm离心2小时,以用于实施例11中,而将孵育的剩余部分储存在4℃下,用于根据此实施例10进行分析。取出并储存上清液,同时将沉淀重悬浮于100μl中。随后,从这些溶液制备连续1:2稀释液,并根据实施例1中的方案,以20nM质粒浓度(和2μg/ml质粒浓度)开始向HEK293-bsd-cTLR21细胞施用,并与仅含有GCGT3-TG4T的样品进行比较。

[0141] 两份样品均显示有效的TLR21刺激活性,但GCGT3-TG4T/免疫调节剂组合物组合("pDNA-F/5-Chol-GCGT3-TG4T")在较高浓度下显示强烈降低的信号(图12A),这可能是免疫调节剂组合物细胞毒性的结果。当在低毒性浓度下考虑样品的免疫调节剂组合物组分的刺激活性时,各自的V_{max}值是非常相似的(图12B,表7)。然而,组合免疫调节剂组合物/GCGT3-TG4T的计算的EC_{50}比单独的GCGT3-TG4T的计算的EC_{50}低多于4倍(表7)。单独的免疫调节剂组合物("pDNA-F")仅显示最小的活性,其累加作用不能解释免疫调节剂组合物/GCGT3-TG4T的活性相比于单独的GCGT3-TG4T增加。

[0142] 表7:半最大有效浓度(EC_{50})和最大信号速度(V_{max})

免疫刺激剂	EC_{50}皮摩尔浓度 (pM)	Vmax milliOD 405nm/min (mOD405/min)
GCGT3-TG4T	324	56
GCGT3-TG4T-pDNA-F 组合	69.4	51
GCGT3-TG4T-pDNA-F 组合 (离心上清液)	860	43
GCGT3-TG4T-pDNA-F 组合 (离心沉淀)	252	36

。

[0143] 实施例11:免疫调节剂组合物/GCGT3-TG4T的离心

免疫调节剂组合物/GCGT3-TG4T组合的离心产生清晰可见的沉淀。免疫调节剂组合物/GCGT3-TG4T组合沉淀难以重悬浮,但在如实施例1中所述的TLR21测定中,与上清液("pDNA-F/GCGT3-TG4T上清液")相比,其("pDNA-F/GCGT3-TG4T沉淀")含有>3倍更多的刺激活性(图13B),尽管EC_{50}高于原始样品("pDNA-F/GCGT3-TG4T")(图13B,表7)。该结果表明,在与免疫调节剂组合物混合之后,GCGT3-TG4T与脂质体级分在数量上物理缔合,尽管可能不与胆固醇基-衍生的5-Chol-GCGT3-TG4T一样有效。

[0144] 本领域技术人员将理解,可以对本发明的优选实施方案进行多种改变和修改,并且可以在不脱离本发明的精神的情况下进行此类改变和修改。因此,所附权利要求意欲覆盖落入本发明的真实精神和范围内的所有此类等同变化。

[0145] 在本文件中引用或描述的每个专利、专利申请和出版物的公开内容在此以其整体通过引用并入本文。

[0146] 实施例12:免疫刺激剂在鸡新城疫接种疫苗模型中的效力的体内研究为了确定ODN1、ODN2和ODN3作为免疫刺激剂的适用性和效力,各自以三种不同的浓度进行测试。

[0147] 研究以下免疫刺激剂:

ODN1:[CholTEG]-TGGGGTTTTTTTTGCGTTTTTGCGTTTTTGCGTTTT("5Chol-GCGT3-TG4T")(SEQ ID NO:1)([CholTEG]=5'-三乙二醇连接的胆固醇基修饰),ODN2:TGGGGTTTTTTTTGCGTTTTTGCGTTTTTGCGTTTT("GCGT3-TG4T")(SEQ ID NO:252),

ODN3:tcgtcgttttgtcgttttgtcgtt("2006-PTO")(SEQ ID NO:3)。

[0148] 根据表9,将每种免疫刺激剂添加至含有次优浓度的灭活新城疫病毒(NDV)的油乳剂中。对于次优NDV疫苗的制备,将NDV抗原批次在NDV-阴性尿囊液(AF)中稀释50倍。在SPF级鸡(Leghorn)中测试ODN1、ODN2和ODN3与次优剂量的新城疫疫苗组合的效力。测量血清学应答并将其与没有免疫刺激剂的类似次优NDV疫苗进行比较。在接种疫苗后的不同时间点测定抗体滴度,以研究免疫刺激剂的添加是否导致较早的免疫应答。为了确定三种ODN的最佳剂量,各自以100ng、1000ng和5000ng的三种不同剂量补充至次优NDV疫苗,产生9个免疫刺激剂组。除了这9个免疫刺激剂组以外,本研究中并入5个对照组,其由以下组成:无免疫刺激剂的次优NDV疫苗组,未稀释的NDV疫苗组,阴性对照组(免疫刺激剂与佐剂的组合)和具有两种不同浓度的聚肌苷酸:聚胞苷酸(聚I:C)的两个阳性对照组(表8)。

[0149] 测试了以下参数:鸡的健康(数据未显示)和通过血凝抑制(HI)测定的血清学。

[0150] 表8:研究设计

测试物品/对照项	测试组	数目(n)
次优的NDV+ODN1 100ng	T01	10

次优的NDV+ODN1 1000ng	T02	10
次优的NDV+ODN1 5000ng	T03	10
次优的NDV+ODN2 100ng	T04	10
次优的NDV+ODN2 1000ng	T05	10
次优的NDV+ODN2 5000ng	T06	10
次优的NDV+ODN3 100ng	T07	10
次优的NDV+ODN3 1000ng	T08	10
次优的NDV+ODN3 5000ng	T09	10
次优的NDV	T10	10
最优的NDV(未稀释的疫苗)	T11	10
ODN1 5000ng+佐剂*	T12a	3
ODN2 5000ng+佐剂*	T12b	3
ODN3 5000ng+佐剂*	T12c	3
单独的佐剂(tstimune)*	T12d	1
次优的NDV+10μg聚I:C	T13	9
次优的NDV+100μg聚I:C	T14	9

*对于与佐剂(Stimune)组合的每种免疫刺激剂,分配3只动物作为对照。一只动物仅接受佐剂。

所有动物都在3周龄时到达。

所有动物都在5周龄时接种疫苗。在第0天通过肌肉内注射进行所有疫苗接种。

在第0天(接种疫苗前)、第7天、第14天和第21天进行血液采样/血清学分析。

每天进行所有动物的临床评分。

[0151] 根据研究设计,处理组T01-T14中纳入的鸡接受测试物品或对照项。在T13和T14组中,由于在研究开始前丢失两只动物,所以每组九只鸡而不是十只鸡接种疫苗。

[0152] 分配至处理组T01、T02、T03、T04、T05、T06、T07、T08和T09的鸡用次优NDV悬浮液接种疫苗,所述悬浮液含有3种不同的免疫刺激剂(ODN)之一,每种呈3种不同的浓度(100、1000、5000ng/剂)。为了制备油包水乳剂,将NDV抗原悬浮液和免疫刺激剂(水相)与佐剂Stimune(油相)以4:5的比率一起配制(表9)。

[0153] 表9:测试物品和对照项的制备。

		水相				油相		
组	名称	NDV 批次 (µl)	Neg. AF (µl)	Stimune 600 ng/µl (µl)	总体积 水相 (ml)	将以下体积 水相添加至 Stimune (ml)	Stimune (ml)	总体 (ml)
T01	ODN1 100 ng	100	4896	4	5	4	5	9
T02	ODN1 1000 ng	100	4862	38	5	4	5	9
T03	ODN1 5000 ng	100	4712	188	5	4	5	9
T04	ODN2 100 ng	100	4896	4	5	4	5	9
T05	ODN2 1000 ng	100	4862	38	5	4	5	9
T06	ODN2 5000 ng	100	4712	188	5	4	5	9
T07	ODN3 100 ng	100	4896	4	5	4	5	9
T08	ODN3 1000 ng	100	4862	38	5	4	5	9
T09	ODN3 5000 ng	100	4712	188	5	4	5	9
T10	次优疫苗	100	4900	0	5	4	5	9
T11	未稀释的 疫苗	5000	0	0	5	4	5	9
T12a	ODN1 5000 ng/ Stimune	-	2887	113	3	2	2.5	4.5
T12b	ODN2 5000	-	2887	113	3	2	2.5	4.5

	ng / Stimune							
T12c	ODN3 5000 ng / Stimune	-	2887	113	3	2	2.5	4.5
T12d	稀释缓冲液 (PBS) / Stimune	-	2887	113	3	0.8	1	1.8
T13	聚 I:C 10 μg	100	4877	23	5	4	5	9
T14	聚 I:C 100 μg	100	4675	225	5	4	5	9

ODN制备至600 ng/μl				
		100 μM ODN (μl)	稀释缓冲液 (μl)	体积储备物 600 ng/μl (μl)
ODN1	GCGT3-TG4T-5Chol (SEQ ID NO:1, 参见表1)	204	196	400
ODN2	GCGT3-TG4T (SEQ ID NO:252, 参见表1)	216	184	400
ODN3	2006-PTO (SEQ ID NO: 3, 参见表1)	312	88	400
聚 I:C 10 μg/μl				
		冻干粉末(mg)	生理盐溶液(ml)	体积储备物10 μg/μl (μl)
对照	聚I:C (P0913)	10	1	1000
批号:	116M4118V		#16TK5011	10 min 50 , 60 min RT (重新退火)
				储存在-20

[0154] 分配至T10的对照组的鸡用在佐剂(Stimune)中没有免疫刺激剂的次优NDV悬浮液(比率为4:5)接种疫苗。

[0155] 分配至T11的对照组的鸡用在佐剂(Stimune)中没有免疫刺激剂的未稀释的NDV悬浮液(比率为4:5)接种疫苗。

[0156] 分配至T12组的鸡,用佐剂(Stimune)中的免疫刺激剂1(3只鸡)、免疫刺激剂2(3只鸡)和免疫刺激剂3(3只鸡)(比率为4:5)接种疫苗。一只鸡用佐剂(Stimune)中的稀释缓冲液(专有)接种疫苗。

[0157] 分配至T13(n=9)和T14(n=9)的对照组的鸡用在佐剂(Stimune)中与两种浓度(10,000ng和100μg)的聚I:C组合的NDV的次优NDV悬浮液(比率为4:5)接种疫苗。

[0158] 测试物品或对照项施用

将在-70℃下储存的灭活的NDV菌株Ulster悬浮液解冻,并在阴性尿囊液中稀释50倍,以产生次优的疫苗剂量。根据研究设计添加免疫刺激剂。根据表9中显示的接种疫苗制备方案,将所得的水相与Stimune以4:5的比率混合。在制备期间,将除了Stimune佐剂以外的所有疫苗成分置于融冰中。制备后直接注射(0.5ml,肌肉内注射)配制的疫苗。

[0159] 从到达之日直至研究结束,每天由经验丰富的生物技术人员监测总体健康。

[0160] 血清采血

在研究的第0天(接种疫苗前)、第7天、第14天和第21天从所有鸡收集血液样品用于血清学分析。血液样品用研究编号、独特的样品标识和采集日期标记。根据抽取的血液体积量,将血清等分成两个近似0.5ml的等份试样,并储存在-20±5℃。

[0161] 血凝抑制(HI)测定

简而言之,将稀释的血清系列与8HAU(血凝单位)的NDV菌株Ulster在室温下孵育60分钟。在每次测定之前,将HAU滴定。其后,添加鸡红细胞并在4℃下孵育45分钟后对凝集进行评分。每种测定中都包括阴性对照血清和具有低、中和高抗体滴度的三种阳性对照血清。

[0162] HI滴度结果表示为完全抑制凝集的最高血清稀释度的倒数,将其对数转化为最终的Log2滴度。

[0163] 统计学

每只动物总结对数转化的HI结果(参见表62-65)。每个处理组,计算抗体滴度的平均值和标准偏差。用非参数Mann-Whitney t-检验进行统计分析。

[0164] 结果

在所有组中均未观察到与接种疫苗相关的临床症状或不良事件,在整个研究时段期间,所有鸡都看起来健康。

[0165] 然而,由于啄食行为,两只鸡被评分为具有轻伤,这在研究开始前6天开始。在接种疫苗当天,将这些鸡分配至聚I:C组T13(#11658)和T14(#11676)。恢复在接种疫苗后一周内发生。

[0166] ODN1,GCGT3-TG4T-5Chol

在表10中指示100ng、1000ng和5000ng ODN1剂量组的表示为Log2滴度的个体HI结果。与稀释的NDV疫苗组的平均滴度相比,在图14(接种疫苗后(pv)第14天和第21天)和图15(所有数据)中指示这些组的平均HI滴度和标准偏差。

[0167] 与稀释的NDV疫苗(平均HI滴度:4.8Log2/SD 1.0)相比,GCGT3-TG4T-5Chol组显示显著更高的HI滴度。在pv第14天时,所有三种剂量都是如此;100ng:平均HI滴度6.2Log2/SD 1.4(p=0.0214),1000ng:平均HI滴度6.9Log2/SD 1.1(p=0.0003)和5000ng:平均HI 5.9Log2/SD 0.7(p=0.0243)。

[0168] 然而,在pv第21天时,当与NDV疫苗;HI滴度6.2Log2/SD1.0相比时,对于所有浓度均未观察到显著差异;100ng:平均HI滴度6.9Log2/SD 0.8(p=0.1995);1000ng:平均HI滴度7.3Log2/SD 0.9(p=0.0527);和5000ng:平均HI 6.7Log2/SD 0.9(p=0.4523),尽管1000ng浓度非常接近于显著性(图14)。

表10:

结果	双重HI		HI 1	HI2		HI 1	HI2		HI 1	HI2	HI3		HI 1	HI2	HI3	
组	处理	动物	d0	d0	平均值	d7	d7	平均值	d14	d14	d14	平均值	d21	d21	d21	平均值
T01	GCGT3-TG4T-5Chol 100 ng	11402	0	0	**0**	1	1	**1**	7	7	7	**7.0**	7	7	7	**7.0**
		11404	0	0	**0**	0	0	**0**	7	7	7	**7.0**	7	7	7	**7.0**
		11406	0	0	**0**	0	0	**0**	3	4	4	**3.7**	6	6	6	**6.0**
		11408	0	0	**0**	0	0	**0**	7	8	8	**7.7**	8	9	7	**8.0**
		11410	0	0	**0**	0	0	**0**	5	6	6	**5.7**	7	7	7	**7.0**
		11412	0	0	**0**	0	0	**0**	6	6	8	**6.7**	6	6	6	**6.0**
		11414	0	0	**0**	0	0	**0**	5	5	6	**5.3**	7	7	6	**6.7**
		11416	0	0	**0**	0	0	**0**	8	7	8	**7.7**	8	8	8	**8.0**
		11418	0	0	**0**	0	0	**0**	5	4	4	**4.3**	6	6	6	**6.0**
		11420	0	0	**0**	0	0	**0**	8	7	7	**7.3**	7	7	8	**7.3**
		平均			**0.0**			**0.1**				**6.2**				**6.9**
		SD			**0.0**			**0.3**				**1.4**				**0.8**
T02	GCGT3-TG4T-5Chol 1000 ng	11422	0	0	**0**	0	0	**0**	7	6	7	**6.7**	6	6	6	**6.0**
		11424	0	0	**0**	0	0	**0**	8	7	7	**7.3**	9	7	8	**8.0**
		11426	0	0	**0**	0	0	**0**	6	5	5	**5.3**	6	6	6	**6.0**
		11428	0	0	**0**	0	0	**0**	7	7	7	**7.0**	7	7	7	**7.0**
		11430	0	0	**0**	1	1	**1**	10	9	10	**9.7**	8	8	9	**8.3**
		11432	0	0	**0**	0	0	**0**	7	6	7	**6.7**	7	7	7	**7.0**
		11434	0	0	**0**	0	0	**0**	7	6	6	**6.3**	7	7	7	**7.0**
		11436	0	0	**0**	0	0	**0**	7	6	7	**6.7**	8	7	9	**8.0**
		11438	0	0	**0**	0	0	**0**	7	6	6	**6.3**	7	7	7	**7.0**
		11440	0	0	**0**	0	0	**0**	7	7	7	**7.0**	8	8	9	**8.3**
		平均			**0.0**			**0.1**				**6.9**				**7.3**
		SD			**0.0**			**0.3**				**1.1**				**0.9**
T03	GCGT3-TG4T-5Chol 5000 ng	11442	0	0	**0**	0	0	**0**	6	6	7	**6.3**	7	7	8	**7.3**
		11444	0	0	**0**	0	0	**0**	5	5	5	**5.0**	6	6	6	**6.0**
		11446	0	0	**0**	0	0	**0**	5	4	5	**4.7**	5	5	6	**5.3**
		11448	0	0	**0**	0	0	**0**	7	7	7	**7.0**	8	8	9	**8.3**
		11450	0	0	**0**	0	0	**0**	6	5	5	**5.3**	6	6	7	**6.3**
		11452	0	0	**0**	0	0	**0**	6	5	6	**5.7**	7	7	7	**7.0**
		11454	0	0	**0**	0	0	**0**	7	6	6	**6.3**	7	6	7	**6.7**
		11456	0	0	**0**	0	0	**0**	6	6	6	**6.0**	6	6	6	**6.0**
		11458	0	0	**0**	0	0	**0**	6	5	6	**5.7**	6	6	7	**6.3**
		11460	0	0	**0**	0	0	**0**	7	6	7	**6.7**	7	7	8	**7.3**
		平均			**0.0**			**0.0**				**5.9**				**6.7**
		SD			**0.0**			**0.0**				**0.7**				**0.9**

[0169] ODN2,GCGT3-TG4T

在表11中指示100ng、1000ng和5000ng ODN1剂量组的表示为Log2滴度的个体HI结果。与稀释的NDV疫苗组的平均滴度相比,在图16(pv第14天和第21天)和图17(所有数据)中指示这些组的平均HI滴度和标准偏差。

[0170] 与稀释的NDV疫苗(平均HI滴度:4.8Log2/SD 1.0)相比,ODN2,GCGT3-TG4T组显示显著更高的HI滴度。在接种疫苗后第14天,对于所有三种疫苗都是如此;100ng:平均HI滴度7.1Log_2/SD 1.2(p=0.0003),1000ng:平均HI滴度6.4Log_2/SD 0.7(p=0.0027)和5000ng:平均HI滴度6.1Log_2/SD 1.1(p=0.0236)。在第21天,当与NDV疫苗(HI滴度6.2Log_2/SD 1.0)相比时,仅在100ng剂量下观察到显著差异,其中平均HI滴度为7.6Log_2/SD 0.8(p=0.0083)。1000ng和5000ng的平均HI滴度分别为7.1Log_2/0.6(p=0.0696)和7.2Log_2/SD 1.0(p=0.0956)(图16)。

表11:

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

[0171] ODN3,2006-PTO

在表12中指示测量的100ng、1000ng和5000ng ODN1剂量组的表示为Log2滴度的个体HI结果。在进行三次重复HI测定期间,在第21天观察到动物11570的异常结果,这最可能由移液错误(未添加足够的AF)引起,且因此从最终分析忽略该结果(表12中突出显示)。因此,对于该动物和日期,平均HI滴度基于二次重复测量。

[0172] 与稀释的NDV疫苗组的平均滴度相比,在图18(pv第14天和第21天)和图19(所有数据)中指示这些组的平均HI滴度和标准偏差。

[0173] 与稀释的NDV疫苗(平均HI滴度:4.8Log2/SD 1.0)相比,ODN3,2006-PTO组显示显著更高的HI滴度。在接种疫苗后第14天,对于两种疫苗都是如此;1000ng:平均HI滴度:6.3Log2/SD 1.2(p=0.0081)和5000ng:平均HI滴度:6.2Log2/SD 0.8(p=0.0059)。100ng剂量的平均HI滴度为5.3Log2/SD 0.5(p=0.2090)。在pv第21天,仅在5000ng测量到显著差异:平均HI滴度7.3Log2/SD 0.6(p=0.0296)。当与NDV疫苗;HI滴度6.2Log2/SD 1.0相比时,在100ng和1000ng剂量没有观察到显著差异,其中平均HI滴度分别为6.6Log2/SD 0.5(p=0.7183)和6.8Log2/SD 1.1(p=0.1685)(图18)。

表12:

T07	2006-PTO 100 ng	11522	0	0	0	0	0	0	6	5	5	5.3	6	6	6	6.0
		11524	0	0	0	0	0	0	5	5	6	5.3	6	6	6	6.0
		11526	0	0	0	0	0	0	6	5	6	5.7	7	7	7	7.0
		11528	0	0	0	0	0	0	5	5	5	5.0	6	7	6	6.3
		11530	0	0	0	0	0	0	6	5	7	6.0	7	7	7	7.0
		11532	0	0	0	0	0	0	5	5	5	5.0	5	6	6	5.7
		11534	0	0	0	0	0	0	5	5	6	5.3	7	7	7	7.0
		11536	0	0	0	0	0	0	5	5	6	5.3	7	7	7	7.0
		11538	0	0	0	0	0	0	4	4	5	4.3	7	6	7	6.7
		11540	0	0	0	0	0	0	6	5	6	5.7	7	7	7	7.0
		平均			0.0			0.0				5.3				6.6
		SD			0.0			0.0				0.5				0.5
T08	2006-PTO 1000 ng	11542	0	0	0	0	0	0	6	5	6	5.7	6	6	7	6.3
		11544	0	0	0	0	0	0	6	4	6	5.3	7	7	7	7.0
		11546	0	0	0	0	0	0	4	4	5	4.3	4	5	4	4.3
		11548	0	0	0	0	0	0	5	5	6	5.3	6	6	7	6.3
		11550	0	0	0	0	0	0	7	7	7	7.0	7	7	8	7.3
		11552	0	0	0	0	0	0	7	7	8	7.3	7	7	8	7.3
		11554	0	0	0	0	0	0	8	8	9	8.3	8	8	9	8.3
		11556	0	0	0	0	0	0	6	6	6	6.0	6	6	6	6.0
		11558	0	0	0	0	0	0	7	7	7	7.0	7	7	8	7.3
		11560	0	0	0	0	0	0	7	7	7	7.0	8	8	8	8.0
		平均			0.0			0.0				6.3				6.8
		SD			0.0			0.0				1.2				1.1
T09	2006-PTO 5000 ng	11562	0	0	0	0	0	0	6	6	6	6.0	7	7	8	7.3
		11564	0	0	0	0	0	0	6	6	7	6.3	7	7	8	7.3
		11566	0	0	0	0	0	0	6	6	7	6.3	7	7	7	7.0
		11568	0	0	0	0	0	0	6	6	7	6.3	7	7	7	7.0
		11570	0	0	0	0	0	0	5	5	6	5.3	7	11	7	7.0
		11572	0	0	0	0	0	0	6	6	7	6.3	7	8	8	7.7
		11574	0	0	0	0	0	0	5	5	6	5.3	6	7	7	6.7
		11576	0	0	0	0	0	0	8	8	9	8.3	8	10	9	9.0
		11578	0	0	0	0	0	0	6	6	7	6.3	7	7	7	7.0
		11580	0	0	0	1	1	1	5	5	7	5.7	7	7	8	7.3
		平均			0.0			0.1				6.2				7.3
		SD			0.0			0.3				0.8				0.6

[0174] 对照组

在表13中指示10μg和100μg聚I:C剂量组、稀释和未稀释的NDV疫苗以及阴性对照组的表示为Log2滴度的个体HI结果。与稀释的NDV疫苗组的平均滴度相比,在图20(pv第14天和第21天)和图21(所有数据)中指示这些组的平均HI滴度和标准偏差。

[0175] 当与NDV疫苗(6.2Log2/SD 1.0)相比时,对于聚I:C阳性对照组,仅在100μg剂量观察到显著更高的HI滴度:在第21天的HI滴度7.5Log2/SD 0.4(p=0.0053)。10μg和100μg剂量组的pv第14天的平均HI滴度分别为5.8Log2/SD 1.3(p=0.1859)和5.5Log2/SD 0.8(p=0.1609)。在pv第21天的10μg剂量组的平均HI滴度为6.4Log2/SD 1.3(p=0.7273)。在接种疫苗后第14天和第21天,与稀释的NDV组(分别为4.8/SD 1.0和6.2Log2/SD 1.0)相比,未稀释的NDV疫苗(8.3/SD 0.5和8.5Log2/SD 0.7)和阴性对照组之间观察到显著差异(p<0.0001)(图20)。

表13:

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

[0176] 结论目的是研究三种不同的免疫刺激剂的佐剂活性。通过用含次优浓度的灭活NDV和不同浓度的三种不同免疫刺激剂之一的油乳剂疫苗接种疫苗后测量血清学应答来测试这一点。

[0177] 研究以下免疫刺激剂:

ODN1:[CholTEG]-TGGGGTTTTTTTTGCGTTTTTGCGTTTTTGCGTTTT(“GCGT3-TG4T-5Chol”)(SEQ ID NO:1)([CholTEG]＝5’-三乙二醇连接的胆固醇基修饰),ODN2:TGGGGTTTTTTTTGCGTTTTTGCGTTTTTGCGTTTT(“GCGT3-TG4T”)(SEQ ID NO:252),

ODN3:tcgtcgttttgtcgttttgtcgtt(“2006-PTO”)(SEQ ID NO:3)。

[0178] ODN1和ODN2免疫的主链是磷酸二酯连接的,而ODN3的主链是硫代磷酸酯连接的。在补充至次优NDV疫苗的三种不同剂量(100ng、1000ng和5000ng)下测定每种ODN的效力。

[0179] 在疫苗接种后第0天(疫苗接种前)、第7天、第14天和第21天测定血清学应答,以研

究这些免疫刺激剂的添加是否也可以导致较早的免疫应答。在接种疫苗后(pv)第0天和第7天,未检测到针对NDV的抗体水平,除了在第7天未稀释NDV疫苗组中的一只动物(#11618)。

[0180] 表示为Log2HI滴度的血清学应答显示了在pv第14天和第21天,未稀释和次优NDV疫苗之间的显著差异($p<0.0001$),指示50倍的稀释倍数足以产生次优疫苗剂量。

[0181] 阴性对照组在整个研究期间保持阴性,表明没有NDV疫苗的免疫刺激剂不导致非特异性免疫应答。

[0182] 在第21天,与未经NDV疫苗处理相比,阳性对照聚I:C 100μg剂量组显示显著更高的HI滴度($p=0.0053$),表明该剂量组充当有效的阳性对照组。

[0183] 对于所有三种剂量,在pv第14天,与稀释的NDV疫苗相比,GCGT3-TG4T-5Chol(ODN1)组显示显著更高的HI滴度;100ng($p=0.0214$),1000ng($p=0.0003$)和5000ng($p=0.0243$)。然而,在pv第21天,均未观察到显著差异。

[0184] 对于所有三种剂量,在pv第14天,与稀释的NDV疫苗相比,GCGT3-TG4T(ODN2)组显示显著更高的HI滴度;100ng($p=0.0003$),1000ng($p=0.0027$)和5000ng($p=0.0236$)。在第21天,仅在100ng剂量组测量到显著差异($p=0.0083$)。

[0185] 对于两种剂量,在pv第14天,与稀释的NDV疫苗相比,2006-PTO(ODN3)组显示显著更高的HI滴度;1000ng($p=0.0081$)和5000ng($p=0.0059$)。在pv第21天,仅在5000ng剂量组测量到显著差异($p=0.0296$)。

[0186] 总之,在100ng GCGT3-TG4T(ODN2)剂量组,观察到最高的平均HI滴度,7.1Log2(pv第14天)和7.6Log2(pv第21天),表明在pv第14天和第21天,当与未经NDV疫苗处理相比时,滴度分别增加2.3Log2和1.4Log2。

[0187] 在pv第14天和第21天的1000ng GCGT3-TG4T-5Chol(ODN1)剂量组的滴度(6.9Log2和7.3Log2)分别与ODN2组几乎相似。在pv第14天,在ODN1和ODN2组之间未观察到显著差异($p=0.7513$)。

[0188] 在pv第14天和第21天,5000ng 2006-PTO(ODN3)剂量组的滴度分别为6.2Log2和7.3Log2。在pv第14天时,ODN3组与ODN1和ODN2组两者均显著不同($p=0.0300$)(图22和图23)。

[0189] 在pv第21天,未显示所有ODN组之间的显著差异。

[0190] 因此,这些结果表明,所有ODN都能够显著增加血清学应答,特别是在接种疫苗后的第14天,也表明免疫开始较早。

[0191] 实施方案

为了进一步举例说明,本公开的额外非限制性实施方案在下面阐述。

[0192] 例如,实施方案1是免疫刺激性组合物,其包含:

包含核酸质粒和脂质体递送媒介物的免疫调节剂组合物;以及

免疫刺激性寡核苷酸,其具有至少一个CpG基序和所述免疫刺激性寡核苷酸的5'末端处或附近的鸟嘌呤核苷酸富集的序列。

[0193] 实施方案2是实施方案1的免疫刺激性组合物,其中所述免疫调节剂组合物和所述免疫刺激性寡核苷酸以协同有效量存在。

[0194] 实施方案3是实施方案1或2的免疫刺激性组合物,其中所述免疫刺激性寡核苷酸包含胞质核酸监视分子的配体。

[0195] 实施方案4是实施方案3的免疫刺激性组合物,其中免疫胞质核酸监视分子是toll-样受体(TLR)。

[0196] 实施方案5是实施方案3或4的免疫刺激性组合物,其中所述胞质核酸监视分子是TLR21。

[0197] 实施方案6是前述实施方案中任一项的免疫刺激性组合物,其中所述免疫调节剂组合物具有约200μg/ml的核酸浓度。

[0198] 实施方案7是前述实施方案中任一项的免疫刺激性组合物,其中所述免疫刺激性寡核苷酸的浓度在约10μM和0.5μM之间。

[0199] 实施方案8是实施方案7的免疫刺激性组合物,其中所述免疫刺激性寡核苷酸的浓度是约2μM。

[0200] 实施方案9是前述实施方案中任一项的免疫刺激性组合物,其中所述免疫调节剂组合物的核酸质粒浓度大于所述免疫刺激性寡核苷酸的浓度。

[0201] 实施方案10是前述实施方案中任一项的免疫刺激性组合物,其中所述免疫调节剂组合物以无细胞毒性的量存在。

[0202] 实施方案11是前述实施方案中任一项的免疫刺激性组合物,其进一步包含药物载体。

[0203] 实施方案12是前述实施方案中任一项的免疫刺激性组合物,其中所述脂质体递送媒介物包含多层囊泡脂质、挤出脂质或两者。

[0204] 实施方案13是前述实施方案中任一项的免疫刺激性组合物,其中所述脂质体递送媒介物是阳离子的。

[0205] 实施方案14是实施方案13的免疫刺激性组合物,其中阳离子脂质体递送媒介物包含选自以下的脂质对:N-[1-(2,3-二油烯基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)和胆固醇;N-[1-(2,3-二油酰基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTAP)和胆固醇;1-[2-(油酰基氧基)乙基]-2-油烯基-3-(2-羟基乙基)咪唑啉鎓氯化物(DOTIM)和胆固醇;以及二甲基双十八烷基溴化铵(DDAB)和胆固醇。

[0206] 实施方案15是前述实施方案中任一项的免疫刺激性组合物,其中所述核酸质粒是非编码的。

[0207] 实施方案16是前述实施方案中任一项的免疫刺激性组合物,其中所述核酸质粒是细菌来源的。

[0208] 实施方案17是前述实施方案中任一项的免疫刺激性组合物,其中所述核酸质粒是免疫原性的。

[0209] 实施方案18是实施方案1-17中任一项的免疫刺激性组合物,其中所述核酸质粒与SEQ ID NO.265具有至少75%序列同一性。

[0210] 实施方案19是实施方案1-17中任一项的免疫刺激性组合物,其中所述核酸质粒与SEQ ID NO.266具有至少75%序列同一性。

[0211] 实施方案20是实施方案1-17中任一项的免疫刺激性组合物,其中所述核酸质粒与SEQ ID NO:268具有至少75%序列同一性。

[0212] 实施方案21是前述实施方案中任一项的免疫刺激性组合物,其中所述鸟嘌呤核苷酸富集的序列包含第一多个鸟嘌呤核苷酸。

[0213] 实施方案22是实施方案21的免疫刺激性组合物,其中所述第一多个鸟嘌呤核苷酸包含三个至八个鸟嘌呤核苷酸。

[0214] 实施方案23是实施方案21或22的免疫刺激性组合物,其中所述免疫刺激性寡核苷酸包含SEQ ID NO:16、17、18、19、20、21、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、77、78、81、82、85、86、89、90、92、93、96、97、100、102、104、106、108、143或1。

[0215] 实施方案24是实施方案21或22的免疫刺激性组合物,其进一步包含在所述第一多个鸟嘌呤核苷酸下游的第二多个鸟嘌呤核苷酸。

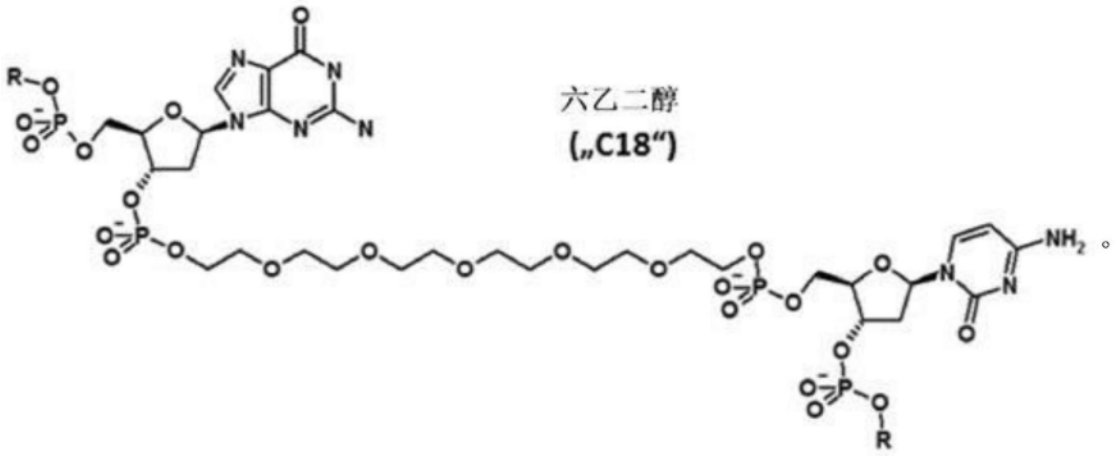
[0216] 实施方案25是实施方案24的免疫刺激性组合物,其中所述免疫刺激性寡核苷酸包含SEQ ID NO:141、142、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203或GCGT-G线3。

[0217] 实施方案26是实施方案24或25的免疫刺激性组合物,其中所述第一多个鸟嘌呤核苷酸和所述第二多个鸟嘌呤核苷酸被至少两个核苷酸分隔。

[0218] 实施方案27是实施方案21至26中任一项的免疫刺激性组合物,其中所述第一多个鸟嘌呤核苷酸和所述至少一个CpG基序被至少3个核苷酸分隔。

[0219] 实施方案28是实施方案21至27的免疫刺激性组合物,其中所述第一多个鸟嘌呤核苷酸和所述至少一个CpG基序被六乙二醇、四乙二醇、丙二醇或其衍生物分隔。

[0220] 实施方案29是实施方案28的免疫刺激性组合物,其中所述六乙二醇的结构是:



[0221] 实施方案30是前述实施方案中任一项的免疫刺激性组合物,其中所述免疫刺激性寡核苷酸进一步包含多个CpG基序,所述多个CpG基序中的每个CpG基序与所述多个CpG基序中的其他CpG基序通过间隔基分隔。

[0222] 实施方案31是实施方案30的免疫刺激性组合物,其中所述间隔基包含至少一个核苷酸或核苷酸类似物。

[0223] 实施方案32是实施方案31的免疫刺激性组合物,其中所述间隔基包含脱氧核糖磷酸酯桥。

[0224] 实施方案33是实施方案32的免疫刺激性组合物,其中所述脱氧核糖磷酸酯桥是无碱基的。

[0225] 实施方案34是实施方案31的免疫刺激性组合物,其中所述间隔基包含碳链。

[0226] 实施方案35是实施方案34的免疫刺激性组合物,其中所述碳链衍生自1,3-丙二醇。

[0227] 实施方案36是实施方案31的免疫刺激性组合物,其中所述间隔基包含重复的化学单元。

[0228] 实施方案37是实施方案36的免疫刺激性组合物,其中所述重复的化学单元是乙二醇。

[0229] 实施方案38是前述实施方案中任一项的免疫刺激性组合物,其中所述免疫刺激性寡核苷酸包含至少一个核苷酸类似物。

[0230] 实施方案39是前述实施方案中任一项的免疫刺激性组合物,其中所述免疫刺激性寡核苷酸进一步包含磷酸二酯主链。

[0231] 实施方案40是实施方案1-38中任一项的免疫刺激性组合物,其中所述免疫刺激性寡核苷酸进一步包含硫代磷酸酯主链。

[0232] 实施方案41是前述实施方案中任一项的免疫刺激性组合物,其中所述免疫刺激性寡核苷酸包含脂质部分。

[0233] 实施方案42是实施方案41的免疫刺激性组合物,其中所述脂质部分是胆固醇基。

[0234] 实施方案43是实施方案41至42中任一项的免疫刺激性组合物,其中所述脂质部分在所述免疫刺激性寡核苷酸的5'末端处或附近。

[0235] 实施方案44是前述实施方案中任一项的免疫刺激性组合物,其在5'末端、3'末端或两者处包含CpG序列元件。

[0236] 实施方案45是实施方案44的免疫刺激性组合物,其具有至少两个CpG序列元件。

[0237] 实施方案46是实施方案44或45的免疫刺激性组合物,其中所述CpG序列元件是GCGA、GCGG、ACGC、CCGC、GCGT或TCGC。

[0238] 实施方案47是制备前述权利要求中任一项的免疫刺激性组合物的方法,其包括:组合所述免疫调节剂组合物和所述免疫刺激性寡核苷酸以形成免疫刺激性组合物;

将所述免疫刺激性组合物离心以生成上清液和沉淀;和

分离所述沉淀。

[0239] 实施方案48是用于刺激toll-样受体21(TLR21)的方法,其包括:

施用免疫刺激性寡核苷酸和免疫调节剂组合物,其中所述免疫刺激性寡核苷酸具有至少一个CpG基序和所述免疫刺激性寡核苷酸的5'末端处或附近的鸟嘌呤核苷酸富集的序列,且其中所述免疫调节剂组合物包含非编码核酸质粒和脂质递送媒介物。

[0240] 实施方案49是实施方案48的方法,其中所述免疫调节剂组合物和所述免疫刺激性寡核苷酸以协同有效量存在。

[0241] 实施方案50是实施方案48或49的方法,其中所述免疫刺激性寡核苷酸包含TLR21的配体。

[0242] 实施方案51是实施方案48至50中任一项的方法,其中所述免疫调节剂组合物的核酸质粒浓度是约200μg/ml。

[0243] 实施方案52是实施方案48至51中任一项的方法,其中所述免疫刺激性寡核苷酸的浓度在约10μM和0.5μM之间。

[0244] 实施方案53是实施方案52的方法,其中所述免疫刺激性寡核苷酸的浓度是约2μM。

[0245] 实施方案54是实施方案48至53中任一项的方法,其中所述免疫调节剂组合物的核酸质粒浓度大于所述免疫刺激性寡核苷酸的浓度。

[0246] 实施方案55是实施方案48至54中任一项的方法,其中所述免疫调节剂组合物以无细胞毒性的量存在。

[0247] 实施方案56是实施方案48至55中任一项的方法,其中所述免疫调节剂组合物进一步包含药物载体。

[0248] 实施方案57是实施方案48至56中任一项的方法,其中所述脂质体递送媒介物包含多层囊泡脂质、挤出脂质或两者。

[0249] 实施方案58是实施方案48至57中任一项的方法,其中所述脂质体递送媒介物是阳离子的。

[0250] 实施方案59是实施方案58的方法,其中阳离子脂质体递送媒介物包含选自以下的脂质对:N-[1-(2,3-二油烯基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)和胆固醇;N-[1-(2,3-二油酰基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTAP)和胆固醇;1-[2-(油酰基氧基)乙基]-2-油烯基-3-(2-羟基乙基)咪唑啉鎓氯化物(DOTIM)和胆固醇;以及二甲基双十八烷基溴化铵(DDAB)和胆固醇。

[0251] 实施方案60是实施方案48至59中任一项的方法,其中所述核酸质粒是非编码的。

[0252] 实施方案61是实施方案48至60中任一项的方法,其中所述核酸质粒是细菌来源的。

[0253] 实施方案62是实施方案48至61中任一项的方法,其中所述核酸质粒是免疫原性的。

[0254] 实施方案63是实施方案48至62中任一项的方法,其中所述核酸质粒与SEQ ID NO:265具有至少75%序列同一性。

[0255] 实施方案64是实施方案48至62中任一项的方法,其中所述核酸质粒与SEQ ID NO:266具有至少75%序列同一性。

[0256] 实施方案65是实施方案48至62中任一项的方法,其中所述核酸质粒与SEQ ID NO:268具有至少75%序列同一性。

[0257] 实施方案66是实施方案48至65中任一项的方法,其中所述鸟嘌呤核苷酸富集的序列包含第一多个鸟嘌呤核苷酸。

[0258] 实施方案67是实施方案66的方法,其中所述第一多个鸟嘌呤核苷酸包含三个至八个鸟嘌呤核苷酸。

[0259] 实施方案68是实施方案66或67的方法,其中所述免疫刺激性寡核苷酸包含SEQ ID NO:1、16、17、18、19、20、21、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、77、78、81、82、85、86、89、90、92、93、96、97、100、102、104、106、108或143。

[0260] 实施方案69是实施方案48-68中任一项的方法,其中所述免疫刺激性寡核苷酸进一步包含在所述第一多个鸟嘌呤核苷酸下游的第二多个鸟嘌呤核苷酸。

[0261] 实施方案70是实施方案69的方法,其中所述免疫刺激性寡核苷酸包含SEQ ID NO:141、142、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203或GCGT-G线3。

[0262] 实施方案71是实施方案69或70的方法,其中所述第一多个鸟嘌呤核苷酸、所述第二多个鸟嘌呤核苷酸或两者促进四级结构在体外、体内或两者的形成。

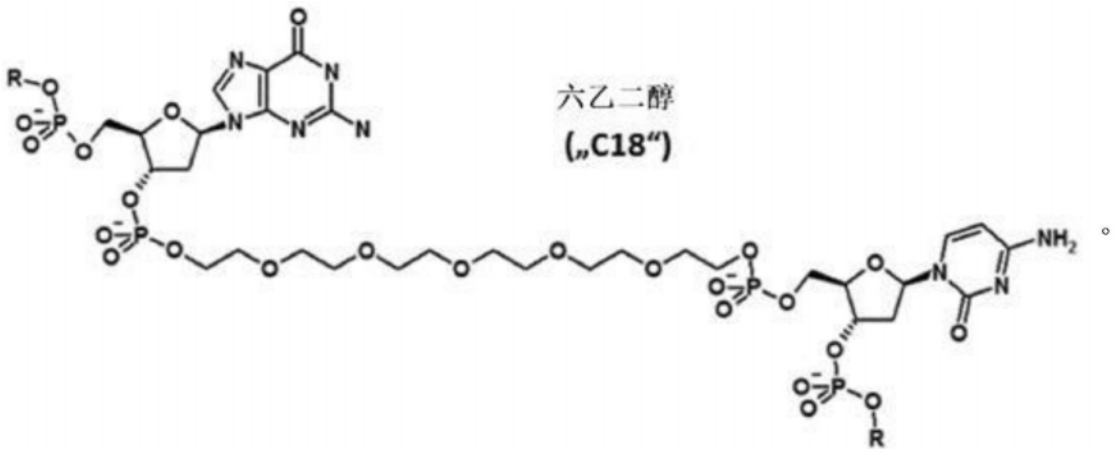
[0263] 实施方案72是实施方案70或71的方法,其中所述第一和第二多个鸟嘌呤核苷酸促进形成具有G-线构象的四级结构。

[0264] 实施方案73是实施方案70至72中任一项的方法,其中所述第一多个鸟嘌呤核苷酸和所述第二多个鸟嘌呤核苷酸被至少两个核苷酸分隔。

[0265] 实施方案74是实施方案67至73中任一项的方法,其中所述第一多个鸟嘌呤核苷酸和所述至少一个CpG基序被至少3个核苷酸分隔。

[0266] 实施方案75是实施方案67至73中任一项的方法,其中所述第一多个鸟嘌呤核苷酸和所述至少一个CpG基序被六乙二醇分隔。

[0267] 实施方案76是实施方案75的方法,其中所述六乙二醇的结构是:



[0268] 实施方案77是实施方案48至76中任一项的方法,其中所述免疫刺激性寡核苷酸进一步包含多个CpG基序,所述多个CpG基序中的每个CpG基序被间隔基分隔。

[0269] 实施方案78是实施方案77的方法,其中所述间隔基包含至少一个核苷酸或核苷酸衍生物。

[0270] 实施方案79是实施方案78的方法,其中所述间隔基是脱氧核糖磷酸酯桥。

[0271] 实施方案80是实施方案79的方法,其中所述脱氧核糖磷酸酯桥是无碱基的。

[0272] 实施方案81是实施方案78的方法,其中所述间隔基包含碳链。

[0273] 实施方案82是实施方案81的方法,其中所述碳链衍生自1,3-丙二醇。

[0274] 实施方案83是实施方案78的方法,其中所述间隔基包含重复的化学单元。

[0275] 实施方案84是实施方案83的方法,其中所述重复的化学单元是乙二醇。

[0276] 实施方案85是实施方案48至84中任一项的方法,其中所述免疫调节剂组合物、所述免疫刺激性寡核苷酸或两者进一步包含至少一个核苷酸类似物。

[0277] 实施方案86是实施方案48至85中任一项的方法,其中所述免疫刺激性寡核苷酸包含磷酸二酯主链。

[0278] 实施方案87是实施方案48至85中任一项的方法,其中所述免疫刺激性寡核苷酸包含硫代磷酸酯主链。

[0279] 实施方案88是实施方案48至87中任一项的方法,其中所述免疫刺激性寡核苷酸进一步包含脂质部分。

[0280] 实施方案89是实施方案88的方法,其中所述脂质部分增强所述免疫刺激性寡核苷酸的生物利用度。

[0281] 实施方案90是实施方案88或89的方法,其中所述脂质部分是胆固醇基。

[0282] 实施方案91是实施方案88至90中任一项的方法,其中所述脂质部分在所述免疫刺激性寡核苷酸的5'末端处或附近。

[0283] 实施方案92是实施方案48至91中任一项的方法,其在5'末端、3'末端或两者处包含CpG序列元件。

[0284] 实施方案93是实施方案92的方法,其具有至少两个CpG序列元件。

[0285] 实施方案94是实施方案92或93的方法,其中所述CpG序列元件是GCGA、GCGG、ACGC、CCGC、GCGT或TCGC。

[0286] 实施方案95是实施方案48至94中任一项的方法,其中所述免疫调节剂组合物和所述免疫刺激性寡核苷酸同时施用。

[0287] 实施方案96是引发受试者中的免疫应答的方法,其包括向所述受试者施用实施方案1至46中任一项的免疫刺激性组合物。

[0288] 实施方案97是免疫刺激性组合物,其包含:

核酸质粒和脂质体递送媒介物;以及

包含SEQ ID NO:1的免疫刺激性寡核苷酸。

[0289] 实施方案98是实施方案97的免疫刺激性组合物,其中所述核酸质粒与SEQ ID NO:265具有至少75%序列同一性。

[0290] 实施方案99是实施方案97的免疫刺激性组合物,其中所述核酸质粒与SEQ ID NO:266具有至少75%序列同一性。

[0291] 实施方案100是实施方案97的免疫刺激性组合物,其中所述核酸质粒与SEQ ID NO:268具有至少75%序列同一性。

[0292] 实施方案101是实施方案97-100中任一项的免疫刺激性组合物,其中所述脂质体递送媒介物包含多层囊泡脂质、挤出脂质或两者。

[0293] 实施方案102是实施方案101的免疫刺激性组合物,其中所述脂质体递送媒介物是阳离子的。

[0294] 实施方案103是实施方案102的免疫刺激性组合物,其中阳离子脂质体递送媒介物包含选自以下的脂质对:N-[1-(2,3-二油烯基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)和胆固醇;N-[1-(2,3-二油酰基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTAP)和胆固醇;1-[2-(油酰基氧基)乙基]-2-油烯基-3-(2-羟基乙基)咪唑啉鎓氯化物(DOTIM)和胆固醇;以及二甲基双十八烷基溴化铵(DDAB)和胆固醇。

[0295] 实施方案104是实施方案97-103中任一项的免疫刺激性组合物,其中所述免疫刺激性寡核苷酸进一步包含5'胆固醇基修饰。

[0296] 实施方案105是实施方案104的免疫刺激性组合物,其中所述5'胆固醇基修饰包含三乙二醇接头。

[0297] 当引入本公开的要素或其优选实施方案时,冠词"一(a)"、"一(an)"、"该(the)"和"所述(said)"意指存在一或多个的所述要素。术语"包含"、"包括"和"具有"意欲是包括性的,并且意味着除了所列要素之外可以存在额外要素。

[0298] 鉴于上述内容,可见实现了本公开的几个目的并且获得了其他有利的结果。

[0299] 由于可以在不背离本公开的范围的情况下在上述产品和方法中进行各种改变,所以意欲应当将上述说明书中含有的所有内容解释为说明性的而不是在限制性意义上解释。

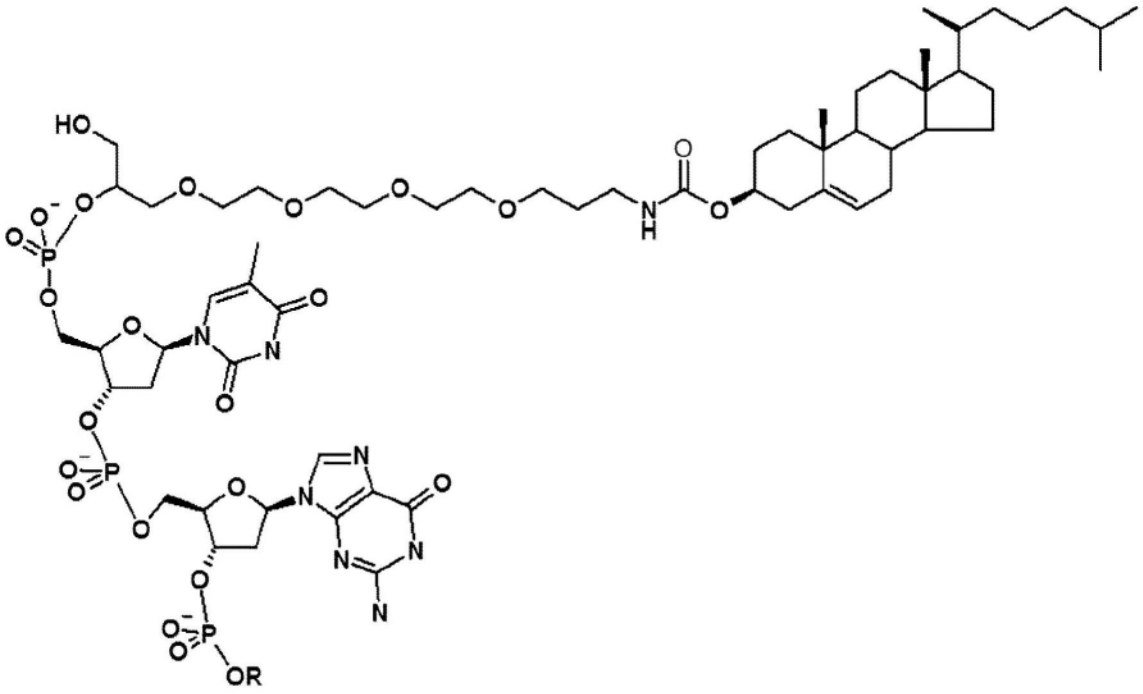

HO
O
N
H
O
N
N
O
N
N
N
N
O
N
N
O
P
O
OR

图1

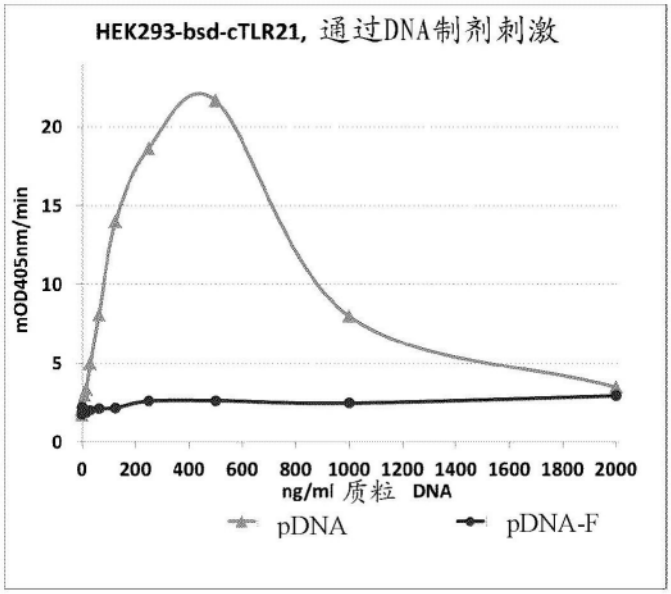

HEK293-bsd-cTLR21, 通过DNA制剂刺激
mOD405nm/min
20
15
10
5
0
0 200 400 600 800 1000 1200 1400 1600 1800 2000
ng/ml 质粒 DNA
pDNA
pDNA-F

图2A

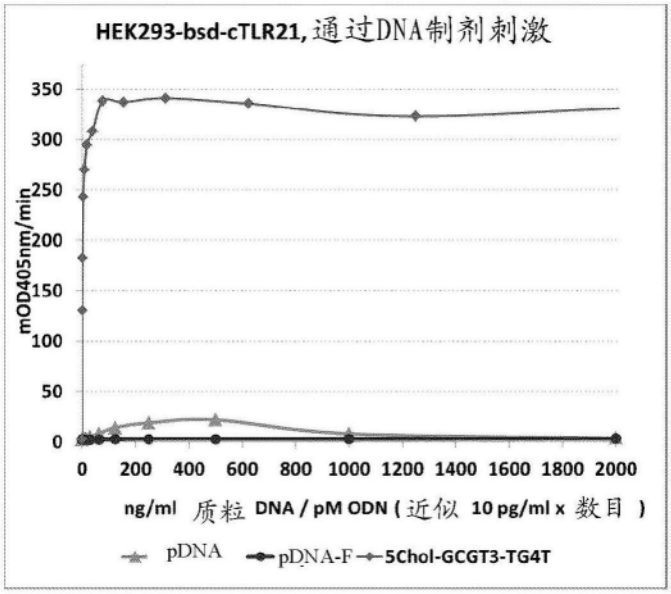

HEK293-bsd-cTLR21,通过DNA制剂刺激
mOD405nm/min
350
300
250
200
150
100
50
0
0 200 400 600 800 1000 1200 1400 1600 1800 2000
ng/ml 质粒 DNA / pM ODN (近似 10 pg/ml x 数目)
pDNA
pDNA-F
5Chol-GCGT3-TG4T

图2B

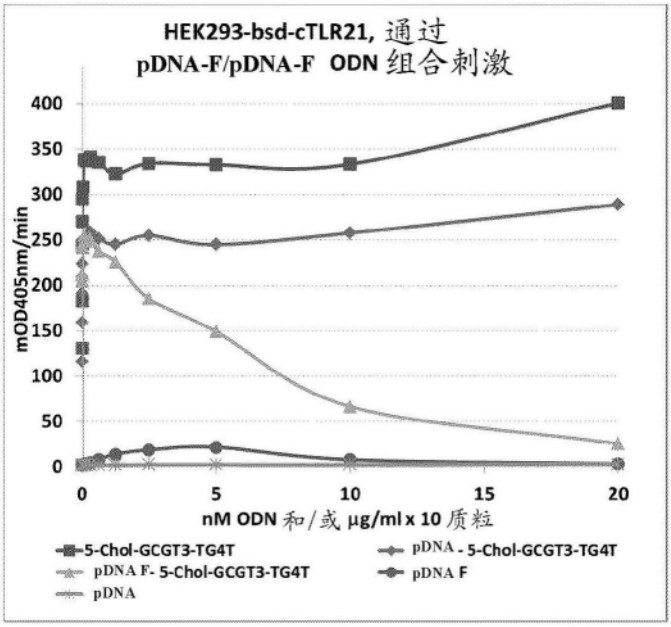

HEK293-bsd-cTLR21, 通过
pDNA-F/pDNA-F ODN 组合刺激
mOD405nm/min
400
350
300
250
200
150
100
50
0
0 5 10 15 20
nM ODN 和/或 µg/ml x 10 质粒
5-Chol-GCGT3-TG4T
pDNA - 5-Chol-GCGT3-TG4T
pDNA F- 5-Chol-GCGT3-TG4T
pDNA F
pDNA

图3A

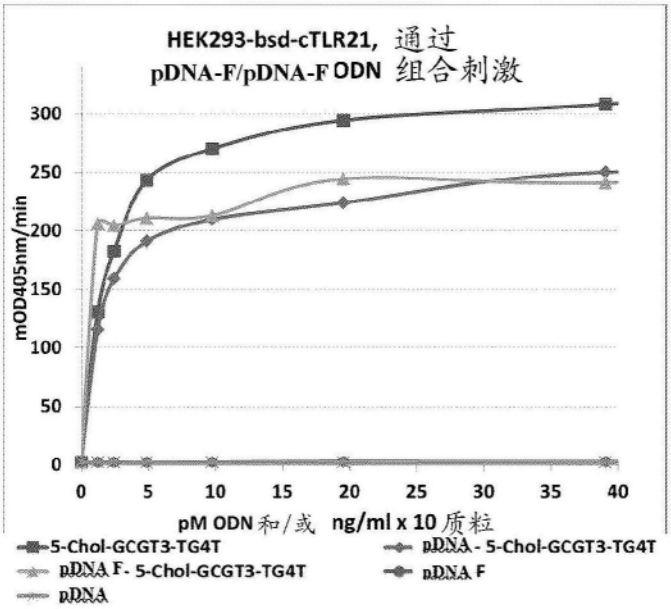

HEK293-bsd-cTLR21, 通过
pDNA-F/pDNA-F ODN 组合刺激
mOD405nm/min
300
250
200
150
100
50
0
0 5 10 15 20 25 30 35 40
pM ODN和/或 ng/ml x 10 质粒
5-Chol-GCGT3-TG4T
pDNA - 5-Chol-GCGT3-TG4T
pDNA F - 5-Chol-GCGT3-TG4T
pDNA F
pDNA

图3B

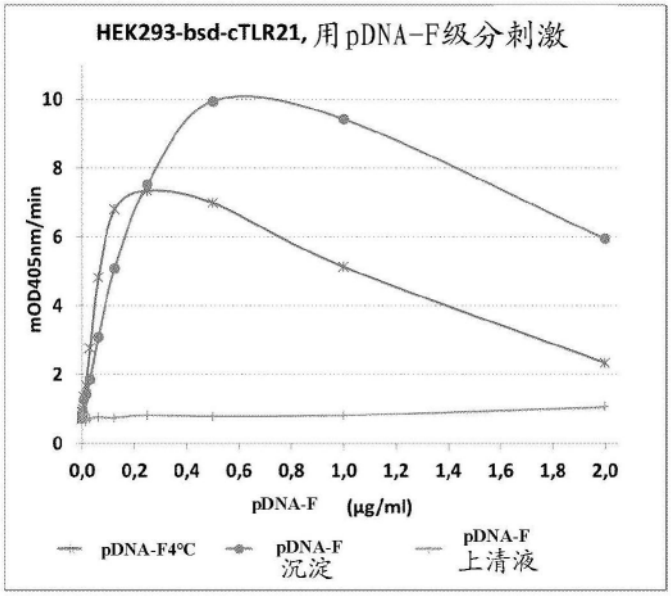

HEK293-bsd-cTLR21, 用pDNA-F级分刺激
mOD405nm/min
10
8
6
4
2
0
0,0 0,2 0,4 0,6 0,8 1,0 1,2 1,4 1,6 1,8 2,0
pDNA-F (μg/ml)
pDNA-F4℃
pDNA-F 沉淀
pDNA-F 上清液

图4

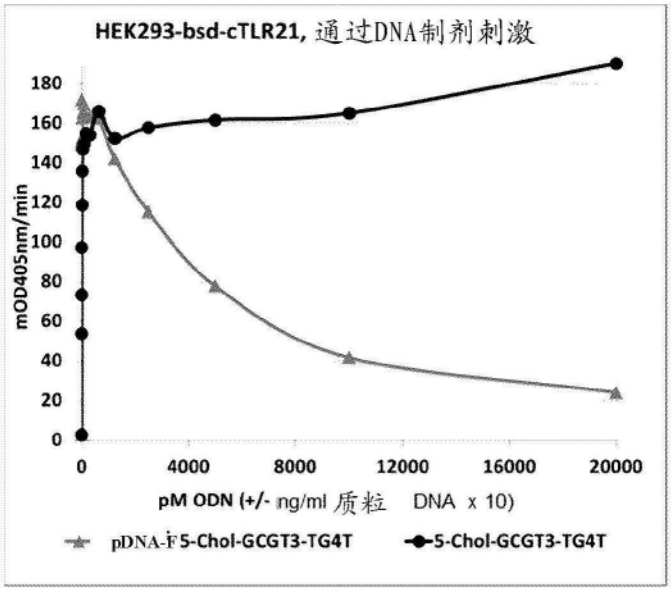

HEK293-bsd-cTLR21, 通过DNA制剂刺激
mOD405nm/min
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0
4000
8000
12000
16000
20000
pM ODN (+/- ng/ml 质粒 DNA x 10)
pDNA-F
5-Chol-GCGT3-TG4T
5-Chol-GCGT3-TG4T

图5A

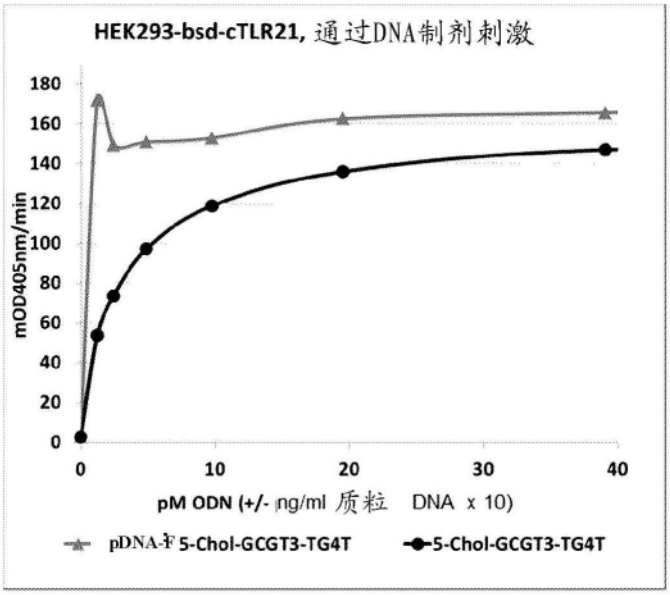

HEK293-bsd-cTLR21, 通过DNA制剂刺激
mOD405nm/min
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
pM ODN (+/- ng/ml 质粒 DNA x 10)
pDNA-F
5-Chol-GCGT3-TG4T
5-Chol-GCGT3-TG4T

图5B

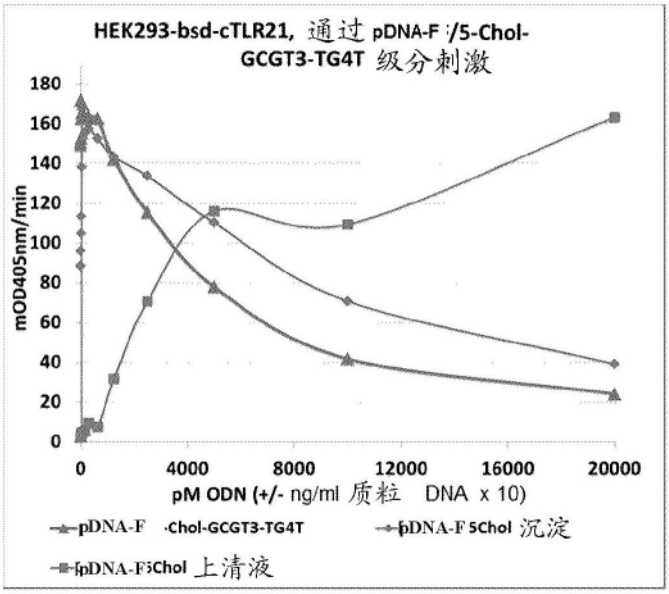

HEK293-bsd-cTLR21, 通过 pDNA-F 5-Chol-GCGT3-TG4T 级分刺激
mOD405nm/min
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0
4000
8000
12000
16000
20000
pM ODN (+/- ng/ml 质粒 DNA x 10)
pDNA-F 5-Chol-GCGT3-TG4T
pDNA-F 5Chol 沉淀
pDNA-F 5Chol 上清液

图6A

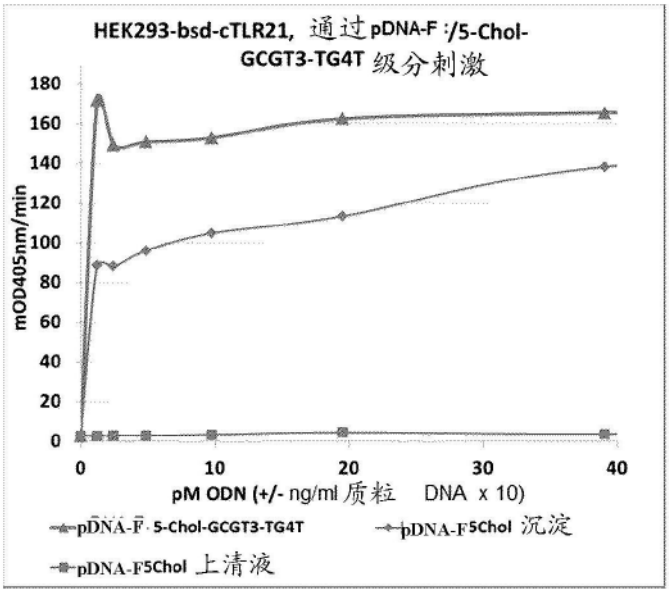

HEK293-bsd-cTLR21, 通过 pDNA-F 5-Chol-GCGT3-TG4T 级分刺激
mOD405nm/min
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
pM ODN (+/- ng/ml 质粒 DNA x 10)
pDNA-F 5-Chol-GCGT3-TG4T
pDNA-F 5Chol 沉淀
pDNA-F 5Chol 上清液

图6B

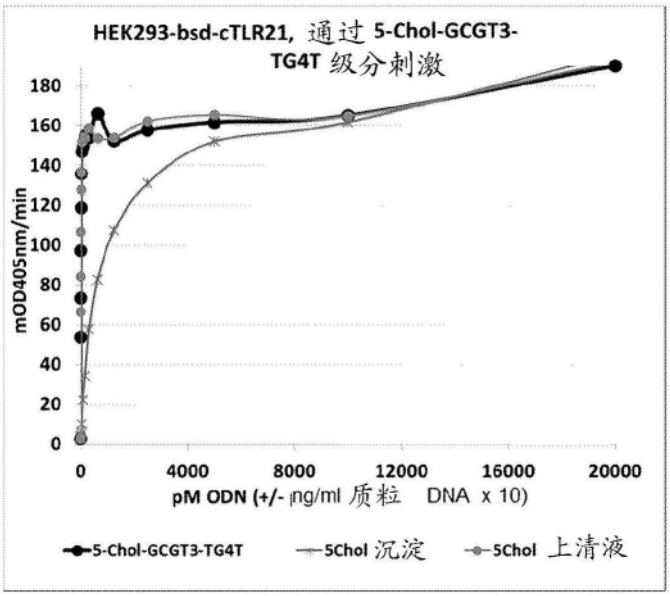

HEK293-bsd-cTLR21, 通过 5-Chol-GCGT3-TG4T 级分刺激
mOD405nm/min
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
0
4000
8000
12000
16000
20000
pM ODN (+/- ng/ml 质粒 DNA x 10)
5-Chol-GCGT3-TG4T
5Chol 沉淀
5Chol 上清液

图7A

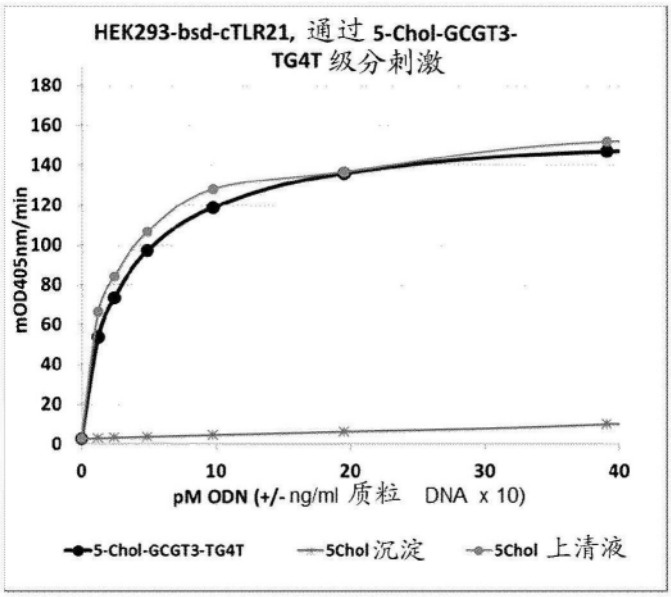

HEK293-bsd-cTLR21, 通过 5-Chol-GCGT3-TG4T 级分刺激
mOD405nm/min
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
0
10
20
30
40
pM ODN (+/- ng/ml 质粒 DNA x 10)
5-Chol-GCGT3-TG4T
5Chol 沉淀
5Chol 上清液

图7B

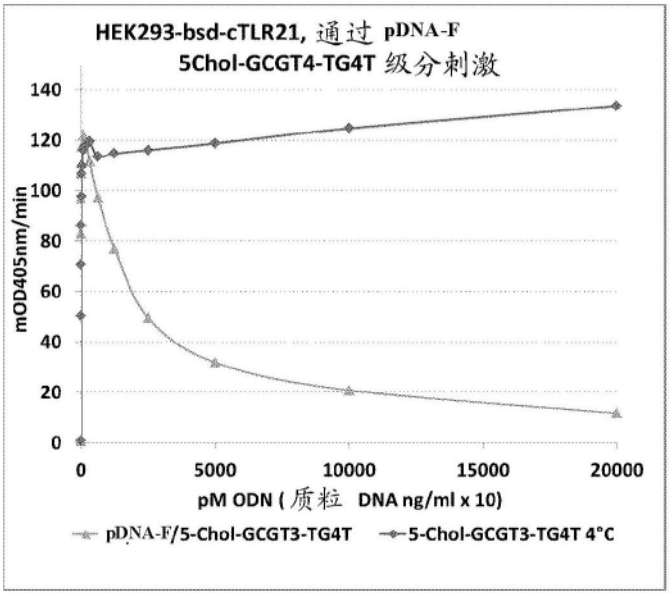

HEK293-bsd-cTLR21, 通过 pDNA-F
5Chol-GCGT4-TG4T 级分刺激
mOD405nm/min
140
120
100
80
60
40
20
0
0
5000
10000
15000
20000
pM ODN (质粒 DNA ng/ml x 10)
pDNA-F/5-Chol-GCGT3-TG4T
5-Chol-GCGT3-TG4T 4°C

图8A

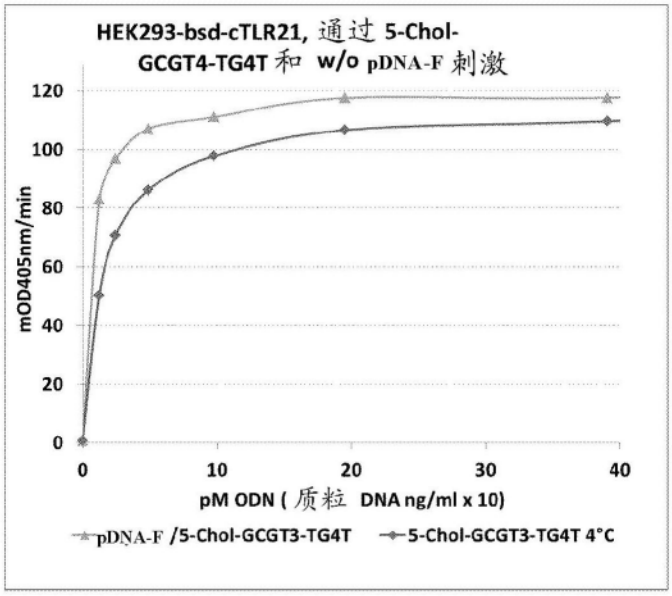

HEK293-bsd-cTLR21, 通过 5-Chol-
GCGT4-TG4T 和 w/o pDNA-F 刺激
mOD405nm/min
120
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
pM ODN (质粒 DNA ng/ml x 10)
pDNA-F /5-Chol-GCGT3-TG4T
5-Chol-GCGT3-TG4T 4°C

图8B

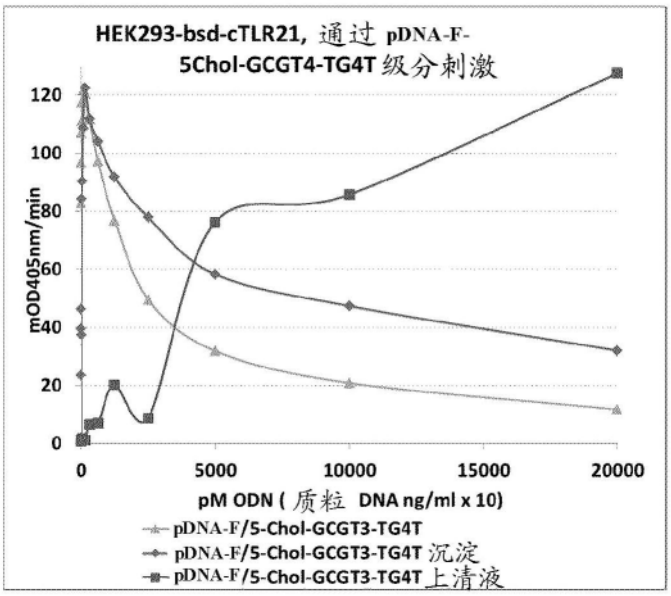

HEK293-bsd-cTLR21, 通过 pDNA-F-
5Chol-GCGT4-TG4T 级分刺激
mOD405nm/min
120
100
80
60
40
20
0
0
5000
10000
15000
20000
pM ODN (质粒 DNA ng/ml x 10)
pDNA-F/5-Chol-GCGT3-TG4T
pDNA-F/5-Chol-GCGT3-TG4T 沉淀
pDNA-F/5-Chol-GCGT3-TG4T 上清液

图9A

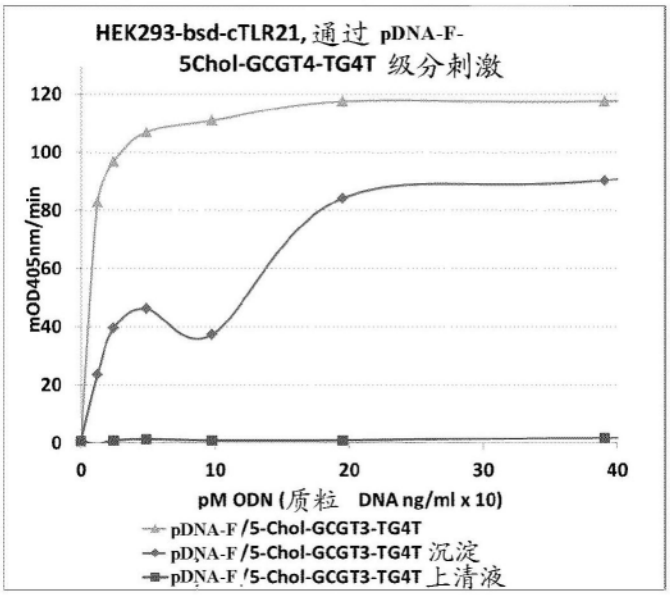

HEK293-bsd-cTLR21, 通过 pDNA-F-
5Chol-GCGT4-TG4T 级分刺激
mOD405nm/min
120
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
pM ODN (质粒 DNA ng/ml x 10)
pDNA-F /5-Chol-GCGT3-TG4T
pDNA-F /5-Chol-GCGT3-TG4T 沉淀
pDNA-F /5-Chol-GCGT3-TG4T 上清液

图9B

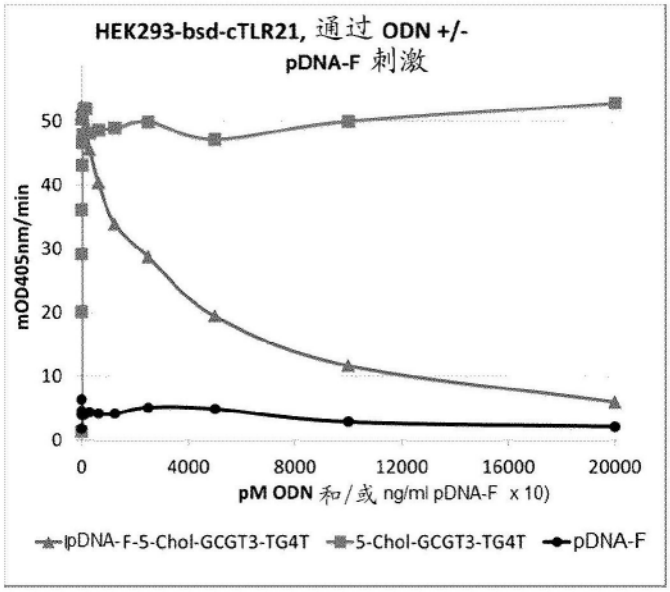

HEK293-bsd-cTLR21, 通过 ODN +/-
pDNA-F 刺激
mOD405nm/min
0
10
20
30
40
50
0
4000
8000
12000
16000
20000
pM ODN 和/或 ng/ml pDNA-F x 10)
pDNA-F-5-Chol-GCGT3-TG4T
5-Chol-GCGT3-TG4T
pDNA-F

图10A

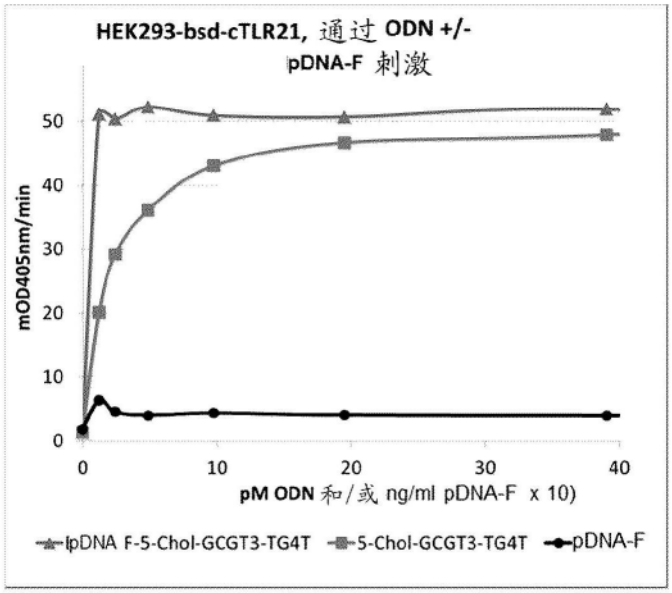

HEK293-bsd-cTLR21, 通过 ODN +/-
pDNA-F 刺激
mOD405nm/min
0
10
20
30
40
50
0
10
20
30
40
pM ODN 和/或 ng/ml pDNA-F x 10)
pDNA F-5-Chol-GCGT3-TG4T
5-Chol-GCGT3-TG4T
pDNA-F

图10B

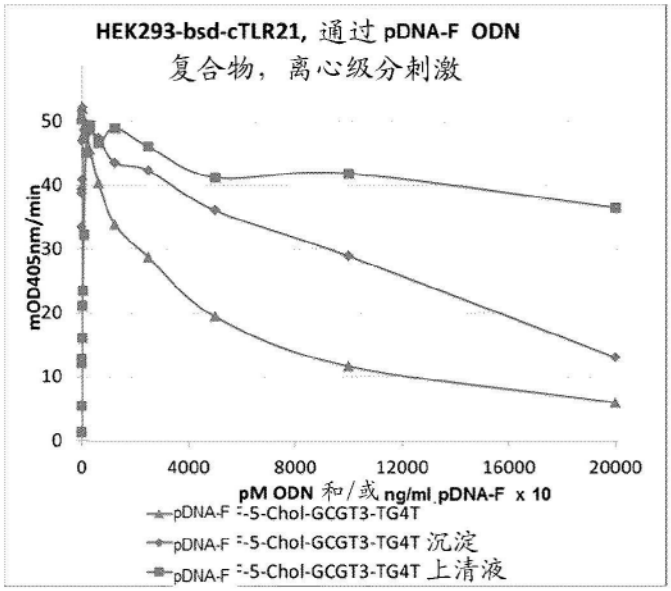

HEK293-bsd-cTLR21, 通过 pDNA-F ODN
复合物，离心级分刺激
mOD405nm/min
0
10
20
30
40
50
0
4000
8000
12000
16000
20000
pM ODN 和/或 ng/ml pDNA-F x 10
pDNA-F -5-Chol-GCGT3-TG4T
pDNA-F -5-Chol-GCGT3-TG4T 沉淀
pDNA-F -5-Chol-GCGT3-TG4T 上清液

图11A

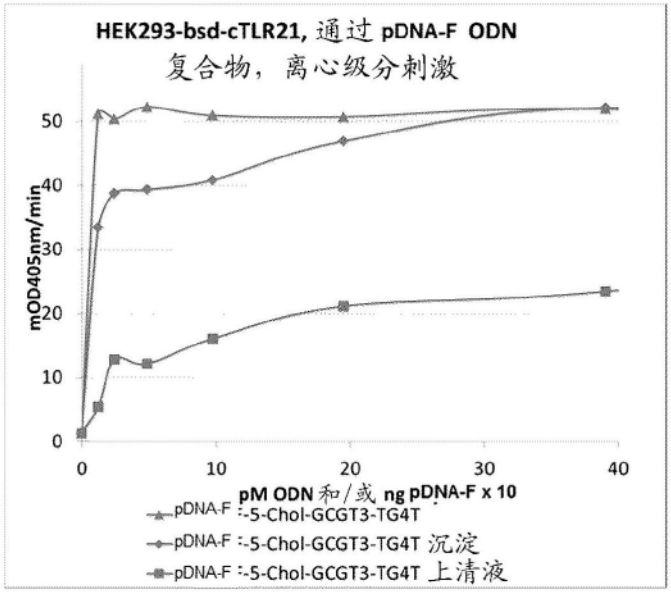

HEK293-bsd-cTLR21, 通过 pDNA-F ODN
复合物，离心级分刺激
mOD405nm/min
0
10
20
30
40
50
0
10
20
30
40
pM ODN 和/或 ng pDNA-F x 10
pDNA-F -5-Chol-GCGT3-TG4T
pDNA-F -5-Chol-GCGT3-TG4T 沉淀
pDNA-F -5-Chol-GCGT3-TG4T 上清液

图11B

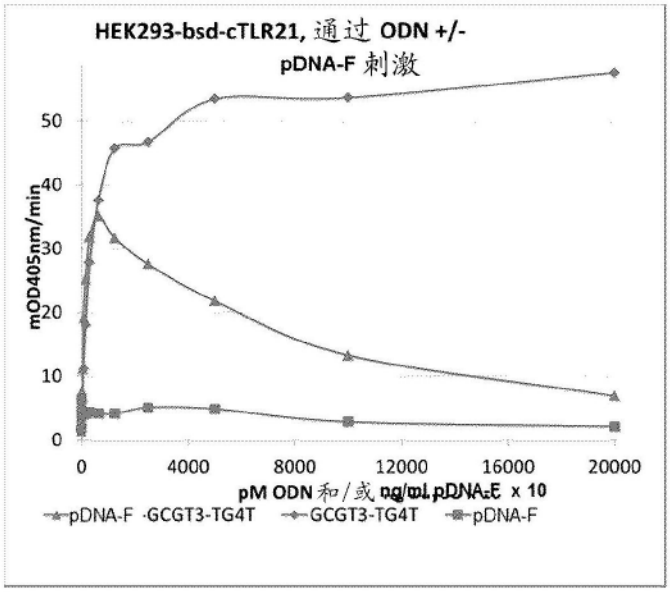

HEK293-bsd-cTLR21, 通过 ODN +/-
pDNA-F 刺激
mOD405nm/min
0
10
20
30
40
50
0
4000
8000
12000
16000
20000
pM ODN 和/或 ng/ml pDNA-F x 10
pDNA-F -GCGT3-TG4T
GCGT3-TG4T
pDNA-F

图12A

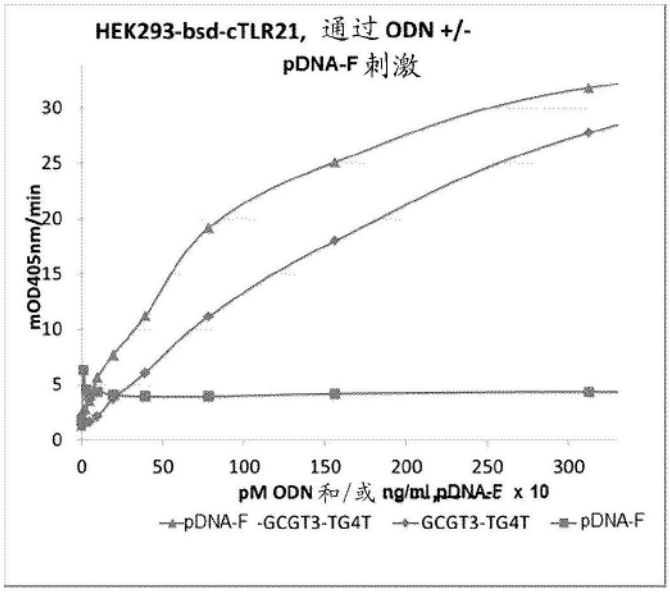

HEK293-bsd-cTLR21, 通过 ODN +/-
pDNA-F 刺激
mOD405nm/min
0
5
10
15
20
25
30
0
50
100
150
200
250
300
pM ODN 和/或 ng/ml pDNA-F x 10
pDNA-F -GCGT3-TG4T
GCGT3-TG4T
pDNA-F

图12B

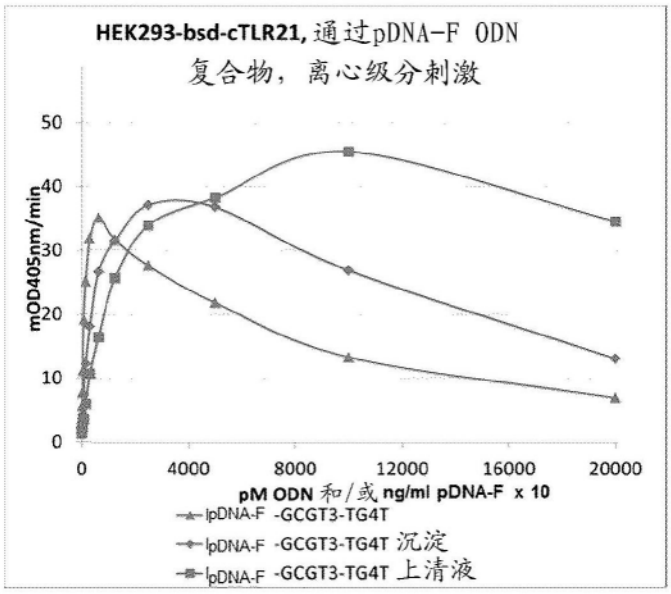

HEK293-bsd-cTLR21, 通过pDNA-F ODN
复合物，离心级分刺激
mOD405nm/min
0
10
20
30
40
50
0
4000
8000
12000
16000
20000
pM ODN 和/或 ng/ml pDNA-F x 10
pDNA-F -GCGT3-TG4T
pDNA-F -GCGT3-TG4T 沉淀
pDNA-F -GCGT3-TG4T 上清液

图13A

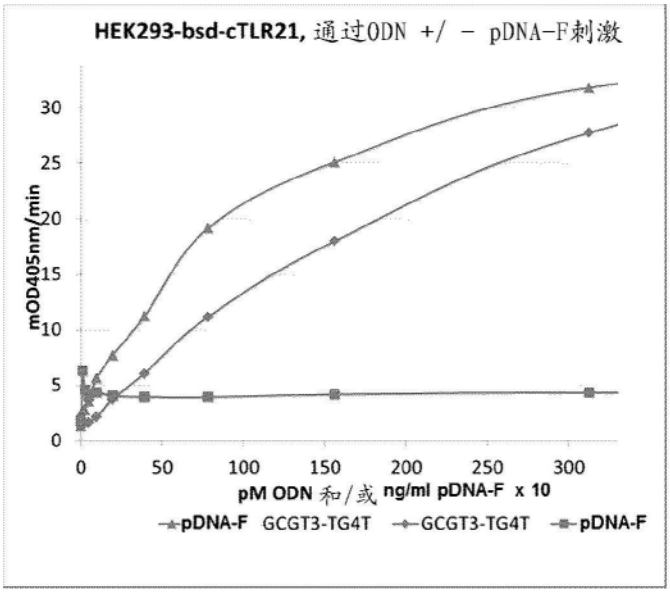

HEK293-bsd-cTLR21, 通过ODN +/ - pDNA-F刺激
mOD405nm/min
0
5
10
15
20
25
30
0
50
100
150
200
250
300
pM ODN 和/或 ng/ml pDNA-F x 10
pDNA-F GCGT3-TG4T
GCGT3-TG4T
pDNA-F

图13B

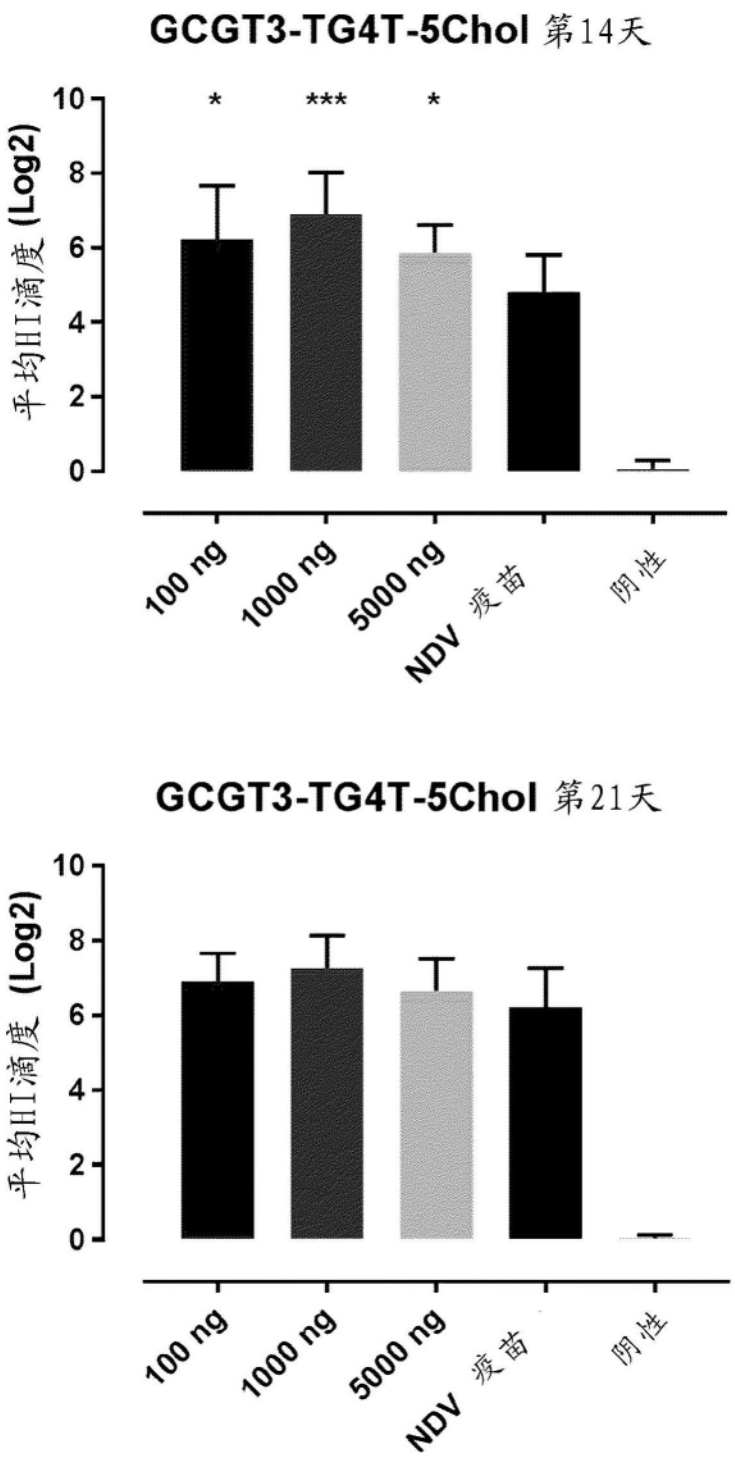

GCGT3-TG4T-5Chol 第14天
平均HI滴度 (Log2)
10
8
6
4
2
0
*
***
*
100 ng
1000 ng
5000 ng
NDV 疫苗
阴性
GCGT3-TG4T-5Chol 第21天
平均HI滴度 (Log2)
10
8
6
4
2
0
100 ng
1000 ng
5000 ng
NDV 疫苗
阴性

图14

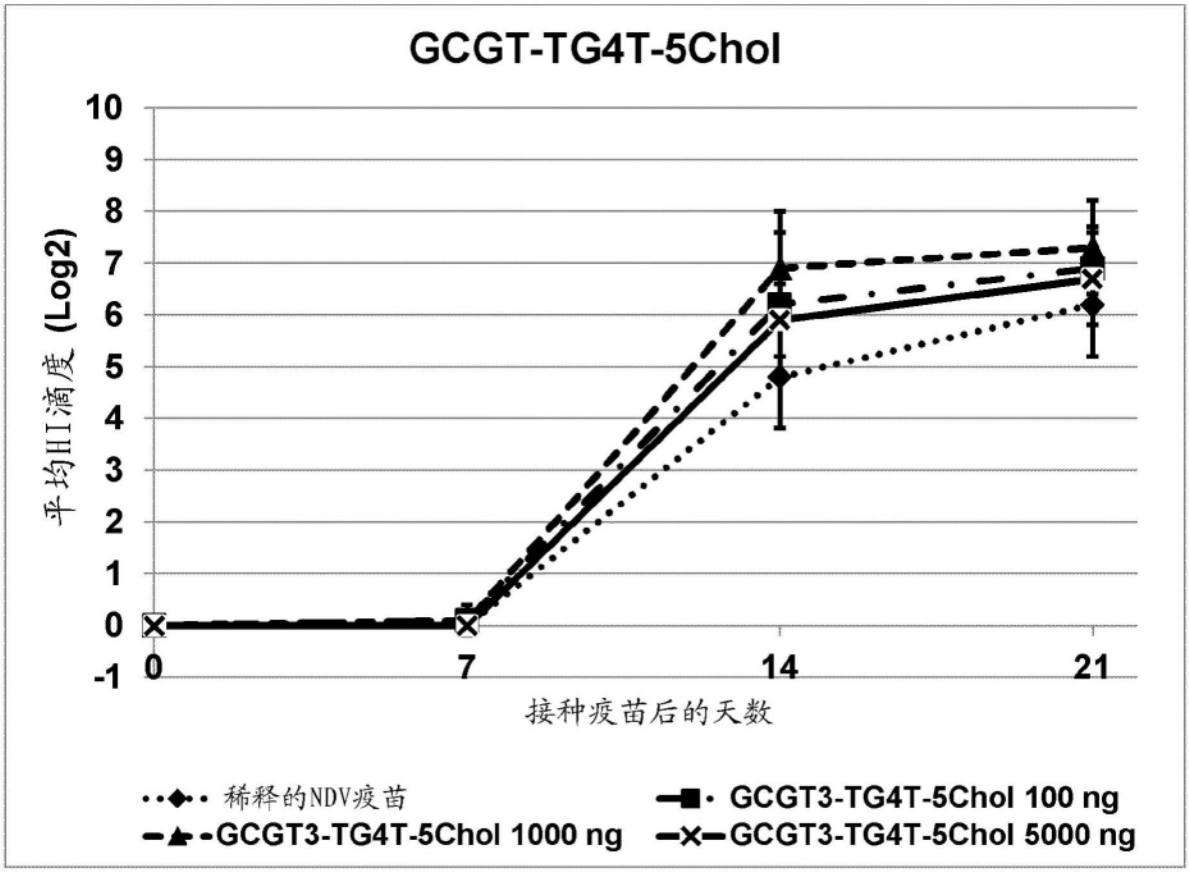

GCGT-TG4T-5Chol
平均HI滴度 (Log2)
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
-1
0
7
14
21
接种疫苗后的天数
稀释的NDV疫苗
GCGT3-TG4T-5Chol 100 ng
GCGT3-TG4T-5Chol 1000 ng
GCGT3-TG4T-5Chol 5000 ng

图15

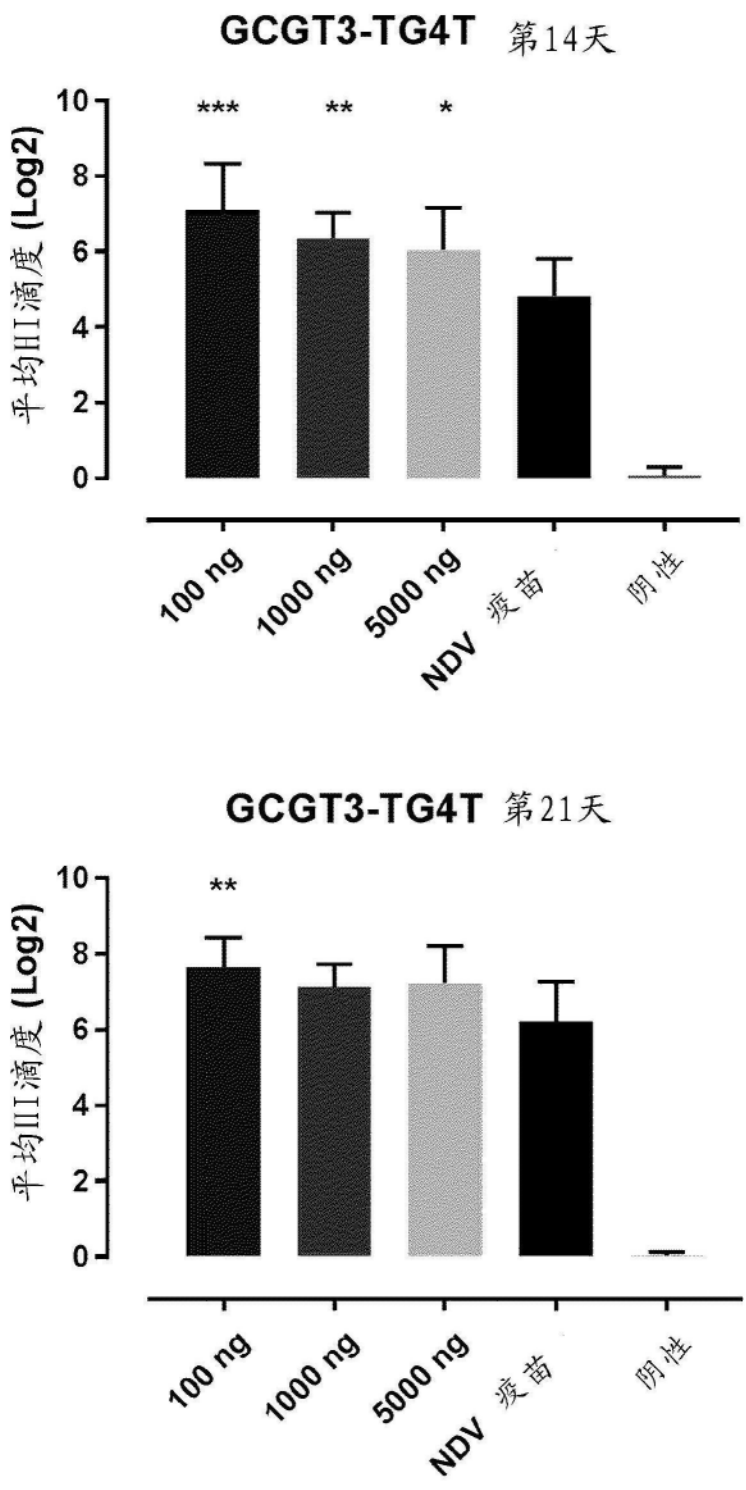

GCGT3-TG4T 第14天
平均HI滴度 (Log2)
10
8
6
4
2
0
***
**
*
100 ng
1000 ng
5000 ng
NDV 疫苗
阴性
GCGT3-TG4T 第21天
平均HI滴度 (Log2)
10
8
6
4
2
0
**
100 ng
1000 ng
5000 ng
NDV 疫苗
阴性

图16

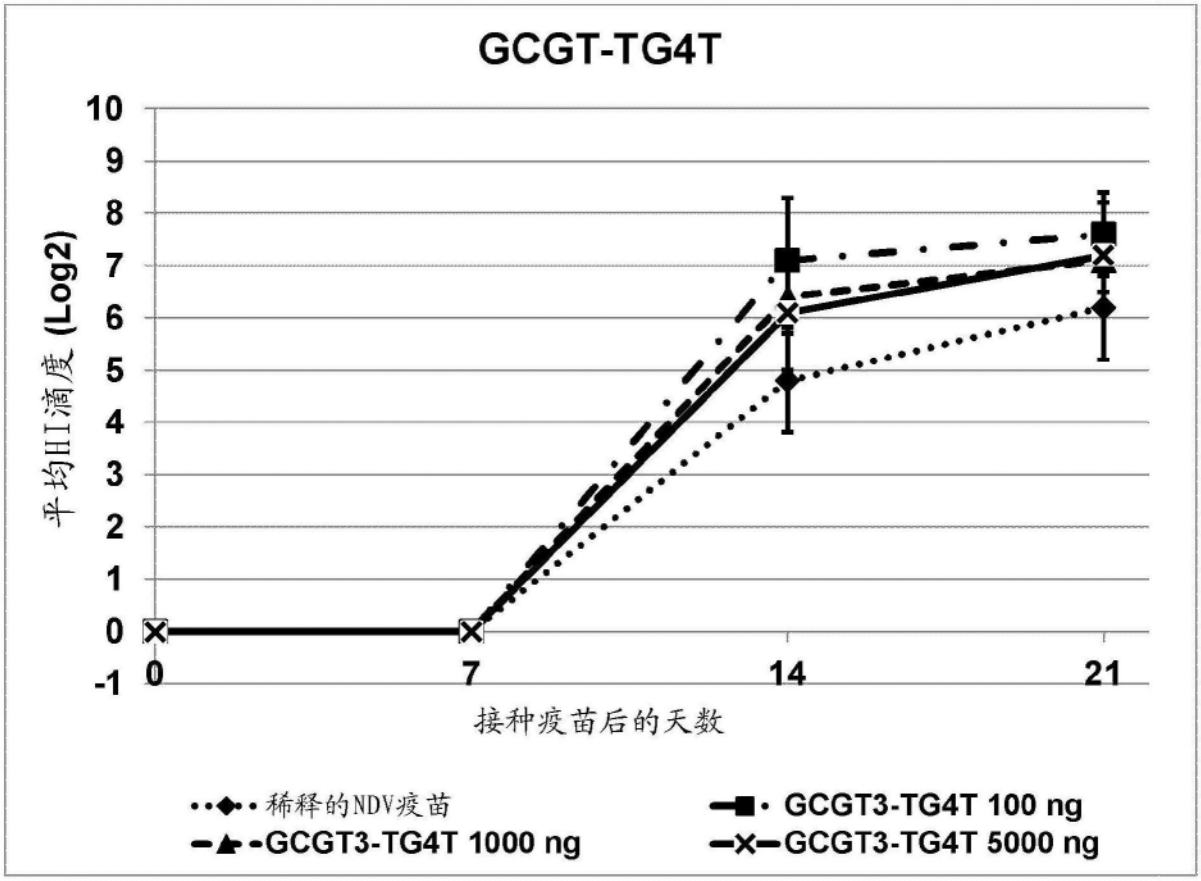

GCGT-TG4T
平均HI滴度 (Log2)
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
-1
0
7
14
21
接种疫苗后的天数
稀释的NDV疫苗
GCGT3-TG4T 100 ng
GCGT3-TG4T 1000 ng
GCGT3-TG4T 5000 ng

图17

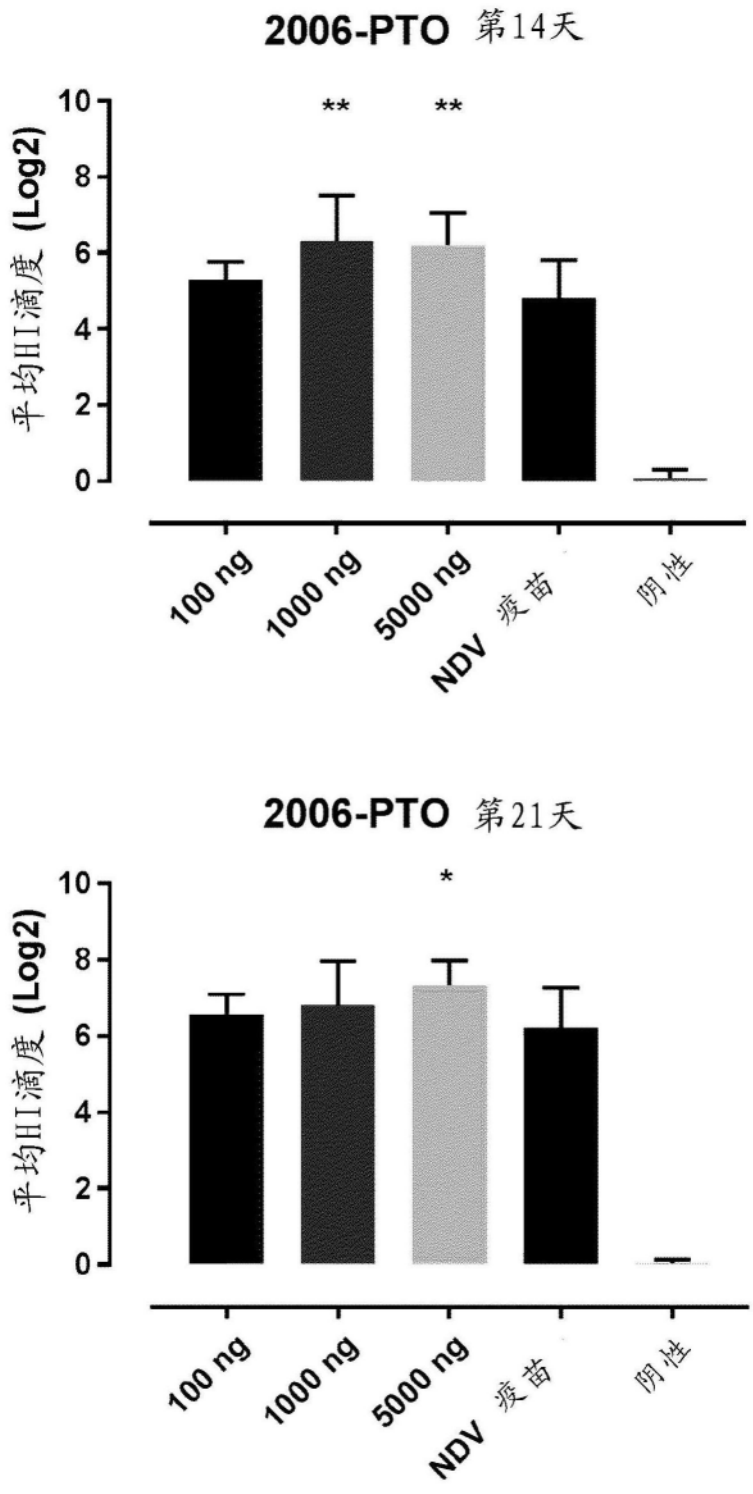

2006-PTO 第14天
平均HI滴度 (Log2)
10
8
6
4
2
0
**
**
100 ng
1000 ng
5000 ng
NDV 疫苗
阴性
2006-PTO 第21天
平均HI滴度 (Log2)
10
8
6
4
2
0
*
100 ng
1000 ng
5000 ng
NDV 疫苗
阴性

图18

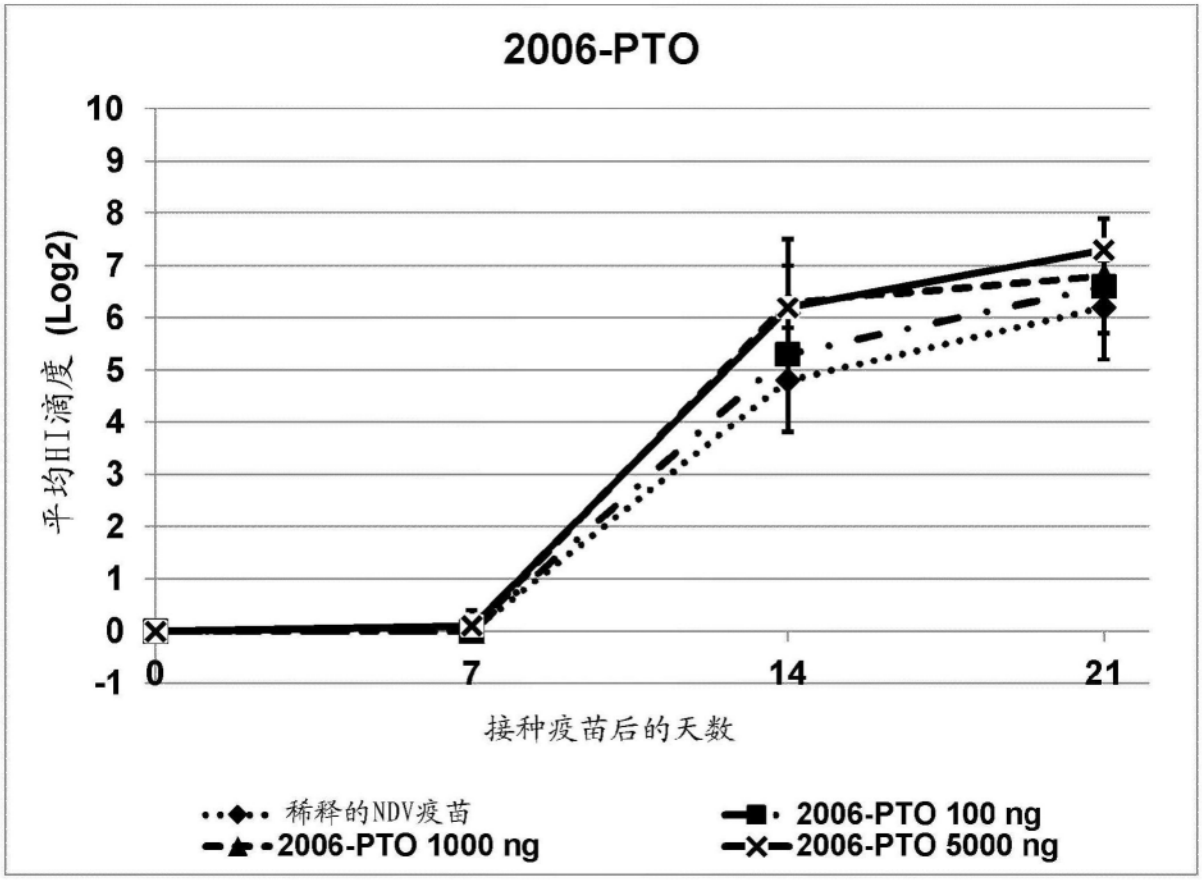

2006-PTO
平均HI滴度 (Log2)
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
-1
0
7
14
21
接种疫苗后的天数
稀释的NDV疫苗
2006-PTO 100 ng
2006-PTO 1000 ng
2006-PTO 5000 ng

图19

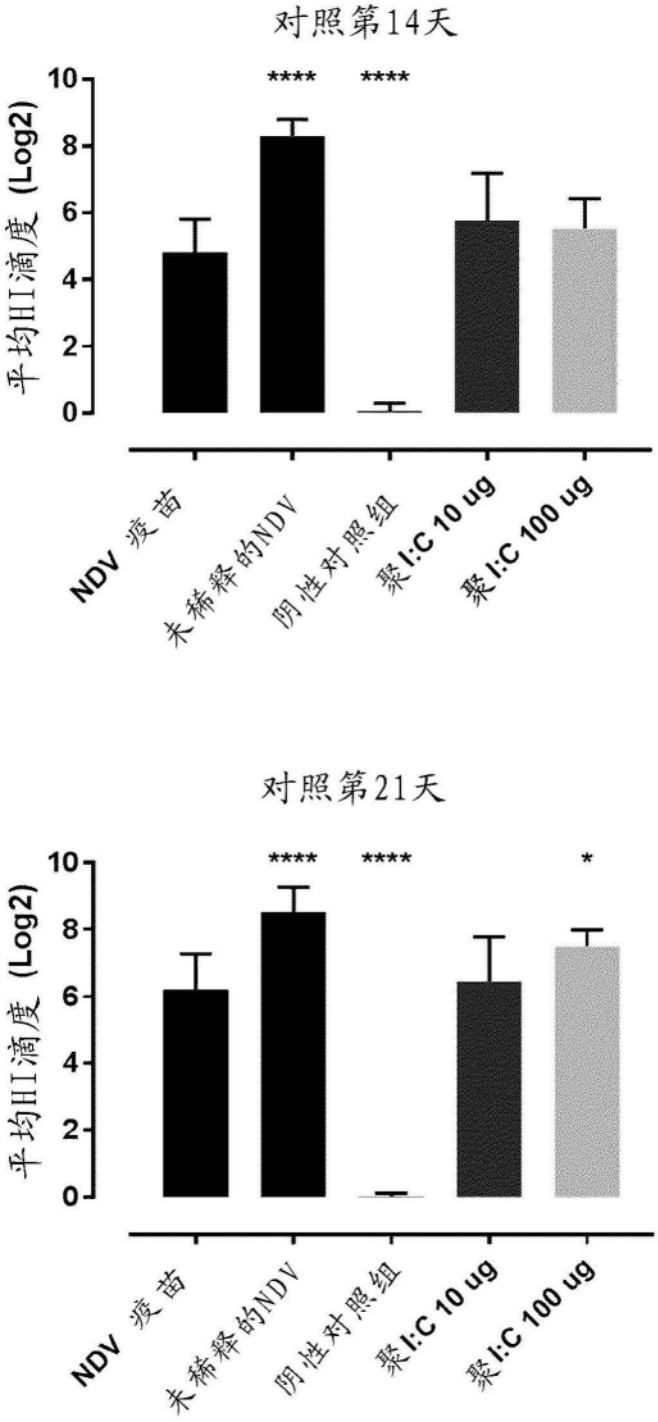

对照第14天
平均HI滴度 (Log2)
10
8
6
4
2
0
****
****
NDV 疫苗
未稀释的NDV
阴性对照组
聚I:C 10 ug
聚I:C 100 ug
对照第21天
平均HI滴度 (Log2)
10
8
6
4
2
0
****
****
*
NDV 疫苗
未稀释的NDV
阴性对照组
聚I:C 10 ug
聚I:C 100 ug

图20

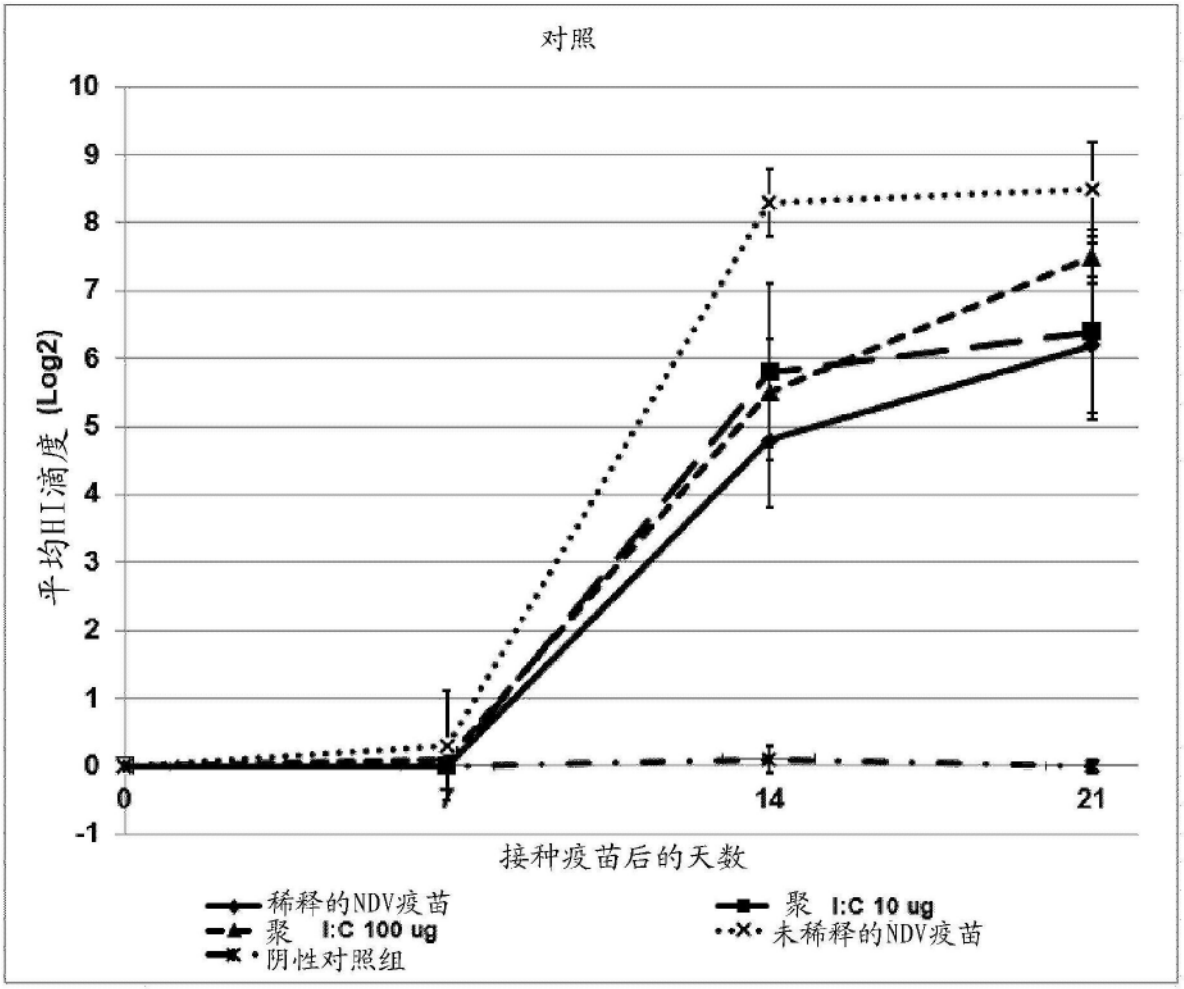

对照
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
-1
平均HI滴度 (Log2)
0
7
14
21
接种疫苗后的天数
稀释的NDV疫苗
聚 I:C 10 ug
聚 I:C 100 ug
未稀释的NDV疫苗
阴性对照组

图21

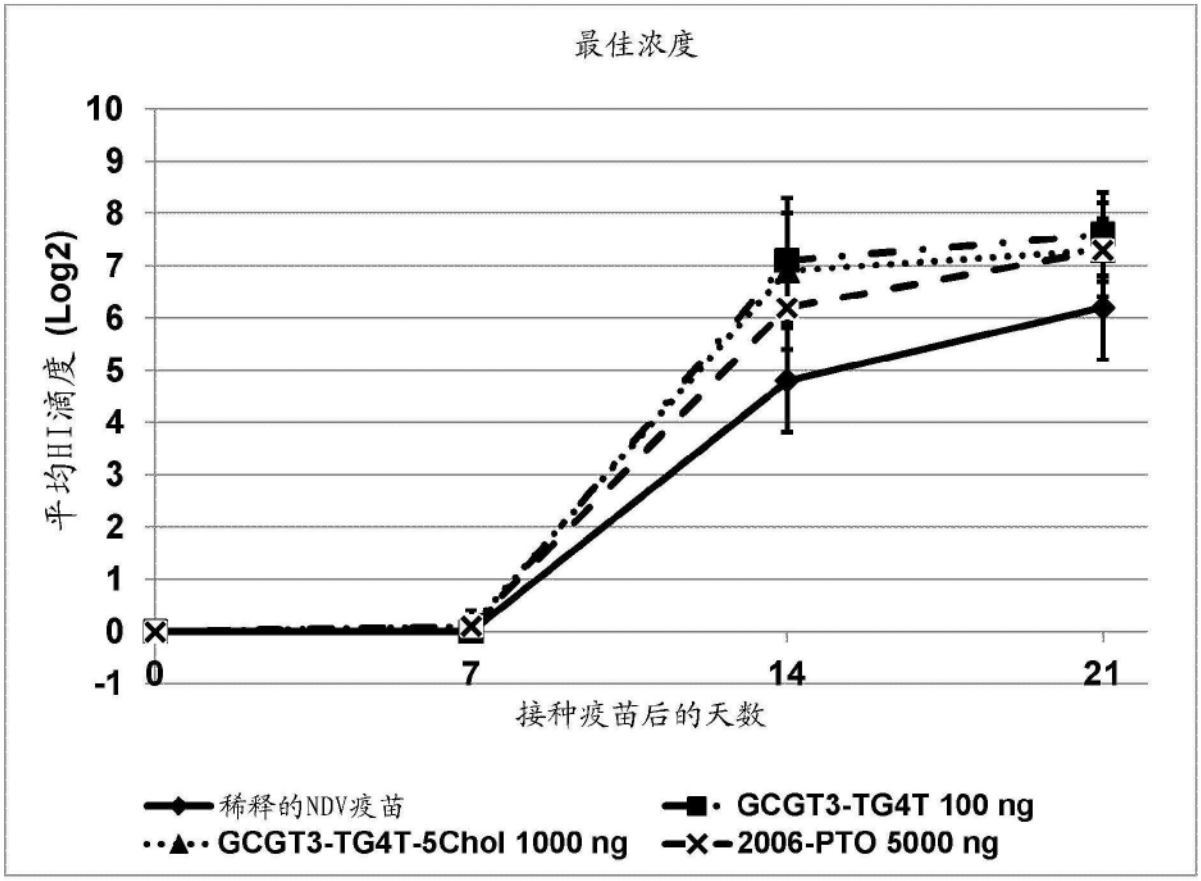

最佳浓度
平均HI滴度 (Log2)
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
-1
0
7
14
21
接种疫苗后的天数
稀释的NDV疫苗
GCGT3-TG4T 100 ng
GCGT3-TG4T-5Chol 1000 ng
2006-PTO 5000 ng

图22

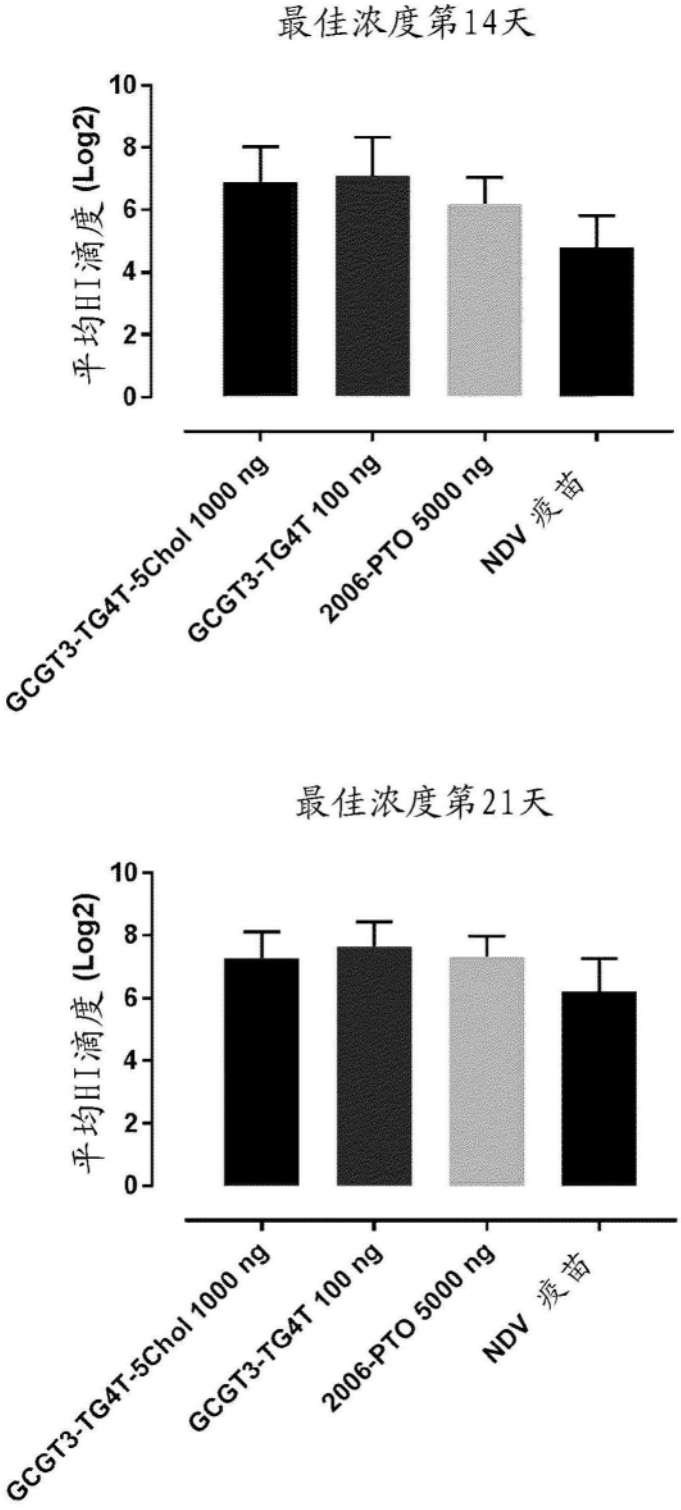

最佳浓度第14天
平均HI滴度 (Log2)
10
8
6
4
2
0
GCGT3-TG4T-5Chol 1000 ng
GCGT3-TG4T 100 ng
2006-PTO 5000 ng
NDV 疫苗
最佳浓度第21天
平均HI滴度 (Log2)
10
8
6
4
2
0
GCGT3-TG4T-5Chol 1000 ng
GCGT3-TG4T 100 ng
2006-PTO 5000 ng
NDV 疫苗

图23