

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780051260. X

[51] Int. Cl.

A01N 43/04 (2006.01)

A61K 31/70 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 12 月 23 日

[11] 公开号 CN 101610671A

[22] 申请日 2007. 12. 12

[21] 申请号 200780051260. X

[30] 优先权

[32] 2006. 12. 12 [33] US [31] 60/869,604

[86] 国际申请 PCT/US2007/087182 2007. 12. 12

[87] 国际公布 WO2008/073959 英 2008. 6. 19

[85] 进入国家阶段日期 2009. 8. 12

[71] 申请人 艾德拉药物股份有限公司

地址 美国马萨诸塞州

[72] 发明人 埃卡姆巴·R·坎迪马拉

马力卡朱纳·雷迪 郁 东

拉克施米·巴加特 王大庆

萨迪尔·阿格拉瓦尔

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 闵 丹

权利要求书 1 页 说明书 41 页

[54] 发明名称

合成的 TLR9 激动剂

[57] 摘要

本发明提供了新的基于寡核苷酸的化合物，它们各自作为激动剂与 TLR9 相互作用而分别提供相异的免疫应答序型。依照本发明的 TLR9 激动剂的特征在于特定的和独特的化学修饰，其提供了它们相异的免疫应答激活序型。

1. 具有表1中SEQ ID NO: 1-92所示寡核苷酸的TLR9激动剂, 其中核苷间连接选自下组: 磷酸二酯连接、硫代磷酸酯连接及其混合。
2. 一种组合物, 其包含依照权利要求1的TLR9激动剂, 且进一步包含生理学可接受载体。
3. 一种疫苗, 其包含依照权利要求2的组合物, 且进一步包含抗原。
4. 在脊椎动物中产生TLR9介导的免疫应答的方法, 包括对脊椎动物施用有效量的依照权利要求1的TLR9激动剂。
5. 在脊椎动物中产生TRL9介导的免疫应答的方法, 包括对脊椎动物施用有效量的依照权利要求2的组合物。
6. 用于治疗性处理患有疾病或病症的患者的方法, 包括对患者施用治疗有效量的依照权利要求1的TLR9激动剂。
7. 用于治疗性处理患有疾病或病症的患者的方法, 包括对患者施用治疗有效量的依照权利要求2的组合物。
8. 用于治疗性处理患有疾病或病症的患者的方法, 包括对患者施用治疗有效量的依照权利要求3的疫苗。
9. 用于在对疾病或病症易感的患者中预防所述疾病或病症的方法, 包括对患者施用预防有效量的依照权利要求1的TLR9激动剂。
10. 用于在对疾病或病症易感的患者中预防所述疾病或病症的方法, 包括对患者施用预防有效量的依照权利要求2的组合物。
11. 用于在对疾病或病症易感的患者中预防所述疾病或病症的方法, 包括对患者施用预防有效量的依照权利要求3的疫苗。
12. 依照权利要求4-11任一项的方法, 其中所述疾病或病症选自下组: 癌症、自身免疫性病症、气道炎症、炎性病症、传染病、变态反应、哮喘和由病原体引起的疾病。

合成的TLR9激动剂

相关申请

本申请要求2006年12月12日提交的美国临时申请流水号60/869,604的权益，通过述及将其内容收入本文。

发明领域

本发明涉及对于调控Toll样受体(TLR)介导的免疫应答有用的合成的化学组合物。具体而言，本发明涉及产生独特的细胞因子和趋化因子序型的Toll样受体9 (TLR9)激动剂。

发明背景

Toll样受体(TLR)存在于免疫系统的许多细胞上，而且已经显示出牵涉先天性免疫应答(Hornung, V.等 (2002) J. Immunol. 168:4531-4537)。在脊椎动物中，这个家族由称作TLR1至TLR11的11种蛋白质组成，已知它们识别来自细菌、真菌、寄生物、和病毒的病原体相关分子样式(Poltorak, a.等 (1998) Science 282:2085-2088; Underhill, D.M.等 (1999) Nature 401:811-815; Hayashi, F.等 (2001) Nature 410:1099-1103; Zhang, D.等 (2004) Science 303:1522-1526; Meier, A.等 (2003) Cell. Microbiol. 5:561-570; Campos, M.A.等 (2001) J. Immunol. 167: 416-423; Hoebe, K.等 (2003) Nature 424: 743-748; Lund, J. (2003) J. Exp. Med. 198:513-520; Heil, F.等 (2004) Science 303:1526-1529; Diebold, S.S.等 (2004) Science 303:1529-1531; Hornung, V.等 (2004) J. Immunol. 173:5935-5943)。

TLR是脊椎动物识别外来分子和对外来分子发动免疫应答的关键手段，而且还提供了联系先天性和适应性免疫应答的手段(Akira, S.等 (2001) Nature Immunol. 2:675-680; Medzhitov, R. (2001) Nature Rev. Immunol. 1:135-145)。有些TLR位于细胞表面上以检测胞外病原体和对胞外病原体启动应答，而其它TLR位于细胞内以检测胞内病原体和对胞内病原体启动应答。

已知TLR9识别细菌DNA中的和合成寡核苷酸中的未甲基化CpG基序(Hemmi, H.等 (2000) *Nature* 408:740-745)。含CpG的硫代磷酸酯寡核苷酸的其它修饰也能影响它们作为经由TLR9之免疫应答的调控物起作用的能力(参见例如Zhao等 (1996) *Biochem. Pharmacol.* 51:173-182; Zhao等 (1996) *Biochem Pharmacol.* 52:1537-1544; Zhao等 (1997) *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 7:495-502; Zhao等 (1999) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9:3453-3458; Zhao等 (2000) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 10:1051-1054; Yu, D.等 (2000) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 10:2585-2588; Yu, D.等 (2001) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11:2263-2267; 及 Kandimalla, E.等 (2001) *Bioorg. Med. Chem.* 9:807-813)。天然存在的TLR9激动剂已经显示出产生抗肿瘤活性(例如肿瘤生长和血管发生), 导致有效的抗癌应答(例如抗白血病)(Smith, J.B.和Wickstrom, E. (1998) *J. Natl. Cancer Inst.* 90:1146-1154)。另外, TLR9激动剂已经显示出与其它已知的抗肿瘤化合物(例如西妥昔单抗(cetuximab)、伊立替康(irinotecan))协同工作(Vincenzo, D.等 (2006) *Clin. Cancer Res.* 12(2):577-583)。

某些TLR9激动剂由含有核心CpR二核苷酸的3'-3'连接的DNA结构构成, 其中R为经修饰的鸟苷(美国专利申请号10/279,684)。另外, 特定的化学修饰容许制备特定的寡核苷酸类似物, 其产生对免疫应答的相异的调控。具体而言, 结构活性相关性研究容许鉴定合成基序和新的基于DNA的化合物, 其产生对免疫应答的特定的调控, 而且这些调控与由未甲基化的CpG二核苷酸所产生的调控是相异的(Kandimalla, E.等 (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 102:6925-6930; Kandimalla, E.等 (2003) *Proc. Nat. Acad. Sci. U S A* 100:14303-14308; Cong, Y.等 (2003) *Biochem Biophys Res. Commun.* 310:1133-1139; Kandimalla, E.等 (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 306:948-953; Kandimalla, E.等 (2003) *Nucleic Acids Res.* 31:2393-2400; Yu, D.等 (2003) *Bioorg. Med. Chem.* 11:459-464; Bhagat, L.等 (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300:853-861; Yu, D.等 (2002) *Nucleic Acids Res.* 30:4460-4469; Yu, D.等 (2002) *J. Med. Chem.* 45:4540-4548; Yu, D.等 (2002) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297:83-90; Kandimalla, E.等 (2002) *Bioconjug. Chem.* 13:966-974; Yu, D.等 (2002) *Nucleic Acids Res.* 30:1613-1619; Yu, D.等 (2001) *Bioorg. Med. Chem.* 9:2803-2808; Yu, D.等

(2001) Bioorg. Med. Chem. Lett. 11:2263-2267; Kandimalla, E.等 (2001) Bioorg. Med. Chem. 9:807-813; Yu, D.等 (2000) Bioorg. Med. Chem. Lett. 10:2585-2588; Putta, M.等 (2006) Nucleic Acids Res. 34:3231-3238)。

发明人出人意料地发现,对核心CpR二核苷酸侧翼序列的独特的修饰产生新的TLR9激动剂,其在体外和在体内产生相异的细胞因子和趋化因子序型。这种对含CpR的寡核苷酸“定制调节”(custom-tune)细胞因子和趋化因子应答的能力容许提供以疾病特异性的和甚至患者特异性的方式预防和/或治疗各种疾病状况的能力。如此,需要新的寡核苷酸类似物化合物来提供此类受到定制调节的应答。

发明概述

本发明提供了新的基于寡核苷酸的化合物,它们各自作为激动剂与TLR9相互作用而分别提供相异的(distinct)免疫应答序型(profile)。依照本发明的TLR9激动剂的特征在于特定的(specific)和独特的(unique)化学修饰,其提供了它们相异的(distinctive)免疫应答激活序型。

依照本发明的TLR9激动剂在多种细胞类型中且在多种体外和体内实验模型中诱导免疫应答,其中各种激动剂提供相异的免疫应答序型。因此,它们作为用于研究免疫系统以及用于比较各种动物物种(诸如人和小鼠)的免疫系统的工具是有用的。依照本发明的TLR9激动剂单独、或与其它药物联合,或作为用作疫苗的抗原的佐剂,用在预防和/或治疗各种疾病中。

如此,在第一个方面,本发明提供了TLR9的基于寡核苷酸的激动剂。

在第二个方面,本发明提供了包含依照本发明的基于寡核苷酸的TRL9激动剂(“化合物”)和生理学可接受载体的组合物。

在第三个方面,本发明提供了疫苗。依照这个方面的疫苗包含依照本发明的组合物,且进一步包含抗原。

在第四个方面,本发明提供了用于在脊椎动物中产生TLR9介导的免疫应答的方法,此类方法包括对脊椎动物施用依照本发明的化合物、组合物或疫苗。

在第五个方面,本发明提供了用于治疗性处理患有疾病或病症的患者的方法,此类方法包括对患者施用依照本发明的化合物、组合物或疫苗。

在第六个方面,本发明提供了用于预防疾病或病症的方法,包括对患者

施用依照本发明的化合物、组合物或疫苗。

发明详述

本发明提供了新的基于寡核苷酸的化合物，它们各自作为激动剂与TLR9相互作用而分别提供相异的免疫应答序型。依照本发明的TLR9激动剂的特征在于独特的化学修饰，其提供了它们相异的免疫应答激活序型。本文中所引用的所有出版物反映了本领域的技术水平，通过述及将它们完整收入本文。这些参考文献的教导与本说明书之间的任何冲突应当以有利于后者的方式来解决。

依照本发明的TLR9激动剂在多种细胞类型中且在多种体内和体外实验模型中诱导免疫应答，其中各种激动剂提供相异的免疫应答序型。因此，它们作为用于研究免疫系统以及用于比较各种动物物种(诸如人和小鼠)的免疫系统的工具是有用的。依照本发明的TLR9激动剂单独、或与其它药物联合，或作为用作疫苗的抗原的佐剂，用在预防和/或治疗各种疾病中。

表1显示了依照本发明的某些TLR9激动剂。在此表中，除非指明，基于寡核苷酸的TLR9激动剂均为硫代磷酸酯(PS)连接。除非指明，所有核苷酸均为脱氧核糖核苷酸。然而，本领域技术人员会认识到，可使用磷酸二酯(PO)连接或混用PS连接和PO连接。

表1

SEQ ID NO/寡聚物No.	序列和修饰
1	5'-TCAGTCG ₁ TTAC-X-CATTG ₁ CTGACT-5'
2	5'-TCTGTCTCG ₁ TTAG-X-GATTG ₁ CTGTCT-5'
3	5'-CAGTCG ₁ TTCTAG-X-GACTTG ₁ CTGAC-5'
4	5'-TCTGTCTCG ₁ TTTT-X-TTTTG ₁ CTGTCT-5'
5	5'-TCTGTCTCG ₁ TTGT-X-TGTTG ₁ CTGTCT-5'
6	5'-TAGTCG ₁ TTTTT-X-TTTTTG ₁ CGTAT-5'
7	5'-TGGTCG ₁ TTCTT-X-TTCTTG ₁ CTGGT-5'
8	5'-TAGTCG ₁ TTGTA-X-ATGTTG ₁ CTGAT-5'
9	5'-TAGTCG ₁ TTCTC-X-CTCTTG ₁ CTGAT-5'
10	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTCTT-X-TTCTTG ₁ CTGCT-5'
11	5'-TCG ₁ TACG ₁ TACG ₁ -X-G ₁ CATG ₁ CATG ₁ CT-5'
12	5'-TCG ₁ TCG ₁ ACG ₁ AT-X-TAG ₁ CAG ₁ CTG ₁ CT-5'
13	5'-TCG ₁ ATCG ₁ ATCG ₁ -X-G ₁ CTAG ₁ CTAG ₁ CT-5'
14	5'-TCAGACG ₁ TTAC-X-CATTG ₁ CAGACT-5'

15	5'-TCTGACG ₁ TTAG-X-GATTG ₁ CAGTCT-5'
16	5'-CAGACG ₁ TTCAG-X-GACTTG ₁ CAGAC-5'
17	5'-TCTGACG ₁ TTTT-X-TTTTG ₁ CAGTCT-5'
18	5'-TCTGACGTTGT-X-TGTTG ₁ CAGTCT-5'
19	5'-TAGACG ₁ TTTTT-X-TTTTTG ₁ CAGAT-5'
20	5'-TGGACG ₁ TTCTT-X-TTCTTG ₁ CAGGT-5'
21	5'-TAGACGTTGTA-X-ATGTTG ₁ CAGAT-5'
22	5'-TAGACG ₁ TTCTC-X-CTCTTG ₁ CAGAT-5'
23	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTCTT-X-TTCTTG ₁ CTG ₁ CT-5'
24	5'-TCAGTCG ₂ TTAC-X-CATTG ₂ CTGACT-5'
25	5'-TCTGTCG ₂ TTAG-X-GATTG ₂ CTGTCT-5'
26	5'-CAGTCG ₂ TTCAG-X-GACTTG ₂ CTGAC-5'
27	5'-TCTGTCG ₂ TTTT-X-TTTTG ₂ CTGTCT-5'
28	5'-TCTGTCG ₂ TTGT-X-TGTTG ₂ CTGTCT-5'
29	5'-TAGTCG ₂ TTTTT-X-TTTTTG ₂ CGTAT-5'
30	5'-TGGTCG ₂ TTCTT-X-TTCTTG ₂ CTGGT-5'
31	5'-TAGTCG ₂ TGTA-X-ATGTTG ₂ CTGAT-5'
32	5'-TAGTCG ₂ TTCTC-X-CTCTTG ₂ CTGAT-5'
33	5'-TCG ₂ TCG ₂ TTCTT-X-TTCTTG ₂ CTG ₂ CT-5'
34	5'-TCG ₂ TACG ₂ TACG ₂ -X-G ₂ CATG ₂ CATG ₂ CT-5'
35	5'-TCG ₂ TCG ₂ ACG ₂ AT-X-TAG ₂ CAG ₂ CTG ₂ CT-5'
36	5'-TCG ₂ ATCG ₂ ATCG ₂ -X-G ₂ CTAG ₂ CTAG ₂ CT-5'
37	5'-TCTGTCGTTCT-Y-TCTTGCTGTCT-5'
38	5'-TCTGACG ₁ TTCT-Y-TCTTG ₁ CAGTCT-5'
39	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCTG ₁ -Y-G ₁ CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'
40	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTCTG-Y-GTCTTG ₁ CTG ₁ CT-5'
41	5'-TCAGTC ₁ GTTAG-Y-GATTGC ₁ TGACT-5'
42	5'-TCTGTC ₁ GTTCT-Y-TCTTGC ₁ TGTCT-5'
43	5'-TCGTTGL-Y-LGTTGCT-5'
44	5'-TCGTTGM-Y-MGTTGCT-5'
45	5'-TCG ₁ TTGM-Y-MGTTG ₁ CT-5'
46	5'-TCGTTGM-X-MGTTGCT-5'
47	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCTG ₁ -M-TCTTG ₁ CTGTCT-5'
48	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCTG ₁ -M-GACAG ₁ CTGTCT-5'
49	[(5'-TCTGACG ₁ TTCT) ₂ Y]
50	5'-TCTGTCG ₃ TTCT-Y-TCTTG ₃ CTGTCT-5'
51	5'-TCTGACG ₃ TTCT-Y-TCTTG ₃ CAGTCT-5'
52	5'-TCTGTC ₁ G ₃ TTCT-Y-TCTTG ₃ C ₁ TGTCT-5'

53	5'-TCTGACGTTCT-Z-TCTTGCAGTCT-5'
54	5'-TCTGACG ₁ TTCT-Z-TCTTG ₁ CAGTCT-5'
55	5'-TCTGTCTG ₁ TTCT-Z-TCTTG ₁ CTGTCT-5'
56	5'-TCTGACG ₁ TTCT-S-TCTTG ₁ CAGTCT-5'
57	5'-TCTGTCTG ₁ TTCT-S-TCTTG ₁ CTGTCT-5'
58	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -S-G ₁ CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'
59	5'-TCAGTCG ₁ TTAG-S-GATTG ₁ CTGACT-5'
60	5'-TCTGTCTG ₁ TT <u>C</u> <u>U</u> ₀ -X- <u>o</u> <u>U</u> CTTG ₁ CTGTCT-5'
61	5'-TCTGTCTG ₁ TT <u>C</u> <u>o</u> <u>U</u> ₀ -X- <u>o</u> <u>U</u> <u>C</u> TTG ₁ CTGTCT-5'
62	5'-TCTGTCTG ₂ TT <u>C</u> <u>U</u> -X- <u>U</u> CTTG ₂ CTGTCT-5'
63	5'-CTGTCTG ₂ TT <u>C</u> <u>U</u> <u>C</u> -X- <u>C</u> UCTTG ₂ CTGTC-5'
64	5'-TCG ₁ AACG ₁ TT <u>C</u> <u>G</u> -X- <u>G</u> CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'
65	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -L- <u>G</u> <u>A</u> CAG ₁ CTGTCT-5'
66	5'-TCTGTCTG ₁ TT <u>C</u> <u>U</u> ₀ -X- <u>o</u> <u>U</u> CTTG ₁ CTGCTC-5'
67	5'-TCTGTCTG ₁ TT <u>C</u> <u>o</u> <u>U</u> ₀ -X- <u>o</u> <u>U</u> <u>C</u> TTG ₁ CTGCTC-5'
68	5'-TCTGTCTG ₂ TT <u>C</u> <u>U</u> -X- <u>U</u> CTTG ₂ CTGCTC-5'
69	5'-CTGTCTG ₂ TT <u>C</u> <u>U</u> <u>C</u> -X- <u>C</u> UCTTG ₂ CTGCTC-5'
70	5'-TCG ₁ AACG ₁ TT <u>C</u> <u>G</u> -X- <u>G</u> CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'
71	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -L- <u>G</u> <u>A</u> CAG ₁ CTGTCT-5'
72	5'-TCTGTCTG ₁ TTAG-S-GATTG ₁ CTGTCT-5'
73	5'-CAGTCG ₁ TTACAG-Z-GACTTG ₁ CTGAC-5'
74	5'-TCG ₁ TCG ₁ ACG ₁ AT-S-TAG ₁ CAG ₁ CTG ₁ CT-5'
75	5'-TCAGTCG ₁ TT <u>A</u> <u>C</u> -X- <u>C</u> ATTG ₁ CTGACT-5'
76	5'-TCA ₀ GT ₀ CG ₂ TTAC-X-CATTG ₂ CoTG ₀ ACT-5'
77	5'- <u>U</u> CAGTCG ₁ TTAC-X-CATTG ₁ CTGAC <u>U</u> -5'
78	5'-TCAGTCG ₁ TTA ₀ C-X-CoATTG ₁ CTGACT-5'
79	5'-TAGToCG ₂ TTTTT-X-TTTTTG ₂ CoTGTAT-5'
80	5'-TCTGTToCG ₂ TTGT-X-TGTTG ₂ CoTGTCT-5'
81	5'-TAGToToCG ₂ TTTTT-X-TTTTTG ₂ CoToGTAT-5'
82	5'-TCG ₂₀ ToCG ₂ AoCG ₂ AT-X-TAG ₂ CoAG ₂ CoToG ₂ CT-5'
83	5'-TCG ₂ AoToCG ₂₀ AoTCG ₂ -X-G ₂ CToAoG ₂ CoToAG ₂ CT-5'
84	5'-TCAGToCG ₂ TTAC-S-CATTG ₂ CoTGACT-5'
85	5'-TCTGToToCG ₂ TAG-Z-GATTG ₂ CoToGTCT-5'
86	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTTL-S-LTTTG ₁ CTG ₁ CT-5'
87	5'-LTCG ₁ TCG ₁ TTTL-S-LTTTG ₁ CTG ₁ CTL-5'
88	5'-TCG ₁ CG ₁ TTTL-Z-LTTTG ₁ CTG ₁ CT-5'
89	5'-LTCG ₁ TCG ₁ TTTL-Z-LTTTG ₁ CTG ₁ CTL-5'
90	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTTL-X-LTTTG ₁ CTG ₁ CT-5'

91	5'-LTCG ₁ TCG ₁ TTL-X-LTTTG ₁ CTG ₁ CTL-5'
92	5'-TCAGTCG ₁ TTAC-X-CATTG ₁ CTGACT-5'

G₁=7-脱氮-dG; G₂=AraG; G₃=N¹-Me-dG; C₁=1-(2'-脱氧-β-D-呋喃核糖基)-2-氧-7-脱氮-8-甲基-嘌呤; U/C/G/A=2'-O-甲基核糖核苷酸; o=磷酸二酯连接; X=甘油; Y=1,3,5-戊三醇; L=1,3-丙二醇; M=1,5-戊二醇; Z=顺式, 顺式-1,3,5-环己三醇; S=3-Me-1,3,5-戊三醇

如实施例2中所述, 在表达TLR9的HEK293细胞中对表1例示的TLR9激动剂测试了免疫刺激活性。下文表2a、2b、2c、和2d所示结果证明了对3'-3'连接的寡核苷酸的特定化学修饰会改变它们在施用后24小时的TLR9介导的NF-kB激活序型。更一般地, 这些数据证明了对3'-3'连接的寡核苷酸的特定化学修饰可用于提高或降低NF-kB激活。

表2a: 表达TLR9的HEK293细胞中的NF-kB激活序型

SEQ ID NO /寡聚物No.	序列和修饰(5'-3')	10μg/ml时的NF-kB活性的倍数变化±SD
1	5'-TCAGTCG ₁ TTAC-X-CATTG ₁ CTGACT-5'	13.94±0.33
2	5'-TCTGTCG ₁ TTAG-X-GATTG ₁ CTGTCT-5'	6.76±0.12
3	5'-CAGTCG ₁ TTACAG-X-GACTTG ₁ CTGAC-5'	10.45±0.13
4	5'-TCTGTCG ₁ TTTT-X-TTTTG ₁ CTGTCT-5'	7.84±0.02
5	5'-TCTGTCG ₁ TTGT-X-TGTTG ₁ CTGTCT-5'	9.45±1.31
6	5'-TAGTCG ₁ TTTTT-X-TTTTTG ₁ CGTAT-5'	6.95±0.05
7	5'-TGGTCG ₁ TTCTT-X-TTCTTG ₁ CTGGT-5'	5.02±0.13
8	5'-TAGTCG ₁ TTGTA-X-ATGTTG ₁ CTGAT-5'	2.75±0.46
9	5'-TAGTCG ₁ TTCTC-X-CTCTTG ₁ CTGAT-5'	12.59±0.26
10	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTCTT-X-TTCTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	13.24±1.58
14	5'-TCAGACG ₁ TTAC-X-CATTG ₁ CAGACT-5'	14.32±0.19
15	5'-TCTGACG ₁ TTAG-X-GATTG ₁ CAGTCT-5'	12.19±0.94
16	5'-CAGACG ₁ TTACAG-X-GACTTG ₁ CAGAC-5'	16.42±0.44
17	5'-TCTGACG ₁ TTTT-X-TTTTG ₁ CAGTCT-5'	16.49±1.13
18	5'-TCTGACG ₁ TTGT-X-TGTTG ₁ CAGTCT-5'	14.63±0.03
19	5'-TAGACG ₁ TTTTT-X-TTTTTG ₁ CAGAT-5'	16.06±0.71
20	5'-TGGACG ₁ TTCTT-X-TTCTTG ₁ CAGGT-5'	13.28±0.42
21	5'-TAGACG ₁ TTGTA-X-ATGTTG ₁ CAGAT-5'	11.75±0.42
22	5'-TAGACG ₁ TTCTC-X-CTCTTG ₁ CAGAT-5'	13.70±0.21
培养基		1±0.07

表2b: 表达TLR9的HEK293细胞中的NF-kB激活序型

SEQ ID NO /寡聚物No.	序列和修饰(5'-3')	10μg/ml时的NF-kB活性的倍数变化
37	5'-TCTGTCGTTCT-Y-TCTTGCTGTCT-5'	11.35
38	5'-TCTGACG ₁ TTCT-Y-TCTTG ₁ CAGTCT-5'	11.51
50	5'-TCTGTCG ₃ TTCT-Y-TCTTG ₃ CTGTCT-5'	12.32
52	5'-TCTGTCG ₃ TTCT-Y-TCTTG ₃ CTGTCT-5'	9.40
57	5'-TCTGTCG ₁ TTCT-S-TCTTG ₁ CTGTCT-5'	11.05
	PBS	1.00

表2c: 表达TLR9的HEK293细胞中的NF-kB激活序型

SEQ ID NO /寡聚物No.	序列和修饰(5'-3')	10μg/ml时的NF-kB活性的倍数变化±SD
60	5'-TCTGTCG ₁ TT <u>C</u> <u>U</u> ₀ -X-o <u>U</u> CTTG ₁ CTGTCT-5'	11.2±0.06
61	5'-TCTGTCG ₁ TT <u>C</u> <u>0</u> <u>U</u> ₀ -X-o <u>U</u> <u>0</u> CTTG ₁ CTGTCT-5'	9.5±0.06
62	5'-TCTGTCG ₂ TT <u>C</u> <u>U</u> -X- <u>U</u> CTTG ₂ CTGTCT-5'	6.6±0.04
63	5'-CTGTCG ₂ TT <u>C</u> <u>U</u> -X- <u>C</u> UCTTG ₂ CTGTC-5'	14.6±0.09
64	5'-TCG ₁ AACG ₁ TT <u>C</u> <u>G</u> -X- <u>G</u> CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	32.1±0.6
65	5'-TCG ₁ AACG ₁ TT <u>C</u> <u>G</u> ₁ -L- <u>G</u> ACAG ₁ CTGTCT-5'	23.7±0.2
PBS		1±0.03

表2d: 表达TLR9的HEK293细胞中的NF-kB激活序型

SEQ ID NO /寡聚物No.	序列和修饰(5'-3')	10μg/ml时的NF-kB活性的倍数变化±SD
72	5'-TCTGTCG ₁ TTAG-S-GATTG ₁ CTGTCT-5'	3.81±0.14
73	5'-CAGTCG ₁ TTAG-Z-GACTTG ₁ CTGAC-5'	5.47±0.17
74	5'-TCG ₁ TCG ₁ ACG ₁ AT-S-TAG ₁ CAG ₁ CTG ₁ CT-5'	9.46±1.35; 9.18±0.09
75	5'-TCAGTCG ₁ TT <u>A</u> <u>C</u> -X- <u>C</u> ATTG ₁ CTGACT-5'	5.08±0.58; 6.91±1.52
77	5'- <u>U</u> CAGTCG ₁ TTAC-X-CATTG ₁ CTGAC <u>U</u> -5'	5.33±0.25; 4.85±0.46
78	5'-TCAGTCG ₁ TTA <u>0</u> C-X-C <u>0</u> ATTG ₁ CTGACT-5'	7.63±0.54; 10.79±0.9
79	5'-TAGT <u>0</u> CG ₂ TTTTT-X-TTTTTG ₂ C <u>0</u> TGTAT-5'	5.63±1.46; 5.75±0.45
80	5'-TCTGT <u>0</u> CG ₂ TTGT-X-TGTTG ₂ C <u>0</u> TGTCT-5'	9.60±1.39; 9.75±0.25

81	5'-TAGoToCG ₂ TTTTT-X-TTTTTG ₂ CoToGTAT-5'	5.63±0.46; 6.22±0.12
82	5'-TCG ₂ oToCG ₂ AoCG ₂ AT-X-TAG ₂ CoAG ₂ CoToG ₂ C T-5'	9.71±0.75; 12.59±0.3
83	5'-TCG ₂ AoToCG ₂ oAoTCG ₂ -X-G ₂ CToAoG ₂ CoToAG ₂ CT-5'	7.24±0.42
84	5'-TCAGToCG ₂ TTAC-S-CATTG ₂ CoTGACT-5'	8.92±0.88; 10.33±0.2; 12.16±1.5
85	5'-TCTGoToCG ₂ TAG-Z-GATTG ₂ CoToGTCT-5'	9.13±1.25; 8.05±0.39; 11.34±0.3
86	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTTL-S-LTTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	11.61±0.6
88	5'-TCG ₁ CG ₁ TTTL-Z-LTTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	9.61±0.14; 9.32±0.20
89	5'-LTCG ₁ TCG ₁ TTTL-Z-LTTTG ₁ CTG ₁ CTL-5'	2.57±0.28
90	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTTL-X-LTTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	9.65±1.78; 9.57±0.18
92	5'-TCAGTCG ₁ TTAC-X-CATTG ₁ CTGACT-5'	5.67±0.25; 7.25±1.23
培养基		1.0±0.17; 1±0.25; 1.0±0.02; 1.0±0.11

如实施例3中所述，在C57BL/6小鼠脾细胞IL-12测定法中对表1例示的TLR9激动剂测试了免疫刺激活性。下文表3a、3b和3c所示结果证明了对3'-3'连接的寡核苷酸的特定化学修饰会改变它们在施用后24小时在脾细胞中的TLR9介导的IL-12激活序型，而且这种激活序型根据化学修饰的不同而可以是剂量依赖性的。更一般地，这些数据证明了对3'-3'连接的寡核苷酸的特定化学修饰可用于提高或降低IL-12激活。

表3a: C57BL/6小鼠脾细胞培养物中IL-12分泌的诱导

SEQ ID NO /寡聚物No.	序列和修饰(5'-3')	IL-12 (pg/ml±SD)	
		在1μg/ml	在3μg/ml
1	5'-TCAGTCG ₁ TTAC-X-CATTG ₁ CTGACT-5'	733±5	638±14
2	5'-TCTGTCTCG ₁ TTAG-X-GATTG ₁ CTGTCT-5'	919±8	660±8
3	5'-CAGTCG ₁ TTACAG-X-GACTTG ₁ CTGAC-5'	500±26	634±49
4	5'-TCTGTCTCG ₁ TTTT-X-TTTTG ₁ CTGTCT-5'	822±9	516±7

5	5'-TCTGTCG ₁ TTGT-X-TGTTG ₁ CTGTCT-5'	636±6	369±4
6	5'-TAGTCG ₁ TTTTT-X-TTTTTG ₁ CGTAT-5'	857±0	115±0
7	5'-TGGTCG ₁ TTCTT-X-TTCTTG ₁ CTGGT-5'	61±0	357±16
8	5'-TAGTCG ₁ TTGTA-X-ATGTTG ₁ CTGAT-5'	253±10	120±13
9	5'-TAGTCG ₁ TTCTC-X-CTCTTG ₁ CTGAT-5'	743±33	553±12
10	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTCTT-X-TTCTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	714±0	913±12
14	5'-TCAGACG ₁ TTAC-X-CATTG ₁ CAGACT-5'	1654±64	1592±27
15	5'-TCTGACG ₁ TTAG-X-GATTG ₁ CAGTCT-5'	1299±2	1257±8
16	5'-CAGACG ₁ TTCAG-X-GACTTG ₁ CAGAC-5'	1152±11	1134±0
17	5'-TCTGACG ₁ TTTT-X-TTTTG ₁ CAGTCT-5'	1370±4	1015±7
18	5'-TCTGACG ₁ TTGT-X-TGTTG ₁ CAGTCT-5'	1140±16	816±4
19	5'-TAGACG ₁ TTTTT-X-TTTTTG ₁ CAGAT-5'	1215±32	719±3
20	5'-TGGACG ₁ TTCTT-X-TTCTTG ₁ CAGGT-5'	814±9	645±40
21	5'-TAGACG ₁ TTGTA-X-ATGTTG ₁ CAGAT-5'	835±34	750±16
22	5'-TAGACG ₁ TTCTC-X-CTCTTG ₁ CAGAT-5'	1211±26	898±24
培养基		154±1	154±1

表3b: C57BL/6小鼠脾细胞培养物中IL-12分泌的诱导

SEQ ID NO /寡聚物No.	序列和修饰(5'-3')	IL-12 (pg/ml±SD)	
24	5'-TCAGTCG ₂ TTAC-X-CATTG ₂ CTGACT-5'	932±18	892±2
25	5'-TCTGTCG ₂ TTAG-X-GATTG ₂ CTGTCT-5'	771±6	604±6
26	5'-CAGTCG ₂ TTCAG-X-GACTTG ₂ CTGAC-5'	835±4	905±4
27	5'-TCTGTCG ₂ TTTT-X-TTTTG ₂ CTGTCT-5'	571±11	502±2
28	5'-TCTGTCG ₂ TTGT-X-TGTTG ₂ CTGTCT-5'	567±0	698±77
29	5'-TAGTCG ₂ TTTTT-X-TTTTTG ₂ CGTAT-5'	975±24	656±33
30	5'-TGGTCG ₂ TTCTT-X-TTCTTG ₂ CTGGT-5'	426±16	393±1
31	5'-TAGTCG ₂ TTGTA-X-ATGTTG ₂ CTGAT-5'	568±23	575±14
32	5'-TAGTCG ₂ TTCTC-X-CTCTTG ₂ CTGAT-5'	960±2	647±13
33	5'-TCG ₂ TCG ₂ TTCTT-X-TTCTTG ₂ CTG ₂ CT-5'	659±10	1014±1
34	5'-TCG ₂ TACG ₂ TACG ₂ -X-G ₂ CATG ₂ CATG ₂ CT-5'	1044±66	1109±32
35	5'-TCG ₂ TCG ₂ ACG ₂ AT-X-TAG ₂ CAG ₂ CTG ₂ CT-5'	1406±36	968±4
36	5'-TCG ₂ ATCG ₂ ATCG ₂ -X-G ₂ CTAG ₂ CTAG ₂ CT-5'	912±3	1035±11
培养基		190±4	

表3c: C57BL/6小鼠脾细胞培养物中IL-12分泌的诱导

SEQ ID NO /寡聚物No.	序列和修饰(5'-3')	IL-12 (pg/ml±SD)
----------------------	--------------	---------------------

72	5'-TCTGTCG ₁ TTAG-S-GATTG ₁ CTGTCT-5'	988±224
73	5'-CAGTCG ₁ TTCAG-Z-GACTTG ₁ CTGAC-5'	504±76
74	5'-TCG ₁ TCG ₁ ACG ₁ AT-S-TAG ₁ CAG ₁ CTG ₁ CT-5'	906±47
75	5'-TCAGTCG ₁ TTAC-X-CATTG ₁ CTGACT-5'	473±67
77	5'-UCAGTCG ₁ TTAC-X-CATTG ₁ CTGACU-5'	265±19
78	5'-TCAGTCG ₁ TTA ₀ C-X-CoATTG ₁ CTGACT-5'	833±63
79	5'-TAGToCG ₂ TTTTT-X-TTTTTG ₂ CoTGTAT-5'	380±54
80	5'-TCTGT ₀ CG ₂ TTGT-X-TGTTG ₂ CoTGTCT-5'	1502±162
81	5'-TAG ₀ ToCG ₂ TTTTT-X-TTTTTG ₂ CoToGTAT-5'	370±47
82	5'-TCG ₂₀ ToCG ₂ A ₀ CG ₂ AT-X-TAG ₂ CoAG ₂ CoToG ₂ CT-5'	1599±156
83	5'-TCG ₂ A ₀ ToCG ₂₀ A ₀ TCG ₂ -X-G ₂ CT ₀ A ₀ G ₂ CoToAG ₂ CT-5'	1203±109
84	5'-TCAGToCG ₂ TTAC-S-CATTG ₂ CoTGACT-5'	838±61
85	5'-TCTGoToCG ₂ TAG-Z-GATTG ₂ CoToGTCT-5'	589±45
86	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTTL-S-LTTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	1603±167
88	5'-TCG ₁ CG ₁ TTTL-Z-LTTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	1643±40
89	5'-LTCG ₁ TCG ₁ TTTL-Z-LTTTG ₁ CTG ₁ CTL-5'	450±50
90	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTTL-X-LTTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	1393±9
92	5'-TCAGTCG ₁ TTAC-X-CATTG ₁ CTGACT-5'	383±23
培养基		82±4; 168±15

如实施例3中所述，在C57BL/6小鼠脾细胞IL-6测定法中对表1例示的TLR9激动剂测试了免疫刺激活性。下文表4a、4b、和4c所示结果证明了对3'-3'连接的寡核苷酸的特定化学修饰会改变它们在施用后24小时在脾细胞中的TLR9介导的IL-6激活序型，而且这种激活序型根据化学修饰的不同而可以是剂量依赖性的。更一般地，这些数据证明了对3'-3'连接的寡核苷酸的特定化学修饰可用于提高或降低IL-6激活。

表4a: C57BL/6小鼠脾细胞培养物中IL-6分泌的诱导

SEQ ID NO /寡聚物No.	序列和修饰(5'-3')	IL-6 (pg/ml±SD)	
		在1μg/ml	在3μg/ml
1	5'-TCAGTCG ₁ TTAC-X-CATTG ₁ CTGACT-5'	2436±93	6282±138
2	5'-TCTGTCG ₁ TTAG-X-GATTG ₁ CTGTCT-5'	1812±95	5758±55
3	5'-CAGTCG ₁ TTCAG-X-GACTTG ₁ CTGAC-5'	1650±63	3349±46
4	5'-TCTGTCG ₁ TTTT-X-TTTTG ₁ CTGTCT-5'	707±59	7018±3
5	5'-TCTGTCG ₁ TTGT-X-TGTTG ₁ CTGTCT-5'	1302±56	5874±83
6	5'-TAGTCG ₁ TTTTT-X-TTTTTG ₁ CGTAT-5'	1025±93	1677±12
7	5'-TGGTCG ₁ TTCTT-X-TTCTTG ₁ CTGGT-5'	453±8	3068±3

8	5'-TAGTCG ₁ TTGTA-X-ATGTTG ₁ CTGAT-5'	914±74	1147±30
9	5'-TAGTCG ₁ TTCTC-X-CTCTTG ₁ CTGAT-5'	3570±21	12114±86
10	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTCTT-X-TTCTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	77±0	1657±17
14	5'-TCAGACG ₁ TTAC-X-CATTG ₁ CAGACT-5'	2605±15	7206±16
15	5'-TCTGACG ₁ TTAG-X-GATTG ₁ CAGTCT-5'	1705±28	6538±63
16	5'-CAGACG ₁ TTCAG-X-GACTTG ₁ CAGAC-5'	1081±20	3765±18
17	5'-TCTGACG ₁ TTTT-X-TTTTG ₁ CAGTCT-5'	1711±32	8386±33
18	5'-TCTGACG ₁ TTGT-X-TGTTG ₁ CAGTCT-5'	1725±0	7340±142
19	5'-TAGACG ₁ TTTTT-X-TTTTTG ₁ CAGAT-5'	984±16	3312±22
20	5'-TGGACG ₁ TTCTT-X-TTCTTG ₁ CAGGT-5'	515±77	1828±22
21	5'-TAGACG ₁ TTGTA-X-ATGTTG ₁ CAGAT-5'	221±5	1539±9
22	5'-TAGACG ₁ TTCTC-X-CTCTTG ₁ CAGAT-5'	1593±19	6960±81
培养基		0±0	0±0

表4b: C57BL/6小鼠脾细胞培养物中IL-6分泌的诱导(24小时)

SEQ ID NO /寡聚物No.	序列和修饰(5'-3')	IL-6 (pg/ml±SD)	
24	5'-TCAGTCG ₂ TTAC-X-CATTG ₂ CTGACT-5'	8276±35	11634±83
25	5'-TCTGTCG ₂ TTAG-X-GATTG ₂ CTGTCT-5'	5428±106	11860±154
26	5'-CAGTCG ₂ TTCAG-X-GACTTG ₂ CTGAC-5'	6389±15	12402±77
27	5'-TCTGTCG ₂ TTTT-X-TTTTG ₂ CTGTCT-5'	3977±89	8058±46
28	5'-TCTGTCG ₂ TTGT-X-TGTTG ₂ CTGTCT-5'	4333±59	10555±49
29	5'-TAGTCG ₂ TTTTT-X-TTTTTG ₂ CGTAT-5'	3380±24	9348±90
30	5'-TGGTCG ₂ TTCTT-X-TTCTTG ₂ CTGGT-5'	2452±45	4028±15
31	5'-TAGTCG ₂ TTGTA-X-ATGTTG ₂ CTGAT-5'	2574±45	6426±40
32	5'-TAGTCG ₂ TTCTC-X-CTCTTG ₂ CTGAT-5'	6432±4	10872±413
33	5'-TCG ₂ TCG ₂ TTCTT-X-TTCTTG ₂ CTG ₂ CT-5'	6136±24	10408±7
34	5'-TCG ₂ TACG ₂ TACG ₂ -X-G ₂ CATG ₂ CATG ₂ CT-5'	7840±61	15642±56
35	5'-TCG ₂ TCG ₂ ACG ₂ AT-X-TAG ₂ CAG ₂ CTG ₂ CT-5'	8004±141	15174±54
36	5'-TCG ₂ ATCG ₂ ATCG ₂ -X-G ₂ CTAG ₂ CTAG ₂ CT-5'	5590±259	14788±441
培养基		346±0	

表4c: C57BL/6小鼠脾细胞培养物中IL-6分泌的诱导(24小时)

SEQ ID NO /寡聚物No.	序列和修饰(5'-3')	IL-6 (pg/ml±SD)
72	5'-TCTGTCG ₁ TTAG-S-GATTG ₁ CTGTCT-5'	8388±1609
73	5'-CAGTCG ₁ TTCAG-Z-GACTTG ₁ CTGAC-5'	4198±1602
74	5'-TCG ₁ TCG ₁ ACG ₁ AT-S-TAG ₁ CAG ₁ CTG ₁ CT-5'	18828±1448

75	5'-TCAGTCG ₁ TTAC-X-CATTG ₁ CTGACT-5'	3689±109
77	5'-UCAGTCG ₁ TTAC-X-CATTG ₁ CTGACU-5'	91±12
78	5'-TCAGTCG ₁ TTA ₀ C-X-CoATTG ₁ CTGACT-5'	22047±8443
79	5'-TAGToCG ₂ TTTTT-X-TTTTTG ₂ CoTGTAT-5'	1234±508
80	5'-TCTGT ₀ CG ₂ TTGT-X-TGTTG ₂ CoTGTCT-5'	14025±369
81	5'-TAG ₀ ToCG ₂ TTTTT-X-TTTTTG ₂ CoToGTAT-5'	373±61
82	5'-TCG ₂₀ ToCG ₂ A ₀ CG ₂ AT-X-TAG ₂ CoAG ₂ CoToG ₂ CT-5'	86355±4638
83	5'-TCG ₂ A ₀ ToCG ₂₀ A ₀ TCG ₂ -X-G ₂ CT ₀ A ₀ G ₂ CoToAG ₂ CT-5'	10871±1996
84	5'-TCAGToCG ₂ TTAC-S-CATTG ₂ CoTGACT-5'	30346±1670
85	5'-TCTG ₀ ToCG ₂ TAG-Z-GATTG ₂ CoToGTCT-5'	113±11
86	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTTL-S-LTTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	15654±470
88	5'-TCG ₁ CG ₁ TTTL-Z-LTTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	16317±659
89	5'-LTCG ₁ TCG ₁ TTTL-Z-LTTTG ₁ CTG ₁ CTL-5'	1259±215
90	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTTL-X-LTTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	13864±344
92	5'-TCAGTCG ₁ TTAC-X-CATTG ₁ CTGACT-5'	2171±186
培养基		51±3; 60±1

如实施例4中所述, 在人B细胞增殖测定法中对表1例示的TLR9激动剂测试了免疫刺激活性。下文表5a、5b、5c、5d和5e所示结果证明了对3'-3'连接的寡核苷酸的特定化学修饰会改变它们TLR9介导的B细胞增殖活性, 而且这种激活序型根据化学修饰的不同而可以是剂量依赖性的。更一般地, 这些数据证明了对3'-3'连接的寡核苷酸的特定化学修饰可用于调节B细胞增殖。

表5a: 人B细胞增殖测定法

SEQ ID NO /寡聚物No.	序列和修饰(5'-3')	[³ H]-T (cpm±SD)	
		在1μg/ml	在3μg/ml
1	5'-TCAGTCG ₁ TTAC-X-CATTG ₁ CTGACT-5'	9170±5038	7556±3260
2	5'-TCTGTCG ₁ TTAG-X-GATTG ₁ CTGTCT-5'	9907±4299	9405±3319
3	5'-CAGTCG ₁ TTTAC-X-GACTTG ₁ CTGAC-5'	7594±4088	7094±1526
4	5'-TCTGTCG ₁ TTTT-X-TTTTG ₁ CTGTCT-5'	13130±6721	12343±4336
5	5'-TCTGTCG ₁ TTGT-X-TGTTG ₁ CTGTCT-5'	11990±5511	12102±5618
6	5'-TAGTCG ₁ TTTTT-X-TTTTTG ₁ CGTAT-5'	13676±3676	14223±6073
7	5'-TGGTCG ₁ TTCTT-X-TTCTTG ₁ CTGGT-5'	7286±2800	7007±1424
8	5'-TAGTCG ₁ TTGTA-X-ATGTTG ₁ CTGAT-5'	7858±2877	8757±3733
9	5'-TAGTCG ₁ TTCTC-X-CTCTTG ₁ CTGAT-5'	7834±2397	6840±2158
培养基		559±355	559±355

表5b: 人B细胞增殖测定法

SEQ ID NO/ 寡聚物No.	序列和修饰(5'-3')	[³ H]-T (cpm±SD)	
24	5'-TCAGTCG ₂ TTAC-X-CATTG ₂ CTGACT-5'	12015±2721	22634±7474
25	5'-TCTGTCG ₂ TTAG-X-GATTG ₂ CTGTCT-5'	12033±1502	28048±14380
26	5'-CAGTCG ₂ TTCAG-X-GACTTG ₂ CTGAC-5'	8738±2957	23675±11455
27	5'-TCTGTCG ₂ TTTT-X-TTTTG ₂ CTGTCT-5'	17623±4158	24309±7340
28	5'-TCTGTCG ₂ TTGT-X-TGTTG ₂ CTGTCT-5'	13631±1735	18438±3212
29	5'-TAGTCG ₂ TTTTT-X-TTTTTG ₂ CGTAT-5'	12051±5367	19867±9831
30	5'-TGGTCG ₂ TTCTT-X-TTCTTG ₂ CTGGT-5'	17206±8474	18061±9703
31	5'-TAGTCG ₂ TTGTA-X-ATGTTG ₂ CTGAT-5'	21600±10694	22746±13411
32	5'-TAGTCG ₂ TTCTC-X-CTCTTG ₂ CTGAT-5'	15827±8603	26722±16455
33	5'-TCG ₂ TCG ₂ TTCTT-X-TTCTTG ₂ CTG ₂ CT-5'	19269±14059	21945±11281
34	5'-TCG ₂ TACG ₂ TACG ₂ -X-G ₂ CATG ₂ CATG ₂ CT-5'	11228±4499	17990±7547
35	5'-TCG ₂ TCG ₂ ACG ₂ AT-X-TAG ₂ CAG ₂ CTG ₂ CT-5'	13364±2570	22787±3265
36	5'-TCG ₂ ATCG ₂ ATCG ₂ -X-G ₂ CTAG ₂ CTAG ₂ CT-5'	14071±3313	31519±2373
培养基		634±166	

表5c: 人B细胞增殖测定法

SEQ ID NO /寡聚物No.	序列和修饰(5'-3')	[³ H]-T (cpm±SD)	
38	5'-TCTGACG ₁ TTCT-Y-TCTTG ₁ CAGTCT-5'	4714±1043	4535±1269
39	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -Y-G ₁ CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	3664±219	7556±1615
40	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTCTG-Y-GTCTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	4346±453	6093±2052
41	5'-TCAGTCGTTAG-Y-GATTGCTGACT-5'	3585±495	4371±1380
42	5'-TCTGTCGTTCT-Y-TCTTGCTGTCT-5'	5607±1163	5202±1980
43	5'-TCGTTGL-Y-LGTTGCT-5'	3302±359	4767±737
47	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -M-TCTTG ₁ CTGTCT-5'	6010±1951	6469±3332
48	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -M-GACAG ₁ CTGTCT-5'	3507±768	4351±2101
	PBS	545±237	

表5d: 人B细胞增殖测定法

SEQ ID NO /寡聚物No.	序列和修饰(5'-3')	1μg/ml时的增殖指数
60	5'-TCTGTCG ₁ TTC <u>U</u> ₀ -X-o <u>U</u> CTTG ₁ CTGTCT-5'	28.4
61	5'-TCTGTCG ₁ TTC <u>Co</u> <u>U</u> ₀ -X-o <u>U</u> <u>C</u> TTG ₁ CTGTCT-5'	31.3
62	5'-TCTGTCG ₂ TTC <u>U</u> -X- <u>U</u> CTTG ₂ CTGTCT-5'	42.6
63	5'-CTGTCG ₂ TTC <u>UC</u> -X- <u>CU</u> CTTG ₂ CTGTC-5'	41.5

64	5'-TCG ₁ AACG ₁ TT <u>CG</u> -X- <u>G</u> CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	45.6
65	5'-TCG ₁ AACG ₁ TT <u>CG</u> ₁ -L- <u>G</u> ACAG ₁ CTGTCT-5'	23.8
培养基		1

表5e: 人B细胞增殖测定法

SEQ ID NO /寡聚物No.	序列和修饰(5'-3')	1μg/ml时的 增殖指数
66	5'-TCTGTCG ₁ TT <u>C</u> <u>U</u> ₀ -X-o <u>U</u> CTTG ₁ CTGCTC-5'	13582±1296
67	5'-TCTGTCG ₁ TT <u>C</u> <u>U</u> ₀ -X-o <u>U</u> <u>0</u> CTTG ₁ CTGCTC-5'	19250±1860
68	5'-TCTGTCG ₂ TT <u>C</u> <u>U</u> -X- <u>U</u> CTTG ₂ CTGCTC-5'	24809±3983
69	5'-CTGTCG ₂ TT <u>C</u> <u>U</u> -X- <u>C</u> UCTTG ₂ CTGCTC-5'	21125±2056
70	5'-TCG ₁ AACG ₁ TT <u>CG</u> -X- <u>G</u> CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	20306±6796
71	5'-TCG ₁ AACG ₁ TT <u>CG</u> ₁ -L- <u>G</u> ACAG ₁ CTGTCT-5'	11547±631
72	5'-TCTGTCG ₁ TTAG-S-GATTG ₁ CTGTCT-5'	16603±2124
73	5'-CAGTCG ₁ TTACAG-Z-GACTTG ₁ CTGAC-5'	9787±1290
74	5'-TCG ₁ TCG ₁ ACG ₁ AT-S-TAG ₁ CAG ₁ CTG ₁ CT-5'	16934±2628
80	5'-TCTGT <u>o</u> CG ₂ TTGT-X-TGTTG ₂ C <u>o</u> TGTCT-5'	16347±980; 18093±3142
84	5'-TCAGT <u>o</u> CG ₂ TTAC-S-CATTG ₂ C <u>o</u> TGACT-5'	14546±2616
85	5'-TCTG <u>o</u> T <u>o</u> CG ₂ TAG-Z-GATTG ₂ C <u>o</u> T <u>o</u> GTCT-5'	10051±1376
86	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTTL-S-LTTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	18297±1246
88	5'-TCG ₁ CG ₁ TTTL-Z-LTTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	12128±2106; 16534±1037
89	5'-LTCG ₁ TCG ₁ TTTL-Z-LTTTG ₁ CTG ₁ CTL-5'	10749±1191
90	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTTL-X-LTTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	11357±692; 22666±54
91	5'-LTCG ₁ TCG ₁ TTL-X-LTTTG ₁ CTG ₁ CTL-5'	
92	5'-T <u>C</u> AGTCG ₁ TTAC-X-CATTG ₁ CTGACT-5'	
培养基		621±215

如实施例3中所述, 在针对IL-1Ra、IL-6、IL-10、和IL-12的人PBMC和B细胞测定法中对表1例示的TLR9激动剂测试了免疫刺激活性。下文表6a、6b、6c、6d、6e、6f、6g、和6h所示结果证明了对3'-3'连接的寡核苷酸的特定化学修饰会改变它们在人PBMC中的TLR9介导的IL-1Ra、IL-6、IL-10、和/或IL-12激活序型。更一般地, 这些数据证明了对3'-3'连接的寡核苷酸的特定化学修饰可用于提高或降低IL-1Ra、IL-6、IL-10、和IL-12激活。

表6a: 针对IL-1R α 、IL-6和IL-12的人PBMC测定法

SEQ ID NO/ 寡 聚物No.	序列和修饰(5'-3')	IL-1R α (pg/ml) 在 10 μ g/ml	IL-6 (pg/ml) 在 10 μ g/ml	IL-12 (pg/ml) 在 10 μ g/ml
1	5'-TCAGTCG ₁ TTAC-X-CATTG ₁ CTGACT-5'	1331	1035	116.5
2	5'-TCTGTCG ₁ TTAG-X-GATTG ₁ CTGTCT-5'	599.5	630	56.5
3	5'-CAGTCG ₁ TTACAG-X-GACTTG ₁ CTGAC-5'	1133	867.5	76
4	5'-TCTGTCG ₁ TTTT-X-TTTTG ₁ CTGTCT-5'	926	994	81
5	5'-TCTGTCG ₁ TTGT-X-TGTTG ₁ CTGTCT-5'	874.5	813.5	69
6	5'-TAGTCG ₁ TTTTT-X-TTTTTG ₁ CGTAT-5'	921	958	90.5
7	5'-TGGTCG ₁ TTCTT-X-TTCTTG ₁ CTGGT-5'	1365	1110.5	101.5
8	5'-TAGTCG ₁ TTGTA-X-ATGTTG ₁ CTGAT-5'	744	1048.5	75.5
9	5'-TAGTCG ₁ TTCTC-X-CTCTTG ₁ CTGAT-5'	1239	1084.5	104.5
10	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTCTT-X-TTCTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	1727	1415.5	145
11	5'-TCG ₁ TACG ₁ TACG ₁ -X-G ₁ CATG ₁ CATG ₁ CT-5'	2905.5	2099.5	197.5
12	5'-TCG ₁ TCG ₁ ACG ₁ AT-X-TAG ₁ CAG ₁ CTG ₁ CT-5'	2965	1985.3	192.7
13	5'-TCG ₁ ATCG ₁ ATCG ₁ -X-G ₁ CTAG ₁ CTAG ₁ CT-5'	3584.5	2543.5	300.5
培养基		187	36	21

表6b: 针对IL-1R α 、IL-6和IL-12的人PBMC测定法

SEQ ID NO/ 寡 聚物No.	序列和修饰(5'-3')	IL-1R α (pg/ml) 在 10 μ g/ml	IL-6 (pg/ml) 在 10 μ g/ml	IL-12 (pg/ml) 在 10 μ g/ml
24	5'-TCAGTCG ₂ TTAC-X-CATTG ₂ CTGACT-5'	10537.8	340.8	350.7
25	5'-TCTGTCG ₂ TTAG-X-GATTG ₂ CTGTCT-5'	14850.4	413.6	456.1
26	5'-CAGTCG ₂ TTACAG-X-GACTTG ₂ CTGAC-5'	9440.6	335.0	304.4
27	5'-TCTGTCG ₂ TTTT-X-TTTTG ₂ CTGTCT-5'	13014.5	499.0	421.9
28	5'-TCTGTCG ₂ TTGT-X-TGTTG ₂ CTGTCT-5'	10270.2	363.2	323.0
29	5'-TAGTCG ₂ TTTTT-X-TTTTTG ₂ CGTAT-5'	11644.7	421.2	362.3
30	5'-TGGTCG ₂ TTCTT-X-TTCTTG ₂ CTGGT-5'	10528.9	465.7	339.2
31	5'-TAGTCG ₂ TTGTA-X-ATGTTG ₂ CTGAT-5'	19086.4	554.6	551.3
32	5'-TAGTCG ₂ TTCTC-X-CTCTTG ₂ CTGAT-5'	15514.6	434.8	462.9
33	5'-TCG ₂ TCG ₂ TTCTT-X-TTCTTG ₂ CTG ₂ CT-5'	22655.8	551.9	598.6
34	5'-TCG ₂ TACG ₂ TACG ₂ -X-G ₂ CATG ₂ CATG ₂ CT-5'	20375.5	456.3	596.3
35	5'-TCG ₂ TCG ₂ ACG ₂ AT-X-TAG ₂ CAG ₂ CTG ₂ CT-5'	17750.6	383.5	521.9
36	5'-TCG ₂ ATCG ₂ ATCG ₂ -X-G ₂ CTAG ₂ CTAG ₂ CT-5'	23576.8	428.0	706.3
培养基		799.5	15.7	47.7

表6c: 针对IL-6的人PBMC测定法(24小时)

SEQ ID NO /寡聚物No.	序列和修饰(5'-3')	IL-6 (pg/ml±SD) 在10μg/ml
60	5'-TCTGTCG ₁ TTC <u>U</u> ₀ -X-o <u>U</u> CTTG ₁ CTGTCT-5'	423±1
61	5'-TCTGTCG ₁ TT <u>C</u> ₀ <u>U</u> ₀ -X-o <u>U</u> ₀ <u>C</u> TTG ₁ CTGTCT-5'	938±14
62	5'-TCTGTCG ₂ TT <u>C</u> <u>U</u> -X- <u>U</u> CTTG ₂ CTGTCT-5'	497±4
63	5'-CTGTCG ₂ TTC <u>U</u> <u>C</u> -X- <u>C</u> UCTTG ₂ CTGTC-5'	409±2
64	5'-TCG ₁ AACG ₁ TT <u>C</u> <u>G</u> -X- <u>G</u> CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	474±0
65	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -L- <u>G</u> ACAG ₁ CTGTCT-5'	626±3
培养基		0±0

表6d: 针对IL-6的人PBMC测定法(24小时)

SEQ ID NO /寡聚物No.	序列和修饰(5'-3')	IL-6 (pg/ml±SD) 在10μg/ml
66	5'-TCTGTCG ₁ TTC <u>U</u> ₀ -X-o <u>U</u> CTTG ₁ CTGCTC-5'	135.63
67	5'-TCTGTCG ₁ TT <u>C</u> ₀ <u>U</u> ₀ -X-o <u>U</u> ₀ <u>C</u> TTG ₁ CTGCTC-5'	117.98
68	5'-TCTGTCG ₂ TT <u>C</u> <u>U</u> -X- <u>U</u> CTTG ₂ CTGCTC-5'	300.79
69	5'-CTGTCG ₂ TTC <u>U</u> <u>C</u> -X- <u>C</u> UCTTG ₂ CTGCTC-5'	151.84
70	5'-TCG ₁ AACG ₁ TT <u>C</u> <u>G</u> -X- <u>G</u> CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	268.71
71	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -L- <u>G</u> ACAG ₁ CTGTCT-5'	364.23
75	5'-TCAGTCG ₁ TT <u>A</u> <u>C</u> -X- <u>C</u> ATTG ₁ CTGACT-5'	722.58
77	5'- <u>U</u> CAGTCG ₁ TTAC-X-CATTG ₁ CTGAC <u>U</u> -5'	615.21
78	5'-TCAGTCG ₁ TTA <u>o</u> C-X-CoATTG ₁ CTGACT-5'	449.96
79	5'-TAGToCG ₂ TTTTT-X-TTTTTG ₂ CoTGTAT-5'	658.10
80	5'-TCTGT <u>o</u> CG ₂ TTGT-X-TGTTG ₂ CoTGTCT-5'	490.37
81	5'-TAG <u>o</u> ToCG ₂ TTTTT-X-TTTTTG ₂ CoToGTAT-5'	668.52
82	5'-TCG ₂ <u>o</u> ToCG ₂ A <u>o</u> CG ₂ AT-X-TAG ₂ CoAG ₂ CoToG ₂ CT-5'	614.15
84	5'-TCAGToCG ₂ TTAC-S-CATTG ₂ CoTGACT-5'	603.68; 351.00
85	5'-TCTGoToCG ₂ TAG-Z-GATTG ₂ CoToGTCT-5'	387.97; 464.58
88	5'-TCG ₁ CG ₁ TTTL-Z-LTTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	440.25
90	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTTL-X-LTTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	446.67
92	5'-T <u>C</u> AGTCG ₁ TTAC-X-CATTG ₁ CTGAC <u>T</u> -5'	605.79
培养基		7.12; 3.59

表6e: 针对IL-10的人PBMC测定法(24小时)

SEQ ID NO /寡聚物No.	序列和修饰(5'-3')	IL-10 (pg/ml±SD) 在10μg/ml
60	5'-TCTGTCG ₁ TTC <u>U</u> ₀ -X-o <u>U</u> CTTG ₁ CTGTCT-5'	44±6
61	5'-TCTGTCG ₁ TT <u>C</u> ₀ <u>U</u> ₀ -X-o <u>U</u> ₀ CTTG ₁ CTGTCT-5'	50±6
62	5'-TCTGTCG ₂ TT <u>C</u> <u>U</u> -X- <u>U</u> CTTG ₂ CTGTCT-5'	42±2
63	5'-CTGTCG ₂ TTC <u>U</u> C-X- <u>C</u> UCTTG ₂ CTGTC-5'	55±2
64	5'-TCG ₁ AACG ₁ TT <u>C</u> G-X- <u>G</u> CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	11±2
65	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -L- <u>G</u> ACAG ₁ CTGTCT-5'	26±2
培养基		18±0

表6f: 针对IL-12的人PBMC测定法(24小时)

SEQ ID NO /寡聚物No.	序列和修饰(5'-3')	IL-12 (pg/ml±SD) 在10μg/ml
66	5'-TCTGTCG ₁ TTC <u>U</u> ₀ -X-o <u>U</u> CTTG ₁ CTGCTC-5'	284.03
67	5'-TCTGTCG ₁ TT <u>C</u> ₀ <u>U</u> ₀ -X-o <u>U</u> ₀ CTTG ₁ CTGCTC-5'	296.62
68	5'-TCTGTCG ₂ TT <u>C</u> <u>U</u> -X- <u>U</u> CTTG ₂ CTGCTC-5'	502.12
69	5'-CTGTCG ₂ TTC <u>U</u> C-X- <u>C</u> UCTTG ₂ CTGCTC-5'	531.48
70	5'-TCG ₁ AACG ₁ TT <u>C</u> G-X- <u>G</u> CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	729.32
71	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -L- <u>G</u> ACAG ₁ CTGTCT-5'	810.12
75	5'-TCAGTCG ₁ TT <u>A</u> C-X- <u>C</u> ATTG ₁ CTGACT-5'	1678.61
77	5'- <u>U</u> CAGTCG ₁ TTAC-X-CATTG ₁ CTGAC <u>U</u> -5'	1500.97
78	5'-TCAGTCG ₁ TTA <u>o</u> C-X-CoATTG ₁ CTGACT-5'	927.15
79	5'-TAGToCG ₂ TTTTT-X-TTTTTG ₂ CoTGTAT-5'	1013.11
80	5'-TCTGTToCG ₂ TTGT-X-TGTTG ₂ CoTGTCT-5'	1498.64
81	5'-TAGoToCG ₂ TTTTT-X-TTTTTG ₂ CoToGTAT-5'	1019.68
82	5'-TCG _{2o} ToCG ₂ AoCG ₂ AT-X-TAG ₂ CoAG ₂ CoToG ₂ CT-5'	1220.94
84	5'-TCAGToCG ₂ TTAC-S-CATTG ₂ CoTGACT-5'	1450.24; 1604.88
85	5'-TCTGoToCG ₂ TAG-Z-GATTG ₂ CoToGTCT-5'	879.09; 1498.64
88	5'-TCG ₁ CG ₁ TTTL-Z-LTTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	1463.20
90	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTTL-X-LTTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	1417.50
92	5'-T <u>C</u> AGTCG ₁ TTAC-X-CATTG ₁ CTGACT-5'	1602.41
培养基		54.36; 196.06; 511.18

表6g: 人B细胞培养物中IL-6的诱导(24小时)

SEQ ID NO /寡聚物No.	序列和修饰(5'-3')	IL-6 (pg/ml±SD) 在10μg/ml
----------------------	--------------	-----------------------------

60	5'-TCTGTCG ₁ TTC <u>U</u> ₀ -X-o <u>U</u> CTTG ₁ CTGTCT-5'	359±7
61	5'-TCTGTCG ₁ TTC <u>Co</u> <u>U</u> ₀ -X-o <u>U</u> ₀ CTTG ₁ CTGTCT-5'	570±37
62	5'-TCTGTCG ₂ TTC <u>U</u> -X- <u>U</u> CTTG ₂ CTGTCT-5'	333±3
63	5'-CTGTCG ₂ TTC <u>UC</u> -X- <u>C</u> UCTTG ₂ CTGTC-5'	593±8
64	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTC <u>G</u> -X- <u>G</u> CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	503±28
65	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -L- <u>G</u> ACAG ₁ CTGTCT-5'	481±13
培养基		91±0

表6h: 人B细胞培养物中IL-10的诱导(24小时)

SEQ ID NO /寡聚物No.	序列和修饰(5'-3')	IL-10(pg/ml±SD) 在10μg/ml
60	5'-TCTGTCG ₁ TTC <u>U</u> ₀ -X-o <u>U</u> CTTG ₁ CTGTCT-5'	188±0
61	5'-TCTGTCG ₁ TTC <u>Co</u> <u>U</u> ₀ -X-o <u>U</u> ₀ CTTG ₁ CTGTCT-5'	286±3
62	5'-TCTGTCG ₂ TTC <u>U</u> -X- <u>U</u> CTTG ₂ CTGTCT-5'	223±10
63	5'-CTGTCG ₂ TTC <u>UC</u> -X- <u>C</u> UCTTG ₂ CTGTC-5'	201±2
64	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTC <u>G</u> -X- <u>G</u> CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	268±0
65	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -L- <u>G</u> ACAG ₁ CTGTCT-5'	212±1
培养基		86±5

如实施例3中所述, 在针对IFN-γ、MIP-1α和MIP-β的人PBMC测定法中对表1例示的TLR9激动剂测试了免疫刺激活性。下文表7a和7b所示结果证明了对3'-3'连接的寡核苷酸的特定化学修饰会改变它们在人PBMC中的TLR9介导的IFN-γ、MIP-1α、和/或MIP-β激活序型。更一般地, 这些数据证明了对3'-3'连接的寡核苷酸的特定化学修饰可用于提高或降低IFN-γ、MIP-1α、和MIP-β激活。

表7a: 针对IFN-γ、MIP-1α和MIP-β的人PBMC测定法

SEQ ID NO/ 寡 聚物No.	序列和修饰(5'-3')	IFN-γ (pg/ml) 在 10μg/ml	MIP-1α (pg/ml) 在 10μg/ml	MIP-β (pg/ml) 在 10μg/ml
1	5'-TCAGTCG ₁ TTAC-X-CATTG ₁ CTGACT-5'	86	28	1108
2	5'-TCTGTCG ₁ TTAG-X-GATTG ₁ CTGTCT-5'	38.5	11	568.5
3	5'-CAGTCG ₁ TTACAG-X-GACTTG ₁ CTGAC-5'	29	8.5	465.5
4	5'-TCTGTCG ₁ TTTT-X-TTTTG ₁ CTGTCT-5'	31.5	14	648.5
5	5'-TCTGTCG ₁ TTGT-X-TGTTG ₁ CTGTCT-5'	52.5	12	679
6	5'-TAGTCG ₁ TTTTT-X-TTTTTG ₁ CGTAT-5'	66.5	15.5	799

7	5'-TGGTCG ₁ TTCTT-X-TTCTTG ₁ CTGGT-5'	68.5	17	889.5
8	5'-TAGTCG ₁ TTGTA-X-ATGTTG ₁ CTGAT-5'	77	20	1174
9	5'-TAGTCG ₁ TTCTC-X-CTCTTG ₁ CTGAT-5'	93.5	26.5	1240.5
10	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTCTT-X-TTCTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	59.5	29.5	1007
11	5'-TCG ₁ TACG ₁ TACG ₁ -X-G ₁ CATG ₁ CATG ₁ CT-5'	5237.5	83	2931.5
12	5'-TCG ₁ TCG ₁ ACG ₁ AT-X-TAG ₁ CAG ₁ CTG ₁ CT-5'	2199.7	24.7	2363
13	5'-TCG ₁ ATCG ₁ ATCG ₁ -X-G ₁ CTAG ₁ CTAG ₁ CT-5'	5619.5	173	2479
培养基		40	6	187

表7b: 针对IFN- γ 、MIP-1 α 和MIP- β 的人PBMC测定法

SEQ ID NO/ 寡 聚物No.	序列和修饰(5'-3')	IFN- γ (pg/ml) 在 10 μ g/ml	MIP-1 α (pg/ml) 在 10 μ g/ml	MIP- β (pg/ml) 在 10 μ g/ml
24	5'-TCAGTCG ₂ TTAC-X-CATTG ₂ CTGACT-5'	11.29	84.49	1373.07
25	5'-TCTGTCG ₂ TTAG-X-GATTG ₂ CTGTCT-5'	14.44	90.61	1557.81
26	5'-CAGTCG ₂ TTCAG-X-GACTTG ₂ CTGAC-5'	11.29	84.49	1337.00
27	5'-TCTGTCG ₂ TTTT-X-TTTTG ₂ CTGTCT-5'	13.66	109.05	1746.19
28	5'-TCTGTCG ₂ TTGT-X-TGTTG ₂ CTGTCT-5'	12.08	87.58	1337.01
29	5'-TAGTCG ₂ TTTTT-X-TTTTTG ₂ CGTAT-5'	12.87	82.12	1428.54
30	5'-TGGTCG ₂ TTCTT-X-TTCTTG ₂ CTGGT-5'	11.29	105.04	1839.64
31	5'-TAGTCG ₂ TTGTA-X-ATGTTG ₂ CTGAT-5'	13.66	113.18	1995.04
32	5'-TAGTCG ₂ TTCTC-X-CTCTTG ₂ CTGAT-5'	12.08	107.78	1603.54
33	5'-TCG ₂ TCG ₂ TTCTT-X-TTCTTG ₂ CTG ₂ CT-5'	13.66	150.26	2785.79
34	5'-TCG ₂ TACG ₂ TACG ₂ -X-G ₂ CATG ₂ CATG ₂ CT-5'	13.66	195.82	3966.88
35	5'-TCG ₂ TCG ₂ ACG ₂ AT-X-TAG ₂ CAG ₂ CTG ₂ CT-5'	10.50	134.83	2878.33
36	5'-TCG ₂ ATCG ₂ ATCG ₂ -X-G ₂ CTAG ₂ CTAG ₂ CT-5'	8.11	107.78	2343.94
培养基		3.25	6.11	149.2

如实施例3中所述,在针对MCP-1和IFN- α 的人PBMC测定法中对表1例示的TLR9激动剂测试了免疫刺激活性。下文表8a和8b所示结果证明了对3'-3'连接的寡核苷酸的特定化学修饰会改变它们在人PBMC中的TLR9介导的MCP-1和/或IFN- α 激活序型。更一般地,这些数据证明了对3'-3'连接的寡核苷酸的特定化学修饰可用于提高或降低MCP-1和IFN- α 激活。

表8a: 针对MCP-1和IFN- α 的人PBMC测定法

SEQ ID NO /寡聚物No.	序列和修饰(5'-3')	MCP-1 (pg/ml) 在 10μg/ml	IFN-α (pg/ml) 在 10μg/ml
1	5'-TCAGTCG ₁ TTAC-X-CATTG ₁ CTGACT-5'	3774.5	86
2	5'-TCTGTCG ₁ TTAG-X-GATTG ₁ CTGTCT-5'	841	38.5
3	5'-CAGTCG ₁ TTACAG-X-GACTTG ₁ CTGAC-5'	3503	29
4	5'-TCTGTCG ₁ TTTT-X-TTTTG ₁ CTGTCT-5'	2514	31.5
5	5'-TCTGTCG ₁ TTGT-X-TGTTG ₁ CTGTCT-5'	2134.5	52.5
6	5'-TAGTCG ₁ TTTTT-X-TTTTTG ₁ CGTAT-5'	2154	66.5
7	5'-TGGTCG ₁ TTCTT-X-TTCTTG ₁ CTGGT-5'	4201.5	68.5
8	5'-TAGTCG ₁ TTGTA-X-ATGTTG ₁ CTGAT-5'	3620	77
9	5'-TAGTCG ₁ TTCTC-X-CTCTTG ₁ CTGAT-5'	4885	935
10	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTCTT-X-TTCTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	2672	59.5
11	5'-TCG ₁ TACG ₁ TACG ₁ -X-G ₁ CATG ₁ CATG ₁ CT-5'	6793	5237.5
12	5'-TCG ₁ TCG ₁ ACG ₁ AT-X-TAG ₁ CAG ₁ CTG ₁ CT-5'	6251	2199.7
13	5'-TCG ₁ ATCG ₁ ATCG ₁ -X-G ₁ CTAG ₁ CTAG ₁ CT-5'	6686	5619.5
培养基		534	40

表8b: 针对MCP-1和IFN-α的人PBMC测定法

SEQ ID NO /寡聚物No.	序列和修饰(5'-3')	MCP-1 (pg/ml) 在 10μg/ml	IFN-α (pg/ml) 在 10μg/ml
24	5'-TCAGTCG ₂ TTAC-X-CATTG ₂ CTGACT-5'	12480.44	62.03
25	5'-TCTGTCG ₂ TTAG-X-GATTG ₂ CTGTCT-5'	50410.30	18.07
26	5'-CAGTCG ₂ TTACAG-X-GACTTG ₂ CTGAC-5'	3982.45	42.09
27	5'-TCTGTCG ₂ TTTT-X-TTTTG ₂ CTGTCT-5'	53685.37	13.28
28	5'-TCTGTCG ₂ TTGT-X-TGTTG ₂ CTGTCT-5'	6116.14	46.03
29	5'-TAGTCG ₂ TTTTT-X-TTTTTG ₂ CGTAT-5'	26435.31	38.08
30	5'-TGGTCG ₂ TTCTT-X-TTCTTG ₂ CTGGT-5'	12012.62	30.38
31	5'-TAGTCG ₂ TTGTA-X-ATGTTG ₂ CTGAT-5'	53166.41	26.16
32	5'-TAGTCG ₂ TTCTC-X-CTCTTG ₂ CTGAT-5'	36199.26	67.03
33	5'-TCG ₂ TCG ₂ TTCTT-X-TTCTTG ₂ CTG ₂ CT-5'	42397.84	31.4
34	5'-TCG ₂ TACG ₂ TACG ₂ -X-G ₂ CATG ₂ CATG ₂ CT-5'	62106.60	83.69
35	5'-TCG ₂ TCG ₂ ACG ₂ AT-X-TAG ₂ CAG ₂ CTG ₂ CT-5'	41760.82	29.94
36	5'-TCG ₂ ATCG ₂ ATCG ₂ -X-G ₂ CTAG ₂ CTAG ₂ CT-5'	25530.72	942.37
培养基		267.37	0

如实施例3中所述, 在针对IFN- α 、IL6、和IL-12的人PBMC和pDC测定法中对表1例示的TLR9激动剂测试了免疫刺激活性。下文表9a、9b、9c、9d、9e、9f、和9g所示结果证明了对3'-3'连接的寡核苷酸的特定化学修饰会改变它们在人PBMC和pDC中的TLR9介导的IFN- α 激活序型。更一般地, 这些数据证明了对3'-3'连接的寡核苷酸的特定化学修饰可用于提高或降低IFN- α 、IL-6、和IL-12激活。

表9a: 针对IFN- α 的人PBMC测定法

SEQ ID NO /寡聚物No.	序列和修饰(5'-3')	IFN- α (pg/ml) 在10 μ g/ml
10	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTCTT-X-TTCTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	142.5
11	5'-TCG ₁ TACG ₁ TACG ₁ -X-G ₁ CATG ₁ CATG ₁ CT-5'	8065.5
12	5'-TCG ₁ TCG ₁ ACG ₁ AT-X-TAG ₁ CAG ₁ CTG ₁ CT-5'	7270.5
13	5'-TCG ₁ ATCG ₁ ATCG ₁ -X-G ₁ CTAG ₁ CTAG ₁ CT-5'	8437
培养基		109.5

表9b: 针对IFN- α 的人PBMC测定法(24小时)^a

SEQ ID NO /寡聚物No.	序列和修饰(5'-3')	IFN- α (pg/ml $\pm$ SD) 在10 μ g/ml
60	5'-TCTGTCG ₁ TTC <u>U</u> ₀ -X-o <u>U</u> CTTG ₁ CTGTCT-5'	257.5 $\pm$ 539.4
61	5'-TCTGTCG ₁ TTC <u>Co</u> <u>U</u> ₀ -X-o <u>U</u> <u>C</u> TTG ₁ CTGTCT-5'	39.0 $\pm$ 88.5
62	5'-TCTGTCG ₂ TTC <u>U</u> -X- <u>U</u> CTTG ₂ CTGTCT-5'	84.4 $\pm$ 143.2
63	5'-CTGTCG ₂ TTC <u>UC</u> -X- <u>C</u> UCTTG ₂ CTGTCT-5'	34.0 $\pm$ 37.1
64	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTC <u>G</u> -X- <u>G</u> CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	1165 $\pm$ 704.7
65	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -L- <u>GAC</u> AG ₁ CTGTCT-5'	2494.3 $\pm$ 1880.1
培养基		22.2 $\pm$ 39.8

^a: 数据为10名供体的均值

表9c: 针对IFN- α 的人PBMC测定法(24小时)

SEQ ID NO /寡聚物No.	序列和修饰(5'-3')	IFN- α (pg/ml) 在10 μ g/ml
68	5'-TCTGTCG ₂ TTC <u>U</u> -X- <u>U</u> CTTG ₂ CTGCTC-5'	53.42
69	5'-CTGTCG ₂ TTC <u>UC</u> -X- <u>C</u> UCTTG ₂ CTGCTC-5'	56.30
70	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTC <u>G</u> -X- <u>G</u> CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	622.25
71	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -L- <u>GAC</u> AG ₁ CTGTCT-5'	1823.24
75	5'-TCAGTCG ₁ TT <u>AC</u> -X- <u>C</u> ATTG ₁ CTGACT-5'	97.42

77	5'- <u>UCAGTCG</u> ₁ TTAC-X-CATT <u>G</u> ₁ CTGAC <u>U</u> -5'	92.64
78	5'-TCAGTCG ₁ TTA <u>oC</u> -X-CoATT <u>G</u> ₁ CTGACT-5'	86.38
79	5'-TAGToCG ₂ TTTTT-X-TTTTTG ₂ CoTGTAT-5'	86.38
80	5'-TCTGT <u>oCG</u> ₂ TTGT-X-TGTTG ₂ CoTGTCT-5'	66.13
81	5'-TAG <u>oToCG</u> ₂ TTTTT-X-TTTTTG ₂ CoToGTAT-5'	92.10
82	5'-TCG _{2o} ToCG ₂ AoCG ₂ AT-X-TAG ₂ CoAG ₂ CoToG ₂ CT-5'	65.86
84	5'-TCAGToCG ₂ TTAC-S-CATTG ₂ CoTGACT-5'	86.38; 761.92
85	5'-TCTGoToCG ₂ TAG-Z-GATTG ₂ CoToGTCT-5'	98.37; 592.17
88	5'-TCG ₁ CG ₁ TTTL-Z-LTTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	958.92
90	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTTL-X-LTTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	710.90
92	5'-TCAGTCG ₁ TTAC-X-CATTG ₁ CTGACT-5'	92.64
培养基		32.9; 64.8; 14.5

表9d: 针对IFN-α的人pDC测定法(24小时)^a

SEQ ID NO /寡聚物No.	序列和修饰(5'-3')	IFN-α pg/ml±SD) 在10μg/ml
60	5'-TCTGTCG ₁ TTC <u>U</u> _o -X- <u>oU</u> CTTG ₁ CTGTCT-5'	1509.5±2612.7
61	5'-TCTGTCG ₁ TTC <u>CoU</u> _o -X- <u>oU</u> <u>o</u> CTTG ₁ CTGTCT-5'	1598.9±3727.2
62	5'-TCTGTCG ₂ TTC <u>U</u> -X- <u>U</u> CTTG ₂ CTGTCT-5'	3415.6±3903.6
63	5'-CTGTCG ₂ TTC <u>UC</u> -X- <u>CU</u> CTTG ₂ CTGTC-5'	2180.1±3882.0
64	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG-X- <u>G</u> CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	32956.8±2639.9
65	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -L- <u>GAC</u> AG ₁ CTGTCT-5'	47746.2±53192.1
培养基		106.6±156.5

^a: 数据为10名供体的均值

表9e: 针对IFN-α的人pDC测定法(24小时)

SEQ ID NO /寡聚物No.	序列和修饰(5'-3')	IFN-α(pg/ml±SD) 在10μg/ml
67	5'-TCTGTCG ₁ TTC <u>CoU</u> _o -X- <u>oU</u> <u>o</u> CTTG ₁ CTGCTC-5'	174.81
68	5'-TCTGTCG ₂ TTC <u>U</u> -X- <u>U</u> CTTG ₂ CTGCTC-5'	900.94
69	5'-CTGTCG ₂ TTC <u>UC</u> -X- <u>CU</u> CTTG ₂ CTGCTC-5'	475.64
70	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG-X- <u>G</u> CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	4813.76
71	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -L- <u>GAC</u> AG ₁ CTGTCT-5'	15494.15
72	5'-TCTGTCG ₁ TTAG-S-GATTG ₁ CTGTCT-5'	1934.09
73	5'-CAGTCG ₁ TTCAG-Z-GACTTG ₁ CTGAC-5'	2978.9
74	5'-TCG ₁ TCG ₁ ACG ₁ AT-S-TAG ₁ CAG ₁ CTG ₁ CT-5'	57697.2
75	5'-TCAGTCG ₁ TT <u>AC</u> -X- <u>C</u> ATTG ₁ CTGACT-5'	8171
77	5'- <u>UCAGTCG</u> ₁ TTAC-X-CATTG ₁ CTGAC <u>U</u> -5'	598.6
78	5'-TCAGTCG ₁ TTA <u>oC</u> -X-CoATTG ₁ CTGACT-5'	4245.4

79	5'-TAGToCG ₂ TTTTT-X-TTTTTG ₂ CoTGTAT-5'	2807.2
80	5'-TCTGTToCG ₂ TTGT-X-TGTTG ₂ CoTGTCT-5'	6133.96
81	5'-TAGoToCG ₂ TTTTT-X-TTTTTG ₂ CoToGTAT-5'	1028.1
82	5'-TCG ₂ oToCG ₂ AOCG ₂ AT-X-TAG ₂ CoAG ₂ CoToG ₂ CT-5'	17873.5
84	5'-TCAGToCG ₂ TTAC-S-CATTG ₂ CoTGACT-5'	190.42.1
85	5'-TCTGoToCG ₂ TAG-Z-GATTG ₂ CoToGTCT-5'	11673.4
86	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTTL-S-LTTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	10408.2
88	5'-TCG ₁ CG ₁ TTTL-Z-LTTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	14783.3
89	5'-LTCG ₁ TCG ₁ TTTL-Z-LTTTG ₁ CTG ₁ CTL-5'	6819.14
90	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTTL-X-LTTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	14515.1
92	5'-TCAGTCG ₁ TTAC-X-CATTG ₁ CTGACT-5'	307.8
培养基		32.9; 0; 0.105

表9f: 针对IL-6的人pDC测定法(24小时)

SEQ ID NO /寡聚物No.	序列和修饰(5'-3')	IL-6 (pg/ml) 在10μg/ml
66	5'-TCTGTTCG ₁ TTCU _o -X-oUCTTG ₁ CTGCTC-5'	2384.36
67	5'-TCTGTTCG ₁ TTC _{Co} U _o -X-oU _o CTTG ₁ CTGCTC-5'	1405.14
68	5'-TCTGTTCG ₂ TTCU _o -X-UUCTTG ₂ CTGCTC-5'	2851.75
69	5'-CTGTTCG ₂ TTCUC _o -X-CUUCTTG ₂ CTGCTC-5'	1598.06
70	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG _o -X-GCTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	1625.8
71	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -L-GACAG ₁ CTGTCT-5'	1648.17
80	5'-TCTGTToCG ₂ TTGT-X-TGTTG ₂ CoTGTCT-5'	13805.44
84	5'-TCAGToCG ₂ TTAC-S-CATTG ₂ CoTGACT-5'	19405.66
85	5'-TCTGoToCG ₂ TAG-Z-GATTG ₂ CoToGTCT-5'	17253.59
88	5'-TCG ₁ CG ₁ TTTL-Z-LTTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	9277.99
90	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTTL-X-LTTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	5092.34
培养基		1847.09; 1918.47

表9g: 针对IL-12的人pDC测定法(24小时)

SEQ ID NO /寡聚物No.	序列和修饰(5'-3')	IL-12 (pg/ml) 在10μg/ml
66	5'-TCTGTTCG ₁ TTCU _o -X-oUCTTG ₁ CTGCTC-5'	624.29
67	5'-TCTGTTCG ₁ TTC _{Co} U _o -X-oU _o CTTG ₁ CTGCTC-5'	492.13
68	5'-TCTGTTCG ₂ TTCU _o -X-UUCTTG ₂ CTGCTC-5'	724.53
69	5'-CTGTTCG ₂ TTCUC _o -X-CUUCTTG ₂ CTGCTC-5'	895.07
70	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG _o -X-GCTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	369.77
71	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -L-GACAG ₁ CTGTCT-5'	567.95
80	5'-TCTGTToCG ₂ TTGT-X-TGTTG ₂ CoTGTCT-5'	1498.64

84	5'-TCAGToCG ₂ TTAC-S-CATTG ₂ CoTGACT-5'	1604.88
85	5'-TCTGoToCG ₂ TAG-Z-GATTG ₂ CoToGTCT-5'	1498.64
88	5'-TCG ₁ CG ₁ TTTL-Z-LTTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	1463.20
90	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTTL-X-LTTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	1417.50
培养基		349.26; 397.1

如实施例3中所述, 在小鼠脾细胞培养物中对表1例示的TLR9激动剂测试了它们对IL-12和IL-6的诱导。下文表10a和10b所示结果证明了对3'-3'连接的寡核苷酸的特定化学修饰会改变它们在脾细胞中的TLR9介导的IL-6和/或IL-12激活序型, 而且这种激活序型根据化学修饰的不同而可以是剂量依赖性的。更一般地, 这些数据证明了对3'-3'连接的寡核苷酸的特定化学修饰可用于提高或降低IL-6和IL-12激活。

表10a: 小鼠脾细胞培养物中IL-12和IL-6分泌的诱导

SEQ ID NO /寡聚物No	序列	IL-6 (pg/ml±SD)		IL-12 (pg/ml±SD)	
		在1μg/ml	在3μg/ml	在1μg/ml	在3μg/ml
38	5'-TCTGACG ₁ TTCT- Y-TCTTG ₁ CAGTCT-5'	8354±32	24508±86	909±17	876±89
39	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ - Y-G ₁ CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	3371±102	15012±25	621±12	517±19
40	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTCTG- Y-GTCTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	361±4	4072±1	451±13	279±0
41	5'-TCAGTCGTTAG- Y-GATTGCTGACT-5'	2496±69	17796±3	856±12	626±6
42	5'-TCTGTCGTTCT- Y-TCTTGCTGTCT-5'	8034±95	22124±57	659±7	455±18
43	5'-TCGTTGL- Y-LGTTGCT-5'	3127±22	14412±32	532±11	536±27
47	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ - M-TCTTG ₁ CTGTCT-5'	2685±29	15663±35	957±2	566±18
48	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ - M-GACAG ₁ CTGTCT-5'	3199±69	17016±11	792±3	528±2
	PBS	0.00	0.00	87±16	87±16

表10b: 小鼠脾细胞培养物中IL-12和IL-6分泌的诱导

SEQ ID NO/寡聚物 No.	序列和修饰(5'-3')	IL-12 (pg/ml±SD) 在1μg/ml	IL-6 (pg/ml±SD) 在1μg/ml
60	5'-TCTGTCG ₁ TTC <u>U</u> o-X-o <u>U</u> CTTG ₁ CTGTCT-5'	4066±47	78±14
61	5'-TCTGTCG ₁ TTC <u>C</u> o <u>U</u> o-X-o <u>U</u> o <u>C</u> TTG ₁ CTGTCT-5'	2438±81	164±21
62	5'-TCTGTCG ₂ TTC <u>U</u> -X- <u>U</u> CTTG ₂ CTGTCT-5'	1782±67	120±36
63	5'-CTGTCG ₂ TTC <u>U</u> C-X- <u>C</u> UCTTG ₂ CTGTC-5'	2496±105	215±19
64	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTC <u>G</u> -X- <u>G</u> CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	64796±60	3776±25
65	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -L- <u>G</u> ACAG ₁ CTGTCT-5'	8245±244	3776±46
培养基		921±60	38±0

如实施例3中所述, 在人PBMC培养物中对表1例示的TLR9激动剂测试了它们对IL-1Rα、IL-6和IL-12p40p70的诱导。下文表11所示结果证明了对3'-3'连接的寡核苷酸的特定化学修饰会改变它们在PBMC中的TLR9介导的IL-1Rα、IL-6、和IL-12p40p70激活序型, 而且这种激活序型根据化学修饰的不同而可以是剂量依赖性的。更一般地, 这些数据证明了对3'-3'连接的寡核苷酸的特定化学修饰可用于提高或降低IL-1Rα、IL-6、和IL-12p40p70激活。

表11: 人PBMC中的IL-1Rα、IL-6和IL-12p40p70

SEQ ID NO /寡聚物No	序列	IL-1Rα	IL-6	IL-12p40p70
43	5'-TCGTTGL-Y-LGTTGCT-5'	1595.5	1079.5	160.5
44	5'-TCGTTGM-Y-MGTTGCT-5'	1775.0	931.5	148.0
45	5'-TCG ₁ TTGM-Y-MGTTG ₁ CT-5'	954.0	1235.5	71.0
46	5'-TCGTTGM-X-MGTTGCT-5'	1550.0	800.0	127.0
	PBS	187.0	36.0	21.0

如上文所描述的, 在第一个方面, 本发明提供了TLR9的基于寡核苷酸的合成激动剂。基于对碱基、糖、连接、或接头的某些化学修饰, TLR9的激动剂在与其它TLR9激动剂分子结合、成双(duplex)时可拥有升高的稳定性, 同时保留可及的5'-末端。

在第二个方面, 本发明提供了组合物, 其包含依照本发明的基于寡核苷酸的TLR9激动剂(“化合物”)和生理学可接受载体。术语“生理学可接受载体”一般指不干扰化合物的效力和与生物学系统(诸如细胞、细胞培养物、

组织、或生物体)相容的物质。

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

生理学可接受载体或稀释剂中所包括的活性化合物的量足以给患者投递预防或治疗有效量而不会在所处理的患者中引起严重的毒性作用。术语“有效量”或“足够量”一般指足以实现期望生物学效应(诸如有益结果)的量。如此，“有效量”或“足够量”会取决于施用它的背景。生理学可接受衍生物的有效剂量范围可基于要投递的亲本化合物的重量来计算。如果衍生物自身展现出活性，那么有效剂量可如上所述使用衍生物的重量或通过本领域技术人员知道的其它手段来估算。

在第三个方面，本发明提供了疫苗。依照这个方面的疫苗包含依照本发明的组合物，且进一步包含抗原。抗原指引发特异性免疫应答的分子。此类抗原包括但不限于蛋白质、肽、核酸、碳水化合物及其任何复合物或组合。抗原可以是天然的或合成的，而且一般诱导对该抗原特异性的免疫应答。任何此类抗原可任选是与免疫原性蛋白质相连接的，诸如匙孔蠍血蓝蛋白(KLH)、霍乱毒素B亚基、或任何其它免疫原性载体蛋白。

依照本发明的疫苗可进一步包括众多已知佐剂中的任何佐剂，包括但不限于弗氏完全佐剂、KLH、单磷酸基脂质A (MPL)、明矾、和皂苷，包括QS-21、咪喹莫特(imiquimod)、R848、或其组合。

在第四个方面，本发明提供了用于在脊椎动物中产生TLR9介导的免疫应答的方法，此类方法包括对脊椎动物施用依照本发明的化合物、组合物或疫苗。在一些实施方案中，脊椎动物是哺乳动物。就本发明而言，术语“哺乳动物”明确地意图包括人和动物。在优选的实施方案中，对需要免疫刺激的脊椎动物施用化合物、组合物或疫苗。

在依照本发明这个方面的方法中，依照本发明的化合物、组合物或疫苗的施用可通过任何合适路径来进行，包括但不限于胃肠外、口服、肿瘤内、舌下、透皮、表面局部(topical)、鼻内、气溶胶、眼内、气管内、直肠内、

粘膜、阴道、通过基因枪、皮肤贴片或以滴眼液或漱口水的形式。化合物、组合物或疫苗的施用可使用已知规程以有效减轻疾病的症状或替代标志物的剂量和时间段来进行。在系统性施用，优选以足够剂量施用化合物、组合物或疫苗以使依照本发明的化合物的血液水平达到约0.0001微摩尔至约10微摩尔。对于局部施用，比这低得多的浓度可以是有效的，而且可耐受高得多的浓度而没有毒性作用。优选的是，依照本发明的化合物的总剂量的范围为约0.001 mg每名患者每天至约200 mg每kg体重每天。可能希望对个体同时地或顺序地施用治疗有效量的一种或多种本发明治疗用组合物作为单次处理事件。

在某些优选的实施方案中，与其它药剂组合地施用依照本发明的化合物、组合物或疫苗，所述其它药剂包括但不限于抗体、细胞毒剂、变应原、抗生素、反义寡核苷酸、siRNA、适体、核酶、靶向疗法、肽、蛋白质、基因疗法载体、DNA疫苗、和/或佐剂(用以增强免疫应答的特异性或强度)。

就本发明的这个方面而言，术语“与...组合”指在治疗患者中的疾病或病症的过程中以任意次序施用依照本发明的化合物、组合物或疫苗和/或其它药剂，包括同时施用，以及相隔长达数小时、数天或数周的时间上有间隔的次序。此类组合处理还可包括超过一次的依照本发明的化合物、组合物或疫苗和/或其它药剂的施用。依照本发明的化合物、组合物或疫苗和/或其它药剂的施用可以通过相同或不同的路径的。

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

在第五个方面，本发明提供了治疗性处理患有疾病或病症的患者的方法，此类方法包括对患者施用依照本发明的化合物、组合物或疫苗。在各种实施方案中，要治疗的疾病或病症是癌症、自身免疫性病症、传染病、气道炎症、炎性病症、变态反应、哮喘或由病原体或变应原引起的疾病。病原体包括例如细菌、寄生物、真菌、病毒、类病毒、和朊病毒。施用如关于本发明第四个方面所述的进行。

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

就本发明而言，术语“变态反应”一般指不当的免疫应答，其特征为炎

症,而且包括但不限于食物变态反应和呼吸变态反应。术语“气道炎症”包括但不限于哮喘。在用于本文时,术语“自身免疫性病症”指其中“自身”组分(例如蛋白质)遭受免疫系统攻击的病症。该术语包括自身免疫性哮喘。术语“癌症”包括但不限于由异常的或不受控制的细胞增殖和/或分裂引起的任何恶性生长或肿瘤。癌症可发生于人和/或动物中,而且可发生于任何和所有组织中。用本发明治疗具有癌症的患者可包括依照本发明的化合物、组合物或疫苗的施用,使得异常的或不受控制的细胞增殖和/或分裂受到影响。

在第六个方面,本发明提供了用于预防疾病或病症的方法,此类方法包括对患者施用依照本发明的化合物、组合物或疫苗。在各种实施方案中,要预防的疾病或病症是癌症、自身免疫性病症、气道炎症、炎性病症、传染病、变态反应、哮喘或由病原体引起的疾病。病原体包括但不限于细菌、寄生物、真菌、病毒、类病毒、和朊病毒。施用如关于本发明第四个方面所述的进行。

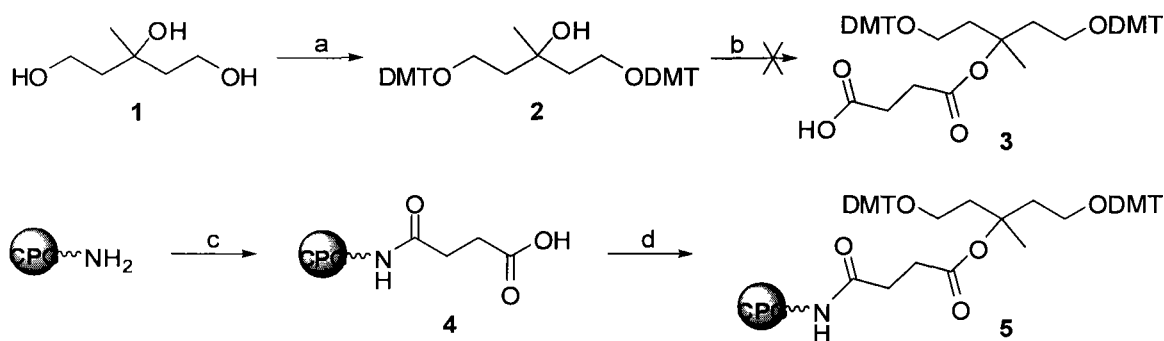
在任何依照本发明的方法中,可以与对预防或治疗疾病或疾患有用的且不减小依照本发明的化合物、组合物或疫苗的免疫刺激效应的任何其它药剂组合地施用依照本发明的化合物、组合物或疫苗。在任何依照本发明的方法中,对预防或治疗疾病或疾患有用的药剂包括但不限于疫苗、抗原、抗体、细胞毒剂、变应原、抗生素、反义寡核苷酸、TLR激动剂、肽、蛋白质、基因疗法载体、DNA疫苗和/或佐剂(用以增强免疫应答的特异性或强度)、或共刺激分子诸如细胞因子、趋化因子、蛋白质配体、反式激活因子、肽和包含经修饰氨基酸的肽。例如,在癌症的预防和/或治疗中,涵盖可以与化疗化合物或单克隆抗体组合地施用依照本发明的化合物、组合物或疫苗。或者,所述药剂可包括编码抗原或变应原的DNA载体。在这些实施方案中,依照本发明的化合物、组合物或疫苗能各式各样地作为佐剂起作用和/或产生直接的免疫调控效应。

以下实施例旨在进一步例示本发明的某些优选实施方案,并非意图以任何方式限制本发明的范围。

实施例1: 寡核苷酸戊烷-1,3,5-三醇、戊烷-1,5-二醇和顺式-1,3,5-环己三醇接头的合成及CPG和OligoPrep固体支持物的官能化

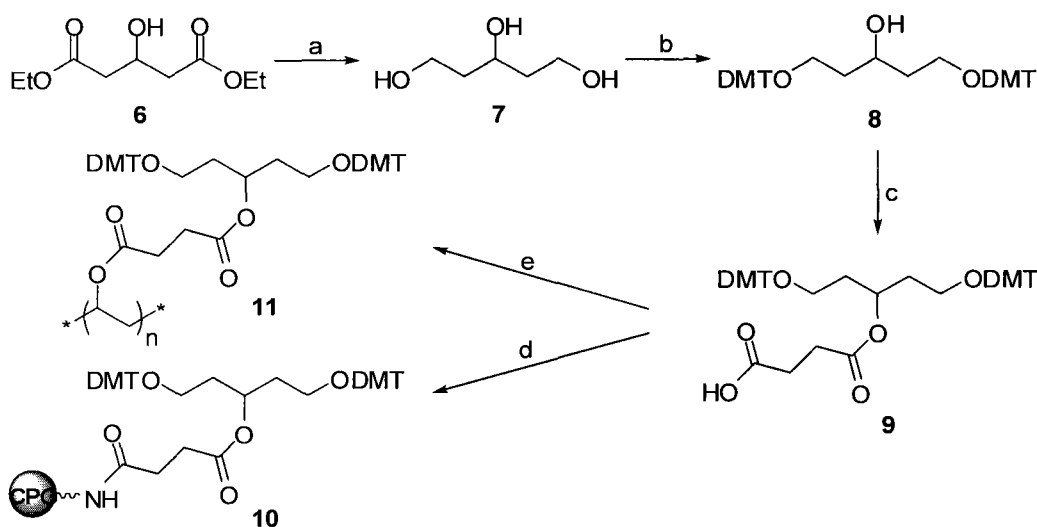
受控孔径玻璃衍生化3-甲基-1,3,5-戊三醇接头(5)如方案1所示自商品化

3-甲基-1,3,5-三醇**1**获得。首先,通过在存在DMAP的情况中用DMTCl进行的处理以高产率自**1**制备受二-DMT保护的醇**2**。由于**2**在3-羟基处的琥珀酰化产物产率低(这可能是由于空间(位阻)效应),不可能采用CPG的常规衍生化方法。然而,遵循替代方法来制备接头衍生化CPG **5**,该方法消除了对生成琥珀酸盐/酯**3**的需要(方案1)。在此路径中,首先,通过用二氯甲烷(DCM)中的3%三氯乙酸(TCA)在室温(r.t.)进行的处理来活化CPG珠,以在CPG表面尽可能多地释放反应性氨基。活化后的CPG珠然后在存在DMAP的情况中用琥珀酸酐衍生化以提供CPG珠**4**。最后,在存在*N*-(3-二甲基氨基丙基)-*N'*-乙基碳二亚胺盐酸盐(DEC)/DMAP的情况中,**2**与CPG **4**的羧基缩合,得到CPG衍生的接头**5**。衍生化后,通过用五氯酚进行的加帽反应消除残余羧基。



方案1. 3-甲基-1,3,5-戊三醇接头的合成和CPG的衍生化。**试剂和条件:** a) DMTCl, DMAP, 吡啶, 0°C - r.t.; b) 琥珀酸酐, DMAP, 吡啶; c) (i) DCM中的3% TCA; (ii) 琥珀酸酐, DMAP, 吡啶; d) (i) **2**, DMAP, TEA, DEC, 吡啶; (ii) 五氯酚。

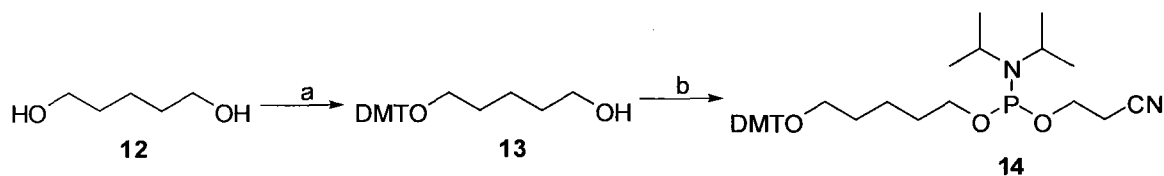
自商品化3-羟基谷氨酸二乙酯**6**开始,制备1,3,5-戊三醇接头衍生化CPG **10**和OligoPrep **11**(方案2)。**6**与LiAlH₄反应,定量产生1,3,5-戊三醇**7**。三醇**7**然后在有DMAP的情况中用DMTCl选择性保护,以提供受二-DMT保护的醇**8**,其然后在有DMAP的情况中用琥珀酸酐进行处理,成功地转变成琥珀酸盐/酯**9**,易于加载到固体支持物上。在有DIC/DMAP的吡啶/乙腈混合物的情况中,以定量加载(quantitative loading yield)使**9**与CPG附着(**10**)。但是,在OligoPrep250(一种PVA固体支持物)官能化的情况中,上文方案的加载量很小。然而,在存在TBTU/DMAP-乙腈的情况中实现了定量加载(**11**)。在CPG (**10**)和OligoPrep250 (**11**)支持物上,加载分别维持在约40μmol/g和约125μmol/g,这提高了核苷酸偶联效率和终产率。



方案2. 1,3,5-戊三醇接头的合成及CPG和OligoPrep固体支持物的衍生化。**试剂和条件:**

a) LiAlH_4 , THF, 0°C - r.t.; b) DMTCl, DMAP, 吡啶, 0°C - r.t.; c) 琥珀酸酐, DMAP, 吡啶; d) LCAA-CPG, DMAP, DIC, 吡啶, 乙腈; e) OligoPrep250, DMAP, TBTU, 乙腈。

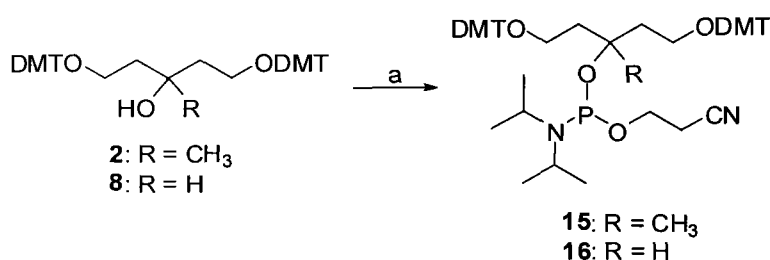
C5接头官能化支持物**10**和**11**对于制备具有同样序列的免疫聚物(immunomer)是理想的。具有不同序列的免疫聚物在我们的研究中也展现出有力的免疫刺激活性。为了制备具有不同序列的免疫聚物,需要受到适当保护的C5接头,诸如**14**(方案3)。用DMT选择性保护商品化1,5-戊二醇的羟基之一,接着用2-氰基乙基 N,N -二异丙基氯-亚磷酰胺(phosphoramidite)进行亚磷酰化(phosphitylation),提供所需要的C5接头**14**(方案3)。



方案3. 戊二醇亚磷酰胺的合成。**试剂和条件:** a) DMTCl, DMAP, 吡啶, -10°C - r.t.; b) DIPEA, 2-氰基乙基 N,N -二异丙基氯-亚磷酰胺, NMI, DCM, 0°C - r.t.

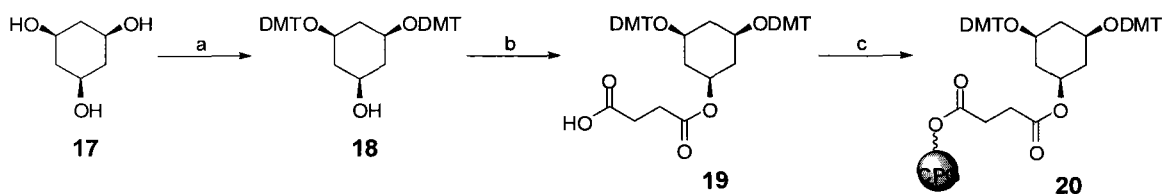
我们还聚焦于我们对作为有力合成免疫调控基序的CpG DNA树状聚体的设计和开发的关注。为了制备CpG DNA树状聚体,受到适当保护的接头亚磷酰胺是至关重要的。如方案4所示通过用2-氰基乙基 N,N -二异丙基氯亚

磷酸胺进行的亚磷酸化分别自二-DMT醇**2**和**8**制备C5接头亚磷酸胺**15**和**16**。



方案4. 戊三醇亚磷酸胺的合成。 **试剂和条件:** a) DIPEA, 2-氰基乙基*N,N*-二异丙基氯亚磷酸胺, NMI, DCM, 0°C - r.t.。

如方案5所示, 获得被CPG **20**衍生化的顺式-环己三醇接头。自商品化顺式-1,3,5-环己三醇(**17**)获得受二-DMT保护的顺式-1,3,5-环己三醇**18**。随后, 在存在DMAP的情况下, 琥珀酸酐使**18**的不受保护的羟基发生琥珀酰化, 由此提供了期望的二-DMT琥珀酸盐/酯**19**, 产率为78%。在存在吡啶/乙腈混合物中的DIC/DMAP的情况下定量加载(**20**, 40 μmol/g), 实现了琥珀酸盐/酯**19**的CPG衍生化。



方案5. 顺式-环己烷-1,3,5-三醇接头的合成和CPG固体支持物的衍生化。 **试剂和条件:** a) DMTCl, DMAP, 吡啶, 0°C - r.t.; b) 琥珀酸酐, DMAP, 吡啶, r.t.; c) LCAA-CPG, DMAP, DIC, 吡啶, 乙腈。

试剂诸如3-羟基谷氨酸二乙酯、氢化铝锂(LiAlH₄)、4,4-二甲氧基三苯甲基氯化物(DMTCl)、4-二甲基氨基吡啶(DMAP)、琥珀酸酐、*O*-(苯并三唑-1-基)-*N,N,N',N'*-四甲基脲四氟硼酸酯(TBTU)、*N,N'*-二异丙基碳二亚胺(DIC)、*N*-(3-二甲基氨基丙基)-*N'*-乙基碳二亚胺盐酸盐(DEC)、三氯乙酸(TCA)、*N*-甲基咪唑(NMI)、三乙胺(TEA)、二异丙基乙胺(DIPEA)和溶剂诸如吡啶、二氯甲烷(DCM)和四氢呋喃(THF)得自Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)并在没有进一步纯化的情况下使用, 除非另有说明。长链烷基胺受控孔径玻

璃(CPG; 120-200目, 500 Å, 90-120 µmol/g NH₂基团)得自CPG Inc. (Lincoln Park, NJ), 而OligoPrep250得自Merck KGaA (Germany)。Cap A(乙酸酐/2,6-卢剔啶/THF 1:1:8)和Cap B(*N*-甲基咪唑/THF 16:84)试剂得自Applied Biosystems (Foster City, CA)。所有反应在玻璃器皿中实施, 玻璃器皿在使用前在120°C烘干至少3小时。TLC在包被在铝片上的硅胶60 F₂₅₄上运行, 并提供UV光或通过来自Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)的5%磷钼酸(PMA)溶液显现。用于层析的溶剂诸如乙酸乙酯(EtOAc)、己烷、DCM、甲醇、叔丁基甲基醚得自J.T. Baker并在没有纯化的情况中使用。急骤柱层析使用硅胶60(目径 0.040-0.063mm 和 230-400 目 ASTM)实施, 其得自EMD Chemicals (Gibbstown, NJ)。NMR谱在Varian 400MHz Unity Inova仪器上实施。化学位移(δ)为相对于TMS的值、以ppm计, 所有偶联(coupling)常数(*J*)均以Hz计。

1,5-二-二甲氧基三苯甲基氧-3-甲基-戊-3-醇(2)。在氮气下将吡啶(25 mL)中的DMTCl (3.6 g, 10.5 mmol, 2.1 当量)逐滴加至冰冷的(0°C)和搅动中的3-甲基-1,3,5-戊二醇(1, 0.7 g, 5 mmol)和DMAP (0.24 g)在干吡啶(25 mL)中的溶液。让反应混合物缓慢达到室温(约4小时)并继续搅动过夜。TLC(含0.5% TEA的己烷/叔丁基甲基醚2:1)指示反应完全。将吡啶旋转蒸发至干, 将残余物溶于乙酸乙酯(250 mL)并用水(2 x 100 mL)、饱和NH₄Cl溶液(2 x 100 mL)、卤水(2 x 100 mL)和水(2 x 100 mL)连续清洗。将乙酸乙酯层在无水MgSO₄上干燥并旋转蒸发至干。在硅胶急骤柱层析上使用含0.5%三乙胺的己烷/叔丁基甲基醚(3:1)纯化残余物以给出受二-DMT保护的产物**2**, 其为白色泡沫(2.9 g, 78%)。¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 1.56 (s, 3H-CH₃), 1.74-1.79 (m, 4H, -CH₂CHCH₂-), 3.19-3.26 (m, 4H, 1 & 5-CH₂-), 3.78 (d, 12H, -OCH₃), 6.82 (dd, *J* = 8.8, 8H, Ar-H), 7.16-7.40 (m, 18H, Ar-H)。

制备二-DMT-3-甲基-戊三醇衍生化CPG (5): 将LCAA-CPG (5 g)加至3% TCA (50 mL)并在室温缓慢搅动3小时。将CPG过滤并用TEA/DIPEA的9:1混合物 (50 mL)接着用DCM (5 x 100 mL)清洗。将活化后的CPG在高真空下干燥1小时。将琥珀酸酐(1 g, 10 mmol)和DMAP (0.2 g)在吡啶(30 mL)中的溶液加至上文CPG (5 g)并将浆液在室温摇动24小时。过滤掉溶液并将CPG用吡啶(2 x 25 mL)接着DCM (5 x 25 mL)清洗并在高真空下干燥2小时以获得CPG的琥珀酸

衍生物**4**。将二-DMT-3-甲基-戊三醇**2** (87 mg)、DMAP (30 mg)、TEA (100 μ L) 和DEC (0.4 g)在干吡啶(10 mL)中的溶液加至CPG **4**并在室温摇动15小时。将五氯酚(0.14 g)加至上文混合物并再摇动15小时。过滤掉溶液, 并将CPG用吡啶(2 x 25 mL)接着DCM (5 x 25 mL)彻底清洗并在干燥器中在高真空下干燥过夜以得到二-DMT-3-甲基-戊三醇衍生化CPG **5**。通过用DCM中的3% TCA 处理小量CPG并通过测量498nm吸光度测定DMT含量(37 μ mol/g)来测定加载。

合成戊烷-1,3,5-三醇(7): 在0°C在氩气下以剧烈搅动将THF (100 mL)中的3-羟基谷氨酸二乙酯(**6**, 25g, 122.4 mmol)逐滴加至LiAlH₄在THF (400 mL)中的1M溶液。添加后, 让反应混合物达到r. t.(约4小时)并搅动过夜。将反应混合物冷却至-78°C(丙酮/干冰浴)并通过逐滴添加饱和NH₄Cl溶液(50 mL)来淬灭, 产生白色沉淀。用另外500mL THF稀释反应混合物并经Celite过滤白色沉淀。用沸腾的THF (250 mL)处理沉淀并过滤。将混合有机溶液在无水MgSO₄上干燥并通过旋转蒸发除去溶剂。在硅胶急骤柱层析上使用DCM/EtOAc/甲醇纯化残余物(6:3:1), 得到三醇**7** (11.4 g, 95.5 mmol, 78%), 其为无色油。%)。 ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 1.39-1.54 (m, 4H, -CH₂CH(OH)CH₂-), 3.47 (t, J = 6.6, 4H, 1 & 5 -CH₂-), 3.61-3.68 (m, 1H, -CH(OH)-) and 4.23 (bs, 3H, 1,3 & 5-OH)。

1,5-二-[(4,4-二甲氧基苯基)-苯基甲氧基]-戊-3-醇(8)。在氩气下将吡啶(100 mL)中的DMTCl (16.6 g, 49 mmol, 2.1 当量)逐滴加至冰冷的(0°C)和搅动中的戊三醇**7** (2.8 g, 23 mmol)和DMAP (2.85 g, 1 当量)在干吡啶(50 mL)中的溶液。让反应混合物缓慢达到r. t.(约4小时)并继续搅动过夜。TLC(含0.5% TEA 的己烷/EtOAc 3:1)指示反应完全。将吡啶旋转蒸发至干, 将残余物溶于DCM (500 mL)并用水(500 mL)、饱和NH₄Cl溶液(500 mL)、卤水(500 mL)和水(2 x 500 mL)连续清洗。将DCM层在无水MgSO₄上干燥并旋转蒸发至干。在硅胶急骤柱层析上使用含0.5% TEA 的己烷/EtOAc (3:1)纯化残余物以给出二-DMT醇**8**, 其为白色泡沫(12.1 g, 16.7 mmol, 72%)。 ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 1.65-1.81 (m, 4H, -CH₂CHCH₂-), 3.16-3.31 (m, 4H, DMTO-CH₂-), 3.78 (s, 12H, -OCH₃), 3.95-4.01 (m, 1H, -CH-), 6.81 (d, J = 8.8, 8H, Ar-H),

7.17-7.42 (m, 18H, Ar-*H*). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75.5 MHz): 37.22, 55.38, 61.81, 69.58, 86.54, 113.27, 126.88, 128.01, 128.26, 130.15, 136.44, 145.16, 158.55.

3(1,5-*O*-二甲氧基三苯甲基戊三醇)琥珀酸(9): 将二-DMT醇8 (12 g, 16.6 mmol)和DMAP (4.04 g, 33.2 mmol)溶于干吡啶(150 mL)并在r.t.在剧烈搅动中逐份添加琥珀酸酐(3.31 g, 33.2 mmol)。将反应混合物搅动过夜并将吡啶旋转蒸发至干。将残余物溶于DCM (500 mL)并用冰冷的10%柠檬酸溶液(2 x 500 mL)和水(2 x 500 mL)连续清洗。将DCM层在无水 MgSO_4 上干燥, 使用旋转蒸发器浓缩至50mL体积并通过硅胶急骤柱层析使用含0.5%的DCM中的0→2%甲醇DCM纯化以给出纯的琥珀酸盐的三乙基铵盐9, 其为白色泡沫(11.4 g, 13.8 mmol, 83%)。 ^1H -NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 1.20 (t, $J = 7.6$, 9H, $-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 1.80-1.85 (m, 4H, $-\text{CH}_2\text{CHCH}_2-$), 2.40 (s, 4H, $-\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CO}-$), 2.90 (q, 6H, $-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$), 3.03-3.11 (m, 4H, 1 & 5- CH_2-), 3.78 (s, 12H, $-\text{OCH}_3$), 5.20-5.26 (m, 1H, $-\text{CH}-$), 6.81 (d, $J = 8.8$, 8H, Ar-*H*), 7.17-7.42 (m, 18H, Ar-*H*). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75.5 MHz): 9.09, 30.94, 31.77, 34.45, 45.08, 52.92, 55.32, 59.73, 69.73, 86.00, 113.12, 126.71, 127.85, 128.32, 130.11, 136.54, 145.22, 158.40, 173.07 和 177.71.

制备二-DMT戊三醇加载的CPG (10): 将琥珀酸盐9 (0.83 g, 1 mmol)、DMAP (0.4 g, 3.3 mmol)和DIC (5 mL)在吡啶/乙腈的1:6混合物(105 mL)中的溶液加至CPG (25 g)并将浆液摇动24小时。过滤掉溶液并将CPG用含5%吡啶的乙腈(100 mL)和乙腈(250 mL)清洗。将Cap A (ABI, 89 mL)和Cap B (ABI, 100 mL)溶液加至CPG支持物并摇动4小时。过滤掉溶液, 将CPG用含5%吡啶的乙腈(2 x 100 mL)接着乙腈(2 x 250 mL)清洗并在高真空下干燥30分钟。将TBDMSCl (5.6 g)和咪唑(1.4 g)在含5%吡啶的乙腈中的溶液(150 mL)加至CPG并摇动4小时。过滤掉溶液, 将CPG用含的5%吡啶的乙腈(3 x 100 mL)和DCM (4 x 250 mL)连续清洗并在干燥器中在高真空下干燥过夜以得到干的CPG支持物10。通过用DCM中的3% TCA处理小份CPG并通过测量498nm吸光度测定DMT含量($40\mu\text{mol/g}$)来测定加载。

制备二-DMT戊三醇加载的OligoPrep250 (11): 将OligoPrep250 (100 g, 在乙

腈中预膨胀)置于肽合成容器中并用无水乙腈(3 x 100 mL)清洗。将琥珀酸盐/酯**9** (1.752 g, 2.125 mmol)、DMAP (1.82 g, 14.87 mmol)、TBTU (3.41 g, 10.62 mmol)和乙腈(100 mL)加至OligoPrep250并将浆液摇动4小时。过滤掉溶液并将OligoPrep用含1% TEA的乙腈(2 x 100 mL)和乙腈(5 x 100 mL)清洗。将Cap A (50 mL: NMI/吡啶/乙腈 = 2:3:5)和Cap B (50 mL: 乙酸酐/乙腈 = 1:4)加至固体支持物并摇动6小时。过滤掉溶液, 乙腈(2 x 100 mL)清洗固体支持物并再一次重复加帽反应。过滤掉溶液, 将固体支持物用含1% TEA的乙腈(3 x 100 mL)接着乙腈(5 x 100 mL)清洗并在干燥器中在高真空下干燥24小时以得到干的OligoPrep250支持物**11** (26.4 g)。通过用DCM中的3% TCA处理小份OligoPrep并通过测量498 nm吸光度测定DMT含量(138 $\mu\text{mol/g}$)来测定加载。

5-二甲氧基三苯甲基氧-戊-1-醇(13): 将戊二醇**12** (12.5 g, 120 mmol)和DMAP (14.6 g, 120 mmol)溶于干吡啶(100 mL), 冷却至 -10°C 并在氩气下维持。在剧烈搅动中逐滴添加吡啶(150 mL)中的DMTCl (37.3 g, 110 mmol, 0.92 当量)。让反应混合物缓慢达到r.t.(约4小时)并继续搅动过夜。将吡啶旋转蒸发至干, 将残余物溶于DCM (500 mL)并用水(250 mL)、饱和 NH_4Cl 溶液(2 x 250 mL)、卤水(250 mL)和水(2 x 250 mL)连续清洗。将DCM层在无水 MgSO_4 上干燥并旋转蒸发至干。将残余物通过硅胶急骤柱层析使用含0.5% TEA的己烷/EtOAc (3:1)纯化以给出受单-DMT保护的醇**13**, 其为无色浆体(28.2 g, 58%)。 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 1.39-1.47 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 1.49-1.1.56 (m, 2H, $\text{DMTO}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1.60-1.68 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 3.06 (t, 2H, $J = 6.2$, $\text{DMTO}-\text{CH}_2-$), 3.60 (t, 2H, $J = 6.3$, $-\text{CH}_2\text{OH}$), 3.77 (s, 12H, $-\text{OCH}_3$), 6.82 (d, $J = 8.8$, 8H, Ar- H), 7.17-7.45 (m, 18H, Ar- H)。 $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 75.5 MHz): 22.84, 30.14, 32.92, 55.51, 63.21, 63.57, 85.98, 113.26, 126.87, 128.00, 128.46, 130.30, 136.96, 145.65 和 158.57。

5-二甲氧基三苯甲基氧-戊烷-1-O-(2-氰基乙基-*N,N*-二异丙基)亚磷酰胺(14): 在氩气下在剧烈搅动中向冰冷的**13** (20.32 g, 50 mmol)在无水DCM (500 mL)中的溶液添加DIPEA (26.12 mL, 150 mmol)。然后逐滴添加2-氰基乙基-*N,N*-二异丙基氯亚磷酰胺(14.2 g, 60 mmol)接着NMI (4 mL, 50 mmol)。让反应混合物缓慢达到r.t.(约4小时)并继续搅动过夜。含0.5% TEA的3:1 己烷/EtOAc

中的TLC展现出反应完全。用另外500 mL DCM稀释反应混合物并用饱和含水 NaHCO_3 (1 x 500 mL)、卤水(2 x 500 mL)和水(1 x 500 mL)顺序清洗。将有机层在无水 MgSO_4 上干燥, 过滤并旋转蒸发至干。将残余物在硅胶急骤柱层析上使用含0.5% TEA的3:1 己烷/ EtOAc 混合物以得到**13**, 其为无色粘稠液体 (22.3 g, 74%)。 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 1.15 (t, 12H, $J = 7.6$, $(\text{Me}_2\text{CH})_2\text{N-}$), 1.37-1.45 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OP-}$), 1.52-1.64 (m, 4H, $\text{DMTO-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 2.55 (t, 2H, $J = 6.2$, $-\text{CH}_2\text{CN}$), 3.01 (t, 2H, $J = 6.5$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$), 3.49-3.64 (m, 4H, DMTO-CH_2- and $-\text{CH}_2\text{OP-}$), 3.73 (s, 12H, $-\text{OCH}_3$), 3.71-3.81 (m, 2H, $(\text{Me}_2\text{CH})_2\text{N-}$), 6.77 (d, $J = 8.8$, 8H, Ar- H), 7.13-7.41 (m, 18H, Ar- H). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 75.5 MHz): 20.56, 20.63, 23.08, 24.82, 24.89, 24.96, 30.05, 31.40, 43.15, 43.27, 55.44, 58.47, 58.66, 63.52, 63.92, 85.89, 113.20, 117.97, 126.81, 127.94, 128.42, 130.25, 136.92, 145.65 和 158.53. $^{31}\text{P-NMR}$: δ 145.07.

合成亚磷酰胺15和16: 使用关于**14**所述的一般规程来合成。化合物**15** - 白色泡沫且产率69%。 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 0.89 (d, 6H, $J = 7$, $(\text{Me}_2\text{CH})_2\text{N-}$), 1.05 (d, 6H, $J = 6.4$, $(\text{Me}_2\text{CH})_2\text{N-}$), 1.25 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 1.88-1.99 (m, 4H, $-\text{CH}_2\text{CHCH}_2-$), 2.40 (t, 2H, $J = 6.4$, $-\text{CH}_2\text{CN}$), 3.10-3.21 (m, 2H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$), 3.30-3.40 (m, 2H, $(\text{Me}_2\text{CH})_2\text{N-}$), 3.43-3.60 (m, 4H, DMTO-CH_2-), 3.77 (d, 12H, $-\text{OCH}_3$), 6.79 (dd, $J = 8.8$, 8H, Ar- H), 7.17-7.42 (m, 18H, Ar- H). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 75.5 MHz): 20.39, 24.27, 24.72, 43.03, 55.38, 57.73, 60.23, 77.96, 78.04, 86.28, 113.15, 118.01, 126.74, 127.89, 128.31, 129.31, 130.18, 136.80, 139.62, 145.47, 158.44. $^{31}\text{P-NMR}$: δ 135.93.

化合物**160** - 白色泡沫且产率79%。 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 1.00 (d, 6H, $J = 6.4$, $(\text{Me}_2\text{CH})_2\text{N-}$), 1.10 (d, 6H, $J = 6.7$, $(\text{Me}_2\text{CH})_2\text{N-}$), 1.73-1.99 (m, 4H, $\text{DMTO-CH}_2\text{CH}_2\text{CHCH}_2-$), 2.36 (t, 2H, $J = 6.6$, $-\text{CH}_2\text{CN}$), 3.14 (t, 2H, $J = 6.5$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$), 3.37-3.60 (m, 6H, DMTO-CH_2- and $(\text{Me}_2\text{CH})_2\text{N-}$), 3.77 (d, 12H, $-\text{OCH}_3$), 4.14-4.22 (m, 1H, $-\text{CHOP-}$), 6.78 (dd, $J = 8.8$, 8H, Ar- H), 7.17-7.42 (m, 18H, Ar- H). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 75.5 MHz): 20.38, 24.56, 24.88, 36.82, 43.08, 55.43, 58.39, 60.45, 69.88, 86.09, 113.18, 117.88, 126.81, 127.93, 128.36, 130.20, 136.77, 137.59, 145.47, 158.49. $^{31}\text{P-NMR}$: δ 145.20.

顺式-3,5-二二甲氧基三苯甲基氧-还己烷-1-醇(18)。将顺式-1,3,5-环己三醇脱水物(5.05 g, 30 mmol)溶于吡啶(100 mL)并旋转蒸发至干并在高真空下干燥以获得无水顺式-1,3,5-环己三醇(4.05 g, 30.6 mmol)。将上文无水环己三醇和DMAP (7.33 g, 60 mmol)溶于干吡啶(100 mL), 在冰浴中冷却并在氮气下维持。在剧烈搅动中将干吡啶(150 mL)中的DMTCl (20.4 g, 60 mmol, 2 当量)逐滴加至上文溶液。让反应混合物缓慢达到r.t.(约4小时)并继续搅动24小时。含0.5% TEA的己烷/EtOAc混合物中的TLC指示一些起始物质的存在。将反应混合物在60°C再搅动5小时并将吡啶旋转蒸发至干。将残余物溶于DCM (500 mL)并用水(500 mL)、饱和NH₄Cl溶液(500 mL)、卤水(500 mL)和水(2 x 500 mL)连续清洗。将DCM层在无水MgSO₄上干燥并旋转蒸发至干。将残余物在硅胶急骤柱层析上使用含0.5% TEA的3:1 己烷/EtOAc混合物纯化以给出二-DMT产物**18**, 其为白色固体(8.4 g, 38%)。 ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 1.04-1.13 (m, 3H, 2,4 & 6-CH₂-), 1.24-1.28 (m, 3H, 2,4 & 6-CH₂-), 1.66 (d, 1H, 1-OH), 2.84-2.93 (m, 1H, -CH-OH), 3.10-3.18 (m, 2H, 3 & 5-CH-), 3.78 (d, 12H, -OCH₃), 6.78 (d, *J* = 8.8, 8H, Ar-H), 7.16-7.42 (m, 18H, Ar-H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75.5 MHz): 41.42, 42.67, 55.37, 66.16, 67.91, 86.28, 113.12, 126.83, 127.81, 128.53, 130.41, 137.39, 146.29, 158.53.

1(3,5-二二甲氧基三苯甲基-顺式-环己三醇)琥珀酸(19): 将二-DMT-环己三醇**18** (4.05 g, 5.5 mmol)和DMAP (1.34 g, 10.1 mmol)溶于干吡啶(50 mL)并在r.t.在剧烈搅动中逐份添加琥珀酸酐(1.1 g, 10.1 mmol)。将反应混合物在r.t.搅动48小时, 而且含2%甲醇和0.5% TEA的DCM中的TLC指示起始物质的完全消失。将吡啶旋转蒸发至干, 将残余物溶于DCM (250 mL)并用冰冷的10%柠檬酸溶液(2 x 250 mL)和水(2 x 250 mL)连续清洗。将DCM层在无水MgSO₄上干燥, 使用旋转蒸发器浓缩至50 mL体积并通过硅胶急骤柱层析使用含0.5% TEA的DCM中的0→2%甲醇纯化以得到纯的琥珀酸盐的三乙基铵盐**19**, 其为白色泡沫(3.58 g, 78%)。 ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 1.17 (t, *J* = 7.6, 9H, -N(CH₂CH₃)₃), 1.17 - 1.25 (m, 2H, 4-CH₂-), 1.36 - 1.51 (m, 4H, 2 & 6-CH₂-), 2.37 - 2.47 (m, 4H, -OCH₂CH₂CN), 2.86 (q, 6H, -N(CH₂CH₃)₃), 2.99 - 3.10 (m, 2H, 3 & 5-CH-), 3.78 (d, 12H, -OCH₃), 3.98 - 4.08 (m, 1H, 1-CH-), 6.76 (dd, *J*

= 8.8, 8H, Ar-*H*), 7.15 - 7.37 (m, 18H, Ar-*H*). ¹³C NMR (CDCl₃, 75.5 MHz): 9.38, 31.16, 31.96, 39.02, 41.76, 45.18, 55.37, 67.68, 86.24, 113.12, 126.79, 127.77, 128.42, 130.33, 130.38, 137.15, 137.26, 146.28, 158.54, 172.58 和 178.16.

二-DMT环己三醇衍生化CPG 20的制备: 将琥珀酸盐**19** (0.78 g, 0.93 mmol)、DMAP (0.38 g, 2.8 mmol)和DIC (3 mL)在吡啶/乙腈的1:7.5混合物(85 mL)中的溶液加至CPG (22.5 g)并将浆液摇动24小时。过滤掉溶液并将CPG用含5%吡啶(2 x 100 mL)的乙腈和乙腈(3 x 100 mL)清洗。将Cap A (ABI, 80 mL)和Cap B (ABI, 90 mL)溶液加至CPG支持物并摇动4小时。过滤掉溶液, 将CPG用含5%吡啶的乙腈(2 x 100 mL)接着乙腈(2 x 250 mL)清洗并在高真空下干燥30分钟。将TBDMSCl (2.5 g)和咪唑(0.75 g)在含5%吡啶的乙腈(100 mL)中的溶液加至CPG并搅动5小时。过滤掉溶液, 将CPG用含5%吡啶的乙腈(3 x 100 mL)和DCM (4 x 100 mL)连续清洗并在干燥器中在高真空下干燥过夜以得到干的CPG支持物**20**。通过用DCM中的3% TCA处理小份CPG并通过测量498mm吸光度测定DMT含量(40μmol/g)来测定加载。

实施例2: 细胞培养条件和试剂, 表1例示的寡聚物在表达小鼠TLR9的HEK293细胞中对细胞因子的诱导

稳定表达小鼠TLR9的HEK293细胞(Invivogen, San Diego, CA)在5% CO₂温箱中的48孔板中培养, 每孔250 μl DMEM且补充有10%热灭活FBS。在80%汇合时, 在培养基中存在4 μl/ml Lipofectamine (Invitrogen, Carlsbad, CA)的情况下用400 ng/ml SEAP(分泌型人胚胎碱性磷酸酶)报道质粒(pNifty2-Seap) (Invivogen)瞬时转染培养物。在无血清培养基中分开稀释质粒DNA和Lipofectamine并在室温温育5分钟。温育后, 将稀释的DNA和Lipofectamine混合并将混合物在室温温育20分钟。25μl含有100ng质粒DNA的DNA/Lipofectamine混合物等分试样和1μl Lipofectamine添加至细胞培养板的每个孔, 并继续培养4小时。

转染后, 培养基更换为新鲜培养基, 将表1例示的寡聚物添加至培养物, 并继续培养24小时。在寡聚物处理结束时, 自每种处理取出30μl培养物上清, 按照制造商的方案(Invivogen)进行SEAP测定。简言之, 将培养物上清与对硝

基苯基磷酸酯底物一起温育，所生成的黄色用读板仪在405nm测量(Putta MR 等, *Nucleic Acids Res.*, 2006, 34:3231-8)。

实施例3: 表1例示的寡聚物在人PBMC、pDC、和小鼠脾细胞中对细胞因子的诱导

分离人PBMC

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

分离人pDC

使用BDCA4细胞分离试剂盒(Miltenyi Biotec)依照制造商的说明书通过正选择自PBMC分离pDC。

分离小鼠脾细胞

如Zhao, Q.等 (*Biochem Pharmacol.* 51: 173-182 (1996))和Branda, R.F.等 (*Biochem. Pharmacol.* 45: 2037-2043 (1993))所述，在RPMI完全培养基中培养来自4-8周龄C57BL/6小鼠的脾细胞。所有其它培养试剂均购自Mediatech (Gaithersburg, MD)。

细胞因子ELISA

将 5×10^6 个细胞/ml的人PBMC或小鼠脾细胞分配入48孔板中。将 1×10^6 个细胞/ml的人pDC分配入96孔板中。将溶于DPBS (pH 7.4; Mediatech)的表1例示寡聚物添加至细胞培养物。然后将细胞在37°C温育24小时，收集上清液进行Luminex Multiplex或ELISA测定。在某些实验中，通过三明治式ELISA测量IFN- α 、IL-6、和/或IL-12水平。所需要的试剂(包括细胞因子抗体和标准品)购自PharMingen。

细胞因子Luminex Multiplex

在某些实验中，通过Luminex Multiplex测定法测量培养物上清液中的IL-1R α 、IL-6、IL-10、IL-12、IFN- α 、IFN- γ 、MIP-1 α 、MIP- β 、MCP-1、和IL-12p40p70水平，其使用Biosource人多种细胞因子测定试剂盒在Luminex

100仪器上实施, 并使用由Applied Cytometry Systems (Sacramento, CA)提供的StarStation软件分析数据。

实施例4: 在存在表1例示的寡聚物的情况中的人B细胞增殖测定法

使用CD19细胞分离试剂盒(Miltenyi Biotec, Auburn, CA)依照制造商的说明书通过正选择自PBMC分离人B细胞。

用于该测定法的培养基组成如下: RPMI 1640培养基, 补充有1.5 mM 谷氨酰胺、1 mM 丙酮酸钠, 0.1 mM 非必需氨基酸, 50 μ M 2-巯基乙醇, 100 IU/ml 青霉素-链霉素混合物和10% 热灭活的胎牛血清。

用不同浓度的表1例示性寡聚物一式三份地在96孔平底板中刺激总共 0.5×10^6 个B细胞每ml(即 $1 \times 10^5/200 \mu$ l/孔), 总共72小时。66小时后, 在每孔中, 用20 μ l RPMI 1640培养基(无血清)中的0.75 μ Ci [3 H]-胸苷(1Ci = 37 GBq; Perkin Elmer Life Sciences)脉冲细胞, 在6-8小时后收获。然后使用细胞收集器收获平板并使用标准液体闪烁技术测定放射性掺入。在有些情况中, 将相应的[3 H]-T (cpm)换算成增殖指数并如此报告。