

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104857512 A

(43) 申请公布日 2015. 08. 26

(21) 申请号 201510106630. 1

(22) 申请日 2007. 11. 09

(30) 优先权数据

60/865,089 2006. 11. 09 US

(62) 分案原申请数据

200780049562. 3 2007. 11. 09

(71) 申请人 戴纳瓦克斯技术公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 E·海塞尔 R·L·考夫曼

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 史文静 黄革生

(51) Int. Cl.

A61K 39/39(2006. 01)

A61K 48/00(2006. 01)

A61P 11/06(2006. 01)

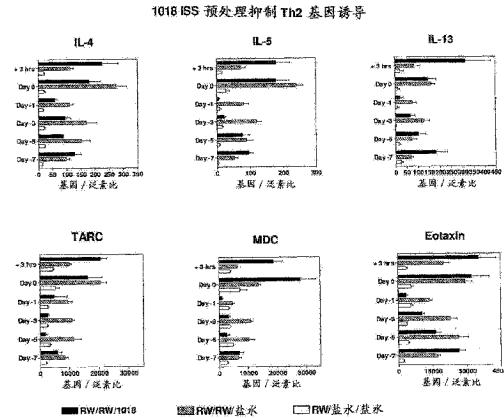
权利要求书1页 说明书43页
序列表13页 附图8页

(54) 发明名称

使用免疫刺激性寡核苷酸进行长期的疾病修饰

(57) 摘要

本发明提供治疗哮喘的方法，该方法通过在一个时期内使用多次 ISS 施用以赋予长期的疾病修饰。



1. 在需要其的个体中治疗哮喘的方法,包括向个体给予有效量的 ISS 的多次施用,其中 ISS 的施用导致对哮喘的长期疾病修饰。
2. 权利要求 1 的方法,其中多次施用是以每周为基础发生的。
3. 权利要求 1 的方法,其中施用 ISS 至少 3 次。
4. 权利要求 1 的方法,其中施用 ISS 四次或更多次。
5. 权利要求 1 的方法,其中长期疾病修饰是个体中 Th2 应答的减小。
6. 权利要求 5 的方法,其中在个体中 Th2 应答的减小是任一选自以下的细胞因子的减少 :IL-4、IL-5、IL-10 和 IL-13。
7. 权利要求 1 的方法,其中在最后施用 ISS 之后该长期疾病修饰持续至少 13 周。
8. 权利要求 1 的方法,其中该治疗导致哮喘的长期疾病修饰,其中该哮喘是过敏性哮喘。
9. 权利要求 1 的方法,其中 ISS 选自 1018ISS、含有 CpG 的 ISS 和嵌合的免疫调节性化合物。
10. 权利要求 1 的方法,其中 ISS 是 1018ISS。
11. 权利要求 10 的方法,其中在外来变应原的存在下施用 ISS。
12. 权利要求 11 的方法,其中外来变应原是豚草。

使用免疫刺激性寡核苷酸进行长期的疾病修饰

[0001] 本申请为 2007 年 11 月 9 日提交的、发明名称为“使用免疫刺激性寡核苷酸进行长期的疾病修饰”的 PCT 申请 PCT/US2007/084358 的分案申请，所述 PCT 申请进入中国国家阶段的日期为 2009 年 7 月 9 日，申请号为 200780049562.3。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请要求在 2006 年 11 月 9 日提交的临时专利申请 60/865,089 的优先权，该公开以其整体通过参考被并入本文。

发明领域

[0004] 本发明涉及通过使用一个或多个免疫刺激性序列（“ISS”）的多次施用来治疗哮喘的方法，所述施用赋予长期的疾病修饰。

[0005] 发明背景

[0006] 由感染或其它抗原攻击导致的免疫应答类型通常能够通过在该应答中涉及的 T 辅助 (Th) 细胞的亚型而区分。Th1 亚型负责经典的细胞介导的功能，例如迟发型的超敏反应和细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 的激活，而 Th2 亚型更有效地作为 B- 细胞激活的辅助细胞发挥功能。对抗原的免疫应答类型通常受到应答抗原的细胞产生的细胞因子的影响。据认为，Th1 和 Th2 细胞分泌的细胞因子的区别反映了这两个亚型的不同的生物功能。见，例如，Romagnani (2000) Ann. Allergy Asthma Immunol. , 85:9-18。

[0007] Th1 亚型可能特别适于应答病毒感染、细胞内病原体、和肿瘤细胞，因为其分泌激活 CTL 的 IL-2 和 IFN- γ 。Th2 亚型可能更适合应答自由生活的细菌和蠕虫类寄生虫和可能介导过敏反应，因为已知 IL-4 和 IL-5 分别诱导 IgE 产生和嗜酸性粒细胞激活。通常，Th1 和 Th2 细胞分泌不同模式的细胞因子，并由此一种类型的应答能够调节另一类型应答的活性。Th1/Th2 平衡的移动能够导致例如过敏反应，或导致增加的 CTL 应答。

[0008] 一段时间以来，已经认识到 Th1- 型免疫应答能够在哺乳动物中通过施用某些 ISS 而被诱导。ISS 包括称为免疫刺激性序列（“ISS”）的序列，该 ISS 通常包括 CG。见，例如，PCT 公开 WO 98/55495、WO 97/28259、美国专利 6,194,388 ;6,207,646 和 6,498,148；和 Krieg 等人 (1995) Nature, 374:546-49。对于许多感染性疾病，例如肺结核和疟疾，Th2- 型应答几乎没有抗感染价值。基于蛋白质的疫苗通常诱导 Th2- 型免疫应答，表征为高滴度的中和抗体而没有显著的细胞介导的免疫。而且，在某些适应症中一些类型的抗体应答是不适合的，最显著的是在变态反应中，其中 IgE 抗体应答能导致过敏性休克。

[0009] 在脊椎动物中，粒细胞（嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、中性粒细胞和肥大细胞）与内皮细胞粘附之后释放炎性介质，例如白三烯类、主要碱性蛋白和组胺。在易感个体中，导致的炎症能够损坏受影响的各组织。

[0010] 最常见的病理学炎症是哮喘，其表征为显著的嗜酸性粒细胞浸润呼吸道，继之为炎性诱导的组织损坏。这类病症的常规治疗通常涉及抑制在粒细胞粘着于内皮之后释放的炎症介质的活性（例如，通过递送肾上腺皮质激素组合物于受影响的组织）。在已知诱导炎症的抗原的身份时，可以通过免疫方法提供抵抗进一步抗原攻击的一定免疫保护。然而，尽

管有效刺激中和抗体的产生,但规范的免疫法不能有效刺激较长期的细胞免疫。而且,抗原免疫可以刺激 IL-4 和 IL-5 的产生。IL-5 促进粒细胞粘附于内皮,而 IL-4 诱导免疫球蛋白转化为 IgE 同种型,存在过敏反应的风险。

[0011] 关于过敏性哮喘,已知证实用 ISS 预治疗可以在过敏性哮喘的小鼠模型中抑制变应原诱导的气道嗜酸性粒细胞增多和气道高反应性。Broide 等人 (1998) J. Immunol. 161:7054。也已证实,该抑制还与气道内 ISS- 诱导的 Th2- 型细胞因子水平的下调有关。Hessel 等人、(2005) J. Exp. Med. 、202 (11) :1563。然而,因为是在变应原攻击之前不久给出 ISS 治疗,故这些效应集中于 ISS 治疗的直接效应。然而,用 ISS 长期治疗的效果大部分仍是未知的。此外,能赋予长期益处的哮喘治疗法也尚未被充分表征。这里公开的本发明为解决上述问题提供了有用的教导。

[0012] 这里引用的全部专利、专利申请和出版物将此以其整体通过参考被并入。

[0013] 发明概述

[0014] 本发明提供通过向个体给予有效量的 ISS 的多次施用在有需要的个体中治疗哮喘的方法。在一个实施方案中,施用该 ISS 至少 3 次。在另一实施方案中,以每周为基础进行该多次施用。在另一实施方案中,该方法导致对哮喘的长期疾病修饰。在另一实施方案中,该长期疾病修饰是在个体中 Th2 应答的减少。在另一实施方案中,在个体中 Th2 应答的减少是选自 IL-4、IL-5、IL-10 和 IL-13 的任一细胞因子的减少。在另一实施方案中,该长期疾病修饰在最后施用 ISS 之后持续至少 13 周。在另一实施方案中,该方法导致对哮喘的长期疾病修饰,其中该哮喘是过敏性哮喘。在另一实施方案中,该 ISS 选自由 1018 ISS、含有 CpG 的 ISS、和嵌合性免疫调节性化合物组成的组。在另一实施方案中,该 ISS 是 1018 ISS。在另一实施方案中,在外来变应原 (adventitious allergen) 存在下施用 ISS。在另一实施方案中,外来变应原是豚草。

附图说明

[0015] 图 1 描绘当用豚草鼻内攻击致敏的小鼠时对 Th2- 型气道炎性反应的发展重要的六种基因 ISS 的结果。该数据表示为基因 / 泛素比。

[0016] 图 2 描述用 1018 ISS 预处理可以抑制对 GOB-5 和 C2 的 Th2 基因诱导。该数据表示为基因 / 泛素比。

[0017] 图 3 描述在 BAL 液体中检测到的 Th2- 型细胞因子 IL-4 和 IL-13 水平。双星号表示 $p < 0.01$ 的统计显著性。单星号表示 $p < 0.05$ 的统计显著性。

[0018] 图 4 描述在 BAL 液体中检测到的 Th2- 型细胞因子 IL-10 和 Th1 型细胞因子 INF- γ 的水平。双星号表示 $p < 0.01$ 的统计显著性。

[0019] 图 5 描述在 BAL 液体中检测到的嗜酸性粒细胞的绝对数。双星号表示 $p < 0.01$ 的统计显著性。

[0020] 图 6 描述在小鼠灌洗液 (BAL 液体) 中测量的 Th2- 型细胞因子 IL-4、IL-5、IL-10 和 IL-13 的水平,该小鼠已经接受过多次 1018 ISS 施用的处理。

[0021] 图 7 描述在小鼠灌洗液 (BAL 液体) 中测量的 Th2- 型细胞因子 IL-4、IL-5、IL-10 和 IL-13 的水平,该小鼠已经经过多次施用 1018 ISS 或 TOLAMBA 的处理。

[0022] 图 8 描述在豚草诱导的过敏性哮喘小鼠模型中用 1018 ISS 长期鼻内处理的效果。

[0023] 发明详述

[0024] 这里,本发明提供经过多次向个体施予有效量的免疫刺激性序列(ISS)来治疗个体中哮喘的方法。在本发明的一个方面,可以通过使用ISS的多次施用,导致长期的疾病修饰。长期的疾病修饰包括在个体中遏制(suppression)Th2应答。在一些情况下,该遏制是对Th2应答的抑制。

[0025] 一般方法

[0026] 除非另外指出,否则本发明的实施将使用分子生物(包括重组技术)、微生物学、细胞生物学、生化、核酸化学和免疫学的常规技术,这些技术在本领域的技术范围内。在文献,例如Molecular Cloning:A Laboratory Manual、第二版(Sambrook等人,1989)和Molecular Cloning:A Laboratory Manual、第三版(Sambrook和Russel,2001)、(这里其联合和分别地被称为“Sambrook”);Oligonucleotide Synthesis(M. J. Gait,编辑,1984);Animal Cell Culture(R. I. Freshney、编辑,1987);Handbook of Experimental Immunology(D. M. Weir&C. C. Blackwell、编辑);Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells(J. M. Miller&M. P. Calos、编辑,1987);Current Protocols in Molecular Biology(F. M. Ausubel等人编辑,1987,包括至2001的增补);PCR:The Polymerase Chain Reaction、(Mullis等人编辑,1994);Current Protocols in Immunology(J. E. Coligan等人编辑,1991);The Immunoassay Handbook(D. Wild,编辑,Stockton Press NY,1994);Bioconjugate Techniques(Greg T. Hermanson、编辑,Academic Press,1996);Methods of Immunological Analysis(R. Masseyeff、W. H. Albert、和N. A. Staines、编辑,Weinheim:VCH Verlags gesellschaft mbH,1993);Harlow and Lane(1988)Antibodies,A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Publications,New York、和Harlow and Lane(1999)Using Antibodies:A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY(其联合和分别地被称为“Harlow and Lane”);Beaucage等人编辑,Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry(John Wiley&Sons, Inc., New York, 2000);和Agrawal,编辑,Protocols for Oligonucleotides and Analogs,Synthesis and Properties(Humana Press Inc., New Jersey, 1993)中已经充分说明了这类技术。

[0027] 定义

[0028] 如这里使用的,术语“变应原”意指当暴露于受试者时引发过敏反应的抗原或分子的抗原部分,通常为蛋白质。通常,受试者例如通过风团红斑测试或本领域任何已知的方法所指示的对变应原过敏。当受试者暴露于分子时即使只有其中一小群受试者呈现变应性免疫应答(例如,IgE),该分子也被称为变应原。由季节决定,变应原可以在环境中小量或较大量存在。变应原的实例在以下表1中列出。

[0029] “个体”是脊椎动物,例如小鼠,和优选是哺乳动物,更优选是人。哺乳动物包括,但不限于,人、灵长类、农场动物、竞技动物、啮齿类和宠物。

[0030] 物质的“有效量”是足以获得有益效果或期望结果,包括临床结果的量,就此而言,“有效量”由应用其的上下文而决定。在施用调节免疫应答的组合物的情况下,在有或无共施用的抗原时,ISS(和抗原,如果适用的话)的有效量是与单独施用该抗原时获得的免疫应答相比足以实现该调节作用的量。有效量可以赋予长期疾病修饰益处,例如遏制和/或抑制Th2免疫应答。可以在一次或多次施用中施用有效量。

[0031] 如这里使用和在本技术领域众所周知的，“治疗”是获得有益或期望效果，包括临床结果的方法。对本发明的目的而言，有益或期望的临床结果包括，但不限于，减缓或改善一个或多个症状、减轻疾病程度、稳定（即，不恶化）疾病状态、延迟或减缓疾病进展、和/或改善或减轻疾病状态。“治疗”也可以指与如果不接受治疗所预期的存活相比延长的存活。

[0032] 如这里使用的，术语“长期的疾病修饰”指在施用最后剂量的 ISS 后持续至少 3 周，优选至少 8 周，最优选至少 12 周减少或消除一种或多种哮喘症状。该哮喘症状包括，但不限于，支气管高反应性、气道中的嗜酸性粒细胞浸润、气道中的粘液产生、气道中的 Th2 细胞因子、气道重塑、速发性哮喘反应（在变应原暴露之后即刻的气道狭窄）、和迟发性哮喘反应（变应原暴露之后几个小时的气道狭窄）。

[0033] ISS 的生物学效应

[0034] 已经观察到可以通过使用 ISS 的多次施用来赋予哮喘个体长期的疾病修饰。实施例提供了对这一观察的一些举例说明。实施例 1 公开了一种类型的 ISS（如 1018 ISS）的直接效应在过敏性哮喘的鼠模型中持续约一周。实施例 2 和 3 说明在已至少 8 周接受了多次 1018 ISS 施用的个体中 Th2 应答能够被遏制。该 Th2 遏制的长期效应能够持续至少 13 周。因此，在一方面，本发明通过向个体施用有效量的 ISS 至少 8 周来提供对哮喘的长期治疗。这一治疗的长期效应能够持续至少 13 周。本发明考虑向可能患有哮喘的个体提供长期益处的方法，该方法通过至少 8 周使用 ISS 的多次施用来赋予持续至少 13、15、17、19、21 或 25 周的长期疾病修饰。

[0035] 功能上，ISS 在个体中增强细胞和体液免疫应答，特别是淋巴细胞增殖和各单核细胞和自然杀伤（NK）细胞的细胞因子（包括干扰素或 IFN）释放。在体内，合成的 ISS 的免疫刺激作用可以通过淋巴细胞个体与例如 ISS、ISS 寡核苷酸缀合物和含有 ISS 的重组表达载体接触而发生。见，例如，美国专利 6,610,661 和 WO 97/28259。因此，尽管天然微生物 ISS 刺激个体免疫系统应答感染，但这些 ISS 的合成类似物可以治疗性用于调节不仅对微生物抗原而且对变应原和其它物质的个体免疫应答。

[0036] ISS 组合物

[0037] 可以通过使用任何类型的 ISS 来实行本发明的方法。在一个实施方案中，使用 1018 ISS。1018 ISS 的结构已经在多个科学文献以及专利中公布。见，例如，Hessel 等人（2005）J. Exp. Med. 202(11):1563。通常，1018 ISS 是 (5'-TGACTGTGAACGTTCGAGATGA-3') (SEQ ID NO:1)。在另一实施方案中，可以使用一个或多个含有 CpG 基序的 ISS。见，例如，美国公开 2006/0058254 或 WO 2004/058179。在另一实施方案中，可以使用一个或多个嵌合的免疫调节性化合物（“CIC”）。见，例如，美国公开 2004/0132677。

[0038] 根据本发明，ISS 可以含有至少一个回文序列（即，回文对称），该回文序列长度为至少 8 碱基，含有至少一个 CG 二核苷酸。该 ISS 在多核苷酸的 5' 末端或附近还含有至少一个 TCG 三核苷酸序列（即，5' -TCG）。在一些情况下，在 ISS 中该回文序列和 5' -TCG 被 0、1 或 2 个碱基隔开。在一些情况下，回文序列包括全部或部分的 5' -TCG。

[0039] ISS 在本技术领域已有描述，和可以使用标准试验容易的鉴定其活性，所述标准试验可以指示多方面的免疫应答，例如细胞因子分泌、抗体产生、NK 细胞激活、B 细胞增殖、T 细胞增殖。见，例如，WO 97/28259；WO 98/16247；WO 99/11275；Krieg 等人（1995）

Nature 374:546-549; Yamamoto 等人 (1992a); Ballas 等人 (1996); Klinman 等人 (1997); Sato 等人 (1996); Pisetsky (1996a); Shimada 等人 (1986) Jpn. J. Cancer Res. 77:808-816; Cowdery 等人 (1996) J. Immunol. 156:4570-4575; Roman 等人 (1997); Lipford 等人 (1997a); WO 98/55495 和 WO 00/61151。因此,可以使用这些和其它的方法鉴定、测试和 / 或证实免疫调节性 ISS。

[0040] ISS 可以是超过 10 个碱基或碱基对, 优选超过 15 个碱基或碱基对, 更优选超过 20 个碱基或碱基对的任意长度。应该理解, 关于本文中所述的公式, 任何和全部的参数都独立地选择。例如, 如果 $x = 0-2$, 则 y 可以独立地选择而不管 x (或公式中的任何其它可选参数) 的数值如何。

[0041] 在一些实施方案中, ISS 包含 (a) 含有至少两个 CG 二核苷酸的长度至少为 8 个碱基的回文序列, 其中该 CG 二核苷酸通过 0、1、2、3、4 或 5 个碱基被彼此分开, 和 (b) 位置距离该多核苷酸的 5' 末端 0、1、2 或 3 个碱基的 $(TCG)_y$ 序列, 其中 y 是 1 或 2, 其中 $(TCG)_y$ 序列的 3' 末端与该回文序列的 5' 末端由 0、1 或 2 个碱基分开。在一些实施方案中, (b) 的 $(TCG)_y$ 序列的 CG 二核苷酸可以算为 (a) 的回文序列中的至少两个 CG 二核苷酸之一。在一些实施方案中, 该回文序列的 CG 二核苷酸由 1、3 或 4 个碱基彼此分开。在本发明的一些 ISS(或者是在本段中描述的或者是在本申请的其它处描述的) 中, 该回文序列具有少于三分之二 G 和 C 的碱基组成。在一些实施方案中, 该回文序列具有超过三分之一 A 和 T 的碱基组成。

[0042] 在一些实施方案中, ISS 包含 (a) 含有至少两个 CG 二核苷酸的长度至少为 8 个碱基的回文序列, 其中该 CG 二核苷酸通过 0、1、2、3、4 或 5 个碱基被彼此分开, 和 (b) 位置距离该多核苷酸的 5' 末端 0、1、2 或 3 个碱基的 $(TCG)_y$ 序列, 其中 y 是 1 或 2, 其中该回文序列包括全部或部分的 $(TCG)_y$ 序列, 其中 (b) 的 $(TCG)_y$ 序列的 CG 二核苷酸可以算为 (a) 的回文序列中的 CG 二核苷酸之一。优选的, 在一些实施方案中, 该回文序列的 CG 二核苷酸由 1、3 或 4 个碱基彼此分开。

[0043] 因此, 在一些实施方案中, ISS 可以包含式 $5' -N_x(TCG(N_q))_yN_w(X_1CGX_1')(CG)_p)_z$ (SEQ ID NO:2) 的序列, 其中 N 是核苷且 $x = 0-3$, $y = 1-4$, $w = -1, 0, 1$ 或 2 , $p = 0$ 或 1 , $q = 0, 1$ 或 2 , $z = 1-20$, 其中 X_1 和 X_1' 是自我互补的, 其中 $(TCG(N_q))_y$ (SEQ ID NO:3) 序列的 5' T 距离该多核苷酸的 5' 末端 0-3 个碱基。该 ISS 还可以包含长度为 8 个碱基或更多的回文序列, 其中该回文序列包含至少一个 $(X_1CGX_1')(CG)_p$ 序列。在 $w = -1$ 的 ISS 中, 该 $(TCG(N_q))_y$ (SEQ ID NO:3) 序列的 3' 碱基是第一个 $(X_1CGX_1')(CG)_p$ 序列的 5' X_1 。在一些实施方案中, 该 $(TCG(N_q))_y$ (SEQ ID NO:3) 序列与回文序列隔开 0、1 或 2 个碱基。在其它实施方案中, 该回文序列包括该 $(TCG(N_q))_y$ (SEQ ID NO:3) 序列的全部或部分。在一些实施方案中, 当 $p = 0$ 时, X_1 是 A 或 T。

[0044] 在一些实施方案中, ISS 可以包含式 $5' -N_x(TCG(N_q))_yN_w(X_1X_2X_3CGX_3'X_2'X_1'(CG)_p)_z$ (SEQ ID NO:4) 的序列, 其中 N 是核苷且 $x = 0-3$, $y = 1-4$, $w = -3, -2, -1, 0, 1$ 或 2 , $p = 0$ 或 1 , $q = 0, 1$ 或 2 , $z = 1-20$, 其中 X_1 和 X_1' 、 X_2 和 X_2' , 及 X_3 和 X_3' 是自我互补的, 其中 $(TCG(N_q))_y$ (SEQ ID NO:3) 序列的 5' T 距离该多核苷酸的 5' 末端 0-3 个碱基。该 ISS 还可以包含长度为 8 个碱基或更多的回文序列, 其中该回文序列包含该至少一个 $(X_1X_2X_3CGX_3'X_2'X_1'(CG)_p)$ (SEQ ID NO:5) 序列的开头 $(X_1X_2X_3CGX_3'X_2'X_1')$ 。在 $w = -1$ 的 ISS 中, $(TCG(N_q))_y$ (SEQ

ID NO:3) 序列的 3' 碱基是第一个 $(X_1 X_2 X_3 CGX_3' X_2' X_1' (CG)_p)$ (SEQ ID NO:5) 序列的 5' X_1 。在 $w = -2$ 的 ISS 中, $(TCG(N_q))_y$ (SEQ ID NO:3) 序列的倒数第二 (即, 从末端开始数第二个) 和倒数第一 (即, 最末的) 3' 碱基分别是第一个 $(X_1 X_2 X_3 CGX_3' X_2' X_1' (CG)_p)$ (SEQ ID NO:5) 序列的 5' X_1 和 X_2 。在 $w = -3$ 的 ISS 中, $(TCG(N_q))_y$ (SEQ ID NO:3) 序列的倒数第三 (即, 从末端开始数第三个)、倒数第二 (即, 从末端开始数第二个) 和倒数第一 (即, 最末的) 3' 碱基分别是第一个 $(X_1 X_2 X_3 CGX_3' X_2' X_1' (CG)_p)$ (SEQ ID NO:5) 序列的 5' X_1 、 X_2 和 X_3 。在一些实施方案中, $(TCG(N_q))_y$ (SEQ ID NO:3) 序列与回文序列被 0、1 或 2 个碱基分开。在其它实施方案中, 该回文序列包括 $(TCG(N_q))_y$ (SEQ ID NO:3) 序列的全部或部分。在一些实施方案中, 当 $p = 1$ 时, X_1 、 X_2 和 X_3 各自是 A 或 T。在一些实施方案中, 当 $p = 0$ 时, X_1 、 X_2 和 X_3 中的至少两个是 A 或 T。

[0045] 在一些实施方案中, ISS 可以包含下式的序列 : $5' - N_x (TCG(N_q))_y N_w (X_1 X_2 X_3 X_4 CGX_4' X_3' X_2' X_1' (CG)_p)_z$ (SEQ ID NO:6), 其中 N 是核苷且 $x = 0-3$, $y = 1-4$, $w = -3$ 、 -2 、 -1 、 0 、 1 或 2 , $p = 0$ 或 1 , $q = 0$ 、 1 或 2 , 和 $z = 1-20$, 其中 X_1 和 X_1' 、 X_2 和 X_2' 、 X_3 和 X_3' 、及 X_4 和 X_4' 是自我互补的, 其中 $(TCG(N_q))_y$ (SEQ ID NO:3) 序列的 5' T 距该多核苷酸的 5' 末端 0-3 个碱基。该 ISS 还可以包含长度为 10 个碱基或更多的回文序列, 其中该回文序列包含该至少一个 $(X_1 X_2 X_3 X_4 CGX_4' X_3' X_2' X_1' (CG)_p)$ (SEQ ID NO:8) 序列的开头 $(X_1 X_2 X_3 X_4 CGX_4' X_3' X_2' X_1')$ (SEQ ID NO:7)。在 $w = -1$ 的 ISS 中, $(TCG(N_q))_y$ (SEQ ID NO:3) 序列的 3' 碱基是第一个 $(X_1 X_2 X_3 X_4 CGX_4' X_3' X_2' X_1' (CG)_p)$ (SEQ ID NO:8) 序列的 5' X_1 。在 $w = -2$ 的 ISS 中, $(TCG(N_q))_y$ 序列的倒数第二 (即, 从末端开始数第二个) 和倒数第一 (即, 最末) 的 3' 碱基分别是第一个 $(X_1 X_2 X_3 X_4 CGX_4' X_3' X_2' X_1' (CG)_p)$ (SEQ ID NO:8) 序列的 5' X_1 和 X_2 。在 $w = -3$ 的 ISS 中, $(TCG(N_q))_y$ (SEQ ID NO:3) 序列的倒数第三 (即, 从末端开始数第三个)、倒数第二 (即, 从末端开始数第二个) 和倒数第一 (即, 最末) 的 3' 碱基分别是第一个 $(X_1 X_2 X_3 X_4 CGX_4' X_3' X_2' X_1' (CG)_p)$ (SEQ ID NO:8) 序列的 5' X_1 、 X_2 和 X_3 。在一些实施方案中, 该 $(TCG(N_q))_y$ (SEQ ID NO:3) 序列与回文序列分开 0、1 或 2 个碱基。在一些实施方案中, 该回文序列包括全部或部分的 $(TCG(N_q))_y$ (SEQ ID NO:3) 序列。在一些实施方案中, 当 $p = 1$ 时, X_1 、 X_2 、 X_3 和 X_4 中的至少三个是 A 或 T。在一些实施方案中, 当 $p = 0$ 时, X_1 、 X_2 、 X_3 和 X_4 中的至少两个是 A 或 T。

[0046] 在一些实施方案中, ISS 可以包含下式的序列 : $5' - N_x (TCG(N_q))_y N_w (X_1 CGCGX_1' (CG)_p)_z$ (SEQ ID NO:9), 其中 N 是核苷且 $x = 0-3$, $y = 1-4$, $w = -1$ 、 0 、 1 或 2 , $p = 0$ 或 1 , $q = 0$ 、 1 或 2 , 和 $z = 1-20$, 其中 X_1 和 X_1' 是自我互补的, 其中序列 $(TCG(N_q))_y$ (SEQ ID NO:3) 的 5' T 距该多核苷酸的 5' 末端 0-3 个碱基。该 ISS 还可以包含长度为 8 个碱基或更多的回文序列, 其中该回文序列包含该至少一个 $(X_1 CGCGX_1' (CG)_p)$ 序列的开头 $(X_1 CGCGX_1')$ 。在 $w = -1$ 的 ISS 中, $(TCG(N_q))_y$ (SEQ ID NO:3) 序列的 3' 碱基是第一个 $(X_1 CGCGX_1' (CG)_p)$ 序列的 5' X_1 。在一些实施方案中, $(TCG(N_q))_y$ (SEQ ID NO:3) 序列与回文序列分开 0、1 或 2 个碱基。在其它实施方案中, 回文序列包括全部或部分的 $(TCG(N_q))_y$ (SEQ ID NO:3) 序列。

[0047] 在一些实施方案中, ISS 可以包含下式的序列 : $5' - N_x (TCG(N_q))_y N_w (CGX_1 X_1' CG (CG)_p)_z$ (SEQ ID NO:10), 其中 N 是核苷且 $x = 0-3$, $y = 1-4$, $w = -2$ 、 0 、 1 or 2 , $p = 0$ or 1 , $q = 0$ 、 1 或 2 , 和 $z = 1-20$, 其中 X_1 和 X_1' 是自我互补的, 其中 $(TCG(N_q))_y$ (SEQ ID NO:3) 序列的 5' T 距该多核苷酸的 5' 末端 0-3 个碱基。该 ISS 还可以包含长度为 8 个碱基或更多的回

文序列，其中该回文序列包含该至少一个 $(CGX_1X_1' CG(CG)_p)$ 序列的开头 $(CGX_1X_1' CG)$ 。在 $w = -2$ 的 ISS 中， $(TCG(N_q))_y (SEQ ID NO:3)$ 序列的倒数第二（即，从末端开始数第二个）和倒数第一（即，最末）的 3' 碱基是 CG 且是第一个 $(CGX_1X_1' CG(CG)_p)$ 序列的 5' CG。在一些实施方案中，该 $(TCG(N_q))_y (SEQ ID NO:3)$ 序列与回文序列分开 0、1 或 2 个碱基。在其它实施方案中，回文序列包括全部或部分的 $(TCG(N_q))_y (SEQ ID NO:3)$ 序列。

[0048] 在一些实施方案中，ISS 可以包含下式的序列： $5' -N_x(TCG(N_q))_y N_w(X_1X_2CGX_3X_3' CGX_2' X_1' (CG)_p)_z (SEQ ID NO:11)$ ，其中 N 是核苷且 $x = 0-3$, $y = 1-4$, $w = -2, -1, 0, 1$ 或 2 , $p = 0$ 或 1 , $q = 0, 1$ 或 2 , 和 $z = 1-20$ ，其中 X_1 和 X_1' 、 X_2 和 X_2' 、和 X_3 和 X_3' 是自我互补的，其中 $(TCG(N_q))_y (SEQ ID NO:3)$ 序列的 5' T 距该多核苷酸的 5' 末端 0-3 个碱基。该 ISS 还可以包含长度为 10 个碱基或更多的回文序列，其中该回文序列包含该至少一个 $(X_1X_2CGX_3X_3' CGX_2' X_1' (CG)_p) (SEQ ID NO:13)$ 序列的开头 $(X_1X_2CGX_3X_3' CGX_2' X_1')$ ($SEQ ID NO:12$)。在 $w = -1$ 的 ISS 中， $(TCG(N_q))_y (SEQ ID NO:3)$ 序列的 3' 碱基是第一个 $(X_1X_2CGX_3X_3' CGX_2' X_1' (CG)_p) (SEQ ID NO:13)$ 序列的 5' X_1 。在 $w = -2$ 的 ISS 中， $(TCG(N_q))_y (SEQ ID NO:3)$ 序列的倒数第二（即，从末端开始数第二个）和倒数第一（即，最末）的 3' 碱基分别是第一个 $(X_1X_2CGX_3X_3' CGX_2' X_1' (CG)_p) (SEQ ID NO:13)$ 序列的 5' X_1 和 X_2 。在一些实施方案中，该 $(TCG(N_q))_y (SEQ ID NO:3)$ 序列与回文序列分开 0、1 或 2 个碱基。在其它实施方案中，该回文序列包括全部或部分的 $(TCG(N_q))_y (SEQ ID NO:3)$ 序列。在一些实施方案中，当 $p = 1$ 时， X_1 、 X_2 和 X_3 各自是 A 或 T。在一些实施方案中，当 $p = 0$ 时， X_1 、 X_2 和 X_3 中的至少两个是 A 或 T。

[0049] 在一些实施方案中，ISS 可以包含下式的序列： $5' -N_x(TCG(N_q))_y N_w(X_1X_2CGX_2' X_1' (CG)_p)_z (SEQ ID NO:14)$ ，其中 N 是核苷且 $x = 0-3$ 、 $y = 1-4$ 、 $w = -2, -1, 0, 1$ 或 2 , $p = 0$ 或 1 , $q = 0, 1$ 或 2 , 和 $z = 1-20$ ，其中 X_1 和 X_1' 、 X_2 和 X_2' 是自我互补的，和其中 $(TCG(N_q))_y (SEQ ID NO:3)$ 序列的 5' T 距该多核苷酸的 5' 末端 0-3 个碱基。该 ISS 还可以包含长度为 8 个碱基或更多的回文序列，其中该回文序列包含该至少一个 $(X_1X_2CGX_2' X_1' (CG)_p)_z (SEQ ID NO:28)$ 序列的开头 $(X_1X_2CGX_2' X_1')$ 。在 $w = -1$ 的 ISS 中， $(TCG(N_q))_y (SEQ ID NO:3)$ 序列的 3' 碱基是第一个 $(X_1X_2CGX_2' X_1' (CG)_p)$ 序列的 5' X_1 。在 $w = -2$ 的 ISS 中， $(TCG(N_q))_y (SEQ ID NO:3)$ 序列的倒数第二（即，从末端开始数第二个）和倒数第一（即，最末）的 3' 碱基分别是第一个 $(X_1X_2CGX_2' X_1' (CG)_p)$ 序列的 5' X_1 和 X_2 。在一些实施方案中，该 $(TCG(N_q))_y (SEQ ID NO:3)$ 序列与回文序列分开 0、1 或 2 个碱基。在其它实施方案中，该回文序列包括全部或部分的 $(TCG(N_q))_y (SEQ ID NO:3)$ 序列。在一些实施方案中， X_1 和 X_2 各自是 A 或 T。

[0050] 在一些实施方案中，ISS 可以包含下式的序列： $5' -N_x(TCG(N_q))_y N_w(X_1X_2X_3X_4X_5CGX_5' X_4' X_3' X_2' X_1' (CG)_p)_z (SEQ ID NO:15)$ ，其中 N 是核苷且 $x = 0-3$, $y = 1-4$, $w = -3, -2, -1, 0, 1$ 或 2 , $p = 0$ 或 1 , $q = 0, 1$ 或 2 , 和 $z = 1-20$ ，其中 X_1 和 X_1' 、 X_2 和 X_2' 、 X_3 和 X_3' 、 X_4 和 X_4' 、及 X_5 和 X_5' 是自我互补的，其中 $(TCG(N_q))_y (SEQ ID NO:3)$ 序列的 5' T 距该多核苷酸的 5' 末端 0-3 个碱基。该 ISS 还可以包含长度为 12 个碱基或更多的回文序列，其中该回文序列包含该至少一个 $((X_1X_2X_3X_4X_5CGX_5' X_4' X_3' X_2' X_1' (CG)_p) (SEQ ID NO:17)$ 序列的开头 $(X_1X_2X_3X_4X_5CGX_5' X_4' X_3' X_2' X_1')$ ($SEQ ID NO:16$)。在 $w = -1$ 的 ISS 中， $(TCG(N_q))_y (SEQ ID NO:3)$ 序列的 3' 碱基是第一个 $(X_1X_2X_3X_4X_5CGX_5' X_4' X_3' X_2' X_1' (CG)_p) (SEQ ID NO:17)$ 序列的

$5'X_1$ 。在 $w = -2$ 的 ISS 中, $(TCG(N_q))_y$ (SEQ ID NO:3) 序列的倒数第二 (即, 从末端开始数第二个) 和倒数第一 (即, 最末) 的 $3'$ 碱基分别是第一个 $(X_1X_2X_3X_4X_5CGX_5'X_4'X_3'X_2'X_1'(CG)_p)$ (SEQ ID NO:17) 序列的 $5'X_1$ 和 X_2 。在 $w = -3$ 的 ISS 中, $(TCG(N_q))_y$ (SEQ ID NO:3) 序列的倒数第三 (即, 从末端开始数第三个)、倒数第二 (即, 从末端开始数第二个) 和倒数第一 (即, 最末) 的 $3'$ 碱基分别是第一个 $(X_1X_2X_3X_4X_5CGX_5'X_4'X_3'X_2'X_1'(CG)_p)$ (SEQ ID NO:17) 序列的 $5'X_1$ 、 X_2 和 X_3 。在一些实施方案中, 该 $(TCG(N_q))_y$ (SEQ ID NO:3) 序列由 0、1 或 2 个碱基与回文序列分开。在其它实施方案中, 该回文序列包括全部或部分的 $(TCG(N_q))_y$ (SEQ ID NO:3) 序列。在一些实施方案中, X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 和 X_5 中的至少三个是 A 或 T。

[0051] 在一些实施方案中, ISS 可以包含下式的序列: $5' - N_x (TCG(N_q))_y N_w (X_1X_2CGCGX_2'X_1'(CG)_p)_z$ (SEQ ID NO:18), 其中 N 是核苷且 $x = 0-3$, $y = 1-4$, $w = -2$ 、 -1 、 0 、 1 或 2 , $p = 0$ 或 1 , $q = 0$ 、 1 或 2 , 和 $z = 1-20$, 其中 X_1 和 X_1' , 及 X_2 和 X_2' 是自我互补的, 其中 $(TCG(N_q))_y$ (SEQ ID NO:3) 序列的 $5' T$ 距该多核苷酸的 $5'$ 末端 0-3 个碱基。该 ISS 还可以包含长度为 8 个碱基或更多的回文序列, 其中该回文序列包含该至少一个 $(X_1X_2CGCGX_2'X_1'(CG)_p)$ (SEQ ID NO:19) 序列的开头 $(X_1X_2CGCGX_2'X_1')$ 。在 $w = -1$ 的 ISS 中, $(TCG(N_q))_y$ (SEQ ID NO:3) 序列的 $3'$ 碱基是第一个 $(X_1X_2CGCGX_2'X_1'(CG)_p)$ (SEQ ID NO:19) 序列的 $5'X_1$ 。在 $w = -2$ 的 ISS 中, $(TCG(N_q))_y$ (SEQ ID NO:3) 序列的倒数第二 (即, 从末端开始数第二个) 和倒数第一 (即, 最末) 的 $3'$ 碱基分别是第一个 $(X_1X_2CGCGX_2'X_1'(CG)_p)$ (SEQ ID NO:19) 序列的 $5'X_1$ 和 X_2 。在一些实施方案中, 该 $(TCG(N_q))_y$ (SEQ ID NO:3) 序列与回文序列分开 0、1 或 2 个碱基。在其它实施方案中, 该回文序列包括全部或部分的 $(TCG(N_q))_y$ (SEQ ID NO:3) 序列。在一些实施方案中, X_1 和 X_2 各自是 A 或 T。

[0052] 在一些实施方案中, ISS 可以包含下式的序列: $5' - N_x (TCG(N_q))_y N_w (X_1X_2X_3CGCGX_3'X_2'X_1'(CG)_p)_z$ (SEQ ID NO:20) 其中 N 是核苷且 $x = 0-3$, $y = 1-4$, $w = -3$ 、 -2 、 -1 、 0 、 1 或 2 , $p = 0$ 或 1 , $q = 0$ 、 1 或 2 , 和 $z = 1-20$, 其中 X_1 和 X_1' 、 X_2 和 X_2' 、及 X_3 和 X_3' 是自我互补的, 其中 $(TCG(N_q))_y$ (SEQ ID NO:3) 序列的 $5' T$ 距该多核苷酸的 $5'$ 末端 0-3 个碱基。该 ISS 还可以包含长度为 10 个碱基或更多的回文序列, 其中该回文序列包含该至少一个 $(X_1X_2X_3CGCGX_3'X_2'X_1'(CG)_p)$ (SEQ ID NO:22) 序列的开头 $(X_1X_2X_3CGCGX_3'X_2'X_1')$ (SEQ ID NO:21)。在 $w = -1$ 的 ISS 中, $(TCG(N_q))_y$ (SEQ ID NO:3) 序列的 $3'$ 碱基是第一个 $(X_1X_2X_3CGCGX_3'X_2'X_1'(CG)_p)$ (SEQ ID NO:22) 序列的 $5'X_1$ 。在 $w = -2$ 的 ISS 中, $(TCG(N_q))_y$ (SEQ ID NO:3) 序列的倒数第二 (即, 从末端开始数第二个) 和倒数第一 (即, 最末) 的 $3'$ 碱基分别是第一个 $(X_1X_2X_3CGCGX_3'X_2'X_1'(CG)_p)$ (SEQ ID NO:22) 序列的 $5' X_1$ 和 X_2 。在 $w = -3$ 的 ISS 中, $(TCG(N_q))_y$ (SEQ ID NO:3) 序列的倒数第三 (即, 从末端开始数第三个)、倒数第二 (即, 从末端开始数第二个) 和倒数第一 (即, 最末) 的 $3'$ 碱基分别是第一个 $(X_1X_2X_3CGCGX_3'X_2'X_1'(CG)_p)$ (SEQ ID NO:22) 序列的 $5' X_1$ 、 X_2 和 X_3 。在一些实施方案中, 该 $(TCG(N_q))_y$ (SEQ ID NO:3) 序列与回文序列分开 0、1 或 2 个碱基。在其它实施方案中, 该回文序列包括全部或部分的 $(TCG(N_q))_y$ 序列。在一些实施方案中, 当 $p = 1$ 时, X_1 、 X_2 和 X_3 各自是 A 或 T。在一些实施方案中, 当 $p = 0$ 时, X_1 、 X_2 和 X_3 中的至少两个是 A 或 T。

[0053] 在一些实施方案中, ISS 可以包含下式的序列: $5' - N_x (TCG(N_q))_y N_w (CGX_1X_2X_2'X_1'CG(CG)_p)_z$ (SEQ ID NO:23), 其中 N 是核苷且 $x = 0-3$, $y = 1-4$, $w = -2$ 、 0 、 1 或 2 , $p = 0$ 或 1 , $q = 0$ 、 1 或 2 , 和 $z = 1-20$, 其中 X_1 和 X_1' , 及 X_2 和 X_2' 是自我互

补的，其中 $(TCG(N_q))_y$ (SEQ ID NO:3) 序列的 5' T 距该多核苷酸的 5' 末端 0-3 个碱基。该 ISS 还可以包含长度为 8 个碱基或更多的回文序列，其中该回文序列包含该至少一个 $(CGX_1X_2X_2'X_1'CG(CG)_p)$ (SEQ ID NO:24) 序列的开头 $(CGX_1X_2X_2'X_1'CG)$ 。在 $w = -2$ 的 ISS 中， $(TCG(N_q))_y$ (SEQ ID NO:3) 序列的倒数第二（即，从末端开始数第二个）和倒数第一（即，最末）的 3' 碱基是 CG 且是第一个 $(CGX_1X_2X_2'X_1'CG(CG)_p)$ (SEQ ID NO:24) 序列的 5' CG。在一些实施方案中， $(TCG(N_q))_y$ (SEQ ID NO:3) 序列与回文序列分开 0、1 或 2 个碱基。在其它实施方案中，回文序列包括全部或部分的 $(TCG(N_q))_y$ (SEQ ID NO:3) 序列。在一些实施方案中， X_1 和 X_2 各自是 A 或 T。

[0054] 对于包含这里所述的任何基序且其中 $y = 2$ 或更多的 ISS，在 $(TCG(N_q))_y$ 的 y 个重复中每一个的 (N_q) 是独立地选择的。例如，在 $y = 2$ 的 ISS 中，第一个 $TCG(N_q)$ 可以具有 $N = A$ 且 $q = 1$ ，而第二个 $TCG(N_q)$ 可以具有 $q = 0$ ，在该情况下 ISS 的这一部分将是…TCGATCG…。在包含这里所述任何基序的 ISS 的一些实施方案中，在一些实施方案中， x 优选是 0 或 1。在包含这里所述任何基序的 ISS 的一些实施方案中， y 优选是 1 或 2。在包含这里所述任何基序的 ISS 的一些实施方案中， w 优选是 0。在包含这里所述任何基序的 ISS 的一些实施方案中， z 优选是 1、2、3、4、5、6、7 或 8。

[0055] 如上所述，ISS 可以含有至少一个长度至少 8 个碱基的回文序列。在一些实施方案中，ISS 含有至少一个具有至少下列长度的回文序列（以碱基计）：10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30。在一些实施方案中，在 ISS 中回文序列重复至少一次。在一些实施方案中，该回文序列也可以包括位于 $(TCG(N_q))_y$ 序列 5' 的碱基（如果有的话）。

[0056] 根据以上的教导，可以在美国公开 2006/0058254 还有在美国公开 2004/0132677 中找到可用的具体 ISS 的非限制性实例。

[0057] 对 ISS 的修饰

[0058] ISS 可以含有修饰。ISS 的修饰包括本领域任何公知的修饰，且不限于对 3' OH 或 5' OH 基团的修饰、核苷酸碱基的修饰、糖组分的修饰和磷酸基团的修饰。在 ISS 的回文序列中可以包括修饰的碱基，只要该修饰的碱基通过沃森-克里克碱基配对而对其天然互补物保持相同的特异性（例如，ISS 的回文部分仍然是自我互补的）。

[0059] ISS 可以含有天然存在的或修饰的、非天然存在的碱基，且可以含有修饰的糖、磷酸、和 / 或末端。例如，除了磷酸二酯键，磷酸修饰包括，但不限于，膦酸甲酯、硫代磷酸酯、磷酰胺酯（桥接的（bridging）或非桥接的）、磷酸三酯和二硫代磷酸酯，且可以以任意的组合使用。也可以使用其它的非磷酸酯键。在一些实施方案中，本发明多核苷酸仅包含硫代磷酸酯骨架。在一些实施方案中，本发明的多核苷酸仅包含磷酸二酯骨架。在一些实施方案中，ISS 可以在磷酸骨架中包含磷酸酯键的组合，例如磷酸二酯和硫代磷酸酯键的组合。

[0060] 在本领域公知的糖修饰，例如 2' - 烷氧基 -RNA 类似物、2' - 氨基 -RNA 类似物、2' - 氟 -DNA、和 2' - 烷氧基 - 或氨基 -RNA/DNA 嵌合物和这里所述的其它也可以被制备并与任何磷酸酯修饰组合。碱基修饰的实例包括，但不限于，向 ISS 的胞嘧啶的 C-5 和 / 或 C-6（例如，5- 溴胞嘧啶、5- 氯胞嘧啶、5- 氟胞嘧啶、5- 碘胞嘧啶），和 ISS 的尿嘧啶的 C-5 和 / 或 C-6（例如，5- 溴尿嘧啶、5- 氯尿嘧啶、5- 氟尿嘧啶、5- 碘尿嘧啶）加入吸电子部分。见，例如，WO 99/62923。在 ISS 的回文序列中使用的碱基修饰不应该干扰涉及沃森-克里克碱基配对的碱基的自我互补能力。然而，在回文序列之外，可以使用修饰的碱基而无此限

制。

[0061] 此外，骨架磷酸基团修饰（例如，膦酸甲基酯、硫代磷酸酯、磷酰胺酯 (phosphoroamidate) 和二硫代磷酸酯核苷酸间键）可以在 ISS 上赋予免疫调节活性和增强其体内稳定性、使其在治疗应用中特别有用。特别有用的磷酸基团修饰是转化为 ISS 寡核苷酸的硫代磷酸酯或二硫代磷酸酯形式。除了其潜在的免疫调节特性，硫代磷酸酯和二硫代磷酸酯比其未修饰的寡核苷酸对应物对体内降解更具有抗性，从而使本发明的 ISS 可以更多地为个体所利用。

[0062] ISS 的合成和筛选

[0063] 可以使用本领域众所周知的技术和核酸合成设备来合成 ISS，其包括，但不限于酶方法、化学方法和更大寡核苷酸序列的降解。见，例如，Ausubel 等人 (1987) 和 Sambrook 等人 (1989)。当酶促合成时，可以例如用连接酶，例如 T4DNA 或 RNA 连接酶来连接各单元。见，例如，美国专利 5,124,246。如在美国专利 4,650,675 中所示例的，可以通过将寡核苷酸暴露于核酸酶来完成寡核苷酸降解。

[0064] 也可以使用常规多核苷酸分离操作来分离 ISS。这类操作包括，但不限于，探针杂交于基因组或 cDNA 文库以检测共有的核苷酸序列、表达文库的抗体筛选来检测共有的结构特征和通过聚合酶链反应来合成特定的天然序列。

[0065] 可以分离、通过重组方法合成、或化学合成环状 ISS。当通过分离或通过重组方法获得环状 ISS 时，ISS 优选为质粒。可以使用文献所述的任何方法执行较小环状寡核苷酸的化学合成。见，例如，Gao 等人 (1995) Nucleic Acids Res. 23:2025-2029；和 Wang 等人 (1994) Nucleic Acids Res. 22:2326-2333。

[0066] 大多数 ISS 的双螺旋（即，双链）和发夹形式是动态平衡的，通常在低多核苷酸浓度和较高温度下有利于发夹形式。对于热、离子、pH-、和浓度诱导的构象改变，共价的链间或链内交联可以分别增加双螺旋或发夹在这些方面的稳定性。为了物理化学和生物学表征，可以使用化学交联将该多核苷酸锁定于双螺旋或发夹形式。构象均一的和“锁定”于其主要活性形式（双螺旋或发夹形式）的交联 ISS 可能比其未交联的对应物更具有活性。因此，本发明的一些 ISS 含有共价链间和 / 或链内交联。

[0067] 在本技术领域公知多种方法来化学交联双螺旋 DNA。只要交联的多核苷酸产物具有期望的免疫调节活性，可以使用任何交联方法。

[0068] 一种方法，例如，在双螺旋或发夹的末端的两个相对的胸腺嘧啶之间产生二硫键。对于这一交联方法，用 5'-DMT-N3-(tBu-SS-乙基) 胸腺嘧啶-3'-亚磷酰胺（“T*”）合成目标寡核苷酸。为了形成该二硫键，还原混合的二硫键、纯化寡核苷酸、使链杂交并空气氧化该化合物以在发夹形式情况下形成链内交联或在双螺旋形式的情况下形成链间交联。备选的，可以先杂交该寡核苷酸然后还原、纯化和空气氧化。这类方法和其它被描述在，例如 Glick 等人 (1991) J. Org. Chem. 56:6746-6747、Glick 等人 (1992) J. Am. Chem. Soc. 114:5447-5448、Goodwin 等人 (1994) Tetrahedron Letters 35:1647-1650、wang 等人 (1995) J. Am. Chem. Soc. 117:2981-2991、Osborne 等人 (1996) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 6:2339-2342 和 Osborne 等人 (1996) J. Am. Chem. Soc. 118:11993-12003。

[0069] 另一交联方法在双螺旋或发夹结构中的分支残基 (offset residues) 之间形成二

硫键。对于这一交联方法,用可转化的(convertible)核苷(可以例如,从Glen Research商购)合成目标寡核苷酸。这一方法利用,例如,A-A二硫键或C-A二硫键且通过其它碱基的连接也可以。为了形成二硫键修饰的多核苷酸,含有可转化核苷的多核苷酸与胱胺(或其它含有二硫键的胺)反应。为了形成二硫键,还原混合的二硫键、纯化寡核苷酸、使链杂交和空气氧化该化合物来在发夹形式的情况下形成链内交联或在双螺旋形式的情况下形成链间交联。备选的,可以先合成该寡核苷酸和然后还原、纯化和空气氧化该寡核苷酸。这类方法和其它被描述在,例如,Glick等人(1991)J.Org.Chem.56:6746-6747、Glick等人(1992)J.Am.Chem.Soc.114:5447-5448、Goodwin等人(1994)Tetrahedron Letters 35:1647-1650、wang等人(1995)J.Am.Chem.Soc.117:2981-2991、Osborne等人(1996)Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters 6:2339-2342和Osborne等人(1996)J.Am.Chem.Soc.118:11993-12003中。

[0070] 另一交联方法在双螺旋或发夹结构中的分支残基(offset residues)之间形成二硫键。对于这一交联方法,用可转化的核苷(可以例如,从Glen Research商购)合成目标寡核苷酸。这一方法利用,例如,A-A二硫键或C-A二硫键且通过其它碱基的连接也是可以的。为了形成二硫键修饰的多核苷酸,含有可转化核苷的多核苷酸与胱胺(或其它含有二硫键的胺)反应。为了形成二硫键,还原混合的二硫键、纯化寡核苷酸、使链杂交和空气氧化该化合物来在发夹形式的情况下形成链内交联或在双螺旋形式的情况下形成链间交联。备选的,可以先合成该寡核苷酸和然后还原、纯化和空气氧化该寡核苷酸。这类方法和其它被描述在,例如,Ferentz等人(1991)J.Am.Chem.Soc.113:4000-4002和Ferentz等人(1993)J.Am.Chem.Soc.115:9006-9014中。

[0071] 制备多核苷酸和修饰的多核苷酸的技术是本领域公知的。通常,通过将合适的核苷亚磷酸酰胺顺序偶联于以3'末端连接在固相载体上的生长寡核苷酸的5'-羟基,继之氧化中间体亚磷酸三酯为磷酸三酯,合成含有磷酸二酯键的天然DNA或RNA。一旦合成期望的多核苷酸序列,将该多核苷酸从载体上移下,将磷酸三酯基团去保护为磷酸二酯并使用氨水或其它碱去保护核苷碱基。见,例如,Beaucage(1993)“Oligodeoxyribonucleotide Synthesis”在Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Synthesis and Properties(Agrawal编辑)Humana Press, Totowa, NJ; Warner等人(1984)DNA 3:401和美国专利4,458,066。

[0072] ISS也可以含有磷酸酯修饰的多核苷酸,已知其中的一些修饰可以稳定多核苷酸。因此,一些实施方案包括稳定化ISS。含有修饰的磷酸酯键或非磷酸酯键的多核苷酸的合成在本技术领域也是公知的。对于综述,见Matteucci(1997)“Oligonucleotide Analogs:an Overview”in Oligonucleotides as Therapeutic Agents、(D.J.Chadwick和G.Cardew编辑)John Wiley and Sons, New York, NY。在本发明的多核苷酸中能够连接于糖或糖类似物部分的磷衍生物(或修饰的磷酸基团)可以是单磷酸酯、二磷酸酯、三磷酸酯、烷基磷酸酯、硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酰胺酯等等。上述磷酸酯类似物的制备和其在核苷酸、修饰的核苷酸和寡核苷酸中的掺入本身也是公知的,在这里不需要详述。Peyrottes等人(1996)Nucleic Acids Res.24:1841-1848; Chaturvedi等人(1996)Nucleic Acids Res.24:2318-2323; 和Schultz等人(1996)Nucleic Acids Res.24:2966-2973。例如,硫代磷酸酯寡核苷酸的合成与以上针对天然存在的寡核苷酸所述的相似,除了氧化步骤由

硫化步骤代替 (Zon(1993) “Oligonucleoside Phosphorothioates” in Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Synthesis and Properties(Agrawal 编辑) Humana Press, 第 165-190 页)。相似的,其它磷酸酯类似物,例如磷酸三酯 (Miller 等人 (1971) JACS93:6657-6665)、非桥接的磷酰胺酯 (Jager 等人 (1988) Biochem. 27:7247-7246)、N3’ 到 P5’ 亚磷酰胺 (Nelson 等人 (1997) JOC 62:7278-7287) 和二硫代磷酸酯 (美国专利 5, 453, 496) 的合成也已有描述。也可以使用其它基于非磷的修饰的寡核苷酸 (Stirchak 等人 (1989) Nucleic Acids Res. 17:6129-6141)。具有硫代磷酸酯骨架的多核苷酸可以比具有磷酸二酯骨架的多核苷酸更具有免疫原性并似乎在注射至宿主之后对于降解更有抗性。Braun 等人 (1988) J. Immunol. 141:2084-2089 ; 和 Latimer 等人 (1995) Mol. Immunol. 32:1057-1064。

[0073] 在本发明中使用的 ISS 可以包含一个或多个核糖核苷酸 (含有核糖作为唯一或主要的糖成分)、脱氧核糖核苷酸 (含有脱氧核糖作为主要糖成分), 或如在本领域公知的, 修饰的糖或糖类似物可以掺入在 ISS 中。因此, 除了核糖和脱氧核糖, 糖部分还可以是戊糖、脱氧戊糖、己糖、脱氧己糖、葡萄糖、阿拉伯糖、木糖、来苏糖和糖“类似物”环戊基团。该糖可以是吡喃糖基或呋喃糖基的形式。在 ISS 中, 该糖部分优选为核糖、脱氧核糖、阿拉伯糖或 2’-0- 烷基核糖的呋喃糖苷, 和该糖能够以 α 或 β 端基异构构型连接于相应的杂环碱基。糖修饰包括, 但不限于, 2’- 烷氧基 -RNA 类似物、2’- 氨基 -RNA 类似物、2’- 氟 -DNA 和 2’- 烷氧基 - 或氨基 -RNA/DNA 嵌合体。例如, 在 ISS 中的糖修饰包括, 但不限于, 2’-0- 甲基 - 尿苷和 2’-0- 甲基 - 胞苷。这些糖或糖类似物和相应“核苷”(其中这类糖或类似物被连接于杂环碱基 (核酸碱基)) 的制备本身是公知的, 除了落入任何具体实施例的这类制备之外, 无需在这里描述。ISS 制备中还可以进行糖修饰并与任何磷酸酯修饰相组合。

[0074] 掺入 ISS 的杂环碱基、或核酸碱基可以是天然存在的主要嘌呤和嘧啶碱基 (即如上所述的尿嘧啶、胸腺嘧啶、胞嘧啶、腺嘌呤和鸟嘌呤)、以及所述主要碱基的天然存在和合成的修饰。因此, ISS 可以包括 2’- 脱氧尿苷和 / 或 2- 氨基 -2’- 脱氧腺苷。

[0075] 在本技术领域的技术人员应该意识到, 大量的包含各种杂环碱基和各种糖部分 (和糖类似物) 的“合成的”非天然核苷是本技术领域可获得的, 只要满足本发明的其它标准, ISS 可以包括非天然核酸的主要五种碱基组分的一个或几个杂环碱基。然而, 优选在 ISS 中的杂环碱基包括, 但不限于, 尿嘧啶 -5- 基、胞嘧啶 -5- 基、腺嘌呤 -7- 基、腺嘌呤 -8- 基、鸟嘌呤 -7- 基、鸟嘌呤 -8- 基、4- 氨基吡咯并 [2.3-d] 嘧啶 -5- 基、2- 氨基 -4- 氧代吡咯并 [2.3-d] 嘧啶 -5- 基、2- 氨基 -4- 氧代吡咯 [2.3-d] 嘧啶 -3- 基基团, 其中嘌呤经由 9- 位, 嘧啶经由 1- 位, 吡咯并嘧啶经由 7- 位和吡唑并嘧啶经由 1- 位连接于 ISS 的糖部分。

[0076] ISS 可以包含至少一个修饰的碱基。如这里使用的, 术语“修饰的碱基”与“碱基类似物”同义, 例如, “修饰的胞嘧啶”与“胞嘧啶类似物”同义。相似的, “修饰的”核苷或核苷酸在这里被定义为与核苷或核苷酸“类似物”同义。碱基修饰的实例包括, 但不限于, 向 ISS 的胞嘧啶的 C-5 和 / 或 C-6 添加吸电子部分。优选的, 该吸电子部分是卤素。这类修饰的胞嘧啶可以包括, 但不限于, 氮杂胞嘧啶、5- 溴胞嘧啶、溴尿嘧啶、5- 氯胞嘧啶、氯化胞嘧啶、环胞嘧啶、胞嘧啶阿糖胞苷、5- 氟胞嘧啶、氟嘧啶、氟尿嘧啶、5,6- 二氢胞嘧啶、5- 碘胞嘧啶、羟基脲、碘代尿嘧啶、5- 硝基胞嘧啶、尿嘧啶和任何其它的嘧啶类似物或修饰的嘧啶。

碱基修饰的其它实例包括,但不限于,向 ISS 的尿嘧啶的 C-5 和 / 或 C-6 加入吸电子部分。优选的,该吸电子部分是卤素。这类修饰的尿嘧啶可以包括,但不限于,5- 溴尿嘧啶、5- 氯尿嘧啶、5- 氟尿嘧啶和 5- 碘尿嘧啶。

[0077] 碱基修饰的其它实例包括向碱基加入一个或多个巯基基团,所述碱基包括,但不限于,2- 氨基 - 腺嘌呤、6- 硫代 - 鸟嘌呤、2- 硫代 - 胸腺嘧啶、4- 硫代 - 胸腺嘧啶、5- 丙炔基 - 尿嘧啶和 4- 硫代 - 尿嘧啶。碱基修饰的其它实例包括,但不限于,N4- 乙基胞嘧啶、7- 脱氮鸟嘌呤、7- 脱氮 -8- 氮杂鸟嘌呤和 5- 羟基胞嘧啶。见,例如, Kandimalla 等人 (2001) *Bioorg. Med. Chem.* 9:807-813。

[0078] 制备碱基修饰的核苷和使用所述碱基修饰的核苷作为前体合成修饰的寡核苷酸已经被描述在例如,美国专利 4,910,300、4,948,882 和 5,093,232。已经设计过这些碱基修饰的核苷使其可以通过化学合成被掺入寡核苷酸的末端或内部位置。存在于寡核苷酸的末端或内部位置的这类碱基修饰的核苷可以作为肽或其它抗原的附着位点。在其糖部分修饰的核苷也已经被描述(包括,但不限于,;例如,美国专利 4,849,513、5,015,733、5,118,800 和 5,118,802) 和能够被相似地使用。

[0079] 在一些实施方案中,ISS 小于大约任意的下列长度(以碱基或碱基对计):10,000、5,000、2500、2000、1500、1250、1000、750、500、300、250、200、175、150、125、100、75、60、50、40、30、25、20、15、14、13、12、11、10。在一些实施方案中,ISS 大于大约任意的下列长度(以碱基或碱基对计):10、11、12、13、14、15、20、25、30、40、50、60、75、100、125、150、175、200、250、300、350、400、500、750、1000、2000、5000、7500、10000、20000、50000。或者,ISS 可以是上限为 10,000、5,000、2500、2000、1500、1250、1000、750、500、300、250、200、175、150、125、100、75、60、50、40、30、25、20、15、14、13、12、11 或 10 且独立选择的下限为 10、11、12、13、14、15、20、25、30、40、50、60、75、100、125、150、175、200、250、300、350、400、500、750、1000、2000、5000 或 7500 且其中下限低于上限的任何长度范围。在一些实施方案中,ISS 优选长度约 200 或更少的碱基。

[0080] 或者,可以使用本领域众所周知的技术,例如核酸杂交,从微生物物种(尤其是分枝杆菌)分离 ISS。优选的,这类分离的 ISS 可以被纯化至基本纯的状态,即,不含内源的污染物,例如脂多糖。可以通过本领域众所周知的技术,例如通过核酸内切酶消化,将作为较大多核苷酸的一部分分离的 ISS 减小至期望长度。本领域的普通技术人员将熟悉或容易地确定适合分离、纯化和消化多核苷酸以获得在本发明中潜在有用的技术。

[0081] 如以下描述,为了确证一个特定寡核苷酸是否具有用于本发明的 ISS 的特性,可以评估该 ISS 是否影响细胞因子分泌。在实施例中给出在进行这类评估中有用的体外技术的详情;根据本文教导的参数,本领域普通技术人员也将知道或能够容易地确定测量细胞因子分泌的其它方法。

[0082] 可以与 ISS 一起施用的抗原

[0083] 任何抗原均可以与 ISS 共同施用和 / 或用在包含 ISS 和抗原的组合物中(和这些组合物的制剂中)。

[0084] 在一些实施方案中,该抗原是变应原。在表 1 中提供重组变应原的实例。许多变应原的制备是本领域众所周知的,包括,但不限于,制备豚草花粉变应原 E 抗原 (Amb a 1) (Rafnar 等人 (1991) *J. Biol. Chem.* 266:1229-1236)、草变应原 Lol p

1(Tamborini 等人 (1997) Eur. J. Biochem. 249:886–894)、主要尘螨 (dust mite) 变应原 Der pI 和 Der PII(Chua 等人 (1988) J. Exp. Med. 167:175–182; Chua 等人 (1990) Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 91:124–129)、家猫变应原 Fel d I(Rogers 等人 (1993) Mol. Immunol. 30:559–568)、白桦树花粉 Bet v1(Breiteneder 等人 (1989) EMBO J. 8:1935–1938)、柳杉 (Japanese cedar) 变应原 Cry j 1 和 Cry j 2(Kingetsu 等人 (2000) Immunology 99:625–629) 和来自其它树花粉的蛋白抗原 (Elsayed 等人 (1991) Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl. 204:17–31)。如所示的, 来自树的变应原是公知的, 包括来自桦树、刺柏和柳杉的变应原。已经报道用于体内施用的来自草花粉的蛋白抗原的制备。

[0085] 在一些实施方案中, 变应原是食物变应原, 包括, 但不限于, 花生变应原, 例如 Ara h I(Stanley 等人 (1996) Adv. Exp. Med. Biol. 409:213–216)、胡桃变应原, 例如 Jug r I(Tueber 等人 (1998) J. Allergy Clin. Immunol. 101:807–814)、巴西坚果变应原, 例如白蛋白 (Pastorello 等人 (1998) J. Allergy Clin. Immunol. 102:1021–1027)、shrISS 变应原, 例如 Pen a I(Reese 等人 (1997) Int. Arch. Allergy Immunol. 113:240–242)、蛋变应原, 例如, 卵的类粘蛋白 (Crooke 等人 (1997) J. Immunol. 159:2026–2032)、乳的变应原, 例如, 牛 β -乳球蛋白 (Selot al. (1999) Clin. Exp. Allergy 29:1055–1063)、鱼变应原, 例如, 小白蛋白 (Van Do 等人 (1999) Scand. J. Immunol. 50:619–625; Galland 等人 (1998) J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl. 706:63–71)。在一些实施方案中, 变应原是乳胶变应原, 包括但不限于, Hev b 7(Sowka 等人 (1998) Eur. J. Biochem. 255:213–219)。表 1 显示可以使用的变应原的实例表。

[0086] 表 1

[0087] 重组变应原

[0088]

组	变应原	参考文献
动物:		
甲壳类动物		
ShrlSS/ 龙虾	原肌球蛋白 Pan s I	Leung 等人(1996) J. Allergy Clin. Immunol. 98:954-961 Leung 等人(1998) Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 7:12-20
昆虫		
蚂蚁	Soli 2 (毒液)	Schmidt 等人 J Allergy Clin Immunol., 1996, 98:82-8
蜜蜂	磷脂酶 A2 (PLA) 透明质酸酶(Hya)	Muller 等人 J Allergy Clin Immunol, 1995, 96:395-402 Forster 等人 J Allergy Clin Immunol, 1995, 95:1229-35 Muller 等人 Clin Exp Allergy, 1997, 27:915-20 Soldatova 等人 J Allergy Clin Immunol, 1998, 101:691-8
蟑螂	Bla g Bd9OK Bla g 4 (calycin) 谷胱甘肽 S-转移酶 Per a 3	Helm 等人 J Allergy Clin Immunol, 1996, 98:172-180 Vailes 等人 J Allergy Clin Immunol, 1998, 101:274-280 Arruda 等人 J Biol Chem, 1997, 272:20907-12 Wu 等人 Mol Immunol, 1997, 34:1-8
尘螨	Der p 2 (主要变应原) Der p2 变体 Der f2 Der p10 Tyr p 2	Lynch 等人 J Allergy Clin Immunol, 1998, 101:562-4 Hakkaart 等人 Clin Exp Allergy, 1998, 28:169-74 Hakkaart 等人 Clin Exp Allergy, 1998, 28:45-52 Hakkaart 等人 Int Arch Allergy Immunol, 1998, 115 (2):150-6 Mueller 等人 J Biol Chem, 1997, 272:26893-8 Smith 等人 J Allergy Clin Immunol, 1998, 101:423-5 Yasue 等人 Clin Exp Immunol, 1998, 113:1-9 Yasue 等人 Cell Immunol, 1997, 181:30-7 Asturias 等人 Biochim Biophys Acta, 1998, 1397:27-30

[0089]

		Eriksson 等人 Eur J Biochem, 1998
大黄蜂	抗原 5 aka Dol m V (毒液)	Tomalski 等人 Arch Insect Biochem Physiol, 1993, 22:303-13
蚊子	Aed a I(唾液腺苷 三磷酸双磷酸酶)	Xu 等人 Int Arch Allergy Immunol, 1998, 115:245-51
小黄蜂	抗原 5, 透明质酸酶 和磷脂酶(毒液)	King 等人 J Allergy Clin Immunol, 1996, 98:588-600
哺乳动物		
猫	Fcl d I	Slunt 等人 J Allergy Clin Immunol, 1995, 95:1221-8 Hoffmann 等人(1997) J Allergy Clin Immunol 99:227-32 Hedlin Curr Opin Pediatr, 1995, 7:676-82
母牛	Bos d 2(皮屑; 脂质 运载蛋白) β-乳球蛋白(BLG, 主要牛乳变应原)	Zeiler 等人 J Allergy Clin Immunol, 1997, 100:721-7 Rautiainen 等人 Biochem Bioph. Res Comm., 1998, 247:746-50 Chatel 等人 Mol Immunol, 1996, 33:1113-8 Lehrer 等人 Crit Rev Food Sci Nutr, 1996, 36:553-64
狗	Can f 1 和 Can f 2, 唾液脂质运载蛋白	Konieczny 等人 Immunology, 1997, 92:577-86 Spitzauer 等人 J Allergy Clin Immunol, 1994, 93:614-27 Vrtala 等人 J Immunol, 1998, 160:6137-44
马	Equ c1(主要变应 原, 脂质运载蛋白)	Gregoire 等人 J Biol Chem, 1996, 271:32951-9
小鼠	小鼠尿蛋白(MUP)	Konieczny 等人 Immunology, 1997, 92:577-86
其它哺乳动 物变应原		
胰岛素		Ganz 等人 J Allergy Clin Immunol , 1990, 86:45-51 Grammer 等人 J Lab Clin Med, 1987, 109:141-6 Gonzalo 等人 Allergy, 1998, 53:106-7
干扰素	干扰素 α2c	Detmar 等人 Contact Dermatis, 1989, 20:149-50
软体动物	原肌球蛋白	Leung 等人 J Allergy Clin Immunol, 1996, 98:954-61
植物 变应原:		
大麦	Hor v 9	Astwood 等人 Adv Exp Med Biol, 1996, 409:269-77
桦树	花粉变应原, Bet v 4 rBet v 1 Bet v 2: (抑制蛋白)	Twardosz 等人 Biochem Bioph. Res Comm., 1997, 23 9:197 Pauli 等人 J Allergy Clin Immunol, 1996, 97:1100-9 van Neerven 等人 Clin Exp Allergy, 1998, 28:423-33 Jahn-Schmid 等人 Immunotechnology, 1996, 2:103-13 Breitwieser 等人 Biotechniques, 1996, 21:918-25 Fuchs 等人 J Allergy Clin Immunol, 1997, 100:3 56-64
巴西坚果	球蛋白	Bartolome 等人 Allergol Immunopathol, 1997, 25:135-44

[0090]

樱桃	Pru a I (主要变应原)	Scheurer 等人 Mol Immunol, 1997, 34:619-29
玉米	Zml3 (花粉)	Heiss 等人 FEBS Lett, 1996, 381:217-21 Lehrer 等人 Int Arch Allergy Immunol, 1997, 113:122-4
	Phl p 1、Phl p 2、Phl p 5 (梯牧草花粉)	Bufe 等人 Am J Respir Crit Care Med, 1998, 157:1269-76 Vrtala 等人 J Immunol Jun 15, 1998, 160:6137-44 Niederberger 等人 J Allergy Clin Immunol, 1998, 101:258-64
	Hol l 5 绒毛草花粉	Schramm 等人 Eur J Biochem, 1998, 252:200-6
草	早熟禾变应原	Zhang 等人 J Immunol, 1993, 151:791-9
	Cyn d 7 狗牙根	Smith 等人 Int Arch Allergy Immunol, 1997, 114:265-71
	Cyn d 12 (抑制蛋白)	Asturias 等人 Clin Exp Allergy, 1997, 27:1307-13 Fuchs 等人 J Allergy Clin Immunol, 1997, 100:356-64
柳杉	Jun a 2 (阿希刺柏 (Juniperus ashei))	Yokoyama 等人 Biochem. Biophys. Res. Commun., 2000, 275:195-202
	Cry j 1, Cry j 2 (日本柳杉 (Cryptomeria japonica))	Kingetsu 等人 Immunology, 2000, 99:625-629
刺柏	Jun o 2 (花粉)	Tinghino 等人 J Allergy Clin Immunol, 1998, 101:772-7
乳胶	Hev b 7	Sowka 等人 Eur J Biochem, 1998, 255:213-9 Fuchs 等人 J Allergy Clin Immunol, 1997, 100:3 56-64
山靛属	Mer a I (抑制蛋白)	Vallverdu 等人 J Allergy Clin Immunol, 1998, 101:3 63-70
芥子(黄)	Sin a I (种子)	Gonzalez de la Pena 等人 Biochem Bioph. Res Comm., 1993, 190:648-53
油菜	Bra r I 花粉变应原	Smith 等人 Int Arch Allergy Immunol, 1997, 114:265-71
花生	Ara h I	Stanley 等人 Adv Exp Med Biol, 1996, 409:213-6
	Ara h II	Burks 等人 J Clin Invest, 1995, 96:1715-21 Burks 等人 Int Arch Allergy Immunol, 1995, 107:248-50
草地早熟禾 (Poa pratensis)	Poa p9	Parronchi 等人 Eur J Immunol, 1996, 26:697-703 Astwood 等人 Adv Exp Med Biol, 1996, 409:269-77
豚草	Amb a I	Sun 等人 Biotechnology Aug, 1995, 13:779-86 Hirschwehr 等人 J Allergy Clin Immunol, 1998, 101:196-206 Casale 等人 J Allergy Clin Immunol, 1997, 100:110-21
黑麦	Lol p I	Tamborini 等人 Eur J Biochem, 1997, 249:886-94
胡桃	Jug r I	Teuber 等人 J Allergy Clin Immunol, 1998, 101:807-14
小麦	变应原	Fuchs 等人 J Allergy Clin Immunol, 1997, 100:356-64 Donovan 等人 Electrophoresis, 1993, 14:917-22

[0091]

真菌		
曲霉属	Asp f1, Asp f2, Asp f3, Asp f4, rAsp f6	Crameri 等人 Mycoses, 1998, 41 Suppl 1:56-60 Hemmann 等人 Eur J Immunol, 1998, 28:1155-60 Banerjee 等人 J Allergy Clin Immunol, 1997, 99:821-7 Crameri Int Arch Allergy Immunol, 1998, 115:99-114 Crameri 等人 Adv Exp Med Biol, 1996, 409:111-6 Moser 等人 J Allergy Clin Immunol, 1994, 93: 1-11
	锰超氧化物歧化酶 (MNSOD)	Mayer 等人 Int Arch Allergy Immunol, 1997, 113:213-5
无爪螨属 (Blomia)	变应原	Caraballo 等人 Adv Exp Med Biol, 1996, 409:81-3
青霉属	变应原	Shen 等人 Clin Exp Allergy, 1997, 27:682-90
裸盖菇属 (psilocybe)	Psi c 2	Horner 等人 Int Arch Allergy Immunol, 1995, 107:298-300

[0092] 在一些实施方案中,抗原来自感染性物质,包括原生动物、细菌、真菌(包括单细胞和多细胞)和病毒感染性物质。合适的病毒抗原的实例在这里被描述且是本领域公知的。细菌包括流感嗜血杆菌 (*Hemophilus influenza*)、结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 和百日咳博德特菌 (*Bordetella pertussis*)。原生动物感染性物质包括疟原虫 (*malarial plasmodia*)、利什曼原虫物种 (*Leishmania*)、锥虫物种 (*Trypanosoma*) 和血吸虫物种 (*Schistosoma*)。真菌包括白色念珠菌 (*Candida albicans*)。

[0093] 在一些实施方案中,该抗原是病毒抗原。病毒多肽抗原包括,但不限于,HIV蛋白,例如HIV gag蛋白(包括,但不限于,膜锚定(MA)蛋白、核心病毒壳体(CA)蛋白和核壳(NC)蛋白)、HIV聚合酶、流感病毒基质(M)蛋白和流感病毒核壳(NP)蛋白、乙型肝炎表面抗原(HBsAg)、乙型肝炎核心蛋白(HBcAg)、戊型肝炎蛋白(HBeAg)、乙型肝炎DNA聚合酶、丙型肝炎抗原等。讨论流感疫苗的参考文献包括 Scherle 和 Gerhard(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:4446-4450 ;Scherle 和 Gerhard(1986) J. Exp. Med. 164:1114-1128 ;Granoff 等人 (1993) Vaccine 11:S46-51 ;Kodihalli 等人 (1997) J. Virol. 71:3391-3396 ;Ahmeida 等人 (1993) Vaccine 11:1302-1309 ;Chen 等人 (1999) Vaccine 17:653-659 ;Govorkova 和 Smirnov(1997) Acta Virol. (1997) 41:251-257 ;Koide 等人 (1995) Vaccine 13:3-5 ;Mbawuike 等人 (1994) Vaccine 12:1340-1348 ;Tamura 等人 (1994) Vaccine 12:310-316 ;Tamura 等人 (1992) Eur. J. Immunol. 22:477-481 ;Hirabayashi 等人 (1990) Vaccine 8:595-599。抗原多肽的其它实例是公知的多种感染性物质的组或亚组特异性抗原,所述感染性物质,包括,但不限于,腺病毒、单纯疱疹病毒、乳头瘤病毒、呼吸道合胞病毒和痘病毒。

[0094] 多种抗原肽和蛋白质是公知的,和可以在本领域获得;其它的可以使用常规技术鉴定。对于抗肿瘤形成的免疫或已有肿瘤的治疗,免疫调节肽可以包括肿瘤细胞(活的或辐射过的)、肿瘤细胞提取物或肿瘤抗原的蛋白质亚单位,例如 Her-2/neu、Mart1、癌胚抗原(CEA)、神经节苷脂、人乳脂肪球(HMFG)、粘蛋白(MUC1)、MAGE 抗原、BAGE 抗原、GAGE 抗原、gp100、前列腺特异性抗原(PSA)和酪氨酸酶。基于免疫的避孕疫苗可以通过包括施用精子蛋白和 ISS 而形成。Lea 等人 (1996) Biochim. Biophys. Acta 1307:263。

[0095] 减毒和灭活的病毒适合在本文用作抗原。这些病毒的制备是本领域众所周知

的,和许多是可以商购的(见,例如,Physicians' Desk Reference(1998)52nd edition, Medical Economics Company, Inc.)。例如,可以获得脊髓灰质炎病毒 **IPOL®** (Pasteur Merieux Connaught) 和 **ORIMUNE®** (Lederle Laboratories)、甲型肝炎病毒 **VAQTA®** (Merck)、麻疹病毒 **ATTENUVAX®** (Merck)、腮腺炎病毒 **MUMPSVAX®** (Merck) 和风疹病毒 **MERUVAX®II** (Merck)。另外,减毒和灭活的病毒例如 HIV-1、HIV-2、单纯疱疹病毒、乙型肝炎病毒、轮状病毒、人和非人的乳头瘤病毒和脑慢病毒能够提供肽抗原。在一些实施方案中,抗原包含病毒载体,例如痘苗病毒、腺病毒和金丝雀痘病毒。

[0096] 使用本领域公知的纯化技术可以从其来源分离抗原,或更常规的,可以使用重组方法产生抗原。抗原肽可以包括纯化的天然肽、合成的肽、重组蛋白质、蛋白粗提物、减毒或灭活的病毒、细胞、微生物、或这类肽的片段。免疫调节肽可以是天然的或化学或酶促合成的。本领域公知的任何化学合成的方法是合适的。可以使用液相肽合成法来构建中等大小的肽或,对于肽的化学构建可以使用固相合成法。Atherton 等人 (1981) Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 362:833-839。也可以使用蛋白水解酶偶联氨基酸来产生肽。Kullmann (1987) Enzymatic Peptide Synthesis, CRC Press, Inc. 或者,可以通过使用细胞的生化机制,或通过从生物来源分离而获得肽。可以使用重组 DNA 技术产生肽。Hames 等人 (1987) Transcription and Translation: A Practical Approach, IRL Press。也可以使用标准技术例如亲和层析法分离肽。

[0097] 优选该抗原是肽、脂质(例如,除胆固醇之外的甾醇、脂肪酸和磷脂)、多糖例如在流感嗜血杆菌 (*H. influenza*) 疫苗中使用的多糖、神经节苷脂和糖蛋白。这些可以通过本领域多种公知的方法获得,包括使用化学和酶促方法分离和合成。在某些情况下,例如对于许多甾醇、脂肪酸和磷脂,该分子的抗原部分是可商购的。

[0098] 在主题组合物中和使用该组合物的方法中有用的病毒抗原的实例包括,但不限于, HIV 抗原。这类抗原包括,但不限于,那些衍生自 HIV 被膜糖蛋白(包括,但不限于, gp160、gp120 和 gp41)的抗原。编码 HIV 基因和抗原的多种序列是公知的。例如,Los Alamos 国家实验室 HIV 序列数据库收集、管理和注解 HIV 核苷酸和氨基酸序列。这一数据库可以经由互联网进入并每年公布,见 Human Retroviruses and AIDS Compendium(例如,2000 编)。

[0099] 可以使用本领域公知的方法,例如,从天然的病毒或细菌提取物、从用感染性物质感染的细胞、从纯化的多肽、从重组产生的多肽和 / 或以合成肽的形式,获得衍生自感染性物质的抗原。

[0100] ISS- 抗原

[0101] 当与抗原一起使用时,可以以多种方式施用 ISS 和抗原。在一些实施方案中,可以以彼此空间接近的方式或作为混合物(即,在溶液中)施用 ISS 和抗原。如下所述,可以以多种方式,包括经由固定于平台上或吸附在表面上、缀合(连接)、壳体化,实现空间接近。通常,和最优选的,与施用混合物形式的 ISS 和抗原产生的免疫应答相比,以有效增加免疫应答的距离使 ISS 和抗原接近。

[0102] 在一些实施方案中,ISS 与抗原缀合。可以以多种方式,包括共价和 / 或非共价的

相互作用,将 ISS 部分与缀合物的抗原部分偶联。

[0103] 两部分之间的连接可以发生在 ISS 的 3' 或 5' 末端,或在 ISS 内部位置的合适修饰的碱基处。如果抗原是肽并含有合适的反应性基团(例如,N-羟基琥珀酰亚胺酯),其可以直接与胞嘧啶残基的 N⁴氨基反应。由 ISS 中的胞嘧啶残基的数目和位置决定,可以获得在一个或多个残基上的特异性偶联。

[0104] 或者,修饰的寡核苷酸,例如在本领域公知的那些,可以被掺入 ISS 的任一末端或内部位置。这些可以含有封闭的官能基团,其当被去封闭时将对可能存在于目的抗原上的或附于目的抗原上的多种官能基团有反应活性。

[0105] 当抗原是肽或多肽时,缀合物的这一部分可以通过固相载体化学而连接于 ISS 的 3'-末端。例如,ISS 部分可以被加至已经在载体上预先合成的多肽部分上。Haralambidis 等人(1990a)Nucleic Acids Res. 18:493-499; 和 Haralambidis 等人(1990b)Nucleic Acids Res. 18:501-505。或者,可以合成 ISS,使其可以通过从 3'-末端延伸出去的可切割接头连接于固相载体上。当从载体上化学切割下 ISS 时,在该寡核苷酸的 3'-末端留下末端的巯基基团(Zuckermann 等人(1987)Nucleic Acids Res. 15:5305-5321; 和 Corey 等人(1987)Science 238:1401-1403)或留下末端氨基基团(Nelson 等人(1989)Nucleic Acids Res. 17:1781-1794)。可以如在 Benoit 等人(1987)Neuromethods 6:43-72 所述,将氨基修饰的 ISS 缀合于肽的氨基。可以如在 Sinah 等人(1991)Oligonucleotide Analogues:A Practical Approach, IRL Press 中所述,将巯基-修饰的 ISS 缀合于肽的羧基。将带有附加的马来酰亚胺的寡核苷酸偶联于肽的半胱氨酸残基的巯基侧链上也已经有描述。Tung 等人(1991)Bioconjug. Chem. 2:464-465。

[0106] 缀合物的肽或多肽部分可以通过在 ISS 合成中已经掺入该寡核苷酸的胺、巯基或羧基而连接于 ISS 的 5'-末端。优选的,当寡核苷酸被固定于固相载体上,将在一个末端包含被保护的胺、巯基或羧基和在另一端包含亚磷酸酰胺的连接基团共价连接于 5'-羟基。去保护之后,可以使用该胺、巯基和羧基官能团将寡核苷酸共价连接于肽。Benoit 等人(1987); 和 Sinah 等人(1991)。

[0107] ISS-抗原缀合物也可以通过非共价的相互作用,例如离子键、疏水的相互作用、氢键和/或范德瓦氏引力形成。

[0108] 非共价连接的缀合物可以包括非共价的相互作用,例如生物素-链霉亲和素复合物。生物素基可以被连接于例如,ISS 的修饰的碱基。Roget 等人(1989)Nucleic Acids Res. 17:7643-7651。将链霉亲和素部分掺入肽部分中将允许形成链霉亲和素缀合的肽和生物素化的寡核苷酸的非共价结合复合物。

[0109] 也可以通过涉及 ISS 和抗原内的残基(例如,带电荷的氨基酸)的离子相互作用,或通过使用包含带电荷残基(其可以与寡核苷酸和抗原两者相互作用)的接头部分,发生非共价结合。例如,非共价缀合可以在通常带负电荷的 ISS 和肽的带正电荷的氨基酸残基(例如,聚赖氨酸、聚精氨酸和聚组氨酸残基)之间发生。

[0110] 在 ISS 和抗原之间的非共价缀合可以通过分子的 DNA 结合基序发生,其中该基序将与作为其天然配体的 DNA 发生相互作用。例如,在转录因子和抗 DNA 抗体中可以发现这类 DNA 结合基序。

[0111] ISS 与脂质的连接可以使用标准方法进行。这些方法包括,但不限于,合成寡核

昔酸 - 磷脂缀合物 (Yanagawa 等人 (1988) Nucleic Acids Symp. Ser. 19:189-192), 寡核昔酸 - 脂肪酸缀合物 (Grabarek 等人 (1990) Anal. Biochem. 185:131-135; 和 Staros 等人 (1986) Anal. Biochem. 156:220-222) 和寡核昔酸 - 酯醇缀合物。Boujrad 等人 (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5728-5731。

[0112] 可以使用标准的公知的方法进行寡核昔酸与寡糖的连接。这些方法包括,但不限于,合成寡核昔酸 - 寡糖缀合物,其中该糖是免疫球蛋白的部分。O'Shannessy 等人 (1985) J. Applied Biochem. 7:347-355。

[0113] 可以以多种方式进行环 ISS 与肽或抗原的连接。在使用重组或化学方法合成环 ISS 时,修饰的核昔是合适的。Ruth (1991) 在 Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, IRL Press。然后可以使用标准连接技术将环 ISS 连接至抗原或其它的肽。Goodchild (1990) Bioconjug. Chem. 1:165。在使用重组或化学方法分离或合成环 ISS 的情况,可以通过化学激活或光活化已经掺入抗原或其它肽的反应性基团(例如,卡宾,自由基)来实现连接。

[0114] 使肽和其它分子连接于寡核昔酸的另外的方法可以在美国专利 5,391,723; Kessler (1992) "Nonradioactive labeling methods for nucleic acids" in Kricka (ed.) Nonisotopic DNA Probe Techniques, Academic Press; 和 Geoghegan 等人 (1992) Bioconjug. Chem. 3:138-146 中发现。

[0115] 可以以其它方式使 ISS 与抗原接近。在一些实施方案中,ISS 和抗原通过包囊化而接近。在其它实施方案中,ISS 和抗原通过连接于平台分子上而接近。“平台分子”(也称为“平台”)是含有允许 ISS 和抗原附着的位点的分子。在其它实施方案中,ISS 和抗原通过吸附于表面,优选载体颗粒上而邻近。

[0116] 在一些实施方案中,本发明的方法使用如下囊化剂(或包含这类囊化剂的组合物),其中所述囊化剂能够保持 ISS 和第一抗原的邻近联系直至该复合物可用于靶。优选的,包含 ISS、抗原和囊化剂的组合物是佐剂水包油乳剂、微粒和 / 或脂质体的形式。更优选的,囊包 ISS 免疫调节分子的佐剂水包油乳剂、微粒和 / 或脂质体是颗粒的形式,大小从约 0.04 μm 至约 100 μm,并优选任意的下列范围:从约 0.1 μm 至约 20 μm; 从约 0.15 μm 至约 10 μm; 从约 0.05 μm 至约 1.00 μm; 从约 0.05 μm 至约 0.5 μm。

[0117] 胶体分散系统,例如微球体、珠、大分子复合体、纳米囊和基于脂质的体系,例如水包油乳剂、微胶粒、混合的微胶粒和脂质体能够有效地包封含有 ISS 的组合物。

[0118] 囊化组合物还可以包含广泛多种成分中的任何成分。这些包括,但不限于,明矾、脂质、磷脂、脂膜结构 (LMS)、聚乙二醇 (PEG) 和其它聚合物,例如多肽、糖肽和多糖。

[0119] 适用于囊化成分的多肽包括本领域任何公知的成分和包括,但不限于,脂肪酸结合蛋白。修饰的多肽可以含有多种修饰中的任何修饰,包括,但不限于,糖基化、磷酸化、十四烷基化、硫酸化和羟基化作用。如在这里使用的,合适的多肽为可以保护含有 ISS 的组合物以保存其免疫调节活性的那些多肽。结合蛋白的实例包括,但不限于,白蛋白,例如牛血清白蛋白 (BSA) 和豌豆白蛋白。

[0120] 其它合适的聚合物可以是任何制药领域中公知的,且包括,但不限于,天然存在的聚合物例如葡聚糖、羟乙基淀粉和多糖,和合成的聚合物。天然存在的聚合物的实例包括蛋白质、糖肽、多糖、葡聚糖和脂质。另外的聚合物可以是合成的聚合物。适合在本发明中使

用的合成的聚合物的实例包括,但不限于,聚烷基二醇 (PAG) 例如 PEG, 聚氧乙基化多元醇 (POP), 例如聚氧乙基化甘油 (POG)、聚三亚甲基二醇 (polytrimethylene glycol) (PTG)、聚丙二醇 (PPG)、聚羟基乙基甲基丙烯酸酯、聚乙烯醇 (PVA)、聚丙烯酸、聚乙基恶唑啉、聚丙烯酰胺、聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)、聚氨基酸、聚氨基甲酸酯和聚膦腈。合成的聚合物也可以是线性或支链的、取代或未取代的、均聚的、或两个或更多不同的合成单体的共聚物或嵌段共聚物。

[0121] 在本发明的囊化组合物中使用的 PEG 可以从化学供应商商购或者使用本领域技术人员公知的技术合成。

[0122] 如这里使用的术语“LMS”, 意指层状脂质颗粒, 其中极性脂质的极性头基团排列以面向界面的水相从而形成膜结构。LMS 的实例包括脂质体、微胶粒、蜗形物 (即, 通常圆柱状的脂质体)、微乳、单层脂质体、多层脂质体等。

[0123] 本发明的优选的胶体分散体系是脂质体。在用脂质体囊化的抗原免疫的小鼠中, 脂质体显示提高对抗原的 Th1- 型免疫应答。Aramaki 等人 (1995) Vaccine 13:1809–1814。如本文使用的, “脂质体”或“脂囊泡”是由至少一个和可能地超过一个双层脂膜包围的小泡。脂质体可以通过本领域公知的任何技术从磷脂、糖脂、脂质、甾类例如胆固醇、有关分子、或其组合人工制备, 所述技术包括但不限于超声、挤压或从脂质 - 去污剂复合物中除去去污剂。脂质体也可以任选的包含另外的成分, 例如组织靶向成分。应该理解, 只要膜的总体结构是两个亲水表面层夹着疏水核心, 则“脂膜”或“脂双层”不需要单一由脂质组成, 而是可以另外地含有任何合适的其它成分, 包括, 但不限于, 胆固醇和其它甾类、脂质可溶性化合物、任何长度的蛋白质、和其它两亲性分子。对于膜结构的一般讨论, 见 The Encyclopedia of Molecular Biology (J. Kendrew 著) (1994)。对于合适的脂质, 见, 例如, Lasic (1993) “Liposomes: from Physics to Applications” Elsevier, Amsterdam。

[0124] 制备含有含 ISS 组合物的脂质体的方法是本领域公知的。可以通过本领域公知的任何合适的技术制备脂囊泡。方法包括, 但不限于, 微囊化、微流化、LLC 方法、乙醇注射、氟利昂注射、“鼓泡”(bubble) 法、去污剂透析、水合、超声和反相蒸发法。综述在 Watwe 等人 (1995) Curr. Sci. 68:715–724 中。可以组合技术以提供具有最理想属性的囊泡。

[0125] 本发明涵盖使用含有组织或细胞靶向成分的 LMS。这类靶向成分是 LMS 的成分, 当施用于完整动物、器官或细胞培养物时, 其使 LMS 在某些组织或细胞位点优于其它组织或细胞位点聚积。靶向成分通常是从脂质体外部可接近的, 因此优选结合于外表面或插入外部脂双层。靶向成分可以尤其是对细胞表面分子或标记物具有特异性的抗体、或其抗原结合片段、肽、更大肽的区域、核酸、碳水化合物、复杂的碳水化合物的区域、特别的脂质、或结合于任意的上述分子的小分子例如药物、激素、或半抗原。对细胞类型特异性细胞表面标记物具有特异性的抗体是本领域公知的和可以通过本领域公知的方法容易的制备。

[0126] LMS 可以被靶向于治疗待指向的任何细胞类型, 例如, 能够调节和 / 或参与免疫应答的细胞类型。这类靶标细胞和器官包括, 但不限于, APC, 例如巨噬细胞、树突细胞和淋巴细胞、淋巴结构, 例如淋巴结和脾, 和非淋巴结构, 特别是其中发现树突细胞的那些结构。

[0127] 本发明的 LMS 组合物可以另外地包含表面活性剂。表面活性剂可以是阳离子的、阴离子的、两亲性的或非离子的。可以使用的一类表面活性剂是非离子表面活性剂; 特别优选水溶的那些。

[0128] 在其中 ISS 和抗原通过连接于平台分子而邻近联系的实施方案中, 该平台可以是蛋白质的或非蛋白质的(即, 有机的)。蛋白质的平台的实例包括, 但不限于, 白蛋白、丙种球蛋白、免疫球蛋白(IgG)和卵清蛋白。Borel 等人(1990) Immunol. Methods 126:159-168; Dumas 等人(1995) Arch. Dermatol. Res. 287:123-128; Borel 等人(1995) Int. Arch. Allergy Immunol. 107:264-267; Borel 等人(1996) Ann. N. Y. Acad. Sci. 778:80-87。平台是多价的(即, 含有超过一个结合、或连接位点), 适合结合 ISS 和抗原两者。因此, 平台可以含有 2 个或更多、3 个或更多、4 个或更多、5 个或更多、6 个或更多、7 个或更多、8 个或更多、9 个或更多、10 个或更多的结合或连接位点。聚合物平台的其它实例是葡聚糖、聚丙烯酰胺、Ficoll、羧甲基纤维素、聚乙烯醇和聚 D- 谷氨酸 /D- 赖氨酸。

[0129] 使用平台分子的原则是本领域众所周知的。通常, 平台含有, 或经衍生化而含有, 用于 ISS 和抗原的合适的结合位点。此外, 或备选的, ISS 和 / 或抗原被衍生化以提供合适的连接基团。例如, 简单的平台是双官能接头(即, 具有两个结合位点), 例如肽。另外的实例讨论如下。

[0130] 平台分子可以被生物稳定化, 即, 它们呈现的体内排泄半衰期通常从数小时至数天至数月以赋予治疗有效性, 并且它们优选地由具有确定的组成的合成单链组成。它们通常具有范围在约 200 至约 1,000,000 的分子量, 优选任意的以下范围: 从约 200 至约 500,000; 从约 200 至约 200,000; 从约 200 至约 50,000(或更少, 例如 30,000)。多价(Valency) 平台分子的实例是聚合物(或由聚合物组成), 例如聚乙二醇(PEG; 优选具有的分子量为约 200 至约 8000), 聚-D- 赖氨酸、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、D- 谷氨酸和 D- 赖氨酸(以比例 3:2)。可以使用的其它分子是白蛋白和 IgG。

[0131] 适合在本发明中使用的其它平台分子是化学确定的非聚合的多价平台分子, 其在美国专利 5,552,391 中公开。在本发明内适合使用的其它均质的化学确定的多价平台分子是衍生化的 2,2'-亚乙基二氧基二乙基胺(EDDA) 和三甘醇(TEG)。

[0132] 另外的合适的多价平台分子包括, 但不限于, 四氨基苯、七氨基 β -环糊精、四氨基季戊四醇、1,4,8,11-四氮杂环十四烷(Cyclam) 和 1,4,7,10-四氮杂环十二烷(Cyclen)。

[0133] 通常, 这些平台通过标准化学合成技术制备。PEG 必须被衍生化和制备为多价, 这可以使用标准技术完成。适合缀合物合成的一些物质, 例如 PEG、白蛋白和 IgG 是可以商购的。

[0134] 可以以任意数目的方式实现 ISS 和抗原对平台分子的缀合, 通常涉及一个或多个交联剂、及抗原和 ISS 平台和平台分子上的官能团。平台和 ISS 和抗原必须具有合适的连接基团。使用标准合成化学技术将连接基团加至平台上。使用标准的固相合成技术或重组技术可以将连接基团加至多肽抗原和 ISS 上。重组方法可能需要翻译后修饰以连接接头, 这些方法是本领域公知的。

[0135] 例如, 多肽可以含有含官能团的氨基酸侧链部分, 所述官能团例如氨基、羧基或巯基, 其可以作为用于将多肽偶联于平台的位点。如果该多肽未已经含有这些基团, 可以将具有这类官能团的残基加入多肽。可以通过固相合成技术或重组技术掺入这类残基, 这两种技术都是肽合成领域中众所周知的。当该多肽具有碳水化合物侧链时(或如果该抗原是碳水化合物时), 可以通过常规化学将官能团氨基、巯基和 / 或醛基掺入其中。例如, 可以在氰基硼氢化钠存在下通过氧化的糖与乙二胺的反应掺入伯氨基基团, 可以通过与半胱胺二盐

酸盐反应继之用标准二硫化物还原剂还原而引入巯基，而醛基可以在高碘酸盐氧化作用之后产生。如果平台分子未已经具有合适的官能基团，则以相似的方式，平台分子也可以被衍生化而含有官能团。

[0136] 可变长度的亲水接头对于连接 ISS 和抗原至平台分子是有用的。合适的接头包括乙二醇的线性寡聚物或聚合物。这类接头包括具有式 $R^1S(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2O(CH_2)_mCO_2R^2$ 的接头，其中 $n = 0-200$, $m = 1$ 或 2 , $R^1 = H$ 或保护基例如三苯甲基, $R^2 = H$ 或烷基或芳基, 例如, 4-硝基苯基酯。这些接头可以用于将含有巯基反应性基团, 例如卤代乙酰基、马来酰亚胺等的分子 (经由硫醚) 连接于含有氨基的第二分子 (经由酰胺键)。这些接头在连接的顺序方面是灵活的, 即, 可以首先或最后形成硫醚。

[0137] 在其中 ISS 和抗原通过吸附在表面而邻近联系的实施方案中, 该表面可以是制成具有无机或有机核心的载体颗粒的形式 (例如, 纳米颗粒)。这类纳米颗粒的实例包括, 但不限于, 纳米晶体颗粒、由烷基氰基丙烯酸酯的聚合制备的纳米颗粒和通过亚甲基丙二酸酯 (methylidene malonate) 的聚合制备的纳米颗粒。ISS 和抗原可以被吸附至的另外的表面积, 但不限于, 活化碳颗粒和蛋白质 - 陶瓷纳米板。这里提供载体颗粒的其它实例。

[0138] 为了将吸附的分子递送至细胞, 多核苷酸和多肽至表面的吸附是本领域众所周知的。见, 例如, Douglas 等人 (1987) *Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier Syst.* 3:233-261 ; Hagiwara 等人 (1987) *In Vivo* 1:241-252 ; Bousquet 等人 (1999) *Pharm. Res.* 16:141-147 ; 和 Kossovsky 等人, 美国专利 5, 460, 831。优选的, 包含吸附剂表面的材料是可以生物降解的。ISS 和 / 或抗原至表面的吸附可以通过非共价相互作用发生, 包括离子的和 / 或疏水性相互作用。

[0139] 通常, 载体 (例如纳米颗粒) 的特性, 例如表面电荷、颗粒大小和分子量, 依赖于在聚合过程中的聚合条件、单体浓度和稳定剂的存在 (Douglas 等人, 1987)。载体颗粒的表面可以被修饰, 例如具有表面包衣, 以允许或增强 ISS 和 / 或抗原的吸附。还可以用其它物质包被具有吸附的 ISS 和 / 或抗原的载体颗粒。如这里所述, 加入这类其它的物质可以, 例如, 延长颗粒施用于受试者后的半衰期, 和 / 或可以将颗粒靶向于特定的细胞类型或组织。

[0140] ISS 和抗原可以吸附至的纳米晶体表面已经有描述 (见, 例如, 美国专利 5, 460, 831)。可以用促进多肽、多核苷酸和 / 或其它药剂吸附的表面能量修饰层包被纳米晶体核心颗粒 (具有 $1\mu m$ 或更少的直径)。如在美国专利 5, 460, 831 中所述, 例如, 用促进寡核苷酸吸附的表面包被核心颗粒, 接着用抗原制备物, 例如, 以脂质 - 抗原混合物的形式, 包被之。这类纳米颗粒是纳米大小的颗粒 (通常在 $0.1\mu m$ 级, 带有 ISS 的内层和抗原的外层) 的自组装复合体。

[0141] 另一吸附表面是通过烷基氰基丙烯酸酯的聚合作用制备的纳米颗粒。烷基氰基丙烯酸酯可以通过阴离子聚合作用在酸化的含水介质中聚合。由聚合条件决定, 该小颗粒倾向于具有 20 至 3000nm 的大小, 并可以使纳米颗粒具有特定表面特征和具有特定的表面电荷 (Douglas 等人, 1987)。例如, 在疏水阳离子 (例如, 四苯𬭸氯或季铵盐, 例如溴化十六烷基三甲基铵) 的存在下, 寡核苷酸可以被吸附至聚异丁基 - 和聚异己基氰基丙烯酸酯纳米颗粒。在这些纳米颗粒上的寡核苷酸吸附显示出由在核酸链的带负电荷的磷酸基团和疏水阳离子之间形成的离子对来介导。见, 例如, Lambert 等人 (1998) *Biochimie* 80:969-976, Chavany 等人 (1994) *Pharm. Res.* 11:1370-1378 ; Chavany 等人 (1992) *Pharm.*

Res. 9:441-449。多肽也可以被吸附至聚烷基氰基丙烯酸酯纳米颗粒。见,例如,Douglas 等人,1987 ;Schroeder 等人 (1998)Peptides 19:777-780。

[0142] 另一吸附表面是通过亚甲基丙二酸酯聚合作用制备的纳米颗粒。例如,如在Bousquet 等人,1999 中所述,吸附至聚(亚甲基丙二酸酯 2.1.2) 纳米颗粒的多肽显示起初通过静电力继而通过疏水力稳定而实现吸附。

[0143] ISS/MC 复合物

[0144] ISS 可以是以 ISS/ 微载体 (ISS/MC) 复合体的形式被施用。因此,本发明提供包含 ISS/MC 复合体的组合物。

[0145] 在本发明中有用的微载体是大小少于约 150、120 或 100 μm , 更通常少于约 50-60 μm , 优选少于约 10 μm , 并在纯水中是不溶解的。在本发明中使用的微载体优选是生物可降解的, 尽管非生物可降解的微载体是可接受的。微载体通常是固相, 例如“珠子”或其它颗粒, 尽管也可以考虑液相微载体例如包含生物可降解的聚合物或油的水包油型乳剂。可接受用作微载体的大范围的生物可降解和非生物可降解的材料是本领域公知的。

[0146] 在本发明的组合物或方法中使用的微载体通常大小少于约 10 μm (例如, 具有少于约 10 μm 的平均直径, 或至少约 97% 的颗粒通过 10 μm 筛滤板), 包括纳米载体 (即, 大小少于约 1 μm 的载体)。优选的, 选择的微载体具有的大小在上限为约 9.7、5.2 或 1 μm 或 900、800、700、600、500、400、300、250、200 或 100nm 和独立选择的下限为约 4.2 或 1 μm 或约 800、600、500、400、300、250、200、150、100、50、25 或 10nm(其中下限低于上限) 的范围内。在一些实施方案中, 微载体具有的大小约为 1.0-1.5 μm , 约 1.0-2.0 μm 或约 0.9-1.6 μm 。在某些优选的实施方案中, 微载体具有的大小为约 10nm 至约 5 μm 、或约 25nm 至约 4.5 μm 、约 1 μm 、约 1.2 μm 、约 1.4 μm 、约 1.5 μm 、约 1.6 μm 、约 1.8 μm 、约 2.0 μm 、约 2.5 μm 或约 4.5 μm 。当微载体是纳米载体时, 优选的实施方案包括约 25 至约 300nm、50 至约 200nm、约 50nm 或约 200nm 的纳米载体。

[0147] 可以从生物可降解的聚合物制备固相生物可降解的微载体, 所述聚合物包括, 但不限于: 生物可降解的聚酯, 例如聚(乳酸)、聚(乙醇酸) 和其共聚物(包括嵌段共聚物), 以及聚(乳酸) 和聚(乙二醇) 的嵌段共聚物; 聚原酸酯例如基于 3,9-二亚乙基-2,4,8,10-四氧杂螺[5.5]十一烷 (DETOSU) 的聚合物; 聚酐, 例如基于相对亲水的单体例如癸二酸的聚(酸酐) 聚合物; 聚酐二酰亚胺, 例如基于癸二酸衍生的单体的聚酐聚合物, 其中所述单体被掺入氨基酸例如甘氨酸或丙氨酸(即, 通过氨基末端氮由二酰亚胺键连接于癸二酸); 聚酐酯; 聚磷腈, 特别是含有水解敏感的酯基团的聚(磷腈), 该基团能够通过产生羧酸基团而催化聚合物骨架的降解 (Schacht 等人, (1996)Biotechnol. Bioeng. 1996:102); 和聚酰胺, 例如聚(乳酸-共-赖氨酸)。

[0148] 适合制备微载体的广泛多种的非生物可降解材料也是公知的, 包括, 但不限于聚苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、硅石、陶瓷、聚丙烯酰胺、葡聚糖、羟基磷灰石、乳胶、金和铁磁性或顺磁性材料。某些实施方案排除金、乳胶、和 / 或磁珠。在某些实施方案中, 可以用被第二材料(例如, 聚苯乙烯) 包囊化的第一材料(例如, 磁性材料) 制备微载体。

[0149] 可以使用本领域公知的技术制备固相微球体。例如, 其可以通过乳剂-溶剂提取 / 蒸发技术制备。通常, 在这一技术中, 将生物可降解的聚合物, 例如聚酐、聚(烷基- α -氰基丙烯酸酯) 和聚(α -羟基酯), 例如, 聚(乳酸)、聚(乙醇酸)、聚(D,L-乳酸-共-乙醇

酸) 和聚(己内酯), 溶解在合适的有机溶剂, 例如二氯甲烷中, 以构成乳剂的分散相 (DP)。通过高速匀浆将 DP 乳化进入过量体积的水性连续相 (CP), 该连续相含有溶解的表面活性剂, 例如, 聚乙烯醇 (PVA) 或聚乙烯吡咯酮 (PVP)。在 CP 中的表面活性剂可以确保形成离散的和合适大小的乳剂小滴。然后提取有机溶剂进入 CP 和接着通过提高系统温度进行蒸发。然后通过离心或过滤分离固体微颗粒, 和在 4°C 贮存之前干燥, 例如, 通过冻干法或真空干燥。

[0150] 可以确定干燥的微球体的物理化学特征例如平均大小、大小分布和表面电荷。例如, 通过动态光散射技术确定大小特征, 和通过测量 ζ 电位确定表面电荷。

[0151] 液相微载体包括脂质体、微胶粒、油滴和其它基于脂质或油的颗粒, 其可以掺入生物可降解的聚合物或油。在某些实施方案中, 生物可降解的聚合物是表面活性剂。在其它实施方案中, 由于包括生物可降解的油, 例如角鲨烯或植物油, 液相微载体是生物可降解的。一个优选的液相微载体是在水包油乳剂内的油滴。优选的, 用作微载体的水包油乳剂包含生物可降解的取代基例如角鲨烯。

[0152] ISS/MC 复合物包含结合于微载体表面的 ISS(即, ISS 不被包入 MC 中), 优选地包含以多个分子结合于每个微载体上的 ISS。在某些实施方案中, 不同 ISS 的混合物可以与微载体复合, 从而该微载体结合超过一种的 ISS。在 ISS 和 MC 之间的键可以是共价或非共价的。本领域技术人员将理解, ISS 可以被修饰或衍生化, 且可以选择和 / 或修饰微载体的组成以适应于期望用于 ISS/MC 复合物形成的期望结合类型。

[0153] 可以使用本领域公知的任何共价交联技术, 连接共价键合的 ISS/MC 复合物。通常, 可以修饰 ISS 部分来掺入另外的部分 (例如, 游离胺、羧基或巯基) 或掺入修饰的 (例如, 硫代磷酸酯) 核苷酸碱基以提供 ISS 部分上可以用于连接于微载体的位点。可以在 ISS 的 3' 或 5' 末端, 或在 ISS 中内部位置的合适修饰的碱基上, 实现复合体的 ISS 和 MC 部分之间的连接。尽管也可以使用通常在微载体上存在的官能团, 但通常也修饰微载体以并入可以借以形成共价键的部分。可以在允许形成共价复合物的条件下 (例如, 存在交联剂或使用包含活化部分的活化微载体, 其中该活化部分将与 ISS 形成共价键), 通过孵育 ISS 和微载体形成 ISS/MC。

[0154] 多种交联技术是本领域公知的, 包括与氨基、羧基和巯基具反应性的交联剂。对本领域技术人员显而易见的是, 交联剂和交联操作方案的选择将依赖于 ISS 和微载体的构型以及期望的 ISS/MC 复合物的最终构型。交联剂可以是同双官能的或异双官能的。当使用同双官能交联剂时, 该交联剂利用 ISS 和 MC 上相同的部分 (例如, 可以使用醛交联剂共价连接 ISS 和 MC, 其中 ISS 和 MC 都包含一个或多个游离胺)。异双官能的交联剂使用 ISS 和 MC 上的不同部分 (例如, 可以使用马来酰亚氨 -N- 羟基琥珀酰亚胺酯共价连接 ISS 上的游离巯基和 MC 上的游离胺), 且其对于最小化微载体之间的键形成是优选的。在多数情况下, 优选通过微载体上的第一交联部分和 ISS 上的第二交联部分交联, 其中第二交联部分不在微载体上存在。产生 ISS/MC 复合体的一个优选的方法是通过微载体与异双官能交联剂孵育来“活化”该微载体, 而后在适于反应的条件下通过孵育 ISS 和活化的 MC 形成 ISS/MC 复合体。该交联剂可以在反应性部分之间掺入“间隔”臂, 或交联剂中的两个反应性部分可以为直接连接。

[0155] 在一个优选的实施方案中, ISS 部分包含至少一个游离的巯基 (例如, 由 5' - 巍

基修饰的碱基或接头提供)用于交联于微载体,而该微载体包含游离的胺基团。可以使用与这两个基团反应的异双官能交联剂(例如,包含马来酰亚胺基团和NHS-酯的交联剂),例如,琥珀酰亚氨基-4-(N-马来酰亚氨基甲基)环己烷-1-羧酸酯激活MC,然后共价交联ISS以形成ISS/MC复合物。

[0156] 可以通过任意的非共价结合或相互作用连接非共价ISS/MC复合物,包括离子(静电)键、疏水相互作用、氢键、范德瓦耳氏引力、或两个或更多不同相互作用的组合,在以结合对连接ISS和MC的情况下通常正是如此。

[0157] 优选的非共价ISS/MC复合物通常是以疏水或静电(离子)相互作用或其组合来复合的(例如,通过在ISS和结合于MC的多核苷酸之间的碱基配对,使用结合对)。由于多核苷酸骨架的亲水特性,依赖于疏水相互作用形成复合物的ISS/MC复合物通常需要该复合物的ISS部分的修饰以掺入高度的疏水部分。优选的,该疏水部分是生物相容的、非免疫原性的,且是在该组合物预期用于的个体中天然存在的(例如,在哺乳动物,特别是人中存在的)。优选的疏水部分的实例包括脂质、甾类、甾醇例如胆固醇、和萜类。连接疏水部分至ISS的方法当然将依赖于ISS的构型和疏水部分的身份。可以将疏水部分加入ISS中的任何方便的位点,优选在5'或3'末端;在胆固醇部分加入ISS的情况下,优选使用常规化学反应将胆固醇部分加至ISS的5'末端(见,例如,Godard等人(1995)Eur. J. Biochem. 232:404-410)。优选的,从疏水材料,例如油滴或疏水聚合物制备微载体用于通过疏水键而连接的ISS/MC复合物中,但是也可以使用被修饰以掺入了疏水部分的亲水材料。当微载体是脂质体或包含腔的其它液相微载体时,在制备MC之后通过混合ISS和MC形成ISS/MC复合物,以避免在MC制备过程中ISS被包囊化。

[0158] 通过静电结合作用结合的非共价ISS/MC复合物通常利用多核苷酸骨架的高度负电荷。因此,在该非共价结合的ISS/MC复合物中使用的微载体在生理pH(例如,约pH6.8-7.4)通常是带正电荷的(阳离子的)。微载体可以固有地具有正电荷,但是从通常不具有正电荷的化合物制备的微载体可以被衍生或以另外方式修饰以带正电荷(阳离子)。例如,可以衍生用于制备微载体的聚合物以加入带正电荷的基团,例如伯胺。或者,可以在制备过程中将带正电荷的化合物掺入微载体的制剂中(例如,在制备聚(乳酸)/聚(乙醇酸)共聚物中可以使用正电荷的表面活性剂以在产生的微载体颗粒上赋予正电荷)。

[0159] 如这里所述,为了制备阳离子微球体,将阳离子脂质或聚合物,例如,1,2-二油酰基-1,2,3-三甲铵基丙烷(DOTAP)、溴化十六烷基三甲基铵(CTAB)或聚赖氨酸,按照它们在DP或CP相中的各自溶解性加入DP或CP。

[0160] 如这里所述,ISS/MC复合物可以通过(优选在水性混合物中)孵育该多核苷酸和该颗粒,经由吸附至阳离子微球体上面形成。这类孵育可以在任何期望的条件下进行,包括环境(室)温(例如,约20°C)或在冷藏条件(例如,4°C)。因为阳离子微球体和多核苷酸相对较快的结合,该孵育可以进行任何方便的时间长度,例如,5、10、15分钟或更多,包括过夜和更长的孵育。例如,通过在4°C在水性溶液中孵育多核苷酸和颗粒过夜,ISS可以吸附至阳离子微球体。然而,因为阳离子微球体和多核苷酸可以自发地结合,故可以通过多核苷酸和MC的sISS1e共施用而形成ISS/MC复合物。在多核苷酸结合之前和之后可以表征微球体的大小和表面电荷特征。然后,可以在例如,如本文所述,建立的人外周血单核细胞(PBMC)和小鼠脾细胞试验中评估选择的批次相对合适对照的活性。也可以在合适的动物模

型中评估该制剂。

[0161] 使用常规方法学可以产生由核苷酸碱基配对连接的非共价 ISS/MC 复合物。通常，使用包含结合的，优选共价结合的、至少与 ISS 部分地互补的多核苷酸（“捕获多核苷酸”）的微载体产生碱基配对的 ISS/MC 复合物。在 ISS 和捕获核苷酸之间的互补性节段优选是至少 6、8、10 或 15 个连续碱基对，更优选至少 20 个连续的碱基对。通过本领域任何公知的方式可以将该捕获核苷酸结合于 MC，并且优选该捕获核苷酸在 5' 或 3' 末端共价结合于 ISS。

[0162] 在其它实施方案中，可以使用结合对连接在 ISS/MC 复合物中的 ISS 和 MC。该结合对可以是受体和配体，抗体和抗原（或表位），或以高亲和性结合（例如， K_d 少于约 10^{-8} ）的任何其它结合对。优选的一个类型结合对是生物素和链霉亲和素或生物素和亲和素，它们形成非常紧密的复合物。当使用结合对介导 ISS/MC 复合物结合时，用结合对的一个成员典型地通过共价连接方式衍生化 ISS，和用结合对的另一成员衍生化 MC。两个衍生的化合物的混合物导致 ISS/MC 复合物形成。

[0163] 许多 ISS/MC 复合物实施方案不包括抗原，某些实施方案排除与疾病或病症有关的抗原，其中该疾病或病症是 ISS/MC 复合物治疗的目标。在另一实施方案中，ISS 也可以结合于一个或多个抗原分子。抗原可以以多种方式与 ISS/MC 复合物的 ISS 部分偶联，包括共价和 / 或非共价的相互作用，如，例如，在 WO 98/16247 中所述。或者，可以将抗原连接于微载体。在包括结合于 ISS 的抗原的 ISS/MC 复合物中，抗原和 ISS 之间的连接可以通过这里所述和本领域公知的技术实现，包括，但不限于，直接的共价键合、经由交联剂部分（其可以包括间隔臂）的共价缀合、经由特定的结合对（例如，生物素和亲和素）的非共价缀合、和经由静电或疏水键的非共价缀合。

[0164] ISS 复合物与阳离子凝聚剂和稳定剂

[0165] 可以将 ISS 作为包含阳离子凝聚剂 (cationic condensing agent)、ISS 和稳定剂的组合物（即，CIS 组合物）施用以调节在接受者中的免疫应答。见，美国专利申请 60/402,968。在一些实施方案中，CIS 组合物也可以包含抗原和 / 或脂肪酸。

[0166] 本发明的 CIS 组合物通常是粒子形式。如本领域技术人员显而易见的，本发明的 CIS 粒子组合物由一群不同大小的颗粒组成。由于这一天然带来的变化性，本发明的组合物中的颗粒“大小”可以以范围或以最大或最小直径来描述。如果至少 95% 的颗粒（通过质量计）符合规定的尺寸，则认为颗粒具有特定的大小（例如，如果至少 97% 的颗粒是直径少于 $20 \mu\text{m}$ ，那么该组合物被认为由直径少于 $20 \mu\text{m}$ 的颗粒组成）。可以通过本领域公知的任何方便的方法测量颗粒大小，包括过滤（例如，使用“深层”过滤器以捕获超过截断大小的颗粒）、动态光散射、电子显微镜检查，包括 TEM（特别是与冷冻断裂术组合）和 SEM 等。

[0167] 优选的，本发明的 CIS 组合物包含的颗粒的直径少于约 $50 \mu\text{m}$ ，更优选直径少于约 $20 \mu\text{m}$ ，但在一些实施方案中颗粒的直径将少于约 3、2 或 $1 \mu\text{m}$ 。优选的颗粒大小范围包括直径为约 $0.01 \mu\text{m}$ 至 $50 \mu\text{m}$ 、 0.02 至 $20 \mu\text{m}$ 、 0.05 至 $5 \mu\text{m}$ 、和 0.05 至 $3 \mu\text{m}$ 。

[0168] CIS 组合物的成分可以在组合物中以各种比例 / 数量存在，但可以考虑使稳定剂和可选成分例如脂肪酸和抗原的量保持相对不变，其中稳定剂通常为大约 0.1% 至 0.5% (v/v)、脂肪酸为约 0 至 0.5%、抗原浓缩物为约 0.1 至约 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ ，优选约 1 至约 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ ，更优选约 10 至 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。ISS 和阳离子凝聚剂的量和比例在本发明组合物中可以有较大的变异范围。ISS 的量在某种程序上可以作为 ISS 的分子量的函数而变化，并通常为约

50 μg/mL 至约 2mg/mL, 优选约 100 μg/mL 至 1mg/mL。阳离子凝聚剂通常是以超过 ISS 的量存在 (以质量计), 通常比例为约 1:2 (ISS: 阳离子凝聚剂) 至约 1:6, 更优选约 2:5 至 1:5。

[0169] 在 CIS 组合物中的颗粒大小是大量变量的函数。在组合物中的颗粒的大小分布可以通过改变阳离子凝聚剂对 ISS 的比例来调节。例如, 在示例性的 +ISS/0.4% 吐温 85/0.4% 油酸酯 / 多粘菌素 B 组合物中改变阳离子凝聚剂对 ISS 的比例能改变平均颗粒大小从约 1.5 μm (阳离子凝聚剂 :IMC = 1 时) 至约 45 μm (阳离子凝聚剂 :ISS = 10 时)。

[0170] 在某些实施方案中, CIS 组合物包含阳离子凝聚剂、ISS 和为非离子去污剂的稳定剂。在其它实施方案中, 组合物包含膜破坏性阳离子脂肽 (优选多粘菌素, 更优选多粘菌素 B)、ISS 和稳定剂。在其它实施方案中, 稳定剂不是血清蛋白 (尤其不是牛血清蛋白)。这一类型实施方案的示例性组合物使用聚氧乙烯醚去污剂例如吐温 80 或吐温 85 作为稳定剂, 其中油酸酯可以作为可选的额外的稳定剂。

[0171] 在一些实施方案中, CIS 组合物包含免疫调节性颗粒, 其中通过混合阳离子凝聚剂、ISS 和为非离子去污剂的稳定剂的步骤来制备该颗粒。在其它实施方案中, 本发明的组合物包含免疫调节性颗粒, 其中通过混合膜破坏性阳离子脂肽 (优选多粘菌素, 更优选多粘菌素 B)、ISS 和稳定剂的步骤制备该颗粒。在一些实施方案中, 该稳定剂不是血清蛋白 (特别不是牛血清蛋白)。

[0172] 在一些实施方案中, CIS 组合物包含免疫调节性颗粒, 其中通过混合 ISS 和为非离子去污剂的稳定剂的步骤, 由此形成 ISS/ 稳定剂混合物, 和将阳离子凝聚剂与 ISS/ 稳定剂混合物混合来形成该颗粒。在其它实施方案中, 本发明的组合物包含免疫调节性颗粒, 其中通过混合 ISS 和稳定剂的步骤, 由此形成 ISS/ 稳定剂混合物, 和将膜破坏性阳离子脂肽 (优选多粘菌素, 更优选多粘菌素 B) 与 ISS/ 稳定剂混合物混合来形成该颗粒。在一些实施方案中, 该稳定剂不是血清蛋白 (特别不是牛血清蛋白)。

[0173] 在一些实施方案中, CIS 组合物包含免疫调节性颗粒, 其中该颗粒包含阳离子凝聚剂、ISS 和为非离子去污剂的稳定剂。在其它实施方案中, 本发明的组合物包含免疫调节性颗粒, 其中该颗粒包含膜破坏性阳离子脂肽 (优选多粘菌素、更优选多粘菌素 B)、ISS 和稳定剂。在一些实施方案中, 该稳定剂不是血清蛋白 (特别不是牛血清蛋白)。

[0174] 在 CIS 组合物及使用 CIS 组合物的方法中使用的阳离子凝聚剂是在生理 pH (即, 约 7.0 至约 7.5 的 pH) 带正电荷的分子。优选的, 在本发明中使用的阳离子凝聚剂不是兼性离子的而是多阳离子的, 即, 每个分子具有超过一个的正电荷。在本发明中有用的阳离子凝聚剂包括亲水的或两亲性的多阳离子。

[0175] 优选的阳离子凝聚剂包括:(a) 膜破坏性阳离子脂肽, 包括, 但不限于多粘菌素, 包括多粘菌素 A、多粘菌素 B (包括多粘菌素 B1 和多粘菌素 B2)、多粘菌素 C、多粘菌素 D、多粘菌素 E (也称为粘菌素)、多粘菌素 K、多粘菌素 M、多粘菌素 P、多粘菌素 S 和多粘菌素 T; 环杆菌素包括环杆菌素 A、环杆菌素 B、环杆菌素 C、环杆菌素 D、环杆菌素 E 和环杆菌素 F; 八肽菌素; 两性霉素包括两性霉素 B, 和酰化的肽包括辛酰基 -KFFKFFKFF (SEQ ID NO:25) 和酰基 KALA (辛酰基 -WEAKLAKAL AKAL AKHLA KALAKALEACEA (SEQ ID NO:26); (b) 膜破坏性阳离子肽, 包括, 但不限于多粘菌素 B 九肽、天蚕素包括天蚕素 A、天蚕素 B 和天蚕素 P1、KFFKFFKFF (SEQ ID NO:25) 和 KALA (WEAKLAKALAKALAKHLAKALKACEA) (SEQ ID NO:27); (c) 单链阳离子表面活性剂, 包括, 但不限于溴化十六烷基三甲铵 (CTAB)、苯基 - 二

甲基 - 溴化铵 (BDAB)、CpyrB (溴化十六烷基吡啶鎓)、CimB (溴化十六烷基咪唑鎓) 和多阳离子聚合物, 包括, 但不限于, 聚-L-赖氨酸 (PLL) 和聚乙烯亚胺 (PEI)。在某些实施方案中, 该阳离子凝聚剂是膜破坏性阳离子脂肪, 优选多粘菌素, 更优选多粘菌素 B。在一些实施方案中, 阳离子凝聚剂可以排除脂肪酸酯 (即, 脂质) 和双链阳离子表面活性剂。

[0176] 在 CIS 组合物和使用 CIS 组合物的方法中有用的稳定剂包括在水中可悬浮和减少水的表面张力的那些, 然而优选可水溶的和 / 或在水中可完全混溶的稳定剂。多种类型的稳定剂在组合物和本发明的方法中有用, 包括蛋白质 (优选亲水蛋白)、非离子去污剂、聚合物表面活性剂 (例如, 聚乙烯醇和聚乙烯吡咯烷酮)、阳离子去污剂、阴离子去污剂和脂肪酸, 然而在某些实施方案中, 稳定剂的定义中可以排除血清蛋白 (特别是牛血清蛋白)、脂肪酸、和 / 或离子去污剂。

[0177] 可以使用任何蛋白作为根据本发明的稳定剂。在一些实施方案中, 该稳定剂是不预期作为抗原的蛋白 (见以下讨论); 在这些实施方案中, 优选该蛋白质衍生自与组合物的预期接受者相同的物种 (例如, 如果该组合物是预期用于人的, 则优选作为稳定剂的蛋白质是人蛋白质)。血清白蛋白是在这类实施方案中作为稳定剂的有用的示例性蛋白质。在其它实施方案中, 抗原被用作稳定剂, 在此情况下该抗原不需要, 且通常优选不, 与期望的接受者为物种匹配的。在组合物和本发明的方法中使用的抗原在下面被描述。

[0178] 在 CIS 组合物和使用 CIS 组合物的方法中有用的非离子去污剂包括葡糖酰胺例如癸基二甲基氧化膦 (APO-10) 和二甲基十二烷基氧化膦 (APO-12)、辛酰基-N-甲基葡糖酰胺 (MEGA-8)、壬酰基-N-甲基葡糖酰胺 (MEGA-9) 和癸酰基-N-甲基葡糖酰胺 (MEGA-10)、聚氧乙烯醚去污剂, 包括聚氧乙烯 (10) 十二烷基酯 (Genapol C100)、聚氧乙烯 (4) 十二烷基醚 (**BRIJ®30**)、聚氧乙烯 (9) 十二烷基醚 (**LUBROL®PX**)、聚氧乙烯 (23) 十二烷基醚 (**BRIJ®35**)、聚氧乙烯 (2) 十六烷基醚 (**BRIJ®52**)、聚氧乙烯 (10) 十六烷基醚 (**BRIJ® 56**)、聚氧乙烯 (20) 十六烷基醚 (**BRIJ®58**)、聚氧乙烯 (2) 十八烷基醚 (**BRIJ®72**)、聚氧乙烯 (10) 十八烷基醚 (**BRIJ®76**)、聚氧乙烯 (20) 十八烷基醚 (**BRIJ®78**)、聚氧乙烯 (100) 十八烷基醚 (**BRIJ®700**)、聚氧乙烯 (2) 油基醚 (**BRIJ®92**)、聚氧乙烯 (10) 油基醚 (**BRIJ®97**)、聚氧乙烯 (20) 油基醚 (**BRIJ®98**)、异十三烷基聚 (乙二醇醚)₈ (Genapol 80)、**PLURONIC® F-68**、**PLURONIC® F-127**、十二烷基聚 (乙二醇醚)₉ (Thesit) 聚氧乙烯 (10) 异辛基苯基醚 (**TRITON® X-100**)、聚氧乙烯 (8) 异辛基苯基醚 (**TRITON® X-114**)、聚乙二醇脱水山梨醇单月桂酸酯 (**TWEEN® 20**)、聚氧乙烯脱水山梨醇单棕榈酸酯 (**TWEEN® 40**)、聚乙二醇脱水山梨醇单硬脂酸酯 (**TWEEN® 60**)、聚氧乙烯脱水山梨醇三硬脂酸酯 (**TWEEN® 65**)、聚乙二醇脱水山梨醇单油酸酯 (**TWEEN® 80**)、聚氧乙烯 (20) 脱水山梨醇三油酸酯 (**TWEEN® 85**)、泊洛沙姆 188、和聚乙二醇 - 对 - 异辛基苯基醚 (Nonidet NP40)、烷基麦芽糖苷去污剂, 包括环己基 - 正 - 乙基 - β-D-麦芽糖苷、环己基 - 正 - 己基 - β-D- 麦芽糖苷、和环己基 - 正 - 甲基 - β-D- 麦芽糖苷、正 - 癸酰基蔗

糖, 吡喃葡萄糖昔, 包括甲基 6-O-(N-庚基氨甲酰基)-α-D-吡喃葡萄糖昔 (HECAMEG) 和烷基吡喃葡萄糖昔, 例如正-癸基-β-D-吡喃葡萄糖昔、正-庚基-β-D-吡喃葡萄糖昔、正-十二烷基-β-D-吡喃葡萄糖昔、正-壬基-β-D-吡喃葡萄糖昔、正-辛基-β-D-吡喃葡萄糖昔和正-辛基-β-D-吡喃葡萄糖昔, 烷基硫吡喃葡萄糖昔, 包括正-庚基-β-D-硫吡喃葡萄糖昔, 烷基吡喃麦芽糖昔, 包括正-癸基-β-D-吡喃麦芽糖昔和正-辛基-β-D-吡喃麦芽糖昔、正-癸基-β-D-硫麦芽糖昔、洋地黄皂甙、正-十二烷酰基蔗糖、正-十二烷基-β-D-麦芽糖昔、庚烷 1, 2, 3-三醇、正-辛酰基-β-D-葡萄糖胺 (NOGA)、正-辛酰基蔗糖、泊洛沙姆 (聚氧乙烯 / 聚氧丙烯嵌段共聚物) 例如泊洛沙姆 188 和泊洛沙姆 407, 和磺基三甲铵乙内酯, 包括 SB-10、SB-12、和 SB-14 和正-十一基-β-D-麦芽糖昔。优选的稳定剂包括聚氧乙烯醚去污剂, 特别是聚乙二醇脱水山梨醇单油酸酯和聚氧乙烯 (20) 脱水山梨醇三油酸酯。

[0179] 在 CIS 组合物和使用 CIS 组合物的方法中有用的阴离子去污剂包括辛酸和其盐、鹅脱氧胆酸和其盐、胆酸和其盐、癸烷磺酸和其盐、脱氧胆酸和其盐、脱氧甘胆酸和其盐、月桂酰肌氨酸和其盐、正-十二烷基硫酸和其盐 (包括钠盐和锂盐)、牛磺鹅脱氧胆酸和其盐、牛磺胆酸和其盐、牛磺脱氢胆酸和其盐、牛磺脱氧胆酸和其盐、牛磺石胆酸和其盐、和牛磺鸟索脱氧胆酸和其盐。

[0180] 阳离子去污剂包括十六烷基吡啶鎓和其盐, 十六烷基三甲基铵和其盐, 包括溴化十六烷基三甲铵 (CTAB), 十二烷基三甲基铵和其盐, 包括溴化十二烷基三甲基铵, 烷基铵咪唑啉类, 季咪唑啉类, 和十四烷基三甲基铵和其盐, 包括溴化十四烷基三甲基铵。

[0181] 选择用作稳定剂的去污剂优选为被认为是油 / 水乳化去污剂的那些。油 / 水乳化去污剂是本领域公知的, 和通常表征为疏水 / 亲脂平衡 (HLB) 值为约 8 至约 18。优选的, 掺入粒子组合物的去污剂具有的 HLB 值为约 10 至约 16, 更优选约 11 至约 15 (例如, 聚乙二醇脱水山梨醇单油酸酯, HLB = 15.4; 聚氧乙烯 (10) 异辛基苯基醚, HLB = 13.5; 聚氧乙烯 (20) 脱水山梨醇三油酸酯 HLB = 11)。

[0182] 在某些实施方案中, CIS 组合物也可以包括一种或多种脂肪酸, 或其盐作为另外的成分。在使用脂肪酸作为稳定剂成分且使用脂肪酸作为组合物的另外的成分的那些实施方案中, 用作稳定剂的脂肪酸与用作“另外的”成分的脂肪酸不同。在本发明的 CIS 组合物中有用的脂肪酸的大小范围可以从 4 至 30 个碳原子, 并可以是不饱和的 (例如, 硬脂酸)、单不饱和的 (例如, 油酸)、或多不饱和的 (例如, 亚油酸), 虽然通常优选单不饱和的和多不饱和的脂肪酸。

[0183] 在一些实施方案中, CIS 组合物将掺入脂肪酸, 所述脂肪酸具有碳链长度为至少约 4、5、6、8、10、15、18 或 20 个碳原子和少于约 30、25、20、19、15 或 10 个碳原子。因此, 在一些实施方案中, 在本发明使用的脂肪酸可以具有的碳链长度范围为约 4-30、5-25、10-20、或 15-20 个碳原子。

[0184] 在 CIS 组合物中有用的脂肪酸包括, 但不限于, 花生四烯酸、癸酸、二十二烷酸、二十二碳六烯酸、花生酸、二十一烷酸、十七烷酸、庚酸、己酸、月桂酸、亚油酸、亚麻酸、肉豆蔻酸、十九烷酸、壬酸、辛酸、油酸、棕榈酸、十五烷酸、硬脂酸、二十四烷酸、二十三烷酸、十三烷酸和十一烷酸。在 CIS 组合物中使用的优选的脂肪酸包括油酸、棕榈油酸、和亚油酸。

[0185] 在本发明的某些实施方案中, 抗原被并入 CIS 组合物或与 CIS 组合物组合施用。那

些掺入抗原的 CIS 组合物可以将抗原掺入粒子组合物本身,或溶解或悬浮在其中悬浮了该粒子组合物的溶液中。任何抗原均可以被掺入本发明的 CIS 组合物或与之共同施用。

[0186] ISS 的递送

[0187] 在一个实施方案中,通过 ISS 自身将 ISS 递送到个体。在另一个实施方案中,用一个或多个抗原递送 ISS。在一个实施方案中,将抗原与 ISS 以缀合物形式共施用。在另一个实施方案中,将抗原与 ISS 在分开的运载体中施用。抗原的施用可以是与 ISS 同期发生的或同时发生的。以下 ISS 的递送的讨论也考虑抗原与 ISS 的递送。

[0188] ISS 可以被并入递送载体,例如,质粒、粘粒、病毒或逆转录病毒,其又可以编码治疗有益的多肽,例如细胞因子、激素和抗原。将 ISS 并入这类载体不会不利的影响其活性。

[0189] 可以使用胶体分散系统将 ISS 靶向递送至发炎的组织,例如鼻膜。胶体分散系统包括高分子复合物、纳米囊、微球体、珠子和基于脂质的系统,包括水包油乳剂、微胶粒、混合的微胶粒和脂质体。在一个实施方案中,本发明的胶体系统是脂质体。

[0190] 脂质体是人工膜囊泡,其可以用作体外和体内的递送运载体。已经显示大小范围从 0.2–4.0 μm 的大单层脂质体 (LUV) 可以囊化实质性百分比的含有大的大分子的水性缓冲液。RNA、DNA 和完整的病毒粒子能够被包在水性内部和以生物活性形式被传递至细胞 (Fraley 等人, Trends Biochem. Sci., 6:77, 1981)。除哺乳动物细胞之外,脂质体还已经被用于在植物、酵母和细菌细胞中传递多核苷酸。为了脂质体成为有效的基因转移运载体,应该存在下列特征:(1) 高效地包封编码反义多核苷酸的基因而不损害其生物活性;(2) 与非靶标细胞相比,优先地和主要地结合于靶标细胞;(3) 高效地将囊泡的水性内含物递送至靶标细胞的细胞质;和(4) 准确和有效的表达遗传信息 (Mannino 等人, Biotechniques, 6:682, 1988)。

[0191] 脂质体的组成通常是磷脂的组合,所述磷脂特别是高相变温度的磷脂,通常可以与甾类,特别是胆固醇组合。也可以使用其它的磷脂或其它脂质。脂质体的物理特征依赖于 pH、离子强度和二价阳离子的存在。

[0192] 在脂质体制备中有用的脂质的实例包括磷脂酰化合物,例如磷脂酰甘油、磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰乙醇胺、鞘脂、脑苷脂和神经节苷脂。特别有用的是二酰基磷脂酰甘油,其中脂质部分含有 14–18 个碳原子,特别是 16–18 个碳原子且是饱和的。示例性磷脂包括卵磷脂酰胆碱、二棕榈酰磷脂酰胆碱和二硬脂酰磷脂酰胆碱。

[0193] 脂质体的靶向可以基于解剖和机械的因素而分类。解剖分类是基于选择性的水平,例如,器官特异性、细胞特异性和细胞器特异性。机械靶向可以基于其是被动或主动而区分。被动靶向利用脂质体的天然倾向性以分布于含有窦状隙毛细血管的器官中的网状内皮系统 (RES) 细胞。在另一方面,主动靶向涉及通过将脂质体偶联于特异性配体,或通过改变脂质体的组成或大小来改变脂质体,从而达到靶向于非天然定位位点的器官和细胞类型,所述配体例如单克隆抗体、糖、糖脂或蛋白质。

[0194] 可以以多种方式修饰靶向递送系统的表面。在脂质体靶向递送系统的情况下,脂质基团可以被掺入脂质体的脂双层以维持寻靶配体与脂质体双层的稳定结合。可以使用多种众所周知的连接基团将脂链连接上该寻靶配体(见,例如, Yanagawa 等人, Nuc. Acids Symp. Ser., 19:189 (1988); Grabarek 等人, Anal. Biochem., 185:131 (1990); Staros 等人, Anal. Biochem., 156:220 (1986) 和 Boujrad 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA,

90:5728(1993)。通过将 ISS 缀合于病毒和非病毒重组表达载体的表面、缀合于抗原或其它配体、缀合于单克隆抗体或缀合于具有期望的结合特异性的任何分子，也能获得靶向的 ISS 递送。

[0195] 本领域的普通技术人员也熟悉或可以容易的确定对于制备寡核苷酸一肽缀合物有用的方法。可以在 ISS 的任意末端或在内部位置的适当修饰的碱基（例如，胞嘧啶或尿嘧啶）处完成缀合。对于参考，将寡核苷酸缀合于蛋白质和缀合于 Ig 的寡糖部分的方法是众所周知的（见，例如，O' Shannessy 等人，J. Applied Biochem., 7:347(1985)。另一有用的参考文献是 Kessler：“Nonradioactive Labeling Methods for Nucleic Acids”，in Kricka(ed.)，Nonisotopic DNA Probe Techniques(Acad. Press, 1992)）。

[0196] 也可以通过将 ISS 顺式或反式掺入如下重组表达载体（质粒、粘粒、病毒或逆转录病毒），所述重组表达载体可以编码能够由重组表达载体递送的任何治疗有益的蛋白，从而实现肽药物与 ISS 的共施用。如果期望将 ISS 掺入表达载体用于实施本发明，则可以使用对本领域普通技术人员不需详细解释的常规技术实现这类掺入。然而，关于综述，普通技术人员可能希望参考 Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, 同上引文。

[0197] 简而言之，重组表达载体（包括不编码任何蛋白质和用作 ISS 的载体的那些）的构建可以使用标准的连接技术。为了分析以证实在构建的载体中的正确序列，可以使用连接混合物转化细胞个体和如果合适的话通过抗生素抗性选择成功的转化体。从转化体制备载体，通过限制性来分析和 / 或进行测序，所述测序方法例如，Messing 等人的方法(Nucleic Acids Res., 9:309, 1981)、Maxam 等人的方法(Methods in Enzymology, 65:499, 1980)、或本领域技术人员公知的其它合适的方法。使用如例如，由 Maniatis 等人(Molecular Cloning, pp. 133-134, 1982) 所述的常规凝胶电泳可以执行切割片段的大小分离。

[0198] 可以用表达载体转化细胞个体和在按适于诱导启动子、选择转化体或扩增基因的方式修饰的常规营养培养基中培养。培养条件，例如温度、pH 等等，是先前用于该选择用于表达的细胞个体的那些条件，并对于本领域普通技术人员是显而易见的。

[0199] 如果使用重组表达载体作为本发明的 ISS 的运载体，特别优选质粒和粘粒，这是因为其缺少致病性。然而，质粒和粘粒比病毒更快的体内降解，因此可能不能递送足够的 ISS 剂量以实质性抑制由系统性施用基因治疗载体所引起的 ISS 免疫刺激活性。对于病毒载体备选方案，腺相关病毒拥有低致病性的优点。用于插入外源基因的腺相关病毒的相对低的容量在本发明中不成为问题，因为可以合成相对小的尺寸的本发明 ISS。

[0200] 能够在本发明中使用的其它病毒载体包括腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒、痘苗病毒或 RNA 病毒例如逆转录病毒。逆转录病毒优选是鼠、禽或人 HIV 逆转录病毒的衍生物。其中可以插入单个外源基因的逆转录病毒载体的实例包括，但不限于：Moloney 鼠白血病病毒(MoMuLV)、Harvey 鼠肉瘤病毒(HaMuSV)、鼠乳癌病毒(MuMTV) 和劳斯肉瘤病毒(RSV)。许多其它的逆转录病毒载体可以掺入多个基因。全部这些载体均可以转移或掺入编码可选择标记的基因，从而可以鉴别和产生转导的细胞。

[0201] 由于重组逆转录病毒是缺陷性的，它们需要帮助以产生感染性载体颗粒。可以例如通过使用含有如下质粒的辅助细胞系提供这一帮助，所述质粒在 LTR 内的调节序列控制下编码逆转录病毒的全部结构基因。这些质粒缺少如下核苷酸序列，该核苷酸序列使包装

机制能够识别 RNA 转录物用于壳体化。缺失包装信号的辅助细胞系包括,但不限于,例如, T2、PA317 和 PA 12。因为没有基因组被包装,这些细胞系产生空的病毒粒子。如果将其中包装信号完整但是结构基因被其它目的基因替代的逆转录病毒载体引入这类辅助细胞,则可以包装载体和可以产生载体病毒粒子。通过将一个或多个目的序列与另外的基因一起插入病毒载体,所述另外的基因编码例如特定靶标细胞上的受体的配体,则该载体可以被赋予靶标特异性。可以通过插入,例如,编码糖、糖脂或蛋白质的多核苷酸使逆转录病毒载体具有靶标特异性。可以通过使用抗体来使逆转录病毒载体定向,而实现优选的靶向。本领域技术人员将知道或能够无需过度实验而容易的确定能够被插入逆转录病毒基因组以允许含有 ISS 的逆转录病毒载体实现靶标特异性递送的特定多核苷酸序列。

[0202] ISS 的药物组合物

[0203] 如果不使用载体或其它递送系统而传递 ISS,可以将 ISS 配制在药物可接受的组合物中。优先用于本发明 ISS 的药物可接受的载体可以包括无菌的非水性或水性溶液、悬浮液和乳剂。非水性溶剂的实例是丙二醇、聚乙二醇、植物油例如橄榄油、和可注射的有机酯例如油酸乙酯。水性载体包括水、醇 / 水溶液、乳剂或悬浮液,包括盐水和缓冲的介质。胃肠外载体包括氯化钠溶液、林格氏葡萄糖、葡萄糖和氯化钠、乳酸林格氏液或固定油。静脉内载体包括流体和营养补充物、电解质补充物(例如基于林格氏葡萄糖的那些)等等。也可以存在防腐剂和其它添加剂,例如抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体等。也可以使用本领域众所周知的手段冻干 ISS 的组合物用于根据本发明的随后复原(reconstitution)和使用。

[0204] 吸收促进剂、去污剂和化学刺激物(例如,角蛋白分解剂(keritinolytic agent))可以提高 ISS 组合物转移进入靶标组织。有关已经被成功用于有机的和基于肽的药物的粘膜递送的吸收促进剂和去污剂,其一般原则可以参考见 Chien, Novel Drug Delivery Systems, Ch. 4(Marcel Dekker, 1992)。

[0205] 合适的鼻吸收促进剂的实例尤其可见 Chien, 上述引文之 Ch. 5, 表 2 和 3; 优先较温和的物质。用于粘膜 / 鼻递送的本发明方法中使用的合适的物质也被描述在 Chang, 等人, Nasal Drug Delivery, "Treatise on Controlled Drug Delivery", Ch. 9 和其表 3-4B, (Marcel Dekker, 1992)。公知可以提高药物透皮吸收的合适物质被描述在 Sloan, Use of Solubility Parameters from-Regular Solution Theory to Describe Partitioning-Driven Processes, Ch. 5, "Prodrugs:Topical and Ocular Drug Delivery" (Marcel Dekker, 1992) 和本文的其它位置。

[0206] 向个体施用 ISS 的方法和途径

[0207] 可以使用任何适于药物递送的可得方法和途径将本发明的 ISS 施用于个体。在一个实施方案中,通过本领域技术人员公知的任何递送方法,将与或不与抗原组合的 ISS 递送于上和 / 或下呼吸道。如在实施例中所述, ISS 递送的一个优选的方法是鼻内递送。另一 ISS 递送的优选方法是吹入。施用的其它方法包括离体方法(例如,用 ISS 孵育或转染的细胞进行的递送)以及全身性或局部的途径。本领域普通技术人员将明了将 ISS 递送进入个体的递送方法和途径应该避免体内的 ISS 降解。

[0208] 在一个方面,本发明提供将 ISS 与在环境中天然存在的抗原(即,“外来”抗原(“adventitious”antigen))一起施用的方法。外来变应原可以是在四季中水平波动

的变应原。可以通过使用多种来源,例如来自天气服务部门的天气报告、通过电视、收音机或报纸广播的新闻报告、公共机构的记录和私人研究,确定季节性变应原的存在。外来抗原的一个实例是豚草,例如豚草花粉变应原抗原 E(Amb a I)。其它外来抗原的非限制性实例是草变应原 Lol p 1(Tamborini 等人(1997)Eur. J. Biochem. 249:886-894)、主要尘螨变应原 Der pI 和 Der PII(Chua 等人(1988)J. Exp. Med. 167:175-182;Chua 等人(1990)Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 91:124-129),家猫变应原 Fel d I(Rogers 等人(1993)Mol. Immunol. 30:559-568)、白桦树花粉 Bet v1(Breiteneder 等人(1989)EMBO J. 8:1935-1938)、柳杉变应原 Cry j 1 和 Cry j 2(Kingetsu 等人(2000)Immunology 99:625-629) 和来自其它树花粉的蛋白抗原(Elsayed 等人(1991)Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl. 204:17-31)。如所示,来自树的变应原是公知的,包括来自桦树、刺柏和柳杉的变应原。从草花粉制备用于体内施用的蛋白质抗原已经被报道。在上面表 1 中描述了可以使用的其它抗原。

[0209] 由于多种外源性抗原进入个体的进入点是通过皮肤或粘膜。因此,靶向皮肤(例如,对于皮肤和皮下状况)或粘膜(例如,对于呼吸、眼、舌或生殖器状况)的递送方法和途径是特别有用的。临床领域的普通技术人员将熟悉或能够容易地确定将药物递送至皮肤和粘膜的方式。然而,对于综述,在以下简述了在本发明中有用的药物递送的示例性方法和途径。

[0210] 鼻内施用方式在解决呼吸问题,例如哮喘(例如,过敏性哮喘)、呼吸道炎症,特别是由从鼻道传递至气管或细支气管的抗原介导的炎症中是特别有用的。这类方式包括吸入本发明的多核苷酸组合物的气雾剂悬浮物。适合将多核苷酸组合物递送至鼻粘膜、气管和细支气管的喷雾器装置是本领域众所周知的和因此这里不再具体描述。关于鼻内药物递送的一般综述,本领域普通技术人员可能希望参考 Chien, Novel Drug Delivery Systems, Ch. 5(Marcel Dekker, 1992)。

[0211] 皮肤施用途径以及皮下注射可以用于解决皮肤的过敏反应和炎症。递送药物至皮肤的实例方式有合适的药物制剂的局部施用、经皮传递、注射和表皮施用。

[0212] 为了经皮传递,吸收促进剂或离子电渗疗法是合适的方法。有关这类方法,本领域普通技术人员可以希望咨询 Chien, 如上引文在 Ch. 7 中。可以使用可商购的贴剂实现离子电渗传递,其持续几天或更多天经由电脉冲连续地递送其产品通过未破损的皮肤。这一方法的使用使得能够控制药物组合物以相对高浓度传递,允许输注组合药物和允许同期使用吸收促进剂。

[0213] 在本方法中使用的示例性贴剂产品是加利福尼亚洛杉矶的综合医药公司(General Medical Company) 的 LECTRO 贴剂商品。这一产品电子地保持储库电极在中性 pH, 其可以适应于提供不同浓度的剂量, 适应于连续地给药和 / 或周期性地给药。应根据伴随 LECTRO 贴剂产品的厂商打印的说明书执行该贴剂的预备和应用, 这些说明书在这里通过参考被并入。

[0214] 表皮施用基本上涉及给予表皮最外层足够的机械或化学刺激以引起对该刺激的免疫应答。在表皮施用中使用的一个示例性装置使用许多的极窄直径的、短“tynes”, 可以使用这些 Tynes 通过刮擦使包被于 tynes 上的 ISS 进入皮肤。

[0215] 法国莱昂的 Pasteur Merieux 制造的包括在 MONO-VACC 旧结核菌素试验中的该装

置适合用于表皮施用 ISS。该装置的使用根据伴随该装置产品的厂商书面说明书进行；通过参考将关于用法和施用的这些说明并入此处以示例该装置的常规用法。也可以用在这一实施方案中的相似的装置是目前用于执行变态反应测试的那些。

[0216] 系统性给药涉及药物制剂的侵入性或系统性吸收的局部施用。局部施用以及静脉和肌肉内注射是药物的系统性给药的普通方法的实例。

[0217] ISS 的剂量参数

[0218] 本发明的 ISS 的一个具体优点是甚至在低剂量下它们也能够发挥抗炎性和 / 或免疫治疗性活性。尽管使用的剂量将依赖于要实现的临床目标而变化，但合适的剂量范围是获得长期疾病修饰的有效量。在一个实施方案中，长期疾病的实施方案是减少哮喘的任一个下列症状：支气管高反应性、气道中的嗜酸性粒细胞浸润、气道中粘液产生、气道中 Th2 细胞因子、气道重塑、速发性的哮喘反应（在变应原暴露之后立即的气道狭窄）和迟发性哮喘反应（在变应原暴露之后数小时的气道狭窄）。

[0219] 在一个方面，ISS 以至少 3 个周剂量施用。施用的 ISS 的剂量是约 0.001mg/kg 至约 100mg/kg。在一个实施方案中，施用的剂量是 0.005mg/kg 至约 50mg/kg。在另一个实施方案中，施用的 ISS 剂量是约 0.01mg/kg 至约 10mg/kg。在另一个实施方案中，将至少 4、5、6、7、8、9、10、11、或 12 剂 ISS 施用于个体以获得长期的疾病修饰。

[0220] ISS 可以在一段时间内多次施用。剂量施用之间的间隔可以是一周一次。备选的，可以使用较短时间的剂量施用间隔，例如在剂量施用之间为 3、4、5 或 6 天。另外备选的，在剂量施用之间可以经过更长时间，例如每 8、9、10、11、12、13、或 14 天。在另一备选中，可以按每 2.5 周、3 周或 4 周施用 ISS 的多个剂量。在一个实施方案中，施用 ISS 的至少 3 个周剂量，每剂量约 0.01mg/kg 至约 10mg/kg。在另一个实施方案中，向个体施用至少 4、5、6、7、8、9、10、11、或 12 剂 ISS 以获得长期效应。

[0221] 在另一方面，以约 0.01mg/kg 至约 10mg/kg 的剂量施用 ISS，并且以剂量之间间隔约 3、4、5 或 6 天向个体施用至少 3 个剂量以赋予长期的疾病修饰。在另一个实施方案中，以约 0.01mg/kg 至约 10mg/kg 的剂量施用 ISS，并以剂量之间间隔约 8、9、10、11、12、13 或 14 天向个体施用至少 3 个剂量以赋予长期疾病修饰。在另一个实施方案中，以约 0.01mg/kg 至约 10mg/kg 的剂量施用 ISS，且以剂量之间间隔约 2.5 周、3 周或 4 周向个体施用至少 3 个剂量以赋予长期的疾病修饰。在一个实施方案中，以剂量之间约 3 至约 14 天的间隔向个体施用 ISS 的至少 4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 个剂量以获得长期效果。在另一个实施方案中，以剂量之间约 2.5 周、3 周或 4 周的间隔向个体施用 ISS 的至少 4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 个剂量以获得长期效果。在另一个实施方案中，以约每周一次的方式，施用这些剂的 ISS。本领域的技术人员将能够通过测量 Th2 细胞因子的水平相应地调节剂量的范围，如在实施例中示例的。考虑到本公开提供的教导和在提交申请时所公知的技术，临床领域的普通技术人员将熟悉或能够容易地确定合适的参数用于本发明 ISS 的施用。

[0222] 在这一方面，应该注意在本发明中 ISS 的抗炎性和免疫治疗性活性基本是剂量依赖性的。因此，为了提高 ISS 的效力两倍，每个单剂量应该浓度加倍。临幊上，可能可取的是以低剂量（例如，约 0.01mg/kg）施用 ISS，然后按照需要增加剂量以获得期望的治疗目标。基于目前的研究，认为 ISS 在这些剂量水平几乎无毒或没有毒性。

[0223] 用于实施本发明的方法的试剂盒

[0224] 为了在以上描述的方法中使用,也通过本发明提供试剂盒。这类试剂盒可以包括下列的任意或全部:ISS(缀合或未缀合的);药物可接受的载体(可以是与ISS预混合的)或用于复原冻干的ISS的悬浮基质;另外的药物;用于各个ISS和另外的药物的无菌瓶,或用于其混合物的单个小瓶;用于将ISS递送至个体的装置;用于检测表明在治疗个体中已经获得所寻求的免疫调节效果的标记的试验试剂;如何和何时施用ISS和合适的测定装置的说明书。

[0225] 以下给出示例性说明本发明的实施的实施例。这些实施例仅用于参考目的,不应该被解释为对本发明的限制。

实施例

[0226] 实施例1在豚草诱导的过敏性哮喘小鼠模型中用1018 ISS鼻内处理之后对Th2-型基因诱导的抑制。

[0227] 这一试验的一个目的是研究在经豚草敏化和攻击的小鼠中鼻内1018 ISS处理的效应——抑制变应原诱导的Th2-基因诱导——的持续时间。评估的基因包括多种Th2-细胞因子、趋化因子和涉及气道炎症的多种其它分子。在-21天和-14天将雌性BALB/c小鼠用明矾上的豚草经腹膜内致敏。在不同时间点(从第-7天到第0天加3小时),用1018 ISS或盐水在浅麻醉条件下鼻内处理小鼠组。在第0天,用豚草或盐水鼻内攻击所有的组。在攻击后6小时,采集肺和在液氮中速冻。分离总RNA和转化为cDNA。使用实时定量PCR在肺cDNA样品中测量mRNA的表达。

[0228] 使用的材料是:1018(批号AGU-003,Dynavax)、豚草(花粉批号#16,24QQ 56-9FD-3,于03年1月17日提取,Dynavax),无致热原的盐水(Sigma)。使用的方法如下:用来自Charles River(Hollister,CA)的6-8周龄雌性BALB/c小鼠进行研究。在第-21天和第-14天用10 μ g的于明矾上的豚草腹膜内致敏总共90只小鼠。从第-7天起,根据以下时间方案在浅异氟醚麻醉下用无致热原的盐水(50 μ l)或用1018 ISS(20 μ g/50 μ l盐水)鼻内处理5只小鼠的组。

[0229]

致敏	处理日	处理	攻击
豚草	-7	盐水	盐水
豚草	-7	盐水	豚草
豚草	-7	1018 ISS	豚草
豚草	-5	盐水	盐水
豚草	-5	盐水	豚草
豚草	-5	1018 ISS	豚草
豚草	-3	盐水	盐水
豚草	-3	盐水	豚草
豚草	-3	1018 ISS	豚草
豚草	-1	盐水	盐水
豚草	-1	盐水	豚草
豚草	-1	1018 ISS	豚草
豚草	0	盐水	盐水
豚草	0	盐水	豚草
豚草	0	1018 ISS	豚草
豚草	0+3 小时	盐水	盐水
豚草	0+3 小时	盐水	豚草
豚草	0+3 小时	1018 ISS	豚草

[0230] 在第 0 天,用豚草 ($5 \mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ 盐水) 或盐水 ($50 \mu\text{l}$) 鼻内攻击全部小鼠。在攻击之后六小时,采集肺,在液氮中速冻和贮存在 -80°C 供之后使用。使用 RNeasy 迷你试剂盒 (Qiagen Inc., Valencia, CA) 分离总 RNA。根据先前公开的方法 (scheerens 等, Eur, J of Immunology 2001, 31:1465-74), 用 DNase 处理 RNA 样品 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), 使用 Superscript II Rnase H- 逆转录酶 (Invitrogen, Rockville, MD) 转化为 cDNA。

[0231] 在各个 cDNA 样品中, 使用实时定量 PCR (ABI Prism 5700, Perkin Elmer Applied Biosystems) 和 SYBR 绿 (Qiagen Inc., Valencia, CA) 测量多个基因的 mRNA 表达水平。内部开发了用于检测的有义和反义引物, 包括针对 Th2- 细胞因子、趋化因子和涉及气道炎症的多个其它分子的引物对。除了目的基因, 在各个样品中还测量了管家基因的 mRNA 表达 (在这一情况下是泛素)。在校正每个样品的 RNA 量之后, 计算全部数据相对于管家基因的表达 (表示为基因 / 泛素比例)。

[0232] 结果 :在图 1, 描述对于发展 Th2- 型气道炎症反应必需的六个基因, 数据表示为基因 / 泛素比。该数据证明当与盐水攻击的小鼠相比时, 在致敏小鼠中用豚草鼻内攻击上调了 Th2- 基因例如 IL-4、IL-5、和 IL-13 的 mRNA 表达水平 (豚草 - 攻击的小鼠以灰色棒表示为 RW/RW/ 盐水, 盐水 - 攻击的小鼠以空白棒表示为 RW/ 盐水 / 盐水)。此外, 在 RW/RW/ 盐水小鼠中变应原攻击之后, 趋化因子 TARC、MDC 和 eotaxin 的 mRNA 表达水平被上调。相反, 在用 1018 ISS 预处理的小鼠中 (以黑棒表示为 RW/RW/1018), 豚草 - 诱导的多种细胞因子和趋化因子表达水平的上调被抑制, 然而, 这仅出现于在第 -1 天或在第 -3 天, 或对于一些

基因在第 -5 天给予 1018 ISS 预处理时。

[0233] 在图 2, 显示 GOB-5 和 C2 的基因 / 泛素比。GOB-5 和 C2(也称为 FIZZ-1)都是公知的由 IL-4 在气道中诱导的基因。从我们的数据很清楚的是, 用豚草攻击导致上调两种基因。相反, 在用豚草攻击之前几天给予 1018 ISS 预处理抑制了与 Th2-型气道炎症相关的这些 mRNA 的表达。对于 GOB-5, 当在第 -1 天或第 -3 天给药时, 1018 ISS 处理是有效的。对于 C2, 当在第 -3 天或第 -5 天给药时, 1018 ISS 处理是有效的。

[0234] 已经公开, 用 ISS 预处理可以在过敏性哮喘的小鼠模型中抑制变应原 - 诱导的气道嗜酸性粒细胞增多和气道高反应性 (Broide 等人, J. Immunol., 161:7054, 1998)。我们已经证实这一抑制与气道中 ISS- 诱导的 Th2 和 Th2- 依赖性基因表达水平的下调相关 (Hessel 等人 (2005) J. Exp. Med., 202(11):1563)。

[0235] 这里, 我们测定了在气道中 ISS 介导的对变应原 - 诱导的 Th2 应答的抑制作用的持续时间。作为建立这一疗效窗的方法, 我们测量了气道中一系列基因的表达, 所述基因在致敏小鼠于变应原攻击之后的 Th2 型气道炎症发展中是必需的或与此发展紧密相关的。我们的数据证明, 在变应原攻击之前一至三天之间给药 1018 ISS 能够抑制这些基因中的大多数, 导致在气道中高度减小的 Th2 应答。如果将 1018 ISS 的给予进一步向变应原攻击之前移 (即, 早于第 -3 天), 我们发现 1018 ISS 不能下调 Th2 或 Th2- 依赖性基因的表达。

[0236] 因此, 如果想要研究 ISS 处理在气道 Th2 应答上的直接效应, 可取的是在变应原攻击之前一至三天之内预处理, 然而如果有兴趣研究 ISS 在疾病修饰上的长期效应, 可取的是在 ISS 处理之后等待至少一周以确保不存在直接的 ISS 效应。

[0237] 实施例 2 在豚草 - 诱导的过敏性哮喘的小鼠模型中用 1018 ISS 长期鼻内处理的效应

[0238] 这套实验的一个目的是研究用 1018 ISS 长期鼻内处理是否在豚草 - 诱导的过敏性哮喘小鼠模型中导致疾病修饰。研究了在豚草 - 致敏和攻击的小鼠中用 1018 ISS 每周鼻内处理的长期效应。

[0239] 以每周为基础用鼻内低剂量的豚草致敏和接着攻击小鼠。也以每周为基础, 用盐水或 1018 ISS 鼻内处理小鼠。在试验过程中的几个时间点, 留出小鼠休息 2 周。这一休息期是为了确保 1018 ISS 处理的直接效应已经消逝。在 2 周结束时, 用高剂量的豚草重新攻击这些小鼠, 通过测量气道中 Th2 和 Th1 细胞因子的量和通过测定气道嗜酸性粒细胞浸润的量来评估对这一变应原攻击的应答。

[0240] 更具体的, 使用的材料是 :1018(批号 AGU-003, Dynavax)、豚草 (花粉批号 #16, 24QQ 56-9FD-3, 于 03 年 1 月 17 日提取, Dynavax), 无致热原的盐水 (Sigma)。使用的方法如下 :用来自 Charles River(Hollister, CA) 的 6-8 周龄雌性 BALB/c 小鼠进行研究。在第 0 天和第 7 天用 15 μg 于明矾上的豚草腹膜内致敏小鼠。从第 14 天起, 以每周为基础在浅异氟醚麻醉下用 0.5 μg 豚草或无致热原的盐水 (50 μl) 鼻内攻击小鼠。同时用 1018 ISS(20 μg/50 μl 盐水) 或无致热原的盐水 (50 μl) 经由鼻内途径每周处理小鼠。在抗原攻击和 ISS 处理的 1、2、6 和 10 周之后, 留出小鼠休息 2 周, 接着用 5 μg 的豚草鼻内重新攻击。二十四小时之后灌洗肺和通过 ELISA 在灌洗液中测量细胞因子。IL-4、IL-13、IL-10 和 IFN-γ ELISA 的检测水平分别是 8、8、8 和 23pg/ml。将灌洗液离心和使用台盼蓝计算回收的细胞。使用剩余的细胞制备 Cytospin 和用 Wright-Giemsa 染色法染色。进行差异细

胞计数,针对每个 Cytospin 测定嗜酸性粒细胞数目。

[0241] 在图 3 和 4,在灌洗液中测量的 Th2- 型细胞因子 IL-4、IL-13 和 IL-10 的水平以 pg/ml 描述。此外,在图 4 中显示 Th1- 型细胞因子 IFN- γ 。结果表明用豚草在致敏小鼠中每周攻击在其气道中导致强 Th2 炎症,具有高水平的 IL-4、IL-13 和 IL-10,以及高数目的嗜酸性粒细胞(在图 5 中显示)。当豚草 - 致敏小鼠仅用盐水攻击时,Th2 细胞因子和嗜酸性粒细胞的这些高水平是不存在的。当用豚草攻击并同时用 1018 ISS 处理小鼠时,比较用盐水或用 ISS 处理的豚草 - 攻击的小鼠,在 1、2 或 6 周的 ISS 处理之后没有观察到显著差异。然而,在 10 周的 1018 ISS 处理之后,Th2 细胞因子水平以及嗜酸性粒细胞数目显著减少(IL-13 :*p<0.05; IL-4、IL-10、和嗜酸性粒细胞 :**p<0.01),表明在那些小鼠中 Th2 炎症被抑制。而且,这些数据显示在任何测量的时间点,在用 1018 ISS 处理的小鼠中都没有诱导增加的 IFN- γ 水平,说明用 1018 ISS 进行 10 次周处理未在气道中诱导明显 Th1- 型应答。

[0242] 在这一试验中描述的我们的试验数据证明 ISS 处理确实导致了疾病修饰,即,抑制对变应原的 Th2 应答,然而,这在我们手中没有伴随气道中明显的 Th1 应答的发展。在实施例 1 中,我们测定到 1018 ISS 对气道中 Th2 应答的直接效应持续不到一周。因此,在这一实施例中,全部小鼠在其最后的 ISS 处理之后,在用变应原再次攻击之前,休息了至少 2 周。因此,见到的任何效应都不可能归因于 ISS 处理的直接效应。对变应原的再次攻击的应答是为了确定是否该气道仍将发展应答变应原攻击的 Th2 炎症或是否它们对变应原攻击已不起反应。我们的数据显示需要至少 10 次的每周鼻内 1018 ISS 处理以获得这一疾病修饰效果。

[0243] 实施例 3 在豚草 - 诱导的过敏性哮喘小鼠模型中用 1018 ISS 长期鼻内处理的效应

[0244] 进行这一组试验以研究用 1018 ISS 长期鼻内处理是否在豚草 - 诱导的过敏性哮喘小鼠模型中赋予疾病修饰和评估在 1018 ISS 治疗停止之后但变应原暴露持续时这一疾病修饰是否持续。

[0245] 小鼠被致敏和随后以每周为基础用鼻内低剂量的豚草攻击。也以每周为基础,用盐水或 1018 ISS 鼻内处理小鼠。在试验过程的几个时间点,留出小鼠休息 2 周。这一休息期是为了确保 1018 ISS 处理的直接效果已经消逝。在此 2 周结束时,用高剂量的豚草再次攻击这些小鼠,通过测量在气道中的 Th2 和 Th1 细胞因子的量,评估对这一变应原攻击的应答。在此研究中包括的实验组如下:

[0246]

致敏	周变应原	周处理
第 0 和 7 天豚草	豚草 wk 1-25	盐水第 1-25 周
第 0 和 7 天豚草	豚草 wk 1-25	1018 ISS 第 1-25 周
第 0 和 7 天豚草	豚草 wk 1-25	1018 ISS 第 1-12 周
第 0 和 7 天豚草	豚草 wk 1-12	1018 ISS 第 1-12 周

[0247] 小鼠接受 ISS 处理 12 周和变应原攻击总共 25 周的目的是评估在连续的变应原暴露存在下 ISS- 诱导的疾病修饰是否是持久的。

[0248] 更具体的,使用的材料是:1018(批号 AGU-003, Dynavax);豚草(花粉批号 #01/26/05,Dynavax);无致热原的盐水(Sigma)。来自 Charles River(Hollister, CA) 的 6-8 周龄雌性 BALB/c 小鼠进行研究。在第 0 天和第 7 天用 15 μ g 的在明矾上的豚草腹膜内致敏小鼠。从第 14 天起,在浅异氟醚麻醉下用 0.5 μ g 豚草或无致热原的盐水(50 μ l)以每周为基础鼻内攻击小鼠。同时用 1018 ISS(20 μ g/50 μ l 盐水)或 TOLAMBA(20 μ g/50 μ l 盐水)或无致热原的盐水(50 μ l)经由鼻内途径每周处理小鼠。在抗原攻击和 ISS 处理的 1、8、12、16 和 25 周之后,留出小鼠休息 2 周和接着用 5 μ g 的豚草鼻内再次攻击。二十四小时之后灌洗肺和通过 ELISA 在灌洗液中测量细胞因子。

[0249] 结果:在图 6 中,在灌洗液(BAL 液体)中测量的 Th2- 型细胞因子 IL-4、IL-5、IL-13 和 IL-10 的水平以 pg/ml 描述。IL-4、IL-5、IL-13、IL-10 和 IFN- γ ELISA 的检测水平分别是 8、8、8、8 和 23pg/ml。此外,检测了 Th1- 型细胞因子 IFN- γ ,但是在任何的处理组中,都未测量到高于检测水平之上的 IFN- γ 的诱导。我们的结果显示在致敏小鼠中用豚草每周攻击导致气道中有力的 Th2 炎症,具有高水平的 IL-4、IL-5、IL-13 和 IL-10。当小鼠用豚草攻击且同时用 1018 ISS 处理时,比较用盐水或用 ISS 处理的豚草 - 攻击的小鼠,在 1 周的 ISS 处理之后没有观察到显著区别。然而,8、12、16 和 25 周的 1018 ISS 处理后,Th2 细胞因子水平显著减少,表明在 1018 ISS 处理的小鼠中变应原 - 诱导的 Th2 炎症被抑制。在测量的任何时间点在用 1018 ISS 处理的小鼠中没有可检测水平的 IFN- γ 被诱导,这一观察结果说明 1018 ISS 的 25 次周处理未在气道中诱导明显的 Th1- 型应答。在用 1018 ISS 处理 12 周接着继续接受变应原攻击另外 13 周的组中,Th2 应答保持被抑制,说明 1018 ISS 诱导的疾病修饰是持久的。

[0250] 在实施例 2 中,我们证明了 10 次的 ISS 周处理产生疾病修饰,即,抑制对变应原的 Th2 应答,然而,这没有伴随在气道中明显的 Th1 应答的发展。这里描述的试验以如下观察结果扩充了这一发现,即观察到在 8 次 1018 ISS 周处理之后实际已经获得疾病修饰而且甚至当变应原暴露持续另 13 周时这一疾病修饰仍继续。

[0251] 实施例 4 ISS- 缀合物

[0252] 使用与以上实施例 3 相似的方法,除了使用的是 1018 ISS 和缀合于 Amb a I 的 1018 ISS(缀合物称为 TOLAMBA)。图 7 描述在如下小鼠中测量 Th2- 型细胞因子 IL-4、IL-5、IL-10 和 IL-13 的结果,所述小鼠已经持续 25 周接受了 20 μ g 的 1018 ISS 经由鼻内途径的每周处理、或已经持续 25 周接受了 20 μ g TOLAMBA 经由鼻内途径的每周处理。当使用 ISS- 缀合物时,也观察到 Th2 遏制。

[0253] 实施例 5 在豚草 - 诱导的过敏性哮喘小鼠模型中用 1018 ISS 长期鼻内处理的效应和 IFN- γ 的作用

[0254] 进行这一试验,以研究在豚草 - 诱导的过敏性哮喘小鼠模型中通过 1018 ISS 长期鼻内处理诱导的疾病修饰的维持是否由细胞因子 IFN- γ 介导。~

[0255] 小鼠被致敏和随后用鼻内低剂量的豚草以每周为基础攻击。也以每周为基础用盐水或 1018 ISS 鼻内处理小鼠。在试验过程的几个时间点,留出小鼠休息 2 周。这一休息期是确保 1018 ISS 处理的直接效应已经消逝。在此 2 周结束时,用高剂量豚草再次攻击这些

小鼠,通过测量在气道中的 Th2 和 Th1 细胞因子的量,评估对这一变应原攻击的应答。在此研究中包括的试验组如下:

[0256]

致敏	周变应原	周处理	抗体处理
第 0 和 7 天豚草	盐水 wk 1-17	盐水第 1-17 周	无
第 0 和 7 天豚草	豚草 1-17	盐水第 1-17 周	无
第 0 和 7 天豚草	豚草 1-17	1018 ISS 第 1-17 周	无
第 0 和 7 天豚草	豚草 1-17	1018 ISS 第 1-13 周	无
第 0 和 7 天豚草	豚草 1-13	1018 ISS 第 1-13 周	无
第 0 和 7 天豚草	豚草 1-17	1018 ISS 第 1-13 周	同种型 (GL113)wk 13-17
第 0 和 7 天豚草	豚草 1-17	1018 ISS 第 1-13 周	抗 IFN- γ (XMG1.2)wk 13-17

[0257] 小鼠接受 ISS 处理 13 周和变应原攻击共 17 周的目的是评估在连续的变应原暴露存在下 ISS- 诱导的疾病修饰是否是持久的。接受抗体 (对照或抗 IFN- γ 抗体) 处理的组的目的是评估 IFN- γ 对于维持 ISS- 诱导的疾病修饰是否必需。

[0258] 更具体的,使用的材料是 :1018 ISS(批号 AGU-003, Dynavax) ;豚草 (花粉批号 #01/26/05, Dynavax) ;无致热原的盐水 (Sigma)。用来自 Charles River (Hollister, CA) 的 6-8 周龄雌性 BALB/c 小鼠进行研究。在第 0 天和第 7 天用 15 μ g 的明矾上豚草腹膜内致敏小鼠。从第 14 天起,在浅异氟醚麻醉下用 0.5 μ g 豚草或无致热原的盐水 (50 μ l) 以每周为基础鼻内攻击小鼠。同时用 1018 ISS(20 μ g/50 μ l 盐水) 或无致热原的盐水 (50 μ l) 经由鼻内途径每周处理小鼠。在一些组中,用同种型对照抗体 (克隆 GL113) 或用 IFN- γ 的抗体 (克隆 XMG1.2) (2mg 在 200 μ l 中,每周一次) 在第 13-17 周期间腹膜内处理小鼠。在抗原攻击和 ISS 处理的 1、3、8、13 和 17 周之后,留出小鼠休息 2 周,接着用 5 μ g 的豚草鼻内再次攻击。二十四小时之后灌洗肺和通过 ELISA 在灌洗液中测量细胞因子。

[0259] 结果 :在图 8 中,在灌洗液 (BAL 液) 中测量的 Th2- 型细胞因子 IL-4、IL-13 和 IL-5 的水平以 pg/ml 描述。IL-4、IL-13、IL-5 和 IFN- γ ELISA 的检测水平分别是 16、16、31 和 16pg/ml。此外,检测了 Th1- 型细胞因子 IFN- γ ,但是在任何处理组中均未测量到高于检测水平之上的 IFN- γ 的诱导。我们的结果显示在致敏小鼠中用豚草每周攻击导致气道中有有力的 Th2 炎症,具有高水平的 IL-4、IL-13 和 IL-5。当小鼠用豚草攻击且同时用 1018 ISS 处理时,比较用盐水或用 ISS 处理的豚草 - 攻击的小鼠,在 1 或 3 周的 ISS 处理之后没有观察到 IL-4 和 IL-5 的显著区别。在 1 或 3 周的 ISS- 处理之后,在用 ISS- 处理和豚草 - 攻击的小鼠中,IL-13 水平被显著抑制。然而,在 8、13 和 17 周的 1018 ISS 处理之后,全部三种 Th2 细胞因子水平都显著的减少,表明在 1018 ISS- 处理的小鼠中变应原 - 诱导的 Th2 炎症被抑制。在测量的任何时间点在用 1018 ISS 处理的小鼠中,没有可检测水平的 IFN- γ 被诱导,这一观察结果说明 1018 ISS 的 17 次周处理未在气道中诱导明显的 Th1- 型应答。

在用 1018 ISS 处理 13 周接着再继续接受变应原攻击另外 4 周的组中, Th2 应答保持被抑制, 说明 1018 ISS 诱导的疾病修饰是持久的。在用 1018 ISS 处理 13 周随后继续变应原暴露和用对照或抗 -IFN- γ 抗体处理的组中, Th2 应答也保持被抑制, 说明 IFN- γ 对于维持疾病修饰不是必需的。

[0260] 在实施例 2, 我们证明了 10 次每周 ISS 处理导致疾病修饰, 即, 抑制对变应原的 Th2 应答, 然而, 这不伴随着气道中明显 Th1 应答的发展。在实施例 3 中, 我们证明了在 8 次每周 1018 ISS 处理之后已经获得疾病修饰且甚至当变应原暴露持续另外 13 周时这一疾病修饰也持续。本试验重复了在 8 次每周 1018 ISS 处理之后已获得疾病修饰的观察结果并以如下观察结果延伸了该发现, 即观察到维持这一疾病修饰不需要 IFN- γ 。

[0001]

序列表

<110> 戴纳瓦克斯技术公司(DYNAVAX TECHNOLOGIES CORPORATION)

<120> 使用免疫刺激性寡核苷酸进行长期的疾病修饰

<130> 377882003740

<140> PCT/US2007/084358

<141> 2007-11-09

<150> E0/865.089

<151> 2006-11-09

<160> 28

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> 人二序列

<220>

<223> 免疫调节性多核苷酸

<400> 1

tgacgtgaa cgttcgagat ga

22

<210> 2

<211> 16

<212> DNA

<213> 人二序列

<220>

<223> 免疫调节性多核苷酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)...(3)

<223> r = 不存在, A, T, C 或 G

<220>

<221> misc_feature

<222> (7)...(8)

<223> r = 不存在, A, T, C 或 G

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)...(8)

<223> 4-8位的碱基序列可以重复多达4次

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)...(10)

<223> r = 不存在, A, T, C 或 G

<220>

<221> misc_feature

<222> 11

<223> r = A, T, C 或 G 且碱基与14位碱基互补

<220>

<221> misc_feature

<222> 14

<223> r = A, T, C 或 G 且碱基与11位碱基互补

<220>

<221> misc_feature

<222> (15)...(16)

<223> 15-16位碱基可以不存在

<220>

<221> misc_feature

<222> (11)...(16)

<223> 11-16位的碱基序列可以重复多达20次

<400> 2

nnntcgtnnn nnnnn

16

<210> 3

<211> 5

<212> DNA

<213> 人二序列

<220>

<223> 免疫调节性多核苷酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)...(5)

<223> r = 不存在, A, T, C 或 G

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)...(5)

<223> 1-5位的碱基序列可以重复多达4次

<400> 3

tgcnn

5

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> 人二序列

<220>

<223> 免疫调节性多核苷酸

[0002]

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)...(3)
 <223> r = 不存在, A, T, C 或 G

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)...(8)
 <223> r = 不存在, A, T, C 或 G

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)...(8)
 <223> 碱基序列可以重复多达4次

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)...(10)
 <223> r = 不存在, A, T, C 或 G

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 11
 <223> r = A, T, C 或 G 且碱基与18位碱基互补

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 12
 <223> r = A, T, C 或 G 且碱基与17位碱基互补

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 13
 <223> r = A, T, C 或 G 且碱基与16位碱基互补

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 16
 <223> r = A, T, C 或 G 且碱基与13位碱基互补

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 17
 <223> r = A, T, C 或 G 且碱基与12位碱基互补

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 18
 <223> r = A, T, C 或 G 且碱基与11位碱基互补

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)...(20)
 <223> 19-20 位碱基可以不存在

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)...(20)
 <223> 11-20位的碱基序列可以重复多达20次

 <400> 4
 nnntggttttt nnnnnnnnnn

 <210> 5
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> 人二序列

 <220>
 <221> 免疫调节性多核苷酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 1
 <223> r = A, T, C 或 G 且碱基与8位碱基互补

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 2
 <223> r = A, T, C 或 G 且碱基与7位碱基互补

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 3
 <223> r = A, T, C 或 G 且碱基与6位碱基互补

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 6
 <223> r = A, T, C 或 G 且碱基与3位碱基互补

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 7
 <223> r = A, T, C 或 G 且碱基与2位碱基互补

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 8
 <223> r = A, T, C 或 G 且碱基与1位碱基互补

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)...(10)
 <223> 9-10 位碱基可以不存在

<400> 5
 nnncgtttttt

20

10

[0003]

<210> 6
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人二序列
 <220>
 <223> 免疫调节性多核苷酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)...(3)
 <223> r = 不存在, A, T, C 或 G
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)...(8)
 <223> r = 不存在, A, T, C 或 G
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)...(8)
 <223> 4-8位的碱基序列可以重复多达4次
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)...(10)
 <223> r = 不存在, A, T, C 或 G
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 11
 <223> r = A, T, C 或 G 且碱基与20位碱基互补
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 12
 <223> r = A, T, C 或 G 且碱基与19位碱基互补
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 13
 <223> r = A, T, C 或 G 且碱基与18位碱基互补
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 14
 <223> r = A, T, C 或 G 且碱基与17位碱基互补
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 17
 <223> r = A, T, C 或 G 且碱基与14位碱基互补
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 18
 <223> r = A, T, C 或 G 且碱基与13位碱基互补
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 19
 <223> r = A, T, C 或 G 且碱基与12位碱基互补
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20
 <223> r = A, T, C 或 G 且碱基与11位碱基互补
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)...(22)
 <223> 21-22 位碱基可以不存在
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)...(22)
 <223> 11-22位的碱基序列可以重复多达20次
 <100> 6
 nnntcgnnn nnnnnnnnn cg
 <210> 7
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> 人二序列
 <220>
 <223> 免疫调节性多核苷酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 1
 <223> r = A, T, C 或 G 且碱基与10位碱基互补
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 2
 <223> r = A, T, C 或 G 且碱基与9位碱基互补
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 3
 <223> r = A, T, C 或 G 且碱基与8位碱基互补
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 4
 <223> r = A, T, C 或 G 且碱基与7位碱基互补

[0004]

<220>
 <221> misc_feature
 <222> 7
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与4位碱基互补

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 8
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与3位碱基互补

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 9
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与2位碱基互补

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 10
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与1位碱基互补

 <400> 7
 prnnncgnnnr

 <210> 8
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 免疫调节性多核苷酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 1
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与10位碱基互补

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 2
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与9位碱基互补

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 3
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与8位碱基互补

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 4
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与7位碱基互补

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 7
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与4位碱基互补

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 8
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与3位碱基互补

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 9
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与2位碱基互补

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 10
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与1位碱基互补

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)…(12)
 <223> 11-12 位碱基可以不存在

 <400> 8
 prnnncgnnnr_cg

 <210> 9
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 免疫调节性多核苷酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)…(3)
 <223> n = 不存在, A, T, C 或 G

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)…(8)
 <223> n = 不存在, A, T, C 或 G

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)…(8)
 <223> 4-8位的碱基序列可以重复多达4次

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)…(10)
 <223> n = 不存在, A, T, C 或 G

 <220>
 <221> misc_feature

[0005]

<220> 11
 <221> n = A, T, C 或 G 且碱基与16位碱基互补
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 16
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与11位碱基互补
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)...(18)
 <223> 17~18 位碱基可以不存在
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)...(18)
 <223> 11~18位的碱基序列可以重复多达20次
 <400> 9
 nontcggnnnn: ncgcgcgc
 <210> 10
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 免疫调节性多核苷酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)...(3)
 <223> n = 不存在, A, T, C 或 G
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)...(8)
 <223> n = 不存在, A, T, C 或 G
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)...(8)
 <223> 4~8位的碱基序列可以重复多达4次
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)...(10)
 <223> n = 不存在, A, T, C 或 G
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 13
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与14位碱基互补
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 14
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与13位碱基互补
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)...(18)
 <223> 17~18 位碱基可以不存在
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)...(18)
 <223> 11~18位的碱基序列可以重复多达20次
 <400> 10
 nontcggnnnn: cgnncgcg
 <210> 11
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 免疫调节性多核苷酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)...(3)
 <223> n = 不存在, A, T, C 或 G
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)...(8)
 <223> n = 不存在, A, T, C 或 G
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)...(8)
 <223> 4~8位的碱基序列可以重复多达4次
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)...(10)
 <223> n = 不存在, A, T, C 或 G
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 11
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与20位碱基互补
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 12
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与19位碱基互补

[0006]

<220>
 <221> misc_feature
 <222> 15
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与16位碱基互补

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 16
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与15位碱基互补

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 19
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与12位碱基互补

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与11位碱基互补

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)...(22)
 <223> 21-22 位碱基可以不存在

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)...(22)
 <223> 11-22 位碱基序列可以重复多达20次

 <400> 11
 nnrttgmmnn nnegnnnegnn eg 22

 <210> 12
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 免疫调节性多核苷酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 1
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与10位碱基互补

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 2
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与9位碱基互补

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 5
 <223> n ~ A, T, C 或 G 且碱基与6位碱基互补

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 6
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与5位碱基互补

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 9
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与2位碱基互补

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 10
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与1位碱基互补

 <400> 12
 nnccgnncgnn 10

 <210> 13
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 免疫调节性多核苷酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 1
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与10位碱基互补

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 2
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与9位碱基互补

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 3
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与6位碱基互补

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 6
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与5位碱基互补

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 9
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与2位碱基互补

 <220>

[0007]

<221> misc_feature
 <222> 10
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与1位碱基互补
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..
 <223> 11-12 位碱基可以不存在
 <400> 13
 nnccnnccnn cc
 <210> 14
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 免疫调节性多核苷酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..
 <223> n = 不存在, A, T, C 或 G
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..
 <223> n = 不存在, A, T, C 或 G
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..
 <223> 4-8位的碱基序列可以重复多达4次
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..
 <223> n = 不存在, A, T, C 或 G
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 11
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与16位碱基互补
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 12
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与15位碱基互补
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 13
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与12位碱基互补
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 16
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与11位碱基互补
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..
 <223> 17-18 位碱基可以不存在
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..
 <223> 11-18位的碱基序列可以重复多达20次
 <400> 14
 nnntggnnnn nnccnncc
 <210> 15
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 免疫调节性多核苷酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..
 <223> n = 不存在, A, T, C 或 G
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..
 <223> n = 不存在, A, T, C 或 G
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..
 <223> 4-8位的碱基序列可以重复多达4次
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..
 <223> n = 不存在, A, T, C 或 G
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 11
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与22位碱基互补
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 12

[0008]

<223> n = A, T, C 或 G 且碱基与21位碱基互补
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 13
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与20位碱基互补
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 14
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与19位碱基互补
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 15
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与18位碱基互补
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 18
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与17位碱基互补
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 19
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与16位碱基互补
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与15位碱基互补
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 21
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与14位碱基互补
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 22
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与13位碱基互补
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 23
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与12位碱基互补
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 24
 <223> 23-24 位碱基可以不存在
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)...(24)
 <223> 11-24位的碱基序列可以重复多达20次
 <400> 15
 nnntcgnnnn nnnnnnnnnn nnncg
 <210> 16
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 免疫调节性多核苷酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 1
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与12位碱基互补
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 2
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与11位碱基互补
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 3
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与10位碱基互补
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 4
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与9位碱基互补
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 5
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与8位碱基互补
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 8
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与5位碱基互补
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 9
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与4位碱基互补
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 10
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与3位碱基互补
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 11
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与2位碱基互补
 <220>

[0009]

24

<221> misc_feature <222> 12 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与1位碱基互补 <400> 16 nnnnncgnnn nn <210> 17 <211> 14 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 免疫调节性多核苷酸 <220> <221> misc_feature <222> 1 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与12位碱基互补 <220> <221> misc_feature <222> 2 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与11位碱基互补 <220> <221> misc_feature <222> 3 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与10位碱基互补 <220> <221> misc_feature <222> 4 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与9位碱基互补 <220> <221> misc_feature <222> 5 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与8位碱基互补 <220> <221> misc_feature <222> 8 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与5位碱基互补 <220> <221> misc_feature <222> 9 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与4位碱基互补 <220> <221> misc_feature <222> 10 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与3位碱基互补 <220> <221> misc_feature <222> 11 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与2位碱基互补 <220> <221> misc_feature <222> 12 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与1位碱基互补 <220> <221> misc_feature <222> {13}...{14} <223> 13-14 位碱基可以不存在 <400> 17 nnnnncgnnn nncc 14	<210> 18 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 免疫调节性多核苷酸 <220> <221> misc_feature <222> {1}...{3} <223> n = 不存在, A, T, C 或 G <220> <221> misc_feature <222> {7}...{8} <223> n = 不存在, A, T, C 或 G <220> <221> misc_feature <222> {4}...{8} <223> 4-8位的碱基序列可以重复多达4次 <220> <221> misc_feature <222> {9}...{10} <223> n = 不存在, A, T, C 或 G <220> <221> misc_feature <222> 11 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与18位碱基互补 <220> <221> misc_feature <222> 12
---	--

[0010]

<223> r = A, T, C 或 G 且碱基与17位碱基互补

<220*>

<221> misc_feature

<222> 17

<223> r = A, T, C 或 G 且碱基与12位碱基互补

<220*>

<221> misc_feature

<222> 18

<223> r = A, T, C 或 G 且碱基与11位碱基互补

<220*>

<221> misc_feature

<222> (19)...(20)

<223> Bases 19-20 位碱基可以不存在

<220*>

<221> misc_feature

<222> (11)...(20)

<223> 11-20位的碱基序列可以重复多达20次

<400> 18

nnntgrnnn nnegcgncg

20

<210> 19

<211> 10

<212> DNA

<213> 人工序列

<220*>

<223> 免疫调节性多核苷酸

<220*>

<221> misc_feature

<222> 1

<223> r = A, T, C 或 G 且碱基与8位碱基互补

<220*>

<221> misc_feature

<222> 2

<223> r = A, T, C 或 G 且碱基与7位碱基互补

<220*>

<221> misc_feature

<222> 7

<223> r = A, T, C 或 G 且碱基与2位碱基互补

<220*>

<221> misc_feature

<222> 8

<223> r = A, T, C 或 G 且碱基与1位碱基互补

<220*>

<221> misc_feature

<222> (9)...(10)

<223> 9-10 位碱基可以不存在

<400> 19

nacgcgnacg

10

<210> 20

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220*>

<223> 免疫调节性多核苷酸

<220*>

<221> misc_feature

<222> (1)...(3)

<223> r = 不存在, A, T, C 或 G

<220*>

<221> misc_feature

<222> (7)...(8)

<223> r = 不存在, A, T, C 或 G

<220*>

<221> misc_feature

<222> (4)...(8)

<223> 4-8位的碱基序列可以重复多达4次

<220*>

<221> misc_feature

<222> (9)...(10)

<223> r = 不存在, A, T, C 或 G

<220*>

<221> misc_feature

<222> 11

<223> r = A, T, C 或 G 且碱基与20位碱基互补

<220*>

<221> misc_feature

<222> 12

<223> r = A, T, C 或 G 且碱基与19位碱基互补

<220*>

<221> misc_feature

<222> 13

<223> r = A, T, C 或 G 且碱基与18位碱基互补

<220*>

<221> misc_feature

<222> 18

<223> r = A, T, C 或 G 且碱基与13位碱基互补

[0011]

<220>
 <221> misc_feature
 <222> 19
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与12位碱基互补

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 20
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与11位碱基互补

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)...(22)
 <223> 21-22 位碱基可以不存在

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)...(22)
 <223> 11-22 位碱基序列可以重复多达20次

 <400> 20
 nnntcggnnn nnncgggnn cg 22

 <210> 21
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 免疫调节性多核苷酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 1
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与10位碱基互补

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 2
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与9位碱基互补

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 3
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与8位碱基互补

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 8
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与3位碱基互补

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 9
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与2位碱基互补

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 10
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与1位碱基互补

 <400> 21
 nnncgggnn 10

 <210> 22
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 免疫调节性多核苷酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 1
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与10位碱基互补

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 2
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与9位碱基互补

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 3
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与8位碱基互补

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 8
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与3位碱基互补

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 9
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与2位碱基互补

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 10
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与1位碱基互补

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)...(12)
 <223> 11-12 位碱基可以不存在

 <400> 22
 nnncgggnn cg 12

[0012]

<210> 23
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人二序列
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)...(3)
 <223> n = 不存在, A, T, C 或 G
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)...(8)
 <223> n = 不存在, A, T, C 或 G
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)...(8)
 <223> 4-8位的碱基序列可以重复多达4次
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)...(10)
 <223> n = 不存在, A, T, C 或 G
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 13
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与16位碱基互补
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 14
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与15位碱基互补
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 15
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与14位碱基互补
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 16
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与13位碱基互补
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)...(20)
 <223> 19-20 位碱基可以不存在
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)...(20)
 <223> 11-20位的碱基序列可以重复多达20次
 <400> 23
 nnntcghnnn: cgnntncgog 20

<210> 24
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> 人二序列
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 免疫调节性多核苷酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> 3
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与6位碱基互补

<220>
 <221> misc_feature
 <222> 4
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与5位碱基互补

<220>
 <221> misc_feature
 <222> 5
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与4位碱基互补

<220>
 <221> misc_feature
 <222> 6
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与3位碱基互补

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)...(10)
 <223> 9-10 位碱基可以不存在

<400> 24
 cgnntncgog 10

<210> 25
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人二序列
 <220>
 <221> 免疫调节性多核苷酸

<400> 25
 Lys Phe Phe Lys Phe Phe Lys Phe Phe
 1 5

[0013]

<210> 26
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 肽
 <400> 26
 Trp Glu Ala Lys Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys His
 1 5 10 15
 Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys Ala Leu Glu Ala Cys Glu Ala
 20 25 30

 <210> 27
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 肽
 <400> 27
 Trp Glu Ala Lys Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys His
 1 5 10 15
 Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys Ala Leu Lys Ala Cys Glu Ala
 20 25 30

 <210> 28
 <211> 8
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 免疫调节性多核苷酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 1
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与6位碱基互补

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 2
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与5位碱基互补

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 5
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与2位碱基互补

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 6
 <223> n = A, T, C 或 G 且碱基与1位碱基互补

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)...(8)
 <223> 7-8 位碱基可以不存在

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)...(8)
 <223> 1-8位的碱基序列可以重复多达20次

 <400> 28
 nnccgnncg

1018 ISS 预处理抑制 Th2 基因诱导

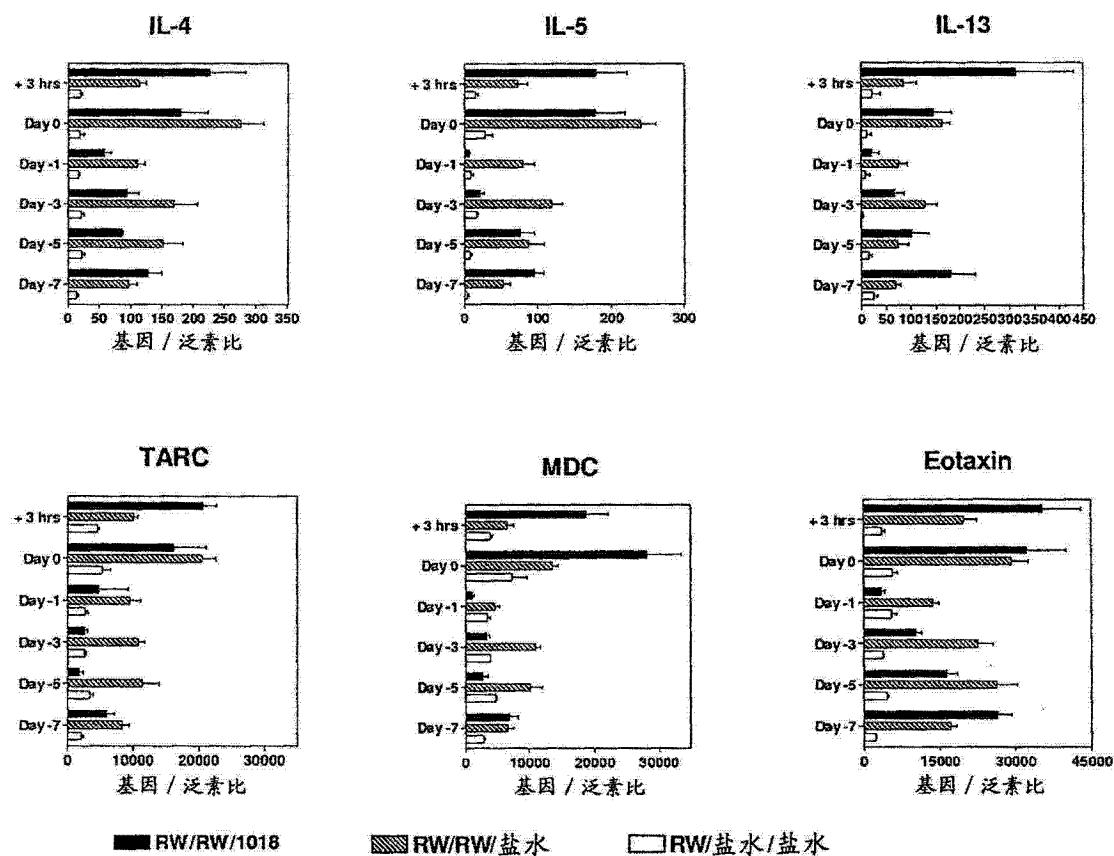


图 1

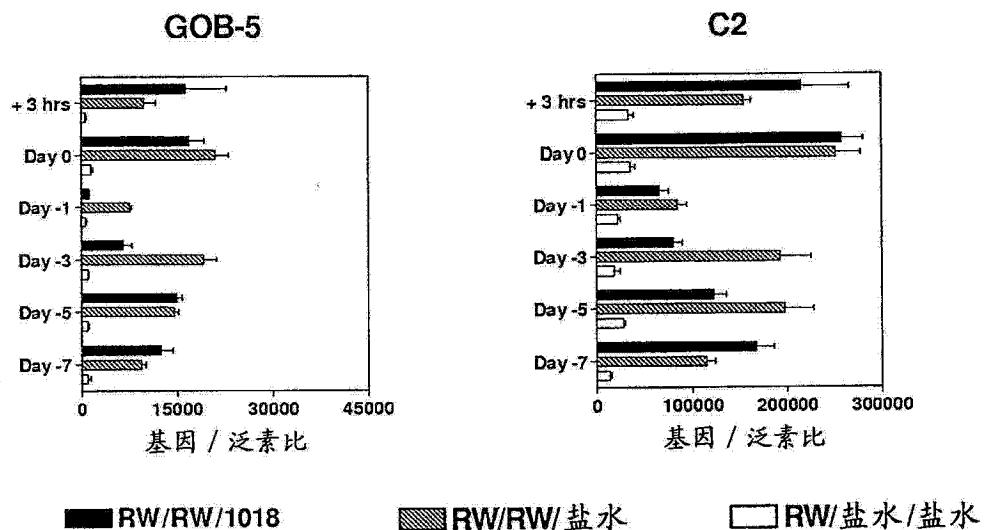
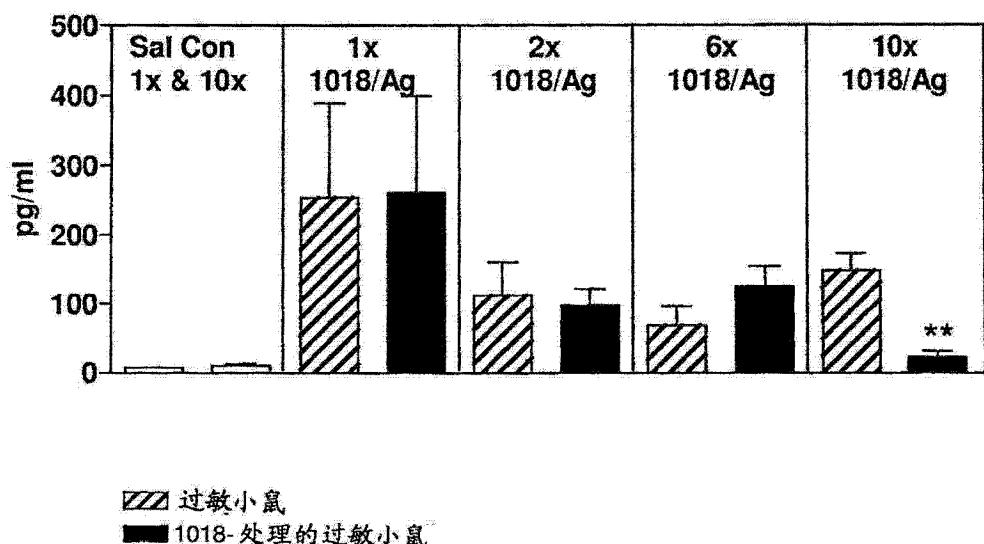
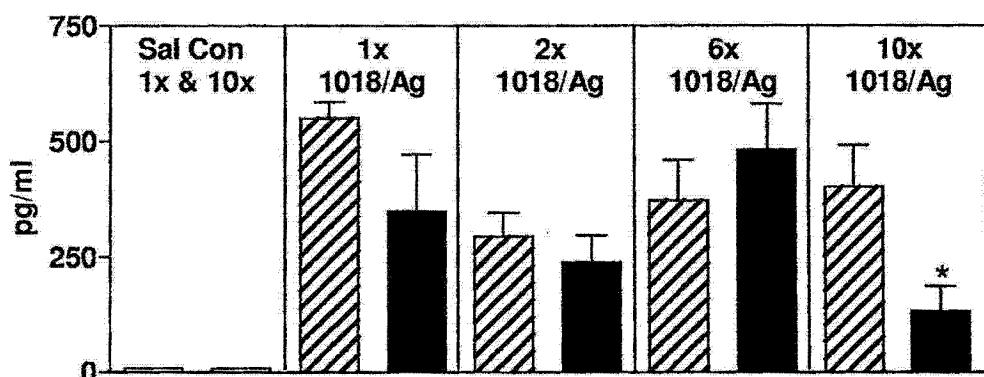
1018 ISS 预处理抑制 Th2 基因诱导

图 2

IL-4 在 BAL 液中



IL-13 在 BAL 液中



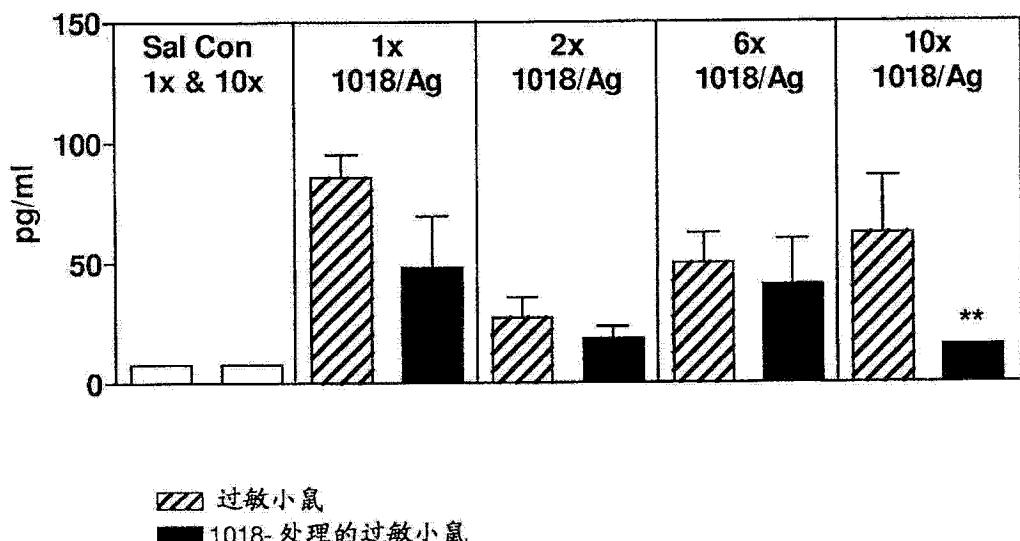
空白柱：豚草致敏的、每周盐水攻击和盐水处理，两周休息后盐水再次攻击

条纹柱：豚草致敏的、每周豚草攻击和盐水处理，两周休息后豚草再次攻击

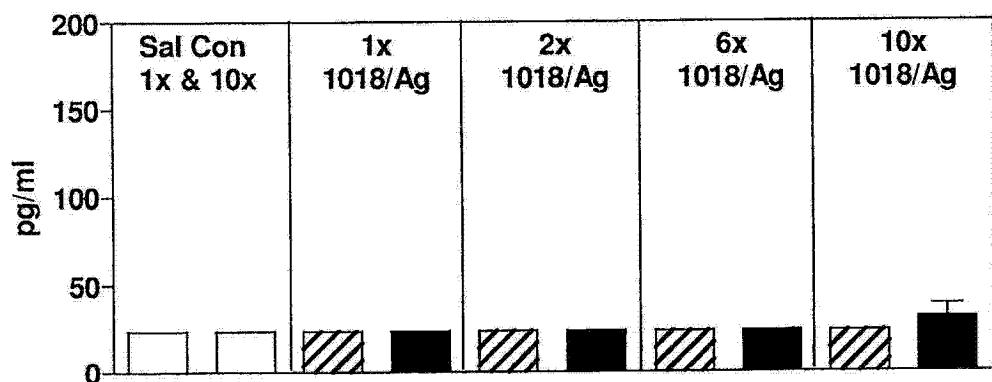
黑色柱：豚草致敏的、每周豚草攻击和 1018 ISS 处理，两周休息后豚草再次攻击

图 3

IL-10 在 BAL 液中



IFN- γ 在 BAL 液中



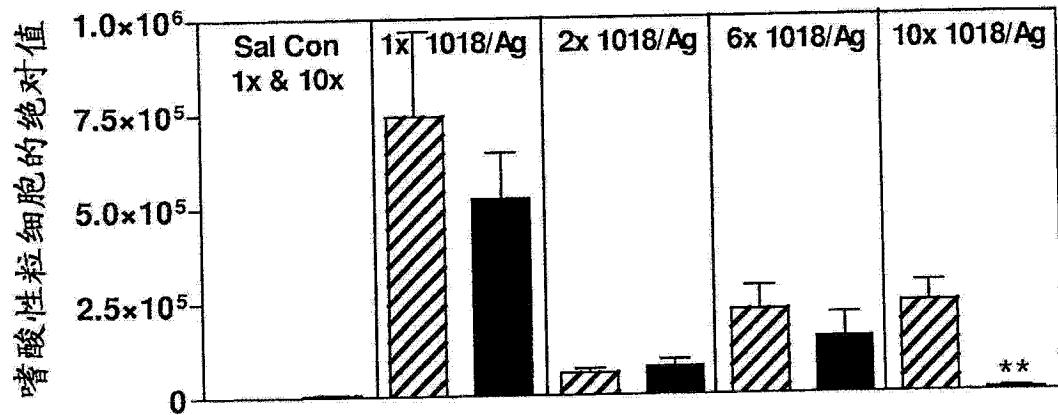
空白柱：豚草致敏的、每周盐水攻击和盐水处理，两周休息后盐水再次攻击

条纹柱：豚草致敏的、每周豚草攻击和盐水处理，两周休息后豚草再次攻击

黑色柱：豚草致敏的、每周豚草攻击和 1018 ISS 处理，两周休息后豚草再次攻击

图 4

嗜酸性粒细胞在 BAL 中



空白柱：豚草致敏的、每周盐水攻击和盐水处理，两周休息后盐水再次攻击

条纹柱：豚草致敏的、每周豚草攻击和盐水处理，两周休息后豚草再次攻击

黑色柱：豚草致敏的、每周豚草攻击和 1018 ISS 处理，两周休息后豚草再次攻击

图 5

1-25 轮 1018 ISS 处理后 BAL 液中的细胞因子

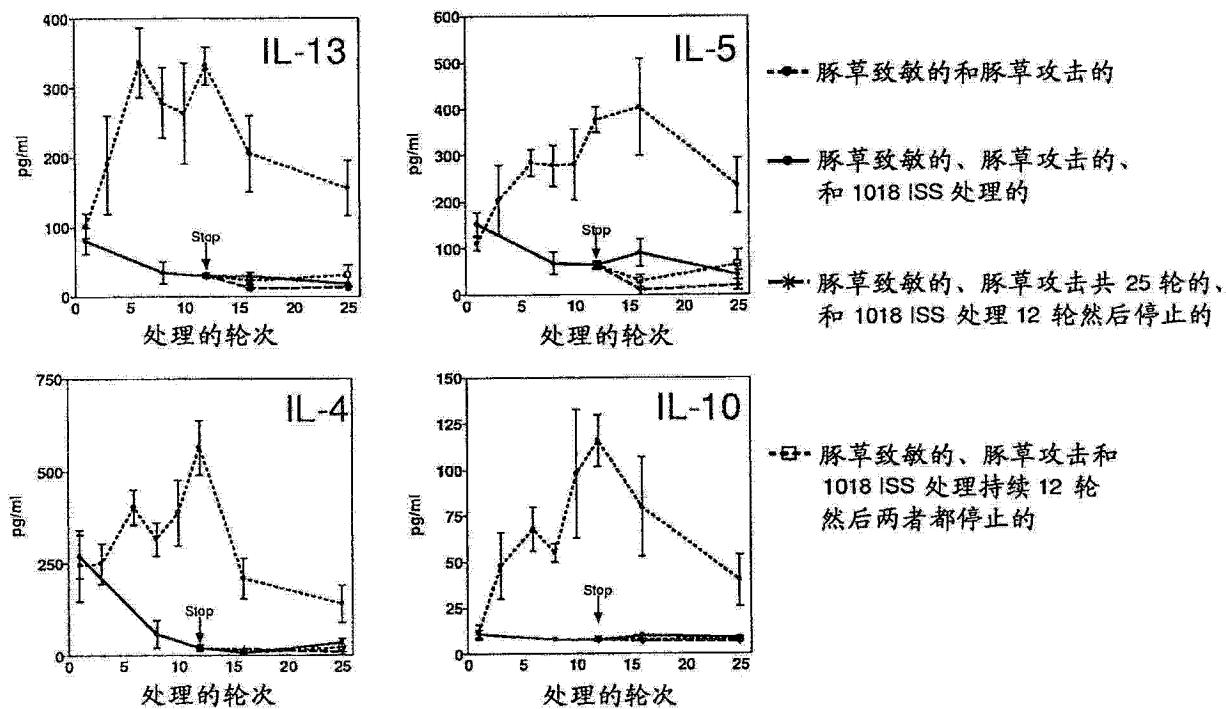


图 6

**用 TOLAMBA 或 1018 ISS 长期处理
导致气道中对变应原无应答**

**1-25 轮 1018 ISS 或 TOLAMBA 处理后
BAL 液中的细胞因子**

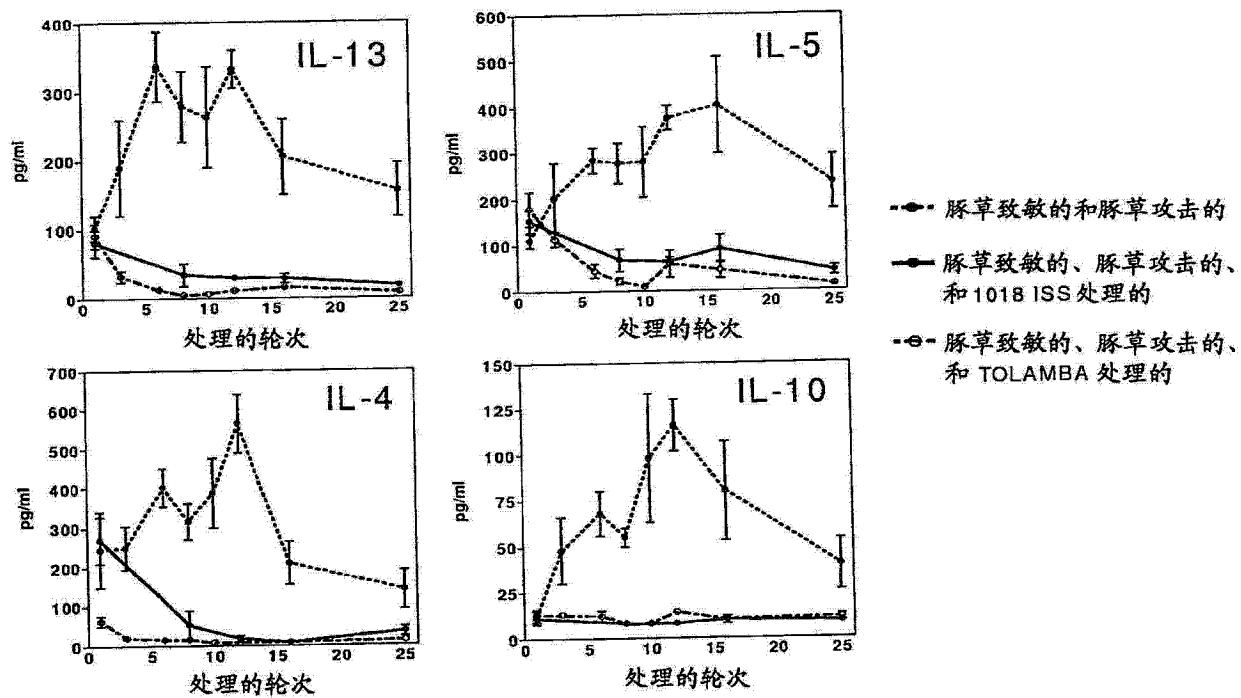


图 7

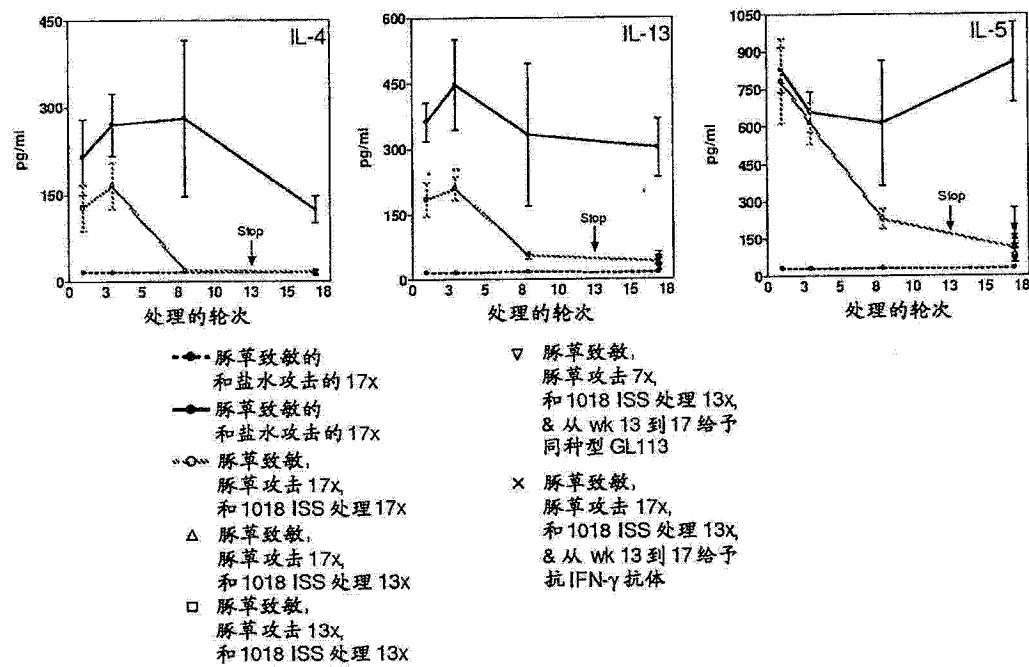


图 8