

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200480032018.4

[51] Int. Cl.

C12N 15/11 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61P 37/08 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 6 月 10 日

[11] 公开号 CN 101454451A

[22] 申请日 2004.10.29

[21] 申请号 200480032018.4

[30] 优先权

[32] 2003.10.30 [33] US [31] 60/516,193

[86] 国际申请 PCT/US2004/036240 2004.10.29

[87] 国际公布 WO2005/042018 英 2005.5.12

[85] 进入国家阶段日期 2006.5.8

[71] 申请人 科勒制药有限公司

地址 德国郎根费尔德

共同申请人 科勒制药集团有限公司

[72] 发明人 欧根·乌尔曼 约尔格·福尔默

阿瑟·M·克里格

伯恩哈德·O·诺尔

[74] 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

代理人 顾晋伟 刘继富

权利要求书 12 页 说明书 56 页 序列表 26 页
附图 7 页

[54] 发明名称

具有增强免疫刺激能力的 C 类寡核苷酸类似物

[57] 摘要

本发明涉及一类含有 CpG 免疫刺激性基序和第二基序的 CpG 免疫刺激性寡核苷酸，所述寡核苷酸能在体内和体外形成二级结构，包括双链体和更高级结构。本发明的寡核苷酸可用作疫苗接种中的佐剂。所述寡核苷酸也可用于诱导免疫应答、诱导表达 I 型干扰素 (IFN)、诱导表达 γ -干扰素，并用于治疗多种疾病，包括变态反应、哮喘、感染和癌症。

1. 含有式 I 的免疫刺激性核酸分子的组合物,

$$Z_1 [(X_1 Y_1 R_1) N (X_2 Y_2 R_2)_k Z_2]_p (S_1)_q N' (N_n) \dots (N_2)(N_1) S_2 (N_{1\#})(N_{2\#}) \dots (N_{n\#}) Z_3 \quad (\text{式 I})$$

其中

Z_1 、 Z_2 和 Z_3 相互独立地是 0-12 个核苷酸长的任意序列, 其任选地包含非核苷酸连接子或无碱基 dSpacer;

X_1 和 X_2 相互独立地是含胸腺嘧啶、尿嘧啶、腺嘌呤或 5-取代尿嘧啶的核苷酸;

Y_1 和 Y_2 相互独立地是胞嘧啶 (C) 或修饰胞嘧啶;

R_1 和 R_2 相互独立地是鸟嘌呤 (G) 或修饰鸟嘌呤;

N 和 N' 相互独立地是 0-12 个核苷酸长的任意序列, 其任选地包含非核苷酸连接子或无碱基 dSpacer;

S_1 是非核苷酸连接子、无碱基连接子 (dSpacer)、三乙二醇单元或六乙二醇单元, 任选地提供 2'5'-、5'5'-、3'3'-、2'2'-或 2'3'-核苷间连键;

S_2 是 1-10 个核苷酸长的任意非回文序列或非核苷酸连接子、无碱基连接子 (dSpacer)、三乙二醇单元或六乙二醇单元;

N_1 、 N_2 、 $\dots N_n$ 和 $N_{1\#}$ 、 $N_{2\#}$ 、 $\dots N_{n\#}$ 分别是任意核苷酸或修饰核苷酸, 其中 N_1 与 $N_{1\#}$ 形成碱基对、 N_2 与 $N_{2\#}$ 形成碱基对、 $\dots N_n$ 与 $N_{n\#}$ 形成碱基对;

k 是 0-5 的整数;

n 是 2-16 的整数;

p 是 1-6 的整数;

q 是 0-10 的整数,

并且其中当 $(N_n) \dots (N_2)(N_1) S_2 (N_{1\#})(N_{2\#}) \dots (N_{n\#})$ 是 10-42 个核苷酸长时, S_2 是 4-10 个核苷酸长, S_2 包含非核苷酸连接子、无碱基连接子 (dSpacer)、三乙二醇单元或六乙二醇单元, 和/或 $(N_n) \dots (N_2)(N_1) S_2 (N_{1\#})(N_{2\#}) \dots (N_{n\#})$ 具有小于 2/3 的 GC 含量。

2. 权利要求 1 的免疫刺激性核酸分子, 其中 N_1 、 N_2 、 $\dots N_n$ 和 $N_{1\#}$ 、 $N_{2\#}$ 、 $\dots N_{n\#}$ 分别选自 C、G 或其修饰物, 并且其中 C 与 G 形成碱基对。

3. 权利要求 1 的免疫刺激性核酸分子, 其中 N_1 、 N_2 、 $\dots N_n$ 和 $N_{1\#}$ 、 $N_{2\#}$ 、 $\dots N_{n\#}$ 分别

选自 T、A 或其修饰物，并且其中 T 与 A 形成碱基对。

4. 权利要求 1 的免疫刺激性核酸分子，其中 N_1 、 N_2 、 $\cdots N_n$ 和 $N_{1\#}$ 、 $N_{2\#}$ 、 $\cdots N_{n\#}$ 分别选自 C、T、A、G 或其修饰物，并且其中 C 与 G 形成碱基对，T 与 G 形成碱基对，A 与 T 形成碱基对，A 与 G 形成碱基对。

5. 权利要求 1 的免疫刺激性核酸分子，其中 N_1 、 N_2 、 $\cdots N_n$ 和 $N_{1\#}$ 、 $N_{2\#}$ 、 $\cdots N_{n\#}$ 分别选自形成沃森-克里克碱基对的未修饰或修饰核苷酸。

6. 权利要求 1 的免疫刺激性核酸分子，其中各个 N_1 、 N_2 、 $\cdots N_n$ 和 $N_{1\#}$ 、 $N_{2\#}$ 、 $\cdots N_{n\#}$ 中至少一个选自形成非沃森-克里克碱基对的未修饰或修饰核苷酸。

7. 权利要求 1 的免疫刺激性核酸分子，还包含具有至少一个磷酸二酯键的部分稳定化骨架。

8. 权利要求 1 的免疫刺激性核酸分子，还包含具有至少一个稳定化核苷酸间连键的骨架。

9. 权利要求 1 的免疫刺激性核酸分子，其中所述寡核苷酸的核苷酸间连键都是硫代磷酸酯键。

10. 权利要求 1 的免疫刺激性核酸分子，还包含具有连接 Y_1R_1 或 Y_2R_2 中至少一个的磷酸二酯键的部分稳定化骨架。

11. 权利要求 1 的免疫刺激性核酸分子，其中 Y_1 是 C。

12. 权利要求 1 的免疫刺激性核酸分子，其中 R_1 是 G。

13. 权利要求 1 的免疫刺激性核酸分子，其中 Y_1 是 C， R_1 是 G。

14. 权利要求 1 的免疫刺激性核酸分子，其中 X_1 或 X_2 是 T。

15. 权利要求 1 的免疫刺激性核酸分子，其中 X_1 是 T， X_2 是 T， Y_1 是 C， R_1 是 G， k 是 1。

16. 权利要求 1 的免疫刺激性核酸分子，其中 X_1 是 T， X_2 是 T， Y_1 是 C， R_1 是 G， k 是 1， p 是 1， N 和 N' 和 Z_3 分别含有 0 个核苷酸，并且 Z_2 是 TTTT 或 d(UUUU)。

17. 权利要求 1 的免疫刺激性核酸分子，其中 S_2 是非核苷酸连接子。

18. 权利要求 1 的免疫刺激性核酸分子, 其中 S_2 含有至少一个无碱基 **dSpacer** 残基。

19. 权利要求 1 的免疫刺激性核酸分子, 其中所述寡核苷酸包括至少一个带分支的非核苷连键。

20. 权利要求 1 的免疫刺激性核酸分子, 还包含至少一个双体单元、至少一个三体单元, 或至少一个双体单元和至少一个三体单元。

21. 权利要求 1 的免疫刺激性核酸分子, 其中 S_1 是双体单元或三体单元。

22. 权利要求 1 的免疫刺激性核酸分子, 其中所述寡核苷酸包含至少一个 2'5'-、5'5'-、3'3'-、2'2'-或 2'3'-核苷间连键。

23. 式 III 的免疫刺激性核酸分子

$$(Z')_m Z_3 (S_3) \quad (\text{式 III})$$

其中

Z' 是 $Z_1 [(X_1 Y_1 R_1) N (X_2 Y_2 R_2)_k Z_2]_p (S_1)_q N' (N_n) \dots (N_3)(N_2)(N_1) S_2 (N_{1\#})(N_{2\#})(N_{3\#}) \dots (N_{n\#})$;

Z_1 、 Z_2 和 Z_3 相互独立地是 0-12 个核苷酸长的任意序列, 其任选地包含非核苷酸连接子或无碱基 **dSpacer**;

X_1 和 X_2 相互独立地是含胸腺嘧啶、尿嘧啶、腺嘌呤或 5-取代尿嘧啶的核苷酸;

Y_1 和 Y_2 相互独立地是胞嘧啶或修饰胞嘧啶;

R_1 和 R_2 相互独立地是鸟嘌呤或修饰鸟嘌呤;

N 和 N' 互相独立地是 0-12 个核苷酸长的任意序列, 其任选地包含非核苷酸连接子或无碱基 **dSpacer**;

S_1 是非核苷酸连接子、无碱基连接子 (**dSpacer**)、三乙二醇单元或六乙二醇单元, 任选地提供 2'5'-、5'5'-、3'3'-、2'2'-或 2'3'-核苷间连键;

S_2 是 1-10 个核苷酸长的任意非回文序列或非核苷酸连接子、无碱基连接子 (**dSpacer**)、三乙二醇单元或六乙二醇单元;

S_3 是直接或间接的 2'5'-、5'5'-、3'3'-、2'2'-或 2'3'-核苷间连键或非核苷酸连接子, 所述非核苷酸连接子包含无碱基连接子 (**dSpacer**)、三乙二醇单元或六乙二醇单元, 辅助 m 序列部分的 2'5'-、5'5'-、3'3'-、2'2'-或 2'3'-连接;

N_1 、 N_2 、 $\dots N_n$ 和 $N_{1\#}$ 、 $N_{2\#}$ 、 $\dots N_{n\#}$ 分别是任意核苷酸或修饰核苷酸，其中 N_1 与 $N_{1\#}$ 形成碱基对、 N_2 与 $N_{2\#}$ 形成碱基对、 N_3 与 $N_{3\#}$ 形成碱基对、 $\dots N_n$ 与 $N_{n\#}$ 形成碱基对；

k 是 0-5 的整数；

m 是 2-10 的整数；

n 是 2-16 的整数；

p 是 1-6 的整数；并且

q 是 0-10 的整数。

24. 包含权利要求 1 或 23 的免疫刺激性核酸分子的组合物，其中 $Z_1 [(X_1 Y_1 R_1) N (X_2 Y_2 R_2)_k Z_2]_p (S_1)_q$ 是非回文序列。

25. 包含权利要求 1 或 23 的免疫刺激性核酸分子的组合物，其中 $Z_1 [(X_1 Y_1 R_1) N (X_2 Y_2 R_2)_k Z_2]_p (S_1)_q$ 是 TCGTCGTTTT (SEQ ID NO:40)，TCGTCGTLL, TCGA, TCGAC, TCGACGTC 或 TCGACGTCG，其中 L 是 dSpacer。

26. 包含权利要求 1 或 23 的免疫刺激性核酸分子的组合物，其中 $Z_1 [(X_1 Y_1 R_1) N (X_2 Y_2 R_2)_k Z_2]_p (S_1)_q$ 是回文序列。

27. 权利要求 1 或 23 的免疫刺激性核酸分子，其中 $Z_1 [(X_1 Y_1 R_1) N (X_2 Y_2 R_2)_k Z_2]_p (S_1)_q$ 是 TCGACGTCGA (SEQ ID NO:19) 或 TCGTCGACGA (SEQ ID NO:34)。

28. 权利要求 1 或 23 的免疫刺激性核酸分子，其中 $Z_1 [(X_1 Y_1 R_1) N (X_2 Y_2 R_2)_k Z_2]_p (S_1)_q$ 是 TCGCGACGTT (SEQ ID NO:26) 或 TCGCGTCGTT (SEQ ID NO:69)。

29. 权利要求 1 的免疫刺激性核酸分子，其中 $(N_n) \dots (N_2)(N_1) S_2 (N_{1\#})(N_{2\#}) \dots (N_{n\#}) Z_3$ 包含序列

AGCGAAGCT,

CAATATTTATTG (SEQ ID NO:1),

CCGTTTTGTGG (SEQ ID NO:2),

CGGCGCCGTGCCG (SEQ ID NO:19),

CGGCGCCGTTGCCG (SEQ ID NO:34),

CGGCGLLCGCCG (SEQ ID NO:5),

CGGCGLLLTGCCG (SEQ ID NO:6),

CGGCGLLCCGCCG (SEQ ID NO:7),

CGGCGTCGCCGCCG (SEQ ID NO:8),
CGTCGACGGGACGGG (SEQ ID NO:10),
CGTCGACGTGACGGG (SEQ ID NO:11),
GAGAGTTGGGCTCTC (SEQ ID NO:12),
GTCGAGGAGGT (SEQ ID NO:14),
TAATALLTATTA (SEQ ID NO:15),
TAATATCCATTA (SEQ ID NO:16)或
TAATATTTATTA (SEQ ID NO:17),

其中 L 是 dSpacer。

30. 权利要求 1 的免疫刺激性核酸分子, 其中 $(N_n) \dots (N_2)(N_1) S_2 (N_{1\#})(N_{2\#}) \dots (N_{m\#})$ 包含序列 GCGCGCTGCCG (SEQ ID NO:13)。

31. 权利要求 1 的免疫刺激性核酸分子, 包含序列
TCGACGTCGACCGTTTTGTGG (SEQ ID NO:20),
TCGACGTCGACGGGACGGG (SEQ ID NO:21),
TCGACGTCGACGTGACGGG (SEQ ID NO:22),
TCGACGTCGAGAGTTGGGCTCTC (SEQ ID NO:23),
TCGACGTCGAGCGAAGCT (SEQ ID NO:24)或
TCGACGTCGAGGAGGT (SEQ ID NO:25)。

32. 权利要求 1 的免疫刺激性核酸分子, 包含序列
TCGTCGTTLLACGGCGCCGTGCCG (SEQ ID NO:37),
TCGTCGTTLLACGGCGLLLTGCCG (SEQ ID NO:38),
TCGTCGTTLLCGGCGCGGCGCCG (SEQ ID NO:39),
TCGTCGTTTTACGGCGCCGTGCGG (SEQ ID NO:44),
TCGTCGTTTTACGGCGLLLTGCCG (SEQ ID NO:45),
TCGTCGTTTTACGGCGTTTTGCGG (SEQ ID NO:49),
TCGTCGTTTTCAATATTTATTG (SEQ ID NO:50),
TCGTCGTTTTCGGCGLLCGCCG (SEQ ID NO:52),
TCGTCGTTTTCGGCGLLCGCCG (SEQ ID NO:54),
TCGTCGTTTTCGGCGTCGCCGCCG (SEQ ID NO:55),
TCGTCGTTTTTAATALLTATTA (SEQ ID NO:57),
TCGTCGTTTTTAATATCCATTA (SEQ ID NO:58)或

TCGTCGTTTTTAATATTTATTA (SEQ ID NO:59),

其中 L 是 dSpacer。

33. 权利要求 1 的免疫刺激性核酸分子, 包含序列
TCGCGTCGTTTCGGCGCGCTGCCG (SEQ ID NO:30)。

34. 权利要求 1 的免疫刺激性核酸分子, 包含序列
TCGCGACGTTTCGGCGCGCTGCCG (SEQ ID NO:27)。

35. 权利要求 1 的免疫刺激性核酸分子, 包含选自以下的序列:

T*C*G*T*C*G*T*T*T*A*C_G*G*C_G*C*C_G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:43),
T*C*G*T*C_G*T*T*T*A*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:43),
T*C*G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*A*C*G*C*C*G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:42),
T*C*G*T*C*G*C*T*T*T*G*C*G*A*C*G*C*C*G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:36),
T*C*G*T*C*G*C*C*C*G*G*C*G*A*C*G*C*C*G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:35),
T*C*G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*C*C*G*T*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:44),
T*C*G*T*C*G*T*T*L*L*A*C*G*G*C*G*C*C*G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:37),
T*C*G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*L*L*L*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:45),
T*C*G*T*C*G*T*T*L*L*A*C*G*G*C*G*L*L*L*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:38),
T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*G*L*L*C*C*G*C*C*G (SEQ ID NO:54),
T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*T*C*G*C*C*G*C*C*G (SEQ ID NO:55),
T*C*G*T*C*G*T*T*L*L*C*G*G*C*G*C*G*G*C*G*C*C*G (SEQ ID NO:39),
T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*L*L*C*G*C*C*G (SEQ ID NO:52),
T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*A*A*T*A*T*T*T*A*T*T*A (SEQ ID NO:59),
T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*A*A*T*A*T*T*T*A*T*T*A (SEQ ID NO:59),
T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*C*A*A*T*A*T*T*T*A*T*T*G (SEQ ID NO:50),
T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*A*A*T*A*T*C*C*A*T*T*A (SEQ ID NO:58),
T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*A*A*T*A*L*L*T*A*T*T*A (SEQ ID NO:57),
T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*A*C*G*G*C*G*L*L*L*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:45),
T*C*G*T*C_G*T*T*L*L*A*C*G*G*C*G*L*L*L*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:38), 和
T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*G*L*L*C*C*G*C*C*G (SEQ ID NO:54).

其中 L 是 dSpacer, *是硫代磷酸酯, _是磷酸二酯。

36. 权利要求 1 的免疫刺激性核酸分子, 包含选自以下的序列:

T*C*G*A*C*G*T*C*G_A_C*G*G*G*A*C*G*G*G (SEQ ID NO:21),
 T*C*G*A*C*G*T*C*G_A_C*G*T*G*A*C*G*G*G (SEQ ID NO:22),
 T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*C*G*G*G*A*C*G*G*G (SEQ ID NO:21),
 T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*G*G*A*G*G*T (SEQ ID NO:25),
 T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*G*C*G*A*A*G*C*T (SEQ ID NO:24),
 T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*C*C*G*T*T*T*G*T*G*G (SEQ ID NO:20)和
 T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*G*A*G*T*T*G*G*G*C*T*C*T*C (SEQ ID NO:23),

其中*是硫代磷酸酯，_是磷酸二酯。

37. 权利要求 1 的免疫刺激性核酸分子，包含选自以下的序列：

T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*C*G*T*G*A*C*G*T*G (SEQ ID NO:62),
 T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*C*G*T*G*A*C*G (SEQ ID NO:61),
 T*C_G*T*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:65),
 T*C*G*T*C_G*T*A*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:66),
 T*C*G*T*C_G*T*T*A*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:67),
 T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*C*G*T*G*A*C*G*T*T (SEQ ID NO:63),
 T*C*G*T*C_G*A*C_G*A*T*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:64),
 T*C*G*T*C*G*A*C*G*A_T_C*G*G*C*G*C*C*G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:64),
 T*C*G*A*C_G*T*C*G*A*C_G*T*G*A*C*G*T*T (SEQ ID NO:63),
 T*C*G*A*C_G*T*C*G*A*C*G*T_G*A*C*G*T*T (SEQ ID NO:63)和
 T*C*G*T*C_G*T*T*T*A*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G*T (SEQ ID NO:68),

其中*是硫代磷酸酯，_是磷酸二酯。

38. 权利要求 1 的免疫刺激性核酸分子，包含选自以下的序列：

T*C*G*C_G*T*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:30),
 T*C*G_C*G*T*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:30), 和
 T*C*G*C*G_T*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:30),

其中*是硫代磷酸酯，_是磷酸二酯。

39. 权利要求 1 的免疫刺激性核酸分子，包含序列

T*C*G*C_G*A*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:27),

其中*是硫代磷酸酯，_是磷酸二酯。

40. 权利要求 1 的免疫刺激性核酸分子，包含选自以下的序列：

T*C_G*T*C*G*T*T*T*T*A*C*G*G*C*G*T*C*G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:48),
T*C_G*T*C*G*T*T*T*T*A*C*G*G*C*G*T*C*G*C*G*C*C*G (SEQ ID NO:47), 和
T*C_G*T*C*G*T*T*T*T*A*C*G*G*C*G*T*C*G*C*G (SEQ ID NO:46),

其中*是硫代磷酸酯，_是磷酸二酯。

41. 权利要求 1 的免疫刺激性核酸分子，包含序列

T*C_G*T*C*G*T*T*T*T*A*C*G*G*C*G*T*C*G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:48),

其中*是硫代磷酸酯，_是磷酸二酯。

42. 权利要求 1 的免疫刺激性核酸分子，其中所述寡核苷酸中至少一个核苷酸是取代或修饰的嘌呤或嘧啶。

43. 权利要求 42 的免疫刺激性核酸分子，其中所述取代的嘧啶是 C5-或 C6-取代的嘧啶。

44. 权利要求 42 的免疫刺激性核酸分子，其中所述取代的嘌呤是 C8-或 C7-取代的嘌呤。

45. 权利要求 42 的免疫刺激性核酸分子，其中所述取代或修饰的嘌呤或嘧啶选自：

5-取代胞嘧啶、6-取代胞嘧啶、N4-取代胞嘧啶、5-氮杂胞嘧啶、2-巯基-胞嘧啶、异胞嘧啶、假-异胞嘧啶、带稠环系统的胞嘧啶类似物和尿嘧啶衍生物、胸腺嘧啶衍生物、7-去氮杂鸟嘌呤、7-去氮杂-7-取代鸟嘌呤、7-去氮杂-8-取代鸟嘌呤、7-去氮杂-8-氮杂鸟嘌呤、次黄嘌呤、N2-取代鸟嘌呤、5-氨基-3-甲基-3H,6H-嘧啶并[4,5-d]嘧啶-2,7-二酮、2,6-二氨基嘌呤、2-氨基嘌呤、嘌呤、吡啶、取代腺嘌呤、8-取代鸟嘌呤和 6-硫代鸟嘌呤。

46. 权利要求 42 的免疫刺激性核酸分子，其中所述取代或修饰的嘌呤或嘧啶选自：

5-甲基胞嘧啶、5-氟胞嘧啶、5-氯胞嘧啶、5-溴胞嘧啶、5-碘胞嘧啶、5-羟基胞嘧啶、6-羟基胞嘧啶、5-羟甲基胞嘧啶、5-二氟甲基胞嘧啶和未取代或取代 5-炔基胞嘧啶、N4-乙基胞嘧啶、N,N'-亚丙基胞嘧啶、吩噻嗪、5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-溴乙烯基尿嘧啶、4-硫代尿嘧啶、5-羟基尿嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶、2-硫代胸腺嘧啶、4-硫代胸腺嘧啶、6-取代胸腺嘧啶、7-去氮杂-7-(C2-C6)炔基鸟嘌呤、N2-甲基-鸟嘌呤、N6-甲基-腺嘌呤、8-氧杂腺嘌呤、8-羟基鸟嘌呤和 8-溴鸟嘌呤。

47. 权利要求 42 的免疫刺激性核酸分子，其中所述取代或修饰的嘌呤或嘧啶选自：

通用碱基、芳环系统、芳环系统和氢原子 (dSpacer)。

48. 权利要求 42 的免疫刺激性核酸分子, 其中所述取代或修饰的嘌呤或嘧啶选自: 4-甲基咪唑、5-硝基咪唑、3-硝基吡咯、P-碱基和 K-碱基、苯并咪唑、二氯苯并咪唑、1-甲基-1H-[1,2,4]三唑-3-羧酰胺、氟苯和二氟苯。

49. 权利要求 1 的免疫刺激性核酸分子, 其中 N、S、X 或 Z 中任意一个被选自下组的残基取代: C6-C30 烷基链、胆汁酸、胆酸、牛磺胆酸、脱氧胆酸、胆固醇、*oleyl lithocholic acid*、油酰胆烯酸、糖脂、磷脂、鞘脂、类异戊二烯、类固醇、维生素、维生素 E、饱和脂肪酸、不饱和脂肪酸、脂肪酸酯、甘油三酯、萜类、卟啉类、*Texaphyrine*、金刚烷、吡啶类、生物素、香豆素、荧光素、罗丹明、德克萨斯红、地高辛、二甲氧基三苯甲基、叔丁基二甲基硅烷基、叔丁基二苯基硅烷基、花青染料、花青染料 Cy3、花青染料 Cy576、*Hoechst 33258* 染料、补骨脂素和布洛芬。

50. 免疫刺激性核酸分子, 包括

(a) 5'端, 始于选自(TCG)_nN 和 RDCGY₁Y₂N 的免疫刺激性基序, 其中 T 是胸腺嘧啶, C 是未甲基化胞嘧啶, G 是鸟嘌呤, R 是嘌呤, D 不是 C, Y₁ 和 Y₂ 相互独立地是嘧啶, n 是 1-4 之间的整数, 包括两端, N 是 0-12 个碱基长的任意序列;

(b) 3'端, 以能形成发夹或茎环结构的反向重复终止, 所述结构包括

长 2-6 个连续碱基对的富含 GC 的茎, 和

至少一个未匹配或错配碱基; 和

(c) 部分稳定化的骨架, 包含至少一个 5'-CpG-3'磷酸二酯键。

51. 权利要求 50 的免疫刺激性核酸分子, 其中富含 GC 的茎是 2 个连续碱基对长。

52. 权利要求 50 的免疫刺激性核酸分子, 其中富含 GC 的茎是 3 个连续碱基对长。

53. 权利要求 50 的免疫刺激性核酸分子, 其中富含 GC 的茎是 4 个连续碱基对长。

54. 权利要求 50 的免疫刺激性核酸分子, 其中富含 GC 的茎是 5 个连续碱基对长。

55. 权利要求 50 的免疫刺激性核酸分子, 其中富含 GC 的茎是 6 个连续碱基对长。

56. 权利要求 50 的免疫刺激性核酸分子, 其中富含 GC 的茎包含至少 2 个 G-C 碱基对。

57. 权利要求 50 的免疫刺激性核酸分子, 其中富含 GC 的茎包含至少 3 个 G-C 碱基对。

58. 权利要求 50-57 中任意一项的免疫刺激性核酸分子, 其中所述至少一个未匹配或错配的碱基是 T。

59. 权利要求 50 的免疫刺激性核酸分子, 其中所述包括至少一个 5'-CpG-3'磷酸二酯键的部分稳定化骨架还包含多个核苷酸间硫代磷酸酯键。

60. 权利要求 50 的免疫刺激性核酸分子, 其中所述 5'端具有序列 TCGTCGTTTTA (SEQ ID NO:41)。

61. 权利要求 50 的免疫刺激性核酸分子, 其中所述以反向重复终止的 3'端具有碱基序列 CGGCGCCGTGCCG (SEQ ID NO:19)。

62. 权利要求 50 的免疫刺激性核酸分子, 其中所述以反向重复终止的 3'端具有碱基序列 CGGCGTCGTGCCG (SEQ ID NO:9)。

63. 具有以下碱基序列的免疫刺激性核酸:

TCGTCGTTTTACGGCGCCGTGCCG (SEQ ID NO:43)。

64. 具有以下碱基序列的免疫刺激性核酸:

TCGTCGTTTTACGGCGTCGTGCCG (SEQ ID NO:48)。

65. 具有以下碱基序列的免疫刺激性核酸:

T*C_G*T*C*G*T*T*T*T*A*C*G*G*C*G*C*C*G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:43),

其中*代表核苷酸间硫代磷酸酯键, _代表核苷酸间磷酸二酯键。

66. 具有以下碱基序列的免疫刺激性核酸:

T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*A*C_G*G*C_G*C*C_G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:43),

其中*代表核苷酸间硫代磷酸酯键, _代表核苷酸间磷酸二酯键。

67. 具有以下碱基序列的免疫刺激性核酸:

T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*A*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:43),

其中*代表核苷酸间硫代磷酸酯键, _代表核苷酸间磷酸二酯键。

68. 具有以下碱基序列的免疫刺激性核酸:

T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*A*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:43),

其中*代表核苷酸间硫代磷酸酯键, _代表核苷酸间磷酸二酯键。

69. 包含权利要求 1-68 中任意一项的免疫刺激性核酸分子和抗原的疫苗。

70. 包含权利要求 1-68 中任意一项的免疫刺激性核酸分子和药学上可接受载体的药

物组合物。

71. 诱导 I 型干扰素 (IFN) 表达的方法, 包括:

使能表达 I 型 IFN 的细胞与权利要求 1-68 中任意一项的免疫刺激性核酸接触, 所述核酸的量可以有效诱导 I 型 IFN 表达。

72. 权利要求 71 的方法, 其中所述 I 型 IFN 是干扰素 α (IFN- α)。

73. 诱导 γ 干扰素 (IFN- γ) 表达的方法, 包括:

使能表达 IFN- γ 的细胞与权利要求 1-68 中任意一项的免疫刺激性核酸接触, 所述核酸的量可以有效诱导 IFN- γ 表达。

74. 活化自然杀伤 (NK) 细胞的方法, 包括:

使 NK 细胞与权利要求 1-68 中任意一项的免疫刺激性核酸接触, 所述核酸的量可以有效活化 NK 细胞。

75. 治疗感染的方法, 包括:

向患有感染或有发生感染风险的对象给予权利要求 1-68 中任意一项的免疫刺激性核酸, 所述核酸的量可以有效治疗或预防感染。

76. 权利要求 75 的方法, 其中所述对象患有以下感染或有发生以下感染的风险: 病毒、细菌、真菌或寄生虫感染。

77. 权利要求 75 的方法, 其中所述对象患有病毒感染或有发生病毒感染的风险, 其中病毒选自乙肝病毒 (HBV)、丙肝病毒 (HCV)、巨细胞病毒 (CMV)、EB 病毒 (EBV)、乳头瘤病毒、人免疫缺陷病毒 (HIV) 或单纯疱疹病毒 (HSV)。

78. 权利要求 75 的方法, 其中所述对象患有细菌感染或有发生细菌感染的风险, 其中细菌物种选自利什曼虫属、利斯特氏菌属或炭疽。

79. 治疗变态反应疾病的方法, 包括:

向患有变态反应疾病或有发生风险的对象给予权利要求 1-68 中任意一项的免疫刺激性核酸, 所述核酸的量可以有效治疗或预防变态反应疾病。

80. 权利要求 79 的方法, 其中所述变态反应疾病是变态反应性哮喘。

81. 治疗癌症的方法, 包括:

向患有癌症或有发生癌症风险的对象给予权利要求 1-68 中任意一项的免疫刺激性核酸, 所述核酸的量可以有效治疗或预防癌症。

82. 权利要求 81 的方法，其中所述癌症选自：基底细胞癌、胆管癌、膀胱癌、骨癌、脑和中枢神经系统癌症、乳癌、宫颈癌、绒膜癌、结直肠癌、结缔组织癌症、消化系统癌症、子宫内膜癌、食管癌、眼癌、头颈癌、胃癌、上皮内赘生物、肾癌、喉癌、白血病、肝癌、肺癌、包括何杰金和非何杰金氏淋巴瘤的淋巴瘤、黑素瘤、骨髓瘤、神经母细胞瘤、口腔癌、卵巢癌、胰癌、前列腺癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、直肠癌、肾癌、呼吸系统癌症、肉瘤、皮肤癌、胃癌、睾丸癌、甲状腺癌、子宫癌、泌尿系统癌症，或其它癌和肉瘤。

83. 权利要求 81 的方法，其中所述癌症是对干扰素 α (IFN- α) 治疗敏感的癌症。

84. 权利要求 83 的方法，其中所述对 IFN- α 治疗敏感的癌症选自毛细胞白血病、慢性髓性白血病、皮肤 T 细胞白血病、多发性骨髓瘤、滤泡淋巴瘤、恶性黑素瘤、鳞细胞癌、AIDS 相关卡波希肉瘤、肾细胞癌、前列腺癌、宫颈发育异常或结肠癌。

85. 权利要求 1-68 中任意一项的免疫刺激性核酸在制造用于治疗感染的药物中的用途。

86. 权利要求 1-68 中任意一项的免疫刺激性核酸在制造用于治疗变态反应疾病的药物中的用途。

84. 权利要求 1-68 中任意一项的免疫刺激性核酸在制造用于治疗变态反应性哮喘的药物中的用途。

85. 权利要求 1-68 中任意一项的免疫刺激性核酸在制造用于治疗癌症的药物中的用途。

具有增强免疫刺激能力的 C 类寡核苷酸类似物

发明领域

本发明大体涉及免疫刺激性核酸、其组合物和使用免疫刺激性核酸的方法。

发明背景

细菌 DNA 具有活化 B 细胞和自然杀伤细胞的免疫刺激作用，但脊椎动物 DNA 不行。Tokunaga T et al. (1988) *Jpn J Cancer Res* 79:682-6; Tokunaga T et al. (1984) *JNCI* 72:955-62; Messina JP et al. (1991) *J Immunol* 147:1759-64; 并有以下综述：Krieg, 1998, In: *Applied Oligonucleotide Technology*, C.A. Stein and A.M. Krieg, (Eds.), John Wiley and Sons, Inc., New York, NY, pp. 431-448) and Krieg AM (2002) *Annu Rev Immunol* 20:709-60。现已知道细菌 DNA 的这些免疫刺激作用是由于在特定碱基环境中存在未甲基化的 CpG 二核苷酸 (CpG 基序)，这在细菌 DNA 中常见，但在脊椎动物 DNA 中它们被甲基化而没有代表性。Krieg AM et al. (1995) *Nature* 374:546-9; Krieg AM (1999) *Biochim Biophys Acta* 1489:107-16.

细菌 DNA 的免疫刺激作用可用含这些 CpG 基序的合成寡核苷酸 (ODN) 模拟。这种 CpG ODN 对人和小鼠白细胞具有高度刺激作用，诱导 B 细胞增殖；细胞因子和免疫球蛋白分泌；自然杀伤 (NK) 细胞裂解活性和 γ 干扰素 (IFN- γ) 分泌；并活化树突细胞 (DC) 和其它抗原提呈细胞表达共刺激分子和分泌细胞因子，尤其是对于促进 Th1 样 T 细胞应答重要的 Th1 样细胞因子。天然磷酸二酯骨架 CpG ODN 的这些免疫刺激作用是高度 CpG 特异性的，如果 CpG 基序被甲基化、改变成 GpC 或消除或改变，这些作用则大大降低。Krieg AM et al. (1995) *Nature* 374:546-9; Hartmann G et al. (1999) *Proc Natl. Acad Sci USA* 96:9305-10.

早期研究中认为，免疫刺激性 CpG 基序符合下列通式：嘌呤—嘌呤—CpG—嘧啶—嘧啶。Krieg AM et al. (1995) *Nature* 374:546-9; Pisetsky DS (1996) *J Immunol* 156:421-3; Hacker H et al. (1998) *EMBO J* 17:6230-40; Lipford GB et al. (1998) *Trends*

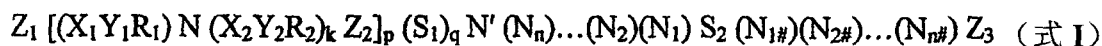
Microbiol 6:496-500. 然而, 现已清楚, 小鼠淋巴细胞对不符合该“式”的磷酸二酯 CpG 基序具有非常好的应答 (Yi AK et al.(1998) *J Immunol* 160:5898-906), 并且对于人 B 细胞和树突细胞也是如此 (Hartmann G et al. (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* 96:9305-10; Liang H et al. (1996) *J Clin Invest* 98:1119-29)。

发明内容

本发明部分涉及含 CpG 的免疫刺激性寡核苷酸和寡核苷酸类似物, 在分子 3' 端或附近具有反向重复的二级结构。在一定条件下该二级结构参与形成双链体或高级结构。作为本发明寡核苷酸和寡核苷酸类似物的重要特性, 反向重复不是严格的沃森-克里克回文, 而可以被间插序列或核苷酸类似物中断。作为本发明寡核苷酸和寡核苷酸类似物的另一个特性, 可以修饰骨架以包括策略性放置的核酸酶抗性和核酸酶敏感性核苷酸间连键, 从而既有利于活性又降低潜在毒性。此外, 已发现这些寡核苷酸和寡核苷酸类似物同时具有 A 类和 B 类免疫刺激活性, 因此被分类为新的 C 类免疫刺激性核酸分子。

本发明部分是基于发明人的这一发现, 在分子 3' 端处或附近含有不完善回文的、含 CpG 的免疫刺激性寡核苷酸和寡核苷酸类似物在其制备和生物活性上具有某些优点。具体而言, 本发明的 C 类寡核苷酸和寡核苷酸类似物在溶液中特征性地是单体。据信这些相同核酸分子可以在体外形成分子内双链结构, 使之对核酸酶消化更稳定。也相信在核内体区隔内 (intraendosomal compartment) 的环境中这些相同核酸分子可以形成分子间双链甚至可能形成高级结构, 并在内体中发挥其生物活性。

在本发明的一个方面, 提供包括式 I 的免疫刺激性核酸分子的组合物。



其中 Z_1 、 Z_2 和 Z_3 相互独立地是 0-12 个核苷酸长的任意序列, 其任选地包含非核苷酸连接子或无碱基 dSpacer; X_1 和 X_2 相互独立地是含胸腺嘧啶、尿嘧啶、腺嘌呤或 5-取代尿嘧啶的核苷酸; Y_1 和 Y_2 相互独立地是胞嘧啶 (C) 或修饰胞嘧啶; R_1 和 R_2 相互独立地是鸟嘌呤 (G) 或修饰鸟嘌呤; N 和 N' 相互独立地是 0-12 个核苷酸长的任意序列, 其任选地包含非核苷酸连接子或无碱基 dSpacer; S_1 是非核苷酸连接子、

无碱基连接子 (dSpacer)、三乙二醇单元或六乙二醇单元, 任选地提供 2'5'-、5'5'-、3'3'-、2'2'-或 2'3'-核苷间连键; S_2 是 1-10 个核苷酸长的任意非回文序列或非核苷酸连接子、无碱基连接子 (dSpacer)、三乙二醇单元或六乙二醇单元; N_1 、 N_2 、 $\dots N_n$ 和 $N_{1\#}$ 、 $N_{2\#}$ 、 $\dots N_{n\#}$ 分别是任意核苷酸或修饰核苷酸, 其中 N_1 与 $N_{1\#}$ 形成碱基对、 N_2 与 $N_{2\#}$ 形成碱基对、 $\dots N_n$ 与 $N_{n\#}$ 形成碱基对; k 是 0-5 的整数; n 是 2-16 的整数; p 是 1-6 的整数; q 是 0-10 的整数, 并且其中当 $(N_n)\dots(N_2)(N_1)S_2(N_{1\#})(N_{2\#})\dots(N_{n\#})$ 是 10-42 个核苷酸长时, S_2 是 4-10 个核苷酸长, S_2 包含非核苷酸连接子、无碱基连接子 (dSpacer)、三乙二醇单元或六乙二醇单元, 和/或 $(N_n)\dots(N_2)(N_1)S_2(N_{1\#})(N_{2\#})\dots(N_{n\#})$ 具有小于 2/3 的 GC 含量。

在一个实施方案中, N_1 、 N_2 、 $\dots N_n$ 和 $N_{1\#}$ 、 $N_{2\#}$ 、 $\dots N_{n\#}$ 分别选自 C、G 或其修饰物, 其中 C 与 G 碱基配对。

在一个实施方案中, N_1 、 N_2 、 $\dots N_n$ 和 $N_{1\#}$ 、 $N_{2\#}$ 、 $\dots N_{n\#}$ 分别选自 T、A 或其修饰物, 并且 T 与 A 碱基配对。

在这些和其它实施方案中, C、G、A 和 T 分别能表示具有对应碱基胞嘧啶、鸟嘌呤、腺嘌呤和胸腺嘧啶的脱氧核苷酸。

在一个实施方案中, N_1 、 N_2 、 $\dots N_n$ 和 $N_{1\#}$ 、 $N_{2\#}$ 、 $\dots N_{n\#}$ 分别选自 C、T、A、G 或其修饰物, 并且 C 与 G 碱基配对, T 与 G 碱基配对, A 与 T 碱基配对, A 与 G 碱基配对。

在一个实施方案中, N_1 、 N_2 、 $\dots N_n$ 和 $N_{1\#}$ 、 $N_{2\#}$ 、 $\dots N_{n\#}$ 分别选自形成沃森-克里克碱基对的未修饰或修饰核苷酸, 即各碱基对 N_1 - $N_{1\#}$ 、 N_2 - $N_{2\#}$ 、 $\dots N_n$ - $N_{n\#}$ 是沃森-克里克碱基对。

在一个实施方案中, 各 N_1 、 N_2 、 $\dots N_n$ 和 $N_{1\#}$ 、 $N_{2\#}$ 、 $\dots N_{n\#}$ 中至少一个选自形成非沃森-克里克碱基对的未修饰或修饰核苷酸, 即至少一个碱基对 N_1 - $N_{1\#}$ 、 N_2 - $N_{2\#}$ 、 $\dots N_n$ - $N_{n\#}$ 是非沃森-克里克碱基对。

在一个实施方案中, 所述免疫刺激性核酸分子包括具有至少一个磷酸二酯键的部分稳定化骨架。

在一个实施方案中, 所述免疫刺激性核酸分子包括具有至少一个稳定化核苷酸

间连键的骨架。

在一个实施方案中，所述寡核苷酸的核苷酸间连键都是硫代磷酸酯键。

在一个实施方案中，所述免疫刺激性核酸分子包括具有磷酸二酯键的部分稳定化骨架，所述磷酸二酯键连接 Y_1R_1 或 Y_2R_2 的至少一个。

在一个实施方案中， Y_1 是 C。

在一个实施方案中， R_1 是 G。

在一个实施方案中， Y_1 是 C， R_1 是 G。

在一个实施方案中， X_1 或 X_2 是 T。

在一个实施方案中， X_1 是 T， X_2 是 T， Y_1 是 C， R_1 是 G， k 是 1。

在一个实施方案中， X_1 是 T， X_2 是 T， Y_1 是 C， R_1 是 G， k 是 1， p 是 1， N 和 N' 和 Z_3 分别含 0 个核苷酸，并且 Z_2 是 TTTT 或 d(UUUU)，其中 d(UUUU)代表 dUdUdUdU 即(脱氧 U)₄。

在一个实施方案中， S_2 是非核苷酸连接子。

在一个实施方案中， S_2 含至少一个无碱基 dSpacer 残基。

在一个实施方案中，所述寡核苷酸包括至少一个带分支的非核苷连键。

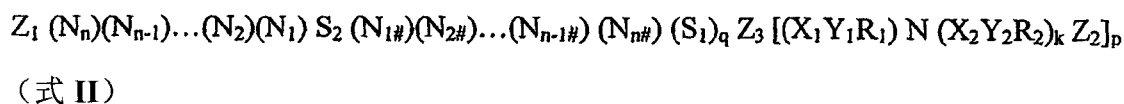
在一个实施方案中，所述免疫刺激性核酸分子包括至少一个双体 (doubler) 单元、至少一个三体 (trebler) 单元，或至少一个双体单元和至少一个三体单元。

在一个实施方案中， S_1 是双体单元或三体单元。

在一个实施方案中，所述寡核苷酸包括至少一个 2'5'、5'5'、3'3'、2'2'或 2'3'-核苷间连键。

在一个实施方案中，式 I 的免疫刺激性核酸分子不是反义核酸。

在本发明的一个方面，提供式 II 的免疫刺激性核酸分子。



其中 Z_1 、 Z_2 和 Z_3 相互独立地是 0-12 个核苷酸长的任意序列，其任选地包含非核苷酸连接子或无碱基 dSpacer； X_1 和 X_2 相互独立地是含胸腺嘧啶、尿嘧啶、腺嘌呤或 5-取代尿嘧啶的核苷酸； Y_1 和 Y_2 相互独立地是胞嘧啶 (C) 或修饰胞嘧啶； R_1 和 R_2

相互独立地是鸟嘌呤 (G) 或修饰鸟嘌呤; N 是 0-12 个核苷酸长的任意序列, 其任选地包含非核苷酸连接子或无碱基 dSpacer; S_1 是非核苷酸连接子、无碱基连接子 (dSpacer)、三乙二醇单元或六乙二醇单元, 任选地提供 2'5'-、5'5'-、3'3'-、2'2'-或 2'3'-核苷间连键; S_2 是 1-10 个核苷酸长的任意非回文序列或非核苷酸连接子、无碱基连接子 (dSpacer)、三乙二醇单元或六乙二醇单元; N_1 、 N_2 、 $\dots N_{n-1}$ 、 N_n 和 $N_{1\#}$ 、 $N_{2\#}$ 、 $\dots N_{n-1\#}$ 、 $N_{n\#}$ 分别是任意核苷酸或修饰核苷酸, 其中 N_1 与 $N_{1\#}$ 形成碱基对、 N_2 与 $N_{2\#}$ 形成碱基对、 $\dots N_{n-1}$ 与 $N_{n-1\#}$ 形成碱基对, N_n 与 $N_{n\#}$ 形成碱基对; k 是 0-5 的整数; n 是 2-16 的整数; p 是 1-6 的整数; q 是 0-10 的整数, 并且其中当 $(N_n)\dots(N_2)(N_1)S_2(N_{1\#})(N_{2\#})\dots(N_{n\#})$ 是 10-42 个核苷酸长时, S_2 是 4-10 个核苷酸长, S_2 包含非核苷酸连接子、无碱基连接子 (dSpacer)、三乙二醇单元或六乙二醇单元, 和/或 $(N_n)\dots(N_2)(N_1)S_2(N_{1\#})(N_{2\#})\dots(N_{n\#})$ 具有小于 2/3 的 GC 含量。

在一个实施方案中, $Z_1(N_n)(N_{n-1})$ 是 TYR, 其中 Y 是胞嘧啶或修饰胞嘧啶, R 是鸟嘌呤或修饰鸟嘌呤。

在一个实施方案中, N_1 、 N_2 、 $\dots N_{n-1}$ 、 N_n 和 $N_{1\#}$ 、 $N_{2\#}$ 、 $\dots N_{n-1\#}$ 、 $N_{n\#}$ 分别选自 C、G 或其修饰物, 其中 C 与 G 碱基配对。

在一个实施方案中, N_1 、 N_2 、 $\dots N_{n-1}$ 、 N_n 和 $N_{1\#}$ 、 $N_{2\#}$ 、 $\dots N_{n-1\#}$ 、 $N_{n\#}$ 分别选自 T、A 或其修饰物, 并且 T 与 A 碱基配对。

在这些和其它实施方案中, C、G、A 和 T 分别能表示具有对应碱基胞嘧啶、鸟嘌呤、腺嘌呤和胸腺嘧啶的脱氧核苷酸。

在一个实施方案中, N_1 、 N_2 、 $\dots N_{n-1}$ 、 N_n 和 $N_{1\#}$ 、 $N_{2\#}$ 、 $\dots N_{n-1\#}$ 、 $N_{n\#}$ 分别选自 C、T、A、G 或其修饰物, 并且 C 与 G 碱基配对, T 与 G 碱基配对, A 与 T 碱基配对, A 与 G 碱基配对。

在一个实施方案中, N_1 、 N_2 、 $\dots N_{n-1}$ 、 N_n 和 $N_{1\#}$ 、 $N_{2\#}$ 、 $\dots N_{n-1\#}$ 、 $N_{n\#}$ 分别选自形成沃森-克里克碱基对的未修饰或修饰核苷酸, 即各碱基对 N_1 - $N_{1\#}$ 、 N_2 - $N_{2\#}$ 、 $\dots N_n$ - $N_{n\#}$ 是沃森-克里克碱基对。

在一个实施方案中, 各 N_1 、 N_2 、 $\dots N_{n-1}$ 、 N_n 和 $N_{1\#}$ 、 $N_{2\#}$ 、 $\dots N_{n-1\#}$ 、 $N_{n\#}$ 中至少一个选自形成非沃森-克里克碱基对的未修饰或修饰核苷酸, 即至少一个碱基对

$N_1-N_{1\#}$ 、 $N_2-N_{2\#}$ 、 $\cdots N_n-N_{n\#}$ 是非沃森-克里克碱基对。

在一个实施方案中，所述免疫刺激性核酸分子包括具有至少一个磷酸二酯键的部分稳定化骨架。

在一个实施方案中，所述免疫刺激性核酸分子包括具有至少一个稳定化核苷酸间连键的骨架。

在一个实施方案中，所述寡核苷酸的核苷酸间连键都是硫代磷酸酯键。

在一个实施方案中，所述免疫刺激性核酸分子包括具有磷酸二酯键的部分稳定化骨架，所述磷酸二酯键连接 Y_1R_1 或 Y_2R_2 的至少一个。

在一个实施方案中， Y_1 是 C。

在一个实施方案中， R_1 是 G。

在一个实施方案中， Y_1 是 C， R_1 是 G。

在一个实施方案中， X_1 或 X_2 是 T。

在一个实施方案中， X_1 是 T， X_2 是 T， Y_1 是 C， R_1 是 G， k 是 1。

在一个实施方案中， X_1 是 T， X_2 是 T， Y_1 是 C， R_1 是 G， k 是 1， p 是 1， N 和 N' 和 Z_3 分别含 0 个核苷酸，并且 Z_2 是 TTTT 或 d(UUUU)，其中 d(UUUU)代表(脱氧 U)₄。

在一个实施方案中， S_2 是非核苷酸连接子。

在一个实施方案中， S_2 含至少一个无碱基 dSpacer 残基。

在一个实施方案中，所述寡核苷酸包括至少一个带分支的非核苷连键。

在一个实施方案中，所述免疫刺激性核酸分子包括至少一个双体单元、至少一个三体单元，或至少一个双体单元和至少一个三体单元。

在一个实施方案中， S_1 是双体单元或三体单元。

在一个实施方案中，所述寡核苷酸包括至少一个 2'5'-、5'5'-、3'3'-、2'2'-或 2'3'-核苷间连键。

在一个实施方案中，式 I 的免疫刺激性核酸分子不是反义核酸。

在本发明的一个方中，提供式 III 的免疫刺激性核酸分子。

$(Z')_mZ_3(S_3)$ (式 III)

其中 Z' 是 $Z_1 [(X_1 Y_1 R_1) N (X_2 Y_2 R_2)_k Z_2]_p (S_1)_q N' (N_n) \dots (N_3)(N_2)(N_1) S_2 (N_{1\#})(N_{2\#})(N_{3\#}) \dots (N_{n\#})$; Z_1 、 Z_2 和 Z_3 相互独立地是 0-12 个核苷酸长的任意序列, 其任选地包含非核苷酸连接子或无碱基 dSpacer; X_1 和 X_2 相互独立地是含胸腺嘧啶、尿嘧啶、腺嘌呤或 5-取代尿嘧啶的核苷酸; Y_1 和 Y_2 相互独立地是胞嘧啶或修饰胞嘧啶; R_1 和 R_2 相互独立地是鸟嘌呤或修饰鸟嘌呤; N 和 N' 互相独立地是 0-12 个核苷酸长的任意序列, 其任选地包含非核苷酸连接子或无碱基 dSpacer; S_1 是非核苷酸连接子、无碱基连接子 (dSpacer)、三乙二醇单元或六乙二醇单元, 任选地提供 2'5'-、5'5'-、3'3'-、2'2'-或 2'3'-核苷间连键; S_2 是 1-10 个核苷酸长的任意非回文序列或非核苷酸连接子、无碱基连接子 (dSpacer)、三乙二醇单元或六乙二醇单元; S_3 是直接或间接的 2'5'-、5'5'-、3'3'-、2'2'-或 2'3'-核苷间连键或非核苷酸连接子, 所述非核苷酸连接子包括无碱基连接子 (dSpacer)、三乙二醇单元或六乙二醇单元, 有助于 m 序列部分的 2'5'-、5'5'-、3'3'-、2'2'-或 2'3'-连键; N_1 、 N_2 、 $\dots N_n$ 和 $N_{1\#}$ 、 $N_{2\#}$ 、 $\dots N_{n\#}$ 分别是任意核苷酸或修饰核苷酸, 其中 N_1 与 $N_{1\#}$ 形成碱基对、 N_2 与 $N_{2\#}$ 形成碱基对、 $\dots N_n$ 与 $N_{n\#}$ 形成碱基对; k 是 0-5 的整数; m 是 2-10 的整数; n 是 2-16 的整数; p 是 1-6 的整数; q 是 0-10 的整数。

在某些实施方案中, $Z_1 [(X_1 Y_1 R_1) N (X_2 Y_2 R_2)_k Z_2]_p (S_1)_q$ 是非回文序列。

在某些实施方案中, $Z_1 [(X_1 Y_1 R_1) N (X_2 Y_2 R_2)_k Z_2]_p (S_1)_q$ 是 TCGTCGTTTT (SEQ ID NO:40), TCGTCGTLL, TCGA, TCGAC, TCGACGTC 或 TCGACGTCG, 其中 L 是 dSpacer。

在某些实施方案中, $Z_1 [(X_1 Y_1 R_1) N (X_2 Y_2 R_2)_k Z_2]_p (S_1)_q$ 是回文序列。

在某些实施方案中, $Z_1 [(X_1 Y_1 R_1) N (X_2 Y_2 R_2)_k Z_2]_p (S_1)_q$ 是 TCGACGTCGA (SEQ ID NO:19) 或 TCGTCGACGA (SEQ ID NO:34)。

在某些实施方案中, $Z_1 [(X_1 Y_1 R_1) N (X_2 Y_2 R_2)_k Z_2]_p (S_1)_q$ 是 TCGCGACGTT (SEQ ID NO:26) 或 TCGCGTCGTT (SEQ ID NO:69)。

在一个实施方案中, $(N_n) \dots (N_2)(N_1) S_2 (N_{1\#})(N_{2\#}) \dots (N_{n\#}) Z_3$ 包含序列

AGCGAAGCT, CAATATTTATTG (SEQ ID NO:1), CCGTTTTGTGG (SEQ ID NO:2),
CGGCGCCGTGCCG (SEQ ID NO:19), CGGCGCCGTTGCCG (SEQ ID NO:34),
CGGCGLLCGCCG (SEQ ID NO:5), CGGCGLLLTGCCG (SEQ ID NO:6),
CGGCGLLCCGCCG (SEQ ID NO:7), CGGCGTCGCCGCCG (SEQ ID NO:8),
CGTCGACGGGACGGG (SEQ ID NO:10), CGTCGACGTGACGGG (SEQ ID NO:11),
GAGAGTTGGGCTCTC (SEQ ID NO:12), GTCGAGGAGGT (SEQ ID NO:14),
TAATALLTATTA (SEQ ID NO:15), TAATATCCATTA (SEQ ID NO:16),或
TAATATTTATTA (SEQ ID NO:17), 其中 L 是 dSpacer。

在一个实施方案中, $(N_n) \dots (N_2)(N_1) S_2 (N_{1\#})(N_{2\#}) \dots (N_{n\#})$ 包含序列
GGCGCGCTGCCG (SEQ ID NO:13)。

在一个实施方案中, 所述免疫刺激性核酸分子包含序列
TCGACGTCGACCGTTTTGTGG (SEQ ID NO:20),
TCGACGTCGACGGGACGGG (SEQ ID NO:21),
TCGACGTCGACGTGACGGG (SEQ ID NO:22),
TCGACGTCGAGAGTTGGGCTCTC (SEQ ID NO:23),
TCGACGTCGAGCGAAGCT (SEQ ID NO:24)或
TCGACGTCGAGGAGGT (SEQ ID NO:25)。

在一个实施方案中, 所述免疫刺激性核酸分子包含序列
TCGTCGTTLLACGGCGCCGTGCCG (SEQ ID NO:37),
TCGTCGTTLLACGGCGLLLTGCCG (SEQ ID NO:38),
TCGTCGTTLLCGGCGCGGCCG (SEQ ID NO:39),
TCGTCGTTTTACGGCGCCGTGCCG (SEQ ID NO:44),
TCGTCGTTTTACGGCGLLLTGCCG (SEQ ID NO:45),
TCGTCGTTTTACGGCGTTTTGCCG (SEQ ID NO:49),
TCGTCGTTTTCAATATTTATTG (SEQ ID NO:50),
TCGTCGTTTTCGGCGLLCGCCG (SEQ ID NO:52),
TCGTCGTTTTCGGCGLLCCGCCG (SEQ ID NO:54),
TCGTCGTTTTCGGCGTCGCCGCCG (SEQ ID NO:55),
TCGTCGTTTTTAATALLTATTA (SEQ ID NO:57),
TCGTCGTTTTTAATATCCATTA (SEQ ID NO:58)或
TCGTCGTTTTTAATATTTATTA (SEQ ID NO:59),

其中 L 是 dSpacer。

在一个实施方案中，所述免疫刺激性核酸分子包含序列
TCGCGTCGTTTCGGCGCGCTGCCG (SEQ ID NO:30)。

在一个实施方案中，所述免疫刺激性核酸分子包含序列
TCGCGACGTTTCGGCGCGCTGCCG (SEQ ID NO:27)。

在一个实施方案中，所述免疫刺激性核酸分子包含选自以下的序列：

T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*A*C_G*G*C_G*C*C_G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:43),
T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*A*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:43),
T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*A*C*G*A*C*G*C*C*G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:42),
T*C*G*T*C*G*C*T*T*T*G*C*G*A*C*G*C*C*G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:36),
T*C*G*T*C*G*C*C*C*G*G*C*G*A*C*G*C*C*G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:35),
T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*A*C*G*G*C*G*C*C*G*T*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:44),
T*C*G*T*C*G*T*T*L*L*A*C*G*G*C*G*C*C*G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:37),
T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*A*C*G*G*C*G*L*L*L*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:45),
T*C*G*T*C*G*T*T*L*L*A*C*G*G*C*G*L*L*L*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:38),
T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*G*L*L*C*C*G*C*C*G (SEQ ID NO:54),
T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*T*C*G*C*C*G*C*C*G (SEQ ID NO:55),
T*C*G*T*C*G*T*T*L*L*C*G*G*C*G*C*G*G*C*G*C*C*G (SEQ ID NO:39),
T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*L*L*C*G*C*C*G (SEQ ID NO:52),
T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T*A*A*T*A*T*T*T*A*T*T*A (SEQ ID NO:59),
T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*T*A*A*T*A*T*T*T*A*T*T*A (SEQ ID NO:59),
T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*C*A*A*T*A*T*T*T*A*T*T*G (SEQ ID NO:50).

T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*T*A*A*T*A*T*C*C*A*T*T*A (SEQ ID NO:58),
T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T*A*A*T*A*L*L*T*A*T*T*A (SEQ ID NO:57),
T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*A*C*G*G*C*G*L*L*L*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:45),
T*C*G*T*C_G*T*T*L*L*A*C*G*G*C*G*L*L*L*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:38), 和

T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*G*L*L*C*C*G*C*C*G (SEQ ID NO:54),

其中 L 是 dSpacer，*是硫代磷酸酯，_是磷酸二酯。

在一个实施方案中，所述免疫刺激性核酸分子包含选自以下的序列：

T*C*G*A*C*G*T*C*G_A_C*G*G*G*A*C*G*G*G (SEQ ID NO:21),
 T*C*G*A*C*G*T*C*G_A_C*G*T*G*A*C*G*G*G (SEQ ID NO:22),
 T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*C*G*G*G*A*C*G*G*G (SEQ ID NO:21),
 T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*G*G*A*G*G*T (SEQ ID NO:25),
 T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*G*C*G*A*A*G*C*T (SEQ ID NO:24),
 T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*C*C*G*T*T*T*G*T*G*G (SEQ ID NO:20), 和
 T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*G*A*G*T*T*G*G*G*C*T*C*T*C (SEQ ID NO:23),
 其中*是硫代磷酸酯, _是磷酸二酯。

在一个实施方案中, 所述免疫刺激性核酸分子包含选自以下的序列:

T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*C*G*T*G*A*C*G*T*G (SEQ ID NO:62),
 T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*C*G*T*G*A*C*G (SEQ ID NO:61),
 T*C_G*T*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:65),
 T*C*G*T*C_G*T*A*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:66),
 T*C*G*T*C_G*T*T*A*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:67),
 T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*C*G*T*G*A*C*G*T*T (SEQ ID NO:63),
 T*C*G*T*C_G*A*C_G*A*T*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:64),
 T*C*G*T*C*G*A*C*G*A_T_C*G*G*C*G*C*C*G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:64),
 T*C*G*A*C_G*T*C*G*A*C_G*T*G*A*C*G*T*T (SEQ ID NO:63),
 T*C*G*A*C_G*T*C*G*A*C*G*T_G*A*C*G*T*T (SEQ ID NO:63), 和
 T*C*G*T*C_G*T*T*T*A*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G*T (SEQ ID NO:68),
 其中*是硫代磷酸酯, _是磷酸二酯。

在一个实施方案中, 所述免疫刺激性核酸分子包含选自以下的序列:

T*C*G*C_G*T*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:30),
 T*C*G_C*G*T*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:30), 和
 T*C*G*C*G_T*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:30),
 其中*是硫代磷酸酯, _是磷酸二酯。

在一个实施方案中, 所述免疫刺激性核酸分子包含序列

T*C*G*C_G*A*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:27),
 其中*是硫代磷酸酯, _是磷酸二酯。

在一个实施方案中, 所述免疫刺激性核酸分子包含选自以下的序列:

T*C_G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*T*C*G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:48) T*C_G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*T*C*G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:47), 和 T*C_G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*T*C*G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:46), 其中*是硫代磷酸酯, _是磷酸二酯。

在一个实施方案中, 所述免疫刺激性核酸分子包含序列 T*C_G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*T*C*G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:48), 其中*是硫代磷酸酯, _是磷酸二酯。

在一个实施方案中, 所述免疫刺激性核酸分子包括序列 T*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G*T*C*G*T*C_G*T*T*T (SEQ ID NO:33), 其中*是硫代磷酸酯, _是磷酸二酯。

在一个实施方案中, 所述寡核苷酸中至少一个核苷酸是取代或修饰的嘌呤或嘧啶。

在一个实施方案中, 所述取代嘧啶是 C5-或 C6-取代的嘧啶。

在一个实施方案中, 所述取代嘌呤是 C8-或 C7-取代的嘌呤。

在一个实施方案中, 所述取代或修饰嘌呤或嘧啶选自: 5-取代胞嘧啶、6-取代胞嘧啶、N4-取代胞嘧啶、5-氮杂胞嘧啶、2-巯基-胞嘧啶、异胞嘧啶、假-异胞嘧啶、带稠环系统的胞嘧啶类似物和尿嘧啶衍生物、胸腺嘧啶衍生物、7-去氮杂鸟嘌呤、7-去氮杂-7-取代鸟嘌呤、7-去氮杂-8-取代鸟嘌呤、7-去氮杂-8-氮杂鸟嘌呤、次黄嘌呤、N2-取代鸟嘌呤、5-氨基-3-甲基-3H,6H-噻唑并[4,5-d]吡啶-2,7-二酮、2,6-二氨基嘌呤、2-氨基嘌呤、嘌呤、吡啶、取代腺嘌呤、8-取代鸟嘌呤和 6-硫代鸟嘌呤。

在一个实施方案中, 所述取代或修饰嘌呤或嘧啶选自: 5-甲基胞嘧啶、5-氟胞嘧啶、5-氯胞嘧啶、5-溴胞嘧啶、5-碘胞嘧啶、5-羟基胞嘧啶、6-羟基胞嘧啶、5-羟甲基胞嘧啶、5-二氟甲基胞嘧啶和未取代或取代 5-炔基胞嘧啶、N4-乙基胞嘧啶、N,N'-亚丙基胞嘧啶、吩噻嗪、5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-溴乙烯基尿嘧啶、4-硫代尿嘧啶、5-羟基尿嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶、2-硫代胸腺嘧啶、4-硫代胸腺嘧啶、6-取代胸腺嘧啶、7-去氮杂-7-(C2-C6)炔基鸟嘌呤、N2-甲基-鸟嘌呤、N6-甲基-腺嘌呤、8-氧杂腺嘌呤、8-羟基鸟嘌呤和 8-溴鸟嘌呤。

在一个实施方案中，所述取代或修饰嘌呤或嘧啶选自：通用碱基、芳环系统、芳环系统和氢原子（dSpacer）。

在一个实施方案中，所述取代或修饰嘌呤或嘧啶选自：4-甲基吡咯、5-硝基吡咯、3-硝基吡咯、P 碱基（P-base）和 K 碱基（K-base）、苯并咪唑、二氯苯并咪唑、1-甲基-1H-[1,2,4]三唑-3-羧酰胺、氟苯和二氟苯。

在一个实施方案中，N、S、X、或 Z 中任意一个被选自下组的残基取代：C6-C30 烷基链、胆汁酸、胆酸、牛磺胆酸、脱氧胆酸、胆固醇、oleyl lithocholic acid、油酰胆烯酸、糖脂、磷脂、鞘脂、类异戊二烯、类固醇、维生素、维生素 E、饱和脂肪酸、不饱和脂肪酸、脂肪酸酯、甘油三酯、萜类、卟啉类、Texaphyrine、金刚烷、吡啶、生物素、香豆素、荧光素、罗丹明、德克萨斯红、地高辛、二甲氧基三苯甲基、叔丁基二甲基硅烷基、叔丁基二苯基硅烷基、花青染料、花青染料 Cy3、花青染料 Cy576、Hoechst 33258 染料、补骨脂素和布洛芬。

本发明的一个方面提供免疫刺激性核酸分子，包括（a）5'端，以选自(TCG)_nN 和 RDCGY₁Y₂N 的免疫刺激性基序起始，其中 T 是胸腺嘧啶，C 是未甲基化胞嘧啶，G 是鸟嘌呤，R 是嘌呤，D 不是 C，Y₁ 和 Y₂ 相互独立地是嘧啶，n 是 1-4 的整数（包括两端），N 是 0-12 个碱基长的任意序列；（b）3'端，以能形成发夹或茎环结构的反向重复终止，所述结构包括长 2-6 个连续碱基对的富含 GC 的茎和至少一个未匹配或错配碱基；和（c）部分稳定化的骨架，包括至少一个 5'-CpG-3'磷酸二酯键。

在一个实施方案中，富含 GC 的茎是 2 个连续碱基对长。

在一个实施方案中，富含 GC 的茎是 3 个连续碱基对长。

在一个实施方案中，富含 GC 的茎是 4 个连续碱基对长。

在一个实施方案中，富含 GC 的茎是 5 个连续碱基对长。

在一个实施方案中，富含 GC 的茎是 6 个连续碱基对长。

在一个实施方案中，富含 GC 的茎包括至少 2 个 G-C 碱基对。

在一个实施方案中，富含 GC 的茎包括至少 3 个 G-C 碱基对。

在某些实施方案中，所述至少一个未匹配或错配的碱基是 T。

在一个实施方案中，所述包括至少一个 5'-CpG-3'磷酸二酯键的部分稳定化的骨

架还包括多个核苷酸间硫代磷酸酯键。

在一个实施方案中，所述 5'端具有序列 TCGTCGTTTTA (SEQ ID NO:41)。

在一个实施方案中，所述以反向重复终止的 3'端具有碱基序列 CGGCGCCGTGCCG (SEQ ID NO:19)。

在一个实施方案中，所述以反向重复终止的 3'端具有碱基序列 CGGCGTCGTGCCG (SEQ ID NO:9)。

在一个方面中，本发明提供具有以下碱基序列的免疫刺激性核酸：TCGTCGTTTTACGGCGCCGTGCCG (SEQ ID NO:43)。

在一个方面中，本发明提供具有以下碱基序列的免疫刺激性核酸：TCGTCGTTTTACGGCGTCGTGCCG (SEQ ID NO:48)。

在一个方面中，本发明提供具有以下碱基序列的免疫刺激性核酸：T*C_G*T*C_G*T*T*T*A*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:43)，其中*代表核苷酸间硫代磷酸酯键，_代表核苷酸间磷酸二酯键。

在一个方面中，本发明提供具有以下碱基序列的免疫刺激性核酸：T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*A*C_G*G*C_G*C*C_G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:43)，其中*代表核苷酸间硫代磷酸酯键，_代表核苷酸间磷酸二酯键。

在一个方面中，本发明提供具有以下碱基序列的免疫刺激性核酸：T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*A*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:43)，其中*代表核苷酸间硫代磷酸酯键，_代表核苷酸间磷酸二酯键。

在一个方面中，本发明提供具有以下碱基序列的免疫刺激性核酸：T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*A*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:43)，其中*代表核苷酸间硫代磷酸酯键，_代表核苷酸间磷酸二酯键。

在一个方面中，本发明提供包括本发明免疫刺激性核酸分子和抗原的疫苗。

在一个方面中，本发明提供包括本发明免疫刺激性核酸分子和药学上可接受的载体的药物组合物。

在一个方面中，本发明提供诱导 I 型干扰素 (IFN) 表达的方法。根据本发明此方面的方法涉及将能表达 I 型 IFN 的细胞与本发明的免疫刺激性核酸接触，所述核

酸的量可以有效诱导 I 型 IFN 表达。

在一个实施方案中，所述 I 型 IFN 是干扰素 α (IFN- α)。

在一个实施方案中，所述 I 型 IFN 是干扰素 β (IFN- β)。

在一个方面中，本发明提供诱导 γ 干扰素 (IFN- γ) 表达的方法。根据本发明此方面的方法涉及将能表达 IFN- γ 的细胞与本发明的免疫刺激性核酸接触，所述核酸的量可以有效诱导 IFN- γ 表达。

在一个方面中，本发明提供活化自然杀伤 (NK) 细胞的方法。根据本发明此方面的方法涉及将 NK 细胞与本发明的免疫刺激性核酸接触，所述核酸的量可以有效活化 NK 细胞。

在一个方面中，本发明提供治疗感染的方法。根据本发明此方面的方法涉及向患有感染或有发生感染风险的对象给予本发明的免疫刺激性核酸，所述核酸的量可以有效治疗或预防感染。

在一个实施方案中，所述对象患有以下感染或有发生以下感染的风险：病毒、细菌、真菌或寄生虫感染。

在一个实施方案中，所述对象患有病毒感染或有发生病毒感染的风险，其中病毒选自乙肝病毒 (HBV)、丙肝病毒 (HCV)、巨细胞病毒 (CMV)、EB 病毒 (EBV)、乳头瘤病毒、人免疫缺陷病毒 (HIV) 或单纯疱疹病毒 (HSV)。

在一个实施方案中，所述对象患有细菌感染或有发生细菌感染的风险，其中细菌物种选自利什曼虫属、利斯特氏菌属或炭疽。

在一个方面中，本发明提供治疗变态反应疾病的方法。根据本发明此方面的方法涉及向患有变态反应疾病或有发生风险的对象给予本发明的免疫刺激性核酸，所述核酸的量可以有效治疗或预防变态反应疾病。

在一个实施方案中，所述变态反应性疾病是变态反应性哮喘。

在一个方面中，本发明提供治疗癌症的方法。根据本发明此方面的方法涉及向患有癌症或有发生癌症风险的对象给予本发明的免疫刺激性核酸，所述核酸的量可以有效治疗或预防癌症。

在一个实施方案中，所述癌症选自：基底细胞癌、胆管癌、膀胱癌、骨癌、脑

和中枢神经系统癌症、乳癌、宫颈癌、绒膜癌、结直肠癌、结缔组织癌症、消化系统癌症、子宫内膜癌、食管癌、眼癌、头颈癌、胃癌、上皮内赘生物、肾癌、喉癌、白血病、肝癌、肺癌、包括何杰金和非何杰金氏淋巴瘤的淋巴瘤、黑素瘤、骨髓瘤、神经母细胞瘤、口腔癌、卵巢癌、胰癌、前列腺癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、直肠癌、肾癌、呼吸系统癌症、肉瘤、皮肤癌、胃癌、睾丸癌、甲状腺癌、子宫癌、泌尿系统癌症、或其它癌和肉瘤。

在一个实施方案中，所述癌症是对干扰素 α (IFN- α) 治疗敏感的癌症。

在一个实施方案中，对 IFN- α 治疗敏感的癌症选自毛细胞白血病、慢性髓性白血病、皮肤 T 细胞白血病、多发性骨髓瘤、滤泡淋巴瘤、恶性黑素瘤、鳞细胞癌、AIDS 相关卡波希肉瘤 (Kaposi's sarcoma)、肾细胞癌、前列腺癌、宫颈癌或结肠癌。

在一个方面中，本发明提供本发明免疫刺激性核酸在制造用于治疗感染的药物中的用途。

在一个方面中，本发明提供本发明免疫刺激性核酸在制造用于治疗变态反应疾病的药物中的用途。

在一个方面中，本发明提供本发明免疫刺激性核酸在制造用于治疗变态反应性哮喘的药物中的用途。

在一个方面中，本发明提供本发明免疫刺激性核酸在制造用于治疗癌症的药物中的用途。

对本发明的各种限定能涉及本发明的多种实施方案。因此可以预见，涉及任一种元素或元素组合的对本发明的各种限定可以被包括在本发明的各个方面中。

附图简述

当结合附图时，可以更容易和完全地理解本发明。提供附图仅仅是为了示例性目的，并不是理解或实施本发明所必需的。

图 1 是表示用 ODN332、333 和 334 诱导 IFN- α 和 TLR9 信号传递的一系列图。

图 2 是表示用 ODN611、614 和 620 诱导 IFN- α 和 TLR9 信号传递的一系列图。

图 3 表示一组寡核苷酸刺激的外周血单核细胞 (PBMC) 中产生 IFN- α 。

图 4 表示用 1 μ g 乙肝表面抗原 (HBsAg) 和指定量 ODN 免疫以后抗原特异性总 IgG 的组平均效价 (GMT)。

图 5 表示用 1 μ g HBsAg 和指定量 ODN 免疫以后抗原特异性各 IgG 亚型的 GMT。

图 6 表示用 1 μ g HBsAg 和指定量 ODN 免疫以后抗原特异性细胞裂解性 T 淋巴细胞应答。

图 7A 表示小鼠神经母细胞瘤肿瘤模型中根据不同 ODN 处理的存活率。

图 7B 表示小鼠神经母细胞瘤肿瘤模型中根据不同 ODN 处理的肿瘤体积。

选择序列列表

ODN	序列	SEQ ID NO:
126	T*C_G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*T*C*G*C*G*C*C*G	47
128	T*C_G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*T*C*G*T*G*C*C*G	48
129	T*C_G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*C*C*G*T*G*C*C*G	43
130	T*C_G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*T*C*G*C*G	46
286	T*C*G*A*C*G*T*C*G_A_C*G*T*G*A*C*G*G*G	22
291	T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*C*G*G*G*A*C*G*G*G	21
298	T*C*G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*A*C*G*C*C*G*T*G*C*C*G	42
299	T*C*G*T*C*G*C*T*T*G*C*G*A*C*G*C*C*G*T*G*C*C*G	36
300	T*C*G*T*C*G*C*C*G*G*C*G*A*C*G*C*C*G*T*G*C*C*G	35
301	T*C*G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*C*C*G*T*G*C*C*G	44
306	T*C*G*T*C*G*T*T*L*L*A*C*G*G*C*G*C*C*G*T*G*C*C*G	37
307	T*C*G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*L*L*L*T*G*C*C*G	45
308	T*C*G*T*C*G*T*T*L*L*A*C*G*G*C*G*L*L*L*T*G*C*C*G	38
310	T*C*G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*G*L*L*C*C*G*C*C*G	54
312	T*C*G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*T*C*G*C*C*G*C*C*G	55
313	T*C*G*T*C*G*T*T*L*L*C*G*G*C*G*C*G*G*C*G*C*C*G	39
314	T*C*G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*L*L*C*G*C*C*G	52
331	T*C*G*C_G*A*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*T*G*C*C*G	27
332	T*C*G*C_G*T*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*T*G*C*C*G	30
333	T*C*G*C_G*A*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*T*C*G*C*C*G	28
334	T*C*G*C_G*A*C*G*T*T*C_G*G*C*G*G*C_T*C*G*C*C*G	29
335	T*C*G_C*G*T*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*T*G*C*C*G	30
336	T*C*G*C*G_T*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*T*G*C*C*G	30
337	T*C*G*C*G_A*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*T*C*G*C*C*G	28
338	T*C*G*C*G_A*C*G*T*T*C_G*G*C*G*G*C_T*C*G*C*C*G	29
339	T*C*G_C*G*A*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*T*C*G*C*C*G	28
340	T*C*G_C*G*A*C*G*T*T*C_G*G*C*G*G*C_T*C*G*C*C*G	29
341	T*C*G*C_G*T*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*T*C*G*C*C*G	31
342	T*C*G*C_G*T*C*G*T*T*C_G*G*C*G*G*C_T*C*G*C*C*G	32
343	T*C*G*C*G_T*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*T*C*G*C*C*G	31
344	T*C*G*C*G_T*C*G*T*T*C_G*G*C*G*G*C_T*C*G*C*C*G	32
380	T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*G*G*A*G*G*T	25
382	T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*G*C*G*A*A*G*C*T	24

383	T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*C*C*G*T*T*T*G*T*G*G	20
384	T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*G*A*G*T*T*G*G*G*C*T*C*T*C	23
608	T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*C_G*G*C_G*C*G*C_G*C*C*G	51
611	T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*A*C_G*G*C_G*C*C_G*T*G*C*C*G	43
614	T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*A*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G	43
618	T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*C_G*G*C*G*G*C*C_G*C*C*G	53
620	T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*A*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G	43
644	T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T*A*A*T*A*T*T*T*A*T*T*A	59
645	T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*T*A*A*T*A*T*T*T*A*T*T*A	59
646	T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*C*A*A*T*A*T*T*T*A*T*T*G	50
647	T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*T*A*A*T*A*T*C*C*A*T*T*A	58
648	T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T*A*A*T*A*L*L*T*A*T*T*A	57
649	T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*A*C*G*G*C*G*L*L*L*T*G*C*C*G	45
650	T*C*G*T*C_G*T*T*L*L*A*C*G*G*C*G*L*L*L*T*G*C*C*G	38
651	T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*G*L*L*C*C*G*C*C*G	54
830	T*C*G*A*C*G*T*C*G_A_C*G*G*G*A*C*G*G*G	21

发明详述

本发明在一个方面涉及一种发现，即具有确定二级结构的特异性亚类的 CpG 免疫刺激性寡核苷酸在介导免疫刺激作用中高度有效。这些 CpG 核酸可治疗性和预防性用于刺激免疫应答，以治疗癌症、传染病、变态反应、哮喘和其它病症，并有助于预防癌症化疗后可能的感染。来自 CpG 刺激的这种强而平衡的细胞和体液免疫应答反映对抗所侵入病原体和癌性细胞的机体自身天然防御系统。

本发明的序列与称为 C 类或组合基序 CpG 寡核苷酸的一类 CpG 寡核苷酸具有一些结构相似性。见公开 PCT 国际专利申请 WO03/015711。与前述 C 类寡核苷酸相似，本发明的 C 类 CpG 寡核苷酸具有确定的 5'和 3'基序作为分子的一部分。这些前述 C 类寡核苷酸具有传统“刺激性”CpG 序列和“富含 GC 的回文”基序，前者通常位于分子的 5'端或 3'端或与之临近，后者通常位于分子的另一端或与之临近。这些组合基序核酸具有的免疫刺激作用落在与传统“B 类”CpG ODN 相关的作用和与更近描述的一类免疫刺激性核酸（“A 类”CpG ODN）相关的作用之间，所述“B 类”CpG ODN 是 B 细胞活化和树突细胞活化的强诱导剂，所述“A 类”CpG ODN 是 IFN- α 和 NK 细胞活化的强诱导剂，但对 B 细胞和 DC 活化的诱导相对较差。

本发明的新的 C 类 CpG 寡核苷酸与前述的 C 类 CpG 寡核苷酸也是结构不同的。与前述 C 类 CpG 寡核苷酸比较,本发明的免疫刺激性核酸分子特征在于对位于分子一端的富含 GC 的回文有非常宽松的要求。例如,前述 C 类寡核苷酸在一个实施方案中包括严格或完美的回文,具有至少 10 个核苷酸长并具有至少 2/3 的 GC 含量。在一些实施方案中,前述 C 类寡核苷酸的回文能包括至多最小数目的连续错配核苷酸。

与前述 C 类寡核苷酸相比较,本发明的 C 类寡核苷酸类似物特征在于回文基序在多种实施方案中能具有少于 10 个核苷酸;GC 含量在 0 和小于 2/3 之间;具有多种核苷酸类似物和取代物,包括缺少任何核碱基的类型 (dSpacer);涉及四个或更多连续核苷酸或取代核苷酸的更长的间插序列,它们不形成沃森-克里克碱基配对;及其任意组合。而且在一些实施方案中,两个或更多分子的 3' 部分可以通过它们的 3' 末端连接在一起。已经发现,不具有完美回文的这该新亚类的寡核苷酸仍然能诱导高水平 IFN 生成,包括 I 型 IFN (如 IFN- α 、IFN- β) 和 IFN- γ ,这与前述的组合基序 CpG 寡核苷酸相似。

“回文”和等价的“回文序列”在此表示一种核酸序列,其自身完美的逆向互补(即序列如 ABCDEE'D'C'B'A',其中 A 和 A'、B 和 B'、C 和 C'、D 和 D'、以及 E 和 E'是能形成通常的沃森-克里克碱基对的碱基,即 G-C、A-T 和 A-U。在此,严格意义上的“回文”不包括不参与形成通常沃森-克里克碱基对的间插序列或间插非核苷酸结构。

本文的“反向重复”表示不完美的回文,即核酸序列,其中既有能形成通常沃森-克里克碱基对的核苷酸,又有不参与形成通常沃森-克里克碱基对的核苷酸、核苷酸类似物或其它结构(例如序列如 ABCDE-S-E'D'C'B'A',其中 A 和 A'、B 和 B'、C 和 C'、D 和 D'、以及 E 和 E'是能形成通常的沃森-克里克碱基对的碱基,而 S 是非回文序列或非核苷酸连接子或无碱基连接子 (dSpacer))。在某些实施方案中,不参与形成通常沃森-克里克碱基对的核苷酸、核苷酸类似物或其它结构打断完美回文。在某些实施方案中,不参与形成通常沃森-克里克碱基对的核苷酸可以与另一个核苷酸形成非沃森-克里克碱基对,如 G-T。此处的非沃森-克里克碱基对是沃森-

克里克碱基对以外的任意碱基对,包括但不限于 **Hoogsteen** 碱基对和所谓的摆动性碱基对。在某些实施方案中,不参与形成通常沃森-克里克碱基对的核苷酸是未匹配的,没有核苷酸碱基或核苷酸碱基类似物与之形成沃森-克里克或非沃森-克里克碱基对,如 **G** 对 **dSpacer**。在某些实施方案中,不参与形成通常沃森-克里克碱基对的核苷酸能与另一核苷酸形成非标准碱基对,如二氨基吡啶能与黄嘌呤核苷形成碱基对。

在一个实施方案中,所述核酸的 5'端始于选自 **(TCG)_nN** 和 **RDCGY₁Y₂N** 的免疫刺激性基序。**T** 是胸腺嘧啶, **C** 是未甲基化的胞嘧啶, **G** 是鸟嘌呤, **R** 是嘌呤, **D** 不是 **C**, **Y₁** 和 **Y₂** 相互独立地是嘧啶, **n** 是包括 1 和 4 在内的 1-4 之间的整数, **N** 是 0-12 个碱基长的任意序列。

所述核酸的 3'端以能形成发夹或茎环结构的反向重复终止。术语“终止”表示位于或接近 3'端的结构。因此,不完美回文的末端可以位于分子的实际 3'端,或者 3'端可以包括不是反向重复结构部分的 1 或多个其他核苷酸。分子的 3'端优选包括 3 个或更少不形成反向重复结构部分的核苷酸,

在一个实施方案中,本文中“能形成发夹或茎环结构的反向重复”表示一种核苷酸序列,它形成 2-10 个连续碱基对长的富含 **GC** 的茎或发夹,并包括至少一个未匹配或错配的碱基。在具体的实施方案中,富含 **GC** 的茎长 2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个连续碱基对。在一些实施方案中,富含 **GC** 的茎包括至少 2、3 或 4 个 **G-C** 碱基对。

在一个实施方案中,本文的“能形成发夹或茎环结构的反向重复”表示一种核苷酸序列,它形成 2-10 个连续碱基对长的富含 **AT** 的茎或发夹,并包括至少一个未匹配或错配的碱基。在具体的实施方案中,富含 **AT** 的茎长 2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个连续碱基对。在一些实施方案中,富含 **AT** 的茎包括至少 2、3 或 4 个 **A-T** 碱基对。

有些情况下,至少一个未匹配或错配的碱基桥接茎或发夹的末端。通过向茎提供分子中的柔性点而配对碱基并形成发夹,这可以允许形成二级结构。作为替代方案,未匹配或错配碱基可以在茎中。优选地,如果错配碱基在茎中,那么茎至少是 3 个碱基对长。未匹配或错配碱基可以是任意核苷酸。在一些实施方案中,未匹配或错配碱基

基是 T。位于双链末端的未匹配核苷酸也称为突出核苷酸或悬垂端，它能显著稳定双链体形成或发夹形成。Freier SM et al. (1983) Effects of 3' dangling end stacking on the stability of GGCC and CCGG double helixes. *Biochemistry* 22:6198-206.

所述核酸也包括含至少一个 5'-CpG-3'磷酸二酯键的部分稳定化的骨架。

在一些实施方案中，分子的双链部分也可以含有非天然（非标准）碱基对（如，二氨基吡啶与黄嘌呤核苷配对）。Lutz MJ et al. (1998) Recognition of a non-standard base pair by thermostable DNA polymerases. *Bioorg Med Chem Lett* 8:1149-52

所述式定义表现优异免疫刺激特性的该类 CpG 寡核苷酸的亚组。在所述式中，5'表示寡核苷酸的游离 5'端，3'表示寡核苷酸的游离 3'端。

寡核苷酸可具有一个或多个可接近的 5'或 3'端。在一些实施方案中，3'端可以与另一个 3'端连接。因为 5'和 3'基序的重要性已经被发现并在此处描述，也可能创建具有两个这种 5'或 3'端的修饰寡核苷酸。例如，这可以通过用 3'-3'键连接两个寡核苷酸而产生具有两个可接近 5'端的寡核苷酸。3'3'-或 5'5'键可以是磷酸二酯键、硫代磷酸酯键或任意其它修饰的核苷酸间桥。实现这种连接的方法在本领域已知。例如，这种连接已经描述于 Seliger H et al. (1991) Oligonucleotide analogs with terminal 3'-3'- and 5'-5'- internucleotidic linkages as antisense inhibitors of viral gene expression, *Nucleosides & Nucleotides* 10:469-77 和 Jiang Z et al. (1999) Pseudo-cyclic oligonucleotides: in vitro and in vivo properties, *Bioorg Med Chem* 7:2727-35。

另外地，可以用另外的间隔如三-或四-乙二醇磷酸酯基团来制备 3'-或 5'-末端核苷间连键不是磷酸二酯键、硫代磷酸酯键或其它修饰桥的 3'-3'-连键或 5'-5'-连键的 ODN (Durand M et al. (1992) Triple-helix formation by an oligonucleotide containing one (dA)₁₂ and two (dT)₁₂ sequences bridged by two hexaethylene glycol chains, *Biochemistry* 31:9197-204; U.S. Pat. No. 5,658,738; 和 U.S. Pat. No. 5,668,265)。作为替代方案，通过使用常规的亚磷酰胺（phosphoramidite）化学，非核苷酸连接子可以衍生自乙二醇、丙二醇或无碱基脱氧核糖（dSpacer）单元（Fontanel ML et al. (1994) Sterical recognition by T4 polynucleotide kinase of non-nucleosidic moieties 5'-attached to oligonucleotides, *Nucleic Acids Res* 22:2022-7)。所述非核苷酸连接子可

以掺入一次或多次、或互相组合，以允许待连接的两个 ODN 的 3'端之间任意期望距离。

本文中“非核苷酸连接子”表示不是核苷酸或其聚合物（即多核苷酸）的任意连接元件，其中核苷酸包括嘌呤或嘧啶核碱基和糖磷酸。非核苷酸连接子因而包括无碱基核苷酸（dSpacer），即其中核碱基被氢原子取代的核苷酸样糖磷酸单元。非核苷酸连接子可以是聚乙二醇，包括但不限于三乙二醇和六乙二醇。

在一些实施方案中，所述寡核苷酸具有以下结构之一：
TCGTCGTTTTA (SEQ ID NO:41), CGGCGCCGTGCCG (SEQ ID NO:19),
CGGCGTCGTGCCG (SEQ ID NO:9), TCGTCGTTTTACGGCGCCGTGCCG (SEQ ID NO:43), TCGTCGTTTTACGGCGTCGTGCCG (SEQ ID NO:48),
T*C_G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*C*C*G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:43),
T*C*G*T*C*G*T*T*T*A*C_G*G*C_G*C*C_G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:43),
T*C*G*T*C*G*T*T*T*A*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:43), 和
T*C*G*T*C_G*T*T*T*A*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:43)。

符号*表示存在稳定化的核苷酸间连键，_表示存在磷酸二酯键。

所述免疫刺激性寡核苷酸一般长 6-100 个核苷酸。在一些实施方案中，长度范围是 6-40、13-100、13-40、13-30、15-50 或 15-30 个核苷酸或其间的任意整数范围。

术语“核酸”和“寡核苷酸”可互换使用，表示多核苷酸（即包括与磷酸基以及可互换的有机碱连接的糖（如核糖或脱氧核糖）的分子，所述有机碱是取代嘧啶（如胞嘧啶（C）、胸腺嘧啶（T）或尿嘧啶（U））或取代嘌呤（如腺嘌呤（A）或鸟嘌呤（G））。本文中术语“核酸”和“寡核苷酸”表示寡聚核糖核苷酸以及寡聚脱氧核糖核苷酸。术语“核酸”和“寡核苷酸”也包括多聚核苷（即去除磷酸的多核苷酸）和任意的其它含有机碱的聚合物。核酸分子可以从已有核酸来源（如基因组 DNA）获得，但优选是合成的（如经核酸合成产生）。

本文中术语“核酸”和“寡核苷酸”包括本发明的核酸分子和寡核苷酸，以及本发明的寡核苷酸类似物。本文中术语“寡聚脱氧核糖核苷酸”和等价的“ODN”包括本发明的未修饰寡聚脱氧核糖核苷酸以及本发明的寡聚脱氧核糖核苷酸类似物。

术语“核酸”和“寡核苷酸”也包括具有取代或修饰的核酸或寡核苷酸，如在

碱基和/或糖中具有取代或修饰。例如，它们包括具有这种糖骨架的核酸，其中糖与 2' 位羟基以外和 5' 位磷酸基或羟基以外的低分子量有机基团共价连接。因此，修饰核酸可以包括 2'-O-烷基化核糖基团。此外，修饰核酸可以包括诸如阿拉伯糖或 2'-氟阿拉伯糖的糖来代替核糖。因此所述核酸在骨架组成上可以是异质的，其中含有连接在一起的聚合物单元的任何可能组合，如肽-核酸（它具有肽样骨架和核酸碱基）。其它实例在下面更详细描述。

与包括磷酸二酯核苷间桥、 β -D-核糖单元和/或天然核苷碱基（腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶、尿嘧啶）的天然 RNA 和 DNA 相比，本发明的免疫刺激性寡核苷酸可以包括多种化学修饰和取代。化学修饰的实例对本领域技术人员已知，例如已经描述于 Uhlmann E et al. (1990) *Chem Rev* 90:543; "Protocols for Oligonucleotides and Analogs" Synthesis and Properties & Synthesis and Analytical Techniques, S. Agrawal, Ed, Humana Press, Totowa, USA 1993; Crooke ST et al. (1996) *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36:107-29; 和 Hunziker J et al. (1995) *Mod Synth Methods* 7:331-417。根据本发明的寡核苷酸可以具有一个或多个修饰，与由天然 DNA 或 RNA 组成的相同序列的寡核苷酸相比，其中各个修饰位于特定磷酸二酯核苷间桥和/或位于特定 β -D-核糖单元和/或位于特定天然核苷碱基位置。

例如，所述寡核苷酸可以包括一个或多个修饰，其中各个修饰相互独立地选自：

- a) 位于核苷 3' 和/或 5' 端的磷酸二酯核苷间桥被修饰的核苷间桥替换，
- b) 位于核苷 3' 和/或 5' 端的磷酸二酯核苷间桥被去磷桥替换，
- c) 糖磷酸骨架的糖磷酸单元被另一个单元替换，
- d) β -D-核糖单元被修饰糖单元替换，和
- e) 天然核苷碱基被修饰核苷碱基替换。

以下是寡核苷酸化学修饰的更详细实例。

所述寡核苷酸可以包括修饰的核苷酸间连键，如以上 a 和 b 所述。这些修饰键可以是部分抗降解的（如被稳定化）。“稳定化的寡核苷酸分子”意思是指由这些修饰导致的对体内降解（如经核酸外切酶或核酸内切酶）的相对抗性。在一些实施方案中，具有硫代磷酸酯键的寡核苷酸可以提供最大活性，保护寡核苷酸免受细胞内的核酸外

切酶或核酸内切酶的降解。

位于核苷 3'和/或 5'端的磷酸二酯核苷间桥可以用修饰的核苷间桥替换,其中修饰的核苷间桥例如选自硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、 NR^1R^2 -氨基磷酸酯、boranophosphate、 α -羟苯甲基磷酸酯、磷酸-($\text{C}_1\text{-C}_{21}$)-O-烷基酯、磷酸-[($\text{C}_6\text{-C}_{12}$)芳基-($\text{C}_1\text{-C}_{21}$)-O-烷基]酯、($\text{C}_1\text{-C}_8$)烷基磷酸酯和/或($\text{C}_6\text{-C}_{12}$)芳基磷酸酯桥、($\text{C}_7\text{-C}_{12}$)- α -羟甲基-芳基(如公开于 WO95/01363),其中($\text{C}_6\text{-C}_{12}$)芳基、($\text{C}_6\text{-C}_{20}$)芳基和($\text{C}_6\text{-C}_{14}$)芳基任选地被卤素、烷基、烷氧基、硝基、氰基取代,并且其中 R^1 和 R^2 相互独立地是氢、($\text{C}_1\text{-C}_{18}$)-烷基、($\text{C}_6\text{-C}_{20}$)-芳基、($\text{C}_6\text{-C}_{14}$)芳基-、($\text{C}_1\text{-C}_8$)烷基,优选氢、($\text{C}_1\text{-C}_8$)烷基,优选($\text{C}_1\text{-C}_4$)烷基和/或甲氧基乙基,或 R^1 和 R^2 与携带它们的氮原子一起形成 5-6 员杂环,杂环另外可以含有选自 O、S 和 N 的杂原子。

位于核苷 3'和/或 5'端的磷酸二酯桥由去磷桥替换(去磷桥例如描述在 Uhlmann E and Peyman A in "Methods in Molecular Biology", Vol. 20, "Protocols for Oligonucleotides and Analogs", S. Agrawal, Ed., Humana Press, Totowa 1993, Chapter 16, pp.355 ff),其中去磷桥例如选自去磷桥 formacetal、3'-thioformacetal、甲羟胺、脞、亚甲基二甲基-胍撑、二亚甲基砷和/或硅烷基。

所述糖磷酸骨架(即糖磷酸骨架由糖磷酸单元组成)的糖磷酸单元(即 β -D-核糖和磷酸二酯核苷间桥一起形成糖磷酸单元)可以被另一个单元替换,其中所述其它单元例如适于构建“吗啉代衍生”的寡聚物(例如描述于 Stirchak EP et al. (1989) *Nucleic Acids Res* 17:6129-41),也就是说,例如由吗啉代衍生物单元替换;或构建聚酰胺核酸(“PNA”,例如描述于 Nielsen PE et al. (1994) *Bioconj Chem* 5:3-7),也就是说,例如由 PNA 骨架单元如由 2-氨基乙基甘氨酸替换。所述寡核苷酸可以具有其它糖骨架修饰和替换,如带磷酸酯基的肽核酸(PHONA)、被锁的核酸(locked nucleic acids)(LNA),和具有带烷基连接子或氨基连接子的骨架区的寡核苷酸。所述烷基连接子可以是带分支或未分支的,取代或未取代的,可以是手性纯的或外消旋混合物。

β -核糖单元或 β -D-2'-脱氧核糖单元可以被修饰糖单元替换,其中所述修饰糖单元例如选自 β -D-核糖、 α -D-2'-脱氧核糖、L-2'-脱氧核糖、2'-F-2'-脱氧核糖、2'-F-阿

拉伯糖、2'-O-(C₁-C₆)烷基-核糖 (2'-O-(C₁-C₆)烷基-核糖优选是 2'-O-甲基核糖)、2'-O-(C₂-C₆)烯基-核糖、2'-[O-(C₁-C₆)烷基-O-(C₁-C₆)烷基]-核糖、2'-NH₂-2'-脱氧核糖、β-D-木-呋喃糖、α-阿拉伯-呋喃糖、2,4-二脱氧-β-D-赤藓-吡喃己糖和碳环 (例如描述于 Froehler (1992) *J Am Chem Soc* 114:8320) 和/或开链糖类似物 (例如描述于 Vandendriessche et al. (1993) *Tetrahedron* 49:7223) 和/或双环糖类似物 (例如描述于 Tarkov M et al. (1993) *Helv Chim Acta* 76:481)。

在一些实施方案中,糖是 2'-O-甲基核糖,特别是对于一或两个都由磷酸二酯或磷酸二酯样核苷间连键而连接的核苷酸。

核酸还包括取代嘌呤和嘧啶如 C-5 丙炔嘧啶和 7-去氮杂-7-取代嘌呤修饰碱基。Wagner RW et al. (1996) *Nat Biotechnol* 14 : 840-4。嘌呤和嘧啶包括但不限于腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、胸腺嘧啶和尿嘧啶,以及其它天然与非天然存在的核碱基、取代和未取代芳香基团。

修饰碱基是与在 DNA 和 RNA 通常发现的天然存在碱基如 T、C、G、A 和 U 化学上不同的任意碱基,但它们与这些天然存在碱基共有基本化学结构。所述修饰核苷碱基例如可以选自次黄嘌呤、尿嘧啶、二氢尿嘧啶、假尿嘧啶、2-硫代尿嘧啶、4-硫代尿嘧啶、5-氨基尿嘧啶、5-(C₁-C₆)-烷基尿嘧啶、5-(C₂-C₆)-烯基尿嘧啶、5-(C₂-C₆)-炔基尿嘧啶、5-(羟甲基)尿嘧啶、5-氯尿嘧啶、5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-羟基胞嘧啶、5-(C₁-C₆)-烷基胞嘧啶、5-(C₂-C₆)-烯基胞嘧啶、5-(C₂-C₆)-炔基胞嘧啶、5-氯胞嘧啶、5-氟胞嘧啶、5-溴胞嘧啶、N²-二甲基鸟嘌呤、2,4-二氨基嘌呤、8-氮杂嘌呤、取代 7-去氮杂嘌呤优选 7-去氮杂-7-取代和/7-去氮杂-8-取代嘌呤、5-羟甲基胞嘧啶、N4-烷基胞嘧啶如 N4-乙基胞嘧啶、5-羟基脱氧胞嘧啶、5-羟甲基脱氧胞嘧啶、N4-烷基脱氧胞嘧啶如 N4-乙基脱氧胞嘧啶、6-硫代脱氧鸟嘌呤,和硝基吡咯的脱氧核糖核苷、C5-丙炔基嘧啶,以及二氨基嘌呤如 2,6-二氨基嘌呤、肌苷、5-甲基胞嘧啶、2-氨基嘌呤、2-氨基-6-氯嘌呤、次黄嘌呤或其它修饰的天然核苷碱基。

修饰碱基可以掺入本文所述的特定通式中。例如胞嘧啶可以用修饰胞嘧啶替换。本文所用的修饰胞嘧啶是胞嘧啶的天然存在或非天然存在的嘧啶碱基类似物,它们可以替换该碱基而不影响所述寡核苷酸的免疫刺激活性。修饰胞嘧啶包括但不限于 5-

取代胞嘧啶（如 5-甲基胞嘧啶、5-氟胞嘧啶、5-氯胞嘧啶、5-溴胞嘧啶、5-碘胞嘧啶、5-羟基胞嘧啶、5-羟甲基胞嘧啶、5-二氟甲基胞嘧啶和未取代或取代的 5-炔基胞嘧啶），6-取代胞嘧啶（如 6-羟基胞嘧啶），N4-取代胞嘧啶（如 N4-乙基胞嘧啶），5-氮杂胞嘧啶、2-巯基胞嘧啶、异胞嘧啶、假异胞嘧啶、带稠环系统的胞嘧啶类似物（如 N,N'-亚丙基胞嘧啶或吩噻嗪），和尿嘧啶及其衍生物（如 5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-溴乙烯基尿嘧啶、4-硫代-尿嘧啶、5-羟基胞嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶）。一些优选的胞嘧啶包括 5-甲基胞嘧啶、5-氟胞嘧啶、5-羟基胞嘧啶、5-羟甲基胞嘧啶和 N4-乙基胞嘧啶。在本发明的另一个实施方案中，胞嘧啶碱基由通用碱基（如 3-硝基吡咯、P-碱基）、芳香环系统（如氟苯或二氟苯）或氢原子（dSpacer）替换。

鸟嘌呤可以用修饰鸟嘌呤替换。本文所用的修饰鸟嘌呤是鸟嘌呤的天然存在或非天然存在的嘌呤碱基类似物，它们可以替换该碱基而不影响所述寡核苷酸的免疫刺激活性。修饰鸟嘌呤包括但不限于 7-去氮杂鸟嘌呤、7-去氮杂-7-取代鸟嘌呤（如 7-去氮杂-7-(C₂-C₆)炔基鸟嘌呤）、7-去氮杂-8-取代鸟嘌呤、次黄嘌呤、N2-取代鸟嘌呤（如 N2-甲基鸟嘌呤）、5-氨基-3-甲基-3H,6H-噻唑并[4,5-d]嘧啶-2,7-二酮、2,6-二氨基嘌呤、2-氨基嘌呤、嘌呤、吡咯、腺嘌呤、取代腺嘌呤（如 N6-甲基-腺嘌呤、8-氧杂腺嘌呤）、8-取代鸟嘌呤（如 8-羟基鸟嘌呤和 8-溴鸟嘌呤）和 6-硫代鸟嘌呤。在本发明的另一个实施方案中，鸟嘌呤碱基被通用碱基（如 4-甲基吡咯、5-硝基吡咯和 K-碱基）、芳香环系统（如苯并咪唑或二氯苯并咪唑、1-甲基-1H-[1,2,4]三氮唑-3-羧酰胺）或氢原子（dSpacer）替换。

在一个实施方案中，CG 二核苷酸的 C 和 G 分别是未修饰的胞嘧啶和鸟嘌呤。在一个实施方案中，CG 二核苷酸的 C 是未甲基化的。

对于本发明的应用，本发明的寡核苷酸可以用本领域已知的多种方法中任一种从头合成，例如β-氰乙基亚磷酰胺法（Beaucage SL et al. (1981) *Tetrahedron Lett* 22:1859）；或核苷 H-磷酸酯法（Garegg et al. (1986) *Tetrahedron Lett* 27:4051-4; Froehler BC et al. (1986) *Nucleic Acids Res* 14:5399-407; Garegg et al. (1986) *Tetrahedron Lett* 27:4055-8; Gaffney et al. (1988) *Tetrahedron Lett* 29:2619-22）。这些化学可用市场可用的多种自动核酸合成仪实施。这些寡核苷酸被称为合成寡核苷酸。分

离寡核苷酸一般表示与天然状态下正常结合的组分分离的寡核苷酸。作为实例，分离寡核苷酸可以是从小细胞、细胞核、线粒体或染色质分离的一种。

修饰骨架如硫代磷酸酯可以用利用氨基磷酸酯或 H-磷酸酯化学的自动化技术合成。芳基-和烷基-磷酸酯可以如 U.S. Patent. No.4,469,863 中所述制备；烷基磷酸三酯（其中带电氧基团如 U.S. Pat. No. 5,023,243 和 EP No.092,574 所述被烷基化）可以通过自动化固相合成用商品试剂制备。已经描述了制造其它 DNA 骨架修饰和替换的方法（如 Uhlmann E et al. (1990) *Chem Rev* 90:544; Goodchild J (1990) *Bioconjugate Chem* 1:165）。

所述免疫刺激性寡核苷酸还可以在核苷酸或核苷酸类似物结构之间含有一种或多种稀有连键。通常的核苷间连键是 3'5'-连键。所有其它连键都被认为是稀有核苷间连键，如 2'5'-、5'5'-、3'3'-、2'2'-、和 2'3' 连键。因而，2'-5'的命名是根据核糖的碳原子。然而，如果使用稀有糖结构如环扩张糖类似物（如己糖、环己烯或吡喃糖）或双环或三环糖类似物，那么该命名根据单体的命名而改变。例如在 3'-脱氧-β-D-吡喃核糖类似物（也称 *p*-DNA）中，单核苷酸经 4'2'-连键而连接。

如果核苷酸含有一个 3'3'-连键，那么该寡核苷酸类似物通常具有两个未连接的 5'-端。与之相似，如果核苷酸含有一个 5'5'-连键，那么该寡核苷酸类似物通常具有两个未连接的 3'-端。核苷酸的未连接端的可接近性可以是对它们的受体更好接近。两种类型稀有连键（3'3'-和 5'5'-）描述于 Ortigao JF et al. (1992) *Antisense Res Dev* 2:129-46，其中报道具有 3'3'-连键的寡核苷酸显示对核酸酶切割的增强的稳定性。

不同类型的连键也可以组合在一个分子中，这可以导致寡聚物形成分支。如果寡聚物的一部分经 3'3'-连键与第二个寡核苷酸部分连接，并经 2'3'-连键在 2'端与所述分子的第三部分连接，这导致例如具有三个 5'-端的带分支的寡核苷酸（3'3'-、2'3'-分支）。

寡核苷酸不同部分之间或不同寡核苷酸之间的连接分别可以通过该分子的所有部分发生，只要不负面干扰受体识别即可。根据核酸的本性，连接可以涉及糖结构（Su）、杂环核碱基（Ba）或磷酸骨架（Ph）。因此，Su-Su、Su-Ph、Su-Ba、Ba-Ba、Ba-Su、Ba-Ph、Ph-Ph、Ph-Su 和 Ph-Ba 类型的连接是可能的。如果寡核苷酸进一步

被某种非核苷酸取代基修饰,连接也可以通过寡核苷酸的修饰部分发生。这些修饰还包括修饰核酸,如 PNA、LNA 或吗啉代寡核苷酸类似物。

连键优选由 C、H、N、O、S、B、P 和卤素组成,含 3-300 个原子。具有 3 个原子的实例是缩醛键 (ODN1-3'-O-CH₂-O-3'-ODN2; Froehler and Matteucci), 它例如将一个核苷酸的 3'羟基连接到第二个寡核苷酸的 3'-羟基上。具有约 300 个原子的实例是 PEG-40 (tetraconta polyethyleneglycol)。优选的连键是磷酸二酯键、硫代磷酸酯键、甲基磷酸酯键、氨基磷酸酯键、boranophosphonate 键、酰胺键、醚键、硫醚键、缩醛键、硫缩醛键、脲键、硫脲键、磺酰胺键、希弗氏碱键和二硫键。另一种可能性是使用 Solulink BioConjugation System (TriLink BioTechnologies, San Diego, CA)。

如果寡核苷酸由两个或更多序列部分组成,这些部分可以相同或不同。因此,在具有 3'3'-连键的寡核苷酸中,序列可以相同,如 5'-ODN1-3'3'-ODN1-5',或不同,如 5'-ODN1-3'3'-ODN2-5'。另外,多种寡核苷酸部分以及连接它们的连接子的化学修饰可以不同。因为端寡核苷酸的吸收似乎比长寡核苷酸更低效,两个或更多短序列的连接导致更强的免疫刺激。短寡核苷酸的长度优选是 2-20 个核苷酸,更优选 3-16 个核苷酸,但最优选 5-10 个核苷酸。优选的是,连接的寡核苷酸具有两个或更多未连接的 5'-端。

寡核苷酸部分序列还可以通过非核苷酸连接子连接,尤其是无碱基连接子 (dSpacer)、三乙二醇单元或六乙二醇单元。其它连接子包括烷氨基连接子,如 C3、C6、C12 氨基连接子,以及烷基硫醇连接子,如 C3 或 C6 硫醇连接子。寡核苷酸还可以用芳香残基连接,所述芳香残基可以进一步被烷基或取代烷基取代。

寡核苷酸还可以含有双体或三体单元 (Glen Research, Sterling, VA), 尤其是那些具有 3'3'-连键的寡核苷酸。在一个实施方案中,双体单元可以基于 1,3-双-[5-(4,4'-二甲氧基三苯氧基)戊酰胺]丙基-2-[(2-氰乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺。在一个实施方案中,三体单元可以基于三-2,2,2-[3-(4,4'-二甲氧基三苯氧基)丙氧基甲基]乙基-[(2-氰乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺的掺入。由多个双体单元、三体单元或其它多倍单元产生的寡核苷酸分支导致枝状体(dendrimer),这是本发明的进一步实施方案。

寡核苷酸还可以含有由肽修饰试剂或寡核苷酸修饰试剂(Glen Research, Sterling VA)产生的连接子单元。此外,连接子可以含有由肽(酰胺)键连接的一个或多个天然或非天然氨基酸残基。

连接寡核苷酸的另一种可能性是通过交联杂环碱基(Verma S et al (1998) *Annu Rev Biochem* 67:99-134; page 124)。再一种可能性是一个序列部分的糖结构与另一个序列部分的杂环碱基之间的连接(Iyer et al. (1999) *Curr Opin Mol Therapeutics* 1:344-58; page 352)。

含稀有连键的不同寡核苷酸用已知方法合成并可以在固相合成期间在线连接在一起。作为替代方案,可以在各部分序列合成以后再将它们连接在一起。

在小鼠系统中具有强免疫刺激活性的 CpG 硫代磷酸酯寡核苷酸对于人和其它非啮齿类免疫细胞倾向于表现较低活性。含这些(TCG)_nN 或 RDCGY₁Y₂N 基序的 DNA 强烈刺激人外周血细胞产生 IFN- α 。

根据本发明已经发现,所述亚类的 CpG 免疫刺激性寡核苷酸对于人细胞如 PBMC 具有强的免疫刺激作用,这提示这些 CpG 免疫刺激性寡核苷酸是用于人疫苗接种、癌症免疫疗法、哮喘免疫疗法、免疫功能的一般性增强、放射或化学疗法后造血恢复的增强和其它免疫调节性应用的有效治疗剂。

本文中当用于疾病如传染性疾病、癌症、变态反应或哮喘时,术语“治疗(treat, treated 或 treating)”表示预防性治疗,以增加治疗对象对疾病发生(如感染病原体)的抗性,或换句话说,降低治疗对象发生疾病(如感染病原体)的概率,以及在对象已经发生疾病以后的治疗,以对抗疾病(如降低或消除感染)或预防疾病加重。

因此,在本发明的一些方面中, CpG 所述免疫刺激性寡核苷酸可用作治疗患有变态反应或哮喘、感染传染性生物或已鉴定到特定癌抗原的癌症或有发生这些疾病风险的对象的疫苗。因此所述 CpG 免疫刺激性寡核苷酸可以与抗原或变应原一起联合给予治疗对象,用于治疗感染、变态反应、哮喘或癌症。作为替代方案和附加方案,所述 CpG 免疫刺激性寡核苷酸还可以不加抗原或变应原单独给予,用于抵抗感染、变态反应或癌症,或可以与其它治疗剂一起给予。所述 CpG 免疫刺激性寡核苷酸还可以与其它治疗剂一起给予。重复给药可允许更长保护。

本文中处于风险中的对象是具有暴露于引起感染的病原体的任何可识别风险或发生癌症的风险的对象。例如，处于发生感染的风险中的对象可以是计划到发现特定类型传染因子的地区旅行的对象，或者可以是由于生活方式或医学操作要暴露于可能含有传染性生物的体液或直接暴露于这种生物的对象，或者可以是在已经鉴定了传染性生物或变应原的地区生活的任何对象。处于发生感染的风险中的对象还包括医疗机构推荐接种特定传染性生物抗原疫苗的一般人群。如果所述抗原是变应原，对象对该变应原发生变态反应并且对象可能暴露于该抗原，如花粉季节，那么该对象处于发生变态反应的风险中。处于发生变态反应或哮喘风险的对象包括已鉴定患有变态反应或哮喘但在 **CpG** 免疫刺激性寡核苷酸治疗期间不具有活跃疾病的对象。处于发生变态反应或哮喘风险的对象还包括由于遗传或环境因素被认为处于发生这些疾病的风险中的对象。

处于发生癌症的风险中的对象是具有发生癌症的高概率的对象。例如这些对象包括具有遗传异常的对象，这种异常的存在已被证明与发生癌症的较高概率具有相关性；暴露于癌症相关物质如烟草、石棉或其它化学毒素的对象；和之前因癌症被治疗并处于明显好转的对象。当处于发生癌症的风险中的对象用 **CpG** 免疫刺激性寡核苷酸和任选的抗原治疗时，所述对象可以在癌细胞发生时将之杀死，其中所述抗原特异性针对所述对象有风险的癌症类型。如果肿瘤开始在对象中形成，所述对象将发生抗该肿瘤抗原的先天性免疫应答或特异性免疫应答。

除了 **CpG** 免疫刺激性寡核苷酸用于预防性治疗的用途以外，本发明还涉及 **CpG** 免疫刺激性寡核苷酸用于治疗患有感染、变态反应、哮喘或癌症的对象的用途。

患有感染的对象是已经暴露于传染性病原体并且在身体中具有急性或慢性可检测水平的该病原体的对象。所述 **CpG** 免疫刺激性寡核苷酸可与抗原或其它治疗剂一起或不一起使用，以引发能够降低该传染性病原体的水平或根除该病原体的先天性或抗原特异性、系统性或粘膜免疫应答。本文中传染性疾病是因身体中存在外来微生物而产生的疾病。特别重要的是开发有效的疫苗策略和治疗以保护身体的粘膜表面，这是病原体进入的起始部位。

患有变态反应的对象是能对变应原产生变态反应的对象。变态反应表示对物质

（变应原）的获得性超敏性。变态反应疾病包括但不限于湿疹、变应性鼻炎或伤风、枯草热、结膜炎、支气管哮喘、变应性哮喘、风疹（荨麻疹）、食物变态反应和其它特应性疾病。

变态反应一般由产生抗无害性变应原的 **IgE** 抗体而引起。系统或粘膜给予 **CpG** 免疫刺激性寡核苷酸诱导的细胞因子主要是称作 **Th1**（实例是 **IL-12**、**IP-10**、**IFN- α** 和 **IFN- γ** ）的类型，它们诱导体液免疫应答和细胞免疫应答。其它主要类型的免疫应答与产生 **IL-4** 和 **IL-5** 细胞因子相关，称为 **Th2** 免疫应答。一般来说，看起来变应性疾病由 **Th2** 型免疫应答介导。基于此处所述 **CpG** 免疫刺激性寡核苷酸将对象中免疫应答由 **Th2**（与产生 **IgE** 抗体和变态反应相关）为主转移为 **Th2/Th1** 平衡的应答（保护抵抗变态反应）的能力，有效剂量的诱导免疫应答的 **CpG** 免疫刺激性寡核苷酸可以给予对象以治疗哮喘和变态反应。

因此，所述 **CpG** 免疫刺激性寡核苷酸在治疗变态反应疾病和哮喘中具有显著的治疗用途。**Th2** 细胞因子，尤其是 **IL-4** 和 **IL-5**，在哮喘对象的气道中增加。这些细胞因子促进哮喘炎性反应的重要方面，包括 **IgE** 同位（**isotope**）转换、嗜酸性粒细胞的趋化性和活化和肥大细胞生长。**Th1** 细胞因子，尤其是 **IFN- γ** 和 **IL-12**，能抑制 **Th2** 克隆形成和 **Th2** 细胞因子的产生。哮喘是以炎症、气道狭窄和气道对吸入因子反应性增加为特征的一种呼吸系统疾病。尽管不绝对，哮喘经常与特应性或变应性症状相关。因此，哮喘包括变应性哮喘和非变应性哮喘。

患有癌症的对象是具有可检测水平癌性细胞的对象。癌症可以是恶性或非恶性癌症。癌症或肿瘤包括但不限于胆管癌；脑癌；乳癌；宫颈癌；绒膜癌；结肠癌；子宫内膜癌；食管癌；胃癌；上皮内赘生物；淋巴瘤；肝癌；肺癌（如小细胞和非小细胞肺癌）；黑素瘤；神经母细胞瘤；口腔癌；卵巢癌；胰癌；前列腺癌；直肠癌；肉瘤；皮肤癌；睾丸癌；甲状腺癌；和肾癌，以及其它癌和肉瘤。在一个实施方案中，癌症是毛细胞白血病、慢性髓性白血病、皮肤 **T** 细胞白血病、多发性骨髓瘤、滤泡性淋巴瘤、恶性黑素瘤、鳞状细胞癌、肾细胞癌、前列腺癌、膀胱细胞癌或结肠癌。

对象表示人或脊椎动物，包括但不限于狗、猫、马、牛、猪、绵羊、山羊、火鸡、鸡、灵长目如猴，以及鱼（水生生物）如鲑鱼。因此所述化合物可用于治疗人和

非人对象中的癌症和肿瘤、感染和变态反应/哮喘。癌症是伴侣动物（如猫和狗）死亡的主要因素之一。

当与抗原一起施用 **CpG** 寡核苷酸时，对象可能暴露于抗原。本文中术语“暴露于”表示使对象与抗原主动接触的步骤或者将对象被动暴露于体内抗原。使对象主动暴露于抗原的方法在本领域公知。一般来说，通过任意方式如静脉内、肌肉内、经口、透皮、粘膜、鼻内、气管内或皮下给药，将抗原直接施用于对象。抗原可以系统性或局部施用。施用抗原和 **CpG** 免疫刺激性寡核苷酸的方法在下面更详细描述。如果抗原可以暴露于体内的免疫细胞，则对象被动暴露于抗原。例如可以通过使外来抗原进入体内或通过产生表达外来抗原在其表面上的肿瘤细胞，对象可以被动暴露于抗原。

对象被动暴露于抗原的方法可能特别依赖于施用 **CpG** 免疫刺激性寡核苷酸的时间方案。例如，在处于发生癌症或传染病或变态反应或哮喘反应风险的对象中，当该风险最大时，如在变态反应季节期间或暴露于引起癌症的因子之后，可以定期向对象施用 **CpG** 免疫刺激性寡核苷酸。另外，可以在旅行者处于暴露于传染因子的风险中的外地旅行之前，向他们施用 **CpG** 免疫刺激性寡核苷酸。类似地，可以向处于暴露于生物战争风险中的士兵或平民施用 **CpG** 免疫刺激性寡核苷酸，以在对象暴露于抗原时诱导对抗原的系统或粘膜免疫应答。

本文所用抗原是能唤起免疫应答的分子。抗原包括但不限于细胞、细胞提取物、蛋白质、多肽、肽、多糖、多糖缀合物、多糖和其它分子的肽和非肽模拟物、小分子、脂、糖脂、碳水化合物、病毒和病毒提取物，以及多细胞生物如寄生虫和变应原。术语抗原广义上包括被宿主免疫系统识别为外来物的任何类型的分子。抗原包括但不限于癌抗原、微生物抗原和变应原。

本文中癌抗原是与肿瘤或癌症细胞表面结合并且就 **MHC** 分子而言当表达于抗原提呈细胞表面时能唤起免疫应答的化合物，如肽或蛋白质。癌抗原可以从癌细胞制备，这可以通过制备癌细胞的粗提取物，例如描述于 **Cohen PA et al. (1994) *Cancer Res* 54:1055-8**，通过部分纯化该抗原，通过重组技术，或通过从头合成已知抗原。癌抗原包括但不限于重组表达的抗原、其免疫原性部分或整个肿瘤或癌细胞。这些抗原可以通过重组方式或本领域已知的任何其它方式分离或制备。

本文中术语“癌抗原”和“肿瘤抗原”可以互换使用，表示由癌细胞差异表达并因而能被用于靶向癌细胞的抗原。癌抗原是潜在能刺激明显肿瘤特异性免疫应答的抗原。其中一些癌抗原由正常细胞编码，尽管不一定表达。这些抗原能被表征为在正常细胞中正常沉默（即不表达）的抗原、只在某些发育阶段表达的抗原和暂时性表达的抗原如胚抗原和胎抗原。其它癌抗原由细胞基因突变体如癌基因（如活化的 **ras** 癌基因）、抑制基因（如 **p53** 突变体）、由内部缺失或染色体转位产生的融合蛋白编码。还有其它癌抗原可以由病毒基因如 **RNA** 和 **DNA** 肿瘤病毒上携带的病毒基因编码。

本文中微生物抗原是微生物的抗原，包括但不限于病毒、细菌、寄生虫和真菌。这些抗原包括完整微生物及其天然分离物和片段或衍生物，以及与天然微生物抗原相同或相似并诱导对该微生物特异性免疫应答的合成化合物。如果化合物诱导针对天然微生物抗原的免疫应答（体液和/或细胞免疫应答），则该化合物与天然微生物抗原相似。这些抗原在本领域常规使用并且对本领域普通技术人员是公知的。

已经在人中发现的病毒的实例包括但不限于：逆转录病毒科（如人免疫缺陷病毒如 **HIV-1**（也称为 **HTLV-III**、**LAV** 或 **HTLV-III/LAV**，或 **HIV-III**；和其它分离物如 **HIV-LP**；小 **RNA** 病毒科（例如脊髓灰质炎病毒、甲肝病毒、肠病毒、人科萨奇病毒、鼻病毒、人肠道细胞病变孤儿病毒）；***Caliciviridae***（例如引起肠胃炎的毒株）；披膜病毒科（例如马脑炎病毒、风疹病毒）；黄病毒科（例如登革热病毒、脑炎病毒、黄热病毒）；冠状病毒科（例如冠状病毒）；***Rhabdoviridae***（例如血管性口腔炎病毒、狂犬病毒）；***Filoviridae***（例如埃博拉病毒）；副粘病毒科（例如副流感病毒、腮腺炎病毒、麻疹病毒、呼吸道合胞体病毒）；正粘病毒科（例如流感病毒）；布尼亚病毒科（例如汉坦病毒、布尼亚病毒、白蛉热病毒和 **Nairo** 病毒）；沙粒病毒科（出血热病毒）；呼肠孤病毒科（例如呼肠孤病毒、环状病毒和轮状病毒）；***Bornaviridae***；肝 **DNA** 病毒科（乙肝病毒）；细小病毒科（细小病毒）；乳多空病毒科（乳头瘤病毒、多瘤病毒）；腺病毒科（多数腺病毒）；疱疹病毒科（单纯疱疹病毒（**HSV**）1 和 2、水痘带状疱疹病毒、巨细胞病毒（**CMV**）、疱疹病毒；痘病毒科（天花病毒、痘苗病毒、痘病毒）；和虹彩病毒科（如非洲猪热病毒）；和未分类病毒（例如丁型肝炎因子（被认为是乙肝病毒的缺陷型卫星病毒）、丙型肝炎因子；诺沃克和相关病毒，以及星状病

毒)。

革兰氏阴性和革兰氏阳性细菌都可以作为脊椎动物的抗原。这样的革兰氏阳性细菌包括但不限于巴斯德氏菌属物种、葡萄球菌属物种和链球菌属物种。革兰氏阴性细菌包括但不限于大肠埃希氏菌、假单孢菌属物种和沙门氏菌属物种。传染性细菌的具体实例包括但不限于幽门螺杆菌、伯氏疏螺旋体 (*Borrelia burgdorferi*)、亲肺军团菌 (*Legionella pneumophila*)、分枝杆菌属物种 (例如结核分枝杆菌、鸟分支杆菌、胞内分支杆菌、堪萨斯分支杆菌、戈登分支杆菌)、金黄色葡萄球菌、奈瑟氏淋病双球菌、脑膜炎奈瑟氏球菌、单核细胞增生性利斯特氏菌、化脓性链球菌 (A 群链球菌)、无乳链球菌 (B 群链球菌)、链球菌 (草绿色链球菌)、粪链球菌、牛链球菌、链球菌 (*anaerobic* spp.)、肺炎链球菌、致病性弯曲杆菌属物种、肠球菌属物种、流感嗜血杆菌、炭疽芽孢杆菌、白喉棒状杆菌、棒状杆菌属物种、猪丹毒杆菌、产气荚膜梭状芽孢杆菌、破伤风梭菌、产气肠杆菌、肺炎克雷伯氏菌、多杀性巴氏杆菌 (*Pasturella multocida*)、厌氧杆菌、具核梭杆菌、念珠状链杆菌、梅毒螺旋体、雅司病螺旋体、螺旋体、立克次氏体和以色列放线菌 (*Actinomyces israelii*)。

真菌的实例包括新型隐球菌、荚膜组织胞浆菌、*Coccidioides immitis*、*Blastomyces dermatitidis*、*Chlamydia trachomatis*、*Candida albicans*。

其它传染性生物 (即原生生物) 包括疟原虫属物种如镰状疟原虫、三日疟原虫、卵形疟原虫、核间日疟原虫和鼠弓形体。血源和/或组织寄生虫包括疟原虫属物种、*Babesia microti*、*Babesia divergens*、热带利什曼原虫、利什曼虫属物种、巴西利什曼原虫、杜氏利什曼原虫、*Trypanosoma gambiense* 和 *Trypanosoma rhodesiense* (非洲昏睡病)、*Trypanosoma cruzi* (恰加斯病) 和 *Toxoplasma gondii*。

其它医学相关微生物已经在文献中广泛描述, 例如见. C.G.A Thomas, *Medical Microbiology*, Bailliere Tindall, Great Britain 1983, 其全部内容通过引用并入本文。

变应原指能在易感对象中诱导变态反应或哮喘反应的物质 (抗原)。变应原的数量是巨大的, 并可以包括花粉、昆虫毒液、动物毛皮屑、尘、真菌孢子和药物 (如青霉素)。天然动物和植物变应原的实例包括但不限于特异于以下属的蛋白质: 犬属 (家犬); 尘螨属 (如粉尘螨); 猫属 (家猫); 豚草属 (*Ambrosia artemisiifolia*); 黑麦草属 (如

Lolium perenne 或 *Lolium multiflorum*); 柳杉属 (*Cryptomeria*) (日本柳杉); 链格孢属(交链格孢); 桤木属 (*Alder*); *Alnus* (*Alnus glutinosa*); 桦属(疣皮桦); 栎属 (白栎); 洋橄榄属(油橄榄); 蒿属(艾蒿); 车前草属(如长叶蒲公英); 墙草属 (如直立墙草或犹太墙草); 小蠹属 (如德国小蠹); 蜜蜂属 (如 *Apis mellifera*); 柏属 (如地中海柏木、绿干柏和大果柏木); 桧属(如 *Juniperus sabinoides*, *Juniperus virginiana*, *Juniperus communis* 和 *Juniperus ashei*); 崖柏属 (如侧柏); 扁柏属 (如扁柏); 大蠹属 (如美洲大蠹); 冰草属 (如匍匐冰草); 黑麦属 (如黑麦); 小麦属 (如小麦); 鸭茅属(如鸭茅); 羊茅属 (如草地羊茅); 早熟禾属 (如草地早熟禾或加拿大早熟禾); 燕麦属 (如燕麦); 绒毛草属 (如绒毛草); 黄花茅属 (如香黄花茅); 燕麦草属 (如天鹅燕麦草); 剪股颖属(如小糠草); 梯牧草属 (如猫尾草); 藜草属 (如藜草); 雀稗属 (如百喜草); 高粱属 (如 *Sorghum halepense*); 和雀麦属 (如无芒雀麦)。

抗原可以基本是纯化的。本文中术语基本纯化的表示抗原即多肽基本没有其它蛋白质、脂、碳水化合物或其它天然结合物质。本领域技术人员能用蛋白质纯化的标准技术纯化多肽抗原。基本纯多肽经常在非还原聚丙烯酰胺凝胶上产生单一主带。对于部分糖基化的多肽或具有几个起始密码子的多肽,在非还原聚丙烯酰胺凝胶上可能有几条带,但这些带将形成该多肽的可区分模式。多肽抗原的纯度也可以通过氨基端氨基酸序列分析确定。其它类型的抗原如多糖、小分子、模拟物等包括在本发明范围内,并且任选地是基本纯的。

本发明的寡核苷酸可以与抗微生物剂一起给予对象。本文中抗微生物剂表示能杀死或抑制传染性微生物的天然存在或合成化合物。根据本发明使用的抗微生物剂的类型将依赖于对象感染或有感染风险的微生物类型。抗微生物剂包括但不限于抗菌剂、抗病毒剂、抗真菌剂和抗寄生虫剂。短语如“抗感染剂”、“抗菌剂”、“抗病毒剂”、“抗真菌剂”和“抗寄生虫剂”和“杀寄生虫剂”对于本领域普通技术人员具有明确含义并已经在标准医学书籍中定义。简单的说,抗菌剂杀死或抑制细菌,包括抗生素以及具有相似功能的其它合成或天然化合物。抗生素是由细胞如微生物作为次生代谢物产生的低分子量分子。一般来说,抗生素干扰一种或多种细菌功能或结构,这些功能和结构是微生物特异性的并且宿主细胞中没有。抗病毒剂可从天然来源分离

或合成，并可用于杀死或抑制病毒。抗真菌剂用于治疗表面真菌感染以及可能的和原发性系统性真菌感染。抗寄生虫剂杀死或抑制寄生虫。

抗寄生虫剂用于人时也称杀寄生虫剂，它的实例包括但不限于阿苯达唑、两性霉素 B、苄硝唑、硫氯酚、盐酸氯喹、磷酸氯喹、氯洁霉素、去氢依米丁、乙胺嘧啶、糠二氯散、依洛尼塞、呋喃唑酮、糖皮质激素、卤泛曲林、双碘喹啉、伊维菌素、甲苯哒唑、甲氟喹、葡甲胺锑酸盐、美拉肿醇、敌百虫、灭滴灵、氯硝柳胺、硝呋莫司、奥沙尼喹、巴龙霉素、戊双脒羟乙基磺酸盐、哌嗪、吡喹酮、磷酸伯氨喹、氯胍、噻嘧啶双羟萘酸盐、乙胺嘧啶-磺酰胺、乙胺嘧啶-磺胺多辛、盐酸阿的平、硫酸奎宁、葡萄糖酸奎纳、螺旋霉素、锑葡萄糖酸钠、苏拉明、四环素、强力霉素、噻苯咪唑、替硝唑、**trimethoprim**-磺胺甲恶唑和锥虫胂胺，其中一些单独使用或与其它组合使用。

抗细菌剂杀死或抑制细菌的生长或功能。一大类抗细菌剂是抗生素。可有效杀死或抑制广谱细菌的抗生素，被称为广谱抗生素。其它类型的抗生素主要对革兰氏阳性或革兰氏阴性类型的细菌有效。这些类型的抗生素被称为窄谱抗生素。对单个生物或疾病有效而不抗其它类型细菌的其它抗生素被称为限制谱抗生素。抗细菌剂有时基于它们的主要作用模式分类。一般来说，抗细菌剂有细胞壁合成抑制剂、细胞膜抑制剂、蛋白质合成抑制剂、核酸合成或功能抑制剂和竞争性抑制剂。

抗病毒剂是防止细胞被病毒感染或防止病毒在细胞内复制的化合物。与抗细菌药物相比，抗病毒药物少的多，因为病毒复制过程与宿主细胞内 DNA 复制紧密相关，以至于非特异性抗病毒剂经常对宿主有毒性。病毒感染过程中有几个阶段可以被抗病毒剂阻断或抑制。这些阶段包括病毒与宿主细胞附着（免疫球蛋白或结合肽）、病毒去包装（如金刚烷胺）、病毒 mRNA 的合成或翻译（如干扰素）、病毒 RNA 或 DNA 的复制（如核苷类似物）、新病毒蛋白质的成熟（如蛋白酶抑制剂）和病毒出芽与释放。

核苷酸类似物是与核苷酸相似、但具有不完全或异常脱氧核糖或核糖基的合成化合物。核苷酸类似物在细胞中时，它们被磷酸化，产生三磷酸形式，与正常核苷酸竞争掺入病毒 DNA 或 RNA 中。核苷酸类似物的三磷酸形式掺入生长中核酸链时，引起与病毒聚合酶的不可逆结合并因而使链终止。核苷酸类似物包括但不限于阿昔洛

韦（用于治疗单纯疱疹病毒和水痘带状疱疹病毒）、更昔洛韦（用于治疗巨细胞病毒）、碘脱氧尿苷、利巴韦林（用于治疗呼吸道合胞体病毒）、二脱氧肌苷、二脱氧胞苷、齐多夫定（叠氮胸苷）、咪喹莫特和 **resimiquimod**。

干扰素是由感染病毒的细胞和免疫细胞分泌的细胞因子。干扰素通过结合与感染细胞临近的细胞上的特异性受体而发挥功能，引起细胞的改变，保护细胞免受病毒感染。 α -和 β -干扰素还诱导感染细胞表面上 I 类和 II 类 MHC 分子的表达，导致抗原提呈增加以使宿主免疫细胞识别。 α -和 β -干扰素有重组形式可用，并已经用于治疗慢性乙肝和丙肝感染。在抗病毒治疗有效的剂量下，干扰素有严重副作用如发热、不适和体重下降。

用于本发明的抗病毒剂包括但不限于免疫球蛋白、金刚烷胺、干扰素、核苷类似物和蛋白酶抑制剂，抗病毒剂的具体实例包括但不限于乙酰吗喃；阿昔洛韦；阿昔洛韦钠；阿德福韦；阿洛韦定；**Alvircept Sudotox**；盐酸金刚烷胺；阿拉诺丁；阿立酮；甲磺酸阿地维定；阿夫立定；西多福韦；西潘茶碱；盐酸阿糖胞苷；甲磺酸地拉韦定；地昔洛韦；地达诺新；二噁沙利；依度尿苷；恩韦拉登；恩韦肟；泛昔洛韦；盐酸法莫汀；非西他滨；非阿尿苷；膦利酯；膦甲酸钠；膦乙酸钠；更昔洛韦；更昔洛韦钠；碘脱氧尿苷；凯托沙；拉米夫定；洛布卡韦；盐酸美莫汀；美替沙脞；奈韦拉平；戊昔洛韦；**Pirodavir**；利巴韦林；盐酸金刚乙胺；甲磺酸沙喹那韦；盐酸索金刚胺；索利夫定；匍枝青霉素；司他夫定、盐酸乙胺苄酮；三氟尿苷；盐酸伐昔洛韦（**Valacyclovir**）；阿糖腺苷；磷酸阿糖腺苷；磷酸钠阿糖腺苷；**Viroxime**；扎西胞苷；齐多夫定；和 **Zinviroxime**。

抗真菌剂用于治疗 and 预防传染性真菌。抗真菌剂有时根据其作用机理分类。一些抗真菌剂通过抑制葡萄糖合成酶作为细胞壁抑制剂发挥功能。这些包括但不限于 **basiungin/ECB**。其它抗真菌剂通过去稳定膜完整性而发挥功能。这些包括但不限于咪唑类如克霉唑、舍他康唑、氟康唑、伊曲康唑、酮康唑、咪康唑和奥利康唑。以及 **FK463**、两性霉素 B、**BAY 38-9502**、**MK 991**、普那米星、**UK 292**、丁萘芬和特比萘芬。其它抗真菌剂通过分解几丁质（如几丁质酶）或抑制免疫（**501 霜**）而发挥功能。

CpG 免疫刺激性寡核苷酸可以与其它治疗剂如佐剂组合以增强免疫应答。**CpG**

免疫刺激性寡核苷酸和其它治疗剂可以同时或依次施用。当其它治疗剂同时施用时，它们可以相同或分离的制剂但相同时间施用。当其它治疗剂和 **CpG** 免疫刺激性寡核苷酸在时间上分开施用时，其它治疗剂与 **CpG** 免疫刺激性寡核苷酸互相先后依次施用。更具体地，**CpG** 免疫刺激性寡核苷酸可以在施用（或暴露于）至少一种其它治疗剂之前或之后施用。施用这些化合物之间时间上的分离可以是以分钟计或更长时间。其它治疗剂包括但不限于佐剂、细胞因子、抗体、抗原等。

本发明的组合物还可以与非核酸佐剂一起施用。非核酸佐剂是除了能刺激体液和/或细胞免疫应答的本文所述 **CpG** 免疫刺激性寡核苷酸之外的任何分子或化合物。非核酸佐剂例如包括产生沉积作用的佐剂、免疫刺激性佐剂，和产生沉积作用并刺激免疫系统的佐剂。

CpG 免疫刺激性寡核苷酸还可用作粘膜佐剂。之前已经发现，经粘膜递送 **CpG** 核酸诱导系统和粘膜免疫。因此，寡核苷酸可以与其它粘膜佐剂组合施用。

与 **CpG** 免疫刺激性寡核苷酸一起施用或共线性表达细胞因子（**Bueller & Mulligan, 1996; Chow et al., 1997; Geissler et al., 1997; Iwasaki et al., 1997; Kim et al., 1997**）或共刺激分子如 **B7**（**Iwasaki et al., 1997; Tsuji et al., 1997**）也可诱导或增强免疫应答。术语细胞因子用作多种可溶性蛋白质和肽的上位概念，它们在正常或病理条件下在纳-或皮摩尔浓度起体液调节因子的作用，调节单个细胞和组织的功能活性。这些蛋白质也直接介导细胞间相互作用并调节细胞外环境中发生的过程。细胞因子的实例包括但不限于白介素-1（**IL-1**）、**IL-2**、**IL-3**、**IL-4**、**IL-5**、**IL-6**、**IL-7**、**IL-10**、**IL-12**、**IL-15**、**IL-18**、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子（**GM-CSF**）、粒细胞集落刺激因子（**G-CSF**）、**IFN- γ** 、**IFN- α** 、**IFN- β** 、肿瘤坏死因子（**TNF**）、**TGF- β** 、**Flt-3** 配体和 **CD40** 配体。除了细胞因子以外，**CpG** 寡核苷酸还可与抗某些细胞因子的抗体如抗 **IL-10** 和抗 **TGF- β** 以及环氧合酶抑制剂即 **COX-1** 和 **COX-2** 抑制剂组合使用。

寡核苷酸还可用于将免疫应答从 **Th2** 免疫应答重定向为 **Th1** 免疫应答。这导致产生相对平衡的 **Th1/Th2** 环境。从 **Th2** 免疫应答到 **Th1** 免疫应答的重定向能通过测量对所述核酸应答而产生的细胞因子水平来评价（如通过诱导单核细胞和其它细胞产生 **Th1** 细胞因子，包括 **IFN- α** ）。免疫应答从 **Th2** 向 **Th1** 应答的重定向或重平衡对于

治疗哮喘特别有用。例如，治疗哮喘的有效量可以是用于重定向与哮喘相关的 **Th2** 型免疫应答为 **Th1** 型应答或平衡 **Th1/Th2** 环境的量。**Th2** 细胞因子，尤其是 **IL-4** 和 **IL-5** 在哮喘患者气道中增加。本文所述 **CpG** 免疫刺激性寡核苷酸引起 **Th1** 细胞因子增加，帮助重新平衡免疫系统，预防或降低与 **Th2** 为主免疫应答相关的不利作用。

从 **Th2** 免疫应答向 **Th1** 免疫应答的重定向还可以通过测量具体同种型免疫球蛋白的水平来评价。例如，在小鼠中 **IgG2a** 与 **Th1** 免疫应答相关，**IgG1** 和 **IgE** 与 **Th2** 免疫应答相关。

CpG 免疫刺激性寡核苷酸具有促进树突细胞的细胞存活、分化、活化和成熟的独特能力，并可用于涉及树突细胞的体外、体内和离体方法。

CpG 免疫刺激性寡核苷酸还增加自然杀伤细胞裂解活性和抗体依赖性细胞毒作用 (**ADCC**)。**ADCC** 可用 **CpG** 免疫刺激性寡核苷酸与对细胞靶如癌细胞特异的抗体组合来进行。当 **CpG** 免疫刺激性寡核苷酸与抗体组合给予对象时，对象的免疫系统被诱导以杀死肿瘤细胞。用于 **ADCC** 方法的抗体包括与体内细胞相互作用的抗体。很多这样的特异性针对细胞靶的抗体已经在本领域描述并且很多可以商业获得。

CpG 免疫刺激性寡核苷酸还可以与抗癌治疗联合施用。抗癌治疗包括癌症药物、放射和手术方法。本文中“癌症药物”表示为治疗癌症目的而给予对象的药物。本文中“治疗癌症”包括预防癌症发生、减小癌症症状和/或抑制已有癌症生长。在其它方面中，癌症药物被给予处于发生癌症风险中的对象，以降低发生癌症的风险。本文中描述多种类型治疗癌症的药物。对于本说明书的目的，癌症药物被分类为化疗药、免疫治疗剂、癌疫苗、激素治疗和生物反应调节剂。

另外，本发明的方法还涉及将一种以上的癌症药物与 **CpG** 免疫刺激性寡核苷酸一起使用。例如，适当时，**CpG** 免疫刺激性寡核苷酸可以与化疗药和免疫治疗剂一起施用。作为替代方案，癌症药物可以包括免疫治疗剂和癌疫苗，或化疗药和癌疫苗，或化疗药、免疫治疗剂和癌疫苗，它们一起施用于一个对象以治疗患有癌症或处于发生癌症风险中的对象。

化疗剂可以选自：氨甲蝶呤、长春新碱、阿霉素、顺铂、不含糖的氯乙基亚硝基脲、5-氟尿嘧啶、丝裂霉素 C、博来霉素、阿霉素 (**doxorubicin**)、氮烯唑胺、紫

杉醇、fragyline、蜜胺 GLA、戊柔比星、卡莫司汀 (carmustaine) 和 poliferposan、MMI270、BAY 12-9566、RAS 法尼基转移酶抑制剂、法尼基转移酶抑制剂、MMP、MTA/LY231514、LY264618/洛美曲索 (Lometexol)、Glamolec、CI-994、TNP-470、Hycamtin/Topotecan、PKC412、Valspodar/PSC833、Novantrone/Mitroxantrone、Metaret/Suramin、巴马司他、E7070、BCH-4556、CS-682、9-AC、AG3340、AG3433、Incel/VX-710、VX-853、ZD0101、ISI641、ODN 698、TA2516/Marmistat、BB2516/Marmistat、CDP 845、D2163、PD183805、DX8951f、Lemonal DP 2202、FK 317、Picibanil/OK-432、AD 32/戊柔比星、美他锶种/锶衍生物、Temodal/Temozolomide、Evacet/脂质体阿霉素、Yewtaxan/Paclitaxel、紫杉醇/Paclitaxel、希罗达/卡培他滨、Furtulon/Doxifluridine、Cyclopax/口服 paclitaxel、口服 Taxoid、SPU-077/顺铂、HMR 1275/Flavopiridol、CP-358 (774)/EGFR、CP-609 (754)/RAS 癌基因抑制剂、BMS-182751/口服铂、UFT(Tegafur/尿嘧啶)、Ergamisol/左咪唑、Eniluraci1/776C85/5FU 增强剂、开普拓/左咪唑、Camptosar/Irinotecan、Tumodex/Ralitrexed、Leustatin/Cladribine、Paxex/紫杉醇、Doxil/脂质体阿霉素、Caelyx/脂质体阿霉素、Fludara/氟达拉滨、Pharmarubicin/表阿霉素、DepoCyt、ZD1839、LU 79553/Bis-Naphtalimide、LU 103793/Dolastain、Caetyx/脂质体阿霉素、Gemzar/吉西他滨、ZD 0473/Anormed、YM 116、Iodine seeds、CDK4 和 CDK2 抑制剂、PARP 抑制剂、D4809/Dexifosamide、Ifes/Mesnex/异磷酰胺、Vumon/替尼泊苷、Paraplatin/卡铂、Plantinol/顺铂、Vepeside/依托泊苷、ZD 9331、Taxotere/多西他赛、阿糖鸟苷的前药、紫杉烷类似物、亚硝基脲、烷基化剂如 melphelan 和环磷酰胺、氨鲁米特、天冬酰胺酶、白消安、卡铂、苯丁酸氮芥、盐酸阿糖胞苷、放线菌素 D、盐酸柔红霉素、雌氮芥磷酸钠、鬼臼乙叉苷 (VP16-213)、氟尿苷、氟尿嘧啶 (5-FU)、氟他米特、羟基脲(羟基尿素)、异环磷酰胺、干扰素 α -2a、 α -2b、乙酸亮脯利特(LHRH 释放因子类似物)、洛莫司汀 (CCNU)、盐酸二氯甲基二乙胺 (氮芥)、巯基嘌呤、美司钠、米托坦 (o.p'-DDD)、盐酸米托蒽醌、生长抑素八肽、普卡霉素、盐酸丙卡巴肼、链佐星、柠檬酸他莫西芬、硫代鸟嘌呤、硫替派、硫酸长春碱、安吖啶 (m-AMSA)、氮杂胞苷、红细胞生成素、六甲基密胺 (HMM)、白介素 2、

Mitoguazone (甲基-GAG; 甲基乙二醛双鸟嘌呤基脒; **MGBG**)、戊糖苷(2' 脱氧柯福霉素)、司莫司汀(甲基-CCNU)、替尼泊苷(**VM-26**)和硫酸长春地辛, 但不限于此。

所述免疫治疗剂可以选自 **Rituxan**、**Ributaxin**、**Herceptin**、**Quadramet**、**Panorex**、**IDEC-Y2B8**、**BEC2**、**C225**、**Oncolym**、**SMART M195**、**ATRAGEN**、**Ovarex**、**Bexxar**、**LDP-03**、**ior t6**、**MDX-210**、**MDX-11**、**MDX-22**、**OV103**、**3622W94**、抗-VEGF、**Zenapax**、**MDX-220**、**MDX-447**、**MELIMMUNE-2**、**MELIMMUNE-1**、**CEACIDE**、**Pretarget**、**NovoMAb-G2**、**TNT**、**Gliomab-H**、**GNI-250**、**EMD-72000**、**LymphoCide**、**CMA 676**、**Monopharm-C**、**4B5**、**ior egf.r3**、**ior c5**、**BABS**、**anti-FLK-2**、**MDX-260**、**ANA Ab**、**SMART 1D10 Ab**、**SMART ABL 364 Ab** 和 **ImmuRAIT-CEA**, 但不限于此。

所述癌症疫苗可以选自 **EGF**、抗独特型癌症疫苗、**Gp75** 抗原、**GMK** 黑素瘤疫苗、**MGV** 神经节苷脂缀合物疫苗、**Her2/neu**、**Ovarex**、**M-Vax**、**O-Vax**、**L-Vax**、**STn-KHL theratope**、**BLP25 (MUC-I)**、脂质体独特型疫苗、**Melacine**、肽抗原疫苗、毒素/抗原疫苗、基于 **MVA** 的疫苗、**PACIS**、**BCG** 疫苗、**TA-HPV**、**TA-CIN**、**DISC** 病毒和 **ImmuCyst/TheraCys**, 但不限于此。

CpG 免疫刺激性寡核苷酸联合使用免疫治疗剂如单克隆抗体能通过多种机制增加长期存活率, 包括显著增强 **ADCC** (如上述)、活化 **NK** 细胞和增加 **IFN- α** 水平。当与单克隆抗体联合使用时所述核酸用于降低实现生物学结果需要的抗体剂量。

本发明还包括使用 **CpG** 免疫刺激性寡核苷酸诱导抗原非特异性自然免疫活化和对传染性攻击的广谱抗性的方法。本文中术语自然免疫活化表示活化除记忆 **B** 细胞以外的免疫细胞, 例如可以包括活化单核细胞、中性粒细胞、巨噬细胞、树突细胞、**NK** 细胞和/或能以不依赖于抗原的方式作出反应的其它免疫细胞。对传染性攻击的广谱抗性被诱导是因为免疫细胞处于活性形式并被引发对任何侵入化合物或微生物作出反应。细胞不必被抗特定抗原的特异性引发。这尤其可用于生物战和上述其它情况如旅行者。

CpG 免疫刺激性寡核苷酸可以直接施用于对象, 或者可以与核酸递送复合物联合施用。核酸递送复合物指与靶向物质(如导致对靶细胞更高亲和力的分子)结合(如

离子或共价结合,或包封在其中)的核酸分子。核酸递送复合物的实例包括与甾醇(如胆固醇)、脂质(如阳离子脂质、病毒颗粒或脂质体)或靶细胞特异性结合因子(如由靶细胞特异性受体识别的配体)结合的核酸分子。优选的复合物可以在体内足够稳定,以防止被靶细胞内化之前的显著解偶联。然而,复合物可以在细胞内适当条件下切割的,使得寡核苷酸以功能性形式释放。

CpG 免疫刺激性寡核苷酸和/或抗原和/或其它治疗剂可以单独施用(如在盐水或缓冲液中),或用本领域已知的任何递送载体。例如以下递送载体已经描述: Cochleates (Gould-Fogerite et al., 1994, 1996); Emulsomes (Vancott et al., 1998, Lowell et al., 1997); ISCOM (Mowat et al., 1993, Carlsson et al., 1991, Hu et al., 1998, Morein et al., 1999); 脂质体(Childers et al., 1999, Michalek et al., 1989, 1992, de Haan 1995a, 1995b); 活细菌载体(例如沙门氏菌、大肠杆菌、bacillus Calmette-Guérin, 志贺菌、乳酸杆菌) (Hone et al., 1996, Pouwels et al., 1998, Chatfield et al., 1993, Stover et al., 1991, Nugent et al., 1998); 活病毒载体 (如痘苗、腺病毒、单纯疱疹) (Gallichan et al., 1993, 1995, Moss et al., 1996, Nugent et al., 1998, Flexner et al., 1988, Morrow et al., 1999); 微球 (Gupta et al., 1998, Jones et al., 1996, Maloy et al., 1994, Moore et al., 1995, O'Hagan et al., 1994, Eldridge et al., 1989); 核酸疫苗 (Fynan et al., 1993, Kuklin et al., 1997, Sasaki et al., 1998, Okada et al., 1997, Ishii et al., 1997); 聚合物(例如羧甲基纤维素、壳聚糖) (Hamajima et al., 1998, Jabbal-Gill et al., 1998); 聚合物环 (Wyatt et al., 1998); 蛋白酶体 (Vancott et al., 1998, Lowell et al., 1988, 1996, 1997); 氟化钠 (Hashi et al., 1998); 转基因植物 (Tacket et al., 1998, Mason et al., 1998, Haq et al., 1995); Virosomes (Gluck et al., 1992, Mengiardi et al., 1995, Cryz et al., 1998); 病毒样颗粒 (Jiang et al., 1999, Leibl et al., 1998)。其它递送载体在本领域已知。

术语“有效量”通常指实现所期望生物效应所必需或足够的量。例如,与抗原一起施用来诱导粘膜免疫的 **CpG 免疫刺激性寡核苷酸**的有效量是与抗原接触时导致对抗原应答而产生 **IgA** 所需的量,而诱导系统性免疫所必需的量是与抗原接触时导致对抗原应答而产生 **IgG** 所需的量。与本文的教导相结合,通过在多种活性化合物

中选择, 并和量因素如功效、相对生物利用度、患者体重、不良副作用严重性和优选的施用模式, 可以安排不导致明显毒性并对治疗特定对象完全有效的有效预防性或治疗性治疗方案。任意特定应用的有效量可以根据下列因素变动: 待治疗的疾病或病症、待施用的具体 **CpG** 免疫刺激性寡核苷酸、对象体型大小或疾病或病症的严重程度。本领域的普通技术人员可以根据经验确定特定 **CpG** 免疫刺激性寡核苷酸和/或抗原和/或其他治疗药的有效量, 而不需要过多的实验。

本文所述化合物用于粘膜或局部递送的剂量典型范围为每次施用约 **10 μ g-10g**, 根据应用可以每日、每周或每月和任意其它量的时间间隔或按需要给予。更典型地粘膜或局部剂量范围为每次施用约 **1mg-500mg**, 最典型地约 **1mg-100mg**, 经 **2-4** 次施用, 之间间隔数天或数周。更典型地, 免疫刺激物剂量范围为每次施用约 **10 μ g-100mg**, 最典型地约 **100 μ g-10mg**, 每天或每周施用。为诱导抗原特异性免疫应答, 其中所述化合物与抗原而非另一种治疗剂一起递送, 本文所述化合物用于非胃肠道递送的剂量典型地比用于疫苗佐剂或免疫刺激物应用地有效粘膜剂量高 **5-10,000** 倍, 更典型地高 **10-1,000** 倍, 最典型地高 **20-100** 倍。当 **CpG** 免疫刺激性寡核苷酸与其它治疗剂组合施用或于专用递送载体中施用时, 经非胃肠道递送用于诱导先天性免疫应答或用于增强 **ADCC** 或用于诱导抗原特异性免疫应答的本文所述化合物的剂量典型范围为每次施用约 **100 μ g-10g**, 根据应用可以每日、每周或每月和任意其它量的时间间隔或按需要给予。对于这些目的, 更典型剂量范围为每次施用约 **1mg-5g**, 最典型地约 **1mg-1g**, 经 **2-4** 次施用, 之间间隔数天或数周。然而在一些实施方案中, 对于这些目的的非胃肠道剂量可以使用比上述典型剂量高 **5-10,000** 倍。

对于本文所述任意化合物, 治疗有效量可以从动物模型初步确定。治疗有效剂量还可以从已经人体试验的其它 **CpG** 寡核苷酸和已知表现相似药理活性的化合物如其它佐剂如 **LT** 和用于疫苗接种的其它抗原的人用数据确定。非胃肠道施用可以要求更高剂量。应用剂量可根据相对生物利用度和所施用化合物的效力而调节。基于上述方法和本领域公知的其它方法调节剂量以实现最大疗效正好在普通技术人员的能力范围内。

本发明制剂以药学上可接受的溶液施用, 其中可常规含有药学上可接受浓度的

盐、缓冲剂、防腐剂、兼容载体、佐剂和任选地其它治疗成分。

对于治疗用途,有效量的 **CpG** 免疫刺激性寡核苷酸和/或其它治疗剂可以任意方式给予对象,只要所述模式将化合物递送到所期望表面,如局部、粘膜、系统性给予。施用本发明的药物组合物可以通过本领域技术人员已知的任何方式。优选给药途径包括但不限于经口、非胃肠道、静脉内、肌内、皮下、病灶内、肿瘤内、鼻内、舌下、气管内、吸入、眼、阴道和直肠。

对于经口给予,通过组合活性化合物与本领域公知的药学上可接受的载体,化合物(即 **CpG** 免疫刺激性寡核苷酸、抗原和/或其它治疗剂)可以容易地配制。这些载体能使本发明的化合物配制成片剂、丸剂、糖衣丸、胶囊、液体、凝胶、糖浆、淤浆、悬剂等,用于待治疗对象经口摄入。口服药物制剂可以如下获得,固体赋形剂任选地研磨所得混合物、加工混合物颗粒、加入适当助剂以后,如果期望,获得片剂或糖衣丸芯。适当赋形剂具体是填充剂如糖,包括乳糖、蔗糖、甘露醇或山梨醇;纤维素制剂例如玉米淀粉、小麦淀粉、水稻淀粉、马铃薯淀粉、明胶、黄芪胶、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠和/或聚乙烯吡咯烷酮(**PVP**)。如果期望,可以加入崩解剂,如交联聚乙烯吡咯烷酮、琼脂或海藻酸,或其盐如海藻酸钠。任选地,口服制剂还可以配制成盐水或缓冲液,以中和内部酸性条件,或可以不用任何载体施用。

向糖衣丸芯提供合适包衣。对此目的,可使用浓缩糖液,其中任选地可含有阿拉伯胶、滑石、聚乙烯吡咯烷酮、卡巴浦尔凝胶、聚乙二醇和/或二氧化钛、漆溶液,以及合适的有机溶剂或溶剂混合物。染料或色素可以加入片剂或糖衣丸包衣中以识别或表征不同组合的活性化合物剂量。

可经口使用的药物制剂包括由明胶制成的承插式胶囊,以及由明胶和增塑剂如甘油或山梨醇制成的软密封胶囊。承插式胶囊可以含有活性成分并混合有填充剂如乳糖,粘合剂如淀粉,和/或润滑剂如滑石或硬脂酸镁,以及任选的稳定剂。在软胶囊中,活性化合物可以溶解或悬浮于合适液体如脂肪油、液体石蜡或液体聚乙二醇中。此外,可以加入稳定剂。也可以使用为口服施用而配制的微球。这种微球已在本领域良好地定义。所有口服制剂都应该是适于这种施用的剂量。

对于含服，组合物可以使用以常规方式配制的片剂或锭剂形式。

可用标准吸入装置通过吸入肺道（尤其是进入支气管，更尤其是进入肺深处的肺泡）来施用所述化合物。可以气溶胶喷雾剂形式从压力包装或喷雾器中递送化合物，其中使用合适的推进剂如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其它合适气体。对于加压气溶胶，通过提供递送计量剂量的阀可以确定剂量单位。可使用吸入装置将化合物递送给对象。本文中吸入装置是递送气溶胶如干粉形式化合物的任意装置。此类型的装置在本领域公知，并已详细描述，如以下描述：**Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, 1995, Mac Publishing Company, Easton, Pennsylvania, pages 1676-1692.**很多美国专利也描述了吸入装置，如 **U.S. Pat. No. 6,116,237**。

本文中“粉末”表示由细分散固体颗粒组成的组合物。优选地，组合物相对自由流动并能被分配到吸入装置中并随之被对象吸入，使得化合物达到肺部以透入肺泡。“干粉”表示这样的粉末组合物，其含水量使得颗粒容易分配到吸入装置中形成气溶胶。以水重量（%w）计，含水量一般低于约 10%，在一些实施方案中，低于约 5%w，优选低于约 3%w。粉末可以与聚合物一起配制，或任选地与其它物质如脂质体、白蛋白和/或其它载体一起配制。

用于特定治疗应用的气溶胶给药和递送系统可以由本领域技术人员选择，例如描述于：**Gonda, I. "Aerosols for delivery of therapeutic and diagnostic agents to the respiratory tract," in Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 6:273-313 (1990),** 和 **Moren, "Aerosol dosage forms and formulations," in Aerosols in Medicine. Principles, Diagnosis and Therapy, Moren, et al., Eds., Elsevier, Amsterdam, 1985.**

当期望全身递送时，可以配制化合物以通过注射进行非胃肠道给药，例如经快速浓注或连续灌输。注射剂可以单位剂量形式提供，如在安瓿或在多剂量容器中，其中具有另加的防腐剂。组合物可以采用诸如油性或水性载体中的悬液、溶液或乳液形式，并可以含有制剂形成剂（**formulatory agent**）如助悬剂、稳定剂和/或分散剂。

非胃肠道施用的药物制剂包括水溶形式活性化合物的水溶液。另外，活性化合

物的悬液可以适当制备为适当的油性注射悬液。合适的亲脂性溶剂或载体包括脂肪油如芝麻油，或合成脂肪酸酯如油酸乙酯或甘油三酯，或脂质体。水性注射悬液可以含有增加悬液粘度的物质，如羧甲基纤维素钠、山梨醇或葡聚糖。任选地，悬液还可以含有合适稳定剂或增加化合物溶解性的试剂，以制备高浓度溶液。

作为替代方案，活性化合物可以是粉末形式，使用前用合适载体如无菌无致热源的水配制。

化合物还可以配制成例如含有常规栓剂基料如可可脂或其它甘油酯的直肠或阴道组合物，如栓剂或灌肠剂，。

除了之前描述的剂型以外，化合物还可以配制成长效（**depot**）制剂。这种长效制剂可以用合适的聚合物或疏水材料（例如作为可接受油中的乳液）或离子交换树脂配制，或配制成微溶性衍生物，例如微溶性盐。

药物组合物还可以包括合适的固体或凝胶相载体或赋形剂。这些载体或赋形剂的实例包括但不限于碳酸钙、磷酸钙、多种糖、淀粉、纤维素衍生物、明胶和诸如聚乙二醇的聚合物。

合适的液体或固体药物制剂形式例如是水性或盐水溶液，用于吸入、微胶囊化、**enocochleated**、包覆于显微金颗粒上、含于脂质体中、喷雾化，气溶胶，植入皮肤的小丸或干燥到要划入皮肤的尖锐物体上。药物组合物还可以包括颗粒、粉末、片剂、包衣片剂、（微）胶囊、栓剂、糖浆、乳液、悬液、霜、滴剂或延迟释放活性化合物的制剂，在这些制剂中如上述常规使用赋形剂和添加剂和/或助剂如崩解剂、粘合剂、包衣剂、溶胀剂、润滑剂、调味剂、增甜剂或助溶剂。药物组合物适用于多种药物递送系统。药物递送方法的简单综述可见 **Langer R (1990) Science 249:1527-33**，该文经引用并入本文。

CpG 免疫刺激性寡核苷酸和任选的其它治疗剂和/或抗原可以自身（净）或以药物接受的盐形式给予。当用于药物时，所述盐应该是药学上可接受的，但非药学上可接受的盐可以方便的用于制备药学上可接受的盐。这些盐包括但不限于由以下酸制备的盐：盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸、马来酸、乙酸、水杨酸、对甲苯磺酸、酒石酸、柠檬酸、甲磺酸、甲酸、苹果酸、琥珀酸、**萘-2-磺酸**和苯磺酸。另外，这些

盐可以制备成碱金属盐或碱土金属盐，如羧酸基的钠、钾或钙盐。

合适的缓冲剂包括：乙酸及其盐（1-2%w/v）；柠檬酸及其盐（1-3%w/v）；硼酸及其盐（0.5-2.5%w/v）；和磷酸及其盐（0.8-2%w/v）。合适的防腐剂包括苯扎氯胺（0.003-0.03%w/v）；氯丁醇（0.3-0.9%w/v）；对羟基苯甲酸酯类（0.01-0.25%w/v）和硫柳汞（0.004-0.02%w/v）。

本发明的药物组合物含有有效量的 CpG 免疫刺激性寡核苷酸和任选的抗原和/或其它治疗剂，并任选地包括于药学上可接受的载体中。术语药学上可接受的载体是指一种或多种相容性固体或液体填充剂、稀释剂或包封物质，它们适于给予人或其它脊椎动物。术语载体表示活性成分与之组合有利于应用的天然或合成的有机或无机成分。药物组合物的成分也能与本发明的化合物互相混合，这种方式应使得没有会实质性影响预期药物疗效的相互作用。

本发明进一步用以下实施例举例说明，无论如何，这些实施例不应理解为进一步限制。

实施例

实施例 1

C 类 ODN 类似物体外诱导 IFN- α 分泌和人 TLR9 活性

在此系列试验中，体外测试本发明的 C 类 ODN 类似物刺激人外周血单核细胞（PBMC）分泌 IFN- α 的能力和刺激稳定转染人 TLR9 和 NF- κ B 报告基因构建体的 HEK293 细胞显示 TLR9 信号传递的能力。

ODN 购自 Biospring (Frankfurt, Germany)，并由 Coley Pharmaceutical GmbH (Langenfeld, Germany) 控制其识别特征和纯度。ODN 稀释于磷酸盐缓冲液 (Sigma, Germany) 中并保存于 -20°C。所有稀释用无致热源试剂进行。测试 ODN 包括以下：

128	T*C_G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*T*C*G*T*G*C*C*G	(SEQ ID NO:48)
611	T*C*G*T*C*G*T*T*T*A*C_G*G*C_G*C*C_G*T*G*C*C*G	(SEQ ID NO:43)
614	T*C*G*T*C*G*T*T*T*A*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G	(SEQ ID NO:43)
620	T*C*G*T*C_G*T*T*T*A*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G	(SEQ ID NO:43)
331	T*C*G*C_G*A*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*T*G*C*C*G	(SEQ ID NO:27)
332	T*C*G*C_G*T*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*T*G*C*C*G	(SEQ ID NO:30)
333	T*C*G*C_G*A*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*T*C*G*C*C*G	(SEQ ID NO:28)
334	T*C*G*C_G*A*C*G*T*T*C_G*G*C*G*G*C_T*C*G*C*C*G	(SEQ ID NO:29)
335	T*C*G_C*G*T*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*T*G*C*C*G	(SEQ ID NO:30)
336	T*C*G*C*G_T*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*T*G*C*C*G	(SEQ ID NO:30)
337	T*C*G*C*G_A*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*T*C*G*C*C*G	(SEQ ID NO:28)
338	T*C*G*C*G_A*C*G*T*T*C_G*G*C*G*G*C_T*C*G*C*C*G	(SEQ ID NO:29)
339	T*C*G_C*G*A*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*T*C*G*C*C*G	(SEQ ID NO:28)
340	T*C*G_C*G*A*C*G*T*T*C_G*G*C*G*G*C_T*C*G*C*C*G	(SEQ ID NO:29)
341	T*C*G*C_G*T*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*T*C*G*C*C*G	(SEQ ID NO:31)
342	T*C*G*C_G*T*C*G*T*T*C_G*G*C*G*G*C_T*C*G*C*C*G	(SEQ ID NO:32)
343	T*C*G*C*G_T*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*T*C*G*C*C*G	(SEQ ID NO:31)
344	T*C*G*C*G_T*C*G*T*T*C_G*G*C*G*G*C_T*C*G*C*C*G	(SEQ ID NO:32)

其中 * 代表硫代磷酸酯键，_ 代表磷酸二酯键。CpG ODN 2006 (TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT, SEQ ID NO:56) 用作 TLR9 信号活化的阳性对照。C 类 CpG ODN 2429 (TCGTCGTTTTCGGCGGCCGCG, SEQ ID NO:53) 用作 IFN- α 诱导的阳性对照。非 CpG ODN 1982 (TCCAGGACTTCTCTCAGGTT, SEQ ID NO:18) 用作阴性对照。

来自健康男性和女性人供体的外周血血沉棕黄层制备物从杜塞尔多夫大学血库获得，PBMC 经 Ficoll-Hypaque (Sigma) 离心从中纯化。纯化的 PBMC 重悬于 RPMI 1640 培养基 (BioWhittaker, Belgium) 中，培养基中添加 5% (v/v) 热灭活人 AB 血清 (BioWhittaker) 或 10% (v/v) 热灭活 FCS、2mM L-谷氨酰胺 (BioWhittaker)、100U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素 (Invitrogen, Karlsruhe, Germany)。

新鲜 PBMC 种植于 96 孔圆底板上并与标示浓度的 ODN 一起在 37 $^{\circ}$ C 加湿培养箱中培养 48 小时。收集培养上清，如果不立即使用冷冻于 -20 $^{\circ}$ C 直至需要。

上清中 IFN- α 的量用酶联免疫吸附测试 (ELISA) 用商品抗体 (Alexis GmbH, Grünberg, Germany) 测定。用四个不同供体来源的 PBMC 测试 ODN 128、331-344、611 和 620, 用三个不同供体来源的 PBMC 测试 ODN 614。

用于人 TLR9 报告基因测试的稳定转染的 HEK293 细胞表达人 TLR9 受体和 NF- κ B 报告基因构建体。将细胞与 ODN 在加湿培养箱中于 37°C 孵育 16 小时。每个数据点重复三次。将细胞裂解并测试报告基因活性。参考不加 ODN 的培养基中报告基因活性计算刺激指数。

结果. 代表性结果见图 1 和图 2。图 1 表示当以 1 μ M 浓度存在时 C 类 ODN 332、333 和 334 诱导大量 IFN- α (典型地约 2000-2500 pg/ml)。这些 ODN 诱导的 IFN- α 量显著超过相同浓度 ODN 2006 或 1982 诱导的 IFN- α 量。图 1 还显示当以 10 μ M 浓度存在时 C 类 ODN 332、333 和 334 诱导显著量的 TLR9 信号传递活性 (典型地刺激指数约 15)。这些 ODN 诱导的 TLR9 信号传递活性的量约是相同浓度 ODN 2006 诱导 TLR9 信号传递活性量的一半。对于 ODN 128 和 335-344, 观察到基本相同的结果。

图 2 表示当以 1 μ M 浓度存在时 C 类 ODN 611、614 和 620 诱导甚至更高量的 IFN- α (典型地约 3000-4000 pg/ml)。这些 ODN 诱导的 IFN- α 量显著超过相同浓度 ODN 2006 或 1982 诱导的 IFN- α 量。图 2 还显示当以 10 μ M 浓度存在时 C 类 ODN 611、614 和 620 诱导显著量的 TLR9 信号传递活性 (典型地刺激指数约 10-20)。这些 ODN 诱导的 TLR9 信号传递活性的量也约是相同浓度 ODN 2006 诱导 TLR9 信号传递活性量的一半。

ODN 611 (SEQ ID NO:43)、ODN 614 (SEQ ID NO:43) 和 ODN 620 (SEQ ID NO:43) 也与 ODN 2429 (描述的原始含回文的 C 类寡核苷酸之一) 进行了比较。这些新的 C 类 ODN 在人 TLR9 测试中显示更高活性, 而对 IFN- α 诱导与 ODN 2429 相似 (图 3)。

总的来说, 这些试验的结果证明本发明的 C 类 ODN 类似物有效的在体外诱导 IFN- α 分泌和人 TLR 活性。

实施例 2

其他 C 类 ODN 类似物体外诱导 IFN- α 分泌

在该系列试验中，体外测试本发明其他 C 类 ODN 类似物诱导 IFN- α 分泌的能力。这些试验中的 C 类 ODN 类似物特征部分在于存在富含 AT 的中断反向重复，或存在含 dSpacer 残基而不含常规核苷酸残基的中断反向重复。

ODN 如实施例 1 获得。测试 ODN 包括以下：

645	T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*A*A*T*A*T*T*T*A*T*T*A	SEQ ID NO:59
646	T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*C*A*A*T*A*T*T*T*A*T*T*G	SEQ ID NO:50
647	T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*A*A*T*A*T*C*C*A*T*T*A	SEQ ID NO:58
649	T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*A*C*G*G*C*G*L*L*L*T*G*C*C*G	SEQ ID NO:45
650	T*C*G*T*C_G*T*T*L*L*A*C*G*G*C*G*L*L*L*T*G*C*C*G	SEQ ID NO:38
651	T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*G*L*L*C*C*G*C*C*G	SEQ ID NO:54

其中*代表核苷酸间硫代磷酸酯键，_代表核苷酸间磷酸二酯键，L 代表 dSpacer。

人 PBMC 以和实施例 1 类似的方式获得并处理。

上清中 IFN- α 的量用酶联免疫吸附测试 (ELISA) 以和实施例 1 类似的方式评价。

结果 C 类 ODN 645、646 和 647 部分特征是存在富含 AT 的中断反向重复，当以 1 μ M 浓度存在时诱导中等量的 IFN- α (典型地约 1200-1500pg/ml)。这些 ODN 诱导的 IFN- α 量显著超过相同浓度 ODN 2006 或 1982 诱导的 IFN- α 量。C 类 ODN 649、650 和 651 部分特征是存在含 dSpacer 残基的中断反向重复，当以 1 μ M 浓度存在时诱导大量 IFN- α (典型地约 2000-2500pg/ml)。这些 ODN 诱导的 IFN- α 量显著超过相同浓度 ODN 2006 或 1982 诱导的 IFN- α 量。

总的来说，这些试验的结果证明本发明的 C 类 ODN 类似物有效地在体外诱导 IFN- α 分泌，所述 C 类 ODN 类似物特征部分在于存在富含 AT 的中断反向重复，或存在含 dSpacer 残基而不含常规核苷酸残基的中断反向重复。

实施例 3

另外的 C 类 ODN 类似物体外诱导 IFN- α 分泌和人 TLR9 活性

在此系列试验中，体外测试本发明的 C 类 ODN 类似物刺激人外周血单核细胞（PBMC）分泌 IFN- α 的能力和刺激稳定转染人 TLR9 和 NF- κ B 报告基因构建体的 HEK293 细胞显示 TLR9 信号传递的能力。基本操作方案如实施例 1 所述，只是测试 ODN 包括以下：

664	T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*C*G*T*G*A*C*G*T*G	(SEQ ID NO:62)
376	T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*C*G*T*G*A*C*G	(SEQ ID NO:61)
801	T*C*_G*T*C*_G*A*C*_G*T*T*C*_G*G*C*G*C*C*_G*T*G*C*C*G	(SEQ ID NO:65)
893	T*C*G*T*C*_G*T*A*C*_G*G*C*G*C*C*_G*T*G*C*C*G	(SEQ ID NO:66)
894	T*C*G*T*C*_G*T*T*A*C*_G*G*C*G*C*C*_G*T*G*C*C*G	(SEQ ID NO:67)
882	T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*C*G*T*G*A*C*G*T*T	(SEQ ID NO:63)
2290	T*C*G*T*C*_G*A*C*_G*A*T*C*_G*G*C*G*C*C*_G*T*G*C*C*G	(SEQ ID NO:64)
2292	T*C*G*T*C*G*A*C*G*A*_T_C*G*G*C*G*C*C*G*T*G*C*C*G	(SEQ ID NO:64)
2337	T*C*G*A*C*_G*T*C*G*A*C*_G*T*G*A*C*G*T*T	(SEQ ID NO:63)
2341	T*C*G*A*C*_G*T*C*G*A*C*G*T*_G*A*C*G*T*T	(SEQ ID NO:63)
2357	T*C*G*T*C*_G*T*T*T*A*C*_G*G*C*G*C*C*_G*T*G*C*C*G*T	(SEQ ID NO:68)

其中*代表硫代磷酸酯键，_代表磷酸二酯键。

在 TLR9 报告基因测试中测试了不同浓度的 ODN。用 SigmaPlot(SigmaPlot 2002 for Windows Version 8.0) 计算 EC50（作用为最大作用 50%时的 ODN 浓度）。最大刺激指数（max SI）计算为任意 ODN 测试的所有浓度最高值与培养基对照的商。结果表示于表 1，其中可以看出刺激指数通常为 10-30。

表 1

本发明的 C 类 CpG ODN 活化人 TLR9

ODN	EC50 (nM)	max SI
801	130	29
2341	2900	27
2357	1900	19
882	2700	15
893	3500	11
894	2800	11
2290	1200	11
2337	3900	11
664	1290	5
2292	2700	5
376	230	2

与这些 C 类 CpG ODN 一起培养 48 小时后，人 PBMC 分泌大量 IFN- α 。与浓度小于或等于 1 μ M 的 ODN 一起培养后，IFN- α 的典型量为 3000-4000pg/ml。这些试验中 IFN- α 的反应曲线与图 2 中的非常相似。

实施例 4

C 类 ODN 类似物体内诱导抗原特异性免疫应答

在该系列试验中，在体内测试本发明的 C 类 ODN 与小鼠疫苗接种相结合的情况。观察到本发明的 C 类 ODN 以至少与 B 类 CpG ODN 2006 相当的方式增强抗原特异性总 IgG 和 IgG2a（小鼠中 Th1 样 IgG）的效价，以及抗原特异性细胞裂解性 T 淋巴细胞（CTL）应答。

ODN 如实施例 1 所述获得。

雌性 BALB/c 小鼠（6-8 周龄）用于所有试验。动物购自 Charles River Canada（Quebec, Canada），并饲养于 Ottawa Hospital Research Institute, Civic Site 的动物养护设施中的微分离器（micro isolator）中。

幼年 BALB/c 小鼠脾细胞用于所有体外测试。用异氟烷麻醉动物并引颈处死。在无菌条件下取出脾，放置于磷酸盐缓冲液（PBS）+0.2%牛血清白蛋白（Sigma Chemical Company）中。然后匀浆脾，将脾细胞重悬于 RPMI 1640 组织培养基（Life Technologies, Grand Island, NY）中，培养基中还添加 2%正常小鼠血清（Cedarlane

Laboratories, Ontario, Canada)、青-链霉素溶液(终浓度分别是 1000 U/ml 和 1 mg/ml, Sigma Chemical Company)和 5×10^{-5} M β -巯基乙醇(Sigma Chemical Company)。

用 1 μ g 乙肝表面抗原(HBsAg) ad 亚型(International Enzymes, CA)单独或与 1-100 μ g CpG ODN 2006、608、611、618 或 CpG ODN 620 组合免疫 BALB/c 小鼠(n=10/组)。动物被采血并在初次免疫后 4 周时增强。增强后 2 周时,将每组 5 只动物处死并取出脾用于 CTL 测试。

用终点稀释 ELISA 测试检测并定量特异性针对 HBsAg(抗 HBs)的抗体(总 IgG、IgG1 和 IgG2),来自单个动物的样品重复三次。终点效价定义为导致吸光度值(OD450)超过非免疫血浆两倍的最高血浆稀释度,其中截止值为 0.05。这些报告为组平均效价(GMT) $\pm$ SEM。

CTL 测试根据标准方式进行。简单的说,免疫后 4 周取出脾并匀浆为 RPMI 1640 组织培养基(Life Technologies, Grand Island, NY)中的单细胞悬液,培养基中还添加 10%胎牛血清(Life Technologies)、青-链霉素溶液(终浓度分别是 1000 U/ml 和 1 mg/ml, Sigma, Irvine, UK)和 5×10^{-5} M β -巯基乙醇(Sigma)(完全 RPMI 1640)。脾细胞悬液(3×10^6 细胞/ml)中的 HBsAg 特异性淋巴细胞通过与表达 HBsAg 的小鼠细胞系(p815-S)一起培养 5 天而被再刺激。再刺激以后,淋巴细胞杀死表达 HBsAg 细胞的能力用 ^{51}Cr 释放试验确定。结果表示为不同效应子:靶(E:T)比的%比裂解(specific lysis)。

结果. 代表性结果表示于图 4-6。如图 4 所示,ODN 2006 和 ODN 620 的总 IgG 效价是剂量依赖的,发现在 1 μ g ODN 剂量时大约分别为 5×10^3 和 6.5×10^3 。在 100 μ g ODN 剂量时发现 ODN 2006 和 ODN 620 的总 IgG 效价大约为 1×10^4 。如图 5 所示,与非 CpG 对照 ODN 2137(TGCTGCTTTTGTGCTTTTGTGCTT; SEQ ID NO:60)相比,ODN 2006 和 ODN 620 都显著增强 IgG2a(小鼠中 Th1 样 IgG)。具体而言,各自施用 10 μ g 剂量时,对于 ODN 2006、620 和 2137 的 IgG2a 分别是约 3×10^3 、 6×10^3 和 3×10^2 。如图 6 所示,施用 10 和 100 μ g 剂量时,对于 ODN 2006、620, E:T 比为 100:1 时的 CTL 活性显著大于对照。例如,各自施用 10 μ g 剂量时,ODN 2006、620 和 2137

的百分比裂解约为 26%、24% 和 12%。

总的来说，这些试验的结果证明本发明的 C 类 ODN 类似物在体内有效诱导抗原特异性免疫应答。

实施例 5

在体内肿瘤模型中 C 类 ODN 类似物提高存活率并减小肿瘤体积

在该系列试验中，本发明的 C 类 ODN 类似物在小鼠神经母细胞瘤模型中进行体内测试。发现本发明的 C 类 ODN 类似物显著改善整体存活率和肿瘤负担。

ODN 如实施例 1 获得。

BALB/c 小鼠如实施例 4 获得。

在第 0 天向 BALB/c 小鼠左侧皮下 (s.c.) 注射 1×10^6 神经母细胞瘤 (Neuro-2a) 细胞 (如 ATCC CCL-131, American Type Culture Collection, Manassas, VA)。从第 10-25 天，每天向小鼠皮下注射 PBS、CpG 2006、CpG 620 或非 CpG 对照 ODN 2137。测量存活率和肿瘤体积。

结果 代表性结果见图 7。如图 7A 所示，与对应 ODN 2006、ODN 2137 或 PBS 的存活率 0-20% 相比，用 100 μ g ODN 620 处理的小鼠在第 80 天具有 50% 存活率。而且如图 7B 所示，用 100 μ g ODN 620 处理的小鼠在第 28 天具有峰值肿瘤体积约 1000mm³，在 38 天内减小到 0mm³。相比之下，用 ODN2137 或 PBS 处理的小鼠具有更快、无变化的肿瘤生长。

总的来说，这些试验的结果证明在体内肿瘤模型中本发明的 C 类 ODN 类似物有效改善存活率并减小肿瘤体积。

实施例 6

C 类 ODN 类似物的组织代谢和分布

本发明的 C 类 ODN 类似物的吸收/分布研究在小鼠皮下处理后显示有利的代谢和从器官如肾和肝中的清除。

小鼠分成 5 组，每组小鼠在第 0 天单次皮下给予 250 μ g ODN。在不同时间点，

取出器官（肝、肾和脾），提取寡核苷酸和其代谢物以定量含量。

结果. 与完全已知的硫代磷酸酯回文 ODN 如 2429 比较, 本发明的 ODN (如 611 和 620) 显示较少积累于器官。例如, 在第 3 天, ODN 611、620 和 2429 的肾水平分别是约 70 ± 28 、 30 ± 18 和 $90\pm 10\text{mg/kg}$ 。相类似的, 在第 3 天, ODN 611、620 和 2429 的肝水平分别是约 45 ± 15 、 28 ± 12 和 $150\pm 15\text{mg/kg}$ 。

总的来说, 这些结果证明本发明的 C 类 ODN 类似物有利的代谢, 并从可能积累的器官中清除。

实施例 7

C 类 ODN 类似物的物理特征

在这组试验中, ODN 2429、611、620、608 (T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*C_G*G*C_G*C*G*C_G*C*C*G; SEQ ID NO:51) 和 618 (T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*C_G*G*C*G*G*C*C_G*C*C*G; SEQ ID NO:53) 用体积排阻层析、毛细管凝胶电泳 (CGE)、UV 热变性和高压液相色谱 (HPLC) 进行表征。当用体积排阻层析研究 ODN611 和 ODN620 (225 μM PBS 溶液) 时, 每种化合物仅观察到一个峰, 即每种寡核苷酸以单体形式被洗脱。相反, 当 ODN608 和 618 (各自含有回文序列) 用体积排阻层析研究时, 每种寡核苷酸观察到两个峰, 与除了单体以外还存在分子间二聚体相一致。然而, UV 热变性研究表明 ODN 611 和 ODN620 在溶液中具有二级结构, 这与分子内发夹结构相一致。发夹结构被认为来自 611 和 620 序列中的反向重复。一般来说, 与 ODN2429 和 ODN608 相比, HPLC 和 CGE 中观察到这些序列的峰更尖。

总的来说, 这些结果证明在研究浓度下, 本发明的 C 类 ODN 类似物在体外倾向于形成分子内二级结构并且不形成分子间复合物, 而含回文的 C 类 ODN 倾向于通过分子间相互作用结合成复合物。然而, 在体内, 核内体区隔中可达到的 ODN 的浓度有可能足够高, 以有利于形成 ODN 的双链体或更高级复合物, 包括本发明 C 类 ODN 类似物的双链体或更高级复合物。

等价物

前面的书面说明足以使本领域技术人员实施本发明。除了此处显示和描述的以外，从前面的说明，本发明的多种改动对于本领域技术人员将是显而易见的，并落在所附的权利要求范围内。本发明的优点和目的不必被本发明的每个实施方案都包括。

本文引用的所有参考文献、专利和专利申请都通过引用全部并入本文。

<110> 科勒制药有限公司
科勒制药集团有限公司

<120> 具有增强免疫刺激能力的C类寡核苷酸类似物

<130> C1041.70034WQ00

<150> US 60/516,913

<151> 2003-10-30

<160> 69

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 12

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400> 1

caatatttat tg

12

<210> 2

<211> 11

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400> 2

ccgttttgtg g

11

<210> 3

<211> 13

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400> 3

cggcgccgtg ccg

13

<210> 4

<211> 14

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400> 4
cggcgcgcgtt gccg

14

<210> 5
<211> 12
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<220>
<221> 修饰碱基
<222> (6)..(7)
<223> 无碱基核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(7)
<223> n 是 a, c, g, 或 t

<400> 5
cggcggnncgc cg

12

<210> 6
<211> 13
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<220>
<221> 修饰碱基
<222> (6)..(8)
<223> 无碱基核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(8)
<223> n 是 a, c, g, 或 t

<400> 6
cggcggnntg ccg

13

<210> 7
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<220>		
<221>	修饰碱基	
<222>	(7)..(8)	
<223>	无碱基核苷酸	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(7)..(8)	
<223>	n 是 a, c, g, 或 t	
<400>	7	
	cggcggnncc gccg	14
<210>	8	
<211>	14	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	8	
	cggcgtcgcc gccg	14
<210>	9	
<211>	13	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	9	
	cggcgtcgtg ccg	13
<210>	10	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	10	
	cgtcgacggg acggg	15
<210>	11	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	

<400> 11 cgtcgacgtg acggg	15
<210> 12 <211> 15 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成寡核苷酸	
<400> 12 gagagttggg ctctc	15
<210> 13 <211> 12 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成寡核苷酸	
<400> 13 ggcgcgctgc cg	12
<210> 14 <211> 11 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成寡核苷酸	
<400> 14 gtcgaggagg t	11
<210> 15 <211> 12 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成寡核苷酸	
<220> <221> 修饰碱基 <222> (6)..(7) <223> 无碱基核苷酸	
<220> <221> misc_feature <222> (6)..(7) <223> n 是 a, c, g, 或 t	

<400> 15 taatanntat ta	12
<210> 16 <211> 12 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成寡核苷酸	
<400> 16 taatatccat ta	12
<210> 17 <211> 12 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成寡核苷酸	
<400> 17 taatatttat ta	12
<210> 18 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成寡核苷酸	
<400> 18 tccaggactt ctctcaggtt	20
<210> 19 <211> 10 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成寡核苷酸	
<400> 19 tcgacgtcga	10
<210> 20 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220>	

<223> 合成寡核苷酸		
<400> 20		
tcgacgtcga ccgttttgtg g		21
<210> 21		
<211> 19		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成寡核苷酸		
<400> 21		
tcgacgtcga cgggacggg		19
<210> 22		
<211> 19		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成寡核苷酸		
<400> 22		
tcgacgtcga cgtgacggg		19
<210> 23		
<211> 23		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成寡核苷酸		
<400> 23		
tcgacgtcga gagttgggct etc		23
<210> 24		
<211> 18		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成寡核苷酸		
<400> 24		
tcgacgtcga gcgaagct		18
<210> 25		
<211> 16		
<212> DNA		
<213> 人工序列		

<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	25	
	tcgacgtcga ggaggt	16
<210>	26	
<211>	10	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	26	
	tcgcgacgtt	10
<210>	27	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	27	
	tcgcgacgtt cggcgcgtg ccg	23
<210>	28	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	28	
	tcgcgacgtt cggcgcgtcg ccg	23
<210>	29	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	29	
	tcgcgacgtt cggcggctcg ccg	23
<210>	30	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	

<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	30	
tcgcgctcggtt	cggcgcgctg ccg	23
<210>	31	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	31	
tcgcgctcggtt	cggcgcgctcg ccg	23
<210>	32	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	32	
tcgcgctcggtt	cggcgcgctcg ccg	23
<210>	33	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	33	
tcggcgccgt	gcgctcgtag ttt	23
<210>	34	
<211>	10	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	34	
tcgtcgacga		10
<210>	35	
<211>	24	
<212>	DNA	

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400> 35
tcgtcgcccg gcgacgccgt gccg 24

<210> 36
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400> 36
tcgtcgcttt gcgacgccgt gccg 24

<210> 37
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (9)..(10)

<223> 无碱基核苷酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(10)

<223> n 是 a, c, g, 或 t

<400> 37
tcgtcgttnn acggcgccgt gccg 24

<210> 38
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (9)..(10)

<223> 无碱基核苷酸

<220>

<221> misc_feature
 <222> (9)..(10)
 <223> n 是 a, c, g, 或 t

<220>
 <221> 修饰碱基
 <222> (17)..(19)
 <223> 无碱基核苷酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(19)
 <223> n 是 a, c, g, 或 t

<400> 38
 tcgtcgttnn acggcgnnnt gccg

24

<210> 39
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成寡核苷酸

<220>
 <221> 修饰碱基
 <222> (9)..(10)
 <223> 无碱基核苷酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(10)
 <223> n 是 a, c, g, 或 t

<400> 39
 tcgtcgttnn cggcgcggcg ccg

23

<210> 40
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成寡核苷酸

<400> 40
 tcgtcgtttt

10

<210> 41
 <211> 11
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸	
<400> 41 tcgtcgttttt a	11
<210> 42 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成寡核苷酸	
<400> 42 tcgtcgttttt acgacgccgt gccg	24
<210> 43 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成寡核苷酸	
<400> 43 tcgtcgttttt acggcgccgt gccg	24
<210> 44 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成寡核苷酸	
<400> 44 tcgtcgttttt acggcgccgt tgccg	25
<210> 45 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成寡核苷酸	
<220> <221> 修饰碱基 <222> (17)..(19) <223> 无碱基核苷酸	
<220> <221> misc_feature <222> (17)..(19)	

<223> n 是 a, c, g, 或 t	
<400> 45 tcgtcgttttt acggcggnnt gccg	24
<210> 46 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成寡核苷酸	
<400> 46 tcgtcgttttt acggcgtcgc g	21
<210> 47 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成寡核苷酸	
<400> 47 tcgtcgttttt acggcgtcgc gccg	24
<210> 48 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成寡核苷酸	
<400> 48 tcgtcgttttt acggcgtcgt gccg	24
<210> 49 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成寡核苷酸	
<400> 49 tcgtcgttttt acggcgtttt gccg	24
<210> 50 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400> 50
tcgtcgtttt caatatttat tg 22

<210> 51
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400> 51
tcgtcgtttt cggcgcgcgc cg 22

<210> 52
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<220>
<221> 修饰碱基
<222> (16)..(17)
<223> 无碱基核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(17)
<223> n 是 a, c, g, 或 t

<400> 52
tcgtcgtttt cggcggnnccgc cg 22

<210> 53
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400> 53
tcgtcgtttt cggcggccgc cg 22

<210> 54
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (17)..(18)

<223> 无碱基核苷酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (17)..(18)

<223> n 是 a, c, g, 或 t

<400> 54

tcgtcgttttt cggcggnncc gccg

24

<210> 55

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400> 55

tcgtcgttttt cggcgctcgcc gccg

24

<210> 56

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400> 56

tcgtcgttttt gtcgtttttgt cggtt

24

<210> 57

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰碱基

<222> (16)..(17)

<223> 无碱基核苷酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (16)..(17)

<223> n 是 a, c, g, 或 t	
<400> 57 tcgtcgtttt taatanntat ta	22
<210> 58 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成寡核苷酸	
<400> 58 tcgtcgtttt taatatccat ta	22
<210> 59 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成寡核苷酸	
<400> 59 tcgtcgtttt taatatattat ta	22
<210> 60 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成寡核苷酸	
<400> 60 tgctgctttt gtgcttttgt gott	24
<210> 61 <211> 17 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成寡核苷酸	
<400> 61 tcgacgtcga cgtgacg	17
<210> 62 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	

<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 62	
tcgacgtcga cgtgacgtg	19.
<210> 63	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 63	
tcgacgtcga cgtgacgtt	19
<210> 64	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 64	
tcgtcgacga tcggcgccgt gccg	24
<210> 65	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 65	
tcgtcgacgt tcggcgccgt gccg	24
<210> 66	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 66	
tcgtcgtagc gcgccgtgcc g	21
<210> 67	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	67	
tcgtcgttac	ggcgccgtgc cg	22
<210>	68	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	68	
tcgtcgttta	cggcgccgtg ccgt	24
<210>	69	
<211>	10	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	69	
tcgcgtcgtt		10

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400> 35
tcgtcgcccg gcgacgccgt gccg 24

<210> 36
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400> 36
tcgtcgcttt gcgacgccgt gccg 24

<210> 37
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰碱基
<222> (9)..(10)
<223> 无碱基核苷酸

<220>

<221> misc_feature
<222> (9)..(10)
<223> n 是 a, c, g, 或 t

<400> 37
tcgtcgttnn acggcgccgt gccg 24

<210> 38
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰碱基
<222> (9)..(10)
<223> 无碱基核苷酸

<220>

<221> misc_feature
 <222> (9)..(10)
 <223> n 是 a, c, g, 或 t

<220>
 <221> 修饰碱基
 <222> (17)..(19)
 <223> 无碱基核苷酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(19)
 <223> n 是 a, c, g, 或 t

<400> 38
 tcgtcgtttnn acggcgnnnt gccg

24

<210> 39
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成寡核苷酸

<220>
 <221> 修饰碱基
 <222> (9)..(10)
 <223> 无碱基核苷酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(10)
 <223> n 是 a, c, g, 或 t

<400> 39
 tcgtcgtttnn cggcgcgggcg ccg

23

<210> 40
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成寡核苷酸

<400> 40
 tcgtcgttttt

10

<210> 41
 <211> 11
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>

<223>	合成寡核苷酸	
<400>	41	
	tcgtcgttttt a	11
<210>	42	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	42	
	tcgtcgttttt acgacgccgt gccg	24
<210>	43	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	43	
	tcgtcgttttt acggcgccgt gccg	24
<210>	44	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	44	
	tcgtcgttttt acggcgccgt tgccg	25
<210>	45	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<220>		
<221>	修饰碱基	
<222>	(17)..(19)	
<223>	无碱基核苷酸	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(17)..(19)	

<223> n 是 a, c, g, 或 t	
<400> 45 tcgtcgttttt acggcggnnt gccg	24
<210> 46 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成寡核苷酸	
<400> 46 tcgtcgttttt acggcgtcgc g	21
<210> 47 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成寡核苷酸	
<400> 47 tcgtcgttttt acggcgtcgc gccg	24
<210> 48 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成寡核苷酸	
<400> 48 tcgtcgttttt acggcgtcgt gccg	24
<210> 49 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成寡核苷酸	
<400> 49 tcgtcgttttt acggcgtttt gccg	24
<210> 50 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	

<220>
 <223> 合成寡核苷酸

<400> 50
 tcgtcgtttt caatatttat tg 22

<210> 51
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成寡核苷酸

<400> 51
 tcgtcgtttt cggcgcgcgc cg 22

<210> 52
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成寡核苷酸

<220>
 <221> 修饰碱基
 <222> (16)..(17)
 <223> 无碱基核苷酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(17)
 <223> n 是 a, c, g, 或 t

<400> 52
 tcgtcgtttt cggcggnccg cg 22

<210> 53
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成寡核苷酸

<400> 53
 tcgtcgtttt cggcggccgc cg 22

<210> 54
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成寡核苷酸

<220>
 <221> 修饰碱基
 <222> (17)..(18)
 <223> 无碱基核苷酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> n 是 a, c, g, 或 t

<400> 54
 tcgtcgttttt cggcggnncc gccg 24

<210> 55
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成寡核苷酸

<400> 55
 tcgtcgttttt cggcgtcgcc gccg 24

<210> 56
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成寡核苷酸

<400> 56
 tcgtcgttttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 57
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成寡核苷酸

<220>
 <221> 修饰碱基
 <222> (16)..(17)
 <223> 无碱基核苷酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(17)

<223> n 是 a, c, g, 或 t

<400> 57

tcgtcgttttt taatanntat ta

22

<210> 58

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400> 58

tcgtcgttttt taatatccat ta

22

<210> 59

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400> 59

tcgtcgttttt taatatattat ta

22

<210> 60

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400> 60

tgctgcttttt gtgctttttgt gctt

24

<210> 61

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400> 61

tcgacgtcga cgtgacg

17

<210> 62

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	62	
tcgacgtcga	cgtgacgtg	19
<210>	63	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	63	
tcgacgtcga	cgtgacgtt	19
<210>	64	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	64	
tcgtcgacga	tcggcgccgt gccg	24
<210>	65	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	65	
tcgtcgacgt	tcggcgccgt gccg	24
<210>	66	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	66	
tcgtcgtacg	gcgccgtgcc g	21
<210>	67	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	

<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	67	
tcgtcgttac	ggcgccgtgc	cg
		22
<210>	68	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	68	
tcgtcgttta	cgcgccgtg	ccgt
		24
<210>	69	
<211>	10	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	69	
tcgcgtcgtt		10

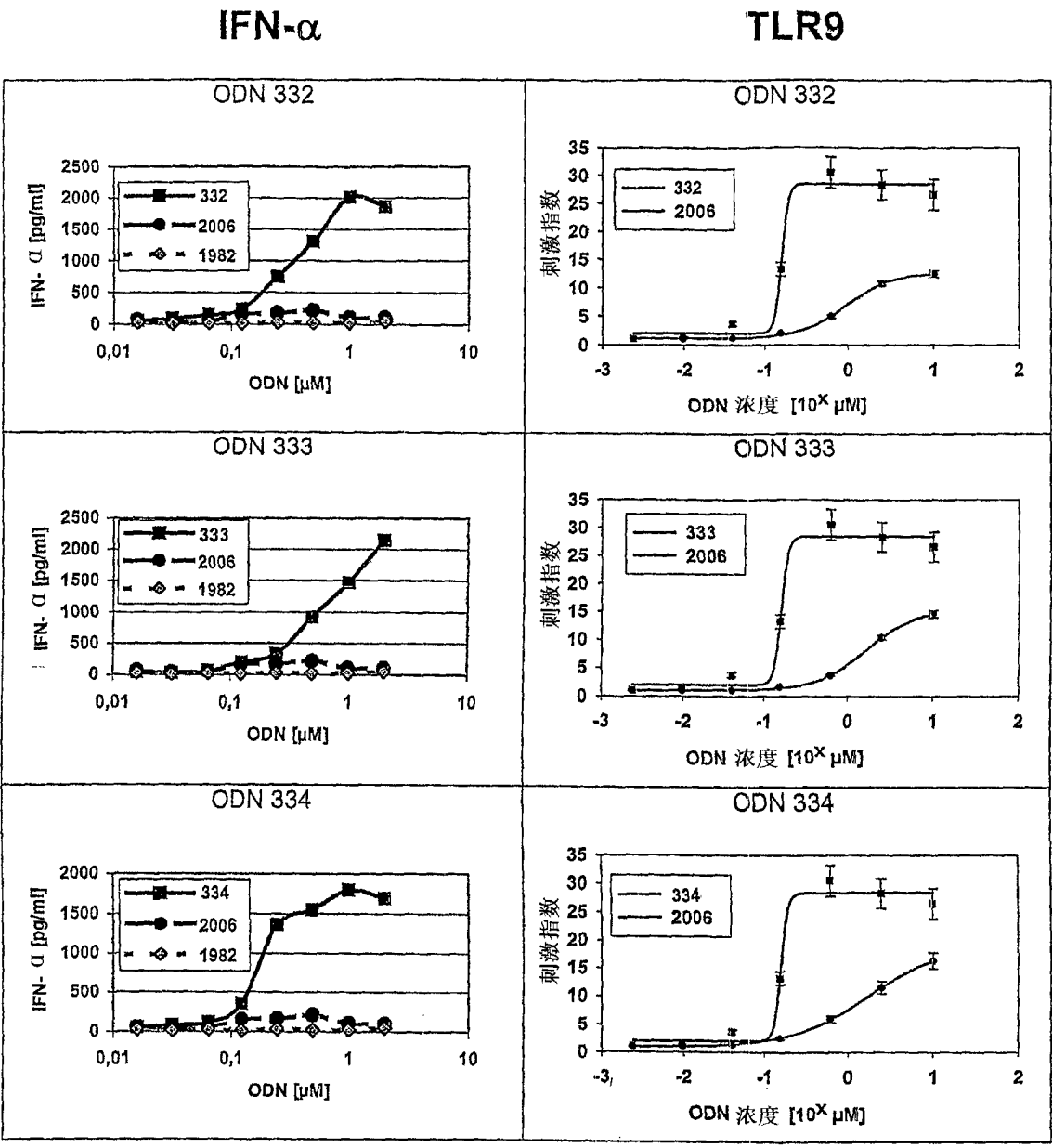


图1

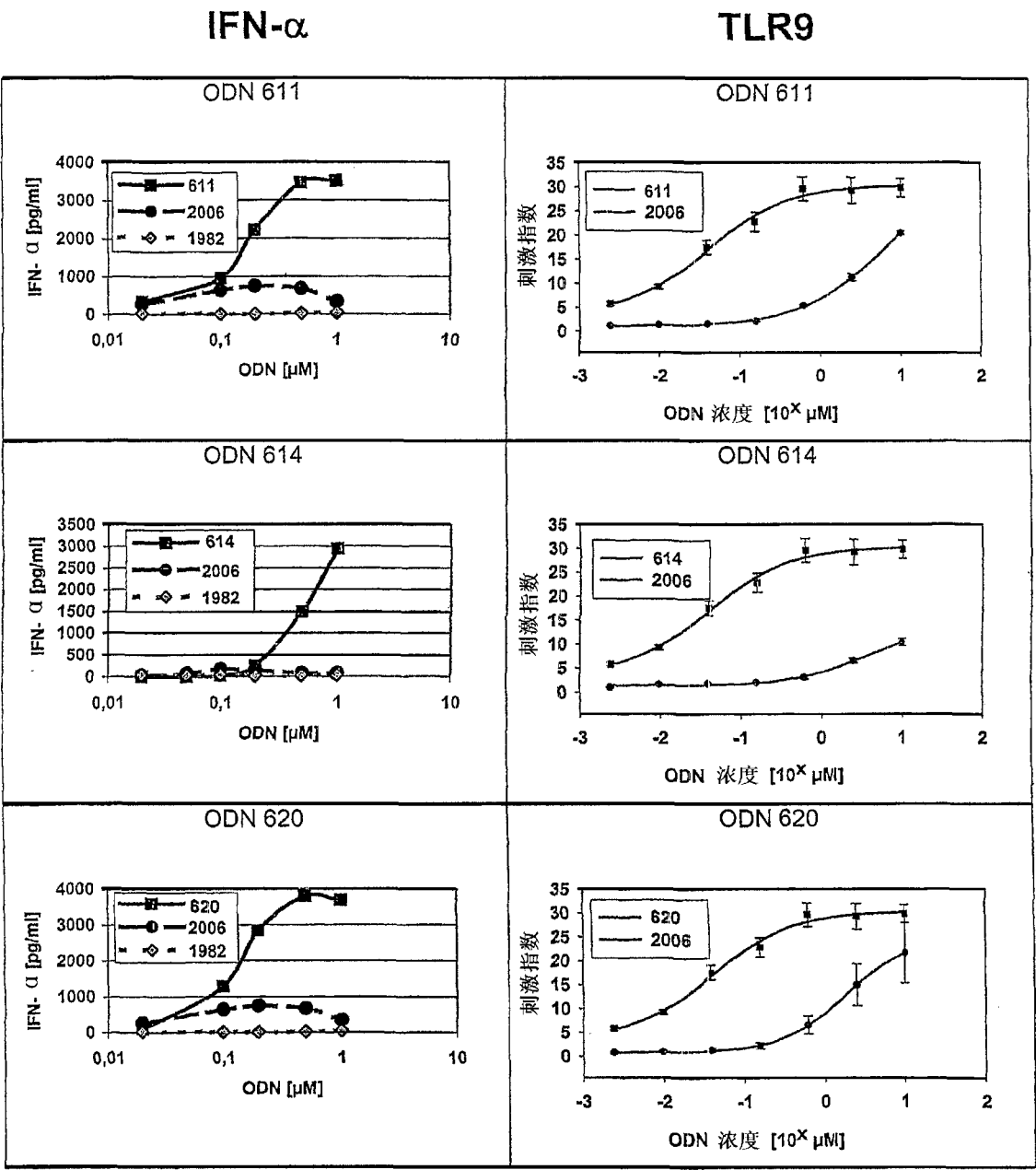


图 2

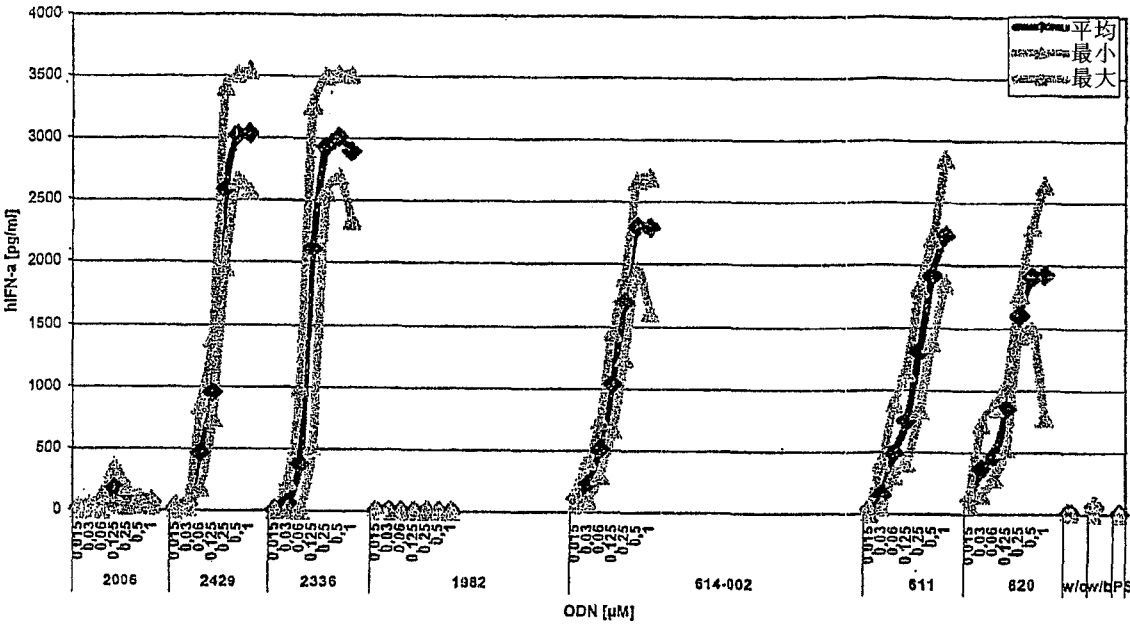


图 3

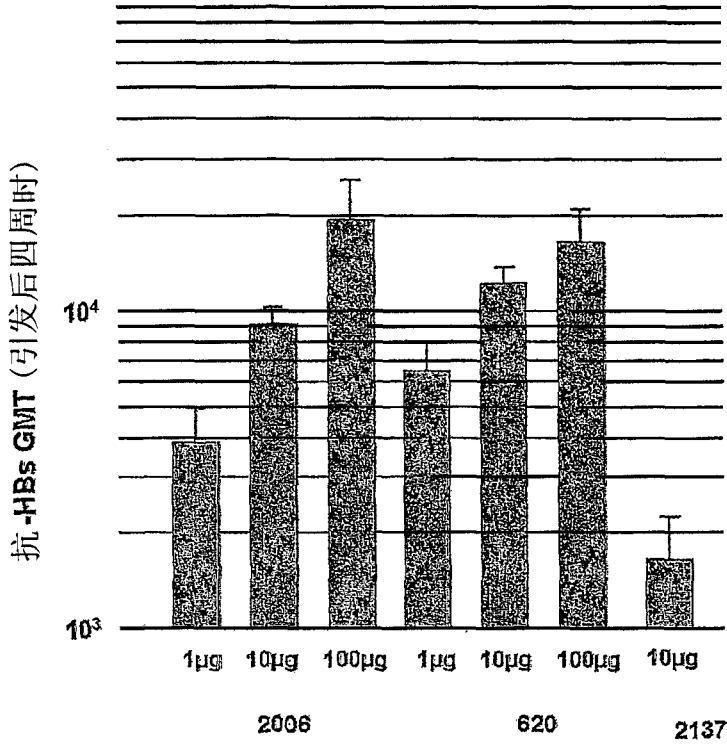


图 4

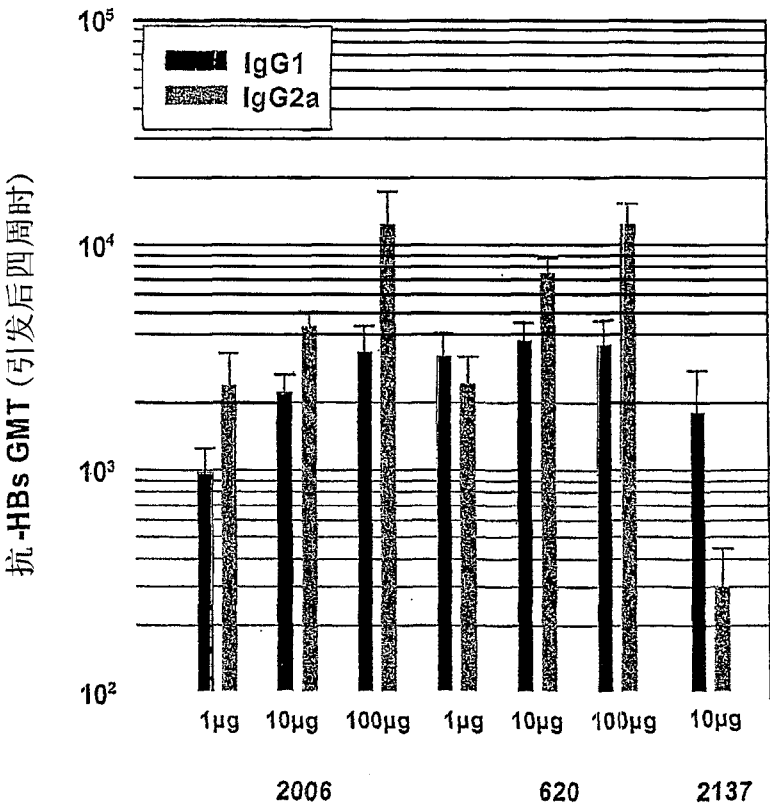


图 5

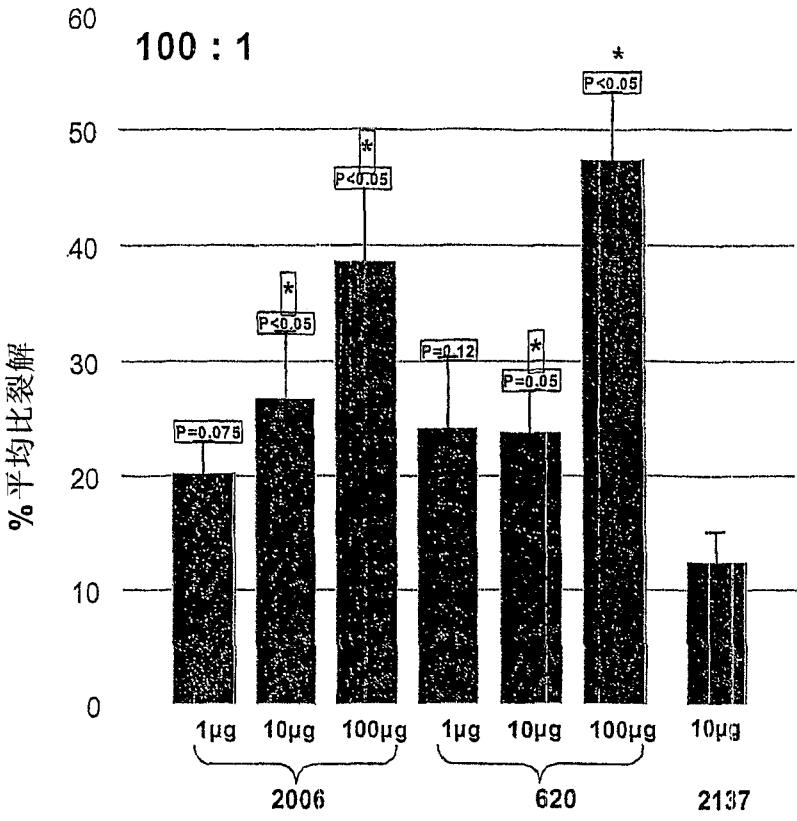


图 6

图 7A

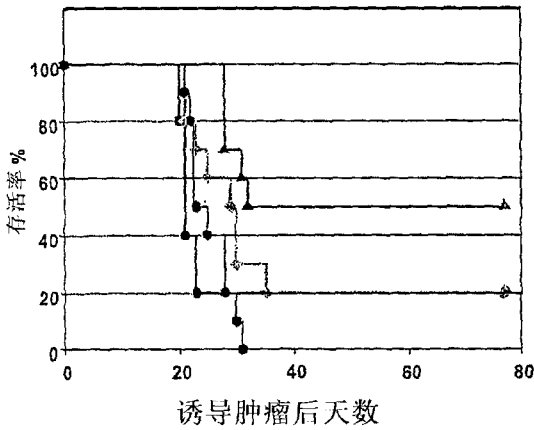


图 7B

