

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 97199352.1

[51] Int. Cl.

C07H 21/00 (2006.01)

C07H 21/02 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

A61K 31/175 (2006.01)

A61K 31/335 (2006.01)

A61K 31/47 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 9 月 19 日

[11] 授权公告号 CN 100338086C

[51] Int. Cl. (续)

A61K 31/70 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

[22] 申请日 1997.10.30 [21] 申请号 97199352.1

[30] 优先权

[32] 1996.10.30 [33] US [31] 08/738,652

[86] 国际申请 PCT/US1997/019791 1997.10.30

[87] 国际公布 WO1998/018810 英 1998.5.7

[85] 进入国家阶段日期 1999.4.30

[73] 专利权人 艾奥华大学研究基金会

地址 美国艾奥华州

[72] 发明人 阿撒尔·M·科瑞格

约尔·N·科里尼

阿尔费雷德·D·斯德伯格

丹尼斯·克林曼

审查员 王青华

[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 10 页 说明书 86 页 附图 19 页

[54] 发明名称

免疫刺激性核酸分子

[57] 摘要

本发明涉及含有未甲基化的 CpG 二核苷酸的核酸序列，其中的 CpG 二核苷酸调节免疫反应，包括刺激 Th1 类型的免疫活化、细胞因子的产生、NK 溶胞活性、以及 B 细胞的繁殖。这些序列可以用作合成附剂。

1. 一种免疫刺激寡核苷酸包括两个或多于两个的未甲基化的 CpG 二核苷酸，其序列包括：5' N₁X₁X₂CGTTN₂ 3'，其中免疫刺激寡核苷酸包括一个或多个磷酸主链修饰的核苷酸内连接，其中一个或多个核苷酸将连续的 CpGs 分开；X₁ X₂ 是 GpT 或 ApT；N₁ 是任何包括 5'TC 或 TG 的核苷酸，并且 N₁+ N₂ 是约 0-26 个碱基，条件是 N₁ 和 N₂ 不含有 CCGG 四元体或多于一个的 CCG 或 CGG 三元体；并且免疫刺激寡核苷酸的长度为 8-30 个碱基。
2. 一种免疫刺激寡核苷酸包括两个或多于两个的未甲基化的 CpG 二核苷酸，用来治疗，预防或改善受试体的病变，其序列包括：5' N₁X₁X₂CGTTN₂ 3'，其中一个或多个核苷酸将连续的 CpGs 分开；X₁ X₂ 是 GpT 或 ApT；N₁ 是任何包括 5'TC 或 TG 的核苷酸，并且 N₁+ N₂ 是约 0-26 个碱基，条件是 N₁ 和 N₂ 不含有 CCGG 四元体或多于一个的 CCG 或 CGG 三元体；并且免疫刺激寡核苷酸的长度为 8-30 个碱基。
3. 根据权利要求 1 或 2 的免疫刺激寡核苷酸，其中 N₁ 包括 5'TC。
4. 根据权利要求 1 和 2 的免疫刺激寡核苷酸，包括两个或多于两个的被胸腺嘧啶分开的连续的 CpGs。
5. 根据权利要求 3 的免疫刺激寡核苷酸，其中 GTCGT 基元紧跟在 5'TC 后。
6. 根据权利要求 2 的免疫刺激寡核苷酸，进一步包括抗原。

7. 根据权利要求1和2的免疫刺激寡核苷酸，其中寡核苷酸是合成的。
8. 根据权利要求2的免疫刺激寡核苷酸，其中寡核苷酸包括一个或多个磷酸主链修饰的核苷酸内连接。
9. 根据权利要求1和8的免疫刺激寡核苷酸，其中磷酸主链修饰是硫代磷酸酯修饰或磷酸二酯修饰。
10. 根据权利要求9的免疫刺激寡核苷酸，其中核苷酸内连接是硫代磷酸酯连接。
11. 根据权利要求1和2的免疫刺激寡核苷酸，其中寡核苷酸包括 GTCGCT 或 GTCGTT 基元。
12. 根据权利要求1和2的免疫刺激寡核苷酸，其不是回文的。
13. 一种免疫刺激寡核苷酸具有序列 TCGTCGTTTTGTCGTTTT GTCGTT。
14. 一种免疫刺激寡核苷酸具有序列 TCGTCGTTTTGTCGTTTT GTCGTT，

TCCATGACGGTCCTGATGCT，

TCCATGTCGTTCTGTTCGTT，

TCCTGTCTTCCTGTCGTT，

TCCTGTCGTTTCCTTGTCGTT，

TCCTTGTCCTTCCTGTCGTT，

TCCTGTCGTTTTTTTGTCGTT，

TCGTCGCTGTTGTCGTTTCTT,
TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT,
TCGTCGTTGTCGTTTTGTCGTT,
TGTCGTTGTCGTTGTCGTTGTCGTT,
TGTCGTTGTCGTTGTCGTT,
TCGTCGTCGTCGTT 和
TGTCGTTGTCGTT。

15. 根据权利要求 13 和 14 的免疫刺激寡核苷酸，其中寡核苷酸包括一个或多个磷酸主链修饰的核苷酸内连接。
16. 根据权利要求 15 的免疫刺激寡核苷酸，其中磷酸主链修饰是硫代磷酸酯修饰或磷酸二酯修饰。
17. 根据权利要求 15 的免疫刺激寡核苷酸，其中核苷酸内连接是硫代磷酸酯连接。
18. 一种组合物，包括权利要求 1，2，8，13 或 14 任何一个的寡核苷酸和固醇，阳离子脂质，病毒粒子，或脂质体，以形成核酸释放复合物。
19. 一种组合物，包括权利要求 1，2，8，13 或 14 任何一个的寡核苷酸和药理学可接受的载体。
20. 一种组合物基本上由权利要求 1，2，8，13 或 14 任何一个的寡核苷酸组成。

21. 权利要求 1, 2, 8, 13 或 14 任何一个的寡核苷酸在制备通过刺激受试体的免疫系统来治疗, 预防或改善受试体病变的药物中的应用。
22. 根据权利要求 21 的应用, 其中药物用来治疗或预防受试体的癌症。
23. 根据权利要求 21 的应用, 其中药物诱导受试体内的细胞毒性淋巴细胞应答。
24. 根据权利要求 21 的应用, 其中药物治疗或预防受试体的病毒性, 真菌性, 细菌性, 或寄生虫性感染。
25. 根据权利要求 21 的应用, 其中药物刺激受试体对疫苗的应答。
26. 根据权利要求 21 的应用, 其中药物用作为刺激受试体的免疫活化的附剂。
27. 根据权利要求 21 的应用, 其中药物治疗或预防受试体的过敏。
28. 根据权利要求 21 的应用, 其中药物治疗或预防受试体的气喘。
29. 包括一个或多个未甲基化 CpG 二核苷酸的免疫刺激寡核苷酸在制备治疗或预防气喘的药物中的应用, 其中免疫刺激寡核苷酸不与使用的过敏原一起使用。
30. 包括一个或多个未甲基化 CpG 二核苷酸的免疫刺激寡核苷酸在制备治疗或预防气喘的口服药物中的应用。

31. 包括一个或多个未甲基化 CpG 二核苷酸的免疫刺激寡核苷酸在制备治疗或预防过敏的药物中的应用，其中免疫刺激寡核苷酸不与使用的过敏原一起使用。
32. 包括一个或多个未甲基化 CpG 二核苷酸的免疫刺激寡核苷酸在制备治疗或预防过敏的口服药物中的应用。
33. 包括一个或多个未甲基化 CpG 二核苷酸的免疫刺激寡核苷酸在制备治疗或预防湿疹，过敏性鼻炎，鼻炎，枯草热，风疹或食物过敏的药物中的应用。
34. 根据权利要求 29-33 中任何一个的应用，其中免疫刺激寡核苷酸含有包括通式如下表示的 CpG 基元的序列：



其中一个或多个核苷酸将连续的 CpGs 分开； X_1 是腺嘌呤，鸟嘌呤，或胸腺嘧啶； X_2 是胞嘧啶或胸腺嘧啶；N 是核苷酸，并且 $N_1 + N_2$ 是 0-26 个碱基，条件是 N_1 和 N_2 不含有 CCGG 四元体或多于一个的 CCG 或 CGG 三元体；并且寡核苷酸的长度为 8-30 个碱基。

35. 根据权利要求 29-33 中任何一个的应用，其中免疫刺激寡核苷酸含有包括通式如下表示的 CpG 基元的序列：



其中一个或多个核苷酸将连续的 CpGs 分开；其中 $X_1 X_2$ 是 GpT, GpG, GpA, ApT, 或 ApA, $X_3 X_4$ 是 TpT 或 CpT；N 是核苷酸，并且 $N_1 + N_2$ 是 0-26 个碱基，条件是 N_1 和 N_2 不含有 CCGG 四元体或多于一个的 CCG 或 CGG 三元体；并且寡核苷酸的长度为 8-30 个碱基。

36. 根据权利要求 35 中的应用，其中 X_1 X_2 是 GpT, GpG, GpA, 或 ApA, X_3 X_4 是 TpT, CpT 或 GpT。
37. 根据权利要求 34 中的应用，当药物用来治疗气喘时，其中免疫刺激寡核苷酸是：
- (a)GTCG (T/C) T 或 TGACGTT;
- (b)TGTCG (T/C) T。
38. 根据权利要求 29-33 中任何一个的应用，其中包括一个或多个未甲基化 CpG 二核苷酸的免疫刺激寡核苷酸的长度为 8-30 个碱基。
39. 根据权利要求 29-33 中任何一个的应用，其中包括一个或多个未甲基化 CpG 二核苷酸的免疫刺激寡核苷酸在 5' 端有 TC 或 TG。
40. 根据权利要求 29-33 中任何一个的应用，其中包括一个或多个未甲基化 CpG 二核苷酸的免疫刺激寡核苷酸包括被一个或多个胸腺嘧啶分开的两个或多于两个连续 CpG。
41. 根据权利要求 29-33 中任何一个的应用，其中包括一个或多个未甲基化 CpG 二核苷酸的免疫刺激寡核苷酸不包括回文 CpG 基元。
42. 根据权利要求 29-33 中任何一个的应用，其中包括一个或多个未甲基化 CpG 二核苷酸的免疫刺激寡核苷酸是磷酸二酯寡核苷酸。

43. 根据权利要求 29-33 中任何一个的应用，其中包括一个或多个未甲基化 CpG 二核苷酸的免疫刺激寡核苷酸包括磷酸主链修饰。
44. 根据权利要求 43 的应用，其中磷酸主链修饰包括硫代磷酸酯修饰的连接。
45. 根据权利要求 29-33 中任何一个的应用，其中包括一个或多个未甲基化 CpG 二核苷酸的免疫刺激寡核苷酸是核糖核酸或脱氧核糖核酸。
46. 根据权利要求 29-33 中任何一个的应用，其中包括一个或多个未甲基化 CpG 二核苷酸的免疫刺激寡核苷酸是合成的。
47. 根据权利要求 29-33 中任何一个的应用，其中包括一个或多个未甲基化 CpG 二核苷酸的免疫刺激寡核苷酸是稳定化的。
48. 包括一个或多个未甲基化 CpG 二核苷酸的免疫刺激寡核苷酸在制备通过增强依赖抗体细胞毒性来治疗恶性肿瘤或肉瘤的药物中的应用。
49. 根据权利要求 48 的应用，其中恶性肿瘤是脑，肺，卵巢，乳房，前列腺，或结肠的瘤。
50. 包括一个或多个未甲基化 CpG 二核苷酸的免疫刺激寡核苷酸在制备与化疗药物一起服用或之后服用以增加恶性细胞对后来的化疗或免疫治疗的反应的药物中的应用。

51. 包括一个或多个未甲基化 CpG 二核苷酸的免疫刺激寡核苷酸在制备与免疫治疗一起服用，之前服用，或之后服用以增加恶性细胞对后来的化疗或免疫治疗的反应的药物中的应用。
52. 包括一个或多个未甲基化 CpG 二核苷酸的免疫刺激寡核苷酸在制备与化疗或免疫治疗一起服用，之前服用，或之后服用以加快骨髓的恢复的药物中的应用。
53. 包括一个或多个未甲基化 CpG 二核苷酸的免疫刺激寡核苷酸在制备治疗乙型肝炎病毒感染的药物中的应用。
54. 包括一个或多个未甲基化 CpG 二核苷酸的免疫刺激寡核苷酸在制备治疗丙型肝炎病毒感染的药物中的应用。
55. 根据权利要求 29-33 或 48-54 中任何一个的应用，其中免疫刺激寡核苷酸是权利要求 1，2，8，13 或 14 中任何一个的寡核苷酸。
56. 根据权利要求 29-33 或 48-54 中任何一个的应用，其中药物包括固醇，阳离子脂质，病毒粒子，或脂质体，以形成核酸释放复合物或药理学可接受的载体。
57. 根据权利要求 29-33 或 48-54 中任何一个的应用，其中药物是人类使用的。

58. 根据权利要求 29-33 或 48-54 中任何一个的应用，其中包括一个或多个未甲基化 CpG 二核苷酸的免疫刺激寡核苷酸是口服的，经皮服用，或通过皮下注射，静脉注射，非肠道注射，经腹膜注射或胸内注射。
59. 根据权利要求 22 的应用，其中药物是人类使用的。
60. 根据权利要求 22 的应用，其中包括一个或多个未甲基化 CpG 二核苷酸的免疫刺激寡核苷酸是口服的，经皮服用，或通过皮下注射，静脉注射，胃肠道外注射，腹膜内注射或胸内注射。
61. 根据权利要求 23 的应用，其中药物是人类使用的。
62. 根据权利要求 23 的应用，其中包括一个或多个未甲基化 CpG 二核苷酸的免疫刺激寡核苷酸是口服的，经皮服用，或通过皮下注射，静脉注射，胃肠道外注射，腹膜内注射或胸内注射。
63. 根据权利要求 24 的应用，其中药物是人类使用的。
64. 根据权利要求 24 的应用，其中包括一个或多个未甲基化 CpG 二核苷酸的免疫刺激寡核苷酸是口服的，经皮服用，或通过皮下注射，静脉注射，胃肠道外注射，腹膜内注射或胸内注射。
65. 根据权利要求 25 的应用，其中药物是人类使用的。

66. 根据权利要求 25 的应用,其中包括一个或多个未甲基化 CpG 二核苷酸的免疫刺激寡核苷酸是口服的,经皮服用,或通过皮下注射,静脉注射,胃肠道外注射,腹膜内注射或胸内注射。
67. 根据权利要求 26 的应用,其中药物是人类使用的。
68. 根据权利要求 26 的应用,其中包括一个或多个未甲基化 CpG 二核苷酸的免疫刺激寡核苷酸是口服的,经皮服用,或通过皮下注射,静脉注射,胃肠道外注射,腹膜内注射或胸内注射。
69. 根据权利要求 27 的应用,其中药物是人类使用的。
70. 根据权利要求 27 的应用,其中包括一个或多个未甲基化 CpG 二核苷酸的免疫刺激寡核苷酸是口服的,经皮服用,或通过皮下注射,静脉注射,胃肠道外注射,腹膜内注射或胸内注射。
71. 根据权利要求 28 的应用,其中药物是人类使用的。
72. 根据权利要求 28 的应用,其中包括一个或多个未甲基化 CpG 二核苷酸的免疫刺激寡核苷酸是口服的,经皮服用,或通过皮下注射,静脉注射,胃肠道外注射,腹膜内注射或胸内注射。

免疫刺激性核酸分子

本发明的研究部分地得到了美国国家卫生研究院的第 R29-AR42556-01 拨款的资助。美国政府有本发明的部分权利。

本发明的技术领域

本发明一般地涉及寡核苷酸，具体地讲，涉及那些包括至少一个免疫刺激性的未甲基化 CpG 二核苷酸的寡核苷酸序列。

本发明的背景技术

在二十世纪七十年代，一些研究人员报道了高分子量 DNA 与细胞膜的结合（Lerner, R.A. et al., 1971. “Membran-associated DNA in the cytoplasm of diploid human lymphocytes”. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68:112; Agrawal, S.K., R.W. Wagner, P.K. McAllister, and B. Rosenberg. 1975. “Cell-surface-associated nucleic acid in tumorigenic cells made visible with platinum-pyrimidine complexes by electron microscopy”. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72:928）。在 1985 年，Bennett 等人首次提出证据证明了 DNA 与淋巴细胞的结合相似于配体与受体的相互作用，即结合是饱和的、竞争性的、并导致 DNA 细胞内吞作用和降解为寡核苷酸（Bennett, R.M., G.T. Gabor, and M.M. Merritt. 1985. “DNA binding to human leukocytes. Evidence for receptor-mediated association, internalization, and degradation of DNA”. J. Clin. Invest. 76:2182）。类似于 DNA，寡脱氧核糖核酸（ODN）也能以饱和、不依赖序列、但依赖温度和能量的形式进入到细

胞中(见 Jaroszewski, J.W., and J.S. Cohen. 1991. "Cellular uptake of antisense oligodeoxynucleotides". *Advanced Drug Delivery Reviews* 6:235; Akhtar, S., Y. Shoji, and R.L. Juliano. 1992. "Pharmaceutical aspects of the biological stability and membrane transport characteristics of antisense oligonucleotides". In: Gene Regulation: Biology of Antisense RNA and DNA. R.P. Erickson, and J.G. Izant, eds. Raven Press, Ltd. New York, pp. 133; and Zhao, Ql, T. Waldschmidt, E. Fisher, C.J. Herrera, and A.M. Krieg., 1994. "Stage specific oligonucleotide uptake in murine bone marrow B cell precursors". *Blood*, 84:3660)。但是, 还没有克隆化到吸收 DNA 或 ODN 的受体, 而且, 还不清楚 ODN 结合及细胞吸收是采取与高分子量的 DNA 相同或不同的机制。

淋巴细胞的 ODN 吸收已经被证明可由细胞活化来调节。用 B 细胞分裂素 LPS 刺激的脾细胞在 B 细胞群体中显示了 ODN 吸收的显著提高, 而用 T 细胞分裂素 Con A 处理的脾细胞显示的 ODN 吸收的提高是在 T 细胞中而不是在 B 细胞中(Krieg, A.M., F. Gmelig-Meyling, M.F. Gourley, W.J. Kisch, L.A. Chrisey, and A.D. Steinberg. 1991. "Uptake of oligodeoxyribonucleotides by lymphoid cells is heterogeneous and inducible". *Antisense Research and Development* 1:161)。

已经对一些多聚核苷酸作为反应修饰剂进行了广泛的研究。也许最好的例子是多聚(I,C), 这是一种 IFN 生产的强力诱导子, 也是巨嗜细胞活化子和 NK 活性诱导子(Talmadge, J.E., J. Adams, H. Phillips, M. Collins, B. Lenz, M. Schneider, E. Schlick, R. Ruffmann, R.H. Wiltout, and M.A. Chirigos. 1985. "Immunomodulatory effects in mice of polyinosinic-polycytidylic acid complexed with poly-L-lysine and carboxymethylcellulose". *Cancer Res.* "Immunomodulation of natural killer activity by polyribonucleotides". *J. Biol. Resp. Mod.* 4:512; Krown, S.E. 1986.

“Interferons and interferon inducers in cancer treatment”. *Sem. Oncol.* 13:207; and Ewel, C.H., S.J. Urba, W.C. Kopp, J.W. Smith II, R.G. Steis, J.L. Rossio, D.L. Longo, M.J. Jones, W.G. Alvord, C.M. Pinsky, J.M. Beveridge, K.L. McNitt, and S.P. Creekmore. 1992. “Polyinosinic-polycytidylic acid complexed with poly-L-lysine and carboxymethylcellulose in combination with interleukin-2 in patients with cancer: clinical and immunological effects”. *Canc. Res.* 52:3005)。看起来, 这种鼠 NK 活化的单一原因是引入了 IFN- β 分泌 (Ishikawa, R., and C.A. Biron. 1993. “IFN induction and associated changes in splenic leukocyte distribution”. *J. Immunol.* 150:3713)。这种活化是对核糖为特异的, 因为对脱氧核糖没有效力。其体外抗肿瘤活性的效力导致多种采用多聚 (I,C) 复合多聚-L-赖氨酸和羧甲基纤维素 (用以减少 RNase 降解) 的临床研究 (Talmadge, J.E., et al., 1985. 出处同上; Wiltrout, R.H., et al., 1985. 出处同上); Krown, S.E., 1986. 出处同上); and Ewel, C.H., et al., 1992. 出处同上)。不幸的是, 对毒性副作用的研究完全排除了多聚 (I,C) 成为有用的治疗药剂的可能。

在 C8 位发生溴或硫醇基取代的鸟嘌呤核糖核苷酸是 B 细胞的分裂素, 并且可以取代“B 细胞分化因子” (Feldbush, T.L., and Z.K. Ballas. 1985. “Lymphokine-like activity of 8-mercaptoguanosine: induction of T and B cell differentiation”. *J. Immunol.* 134:3204; and Goodman, M.G. 1986. “Mechanism of synergy between T cell signals and C8-substituted guanine nucleosides in humoral immunity: B lymphotropic cytokines induce responsiveness to 8-mercaptoguanosine”. *J. Immunol.* 136:3335)。8-巯基鸟苷和 8-溴鸟苷还可以取代细胞因子来用在 MHC 限制的 CTL 的产生 (Feldbush, T.L., 1985. 出处同上), 增大鼠 NK 活性 (Koo, G.C., M.E. Jewell, C.L. Manyak, N.H. Sigal, and L.S.

Wicker. 1988. "Activation of murine natural killer cells and macrophages by 8-bromoguanosine". *J. Immunol.* 140:3249), 以及与 IL-2 一起在诱发鼠 LAK 产生中的协同效应 (Thompson, R.A., and Z.K. Ballas. 1990. "Lymphokine-activated killer (LAK) cells. V. 8-Mercaptoguanosine as an IL-2-sparing agent in LAK generation". *J. Immunol.* 145:3524)。这些 C8 取代的鸟苷的 NK 和 LAK 活性的增大看起来归因于它们对 IFN 的引入 (Thompson, R.A., et al., 1990. 出处同上)。近来, 由分枝杆菌产生的 5'三磷酸化胸苷被发现是对人 $\gamma\delta$ T 细胞亚类为促有丝分裂的 (Constant, P., F. Davodeau, M. A. Peyrat, Y. Poquet, G. Puzo, M. Bonneville, and J.-J. Fournie. 1994. "Stimulation of human $\gamma\delta$ T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands" *Science* 264:267)。该篇报道指明, 免疫系统可能产生对微生物核酸的带有倾向性的反应方式。

一些研究已经表明, 某些 DNA 结构可以还带有活化淋巴细胞的潜力。例如, Bell 等人曾经报道, 在脾细胞上清液中的核小体蛋白质-DNA 复合物 (不是裸露的 DNA) 引起了 B 细胞的繁殖和免疫球蛋白的分泌 (Bell, D.A., B. Morrison, and P. VanderBygaart. 1990. "Immunogenic DNA-related factors". *J. Clin. Invest.* 85:1487)。在其它的情况下, 裸露的 DNA 已经被报道具有免疫效应。例如, Messina 等人最近曾报道说, 多聚(dG)·(dC) 和多聚(dG·dC)的 260 至 800 bp 的片段是对 B 细胞为促有丝分裂的 (Messina, J.P., G.S. Gilkeson, and D.S. Pisetsky. 1993. "The influence of DNA structure on the in vitro stimulation of murine lymphocytes by natural and synthetic polynucleotide antigens". *Cell. Immunol.* 147:148)。Tokunaga 等人已经报道了 dG·dC 诱导 γ -IFN 和 NK 活性 (Tokunaga, S. Yamamoto, and K. Namba. 1988. "A synthetic single-stranded DNA, poly(dG,dC), induces interferon- α/β and γ , augments natural killer activity, and

suppresses tumor growth” Jpn. J. Cancer Res. 79:682)。除了这些人造的均聚体序列之外, Pisetsky 等人报道了纯净哺乳动物 DNA 没有可检测性免疫效应, 但是, 从某些细菌来的 DNA 则诱导了 B 细胞的活化和免疫球蛋白的分泌(Messina, J.P., G.S. Gilkeson, and D.S. Pisetsky. 1991. “Stimulation of in vitro murine lymphocyte proliferation by bacterial DNA”. J. Immunol. 147:1759)。假设这些数据不是那些特异的污染物的结果, 那么, 这些研究则建议, 细菌 DNA 的特定结构或它们的特定性质使其能够启动 B 细胞的活化。对分枝杆菌 DNA 序列的研究显示, 含有某种回文序列的 ODN 可以活化 NK 细胞(Yamamoto, S., T. Yamamoto, T. Kataoka, E. Kuramoto, O. Yano, and T. Tokunaga. 1992. “Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are required to induce INF and augment INF-mediated natural killer activity”. J. Immunol. 148:4072; Kuramoto, E., O. Yano, Y. Kimura, M. Baba, T. Makino, S. Yamamoto, T. Yamamoto, T. Kataoka, and T. Tokunaga. 1991. “Oligonucleotide sequences required for natural killer cell activation”. Jpn. J. Cancer Res. 83:1128)。

还报道了其它一些硫代磷酸酯修饰的 ODN 在体外或体内对 B 细胞的刺激(Tanaka, T., C.C. Chu, and W.E. Paul. 1992. “An antisense oligonucleotide complementary to a sequence in Ig2b increases g2b germline transcripts, stimulates B cell DNA synthesis, and inhibits immunoglobulin secretion”. J. Exp. Med. 175:597; Branda, R.F., A.L. Moore, L. Mathews, J.J. McCormack, and G. Zon. 1993. “Immune stimulation by an antisense oligomer complementary to the rev gene of HIV-1”. Biochem. Pharmacol. 45:2037; McIntyre, K.W., K. Lombard-Gillooly, J.R. Perez, C. Kunsch, U.M. Sarmiento, J.D. Larigan, K.T. Landreth, and R. Narayanan. 1993. “A sense phosphorothioate oligonucleotide directed to the initiation codon of transcription factor NF- κ B T65

causes sequence-specific immune stimulation". *Antisense Res. Develop.* 3:309; and Pisetsky, D.S., and C.F. Reich. 1993. "Stimulation of murine lymphocyte proliferation by a phosphorothioate oligonucleotide with antisense activity for herpes simplex virus". *Life Sciences* 54:101)。这些报道没有建议出在这些 ODN 中有可以解释这些效果的共同的结构基元或序列因素。

cAMP 效应元件结合蛋白质 (CREB) 和活化转录因子 (ATF) 或转录因子的 CREB/ATF 家族是普遍被表达的一类转录因子,其 11 个成员已经被克隆化了 (reviewed in de Groot, R.P., and P. Sassone-Corsi: "Hormonal control of gene expression: Multiplicity and versatility of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-responsive nuclear regulators". *Mol. Endocrin.* 7:145, 1993; Lee, K.A. W., and N. Masson: "Transcriptional regulation by CREB and its relatives". *Biochim. Biophys. Acta* 1174:221, 1993)。它们都属于蛋白质中碱性区/亮氨酸拉链结构 (bZip) 类。所有的细胞都显示出对一种或一种以上的 CREB/ATF 蛋白质的表达,但是,所表达的成员和对 mRNA 剪接的调节则显示为组织特异性的。对活化区的分化剪接可以确定某一具体的 CREB/ATF 蛋白质是转录抑制子或活化子。许多的 CREB/ATF 蛋白质活化病毒性转录,但是,有些缺少活化区的剪接变体则是抑制性的。CREB/ATF 蛋白质可以作为均二聚体或异二聚体通过 cAMP 效应元件来结合 DNA,而 cAMP 效应元件,即 CRE,其共有形式是未甲基化序列 TGACGTC (如果 CpG 是甲基化的,则结合就被抑制) (Iguchi-Arigo, S.M.M., and W. Schaffner: "CpG methylation of the cAMP responsive enhancer/promoter sequence TGACGTCA abolishes specific factor binding as well as transcriptional activation". *Genes & Develop.* 3:612, 1989.)。

CRE 的转录活性在 B 细胞活化中被提高(Xie, H.T.C. Chiles, and T.L. Rothstein: "Induction of CREB activity via the surface Ig receptor of B cells". J.Immunol. 151:880, 1993)。CREB/ATF 蛋白质好象是通过 CRE 来对多种基因的表达进行调节, 包括免疫学上重要的基因, 例如, fos、jun B、Rb-1、IL-6、IL-1(Tsukada, J., K. Saito, W.R. Waterman, A.C. Webb, and P.E. Auron: "Transcription factors NF-IL-6 and CREB recognize a common essential site in the human prointerleukin 1 gene". Mol. Cell. Biol. 14:7285, 1994; Gray, G.D., O.M. Hernandez, D. Hebel. M. Root, J.M. Pow-Sang, and E. Wickstrom: "antisense DNA inhibition of tumor growth induced by c-Ha-ras oncogene in nude mice". Cancer Res. 53:577, 1993) , IFN- (Du, W., and T. Maniatis: "An TF/CREB binding site protein is required for virus induction of human interferon B gene". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:2150, 1992) , TGF-1 (Asiedu, C.K., L. Scott, R.K. Assoian, M. Ehrlich: "Binding of AP-1/CREB proteins and of MDBP to contiguous sites downstream of the human TGF-B1 gene". Biochim. Biophys. Acta 1219:55, 1994) , TGF-2, II MHC 类(Cox, P.M., and C.R. Goding: "An ATF/CREB binding motif is required for aberrant constitutive expression of the MHC class II DRa promoter and activation by SV40 T-antigen". Nucl. Acids Res. 20:4881, 1992) , E-选择素, GM-CSF, CD-8, 种系 Ig 恒定区基因, TCR V 基因, 以及繁殖细胞核抗原(Huang, D., P.M. Shipman-Appasamy, D.J. Orten, S.H. Hinrichs, and M.B. Prystowsky: "Promoter activity of the proliferating-cell nuclear antigen gene is associated with inducible CRE-binding proteins in interleukin 2-stimulated T lymphocytes: Mol. Cell. Biol. 14:4233, 1994)。除了通过 cAMP 途径的活化, CREB 还可以介导对细胞内 Ca^{++} 浓度变化的转录应答(Sheng, M., G. McFadden, and M.E. Greenberg: "Membrane depolarization and calcium induce c-fos transcription via phosphorylation of transcription factor CREB". Neuron 4:571, 1990)。

在 CREB/ATF 蛋白质的转录活化中，蛋白质-蛋白质之间的相互作用显示为极其重要角色。已经有一些发表的研究报道了在 NFkB 蛋白质和 CREB/ATF 蛋白质之间的直接性或间接性相互作用 [Whitley, et al., (1994) Mol. & Cell. Biol. 14:6464; Cogswell, et al., (1994) J. Immun. 153:712; Hines, et al., (1993) Oncogene 8:3189; and Du, et al., (1993) Cell 74:887]。通过环 AMP 途径对 CREB 的活化需要蛋白质激酶 A (PKA)，其将 CREB³⁴¹ 在 ser¹³³ 磷酸化，并允许其与近来克隆化的蛋白质 CBP 结合 (Kwok, R.P.S., J.R. Lundblad, J.C. Chrivia, J.P. Richards, H.P. Bachinger, R.G. Brennan, S.G.E. Roberts, M.R. Green, and R.H. Goodman: "Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB". Nature 370:223, 1994; Arias, J., A.S. Alberts, P. Brindle, F.X. Claret, T.Smea, M.Karin, J. Feranmisco, and M. Montminy: "Activation of cAMP and mitogen responsive genes relies on a common nuclear factor". Nature 370:226, 1994.)。CBP 随后再与碱性转录因子 TFIIB 相互作用造成提高了的转录。CREB 还被报道与 dTAFII 110 相互作用，该 dTAFII 110 是一种 TATA 结合蛋白质相关的因子，其结合可以调节转录 (Ferreri, K., G. Gill, and M. Montminy: "The cAMP-regulated transcription factor CREB interacts with a component of the TFIID complex". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:1210, 1994)。除了这些相互作用之外，CREB/ATF 蛋白质可以特异性结合多种其它的核因子 (Hoeffler, J.P., J.W. Lustbader, and C.-Y. Chen: "Identification of multiple nuclear factors that interact with cyclic adenosine 3',5'-monohosphate response element-binding protein and activating transcription factor-2 by protein-protein interactions". Mol. Endocrinol. 5:256, 1991)，但是，这些相互作用中的大多数的生物学重要性还都是未知的。一般都认为 CREB 与 DNA 的结合是均二聚体的或与其它蛋白质的异二聚体。另人惊奇的是，CREB 单体对转录的活化是组成性的 (Krajewski,

Wl, and K.A.W. Lee: "A monomeric derivative of the cellular transcription factor CREB functions as constitutive activator". *Mol. Cell. Biol.* 14:7204, 1994)。

除了在调节细胞转录中的重要作用之外，最近还证实了 CREB/ATF 蛋白质被某些感染性病毒和逆病毒所破坏，使其需要病毒复制。例如，在已知的最为强烈的哺乳动物启动子中，即巨细胞病毒立即早期启动子中，含有对启动子功能为必须的 CRE 的 11 个拷贝 (Chang, Y.-N., S. Crawford, J. Stall, D.R. Rawlins, K.-T. Jeang, and G.S. Hayward: "The palindromic series I repeats in the simian cytomegalovirus major immediate-early promoter behave as both strong basal enhancers and cyclic AMP response elements". *J. Virol.* 64:264, 1990)。诱导众多启动子的腺病毒 E1A 蛋白质的至少一部分转录活化效应归因于其与 CREB/ATF 蛋白质的 DNA 结合区的结合，即与 ATF-2 的结合，其介导 E1A 可诱导的转录活化 (Liu, F., and M.R. Green: "Promoter targeting by adenovirus E1a through interaction with different cellular DNA-binding domains". *Nature* 368:520, 1994)。还建议的是，E1A 与 CREB 结合蛋白质 CBP 相结合 (Arany, Z., W.R. Sellers, D.M. Livingston, and R.Eckner: "E1A-associated p300 and CREB-associated CBP belong to a conserved family of coactivators". *Cell* 77:799, 1994)。人 T 嗜淋巴细胞病毒-I (HTLV-1)，即造成人 T 细胞白血病和热带痉挛轻瘫的逆病毒，也需要 CREB/ATF 蛋白质来复制。在这种情况下，逆病毒产生蛋白质 Tax，其与 CREB/ATF 蛋白质结合，再指引它们从其正常的细胞结合位点改变为存在于 HTLV 转录增强子中的不同的 DNA 序列 (侧翼序列为 G-和 C-富集的序列) (Pac-Uccaralertkun, S., L.-J. Zhao, N. Adya, J.V. Cross, B.R. Cullen, I.M. Boros, and C.-Z. Giam: "In vitro selection of DNA elements highly responsive to the human T-cell lymphotropic virus type I

transcriptional activator, Tax". Mol. Cell. Biol. 14:456, 1994; Adya, N., L.-J. Zhao, W. Huang, I. Boros, and C.-Z. Giam: "Expansion of CREB's DNA recognition specificity by Tax results from interaction with Ala-Ala-Arg at positions 282-284 near the conserved DNA-binding domain of CREB". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:5642, 1994)。

本发明的概述

本发明的基础是发现了某些含有未甲基化的胞嘧啶-鸟苷 (CpG) 二核苷酸活化对象中的淋巴细胞并使对象的免疫系统由 Th2 转变为 Th1 (例如, 诱导单核细胞以及其它细胞产生 Th1 细胞因子, 包括 IL-12、IFN- γ 、和 GM-CSF)。基于这个发现, 本发明在一方面涉及新的免疫刺激性核酸组合物。

在一个实施方案中, 本发明提供了被分离的免疫刺激性的含有 CpG 基元的核酸序列, 其表达式为:



其中, 至少有一个核苷酸将连续的 CpGs 间隔开来; X_1 是腺嘌呤, 鸟嘌呤, 或胸腺嘧啶; X_2 是胞嘧啶或胸腺嘧啶; N 是任何的核苷酸, 且 N_1+N_2 是 0-26 碱基, 条件是 N_1 和 N_2 都不含有 CCGG 四元体或多于一个的 CCG 或 CGG 三元体; 并且核酸序列的长度为约 8-30 碱基对。

在另一个实施方案中, 本发明提供了被分离的免疫刺激性的含有 CpG 基元的核酸序列, 其表达式为:



其中，至少有一个核苷酸将连续的 CpGs 间隔开来； $X_1 X_2$ 是选自 GpT、GpG、GpA、ApT 和 ApA； $X_3 X_4$ 是选自 TpT 或 CpT；N 是任何的核苷酸，且 $N_1 + N_2$ 是 0-26 碱基，条件是 N_1 和 N_2 都不含有 CCGG 四元体或多于一个的 CCG 或 CGG 三元体；并且核酸序列的长度为约 8-30 碱基对。

在另一个实施方案中，本发明提供了刺激免疫活化的方法，将本发明的核酸序列提供给对象，优选人类。在优选的实施方案中，免疫活化产生主要是 Th1 形式的免疫活化。

在另一个实施方案中，本发明的核酸序列刺激细胞因子的生产。具体地讲，IL-6、IL-12、IFN- γ 、TNF- α 和 GM-CSF 是通过用本文中所述的核酸序列刺激免疫系统来产生的。在另一方面，本发明的核酸序列刺激天然杀死细胞（NK）的溶胞活性和 B 细胞的繁殖。

在另一个实施方案中，本发明的核酸序列被用作人造附剂来在哺乳动物如小鼠或人中产生抗体。

在另一个实施方案中，通过抑制对象的对 CpG 介导的淋巴细胞活化的应答来治疗自体免疫紊乱。本发明提供了施加对体内酸化的抑制物如 bafilomycin a，氯喹，和莫能菌素来缓解自体免疫紊乱。具体地讲，用这种方式治疗了系统性红斑狼疮。

本发明的核酸序列还可以用于治疗、防止或缓解其它的紊乱（例如，肿瘤或癌症，病毒性、真菌性、细菌性或寄生性感染）。此外，本发明的核酸序列可以施加给对象来刺激其对疫苗的应答。进一步，将对象的免疫系统从 Th2 改变为 Th1，本发明的核酸序列可以治疗和防止气喘疾病。此外，本发明的核酸序列可以

施加给患有过敏疾病的对象,作为消除敏感的制剂来治疗或防止与气喘相关的过敏反应。

进一步,本发明的核酸序列的诱导白血细胞进入细胞循环的能力支持了其治疗白血病的应用,即提高了在常规的消除化疗之后的白血细胞的敏感性,或者将本发明的核酸序列与其它的免疫治疗物一起使用。

本发明的其它的特点和优点将可以从下面的描述和权利要求书中更为明显地看出。

附图的简要说明

图 1A-C 用制图说明在消除了 T 细胞的脾细胞培养物中对各种 DNA 序列的应答的 IL-6 生产的剂量依赖情况。

图 1A 是大肠杆菌 DNA (l) 和小牛胸腺 DNA (n) 序列和 LPS (10 倍浓度的大肠杆菌和小牛胸腺 DNA) (u)。

图 1B 是对照的磷酸二脂寡聚脱氧核苷酸 (ODN) 5'ATGGAAGGTCCAGTGTTCTC3' (SEQ ID No:1) (n)和两个磷酸二脂 CpG ODN 5'ATCGACCTACGTGCGTTCTC3' (SEQ ID No:2) (u)和 5'TCCATAACGTTCCTGATGCT3' (SEQ ID No:3) (l)。

图 1C 是对照的硫代磷酸酯 ODN 5'GCTAGATGTTAGCGT3' (SEQ ID No:4) (n)和两个硫代磷酸酯 CpG ODN 5'GAGAACGTCGACCTTCGAT3' (SEQ ID No:5) (u)和 5'GCATGACGTTGAGCT3' (SEQ ID No:6) (l)。数据代表三份的平均值±标准偏差。

图 2 图示注射后 1-8 小时所确定的体内 CpG DNA 诱导的 IL-6 生产。数据代表从两个小鼠的血清的两次分析的平均值。对 BALB/c 小鼠（每组两只）静脉内注射 100 微升的 PBS (o) 或 200 微克的 CpG 硫代磷酸酯 ODN 5'TCCATGACGTTTCCTGATGCT3' (SEQ ID No:7) (n) 或非 -CpG 硫代磷酸酯 ODN 5'TCCATGAGCTTCCTGAGTCT3' (SEQ ID No:8) (u)。

图 3 是放射性自显影图，说明 IL-6 mRNA 表达，由反转录聚合酶链反应确定，在肝、脾和胸腺中各个时间的情况，事先对 BALB/c 小鼠（每组两只）进行体内刺激，静脉内注射 100 微升的 PBS，200 微克的 CpG 硫代磷酸酯 ODN 5'TCCATGACGTTTCCTGATGCT3' (SEQ ID No:7) 非-CpG 硫代磷酸酯 ODN 5'TCCATGAGCTTCCTGAGTCT3' (SEQ ID No:8)。

图 4A 是图示抗 IL-6 对 CpG 诱导的 IgM 生产的剂量依赖性抑制。从 DBA/2 小鼠来的脾 B 细胞用 CpG ODN 5'TCCAAGACGTTTCCTGATGCT3' (SEQ ID No:9) 刺激，有给出浓度的中性抗-IL-6(u)或等模标本对照 Ab(l)的存在，在培养物上清液中的 IgM 水平有 ELISA 确定。在没有 CpG ODN 存在的情况下，抗-IL-6 抗体对 IgM 分泌没有效应(n)。

图 4B 图示用 CpG S-ODN 5'TCCATGACGTTTCCTGATGCT3' (SEQ ID No:7) 和抗-IL-6 (u)培养或用抗-IL-6 抗体单独培养(n)的脾 B 细胞 CpG-诱导的刺激指数。数据代表三份的平局值±标准偏差。

图 5 是条块图，说明在 WEHI-231 细胞中的氯霉素酰基转移酶 (CAT) 的活性，其中的细胞被不含启动子的 CAT 结构 (pCAT)、阳性对照质粒 (RSV)、IL-6 启动子-CAT 结构自身、以及按照给定浓度的 CpG 5'TCCATGACGTTTCCTGATGCT3'

(SEQ ID No:7) 或非 -CpG 5'TCCATGAGCTTCCTGAGTCT3' (SEQ ID No:8) 硫代磷酸酯 ODN 与 IL-6 启动子-CAT 结构所转染。数据代表三份数据的平均值。

图 6 是含有免疫刺激性的未甲基化 CpG 的核酸的免疫效果的总体图示, 该核酸可以直接活化 B 细胞和单核细胞 (包括巨嗜细胞和树状细胞)。免疫刺激性寡核苷酸不直接活化纯化的 NK 细胞, 但可以使它们适合于应答 IL-12 并使 IFN- γ 生产有明显提高。由于使 NK 细胞被诱导产生 IL-12 和随后的 IFN- γ 分泌被提高, 免疫刺激性核酸促进了 Th1 类型的免疫应答。没有发现高纯度的 T 细胞可以直接活化细胞因子分泌的增加。然而, 由免疫刺激性寡核苷酸所诱导的 Th1 细胞因子分泌促进了细胞毒性淋巴细胞应答的产生。

图 7 是自显影照相图, 显示 NF κ B mRNA 在单核细胞中的诱导结果, 这些细胞被大肠杆菌 (EC) DNA (含有未甲基化 CpG 基元)、对照 (CT) DNA (不含未甲基化 CpG 基元) 和脂多糖 (LPS) 等所处理并分别在接触后的第 15 分钟、30 分钟等各时间测量。

图 8 A 显示流式细胞仪的测定结果, 使用的是小鼠 B 细胞, 用二倾若丹明 123 染色来确定反应性氧的种类和水平。在 A 组中的仅用了染料的情况显示细胞对染料的阳性背景值为 28.6%。这个水平的反应性氧种类在用 PMA 和离子霉素处理 20 分钟的细胞中被提高到了 80%, 即阳性对照 (B 组)。细胞用 CpG 寡核苷酸 (TCCATGACGTTTCCTGACGTT, SEQ ID No. 10) 处理后也显示了反应性氧种类水平的提高, 即 50% 以上的细胞变为阳性 (D 组)。然而, 用同样序列的寡核苷酸处理但 CpGs 被

换为（TCCATGAGCTTCCTGAGTGCT，SEQ ID No. 11）则没有显示反应性氧种类水平的提高（E组）。

图 8B 显示流式细胞仪的结果，使用了小鼠 B 细胞，有氯喹存在，用二氢若丹明 123 染色来确定反应性氧种类的水平。氯喹将细胞中背景的反应性氧种类的水平稍微降低了一些，使在 A 组中的未处理的细胞仅有 4.3% 为阳性。氯喹完全终止了在用 CpG DNA 处理的细胞（B 组）中对反应性氧种类的诱导，但对用 PMA 和离子霉素处理的细胞（E 组）则没有降低其反应性氧种类水平。

图 9 说明用肺灌洗细胞计数对时间的作图。该图显示，当小鼠开始被注射了 *Schistosoma mansoni* 卵这种诱导 Th2 应答的“卵”并且随后呼吸 *Schistosoma mansoni* 卵抗原“SEA”后（空心环），则在肺部内有众多的发炎的细胞。然而，当小鼠开始接受的是 CpG 寡核苷酸（SEQ ID No.10）以及卵时，则肺部内的发炎细胞并不随呼吸 SEA 而提高（空心三角形）。

图 10 说明肺部灌洗嗜伊红粒细胞计数对时间的作图。该图显示，当小鼠开始注射了卵并随后呼吸 SEA（空心环），则在肺部内有众多的嗜伊红粒细胞存在。然而，当小鼠开始接受的是 CpG 寡核苷酸（SEQ ID No.10）和卵时，则在肺部内的发炎细胞就不随着后来呼吸 SEA 而增高（空心三角形）。

图 11 是条块图，说明巨嗜细胞、淋巴细胞、嗜碱性细胞、嗜伊红粒细胞分别暴露于盐水、卵加 SEA、卵加 SEQ ID No.11 及随后的 SEA、卵加对照寡核苷酸（SEQ ID No.11）以及随后的 SEA 后，诱导的细胞百分数的效应。当小鼠在暴露于卵的同时给予对照寡核苷酸，则吸入 SEA 后对嗜伊红粒细胞在肺部内

没有明显效应。因此，当小鼠在第 14 天或第 21 天呼吸卵，它们在肺部内产生急性发炎。然而，如果在第 0 天或第 7 天开始接触抗原的时候将 CpG 寡核苷酸同卵一起提供给小鼠，则就完全防止小鼠在随后的第 14 天呼吸卵抗原所产生的嗜伊红粒细胞增加。

图 12 是一个条块图，说明注射不同剂量的保护性寡核苷酸 SEQ ID No.10 所产生的嗜伊红粒细胞计数的情况。

图 13 是随时间的小鼠产生白细胞介素-4 (IL-4) 的情况 (pg/ml)，其所应答的分别是注射卵和随后的 SEA (空心菱形)；卵加 SEQ ID No.10 和随后的 SEA (空心环)；盐水加随后的盐水 (空心矩形)。该图的结果显示，所产生的发炎的应答相关于在肺部的 Th2 细胞因子 IL-4 的水平。

图 14 是条块图，说明随时间的小鼠产生白细胞介素-12 (IL-12) 的情况 (pg/ml)，其所应答的分别是注射盐水；卵和随后的 SEA；卵加 SEQ ID No.10 和随后的 SEA。该图的结果显示，注射含有未甲基化 CpG 基元的寡核苷酸可以实际上使肺对细胞因子的应答变为产生 IL-12，表明是 Th1 类型的免疫应答。

图 15 是条块图，说明随时间的小鼠产生伽玛干扰素 (IFN- γ) 的情况 (pg/ml)，其所应答的分别是注射盐水；卵和随后的 SEA；卵加 SEQ ID No.10 和随后的 SEA。该图的结果显示，注射含有未甲基化 CpG 基元的寡核苷酸还可以使肺对细胞因子的应答变为产生 IFN- γ ，表明是 Th1 类型的免疫应答。

本发明的详细描述

定义

在本文中，下面各种术语和词组所表达的意思定义如下：

术语“过敏原”指的是可以在易感染的对象中产生过敏反应或气喘反应的物质。过敏原的名单是非常巨大的，可以包括花粉、昆虫毒物、动物皮、真菌孢子和药物（青霉素）等。天然的、动物的和植物的过敏原的实例包括对下面各属为特异性的蛋白质：犬（*Canis familiaris*），螨（*Dermatophagoides farinae*），Felis（*Felis domesticus*），豚草（*Ambrosia artemisiifolia*），黑麦草（*Lolium perenne* 或 *Lolium multiflorum*），柳杉（*Cryptomeria japonica*），链格孢（*Alternaria alternata*），小蠹甲（Alder），桤木（*Alnus glutinosa*），桦木（*Betula verrucosa*），栎（*Quercus alba*），木犀榄（*Olea europaea*），蒿（*Artemisia vulgaris*），车前（*Plantago lanceolata*），墙草（*Parietaria officinalis* 或 *Parietaria judaica*），小蠊（*Blattella germanica*），蜂（*Apis mellifera*），柏木（*Cupressus sempervirens*, *Cupressus arizonica* 和 *Cupressus macrocarpa*），刺柏（*Juniperus sabinoi*, *Juniperus virginiana*, *Juniperus communis* 和 *Juniperus ashei*），Thuya（*Thuya orientalis*），扁柏（*Chamaecyparis obtusa*），大蠊（*Periplaneta americana*），冰草（*Agropyron repens*），黑麦（*Secale cereale*），小麦（*Triticum aestivum*），鸭茅（*Dactylis glomerata*），羊茅（*Festuca elatior*），早熟禾（*Poa pratensis* 或 *Poa compressa*），燕麦（*Avena sativa*），绒毛草（*Holcus lanatus*），黄花茅（*Anthoxanthum odoratum*），燕麦草（*Arrhenatherum elatius*），剪股颖（*Agrostis alba*）梯牧草（*Phleum pratense*），（*Phalaris arundinacea*），雀稗（*Paspalum notatum*），高粱（*Sorghum halepensis*），以及雀麦（*Bromus inermis*）。

术语“过敏”指的是对某种物质（过敏原）所获得的过度敏感。过敏包括湿疹、过敏性鼻炎、枯草热、支气管哮喘、荨麻疹、食物过敏，以及其它的特异性反应性疾病。

术语“气喘”指的是呼吸道的疾病，其特征是发炎，气管狭窄，对吸入的物质的反应增加。气喘虽然不是必然的但也是经常地伴随着特异性反应性或过敏性症状。

术语“免疫系统缺陷”指的是这样的一些疾病或紊乱，其中，个体的免疫系统不能正常发挥功能，或将使该个体的免疫应答不能对消除肿瘤或癌症[例如，脑瘤、肺（包括小细胞和非小细胞）癌、卵巢癌、乳腺癌、前列腺癌、直肠癌、以及其它的恶性肿瘤和肉瘤]或其它的感染而提高其有用性。

感染性的病毒的实例包括：*Retroviridae* [例如，人免疫缺陷病毒，如 HIV-1（也称为 HTLV-III，LAV 或 HTLV-III/LAV，或 HIV-III；以及其它的分离物，例如 HIV-LP）]；小 RNA 病毒科 [*Picornaviridae*（例如，polio 病毒，甲肝病毒，肠道病毒，人柯萨奇病毒，鼻病毒）]，嵌杯样病毒 [*Caliciviridae*（例如，造成肠道疾病的品系）]，黄色病毒 [*Flaviridae*，例如，登革病毒（dengue viruses），脑病毒（encephalitis viruses），黄热病毒（yellow fever viruses）]，冠形病毒 [*Coronaviridae*，例如冠形病毒（coronaviruses）]，弹状病毒 [*Rhabdoviridae*，例如，vesicular stomatitis viruses, rabies viruses]，*Filoviridae*（例如，ebola viruses），副粘病毒 [*Paramyxoviridae*，例如，parainfluenza viruses, mumps virus, measles virus, respiratory syncytial virus]，亚粘病毒 [*Orthomyxoviridae*，例如，influenza viruses]，*Bunyaviridae* [例如，Hantaan viruses, bunya viruses, phleboviruses 和 Nairo viruses]，嵌沙样病毒 [*Arena viridae*，例

如, hemorrhagic fever viruses], 呼吸肠道病毒[Reoviridae, 例如, reoviruses, orbiviruses 和 rotaviruses], Birnaviridae, 肝炎病毒[Hepadnaviridae, 例如, 乙型肝炎病毒(Hepatitis B virus)], 细小病毒[Parvoviridae(parvoviruses)], 乳多孔病毒[Papovaviridae, 例如, 乳头瘤病毒(papilloma viruses, polyoma viruses)], 腺病毒[Adenoviridae(most adenoviruses)], 疱疹病毒[Herpesviridae, 例如, herpes simplex virus(HSV)1 和 2, varicella zoster virus, cytomegalovirus(CMV), herpes viruses], 痘病毒[variola viruses, vaccinia viruses, pox viruses], 和虹色病毒[Iridoviridae, 例如, African swine fever virus], 以及一些未分类的病毒[例如, 海绵脑病的致病剂, δ 肝炎致病剂(被认为是乙型肝炎病毒的缺陷型变体), 非甲非乙型肝炎的致病剂(1类=内部传染, 2类=肠胃外传染(如丙型肝炎), Norwalk 病毒以及相关的病毒, 和星状病毒)]。

感染性细菌的实例包括: *Helicobacter pylori*, 疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, 分枝杆菌[*Mycobacteria* spp., 例如, 结核杆菌(*M. Tuberculosis*), 鸟型结核分支杆菌(*M. avium*), *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. gordonae*], 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*), 淋病奈瑟氏菌(*Neisseria gonorrhoeae*), 脑膜炎双球菌(*Neisseria meningitidis*), 单核细胞增多性李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*), 酿脓链球菌[*Streptococcus pyogenes*(A 组 *Streptococcus*)], 无孔链球菌[*Streptococcus agalactiae*(B 组 *Streptococcus*)], 链球菌属[*Streptococcus*(viridans 组)], 粪链球菌(*Streptococcus faecalis*), 牛链球菌(*Streptococcus bovis*), 链球菌属(*Streptococcus* 厌氧菌, *anaerobic* spp.), 肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*), 弯曲杆菌(*pathogenic Campylobacter* sp.,), 肠球菌(*Enterococcus* sp.,), 流感嗜

血菌 (*Haemophilus influenzae*)，炭疽芽孢杆菌 (*Bacillus anthracis*)，白喉棒杆菌 (*Corynebacterium diphtheriae*)，棒杆菌属 (*Corynebacterium sp.*)，红斑丹毒丝菌 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*)，产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*)，破伤风梭菌 (*Clostridium tetani*)，*Enterobacter aerogenes*，肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*)，多杀巴斯德氏菌 (*Pasturella multocida*)，拟杆菌 (*Bacteroides sp.*)，核粒梭形杆菌 (*Fusobacterium nucleatum*)，念珠状链杆菌 (*Streptobacillus moniliformis*)，梅毒螺旋菌 (*Treponema pallidum*)，细弱密螺旋体 (*Treponema pertenue*)，钩端螺旋体 (*Leptospira*) 和伊氏放线菌 (*Actinomyces israeli*)。

感染性真菌的实例包括：新型隐球菌 (*Cryptococcus neoformans*)，荚膜组织胞浆菌 (*Histoplasma capsulatum*)，粗球孢子菌 (*Coccidioides immitis*)，皮炎芽酵母 (*Blastomyces dermatitidis*)，沙眼衣原体 (*Chlamydia trachomatis*)，白色念球菌 (*Candida albicans*)。其它的感染性有机体 (例如，原生动物) 包括：恶性疟原虫 (*Plasmodium falciparum*) 和鼠弓形虫 (*Toxoplasma gondii*)。

术语“免疫刺激性核酸分子”指的是这样的核酸分子，它们含有未甲基化的胞嘧啶，鸟嘌呤二核苷酸序列 (即，“CpG DNA”或含有胞嘧啶并接着鸟苷且由磷酸盐键所连接的DNA) 并刺激脊椎动物淋巴细胞 (例如，具有促有丝分裂效应，或诱导或提高细胞因子的表达)。免疫刺激性核酸分子可以是双链的或单链的。一般，双链的分子在体内比较稳定，而单链的分子则具有提高了的免疫活性。

在本发明的一个优选的实施方案中，提供了被分离的免疫刺激性核酸序列，其含有的 CpG 基元由下式表达：



其中，至少有一个核苷酸将连续的 CpGs 间隔开来； X_1 是腺嘌呤，鸟嘌呤，或胸腺嘧啶； X_2 是胞嘧啶或胸腺嘧啶；N 是任何的核苷酸，且 N_1+N_2 是 0-26 碱基，条件是 N_1 和 N_2 都不含有 CCGG 四元体或多于一个的 CCG 或 CGG 三元体；并且核酸序列的长度为约 8-30 碱基对。

在另一个实施方案中，本发明提供了被分离的免疫刺激性的含有 CpG 基元的核酸序列，其表达式为：



其中，至少有一个核苷酸将连续的 CpGs 间隔开来； X_1 X_2 是选自 GpT、GpG、GpA、ApT 和 ApA； X_3X_4 是选自 TpT 或 CpT；N 是任何的核苷酸，且 N_1+N_2 是 0-26 碱基，条件是 N_1 和 N_2 都不含有 CCGG 四元体或多于一个的 CCG 或 CGG 三元体；并且核酸序列的长度为约 8-30 碱基对。

优选的是，本发明的免疫刺激性核酸序列包括 X_1 X_2 ，它们选自 GpT、GpG、GpA 和 ApA，且 X_3X_4 选自 TpT、CpT 和 GpT（见表 5）。为了促进吸收到细胞中，含有免疫刺激性核酸分子的 CpG 优选为 8-30 个碱基的长度。然而，如果有足够的免疫刺激性基元的存在，则任何长度的核酸（甚至很多个碱基对长）都可以是免疫刺激性的，因为这样的大型核酸在细胞内被降解为寡核苷酸。优选的合成性的寡核苷酸不含有 CCGG 四元体或多于一个的 CCG 或 CGG 三元体在其或靠近其 5'和/或 3'端，和/或

其共有的促有丝分裂 CpG 基元不是回文结构。当寡核苷酸整合有磷酸盐主链的修饰时，用稳定的寡核苷酸可以获得长久的免疫刺激性。例如，当修饰为硫代磷酸酯或硫代磷酸酯类的修饰时既是如此。另外，更具体地讲，磷酸盐主链修饰发生在核酸的 5' 端，即在核酸 5' 端的最初两个核苷酸上。进而言之，磷酸盐主链修饰可以发生在核酸的 3' 端，即在核酸的 3' 端的最后 5 个核苷酸上。

优选的免疫刺激性 CpG DNA 是寡核苷酸时，其长度为 8-30 个碱基对。另外，CpG 二核苷酸可以在质粒中大规模生产，当其被给予个体后，降解为寡核苷酸。优选的免疫刺激性核酸分子[例如，用于提高疫苗的有效性，或在个体内刺激抗体（例如体液的）应答来治疗免疫系统缺陷]具有相对高的对 B 细胞、单核细胞和/或天然杀死细胞反应的刺激系数（例如，细胞因子、繁殖性、溶胞性或其它的反应）。

本发明的核酸序列刺激对象中的细胞因子的产生。细胞因子包括但不限于 IL-6、IL-12、IFN- γ 、TNF- α 、GM-CSF。这些序列的实例包括：TCCATGTCGCTCCTGATGCT（SEQ ID NO: 42），TCCATGTCGTTCCTGATGCT（SEQ ID NO: 43），和 TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT（SEQ ID NO: 56）。

本发明的核酸序列还可以用于刺激天然杀死细胞（NK）在如人的对象中的溶胞活性。具体的但非限制性的实例包括：

TCGTCGTTGTCGTTGTCGTT（SEQ ID NO: 57），
TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT（SEQ ID NO: 58），
TCGTCGTTGTCGTTTTGTCGTT（SEQ ID NO: 59），
GCGTGCGTTGTCGTTGTCGTT（SEQ ID NO: ），

TGTCGTTTGTCGTTTGTCGTT (SEQ ID NO:),
TGTCGTTTGTCGTTTGTCGTT (SEQ ID NO: 60) 和
TCGTCGTCGTCGTT (SEQ ID NO: 61)。

本发明的核酸序列还可以用于在如人的对象中刺激 B 细胞繁殖。具体的但非限制性的实例包括:

TCCTGTCGTTTCCTTGTCGTT (SEQ ID NO: 62),
TCCTGTCGTTTTTTTGTCGTT (SEQ ID NO: 63),
TCGTCGCTGTCTGCCCTTCTT (SEQ ID NO: 64),
TCGTCGCTGTTGTCGTTTCTT (SEQ ID NO: 65),
TCGTCGTTTTTGTCGTTTTTGTCGTT (SEQ ID NO: 66),
TCGTCGTTTGTCGTTTTTGTCGTT (SEQ ID NO: 67), 和
TGTCGTTTGTCGTTTGTCGTT (SEQ ID NO: 68)。

在本发明的另一个方面, 本发明的核酸序列可以在哺乳动物中生产抗体时作为附剂使用。具体的但非限制性的实例 包括 TCCATGACGTTTCCTGACGTT (SEQ ID NO: 10), GTCG (T/C) T 和 TGTCG (T/C) T。进而言之, 这些核酸序列可以用于治疗和防止气喘疾病的症状, 将对象的免疫应答从 Th2 型改变为 Th1 型。具体的实例包括 TCCATGACGTTTCCTGACGTT (SEQ ID NO: 10)。

具体的免疫刺激性 CpG DNA 的刺激指数可以用各种免疫细胞检测来测定。优选地, 免疫刺激性 CpG DNA 的刺激指数对 B 细胞繁殖为约 5, 优选至少为至少 10, 更优选地为至少 15, 最优选地为至少约 20, 由 ³H 尿苷在 B 细胞培养物中测定, 其中, 在 37°C 下与 20 μM 的 ODN 接触 20 小时, 并且用 1 μCi 的 ³H 尿

昔冲击，并按照实施例 1 所述在 4 小时后收获和计数。对于体内的应用，例如，用于治疗免疫系统缺陷刺激细胞介导的对象中的免疫反应，重要的是，免疫刺激性 CpG DNA 要能够有效地诱导单核细胞分泌细胞因子和/或天然杀死细胞（NK）的细胞溶胞活性。

优选的免疫刺激性 CpG 核酸应该可以产生至少约 500 pg/ml 的 TNF- α 、15 pg/ml 的 IFN- γ 、70 pg/ml 的 GM-CSF、275 pg/ml 的 IL-6、200 pg/ml 的 IL-12，具体依据治疗指标而定，可以按照实施例 2 中的所述的检测来确定。其它优选的免疫刺激性 CpG DNAs 要能够产生至少约 10%，更优选至少约 15%，而最优选至少约 20% 的 YAC-1 细胞特异性溶胞，或至少约 30%，更优选至少约 35%，和最优选至少约 40% 的 2C11 细胞特异性溶胞，由实施例 4 中描述的检测来确定。

术语“核酸”或“DNA”指的是多核苷酸{即，含有糖（如核糖或脱氧核糖）且通过磷酸盐基团连接到可交换的有机碱上的分子，其替换嘧啶[例如，胞嘧啶（C）、胸腺嘧啶（T）或尿嘧啶（U）]，或替代嘌呤[例如，腺嘌呤（A），鸟嘌呤（G）]}。在本文中，该术语指的是核糖核苷酸以及寡脱氧核糖核苷酸。该术语应该包括多核苷（即，多核苷酸减去一个磷酸）以及其它的含有有机碱的聚合物。核酸分子可以从已经存在的核酸源获得（例如，基因组或 cDNA），但是，优选合成性的（例如，由寡核苷酸合成所产生的）。

术语“核酸释放复合物”指的是核酸分子（通过离子键或共价键，或包埋方式）与靶向装置[例如，对靶细胞（如 B 细胞和天然杀死(NK)细胞）表面有较高亲和结合性和/或提高靶细胞的吸收的分子]结合在一起。核酸释放复合物的实例包括与下列物

质结合的核酸：固醇（例如，胆固醇）、脂类（例如，阳离子脂、病毒体、或脂质体）、或靶细胞特异性结合制剂（例如，由靶细胞特异性受体所识别的配体）。优选的复合物必须在体内足够地稳定来防止在被靶细胞内化之前就显著地解脱偶联。然而，这些复合物要能够在细胞内适宜的条件下被剪切，使核酸以功能性的形式被释放。

术语“回文序列”指的是反向的重复（即，如 ABCDEE'D'C'B'A' 这样的序列，其中 A 和 A' 是能够形成常规的 Watson-Crick 碱基对的碱基。在体内，这样的序列可以形成双链结构。

术语“稳定化的核酸分子”指的是在体内对降解（例如，通过外切核酸酶或内切核酸酶的降解）具有相对抵抗性的核酸分子。稳定可以是长度的功能或次级结构的功能。长度为几十个甚至上百个碱基的含有未甲基化 CpG 的核酸分子对体内降解有相对的抵抗性。对于较短的免疫刺激性核酸分子，次级结构可以稳定和提高其功能。例如，如果核酸分子的 3' 端具有对上游区的自己互补性，则它就可以回折来形成某种茎-环结构，然后，核酸分子变为稳定的并从而表现更强的活性。

优选的本发明的稳定化核酸分子具有被修饰的主链。用于免疫刺激时，特别优选的核酸分子是硫代磷酸酯（即，核酸分子的至少一个磷酸氧被硫所取代）或硫代磷酸酯修饰的核酸分子。更具体地讲，磷酸主链修饰发生在核酸的 5' 端，在核酸 5' 端的最初两个核苷酸上。进而言之，磷酸主链修饰可以发生在核酸的 3' 端，发生在核酸的 3' 端的最后 5 个核苷酸上。除了稳定的核酸分子外，正如本文中进一步描述的那样，硫代磷酸酯-修饰（包括二硫代磷酸酯-修饰）的核酸分子可以提高该核酸分子的免疫

刺激程度，它们含有所示的未甲基化 CpG 二核苷酸。题目为“硫代磷酸酯寡核苷酸类似物的免疫刺激”的国际专利申请公开第 WO95/26204 号也报道了硫代磷酸酯修饰的寡核苷酸的非序列特异性的免疫刺激效果。如本文所描述的，含有未甲基化 CpG 的并具有硫代磷酸酯主链的核酸分子已经被发现倾向于活化 B 细胞活性，而含有未甲基化 CpG 的并具有磷酸二酯主链的核酸分子已经被发现倾向于活化单核性细胞（巨嗜细胞、树状细胞和单核细胞）和 NK 细胞。带有优选的人基元的硫代磷酸酯 CpG 寡核苷酸也是单核性细胞和 NK 细胞的强活化子。

其它的稳定的核酸分子包括：非离子性 DNA 类似物，例如烷基或芳基的磷酸酯（其中带电的磷酸氧被烷基或芳基所取代），磷酸二酯和烷基磷酸三酯，其中的带电的氧基团被烷基化。带有二醇例如四甘醇或六甘醇的核酸分子，已经显示在其一个终端或两个终端都是基本抵抗核酸酶的降解的。

术语“对象”指的是人或脊椎动物，包括狗、猫、马、牛、猪、绵羊、山羊、鸡、猴子、大鼠，和小鼠。

在本文中，术语“载体”指的是能够运送与之相连的其它核酸的核酸分子。优选的载体是能够对与之相连的核酸进行自我复制和表达的载体（例如，附加体）。能够对与之可工作地相连的基因的表达进行指导的载体被在本文中成为“表达载体”。总体来说，在重组 DNA 技术中有用的表达载体经常都是“质粒”形式的，其一般所指的是双链 DNA 的环形物，其在载体形式时不与染色体相连。在本说明书中，术语“质粒”和“载体”是可以相互替换的，因为质粒是最常用形式的载体。然而，本发明也包括其它形式的载体，即它们的功能等同物，以及随后变为本领域所知的那些载体。

某些含有未甲基化 CpG 并具有在体内和体外的 B 细胞刺激活性的核酸

在根据随后的实施例 1 和 2 的描述所进行的对内源性逆病毒序列具有特异性的两种反义寡核苷酸刺激淋巴细胞效应的研究中，令人惊奇地发现了在 24 个“对照”（包括在“反义”ODN 组中的各种杂乱的、有义的、和错配的对照）中的 2 个也能够介导 B 细胞活化和 IgM 分泌，而其它的“对照”则不具有这样的功能。

这两个研究的结果表明，这种“对照”ODN 的 B 细胞活化机制可能不涉及反义效果，1）通过与基因库（GenBank）所列的脊椎动物 DNA 序列相比较，没有显示出比那些没有刺激性的 ODN 更多的同源性，以及 2）这两个对照在使用了 10 μ g 的脾 poly A+RNA 的 Northern 印迹中没有显示出杂交。在不同的合成器上再次合成这些 ODN，或用聚丙烯酰胺凝胶电泳或高压液相色谱来充分提纯，都得到相等的刺激，消除了杂质的可能性。采用来自 C3H/HeJ 小鼠的 B 细胞也见到了类似的刺激，这消除了脂多糖（LPS）污染会影响结果的可能性。

两个“对照”ODN 所造成 B 细胞活化与两个“反义”ODN 的情况相类似的事实提出了这样的可能性，即所有四个 ODN 对 B 细胞的刺激通过的是某种非反义机制进行的，所涉及的序列基元在所有的其它的非刺激性对照 ODN 中都不存在。比较这些序列发现，所有四个刺激性 ODN 含有的 CpG 二核苷酸处于与非刺激性对照不同的序列位置。

为了确定存在于刺激性 ODN 中的 CpG 基元是否负责所观察到的刺激作用，合成了超过 300 个的 ODN，它们的长度范围

是 5-42 个碱基对，含有甲基化或未甲基化的 CpG 二核苷酸，或者不含有 CpG 二核苷酸，并且位置也不同。这些 ODN，包括两个原始的“对照”（即 ODN 1 和 2）以及两个原始的合成性“反义”物[ODN 3D 和 3M; Krieg, A.M. J.Immunol. 143:2448 (1989)]，然后检查它们的脾细胞体外效果（代表性序列在表 1 中给出）。含有 CpG 二核苷酸的几种 ODN 诱导了 B 细胞的活化和 IgM 的分泌；这种刺激的程度一般可以由增加更多的 CpG 二核苷酸来提高（表 1；比较 ODN 2 与 2a 或 3D 与 3Da 和 3Db）。看起来刺激不是反义机制或杂质的结果。ODN 没有造成可检测的 $\gamma\delta$ 或其它的 T 细胞种群的繁殖。

如果 CpG 二核苷酸发生突变，有丝分裂 ODN 序列都变为非刺激性的（表 1；比较 ODN 1 与 1a；3D 与 3Dc；3M 与 3Ma；以及 4 与 4a），或如果 CpG 二核苷酸的胞嘧啶被 5-甲基胞嘧啶取代（表 1；ODN 1b, 2b, 3Dd, 和 3Mb）。CpG 基元的部分甲基化造成刺激效果的部分损失（比较 2a 与 2c，表 1）。相对照，对其它的胞嘧啶的甲基化没有减少 ODN 活性（ODN 1c, 2d, 3De 和 3Mc）。这些数据确认了 CpG 基元存在于 ODN 中活化 B 细胞的重要元素。

在这些研究的过程中，变的更为清楚的是，在 CpG 二核苷酸侧翼的碱基在由 ODN 诱导的小鼠 B 细胞活化的确定中起着重要的作用。最佳的刺激基元被确定包括有以两个 5'嘌呤（优选为 GpA 二核苷酸）和两个 3'嘧啶（优选 TpT 或 TpC 二核苷酸）为侧翼的 CpG。将 CpG 基元趋向靠近这种理想形态的 ODN 突变改善了刺激性（例如，表 1，比较 ODN 2 与 2e；3M 与 3Md），而那些打乱该基元的突变则减弱了刺激性（见表 1，比较 ODN 3D 与 3Df；4 与 4b, 4c 和 4d）。另一方面，在 CpG 以外的突变没有减弱刺激性（例如，表 1，比较 ODN 1 与 1d；3D 与 3Dg；3M

与 3Me)。对于活化人的细胞,最佳的侧翼碱基是稍有不同的(见表 5)。

在那些实验过的 ODNs 中,长度小于 8 个碱基对的 ODN 都没有刺激性(例如,表 1, ODN 4e)。在所测试过的 48 个长度为 8 个碱基对的 ODN 中,确定了具有强刺激性的序列是 TCAACGTT(ODN 4),其含有自我互补的“回文序列”AACGTT。在对该基元的进一步优化中,发现在两个终端都有 G 的 ODN 具有更强的刺激性,特别当 ODN 被硫代磷酸酯修饰了终端的核苷酸间的连接而具有对核酸酶的抗性后更是如此。ODN 1585[5'GGGGTCAACGTTTCAGGGGGG3'(SEQ ID NO: 12)]中,前两个和最后的 5 个核苷酸间的连接都被硫代磷酸酯修饰了,使其在小鼠脾细胞的繁殖中平均提高了 25.4 倍,而相比之下,由 ODN 1638 所造成的繁殖只增加了 3.2 倍,该 ODN 1638 与 ODN 1585 具有相同的序列,只是在两端的第 10 位的 G 被第 10 位的 A 所取代。富含 G 的终端的效果是其为顺式,对 ODN 加上多 G 的终端但不将 CpG 基元与 1638 一起加入细胞,也不会得到增强的繁殖。对于长度大于 8 个碱基对的核酸,含有未甲基化 CpG 的非回文序列基元被发现是更具有刺激性的。

含有 6 个碱基回文序列以及在 5'端有 TpC 二核苷酸的 10 元 ODN 也是活性的(见表 1, ODN 4b, 4c)。在 5'端的其它的二核苷酸减弱刺激性(例如, ODN 4f, 对所有可能的 16 种二核苷酸都进行了测试)。有 3'端二核苷酸存在并不足以补偿对 5'端二核苷酸的缺失(见表 1, ODN 4g)。对回文序列打乱就消除了 10 元 ODN 的刺激性(例如,表 1, ODN 4h),但是,在更长的 ODN 中,回文序列不是必须的。

表 1: 寡核苷酸对小鼠 B 细胞的刺激

ODN 生产	序列 (5'至 3')	刺激性指数'	
		³ H 尿嘧啶	IgM
1 (SEQ ID NO:13)	GCTAGACGTTAGCGT	6.1 ± 0.8	17.9 ± 3.6
1a(SEQ ID No:4)	■ ■ ■ ■ ■ T ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	1.2 ± 0.2	1.7 ± 0.5
1b(SEQ ID No:14)	■ ■ ■ ■ ■ Z ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	1.2 ± 0.1	1.8 ± 0.0
1c(SEQ ID No:15)	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ Z ■ ■	10.3 ± 4.4	9.5 ± 1.8
1d(SEQ ID No:16)	■ ■ AT ■ ■ ■ ■ ■ GAGC ■	13.0 ± 2.3	18.3 ± 7.5
2(SEQ ID No:17)	ATGGAAGGTCCAGCGTTCTC	2.9 ± 0.2	13.6 ± 2.0
2a(SEQ ID No:18)	■ ■ C ■ CTC ■ G ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	7.7 ± 0.8	24.2 ± 3.2
2b(SEQ ID No:19)	■ ■ Z ■ CTC ■ ZG ■ ■ Z ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	1.6 ± 0.5	2.8 ± 2.2
2c(SEQ ID No:20)	■ ■ Z ■ CTC ■ G ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	3.1 ± 0.6	7.3 ± 1.4
2d(SEQ ID No:21)	■ ■ C ■ CTC ■ G ■ ■ ■ ■ ■ ■ Z ■ ■	7.4 ± 1.4	27.7 ± 5.4
2e(SEQ ID No:22)	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ A ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	5.6 ± 2.0	ND
3D(SEQ ID No:23)	GAGAACGCTGGACCTTCCAT	4.9 ± 0.5	19.9 ± 3.6
3Da(SEQ ID No:24)	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ C ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	6.6 ± 1.5	33.9 ± 6.8
3Db(SEQ ID No:25)	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ C ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ G ■ ■	10.1 ± 2.8	25.4 ± 0.8
3Dc(SEQ ID No:26)	■ ■ C ■ A ■	1.0 ± 0.1	1.2 ± 0.5
3Dd(SEQ ID No:27)	■ ■ ■ ■ ■ Z ■	1.2 ± 0.2	1.0 ± 0.4
3De(SEQ ID No:28)	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ Z ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	4.4 ± 1.2	18.8 ± 4.4
3Df(SEQ ID No:29)	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ A ■	1.6 ± 0.1	7.7 ± 0.4
3Dg(SEQ ID No:30)	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ CC ■ G ■ ACTG ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	6.1 ± 1.5	18.6 ± 1.5
3M(SEQ ID No: 31)	TCCATGTCGGTCCTGATGCT	4.1 ± 0.2	23.2 ± 4.9
3Ma(SEQ ID No:32)	■ ■ ■ ■ ■ CT ■	0.9 ± 0.1	1.8 ± 0.5
3Mb(SEQ ID No:33)	■ ■ ■ ■ ■ Z ■	1.3 ± 0.3	1.5 ± 0.6
3Mc(SEQ ID No:34)	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ Z ■	5.4 ± 1.5	8.5 ± 2.6
3Md(SEQ ID No:35)	■ ■ ■ ■ ■ A ■ ■ T ■	17.2 ± 9.4	ND
3Me(SEQ ID No:36)	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ C ■ ■ A ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	3.6 ± 0.2	14.2 ± 5.2
4	TCAACGTT	6.1 ± 1.4	19.2 ± 5.2
4a	■ ■ ■ ■ GC ■ ■	1.1 ± 0.2	1.5 ± 1.1
4b	■ ■ ■ GCGC ■	4.5 ± 0.2	9.6 ± 3.4
4c	■ ■ ■ TCGA ■	2.7 ± 1.0	ND
4d	■ ■ TT ■ ■ AA	1.3 ± 0.2	ND
4e	- ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	1.3 ± 0.2	1.1 ± 0.5
4f	C ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	3.9 ± 1.4	ND
4g	- - ■ ■ ■ ■ ■ CT	1.4 ± 0.3	ND
4h	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ C	1.2 ± 0.2	ND
LPS		7.8 ± 2.5	4.8 ± 1.0

'刺激指数是至少三个单独实验的平均值和标准偏差，并且与没有加入 ODN 的培养物的小孔进行比较。

ND=未进行。

CpG 二核苷酸用下划线标出。

黑点表示位置，短线表示缺失。

Z 代表 5 甲基胞嘧啶。

表 2: 确定对小鼠 IL-6 生产和 B 细胞活化为最优的 CpG 基元

ODN	序列 (5'-3')	IL-6(pg/ml) ^a			
		SI ^b	IgM(ng/ml) ^c	CH12.LX	脾 B 细胞
512(SEQ ID No:31)	TCCATGTCGGTCCTGAT GCT	1300±106	627±43	5.8±0.3	7315±1324
1637(SEQ ID No:38)	C.....	136±27	46±6	1.7 ± 0.2	770±72
1615(SEQ ID No:39)	G.....	1201±155	850±202	3.7 ± 0.3	3212±617
1614(SEQ ID No:40)	A.....	1533±321	1812±103	10.8±0.6	7558 ± 414
1636(SEQ ID No:41)	A.....	1181±76	947±132	5.4±0.4	3983 ± 485
1634(SEQ ID No:42)	C.....	1049±223	1671±175	9.2±0.9	6256 ± 261
1619(SEQ ID No:43)	T.....	1555±304	2908±129	12.5±1.0	8243 ± 698
1618(SEQ ID No:44)	A..T.....	2109±291	2596±166	12.9±0.7	10425 ± 674
1639(SEQ ID No:45)	AA..T.....	1827±83	202±132	11.5±0.4	9489 ± 103
1707(SEQ ID No:46)	A..TC.....	ND	1147±175	4.0 ± 0.2	3534±217
1708(SEQ ID No:47)	CA..TG.....	ND	59±3	1.5±0.1	466±109

黑点代表位置；CpG 二核苷酸用下划线标出；ND=未进行

^a进行的实验为至少三次近似的结果。CH12.LX 和脾 B 细胞的未刺激的对照培养物的 IL-6 水平≤10 pg/ml。未刺激的培养物的 IgM 水平为 547±82 ng/ml。CpG 二核苷酸用下划线标出，黑点代表位置。

^b[³H]尿嘧啶吸收用对未刺激的对照 (2322.67±213.68 cpm) 所提高的倍数表示 (SI: 刺激指数)。细胞用 20 μM 各种 CpG O-ODN 刺激。数据代表三个数据的平均值±标准偏差。

^c用 ELISA 测定。

对淋巴细胞活化的动力学的研究采用了小鼠脾细胞。在加入 ODN 的同时对细胞进行冲击，4 小时后收获，已经有了 2 倍的 ^3H 尿嘧啶的吸收。刺激的峰值在 12-48 小时，然后降低。24 小时后，检测不到完整的 ODN，这也许就是当纯化的 B 细胞随后在有或没有抗-IgM（亚促有丝分裂剂量）条件下与 CpG ODN 一起培养时发生刺激性下降的原因，在 48 小时后，两种促有丝分裂还造成繁殖也同时增强约 10 倍。刺激的力度依赖于浓度，并且在对两种物质为优化的条件下都一致地超过 LPS。含有抗核酸酶的硫代磷酸酯主链的寡核苷酸比未修饰的寡核苷酸强大约 200 倍。

采用细胞生长循环来确定由 CpG-ODN 活化的 B 细胞的数量。CpG-ODN 诱导了在大于 95% 的 B 细胞的循环。用流式细胞仪区分脾 B 淋巴细胞为 CD23⁻（边缘区）和 CD23⁺（小泡区）亚群，它们对 ODN 诱导的刺激都有同样的反应，用 Percoll 梯度区分的 B 细胞类群也是休眠和活化的种群。这些研究表明，CpG-ODN 诱导几乎所有的 B 细胞进入细胞循环。

免疫刺激性核酸分子对小鼠 B 细胞编程性细胞死亡的封闭

有些 B 细胞系，例如 WEHI-231，被诱导经历生长的休眠和/或编程性细胞死亡，应答于它们的抗原受体与抗-IgM 的交联 [Jakway, J.P. et al., "Growth regulation of the B lymphoma cell line WEHI-231 by anti-immunoglobulin, lipopolysaccharide and other bacterial products" J. Immunol. 137:2225 (1986); Tsubata, T., J. Wu and T. Honjo: B-cell apoptosis induced by antigen receptor crosslinking is blocked by a T-cell signal through CD40." Nature 364:645 (1993)]。用某些刺激物如 LPS 和 CD40 配体可以将 WEHI-231 细胞从这种生长休眠状态下恢复出来。含有 CpG 基元

的 ODN 也被发现可以保护 WEHI-231 细胞不受抗-IgM 诱导的生长休眠的影响,表明这种效果不需要辅助细胞种群。随后的研究工作表明, CpG ODN 诱导 Bcl-x 和 myc 表达,它们可能对抵抗编程性细胞死亡有作用。再者, CpG 核酸被发现可以封闭人细胞的编程性细胞死亡。这种对编程性细胞死亡的抑制具有重要性,因为它将提高和延长 CpG DNA 的免疫活化。

鉴定对诱导小鼠 IL-6 和 IgM 分泌以及 B 细胞繁殖为最优化的 CpG 基元

为了确定最优化的 B 细胞刺激性 CpG 基元是否与对 IL-6 分泌的最优化 CpG 基元相同,研究了一组 ODN,它们的 CpG 二核苷酸的侧翼碱基被逐步取代。对该组 ODN 的研究着重于分析它们对 B 细胞繁殖、Ig 生产、IL-6 分泌的效应,使用了脾 B 细胞和 CH12.LX 细胞。如表 2 所示,优化的刺激性基元含有未甲基化的 CpG,侧翼为两个 5'嘌呤和两个 3'嘧啶。一般地说,5'嘌呤向 3'嘧啶的突变和 3'嘧啶向嘌呤的突变都显著地降低这种效应。从 5'嘌呤向 C 的变化是特别的有破坏性的,但是,从 5'嘌呤向 T 的变化或 3'嘧啶向嘌呤的变化所产生的影响就比较小。根据这些分析以及其它的 ODN 的结果,确定了优化的 CpG 基元对诱导 IL-6 分泌为 TGACGTT,其相同于优化的促有丝分裂和 IgM 诱导性 CpG 基元(表 2)。该基元比任何所研究过的含有回文序列的序列都更具有刺激性(1639, 1707 和 1708)。

由在细菌 DNA 中或寡核苷酸中的 CpG 基元诱导的小鼠细胞因子的分泌

如在实施例 9 中所描述的那样,以 CpG DNA 刺激后的脾细胞分泌的 IL-6 的数量用 ELISA 测定。采用的不是全脾细胞,而

是用去除了 T 细胞的脾细胞培养物,进行了体外研究,经过最初的研究发现, T 细胞对 CpG DNA 刺激的脾细胞生产 IL-6 没有任何作用。如表 3 所示,用大肠杆菌 DNA 培养的细胞明显地提高了 IL-6 的生产,而用小牛胸腺 DNA 培养的细胞则没有提高。为了确认所观察到的用大肠杆菌 DNA 培养的细胞的 IL-6 生产的提高不是由于污染物或其它的细菌产物所造成的,在进行分析之前,对 DNA 用 DNA 酶进行处理。这种 DNA 酶的预处理取消了由大肠杆菌 DNA 诱导的 IL-6 的生产(表 3)。此外,从 LPS-非应答 C3H/HeJ 小鼠来的脾细胞应答了细菌 DNA 而产生了相似水平的 IL-6。为了研究由大肠杆菌 DNA 诱导的 IL-6 的分泌是否由细菌 DNA 中的未甲基化 CpG 二核苷酸所介导,检验了甲基化的大肠杆菌 DNA 和一组合成性 ODN。如表 3 所示, CpG ODN 显著地诱导了 IL-6 的分泌(ODN 5a, 5b, 5c),而 CpG 甲基化大肠杆菌 DNA,或含有甲基化 CpG 的 ODN(ODN 5f),或不含 CpG 的 ODN(ODN 5d)则都没有发生诱导。在 CpG 二核苷酸(ODN 5b)以外位置的改变,以及其它的胞嘧啶的甲基化(ODN 5g)都没有减弱 CpG ODN 的效应。在含有三个 CpG 的 ODN 中对一个 CpG 甲基化的结果是部分地降低了其刺激性(表 3,比较 ODN 5c 和 5e)。

表 3: 由在细菌 DNA 中或寡核苷酸中的 CpG 基元诱导的小鼠 IL-6 的分泌

处理		IL-6 (pg/ml)
小牛胸腺 DNA		≤10
小牛胸腺 DNA+DNase		≤10
大肠杆菌 DNA		1169.5±94.1
大肠杆菌 DNA+DNase		≤10
CpG 甲基化大肠杆菌 DNA		≤10
LPS		280.1±17.1
培养基 (没有 DNA)		≤10
ODN		
5a SEQ ID NO:1	ATGGACTCTCCAG <u>C</u> GTTCTC	1096.4±372.0
5b SEQ ID NO:2	▪▪▪▪▪AGG▪▪▪▪A▪▪▪▪▪	1124.5±126.2
5c SEQ ID NO:3	▪▪ <u>C</u> ▪▪▪▪▪ <u>G</u> ▪▪▪▪▪	1783.0±189.5
5d SEQ ID NO:4	▪▪▪▪AGG▪▪C▪▪T▪▪▪▪▪	≤10
5e SEQ ID NO:5	▪▪ <u>C</u> ▪▪▪▪▪ <u>G</u> ▪▪Z▪▪▪▪▪	851.1±114.4
5f SEQ ID NO:6	▪▪Z▪▪▪▪▪ZG▪▪Z▪▪▪▪▪	≤10
5g SEQ ID NO:7	▪▪ <u>C</u> ▪▪▪▪▪ <u>G</u> ▪▪▪▪▪Z▪▪	1862.3±87.26

去除了 T 细胞的来自 DBA/2 小鼠的脾细胞用磷酸二酯修饰的寡核苷酸 (O-ODN) (20 μM)、小牛胸腺 DNA (50 μg/ml)、经过或不经酶处理的大肠杆菌 DNA (50 μg/ml)、或 LPS (10 μg/ml) 分别刺激 24 小时。数据代表三个数据的平均值±SD。CpG 二核苷酸用下划线标出, 黑点代表位置。Z 表示 5-甲基胞嘧啶。

CpG 基元可以用作人工附剂

免疫应答的非特异性刺激物是已知的附剂。使用附剂对诱导相对于抗原的强抗体应答是重要的 (Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory manual*, Cold Spring harbor, N.Y. Current Edition; 通过在此引述而合并于本文)。附剂总体效应是强烈的, 它们的重要性是不会被过分强调的。附剂的作用允许用更小剂量的抗原来产生更为一致的抗体应答。对免疫应答的非特异性活化经常可以分辨出获得免疫应答的成功或失败。应该在第一次注射的时候使用附剂, 除非有非常特殊的理由来避免这样做。大多数的附剂含有两个成分。一个成分是用来保护抗原不被快速分解代谢[例如, 脂质体或合成的表面活性剂 (Hunter et al., 1981)]。脂质体仅仅在免疫原被整合到外脂层时有效, 内埋的分子是免疫系统看不见的。其它的成分则是非特异性刺激免疫应答的物质。这些物质的作用是提高淋巴因子的水平。淋巴因子直接刺激抗原处理细胞的活性, 并引起注射位置的局部发炎反应。早期的工作完全依赖于热杀死细菌 (Dienes 1936) 或脂多糖 (LPS) (Johnson et al., 1956)。LPS 是合理的毒性的, 通过对它的结构的分析, 其作为附剂的大多数的性质已经被证实为在于称作脂质 A 的部分。脂质 A 可以由多种合成的和天然的形式获得, 其毒性远远小于 LPS, 但仍然保存了其前身的 LPS 分子的大多数良好的附剂性质。脂质 A 化合物经常用脂质体提供。

近来, 寻找强有力的并带有更可接受的副作用的附剂的工作导致了新的合成附剂的产生。在本发明中, 我们提供了序列第 1826 号, 即 TCCATGACGTTCCTGACGTT (SEQ ID NO: 10), 它是一种包括了含 CpG 的核酸的附剂。该序列是强免疫活化序列, 并且是非常优秀的附剂, 其效率相等于完全 Freund's, 甚至超过该附剂, 但是, 又没有明显的毒性。

CpG 基元诱导小鼠 IL-6 生产的效价

细菌 DNA 和 CpG ODN 在去除了 T 细胞的小鼠脾细胞中诱导的 IL-6 生产是属于剂量依赖型的,但是,脊椎动物 DNA 和非 CpG ODN 则不是(图 1)。IL-6 的生产在大约 50 $\mu\text{g/ml}$ 细菌 DNA 和 40 μM 的 CpG O-ODN 水平时是平台式的。由细菌 DNA 和 CpG ODN 诱导的 IL-6 的生产的最大值分别在 1-1.5 ng/ml 和 2-4 ng/ml 。这些水平比在 LPS (0.35 ng/ml) 刺激后所见到的要明显地高(图 1A)。为了评价带有核酸酶抗性 DNA 主链的 CpG ODN 是否也可以诱导 IL-6 的生产,向去除了 T 细胞的小鼠脾细胞中加入 S-ODN。CpG S-ODN 也诱导了剂量依赖型的 IL-6 生产,并且水平也类似于 CpG O-ODN,而非 CpG S-ODN 则没有诱导 IL-6 的生产(图 1C)。浓度为 0.05 μM 的 CpG S-ODN 可以在这些细胞中诱导最大的 IL-6 生产。这个结果表明核酸酶抗性 DNA 主链修饰保留的 CpG DNA 对 IL-6 生产的序列特异性能力,并且 CpG S-ODN 在该检测系统中比 CpG ODN 的强度高出 80 倍以上。

CpG DNA 在体内对小鼠 IL-6 分泌的诱导

为了评价细菌 DNA 和 CpG S-ODN 体内诱导 IL-6 分泌的能力,给 BALB/c 小鼠静脉注射 100 μg 大肠杆菌 DNA、小牛胸腺 DNA、CpG 或非刺激性 S-ODN,2 小时后采血。在注射了大肠杆菌 DNA 的组中,血清内 IL-6 水平为约 13 ng/ml ,而在注射了小牛胸腺 DAN 的组和注射了 PBS 的组中,血清内没有检测到 IL-6(表 4)。在注射了 CpG S-ODN 的组中,血清内 IL-6 的水平为约 20 ng/ml 。在注射了非刺激性 S-ODN 的组中,没有检测到 IL-6(表 4)。

表 4. CpG DAN 刺激诱导的小鼠体内 IL-6 分泌

刺激物	IL-6 (pg/ml)
PBS	<50
大肠杆菌 DNA	13858±3143
小牛胸腺 DNA	<50
CpG S-ODN	20715±606
非-CpG S-ODN	<50

小鼠（每组 2 只）接受静脉注射 100 μ l 的 PBS、200 μ g 的大肠杆菌 DNA 或小牛胸腺 DNA、或 500 μ g 的 CpG S-ODN 或非-CpG 对照 S-ODN。注射后 2 小时采血，按 1:10 稀释，每种血清用 ELISA 测定 IL-6。ELISA 测定 IL-6 的敏感限定为 5 pg/ml。CpG S-ODN 的序列是 5'GCATGACGTTGAGCT3'（SEQ ID NO: 48），非刺激性 S-ODN 的序列是 5'TCTAGATGTTAGCGT3'（SEQ ID NO: 49）。应该注意的是，虽然在序列 48 中有 CpG，但对于刺激效应来讲它太靠近 3'端了。数据代表两个结果的平均值 $\pm$ 标准偏差。实验进行至少两次且结果类似。

用 CpG 基元刺激后小鼠体内分泌 IL-6 的动力学

为了评价 CpG DNA 在体内诱导 IL-6 分泌的动力学，对 BALB/c 小鼠静脉注射 CpG 或对照非-CpG S-ODN。在注射了 CpG S-ODN 的组中，血清 IL-6 水平在 1 小时内就明显提高，并且在 2 小时达到峰值水平约 9 ng/ml（图 2）。血清中 IL-6 蛋白质水平

在 4 小时后明显下降,并在 12 小时后回到基础水平。与 CpG DNA 刺激的组相反,在注射了非刺激性 S-ODN 或 PBS 的组中,血清内 IL-6 没有明显提高(图 2)。

CpG 基元在体内诱导的 IL-6 mRNA 表达的动力学和组织分布

如图 2 所示,在 CpG DAN 刺激后,血清 IL-6 水平迅速提高。为了调查这种血清 IL-6 的可能的组织起源以及 CpG DNA 刺激后体内 IL-6 基因表达的动力学,在刺激后的不同的时间点对 BALB/c 小鼠静脉内注射 CpG 或非 CpG S-ODN 和 RNA, RNA 分别取自肝、脾、胸腺、和骨髓。如图 3A 所示,注射 CpG S-ODN 后 30 分钟内,在肝、脾、和胸腺的 IL-6 mRNA 水平已经明显提高。肝内 IL-6 mRNA 在注射后 2 小时达到峰值,随后迅速下降并在刺激后 8 小时回到基础水平(图 3A)。脾内 IL-6 mRNA 在刺激后 2 小时达到峰值,然后逐渐降低(图 3A)。胸腺内 IL-6 mRNA 在注射后 1 小时达到峰值,然后逐渐降低(图 3A)。在注射 CpG S-ODN 后 1 小时内,骨髓内 IL-6 mRNA 明显提高,然后恢复到基础水平。作为对 CpG S-ODN 的应答,肝、脾、和胸腺的 IL-6 mRNA 表达的提高明显高于骨髓。

CpG DNA 诱导的小鼠细胞因子表达的形式

在体内或在全脾细胞中,在最初的 6 个小时内,下列的白细胞介素如, IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、和 IL-10 等都没有检测到其蛋白质水平的显著提高[Ilinman, D.M. et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:2879-2883]。然而,在注射 CpG ODN 的小鼠血清中, TNF- α 的水平在 30 分钟内明显提高, IL-6 的水平在 2 小时内显著地升高。在脾细胞中,在首先的 2 小时内也检测到 IL-12 和伽玛干扰素 (IFN- γ) mRNA 的表达的提高。

表 5. CpG 寡核苷酸诱导人 PBMC 细胞因子的分泌

ODN	序列 (5'-3')	IL-6 ₁	TNF- α ₁	IFN-γ ₁	GM- CSF	IL-12
512 SEQ ID NO:31	TCCATGT <u>C</u> CGTCCTGATGCT	500	140	15.6	70	250
1637 SEQ ID NO:38	C <u> </u>	550	16	7.8	15.6	16
1615 SEQ ID NO:39	G <u> </u>	600	145	7.8	45	145
1614 SEQ ID NO:40	A <u> </u>	550	31	0	50	31
1636 SEQ ID NO:41	 <u> </u> A.....	325	250	35	40	250
1634 SEQ ID NO:42	 <u> </u> C.....	300	400	40	85	400
1619 SEQ ID NO:43	 <u> </u> T.....	275	450	200	80	450
1618 SEQ ID NO:44	A <u> </u> T.....	300	60	15.6	15.6	62
1639 SEQ ID NO:45	AA <u> </u> T.....	625	220	15.6	40	220
1707 SEQ ID NO:46	A <u> </u> TC.....	300	70	17	0	70
1708 SEQ ID NO:47	CA <u> </u> TG.....	270	10	17	ND	10

黑点代表位置，CpG 二核苷酸用下划线标出。

¹由 ELISA 测定，采用了从 R&D System 的 Quantikine 试剂盒 (pg/ml)。在收集上清液和检测前，细胞培养在 10% 自身血清并加以给出剂量的寡脱氧核苷酸 (12 μg/ml)，对 TNF-α 为 4 小时，对其它的细胞因子为 24 小时。数据代表相对于没有加入寡脱氧核苷酸的小孔的细胞因子的提高水平。

CpG DNA 诱导的特异性单核细胞人 PBMC 的细胞因子的分泌

采用了与研究小鼠细胞因子表达的同一组 ODN，来确定人的细胞是否也被 CpG 基元诱导表达细胞因子（或繁殖），并确定有关的 CpG 基元。寡核苷酸 1619（GTCGTT）是对 TNF- α 和 INF- γ 的最好的诱导物，与其几乎相等的在寡核苷酸 1634 中的基元（GTCGCT）则近随其后（表 5）。在寡脱氧核苷酸 1637 和 1614 中的基元（GCCGGT 和 GACGGT）导致强烈的 IL-6 分泌但对其它的细胞因子则相对没有诱导。因此，这就显示人淋巴细胞同小鼠淋巴细胞一样，应答于 CpG 二核苷酸而分泌不同的细胞因子，具体由其周围的碱基所决定。然而，对刺激小鼠基元为最好的基元则不同于对人细胞最有效的基元。某些 CpG 寡脱氧核苷酸对活化人细胞是很差的（寡脱氧核苷酸 1707、1708，它们分别含有形成回文的序列 GACGTC 和 CACGTG）。

对 DNA 应答的细胞表现为单核细胞，因为用 L-亮氨酸-亮氨酸甲基酯（L-LME）处理可以消除细胞因子的分泌，该物质对单核细胞为选择性毒性物（但是，也对 T 淋巴细胞和 NK 细胞为细胞毒性的），并不影响 B 细胞的 Ig 分泌（表 6）。经过 L-LME 处理而存活的细胞用锥虫蓝排斥有 >95% 的存活率，这表明，这些细胞缺少细胞因子应答并不简单反映非特异性的细胞死亡。应答大肠杆菌 DNA 的细胞因子分泌需要未甲基化 CpG 基元，因为甲基化消除了大肠杆菌 DNA 的作用（表 6 中倒数第二行）。LPS 对 DNA 的污染并不能解释这些结果，因为在天然的和甲基化的 DNA 中的污染是相同水平的，而且，加入两倍最高水平的污染物 LPS 也没有产生效应（未示出）。

表 6. CpG DNA 诱导人 PBMC 的细胞因子的分泌

DNA	TNF- α (pg/ml) ¹	IL-6 (pg/ml)	IFN- γ (pg/ml)	RANTES (pg/ml)
EC DNA (50 μ g/ml)	900	12,000	700	1560
EC DNA (5 μ g/ml)	850	11,000	400	750
EC DNA (0.5 μ g/ml)	500	ND	200	0
EC DNA (0.05 μ g/ml)	62.5	10,000	15.6	0
EC DNA (50 μ g/ml)+L-LME ₂	0	ND	ND	ND
EC DNA (10 μ g/ml) Methyl ₃	0	5	ND	ND
CT DNA(50 μ g/ml)	0	600	0	0

¹ 所有细胞因子的水平的测定都用 ELISA 进行, 采用的是 R&D Systems 的 Quantikine 试剂盒, 如同前面的表中描述的一样。结果代表从不同的供体来的 PBMC 的情况。

² 对细胞用 L-亮氨酰-亮氨酸甲基酯 (M-LME) 预处理 15 分钟, 来确定在这样的条件下的细胞因子的产生是否是从单核细胞中来的 (或来自于其它的对 L-LME 敏感的细胞)。

³ 对大肠杆菌 DNA 用 2U/ μ gDNA 的 CpG 甲基酶 (New England Biolabs) 甲基化, 以 HpA-II 和 Msp-I 酶解来确认甲基化。作为阴性对照, 样品内包括的污染物 LPS 量为在该实验条件下没有诱导可检测细胞因子生产的最高量大肠杆菌 DNA 中的污染物的两倍。

ND=未进行。

用 L-LME 处理的 PBMC 损失了细胞因子生产这个现象建议单核细胞也许对应答 CpG DNA 的细胞因子生产负责。为了更直

接地验证这个假设，测试了 CpG DNA 对高纯度的人单核细胞和巨嗜细胞的效果。如同所假设的那样，CpG DNA 直接活化人巨嗜细胞生产 IL-6、GM-CSF、和 TNF- α ，而非 CpG DNA 则不能（表 7）。

表 7. CpG DNA 诱导纯化人巨嗜细胞分泌细胞因子

	IL-6 (pg/ml)	GM-CSF(pg/ml)	TNF- α (pg/ml)
细胞	0	0	0
CT DNA (50 μ g/ml)	0	0	0
EC DNA(50 μ g/ml)	2000	15.6	1000

应答 CpG 基元的诱导的小鼠 IgM 生产中的 IL-6 的生物学作用

上述的动力学研究揭示了在 CpG 刺激后 1 小时诱导了 IL-6 的分泌并进而有 IgM 的分泌。因为对 ODN 诱导 IL-6 分泌的优化 CpG 基元相同于 IgM 的优化基元（表 2），所以检测了 CpG 基元是否单独诱导 IgM 和 IL-6 生产，以及是否 IgM 的生产依赖于 IL-6 的产生。加入中性抗-IL-6 抗体抑制了体外的由 CpG ODN 介导的剂量依赖型的 IgM 生产，但是对照抗体则不能（图 4A）。相对照的是，加入 IL-6 则没有影响 CpG 诱导的 B 细胞的繁殖水平和其基础水平（图 4B）。

应答 CpG DNA 的 IL-6 启动子的转录活性的提高

用 CpG DNA 刺激后的 IL-6 mRNA 和蛋白质水平的提高可以是来源于转录调节或转录后调节的结果。为了确定 IL-6 启动

子的转录活性是否在与 CpG ODN 一起培养的 B 细胞中被上调, 采用了应答 CpG DNA 产生 IL-6 的小鼠 B 细胞系 WEHI-231, 对起用 IL-6 启动子 CAT 构建物转染[pIL-6/CAT(Pottratz, S.T. et al., 17B-estradiol) Inhibits expression of human interleuking-6-promoter-reporter constructs by a receptor-dependent mechanism. J.Clin.Invest. 93:944]。CAT 检测在用各种浓度的 CpG 或非 CpG ODN 刺激后进行。如图 5 所示, CpG ODN 诱导的 CAT 活性的提高是剂量依赖型的, 而非 CpG ODN 则没有诱导 CAT 活性。这就肯定了 CpG 诱导 IL-6 启动子的转录活性。

CpG ODN 诱导的 B 细胞活化对 5'和 3'硫代磷酸酯核苷酸内连接数目的依赖

为了确定 ODN 主链上的部分的硫修饰是否足以提高 B 细胞的活化, 选取了一系列具有相同的序列但在 5'和 3'端的核苷酸内连接的 S 数目不同的 ODN, 并测定了它们的效果。根据以前的对核酸酶降解 ODN 的研究, 确定了需要在 ODN 的 5'端有至少两个硫代磷酸酯连接才可以保护 ODN 不被细胞性外切核酸酶或内切核酸酶所降解。因此, 只对含有两个 5'硫代磷酸酯修饰的连接的内合性 ODN 以及各种数目的 3'修饰的连接进行了检测。

试验了这些 ODN 对淋巴细胞的刺激效果, 使用了三种浓度 (3.3 , 10, 和 30 μM), 测定了它们在处理过的脾细胞培养物中的总 RNA 合成水平 (由 ^3H 尿苷整合) 或 DNA 合成 (有 ^3H 胸苷整合) 水平 (实施例 10)。带有 CpG 基元的 O-ODN (0/0 硫代磷酸酯修饰) 对脾细胞没有刺激, 除非在加入的培养基中的浓度为至少 10 μM (实施例 10)。然而, 当这个序列发生了在 5'端的两个 S 连接修饰和在 3'端的至少 3 个 S 连接的修饰时, 则在 3.3 μM 的剂量时有显著的刺激表现出来。在这种低剂量的条件

下,随着 3'端修饰的碱基数目的增加有刺激水平的逐渐增加,当达到或超过 6 个修饰时,刺激指数开始下降。一般地讲,对脾细胞刺激的优化的 3'的 S 修饰数目为 5。在所有测试的 3 种浓度中, S-ODN 都比嵌合性化合物的刺激性小。

CpG 介导的淋巴细胞活化对主链修饰类型的依赖

硫代磷酸酯修饰的 ODN (S-ODN) 比磷酸二酯修饰的 ODN (O-ODN) 具有更强的对核酸酶的抗性。因此,由 S-ODN 和 S-O-ODN (即,嵌合性硫代磷酸酯 ODN,其中的中央连接是磷酸二酯,但有 2 个 5'和 5 个 3'的连接是硫代磷酸酯修饰的)所造成的比 O-ODN 更高的免疫刺激可能是前者的对核酸酶的抗性的结果。为了确定 ODN 核酸酶抗性在 CpG ODN 的免疫刺激中的作用,测试了嵌合性 ODN 的刺激效果,这些 ODN 中的 5'端和 3'端都附带有核酸酶抗性,来自于甲基磷酸酯 (MP-)、甲基硫代磷酸酯 (MPS-)、磷酸二酯 (S-)、或二硫代磷酸酯 (S₂-) 的核苷酸内的连接 (实施例 10)。这些研究显示,无论它们的核酸酶抗性如何,MP-O-ODN 实际上都比 O-ODN 的免疫刺激性低。然而,通过用 5'端和 3'端的 MPS 核苷酸内连接来取代非桥连 O 分子将 MP 和 S 的修饰结合起来,就使免疫刺激的水平恢复到稍微高于 O-ODN 的水平。

S-O-ODN 比 O-ODN 更为具有刺激性,甚至比 S-ODN 更具有刺激性,至少在高于 3.3 μ M 浓度时如此。在低于 3 μ M 浓度时,带有 3M 序列的 S-ODN 比相应的 S-O-ODN 更具刺激性,而带有 3D 序列的 S-ODN 则比相应的 S-O-ODN 的刺激性弱 (实施例 10)。在比较这两个序列的刺激性 CpG 基元时,注意到了 3D 序列与侧翼为 2 个 5'端嘌呤和 2 个 3'端嘧啶的 CpG 这样的基元完全吻合。然而,在 ODN 3D 中紧靠 CpG 的侧翼碱基不是优化的,

其具有 5'端嘧啶和 3'端嘌呤。根据进一步的试验,发现免疫刺激所需要的序列对 S-ODN 比对 S-O-ODN 和 O-ODN 更为严谨。S-ODN 与优化的 CpG 基元吻合性差就会对淋巴细胞的活化没有刺激或很小(例如,序列 3D)。然而,与基元吻合很好的 S-ODN,特别是在紧靠 CpG 的侧翼位置,都比相应的 S-O-ODN 更具有刺激性(例如,序列 3M,序列 4 和 6),虽然在高浓度(大于 3 μM)时的峰值效应是 S-O-ODN 的更强(实施例 10)。

S₂-O-ODN 具有显著的刺激性,并且在每个测试浓度都引起比相应的 S-ODN 或 S-O-ODN 更为强烈的对淋巴细胞的活化。

在带有 S 或 S₂ 取代的 CpG ODN 中所见到的对 B 细胞刺激的升高可能是下述的一个或全部的效应的结果:核酸酶抗性、增强的细胞吸收、增强的蛋白质的结合、和改变了的细胞间的定位。然而,核酸酶抗性不会是的唯一的解释,因为 MP-O-ODN 实际上比带有 CpG 基元的 O-ODN 的刺激性低。以前的研究已经显示淋巴细胞对 ODN 的吸收明显地受到主链的化学结构的影响 [Zhao et al., (1993) Comparison of cellular binding and uptake of antisense phosphodiester, phosphorothioate, and mixed phosphorethioate and methylphosphonate oligonucleotides. (Andisense Research and Development 3, 53-66; Zhao et al., (1994) Stage specific oligonucleotide uptake in murine bone marrow B cell precursors. Blood 84, 3660-3666.))]. 细胞膜结合和吸收的最高值见于 S-ODN, 随后是 S-O-ODN, O-ODN, 和 MP-ODN。这种吸收的区分与免疫刺激的程度正好相关。

含有未甲基化 CpG 的寡核苷酸具有对 NK 细胞的刺激活性

为了确定含有 CpG 的寡核苷酸除了刺激 B 细胞外是否还对天然杀死细胞 (NK) 具有刺激活性,进行了各种实验。如表 8

所示，用 CpG ODN 1 和 3Dd 培养的脾细胞中有明显的 NK 活性的诱导。相比之下，用非 CpG 对照 ODN 处理的效应物都相对没有诱导。

表 8. CpG 寡核苷酸（ODN）诱导的 NK 活性

	%YAC-1 特异性溶胞*		%2C11 特异性溶胞	
	效应物	靶标	效应物	靶标
ODN	50:1	100:1	50:1	100:1
无	-1.1	-1.4	15.3	16.6
1	16.1	24.5	38.7	47.2
3Dd	17.1	27.0	37.0	40.0
非-CpG ODN	-1.6	-1.7	14.8	15.4

由含有 CpG 基元的 DNA 而不是非 CpG DNA 诱导的 NK 活性

在 37°C 下对细菌 DNA 培养 18 小时，然后测定杀死 K562（人）或 Yac-1（小鼠）靶细胞在去除了 B 细胞的脾细胞中和在人 PBMC 细胞中诱导的溶胞活性，但是，脊椎动物的 DNA 没有这种效果（表 9）。为了确定细菌 DNA 的刺激活性是否归因于其未甲基化 CpG 二核苷酸水平的提高，对含有未甲基化 CpG 二核苷酸、甲基化的 CpG 二核苷酸、或没有 CpG 二核苷酸的 50 个以上的合成性 ODN 进行了测验。结果如表 9 所示，显示了合成的 ODN 可以显著地刺激 NK 活性，只要它们含有至少一个未甲基化 CpG 二核苷酸即可。在 CpG 处于回文序列中的 ODN（例如 ODN1585，其含有回文序列 AACGTT）与没有回文序列的 ODN

(例如 ODN1613 或 1619) 之间没有观察到明显的刺激性的区别, 要注意的是, 优化的刺激一般见于那些 CpG 侧翼为 2 个 5' 端嘌呤或 5' 端 GpT 二核苷酸和 2 个 3' 端嘧啶的 ODN 中。动力学实验表明 NK 活性的峰值出现在加入 ODN 后的约 18 小时处。数据指出小鼠 NK 应答依赖于在先的 CpG DNA 对单核细胞的活化, 导致的 IL-12、THF- α 、和 IFN- α /b 的生产 (实施例 11)。

表 9. 含有 CpG 基元的 DNA 但不是非 CpG DNA 诱导的 NK 活性

			LU/10 ⁶	
			小鼠细胞	人细胞
加入的 DNA 或细胞因子				
实验 1	无		0.00	0.00
	IL-2		16.68	15.82
	大肠杆菌 DNA		7.23	5.05
	小牛胸腺 DNA		0.00	0.00
实验 2	无		0.00	3.28
	1585ggGGTCAACGTTGACgggg	(SEQ ID NO.12)	7.38	17.98
	1629-----gtc-----	(SEQ ID NO.50)	0.00	4.4
实验 3	无		0.00	
	1613GCTAGACGTTAGTGT	(SEQ ID NO.51)	5.22	
	1769-----Z-----	(SEQ ID NO.52)	0.02	ND
	1619TCCATGTCGTTCTGATGCT	(SEQ ID NO.43)	3.35	
	1765-----Z-----	(SEQ ID NO.53)	0.11	

在 ODN 中的 CpG 二核苷酸用下划线标出; Z 代表甲基胞嘧啶。小写字母代表核酸酶抗性硫代磷酸酯修饰的核苷酸内连接, 其在效价实验中显示了比非修饰的 ODN 强 20 倍以上的力度, 具体根据侧翼碱基来决定。多 G 结尾 (g) 用在了某些 ODN 中, 因为它们显著地提高了 ODN 吸收水平。

从所有这些研究中，得到了对 CpG DNA 的免疫效应的更为全面的理解，并将其总结于图 6 中。

CpG 基元的免疫活化可能依赖于 CpG 侧翼的碱基，在 ODN 中的 CpG 的数量和间隔。虽然在理想的碱基成分中的单一 CpG 可以很强并且是有用的免疫活化子，但在含有几个 CpG 并带有适宜的侧翼碱基和间隔的 ODN 中能见到更为优越的效果。对 B 细胞的活化来讲，优化的 CpG 基元是 TGACGTT。

下面所进行的研究是为了确定对刺激人细胞为优化的 ODN 序列，检验了变换 CpG 二核苷酸的数目、间隔和侧翼碱基的效果。

确定带有对活化人 NK 细胞为优化的 CpG 基元的硫代磷酸酯 ODN

要想应用于临床，则 ODN 必须以不受核酸酶降解的形式提供给对象。用磷酸二酯 ODN 来达到这个方法是本领域所熟知的，包括将其包被在脂质中或在释放系统中，例如，在纳米颗粒中。这种保护还可以利用对 DNA 的化学修饰来达到，例如，修饰的 DNA 主链包括那些核苷酸间连接为抗核酸酶的。有些修饰可以赋予另外的所需性质，例如提高细胞吸收。磷酸二酯连接可以通过用硫替代非桥连氧原子中的一个来进行修饰，从而得到硫代磷酸酯 DNA。如果硫代磷酸酯 DNA 具有 CpG 基元，则其具有提高了的细胞吸收（Krieg et al., Antisense Res. Dev. 6:133, 1996）和改善了 B 细胞刺激性。因为 NK 活化相关于体内的附剂效应，所以确定那些可以活化人 NK 细胞的硫代磷酸酯 ODN 是十分重要的。

检验了不同的硫代磷酸酯 ODNs-即在各种碱基成分中含有 CpG 二核苷酸-对人 NK 细胞活化的效果（表 10）。ODN 1840 含有 2 份 TGTCGTT 基元，具有明显的 NK 溶胞活性（表 10）。为了进一步确定其它的对 NK 活化为优化的 ODN，对大约 100 个含有不同数量和间隔的 CpG 基元的 ODN 进行了检测，并以 ODN 1982 作为对照。结果列于表 11。

有效的 ODNs 以 TC 或 TG 作为 5'端开始，然而，这个要求不是必须的。带有内含 CpG 基元的 ODNs（例如，ODN 1840）一般是比 GTCGCT 基元紧靠 5'端的 ODN 较弱的刺激物（例如，ODN 1967 和 1968）。ODN 1968 在其 3'端的那一半具有第二个 GTCGTT 基元，其始终比不含第二个基元的 ODN 1967 更具有刺激性。然而，ODN 1967 比实验 1 和 3 中比 ODN 1968 稍强，在实验 2 中则不是。ODN 2005 具有第三个 GTCGTT 基元，其所诱导的 NK 活性平均比 1968 稍高。然而，ODN 2006 中 GTCGTT 基元之间的间隔由于在每个基元之间都加入了两个 T 而被增加了，其比 ODN 2005 和 ODN 2007 更为优越，后者只有一个基元添加了间隔性的 2 个 T。在 CpG 基元之间的最小可接受的间隔是一个核苷酸，只要该 ODN 在 3'端有两个嘧啶（优选 T）即可（如 ODN 2015）。令人惊奇的是，用 5'端的 T 来把两个 GTCGTT 基元对头连接起来也创造了对 NK 活性为合理强度的诱导物（例如，ODN 2016）。选择胸腺嘧啶（T）来分开相连的 CpG 二核苷酸不是绝对的，因为 ODN 2002 诱导的相当的 NK 活化，虽然其中是由腺嘌呤（A）将其 CpGs（即 CGACGTT）间隔开来。还应该注意的，不含 CpG 的 ODN（例如 ODN 1982），含有成串的 CpGs 的 ODN，以及 CpGs 存在于坏的序列中的 ODN（例如，ODN 2010）都没有对 NK 活化的刺激效应。

表 10. ODN 诱导 NK 溶胞活性 (LU)

ODN	序列 (5'-3')	LU
细胞自己		0.01
1754	ACCATGGACGATCTGTTTCCCCTC	0.02
1758	TCTCCCAGCGTGCGCCAT	0.05
1761	TACCGCGTGCGACCCTCT	0.05
1776	ACCATGGACGAAGCTGTTTCCCCTC	0.03
1777	ACCATGGACGAGCTGTTTCCCCTC	0.05
1778	ACCATGGACGACCTGTTTCCCCTC	0.01
1779	ACCATGGACGTACTGTTTCCCCTC	0.02
1780	ACCATGGACGGTCTGTTTCCCCTC	0.29
1781	ACCATGGACGTTCTGTTTCCCCTC	0.38
1823	GCATGACGTTGAGCT	0.08
1824	CACGTTGAGGGGCAT	0.01
1825	CTGCTGAGACTGGAG	0.01
1828	TCAGCGTGCGCC	0.01
1829	ATGACGTTCCCTGACGTT	0.42
1830 ²	随机序列	0.25
1834	TCTCCCAGCGGGCGCAT	0.00
1836	TCTCCCAGCGCGCGCCAT	0.46
1840	TCCATGTCGTTCCCTGTCGTT	2.70
1841	TCCATAGCGTTCCTAGCGTT	1.45
1842	TCGTCGCTGTCTCCGCTTCTT	0.06
1851	TCCTGACGTTCCCTGACGTT	2.32

¹ 溶胞单位 (LU) 按照所述 (8) 进行。简言之, 从正常的供体收集 PBMC, 用 Ficoll 离心, 然后采用或不采用给定剂量的 ODN (加入的剂量为 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 培养 24 小时。确定它们的对 ⁵¹Cr-标记的 K562 细胞的溶胞能力。给出的结果是从几个不同的正常人供体获得的典型的结果。² 该寡核苷酸混合物含有的是在每个位置上从 4 种碱基中随机选择的碱基。

表 11. 带有良好基元的硫代磷酸酯 CpG ODN 诱导 NK LU

ODN ¹	序列(5'-3')	实验 1	实验 2	实验 3
细胞自己		0.00	1.26	0.46
1840	TCCATGTCGTTCCCTGTCGTT	2.33	ND	ND
1960	TCCTGTCGTTCCCTGTCGTT	ND	0.48	8.99
1961	TCCATGTCGTTTTTTGTCGTT	4.03	1.23	5.08
1962	TCCTGTCGTTCCCTGTCGTT	ND	1.60	5.74
1963	TCCTTGTGCTTCCTGTCGTT	3.42	ND	ND
1965	TCCTGTCGTTTTTTGTCGTT	0.46	0.42	3.48
1966	TCGTCGCTGTCTCCGCTTCTT	2.62	ND	ND
1967	TCGTCGCTGTCTGCCCTTCTT	5.82	1.64	8.32
1968	TCGTCGCTGTTGTGCTTCTT	3.77	5.26	6.12
1979 ²	TCCATGTZGTTCCCTGTZGTT	1.32	ND	ND
1982	TCCAGGACTTCTCTCAGGTT	0.05	ND	0.98
1990	TCCATGCGTGCGTGCGTTTT	2.10	ND	ND
1991	TCCATGCGTTGCGTTGCGTT	0.89	ND	ND
2002	TCCACGACGTTTTTCGACGTT	4.02	1.31	9.79
2005	TCGTCGTTGTGCTTGTGCTT	ND	4.22	12.75
2006	TCGTCGTTTTTTGTCGTTTTGTCGTT	ND	6.17	12.82
2007	TCGTCGTTGTGCTTTTTGTCGTT	ND	2.68	9.66
2008	GCGTGCGTTGTGCTTGTGCTT	ND	1.37	8.15
2010	GCGGCGGGCGGCGCGCGCCC	ND	0.01	0.05
2012	TGTCGTTTGTGCTTTGTGCTT	ND	2.02	11.61
2013	TGTCGTTGTGCTTGTGCTTGTGCTT	ND	0.56	5.22
2014	TGTCGTTGTGCTTGTGCTT	ND	5.74	10.89
2015	TCGTCGTCGTCGTT	ND	4.53	10.13
2016	TGTCGTTGTGCTT	ND	6.54	8.06

¹PBMC 基本如本文所述。结果是 6 个分别的实验的代表；每个实验代表不同的供体。²这是甲基化形式的 ODN 1840；Z=5-甲基胞嘧啶，LU 是溶胞单位，ND=未进行，CpG 二核苷酸用下划线标出。

确定带有对人 B 细胞增殖活化为优化的 CpG 基元的硫代磷酸酯 ODN

CpG ODN 诱导 B 细胞增殖的能力是其附剂潜力的良好指标。具有强附剂效应的 ODN 一般都诱导 B 细胞增殖。为了确定诱导 B 细胞增殖的优化的 CpG ODN 是否与诱导 NK 细胞活性的

ODN 相同，测试了相似的一组 ODN（表 12）。表现出最为一致的刺激性的 ODN 是 ODN 2006（表 12）。

表 12. 硫代磷酸酯 CpG ODN 对人 B 细胞繁殖的诱导

DN	序列(5'-3')	刺激指标 ¹				
		实验 1	实验 2	实验 3	实验 4	实验 5
1840	TCCATGTCGTTTCCTGTTCGTT	4	ND	ND	ND	N
1841	TCCATAGCGTTTCCTAGCGTT	3	ND	ND	ND	N
1960	TCCTGTTCGTTTCCTGTTCGTT	ND	2.0	2.0	3.6	N
1961	TCCATGTCGTTTTTTGTTCGTT	2	3.9	1.9	3.7	N
1962	TCCTGTTCGTTTCCTTGTTCGTT	ND	3.8	1.9	3.9	5
1963	TCCTTGTTCGTTTCCTGTTCGTT	3	ND	ND	ND	N
1965	TCCTGTTCGTTTTTTGTTCGTT	4	3.7	2.4	4.7	6
1967	TCGTTCGCTGTCTGCCCTTCTT	ND	4.4	2.0	4.5	5
1968	TCGTTCGCTGTTGTTCGTTTCTT	ND	4.0	2.0	4.9	8
1982	TCCAGGACTTCTCTCAGGTT	3	1.8	1.3	3.1	3
2002	TCCACGACGTTTTTCGACGTT	ND	2.7	1.4	4.4	N
2005	TCGTTCGTTGTTCGTTGTTCGTT	5	3.2	1.2	3.0	7
2006	TCGTTCGTTTTTGTTCGTTTTTGTTCGTT	4	4.5	2.2	5.8	8
2007	TCGTTCGTTGTTCGTTTTTGTTCGTT	3	4.0	4.2	4.1	N
2008	GCGTGCGTTGTTCGTTGTTCGTT	ND	3.0	2.4	1.6	N
2010	GCGGCGGGCGGGCGCGCGCCC	ND	1.6	1.9	3.2	N
2012	TGTTCGTTTTGTTCGTTTGTTCGTT	2	2.8	0	3.2	N
2013	TGTTCGTTGTTCGTTGTTCGTTGTTCGTT	3	2.3	3.1	2.8	N
2014	TGTTCGTTGTTCGTTGTTCGTT	3	2.5	4.0	3.2	6
2015	TCGTTCGTCGTCGTT	5	1.8	2.6	4.5	9
2016	TGTTCGTTGTTCGTT	ND	1.1	1.7	2.7	7

¹ 细胞=手术中收集的并储存于-70℃的人脾细胞，或从正常供体采集的 PBMC 细胞并经过 Ficoll 离心。细胞培养在 96 孔 U 底微滴盘逼供内加入或不加入给定剂量的 ODN(加入的剂量为 6 μml)。N=12 个实验。细胞培养 4-7 天，用 1 μCi 的 ³H 胸苷冲击 18 小时然后收获并闪烁计数。刺激指数=不加入 ODN 小孔中的 cpm 与在整个培养过程中用给定 ODN 刺激的小孔的 cpm 的比率（一旦建立培养物后就没有再加入进一步的 ODN）。ND=未进行。

确定诱导人 IL-2 分泌的硫代磷酸酯 ODN

CpG ODN 诱导 IL-12 分泌的能力是其附剂潜力的良好指标, 特别从其诱导 Th1 免疫应答这种高度依赖 IL-12 的能力的角度来讲更是如此。因此, 检验了某一组硫代磷酸酯 ODN 诱导人 PBMC 体外分泌 IL-12 的能力 (表 13)。这些实验显示在某些人 PBMC 细胞中, 大多数 CpG ODN 可以诱导 IL-12 的分泌 (例如, 实验 1)。然而, 其它的供体只应答少数的 CpG ODN (例如, 实验 2)。从大多数对象来的 ODN 2006 则始终诱导 IL-2 分泌 (表 13)。

表 13. 硫代磷酸酯 CpG ODN 诱导人 IL-12 分泌

ODN ¹	序列(5'-3')	IL-12 (pg/ml)	
		实验 1	实验 2
细胞自己		0	0
1962	TCCTGTCGTTTCCTTGTCGTT	19	0
1965	TCCTGTCGTTTTTTTGTCGTT	36	0
1967	TCGTCGCTGTCTGCCCTTCTT	41	0
1968	TCGTCGCTGTTGTCGTTTCTT	24	0
2005	TCGTCGTTGTCGTTGTCGTT	25	0
2006	TCGTCGTTTTTGTCGTTTTTGTCGTT	29	15
2014	TGTCGTTGTCGTTGTCGTT	28	0
2015	TCGTCGTCGTCGTT	14	0
2016	TGTCGTTGTCGTT	3	0

¹PBMC 采集于正常供体并用 Ficoll 离心, 然后以 10^6 细胞/孔培养在 96 孔微滴盘中, 加入或不加入给定的 ODN, 如果加入 ODN, 其剂量为 6 $\mu\text{g/ml}$ 。24 小时后收获上清液, 用 ELISA 方法检测 IL-12 的水平。对每个实验建立标准曲线, 其代表不同的供体。

确定对 B 细胞和单核细胞/NK 细胞为特异性的寡核苷酸

如图 6 所示，CpG DNA 可以直接活化高纯度 B 细胞和单核细胞。CpG DNA 活化这些种类细胞的机制中有很多相似之处。例如，都需要 NFkB 活化，对此在下面给予解释。

在对 CpG DNA 的不同免疫效应的进一步研究中，发现有多种以上的一种以上的 CpG 基元。具体地讲，寡核苷酸 1668 带有最佳的小鼠 B 细胞基元，它是对 B 细胞和天然杀死细胞（NK）的活化的强诱导物，而寡核苷酸 1758 是对 B 细胞的弱活化物，但仍然诱导很好的 NK 应答（表 14）。

表 14.刺激优化小鼠 B 细胞和 NK 活化的不同的 CpG 基元

ODN	序列	B 细胞 活化 ¹	NK 活 化 ²
1668	TCCATGAC <u>G</u> TTTCCTGATGCT (SEQ ID NO:44)	42,849	2.52
1758	TCTCCCAG <u>C</u> GTG <u>C</u> GCCAT (SEQ ID NO:55)	1,747	6.66
无		367	0.00

CpG 二核苷酸用下划线标出，寡核苷酸是合成的并有硫代磷酸酯修饰的主链来改善其核酸酶抗性。¹按照实施例 1 所述用 200 nM 的寡脱氧核苷酸培养 48 小时后的 ³H 胸苷吸收来进行测定。²按照溶胞单位来测定。

免疫刺激核酸的目的论基础

脊椎动物 DNA 是高度甲基化的,并且 CpG 二核苷酸是不足表达的。然而,刺激性 CpG 基元是在微生物基因组 DNA 中常见的,但是在脊椎动物 DNA 中就很少见。此外,细菌 DNA 已经被报道可以诱导 B 细胞增殖和免疫球蛋白(Ig)的生产,而哺乳动物 DNA 则不行[Messina, J.P. et al., J. Immunol. 147:1759 (1991)]。在实施例 3 中进一步描述的实验中,用 CpG 甲基化酶对细菌 DNA 的甲基化被发现是消除了有丝分裂的,这就证实了 CpG 状态的差异是细菌 DNA 引起 B 细胞刺激的原因。这个数据支持了下面的结论:即存在于细菌 DNA 中的未甲基化 CpG 二核苷酸负责了细菌 DNA 的刺激效应。

就目的论而言,看起来 CpG 基元造成的淋巴细胞活化代表了免疫防御机制,其可以区分细菌 DNA 和宿主 DNA。宿主 DNA 一般由于编程性细胞死亡而存在于很多发炎的组织 and 区域中,但它通常不诱导或很少诱导淋巴细胞活化,因为 CpG 被抑制和甲基化。然而,含有未甲基化 CpG 基元的细菌 DNA 的存在可以准确地感染的区域引起淋巴细胞活化,这则是有益的。这种新的活化途径提供了 T 细胞依赖抗原对特异性 B 细胞活化的快速替代途径。由于 CpG 途径通过抗原受体协同了 B 细胞的活化,带有对细菌抗原为特异性抗原受体的 B 细胞将通过其细胞膜 Ig 接受一个活化信号以及从细菌 DNA 来的第二个信号,并从而倾向于有区分地被活化。这个途径与其它的 B 细胞活化途径的相互作用提供了使用多克隆抗原来诱导抗原特异性应答的生理学机制。

然而，B 细胞活化似乎不是完全非特异性的。带有对细菌产物为特异性抗原受体的 B 细胞可以通过细胞膜 Ig 接受一个活化信号，以及从细菌 DNA 来的第二信号，从而更强烈地启动抗原特异性免疫应答。如同其它的免疫防御机制，对细菌 DNA 的应答可以具有在某些位置的非理想序列。例如，对自身抗原的自身免疫应答将还倾向于由细菌感染来区分性地启动，因为自身抗原还可以由细菌 DNA 启动来向自身接受性 B 细胞提供第二活化信号。确实，细菌感染对自身免疫的诱导是临床观察中常见的。例如，自身免疫系统性红斑狼疮，其本身是 1) 以产生抗-DNA 抗体为特征，2) 由抑制 DNA 甲基转移酶的药物所诱导[Cornacchia, E.J. et al., J. Clin. Invest. 92:38 (1993)]，以及 3) 与被减少的 DNA 甲基化有关[Richardson, B., L. et al., Arth. Rheum 35:647 (1992)]，所以，它可以部分地由对 DNA 为特异性的 B 细胞通过由 CpG 基元提供的刺激信号的活化来启动，以及由细菌 DNA 同抗原受体的结合来启动。

此外，脓毒病，其特征是由于大量的对免疫系统的非特异性活化而导致高度发病率和死亡率，在死亡的细菌达到了足以直接活化许多淋巴细胞的浓度而释放出细菌 DNA 和其它的产物时而活化免疫系统。在脓毒病综合症中 CpG DNA 作用的进一步证据可见于 Cowdery, J.等人的文献[Cowdery, J., et al., (1996) The Journal of Immunology 156:4570-4575]。

与抗原通过其表面 Ig 受体来启动 B 细胞不同的是，CpG-ODN 不诱导任何可检测到的 Ca^{2+} 流，在蛋白质酪氨酸磷酸化中的改变，或 IP3 的产生。以带有或不带有 CpG 基元的 ODN 与 FITC 共轭进行的流式细胞仪测定按照 Zhao, Q 等人所述进行[Antisense Research and Development 3:53-66 (1993)]，并且显示了相等的膜结合，细胞吸收，外流，以及胞内定位。这就建议，也

许不存在对 CpG ODN 为特异性的细胞膜蛋白质。不同于经过细胞膜来起作用，这些数据建议的是含有未甲基化 CpG 的寡核苷酸需要细胞吸收来发挥活性：与固体 Teflon 支持物共价连接的 ODN 是非刺激性的，如同在抗生物素蛋白小珠或抗生物素蛋白涂布的培养皿上固定化的生物素化的 ODN 一样。与 FITC 或生物素共轭的 CpG ODN 保留了全部的有丝分裂性质，表明没有立体性妨碍。

最近的数据表明，转录因子 NFkB 的介入是 CpG 效应的直接或间接的介导体。例如，用 CpG DNA 处理 B 细胞或单核细胞 15 分钟后，NFkB 结合活性的水平被提高了（图 7）。然而，这种提高不是由于那些不含 CpG 基元的 DNA 所导致的。此外，还发现的是，NFkB 活化的两个不同的抑制物，即 PDTC 和胶毒素，完全封闭了 CpG DNA 对淋巴细胞的刺激，由测定 B 细胞繁殖或单核细胞分泌细胞因子而证实，这就建议两种细胞都需要 NFkB 活化。

对 NFkB 的活化可能有几种机制。它们包括通过对各种蛋白质激酶的活化，或通过反应性氧的产生。没有发现在 CpG DNA 处理 B 细胞或单核细胞后立即诱导蛋白质激酶活化的任何证据，而且蛋白质激酶 A、蛋白质激酶 C，以及蛋白质酪氨酸激酶的抑制物都对 CpG 诱导的活化没有任何影响。然而，CpG DNA 在 B 细胞和单核细胞中都快速诱导反应性氧的生产，用按照 Royall, J.A.所述的敏感性荧光染料二氢若丹明 123 检测所证实 [Royall, J.A., and Ischiropoulos, H. (Archives of Biochemistry and Biophysics 302:348-355(1993))]. 然而，对产生这些反应性氧的抑制物完全封闭了 NFkB 的诱导以及随后的 CpG DNA 对细胞繁殖和细胞因子分泌的诱导。

下一个问题是，CpG DNA 如何快速地导致了反应性氧的产生。本发明人的前述研究证实了寡核苷酸和质粒或细菌 DNA 被细胞内吸到核内体中。这些核内体迅速地在细胞内被酸化。为了确定这个酸化步骤是否在 CpG DNA 活化反应性氧的机制中是重要的，用核内体酸化的特异性抑制物封闭该酸化步骤，包括氯喹、莫能菌素、和 bafilomycin 等，它们通过不同的机制工作。图 8A 显示了流式细胞仪的研究结果，其中采用了小鼠 B 细胞以及二氢若丹明 123 染料来确定反应性氧的水平。该图内在 A 组中仅仅含有染料的样品显示了细胞对染料的阳性背景水平为 28.6%。正如所预期的，反应性氧的这个水平在用 PMA 和离子霉素处理细胞 20 分钟后被大大地提高到 80%，即阳性对照（B 组）。用 CpG 寡核苷酸处理的细胞也显示反应性氧水平的提高，使大于 50% 的细胞变为阳性（D 组）。然而，用除了 CpG 改变之外序列完全相同的寡核苷酸处理的细胞没有显示这种显著的反应性氧水平的提高（E 组）。

在有氯喹存在时，这些结果非常不同（图 8B）。氯喹将细胞中反应性氧的背景水平稍微的降低了一些，使在 A 组中的未处理的细胞只有 4.3% 为阳性。氯喹完全消除了在用 CpG DNA 处理的细胞中的反应性氧的诱导（B 组），但是对用 PMA 和离子霉素处理的细胞中的反应性氧的水平没有减弱（E 组）。这就证明，与 PMA 加上离子霉素不同，用 CpG DNA 处理 B 细胞后的反应性氧的产生需要 DNA 在核内体中经历酸化步骤。这是淋巴细胞活化的全新的机制。氯喹、莫能菌素、以及 bafilomycin 还显示对 CpG DNA 活化 NFkB 的封闭，以及对随后的繁殖和细胞因子分泌的诱导的封闭。

CpG DNA 的慢性免疫活化以及自身免疫疾病

CpG DNA 对 B 细胞的活化协同于通过 B 细胞受体的信号。这就提出了这样的可能, 即 DNA 特异性 B 细胞可以通过将细菌 DNA 与其抗原受体结合以及同时的 CpG 介导的信号的刺激来活化。此外, CpG DNA 诱导 B 细胞变为抗编程死亡的, 这种机制被认为在防止对自身抗原如 DNA 的免疫应答中是重要的。确实, 对 bDNA 的暴露可以启动抗-DNA 的抗体的产生。假定 CpG DNA 具有促进自身免疫的这种潜在能力, 那么值得注意的是, 患有自身免疫疾病系统性红斑狼疮的患者都具有持续的升高水平的循环血浆 DNA, 其高甲基化 CpG 中被富集。这个发现建议了在狼疮疾病发病机理中 CpG DNA 造成的慢性免疫活化所可能扮演的角色。

治疗狼疮疾病的一类有效药剂是抗疟疾药物, 例如, 氯喹。虽然这些药物的治疗机制还不清楚, 但是已知的是它们抑制核内体内部的酸化。CpG DNA 对淋巴细胞的活化不是通过与细胞表面受体的结合所介导的, 而是需要细胞吸收来实现的, 这种细胞吸收通过将吸收性内吞到酸化的氯喹敏感的胞内小室而发生。这就建议一种假说, 即 CpG DNA 对淋巴细胞的活化可能在发生时相关于酸化的核内体, 并且甚至可能是依赖于 pH 的。为了检验这个假说, 采用了对 DNA 酸化为特异性的抑制物来确定 B 细胞或单核细胞是否可能在酸化被抑制的条件下应答于 CpG DNA。

被检测到的对 CpG DNA 应答的最早的淋巴细胞活化现象是反应性氧 (ROS) 的产生, 其在脾细胞以及 B 细胞和单核细胞中都是在 5 分钟内被诱导出来的。核内体内部酸化的抑制物包括氯喹、bafilomycin A, 以及莫能菌素, 它们具有不同的作用机制, 对 CpG 诱导的 ROS 产生有封闭作用, 但是对由 PMA、与 CD40

或 IgM 配合等所介导的 ROS 的产生没有影响。这些研究显示 ROS 的产生是通过多种途径的淋巴细胞活化中一种所共有的现象。这种 ROS 的产生一般独立于核内体中的酸化，而酸化是应答 CpG DAN 的 ROS 中所需要的。应答 CpG 的 ROS 的生产并不被 NF κ B 抑制物如胶霉毒素所抑制，确认其不是 NF κ B 活化的次级现象。

为了确定 CpG DAN 在核内体中的酸化是否对其所起到的其它免疫刺激效果是必须的，进行了各种实验。LPS 和 CpG DNA 都诱导相似快速的 NF κ B 活化，提高了原癌基因 mRNA 水平，以及细胞因子分泌。DNA 对 NF κ B 的活化依赖于 CpG 基元，因为其不被用 CpG 甲基酶处理的 bDAN 诱导，也不被因为碱基变换而打乱了 CpG 的 ODN 所诱导。采用特异性抗体的超迁移实验指出，被活化的 NF κ B 复合物包括 p50 和 p60 组分。并非出人意料的是，在 LPS 或 CpG 处理的细胞中的 NF κ B 活化伴随有 I κ B α 和 I κ B β 的降解。然而，核内体酸化的抑制物选择性地封闭了所有的 CpG 诱导的活化，但没有对任何 LPS 诱导的胞内活化现象进行了封闭。值得注意的是，已经确定的是很低浓度的氯喹 (<10 μ M) 抑制了 CpG 介导的淋巴细胞的活化，因为该剂量远远低于治疗疟疾和记忆性其它的被报道的免疫效应所需要的剂量（例如，100-1000 μ M）。这些实验支持了在 CpG DNA 刺激效果的介导中依赖于 pH 的信号机制的角色。

表 15. 核内体酸化或 NFkB 活化的抑制物对 CpG 诱导的
TNF- α 和 IL-12 表达的特异性封闭

			抑制物									
活化物	培养基		Bafilomycin (250nM)		氯喹 (2.5μg/ml)		莫能菌素 (10 nM)		NAC 50mM	TPCK 50μM	胶霉毒素 0.1μg/ml	双胶霉 毒素 0.1μg/ml
	TNF-α	IL-12	TNF-α	IL-12	TNF-α	IL-12	TNF-α	IL-12	TNF-α	TNF-α	TNF-α	TNF-α
培养基	37	147	46	102	27	20	22	73	10	24	17	41
CpG ODN	455	17,114	71	116	28	6	49	777	54	23	31	441
LPS	901	22,458	1370	4051	1025	12418	491	4796	417	46	178	1120

表 15 给出了 IL-2 和 TNF- α 的检测：小鼠单核细胞系 J774（对 IL-12 为 1×10^5 细胞/毫升，对 TNF- α 为 1×10^6 细胞/毫升），在有给出的浓度的抑制物或没有抑制物的条件下培养 2 小时，然后用 CpG 寡核苷酸 (ODN) 1826 (TCCATGACGTTTCCTGACGTT SEQ ID NO: 10) 刺激，剂量为 2 μ M，对 LPS 为 (10 μ g/ml)，对 TNF- α 为 4 小时，对 IL-12 为 24 小时，收集上清液。对上清液用 ELISA 检测 IL-12 或 TNF- α (pg/ml)，操作参见以前的文献[A. K. Krieg, A.-K. Yi, S. Matson, T.J. Waldschmidt, G.A. Bishop, R. Teasdale, G. Koretzky and D. Klinman, Nature 374, 546 (1995); Yi, A.-K., D. M. Klinman, T. L. Martin, S. Matson and A. M. Krieg, J. Immunol, 157:5394-5402 (1996); Krieg, A. M., J. Lab. Clin. Med., 128, 128-133 (1996)]。用不含有 CpG 基元的 ODN 培养细胞没有诱导细胞因子的分泌。在 IL-6 的检测中也见到了相似的 CpG 应答的特异性抑制，也见于采用原脾细胞或 B 细胞系 CH12.LX 和 WEHI-231 的实验中。2.5 μ g/ml 氯喹相当于 < 5 μ M。NFkB 活化的其它抑制物包括 PDTC 和钙蛋白酶抑制物 I 和 II，都给出了相似的抑制效果。给出的数据代表在 10 个不同的实验中所得到的结果。

过量的 CpG 基元的免疫活化可能对自身免疫疾病系统性红斑狼疮的发病有作用，其伴随着升高水平的循环高甲基化 CpG DNA。氯喹和有关的抗疟疾化合物是对系统性红斑狼疮和其它的一些自身免疫疾病的有效的治疗药物，虽然它们的作用机制尚不明了。我们对极低浓度氯喹可以特异性抑制 CpG 介导的淋巴细胞活化的能力的确定，建议出了一种新的有效的机制。值得注意的是，狼疮的经常复发被认为是微生物感染启动的。在感染的组织中存在的 bDNA 水平可以是足以诱导局部发炎应答的。与在脓毒综合症和其它的疾病中 CpG DNA 起者介导物的作用相结合，我们的研究建议了抗疟疾药物作为核内体酸化的抑制物的新的医药用途。

CpG 诱导的 ROS 生产可能是细胞活化的偶然结果，或者是介导这种活化的信号。ROS 的清除物 N-乙酰基-L-半胱氨酸 (NAC) 封闭 CpG 诱导的 NFkB 活化，细胞因子的产生，以及 B 细胞的繁殖，这就建议在途径中 ROS 生产的起因角色。这些数据与前面的支持 ROS 在活化 NFkB 中的角色的证据相吻合。WEHI-231 B 细胞 (5×10^5 细胞/毫升) 在有或没有氯喹 [$5 \mu\text{g/ml}$ ($<10 \mu\text{M}$)] 或胶霉毒素 ($0.2 \mu\text{g/ml}$) 条件下预培养 30 分钟。然后对细胞等份试样按照上述在 RPMI 培养基中 10 分钟，添加或不添加 CpG ODN (1826) 或非 CpN ODN (1911) $1 \mu\text{M}$ ，或佛波醇豆蔻乙酸酯 (PMA) 加离子霉素 (iono)。然后对细胞用二氢若丹明 123 染色并用流式细胞仪分析胞内 ROS 的产生，具体操作按照以前所述的进行 [A. K. Krieg, A.-K. Yi, S. Matson, T.J. Waldschmidt, G.A. Bishop, R. Teasdale, G. Koretzky and D. Klinman, *Nature* 374, 546 (1995); Yi, A.-K., D. M. Klinman, T. L. Martin, S. Matson and A. M. Krieg, *J. Immunol*, 157:5394-5402 (1996); Krieg, A. M., *J. Lab. Clin. Med.*, 128, 128-133 (1996)]。J774 细胞，一种单核细胞系，显示了相似的依赖 pH 的 CpG 诱导的

ORS 应答。与之相对照, CpG DNA 没有诱导胞间 ROS 的产生, 也没有任何可检测的嗜中性白细胞 ROS。这些氯喹的浓度(以及那些与其它的核内体酸化抑制物一起使用的浓度)防止了内化的 CpG DNA 的酸化, 用荧光偶联 ODN 如 Tonkinson 等人所述的进行了证实[Tonkinson et al., Nucl. Acids Res. 22, 4268 (1994); A.M. Krieg, In: Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics. Editor, S. Akhtar, CRC Press, Inc., pp. 177 (1995)]。用高于抑制核内体酸化所需浓度, 观察到了非特异性的抑制效果。每个实验都进行至少三次并得到相似结果。

虽然已知 NFkB 对基因表达是重要的调节物, 但其在对 CpG DNA 的应答中的角色却始终不清楚。为了确定这个 NFkB 活化对 CpG 介导的基因表达是必须的, 对细胞在有或没有二硫代氨基甲酸吡咯烷(PDTC)这种 IkB 磷酸化抑制物存在的条件下用 CpG DNA 活化。这些 NFkB 活化的抑制物完全封闭了 CpG 诱导的原癌基因和细胞因子 mRNA 和蛋白质的表达, 显示 NFkB 在这些现象中作为介导物的基本作用。在这些研究所用的条件中, 没有任何一个抑制物减弱了细胞的生存力。J774, 一种小鼠单核细胞系, 以 5 $\mu\text{g/ml}$ 的水平在有小牛胸腺(CT)、大肠杆菌(EC)、或甲基化大肠杆菌(mEC)DNA(用 CpG 甲基化酶进行甲基化⁴)存在的条件下培养, 或与 0.75 μM 的 CpG 寡核苷酸(ODN 1826, 表 15)或非 CpG ODN(TCCATGAGCTTCCTGAGTCT; ODN 1745)培养 1 小时, 然后, 对细胞进行溶胞, 制备核酸提取物。含有共同 NFkB 位点的双链 ODN 被 5'端放射性标记, 用作 EMSA 的探针, 具体操作按照以前所述进行[J. D. Dignam, R. M. Lebovitz and R. G. Roeder, Nucl. Acids Res. 11, 1475 (1983); M. Briskin, M. Damore, R. Law, G. Lee, P. W. Kincade, C. H. Sibley, M. Kuehl and R. Wall, Mol. Cell. Biol. 10, 422 (1990)]。p50/p65 异源双体的位置用对 p65 和 p50 的特异性抗体以超迁移方法确定

[Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA]。用 J774 细胞建立氯喹对 CpG 诱导的但不是 LPS 诱导的 NFkB 活化的抑制。将细胞在有或没有氯喹 (20 $\mu\text{g/ml}$) 存在的条件下预培养 2 小时, 然后按照上述用 EC DNA、CpG ODN、非 CpG ODN 或 LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) 刺激 1 小时。在 B 细胞系、WEHI-231 和原脾细胞中见到了相似的氯喹敏感性 CpG 诱导的对 NFkB 的活化。这些实验都进行三次, 氯喹的浓度范围是 2.5 至 20 $\mu\text{g/ml}$, 得到了相似的结果。

还明白了的是, CpG 刺激的 mRNA 表达需要核内体酸化以及在 B 细胞和单核细胞中的 NFkB 活化。J774 细胞 (2×10^6 细胞/毫升) 在有或没有氯喹 [2.5 $\mu\text{g/ml}$ ($< 5 \mu\text{M}$)], 或 N-甲苯磺酰基-L-苯并氨酸氯甲酮 (TPCK, 50 μM), 这是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白酶抑制物, 其防止 IkB 蛋白水解并因此而封闭 NFkB 活化。然后对细胞进行刺激, 使用的是大肠杆菌 DNA (EC, 50 $\mu\text{g/ml}$)、小牛胸腺 DNA (CT, 50 $\mu\text{g/ml}$)、LPS (10 $\mu\text{g/ml}$)、CpG ODN (1826, 1 μM)、或对照的非 CpG ODN (1911, 1 μM), 进行 3 小时。WEHI-231 B 细胞 (5×10^5 细胞/毫升) 在有或没有胶霉毒素 (0.1 μM) 或双胶霉毒素 (0.1 $\mu\text{g/ml}$) 存在的条件下培养 2 小时, 然后进行刺激, 使用的是 CpG ODN (1826), 或对照的非 CpG ODN (1911, TCCAGGACTTTCCTCAGGTT), 用量为 0.5 μM , 时间为 8 小时。在这两种情况下, 细胞被收集后, 用 RNazol 按照厂商的说明书来制备 RNA。进行多探针 Rnase 保护检测, 操作按照以前所述的进行[A.-K. Yi, P. Hornbeck, D.E. Lafrenz and A.M. Krieg, J. Immunol., 157, 4918-4925(1996)]。将可比数量的 RNA 装入每条道内, 用核糖体 μRNA 作为加载对照 (L32)。对这些实验重复三次, 得到相似的结果。

这些结果表明淋巴细胞对 CpG DNA 的应答是通过新的途径完成的, 涉及了依赖 pH 的胞内 ROS 的产生。依赖 pH 的步骤

可能是 CpG DNA 的运转或加工步骤, ROS 的产生, 或某些其它的现象。ROS 被广泛地认为是在多种类型细胞中的信号途径的第二信使, 但是在此之前还没有被证明是可以在 B 细胞中介导刺激信号的。

假设在核内体之中或其附近有一种蛋白质, 它特异性识别含有 CpG 基元的 DNA, 并导致反应性氧的产生。为了探测细胞的胞质中能够特异性结合 CpG DNA 的蛋白质, 进行了电泳迁移率变动分析(EMSA), 其中使用的是以 5'放射性标记的带有或不带有 CpG 基元的寡核苷酸。发现有一条带似乎代表与具有 CpG 基元的单链寡核苷酸特异性结合的蛋白质, 但其不与缺少 CpG 基元的寡核苷酸结合, 也不与含有被甲基化了的 CpG 基元的寡核苷酸结合。这个结合活性在加入了过量的含有 NFkB 结合位点的寡核苷酸时被封闭。这就建议 NFkB 或相关的蛋白质是与刺激性 CpG 寡核苷酸结合的蛋白质或蛋白质复合体的组成部分。

在 NFkB 被强烈活化的时间点上没有发现 CREB/ATF 蛋白质被活化。因而, 这些数据没有提供 NFkB 蛋白质实际上结合 CpG 核酸的证据, 而是说明了 CpG 活性在某种方式上需要该蛋白质。可能的是, CREB/ATF 或相关的蛋白质与 NFkB 蛋白质或其它的蛋白质以某种方式相互作用, 这样可以解释 CREB 蛋白质的结合基元与优化的 CpG 基元的显著的相似性。还可能的是寡核苷酸结合 CREB/ATF 或相关的蛋白质, 并导致 NFkB 的活化。

另外, 很可能的是, CpG 核酸可以与 TRAF 蛋白质中的一种相结合, 该蛋白质与 CD40 的胞质区结合, 并在 CD40 被交联时调节 NFkB 活性。这样的 TRAF 蛋白质的例子包括 TRAF-2 和 TRAF-5。

制备免疫刺激性核酸的方法

在本发明中，核酸可以使用本领域熟知的任何数目的方法全程合成。例如，可以采用 b-氰乙基氨基磷酸酯法[S.L. Beaucage and M.H. Caruthers, (1986) Tet. Let. 22:1859]，核苷 H-磷酸酯法[Caregg et al., (1986) Tet. Let. 27:4051-4054; Froehler et al., (1986) Nucl. Acid. Res. 14:5399-5407; Caregg et al., (1986) Tet. Let. 27:4055-4058, Gaffney et al., (1988) Tet. Let. 29:2619-2622]。这些化学合成可以用市售的各种自动化寡核苷酸合成仪还完成。另外，也可以用已知的方法从已经存在的核酸序列（例如，基因组 DNA 或 cDNA）中制备出来，例如，那些利用限制性酶，核酸外切酶和核酸内切酶的技术。

为了用于体内，核酸优选具有相当的抗降解性（例如，对核酸外切酶或核酸内切酶的降解有抗性的）核酸。次级结构，例如茎-环结构，可以稳定核酸来抵抗降解。另外，核酸的稳定化可以通过磷酸酯主链修饰来实现。优选的稳定核酸具有至少部分的硫代磷酸酯修饰的主链。硫代磷酸酯可以用自动化技术由氨基磷酸酯或 H-磷酸酯来化学合成。芳基的和酰基的磷酸酯可以通过如美国专利第 4,469,863 号所描述的方法来制备，并且，芳基磷酸三酯（其中的带电的氧基团被美国专利第 5,023,243 号和欧洲专利第 092,574 号所述的方法所烷基化）可以用市售的制剂以自动化固相合成法来制备。进行其它的 DNA 主链修饰和替换的方法已经被描述了[Uhlmann, E. and Peyman, A. (1990) Chem. Rev. 90:544; Goodchild, J. (1990) Bioconjugate Chem. 1:165]。带有 CpG 基元的 2'-O-甲基核酸还引起免疫活化，环氧修饰的 CpG 核酸也如此。事实上，还没有发现任何主链的修饰可以完全消除 CpG 效应，虽然用 5-甲基的 C 取代 C 可以极大地削弱之。

为了体内给药，核酸可以结合有能与靶细胞 [例如，B 细胞，单核细胞和天然杀死细胞 (NK)] 表面更高度亲和的分子和/或提高靶细胞的细胞吸收而形成“核酸释放复合体”的分子。核酸可以是离子性地或共价地与适宜的分子通过本领域所熟知的技术连接起来。可以使用的有各种的偶联和交联制剂，例如，蛋白质 A，碳二亚胺，N-琥珀酰基-3-(2-吡啶二硫基) 丙酸盐 (SPDP)。核酸还可以用熟知的技术包埋在脂质体或病毒体中。

免疫刺激性核酸分子的医疗应用

根据免疫刺激性核酸分子的性质，可以将含有至少一个未甲基化 CpG 二核苷酸的核酸分子给对象体内给药来治疗“免疫系统缺陷”疾病。另外，含有至少一个未甲基化 CpG 二核苷酸的核酸分子可以同来自免疫系统缺陷疾病的患者的淋巴细胞 (例如，B 细胞，单核细胞或 NK 细胞) 在体外接触来活化这些淋巴细胞，然后再将这些淋巴细胞送回到对象体内。

正如本文所描述的，作为对含有未甲基化 CpG 的核酸分子的应答，有更多数量的脾细胞分泌了 IL-6、IL-12、IFN- γ 、IFN- α 、IFN- β 、IL-1、IL-3、IL-10、TNF- α 、TNF- β 、GM-CSF、RANTES、甚至还有其它的物质。在 B 细胞、CD4⁺T 细胞和单核细胞中发现了 IL-6 表达的提高。

免疫刺激性核酸分子还可以同疫苗一起提供给对象来促进其免疫系统并从而产生对疫苗的更好的应答。优选的是，将免疫刺激性核酸分子与疫苗一起或稍微提前一点提供给对象。常规的附剂可以同疫苗一起使用，其一般包括抗原，常规的附剂可以通过提高抗原的吸收来进一步改善免疫疫苗的效果。

如果疫苗是 DNA 疫苗，则至少有两个成分决定其效率。首先，由疫苗编码的抗原决定免疫应答的特异性。其次，如果质粒的主链含有 CpG 基元，其就作为疫苗的附剂起作用。因此，CpG DNA 起着有效的“危险信号”的作用，并引起免疫系统对该区域内的新抗原产生强烈的反应。这种作用方式似乎是 CpG DNA 对树枝状细胞和其它的“专业”抗原提呈细胞的局部刺激性效应以及对 B 细胞的共同刺激效应的结果。

免疫刺激性寡核苷酸和含有未甲基化 CpG 的疫苗直接活化淋巴细胞并共同刺激抗原特异性应答，这是与常规的附剂（例如，铝沉淀物）完全不同的，常规附剂在单独注射时被认为是通过吸附抗原来起作用并从而使其对免疫细胞更为有效。进而言之，常规附剂只对某些抗原有效，仅仅诱导抗体（体液）免疫应答（Th2），并且在诱导细胞免疫应答（Th1）方面很差。对于许多的致病物，体液应答对防御仅有很小的作用，有时甚至是有害的。

此外，免疫刺激性寡核苷酸可以在化疗或免疫治疗之前、之中或之后给药，来提高肿瘤细胞对以后的化疗或免疫治疗的应答，或通过诱导恢复性细胞因子如 GM-CSF 来加速骨髓的恢复。CpG 核酸还提高天然杀死细胞的溶胞活性和依赖抗体的细胞毒性（ADCC）。对 NK 活性和 ADCC 的诱导可以独自或与其它的治疗一起在癌症的免疫治疗中带来有益效果。

所述的免疫刺激性核酸分子的另外一种应用是对过敏的去敏感化治疗，过敏一般由对无害的过敏原产生 IgE 抗体所导致的。由未甲基化 CpG 核酸诱导的细胞因子主要是属于“Th1”类型的，其最主要的特点是细胞免疫应答并与 IL-12 和 IFN- γ 有关。其它的主要类型的免疫应答被称为“Th2”免疫应答，其更多地

相关于抗体免疫应答并产生 IL-4、IL-5 和 IL-10。一般来讲，所有的过敏疾病都表现为 Th2 类型免疫应答介导的和 Th1 免疫应答介导的自身免疫疾病。根据免疫刺激性核酸分子将对象的免疫应答从 Th2（其与 IgE 抗体的产生和过敏有关）转换为 Th1 应答（其对抵抗过敏反应）的能力，可以单独向对象提供有效剂量的免疫刺激性核酸或与免疫原一起提供来治疗或防止过敏。

含有未甲基化 CpG 基元的核酸还具有在治疗气喘中的重要应用。Th2 细胞因子，特别是 IL-4 和 IL-5，都是在气喘病人的呼吸道中呈增高量的。这些细胞因子促进了气喘发炎反应的重要的方面，包括 IgE 同种型之间的变换，嗜伊红粒细胞趋化性和活化，以及掩饰细胞的生长等。Th1 细胞因子，特别是 IFN- γ 和 IL-12，可以对 Th2 克隆的形成和 Th2 细胞因子的生产进行抑制。

如同在下面的实施例 12 中所具体描述的那样，含有未甲基化 CpG 基元的寡核苷酸（即，TCCATGACCGTTCCTGACCGTT，SEQ ID NO：11），但不是对照寡核苷酸（TCCATGAGCTTCCTGAGTCT SEQ ID NO: 11，），可以在小鼠气喘模型中防止发炎细胞浸入和嗜伊红粒细胞化。进而言之，对嗜伊红粒细胞性发炎的抑制是相关于对 Th2 应答的抑制和对 Th1 应答的诱导的。

在治疗应用中，有效剂量的适宜的免疫刺激性核酸分子自己或是其与释放复合体的制剂可以用任何能够让寡核苷酸被适宜的靶细胞（例如，B 细胞和单核细胞）吸收的方式向对象给药。优选的服用方式为口服和经皮服用（如贴片）。其它的给药的途径包括注射（皮下、静脉内、肠胃外、腹膜内、胸内，等）。注射可以一次给足，也可以连续渗透。

核酸自己或其与释放复合体一起，都可以与药理学可接受的载体一同给药。在本文中，术语“药理学可接受的载体”指的是那些能够同核酸或核酸释放复合体一起给药并使核酸可以发挥其有关功能的物质。这样的载体的例子包括溶液、溶剂、分散介质、延缓制剂、乳液，等等。根据药理学活性物质来选用这样的介质是本领域熟知的。其它的适合用于核酸的常规载体也都在本发明所包括的范围之内。

术语核酸分子的“有效剂量”指的是对实现所需要的生物学效果为必须的或充足的剂量。例如，对含有至少一个未甲基化 CpG 的核酸用于治疗免疫系统缺陷来讲，该剂量是对消除肿瘤、癌症、或细菌的、病毒的、或真菌感染为必须的剂量。对于用作疫苗附剂来讲，有效剂量是可以促进对象对疫苗的免疫应答的剂量。对于治疗气喘的“有效剂量”则是讲与气喘相关的 Th2 类型的免疫应答转变为 Th1 类型的应答所需要的剂量。对于任何具体的应用的有效剂量，可以根据诸多因素来决定，例如，需要治疗的疾病或状态，具体使用的核酸（例如，含有的未甲基化 CpG 基元的数目或它们在核酸中的位置），治疗对象的身高和体重，以及疾病的程度等。本领域的技术人员不需要进行非必须的实验就可以确定具体的寡核苷酸的实际用量。

本发明将由下面的实施例中给予更为细致的描述，这些实施例不从任何角度限制本发明。在本申请全文中所提到的文献（包括文献材料，授权的专利，公开的专利申请，和共悬未决的专利申请）都通过在此引述而合并于本文。

实施例

实施例 1: ODN 对 B 细胞总 RNA 合成以及细胞循环的效应

从不带有特异性病原体的 6-12 周龄的 DBA/2 或 BXS B 小鼠（饲养在 Iowa 大学动物实验中心，没有发现明显的品系差异）的脾中获得 B 细胞，用抗-Thy-1.2 消除 T 细胞，对淋巴细胞 M 离心（Cedarlane Laboratories, Hornby, Ontario, Canada）（此后称为“B 细胞”）。B 细胞中含有少于 1% 的 CD4⁺或 CD8⁺细胞。8 x 10⁴ 个 B 细胞分三份加入 96 孔微滴盘中，每孔中含有 100 μ l 的 RPMI，其中含有 10% 的 FBS（在 65°C 下热灭活 30 分钟），50 μ M 的 2-巯基乙醇，100 U/ml 的青霉素，100 μ g/ml 链霉素，以及 2 mM 的 L-谷氨酸。在进行 37°C 下的 20 小时培养的开始时刻，加入 20 μ M 的 ODN，给细胞加以 1 μ Ci 的 ³H 尿苷，4 小时后收获细胞。将全脾细胞用 20 μ M 的 ODN 培养 48 小时后，对分泌 Ig 的 B 细胞用 ELISA 点检测法计数。表 1 给出了有关的结果，数据代表与未用 ODN 培养的细胞比较得到的刺激指数。³H 胸苷吸收检测显示了相似的结果，但是有从降解的 ODN 释放的胸苷造成的非特异性抑制 [Matson. S and A.M. Krieg (1992) Nonspecific suppression of ³H-thymidine incorporation by control oligonucleotides. Antisense Research and Development 2:325]。

实施例 2: ODN 对 B 细胞生产 IgM 的效应

从新杀死的小鼠获得的脾制备单个细胞的悬浮液，用抗-Thy1，抗-CD4，和抗-CD8 和补体处理，具体方法见 Leibson 等人的文献 [Leibson et al., J. Exp. Med. 154:1681 (1981)]。按照 DeFranco 等人的程序 [DeFranco et al., J. Exp. Med. 155:1523 (1982)] 从不连续 Percoll 梯度的 63-70% 的带中分离休眠的 B 细胞

(T 细胞污染 < 0.2%)。这些都按照上述用 30 μ M 的 ODN 或 20 μ g/ml 的 LPS 培养 48 小时。正在分泌 IgM 的 B 细胞数在此时为最大, 有 ELISA 点检测法确定[Klinman, D.M. et al., J. Immunol. 144:506 (1990)]。在这个检测中, B 细胞在抗-Ig 涂布的微滴盘上培养 6 小时。它们所产生的 Ig (> 99% 的 IgM) 用磷酸酶-标记的抗-Ig 检测[Southern Biotechnology Associated, Birmingham, AL]。每个 B 细胞产生的抗体用加入 BCIP (Sigma Chemical Co., St. Louis MO) 来观察, 在有磷酸酶存在时, 形成不溶性兰色沉淀。对细胞进行稀释后, 产生了 20-40 点孔的结果, 用其来确定样品中分泌抗体的 B 细胞的总数。所有的检测都进行三次(数据给出在表 1)。在有些实验中, 培养物上清液被用 ELISA 来检测 IgM, 显示了应答 CpG-ODN 的相似结果。

实施例 3: 细菌 DNA 对 B 细胞的刺激

对 DBA/2 B 细胞进行培养, 不加入 DNA, 或加入 50 μ g/ml 的 a) *Micrococcus lysodeikticus*; b) NZB/N 小鼠脾; c) NFS/N 小鼠脾基因组 DNA, 培养 48 小时后, 加入 ^{3} H 胸苷, 4 小时后收获细胞。对双份的 DNA 样品用 DNASE I 在 37°C 下酶解 30 分钟, 然后加入细胞培养物。用 ELISA-点检测法确定了在 48 小时的时候, 大肠杆菌 DNA 诱导分泌 IgM 的 B 细胞数目提高了 8.8 倍。

对 DBA/2 的 B 细胞进行培养, 不加入任何物质, 或加入 50 μ g/ml 的 LPS, 或 20 μ M 的 ODN 1、1a、4、或 4a。培养细胞并在第 4、8、24 和 48 小时收集细胞。对 BXSb 细胞按照实施例 1 所述进行培养, 分别加入 5、10、20、40、80 μ M 的 ODN 1、1a、4、4a 或 LPS。在这个实验中, 没加入 ODN 的小孔中为 3833 cpm。每个实验都进行至少三次, 得到了相似的结果。重复的三个小孔的标准偏差小于 5%。

实施例 4: ODN 对天然杀死细胞 (NK) 活性的效应

10 x 10⁶ 个 C57BL/6 脾细胞培养在 2 ml 的 RPMI 中 (按照实施例 1 进行补充), 加入或不加入 40 μM 的 CpG 或非-CpG ODN, 培养 48 小时。洗过细胞后, 用于在短期 ⁵¹Cr 释放检测中作为效应细胞, 检测中使用了 YAC-1 和 2C11 这两种 NK 敏感靶细胞系 [Ballas, Z. K. et al. (1993) J. Immunol. 150:17]。加入的效应细胞浓度不同, 直至 V 底微滴盘中达到每 0.2 ml 含有 10⁴ 个 ⁵¹Cr 标记的靶细胞, 在 37°C 温度于 5% 的 CO₂ 下培养 4 小时。然后离心, 对上清液的等份试样计数放射活性。特异性溶胞的百分数的计算是, 在有效应细胞存在时的 ⁵¹Cr 释放减去靶细胞自己培养时的 ⁵¹Cr 释放, 与用 2% 乙酸溶胞后的总释放量减去细胞单独培养时的 ⁵¹Cr cpm 释放相比。

实施例 5: 对 CpG 硫代磷酸酯 ODN 的体外研究

对小鼠称重, 腹腔内注射 0.25 ml 的无菌 PBS 或给定剂量的硫代磷酸酯 ODN 溶于 PBS。24 小时后, 收获脾细胞, 洗过之后染色, 进行流式细胞仪测定, 使用藻红蛋白偶连 6B2, 来控制 B 细胞, 以及生物素偶连的抗 Ly-6A/E 或抗-Ia^d (Pharmingen, San Diego, CA) 或抗-Bla-1 [Hardy, R.R. et al., J. Exp. Med. 159:1169 (1984)]。每种条件都实验了两只小鼠, 每只小鼠单独进行分析。

实施例 6: 硫代磷酸酯 ODN 对 B 细胞刺激的效价

用硫代磷酸酯 ODN 培养 B 细胞, ODN 带有对照 ODN 1a 的序列, 或 CpG ODN 1d 的序列, 或是带有 3Dd 的序列, 20 小时后, 加入 ³H 尿苷, 或 44 小时后加入 ³H 胸苷, 然后收获细胞并确定 cpm。

实施例 7: 挽救 B 细胞于编程性死亡

WEHI-231 细胞 (5×10^4 个/孔) 于 37°C 下培养 1 小时, 存在或不存在 LPS、对照 ODN 1a、CpG ODN 1d、3Dd, 然后加入抗-IgM ($1 \mu\text{g/ml}$)。细胞继续培养 20 小时, 加入 $2 \mu\text{Ci/孔}$ 的 ^3H 胸苷 4 小时。在这个实验中, 没有 ODN 的细胞或有抗-IgM 的细胞得到了 $90.4 \times 10^3 \text{ cpm}$ 的 ^3H 胸苷吸收。表 1 中给出的磷酸二酯 ODN 也给予了相似的保护, 虽然由于 ODN 的降解有一些非特异性抑制。每个实验都进行至少 3 次, 得到相似结果。

实施例 8: 体内诱导小鼠 IL-6

DBA/2 雌性小鼠 (2 月龄) 腹膜内注射 $500 \mu\text{g}$ CpG 或对照硫代磷酸酯 ODN。在注射后的不同时间点对小鼠采血。每个时间点研究 2 只小鼠。用 Elisa 测定 IL-6, IL-6 的浓度用与标准曲线比较来计算, 标准曲线用重组的 IL-6 获得。该检测的敏感度为 10 pg/ml 。8 小时后无法检测。

实施例 9: 系统性诱导小鼠 IL-6 转录

小鼠和细胞系。DBA/2, BALB/c, 和 C3H/HeJ 小鼠, 5-10 周龄, 用作淋巴细胞来源。所有的小鼠都来自于 The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME), 并在 Iowa 大学的动物饲养中心的无特异性病原体条件下培育和饲养。小鼠 B 细胞系 CH12.LX 由 Bishop 博士 (Iowa 大学) 慷慨提供。

制备细胞.对小鼠折颈处死。从小鼠的脾无菌制备单个细胞的悬浮液。使用抗-Thy-1.2 和补体制备消除了 T 细胞的小鼠脾细胞, 并对淋巴细胞 M (Cedarlane Laboratories, Hornby, Ontario, Canada) 离心, 具体如前所述[Krieg, A. M. et al., (1989) A role

for endogenous retroviral sequences in the regulation of lymphocyte activation. J. Immunol. 143:2448].

ODN 和 DNA. 磷酸二酯寡核苷酸 (O-ODN) 和主链修饰的硫代磷酸酯 ODN (S-ODN) 得自于 Iowa 大学 DNA 中心机构或 Operon Technologies (Alameda, CA)。大肠杆菌 DNA (菌系 B) 和小牛胸腺 DNA 购自于 Sigma 公司 (St. Louis, MO)。所有的 DNA 和 ODN 都被纯化, 使用的是酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1) 和/或乙醇沉淀。在使用前, 对大肠杆菌 DNA 和小牛胸腺 DNA 煮沸 10 分钟, 冰冷却 5 分钟, 使它们成为单链。对于某些实验, 大肠杆菌 DNA 和小牛胸腺 DNA 都用 DNase I (2U/ μ g DNA) 酶解, 37°C 下 2 小时, 在 1 X SSC 中, 有 5 mM $MgCl_2$ 存在。为了对大肠杆菌 DNA 中的 CpG 二核苷酸内的胞嘧啶甲基化, 将大肠杆菌 DNA 用 C: G 甲基酶 (M. SssI; 2U/ μ g 的 DNA) 于 NE 缓冲液内处理, 补充以 160 μ M 的 S-腺苷甲硫氨酸, 37°C 下过夜培养。对甲基化的 DNA 的纯化按照上述进行。甲基化的效率有 Hpa II 酶解, 凝胶电泳分析来确定。所有的酶都购自于 New England Biolabs (Beverly, MA)。在 ODN 中的 LPS 水平低于 12.5 ng/ml, 大肠杆菌 DNA 和小牛胸腺 DNA 中含有少于 2.5 ng 的 LPS/mg 的 DNA, 由鲎检测确定。

细胞培养物. 所有的细胞都在润湿箱中的 5% 的 CO_2 内以 37°C 培养, 加入 RPMI-1640 并补充以 10% (v/v) 的热灭活小牛血清 (FCS), 1.5 mM L-谷氨酸 (50 μ g/ml), CpG 或非 CpG 磷酸二酯 ODN (O-ODN) (20 μ M), 硫代磷酸酯 ODN (S-ODN) (0.5 μ M), 或大肠杆菌 DNA (50 μ g/ml) 或小牛胸腺 DNA (50 μ g/ml), 37°C 下 24 小时 (对 IL-6 生产), 或 5 天 (对 IgM 生产)。刺激物浓度的选择按照以前的研究和滴定来决定。在某些情况下, 细胞用 CpG O-ODN 处理, 加入不同浓度 (1-10 μ g/ml)

的中性的大鼠 IgG1 抗小鼠 IL-6 抗体（杂交瘤 MP5-20F3）或对照大鼠 IgG1 单克隆抗大肠杆菌 β -半乳糖苷酶（杂交瘤 GL113; ATCC, Rockville, MD）(20)，5 天。在培养结束时，对培养物上清液用 ELISA 按照下述进行分析。

体内诱导 IL-6 和 IgM. BALB/c 小鼠静脉注射 PBS，小牛胸腺 DNA(200 μ g/100 μ l PBS/小鼠)，大肠杆菌 DNA(200 μ g/100 μ l PBS/小鼠)，或 CpG 或非 CpG S-ODN (200 μ g/100 μ l PBS/小鼠)。小鼠 (2 只/每组) 在不同的时间点后眶采血并折颈处死。取出肝，脾，胸腺，骨髓，从这些器官中用 RANzol 根据厂商的说明 (Tel-Test, Friendswood, TX) 制备 RNA。

ELISA. 平底 Immun 1 盘 (Dynatech Laboratories, Inc., Chantilly, VA) 被涂布，使用的是 100 μ l/孔抗-小鼠 IL-6 单克隆抗体(MP5-20F3) (2 μ g/ml)，或抗小鼠 IgM μ -链特异性(5 μ g/ml; Sigma, St. Louis, MO) 在碳酸酯-碳酸氢酯，pH9.6 缓冲液 (15 mM Na_2CO_3 , 35 mM NaHCO_3)，4°C 过夜。然后，用 TPBS (0.5 mM $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH_2PO_4 , 0.14 M NaCl, 6.6 mM K_2HPO_4 , 0.5% Tween 20) 洗该盘，用 10%FCS 在 TPBS 中室温下封闭该盘 2 小时，然后再次洗该盘。培养物上清、小鼠血清、重组的小鼠 IL-6 (Pharmingen, San Diego, CA) 或纯化的小鼠 IgM (Calbiochem, San Diego, CA) 都用 10%FCS 进行适宜的稀释，加入到小孔中，三份重复，室温下培育 6 小时。洗该盘，生物素化大鼠抗-小鼠 IL-6 单克隆抗体 (MP5-32C11, Pharmingen, San Diego, CA) (1 μ g/ml 在 10%FCS 中) 或生物素化的抗-小鼠 Ig (Sigma, St. Louis, MO) 以 100 μ l/孔的剂量加入到各个小孔中，室温下培育 45 分钟，然后用 TPBS 洗。辣根过氧化物酶 (HRP) 共轭的抗生物素蛋白 (Bio-rad Laboratories, Hercules, CA) 以 1:4000 的比例在 10%FCS (100 μ l/孔) 中稀释，加入到小孔中，

室温下培育 30 分钟。洗盘后，加入苯基二胺二盐酸化物（OPD, Sigma, St. Louis MO），0.05 M 磷酸盐-柠檬酸盐缓冲液，pH 5.0，30 分钟。加入 0.67 N 的 H_2SP_4 终止反应，用微滴盘读数仪（Cambridge Technology, Inc., Watertown, MA）在 490-600 nm 处读盘。结果在图 1 和 2 中给出。

RT-PCR. 有义引物、反义引物、以及 IL-6 的内部寡核苷酸探针都用公开的序列来合成[Montgomery, R.A. and M.S. Dallman (1991), Analysis of cytokine gene expression during fetal thymic ontogeny using the polymerase chain reaction (J. Immunol.) 147:554]。cDNA 合成以及 IL-6 的 PCR 都基本按照 Montgomery 和 Dallman 所述的方法进行[Montgomery, R.A. and M.S. Dallman (1991), Analysis of cytokine gene expression during fetal thymic ontogeny using the polymerase chain reaction (J. Immunol.) 147:554]，采用了 RT-PCR 试剂，该试剂来自 Perkin-Elmer 公司（Hayward, CA）。扩增 30 个循环后分析样品，采用了凝胶电泳和非印迹（unblot）分析方法[Stoye, J.P. et al., (1991) DNA hybridization in dried gels with fragmented probes: an improvement over blotting techniques, Techniques 3:123]。简言之，凝胶在变性缓冲液（0.05 M NaOH, 1.5 M NaCl）中于室温下杂化 30 分钟，然后在复性缓冲液（1.5 M NaCl, 1 M Tris, pH 8）中培育 30 分钟，再用双蒸水洗。干燥凝胶后，在 47°C 预杂化 2 小时，杂化缓冲液（5X SSPE, 0.1% SDS）含有 10 μ g/ml 的变性大麻哈鱼精子 DNA。对凝胶用 2×10^6 cpm/ml 的 IL-6 [(5'CATTTCACGATTTCCTCA3') SEQ ID NO:56] 的 γ -[^{32} P]ATP

终端标记的内部寡核苷酸在 47°C 过夜杂交, 室温下洗 4 次(2 X SSC, 0.2% SDS), 然后放射性自显影。结果在图 3 中给出。

细胞繁殖检测. DBA/2 小鼠脾 B 细胞 (5×10^4 个细胞/100 μ l/孔) 在 37°C 下用培养基、CpG 或非 CpG S-ODN (0.5 μ M) 或 O-ODN (20 μ M) 处理 24 小时。最后 4 小时, 加入 [^{3} H] 胸苷或 [^{3} H] 尿苷 (1 μ Ci/孔)。吸收的 [^{3} H] 数量用液相闪烁分析仪 (Packard Instrument Co., Downers Grove, IL) 测定。

转染和 CAT 检测. WEHI-231 细胞 (10^7 细胞) 用电穿孔加入 20 μ g 对照的或人 IL-6 启动子-CAT 构建物 (由阿肯色大学的 S. Manolagas 慷慨提供) [Pottratz, S.T. et al., (1994) 17 B-estradiol inhibits expression of human interleukin-6 promoter-reporter constructs by a receptor-dependent mechanism. J. Clin. Invest. 93:944], 250 mV 和 960 μ F。电穿孔后, 对细胞用各种浓度的 CpG 或非-CpG ODN 刺激。转染 16 小时后, 用溶液检测法来测定氯霉素酰基转移酶 (CAT) 的活性 [Seed, B. and J.Y. Sheen (1988) A single phase-extraction assay for chloramphenicol acetyl transferase activity. Gene 76:271]。结果在图 5 中给出。

实施例 10: 决定 CpG 基元对 B 细胞刺激程度的寡脱氧核苷酸修饰

采用标准程序在 Applied Biosystem 公司 (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA) 的型号为 380A、380B、或 394 的 DNA 合成仪对 ODN 进行了合成 [Beacage and Caruthers (1981) Deoxynucleoside phosphoramidites--A new class of key

intermediates for deoxypolynucleotide syntheses. Tetrahedron Letters 22, 1859-1862]. 对磷酸二酯 ODN 用标准的 β -氰乙基氨基磷酸酯化学方法合成。硫代磷酸酯连接用元素硫氧化亚磷酸连接来加入，而不是采用常规的碘氧化法。四种常见的核苷酸氨基磷酸酯购自于 Applied Biosystem 公司。所有含 ODN 的磷酸二酯和硫代磷酸酯都用浓氨水在 55°C 处理 12 小时来去保护。对 ODN 用凝胶排阻层析提纯并在使用前冷冻干燥。二硫代磷酸酯连接用脱氧核苷酸 S-(b-苯甲酰基巯基乙基)吡咯烷硫代氨基磷酸硫酯来加入[Wiesler, W.T. et al., (1993) In Methods in Molecular Biology: Protocols for Oligonucleotides and Analogs- Synthesis and Properties, Agrawal, S.(ed), Humana Press, 191-206.]. 含有 ODN 的二硫酯用浓氨水在 55°C 处理 12 小时去保护，然后用反向 HPLC 提纯。

为了合成在所需要的核苷酸间的连接位置含有甲基硫代磷酸酯或甲基磷酸酯以及磷酸二酯的 ODN，采用了两种不同的合成途径。这两种途径的主要区别是对二烷基氨基甲基核苷酸磷化氢采用了偶连试剂，而对甲基硫代磷酸酯采用了氧化试剂。为了合成它们的衍生物，对二烷基氨基甲基核苷酸磷化氢延长了其缩化时间，因为偶连动力学比较缓慢[Jager and Engels, (1984) Synthesis of deoxynucleoside methylphosphonates via a phosphoramidite approach. Tetrahedron Letters 27, 1437-1440]。在偶连步骤完成后，对甲基磷酸二酯用硫化试剂处理[5%元素硫，100 mM 的 N,N-二甲基氨基吡咯烷，存在于二硫化碳/吡啶/三乙胺中]，四个连续的 450 秒处理，每次都产生了甲基硫代磷酸酯。为了产生硫代磷酸酯连接，对甲基磷酸二酯用标准的氧化试剂处理（0.1 M 碘，在四氢呋喃/2,6-二甲基吡啶/水中）。

对硅胶结合的寡聚物用蒸馏吡啶/浓氨水为 1:1(v/v)在 4°C 下处理 4 天。上清液真空干燥后,溶解于水中,在 G50/50 的 Sephadex 柱上色谱。

在本文中, O-ODN 指的是磷酸二酯 ODN; S-ODN 指的是完全硫代磷酸酯修饰的 ODN; S-O-ODN 指的是嵌合性 ODN, 其中的中央连接是磷酸二酯, 但是 5'和 3'端的两个连接是硫代磷酸酯修饰的; S₂-O-ODN 指的是嵌合性 ODN, 其中的中央连接是磷酸二酯, 但 5'和 3'端的两个连接是二硫代磷酸酯修饰的; MP-O-ODN 是嵌合性 ODN, 其中的中央连接是磷酸二酯, 但 5'和 3'端的两个连接是甲基磷酸酯修饰的。所研究的 ODN 序列(对 CpG 二核苷酸用下划线标出)包括:

3D (5"GAGAACGCTGGACCTTAT), (SEQ ID NO. 14);
3M (5'TCCATGTCCGGTCCTGATGCT), (SEQ ID NO. 31);
5 (5'GGCGTTATTCCTGACTCGCC), (SEQ ID NO. 57);
6 (5'CCTACGTTGTATGCGCCCAGCT), (SEQ ID NO. 58)。

这些序列基本上代表了在这些研究过程上所测验过的百种 CpG 和非-CpG 的 ODN。

小鼠。 DBA/2 或 BXSB 来自于 The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME), 饲养在没有特异性病原体的条件下, 用 5-10 周龄的小鼠作淋巴细胞来源, 得到类似的结果。

细胞繁殖检测。 对于细胞繁殖检测, 将小鼠脾细胞 (5×10^4 个细胞/100 μ l/孔) 于 37°C 的 5%CO₂ 润湿箱中培养于 RPMI-1640 中, 补充以 10% (v/v) 热灭活小牛血清 (对 O-ODN 实验加热到

65°C, 对仅仅使用修饰的 ODN 的实验加热到 56°C), 1.5 μ M L-谷氨酸, 50 μ M 的 2-巯基乙醇, 100U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素, 按照给出的要求培养 24 小时或 48 小时。每个小孔中加入 1 μ Ci 的 ^{3} H 尿苷或胸苷 (按给出的要求进行), 继续培养 4 小时后, 收获细胞。对过滤物用闪烁仪计数。三份重复的小孔的标准偏差小于 5%。结果在图 6-8 中给出。

实施例 11: NK 活性的诱导

磷酸二酯 ODN 购自于 Operon Technologies 公司 (Operon Technologies, Alameda, CA)。硫代磷酸酯 ODN 购自于 Iowa 大学的 DNA 中心机构, 或购自于 Midland Certified Reagent Company (Midland, TX)。大肠杆菌 (菌系 B) DNA 和小牛胸腺 DNA 购自于 Sigma 公司 (Sigma, St. Louis, MO)。所有的 DNA 和 ODN 都用酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1) 萃取和/或乙醇沉淀来纯化。在 ODN 中的 LPS 水平低于 12.5 ng/ml, 所含有的大肠杆菌 DNA 和小牛胸腺 DNA 低于 2.5 ng LPS/mg DNA, 由鲎检测方法确定。

不含有病毒的 4-6 周龄的 DBA/2 小鼠、C57BL/6 (B6) 小鼠, 以及先天无胸腺的 BALB/C 小鼠都根据合同通过 Veterans Affairs 来自于 National Cancer Institute (Bethesda, MD)。C57BL/6 SCID 小鼠饲养在 Iowa 大学动物饲养站的 SPF 封闭饲养设施中。

人外周血单核淋巴细胞 (PBMC) 按照前述获得 [Ballas, Z.K. et al., (1990) J. Allergy Clin. Immunol. 85:453; Ballas, Z.K. and W. Rasmussen (1990) J. Immunol. 145:1039; Ballas, Z.K. and W. Rasmussen (1993) J. Immunol. 150:17]。人或小鼠的细胞按 5×10^6 个细胞/孔的数量放在 24 孔微滴盘中的小孔内, 培养于 37°C 的 5%CO₂ 的润湿箱中 [Ballas, Z.K. et al., (1990) J. Allergy Clin.

Immunol. 85:453; Ballas, Z.K. and W. Rasmussen (1990) J. Immunol. 145:1039; and Ballas, Z.K. and W. Rasmussen (1993) J. Immunol. 150:17], 仅加入培养基, 或加入 CpG 或非 CpG ODN, 剂量按给出的数据办理, 或加入大肠杆菌 DNA 或小牛胸腺 DNA (50 µg/ml) 并在 37°C 培养 24 小时。所有的培养物在 18 小时后收获, 将这些细胞作为效应细胞, 按照以前的描述用在标准的 4 小时 ⁵¹Cr-释放检测中来针对 K562 (人) 或 YAC-1 (小鼠) 靶细胞。在计算溶胞单位 (LU) 时, 1 LU 定义为 30% 特异性溶胞所需要的细胞数。如同所给出的那样, 在开始培养的时候, 加入中性的抗 IFN-β 抗体 (Lee Biomolecular, San Diego, CA), 或 IL-12 (C15.1, C15.6, C17.8, 和 C17.15; 来自于 Giorgio Trinchieri 博士, The Wistar Institute, Philadelphia, PA), 或加入它们的同型物对照, 直至浓度为 10 µg/ml。在加入抗-IL-12 时, 同时加入 4 中单克隆抗体(MAB) (或它们的同型物对照) 各 10 µg。重组的人 IL-2 的使用浓度为 100 U/ml。

实施例 12: 在小鼠气喘模型中防止发炎细胞的侵入 和嗜伊红粒细胞化的发生

6-8 周龄的 C56BL/6 小鼠 (来自 The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) 在第 0 天和第 7 天腹膜内注射 5000 血吸虫卵 (Schistosoma mansoni eggs) 进行免疫。这些血吸虫卵含有抗原 [血吸虫卵抗原 (SEA)], 其诱导 Th2 免疫应答 (例如, IgE 抗体的生产)。IgE 抗体的产生是已知的气喘的重要诱因。

然后, 对免疫的小鼠用寡核苷酸 (30 µg 在 200 µl 盐水中, 注射) 处理, 这些寡核苷酸中要么含有未甲基化 CpG 基元 (即, TCCATGACGTTCTGACGTT; SEQ ID NO. 10), 或不含这种基元 (即, 对照物, TCCATGAGCTTCTGAGTCT; SEQ ID NO.

11)。溶解性 SEA (10 μg 在 25 μl 盐水中) 在第 14 天和第 21 天鼻内滴入给药。盐水用作对照。

经过呼吸道的攻击后, 在不同的时间点处死小鼠。进行全肺灌洗, 收集呼吸道和肺泡的发炎细胞。用 ELISA 测定灌洗液的细胞因子水平。从全肺洗液中分离 RNA, 进行 Northern 分析和 RT-PCR 研究, 使用了 CsCl 梯度。对肺部组织充气并灌注 4% 仲甲醛来进行组织学检查。

图 9 显示的是, 小鼠开始被腹膜内注射了血吸虫卵, 然后吸入血吸虫卵抗原(空心环), 则在肺部有很多的发炎细胞。然而, 当小鼠在开始的时候, 与血吸虫卵一起接受了含有未甲基化 CpG 基元的核酸, 则在随后吸入血吸虫卵抗原(空心三角形)后, 肺部没有发炎细胞的增多。

图 10 显示的是, 测定肺部灌洗液中嗜伊红粒细胞所获得的相似的结果。嗜伊红粒细胞是与气喘非常相关的发炎细胞。

图 11 显示, 当小鼠在开始的时候用对照寡核苷酸与血吸虫卵一起处理, 在吸入了 SEA 后, 对随后的嗜伊红粒细胞侵入肺部没有效应。因此, 当小鼠在第 14 天和第 21 天吸入血吸虫卵后, 它们发生了肺部的急性发炎反应。然而, 在第 0 天和第 7 天开始接触抗原的时候将 CpG 寡核苷酸与血吸虫卵一起提供给小鼠的话, 则几乎彻底消除了在第 14 天吸入血吸虫卵抗原所造成的嗜伊红粒细胞的增高。

图 12 显示, 很低剂量的寡核苷酸 ($< 10 \mu\text{g}$) 就可以提供这样的保护。

图 13 显示, 所发生的发炎应答相关于肺部 Th2 细胞因子 IL-4 的水平。

图 14 显示, 提供含有未甲基化 CpG 基元的寡核苷酸可以实际上将肺部的细胞因子应答改变为 IL-12 的生产, 标明 Th1 类型的免疫应答。

图 15 显示, 提供含有未甲基化 CpG 基元的寡核苷酸还可以将肺部的细胞因子应答改变为 IFN- γ 的生产, 标明 Th1 类型的免疫应答。

实施例 13: CpG 寡核苷酸诱导人 PBMC 分泌细胞因子

对 Ficoll 的 Hypaque 用常规离心从全血中制备人 PBMC。细胞 ($5 \times 10^5/\text{ml}$) 在 96 孔微滴盘内, 与 10% 自身血清, CpG 或对照寡核苷酸 (对磷酸二酯寡核苷酸为 $24 \mu\text{g}/\text{ml}$, 对核酸酶抗性硫代磷酸酯寡核苷酸为 $6 \mu\text{g}/\text{ml}$) 一起培养, 在 TNF- α 时为 4 小时, 在其它的细胞因子时为 24 小时, 然后收获上清并用 ELISA 检测, 使用 Quantikine 试剂盒, 或使用来自 R&D Systems (pg/ml) 的试剂, 或使用来自 Biosource 的细胞因子 ELISA 试剂盒 (对 IL-12 检测)。各检测都按照厂商的说明书进行。表 6 提供了这些实验的数据, 以比没有加入寡脱氧核苷酸的小孔高出的细胞因子水平来表达。

本领域的技术人员将能够采用不超过常规的实验来认识或确定那些本发明描述的具体实施方案的众多等同物。这些等同物都是包括在本发明的权利要求书中的。

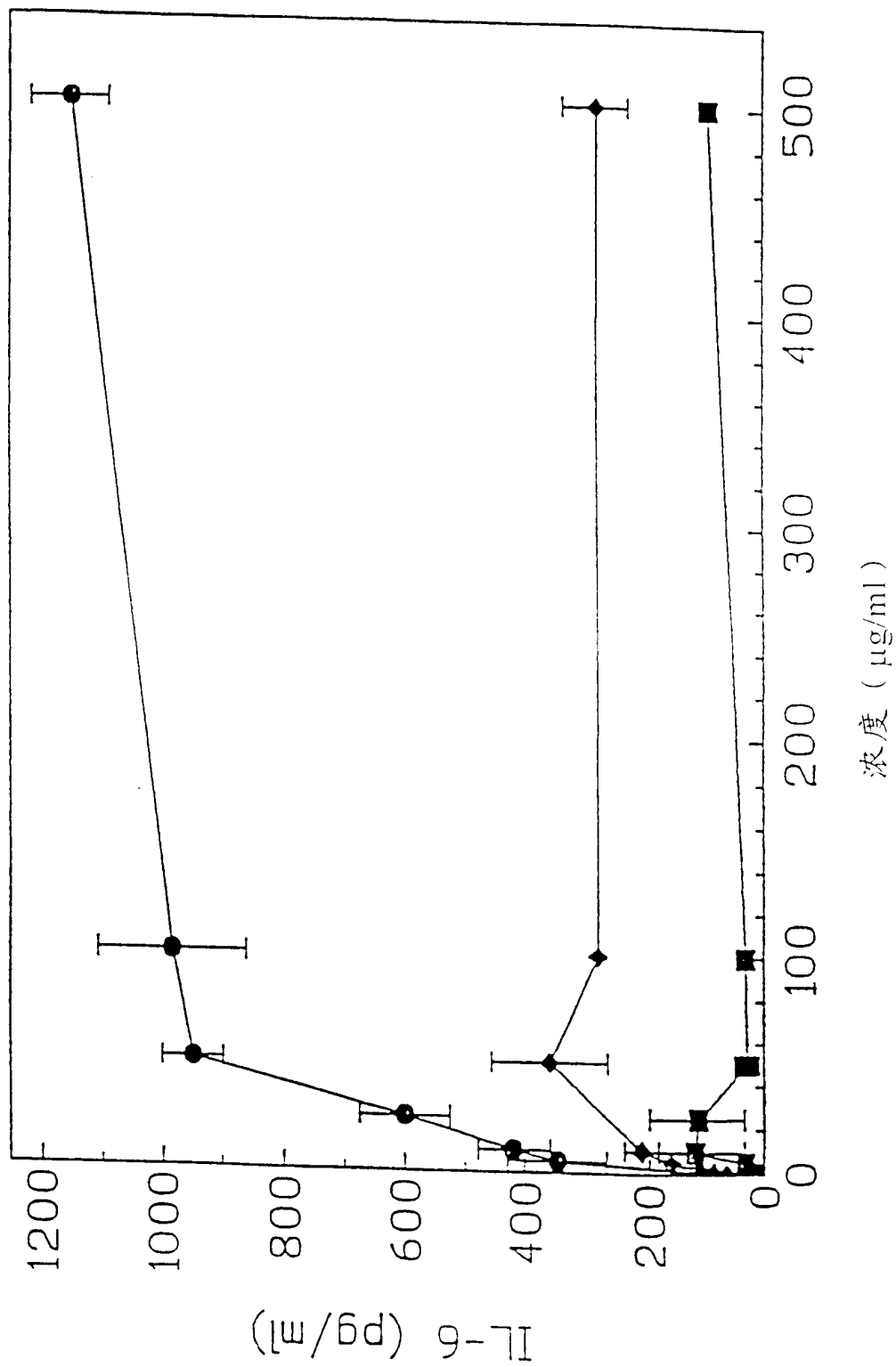


图 1A

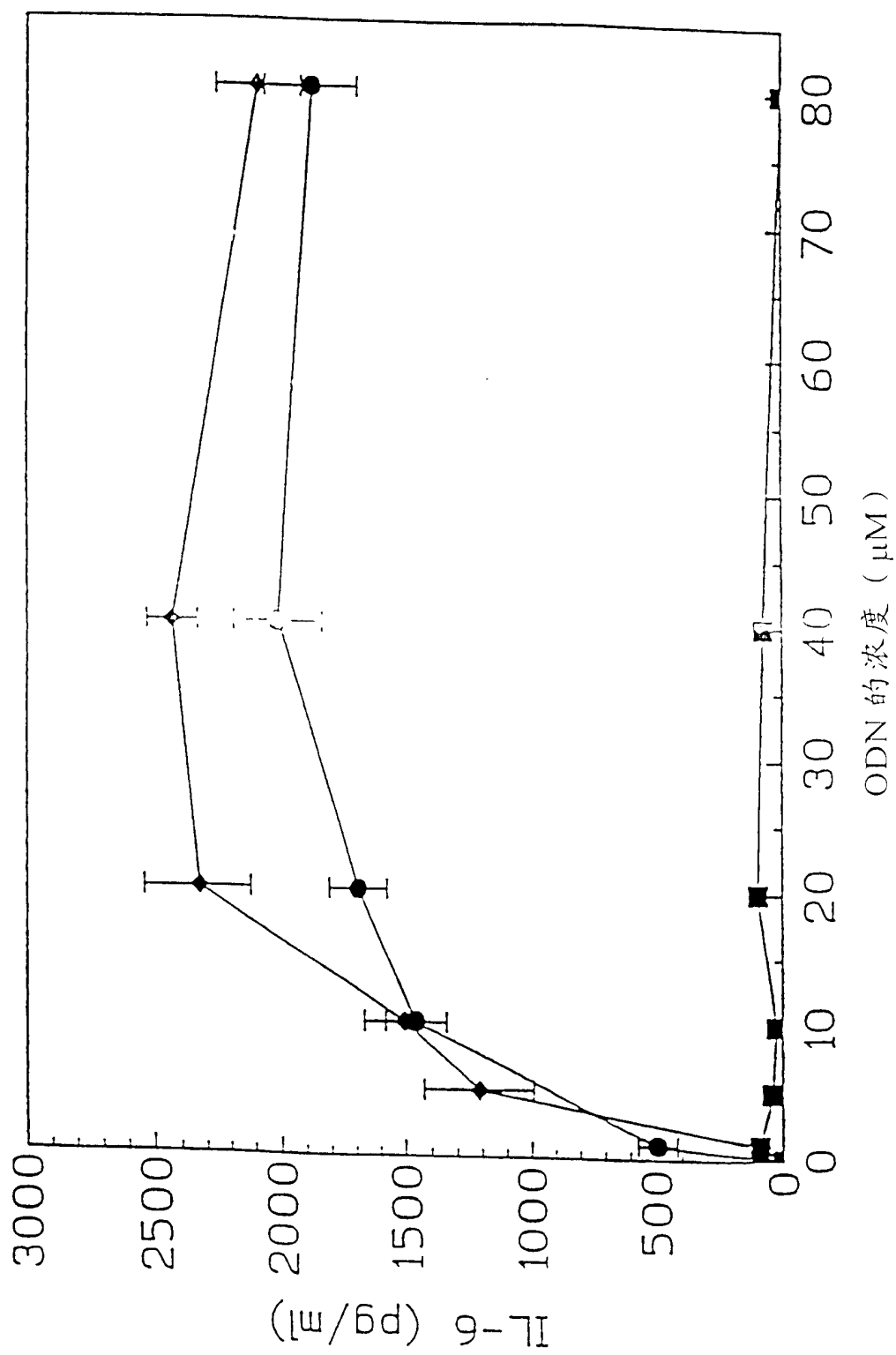


图 1B

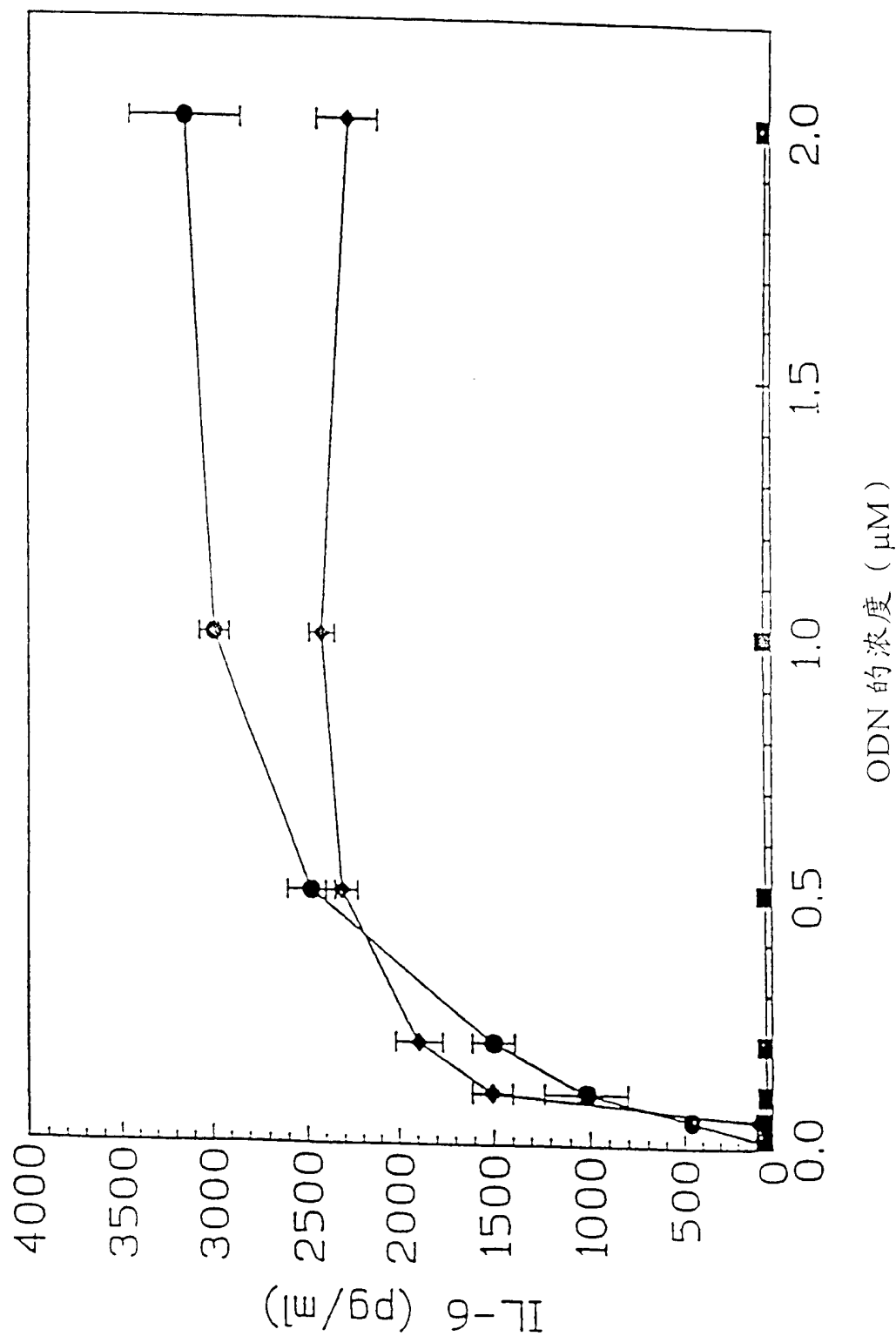


图 1C

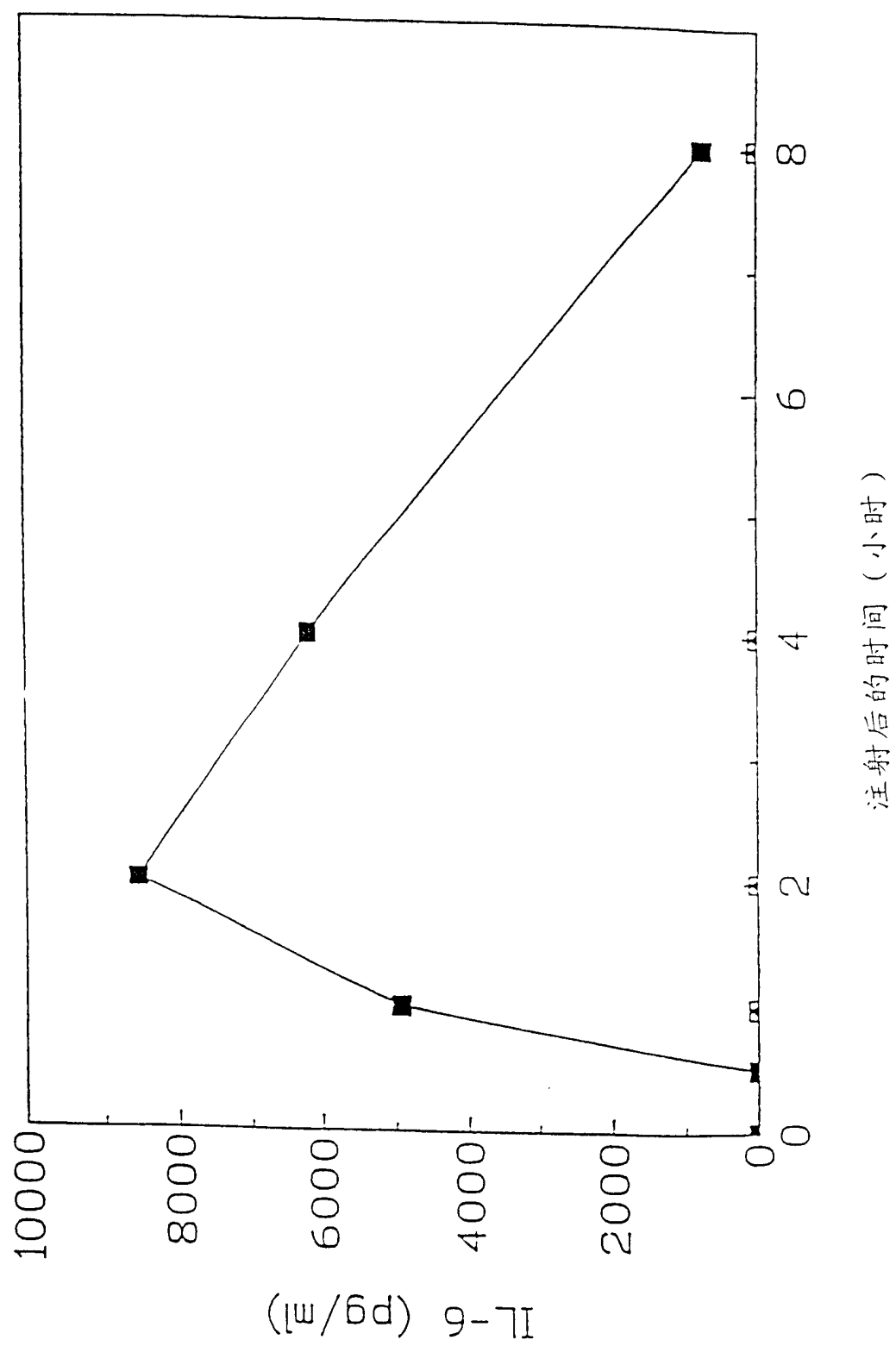


图 2

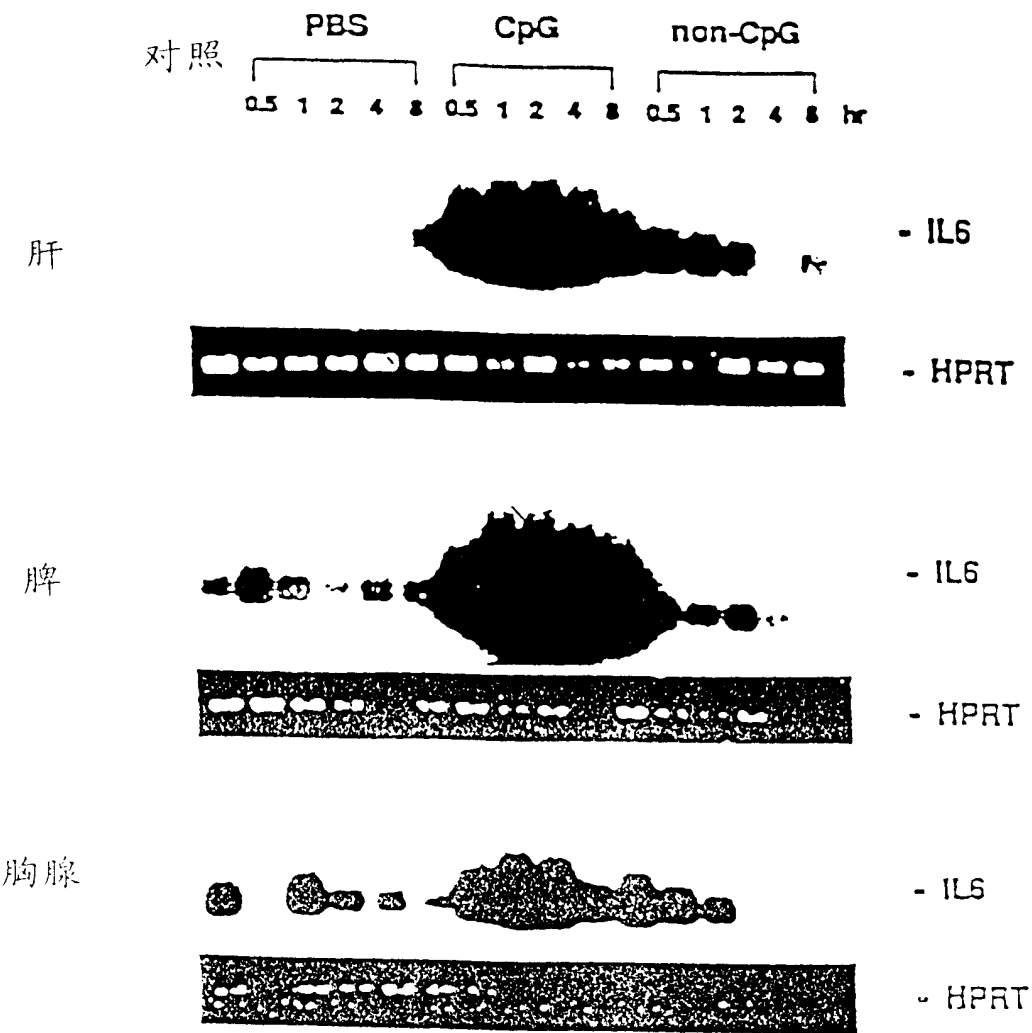


图 3

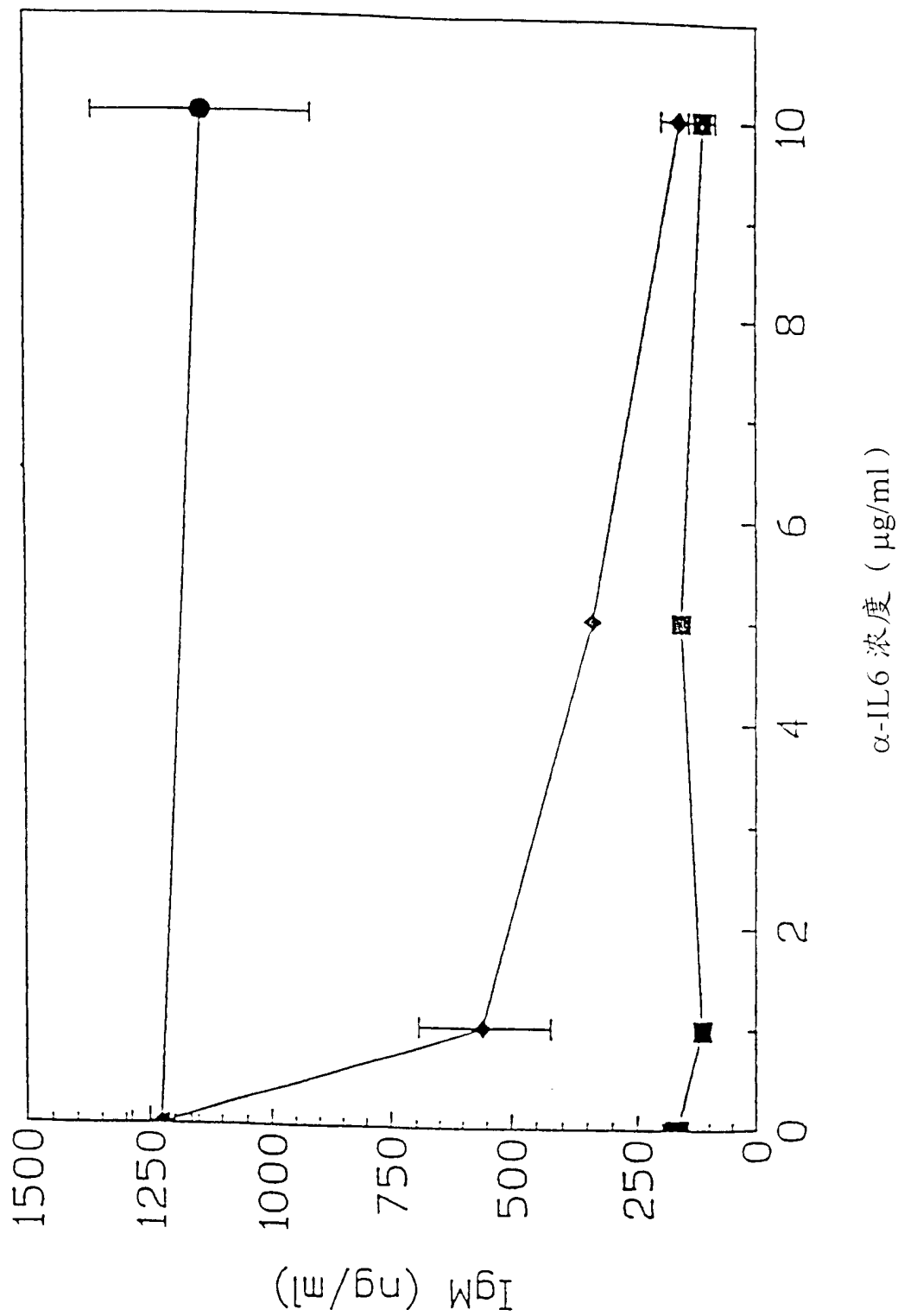


图 4 A

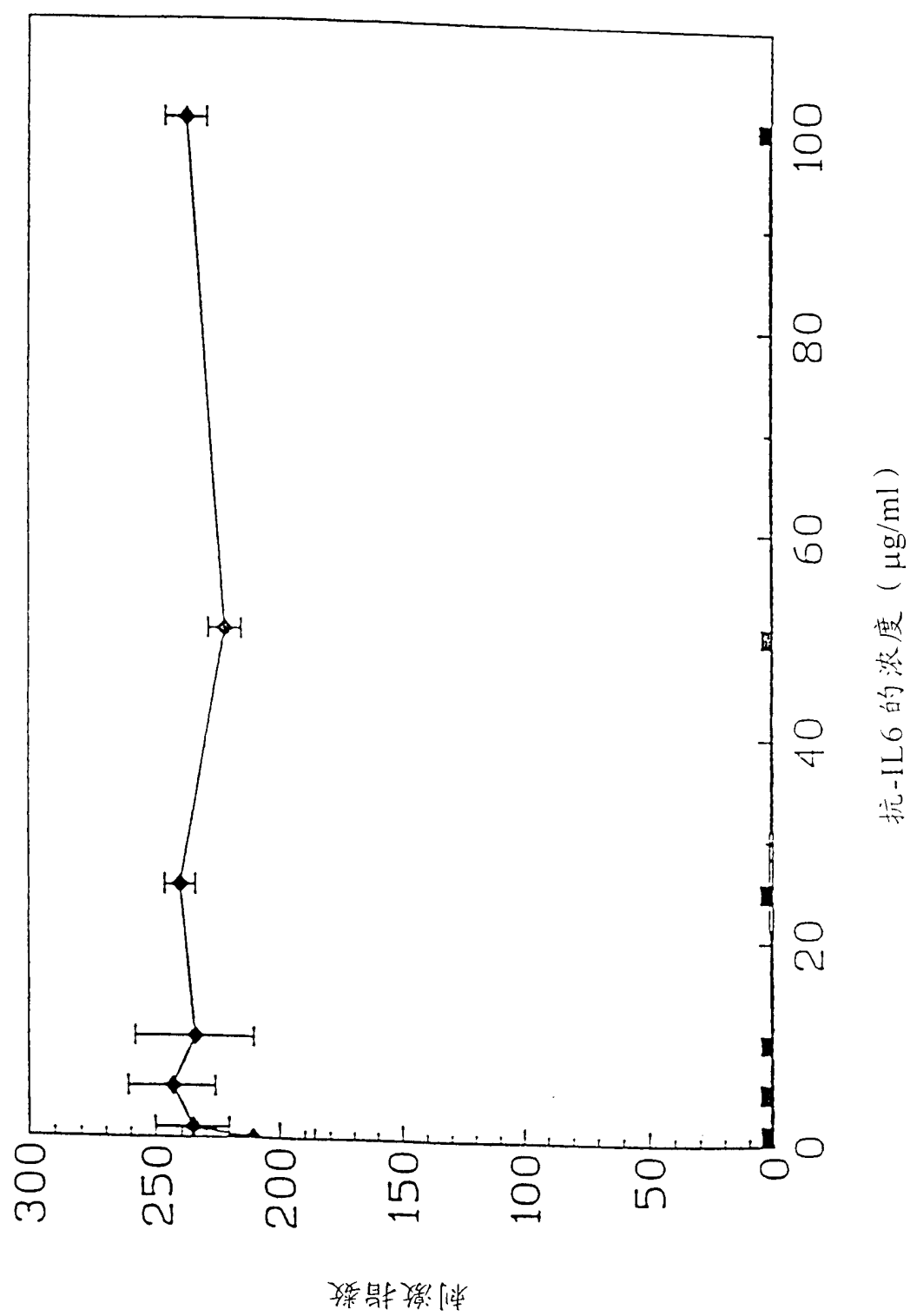


图 4B

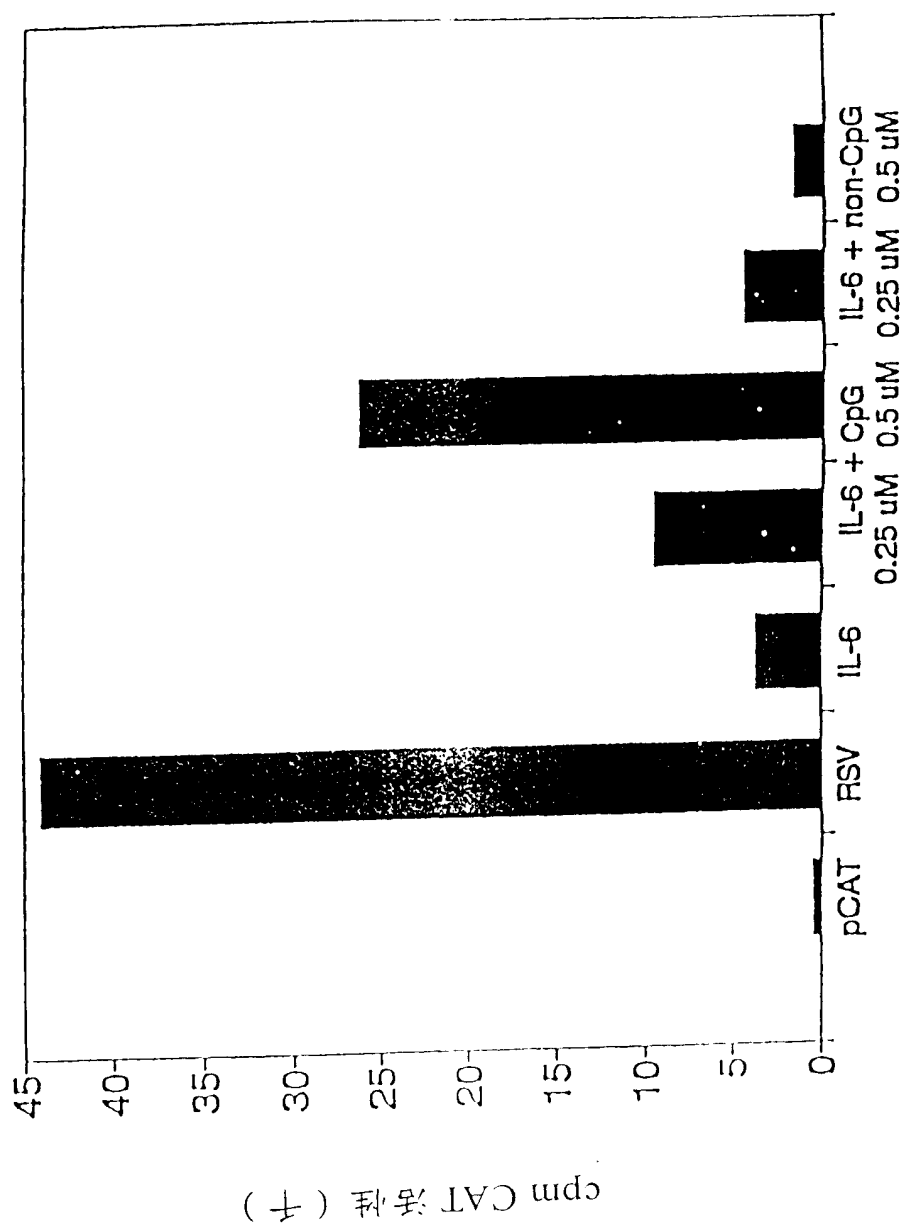


图 5

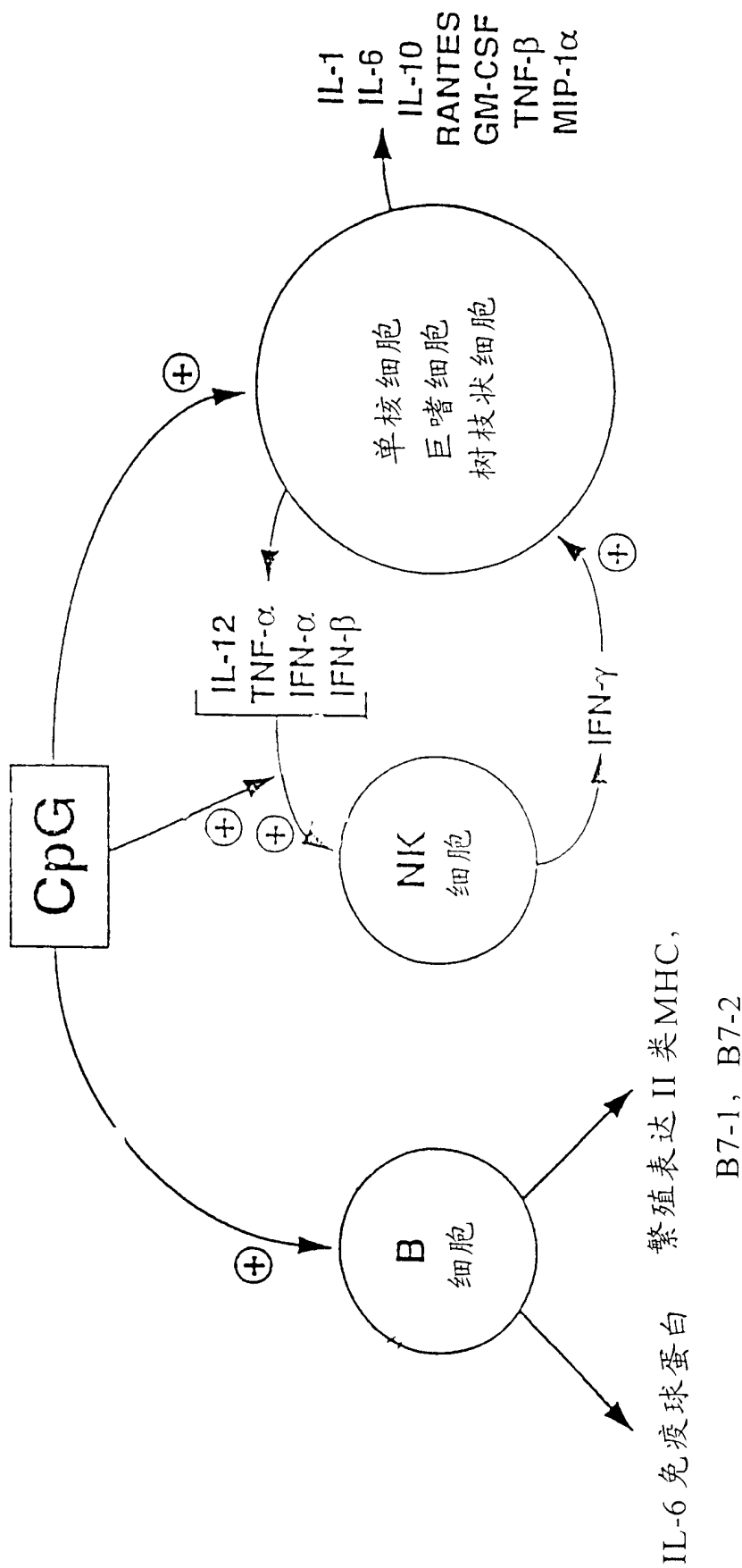


图 6

用大肠杆菌 DNA 处理的单核
细胞中 NFkB 活化的时间

处理:	0	EC		CT		LPS	
		DNA		DNA			
分钟:	0	15	30	15	30	15	30

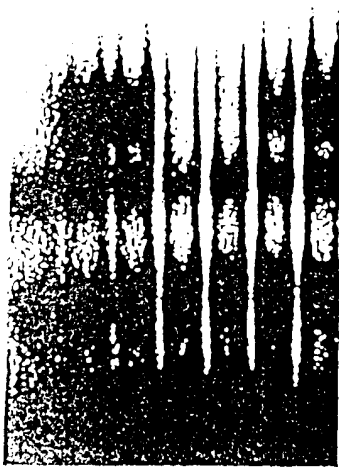


图 7

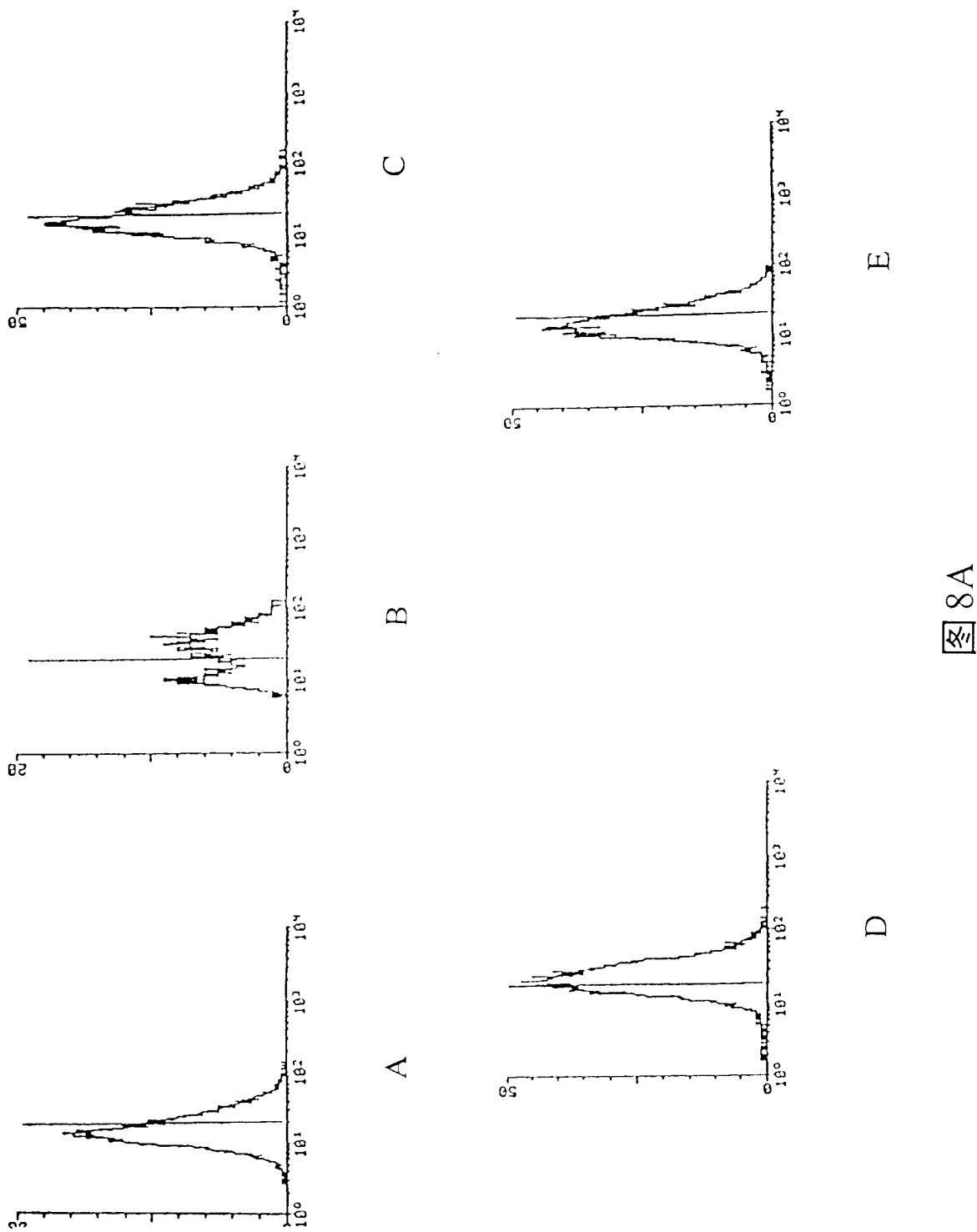


图 8A

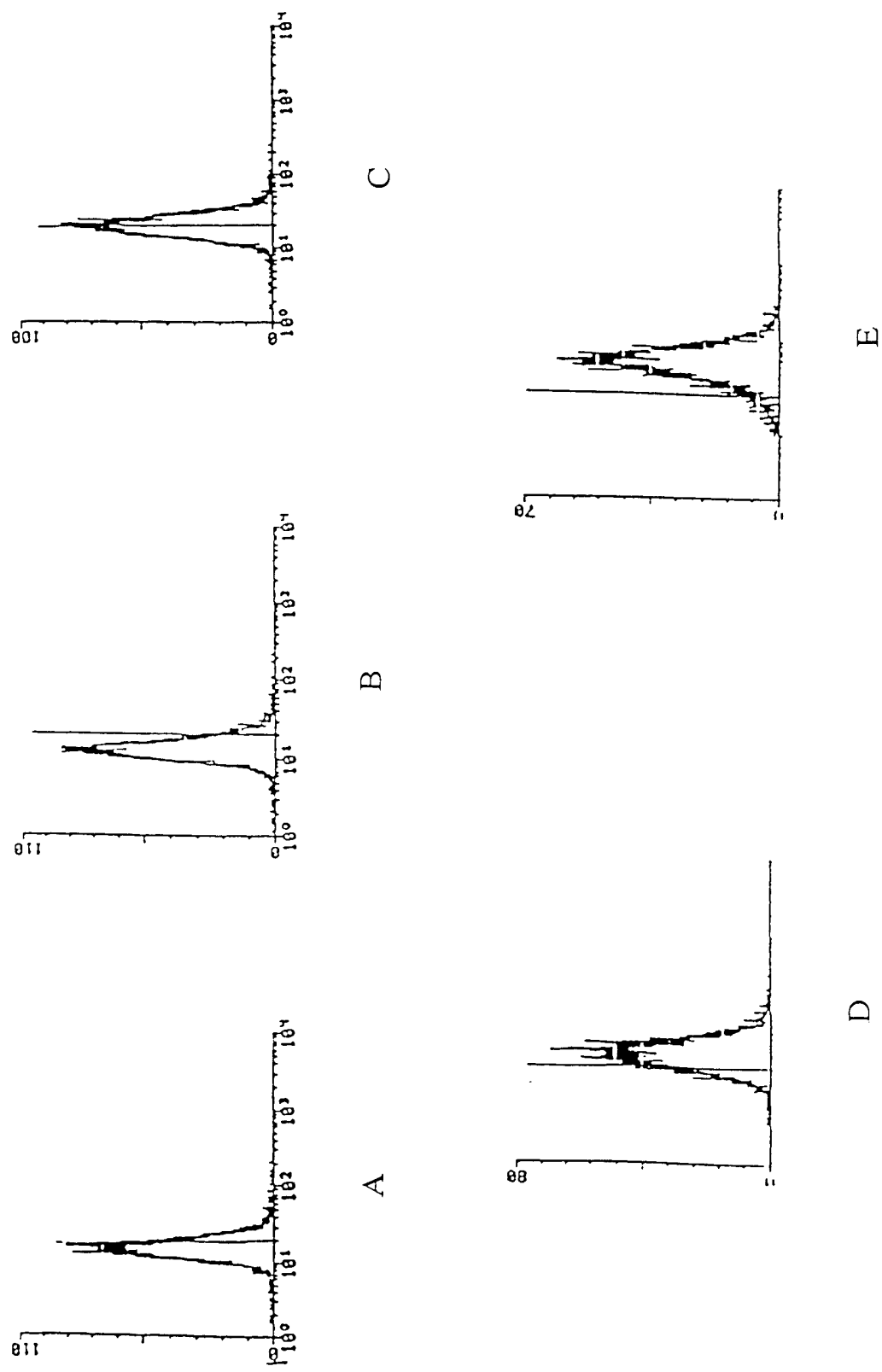


图 8B

CpG 和呼吸道暴露对肺部灌洗液的细胞计数效应

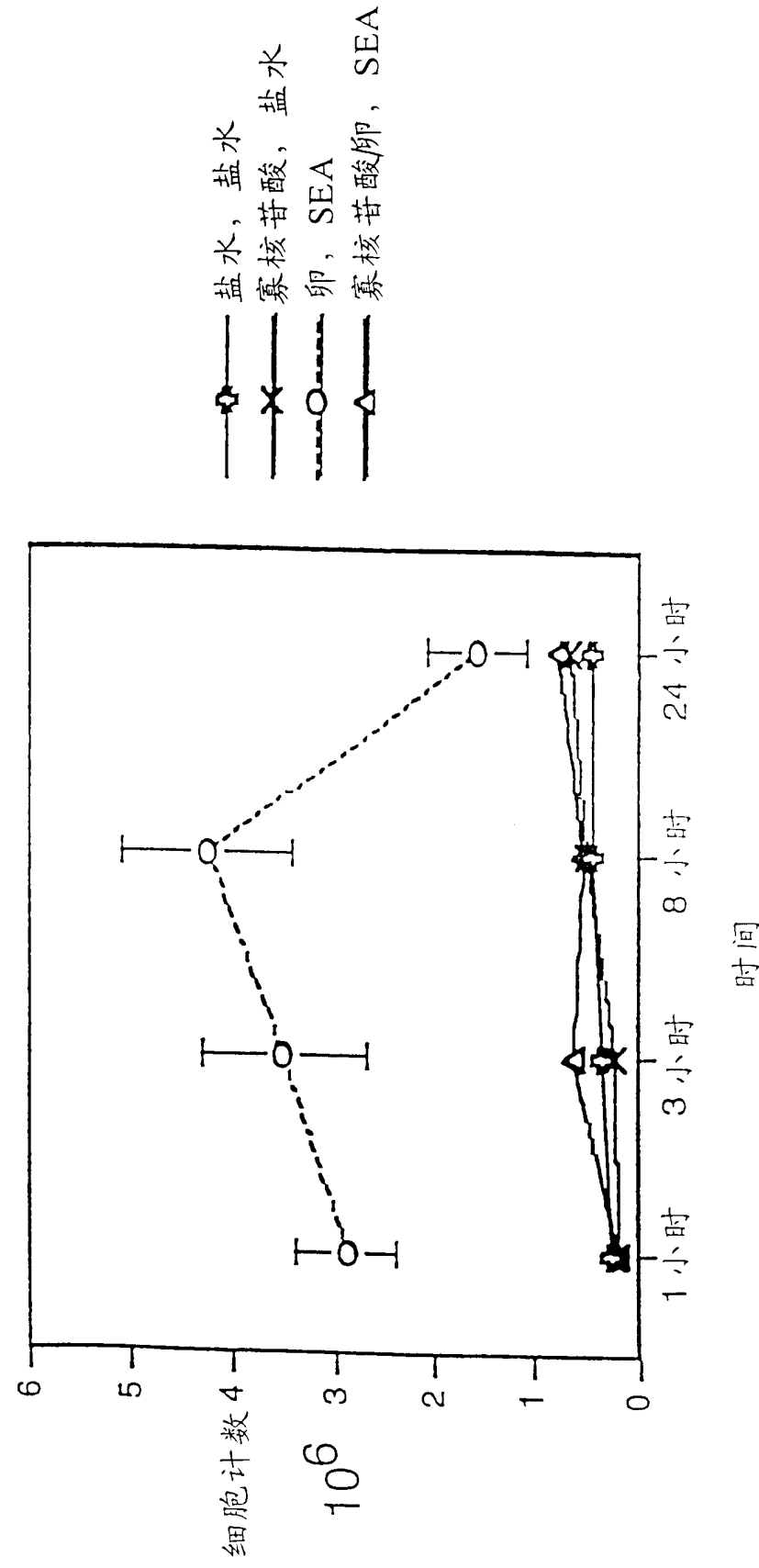


图9

CpG 和呼吸道暴露对肺部灌洗液嗜伊红粒细胞的效应

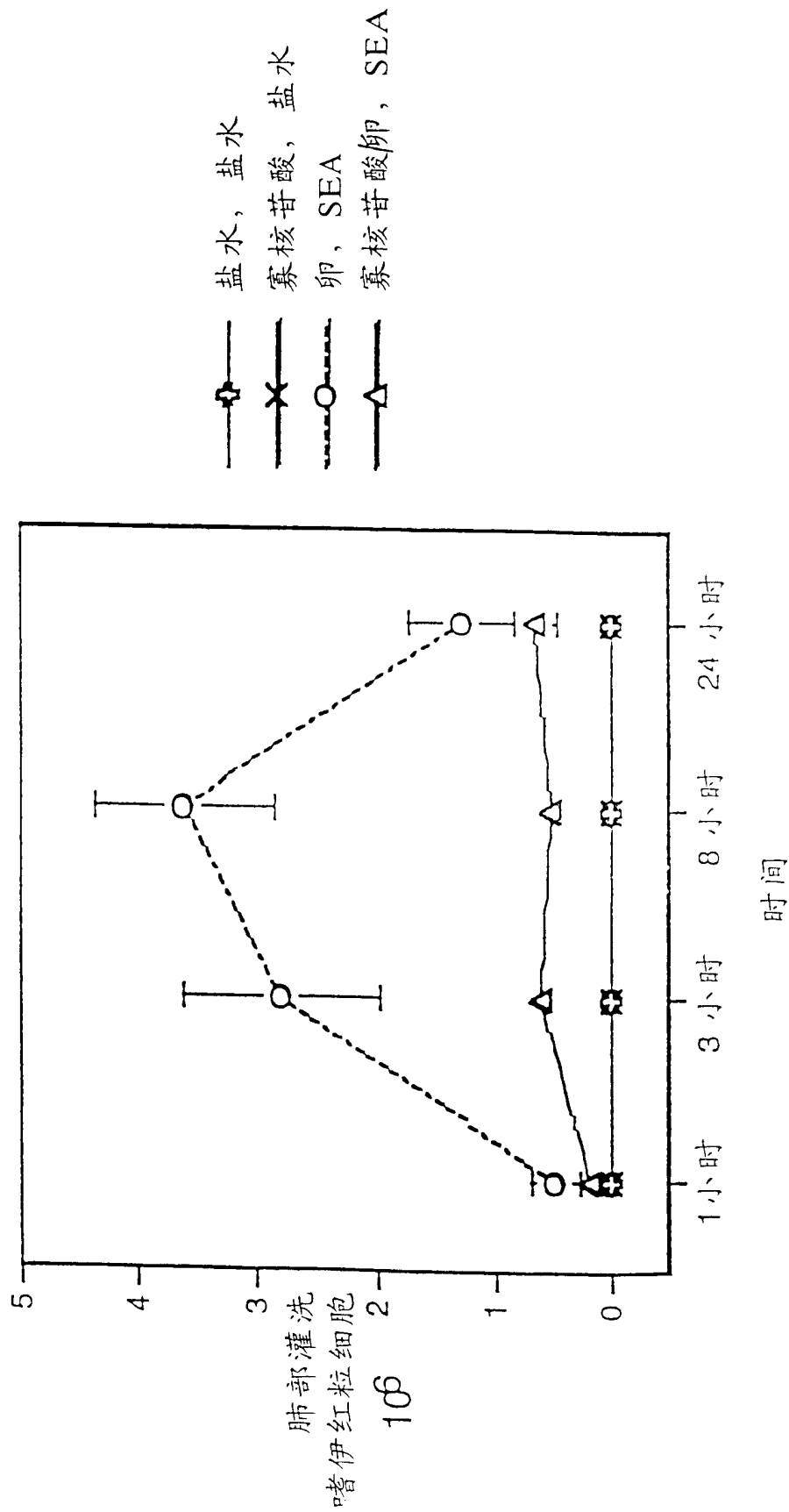


图10

CpG 和呼吸道暴露肺部灌洗液中各成分的效应

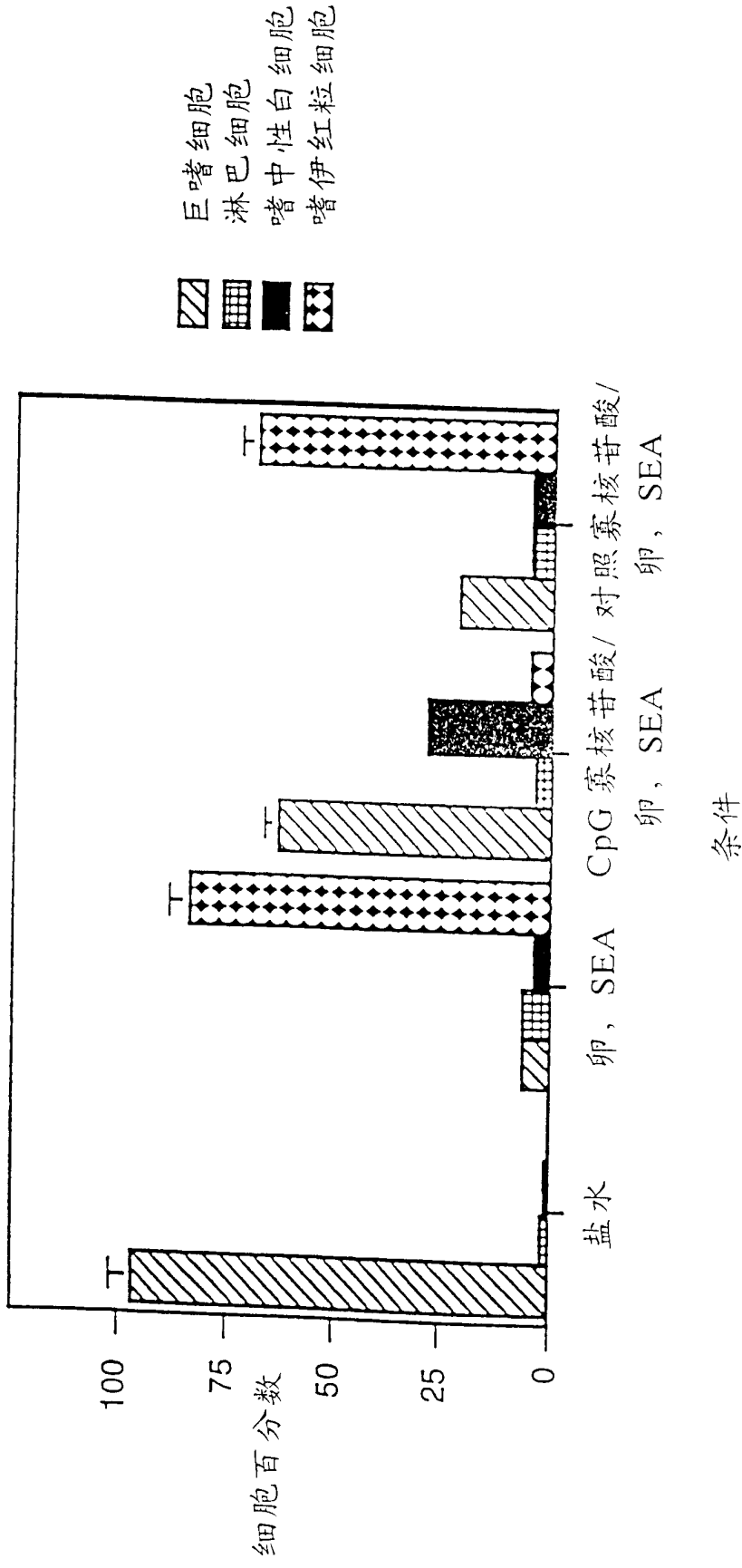


图 11

寡核苷酸剂量对总细胞数和嗜伊红细胞数的效应

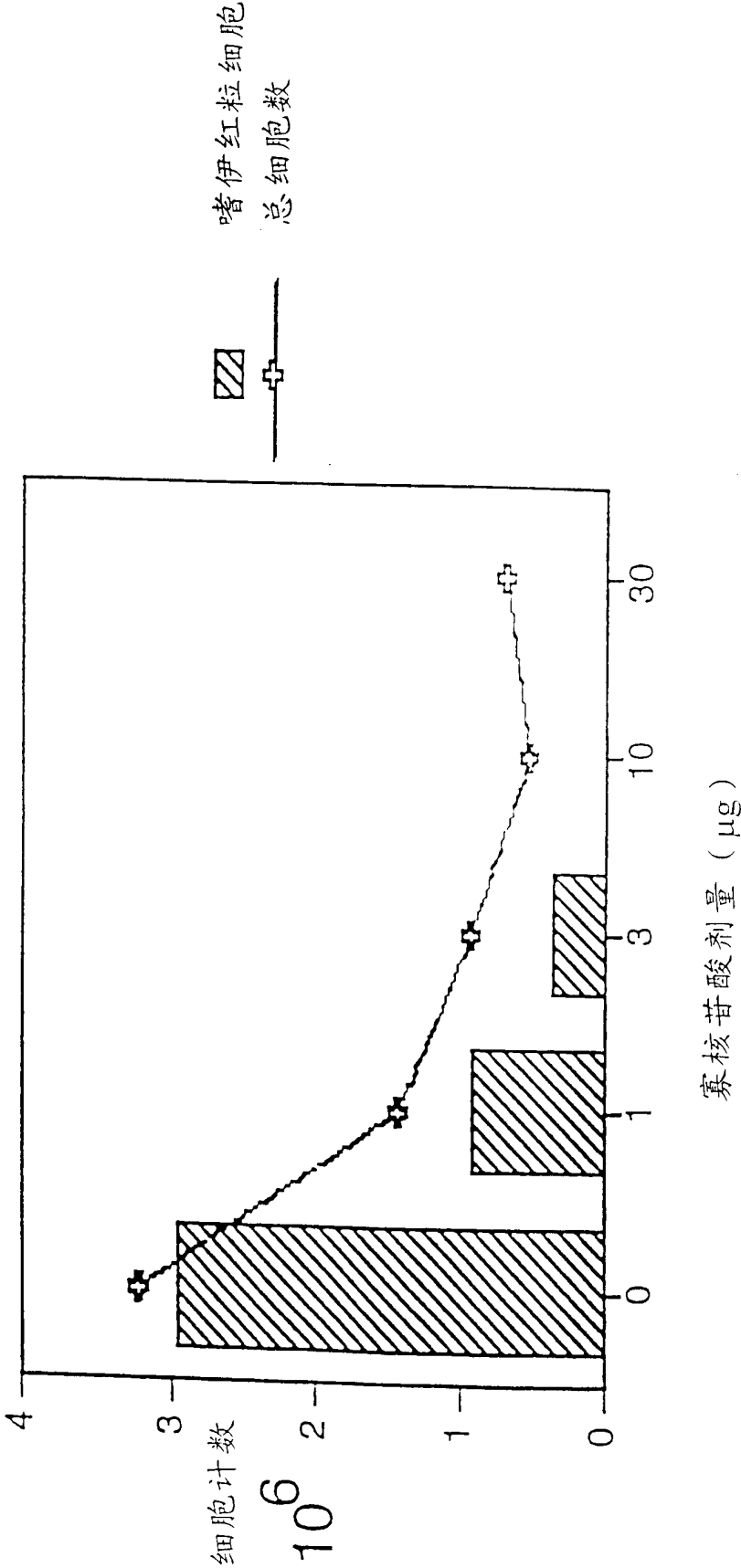


图 12

CpG 和呼吸道暴露对肺部灌洗中的 IL-4 的效应

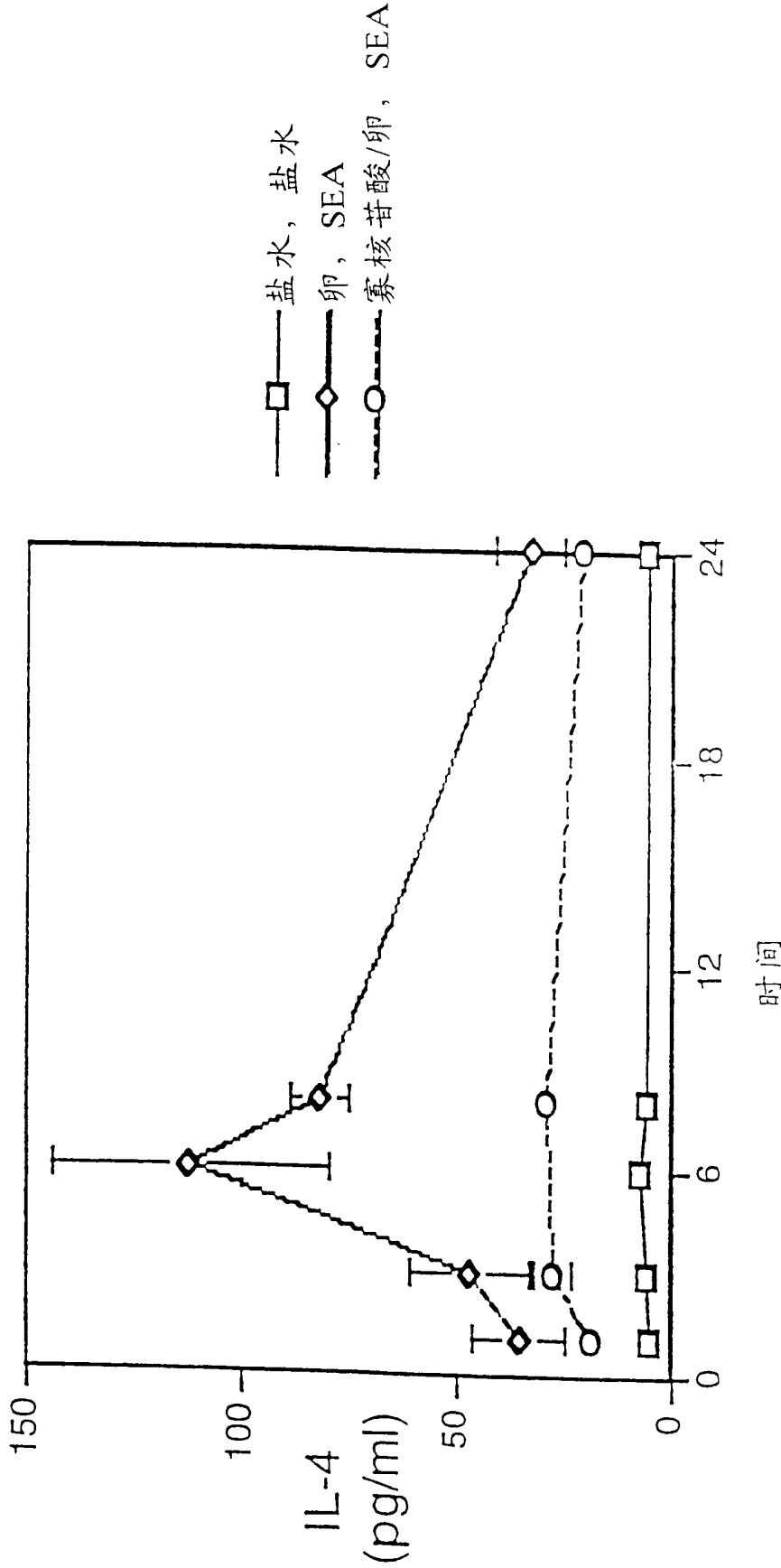


图 13

CpG 和呼吸道暴露对肺部灌洗中的 IL-12 的效应

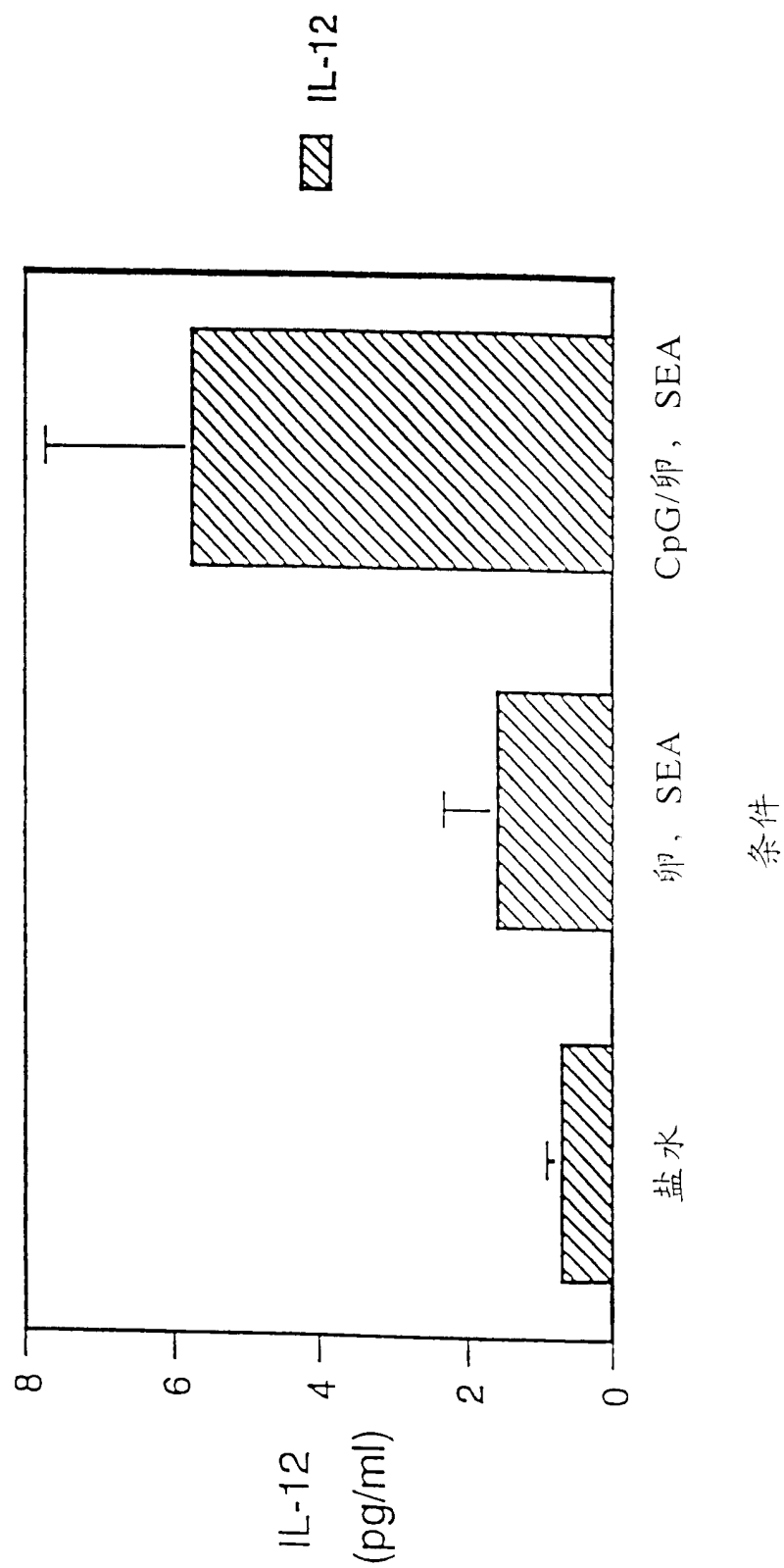


图 14

CpG 和呼吸道暴露对肺部灌洗中的 IFN- γ 的效应

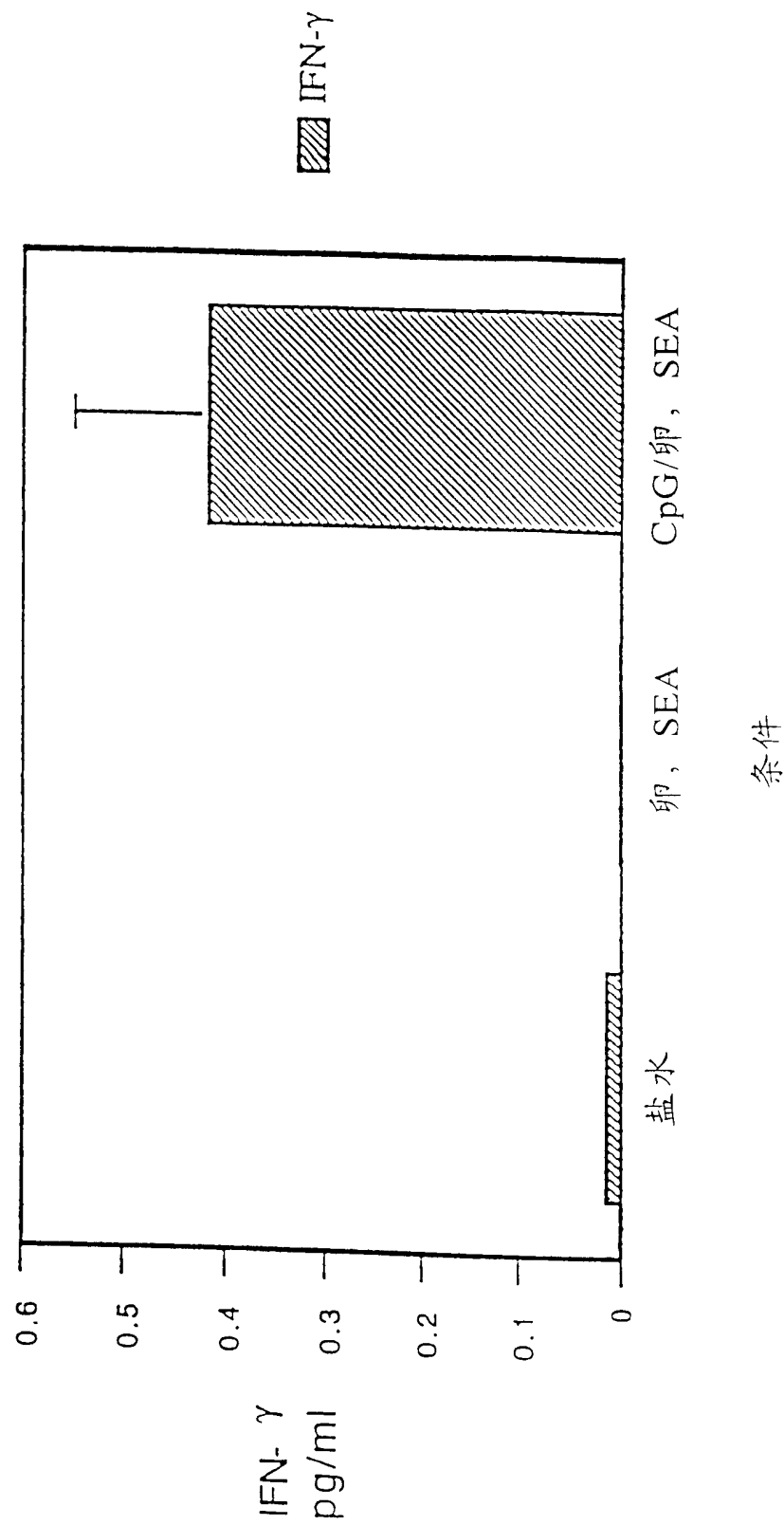


图 15