

[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 200380107301.4

[51] Int. Cl.

C07H 21/02 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

A01N 43/04 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009 年 10 月 7 日

[11] 授权公告号 CN 100546998C

[22] 申请日 2003.12.18

审查员 陈真

[21] 申请号 200380107301.4

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

[30] 优先权

代理人 范征

[32] 2002.12.23 [33] US [31] 60/436,122

[32] 2003. 2. 13 [33] US [31] 60/447,885

[32] 2003. 5. 1 [33] US [31] 60/467,546

[86] 国际申请 PCT/US2003/041001 2003.12.18

[87] 国际公布 WO2004/058179 英 2004.7.15

[85] 进入国家阶段日期 2005.6.23

[73] 专利权人 戴纳伐克斯技术股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 D·迪纳 K·L·费伦

J·马歇尔

[56] 参考文献

US6613751 2003.9.2

权利要求书 4 页 说明书 159 页 附图 2 页

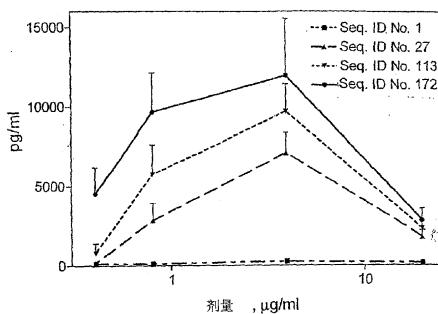
[54] 发明名称

免疫刺激序列寡核苷酸和使用方法

[57] 摘要

本发明提供免疫调节多核苷酸和用免疫调节多核苷酸免疫调节个体的方法。

IFN- α 生成



1. 一种免疫调节多核苷酸，其特征在于，所述多核苷酸包括：
 - (a) 包含至少 2 个 CG 二核苷酸的回文序列，其中 CG 二核苷酸由 0、1、2、3、4 或 5 个碱基分开且回文序列至少为 8 个碱基长度；和
 - (b)(TCG)_y，其中 y 是 1 或 2，其中(TCG)_y 的 5'T 位置离多核苷酸 5'末端 0、1、2 或 3 个碱基且其中(TCG)_y 与回文序列 5'末端由 0、1 或 2 个碱基分开。
2. 如权利要求 1 所述的免疫调节多核苷酸，其特征在于，回文序列有 A 和 T 大于三分之一的碱基组成。
3. 如权利要求 1 所述的免疫调节多核苷酸，其特征在于，回文序列包括所有或部分(TCG)_y 序列。
4. 一种免疫调节多核苷酸，其特征在于，所述多核苷酸包括：
 - (a) 包含至少 2 个 CG 二核苷酸的回文序列，其中 CG 二核苷酸由 0、1、2、3、4 或 5 个碱基分开且回文序列至少为 8 个碱基长度；和
 - (b)(TCG)_y 序列，其中 y 是 1 或 2，其中(TCG)_y 序列的 5'T 位置离多核苷酸 5'末端 0、1、2 或 3 个碱基；其中(a)的回文序列包括所有或部分(TCG)_y 序列；和其中(TCG)_y 序列的 CG 可以是(a)回文序列的一个 CG 二核苷酸。
5. 如权利要求 4 所述的免疫调节多核苷酸，其特征在于，回文序列有 A 和 T 大于三分之一的碱基组成。
6. 如权利要求 4 所述的免疫调节多核苷酸，其特征在于，回文序列包括所有或部分(TCG)_y 序列。
7. 一种免疫调节多核苷酸，其特征在于，所述多核苷酸包括：
 - (a) 5'-N_x(TCG(N_q))_yN_w(X₁X₂CGX₂'X₁')(CG)_p)_z(SEQ ID NO:156)
其中 N 是核苷，x=0-3，y=1-4，w=-2、-1、0、1 或 2，p=0 或 1，q=0、1 或 2 且 z=1-20，X₁ 和 X₁' 是自身互补的核苷，X₂ 和 X₂' 是自身互补的核苷，其中(TCG(N_q))_y 序列的 5'T 是离多核苷酸 5'末端的 0-3 个碱基；和
 - (b) 至少 8 个碱基长度的回文序列，其中回文序列包括(X₁X₂CGX₂'X₁')(CG)_p)_z 序列的第 1 个(X₁X₂CGX₂'X₁')。
8. 如权利要求 7 所述的免疫调节多核苷酸，其特征在于，回文序列有 A 和 T 大于三分之一的碱基组成。
9. 如权利要求 7 所述的免疫调节多核苷酸，其特征在于，IMP 包括的序列选

自 SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:113、SEQ ID NO:175 和 SEQ ID NO:172。

10. 一种免疫调节多核苷酸，其特征在于，所述多核苷酸包括：

(a) $5'-N_x(TCG(N_q))_y N_w(X_1 X_2 CGX_3 X_3' CGX_2' X_1'(CG)_p)_z (SEQ\ ID\ NO:159)$

其中 N 是核苷， $x=0-3$, $y=1-4$, $w=-2$ 、 -1 、 0 、 1 或 2 , $p=0$ 或 1 , $q=0$ 、 1 或 2 且 $z=1-20$, X_1 和 X_1' 是自身互补的核苷， X_2 和 X_2' 是自身互补的核苷， X_3 和 X_3' 是自身互补的核苷，其中 $(TCG(N_q))_y$ 序列的 5'T 是离多核苷酸 5'末端的 0-3 个碱基；和

(b) 至少 10 个碱基长度的回文序列，其中回文序列包括 $(X_1 X_2 CGX_3 X_3' CGX_2' X_1'(CG)_p)_z$ 序列的第 1 个 $(X_1 X_2 CGX_3 X_3' CGX_2' X_1')$ 。

11. 如权利要求 10 所述的免疫调节多核苷酸，其特征在于，回文序列有 A 和 T 大于三分之一的碱基组成。

12. 一种免疫调节多核苷酸，其特征在于，所述多核苷酸包括：

(a) $5'-N_x(TCG(N_q))_y N_w(X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 CGX_5' X_4' X_3' X_2' X_1'(CG)_p)_z (SEQ\ ID\ NO:160)$

其中 N 是核苷， $x=0-3$, $y=1-4$, $w=-3$ 、 -2 、 -1 、 0 、 1 或 2 , $p=0$ 或 1 , $q=0$ 、 1 或 2 且 $z=1-20$, X_1 和 X_1' 是自身互补的核苷， X_2 和 X_2' 是自身互补的核苷， X_3 和 X_3' 是自身互补的核苷， X_4 和 X_4' 是自身互补的核苷， X_5 和 X_5' 是自身互补的核苷，其中 $(TCG(N_q))_y$ 序列的 5'T 是离多核苷酸 5'末端的 0-3 个碱基；和

(b) 至少 12 个碱基长度的回文序列，其中回文序列包括 $(X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 CGX_5' X_4' X_3' X_2' X_1'(CG)_p)_z$ 序列的第 1 个

$(X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 CGX_5' X_4' X_3' X_2' X_1')$ 。

13. 如权利要求 12 所述的免疫调节多核苷酸，其特征在于，回文序列有 A 和 T 大于三分之一的碱基组成。

14. 一种免疫调节多核苷酸，其特征在于，所述多核苷酸包括：

(a) $5'-N_x(TCG(N_q))_y N_w(CGX_1 X_1' CG(CG)_p)_z (SEQ\ ID\ NO:161)$

其中 N 是核苷， $x=0-3$, $y=1-4$, $w=-2$ 、 0 、 1 或 2 , $p=0$ 或 1 , $q=0$ 、 1 或 2 且 $z=1-20$, 其中 X_1 和 X_1' 是自身互补的核苷且其中 $(TCG(N_q))_y$ 序列的 5'T 是离多核苷酸 5'末端的 0-3 个碱基；和

(b) 至少 8 个碱基长度的回文序列，其中回文序列包括 $(CGX_1 X_1' CG(CG)_p)_z$ 序列的第 1 个 $(CGX_1 X_1' CG)$ 。

15. 如权利要求 14 所述的免疫调节多核苷酸，其特征在于，回文序列有 A 和 T 大于三分之一的碱基组成。

16. 一种免疫调节多核苷酸，其特征在于，所述多核苷酸包括：

(a) $5'-N_x(TCG(N_q))_y N_w(X_1 CGCGX_1'(CG)_p)_z$ (SEQ ID NO:162)

其中 N 是核苷，x=0-3, y=1-4, w=-1、0、1 或 2, p=0 或 1, q=0、1 或 2 且 z=1-20, X_1 和 X_1' 是自身互补的核苷，其中 $(TCG(N_q))_y$ 序列的 5'T 是离多核苷酸 5'末端的 0-3 个碱基；

(b) 至少 8 个碱基长度的回文序列，其中回文序列包括 $(X_1 CGCGX_1'(CG)_p)_z$ 序列的第 1 个 $(X_1 CGCGX_1')$ 。

17. 如权利要求 16 所述的免疫调节多核苷酸，其特征在于，回文序列有 A 和 T 大于三分之一的碱基组成。

18. 一种免疫调节多核苷酸，其特征在于，所述多核苷酸包括：

(a) $5'-N_x(TCG(N_q))_y N_w(X_1 X_2 CGCGX_2'X_1'(CG)_p)_z$ (SEQ ID NO:163)

其中 N 是核苷，x=0-3, y=1-4, w=-2、-1、0、1 或 2, p=0 或 1, q=0、1 或 2 且 z=1-20, X_1 和 X_1' 是自身互补的核苷， X_2 和 X_2' 是自身互补的核苷，其中 $(TCG(N_q))_y$ 序列的 5'T 是离多核苷酸 5'末端的 0-3 个碱基；和

(b) 至少 8 个碱基长度的回文序列，其中回文序列包括 $(X_1 X_2 CGCGX_2'X_1'(CG)_p)_z$ 序列的第 1 个 $(X_1 X_2 CGCGX_2'X_1')$ 。

19. 如权利要求 18 所述的免疫调节多核苷酸，其特征在于，回文序列有 A 和 T 大于三分之一的碱基组成。

20. 一种免疫调节多核苷酸，其特征在于，所述多核苷酸包括：

(a) $5'-N_x(TCG(N_q))_y N_w(X_1 X_2 X_3 CGCGX_3'X_2'X_1'(CG)_p)_z$ (SEQ ID NO:164)

其中 N 是核苷，x=0-3, y=1-4, w=-3、-2、-1、0、1 或 2, p=0 或 1, q=0、1 或 2 且 z=1-20, X_1 和 X_1' 是自身互补的核苷， X_2 和 X_2' 是自身互补的核苷， X_3 和 X_3' 是自身互补的核苷，其中 $(TCG(N_q))_y$ 序列的 5'T 是离多核苷酸 5'末端的 0-3 个碱基；和

(b) 至少 10 个碱基长度的回文序列，其中回文序列包括 $(X_1 X_2 X_3 CGCGX_3'X_2'X_1'(CG)_p)_z$ 序列的第 1 个 $(X_1 X_2 X_3 CGCGX_3'X_2'X_1')$ 。

21. 如权利要求 20 所述的免疫调节多核苷酸，其特征在于，回文序列有 A 和 T 大于三分之一的碱基组成。

22. 一种免疫调节多核苷酸，其特征在于，所述多核苷酸包括：

(a) $5'-N_x(TCG(N_q))_y N_w(CGX_1 X_2 X_2'X_1'CG(CG)_p)_z$ (SEQ ID NO:165)

其中 N 是核苷，x=0-3, y=1-4, w=-2、0、1 或 2, p=0 或 1, q=0、1 或 2 且 z=1-20,

X_1 和 X_1' 是自身互补的核苷， X_2 和 X_2' 是自身互补的核苷，其中 $(TCG(N_q)_y$ 序列的 5'T 是离多核苷酸 5'末端的 0-3 个碱基；和

(b) 至少 8 个碱基长度的回文序列，其中回文序列包括 $(CGX_1X_2X_2'X_1'CG(CG)_p)_z$ 序列的第 1 个 $(CGX_1X_2X_2'X_1'CG)$ 。

23. 如权利要求 22 所述的免疫调节多核苷酸，其特征在于，回文序列有 A 和 T 大于三分之一的碱基组成。

24. 一种免疫调节组合物，其特征在于，所述组合物包括权利要求 1 所述的免疫调节多核苷酸。

25. 权利要求 1 所述的免疫调节多核苷酸在制备用于调节个体免疫反应的物质中的应用。

26. 权利要求 4 所述的免疫调节多核苷酸在制备用于调节个体免疫反应的物质中的应用。

27. 权利要求 1 所述的免疫调节多核苷酸在制备用于增加个体中干扰素- γ 的物质中的应用。

28. 权利要求 4 所述的免疫调节多核苷酸在制备用于增加个体中干扰素- γ 的物质中的应用。

29. 权利要求 1 所述的免疫调节多核苷酸在制备用于增加个体中干扰素- α 的物质中的应用。

30. 权利要求 4 所述的免疫调节多核苷酸在制备用于增加个体中干扰素- α 的物质中的应用。

31. 权利要求 7 所述的免疫调节多核苷酸在制备用于增加个体中干扰素- α 的物质中的应用。

32. 权利要求 1 所述免疫调节多核苷酸在制备用于改善个体传染病症状的物质中的应用。

33. 权利要求 4 所述免疫调节多核苷酸在制备用于改善个体传染病症状的物质中的应用。

34. 权利要求 1 所述免疫调节多核苷酸在制备用于改善个体 IgE 相关疾病症状的物质中的应用。

35. 权利要求 4 所述免疫调节多核苷酸在制备用于改善个体 IgE 相关疾病症状的物质中的应用。

免疫刺激序列寡核苷酸和使用方法

技术领域

本发明涉及免疫调节多核苷酸。它也涉及施用多核苷酸以调节免疫反应。

发明的背景

产生感染或其它抗原性攻击的免疫反应类型一般能通过参与反应的 T 辅助(Th)细胞亚群区分。Th1 亚群引起经典的细胞介导功能，如迟发型超敏反应和细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)的活化，而 Th2 亚群功能更有效地作为 B 细胞活化的辅助功能。对抗原的免疫反应类型一般受细胞响应抗原生成的细胞因子影响。认为 Th1 和 Th2 细胞所分泌细胞因子的差异反映这 2 个亚群的不同生物功能。参见例如 Romagnani(2000) *Ann.Allergy Asthma Immunol.* 85:9-18。

Th1 亚群可特定地适合响应病毒感染、胞内病原体和肿瘤细胞，因为它分泌激活 CTL 的 IL-2 和 IFN-?。Th2 亚群可能更适合响应自生细菌和蠕虫性寄生虫(helminthic parasites)且能介导变态反应，因为已知 IL-4 和 IL-5 分别诱导 IgE 生成和嗜伊红细胞活化。一般，Th1 和 Th2 细胞分泌不同模式的细胞因子，因此一种反应类型能调节另一种反应类型的活性。Th1/Th2 平衡移动可导致变态反应，例如或另外导致 CTL 反应的增加。

对于许多传染病如肺结核和疟疾，Th2 型反应抗感染的保护值小。建议的疫苗使用获得自靶抗原的小肽和其它目前所用抗原剂，避免使用潜在感染性完整病毒颗粒，疫苗不总是引起获得治疗效果必需的免疫反应。以蛋白为基础的疫苗通常诱导 Th2 型免疫反应，特征是中和抗体的高效价，但没有显著的细胞介导免疫。

此外，一些抗体反应类型在某些适应证中不合适，最显著的是变态反应，其中 IgE 抗体反应能导致过敏性休克。一般，变态反应也包括 Th2 型免疫反应。包括诱导变应性哮喘的变态反应特征是早期反应和晚期反应，早期反应在接触变态原几秒到几分钟内发生且特征是细胞脱粒，晚期反应在 4 到 24 小时后发生且特征是嗜伊红细胞浸润到变应原接触的位置中。在早期过敏反应期间，变应原特定地交联嗜碱细胞和肥大细胞上的 IgE 抗体，依次激发脱粒和随后释放组胺及来自肥大

细胞和嗜碱细胞的炎症的其它介体。在晚期反应期间，嗜伊红细胞浸润到变应原接触的位置中(其中产生组织损坏和功能不良)。

变应性紊乱的抗原免疫治疗包括皮下注射少但逐渐增大量的抗原。这种免疫治疗有诱导 IgE 介导的过敏反应的风险，不有效针对过敏晚期反应中细胞因子介导的事件。迄今，此方法取得了仅有限的成功。

施用某些一般已知为免疫刺激序列的 DNA 序列会诱导 Th1 型偏倚的免疫反应，通过 Th1 相关细胞因子的分泌来指示。施用有抗原的免疫刺激多核苷酸产生对施用抗原的 Th1 型免疫反应。Roman 等(1997) *Nature Med.* 3:849-854。例如，小鼠皮内注射盐水或佐剂明矾中的大肠杆菌 (*E. coli*) β -半乳糖苷酶(β -gal)，小鼠通过产生特异 IgG1 和 IgE 抗体以及 CD4 $^{+}$ 细胞来响应，CD4 $^{+}$ 细胞分泌 IL-4 和 IL-5，但没有 IFN- γ ，证明 T 细胞主要是 Th2 亚群。然而，小鼠皮内注射(或用 tyne 皮肤划痕器)质粒 DNA(盐水中)，质粒 DNA 编码 β -gal 并包含免疫刺激序列，小鼠通过产生 IgG2a 抗体和 CD4 $^{+}$ 细胞来响应，CD4 $^{+}$ 细胞分泌 IFN- γ ，但没有 IL-4 和 IL-5，证明 T 细胞主要是 Th1 亚群。此外，注射质粒 DNA 的小鼠产生的特异 IgE 下降 66-75%。Raz 等(1996) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 93:5141-5145。一般，对裸露 DNA 免疫的反应特征是抗原刺激的 CD4 $^{+}$ T 细胞生成 IL-2、TNF α 和 IFN- γ ，这是 Th1 型反应的征兆。这对治疗变态反应和哮喘特别重要，如 IgE 生成减少所示。免疫刺激多核苷酸刺激 Th1 型免疫反应的能力用细菌抗原、病毒抗原和变应原证明(参见例如 WO 98/55495)。

描述多核苷酸的免疫刺激活性的参考文献包括：Krug 等(2001) *Eur.J.Immunol.* 31: 3026; Bauer 等(2001) *J.Immunol.* 166:5000; Klinman 等(1999) *Vaccine.* 17: 19; Jahn-Schmid 等 (1999) *J.Allergy Clin.Immunol.* 104:1015 ; Tighe 等 (2000) *Eur.J.Immunol.* 30:1939; Shirota 等(2000) *J.Immunol.* 164:5575; Klinman 等(1999) *Infect.Immun.* 67:5658 ; Sur 等(1999) *J.Immunol.* 162:6284 ; Magone 等(2000) *Eur.J.Immunol.* 30:1841; Kawarada 等(2001) *J.Immunol.* 167: 5247; Kranzer 等(2000) *Immunology* 99:170 ; Krug 等(2001) *Eur.J.Immunol.* 31:2154 ; Hartmann 等(2000) *J.Immunol.* 164:944 ; Bauer 等 (1999) *Immunology* 97:699 ; Fujieda 等 (2000) *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 162:232 ; Krieg(2002) *Annu.Rev.Immunol.* 20:709 ; Verthelyi 等(2002) *J.Immunol.* 168:1659; Hornung 等(2002) *J.Immunol.* 168:4531; Yamamoto 等 (2000) *Springer Semin.Immunopathol.* 22:35 ; Lee 等 (2000) *J.Immunol.* 165:3631 ; Gursel 等(2002) *J.Leukoc.Biol.* 71:813 ; Gursel 等 (2002)

*Eur.J.Immunol.*32:2617; Broide 等(2001) *J.Clin.Immunol.* 21:175; Zhu 等(2001) *Immunology*103:226; Klinman 等(2002) *Microbes Infect.* 4:897; Hartmann 等(2000) *J.Immunol.*164:1617; Krieg(1999) *Biochim.Biophys.Acta* 1489:107; Dalpke 等(2002) *Immunology*106:102; Yu 等(2002) *Biochim.Biophys.Res.Commun.* 297:83; Hafner 等(2001) *Cancer Res.* 61:5523; Zwaveling 等(2002) *J.Immunol.*169:350; Davis 等(2000) *Vaccine*18:1920; Gierynska 等(2002) *J.Virol.* 76:6568; Lipford 等(2000) *J.Immunol.* 165:1228; Freidag 等(2000) *Infect.Immun.* 68:2948; Dieudonne 等(2001) *J.Allergy Clin.Immunol.*107:S233。

其它描述免疫刺激序列的参考文献包括：Krieg 等(1998) *J.Immunol.*143: 2448-2451; Tokunaga 等(1992) *Microbiol.Immunol.*36:55-66; Kataoka 等(1992) *Jpn.J.Cancer Res.* 83:244-247; Yamamoto 等(1992) *J.Immunol.*148:4072-4076; Mojck 等(1993) *Clin.Immuno. and Immunopathol.*67:130-136; Branda 等(1993) *Biochem. Pharmacol.* 45:2037-2043; Pisetsky 等(1994) *Life Sci.* 54(2):101-107; Yamamoto 等(1994a) *Antisense Research and Development.* 4:119-122; Yamamoto 等(1994b) *Jpn.J.Cancer Res.* 85:775-779; Raz 等(1994) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 91:9519-9523; Kimura 等(1994) *J.Biochem.(Tokyo)* 116:991-994; Krieg 等(1995) *Nature* 374:546-549; Pisetsky 等(1995) *Ann.N.Y.Acad.Sci.*772:152-163; Pisetsky 等(1996a) *J.Immunol.*156: 421-423; Pisetsky 等(1996b) *Immunity* 5:303-310; Zhao 等(1996) *Biochem. Pharmacol.* 51:173-182; Yi 等(1996) *J.Immunol.*156:558-564; Krieg 等(1996) *Trends Microbiol.* 4(2):73-76; Krieg 等(1996) *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 6:133-139; Klinman 等(1996) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 93:2879-2883; Raz 等(1996); Sato 等(1996) *Science* 273:352-354; Stacey 等(1996) *J.Immunol.*157:2116-2122; Ballas 等(1996) *J.Immunol.* 157:1840-1845; Branda 等(1996) *J.Lab.Clin.Med.* 128:329-338; Sonehara 等(1996) *J.Interferon and Cytokine Res.* 16:799-803; Klinman 等(1997) *J.Immunol.*158:3635- 3639; Sparwasser 等(1997) *Eur.J.Immunol.*27:1671-1679; Roman 等(1997); Carson 等(1997) *J.Exp.Med.*186:1621-1622; Chace 等(1997) *Clin.Immunol.and Immunopathol.* 84:185-193; Chu 等(1997) *J.Exp.Med.*186:1623-1631; Lipford 等(1997a) *Eur.J.Immunol.* 27:2340-2344; Lipford 等(1997b) *Eur.J.Immunol.* 27:3420-3426; Weiner 等(1997) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 94:10833-10837; Macfarlane 等(1997) *Immunology* 91:586-593; Schwartz 等(1997) *J.Clin.Invest.* 100:68-73; Stein 等(1997)

《反义技术》(*Antisense Technology*), 第 11 章, 241-264 页, C.Lichtenstein 和 W.Nellen 编辑, IRL Press; Wooldridge 等(1997) *Blood* 89:2994-2998; Leclerc 等(1997) *Cell.Immunol.* 179:97-106; Kline 等(1997) *J.Invest.Med.* 45(3):282A; Yi 等(1998a) *J.Immunol.* 160:1240-1245; Yi 等(1998b) *J.Immunol.* 160:4755-4761; Yi 等(1998c) *J.Immunol.* 160:5898-5906; Yi 等(1998d) *J.Immunol.* 161:4493-4497; Krieg 等(1998) 《应用反义寡核苷酸技术》 (*Applied Antisense Oligonucleotide Technology*), 第 24 章, 431-448 页, C.A.Stein 和 A.M.Krieg 编辑, Wiley-Liss, Inc.; Krieg 等(1998a) *Trends Microbiol.* 6:23-27; Krieg 等(1998b) *J.Immunol.* 161:2428-2434; Krieg 等(1998c) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 95: 12631-12636 ; Spiegelberg 等 (1998) *Allergy* 53(45S):93-97 ; Horner 等 (1997) *Cell.Immunol.* 190:77-82 ; Jakob 等 (1998) *J.Immunol.* 161:3042-3049; Redford 等(1998) *J.Immunol.* 161:3930-3935; Weeratna 等 (1998) *Antisense& Nucleic Acid Drug Development* 8:351-356; McCluskie 等(1998) *J.Immunol.* 161(9):4463-4466; Gramzinski 等(1998) *Mol.Med.* 4:109-118; Liu 等(1998) *Blood* 92:3730-3736; Moldoveanu 等(1998) *Vaccine* 16:1216-1224; Brazolot Milan 等 (1998) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 95:15553- 15558 ; Briode 等 (1998) *J.Immunol.* 161:7054-7062; Briode 等(1999) *Int.Arch.Allergy Immunol.* 118:453-456; Kovarik 等 (1999) *J.Immunol.* 162:1611-1617 ; Spiegelberg 等 (1998) *Pediatr.Pulmonol.Supppl.* 18:118-121 ; Martin-Orozco 等 (1999) *Int.Immunol.* 11: 1111-1118; EP 468, 520; WO 96/02555; WO 97/28259; WO 98/16247; WO 98/18810; WO 98/37919; WO 98/40100; WO 98/52581; WO 98/55495; WO 98/55609 和 WO 99/11275。也参见 Elkins 等(1999) *J.Immunol.* 162:2291-2298、WO 98/52962、WO 99/33488、WO 99/33868、WO 99/51259 和 WO 99/62923。也参见 Zimmermann 等 (1998) *J.Immunol.* 160:3627-3630; Krieg(1999) *Trends Microbiol.* 7:64-65 和美国专利号 5, 663, 153、5, 723, 335 和 5, 849, 719。也参见 Liang 等(1996) *J.Clin.Invest.* 98: 1119-1129; Bohle 等(1999) *Eur.J.Immunol.* 29:2344-2353 和 WO 99/56755。也参见 WO 99/61056; WO 00/06588; WO 00/16804; WO 00/21556; WO 00/54803; WO 00/61151; WO 00/67023; WO 00/67787 和美国专利号 6, 090, 791。也参见 Manzel 等(1999) *Antisense Nucl. Acid Drug Dev.* 9:459-464; Verthelyi 等(2001) *J.Immunol.* 166: 2372-2377; WO 01/15726; WO 01/12223; WO 01/22972; WO 01/22990; WO 01/35991; WO 01/51500; WO 01/54720; 美国专利号 6,174,872、6,194,388、6,207,646、6,214,806、6,218,371、6,239,116。也参见 WO 01/12804;

WO 01/45740; WO 01/55341; WO 01/55370; WO 01/62207; WO 01/68077; WO 01/68078; WO 01/68103; WO 01/68116; WO 01/68117; WO 01/68143; WO 01/68144; WO 01/72123; WO 01/76642; WO 01/83503; WO 01/93902; WO 02/026757; WO 02/052002; WO 02/069369; WO 02/074922; 美国专利号 6,339,068、6,406,705、6,426,334、6,426,336、6,429,199、6,476,000。

免疫调节多核苷酸一般包括 CG 序列。IMP 的 CG 侧翼核苷酸也似乎在多核苷酸的免疫调节活性中发挥作用。仍需要继续鉴定免疫调节多核苷酸。

本文引用的所有专利、专利申请和出版物全部纳入供参考。

发明的描述

发明涉及免疫调节多核苷酸(IMP)和用这些多核苷酸调节个体免疫反应的方法，特定是人。

一方面，发明提供免疫调节多核苷酸。在某些实施方案中，发明包括含本文所述任意免疫调节多核苷酸的组合物。组合物也可包括例如药学上可接受的赋形剂或任意一些其它成分如抗原。

一方面，发明的免疫调节多核苷酸包括(a)包含至少 2 个 CG 二核苷酸的回文序列，其中 CG 二核苷酸由 0、1、2、3、4 或 5 个碱基分开且其中回文序列至少为 8 个碱基长度；(b)(TCG)_y，其中 y 是 1 或 2，(TCG)_y 的 5'T 位置是离多核苷酸 5'末端的 0、1、2 或 3 个碱基且其中(TCG)_y 与回文序列的 5'末端由 0、1 或 2 个碱基分开。在发明的一些免疫调节多核苷酸中，无论是在此段落或是本专利申请的其它地方描述，回文序列有 G 和 C 小于三分之二的碱基组成。在一些实施方案中，回文序列有 A 和 T 大于三分之一的碱基组成。

另一方面，发明的免疫调节多核苷酸包括(a)包含至少 2 个 CG 二核苷酸的回文序列，其中 CG 二核苷酸由 0、1、2、3、4 或 5 个碱基分开且其中回文序列至少为 8 个碱基长度；(b)(TCG)_y 序列，其中 y 是 1 或 2，(TCG)_y 序列的 5'T 位置是离多核苷酸 5'末端的 0、1、2 或 3 个碱基，此外其中(a)的回文序列包括所有或部分(TCG)_y 序列且其中(TCG)_y 序列的 CG 可以是(a)的回文序列的一个 CG 二核苷酸。

另一方面，发明的免疫调节多核苷酸包括 (a)5'-N_x(TCG(N_q))_yN_w(X₁X₂CGX₂'X₁'(CG)_p)_z(SEQ ID NO:156)，其中 N 是核苷，x=0-3，y=1-4，w=-2、-1、0、1 或 2，p=0 或 1，q=0、1 或 2 且 z=1-20，X₁ 和 X₁'是自身互补的核苷，X₂ 和 X₂'是自身互补的核苷，其中(TCG(N_q))_y 序列的 5'T 是离多核苷酸 5'末端的 0-3 个碱

基；(b)至少8个碱基长度的回文序列，其中回文序列包括($X_1X_2CGX_2'X_1'(CG)_p)_z$ 序列的第1个($X_1X_2CGX_2'X_1'$)。在一些实施方案中， X_1 和 X_2 各是A或T。

另一方面，发明的免疫调节多核苷酸包括(a) $5'-N_x(TCG(N_q))_yN_w(X_1X_2CGX_3X_3'CGX_2'X_1'(CG)_p)_z$ (SEQ ID NO:159)，其中N是核苷， $x=0-3$ ， $y=1-4$ ， $w=-2$ 、-1、0、1或2， $p=0$ 或1， $q=0$ 、1或2且 $z=1-20$ ， X_1 和 X_1' 是自身互补的核苷， X_2 和 X_2' 是自身互补的核苷， X_3 和 X_3' 是自身互补的核苷，其中($TCG(N_q)_y$)序列的5'T是离多核苷酸5'末端的0-3个碱基；(b)至少10个碱基长度的回文序列，其中回文序列包括($X_1X_2CGX_3X_3'CGX_2'X_1'(CG)_p)_z$ (SEQ ID NO:217)序列的第1个($X_1X_2CGX_3X_3'CGX_2'X_1'$)(SEQ ID NO:216)。在一些实施方案中，当 $p=1$ 时， X_1 、 X_2 和 X_3 各是A或T。在一些实施方案中，当 $p=0$ 时， X_1 、 X_2 和 X_3 中至少2个是A或T。

另一方面，发明的免疫调节多核苷酸包括(a) $5'-N_x(TCG(N_q))_yN_w(X_1X_2X_3X_4X_5CGX_5'X_4'X_3'X_2'X_1'(CG)_p)_z$ (SEQ ID NO:160)，其中N是核苷， $x=0-3$ ， $y=1-4$ ， $w=-3$ 、-2、-1、0、1或2， $p=0$ 或1， $q=0$ 、1或2且 $z=1-20$ ， X_1 和 X_1' 是自身互补的核苷， X_2 和 X_2' 是自身互补的核苷， X_3 和 X_3' 是自身互补的核苷， X_4 和 X_4' 是自身互补的核苷， X_5 和 X_5' 是自身互补的核苷，其中($TCG(N_q)_y$)序列的5'T是离多核苷酸5'末端的0-3个碱基；(b)至少12个碱基长度的回文序列，其中回文序列包括($X_1X_2X_3X_4X_5CGX_5'X_4'X_3'X_2'X_1'(CG)_p)_z$ (SEQ ID NO:219)序列的第1个($X_1X_2X_3X_4X_5CGX_5'X_4'X_3'X_2'X_1'$)(SEQ ID NO:218)。在一些实施方案中， X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 和 X_5 中至少3个是A或T。

一方面，发明的免疫调节多核苷酸包括(a) $5'-N_x(TCG(N_q))_yN_w(CGX_1X_1'CG(CG)_p)_z$ (SEQ ID NO:161)，其中N是核苷， $x=0-3$ ， $y=1-4$ ， $w=-2$ 、0、1或2， $p=0$ 或1， $q=0$ 、1或2且 $z=1-20$ ，其中 X_1 和 X_1' 是自身互补的核苷且其中($TCG(N_q)_y$)序列的5'T是离多核苷酸5'末端的0-3个碱基；(b)至少8个碱基长度的回文序列，其中回文序列包括($CGX_1X_1'CG(CG)_p)_z$ 序列的第1个($CGX_1X_1'CG$)。

另一方面，发明的免疫调节多核苷酸包括(a) $5'-N_x(TCG(N_q))_yN_w(X_1CGCGX_1'(CG)_p)_z$ (SEQ ID NO:162)，其中N是核苷， $x=0-3$ ， $y=1-4$ ， $w=-1$ 、0、1或2， $p=0$ 或1， $q=0$ 、1或2且 $z=1-20$ ， X_1 和 X_1' 是自身互补的核苷，其中($TCG(N_q)_y$)序列的5'T是离多核苷酸5'末端的0-3个碱基；(b)至少8个碱基长度的回文序列，其中回文序列包括($X_1CGCGX_1'(CG)_p)_z$ 序列的第1个(X_1CGCGX_1')。

另一方面，发明的免疫调节多核苷酸包括(a) $5'-N_x(TCG(N_q))_yN_w$

(X₁X₂CGCGX₂'X₁'(CG)_p)_z(SEQ ID NO:163), 其中 N 是核苷, x=0-3, y=1-4, w=-2、-1、0、1 或 2, p=0 或 1, q=0、1 或 2 且 z=1-20, X₁ 和 X₁'是自身互补的核苷, X₂ 和 X₂'是自身互补的核苷, 其中(TCG(N_q))_y序列的 5'T 是离多核苷酸 5'末端的 0-3 个碱基; (b) 至少 8 个碱基长度的回文序列, 其中回文序列包括(X₁X₂CGCGX₂'X₁'(CG)_p)_z(SEQ ID NO:220)序列的第 1 个(X₁X₂CGCGX₂'X₁')。在一些实施方案中, X₁ 和 X₂ 各是 A 或 T。

另一方面, 发明的免疫调节多核苷酸包括 (a)5'-N_x(TCG(N_q))_yN_w(X₁X₂X₃CGCGX₃'X₂'X₁'(CG)_p)_z(SEQ ID NO:164), 其中 N 是核苷, x=0-3, y=1-4, w=-3、-2、-1、0、1 或 2, p=0 或 1, q=0、1 或 2 且 z=1-20, X₁ 和 X₁'是自身互补的核苷, X₂ 和 X₂'是自身互补的核苷, X₃ 和 X₃'是自身互补的核苷, 其中(TCG(N_q))_y序列的 5'T 是离多核苷酸 5'末端的 0-3 个碱基; (b)至少 10 个碱基长度的回文序列, 其中回文序列包括(X₁X₂X₃CGCGX₃'X₂'X₁'(CG)_p)_z(SEQ ID NO:222)序列的第 1 个(X₁X₂X₃CGCGX₃'X₂'X₁')(SEQ ID NO:221)。在一些实施方案中, 当 p=1 时, X₁、X₂ 和 X₃ 各是 A 或 T。在一些实施方案中, 当 p=0 时, X₁、X₂ 和 X₃ 中至少 2 个是 A 或 T。

另一方面, 发明的免疫调节多核苷酸包括 (a)5'-N_x(TCG(N_q))_yN_w(CGX₁X₂X₂'X₁'CG(CG)_p)_z(SEQ ID NO:165), 其中 N 是核苷, x=0-3, y=1-4, w=-2、0、1 或 2, p=0 或 1, q=0、1 或 2 且 z=1-20, X₁ 和 X₁'是自身互补的核苷, X₂ 和 X₂'是自身互补的核苷, 其中(TCG(N_q))_y序列的 5'T 是离多核苷酸 5'末端的 0-3 个碱基; (b) 至少 8 个碱基长度的回文序列, 其中回文序列包括(CGX₁X₂X₂'X₁'CG(CG)_p)_z(SEQ ID NO:223)序列的第 1 个(CGX₁X₂X₂'X₁'CG)。在一些实施方案中, X₁ 和 X₂ 各是 A 或 T。

另一方面, 发明提供调节个体免疫反应的方法, 包括施用发明的免疫调节多核苷酸给个体, 量足以调节所述个体中的免疫反应。根据发明方法的免疫调节可在个体中实践, 包括患 Th2 型免疫反应相关疾病的个体(例如变态反应、变态反应诱导的哮喘或特应性皮炎)、接受疫苗如治疗性疫苗(例如包括变应抗原表位、分枝杆菌抗原表位或肿瘤相关抗原表位的疫苗)或预防性疫苗的个体、患癌症个体和有传染病的个体。

另一方面, 发明提供增加个体中干扰素-γ(IFN-γ)的方法, 包括施用有效量的发明免疫调节多核苷酸给所述个体。根据发明施用免疫调节多核苷酸增加个体中的 IFN-γ。

另一方面，发明提供增加个体中干扰素- α (IFN- α)的方法，包括施用有效量的发明免疫调节多核苷酸给所述个体。根据发明施用免疫调节多核苷酸增加个体中的 IFN- α 。

另一方面，发明提供改善 1 种或多种传染病症状的方法，包括施用有效量的发明免疫调节多核苷酸给有传染病的个体。根据发明施用免疫调节多核苷酸可改善 1 种或多种传染病症状。

另一方面，发明提供改善 1 种或多种 IgE 相关疾病症状的方法，包括施用有效量的发明免疫调节多核苷酸给有 IgE 相关疾病的个体。根据发明施用免疫调节多核苷酸可改善 1 种或多种 IgE 相关疾病症状。

发明进一步涉及试剂盒，优选执行发明的方法。发明的试剂盒一般包括发明的免疫调节多核苷酸(通常在合适的容器中)，更可包括使用免疫调节多核苷酸免疫调节个体的说明书。

附图的概述

图 1 描述人 PBMCs 响应变化剂量的 4 种不同 IMPs: SEQ ID Nos:1、27、113 和 172 产生的 IFN- α 量(pg/ml)。

图 2 包含描述由 IMPs 刺激的 NK 细胞裂解活性的图。

完成发明的方式

我们发现了免疫调节多核苷酸和用这些免疫调节多核苷酸调节个体特定是人免疫反应的方法。发明的组合物包括本文所述的免疫调节多核苷酸。发明的免疫调节多核苷酸包括 a)至少 8 个碱基长度的回文序列，它包含至少 1 个 CG 二核苷酸和 b)至少 1 个在多核苷酸 5'末端或附近的 TCG 三核苷酸。

我们发现发明的免疫调节多核苷酸以多种方式有效调节免疫细胞，包括人细胞。我们观察到发明的免疫调节多核苷酸能有效刺激细胞因子从人细胞中生成，包括 I 型干扰素如 IFN- α 、IFN- ω 和 IFN- γ 。我们也观察到发明的免疫调节多核苷酸能有效刺激 B 细胞增殖。我们观察到发明的一些免疫调节多核苷酸激活浆细胞样树突细胞以使其成熟。我们也观察到存在一些发明的免疫调节多核苷酸能导致培养中的浆细胞样树突细胞细胞凋亡延迟。

发明也提供调节个体免疫反应的方法，通过施用发明的免疫调节多核苷酸给个体。进一步提供包括发明的 IMPs 的试剂盒。试剂盒更可包括施用发明免疫调节多

核苷酸免疫调节受试者的说明书以及免疫调节多核苷酸。

一般技术

除非另有说明，本发明实践使用分子生物学(包括重组技术)、微生物、细胞生物学、生物化学和免疫学的常规技术，它们在本领域技术范围内。这些技术在文献中详细解释，如《分子克隆：实验室手册》(*Molecular Cloning:A Laboratory Manual*)，第2版(Sambrook等，1989)；《寡核苷酸合成》(*Oligonucleotide Synthesis*) (M.J.Gait编，1984)；《动物细胞培养》(*Animal Cell Culture*) (R.I.Freshney编，1987)；《实验免疫学手册》(*Handbook of Experimental Immunology*) (D.M.Weir和C.C.Blackwell编)；《哺乳动物细胞的基因转移载体》(*Gene Transfer Vector for Mammal Cells*) (J.M.Miller和M.P.Calos编，1987)；《新编分子生物学实验指南》(*Current Protocols in Molecular Biology*) (F.M.Ausubel等编，1987)；《PCR：聚合酶链式反应》(*PCR:The Polymerase Chain Reaction*) (Mullis等编，1994)；《新编免疫学实验指南》(*Current Protocols in Immunology*) (J.E.Coligan等编，1991)；《免疫测定手册》(*The Immunoassay Handbook*) (D.Wild编，Stockton Press NY，1994)；《生物缀合技术》(*Bioconjugate Techniques*) (Greg T.Hermanson编，Academic Press，1996) 和《免疫学分析方法》(*Methods of Immunological Analysis*) (R.Masseyeff, W.H.Albert和N.A.Staines编，Weinheim:VCH Verlags gesellschaft mbH，1993)。

定义

如本文所用，除非另有说明，单数形式“a”、“an”和“the”包括复数基准。例如，“an”IMP包括1种或多种IMP。

如本文所交换使用，术语“多核苷酸”和“寡核苷酸”包括单链DNA(ssDNA)、双链DNA(dsDNA)、单链RNA(ssRNA)和双链RNA(dsRNA)、修饰的寡核苷酸和寡核苷或其组合。寡核苷酸可以是线性或环形构型，或寡核苷酸可包含线性和环形区段。寡核苷酸是相连核苷的聚合体，一般经磷酸二酯连接，尽管交替连接如硫代磷酸酯也可用于寡核苷酸。核苷由嘌呤(腺嘌呤(A)或鸟嘌呤(G)或其衍生物)或嘧啶(胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)或尿嘧啶(U)其衍生物)碱基组成，碱基与糖键合。DNA中的4种核苷单位(或碱基)称为脱氧腺苷、脱氧肌鸟苷、脱氧胸苷和脱氧胞苷。核苷酸是核苷的磷酸酯。

如本文所用，术语“免疫调节多核苷酸”或“IMP”指影响和/或有助于可测量免疫反应的多核苷酸，如体外、体内和/或活体外所测量。可测量免疫反应的例子

包括但不限于抗原特异性抗体生成、细胞因子分泌、激活或扩增淋巴细胞群如 NK 细胞、CD4+T 淋巴细胞、CD8+T 淋巴细胞、B 淋巴细胞等。IMP 序列优选激活 Th1 型反应。

如本文所用，术语“免疫调节”或“调节免疫反应”包括免疫刺激以及免疫抑制效果。免疫调节主要是总免疫反应的定性变化，尽管定量变化也结合免疫调节发生。根据本发明免疫调节的免疫反应移向“Th1 型”免疫反应，与“Th2 型”免疫反应相反。通常认为 Th1 型反应是细胞免疫系统(例如细胞毒性淋巴细胞)反应，而 Th2 型反应一般基于“体液”或抗体。Th1 型免疫反应的正常特征是对抗原的“迟发型超敏”反应，能通过 Th1 相关细胞因子水平增加在生化水平检测，如 IFN- γ 、IFN- α 、IL-2、IL-12 和 TNF- β 以及 IL-6，尽管 IL-6 也可与 Th1 型反应相关。Th1 型免疫反应一般与细胞毒性淋巴细胞(CTL)生成和抗体的低水平或短暂生成相关。Th2 型免疫反应一般与较高水平抗体生成相关，包括 IgE 生成、没有 CTL 生成或最小以及表达 Th2 相关细胞因子如 IL-4 相关。因此，根据发明的免疫调节可通过例如根据发明方法治疗的个体与没有治疗个体相比，IFN- γ 和/或 IFN- α 增加和/或 IgE 生成减少来识别。

术语“3'”一般指多核苷酸或寡核苷酸中的区域或位置，在相同多核苷酸或寡核苷酸另外区域或位置的 3'(下游)。术语“3'末端”指多核苷酸的 3'末端。

术语“5'”一般指多核苷酸或寡核苷酸中的区域或位置，在相同多核苷酸或寡核苷酸另外区域或位置的 5'(上游)。术语“5'末端”指多核苷酸的 5'末端。

与另外序列“相邻”的区域、部分或序列直接毗邻该区域、部分或序列。例如，与免疫调节多核苷酸特定部分相邻的另外多核苷酸序列(如 TCG 三核苷酸)直接毗邻该区域。

术语“回文序列”或“回文”指反向重复的核酸序列，如 ABCDD'C'B'A'，其中碱基例如 A 和 A'、B 和 B'、C 和 C'、D 和 D'能形成沃森-克里克碱基对。这种序列在一些条件下可以是单链或能形成双链结构或形成发夹环结构。例如，如本文所用，“8 碱基回文”指核酸序列中回文序列为 8 个碱基长度，如 ABCDD'C'B'A'。回文序列可以是部分多核苷酸，多核苷酸也包含非回文序列。多核苷酸可包含 1 个或多个回文序列部分和 1 个或多个非回文序列部分。另外，多核苷酸序列可以完全是回文。在有超过 1 个回文序列部分的多核苷酸中，回文序列部分可彼此重叠或回文序列部分彼此不重叠。

术语“缀合物”指复合体，其中 IMP 和抗原相连。这种缀合键包括共价和/或

非共价键。

术语“抗原”指由抗体或T细胞抗原受体特异识别和结合的物质。抗原可包括肽、蛋白、糖蛋白、多糖、复合碳水化合物、糖、神经节苷脂、脂类和磷脂；它们的部分和组合。抗原可以是天然发现或合成的。适合用IMP施用的抗原包括能引起B细胞或T细胞抗原特异反应的任何分子。抗原优选引起特异于该抗原的抗体反应。半抗原包括在“抗原”范围内。半抗原是本身没有免疫原性的低分子量化合物，但当缀合含抗原决定簇的免疫原性分子时呈现免疫原性。小分子可能需要半抗原化以产生抗原性。本发明抗原优选包括肽、脂类(例如固醇、脂肪酸和磷脂)、多糖如流感嗜血杆菌疫苗所用多糖、神经节苷脂和糖蛋白。

“佐剂”指物质在加入免疫原性试剂如抗原时，可非特异性提高或加强受体宿主接触混合物时对抗原的免疫反应。

术语“肽”是有足够长度和引起生物反应的组成的多肽，如抗体生成或细胞因子活性，无论肽是否是半抗原。通常，肽至少是6个氨基酸残基长度。术语“肽”进一步包括修饰的氨基酸(无论是天然或是非天然产生)，这种修饰包括但不限于磷酸化、糖基化、聚乙二醇化、脂质化和甲基化。

“抗原肽”可包括纯化的天然肽、合成肽、重组蛋白、粗蛋白提取物、减毒或灭活病毒、细胞、微生物、或这种肽的片段。因而，“抗原肽”或“抗原多肽”指表现出1种或多种抗原性质的所有或部分多肽。因此，例如“*Amb a 1*抗原多肽”或“*Amb a 1*多肽抗原”是来自*Amb a 1*的氨基酸序列，无论是完整序列、部分序列和/或表现出抗原性质的序列修饰(即特异结合抗体或T细胞受体)。

“传递分子”或“传递载体”是促进、允许和/或提高免疫调节多核苷酸传递到特定位置和/或关于特定时间选择的化学部分。传递载体可以或不可以另外刺激免疫反应。

“对抗原的变态反应”指免疫反应，一般特征是产生嗜伊红细胞和/或抗原特异IgE和它们产生的效果。如本领域所熟知，IgE结合肥大细胞和嗜碱细胞上的IgE受体。稍后接触由IgE识别的抗原时，抗原交联肥大细胞和嗜碱细胞上的IgE，引起这些细胞脱粒，包括但不限于组胺释放。要理解术语“对抗原的变态反应”、“变态反应”和“变应性状况”对应用一些发明的方法同等适合。此外，要理解发明的方法包括对预防变态反应以及治疗预先存在变应性状况同等适合的方法。

如本文所用，术语“变应原”指抗原或分子的抗原部分，通常是蛋白，在接触受试者时引起变态反应。受试者通常对变应原过敏，通过例如疹块和红斑试验或

本领域已知的任何方法指示。据说分子是变应原，即使仅一小部分受试者亚群在接触分子时表现出变应性(例如 IgE)免疫反应。本领域已知一些分离的变应原。它们包括但不限于本文表 1 中所列。

术语“脱敏作用”指施用增加剂量的变应原的方法，受试者已证明对变应原敏感。用于脱敏作用的变应原剂量例子在本领域已知，参见例如 Fornadley(1998) *Otolaryngol.Clin.North Am.* 31:111-127。

“抗原特异性免疫治疗”指包括抗原并产生抗原特异性免疫反应调节的任何免疫治疗形式。在变态反应内容中，抗原特异性免疫治疗包括但不限于脱敏治疗。

术语“微载体”指不溶于水的颗粒组合物，尺寸小于约 150、120 或 100 μm ，优选小于约 50-60 μm ，优选小于约 10 μm ，优选小于约 5、2.5、2 或 1.5 μm 。微载体包括“纳米载体”，它们是尺寸小于约 1 μm 的微载体，优选小于约 500nm。微载体包括固相颗粒，如从生物相容的天然产生聚合物、合成聚合物或合成共聚物形成的颗粒，尽管从琼脂糖或交联琼脂糖形成的微载体可包括于本文的微载体定义或从本文的微载体定义以及本领域已知的其它可生物降解物质中排除。用于本发明的微载体可生物降解或非生物降解。非生物降解的固相微载体形成自在哺乳动物生理条件下不易侵蚀和/或不可降解的聚合物或其它物质，如聚苯乙烯、聚丙烯、硅石、陶瓷、聚丙烯酰胺、金、胶乳、羟磷灰石、葡聚糖、铁磁和顺磁性材料。可生物降解的固相微载体能形成自在哺乳动物生理条件下可生物降解(如聚(乳酸)、聚(乙醇酸)和其共聚物)或易侵蚀(例如聚(原酸酯)如 3, 9-二亚乙基-2, 4, 8, 10-四氧螺[5.5]十一烷(DETOSU)或聚(酐)如癸二酸的聚(酐))的聚合物。微载体也可以是液相(例如基于油或脂质)，如脂质体、无抗原的 iscoms(免疫刺激复合体，它们是胆固醇、磷脂或佐剂活性皂角苷的稳定复合体)、或者水包油或油包水乳剂中发现的小滴或胶束。可生物降解的液相微载体通常掺入可生物降解油，其中一些在本领域已知，包括鲨烯和植物油。微载体典型是球形，但偏离球形的微载体也是可接受的(例如椭圆形、杆形等)。由于它们的不溶性质(关于水)，微载体可从水或基于水的(含水)溶液中过滤。

如本文所用，术语“非生物降解”指在正常哺乳动物生理条件下不降解或侵蚀的微载体。一般，如果在正常人血清中 37°C 孵育 72 小时后不降解(即损失小于其 5% 质量或平均聚合物长度)，认为微载体是非生物降解的。

如果在正常哺乳动物生理条件下降解或侵蚀，认为微载体是“可生物降解的”。一般，如果在正常人血清中 37°C 孵育 72 小时后降解(即损失大于其 5% 质量或平均

聚合物长度)，认为微载体是“可生物降解的”。

微载体“大小”通常是厂商规定的颗粒“设计大小”或预定大小。大小可以是直接测量的尺寸，如平均或最大直径，或可通过间接测定如过滤筛选测定来确定。直接测量微载体大小通常用显微镜、普通光学显微镜或扫描电镜(SEM)进行，与已知大小的颗粒比较或参照测微计。由于生产过程中产生微小的尺寸变化，如果测量显示微载体是土约 5-10%的规定尺寸，认为微载体具有规定大小。大小特征也可通过动态光学散射或遮蔽技术(obscuration techniques)确定。另外，微载体大小可通过过滤筛选测定来确定。如果至少 97% 颗粒经过规定大小的“筛选型”滤器(即滤器中保留的颗粒在滤器表面上，如聚碳酸酯或聚醚砜滤器，与保留颗粒贮存在滤器内的“深度滤器”相反)，则微载体小于规定尺寸。如果至少约 97% 微载体颗粒保留于规定大小的筛选型滤器，则微载体大于规定尺寸。因此，至少约 97% 的约 10 μ m 到约 10nm 大小的微载体经过 10 μ m 孔筛选滤器并通过 10nm 筛选滤器保留。

如上面的讨论所示，提到微载体的大小或大小范围隐含地包括近似变化和接近规定大小和/或大小范围。当提及大小或大小范围时，这通过使用术语“约”反映，提到大小或大小范围而未用到“约”并不意味大小或大小范围是精确的。

术语“免疫调节多核苷酸/微载体复合物”或“IMP/MC 复合物”指免疫调节多核苷酸和微载体的复合物。复合物的组分可共价或非共价连接。非共价键可由任何非共价键力介导，包括疏水相互作用、离子(静电)键合、氢键和/或范德瓦尔斯引力。在疏水键的情况下，键一般经共价连接 IMP 的疏水部分(如胆固醇)。

“个体”是脊椎动物，如鸟类，优选是哺乳动物，更优选是人。哺乳动物包括但不限于人、灵长类动物、农畜(farm animal)、运动型动物(sport animals)、啮齿动物和宠物。

“有效量”或“足够量”的物质是足以影响有益或所需结果的量，包括临床结果，同样，“有效量”取决于其应用情况。施用调节免疫反应的组合物到共施用抗原时，有效量的免疫调节多核苷酸和抗原是足以获得这种调节的量，与单独施用抗原时获得的免疫反应相比。有效量可在 1 次或多次施用中施用。

如本文所用，术语“共施用”指施用至少 2 种不同物质以调节免疫反应，施用时间足够接近。共施用优选指同时施用至少 2 种不同物质。

“刺激”反应或参数包括引起和/或增强反应或参数。例如，“刺激”免疫反应如 Th1 反应指反应增加，这可能产生于引起和/或增强反应。类似地，“刺激”细

胞因子或细胞类型(如 CTL)指细胞因子或细胞类型的量或水平增加。B 细胞“刺激”包括例如来自受刺激 B 细胞的增强的 B 细胞增殖、诱导的 B 细胞活化和/或增加的细胞因子生成，如 IL-6 和/或 TNF α 。

“IgE 相关疾病”是一种生理状况，其特征部分是 IgE 水平提高，这可以或不可以持久。IgE 相关疾病包括但不限于变态反应、食物过敏、变态反应相关紊乱(下述)、哮喘、鼻炎、特应性皮炎、结膜炎、荨麻疹、休克、膜翅目昆虫(*Hymenoptera*)针刺变态反应、药物变态反应和寄生虫感染。此术语也包括这些疾病的相关症状。一般，这些疾病中的 IgE 是抗原特异性的。

“过敏相关紊乱”指抗原特异 IgE 免疫反应作用产生的紊乱。这种作用包括但不限于低血压和休克。过敏性反应是变态反应相关紊乱的例子，在此期间组胺释放到循环中，导致血管舒张以及毛细血管渗透性增加，结果来自循环的血浆损失显著。过敏性反应可全身性发生，整个身体经历相关作用，过敏性反应可局部发生，反应限于特定靶组织或器官。

如本文所用，术语“病毒病”指以病毒作为其病原的疾病。病毒病的例子包括乙肝、丙肝、流感、获得性免疫缺陷综合征(AIDS)和带状疱疹。

如本文所用和本领域中充分了解，“治疗”是一种获得有益或所需结果的方法，包括临床结果。为了本发明目的，有益或所需临床结果包括但不限于缓解或改善 1 种或多种症状、减小疾病程度、稳定(即不恶化)疾病状态、防止疾病传播、延迟或减缓疾病进展、改善或减轻疾病状态、缓解(无论部分或全部)，无论可检测或不能检测。“治疗”也可指与不接受治疗所预期的存活相比，延长存活。

“减轻”疾病或紊乱指与不治疗紊乱相比，紊乱或疾病状态的程度和/或不需要临床表现减少和/或进展的时程减缓或延长。特别是在变态反应情况中，如本领域技术人员充分了解，减轻可在调节免疫反应抗变应原时发生。此外，减轻不一定通过施用 1 种剂量来发生，但常通过施用一系列剂量发生。因此，足以改善反应或紊乱的量可在 1 次或多次施用中施用。

由免疫调节多核苷酸和抗原“引起”的“抗体效价”或“抗体量”指特定抗体在施用免疫调节多核苷酸和抗原后的时间点所测量的量。

“Th1 相关抗体”是其生成和/或增加与 Th1 免疫反应相关的抗体。例如，IgG2a 是小鼠中的 Th1 相关抗体。为了本发明目的，测量 Th1 相关抗体可以是 1 种或多种这种抗体的测量。例如，在人中，测量 Th1 相关抗体可要求测量 IgG1 和/或 IgG3。

“Th2 相关抗体”是其生成和/或增加与 Th2 免疫反应相关的抗体。例如，IgG1

是小鼠中的 Th2 相关抗体。为了本发明目的，测量 Th2 相关抗体可以是 1 种或多种这种抗体的测量。例如，在人中，测量 Th2 相关抗体可要求测量 IgG2 和/或 IgG4。

“遏制”或“抑制”功能或活性如细胞因子生成、抗体生成或组胺释放是减小功能或活性，与另外相同条件下的功能或活性相比，除了感兴趣的条件或参数外，或另外与其它条件相比。例如，包括免疫调节多核苷酸和抗原的组合物抑制组胺释放，与例如单独抗原诱导的组胺释放相比降低组胺释放。另一个例子是包括免疫调节多核苷酸和抗原的组合物抑制抗体生成，与例如单独抗原产生的抗体程度和/或水平相比降低抗体程度和/或水平。

“血清蛋白”是无疾病哺乳动物中正常发现的蛋白，特定是无疾病的牛。最普遍的血清蛋白是血清白蛋白。

如本文所用，术语“包含”和其同源词用于广范意义；即相等于术语“包括”和其对应同源词。

发明的组合物

发明提供免疫调节多核苷酸(IMPs)用于调节个体的免疫反应。发明组合物包括单独的免疫调节多核苷酸(或者 2 种或多种免疫调节多核苷酸的组合)或结合另外的免疫调节剂如肽、抗原(下述)和/或其它佐剂。发明组合物可包括免疫调节多核苷酸和药学上可接受的赋形剂。药学上可接受的赋形剂包括缓冲液，它们在本领域熟知。《雷明顿：药学的科学和实践》(*Remington: The Science and Practice of Pharmacy*)，第 20 版，Mack Publishing(2000)。

施用时，包括抗原、发明的免疫调节多核苷酸和任选佐剂的组合物能导致对抗原的免疫反应加强并因此产生增强的免疫反应，与含单独 IMP 和抗原的组合物所得结果相比。佐剂在本领域已知，包括但不限于水包油乳剂、油包水乳剂、明矾(铝盐)、脂质体和微粒，包括但不限于聚苯乙烯、淀粉、聚磷腈和聚交酯/聚葡萄糖。其它合适的佐剂也包括但不限于 MF59、DETOXTM(Ribi)、鲨烯混合物(SAF-1)、胞壁酰肽、皂苷衍生物、分枝杆菌细胞壁制品、单磷酰基脂质 A、分枝菌酸衍生物、非离子嵌段共聚物表面活性剂、Quil A、霍乱毒素 B 亚基、聚磷腈和衍生物、免疫刺激复合物(ISCOMs)如 Takahashi 等(1990) *Nature* 344:873-875 所述以及以脂类为基础的佐剂和本文所述其它佐剂。为了兽医用途和在动物中生成抗体，可使用弗氏佐剂(完全和不完全)的促有丝分裂成分。

发明的 IMPs 可结合其它治疗用于特定适应证。例如，除了 IMP 外，发明组合物也可包括抗疟疾药物如用于疟疾病人的氯喹，杀利什曼原虫的药物如用于利什

曼病患者的五肽和/或别嘌呤醇，抗分枝杆菌药物如用于肺结核病人的异烟肼、利福平和/或乙胺丁醇，或用于特应性(变态反应)患者的变应原脱敏试剂。

如本文所述，发明组合物可包括 IMPs 且可进一步包括 1 种或多种另外的免疫治疗剂(即经免疫系统作用的试剂和/或获得自免疫系统的试剂)，包括但不限于细胞因子、佐剂和抗体。治疗性抗体的例子包括癌症所用抗体(例如抗肿瘤抗体)，如下面所述。

免疫调节多核苷酸

根据本发明，免疫调节多核苷酸包含至少 1 种回文序列(即回文)，回文序列至少为 8 个碱基长度，包含至少 1 个 CG 二核苷酸。IMP 也包含至少 1 个在多核苷酸 5'末端或附近的 TCG 三核苷酸(即 5'-TCG)。在一些例子中，IMP 中的回文序列和 5'-TCG 由 0、1 或 2 个碱基分开。在一些例子中，回文序列包括所有或部分 5'-TCG。

IMPs 已在本领域中描述且它们的活性易鉴定，使用指示免疫反应不同方面的标准测定，如细胞因子分泌、抗体生成、NK 细胞活化、B 细胞增殖、T 细胞增殖。参见例如 WO 97/28259；WO 98/16247；WO 99/11275；Krieg 等(1995) *Nature* 374:546-549；Yamamoto 等(1992a)；Ballas 等(1996)；Klinman 等(1997)；Sato 等(1996)；Pisetsky 等(1996a)；Shimada 等(1986) *Jpn.J.Cancer Res.* 77:808-816；Cowdery 等(1996) *J.Immunol.* 156:4570-4575；Roman 等(1997)；Lipford 等(1997a)；WO 98/55495 和 WO 00/61151。因此，这些和其它方法可用于鉴定、测试和/或确认免疫调节 IMPs。

IMP 可以是大于 10 个碱基或碱基对的任意长度，优选大于 15 个碱基或碱基对，更优选大于 20 个碱基或碱基对长度。

如本文所清楚描述，要理解关于本文所述公式，任何和所有参数是独立选择的。例如，如果 $x=0-2$ ，则 y 可独立选择，无论 x 值为多少(或公式中的任何其它可选择参数)。

在一些实施方案中，IMP 包括 a)至少 8 个碱基长度的回文序列，包含至少 2 个 CG 二核苷酸，其中 CG 二核苷酸彼此由 0、1、2、3、4 或 5 个碱基分开，b)位于离多核苷酸 5'末端 0、1、2 或 3 个碱基的 $(TCG)_y$ 序列，其中 y 是 1 或 2，其中 $(TCG)_y$ 序列 3'末端与回文序列 5'末端由 0、1 或 2 个碱基分开。在一些实施方案中，(b) 中 $(TCG)_y$ 序列的 CG 二核苷酸可当作(a)的回文序列中至少 2 个 CG 二核苷酸之一。在一些实施方案中，回文序列的 CG 二核苷酸由 1、3 或 4 个碱基彼此分开。在发

明的一些 IMPs 中，无论是在此段落或是本专利申请的其它地方描述，回文序列有 G 和 C 小于三分之二的碱基组成。在一些实施方案中，回文序列有 A 和 T 大于三分之一的碱基组成。

在一些实施方案中，IMP 包括 a)至少 8 个碱基长度的回文序列，包含至少 2 个 CG 二核苷酸，其中 CG 二核苷酸由 0、1、2、3、4 或 5 个碱基彼此分开，b)位于离多核苷酸 5'末端 0、1、2 或 3 个碱基的 $(TCG)_y$ 序列，其中 y 是 1 或 2，回文序列包括所有或部分 $(TCG)_y$ 序列，(b)中 $(TCG)_y$ 序列的 CG 二核苷酸可当作(a)中回文序列的 1 个 CG 二核苷酸。在一些实施方案中，回文序列的 CG 二核苷酸优选由 1、3 或 4 个碱基彼此分开。

因此，在一些实施方案中，IMP 包括的序列具有公式：5'-N_x(TCG(N_q))_yN_w(X₁CGX₁'(CG)_p)_z(SEQ ID NO:155)，其中 N 是核苷，x=0-3，y=1-4，w=-1、0、1 或 2，p=0 或 1，q=0、1 或 2 且 z=1-20，其中 X₁ 和 X₁'自身互补且 其中 $(TCG(N_q))_y$ 序列的 5'T 是离多核苷酸 5'末端的 0-3 个碱基。IMP 进一步包括 8 个碱基长度或更大的回文序列，其中回文序列包括至少 1 个(X₁CGX₁'(CG)_p)序列。在 w=-1 的 IMP 中， $(TCG(N_q))_y$ 序列的 3'碱基是第 1 个(X₁CGX₁'(CG)_p)序列的 5'X₁。在一些实施方案中， $(TCG(N_q))_y$ 序列与回文序列由 0、1 或 2 个碱基分开。在其它实施方案中，回文序列包括所有或部分 $(TCG(N_q))_y$ 序列。在一些实施方案中，当 p=0 时，X₁ 是 A 或 T。

在一些实施方案中，IMP 包括下列序列(回文序列加下划线)：

5'-TCGTCGACGTCGAGATGATAT(SEQ ID NO:35);
 5'-TCGTCGACGTCGACGAGATAT(SEQ ID NO:60);
 5'-TCGACGTCGACGTCGACGTAT(SEQ ID NO:61);
 5'-TCGGTCGACGTCGACCGATT(SEQ ID NO:82);
 5'-TCGGACGTCGACGTCCGATT(SEQ ID NO:83);
 5'-TCGACGTCGA(SEQ ID NO:105);
 5'-TCGGACGTCGACGTGCGATT(SEQ ID NO:114);
 5'-TCGACGTCGACGTCGACGTCGA(SEQ ID NO:119);
 5'-ACGTCGACGTCGACGTCGACGT(SEQ ID NO:120);
 5'-TCGTCGACGTCGACGTCGACGT(SEQ ID NO:121);
 5'-TCGTCGGCGCCGGCGCCGGCGC(SEQ ID NO:122);
 5'-TCGTCGCCGGCGCCGGCGCCGG(SEQ ID NO:123);

5'-TCGATACGTCGACGTCGACGT(SEQ ID NO:124)。

在一些实施方案中，IMP 包括的序列具有公式：5'-N_x(TCG(N_q))_yN_w(X₁X₂X₃CGX₃'X₂'X₁'(CG)_p)_z(SEQ ID NO:157)，其中 N 是核苷，x=0-3，y=1-4，w=-3、-2、-1、0、1 或 2，p=0 或 1，q=0、1 或 2 且 z=1-20，其中 X₁ 和 X₁'、X₂ 和 X₂'、X₃ 和 X₃' 自身互补且其中 (TCG(N_q))_y 序列的 5'T 是离多核苷酸 5' 末端的 0-3 个碱基。IMP 进一步包括 8 个碱基长度或更大的回文序列，其中回文序列包括至少 1 个 (X₁X₂X₃CGX₃'X₂'X₁'(CG)_p)(SEQ ID NO:224) 序列的第 1 个(X₁X₂X₃CGX₃'X₂'X₁')。在 w=-1 的 IMP 中，(TCG(N_q))_y 序列的 3' 碱基是第 1 个(X₁X₂X₃CGX₃'X₂'X₁'(CG)_p)(SEQ ID NO:224) 序列的 5'X₁。在 w=-2 的 IMP 中，倒数第二(即最后第二)和最终(即最后)的(TCG(N_q))_y 序列 3' 碱基分别是第 1 个(X₁X₂X₃CGX₃'X₂'X₁'(CG)_p)(SEQ ID NO:224) 序列的 5'X₁ 和 X₂。在 w=-3 的 IMP 中，倒数第三(即最后第三)、倒数第二(即最后第二)和最终(即最后)的(TCG(N_q))_y 序列 3' 碱基分别是第 1 个(X₁X₂X₃CGX₃'X₂'X₁'(CG)_p)(SEQ ID NO:224) 序列的 5'X₁、X₂ 和 X₃。在一些实施方案中，(TCG(N_q))_y 序列与回文序列由 0、1 或 2 个碱基分开。在其它实施方案中，回文序列包括所有或部分(TCG(N_q))_y 序列。在一些实施方案中，当 p=1 时，X₁、X₂、X₃ 各是 A 或 T。在一些实施方案中，当 p=0 时，X₁、X₂、X₃ 的至少 2 个是 A 或 T。

在一些实施方案中，IMP 包括下列序列(回文序列加下划线)：

5'-TCGTCGAAACGTTCGACAGT (SEQ ID NO:62);

5'-TCGTCGAGACGTCTCGAC AGT (SEQ ID NO:63);

5'-TCGTCGAAGCGCTTCGACAGT (SEQ ID NO:125);

5'-TCGTCGAATCGATTCGACAGT (SEQ ID NO:126);

5'-TCGTCGAGTCGACTCGACAGT (SEQ ID NO:127);

5'-TCGTCGCAACGTTGCGACAGT (SEQ ID NO:128);

5'-TCGTCGCCGCGCGGCGACAGT (SEQ ID NO:129);

5'-TCGAACGTTCGACAGTGAT (SEQ ID NO:130).

在一些实施方案中，IMP 包括的序列具有公式：5'-N_x(TCG(N_q))_yN_w(X₁X₂X₃X₄CGX₄'X₃'X₂'X₁'(CG)_p)_z(SEQ ID NO:158)，其中 N 是核苷，x=0-3，y=1-4，w=-3、-2、-1 或 2，p=0 或 1，q=0、1 或 2，且 z=1-20，其中 X₁ 和 X₁'X₂ 和 X₂'X₃ 和 X₃'；和 X₄ 和 X₄' 自身互补且其中 (TCG(N_q))_y 序列的 5'T 是离多核苷酸 5' 末端的 0-3 个

碱基。IMP 进一步包括 10 个碱基长度或更大的回文序列，其中回文序列包括至少 1 个($X_1 X_2 X_3 X_4 CG X_4' X_3' X_2' X_1$ (SEQ ID No:226)序列的第 1 个($X_1 X_2 X_3 X_4 CG X_4' X_3' X_2' X_1$ (SEQ ID No:225)。在 $w=-1$ 的 IMP 中， $(TCG(N_q))_y$ 序列的 3' 碱基是第 1 个($(X_1 X_2 X_3 X_4 CG X_4' X_3' X_2' X_1'(CG)_p$)SEQ ID No:226)序列的 5' \times 10 在 $W=-2$ 的 IMP 中，倒数第二（即最后第二）和最终（即最后）的 $(TCG(N_q))_y$ 序列 3' 碱基分别是第 1 个($X_1 X_2 X_3 X_4 CG X_4' X_3' X_2' X_1'(CG)_p$) (SEQ ID No:226)序列的 5' X_1 和 X_2 。在 $W=-3$ 的 IMP 中，倒数第三（即最后第三）、倒数第二（即最后第二）和最终（即最后）的 $(TCG(N_q))_y$ 序列 3' 碱基分别是第一个($X_1 X_2 X_3 X_4 CG X_4' X_3' X_2' X_1'(CG)_p$) (SEQ ID No:226)序列的 5' X_1 、 X_2 和 X_3 。在一些实施方案中， $(TCG(N_q))_y$ 序列与回文序列由 0, 1 或 2 个碱基分开。在其它实施方案中，回文序列包括所有或部分 $(TCG(N_q))_y$ 序列。在一些实施方案中，当 $P=1$ 时， X_1 、 X_2 、 X_3 的至少 3 个是 A 或 T。在一些实施方案中，当 $P=0$ 时， X_1 、 X_2 、 X_3 和 X_4 的至少 2 个是 A 或 T。

在一些实施方案中，IMP 包括下列序列(回文序列加下划线):

5'-TCGTCGAAACGTTTCGAGAT(SEQ ID NO:64);

5'-TCGAAAACGTTTCGAGATGAT(SEQ ID NO:65);

5'-TCGAGGACGTCCTCGAGATGAT(SEQ ID NO:66);

5'-TCGAGGTCGACCTCGAGATGAT(SEQ ID NO:131);

5'-ATCGATGTCGACATCGATATGAT(SEQ ID NO:132);

5'-TCGTCGTCGACGACGAGATGAT(SEQ ID NO:133);

在一些实施方案中，IMP 包括的序列具有公式：5'- $N_x(TCG(N_q))_y N_w (X_1 CGCGX_1'(CG)_p)_z$ (SEQ ID NO:162)，其中 N 是核苷， $x=0-3$ ， $y=1-4$ ， $w=-1$ 、0、1 或 2， $p=0$ 或 1， $q=0$ 、1 或 2 且 $z=1-20$ ，其中 X_1 和 X_1' 自身互补且其中 $(TCG(N_q))_y$ 序列的 5'T 是离多核苷酸 5' 末端的 0-3 个碱基。IMP 进一步包括 8 个碱基长度或更大的回文序列，其中回文序列包括至少 1 个($X_1 CGCGX_1'(CG)_p$)序列的第 1 个($X_1 CGCGX_1'$)。在 $w=-1$ 的 IMP 中， $(TCG(N_q))_y$ 序列的 3' 碱基是第 1 个($X_1 CGCGX_1'(CG)_p$)序列的 5' X_1 。在一些实施方案中， $(TCG(N_q))_y$ 序列与回文序列由 0、1 或 2 个碱基分开。在其它实施方案中，回文序列包括所有或部分 $(TCG(N_q))_y$ 序列。在一些实施方案中，IMP 包括下列序列(回文序列加下划线):

5'-TCGTCGTCGCGACGAGATGAT(SEQ ID NO:50);

5'-TCGTCGACGCGTCGAGATGAT(SEQ ID NO:142);

5'-TCGTCGGCGCGCCGAGATGAT(SEQ ID NO:143);

在一些实施方案中，IMP 包括的序列具有公式： $5'-N_x(TCG(N_q))_y N_w (CGX_1 X_1' CG(CG)_p)_z$ (SEQ ID NO:161)，其中 N 是核苷， $x=0-3$ ， $y=1-4$ ， $w=-2$ 、 0 、 1 或 2 ， $p=0$ 或 1 ， $q=0$ 、 1 或 2 且 $z=1-20$ ，其中 X_1 和 X_1' 自身互补且其中 $(TCG(N_q))_y$ 序列的 5'T 是离多核苷酸 5'末端的 0-3 个碱基。IMP 进一步包括 8 个碱基长度或更大的回文序列，其中回文序列包括至少 1 种 $(CGX_1 X_1' CG(CG)_p)$ 序列的第 1 个 $(CGX_1 X_1' CG)$ 。在 $w=-2$ 的 IMP 中，倒数第二(即最后第二)和最终(即最后)的 $(TCG(N_q))_y$ 序列 3'碱基是 CG 和第 1 个 $(CGX_1 X_1' CG(CG)_p)$ 序列的 5'CG。在一些实施方案中， $(TCG(N_q))_y$ 序列与回文序列由 0、1 或 2 个碱基分开。在其它实施方案中，回文序列包括所有或部分 $(TCG(N_q))_y$ 序列。在一些实施方案中，IMP 包括下列序列(回文序列加下划线)：

5'-TCGTCGCGATCGCGAGATGAT(SEQ ID NO:49);

5'-TCGTCGCGTACGCGAGATGAT(SEQ ID NO:139);

5'-TCGTCGCGGCCGCGAGATGAT(SEQ ID NO:140);

5'-TCGCGATCGCGCGATCGCGA(SEQ ID NO:141);

在一些实施方案中，IMP 包括的序列具有公式： $5'-N_x(TCG(N_q))_y N_w (X_1 X_2 CGX_3 X_3' CGX_2' X_1'(CG)_p)_z$ (SEQ ID NO:159)，其中 N 是核苷， $x=0-3$ ， $y=1-4$ ， $w=-2$ 、 -1 、 0 、 1 或 2 ， $p=0$ 或 1 ， $q=0$ 、 1 或 2 且 $z=1-20$ ，其中 X_1 和 X_1' 、 X_2 和 X_2' 、 X_3 和 X_3' 自身互补且其中 $(TCG(N_q))_y$ 序列的 5'T 是离多核苷酸 5'末端的 0-3 个碱基。IMP 进一步包括 10 个碱基长度或更大的回文序列，其中回文序列包括至少 1 个 $(X_1 X_2 CGX_3 X_3' CGX_2' X_1'(CG)_p)$ (SEQ ID NO:217) 序列的第 1 个 $(X_1 X_2 CGX_3 X_3' CGX_2' X_1')$ (SEQ ID NO:216)。在 $w=-1$ 的 IMP 中， $(TCG(N_q))_y$ 序列的 3'碱基是第 1 个 $(X_1 X_2 CGX_3 X_3' CGX_2' X_1'(CG)_p)$ (SEQ ID NO:217) 序列的 5'X₁。在 $w=-2$ 的 IMP 中，倒数第二(即最后第二)和最终(即最后)的 $(TCG(N_q))_y$ 序列 3'碱基分别是第 1 个 $(X_1 X_2 CGX_3 X_3' CGX_2' X_1'(CG)_p)$ (SEQ ID NO:217) 序列的 5'X₁ 和 X₂。在一些实施方案中， $(TCG(N_q))_y$ 序列与回文序列由 0、1 或 2 个碱基分开。在其它实施方案中，回文序列包括所有或部分 $(TCG(N_q))_y$ 序列。在一些实施方案中，当 $p=1$ 时， X_1 、 X_2 和 X_3 各是 A 或 T。在一些实施方案中，当 $p=0$ 时， X_1 、 X_2 和 X_3 中至少 2 个是 A 或 T。在一些实施方案中，IMP 包括下列序列(回文序列加下划线)：

5'-TCGGACGATCGTCGACGATCGTC(SEQ ID NO:86);

5'-TCGTCGGACGATCGTCACGACG(SEQ ID NO:87);

5'-TCGGTCGATCGACGTCGATCGAC(SEQ ID NO:134);

5'-TCGGACGCCGTCGACGCCGTC(SEQ ID NO:135);

5'-TCGGACGTACGTCGACGTACGTC(SEQ ID NO:136);

5'-TCGATCGTACGATATCGTACGAT(SEQ ID NO:137);

5'-TCGTCGGACGATCGTCCGACGA(SEQ ID NO:138);

在一些实施方案中，IMP 包括的序列具有公式：5'-N_x(TCG(N_q))_yN_w(X₁X₂CGX₂'X₁'(CG)_p)_z(SEQ ID NO:156)，其中 N 是核苷，x=0-3，y=1-4，w=-2、-1、0、1 或 2，p=0 或 1，q=0、1 或 2 且 z=1-20，其中 X₁ 和 X₁'、X₂ 和 X₂' 自身互补且其中(TCG(N_q))_y 序列的 5'T 是离多核苷酸 5'末端的 0-3 个碱基。IMP 进一步包括 8 个碱基长度或更大的回文序列，其中回文序列包括至少 1 个(X₁X₂CGX₂'X₁'(CG)_p)_z 序列的第一 1 个(X₁X₂CGX₂'X₁')。在 w=-1 的 IMP 中，(TCG(N_q))_y 序列的 3'碱基是第一个(X₁X₂CGX₂'X₁')序列的 5'X₁。在 w=-2 的 IMP 中，倒数第二(即最后第二)和最终(即最后)的(TCG(N_q))_y 序列 3'碱基分别是第一个(X₁X₂CGX₂'X₁'(CG)_p)_z 序列的 5'X₁ 和 X₂。在一些实施方案中，(TCG(N_q))_y 序列与回文序列由 0、1 或 2 个碱基分开。在其它实施方案中，回文序列包括所有或部分(TCG(N_q))_y 序列。在一些实施方案中，X₁ 和 X₂ 各是 A 或 T。

在一些实施方案中，IMP 包括下列序列(回文序列加下划线)：

5'-TCGAACGTTCGTCAACGAACGTT(SEQ ID NO:147);

5'-TCGAACGTTTCGAAAACGTT(SEQ ID NO:148);

5'-TCGTCGAACGTTCTAACGTTCG(SEQ ID NO:7);

5'-TCGAACGTTAACGTTCGATT(SEQ ID NO:80);

5'-TCGTCGAACGTTCGAGATGAT(SEQ ID NO:27);

5'-GGTCGAACGTTCGAGGGGGG(SEQ ID NO:30);

5'-TCGTCGAACGTTCGAGGGGGG(SEQ ID NO:32);

5'-TTCGAACGTTCGAACGTTCGAAT(SEQ ID NO:38);

5'-TCGAACGTTCGAACGTTCGAAT(SEQ ID NO:39);

5'-TCGTCGAACGTTCGACGA(SEQ ID NO:52);

5'-TTTCGAACGTTCGAACGTTCGAAAT(SEQ ID NO:57);

5'-TTTCGAACGTTCGAACGTTCGAAAAT(SEQ ID NO:58);

5'-TTTCGAACGTTCGAACGTTCGAAT(SEQ ID NO:59);

5'-TCGAACGTTCGAACGTTCGA(SEQ ID NO:97);

5'-TTCGAACGTTCGAA(SEQ ID NO:98);
5'-TCGTCGAACGTTCGAGAT(SEQ ID NO:99);
5'-TCGTCGAACGTTCGAG(SEQ ID NO:100);
5'-TCGTCGAACGTTCGA(SEQ ID NO:101);
5'-TCGAACGTTCGAG(SEQ ID NO:102);
5'-TCGAACGTTCGA(SEQ ID NO:103);
5'-TCGAACGTTCG(SEQ ID NO:104);
5'-TCGTCGTCGAACGTTCGAGAT(SEQ ID NO:106);
5'-TCGTCGTCGACGTTCGA(SEQ ID NO:107);
5'-TCGTCGTCGAACGTTCGACGAGAT(SEQ ID NO:108);
5'-TCGAACGTTCGAACGTTCGAACGTT(SEQ ID NO:113);
5'-CTTCGAACGTTCGAACGTTG(SEQ ID NO:115);
5'-TGATCGTCGAACGTTCGACGATCA(SEQ ID NO:116);
5'-TCGAACGTTCGAACGTTCGAATTTC(SEQ ID NO:117);
5'-TCGCGAACGTTCGAACGTTCG(SEQ ID NO:150);
5'-TCGCGAACGTTCGAACGTTTC(SEQ ID NO:151);
5'-TCGATAACGTTCGAACGTTAT(SEQ ID NO:152);
5'-TCGATAACGTTCGAACGTTTC(SEQ ID NO:153);
5'-TCGTCGAACGTTCGAGATG(SEQ ID NO:166);
5'-TCGTCGAACGTTCG(SEQ ID NO:167);
5'-TCGAACGTTCGA TCGAACGTTCGA(SEQ ID NO:168);
5'-TCGACCGGTCGACCGGTCGA(SEQ ID NO:169);
5'-TCGAACGTTCGAACGTTGATGAT(SEQ ID NO:170);
5'-TCGAACGTTCGAACAGATGATGAT(SEQ ID NO:171);
5'-TCGAACGTTCGAACGTTCGAACG(SEQ ID NO:175);
5'-TCGAACGTTCGAACGTTCGAACGTTCGAACAT(SEQ ID NO:172);
5'-TCGATAACGTTCGAACGTTCGAACGTTAT(SEQ ID NO:173);
5'-TCGTAACGTTCGAACGTTCGAACGTTA(SEQ ID NO:174)。

在一些实施方案中，在含 SEQ ID NO:156 公式的 IMP 中，X₁X₂ 不是 AA。在一些实施方案中，在含 SEQ ID NO:156 公式的 IMP 中，X₁ 不是 A。因此，在一些实施方案中，IMP 包括下列序列(回文序列加下划线):

5'-TCGAGCGCTAGCGCTCGATT(SEQ ID NO:81);
5'-TCGGTCGACGTCGACCGATT(SEQ ID NO:82);
5'-TCGGACGTCGACGTCCGATT(SEQ ID NO:83);
5'-TCGTTCGAATTCGAACGATT(SEQ ID NO:84);
5'-TCGTCGGCCGGCCGAGATGAT(SEQ ID NO:112);
5'-TCGGACGTCCGGACGTCCGA(SEQ ID NO:79);
5'-TCGTCGCACGTGCGAGATGAT(SEQ ID NO:48);
5'-TCGTCGTACGTACGAGATGAT(SEQ ID NO:51);
5'-TCGTCGGCGCCCGAGATGAT(SEQ ID NO:70);
5'-TCGTCGCGCGCGAGATGAT(SEQ ID NO:71);
5'-TCGTCGCTCGAGCGAGATGAT(SEQ ID NO:72);
5'-TCGTCGCCGGCGAGATGAT(SEQ ID NO:73);
5'-TCGTCGTGCGCACGAGATGAT(SEQ ID NO:74);
5'-TCGTCGTCCGGACGAGATGAT(SEQ ID NO:76);
5'-TCGAGCGCTCGAGCGCTCGA(SEQ ID NO:77);
5'-TCGTCGGTCGACCGAGATGAT(SEQ ID NO:46);
5'-TCGTCGGACGTCCGAGATGAT(SEQ ID NO:47);
5'-TCGTCGAGCGCTCGAGATGAT(SEQ ID NO:44);
5'-TCGATTCGAACGTTCGAACGTTCG(SEQ ID NO:40);
5'-TCGTTCGAACGTTCGAACGTGAT(SEQ ID NO:41);
5'-TCGTTCGAACGTTCGAACCGA(SEQ ID NO:42);
5'-TCGTTCGAACGTTCGAACGTTCG(SEQ ID NO:53);
5'-TCGTTCGAACGTTCGAA(SEQ ID NO:54);
5'-TCGTTCGAACGTTCGAACGTTCGAA(SEQ ID NO:55);
5'-TCGTTCGAACGTTCGAACGATTTCGTTCGAACGTTCGAACCGA(SEQ ID NO:56);
5'-TCGATCGATCGATCGATCGATT(SEQ ID NO:43);
5'-TCGTCGATCGATCGAGATGAT(SEQ ID NO:45);
5'-TCGTCGACCGGTCGAGATGAT(SEQ ID NO:69);
5'-TCGTCGTTCGAACGAGATGAT(SEQ ID NO:75);
5'-TCGGTCGACCGGTCGACCGA(SEQ ID NO:78);

5'-TCGTTCGAACGTTCGAACGTTCGAACG(SEQ ID NO:109);

5'-TCGTTCGAACGTTCGAACGAATGAT(SEQ ID NO:118);

5'-TCGACCGGTCGACCGGTCGACCGGT(SEQ ID NO:176);

5'-TCGCGCGCGCGCGCGCGA(SEQ ID NO:177);

5'-TCGCCCGGGCGCCCGGGCGA(SEQ ID NO:178);

5'-TCGGCCGGACGTCCGGACGA(SEQ ID NO:179);

5'-TCGGCCGGCCGGCCGGCCGA(SEQ ID NO:180);

在一些实施方案中，IMP 包括的序列具有公式：5'-N_x(TCG(N_q))_yN_w(X₁X₂X₃X₄X₅CGX₅'X₄'X₃'X₂'X₁'(CG)_p)_z(SEQ ID NO:160)，其中 N 是核苷，x=0-3，y=1-4，w=-3、-2、-1、0、1 或 2，p=0 或 1，q=0、1 或 2 且 z=1-20，其中 X₁ 和 X₁'、X₂ 和 X₂'、X₃ 和 X₃'、X₄ 和 X₄'、X₅ 和 X₅'自身互补且其中(TCG(N_q))_y序列的5'T是离多核苷酸5'末端的0-3个碱基。IMP 进一步包括12个碱基长度或更大的回文序列，其中回文序列包括至少1个(X₁X₂X₃X₄X₅CGX₅'X₄'X₃'X₂'X₁'(CG)_p)(SEQ ID NO:219)序列的第1个(X₁X₂X₃X₄X₅CGX₅'X₄'X₃'X₂'X₁')(SEQ ID NO:218)。在w=-1的IMP中，(TCG(N_q))_y序列的3'碱基是第1个(X₁X₂X₃X₄X₅CGX₅'X₄'X₃'X₂'X₁')(CG)_p)(SEQ ID NO:219)序列的5'X₁。在w=-2的IMP中，倒数第二(即最后第二)和最终(即最后)的(TCG(N_q))_y序列3'碱基分别是第1个(X₁X₂X₃X₄X₅CGX₅'X₄'X₃'X₂'X₁'(CG)_p)(SEQ ID NO:219)序列的5'X₁和X₂。在w=-3的IMP中，倒数第三(即最后第三)、倒数第二(即最后第二)和最终(即最后)的(TCG(N_q))_y序列3'碱基分别是第1个(X₁X₂X₃X₄X₅CGX₅'X₄'X₃'X₂'X₁'(CG)_p)(SEQ ID NO:219)序列的5'X₁、X₂和X₃。在一些实施方案中，(TCG(N_q))_y序列与回文序列由0、1或2个碱基分开。在其它实施方案中，回文序列包括所有或部分(TCG(N_q))_y序列。在一些实施方案中，X₁、X₂、X₃、X₄和X₅中至少3个是A或T。在一些实施方案中，IMP包括下列序列(回文序列加下划线)：

5'-TCGTGCATCGATGCAACG(SEQ ID NO:93);

5'-TCGTGCATCGATGCAGATGAT(SEQ ID NO:110);

5'-TCGTGCATCGATGCATCGATGCA(SEQ ID NO:111);

5'-TCGTGCATCGATGCACGA(SEQ ID NO:149);

在一些实施方案中，IMP 包括的序列具有公式：5'-N_x(TCG(N_q))_yN_w(X₁X₂CGCGX₂'X₁'(CG)_p)_z(SEQ ID NO:163)，其中 N 是核苷，x=0-3，y=1-4，w=-2、-1、0、1 或 2，p=0 或 1，q=0、1 或 2 且 z=1-20，其中 X₁ 和 X₁'、X₂ 和 X₂'自身互

补且其中 $(TCG(N_q))_y$ 序列的5'T是离多核苷酸5'末端的0-3个碱基。IMP进一步包括8个碱基长度或更大的回文序列，其中回文序列包括至少1个 $(X_1X_2CGCGX_2'X_1'(CG)_p)(SEQ\ ID\ NO:220)$ 序列的第1个 $(X_1X_2CGCGX_2'X_1')(SEQ\ ID\ NO:220)$ 。在w=-1的IMP中， $(TCG(N_q))_y$ 序列的3'碱基是第1个 $(X_1X_2CGCGX_2'X_1'(CG)_p)(SEQ\ ID\ NO:220)$ 序列的5'X₁。在w=-2的IMP中，倒数第二(即最后第二)和最终(即最后)的 $(TCG(N_q))_y$ 序列3'碱基分别是第1个 $(X_1X_2CGCGX_2'X_1')(SEQ\ ID\ NO:220)$ 序列的5'X₁和X₂。在一些实施方案中， $(TCG(N_q))_y$ 序列与回文序列由0、1或2个碱基分开。在其它实施方案中，回文序列包括所有或部分 $(TCG(N_q))_y$ 序列。在一些实施方案中，X₁和X₂各是A或T。在一些实施方案中，IMP包括下列序列(回文序列加下划线)：

5'-TCGTCGATCGCGATCGACGA(SEQ ID NO:144)。

在一些实施方案中，IMP包括的序列具有公式：5'-N_x(TCG(N_q))_yN_w(X₁X₂X₃CGCGX₃'X₂'X₁'(CG)_p)_z(SEQ ID NO:164)，其中N是核苷，x=0-3，y=1-4，w=-3、-2、-1、0、1或2，p=0或1，q=0、1或2且z=1-20，其中X₁和X₁'、X₂和X₂'、X₃和X₃'自身互补且其中 $(TCG(N_q))_y$ 序列的5'T是离多核苷酸5'末端的0-3个碱基。IMP进一步包括10个碱基长度或更大的回文序列，其中回文序列包括至少1个 $(X_1X_2X_3CGCGX_3'X_2'X_1'(CG)_p)(SEQ\ ID\ NO:222)$ 序列的第1个 $(X_1X_2X_3CGCGX_3'X_2'X_1')(SEQ\ ID\ NO:221)$ 。在w=-1的IMP中， $(TCG(N_q))_y$ 序列的3'碱基是第1个 $(X_1X_2X_3CGCGX_3'X_2'X_1'(CG)_p)(SEQ\ ID\ NO:222)$ 序列的5'X₁。在w=-2的IMP中，倒数第二(即最后第二)和最终(即最后)的 $(TCG(N_q))_y$ 序列3'碱基分别是第1个 $(X_1X_2X_3CGCGX_3'X_2'X_1'(CG)_p)(SEQ\ ID\ NO:222)$ 序列的5'X₁和X₂。在w=-3的IMP中，倒数第三(即最后第三)、倒数第二(即最后第二)和最终(即最后)的 $(TCG(N_q))_y$ 序列3'碱基分别是第1个 $(X_1X_2X_3CGCGX_3'X_2'X_1'(CG)_p)(SEQ\ ID\ NO:222)$ 序列的5'X₁、X₂和X₃。在一些实施方案中， $(TCG(N_q))_y$ 序列与回文序列由0、1或2个碱基分开。在其它实施方案中，回文序列包括所有或部分 $(TCG(N_q))_y$ 序列。在一些实施方案中，X₁、X₂和X₃各是A或T。在一些实施方案中，当p=0时，X₁、X₂和X₃中至少2个是A或T。在一些实施方案中，IMP包括下列序列(回文序列加下划线)：

5'-TCGTCGAATCGCGATTGACGA(SEQ ID NO:145)。

在一些实施方案中，IMP包括的序列具有公式：5'-N_x(TCG(N_q))_yN_w(CGX₁X₂X₂'X₁'CG(CG)_p)_z(SEQ ID NO:165)，其中N是核苷，x=0-3，y=1-4，w=-2、

0、1 或 2, p=0 或 1, q=0、1 或 2 且 z=1-20, 其中 X₁ 和 X₁'、X₂ 和 X₂' 自身互补且 (TCG(N_q))_y 序列的 5'T 是离多核苷酸 5'末端的 0-3 个碱基。IMP 进一步包括 8 个碱基长度或更大的回文序列, 其中回文序列包括至少 1 种 (CGX₁X₂X₂'X₁'CG(CG)_p)(SEQ ID NO:223) 序列的第一个(CGX₁X₂X₂'X₁'CG)。在 w=-2 的 IMP 中, 倒数第二(即最后第二)和最终(即最后)的(TCG(N_q))_y 序列 3'碱基是 CG 和第一个(CGX₁X₂X₂'X₁'CG(CG)_p)(SEQ ID NO:223) 序列的 5'CG。在一些实施方案中, (TCG(N_q))_y 序列与回文序列由 0、1 或 2 个碱基分开。在其它实施方案中, 回文序列包括所有或部分(TCG(N_q))_y 序列。在一些实施方案中, X₁ 和 X₂ 各是 A 或 T。在一些实施方案中, IMP 包括下列序列(回文序列加下划线):

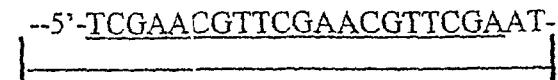
5'-TCGTCGCGATATCGCGACGA(SEQ ID NO:146)。

对于含本文所述任意基序的 IMPs(即 SEQ ID NOs:155-165), 其中 y=2 或更大, 各 y 重复的(TCG(N_q))_y 中(N_q)是独立选择的。例如, 在 y=2 的 IMP 中, 第一个 TCG(N_q) 可具有 N=a 和 q=1, 第 2 个 TCG(N_q) 可具有 q=0, 其中此部分 IMP 可能是...TCGATCG...。在一些 IMPs 的实施方案中, IMPs 含本文所述任意基序(即 SEQ ID NOs:155-165), x 优选是 0 或 1。在一些 IMPs 的实施方案中, IMPs 含本文所述任意基序(即 SEQ ID NOs:155-165), y 优选是 1 或 2。在一些 IMPs 的实施方案中, IMPs 含本文所述任意基序(即 SEQ ID NOs:155-165), w 优选是 0。在一些 IMPs 的实施方案中, IMPs 含本文所述任意基序(即 SEQ ID NOs:155-165), z 优选是 1、2、3、4、5、6、7 或 8。

如上所示, IMPs 包含至少 1 种回文序列, 回文序列至少为 8 个碱基长度。在一些实施方案中, IMP 包含至少 1 种回文序列, 回文序列具有至少下列长度(碱基): 10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30。在一些实施方案中, 回文序列在 IMP 中至少重复 1 次。在一些实施方案中, 如果有的话, 回文序列也包括 (TCG(N_q))_y 序列的 5'碱基。

免疫调节多核苷酸可包含修饰。IMP 的修饰包括本领域任何已知的修饰, 但并不限于 3'OH 或 5'OH 基团的修饰、核苷酸碱基修饰、糖成分修饰和磷酸基团修饰。不同的这种修饰描述于下。IMP 的回文序列可包括修饰碱基, 只要修饰碱基通过沃森-克里克碱基配对维持对其天然补体的相同特异性(例如, IMP 的回文部分仍是自身互补)。

IMP 可以是线性, 可以是环形或包括环形部分和/或包括发夹环。在一些实施方案中, IMP 包括下列循环序列(回文序列加下划线):



(SEQ ID NO:181)

IMP 可以单链或双链 DNA 以及单或双链 RNA 或其它修饰的多核苷酸。在一些实施方案中，IMP 包括下列双链序列：

5'-TCGTCGAACGTTCGAGATGAT / 5'-ATCATCTCGAACGTTCGACGA(SEQ ID NO:27/ SEQ ID NO:29)(双链体是 SEQ ID NO:182);

5'-TCG*TCG*AACG*TTCG*AG*ATG*AT / 5'-ATCATCTCGAACGTTCGACGA(G*=7-脱氮-8-氮-dG, SEQ ID NO:187/ SEQ ID NO:29)(双链体是 SEQ ID NO:183);

5'-TCGTCGA*A*CGTTCGA*GA*TGA*T / 5'-ATCATCTCGAACGTTCGACGA(A*=2-氨基-dA, SEQ ID NO:188/ SEQ ID NO:29)(双链体是 SEQ ID NO:184);

5'-TCGTCGAA*CGT*TCGAGATGAT / 5'-ATCATCTCGAACGTTCGACGA(A*=2-氨基-dA, T*=2-巯基-dT, SEQ ID NO:189/ SEQ ID NO:29)(双链体是 SEQ ID NO:185);

5'-TCGTCGA*A*CGT*T*CGAGATGAT / 5'-ATCATCTCGAACGTTCGACGA(A*=2-氨基-dA, T*=2-巯基-dT, SEQ ID NO:190/ SEQ ID NO:29)(双链体是 SEQ ID NO:186)。

IMP 可包含天然产生或修饰、非天然产生的碱基，可包含修饰的糖、磷酸和/或末端。例如，除了磷酸二酯键外，磷酸修饰包括但不限于甲基磷酸酯、硫代磷酸酯、氨基磷酸酯(桥连或非桥连)、磷酸三酯和二硫代磷酸酯且能以任何组合使用。也可使用其它非磷酸酯连接。在一些实施方案中，本发明的多核苷酸仅包括硫代磷酸酯主链。在一些实施方案中，本发明的多核苷酸仅包括磷酸二酯主链。在一些实施方案中，IMP 可包括磷酸主链中磷酸酯连接的组合，如磷酸二酯和硫代磷酸酯连接的组合。例如，在一些实施方案中，IMP 包括下列序列(“s”表示硫代磷酸酯连接)：

5'-TCGTCGAAACGTTCGACAGT(SEQ ID NO:62)，全部硫代磷酸酯连接；

5'-TCGTTCGAACGTTCGAACGA(SEQ ID NO:88)，全部磷酸二酯连接；

5'-TsCsGsTTCGAACGTTCGsAsAsCsGsA(SEQ ID NO:89)，硫代磷酸酯/磷酸二酯嵌合体；

5'-GsGsTCGAACGTTCGAGsGsGsGsGsG(SEQ ID NO:26)，硫代磷酸酯/磷酸二

酯嵌合体；

5'-TsCsGsTCGAACGTTCGAGsGsGsGsG(SEQ ID NO:33), 硫代磷酸酯/磷酸二酯嵌合体；

5'-TsCsGsTGCATCGATGCAGGsGsGsGsG(SEQ ID NO:34), 硫代磷酸酯/磷酸二酯嵌合体。

也可进行本领域已知的糖修饰如 2'-烷氧基-RNA 类似物、2'-氨基-RNA 类似物、2'-氟-DNA 和 2'-烷氧基-或氨基-RNA/DNA 嵌合体和本文所述其它修饰，并结合任意磷酸修饰。碱基修饰的例子(下面进一步讨论)包括但不限于加入吸电子部分到 IMP 中胞嘧啶的 C-5 和/或 C-6(例如 5-溴胞嘧啶、5-氯胞嘧啶、5-氟胞嘧啶、5-碘胞嘧啶)和 IMP 中尿嘧啶的 C-5 和/或 C-6(例如 5-溴尿嘧啶、5-氯尿嘧啶、5-氟尿嘧啶、5-碘尿嘧啶)。参见例如国际专利申请号 WO 99/62923。如上所示，使用 IMP 中回文序列的碱基修饰不应干扰参与沃森-克里克碱基配对的碱基的自身互补能力。然而，在回文序列外，可使用修饰的碱基而没有此限制。例如，在一些实施方案中，IMP 包括下列序列：

5'-uCGuCGAACGTTCGAGATG(SEQ ID NO:21), u=2'-O-甲基-尿苷；

5'-TcGTCGAACGTTCGAGATG(SEQ ID NO:22), c=2'-O-甲基-胞苷；

5'-TCGTcGAACGTTCGAGATG(SEQ ID NO:23), c=2'-O-甲基-胞苷；

5'-TBGBTBGAABGTTBGAGATGAT(SEQ ID NO:28), B=5-溴-2'-脱氧胞苷。

IMP 可用本领域熟知的技术和核酸合成设备合成，包括但不限于酶方法、化学方法、降解较大的寡核苷酸序列。参见例如 Ausubel 等(1987)和 Sambrook 等(1989)。当用酶法装配时，可连接单独单位，例如用连接酶如 T4 DNA 或 RNA 连接酶。美国专利号 5, 124, 246。通过使寡核苷酸暴露于核酸酶可完成寡核苷酸降解，如美国专利号 4, 650, 675 所示。

IMP 也可用常规多核苷酸分离程序分离。这种程序包括但不限于对基因组或 cDNA 文库的探针杂交以检测共享的核苷酸序列、抗体筛选表达文库以检测共享的结构特征和通过聚合酶链式反应合成特定天然序列。

环状免疫调节多核苷酸可分离、合成，通过重组方法或化学合成。当环形 IMP 通过分离或重组方法获得时，IMP 优选是质粒。化学合成较小的环状寡核苷酸可用文献所述方法进行。参见例如 Gao 等(1995)*Nucleic Acids Res.* 23:2025-2029 和 Wang 等(1994)*Nucleic Acids Res.* 22:2326-2333。

大部分 IMPs 的双链体(即双链)和发夹形式处于动态平衡，低多核苷酸浓度和

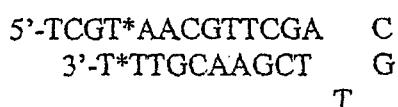
较高温度一般有利于发夹形式。共价链间或链内交联分别增加双链体或发夹相对热-、离子-、pH-和浓度-诱导的构象变化的稳定性。化学交联可将多核苷酸锁定到双链体或发夹形式中，用于物理化学和生物鉴定。构象均一旦以其最活跃形式(双链体或发夹形式)“锁定”的交联 IMPs 潜在比它们未交联对应物更活跃。因此，一些发明的 IMPs 包含共价链间和/或链内交联。

多种化学交联双链体 DNA 的方法在本领域已知。可使用任何交联方法，只要交联的多核苷酸产物具有所需免疫调节活性。

例如，1 种方法在双链体或发夹末端的 2 个相反胸苷间产生二硫桥。对于此交联方法，感兴趣的寡核苷酸用 5'-DMT-N3-(tBu-SS-乙基)胸昔-3'-亚磷酰胺(“T*”)合成。为形成此二硫桥，还原混合的二硫键，纯化寡核苷酸，杂交链并空气氧化化合物，以在发夹形式的情况下形成链内交联或在双链体形式的情况下形成链间交联。另外，可首先杂交寡核苷酸，然后还原，纯化和空气氧化。这种方法和其它方法描述于例如 Glick 等(1991) *J.Org.Chem.* 56:6746-6747, Glick 等(1992) *J.Am.Chem. Soc.* 114:5447-5448 , Goodwin 等 (1994) *Tetrahedron Letters* 35:1647-1650, Wang 等(1994) *J.Am.Chem.Soc.* 117:2981-2991, Osborne 等(1996) *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 6:2339-2342 和 Osborne 等(1996) *J.Am.Chem.Soc.* 118:11993-12003。

多核苷酸序列的例子包括下列各项，其中可掺入 5'-DMT-N3-(tBu-SS-乙基)胸昔-3'-亚磷酰胺(“T*”)用于交联目的。在 SEQ ID NO:27 类似物(5'-TCGTCGAACGTTCGAGATGAT*-3'，SEQ ID NO:27 ANALOG1)3'末端和在 SEQ ID NO:29 类似物(5'-T*TCACTCGAACGTTCGACGA-3'，SEQ ID NO:29 ANALOG1)5'末端掺入 T*可能允许在 SEQ ID NO:27 类似物 3'末端的二个链的双链体中交联。在 SEQ ID NO:113 类似物中的 2 个位置掺入 T*可能允许 2 个交联以形成双链体或单个交联以维持发夹形式。例如，使序列 5'-TCGT*AACGTTCGAACGTTCGAACGTTT*-3'(SEQ ID NO:113 ANALOG1)折叠成发夹结构并在取代的 T 残基处形成交联会产生有下列二级结构的交联多核苷酸。

A



这种有相同序列的发夹结构或双链体结构具有游离的 5'-TCG，尽管限于 2 个位置(3'末端和离 5'-末端 4 个碱基)。

另一种交联方法在双链体或发夹结构的位移残基(offset residues)间形成二硫桥。对于此交联方法，感兴趣的寡核苷酸用可转变核苷(可商业购买，例如来自 Glen Research)合成。此方法使用例如 A-A 二硫或 C-A 二硫桥，经其它碱基的键也是可能的。为形成二硫修饰的多核苷酸，含可转变核苷的多核苷酸与胱胺(或其它含二硫的胺)反应。为形成二硫桥，还原混合的二硫键，纯化寡核苷酸，杂交链并空气氧化化合物，以在发夹形式的情况下形成链内交联或在双链体形式的情况下形成链间交联。另外，可首先杂交寡核苷酸，然后还原，纯化和空气氧化。这种方法描述于例如 Ferentz 等(1991) *J.Am.Chem.Soc.* 113:4000-4002 和 Ferentz 等(1993) *J.Am.Chem.Soc.* 115:9006-9014。

多核苷酸序列的例子包括下列各项，其中位移 N6-胱胺-2'-dA(A*)残基用于交联双链体。在序列 5'-TCGTCGAACGTTCGAGA*TGAT-3'，SEQ ID NO:191 的 3' 末端和其互补 5'-ATCA*TCTCGAACGTTCGACGA-3'，SEQ ID NO:192 的 5' 末端掺入 A* 可能允许在 SEQ ID NO:191 3' 末端的二个链的双链体中交联。这种修饰也能用于交联发夹结构。

制备多核苷酸和修饰的多核苷酸的技术在本领域已知。合成含磷酸二酯键的天然产生 DNA 或 RNA 一般是通过连续偶联适当核苷亚磷酸酰胺到生长寡核苷酸的 5'-羟基，寡核苷酸的 3' 末端附着于固体支持物，接着将中间体亚磷酸三酯氧化成磷酸三酯。一旦合成了所需多核苷酸序列，从支持物中取出多核苷酸，磷酸三酯基团去保护成磷酸二酯且核苷碱基用氨水或其它碱去保护。参见例如 Beaucage(1993) “寡脱氧核糖核苷酸合成” (Oligodeoxyribonucleotide Synthesis)，刊载于《寡核苷酸和类似物的流程、合成和性质》 (Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Synthesis and Properties) (Agrawal 编)，Humana Press, Totowa, NJ；Warner 等(1984) *DNA* 3:401 和美国专利号 4, 458, 066。

IMP 也可包含磷酸修饰的多核苷酸，其中一些已知使多核苷酸稳定。因此，一些实施方案包括稳定的免疫调节多核苷酸。合成含修饰磷酸酯连接或非磷酸酯连接的多核苷酸也在本领域已知。综述参见 Matteucci(1997) “寡核苷酸类似物：概要” (Oligonucleotide Analogs:an Overview)，《寡核苷酸作为治疗剂》刊载于《作为治疗剂的寡核苷酸》 (Oligonucleotides as Therapeutic Agents)(D.J.Chadwick 和 G.Cardew 编)，John Wiley and Sons, New York, NY。能附着于本发明多核苷酸中

糖或糖类似物部分的磷衍生物(或修饰的磷酸基团)可以是单磷酸酯、二磷酸酯、三磷酸酯、烷基膦酸酯、硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、氨基磷酸酯等。制备上述磷酸类似物和将它们掺入核苷酸、修饰的核苷酸和寡核苷酸本身也已知，不需在此详细描述。Peyrottes 等(1996) *Nucleic Acids Res.* 24: 1841-1848; Chaturvedi 等(1996) *Nucleic Acids Res.* 24:2318-2323; Schultz 等(1996) *Nucleic Acids Res.* 24:2966-2973。例如，合成硫代磷酸酯寡核苷酸与上述用于天然产生寡核苷酸类似，除了氧化步骤由硫化步骤取代(Zon(1993)“寡核苷硫代磷酸酯”(Oligonucleoside Phosphorothioates)，刊载于《寡核苷酸和类似物的流程、合成和性质》(Agrawal 编), Humana Press, 165-190 页)。类似地，也描述了合成其它磷酸类似物如磷酸三酯(Miller 等(1971) *JACS* 93:6657-6665)、非桥连氨基磷酸酯(Jager 等(1988) *Biochem.* 27:7247-7246)、N3'到P5'氨基磷酸酯(phosphoramidate)(Nelson 等(1997) *JOC* 62: 7278-7287)和二硫代磷酸酯(美国专利号 5,453,,396)。也可使用其它基于非磷修饰的寡核苷酸(Stirchak 等(1989) *Nucleic Acids Res.* 17:6129-6141)。有硫代磷酸酯主链的多核苷酸的免疫原性可大于有磷酸二酯主链的多核苷酸，且似乎在注射入宿主之后更抗降解。Braun 等(1988) *J.Immunol.* 141:2048-2089 和 Latimer 等(1995) *Mol.Immunol.* 32:1057-1064。

用于发明的 IMPs 可包括 1 种或多种核糖核苷酸(包含核糖作为唯一或主要的糖成分)、脱氧核糖核苷酸(包含脱氧核糖作为主要的糖成分)，或如本领域已知，修饰的糖或糖类似物可掺入 IMP。因此，除了核糖和脱氧核糖外，糖部分可以是戊糖、脱氧戊糖、己糖、脱氧己糖、葡萄糖、阿拉伯糖、木糖、来苏糖和糖“类似物”环戊基。糖可以是吡喃糖基或呋喃糖基形式。在 IMP 中，糖部分优选是核糖、脱氧核糖、阿拉伯糖或 2'-O-烷基核糖的呋喃糖苷，糖可附着于 α 或 β 异头构象的各杂环碱基。糖修饰包括但不限于 2'-烷氧基-RNA 类似物、2'-氨基-RNA 类似物、2'-氟-DNA 和 2'-烷氧基-或氨基-RNA/DNA 嵌合体。例如，IMP 中的糖修饰包括但不限于 2'-O-甲基-尿苷和 2'-O-甲基-胞苷。制备这些糖或糖类似物和各自的“核苷”本身已知，其中这种糖或类似物附着于杂环碱基(核酸碱基)，制备不需在此描述，除非这种制备涉及任何特定例子。也可进行糖修饰并结合 IMP 制备中的任何磷酸修饰。

掺入 IMP 的杂环碱基或核酸碱基可以是天然产生的主要嘌呤和嘧啶碱基(即尿嘧啶、胸腺嘧啶、腺嘌呤和鸟嘌呤，如上所示)以及所述主要碱基的天然产生和合成修饰。因此，IMP 可包括 2'-脱氧尿苷和/或 2'-氨基-2'-脱氧腺苷。

本领域技术人员意识到大量“合成”的非天然核苷可用于本领域，它们包括多种杂环碱基和不同糖部分(和糖类似物)，且只要满足本发明的其它标准，IMP 可包括 1 种或几种杂环碱基，杂环碱基不同于主要的 5 种天然产生核酸的碱基成分。然而，IMP 中的杂环碱基优选包括但不限于尿嘧啶-5-基、胞嘧啶-5-基、腺嘌呤-7-基、腺嘌呤-8-基、鸟嘌呤-7-基、鸟嘌呤-8-基、4-氨基吡咯[2,3-d]嘧啶 5-基、2-氨基-4-氧吡咯[2,3-d]嘧啶-5-基、2-氨基-4-氧吡咯[2,3-d]嘧啶-3-基基团，其中嘌呤经 9-位附着于 IMP 的糖部分，嘧啶经 1-位，吡咯嘧啶经 7-位且吡唑嘧啶经 1-位。

IMP 可包括至少 1 种修饰的碱基。如本文所用，术语“修饰的碱基”与“碱基类似物”同义，例如“修饰的胞嘧啶”与“胞嘧啶类似物”同义。类似地，本文定义的“修饰”核苷或核苷酸与核苷或核苷酸“类似物”同义。碱基修饰的例子包括但不限于加入吸电子部分到 IMP 中胞嘧啶的 C-5 和/或 C-6。吸电子部分优选是卤素。这种修饰的胞嘧啶可包括但不限于氮胞嘧啶、5-溴胞嘧啶、溴尿嘧啶、5-氯胞嘧啶、氯化胞嘧啶、环胞嘧啶、胞嘧啶阿拉伯糖苷、5-氟胞嘧啶、氟嘧啶、氟尿嘧啶、5, 6-二氢胞嘧啶、5-碘胞嘧啶、羟基脲、碘尿嘧啶、5-硝基胞嘧啶、尿嘧啶和任何其它嘧啶类似物或修饰的嘧啶。碱基修饰的其它例子包括但不限于加入吸电子部分到免疫调节多核苷酸中尿嘧啶的 C-5 和/或 C-6。吸电子部分优选是卤素。这种修饰的尿嘧啶可包括但不限于 5-溴尿嘧啶、5-氯尿嘧啶、5-氟尿嘧啶、5-碘尿嘧啶。

碱基修饰的其它例子包括加入 1 个或多个巯基到碱基，包括但不限于 2-氨基-腺嘌呤、6-巯基-鸟嘌呤、2-巯基-胸腺嘧啶、4-巯基-胸腺嘧啶、5-丙炔基-尿嘧啶和 4-巯基-尿嘧啶。其它碱基修饰例子包括但不限于 N-4 乙基胞嘧啶、7-脱氮鸟嘌呤、7-脱氮-8-氮鸟嘌呤和 5-羟基胞嘧啶。参见例如 Kandimalla 等 (2001) *Bioorg. Med. Chem.* 9:807-813。在一些实施方案中，IMP 包括下列有修饰碱基的序列(回文序列加下划线)：

5'-TCXTCXAACXTTCXAGATGAT(X=7-脱氮-dG)(SEQ ID NO:193);

5'-TCGTCGAA*CGT*TCGAGATGAT(A*=2-氨基-dA; T*=2-巯基-dT)(SEQ ID NO:189);

5'-TCGTCGA*A*CGT*T*CGAGATGAT(A*=2-氨基-dA; T*=2-巯基-dT)(SEQ ID NO:190);

5'-TCG*TCG*AACG*TTCG*AG*ATG*AT(G*=7-脱氮-8-氮-dG)(SEQ ID NO:187);

5'-TCG*AACG*TTCG*AACG*TTCG*AACG*TT(G*=7-脱氮-8-氮-dG)(SEQ ID NO:194);

5'-TCGT*CGAACGT*T*CGAGAT*GAT*(T*=5-丙炔基-dU)(SEQ ID NO:195);

5'-TCGAACGT*T*CGAACGT*T*CGAACGT*T*(T*=5-丙炔基-dU)(SEQ ID NO:196);

5'-TCGTCGA*A*CGTTCGA*GA*TGA*T(A*=2-氨基-dA)(SEQ ID NO:188);

5'-TCGA*A*CGTTCGA*A*CGTTCGA*A*CGTT(A*=2-氨基-dA)(SEQ ID NO:197)。

如实施例 1 所例示，在低浓度维持双链体形式的 IMPs 往往能刺激来自人 PBMCs 的 IFN- α 生成。上面描述了通过交联来稳定双链体多核苷酸形式。当与其互补序列处于双链体形式时，某些修饰的碱基也能增加双链体稳定性。例如，2-氨基-dA(可商业购买，例如来自 Glen Research)与 T 形成 3 个氢键，而不是 dA 与 T 之间形成的 2 个氢键。SEQ ID NO:27 的类似物 SEQ ID NO:188 包含 5 个 2-氨基-dA 碱基，代替 SEQ ID NO:27 的 5 个 dA 碱基，且自身形成的双链体强于 SEQ ID NO:27(大小排阻层析数据)。掺入这些修饰的碱基使 Tm 增加约 3°C 每修饰。如本文的实施例 1 所证明，当人 PBMCs 用 0.8 μ g/ml IMP 处理时，SEQ ID NO:188 也诱导生成比 SEQ ID NO:27 多的 IFN- α 。双链 SEQ ID NO:884 诱导的 IFN- α 生成约是单链 SEQ ID NO:188 的 3 倍。

描述了使用所述碱基修饰的核苷作为前体，制备碱基修饰的核苷以及合成修饰的寡核苷酸，例如描述于美国专利号 4,910,300、4,948,882 和 5,093,232。设计这些碱基修饰的核苷，使它们能通过化学合成掺入寡核苷酸的末端或内部位置。这些碱基修饰的核苷存在于寡核苷酸的末端或内部位置，能用作肽或其它抗原附着的位置。也描述了它们的糖部分中的核苷修饰(包括但不限于例如美国专利号 4,849,513、5,015,733、5,118,800、5,118,802)并能相似地使用。

在一些实施方案中，免疫调节多核苷酸小于约任何下列长度(碱基或碱基对): 10,000; 5,000; 2500; 2000; 1500; 1250; 1000; 750; 500; 300; 250; 200; 175; 150; 125; 100; 75; 60; 50; 40; 30; 25; 20; 15; 14; 13; 12; 11; 10。在一些实施方案中，免疫调节多核苷酸大于约任何下列长度(碱基或碱基对): 10; 11; 12; 13; 14; 15; 20; 25; 30; 40; 50; 60; 75; 100; 125; 150; 175; 200; 250; 300; 350; 400; 500; 750; 1000; 2000; 5000; 7500; 10000; 20000; 50000。另外，免疫调节多核苷酸可以是任一范围大小，上限为 10,000; 5,000; 2500;

2000; 1500; 1250; 1000; 750; 500; 300; 250; 200; 175; 150; 125; 100; 75; 60; 50; 40; 30; 25; 20; 15; 14; 13; 12; 11; 10 且独立选择的下限为 10; 11; 12; 13; 14; 15; 20; 25; 30; 40; 50; 60; 75; 100; 125; 150; 175; 200; 250; 300; 350; 400; 500; 750; 1000; 2000; 5000; 7500, 其中下限小于上限。在一些实施方案中, IMP 优选约为 200 个碱基长度或更少。

发明也提供制备本文所述免疫调节多核苷酸的方法。方法可以是本文所述的任何方法。例如, 方法可以是合成 IMP(如使用固态合成)且能进一步包括任何纯化步骤。纯化方法在本领域已知。其它制备方法包括结合免疫调节多核苷酸与抗原。

抗原

任何抗原可与免疫调节多核苷酸共施用和/或用于包含免疫调节多核苷酸和抗原的组合物(和这些组合物的制品)。

在一些实施方案中, 抗原是变应原。重组变应原的例子列于表 1。许多变应原的制备在本领域熟知, 包括但不限于制备豚草花粉变应原抗原 E(Amb a I)(Rafnar 等(1991) *J.Biol.Chem.* 266:1229-1236)、草变应原 Lol p 1(Tamborini 等(1997) *Eur.J.Biochem.* 249:886-894)、主要尘螨变应原 Der pI 和 Der pII(Chua 等(1988) *J.Exp.Med.* 167:175-182; Chua 等(1990) *Int.Arch.Allergy Appl.Immunol.* 91:124-129)、家猫变应原 Fel d I(Rogers 等(1993) *Mol.Immunol.* 30: 559-568)、桦树花粉 Bet v1(Breiteneder 等(1989) *EMBO J.* 8:1935-1938)、日本杉变应原 Cry j 1 和 Cry j 2(Kingetsu 等(2000) *Immunoogy* 99:625-629)和来自其它树花粉的蛋白抗原(Elsayed 等(1991) *Scand.J.Clin.Lab.Invest.Supp.* 204:17-31)。如上所示, 来自树的变应原已知, 包括来自桦树、杜松和日本杉的变应原。报导了从草花粉制备蛋白抗原用于体内施用。

在一些实施方案中, 变应原是食物变应原, 包括但不限于花生变应原如 Ara h I(Stanley 等(1996) *Adv.Exp.Med.Biol.* 409:213-216); 胡桃变应原如 Jug r I(Tueber 等(1998) *J.Allergy Clin.Immunol.* 101:807-814); 巴西坚果变应原如白蛋白(Pastorello 等(1998) *J.Allergy Clin.Immunol.* 102:1021-1027); 虾变应原如 Pen a I(Reese 等(1997) *Int.Arch.Allergy Immunol.* 113:240-242); 蛋变应原如卵类粘蛋白(Crooke 等(1997) *J.Immunol.* 159:2026-2032); 乳变应原如牛 β -乳球蛋白(Selot 等(1999) *Clin.Exp.Allergy* 29:1055-1063); 鱼变应原如小清蛋白(Van Do 等(1999) *Scand.J.Immunol.* 50:619-625; Galland 等(1998) *J.Chromatogr.B.Biomed.Sci.Appl.* 706:63-71)。在一些实施方案中, 变应原是乳胶变应原, 包括但不限于 Hev b 7(Sowka 等(1998)

Eur.J.Biochem. 255:213-219)。表 1 显示可使用变应原的示范列表。

表 1
重组变应原

组	变应原	参考文献
动物		
甲壳纲		
虾/龙虾	原肌球蛋白 Pan s I	Leung 等(1996)J.Allergy Clin.Immunol.98:954-961 Leung 等(1998)Mol.Mar.Biol.Biotechnol.7:12-20
昆虫		
蚂蚁	Sol i 2(毒液)	Schmidt 等 J Allergy Clin Immunol., 1996, 98:82-8
蜜蜂	磷脂酶 A2(PLA) 透明质酸酶(Hya)	Muller 等 J Allergy Clin Immunol, 1995, 96:395-402 Forster 等 J Allergy Clin Immunol, 1995, 95:1229-35 Muller 等 Clin Exp Allergy, 1997, 27:915-20 Soldatova 等 J Allergy Clin Immunol, 1998, 101:691 -8
蟑螂	Bla g Bd9OK Bla g 4(卡里碱) 谷胱甘肽 S-转移酶 Per a 3	Helm 等 J Allergy Clin Immunol, 1996, 98:172-180 Vailes 等 J Allergy Clin Immunol, 1998, 101:274-280 Arruda 等 J Biol Chem, 1997, 272:20907-12 Wu 等 Mol Immunol, 1997, 34:1-8
尘螨	Der p 2(主要变应原) Der p2 变体 Der f2 Der p10 Tyr p 2	Lynch 等 J Allergy Clin Immunol, 1998, 101:562-4 Hakkaart 等 Clin Exp Allergy, 1998, 28:169-74 Hakkaart 等 Clin Exp Allergy, 1998, 28:45-52 Hakkaart 等 Int Arch Allergy Immunol, 1998, 115(2): 150-6 Mueller 等 J Biol Chem, 1997, 272:26893-8 Smith 等 J Allergy Clin Immunol, 1998, 101:423-5 Yasue 等 Clin Exp Immunol, 1998, 113:1-9 Yasue 等 Cell Immunol, 1997, 181:30-7 Asturias 等 Biochim Biophys Acta, 1998, 1397:27-30 Eriksson 等 Eur J Biochem, 1998
大黄蜂	抗原 5 aka Dol m V(毒液)	Tomalski 等 Arch Insect Biochem Physiol, 1993, 22: 303-13
蚊子	Aed a I(唾液三磷酸双磷酸酶) 腺苷	Xu 等 Int Arch Allergy Immunol, 1998, 115:245-51
黄蜂	抗原 5, 透明质酸酶和磷脂酶(毒液)	King 等 J Allergy Clin Immunol, 1996, 98:588-600
哺乳动物		
猫	Fel d 1	Slunt 等 J Allergy Clin Immunol, 1995, 95:1221-8 Hoffmann 等(1997) J.Allergy Clin Immunol 99:227-32 Hedlin Curr Opin Pediatr, 1995, 7:676-82
母牛	Bos d 2(皮屑;脂笼蛋白) β -乳球蛋白(BLG, 主要牛乳变应原)	Zeiler 等 J Allergy Clin Immunol, 1997, 100:721-7 Rautiainen 等 Biochem Bioph.Res Comm., 1998, 247:746-50 Chatel 等 Mol Immunol, 1996, 33:1113-8 Lehrer 等 Crit Rev Food Sci Nutr, 1996, 36:553-64
狗	Can f1 和 Can f2, 唾液脂笼蛋白	Konieczny 等 Immunology, 1997, 92:577-86 Spitzauer 等 J Allergy Clin Immunol, 1994, 93: 614-27 Vrtala 等 J Immunol, 1998, 160:6137-44

马	Equ c1(主要变应原, 脂笼蛋白)	Gregoire 等 J Biol Chem, 1996, 271:32951-9
小鼠	小鼠尿蛋白 (MUP)	Konieczny 等 Immunology, 1997, 92:577-86
其它哺乳动物变应原		
胰岛素		Ganz 等 J Allergy Clin Immunol, 1990, 86:45-51 Grammer 等 J Lab Clin Med, 1987, 109:141-6 Gonzalo 等 Allergy, 1998, 53:106-7
干扰素	干扰素 α 2c	Detmar 等 Contact Dermatis, 1989, 20:149-50
软体动物	原肌球蛋白	Leung 等 J Allergy Clin Immunol, 1996, 98:954-961
植物变应原		
大麦	Hor v 9	Astwood 等 Adv Exp Med Biol, 1996, 409:269-77
桦树	花粉变应原, Bet v 4 rBet v 2: (抑制蛋白)	Twardosz 等 Biochem Bioph.Res Comm., 1997, 239: 197 Pauli 等 J Allergy Clin Immunol, 1996, 97:1100-9 van Neerven 等 Clin Exp Allergy, 1998, 28:423-33 Jahn-Schmid 等 Immunotechnology, 1996, 2:103-13 Breitwieser 等 Biotechniques, 1996, 21:918-25 Fuchs 等 J Allergy Clin Immunol, 1997, 100:3 56-64
巴西坚果	球蛋白	Bartolome 等 Allergol Immunopathol, 1997, 25:135-44
樱桃	Pru a I(主要变应原)	Scheurer 等 Mol Immunol, 1997, 34:619-29
谷物	Zml3(花粉)	Heiss 等 FEBS Lett, 1996, 381:217-21 Lehrer 等 Int Arch Allergy Immunol, 1997, 113:122-4
草	Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5(梯牧草花粉) Hol 1 5 绒毛草花粉 草熟禾变应原 Cyn d 7 狗牙草 Cyn d 12 (抑制蛋白)	Bufe 等 Am J Respir Crit Care Med, 1998, 157:1269-76 Vrtala 等 J Immunol Jun 15, 1998, 160:6137-44 Niederberger 等 J Allergy Clin Immunol., 1998, 101: 258-64 Schramm 等 Eur J Biochem, 1998, 252:200-6 Zhang 等 J Immunol, 1993, 151:791-9 Smith 等 Int Arch Allergy Immunol, 1997, 114: 265-71 Asturias 等 Clin Exp Allergy, 1997, 27:1307-13 Fuchs 等 J Allergy Clin Immunol, 1997, 100:356-64
日本杉	Jun a 2(阿希刺柏) Cry j 1, Cry j 2 (日本柳杉)	Yokoyama 等 Biochem Bioph.Res Comm., 2000, 275: 195-202 Kingetsu 等 Immunology, 2000, 99:625-629
杜松木	Jun o 2(花粉)	Tinghino 等 J Allergy Clin Immunol, 1998, 101:772-7
乳胶	Hev b 7	Sowka 等 Eur J Biochem, 1998, 255:213-9 Fuchs 等 J Allergy Clin Immunol, 1997, 100:3 56-64
山靛	Mer a I(抑制蛋白)	Vallverdu 等 J Allergy Clin Immunol, 1998, 101:3 63-70
芥末(黄色)	Sin a I(种子)	Gonzalez de la Pena 等 Biochem Bioph.Res Comm., 1993, 190:648-53
含油种子油菜	Bra r I 花粉变应原	Smith 等 Int Arch Allergy Immunol, 1997, 114: 265-71
花生	Ara h I	Stanley 等 Adv Exp Med Biol, 1996, 409:213-6 Burks 等 J Clin Invest, 1995, 96:1715-21 Burks 等 Int Arch Allergy Immunol, 1995, 107: 248-50
草地早熟禾	Poa p9	Parronchi 等 Eur J Immunol, 1996, 26:697-703 Astwood 等 Adv Exp Med Biol, 1996, 409:269-77

豚草	Amb a I	Sun 等 Biotechnology Aug, 1995, 13:779-86 Hirschwehr 等 J Allergy Clin Immunol, 1998, 101: 196-206 Casale 等 J Allergy Clin Immunol, 1997, 100:110-21
黑麦	Lol p I	Tamborini 等 Eur J Biochem, 1997, 249:886-94
胡桃	Jug r I	Teuber 等 J Allergy Clin Immunol., 1998, 101:807-14
小麦	变应原	Fuchs 等 J Allergy Clin Immunol, 1997, 100:356-64 Donovan 等 Electrophoresis, 1993, 14:917-22
真菌		
曲霉菌属	Asp f 1, Asp f 2, Asp f 3, Asp f 4, rAsp f 6 超氧化锰岐化酶 (MNSOD)	Grameri 等 Mycoses, 1998, 41 Suppl 1:56-60 Hemmann 等 Eur J Immunol, 1998, 28:1155-60 Banerjee 等 J Allergy Clin Immunol, 1997, 99:821-7 Grameri Int Arch Allergy Immunol, 1998, 115:99-114 Grameri 等 Adv Exp Med Biol, 1996, 409:111-6 Moser 等 J Allergy Clin Immunol, 1994, 93:1-11 Mayer 等 Int Arch Allergy Immunol, 1997, 113:213-5
无爪螨属	变应原	Caraballo 等 Adv Exp Med Biol, 1996, 409:81-3
青霉菌属	变应原	Shen 等 Clin Exp Allergy, 1997, 27:682-90
裸盖菇属	Psi c 2	Horner 等 Int Arch Allergy Immunol, 1995, 107:298 -300

在一些实施方案中，抗原来自传染剂，包括原生动物、细菌、真菌(包括单细胞和多细胞)和病毒传染剂。合适的病毒抗原的例子在本文中描述且在本领域已知。细菌包括流感嗜血杆菌(*Hemophilus influenzae*)、结核分枝杆菌(*Mycobacteris tuberculosis*)和百日咳博德特氏菌(*Bordetella pertussis*)。原生动物传染剂包括疟疾疟原虫、利什曼原虫(*Leishmania*)种、锥虫(*Trypanosoma*)种和血吸虫(*Schistosoma*)种。真菌包括白色念珠菌(*Candida albicans*)。

在一些实施方案中，抗原是病毒抗原。病毒多肽抗原包括但不限于 HIV 蛋白如 HIV gag 蛋白(包括但不限于膜锚定(MA)蛋白、核心衣壳(CA)蛋白和核壳(NC)蛋白)、HIV 聚合酶、流感病毒基质(M)蛋白和流感病毒核壳(NC)蛋白、乙肝表面抗原(HBsAg)、乙肝核心蛋白(HBcAg)、戊型肝炎蛋白(HBeAg)、乙肝 DNA 聚合酶、丙肝抗原等。讨论流感疫苗接种的参考文献包括 Scherle 和 Gerhard(1988) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.*85:4446-4450; Scherle 和 Gerhard(1986) *J.Exp.Med.*164:1114-1128; Granoff 等(1993) *Vaccine* 11:S46-51; Kodihalli 等(1997) *J.Viro.*71:3391-3396; Ahmeida 等(1993) *Vaccine* 11:1302-1309; Chen 等(1999) *Vaccine* 17:653-659; Govorkova 和 Smirnov(1997) *Acta Virol.*(1997) 41:251-257; Koide 等(1995) *Vaccine* 13: 3-5 ; Mbawuike 等 (1994) *Vaccine* 12:1340-1348 ; Tamura 等 (1994) *Vaccine* 12:1310-316 ; Tamura 等(1992) *Eur.J.Immunol.*22:477-481 ; Hirabayashi 等(1990) *Vaccine* 8:595-599。其它抗原多肽的例子是组-或亚组特异抗原，它们已知用于一些

传染剂，包括但不限于腺病毒、单纯疱疹病毒、乳头瘤病毒、呼吸道合胞病毒和痘病毒。

许多抗原肽和蛋白已知并可用于本领域；其它的可用常规技术鉴定。对于抗肿瘤形成的免疫或治疗现有肿瘤，免疫调节肽可包括肿瘤细胞(活或辐射的)、肿瘤细胞提取物、或肿瘤抗原的蛋白亚基如 Her-2/neu、Mart1、癌胚抗原(CEA)、神经节苷脂、人乳脂肪小球(HMFG)、粘蛋白(MUC1)、MAGE 抗原、BAGE 抗原、GAGE 抗原、gp100、前列腺特异抗原(PSA)和酪氨酸酶。可形成疫苗用于以免疫为基础的避孕，这是通过包括施用具有 IMP 的精蛋白。Lea 等(1996) *Biochim.Biophys. Acta* 1307:263。

减毒和灭活病毒适用于本文作为抗原。这些病毒的制备在本领域熟知且许多可商业购买(参见例如《医师案头参考浆料》(Physicians' Desk Reference)(1998)，第 52 版，Medical Economics Company, Inc.)。例如，脊髓灰质炎病毒可作为 IPOL®(Pasteur Merieux Connaught)和 ORIMUNE®(Lederle Laboratories)使用，甲肝病毒作为 VAQTA®(Merck)，麻疹病毒作为 ATTENUVAX®(Merck)，腮腺炎病毒作为 MUMPSVAX®(Merck)，风疹病毒作为 MERUVAX®II(Merck)使用。另外，减毒和灭活病毒如 HIV-1、HIV-2、单纯疱疹病毒、乙肝病毒、轮状病毒、人和非人乳头瘤病毒以及慢脑病毒(slow brain virus)可提供肽抗原。

在一些实施方案中，抗原包括病毒载体，如牛痘、腺病毒和金丝雀痘。

抗原可从它们的来源中分离，使用本领域已知的纯化技术，或更方便地使用重组方法生成。

抗原肽可包括纯化的天然肽、合成肽、重组蛋白、粗蛋白提取物、减毒或灭活病毒、细胞、微生物、或这种肽的片段。免疫调节肽可以是天然或者化学或酶合成。本领域已知的任何化学合成都适合。溶液相肽合成可用于构建大小适中的肽，或者固相合成可用于化学构建肽。Atherton 等(1981) *Hoppe Seylers Z.Physiol. Chem.* 362: 833-839。蛋白水解酶也可用于偶联氨基酸以生成肽。Kullmann(1987)《酶促肽合成》(Enzymatic Peptide Synthesis), CRC Press, Inc.. 另外，肽可用细胞的生化机械作用获得或从生物来源分离。重组 DNA 技术可用于生成肽。Hames 等(1987)《转录和翻译：一种实践方法》(Transcription and Translation:A Practical Approach), IRL Press。肽也可使用标准技术分离，如亲和层析。

抗原优选是肽、脂类(例如排除胆固醇的固醇、脂肪酸和磷脂)、多糖如流感嗜血杆菌疫苗所用多糖、神经节苷脂和糖蛋白。它们通过本领域几种已知方法获得，

包括使用化学和酶方法的分离和合成。在某些情况中，如对于许多固醇、脂肪酸和磷脂，分子的抗原部分可商业购买。

病毒抗原用于受试组合物和使用组合物的方法，其例子包括但不限于 HIV 抗原。这种抗原包括但不限于获得自 HIV 包膜糖蛋白的抗原，包括但不限于 gp160、gp120 和 gp41。已知许多用于 HIV 基因和抗原的序列。例如，Los Alamos 国家实验室 HIV 序列数据库收集、补救和注释 HIV 核苷酸和氨基酸序列。此数据库可通过因特网和年度出版物获得，参见《人逆转录病毒和 AIDS 概略》(Human Retroviruses and AIDS Compendium)(例如 2000 版)。

获得自传染剂的抗原可用本领域已知方法获得，例如来自天然病毒或细菌提取物，来自感染传染剂的细胞，来自纯化的多肽，来自重组产生的多肽和/或合成肽。

IMP-抗原

当与抗原使用时，IMP 可以多种方式与抗原一起施用。在一些实施方案中，IMP 和抗原的施用空间彼此接近，或作为混合物(即在溶液中)。如下所述，空间接近可用一些方法完成，包括缀合(键合)、包壳作用、经附加到平台或吸收到表面上。一般，最优选 IMP 和抗原邻近相联，其距离可有效增强所产生的免疫反应，与 IMP 和抗原作为混合物施用相比较。

在一些实施方案中，IMP 与抗原缀合。IMP 部分可以多种方式与缀合物的抗原部分偶联，包括共价和/或非共价相互作用。

部分间的连接可在 IMP 的 3'或 5'末端进行，或在 IMP 中的内部位置适当修饰的碱基上进行。如果抗原是肽且包含合适的反应基团(例如 N-羟基琥珀酰亚胺酯)，它可直接与胞嘧啶残基的 N⁴氨基反应。取决于 IMP 中胞嘧啶残基的数量和位置，可完成 1 个或多个残基上的特异偶联。

另外，修饰的寡核苷酸如本领域已知的，可在 IMP 中的任一末端或内部位置上掺入。它们可包含阻断的官能团，当去阻断时与多种存在于或附着于感兴趣抗原的官能团反应。

当抗原是肽或多肽时，此部分缀合物可通过固体支持物化学附着于 IMP 的 3'末端。例如，IMP 部分可加入到多肽部分中，多肽部分在支持物上预合成。Haralambidis 等(1990a) *Nucleic Acids Res.* 18:493-499 和 Haralambidis 等(1990b) *Nucleic Acids Res.* 18:501-505。另外，可合成 IMP，使它通过从 3'末端延伸的可切割接头与固体支持物连接。从支持物中化学切割 IMP 时，末端巯基留在寡核苷酸的 3'末端(Zuckermann 等(1987) *Nucleic Acids Res.* 15:5305-531 和 Corey 等(1987)

Science 238:1401-1403)或者末端氨基留在寡核苷酸的 3'末端(Nelson 等(1989) *Nucleic Acids Res.* 17: 1781-1794)。氨基修饰的 IMP 与肽的氨基缀合如 Benoit 等(1987) *Neuromethods* 6: 43-72 所述进行。巯基修饰的 IMP 与肽的羧基缀合如 Sinah 等(1991)《寡核苷酸类似物：一种实践方法》(*Oligonucleotide Analogues: A Practical Approach*)，IRL Press 所述进行。也描述了携带附属马来酰亚胺的寡核苷酸与肽的半胱氨酸残基的巯基侧链的偶联。Tung 等(1991) *Bioconjug. Chem.* 2:464-465。通过在其合成期间掺入寡核苷酸的胺、巯基或羧基。

缀合物的肽或多肽部分可附着于 IMP 的 5'末端。尽管寡核苷酸固定于固体支持物，连接基团优选共价附着于 5'羟基，连接基团的一个末端包含受保护的胺、巯基或羧基且另一末端包含亚磷酰胺。Agrawal 等(1986) *Nucleic Acids Res.* 14:6227-6245; Connolly(1985) *Nucleic Acids Res.* 13:4485-4502; Kremsky 等(1987) *Nucleic Acids Res.* 15:2891-2909; Connolly (1987) *Nucleic Acids Res.* 15:3131-3139; Bischoff 等(1987) *Anal.Biochem.* 164:336-344; Blanks 等(1988) *Nucleic Acids Res.* 16:10283-10299 和美国专利号 4, 849, 513、5, 015, 733、5, 118, 800、5, 118, 802。在去保护之后，胺、巯基和羧基官能团可用于使寡核苷酸共价附着于肽。Benoit 等(1987)和 Sinah 等(1991)。

IMP-抗原缀合物也可通过非共价相互作用形成，如离子键、疏水相互作用、氢键和/或范德瓦尔斯引力。

非共价连接的缀合物可包括非共价相互作用，如生物素-链霉抗生物素蛋白复合物。生物素基基团可附着于例如 IMP 的修饰碱基。Roget 等(1989) *Nucleic Acids Res.* 17:7643-7651。将链霉抗生物素蛋白部分掺入肽部分可形成链霉抗生物素蛋白缀合肽与生物素酰化寡核苷酸的非共价结合复合物。

非共价缔合也可通过离子相互作用发生，涉及 IMP 和抗原内的残基，如带电氨基酸，或通过使用接头部分，接头部分包含能与寡核苷酸和抗原相互作用的带电残基。例如，非共价缀合可在通常带负电的 IMP 和带正电的肽的氨基酸残基间发生，如聚赖氨酸、聚精氨酸和聚组氨酸残基。

IMP 和抗原间的非共价缀合可通过分子的 DNA 结合基序发生，分子作为天然配基与 DNA 相互作用。例如，这种 DNA 结合基序可在转录因子和抗 DNA 抗体中发现。

IMP 与脂类的连接能用标准方法形成。这些方法包括但不限于合成寡核苷酸-磷脂缀合物(Yanagawa 等(1988) *Nucleic Acids Symp.Ser.* 19:189-192)、寡核苷酸-脂肪

酸缀合物(Grabarek 等(1990) *Anal.Biochem.* 185:131-135 和 Staros 等(1986) *Anal.Biochem.* 156:220-222) 和寡核苷酸-固醇缀合物。Boujrad 等(1993) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 90:5728-5731。

寡核苷酸与寡糖的连接能用已知标准方法形成。这些方法包括但不限于合成寡核苷酸-寡糖缀合物, 其中寡糖是免疫球蛋白的部分。O'Shannessy 等(1985) *J.Applied Biochem.* 7:347-355。

环状 IMP 与肽或抗原的连接可用几种方法形成。当环状 IMP 用重组或化学方法合成时, 修饰的核苷的合适的。Ruth(1991), 《寡核苷酸和类似物: 一种实践方法》, IRL Press。然后, 标准的连接技术可用于连接环状 IMP 与抗原或其它肽。Goodchild(1990) *Bioconjug.Chem.* 1:165。当环状 IMP 用重组或化学方法分离或合成时, 通过化学激活或光活化反应基团(如卡宾、自由基)可形成连接, 反应基团掺入抗原或其它肽。

使肽和其它分子附着于寡核苷酸的另外方法可发现于美国专利号 5, 391, 723; Kessler(1992)“用于核酸的非放射性标记方法”(Nonradioactive labeling methods for nucleic acids), 刊载于 Kricka(编)《非同位素 DNA 探针技术》(Nonisotopic DNA Probe Techniques), Academic Press 和 Geoghegan 等(1992) *Bioconjug.Chem.* 3:138-146。

可用其它方法邻近相联 IMP 和抗原。在一些实施方案中, IMP 和抗原通过包囊来邻近相联。在其它实施方案中, IMP 和抗原通过连接平台分子来邻近相联。

“平台分子”(也称为“平台”)是含允许 IMP 和抗原附着位点的分子。在其它实施方案中, IMP 和抗原通过吸收到表面上来邻近相联, 表面优选是载体颗粒。

在一些实施方案中, 发明的方法使用包囊剂, 包囊剂可维持 IMP 和第 1 个抗原的邻近相联, 直到复合物能用于靶(或包含这种包囊剂的组合物)。包含 IMP、抗原和包囊剂的组合物优选以水包油乳剂、微粒和/或脂质体的形式。包囊 IMP-免疫调节分子的佐剂水包油乳剂、微粒和/或脂质体优选以约 0.04 μ m 到约 100 μ m 大小的颗粒形式, 优选任何下列范围: 从约 0.1 μ m 到约 20 μ m; 从约 0.15 μ m 到约 10 μ m; 从约 0.05 μ m 到约 1.00 μ m; 从约 0.05 μ m 到约 0.5 μ m。

胶体分散系统如微球、珠、大分子复合物、纳米胶囊和以脂类为基础的系统如水包油乳剂、胶束、混合的胶束和脂质体可有效包囊含 IMP 的组合物。

包囊组合物进一步包括任意多种成分。它们包括但不限于明矾、脂类、磷脂、脂膜结构(LMS)、聚乙二醇(PEG)和其它聚合物如多肽、糖肽和多糖。

适用于包囊成分的多肽包括本领域中任何已知的且包括但不限于脂肪酸结合

蛋白。修饰的多肽包含任意多种修饰，包括但不限于糖基化、磷酸化、十四烷基化、硫酸化和羟基化。如本文所用，合适的多肽保护含 IMP 的组合物以保存其免疫调节活性。结合蛋白的例子包括但不限于白蛋白，如牛血清白蛋白(BSA)和豌豆白蛋白。

其它合适的聚合物可以是药学领域中已知的任何聚合物且包括但不限于天然产生的聚合物如葡聚糖、羟乙基淀粉和多糖以及合成聚合物。天然产生聚合物的例子包括蛋白、糖肽、多糖、葡聚糖和脂类。另外的聚合物可以是合成聚合物。适用于本发明的合成聚合物例子包括但不限于聚烷基二醇(PAG)如 PEG、聚氧乙基化多元醇(polyoxyethylated polyols)(POP)如聚氧乙基化甘油(polyoxyethylated glycerol)(POG)、聚三亚甲基二醇(PTG)、聚丙二醇(PPG)、聚羟乙酸甲基丙烯酸酯、聚乙烯醇(PVA)、聚丙烯酸、聚乙基噁唑啉、聚丙烯酰胺、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、聚氨基酸、聚氨酯和聚磷腈。合成聚合物也可以是 2 种或多种不同合成单体的线性或分支、取代或未取代、同聚、共聚物或嵌段共聚物。

用于本发明包囊组合物的 PEGs 购自化学供应商或用本领域技术人员已知的技术合成。

如本文所用，术语“LMS”指片层状脂质颗粒，其中极性脂质的极性头基团排列成面向界面的水相以形成膜结构。LMSs 的例子包括脂质体、胶束、蜗牛壳(cochleates)(即一般圆柱形脂质体)、微乳液、单层小泡、多层小泡等。

本发明的优选胶体分散系统是脂质体。在用脂质体包囊抗原免疫的小鼠中，脂质体似乎增强对抗原的 Th1 型免疫反应。Aramaki 等(1995) *Vaccine* 13:1809-1814。如本文所用，“脂质体”或“脂质小泡”是小泡，受至少 1 种且可能大于 1 种双层脂质膜束缚。可通过本领域已知技术，从磷脂、糖脂、脂类、类固醇如胆固醇、相关分子或其组合中人工制成脂质体，包括但不限于超声处理、挤压或从脂类-去垢剂复合物中去除去垢剂。脂质体也可任选包括另外的成分，如组织靶向成分。应理解“脂膜”或“脂双层”不需全部由脂类组成，而可另外包含任何合适的其它组分，包括但不限于胆固醇和其它类固醇、脂溶性化学制品、任意长度的蛋白和其它两性分子，只要膜的总体结构是 2 个亲水表面的片层，夹在当中是疏水核心。膜结构的一般讨论参见《分子生物学百科全书》(*The Encyclopedia of Molecular Biology*)，J.Kendrew(1994)。合适的脂类参见例如 Lasic(1993)“脂质体：从物理学到应用”(*Liposomes:from Physics to Applications*)，Elsevier，Amsterdam。

制备含 IMP-包含组合物的脂质体的方法在本领域已知。脂小泡可用本领域已

知的任何合适技术制备。方法包括但不限于微囊化、微流化、LLC 方法、乙醇注射、氟里昂注射、“气泡”方法、去垢剂透析、水合、超声处理和反相蒸发。综述参见 Watwe 等(1995) *Curr.Sci.* 68:715-724。技术可组合，以便提供具有最需要特性的小泡。

发明包括使用含组织或细胞靶向成分的 LMSs。这种靶向成分是 LMS 组分，当施用给完整动物、器官或细胞培养物时会提高其在某些组织或细胞位置的积聚，优先于其它组织或细胞位置。靶向成分一般可从脂质体外获得，因此优选结合于外表面或插入外脂双层。靶向成分特别可以是肽、较大肽的一个区域、特异于细胞表面分子或标记的抗体或其抗原结合片段、核酸、碳水化合物、复合碳水化合物的一个区域、特殊的脂质、或小分子如药物、激素或半抗原，它们附着于任何上述分子。对细胞类型特异性细胞表面标记有特异性的抗体在本领域已知且易用本领域已知方法制备。

LMSs 可靶向任何细胞类型有利于待定向的一种治疗，例如能调节和/或参与免疫反应的细胞类型。这种靶细胞和器官包括但不限于 APCs 如巨噬细胞、树突细胞和淋巴细胞，淋巴结构如淋巴结和脾，非淋巴结构，特别是发现树突细胞的结构。

本发明的 LMS 组合物可另外包含表面活性剂。表面活性剂可以是阳离子、阴离子、两性或非离子。优选的表面活性剂种类是非离子表面活性剂；特定优选水溶性表面活性剂。

在 IMP 和抗原通过连接平台分子来邻近相联的实施方案中，平台可以是蛋白性质的或非蛋白性质的(即有机)。蛋白性质的平台的例子包括但不限于白蛋白、丙种球蛋白、免疫球蛋白(IgG)和卵白蛋白。Borel 等(1990) *Immunol.Methods* 126: 159-168; Dumas 等(1995) *Arch.Dermatol.Res.* 287:123-128; Borel 等(1995) *Int.Arch.Allergy Immunol.* 107:264-267; Borel 等(1996) *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 778:80-87。平台是多价的(即包含大于 1 个结合或连接位置)以适应结合 IMP 和抗原。因此，平台可包含 2 个或多个、3 个或多个、4 个或多个、5 个或多个、6 个或多个、7 个或多个、8 个或多个、9 个或多个、10 个或更多结合或连接位置。其它聚合平台的例子是葡聚糖、聚丙烯酰胺、菲可、羧甲基纤维素、聚乙烯醇和聚 D-谷氨酸/D-赖氨酸。

使用平台分子的原理在本领域充分了解。一般，平台包含或衍生成包含 IMP 和抗原的适当结合位点。此外或另外，IMP 和/或抗原衍生以提供适当连接基团。例如，一个简单的平台是双功能接头(即有 2 个结合位点)，如肽。更多的例子讨论

于下。

平台分子可在生物学上稳定，即它们通常表现出几小时到几天到几个月的体内排泄半衰期以赋予治疗功效，且优选由确定组合物的合成单链组成。它们的分子量一般在约 200 到约 1,000,000 的范围内，优选任何下列范围：从约 200 到约 500,000；从约 200 到约 200,000；从约 200 到约 50,000(或更少，如 30,000)。价平台分子的例子是聚合物(或由聚合物组成)，如聚乙二醇(PEG；优选分子量从约 200 到约 800)、聚 D-赖氨酸、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、D-谷氨酸和 D-赖氨酸(比例为 3:2)。其它可使用的分子是白蛋白和 IgG。

其它适用于本发明的平台分子是化学上确定的非聚合价平台分子，公开于美国专利号 5,552,391。其它适用于本发明的均一、化学上确定的价平台分子是衍生的 2,2'-乙二氧二乙胺(ethylenedioxydiethylamine)(EDDA)和三乙醇(TEG)。

另外合适的价平台分子包括但不限于四氨基苯、七氨基 β 环状糊精、四氨基戊赤藓糖醇、1,4,8,11-四氮环十四烷(Cyclam)和 1,4,7,10-四氮环十二烷(Cyclen)。

一般，这些平台通过标准化学合成方法制成。PEG 必须衍生并制成多价，这用标准技术完成。一些适用于缀合物合成的物质可商业购买，如 PEG、白蛋白和 IgG。

IMP 和抗原与平台分子的缀合受许多方法影响，通常涉及 1 种或多种交联剂及抗原和 IMP 平台和平台分子上的官能团。平台和 IMP 和抗原必须有适当的连接基团。用标准合成化学技术将连接基团加入平台中。连接基团可加入多肽抗原和 IMP 中，使用标准固相合成技术或重组技术。重组方法可能需要翻译后修饰以附着接头，这些方法在本领域已知。

例如，多肽包含氨基酸侧链部分，侧链部分含官能团如氨基、羧基或巯基，它们用作偶联多肽与平台的位点。如果多肽不包含这些基团，有这种官能团的残基可加入多肽中。这种残基可通过固相合成技术或重组技术掺入，这两种技术在肽合成领域中熟知。当多肽有碳水化合物侧链(或如果抗原是碳水化合物)时，功能性氨基、巯基和/或醛基可通过常规化学掺入其中。例如，掺入一级氨基可通过氧化糖与乙二胺反应，存在氰基硼氢钠，引入巯基可通过二盐酸半胱胺反应，接着用标准二硫化物还原剂还原，而醛基可在高碘酸盐氧化后产生。以类似的方式，如果平台分子不具有适当官能团，它也能衍生成包含官能团。

长度可变的亲水接头用于使 IMP 和抗原连接平台分子。合适的接头包括乙二醇的线性寡聚体或聚合物。这种接头包括具有公式 $R^1S(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2O(CH_2)_mCO_2R^2$ 的接头，其中 $n=0-200$, $m=1$ 或 2 , $R^1=H$ 或

保护基团如三苯甲基, $R^2=H$ 或烷基或芳基如 4-硝基苯基酯。这些接头用于使含硫醇反应基团如卤乙酰基、马来酰亚胺等的分子经硫醚连接第 2 个分子, 第 2 个分子经酰胺键包含氨基。这些接头相对于附着顺序是灵活的, 即硫醚可首先或最后形成。

在 IMP 和抗原通过吸收到表面上来邻近相联的实施方案中, 表面可以是载体颗粒形式(例如纳米粒), 有无机或有机核心。这种纳米粒的例子包括但不限于纳米晶粒、烷基氰基丙烯酸酯聚合制成的纳米粒和次甲基丙二酸酯聚合制成的纳米粒。IMP 和抗原可吸附的其它表面包括但不限于活化的碳粒和蛋白-陶瓷纳米板。本文提供其它的载体颗粒的例子。

吸附多核苷酸和多肽到表面, 用于传递吸附分子到细胞在本领域熟知。参见例如 Douglas 等(1987) *Crit.Rev.Ther.Drug.Carrier Syst.* 3:233-261; Hagiwara 等(1987) *In Vivo* 1:241-252; Bousquet 等(1999) *Pharm.Res.* 16:141-147 和 Kossovsky 等, 美国专利 5,460,831。包含吸附表面的物质优选可生物降解。吸附 IMP 和/或抗原到表面可通过非共价相互作用发生, 包括离子和/或疏水相互作用。

一般, 载体如纳米粒的特征如表面电荷、颗粒大小和分子量取决于聚合过程中的聚合条件、单体浓度和稳定剂的存在(Douglas 等, 1987)。可修饰载体颗粒的表面, 例如用表面包被, 以允许或提高 IMP 和/或抗原的吸附。具有吸附的 IMP 和/或抗原的载体颗粒可进一步用其它物质包被。一旦施用给受试者, 这种其它物质的加入可例如延长颗粒的半衰期和/或使颗粒靶向特定细胞类型或组织, 如本文所述。

描述了可吸附 IMP 和抗原的纳米结晶表面(参见例如美国专利号 5, 460, 831)。纳米结晶核心颗粒(直径为 $1 \mu m$ 或更小)用表面能量修饰层包被, 修饰层能促进多肽、多核苷酸和/或其它药剂的吸附。如美国专利号 5, 460, 831 所述, 核心颗粒用促进寡核苷酸吸附的表面包被, 随后用抗原制品包被, 例如以脂-抗原混合物形式。这种纳米粒是纳米大小颗粒的自身装配复合物, 通常大约 $0.1 \mu m$, 携带 IMP 的内层和抗原的外层。

另外的吸附表面是通过烷基氰基丙烯酸酯聚合制成的纳米粒。烷基氰基丙烯酸酯可在酸化水介质中聚合, 通过阴离子聚合的方法。取决于聚合条件, 小颗粒往往大小在 20 到 3000nm 范围内, 可能产生纳米粒特异表面特征且具有特定表面电荷(Douglas 等, 1987)。例如, 在有疏水性阳离子如氯化四苯基磷或季铵盐如鲸蜡基三甲基溴化铵的情况下。寡核苷酸可吸附于聚异丁基-和聚异己基氰基丙烯酸酯

纳米粒，这些纳米粒上的寡核苷酸吸附似乎受带负电的核酸链的磷酸基团与疏水阳离子间的离子对形成介导。参见例如 Lambert 等(1998) *Biochimie* 80:969-976; Chavany 等(1994) *Pharm.Res.* 11:1370-1378; Chavany 等(1992) *Pharm.Res.* 9:441-449。多肽也可吸附到聚烷基氯基丙烯酸酯纳米粒上。参见例如 Douglas 等, 1987; Schroeder 等(1998) *Peptides* 19:777-780。

另一种吸附表面是通过次甲基丙二酸酯聚合制成的纳米粒。如 Bousquet 等, 1999 所述, 吸附到聚(次甲基丙二酸酯 2.1.2)纳米粒的多肽似乎初始通过静电力吸附, 接着通过疏水力稳定。

IMP/MC 复合物

IMPs 可以免疫调节多核苷酸/微载体(IMP/MC)复合物的形式施用。因此, 发明提供包含 IMP/MC 复合物的组合物。

用于发明的微载体尺寸小于约 150、120 或 100 μm , 更通常小于约 50-60 μm , 优选小于约 10 μm , 且不溶于纯水。发明所用微载体优选可生物降解, 尽管不能生物降解的微载体是可接受的。微载体通常是固相, 如“珠”或其它颗粒, 尽管也考虑液相微载体, 如包含可生物降解聚合物或油的水包油乳剂。本领域已知各种可接受用作微载体的可生物降解和不能生物降解的物质。

用于组合物或发明方法的微载体一般尺寸小于约 10 μm (例如平均直径小于约 10 μm , 或至少约 97% 的颗粒经过 10 μm 筛选滤器), 包括纳米粒(即载体尺寸小于约 1 μm)。优选选择的微载体的尺寸上限约为 9、7、5、2 或 1 μm 或者 900、800、700、600、500、400、300、250、200 或 100nm 且独立选择的下限约为 4、2 或 1 μm 或约 800、600、500、400、300、250、200、150、100、50、25 或 10nm, 其中下限小于上限。在一些实施方案中, 微载体的大小约为 1.0-1.5 μm 、约 1.0-2.0 μm 或约 0.9-1.6 μm 。在一些较佳实施方案中, 微载体的大小约 10nm 到约 5 μm 或约 25nm 到约 4.5 μm 、约 1 μm 、约 1.2 μm 、约 1.4 μm 、约 1.5 μm 、约 1.6 μm 、约 1.8 μm 、约 2.0 μm 、约 2.5 μm 或约 4.5 μm 。当微载体是纳米粒时, 较佳实施方案包括约 25 到约 300nm、50 到约 200nm、约 50nm 或约 200nm 的纳米粒。

可生物降解的固相微载体能从可生物降解的聚合物中生产, 包括但不限于: 可生物降解的聚酯如聚(乳酸)、聚(乙醇酸)和其共聚物(包括嵌段共聚物)以及聚(乳酸)和聚(乙二醇)的嵌段共聚物; 聚原酸酯如基于 3,9-二亚乙基-2,4,8,10-四氧螺[5.5]十一烷(DETOSU)的聚合物; 聚酐例如基于相对亲水单体如癸二酸的聚(酐)聚合物; 聚酐酰亚胺如基于癸二酸衍生单体的聚酐聚合物, 它掺入氨基酸(即通过酰亚胺键

经氨基末端氮连接癸二酸)如甘氨酸或丙氨酸; 聚酰酯; 聚磷腈, 特别是含水解敏感酯基的聚(磷腈), 它能通过产生羧酸基团来催化聚合物主链的降解(Schacht 等(1996)*Biotechnol.Bioeng.*1996;102); 聚酰胺如聚(乳酸-共-赖氨酸)。

也已知各种适用于生产微载体的不可生物降解的物质, 包括但不限于聚苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、硅石、陶瓷、聚丙烯酰胺、葡聚糖、羟磷灰石、乳胶、金和铁磁或顺磁性材料。某些实施方案排除金、乳胶和/或磁珠。在某些实施方案中, 微载体可由第 1 种物质(如磁性材料)制成, 第 1 种物质用第 2 种物质(如聚苯乙烯)包囊。

固相微球用本领域已知技术制备。例如, 它们可通过乳剂-溶剂提取/蒸发技术制备。一般, 在此技术中, 可生物降解的物质如聚脱水杨 (polyanhydrides)、聚(烷基- α -氰基丙烯酸酯)和聚(α -羟基酯)例如聚(乳酸)、聚(乙醇酸)、聚(D, L-乳酸-共-乙醇酸)和聚(己内酯)溶解于合适的有机溶剂如二氯甲烷, 以构成乳剂的分散相(DP)。DP 通过高速均浆乳化成过量体积的水连续相(CP), CP 包含溶解的表面活性剂例如聚乙烯醇(PVA)或聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。CP 中的表面活性剂确保形成不连续且适当大小的乳滴。有机溶剂然后抽提入 CP 中, 之后通过提高系统温度蒸发。然后, 通过离心或过滤来分离固体微粒, 并通过例如冻干或应用真空来干燥, 然后 4°C 贮存。

可确定干燥微球的物理化学特征, 如平均大小、大小分布和表面电荷。通过例如动态光散射技术确定大小特征, 通过测量 zeta 电位确定表面电荷。

液相微载体包括脂质体、胶束或油滴和其它脂类或基于油的颗粒, 颗粒结合可生物降解的聚合物或油。在某些实施方案中, 可生物降解的聚合物是表面活性剂。在其它实施方案中, 液相微载体是可生物降解的, 因为包含可生物降解的油如鲨烯或植物油。一种优选的液相微载体是水包油乳剂内的油滴。用作微载体的水包油乳剂优选包括可生物降解的取代物如鲨烯。

IMP/MC 复合物包含结合微载体表面的 IMP(即 IMP 不包囊在 MC 中), 优选包含多种结合各微载体的 IMP 分子。在一些实施方案中, 不同 IMPs 的混合物可与微载体络合, 从而微载体结合超过 1 种 IMP 种类。IMP 和 MC 间的键可以是共价或非共价。如本领域技术人员所理解的, IMP 可修饰或衍生且微载体的组成可选择和/或修饰以适应形成 IMP/MC 复合物所需的理想结合类型。

共价结合的 IMP/MC 复合物可用本领域已知的任何交联技术连接。通常, 可修饰 IMP 部分, 用于掺入另外部分(例如游离胺、羧基或巯基)或掺入修饰的(例如硫

代磷酸酯)核苷酸碱基以提供 IMP 部分可连接到微载体的位点。复合物的 IMP 和 MC 部分间的连接可在 IMP 的 3'或 5'末端进行, 或在 IMP 中内部位置的适当修饰碱基上进行。一般也修饰微载体以掺入可形成共价连接的部分, 尽管也可使用微载体上正常存在的官能团。形成 IMP/MC 是通过用微载体孵育 IMP, 在允许形成共价复合物的条件下(例如存在交联剂或使用激活的微载体, 微载体包含活化部分会与 IMP 形成共价键)。

各种交联技术在本领域已知, 包括与氨基、羧基和巯基反应的交联剂。对本领域技术人员显然的是, 交联剂的选择和交联流程取决于 IMP 和微载体的构型以及 IMP/MC 复合物的所需最终构型。交联剂可以是同双功能或异双功能。当使用同双功能交联剂时, 交联剂利用 IMP 和 MC 上的相同部分(例如醛交联剂可用于共价连接 IMP 和 MC, 其中 IMP 和 MC 都包含 1 个或多个游离胺)。异双功能交联剂利用 IMP 和 MC 上的不同部分(例如马来酰亚胺-N-羟基琥珀酰亚胺酯可用于共价连接 IMP 上的游离巯基和 MC 上的游离胺), 且优先用于最小化形成微载体间键。在大部分情况中, 优先通过微载体上第 1 个交联部分和 IMP 上第 2 个交联部分来交联, 其中第 2 个交联部分不存在于微载体上。一种产生 IMP/MC 复合物的优选方法是通过用异双功能交联剂孵育来‘活化’微载体, 然后在适合反应的条件下, 通过孵育 IMP 和活化 MC 来形成 IMP/MC 复合物。交联剂可结合反应部分间的“间隔”臂, 或交联剂中的 2 个反应部分可直接连接。

在一个较佳实施方案中, IMP 部分包含至少 1 个游离巯基(例如由 5'-巯基修饰的碱基或接头提供)用于交联微载体, 而微载体包含游离胺基。与这 2 个基团反应的异双功能交联剂(例如包含马来酰亚胺基团和 NHS 酯的交联剂)如琥珀酰亚胺基 4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯用于活化 MC, 然后共价交联 IMP 以形成 IMP/MC 复合物。

非共价 IMP/MC 复合物可通过非共价结合或相互作用连接, 包括离子(静电)键、疏水相互作用、氢键、范德瓦尔斯引力、或 2 种或多种不同相互作用的组合, 当结合对是连接 IMP 和 MC 时情况通常如此。

优选的非共价 IMP/MC 复合物通常通过疏水或静电(离子)相互作用或其组合(例如通过 IMP 与结合 MC 的多核苷酸之间的碱基配对, 使用结合对)复合。由于多核苷酸主链的亲水性质, 依赖疏水相互作用形成复合物的 IMP/MC 复合物一般需要修饰复合物的 IMP 部分以掺入高度疏水部分。疏水部分优选是生物相容、非免疫原性, 它在组合物针对的个体中天然产生(例如在哺乳动物中发现, 特定是人)。

优选疏水部分的例子包括脂类、类固醇、固醇如胆固醇、萜烯。连接疏水部分与 IMP 的方法当然取决于 IMP 构型和疏水部分的同一性。疏水部分可在 IMP 的任何方便位置加入，优选在 5'或 3'末端；在加入胆固醇部分到 IMP 的情况下，胆固醇部分优选加入 IMP 的 5'末端，使用常规化学反应(参见例如 Godard 等(1995) *Eur.J.Immunol.* 23:404-410)。用于 IMP/MC 复合物的微载体通过疏水键连接，微载体优选从疏水物质制成，如油滴或疏水聚合物，尽管修饰掺入疏水部分的亲水物质也可使用。当微载体是脂质体或其它包含腔的液相微载体时，通过在 MC 制备后混合 IMP 与 MC 来形成 IMP/MC 复合物，以便在 MC 制备过程中避免包囊 IMP。

通过静电结合的非共价 IMP/MC 复合物通常利用多核苷酸主链的高负电荷。因此，用于非共价结合 IMP/MC 复合物的微载体一般在生理 pH(如约 pH6.8-7.4)带正电(阳离子)。微载体可内在地具有正电荷，但从正常不带正电荷的化合物制成的微载体可衍生或另外修饰以变成带正电(阳离子)。例如，用于制成微载体的聚合物可衍生以加入带正电基团如一级胺。另外，带正电的化合物可在生产期间掺入到微载体的制剂中(例如在生产聚(乳酸)/聚(乙醇酸)共聚物期间可使用带正电的表面活性剂以将正电荷给所得微载体颗粒)。

如本文所述，为制备阳离子微球，阳离子脂或聚合物如 1,2-二油酰-1,2,3-三甲铵丙烷(DOTAP)、鲸蜡基三甲基溴化铵(CTAB)或聚赖氨酸加入 DP 或 CP 中，按照它们在这些相中的溶解度。

如本文所述，通过吸附到阳离子微球能完成 IMP/MC 复合物，孵育多核苷酸和颗粒，优选在水混合物中。这种孵育能在任何所需条件下完成，包括环境(室)温度(例如约 20°C)或在冷藏下(例如 4°C)。因为阳离子微球和多核苷酸相对迅速相联，所以孵育可在任何方便的时间段进行，如 5、10、15 分钟或更长，包括过夜和较长的孵育。例如，IMPs 能吸附到阳离子微球上，这是通过在 4°C 过夜水孵育多核苷酸和颗粒。然而，由于阳离子微球和多核苷酸自发相联，通过简单共施用多核苷酸和 MC 可形成 IMP/MC 复合物。可在多核苷酸相联之前或之后鉴定微球的大小和表面电荷。然后评估所选批相对合适对照的活性，例如在确定的人外周血单核细胞(PBMC)和小鼠脾细胞测定中，如本文所述。制剂也可在合适的动物模型中评估。

通过核苷酸碱基配对连接的非共价 IMP/MC 复合物可用常规方法产生。一般，碱基配对的 IMP/MC 复合物用微载体产生，微载体包含结合且优选共价结合的多核苷酸(“捕获多核苷酸”)，多核苷酸与 IMP 至少部分互补。IMP 与捕获核苷酸

间的互补区段优选是至少 6、8、10 或 15 个毗连碱基对，更优选至少 20 个毗连碱基对。捕获核苷酸可通过本领域任何已知方法结合 MC，优选在 5'或 3'末端共价结合 IMP。

在其它实施方案中，结合对可用于在 IMP/MC 复合物中连接 IMP 和 MC。结合对可以是受体和配基，抗体和抗原(或抗原表位)，或任何其它以高亲和性结合的结合对(例如 K_d 小于约 10⁻⁸)。一类优选结合对是生物素和链霉抗生物素蛋白或生物素和抗生物素蛋白，它们形成很紧的复合物。当使用结合对介导 IMP/MC 复合物结合时，IMP 一般通过共价键用结合对的一个成员衍生，MC 用结合对的另一个成员衍生。2 种衍生化合物的混合物导致 IMP/MC 复合物形成。

许多 IMP/MC 复合物实施方案不包括抗原，某些实施方案排除与疾病或紊乱相关的抗原，它们是 IMP/MC 复合物治疗的目标。在进一步的实施方案中，IMP 也结合 1 种或多种抗原分子。抗原可以多种方式偶联 IMP/MC 复合物的 IMP 部分，包括共价和/或非共价相互作用，如 WO 98/16247 所述。另外，抗原可连接微载体。抗原与 IMP/MC 复合物中 IMP 之间的连接包括结合 IMP 的抗原，连接能用本文和本领域已知技术完成，包括但不限于直接共价连接、经交联剂部分(包括间隔臂)的共价缀合、经特异结合对(如生物素和抗生物素蛋白)的非共价缀合、经静电或疏水结合的非共价缀合。

有阳离子凝聚剂和稳定剂的 IMP 复合物

IMPs 可作为组合物施用，组合物包含阳离子凝聚剂、IMP 和稳定剂(即 CIS 组合物)，用于调节受体的免疫反应。参见美国专利申请 60/402, 968。在一些实施方案中，CIS 组合物也能包含抗原和/或脂肪酸。

发明的 CIS 组合物通常是微粒形式。对本领域技术人员显然的是，发明的 CIS 颗粒组合物由不同大小的颗粒群组成。由于此天然产生的可变性，发明组合物中颗粒的“大小”以一定范围描述或描述为最大或最小直径。如果至少 95% 颗粒符合特定尺寸，认为颗粒具有特定大小(例如如果至少 97% 颗粒的直径小于 20 μm ，则认为组合物由直径小于 20 μm 的颗粒组成)。颗粒大小可通过本领域已知的任何简便方法测量，包括过滤(如使用“深度”滤器以捕获大于截止尺寸的颗粒)、动态光散射、电镜、包含 TEM(特定结合冷冻断裂处理)和 SEM 等。

发明的 CIS 组合物优选包含直径小于约 50 μm 的颗粒，更优选直径小于约 20 μm ，尽管在一些实施方案中，颗粒直径小于约 3、3 或 1 μm 。优选的颗粒大小范围包括约 0.01 μm 到 50 μm 、0.02 μm 到 20 μm 、0.05 μm 到 5 μm 、0.05 μm 到 3

μm 的直径。

CIS 组合物成分可以不同比例/量存在于组合物中，尽管考虑到稳定剂和任选成分如脂肪酸和抗原的量保持相对不变，稳定剂一般范围从约 0.1% 到 0.5%(v/v)，脂肪酸范围从约 0 % 到 0.5%，抗原浓度范围从约 0.1 到约 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，优选约 1 到约 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，更优选约 10 到 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。IMP 和阳离子凝聚剂的量和比例在发明的组合物中经受较大范围的变化。IMP 的量可变化到一定程度，作为 IMP 分子量的函数，且一般范围从约 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 到约 2mg/mL，优选约 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 到 1mg/mL。阳离子凝聚剂通常以超过 IMP 的量(在质量方面)存在，一般比例约 1:2(IMP:阳离子凝聚剂)到约 1:6，更优选约 2:5 到约 1:5。

CIS 组合物的颗粒大小是一些变量的函数。通过改变阳离子凝聚剂与 IMP 的比例可调节组合物中颗粒的大小分布。例如，改变示范+ISS/0.4% 吐温 85/0.4% 油酸盐/多粘菌素 B 组合物中阳离子凝聚剂与 IMP 的比例可改变平均颗粒大小，从阳离子凝聚剂:IMP=1 时的约 1.5 μm 到阳离子凝聚剂:IMP=10 时的约 45 μm 。

在一些实施方案中，CIS 组合物包含阳离子凝聚剂、IMP 和稳定剂，稳定剂是非离子去垢剂。在其它实施方案中，组合物包含膜破裂阳离子脂肽(优选多粘菌素，更优选多粘菌素 B)、IMP 和稳定剂。在一些实施方案中，稳定剂不是血清蛋白(特别不是牛血清蛋白)。此类实施方案的示范组合物使用聚氧乙烯醚去垢剂如吐温 80 或吐温 85 作为稳定剂，油酸盐作为任选的另外稳定剂。

在一些实施方案中，CIS 组合物包含免疫调节颗粒，其中通过结合阳离子凝聚剂、IMP 和稳定剂的方法制成颗粒，稳定剂是非离子去垢剂。在其它实施方案中，发明的组合物包含免疫调节颗粒，其中通过结合膜破裂阳离子脂肽(优选多粘菌素，更优选多粘菌素 B)、IMP 和稳定剂的方法制成颗粒。在一些实施方案中，稳定剂不是血清蛋白(特别不是牛血清蛋白)。

在一些实施方案中，CIS 组合物包含免疫调节颗粒，其中形成颗粒的方法是结合 IMP 和稳定剂，稳定剂是非离子去垢剂，从而形成 IMP/稳定剂混合物，结合阳离子凝聚剂和 IMP/稳定剂混合物。在其它实施方案中，发明的组合物包含免疫调节颗粒，其中形成颗粒的方法是结合 IMP 和稳定剂，从而形成 IMP/稳定剂混合物，结合膜破裂阳离子脂肽(优选多粘菌素，更优选多粘菌素 B)与 IMP/稳定剂混合物。在一些实施方案中，稳定剂不是血清蛋白(特别不是牛血清蛋白)。

在一些实施方案中，CIS 组合物包含免疫调节颗粒，其中颗粒包含阳离子凝聚剂、IMP 和稳定剂，稳定剂是非离子去垢剂。在其它实施方案中，发明的组合物

包含免疫调节颗粒，其中颗粒包括膜破裂阳离子脂肽(优选多粘菌素，更优选多粘菌素 B)、IMP 和稳定剂。在一些实施方案中，稳定剂不是血清蛋白(特别不是牛血清蛋白)。

用于 CIS 组合物和使用 CIS 组合物方法的阳离子凝聚剂是在生理 pH(即 pH 为约 7.0 到约 7.5)带正电的分子。用于本发明的阳离子凝聚剂不是两性离子且是聚阳离子，即有大于 1 个正电荷每分子。用于本发明的阳离子凝聚剂包括亲水或两亲聚阳离子。

优选的阳离子凝聚剂包括：(a)膜破裂阳离子脂肽，包括但不限于多粘菌素、包括多粘菌素 A、多粘菌素 B(包括多粘菌素 B₁ 和多粘菌素 B₂)、多粘菌素 C、多粘菌素 D、多粘菌素 E(也称为粘菌素)、多粘菌素 K、多粘菌素 M、多粘菌素 P、多粘菌素 S 和多粘菌素 T，环杆菌素包括环杆菌素 A、环杆菌素 B、环杆菌素 C、环杆菌素 D、环杆菌素 E 和环杆菌素 F、八肽菌素、两性霉素包括两性霉素 B，酰化肽包括辛酰基-KFFKFFKFF 和酰基 KALA(辛酰基-WEAKLAKALAKALAKH LAKALAKALEACEA)；(b)膜破裂阳离子肽，包括但不限于多粘菌素 B 九肽、杀菌肽、包括杀菌肽 A、杀菌肽 B 和杀菌肽 P1；KFFKFFKFF 和 KALA(WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALEACEA)，(c)单链阳离子表面活性剂，包括但不限于鲸蜡基三甲基溴化铵(CTAB)、苄基-二甲基-溴化铵(BDAB)、CpyrB(鲸蜡基-溴化吡啶)、CimB(鲸蜡基溴化咪唑)，聚阳离子聚合物，包括但不限于聚 L-赖氨酸(PLL)和聚乙烯亚胺(PEI)。在一些实施方案中，阳离子凝聚剂是膜破裂阳离子脂肽，优选是多粘菌素，更优选多粘菌素 B。在某些实施方案中，阳离子凝聚剂可排除脂肪酸酯(即脂类)和双链阳离子表面活性剂。

用于 CIS 组合物和使用 CIS 组合物方法的稳定剂包括在水中可悬浮并降低水表面张力的稳定剂，尽管优选水溶性和/或在水中完全可混溶的稳定剂。一些稳定剂种类用于组合物和发明方法，包括蛋白(优选亲水性蛋白)、非离子去垢剂、聚合表面活性剂(例如聚乙烯醇和聚乙烯吡咯烷酮)、阳离子去垢剂、阴离子去垢剂和脂肪酸，尽管在某些实施方案中，血清蛋白(特定是牛血清蛋白)、脂肪酸和/或离子去垢剂可从稳定剂定义中排除。

任何蛋白能根据发明用作稳定剂。在一些实施方案中，稳定剂是不用作抗原的蛋白(参见下面的讨论)；在这些实施方案中，蛋白优选获得自与组合物的计划受体相同的种类(例如如果组合物计划用于人，则用作稳定剂的蛋白优选是人蛋白)。血

清白蛋白是在这种实施方案中用作稳定剂的示范蛋白。在其它实施方案中，抗原用作稳定剂，其中抗原不需且一般优选不是与计划受体匹配的种类。用于组合物和发明方法的抗原在下面披露。

用于CIS组合物和使用CIS组合物方法的非离子去垢剂包括氯磺丙脲如癸基二甲基氧化膦(APO-10)和二甲基十二烷基氧化膦(APO-12)、辛酰基-N-甲基氯磺丙脲(MEGA-8)、壬酰基-N-甲基氯磺丙脲(MEGA-9)和癸酰基-N-甲基氯磺丙脲(MEGA-10)；聚氧乙烯醚去垢剂，包括聚氧乙烯(10)十二烷酯(Genapol C100)、聚氧乙烯(4)月桂醚(BRIJ®30)、聚氧乙烯(9)月桂醚(LUBROL®PX)、聚氧乙烯(23)月桂醚(BRIJ®35)、聚氧乙烯(2)鲸蜡醚(BRIJ®52)、聚氧乙烯(10)鲸蜡醚(BRIJ®56)、聚氧乙烯(20)鲸蜡醚(BRIJ®58)、聚氧乙烯(2)硬脂醚(BRIJ®72)、聚氧乙烯(10)硬脂醚(BRIJ®76)、聚氧乙烯(20)硬脂醚(BRIJ®78)、聚氧乙烯(100)硬脂醚(BRIJ®700)、聚氧乙烯(2)油醚(BRIJ®92)、聚氧乙烯(10)油醚(BRIJ®97)、聚氧乙烯(20)油醚(BRIJ®98)、异三癸基聚(乙二醇醚)₈(Genapol 80)、PLURONIC®F-68、PLURONIC®F-127、十二烷基聚(乙二醇醚)₉(Thesit)、聚氧乙烯(10)异辛基苯基醚(TRITON®X-100)、聚氧乙烯(8)异辛基苯基醚(TRITON®X-114)、聚乙二醇山梨聚糖单月桂酸酯(吐温®20)、聚氧乙烯山梨聚糖单棕榈酸酯(吐温®40)、聚乙二醇山梨聚糖单硬脂酸酯(吐温®60)、聚氧乙烯山梨聚糖三硬脂酸酯(吐温®65)、聚乙二醇山梨聚糖单油酸酯(吐温®80)、聚氧乙烯(20)山梨聚糖三油酸酯(吐温®85)、泊洛沙姆 188 和聚乙二醇-p-异辛基苯基醚(Nonidet NP40)；烷基麦芽糖苷去垢剂，包括环己基-n-乙基-β-D-麦芽糖苷、环己基-n-己基-β-D-麦芽糖苷和环己基-n-甲基-β-D-麦芽糖苷；n-癸酰基蔗糖；吡喃葡萄糖苷，包括甲基 6-O-(N-庚基氨基甲酰基)-a-D-吡喃葡萄糖苷(HECAMEG)和烷基吡喃葡萄糖苷如 n-癸基-β-D-吡喃葡萄糖苷、n-庚基-β-D-吡喃葡萄糖苷、n-十二烷基-β-D-吡喃葡萄糖苷、n-壬基-β-D-吡喃葡萄糖苷、n-辛基-α-D-吡喃葡萄糖苷和 n-辛基-β-D-吡喃葡萄糖苷；烷基吡喃葡糖硫苷，包括 n-庚基-β-D-吡喃葡糖硫苷；烷基吡喃麦芽糖苷，包括 n-癸基-β-D-吡喃麦芽糖苷和 n-辛基-β-D-吡喃麦芽糖苷；n-癸基-β-D-麦芽糖硫苷；毛地黄皂苷；n-十二酰基蔗糖；n-十二烷基-β-D-麦芽糖苷；庚烷 1, 2, 3-三醇；n-辛酰基-β-D-葡糖胺(NOGA)；n-辛酰基蔗糖；泊洛沙姆(聚氧乙烯/聚氧丙烯嵌段共聚物)如泊洛沙姆 188 和泊洛沙姆 407；磺酸甜菜碱，包括 SB-10、SB-12、SB-14 以及 n-十一烷基-β-D-麦芽糖苷。优选的稳定剂包括聚氧乙烯醚去垢剂，特定是聚乙二醇山梨聚糖单油酸酯和聚氧乙烯(20)山梨聚糖三油酸酯。

用于 CIS 组合物和使用 CIS 组合物方法的阴离子去垢剂包括辛酸和其盐、鹅脱氧胆酸和其盐、胆酸和其盐、癸烷磺酸和其盐、脱氧胆酸和其盐、糖脱氧胆酸和其盐、月桂酰肌氨酸和其盐、*n*-十二烷基硫酸酯和其盐(包括钠和锂盐)、牛磺鹅脱氧胆酸和其盐、牛磺胆酸和其盐、牛磺脱氢胆酸和其盐、牛磺脱氧胆酸和其盐、牛磺石胆酸和其盐、牛磺熊脱氧胆酸和其盐。

阳离子去垢剂包括鲸蜡基吡啶𬭩和其盐、鲸蜡基三甲基氨和其盐，包括鲸蜡基三甲基溴化铵(CTAB)、十二烷基三甲基氨和其盐，包括十二烷基三甲基溴化铵、烷基咪唑啉铵、季咪唑啉、十四烷基三甲基氨和其盐，包括十四烷基三甲基溴化铵。

选择用作稳定剂的去垢剂优选是油/水乳化去垢剂。油/水乳化去垢剂在本领域已知且一般特点在于约 8 到约 18 的疏水/亲脂平衡(HLB)值。掺入颗粒组合物的去垢剂优选具有约 10 到约 16 的 HLB 值，更优选约 11 到约 15(例如聚乙二醇山梨聚糖单油酸酯，HLB=15.4；聚氧乙烯(10)异辛基苯基醚，HLB=13.5；聚乙二醇(20)山梨聚糖三油酸酯，HLB=11)。

在某些实施方案中，CIS 组合物也可包括 1 种或多种脂肪酸或其盐作为另外的成分。在这些使用脂肪酸作为稳定剂组分和使用脂肪酸作为组合物的另外成分的实施方案中，用作稳定剂的脂肪酸不同于用作‘另外’成分的脂肪酸。用于发明 CIS 组合物的脂肪酸大小范围可从 4 到 30 个碳原子，可以是不饱和(例如硬脂酸)、单不饱和(例如油酸)或多不饱和(例如亚油酸)，尽管一般优选单不饱和或多不饱和脂肪酸。

在一些实施方案中，CIS 组合物所掺入脂肪酸的碳链长度至少约为 4、5、6、8、10、15、18 或 20 个碳原子且小于约 30、25、20、19、15 或 10 个碳原子。因此，在一些实施方案中，发明所用脂肪酸的碳链长度范围约 4 到 30、5 到 25、10 到 20 或 15 到 20 个碳原子。

用于 CIS 组合物的脂肪酸包括但不限于花生四烯酸、癸酸、二十二烷酸、二十二碳六烯酸、花生酸、二十一烷酸、十七烷酸、庚酸、己酸、月桂酸、亚油酸、亚麻酸、十四烷酸、十九烷酸、壬酸、辛酸、油酸、棕榈酸、十五烷酸、硬脂酸、二十四烷酸、二十三烷酸、十三烷酸和十一烷酸。用于 CIS 组合物的优选脂肪酸包括油酸、棕榈油酸和亚油酸。

在发明的某些实施方案中，抗原掺入 CIS 组合物或与 CIS 组合物联合施用。这些掺入抗原的 CIS 组合物可将抗原掺入颗粒组合物本身，或者使其溶解于或悬浮

于颗粒组合物悬浮的溶液。任何抗原可掺入发明的 CIS 组合物或与其共施用。

发明的方法

如本文所述，发明的 IMPs 特定刺激 IL-6、TNF α 、IFN- γ 和 I 型干扰素的生成，I 型干扰素包括 IFN- α 和 IFN- ω ，刺激 B 细胞增殖和/或激活浆细胞样树突细胞以分化。发明的 IMPs 也刺激生成其它细胞因子、化学因子和活化相关蛋白，包括但不限于 IP-10(干扰素诱导蛋白 10kDa)、MCP-1(单核细胞趋化蛋白 1)、MCP-2、MCP-3、MIG、MIP-3b、CD80、CD86、CD40、CD54 和 MHC II 类。发明的 IMPs 也可刺激表达 IFN- α -诱导型基因，包括但不限于 2,5-寡腺苷酸合成酶(2,5-OAS)、干扰素刺激基因-54K(ISG-54K)和鸟苷酸结合蛋白-1(GBP-1)。发明的免疫调节多核苷酸也提供延迟类细胞样树突细胞细胞凋亡的信号。发明的免疫调节多核苷酸也可刺激天然杀伤(NK)细胞的裂解活性。因此，发明的 IMPs 在调节个体的免疫反应中特别有效。

发明提供调节个体免疫反应的方法，优选是哺乳动物，更优选人，方法包括施用本文所述 IMP 给个体。免疫调节可包括刺激 Th1 型免疫反应和/或抑制或减少 Th2 型免疫反应。IMP 施用量足以调节免疫反应。如本文所述，调节免疫反应可以是体液和/或细胞，用本领域和本文所述标准技术测量。

例如，调节动物或细胞群的免疫反应，例如哺乳动物细胞，任选人血细胞(如 PBMCs、淋巴细胞、树突细胞)、支气管肺泡灌洗细胞或其它含 ISS 响应细胞的细胞或细胞群，通过细胞接触 IMP 或本文所述含 IMP 的组合物(例如含 IMP、IMP 和抗原、IMP-抗原缀合物、IMP/微载体复合物等的组合物)完成调节。调节可通过任何接触形式完成，无限制地包括体外共孵育细胞和 IMP、应用 IMP 到哺乳动物皮肤(例如实验动物皮肤)和胃肠外施用。

动物或细胞群的免疫反应可用多种方法检测，包括 1 种或多种 IFN- γ 、IFN- α 、IL-2、IL-12、TNF- α 、IL-6、IL-4、IL-5、IP-10、ISG-54K、MCP-1 的表达增加或免疫刺激的基因表达分布特征变化以及反应如 B 细胞增殖和树突细胞成熟。刺激细胞群中免疫反应的能力有一些用途，例如用于免疫抑制剂的测定系统。

一些个体适合接受本文所述的免疫调节多核苷酸。个体优选但不一定是人。

在某些实施方案中，个体患与 Th2 型免疫反应相关的疾病，如变态反应或变态反应诱导的哮喘。施用 IMP 可产生免疫调节，增加 1 种或多种 Th1 型反应相关细胞因子的水平，可导致与个体响应变态原相关的 Th2 型反应特征下降。免疫调节患 Th2 型反应相关疾病的个体可减少或改善 1 种或多种疾病的症状。当疾病是变

态反应或变态反应诱导的哮喘时, 1 种或多种症状的改善包括 1 种或多种下列情况减少: 鼻炎、变态性结膜炎、IgE 的循环水平、组胺的循环水平和/或需要‘拯救’吸入疗法(例如通过定量吸入器或喷雾器施用的吸入的舒喘宁)。

在进一步的实施方案中, 经受发明免疫调节治疗的个体是接受疫苗的个体。疫苗可以是预防性疫苗或治疗性疫苗。预防性疫苗包括 1 种或多种可能使个体处于危险的疾病相关抗原表位(例如结核分枝杆菌抗原作为预防肺结核的疫苗)。治疗性疫苗包括 1 种或多种影响个体的特定疾病相关抗原表位, 如肺结核病人中的结核分枝杆菌或牛分枝杆菌(*M. bovis*)表面抗原、经受变态反应的个体中个体变应性的抗原(即变态反应脱敏治疗)、来自癌症个体的肿瘤细胞(例如描述于美国专利号 5,484,596)或癌症患者的肿瘤相关抗原。

IMP 可结合疫苗给予(例如在相同注射或同时的但单独注射)或 IMP 能单独施用(例如施用疫苗之前或之后至少 12 小时)。在某些实施方案中, 疫苗抗原是部分 IMP, 通过共价或非共价连接 IMP。在其它实施方案中, IMP 可作为预防性疫苗单独施用以增加对广范围的细菌或病毒病原体感染的抗性, 包括用作生物战或恐怖行为的天然或遗传修饰的生物体。施用免疫调节多核苷酸治疗给接受疫苗的个体与接受无 IMP 疫苗的个体相比, 导致对疫苗的免疫反应移向 Th1 型反应。识别移向 Th1 型反应可通过对疫苗中抗原的迟发型超敏(DTH)反应、IFN- γ 和其它 Th1 型反应相关细胞因子增加、生成特异于疫苗抗原的 CTL、特异于疫苗抗原的 IgE 水平低或下降、特异于疫苗抗原的 Th2 相关抗体减少和/或特异于疫苗抗原的 Th1 相关抗体增加。在治疗性疫苗的情况下, 施用 IMP 和疫苗能改善 1 种或多种打算疫苗治疗疾病的症状。对本领域技术人员显然的是, 确切的症状和其改善方式取决于寻求治疗的疾病。例如, 当治疗性疫苗用于肺结核时, 用疫苗的 IMP 治疗可减少咳嗽、胸膜或胸壁疼痛、发热和/或本领域已知的其它症状。当疫苗是变态反应脱敏治疗所用变应原时, 治疗使变态反应的症状减少(例如鼻炎、变应性结膜炎、IgE 循环水平和/或组胺循环水平下降)。

发明的其它实施方案涉及免疫调节治疗患预先存在疾病或紊乱的个体, 如癌症或传染病。癌症是免疫调节的有吸引力的靶, 因为大部分癌症表达肿瘤相关和/或肿瘤特异抗原, 这些抗原没有在身体其它细胞中发现。刺激抗肿瘤细胞的 Th1 型反应导致免疫系统直接和/或旁观者杀死肿瘤细胞, 引起癌细胞下降和/或症状减少。施用 IMP 给癌症个体可刺激抗肿瘤细胞的 Th1 型免疫反应。这种免疫反应可杀死肿瘤细胞, 通过细胞免疫系统细胞(如 CTL、NK 细胞)或体液免疫系统成分的

直接作用或通过免疫系统对靶向细胞的邻近细胞的旁观者作用。参见例如 Cho 等(2000)*Nat.Biotechnol.* 18:509-514。在癌症情况中，施用 IMPs 可进一步包括施用 1 种或多种另外的治疗剂如抗肿瘤抗体、化疗方案和/或放射治疗。抗肿瘤抗体包括但不限于抗肿瘤抗体片段和/或其衍生物、单克隆抗肿瘤抗体、片段和/或其衍生物，它们在本领域已知，因为在癌症治疗中施用这种抗体试剂(如 Rituxan®(利妥昔单抗); Herceptin®(曲妥珠单抗))。施用 1 种或多种另外的治疗剂可在施用 IMPs 之前、后和/或同时发生。

根据发明的免疫调节治疗也用于患传染病的个体，特定是抗体液免疫反应的传染病(例如分枝杆菌感染和胞内病原体引起的疾病)。免疫调节疗法能用于治疗细胞病原体(如细菌或原生动物)或亚细胞病原体(如病毒)引起的传染病。IMP 治疗可施用给患分枝杆菌疾病的个体，如肺结核(例如结核分枝杆菌和/或牛分枝杆菌感染)、麻风病(即麻风分枝杆菌(*M.leprae*)感染)或海分枝杆菌(*M.marinum*)或溃疡分枝杆菌(*M.ulcerans*)感染。IMP 疗法也用于治疗病毒感染，包括流感病毒、呼吸道合胞病毒(RSV)、乙肝病毒、丙肝病毒、疱疹病毒，特定是单纯疱疹病毒和乳头瘤病毒的感染。IMP 疗法也有益于胞内寄生虫引起的疾病如疟疾(例如通过间日疟原虫(*Plasmodium vivax*)、卵形疟原虫(*P.ovale*)、镰状疟原虫(*P.falciparum*)和/或三日疟原虫(*P.malariae*)感染)、利什曼病(例如通过杜氏利什曼原虫(*Leishmania donovani*)、热带利什曼原虫(*L.tropica*)、墨西哥利什曼原虫(*L.mexicana*)、巴西利什曼原虫(*L.braziliensis*)、秘鲁利什曼原虫 (*L.peruviana*)、婴儿利什曼原虫(*L.infantum*)、恰加斯利什曼原虫 (*L.chagasi*) 和/或埃塞俄比亚利慢原虫 (*L.aethiopica*) 感染)和弓形体病(即通过鼠弓形虫(*Toxoplasma gondii*)感染)。IMP 疗法同样用于治疗寄生虫病如血吸虫病(即通过血吸虫(*Schistosoma*)属血吸虫感染，如埃及血吸虫(*S.haematobium*)、曼森血吸虫(*S.mansoni*)、日本血吸虫 (*S.japonicum*)和湄公河血吸虫(*S.mekongi*))和支睾吸虫病(即通过中华支睾吸虫(*Clonorchis sinensis*)感染)。施用 IMP 给患传染病个体可改善传染病的症状。在一些实施方案中，传染病不是病毒病。

发明进一步提供增加或刺激个体中至少 1 种 Th1 相关细胞因子的方法，包括 IL-2、IL-12、TNF- β 、IFN- γ 、IFN- α 。在某些实施方案中，发明提供增加或刺激个体中 IFN- γ 的方法，特定是需要 IFN- γ 水平增加的个体，通过施用有效量 IMP 给个体，从而增加 IFN- γ 。需要 IFN- γ 增加的个体是所患疾病一般响应 IFN- γ 施用的个体。这种疾病包括一些炎性疾病，包括但不限于溃疡性结肠炎。这种疾病

也包括一些纤维变性紊乱，包括但不限于特发性肺纤维化(IPF)、硬皮病、皮肤辐射诱导的纤维化、包括血吸虫病诱导肝纤维化的肝纤维化、肾纤维化以及其它可通过施用 IFN- γ 改善的疾病。根据发明施用 IMP 使 IFN- γ 水平增加、改善 1 种或多种症状、稳定 1 种或多种症状、和/或预防或减缓疾病的进展(例如减少或去除另外的损伤或症状)，疾病响应 IFN- γ 。

实践发明的方法可联合其它构成疾病护理标准的治疗，如施用消炎剂例如 IPF 中的系统性皮质类固醇疗法(如可的松)。

在某些实施方案中，发明提供增加个体中 I 型干扰素的方法，包括 IFN- α 、IFN- β 和 IFN- ω ，特定是在需要 I 型干扰素水平增加的个体中，通过施用有效量 IMP 给个体，从而增加 I 型干扰素水平。在某些实施方案中，发明提供增加个体中 IFN- α 的方法，特定是在需要 IFN- α 水平增加的个体中，通过施用有效量 IMP 给个体，从而增加 IFN- α 水平。需要 IFN- α 增加的个体是所患疾病一般响应 IFN- α 施用的个体，包括重组 IFN- α ，包括但不限于病毒感染和癌症。在一些需要增加生成较高水平 IFN- α 的实施方案中，IMP 包含至少 1 种回文序列，回文序列具有至少下列长度(碱基)：10、12、14、16、18、20、22、24、26、28 或 30，在一些实施方案中，IMP 包含至少 1 种长度大于 30 个碱基的回文序列。

根据发明施用 IMP 使 IFN- α 水平增加、改善 1 种或多种症状、稳定 1 种或多种症状、和/或预防或减缓疾病的进展(例如减少或去除另外的损伤或症状)，疾病响应 IFN- α 。实践发明的方法可联合其它构成疾病护理标准的治疗，如施用抗病毒剂用于病毒感染。

也提供减少患 IgE 相关疾病个体中 IgE 水平的方法，特定是血清水平，通过施用有效量 IMP 给个体。在这种方法中，免疫调节多核苷酸可单独施用(例如没有抗原)或与抗原如变应原一起施用。IgE 下降能改善 1 种或多种 IgE 相关疾病的症状。这些症状包括变态反应性症状如鼻炎、结膜炎、对变应原敏感性减少、变态反应个体中变态反应的症状减少或变应反应的严重性下降。因此，发明也提供治疗个体中变应性疾病的方法。在一些实施方案中，治疗变应性疾病的方法包括施用具有抗原特定量或剂量的免疫调节多核苷酸。施用任何另外的抗原，施用的抗原量或剂量在治疗进程中可保持相同，可减小或增加(如在常规脱敏治疗中)。

在一些实施方案中，发明提供刺激个体中 CTL 生成的方法，特定是需要增加 CTL 数量和/或活性的个体，方法包括施用有效量 IMP 给个体，从而增加 CTL 生成。需要增加 CTL 生成的个体是所患疾病一般响应 CTL 活性的个体。这种疾病包

括但不限于癌症和胞内感染。根据发明施用 IMP 使 CTL 水平增加、改善 1 种或多种症状、稳定 1 种或多种症状、和/或预防或减缓疾病的进展(例如减少或去除另外的损伤或症状)，疾病响应 CTL 活性。

发明的方法包括本文所述的任何实施方案，如施用免疫调节多核苷酸/微载体复合物形式的 IMPs(有或没有抗原，或者在施用进程中中有或没有抗原)或与抗原邻近相联的 IMPs。

对本领域技术人员显然的是，实践发明的方法可联合其它用于特定适应证的疗法，适应证施用 IMP。例如，施用 IMP 治疗可结合抗疟疾药物如用于疟病人的氯喹，结合杀利什曼原虫的药物如用于利什曼病患者的戊烷脒和/或别嘌呤醇，结合抗分枝杆菌药物如用于肺结核病人的异烟肼、利福平和/或乙胺丁醇，或结合用于特应性(变态反应)患者的变应原脱敏治疗。

如本文所述，施用 IMPs 能进一步包括施用 1 种或多种另外的免疫治疗剂(即经免疫系统作用的试剂和/或获得自免疫系统的试剂)，包括但不限于细胞因子、佐剂和抗体(包括但不限于抗体片段和/或其衍生物和单克隆抗体、片段和/或其衍生物)。治疗性抗体的例子包括癌症中所用的抗体(例如抗肿瘤抗体)。施用这些另外的免疫治疗剂可应用于本文所述的全部方法。

IMP 也能结合佐剂施用。与包含单独 IMP 和抗原的组合物所得结果相比，抗原与 IMP 和佐剂一起施用可加强对抗原的免疫反应并因此产生增强的免疫反应。佐剂在本领域中已知，包括但不限于水包油乳剂、油包水乳剂、明矾(铝盐)、脂质体和微粒，微粒包括但不限于聚苯乙烯、淀粉、聚磷腈和聚交酯/聚糖昔。其它合适的佐剂也包括但不限于 MF59、DETOXTM(Ribi)、鲨烯混合物(SAF-1)、胞壁酰肽、皂昔衍生物、分枝杆菌细胞壁制品、单磷酰脂 A、分枝菌酸衍生物、非离子嵌段共聚物表面活性剂、Quil A、霍乱毒素 B 亚基、聚磷腈和衍生物、免疫刺激复合物(ISCOMs)如 Takahashi 等(1990) *Nature* 344:873-875 所述以及以脂类为基础的佐剂和本文所述其它佐剂。对于兽医用途和在动物中生成抗体，可使用弗氏佐剂(完全和不完全)的促有丝分裂成分。

施用和评估免疫反应

IMP 能联合其它药物和/或免疫原性和/或免疫刺激剂施用，如本文所述，且能结合其生理学上可接受的载体(发明同样包括这些组合物)。IMP 可以是本文所述的任意一种。

因此，IMP 能结合其它免疫治疗剂施用，包括但不限于细胞因子、佐剂和抗体。

对于所有免疫原性组合物，特定 IMP 制剂的免疫学有效量和施用方法可变化，变化是基于个体、待治疗疾病和其它对本领域技术人员明显的因素。考虑因素包括抗原的抗原性(如果施用抗原)，IMP 是否与佐剂、传递分子和/或抗原一起施用或是共价附着于它们，施用途径和待施用的免疫剂量数。这些因素在本领域中已知且在本领域技术范围内，以作出这种决定而不需过度试验。合适的剂量范围是提供所需免疫反应调节(如刺激 IFN- α 和/或 IFN- γ)的范围。当需要对抗原免疫反应时，合适的剂量范围是提供所需对抗原免疫反应的调节范围。一般，剂量由施用给病人的 IMP 量确定，而不是所施用含 IMP 的组合物的总量。有用的 IMP 剂量范围以传递的 IMP 量给出，可以是例如大约任何下列范围：1 到 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、100 到 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、200 到 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、1 到 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、100 到 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、300 到 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、400 到 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。给予各病人的绝对量取决于药理学性质，如生物利用度、清除率和施用途径。

特定 IMP 制剂的有效量和施用方法可变化，变化是基于单独病人、所需结果和/或疾病类型、疾病阶段和其它对本领域技术人员明显的因素。用于特定应用的施用途径对本领域技术人员是显然的。施用途径包括但不限于局部、皮肤、经皮肤、经粘膜、表皮、胃肠外、胃肠、鼻咽和肺，包括经支气管和经肺泡。合适剂量范围是提供足够 IMP 包含组合物以达到约 1-10 μM 组织浓度的剂量范围，浓度由血液水平测量。给予各病人的绝对量取决于药理学性质，如生物利用度、清除率和施用途径。

如本文所述，APCs 和具有高浓度 APCs 的组织是 IMP 的优选靶。因此，优选施用 IMP 到哺乳动物皮肤和/或粘膜，其中 APCs 以相对高浓度存在。

本发明提供适合局部应用的 IMP 制剂，包括但不限于生理学上可接受的移植物、软膏剂、乳剂、清洗液和凝胶。局部应用是例如通过有传递体系分散的敷料或绷带、直接施用传递体系到切口或敞开伤口中、或通过定向于感兴趣位置的经皮肤施用装置。有 IMP 分散的乳剂、清洗液、凝胶或软膏剂适用作局部软膏剂或伤口填充剂。

皮肤施用的优选途径是侵入性最低的途径。这些方式中优选的是经皮肤传输、表皮施用和皮下注射。在这些方式中，表皮施用优先于较高浓度的 APCs，皮内组织中预期有较高浓度的 APCs。

经皮肤施用是通过应用乳剂、清洗液、凝胶等完成的，它们能允许 IMP 渗透皮肤并进入血流。适合经皮肤施用的组合物包括但不限于药学上可接受的悬浮液、

油、乳剂和软膏剂，它们直接应用于皮肤或掺入保护载体如经皮肤装置(所谓的‘贴片')。合适当乳剂、软膏剂等的例子可发现于例如《医师案头参考资料》。

对于经皮肤传输，离子电渗疗法是合适的方法。离子电渗传输可用商业购买的贴片完成，贴片经完整皮肤连续传递其产品，持续几天或更长。使用此方法能以相对高浓度控制传送药物组合物，可输注组合药物和同时使用吸收促进剂。

用于此方法的示范贴片产品是通用医学公司，Los Angeles, CA 的注册商标产品 LECTRO PATCH。此产品电子维持充电电极于中性 pH 并能适合提供不同浓度的剂量，适合连续和/或周期性提供剂量。制备和使用贴片应根据 LECTRO PATCH 产品所附厂商印制说明书进行；说明书纳入本文供参考。其它闭合的膜片系统也合适。

对于经皮肤传输，低频率超声波传递也是合适的方法。Mitragotri 等(1995) *Science* 269:850-853。应用低频率超声波频(约 1MHz)可综合控制传递治疗组合物，包括高分子量的组合物。

表皮施用基本上包括机械或化学刺激表皮的最外层足以引起对刺激物的免疫反应。特别地，刺激应足以吸引 APCs 到刺激位置。

示范的机械刺激方法使用多种很窄直径、短齿，可用于刺激皮肤和吸引 APCs 到刺激位置，以吸收从齿末端转移的 IMP。例如，Pasterur Merieux, Lyon, France 生产的 MONO-VACC 老结核菌素测试所包含的装置适用于引入含 IMP 的组合物。

此装置(在美国由 Connaught Laboratories, Inc, Swiftwater, PA 销售)由塑料容器组成，容器一端有注射器活塞且另一端有齿盘。齿盘支持多种窄直径齿，齿长度正好抓到表皮细胞最外层。MONO-VACC 试剂盒中的各齿用老结核菌素包被；在本发明中，各针用 IMP 制剂的药物组合物包被。使用此装置优选根据装置产品所包括的厂商书面说明。也可用于此实施方案的类似装置是目前用于进行变态反应测试的装置。

另一种表皮施用 IMP 的合适方法是使用刺激表皮最外面细胞的化学制品，从而引起足够的免疫反应以吸引 APCs 到该区域。一个例子是溶角质蛋白水解剂，如可商业购买的局部脱毛乳剂所用的水杨酸，此脱毛乳剂由 Noxema 公司以商标 NAIR 出售。此方法也可用于完成在粘膜中表皮施用。化学刺激物也可结合机械刺激物应用(例如，如果 MONO-VACC 型齿也用化学刺激物包被，可使用机械刺激物)。IMP 可悬浮于也包含化学刺激物的载体中，或与此共施用。

胃肠外施用途径包括但不限于电(离子电渗疗法)或直接注射如直接注射到中央

静脉线、静脉内、肌肉内、腹膜内、皮内或皮下注射。适合胃肠外施用的 IMP 制剂一般在 USP 水或注射用水中配制，且进一步包括 pH 缓冲液、盐膨胀剂、防腐剂和其它药学上可接受的赋形剂。用于胃肠外注射的免疫调节多核苷酸能在药学上可接受的无菌等渗溶液中配制，如盐水和用于注射的磷酸缓冲盐水。

胃肠施用途径包括但不限于摄取和直肠。发明包括适合胃肠施用的 IMP 制剂，包括但不限于药学上可接受的粉末、药丸或用于摄食的液体和用于直肠施用的栓剂。对本领域技术人员显然的是，药丸或栓剂进一步包括药学上可接受的固体如淀粉，以提供组合物体积。

鼻咽和肺施用包括通过吸入完成，且包括传递途径如鼻内、经支气管和经肺泡途径。发明包括适合吸入施用的 IMP 制剂，包括但不限于形成气雾剂的液体悬浮液以及用于干粉末吸入传递系统的粉末形式。适合吸入施用 IMP 制剂的装置包括但不限于雾化器、蒸馏器、喷雾器和干粉末吸入传递装置。

本领域熟知用于本文所述施用途径的溶液或悬浮液可包括 1 种或多种下列成分：无菌稀释液如注射水、盐溶液、不挥发性油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它合成溶剂；抗菌剂如苄醇或对羟基苯甲酸甲酯；抗氧化剂如抗坏血酸或亚硫酸氢钠；螯合剂如乙二胺四乙酸；缓冲液如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐和调节渗透性的试剂如氯化钠或右旋糖。PH 可用酸或碱调节，如盐酸或氢氧化钠。胃肠外制品可封入安瓿、一次性注射器或由玻璃或塑料制成的多剂量小瓶。

本领域熟知适合注射使用的药物组合物包括无菌水溶液(其中水可溶)或分散液和用于临时制备无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末。对于静脉内施用，合适载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor ELTM(BASF, Parsippany, NJ)或磷酸缓冲盐水(PBS)。在所有情况中，组合物必须无菌且应流动到存在易可注射性的程度。它在生产和贮藏条件下应稳定且保存必须抗微生物如细菌和真菌的污染作用。载体可以是溶剂或分散介质，包含例如水、乙醇、多元醇(如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)和其合适的混合物。可维持适当流动性，例如通过使用包衣如卵磷脂、在分散液的情况下维持所需颗粒大小以及使用表面活性剂。防止微生物作用可通过各种抗细菌剂和抗真菌剂完成，例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、酚、抗坏血酸、硫柳汞等。组合物中优选包括等渗剂，例如糖、多醇如甘露醇、山梨糖醇和氯化钠。通过组合物中包含延迟吸收的试剂如单硬脂酸铝和明胶能引起可注射组合物的延长吸收。

本领域熟知制备无菌的可注射溶液可通过将所需量的活性化合物掺入适当溶

剂中，溶剂有 1 种或上列成分的组合，接着过滤灭菌。一般，制备分散液是通过将活性化合物掺入无菌载体，载体包含基本的分散介质和上面所列所需的其它成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下，优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥，产生活性成分的粉末加来自前面无菌过滤溶液的任何其它所需成分。

选择传递途径可用于调节引起的免疫反应。例如，当流感病毒经肌肉内或表皮(基因枪)途径施用时，IgG 效价和 CTL 活性相同；然而，肌肉接种主要产生 IgG2a，而表皮途径大部分产生 IgG1。Pertmer 等(1996)*J.Virol.*70:6119-6125。因此，本领域技术人员可利用本发明免疫调节多核苷酸不同施用途径引起的免疫原性的微小差异。

上述组合物和施用方法用于描述而不是限制施用发明 IMPs 制剂的方法。产生不同组合物和装置的方法在本领域技术人员的能力范围内且在此不详细描述。

可通过本领域已知的任何方法分析(定性和定量)对 IMP 的免疫反应，包括但不限于测量抗原特异抗体生成(包括测量特异抗体亚类)，活化特异淋巴细胞群如 CD4+T 细胞、B 细胞、NK 细胞或 CTL，树突细胞成熟(包括浆细胞样树突细胞)，生成细胞因子和化学因子如 IFN- γ 、IFN- α 、IFN- ω 、TNF- α 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-12、IP-10、MCP-1、MCP-2、MCP-3、MIG 或 MIP-3 β 和/或释放组胺。测量特异抗体反应的方法包括酶联免疫吸附测定(ELISA)且在本领域熟知。可测量特异淋巴细胞类型如 CD4+T 细胞的数量，例如用荧光激活细胞分选术(FACS)。测量特定细胞群的活化可通过确定标记的表达完成，例如细胞表面标记、特异于特定细胞类型活化的标记。细胞标记表达可测量，例如通过测量 RNA 表达或通过例如 FACS 分析测量特定标记的细胞表面表达。可进行细胞毒性和 CTL 测定，例如描述于 Raz 等(1994) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 91:9519-9523 和 Cho 等(2000)。细胞因子浓度可通过例如 ELISA 测量。可进行树突细胞成熟的测量，例如描述于 Hartmann 等(1999) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 96:9305-9310。这些和其它评估对免疫原免疫反应的测定在本领域熟知。参见例如《细胞免疫学的选择方法》(Selected Methods in Cellular Immunology)(1980)，Mishell 和 Shiigi 编，W.H.Freeman and Co.。

分析(定性和定量)对 IMP 的免疫反应也可通过测量细胞因子、化学因子和/或其它由细胞因子诱导的分子如 IFN- γ 和/或 IFN- α 的水平，它们的生成受 IMP 刺激。因此，发明的 IMPs 也刺激表达 IFN- γ 和/或 IFN- α 诱导型细胞因子、化学因子和炎性蛋白，包括但不限于 IP-10(干扰素诱导蛋白 10kDa)、IFN- γ 诱导的单核

因子和单核细胞趋化蛋白 1(MCP-1)。分析对 IMP 的免疫反应也能通过测量细胞因子、化学因子和/或其它已知有抗病毒活性的分子的水平，包括 2, 5-寡腺苷酸合成酶(2, 5-OAS)、干扰素刺激基因-54K(ISG-54K)、MxA、MxB 和鸟苷酸结合蛋白-1(GBP-1)。因此，抗病毒分子和 IFN- γ 和/或 IFN- α 诱导的分子可用作 IMP 活性标记。可通过本领域已知的任何方法测量这种干扰素诱导分子的生成和/或基因表达，包括但不限于用 ELISA 和测量 RNA 生成的定量 PCR。

优选刺激 Th1 型反应，即激发和/或增强。关于发明，刺激 Th1 型免疫反应可在体外或活体外确定，这是通过测量 IMP 处理细胞的细胞因子生成，与无 IMP 处理的细胞相比较。确定细胞中细胞因子生成的方法包括本文所述和本领域已知的方法。响应 IMP 处理生成的细胞因子类型表明细胞的 Th1 型或 Th2 型偏倚免疫反应。如本文所用，术语“Th1 型偏倚”细胞因子生成指存在刺激物时 Th1 型免疫反应相关细胞因子的生成与没有刺激时这种细胞因子的生成相比可测量增加。这种 Th1 型偏倚细胞因子的例子包括但不限于 IL-2、IL-12、IFN- γ 和 IFN- α 。相反，“Th1 型偏倚细胞因子”指 Th2 型免疫反应相关细胞因子，包括但不限于 IL-4、IL-5 和 IL-13。用于确定 IMP 活性的细胞包括免疫系统细胞，分离自宿主和/或细胞系的原代细胞，优选 APCs 和淋巴细胞，更优选巨噬细胞和 T 细胞。

刺激 Th1 型免疫反应也可在用 IMP 处理宿主中测量，可通过本领域已知的任何方法确定，包括但不限于：(1)抗原攻击前或后所测 IL-4 或 IL-5 水平下降；或在 IMP 处理宿主中检测到较低(或甚至没有)水平的 IL-4 或 IL-5，任选与抗原致敏、或致敏和攻击、无 IMP 处理的对照相比较；(2)抗原攻击前或后 IL-12、IL-18 和/或 IFN(α 、 β 或 γ)水平增加；或在 IMP 处理宿主中检测到较高水平的 IL-12、IL-18 和/或 IFN(α 、 β 或 γ)，与抗原致敏、或致敏和攻击、无 IMP 处理的对照相比较；(3)与无 IMP 处理对照相比，IMP 处理宿主中“Th1 型偏向”抗体生成；和/或(4)抗原攻击前或后测量的抗原特异 IgE 水平下降；或在 IMP 处理宿主中检测到较低(或甚至没有)水平的抗原特异 IgE，与抗原致敏、或致敏和攻击、无 IMP 处理的对照相比较。可进行多种这些确定，通过测量 APCs 和/或淋巴细胞产生的细胞因子，优选巨噬细胞和/或 T 细胞，在体外或活体外使用本文所述和本领域已知的方法。进行一些确定可通过测量抗原特异抗体的种类和/或亚类，使用本文所述和本领域已知的方法。

响应 IMP 处理产生的抗原特异抗体的种类和/或亚类表明细胞的 Th1 型或 Th2 型偏倚免疫反应。如本文所用，术语“Th1 型偏倚”抗体生成指 Th1 型免疫反应

相关抗体(即 Th1 相关抗体)的生成可测量增加。可测量 1 种或多种 Th1 相关抗体。这种 Th1 型偏倚抗体的例子包括但不限于人 IgG1 和/或 IgG3(参见例如 Widhe 等(1998) *Scand.J. Immunol.* 47:575-581 和 de Martino 等(1999) *Ann.Allergy Asthma Immunol.* 83:160-164)和鼠 IgG2a。相反,“Th1 型偏倚抗体”指 Th2 型免疫反应相关抗体,包括但不限于人 IgG2、IgG4 和/或 IgE(参见例如 Widhe 等(1998)和 de Martino 等(1999))和鼠 IgG1 和/或 IgE。

施用 IMP 引起的 Th1 型偏倚细胞因子诱导可产生增强的细胞免疫反应,如 NK 细胞、细胞毒性杀伤细胞、Th1 辅助和记忆细胞进行的反应。这些反应特定有益于预防性和治疗性疫苗接种,抗病毒、真菌、原生动物寄生虫、细菌、变应敏性病、哮喘以及肿瘤。

在一些实施方案中, Th2 型反应受抑制(减少)。可确定 Th2 型反应的抑制,通过例如 Th2 相关细胞因子如 IL-4 或 IL-5 水平下降、Th2 相关抗体水平减少以及 IgE 下降和响应变应原的组胺释放减少。

发明的试剂盒

发明提供试剂盒。在某些实施方案中,发明的试剂盒一般包括 1 个或多个容器,容器含本文所述的任何 IMP。试剂盒可进一步包括合适的一套说明书,一般是书面说明,涉及本文所述任何方法的 IMP 使用(例如免疫调节、改善 1 种或多种传染病的症状、增加 IFN- γ 水平、增加 IFN- α 水平、或改善 IgE 相关疾病)。

试剂盒可包含以任何方便、适当包装的 IMP。例如,如果 IMP 是干制剂(如冷冻干燥或干粉末),通常使用有弹性塞子的小瓶,从而经弹性塞注射液体能容易重新悬浮 IMP。有非弹性、可卸式关闭装置的安瓿(如密封的玻璃)或有弹性塞子的安瓿最方便用于 IMP 的液体制剂。可考虑包装结合特定装置使用,如吸入器、鼻施用装置(如雾化器)或输注装置如微型泵。

涉及 IMP 使用的说明书一般包括关于计划使用方法的剂量、剂量方案和施用途径的信息。IMP 的容器可以是单位剂量、散装(例如多剂量包装)或亚单位剂量。发明试剂盒提供的说明一般是标签或包装说明书(如试剂盒所含纸片)上的书面说明书,但也能接受机器可读的说明(如磁或光存储盘携带的说明)。

在一些实施方案中,试剂盒还包括抗原(或 1 种或多种抗原),抗原可以或不可包装于和 IMP 相同的容器(制剂)。抗原在本文中描述。

在一些实施方案中,发明的试剂盒还包括免疫调节多核苷酸/微载体复合物 (IMP/MC)形式的 IMP 且可进一步包括一套说明书,一般是书面说明书,涉及用于

本文所述任何方法的 IMP/MC 复合物(例如免疫调节、改善 1 种或多种传染病的症状、增加 IFN- γ 水平、增加 IFN- α 水平、或改善 IgE 相关疾病)。

在一些实施方案中，发明的试剂盒包括生成 IMP/MC 复合物的材料，一般包括单独的 IMP 和 MC 容器，尽管在某些实施方案中，提供生成 MC 的材料而不是预制的 MC。优选提供的 IMP 和 MC 形式在混合提供的 IMP 和 MC 时允许形成 IMP/MC 复合物。当 IMP/MC 复合物通过非共价键连接时优选此构型。当 IMP 和 MC 经异双功能交联剂交联时也优选此构型；IMP 或 MC 以“活化”形式提供(例如连接异双功能交联剂，从而获得与 IMP 反应的部分)。

含液相 MC 的 IMP/MC 复合物的试剂盒优选包含 1 个或多个容器，容器含用于产生液相 MC 的材料。例如，用于水包油乳剂 MC 的 IMP/MC 试剂盒可包括 1 个或多个容器，容器含油相和水相。乳化容器的内含物以产生 MC，MC 然后可混合 IMP，优选修饰掺入疏水部分的 IMP。这种材料包括用于生成水包油乳剂的油和水，或冻干脂质体成分的容器(例如磷脂、胆固醇和表面活性剂)的混合物加 1 个或多个含水相的容器(例如药学上可接受的水缓冲液)。在某些实施方案中，发明的试剂盒在 1 个或多个容器中包括阳离子凝聚剂-IMP-稳定剂(CIS)组合物形式的 IMP，容器含本文所述的任何免疫调节 CIS 颗粒组合物。另外，试剂盒可包括 1 个或多个容器，容器含发明 CIS 组合物的成分。此实施方案的构型包括有 IMP/稳定剂混合物容器和阳离子凝聚剂容器的试剂盒以及有 IMP 容器、稳定剂容器和阳离子凝聚剂容器的试剂盒。试剂盒还可包括一套合适的说明书，一般是书面说明书，涉及用于本文所述任何方法的 CIS 颗粒组合物的使用(例如免疫调节、改善 1 种或多种传染病的症状、增加 IFN- γ 水平、增加 IFN- α 水平、或改善 IgE 相关疾病)。含 CIS 组合物成分的容器的试剂盒实施方案一般包括根据本文所示方法生成 CIS 组合物的说明。除了发明 CIS 组合物和/或 CIS 组合物成分外，试剂盒实施方案也包括根据本文所示方法生成 CIS 组合物的说明和用于本文所述任何方法的免疫调节 CIS 组合物使用的说明。

提供下列实施例来阐述而不是限制发明。

实施例

实施例 1：通过免疫调节多核苷酸来免疫调节人细胞

测试免疫调节多核苷酸(IMPs)或对照样品对人外周血单核细胞(PBMCs)的免疫调节活性，包括无免疫调节序列(5'-TGACTGTGAAACCTTAGAGATGA-3' (SEQ ID

NO:2))的多核苷酸、SAC 和单独培养基。也测试标准免疫调节多核苷酸 5'-TGACTGTGAACGTTGAGATGA(SEQ ID NO:1)。除非另有说明，测试的多核苷酸是充分修饰的硫代磷酸酯寡脱氧核苷酸。

通过静脉穿刺从志愿者中收集外周血，使用肝素化注射器。血在 FICOLL®(Amersham Pharmacia Biotech)垫上分层并离心。收集位于 FICOLL®界面的 PBMCs，然后用冷的磷酸缓冲盐水(PBS)洗涤 2 次。细胞重悬浮并以 2×10^6 细胞/mL 培养于 48 或 96 孔板的 RPMI 1640 中，RPMI 1640 有 10% 热灭活人 AB 血清，加 50 单位/mL 青霉素、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素、300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 谷氨酰胺、1mM 丙酮酸钠和 1x MEM 非必需氨基酸(NEAA)。

细胞在测试样品(IMP或对照)存在时培养 24 小时，剂量范围从 0.2 到 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ ，然后从各孔收集无细胞的培养基，测定 IFN- γ 和/或 IFN- α 浓度。用来自 BioSource International, Inc. 的 CYTOSCREEN™ ELISA 试剂盒，根据厂商说明测定 IFN- γ 和/或 IFN- α 。一般，测试样品用来自 4 个人供体的 PBMCs 测试。

IMPs 刺激人 PBMCs 的 IFN- γ 和/或 IFN- α 分泌。在人 PBMC 测定中，供体的背景水平 IFN- γ 可变化，甚至显著。然而，其它细胞因子如 IFN- α 证明有一般稳定的活化模式且通常在未刺激条件下表现出低背景水平。这种用 PBMCs 测定的结果的例子概括于表 2-7。

在剂量滴定测定中，4 个供体的 PBMCs 用上述 0.2 到 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的 SEQ ID NO:27 刺激。产生的 IFN- α 和 IFN- γ 量如上所述评估，平均 4 个供体的结果且平均结果示于表 2。

表 2.IMP 滴定-IFN ($\mu\text{g}/\text{ml}$)

SEQ ID NO:27 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	IFN- γ	IFN- α
20	412	749
8	583	4036
3.2	203	4073
1.3	39	887
0.5	15	108
0.2	11	50

从表 2 所示结果可见，诱导 IFN- α 生成的能力随着 IMP 剂量减少而增加且在

约 3-8 μ g/ml 最佳，之后活性随着剂量下降。其它测定确认此结果。

来自 4 个供体的 PBMCs 用 20 μ g/ml IMP 或对照刺激，如上所述评估 IFN- α 和 IFN- γ 的生成刺激。测试的多核苷酸是：

5'-TCGTCGAACGTTCGTTAACGTTCG (SEQ ID NO:5);
 5'-TCGTCGAACGTTCGTT(SEQ ID NO:12);
 5'-TCGTCGGAACGTTCGAGATG(SEQ ID NO:14);
 5'-TCGTCGTGAACGTTCGAGATGA(SEQ ID NO:13);
 5'-TCGTCGAACGTTCTTAACGTTCC(SEQ ID NO:6);
 5'-TCGTCGTAACGTTCGAGATG(SEQ ID NO:15);
 5'-TCGTCGAACGTTAACGTT(SEQ ID NO:31);
 5'-TCGTTCAACGTTCGTTAACGTTCG(SEQ ID NO:9);
 5'-TCGTCGGACGTTCGAGATG(SEQ ID NO:16);
 5'-TCGTCGTACGTTCGAGATG(SEQ ID NO:17);
 5'-TCGTCGTTCGTTCGAGATG(SEQ ID NO:18);
 5'-TCGTCGAACCTTCGTTAACCTTCG(SEQ ID NO:11);
 5'-TGATCGTCGAACGTTCGAGATG(SEQ ID NO:24);
 5'-TGATCGAACGTTCGTTAACGTTCG(SEQ ID NO:8);
 5'-TGATTCAACGTTCGTTAACGTTCG(SEQ ID NO:10);
 5'-TCAACGTTCGTTAACGTTCGTT(SEQ ID NO:4)。

平均来自各供体 PBMCs 的细胞因子生成的结果，平均结果示于表 3。

表 3.人 PBMC 测定-IFN (pg/ml)

测试或对照(SEQ ID NO.)	IFN- γ	IFN- α
2 (非 IMP)	11	50
1 (IMP 标准)	205	141
27	335	842
5	297	517
35	308	686
12	153	157
14	340	576
13	297	142
7	510	594
6	554	103
15	204	194
31	169	178

9	310	57
16	274	421
17	387	208
18	78	50
11	36	50
24	462	708
8	650	704
10	111	66
4	126	50
培养基	11	50

如表 3 所证明，比 IMP 标准、SEQ ID NO:1 刺激生成更多 IFN- α 的 IMP 包括至少 1 个在多核苷酸 5'末端或附近的 TCG 序列(5'-TCG)和与 5'-TCG 相邻或在 3 个碱基内的回文序列，回文序列至少为 8 个碱基长度。一般，刺激 IFN- γ 生成反映 IFN- α 生成刺激，尽管 IFN- γ 刺激的变化范围小于 IFN- α 。在回文序列和 5'-TCG 分开的多核苷酸中，一般优选生成 IFN- α ，由第 2 个 TCG 三核苷酸分开或与之重叠(参见例如 SEQ ID NO:14)。含 5'-TCG 但没有上述回文序列的 IMPs 诱导很低水平的 IFN- γ 且不诱导 IFN- α 生成(参见例如 SEQ ID NO:18 和 11)。含 6-8 个碱基回文但没有 5'-TCG 三核苷酸的 IMPs 诱导 IFN- γ ，但 IFN- α 水平低(参见例如 SEQ ID NO:1 和 4)。特别是，含 TCG(从多核苷酸 5'末端取出 3 个碱基)和含至少 10 个碱基长度回文序列的 IMP 与无 5'-TCG 的 IMP 标准，SEQ ID NO:1 相比，诱导特别高水平的 IFN- α (参见例如 SEQ ID NO:24 和 8)。

进行测定以测试 IMP 对刺激 IFN- α 生成的剂量依赖性。此测定中测试的 IMPs 变化，变化在于多核苷酸中回文序列的位置和/或至少 1 个在 5'末端的 TCG 序列位置。在测试的多核苷酸中，一些有 CG 二核苷酸和 5'-TCG 序列，但没有 8 个碱基长度或更大的回文序列(例如 SEQ ID NO:11; SEQ ID NO:18; 5'-TCGTCGTTTGT CGTTTGTCGTT (SEQ ID NO:3))。也测试有 CG 二核苷酸和 8 个碱基长度或更大回文序列但没有 5'-TCG 三核苷酸的多核苷酸(例如 SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:4; 5'-ATCATCTCGAACGTTCGACGA(SEQ ID NO:29); 5'- AACGTTCGAACGTTCGAACGTTT (SEQ ID NO:67); 5'- TCAACGTTCGAACGTTCGAACGTT(SEQ ID NO:68); 5'- GACGATCGTCGACGATCGTC(SEQ ID NO:85))。来自 4 个供体的 PBMCs 用 0.8、4.0 或 20 μ g/ml IMP 或对照刺激。如上所述评估 IFN- α 的生成刺激且 4 个供体的平均结果示于表 4。

表 4. 人 PBMC 测定-IFN- α (pg/ml)

测试或对照 (SEQ ID NO.)	20 μ g/ml	4.0 μ g/ml	0.8 μ g/ml
2(非 IMP)	52	52	52
1(IMP 标准)	52	108	52
27	8626	7908	715
52	2425	4249	1085
39	2388	9325	3590
38	1874	7744	4635
57	1991	4262	9780
58	915	1654	5965
59	616	3221	1147
24	1848	2233	71
8	1023	544	52
29	1000	3325	95
35	3507	8734	63
60	1978	517	52
61	7256	13767	599
62	11157	16722	2254
63	17077	12510	360
64	569	2896	80
65	2007	1158	55
66	3926	718	64
67	246	2399	52
68	520	1558	1254
85	52	411	52
4	158	124	52
18	473	618	52
11	52	261	756
3	138	289	53
培养基	52		

表4所示结果支持至少8个碱基长度的回文序列和至少1个在多核苷酸5'末端或附近的TCG序列对从人PBMCS刺激IFN-α的重要性。

进行另一种测定以测试IMP对刺激IFN-α生成的剂量依赖性。此测定中测试的IMPs变化，变化在于多核苷酸中CG二核苷酸和5'-TCG序列的存在。在测试的多核苷酸中，一些有回文序列但没有CG二核苷酸(例如SEQ ID NO:2; 5'-TGCTTGCAAGCTTGCAAGCA (SEQ ID NO:90); 5'-TCAGTCAGTCAGCTGACT GACTGA(SEQ ID NO:96)和/或没有5'-TCG序列(例如SEQ ID NOs:1、90、96; 5'-ACCGATAACGTTGCCGGTGACGGCACCACG (SEQ ID NO:92) ; 5'-AACAAACAACGTTGTTGTT(SEQ ID NO:95) ; 5'-ACCGATA

ACGTTGCCGGTGA CGGCACCACG(SEQ ID NO:25); 5'- AACAAACAACGTTGTT GTT(SEQ ID NO:94))。此测定也测试多核苷酸 5'- TCGTTGCAAGCTTGCAACGA (SEQ ID NO:91)。一些 IMPs 的磷酸主链组成变化。来自 3 个供体的 PBMCs 用 0.8、4.0 或 20 μ g/ml IMP 或对照刺激。如上所述用来自 3 个供体的 PBMCs 评估 IFN- α 的生成刺激，且 3 个供体的平均结果示于表 5。

表 5. 人 PBMC 测定-IFN- α (pg/ml)

测试或对照 (SEQ ID NO.)	20 μ g/ml	4.0 μ g/ml	0.8 μ g/ml
培养基	43	-	-
2 (非 IMP)	43	43	43
1 (IMP 标准)	43	371	43
27	823	4958	1893
53	1968	13779	13550
54	142	5090	2832
97	1244	12097	5173
42	1790	7923	4249
90	43	43	50
96	58	613	43
91	1177	1539	870
25	43	43	43
92	43	903	43
94	235	56	43
95	216	84	43
26	25240	19903	4136
30	1125	7543	5955
32	1483	5088	2933
33	6031	24061	14111
34	15012	17241	6979
93	1355	6193	1762

如表 5 所示结果可见, 高活性序列 SEQ ID NO:42 中的 CG 二核苷酸倒置成 GC 二核苷酸会去除 SEQ ID NO:90 诱导 IFN- α 的能力。类似地, 无 CG 二核苷酸的回文多核苷酸 SEQ ID NO:96 也失活。

如表 5 可见, 2 种代表性磷酸二酯多核苷酸、SEQ ID NO:25 和 SEQ ID NO:94 以及它们各自充分修饰的硫代磷酸酯形式、SEQ ID NO:92 和 SEQ ID NO:95 在从人 PBMCs 诱导 IFN- α 中没有活性。尽管 SEQ ID NOs:25 和 SEQ ID NO:92 包含几个 CG 二核苷酸, 包括基序 AACGTT, 它们不包括 TCG 或至少 8 个碱基的回文序列。SEQ ID NOs:94 和 SEQ ID NO:95 是 18 个碱基的回文且包含 1 个 CG 二核苷酸, 但没有 TCG 三核苷酸。因此, 这些多核苷酸不匹配本文所述基序。

SEQ ID NOs:26、32 和 33 包含所有硫代磷酸酯连接(SEQ ID NOs:30 和 32)或嵌合硫代磷酸酯/磷酸二酯连接(SEQ ID NOs:26 和 33), 从人 PBMCs 中诱导大量 IFN- α 。SEQ ID NOs:34(包含嵌合硫代磷酸酯/磷酸二酯连接)和 93(所有硫代磷酸酯连接)从人 PBMCs 中诱导 IFN- α 。

在测试回文序列长度对刺激 IFN- α 的效果的测定中, 来自 4 个供体的 PBMCs 用 2 μ g/ml 或 20 μ g/ml IMPs 或对照刺激, 如上所述评估 IFN- α 的生成刺激, 平均结果示于表 6。测试的多核苷酸中有 5'-TTCGAACGTTCTAACGTTCTG (SEQ ID NO:20) 和 5'-TCGTCGAACGTTCTAACGTTCTG (SEQ ID NO:19)。

表 6. 人 PBMC 测定-IFN- α (pg/ml)

测试或对照 (SEQ ID NO.)	20 μ g/ml	2 μ g/ml
2 (非 IMP)	26	26
1 (IMP 标准)	93	34
5	2146	4018
20	2350	312
19	9844	15989
38	1935	15217
39	3729	14127
40	4584	12550
43	4174	10362
27	2008	10062
41	543	12916

42	3935	14752
培养基	26	26

表 6 所示结果支持至少 8 个碱基长度的回文序列和至少 1 个在多核苷酸 5'末端或附近的 TCG 序列对从人 PBMCs 刺激 IFN- α 的重要性。

在用多种 12 碱基回文测试 IMPs 的 IFN- α 刺激活性的测定中，来自 4 个供体的 PBMCs 用 0.8、4 或 20 $\mu\text{g/ml}$ IMPs 或对照刺激，如上所述评估 IFN- α 的生成刺激，平均结果示于表 7。

表 7. 人 PBMC 测定-IFN- α (pg/ml)

测试或对照 (SEQ ID NO.)	20 $\mu\text{g/ml}$	4.0 $\mu\text{g/ml}$	0.8 $\mu\text{g/ml}$
2 (非 IMP)	169	133	133
1 (IMP 标准)	190	238	143
27	3010	6473	2775
44	4951	10420	5468
45	3821	7221	2864
46	1403	5296	5169
47	2798	6731	3992
48	3082	9190	4113
51	2701	5699	1727
69	1886	8299	5195
70	7893	8429	5553
71	10647	10525	6173
72	9652	9109	5095
73	10419	9376	4896
74	9883	9085	5635
75	10269	8153	3888
76	10551	9773	5062
49	5424	7762	2788
50	6112	8517	3239

42	7634	8208	5472
43	6777	6768	4472
77	3694	4725	768
78	2542	4257	4311
79	1201	5725	5757
39	7454	9965	6622
80	2938	4137	1412
81	5914	4918	865
82	3451	4249	4170
84	3454	5363	2255
86	10742	11881	6332
87	5110	5950	4139
114	4779	5491	2907
培养基	204	204	204

表 7 所列结果表明用 12 碱基回文测试的 IMPs 在从人 PBMCs 刺激 IFN- α 中有活性。这些 IMPs 包含 12 碱基回文，有序列 TCGX₁X₂CGX₂'X₁'CGA(SEQ ID NO:198)，其中对 X₁ 和 X₂ 没有核苷酸限制，尽管形成 CGCG、CCGG 和 GCGC 的趋向，这以前描述为免疫抑制序列或免疫中和序列(Krieg 等(1998) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 95: 12631-12636)。例如，SEQ ID NOs:49 和 50 在刺激 IFN- α 中有活性且包含序列 CGCG。SEQ ID NO:49 是作为含上述 SEQ ID NO:161 的免疫调节多核苷酸的例子。SEQ ID NO:50 是作为含上述 SEQ ID NO:162 的免疫调节多核苷酸的例子。

有较长回文的 IMPs 从人 PBMCs 中诱导较高水平的 IFN- α ，特定是在较低的 IMP 剂量。如图 1 所示测定结果可见，在 0.4 μ g/ml IMP 剂量时，细胞响应 SEQ ID NO:172 生成的 IFN- α 量显著高于 SEQ ID NO:113、SEQ ID NO:27 和 SEQ ID NO:1。同样，在 0.8 μ g/ml IMP 剂量时，响应 SEQ ID NO:172 生成的 IFN- α 量显著高于 SEQ ID NO:27 和 SEQ ID NO:1($p<0.001$)。IMPs 的回文长度在 SEQ ID NO:172 中为 28 个碱基，在 SEQ ID NO:113 中为 22 个碱基，在 SEQ ID NO:27 中为 12 个碱基，在 SEQ ID NO:1 中为 8 个碱基。

在另一个测定中，比较总 IMP 长度和 IMP 回文长度对人 PBMCs 生成 IFN- α

的诱导。测试的多核苷酸中有：SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:12; SEQ ID NO:27; 5'-TCGTCGAACGTTCGAGATG(SEQ ID NO:166); 5'-TCGTCGAACGTT CGAGAT(SEQ ID NO:99)； 5'-TCGTCGAACGTTCGAG(SEQ ID NO:100)； 5'-TCGTCGAACGTTCGA(SEQ ID NO:101)； 5'-TCGAACGTTCGAG(SEQ ID NO:102)； 5'-TCGAACGTTCGA(SEQ ID NO:103)； 5'-TCGAACGTTCG(SEQ ID NO:104)； 5'-TCGACGTCGA(SEQ ID NO:105)； 5'-TCGTCGAACGTTCG(SEQ ID NO:167)； 5'-TCGTCGAACGTT(SEQ ID NO:199)； 5'-TCGTCGAACGTTCG AA(SEQ ID NO:54)； 5'-TTCGAACGTTCGAA(SEQ ID NO:98)。来自 4 个供体的 PBMCs 用 0.8、4.0 或 20 μg/ml IMPs 或对照刺激，如上所述评估所得 IFN- α 的生成。4 个供体在各 IMP 浓度的平均结果示于表 8。

表 8. 人 PBMC 测定-IFN- α (pg/ml)

测试(SEQ ID NO.)或对照	IFN- α			IMP	
	20 μg/ml	4.0 μg/ml	0.8 μg/ml	总长度 (碱基)	回文 (碱基)
2(非 IMP)	128	412	52	22	8
1 (IMP 标准)	52	52	52	22	-
27	1181	5697	1264	21	12
166	1527	4827	2095	19	12
99	204	4254	2093	18	12
100	451	3835	2115	16	12
101	601	3065	547	15	12
102	1016	3529	533	13	12
103	484	1091	83	12	12
104	321	52	52	11	10
105	52	52	52	10	10
12	224	1692	63	16	10
167	319	556	69	14	10
199	52	52	52	12	6
54	99	3143	1133	17	14
98	1027	2321	744	14	14
培养基	82	82	82		

表 8 所列结果表明对于测试的多核苷酸，刺激人 PBMCs 中 IFN- α 生成的最小多核苷酸总长度是约 12 个碱基，回文约为 10 个碱基长度。因此，在一些需要生成较高水平 IFN- α 的实施方案中，IMP 包含至少 1 种回文序列，回文序列具有至少下列长度(碱基): 10、12、14、16、18、20、22、24、26、28 或 30，在一些实施方案中，IMP 包含至少 1 种长度大于 30 个碱基的回文序列。

在另一个测定中，来自 3 个供体的 PBMCs 用 0.8、4.0 或 20 $\mu\text{g/ml}$ IMPs 或对照刺激。如上所述评估 IFN- α 、IFN- β 和 IFN- ω 生成的刺激。用来自 PBL Biomedical Laboratories 的 ELISA 试剂盒评估 IFN- ω ，检测 IFN- ω 的下限和上限分别是 48 pg/ml 和 6000 pg/ml。用来自 BiSource 的 ELISA 试剂盒测定 IFN- β ，检测 IFN- β 的下限和上限分别是 12 IU/ml 和 3046 IU/ml。3 个供体在各 IMP 浓度的平均结果示于表 9。

表 9. 人 PBMC 测定-IFN- α 或 IFN- ω (pg/ml)

	IFN- α			IFN- ω		
测试(SEQ ID NO.)或对照	20 $\mu\text{g/ml}$	4.0 $\mu\text{g/ml}$	0.8 $\mu\text{g/ml}$	20 $\mu\text{g/ml}$	4.0 $\mu\text{g/ml}$	0.8 $\mu\text{g/ml}$
培养基	16	-	-	48	48	-
2 (非 IMP)	14	16	14	48	48	48
1 (IMP 标准)	49	198	19	48	48	48
27	700	7394	2146	76	629	163
39	2716	6180	5922	284	741	604
38	nd	nd	nd	228	632	650

nd=未确定

如表 9 可见，本发明的 IMPs 从人 PBMCs 中刺激 IFN- ω 的生成以及 IFN- α 的生成。在上述测定中，没有检测到 IFN- β 。

在另一个测定中，比较双链体形式多核苷酸与非双链体形式对人 PBMCs 生成 IFN- α 的诱导。测试的多核苷酸中有：SEQ ID NO:1；SEQ ID NO:90；SEQ ID NO:27；5'-TCGTCGAACGTTCGAGATGAT/5'-ATCATCTCGAACGTTGACGA (SEQ ID NO:182- SEQ ID NO:27 和 SEQ ID NO:29 的双链体)。来自 3 个供体的 PBMCs 用 0.4、0.8、4.0 或 2 $\mu\text{g/ml}$ IMPs 或对照刺激，如上所述评估所得 IFN- α 的生成。比较双链体和单一序列，使用相同总剂量的多核苷酸(例如比较 4 $\mu\text{g/ml}$ SEQ ID NO:27 与 4 $\mu\text{g/ml}$ 双链 SEQ ID NO:182，后者包含 2 $\mu\text{g/ml}$ SEQ ID NO:27

和 2 μ g/ml SEQ ID NO:29)。3 个供体在各 IMP 浓度的平均结果示于表 10。

表 10. 人 PBMC 测定-IFN- α (pg/ml)

测试(SEQ ID NO.)或对照	IFN- α			
	20 μ g/ml	4.0 μ g/ml	0.8 μ g/ml	0.4 μ g/ml
27	592	3719	254	57
182(27/29 双链体)	386	2612	4725	1027
1	124	312	52	52
90	52	nd	nd	nd
培养基	52	52	52	52

nd=未确定

如表 10 可见, SEQ ID NO:27 的双链体形式 SEQ ID NO:182 在较低 IMP 剂量刺激 IFN- α 生成时比 SEQ ID NO:27 更有活性。在较高剂量(4 和 20 μ g/ml), SEQ ID NO:27 稍更有刺激性。

在另一个测定中, 比较含修饰碱基的多核苷酸和无修饰碱基的多核苷酸对人 PBMCs 生成 IFN- α 的诱导。测试的多核苷酸中有: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 5'-TCGTCGAACGTTCGAGATGAT(SEQ ID NO:27) 和 5'-TCXTCXAACTTCXAGATGAT(X=7-脱氮-dG, SEQ ID NO:193)。SEQ ID NO:27 和 SEQ ID NO:193 有相同的核苷酸序列, 除了脱氮-dG 取代 SEQ ID NO:27 中的 4 个 dG。来自 4 个供体的 PBMCs 用 0.8、4.0 或 20 μ g/ml IMPs 或对照刺激, 如上所述评估所得 IFN- α 的生成。4 个供体在各 IMP 浓度的平均结果示于表 11。

表 11. 人 PBMC 测定-IFN- α (pg/ml)

测试 (SEQ ID NO.)或对照	IFN- α		
	20 μ g/ml	4.0 μ g/ml	0.8 μ g/ml
1 (IMP 标准)	129	118	80
2 (非 IMP 标准)	102	102	102
27	10248	13871	3798
193	10754	12262	193
培养基	102		

如表 11 可见, SEQ ID NO:193 的 IFN- α 刺激活性可与 SEQ ID NO:27 相比, 除了在 0.8 $\mu\text{g/ml}$ 剂量。

测定单和双链形式多核苷酸从人 PBMCs 诱导 IFN- α 生成的活性, 多核苷酸含修饰碱基。测试的多核苷酸中有: 单链和双链 SEQ ID NO:1, 单链 SEQ ID NO:2, 单链 SEQ ID NO:29, 单链和双链 SEQ ID NO:27, 单链和双链 SEQ ID NO:187, 单链和双链 SEQ ID NO:188, 单链和双链 SEQ ID NO:189, 单链和双链 SEQ ID NO:190, 单链 SEQ ID NO:194, 单链 SEQ ID NO:197。SEQ ID NOs:187、188、189、190、194 和 197 的核苷酸序列与 SEQ ID NO:27 相同, 除了注出的取代:

5'-TCGTCGAA*CGT*TCGAGATGAT(A*=2-氨基-dA; T*=2-硫代-dT)(SEQ ID NO:189);

5'-TCGTCGA*A*CGT*T*CGAGATGAT(A*=2-氨基-dA; T*=2-硫代-dT)(SEQ ID NO:190);

5'-TCG*TCG*AACG*TTCG*AG*ATG*AT(G*=7- 脱 氮 -8- 氮 -dG)(SEQ ID NO:187);

5'-TCG*AACG*TTCG*AACG*TTCG*AACG*TT(G*=7-脱氮-8-氮-dG)(SEQ ID NO:194);

5'-TCGTCGA*A*CGTTCGA*GA*TGA*T(A*=2-氨基-dA)(SEQ ID NO:188);

5'-TCGA*A*CGTTCGA*A*CGTTCGA*A*CGTT(A*=2- 氨 基 -dA)(SEQ ID NO:197)。

来自 8 个供体的 PBMCs 用 0.2、0.4、0.8、1.6、4.0 或 8 $\mu\text{g/ml}$ IMPs 或对照不同刺激, 如上所述评估所得 IFN- α 的生成。比较双链体和单一序列, 使用相同总剂量的多核苷酸(例如比较 4 $\mu\text{g/ml}$ SEQ ID NO:27 与 4 $\mu\text{g/ml}$ 双链 SEQ ID NO:182, 后者包含 2 $\mu\text{g/ml}$ SEQ ID NO:27 和 2 $\mu\text{g/ml}$ SEQ ID NO:29)。8 个供体在各 IMP 浓度的平均结果示于表 12。

表 12. 人 PBMC 测定-IFN- α (pg/ml)

测试(SEQ ID NO.)或 对照	IFN- α (pg/ml)					
	8 $\mu\text{g/ml}$	4 $\mu\text{g/ml}$	1.6 $\mu\text{g/ml}$	0.8 $\mu\text{g/ml}$	0.4 $\mu\text{g/ml}$	0.2 $\mu\text{g/ml}$
2 (非 IMP)	nd	87	nd	nd	nd	nd
90	nd	77	nd	nd	nd	nd

1 (IMP 标准)	nd	288	nd	77	77	nd
1 双链体	81	126	1988	1740	258	77
27	nd	8850	nd	955	77	nd
29	nd	6040	nd	85	77	nd
182(27/29 双链体)	747	2162	6462	7280	1862	89
187	nd	1050	nd	139	77	nd
183(187/29 双链体)	91	117	311	1081	411	119
188	nd	644	nd	3360	147	nd
184(188/29 双链体)	225	978	5483	10057	5022	527
189	nd	845	nd	302	79	nd
185(189/29 双链体)	257	638	7345	7973	2711	314
190	nd	3064	nd	150	77	nd
186(190/29 双链体)	491	2673	6085	6603	1703	194
194	nd	164	nd	645	77	nd
197	nd	4833	nd	5742	1224	nd
SAC(1:5000)	96					
培养基	77					

nd=未确定

如表 12 可见，在 IMP 中使用某些修饰碱基能产生有 IFN- α 刺激活性的多核苷酸。除了 183，这些结果也显示与互补序列形成双链体多核苷酸产生高活性 IMP 用于刺激 IFN- α 生成，特定是在较低剂量。独自不能形成双链体的多核苷酸如 SEQ ID NO:189 和 SEQ ID NO:190 诱导很少的 IFN- α ，而较长序列(例如 SEQ ID NO:172，有 28 碱基回文的 30 聚体)和双链体 SEQ ID NO:182 在低剂量(如 0.4 和 0.8 μ g/ml)诱导的 IFN- α 多于 SEQ ID NO:27 和其它回文长度小于 28 个碱基的 IMPs(如表 12 和图 1 所示)。如本文所讨论，某些修饰碱基可增加所形成的双链体的稳定性。

实施例 2：通过免疫调节多核苷酸活化人 B 细胞

通过测量响应 IMPs 孵育的 B 细胞增殖和 IL-6 生成来确定 IMPs 活化人 B 细胞

的能力。人 PBMCs 用 CD19 MACS 珠(Miltenyi Biotec)孵育并经过磁体，通过阳性选择分离 CD19⁺B 细胞(>98% CD19⁺, 由 FACS 确定)。对于增殖测定，B 细胞以 1×10^5 /孔($5 \times 10^5/\text{ml}$)培养于 96 孔圆底板。细胞用 $2 \mu\text{g/ml}$ IMP 或对照三重孵育 72 小时。在培养阶段末期，板用 ^{3}H -胸苷脉冲($1 \mu\text{Ci}/\text{孔}$, Amersham)并再孵育 18 小时。然后收获板并用标准液体闪烁技术确定放射性掺入，数据以计数每分钟(cpm)收集。对于 IL-6 分泌，B 细胞以 $0.5-1 \times 10^6$ /孔在 48 孔板(有 $5 \mu\text{g/ml}$ IMP 或对照)中培养 48 小时，然后收集培养物上清，用具有 CytoSet 抗体对的 ELISA 根据厂商说明书(BioSource)测定 IL-6。最大/最小检测界限是 $4000/2 \text{ pg/ml}$ 。

表 13 所示 B 细胞增殖测定的结果是来自各供体细胞的三倍细胞增殖 cpm 的平均值和 2 种供体的平均 cpm 值。表 13 所示 B 细胞 IL-6 测定的结果是各供体细胞生成的 IL-6 量和 2 种供体的平均值。

表 13. 人 B 细胞测定

测试(SEQ ID NO.)或对照	增殖测定(cpm)			IL-6 测定(pg/ml)		
	供体 1	供体 2	平均	供体 1	供体 2	平均
培养基	415	575	495	26	28	27
1 (IMP 标准)	27, 731	43, 403	35, 567	222	531	377
2 (非 IMP)	6748	7704	7226	52	126	89
43	22, 695	26, 456	24, 576	187	935	561
38	45, 364	27, 327	36, 346	248	984	616
40	60, 250	52, 916	56, 583	172	336	254
19	22, 683	29, 569	26, 126	173	257	215
LPS	1647	544	1096	34	21	28

从表 13 所示结果，含 CG 二核苷酸的化合物诱导 B 细胞增殖和 IL-6 生成。如表 9 所示结果可见，尽管免疫调节多核苷酸的良好 B 细胞刺激活性取决于 CG 二核苷酸的存在，它似乎不需本文所述用于高 IFN- α 诱导的更特殊基序。

在另一个测定中，比较双链体形式多核苷酸与非双链体形式的 B 细胞活化。测试的多核苷酸中有：SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:90, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:182-SEQ ID NO:27 和 SEQ ID NO:29 的双链体。来自 3 个供体的 B 细胞用 1.0 或 $5.0 \mu\text{g/ml}$ IMPs 或对照刺激，如上所述评估所得细胞增殖和 IL-6 生成。3 个供体在各 IMP 浓

度的平均结果示于表 14。

表 14. 人 B 细胞测定

测试(SEQ ID NO.) 或对照	增殖测定(cpm)		IL-6 测定(pg/ml)	
	5 μ g/ml	1 μ g/ml	5 μ g/ml	1 μ g/ml
1	57921	11307	554	73
27	66735	24529	723	322
182(27/29 双链体)	78047	25344	809	281
90	3333	2181	5	4
培养基	2104	2104	4	4

从表 14 所示结果, SEQ ID NO:27 的双链体形式 SEQ ID NO:182 在活化 B 细胞上与 SEQ ID NO:27 大致相等, 如刺激 IL-6 生成和细胞增殖所测量。

实施例 3：通过免疫调节多核苷酸来免疫调节鼠细胞

测定免疫调节多核苷酸或对照多核苷酸对小鼠脾细胞的免疫调节活性。测试的多核苷酸是充分修饰的硫代磷酸酯寡脱氧核苷酸。测试的多核苷酸中有 SEQ ID NO:1(正对照)和 SEQ ID NO:2(负对照)。

BALB/c 小鼠脾片段用溶于磷酸缓冲盐水(PBS)的胶原酶/分散酶(0.1 U/mL/0.8 U/mL)在 37°C 消化 45 分钟, 然后通过推动消化片段经过金属屏蔽来机械分散。分散的脾细胞通过离心沉淀, 然后重悬浮于新鲜培养基(RPMI 1640, 有 10% 胎牛血清, 加 50 单位/mL 青霉素、50 μ g/mL 链霉素、2mM 谷氨酰胺和 0.05mM β -巯基乙醇)。

小鼠脾细胞分散到 96 孔板各孔(7×10^7 细胞/ml)中并 37°C 孵育 1 小时。加入 100 μ L 2x 浓度测试样品或对照且细胞再孵育 24 小时。双份测试各测试样品或对照。从各孔收集培养基并在测试前冷冻于-80°C。解冻收集的培养基, 通过 ELISA 测试细胞因子浓度。多核苷酸以不同浓度测试, 包括 5.0、1.0 和 0.1 μ g/ml。测试的多核苷酸中有 5'-TGACTGTGAACGTTCGAAATGA(SEQ ID NO:36) 和 5'-TGACTGTGAACGTTCGAAGTGA(SEQ ID NO:37)。对照样品包括单独培养基和 PANSORBIN® 热杀死、福尔马林固定的金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)(SAC)(CalBiochem)。

IL-6、IL-12 和 IFN- γ 用三明治形式的 ELISA 测定。来自小鼠脾细胞测定的培养基在微量滴定板中孵育，板用抗 IL-6、抗 IL-12 p40/70 或抗 IFN- γ 单克隆抗体(Nunc)包被。使用生物素酰化的抗细胞因子抗体(抗 IL-6、抗 IL-12 p40/70 或抗 IFN- γ)和链霉抗生物素蛋白-辣根过氧化物酶缀合二抗检测结合的细胞因子(IL-6、IL-12 或 IFN- γ)，在有过氧化物酶的情况下，用生色过氧化物酶底物 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)显影，通过用 Emax 精确微型板读数器(Molecular Devices)测量 450nm 吸光率来定量。小于 45pg/ml 的 IL-6 值被赋予 45pg/ml 的值(即 45=<45)。小于 36pg/ml 的 IL-12 p40/70 值被赋予 36pg/ml 的值(即 36=<36)。小于 54pg/ml 的 IFN- γ 值被赋予 54pg/ml 的值(即 54=<54)。

表 15 和 16 概括了响应 IMPs 的细胞因子生成的测定结果。含 CG 二核苷酸的免疫调节多核苷酸一般刺激鼠脾细胞的 IL-6、IL-12 或 IFN- γ 分泌，与本文所述用于高 IFN- α 诱导的更特殊基序的存在无关。

表 15. 鼠脾细胞测定- IL-6 (pg/ml)

测 试 (SEQ ID NO.)或对照	剂 量 (μ g/ml)	重 备 1	重 备 2	平 均
1 (IMP 标准)	5.0	4623	4655	4639
	1.0	999	961	980
	0.1	47	45	46
2 (非 IMP)	5.0	45	45	45
	1.0	45	45	45
SAC		308	296	302
培 养 基		-	-	45
5	5.0	4755	4653	4704
	1.0	1055	985	1020
	0.1	45	46	46
20	5.0	4953	5464	5209
	1.0	1318	1413	1366
	0.1	90	124	107
19	5.0	4421	4726	4574
	1.0	645	740	693
	0.1	45	45	45
38	5.0	4267	4350	4309
	1.0	613	673	643
	0.1	89	160	125
39	5.0	4775	4819	4797
	1.0	802	731	767
	0.1	213	147	180
40	5.0	2644	2217	2431

	1.0	341	251	296
	0.1	45	45	45
43	5.0	101	105	103
	1.0	45	45	45
	0.1	45	45	45
27	5.0	4809	5245	5027
	1.0	2182	2693	2438
	0.1	216	242	229
41	5.0	4781	5504	5143
	1.0	1979	2285	2132
	0.1	316	372	344
42	5.0	2706	3242	2974
	1.0	460	577	519
	0.1	66	70	68
44	5.0	2458	2585	2522
	1.0	358	321	340
	0.1	45	45	45
45	5.0	3920	3667	3794
	1.0	1177	1117	1147
	0.1	45	45	45
46	5.0	45	45	45
	1.0	45	45	45
	0.1	45	45	45
47	5.0	163	213	188
	1.0	45	45	45
	0.1	45	45	45
48	5.0	182	216	199
	1.0	45	45	45
	0.1	45	45	45
49	5.0	690	765	728
	1.0	66	73	70
	0.1	45	45	45
50	5.0	45	45	45
	1.0	45	45	45
	0.1	45	45	45
51	5.0	1942	1868	1905
	1.0	224	197	211
	0.1	45	45	45
52	5.0	1421	1234	1328
	1.0	456	488	472
	0.1	45	45	45
36	5.0	3656	3834	3745
	1.0	858	991	925
	0.1	45	45	45
36	5.0	3716	3750	3733

	1.0	897	934	916
	0.1	45	45	45
37	5.0	4253	4643	4448
	1.0	1256	1218	1237
	0.1	157	190	174
37	5.0	4457	4323	4390
	1.0	1099	941	1020
	0.1	88	109	99

表 16. 鼠脾细胞测定- IL-12 和 IFN- γ

测试(SEQ ID NO.)或对照	剂量 (μg/ml)	IL-12 (pg/ml)			IFN- γ (pg/ml)		
		重复 1	重复 2	平均	重复 1	重复 2	平均
1 (IMP 标准)	5.0	1915	1737	1826	1858	2589	2089
	1.0	1419	1424	1422	1941	1954	1948
	0.1	573	603	588	179	395	287
2 (非 IMP)	5.0	38	36	37	54	54	54
	1.0	36	43	40	54	54	54
SAC		609	620	615	11889	13338	12614
培养基		-	-	44	-	-	54
5	5.0	1773	1679	1726	1331	1463	1397
	1.0	2099	2193	2146	1878	1811	1845
	0.1	651	649	650	271	157	214
20	5.0	1838	2023	1931	2822	3342	3082
	1.0	2245	2315	2280	2662	3402	3032
	0.1	1016	1077	1047	513	1392	953
19	5.0	1364	1458	1411	1997	2686	2343
	1.0	1513	1702	1608	1427	2375	1901
	0.1	648	597	623	58	54	56
38	5.0	1822	1870	1846	3168	3851	3510
	1.0	1963	2239	2101	3440	3721	3581
	0.1	1207	1430	1319	446	1364	905
39	5.0	2476	2344	2410	3578	3065	3322
	1.0	2856	2504	2680	2415	3497	2956
	0.1	2101	2085	2093	1403	1217	1310
40	5.0	902	797	850	605	502	554
	1.0	1244	1216	1230	1116	318	717
	0.1	304	210	257	54	54	54
43	5.0	940	720	830	54	54	54
	1.0	721	852	787	54	54	54
	0.1	37	36	37	54	54	54
27	5.0	1978	2295	2137	3603	4546	4075
	1.0	1833	2373	2103	3634	4735	4185

	0.1	1761	1945	1853	2401	2313	2357
41	5.0	1590	1898	1744	3328	4447	3888
	1.0	1611	1910	1761	4197	3402	3800
	0.1	1738	1853	1796	3030	3016	3023
42	5.0	1507	1887	1697	2747	3203	2975
	1.0	2185	2269	2227	2609	4162	3386
	0.1	669	669	669	192	206	199
44	5.0	1870	1805	1838	2593	2802	2698
	1.0	2058	1854	1956	1464	1747	1606
	0.1	235	214	225	54	54	54
45	5.0	1716	1597	1657	2153	1776	1965
	1.0	1341	1175	1258	1567	1368	1468
	0.1	646	446	546	54	54	54
46	5.0	525	392	459	54	54	54
	1.0	234	132	183	54	54	54
	0.1	36	36	36	54	54	54
47	5.0	746	738	742	54	54	54
	1.0	757	752	755	54	54	54
	0.1	59	64	62	54	54	54
48	5.0	578	676	627	54	54	54
	1.0	697	786	742	54	54	54
	0.1	41	51	46	54	54	54
49	5.0	1095	1288	1192	376	778	577
	1.0	1510	1551	1531	54	54	54
	0.1	79	111	95	54	54	54
50	5.0	586	424	505	54	54	54
	1.0	206	178	192	54	54	54
	0.1	39	44	42	54	54	54
51	5.0	1341	1117	1229	955	1023	989
	1.0	1412	1257	1335	426	845	636
	0.1	92	75	84	54	54	54
52	5.0	1855	1557	1706	2408	2107	2258
	1.0	2961	2821	198	4421	5632	5027
	0.1	205	245	225	54	934	494
36	5.0	1717	1656	1687	3390	3338	3364
	1.0	1480	1510	1495	2547	2832	2690
	0.1	700	571	636	384	264	324
36	5.0	1478	1565	1522	2281	2200	2241
	1.0	1293	1235	1264	2073	3112	2593
	0.1	666	590	628	54	448	251
37	5.0	1679	1918	1799	3240	3748	3494
	1.0	1603	1561	1582	3950	4437	4194
	0.1	1232	1235	1234	1548	2044	1796
37	5.0	2064	3202	2633	2419	2631	2525
	1.0	1895	2417	2156	1894	3332	2613

	0.1	831	1430	1131	293	530	412
--	-----	-----	------	------	-----	-----	-----

从表 15 和 16 所示结果，所有含 CpG 基序的化合物从鼠脾细胞中诱导 IL-12 生成，大部分但不是所有含 CpG 基序的化合物从鼠脾细胞中诱导 IL-6 和 IFN- γ 生成。如表 15 和 16 所示结果可见，尽管免疫刺激多核苷酸对鼠脾细胞的 IL-6、IL-12 和 IFN- γ 刺激活性一般取决于 CG 二核苷酸的存在，它似乎不需本文所述用于高 IFN- α 诱导的更特殊基序。

实施例 4：通过免疫调节多核苷酸刺激干扰素诱导型基因表达

如本文所证明，免疫调节多核苷酸能从 PBMCs 中诱导 IFN- γ 和/或 IFN- α 的生成。使用定量 PCR 技术、TaqMan 技术，测定 IMPs 对人 PBMCs 的活性用于诱导 mRNA 表达另外细胞因子基因、化学因子基因和其它基因。测试的多核苷酸是充分修饰的硫代磷酸酯寡脱氧核苷酸。测试的多核苷酸中有 SEQ ID NO:1(正对照)和 SEQ ID NO:2(负对照)。

人 PBMCs 如实施例 1 所述制备。在有 5 μ g/ml 的测试样品(IMPs 或对照)的情况下，细胞培养 24 小时。总 RNA 用 Qiagen RNeasy Mini 方案(Qiagen)提取并用寡 dT(Promega)、随机六聚体(Promega)和 SuperScript RT II(Invitrogen)转变成 cDNA。1:10 稀释 cDNA 并进行 PCR，使用 QuantiTect SYBR green PCR master mix(Qiagen)和裸露引物(由 Operon 合成)或 QuantiTect probe PCR master mix(Qiagen)和有标记探针的 PDAR 引物(Applied BioSystems)。反应用 GeneAmp 5700 序列检测器(PE BioSystems)进行。

合成引物的序列的例子如下(5'到 3'列出)：

泛素(F:CACTTGGTCCTGCGCTTGA(SEQ ID NO:200),

R: CAATTGGGAATGCAACAACTTTAT(SEQ ID NO:201));

2, 5-OAS(F:AGGGAGCATGAAAACACATTCA(SEQ ID NO:202),

R: TTGCTGGTAGTTATGACTAATTCCAAG (SEQ ID NO:203));

GBP-1(F:TGGAACGTGTGAAAGCTGAGTCT(SEQ ID NO:204),

R: CATCTGCTCATTCTTCTTGCA(SEQ ID NO:205));

IFN- α (F:CCCAGGAGGAGTTGGCAA(SEQ ID NO:206),

R: TGCTGGATCATCTCATGGAGG(SEQ ID NO:207));

ISG-54K(F:CTGGACTGGCAATAGCAAGCT(SEQ ID NO:208),

R: AGAGGGTCAATGGCGTTCTG(SEQ ID NO:209));
 MCP-2(F:CTGCTCATGGCAGCCACTT(SEQ ID NO:210),
 R: AGCAGGTGATTGGAATGGAAA(SEQ ID NO:211));
 MIG(F:CATCTTGCTGGTTCTGATTGGA(SEQ ID NO:212),
 R: TGGTGCTGATGCAGGAACAG(SEQ ID NO:213));
 TNF- α (F:CTTCTGCCTGCTGCACTTG(SEQ ID NO:214),
 R: CTGGGCCAGAGGGCTGAT(SEQ ID NO:215))。

IFN- γ 、IL-1 α 、IL-6、IP-10、MCP-3 和 MIP-3 β 用 PE BioSystems 提供的 PDARs 测量。各基因的阈循环(C_T)值归一化成泛素，使用公式 $1.8^{(UBQ-GENE)}(100, 000)$ ，其中 UBQ 是三重泛素运转的平均 C_T ，GENE 是感兴趣基因的双重运转的平均 C_T ，100, 000 是任意选择使所有值大于 0 的因子。各实验的负对照是用单独培养基刺激，赋予 1 的值，所有数据表示为相对负对照的诱导倍数。

表 17 概括了 PBMCs 响应 IMP SEQ ID NO:27 的细胞因子、化学因子和炎性蛋白基因表达的测定结果，也测试多核苷酸 5'-GGTGCATCGATGCAGGGGGG(SEQ ID NO:154)。数据表示为相对培养基对照(赋予 1.0 的值)的平均诱导倍数，用平均标准误 (SEM)。

表 17. 受 IMP 调节的基因表达的分布

测试或对照 (SEQ ID NO)	IL-1 α		IP-10		MCP-2		MCP-3		MIG	
	平均	SEM	平均	SEM	平均	SEM	平均	SEM	平均	SEM
培养基	1.0	0.0	1.0	0.0	1.0	0.0	1.0	0.0	1.0	0.0
2	2.0	0.7	0.6	0.3	0.2	0.1	0.9	0.1	0.6	0.1
1	1.7	0.4	2.7	0.6	28.3	21.2	3.0	1.0	3.0	0.9
27	0.4	0.2	94.0	27.5	198.8	59.6	8.0	2.2	8.8	2.0
154	0.2	0.1	145.4	65.1	284.8	108.7	8.5	1.4	14.5	7.0
	MIP-3 β		2, 5-OAS		GBP-1		ISG-54K			
	平均	SEM	平均	SEM	平均	SEM	平均	SEM		
培养基	1.0	0.0	1.0	0.0	1.0	0.0	1.0	0.0		
2	1.2	0.3	0.7	0.2	1.0	0.1	0.7	0.1		
1	2.9	0.9	7.6	3.3	2.5	0.6	4.9	2.1		
27	6.9	1.8	16.5	2.3	5.9	0.4	27.1	2.6		
154	10.5	2.1	15.7	1.3	5.7	1.1	31.9	2.1		

如表 17 所示, SEQ ID NO:27 大幅增加化学因子 IP-10、MCP-2、MCP-3、MIG 和 MIP-3 β 的表达。存在 SEQ ID NO:27 时, IL-1 α 的表达减少。此外, SEQ ID NO:27 显著增加 IFN- α -诱导型基因 2, 5-寡腺苷酸合成酶(2, 5-OAS)、干扰素刺激基因 -54K(ISG-54K)和鸟苷酸结合蛋白-1(GBP-1)的表达。

在这些测定中, IMP SEQ ID NO:27 对细胞因子 G-CSF、IL-1 β 、IL-6、IL-12p40、IL-23、TNF- α 或化学因子 BCA-1、IL-8、LPTN、MCP-1、MDC、MIP-1a、MIP-1b、MIP-3a、RANTES 和 TARC 的 mRNA 表达水平没有显著影响。

实施例 5：通过免疫调节多核苷酸刺激 NK 细胞裂解活性

本发明的 IMPs 刺激天然杀伤(NK)细胞的裂解活性相比 IMP 标准有改进。通过 K562 靶细胞的裂解测定 NK 细胞裂解活性。简要地, PBMCs 用 10mg/ml IMP(以前获得的最佳剂量)或负对照多核苷酸在培养中刺激 48 小时。然后, 处理的 PBMCs 与负载⁵¹Cr 的 K562 肿瘤靶细胞共培养 4 小时, 以一定范围的效应物:靶比例。细胞裂解时的⁵¹Cr 释放通过 TopCount NXT 闪烁计数器(Packard)测量并报导为计数每分钟(cpm)。

2 个不同 PBMC 供体的 NK 细胞刺激的结果示于图 2。用于测定的 IMPs 是 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:172 和 SEQ ID NO:113。IMPs 的回文长度在 SEQ ID NO:172 中为 28 个碱基, 在 SEQ ID NO:113 中为 22 个碱基, 在 SEQ ID NO:27 中为 12 个碱基, 在 SEQ ID NO:1 中为 8 个碱基。非 IMP 对照 SEQ ID NO:90 有 20 个碱基长度的回文, 但不包含 5'-C, G-3'序列。在此实验中, 具有 12 个碱基长度或较长回文的 IMPs 与具有 8 个碱基长度回文的 IMP 标准 SEQ ID NO:1 相比, 刺激 NK 细胞裂解活性的量增加。

尽管上述发明通过说明和例子更详细描述用于阐明和理解的目的, 对本领域技术人员显然的是可进行某些变化和修改。因此, 描述和例子不应认作为限制发明的范围。

序列表

<110> 戴纳伐克斯技术股份有限公司 (DYNAVAX TECHNOLOGIES)

D. 迪纳 (DINA, Dino)

K. L. 费伦 (FEARON, Karen L.)

J. 马歇尔 (MARSHALL, Jason)

<120> 免疫刺激序列寡核苷酸和使用方法

<130> 377882003340

<140> PCT/US03/41001

<141> 2003-12-18

<150> US 60/436, 122

<151> 2002-12-23

<150> US 60/447, 885

<151> 2003-02-13

<150> US 60/467, 546

<151> 2003-05-01

<160> 227

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 1

tgactgtgaa cgttcgagat ga

22

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 不含 CG 的多核苷酸

<400> 2

tgactgtgaa ccttagagat ga

22

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 3

tcgtcgttt gtcgtttgt cgtt

24

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 4

tcaacgttcg ttaacgttcg tt

22

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 5

tcgtcgaacg ttgcgttaacg ttcg

24

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 6

tcgtcgaacg ttccttaacg ttcc

24

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 7
tcgtcgaacg ttccttaacg ttgc 24

<210> 8
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 8
tgatcgaacg ttcgttaacg ttgc 24

<210> 9
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 9
tcgttcaacg ttcgttaacg ttgc 24

<210> 10
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 10
tgattcaacg ttcgttaacg ttgc 24

<210> 11
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 11
tcgtcgaacc ttcgttaacc ttgc 24

<210> 12
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 12

tcgtcgaacg ttcgtt

16

<210> 13

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 13

tcgtcgtgaa cgttcgagat ga

22

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 14

tcgtcggAAC gttcgagatg

20

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 15

tcgtcgtaac gttcgagatg

20

<210> 16

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 16

tcgtcggACG ttcgagatg

19

<210> 17
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 17
tcgtcgtacg ttcgagatg 19

<210> 18
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 18
tcgtcgttcg ttcgagatg 19

<210> 19
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 19
tcgtcgaacg ttcgaacggtt cg 22

<210> 20
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 20
ttcgaacggtt cgttaacggtt cg 22

<210> 21
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<221> modified_base

<222> 1, 4

<223> n = um

<400> 21

ncgncaacg ttcgagatg

19

<210> 22

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<221> modified_base

<222> 2

<223> n = cm

<400> 22

tngtcgaacg ttcgagatg

19

<210> 23

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<221> modified_base

<222> 5

<223> n = cm

<400> 23

tcgtngaacg ttcgagatg

19

<210> 24

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 24

tgatcgta acgttcgaga tg

22

<210> 25
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 25
 accgataacg ttgccgggtga cggcaccacg

30

<210> 26
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 含 CG 的多核苷酸

<221> misc_feature
 <222> 1, 2, 16-20
 <223> 硫代磷酸酯连接

<400> 26
 ggtcgaacgt tcgagggggg

20

<210> 27
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 27
 tcgtcgaacg ttcgagatga t

21

<210> 28
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 含(5-溴胞苷)G 的多核苷酸

<221> modified_base
 <222> 2, 5, 9, 13
 <223> n= 5-溴-2'-脱氧胞苷

<400> 28
 tngtngaang ttngagatga t

21

<210> 29
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 29
atcatctcg a acgttcgacg a

21

<210> 30
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 30
ggtcgaacgt tcgaggggg

20

<210> 31
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 31
tcgtcgaacg ttttaacgtt

20

<210> 32
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 32
tcgtcgaacg ttgcaggggg g

21

<210> 33
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<221> misc_feature

<222> 1-3, 16-21

<223> 硫代磷酸酯连接

<400> 33

tcgtcgaacg ttcgaggggg g

21

<210> 34

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<221> misc_feature

<222> 1-3, 17-21

<223> 硫代磷酸酯连接

<400> 34

tcgtgcacatcg atgcaggggg g

21

<210> 35

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 35

tcgtcgacgt cgagatgata t

21

<210> 36

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 36

tgactgtgaa cgttcgaaat ga

22

<210> 37

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 37

tgactgtgaa cgttcgaagt ga

22

<210> 38

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 38

ttcgaacgtt cgaacgttcg aat

23

<210> 39

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 39

tcgaacgttc gaacgttcg aat

22

<210> 40

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 40

tcgattcgaa cggtcgaacg ttgc

24

<210> 41

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 41

tcgttcgaac gttcgaagtg at

22

<210> 42

<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 42
tcgttgcgaac gttcgAACGGA

20

<210> 43
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 43
tcgatcgatc gatcgatcga tt

22

<210> 44
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 44
tcgtcgagcg ctcgagatga t

21

<210> 45
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 45
tcgtcgatcg atcgagatga t

21

<210> 46
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 46
tcgtcggtcg accgagatga t 21

<210> 47
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 47
tcgtcggacg tccgagatga t 21

<210> 48
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 48
tcgtcgacg tgcgagatga t 21

<210> 49
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 49
tcgtcgcat cgcgagatga t 21

<210> 50
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 50
tcgtcgatcg gacgagatga t 21

<210> 51
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 51

tcgtcgtacg tacgagatga t

21

<210> 52

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 52

tcgtcgaacg ttcgacgaa

18

<210> 53

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 53

tcgttcgaac gttcgaacgt tcg

23

<210> 54

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 54

tcgttcgaac gttcgaa

17

<210> 55

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 55

tcgttcgaac gttcgaacgt tcgaa

25

<210> 56
<211> 44
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 56
tcgtcgaac gttcgaaacga ttttcgttc gaacgttcga acga

44

<210> 57
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 57
tttcgaacgt tcgaacgttc gaaat

25

<210> 58
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 58
ttttcgaacg ttcaacgtt cggaaat

27

<210> 59
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 59
ttttcgaacg ttcaacgtt cgaat

25

<210> 60
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 60
tcgtcgacgt cgacgagata t 21

<210> 61
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 61
tcgacgtcga cgtcgacgta t 21

<210> 62
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 62
tcgtcgaaac gtttcgacag t 21

<210> 63
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 63
tcgtcgagac gtctcgacag t 21

<210> 64
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 64
tcgtcgaaaa cgaaaaat 22

<210> 65
<211> 22
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 65

tcgaaaacgt tttcgagatg at

22

<210> 66

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 66

tcgaggacgt cctcgagatg at

22

<210> 67

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 67

aacgttcgaa cgttcgaacg ttt

23

<210> 68

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 68

tcaacgttcg aacgttcgaa cgtt

24

<210> 69

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 69

tcgtcgaccg gtcgagatga t

21

<210> 70
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 70
tcgtcggcg cccgagatga t

21

<210> 71
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 71
tcgtcgcg cgcgagatga t

21

<210> 72
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 72
tcgtcgctcg agcgagatga t

21

<210> 73
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 73
tcgtcgcccg ggcgagatga t

21

<210> 74
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 74

tcgtcgtcg c acgagatga t

21

<210> 75

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 75

tcgtcg tt cg a acgagatga t

21

<210> 76

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 76

tcgtcg tcc g a c g a g a t g a t

21

<210> 77

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 77

t c g a g c g c t c g a g c g c t c g a

20

<210> 78

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 78

t c g g t c g a c c g t c g a c c g a

20

<210> 79

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 79

tcggacgtcc ggacgtccga

20

<210> 80

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 80

tgcAACGTTA ACGTTCGATT

20

<210> 81

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 81

TCGAGCGCTA GCGCTCGATT

20

<210> 82

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 82

TCGGTCGACG TCGACCGATT

20

<210> 83

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 83
tcggacgtcg acgtccgatt 20

<210> 84
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 84
tcgttcaat tcgaacgatt 20

<210> 85
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 85
gacgatcgta gacgatcgta 20

<210> 86
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 86
tcggacgatc gtgcgacgatc gtc 23

<210> 87
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 87
tcgtcggacg atcgtcacga cg 22

<210> 88
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 88

tcgttgcAAC gttcAACgA

20

<210> 89

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<221> misc_feature

<222> 1-3, 15-20

<223> 硫代磷酸酯连接

<400> 89

tcgttgcAAC gttcAACgA

20

<210> 90

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 不含 CG 的多核苷酸

<400> 90

tgcTTGCAAG cttGCAAGcA

20

<210> 91

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 91

tgcTTGCAAG cttGCAACgA

20

<210> 92

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 92

accgataacg ttgccggta cggcaccacg

30

<210> 93

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 93

tctgtcatcg atgcaacg

18

<210> 94

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 94

aacaacaacg ttgttgtt

18

<210> 95

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 95

aacaacaacg ttgttgtt

18

<210> 96

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 不含 CG 的多核苷酸

<400> 96

tcagttagtc agctgactga ctga

24

<210> 97

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 97

tcgaacgttc gaacgttcga

20

<210> 98

<211> 14

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 98

ttcgaacgtt cgaa

14

<210> 99

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 99

tcgtcgaacg ttcgagat

18

<210> 100

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 100

tcgtcgaacg ttcgag

16

<210> 101

<211> 15

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 101

tcgtcgaacg ttcga

15

<210> 102

<211> 13

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 102

tcgaacgttc gag

13

<210> 103

<211> 12

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 103

tcgaacgttc ga

12

<210> 104

<211> 11

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 104

tcgaacgttc g

11

<210> 105

<211> 10

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 105

tcgacgtcga

10

<210> 106

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 111

tcgtgcatcg atgcatgcat cgatgca

27

<210> 112

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 112

tcgtcggccg gccgagatga t

21

<210> 113

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 113

tcgaacgttc gaacgttcga acgtt

25

<210> 114

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 114

tcggacgtcg acgtgcgatt

20

<210> 115

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 115
cttcgaacgt tcgaagtg 18

<210> 116
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 116
tgatcgtaa acgttcgacg atca 24

<210> 117
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 117
tcgaacgttc gaacgttcaa atttt 25

<210> 118
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 118
tcgttcgaac gttcgaacga atgat 25

<210> 119
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 119
tcgacgtcga cgtcgacgtc ga 22

<210> 120
<211> 22
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 120

acgtcgacgt cgacgtcgac gt

22

<210> 121

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 121

tcgtcgacgt cgacgtcgac gt

22

<210> 122

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 122

tcgtcggcgc cggcgccggc gc

22

<210> 123

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 123

tcgtcgccgg cgccggcgcc gg

22

<210> 124

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 124

tcgatacgtc gacgtcgacg t

21

<210> 125

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 125

tcgtcgaagc gcttcgacag t

21

<210> 126

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 126

tcgtcgaatc gattcgacag t

21

<210> 127

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 127

tcgtcgagtc gactcgacag t

21

<210> 128

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 128

tcgtcgcaac gttgcgacag t

21

<210> 129

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 129

tcgtcgccgc gcggcgacag t

21

<210> 130

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 130

tcgaaacgtt tcgacagtga t

21

<210> 131

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 131

tcgaggtcga cctcgagatg at

22

<210> 132

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 132

atcgatgtcg acatcgatat gat

23

<210> 133

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 133

tcgtcgtcga cgacgagatg at

22

<210> 134

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 134

tcggtcgatc gacgtcgatc gac

23

<210> 135

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 135

tcggacggcc gtcgacggcc gtc

23

<210> 136

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 136

tcggacgtac gtcgacgtac gtc

23

<210> 137

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 137

tgcgtcgatc gatatcgatc gat

23

<210> 138

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 138

tcgtcggacg atcggtccgac ga

22

<210> 139

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 139

tcgtcgcgta cgcgagatga t

21

<210> 140

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 140

tcgtcgcggc cgcgagatga t

21

<210> 141

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 141

tcgcgatcgc gcgatcgcga

20

<210> 142

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 142

tcgtcgacgc gtcgagatga t

21

<210> 143

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 143

tcgtcggcgc gccgagatga t

21

<210> 144

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 144

tcgtcgatcg cgatcgacga

20

<210> 145

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 145

tcgtcgaatc gcgattcgac ga

22

<210> 146

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 146

tcgtcgcat atcgcgacga

20

<210> 147

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 147

tcgaacgttc gttcgaaacga acgtt

25

<210> 148

<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 148
tcgaacgtt tcgaaaacgt t

21

<210> 149
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 149
tcgtgcacatcg atgcacgaa

18

<210> 150
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 150
tcgcgaacgt tcgaacgttc g

21

<210> 151
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 151
tcgcgaacgt tcgaacgttt c

21

<210> 152
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 152
tcgataaacgt tcgaacgtta t 21

<210> 153
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 153
tcgataaacgt tcgaacgttt c 21

<210> 154
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 154
ggtgtcatcga tgccaggggg 20

<210> 155
<211> 12
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 含 CG 的多核苷酸

<221> misc_feature
<222> 1
<223> n = 不存在、n、nn 或 nnn

<221> misc_feature
<222> 2-5
<223> 2-5 位的碱基序列可出现 1、2、3 或 4 次

<221> misc_feature
<222> 6
<223> n = 不存在、n、nn；或不存在 2-5 位 (tcgn) 的 3' 最大可能碱基以及 7-12 位 (ncgnncg) 的 5' 最大可能碱基

<221> misc_feature
<222> 11, 12
<223> 11-12 位的碱基序列可存在或不存在

<221> misc_feature

<222> 5

<223> n = 不存在, n 或 nn

<221> misc_feature

<222> (7)...(12)

<223> 7-12 位的碱基序列可出现 1-20 次

<221> misc_feature

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

<223> n = 与 10 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

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

<223> n = 与 7 位的碱基互补的任何碱基

<400> 155

ntcgnnnncgn cg

12

<210> 156

<211> 14

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<221> misc_feature

<222> 1

<223> n = 不存在、n、nn 或 nnn

<221> misc_feature

<222> 2-5

<223> 2-5 位的碱基序列可出现 1、2、3 或 4 次

<221> misc_feature

<222> 6

<223> n = 不存在; n; nn; 或不存在 2-5 位 (tcgn) 的 3' 最大可能碱基以及 7-14 位 (nnccgnncg) 的 5' 最大可能碱基; 或不存在 2-5 位 (tcgn) 的最后一个和第二个至最后一个 3' 碱基, 以及 7-14 位 (nnccgnncg) 的第二个和第一个 5' 碱基

<221> misc_feature

<222> 13, 14

<223> 13-14 位的碱基序列可存在或不存在

<221> misc_feature

<222> 5

<223> n = 不存在, n 或 nn

<221> misc_feature

<222> (7)...(14)

<223> 7-14 位的碱基序列可出现 1-20 次

<221> misc_feature
 <222> (7)...(7)
 <223> n = 与 12 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature
 <222> (12)...(12)
 <223> n = 与 7 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature
 <222> (8)...(8)
 <223> n = 与 11 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature
 <222> (11)...(11)
 <223> n = 与 8 位的碱基互补的任何碱基

<400> 156
 ntcgnnnnncg nnncg 14

<210> 157
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 含 CG 的多核苷酸

<221> misc_feature
 <222> 1
 <223> n = 不存在、n、nn 或 nnn

<221> misc_feature
 <222> 2-5
 <223> 2-5 位的碱基序列可出现 1、2、3 或 4 次

<221> misc_feature
 <222> 6
 <223> n = 不存在；n；nn；或不存在 2-5 位 (tcgn) 的 3' 最大可能碱基以及 7-16 位 (nnncgnnncg) 的 5' 最大可能碱基；或不存在 2-5 位 (tcgn) 的最后一个和第二个至最后一个 3' 碱基，以及 7-16 位 (nnncgnnncg) 的第二个和第一个 5' 碱基；或不存在 2-5 位 (tcgn) 的最后一个、第二个至最后一个和第三个至最后一个 3' 碱基，以及 7-16 位 (nnncgnnncg) 的第三个、第二个和第一个 5' 碱基

<221> misc_feature
 <222> 15, 16
 <223> 15-16 位的碱基序列可能存在或不存在

<221> misc_feature
 <222> 5

<223> n = 不存在, n 或 nn

<221> misc_feature

<222> (7)...(16)

<223> 7-16 位的碱基序列可出现 1-20 次

<221> misc_feature

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

<223> n = 与 14 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

<222> (14)...(14)

<223> n = 与 7 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

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

<223> n = 与 13 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

<222> (13)...(13)

<223> n = 与 8 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

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

<223> n = 与 12 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

<222> (2)...(2)

<223> n = 与 9 位的碱基互补的任何碱基

<400> 157

ntcgnnnnnnc gnnnncg

16

<210> 158

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<221> misc_feature

<222> 1

<223> n = 不存在、n、nn 或 nnn

<221> misc_feature

<222> 2-5

<223> 2-5 位的碱基序列可出现 1、2、3 或 4 次

<221> misc_feature

<222> 6

<223> n = 不存在; n; nn; 或不存在 2-5 位(tcgn)的 3' 最大可能碱基以及 7-18 位(nnncgnnnncg)的 5' 最大可能碱基; 或不存在 2-5 位(tcgn)的最后一个和第二个至最后一个 3' 碱基, 以及 7-18 位(nnncgnnnncg)的第二个和第一个 5' 碱基; 或不存在 2-5 位(tcgn)的最后一个、第二个至最后一个和第三个至最后一个 3' 碱基, 以及 7-18 位(nnncgnnnncg)的第三个、第二个和第一个 5' 碱基

<221> misc_feature

<222> 17, 18

<223> 17-18 位的碱基序列可存在或不存在

<221> misc_feature

<222> 5

<223> n = 不存在, n 或 nn

<221> misc_feature

<222> (7)...(18)

<223> 7-18 位的碱基序列可出现 1-20 次

<221> misc_feature

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

<223> n = 与 16 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

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

<223> n = 与 7 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

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

<223> n = 与 15 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

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

<223> n = 与 8 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

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

<223> n = 与 14 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

<222> (14)...(14)

<223> n = 与 9 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

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

<223> n = 与 13 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

<222> (13)...(13)

<223> n = 与 10 位的碱基互补的任何碱基

<400> 158
ntcgnnnnnn cgnnnncg

18

<210> 159
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 含 CG 的多核苷酸

<221> misc_feature
<222> 1
<223> n = 不存在、n、nn 或 nnn

<221> misc_feature
<222> 2-5
<223> 2-5 位的碱基序列可出现 1、2、3 或 4 次

<221> misc_feature
<222> 6
<223> n = 不存在；n；nn；或不存在 2-5 位 (tcgn) 的 3' 最大可能碱基以及 7-18 位 (nnnncgnnnncg) 的 5' 最大可能碱基；或不存在 2-5 位 (tcgn) 的最后一个和第二个至最后一个 3' 碱基，以及 7-18 位 (nnnncgnnnncg) 的第二个和第一个 5' 碱基

<221> misc_feature
<222> 17, 18
<223> 17-18 位的碱基序列可存在或不存在

<221> misc_feature
<222> 5
<223> n = 不存在, n 或 nn

<221> misc_feature
<222> (7)...(18)
<223> 7-18 位的碱基序列可出现 1-20 次

<221> misc_feature
<222> (7)...(7)
<223> n = 与 16 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature
<222> (16)...(16)
<223> n = 与 7 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature
<222> (8)...(80)
<223> n = 与 15 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature
<222> (15)...(15)

<223> n = 与 8 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

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

<223> n = 与 12 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

<222> (12)...(12)

<223> n = 与 11 位的碱基互补的任何碱基

<400> 159

ntcgnnnncg nncgnncg

18

<210> 160

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<221> misc_feature

<222> 1

<223> n = 不存在、n、nn 或 nnn

<221> misc_feature

<222> 2-5

<223> 2-5 位的碱基序列可出现 1、2、3 或 4 次

<221> misc_feature

<222> 6

<223> n = 不存在；n；nn；或不存在 2-5 位(tcg)的 3' 最大可能碱基以及 7-20 位(nnncgnnnnncg)的 5' 最大可能碱基；或不存在 2-5 位(tcg)的最后一个和第二个至最后一个 3' 碱基，以及 7-20 位(nnncgnnnnncg)的第二个和第一个 5' 碱基；或不存在 2-5 位(tcg)的最后一个、第二个至最后一个和第三个至最后一个 3' 碱基，以及 7-20 位(nnncgnnnnncg)的第三个、第二个和第一个 5' 碱基

<221> misc_feature

<222> 19, 20

<223> 19-20 位的碱基序列可存在或不存在

<221> misc_feature

<222> 5

<223> n = 不存在, n 或 nn

<221> misc_feature

<222> (7)...(20)

<223> 7-20 位的碱基序列可出现 1-20 次

<221> misc_feature

<222> (7)...(70)

<223> n = 与 18 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

<222> (18)...(18)

<223> n = 与 7 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

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

<223> n = 与 17 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

<222> (17)...(17)

<223> n = 与 8 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

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

<223> n = 与 16 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

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

<223> n = 与 9 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

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

<223> n = 与 15 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

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

<223> n = 与 10 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

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

<223> n = 与 14 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

<222> (14)...(14)

<223> n = 与 11 位的碱基互补的任何碱基

<400> 160

ntcgnnnnn ncgnnnnnncg

20

<210> 161

<211> 14

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<221> misc_feature

<222> 1

<223> n = 不存在、n、nn 或 nnn

<221> misc_feature

<222> 2-5

<223> 2-5 位的碱基序列可出现 1、2、3 或 4 次

<221> misc_feature

<222> 6

<223> n = 不存在；n；nn；或不存在 2-5 位 (tcgn) 的第二个至最后一个和最后一个 3' 碱基，以及 7-14 位 (cgnncg) 的第一个和第二个 5' 碱基

<221> misc_feature

<222> 13, 14

<223> 13-14 位的碱基序列可存在或不存在

<221> misc_feature

<222> 5

<223> n = 不存在，n 或 nn

<221> misc_feature

<222> (7)...(14)

<223> 7-14 位的碱基序列可出现 1-20 次

<221> misc_feature

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

<223> n = 与 10 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

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

<223> n = 与 9 位的碱基互补的任何碱基

<400> 161

ntcgnncgnn cgcg

14

<210> 162

<211> 14

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<221> misc_feature

<222> 1

<223> n = 不存在、n、nn 或 nnn

<221> misc_feature

<222> 2-5

<223> 2-5 位的碱基序列可出现 1、2、3 或 4 次

<221> misc_feature
 <222> 6
 <223> n = 不存在; n; nn; 或不存在 2-5 位 (tcgn) 的 3' 最大可能碱基以及 7-14 位 (ncgcgnccg) 的 5' 最大可能碱基

<221> misc_feature
 <222> 13, 14
 <223> 13-14 位的碱基序列可存在或不存在

<221> misc_feature
 <222> 5
 <223> n = 不存在, n 或 nn

<221> misc_feature
 <222> (7)...(14)
 <223> 7-14 位的碱基序列可出现 1-20 次

<221> misc_feature
 <222> (7)...(7)
 <223> n = 与 12 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature
 <222> (12)...(12)
 <223> n = 与 7 位的碱基互补的任何碱基

<400> 162
 ntcgnnncgc gncg 14

<210> 163
 <211> 16
 <212> DNA

<213> 人工序列

<220>
 <223> 含 CG 的多核苷酸

<221> misc_feature
 <222> 1
 <223> n = 不存在、n、nn 或 nnn

<221> misc_feature
 <222> 2-5
 <223> 2-5 位的碱基序列可出现 1、2、3 或 4 次

<221> misc_feature
 <222> 6
 <223> n = 不存在; n; nn; 或不存在 2-5 位 (tcgn) 的 3' 最大可能碱基以及 7-16 位 (nnccgcnccg) 的 5' 最大

可能碱基;或不存在 2-5 位 (tcgn) 的最后一个和第二个至最后一个 3' 碱基, 以及 7-16 位 (nnccgcnncg) 的第二个和第一个 5' 碱基

<221> misc_feature
 <222> 15, 16
 <223> 15-16 位的碱基序列可存在或不存在

<221> misc_feature
 <222> 5
 <223> n = 不存在, n 或 nn

<221> misc_feature
 <222> (7)...(16)
 <223> 7-16 位的碱基序列可出现 1-20 次

<221> misc_feature
 <222> (7)...(7)
 <223> n = 与 14 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature
 <222> (14)...(14)
 <223> n = 与 7 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature
 <222> (8)...(8)
 <223> n = 与 13 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature
 <222> (13)...(13)
 <223> n = 与 8 位的碱基互补的任何碱基

<400> 163
 ntcgnnnnncg cgnncg 16

<210> 164
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<221> misc_feature
 <222> 1
 <223> n = 不存在、n、nn 或 nnn

<221> misc_feature
 <222> 2-5
 <223> 2-5 位的碱基序列可出现 1、2、3 或 4 次

<221> misc_feature

<222> 6

<223> n = 不存在; n; nn; 或不存在 2-5 位(tcgn)的 3' 最大可能碱基以及 7-18 位(nnncgcgnncg)的 5' 最大可能碱基; 或不存在 2-5 位(tcgn)的最后一个和第二个至最后一个 3' 碱基, 以及 7-18 位(nnncgcgnncg)的第二个和第一个 5' 碱基; 或不存在 2-5 位(tcgn)的最后一个、第二个至最后一个和第三个至最后一个 3' 碱基, 以及 7-18 位(nnncggnncg)的第三个、第二个和第一个 5' 碱基

<221> misc_feature

<222> 17, 18

<223> 17-18 位的碱基序列可存在或不存在

<221> misc_feature

<222> 5

<223> n = 不存在, n 或 nn

<221> misc_feature

<222> (7)...(18)

<223> 7-18 位的碱基序列可出现 1-20 次

<221> misc_feature

<222> (7)...(0)

<223> n = 与 16 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

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

<223> n = 与 7 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

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

<223> n = 与 15 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

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

<223> n = 与 8 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

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

<223> n = 与 14 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

<222> (14)...(14)

<223> n = 与 9 位的碱基互补的任何碱基

<400> 164

ntcgnnnnnc gcgnncg

18

<210> 165

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<221> misc_feature

<222> 1

<223> n = 不存在、n、nn 或 nnn

<221> misc_feature

<222> 2-5

<223> 2-5 位的碱基序列可出现 1、2、3 或 4 次

<221> misc_feature

<222> 6

<223> n = 不存在；n；nn；或不存在 2-5 位 (tcgn) 的第二个至最后一个 3' 碱基，以及 7-16 位 (cgnnnnncg) 的第一个和第二个 5' 碱基

<221> misc_feature

<222> 15, 16

<223> 15-16 位的碱基序列可存在或不存在

<221> misc_feature

<222> 5

<223> n = 不存在, n 或 nn

<221> misc_feature

<222> (7)...(16)

<223> 7-16 位的碱基序列可出现 1-20 次

<221> misc_feature

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

<223> n = 与 12 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

<222> (12)...(12)

<223> n = 与 9 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

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

<223> n = 与 11 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

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

<223> n = 与 10 位的碱基互补的任何碱基

<400> 165

ntcgnncgnn nncgcg

16

<210> 166

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 166

tcgtcgaacg ttcgagatg

19

<210> 167

<211> 14

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 167

tcgtcgaacg ttcg

14

<210> 168

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 168

tcgaacgttc gatcgaacgt tcga

24

<210> 169

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 169

tcgaccggtc gaccggtcga

20

<210> 170

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 170

tcgaacgttc gaacgttgat gt 22

<210> 171

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 171

tcgaacgttc gaagatgatg at 22

<210> 172

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 172

tcgaacgttc gaacgttcga acgttcgaat 30

<210> 173

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 173

tcgataacgt tcgaacgttc gaacgttat 29

<210> 174

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 174

tcgtaacgtt cgaacgttcg aacgtta 27

<210> 175

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 175

tcgaacgttc gaacgttcga acg 23

<210> 176

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 176

tcgaccggtc gaccggtcga ccgg 25

<210> 177

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 177

tcgcgcgcgc gcgcgcgcga 20

<210> 178

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 178

tgcggcgccc gcccggcgca 20

<210> 179

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 179
tcggccggac gtccggacga 20

<210> 180
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 180
tcggccggcc ggccggccga 20

<210> 181
<211> 22

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<221> misc_feature
<222> (1)...(22)
<223> 多核苷酸循环

<400> 181
tcgaacgttc gaacgttcga at 22

<210> 182
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽

<400> 182
Lys Phe Phe Lys Phe Phe Lys Phe Phe
1 5

<210> 183
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<400> 183

Trp	Glu	Ala	Lys	Leu	Ala	Lys	Ala	Leu	Ala	Lys	Ala	Leu	Ala	Lys	His
1			5			10			15						
Leu	Ala	Lys	Ala	Leu	Ala	Lys	Ala	Leu	Glu	Ala	Cys	Glu	Ala		
			20			25			30						

<210> 184

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<400> 184

Trp	Glu	Ala	Lys	Leu	Ala	Lys	Ala	Leu	Ala	Lys	Ala	Leu	Ala	Lys	His
1			5			10			15						
Leu	Ala	Lys	Ala	Leu	Ala	Lys	Ala	Leu	Lys	Ala	Cys	Glu	Ala		
			20			25			30						

<210> 185

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<221> misc_feature

<222> 21

<223> n =

5' -DMT-N3-(tBu-SS-乙基)胸昔-3' -氨基磷酸盐

<400> 185

tcgtcgaacg	ttcgagatga	n	21
------------	------------	---	----

<210> 186

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<221> misc_feature

<222> 1

<223> n = 5' -DMT-N3-(tBu-SS-乙基)胸昔-3' -氨基磷酸盐

<400> 186
ntcatctcgacg acgttcgacg a 21

<210> 187
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 含 C 修饰的 G 的多核苷酸

<221> modified_base
<222> 3, 6, 10, 14, 16, 19
<223> n = 7-脱氮杂-8-氮杂-dG

<400> 187
tcntcnaacn ttccnanatna t 21

<210> 188
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 含 CG 的多核苷酸

<221> modified_base
<222> 7, 8, 15, 17, 20
<223> n = 2-氨基-dA

<400> 188
tcgtcggnncg ttccngntgn t 21

<210> 189
<211> 21
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 含 CG 的多核苷酸

<221> modified_base
<222> 8
<223> n = 2-氨基-dA

<221> modified_base
<222> 11
<223> n = 2-硫代-dT

<400> 189
tcgtcgancg ntcgagatga t 21

<210> 190
<211> 21

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 含 CG 的多核苷酸

<221> modified_base
<222> 7, 8
<223> n = 2-氨基-dA

<221> modified_base
<222> 11, 12
<223> n = 2-硫代-dT

<400> 190
tcgtcgnncg nnccgagatga t 21

<210> 191
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 含 CG 的多核苷酸

<221> modified_base
<222> 17
<223> n = N6-脱胺-2-dA

<400> 191
tcgtcgaacg ttccgagntga t 21

<210> 192
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 含 CG 的多核苷酸

<221> modified_base
<222> 4
<223> n = N6-脱胺-2-dA

<400> 192
atcntctcgaa cgttcgacg a

21

<210> 193

<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 含 C 修饰的 G 的多核苷酸

<221> modified_base
<222> 3, 6, 10, 14
<223> n = 7-脱氮杂-dG

<400> 193
tcntcnaacn ttcnagatga t

21

<210> 194
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Polynucleotide containing C modified G

<221> modified_base
<222> 3, 7, 11, 15, 19, 23
<223> n = 7-脱氮杂-8-氮杂-dG

<400> 194
tcnaacnttc naacnttcna acntt

25

<210> 195
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 含 CG 的多核苷酸

<221> modified_base
<222> 4, 11, 12, 18, 21
<223> n = 5-丙炔基-dU

<400> 195
tcgncaacg nnccgaganga n

21

<210> 196
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 含 CG 的多核苷酸

<221> modified_base
 <222> 8, 9, 16, 17, 24, 25
 <223> n = 5-丙炔基-dU

<400> 196
 tcgaacgnnc gaacgnncga acgnn 25

<210> 197
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 含 CG 的多核苷酸

<221> modified_base
 <222> 4, 5, 12, 13, 20, 21
 <223> n = 2-氨基-dA

<400> 197
 tcgnncgttc gnncgttcgn ncgtt 25

<210> 198
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 含 CG 的多核苷酸

<221> misc_feature
 <222> 4
 <223> n = 与 9 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature
 <222> 9
 <223> n = 与 4 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature
 <222> 5
 <223> n = 与 8 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

<222> 8

<223> n = 与 5 位的碱基互补的任何碱基

<400> 198

tcgnncgnnc ga

12

<210> 199

<211> 12

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<400> 199

tcgtcgaacg tt

12

<210> 200

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 200

cacttgggcc tgcgcttga

19

<210> 201

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 201

caattggaa tgcaacaact ttat

24

<210> 202

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 202

aggagcatg aaaacacatt tca

23

<210> 203

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 203

ttgctggtag tttatgacta attccaag

28

<210> 204

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 204

tggAACGTGT gaaAGCTGAG TCT

23

<210> 205

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 205

catctgctca ttctttcttt gca

23

<210> 206

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 206

cccaggagga gtttggcaa

19

<210> 207

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 207

tgctggatca tctcatggag g

21

<210> 208

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 208

ctggactggc aatagcaagc t

21

<210> 209

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 209

agagggtcaa tggcgttctg

20

<210> 210

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 210

ctgctcatgg cagccacttt

20

<210> 211

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 211

agcaggtgat tggaatggaa a

21

<210> 212

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 212

catcttgctg gttctgattt ga

22

<210> 213

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 213

tggtgctgat gcaggaacag

20

<210> 214

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 214

cttctgcctg ctgcactttt

20

<210> 215

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 215

ctgggccaga gggctgat

18

<210> 216

<211> 10

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<221> misc_feature

<222> 1

<223> n = 与 10 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

<222> 10

<223> n = 与 1 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

<222> 2

<223> n = 与 9 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

<222> 9

<223> n = 与 2 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

<222> 5

<223> n = 与 6 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

<222> (6)...(6)

<223> n = 与 5 位的碱基互补的任何碱基

<400> 216

nncgnncgnn

10

<210> 217

<211> 12

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<221> misc_feature

<222> 11, 12

<223> 11-12 位的碱基序列可存在或不存在

<221> misc_feature

<222> 1-12

<223> 1-12 位的碱基序列可出现 1-20 次

<221> misc_feature

<222> 1

<223> n = 与 10 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature
<222> 10

<223> n = 与 1 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature
<222> 2
<223> n = 与 9 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature
<222> (9)...(9)
<223> n = 与 2 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature
<222> (5)...(5)
<223> n = 与 6 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature
<222> (6)...(6)
<223> n = 与 5 位的碱基互补的任何碱基

<400> 217
nncgnncgnn cg 12

<210> 218
<211> 12
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 含 CG 的多核苷酸

<221> misc_feature
<222> 1
<223> n = 与 12 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature
<222> 12
<223> n = 与 1 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature
<222> 2
<223> n = 与 11 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature
<222> 11
<223> n = 与 2 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature
<222> 3
<223> n = 与 10 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature
 <222> (10)...(10)
 <223> n = 与 3 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature
 <222> (4)...(4)
 <223> n = 与 9 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature
 <222> (9)...(9)
 <223> n = 与 4 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature
 <222> (5)...(5)
 <223> n = 与 8 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature
 <222> (8)...(8)
 <223> n = 与 5 位的碱基互补的任何碱基

<400> 218
 nnnnncgnnn nn 12

<210> 219
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<221> misc_feature
 <222> 13, 14
 <223> 13-14 位的碱基序列可存在或不存在

<221> misc_feature
 <222> 1-14
 <223> 1-14 位的碱基序列可出现 1-20 次

<221> misc_feature

<222> 1
 <223> n = 与 12 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature
 <222> 12

<223> n = 与 1 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature
 <222> 2
 <223> n = 与 11 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature
 <222> (11)...(11)
 <223> n = 与 2 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature
 <222> (3)...(3)
 <223> n = 与 10 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature
 <222> (10)...(10)
 <223> n = 与 3 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature
 <222> (4)...(4)
 <223> n = 与 9 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature
 <222> (9)...(9)
 <223> n = 与 4 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature
 <222> (5)...(5)
 <223> n = 与 8 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature
 <222> (8)...(8)
 <223> n = 与 5 位的碱基互补的任何碱基

<400> 219
 nnnnncgnnn nncg 14

<210> 220
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<221> misc_feature
 <222> 9, 10
 <223> 9-10 位的碱基序列可能存在或不存在

<221> misc_feature
 <222> 1-10

<223> 1-10 位的碱基序列可出现 1-20 次

<221> misc_feature

<222> 1

<223> n = 与 8 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

<222> 8

<223> n = 与 1 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

<222> 2

<223> n = 与 7 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

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

<223> n = 与 2 位的碱基互补的任何碱基

<400> 220

nncgcgnncg

10

<210> 221

<211> 10

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<221> misc_feature

<222> 1

<223> n = 与 10 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

<222> 10

<223> n = 与 1 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

<222> 2

<223> n = 与 9 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

<222> 9

<223> n = 与 2 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

<222> 3

<223> n = 与 8 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

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

<223> n = 与 3 位的碱基互补的任何碱基

<400> 221

nnncgcgnnn

10

<210> 222

<211> 12

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<221> misc_feature

<222> 11, 12

<223> 11-12 位的碱基序列可存在或不存在

<221> misc_feature

<222> 1-12

<223> 1-12 位的碱基序列可出现 1-20 次

<221> misc_feature

<222> 1

<223> n = 与 10 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

<222> 10

<223> n = 与 1 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

<222> 2

<223> n = 与 9 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

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

<223> n = 与 2 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

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

<223> n = 与 8 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

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

<223> n = 与 3 位的碱基互补的任何碱基

<400> 222

nnncgcgnnn cg

12

<210> 223

<211> 10

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<221> misc_feature

<222> 9, 10

<223> 9-10 位的碱基序列可存在或不存在

<221> misc_feature

<222> 1-10

<223> 1-10 位的碱基序列可出现 1-20 次

<221> misc_feature

<222> 3

<223> n = 与 6 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

<222> 6

<223> n = 与 3 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

<222> 4

<223> n = 与 5 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

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

<223> n = 与 4 位的碱基互补的任何碱基

<400> 223

cgnnnncgcg

10

<210> 224

<211> 10

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<221> misc_feature

<222> 9, 10

<223> 9-10 位的碱基序列可存在或不存在

<221> misc_feature

<222> 1

<223> n = 与 8 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

<222> 8

<223> n = 与 1 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

<222> 2

<223> n = 与 7 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

<222> 7

<223> n = 与 2 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

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

<223> n = 与 6 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

<222> (6)...(6)

<223> n = 与 3 位的碱基互补的任何碱基

<400> 224

nnncgnnncg

10

<210> 225

<211> 10

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<221> misc_feature

<222> 1

<223> n = 与 10 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

<222> 10

<223> n = 与 1 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

<222> 2

<223> n = 与 9 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

<222> 9

<223> n = 与 2 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

<222> 3

<223> n = 与 8 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

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

<223> n = 与 3 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

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

<223> n = 与 7 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

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

<223> n = 与 4 位的碱基互补的任何碱基

<400> 225

nnnnncgnnnn

10

<210> 226

<211> 12

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<221> misc_feature

<222> 11, 12

<223> 11-12 位的碱基序列可存在或不存在

<221> misc_feature

<222> 1

<223> n = 与 10 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

<222> 10

<223> n = 与 1 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

<222> 2

<223> n = 与 9 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

<222> 9

<223> n = 与 2 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

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

<223> n = 与 8 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

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

<223> n = 与 3 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

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

<223> n = 与 7 位的碱基互补的任何碱基

<221> misc_feature

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

<223> n = 与 4 位的碱基互补的任何碱基

<400> 226

nnnnncgnnnn cg

12

<210> 227

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 含 CG 的多核苷酸

<221> misc_feature

<222> 4, 27

<223> n = 5' -DMT-N3-(tBu-SS-乙基)胸腺嘧啶-3' -亚磷酸胺

<400> 227

tcgnaacgtt cgaacgttcg aacgttn

27

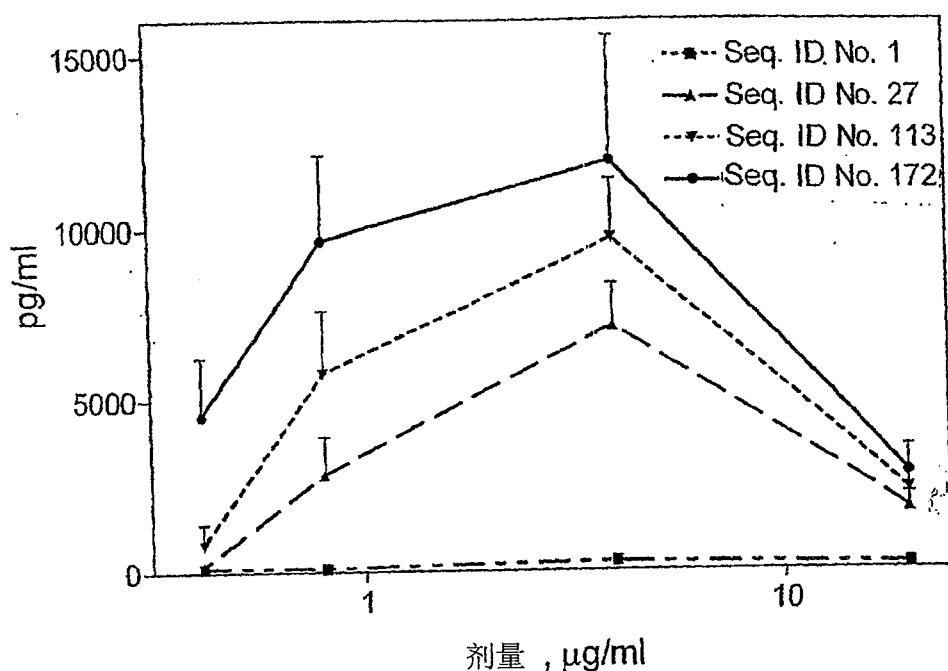
IFN- α 生成

图 1

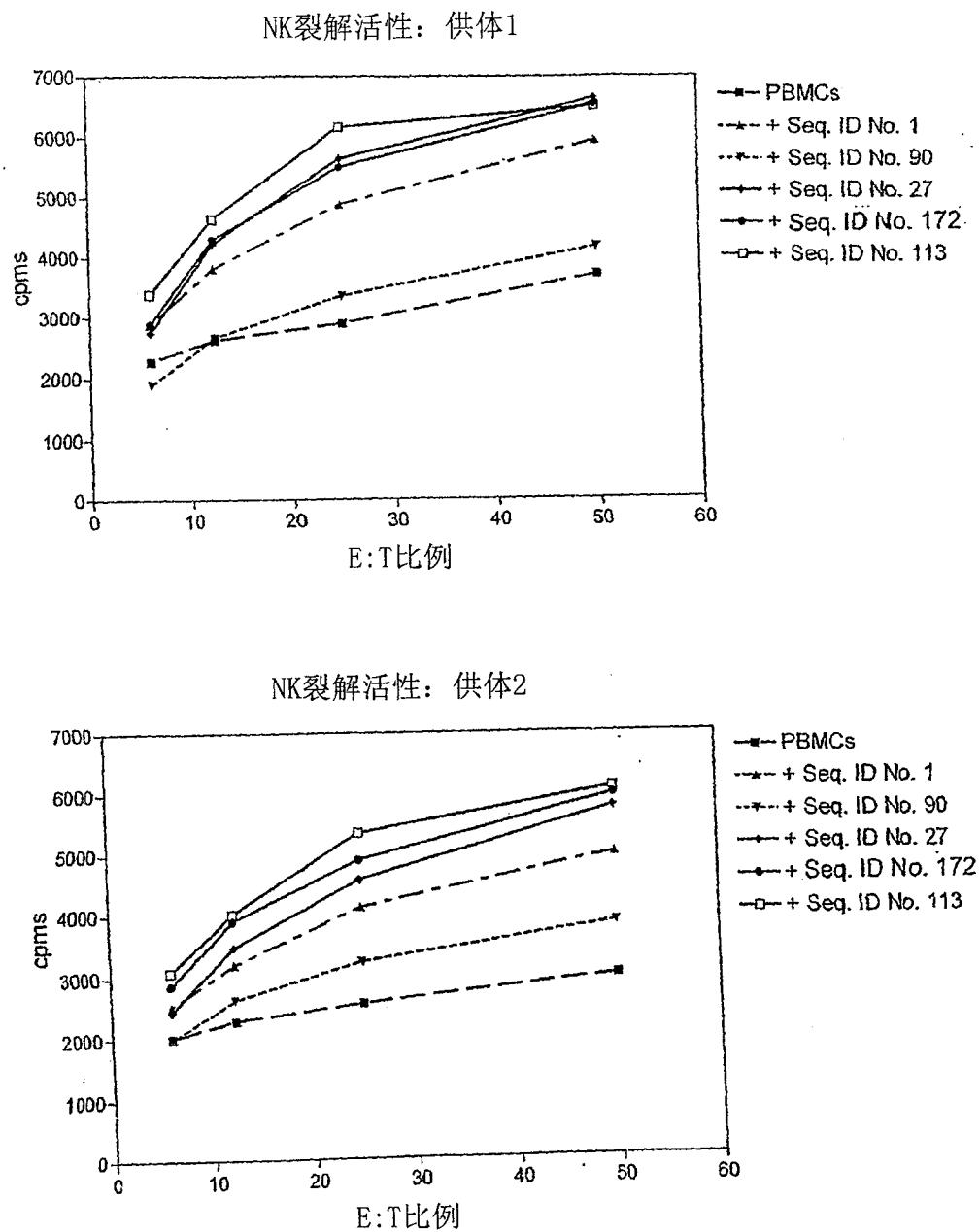


图 2