



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201026323 A1

(43)公開日：中華民國 99 (2010) 年 07 月 16 日

(21)申請案號：098141948

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 12 月 08 日

(51)Int. Cl. : A61K39/385 (2006.01)

A61K39/39 (2006.01)

A61K31/7088(2006.01)

(30)優先權：2008/12/09 美國 61/121,022

2009/05/28 美國 61/181,799

(71)申請人：輝瑞大藥廠(美國) PFIZER INC. (US)

美國

(72)發明人：戴維斯 希爾特 里恩 DAVIS, HEATHER LYNN (CA)；威瑞塔 瑞西尼 達哈

米卡 WEERATNA, RISINI DHAMMIKA (CA)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：32 項 圖式數：21 共 114 頁

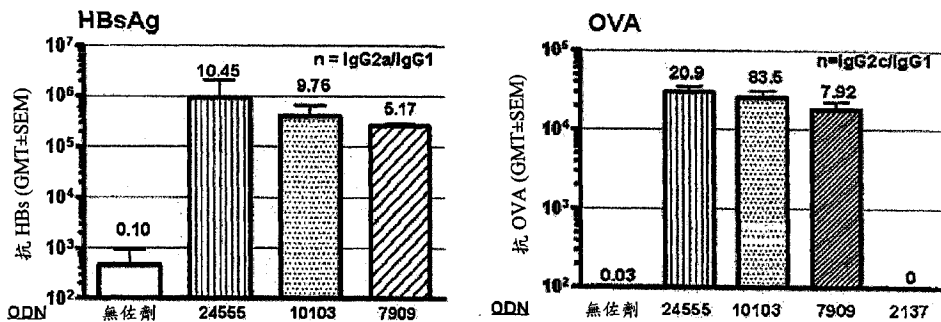
(54)名稱

免疫刺激性寡核苷酸

IMMUNOSTIMULATORY OLIGONUCLEOTIDES

(57)摘要

本發明係關於免疫刺激性寡核苷酸，及使用免疫刺激性寡核苷酸誘導抗原特異性免疫反應之方法。本發明另外關於包含免疫刺激性寡核苷酸及抗原及包含醫藥上可接受之載劑之疫苗。在一些實施例中，本發明免疫刺激性寡核苷酸包括一或多個經修飾之鍵聯。





(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201026323 A1

(43)公開日：中華民國 99 (2010) 年 07 月 16 日

(21)申請案號：098141948

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 12 月 08 日

(51)Int. Cl. : A61K39/385 (2006.01)

A61K39/39 (2006.01)

A61K31/7088(2006.01)

(30)優先權：2008/12/09 美國 61/121,022

2009/05/28 美國 61/181,799

(71)申請人：輝瑞大藥廠(美國) PFIZER INC. (US)

美國

(72)發明人：戴維斯 希爾特 里恩 DAVIS, HEATHER LYNN (CA)；威瑞塔 瑞西尼 達哈

米卡 WEERATNA, RISINI DHAMMIKA (CA)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：32 項 圖式數：21 共 114 頁

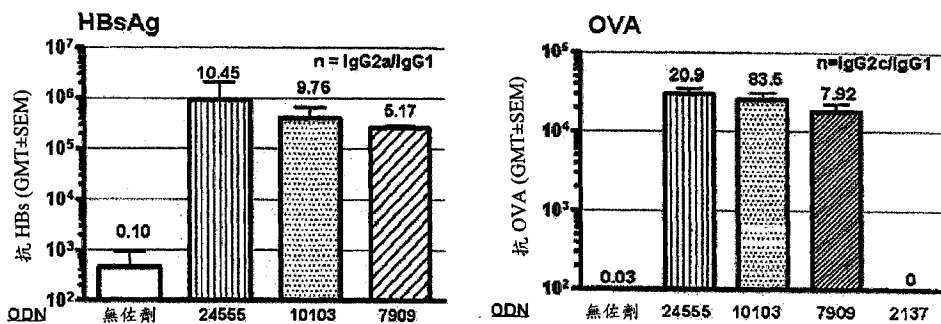
(54)名稱

免疫刺激性寡核苷酸

IMMUNOSTIMULATORY OLIGONUCLEOTIDES

(57)摘要

本發明係關於免疫刺激性寡核苷酸，及使用免疫刺激性寡核苷酸誘導抗原特異性免疫反應之方法。本發明另外關於包含免疫刺激性寡核苷酸及抗原及包含醫藥上可接受之載劑之疫苗。在一些實施例中，本發明免疫刺激性寡核苷酸包括一或多個經修飾之鍵聯。



## 六、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

本發明係關於免疫刺激性寡核苷酸及使用免疫刺激性寡核苷酸來誘導抗原特異性免疫反應之方法。

### 【先前技術】

細菌DNA具有活化B細胞及天然殺傷細胞之免疫刺激性效應，但脊椎動物DNA無此效應(Tokunaga, T.等人，1988, *Jpn. J. Cancer Res.* 79:682-686；Tokunaga, T.等人，1984, *JNCI* 72:955-962；Messina, J. P.等人，1991, *J. Immunol.* 147:1759-1764；且綜述於Krieg, 1998, *Applied Oligonucleotide Technology*, C. A. Stein及A. M. Krieg(編輯)，John Wiley and Sons公司，New York, N.Y.，第431-448頁中)。現已理解，細菌DNA之該等免疫刺激性效應係在特定鹼基背景中存在未甲基化CpG二核苷酸(CpG基序)之結果，該等基序常見於細菌DNA中，但其在脊椎動物DNA中經甲基化且低於適當比例(Krieg等人，1995 *Nature* 374:546-549；Krieg, 1999 *Biochim. Biophys. Acta* 1489:107-116)。可用含有該等CpG基序之合成寡去氧核苷酸(ODN)來模仿細菌DNA之免疫刺激性效應。該CpG ODN對人類及鼠類白細胞具有高刺激性效應，其誘導B細胞增殖；細胞因子及免疫球蛋白分泌；天然殺傷(NK)細胞溶解活性及IFN- $\gamma$ 分泌；及活化樹突細胞(DC)及其他抗原呈遞細胞以表現共刺激分子及分泌細胞因子，尤其在促進產生Th1樣T細胞反應中具有重要作用之Th1樣細胞因子。天然磷酸二酯骨架CpG ODN之該

等免疫刺激性效應具有高CpG特異性，此乃因該等效應在CpG基序發生甲基化變為GpC時或以其他方式消除或改變時顯著降低 (Krieg 等人，1995 Nature 374:546-549；Hartmann 等人，1999 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:9305-10)。

先前已報導，CpG寡核苷酸之免疫刺激性活性取決於CpG基序之數量、CG二核苷酸兩側之序列、CpG基序之位置及CpG基序之間之距離 (Ballas 等人，1996, J. Immunol. 157(5): 1840-5；Hartmann 等人，2000, J. Immunol., 164(3): 1617-24；Klinman 等人，2003, Clin. Exp. Immunol., 133(2): 227-32)。在本文中揭示3' CpG基序經移除之免疫刺激性寡核苷酸，其令人驚訝地仍保留其免疫刺激性活性。本文另外揭示包含該免疫刺激性寡核苷酸及抗原之疫苗及使用該疫苗之方法。

### 【發明內容】

在本發明各態樣中，提供包含核苷酸序列5' TCGTCG TTTTTCGGTGCTTTT 3' (SEQ ID NO:1)之免疫刺激性寡核苷酸。在一些實施例中，免疫刺激性寡核苷酸包含一或多個經修飾之鍵聯。在某些實施例中，免疫刺激性寡核苷酸包含一或多個硫代磷酸酯鍵聯。在某些實施例中，寡核苷酸之所有核苷酸間鍵聯皆為硫代磷酸酯鍵聯。在一些實施例中，免疫刺激性寡核苷酸包含至少一個親脂性經取代之核苷酸類似物及嘧啶-嘌呤二核苷酸。

在本發明各態樣中，提供包含抗原及包含核苷酸序列

SEQ ID NO:1之免疫刺激性寡核苷酸之疫苗，另外包含醫藥上可接受之載劑。在一些實施例中，免疫刺激性寡核苷酸係以可誘導抗原特異性免疫反應之有效量。在其他實施例中，所誘導抗原特異性免疫反應係Th1免疫反應。在一些實施例中，抗原係微生物抗原、自身抗原或成癮性物質。在其他實施例中，細菌抗原係與金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)有關，或細菌抗原係與引發齲齒之細菌有關。在其他實施例中，細菌係變異鏈球菌 (*Streptococcus mutans*)、齲齒鏈球菌 (*Streptococcus sobrinus*)、血鏈球菌 (*Streptococcus sanguis*)、嗜酸乳桿菌 (*Lactobacillus acidophilis*)、或黏性放線菌 (*Actinomyces viscosus*)。在其他實施例中，細菌抗原係與引發牙周病之細菌有關。在其他實施例中，細菌係牙齦卟啉單胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*)或伴放線放線桿菌 (*Actinobacillus actinomyces-comitans*)。在一些實施例中，病毒抗原係與呼吸道合胞病毒 (RSV)、單純疱疹病毒1、單純疱疹病毒2、人類免疫缺陷病毒-1 (HIV-1)或HIV-2有關。在其他實施例中，寄生性抗原係與引發瘧疾之寄生蟲有關。在一些實施例中，自身抗原係腫瘤抗原、與阿茲海默氏病 (Alzheimer's Disease)有關之抗原、針對人類抗體之抗原、或人類內源性逆轉錄病毒元件表現之抗原。在其他實施例中，腫瘤抗原係HER2、MAGE、NY-ESO、PSA、CEA或EGFR之變體形式。在抗原與阿茲海默氏病有關之其他實施例中，抗原係 $\tau$ -或 $\beta$ -澱粉樣蛋白。在一些實施例中，抗原係IgE。在一

些實施例中，抗原係與載體結合之菸鹼半抗原。在其他實施例中，與菸鹼半抗原結合之載體係白喉毒素(DT)。在其他實施例中，抗原為肽、重組蛋白、純化蛋白、完全殺死病原體、活減毒病毒或病毒載體、活減毒細菌或細菌載體、多糖、半抗原、或由質粒DNA編碼之抗原。

在一些實施例中，抗原與載體結合。在其他實施例中，載體係白喉毒素(DT)。在其他實施例中，載體係病毒樣顆粒。在其他實施例中，病毒樣顆粒係RNA噬菌體Q- $\beta$ 、B型肝炎表面抗原(HBsAg)、或B型肝炎核心抗原(HBcAg)。在一些實施例中，疫苗另外包含一或多種佐劑。在其他實施例中，佐劑係類鐸受體(Toll-like receptor)(TLR)之激動劑，該受體並非TLR 9。在其他實施例中，激動劑係針對TLR 3。在其他實施例中，TLR 3激動劑係經穩定聚I:C。在某些實施例中，激動劑係針對TLR 4。在其他實施例中，TLR 4激動劑係脂多糖(LPS)衍生物。在其他實施例中，LPS衍生物係MPL或GLA。在其他實施例中，激動劑係針對TLR 5。在其他實施例中，TLR 5激動劑係鞭毛蛋白。在某些實施例中，激動劑係針對TLR 7或8。在其他實施例中，TLR 7或8激動劑係咪唑并喹啉家族之小分子。在其他實施例中，佐劑係鋁鹽。在其他實施例中，鋁鹽係氫氧化鋁。在某些實施例中，佐劑係免疫刺激性複合物(ISCOM)。在其他實施例中，佐劑係水包油或油包水乳液。在某些實施例中，佐劑係脂質體。在其他實施例中，佐劑係遞送系統。在其他實施例中，遞送系統係奈米顆粒

或微粒。

在某些實施例中，免疫刺激性寡核苷酸包含一或多個經修飾之鍵聯。在其他實施例中，免疫刺激性寡核苷酸包含一或多個硫代磷酸酯鍵聯。在某些實施例中，寡核苷酸之所有核苷酸間鍵聯皆為硫代磷酸酯鍵聯。在其他實施例中，免疫刺激性寡核苷酸包含至少一個親脂性經取代核苷酸類似物及嘧啶-嘌呤二核苷酸。在某些實施例中，疫苗經調配以供投與。在其他實施例中，疫苗經調配以供經由非經腸途徑來投與，其中該非經腸途徑係肌內、皮下、皮內、靜脈內或腹膜內。在其他實施例中，疫苗經調配以供經由局部途徑投與，其中該局部途徑係皮膚、經皮或黏膜表面。在其他實施例中，黏膜途徑係經口、鼻內、陰道內、直腸內、頰內或眼內。

在本發明之某些態樣中，在有需要之個體中誘導抗原特異性免疫反應之方法包含以有效量向個體投與抗原及包含核苷酸序列 SEQ ID NO:1 之免疫刺激性寡核苷酸以在該個體中誘導抗原特異性免疫反應。在某些實施例中，抗原係微生物抗原、自身抗原或成癮性物質。在其他實施例中，微生物抗原係細菌抗原、病毒抗原或寄生性抗原。在其他實施例中，細菌抗原係與金黃色葡萄球菌有關，或細菌抗原係與引發齲齒之細菌有關。在其他實施例中，細菌係變異鏈球菌、齲齒鏈球菌、血鏈球菌、嗜酸乳桿菌、或黏性放線菌。在其他實施例中，細菌抗原係與引發牙周病之細菌有關。在其他實施例中，細菌係牙齦卟啉單胞菌或伴放

線放線桿菌。在某些實施例中，病毒抗原係與呼吸道合胞病毒(RSV)、單純疱疹病毒1、單純疱疹病毒2、人類免疫缺陷病毒-1 (HIV-1)或HIV-2有關。在其他實施例中，寄生性抗原係與引發瘧疾之寄生蟲有關。在某些實施例中，自身抗原係腫瘤抗原、與阿茲海默氏病有關之抗原、針對人類抗體之抗原、或自人類內源性逆轉錄病毒元件表現之抗原。在其他實施例中，腫瘤抗原係HER2、MAGE、NY-ESO、PSA、CEA或EGFR之變體形式。在抗原與阿茲海默氏病有關之其他實施例中，抗原係 $\tau$ -或 $\beta$ -澱粉樣蛋白。在某些實施例中，抗原係IgE。在某些實施例中，抗原係與載體結合之菸鹼半抗原。在其他實施例中，與菸鹼半抗原結合之載體係白喉毒素(DT)。在其他實施例中，抗原為肽、重組蛋白、純化蛋白、完全殺死病原體、減毒活病毒或病毒載體、減毒活細菌或細菌載體、多糖、半抗原、或藉由質粒DNA來編碼。

在某些實施例中，抗原與載體結合。在其他實施例中，載體係白喉毒素(DT)。在其他實施例中，載體係病毒樣顆粒。在其他實施例中，病毒樣顆粒係RNA噬菌體Q- $\beta$ 、B型肝炎表面抗原(HBsAg)、或B型肝炎核心抗原(HBcAg)。在某些實施例中，疫苗另外包含一或多種佐劑。在其他實施例中，佐劑係類鐸受體(TLR)之激動劑，該受體並非TLR 9。在其他實施例中，激動劑係針對TLR 3。在其他實施例中，TLR 3激動劑係經穩定聚I:C。在某些實施例中，激動劑係針對TLR 4。在其他實施例中，TLR 4激動劑係脂多糖

(LPS)衍生物。在其他實施例中，LPS衍生物係MPL或GLA。在其他實施例中，激動劑係針對TLR 5。在其他實施例中，TLR 5激動劑係鞭毛蛋白。在某些實施例中，激動劑係針對TLR 7或8。在其他實施例中，TLR 7或8激動劑係咪唑并喹啉家族之小分子。在其他實施例中，佐劑係鋁鹽。在其他實施例中，鋁鹽係氫氧化鋁。在某些實施例中，佐劑係免疫刺激性複合物(ISCOM)。在其他實施例中，佐劑係水包油或油包水乳液。在某些實施例中，佐劑係脂質體。在其他實施例中，佐劑係遞送系統。在其他實施例中，遞送系統係奈米顆粒或微粒。

在某些實施例中，免疫刺激性寡核苷酸包含一或多個經修飾之鍵聯。在其他實施例中，免疫刺激性寡核苷酸包含一或多個硫代磷酸酯鍵聯。在某些實施例中，寡核苷酸之所有核苷酸間鍵聯皆為硫代磷酸酯鍵聯。在其他實施例中，免疫刺激性寡核苷酸包含至少一個親脂性經取代核苷酸類似物及嘧啶-嘌呤二核苷酸。在某些實施例中，抗原及/或免疫刺激性寡核苷酸經調配以供投與。在其他實施例中，抗原及/或免疫刺激性寡核苷酸經調配以供經由非經腸途徑投與，其中該非經腸途徑係肌內、皮下、皮內、靜脈內或腹膜內。在其他實施例中，抗原及/或免疫刺激性寡核苷酸經調配以供經由局部途徑投與，其中該局部途徑係皮膚、經皮或黏膜表面。在其他實施例中，黏膜途徑係經口、鼻內、陰道內、直腸內、頰內或眼內。在某些實施例中，抗原及免疫刺激性寡核苷酸係經由相同、類似或

不同途徑來投與。在其他實施例中，抗原及免疫刺激性寡核苷酸係結合、同時或分別投與。在其他實施例中，抗原及免疫刺激性寡核苷酸之投與彼此相隔24小時以內。在某些實施例中，個體係藉由獸醫學治療之物種。在其他實施例中，個體係非齧齒動物個體。在某些實施例中，個體為人類。

### 序列說明

SEQ ID NO:1-免疫刺激性寡核苷酸ODN CPG 24555之核苷酸序列。

SEQ ID NO:2-免疫刺激性寡核苷酸CPG 10103之核苷酸序列。

SEQ ID NO:3-免疫刺激性寡核苷酸CPG 7909之核苷酸序列。

SEQ ID NO:4-無CpG寡核苷酸22881之核苷酸序列。

SEQ ID NO:5-無CpG寡核苷酸2137之核苷酸序列。

### 【實施方式】

本發明各態樣係部分基於以下令人驚訝地事實：自免疫刺激性寡核苷酸移除CpG基序對免疫刺激性寡核苷酸提高抗原特異性免疫反應之能力無負面影響。令人驚訝地，亦已發現移除該CpG基序使得可生成不同抗原特異性T細胞群。具體而言，已發現該抗原特異性T細胞群包含更多IFN- $\gamma$ 分泌T細胞及更多多功能T細胞。

在本發明各態樣中，免疫刺激性寡核苷酸具有核酸序列5' TCGTCGTTTTTCGGTGCTTTT 3' (ODN CPG 24555；SEQ ID NO:1)。SEQ ID NO:1之免疫刺激性寡核苷酸核酸序列與先前報導之免疫刺激性寡核苷酸(ODN 10103) 5'

TCGTCGTTTTTCGGTCGTTTT 3' (SEQ ID NO:2)之不同之處在於最靠近3'-端之CG二核苷酸之顛倒。該兩種免疫刺激性寡核苷酸之活性具有驚人相似性，此乃因先前已報導CpG寡核苷酸之免疫刺激性活性取決於CpG基序之數量、CG二核苷酸兩側之序列、CpG基序之位置及CpG基序之間之距離(Ballas等人，1996, *J. Immunol.* 157(5): 1840-5；Hartmann等人，2000, *J. Immunol.*, 164(3): 1617-24；Klinman等人，2003, *Clin. Exp. Immunol.*, 133(2): 227-32)。如根據先前揭示內容所預期，移除免疫刺激性寡核苷酸CPG ODN 24555 (SEQ ID NO:1)中最靠近3'-端之CG二核苷酸不會對此免疫刺激性寡核苷酸提高抗原特異性免疫反應之能力產生負面影響。CPG ODN 24555表現與CPG ODN 10103相比類似的、且在某些情況下增強之免疫刺激性活性。

此外，已發現與CPG ODN 10103相比，CPG ODN 24555可誘導不同抗原特異性T細胞群(參見圖8、表1及表2)。具體而言，已令人驚訝地發現，與使用CPG ODN 10103或CPG ODN 7909生成之抗原特異性T細胞群相比，使用CPG ODN 24555作為佐劑生成之抗原特異性T細胞群(具體而言抗原特異性CD4<sup>+</sup> T細胞群)包含更多IFN- $\gamma$ 分泌T細胞及更多多功能T細胞。

舉例而言，與用CpG ODN 10103所獲得抗原特異性CD4<sup>+</sup> T細胞群相比，獲得更高比例之產生IFN- $\gamma$ 之抗原特異性CD4<sup>+</sup> T細胞。與用CPG ODN 10103或CPG ODN 7909獲得之抗原特異性CD4<sup>+</sup> T細胞群相比，亦可獲得更高比

例之產生IFN- $\gamma$ 及TNF- $\alpha$ 二者、IFN- $\gamma$ 及IL-2二者或TNF- $\alpha$ 及IL-2二者之多功能抗原特異性CD4+ T細胞、或甚至分泌IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 及IL-2之三細胞因子產生細胞。與用CPG ODN 10103所獲得抗原特異性CD8+ T細胞群相比，同樣獲得較高比例之產生TNF- $\alpha$ 之抗原特異性CD8+ T細胞。與用CPG ODN 10103或CPG ODN 7909所獲得抗原特異性CD8+ T細胞群相比，亦獲得較高比例之產生IFN- $\gamma$ 及IL-2二者、TNF- $\alpha$ 及IL-2二者之抗原特異性CD8+ T細胞、或甚至分泌IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 及IL-2之三細胞因子產生細胞。

近期已揭示T細胞在免疫原性方面之多功能性的重要意義。具體而言，在某些情形下，抗原特異性T細胞在產生趨化因子(例如IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 及IL-2)方面之多功能性與其自衛力相關(例如，參見Harari A等人，*Immunol Rev.* 2006; 211:236-54, Makedonas G及Betts MR. *Springer Semin Immunopathol.* 2006; 28(3):209-19, Precopio ML等人，*J Exp Med.* 2007 204(6):1405-16，Xu R等人，*Vaccine.* 2008; 26(37):4819-29)，人們認為此乃因其效應子功能優於僅分泌單一細胞因子之T細胞所致。

有利地，CPG ODN 24555在用作佐劑時使得可生成多功能抗原特異性T細胞群，此在疫苗設定中具有重要意義。

免疫刺激性核酸可為雙鏈或單鏈。一般而言，雙鏈分子在體內更穩定，而單鏈分子具有提高之免疫活性。在本發明之某些態樣中，核酸較佳為單鏈；且在其他態樣中，核酸較佳為雙鏈。

術語「核酸」及「寡核苷酸」在本文中可互換使用，其意指多個核苷酸，即包含與磷酸酯基及可交換有機鹼相連之糖(例如核糖或去氧核糖)之分子，該有機鹼為經取代嘧啶(例如胞嘧啶(C)、胸苷(T)或尿嘧啶(U))或經取代嘌呤(例如腺嘌呤(A)或鳥嘌呤(G))。本文所用該術語係指寡去氧核糖核苷酸、寡核糖核苷酸(即去除磷酸酯基之多核苷酸)及任何其他含有有機鹼聚合物。核酸分子可自現有核酸來源(例如基因組DNA或cDNA)來獲得，但較佳為合成核酸分子(例如藉由核酸合成來產生)。

在本發明各態樣中，免疫刺激性寡核苷酸可相對於天然RNA及DNA涵蓋各種化學修飾及取代，涉及核苷間磷酸二酯橋、 $\beta$ -D-核糖單元及/或天然核苷鹼基(腺嘌呤、鳥嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶、尿嘧啶)。化學修飾之實例為熟習此項技術者已知且闡述於(例如)以下文獻中：Uhlmann E. 等人(1990), Chem. Rev. 90:543；「Protocols for Oligonucleotides and Analogs」Synthesis and Properties & Synthesis and Analytical Techniques, S. Agrawal編輯，Humana Press, Totowa, USA 1993；Crooke, S.T.等人(1996) Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 36:107-129；及Hunziker J. 等人(1995), Mod. Synth. Methods 7:331-417。本發明寡核苷酸可具有一或多處修飾，其中各修飾與具有由天然DNA或RNA組成之相同序列之寡核苷酸相比位於特定核苷間磷酸二酯橋處及/或位於特定 $\beta$ -D-核糖單元處及/或位於特定天然核苷鹼基位置處。

在本發明各態樣中，寡核苷酸可包含一或多處修飾。該等修飾可選自：a)用經修飾核苷間橋替代位於核苷3'及/或5'末端之核苷間磷酸二酯橋，b)用去磷橋替代位於核苷3'及/或5'末端之磷酸二酯橋，c)用另一單元替代糖磷酸酯骨架中之糖磷酸酯單元，d)用經修飾糖單元替代 $\beta$ -D-核糖單元，及e)替代天然核苷鹼基。

核酸亦包括經取代嘌呤及嘧啶，例如C-5丙炔嘧啶及7-去氮-7-經取代嘌呤修飾鹼基(Wagner等人，1996, Nat. Biotechnol. 14:840-4)。嘌呤及嘧啶包括(但不限於)腺嘌呤、胞嘧啶、鳥嘌呤、胸苷、5-甲基胞嘧啶、2-氨基嘌呤、2-氨基-6-氯嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、次黃嘌呤、及其他天然及非天然存在之核鹼基、經取代及未經取代之芳香族部分。其他該等修飾為熟習此項技術者所熟知。

經修飾鹼基係化學上與通常在DNA及RNA中所發現天然存在鹼基(例如T、C、G、A及U)不同之任何鹼基，但其與該等天然存在鹼基共用基本化學結構。經修飾核苷鹼基可選自(例如)次黃嘌呤、二氫尿嘧啶、假尿嘧啶、2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、5-氨基尿嘧啶、5-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-烷基尿嘧啶、5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-烯基尿嘧啶、5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-炔基尿嘧啶、5-(羥甲基)尿嘧啶、5-氯尿嘧啶、5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-羥基胞嘧啶、5-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-烷基胞嘧啶、5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-烯基胞嘧啶、5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-炔基胞嘧啶、5-氯胞嘧啶、5-氟胞嘧啶、5-溴胞嘧啶、N<sup>2</sup>-二甲基鳥嘌呤、2,4-二氨基-嘌呤、8-氮雜嘌呤、經取代7-去氮嘌呤、較佳7-去氮-7-取代及/或7-去氮-

8-經取代嘧啶、5-羥基甲基胞嘧啶、N4-烷基胞嘧啶(例如N4-乙基胞嘧啶)、5-羥基去氧胞苷、5-羥甲基去氧胞苷、N4-烷基去氧胞苷(例如N4-乙基去氧胞苷)、6-硫去氧鳥苷、硝基吡咯之去氧核糖核苷、C5-丙炔基嘧啶、二胺基嘧啶(例如2,6-二胺基嘧啶)、肌苷、5-甲基胞嘧啶、2-胺基嘧啶、2-胺基-6-氯嘧啶、次黃嘧啶或天然核苷鹼基之其他修飾。此列表意欲具有實例性且不欲理解為具有限制性。

在本發明之某些態樣中，本文所述免疫刺激性寡核苷酸之CpG二核苷酸較佳未甲基化。未甲基化CpG基序係未甲基化胞嘧啶-鳥嘧啶二核苷酸序列(即未甲基化5'胞嘧啶以及隨後之3'鳥苷，且藉由磷酸鍵來連接)。在其他態樣中，CpG基序經甲基化。甲基化CpG基序係甲基化胞嘧啶-鳥嘧啶二核苷酸序列(即甲基化5'胞嘧啶以及隨後之3'鳥苷，且其藉由磷酸鍵來連接)。

在本發明之某些態樣中，免疫刺激性寡核苷酸可含有經修飾胞嘧啶。經修飾胞嘧啶係胞嘧啶之天然存在或非天然存在之嘧啶鹼基類似物，其可替代此鹼基且不損害寡核苷酸之免疫刺激性活性。經修飾胞嘧啶包括(但不限於)5-取代胞嘧啶(例如5-甲基-胞嘧啶、5-氟-胞嘧啶、5-氯-胞嘧啶、5-溴-胞嘧啶、5-碘-胞嘧啶、5-羥基-胞嘧啶、5-羥甲基-胞嘧啶、5-二氟甲基-胞嘧啶、及未經取代或經取代5-炔基-胞嘧啶)、6-取代胞嘧啶、N4-取代胞嘧啶(例如N4-乙基-胞嘧啶)、5-氮雜-胞嘧啶、2-巯基-胞嘧啶、異胞嘧啶、假異胞嘧啶、具有稠環系統之胞嘧啶類似物(例如N,N'-丙

烯胞嘧啶或吩噁嗪)。某些較佳胞嘧啶包括5-甲基-胞嘧啶、5-氟-胞嘧啶、5-羥基-胞嘧啶、5-羥甲基-胞嘧啶、及N4-乙基-胞嘧啶。在本發明另一實施例中，胞嘧啶鹼基經通用鹼基(例如3-硝基吡咯、P-鹼基)、芳香環系統(例如氟苯或二氟苯)或氫原子(無鹼基間隔子(dSpacer))取代。在某些態樣中，免疫刺激性寡核苷酸可含有尿嘧啶及/或其衍生物(例如5-氟-尿嘧啶、5-溴-尿嘧啶、5-溴乙烯基-尿嘧啶、4-硫-尿嘧啶、5-羥基-尿嘧啶、5-丙炔基-尿嘧啶)。

在本發明之某些態樣中，免疫刺激性寡核苷酸可含有經修飾鳥嘌呤。經修飾鳥嘌呤係鳥嘌呤之天然存在或非天然存在嘌呤鹼基類似物，其可替代此鹼基而不損害寡核苷酸之免疫刺激性活性。經修飾鳥嘌呤包括(但不限於)7-去氫鳥嘌呤、7-去氫-7-取代鳥嘌呤、次黃嘌呤、N2-取代鳥嘌呤(例如N2-甲基-鳥嘌呤)、5-胺基-3-甲基-3H,6H-噻唑并[4,5-d]嘧啶-2,7-二酮、2,6-二胺基嘌呤、2-胺基嘌呤、嘌呤、嘧啶、腺嘌呤、經取代腺嘌呤(例如N6-甲基-腺嘌呤、8-側氧基-腺嘌呤)、8-取代鳥嘌呤(例如8-羥基鳥嘌呤或8-溴鳥嘌呤)、及6-硫鳥嘌呤。在本發明另一實施例中，鳥嘌呤鹼基經通用鹼基(例如4-甲基-嘧啶、5-硝基-嘧啶、或K-鹼基)、芳香環系統(例如苯并咪唑或二氯-苯并咪唑、1-甲基-1H-[1,2,4]三唑-3-甲醯胺)或氫原子(無鹼基間隔子)取代。

在某些態樣中，寡核苷酸可包括經修飾核苷酸間鍵聯。該等經修飾之鍵聯可部分抵抗降解(例如經穩定)。「經穩

定核酸分子」應意指核酸分子對體內降解(例如經由外切或內切核酸酶)具有相對強抗性。穩定性可隨長度或二級結構而變化。長數萬至數十萬鹼基之核酸對體內降解之抗性相對較強。對於較短核酸而言，二級結構可穩定且增強其效應。莖環結構之形成可穩定核酸分子。舉例而言，若核酸之3'末端對上游區域具有自身互補性而使其可向後摺疊並形成莖環結構，則該核酸可變穩定且表現更強活性。

核酸穩定亦可經由磷酸酯骨架修飾來達成。在某些實施例中，具有硫代磷酸酯鍵聯之寡核苷酸可提供最大活性且保護寡核苷酸免受細胞內外切及內切核酸酶降解。

對於體內應用而言，核酸較佳對降解(例如經由內切及外切核酸酶)具有相對強抗性。已證實，修飾核酸骨架可在體內投與時增強核酸活性。諸如莖環等二級結構可針對降解穩定核酸。或者，核酸穩定可經由磷酸酯骨架修飾來達成。較佳經穩定核酸具有至少部分硫代磷酸酯修飾骨架。硫代磷酸酯可使用採用氨基磷酸酯或H-膦酸酯化學物質之自動化技術來合成。芳基-及烷基-膦酸酯可如(例如)美國專利第4,469,863號中所述來製備；且烷基磷酸三酯(其中荷電氧部分如美國專利第5,023,243號及歐洲專利第092,574號所述經烷基化)可藉由自動化固相合成使用市售試劑來製備。人們已闡述製備其他DNA骨架修飾及取代之方法(Uhlmann, E.及Peyman, A. (1990), Chem. Rev. 90:544; Goodchild, J. (1990) Bioconjugate Chem. 1:165)。具有CpG基序之2'-O-甲基核酸亦引發免疫活化，如乙氧基修飾之

CpG核酸即如此。事實上，尚未發現任何骨架修飾可完全消除CpG效應，但可藉由用5-甲基C替代C來顯著降低該效應。具有硫代磷酸酯鍵聯之構造提供最大活性且保護核酸免受細胞內外切及內切核酸酶降解。其他經修飾核酸包括磷酸二酯修飾核酸、磷酸二酯與硫代磷酸酯核酸之組合、甲基膦酸酯、甲基硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、p-乙氧基、及其組合。該等組合中之任一者及其對免疫細胞之特定效應關於CpG核酸之更多細節論述於PCT公開專利申請案PCT/US95/01570 (WO 96/02555)及PCT/US97/19791 (WO 98/18810)以及於2001年2月27日頒佈之美國專利第6,194,388 B1號及於2001年5月29日頒佈之美國專利第6,239,116 B1號中。據信該等經修飾核酸因核酸酶抗性增強、細胞吸收提高、蛋白質結合增強及/或細胞內定位改變而可表現更強刺激性活性。

對於體內投與，核酸可與某種分子相連，該分子可導致與靶細胞(例如B-細胞、單核細胞或天然殺傷(NK)細胞)表面之較高親和力結合及/或提高靶細胞之細胞吸收，從而形成「核酸遞送複合體」。可使用業內熟知之技術使核酸以離子方式或共價方式與適宜分子相連。可使用多種偶合或交聯劑，例如蛋白質A、碳二亞胺、或3-(2-吡啶基二硫)丙酸N-琥珀醯亞胺基酯(SPDP)。或者可使用熟知技術將核酸囊封於脂質體或病毒體中。

其他經穩定核酸包括(但不限於)非離子型DNA類似物，例如烷基-及芳基-磷酸酯(其中荷電膦酸酯氧經烷基或芳基

替代)、磷酸二酯及烷基磷酸三酯(其中荷電氣部分經烷基化)。含有二醇(例如四乙二醇或六乙二醇)之核酸亦已在一個或兩個末端處表現實質上可抵抗核酸酶降解。在某些實施例中,本發明免疫刺激性寡核苷酸可包括至少一個親脂性經取代核苷酸類似物及/或嘧啶-嘌呤二核苷酸。

寡核苷酸可具有一個或兩個可及5'末端。可產生具有兩個可及5'末端之經修飾寡核苷酸,其係藉由(例如)經由3'-3'鍵聯連接兩個寡核苷酸以生成具有一個或兩個可及5'末端之寡核苷酸來達成。3'-3'鍵聯可為磷酸二酯、硫代磷酸酯或任何其他經修飾核苷間橋。達成該等鍵聯之方法為業內所知。例如,該等鍵聯已闡述於以下文獻中: Seliger, H.等人, Oligonucleotide analogs with terminal 3'-3'- and 5'-5'-internucleotidic linkages as antisense inhibitors of viral gene expression, *Nucleosides & Nucleotides* (1991), 10(1-3), 469-77; 及 Jiang等人, Pseudo-cyclic oligonucleotides: *in vitro* and *in vivo* properties, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (1999), 7(12), 2727-2735。

此外,可使用諸如三-或四-乙二醇磷酸酯部分等額外間隔子來製備3'末端核苷之間之鍵聯并非磷酸二酯、硫代磷酸酯或其他經修飾橋之3'-3'連接寡核苷酸(Durand, M.等人, Triple-helix formation by an oligonucleotide containing one (dA)<sub>12</sub> and two (dT)<sub>12</sub> sequences bridged by two hexaethylene glycol chains, *Biochemistry* (1992), 31(38), 9197-204, 美國專利第5,658,738號及美國專利第5,668,265

號)。或者，可使用標準亞磷醯胺化學自乙二醇、丙二醇或自無鹼基去氧核糖(無鹼基間隔子)單元衍生出非核苷酸連接子(Fontanel, Marie Laurence等人, Sterical Recognition by T4 polynucleotide kinase of non-nucleosidic moieties 5'-attached to oligonucleotides; Nucleic Acids Research (1994), 22(11), 2022-7)。可一次或多次納入非核苷酸連接子，或可將其彼此組合，從而使得欲連接之兩個寡核苷酸的3'末端之間可存在任一期望距離。

可藉由經修飾核苷間橋來替代位於核苷3'及/或5'末端之核苷間磷酸二酯橋，其中經修飾核苷間橋選自(例如)硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>-氨基磷酸酯、硼烷磷酸酯、 $\alpha$ -羥基苄基磷酸酯、磷酸-(C<sub>1</sub>-C<sub>21</sub>)-O-烷基酯、磷酸-[(C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>)芳基-(C<sub>1</sub>-C<sub>21</sub>)-O-烷基]酯、(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)烷基磷酸酯及/或(C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>)芳基磷酸酯橋、(C<sub>7</sub>-C<sub>12</sub>)- $\alpha$ -羥甲基-芳基(例如WO 95/01363中所揭示)，其中(C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>)芳基、(C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>)芳基及(C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>)芳基視需要經鹵素、烷基、烷氧基、硝基、氰基取代且其中R<sup>1</sup>及R<sup>2</sup>彼此獨立地為氫、(C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>)-烷基、(C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>)-芳基、(C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>)-芳基、(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)-烷基，較佳為氫、(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)-烷基，較佳為(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-烷基及/或甲氧基乙基，或R<sup>1</sup>與R<sup>2</sup>與其所連接之氮原子一起形成可另外含有來自O、S及N之群之另一雜原子之5員或6員雜環。

藉由去磷橋來替代位於核苷3'及/或5'末端之磷酸二酯橋(去磷橋闡述於(例如)以下文獻中：Uhlmann E.及Peyman A., 「Methods in Molecular Biology」，第20卷，

「 Protocols for Oligonucleotides and Analogs 」, S. Agrawal 編輯, Humana Press, Totowa 1993, 第16章, 第355 ff頁), 其中去磷橋選自(例如)以下去磷橋: 甲縮醛、3'-硫代甲縮醛、甲基羥胺、胍、亞甲基二甲基-亞胍基、二甲砜及/或甲矽烷基。

本發明免疫刺激性寡核苷酸可視需要具有嵌合骨架。嵌合骨架係包含不止一種類型之鍵聯之骨架。在一實施例中, 嵌合骨架可表示為下式:  $5' Y_1 N_1 Z N_2 Y_2 3'$ 。  $Y_1$  及  $Y_2$  係具有1至10個核苷酸之核酸分子。  $Y_1$  及  $Y_2$  各自包括至少一個經修飾核苷酸間鍵聯。由於嵌合寡核苷酸中至少2個核苷酸包括骨架修飾, 故該等核酸係一類經穩定免疫刺激性核酸之實例。

對於嵌合寡核苷酸而言, 應認為  $Y_1$  與  $Y_2$  彼此獨立。此意指在同一分子中,  $Y_1$  及  $Y_2$  可各自具有或不具有彼此不同之序列及彼此不同之骨架鍵聯。在某些實施例中,  $Y_1$  及/或  $Y_2$  具有3至8個核苷酸。  $N_1$  及  $N_2$  係具有0至5個核苷酸之核酸分子, 只要  $N_1 Z N_2$  總計具有至少6個核苷酸即可。  $N_1 Z N_2$  之核苷酸具有磷酸二酯骨架且不包括具有經修飾骨架之核酸。  $Z$  係免疫刺激性核酸基序, 其較佳選自本文所列舉之免疫刺激性寡核苷酸。

式  $Y_1 N_1 Z N_2 Y_2$  之中心核苷酸 ( $N_1 Z N_2$ ) 具有磷酸二酯核苷酸間鍵聯, 且  $Y_1$  及  $Y_2$  具有至少一個經修飾核苷酸間鍵聯, 但可能具有不止一個經修飾核苷酸間鍵聯, 或甚至可具有所有經修飾核苷酸間鍵聯。在較佳實施例中,  $Y_1$  及/或  $Y_2$  具

有至少兩個或2至5個經修飾核苷酸間鍵聯，或 $Y_1$ 具有5個經修飾核苷酸間鍵聯且 $Y_2$ 具有2個經修飾核苷酸間鍵聯。在某些實施例中，經修飾核苷酸間鍵聯係硫代磷酸酯修飾之鍵聯、二硫代磷酸酯鍵聯或p-乙氧基修飾之鍵聯。

核酸亦包括骨架糖共價連接至除2'位之羥基及5'位之磷酸酯基以外的低分子量有機基團之核酸。因此，經修飾核酸可包括2'-O-烷基化核糖基團。此外，經修飾核酸可包括諸如阿拉伯糖或2'-氟阿拉伯糖等糖來代替核糖。因此，各核酸可具有不同骨架組成，由此含有任何可能組合之連接在一起之聚合物單元，例如肽-核酸(其具有胺基酸骨架及核酸鹼基)。在某些實施例中，各核酸具有相同骨架組成。

糖磷酸酯骨架中之糖磷酸酯單元(即 $\beta$ -D-核糖及核苷間磷酸二酯橋一起形成糖磷酸酯單元)(即糖磷酸酯骨架係由糖磷酸酯單元組成)可藉由另一單元來替代，其中該另一單元適合(例如)構建「嗎啉並衍生物」寡聚體(例如，如Stirchak E. P.等人(1989)，*Nucleic Acid Res.* 17:6129-41中所述)，亦即(例如)藉由嗎啉並衍生物來替代；或構建聚醯胺核酸(「PNA」；例如，如Nielsen P. E.等人(1994)，*Bioconjug. Chem.* 5:3-7中所述)，亦即(例如)藉由PNA骨架單元(例如2-胺基乙基甘胺酸)來替代。寡核苷酸可具有其他碳水化合物骨架修飾及替代，例如具有磷酸酯基(PHONA)之肽核酸、鎖核酸(LNA)、及骨架區段具有烷基連接子或胺基連接子之寡核苷酸。烷基連接子可具有支鏈

或無支鏈，經取代或未經取代，且為對掌純或外消旋混合物。

$\beta$ -核糖單元或 $\beta$ -D-2'-去氧核糖單元可藉由經修飾糖單元來替代，其中該經修飾糖單元選自(例如) $\beta$ -D-核糖、 $\alpha$ -D-2'-去氧核糖、L-2'-去氧核糖、2'-F-2'-去氧核糖、2'-F-阿拉伯糖、2'-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷基-核糖，較佳2'-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷基-核糖係2'-O-甲基核糖、2'-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烯基-核糖、2'-[O-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷基-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷基]-核糖、2'-NH<sub>2</sub>-2'-去氧核糖、 $\beta$ -D-木-呔喃糖、 $\alpha$ -阿拉伯呔喃糖、2,4-二去氧- $\beta$ -D-赤-己-吡喃糖、碳環(例如Froehler J. (1992) Am. Chem. Soc. 114:8320中所述)及/或開鏈糖類似物(例如Vandendriessche等人(1993), Tetrahedron 49:7223中所述)及/或二環糖類似物(例如Tarkoy M.等人(1993), Helv. Chim. Acta. 76:481中所述)。

在某些實施例中，糖係2'-O-甲基核糖，對於一個或兩個藉由磷酸二酯或磷酸二酯樣核苷間鍵聯連接之核苷酸而言尤其如此。

本發明寡核苷酸可使用多種業內熟知程序中之任一種來從頭合成。舉例而言，b-氰基乙基亞磷醯胺方法(Beaucage, S. L.及Caruthers, M. H., (1981) Tet. Let. 22:1859)；核苷H-磷酸酯方法(Garegg等人，(1986) Tet. Let. 27:4051-4054；Froehler等人，(1986) Nucl. Acid Res. 14:5399-5407；Garegg等人，(1986) 27:4055-4058；Gaffney等人，(1988) Tet. Let. 29:2619-2622)。該等化學方法可藉由多種市售自

動化核酸合成器來實施。該等寡核苷酸稱作合成寡核苷酸。或者，可在質粒中大規模製造富含T之核酸及/或TG二核苷酸(參見 Sambrook T. 等人，「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」，Cold Spring Harbor laboratory Press, New York, 1989)，且將其分離為較小部分或以完整質粒來投與。可自己已有核酸序列(例如基因組或cDNA)使用已知技術來製備核酸，例如彼等採用限制性酶、外切核酸酶或內切核酸酶之技術。

在本發明一實施例中，免疫刺激性寡核苷酸中之所有核苷酸間鍵聯皆為硫代磷酸酯鍵聯。

諸如硫代磷酸酯等經修飾骨架可使用採用氨基磷酸酯或H-磷酸酯化學物質之自動化技術來合成。芳基-及烷基-磷酸酯可如(例如)美國專利第4,469,863號中所述來製備，且烷基磷酸三酯(其中荷電氣部分係如美國專利第5,023,243號中所述來烷基化)可藉由自動化固相合成使用市售試劑來製備。人們已闡述製備其他DNA骨架修飾及取代之方法(例如 Uhlmann, E.及 Peyman, A., Chem. Rev. 90:544, 1990; Goodchild, J., Bioconjugate Chem. 1:165, 1990)。

以此方式製備之核酸稱作經分離核酸。「經分離核酸」一般係指與一起自細胞、自細胞核、自線粒體或自染色質分離之組份及任何其他可視作污染物之組份分開之核酸。

在一實施例中，本發明免疫刺激性寡核苷酸由5' T\*C\*G\*T\*C\*G\*T\*T\*T\*T\*T\*C\*G\*G\*T\*G\*C\*T\*T\*T\*T 3'構成，其中\*表示硫代磷酸酯鍵聯。

在一實施例中，本發明免疫刺激性寡核苷酸誘導較高比例的抗原特異性CD4<sup>+</sup> T-細胞分泌IFN- $\gamma$ 。在一實施例中，本發明免疫刺激性寡核苷酸能誘導分泌IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 及/或IL-2之抗原特異性CD4<sup>+</sup> T-細胞群中至少40%、較佳至少45%、甚至較佳至少50%、甚至較佳約53%之抗原特異性CD4<sup>+</sup> T-細胞分泌IFN- $\gamma$ 。在一實施例中，藉由多色流式細胞術來測定該分泌IFN- $\gamma$ 之抗原特異性CD4<sup>+</sup> T-細胞之比例。該測定之一實例揭示於本文獻之實例1中(參見「抗原特異性多細胞因子分泌型T細胞群」段落)。

在一實施例中，本發明免疫刺激性寡核苷酸能誘導分泌IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 及/或IL-2之抗原特異性CD4<sup>+</sup> T-細胞群中至少10%、較佳至少15%、甚至較佳至少20%、甚至較佳約22%之抗原特異性CD4<sup>+</sup> T-細胞分泌IFN- $\gamma$ 及TNF- $\alpha$ 二者。在一實施例中，藉由多色流式細胞術來測定該分泌IFN- $\gamma$ 及TNF- $\alpha$ 二者之多功能抗原特異性CD4<sup>+</sup> T-細胞之比例。該測定之一實例揭示於本文獻之實例1中(參見「抗原特異性多細胞因子分泌型T細胞群」段落)。

在一實施例中，本發明免疫刺激性寡核苷酸能誘導分泌IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 及/或IL-2之抗原特異性CD8<sup>+</sup> T-細胞群中至少30%、較佳至少40%、甚至較佳至少45%、甚至較佳約47%之抗原特異性CD8<sup>+</sup> T-細胞分泌IFN- $\gamma$ 及TNF- $\alpha$ 二者。在一實施例中，藉由多色流式細胞術來測定該分泌IFN- $\gamma$ 及TNF- $\alpha$ 二者之多功能抗原特異性CD8<sup>+</sup> T-細胞之比例。該測定之一實例揭示於本文獻之實例1中(參見「抗原特異

性多細胞因子分泌型T細胞群」段落)。

可使用本發明核酸作為獨立療法。獨立療法係可藉由投與單一藥劑或組合物來達成預防性或治療性有益結果之療法。因此，可單獨使用本文所揭示核酸來防止或治療傳染病，此乃因該等核酸能誘導對該等疾病之治療結果有益之免疫反應。本文所提及之某些方法涉及使用該等核酸以及其他治療藥劑。

可在疫苗中使用本發明核酸。當用於疫苗中時，核酸可與抗原一起投與。抗原對欲防止或治療之病症較佳具有特異性。舉例而言，若病症係傳染病，則抗原較佳得自傳染性生物體(例如細菌、病毒、寄生蟲、真菌等)；若病症涉及自身抗原(例如腫瘤、諸如阿茲海默氏病等神經變性病，針對人類抗體之抗原、或自人類內源性逆轉錄病毒元件表現之抗原)，則抗原較佳得自與該抗原相關之特定病症。若病症涉及成癮性物質，則抗原較佳得自與該抗原(例如菸鹼半抗原)相關之特定成癮性物質。

本文所用術語「病症」及「疾病」可互換使用。

在一實施例中，本發明係關於在治療或防止疾病之疫苗中用作佐劑之本發明免疫刺激性寡核苷酸，其中該疫苗包含至少一種抗原且其中該疾病可受益於多功能抗原特異性T細胞之生成。

已發現，與用CPG ODN 10103獲得之抗原特異性CD4<sup>+</sup>T細胞群相比，CPG ODN 24555可誘導更高比例之產生IFN- $\gamma$ 之抗原特異性CD4<sup>+</sup>T細胞。與用CPG ODN 10103或

CPG ODN 7909獲得之抗原特異性CD4<sup>+</sup> T細胞群相比，同樣可獲得更高比例之產生IFN- $\gamma$ 及TNF- $\alpha$ 二者、IFN- $\gamma$ 及IL-2二者、TNF- $\alpha$ 及IL-2二者之多功能抗原特異性CD4<sup>+</sup> T細胞、或甚至產生IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 及IL-2之三細胞因子產生細胞。與用CPG ODN 10103或CPG ODN 7909獲得之抗原特異性CD8<sup>+</sup> T細胞群相比，亦可獲得更高比例之產生IFN- $\gamma$ 及IL-2二者、TNF- $\alpha$ 及IL-2二者之多功能抗原特異性CD8<sup>+</sup> T細胞、或甚至產生IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 及IL-2之三細胞因子產生細胞。

在多種疾病中皆涉及IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 及IL-2。舉例而言，癌症涉及TNF- $\alpha$ 且諸如病毒感染等傳染病中涉及IFN- $\gamma$ 。因此，在一實施例中，本發明係關於在治療或防止癌症之疫苗中用作佐劑之本發明免疫刺激性寡核苷酸。在一實施例中，本發明係關於在治療或防止癌症之疫苗中用作佐劑之本發明免疫刺激性寡核苷酸，其中該疫苗包含至少一種腫瘤抗原，較佳為本文所揭示之任一種腫瘤抗原。

在一實施例中，本發明係關於在治療或防止傳染病之疫苗中用作佐劑之本發明免疫刺激性寡核苷酸。在一實施例中，本發明係關於在治療或防止傳染病之疫苗中用作佐劑之本發明免疫刺激性寡核苷酸，其中該疫苗包含至少一種微生物抗原，較佳為本文所揭示任一種微生物抗原。

免疫刺激性寡核苷酸可在本發明某些態樣中用作防止感染(即傳染病)、與自身抗原相關之病症、或與成癮性物質相關之病症之預防性疫苗。較佳地，在診斷未患有疫苗所

針對病況之個體中使用預防性疫苗接種，且更佳地該等個體被視為具有發生該等病況中之一種之危險。舉例而言，個體可為具有發生經傳染性生物體感染之危險、或易患與自身抗原相關之病症、或易患與成癮性物質相關之病症者。

本文所用具有危險之個體係具有任何曝露於引發感染之病原體、與自身抗原相關之病症、或與成癮性物質相關之病症之危險的個體。具有危險之個體亦包括具有發生該等病症之傾向之個體。某些傾向可能是遺傳性的(且因此可藉由遺傳分析或家族病史來確定)。某些傾向是環境性的(例如先前曾曝露於傳染原、自身抗原或成癮性物質中)。對於具有發生感染之危險之個體而言，此一個體之實例係居住在可發現或已發現特定類型傳染原之區域或預期要旅行至該區域之個體，或可為因生活方式或醫療程序而直接曝露於生物體或藉由接觸可能含有傳染性生物體之體液而間接曝露於該生物體之個體。具有發生感染之危險之個體亦包括醫療機構建議針對特定傳染性生物體實施疫苗接種之一般人群。

個體係藉由獸醫學治療之個體，其為齧齒動物或非齧齒動物個體。非齧齒動物個體包括(但不限於)人類或脊椎動物，例如犬、貓、馬、牛、豬、綿羊、山羊、雞、靈長類(例如猴子)及魚(水生物種，例如鮭魚)。齧齒動物個體包括(但不限於)大鼠及小鼠。在某些實施例中，個體為人類。

亦可將無抗原免疫刺激性寡核苷酸給予個體以達成針對感染之短期保護。在此情形下，重複給藥使得可達成長期保護。

患有感染之個體係已曝露於傳染病原體且體內或身體排泄物中具有急性或慢性可檢測含量之病原體的個體。在治療性使用時，免疫刺激性寡核苷酸可獨立使用或與另一治療藥劑組合使用。舉例而言，免疫刺激性寡核苷酸可與抗原一起以治療性方式使用以產生抗原特異性全身性或黏膜免疫反應，其能降低傳染病原體之含量或根除該傳染病原體。

本文所用傳染病係因體內存在外來微生物而產生之疾病。其對研發保護身體黏膜表面之有效疫苗策略及治療尤為重要，黏膜表面係病原體進入之主要位點。

與自身抗原相關之病症係任何由個體自身細胞或細胞產物中可引發該個體免疫反應之抗原引發之病症。舉例而言，在某些實施例中，自身抗原係腫瘤抗原、與阿茲海默氏病有關之抗原、針對抗體之抗原、或自人類內源性逆轉錄病毒元件表現之抗原。腫瘤抗原可為HER2、MAGE、NYESO-1、PSA、CEA或EGFR之變體形式。與阿茲海默氏病有關之抗原可為 $\tau$ -或 $\beta$ -澱粉樣蛋白。針對抗體之抗原可為針對人類抗體之抗原，例如在某些實施例中該抗原為IgE。

在某些實施例中，腫瘤抗原為MAGE A1、MAGE A2、MAGE A3、MAGE A4、MAGE A6、MAGE A10、MAGE

A12、HAGE (CT13)、BAGE、BORIS、SSX-2、LAGE-1、CAMEL(LAGE-1 alt閱讀框)、GAGE 1,2,3、TRAG-3、NY-ESO-1、Melan-A/MART-1、酪胺酸酶、tyrp1 (gp75)、tyrp2、gp100/pmell17、PAP、PSA、CEA、Ep-CAM、PSMA、MUC1、MUC2、HER-2、AFP、EphA2、FGF-5、htert、iCE、Livin (ML-IAP)、RAGE、RU2、存活蛋白、存活蛋白 2B、WT1、Thomsen-Friedenreich (TF) 抗原、5T4、PSCA、STEAP、TGR、親脂素(Adipophilin)、AIM-2、G250、OGT、TGFaRII、CO-95 (KIAA1416)、CO-94 (seb4D)、CO-9 (HDAC 5)、CO-61 (HIP1R)、CO-58 (KNSL6)、CO-45、CO-42 (TRIP4)、CO-41 (MBD2)、Ren-32 (Lamin C)、TNKL (BC-203)、CO-26 (MNK 1)、SDCCAG3、GA733-2、STn、CA125、EGFRvIII、BCR-abl、高親和力葉酸鹽受體、間皮素(Mesothelin)、hCG、FAP  $\alpha$ 、細胞週期蛋白1、拓撲異構酶、絲胺酸蛋白酶抑制劑(Serpin) B5/乳腺絲胺酸蛋白酶抑制劑(Maspin)、豆類天冬胺酸蛋白酶內切酶(Legumain)、CDK4、PRAME、ADAM 17、EDDR1、CDC2、複製蛋白A、CDK2、GM2、Globo H、TF(c)、Le<sup>y</sup>、Tn(c)、STn(c)、GD2、GD3或GD3L。

與成癮性物質相關之病症係任何涉及可導致個體對成癮性物質產生成癮性之化學或生物物質之病症。舉例而言，在某些實施例中，成癮性物質可為菸鹼或可卡因。在某些實施例中，菸鹼抗原可為與載體結合之菸鹼半抗原。在某些實施例中，與菸鹼半抗原結合之載體係白喉毒素。

本文所用術語「治療」、「經治療」或「正在治療」在用於傳染病時係指提高個體(具有感染危險之個體)對病原體感染之抗性或換言之降低個體受到病原體感染之可能性的預防性治療，以及在個體(已感染個體)被感染後用於抵抗感染(例如降低或消除感染或防止感染加劇)之治療。

術語「治療」、「經治療」或「正在治療」在用於與自身抗原相關之病症時係指提高個體(具有罹患與自身抗原相關之病症之危險的個體)對發生此一病症之抗性或降低個體發生與自身抗原相關之病症之可能性的預防性治療，以及在個體(具有罹患與自身抗原相關之病症之危險的個體)已發生此一病症或開始出現發生此一病症之體徵或症狀後降低病症影響(例如降低或消除與病症相關之體徵或症狀或防止其加劇)之治療。

術語「治療」、「經治療」或「正在治療」在用於與成癮性物質相關之病症時係指提高個體(具有罹患與成癮性物質相關之病症之危險的個體)對發生此一病症之抗性或降低個體發生與成癮性物質相關之病症之可能性的預防性治療，以及在個體(具有罹患與成癮性物質相關之病症之危險的個體)已發生此一病症或開始出現發生此一病症之體徵或症狀後降低病症影響(例如降低或消除病症相關體徵或症狀或防止其加劇)之治療。

用本文所述免疫刺激性寡核苷酸治療個體可導致降低感染或完全消除感染，減少與與自身抗原相關之病症之相關體徵/症狀或完全消除該病症，或減少與成癮性物質相關

之病症之相關體徵/症狀或完全消除該病症。若該等傳染病、與自身抗原相關之病症或與成癮性物質相關之病症的相關症狀因該治療而減少、受控或消除，則可將個體視為經治療。對於傳染病，該治療亦涵蓋降低個體中所存在傳染原之數量(例如該等數量可使用諸如ELISA等熟習此項技術者已知之標準分析方法來量測)。對於與自身抗原相關之病症，該治療亦涵蓋降低個體中所存在自身抗原之數量或減少因自身抗原所誘導免疫反應。對於與成癮性物質相關之病症，該治療亦涵蓋減少與對成癮性物質之成癮性相關之體徵/症狀。

本文所用「抗原」係能激發免疫反應之分子。抗原包括(但不限於)細胞、細胞提取物、蛋白質、重組蛋白、純化蛋白、多肽、肽、多糖、多糖結合物、質粒DNA編碼之多糖及其他分子之肽及非肽類似物、半抗原、小分子、脂質、糖脂、碳水化合物、完全殺死病原體、病毒及病毒提取物、減毒活病毒或病毒載體、減毒活細菌或細菌載體及多細胞生物體，例如寄生蟲及變應原。術語抗原廣義上包括可由宿主免疫系統識別為外來物之任何類型之分子。抗原包括(但不限於)微生物抗原、自身抗原及成癮性物質。

在某些態樣中，抗原與載體結合。在某些實施例中，載體係白喉毒素或病毒樣顆粒。在某些實施例中，病毒樣顆粒包括RNA噬菌體Q- $\beta$ 、B型肝炎表面抗原(HBsAg)、或B型肝炎核心抗原(HBcAg)。

本文所用「微生物抗原」係微生物之抗原且包括(但不

限於)病毒、細菌、寄生蟲及真菌。在某些實施例中，細菌抗原係與細菌金黃色葡萄球菌相關者。在其他實施例中，細菌抗原係與引發齲齒之細菌相關者，例如變異鏈球菌、齲齒鏈球菌、血鏈球菌、嗜酸乳桿菌或黏性放線菌。在某些實施例中，細菌抗原係與引發牙周病之細菌相關者，例如牙齦卟啉單胞菌或伴放線放線桿菌。在某些實施例中，病毒抗原係與呼吸道合胞病毒(RSV)、單純疱疹病毒1 (HSV1)、單純疱疹病毒2 (HSV2)或人類免疫缺陷病毒-1 (HIV-1)或HIV-2相關者。在某些實施例中，寄生性抗原係與引發瘧疾之寄生蟲相關者。

該等抗原包括完整微生物以及其天然分離物及片段或衍生物，亦及與天然微生物抗原相同或類似且可誘導對該微生物具有特異性之免疫反應之合成化合物。若化合物可誘導針對天然微生物抗原之免疫反應(體液及/或細胞)，則該化合物類似於該天然微生物抗原。該等抗原為業內所常用且為熟習此項技術者所熟知。

在本發明之某些態樣中，個體「曝露於」抗原中。本文所用術語「曝露於」係指使個體主動接觸抗原之步驟或個體被動曝露於體內抗原。使個體主動曝露於抗原中之方法為業內所熟知。一般而言，藉由任何方式將抗原直接投與個體，例如靜脈內、肌內、經口、經皮、黏膜、鼻內、氣管內、或皮下投與。可局部或全身投與抗原。投與抗原及免疫刺激性寡核苷酸之方法更詳細地闡述於下文中。若使抗原曝露於體內免疫細胞，則個體就會被動曝露於抗原

中。例如，可藉由使外來病原體進入體內來使個體被動曝露於抗原。

使個體被動曝露於抗原之方法可尤其取決於投與免疫刺激性寡核苷酸之時機。舉例而言，在具有發生傳染病之危險之個體中，可在危險最大時定期向該個體投與免疫刺激性寡核苷酸。此外，可在旅行者旅行至可使其具有曝露於傳染原之危險之異地之前向其投與免疫刺激性寡核苷酸。亦可向具有曝露於生物戰之危險之士兵或市民投與免疫刺激性寡核苷酸，以在個體曝露於抗原時誘導針對抗原之全身性或黏膜免疫反應。

已在人類中發現之病毒之實例包括(但不限於)：逆轉錄病毒科(Retroviridae)(例如人類免疫缺陷病毒，例如HIV-1(亦稱作HTLV-III、LAV或HTLV-III/LAV或HIV-III；及其他分離物，例如HIV-LP)；細小RNA病毒科(Picornaviridae)(例如脊髓灰質炎病毒、甲型肝炎病毒；腸道病毒、人類柯薩奇病毒(Coxsackie virus)、鼻病毒、埃克病毒(echovirus))；嵌杯病毒科(Caliciviridae)(例如引發胃腸炎之株系)；披膜病毒科(Togaviridae)(例如馬腦炎病毒、風疹病毒)；黃病毒科(Flaviridae)(例如登革熱病毒(dengue virus)、昏睡性腦炎病毒、黃熱病毒)；冠狀病毒科(Coronaviridae)(例如冠狀病毒)；彈狀病毒科(Rhabdoviridae)(例如水疱性口炎病毒、狂犬病病毒)；纖絲病毒科(Filoviridae)(例如埃博拉病毒(ebolavirus))；副黏液病毒科(Paramyxoviridae)(例如副流感病毒、腮腺炎病毒、麻

疹病毒、呼吸道合胞病毒)；正黏病毒科(Orthomyxoviridae)(例如流感病毒)；布尼亞病毒科(Bunyaviridae)(例如漢坦病毒(Hantaan virus)、布尼亞病毒(bunya virus)、白蛉病毒(phlebovirus)及內羅畢病毒(Nairo virus))；沙粒病毒科(Arenaviridae)(出血熱病毒)；呼腸病毒科(Reoviridae)(例如呼腸孤病毒、環狀病毒(orbiviruses)及輪狀病毒)；雙RNA病毒科(Birnaviridae)；嗜肝DNA病毒科(Hepadnaviridae)(乙型肝炎病毒)；細小病毒科(Parvoviridae)(細小病毒)；乳多瘤病毒科(Papovaviridae)(乳頭狀瘤病毒、多瘤病毒)；腺病毒科(Adenoviridae)(大多數腺病毒)；疱疹病毒科(Herpesviridae)(單純疱疹病毒(HSV) 1及2、水痘帶狀疱疹病毒、巨細胞病毒(CMV)、疱疹病毒)；痘病毒科(Poxviridae)(天花病毒、痘苗病毒、痘病毒)；及虹膜病毒科(Iridoviridae)(例如非洲豬瘟病毒)；及未分類病毒(例如海綿狀腦病之病原體、 $\delta$ 肝炎之病原體(認為係乙型肝炎病毒之缺陷型衛星體)、非甲非乙型肝炎病原體(1類=內部傳播；2類=非經腸傳播(即丙型肝炎)；諾瓦克病毒(Norwalk)及相關病毒、及星狀病毒)。在某些實施例中，病毒係呼吸道合胞病毒(RSV)、單純疱疹病毒1 (HSV1)、單純疱疹病毒2 (HSV2)、人類免疫缺陷病毒-1 (HIV1)或HIV2。

儘管本文所述多種微生物抗原係關於人類病症，但本發明亦可用於治療其他非人脊椎動物。非人脊椎動物亦能發生感染，其可用本文所揭示免疫刺激性核酸來防止或治療。舉例而言，除傳染性人類疾病之治療外，本發明方法

可用於治療動物感染。

在脊椎動物中使用革蘭氏(gram)陰性及革蘭氏陽性細菌作為抗原。該等革蘭氏陽性細菌包括(但不限於)巴斯德菌屬(*Pasteurella*)物種、葡萄球菌屬(*Staphylococci*)物種，及鏈球菌屬(*Streptococcus*)物種。革蘭氏陰性細菌包括(但不限於)大腸桿菌(*Escherichia coli*)、假單胞菌屬(*Pseudomonas*)物種、及沙門菌屬(*Salmonella*)物種。傳染性細菌之具體實例包括(但不限於)幽門螺桿菌(*Helicobacter pylori*)、伯氏疏螺旋體(*Borelia burgdorferi*)、嗜肺軍團菌(*Legionella pneumophila*)、分支桿菌(*Mycobacteria*)物種(例如結核分支桿菌(*M. tuberculosis*)、鳥分支桿菌(*M. avium*)、胞內分支桿菌(*M. intracellulare*)、堪薩斯分支桿菌(*M. kansasii*)、戈登分支桿菌(*M. goodii*)、金黃色葡萄球菌、淋病奈瑟球菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、腦膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)、單核細胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)、膿腫鏈球菌(*Streptococcus pyogenes*)(A組鏈球菌)、無乳鏈球菌(*Streptococcus agalactiae*)(B組鏈球菌)、鏈球菌(草綠色鏈球菌(viridans)組)、糞鏈球菌(*Streptococcus faecalis*)、牛鏈球菌(*Streptococcus bovis*)、鏈球菌(厭氧物種)、肺炎鏈球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、病原性彎曲桿菌屬(*Campylobacter*)物種、腸桿菌屬(*Enterococcus*)物種、流感嗜血菌(*Haemophilus influenzae*)、炭疽芽孢桿菌(*Bacillus anthracis*)、白喉棒桿菌(*Corynebacterium diphtheriae*)、棒桿菌屬(*Corynebacterium*)物

種、紅斑丹毒絲菌(*Erysipelothrix rhusiopathiae*)、產氣莢膜梭菌(*Clostridium perfringens*)、破傷風梭菌(*Clostridium tetani*)、產氣腸桿菌(*Enterobacter aerogenes*)、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)、多殺巴斯德菌(*Pasturella multocida*)、擬桿菌屬(*Bacteroides*)物種、具核梭桿菌(*Fusobacterium nucleatum*)、念珠狀鏈桿菌(*Streptobacillus moniliformis*)、蒼白密螺旋體(*Treponema pallidum*)、細弱密螺旋體(*Treponema pertenuae*)、鉤端螺旋體屬(*Leptospira*)、立克次體屬(*Rickettsia*)、及伊斯雷爾放線菌(*Actinomyces israeli*)。在某些實施例中，細菌係引發齲齒之細菌，例如變異鏈球菌、齲齒鏈球菌、血鏈球菌、嗜酸乳桿菌、或黏性放線菌。在其他實施例中，細菌係引發牙周病之細菌，例如牙齦卟啉單胞菌或伴放線放線桿菌。

細菌病原體多肽包括(但不限於)引發癩病之殺鮭氣單胞菌(*Aeromonis salmonicida*)之鐵調外膜蛋白(IROMP)、外膜蛋白(OMP)、及A-蛋白；引發細菌性腎病(BKD)之鮭魚腎菌(*Renibacterium salmoninarum*)之p57蛋白；耶爾森氏菌(*Yersinia*)之主要表面相關抗原(msa)、表面表現細胞毒素(mpr)、表面表現溶血素(ish)、及鞭毛抗原；巴斯德菌之細胞外蛋白(ECP)、IROMP、及結構蛋白；鰻弧菌(*Vibrio anguillarum*)及病海弧菌(*V. ordalii*)之OMP及鞭毛蛋白；鯰魚愛德華菌(*Edwardsiella ictaluri*)及緩慢愛德華菌(*E. tarda*)之鞭毛蛋白、OMP蛋白、aroA及purA；及小瓜蟲屬(*Ichthyophthirius*)之表面抗原；及柱狀嗜纖維菌

(*Cytophaga columnari*)之結構及調節蛋白；及立克次體屬之結構及調節蛋白。

真菌之實例包括新型隱球菌(*Cryptococcus neoformans*)、荚膜組織胞漿菌(*Histoplasma capsulatum*)、粗球孢子菌(*Coccidioides immitis*)、皮炎芽生菌(*Blastomyces dermatitidis*)、沙眼衣原體(*Chlamydia trachomatis*)、白色念珠菌(*Candida albicans*)。其他傳染性生物體(即原生生物)包括瘧原蟲屬(*Plasmodium* spp.)，例如惡性瘧原蟲(*Plasmodium falciparum*)、三日瘧原蟲(*Plasmodium malariae*)、卵形瘧原蟲(*Plasmodium ovale*)、間日瘧原蟲(*Plasmodium vivax*)及鼠弓形蟲(*Toxoplasma gondii*)。血源性及/或組織寄生蟲包括瘧原蟲屬、果氏巴貝蟲(*Babesia microti*)、分歧巴貝蟲(*Babesia divergens*)、熱帶利什曼原蟲(*Leishmania tropica*)、利什曼原蟲屬(*Leishmania* spp.)、巴西利什曼原蟲(*Leishmania braziliensis*)、杜氏利什曼原蟲(*Leishmania donovani*)、岡比亞錐蟲(*Trypanosoma gambiense*)及羅德西亞錐蟲(*Trypanosoma rhodesiense*)(非洲昏睡病)、克魯斯錐蟲(*Trypanosoma cruzi*)(南美洲錐蟲病(Chagas' disease))、及鼠弓形蟲。在某些實施例中，寄生蟲係與瘧疾相關者。其他醫學相關微生物已廣泛闡述於文獻中，例如參見C. G. A Thomas, *Medical Microbiology*, Bailliere Tindall, Great Britain 1983。

治療非人脊椎動物之多種疫苗揭示於Bennett, K., *Compendium of Veterinary Products*, 第3版, North American

Compendiums公司，1995中。如上所述，抗原包括傳染性微生物，例如病毒、寄生蟲、細菌及真菌及其得自天然來源或以合成方式獲得的片段。人類及非人脊椎動物之傳染性病毒包括逆轉錄病毒、RNA病毒及DNA病毒。此逆轉錄病毒組包括簡單逆轉錄病毒及複雜逆轉錄病毒二者。簡單逆轉錄病毒包括B型逆轉錄病毒、C型逆轉錄病毒及D型逆轉錄病毒亞組。B型逆轉錄病毒之實例係小鼠乳房腫瘤病毒(MMTV)。C型逆轉錄病毒包括C型A類(包括勞斯肉瘤病毒(Rous sarcoma virus)(RSV)、禽白血病病毒(ALV)、及禽髓母細胞白血病病毒(AMV))及C型B類(包括貓白血病病毒(FeLV)、長臂猿白血病病毒(GALV)、脾壞死病毒(SNV)、網狀內皮組織增殖病病毒(RV)及猿猴肉瘤病毒(SSV))亞組。D型逆轉錄病毒包括Mason-Pfizer猴病毒(MPMV)及猿猴逆轉錄病毒1型(SRV-1)。複雜逆轉錄病毒包括慢病毒、T-細胞白血病病毒及泡沫病毒亞組。慢病毒包括HIV-1，且亦包括HIV-2、SIV、綿羊髓鞘脫落病毒(Visna virus)、貓免疫缺陷病毒(FIV)、及馬傳染性貧血病毒(EIAV)。T-細胞白血病病毒包括HTLV-1、HTLV-II、猿猴T-細胞白血病病毒(STLV)、及牛白血病病毒(BLV)。泡沫病毒包括人類泡沫病毒(HFV)、猿猴泡沫病毒(SFV)及牛泡沫病毒(BFV)。

作為脊椎動物抗原之其他RNA病毒之實例包括(但不限於)呼腸病毒科成員，包括正呼腸孤病毒屬(Orthoreovirus)(哺乳動物及禽逆轉錄病毒二者之多種血清型)、環狀病毒

屬(藍舌病毒(Bluetongue virus)、尤比納奇病毒(Eugenangee virus)、克麥羅沃病毒(Kemerovo virus)、非洲馬瘟病毒、及科羅拉多壁虱熱病毒(Colorado Tick Fever virus))、輪狀病毒屬(人類輪狀病毒、內布拉斯加牛腹瀉病毒(Nebraska calf diarrhea virus)、猿猴輪狀病毒、牛或羊輪狀病毒、禽輪狀病毒)；細小RNA病毒科，包括腸道病毒屬(脊髓灰質炎病毒、柯薩奇病毒A及B、人腸道細胞病變孤兒(ECHO)病毒、甲型肝炎病毒、猿猴腸道病毒、鼠腦脊髓炎(ME)病毒、鼠脊髓灰質炎病毒、牛腸道病毒、豬腸道病毒、心病毒(Cardiovirus)屬(腦心肌炎病毒(Encephalomyocarditis virus)(EMC)、門哥病毒(Mengovirus))、鼻病毒屬(人鼻病毒，其包括至少113種亞型；其他鼻病毒)、口蹄疫病毒屬(Aphovirus)(口蹄疫(FMDV))；嵌杯病毒科，包括豬水疱疹病毒(Vesicular exanthema of swine virus)、聖米格爾海獅病毒(San Miguel sea lion virus)、貓小核糖核酸病毒(Feline picornavirus)及諾瓦克病毒；披膜病毒科，包括甲病毒屬(Alphavirus)(東方馬腦炎病毒、西門力克森林病毒(Semliki forest virus)、辛德比斯病毒(Sindbis virus)、切昆貢亞病毒(Chikungunya virus)、奧尼永尼永病毒(O'Nyong-Nyong virus)、羅斯河病毒(Ross river virus)、委內瑞拉馬腦炎病毒(Venezuelan equine encephalitis virus)、西方馬腦炎病毒)、黃病毒屬(Flavivirus)(蚊媒黃熱病毒(Mosquito borne yellow fever virus)、登革熱病毒、日本昏睡性腦炎病毒、聖路易斯昏睡性腦炎病毒、墨累河谷昏睡

性腦炎病毒(Murray Valley encephalitis virus)、西尼羅病毒(West Nile virus)、庫寧病毒(Kunjin virus)、中歐蜱媒病毒(Central European tick borne virus)、遠東蜱媒病毒(Far Eastern tick borne virus)、科薩努爾森林病毒(Kyasanur forest virus)、路平III型病毒(Louping III virus)、波瓦森病毒(Powassan virus)、鄂木斯克出血熱病毒(Omsk hemorrhagic fever virus)、風疹病毒屬(Rubivirus)(風疹病毒)、瘟病毒屬(Pestivirus)(黏膜病病毒、豬霍亂病毒(Hog cholera virus)、邊緣病病毒(Border disease virus))；布尼亞病毒科，包括布尼亞病毒屬(Bunyavirus)(布尼亞維拉病毒(Bunyamwera)及相關病毒、加利福尼亞腦炎(California encephalitis)類病毒)、白蛉病毒屬(白蛉熱西西里病毒(Sandfly fever Sicilian virus)、立夫特山谷熱病毒(Rift Valley fever virus))、內羅畢病毒屬(克裏米亞-剛果出血熱病毒(Crimean-Congo hemorrhagic fever virus)、內羅畢綿羊病病毒(Nairobi sheep disease virus))、及吳孔病毒屬(Uukuvirus)(吳孔涅米病毒(Uukuniemi)及相關病毒)；正黏病毒科，包括流感病毒屬(A型流感病毒、多種人類亞型)；豬流感病毒、及禽及馬流感病毒；B型流感(多種人類亞型)、及C型流感(可能的獨立屬)；副黏液病毒科，包括副黏病毒屬(Paramyxovirus)(1型副流感病毒、仙台病毒(Sendai virus)、血細胞吸附病毒(Hemadsorption virus)、2至5型副流感病毒、新城疫病毒(Newcastle Disease Virus)、腮腺炎病毒)、麻疹病毒屬(Morbillivirus)(麻疹病

毒、亞急性硬化性全腦炎病毒(subacute sclerosing panencephalitis virus)、溫熱病病毒(distemper virus)、牛瘟病毒(Rinderpest virus)、肺炎病毒屬(Pneumovirus)(呼吸道合胞病毒(RSV)、牛呼吸道合胞病毒及肺炎病毒)；彈狀病毒科，包括水疱病毒屬(Vesiculovirus)(VSV)(水疱性口炎-印度病毒屬(Chandipura virus)、費蘭杜-哈克公園病毒(Flanders-Hart Park virus))、狂犬病病毒屬(Lyssavirus)(狂犬病病毒)、魚彈狀病毒、及兩種可能的彈狀病毒(馬爾堡病毒(Marburg virus)及埃博拉病毒)；沙粒病毒科，包括淋巴細胞性脈絡叢腦膜炎病毒(Lymphocytic choriomeningitis virus)(LCM)、塔卡裏伯病毒(Tacaribe virus)複合體、及拉沙病毒(Lassa virus)；冠狀病毒科，包括傳染性支氣管炎病毒(IBV)、肝炎病毒、人腸道日晷形病毒(Human enteric corona virus)、及貓傳染性腹膜炎(貓冠狀病毒)。

作為脊椎動物抗原之說明性DNA病毒包括(但不限於)痘病毒科，包括正痘病毒屬(Orthopoxvirus)(重型天花(Variola major)、類天花(Variola minor)、猴痘病毒(Monkey pox Vaccinia)、牛痘、水牛痘、兔痘、鼠痘)、兔病毒屬(Leporipoxvirus)(黏液瘤(Myxoma)、纖維瘤(Fibroma))、禽痘病毒屬(Avipoxvirus)(雞痘、其他禽痘病毒)、山羊痘病毒屬(Capripoxvirus)(綿羊痘、山羊痘)、豬痘病毒屬(Suipoxvirus)(豬痘)、副痘病毒屬(Parapoxvirus)(綿羊接觸性膿疱皮炎病毒、假牛痘、小牛侵蝕性口炎病毒)；虹膜病毒科(非洲豬瘟病毒、蛙病毒2及3、魚淋巴囊腫病毒)；

疱疹病毒科，包括 $\alpha$ -疱疹病毒(單純疱疹1型及2型、水痘帶狀疱疹、馬流產病毒(Equine abortion virus)、馬疱疹病毒2及3、假狂犬病病毒、牛傳染性角結膜炎病毒、牛傳染性鼻氣管炎病毒、貓鼻氣管炎病毒、禽傳染性喉氣管炎病毒)、 $\beta$ -疱疹病毒(人類巨細胞病毒、及豬及猴巨細胞病毒)； $\gamma$ -疱疹病毒(愛潑斯坦-巴爾病毒(Epstein-Barr virus)(EBV)、馬雷克病疱疹病毒(Marek's disease virus)、松鼠猴疱疹病毒、蛛猴疱疹病毒、棉尾兔疱疹病毒、荷蘭豬疱疹病毒、蛙腎瘤病毒(Lucke tumor virus))；腺病毒科，包括哺乳動物腺病毒屬(Mastadenovirus)(人類A、B、C、D、E亞組及未分組病毒；猿猴腺病毒(至少23種血清型)、犬傳染性肝炎、及牛、豬、綿羊、蛙及多種其他物種之腺病毒、禽腺病毒屬(Aviadenovirus)(禽腺病毒)；及不可接種腺病毒；乳多瘤病毒科，包括乳頭狀瘤病毒屬(人類乳頭狀瘤病毒、牛乳頭狀瘤病毒、肖普兔(Shope rabbit)乳頭狀瘤病毒、及其他物種之各種病原性乳頭狀瘤病毒)、多瘤病毒屬(多瘤病毒、猿猴致空泡因子(SV-40)、兔致空泡因子(RKV)、K病毒、BK病毒、JC病毒、及其他靈長類多瘤病毒，例如親淋巴乳頭狀瘤病毒(Lymphotropic papilloma virus))；細小病毒科，包括腺病毒伴隨病毒屬(Adeno-associated virus)、細小病毒屬(貓泛白細胞減少症病毒(Feline panleukopenia virus)、牛細小病毒、犬細小病毒、阿留申水貂病病毒(Aleutian mink disease virus)等)。此外，DNA病毒可包括不屬於上述各科之病毒，例如庫魯

病病毒(Kuru)及克雅二氏病病毒(Creutzfeldt-Jacob disease virus)及慢性傳染性神經系病病毒(CHINA病毒)。

在一實施例中，本發明係關於誘導抗原特異性免疫反應之方法，其包含投與抗原及本發明免疫刺激性寡核苷酸，其中分泌IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 及/或IL-2之抗原特異性CD4+ T-細胞群中至少40%、較佳至少45%、甚至較佳至少50%、甚至較佳約53%之經誘導抗原特異性CD4+ T-細胞分泌IFN- $\gamma$ 。在一實施例中，藉由多色流式細胞術來測定該分泌IFN- $\gamma$ 之抗原特異性CD4+ T-細胞之比例。該測定之一實例揭示於本文獻之實例1中(參見「抗原特異性多細胞因子分泌型T細胞群段落」)。在一實施例中，以有效量投與抗原及免疫刺激性寡核苷酸以在個體中誘導抗原特異性免疫反應。在一實施例中，抗原為本文所揭示抗原中之任一種。

在一實施例中，本發明係關於誘導抗原特異性免疫反應之方法，其包含投與抗原及本發明免疫刺激性寡核苷酸，其中分泌IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 及/或IL-2之抗原特異性CD4+ T-細胞群中至少10%、較佳至少15%、甚至較佳至少20%、甚至較佳約22%之經誘導抗原特異性CD4+ T-細胞為優先分泌IFN- $\gamma$ 及TNF- $\alpha$ 二者之雙細胞因子產生細胞。在一實施例中，藉由多色流式細胞術來測定該分泌IFN- $\gamma$ 及TNF- $\alpha$ 二者之抗原特異性CD4+ T-細胞之比例。該測定之一實例揭示於本文獻之實例1中(參見「抗原特異性多細胞因子分泌型T細胞群段落」)。在一實施例中，以有效量投與抗原及免疫刺激性寡核苷酸以在個體中誘導抗原特異性免疫反應。

在一實施例中，抗原為本文所揭示抗原中之任一種。

在一實施例中，本發明係關於誘導抗原特異性免疫反應之方法，其包含投與抗原及本發明免疫刺激性寡核苷酸，其中分泌IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 及/或IL-2之抗原特異性CD8+ T-細胞群中至少30%、較佳至少40%、甚至較佳至少45%、甚至較佳約47%之經誘導抗原特異性CD8+ T-細胞為優先分泌IFN- $\gamma$ 及TNF- $\alpha$ 二者之雙細胞因子產生細胞。在一實施例中，藉由多色流式細胞術來測定該分泌IFN- $\gamma$ 及TNF- $\alpha$ 二者之抗原特異性CD8+ T-細胞之比例。該測定之一實例揭示於本文獻之實例1中(參見「抗原特異性多細胞因子分泌型T細胞群段落」)。在一實施例中，以有效量投與抗原及免疫刺激性寡核苷酸以在個體中誘導抗原特異性免疫反應。在一實施例中，抗原為本文所揭示抗原中之任一種。

在一實施例中，本發明係關於用於誘導針對抗原之免疫反應之本發明免疫刺激性寡核苷酸，其中分泌IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 及/或IL-2之抗原特異性CD4+ T-細胞群中至少40%、較佳至少45%、甚至較佳至少50%、甚至較佳約53%之經誘導抗原特異性CD4+ T-細胞分泌IFN- $\gamma$ 。在一實施例中，藉由多色流式細胞術來測定該分泌IFN- $\gamma$ 之抗原特異性CD4+ T-細胞之比例。該測定之一實例揭示於本文獻之實例1中(參見「抗原特異性多細胞因子分泌型T細胞群段落」)。在一實施例中，抗原為本文所揭示抗原中之任一種。

在一實施例中，本發明係關於用於誘導針對抗原之免疫

反應之本發明免疫刺激性寡核苷酸，其中分泌IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 及/或IL-2之抗原特異性CD4+ T-細胞群中至少10%、較佳至少15%、甚至較佳至少20%、甚至較佳約22%之經誘導抗原特異性CD4+ T-細胞為優先分泌IFN- $\gamma$ 及TNF- $\alpha$ 二者之雙細胞因子產生細胞。在一實施例中，藉由多色流式細胞術來測定該分泌IFN- $\gamma$ 及TNF- $\alpha$ 二者之抗原特異性CD4+ T-細胞之比例。該測定之一實例揭示於本文獻之實例1中(參見「抗原特異性多細胞因子分泌型T細胞群段落」)。在一實施例中，抗原為本文所揭示抗原中之任一種。

在一實施例中，本發明係關於用於誘導針對抗原之免疫反應之本發明免疫刺激性寡核苷酸，其中分泌IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 及/或IL-2之抗原特異性CD8+ T-細胞群中至少30%、較佳至少40%、甚至較佳至少45%、甚至較佳約47%之經誘導抗原特異性CD8+ T-細胞為優先分泌IFN- $\gamma$ 及TNF- $\alpha$ 二者之雙細胞因子產生細胞。在一實施例中，藉由多色流式細胞術來測定該分泌IFN- $\gamma$ 及TNF- $\alpha$ 二者之抗原特異性CD4+ T-細胞之比例。該測定之一實例揭示於本文獻之實例1中(參見「抗原特異性多細胞因子分泌型T細胞群段落」)。在一實施例中，抗原為本文所揭示抗原中之任一種。

在一實施例中，本發明係關於在疫苗中用作佐劑之本發明免疫刺激性寡核苷酸其中該疫苗誘導針對抗原之免疫反應，且其中分泌IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 及/或IL-2之抗原特異性

CD4+ T-細胞群中至少40%、較佳至少45%、甚至較佳至少50%、甚至較佳約53%之經誘導抗原特異性CD4+ T-細胞分泌IFN- $\gamma$ 。在一實施例中，藉由多色流式細胞術來測定該分泌IFN- $\gamma$ 之抗原特異性CD4+ T-細胞之比例。該測定之一實例揭示於本文獻之實例1中(參見「抗原特異性多細胞因子分泌型T細胞群段落」)。在一實施例中，抗原為本文所揭示抗原中之任一種。

在一實施例中，本發明係關於在疫苗中用作佐劑之本發明免疫刺激性寡核苷酸，其中該疫苗誘導針對抗原之免疫反應，且其中分泌IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 及/或IL-2之抗原特異性CD4+ T-細胞群中至少10%、較佳至少15%、甚至較佳至少20%、甚至較佳約22%之經誘導抗原特異性CD4+ T-細胞為優先分泌IFN- $\gamma$ 及TNF- $\alpha$ 二者之雙細胞因子產生細胞。在一實施例中，藉由多色流式細胞術來測定該分泌IFN- $\gamma$ 及TNF- $\alpha$ 二者之雙細胞因子產生抗原特異性CD4+ T-細胞之比例。該測定之一實例揭示於本文獻之實例1中(參見「抗原特異性多細胞因子分泌型T細胞群段落」)。在一實施例中，抗原為本文所揭示抗原中之任一種。

在一實施例中，本發明係關於在疫苗中用作佐劑之本發明免疫刺激性寡核苷酸，其中該疫苗誘導針對抗原之免疫反應，且其中分泌IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 及/或IL-2之抗原特異性CD8+ T-細胞群中至少30%、較佳至少40%、甚至較佳至少45%、甚至較佳約47%之經誘導抗原特異性CD8+ T-細胞為優先分泌IFN- $\gamma$ 及TNF- $\alpha$ 二者之雙細胞因子產生細胞。在一

實施例中，藉由多色流式細胞術來測定該分泌IFN- $\gamma$ 及TNF- $\alpha$ 二者之雙細胞因子產生抗原特異性CD8+ T-細胞之比例。該測定之一實例揭示於本文獻之實例1中(參見「抗原特異性多細胞因子分泌型T細胞群段落」)。在一實施例中，抗原為本文所揭示抗原中之任一種。

在一實施例中，本發明係關於包含抗原及本發明免疫刺激性寡核苷酸之疫苗，其用於誘導針對該抗原之免疫反應，其中分泌IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 及/或IL-2之抗原特異性CD4+ T-細胞群中至少40%、較佳至少45%、甚至較佳至少50%、甚至較佳約53%之經誘導抗原特異性CD4+ T-細胞分泌IFN- $\gamma$ 。在一實施例中，藉由多色流式細胞術來測定該分泌IFN- $\gamma$ 之抗原特異性CD4+ T-細胞之比例。該測定之一實例揭示於本文獻之實例1中(參見「抗原特異性多細胞因子分泌型T細胞群段落」)。在一實施例中，抗原為本文所揭示抗原中之任一種。

在一實施例中，本發明係關於包含抗原及本發明免疫刺激性寡核苷酸之疫苗，其用於誘導針對該抗原之免疫反應，其中分泌IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 及/或IL-2之抗原特異性CD4+ T-細胞群中至少10%、較佳至少15%、甚至較佳至少20%、甚至較佳約22%之經誘導抗原特異性CD4+ T-細胞為優先分泌IFN- $\gamma$ 及TNF- $\alpha$ 二者之雙細胞因子產生細胞。在一實施例中，藉由多色流式細胞術來測定該分泌IFN- $\gamma$ 及TNF- $\alpha$ 二者之抗原特異性CD4+ T-細胞之比例。該測定之一實例揭示於本文獻之實例1中(參見「抗原特異性多細胞

因子分泌型T細胞群段落」)。在一實施例中，抗原為本文所揭示抗原中之任一種。

在一實施例中，本發明係關於包含抗原及本發明免疫刺激性寡核苷酸之疫苗，其用於誘導針對該抗原之免疫反應，其中分泌IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 及/或IL-2之抗原特異性CD8+ T-細胞群中至少30%、較佳至少40%、甚至較佳至少45%、甚至較佳約47%之經誘導抗原特異性CD8+ T-細胞為優先分泌IFN- $\gamma$ 及TNF- $\alpha$ 二者之雙細胞因子產生細胞。在一實施例中，藉由多色流式細胞術來測定該分泌IFN- $\gamma$ 及TNF- $\alpha$ 二者之抗原特異性CD8+ T-細胞之比例。該測定之一實例揭示於本文獻之實例1中(參見「抗原特異性多細胞因子分泌型T細胞群段落」)。在一實施例中，抗原為本文所揭示抗原中之任一種。

片語核酸分子之「有效量」係指實現期望生物學效應所需量或足量。舉例而言，含有至少一個未甲基化CpG之核酸之治療病症之有效量可為消除微生物感染或腫瘤所需量。用作疫苗佐劑之有效量可為可用於加強個體針對疫苗之免疫反應之量。治療傳染病、與自身抗原相關之病症或與成癮性物質相關之病症之「有效量」可為可用於誘導抗原特異性免疫反應之量。任何具體應用之有效量皆可根據諸如以下等因素而變：所治療疾病或病況、所投與具體CpG免疫刺激性寡核苷酸、個體尺寸或該疾病或病況之嚴重程度。熟習此項技術者無需過多實驗即可憑經驗確定具體寡核苷酸之有效量。

在本發明各態樣中，疫苗可另外包括佐劑。在某些實施例中，佐劑係不為TLR9之類鐸受體(TLR)之激動劑。在某些實施例中，TLR之激動劑係TLR3之激動劑(例如經穩定聚I:C)、TLR4之激動劑(例如脂多糖(LPS)衍生物，例如MPL或GLA)、TLR5之激動劑(例如鞭毛蛋白)、TLR7之激動劑(例如咪唑并喹啉家族之小分子)或TLR8之激動劑(例如咪唑并喹啉家族之小分子)。在某些實施例中，佐劑係鋁鹽(例如氫氧化鋁)、免疫刺激性複合物(ISCOM)、水包油或油包水乳液、脂質體或遞送系統(例如奈米顆粒或微粒)。

術語CpG免疫刺激性寡核苷酸之有效量係指實現期望生物學效應所需量或足量。舉例而言，與抗原一起投與之CpG免疫刺激性寡核苷酸誘導抗原特異性免疫反應之有效量係在曝露於抗原後因應抗原誘導免疫反應之所需量。結合本文所提供之教示，藉由選擇不同活性免疫刺激性寡核苷酸及權衡諸如效能、相對生物利用度、患者體重、不利副作用嚴重程度及較佳投與模式等因素，可設計出不引發實質毒性且仍可有效治療具體個體之有效預防性或治療性治療方案。任何具體應用之有效量皆可根據諸如以下等因素而變：所治療疾病或病況、所投與具體CpG免疫刺激性寡核苷酸、個體尺寸或該疾病或病況之嚴重程度。熟習此項技術者無需過多實驗根據本揭示內容即可憑經驗確定具體CpG免疫刺激性寡核苷酸及/或抗原及/或其他治療藥劑之有效量。

本文所述化合物用於局部遞送之個體劑量通常介於每次投與約0.1  $\mu\text{g}$ 至50 mg之間，其端視應用可每日給予、每週給予、或每月給予、及以介於其間之任何其他時間間隔來給予。更通常地局部劑量介於每次投與約10  $\mu\text{g}$ 至10 mg之間，且視需要為約100  $\mu\text{g}$ 至1 mg，其中投與2-4次，每次間隔數日或數週。更通常地，免疫刺激劑劑量介於每次投與1  $\mu\text{g}$ 至10 mg之間，且最通常為10  $\mu\text{g}$ 至1 mg，其中每日或每週投與。本文所述化合物用於非經腸遞送以達成誘導抗原特異性免疫反應之目的(其中化合物係與抗原而非另一治療藥劑一起遞送)之個體劑量通常為疫苗佐劑或免疫刺激劑施用之有效局部劑量的5至10,000倍，且更通常為10至1,000倍，且最通常為20至100倍。本文所述化合物用於非經腸遞送以(例如)誘導先天免疫反應、提高ADCC、誘導抗原特異性免疫反應(其中CpG免疫刺激性寡核苷酸係與其他治療藥劑組合投與或存於專一性遞送媒劑中)之劑量通常介於每次投與約0.1  $\mu\text{g}$ 至10 mg之間，其端視應用可每日給予、每週給予、或每月給予、及以介於其間之任何其他時間間隔來給予。更通常地，用於該等目的之非經腸劑量介於每次投與約10  $\mu\text{g}$ 至5 mg之間，且最通常地為約100  $\mu\text{g}$ 至1 mg，其中投與2-4次，每次間隔數日或數週。然而，在某些實施例中，用於該等目的之非經腸劑量可在上述常用劑量之5至10,000倍範圍內。

對於本文所述任何化合物而言，可首先根據動物模型來確定治療有效量。治療有效劑量亦可根據已在人類中測試

(例如已開始人類臨床試驗)之CpG寡核苷酸及已知可表現類似藥理學活性之化合物(例如其他佐劑, 例如LT及其他疫苗接種用抗原)的人類數據來確定。非經腸投與可能需要較高劑量。所施加劑量可根據所投與化合物之相對生物利用度及效能來調節。根據上述方法及業內熟知之其他方法調節劑量以達成最大效率已為熟習此項技術者所精通。

本發明調配物係以醫藥上可接受之溶液投與, 該等溶液通常可含有醫藥上可接受濃度之鹽、緩衝劑、防腐劑、相容載劑、佐劑及視需要其他治療性成份。

對於治療中之應用, 可藉由將寡核苷酸遞送至期望表面之任何模式來將有效量之CpG免疫刺激性寡核苷酸投與個體。可藉由任何熟習此項技術者習知之方式實施本發明醫藥組合物之投與。較佳投與途徑包括(但不限於)非經腸(例如肌內、皮下、皮內、靜脈內、膀胱內或腹膜內)、局部(例如皮膚(經皮)、黏膜)、經口、鼻內、陰道內、直腸內、經頰、眼內或舌下。

可經由本文所述任一途徑單獨投與免疫刺激性寡核苷酸或其與其他治療藥劑之組合。在某些較佳實施例中, 投與係局部投與。局部投與可包括局部施用至黏膜表面, 例如皮膚, 例如彼等口腔及生殖器中者。

在期望以全身方式遞送免疫刺激性寡核苷酸時, 可將其調配以用於藉由注射(例如, 濃注或連續輸注)非經腸投與。注射用調配物可以單位劑型存在, 例如存於添加有防腐劑之安瓿或多劑量容器中。組合物可呈存於油性或水性

媒劑中之懸浮液、溶液或乳液形式，且可含有諸如懸浮劑、穩定劑及/或分散劑等調配劑。

非經腸投與用醫藥組合物包括水溶性形式之免疫刺激性寡核苷酸之水溶液。另外，可將免疫刺激性寡核苷酸之懸浮液製備成適宜油性注射懸浮液。適宜親脂溶劑或媒劑包括脂肪油(例如芝麻油)或合成脂肪酸酯(例如油酸乙酯或甘油三酯)或脂質體。水性注射懸浮液可含有能提高該懸浮液黏度之物質，例如羧甲基纖維素鈉、山梨醇或葡聚糖。視需要，懸浮液亦可含有適宜穩定劑或可提高免疫刺激性寡核苷酸溶解性之試劑，從而使得可製備高濃縮溶液。

在期望以全身方式遞送免疫刺激性寡核苷酸時，可將其調配以用於藉由注射(例如，濃注或連續輸注)非經腸投與。注射用調配物可以單位劑型存在，例如存於添加有防腐劑之安瓿或多劑量容器中。組合物可呈存於油性或水性媒劑中之懸浮液、溶液或乳液形式，且可含有諸如懸浮劑、穩定劑及/或分散劑等調配劑。

可用惰性材料稀釋治療劑或增加其體積。該等稀釋劑可包括碳水化合物，尤其甘露醇、 $\alpha$ -乳糖、無水乳糖、纖維素、蔗糖、改性葡聚糖及/或澱粉。亦可使用某些無機鹽作為填充劑，包括三磷酸鈣、碳酸鎂及/或氯化鈉。某些市售稀釋劑係 Fast-Flo、Emdex、STA-Rx 1500、Emcompress及 Avicell。

為幫助治療劑溶解於水性環境中，可添加表面活性劑作為潤濕劑。表面活性劑可包括陰離子型洗滌劑，例如月桂

基硫酸鈉、二辛基磺琥珀酸鈉及/或二辛基磺酸鈉。可使用陽離子型洗滌劑且其可包括苯紮氯銨(benzalkonium chloride)或苜索氯銨(benzethonium chloride)。調配物中可引入作為表面活性劑之可能非離子洗滌劑之列表係聚桂醇(lauromacrogol) 400、聚煙氧(polyoxyl) 40硬脂酸酯、聚氧乙烯氫化蓖麻油10、50及60、甘油單硬脂酸酯、聚山梨醇酯40、60、65及/或80、蔗糖脂肪酸酯、甲基纖維素及羧甲基纖維素。該等表面活性劑可單獨或以不同比例之混合物存於免疫刺激性寡核苷酸之調配物中。

非經腸投與用醫藥調配物包括為水溶性形式之免疫刺激性寡核苷酸之水溶液。另外，可將免疫刺激性寡核苷酸之懸浮液製備成適宜油性注射懸浮液。適宜親脂溶劑或媒劑包括脂肪油(例如芝麻油)或合成脂肪酸酯(例如油酸乙酯或甘油三酯)或脂質體。水性注射懸浮液可含有能提高該懸浮液黏度之物質，例如羧甲基纖維素鈉、山梨醇或葡聚糖。視需要，懸浮液亦可含有適宜穩定劑或可提高免疫刺激性寡核苷酸溶解性之試劑，從而使得可製備高濃縮溶液。

或者，免疫刺激性寡核苷酸可呈粉劑形式，以便在使用前用適宜媒劑(例如無菌無致熱原水)來構造。

對於經口投與，該等化合物(即，CpG免疫刺激性寡核苷酸、抗原及其他治療藥劑)可由免疫刺激性寡核苷酸與業內熟知之醫藥上可接受載劑組合輕易地調配。該等載劑使得本發明免疫刺激性寡核苷酸可調配成欲治療個體經口攝

取之錠劑、丸劑、糖衣錠(dragees)、膠囊、液體、凝膠、糖漿、漿液、懸浮液及諸如此類。經口使用之醫藥製劑可以固體賦形劑獲得，視需要研磨所得混合物，若需要，在添加適宜助劑後，處理顆粒混合物以獲得錠劑或糖衣錠核心。適宜賦形劑特別為填充劑，例如糖，包括乳糖、蔗糖、甘露醇或山梨醇；纖維素製劑，例如玉米澱粉、小麥澱粉、水稻澱粉、馬鈴薯澱粉、明膠、黃蓍膠、甲基纖維素、羥丙基甲基纖維素、羧甲基纖維素鈉及/或聚乙烯吡咯啉酮(PVP)。若需要，可添加崩解劑，例如交聯聚乙烯吡咯啉酮、瓊脂、或海藻酸或其鹽，例如海藻酸鈉。視需要，口服調配物亦可在鹽水或緩衝劑(即中和內部酸性條件之EDTA)中調配，或可以無任何載劑投與。

亦涵蓋上述藥劑或調配物之經口劑型。可以化學方式修飾藥劑或調配物以使該衍生物之經口遞送有效。一般而言，所涵蓋之化學修飾係將至少一個部分連接至藥劑或調配物自身，其中該部分容許(a)抑制蛋白水解；及(b)自胃或腸吸收至血流中。亦期望增加藥劑或調配物之整體穩定性及延長在體內之循環時間。該等部分之實例包括：聚乙二醇、乙二醇與丙二醇之共聚物、羧甲基纖維素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯基吡咯啉酮及聚脯胺酸。Abuchowski及Davis, 1981, 「Soluble Polymer-Enzyme Adducts」, *Enzymes as Drugs*, Hocenberg及Roberts編輯, Wiley-Interscience, New York, N.Y., 第367-383頁；Newmark等人, 1982, *J. Appl. Biochem.* 4:185-189。其他可使用之聚

合物係聚-1,3-二氧戊環及聚-1,3,6-三氧八環 (poly-1,3,6-tioxocane)。如上所述，用於醫藥用途之較佳者係聚乙二醇部分。

亦涵蓋本發明醫藥組合物之鼻內遞送。鼻內遞送使得治療性產品投與鼻後本發明醫藥組合物可直接流至血流中，產品不需在肺中沈積。鼻遞送調配物包括具有葡聚糖或環葡聚糖者。

對於鼻內投與而言，可用裝置係附裝有定量劑量噴霧器之小硬瓶子。在一個實施例中，藉由將本發明醫藥組合物抽入一定體積之室中來遞送該定量劑量，該室孔隙之尺寸使得壓縮室內液體時可形成噴霧來霧化氣溶膠調配物。壓縮該室以投與本發明醫藥組合物。在一個具體實施例中，該室係配置活塞。該等裝置可在市場上購得。

或者，可使用具有孔隙或開口之塑膠擠壓瓶，該孔隙或開口之尺寸在擠壓該瓶時可藉由形成噴霧來霧化氣溶膠調配物。開口通常存於瓶子頂部，且頂部通常呈錐形以部分插入鼻道中，從而有效投與氣溶膠調配物。較佳地，鼻吸入器可提供計量量之氣溶膠調配物用於投與所量測劑量之藥物。

對於經頰投與，組合物可呈以習用方式調配之錠劑或菱形錠劑形式。

亦可在直腸或陰道組合物中調配化合物，例如栓劑或保留灌腸劑，其含有(例如)習用栓劑基質，例如可可油或其他甘油酯。

除上述調配物外，亦可將化合物調配為儲積製劑。該等長效調配物可與適宜聚合或疏水材料(例如作為存於可接受油中之乳液)或離子交換樹脂一起調配，或作為微溶性衍生物(例如微溶性鹽)來調配。

醫藥組合物亦可包含適宜固相或凝膠相載劑或賦形劑。該等載劑或賦形劑之實例包括(但不限於)碳酸鈣、磷酸鈣、各種糖、澱粉、纖維素衍生物、明膠、及聚合物(例如聚乙二醇)。

適宜液體或固體醫藥製劑形式為(例如)吸入用水溶液或鹽水溶液、經微囊封、內螺旋狀、塗佈於微小金顆粒上、含於脂質體中、呈噴霧狀、氣溶膠、植入皮膚中之丸粒、或乾燥後附著在尖銳物體上以刺入皮膚中之形式。醫藥組合物亦包括顆粒、粉劑、錠劑、包衣錠劑、(微)膠囊、栓劑、糖漿、乳液、懸浮液、乳霜、滴劑或活性化合物延長釋放之製劑，其中通常如上所述使用製劑賦形劑及添加劑及/或助劑，例如崩解劑、黏合劑、包衣劑、溶脹劑、潤滑劑、矯味劑、甜味劑或增溶劑。醫藥組合物適用於各種藥物遞送系統中。藥物遞送之簡單綜述參見 Langer, *Science* 249:1527-1533, 1990。

CpG免疫刺激性寡核苷酸及視需要其他治療劑及/或抗原可以自身(純淨)形式或以醫藥上可接受之鹽形式來投與。在用於藥品中時，鹽應為醫藥上可接受之鹽，但可便利地使用醫藥上不可接受之鹽來製備其醫藥上可接受之鹽。該等鹽包括(但不限於)彼等自以下酸製備者：鹽酸、氫溴

酸、硫酸、硝酸、磷酸、馬來酸、乙酸、水楊酸、對甲苯磺酸、酒石酸、檸檬酸、甲磺酸、甲酸、丙二酸、琥珀酸、萘-2-磺酸、及苯磺酸。同樣，可將該等鹽製備為鹼金屬鹽或鹼土金屬鹽，例如羧酸基團之鈉鹽、鉀鹽或鈣鹽。

適宜緩衝劑包括：乙酸及鹽(1-2% w/v)；檸檬酸及鹽(1-3% w/v)；硼酸及鹽(0.5-2.5% w/v)；及磷酸及鹽(0.8-2% w/v)。適宜防腐劑包括苯紮氯銨(0.003-0.03% w/v)；氯丁醇(0.3-0.9% w/v)；對羥基苯甲酸酯(0.01-0.25% w/v)及硫柳汞(thimerosal)(0.004-0.02% w/v)。

本發明醫藥組合物含有有效量之CpG免疫刺激性寡核苷酸及視需要抗原及/或視需要引入醫藥上可接受之載劑中之其他治療藥劑。術語醫藥上可接受之載劑意指一或多種適合投與人類或其他脊椎動物之相容固體或液體填充劑、稀釋劑或囊封物質。術語載體表示天然或合成的有機或無機成份，活性成份與其組合以有利於施用。醫藥組合物中之各組份亦能以不存在實質上損害期望醫藥功效之交互作用之方式與本發明化合物摻合及彼此摻合。

藉由以下實例進一步闡述本發明，無論如何不能將其視為進一步限制。本申請案全文所引用之所有參考資料(包括參考文獻、已授予專利、公開專利申請案及共同待決專利申請案)之全部內容係全文以引用方式明確併入本文中。

## 實例

### 實例 1：

在以肌內(IM)方式使用B型肝炎表面抗原(HBsAg)或卵白蛋白(OVA)作為模型抗原實施免疫後，比較免疫刺激性寡核苷酸CPG 24555與寡核苷酸CPG 10103及CPG 7909提高小鼠抗原特異性免疫反應之能力。

#### 方法及材料

所有ODN皆係自凍乾寡去氧核苷酸(ODN)製備。簡言之，使ODN溶於pH 8.0之無內毒素Tris-EDTA緩衝液中(OmniPur®；EM Science, Gibbstown, NJ)且在無菌條件下稀釋於pH 7.2之無菌無內毒素磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)(Sigma Chemical公司，St. Louis, MO)中以防止微生物及內毒素污染。在4°C下儲存原液直至使用為止。

自Charles River Canada (Quebec, Canada)購得雌性野生型BALB/c及C57Bl/6小鼠。在Taconic Farms飼養C57背景之TLR9缺陷型小鼠且將其轉移至Coley動物保護中心中以供研究。在Coley Pharmaceutical Group Canada之動物保護中心中將小鼠飼養於微隔離籠中。所有研究皆係根據Coley Canada之動物保護委員會在實驗動物保護評價認證協會(AAALAC International)及加拿大動物保護協會指導下實施。在研究開始時動物重約18-20 g。

#### 小鼠之免疫

##### *B型肝炎表面抗原(HBsAg)*

在左脛骨前肌處以50 µl之總體積單獨用1 µg HBsAg或用1 µg HBsAg與10 µg CPG 24555、CPG 10103或CPG 7909之組合以肌內(IM)方式對BALB/c小鼠(n=10/組)實施免疫；

該HBsAg為ad亞型(Cliniqa, 4076)。在初免後第2週，經由頷下靜脈使用肝素作為抗凝血劑對動物實施抽血，且使用與初免所用相同之疫苗調配物實施加強免疫。在加強免疫後第2週，藉由心臟穿刺使用肝素作為抗凝血劑對動物實施抽血，藉由頸椎脫位實施無痛致死，且以無菌方式移除脾以用於檢測抗原特異性CTL活性、IFN- $\gamma$ 分泌(培養上清液)及多細胞因子(IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 及IL-2)分泌型CD4與CD8 T細胞之免疫分析中。使用各抽血時間點之血漿來檢測抗原特異性總IgG及IgG同種型IgG1及IgG2a。

#### 雞卵白蛋白(OVA)

在左脛骨前肌處以肌內(IM)方式及50  $\mu$ l之總體積單獨用20  $\mu$ g VII級OVA (Sigma, A7641)或用其與10  $\mu$ g CPG 24555、CPG 10103、CPG 7909或無CpG對照ODN 2137之組合對C57B1/6野生型及TLR9缺陷型(C57B1/6 TLR9-/-)小鼠(n=10/組)實施免疫。在初免後第14天及第21天使用與初免所用相同之疫苗調配物對動物實施加強免疫。在在最後一次加強免疫後第7天，經由心臟穿刺使用肝素作為抗凝血劑對動物實施抽血，藉由頸椎脫位實施無痛致死，且以無菌方式移除脾以用於檢測抗原特異性CTL活性、IFN- $\gamma$ 分泌(培養上清液)、四聚體陽性CD8 T細胞及多細胞因子(IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 及IL-2)分泌型CD4與CD8 T細胞之免疫分析中。使用血漿來檢測抗原特異性總IgG及IgG同種型IgG1及IgG2c。

#### 免疫分析

### 抗原特異性抗體效價之測定

藉由終點稀釋ELISA分析來檢測並定量對HBsAg(抗HBs)或卵白蛋白(抗OVA)具有特異性之抗體(總IgG、IgG1及IgG2a/c)，且對各動物之樣品重複實施三次。終點效價定義為導致吸光度值(OD 450 nm)為截斷值為0.05之未免疫血漿兩倍之最高血漿稀釋度。該等結果以各組幾何平均效價(GMT) ± SEM形式報告。

### CTL反應之評估

使用在最後一次免疫後第1週(對於OVA)或第2週(對於HBsAg)移除之脾來分析抗原特異性細胞毒性T淋巴細胞(CTL)反應。在補加有10%胎牛血清(Hyclone, Logan, UT)、青黴素-鏈黴素溶液(終濃度分別為1000 U/ml及1 mg/ml; Invitrogen, Burlington, ON)、L-麩胺醯胺(終濃度為2 mM; Invitrogen, Burlington, ON)及 $5 \times 10^{-5}$  M  $\beta$ -巰基乙醇(Invitrogen, Burlington, ON)之RPMI 1640 (Hyclone, Logan, UT)組織培養基中將脾勻漿為單細胞懸浮液。藉由與表現HBsAg之經輻照鼠類細胞系(P815/S)一起培養將存於脾細胞懸浮液( $3 \times 10^6$ 細胞/ml)中之HBsAg特異性淋巴細胞再刺激5天，且藉由與表現OVA之經輻照鼠類細胞系(EG.7)一起培養將存於脾細胞懸浮液( $3 \times 10^6$ 細胞/ml)中之OVA特異性淋巴細胞再刺激5天。在再刺激後，藉由使用 $^{51}\text{Cr}$ 釋放分析來測定淋巴細胞殺滅表現HBsAg或OVA之細胞之潛力。結果表示為在效應子與靶(E:T)之不同比率下的特異性溶胞%。

### 脾細胞之抗原特異性IFN- $\gamma$ 分泌之評估

使用在最後一次免疫後第1週(對於OVA)或第2週(對於HBsAg)獲得之脾細胞在抗原再刺激後來量測IFN- $\gamma$ 分泌。簡言之，根據CTL分析在補加有2%正常小鼠血清(Cedarlane Laboratories, Ontario, Canada)、青黴素-鏈黴素溶液(終濃度分別為1000 U/ml及1 mg/ml; Invitrogen, Burlington, ON)、L-麩胺醯胺(終濃度為2 mM; Invitrogen, Burlington, ON)及 $5 \times 10^{-5}$  M  $\beta$ -巰基乙醇(Invitrogen, Burlington, ON)之RPMI 1640 (Hyclone, Logan, UT)組織培養基[完全RPMI 1640]中製備脾細胞懸浮液且將其調節至終濃度為 $5 \times 10^6$ 細胞/ml。將脾細胞懸浮液(100  $\mu$ l/孔)與在完全RPMI 1640中稀釋至適宜濃度之100  $\mu$ l各種刺激劑(如適宜圖例中所述)一起平鋪於96孔U形底組織培養板上。使用伴刀豆球蛋白A (10  $\mu$ g/ml, Sigma)作為陽性對照且使用單獨與培養基一起培養之細胞作為陰性對照。一式三份平鋪各脾細胞樣品且在增濕5% CO<sub>2</sub>培養器中於37°C下培養72 hr。在培養期結束時收集培養上清液且在-80°C下儲存直至進行分析為止。根據製造商說明書使用市售分析套組(小鼠IFN- $\gamma$  OptEIA; BD Pharmingen, Mississauga, ON)來分析培養上清液中之IFN- $\gamma$ 含量。

### OVA四聚體陽性CD8細胞群之定量

亦使用如上所述獲得之脾細胞懸浮液藉由FACS來對OVA四聚體陽性CD8細胞群實施定量。將各脾之脾細胞( $2 \times 10^6$ )轉移至含有500  $\mu$ l如下染色緩衝液之12 $\times$ 75 mm試管

中：含有1%胎牛血清(Hyclone, Logan, UT)及0.1%疊氮化鈉(Sigma)之DPBS。以1200 rpm將細胞離心5分鐘並移除上清液。藉由在4°C下將細胞與抗小鼠CD16/CD32 (Fc阻斷劑)(BD Pharmingen)一起培養10分鐘來阻斷Fc受體。用染色緩衝液洗滌細胞並在4°C下使用1類OVA特異性(SIINFEKL)四聚體(Beckman Coulter)染色20分鐘。然後再次用染色緩衝液洗滌細胞並在4°C下用抗小鼠CD8a-FITC(BD Pharmingen)染色20分鐘。用染色緩衝液洗滌細胞，使其再懸浮於500  $\mu$ l染色緩衝液中並使用FC500流式細胞計(Beckman coulter)來實施分析。經鑒定OVA特異性CD8 T細胞為針對CD8a以及四聚體二者之陽性細胞。將數據表示為CD8及四聚體陽性細胞之%。

#### *抗原特異性多細胞因子分泌型T細胞群之定量*

在24孔組織培養板上補加有2%正常小鼠血清(Cedarlane Laboratories, Ontario, Canada)、青黴素-鏈黴素溶液(終濃度分別為1000 U/ml及1 mg/ml; Invitrogen, Burlington, ON)、L-麩胺醯胺(終濃度為2 mM; Invitrogen, Burlington, ON)及 $5 \times 10^{-5}$  M  $\beta$ -巰基乙醇(Invitrogen, Burlington, ON)之RPMI 1640 (Hyclone, Logan, UT)組織培養基中對各組之彙集脾細胞懸浮液實施再刺激。

對於CD4再刺激：在含有5  $\mu$ g/ml HBsAg之1 ml終體積中將 $5 \times 10^6$ 細胞刺激過夜。

對於CD8再刺激：在含有5  $\mu$ g/ml HBs肽(IPQSLDSWWTSL)之1 ml終體積中將 $5 \times 10^6$ 細胞刺激5小時。

使用不含刺激劑之培養基作為陰性對照，而使用 10 ng/ml PMA (Sigma)及 1 µg/ml 離子黴素(Sigma) [在培養最後 4 小時期間添加]作為陽性對照。此外，在再刺激最後 4 小時期間，添加 Brefeldin A (BD Pharmingen)及 莫能星 (monensin)(BD Pharmingen)以中止蛋白質運輸。

在再刺激後，用染色緩衝液洗滌細胞並藉由在 4°C 下將細胞與抗小鼠 CD16/CD32(Fc 阻斷劑)(BD Pharmingen)一起培養 10 分鐘來阻斷 Fc 受體。然後將細胞離心並使其再懸浮於含有 5 µg/ml 抗小鼠 CD4-ECD (Invitrogen)或抗小鼠 CD8-ECD (Invitrogen)之染色緩衝液中且在 4°C 下培養 30 分鐘。用染色緩衝液洗滌細胞並使其再懸浮於 BD Fix/Perm 溶液 (BD Pharmingen)中並在 4°C 下保持 20 分鐘。再次用 BD Perm 洗滌溶液 (BD Pharmingen)洗滌細胞且使其再懸浮於含有 5 µg/ml IL-2-FITC (BD Pharmingen)、TNF-APC (BD Pharmingen)及 IFN- $\gamma$ -PeCy7 (BD Pharmingen)中之每一者之 1x BD Perm 洗滌溶液 (BD Pharmingen)中，且在室溫及避光條件下培養 20 分鐘。用 1X BD Perm 洗滌溶液 (BD Pharmingen)洗滌細胞並使其再懸浮於正常染色緩衝液中且使用 FC500 流式細胞計 (Beckman Coulter)實施分析。

## 結果

### 體液免疫反應

所測試所有三種 CpG ODN (CPG 24555、10103 及 7909)皆顯著增強野生型小鼠中之 HBsAg 及 OVA 特異性總 IgG 效價 ( $P < 0.05$ )。三種 CpG ODN 在其提高小鼠中之 HBsAg 或 OVA

特異性總IgG之能力方面無顯著差異(圖1)。

使用OVA來測試CPG 24555、CPG 10103及CPG 7909在TLR9缺陷型動物中提高抗體效價之能力。在以任一疫苗接種方案實施加強免疫後第1週所檢測總抗體效價小於100，且與單獨使用疫苗或使用疫苗與無CpG ODN 2137之組合(數據未顯示)時相比，各種CpG ODN皆不能顯著提高針對OVA之抗體效價。

在小鼠中，廣泛使用IgG同種型分佈作為免疫反應性質之指示物，其中高IgG2a或IgG2c含量指示Th1型免疫反應，而高IgG1效價指示Th2型免疫反應。所有三種CpG ODN皆有助於誘導強Th1型免疫反應，該免疫反應中IgG2a/IgG1及IgG2c/IgG1之比率 $>1$ (圖1)且IgG2a/c效價相對於單獨使用抗原時(圖2)顯著提高( $P<0.05$ )。

#### 細胞免疫反應：CTL反應

量測Th1基反應之功能性方式係量測針對抗原呈遞靶細胞之CTL活性。如圖3中所示，相對於單獨或與無CPG ODN 2137組合使用抗原，所測試所有CpG ODN皆能顯著增強小鼠中針對OVA之抗原特異性CTL反應( $P<0.05$ ；圖3右圖)。除在6.25:1 E:T比率下，所測試CpG ODN在促進OVA特異性CTL誘導方面無顯著差異，其中CPG 24555及CPG 7909二組皆顯示顯著高於接受CPG 10103之組之OVA特異性CTL。

對於HBsAg，CPG 24555及10103二者而非CPG 7909能誘導顯著高於單獨使用抗原時之抗原特異性CTL反應。

( $P < 0.05$  ; 圖 3 左圖) 。 CPG 24555 與 CPG 10103 在其促進小鼠中之 HBsAg 特異性 CTL 反應誘導方面無顯著差異。

在 TLR9 缺陷型小鼠中未觀察到 CpG ODN 介導之 CTL 反應之提高(圖 4)。

#### 抗原特異性 CD8 T 細胞

使用 MHC I 類 H-2Kb -SIINFEKL 特異性四聚體來對經 OVA 免疫之小鼠中之 CD8 T 細胞反應實施定量。與單獨或與無 CpG 對照 ODN 2137 組合使用 OVA 時相比，所測試所有 CpG ODN 皆增強抗原特異性 CD8 T 細胞(圖 5)。CPG 7909 在促進 OVA 特異性 CD8 T 細胞誘導方面優於 CPG 24555 及 10103 ( $P < 0.05$ )。CPG 24555 與 10103 在其誘導 OVA 特異性 CD8 T 細胞之能力方面無顯著差異( $P > 0.05$ )。

在 TLR9 缺陷型小鼠中未觀察到 CpG 介導之 OVA 特異性 CD8 T 細胞之提高(圖 5)。

#### 抗原特異性 IFN- $\gamma$ 分泌

亦藉由使用酶免疫分析檢測存於經接種抗原再刺激之脾細胞培養上清液中之細胞因子來研究因應抗原刺激而產生之干擾素  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 作為細胞免疫之量度。自使用 CPG 24555 或 CPG 10103 經 HBsAg 或 OVA 免疫之動物收集之脾細胞培養上清液顯示顯著高於單獨經抗原免疫者之 IFN- $\gamma$  含量。在與 HBsAg 一起使用時，CPG 24555 在促進抗原特異性 IFN- $\gamma$  分泌方面顯著優於 CPG 10103 或 CPG 7909(圖 6；左圖)。在與 OVA 一起使用時，CPG 24555 在促進抗原特異性 IFN- $\gamma$  分泌方面等同於 CPG 10103 但優於 CPG 7909(圖 6；右

圖)。

在TLR9缺陷型動物中未觀察到CpG ODN介導之抗原特異性IFN- $\gamma$ 分泌之提高(圖7)。

#### 抗原特異性多細胞因子分泌型T細胞群

根據較新發現，T細胞單獨產生之IFN- $\gamma$ 不能預示抗原特異性T細胞誘導保護性免疫反應之能力。因此，在此研究中使用多色流式細胞術來評估抗原特異性CD4及CD8 T細胞產生IL-2、TNF- $\alpha$ 及IFN- $\gamma$ 之能力。

對於CD4及CD8 T細胞二者，與IFN- $\gamma$ 及TNF- $\alpha$ 分泌相比所觀察到之IL-2分泌量相對較低(圖8)。對於CD4 T細胞，CPG 24555有助於誘導相對於CPG 10103及7909較高百分比之雙細胞因子分泌T細胞(使用CPG 24555時為23%，而使用CPG 10103及7909時分別為4%及6%)。總之，觀察到極低百分比之三細胞因子產生HBsAg特異性CD4 T細胞(使用CPG 24555、10103及7909時分別為2%、0%及1%)(圖8A)。

對於CD8 T細胞，CPG 24555及CPG 7909二者有助於誘導含量高於CPG 10103之雙細胞因子分泌T細胞(使用CPG 24555及CPG 7909時分別為48%及56%，而使用CPG 10103時僅為19%)。與CD4細胞類似，觀察到極低百分比之三細胞因子產生HBsAg特異性CD8<sup>+</sup> T細胞(使用CPG 24555、10103及7909時分別為1%、0%及0%)(圖8B)。

表 1：作為分泌 IFN- $\gamma$  及 / 或 IL-2 及 / 或 TNF- $\alpha$  之單、雙及三細胞因子產生細胞之 HBsAg 特異性 CD4+ T 細胞的百分比

CD4 + T細胞	僅Ag	Ag + CpG 24555	Ag + CpG 10103
IFN- $\gamma$ *	69%	53%	36%
TNF- $\alpha$ *	41%	65%	62%
IL-2*	15%	9%	6%
IFN- $\gamma$ / IL-2 #	7%	2%	0%
IFN- $\gamma$ / TNF- $\alpha$ #	10%	22%	2%
TNF- $\alpha$ / IL-2 #	8%	5%	2%
IFN- $\gamma$ / IL-2 / TNF- $\alpha$	0%	2%	0%
單細胞因子產生細胞之%	75%	75%	96%
產生至少兩種細胞因子者之%	25%	25%	4%

\* 指示產生該等細胞因子之細胞之總比例，不論其為單、雙亦或三細胞因子產生細胞

# 指示產生該兩種細胞因子之細胞之總比例，不論其為雙亦或三細胞因子產生細胞

表 2：作為分泌 IFN- $\gamma$  及 / 或 IL-2 及 / 或 TNF- $\alpha$  之單、雙或三細胞因子產生細胞之 HBsAg 特異性 CD8+ T 細胞的百分比

CD8 + T細胞	僅Ag	Ag + CpG 24555	Ag + CpG 10103
IFN- $\gamma$ *	63%	67%	76%
TNF- $\alpha$ *	42%	76%	37%
IL-2*	10%	7%	6%
IFN- $\gamma$ / IL-2 #	5%	2%	0%
IFN- $\gamma$ / TNF- $\alpha$ #	10%	47%	18%
TNF- $\alpha$ / IL-2 #	2%	2%	1%
IFN- $\gamma$ / IL-2 / TNF- $\alpha$	2%	1%	0%
單細胞因子產生細胞之%	87%	51%	81%
產生至少兩種細胞因子者之%	13%	49%	19%

\* 指示產生該等細胞因子之細胞之總比例，不論其為單、雙亦或三細胞因子產生細胞

# 指示產生該兩種細胞因子之細胞之總比例，不論其為雙亦或三細胞因子產生細胞

## 討論

將研究設計為比較 CPG 24555 與 CPG 10103 及 CPG 7909 在與 2 種模型抗原 (HBsAg 及 OVA) 一起使用時提高小鼠抗原特異性免疫反應之能力。CPG 24555 及 CPG 10103 具有相同核苷酸序列，但 CPG 24555 中最靠近 3' 之 CG 二核苷酸發生顛倒，從而導致 CPG 24555 中之 CpG 基序消失。CPG

7909係B類CpG ODN，其輔助活性已在用多種疫苗抗原實施之人類臨床實驗中得到證實。

CPG 24555中3' CpG基序之消失對其提高抗原特異性免疫反應之能力無任何負面影響，且與CPG 10103相比顯示相等(抗體反應及抗原特異性CD8 T細胞，如藉由四聚體染色所量測)或更佳(抗原特異性IFN- $\gamma$ 分泌)之應變性免疫反應之提高。類似地，CPG 24555在提高抗原特異性抗體反應以及CTL反應方面等同於CPG 7909。CPG 24555在促進抗原特異性IFN-g分泌方面優於CPG 7909。

使用所測試所有三種CpG ODN達成之應變性免疫反應之提高具有TLR9依賴性，此乃因在TLR9缺陷型小鼠中未觀察到應變性免疫反應之提高。

如表1中所示，使用CPG 24555可獲得較高比例之產生IFN- $\gamma$ 之抗原特異性CD4+ T細胞。同樣可獲得較高比例之多功能抗原特異性CD4+ T細胞，其產生IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 及IL-2中之至少兩種細胞因子(即IFN- $\gamma$ 及TNF- $\alpha$ 二者、IFN- $\gamma$ 及IL-2二者或TNF- $\alpha$ 及IL-2二者，或甚至分泌IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 及IL-2之三細胞因子產生細胞)。

對於CD8+ T細胞(表2)，可獲得較高比例之多功能抗原特異性CD8+ T細胞，其產生兩種細胞因子，且具體而言產生IFN- $\gamma$ 及TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 及IL-2二者。

總體而言，該等結果表明，在用作佐劑時，CPG 24555在生成多功能抗原特異性T細胞群方面優於CPG 10103。此可具有重要意義，此乃因人們認為多功能T細胞尤其在產

生趨化因子(例如 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 及 IL-2)方面係優於分泌單一細胞因子之T細胞之效應子細胞。

實例2：

CPG 24555與CPG 10103之比較

所測試ODN之核苷酸序列

CPG ODN 10103

5' T\*C\*G\*T\*C\*G\*T\*T\*T\*T\*T\*C\*G\*G\*T\*C\*G\*T\*T\*T\*T 3'

(SEQ ID NO:2)

CPG ODN 24555

5' T\*C\*G\*T\*C\*G\*T\*T\*T\*T\*T\*C\*G\*G\*T\*G\*C\*T\*T\*T\*T 3'

(SEQ ID NO:1)

無 CpG ODN 22881

5' T\*G\*C\*T\*G\*C\*T\*T\*T\*T\*T\*G\*G\*C\*T\*G\*C\*T\*T\*T\*T 3'

(SEQ ID NO:4)

無 CpG ODN 2137

5' T\*G\*C\*T\*G\*C\*T\*T\*T\*T\*G\*T\*G\*C\*T\*T\*T\*T\*G\*T\*G\*C\*T\*T 3'

(SEQ ID NO:5)

\* 指示硫代磷酸酯鍵聯(PS)

序列中之下劃線部分代表 CPG ODN 10103與 CPG ODN 24555之間之差異。

人類之最佳 CpG 基序：GTCGTT

人類 PBMC 中之先天免疫

將人類 PBMC ( $5 \times 10^6$ /ml)與各種濃度之 CPG 10103、CPG 24555或無 CpG 對照 ODN 22881 一起培養 24 或 48 h。收集細

胞上清液並使用市售ELISA套組分析細胞因子/趨化因子分泌(圖9A及圖9B)。

#### *BALB/c小鼠中之體內先天免疫*

以100 µg之劑量程度向BALB/c小鼠(n=5/組)皮下注射PBS(安慰劑對照)、CPG 24555、CPG 10103或無CpG對照ODN 2137。在注射後第3小時對動物實施抽血，且使用市售ELISA分析血漿中之IP-10(圖10A)及IL-12(圖10B)或IL-6(圖10C)。所顯示結果為各組平均值 ± 平均值標準誤差(NS=不顯著)。

#### *BALB/c小鼠中之體內體液免疫*

向BALB/c小鼠肌內注射HBsAg (1 µg)以及CPG 2455、CPG 10103或無CpG對照ODN 2137 (10 µg)或單獨注射HBsAg (1 µg)。在第0天及第14天對小鼠實施注射。所顯示結果為在加強免疫後2週藉由終點ELISA量測之HBsAg特异性總IgG效價(圖11A)。

向C57bl/6小鼠肌內注射OVA (20 µg)以及CPG ODN 2455、CPG 10103或無CpG對照ODN 2137 (10 µg)或單獨注射OVA (20 µg)。在第0天、第7天及第21天對小鼠實施注射。所顯示結果為在最後一次加強免疫後1週之OVA特异性總IgG效價(圖11B)。

向BALB/c小鼠肌內注射來自Texas 1/77 (H3N2)之流感A HA (1 µg) ± 白朊(25 µg Al3+)，以及10 µg CPG ODN 2455、CPG 10103或無CpG對照ODN 2137，或單獨注射流感A HA (1 µg) ± 白朊(25 µg Al3+)。所顯示結果為在免疫

後不同時間藉由終點ELISA量測之HA特異性總IgG之動力學(圖11C)。

#### *BALB/c*小鼠中之T細胞反應

向BALB/c小鼠肌內注射HBsAg (1 µg)以及CPG ODN 2455、CPG 10103或無CpG對照ODN 2137 (10 µg)或單獨注射HBsAg (1 µg)。在第0天及第14天對小鼠實施注射。所顯示結果為在加強免疫後2週藉由<sup>51</sup>Cr釋放量測之HBsAg特異性CTL(圖12A)。

向C57bl/6小鼠肌內注射OVA (20 µg)以及CPG ODN 2455、CPG 10103或無CpG對照ODN 2137 (10 µg)或單獨注射OVA (20 µg)。在第0天、第7天及第21天對小鼠實施注射。所顯示結果為在最後一次加強免疫後1週藉由<sup>51</sup>Cr釋放量測之OVA特異性CTL(圖12B)。

向BALB/c小鼠肌內注射HBsAg (1 µg)以及CPG ODN 2455、CPG 10103或無CpG對照ODN 2137 (10 µg)或單獨注射HBsAg (1 µg)。在第0天及第14天對小鼠實施注射。自最後一次加強免疫後第2週將脾細胞與各抗原一起培養72小時且藉由ELISA來測試培養上清液中之IFN-γ(圖13A)。

向C57bl/6小鼠肌內注射OVA (20 µg)以及CPG ODN 2455、CPG 10103或無CpG對照ODN 2137 (10 µg)或單獨注射OVA (20 µg)。在第0天、第7天及第21天對小鼠實施注射。自最後一次加強免疫後第1週將脾細胞與各抗原一起培養72小時且藉由ELISA來測試培養上清液中之IFN-γ(圖13B)。

### 結果與討論

CPG 10103及CPG 24555具有相同核苷酸序列，但存於CPG 10103中最靠近3'之CG二核苷酸顛倒為CPG 24555中之GC，從而導致CPG 24555中之CpG基序消失。根據先前報告，在兩側序列、基序位置及間距相同時，CPG基序數量增加應可導致免疫刺激增強。根據先前知識，預計CPG 24555之免疫刺激性可能低於CPG 10103且作為疫苗佐劑之有效性可能較低。然而，上述結果表明，CPG 24555之免疫刺激性潛力及佐劑活性類似於或大於CPG 10103。

### 實例3

在BALB/C小鼠中比較作為疫苗佐劑之CPG 10103、CPG 24555及CPG 7909與流感血凝素抗原(HA)

### 方法及材料

藉由將來自Texas 1/77 (H3N2)之流感A血凝素(HA)(1  $\mu$ g)  $\pm$  CpG或對照ODN (10 mg)  $\pm$  白朊(25 mg Al3+)以50  $\mu$ l總體積肌內(IM)注射至左脛骨前肌(TA)中來對雌性BALB/c小鼠(10/gp)實施免疫。在免疫後以不同時間間隔對小鼠實施抽血以評價HA特異性抗體反應。在免疫後第6週對每組中之一半動物實施無痛致死以評價細胞介導免疫反應(CTL、HA特異性IFN-g分泌及T-細胞細胞因子分泌之流式細胞檢測分析)。

表 3

試劑	來源，批號	原液濃度	終濃度
流感A抗原 (Texas 1/77 H3N2)	Microbix Biosystems公司 13037A8	1.0 mg/ml	0.02 mg/ml
白朮(AI3+)鋁膠 「85」2%	Cedarlane 85339	10.4 mg/ml	0.5 mg/ml
CPG 7909	Coley，批號ACZ-03I-016-M	37.15 mg/ml	0.2 mg/ml
CPG 24555(亦稱作 CPG 10103_GC4)	Avecia，批號ASD-A0218- 157 [標記為CPG 10103]	17.75	0.2 mg/ml
CPG 10103	Dow Chemical，批號 MM021230	24.51 mg/ml	0.2 mg/ml
對照ODN 2137	Coley，批號008	22.18 mg/ml	0.2 mg/ml
PBS	Sigma (P4244)，批號 096K6064	N/A	N/A

### 結果及討論

#### 在免疫後第6週之抗HA

在免疫後第6週量測抗HA之量。CPG 24555在提高HA特異性IgG方面優於CPG 10103及CPG 7909(圖14)。

#### 在免疫後第4週之血凝抑制(HIA)效價

使用血凝抑制分析(HIA)來評估抗體之功能性。在單獨用作佐劑時，CPG 24555在提高HIA效價方面優於CPG 10103 ( $p=0.009$ )且等同於CPG 7909 ( $p=0.1$ )(圖15)。所測試所有3種CpG ODN在與白朮組合使用時可同等程度地提高HIA效價。

#### HA特異性IFN $\gamma$ 分泌

量測所分泌IFN $\gamma$ 之濃度。在單獨用作佐劑時，CPG 24555在提高HA特異性IFN- $\gamma$ 分泌(細胞介導免疫之標記)方面優於CPG 10103(圖16)。在與白朮組合使用時，CPG 24555在提高HA特異性IFN- $\gamma$ 分泌方面優於CPG 10103及

CPG 7909(圖 16)。

#### 實例4

CPG 24555與CPG 7909作為針對B型肝炎表面抗原(HBsAg)之疫苗佐劑在食蟹猴中之比較

#### 材料及方法

以肌內方式(在右四頭肌0.6 ml IM注射)用以下試劑對食蟹猴(3-5歲; 2.5至5.5 kg; n=5/gp; 但在HBsAg+IMX組中n=4)實施免疫:

- 1) Engerix-B(兒科劑量; 10 mg HBsAg)
- 2) Engerix-B+CPG 7909 (0.5 mg)
- 3) Engerix-B+CPG 24555 (0.5 mg)

動物接受3次免疫; 在第0週(初免)、第4週(加強免疫1)及第8週(加強免疫2)。在初免前、初免後第4週(第4週)、加強免疫1後第2週(第6週)、加強免疫1後第4週(第8週)及加強免疫2後第2週(第10週)對動物實施抽血。

如下所述實施HBsAg特異性免疫分析:

- 1) 抗體效價及親和力
- 2) 胞內細胞因子分泌(IL-2、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ )
- 3) 多功能T細胞
- 4) ELISPOT分析: IL2、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、穿孔蛋白

#### 結果與討論

##### 體液反應

藉由在疫苗接種前所檢測較高程度之HBsAg特異性抗體效價可瞭解動物在此研究中預先曝露於乙型肝炎病毒之可

能性。此外，藉由血清學檢測，所測試批次中一隻動物對HBV呈陽性，此表明其可能曝露於HBV中。然而，藉由PCR來檢測，此研究中所測試所有動物皆對HBV呈陰性。每次加強免疫皆使抗HBsAg效價有所提高。相對於單獨使用Engerix-B，向Engerix-B添加CpG可提高HBsAg特異性抗體效價(圖17)。此外，相對於單獨使用Engerix-B，添加CpG可增強抗體親和力(圖18)。在提高抗體效價及親和力二者方面CPG 24555等同於CPG 7909。

#### *T細胞反應：CD4 T細胞之胞內細胞因子分泌*

向Engerix-B添加CpG傾向於提高CD4 T細胞介導之IFN- $\gamma$ 及TNF- $\alpha$ 而非IL-2分泌之頻率(圖19A、B及C)。總之，CPG 24555在誘導CD4介導細胞因子方面等同於或優於CPG 7909。

#### *T細胞反應：多功能CD4 T細胞；定量分析*

在第10週(加強免疫2後第2週)量測分泌一種、兩種或三種細胞因子之細胞之數量。CPG 24555在誘導分泌一種細胞因子之Engerix-B特異性CD4 T細胞方面等同於CPG 7909。總之，檢測到相對低含量之三細胞因子產生CD4 T細胞。然而，CPG 24555所誘導三細胞因子產生CD4 T細胞多於CPG 7909或單獨使用Engerix-B(圖20A)。此外，經Engerix-B+CPG 24555免疫之動物之三細胞因子產生T細胞的比例高於經Engerix-B單獨免疫或經Engerix-B+CPG 7909免疫之動物(圖20B)。

#### *T細胞反應：多功能CD4 T細胞；定性分析*

量測分泌 IL-2、IFN- $\gamma$  及 TNF $\alpha$ 、或該等細胞因子之組合之細胞的數量。CPG 24555 在誘導多功能 T 細胞方面等同於或優於 CPG 7909 (圖 21A 及圖 21B)。

#### *T 細胞反應：CD4 T 細胞之多功能性*

在加強免疫 2 後第 2 週量測三細胞因子產生 CD4 T 細胞之比例。使用 CPG 24555 時所觀察到三細胞因子產生 CD4 T 細胞之比例高於使用 CPG 7909 時之比例。

#### 結論

根據數據，CPG 24555 中 3' CpG 基序之消失對其提高抗原特異性免疫反應之能力無任何負面影響，且其顯示等同於或優於 CPG 10103 及 CPG 7909 之應變性免疫反應之提高。在小鼠中使用多種抗原觀察到之 CPG 24555 之佐劑活性亦可在非人靈長類中使用 CPG 24555 來達成，其相對於在食蟹猴中使用 B 型肝炎表面抗原時 CPG 7909 之佐劑活性顯示相等 (體液免疫) 或較優 (Ag 特異性多功能 T 細胞) 之佐劑活性。

熟習此項技術者僅使用常規實驗即可確認或能確定本文所述本發明之具體實施例具有許多等效形式。該等等效形式均欲涵蓋與下述申請專利範圍中。

#### 【圖式簡單說明】

圖 1：小鼠中體液免疫反應之提高。用無佐劑或與 CPG 24555、10103 或 7909 (10  $\mu$ g) 或無 CpG 對照 ODN 2137 (10  $\mu$ g；僅與 OVA 一起使用) 組合之 1  $\mu$ g HBsAg (左圖) 或 20  $\mu$ g OVA (右圖) 對成年 (6-8 wk；n=10/gp) 小鼠進行免疫。自最

後一次加強免疫後第2週(對於HBsAg)或第1週(對於OVA)分析血漿中之抗原特異性總IgG、IgG1及IgG2a/c含量(抗HBs或抗OVA)。各條柱代表總IgG之幾何平均( $\pm$  SEM)效價。效價定義為導致吸光度值為截斷值為0.05之未免疫血漿兩倍的最高稀釋度。各條柱上方之數字代表抗原特異性IgG2a(或2c)/IgG1之比。

圖2：在小鼠中所誘導體液免疫反應之性質。用無佐劑或與CPG 24555、10103或7909 (10  $\mu$ g)或無CpG對照ODN 2137(10  $\mu$ g；僅與OVA一起使用)組合之1  $\mu$ g HBsAg(左圖)或20  $\mu$ g OVA(右圖)對成年(6-8 wk；n=10/gp)小鼠進行免疫。自最後一次加強免疫後第2週(對於HBsAg)或第1週(對於OVA)分析血漿中針對HBsAg(抗HBs)或OVA(抗OVA)之IgG1(無色條柱)及IgG2a或IgG2c(黑色條柱)含量。各條柱代表整組(n=10)之ELISA終點稀釋效價之幾何平均( $\pm$  SEM)。效價定義為導致吸光度值為截斷值為0.05之未免疫血漿兩倍的最高稀釋度。

圖3：在小鼠中誘導之細胞毒性T淋巴細胞反應。用無佐劑或與CPG 24555、10103或7909 (10  $\mu$ g)或無CpG對照ODN 2137(10  $\mu$ g；僅與OVA一起使用)組合之1  $\mu$ g HBsAg(左圖)或20  $\mu$ g OVA(右圖)對成年(6-8 wk；n=5/gp)小鼠進行免疫。自最後一次加強免疫後第2週(對於HBsAg)或第1週(對於OVA)使用標準<sup>51</sup>Cr釋放分析來分析脾細胞之抗原特異性CTL反應。

圖4：在TLR9缺陷型小鼠中CTL反應不存在CpG介導提

高。用無佐劑或與CPG 24555、10103或7909 (10  $\mu$ g)或無CpG對照ODN 2137 (10  $\mu$ g)組合之20  $\mu$ g OVA來對TLR9缺陷型成年(6-8 wk; n=5 gp)小鼠進行免疫。自最後一次加強免疫後第1週使用標準<sup>51</sup>Cr釋放分析來分析脾細胞之OVA特異性CTL反應。

圖5：野生型與TLR9缺陷型小鼠中之OVA特異性CD8 T細胞。用無佐劑或與CPG 24555、10103或7909 (10  $\mu$ g)或無CpG對照ODN 2137 (10  $\mu$ g)組合之20  $\mu$ g OVA來對野生型及TLR9缺陷型成年(6-8 wk; n=5/gp)小鼠進行免疫。自最後一次加強免疫後第1週使用MHC I類H-2Kb -SIINFEKL四聚體來分析脾細胞之OVA特異性CD8 T細胞。

圖6：小鼠中之抗原特異性IFN-g分泌。用無佐劑或與CPG 24555、10103或7909 (10  $\mu$ g)或無CpG對照ODN 2137(10  $\mu$ g; 僅與OVA一起使用)組合之1  $\mu$ g HBsAg(左圖)或20  $\mu$ g OVA(右圖)對成年(6-8 wk; n=5/gp)小鼠進行免疫。自最後一次加強免疫後第2週(對於HBsAg)或第1週(對於OVA)用圖中所示相關抗原將脾細胞刺激72 hr, 且藉由ELISA來分析培養上清液中之IFN- $\gamma$ 。

圖7：在TLR9缺陷型小鼠中抗原特異性IFN-g分泌不存在CpG介導提高。用無佐劑或與CPG 24555、10103或7909 (10  $\mu$ g)或無CpG對照ODN 2137 (10  $\mu$ g)組合之20  $\mu$ g OVA來對TLR9缺陷型成年(6-8 wk; n=5 gp)小鼠進行免疫。在最後一次加強免疫後第1週用OVA以0、0.5及1 mg/ml之濃度將脾細胞刺激72 hr, 且藉由ELISA分析培養上清液中之

IFN- $\gamma$ 。

**圖 8：**小鼠中之抗原特異性多細胞因子分泌型T細胞群。單獨用 1  $\mu\text{g}$  HBsAg及抗原或用 1  $\mu\text{g}$  HBsAg及抗原與 CPG 24555、10103 或 7909 (10  $\mu\text{g}$ )之組合對成年(6-8 wk；n=5/gp)小鼠進行免疫。自加強免疫後第2週用HBsAg抗原(對於CD4)或HBs I類肽(對於CD8)對脾細胞實施再刺激，且使用流式細胞術來對分泌IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 及/或IL-2之CD4(圖A)及CD8(圖B)T細胞群實施定量。

**圖 9：**人類 PBMC 中之先天免疫。將人類 PBMC ( $5 \times 10^6/\text{ml}$ )與不同濃度之 CPG 10103、CPG 24555或無 CpG 對照 ODN 22881 一起培養 24 或 48 h。收集細胞上清液並使用市售 ELISA 套組分析其細胞因子/趨化因子分泌。圖 9A 展示 IFN- $\alpha$ 、MCP-1 及 IP-10 分泌。圖 9B 展示 IL-6、IL-10 及 IL-2R 分泌。

**圖 10：**BALB/c 小鼠中之體內先天免疫。以 100  $\mu\text{g}$  之劑量程度向 BALB/c 小鼠 (n=5/組) 皮下注射 PBS(安慰劑對照)、CPG 24555、CPG 10103 或無 CpG 對照 ODN 2137。在注射後 3 小時對動物實施抽血且使用市售 ELISA 分析血漿中之 IP-10(圖 10A)及 IL-12(圖 10B)或 IL-6(圖 10C)。

**圖 11：**BALB/c 小鼠中之體內體液免疫。用 HBsAg (1  $\mu\text{g}$ )  $\pm$  CPG 24555 或 10103 (10  $\mu\text{g}$ )、OVA (20  $\mu\text{g}$ )  $\pm$  CPG 24555 或 10103 (10  $\mu\text{g}$ )、或用來自 Texas 1/77 (H3N2) 之流感 (Influenza) A HA (1  $\mu\text{g}$ ) + 白木 (25  $\mu\text{g}$  Al<sub>3</sub><sup>+</sup>)、 $\pm$  CPG 24555 或 10103 (10  $\mu\text{g}$ ) 來對 BALB/c 小鼠實施肌內免疫。在第 0 天

及第14天(HBsAg)、在第0天、第7天及第21天(OVA)或僅在第0天(HA)對小鼠實施免疫。圖11A展示在加強免疫後第2週時藉由終點ELISA量測之HBsAg特異性總IgG效價。圖11B展示在最後一次加強免疫後第1週時OVA特異性總IgG效價。圖11C展示在免疫後不同時間藉由終點ELISA量測之HA特異性總IgG之動力學。

**圖 12：BALB/c 小鼠中之 T 細胞反應。**向 BALB/c 小鼠肌內注射 HBsAg (1  $\mu$ g) 以及 CPG ODN 2455、CPG 10103 或無 CpG 對照 ODN 2137 (10  $\mu$ g)，或單獨注射 HBsAg (1  $\mu$ g)。在第 0 天及第 14 天對小鼠實施注射。圖 12A 展示在加強免疫後第 2 週藉由  $^{51}\text{Cr}$  釋放量測之 HBsAg 特異性 CTL。向 C57bl/6 小鼠肌內注射 OVA (20  $\mu$ g) 以及 CPG ODN 2455、CPG 10103 或無 CpG 對照 ODN 2137 (10  $\mu$ g)，或單獨注射 OVA (20  $\mu$ g)。在第 0 天、第 7 天及第 21 天對小鼠實施注射。圖 12B 展示在最後一次加強免疫後第 1 週藉由  $^{51}\text{Cr}$  釋放量測之 OVA 特異性 CTL。

**圖 13：BALB/c 小鼠中之 T 細胞反應。**向 BALB/c 小鼠肌內注射 HBsAg (1  $\mu$ g) 以及 CPG ODN 2455、CPG 10103 或無 CpG 對照 ODN 2137 (10  $\mu$ g)，或單獨注射 HBsAg (1  $\mu$ g)。在第 0 天及第 14 天對小鼠實施注射。自最後一次加強免疫後第 2 週將脾細胞與各抗原一起培養 72 小時且藉由 ELISA 來測試培養上清液中之 IFN- $\gamma$  (圖 13A)。向 C57bl/6 小鼠肌內注射 OVA (20  $\mu$ g) 以及 CPG ODN 2455、CPG 10103 或無 CpG 對照 ODN 2137 (10  $\mu$ g) 或單獨注射 OVA (20  $\mu$ g)。在第

0天、第7天及第21天對小鼠實施注射。自最後一次加強免疫後第1週將脾細胞與各抗原一起培養72小時且藉由ELISA來測試培養上清液中之IFN- $\gamma$ (圖13B)。

圖14：在免疫後第6週之抗HA。用HA (1  $\mu\text{g}$ )  $\pm$  CpG或對照ODN (10  $\mu\text{g}$ )  $\pm$  白礬 (25  $\mu\text{g}$  Al<sup>3+</sup>)以50  $\mu\text{l}$ 之總體積對雌性BALB/c小鼠實施免疫。在免疫後第6週量測抗HA之量。

圖15：在免疫後第4週之血凝抑制(HIA)效價。使用血凝抑制分析(HIA)來評估抗體功能。量測單獨或與白礬組合提高HIA效價之能力。

圖16：HA特異性IFN $\gamma$ 分泌。用HA (1  $\mu\text{g}$ )  $\pm$  CpG或對照ODN (10  $\mu\text{g}$ )  $\pm$  白礬 (25  $\mu\text{g}$  Al<sup>3+</sup>)以50  $\mu\text{l}$ 之總體積對雌性BALB/c小鼠實施免疫。使用在免疫後第6週移除之脾細胞來分析抗原特異性IFN $\gamma$ 分泌。

圖17：非人靈長類中之體液反應。在第0週、第4週及第8週藉由肌內注射單獨用Engerix-B (10  $\mu\text{g}$  HBsAg ; 250  $\mu\text{g}$  Al<sup>3+</sup>)或用其與0.5 mg pf CPG 7909或CPG 24555之組合對食蟹猴(3-5歲齡 ; n=5/組)實施免疫。以規律性時間間隔對動物實施抽血，且使用市售套組(MONOLISA™ 抗HBS)來量測HBsAg特異性抗體效價。

圖18：非人靈長類中之體液反應。在第0週、第4週及第8週藉由肌內注射單獨用Engerix-B (10  $\mu\text{g}$  HBsAg ; 250  $\mu\text{g}$  Al<sup>3+</sup>)或用其與0.5 mg CPG 7909或CPG 24555之組合對食蟹猴(3-5歲齡 ; n=5/組)實施免疫。自第2次免疫後第4週及第3次免疫後第2週使用硫氰酸鈉乳液法分析血漿中之抗體親

和力。

**圖 19：**非人靈長類中之T細胞反應。在第0週、第4週及第8週藉由肌內注射單獨用Engerix-B (10  $\mu\text{g}$  HBsAg ; 250  $\mu\text{g}$  Al<sup>3</sup>)或用其與0.5 mg CPG 7909或CPG 24555之組合對食蟹猴(3-5歲齡；n=5/組)實施免疫。在疫苗接種前及在疫苗接種後之若干時間點，藉由流式細胞術來測試外周血單核細胞(PBMC)中HBsAg特異性CD4 T細胞介導之胞內細胞因子分泌。圖19A展示IFN- $\gamma$ 分泌。圖19B展示IL-2分泌。圖19C展示TNF- $\alpha$ 分泌。

**圖 20：**T細胞反應：多功能CD4 T細胞；定量分析。在第0週、第4週及第8週藉由肌內注射單獨用Engerix-B (10  $\mu\text{g}$  HBsAg ; 250  $\mu\text{g}$  Al<sup>3</sup>)或用其與0.5 mg CPG 7909或CPG 24555之組合對食蟹猴(3-5歲齡；n=5/組)實施免疫。在第3次免疫後第2週，藉由流式細胞術來測試外周血單核細胞(PBMC)中分泌一種、兩種或三種細胞因子之HBsAg特異性CD4 T細胞。圖20A展示每一百萬所分析CD4 T細胞中分泌一種、兩種或三種細胞因子之HBsAg特異性CD4 T細胞數。圖20B展示產生單、雙及三細胞因子之T細胞在總HBsAg特異性CD4 T細胞群中之比例。

**圖 21：**T細胞反應：多功能CD4 T細胞；定性分析。量測分泌IL-2、IFN- $\gamma$ 及TNF $\alpha$ 或該等細胞因子之組合之細胞數。在第0週、第4週及第8週藉由肌內注射單獨用Engerix-B (10  $\mu\text{g}$  HBsAg ; 250  $\mu\text{g}$  Al<sup>3</sup>)或用其與0.5 mg CPG 7909或CPG 24555之組合對食蟹猴(3-5歲齡；n=5/組)實施免疫。

在第3次免疫後第2週，藉由流式細胞術來測試外周血單核細胞(PBMC)中分泌IL-2、IFN- $\gamma$ 及TNF $\alpha$ 或該等細胞因子之組合之HBsAg特異性CD4 T細胞之數量。

## 序列表

<110> 美商輝瑞大藥廠

<120> 免疫刺激性寡核苷酸

<130> PC33856A

<140> 098141948

<141> 2009-12-08

<150> 61/181,799

<151> 2009-05-28

<150> 61/121,022

<151> 2008-12-09

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400> 1

tcgtcgttt tcggtgctt t

21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400> 2

tcgtcgttt tcggtcgtt t

21

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400> 3

tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400> 4

tgctgctttt tggctgcttt t

21

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400> 5

tgctgctttt gtgcttttgt gctt

24

# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號： 98141948

A61k 39/385 (2006.01)

※ 申請日： 98.12.8

※IPC 分類：~~C07H~~; A61K 39/39 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

A61k 31/7088 (2006.01)

免疫刺激性寡核苷酸

IMMUNOSTIMULATORY OLIGONUCLEOTIDES

## 二、中文發明摘要：

本發明係關於免疫刺激性寡核苷酸，及使用免疫刺激性寡核苷酸誘導抗原特異性免疫反應之方法。本發明另外關於包含免疫刺激性寡核苷酸及抗原及包含醫藥上可接受之載劑之疫苗。在一些實施例中，本發明免疫刺激性寡核苷酸包括一或多個經修飾之鍵聯。

## 三、英文發明摘要：

The invention relates to immunostimulatory oligonucleotides and methods of using immunostimulatory oligonucleotides to induce an antigen-specific immune response. The invention further relates to a vaccine that comprises an immunostimulatory oligonucleotide and an antigen, and comprises a pharmaceutically acceptable carrier. The immunostimulatory oligonucleotides of the invention, in some embodiments, include one or more modified linkage(s).

## 七、申請專利範圍：

1. 一種免疫刺激性寡核苷酸，其包含以下核苷酸序列：  
5' TCGTCGTTTTTCGGTGCTTTT 3' (SEQ ID NO:1)。
2. 如請求項1之免疫刺激性寡核苷酸，其中該寡核苷酸包含一或多個經修飾之鍵聯(linkages)。
3. 如請求項2之免疫刺激性寡核苷酸，其中該寡核苷酸包含一或多個硫代磷酸酯鍵聯。
4. 如請求項1之免疫刺激性寡核苷酸，其中該寡核苷酸包含至少一個親脂性經取代之核苷酸類似物及嘧啶-嘌呤二核苷酸。
5. 一種疫苗，其包含  
    抗原及包含核苷酸序列SEQ ID NO:1之免疫刺激性寡核苷酸，另外包含醫藥上可接受之載劑。
6. 如請求項5之疫苗，其中該免疫刺激性寡核苷酸呈有效量以誘導抗原特異性免疫反應。
7. 如請求項6之疫苗，其中該所誘導抗原特異性免疫反應係Th1免疫反應。
8. 如請求項5之疫苗，其中該抗原係微生物抗原、自身抗原或成癮性物質。
9. 如請求項8之疫苗，其中該微生物抗原係細菌抗原、病毒抗原或寄生性抗原。
10. 如請求項9之疫苗，其中
  - a) 該細菌抗原係與金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、引發齲齒之細菌、或引發牙周病之細菌相關；

b) 該病毒抗原係與呼吸道合胞病毒(RSV)、單純疱疹病毒1、單純疱疹病毒2、人類免疫缺陷病毒-1 (HIV-1) 或HIV-2相關，或

c) 該寄生性抗原係與引發瘧疾之寄生蟲相關。

11. 如請求項10之疫苗，其中

a) 該引發齲齒之細菌係變異鏈球菌 (*Streptococcus mutans*)、齲齒鏈球菌 (*Streptococcus sobrinus*)、血鏈球菌 (*Streptococcus sanguis*)、嗜酸乳桿菌 (*Lactobacillus acidophilus*)、或黏性放線菌 (*Actinomyces viscosus*)；或

b) 該引發牙周病之細菌係牙齦卟啉單胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*) 或伴放線放線桿菌 (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*)。

12. 如請求項8之疫苗，其中該自身抗原係腫瘤抗原、與阿茲海默氏病 (Alzheimer's Disease) 有關之抗原、針對人類抗體之抗原、人類內源性逆轉錄病毒元件表現之抗原、或與載體結合之菸鹼半抗原。

13. 如請求項12之疫苗，其中

a) 該腫瘤抗原係 HER2、MAGE、NY-ESO、PSA、CEA 或 EGFR 之變體形式；

b) 該與阿茲海默氏病有關之抗原係  $\tau$ - 或  $\beta$ -澱粉樣蛋白；

c) 該抗原係 IgE；或

d) 與該菸鹼半抗原結合之載體係白喉毒素 (DT)。

14 如請求項5之疫苗，其中該抗原係肽、重組蛋白、純化

蛋白、完全殺死病原體、活減毒病毒或病毒載體、活減毒細菌或細菌載體、多糖、半抗原、或由質粒DNA編碼之抗原。

15. 如請求項5之疫苗，其中該抗原與載體結合。
16. 如請求項15之疫苗，其中該載體係白喉毒素(DT)或病毒樣顆粒，其中該病毒樣顆粒係RNA噬菌體Q-β、B型肝炎表面抗原(HBsAg)、或B型肝炎核心抗原(HBcAg)。
17. 如請求項5之疫苗，其另外包含一或多種佐劑。
18. 如請求項17之疫苗，其中該佐劑係非TLR9之類鐸受體(Toll-like receptor)(TLR)之激動劑(agonist)。
19. 如請求項18之疫苗，其中該激動劑係TLR 3、TLR 4、TLR 5、TLR 7或TLR 8之激動劑。
20. 如請求項19之疫苗，其中
  - a) 該TLR 3激動劑係經穩定之聚I:C；
  - b) 該TLR 4激動劑係脂多糖(LPS)衍生物；
  - c) 該TLR 5激動劑係鞭毛蛋白；或
  - d) 該TLR 7或TLR 8激動劑係咪唑并喹啉家族之小分子。
21. 如請求項20之疫苗，其中該LPS衍生物係MPL或GLA。
22. 如請求項17之疫苗，其中該佐劑係鋁鹽、免疫刺激性複合物(ISCOM)、水包油或油包水乳液、脂質體或遞送系統。
23. 如請求項22之疫苗，其中
  - a) 該鋁鹽係氫氧化鋁；或

b) 該遞送系統係奈米顆粒或微粒。

24. 如請求項5之疫苗，其中該免疫刺激性寡核苷酸包含一或多個經修飾之鍵聯。

25. 如請求項24之疫苗，其中

a) 該免疫刺激性寡核苷酸包含一或多個硫代磷酸酯鍵聯；或

b) 該免疫刺激性寡核苷酸包含至少一個親脂性經取代之核苷酸類似物及嘧啶-嘌呤二核苷酸。

26. 如請求項5之疫苗，其中該疫苗經調配投與。

27. 如請求項5之疫苗，其中

a) 該疫苗經調配以經由非經腸途徑投與，其中該非經腸途徑係肌內、皮下、皮內、靜脈內或腹膜內；或

b) 該疫苗經調配以經由局部途徑投與，其中該局部途徑係皮膚、經皮或黏膜表面。

28. 如請求項27之疫苗，其中該黏膜途徑係經口、鼻內、陰道內、直腸內、頰內或眼內。

29. 一種在有需要之個體中誘導抗原特異性免疫反應之醫藥組合物，其包含抗原及有效量之包含核苷酸序列SEQ ID NO:1之免疫刺激性寡核苷酸。

30. 如請求項29之組合物，其中該抗原係微生物抗原、自身抗原或成癮性物質。

31. 一種抗原及包含核苷酸序列SEQ ID NO:1之免疫刺激性寡核苷酸之用途，其用於製造在有需要之個體中誘導抗原特異性免疫反應之藥物。

32. 如請求項31之用途，其中該抗原係微生物抗原、自身抗原或成癮性物質。

八、圖式：

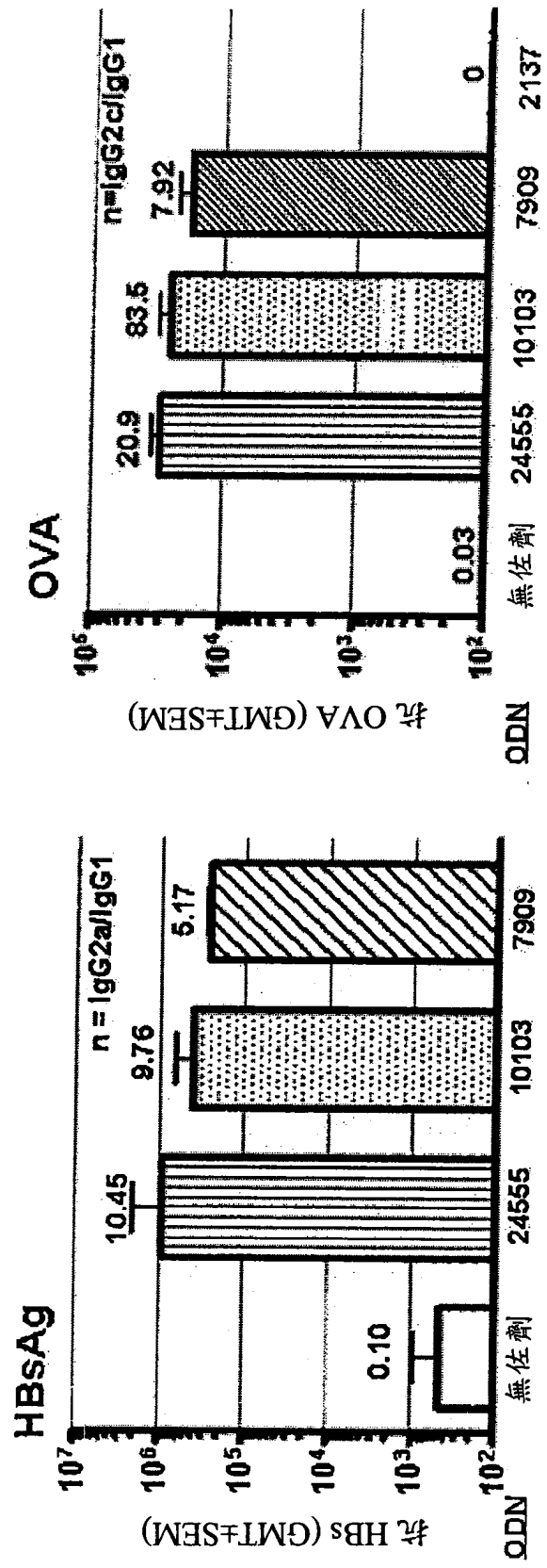


圖 1

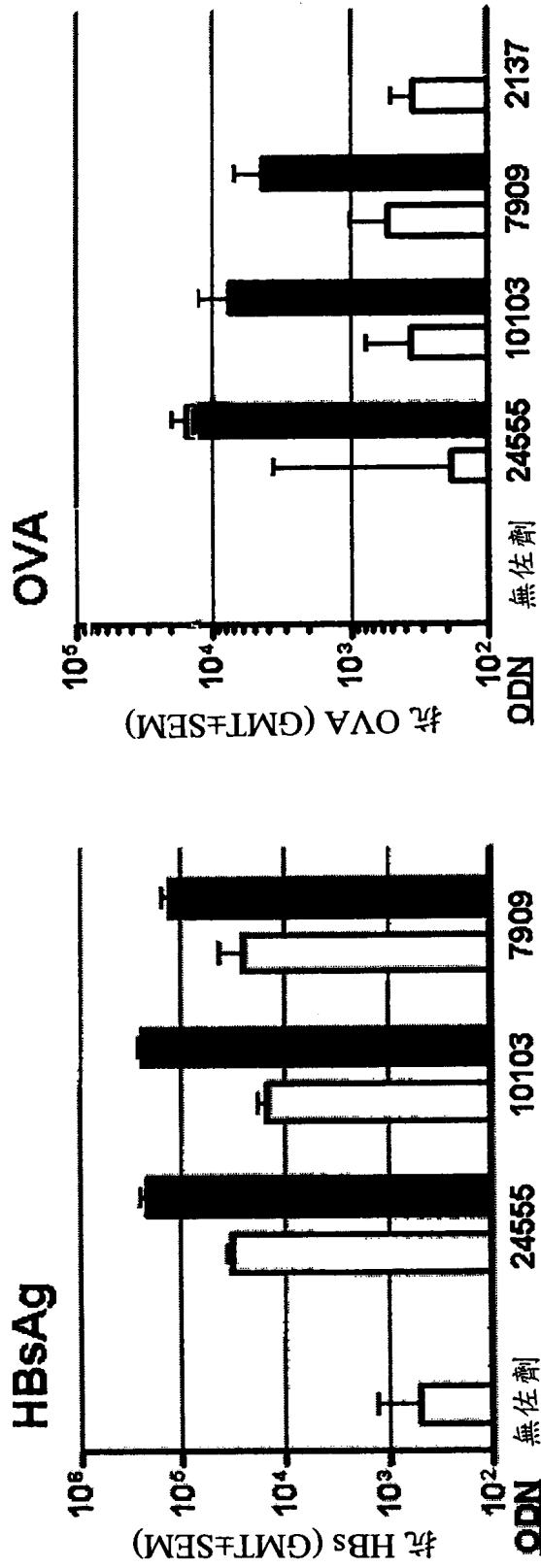


圖 2

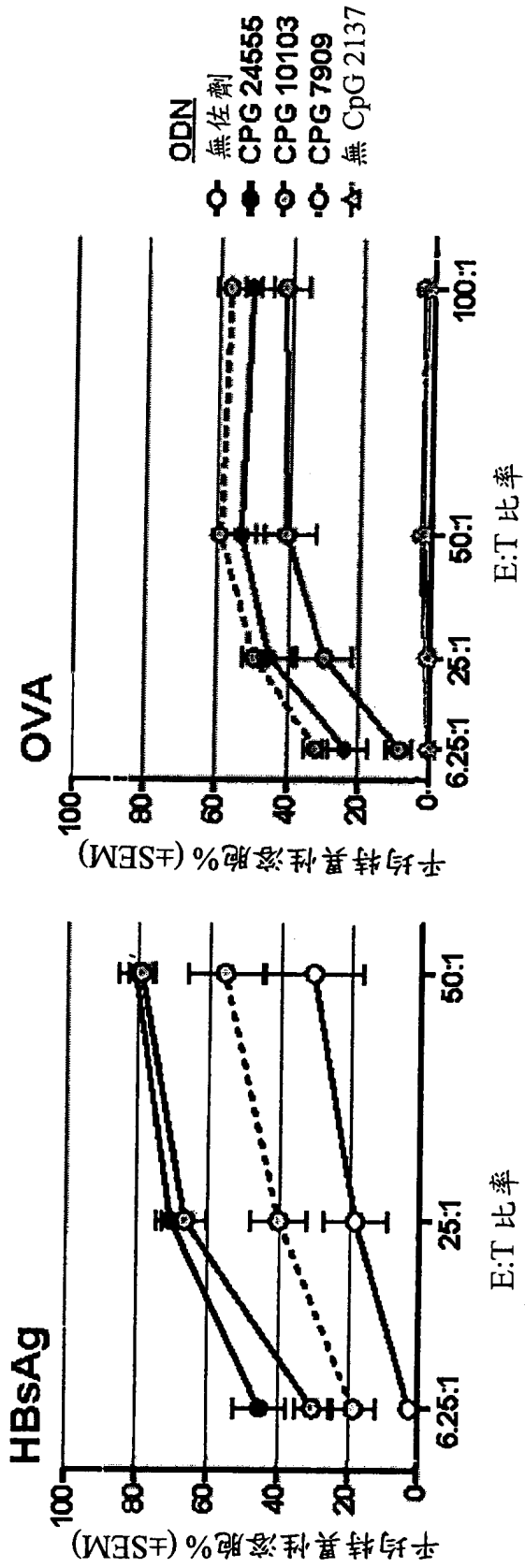


圖 3

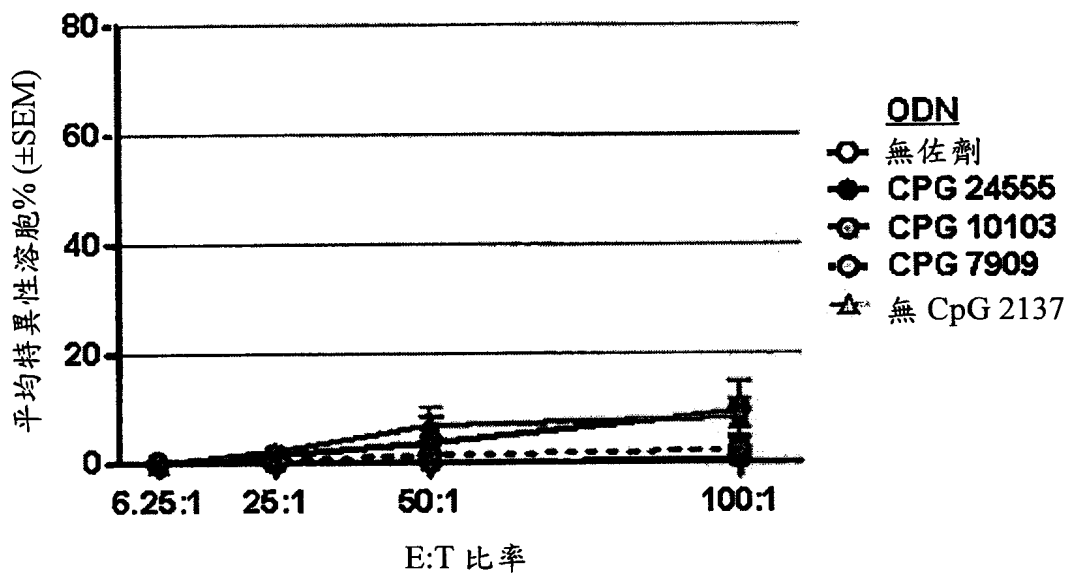


圖 4

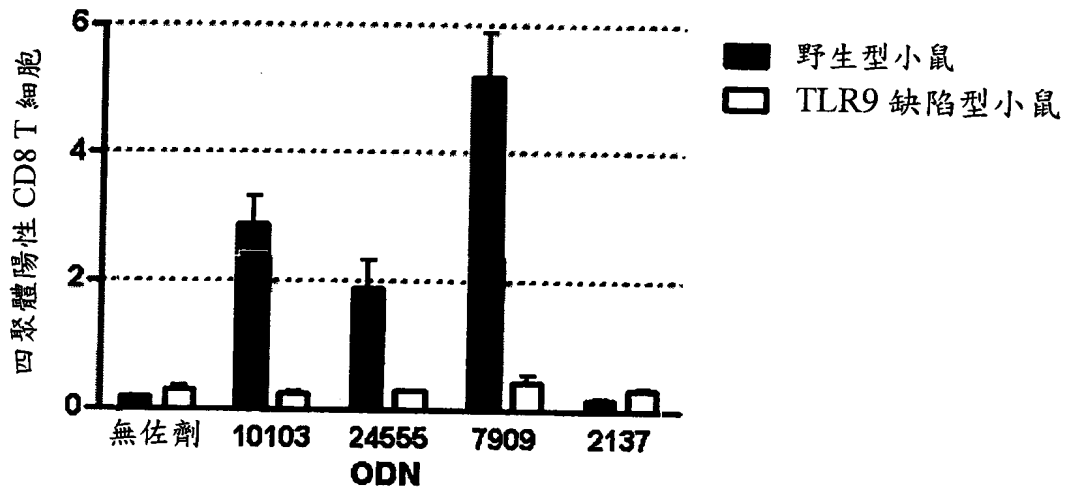


圖 5

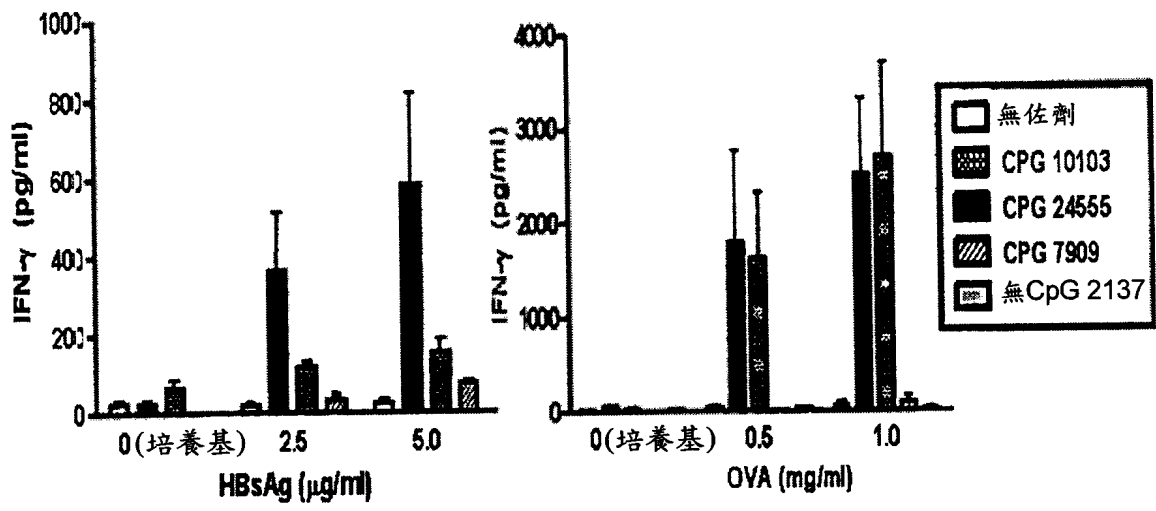


圖 6

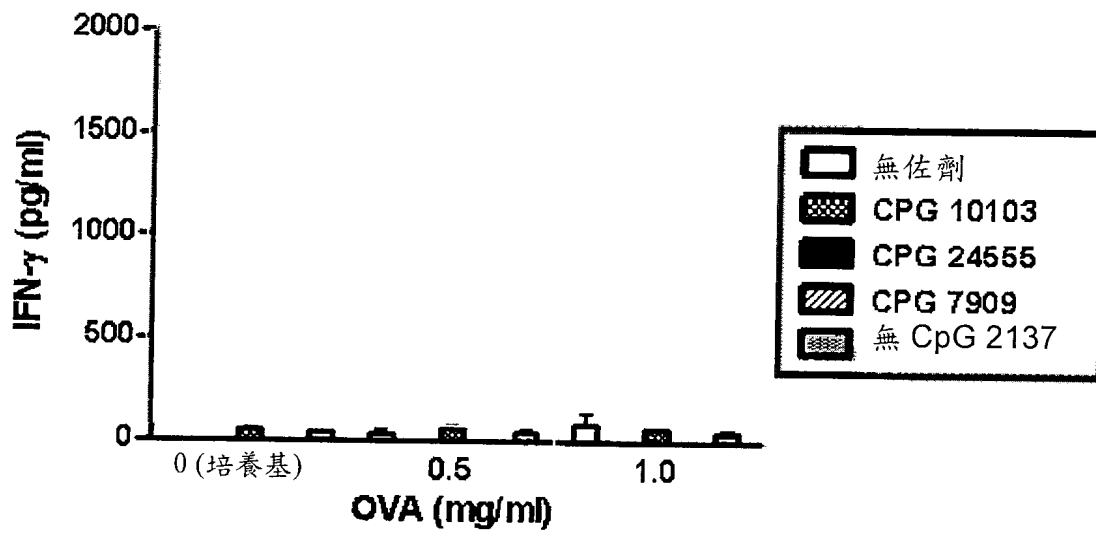


圖 7

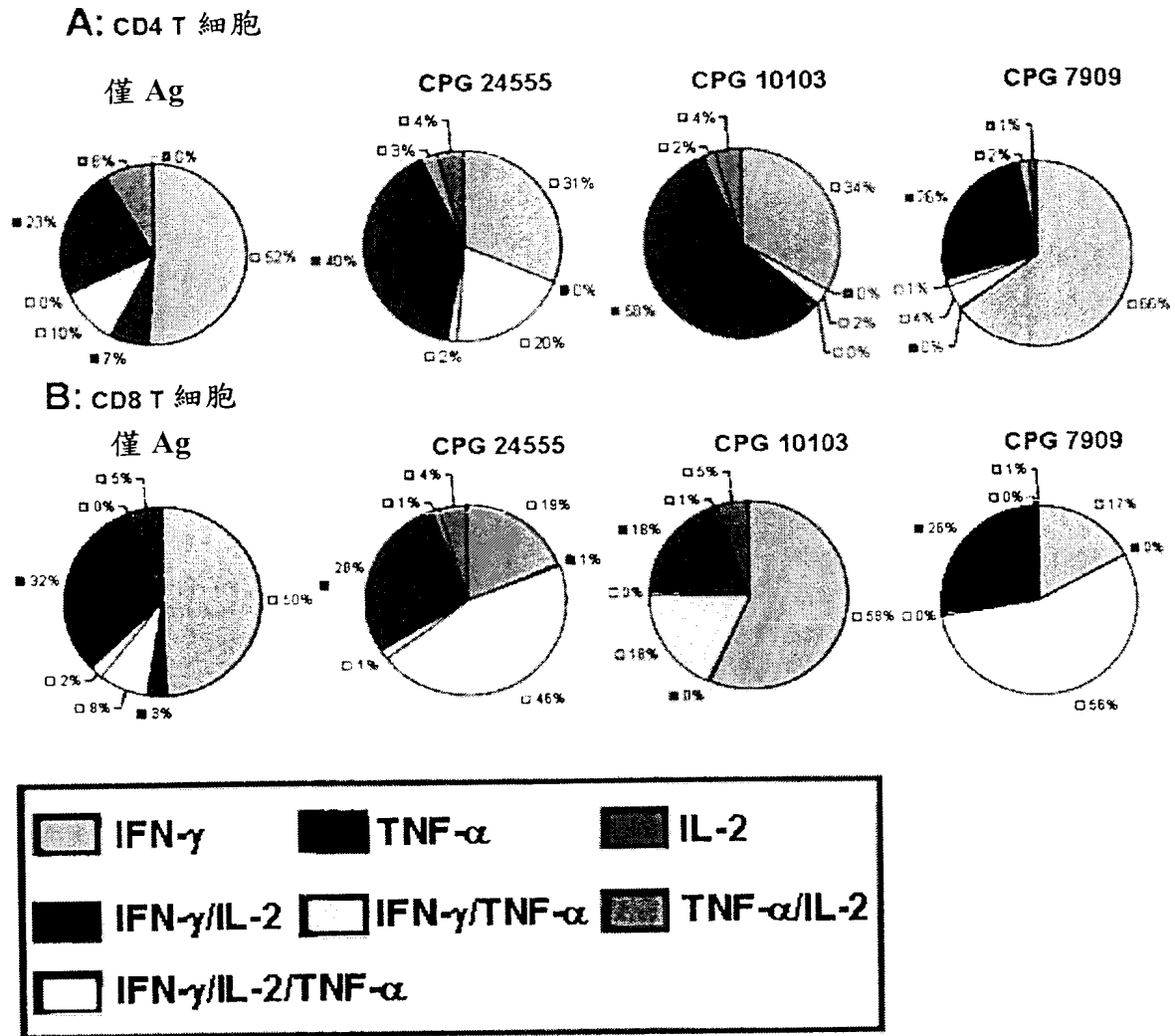


圖 8

ODN	IFN- $\alpha$ (6 個供體)		MCP-1 (3 個供體)		IP-10 (6 個供體)	
	EC50 (nM)	最大值 (pg/mL)	EC50 (nM)	最大值 (pg/mL)	EC50 (nM)	最大值 (pg/mL)
CPG 10103	410	640	460	13,850	570	520
CpG 24555	310	800	390	17,990	220	490
無 -CpG ODN 22881	1,570	200	1,170	640	330	100

圖 9A

ODN	IL-6 (5 個供體)		IL-10 (6 個供體)		IL-2R (3 個供體)	
	EC50 (nM)	最大值 (pg/mL)	EC50 (nM)	最大值 (pg/mL)	EC50 (nM)	最大值 (pg/mL)
CPG 10103	120	330	120	120	390	170
CpG 24555	190	450	100	160	190	200
無 -CpG ODN 22881	210	210	140	20	250	140

圖 9B

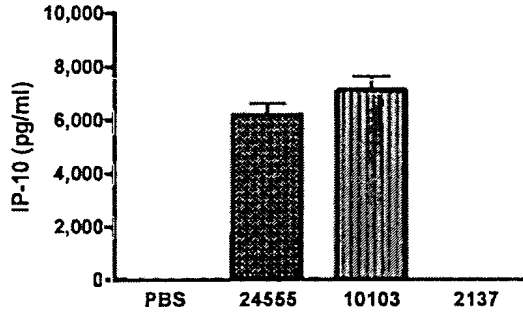


圖 10A

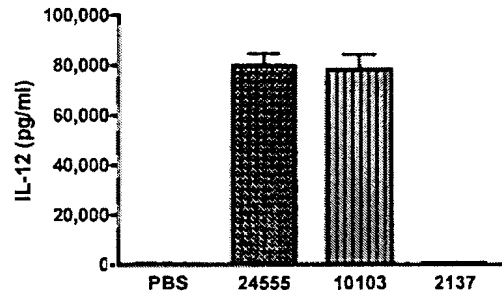


圖 10B

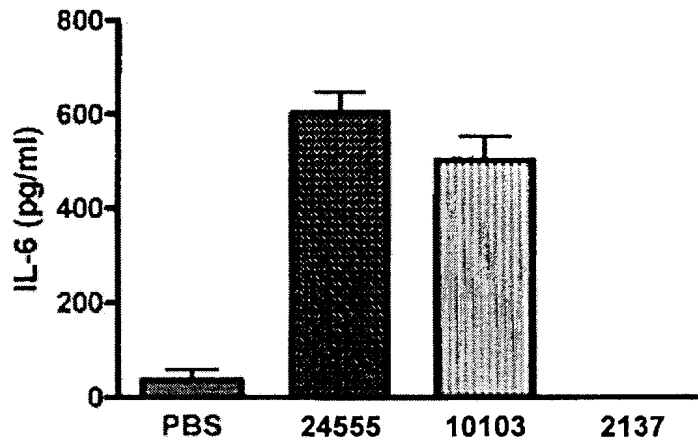


圖 10C

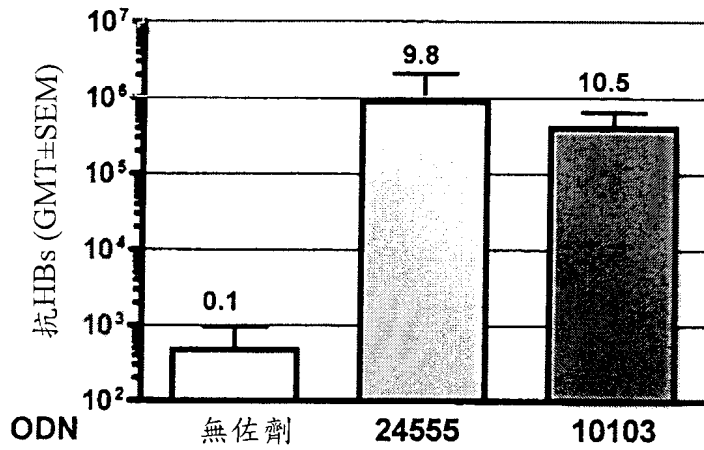


圖 11A

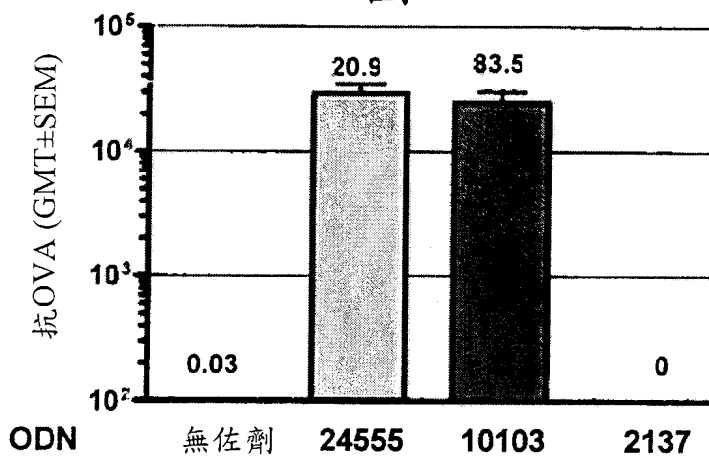


圖 11B

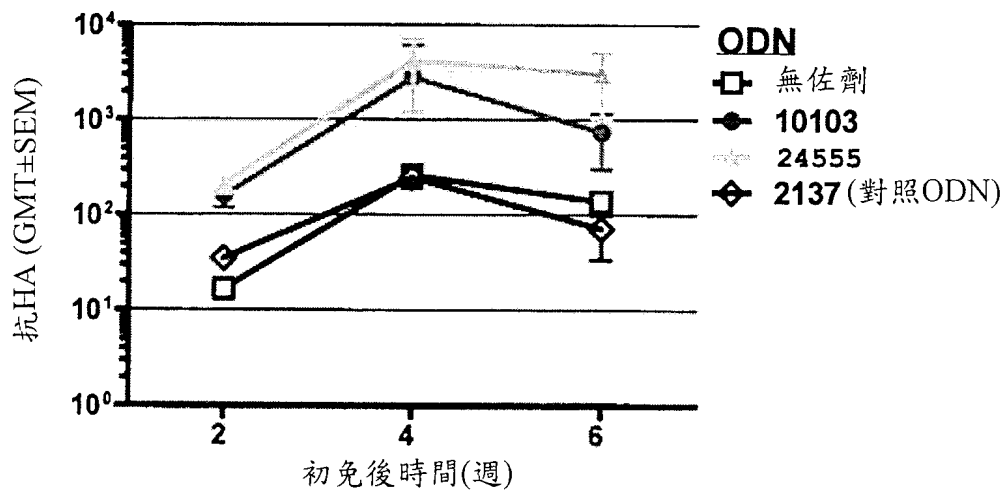


圖 11C

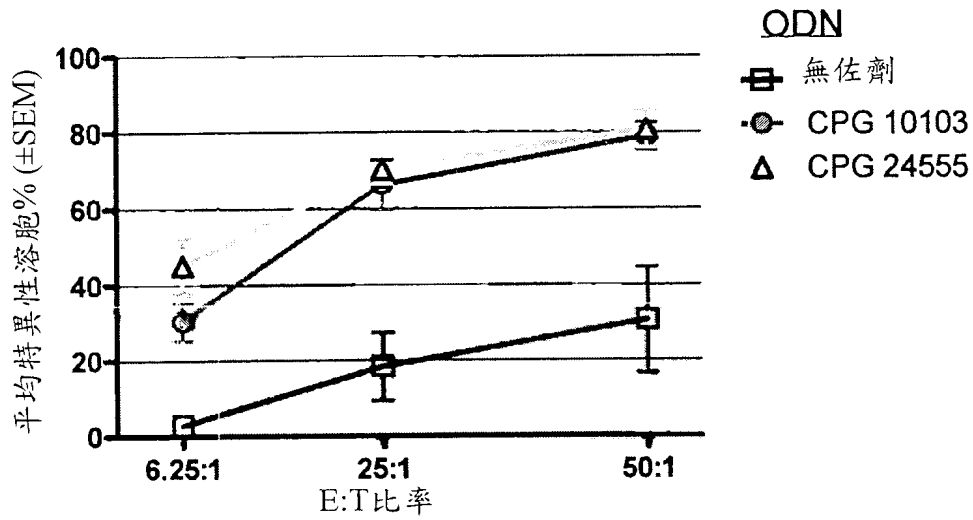


圖 12A

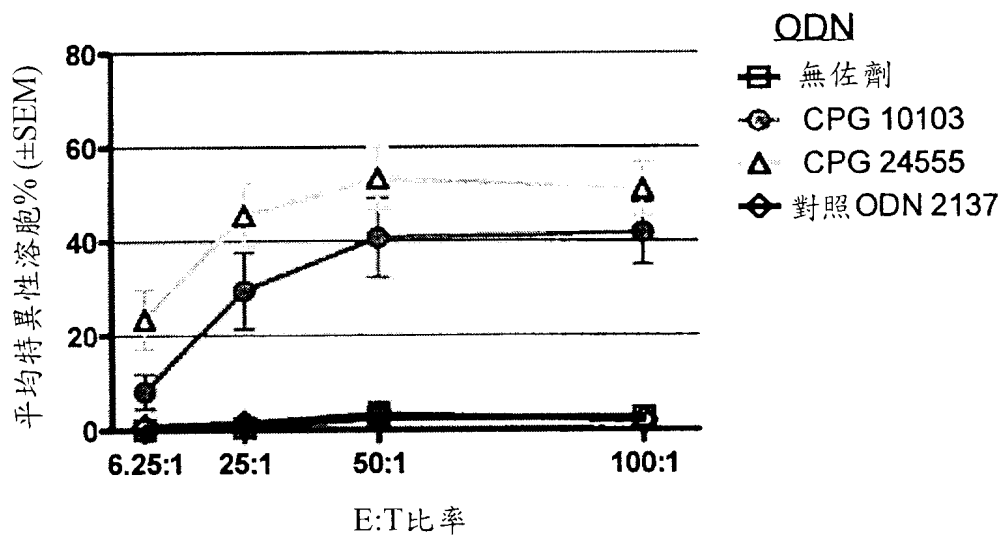


圖 12B

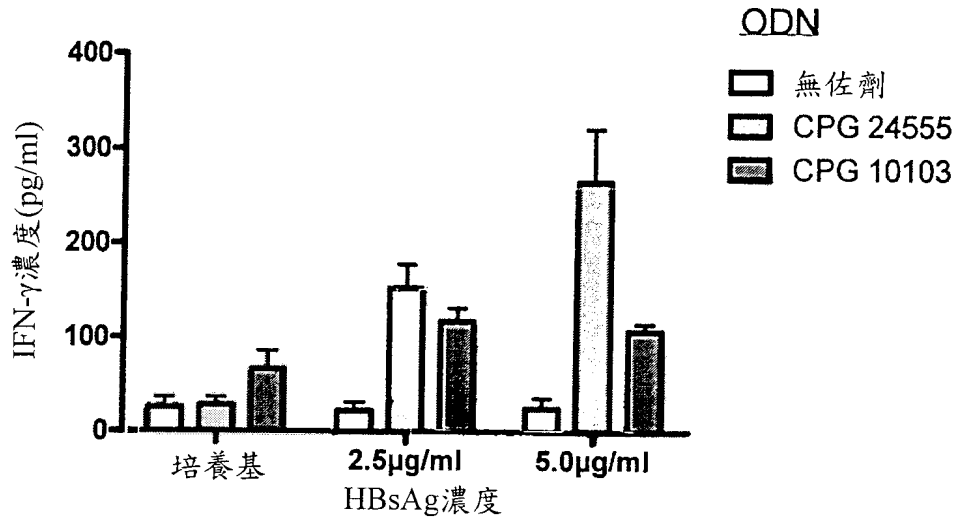


圖 13A

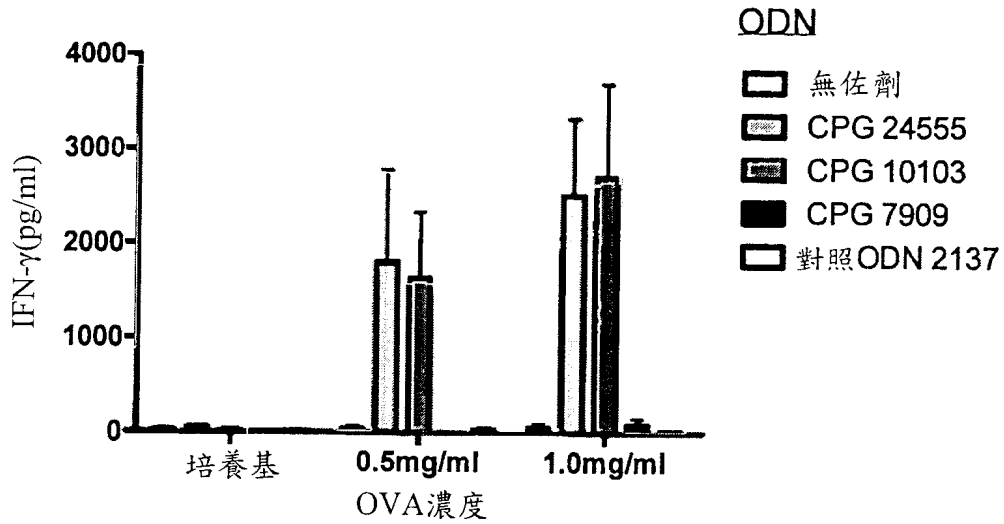


圖 13B

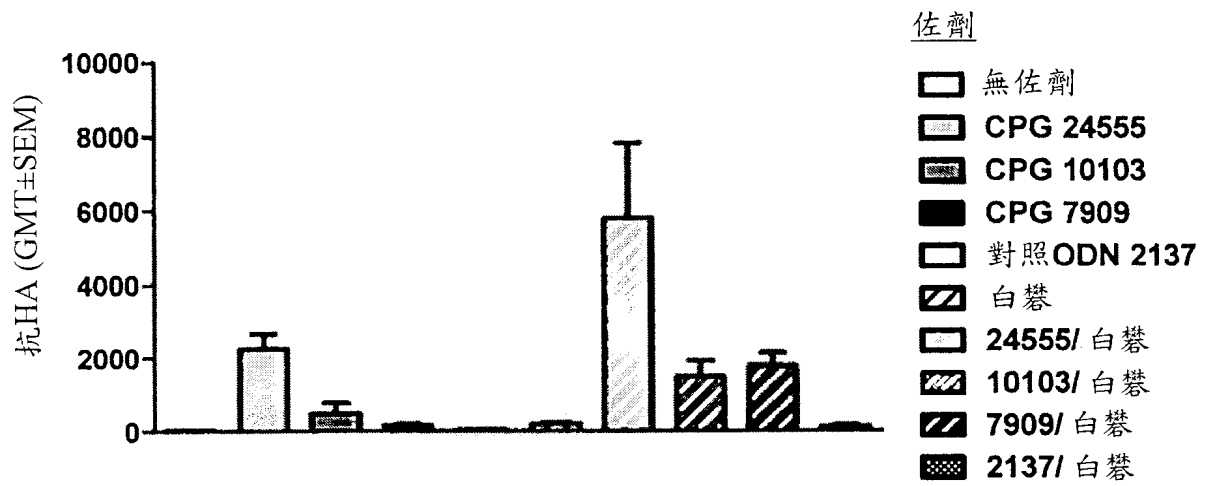


圖 14

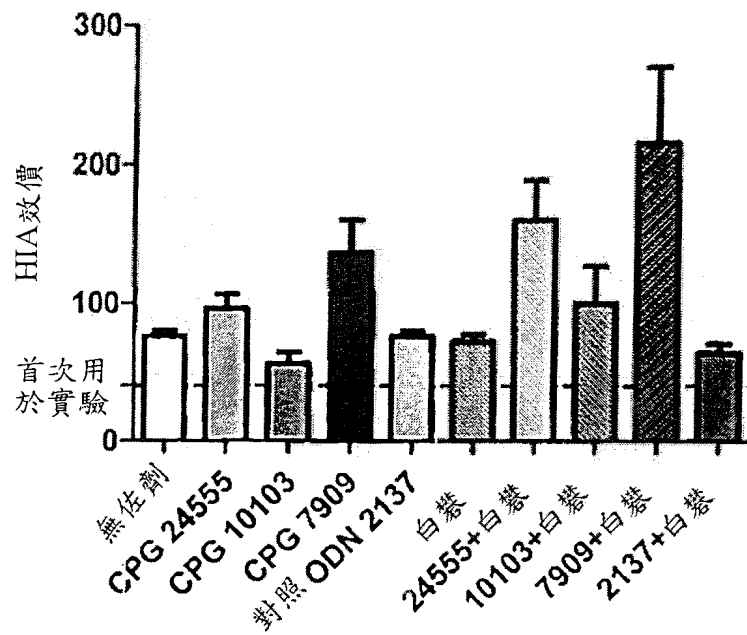


圖 15

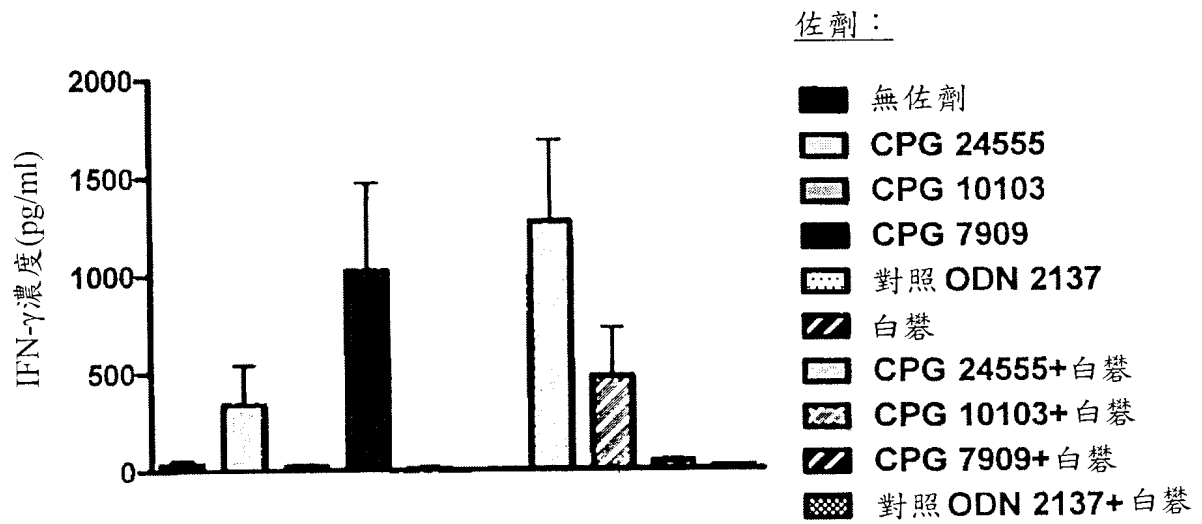


圖 16

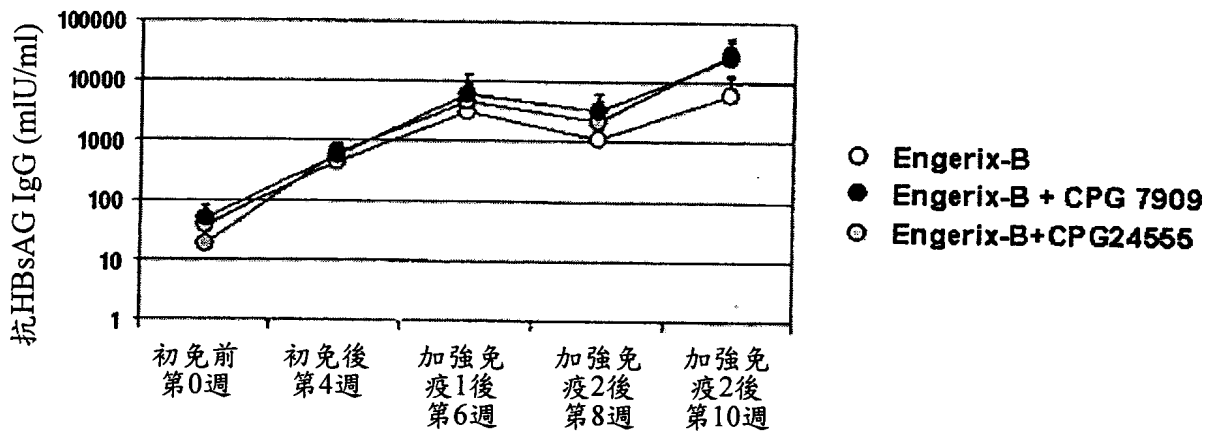


圖 17

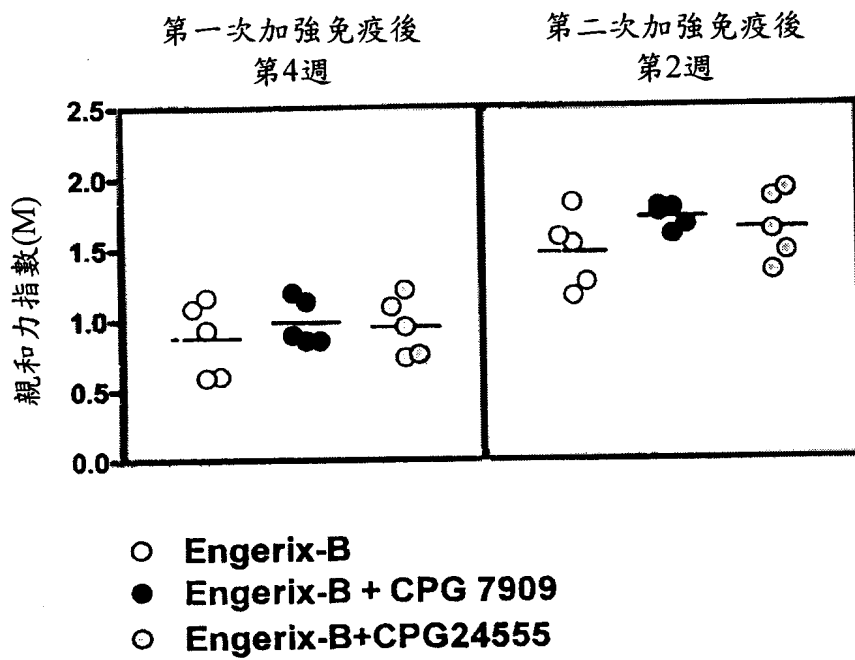
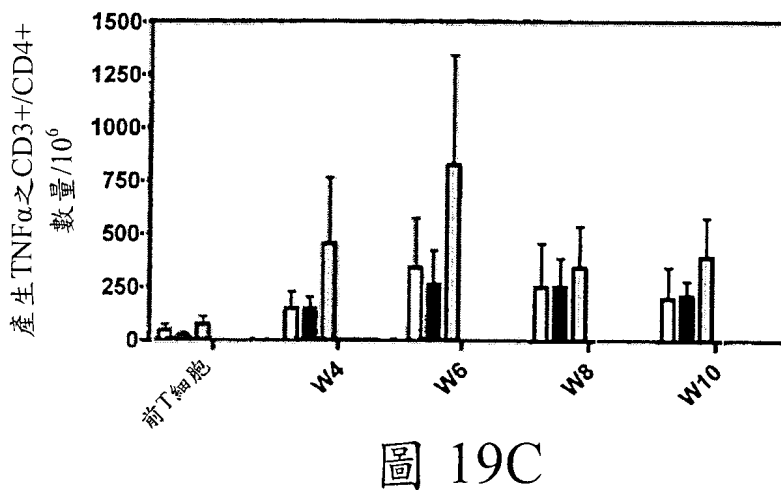
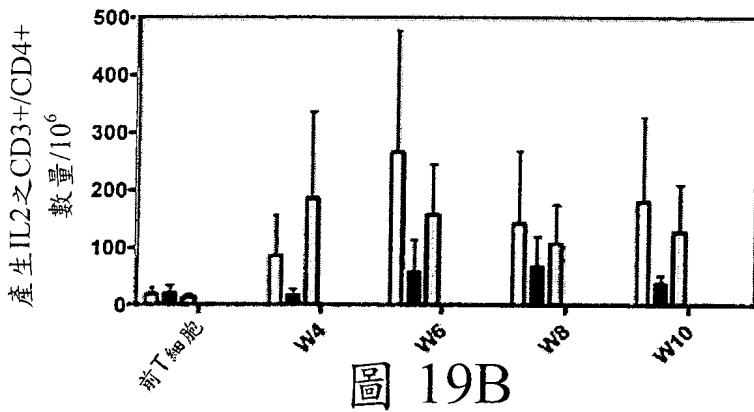
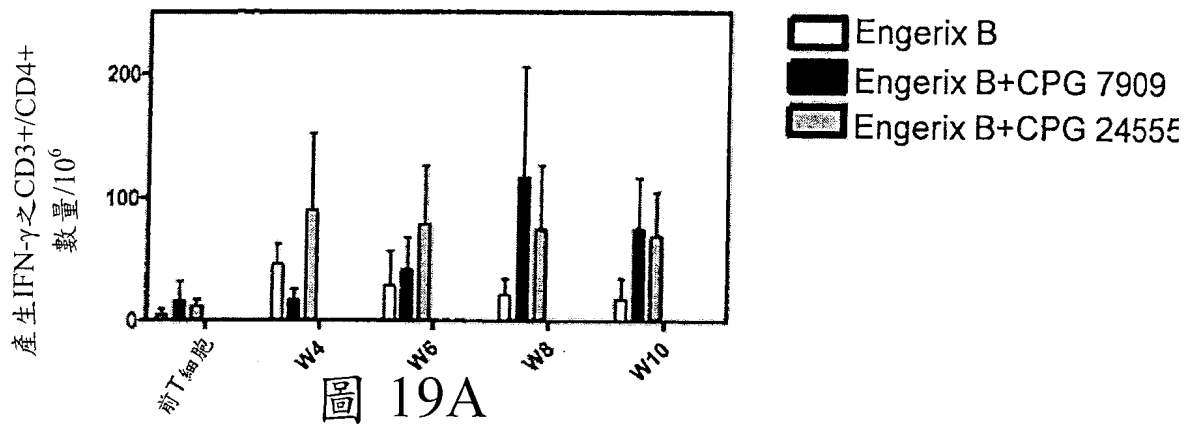


圖 18



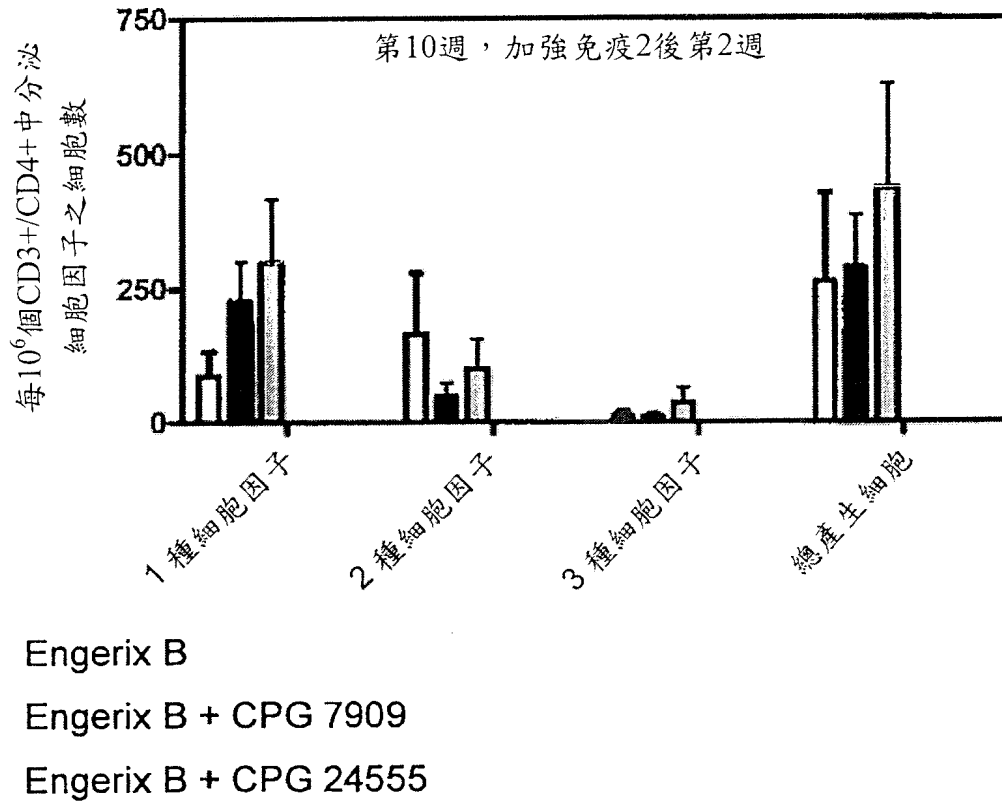


圖 20A

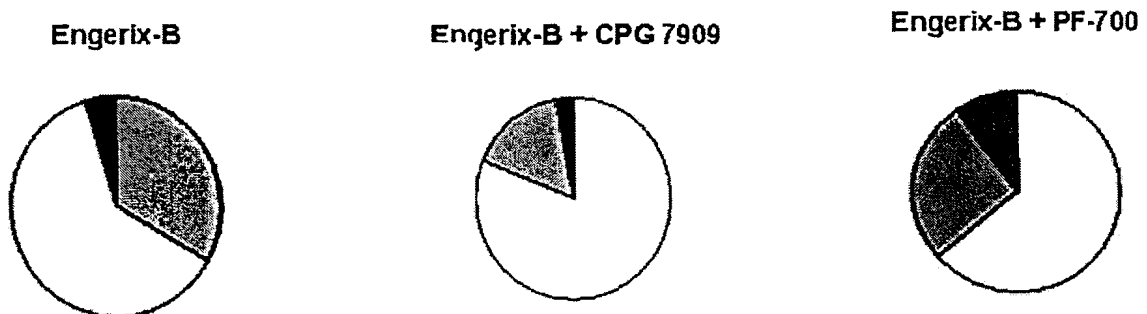


圖 20B

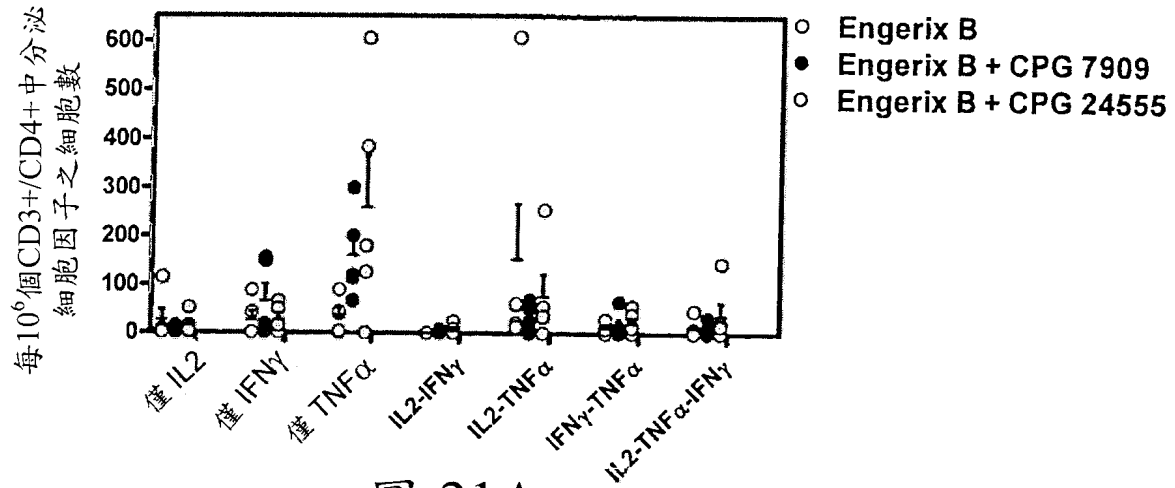


圖 21A

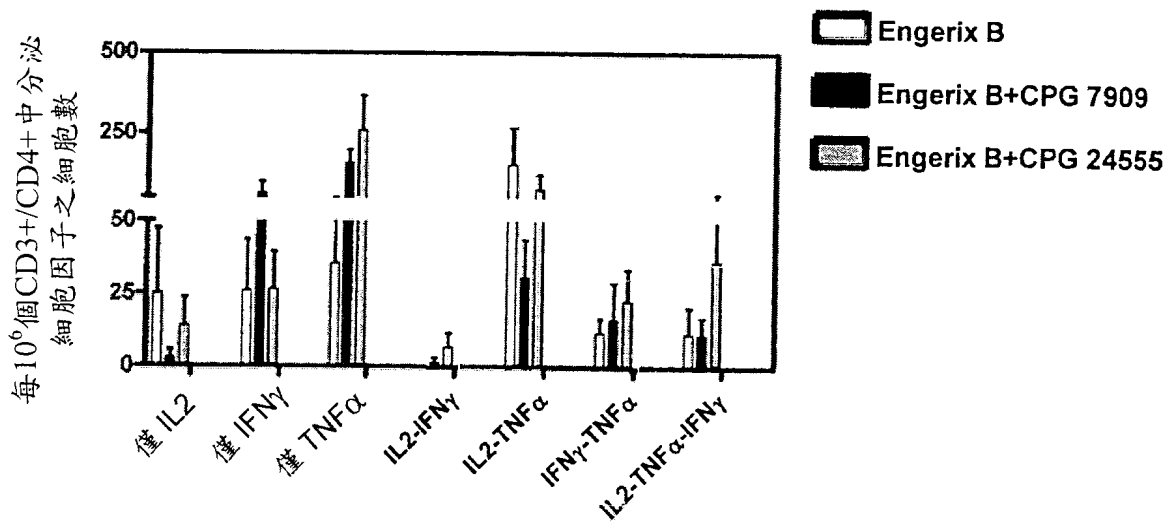


圖 21B

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)