

Область изобретения

Настоящее изобретение, в основном, относится к иммуностимулирующим нуклеиновым кислотам, композициям на их основе и способам применения иммуностимулирующих нуклеиновых кислот.

Предпосылки изобретения

Бактериальная ДНК, в отличие от ДНК позвоночных, оказывает иммуностимулирующий эффект для активации В-клеток и природных клеток-киллеров. Tokunaga T. et al. (1988) *Jpn J Cancer Res* 79:682-6; Tokunaga T. et al. (1984) *JNCI* 72:955-62; Messina J.P. et al. (1991) *J Immunol* 147:1759-64; и обзоры в Krieg, 1998, In: *Applied Oligonucleotide Technology*, C.A. Stein and A.M. Krieg, (Eds.), John Wiley and Sons, Inc., New York, NY, pp. 431-448 и Krieg A.M. (2002) *Annu Rev Immunol* 20:709-60. В настоящее время понятно, что такие иммуностимулирующие эффекты бактериальной ДНК являются результатом присутствия неметилированных CpG-динуклеотидов в окружении конкретных оснований (CpG-мотивов), обычных в бактериальных ДНК, но метилированных и редко присутствующих в ДНК позвоночных. Krieg A.M. et al. (1995) *Nature* 374:546-9; Krieg A.M. (1999) *Biochim Biophys Acta* 1489:107-16.

Иммуностимулирующие эффекты бактериальной ДНК можно имитировать синтетическими олигонуклеотидами (ODN), содержащими эти CpG-мотивы. Такие CpG-ODN оказывают сильные иммуностимулирующие эффекты на мышинные и человеческие лейкоциты, включая пролиферацию В-клеток; секрецию цитокинов и иммуноглобулинов; цитолитическую активность натуральных клеток-киллеров (NK) и секрецию интерферона гамма (IFN-γ); и активацию дендритных клеток (DC) и других антиген-презентирующих клеток для экспрессии костимулирующих молекул и секреции цитокинов, особенно цитокинов Th1-типа, важных для стимуляции Т-клеточных ответов Th1-типа. Данные иммуностимулирующие эффекты природного фосфодиэфирного остова CpG-ODN высоко специфичны для CpG, так как данные эффекты значительно уменьшаются, если CpG-мотив метилирован, заменен на GpC, или другим образом удален или изменен. Krieg A.M. et al. (1995) *Nature* 374:546-9; Hartmann G. et al. (1999) *Proc Natl. Acad Sci USA* 96:9305-10.

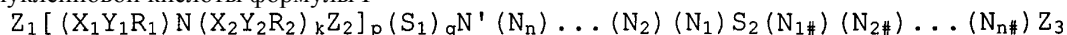
В ранних исследованиях считали, что иммуностимулирующий CpG-мотив следует формуле пурин-пурин-CpG-пиримидин-пиримидин. Krieg A.M. et al. (1995) *Nature* 374:546-9; Pisetsky D.S. (1996) *J Immunol* 156:421-3; Hacker H. et al. (1998) *EMBO J* 17:6230-40; Lipford G.B. et al. (1998) *Trends Microbiol* 6:496-500. Однако в настоящее время понятно, что мышинные лимфоциты достаточно хорошо отвечают на фосфодиэфирные CpG-мотивы, не следующие данной «формуле» (Yi A.K. et al. (1998) *J Immunol* 160:5898-906), и то же самое справедливо для В-клеток и дендритных клеток человека (Hartmann G. et al. (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* 96:9305-10; Liang H. et al. (1996) *J Clin Invest* 98:1119-29).

Сущность изобретения

Настоящее изобретение частично относится к иммуностимулирующим CpG-содержащим олигонуклеотидам и олигонуклеотидным аналогам, обладающим вторичной структурой с инвертированным повтором на 3'-конце молекулы или около него. Вторичная структура вовлекает формирование дуплекса или структур высшего порядка в определенных условиях. Как важное свойство олигонуклеотидов и олигонуклеотидных аналогов по изобретению инвертированный повтор не является строгим Уотсон-Криковским палиндромом, но предпочтительнее прерван промежуточной последовательностью или аналогами нуклеотидов. Как второе свойство олигонуклеотидов и олигонуклеотидных аналогов по изобретению остова можно модифицировать для включения в состав в стратегических местах межнуклеотидные связи, устойчивые к нуклеазе или чувствительные к нуклеазе, таким образом благоприятствуя активности и уменьшая потенциальную токсичность. Дополнительно обнаружено, что данные олигонуклеотиды и олигонуклеотидные аналоги проявляют иммуностимулирующую активность и А-класса, и В-класса и, следовательно, их классифицируют как новые иммуностимулирующие молекулы нуклеиновых кислот С-класса.

Изобретение частично основано на открытии авторами настоящего изобретения, что CpG-содержащие иммуностимулирующие олигонуклеотиды и олигонуклеотидные аналоги, содержащие несовершенный палиндром на 3'-конце молекулы или около него, обладают определенными преимуществами, исходя из их получения и их биологической активности. Конкретно, олигонуклеотиды и олигонуклеотидные аналоги С-класса по настоящему изобретению обычно являются мономерными в растворе. Считают, что данные одинаковые молекулы могут формировать *in vitro* структуры внутримолекулярного дуплекса, предоставляя им стабильность против нуклеазного расщепления. Считают также, что те же самые нуклеиновые кислоты могут формировать внутримолекулярный дуплекс и, возможно, даже структуры более высокого порядка в окружении внутриэндосомальной среды, где, как полагают, они проявляют свою биологическую активность.

В одном аспекте изобретение относится к композиции, содержащей иммуностимулирующую молекулу нуклеиновой кислоты формулы I



где каждый из Z_1 , Z_2 и Z_3 независимо представляет собой любую последовательность длиной от 0 до 12 нуклеотидов, необязательно включающую ненуклеотидный линкер или абазический d-спейсер; каждый из X_1 и X_2 независимо представляет собой нуклеотид, включающий в себя тимин, урацил, аденин или 5-замещенный урацил; каждый из Y_1 и Y_2 независимо представляет собой цитозин (C) или модифициро-

ванный цитозин; каждый из R_1 и R_2 независимо представляет собой гуанин (G) или модифицированный гуанин; каждый из N и N' независимо представляет собой любую последовательность длиной от 0 до 12 нуклеотидов, необязательно содержащую ненуклеотидный линкер или абазический d-спейсер; S_1 представляет собой ненуклеотидный линкер, абазический линкер (d-спейсеры), звенья триэтиленгликоля или звенья гексаэтиленгликоля, необязательно предусматривающие 2'5'-, 5'5'-, 3'3'-, 2'2'- или 2'3'-межнуклеозидные связи; S_2 представляет собой любую непалиндромную последовательность длиной от 1 до 10 нуклеотидов или ненуклеотидный линкер, абазический линкер (d-спейсеры), звенья триэтиленгликоля или звенья гексаэтиленгликоля; каждый из $N_1, N_2, \dots, N_n$ и $N_{1\#}, N_{2\#}, \dots, N_{n\#}$ представляет собой любой нуклеотид или модифицированный нуклеотид, где спариваются основания N_1 с $N_{1\#}$, спариваются основания N_2 с $N_{2\#}$ и спариваются основания N_n с $N_{n\#}$; k представляет собой целое число от 0 до 5; p представляет собой целое число от 2 до 16; r представляет собой целое число от 1 до 6; и q представляет собой целое число от 0 до 10, и где, когда $(N_n) \dots (N_2)(N_1)S_2(N_{1\#})(N_{2\#}) \dots (N_{n\#})$ обладает длиной от 10 до 42 нуклеотидов, S_2 обладает длиной от 4 до 10 нуклеотидов, S_2 включает в себя ненуклеотидный линкер, абазический линкер (d-спейсеры), звенья триэтиленгликоля или звенья гексаэтиленгликоля, и/или $(N_n) \dots (N_2)(N_1)S_2(N_{1\#})(N_{2\#}) \dots (N_{n\#})$ обладает содержанием GC менее чем 2/3.

В одном варианте осуществления каждый из $N_1, N_2, \dots, N_n$ и $N_{1\#}, N_{2\#}, \dots, N_{n\#}$ выбирают из C, G или их модификаций, где спариваются основания C с G.

В одном варианте осуществления каждый из $N_1, N_2, \dots, N_n$ и $N_{1\#}, N_{2\#}, \dots, N_{n\#}$ выбирают из T, A или их модификаций, и спариваются основания T с A.

В данном и других вариантах осуществления каждый из C, G, A или T может относиться к дезокси-нуклеотидам с соответствующими основаниями цитозином, гуанином, аденином и тиминном.

В одном варианте осуществления каждый из $N_1, N_2, \dots, N_n$ и $N_{1\#}, N_{2\#}, \dots, N_{n\#}$ выбирают из C, T, A, G или их модификаций, и спариваются основания C с G, спариваются основания T с G, спариваются основания A с T и спариваются основания A с G.

В одном варианте осуществления каждый из $N_1, N_2, \dots, N_n$ и $N_{1\#}, N_{2\#}, \dots, N_{n\#}$ выбирают из немодифицированных или модифицированных нуклеотидов, формирующих Уотсон-Криковские пары оснований, т.е. каждая пара оснований $N_1-N_{1\#}, N_2-N_{2\#}, \dots, N_n-N_{n\#}$ представляет собой Уотсон-Криковскую пару оснований.

В одном варианте осуществления по меньшей мере один из каждого из $N_1, N_2, \dots, N_n$ и $N_{1\#}, N_{2\#}, \dots, N_{n\#}$ выбирают из немодифицированных или модифицированных нуклеотидов, формирующих не Уотсон-Криковские пары оснований, т.е. по меньшей мере одна пара оснований $N_1-N_{1\#}, N_2-N_{2\#}, \dots, N_n-N_{n\#}$ представляет собой не Уотсон-Криковскую пару оснований.

В одном варианте осуществления иммуностимулирующая молекула нуклеиновой кислоты содержит частично стабилизированный остов по меньшей мере с одной фосфодиэфирной связью.

В одном варианте осуществления иммуностимулирующие молекулы нуклеиновых кислот содержат остов по меньшей мере с одной стабилизированной межнуклеотидной связью.

В одном варианте осуществления все межнуклеотидные связи олигонуклеотида представляют собой фосфотриатные связи.

В одном варианте осуществления иммуностимулирующая молекула нуклеиновой кислоты содержит частично стабилизированный остов с фосфодиэфирной связью, соединяющей по меньшей мере один из Y_1R_1 или Y_2R_2 .

В одном варианте осуществления Y_1 представляет собой C.

В одном варианте осуществления R_1 представляет собой G.

В одном варианте осуществления Y_1 представляет собой C и R_1 представляет собой G.

В одном варианте осуществления X_1 или X_2 представляет собой T.

В одном варианте осуществления X_1 представляет собой T, X_2 представляет собой T, Y_1 представляет собой C, R_1 представляет собой G и k равно 1.

В одном варианте осуществления X_1 представляет собой T, X_2 представляет собой T, Y_1 представляет собой C, R_1 представляет собой G, k равно 1, p равно 1, каждый из N, N' и Z_3 содержит ноль нуклеотидов и Z_2 представляет собой TTTT или d(UUUU), где d(UUUU) представляет собой dUdUdUdU, т.е. (дезоксиU)₄.

В одном варианте осуществления S_2 представляет собой ненуклеотидный линкер.

В одном варианте осуществления S_2 содержит по меньшей мере один абазический остаток d-спейсера.

В одном варианте осуществления олигонуклеотид содержит по меньшей мере одну разветвленную ненуклеозидную связь.

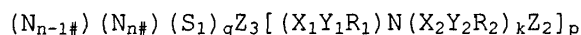
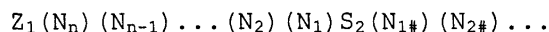
В одном варианте осуществления иммуностимулирующая молекула нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере одно двойное звено, по меньшей мере одно тройное звено или по меньшей мере одно двойное звено и по меньшей мере одно тройное звено.

В одном варианте осуществления S_1 представляет собой двойное звено или тройное звено.

В одном варианте осуществления олигонуклеотид содержит по меньшей мере одну 2'5'-, 5'5'-, 3'3'-, 2'2'- или 2'3'-межнуклеозидную связь.

В одном варианте осуществления иммуностимулирующая молекула нуклеиновой кислоты формулы I не является антисмысловой нуклеиновой кислотой.

В одном аспекте изобретение относится к иммуностимулирующей молекуле нуклеиновой кислоты формулы II



где каждый из Z_1 , Z_2 и Z_3 независимо представляет собой любую последовательность длиной от 0 до 12 нуклеотидов, необязательно содержащую ненуклеотидный линкер или абазический d-спейсер; каждый из X_1 и X_2 независимо представляет собой нуклеотид, включающий в себя тимин, урацил, аденин или 5-замещенный урацил; каждый из Y_1 и Y_2 независимо представляет собой цитозин (C) или модифицированный цитозин; каждый из R_1 и R_2 независимо представляет собой гуанин (G) или модифицированный гуанин; N представляет собой любую последовательность длиной от 0 до 12 нуклеотидов, необязательно включающую ненуклеотидный линкер или абазический d-спейсер; S_1 представляет собой ненуклеотидный линкер, абазический линкер (d-спейсеры), звенья триэтиленгликоля или звенья гексаэтиленгликоля, необязательно предусматривающие 2'5'-, 5'5'-, 3'3'-, 2'2'- или 2'3'-межнуклеозидные связи; S_2 представляет собой любую непалиндромную последовательность длиной от 1 до 10 нуклеотидов или ненуклеотидный линкер, абазический линкер (d-спейсеры), звенья триэтиленгликоля или звенья гексаэтиленгликоля; каждый из N_1 , N_2 , ..., N_{n-1} , N_n и $N_{1\#}$, $N_{2\#}$, ..., $N_{n-1\#}$, $N_{n\#}$ представляет собой любой нуклеотид или модифицированный нуклеотид, где спариваются основания N_1 с $N_{1\#}$, спариваются основания N_2 с $N_{2\#}$, и спариваются основания N_n с $N_{n\#}$; k представляет собой целое число от 0 до 5; n представляет собой целое число от 2 до 16; p представляет собой целое число от 1 до 6; и q представляет собой целое число от 0 до 10, и где, когда $(N_n) \dots (N_2)(N_1)S_2(N_{1\#})(N_{2\#}) \dots (N_{n\#})$ обладает длиной от 10 до 42 нуклеотидов, S_2 обладает длиной от 4 до 10 нуклеотидов, S_2 включает в себя ненуклеотидный линкер, абазический линкер (d-спейсеры) звенья триэтиленгликоля или звенья гексаэтиленгликоля и/или $(N_n) \dots (N_2)(N_1)S_2(N_{1\#})(N_{2\#}) \dots (N_{n\#})$ имеет содержание GC менее чем 2/3.

В одном варианте осуществления $Z_1(N_n)(N_{n-1})$ представляет собой TYR, где Y представляет собой цитозин или модифицированный цитозин и R представляет собой гуанин или модифицированный гуанин.

В одном варианте осуществления каждый из N_1 , N_2 , ..., N_{n-1} , N_n и $N_{1\#}$, $N_{2\#}$, ..., $N_{n-1\#}$, $N_{n\#}$ выбирают из C, G или их модификаций, где спариваются основания C с G.

В одном варианте осуществления каждый из N_1 , N_2 , ..., N_{n-1} , N_n и $N_{1\#}$, $N_{2\#}$, ..., $N_{n-1\#}$, $N_{n\#}$ выбирают из T, A или их модификаций, и спариваются основания T с A.

В данном и других вариантах осуществления каждый из C, G, A и T может относиться к дезоксинуклеотидам с соответствующими основаниями цитозином, гуанином, аденином и тиминном.

В одном варианте осуществления каждый из N_1 , N_2 , ..., N_{n-1} , N_n и $N_{1\#}$, $N_{2\#}$, ..., $N_{n-1\#}$, $N_{n\#}$ выбирают из C, T, A, G и/или их модификаций, и спариваются основания C с G, спариваются основания T с G, спариваются основания A с T, и спариваются основания A с G.

В одном варианте осуществления каждый из N_1 , N_2 , ..., N_{n-1} , N_n и $N_{1\#}$, $N_{2\#}$, ..., $N_{n-1\#}$, $N_{n\#}$ выбирают из немодифицированных или модифицированных нуклеотидов, формирующих Уотсон-Криковские пары оснований, т.е. каждая пара оснований N_1 - $N_{1\#}$, N_2 - $N_{2\#}$, ..., N_n - $N_{n\#}$ представляет собой Уотсон-Криковскую пару оснований.

В одном варианте осуществления по меньшей мере один из каждого N_1 , N_2 , ..., N_{n-1} , N_n и $N_{1\#}$, $N_{2\#}$, ..., $N_{n-1\#}$, $N_{n\#}$ выбирают из немодифицированных или модифицированных нуклеотидов, формирующих не Уотсон-Криковские пары оснований, т.е. по меньшей мере одна пара оснований N_1 - $N_{1\#}$, N_2 - $N_{2\#}$, ..., N_n - $N_{n\#}$ представляет собой не Уотсон-Криковскую пару оснований.

В одном варианте осуществления иммуностимулирующая молекула нуклеиновой кислоты содержит частично стабилизированный остов по меньшей мере с одной фосфодиэфирной связью.

В одном варианте осуществления иммуностимулирующая молекула нуклеиновой кислоты содержит остов по меньшей мере с одной стабилизированной межнуклеотидной связью.

В одном варианте осуществления все межнуклеотидные связи олигонуклеотида представляют собой фосфотриэтиленгликольные связи.

В одном варианте осуществления иммуностимулирующая молекула нуклеиновой кислоты содержит частично стабилизированный остов с фосфодиэфирной связью, соединяющей по меньшей мере один из $Y_1 R_1$ или $Y_2 R_2$.

В одном варианте осуществления Y_1 представляет собой C.

В одном варианте осуществления R_1 представляет собой G.

В одном варианте осуществления Y_1 представляет собой C и R_1 представляет собой G.

В одном варианте осуществления X_1 или X_2 представляет собой T.

В одном варианте осуществления X_1 представляет собой T, X_2 представляет собой T, Y_1 представляет собой C, R_1 представляет собой G и k равно 1.

В одном варианте осуществления X_1 представляет собой T, X_2 представляет собой T, Y_1 представляет собой C, R_1 представляет собой G, k равно 1, p равно 1, каждый из N, N' и Z_3 содержит ноль нуклео-

тидов, и Z_2 представляет собой TTTT или d(UUUU), где d (UUUU) представляет собой dUdUdUdU, т.е. (дезоксид)U₄.

В одном варианте осуществления S_2 представляет собой нуклеотидный линкер.

В одном варианте осуществления S_2 содержит по меньшей мере один абазический остаток d-спейсера.

В одном варианте осуществления олигонуклеотид содержит по меньшей мере одну разветвленную нуклеозидную связь.

В одном варианте осуществления иммуностимулирующая молекула нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере одно двойное звено, по меньшей мере одно тройное звено или по меньшей мере одно двойное звено и по меньшей мере одно тройное звено.

В одном варианте осуществления S_1 представляет собой двойное звено или тройное звено.

В одном варианте осуществления олигонуклеотид содержит по меньшей мере одну 2'5'-, 5'5'-, 3'3'-, 2'2'- или 2'3'-межнуклеозидную связь.

В одном варианте осуществления иммуностимулирующая молекула нуклеиновой кислоты формулы I не является антисмысловой нуклеиновой кислотой.

В одном аспекте изобретение относится к иммуностимулирующей молекуле нуклеиновой кислоты формулы III

$$(Z')_m Z_3 (S_3)$$

где Z' представляет собой $Z_1[(X_1Y_1R_1)N(X_2Y_2R_2)_kZ_2]_p(S_1)_qN'(N_n)...(N_3)(N_2)(N_1)S_2(N_{1\#})(N_{2\#})(N_{3\#})...(N_{n\#})$, каждый из Z_1 , Z_2 и Z_3 независимо представляет собой любую последовательность длиной от 0 до 12 нуклеотидов, необязательно содержащую нуклеотидный линкер или абазический d-спейсер; каждый из X_1 и X_2 независимо представляет собой нуклеотид, включающий в себя тимин, урацил, аденин или 5-замещенный урацил; каждый из Y_1 и Y_2 независимо представляет собой цитозин или модифицированный цитозин; каждый из R_1 и R_2 независимо представляет собой гуанин или модифицированный гуанин; каждый из N и N' независимо представляет собой любую последовательность длиной от 0 до 12 нуклеотидов, необязательно включающую нуклеотидный линкер или абазический d-спейсер; S_1 представляет собой нуклеотидный линкер, абазический линкер (d-спейсеры) звенья триэтиленгликоля или звенья гексаэтиленгликоля, необязательно предусматривающие 2'5'-, 5'5'-, 3'3'-, 2'2'- или 2'3'-межнуклеозидные связи; S_2 представляет собой любую непалиндромную последовательность длиной от 1 до 10 нуклеотидов или нуклеотидный линкер, абазический линкер (d-спейсеры), звенья триэтиленгликоля или звенья гексаэтиленгликоля; S_3 представляет собой прямую или непрямую 2'5'-, 5'5'-, 3'3'-, 2'2'- или 2'3'-межнуклеозидную связь или нуклеотидный линкер, где указанный нуклеотидный линкер содержит абазические линкеры (d-спейсеры), звенья триэтиленгликоля или звенья гексаэтиленгликоля, облегчающие 2'5'-, 5'5'-, 3'3'-, 2'2'- или 2'3'-связь m частей последовательности; каждый из N_1 , N_2 , ... N_n и $N_{1\#}$, $N_{2\#}$, ... $N_{n\#}$ представляет собой любой нуклеотид или модифицированный нуклеотид, где спариваются основания N_1 с $N_{1\#}$, спариваются основания N_2 с $N_{2\#}$, спариваются основания N_3 с $N_{3\#}$ и спариваются основания N_n с $N_{n\#}$; k представляет собой целое число от 0 до 5; m представляет собой целое число от 2 до 10; p представляет собой целое число от 2 до 16; r представляет собой целое число от 1 до 6 и q представляет собой целое число от 0 до 10.

В конкретных вариантах осуществления $Z_1[(X_1Y_1R_1)N(X_2Y_2R_2)_kZ_2]_p(S_1)_q$ представляет собой непалиндромную последовательность.

В конкретных вариантах осуществления $Z_1[(X_1Y_1R_1)N(X_2Y_2R_2)_kZ_2]_p(S_1)_q$ представляет собой TCGTCGTTTT (SEQ ID NO:40), TCGTCGTLL, TCGA, TCGAC, TCGACGTC или TCGACGTCG, где L представляет собой d-спейсер.

В конкретных вариантах осуществления $Z_1[(X_1Y_1R_1)N(X_2Y_2R_2)_kZ_2]_p(S_1)_q$ представляет собой палиндромную последовательность.

В конкретных вариантах осуществления $Z_1[(X_1Y_1R_1)N(X_2Y_2R_2)_kZ_2]_p(S_1)_q$ представляет собой TCGACGTCGA (SEQ ID NO:19) или TCGTCGACGA (SEQ ID NO:34).

В конкретных вариантах осуществления $Z_1[(X_1Y_1R_1)N(X_2Y_2R_2)_kZ_2]_p(S_1)_q$ представляет собой TCGCGACGTT (SEQ ID NO:26) или TCGCGTCGTT (SEQ ID NO:69).

В одном варианте осуществления $(N_n)...(N_2)(N_1)S_2(N_{1\#})(N_{2\#})...(N_{2\#})Z_3$ включает в себя последовательность

AGCGAAGCT, CAATATTTATTG (SEQ ID NO:1), CCGTTTTGTGG (SEQ ID NO:2),
CGGCGCCGTGCCG (SEQ ID NO:19), CGGCGCCGTGCCG (SEQ ID NO:34),
CGGCGLLCGCCG (SEQ ID NO:5), CGGCGLLTGCCG (SEQ ID NO:6),
CGGCGLLCCGCCG (SEQ ID NO:7), CGGCGTCGCCGCCG (SEQ ID NO:8),
CGTCGACGGGACGGG (SEQ ID NO:10), CGTCGACGTGACGGG (SEQ ID NO:11),
GAGAGTTGGGCTCTC (SEQ ID NO:12), GTCGAGGAGGT (SEQ ID NO:14),
TAATALLTATTA (SEQ ID NO:15), TAATATCCATTA (SEQ ID NO:16), или
TAATATTTATTA (SEQ ID NO:17),

где L представляет собой d-спейсер.

В одном из вариантов осуществления $(N_n) \dots (N_2)(N_1)S_2(N_{1\#})(N_{2\#}) \dots (N_{n\#})$ включает в себя последовательность GGCGCGCTGCCG (SEQ ID NO:13).

В одном из вариантов осуществления иммуностимулирующая молекула нуклеиновой кислоты включает в себя последовательность

TCGACGTCGACCGTTTTGTGG (SEQ ID NO:20),
TCGACGTCGACGGGACGGG (SEQ ID NO:21),
TCGACGTCGACGTGACGGG (SEQ ID NO:22),
TCGACGTCGAGAGTTGGGCTCTC (SEQ ID NO:23),
TCGACGTCGAGCGAAGCT (SEQ ID NO:24), или
TCGACGTCGAGGAGGT (SEQ ID NO:25).

В одном из вариантов осуществления иммуностимулирующая молекула нуклеиновой кислоты включает в себя последовательность

TCGTCGTTLLACGGCGCCGTGCCG (SEQ ID NO:37),
TCGTCGTTLLACGGCGLLLTGCCG (SEQ ID NO:38),
TCGTCGTTLLCGGGCGGGCGCCG (SEQ ID NO:39),
TCGTCGTTTTACGGCGCCGTGCCG (SEQ ID NO:44),
TCGTCGTTTTACGGCGLLLTGCCG (SEQ ID NO:45),
TCGTCGTTTTACGGCGTTTTGCCG (SEQ ID NO:49),
TCGTCGTTTTCAATATTTATTG (SEQ ID NO:50),
TCGTCGTTTTCGGCGLLCGCCG (SEQ ID NO:52),
TCGTCGTTTTCGGCGLLCCGCCG (SEQ ID NO:54),
TCGTCGTTTTCGGCCTCGCCGCCG (SEQ ID NO:55),
TCGTCGTTTTTAATALLTATTA (SEQ ID NO:57),
TCGTCGTTTTTAATATCCATTA (SEQ ID NO:58), или
TCGTCGTTTTTAATATTTATTA (SEQ ID NO:59),

где L представляет собой d-спейсер.

В одном из вариантов осуществления иммуностимулирующая молекула нуклеиновой кислоты включает в себя последовательность TCGCGTCGTTTCGGCGCGCTGCCG (SEQ ID NO:30).

В одном из вариантов осуществления иммуностимулирующая молекула нуклеиновой кислоты включает в себя последовательность TCGCGACGTTTCGGCGCGCTGCCG (SEQ ID NO:27).

В одном из вариантов осуществления иммуностимулирующая молекула нуклеиновой кислоты включает в себя последовательность, выбранную из

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

T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*A*A*T*A*T*C*C*A*T*T*A (SEQ ID NO:58),
 T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*A*A*T*A*L*L*T*A*T*T*A (SEQ ID NO:57),
 T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*A*C*G*G*C*G*L*L*L*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:45),
 T*C*G*T*C_G*T*T*L*L*A*C*G*G*C*G*L*L*L*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:38), и
 T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*G*L*L*L*C*C*G*C*C*G (SEQ ID NO:54),

где L представляет собой d-спейсер, * представляет собой фосфоротиоат и _ представляет собой фосфодиэфир.

В одном из вариантов осуществления иммуностимулирующая молекула нуклеиновой кислоты включает в себя последовательность, выбранную из

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

где * представляет собой фосфоротиоат и _ представляет собой фосфодиэфир.

В одном из вариантов осуществления иммуностимулирующая молекула нуклеиновой кислоты включает в себя последовательность, выбранную из

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

где * представляет собой фосфоротиоат и _ представляет собой фосфодиэфир.

В одном из вариантов осуществления иммуностимулирующая молекула нуклеиновой кислоты включает в себя последовательность, выбранную из

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

где * представляет собой фосфоротиоат и _ представляет собой фосфодиэфир.

В одном из вариантов осуществления иммуностимулирующая молекула нуклеиновой кислоты включает в себя последовательность

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

где * представляет собой фосфоротиоат и _ представляет собой фосфодиэфир.

В одном из вариантов осуществления иммуностимулирующая молекула нуклеиновой кислоты включает в себя последовательность, выбранную из

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

где * представляет собой фосфоротиоат и _ представляет собой фосфодиэфир.

В одном из вариантов осуществления иммуностимулирующая молекула нуклеиновой кислоты включает в себя последовательность

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

где * представляет собой фосфоротиоат и _ представляет собой фосфодиэфир.

В одном из вариантов осуществления иммуностимулирующая молекула нуклеиновой кислоты включает в себя последовательность

T*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*G*T*C*G*T*C_G*T*T*T (SEQ ID NO: 33),

где * представляет собой фосфоротриоат и _ представляет собой фосфодиэфир.

В одном из вариантов осуществления по меньшей мере один нуклеотид в олигонуклеотиде представляет собой замещенный или модифицированный пурин или пиримидин.

В одном из вариантов осуществления замещенный пиримидин представляет собой C5- или C6-замещенный пиримидин.

В одном из вариантов осуществления замещенный пурин представляет собой C8- или C7-замещенный пурин.

В одном из вариантов осуществления замещенный или модифицированный пурин или пиримидин выбран из группы, включающей в себя 5-замещенные цитозины, 6-замещенные цитозины, N4-замещенные цитозины, 5-азацитозин, 2-меркаптоцитозин, изоцитозин, псевдоизоцитозин, аналоги цитозина с конденсированными кольцевыми системами и производные урацила, производные тимина, 7-деазагуанин, 7-деаза-7-замещенный гуанин, 7-деаза-8-замещенный гуанин, 7-деаза-8-азагуанин, гипоксантин, N2-замещенные гуанины, 5-амино-3-метил-3Н, 6Н-тиазоло[4,5-d]пиримидин-2,7-дион, 2,6-диаминопурин, 2-аминопурин, пурин, индол, замещенные аденины, 8-замещенный гуанин и 6-тиогуанин.

В одном из вариантов осуществления замещенный или модифицированный пурин или пиримидин выбран из группы, включающей в себя 5-метилцитозин, 5-фторцитозин, 5-хлорцитозин, 5-бромцитозин, 5-йодцитозин, 5-гидроксицитозин, 6-гидроксицитозин, 5-гидроксиметилцитозин, 5-диформетилцитозин и незамещенный или замещенный 5-алкилцитозин, N4-этилцитозин, N,N'-пропиленцитозин, феноксазин, 5-фторурацил, 5-бромурацил, 5-бромвинилурацил, 4-тиоурацил, 5-гидроксиурацил, 5-пропилилурацил, 2-тиотимин, 4-тиотимин, 6-замещенные тимины, 7-деаза-7-(C2-C6)алкилгуанин, N2-метилгуанин, N6-метиладенин, 8-оксоадинин, 8-гидроксигуанин и 8-бромгуанин.

В одном из вариантов осуществления замещенный или модифицированный пурин или пиримидин выбран из группы, включающей в себя универсальное основание, ароматическую циклическую систему и атом водорода (d-спейсер).

В одном из вариантов осуществления замещенный или модифицированный пурин или пиримидин выбран из группы, включающей в себя 4-метилиндол, 5-нитроиндол, 3-нитропиррол, Р-основание и К-основание, бензимидазол, дихлорбензимидазол, амид 1-метил-1Н-[1,2,4]триазол-3-карбоновой кислоты, фторбензол и дифторбензол.

В одном из вариантов осуществления любой из N, S, X или Z замещен остатком, выбранным из группы, включающей в себя C6-C30 алкильную цепь, желчные кислоты, холевую кислоту, таурохолевую кислоту, дезоксихолат, холестерин, олеилитохолевую кислоту, олеилхоленовую кислоту, гликолипиды, фосфолипиды, сфинголипиды, изопреноиды, стероиды, витамины, витамин Е, насыщенные жирные кислоты, ненасыщенные жирные кислоты, сложные эфиры жирных кислот, триглицериды, пирены, порфирины, тексафирин, адамантан, акридины, биотин, кумарин, флуоресцеин, родамин, Техас красный, дигоксигенин, диметокситритил, трет-бутилдиметилсилил, трет-бутилдифенилсилил, цианиновые красители, цианиновый краситель Су3, цианиновый краситель Су576, краситель Хехст 33258, псорален и ибупрофен.

В одном аспекте изобретение относится к иммуностимулирующей молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей: (a) 5'-конец, начинающийся иммуностимулирующим мотивом, выбранным из (TCG)_nN и RDCGY₁Y₂N, где Т представляет собой тимин, С представляет собой неметилированный цитозин, G представляет собой гуанин, R представляет собой пурин, D не является С, каждый из Y₁ и Y₂ независимо представляет собой пиримидин, n является целым числом от 1 до 4 включительно, и N представляет собой любую последовательность длиной 0-12 оснований; (b) 3'-конец, оканчивающийся инвертированным повтором, способным формировать структуру шпильки или стебля-петли, где указанная структура содержит GC-богатый стебель длиной 2-6 последовательных пар оснований и по меньшей мере одно неспаренное или некомплементарно спаренное основание, и (c) частично стабилизированный остов, содержащий по меньшей мере одну фосфодиэфирную связь 5'-СрG-3'. Любой или оба из С и G в СрG-динуклеотиде может являться модифицированным.

В одном из вариантов осуществления GC-богатый стебель имеет длину 2 последовательные пары оснований.

В одном из вариантов осуществления GC-богатый стебель имеет длину 3 последовательные пары оснований.

В одном из вариантов осуществления GC-богатый стебель имеет длину 4 последовательные пары оснований.

В одном из вариантов осуществления GC-богатый стебель имеет длину 5 последовательных пар оснований.

В одном из вариантов осуществления GC-богатый стебель имеет длину 6 последовательных пар оснований.

В одном из вариантов осуществления GC-богатый стебель содержит по меньшей мере 2 пары оснований G-C.

В одном из вариантов осуществления GC-богатый стебель содержит по меньшей мере 3 пары оснований G-C.

В конкретном варианте осуществления по меньшей мере одно неспаренное или некомплементарно спаренное основание представляет собой T.

В одном из вариантов осуществления частично стабилизированный остов, содержащий по меньшей мере одну фосфодиэфирную связь 5'-CpG-3', дополнительно содержит множество фосфоротиаотных межнуклеотидных связей.

В одном из вариантов осуществления 5'-конец обладает последовательностью, представленной как TCGTCGTTTТА (SEQ ID NO: 41).

В одном из вариантов осуществления 3'-конец оканчивается инвертированным повтором, обладающим последовательностью оснований, представленной как CGGCGCCGTGCCG (SEQ ID NO: 19).

В одном из вариантов осуществления 3'-конец оканчивается инвертированным повтором, обладающим последовательностью оснований, представленной как CGGCGTCGTGCCG (SEQ ID NO: 9).

В одном аспекте изобретение относится к иммуностимулирующей нуклеиновой кислоте, обладающей последовательностью оснований, представленной как TCGTCGTTTТАCGGCGCCGTGCCG (SEQ ID NO: 43).

В одном аспекте изобретение относится к иммуностимулирующей нуклеиновой кислоте, обладающей последовательностью оснований, представленной как TCGTCGTTTТАCGGCGTCGTGCCG (SEQ ID NO: 48).

В одном аспекте изобретение относится к иммуностимулирующей нуклеиновой кислоте, обладающей последовательностью оснований, представленной как

T*С*G*Т*С*G*Т*Т*Т*А*С*G*С*G*С*G*С*G*Т*G*С*С*G (SEQ ID NO: 43), где * обозначает фосфоротиаотную межнуклеотидную связь и _ обозначает фосфодиэфирную межнуклеотидную связь.

В одном аспекте изобретение относится к иммуностимулирующей нуклеиновой кислоте, обладающей последовательностью оснований, представленной как

T*С*G*Т*С*G*Т*Т*Т*А*С*_G*G*С*_G*С*С*_G*Т*G*С*С*G (SEQ ID NO: 43), где * обозначает фосфоротиаотную межнуклеотидную связь и _ обозначает фосфодиэфирную межнуклеотидную связь.

В одном аспекте изобретение относится к иммуностимулирующей нуклеиновой кислоте, обладающей последовательностью оснований, представленной как

T*С*G*Т*С*G*Т*Т*Т*А*С*_G*G*С*_G*С*С*_G*Т*G*С*С*G (SEQ ID NO: 43), где * обозначает фосфоротиаотную межнуклеотидную связь и _ обозначает фосфодиэфирную межнуклеотидную связь.

В одном аспекте изобретение относится к иммуностимулирующей нуклеиновой кислоте, обладающей последовательностью оснований, представленной как

T*С*G*Т*С*_G*Т*Т*Т*А*С*_G*G*С*_G*С*С*_G*Т*G*С*С*G (SEQ ID NO: 43), где * обозначает фосфоротиаотную межнуклеотидную связь и _ обозначает фосфодиэфирную межнуклеотидную связь.

В одном аспекте изобретение относится к вакцине, содержащей иммуностимулирующую молекулу нуклеиновой кислоты по изобретению и антиген.

В одном аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей иммуностимулирующую молекулу нуклеиновой кислоты по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

В одном из аспектов изобретение относится к способу индукции экспрессии интерферона I типа (IFN). Способ по данному аспекту изобретения предусматривает контактирование клетки, способной экспрессировать IFN I типа, с иммуностимулирующей молекулой нуклеиновой кислоты по изобретению в количестве, эффективном для индукции экспрессии IFN I типа.

В одном из вариантов осуществления IFN I типа представляет собой интерферон альфа (IFN-α).

В одном из вариантов осуществления IFN I типа представляет собой интерферон бета (IFN-β).

В одном из аспектов изобретение относится к способу индукции экспрессии интерферона гамма (IFN-γ). Способ по данному аспекту изобретения предусматривает контактирование клетки, способной экспрессировать IFN-γ, с иммуностимулирующей нуклеиновой кислотой по изобретению в количестве, эффективном для индукции экспрессии IFN-γ.

В одном из аспектов изобретение относится к способу активации природной клетки-киллера (NK). Способ по данному аспекту изобретения предусматривает контактирование NK-клетки с иммуностимулирующей нуклеиновой кислотой по изобретению в количестве, эффективном для активации NK-клетки.

В одном из аспектов изобретение относится к способу лечения инфекции. Способ по данному аспекту изобретения предусматривает введение субъекту, страдающему от инфекции или подверженному риску ее развития, иммуностимулирующей нуклеиновой кислоты по изобретению в количестве, эффективном для лечения или предупреждения инфекции.

В одном из вариантов осуществления субъект имеет инфекцию, выбранную из вирусной, бактериальной, грибковой или паразитической инфекции, или подвержен риску ее развития.

В одном из вариантов осуществления субъект имеет вирусную инфекцию вирусом, выбранным из вируса гепатита В (HBV), вируса гепатита С (HCV), цитомегаловируса (CMV), вируса Эпштейна-Барра

(EBV), вируса папилломы, вируса иммунодефицита человека (HIV) или вируса простого герпеса (HSV), или подвержен риску ее развития.

В одном из вариантов осуществления субъект имеет бактериальную инфекцию видами бактерий, выбранных из *Leishmania*, *Listeria* или *Anthrax*, или подвержен риску ее развития.

В одном из аспектов изобретение относится к способу лечения аллергического состояния. Способ по данному аспекту изобретения предусматривает введение субъекту, страдающего аллергическим состоянием или подверженному риску его развития, иммуностимулирующей нуклеиновой кислоты по изобретению в количестве, эффективном для лечения или предупреждения аллергического состояния.

В одном из вариантов осуществления аллергическое состояние представляет собой аллергическую астму.

В одном из аспектов изобретение относится к способу лечения рака. Способ по данному аспекту изобретения предусматривает введение субъекту, страдающего раком или подверженному риску его развития, иммуностимулирующей нуклеиновой кислоты по изобретению в количестве, эффективном для лечения или предупреждения рака.

В одном из вариантов осуществления рак выбран из базально-клеточной карциномы, рака желчных путей, рака мочевого пузыря, рака кости, рака мозга и центральной нервной системы, рака молочной железы, рака шейки матки, хориокарциномы, рака ободочной и прямой кишки, рака соединительной ткани, рака пищеварительной системы, эндометриального рака, рака пищевода, злокачественной опухоли глаза, злокачественной опухоли головы и шеи, рака желудка, интраэпителиальной неоплазии, рака почки, рака глотки, лейкоза, рака печени, рака легкого, лимфомы, включая лимфому Ходжкина и неходжкинскую лимфому, меланомы, миеломы, нейробластомы, рака полости рта, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, ретинобластомы, рабдомиосаркомы, рака прямой кишки, рака почки, злокачественной опухоли респираторной системы, саркомы, рака кожи, рака желудка, рака яичка, рака щитовидной железы, рака матки, злокачественной опухоли мочевыделительной системы или других карцином и сарком.

В одном из вариантов осуществления рак представляет собой рак, чувствительный к лечению интерфероном альфа (IFN- α).

В одном из вариантов осуществления рак, чувствительный к лечению интерфероном альфа (IFN- α) выбран из лейкоза ворсистых клеток, хронического миелолейкоза, кожного Т-клеточного лейкоза, множественной миеломы, фолликулярной лимфомы, злокачественной меланомы, плоскоклеточной карциномы, связанной со СПИДом саркомы Капоши, почечно-клеточной карциномы, карциномы предстательной железы, дисплазии шейки матки или карциномы толстой кишки.

В одном из аспектов изобретение относится к применению иммуностимулирующей нуклеиновой кислоты по изобретению для производства лекарственного средства для применения в лечении инфекции.

В одном из аспектов изобретение относится к применению иммуностимулирующей нуклеиновой кислоты по изобретению для производства лекарственного средства для применения в лечении аллергического состояния.

В одном из аспектов изобретение относится к применению иммуностимулирующей нуклеиновой кислоты по изобретению для производства лекарственного средства для применения в лечении аллергической астмы.

В одном из аспектов изобретение относится к применению иммуностимулирующей нуклеиновой кислоты по изобретению для производства лекарственного средства для применения в лечении рака.

Каждое из ограничений изобретения может охватывать различные варианты осуществления по изобретению. Следует предупредить, однако, что каждое из ограничений изобретения, относящееся к любому элементу или сочетанию элементов, можно включить в каждый аспект изобретения.

Краткое описание фигур

Настоящее изобретение можно более просто и полно понять, если рассматривать в совокупности с сопровождающими фигурами. Фигуры приведены только для иллюстративных целей и не являются необходимыми для понимания или осуществления изобретения.

Фиг. 1 представляет собой серию графиков, показывающих индукцию посредством ODN 332, 333 и 334 IFN- α и передачи сигнала TLR9.

Фиг. 2 представляет собой серию графиков, показывающих индукцию посредством ODN 611, 614 и 620 IFN- α и передачи сигнала TLR9.

Фиг. 3 представляет собой график, показывающий продукцию IFN- α периферическими мононуклеарными клетками крови (PBMC), стимулированными панелью олигонуклеотидов.

Фиг. 4 представляет собой график, показывающий средние групповые титры (GMT) общих антиген-специфических IgG после иммунизации 1 мкг поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) с указанным количеством ODN.

Фиг. 5 представляет собой график, показывающий GMT выделенных изотипов антиген-специфических IgG после иммунизации 1 мкг HBsAg с указанным количеством ODN.

Фиг. 6 представляет собой график, показывающий ответы антиген-специфических цитолитических Т-лимфоцитов после иммунизации 1 мкг HBsAg с указанным количеством ODN.

Фиг. 7A представляет собой график, показывающий выживаемость в соответствии с различными лечениями ODN на мышинной модели опухоли нейробластомы.

Фиг. 7B представляет собой график, показывающий объем опухоли в соответствии с различными лечениями ODN на мышинной модели опухоли нейробластомы.

Таблица выбранных последовательностей

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

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

Подробное описание изобретения

В одном аспекте изобретение основано на открытии, что конкретные подклассы иммуностимулирующих CpG-олигонуклеотидов, обладающие определенной вторичной структурой, высокоэффективно опосредуют иммуностимулирующие эффекты. Данные CpG-нуклеиновые кислоты являются терапевтически и профилактически полезными для стимуляции иммунной системы для лечения рака, инфекционных заболеваний, аллергии, астмы и других заболеваний и для помощи при защите против умеренных инфекций после химиотерапии рака. Сильные, но сбалансированные клеточный и гуморальный иммунные ответы, получаемые при стимуляции CpG, отражают собственную природную защиту организма против вторгающихся патогенов и раковых клеток.

Последовательности по изобретению обладают некоторым структурным сходством с классом CpG-олигонуклеотидов, на который ссылаются как на С-класс или олигонуклеотидную с комбинированным мотивом CpG. См. опубликованную международную заявку на получение патента PCT WO 03/015711. Подобно описанным выше олигонуклеотидам С-класса, CpG-олигонуклеотиды С-класса по настоящему изобретению обладают определенными 5'- и 3'-мотивами как частями молекулы. Данные описанные выше олигонуклеотиды С-класса обладают традиционной «стимулирующей» CpG-последовательностью, как правило, расположенной на 5'- или 3'-конце и мотивом «GC-богатого палиндрома», как правило, расположенным на другом конце молекулы или вблизи него. Такие нуклеиновые кислоты с комбинированным мотивом оказывают иммуностимулирующие эффекты, где-то промежуточные между такими эффектами, связанными с традиционными CpG-ODN «В-класса», являющимися сильными индукторами активации В-клеток и активации дендритных клеток, и такими эффектами, связанными с более недавно описанным классом CpG-содержащих иммуностимулирующих нуклеиновых кислот (CpG-ODN «А-класса»), являющимися сильными индукторами IFN- α и активации NK-клеток, но сравнительно слабыми индукторами активации В-клеток и активации DC.

Новые CpG-олигонуклеотиды С-класса по настоящему изобретению также отличаются по структуре от описанных ранее CpG-олигонуклеотидов С-класса. По сравнению с описанными ранее CpG-олигонуклеотидами С-класса, иммуностимулирующие молекулы нуклеиновых кислот по настоящему изобретению характеризуются более мягкими требованиями по отношению к GC-богатому палиндрому на одном конце молекулы. Например, описанные ранее CpG-олигонуклеотиды С-класса в одном из вариантов осуществления содержат строгий или точный палиндром длиной по меньшей мере 10 нуклеотидов, имеющий содержание GC по меньшей мере 2/3. В некоторых вариантах осуществления палиндром описанных ранее олигонуклеотидов С-класса может содержать не более чем минимальное число последовательных некомплементарно спаренных нуклеотидов.

В отличие от описанных ранее олигонуклеотидов С-класса, аналоги олигонуклеотидов С-класса по настоящему изобретению характеризуются палиндромными мотивами, которые могут иметь, в различных вариантах осуществления, менее 10 нуклеотидов; содержание GC между нулем и менее чем 2/3; различные аналоги нуклеотидов и заместители, включая лишённые каких-либо нуклеиновых оснований (d-спейсер); удлиненную инвертированную последовательность, содержащую четыре или более последовательных нуклеотидов или заместителей нуклеотидов, не формирующих Уотсон-Криковские пары оснований, и любые их сочетания. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления 3'-части двух или более молекул можно соединить вместе за их 3'-концы. Обнаружено, что олигонуклеотиды данного нового подкласса, не имеющие точного палиндрома, еще способны, подобно описанным ранее CpG-олигонуклеотидам с комбинированным мотивом, индуцировать высокие уровни продукции IFN, включая

IFN I типа (например, IFN- α , IFN- β) и IFN- γ .

«Палиндром» и, эквивалентно, «палиндромная последовательность», как применяют здесь, относится к последовательности нуклеиновой кислоты, точно обратнo комплементарной себе самой (т.е. последовательности, такой как ABCDEE'D'C'B'A', в которой A и A', B и B', C и C', D и D', E и E' представляют собой основания, способные формировать обычные Уотсон-Криковские пары оснований, т.е. G-C, A-T и A-U. Как применяют здесь, «палиндром» в строгом смысле исключает инвертированную последовательность или инвертированную нуклеотидную структуру, не участвующую в формировании обычных Уотсон-Криковских пар оснований.

«Инвертированный повтор», как применяют здесь, относится к неточному палиндрому, т.е. последовательности нуклеиновой кислоты, в которой присутствуют как нуклеотиды, способные формировать обычные Уотсон-Криковские пары оснований, так и нуклеотиды, аналоги нуклеотидов и другие структуры, не участвующие в формировании обычных Уотсон-Криковских пар оснований (например, последовательность, такая как ABCDE-S-E'D'C'B'A', в которой A и A', B и B', C и C', D и D', E и E' представляют собой основания, способные формировать обычные Уотсон-Криковские пары оснований, и S представляет собой непалиндромную последовательность или нуклеотидный линкер или абазический линкер (d-спейсер)). В конкретных вариантах осуществления нуклеотиды, аналоги нуклеотидов и другие структуры, не участвующие в формировании обычных Уотсон-Криковских пар оснований, прерывают точный во всем остальном палиндром. В конкретных вариантах осуществления нуклеотиды, не участвующие в формировании обычных Уотсон-Криковских пар оснований, могут формировать не Уотсон-Криковские пары оснований с другим нуклеотидом, например G-T. Не Уотсон-Криковская пара оснований, как применяют здесь, представляет собой любую пару оснований, отличную от Уотсон-Криковской пары оснований, включающую в себя в качестве неограничивающих примеров Хугстэнновские взаимодействия и так называемое неоднозначное спаривание. В конкретных вариантах осуществления нуклеотиды, не участвующие в формировании обычных Уотсон-Криковских пар, непарные и не имеют нуклеотидного основания или аналога нуклеотидного основания, с которым могут формировать Уотсон-Криковскую или не Уотсон-Криковскую пару оснований, например G напротив d-спейсера. В конкретных вариантах осуществления нуклеотиды, не участвующие в формировании пар оснований, могут формировать нестандартные пары оснований с другим нуклеотидом, например диаминопиримидин может формировать пару оснований с ксантозином.

По одному из вариантов осуществления 5'-конец нуклеиновой кислоты начинается с иммуностимулирующего мотива, выбранного из (TCG)_nN и RDCGY₁Y₂N. T представляет собой тимин, C представляет собой неметилированный цитозин, G представляет собой гуанин, R представляет собой пурин, D не является C, каждый из Y₁ и Y₂ независимо представляет собой пиримидин, n представляет собой целое число от 1 до 4 включительно, и N представляет собой любую последовательность длиной 0-12 пар оснований.

3'-конец нуклеиновой кислоты оканчивается инвертированным повтором, способным формировать структуру шпильки или стебля-петли. Термин «оканчивается» относится к структуре на 3'-конце или вблизи него. Таким образом, конец неточного палиндрома может располагаться на фактическом 3'-конце молекулы, или, в качестве альтернативы, 3'-конец может содержать 1 или несколько дополнительных нуклеотидов, не являющихся частью структуры инвертированного повтора. Предпочтительно 3'-конец молекулы содержит 3 или менее нуклеотидов, не формирующих часть структуры инвертированного повтора.

По одному из вариантов осуществления «инвертированный повтор, способный формировать структуру шпильки или стебля-петли», как применяют здесь, относится к последовательности нуклеотидов, формирующей GC-богатый стебель или шпильку длиной 2-10 последовательных пар оснований и содержащей по меньшей мере одно неспаренное или некомплементарно спаренное основание. В отдельных вариантах осуществления GC-богатый стебель имеет длину 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 последовательных пар оснований. В некоторых вариантах осуществления GC-богатый стебель содержит по меньшей мере 2, 3 или 4 пары оснований G-C.

По одному из вариантов осуществления «инвертированный повтор, способный формировать структуру шпильки или стебля-петли», как применяют здесь, относится к последовательности нуклеотидов, формирующей AT-богатый стебель или шпильку длиной от 2 до 10 последовательных пар оснований и содержащей по меньшей мере одно неспаренное или некомплементарно спаренное основание. В отдельных вариантах осуществления AT-богатый стебель имеет длину 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 последовательных пар оснований. В некоторых вариантах осуществления AT-богатый стебель содержит по меньшей мере 2, 3 или 4 пары оснований A-T.

В некоторых случаях по меньшей мере одно неспаренное или некомплементарно спаренное основание соединяет мостиком концы стебля или шпильки. Это может позволять формирование вторичной структуры предоставлением точки перегиба в молекуле для стеблей для образования пары оснований и формирования шпильки. В качестве альтернативы неспаренное или некомплементарно спаренное основание (основания) может присутствовать внутри стебля. Если некомплементарно спаренное основание присутствует внутри стебля, тогда предпочтителен стебель длиной по меньшей мере 3 пары оснований.

В некоторых вариантах осуществления неспаренное или некомплементарно спаренное основание представляет собой Т. Неспаренные нуклеотиды на конце двойных цепей известны также как выступающие нуклеотиды или свободные концы, которые могут значительно стабилизировать формирование дуплекса или формирование шпильки. Freier S.M. et al. (1983) Effects of 3'dangling end stacking on the stability of GGCC and CCGG double helices. *Biochemistry* 22:6198-206.

Нуклеиновая кислота содержит также частично стабилизированный остов, содержащий по меньшей мере одну фосфодиэфирную связь 5'-CpG-3'.

В некоторых случаях двухцепочечная часть молекулы может содержать также неприродные (не-стандартные) пары оснований (например, диаминопиримидин, спаренный с ксантином). Lutz M.J. et al. (1998) Recognition of a non-standard base pair by thermostable DNA polymerases. *Bioorg Med Chem Lett* 8:1149-52.

Формулы определяют подгруппы класса CpG-олигонуклеотидов, демонстрирующих отличные иммуностимулирующие свойства. В формулах 5' относится к свободному 5'-концу олигонуклеотида и 3' относится к свободному 3'-концу олигонуклеотида.

Олигонуклеотиды могут иметь один или несколько доступных 5'- или 3'-концов. В некоторых вариантах осуществления 3'-конец можно присоединить к другому 3'-концу. Так как обнаружена и описана здесь важность 5'- и 3'-мотивов, возможно также получить модифицированные олигонуклеотиды, имеющие два таких 5'- или 3'-конца. Этого можно достичь, например, соединением двух олигонуклеотидов посредством связи 3'-3' для получения олигонуклеотида, имеющего два доступных 5'-конца. 3'3'- или 5'5'-связь может представлять собой фосфодиэфирный, фосфоротиоатный или любой другой модифицированный межнуклеозидный мостик. Способы осуществления такого связывания известны в данной области. Например, такие связи описаны в Seliger H. et al. (1991) Oligonucleotide analogs with terminal 3'-3'- and 5'-5'-internucleotidic linkages as antisense inhibitors of viral gene expression, *Nucleosides & Nucleotides* 10:469-77 and Jiang Z. et al. (1999) Pseudo-cyclic oligonucleotides: in vitro and in vivo properties, *Bioorg Med Chem* 7:2727-35.

Кроме того, 3'-3'-связанные или 5'-5'-связанные ODN, где связь между 3'- или 5'-концевыми нуклеотидами не является фосфодиэфирным, фосфоротиоатным или другим модифицированным мостиком, можно получить с применением дополнительного спейсера, такого как три- или тетраэтиленгликольфосфатная группа (Durand M. et al. (1992) Triple-helix formation by an oligonucleotide containing one (dA) 12 and two (dT) 12 sequences bridged by two hexaethylene glycol chains, *Biochemistry* 31:9197-204; патент США № 5658738 и патент США № 5668265). В качестве альтернативы, ненуклеотидный линкер можно получить из этандиола, пропандиола или из абазического дезоксирибозного звена (d-спейсера) (Fontanel M.L. et al. (1994) Sterical recognition by T4 polynucleotide kinase of non-nucleosidic moieties 5'-attached to oligonucleotides, *Nucleic Acids Res* 22:2022-7) с применением обычной фосфорамидитной химии. Ненуклеотидные линкеры можно вводить один или несколько раз или сочетать друг с другом, позволяя любое желательное расстояние между 3'-концами двух подлежащих связыванию ODN.

«Ненуклеотидный линкер», как применяют здесь, относится к любому линкерному элементу, не являющемуся нуклеотидом или его полимером (т.е. полинуклеотидом), где нуклеотид включает в себя пуриновое или пиримидиновое нуклеиновое основание и фосфат сахара. Таким образом, ненуклеотидный линкер включает в себя абазический нуклеотид (d-спейсер), т.е. нуклеотидоподобное сахарофосфатное звено, в котором нуклеиновое основание заменено атомом водорода. Ненуклеотидный линкер может представлять собой полиэтиленгликоль, включающий в себя в качестве неограничивающих примеров триэтиленгликоль и гексаэтиленгликоль.

В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид обладает одной из следующих структур:

TCGTCGTTTTA (SEQ ID NO:41), CGGCGCCGTGCCG (SEQ ID NO:19),
CGGCGTCGTGCCG (SEQ ID NO:9), TCGTCGTTTTACGGCGCCGTGCCG (SEQ ID NO:43),
TCGTCGTTTTACGGCGTCGTGCCG (SEQ ID NO:48),
T*C_G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*C*G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:43),
T*C*G*T*C*G*T*T*T*A*C_G*G*C_G*C*C_G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:43),
T*C*G*T*C*G*T*T*T*A*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:43), и
T*C*G*T*C_G*T*T*T*A*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:43).

Символ * означает присутствие стабилизированной межнуклеотидной связи и _ означает присутствие фосфодиэфирной связи.

Иммуностимулирующие олигонуклеотиды, как правило, имеют длину в диапазоне от 6 до 100 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина находится в диапазоне 6-40, 13-100, 13-40, 13-30, 15-50 или 15-30 нуклеотидов, или в любом диапазоне целых чисел между ними.

Термины «нуклеиновая кислота» и «олигонуклеотид» применяют попеременно, обозначая множественные нуклеотиды (т.е. молекулы, содержащие сахар (например, рибозу или дезоксирибозу)), связанную с фосфатной группой и с взаимозаменяемым органическим основанием, представляющим собой замещенный пиримидин (например, цитозин (C), тимин (T) или урацил (U)) или замещенный пурин (на-

пример, аденин (А) или гуанин (G)). Как применяют здесь, термины «нуклеиновая кислота» и «олигонуклеотид» относятся к олигорибонуклеотидам так же, как к олигодезоксирибонуклеотидам. Термины «нуклеиновая кислота» и «олигонуклеотид» должны относиться также к полинуклеозидам (т.е. полинуклеотиду минус фосфат) и любому другому полимеру, содержащему органическое основание. Молекулы нуклеиновых кислот могут быть получены из существующих источников нуклеиновых кислот (например, геномной или кДНК), но предпочтительно являются синтетическими (например, полученными синтезом нуклеиновых кислот).

Термины «нуклеиновая кислота» и «олигонуклеотид», как применяют здесь, относятся к молекулам нуклеиновой кислоты и олигонуклеотидам по изобретению так же, как к аналогам олигонуклеотидов по изобретению. Термины «олигодезоксинуклеотид» и, эквивалентно, «ODN», как применяют здесь, относятся к немодифицированным олигодезоксинуклеотидам по изобретению так же, как к аналогам олигодезоксинуклеотидов по изобретению.

Термины «нуклеиновая кислота» и «олигонуклеотид», как применяют здесь, относятся к молекулам нуклеиновой кислоты и олигонуклеотидам с замещениями или модификациями, такими как замещения или модификации в основаниях и/или сахарах. Например, они включают в себя нуклеиновые кислоты, имеющие сахара остова, ковалентно присоединенные к низкомолекулярным органическим группам, отличным от гидроксильной группы в 2'-положении и отличным от фосфатной группы или гидроксигруппы в 5'-положении. Такие модифицированные нуклеиновые кислоты могут содержать 2'-О-алкилированную рибозную группу. Кроме того, модифицированные нуклеиновые кислоты могут содержать сахара, такие как арабинозу или 2'-фторарабинозу вместо рибозы. Соответственно, нуклеиновые кислоты могут быть гетерогенными в составе остова, таким образом, содержащими любые возможные сочетания звеньев полимера, соединенных вместе, такими как пептид-нуклеиновые кислоты (имеющие пептидоподобный остов с основаниями нуклеиновых кислот). Другие примеры более детально описаны ниже.

Иммуностимулирующие олигонуклеотиды по настоящему изобретению могут охватывать различные химические модификации или замещения по сравнению с природными РНК и ДНК, вовлекающие фосфодиэфирный межнуклеозидный мостик, β -D-рибозное звено и/или природное нуклеозидное основание (аденин, гуанин, цитозин, тимин, урацил). Примеры химических модификаций известны специалистам в данной области и описаны, например, в Uhlmann E. et al. (1990) Chem Rev 90:543; "Protocols for Oligonucleotides and Analogs" Synthesis and Properties & Synthesis and Analytical Techniques, S. Agrawal, Ed, Humana Press, Totowa, USA 1993; Crooke S.T. et al. (1996) Annu Rev Pharmacol Toxicol 36:107-29; и Hunziker J. et al. (1995) Mod Synth Methods 7:331-417. Олигонуклеотид по настоящему изобретению может содержать одну или несколько модификаций, где каждая модификация локализована в конкретном фосфодиэфирном межнуклеозидном мостике и/или в конкретном β -D-рибозном звене и/или в конкретном положении природного нуклеозидного основания по сравнению с олигонуклеотидом такой же последовательности, составленным из природных ДНК или РНК.

Например, олигонуклеотиды могут содержать одну или несколько модификаций, где каждую модификацию независимо выбирают из:

а) замены фосфодиэфирного межнуклеозидного мостика, локализованного на 3'- и/или 5'-конце нуклеозида модифицированным межнуклеозидным мостиком,

б) замены фосфодиэфирного мостика, локализованного на 3'- и/или 5'-конце нуклеозида дефосфомостиком,

с) замены сахарофосфатного звена из сахарофосфатного остова молекулы другим звеном,

д) замены β -D-рибозного звена звеном модифицированного сахара и

е) замены природного нуклеозидного основания модифицированным нуклеозидным основанием.

Более подробные примеры химических модификаций олигонуклеотида следующие.

Олигонуклеотиды могут содержать модифицированные межнуклеотидные связи, такие как описаны выше в а) или б). Данные модифицированные связи могут быть частично устойчивыми к деградации (например, стабилизированными). «Стабилизированная молекула олигонуклеотида» означает олигонуклеотид, в результате таких модификаций относительно устойчивый к деградации *in vivo* (например, посредством экзо- или эндонуклеазы). Олигонуклеотиды с фосфоротиоатными связями, в некоторых вариантах осуществления, могут обеспечивать максимальную активность и защиту олигонуклеотида от деградации внутриклеточными экзо- и эндонуклеазами.

Фосфодиэфирный межнуклеозидный мостик, локализованный на 3'- и/или 5'-конце нуклеозида, можно заменить модифицированным межнуклеозидным мостиком, где модифицированный межнуклеозидный мостик выбран, например, из фосфоротиоата, фосфородитиоата, NR^1R^2 -фосфорамидата, боранфосфата, α -гидроксibenзилфосфата, фосфат-(C_1 - C_{21})-О-алкилового сложного эфира, фосфат-[(C_6 - C_{12})арил-(C_1 - C_{21})-О-алкил] сложного эфира, (C_1 - C_8)алкилфосфонатных и/или (C_6 - C_{12})арилфосфонатных мостиков, (C_7 - C_{12})- α -гидроксиметиларила (например, описанного в WO 95/01363), где (C_6 - C_{12})арил, (C_6 - C_{20})арил и (C_6 - C_{14})арил необязательно заменен галогеном, алкилом, алкокси-, нитро-, циано-, и где R^1 и R^2 независимо друг от друга представляют собой водород, (C_1 - C_{18})алкил, (C_6 - C_{20})арил, (C_6 - C_{14})арил-(C_1 -

C_8)алкил, предпочтительно водород, (C_1-C_8) алкил, предпочтительно (C_1-C_4) алкил и/или метоксиэтил, или R^1 и R^2 вместе с несущим их атомом азота формируют 5-6-членное гетероциклическое кольцо, которое может дополнительно содержать добавочный гетероатом из группы O, S или N.

Замена фосфодиэфирного мостика, локализованного на 3'- и/или 5'-конце нуклеозида, дефосфомостиком (дефосфомостики описаны, например, в Uhlmann E. and Peyman A. in "Methods in Molecular Biology", Vol. 20, "Protocols for Oligonucleotides and Analogs", S. Agrawal, Ed., Humana Press, Totowa 1993, Chapter 16, pp. 355 ff), где дефосфомостик, например, выбран из дефосфомостиков формацетальной, 3-тиоформацетильной, метилгидроксиламиновой, оксимной, метилендиметилгидразо, диметиленсульфоновой и/или силиловой групп.

Сахарофосфатное звено (например, β -D-рибозу и фосфодиэфирный межнуклеозидный мостик, вместе формирующие сахарофосфатное звено) из сахарофосфатного остова (т.е. сахарофосфатный остов состоит из сахарофосфатных звеньев) можно заменить другим звеном, где другое звено, например, пригоден для построения «морфолино-производного» олигомера (как описано, например, в Stirchak E.P. et al. (1989) *Nucleic Acids Res* 17:6129-41), что представляет собой, например, замену «морфолино-производным» звеном; или для построения полиамидной нуклеиновой кислоты («PNA»; как описано, например, в Nielsen P.E. et al. (1994) *Bioconjug Chem* 5:3-7), что представляет собой, например, замену звеном остова PNA, например, 2-аминоэтилглицином. Олигонуклеотид может иметь другие модификации и замены в остове, такие как пептидные нуклеиновые кислоты с фосфатными группами (PHONA), замкнутые нуклеиновые кислоты (LNA) и олигонуклеотиды с участками остова с алкиловыми линкерами или аминолинкерами. Алкиловый линкер может быть разветвленным или неразветвленным и хирально однородным или рацемической смесью.

β -рибозное звено или β -D-2'-дезоксирибозное звено можно заменить модифицированным сахарным звеном, где модифицированное сахарное звено, например, выбирают из β -D-рибозы, α -D-2'-дезоксирибозы, L-2'-дезоксирибозы, 2'-F-2'-дезоксирибозы, 2'-F-арабинозы, 2'-O- (C_1-C_6) алкилрибозы, где 2'-O- (C_1-C_6) алкилрибоза предпочтительнее представляет собой 2'-O-метилрибозу, 2'-O- (C_2-C_6) алкенилрибозу, 2'-[O- (C_1-C_6) алкил-O- (C_1-C_6) алкил]рибозу, 2'-NH₂-2'-дезоксирибозу, β -D-ксилофуранозы, α -арабинофуранозы, 2,4-дидезокси- β -D-эритрогексопиранозы и аналогов сахаров, карбоциклических (описанных, например, в Froehler (1992) *J Am Chem Soc* 114:8320) и/или с открытой цепью (описанных, например, в Vandendriessche et al. (1993) *Tetrahedron* 49:7223), и/или бицикло-сахарных аналогов (описанных, например, в Tarkov M. et al. (1993) *Helv Chim Acta* 76:481).

В некоторых вариантах осуществления сахар представляет собой 2'-O-метилрибозу, особенно для одного или обоих нуклеотидов, связанных фосфодиэфирной или фосфодиэфирно-подобной межнуклеозидной связью.

Нуклеиновые кислоты содержат также замещенные пурины и пиримидины, такие как C-5-пропинпиримидин и 7-деаза-7-замещенные модифицированные основания. Wagner R.W. et al. (1996) *Nat Biotechnol* 14:840-4. Пурины и пиримидины включают в себя в качестве неограничивающих примеров аденин, цитозин, гуанин, тимин и урацил, и другие природные и неприродные нуклеиновые основания, замещенные и незамещенные ароматические молекулы.

Модифицированное основание представляет собой любое основание, химически отличное от природного основания, обычно находящегося в ДНК и РНК, такого как Т, С, G, А и U, но разделяющего основные химические структуры с природными основаниями. Модифицированное нуклеозидное основание можно выбрать, например, из гипоксантина, урацила, дигидроурацила, псевдоурацила, 2-тиоурацила, 4-тиоурацила, 5-аминоурацила, 5- (C_1-C_6) алкилурацила, 5- (C_2-C_6) алкенилурацила, 5- (C_2-C_6) алкинил-урацила, 5-(гидроксиметил)урацила, 5-хлорурацила, 5-фторурацила, 5-бромурцила, 5-гидроксцитозина, 5- (C_1-C_6) алкилцитозина, 5- (C_2-C_6) алкенилцитозина, 5- (C_2-C_6) алкинилцитозина, 5-хлорцитозина, 5-фторцитозина, 5-бромцитозина, N2-диметилгуанина, 2,4-диаминопурина, 8-азапурина, замещенного 7-деазапурина, предпочтительно 7-деаза-7-замещенного и/или 7-деаза-8-замещенного пурина, 5-гидроксиметилцитозина, N4-алкилцитозина, например N4-этилцитозина, 5-гидроксидезоксицитидина, 5-гидроксиметилдезоксицитидина, N4-алкилдезоксицитидина, например N4-этилдезоксицитидина, 6-тиодезоксигуанозина, и дезоксирибонуклеозида из нитропиррола, C5-пропинилиримидина и диаминопурина, например 2,6-диаминопурина, инозина, 5-метилцитозина, 2-аминопурина, 2-амино-6-хлорпурина, гипоксантина или других модификаций природных нуклеозидных оснований. Данный список является примерным и не должен интерпретироваться как ограничивающий.

В конкретные формулы, описанные здесь, можно включать модифицированные основания. Например, цитозин можно заменять модифицированным цитозином. Модифицированный цитозин, как применяют здесь, представляет собой природное или неприродное пиримидиновое основание, являющееся аналогом цитозина, которым можно заменить данное основание без снижения иммуностимулирующей активности олигонуклеотида.

Модифицированные цитозины включают в себя в качестве неограничивающих примеров 5-замещенные цитозины (например, 5-метилцитозин, 5-фторцитозин, 5-хлорцитозин, 5-бромцитозин, 5-йодцитозин, 5-гидроксцитозин, 5-гидроксиметилцитозин, 5-диформетилцитозин и незамещенный или

замещенный 5-алкинилцитозин), 6-замещенные цитозины (например, 6-гидроксицитозин), N4-замещенные цитозины (например, N4-этилцитозин), 5-азацитозин, 2-меркаптоцитозин, изоцитозин, псевдоизоцитозин, аналоги цитозина с конденсированными кольцевыми системами (например, N,N'-пропиленцитозин или феноксазин), и урацил и его производные (например, 5-фторурацил, 5-бромурацил, 5-бромвинилурацил, 4-тиоурацил, 5-гидроксиурацил, 5-пропинилурацил). Некоторые из предпочтительных цитозинов включают в себя 5-метилцитозин, 5-фторцитозин, 5-гидроксицитозин, 5-гидроксиметилцитозин и N4-этилцитозин. В других вариантах осуществления по изобретению цитозиновое основание заменяют универсальным основанием (например, 3-нитропиррол, Р-основание), ароматической кольцевой системой (например, фторбензол и дифторбензол) или атомом водорода (d-спейсер).

Гуанин можно заменить модифицированным гуаниновым основанием. Модифицированный гуанин, как применяют здесь, представляет собой природное или неприродное пуриновое основание, являющееся аналогом гуанина, которым можно заменить данное основание без снижения иммуностимулирующей активности олигонуклеотида. Модифицированные гуанины включают в себя в качестве неограничивающих примеров 7-деазагуанин, 7-деаза-7-замещенный гуанин (такой как 7-деаза-7-(C₂-C₆)алкинилгуанин), 7-деаза-8-замещенный гуанин, гипоксантин, N2-замещенные гуанины (например, N2-метилгуанин), 5-амино-3-метил-3Н,6Н-тиазоло[4,5-d]пиримидин-2,7-дион, 2,6-диаминопурин, 2-аминопурин, пурин, индол, аденин, замещенные аденины (например, N6-метиладенин, 8-оксоаденин), 8-замещенный гуанин (например, 8-гидроксигуанин и 8-бромгуанин) и 6-тиогуанин. В другом варианте осуществления по изобретению гуанин заменяют универсальным основанием (например, 4-метилиндролом, 5-нитроиндролом и К-основанием), ароматической кольцевой системой (например, бензимидазолом или дихлорбензимидазолом, амидом 1-метил-1Н-[1,2,4]триазол-3-карбоновой кислоты) или атомом водорода (d-спейсер).

В одном варианте осуществления и С, и G из CG-динуклеотида представляют собой немодифицированные основания цитозина и гуанина соответственно. В одном варианте осуществления С в CG-динуклеотиде является неметилированным.

Для применения по настоящему изобретению олигонуклеотиды по изобретению можно синтезировать *de novo* с применением любой из ряда процедур, хорошо известных в данной области, например, β-цианоэтил-фосфорамидный способ (Beaucage S.L. et al. (1981) *Tetrahedron Lett* 22:1859); или нуклеозид-Н-фосфонатный способ (Garegg et al. (1986) *Tetrahedron Lett* 27:4051-4; Froehler B.C. et al. (1986) *Nucleic Acids Res* 14:5399-407; Garegg et al. (1986) *Tetrahedron Lett* 27:4055-8; Gaffney et al. (1988) *Tetrahedron Lett* 29:2619-22). Данные химические способы можно осуществлять посредством автоматизированных синтезаторов нуклеиновых кислот, доступных в продаже. На данные олигонуклеотиды ссылаются как на синтетические олигонуклеотиды. На выделенный олигонуклеотид, как правило, ссылаются как на олигонуклеотид, отделенный от компонентов, с которыми он обычно связан в природе. В качестве примера, выделенный олигонуклеотид может представлять собой олигонуклеотид, отделенный от клетки, от ядра, от митохондрий или от хроматина.

Модифицированные остовы, такие как фосфоротиоаты, можно синтезировать с применением автоматических способов, применяющих фосфорамидатные или Н-фосфонатные химические способы. Арил- или алкил-фосфонаты можно получить, например, как описано в U.S. Pat. No. 4469863; и алкилфосфотриэфиры (в которых заряженная кислородная группа алкилирована, как описано в патенте США № 5023243 и европейском патенте № 092574) можно получить автоматическим твердофазным синтезом с применением коммерчески доступных реагентов. Способы получения других модификаций и замещений остова ДНК описаны (например, Uhlmann E. et al. (1990) *Chem Rev* 90:544; Goodchild J (1990) *Bioconjugate Chem* 1:165).

Имуностимулирующие олигонуклеотиды могут содержать также одну или несколько необычных связей между нуклеотидами или аналогичными нуклеотидами составляющими. Обычной межнуклеозидной связью является 3'5'-связь. Все другие связи считают необычными межнуклеозидными связями, такие 2'5'-, 5'5'-, 3'3'-, 2'2'- и 2'3'-связи. Таким образом, номенклатуру от 2' до 5' выбирают в соответствии с атомом углерода рибозы. Однако если применяют неприродные сахарные составляющие, такие как аналоги сахаров с расширенным кольцом (например, гексаноза, циклогексен или пираноза) или ди- или трициклические аналоги сахара, тогда данную номенклатуру изменяют в соответствии с номенклатурой мономера. В 3'-дезоксид-β-D-рибопиранозных аналогах (называемых также р-ДНК) мононуклеотиды соединены, например, 4'2'-связью.

Если нуклеотид содержит одну 3'3'-связь, тогда данный олигонуклеотид, как правило, имеет два несвязанных 5'-конца. Подобным образом, если нуклеотид содержит одну 5'5'-связь, тогда данный олигонуклеотид, как правило, имеет два несвязанных 3'-конца. Доступность несвязанных концов нуклеотидов может быть более доступна их рецепторам. Оба типа необычных связей (3'3'- и 5'5'-) описаны Ortigao J.F. et al. (1992) *Antisense Res Dev* 2:129-46, в силу чего опубликовано, что олигонуклеотиды, имеющие 3'3'-связь, показывают улучшенную стабильность по отношению к расщеплению нуклеазами.

Различные типы связей можно также сочетать в одной молекуле, что может приводить к разветвлению олигомера. Если одна часть олигонуклеотида присоединена 3'-концом посредством 3'3'-связи ко второй части олигонуклеотида и 2'-концом посредством 2'3'-связи к третьей части молекулы, это приво-

дит, например, к образованию разветвленного нуклеотида с тремя 5'-концами (3'3'-, 2'3'-разветвленного).

В принципе, связи между различными частями олигонуклеотида или между различными олигонуклеотидами, соответственно, можно осуществлять через все части молекулы, пока это не влияет отрицательно на узнавание ее рецептором. В соответствии с природой нуклеиновой кислоты связь может вовлекать составляющую сахара (Su), гетероциклическое нуклеиновое основание (Ba) или фосфатный остов (Ph). Таким образом, возможны связи типа Su-Su, Su-Ph, Su-Ba, Ba-Ba, Ba-Su, Ba-Ph, Ph-Ph, Ph-Su и Ph-Ba. Если олигонуклеотиды дополнительно модифицируют конкретными ненуклеотидными заместителями, могут присутствовать связи между модифицированными частями олигонуклеотидов. Данные модификации включают в себя также модифицированные нуклеиновые кислоты, например, PNA, LNA, или морфолино-олигонуклеотидные аналоги.

Связи предпочтительно состоят из C, H, N, O, S, B, P и галогена и содержат от 3 до 300 атомов. Примером с 3 атомами является ацетальная связь (ODN1-3'-O-CH₂-O-3'-ODN2; Froehler and Matteucci), соединяющая, например 3'-гидроксигруппу одного нуклеотида с 3'-гидроксигруппой второго олигонуклеотида. Примером с примерно 300 атомами является PEG-40 (тетраоктаполиэтиленгликоль). Предпочтительными связями являются фосфодиэфирная, фосфоротиоатная, метилфосфонатная, фосфорамидатная, боранфосфонатная, амидная, простая эфирная, тиоэфирная, ацетальная, тиацетальная, мочевиная, тиомочевинная, сульфонамидная, Шиффова основания и дисульфидная связи. Другой возможностью является применение системы Solulink BioConjugation (TriLink BioTechnologies, San Diego, CA).

Если олигонуклеотид составлен из двух или более частей последовательности, данные части могут быть идентичными или различными. Так, в олигонуклеотиде с 3'3'-связью последовательности могут быть идентичными, например 5'-ODN1-3'3'-ODN1-5', или различными, например 5'-ODN1-3'3'-ODN2-5'. Кроме того, химическая модификация различных частей олигонуклеотида, так же как соединяющий их линкер, могут различаться. Так как поглощение коротких олигонуклеотидов, по-видимому, менее эффективно, чем длинных олигонуклеотидов, соединение двух или более коротких последовательностей приводит к улучшенной иммунной стимуляции. Длина коротких олигонуклеотидов предпочтительно составляет 2-20 нуклеотидов, более предпочтительно 3-16 нуклеотидов, но наиболее предпочтительно 5-10 нуклеотидов. Предпочтительными являются связанные олигонуклеотиды, имеющие два или более несвязанных 5'-концов.

Частичные последовательности олигонуклеотидов можно также связывать ненуклеотидными линкерами, в частности абазическими линкерами (d-спейсерами), звеньями триэтиленгликоля или звеньями гексаэтиленгликоля. Другие линкеры включают в себя алкиламинолинкеры, такие как C3, C6, C12-аминолинкеры, и также алкилтиоловые линкеры, такие как C3 или C6-тиоловые линкеры. Олигонуклеотиды можно связывать также ароматическими остатками, которые в дальнейшем можно заменить алкильными или замещенными алкильными группами.

Олигонуклеотиды могут содержать также удвоенное или утроенное звено (Glen Research, Sterling, VA), в частности, такие олигонуклеотиды с 3'3'-связями. Удвоенное звено в одном из вариантов осуществления может основываться на 1,3-бис-[5-(4,4'-диметокситритилокси)пентиламидо]пропил-2-[(2-цианоэтил)-(N,N-диизопропил)]фосфорамидит. Утроенное звено в одном из вариантов осуществления может основываться на введении трис-2,2,2-[3-(4,4'-диметокситритилокси)пропилоксиметил]этил-[(2-цианоэтил)-(N,N-диизопропил)]фосфорамидита. Разветвление олигонуклеотидов множественными удвоенными, утроенными или другими умножающими звеньями приводит к дендримерам, являющимся дополнительным вариантом осуществления по настоящему изобретению. Олигонуклеотиды могут также содержать линкерные звенья, получаемые пептид-модифицирующими или олигонуклеотид-модифицирующими реагентами (Glen Research, Sterling, VA). Кроме того, линкеры могут содержать один или несколько не природных аминокислотных остатков, соединенных пептидными (амидными) связями.

Другой возможностью для связи олигонуклеотидов является перекрестное связывание гетероциклических оснований (Verma S. et al (1998) Annu Rev Biochem 67:99-134; page 124). Еще одной возможностью является связь между группой сахара одной последовательности с гетероциклическим основанием другой части последовательности (Iyer et al. (1999) Curr Opin Mol Therapeutics 1:344-58; page 352).

Различные олигонуклеотиды, содержащие необычные связи, синтезированы общепризнанными способами и могут быть соединены вместе on-line во время твердофазного синтеза. В качестве альтернативы, их можно соединить вместе после синтеза отдельных частичных последовательностей.

CrG-фосфоротиоатные олигонуклеотиды с сильной стимулирующей активностью в мышинной системе имеют тенденцию показывать более низкую активность в иммунных клетках человека или других, не относящихся к грызунам. ДНК, содержащая данные мотивы (TCG)_nN или RDCGY₁Y₂N, сильно стимулирует периферические клетки крови человека к продукции IFN-α.

В соответствии с изобретением обнаружено, что подгруппы иммуностимулирующих CrG-олигонуклеотидов оказывают существенные иммуностимулирующие эффекты на клетки человека, такие как PBMC, что позволяет предполагать, что такие иммуностимулирующие CrG-олигонуклеотиды являются эффективными терапевтическими средствами для вакцинации человека, иммунотерапии рака, иммунотерапии астмы, общего улучшения иммунной деятельности, улучшения гематопоезического восста-

новления после облучения или химиотерапии и других иммуномодулирующих вариантов применения.

Как применяют здесь, термины обработка, лечить или лечение, когда их применяют по отношению к нарушению, такому как инфекционное заболевание, рак, аллергия или астма, относятся к профилактическому лечению, увеличивающему устойчивость субъекта к развитию заболевания (например, к инфекции патогеном) или, другими словами, уменьшающему вероятность того, что у субъекта разовьется заболевание (например, он станет инфицированным патогеном), так же как к лечению заболевания после того как у субъекта разовьется заболевание, чтобы бороться с заболеванием (например, уменьшить или прекратить инфекцию) или чтобы предупредить заболевание от ухудшения.

Таким образом, иммуностимулирующие CpG-олигонуклеотиды в некоторых аспектах по изобретению полезны в качестве вакцины для лечения субъекта, страдающего аллергией или астмой, инфекцией, вызванной инфекционным организмом, или раком, для которого идентифицирован специфический опухолевый антиген, или подверженного риску их развития. Иммуностимулирующие CpG-олигонуклеотиды, таким образом, можно вводить субъекту в соединении с антигеном или аллергеном для лечения инфекции, аллергии, астмы или рака. Альтернативно и в дополнение иммуностимулирующие CpG-олигонуклеотиды можно давать самостоятельно без антигена или аллергена для защиты против инфекции, аллергии, или рака, или можно вводить с другими терапевтическими средствами. Иммуностимулирующие CpG-олигонуклеотиды можно вводить также с другими терапевтическими средствами. Повторные дозы могут позволить более длительную защиту.

Субъект, подверженный риску, как применяют здесь, является субъектом, имеющим любой идентифицируемый риск воздействия вызывающего инфекцию патогена или аллергена или риск развития злокачественной опухоли. Например, субъектом, подверженным риску развития инфекции, может являться субъект, планирующий поездку в район, где обнаружен конкретный тип инфекционного агента, или им может являться субъект, вследствие образа жизни или медицинских процедур подверженный воздействию жидкостей организма, которые могут содержать инфекционные организмы, или непосредственно организма, или им может являться любой субъект, живущий в районе, где обнаружен инфекционный организм или аллерген. Субъекты, подверженные риску развития инфекции, также включают в себя полные популяции, которым медицинские организации рекомендуют вакцинацию конкретным антигеном инфекционного организма. Если антиген является аллергеном, и у субъекта развиваются аллергические ответы на данный конкретный антиген, и субъект может быть подвержен воздействию антигена, например во время сезона опыления, тогда данный субъект является подверженным риску развития аллергического ответа. Субъект, подверженный риску развития аллергии или астмы, подразумевает субъектов, идентифицированных как страдающих аллергией или астмой, но не имеющих активного заболевания во время лечения иммуностимулирующими CpG-олигонуклеотидами. Субъект, подверженный риску развития аллергии или астмы, также подразумевает субъектов, считающихся подверженными риску развития аллергии или астмы из-за генетических факторов или факторов внешней среды.

Субъектом, подверженным риску развития рака, является субъект, имеющий высокую вероятность развития рака. Данные субъекты включают в себя, например, субъектов, имеющих генетическую аномалию, для которой показана корреляционная связь с повышенной вероятностью развития рака, субъектов, подверженных воздействию ассоциированных с раком веществ, таких как табак, асбест или другие химические токсины, и субъектов, которые ранее лечились от рака и находятся в выраженной ремиссии. Когда подверженного развитию рака субъекта лечат иммуностимулирующими CpG-олигонуклеотидами и, необязательно, антигеном, специфическим для типа рака, риску развития которого подвержен субъект, субъект может быть способен убивать раковые клетки при их развитии. Если у субъекта начинает формироваться опухоль, субъект развивает специфический иммунный ответ против опухолевого антигена.

В дополнение к применению иммуностимулирующих CpG-олигонуклеотидов для профилактического лечения изобретение также относится к применению иммуностимулирующих CpG-олигонуклеотидов для лечения субъектов, страдающих инфекцией, аллергией, астмой или раком.

Субъект, страдающий инфекцией, является субъектом, подвергавшимся воздействию инфекционного патогена и имеет острые или хронические детектируемые уровни патогена в организме. Иммуностимулирующие CpG-олигонуклеотиды можно применять с антигеном или другой терапией или без них для поднятия врожденного или антиген-специфического системного иммунитета или иммунитета слизистых оболочек, способного уменьшать уровень инфекционного патогена или уничтожать его. Инфекционное заболевание, как применяют здесь, представляет собой заболевание, развивающееся вследствие присутствия чужеродного микроорганизма в организме. Особенно важно развивать эффективные вакцинные стратегии и способы лечения для защиты поверхностей слизистых оболочек организма, являющихся первичным участком входа патогена.

Субъект, страдающий аллергией, является субъектом, способным развивать аллергическую реакцию в ответ на аллерген. Аллергия относится к приобретенной гиперчувствительности к веществу (аллергену). Аллергические состояния включают в себя в качестве неограничивающих примеров экземы, аллергические риниты или острый насморк, поллиноз, конъюнктивит, бронхиальную астму, аллергическую астму, уртикарную сыпь (крапивницу), пищевые аллергии и другие атопические состояния.

Аллергии, как правило, вызваны образованием антител IgE против безопасных аллергенов. Цитокины, индуцируемые системным введением или введением на слизистые оболочки иммуностимулирующих CpG-олигонуклеотидов, преимущественно относятся к классу, называемому Th1 (примерами являются IL-12, IP-10, IFN- α и IFN- γ), и индуцируют и гуморальный, и клеточный иммунные ответы. Другим основным типом иммунного ответа, ассоциированным с продукцией цитокинов IL-4 и IL-5, является иммунный ответ, называемый Th2. Как правило, аллергические заболевания, по-видимому, вызваны иммунными ответами Th2-типа. Основываясь на способности иммуностимулирующих CpG-олигонуклеотидов, описанных здесь, сдвигать иммунный ответ субъекта от преобладающего Th2 (связанного с продукцией антител IgE и аллергией) к сбалансированному ответу Th2/Th1 (являющемуся защитным против аллергических реакций), можно вводить субъекту эффективную дозу иммуностимулирующих CpG-олигонуклеотидов для лечения астмы и аллергии.

Таким образом, иммуностимулирующие CpG-олигонуклеотиды имеют значительную терапевтическую полезность в лечении аллергических состояний и астмы. Уровни Th2-цитокинов, особенно IL-4 и IL-5, повышены в дыхательных путях страдающих астмой субъектов. Данные цитокины стимулируют важные аспекты астматического воспалительного ответа, включая переключение изотопов IgE, хемотаксис и активацию эозинофилов и рост тучных клеток. Th1-цитокины, особенно IFN- γ и IL-12, могут подавлять формирование Th2-клонов и продукцию Th2-цитокинов. Астма относится к заболеваниям респираторной системы, характеризующимся воспалением, сужением дыхательных путей и повышенной реактивностью дыхательных путей к вдыхаемым веществам. Астма часто, хотя не исключительно, ассоциирована с атопическими или аллергическими симптомами. Таким образом, астма включает в себя аллергическую астму и не аллергическую астму.

Субъект, страдающий от рака, является субъектом, имеющим детектируемые злокачественные клетки. Опухоль может являться злокачественной или незлокачественной опухолью. Раковые заболевания или опухоли включают в качестве неограничивающих примеров рак желчных путей; рак мозга; рак молочной железы; рак шейки матки; хориокарциному; рак ободочной кишки; эндометриальный рак; рак пищевода; рак желудка; интраэпителиальные неоплазии; лимфомы; рак печени; рак легкого (например, мелкоклеточный и немелкоклеточный); меланому; нейробластомы; рак полости рта; рак яичника; рак поджелудочной железы; рак предстательной железы; рак прямой кишки; саркомы; рак кожи; рак яичка; рак щитовидной железы и рак почки, так же как другие карциномы и саркомы. В одном из вариантов осуществления рак представляет собой лейкоз ворсистых клеток, хронический миелолейкоз, кожный T-клеточный лейкоз, множественную миелому, фолликулярную лимфому, злокачественную меланому, плоскоклеточную карциному, почечно-клеточную карциному, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря или рак ободочной кишки.

Субъект означает человека или позвоночное животное, включая в качестве неограничивающих примеров собаку, кошку, лошадь, корову, свинью, овцу, козу, индейку, курицу, примата, например обезьяну, и рыбу (аквакультурные виды), например лосося. Таким образом, соединения можно применять для лечения рака и опухолей, инфекций и аллергии/астмы у людей и субъектов, не относящихся к человеку. Рак является одной из главных причин смерти животных - спутников человека (например, кошек и собак).

В случаях, когда CpG-олигонуклеотид вводят вместе с антигеном, субъект может быть подвержен воздействию антигена. Как применяют здесь, термин «подвержен воздействию» относится к активной стадии приведения субъекта в контакт с антигеном или к пассивному воздействию антигена на субъекта *in vivo*. Способы активного приведения субъекта в контакт с антигеном хорошо известны в данной области. Как правило, антиген вводят непосредственно субъекту любыми способами, такими как внутривенное, внутримышечное, оральное, чрескожное, на слизистую оболочку, интраназальное, интратрахеальное или подкожное введение. Антиген можно вводить системно или местно. Способы введения антигена и иммуностимулирующего CpG-олигонуклеотида более детально описаны ниже. Субъект, пассивно подверженный воздействию антигена, становится доступным для воздействия иммунных клеток в организме. Субъект может пассивно подвергаться воздействию антигена, например, посредством входа чужеродного патогена в организм или посредством развития опухолевой клетки, экспрессирующей чужеродный антиген на своей поверхности.

Способы, в которых субъект пассивно подвержен воздействию антигена, могут особенно зависеть от распределения по времени введения иммуностимулирующего CpG-олигонуклеотида. Например, для субъекта, подверженного риску развития опухоли или инфекционного заболевания, или аллергического или астматического ответа, субъекту можно вводить иммуностимулирующий CpG-олигонуклеотид на регулярной основе, когда риск является наибольшим, например, во время сезона аллергии или после воздействия вещества, вызывающего рак. Кроме того, иммуностимулирующий CpG-олигонуклеотид можно вводить путешественникам перед их поездкой в зарубежные страны, где они подвержены риску воздействия инфекционных агентов. Подобным образом, иммуностимулирующий CpG-олигонуклеотид можно вводить солдатам или гражданскому населению при риске воздействия биологического оружия для индукции системного иммунного ответа или иммунного ответа слизистых оболочек на антиген, когда и

если субъект подвержен его воздействию.

Антиген, как применяют здесь, представляет собой молекулу, способную провоцировать иммунный ответ. Антигены включают в себя в качестве неограничивающих примеров клетки, экстракты клеток, белки, полипептиды, пептиды, полисахариды, полисахаридные конъюгаты, пептидные и непептидные миметики полисахаридов и других молекул, низкомолекулярные молекулы, липиды, гликолипиды, углеводы, вирусы и вирусные экстракты, и многоклеточные организмы, такие как паразиты и аллергены. Термин антиген в широком смысле относится к любому типу молекулы, узнаваемой иммунной системой хозяина как чужеродной. Антигены включают в себя в качестве неограничивающих примеров опухолевые антигены, микробные антигены и аллергены.

Опухолевый антиген, как применяют здесь, представляет собой соединение, такое как пептид или белок, связанное с поверхностью опухолевой или раковой клетки и способное провоцировать иммунный ответ в окружении молекулы МНС. Опухолевые антигены можно получить из раковых клеток получением грубых экстрактов раковых клеток, например, как описано в Cohen P.A. et al. (1994) Cancer Res 54:1055-8, или частичной очисткой антигенов, или рекомбинантным способом, или синтезом известных антигенов *de novo*. Опухолевые антигены включают в себя в качестве неограничивающих примеров антигены, экспрессированные рекомбинантным способом, их иммуногенную часть или целую опухолевую или раковую клетку. Такие антигены можно выделить или получить рекомбинантным или любыми другими способами, известными в данной области.

Как применяют здесь, термины «раковый антиген» или «опухолевый антиген» применяют попеременно по отношению к антигенам, которые дифференциально экспрессированы раковыми клетками и, таким образом, могут быть использованы для нацеливания на раковые клетки. Раковые антигены представляют собой антигены, потенциально способные стимулировать предположительно опухолеспецифические иммунные ответы. Некоторые из данных антигенов кодированы, но необязательно экспрессированы нормальными клетками. Такие антигены можно охарактеризовать как молчащие в норме (т.е. не экспрессированные) в нормальных клетках, такие, которые экспрессированы только на конкретных стадиях дифференцировки, и такие, которые временно экспрессированы, такие как антигены эмбриона и плода. Другие раковые антигены кодированы мутантными клеточными генами, такие как онкогены (например, активированный онкоген *ras*), генами супрессоров (например, мутантный *p53*), гибридные белки, полученные при внутренних делециях или хромосомных транслокациях. Еще другие раковые антигены могут быть кодированы вирусными генами, такими, которые несут опухолевые РНК- или ДНК-вирусы.

Микробный антиген, как применяют здесь, представляет собой антиген микроорганизма и включает в себя в качестве неограничивающих примеров вирусы, бактерии, паразиты и грибы. Такие антигены включают в себя интактный микроорганизм, так же как природные изоляты и их фрагменты или производные и также синтетические соединения, идентичные или подобные природным антигенам микроорганизмов и индуцирующие иммунный ответ, специфический для данного микроорганизма. Соединение является подобным природному антигену микроорганизма, если оно индуцирует иммунный ответ (гуморальный и/или клеточный) на природный антиген микроорганизма. Такие антигены общеупотребительны в данной области и хорошо известны обычным специалистам в данной области.

Вирусы, обнаруженные у человека, включают в себя в качестве неограничивающих примеров *Retroviridae* (например, вирусы иммунодефицита человека, такие как HIV-1 (на который ссылаются также как на HTLV-III, LAV или HTLV-III/LAV или HIV-III; и другие изоляты, такие как HIV-LP); *Picornaviridae* (например, полиовирусы, вирус гепатита А; энтеровирус, вирусы Коксаки человека, риновирусы, эховирусы); *Calciviridae* (например, штаммы, вызывающие гастроэнтерит); *Togaviridae* (например, вирус конского энцефалита, вирусы краснухи); *Flaviviridae* (например, вирусы лихорадки Денге, вирусы энцефалита, вирусы желтой лихорадки); *Coronaviridae* (например, коронавирусы); *Rhabdoviridae* (например, вирусы везикулярного стоматита, вирусы бешенства); *Filoviridae* (например, вирусы Эбола); *Paramyxoviridae* (например, вирусы парагриппа, вирус свинки, вирус кори, респираторно-синцитиальный вирус); *Orthomyxoviridae* (например, вирусы гриппа); *Bunyaviridae* (например, вирусы Хантаан, буньявирусы, флебовирусы и найровирусы); *Arenaviridae* (вирусы геморрагической лихорадки); *Reoviridae* (например, реовирусы, орбивирусы и ротавирусы); *Bornaviridae*; *Hepadnaviridae* (вирус гепатита В); *Parvoviridae* (парвовирусы); *Papovaviridae* (вирусы папилломы, вирусы полиомы); *Adenoviridae* (большинство аденовирусов); *Herpesviridae* (вирус простого герпеса (HSV) 1 и 2, вирус ветряной оспы, цитомегаловирус (CMV), вирус герпеса); *Poxviridae* (вирусы натуральной оспы, вирусы коревой оспы, поксвирусы); *Iridoviridae* (например, вирус африканской лихорадки свиней) и неклассифицированные вирусы (например, возбудитель гепатита дельта (считающийся дефектным сателлитом вируса гепатита В); гепатита С; Норволк и родственные вирусы и астровирусы).

И грамположительные, и грамотрицательные бактерии служат антигенами для позвоночных животных. Такие грамположительные бактерии включают в себя в качестве неограничивающих примеров виды *Pasteurella*, виды *Staphylococci* и виды *Streptococcus*. Грамотрицательные бактерии включают в себя в качестве неограничивающих примеров *Escherichia coli*, виды *Pseudomonas* и виды *Salmonella*. Конкретные инфекционные бактерии включают в себя в качестве неограничивающих примеров *Helicobacter pylori*, *Borrelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, виды *Mycobacteria* (например, *M. tuberculosis*, *M.*

avium, *M. intracellular*, *M. kansasii*, *M. gordonae*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus* группы A), *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* группы B), *Streptococcus* (группы *viridans*), *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus* (анаэробные виды), *Streptococcus pneumoniae*, патогенные виды *Campylobacter*, виды *Enterococcus*, *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, виды *Corynebacterium*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasturella multocida*, виды *Bacteroides*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Leptospira*, *Rickettsia* и *Actinomyces israelii*.

Примеры грибов включают в себя *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Chlamydia trachomatis*, *Candida albicans*.

Другие инфекционные организмы (например, протисты) включают в себя виды *Plasmodium*, такие как *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* и *Plasmodium vivax*, и *Toxoplasma gondii*. Переносимые с кровью и/или тканевые паразиты включают в себя виды *Plasmodium*, *Babesia microti*, *Babesia divergens*, *Leishmania tropica*, виды *Leishmania*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania donovani*, *Trypanosoma gambiense* и *Trypanosoma rhodesiense* (сонная африканская болезнь), *Trypanosoma cruzi* (болезнь Шагаса) и *Toxoplasma gondii*.

Другие значимые с медицинской точки зрения микроорганизмы широко описаны в литературе, например см. C.G.A Thomas, *Medical Microbiology*, Bailliere Tindall, Great Britain 1983, которая приведена здесь в качестве ссылки в полном объеме.

Аллерген относится к веществу (антигену), которое может индуцировать аллергический или астматический ответ у чувствительного субъекта. Список аллергенов огромный и может включать пыльцу, яды насекомых, перхоть животных, пыль, споры грибов и лекарственные средства (например, пенициллин). Природные аллергены, аллергены животных и растений включают в себя в качестве неограничивающих примеров белки, специфические для следующих родов: *Canine* (*Canis familiaris*); *Dermatophagoides* (например, *Dermatophagoides farinae*); *Felis* (*Felis domesticus*); *Ambrosia* (*Ambrosia artemisiifolia*); *Lolium* (например, *Lolium perenne* или *Lolium multiflorum*); *Cryptomeria* (*Cryptomeria japonica*); *Alternaria* (*Alternaria alternata*); *Alder*; *Alnus* (*Alnus gultinoasa*); *Betula* (*Betula verrucosa*); *Quercus* (*Quercus alba*); *Olea* (*Olea europa*); *Artemisia* (*Artemisia vulgaris*); *Plantago* (например, *Plantago lanceolata*); *Parietaria* (например, *Parietaria officinalis* или *Parietaria judaica*); *Blattella* (например, *Blattella germanica*); *Apis* (например, *Apis multiflorum*); *Cupressus* (например, *Cupressus sempervirens*, *Cupressus arizonica* и *Cupressus macrocarpa*); *Juniperus* (например, *Juniperus sabinoidea*, *Juniperus virginiana*, *Juniperus communis* и *Juniperus ashei*); *Thuja* (например, *Thuja orientalis*); *Chamaecyparis* (например, *Chamaecyparis obtusa*); *Periplaneta* (например, *Periplaneta americana*); *Agropyron* (например, *Agropyron repens*); *Secale* (например, *Secale cereale*); *Triticum* (например, *Triticum aestivum*); *Dactylis* (например, *Dactylis glomerata*); *Festuca* (например, *Festuca elatior*); *Poa* (например, *Poa pratensis* или *Poa compressa*); *Avena* (например, *Avena sativa*); *Holcus* (например, *Holcus lanatus*); *Anthoxanthum* (например, *Anthoxanthum odoratum*); *Arrhenatherum* (например, *Arrhenatherum elatius*); *Agrostis* (например, *Agrostis alba*); *Phleum* (например, *Phleum pratense*); *Phalaris* (например, *Phalaris arundinacea*); *Paspalum* (например, *Paspalum notatum*); *Sorghum* (например, *Sorghum halepensis*) и *Bromus* (например, *Bromus inermis*).

Антиген может являться в основном очищенным. Термин в основном очищенный, как применяют здесь, относится к антигену, например, полипептиду, в основном свободному от других белков, липидов, углеводов или других веществ, с которыми он связан в природе. Специалист в данной области может очистить полипептидные антигены с применением обычных способов очистки белков. В основном чистый полипептид часто дает одну главную полосу в невосстанавливающем полиакриламидном геле. В случае частично гликозилированных полипептидов или полипептидов, имеющих несколько стартовых кодонов, в невосстанавливающем полиакриламидном геле может существовать несколько полос, но они формируют отличительный рисунок для данного полипептида. Чистоту полипептидного антигена можно также определить секвенированием N-конца. Другие типы антигенов, такие как полисахариды, низкомолекулярные, миметики и т.д., относятся к изобретению и, необязательно, могут быть в основном чистыми.

Олигонуклеотиды по изобретению можно вводить субъекту с противомикробным средством. Противомикробное средство, как применяют здесь, относится к природному или синтетическому соединению, способному убивать или ингибировать инфекционные микроорганизмы. Тип противомикробного средства, применимого по изобретению, зависит от типа микроорганизма, которым субъект инфицирован или подвержен риску быть инфицированным. Противомикробные средства включают в себя в качестве неограничивающих примеров противобактериальные средства, противовирусные средства, противогрибковые средства и противопаразитарные средства. Такие фразы как «противомикробное средство», «противобактериальное средство», «противовирусное средство», «противогрибковое средство», «противопаразитарное средство» и «средство для уничтожения паразитов» имеют твердо установившиеся значения для обычных специалистов в данной области и определены в обычных медицинских текстах. Коротко, противобактериальные средства убивают или ингибируют бактерии и включают в себя антибиотики, так же как другие синтетические или природные вещества, обладающие подобными функциями.

Антибиотики представляют собой низкомолекулярные молекулы, производимые как вторичные метаболиты клетками, такими как микроорганизмы. Как правило, антибиотики повреждают одну или несколько бактериальных функций или структур, специфических для микроорганизма и не присутствующих в клетках-хозяевах. Противовирусные средства можно выделить из природных источников или синтезировать и применять для убивания или ингибирования вирусов. Противогрибковые средства применяют для лечения поверхностных грибковых инфекций, так же как условно-патогенных и первичных системных грибковых инфекций. Противопаразитарные средства убивают или ингибируют паразитов.

Противопаразитарные средства, на которые ссылаются также как на средства для уничтожения паразитов, включают в себя в качестве неограничивающих примеров альбендазол, амфотерицин В, бензнидазол, битионол, хлорохин HCl, хлорохина фосфат, клиндамицин, дегидроэметин, диэтилкарбамазин, дилоксанида фураат, эфлорнитин, фуразолидон, глюкокортикоиды, галофантрин, йодохинол, ивермектин, мебендазол, мефлохин, меглумин антимионат, меларсопрол, метрифонат, метронидазол, никлозамид, нифуртимокс, оксамнихин, паромомицин, пентамидина изетионат, пиперазин, празиквантел, примахина фосфат, прогуанил, пирантела памоат, пириметамин-сульфонамиды, пириметамин-сульфадоксин, хинакрин HCl, хинина сульфат, хинидина глюконат, спирамицин, стибоглюконат натрия (глюконат сурьмы натрия), сурамин, тетрациклин, доксициклин, тиабендазол, тинидазол, триметроприм-сульфаметоксазол и трипарсамид, некоторые из которых применяют самостоятельно или в сочетании с другими.

Противобактериальные средства убивают бактерии или ингибируют их рост или функцию. Большой класс противобактериальных средств представляет собой антибиотики. На антибиотики, эффективные для уничтожения или ингибирования широкого ряда бактерий, ссылаются как на антибиотики широкого спектра действия. Другие типы антибиотиков предпочтительно эффективны против бактерий грамположительного или грамотрицательного классов. На данные типы антибиотиков ссылаются как на антибиотики узкого спектра действия. На другие антибиотики, эффективные против отдельного организма или заболевания и не эффективные против других типов бактерий, ссылаются как на антибиотики ограниченного спектра действия. Иногда противобактериальные средства классифицируют по их первичному способу воздействия. Как правило, противобактериальные средства являются ингибиторами синтеза клеточной стенки, ингибиторами клеточной мембраны, ингибиторами белкового синтеза, ингибиторами синтеза нуклеиновых кислот или функциональными ингибиторами и конкурентными ингибиторами.

Противовирусные средства представляют собой соединения, предупреждающие инфекцию клеток вирусами или репликацию вируса внутри клетки. Противовирусных средств намного меньше, чем противобактериальных средств, так как процесс вирусной репликации так тесно связан с репликацией ДНК в клетке-хозяине, что неспецифические противовирусные средства часто являются токсичными для хозяина. В процессе вирусной инфекции существует несколько стадий, которые можно блокировать или ингибировать противовирусными средствами. Данные стадии включают в себя присоединение вируса к клетке-хозяину (иммуноглобулин или связывающие пептиды), декапсидацию вируса (например, амантадин), синтез или трансляцию вирусной мРНК (например, интерферон), - репликацию вирусной РНК или ДНК (например, нуклеозидные аналоги), созревание белков нового вируса (например, ингибиторы протеаз) и почкование и высвобождение вируса.

Аналоги нуклеотидов представляют собой синтетические соединения, подобные нуклеотидам, но имеющие неполную или аномальную дезоксирибозную или рибозную группу. После попадания нуклеотидных аналогов в клетку они подвергаются фосфорилированию, образуя трифосфатную форму, конкурирующую с нормальными нуклеотидами за включение в вирусную ДНК или РНК. После включения трифосфатной формы нуклеотидного аналога в растущую цепь нуклеиновой кислоты оно приводит к необратимому присоединению вирусной полимеразы и, таким образом, терминеции цепи. Аналоги нуклеотидов включают в себя в качестве неограничивающих примеров ацикловир (применяемый для лечения от вируса простого герпеса и вируса ветряной оспы), ганцикловир (применяемый для лечения от цитомегаловируса), идоксуридин, рибавирин (применяемый для лечения от респираторно-синцитиального вируса), дидезоксинозин, дидезоксицитидин, зидовудин (азидотимидин), имиквимод и резимиквимод.

Интерфероны представляют собой цитокины, секретируемые клетками, инфицированными вирусом, так же как иммунными клетками. Интерфероны действуют посредством связывания со специфическими рецепторами на клетках, соседних с инфицированными клетками, вызывая в клетке изменение, защищающее ее от инфекции вирусом, α - и β -интерферон также индуцируют экспрессию молекул МНС класса I и класса II на поверхности инфицированной клетки, приводя к увеличенной презентации антигена для узнавания иммунными клетками хозяина, α - и β -интерфероны доступны в рекомбинантных формах, и их применяют для лечения хронической инфекции гепатитом В и С. В дозах, эффективных для противовирусного лечения, интерфероны обладают тяжелыми побочными эффектами, такими как лихорадка, дисфория и потеря веса.

Противовирусные средства, применяемые по изобретению, включают в себя в качестве неограничивающих примеров иммуноглобулины, амантадин, интерфероны, аналоги нуклеозидов и ингибиторы

протеаз. Конкретные противовирусные средства включают в себя в качестве неограничивающих примеров Ацеманнан; Ацикловир; Ацикловир Натрия; Адефовир; Аловудин; Алвирцефт Судотокс; Амантадина Гидрохлорид; Аранотин; Арилдон; Атевирдина Мезилат; Авридин; Цидофовир; Ципамфилин; Цитарабина Гидрохлорид; Делапирдина Мезилат; Десцикловир; Диданозин; Дизоксарил; Эдоксудин; Энвиралден; Энвироксим; Фамцикловир; Фамотина Гидрохлорид; Фиацитабин; Фиалуридин; Фозарилат; Фоскарнет Натрия; Фосфонет Натрия; Ганцикловир; Ганцикловир Натрия; Идоксуридин; Кетоксал; Ламивудин; Лобукавир; Мемотина Гидрохлорид; Метисазон; Невирапин; Пенцикловир; Пиродавир; Рибавирин; Римантадина Гидрохлорид; Саквинавира Мезилат; Сомантадина Гидрохлорид; Соривудин; Статолон; Ставудин; Тилорона Гидрохлорид; Трифлуридин; Валацикловира Гидрохлорид; Видарабин; Видарабина Фосфат; Видарабина Фосфат Натрия; Вироксим; Зальцитабин; Зидовудин и Зинвироксим.

Противогрибковые средства пригодны для лечения и предупреждения от инфекционных грибов. Иногда противогрибковые средства классифицируют по механизму действия. Некоторые противогрибковые средства действуют как ингибиторы клеточной стенки посредством ингибирования синтазы глюканы. Они включают в себя в качестве неограничивающих примеров базиуниг/ЕСВ. Другие противогрибковые средства действуют посредством дестабилизации целостности мембраны. Они включают в себя в качестве неограничивающих примеров имидазолы, такие как клотримазол, сертаконзол, флуконазол, итраконазол, кетоконазол, миконазол и вориконазол, так же как FK 463, амфотерицин В, ВАУ 38-9502, МК 991, прадицин, UK 292, бутенафин и тербинафин. Другие противогрибковые средства действуют посредством разрушения хитина (например, хитиназа) или иммуносупрессии (крем 501).

Иммуностимулирующие CpG-олигонуклеотиды можно сочетать с другими терапевтическими средствами, такими как адъюванты, для усиления иммунных ответов. Иммуностимулирующий CpG-олигонуклеотид и другое терапевтическое средство можно вводить одновременно или последовательно. Когда другие терапевтические средства вводят одновременно, их можно вводить в том же или отдельных составах, но вводить в одно и то же время. Другие терапевтические средства вводят последовательно друг с другом и с иммуностимулирующим CpG-олигонуклеотидом, когда введение других терапевтических средств и иммуностимулирующего CpG-олигонуклеотида разделены во времени. Более конкретно, иммуностимулирующий CpG-олигонуклеотид можно вводить до или после введения (или воздействия) по меньшей мере одного другого терапевтического средства. Разделение по времени между введением данных соединений может быть вопросом минут, или может длиться дольше. Другие терапевтические средства включают в себя в качестве неограничивающих примеров адъюванты, цитокины, антитела, антигены и т.д.

Композиции по изобретению можно вводить также с адъювантами, отличными от нуклеиновых кислот. Адъювант, отличный от нуклеиновой кислоты, представляет собой любую молекулу или соединение, за исключением описанных здесь иммуностимулирующих CpG-олигонуклеотидов, которое может стимулировать гуморальный и/или клеточный иммунный ответ. Адъюванты, отличные от нуклеиновых кислот, включают в себя, например, адъюванты, создающие эффект депо, иммуностимулирующие адъюванты и адъюванты, создающие эффект депо и стимулирующие иммунную систему.

Иммуностимулирующие CpG-олигонуклеотиды полезны также в качестве адъювантов для слизистых оболочек. Ранее обнаружено, что и системный иммунитет, и иммунитет слизистых оболочек индуцируют введением CpG-нуклеиновых кислот на слизистые оболочки. Таким образом, олигонуклеотиды можно вводить в сочетании с другими адъювантами для слизистых оболочек.

Иммунный ответ можно также индуцировать или усиливать совместным введением или коинъекцией экспрессией цитокинов (Bueler & Mulligan, 1996; Chow et al., 1997; Geissler et al., 1997; Iwasaki et al., 1997; Kim et al., 1997) или костимулирующих молекул, таких как B7 (Iwasaki et al., 1997; Tsuji et al., 1997), с иммуностимулирующими CpG-олигонуклеотидами. Термин цитокин применяют как общее название разнообразной группы растворимых белков и пептидов, действующих как гуморальные регуляторы в концентрациях от нано- до пикомолярных, и в нормальных или патологических условиях модулирующих функциональную активность отдельных клеток и тканей. Данные белки также напрямую опосредуют взаимодействия между клетками и регулируют процессы, происходящие во внеклеточной среде. Цитокины включают в себя в качестве неограничивающих примеров интерлейкин-1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор роста (GM-CSF), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), IFN- γ , IFN- α , IFN- β , фактор некроза опухолей (TNF), TGF- β , Flt-3-лиганд и CD40-лиганд. В дополнение к цитокинам CpG-олигонуклеотиды можно применять в сочетании с антителами против конкретных цитокинов, такими как анти-IL-10 и анти-TGF- β , так же как с ингибиторами циклооксигеназы, т.е. ингибиторами COX-1 и COX-2.

Олигонуклеотиды полезны также для переключения иммунного ответа с Th2-иммунного ответа на Th1-иммунный ответ. Это приводит к получению относительно сбалансированной Th1/Th2-среды. Переключение иммунного ответа с Th2- на Th1-иммунный ответ можно оценить измерением уровней цитокинов, полученных в ответ на нуклеиновую кислоту (например, посредством индукции моноцитарных клеток и других клеток для продукции Th1-цитокинов, включая IFN- α). Переключение или изменение ба-

ланса иммунного ответа с Th2- на Th1-ответ особенно полезно для лечения астмы. Например, эффективным количеством для лечения астмы может быть количество, пригодное для переключения Th2-типа иммунного ответа, ассоциированного с астмой, на Th1-тип ответа или сбалансированную Th1/Th2-среду. Уровни Th2-цитокинов, особенно IL-4 и IL-5, повышены в дыхательных путях страдающих астмой субъектов. Описанные здесь иммуностимулирующие CpG-олигонуклеотиды вызывают повышение Th1-цитокинов, что помогает восстанавливать равновесие иммунной системы, предотвращать или уменьшать неблагоприятные эффекты, связанные с предпочтительным Th2-иммунным ответом.

Переключение иммунного ответа с Th2- на Th1-иммунный ответ можно также оценить измерением уровней специфических изотипов иммуноглобулина. Например, у мышей IgG2a ассоциирован с Th1-иммунным ответом, а IgG1 и IgE ассоциированы с Th2-иммунным ответом.

Имуностимулирующие CpG-олигонуклеотиды обладают уникальной способностью стимулировать клеточные выживание, дифференцировку, активацию и созревание дендритных клеток, и пригодны для способов *in vitro*, *in vivo* и *ex vivo*, вовлекающих дендритные клетки.

Имуностимулирующие CpG-олигонуклеотиды повышают также литическую активность натуральных клеток-киллеров и антитело-зависимую клеточную цитотоксичность (ADCC). ADCC можно осуществлять с применением иммуностимулирующих CpG-олигонуклеотидов в сочетании с антителом, специфичным к клеточной мишени, такой как раковая клетка. Когда иммуностимулирующие CpG-олигонуклеотиды вводят субъекту одновременно с антителом, иммунную систему субъекта индуцируют для убивания раковой клетки. Антитела, пригодные для процедуры ADCC, включают в себя антитела, взаимодействующие с клеткой в организме. Многие такие антитела, специфические для клеточных мишеней, описаны в данной области и многие коммерчески доступны.

Имуностимулирующие CpG-олигонуклеотиды можно вводить также одновременно с противораковым лечением. Противораковое лечение включает в себя противораковые лекарственные средства, облучение и хирургические процедуры. Как применяют здесь, «противораковые медикаменты» относятся к средству, вводимому субъекту с целью лечения рака. Как применяют здесь, «лечение рака» предусматривает предупреждение развития рака, уменьшение симптомов рака и/или ингибирование роста развившейся опухоли. В других аспектах противораковые медикаменты вводят субъекту, подверженному риску развития рака, с целью уменьшения риска развития рака. Различные типы противораковых медикаментов описаны здесь. С целью данного описания противораковые медикаменты классифицированы как химиотерапевтические средства, иммунотерапевтические средства, противораковые вакцины, гормональное лечение и модификаторы биологического ответа.

Кроме того, способы по изобретению предназначены для охвата применения более чем одного противоракового лекарственного средства вместе с иммуностимулирующими CpG-олигонуклеотидами. В качестве примера, когда это целесообразно, иммуностимулирующие CpG-олигонуклеотиды можно вводить и с химиотерапевтическим средством, и с иммунотерапевтическим средством. В качестве альтернативы, противораковый медикамент может охватывать иммунотерапевтическое средство и противораковую вакцину или химиотерапевтическое средство и противораковую вакцину, или химиотерапевтическое средство, иммунотерапевтическое средство и противораковую вакцину, все вводимые одному субъекту с целью лечения субъекта, страдающего от рака или подверженного риску его развития.

Химиотерапевтическое средство можно выбрать из группы, включающей в себя в качестве неограничивающих примеров метотрексат, винкристин, адриамицин, цисплатин, не содержащие сахаров хлорэтилнитрозомочевина, 5-фторурацил, митомицин С, блеомицин, доксорубин, дакарбазин, таксол, фрагиллин, Мегламин GLA, валрубицин, кармустин и полиферпосан, MMI270, BAY 12-9566, ингибитор RAS-фарнезилтрансферазы, ингибитор фарнезилтрансферазы, MMP, MTA/LY231514, LY264618/Лометексол, Гламолек, CI-994, TNP-470, Гикамтин/Топотекан, PKC412, Валсподар/PSC833, Новантрон/Митроксантрон, Метарет/Сурамин, Батимастат, E7070, BCH-4556, CS-682, 9-AC, AG3340, AG3433, Инцел/VX-710, VX-853, ZD0101, ISI641, ODN 698, TA2516/Мармистат, BB2516/Мармистат, CDP 845, D2163, PD183805, DX8951f, Лемонал DP2202, FK 317, Пицибанил/OK-432, AD32/Валрубицин, Метастрон/производное стронция, Темодал/Темозоломид, Эвацет/липосомальный доксорубин, Ютаксан/Паклитаксел, Таксол/Паклитаксел, Кселод/Капецитабин, Фуртулон/Доксифлуридин, Циклопакс/оральный паклитаксел, Оральный Таксид, SPU-077/Цисплатин, HMR 1275/Флавопиридол, CP-358(774)/EGFR, CP-609(754)/ингибитор онкогена RAS, BMS-182751/оральную платину, UFT (Тегафур/Урацил), Эргамизол/Левамизол, Енилурацил/776C85/5FU-энхансер, Кампто/Левамизол, Камптозар/Иринотекан, Тумодекс/Ралитрексед, Лейстатин/Кладрибин, Паксекс/Паклитаксел, Доксил/липосомальный доксорубин, Келикс/липосомальный доксорубин, Флудара/Флударабин, Фармарубин/Эпирубин, ДепоЦит, ZD1839, LU9553/Бис-Нафталимид, LU 103793/Доластин, Кетикс/липосомальный доксорубин, Гемзар/Гемцитабин, ZD 0473/Анормед, YM 116, семена лодина, ингибиторы CDK4 и CDK2, ингибиторы PARP, 04809/Дексифосфамид, Ифес/Меснекс/Ифосфамид, Вумон/Тенипозид, Параплатин/Карбоплатин, Плантинол/цисплатин, Вепезид/Этопозид, ZD 9331, Таксотер/Доцетаксел, пролекарство гуанина арабинозид, Аналог Таксана, нитрозомочевина, алкилирующие агенты, такие как мелфелан и циклофосфамид, Аминоглутетимид, Аспарагиназу, Бусульфид, Карбоплатин, Хлоромбуцил, Цитарабин HCl, Дактиномицин, Даунорубин HCl, Эстрамустин фосфат натрия,

Этопозид (VP16-213), Флоксуридин, Фторурацил (5-FU), Флутамид, Гидроксимочевина (гидроксикарбамид), Ифосфамид, Интерферон Альфа-2а, Альфа-2b, Лейпролида ацетат (аналог фактора высвобождения LHRH), Ломустин (CCNU), Мехлорэтамин HCl (азотный аналог горчичного газа), Меркаптопурин, Месну, Митотан (o.p'-DDD), Митоксантрон HCl, Октреотид, Пликамицин, Прокарбазин HCl, Стрептозоцин, Тамоксифена цитрат, Тиогуанин, Тиотепа, Винбластин сульфат, Амсакрин (m-AMSA), Азациитидин, Эритропозитин, Гексаметилмеламин (НММ), Интерлейкин 2, Митогуазон (метил-GAG; метилглиоксаль-бис-гуанилгидразон; MGBG), Пентостатин (2'-дезоксиформидин), Семустин (метил-CCNU), Тенипозид (VM-26) и Виндезина сульфат.

Иммунотерапевтическое средство может быть выбрано из группы, включающей в себя в качестве неограничивающих примеров Ритуксан, Рибутаксин, Герцептин, Квадрамет, Панорекс, IDEC-Y2B8, BEC2, C225, Онколим, SMART M195, ATRAGEN, Оварекс, Бексар, LDP-03, иор t6, MDX-210, MDX-11, MDX-22, OV103, 3622W94, анти-VEGF, Зенапакс, MDX-220, MDX-447, MELIMMUNE-2, MELIMMUNE-1, CEACIDE, Претаргет, NovoMAb-G2, TNT, Gliomab-H, GNI-250, EMD-72000, ЛимфоЦид, CMA 676, Монофарм-С, 4B5, иор egf.r3, иор c5, BABS, анти-FLK-2, MDX-2 60, ANA Ab, SMART 1D10 Ab, SMART ABL 364 Ab и ImmuRAIT-CEA.

Противораковую вакцину можно выбрать из группы, включающей в себя в качестве неограничивающих примеров EGF, антиидиотипические противораковые вакцины, антиген Gp75, GMK-вакцину против меланомы, конъюгированную с ганглиозидом вакцину MGV, Her2/neu, оварекс, M-Vax, O-Vax, L-Vax, тератоп STn-KHL, BLP25 (MUC-1), липосомальную идиотипическую вакцину, мелацин, вакцины с пептидными антигенами, токсин/антигенные вакцины, вакцину на основе MVA, PACIS, BCG-вакцину, TA-HPV, TA-CIN, DISC-вирус и ImmuCyst/TheraCys.

Применение иммуностимулирующих CpG-олигонуклеотидов в совокупности с иммунотерапевтическими средствами, такими как моноклональные антитела, способно увеличивать длительную выживаемость по ряду механизмов, предусматривающих значительное увеличение ADCC (как обсуждалось выше), активацию NK-клеток и увеличение уровней IFN- α . Нуклеиновые кислоты, когда их применяют в сочетании с моноклональными антителами, служат для снижения дозы антитела, необходимого для достижения биологического результата.

Изобретение относится также к способам индукции с применением иммуностимулирующих CpG-олигонуклеотидов активации не специфического к антигену врожденного иммунного ответа и широкого спектра устойчивости к инфекционному заражению. Термин активация врожденного иммунного ответа, как применяют здесь, относится к активации иммунных клеток, отличных от В-клеток памяти, и может предусматривать, например, активацию моноцитов, нейтрофилов, макрофагов, дендритных клеток, NK-клеток и/или других иммунных клеток, которые могут отвечать антиген-независимым способом. Широкий спектр устойчивости к инфекционному заражению индуцируется, поскольку иммунные клетки находятся в активной форме и примированы для ответа на любое вторгающееся соединение или микроорганизм. Клетки необязательно должны быть специфически примированы против конкретного антигена. Это особенно полезно в биологической войне или в других условиях, описанных выше, таких как путешествия.

Иммуностимулирующие CpG-олигонуклеотиды можно непосредственно вводить субъекту или одновременно с комплексом доставки нуклеиновой кислоты. Комплекс доставки нуклеиновой кислоты означает молекулу нуклеиновой кислоты, ассоциированную (например, ионно или ковалентно связанную с или инкапсулированную в) со средствами для направленной доставки (например, с молекулой, осуществляющей высокоаффинное связывание с клеткой-мишенью). Примеры комплексов доставки нуклеиновых кислот включают в себя нуклеиновые кислоты, ассоциированные со стеринном (например, холестерин), липидом (например, катионный липид, виросома или липосома) или средством, специфически связывающим клетку-мишень (например, лиганд, узнаваемый специфическим рецептором клетки-мишени). Предпочтительные комплексы могут быть достаточно стабильными *in vivo* для предотвращения значительного разъединения до интернализации клеткой-мишенью. Однако комплекс можно расщепить в подходящих условиях внутри клетки, высвобождая олигонуклеотид в функциональной форме.

Иммуностимулирующие CpG-олигонуклеотиды, и/или антиген, и/или другие лекарственные средства можно вводить самостоятельно (например, в соляном растворе или буфере) или с применением любых доставляющих носителей, известных в данной области. Например, описаны следующие носители для доставки: Кохлеаты (Gould-Fogerite et al., 1994, 1996); Эмульсомы (Vancott et al., 1998, Lowell et al., 1997); ISCOM (Mowat et al., 1993, Carlsson et al., 1991, Hu et al., 1998, Morein et al., 1999); Липосомы (Childers et al., 1999, Michalek et al., 1989, 1992, de Haan 1995a, 1995b); Живые бактериальные векторы (например, Salmonella, Escherichia coli, бацилла Кальметта-Герена, Shigella, Lactobacillus) (Hone et al., 1996, Pouwels et al., 1998, Chatfield et al., 1993, Stover et al., 1991, Nugent et al., 1998); Живые вирусные векторы (например, коровьей оспы, аденовирус, простого герпеса) (Gallichan et al., 1993, 1995, Moss et al., 1996, Nugent et al., 1998, Flexner et al., 1988, Morrow et al., 1999); Микросферы (Gupta et al., 1998, Jones et al., 1996, Maloy et al., 1994, Moore et al., 1995, O'Hagan et al., 1994, Eldridge et al., 1989); Нуклеиновые кислоты-вакцины (Fynan et al., 1993, Kuklin et al., 1997, Sasaki et al., 1998, Okada et al., 1997, Ishii et al., 1997); Полимеры (например, карбоксиметилцеллюлоза, хитозан) (Hamajima et al., 1998, Jabbal-Gill et al., 1998);

Полимерные кольца (Wyatt et al., 1998); Протеосомы (Vancott et al., 1998, Lowell et al., 1988, 1996, 1997); Фторид Натрия (Hashi et al., 1998); Трансгенные растения (Tacket et al., 1998, Mason et al., 1998, Naq et al., 1995); Виросомы (Gluck et al., 1992, Mengiardi et al., 1995, Cryz et al., 1998); Вирусоподобные частицы (Jiang et al., 1999, Leibl et al., 1998). Другие носители для доставки известны в данной области.

Термин «эффективное количество», как правило, относится к количеству, достаточному для осуществления желаемого биологического эффекта. Например, эффективное количество иммуностимулирующего CpG-олигонуклеотида, вводимого с антигеном для индукции иммунитета слизистых оболочек, представляет собой количество, необходимое, чтобы под действием антигена вызвать развитие IgA в ответ на антиген, тогда как такое количество, требуемое для индукции системного иммунитета, представляет собой количество, необходимое, чтобы под действием антигена вызвать развитие IgG в ответ на антиген. В сочетании с приведенными здесь объяснениями посредством выбора среди различных активных соединений и оценки факторов, таких как активность, относительная биодоступность, масса тела пациента, тяжесть неблагоприятных побочных эффектов и предпочтительный способ введения, можно планировать эффективный режим профилактического или терапевтического лечения, не приводящий к существенной токсичности и еще вполне эффективный для лечения конкретного субъекта. Эффективное количество для любого конкретного применения может меняться в зависимости от таких факторов, как заболевание или состояние, подлежащее лечению, конкретный вводимый иммуностимулирующий CpG-олигонуклеотид, размер субъекта, или тяжесть заболевания или состояния. Обычный специалист в данной области может эмпирически определить эффективное количество конкретного иммуностимулирующего CpG-олигонуклеотида, и/или антигена, и/или другого терапевтического средства без требования проведения лишних экспериментов.

Дозы описанных здесь соединений для местного введения или введения на слизистые оболочки субъекта, как правило, находятся в диапазоне приблизительно от 10 мкг до 10 г на одно введение, в зависимости от того, что возможно ежедневное, еженедельное или ежемесячное применение, или с любым другим количеством времени между применениями, или как необходимо иначе. Более типично дозы для местного введения или введения на слизистые оболочки находятся в диапазоне приблизительно от 1 до 500 мг на введение и наиболее типично приблизительно от 1 до 100 мг, с 2-4 введениями, разделенными друг от друга сутками или неделями. Более типично дозы иммуностимулянта находятся в диапазоне приблизительно от 10 мкг до 100 мг на введение и наиболее типично от 100 мкг до 10 мг, с ежедневными или еженедельными введениями. Дозы для парентеральной доставки субъекту описанных здесь соединений с целью индукции антиген-специфического иммунного ответа, где соединения доставляют с антигеном, но не с другим лекарственным средством, обычно в 5-10000 раз превышают эффективную дозу для применений вакцинного адъюванта или иммунного стимулятора на слизистых оболочках, более типично превышают в 10-1000 раз и наиболее типично в 20-100 раз. Дозы описанных выше соединений для парентеральной доставки с целью индукции врожденного иммунного ответа или для увеличения ADCC, или для индукции антиген-специфического иммунного ответа, когда иммуностимулирующие CpG-олигонуклеотиды вводят в сочетании с другими лекарственными средствами, обычно находятся в диапазоне приблизительно от 100 мкг до 10 г на введение, в зависимости от того, что возможно ежедневное, еженедельное или ежемесячное применение, или с любым другим количеством времени между применениями, или как необходимо иначе. Более типично парентеральные дозы для данных целей находятся в диапазоне приблизительно от 1 мг до 5 г на введение и наиболее типично приблизительно от 1 мг до 1 г, с 2-4 введениями, разделенными друг от друга сутками или неделями. Однако в некоторых вариантах осуществления парентеральные дозы для данных целей можно применять в диапазоне, в 5-10000 раз превышающем обычные дозы, описанные выше.

Для любого описанного здесь соединения терапевтически эффективное количество можно сначала определить на модельных животных. Терапевтически эффективную дозу можно определить также по данным для человека для других CpG-олигонуклеотидов, которые тестировали для людей (для людей проводят клинические испытания), и для соединений, известных как показывающие похожие фармакологические активности, таких как другие адъюванты, например, LT и другие антигены, для целей вакцинации. Более высокие дозы могут требоваться для парентерального введения. Применяемую дозу можно уточнить на основе относительной биодоступности и активности вводимого соединения. Так как уточнение дозы для достижения максимальной эффективности, основанное на описанных выше способах, и другие способы хорошо известны в данной области, они полностью в компетенции обычных специалистов в данной области.

Композиции по изобретению вводят в фармацевтически приемлемых растворах, которые в общепринятой практике содержат фармацевтически приемлемые концентрации соли, буферных веществ, консервантов, совместимых носителей, адъювантов и, необязательно, других терапевтических ингредиентов.

Для применения в лечении эффективное количество иммуностимулирующих CpG-олигонуклеотидов или других лекарственных средств можно вводить субъекту любым способом, доставляющим соединение к желаемой поверхности, например местным, на слизистую оболочку, системным. Введение фармацевтической композиции по настоящему изобретению можно осуществлять любыми способами, известными специалистам в данной области. Предпочтительные пути введения включают в

себя в качестве неограничивающих примеров оральный, парентеральный, внутривенный, внутримышечный, подкожный, внутриочаговый, внутриопухолевый, интраназальный, подъязычный, интратрахеальный, вдыхание, глазной, вагинальный и ректальный.

Для орального введения соединения (т.е. иммуностимулирующие CpG-олигонуклеотиды, антигены и/или другие терапевтические агенты) можно легко составить сочетанием активного соединения (соединений) с фармацевтически приемлемыми носителями, хорошо известными в данной области. Такие носители позволяют составлять соединения по изобретению в форме таблеток, пилюль, драже, капсул, жидкостей, гелей, сиропов, взвесей, суспензий и подобного для орального введения подлежащему лечению субъекту. Фармацевтические препараты для орального применения можно получить в виде твердого наполнителя, необязательно, размалывая полученную смесь и обрабатывая смесь гранул, после добавления подходящих добавок, если желательно, для получения оболочек таблеток или драже. Подходящими наполнителями являются, в частности, такие наполнители, как сахара, включая лактозу, сахарозу, маннит или сорбит; целлюлозные препараты, такие как, например, кукурузный крахмал, пшеничный крахмал, рисовый крахмал, картофельный крахмал, желатин, трагакантовую камедь, метилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу натрия и/или поливинилпирролидон (PVP). Если желательно, можно добавлять распадающиеся вещества, такие как поперечно сшитый поливинилпирролидон, агар или альгиновую кислоту или их соль, такую как альгинат натрия. Оральные составы можно составлять также в солевом растворе или буферах для нейтрализации внутренних кислых условий или можно вводить без каких-либо носителей.

Оболочки драже обеспечивают подходящими покрытиями. С данной целью можно применять концентрированные растворы сахара, необязательно содержащие гуммиарабик, тальк, поливинилпирролидон, гель карбопол, полиэтиленгликоль и/или диоксид титана, растворы глазури и подходящие органические растворители или смеси растворителей. Красители или пигменты можно добавлять к покрытиям таблеток или драже для идентификации или для обозначения различных сочетаний доз активных соединений.

Фармацевтические препараты, которые можно применять орально, включают в себя заполненные капсулы, изготовленные из желатина и пластификатора, такого как глицерин или сорбит. Заполненные капсулы могут содержать активные ингредиенты в смеси с наполнителем, таким как лактоза, связующих, таких как крахмалы, и/или скользящие вещества, такие как тальк или стеарат магния, и, необязательно, стабилизаторы. В мягких капсулах активные соединения могут быть растворены или суспендированы в подходящих жидкостях, таких как жирные масла, жидкий парафин или жидкие полиэтиленгликоли. Кроме того, можно добавлять стабилизаторы. Можно применять также микросферы, составленные для орального введения. Такие микросферы хорошо определены в данной области. Все составы для орального введения должны быть в дозах, подходящих для такого введения.

Для буккального введения композиции могут принимать форму таблеток или пастилок, составленных обычным способом.

Соединения можно вводить ингаляцией в легочный тракт, особенно в бронхи, и более конкретно, в альвеолы в глубине легкого с применением обычных устройств для ингаляции. Соединения можно доставлять в форме подачи аэрозольного спрея из упаковок под давлением или из распылителя с применением подходящего пропеллента, например дихлордифторметана, трихлорфторметана, дихлортетрафторэтана, углекислого газа или другого подходящего газа. В случае аэрозоля под давлением, единицу дозирования можно определять предоставлением клапана для доставки измеренного количества. Для доставки соединений субъекту можно применять аппараты для ингаляции. Аппарат для ингаляции, как применяют здесь, представляет собой любое приспособление для введения аэрозоля, так же как сухих порошковых форм соединений. Данный тип оборудования хорошо известен в данной области и описан в деталях, как в описании, найденном в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, 1995, Mac Publishing Company, Easton, Pennsylvania, pages 1676-1692. Приспособления для ингаляции описаны также во многих патентах США, таких как патент США № 6116237.

«Порошок», как применяют здесь, относится к композициям, состоящим из тонко измельченных твердых частиц. Соединения предпочтительно относительно свободно пересыпаются, и их можно распределять в приспособлении для ингаляции с последующей ингаляцией субъекту, так что соединения достигают легких, что позволяет проникновение в альвеолы. «Сухой порошок» относится к порошковой композиции, обладающей таким содержанием влаги, что частицы легко распределяются в приспособлении для ингаляции для формирования аэрозоля. Содержание влаги, как правило, составляет менее 10% по массе (мас.%) воды, а в некоторых вариантах осуществления составляет ниже приблизительно 5 мас.% и предпочтительно менее чем 3 мас.%. Порошок можно составлять с полимерами и, необязательно, можно составлять с другими веществами, такими как липосомы, альбумин и/или другие носители.

Специалисты в данной области могут выбирать дозировку и системы доставки аэрозоля для конкретного терапевтического применения, такие как описаны, например, в Gonda, I. "Aerosols for delivery of therapeutic and diagnostic agents to the respiratory tract," in Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 6:273-313 (1990), и в Moren, "Aerosol dosage forms and formulations," in Aerosols in Medicine. Principles, Diagnosis and Therapy, Moren, et al., Eds., Elsevier, Amsterdam, 1985.

Соединения, если желательно доставлять их системно, можно составлять для парентерального введения посредством инъекции, например, посредством болюсного вливания или постоянных вливаний. Составы для инъекций можно представлять в форме однократной дозы, например, ампулы, или в контейнерах для множественных доз, с добавленным консервантом. Композиции могут принимать такие формы как суспензии, растворы или эмульсии в масляных или водных носителях и могут содержать формулирующие средства, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или дисперсионные средства.

Фармацевтические составы для парентерального введения содержат водные растворы активных соединений в водорастворимой форме. Кроме того, суспензии активных соединений можно приготовить как соответствующие масляные суспензии для инъекций. Подходящие липофильные растворители или носители включают в себя нелетучие масла, такие как кунжутное масло, или синтетические сложные эфиры жирных кислот, такие как этилолеат или триглицериды, или липосомы. Водные суспензии для инъекций могут содержать вещества, увеличивающие вязкость суспензии, такие как карбоксиметилцеллюлоза натрия, сорбит или декстран. Суспензия, необязательно, может также содержать подходящие стабилизаторы или средства, увеличивающие растворимость, что позволяет получение высоко концентрированных растворов.

В качестве альтернативы активные соединения могут присутствовать в форме порошка для составления перед применением с подходящим носителем, например, стерильной апиrogenной водой.

Соединения можно составлять также в ректальные или вагинальные композиции, такие как суппозитории или удерживающие клизмы, например, содержащие общепринятые основы для суппозитория, такие как кокосовое масло или другие глицериды.

В дополнение к описанным выше составам, соединения можно составлять также как препараты-депо. Такие составы длительного действия можно составлять с подходящими полимерными или гидрофобными веществами (например, как эмульсию в подходящем масле) или ионообменными смолами или в виде труднорастворимых производных, например труднорастворимой соли.

Фармацевтические композиции могут содержать также подходящие твердофазные или гель-фазные носители или наполнители. Такие носители или наполнители включают в себя в качестве неограничивающих примеров карбонат кальция, фосфат кальция, различные сахара, крахмалы, производные целлюлозы, желатин и полимеры, такие как полиэтиленгликоли.

Подходящими жидкими или твердыми формами фармацевтических препаратов являются, например, водные или солевые растворы для ингаляции, микроинкапсулированные, в составе кохлеатов, покрывающие микроскопические частицы золота, содержащиеся в липосомах, распыляемые, аэрозоли, осадки для имплантации в кожу или высушенные на остром предмете для процарапывания в кожу. Фармацевтические композиции также включают в себя гранулы, порошки, таблетки, покрытые таблетки (микро)капсулы, суппозитории, сиропы, эмульсии, суспензии, кремы, капли или препараты с длительным высвобождением активных соединений, в которых обычно, как описано выше, применяют наполнители и добавки и/или вспомогательные вещества, такие как разрыхлители, связующие, покрывающие средства, набухающие средства, скользящие вещества, ароматизаторы, подсластители или солибутилизаторы. Фармацевтические композиции пригодны для применения во множестве систем доставки лекарственных средств. Краткий обзор способов доставки лекарственных средств см. в Langer R (1990) Science 249:1527-33, что приведено здесь в качестве ссылки в полном объеме.

Иммуностимулирующие CpG-олигонуклеотиды и, необязательно, другие лекарственные средства и/или антигены можно вводить самостоятельно (чистыми) или в форме фармацевтически приемлемой соли. При применении в медицине соли должны быть фармацевтически приемлемыми, однако, фармацевтически не приемлемые соли можно легко применять для получения из них фармацевтически приемлемых солей. Такие соли включают в себя в качестве неограничивающих примеров полученные из следующих кислот: соляной, бромисто-водородной, серной, азотной, фосфорной, малеиновой, уксусной, салициловой, п-толуолсульфоновой, винно-каменной, лимонной, метансульфоновой, муравьиной, малоновой, янтарной, нафталин-2-сульфоновой и бензолсульфоновой. Такие соли можно получить также как соли щелочных металлов или щелочно-земельные соли, такие как соли натрия, калия или кальция с группой карбоновой кислоты.

Пригодные буферные агенты включают в себя уксусную кислоту и соль (1-2% мас./об.); лимонную кислоту и соль (1-3% мас./об.); борную кислоту и соль (0,5-2,5% мас./об.) и фосфорную кислоту и соль (0,8-2% мас./об.). Пригодные консерванты включают в себя хлорид бензалкония (0,003-0,03% мас./об.); хлорбутанол (0,3-0,9% мас./об.); парабены (0,01-0,25% мас./об.) и тимеросал (0,004-0,02% мас./об.).

Фармацевтические композиции по изобретению содержат эффективное количество иммуностимулирующего CpG-олигонуклеотида и, необязательно, антигены и/или другие терапевтические средства, необязательно, заключенные в фармацевтически приемлемый носитель. Термин фармацевтически приемлемый носитель означает один или несколько совместимых твердых или жидких наполнителей, разбавителей или инкапсулирующих веществ, пригодных для введения человеку или другому позвоночному животному. Термин носитель означает органический или неорганический ингредиент, природный или синтетический, с которым объединяют активный ингредиент для облегчения применения. Компоненты

фармацевтических композиций также способны смешиваться с соединениями по настоящему изобретению и друг с другом таким образом, что не возникает взаимодействия, существенно снижающего желаемую фармацевтическую эффективность.

Настоящее изобретение далее проиллюстрировано следующими примерами, которые никаким образом не следует рассматривать как ограничивающие.

Примеры

Пример 1. Аналоги ODN C-класса индуцируют секрецию IFN- α и активность TLR9 человека *in vitro*.

В данных сериях экспериментов аналоги ODN C-класса по изобретению тестировали *in vitro* по их способности стимулировать периферические мононуклеарные клетки крови человека (PBMC) для секреции IFN- α и стимулировать клетки HEK293, стабильно трансфицированные репортерной конструкцией с TLR9 человека и NF- κ B для демонстрации передачи сигнала TLR9.

ODN приобретены в Biospring (Frankfurt, Germany) и проверены на идентичность и чистоту в Coley Pharmaceutical GmbH (Langenfeld, Germany). ODN растворяли в фосфатно-солевом буфере (Sigma, Germany) и хранили при -20°C. Все разведения проводили с апиогенными реагентами. В тест ODN включали следующие:

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

где * означает фосфоротиоатную связь, и _ означает фосфодиэфирную связь. CpG-ODN 2006 (TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT, SEQ ID NO:56) применяли в качестве положительного контроля для активации сигнала TLR9. CpG-ODN C-класса 2429 (TCGTCGTTTTCGGCGGCCGCCG, SEQ ID NO:53) применяли в качестве положительного контроля для индукции IFN- α . Не-CpG-ODN 1982 (TCCAGGACTTCTCTCAGGTT, SEQ ID NO:18) применяли в качестве отрицательного контроля.

Препараты лейкоцитной пленки периферической крови здоровых доноров мужского и женского пола получены из Blood Bank of the University of Düsseldorf (Germany) и из них выделены PBMC центрифугированием на Фиколл-Гипак (Sigma). Выделенные: PBMC ресуспендировали в культуральной среде RPMI 1640 (BioWhittaker, Belgium), дополненной 5% (об./об.) инактивированной нагреванием АВ сывороткой человека (BioWhittaker) или 10% (об./об.) инактивированной нагреванием FCS, 2 mM L-глутамином (BioWhittaker), 100 Ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Invitrogen, Karlsruhe, Germany).

Свежие PBMC пересевали в 96-луночные круглодонные плашки и инкубировали 48 ч с ODN в концентрации, как указано, во влажном инкубаторе при 37°C. Культуральные супернатанты собирали и, если не использовали немедленно, замораживали при -20°C пока не потребуются.

Количества IFN- α в супернатантах оценивали с применением твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), разработанного с применением коммерчески доступных антител (Alexis GmbH, Grünberg, Germany). ODN 128, 331-344, 611 и 620 тестировали с PBMC четырех различных доноров, а ODN 614 тестировали с PBMC трех различных доноров.

Стабильно трансфицированные клетки HEK293 применяли для анализа TLR9 человека по репортерному гену, экспрессируя репортерную генетическую конструкцию с рецептором TLR9 человека и NF-

kB. Клетки инкубировали с ODN 16 ч при 37°C во влажном инкубаторе. Каждую точку данных получали в трех повторях. Клетки лизировали и анализировали активность репортерного гена. Индексы стимуляции рассчитывали по отношению к активности репортерного гена в среде без добавления ODN.

Результаты. Типичные результаты представлены на фиг. 1 и 2. На фиг. 1 показано, что ODN C-класса 332, 333 и 334 индуцируют большие количества IFN-α (обычно приблизительно 2000-2500 пг/мл), когда присутствуют в концентрации 1 мкМ. Количество IFN-α, индуцированного данными ODN, значительно превосходит количество IFN-α, индуцированное такой же концентрацией ODN 2006 или 1982. На фиг. 1 показано также, что ODN C-класса 332, 333 и 334 индуцируют значительные величины сигнальной активности TLR9 (обычно с индексом стимуляции приблизительно 15), когда присутствуют в концентрации 10 мкМ. Величина сигнальной активности TLR9, индуцируемой данными ODN, составляла около половины сигнальной активности TLR9, индуцируемой такой же концентрацией ODN 2006. По существу, такие же результаты получены для ODN 128 и 335-344.

На фиг. 2 показано, что ODN C-класса 611, 614 и 620 индуцируют даже более значительные количества IFN-α (обычно приблизительно 3000-4000 пг/мл), когда присутствуют в концентрации 1 мкМ. Количество IFN-α, индуцированного данными ODN, значительно превосходит количество IFN-α, индуцированное ODN 2006 или 1982 в такой же концентрации. На фиг. 2 показано также, что ODN C-класса 611, 614 и 620 индуцируют значительные величины сигнальной активности TLR9 (обычно с индексом стимуляции приблизительно 10-20), когда присутствуют в концентрации 10 мкМ. Величина сигнальной активности TLR9, индуцируемой данными ODN, снова составляла около половины сигнальной активности TLR9, индуцируемой ODN 2006 в такой же концентрации.

ODN 611 (SEQ ID NO:43), 614 (SEQ ID NO:43) и 620 (SEQ ID NO:43) также сравнивали с ODN 2429 (одним из первых описанных олигонуклеотидов C-класса, содержащих палиндром). Данные новые ODN C-класса показали более высокую активность в анализе TLR9 человека, тогда как индукция IFN-α была такой же, как и для 2429 (фиг. 3).

Вместе взятые, результаты данных экспериментов показывают, что аналоги ODN C-класса по изобретению эффективно индуцируют секрецию IFN-α и активность TLR9 человека *in vitro*.

Пример 2. Дополнительные аналоги ODN C-класса индуцируют секрецию IFN-α *in vitro*.

В данных сериях экспериментов дополнительные аналоги ODN C-класса по изобретению тестировали *in vitro* по их способности индуцировать секрецию IFN-α. Аналоги ODN C-класса в данных экспериментах частично характеризуются присутствием АТ-богатых прерывистых инвертированных повторов, содержащих остатки d-спейсера вместо обычных нуклеотидных остатков.

ODN получали, как в примере 1. В тест ODN включали следующие:

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

где * означает фосфоротиоатную межнуклеотидную связь, _ означает фосфодиэфирную межнуклеотидную связь и L представляет собой d-спейсер.

PBMC человека получали и обрабатывали способом, аналогичным примеру 1.

Количества IFN-α в супернатантах оценивали с применением твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) способом, аналогичным примеру 1.

Результаты. ODN C-класса 645, 646 и 647, частично характеризующиеся присутствием АТ-богатых прерывистых инвертированных повторов, индуцируют умеренные количества IFN-α (обычно приблизительно 1200-1500 пг/мл), когда присутствуют в концентрации 1 мкМ. Количество IFN-α, индуцированного данными ODN, значительно превосходит количество IFN-α, индуцированное такой же концентрацией ODN 2006 или 1982. ODN C-класса 649, 650 и 651, частично характеризующиеся присутствием АТ-богатых прерывистых инвертированных повторов, индуцируют большие количества IFN-α (обычно приблизительно 2000-2500 пг/мл), когда присутствуют в концентрации 1 мкМ. Количество IFN-α, индуцированного данными ODN, значительно превосходит количество IFN-α, индуцированное такой же концентрацией ODN 2006 или 1982.

Вместе взятые результаты данных экспериментов показывают, что аналоги ODN C-класса по изобретению, частично характеризующиеся присутствием АТ-богатых прерывистых инвертированных повторов, содержащих остатки d-спейсера вместо обычных нуклеотидных остатков, эффективно индуцируют секрецию IFN-α *in vitro*.

Пример 3. Дополнительные аналоги ODN C-класса индуцируют секрецию IFN-α и активность TLR9 человека *in vitro*.

В данных сериях экспериментов аналоги ODN C-класса по изобретению тестировали *in vitro* по их способности стимулировать PBMC для секреции IFN- α и стимулировать клетки HEK293, стабильно трансфицированные репортерной конструкцией с TLR9 человека и NF-kB, для демонстрации передачи сигнала TLR9. Основной протокол описан в примере 1, за исключением того, что в тест ODN включали следующие:

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

где * означает фосфоротиоатную связь, и _ означает фосфодиэфирную связь.

ODN в различных концентрациях тестировали анализом TLR9 по репортерному гену. EC50 (концентрацию ODN, при которой эффект составляет 50% от максимального эффекта) рассчитывали с применением SigmaPlot (SigmaPlot 2002 для Windows версии 8.0). Максимальный индекс стимуляции (max SI) рассчитывали как частное между наивысшим значением для всех концентраций, тестируемых для любого ODN, и средним контрольным. Результаты показаны в табл. 1, где видно, что обычно индексы стимуляции лежали в диапазоне 10-30.

Таблица 1

CpG-ODN C-класса по изобретению активируют TLR9 человека

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

PBMC человека при 48-часовой инкубации с данными CpG-ODN C-класса секретируют большие количества IFN- α . Типичные количества IFN- α после инкубации с ODN в концентрациях, меньших или равных 1 мкМ, лежали в диапазоне 3000-4000 пг/мл. Кривые ответа для IFN- α в данных экспериментах очень похожи на кривые, показанные на фиг. 2.

Пример 4. Аналоги ODN C-класса индуцируют антиген-специфический иммунный ответ *in vivo*.

В данных сериях экспериментов аналоги ODN C-класса по изобретению тестировали *in vivo* одновременно с вакцинацией мышей. Обнаружено, что ODN C-класса по изобретению увеличивают титры общих антиген-специфических IgG и IgG2a (Th1-подобных IgG у мышей), так же как ответы антиген-специфических цитотолитических Т-лимфоцитов (CTL) до некоторой степени, по меньшей мере, сравнимой с CpG-ODN B-класса 2006.

ODN получали, как в примере 1.

Для всех экспериментов применяли самок мышей BALB/c (в возрасте 6-8 недель). Животных приобретали в Charles River Canada (Quebec, Canada) и содержали в микроизоляторах в отделе ухода за животными Ottawa Hospital Research Institute, Civic Site.

Для всех анализов *in vitro* применяли наивные спленоциты мышей BALB/c. Животных анестезировали изофлуораном и умерщвляли смещением шейных позвонков. Селезенки удаляли в асептических условиях и помещали в фосфатно-солевой буфер (PBS) + 0,2% бычьего сывороточного альбумина (Sigma Chemical Company). Селезенки гомогенизировали и спленоциты ресуспендировали в среде для культивирования клеток RPMI 1640 (Life Technologies, Grand Island, NY), дополненной 2% нормальной мышшиной сывороткой (Cedarlane Laboratories, Ontario, Canada), раствором пенициллин-стрептомицина (конечная концентрация 1000 Ед./мл и 1 мг/мл, соответственно; Sigma Chemical Company) и 5×10^{-5} М (β-меркаптоэтанолом (Sigma Chemical Company).

Мышей BALB/c (n=10/группу) иммунизировали 1 мкг поверхностного антигена гепатита В (HBsAg) субтипа ad (International Enzymes, CA) самостоятельно или в сочетании с 1-100 мкг CpG-ODN 2006, 608, 611, 618 или CpG-ODN 620. У животных отбирали кровь и проводили вторичную иммунизацию через 4 недели после первичной иммунизации. Через 2 недели после вторичной иммунизации 5 животных из каждой группы умерщвляли и удаляли селезенки для анализов CTL.

Антитела (тотальные IgG, IgG1 и IgG2a), специфические к HBsAg (анти-HBs) детектировали и определяли количественно анализом ELISA с конечными разведениями, который проводили в трех повторях на образцах от отдельных животных. Конечные титры определяли как наибольшее разведение плазмы, дающее значение оптической плотности (OD 450) в два раза выше, чем для неиммунной плазмы со значением отсечки 0,05. Это представлено как средние групповые титры (GMT)±SEM.

Анализ CTL проводили в соответствии с обычным способом. Коротко, селезенки удаляли через 4 недели после иммунизации и гомогенизировали до суспензии отдельных клеток в среде для культивирования клеток RPMI 1640 (Life Technologies, Grand Island, NY), дополненной 10% эмбриональной бычьей сывороткой (Life Technologies), раствором пенициллин-стрептомицина (конечная концентрация 1000 Ед./мл и 1 мг/мл, соответственно; Sigma, Irvine, UK), и 5×10^{-5} М β-меркаптоэтанолом (Sigma) (Полная среда RPMI 1640). HBsAg-специфичные лимфоциты в суспензиях спленоцитов (3×10^6 клеток/мл) рестимулировали в течение 5 суток инкубацией с линией мышшиных клеток (p815-S), экспрессирующей HBsAg. После рестимуляции способность лимфоцитов убивать клетки, экспрессирующие HbsAg, определяли с применением анализа высвобождения ^{51}Cr . Результаты представлены как % специфического лизиса при различных соотношениях эффектор:мишень (Е:Т).

Результаты. Типичные результаты представлены на фиг. 4-6. Как показано на фиг. 4, титры тотальных IgG для ODN 2006 и ODN 620 являлись дозозависимыми и обнаружено, что они составляли приблизительно 5×10^3 и $6,5 \times 10^3$, соответственно, при дозе ODN 1 мкг. Обнаружено, что титры тотальных IgG для ODN 2006 и ODN 620 составляют приблизительно 1×10^4 при дозе ODN 100 мкг. Как показано на фиг. 5, ODN 2006 и ODN 620, оба, значительно повышают IgG2a (Th1-подобные IgG у мышей) по сравнению с контрольными не-CpG-ODN 2137 (TGCTGCTTTTGTGCTTTTGTGCTT; SEQ ID NO:60). Конкретно, титры IgG2a для ODN 2006, 620 и 2137, при введении каждого в дозах 10 мкг, составляли приблизительно 3×10^3 , 6×10^3 и 3×10^2 соответственно. Как показано на фиг. 6, активность CTL при соотношении Е:Т 100:1 для ODN 2006 и 620 значительно превышала контрольную при вводимых дозах 10 и 100 мкг. Например, процент специфического лизиса для ODN 2006, 260 и 2137, при введении каждого в дозе 10 мкг, составлял приблизительно 26, 24 и 12%.

Вместе взятые, результаты данных экспериментов показывают, что аналоги ODN C-класса по изобретению эффективно индуцируют антиген-специфические иммунные ответы *in vivo*.

Пример 5. Аналоги ODN C-класса улучшают выживаемость и уменьшают объем опухоли на модели опухоли *in vivo*.

В данных сериях экспериментов аналоги ODN C-класса по изобретению тестировали *in vivo* на мышшиной модели нейробластомы. Обнаружено, что аналоги ODN C-класса по изобретению значительно улучшают и общую выживаемость, и тяжесть опухоли.

ODN получали, как в примере 1.

Мышей BALB/c получали, как в примере 4.

Мышам BALB/c подкожно инъектировали в левый бок на сутки $0,1 \times 10^6$ клеток нейробластомы (Neuro-2a) (например, ATCC CCL-131, American Type Culture Collection, Manassas, VA). С 10-25 суток мышам ежедневно делали инъекции подкожно PBS, CpG 2006, CpG 620 или контрольного не-CpG-ODN 2137. Измеряли процент выживания и объем опухоли.

Результаты. Типичные результаты представлены на фиг. 7. Как показано на фиг. 7А, мыши, обработанные 100 мкг ODN 620, через 80 суток имели степень выживаемости 50% по сравнению с соответствующими степенями выживаемости 0-20% для ODN 2006, ODN 2137 или PBS. Кроме того, как показано на фиг. 7В, мыши, обработанные 100 мкг ODN 620, имели объем опухоли с острым максимумом приблизительно 1000 мм^3 на 28 сутки и снижением до 0 мм^3 на 38 сутки. Для сравнения, мыши, обработанные ODN 2137 или PBS, имели более быстрый, монотонный рост опухоли.

Вместе взятые, результаты данных экспериментов показывают, что аналоги ODN C-класса по изобретению эффективно улучшают выживаемость и уменьшают объем опухоли на модели опухоли *in vivo*.

Пример 6. Тканевой обмен и распределение аналогов ODN C-класса.

Исследования поглощения/распределения аналогов ODN C-класса по изобретению показали благоприятный метаболизм и клиренс из органов, таких как почки и печень, после подкожной обработки мышей.

Мышей разделяли на группы по 5, и каждой мышце вводили 250 мкг ODN в однократной подкожной дозе на 0 сутки. В различные моменты времени органы (печень, почки и селезенку) удаляли и выделяли олигонуклеотиды и их метаболиты для количественного определения содержания.

Результаты. ODN по настоящему изобретению (например, 611 и 620) показали меньшее накопление в органах по сравнению с известными полностью фосфоротиоатными палиндромными ODN, такими как 2429. Например, на 3 сутки уровни в почках ODN 611, 620 и 2429 составляли приблизительно 70 ± 28 , 30 ± 18 и 90 ± 10 мг/кг соответственно. Подобным образом, на 3 сутки уровни в печени ODN 611, 620 и 2429 составляли приблизительно 45 ± 15 , 28 ± 12 и 150 ± 15 мг/кг соответственно.

Вместе взятые, результаты данных экспериментов показывают, что аналоги ODN C-класса по изобретению обладают благоприятным метаболизмом и клиренсом из органов, где в других обстоятельствах ODN могут накапливаться.

Пример 7. Физические характеристики аналогов ODN C-класса.

В данной серии экспериментов ODN 2429, 611, 620, 608

(T*C*G*T*T*C_G*T*T*T*T*T*C_G*G*C_G*C*G*T*C_G*C*C*G; SEQ ID NO: 51)

и 618 (T*C*G*T*T*C_G*T*T*T*T*T*C_G*G*C*G*G*T*C_G*C*C*G, SEQ ID NO: 53) характеризовали с применением эксклюзионной хроматографии, капиллярного электрофореза в геле (CGE), УФ термической денатурации и жидкостной хроматографии высокого давления (HPLC). Когда ODN 611 и ODN 620 исследовали эксклюзионной хроматографией (225 мкМ в PBS), для каждого соединения наблюдали только один пик, т.е. каждый олигонуклеотид элюировали как мономер. Напротив, когда ODN 608 и 618 (содержащие каждый палиндромную последовательность) исследовали эксклюзионной хроматографией, для каждого олигонуклеотида наблюдали два пика, согласно с присутствием межмолекулярного димера помимо мономера. Однако исследования УФ термической денатурацией показали, что ODN 611 и ODN 620 обладают вторичной структурой в растворе, согласно с внутримолекулярной структурой шпильки. Считают, что структура шпильки возникает из-за инвертированного повтора в последовательностях 611 и 620. При HPLC и CGE, как правило, наблюдали более острые пики по сравнению с ODN 2429 и ODN 608.

Вместе взятые, результаты данных экспериментов показывают, что аналоги ODN C-класса по изобретению проявляют тенденцию к формированию внутримолекулярных вторичных структур и не формируют межмолекулярных комплексов *in vitro* в рассматриваемой концентрации, тогда как палиндром-содержащие ODN C-класса по изобретению проявляют тенденцию к ассоциации в комплексы посредством межмолекулярных взаимодействий. Однако, по-видимому, *in vivo* концентрации ODN, достигаемые во внутриэндосомальной среде, достаточно высоки для поддержания дуплексов или даже комплексов ODN высшего порядка, включая дуплексы или даже комплексы высшего порядка аналогов ODN C-класса по изобретению.

Эквиваленты

Приведенное выше письменное описание считают достаточным, чтобы позволить специалисту в данной области практически использовать изобретение. Различные модификации изобретения в дополнение к показанным и описанным здесь, становятся очевидными специалистам в данной области из приведенного выше описания и попадают в рамки прилагаемой формулы изобретения. Преимущества и объекты изобретения необязательно охвачены в каждом варианте осуществления по изобретению.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Иммуностимулирующая нуклеиновая кислота, содержащая TCGTCGTTTTACGGCGCCGTTGCCG (SEQ ID NO:44).
2. Иммуностимулирующая нуклеиновая кислота по п.1, по существу, состоящая из TCGTCGTTTTACGGCGCCGTTGCCG (SEQ ID NO:44).
3. Иммуностимулирующая нуклеиновая кислота по п.1, где по меньшей мере одна межнуклеотидная связь модифицирована фосфотиоатом.
4. Иммуностимулирующая нуклеиновая кислота по п.1, где каждая межнуклеотидная связь модифицирована фосфотиоатом.
5. Иммуностимулирующая нуклеиновая кислота по п.1, где по меньшей мере один нуклеотид в олигонуклеотиде представляет собой замещенный или модифицированный пурин или пиримидин.
6. Иммуностимулирующая нуклеиновая кислота по п.5, где замещенный пиримидин представляет собой C5- или C6-замещенный пиримидин.
7. Иммуностимулирующая нуклеиновая кислота по п.5, где замещенный пурин представляет собой C8- или C7-замещенный пурин.
8. Иммуностимулирующая нуклеиновая кислота по п.5, где замещенный или модифицированный

пурин или пиримидин выбран из группы, состоящей из 5-замещенных цитозинов, 6-замещенных цитозинов, N4-замещенных цитозинов, 5-азацитозина, 2-меркаптоцитозина, изоцитозина, псевдоизоцитозина, аналогов цитозина с конденсированными кольцевыми системами и производных урацила, производных тимина, 7-деазагуанина, 7-деаза-7-замещенного гуанина, 7-деаза-8-замещенного гуанина, 7-деаза-8-азагуанина, гипоксантина, N2-замещенных гуанинов, 5-амино-3-метил-3Н,6Н-тиазоло[4,5-*d*]пиримидин-2,7-диона, 2,6-диаминопурина, 2-аминопурина, пурина, индола, замещенных аденинов, 8-замещенного гуанина и 6-тиогуанина.

9. Иммуностимулирующая нуклеиновая кислота по п.5, где замещенный или модифицированный пурин или пиримидин выбран из группы, состоящей из 5-метилцитозина, 5-фторцитозина, 5-хлорцитозина, 5-бромцитозина, 5-йодцитозина, 5-гидроксцитозина, 6-гидроксцитозина, 5-гидроксиметилцитозина, 5-диформетилцитозина и незамещенного или замещенного 5-алкинилцитозина, N4-этилцитозина, N,N'-пропиленцитозина, феноксазина, 5-фторурацила, 5-бромуррацила, 5-бромвинилурацила, 4-тиоурацила, 5-гидроксиурацила, 5-пропинилурацила, 2-тиотимина, 4-тиотимина, 6-замещенных тиминон, 7-деаза-7-(C2-C6)алкинилгуанина, N2-метилгуанина, N6-метиладенина, 8-оксоаденина, 8-гидроксигуанина и 8-бромгуанина.

10. Иммуностимулирующая нуклеиновая кислота по п.5, где замещенный или модифицированный пурин или пиримидин выбран из группы, состоящей из универсального основания, ароматической циклической системы и атома водорода (*d*-спейсер).

11. Иммуностимулирующая нуклеиновая кислота по п.5, где замещенный или модифицированный пурин или пиримидин выбран из группы, состоящей из 4-метилиндола, 5-нитроиндола, 3-нитропиррола, R-основания и K-основания, бензимидазола, дихлорбензимидазола, амида 1-метил-1Н-[1,2,4]триазол-3-карбоновой кислоты, фторбензола и дифторбензола.

12. Вакцина, содержащая иммуностимулирующую нуклеиновую кислоту по любому из пп.1-11 и антиген.

13. Фармацевтическая композиция, содержащая иммуностимулирующую нуклеиновую кислоту по любому из пп.1-11 и фармацевтически приемлемый носитель.

14. Фармацевтическая композиция, содержащая иммуностимулирующую нуклеиновую кислоту по любому из пп.1-11 и противораковое лекарственное средство.

15. Способ лечения рака, предусматривающий введение субъекту, страдающего раком или подверженному риску его развития, иммуностимулирующей нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-11 в количестве, эффективном для лечения или предупреждения рака.

16. Способ по п.15, где рак выбран из базально-клеточной карциномы, рака желчных путей, рака мочевого пузыря, рака кости, рака мозга и центральной нервной системы, рака молочной железы, рака шейки матки, хориокарциномы, рака ободочной и прямой кишки, рака соединительной ткани, рака пищеварительной системы, эндометриального рака, рака пищевода, злокачественной опухоли глаза, злокачественной опухоли головы и шеи, рака желудка, интраэпителиальной неоплазии, рака почки, рака глотки, лейкоза, рака печени, рака легкого, лимфомы, включая лимфому Ходжкина и неходжкинскую лимфому, меланомы, миеломы, нейробластомы, рака полости рта, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, ретинобластомы, рабдомиосаркомы, рака прямой кишки, рака почки, злокачественной опухоли респираторной системы, саркомы, рака кожи, рака желудка, рака яичка, рака щитовидной железы, рака матки, злокачественной опухоли мочевыделительной системы или других карцином и сарком.

17. Способ по п.15, где рак представляет собой рак, чувствительный к лечению интерфероном альфа (IFN- α).

18. Способ по п.17, где рак, чувствительный к лечению IFN- α , выбран из лейкоза ворсистых клеток, хронического миелолейкоза, кожного Т-клеточного лейкоза, множественной миеломы, фолликулярной лимфомы, злокачественной меланомы, плоскоклеточной карциномы, связанной со СПИДом саркомы Капоши, почечно-клеточной карциномы, карциномы предстательной железы, дисплазии шейки матки или карциномы толстой кишки.

19. Способ по п.15, где субъекту проводят противораковое лечение.

20. Способ по п.19, где противораковое лечение представляет собой облучение.

21. Способ по п.19, где противораковое лечение представляет собой хирургическое вмешательство.

22. Способ по п.19, где противораковое лечение представляет собой противораковое лекарственное средство.

23. Способ по п.22, где противораковое лекарственное средство представляет собой химиотерапевтическое средство.

24. Способ по п.23, где химиотерапевтическое средство представляет собой метотрексат, винкристин, адриамицин, цисплатин, не содержащие сахаров хлорэтилнитрозомочевина, 5-фторурацил, митомицин С, блеомицин, доксорубин, дакарбазин, таксол, фрагиллин, Мегламин GLA, валрубицин, кармустин и полифепросан, MMI270, BAY 12-9566, ингибитор RAS-фарнезилтрансферазы, ингибитор фарнезилтрансферазы, MMP, MTA/LY231514, LY264618/Лометрексол, Гламолек, CI-994, TNP-470, Гикам-

тин/Топотекан, РКС412, Валсподар/PSC833, Новантрон/Митроксантрон, Метарет/Сурамин, Батимастат, E7070, BCH-4556, CS-682, 9-AC, AG3340, AG3433, Инцел/VX-710, VX-853, ZD0101, ISI641, ODN 698, TA 2516/Мармистат, BB2516/Мармистат, CDP 845, D2163, PD183805, DX8951f, Лемонал DP2202, FK 317, Пицибанил/OK-432, AD 32/Валрубицин, Метастрон/производное стронция, Темодал/Темозоломид, Эвацет/липосомальный доксорубицин, Ютаксан/Паклитаксел, Таксол/Паклитаксел, Кселод/Капецитабин, Фуртулон/Доксифлуридин, Циклопакс/оральный паклитаксел, Оральный Таксоид, SPU-077/Цисплатин, HMR 1275/Флавопиридол, CP-358(774)/EGFR, CP-609(754)/ингибитор онкогена RAS, BMS-182751/оральную платину, UFT(Тегафур/Урацил), Эргамизол/Левамизол, Енилурацил/776C85/5FU-энхансер, Кампто/Левамизол, Камптозар/Иринотекан, Томудекс/Ралтитрексед, Лейстатин/Кладрибин, Паксекс/Паклитаксел, Доксил/липосомальный доксорубицин, Келикс/липосомальный доксорубицин, Флудара/Флударабин, Фармарубицин/Эпирубицин, ДепоЦит, ZD1839, LU 79553/Бис-Нафталимид, LU 103793/Доластин, Келикс/липосомальный доксорубицин, Гемзар/Гемцитабин, ZD 0473/Анормед, YM 116, семена лодина, ингибиторы CDK4 и CDK2, ингибиторы PARP, 04809/Дексифосфамид, Ифес/Меснекс/Ифосфамид, Вумон/Тенипозид, Параплатин/Карбоплатин, Платинол/цисплатин, Вепезид/Этопозид, ZD 9331, Таксофер/Доцетаксел, пролекарство гуанина арабинозид, Аналог Таксана, нитрозомочевина, алкилирующие агенты, такие как мелфелан и циклофосфамид, Аминоглутетимид, Аспарагиназу, Бусульфан, Карбоплатин, Хлоромбуцил, Цитарабин HCl, Дактиномицин, Даунорубицин HCl, Эстрамустин фосфат натрия, Этопозид (VP16-213), Флоксуридин, Фторурацил (5-FU), Флутамид, Гидроксимочевину (гидроксикарбамид), Ифосфамид, Интерферон Альфа-2а, Альфа-2b, Лейпролида ацетат (аналог фактора высвобождения LHRH), Ломустин (CCNU), Мехлорэтамин HCl (азотный аналог горчичного газа), Меркаптопурин, Месну, Митотан, Митоксантрон HCl, Октреотид, Пликамицин, Прокарбазин HCl, Стрептозоцин, Тамоксифена цитрат, Тиогуанин, Тиотепу, Винбластин сульфат, Амсакрин (m-AMSA), Азациитидин, Эритропозтин, Гексаметилмеламин (HMM), Интерлейкин 2, Митогуазон (метил-GAG; метилглиоксаль-бис-гуанилгидразон; MGBG), Пентостатин (2'-дезоксикоформицин), Семустин (метил-CCNU), Тенипозид (VM-26) или Виндезина сульфат.

25. Способ по п.22, где противораковое лекарственное средство представляет собой иммунотерапевтическое средство.

26. Способ по п.25, где иммунотерапевтическое средство представляет собой Ритуксан, Рибутаксин, Герцептин, Квадрамет, Панорекс, IDEC-Y2B8, BEC2, C225, Онколим, SMART M195, ATRAGEN, Оварекс, Бексар, LDP-03, иор t6, MDX-210, MDX-11, MDX-22, OV103, 3622W94, анти-VEGF, Зенапакс, MDX-220, MDX-447, MELIMMUNE-2, MELIMMUNE-1, CEACIDE, Претаргет, NovoMAb-G2, TNT, Gliomab-H, GNI-250, EMD-72000, ЛимфоЦид, CMA 676, Монофарм-С, 4B5, иор egf.r3, иор c5, BABS, анти-FLK-2, MDX-260, ANA Ab, SMART 1D10 Ab, SMART ABL 364 Ab или ImmuRAIT-CEA.

27. Способ по п.22, где противораковое лекарственное средство представляет собой противораковую вакцину.

28. Способ по п.27, где противораковая вакцина представляет собой EGF, антиидиотипические противораковые вакцины, антиген Gr75, GМК-вакцину против меланомы, конъюгированную с ганглиозидом вакцину MGV, Her2/neu, Оварекс, M-Vax, O-Vax, L-Vax, тератоп STn-KHL, BLP25 (MUC-1), липосомальную идиотипическую вакцину, Мелацин, вакцины с пептидными антигенами, токсин/антигенные вакцины, вакцину на основе MVA, PACIS, BCG-вакцину, TA-HPV, TA-CIN, DISC-вирус или Immu-Cyst/TheraCys.

29. Способ по п.15, где субъекту проводят более чем одну противораковую терапию.

30. Способ индукции экспрессии интерферона I типа (IFN), предусматривающий контактирование клетки, способной экспрессировать IFN I типа, с иммуностимулирующей нуклеиновой кислотой по любому из пп.1-11 в количестве, эффективном для индукции экспрессии IFN I типа.

31. Способ по п.30, где IFN I типа представляет собой интерферон альфа (IFN- α).

32. Способ индукции экспрессии интерферона гамма (IFN- γ), предусматривающий контактирование клетки, способной экспрессировать IFN- γ , с иммуностимулирующей нуклеиновой кислотой по любому из пп.1-11 в количестве, эффективном для индукции экспрессии IFN- γ .

33. Способ активации природной клетки-киллера (NK), предусматривающий контактирование NK-клетки с иммуностимулирующей нуклеиновой кислотой по любому из пп.1-11 в количестве, эффективном для активации NK-клетки.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110>	Coley Pharmaceutical GmbH Coley Pharmaceutical Group, Inc.	
<120>	АНАЛОГИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ С-КЛАССА С УЛУЧШЕННОЙ ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩЕЙ ЭФФЕКТИВНОСТЬЮ	
<130>	C1041.70034W000	
<150>	US 60/516,913	
<151>	2003-10-30	
<160>	69	
<170>	Патент версии 3.2	
<210>	1	
<211>	12	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Синтетический олигонуклеотид	
<400>	1 caatatttat tg	12
<210>	2	
<211>	11	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Синтетический олигонуклеотид	
<400>	2 ccgttttggtg g	11
<210>	3	
<211>	13	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Синтетический олигонуклеотид	
<400>	3 cggcgccgtg ccg	13
<210>	4	
<211>	14	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Синтетический олигонуклеотид	
<400>	4 cggcgccgtt gccg	14

<210> 5
 <211> 12
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический олигонуклеотид

<220>
 <221> Модифицированное основание
 <222> (6)..(7)
 <223> Абазический нуклеотид

<220>
 <221> Разнообразный признак
 <222> (6)..(7)
 <223> n представляет собой a, c, g или t

<400> 5
 cggcgnncgc cg

12

<210> 6
 <211> 13
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический олигонуклеотид

<220>
 <221> Модифицированное основание
 <222> (6)..(8)
 <223> Абазический нуклеотид

<220>
 <221> Разнообразный признак
 <222> (6)..(8)
 <223> n представляет собой a, c, g или t

<400> 6
 cggcgnntg ccg

13

<210> 7
 <211> 14
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический олигонуклеотид

<220>
 <221> Модифицированное основание
 <222> (7)..(8)
 <223> Абазический нуклеотид

<220>
 <221> Разнообразный признак
 <222> (7)..(8)

<223>	n представляет собой a, c, g или t	
<400>	7	
	cggcggnncc gccg	14
<210>	8	
<211>	14	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Синтетический олигонуклеотид	
<400>	8	
	cggcgtcgcc gccg	14
<210>	9	
<211>	13	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Синтетический олигонуклеотид	
<400>	9	
	cggcgtcgtg ccg	13
<210>	10	
<211>	15	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Синтетический олигонуклеотид	
<400>	10	
	cgtcgacggg acggg	15
<210>	11	
<211>	15	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Синтетический олигонуклеотид	
<400>	11	
	cgtcgacgtg acggg	15
<210>	12	
<211>	15	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Синтетический олигонуклеотид	
<400>	12	
	gagagttggg ctctc	15

<210>	13	
<211>	12	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Синтетический олигонуклеотид	
<400>	13	
	ggcgcgctgc cg	12
<210>	14	
<211>	11	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Синтетический олигонуклеотид	
<400>	14	
	gtcgaggagg t	11
<210>	15	
<211>	12	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Синтетический олигонуклеотид	
<220>		
<221>	Модифицированное основание	
<222>	(6)..(7)	
<223>	Абазический нуклеотид	
<220>		
<221>	Разнообразный признак	
<222>	(6)..(7)	
<223>	n представляет собой a, c, g или t	
<400>	15	
	taatanntat ta	12
<210>	16	
<211>	12	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Синтетический олигонуклеотид	
<400>	16	
	taatatccat ta	12
<210>	17	
<211>	12	
<212>	ДНК	

<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Синтетический олигонуклеотид	
<400>	17	
	taatatattat ta	12
<210>	18	
<211>	20	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Синтетический олигонуклеотид	
<400>	18	
	tccaggactt ctctcagggtt	20
<210>	19	
<211>	10	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Синтетический олигонуклеотид	
<400>	19	
	tcgacgtcga	10
<210>	20	
<211>	21	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Синтетический олигонуклеотид	
<400>	20	
	tcgacgtcga ccgttttgtg g	21
<210>	21	
<211>	19	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Синтетический олигонуклеотид	
<400>	21	
	tcgacgtcga cgggacggg	19
<210>	22	
<211>	19	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Синтетический олигонуклеотид	

<400> 22 tcgacgtcga cgtgacggg	19
<210> 23 <211> 23 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> Синтетический олигонуклеотид	
<400> 23 tcgacgtcga gagttgggct ctc	23
<210> 24 <211> 18 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> Синтетический олигонуклеотид	
<400> 24 tcgacgtcga gcgaagct	18
<210> 25 <211> 16 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> Синтетический олигонуклеотид	
<400> 25 tcgacgtcga ggaggt	16
<210> 26 <211> 10 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> Синтетический олигонуклеотид	
<400> 26 tcgcgacgtt	10
<210> 27 <211> 23 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> Синтетический олигонуклеотид	
<400> 27 tcgcgacgtt cggcgcgctg ccg	23

<210> 28
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтетический олигонуклеотид

 <400> 28
 tcgacgacgtt cggcgcgtcg ccg 23

<210> 29
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтетический олигонуклеотид

 <400> 29
 tcgacgacgtt cggcgcgtcg ccg 23

<210> 30
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтетический олигонуклеотид

 <400> 30
 tcgcgtcggtt cggcgcgtcg ccg 23

<210> 31
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтетический олигонуклеотид

 <400> 31
 tcgcgtcggtt cggcgcgtcg ccg 23

<210> 32
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтетический олигонуклеотид

 <400> 32
 tcgcgtcggtt cggcgcgtcg ccg 23

<210> 33
 <211> 23
 <212> ДНК

<213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Синтетический олигонуклеотид
 <400> 33
 tcggcgccgt gccgtcgtcg ttt 23

<210> 34
 <211> 10
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Синтетический олигонуклеотид
 <400> 34
 tcgtcgacga 10

<210> 35
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Синтетический олигонуклеотид
 <400> 35
 tcgtcgcccg gcgacgccgt gccg 24

<210> 36
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Синтетический олигонуклеотид
 <400> 36
 tcgtcgcttt gcgacgccgt gccg 24

<210> 37
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Синтетический олигонуклеотид

<220>
 <221> Модифицированное основание
 <222> (9)..(10)
 <223> Абазический нуклеотид

<220>
 <221> Разнообразный признак
 <222> (9)..(10)
 <223> n представляет собой а, с, г или т

<400> 37	
tcgtcgttnn acggcgccgt gccg	24
<210> 38	
<211> 24	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> Синтетический олигонуклеотид	
<220>	
<221> Модифицированное основание	
<222> (9)..(10)	
<223> Абазический нуклеотид	
<220>	
<221> Разнообразный признак	
<222> (9)..(10)	
<223> n представляет собой a, c, g или t	
<220>	
<221> Модифицированное основание	
<222> (17)..(19)	
<223> Абазический нуклеотид	
<220>	
<221> Разнообразный признак	
<222> (17)..(19)	
<223> n представляет собой a, c, g или t	
<400> 38	
tcgtcgttnn acggcgnnnt gccg	24
<210> 39	
<211> 23	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> Синтетический олигонуклеотид	
<220>	
<221> Модифицированное основание	
<222> (9)..(10)	
<223> Абазический нуклеотид	
<220>	
<221> Разнообразный признак	
<222> (9)..(10)	
<223> n представляет собой a, c, g или t	
<400> 39	
tcgtcgttnn cggcgggcg ccg	23
<210> 40	
<211> 10	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	

<220>		
<223>	Синтетический олигонуклеотид	
<400>	40	
	tcgtcgtttt	10
<210>	41	
<211>	11	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Синтетический олигонуклеотид	
<400>	41	
	tcgtcgtttt a	11
<210>	42	
<211>	24	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Синтетический олигонуклеотид	
<400>	42	
	tcgtcgtttt acgacgccgt gccg	24
<210>	43	
<211>	24	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Синтетический олигонуклеотид	
<400>	43	
	tcgtcgtttt acggcgccgt gccg	24
<210>	44	
<211>	25	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Синтетический олигонуклеотид	
<400>	44	
	tcgtcgtttt acggcgccgt tgccg	25
<210>	45	
<211>	24	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Синтетический олигонуклеотид	

<220>
 <221> Модифицированное основание
 <222> (17)..(19)
 <223> Абазический нуклеотид

 <220>
 <221> Разнообразный признак
 <222> (17)..(19)
 <223> n представляет собой a, c, g или t

 <400> 45
 tcgtcgtttt acggcgnnnt gccg 24

 <210> 46
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтетический олигонуклеотид

 <400> 46
 tcgtcgtttt acggcgtcgc g 21

 <210> 47
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтетический олигонуклеотид

 <400> 47
 tcgtcgtttt acggcgtcgc gccg 24

 <210> 48
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтетический олигонуклеотид

 <400> 48
 tcgtcgtttt acggcgtcgt gccg 24

 <210> 49
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтетический олигонуклеотид

 <400> 49
 tcgtcgtttt acggcgtttt gccg 24

 <210> 50

<211> 22
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтетический олигонуклеотид

 <400> 50
 tcgtcgtttt caatatttat tg 22

 <210> 51
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтетический олигонуклеотид

 <400> 51
 tcgtcgtttt cggcgcgcgc cg 22

 <210> 52
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтетический олигонуклеотид

 <220>
 <221> Модифицированное основание
 <222> (16)..(17)
 <223> Абазический нуклеотид

 <220>
 <221> Разнообразный признак
 <222> (16)..(17)
 <223> n представляет собой а, с, г или т

 <400> 52
 tcgtcgtttt cggcgnnccg cg 22

 <210> 53
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтетический олигонуклеотид

 <400> 53
 tcgtcgtttt cggcggccgc cg 22

 <210> 54
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>

<223> Синтетический олигонуклеотид

 <220>
 <221> Модифицированное основание
 <222> (17)..(18)
 <223> Абазический нуклеотид

 <220>
 <221> Разнообразный признак
 <222> (17)..(18)
 <223> n представляет собой a, c, g или t

 <400> 54
 tcgtcgtttt cggcggnncc gccg 24

 <210> 55
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтетический олигонуклеотид

 <400> 55
 tcgtcgtttt cggcgtcgcc gccg 24

 <210> 56
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтетический олигонуклеотид

 <400> 56
 tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt 24

 <210> 57
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтетический олигонуклеотид

 <220>
 <221> Модифицированное основание
 <222> (16)..(17)
 <223> Абазический нуклеотид

 <220>
 <221> Разнообразный признак
 <222> (16)..(17)
 <223> n представляет собой a, c, g или t

 <400> 57
 tcgtcgtttt taatanntat ta 22

<210> 58
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтетический олигонуклеотид

 <400> 58
 tcgtcgtttt taatatccat ta 22

<210> 59
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтетический олигонуклеотид

 <400> 59
 tcgtcgtttt taatatattat ta 22

<210> 60
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтетический олигонуклеотид

 <400> 60
 tgctgctttt gtgcttttgt gctt 24

<210> 61
 <211> 17
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтетический олигонуклеотид

 <400> 61
 tcgacgtcga cgtgacg 17

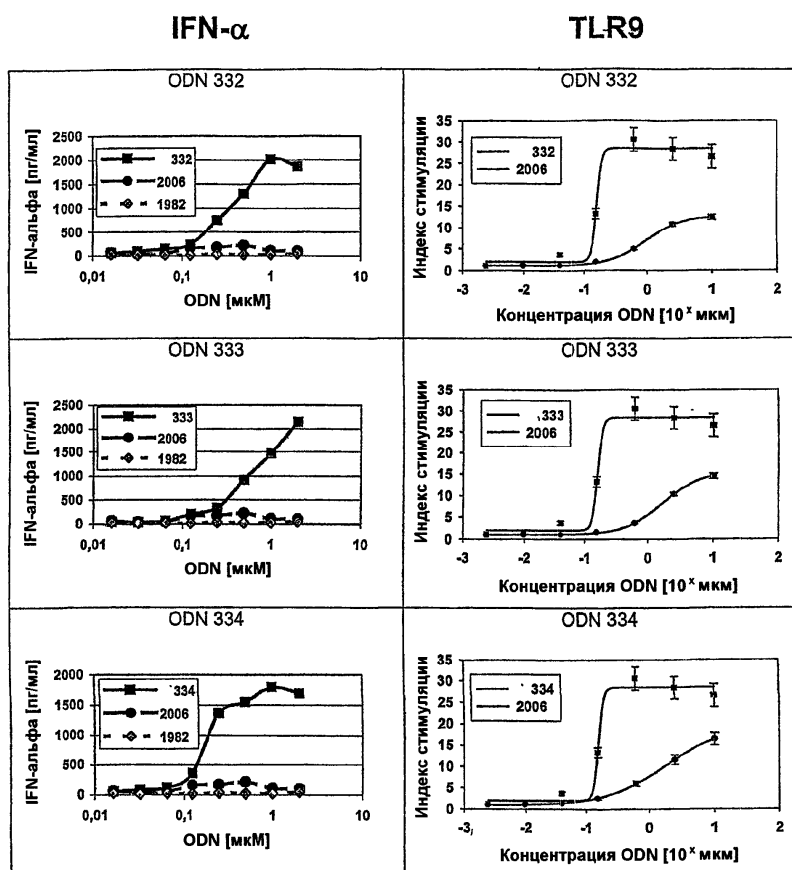
<210> 62
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтетический олигонуклеотид

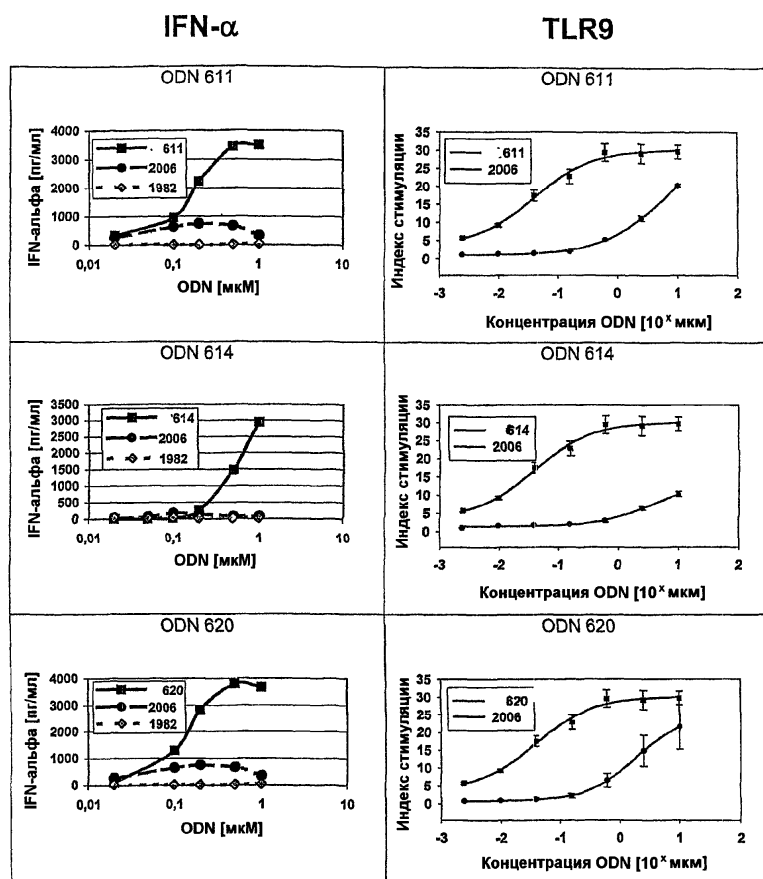
 <400> 62
 tcgacgtcga cgtgacgtg 19

<210> 63
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

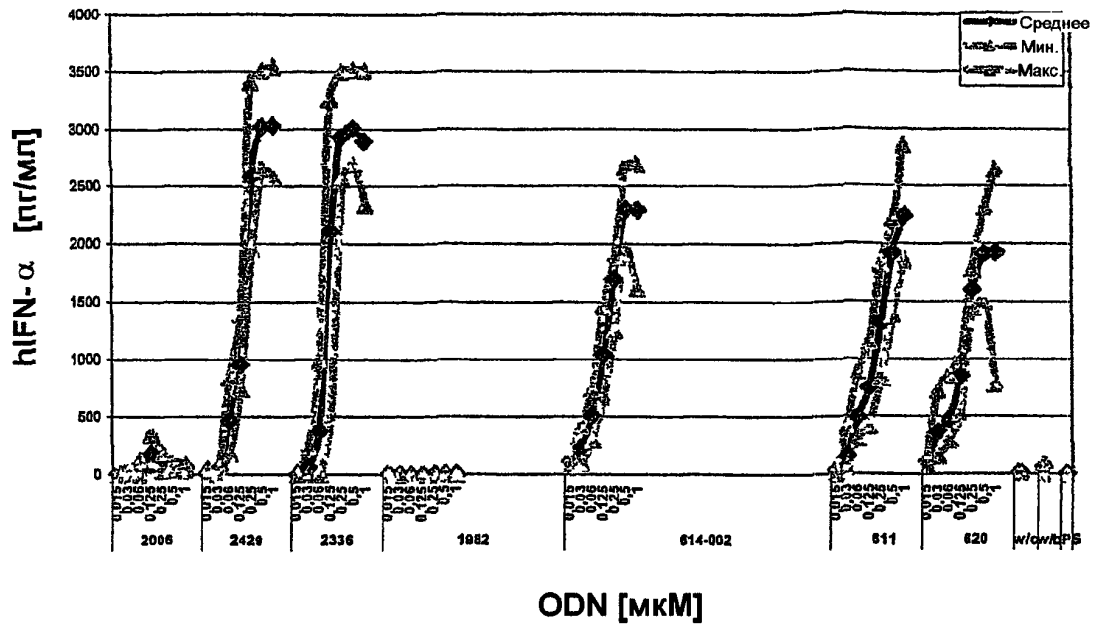
<220>		
<223>	Синтетический олигонуклеотид	
<400>	63	
	tcgacgtcga cgtgacgtt	19
<210>	64	
<211>	24	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Синтетический олигонуклеотид	
<400>	64	
	tcgtcgacga tcggcgccgt gccg	24
<210>	65	
<211>	24	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Синтетический олигонуклеотид	
<400>	65	
	tcgtcgacgt tcggcgccgt gccg	24
<210>	66	
<211>	21	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Синтетический олигонуклеотид	
<400>	66	
	tcgtcgtagc gcgccgtgcc g	21
<210>	67	
<211>	22	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Синтетический олигонуклеотид	
<400>	67	
	tcgtcgttac ggcgccgtgc cg	22
<210>	68	
<211>	24	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Синтетический олигонуклеотид	
<400>	68	
	tcgtcgttta cggcgccgtg ccgt	24
<210>	69	
<211>	10	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Синтетический олигонуклеотид	
<400>	69	
	tcgcgtcgtt	10



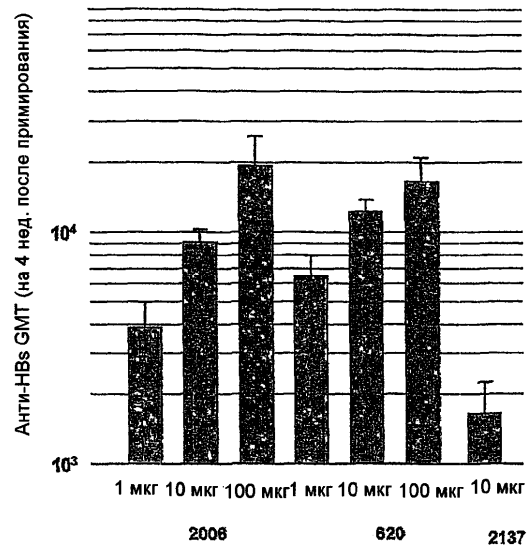
Фиг. 1



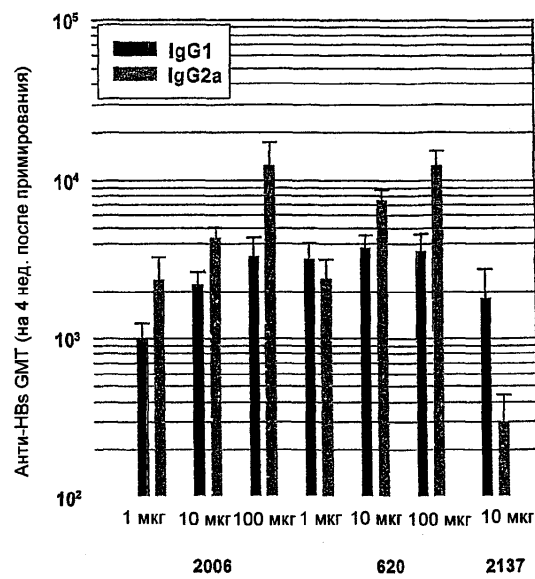
Фиг. 2



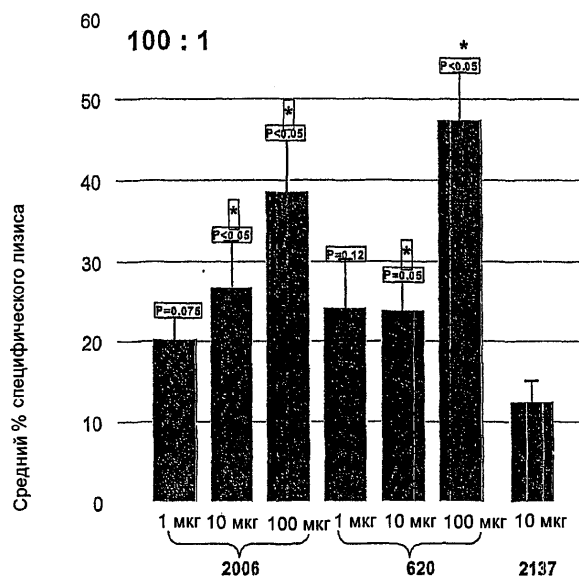
Фиг. 3



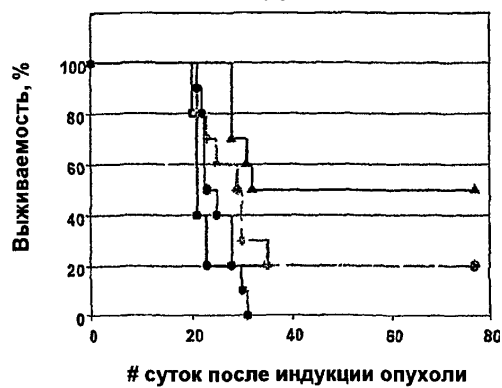
Фиг. 4



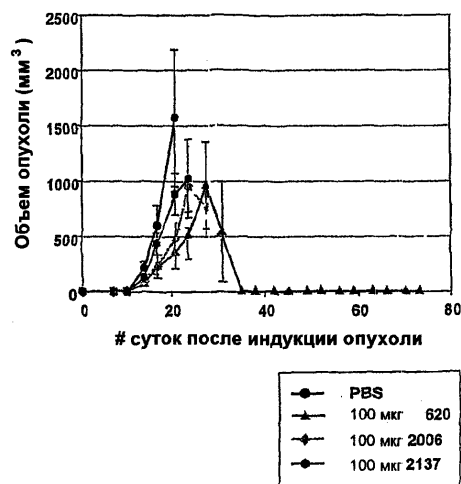
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7А



Фиг. 7В

