



УКРАЇНА

(19) UA (11) 88255 (13) C2

(51) МПК (2009)

C07H 21/04 (2006.01)

C07H 21/02 (2006.01)

A61K 31/70

A61P 37/04 (2009.01)

A61P 11/06 (2009.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ІМУНОСТИМУЛЮЮЧИЙ ОЛІГОНУКЛЕОТИД

1

(21) a200500665
(22) 19.08.2003
(24) 12.10.2009
(86) PCT/US2003/025935, 19.08.2003
(31) 60/404,479
(32) 19.08.2002
(33) US
(31) 60/404,820
(32) 19.08.2002
(33) US
(31) 60/429,701
(32) 27.11.2002
(33) US
(31) 60/447,377
(32) 14.02.2003
(33) US
(46) 12.10.2009, Бюл.№ 19, 2009 р.
(72) КРИГ АРТУР М., US, САМУЛОВИЦ УЛЬРІКЕ, DE, ФОЛЬМЕР ЙОРГ, DE, УЛЬМАН ЄВГЕН, DE, ЮРК МАРІОН, DE, ЛІПФОРД ГРЕЙСОН, DE, РАН-КІН РОБЕРТ, NL
(73) КОЛІ ФАРМАС'ЮТИКАЛ ГРУП, ІНК., US, КОЛІ ФАРМАС'ЮТИКАЛ ГМБХ, DE
(56) US A 5663153, 02.09.1997.
US B1 6214806, 10.04.2001.
WO A 01/22990, 05.04.2001.
WO A 01/22972, 05.04.2001.
WO A 98/18810, 07.05.1998.
Krug A. et al.: "Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells", Eur. J. Immunol. 2001 Jul; 31(7):2154-63 (ABSTRACT).
WO A2 2004039829, 13.05.2004.
WO A2 2004087203, 14.10.2004.
WO A2 03015711, 27.02.2003.
Zhao et al.: "Site of chemical modifications in the CpG containing phosphorothiate oligodeoxynucleotide modulates its immunostimulatory activity. Bioor. Med.Chem. Lett., 20 December 1999, Vol. 9, No.24, pages 3453-3458.
HARTMANN G ET AL: "Delineation of a CpG phosphorothioate oligodeoxynucleotide for activating promate immune responses in vitro and in vivo"

2

JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 164, no. 3, 1 February 2000 (2000-02-01), pages 1617-1624, XP002267233 ISSN: 0022-1767.

(57) 1. Імуностимулюючий олігонуклеотид, що містить щонайменше два внутрішніх цитозингуанінових динуклеотиди (CG) та химерний скелет, у якому щонайменше два внутрішніх динуклеотиди CG мають фосфодієфірний чи фосфодієфіроподібний міжнуклеотидний зв'язок і розділені щонайменше одним стабілізованим міжнуклеотидним зв'язком, причому, необов'язково, кожен додатковий внутрішній динуклеотид CG має фосфодієфірний, фосфодієфіроподібний чи стабілізований міжнуклеотидний зв'язок і всі інші міжнуклеотидні зв'язки є стабілізованими.

2. Олігонуклеотид за п. 1, який **відрізняється** тим, що імуностимулююча нуклеїнова кислота включає множини внутрішніх динуклеотидів CG, які мають фосфодієфірний чи фосфодієфіроподібний міжнуклеотидний зв'язок.

3. Олігонуклеотид за п. 2, який **відрізняється** тим, що кожен внутрішній динуклеотид CG має фосфодієфірний чи фосфодієфіроподібний міжнуклеотидний зв'язок.

4. Олігонуклеотид за будь-яким з пп. 1-3, який **відрізняється** тим, що молекула імуностимулюючої нуклеїнової кислоти є молекулою імуностимулюючої нуклеїнової кислоти В-класу.

5. Олігонуклеотид за будь-яким з пп. 1-3, який **відрізняється** тим, що молекула імуностимулюючої нуклеїнової кислоти є молекулою імуностимулюючої нуклеїнової кислоти С-класу, що здатна індукувати IFN-α.

6. Олігонуклеотид за будь-яким з пп. 1-3, який **відрізняється** тим, що молекула імуностимулюючої нуклеїнової кислоти має довжину 4-100 нуклеотидів.

7. Олігонуклеотид за будь-яким з пп. 1-3, який **відрізняється** тим, що молекула імуностимулюючої нуклеїнової кислоти не є антисмисловим олігонуклеотидом, олігонуклеотидом, що утворює потрійну спіраль, чи рибозимом.

(13) C2

(11) 88255

(19) UA

8. Імуностимулюючий олігонуклеотид, який включає

N_1 -C_G-N₂-C_G-N₃,

де N_1 та N_3 , кожен незалежно, позначають послідовність нуклеїнової кислоти довжиною 1-20 нуклеотидів, у якій символ _ позначає внутрішній фосфодієфірний чи фосфодієфіроподібний міжнуклеотидний зв'язок, N_2 позначає незалежно послідовність нуклеїнової кислоти довжиною 0-20 нуклеотидів, і G-N₂-C включає 1 чи 2 стабілізовані зв'язки.

9. Імуностимулюючий олігонуклеотид, який включає

N_1 -C_G-N₂-C_G-N₃,

де N_1 та N_3 , кожен незалежно, позначають послідовність нуклеїнової кислоти довжиною 1-20 нуклеотидів, у якій символ _ позначає внутрішній фосфодієфірний чи фосфодієфіроподібний міжнуклеотидний зв'язок, N_2 позначає незалежно послідовність нуклеїнової кислоти довжиною 4-20 нуклеотидів, і G-N₂-C включає щонайменше 5 стабілізованих зв'язків.

10. Олігонуклеотид за будь-яким з пп. 1-9, який **відрізняється** тим, що олігонуклеотид додатково включає ад'ювант, цитокін або антиген.

11. Олігонуклеотид за будь-яким з пп. 1-9, який **відрізняється** тим, що стабілізовані міжнуклеотидні зв'язки є фосфоротіоатами.

12. Олігонуклеотид, за п. 1, який **відрізняється** тим, що олігонуклеотид має послідовність, що включає:

5' T*C*G*(T*/A*)TN₃CGTTTTN₄CGN₅*T*T3' (SEQ ID NO: 301),

де N_3 позначає 0-4 нуклеотиди, N_4 позначає 1-5 нуклеотидів, необов'язково 1-2 нуклеотиди, N_5 позначає 0-7 нуклеотидів, символ * позначає присутність стабілізованого міжнуклеотидного зв'язку і, необов'язково, олігонуклеотид має довжину 16-24 нуклеотидів.

13. Олігонуклеотид за п. 12, який **відрізняється** тим, що стабілізований міжнуклеотидний зв'язок є фосфоротіоатним зв'язком.

14. Імуностимулюючий олігонуклеотид, який включає:

5' T*CGCGN₈CGCGC*GN₉3' (SEQ ID NO: 315),

де N_8 має довжину від 4 до 10 нуклеотидів і включає щонайменше 1 C_G-мотив і один фосфоротіоатний міжнуклеотидний зв'язок, і, необов'язково, щонайменше 2 чи 3 CG-мотиви, причому N_9 має довжину від 0 до 3 нуклеотидів, символ * позначає присутність стабілізованого міжнуклеотидного зв'язку, символ _ позначає присутність фосфодієфірного міжнуклеотидного зв'язку і олігонуклеотид має довжину 15-40 нуклеотидів.

15. Олігонуклеотид за п. 14, який **відрізняється** тим, що N_8 позначає PuCGPyPyCGG, PuCGPyPyCGCG або ACGTTCCG.

16. Олігонуклеотид за п. 14, який **відрізняється** тим, що N_9 включає щонайменше один CG-мотив.

17. Олігонуклеотид за п. 14, який **відрізняється** тим, що N_9 позначає CCG.

18. Олігонуклеотид за п. 14, який **відрізняється** тим, що олігонуклеотид має таку структуру:

5'

T*C_G*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*G*G3' (SEQ ID NO: 316) або

5'

T*C*G*C*G*A*C_G*T*T*C*G*C*G*C_G*C*G*C*G3' (SEQ ID NO: 317).

19. Імуностимулюючий олігонуклеотид, який включає:

5' T*C_G(N₆C_G N₇)₂₋₃T*C_G*T*T3' (SEQ ID NOs: 311-312)

де N_6 та N_7 незалежно мають довжину від 1 до 5 нуклеотидів і, необов'язково, N_6 позначає один нуклеотид, краще Т чи А, необов'язково, N_7 позначає п'ять нуклеотидів, краще п'ять піримідинів чи TTTTG, символ * позначає присутність стабілізованого міжнуклеотидного зв'язку, символ _ позначає присутність фосфодієфірного міжнуклеотидного зв'язку і олігонуклеотид має довжину 16-40 нуклеотидів.

20. Імуностимулюючий олігонуклеотид, який включає таку структуру:

5'

T*C_G*T*C_G*T*T*T*T*G*A*C_G*T*T*T*T*G*T*C_G*T*T3' (SEQ ID NO: 313).

21. Імуностимулюючий олігонуклеотид, який включає:

5' T*T*GX₁X₂TGX₃X₄T*T*T*N₁₀T*T*T*T*T*T3' (SEQ ID NO: 318),

де N_{10} має довжину від 4 до 8 нуклеотидів і включає щонайменше 1 C_G-мотив, необов'язково включає щонайменше 2 чи 3 CG-мотиви, причому X_1 , X_2 , X_3 та X_4 позначають незалежно С чи G, символ * позначає присутність стабілізованого міжнуклеотидного зв'язку, символ _ позначає присутність фосфодієфірного міжнуклеотидного зв'язку і олігонуклеотид має довжину 24-40 нуклеотидів.

22. Олігонуклеотид за п. 21, який **відрізняється** тим, що олігонуклеотид має таку структуру:

5'

T*T*G*C_G*T*G*C_G*T*T*T*G*A*C_G*T*T*T*T*T*T3' (SEQ ID NO: 319) або

5'

T*T*G*G_C*T*G*G_C*T*T*T*T*G*A*C_G*T*T*T*T*T*T3' (SEQ ID NO: 320).

23. Імуностимулюючий олігонуклеотид, який включає:

5'

T*C*G*C_G*A*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*G*G3' (SEQ ID NO: 321),

де символ * позначає присутність стабілізованого міжнуклеотидного зв'язку, символ _ позначає присутність фосфодієфірного міжнуклеотидного зв'язку і, необов'язково, олігонуклеотид має довжину 21-40 нуклеотидів.

24. Імуностимулюючий олігонуклеотид, який включає:

октамерну послідовність, що містить щонайменше один динуклеотид CG, який має фосфодієфірний чи фосфодієфіроподібний міжнуклеотидний зв'язок, та щонайменше 4 нуклеотиди Т, С позначає цитозин чи модифікований цитозин, G позначає гуанозин чи модифікований гуанозин і олігонуклеотид включає щонайменше один стабілізований міжнуклеотидний зв'язок.

25. Олігонуклеотид за п. 24, який **відрізняється** тим, що октамерна послідовність включає TTTT-мотив.

26. Олігонуклеотид за п. 24, який **відрізняється** тим, що октамерна послідовність включає два динуклеотиди CG.

27. Олігонуклеотид за п. 26, який **відрізняється** тим, що обидва динуклеотиди CG мають фосфодієфірний чи фосфодієфіроподібний міжнуклеотидний зв'язок.

28. Олігонуклеотид за п. 24, який **відрізняється** тим, що С позначає неметильований С.

29. Олігонуклеотид за п. 24, який **відрізняється** тим, що G позначає гуанозин.

30. Олігонуклеотид за п. 24, який **відрізняється** тим, що октамерну послідовність вибирають з групи, що складається з T*C_G*T*C_G*T*T, C_G*T*C_G*T*T*T, G*T*C_G*T*T*T*T, T*C_G*T*T*T*T*G, C_G*T*T*T*T*G*A, T*T*T*T*G*A*C_G, T*T*T*G*A*C_G*T, T*T*G*A*C_G*T*T, T*G*A*C_G*T*T*T, G*A*C_G*T*T*T*T, A*C_G*T*T*T*T*G, C_G*T*T*T*T*G*T, T*T*T*T*G*T*C_G, T*T*T*G*T*C_G*T, G*T*T*T*T*G*T*C та T*T*G*T*C_G*T*T, де символ * позначає присутність стабілізованого міжнуклеотидного зв'язку і символ _ позначає присутність фосфодієфірного міжнуклеотидного зв'язку.

31. Олігонуклеотид за п. 24, який **відрізняється** тим, що олігонуклеотид має довжину 8-40 нуклеотидів.

32. Олігонуклеотид за п. 24, який **відрізняється** тим, що фосфодієфіроподібний зв'язок є боранофосфонатом чи діастереомерно чистим Rp-фосфоротіоатом.

33. Олігонуклеотид за п. 24, який **відрізняється** тим, що стабілізовані міжнуклеотидні зв'язки вибирають з групи, що складається з фосфоротіоату, фосфородітіоату, метилфосфонату, метилфосфоротіоату та будь-якої їхньої комбінації.

34. Олігонуклеотид за п. 24, який **відрізняється** тим, що С позначає цитозин чи модифіковані цитозинові основи, вибрані з групи, що складається з 5-метилцитозину, 5-метилізоцитозину, 5-гідроксицитозину, 5-галогеноцитозину, урацилу, N4-етилцитозину, 5-фторурацилу та гідрогену.

35. Олігонуклеотид за п. 24, який **відрізняється** тим, що G позначає гуанін чи модифіковану гуанінову основу, вибрану з групи, що складається з 7-деазагуаніну, 7-деаза-7-заміщеного гуаніну (такого як 7-деаза-7-(C2-C6)-алкілгуанін), 7-деаза-8-заміщеного гуаніну, гіпоксантину, 2,6-діамінопурину, 2-амінопурину, пурину, 8-заміщеного гуаніну, такого як 8-гідроксигуанін, та 6-тіогуаніну, 2-амінопурину і гідрогену.

36. Олігонуклеотид за п. 24, який **відрізняється** тим, що олігонуклеотид має 3'-3' зв'язок з одним чи двома доступними 5'-кінцями.

37. Олігонуклеотид за п. 24, який **відрізняється** тим, що олігонуклеотид має два доступні 5'-кінці, кожен з яких є 5'TCG.

38. Олігонуклеотид за п. 24, який **відрізняється** тим, що олігонуклеотид позначає послідовність, вибрану з групи, що складається з CGTCGTTTTGACGTTTTGTCGTT (SEQ ID NO: 333), GTCGTTTTGACGTTTTGTCGTT (SEQ ID NO:

334), TCGTTTTGACGTTTTGTCGTT (SEQ ID NO: 335), CGTTTTGACGTTTTGTCGTT (SEQ ID NO: 336), GTTTTGACGTTTTGTCGTT (SEQ ID NO: 337), TTTTGACGTTTTGTCGTT (SEQ ID NO: 338), TTTGACGTTTTGTCGTT (SEQ ID NO: 339), TTGACGTTTTGTCGTT (SEQ ID NO: 340), TGACGTTTTGTCGTT (SEQ ID NO: 341), GACGTTTTGTCGTT (SEQ ID NO: 342), ACGTTTTGTCGTT (SEQ ID NO: 343), GTTTTGTCGTT (SEQ ID NO: 344), GTTTTGTCGTT (SEQ ID NO: 345), TTTTGTCGTT (SEQ ID NO: 346), TTTGTCGTT та TTGTCGTT.

39. Олігонуклеотид за п. 24, який **відрізняється** тим, що олігонуклеотид позначає послідовність, вибрану з групи, що складається з TCGTCGTTTTGACGTTTTGTCGT (SEQ ID NO: 347), TCGTCGTTTTGACGTTTTGTCG (SEQ ID NO: 348), TCGTCGTTTTGACGTTTTGTC (SEQ ID NO: 349), TCGTCGTTTTGACGTTTTGT (SEQ ID NO: 350), TCGTCGTTTTGACGTTTTG (SEQ ID NO: 351), TCGTCGTTTTGACGTTTT (SEQ ID NO: 352), TCGTCGTTTTGACGTTT (SEQ ID NO: 353), TCGTCGTTTTGACGTT (SEQ ID NO: 354), TCGTCGTTTTGACGT (SEQ ID NO: 355), TCGTCGTTTTGACG (SEQ ID NO: 356), TCGTCGTTTTGAC (SEQ ID NO: 357), TCGTCGTTTTGA (SEQ ID NO: 358), TCGTCGTTTTG (SEQ ID NO: 359), TCGTCGTTTT (SEQ ID NO: 360), TCGTCGTTT та TCGTCGTT.

40. Олігонуклеотид за п. 24, який **відрізняється** тим, що олігонуклеотид позначає послідовність, вибрану з групи, що складається з CGTCGTTTTGACGTTTTGTCGT (SEQ ID NO: 361), GTCGTTTTGACGTTTTGTCG (SEQ ID NO: 362), TCGTTTTGACGTTTTGTC (SEQ ID NO: 363), CGTTTTGACGTTTTGT (SEQ ID NO: 364), GTTTTGACGTTTTG (SEQ ID NO: 365), TTTTGACGTTTT (SEQ ID NO: 366), TTTGACGTTT (SEQ ID NO: 367) та TTGACGTT.

41. Олігонуклеотид, за п. 24, який **відрізняється** тим, що олігонуклеотид включає: 5' TCGTCGTTTTGACGTTTTGTCGTT3' (SEQ ID NO: 368).

42. Імуностимулюючий олігонуклеотид, який включає: T*C_G*T*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*G (SEQ ID NO: 369).

43. Імуностимулюючий олігонуклеотид, який включає: T*C_G*G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C*G*C*G (SEQ ID NO: 371).

44. Спосіб модулювання імунної відповіді, який включає введення суб'єкту олігонуклеотиду за будь-яким з пп. 1-43 у кількості, ефективній для модулювання імунної відповіді.

45. Спосіб за п. 44, який **відрізняється** тим, що олігонуклеотид вводять суб'єкту для лікування астми або алергії у суб'єкта.

46. Спосіб за п. 44, який **відрізняється** тим, що суб'єкт має рак, інфекційну хворобу, автоімунну хворобу або ремоделювання дихальних шляхів.

47. Спосіб за п. 44, який **відрізняється** тим, що додатково включає застосування терапевтичного протоколу, такого як хірургія, опромінювання або композиція лікарського засобу, до суб'єкта.

48. Спосіб за п. 44, який **відрізняється** тим, що олігонуклеотид входить до складу фармацевтичної композиції, необов'язково, входячи до складу фармацевтичної композиції з молекулою, яка забезпечує цільову доставку.

49. Спосіб за п. 44, який **відрізняється** тим, що олігонуклеотид вводять шляхом, вибраним з групи, що складається з перорального, назального, сублінгвального, внутрішньовенного, підшкірного, мукозального, респіраторного, прямої ін'єкції та дермального.

50. Спосіб за п. 44, який **відрізняється** тим, що олігонуклеотид вводять суб'єкту в кількості, ефективній для індукування експресії цитокінів, причо-

му цитокіни необов'язково включають IL-6, TNF α , IFN α , IFN γ та IP-10.

51. Спосіб за п. 44, який **відрізняється** тим, що олігонуклеотид вводять суб'єкту в кількості, ефективній для зсуву імунної відповіді у бік Th1-зміщеної відповіді від Th2-зміщеної відповіді.

52. Спосіб лікування астми, який включає введення суб'єкту олігонуклеотиду, що включає таку структуру:

5'
T*C_G*T*C_G*T*T*T*G*A*C_G*T*T*T*G*T*C_G
*T*T'3' (SEQ ID NO: 313) в кількості, ефективній для лікування астми.

Цей винахід стосується загалом імуностимулюючих нуклеїнових кислот, а також імуностимулюючих олігонуклеотидів зі зниженими ефектами ниркового запалення, їхніх композицій та способів використання імуностимулюючих нуклеїнових кислот.

Бактеріальна ДНК виявляє імуностимулюючу дію з активації В-клітин та природних клітин-убивць, але ДНК хребетних таких властивостей не має (Tokunaga, T., et al., 1988. Jpn. J. Cancer Res. 79: 682-686; Tokunaga, T., et al., 1984, JNCI 72: 955-962; Messina, J.P., et al., 1991, J. Immunol. 147:1759-1764; та огляд Krieg, 1998, у книзі: Applied Oligonucleotide Technology, C.A. Stein and A.M. Krieg, (Eds.), John Wiley and Sons, Inc., New York, NY, pp.431-448). Зараз зрозуміло, що ця імуностимулююча дія бактеріальної ДНК є результатом присутності неметіллованих CpG-динуклеотидів у певному контексті послідовностей основ (CpG-мотиви), які є поширеними у бактеріальній ДНК, але метиловані та слабше представлені у ДНК хребетних (Krieg et al., 1995 Nature 374: 546-549; Krieg, 1999 Biochim. Biophys. Acta 93321: 1-10). Імуностимулюючі ефекти бактеріальної ДНК можуть бути імітовані за допомогою синтетичних олігодезоксинуклеотидів (ОДН), які містять ці CpG-мотиви. Такий CpG-ОДН має високу стимулюючу дію на людські та мишачі лейкоцити, індукування проліферації В-клітин; секрецію цитокіну та імуноглобуліну; літичну активність природних клітин-убивць (NK) та секрецію IFN- γ ; та активацію експресії дендритними клітинами (DCs) й іншими антигенпрезентуючими клітинами ко-стимулюючих молекул та секреції цитокінів, особливо Th1-подібних цитокінів, які відіграють важливу роль у промотуванні розвитку Th1-подібних Т-клітинних відповідей. Ці імуностимулюючі ефекти нативного фосфодієфірного скелета CpG ОДН є високо CpG-специфічними в тому розумінні, що ефекти різко зменшуються, якщо CpG-мотив буде метилований, змінений на GpC, або видалений чи змінений в інший спосіб (Krieg et al., 1995 Nature 374: 546-549; Hartmann et al., 1999 Proc. Natl. Acad. Sci USA 96: 9305-10).

Раніше при проведенні досліджень вважалося, що імуностимулюючий CpG-мотив відповідає фо-

рмулі пурин-пурин-CpG-піримідин-піримідин (Krieg et al., 1995 Nature 374: 546-549; Pisetsky, 1996 J. Immunol. 156: 421-423; Hacker et al., 1998 EMBO J. 17: 6230-6240; Lipford et al., 1998 Trends in Microbiol. 6: 496-500). Однак зараз відомо, що мишачі лімфоцити досить добре реагують на фосфодієфірні CpG-мотиви, які не відповідають цій "формулі" (Yi et al., 1998 J. Immunol. 160:5898-5906), і це саме стосується В-клітин та дендритних клітин людини (Hartmann et al., 1999 Proc. Natl. Acad. Sci USA 96: 9305-10; Liang, 1996 J. Clin. Invest. 98: 1119-1129).

Нещодавно було описано кілька різних класів CpG-нуклеїнових кислот. Один клас є потужним активатором В-клітин, але відносно слабким активатором IFN- α та NK-клітин; цей клас був названий В-класом. CpG-нуклеїнові кислоти В-класу типово є повністю стабілізованими і включають неметилований CpG-динуклеотид у складі певних кращих послідовностей основ. Дивіться, наприклад, патенти США №№6194388; 6207646; 6214806; 6218371; 6239116 та 6339068. Інший клас CpG-нуклеїнових кислот активує В-клітини і NK-клітини та індукує IFN- α ; цей клас був названий С-класом. CpG-нуклеїнові кислоти С-класу, так само, як і попередні, є типово повністю стабілізованими, включають послідовність типу В-класу і GC-збагачений паліндром чи майже повний паліндром. Цей клас був описаний у попередній патентній заявці США №60/313273, поданій 17 серпня 2001р., експертиза якої проводиться паралельно даній заявці, та US10/224523, поданій 19 серпня 2002р., і спорідненій патентній заявці PCT/US02/26468, опублікованій як міжнародна публікація №WO 03/015711.

Було несподівано знайдено, що імуностимулюючі властивості В-класу та С-класу CpG-нуклеїнових кислот та інших стабілізованих імуностимулюючих нуклеїнових кислот можуть бути збережені чи навіть посилені шляхом селективного включення одного чи більше нестабілізованих зв'язків між певними нуклеотидами. Нестабілізовані зв'язки є краще природними зв'язками, тобто фосфодієфірними зв'язками чи фосфодієфіроподібними зв'язками. Нестабілізований зв'язок типово, але не обов'язково, буде відносно чутливим до нуклеазного гідролізу. Імуностимулюючі

нуклеїнові кислоти за цим винаходом включають щонайменше один нестабілізований зв'язок, розташований між 5'-піримідином (Y) та прилеглим 3'-пурином (Z), краще, гуанін (G), причому як 5'-Y, так і 3'-Z є внутрішніми нуклеотидами.

Аналогічно повністю стабілізованим імуностимулюючим нуклеїновим кислотам, імуностимулюючі нуклеїнові кислоти за цим винаходом є корисними для індукування Th1-подібної імунної відповіді. Відповідно до цього, імуностимулюючі нуклеїнові кислоти за цим винаходом є корисними як ад'юванти при вакцинації, і вони є придатними для лікування хвороб, включаючи рак, Інфекційні хвороби, алергію та астму. Вони вважаються особливо корисними при будь-яких станах, що потребують тривалого чи Повторного введення імуностимулюючих нуклеїнових кислот у будь-яких цілях.

Крім придатності для використання в будь-яких цілях, для яких можуть застосовуватися повністю стабілізовані імуностимулюючі нуклеїнові кислоти, імуностимулюючі нуклеїнові кислоти за цим винаходом можуть у деяких варіантах утілення мати переваги над повністю стабілізованими імуностимулюючими нуклеїновими кислотами, такі як підвищена дієвість та знижена токсичність.

Цей винахід стосується частково імуностимулюючих CpG-вмісних олігонуклеотидів. В одному аспекті винахід стосується олігонуклеотиду, який має формулу: 5'T*C*G*T*C*G*TTTGGAN₁CGN₂*T*T3' (SEQ ID NO:296). В олігонуклеотиді N₁ позначає 0-6 нуклеотидів і N₂ позначає 0-7 нуклеотидів. Символ * позначає присутність стабілізованого міжнуклеотидного зв'язку. Міжнуклеотидні зв'язки, що не мають позначки *, можуть бути нестабілізованими чи стабілізованими за умови, що олігонуклеотид включає щонайменше 2 фосфодієфірні міжнуклеотидні зв'язки. Стабілізований міжнуклеотидний зв'язок може бути фосфоротіоатним зв'язком. У деяких варіантах утілення N₁ позначає 0-2 нуклеотиди. Краще, олігонуклеотид має довжину 16-24 нуклеотидів.

У певних варіантах утілення, олігонуклеотид має одну з таких структур:

5'T*C*G*T*C*G*TTTGGAN₁C*G*N₂*T*T3' (SEQ ID NO:296),

5'T*C*G*T*C*G*T*T_T_T_GAN₁C*G*N₂*T*T3' (SEQ ID NO:296) чи

5'T*C*G*T*C*G*T*T*T*GA_N₁C*G*N₂*T*T3' (SEQ ID NO:296) Символ _ позначає присутність фосфодієфірного міжнуклеотидного зв'язку.

Краще, олігонуклеотид позначає

5'T*C*G*T*C*G*T*T*T*G*A_C_C_G_G_T*T*C*G*T*G*T*T3' (SEQ ID NO:297),

5'T*C*G*T*C*G*T*T*T*G_A_C*G*T*T*T*G*T*C*G*T*T3' (SEQ ID NO:298),

5'TC*G*T*C*G*T*T_T.T_G*A*C*G*T*T*T3' (SEQ ID NO:299) чи

5'T*C*G*T*C*G*T*T_T_T_G*A*C*G*T*T3' (SEQ ID NO:300).

В інших аспектах винахід стосується олігонуклеотиду, який включає:

5'T*C*G*(T*/A*)TN₃CGTTTTN₄CGN₅*T*T3' (SEQ ID NO:301). N₃ позначає 0-4 нуклеотиди. N₄ позначає 1-5 нуклеотидів. N₅ позначає 0-7 нуклеотидів. Символ * позначає присутність стабілізованого

міжнуклеотидного зв'язку. Міжнуклеотидні зв'язки, не помічені *, можуть бути нестабілізованими чи стабілізованими за умови, що олігонуклеотид включає щонайменше 2 фосфодієфірні міжнуклеотидні зв'язки. Стабілізований міжнуклеотидний зв'язок може бути фосфоротіоатним зв'язком. У деяких варіантах утілення N₄ позначає 1-2 нуклеотиди. Краще, олігонуклеотид має довжину 16-24 нуклеотидів.

У деяких варіантах утілення олігонуклеотид має одну з таких структур:

5'T*C*G*(T*/A*)TN₃CGTTTTN₄C*G*N₅*T*T3' (SEQ ID NO:301),

5'T*C*G*A*T*N₃C*G*TTTTN₄C_G_*N₅*T*T3' (SEQ ID NO:302) чи

5'T*C*G*T*T*N₃C_G_TTTTTN₄CGN₅*T*T3' (SEQ ID NO:303).

Краще, олігонуклеотид позначає

5'T*C*G*A*T*C*G*rT*T*T_T_C_G*T*G*C*G*T*T*T*T3' (SEQ ID NO:304) чи

5'T*C*G*T*T*T*G*A_C_G_T*T*T*G*T*C*G*T*T3' (SEQ ID NO:305).

Згідно з іншими аспектами передбачений олігонуклеотид, який включає: 5'T*C*G*T*C*G*NNNCGNCGNNNC*G*N*C*G*T*T3' (SEQ ID NO:306). N позначає будь-який нуклеотид. Символ * позначає присутність стабілізованого міжнуклеотидного зв'язку. Міжнуклеотидні зв'язки, не помічені *, можуть бути нестабілізованими чи стабілізованими за умови, що олігонуклеотид включає щонайменше 3 фосфодієфірні міжнуклеотидні зв'язки. Стабілізований міжнуклеотидний зв'язок може бути фосфоротіоатним зв'язком. У деяких варіантах утілення олігонуклеотид включає 5 фосфодієфірних міжнуклеотидних зв'язків. Краще, олігонуклеотид має довжину 16-24 нуклеотидів.

У деяких варіантах утілення олігонуклеотид має одну з таких структур:

5'T*C*G*T*C*G*N*N*N*C_G_N_C_G_*N*N*N*C*G*N*C*G*T*T3' (SEQ ID NO:307),

5'T*C*G*T*C*G*T*T*A*C_G_N_C_G_T*T*A*C*G*N*N*C*G*T*T3' (SEQ ID NO:308) чи

5'T*C*G*T*C*G*N*N*N*C_G_T_C_G_*N*N*N*C*G*T*C*G*T*T3' (SEQ ID NO:309). В одному варіанті втілення олігонуклеотид позначає

5'T*C*G*T*C*G*T*T*A*C_G_T_C_G_T*T*A*C*G*T*C*G*T*T3' (SEQ ID NO:310).

Символ _ позначає присутність фосфодієфірного міжнуклеотидного зв'язку.

В інших варіантах втілення олігонуклеотид включає щонайменше один C_G-мотив з фосфодієфірним міжнуклеотидним зв'язком. В ще інших варіантах утілення олігонуклеотид не включає жодних C_G-мотивів з фосфодієфірним міжнуклеотидним зв'язком.

В інших аспектах передбачений олігонуклеотид, який має структуру 5'T*C_G(N₆C_GN₇)₂₋₃T*C_G*T*T3' (SEQ ID NOS:311-312). N₆ та N₇ мають незалежно довжину від 1 до 5 нуклеотидів, і олігонуклеотид має довжину 16-40 нуклеотидів.

У деяких варіантах утілення N₆ позначає один нуклеотид, наприклад, N₆ може позначати T чи A. N₇ у деяких варіантах утілення позначає п'ять нук-

леотидів, наприклад, N₇ може позначати п'ять піримідинів чи TTTTG.

У деяких варіантах утілення олігонуклеотид має структуру:

5'T*C_G*T*C_G*T*T*T*G*A*C_G*T*T*T*G*
T*C_G*T*T3' (SEQ ID NO:313) чи

5'T*C_G*A*C_G*T*T*T*G*T*C_G*T*T*T*G*
T*C_G*T*T3' (SEQ ID NO:314).

Згідно з іншими аспектами винаходу, передбачений олігонуклеотид, який має структуру 5'TCGGGN₈CGCGC*GN₉3' (SEQ ID NO:315). N₈ має довжину Від 4 до 10 нуклеотидів і включає щонайменше 1 C_G-мотив. N₉ має довжину від 0 до 3 нуклеотидів. Олігонуклеотид має довжину 15-40 нуклеотидів.

У деяких варіантах утілення N₈ включає щонайменше 2 чи 3 CG-мотиви. В інших варіантах втілення N₈ позначає PuCGPyPyCG чи PuCGPyPyCGCG. Необов'язково, N₈ позначає ACGTTTCG. N₉ може включати щонайменше один CG-мотив, такий як CCG.

У деяких варіантах утілення олігонуклеотид має структуру:

5'T*C_G*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*
G*C*C*G3' (SEQ ID NO:316) чи

5'T*C*G*C*G*A*C_G*T*T*C*G*C*G*C_G*C*G*C*
*G3' (SEQ ID NO:317).

В іншому аспекті передбачений олігонуклеотид, який має формулу 5T*T*GX₁X₂TGX₃X₄T*T*T*N₁₀T*T*T*T*T3' (SEQ ID NO:318). N₁₀ має довжину від 4 до 8 нуклеотидів і включає щонайменше 1 C_G-мотив. X₁, X₂, X₃ та X₄ позначають незалежно C чи G. Олігонуклеотид має довжину 24-40 нуклеотидів.

У деяких варіантах утілення N₁₀ включає щонайменше 2 чи 3 CG-мотиви. В інших варіантах втілення олігонуклеотид має одну з таких структур:

5'T*T*G*C_G*T*G*C_G*T*T*T*G*A*C_G*T*T*
T*T*T*T*T3' (SEQ ID NO:319) чи

5'T*T*G*G_C*T*G*G_C*T*T*T*G*A*C_G*T*T*
T*T*T*T*T3' (SEQ ID NO:320).

В інших варіантах утілення олігонуклеотид має структуру:

5'T*C*G*C_G*A*C*G*T*T*C_G*Q*C*G*C_G*C*G*
*C*C*G3' (SEQ ID NO:321).

У деяких аспектах ОДН позначає олігонуклеотид, який має послідовність, вибрану з групи, що складається з CGTCGTTTTGACGTTTTGTCGTT (SEQ ID NO:333), GTCGTTTTGACGTTTTGTCGTT (SEQ ID NO:334), TCGTTTTGACGTTTTGTCGTT (SEQ ID NO:335), CGTTTTGACGTTTTGTCGTT (SEQ ID NO:336), GTTTTGACGTTTTGTCGTT (SEQ ID NO:337), TTTTGACGTTTTGTCGTT (SEQ ID NO:338), TTTGACGTTTTGTCGTT (SEQ ID NO:339), TTGACGTTTTGTCGTT (SEQ ID NO:340), TGACGTTTTGTCGTT (SEQ ID NO:341), GACGTTTTGTCGTT (SEQ ID NO:342), ACGTTTTGTCGTT (SEQ ID NO:343), GTTTTGTCGTT (SEQ ID NO:344), GTTTTGTCGTT (SEQ ID NO:345), TTTTGTCGTT (SEQ ID NO:346), TTTGTCGTT, TTGTCGTT, TCGTGGTTTTGACGTTTTGTCGTT (SEQ ID NO:347), TCGTCGTTTTGACGTTTTGTCGTT (SEQ ID NO:348), TCGTCGTTTTGACGTTTTGTCGTT (SEQ ID NO:349), TCGTCGTTTTGACGTTTTGT (SEQ ID

NO:350), TCGTCGTTTTGACGTTTTG (SEQ ID NO:351), TCGTCGTTTTGACGTTTT (SEQ ID NO:352), TCGTCGTTTTGACGTTTT (SEQ ID NO:353), TCGTCGTTTTGACGTT (SEQ ID NO:354), TCGTCGTTTTGACGT (SEQ ID NO:355), TCGTCGTTTTGACG (SEQ ID NO:356), TCGTCGTTTTGAC (SEQ ID NO:357), TCGTCGTTTTGA (SEQ ID NO:358), TCGTCGTTTTG (SEQ ID NO:359), TCGTCGTTTT (SEQ ID NO:360), TCGTCGTTT, TCGTCGTT, CGTCGTTTTGACGTTTTGTCGTT (SEQ ID NO:361), GTCGTTTTGACGTTTTGTCGTT (SEQ ID NO:362), TCGTTTTGACGTTTTGTCGTT (SEQ ID NO:363), CGTTTTGACGTTTTGT (SEQ ID NO:364), GTTTTGACGTTTTG (SEQ ID NO:365), TTTTGACGTTTT (SEQ ID NO:366), TTTGACGTTT (SEQ ID NO:367) та TTGACGTT.

В іншому аспекті винахід стосується олігонуклеотиду, який включає октамерну послідовність, що містить щонайменше один YZ динуклеотид, який має фосфодієфірний чи фосфодієфіро-подібний міжнуклеотидний зв'язок, і щонайменше 4 нуклеотиди T, у якому Y позначає піримідин чи модифікований піримідин, Z позначає гуанозин чи модифікований гуанозин, і олігонуклеотид включає щонайменше один стабілізований міжнуклеотидний зв'язок.

Y може позначати неметилований C. Z може позначати гуанозин. У деяких варіантах утілення Y позначає цитозин чи модифікований цитозинові основи, вибрані з групи, що складається з 5-метилцитозин, 5-метилізоцитозин, 5-гідроксицитозин, 5-галогеноцитозин, урацил, N4-етилцитозин, 5-флюорурацил та гідроген. В інших варіантах утілення Z позначає гуанін чи модифіковану гуанінові основу, вибрану з групи, що складається з 7-деазагуаніну, 7-деаза-7-заміщеного гуаніну (такого як 7-деаза-7-(C₂-C₆)-алкілгуанін), 7-деаза-8-заміщеного гуаніну, гіпоксантину, 2,6-діамінопурину, 2-амінопурину, пурину, 8-заміщеного гуаніну, такого як 8-гідроксигуанін, та 6-тіогуаніну, 2-амінопурину і гідрогену.

У деяких варіантах утілення октамерна послідовність включає TTTT-мотив. В інших варіантах утілення октамерна послідовність включає два динуклеотиди YZ. Необов'язково, обидва динуклеотиди YZ мають фосфодієфірний чи фосфодієфіро-подібний міжнуклеотидний зв'язок.

У деяких варіантах утілення октамерна послідовність вибрана з групи, що складається з T*C_G*T*C_G*T*T, C_G*T*T*C_G*T*T*T, G*T*T*C_G*T*T*T, T*C_G*T*T*T*G, C_G*T*T*T*T*G*A, T*T*T*T*G*A*C_G, T*T*T*G*A*C_G*T, T*G*A*C_G*T*T, G*A*C_G*T*T*T, A*C_G*T*T*T*G, C_G*T*T*T*G*T, T*T*T*T*G*T*C_G, T*T*T*G*T*C_G*T, G*T*T*T*G*T*C та T*T*G*T*C_G*T, де * позначає присутність стабілізованого міжнуклеотидного зв'язку, і де _ позначає присутність фосфодієфірного міжнуклеотидного зв'язку.

В інших варіантах утілення олігонуклеотид має довжину 8-40 нуклеотидів.

Фосфодієфіро-подібний зв'язок може бути боранофосфонатом чи діастереомерно чистим Rp

фосфоротіоатом. Необов'язково, стабілізовані міжнуклеотидні зв'язки є фосфоротіоатом, фосфодітіоатом, метилфосфонатом, метилфосфоротіоатом чи будь-якою їхньою комбінацією.

Олігонуклеотид може мати 3'-3' зв'язок з одним чи двома доступними 5'-кінцями. У деяких кращих варіантах утілення олігонуклеотид має два доступні 5'-кінці, кожен з яких є 5'TCG.

В іншому аспекті винаходу передбачений олігонуклеотид, який включає: 5'TCGTCGTTTTGACGTTTTGTCGTT3' (SEQ ID NO:368). Щонайменше один CG-динуклеотид має фосфодієфірний чи фосфодієфіро-подібний міжнуклеотидний зв'язок, і олігонуклеотид включає щонайменше один стабілізований міжнуклеотидний зв'язок.

В інших аспектах винахід стосується олігонуклеотиду, який включає: 5'GNC3', де N позначає послідовність нуклеїнових кислот довжиною 4-10 нуклеотидів, яка щонайменше на 50% складається з T і не містить динуклеотиду CG, і олігонуклеотид включає щонайменше один стабілізований міжнуклеотидний зв'язок. В одному варіанті втілення N включає TTTT-мотив. В інших варіантах утілення олігонуклеотид вибирають з групи, що складається з G*T*T*T*T*G*T*C та G*T*T*T*T*G*A*C, де * позначає присутність стабілізованого міжнуклеотидного зв'язку.

В іншому аспекті винахід стосується молекули імуностимулюючої нуклеїнової кислоти, яка має щонайменше один внутрішній динуклеотид піримідин-пурин (YZ) і, необов'язково, динуклеотид піримідин-гуанозин (YG) та химерний скелет, у якому щонайменше один внутрішній динуклеотид YZ має фосфодієфірний чи фосфодієфіро-подібний міжнуклеотидний зв'язок, необов'язково, кожен додатковий внутрішній динуклеотид YZ має фосфодієфірний, фосфодієфіро-подібний чи стабілізований міжнуклеотидний зв'язок, і всі інші міжнуклеотидні зв'язки є стабілізованими. В одному варіанті втілення імуностимулююча нуклеїнова кислота включає множину внутрішніх динуклеотидів YZ, кожен з яких має фосфодієфірний чи фосфодієфіро-подібний міжнуклеотидний зв'язок. В одному варіанті втілення кожен внутрішній динуклеотид YZ має фосфодієфірний чи фосфодієфіро-подібний міжнуклеотидний зв'язок.

В одному варіанті втілення молекулу імуностимулюючої нуклеїнової кислоти вибирають з групи, що складається з:

*A*C_G*T*C_G*T*T*T*T*C_G*T*C_G*T*T (SEQ ID NO:1),
G*C_G*T*C_G*A*C_G*T*C_G*A*C_G*C (SEQ ID NO:2),
G*C_G*T*C_G*T*T*T*T*C_G*T*C_G*C (SEQ ID NO:3),
T*C*C*A*T_G*A*C_G*T*T*C*C*T_G*A*T*G*C (SEQ ID NO:4),
T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*T*C_G*T*T (SEQ ID NO:5),
T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C_G*G*C_G*G*C*C_G*C*C*G (SEQ ID NO:6),
T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C_G*T*C_G*T*T (SEQ ID NO:7),
T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*C_G*T*C_G*T*T (SEQ ID NO:8),
T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*C*G*T*C*G*T*T (SEQ ID NO:9),
T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*C*G*T*C_G*T*T (SEQ ID NO:10),
T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*C_G*T*C*G*T*T (SEQ ID NO:11),
T*C_7*T*C_7*T*T*T*T_G*T*C_G*T*T*T*T_G*T*C_G*T*T (SEQ ID NO:12),
T*C_7*T*C_G*T*T*T*T_G*T*C_G*T*T*T*T_G*T*C_7*T*T (SEQ ID NO:13),
T*C_G*C*C_G*T*T*T*T*C_G*G*C_G*G*C*C_G*C*C*G (SEQ ID NO:14),
T*C_G*T*C*G*T*T*T*T*A*C*G*A*C*G*T*C*G*C*G (SEQ ID NO:15),
T*C_G*T*C*G*T*T*T*T*A*C*G*A*C*G*T*C*G*T*G (SEQ ID NO:16),
T*C_G*T*C*G*T*T*T*T*A*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G (SEQ ID NO:17),
T*C_G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G (SEQ ID NO:21),
T*C_G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*T*C*G*T*T (SEQ ID NO:22),
T*C_G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*T*C_G*T*T (SEQ ID NO:23),
T*C_G*T*C*G*T*T*T*T*C_G*T*C*G*T*T (SEQ ID NO:24),
T*C_G*T*C*G*T*T*T*T*G*C*G*A*C*G*T*C*G*C*G (SEQ ID NO:25),
T*C_G*T*C*G*T*T*T*T*T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*G (SEQ ID NO:26),
T*C_G*T*C*G*T*T*T*T*T*C*G*A*C*G*T*C*G*C*G (SEQ ID NO:27),
T*C_G*T*C_7*T*T*T*T_G*T*C_G*T*T*T*T_7*T*C_G*T*T (SEQ ID NO:28),
T*C_G*T*C_G*T*T*T*T_G*A*C*G*T*T (SEQ ID NO:29),
T*C_G*T*C_G*T*T*T*T_G*A*C_G*T*T*T*T*G*T*C_G*T*T (SEQ ID NO:30),
T*C_G*T*C_G*T*T*T*T_G*T*C_G*A*C_G*T*C_G*T*T*T*T_G*T*C*G (SEQ ID NO:31),
T*C_G*T*C_G*T*T*T*T_G*T*C_G*A*T (SEQ ID NO:32),
T*C_G*T*C_G*T*T*T*T_G*T*C_G*A*T*T (SEQ ID NO:33),
T*C_G*T*C_G*T*T*T*T_G*T*C_G*T (SEQ ID NO:34),
T*C_G*T*C_G*T*T*T*T_G*T*C_G*T*T (SEQ ID NO:35),
T*C_G*T*C_G*T*T*T*T_G*T*C_G*T*T*T*T_G*T*C_G*T*T (SEQ ID NO:36),
T*C_G*T*C_G*T*T*T*T_G*T*C_G*T*T*T*T*G*T*C_G*T*T (SEQ ID NO:37),
T*C_G*T*C_G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*C*G*G*C*G*G*C*G*C*G (SEQ ID NO:38),
T*C_G*T*C_G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*G*C*G*G*C*G (SEQ ID NO:39),
T*C_G*T*C_G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*G*C*G*G*C*G (SEQ ID NO:40),
T*C_G*T*C_G*T*T*T*T*C*G*T*C*G*T*T (SEQ ID NO:41),
T*C_G*T*C_G*T*T*T*T_C_G*G*C_G*C_G*G*C*G (SEQ ID NO:42),
T*C_G*T*C_G*T*T*T*T_C_G*G*C_G*G*C*G_G*C*G (SEQ ID NO:43),
T*C_G*T*C_G*T*T*T*T_C_G*T*C_G*T (SEQ ID NO:44),
T*C_G*T*C_G*T*T*T*T_C_G*T*C_G*T*T (SEQ ID NO:45),
T*C_G*T*C_G*T*T*T*T_C_G*T*T_G*T*T (SEQ ID NO:46),
T*C_G*T*C_G*T*T*T*T*G*T*C_G*T*C_G*T*T*T (SEQ ID NO:47),
T*C_G*T*C_G*T*T*T*T*T*T*T*T*T_C_G*T*C_G*T*T*T (SEQ ID NO:48),
T*C_G*T*C_G*T*T*T*T*T_G*T*C_G*T*T (SEQ ID NO:49),
T*C_G*T*C_G*T*T*T*T_T_G*T*T_G*T*T (SEQ ID NO:50),
T*C_G*T*C_G*T*T*T*T_7*T*C_7*T*T*T*T_G*T*C_G*T*T (SEQ ID NO:51),
T*C_G*T*C_G*T*T*T*T_G*A*C_G*T*T (SEQ ID NO:52),
T*C_G*T*C_G*T*T*T*T_G*A*C_G*T*T*T (SEQ ID NO:53),
T*C_G*T*C_G*T*T*T_T_G*A*C_G*T*T*T*G*T*C*G*T*T (SEQ ID NO:54),

T'C_G'T'C_G'T'T'T'T_G'A'C_G'T'T'T'T_G'T'C_G'T'T (SEQ ID NO:55),
 T'C_G'T'C_G'T'T'T'T_G'T'C_G'T'T (SEQ ID NO:56),
 T'C_G'T'C_G'T'T'T'T_G'T'C_G'T'T'T'T_G'T'C_G'T'T (SEQ ID NO:241),
 T'C_G'T'C_G'T'T'T'T_G'T'C_G'T'T'T'T_7'T'C_7'T'T (SEQ ID NO:58),
 T'C_G'T'C_G'T'T'T'T_G'T'C_G'T'T'T'T_G'T'C_G'T'T (SEQ ID NO:59),
 T'C_G'T'C_G'T'T'T'T_G'T'C_G'T'T (SEQ ID NO:60),
 T'C_G'T'C_G'T'T'T'T_G'T'C_G'T'T'T'T_G'T'C_G'T'T (SEQ ID NO:61),
 T'C_G'T'C_G'T'T'T_G'C_G'T'C_G'T (SEQ ID NO:62),
 T'C_G'T'C_G'T'T'T_G'C_G'T'C_G'T'T (SEQ ID NO:63),
 T'C_G'T'C_G'T'T'T_G'T'C_G'T (SEQ ID NO:64),
 T'C_G'T'C_G'T'T'T_G'T'C_G'T'T (SEQ ID NO:65),
 T'C_G'T'C_G'U'U'U'C_G'T'C_G'U'U'U'U_G'T'C_G'T'T (SEQ ID NO:66),
 T'C_G'T'T'T'T_G'T'C_G'T'T'T (SEQ ID NO:67),
 T'C_G'T'T'T'T_G'T'C_G'T'T'T'T'T'T (SEQ ID NO:68),
 T'C_G'T'T'T'T'T'T'T'T_C_G'T'T'T (SEQ ID NO:69),
 T'C_G'T'T_G'T'T'T'T_C_G'T'C_G'T'T (SEQ ID NO:70),
 T'C_G'T'T_G'T'T'T'T_C_G'T'T_G'T'T (SEQ ID NO:71),
 T'C_G'T'T_G'T'T'T'T_G'T'C_G'T'T (SEQ ID NO:72),
 T'C_G'T'T_G'T'T'T'T_G'T'T_G'T'T (SEQ ID NO:73),
 T'C_G'U'C_G'T'T'T'T_G'T'C_G'T'T'T'U_G'U'C_G'T'T (SEQ ID NO:74),
 T'G'T'C_G'T'T'G'T'C_G'T'T'G'T'C_G'T'T'G'T'C_G'T'T (SEQ ID NO:75),
 T'G'T'C_G'T'T'G'T'C_G'T'T_G'T'C_G'T'T_G'T'C_G'T'T (SEQ ID NO:76),
 T'G'T'C_G'T'T'T_C_G'T'C_G'T'T (SEQ ID NO:77),
 T'G'T'C_G'T'T'T'G'T'C_G'T'T (SEQ ID NO:78),
 T'T'A'G'T'T'C_G'T'A'G'T'T'C'T'T'C_G'T'T (SEQ ID NO:79),
 T'T'C_G'T'C_G'T'T'T'T_C_G'T'C_G'T'T (SEQ ID NO:80),
 T'T'C_G'T'C_G'T'T'T'C_G'T'C_G'T'T (SEQ ID NO:81),
 T'T'C_G'T'C_G'T'T'T'T_G'T'C_G'T'T (SEQ ID NO:82),
 T'T'C_G'T'T'C'T'T'A'G'T'T'C_G'T'A'G'T'T (SEQ ID NO:83),
 T'T'T'C_G'A'C_G'T'C_G'T'T (SEQ ID NO:84),
 T'T'T'T'C_G'T'C_G'T'T'T'G'T'C_G'T'C_G'T (SEQ ID NO:85),
 T'T'T'T'C_G'T'C_G'T'T'T'T'G'T'C_G'T'C_G'T'T (SEQ ID NO:86),
 T'T'T'T'C_G'T'C_G'T'T'T'T'T'T'T_C_G'T'C_G'T (SEQ ID NO:87),
 T'T'T'T'C_G'T'C_G'T'T'T'T'T'T'T'C_G'T'C_G'T'T (SEQ ID NO:88),
 T'T'T'T'C_G'T'C_G'T'T'T'T_G'T'C_G'T'C_G'T'T (SEQ ID NO:89),
 T'T'T'T'C_G'T'T'T'G'T'C_G'T (SEQ ID NO:90),
 T'T'T'T'C_G'T'T'T'G'T'C_G'T'T (SEQ ID NO:91),
 T'T'T'T'C_G'T'T'T'T'T'T'T'T_C_G'T (SEQ ID NO:92),
 T'T'T'T'C_G'T'T'T'T'T'T'T'T_C_G'T (SEQ ID NO:93),
 T'T'T'T'C_G_T'T'T'T_G'T'C_G'T (SEQ ID NO:94),
 T'T'T'T'T'T'T'T_C_G'T'T'T'Q'T'C_G'T (SEQ ID NO:95),
 T'T_G'T'C_G'T'T'T'T_C_G'T'C_G'T (SEQ ID NO:96),
 T'T_G'T'C_G'T'T'T'T_C_G'T'T_G'T (SEQ ID NO:97),
 T'T_G'T'C_G'T'T'T'T_G'T'C_G'T (SEQ ID NO:98), та
 T'T_G'T'C_G'T'T'T'T_G'T'T_G'T (SEQ ID NO:99),

де * позначає фосфоротіоат, _ позначає фосфодієфір, U позначає 2'-дезоксиріацил, і 7 позначає 7-деазагуанін.

В одному варіанті втілення молекулу імуностимулюючої нуклеїнової кислоти вибирають з групи, що складається з:

T'C_G'T'C_G'T'T'T'T_G'T'C_G'T'T'T'G'T'C_G'T'T (SEQ ID NO:100),
 T'C_G'T'C_G'T'T'T'T_G'T'C_G'T (SEQ ID NO:101),
 T'C_G'T'C_G'T'T'T'T_G'T'C_G'T (SEQ ID NO:102),
 T'G'T'C_G'T'T'G'T'C_G'T'T_G'T'C_G'T'T_G'T'C_G'T (SEQ ID NO:103), і
 T'C_G'T'C_G'T'T'T'T'G'G'C'G'G'C'G'G'C'G'G'C'G'G' (SEQ ID NO:104),

де * позначає фосфоротіоат і _ позначає фосфодієфір.

В іншому аспекті винахід стосується імуностимулюючої молекули нуклеїнової кислоти, яка включає химерний скелет та щонайменше одну послідовність N₁YGN₂, де, незалежно для кожної

послідовності N₁YGN₂, YG позначає внутрішній динуклеотид піримідин-гуанозин (YG), N₁ та N₂ позначають кожен, незалежно від іншого, будь-який нуклеотид, і де для щонайменше однієї послідовності N₁YGN₂ і, необов'язково, для кожної додаткової послідовності N₁YGN₂: динуклеотид YG має фосфодієфірний чи фосфодієфіро-подібний міжнуклеотидний зв'язок, і N₁ та Y з'єднані фосфодієфірним чи фосфодієфіро-подібним міжнуклеотидним зв'язком, якщо N₁ позначає внутрішній нуклеотид, G та N₂ з'єднані фосфодієфірним чи фосфодієфіро-подібним міжнуклеотидним зв'язком, якщо N₂ позначає внутрішній нуклеотид, або N₁ та Y з'єднані фосфодієфірним чи фосфодієфіро-подібним міжнуклеотидним зв'язком, якщо N₁ позначає внутрішній нуклеотид, і G та N₂ з'єднані фосфодієфірним чи фосфодієфіро-подібним міжнуклеотидним зв'язком, якщо N₂ позначає внутрішній нуклеотид, причому всі інші міжнуклеотидні зв'язки є стабілізованими.

В одному варіанті втілений імуностимулююча нуклеїнова кислота включає множини послідовностей N₁GN₂, де для кожної послідовності N₁YGN₂: динуклеотид YG має фосфодієфірний чи фосфодієфіро-подібний міжнуклеотидний зв'язок, і N₁ та Y з'єднані фосфодієфірним чи фосфодієфіро-подібним міжнуклеотидним зв'язком, якщо N₁ позначає внутрішній нуклеотид, G та N₂ з'єднані фосфодієфірним чи фосфодієфіро-подібним міжнуклеотидним зв'язком, якщо N₂ позначає внутрішній нуклеотид, або N₁ та Y з'єднані фосфодієфірним чи фосфодієфіро-подібним міжнуклеотидним зв'язком, якщо N₁ позначає внутрішній нуклеотид, G та N₂ з'єднані фосфодієфірним чи фосфодієфіро-подібним міжнуклеотидним зв'язком, якщо N₂ позначає внутрішній нуклеотид.

В одному варіанті втілення молекулу імуностимулюючої нуклеїнової кислоти вибирають з групи, що складається з:

T'C_G'T'C_G'T'T'T'T'G'T'C_G'T'T'T'T'G'T'C_G_T (SEQ ID NO:105),
 T'C_G'T'C_G'T'T'T'T'G'T'C_G'T'T'T'T'G_T_C_G_T (SEQ ID NO:106),
 T'C_G'T'C_G'T'T'T'T'G'T'C_G_T'T'T'T'G_T_C_G_T (SEQ ID NO:107),
 T'C_G'T'C_G'T'T'T'T'G'T'C_G_T'T'T'T'G_T'C_G_T (SEQ ID NO:108),
 T'C_G'T'C_G'T'T'T'T'G'T'C_G_T'T'T'T'G_T'C_G_T (SEQ ID NO:109),
 T'C_G'T'C_G'T'T'T'T'G'T'C_G_T'T'T'T'G_T_C_G_T (SEQ ID NO:110),
 T'C_G'T'C_G'T'T'T'T'G'T'C_G_T'T'T'T'G_T_C_G_T (SEQ ID NO:111),
 T'C_G'T'C_G'T'T'T'T'G_T_C_G_T'T'T'T'G_T'C_G_T (SEQ ID NO:112),
 T'C_G'T'C_G'T'T'T'T'G_T_C_G_T'T'T'T'G_T'C_G_T (SEQ ID NO:113),
 T'C_G'T'C_G'T'T'T'T'G_T_C_G_T'T'T'T'G_T_C_G_T (SEQ ID NO:114),
 T'C_G'T'C_G'T'T'T'T'G_T_C_G_T'T'T'T'G_T_C_G_T (SEQ ID NO:115),
 T'C_G'T'C_G'T'T'T'T'G_T_C_G_T'T'T'T'G_T'C_G_T (SEQ ID NO:116),
 T'C_G'T'C_G'T'T'T'T'G_T_C_G_T'T'T'T'G_T'C_G_T (SEQ ID NO:117),
 T'C_G'T'C_G'T'T'T'T'G_T_C_G_T'T'T'T'G_T_C_G_T (SEQ ID NO:118),
 T'C_G'T'C_G'T'T'T'T'G_T_C_G_T'T'T'T'G_T_C_G_T (SEQ ID NO:119),
 T'C_G'T'C_G_T'T'T'T'G_T'C_G_T'T'T'T'G_T'C_G_T (SEQ ID NO:120),
 T'C_G'T'C_G_T'T'T'T'G_T'C_G_T'T'T'T'G_T'C_G_T (SEQ ID NO:121),
 T'C_G'T'C_G_T'T'T'T'G_T'C_G_T'T'T'T'G_T_C_G_T (SEQ ID NO:122),
 T'C_G'T'C_G_T'T'T'T'G_T'C_G_T'T'T'T'G_T_C_G_T (SEQ ID NO:123),

[illegible]

T'C_G_T'C_G_T'T'T'T'G'T_C_G'T'T'T'T'G'T'C_G'T'T (SEQ ID NO:192),
T'C_G_T'C_G_T'T'T'T'G'T_C_G_T'T'T'T'G'T'C_G_T'T (SEQ ID NO:193),
T'C_G_T'C_G_T'T'T'T'G'T_C_G_T'T'T'T'G'T_C_G'T'T (SEQ ID NO:194),
T'C_G_T'C_G_T'T'T'T'G'T_C_G_T'T'T'T'G'T_C_G_T'T (SEQ ID NO:195),
T'C_G_T'C_G_T'T'T'T'G'T_C_G_T'T'T'T'G'T'C_G'T'T (SEQ ID NO:196),
T'C_G_T'C_G_T'T'T'T'G'T_C_G_T'T'T'T'G'T'C_G_T'T (SEQ ID NO:197),
T'C_G_T'C_G_T'T'T'T'G'T_C_G_T'T'T'T'G'T_C_G'T'T (SEQ ID NO:198),
T'C_G_T'C_G_T'T'T'T'G'T_C_G_T'T'T'T'G'T_C_G_T'T (SEQ ID NO:199),
T'C_G_T_C_G_T'T'T'T'G'T'C_G_T'T'T'T'G'T'C_G'T'T (SEQ ID NO:200),
T'C_G_T_C_G_T'T'T'T'G'T'C_G_T'T'T'T'G'T'C_G_T'T (SEQ ID NO:201),
T'C_G_T_C_G_T'T'T'T'G'T'C_G_T'T'T'T'G'T_C_G'T'T (SEQ ID NO:202),
T'C_G_T_C_G_T'T'T'T'G'T'C_G_T'T'T'T'G_T'C_G_T'T (SEQ ID NO:203),
T'C_G_T_C_G_T'T'T'T'G'T'C_G_T'T'T'T'G'T'C_G'T'T (SEQ ID NO:204),
T'C_G_T_C_G_T'T'T'T'G'T'C_G_T'T'T'T'G'T'C_G_T'T (SEQ ID NO:205),
T'C_G_T_C_G_T'T'T'T'G'T'C_G_T'T'T'T'G_T_C_G'T'T (SEQ ID NO:206),
T'C_G_T_C_G_T'T'T'T'G'T'C_G_T'T'T'T'G'T_C_G_T'T (SEQ ID NO:207),
T'C_G_T_C_G_T'T'T'T'G'T'C_G_T'T'T'T'G'T'C_G'T'T (SEQ ID NO:208),
T'C_G_T_C_G_T'T'T'T'G'T'C_G_T'T'T'T'G'T'C_G_T'T (SEQ ID NO:209),
T'C_G_T_C_G_T'T'T'T'G'T'C_G_T'T'T'T'G'T_C_G'T'T (SEQ ID NO:210),
T'C_G_T_C_G_T'T'T'T'G'T'C_G_T'T'T'T'G_T_C_G_T'T (SEQ ID NO:211),
T'C_G_T_C_G_T'T'T'T'G'T'C_G_T'T'T'T'G'T'C_G'T'T (SEQ ID NO:212),
T'C_G_T_C_G_T'T'T'T'G'T'C_G_T'T'T'T'G'T'C_G_T'T (SEQ ID NO:213),
T'C_G_T_C_G_T'T'T'T'G'T'C_G_T'T'T'T'G_T_C_G'T'T (SEQ ID NO:214),
T'C_G_T_C_G_T'T'T'T'G'T'C_G_T'T'T'T'G'T_C_G_T'T (SEQ ID NO:215),
T'C_G_T_C_G_T'T'T'T'G'T'C_G_T'T'T'T'G'T'C_G'T'T (SEQ ID NO:216),
T'C_G_T_C_G_T'T'T'T'G'T'C_G_T'T'T'T'G'T'C_G_T'T (SEQ ID NO:217),
T'C_G_T_C_G_T'T'T'T'G'T'C_G_T'T'T'T'G_T_C_G'T'T (SEQ ID NO:218),
T'C_G_T_C_G_T'T'T'T'G'T'C_G_T'T'T'T'G_T'C_G_T'T (SEQ ID NO:219),
T'C_G_T_C_G_T'T'T'T'G_T'C_G_T'T'T'T'G_T'C_G'T'T (SEQ ID NO:220),
T'C_G_T_C_G_T'T'T'T'G_T'C_G_T'T'T'T'G'T'C_G_T'T (SEQ ID NO:221),
T'C_G_T_C_G_T'T'T'T'G_T'C_G_T'T'T'T'G_T_C_G'T'T (SEQ ID NO:222),
T'C_G_T_C_G_T'T'T'T'G_T'C_G_T'T'T'T'G_T_C_G_T'T (SEQ ID NO:223),
T'C_G_T_C_G_T'T'T'T'G_T_C_G_T'T'T'T'G_T'C_G'T'T (SEQ ID NO:224),
T'C_G_T_C_G_T'T'T'T'G_T_C_G_T'T'T'T'G_T'C_G_T'T (SEQ ID NO:225),
T'C_G_T_C_G_T'T'T'T'G_T_C_G_T'T'T'T'G_T_C_G'T'T (SEQ ID NO:226),
T'C_G_T_C_G_T'T'T'T'G_T_C_G_T'T'T'T'G_T_C_G_T'T (SEQ ID NO:227),
T'C_G_T_C_G_T'T'T'T'G_T_C_G_T'T'T'T'G_T'C_G'T'T (SEQ ID NO:228),
T'C_G_T_C_G_T'T'T'T'G_T_C_G_T'T'T'T'G_T'C_G_T'T (SEQ ID NO:229),
T'C_G_T_C_G_T'T'T'T'G_T_C_G_T'T'T'T'G_T_C_G'T'T (SEQ ID NO:230), T'a
T'C_G_T_C_G_T'T'T'T'G_T_C_G_T'T'T'T'G_T_C_G_T'T (SEQ ID NO:231),

де * позначає фосфоротіоат і _ позначає фосфодієфір.

В одному варіанті втілення молекулу імуностимулюючої нуклеїнової кислоти вибирають з групи, що складається з:

T¹C¹G¹T¹C¹G¹T¹T¹T¹G¹T¹C¹G¹T¹T¹T¹G¹T¹C¹G¹T¹T¹ (SEQ ID NO:232),
T¹C¹G¹T¹C¹G¹T¹T¹T¹T¹G¹T¹C¹G¹T¹T¹T¹T¹G¹T¹C¹G¹T¹T¹ (SEQ ID NO:233), Ta
T¹C¹G¹T¹C¹G¹T¹T¹T¹T¹G¹T¹C¹G¹T¹T¹T¹T¹G¹T¹C¹G¹T¹T¹ (SEQ ID NO:234).

де * позначає фосфоротіоат і _ позначає фосфодіетер.

В одному варіанті втілення молекулу імуностимулюючої нуклеїнової кислоти вибирають з групи, що складається з:

T*^cG*T*^cG*X*T7_X_G*T*^cG*T*T*T_T_G*T*^cG*T*T (SEQ ID NO:235),
T*^cG*T*^cG*T*T*T*T_G_T*^cG*T*T*T*T_G_T*^cG*T*T (SEQ ID NO:236), Ta
T*^cG*T*^cG*T*T*T T_G T*^cG*T*T*T_T_G T*^cG*T*T (SEQ ID NO:237),

де * позначає фосфоротіоат і _ позначає фосфодієфір.

В одному варіанті втілення молекулу імуностимулюючої нуклеїнової кислоти вибирають з групи, що складається з:

T¹C₁G¹T₁C₁G¹T¹T₁T₁G¹T₁C₁G¹T¹T₁T₁G¹T₁C₁G¹T¹T₁T₁ (SEQ ID NO:238),
T¹C₁G¹T₁C₁G¹T¹T₁T₁G¹T₁C₁G¹T¹T₁T₁G¹T₁C₁G¹T¹T₁T₁ (SEQ ID NO:239), та
T¹C₁G¹T₁C₁G¹T¹T₁T₁G¹T₁C₁G¹T¹T₁T₁G¹T₁C₁G¹T¹T₁T₁ (SEQ ID NO:240),

де* позначає фосфоротіоат і _ позначає фосфодієфір.

В одному варіанті втілення щонайменше один внутрішній динуклеотид YG, який має фосфодієфірний чи фосфодієфіро-подібний міжнуклеотидний зв'язок, позначає CG. В одному варіанті втілення щонайменше один внутрішній динуклеотид YG, який має фосфодієфірний чи фосфодієфіро-подібний міжнуклеотидний зв'язок, позначає TG.

В одному варіанті втілення фосфодієфірний чи фосфодієфіро-подібний міжнуклеотидний зв'язок позначає фосфодієфір. В одному варіанті втілення фосфодієфіро-подібний зв'язок позначає боронофосфонат чи діастереомерно чистий Rp фосфоротіоат.

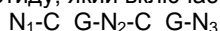
В одному варіанті втілення стабілізовані міжнуклеотидні зв'язки вибирають з групи, що складається з фосфоротіоату, фосфородієфіроату, метилфосфонату, метилфосфоротіоату та будь-якої їхньої комбінації. В одному варіанті втілення стабілізовані міжнуклеотидні зв'язки є фосфоротіоатом.

В одному варіанті втілення молекула імуностимулюючої нуклеїнової кислоти є молекулою імуностимулюючої нуклеїнової кислоти В-класу. В одному варіанті втілення молекула імуностимулюючої нуклеїнової кислоти є молекулою імуностимулюючої нуклеїнової кислоти С-класу.

В одному варіанті втілення молекула імуностимулюючої нуклеїнової кислоти має довжину 4-100 нуклеотидів. В одному варіанті втілення молекула імуностимулюючої нуклеїнової кислоти має довжину 6-40 нуклеотидів. В одному варіанті втілення молекула імуностимулюючої нуклеїнової кислоти має довжину 6-19 нуклеотидів.

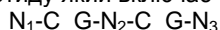
В одному варіанті втілення молекула імуностимулюючої нуклеїнової кислоти не є антисмисловим олігонуклеотидом, олігонуклеотидом, який утворює потрібну спіраль, чи рибозимом.

В іншому аспекті винахід стосується олігонуклеотиду, який включає



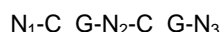
де N₁ та N₃ позначають кожен незалежно послідовність нуклеїнової кислоти довжиною 1-20 нуклеотидів, _ позначає внутрішній фосфодієфірний чи фосфодієфіро-подібний міжнуклеотидний зв'язок, і N₂ позначає незалежно послідовність нуклеїнової кислоти довжиною 0-20 нуклеотидів, а G-N₂-C включає 1 чи 2 стабілізовані зв'язки.

В іншому аспекті винахід стосується олігонуклеотиду який включає



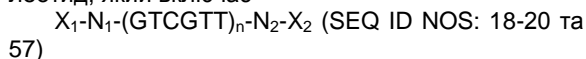
де N₁ та N₃ позначають кожен незалежно послідовність нуклеїнової кислоти довжиною 1-20 нуклеотидів, _ позначає внутрішній фосфодієфірний чи фосфодієфіро-подібний міжнуклеотидний зв'язок, N₂ позначає незалежно послідовність нуклеїнової кислоти довжиною 4-20 нуклеотидів, і G-N₂-C включає щонайменше 5 стабілізованих зв'язків.

В іншому аспекті винахід передбачає олігонуклеотид, який включає



де N₁, N₂ та N₃ позначають кожен незалежно послідовність нуклеїнової кислоти довжиною 0-20 нуклеотидів і _ позначає внутрішній фосфодієфірний чи фосфодієфіро-подібний міжнуклеотидний зв'язок, і олігонуклеотид не є антисмисловим олігонуклеотидом, олігонуклеотидом, який утворює потрібну спіраль, чи рибозимом.

В іншому аспекті винахід передбачає олігонуклеотид, який включає



де N₁ та N₂ позначають кожен незалежно послідовність нуклеїнової кислоти довжиною 0-20 нуклеотидів, у якій n-2 чи n-4-6, X₁ та X₂ позначають кожен незалежно послідовність нуклеїнової кислоти, що має фосфоротіоатні міжнуклеотидні зв'язки з 3-10 нуклеотидів, причому N₁-(GTCGTT)_n-N₂ включає щонайменше один фосфодієфірний міжнуклеотидний зв'язок і 3'- та 5'-нуклеотиди олігонуклеотиду не містять полі-G, полі-A, полі-T, чи полі-C послідовності.

В одному варіанті втілення нуклеїнова кислота має скелет, який включає дезоксирибозу чи рибозу.

В одному варіанті втілення олігонуклеотид має скелет, який включає дезоксирибозу чи рибозу.

В одному варіанті втілення олігонуклеотид є фармацевтичною композицією, яка необов'язково включає фармацевтично прийнятний носій.

В одному варіанті втілення олігонуклеотид додатково включає ад'ювант чи цитокін.

В одному варіанті втілення олігонуклеотид додатково включає антиген, причому олігонуклеотид є ад'ювантом вакцини.

В одному варіанті втілення антиген вибирають з групи, що складається з вірусного антигену, бактеріального антигену, грибового антигену, паразитарного антигену та пухлинного антигену. В одному варіанті втілення антиген кодується вектором нуклеїнової кислоти. В одному варіанті втілення антиген є пептидним антигеном. В одному варіанті втілення антиген ковалентно зв'язаний з олігонуклеотидом чи молекулою імуностимулюючої нуклеїнової кислоти. В іншому варіанті втілення антиген не є ковалентно зв'язаним з олігонуклеотидом чи молекулою імуностимулюючої нуклеїнової кислоти.

В іншому аспекті винахід стосується способу визначення відносної ефективності чи токсичності молекули тестової імуностимулюючої нуклеїнової кислоти. Спосіб включає вибір еталонної імуностимулюючої нуклеїнової кислоти, яка має еталонну послідовність, стабілізований скелет та еталонну імуностимулюючу ефективність чи токсичність; вибір тестової імуностимулюючої нуклеїнової кислоти, яка має еталонну послідовність, фосфодієфірний чи фосфодієфіро-подібний зв'язок замість стабілізованого зв'язку між Y та N щонайменше одного внутрішнього динуклеотиду YN еталонної послідовності, де Y позначає піримідин і N позначає будь-який нуклеотид, і має тестову імуностимулюючу ефективність чи токсичність; і порівняння тестової імуностимулюючої ефективності чи токсичності з еталонною імуностимулюючою ефекти-

вністю чи токсичністю для визначення відносної ефективності чи токсичності тестової молекули імуностимулюючої нуклеїнової кислоти.

В одному варіанті втілення тестова імуностимулююча нуклеїнова кислота є більш потужним індуктором сигнальної активності TLR9, ніж еталонна імуностимулююча нуклеїнова кислота.

В одному варіанті втілення тестова імуностимулююча нуклеїнова кислота є більш потужним індуктором інтерферону типу 1, ніж еталонна імуностимулююча нуклеїнова кислота.

В одному варіанті втілення тестова імуностимулююча нуклеїнова кислота є більш потужним індуктором IP-10, ніж еталонна імуностимулююча нуклеїнова кислота.

В одному варіанті втілення YN позначає YG. В одному варіанті втілення щонайменше один внутрішній динуклеотид YG позначає CG. В одному варіанті втілення щонайменше один внутрішній динуклеотид YG позначає TG.

В одному варіанті втілення тестова імуностимулююча нуклеїнова кислота включає множину внутрішніх динуклеотидів YG, кожен з яких має фосфодієфірний чи фосфодієфіро-подібний міжнуклеотидний зв'язок. В одному варіанті втілення щонайменше один внутрішній динуклеотид YG є кожним внутрішнім динуклеотидом YG.

В одному варіанті втілення фосфодієфірний чи фосфодієфіро-подібний зв'язок є фосфодієфіром. В одному варіанті втілення фосфодієфіро-подібний зв'язок є боронофосфонатом чи діастеремерно чистим Rr фосфоротіоатом.

В одному варіанті втілення стабілізований скелет включає множину міжнуклеотидних зв'язків, вибраних з групи, що складається з фосфоротіоату, фосфородитіоату, метилфосфонату, метилфосфоротіоату та будь-якої їхньої комбінації. В одному варіанті втілення стабілізований скелет включає множину фосфоротіоатних міжнуклеотидних зв'язків.

В одному варіанті втілення еталонна молекула імуностимулюючої нуклеїнової кислоти є молекулою імуностимулюючої нуклеїнової кислоти В-класу. В одному варіанті втілення еталонна молекула імуностимулюючої нуклеїнової кислоти є молекулою імуностимулюючої нуклеїнової кислоти С-класу.

В одному варіанті втілення еталонна молекула імуностимулюючої нуклеїнової кислоти має довжину 4-100 нуклеотидів. В одному варіанті втілення еталонна молекула імуностимулюючої нуклеїнової кислоти має довжину 6-40 нуклеотидів. В одному варіанті втілення еталонна молекула імуностимулюючої нуклеїнової кислоти має довжину 6-19 нуклеотидів.

В іншому аспекті винахід передбачає спосіб конструювання стабілізованої молекули імуностимулюючої нуклеїнової кислоти довжиною менш ніж 20 нуклеотидів. Спосіб включає вибір послідовності довжиною 6-19 нуклеотидів, у якій послідовність включає щонайменше один внутрішній CG-динуклеотид; вибір фосфодієфірного чи фосфодієфіро-подібного зв'язку між С та G щонайменше одного внутрішнього динуклеотиду CG; незалежно, вибір фосфодієфірного, фосфодієфіро-

подібного чи стабілізованого зв'язку між С та G кожного додаткового внутрішнього динуклеотиду CG; і вибір стабілізованого зв'язку для усіх інших міжнуклеотидних зв'язків.

В іншому аспекті винахід є способом лікування чи профілактики алергії чи астми. Спосіб здійснюється шляхом введення суб'єкту описаного тут імуностимулюючого олігонуклеотиду CpG у кількості, ефективній для лікування чи профілактики алергії чи астми. В одному варіанті втілення олігонуклеотид наносять на поверхню слизової. В інших варіантах втілення олігонуклеотид вводять у формі аерозольної композиції. Необов'язково, олігонуклеотид вводять інтраназально.

Згідно з іншим аспектом винаходу передбачений спосіб індукування продукування цитокінів. Спосіб здійснюють шляхом введення суб'єкту описаного тут імуностимулюючого олігонуклеотиду CpG в кількості, ефективній для індукування цитокіну, вибраного з групи, що складається з IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, ФНП, IFN- α , хемокініта IFN- γ .

В іншому аспекті винахід передбачає композицію описаних тут імуностимулюючих олігонуклеотидів CpG у комбінації з антигеном чи іншою терапевтичною сполукою, такою як антимікробний агент. Антимікробний агент може бути, наприклад, антивірусним агентом, антипаразитарним агентом, антибактеріальним агентом чи протигрибковим агентом.

Згідно з іншим аспектом винаходу пропонується композиція засобу з уповільненим вивільненням, яка містить описані тут імуностимулюючі CpG-олігонуклеотиди.

Композиція може необов'язково включати фармацевтичний носій та/або входити до складу засобу доставки. У деяких варіантах втілення засіб доставки вибирають з групи, що складається з катіонних ліпідів, клітинно-проникних протеїнів та засобів уповільненого вивільнення. В одному варіанті втілення засіб уповільненого вивільнення є біорозкладаним полімером чи мікрочастинкою.

Згідно з іншим аспектом винаходу пропонується спосіб стимулювання імунної відповіді. Спосіб включає введення суб'єкту імуностимулюючого олігонуклеотиду CpG у кількості, ефективній для індукування імунної відповіді у суб'єкта. Краще, імуностимулюючий олігонуклеотид CpG вводиться перорально, локально, у засобі уповільненого вивільнення, мукозально, системно, парентерально чи внутрішньом'язово. Якщо імуностимулюючий олігонуклеотид CpG наноситься на поверхню слизової, він може вводиться у кількості, ефективній для індукування мукозальної імунної відповіді чи системної імунної відповіді. У кращих варіантах втілення поверхню слизової вибирають з групи, що складається з оральної, назальної, ректальної, вагінальної та очної поверхні.

У деяких варіантах втілення спосіб включає експонування суб'єкта антигеном, де імунна відповідь є антиген-специфічною імунною відповіддю. У деяких варіантах втілення антиген вибирають з групи, що складається з пухлинного антигену, вірусного антигену, бактеріального антигену, паразитарного антигену та пептидного антигену.

Імуностимулюючі CpG-олігонуклеотиди є здатними провокувати широкий спектр імунних відповідей. Наприклад, ці імуностимулюючі CpG-олігонуклеотиди можуть бути використані для зміни імунної відповіді Th2 на Th1. Імуностимулюючі CpG-олігонуклеотиди можуть бути використані також для активації імунної клітини, такої як лімфоцит (наприклад, В- та Т-клітини), дендритної клітини та NK-клітини. Активация може бути здійснена *in vivo*, *in vitro* чи *ex vivo*, тобто шляхом виділення імунної клітини суб'єкта, введення в контакт імунної клітини з кількістю імуностимулюючого олігонуклеотиду CpG, ефективною для активації імунної клітини та повторного введення активованої імунної клітини суб'єкту. У деяких варіантах втілення дендритна клітина презентує раковий антиген. Дендритна клітина може бути експонована раковим антигеном *ex vivo*.

Імунна відповідь, продукована імуностимулюючими олігонуклеотидами CpG, може також спричинювати індукцію продукування цитокінів, наприклад, продукування IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, ФНП, IFN- α , хемокінів та IFN- γ .

У ще іншому варіанті втілення імуностимулюючі CpG-олігонуклеотиди є придатними для лікування раку. Імуностимулюючі CpG-олігонуклеотиди, відповідно до інших аспектів винаходу, є також корисними для профілактики раку (наприклад, зниження ризику розвитку раку) у суб'єкта, який має ризик розвитку раку. Рак може бути вибраний з групи, що складається з раку жовчних шляхів, раку молочної залози, раку шийки матки, хоріокарциноми, раку ободової кишки, ендометріального раку, раку шлунка, внутрішньоепітеліальних неоплазм, лімфам, раку печінки, раку легень (наприклад, дрібноклітинного та недрібноклітинного), меланоми, нейроblastом, раку ротової порожнини, раку яєчника, раку підшлункової залози, раку простати, раку прямої кишки, сарком, раку щитовидної залози та раку нирок, а також інших карцином та сарком. У деяких важливих варіантах утілення рак вибирають з групи, що складається з раку кісток, раку мозку та ЦНС, раку сполучної тканини, раку стравоходу, раку очей, лімфогранулематозу, раку гортані, раку ротової порожнини, раку шкіри та тестикулярного раку.

Імуностимулюючі CpG-олігонуклеотиди можуть бути використані також для підвищення реактивності ракової клітини до ракової терапії (наприклад, протиракової терапії), необов'язково, коли імуностимулюючий олігонуклеотид CpG вводиться у поєднанні з протираковою терапією. Протиракова терапія може бути хіміотерапією, терапією на основі вакцини (наприклад, сенсibilізованою *in vitro* вакциною дендритних клітин чи вакциною ракового антигену) чи антитіла. Ця остання терапія може також включати введення антитіла, специфічного до клітинного поверхневого антигену, наприклад, ракової клітини, при якому імунна відповідь призводить до антитіло-залежної клітинної цитотоксичності (ADCC). В одному варіанті втілення антитіло може бути вибраним з групи, що складається з Ributaxin, Herceptin, Quadrarnet, Panorex, IDEC-Y2B8, BEC2, C225, Oncolym, SMART M195, ATRAGEN, Ovarex, Bexxar, LDP-03, іor t6, MDX-

210, MDX-11, MDX-22, OV103, 3622W94, anti-VEGF, Zenapax, MDX-220, MDX-447, MELIMMUNE-2, MELIMMUNE-1, CEACIDE, Pretarget, NovoMAB-G2, TNT, Gliomab-H, GNI-250, EMD-72000, LymphoCide» CMA 676, Monopharm-C, 4B5, іor egf.r3, іor c5, BABS, anti-FLK-2, MDX-260, ANA Ab, SMART 1D10 Ab, SMART ABL 364 Ab та ImmuRAIT-CEA.

Таким чином, згідно з деякими аспектами винаходу суб'єкту, хворому на рак, чи з ризиком виникнення раку, вводиться імуностимулюючий олігонуклеотид CpG та засіб протиракової терапії. У деяких варіантах втілення протиракову терапію вибирають з групи, що складається з хіміотерапевтичного агента, імунотерапевтичного агента та ракової вакцини.

У ще іншому варіанті втілення способів, спрямованих на профілактику чи лікування раку, суб'єкту може бути додатково введений інтерферон- α .

Винахід в інших аспектах стосується способів профілактики хвороби у суб'єкта. Спосіб включає введення суб'єкту імуностимулюючого олігонуклеотиду CpG на регулярній основі для промотування реактивності імунної системи з метою запобігання хвороби суб'єкта. Приклади хвороб чи станів, яким намагаються запобігти з використанням профілактичних методів за винаходом, включають мікробні інфекції (наприклад, хвороби, що передаються статевим шляхом) та анафілактичний шок від харчових алергій.

В інших аспектах винахід передбачає спосіб індукування вродженої імунної відповіді шляхом введення суб'єкту імуностимулюючого олігонуклеотиду CpG у кількості, ефективній для активації вродженої імунної відповіді.

Згідно з іншим аспектом винаходу пропонується спосіб лікування чи профілактики вірусної чи ретровірусної інфекції. Спосіб включає введення суб'єкту, який має вірусну чи ретровірусну інфекцію або ризик її виникнення, кількості будь-якої з композицій винаходу, ефективної для лікування чи профілактики вірусної чи ретровірусної інфекції. У деяких варіантах втілення вірусна інфекція спричинена вірусом гепатиту, наприклад, гепатиту В, гепатиту С, ВІЛ, вірусом герпесу чи вірусом папіломи.

Згідно з іншим аспектом винаходу пропонується спосіб лікування чи профілактики бактеріальної інфекції. Спосіб включає введення суб'єкту, який має бактеріальну інфекцію чи ризик її виникнення, ефективної кількості будь-якої з композицій винаходу для лікування чи профілактики бактеріальної інфекції. В одному варіанті втілення бактеріальна інфекція спричинена внутрішньоклітинними бактеріями.

В іншому аспекті винахід пропонує спосіб лікування чи профілактики паразитарної інфекції шляхом введення суб'єкту, який має паразитарну інфекцію чи ризик її виникнення, ефективної кількості будь-якої з композицій винаходу для лікування чи профілактики паразитарної інфекції. В одному варіанті втілення паразитарна інфекція спричинена внутрішньоклітинним паразитом. В

іншому варіанті втілення паразитарна Інфекція спричинена негельмінтним паразитом.

У деяких варіантах втілення суб'єкт є людиною, а в інших варіантах втілення суб'єкт є хребетним, крім людини, вибраним з групи, що складається із собаки, кішки, коня, корови, свині, індички, кози, риби, мавпи, курчати, щура, миші та вівці.

В іншому аспекті винахід стосується способу індукування ТН1-імуної відповіді шляхом введення суб'єкту будь-якої з композицій за винаходом в кількості, ефективній для продукування ТН1-імуної відповіді.

В іншому аспекті винахід стосується способу індукування імуної відповіді шляхом введення суб'єкту, який потребує цього, ефективної кількості імуностимулюючого олігонуклеотиду 5'T*С*G*T*X₁*T*T3', де X₁ позначає 3-30 нуклеотидів, * позначає присутність стабілізованого міжнуклеотидного зв'язку, і олігонуклеотид включає щонайменше 2 фосфодіефірні міжнуклеотидні зв'язки.

В іншому аспекті винахід стосується способу лікування аутоімунної хвороби шляхом введення суб'єкту, який має аутоімунну хворобу чи ризик її виникнення, ефективної кількості будь-якої з композицій за винаходом для лікування чи профілактики аутоімунної хвороби.

В інших варіантах втілення олігонуклеотид вводиться суб'єкту в кількості, ефективній для індукування експресії цитокіну. Необов'язково, цитокін вибирають з групи, що складається із IL-6, ФНП_α, IFN_α, IFN_γ та IP-10. В інших варіантах втілення олігонуклеотид вводиться суб'єкту в кількості, ефективній для зсуву імуної відповіді у бік Th1-відповіді від Th2-зсунутої відповіді.

Винахід у деяких аспектах передбачає спосіб лікування ремоделювання дихальних шляхів, який включає: введення суб'єкту олігонуклеотиду, який містить динуклеотид CG, в кількості, ефективній для лікування ремоделювання дихальних шляхів у суб'єкта. В одному варіанті втілення суб'єкт має астму, хронічну обструктивну хворобу легень чи є курцем. В інших варіантах втілення суб'єкт не має симптомів астми.

Використання олігонуклеотиду за винаходом для стимулювання імуної відповіді також передбачається як аспект винаходу.

Пропонується також спосіб виробництва лікарського засобу олігонуклеотиду за винаходом для стимулювання імуної відповіді.

В іншому аспекті винахід стосується способу стимулювання імуної відповіді шляхом введення суб'єкту олігонуклеотиду довжиною щонайменше 5 нуклеотидів у кількості, ефективній для стимулювання імуної відповіді, причому олігонуклеотид включає щонайменше один імуностимулюючий динуклеотидний мотив, у якому міжнуклеотидний зв'язок між нуклеотидами динуклеотиду має хіральність R, і щонайменше 70% інших міжнуклеотидних зв'язків олігонуклеотиду мають хіральність S.

Кожне з обмежень винаходу може охоплювати різні варіанти втілення винаходу. Таким чином, передбачається, що кожне з обмежень винаходу, пов'язане з будь-яким одним елементом чи комбі-

націями елементів, може бути включене до кожного аспекту винаходу.

Фіг.1 є набором графіків, які зображують рівні інтерферону-альфа (пг/мл), що секретуються мононуклеарними клітинами периферичної крові (P8MC) людини після експонування цих клітин олігонуклеотидами, номери яких вказані уздовж верхньої вісі X графіка, позначені символом ▲, порівняно з олігонуклеотидом позитивного контролю, позначеним символом ■. Досліджувані олігонуклеотиди, зображені на Фіг.1A, включають SEQ ID NO:322, SEQ ID NO:323 та SEQ ID NO:324, а олігонуклеотидом позитивного контролю є SEQ ID NO:242. Досліджувані олігонуклеотиди, зображені на Фіг.1B, включають SEQ ID NO:325, SEQ ID NO:326, SEQ ID NO:327 та SEQ ID NO:328, а олігонуклеотидом позитивного контролю є 5' TCG TCG TTT TGA CGT TTT GTC GTT 3' (SEQ ID NO:329). Концентрація олігонуклеотиду, використана для одержання певної точки даних, вказана на вісі X (мкМ). Наведені дані є середніми результатами для шести донорів. Під графіками для кожного експерименту вказаний рівень інтерферону-альфа (пг/мл), що секретується клітинами, обробленими негативним контролем (середовище).

Фіг.2 є набором графіків, які зображують рівні IL-10 (пг/мл), що секретується PBMC людини після експонування цих клітин олігонуклеотидами, номери яких вказані уздовж верхньої вісі X графіка, позначені символом ▲, порівняно з олігонуклеотидом позитивного контролю, позначеним символом ■. Досліджувані олігонуклеотиди, зображені на Фіг.2A, включають (SEQ ID NO:322), SEQ ID NO:323 та SEQ ID NO:324, а олігонуклеотидом позитивного контролю є SEQ ID NO:242. Досліджувані олігонуклеотиди, зображені на Фіг.2B, включають SEQ ID NO:326, SEQ ID NO:326, SEQ ID NO:327 та SEQ ID NO:328, а олігонуклеотидом позитивного контролю є SEQ ID NO:329. Концентрація олігонуклеотиду, використаного для одержання певної точки даних, вказана по вісі X (мкМ). Наведені дані є середніми значеннями для шести донорів. Під графіками для кожного експерименту вказаний рівень IL-10 (пг/мл), що секретується клітинами, обробленими негативним контролем (середовище).

Фіг.3 є набором графіків, які зображують рівні ФНП-альфа (пг/мл), що секретується PBMC людини після експонування цих клітин олігонуклеотидами, номери яких вказані уздовж верхньої вісі X графіка, позначені символом ▲, порівняно з олігонуклеотидом позитивного контролю, позначеним символом ■. Досліджувані олігонуклеотиди, зображені на Фіг.3A, включають SEQ ID NO:322, SEQ ID NO:323 та SEQ ID NO:324, а олігонуклеотидом позитивного контролю є SEQ ID NO:329. Досліджувані олігонуклеотиди, зображені на Фіг.3B, включають SEQ ID NO:325, SEQ ID NO:326, SEQ ID NO:327 та SEQ ID NO:328, а олігонуклеотидом позитивного контролю є SEQ ID NO:329. Концентрація олігонуклеотиду, використана для одержання певної точки даних, вказується по вісі X (мкМ). Наведені дані є середніми значеннями для трьох донорів. Під графіками для кожного експерименту вказаний рівень ФНП-альфа (пг/мл), що секрету-

ється клітинами, обробленими негативним контролем (середовище) та ліпополісахаридом (LPS).

Фіг.4 є набором графіків, які зображують рівні IL-6 (пг/мл), що секретуються PBMC людини після експонування цих клітин олігонуклеотидами, номери яких вказані уздовж верхньої вісі X графіка, позначені символом ▲, порівняно з олігонуклеотидом позитивного контролю, позначеним символом ■. Досліджувані олігонуклеотиди, зображені на Фіг.4A, включають SEQ ID NO:322, SEQ ID NO:323 та SEQ ID NO:324, а олігонуклеотидом позитивного контролю є SEQ ID NO:329 (з повністю фосфоротіоат-модифікованим скелетом). Досліджувані олігонуклеотиди, зображені на Фіг.4B, включають SEQ ID NO:325, SEQ ID NO:326, SEQ ID NO:327 та SEQ ID NO:328, а олігонуклеотидом позитивного контролю є SEQ ID NO:329. Концентрація олігонуклеотиду, використана для одержання певної точки даних, вказана на вісі X (мкМ). Наведені дані є середніми значеннями для трьох донорів. Під графіками для кожного експерименту зазначений рівень IL-6 (пг/мл), що секретується клітинами, обробленими негативним контролем (середовище) та LPS.

Фіг.5 є набором графіків, які зображують рівні інтерферону-гамма (пг/мл), що секретується PBMC людини після експонування цих клітин олігонуклеотидами, номери яких вказані уздовж верхньої вісі X графіка, позначені символом ▲, порівняно з олігонуклеотидом позитивного контролю, позначеним символом ■. Досліджувані олігонуклеотиди, зображені на Фіг.5A, включають SEQ ID NO:322, SEQ ID NO:323 та SEQ ID NO:324, а олігонуклеотидом позитивного контролю є SEQ ID NO:329. Досліджувані олігонуклеотиди, зображені на Фіг.5B, включають SEQ ID NO:325, SEQ ID NO:326, SEQ ID NO:327 та SEQ ID NO:328, а олігонуклеотидом позитивного контролю є SEQ ID NO:329. Концентрація олігонуклеотиду, використана для одержання певної точки даних, вказується на вісі X (мкМ). Наведені дані є середніми значеннями для трьох донорів. Під графіками для кожного експерименту наведений рівень інтерферону-гамма (пг/мл), що секретується клітинами, обробленими негативним контролем (середовище) та LPS.

Фіг.6 є набором графіків, які зображують рівні експресії CD69 (MFI) NK-клітинами як показник активації NK-клітин після експонування цих клітин олігонуклеотидами, номери яких вказані уздовж верхньої вісі X графіка, позначені символом ▲, порівняно з олігонуклеотидом позитивного контролю, позначеним символом ■. Досліджувані олігонуклеотиди, зображені на Фіг.6A, включають SEQ ID NO:322, SEQ ID NO:323 та SEQ ID NO:324, а олігонуклеотидом позитивного контролю є SEQ ID NO:329. Досліджувані олігонуклеотиди, зображені на Фіг.6B, включають SEQ ID NO:325, SEQ ID NO:326, SEQ ID NO:327 та SEQ ID NO:328, а олігонуклеотидом позитивного контролю є SEQ ID NO:329. Концентрація олігонуклеотиду, використана для одержання певної точки даних, вказується по вісі X (мкМ). Наведені дані є середніми значеннями для трьох донорів. Під графіками для кожного експерименту зазначений рівень експресії

CD69 NK-клітинами, обробленими негативним контролем (середовище) та LPS.

Фіг.7 є набором графіків, які зображують рівні інтерферону-альфа (IFN α) (7A) та IL-10 (7B), що продукуються PBMC людини після експонування цих клітин олігонуклеотидом SEQ ID NO:313, позначені символом ■, порівняно з олігонуклеотидом позитивного контролю SEQ ID NO:242, позначеним символом ●. Концентрація олігонуклеотиду, використана для одержання певної точки даних, вказується по вісі X (мкМ).

Фіг.8 є набором графіків, які зображують рівні інтерферону-альфа (IFN α) (8A) та IL-10 (8B), що продукуються PBMC людини після експонування цих клітин олігонуклеотидом SEQ ID NO:314, позначені символом ■, порівняно з олігонуклеотидом позитивного контролю SEQ ID NO:242, позначеним символом ●. Негативним контролем є ОДН SEQ ID NO:330: tccaggactctctcagggtt. Концентрація олігонуклеотиду, використана для одержання певної точки даних, вказується по вісі X (мкМ).

Фіг.9 є набором графіків, які зображують рівні Інтерферону-альфа (IFN α) (9A) та IL-10 (9B), що продукуються PBMC людини після експонування цих клітин олігонуклеотидом SEQ ID NO:319, позначені символом ■, порівняно з олігонуклеотидом позитивного контролю SEQ ID NO:242, позначеним символом ●. Концентрація олігонуклеотиду, використана для одержання певної точки даних, вказується по вісі X (мкМ).

Фіг.10 є набором графіків, які зображують рівні інтерферону-альфа (IFN α) (10A) та IL-10 (10B), що продукуються PBMC людини після експонування цих клітин олігонуклеотидом SEQ ID NO:316, позначені символом ■, порівняно з олігонуклеотидом позитивного контролю SEQ ID NO:242, позначеним символом ●. Концентрація олігонуклеотиду, використана для одержання певної точки даних, вказується по вісі X (мкМ).

Фіг.11 є набором графіків, які зображують рівні інтерферону-альфа (IFN α) (11A) та IL-10 (11B), що продукуються PBMC людини після експонування цих клітин олігонуклеотидом SEQ ID NO:317, позначені символом ■, порівняно з олігонуклеотидом позитивного контролю SEQ ID NO:242, позначеним символом ●. Концентрація олігонуклеотиду, використана для одержання певної точки даних, вказується по вісі X (мкМ).

Фіг.12 є набором графіків, які зображують рівні інтерферону-альфа (IFN α) (12A) та IL-10 (12B), що продукуються PBMC людини після експонування цих клітин олігонуклеотидом SEQ ID NO:320, позначені символом ■, порівняно з олігонуклеотидом позитивного контролю SEQ ID NO:242, позначеним символом ●. Концентрація олігонуклеотиду, використана для одержання певної точки даних, вказується по вісі X (мкМ).

Фіг.13 є набором графіків, які зображують рівні експресії CD86 В-клітинами (13A) та експресії CD80 моноцитами (13B) після експонування цих клітин олігонуклеотидом SEQ ID NO:313, позначені символом ■, порівняно з олігонуклеотидом позитивного контролю SEQ ID NO:242, позначеним символом ●. Концентрація олігонуклеотиду, вико-

ристана для одержання певної точки даних, вказується по вісі X (мкМ).

Фіг.14 є набором графіків, які зображують рівні експресії CD86 В-клітинами (14А) та експресії CD80 моноцитами (14В) після експонування цих клітин олігонуклеотидом SEQ ID NO:314, позначені символом ■, порівняно з олігонуклеотидом позитивного контролю SEQ ID NO:242, позначеним символом ●. Концентрація олігонуклеотиду, використана для одержання певної точки даних, вказується по вісі X (мкМ).

Фіг.15 є набором графіків, які зображують рівні експресії CD86 В-клітинами (15А) та експресії CD80 моноцитами (15В) після експонування цих клітин олігонуклеотидом SEQ ID NO:319, позначені символом ■, порівняно з олігонуклеотидом позитивного контролю SEQ ID NO:242, позначеним символом ●. Концентрація олігонуклеотиду, використана для одержання певної точки даних, вказується по вісі X (мкМ).

Фіг.16 є набором графіків, які зображують експресію CD86 В-клітинами (16А) та експресію CD80 моноцитами (16В) після експонування цих клітин олігонуклеотидом SEQ ID NO:316, порівняно з олігонуклеотидом позитивного контролю SEQ ID NO:242 та олігонуклеотидом 5' TCC AGG ACT TCT CTC AGG TT 3' (SEQ ID NO:330). Концентрація олігонуклеотиду, використана для одержання певної точки даних, вказується по вісі X (мкМ).

Фіг.17 є набором графіків, які зображують рівні інтерферону-альфа (IFN α) (17А) та IL-10 (17В), що продукуються PBMC людини після експонування цих клітин олігонуклеотидом SEQ ID NO:321, порівняно з контрольним олігонуклеотидом SEQ ID NO:242 та олігонуклеотидом SEQ ID NO:330. Концентрація олігонуклеотиду, використана для одержання певної точки даних, вказується по вісі X (мкМ).

Фіг.18 є набором графіків, які зображують експресію CD86 В-клітинами (18А) та експресію CD80 моноцитами (18В) після експонування цих клітин олігонуклеотидом SEQ ID NO:321, порівняно з олігонуклеотидом позитивного контролю SEQ ID NO:242, та олігонуклеотидом SEQ ID NO:330. Концентрація олігонуклеотиду, використана для одержання певної точки даних, вказується по вісі X (мкМ).

Фіг.19 є набором графіків, які зображують експресію CD86 В-клітинами (19А) та експресію CD80 моноцитами (19В) після експонування цих клітин олігонуклеотидом SEQ ID NO:317, порівняно з олігонуклеотидом позитивного контролю SEQ ID NO:242, та олігонуклеотидом SEQ ID NO:330. Концентрація олігонуклеотиду, використана для одержання певної точки даних, вказується по вісі X (мкМ).

Фіг.20 є набором графіків, які зображують експресію CD86 В-клітинами (20А) та експресію CD80 моноцитами (20В) після експонування цих клітин олігонуклеотидом SEQ ID NO:320, порівняно з олігонуклеотидом позитивного контролю SEQ ID NO:242, та олігонуклеотидом SEQ ID NO:330. Концентрація олігонуклеотиду, використана для одержання певної точки даних, вказується по вісі X (мкМ).

Фіг.21 є графічним зображенням частини молекули нуклеїнової кислоти, на якому показано структурні ознаки, включаючи основи (В), цукри та скелет з фосфодіефірним зв'язком (обведений кружком) між 6'-цитидином та 3'-гуанозином і прилеглі фосфоротіатні зв'язки.

Фіг.22 є стовпчиковою діаграмою, яка зображує відносну кількість у тканинах фосфоротіатних (SEQ ID NO:242), м'яких (SEQ ID NO:294) та напівм'яких (SEQ ID NO:241) олігонуклеотидів у нирці, селезінці та печінці через 48 годин після підшкірної ін'єкції мишам. Олігонуклеотиди SEQ ID NO:242 та SEQ ID NO:241 мають ідентичні послідовності основ і відрізняються будовою скелета.

Фіг.23 зображує стимулювання імунних клітин людини *in vitro* шляхом індукування цитокінів IL-6, IL-10, IFN α та IP-10.

Фіг.24 зображує стимулювання мишачих спленоцитів *in vitro*, яке виявляється в їхній підвищеній ефективності та/або активності як індуктора TLR9-асоційованих цитокінів IL-6, IL-10, IL-12p40, IFN α , ФНП α та IP-10, без помітної секреції IL-1, IL-2, IL-4, IL-5 чи GM-CSF.

Фіг.25 показує індуквану експресію TLR9-асоційованих генів (IL-6, ФНП α , IFN α , IFN γ та IP-10) у легенях ОДН за винаходом (SEQ ID NO:313).

Фіг.26 показує ефекти CpG-ОДН на антиген-індукований розвиток лімфатичного вузла у мишей *in vivo*.

Фіг.27 демонструє, що CpG-ОДН пригнічує Th2-відповідь на антигенну сенсibiлізацію.

Фіг.28 показує вплив на антиген-індуковане продукування IgE у мишей *in vivo*.

Фіг.29 демонструє, що антигенна стимуляція спричинює зростання загальної кількості лейкоцитів, переважно еозинофілів, у просвіті дихальних шляхів.

Фіг.30 та 32 показують, що антигенна стимуляція спричинює зростання загального числа лейкоцитів, переважно еозинофілів, у просвіті дихальних шляхів, і що цей ефект пригнічується ОДН за винаходом (SEQ ID NO:313) у доза-залежний спосіб.

Фіг.31 та 32 показують, що антигенна стимуляція спричинює гіперреактивність дихальних шляхів, і що цей ефект пригнічується ОДН за винаходом (SEQ ID NO:313) у доза-залежний спосіб.

Фіг.33 показує концентрації ОДН у плазмі щурів після внутрішньовенного (IV) та інтратрахеального (IT) введення в дозі 5мг/кг. Дані для плазми показують, що SEQ ID NO:313 виводиться з плазми швидше, ніж SEQ ID NO:329 як після IV, так і після IT введення.

Фіг.34 показує концентрації ОДН у легенях щурів після IV та IT введення в дозі 5мг/кг. Після IV введення при однаковому рівні доз концентрації у легенях SEQ ID NO:313 є нижчими за концентрації SEQ ID NO:329. Після IT введення різниця є менш помітною. Дані для легень для SEQ ID NO:329 є лише для періоду до 48год. після введення дози.

Фіг.35 показує концентрації ОДН у нирках щурів після IV та IT введення в дозі 5мг/кг. Дані для нирок показують, що абсолютні рівні SEQ ID NO:313 у нирках є нижчими за відповідні концентрації SEQ ID NO:329 після як IV, так і IT введення.

Експозиція нирок SEQ ID NO:313 після ІТ введення є, зокрема, значно зниженою порівняно з експозицією SEQ ID NO:329 при однаковому рівні доз.

Фіг.36 показує концентрації ОДН у нирках щурів після ІV введення в дозі 5мг/кг.

Фіг.37 показує концентрації ОДН у нирках щурів після ІТ введення в дозі 5мг/кг.

Фіг.38 показує концентрації SEQ ID NO:313 та його октамерного метаболіту (метаболітів) у нирках щурів після ІV введення SEQ ID NO:313 в дозі 5мг/кг.

Фіг.39 показує концентрації SEQ ID NO:313 та його октамерного метаболіту (метаболітів) у нирках щурів після ІТ введення SEQ ID NO:313 в дозі 5мг/кг.

Фіг.40 є графіком, який зображує індекс стимулювання серій напівм'яких ОДН порівняно з повністю фосфоротіоатним ОДН, що має таку саме послідовність.

Фіг.41 є серією стовпчикових діаграм, які зображують індукування цитокінів А та В (ІР-10), С (ІFN) і D та Е (ФНП) у відповідь на введення м'якого (SEQ ID NO 294), напівм'якого (SEQ ID NO 241) та повністю фосфоротіоатного ОДН (SEQ ID NO 242).

Фіг.42 є набором графіків, які зображують активність антитіл та цитотоксичну активність Т-лімфоцитів у відповідь на введення м'якого (SEQ ID NO 294), напівм'якого (SEQ ID NO 241) та повністю фосфоротіоатного ОДН (SEQ ID NO 242).

Фіг.43 є набором графіків, які зображують протипухлинну терапію у мишей з використанням напівм'якого (SEQ ID NO 241) чи повністю фосфоротіоатного ОДН (SEQ ID NO 242). Фіг.43 А та В показують результати для моделі карциноми ниркових клітин. Фіг.43 С та D показують результати для моделі мишачої нейробластоми. Фіг.43 Е та F показують результати для моделі мишачого недрібноклітинного раку легень.

М'які та напівм'які імуностимулюючі нуклеїнові кислоти одержують згідно з винаходом. Імуностимулюючі олігонуклеотиди за винаходом, описані тут, у деяких варіантах утілення мають поліпшені властивості, включаючи подібну чи посилену ефективність, знижену системну експозицію нирок, печінки та селезінки, і можуть мати знижену реактогенність у місці ін'єкцій. Хоча заявник не зв'язаний механізмом, вважається, що ці поліпшені властивості асоційовані із стратегічним розташуванням в імуностимулюючих олігонуклеотидах фосфодієфірних чи фосфодієфіро-подібних "міжнуклеотидних зв'язків". Термін "міжнуклеотидний зв'язок" у тому значенні, яке тут використовується, стосується ковалентного скелетного зв'язку, який з'єднує два суміжні нуклеотиди в молекулі нуклеїнової кислоти. Ковалентний скелетний зв'язок буде типово модифікованим чи немодифікованим фосфатним зв'язком, але інші модифікації є можливими. Таким чином, лінійний олігонуклеотид, який має в довжину n нуклеотидів, має загалом $n-1$ міжнуклеотидних зв'язків. Ці ковалентні скелетні зв'язки в імуностимулюючих олігонуклеотидах згідно з описом винаходу можуть бути модифікованими чи немодифікованими.

Зокрема, фосфодієфірні чи фосфодієфіро-подібні міжнуклеотидні зв'язки включають "внутрішні динуклеотиди". Внутрішній динуклеотид загалом має позначати будь-яку пару суміжних нуклеотидів, зв'язаних міжнуклеотидним зв'язком, у якому жоден нуклеотид з пари нуклеотидів є термінальним нуклеотидом, тобто жоден нуклеотид з пари нуклеотидів є нуклеотидом, що утворює 5'- чи 3'-кінець олігонуклеотиду. Таким чином, лінійний олігонуклеотид, який має довжину n нуклеотидів, має загалом $n-1$ динуклеотидів і лише $n-3$ внутрішніх динуклеотидів. Кожен міжнуклеотидний зв'язок у внутрішньому динуклеотиді є внутрішнім міжнуклеотидним зв'язком. Таким чином, лінійний олігонуклеотид, що має довжину n нуклеотидів, має загалом $n-1$ міжнуклеотидних зв'язків і лише $n-3$ внутрішніх міжнуклеотидних зв'язків. Отже, стратегічно розташовані фосфодієфірні чи фосфодієфіро-подібні міжнуклеотидні зв'язки стосуються фосфодієфірних чи фосфодієфіро-подібних міжнуклеотидних зв'язків, розташованих між будь-якою парою нуклеотидів у послідовності нуклеїнової кислоти. У деяких варіантах утілення фосфодієфірні чи фосфодієфіро-подібні міжнуклеотидні зв'язки не є розташованими між будь-якою парою нуклеотидів, що є найближчими до 5'- чи 3'-кінця.

Винахід оснований, щонайменше у деяких аспектах, на несподіваній знахідці, що м'які та напівм'які нуклеїнові кислоти, описані тут, мають щонайменше таку саму, або у багатьох випадках більшу імуностимулюючу активність, ніж відповідні повністю стабілізовані імуностимулюючі олігонуклеотиди з такою самою нуклеотидною послідовністю. Це було несподіваним, оскільки загальноприйнятою є думка, що фосфоротіоатні олігонуклеотиди мають загалом сильніші імуностимулюючі властивості, ніж нестабілізовані олігонуклеотиди. Результати були несподіваними, оскільки очікувалося, що, якщо помістити "розм'якшувальний" зв'язок усередині критичного імуностимулюючого мотиву, тобто CG, то нуклеїнова кислота може мати знижену активність, тому що нуклеїнова кислота буде легко розкладатися *in vivo* на фрагменти, що не містять CG. Усупереч очікуванням, багато з цих нуклеїнових кислот мають насправді еквівалентну чи кращу активність *in vitro* та *in vivo*. Виявляється, що м'які та напівм'які олігонуклеотиди є щонайменше так само, якщо не більш, активними, як їхні повністю стабілізовані аналоги; причому сумарний імуностимулюючий ефект м'яких та напівм'яких олігонуклеотидів відображає баланс між активністю та стабільністю. При високих концентраціях баланс виявляється на користь активності, тобто ефективність переважає. При низьких концентраціях цей баланс виявляється на користь стабільності, тобто переважає відносна нестабільність, асоційована з чутливістю нуклеази.

Винахід в одному аспекті стосується м'яких олігонуклеотидів. М'який олігонуклеотид є імуностимулюючим олігонуклеотидом, що має частково стабілізований скелет, у якому фосфодієфірні чи фосфодієфіро-подібні міжнуклеотидні зв'язки розташовані лише усередині й безпосередньо прилягають до щонайменше одного внутрішнього при-

мідин-пуринового динуклеотиду (YZ). Краще, YZ позначає YG, піримідин-гуанозиновий (YG) динуклеотид. Щонайменше один внутрішній динуклеотид YZ сам має фосфодієфірний чи фосфодієфіро-подібний міжнуклеотидний зв'язок. Фосфодієфірні чи фосфодієфіро-подібні міжнуклеотидні зв'язки, що безпосередньо прилягають до щонайменше одного внутрішнього динуклеотиду YZ, можуть бути 5'-, 3'-, чи обома 5'- та 3'-зв'язками для щонайменше одного внутрішнього динуклеотиду YZ. Краще, фосфодієфірний чи фосфодієфіро-подібний міжнуклеотидний зв'язок, що безпосередньо прилягає до щонайменше одного внутрішнього динуклеотиду YZ, є внутрішнім міжнуклеотидним зв'язком. Таким чином, для послідовності N_1YZN_2 , у якій N_1 та N_2 позначають кожен, незалежно від іншого, будь-який одиничний нуклеотид, динуклеотид YZ має фосфодієфірний чи фосфодієфіро-подібний міжнуклеотидний зв'язок і, крім цього, (a) N_1 та Y з'єднані фосфодієфірним чи фосфодієфіро-подібним міжнуклеотидним зв'язком, якщо N_1 позначає внутрішній нуклеотид, (b) Z та N_2 з'єднані фосфодієфірним чи фосфодієфіро-подібним міжнуклеотидним зв'язком, якщо N_2 позначає внутрішній нуклеотид, або (c) N_1 та Y з'єднані фосфодієфірним чи фосфодієфіро-подібним міжнуклеотидним зв'язком, якщо N_1 позначає внутрішній нуклеотид і Z та N_2 з'єднані фосфодієфірним чи фосфодієфіро-подібним міжнуклеотидним зв'язком, якщо N_2 позначає внутрішній нуклеотид.

Необмежувальні приклади м'яких олігонуклеотидів включають ті, що позначені SEQ ID NOs 105-231, SEQ ID NOs 232-234, SEQ ID NOs 235-237 та SEQ ID NOs 238-240.

М'які олігонуклеотиди відповідно до цього винаходу вважаються відносно сприятливими до нуклеазного гідролізу порівняно з повністю стабілізованими олігонуклеотидами. Не маючи на меті бути зв'язаними конкретною теорією чи механізмом, зазначимо, що м'які олігонуклеотиди за винаходом вважаються здатними до розщеплення на фрагменти зі зниженою чи відсутньою імуностимулюючою активністю порівняно з м'якими олігонуклеотидами повного розміру. Вважається, що введення щонайменше одного нуклеаза-чутливого міжнуклеотидного зв'язку, особливо близько до середини олігонуклеотиду, створює "вимикач", який змінює фармакокінетику олігонуклеотиду зі зменшенням тривалості максимальної імуностимулюючої активності олігонуклеотиду. Це може бути особливо важливим для тканин та при клінічному застосуванні, коли бажано уникнути ушкоджень, пов'язаних з хронічним місцевим запаленням чи імуностимулюванням, наприклад, нирок.

В іншому аспекті винахід стосується напів'яких олігонуклеотидів. Напів'який олігонуклеотид є імуностимулюючим олігонуклеотидом, який має частково стабілізований скелет, у якому фосфодієфірні чи фосфодієфіро-подібні міжнуклеотидні зв'язки знаходяться лише усередині щонайменше одного внутрішнього піримідин-пуринового (YZ) динуклеотиду. Напів'які олігонуклеотиди загалом мають підвищену імуностимулюючу ефективність порівняно з відповідними повністю стабілізовани-

ми імуностимулюючими олігонуклеотидами. Наприклад, імуностимулююча активність напів'якого SEQ ID NO:241 є у 2-5 разів вищою за активність цілком фосфоротіоатного SEQ ID NO:242, хоча ці два олігонуклеотиди мають однакову нуклеотидну послідовність і відрізняються лише внутрішніми YZ міжнуклеотидними зв'язками, як вказано нижче, де * позначає фосфоротіоат і _ позначає фосфодієфір:

T*₃C_G*T*₃C_G*T*₃T*₃T_G*T*₃C_G*T*₃T*₃T*₃G*T*₃C_G*T*₃T (SEQ ID NO:241)

T*₃C*₃G*T*₃C*₃G*T*₃T*₃T*₃G*T*₃C*₃G*T*₃T*₃T*₃G*T*₃C*₃G*T*₃T (SEQ ID NO:242). SEQ ID NO:241 включає внутрішні фосфодієфірні міжнуклеотидні зв'язки як у CG, так і у TG (обидва YZ) динуклеотидах. Завдяки більшій ефективності напів'яких олігонуклеотидів, напів'які олігонуклеотиди можуть використовуватися в нижчих ефективних концентраціях та мати нижчі ефективні дози, ніж звичайні повністю стабілізовані імуностимулюючі олігонуклеотиди, для досягнення бажаного біологічного ефекту.

Якщо повністю стабілізовані імуностимулюючі олігонуклеотиди можуть виявляти максимуми кривих залежності доза-ефект, напів'які олігонуклеотиди за цим винаходом, по-видимому, мають монотонно зростаючі криві доза-ефект (визначені за стимулюванням TLR9), які заходять в область концентрацій, вищих за оптимальну концентрацію для відповідних повністю стабілізованих імуностимулюючих олігонуклеотидів. Таким чином, вважається, що напів'які олігонуклеотиди за цим винаходом можуть індукувати сильніше імуностимулювання, ніж повністю стабілізовані імуностимулюючі олігонуклеотиди.

Було знайдено, відповідно до цього винаходу, що імуностимулююча активність повністю стабілізованих олігонуклеотидів зі слабкими імуностимулюючими властивостями може бути посилена шляхом включення щонайменше одного внутрішнього динуклеотиду YZ з фосфодієфірним чи фосфодієфіро-подібним міжнуклеотидним зв'язком. Таким чином, можна почати з імуностимулюючого олігонуклеотиду зі слабкими імуностимулюючими властивостями, який має повністю стабілізований скелет, та поліпшити його імуностимулюючу активність шляхом заміщення фосфодієфірного чи фосфодієфіро-подібного міжнуклеотидного зв'язку щонайменше одного внутрішнього динуклеотиду YG на стабілізований міжнуклеотидний зв'язок. Наприклад, було знайдено, що SEQ ID NO:243 має вищу імуностимулюючу активність, ніж його повністю стабілізований аналог SEQ ID NO:244, причому SEQ ID NO:244 є олігонуклеотидом з відносно слабкою імуностимулюючою активністю порівняно з SEQ ID NO:242:

T*₃G*T*₃C_G*T*₃T*₃G*T*₃C_G*T*₃T_G*T*₃C_G*T*₃T (SEQ ID NO:243)

T*₃G*T*₃C*₃G*T*₃T*₃G*T*₃C*₃G*T*₃T*₃G*T*₃C*₃G*T*₃T (SEQ ID NO:244).

Якщо повністю стабілізовані імуностимулюючі нуклеїнові кислоти довжиною менш ніж 20 нуклеотидів можуть мати помірну імуностимулюючу активність порівняно з довгими (наприклад, довжиною 24 нуклеотиди) повністю стабілізованими олігону-

клеотидами, було знайдено, що напівм'які олігонуклеотиди довжиною усього лише 16 нуклеотидів виявляють імуностимулюючу активність, яка щонайменше дорівнює імуностимулюючій активності повністю стабілізованих олігонуклеотидів довжиною більш ніж 20 нуклеотидів. Наприклад, SEQ ID NO: 245 та 5602 (які обидва є 16-мерами з послідовностями, частково подібними до SEQ ID NO:242) виявляють імуностимулюючу активність, порівняну з SEQ ID NO:242 (24-мер).

T*³C_G*T*³C_G*T*³T*³C_G*T*³C_G*T*³T (SEQ ID NO:245)

5602 T*³C_G*T*³C_G*T*³T*³T_G*T*³C_G*T*³T (SEQ ID NO:56)

T*³C*G*T*³C*G*T*³T*³T*³G*T*³C*G*T*³T*³G*T*³C*G*T*³T (SEQ ID NO:242).

У деяких випадках, коли 6-мерний фосфоротіоатний олігонуклеотид не виявляв імуностимулюючої активності, було знайдено, що заміщення навіть одного фосфодієфірного внутрішнього YZ-міжнуклеотидного зв'язку на фосфоротіоатний зв'язок дає відповідний 6-мер, який має імуностимулюючу активність.

Вважається також, що зазначені вище властивості напівм'яких олігонуклеотидів загалом зростають з підвищенням "доз" фосфодієфірних чи фосфодієфіро-подібних міжнуклеотидних зв'язків у внутрішніх динуклеотидах YZ. Таким чином, вважається, наприклад, що загалом для певної олігонуклеотидної послідовності з п'ятьма внутрішніми динуклеотидами YZ, олігонуклеотид з п'ятьма внутрішніми фосфодієфірними чи фоефодієфіро-подібними YZ-міжнуклеотидними зв'язками має сильніші імуностимулюючі властивості, ніж олігонуклеотид з чотирма внутрішніми фосфодієфірними чи фосфодієфіро-подібними YG-міжнуклеотидними зв'язками, який, у свою чергу, має сильніші імуностимулюючі властивості, ніж олігонуклеотид з трьома внутрішніми фосфодієфірними чи фосфодієфіро-подібними YZ-міжнуклеотидними зв'язками, який, у свою чергу, має сильніші імуностимулюючі властивості, ніж олігонуклеотид з одним внутрішнім фосфодієфірним чи фосфодієфіро-подібним YZ-міжнуклеотидним зв'язком. Важливо, що включення навіть одного внутрішнього фосфодієфірного чи фосфодієфіро-подібного YZ-міжнуклеотидного зв'язку вважається кращим порівняно з відсутністю внутрішніх фосфодієфірних чи фосфодієфіро-подібних YZ міжнуклеотидних зв'язків. Крім кількості фосфодієфірних чи фосфодієфіро-подібних міжнуклеотидних зв'язків, їхнє положення у ланцюгу нуклеїнової кислоти також може впливати на ефективність.

Необмежуючі приклади напівм'яких олігонуклеотидів включають ті, що позначені SEQ ID NOs 1-99 та 241 і SEQ ID NOs 100-104.

Імуностимулюючі олігонуклеотиди за цим винаходом є загалом захищеними від швидкої деградації у сироватці. Імуностимулюючі олігонуклеотиди за цим винаходом є також загалом захищеними від швидкої деградації у більшості

тканин, за винятком особливих тканин зі специфічною чи надмірною нуклеазною активністю, які є здатними розкласти імуностимулюючі олігонуклеотиди. Це призводить до зниження рівня в цих конкретних тканинах імуностимулюючих олігонуклеотидів, накопичення яких могло інакше призвести до небажаних ефектів унаслідок довготривалої терапії з використанням стійких до деградації олігонуклеотидів. Олігонуклеотиди за цим винаходом загалом включатимуть, крім фосфодієфірних чи фосфодієфіро-подібних міжнуклеотидних зв'язків, краще, у внутрішніх положеннях, 5'- та 3'-кінці, стійкі до деградації. Такі стійкі до деградації кінці можуть бути піддані будь-яким придатним модифікаціям, які спричиняють підвищення стійкості до гідролізу екзонуклеазами порівняно з відповідними немодифікованими кінцями. Наприклад, 5' та 3'-кінці можуть бути стабілізовані шляхом включення до них щонайменше однієї фосфатної модифікації скелета. У кращому варіанті втілення щонайменше одна фосфатна модифікація скелета на кожному кінці є, незалежно, фосфоротіоатним, фосфородітїоатним, метилфосфонатним чи метилфосфоротіоатним міжнуклеотидним зв'язком. В іншому варіанті втілення стійкий до деградації кінець включає одну чи більше нуклеотидну ланку, приєднану пептидним чи амідним зв'язком на 3'-кінці. Однак винахід має охоплювати й інші стабілізовані кінці, включаючи, без обмеження, описані далі.

Як було описано вище, олігонуклеотиди за цим винаходом мають усередині фосфодієфірні чи фосфодієфіро-подібні зв'язки, необов'язково прилеглі до внутрішніх динуклеотидів YG. Такі динуклеотиди YG є часто фрагментами імуностимулюючих мотивів. Проте олігонуклеотид не повинен обов'язково містити фосфодієфірні чи фосфодієфіро-подібні зв'язки у кожному імуностимулюючому мотиві. Як приклад, олігонуклеотид, такий як

T*³C*G*T*³C*G*T*³T*³T*³G*T*³C*G*T*³T (SEQ ID NO:242)

з чотирма CpG-динуклеотидами може мати фосфодієфірні зв'язки між C та G другого, третього чи четвертого CpG-динуклеотидів та будь-які їхні комбінації. Додаткові фосфодієфірні чи фосфодієфіро-подібні зв'язки можуть бути також введені для ще більш швидкого ниркового розщеплення цих в іншому "стабілізованих олігонуклеотидів". Наприклад, SEQ ID NO:242 містить додатково два внутрішніх TG динуклеотиди, будь-який чи обидва з яких, самі чи у комбінації з будь-яким одним або з комбінацією внутрішніх CG-динуклеотидів, можуть мати фосфодієфірні чи фосфодієфіро-подібні міжнуклеотидні зв'язки.

Фосфодієфірний міжнуклеотидний зв'язок належить до типу зв'язків, характерних для нуклеїнових кислот, поширених у природі. Як зображено на Fig.20, фосфодієфірний міжнуклеотидний зв'язок включає атом фосфору, з обох боків якого розташовані містчкові атоми кисню, і з'єднаний також з двома додатковими атомами кисню, один з яких є зарядженим, а інший - незарядженим. Фосфодієфірні міжнуклеотидні зв'язки є особливо кращими, якщо важливо зменшити період напіввиведення олігонуклеотиду з тканини.

Фосфодієфіро-подібний міжнуклеотидний зв'язок є фосфор-вмісною містечковою групою, хімічно та/або діастереомерно подібною до фосфодієфіру. Показники подібності до фосфодієфіру включають сприятливість до нуклеазного гідролізу та здатність активувати РНКазу Н. Так, наприклад, фосфодієфіро-подібні олігонуклеотиди є сприятливими до нуклеазного гідролізу, а фосфоротіоатні - ні, хоч як фосфодієфірні, так і фосфоротіоатні олігонуклеотиди активують РНКазу Н. У кращому варіанті втілення фосфодієфіро-подібний міжнуклеотидний зв'язок є боранофосфатним (або, еквівалентно, боранофосфонатним) зв'язком. Патент США №5177198; патент США №5859231; патенти США №6160109; патент США №6207819; Sergueev et al., (1998) J. Am. Chem. Soc. 120: 9417-27. В іншому кращому варіанті втілення фосфодієфіро-подібний міжнуклеотидний зв'язок є діастереомерно чистим Rp-фосфоротіоатом. Вважається, що діастереомерно чистий Rp-фосфоротіоат є більш сприятливим до нуклеазного гідролізу та має кращу здатність до активації РНКазу Н, ніж змішаний чи діастереомерно чистий Sp-фосфоротіоат. Стереізомери CrG-олігонуклеотидів є предметом патентної заявки США 09/361575, поданої 27 липня 1999р., яка розглядається паралельно даній заявці, та опублікованої заявки PCT/US99/17100 (WO 00/06588). Слід відзначити, що в цілях цього винаходу термін "фосфодієфіро-подібний міжнуклеотидний зв'язок" напевно виключає фосфоротіоатний та метилфосфонатний міжнуклеотидні зв'язки.

Молекули імуностимулюючої нуклеїнової кислоти за цим винаходом мають химерний скелет. У цілях цього винаходу химерний скелет стосується частково стабілізованого скелета, у якому щонайменше один міжнуклеотидний зв'язок є фосфодієфірним чи фосфодієфіро-подібним, і у якому щонайменше один інший міжнуклеотидний зв'язок є стабілізованим міжнуклеотидним зв'язком, де щонайменше один фосфодієфірний чи фосфодієфіро-подібний зв'язок та щонайменше один стабілізований зв'язок є різними. Оскільки повідомлялося, що боранофосфонатні зв'язки є стабілізованими порівняно з фосфодієфірними зв'язками, в тому, що стосується химерної природи скелета, боранофосфонатні зв'язки можуть бути класифіковані як фосфодієфіро-подібні або як стабілізовані, залежно від контексту. Наприклад, химерний скелет, відповідно до цього винаходу, може в одному варіанті втілення включати щонайменше один фосфодієфірний (фосфодієфірний чи фосфодієфіро-подібний) зв'язок та щонайменше один боранофосфонатний (стабілізований) зв'язок. В іншому варіанті втілення химерний скелет, відповідно до цього винаходу, може включати боранофосфонатний (фосфодієфірний чи фосфодієфіро-подібний) та фосфоротіоатний (стабілізований) зв'язки. "Стабілізований міжнуклеотидний зв'язок" має позначати міжнуклеотидний зв'язок, який є відносно стійким до деградації *in vivo* (наприклад, під дією екзо- чи ендонуклеази), порівняно з фосфодієфірним міжнуклеотидним зв'язком. Кращі стабілізовані міжнуклеотидні зв'язки включають, без обмеження, фосфоротіоат, фо-

сфоридитіоат, метилфосфонат та метилфосфоротіоат. Інші стабілізовані міжнуклеотидні зв'язки включають, без обмеження: пептидні, алкільні, дефосфо та інші, як описано вище.

Модифіковані скелети, такі як фосфоротіоати, можуть бути синтезовані автоматизованими методами з використанням фосфорамідатної або Н-фосфонатної хімії. Арил- та алкілфосфонати можуть бути одержані, наприклад, як описано у патенті США №4469863; а алкілфосфотрієфіри (у яких заряджена оксигенова група є алкілованою, як описано у патенті США №5023243 та Європейському патенті №092574) можуть бути одержані автоматизованим твердофазовим синтезом з використанням комерційно доступних реагентів. Способи здійснення інших модифікацій скелета ДНК та заміщень були описані (Uhlmann E. et al. (1990) Chem. Rev. 90:544; Goodchild J. (1990) Bioconjugate Chem. 1:165). Способи одержання химерних олігонуклеотидів є також відомими. Наприклад, патенти, видані на ім'я Uhlmann et al., описують такі методики.

Змішані ОДН з модифікованим скелетом можуть бути синтезовані з використанням комерційно доступного синтезатора ДНК та стандартної фосфорамідинової хімії. (F.E. Eckstein, "Oligonucleotides and Analogues - A Practical Approach" IRL Press. Oxford. UK. 1991, та M.D. Matteucci and M.H. Caruthers, Tetrahedron Lett, 21, 719 (1980)). Після проведення сполучення вводять PS-зв'язки шляхом сульфурізації з використанням реагенту Beaucage (R.P. Iyer, W. Egan, J.B. Regan and S.L. Beaucage, J. Am. Chem. Soc, 112, 1253 (1990)) (0,075M в ацетонітрилі) або фенілацетилдисульфиду (PADS) з наступним кепінг'єм з використанням оцтового ангідриду, 2,6-лутидину в тетрагідрофурані (1:1:8; об.:об.:об.) та N-метилімідазолу (16% у тетрагідрофурані). Цю стадію кепінгу проводять після реакції сульфурізації для мінімізації утворення небажаних фосфодієфірних (PO) зв'язків у положеннях, де мають знаходитися фосфоротіоатні зв'язки. У разі введення фосфодієфірного зв'язку, наприклад, в динуклеотид CrG, проміжний фосфор-III окиснюють шляхом обробки розчином йоду у воді/піридині. Після відщеплення від твердого носія та остаточного видалення захисних груп шляхом обробки концентрованим аміаком (15год. при 50°C), ОДН аналізують методом ВЕРХ на колонці Gen-Pak Fax (Millipore-Waters) з використанням градієнта NaCl (наприклад, буфер А: 10мМ MnH_2PO_4 у ацетонітрилі/воді = 1:4/об.:об. рН6,8; буфер В: 10мМ NaH_2PO_4 , 1,5М NaCl у ацетонітрилі/воді = 1:4/об.:об.; від 5 до 60% В за 30 хвилини зі швидкістю 1мл/хв.) чи капілярним гель-електрофорезом. ОДН може бути очищений методом ВЕРХ чи швидкої хроматографії білків високого розділення (FPLC) на колонці Source High Performance (Amersham Pharmacia). Гомогенні за результатами ВЕРХ фракції об'єднують та знесолюють на колонці C18 чи шляхом ультрафільтрації. ОДН аналізують методом часпролітної мас-спектрометрії з матричною лазерною десорбцією/іонізацією (MALDI-TOF) для підтвердження розрахункової маси.

Нуклеїнові кислоти за винаходом можуть також включати інші модифікації. Вони включають неіонні аналоги ДНК, такі як алкіл- та арилфосфати (у яких заряджений оксиген фосфонату замінений на алкільну чи арильну групу), фосфодієфіри та алкілфосфотрієфіри, у яких заряджена оксигенова група є алкілованою. Було продемонстровано, що нуклеїнові кислоти, які містять діол, такий як тетраетиленгліколь чи гексаетиленгліколь, на будь-якому чи з обох кінців, є по суті стійкими до деградації під дією нуклеази.

Розмір (тобто число нуклеотидних залишків по довжині нуклеїнової кислоти) імуностимулюючого олігонуклеотиду може також мати вплив на стимулюючу активність олігонуклеотиду. Для сприяння поглинанню клітинами імуностимулюючі олігонуклеотиди, краще, мають мінімальну довжину 6 нуклеотидних залишків. Нуклеїнові кислоти будь-якого розміру, що перевищує 6 нуклеотидів (навіть довжиною у багато тисяч нуклеотидів), є здатними індукувати імунну відповідь згідно з винаходом, якщо в них присутня достатня кількість імуностимулюючих мотивів, оскільки більші за розміром нуклеїнові кислоти усередині клітини розщеплюються. На думку авторів цього винаходу, напівм'які олігонуклеотиди, які складаються з усього лише 4 нуклеотидів, також можуть мати імуностимулюючі властивості, якщо вони можуть бути доставлені усередину клітини. У певних кращих варіантах утілення цього винаходу імуностимулюючі олігонуклеотиди мають довжину від 4 до 100 нуклеотидів. У типових варіантах утілення імуностимулюючі олігонуклеотиди мають довжину від β до 40 нуклеотидів. У певних кращих варіантах утілення відповідно до цього винаходу імуностимулюючі олігонуклеотиди мають довжину від 6 до 19 нуклеотидів.

Олігонуклеотиди за цим винаходом є нуклеїновими кислотами, які містять специфічні послідовності, що, як було знайдено, викликають імунну відповідь. Ці специфічні послідовності, що викликають імунну відповідь, називаються "імуностимулюючими мотивами", а олігонуклеотиди, що містять імуностимулюючі мотиви, називаються "молекулами імуностимулюючої нуклеїнової кислоти" та, еквівалентно, "імуностимулюючими нуклеїновими кислотами" чи "імуностимулюючими олігонуклеотидами". Імуностимулюючі олігонуклеотиди за винаходом, таким чином, включають щонайменше один імуностимулюючий мотив. У кращому варіанті втілення імуностимулюючий мотив є "внутрішнім імуностимулюючим мотивом". Термін "внутрішній імуностимулюючий мотив" стосується положення послідовності мотиву в довшій послідовності нуклеїнової кислоти, яка має довжину, більшу за послідовність мотиву на щонайменше один нуклеотид, приєднаний до обох 5'- та 3'-кінців послідовності імуностимулюючого мотиву.

У деяких варіантах утілення винаходу імуностимулюючі олігонуклеотиди включають імуностимулюючі мотиви, які є "СрG-динуклеотидами". СрG-динуклеотид може бути метилованим чи неметилованим. Імуностимулююча нуклеїнова кислота, що містить щонайменше один неметилований

СрG-динуклеотид, є молекулою нуклеїнової кислоти, яка містить неметилований цитозин-гуанінову динуклеотидну послідовність (тобто неметилований 5'-цитидин з наступним 3'-гуанозином, з'єднані фосфатним зв'язком) та активує імунну систему; така імуностимулююча нуклеїнова кислота є СрG-нуклеїновою кислотою. СрG-нуклеїнові кислоти були описані у ряді виданих патентів, опублікованих патентних заявках та інших публікаціях, включаючи патенти США №№6194388; 6207646; 6214806; 6218371; 6239116 та 6339068. Імуностимулююча нуклеїнова кислота, що містить щонайменше один метилований СрG-динуклеотид, є нуклеїновою кислотою, яка містить метиловану цитозин-гуанінову динуклеотидну послідовність (тобто метилований 5'-цитидин з наступним 3'-гуанозином, з'єднані фосфатним зв'язком) та активує імунну систему. В інших варіантах утілення імуностимулюючі олігонуклеотиди не містять СрG-динуклеотидів. Такі олігонуклеотиди, що не містять СрG-динуклеотидів, називаються не-СрG олігонуклеотидами і містять не-СрG імуностимулюючі мотиви. Винахід, таким чином, охоплює також нуклеїнові кислоти з іншими типами імуностимулюючих мотивів, які можуть бути метилованими чи неметилованими. Імуностимулюючі олігонуклеотиди за винаходом, далі, можуть включати будь-яку комбінацію метилованих та неметилованих СрG- та не-СрG-імуностимулюючих мотивів.

Що стосується СрG-нуклеїнових кислот, то нещодавно було знайдено, що існують різні класи СрG-нуклеїнових кислот. Один клас є сильним активатором В-клітин, але відносно слабо індукуює активацію IFN- α та NK-клітин; цей клас був названий В-класом. СрG-нуклеїнові кислоти В-класу типово є повністю стабілізованими і включають неметилований СрG-динуклеотид у певних кращих нуклеотидних контекстах. Дивіться, наприклад, патенти США №№6194388; 6207646; 6214806; 6218371; 6239116 та 6339068. Інший клас є сильним активатором індування IFN α та NK-клітин, але відносно слабо стимулює В-клітини; цей клас був названий А-класом. СрG нуклеїнові кислоти А-класу типово мають стабілізовані полі-G послідовності на 5'- та 3'-кінцях і паліндромну фосфодієфірну послідовність, що містить СрG-динуклеотид, яка складається з щонайменше 6 нуклеотидів. Дивіться, наприклад, опубліковану патентну заявку РСТ/US00/26527 (WO 01/22990). Ще інший клас СрG-нуклеїнових кислот активує В-клітини і NK-клітини та індукуює IFN α ; цей клас був названий С-класом. СрG нуклеїнові кислоти С-класу, як зазначалося вище, є типово повністю стабілізованими, включають послідовність типу В-класу та паліндромну чи близьку до паліндромної послідовність з підвищеним вмістом GC. Цей клас був описаний у попередній патентній заявці США №60/313273, поданій 17 серпня 2001р., що розглядається паралельно даній заявці, та №10/224523, поданій 19 серпня 2002р., вміст якої цілком включений сюди за посиланням. Деякі необмежуючі приклади нуклеїнових кислот С-класу включають:

SEQ ID NO Послідовність

У цих формулах N позначає будь-який нуклеотид, N₁ позначає 0-6 нуклеотидів, N₂ позначає 0-7 нуклеотидів, N₃ позначає 0-4 нуклеотиди, N₄ позначає 1-5 нуклеотидій, N₅ позначає 0-7 нуклеотидів, N₆ та N₇ незалежно мають довжину від 1 до 5 нуклеотидів, N₈ має довжину від 4 до 10 нуклеотидів, N₉ має довжину від 0 до 3 нуклеотидів, і N₁₀ має довжину від 4 до 8 нуклеотидів. X₁, X₂, X₃ та X₄ позначають незалежно С чи G. Ці формули визначають підгрупи класу CpG-олігонуклеотидів, які демонструють чудові імуностимулюючі властивості й при цьому є більш чутливими до розщеплення в організмі, ніж повністю фосфоротіоатні олігонуклеотиди. У формулі 5' позначає вільний 5'-кінець олігонуклеотиду і 3' позначає вільний 3'-кінець олігонуклеотиду.

Терміни "нуклеїнова кислота" та "олігонуклеотид" також охоплює нуклеїнові кислоти чи олігонуклеотиди із заміщеннями чи модифікаціями, такими як у складі основ та/або цукрах. Наприклад,

вони включають нуклеїнові кислоти, які мають цукри основного ланцюга, ковалентно з'єднані з низькомолекулярними органічними групами, що відрізняються від гідроксильної групи в 2'-положенні та від фосфатної групи чи гідроксильної групи в 5'-положенні. Модифіковані таким чином нуклеїнові кислоти можуть включати 2'-О-алкіловану рибозну групу. Крім того, модифіковані нуклеїнові кислоти можуть включати цукри, такі як арабіноза чи 2'-флюорарабіноза, замість рибози. Таким чином, нуклеїнові кислоти можуть мати гетерогенний склад скелета, який при цьому містить будь-які можливі комбінації полімерних ланок, з'єднаних разом, таких як пептид-нуклеїнові кислоти (які мають амінокислотний основний ланцюг з основами нуклеїнових кислот).

Нуклеїнові кислоти також включають заміщені пурини та піримідини, такі як С-5 пролінпіримідин та 7-деаза-7-заміщений пурин-модифіковані основи (Wagner RW et al. (1996) Nat. Biotechnol. 14: 840-4). Пурини та піримідини включають, без обмеження, аденін, цитозин, гуанін, тимін, 5-метилцитозин, 5-гідроксицитозин, 5-флюорцитозин, 2-амінопурин, 2-аміно-6-хлорпурин, 2,6-діамінопурин, гілоксантин та інші природні та неприродні основи нуклеїнових кислот, заміщені та незаміщені ароматичні фрагменти. Інші такі модифікації добре відомі фахівцям у цій галузі техніки.

Імуностимулюючі олігонуклеотиди за цим винаходом можуть охоплювати різні хімічні модифікації та заміщення порівняно з природними РНК та ДНК, які включають фосфодієфірний міжнуклеотидний місточок, β -D-рибозну ланку та/або основу природного нуклеотиду (аденін, гуанін, цитозин, тимін, урацил). Приклади хімічних модифікацій відомі кваліфікованим фахівцям і описані, наприклад, у 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: 107-129; та Hunziker J. et al. (1995) Mod. Synth. Methods 7: 331-417. Олігонуклеотид за винаходом може мати одну чи більше модифікацій, причому кожна модифікація розташована у певному фосфодієфірному міжнуклеотидному місточковому зв'язку та/або у певній β -D-рибозній ланці та/або у певному положенні основи природного нуклеотиду, порівняно з олігонуклеотидом, що має таку саме послідовність, який складається з природної ДНК чи РНК.

Наприклад, винахід стосується олігснуклеотиду, який може включати одну чи більше модифікацій, і у якому кожна модифікацію незалежно вибирають з:

а) заміщення фосфодієфірного міжнуклеотидного містка, розташованого на 3'- та/або 5'-кінці нуклеотиду, на модифікований міжнуклеотидний місток,

б) заміщений фосфодієфірного містка, розташованого на 3'- та/або 5'-кінці нуклеотиду, на дефосфо-місток,

с) заміщений ланки фосфату цукру є цукрофосфатному скелеті на іншу ланку,

д) заміщений β -D-рибозної ланки на ланку модифікованого цукру, і

е) заміщений природної нуклеотидної основи на модифіковану нуклеотидну основу.

Більш детальними прикладами хімічної модифікації олігонуклеотиду є такі.

Фосфодієфірний міжнуклеотидний місток, розташований на 3'- та/або 5'-кінці нуклеотиду, може бути заміщений на модифікований міжнуклеотидний місток, де модифікований міжнуклеотидний місток, наприклад, вибирають з фосфоротіоатного, фосфородитіоатного, NR^1R^2 -фосфорамідатного, боронофосфатного, α -гідроксибензилфосфонатного, фосфат-(C_1 - C_{21})-О-алкілєфірного, фосфат-[(C_6 - C_{12})-арил-(C_1 - C_{21})-О-алкіл]-єфірного, (C_1 - C_8)-алкілфосфонатного та/або (C_6 - C_{12})-арилфосфонатного містків, (C_7 - C_{12})- α -гідроксиметиларилу (наприклад, розкритого у WO 95/01363), де (C_6 - C_{12})-арил, (C_6 - C_{20})-арил та (C_6 - C_{11})-арил є необов'язково заміщеними галогеном, алкілом, алкоксигрупою, нітрогрупою, ціаногрупою, і де R^1 та R^2 позначають, незалежно один від одного, гідроген, (C_1 - C_{18})-алкіл, (C_6 - C_{20})-арил, (C_6 - C_{14})-арил-(C_1 - C_8)-алкіл, краще, гідроген, (C_1 - C_8)-алкіл, краще, (C_1 - C_4)-алкіл та/або метоксиетил, або R^1 та R^2 утворюють, разом з атомом нітрогену, до якого вони приєднані, 5-6-членне гетероциклічне кільце, яке може додатково містити додатковий гетероатом з групи, що складається з O, S та N.

Заміщення фосфодієфірного містка, розташованого на 3'- та/або 5'-кінці нуклеотиду, на дефосфомісток (дефосфомістки описані, наприклад, Uhlmann E. та Peyman A., у "Methods in Molecular Biology", Vol.20, "Protocols for Oligonucleotides and Analogs", S. Agrawal, Ed., Humana Press, Totowa 1993, Chapter 16, pp.355 і далі), де дефосфомісток, наприклад, вибирають з дефосфомісточкових формацетальної, 3'-тіоформацетальної, метилгідроксисиламінної, оксимної, метилдендиметилгідрозо-, диметилсульфонові та/або силільної груп.

Цукрофосфатна ланка (тобто β -D-рибоза та фосфодієфірний міжнуклеотидний місток, які разом утворюють цукрофосфатну ланку) з цукрофосфатного скелета (тобто цукрофосфатного скелета, що складається з цукрофосфатних ланок), що складається з цукрофосфатних ланок) може бути заміщена на іншу, причому інша ланка є, наприклад, придатною для утворення "морфоліно-похідного" олігомеру (як описано, наприклад, у Stirchak E.P. et al. (1989) Nucleic Acids Res. 17: 6129-41), тобто, наприклад, заміщеною на морфоліно-похідну ланку; або для утворення поліамідної нуклеїнової кислоти ("PNA"; як описано, наприклад, у Nielsen PE et al. (1994) Bioconjug. Chem. 5: 3-7), тобто, наприклад, заміщеною на PNA-ланку скелета, наприклад, на 2-аміноетилгліцин.

β -Рибозна ланка чи β -D-2'-дезоксирибозна ланка може бути заміщена на модифіковану цукрову ланку, де модифіковану цукрову ланку, наприклад, вибирають з β -D-рибози, α -D-2'-дезоксирибози, L-2'-дезоксирибози, 2'-F-2'-дезоксирибози, 2'-F-арабінози, 2'-O-(C_1 - C_6)-алкілрибози, краще, 2'-O-(C_1 - C_6)-алкілрибоза є 2'-O-метилрибозою, 2'-O-(C_2 - C_6)-алкілрибозою, 2'-[O-(C_1 - C_6)-алкіл-O-(C_1 - C_6)-алкіл]рибози, 2'-NH₂-2'-дезоксирибози, β -D-ксилофуранози, α -

арабінофуранози, 2,4-дидезокси- β -D-еритрогексопіранози та карбоциклічного (описаного, наприклад, у Froehner J. (1992) *Am. Chem. Soc.* 114: 8320) та/або з відкритим ланцюгом аналога цукру (описаного, наприклад, у Vandendriessche et al. (1993) *Tempahedron* 49:7223) та/або біциклоцукрового аналога (описаного, наприклад, у Tarkov M. et al. (1993) *Helv. Chim. Acta* 76: 481).

У деяких кращих варіантах утілення цукор є 2'-О-метилрибозою, особливо у випадку одного чи обох нуклеотидів, з'єднаних фосфодієфірним чи фоефодієфіро-подібним міжнуклеотидним зв'язком.

Нуклеїнові кислоти також включають заміщені пурини та піримідини, такі як С-5 пропінпіримідинові та 7-деаза-7-заміщені пуринові модифіковані основи (Wagner R.W. et al. (1996) *Nat. Biotechnol.* 14: 840-4). Пурини та піримідини включають, без обмеження, аденін, цитозин, гуанін і тимін та інші природні та неприродні основи нуклеїнових кислот, заміщені та незаміщені ароматичні фрагменти.

Модифікована основа є будь-якою основою, що хімічно відрізняється від природних основ, які типово входять до складу ДНК та РНК, таких як Т, С, G, А та U, але має спільну базову хімічну структуру з цими природними основами. Модифікована нуклеотидна основа може бути, наприклад, вибрана з гіпоксантину, урацилу, дигідроурацилу, псевдоурацилу, 2-тіоурацилу, 4-тіоурацилу, 5-аміноурацилу, 5-(C₁-C₆)-алкілурацилу, 5-(C₂-C₆)-алкенілурацилу, 5-(C₂-C₆)-алкінілурацилу, 5-(гідроксиметил)урацилу, 5-хлорурацилу, 5-флюорурацилу, 5-бромуррацилу, 5-гідроксицитозину, 5-(C₁-C₆)-алкілцитозину, 5-(C₂-C₆)-алкенілцитозину, 5-(C₂-C₆)-алкінілцитозину, 5-хлорцитозину, 5-флюорцитозину, 5-бромцитозину, N²-диметилгуаніну, 2,4-діамінопурину, 8-азапурину, заміщеного 7-деазапурину, краще, 7-деаза-7-заміщеного та/або 7-деаза-8-заміщеного пурину, 5-гідроксиметилцитозину, N4-алкілцитозину, наприклад, N4-етилцитозину, 5-гідроксидезоксицитидину, 5-гідроксиметилдезоксицитидину, N4-алкілдезоксицитидину, наприклад, N4-етилдезоксицитидину, 6-тіодезоксигуанозину та дезоксирибонуклеотидів нітропіролу, C5-пропінпіримідину та діамінопурину, наприклад, 2,6-діамінопурину, інозину, 5-метилцитозину, 2-амінопурину, 2-аміно-6-хлорпурину, гіпоксантину чи інших модифікацій природної нуклеотидної основи. Цей перелік є типовим і не повинен тлумачитися як обмежувачий.

У конкретних описаних тут формулах визначений ряд модифікованих основ. Наприклад, літера Y використовується для позначення нуклеотиду, який містить цитозин чи модифікований цитозин. Модифікований цитозин у тому значенні, яке тут використовується, є природною чи неприродною піримідиною основою -аналогом цитозину, яка може заміщати цю основу, не погіршуючи імуностимулюючу активність олігонуклеотиду. Модифіковані цитозини включають, без обмеження, 5-заміщені цитозини (наприклад, 5-метилцитозин, 5-флюорцитозин, 5-хлорцитозин, 5-бромцитозин,

5'йодцитозин, 5-гідроксицитозин, 5-гідроксиметилцитозин, 5-дифлюорметилцитозин та незаміщений чи заміщений 5-алкінілцитозин), 6-заміщені цитозини, N4-заміщені цитозини (наприклад, N4-етилцитозин), 5-азацитозин, 2-меркаптоцитозин, ізоцитозин, псевдоізоцитозин, аналоги цитозину з конденсованими кільцевими системами (наприклад, N,N'-пропіленцитозин чи феноксазин) та урацил і його похідні (наприклад, 5-флюорурацил, 5-бромуррацил, 5-бромнілурацил, 4-тіоурацил, 5-гідроксиурацил, 5-пропінілурацил). Деякі з кращих цитозинів включають 5-метилцитозин, 5-флюорцитозин, 5-гідроксицитозин, 5-гідроксиметилцитозин та N4-етилцитозин. В іншому варіанті втілення винаходу цитозинова основа заміщена універсальною основою (наприклад, 3-нітропіролом, Р-основою), ароматичною кільцевою системою (наприклад, флюорбензолом чи дифлюорбензолом) або атомом гідрогену (dSpacer).

Літера Z використовується для позначення гуаніну чи модифікованої гуанінової основи. Модифікований гуанін у тому значенні, яке тут використовується, позначає природну чи неприродну пуринову основу-аналог гуаніну, яка може заміщати цю основу, не погіршуючи імуностимулюючу активність олігонуклеотиду. Модифіковані гуаніни включають, без обмеження, 7-деазагуанін, 7-деаза-7-заміщений гуанін (такий як 7-деаза-7-(C₂-C₆)-алкінілгуанін), 7-деаза-8-заміщений гуанін, гіпоксантин, N2-заміщені гуаніни (наприклад, N2-метилгуанін), 5-аміно-3-метил-3Н,6Н-тіазоло[4,5-d]піримідин-2,7-діон, 2,6-діамінопурин, 2-амінопурин, пурин, індол, аденін, заміщені аденіни (наприклад, N6-метиладенін, 8-оксоаденін), 8-заміщений гуанін (наприклад, 8-гідроксигуанін та 8-бромгуанін) та 6-тіогуанін. В іншому варіанті втілення винаходу гуанінову основу заміщають універсальною основою (наприклад, 4-метиліндолом, 5-нітроіндолом та К-основою), ароматичною кільцевою системою (наприклад, бензімідазолом чи дихлорбензімідазолом, амідом 1-метил-1Н-[1,2,4]тріазол-3-карбонової кислоти) чи атомом гідрогену (dSpacer).

Олігонуклеотиди можуть мати один чи більше доступних 5'-кінців. Можна створити модифіковані олігонуклеотиди, що мають два таких 5'-кінця. Це може бути здійснено, наприклад, шляхом з'єднання двох олігонуклеотидів через 3'-3'-зв'язок для одержання олігонуклеотиду, який має один чи два доступних 5'-кінця. 3'-3'-зв'язок може бути фосфодієфірним, фосфоротіоатним чи будь-яким іншим модифікованим міжнуклеотидним містком. Методи утворення таких зв'язків відомі фахівцям. Наприклад, такі зв'язки були описані Seliger, H. et al., *Oligonucleotide analogs with terminal 3'-3'- та 5'-5'-internucleotidic linkages as antisense inhibitors of viral gene expression*, *Nucleotides & Nucleotides* (1991), 10(1-3), 469-77, та Jiang, et al., *Pseudocyclic oligonucleotides: in vitro and in vivo properties*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (1999), 7(12), 2727-2735.

Крім того, 3'3'-зв'язані нуклеїнові кислоти у тих випадках, коли зв'язок між 3'-термінальними нуклеотидами не є фосфодієфірним, фосфоротіоат-

ним чи іншим модифікованим містком, можуть бути одержані з використанням додаткового спейсера, такого як три- чи тетраетиленглікольфосфатний фрагмент (Durand, M. et al., Triple-helix formation by an oligonucleotide containing one (dA)₁₂ and two (dT)₁₂ sequences bridged by two hexaethylene glycol chains, *Biochemistry* (1992), 31(38), 9197-204, патент США №5658738 та патент США №5668265). За іншим варіантом, нуклеотидний лінкер може бути створений з етандіолу, пропандіолу, чи з неосновної дезоксирибозної (dSpacer) ланки (Fontanel, Marie Laurence et al., Sterical recognition by T4 polynucleotide kinase of non-nucleosidic moieties 5-attached to oligonucleotides; *Nucleic Acids Research* (1994), 22(11), 2022-7) з використанням стандартної фосфорамідитної хімії. Нуклеотидні лінкери можуть бути включені один чи кілька разів, або об'єднані один з одним з утворенням будь-якої бажаної відстані між 3'-кінцями двох ОДН, що мають бути з'єднані.

Нещодавно було повідомлено, що CpG-олігонуклеотиди, певно, виявляють свою імуностимулюючу дію шляхом взаємодії з Toll-подібним рецептором 9 (TLR9). Hemmi H et al. (2000) *Nature* 408: 740-5. Таким чином, можна визначити сигнальну активність TLR9 у відповідь на CpG-олігонуклеотид чи іншу імуностимулюючу нуклеїнову кислоту шляхом вимірювання NF-κB, NF-κB-асоційованих сигналів і придатних подій та проміжних продуктів вище за NF-κB.

Для використання у цьому винаході олігонуклеотиди за винаходом можуть бути синтезовані de novo із застосуванням будь-якої з ряду процедур, добре відомих фахівцям. Це, наприклад, b-ціаноетилфосфорамідитний метод (Beaucage, S.L., and Caruthers, M.H., *Tet. Let.* 22: 1859, 1981); нуклеотид-Н-фосфонатний метод (Garegg et al., *Tet. Let.* 27: 4051-4054, 1986; Froehler et al., *Nucl/Acid. Res.* 14: 5399-5407, 1986; Garegg et al., *Tet. Let.* 27: 4055-4058, 1986; Gaffney et al., *Tet. Let.* 29: 2619-2622, 1988). Ці хімічні процедури можуть бути здійснені з використанням різноманітних автоматизованих синтезаторів нуклеїнових кислот, доступних на ринку. Ці олігонуклеотиди називаються синтетичними олігонуклеотидами. Ізольований олігонуклеотид загалом стосується олігонуклеотиду, який є відокремленим від компонентів, з якими він звичайно асоційований у природі. Як приклад, ізольованим може бути олігонуклеотид, виділений з клітини, ядра, мітохондрії чи хроматину.

Олігонуклеотиди є частково стійкими до деградації (наприклад, є стабілізованими). "Стабілізована олігонуклеотидна молекула" має позначати олігонуклеотид, який є відносно стійким до деградації in vivo (наприклад, під дією екзо- чи ендонуклеази). Стабілізації нуклеїнової кислоти можна досягти шляхом модифікації скелета. Олігонуклеотиди, що мають фосфоротіоатні зв'язки, забезпечують максимальну активність та захищають олігонуклеотид від розщеплення внутрішньоклітинними екзо- та ендонуклеазами. Інші модифіковані олігонуклеотиди включають модифіковані фосфодієфірні нуклеїнові кислоти,

комбінації фосфодієфірних та фосфоротіоатних нуклеїнових кислот, метилфосфонат, метилфосфоротіоат, фосфородитіоат, р-етокси та їхні комбінації.

Модифіковані скелети, такі як фосфоротіоатні, можуть бути синтезовані автоматизованими методами з використанням фосфорамідитної чи Н-фосфонатної хімії. Арил- та алкілфосфонати можуть бути одержані, наприклад, як описано у патенті США №4469863; а алкілфосфотрієфіри (у яких заряджена оксигенова група є алкілованою, як описано у патенті США №5023243 та Європейському патенті №092574) можуть бути одержані автоматизованим твердофазовим синтезом з використанням комерційно доступних реагентів. Способи здійснення інших модифікацій скелета ДНК та заміщень були описані (наприклад, Uhlmann, E. and Peyman, A., *Chem. Rev.* 90: 544, 1990; Goodchild, J., *Bioconjugate Chem.* 1: 165, 1990).

Інші стабілізовані олігонуклеотиди включають: неіонні аналоги ДНК, такі як алкіл- та арилфосфати (у яких заряджений фосфонатний оксиген є заміщеним алкільною чи арильною групою), фосфодієфіри та алкілфосфотрієфіри, у яких заряджена оксигенова група є алкілованою. Було продемонстровано, що нуклеїнові кислоти, що містять діол, такі як тетраетиленгліколь чи гексаетиленгліколь, на одному чи обох кінцях, також є по суті стійкими до нуклеазного гідролізу.

Хоч ефекти CpG у мишей є добре охарактеризованими, інформація стосовно систем людини є обмеженою. CpG-фосфоротіоатні олігонуклеотиди з високою стимулюючою активністю у мишачих системах виявляють нижчу активність в імунних клітинах людини та інших негризунів. У прикладах описана розробка сильнодіючого людського CpG-мотиву та характеристика його дії механізмів дії на РВМ людини, наприклад, В-клітини та НК-клітини. ДНК, що містять ці CpG-мотиви та мають частково модифіковані скелети, сильно стимулюють клітини периферичної крові людини до продукування IL-6, IL-10, IP-10, ФНП-α, IFN-α та IFN-γ. Рівень IFN-γ зростає вище контрольного. НК-клітини та Т-клітини також індукувалися до експресії підвищених рівнів CD69.

Було знайдено, згідно з винаходом, що підгрупи імуностимулюючих олігонуклеотидів CpG мають дуже сильну імуностимулюючу дію на клітини людини, такі як НК-клітини, тим самим дозволяючи припустити, що ці імуностимулюючі CpG-олігонуклеотиди є ефективними терапевтичними агентами для вакцинації людини, імунотерапії раку, імунотерапії астми, загального посилення імунної функції, посилення відновлення гематопоезу після променевої чи хіміотерапії, при аутоімунних хворобах та для інших імуномодулюючих галузей застосування.

Таким чином, імуностимулюючі CpG-олігонуклеотиди є придатними для використання у деяких аспектах винаходу як вакцина для лікування суб'єкта з ризиком розвитку алергії чи астми, з інфекцією інфекційним організмом чи раком, при якому був ідентифікований специфічний раковий антиген. Імуностимулюючі CpG-олігонуклеотиди

можуть також застосовуватися без антигену чи алергену для захисту від інфекції, алергії чи раку, і у цьому разі повторні дози можуть забезпечити більш тривалий захист. Суб'єкт з ризиком захворювання в тому значенні, яке тут використовується, є суб'єктом, який має будь-який ризик експозиції патогеном, що спричинює інфекцію чи рак, або алергеном, або ризик розвитку раку. Наприклад, суб'єкт з ризиком хвороби може бути суб'єктом, який планує поїздки до місцевості, де знайдений певний тип інфекційного агента, або він може бути суб'єктом, який через свій спосіб життя чи медичні процедури зазнає контакту з рідинами організму, що можуть містити інфекційні організми, чи безпосередньо з такими організмами, або навіть будь-яким суб'єктом, що проживає у місцевості, де був ідентифікований інфекційний організм чи алерген. Суб'єкти з ризиком розвитку інфекції включають також загальну популяцію, якій медичні установи рекомендують вакцинацію певним антигеном інфекційного організму. Якщо антиген є алергеном, а у суб'єкта виникають алергічні реакції на цей конкретний антиген і суб'єкт може бути експонований антигеном, наприклад, під час сезону пилку, то цей суб'єкт має ризик експозиції антигеном. Суб'єкт з ризиком розвитку алергії чи астми включає тих суб'єктів, які були ідентифіковані як такі, що мають алергію чи астму, але не мають активних проявів хвороби під час лікування імуностимулюючим CpG-олігонуклеотидом, а також суб'єктів, які вважаються такими, що мають ризик розвитку цих хвороб унаслідок генетичних чи екологічних факторів.

Суб'єкт з ризиком розвитку раку є таким, що має високу ймовірність розвитку раку. Ці суб'єкти включають, наприклад, суб'єктів з генетичними аномаліями, присутність яких, як було продемонстровано, корелює з високою ймовірністю розвитку раку, та суб'єктів, експонованих агентами, що спричиняють рак, такими як тютюн, азбест чи інші хімічні токсини, або суб'єктів, які раніше лікувалися з приводу раку і зараз мають явну ремісію. Якщо суб'єкт з ризиком розвитку раку проходить лікування антигеном, специфічним до того типу раку, ризик розвитку якого існує для суб'єкта, та імуностимулюючим CpG-олігонуклеотидом, то у суб'єкта може виникнути здатність убивати ракові клітини по мірі їхнього розвитку. Якщо у суб'єкта починає утворюватися пухлина, то у суб'єкта розвивається специфічна імунна відповідь проти пухлинного антигену.

Крім використання імуностимулюючих CpG-олігонуклеотидів для превентивного лікування, винахід також охоплює використання імуностимулюючих CpG-олігонуклеотидів для лікування суб'єкта, який має інфекцію, алергію, астму чи рак.

Суб'єкт, що має інфекцію, є суб'єктом, який був експонований інфекційним патогеном і має гострі чи хронічні виявлені рівні патогену в організмі. Імуностимулюючі CpG-олігонуклеотиди можуть бути використані з антигеном чи без нього для створення антигенспецифічної системної чи мукозальної імунної відповіді, здатної знизити рівень чи винищити інфекційний патоген. Інфекційна хвороба в тому значенні, яке тут використовується,

є хворобою, що виникає внаслідок присутності чужорідного мікроорганізму в організмі. Надзвичайно важливо розробити ефективні стратегії та процедури вакцинації для захисту слизових поверхонь організму, які є первинною ділянкою потрапляння патогенів до організму.

Суб'єкт, що має алергію, є суб'єктом, який виявляє чи має ризик розвитку алергічної реакції у відповідь на алерген. Алергія стосується набутої гіперчутливості до речовини (алергену). Алергічні стани включають, без обмеження, екзему, алергічний риніт чи риніт, сінну гарячку, кон'юнктивіт, бронхіальну астму, кропив'янку (висип) і харчові алергії та інші алергічні стани.

Алергії загалом спричинені генеруванням антитіла IgE проти нешкідливих алергенів. Цитокіни, індуковані системним чи мукозальним введенням імуностимулюючих CpG-олігонуклеотидів, належать переважно до класу, іменованому Th1 (прикладом є IL-12, IP-10, IFN- α та IFN- γ), й індукують як гуморальну, так і клітинну імунну відповідь. Інший важливий тип імунної відповіді, асоційований з продукуванням цитокінів IL-4 та IL-5, називається імунною відповіддю Th2. Загалом, по-видимому, алергічні хвороби медіюються імунними відповідями типу Th2. Враховуючи здатність імуностимулюючих CpG-олігонуклеотидів зсувати імунну відповідь суб'єкта від переважно Th2 (яка асоційована з продукуванням антитіл IgE та алергією) до збалансованої Th2/Th1-відповіді (яка захищає від алергічних реакцій), ефективна для індукування імунної відповіді доза імуностимулюючого CpG-олігонуклеотиду може бути введена суб'єкту для лікування чи профілактики астми та алергії.

Таким чином, імуностимулюючі CpG-олігонуклеотиди мають значну терапевтичну користь у лікуванні алергічних та неалергічних станів, таких як астма. Рівні цитокінів Th2, особливо IL-4 та IL-5, є підвищеними у дихальних шляхах астматичних суб'єктів. Ці цитокіни промотують важливі аспекти астматичної запальної відповіді, включаючи ізотипне перемикання IgE, хемотаксис еозинофілу та активацію і ріст мастоцитів. Цитокіни Th1, особливо IFN- γ та IL-12, можуть пригнічувати утворення клонів Th2 та продукування цитокінів Th2. Астма стосується розладу дихальної системи, який характеризується запаленням, звуженням дихальних шляхів та підвищеною реактивністю дихальних шляхів щодо вдихуваних агентів. Астма часто, хоч і не виключно, асоційована з atopічними чи алергічними симптомами.

Суб'єкт з раковим захворюванням має виявлені ракові клітини. Рак може бути злоякісним чи незлоякісним. Раки чи пухлини включають, без обмеження, рак жовчних шляхів; рак мозку; рак молочної залози; рак шийки матки; хоріокарциному; рак ободової кишки; ендометріальний рак; рак стравоходу; рак шлунка; внутрішньоєпітеліальні неоплазми; лімфоми; рак печінки; рак легень (наприклад, дрібноклітинний та великоклітинний); меланому; нейробластоми; рак ротової порожнини; рак яєчника; рак підшлункової залози; рак простати; рак прямої кишки; саркоми; рак шкіри; тестикулярний рак; рак щитовидної залози та рак

нирок, а також інші карциноми та саркоми. В одному варіанті втілення рак є лейкоемічним ретикулезом, хронічною мієлогенною лейкоемією, шкірною Т-клітинною лейкоемією, множинною мієломою, фолікулярною лімфомою, злоякісною меланою, плоскоклітинною карциномою, нирково-клітинною карциномою, карциномою простати, карциномою клітин сечового міхура чи карциномою ободової кишки.

Суб'єкт має позначати людину чи хребетну тварину, включаючи, без обмеження, собаку, кішку, коня, корову, свиню, вівцю, козу, індичку, курча, примата, наприклад, мавпу, та рибу (водогосподарчі види), наприклад, лосося. Таким чином, винахід може також бути використаний для лікування раку та пухлин, інфекції та алергій/астми у суб'єктів, крім людини. Рак є однією з провідних причин смерті тварин-компаньйонів (тобто кішок та собак).

У тому значенні, яке тут використовується, терміни "лікувати", "що лікується" та "лікування", при використанні по відношенню до розладу, такого як інфекційні хвороби, рак, алергія чи астма, стосуються превентивного лікування, яке підвищує резистентність суб'єкта до розвитку хвороби (наприклад, інфекції патогену) або, іншими словами, знижує ймовірність того, що у суб'єкта розів'ється хвороба (наприклад, він буде інфікованим патогеном), а також лікування, яке проводиться після розвитку хвороби у суб'єкта для боротьби з хворобою (наприклад, зменшення чи знищення інфекції) або запобігання погіршенню хвороби.

У тих випадках, коли CpG-олігонуклеотид вводиться з антигеном, суб'єкт може бути експонований антигеном. У тому значенні, яке тут використовується, термін "експонований" стосується активної стадії контактування суб'єкта з антигеном або пасивного експонування суб'єкта антигеном *in vivo*. Методи активного експонування суб'єкта антигеном добре відомі фахівцям. Загалом антиген вводиться безпосередньо суб'єкту у будь-який спосіб, такий як внутрішньовенне, внутрішньом'язове, пероральне, трансдермальне, мукозальне, інтраназальне, інтратрахеальне чи підшкірне введення. Антиген може бути введений системно чи локально. Методи введення антигену та імуностимулюючого CpG-олігонуклеотиду детальніше описані далі. Суб'єкт пасивно експонований антигеном, якщо антиген стає доступним для експозиції імунних клітин в організмі. Суб'єкт може бути пасивно експонований антигеном, наприклад, шляхом потрапляння чужорідного патогену в організм чи шляхом розвитку пухлинної клітини, що експресує чужорідний антиген на своїй поверхні.

Способи, в які суб'єкт є пасивно експонований антигеном, можуть бути особливо залежними від часу введення імуностимулюючого CpG-олігонуклеотиду. Наприклад, стосовно суб'єкта з ризиком розвитку раку чи інфекційної хвороби або алергічної чи астматичної реакції, імуностимулюючий CpG-олігонуклеотид може вводиться суб'єкту на регулярній основі у той час, коли ризик є найбільшим, тобто протягом сезону алергії чи після експонування агентом, що спричинює рак. Додатково, імуностимулюючий CpG-олігонуклеотид може бути введений мандрівникам перед їхньою поїз-

здкою до іноземних країн, де вони мають ризик експозиції інфекційними агентами. Аналогічно, імуностимулюючий CpG-олігонуклеотид може бути введений солдатам чи цивільним особам з ризиком експозиції біологічною зброєю з метою індукції системної чи мукозальної імунної відповіді на антиген, коли та якщо суб'єкт буде експонований ним.

Антиген у тому значенні, яке тут використовується, є молекулою, здатною провокувати імунну відповідь. Антигени включають, без обмеження, клітини, клітинні екстракти, протеїни, поліпептиди, пептиди, полісахариди, кон'югати полісахаридів, пептидні та непептидні аналоги полісахаридів та інших молекул, малі молекули, ліпіди, гліколіпіди, вуглеводи, віруси та вірусні екстракти і багатоклітинні організми, такі як паразити та алергени. Термін "антиген" у широкому розумінні включає будь-який тип молекул, що розпізнаються імунною системою хазяїна як чужорідні. Антигени включають, без обмеження, ракові антигени, мікробні антигени та алергени.

Раковий антиген у тому значенні, яке тут використовується, є сполукою, такою як пептид чи протеїн, асоційованою з пухлиною чи поверхнею ракової клітини та здатною провокувати імунну відповідь при експресії на поверхні антигенпрезентуючої клітини у контексті молекули головного комплексу гістосумісності (МНС). Ракові антигени можуть бути одержані з ракових клітин шляхом приготування сирових екстрактів ракових клітин, наприклад, як описано у Cohen et al., 1994, *Cancer Research*, 54: 1055, шляхом часткового очищення антигенів, за допомогою рекомбінантної технології, або шляхом синтезу *de novo* відомих антигенів. Ракові антигени включають, без обмеження, антигени, що рекомбінантно експресуються, імуногенну частину, або цілу пухлину чи рак. Такі антигени можуть бути ізольовані чи одержані рекомбінантно чи у будь-які інші способи, відомі фахівцям.

Мікробний антиген у тому значенні, яке тут використовується, є антигеном мікроорганізму і включає, без обмеження, вірус, бактерії, паразитів та грибки. Такі антигени включають інтактні мікроорганізми, а також природні ізоляти та фрагменти чи їхні похідні, та синтетичні сполуки, які є ідентичними чи подібними до природних антигенів мікроорганізмів й індукують імунну відповідь, специфічну для цього мікроорганізму. Сполука є подібною до природного антигену мікроорганізму, якщо вона індукує імунну відповідь (гуморальну та/або клітинну) на природний антиген мікроорганізму. Такі антигени широко використовуються у техніці й добре відомі фахівцям.

Приклади вірусів, що були знайдені у людей, включають, без обмеження: *Retroviridae* (наприклад, віруси імунонедостатності людини, такі як ВІЛ-1 (який також називають HDTV-III, LAV чи HTLV-III/LAV, чи ВІЛ-III; та інші ізоляти, такі як ВІЛ-LP; *Picornaviridae* (наприклад, поліовіруси, вірус гепатиту А; ентеровіруси, людські віруси Коксакі, риновіруси, ECHO-віруси); *Caliciviridae* (наприклад, штами, які спричинюють гастроентерит); *Togaviridae* (наприклад, віруси конячого енцефаліту, віруси корової краснухи); *Flaviridae* (наприклад,

віруси денге, віруси енцефаліту, віруси жовтої гарячки); Coronoviridae (наприклад, коронавіруси); Rhabdoviridae (наприклад, віруси везикулярного стоматиту, віруси сказу); Filoviridae (наприклад, віруси ебола); Paramyxoviridae (наприклад, віруси парагрипу, вірус епідемічного паротиту, вірус кору, респіраторний синцитіальний вірус); Orthomyxoviridae (наприклад, віруси грипу); Bunyaviridae (наприклад, віруси Hantaan, віруси бунга (bunga), флєбовіруси та віруси Nairo); Arenaviridae (віруси геморагічної гарячки); Reoviridae (наприклад, реовіруси, орбівіруси та ротавіруси); Birnaviridae; Herpesviridae (вірус гепатиту В); Parvoviridae (парвовіруси); Parvoviridae (віруси папіломи, віруси поліоми); Adenoviridae (більшість аденовірусів); Herpesviridae (вірус простого герпесу (HSV) 1 та 2, вірус вітряної віспи, цитомегаловірус (CMV), вірус герпесу); Poxviridae (віруси природної віспи, віруси коров'ячої віспи, поксвіруси); та Iridoviridae (наприклад, вірус африканської гарячки свиней); та некласифіковані віруси (наприклад, агент гепатиту-дельта (який вважають дефектним сателітом вірусу гепатиту В), агенти не А, не В гепатиту (клас 1= з внутрішньою трансмісією; клас 2= з парентеральною трансмісією (тобто гепатит С); віруси Norwalk та споріднені, й астровіруси).

Як антигени для хребетних тварин використовуються як грам-негативні, так і грам-позитивні бактерії. Такі грам-позитивні бактерії включають, без обмеження, види *Pasteurella*, види *Staphylococcus* та види *Streptococcus*. Грам-негативні бактерії включають, без обмеження, *Escherichia coli*, види *Pseudomonas* та види *Salmonella*. Конкретні приклади інфекційних бактерій включають, без обмеження, *Helicobacter pylori*, *Borrelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium* spp (наприклад, *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. goodii*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus* групи А), *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* групи В), *Streptococcus* (група *viridans*), *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus* (анаеробні види), *Streptococcus pneumoniae*, патогенні *Campylobacter* sp., *Enterococcus* sp., *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium* sp., *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Bacteroides* sp., *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Leptospira*, *Rickettsia* та *Actinomyces israelii*.

Приклади грибків включають *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Chlamydia trachomatis*, *Candida albicans*.

Інші інфекційні організми (тобто найпростіші) включають *Plasmodium* spp., такі як *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* та *Plasmodium vivax* і *Toxoplasma gondii*. Паразити, що переносяться з кров'ю, та/або паразити тканин

включають *Plasmodium* spp., *Babesia microti*, *Babesia divergens*, *Leishmania tropica*, *Leishmania* spp., *Leishmania braziliensis*, *Leishmania donovani*, *Trypanosoma gambiense* та *Trypanosoma rhodesiense* (африканська сонна хвороба), *Trypanosoma cruzi* (американський трипаномоз) та *Toxoplasma gondii*.

Інші медично релевантні мікроорганізми були детально описані у літературі, наприклад, див. C.G.A. Thomas, *Medical Microbiology*, Bailliere Tindall, Great Britain 1983, вміст якої цілком включений сюди за посиланням.

Алерген стосується речовини (антигену), що може індукувати алергічну чи астматичну реакцію у сприйнятливому суб'єкті. Перелік алергенів є величезним і може включати пилок, отруту комах, частинки лупи тварин, грибові спори та лікарські засоби (наприклад, пеніцилін). Приклади природних, тваринних та рослинних алергенів включають, без обмеження, протеїни, характерні для таких родів: *Canine* (*Canis familiaris*); *Dermatophagoides* (наприклад, *Dermatophagoides farinae*); *Felis* (*Felis domesticus*); *Ambrosia* (*Ambrosia artemisiifolia*); *Lolium* (наприклад, *Lolium perenne* чи *Lolium multiflorum*); *Cryptomeria* (*Cryptomeria japonica*); *Alternaria* (*Alternaria alternata*); *Alder*; *Alnus* (*Alnus glutinosa*); *Betula* (*Betula verrucosa*); *Quercus* (*Quercus alba*); *Olea* (*Olea europaea*); *Artemisia* (*Artemisia vulgaris*); *Plantago* (наприклад, *Plantago lanceolata*); *Parietaria* (наприклад, *Parietaria officinalis* чи *Parietaria judaica*); *Blattella* (наприклад, *Blattella germanica*); *Apis* (наприклад, *Apis mellifera*); *Cupressus* (наприклад, *Cupressus sempervirens*, *Cupressus arizonica* та *Cupressus macrocarpa*); *Juniperus* (наприклад, *Juniperus sabinoides*, *Juniperus virginiana*, *Juniperus communis* та *Juniperus ashei*); *Thuja* (наприклад, *Thuja orientalis*); *Chamaecyparis* (наприклад, *Chamaecyparis obtusa*); *Periplaneta* (наприклад, *Periplaneta americana*); *Agropyron* (наприклад, *Agropyron repens*); *Secale* (наприклад, *Secale cereale*); *Triticum* (наприклад, *Triticum aestivum*); *Dactylis* (наприклад, *Dactylis glomerata*); *Festuca* (наприклад, *Festuca elatior*); *Poa* (наприклад, *Poa pratensis* чи *Poa compressa*); *Avena* (наприклад, *Avena sativa*); *Holcus* (наприклад, *Holcus lanatus*); *Anthoxanthum* (наприклад, *Anthoxanthum odoratum*); *Arrhenatherum* (наприклад, *Arrhenatherum elatius*); *Agrostis* (наприклад, *Agrostis alba*); *Phleum* (наприклад, *Phleum pratense*); *Phalaris* (наприклад, *Phalaris arundinacea*); *Paspalum* (наприклад, *Paspalum notatum*); *Sorghum* (наприклад, *Sorghum halepense*); та *Bromus* (наприклад, *Bromus inermis*).

Термін "по суті очищений" у використуваному тут значенні стосується поліпептиду, що по суті не містить інших протеїнів, ліпідів, вуглеводів чи інших матеріалів, з якими він є природно асоційованим. Фахівець у цій галузі техніки може очистити віруси чи бактеріальні поліпептиди за стандартними методами очищення протеїнів. По суті чистий поліпептид часто матиме одну велику смугу на нередукуючому поліакриламідному гелі. У разі частково глікозилованих поліпептидів чи поліпеп-

тидів, які мають кілька старт-кодонів, на нередукуєчому поліакриламідному гелі може утворюватися кілька смуг, але вони утворюють характерний для цього поліпептиду профіль. Чистоту вірусного чи бактеріального поліпептиду можна також визначити шляхом аналізу аміно-термінальної амінокислотної послідовності. Інші типи антигенів, що не кодуються вектором нуклеїнової кислоти, такі як полісахариди, малі молекули, міміки тощо, також включені до винаходу.

Олігонуклеотиди за винаходом можуть бути введені суб'єкту з антимікробним агентом. Антимікробний агент в тому значенні, яке тут використовується, стосується природної чи синтетичної сполуки, здатної знищувати чи інгібувати інфекційні мікроорганізми. Тип антимікробного агента, придатного для використання відповідно до винаходу, залежатиме від типу мікроорганізму, яким суб'єкт є інфікованим чи має ризик інфікування. Антимікробні агенти включають, без обмеження, антибактеріальні агенти, антивірусні агенти, антигрибкові агенти та антипаразитарні агенти. Такі фрази, як "антиінфекційний агент", "антибактеріальний агент", "антивірусний агент", "антигрибковий агент", "антипаразитарний агент" та "засіб для знищення паразитів", мають значення, добре відомі пересічним фахівцям у цій галузі техніки та визначені у стандартних медичних літературних джерелах. Стисло, антибактеріальні агенти знищують чи інгібують бактерії, та включають антибіотики, а також інші синтетичні чи природні сполуки з аналогічними функціями. Антибіотики є низькомолекулярними молекулами, що продукуються як вторинні метаболіти клітинами, такими як мікроорганізми. Загалом антибіотики впливають на одну чи більше бактеріальних функцій чи структур, специфічних для мікроорганізму, яких не мають клітини-хазяї. Антивірусні агенти можуть бути ізольовані з природних джерел чи синтезовані і є придатними для знищення чи інгібування вірусів. Антигрибкові агенти є корисними для лікування поверхневих грибкових інфекцій, а також опортуністичних та первинних системних грибкових інфекцій. Антипаразитарні агенти знищують чи інгібують паразитів.

Приклади антипаразитарних агентів, які також називаються засобами для знищення паразитів, придатних для введення людині, включають, без обмеження, албендазол, амфотерицин В, бензнідазол, бітіонол, хлороквін-НCl, хлороквін фосфат, кліндаміцин, дегідроemetин, діетилкарбамазин, дилоксанід фураат, ефлорнітин, фуразолідаон, глюкокортикоїди, галофантрин, йодхінол, івермектин, мебендазол, мефлоквін, меглумін антимононат, меларсопрол, метрифонат, метронідазол, ніклосамід, ніфуртимокс, оксамніквін, паромоміцин, пентамідин ізетіонат, піперазин, празиквантел, примаквін фосфат, прогуаніл, пірантел памоат, піриметанмін-сульфонаміди, піриметанмін-сульфадоксин, квінакрин-НCl, хінін сульфат, хінідін глюконат, спіраміцин, стибоглюконат-натрій (глюконат сурми-натрію), сурамін, тетрациклін, доксициклін, тіабендазол, тинідазол, триметроприм-сульфаметоксазол та трипарсамід, деякі з яких використовуються самі чи в комбінації з іншими.

Антибактеріальні агенти знищують або інгібують ріст чи функції бактерій. Великим класом антибактеріальних агентів є антибіотики. Антибіотики, які ефективно знищують чи інгібують широкий спектр бактерій, називаються антибіотиками широкого спектра дії. Інші типи антибіотиків є переважно ефективними проти бактерій, що належать до класу грам-позитивних чи грам-негативних. Ці типи антибіотиків називаються антибіотиками вузького спектра дії. Інші антибіотики, які є ефективними проти окремого організму чи хвороби і неефективні проти інших типів бактерій, називаються антибіотиками з обмеженим спектром дії. Антибактеріальні агенти інколи класифікуються на основі їхнього первинного механізму дії. Загалом, антибактеріальні агенти є інгібіторами синтезу клітинної мембрани, інгібіторами клітинної мембрани, інгібіторами синтезу протеїнів, синтезу нуклеїнових кислот чи функціональними інгібіторами, та конкурентними інгібіторами.

Антивірусні агенти є сполуками, які запобігають інфекції клітин вірусами чи реплікації вірусу у клітині. Антивірусних лікарських засобів існує набагато менше, ніж антибактеріальних, тому що процес вірусної реплікації є настільки близьким до реплікації ДНК у клітині-хазяїні, що неспецифічні антивірусні агенти часто будуть токсичними для хазяїна. Існує кілька стадій процесу вірусної інфекції, які можуть бути блоковані чи інгібуються антивірусними агентами. Ці стадії включають прикріплення вірусу до клітини-хазяїна (імуноглобулін чи зв'язуючі пептиди), декапсидацию вірусу (наприклад, амантадин), синтез чи трансляцію вірусної мРНК (наприклад, інтерферон), реплікацію вірусної РНК чи ДНК (наприклад, нуклеотидні аналоги), визрівання нових вірусних протеїнів (наприклад, інгібітори протеази) і пупкування та вивільнення вірусу.

Нуклеотидні аналоги є синтетичними сполуками, які є подібними до нуклеотидів, але мають неповну чи аномальну дезоксирибозну чи рибозну групу. Після потрапляння до клітини нуклеотидні аналоги фосфорилуються, утворюючи трифосфатну форму, яка конкурує з нормальними нуклеотидами за включення до вірусної ДНК чи РНК. Після включення трифосфатної форми нуклеотидного аналога до зростаючого ланцюга нуклеїнової кислоти, вона спричинює необоротну асоціацію з вірусною полімеразою і, таким чином, обрив ланцюга. Нуклеотидні аналоги включають, без обмеження, ацикловір (використовується для лікування вірусу простого герпесу та вірусу вітряної віспи), ганцикловір (використовується для лікування цитомегаловірусу), ідоксуридин, рибавірін (використовується для лікування респіраторного синцитіального вірусу), дидезоксиінозин, дидезоксицитидин, зидовудин (азидотимідин), імівімоуд та ресимівімоуд.

Інтерферони є цитокінами, що секретуються інфікованими вірусом клітинами, а також імунними клітинами. Інтерферони функціонують шляхом зв'язування зі специфічними рецепторами клітин, прилеглих до інфікованої клітини, спричинюючи зміни у клітині, які захищають її від інфекції вірусом, α - та β -інтерферони також індують експе-

сію молекул головного комплексу гістосумісності (МНС) класу I та класу II на поверхні інфікованих клітин, призводячи до посилення презентації антигенів для розпізнавання імунних клітин хазяїна, α - та β -інтерферони існують у вигляді рекомбінантних форм і використовувалися для лікування інфекції хронічного гепатиту В та С. У дозах, ефективних для антивірусної терапії, інтерферони мають тяжкі побічні ефекти, такі як гарячка, нездужання та втрата ваги.

Антивірусні агенти, придатні для використання за винаходом, включають, без обмеження, імуноглобуліни, амантидин, інтерферони, нуклеотидні аналоги та інгібітори протеази. Конкретні приклади антивірусних засобів включають, без обмеження, ацеманан; ацикловір; ацикловір-натрій; адефовір; аловудин; алвіцепт судотокс; амантидину гідрохлорид; аранотин; арилдон; атевірдину мезилат; авридин; цидофовір; ципамфілін; цитарабіну гідрохлорид; делавірдину мезилат; десцикловір; диданозин; дисоксарил; едоксудин; енвіраден; енвіроксим; фамцикловір; фамотину гідрохлорид; фіацитабін; фіалуридин; фосарилат; фоскарнет-натрій; фосфонет-натрій; ганцикловір; гінцикловір-натрій; ідоксуридин; кетоксал; ламівудин; лобукавір; мемотину гідрохлорид; метисазон; невірапін; пенцикловір; піродавір; рибавірин; римантадину гідрохлорид; саквінавіру мезилат; сомантадину гідрохлорид; соривудин; статолон; ставудин; тилорону гідрохлорид; трифлуридин; валацикловіру гідрохлорид; відарабін; відарабіну фосфат; відарабін-натрійфосфат; віроксим; залцитабін; зидовудин та зинвіроксим.

Антигрибкові агенти є придатними для лікування та профілактики інфекційних грибків. Антигрибкові агенти інколи класифікують за їхнім механізмом дії. Деякі антигрибкові агенти функціонують як інгібітори клітинної мембрани шляхом інгібування глюкозасинази. Вони включають, без обмеження, базіунгін/ЕСВ. Інші антигрибкові агенти функціонують шляхом дестабілізації мембранної цілісності. Вони включають, без обмеження, імідазоли, такі як клотримазол, сертаконзол, флуконазол, ітраконазол, кетоконазол, міконазол та вориконазол, а також FK 463, амфотерицин В, BAY 38-9502, MK 991, прадиміцин, UK 292, бутенафін та тербінафін. Інші антигрибкові агенти функціонують шляхом руйнування хітину (наприклад, хітиназа) чи імунопригнічення (501-крем).

Імуностимулюючі CpG-олігонуклеотиди можуть бути поєднані з іншими терапевтичними агентами, такими як ад'юванти для посилення імунної відповіді. Імуностимулюючий CpG-олігонуклеотид та інші терапевтичні агенти можуть бути введені одночасно чи послідовно. Якщо інші терапевтичні агенти вводяться одночасно, вони можуть бути введені в одній й тій самій чи в окремих композиціях, але одночасно. Інші терапевтичні агенти вводяться послідовно один по відношенню до іншого та до імуностимулюючого CpG-олігонуклеотиду, якщо введення інших терапевтичних агентів та імуностимулюючого CpG-олігонуклеотиду розділено в часі. Проміжки часу між введенням цих сполук можуть мати порядок хвилин або вони можуть бути довшими. Інші терапевтичні агенти включають,

без обмеження, ад'юванти, цитокіни, антитіла, антигени тощо.

Композиції за винаходом можуть бути також введені з ад'ювантами, які не є нуклеїновими кислотами. Ад'ювант, що не є нуклеїновою кислотою, є будь-якою молекулою чи сполукою, за винятком описаних тут імуностимулюючих CpG-олігонуклеотидів, що може стимулювати гуморальну та/або клітинну імунну відповідь. Ад'юванти, що не є нуклеїновими кислотами, включають, наприклад, ад'юванти, які створюють ефект депо, імуностимулюючі ад'юванти та ад'юванти, які створюють ефект депо та стимулюють імунну систему.

Імуностимулюючі CpG-олігонуклеотиди є також корисними як мукозальні ад'юванти. Раніше було знайдено, що як системний, так і мукозальний імунітет індукуються шляхом мукозальної доставки CpG-нуклеїнових кислот. Таким чином, олігонуклеотиди можуть бути введені у комбінації з іншими мукозальними ад'ювантами.

Імунні відповіді можуть також бути індуковані чи посилені за рахунок спільного введення чи колінеарної експресії цитокінів (Bueler & Mulligan, 1996; Chow et al., 1997; Geissler et al., 1997; Iwasaki et al., 1997; Kim et al., 1997) чи B-7 ко-стимулюючих молекул (Iwasaki et al., 1997; Tsuji et al., 1997) з імуностимулюючими CpG-олігонуклеотидами. Термін "цитокін" використовується тут як родова назва неоднорідної групи розчинних протеїнів та пептидів, які функціонують як гуморальні регулятори в концентраціях від нанодо пікомолярних, і які, в умовах нормального чи патологічного стану, модулюють функціональну активність індивідуальних клітин та тканин. Ці протеїни також медіують взаємодії безпосередньо між клітинами та регулюють процеси, що відбуваються в позаклітинному середовищі. Приклади цитокінів включають, без обмеження, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, колонієстимулюючий фактор гранулоцитів-макрофагів (GM-CSF), колонієстимулюючий фактор гранулоцитів (G-CSF), інтерферон- γ (γ -IFN), IFN- α , фактор некрозу пухлин (ФНП), TGF- β , ліганд FLT-3 та ліганд CD40.

Олігонуклеотиди є також придатними для переорієнтації імунної відповіді з імунної відповіді Th2 на імунну відповідь Th1. Це призводить до продукування відносно сбалансованого Th1/Th2 середовища. Переорієнтацію імунної відповіді з Th2- на Th1-імунну відповідь можна оцінити шляхом вимірювання рівнів цитокінів, що продукуються у відповідь на нуклеїнову кислоту (наприклад, шляхом індукування моноцитарних клітин та інших клітин до продукування Th1-цитокінів, включаючи IL-12, IFN- γ та GM-CSF). Переорієнтація чи зміна співвідношення імунних відповідей з Th2- на Th1-відповідь є особливо корисною для лікування чи профілактики астми. Наприклад, кількість, ефективна для лікування астми, може бути кількістю, придатною для переорієнтації Th2-типу імунної відповіді, асоційованого з астмою, на Th1-тип відповіді чи збалансоване Th1/Th2 середовище. Рівні Th2-цитокінів, особливо IL-4 та IL-5, у дихальних шляхах астматичних суб'єктів є підвищеними. Іму-

ностимулюючі CpG-олігонуклеотиди за винаходом спричиняють підвищення ТМ-цитокінів, що допомагає відновити баланс імунної системи, запобігаючи чи знижуючи небажані ефекти, асоційовані з імунною відповіддю переважно Тп2-типу. Олігону-клеотиди за винаходом можуть також бути придатними для лікування ремоделювання дихальних шляхів. Ремоделювання дихальних шляхів викликане проліферацією клітин гладких м'язів та/або утовщенням підслизової оболонки у дихальних шляхах і, в кінцевому рахунку, спричинює звуження дихальних шляхів, яке призводить до обмеження потоку повітря. Олігонуклеотиди за винаходом можуть запобігати подальшому ремоделюванню і, можливо, навіть зменшувати нарощування тканини в результаті процесу ремоделювання.

Олігонуклеотиди є також корисними для поліпшення виживаності, диференціації, активації та визрівання дендритних клітин. Імуностимулюючі CpG-олігонуклеотиди мають унікальну здатність промотувати клітинне виживання, диференціації, активацію та визрівання дендритних клітин.

Імуностимулюючі CpG-олігонуклеотиди також підвищують природну літичну активність клітин-убивць та антитіло-залежну клітинну цитотоксичність (ADCC). ADCC можна здійснити з використанням імуностимулюючого CpG-олігонуклеотиду у комбінації з антитілом, специфічним до клітинної мішені, такої як ракова клітина. Якщо імуностимулюючий CpG-олігонуклеотид вводиться суб'єкту у сполученні з антитілом, імунна система суб'єкта індукується до знищення пухлинної клітини. Антитіла, корисні для використання у процедурі ADCC, включають антитіла, що взаємодіють з клітиною в організмі. Багато таких антитіл, специфічних до клітин-мішеней, були описані в літературі й чимало з них є комерційно доступними.

Імуностимулюючі CpG-олігонуклеотиди можуть також бути введені у сполученні з протираковою терапією. Протираківі терапії включають протиракові медикаменти, променеві та хірургічні процедури. В тому значенні, яке тут використовується, "протираковий медикамент" стосується агента, який вводиться суб'єкту з метою лікування раку. В тому значенні, яке тут використовується, "лікування раку" включає запобігання розвитку раку, послаблення симптомів раку та/або інгібування росту встановленого раку. В інших аспектах протираковий медикамент вводиться суб'єкту з ризиком розвитку раку з метою зниження ризику розвитку раку. Тут описано різні типи медикаментів для лікування раку. В цілях цього опису протиракові медикаменти класифікуються на хіміотерапевтичні агенти, імунотерапевтичні агенти, ракові вакцини, гормональну терапію та модифікатори біологічної реакції.

Додатково, способи за винаходом мають охоплювати використання більш ніж одного протиракового медикаменту разом з імуностимулюючими CpG-олігонуклеотидами. Як приклад, у належних випадках імуностимулюючі CpG-олігонуклеотиди можуть бути введені як з хіміотерапевтичним агентом, так і з імунотерапевтичним агентом. Альтернативно, протираковий медикамент може включати імунотерапевтичний агент та ракову вакцину,

або хіміотерапевтичний агент та ракову вакцину, або хіміотерапевтичний агент, імунотерапевтичний агент та ракову вакцину, які усі вводяться одному суб'єкту з метою лікування суб'єкта, який має рак чи ризик розвитку раку.

Хіміотерапевтичний агент може бути вибраний з групи, що складається з метотрексату, вінкристину, адриаміцину, цисплатину, неуглеводних хлоретилнітрозосечовин, 5-флюорурацилу, мітоміцину С, блеоміцину, доксорубіцину, дакарбазину, таксолу, фрагіліну, мегламину GLA, валрубіцину, кармустаїну та поліферпозану, MMI270, BAY 12-9566, інгібітору RAS-фарнезилтрансферази, інгібітору фарнезилтрансферази, MMP, MTA/LY231514, LY264618/лометексолу, гламолеку, CI-994, TNP-470, гікамтину/топотекану, PKC412, валсподару/P8C833, новантрон/мітроксантрон, метарету/сураміну, батимастату, E7070, BCH-4556, CS-682, 9-AC, AG3340, AG3433, інцелу/VX-710, VX-853, ZD0101, ISI641, ODN 698, TA 2516/мармістату, BB2516/мармістату, CDP 845, D2163, PD183805, DX8951f, лемоналу DP 2202, FK 317, піцибанілу/OK-432, AD 32/валрубіцину, метастрону/похідного стронцію, темодалу/темозоломід, евацету/ліпосомального доксорубіцину, ютаксану/паклітакселу, таксолу/паклітакселу, кселоаду/капецитабіну, фуртулону/доксифлуридину, циклопаксу/паклітакселу перорально, таксоїду перорально, SPU-077/цисплатину, HMR 1275/флавопиридолу, CP-358 (774)/EGFR, CP-609 (754)/інгібітору RAS-онкогену, BMS-182751/платини перорально, IPT(тегафур/урацил), ергамісолу/левамисолу, енілурацилу/776C85/5FU енхансера, кампто/левамисолу, камптосару/іринотекану, тумодексу/ралітрекседу, лейстатину/кладрибіну, паксексу/паклітакселу, доксили/ліпосомального доксорубіцину, каеліксу/ліпосомального доксорубіцину, флудара/флударабіну, фармарубіцину/епірубіцину, DepoCyt, ZD1839, LU 79553/біс-нафталіміду, LU 103793/доластаїну, каетиксу/ліпосомального доксорубіцину, гемзару/гемцитабіну, ZD 0473/анормеду, YM 116, зерняток йоду, інгібіторів CDK4 та CDK2, інгібіторів PARP, O4809/дексифосаміду, іфесу/меснексу/іфосаміду, вумону/теніпозиду, параплатину/карбоплатину, плантинолу/цис-платину, вепезиду/етопозиду, ZD 9331, таксотере/доцетакселу, проліків гуанінарабінозиду, аналога таксану, нітрозосечовини, алкілувальних агентів, таких як мелфелан та циклофосфамід, аміноглутетиміду, аспарагінази, бусульфону, карбоплатину, хлоромбуцилу, цитарабіну-HCl, дактиноміцину, даунорубіцину-HCl, естрамустинофосфату-натрію, етопозиду (VP16-213), флоксуридину, флюорурацилу (5-FU), флутаміду, гідроксисечовини (гідроксикарбаміду), іфосфаміду, інтерферону альфа-2a, альфа-2b, лейпроліду ацетату (аналог LHRH-релізінг-фактора), ломустину (CCNU), мехлоретаміну-HCl (азотистий іприт), меркаптопурину, месна, мітотану (o.p'-DDD), мітоксантрон-HCl, октреотиду, плікаміцину, прокарбазину-HCl, стрептозоцину, тамоксифену цитрату, тіогуаніну, тіотепа, вінбластину сульфату, амсакрину (m-AMSA), азацитидину, еритропоетину, гексаметил-

меламіну (HMM), інтерлейкіну 2, мітогазону (метил-GAG; метилглюксаль-біс-гуанілгідрозону; MGBG), пентостатину (2'-дезоксикоформіцину), семустину (метил-CCNU), теніпозиду (VM-26) та віндезину сульфату, але без обмеження цим переліком.

Імунотерапевтичний агент може бути вибраний з групи, що складається з рибутаксину, герцептину, квадрамету, панорексу, IDEC-Y2B8, BEC2, C225, онколіму, SMART M195, ATRAGEN, оварексу, бексар, LDP-03, іор t6, MDX-210, MDX-11, MDX-22, OV103, 3622W94, anti-VEGF, зенапаксу, MDX-220, MDX-447, MELIMMUNE-2, MELIMMUNE-1, CEACIDE, претаргету, NovoMAb-G2, TNT, гліомабу-Н, GNI-250, EMD-72000, LymphoCide, CMA 676, монофарму-С, 4B5, іор egf.r3, іор с 5, BABS, anti-FLK-2, MDX-260, A Na Ab, S MARTID10 Ab, S MART ABL 364 Ab та ImmuRAIT-CEA, але без обмеження цим переліком.

Ракова вакцина може бути вибрана з групи, що складається з EGF, антиідіотипічних ракових вакцин, антигену Grp75, вакцини меланому GMK, вакцини гангліозидного кон'югата MGv, Her2/neu, оварексу, M-Vax, O-Vax, L-Vax, STn-KHL theratope, BLP25 (MUC-1), ліпосомальної ідіотипічної вакцини, мелацину, пептидних антигенних вакцин, токсин/антигенних вакцин, вакцин на основі MVA, PACIS, вакцини БЦЖ, TA-HPV, TA-CIN, DISC-вірусу та ImmuCyst/TheraCys, але без обмеження цим переліком.

Використання імуностимулюючих CpG-олігонуклеотидів у сполученні з імунотерапевтичними агентами, такими як моноклональні антитіла, може збільшити тривале виживання завдяки ряду механізмів, включаючи істотне посилення ADCC (як обговорювалося вище), активацію природних клітин-убивць (NK) та підвищення рівнів IFN α . Нуклеїнові кислоти при використанні у комбінації з моноклональними антитілами дозволяють знизити дозу антитіла, потрібну для досягнення біологічного результату.

У тому значенні, яке тут використовується, терміни "раковий антиген" та "пухлинний антиген" уживаються взаємозамінно та стосуються антигенів, які диференційовано експресуються раковими клітинами і тому можуть бути використані для перетворення ракових клітин на мішені. Ракові антигени є антигенами, які можуть потенційно стимулювати гадано пухлинно-специфічні імунні відповіді. Деякі з цих антигенів кодуються, хоча при цьому не обов'язково експресуються, нормальними клітинами. Ці антигени можуть бути охарактеризовані як такі, що звичайно мовчать (тобто не експресуються) у нормальних клітинах, такі, що експресуються лише на певних стадіях диференціювання, та такі, що експресуються тимчасово, наприклад, ембріональні та плідні антигени. Інші ракові антигени кодуються мутантними клітинними генами, такими як онкогени (наприклад, активовані gas-онкоген), гени-супресори (наприклад, мутант p53), злиті протеїни, що утворюються в результаті внутрішніх делецій чи хромосомальних транслокацій. Ще інші ракові антигени можуть бути кодовані вірусними генами, такими як гени, що переносяться РНК та ДНК онкогенних вірусів.

Імуностимулюючі CpG-олігонуклеотиди є також придатними для лікування та профілактики автоімунної хвороби. Автоімунна хвороба є класом хвороб, за яких власні антитіла суб'єкта реагують з тканиною хазяїна, або при яких імунні ефекторні Т-клітини є автореактивними до ендогенних аутологічних пептидів та спричиняють деструкцію тканини. Таким чином, імунна відповідь спрямовується проти власних антигенів суб'єкта, які називаються аутологічними антигенами. Автоімунні хвороби включають, без обмеження, ревматоїдний артрит, хворобу Крона, розсіяний склероз, системний червоний вовчак (SLE), автоімунний енцефаломієліт, тяжку псевдопаралітичну міастенію (MG), тиреоїдит Хашімото, синдром Гудпасчера, пемфігус (наприклад, пемфігус звичайний), хвороба Грейвса, автоімунну гемолітичну анемію, автоімунну тромбocyтопенічну пурпуру, склеродермію з антиколагеновими антитілами, змішану хворобу сполучної тканини, поліміозит, зловкісну анемію, ідіопатичну адисонову хворобу, автоімунно-асоційовану безплідність, гломерулонефрит (наприклад, серпоподібний гломерулонефрит, проліферативний гломерулонефрит), бульозний пемфігоїд, синдром Шегрена, інсуліногезистентність та автоімунний цукровий діабет.

"Аутологічний антиген" в тому значенні, яке тут використовується, стосується антигену нормальної тканини-хазяїна. Нормальна тканина-хазяїн не містить ракових клітин. Таким чином, імунна відповідь, викликувана проти аутологічного антигену, в контексті автоімунної хвороби, є небажаною імунною відповіддю і сприяє деструкції та ушкодженню нормальної тканини, тоді як імунна відповідь, викликувана проти ракового антигену, є бажаною імунною відповіддю і сприяє деструкції пухлини чи раку. Отже, в деяких аспектах винаходу, спрямованих на лікування автоімунних розладів, не рекомендується введення імуностимулюючих CpG-нуклеїнових кислот з аутологічними антигенами, особливо тими, що є мішенями автоімунного розладу.

В інших випадках імуностимулюючі CpG-нуклеїнові кислоти можуть бути введені з низькими дозами аутологічних антигенів. У ряді досліджень на тваринах було продемонстровано, що мукозальне введення низьких доз антигену може спричинити стан імунної гіпореактивності чи "толерантності". Активним механізмом є, певно, цитокін-медіований імунний зсув від Th1- до переважно Th2- та Th3-відповіді (тобто домінованої TGF- β). Активне пригнічення низькими дозами антигену, що доставляється, може також пригнічувати неспоріднену імунну відповідь (неспецифічне пригнічення), що представляє значний інтерес в терапії автоімунної хвороби, наприклад, ревматоїдного артриту та SLE. Неспецифічне пригнічення пов'язане з секрецією Th1-контррегуляторних пригнічуючих цитокінів у локальному середовищі, у якому прозапальні та Th1-цитокіни вивільняються у антиген-специфічний чи антиген-неспецифічний спосіб. "Толерантність" у тому значенні, яке тут використовується, має позначати саме це явище. Дійсно, пероральна толерантність виявилася ефективною при лікуванні ряду автоімунних хвороб тварин,

включаючи: експериментальний автоімунний енцефаломієліт (ЕАЕ), експериментальну автоімунну тяжку псевдопаралітичну міастенію, колаген-індукований артрит (CIA) та інсулінзалежний цукровий діабет. У цих моделях профілактика та пригнічення автоімунної хвороби асоційовані із зсувом антиген-специфічної гуморальної та клітинної відповідей від Th1- до Th2/Th3-відповіді.

Винахід також включає спосіб індукування антигеннеспецифічної природної імунної активації та стійкості широкого спектра до інфекційного зараження з використанням імуностимулюючих CpG-олігонуклеотидів. Термін "антиген-неспецифічна природна імунна активація" в тому значенні, яке тут використовується, стосується активації імунних клітин, крім В-клітин, і, наприклад, може включати активацію NK-клітин, Т-клітин чи інших імунних клітин, які можуть реагувати у антигеннезалежний спосіб, чи певної комбінації цих клітин. Стійкість широкого спектра до інфекційного зараження є індукованою, оскільки імунні клітини знаходяться в активній формі й сенсibilізовані для відповіді на будь-яку інвазивну сполуку чи мікроорганізм. Клітини не повинні обов'язково бути сенсibilізованими до певного антигену. Це особливо корисно для використання у засобах ведення біологічної війни, та за інших описаних вище обставин, таких як для мандрівників.

Винахід також стосується олігонуклеотидів, які мають хіральні міжнуклеотидні зв'язки. Як описано вище, м'які та напівм'які олігонуклеотиди за винаходом можуть мати фосфодієфіро-подібні зв'язки між С та G. Одним прикладом фосфодієфіро-подібного зв'язку є фосфоротіоатий зв'язок у Rp-конформації.

Щонайменше одне дослідження було присвячене вивченню ефекту р-хіральності на імуностимулюючу дію CpG-олігонуклеотидів. Yu et al. порівнювали стереозбагачені (не стереочисті) фосфоротіоатні (PS)-олігонуклеотиди за здатністю індукувати проліферацію клітин селезінки (Yu et al., 2000). У цьому дослідженні було знайдено, що 19-мерна послідовність, яка містить один CpG-мотив, індукує високі рівні проліферації клітин селезінки мишей, якщо олігонуклеотид був синтезований з випадковою р-хіральністю або був збагачений Sp-міжнуклеотидними зв'язками, але проліферація помітно знижувалася, коли олігонуклеотид був збагачений Rp-міжнуклеотидними зв'язками (Yu et al., 2000). Однак, у цьому дослідженні не вивчалася специфічна роль р-хіральності CpG-динуклеотиду, та не було визначено, чи виявляють Rp-CpG-олігонуклеотиди активність у тестах на короткотермінове стимулювання.

Було знайдено, згідно з винаходом, що р-хіральність олігонуклеотиду, очевидно, може мати протилежні ефекти на імунну активність CpG-олігонуклеотиду, залежно від моменту часу, в який вимірюється активність. У ранній момент часу, через 40 хвилин, Rp-стереоізомер фосфоротіоатного CpG-олігонуклеотиду індукував фосфорилування JNK-клітин селезінки мишей, а Sp - ні (обговорюється у прикладах). Навпаки, при аналізі в пізній момент часу, через 44 год., Sp-стереоізомер виявляв активність у стимулюванні проліферації

клітин селезінки, а Rp - ні. Ми продемонстрували, що ця різниця у кінетиці та біоактивності Rp- та Sp-стереоізомерів не спричинена якими-небудь розбіжностями у клітинному поглинанні, а, найбільш вірогідно, викликана двома протилежними біологічними ролями р-хіральності. По-перше, підвищена активність Rp-стереоізомеру порівняно з Sp-формою у стимулюванні імунних клітин у ранній період часу вказує на те, що Rp може ефективніше взаємодіяти з CpG-рецептором, TLR9, чи індукувати наступні стадії сигнальних шляхів. З іншого боку, більш швидка деградація Rp-PS-олігонуклеотидів порівняно із Sp призводить до набагато коротшої тривалості збудження, так що Sp-PS-олігонуклеотиди здаються більш біологічно активними при пізнішому проведенні аналізу.

Винахід у деяких аспектах оснований на новій знахідці, що описана раніше відносна недостатність імунного стимулювання Rp PS-олігонуклеотидами викликана лише їхньою лабільністю під дією нуклеази, а не природною нездатністю стимулювати CpG-рецептор та наступні стадії сигнального шляху. При проведенні випробувань на здатність стимулювати фосфорилування JNK, яка свідчить про активацію цього мітоген-активованого протеїнкіназного шляху, найбільш активним виявився Rp-олігонуклеотид, за яким йшов стереонерегулярний олігонуклеотид, а для Sp-олігонуклеотиду активності не було виявлено. Однак, коли ці олігонуклеотиди порівнювали на їхню здатність активувати шлях NF-κB, яку вимірювали за деградацією інгібуючого протеїну IκB-α, всі CpG-олігонуклеотиди виявляли активність, хоча не-CpG контроль не індукував деградації IκB-α. Таким чином, Sp-олігонуклеотид також є біологічно активним. Його нездатність індукувати шлях JNK може бути пов'язана з розбіжностями у кінетиці активації шляхів JNK та NF-κB, але через обмежену кількість стереоспецифічного олігонуклеотиду, доступну для проведення випробувань, ми не змогли підтвердити цю гіпотезу.

Експерименти, описані у Прикладах, виявили несподівано сильний ефект р-хіральності на самий CpG-динуклеотид. Порівняно із стереонерегулярним CpG-олігонуклеотидом, його аналог, у якому один CpG-динуклеотид приєднаний у Rp-конфігурації, був трохи активнішим, у той час як аналог, який містить Sp-зв'язок, був майже неактивним щодо індукування проліферації клітин селезінки. Втрата активності Sp-аналога підтверджує нашу гіпотезу про те, що рецептор TLR9 не може бути індиферентним до хіральності CpG-динуклеотиду в ДНК, з якою він взаємодіє, і може, насправді, краще стимулюватися Rp-стереоізомером. Таким чином, стимулюючий ефект стереонерегулярного олігонуклеотиду спричинений не лише присутністю 50% Sp-зв'язків, що уповільнюють деградацію, але також і тим, що половина олігонуклеотидної молекули має Rp-хіральність CpG-динуклеотиду, що гадано посилює імуностимулюючу дію.

Чутливість Rp-PS зв'язків до нуклеази має важливі наслідки для інтерпретації результатів досліджень фармакокінетики (ФК) та метаболізму PS-олігонуклеотидів у людини чи тварин. Відомо, що

переважаючою сироватковою нуклеазною активністю є 3' екзонуклеаза. У розчині типового стереонерегулярного PS-олігонуклеотиду останній 3'-міжнуклеотидний зв'язок очікувано матиме R_p-хіральність у половини молекул. Тому у цих 50% PS-олігонуклеотидних молекул термінальна 3'-основа буде досить швидко гідролізуватися після внутрішньовенної (IV) інфузії. Другий з кінця 3'-міжнуклеотидний зв'язок матиме R_p-хіральність у половини цих молекул, і тому можна очікувати, що у 25% від вихідних PS-олігонуклеотидних молекул 3'-кінець буде відносно швидко скорочений на 2 основи. Можна очікувати, що цей процес відщеплення основ *in vivo* по 3'-кінцевих R_p-міжнуклеотидних зв'язках буде тривати доти, поки не дійде до 3'-міжнуклеотидного зв'язку у Sp-конфігурації. Таким чином, якщо синтезувати PS-олігонуклеотиди зі Sp-3'-термінальними зв'язками, вони будуть виявляти набагато більш повільну деградацію та відмінний ФК-профіль порівняно із стереонерегулярними PS-олігонуклеотидами. Це повинно створити можливість використовувати дещо коротші олігонуклеотиди для застосування *in vivo*. При розробці оптимізованих олігонуклеотидів для галузей застосування, що потребують антимислових послідовностей, посилене зв'язування РНК з R_p-стереоізомером вказує на бажаність того, щоб якомога більша частина внутрішнього ядра олігонуклеотиду знаходилася в R_p-конфігурації. З іншого боку, оптимізований CpG-олігонуклеотид для імуностимулюючого застосування може бути таким, у якому всі міжнуклеотидні зв'язки, за винятком CpG, матимуть Sp-хіральність.

Імуностимулюючі CpG-олігонуклеотиди можуть бути введені суб'єкту безпосередньо або у поєднанні з комплексом доставки нуклеїнової кислоти. Комплекс доставки нуклеїнової кислоти має позначати молекулу нуклеїнової кислоти, асоційовану із (наприклад, іонно чи ковалентно зв'язану з; чи інкапсульовану у) засобами цілеспрямованої доставки (наприклад, молекулу, що забезпечує вищу афінність зв'язування з клітиною-мішенню). Приклади комплексів доставки нуклеїнової кислоти включають нуклеїнові кислоти, асоційовані зі стеринами (наприклад, холестеринами), ліпідами (наприклад, катіонним ліпідом, віросомою чи ліпосомою), або агентом зв'язування, специфічним до клітини-мішені (наприклад, лігандом, що розпізнається специфічним рецептором клітини-мішені). Кращі комплекси можуть бути достатньо стабільними *in vivo* для того, щоб запобігти їхньому значному від'єднанню до інтерналізації клітиною-мішенню. Однак, комплекс може бути розщеплюваний за відповідних умов усередині клітини з вивільненням олігонуклеотиду в функціональній формі.

Носії чи засоби доставки для доставки антигену та олігонуклеотидів до поверхонь були описані. Імуностимулюючий CpG-олігонуклеотид та/або антиген та/або інші терапевтичні засоби можуть бути введені самі (наприклад, у сольовому розчині чи буфері) або з використанням будь-яких носіїв, відомих фахівцям. Наприклад, були описані такі носії: кохлеати (Gould-Fogerite et al., 1994, 1996); емульсоми (Vancott et al., 1998, Lowell et al., 1997); ISCOMs (Mowat et al., 1993, Carlsson et al., 1991,

Hu et al., 1998, Morein et al., 1999); ліпосоми (Childers et al., 1999, Michalek et al., 1989, 1992, de Haan 1995a, 1995b); живі бактеріальні вектори (наприклад, Salmonella, Escherichia coli, Bacillus calmatte-guerin, Shigella, Lactobacillus) (Hone et al., 1996, Pouwels et al., 1998, Chatfield et al., 1993, Stover et al., 1991, Nugent et al., 1998); живі вірусні вектори (наприклад, Vaccinia, аденовірус, Herpes Simplex) (Gallichan et al., 1993, 1995, Moss et al., 1996, Nugent et al., 1998, Flexner et al., 1988, Morrow et al., 1999); мікросфери (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); вакцини нуклеїнових кислот (Fynan et al., 1993, Kuklin et al., 1997, Sasaki et al., 1998, Okada et al., 1997, Ishii et al., 1997); полімери (наприклад, карбоксиметилцелюлоза, хітозан) (Hamajima et al., 1998, Jabbal-Gill et al., 1998); полімерні кільця (Wyatt et al., 1998); протеосоми (Vancott et al., 1998, Lowell et al., 1988, 1996, 1997); фторид натрію (Hashi et al., 1998); трансгенні рослини (Tacket et al., 1998, Mason et al., 1998, Haq et al., 1995); віросоми (Gluck et al., 1992, Mengiardi et al., 1995, Cryz et al., 1998); вірусоподібні частинки (Jiang et al., 1999, Leibl et al., 1998). Інші носії відомі фахівцям, а деякі додаткові приклади наведені нижче при обговоренні векторів.

Термін "ефективна кількість імуностимулюючого CpG-олігонуклеотиду" стосується кількості, необхідної чи достатньої для реалізації бажаного біологічного ефекту. Наприклад, ефективна кількість імуностимулюючого CpG-олігонуклеотиду, що вводиться з антигеном для індукування мукозального імунітету, є кількістю, необхідною для того, щоб спричинити вироблення IgA у відповідь на антиген при експонуванні антигеном, тоді як кількість, потрібна для індукування системного імунітету, є кількістю, необхідною для того, щоб спричинити вироблення IgG у відповідь на антиген при експонуванні антигеном. Шляхом вибору різних активних сполук та зважаючи на такі фактори, як ефективність, відносна біодоступність, вага тіла пацієнта, тяжкість побічних ефектів та кращий спосіб введення, та у поєднанні з наведеним тут описом, можна спланувати ефективну профілактичну чи терапевтичну схему лікування, яка не спричинить суттєвої токсичності, але буде цілком ефективною для лікування конкретного суб'єкта. Ефективна кількість для будь-якого конкретного застосування може змінюватися залежно від таких факторів, як хвороба чи стан, лікування яких проводиться, конкретний імуностимулюючий CpG-олігонуклеотид, що вводиться, розміри суб'єкта або тяжкість хвороби чи стану. Пересічний фахівець у цій галузі техніки може емпірично визначити ефективну кількість конкретного імуностимулюючого CpG-олігонуклеотиду та/або антигену та/або іншого терапевтичного агента без непотрібного експериментування.

Дози описаних тут сполук для суб'єктів при мукозальній чи локальній доставці типово змінюються в інтервалі від приблизно 0,1мкг до 10мг за прийом, і залежно від застосування можуть вводитися щоденно, щотижнево чи щомісячно та з будь-якими іншими проміжками часу. Більш типово, му-

козальні чи локальні дози змінюються в інтервалі від приблизно 10мкг до 5мг за прийом, найбільш типово, від приблизно 100мкг до 1мг, у 2-4 прийоми з інтервалом у кілька днів чи тижнів. Більш типово, імуностимулюючі дози змінюються в інтервалі від 1мкг до 10мг за прийом, найбільш типово, від 100мкг до 1мг, із щоденним чи щотижневим введенням. Дози описаних тут сполук для парентерального введення суб'єкту з метою індукування антиген-специфічної імунної відповіді, при якому сполуки вводяться з антигеном, але без інших терапевтичних агентів, є типово у 5-10000 разів вищими за ефективну мукозальну дозу для ад'юванта вакцини чи імуностимулюючого застосування, більш типово, у 10-1000 разів вищими, і найбільш типово - у 20-100 разів вищими. Дози описаних тут сполук для парентеральної доставки з метою індукування природної імунної відповіді чи для підвищення ADCC чи для індукування антигенспецифічної імунної відповіді, коли імуностимулюючі CpG-олігонуклеотиди вводяться у комбінації з іншими терапевтичними агентами чи у спеціальному носії, типово змінюються в інтервалі від приблизно 0,1мкг до 10мг за прийом, і залежно від застосування можуть вводитися щоденно, щотижнево чи щомісячно та з будь-якими іншими проміжками часу. Більш типово, парентеральні дози в цих цілях змінюються в інтервалі від приблизно 10мкг до 5мг за прийом, найбільш типово, від приблизно 100мкг до 1мг, у 2-4 прийоми з інтервалом у кілька днів чи тижнів. У деяких варіантах втілення, однак, для цих цілей можуть використовуватися парентеральні дози в 5-10000 разів вищі, ніж типові дози, описані вище.

Для будь-якої описаної тут сполуки терапевтично ефективна кількість може бути спочатку визначена на тваринних моделях. Терапевтично ефективна доза може також бути визначена з одержаних для людей даних для CpG-олігонуклеотидів, які були випробувані на людях (були розпочаті клінічні випробування на людях), та для сполук, про які відомо, що вони виявляють аналогічні фармакологічні властивості, таких як інші ад'юванти, наприклад, LT та інші антигени, застосовувані для вакцинації. Вищі дози можуть бути потрібні для парентерального введення. Застосовувана доза може бути відрегульована на основі відносної біодоступності та ефективності сполуки, що вводиться. Регулювання дози для досягнення максимальної ефективності на основі описаних вище способів та інших методів є добре відомими фахівцям і цілком доступні для пересічного фахівця.

Композиції за винаходом вводяться в фармацевтично прийнятних розчинах, які можуть звичайно містити фармацевтично прийнятні концентрації солі, буферних агентів, консервантів, сумісних носіїв, ад'ювантів та, необов'язково, інших терапевтичних інгредієнтів.

Для використання у терапії ефективна кількість імуностимулюючого CpG-олігонуклеотиду може бути введена суб'єкту у будь-який спосіб, що забезпечує доставку олігонуклеотиду до бажаної поверхні, наприклад, мукозальної, системної. Введення фармацевтичної композиції за цим винахо-

дом може бути здійснене у будь-який спосіб, відомий кваліфікованому фахівцю. Кращі шляхи введення включають, без обмеження, пероральний, парентеральний, внутрішньом'язовий, інтраназальний, сублінгвальний, інтратрахеальний, шляхом інгаляції, очний, вагінальний та ректальний.

Для перорального введення можуть бути зручно виготовлені композиції сполук (тобто імуностимулюючих CpG-олігонуклеотидів, антигенів та інших терапевтичних агентів) шляхом поєднання активної сполуки (сполук) з фармацевтично прийнятними носіями, добре відомими фахівцям. Такі носії дозволяють виготовити композиції сполук за винаходом у формі таблеток, пілюль, драже, капсул, рідин, гелів, сиропів, зависей, суспензій тощо для перорального приймання суб'єктом, який проходить лікування. Фармацевтичні препарати для перорального застосування можуть бути одержані як твердий ексципієнт, необов'язково, з помелом одержаної суміші, та шляхом обробки суміші гранул, після додавання придатних допоміжних речовин, якщо бажано, для одержання серцевин таблеток чи драже. Придатними ексципієнтами є, зокрема, наповнювачі, такі як цукри, включаючи лактозу, сахарозу, маніт чи сорбіт; препарати целюлози, такі як, наприклад, кукурудзяний крохмаль, пшеничний крохмаль, рисовий крохмаль, картопляний крохмаль, желатин, трагакант, метилцелюлозу, гідроксипропілметилцелюлозу, натрієву сіль карбоксиметилцелюлози та/або полівінілпіролідон (PVP). Якщо бажано, можуть бути додані дисперговані агенти, такі як зшитий полівінілпіролідон, агар або альгінова кислота чи її сіль, така як альгінат натрію. Необов'язково, композиції для перорального введення можуть бути також виготовлені у сольовому розчині чи буферах, тобто ЕДТА для нейтралізації стану внутрішньої кислотності, або введені без будь-яких носіїв.

Також конкретно передбачаються дозовані лікарські форми для перорального введення зазначеного вище компонента чи компонентів. Компонент чи компоненти можуть бути хімічно модифікованими для забезпечення ефективності пероральної доставки похідного. Загалом, передбачувана хімічна модифікація полягає у приєднанні щонайменше одного фрагмента до власне молекули компонента, причому зазначений фрагмент дозволяє забезпечити (a) інгібування протеолізу; і (b) поглинання у кровотік зі шлунка чи кишечника. Бажано також підвищити загальну стабільність компонента чи компонентів та збільшити час циркуляції в організмі. Приклади таких фрагментів включають: поліетиленгліколь, співполімери етиленгліколю та пропіленгліколю, карбоксиметилцелюлозу, декстран, полівініловий спирт, полівінілпіролідон та поліпролін (Abuchowski and Davis, 1981, "Soluble Polymer-Enzyme Adducts" In: *Enzymes as Drugs*, Hosenberg and Roberts, eds., Wiley-Interscience, New York, NY, pp.367-383; Newmark, et al., 1982, *J. Appl. Biochem.* 4:185-189). Іншими полімерами, що можуть бути використані, є полі-1,3-діоксолан та полі-1,3,6-тіоксолан. Кращими для фармацевтичного застосування, як вказано вище, є поліетиленглікольні фрагменти.

Для компонента (чи похідного) місцем вивільнення може бути шлунок, тонка кишка (дванадцятипала кишка, порожня кишка чи клубова кишка) або велика кишка. Фахівець у цій галузі техніки знає доступні композиції, які не будуть розчинятися у шлунку, але вивільнятимуть матеріал у дванадцятипалій кишці чи в будь-якій ділянці кишечника. Краще, вивільнення дозволить уникнути руйнівного впливу середовища шлунка шляхом захисту олігонуклеотиду (чи похідного) або через вивільнення біологічно активного матеріалу за межами шлункового середовища, наприклад, у кишечнику.

Для забезпечення повної стійкості у шлунку потрібне покриття, непроникне при pH щонайменше 5,0. Прикладами найбільш поширених інертних інгредієнтів, що використовуються як ентросоліюбильні покриття, є ацетат тримелітат целюлози (CAT), фталат гідроксипропілметилцелюлози (HPMCP), HPMCP 50, HPMCP 55, полівінілацетатфталат (PVAP), Eudragit L30D, Aquateric, ацетатфталат целюлози (CAP), Eudragit L, Eudragit S та Shellac. Ці покриття можуть бути використані у формі плівок змішаного складу.

Покриття чи суміш покриттів можуть також бути використані на таблетках, які не призначені для захисту від шлункового середовища. Вони включають цукрові покриття чи покриття, які дозволяють легше проковтнути таблетку. Капсули можуть складатися з твердої оболонки (такої як желатин) для доставки сухого терапевтичного засобу, наприклад, порошку; для рідких форм можуть бути використані м'які желатинові оболонки. Матеріалом оболонок пастилок може бути загущений крохмаль чи інший їстівний папір. Для пілюль, льодяників, формованих таблеток чи порошоків для таблетування можуть бути застосовані методи вологи гранулювання.

Терапевтичний засіб може бути введений до складу композиції як дисперсний матеріал, що складається з багатьох частинок, у формі гранул чи зерен з розміром частинок близько 1 мм. Композиції матеріалу для введення у капсулах також можуть бути порошком, трохи спресованими шматочками чи навіть таблетками. Терапевтичний засіб може бути виготовлений пресуванням.

Можуть бути включені також барвники та смакові агенти. Наприклад, може бути виготовлена композиція олігонуклеотиду (чи похідного) (наприклад, інкапсульована в ліпосомах чи мікросферах), яка потім далі вводиться до складу харчового продукту, такого як охолоджуваний напій, що містить барвники та смакові агенти.

Можна розводити чи збільшувати об'єм терапевтичного засобу за допомогою інертного матеріалу. Ці розріджувачі можуть включати вуглеводи, особливо маніт, альфа-лактозу, безводну лактозу, целюлозу, сахарозу, модифіковані декстрини та крохмаль. Певні неорганічні солі можуть бути використані також як наповнювачі, включаючи трифосфат кальцію, карбонат магнію та хлорид натрію. Деякими з комерційно доступних розріджувачів є Fast-Flo, Emdex, STA-Rx 1500, Emcompress та Avicell.

Диспергувальні агенти можуть бути включені до складу композицій лікарського засобу у твердій дозованій формі. Матеріали, використовувані як диспергувальні агенти, включають, без обмеження, крохмаль, у тому числі комерційний диспергувальний агент на основі крохмалю Explotab. Можуть бути використані натрієва сіль гліколяту крохмалю, амберліт, натрієва сіль карбоксиметилцелюлози, ультрамілопектин, альгінат натрію, желатин, апельсинна цедра, кисла карбоксиметилцелюлоза, природна губка та бентоніт. Іншою формою диспергувальних агентів є нерозчинні катіонобмінні смоли. Порошкоподібні смоли, що можуть використовуватися як диспергувальні агенти та як зв'язуючі, включають такі порошкоподібні смоли, як агар, камедь караї чи трагакант. Альгінова кислота та її натрієва сіль також є придатними для застосування як диспергувальні агенти.

Зв'язуючі можуть бути використані для утримання терапевтичного агента разом з утворенням твердої таблетки і включають матеріали з природних продуктів, таких як гуміарабік, трагакант, крохмаль та желатин. Інші матеріали включають метилцелюлозу (MC), етилцелюлозу (EC) та карбоксиметилцелюлозу (CMC). Полівінілпіролідон (PVP) та гідроксипропілметилцелюлоза (HPMC) можуть бути використані обидва у спиртових розчинах для гранулювання лікарського засобу.

Антифрикційний засіб може бути включений до композиції терапевтичного агента для запобігання залипанням в процесі формування композиції. Змащувальні речовини можуть бути використані у вигляді шару між терапевтичним агентом та стінкою матриці й можуть включати, без обмеження, стеаринову кислоту, у тому числі її магнієві та кальцієві солі, політетрафлюоретилен (PTFE), рідкий парафін, рослинні олії та воски. Можуть бути використані також розчинні змащувальні речовини, такі як лаурилсульфат натрію, лаурилсульфат магнію, поліетиленгліколь з різною молекулярною вагою, Carbowax 4000 та 6000.

Можуть бути додані ковзні речовини для поліпшення плинності лікарського засобу під час виготовлення композиції та допомоги розподіленню частинок під час пресування. Ковзні речовини можуть включати крохмаль, тальк, пірогенний діоксид силіцію та гідратований алюмосилікат.

На допомогу розчиненню лікарського засобу у водному середовищі може бути додана поверхнево-активна речовина як змочувальний агент. Поверхнево-активні речовини можуть включати аніонні детергенти, такі як лаурилсульфат натрію, діоктилсульфосукцинат натрію та діоктилсульфонат натрію. Можуть бути використані катіонні детергенти, які можуть включати бензалконійхлорид чи бензетонійхлорид. Перелік потенційних неіонних детергентів, що можуть бути включені до композиції як поверхнево-активні речовини, включає лауромакрогол 400, поліоксил-40-стеарат, ефіри поліоксидетилену та гідрогенованої рицинової олії 10, 50 та 60, гліцеринмоностеарат, полісорбат 40, 60, 65 та 80, складні ефіри сахарози та жирних кислот, метилцелюлозу та карбоксиметилцелюлозу. Ці поверхнево-активні речовини можуть входити до складу композиції олігонуклеотиду чи похід-

ного окремо чи як суміші з різними співвідношеннями компонентів.

Фармацевтичні препарати, що можуть бути застосовані перорально, включають рознімні капсули, виготовлені з желатину, а також м'які герметичні капсули, виготовлені з желатину та пластифікатора, такого як гліцерин чи сорбіт. Рознімні капсули можуть містити активні інгредієнти у суміші з наповнювачем, таким як лактоза, зв'язуючими, такими як крохмалі, та/або змащувальними речовинами, такими як тальк чи стеарат магнію і, необов'язково, стабілізаторами. У м'яких капсулах активні сполуки можуть бути розчинені чи суспендовані у придатній рідині, такий як жирні масла, рідкий парафін чи рідкі поліетиленгліколі. Крім того, можуть бути додані стабілізатори. Можуть використовуватися також композиції мікросфер для перорального введення. Такі мікросфери добре відомі фахівцям. Усі композиції для перорального введення повинні виготовлятися у дозах, придатних для такого введення.

Для трансбуккального введення композиції можуть мати форму таблеток чи льодяників, виготовлених у звичайний спосіб.

Для введення шляхом інгаляції сполуки, придатні для використання згідно з цим винаходом, можуть бути зручно введені у формі аерозольного спрею з упаковок під тиском чи за допомогою розпилювача, з використанням придатного газу-носія, наприклад, дихлордифлюорметану, трихлорфлюорметану, дихлортетрафлюоретану, діоксиду вуглецю чи іншого придатного газу. У разі аерозолі під тиском разова доза може бути визначена шляхом використання клапана для доставки мірної кількості. Можуть бути виготовлені капсули та картриджі, наприклад, з желатину, для використання в інгаляторі чи інсуфляторі, які містять порошкоподібну суміш сполуки та придатного порошку-основи, такого як лактоза чи крохмаль.

Передбачаються також олігонуклеотиди (чи їхні похідні) для легеневої доставки. Олігонуклеотид (чи похідне) потрапляють у легені ссавця при вдиханні й проходять крізь епітеліальну вистилку легень у кровотік. Інші звіти про інгаляцію молекул включають Adjei et al., 1990, *Pharmaceutical Research*, 7: 565-569; Adjei et al., 1990, *International Journal of Pharmaceutics*, 63: 135-144 (лейпроліду ацетат); Braquet et al., 1989, *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 13 (suppl. 5): 143-146 (ендотелін-1); Hubbard et al., 1989, *Annals of Internal Medicine*, Vol. III pp.206-212 (a1-антитрипсин); Smith et al., 1989, *J. Clin. Invest.* 84: 1145-1146 (a-1-протеїназа); Oswein et al., 1990, "Aerosolization of Proteins", *Proceedings of Symposium on Respiratory Drug Delivery II*, Keystone, Colorado, March, (рекомбінантний гормон росту людини); Debs et al., 1988, *J. Immunol.* 140:3482-3488 (інтерферон- γ та фактор некрозу пухлин-альфа) та Platz et al., патент США №5284656 (колонієстимулюючий фактор гранулоцитів). Спосіб та композиція для легеневої доставки лікарських засобів для забезпечення системного ефекту описана у патенті США №5451569, виданому 19 вересня 1995 р. на ім'я Wong et al.

Передбачається використання на практиці цього винаходу широкого спектра механічних пристроїв, призначених для легеневої доставки терапевтичних продуктів, включаючи, без обмеження, розпилювачі, інгалятори з мірними дозами та інгалятори для порошоків, які усі є відомими фахівцям у цій галузі техніки.

Деякими конкретними прикладами комерційно доступних пристроїв, придатних для застосування на практиці цього винаходу, є розпилювач Ultravent виробництва фірми Mallinckrodt Inc., St. Louis, Missouri; розпилювач Acorn II виробництва фірми Marquest Medical Products, Englewood, Colorado; інгалятор з мірними дозами Ventolin виробництва фірми Glaxo Inc., Research Triangle Park, North Carolina; та інгалятор для порошоків Spinhaler виробництва фірми Fisons Corp., Bedford, Massachusetts.

Усі такі пристрої потребують використання композицій, придатних для дозування олігонуклеотиду (чи похідного). Типово, кожна композиція є специфічною для типу застосовуваного пристрою і може потребувати використання відповідного матеріалу носія, на додаток до звичайних розріджувачів, ад'ювантів та/або носіїв, застосованих у терапії. Передбачається також використання ліпосом, мікрокапсул чи мікросфер, комплексів включення чи інших типів носіїв. Хімічно модифікований олігонуклеотид може бути також включений до різних композицій залежно від типу хімічної модифікації чи типу використовуваного пристрою.

Композиції, придатні для застосування з розпилювачем, чи то струминним, чи ультразвуковим, будуть типово включати олігонуклеотид (чи похідне), розчинений у воді в концентрації близько 0,1-25 мг біологічно активного олігонуклеотиду на мл розчину. Композиція може також включати буфер та простий цукор (наприклад, для стабілізації олігонуклеотиду та регулювання осмотичного тиску). Розпилювана композиція може також містити поверхнево-активну речовину для зниження чи запобігання поверхнево-індукованої агрегації олігонуклеотиду, спричиненої атомізацією розчину при одержанні аерозолі.

Композиції для використання з дозуючим пристроєм для інгаляції будуть загалом включати тонкодисперсний порошок, що містить олігонуклеотид (чи похідне), суспендований у зрідженому газі-носії за допомогою поверхнево-активної речовини. Газ-носієй може бути будь-яким звичайним матеріалом, що використовується з цією метою, таким як хлорфлюоркарбон, хлорфлюорвуглеводень, флюорвуглеводень, вуглеводень, включаючи трихлорфлюорметан, дихлордифлюорметан, дихлортетрафлюоретанол та 1,1,1,2-тетрафлюоретан чи їхні комбінації. Придатні поверхнево-активні речовини включають сорбітантріолеат та соєвий лецитин. Як поверхнево-активна речовина також може використовуватися олеїнова кислота.

Композиції для дозування з пристроєм для інгаляції порошку будуть включати тонкодисперсний сухий порошок, що містить олігонуклеотид (чи похідне), і можуть також включати об'ємний наповнювач, такий як лактоза, сорбіт, сахароза чи маніт,

у кількості, що сприяє розпилюванню порошку з пристрою, наприклад, 50-90% мас. від ваги композиції. Краще, олігонуклеотид (чи похідне) має бути виготовлений у формі порошку із середнім розміром частинок менше ніж 10 мікрон, найкраще, 0,5-5 мікрон, для забезпечення найбільш ефективної доставки до дистальних ділянок легень.

Передбачається також назальне введення фармацевтичної композиції за цим винаходом. Назальне введення забезпечує потрапляння фармацевтичної композиції за цим винаходом у кровотік безпосередньо після введення терапевтичного продукту в ніс, без необхідності відкладення продукту у легенях. Композиції для назального введення включають композиції з декстраном чи циклодекстраном.

Пристроєм, придатним для назального введення, є маленька тверда пляшка, до якої припасований мірний розпилювач. В одному варіанті втілення введення мірної дози здійснюється шляхом всмоктування розчину фармацевтичної композиції за цим винаходом до камери визначеного об'єму, яка має отвір, розміри якого забезпечують утворення аерозолі з аерозольної композиції шляхом утворення факела при стисненні рідини у камері. Камера стискується для доставки фармацевтичної композиції за цим винаходом. У конкретному варіанті втілення камера має поршневу конструкцію. Такі пристрої є комерційно доступними.

Альтернативно, використовується гнучка пластикова пляшка з щілиною чи отвором, розміри яких забезпечують розпилювання аерозольної композиції з утворенням факела при використанні пляшки. Отвір звичайно розташований у верхній частині пляшки, і верхня частина загалом звукується для того, щоб частково заходити у носові ходи для ефективного введення аерозольної композиції. Краще, назальний інгальатор забезпечує дозування відміряної кількості аерозольної композиції для введення дози лікарського засобу.

Сполуки, коли їх бажано ввести не системно, можуть бути введені до композицій для парентерального введення шляхом ін'єкції, наприклад, болюсної ін'єкції чи безперервної інфузії. Композиції для ін'єкцій можуть бути виготовлені у вигляді разових дозованих форм, наприклад, в ампулах чи багатодозових контейнерах з доданим консервантом. Композиції можуть мати такі форми, як суспензії, розчини чи емульсії у масляних чи водних носіях, і містити фармакологічні агенти, такі як суспендувальні, стабілізуючі та/або диспергувальні агенти.

Фармацевтичні композиції для парентерального введення включають водні розчини активної сполуки у водорозчинній формі. Додатково, суспензії активних сполук можуть бути виготовлені як придатні масляні суспензії для ін'єкцій. Придатні ліпофільні розчинники чи носії включають жирні кислоти, такі як кунжутна олія, чи синтетичні складні ефіри жирних кислот, такі як етилолеат чи тригліцериди, або ліпосоми. Водні суспензії для ін'єкції можуть містити речовини, які підвищують в'язкість суспензій, такі як натрієва сіль карбоксиметилцелюлози, сорбіт чи декстран. Небов'язко-

во, суспензія може також містити придатні стабілізатори чи агенти, які підвищують розчинність сполуки для одержання висококонцентрованих розчинів.

Альтернативно, активні сполуки можуть бути у порошкоподібній формі для відновлення придатним носієм, наприклад, стерильною апірогенною водою, перед застосуванням.

Сполуки можуть бути також введені у композиції для ректального чи вагінального введення, такі як супозиторії чи стримуючі клізми, наприклад, такі, що містять звичайні основи супозиторіїв, такі як какаова олія чи інші гліцериди.

Крім описаних вище композицій, сполуки можуть бути також виготовлені у формі препаратів депо. Такі композиції тривалої дії можуть бути виготовлені з придатними полімерними чи гідрофобними матеріалами (наприклад, у вигляді емульсії у прийнятному маслі) чи іонообмінними смолами, або як малорозчинні похідні, наприклад, малорозчинна сіль.

Фармацевтичні композиції також можуть включати придатні твердофазові чи гелеві носії чи ексципієнти. Приклади таких носіїв чи ексципієнтів включають, без обмеження, карбонат кальцію, фосфат кальцію, різні цукри, крохмалі, целюлозні похідні, желатин та полімери, такі як поліетиленгліколи.

Придатними рідкими чи твердими фармацевтичними формами препаратів є, наприклад, водні чи сольові розчини для інгаляції, мікрокапсульовані препарати, разові дозовані форми рідких препаратів, препарати, нанесені у вигляді покриття на мікроскопічні частинки золота, включені в ліпосоми, розпилені, аерозольні препарати, гранули для імплантації до шкіри, або висушені на гострому предметі для дряпання шкіри. Фармацевтичні композиції включають також гранули, порошки, таблетки, таблетки з покриттям, (мікро)капсули, супозиторії, сиропи, емульсії, суспензії, креми, каплі чи препарати з уповільненим вивільненням активних сполук, у яких звичайно використовуються ексципієнти та добавки та/або допоміжні речовини, такі як диспергувальні агенти, зв'язуючі, покривні агенти, агенти, що сприяють набухання, змашувальні речовини, ароматизатори, підсолоджувачі чи соліолізатори, як описано вище. Фармацевтичні композиції є придатними для використання у різноманітних системах доставки лікарських засобів. Стислий огляд методів доставки лікарських засобів див. у статті Langer, Science 249:1527-1533, 1990, яку включено сюди за посиланням.

Імуностимулюючі CpG-олігонуклеотиди та, не обов'язково, інші терапевтичні засоби та/або антигени можуть бути введені *per se* (нерозведеними) чи у формі фармацевтично прийнятної солі. При використанні у медицині солі мають бути фармацевтично прийнятними, але нефармацевтично прийнятні солі можуть бути зручно використані для одержання фармацевтично прийнятних солей. Такі солі включають, без обмеження, солі наступних кислот: хлористоводневої, бромисто-водневої, сірчаної, азотної, фосфорної, малеїнової, оцтової, саліцилової, п-толуолсульфонової, винної, лимонної, метансульфонової, мурашиної, маленової,

бурштинової, нафталін-2-сульфонової та бензол-сульфонової. Крім того, такі солі можуть бути одержані у вигляді солей лужних чи лужноземельних металів, таких як натрієві, калієві чи кальцієві солі групи карбонової кислоти.

Придатні буферні агенти включають: оцтову кислоту та її сіль (1-2% мас/об.); лимонну кислоту та її сіль (1-3% мас/об.); борну кислоту та її сіль (0,5-2,5% мас/об.); і фосфорну кислоту та її сіль (0,8-2% мас/об.). Придатні консерванти включають бензалконій хлорид (0,003-0,03% мас/об.); хлорбутанол (0,3-0,9% мас/об.); парабени (0,01-0,25% мас/об.) та тимеросал (0,004-0,02% мас/об.).

Фармацевтичні композиції за винаходом містять ефективну кількість імуностимулюючого CpG-олігонуклеотиду і, необов'язково, антигени та/або інші терапевтичні агенти, які необов'язково знаходяться у фармацевтично-прийнятному носії. Термін "фармацевтично-прийнятний носій" позначає один чи більше сумісних твердих чи рідких наповнювачів, розріджувачів чи інкапсулюючих речовин, придатних для введення людині чи іншій хребетній тварині. Термін "носій" позначає органічний чи неорганічний інгредієнт, природний чи синтетичний, з яким поєднується активний інгредієнт для зручності його застосування. Компоненти фармацевтичної композиції також мають здатність змішуватися зі сполуками за цим винаходом та один з одним так, щоб між ними не відбувалося взаємодії, яка могла б істотно вплинути на бажану фармацевтичну активність.

Цей винахід далі ілюструється наведеними Прикладами, які в жодному разі не повинні тлумачитися як такі, що додатково обмежують винахід. Повний зміст усіх посилань (включаючи літературні посилання, видані патенти, опубліковані патентні заявки та патентні заявки, що розглядаються паралельно даній), наведених у тексті цього опису, цим беззастережно включений сюди за посиланням.

Приклади

Матеріали та методи

Олігодезоксинуклеотиди (ОДН)

Усі ОДН були придбані у фірм Biospring (Франкфурт, Німеччина) чи Sigma-Ark (Дармштадт, Німеччина), а їхній контроль з метою визначення ідентичності та ступеня чистоти здійснювався фірмою Coley Pharmaceutical GmbH (Ланггенфельд, Німеччина). ОДН розводили у фосфатно-сольовому буфері (Sigma, Німеччина) і зберігали при -20°C. Всі розведення здійснювали з використанням апірогенних реагентів.

Очищення клітин

Препарати лейкоцитної плівки периферичної крові від здорових донорів чоловічої та жіночої статі були одержані з Банку крові Університету Дюссельдорфа (Німеччина), і з них були виділені PBMC центрифугуванням на Ficoll-Huраque (Sigma). Очищені PBMC використовували у свіжо-одержаному стані (для більшості аналізів) або суспендували в середовищі для заморожування та зберігали при -70°C. За необхідності, аліквоти цих клітин відтаювали, промивали та ресуспендували у культуральному середовищі RPMI1640 (BioWhittaker, Бельгія) з добавкою 5% (об./об.)

термоінактивованої сироватки АВ людини (BioWhittaker, Бельгія) чи 10% (об./об.) термоінактивованої сироватки плоду корови (FCS), 2мМ L-глутаміну (BioWhittaker), 100ОД/мл пеніциліну та 100мкг/мл стрептомицину (Invitrogen (Карлсруе, Німеччина)).

Детектування цитокінів

Відтаяні чи свіжі PBMC висіюють на 48-лункові плоскодонні планшети чи 96-лункові круглодонні планшети, та інкубують з ОДН у вказаних концентраціях у вологому інкубаторі при 37°C. Культуральні супернатанти збирають і, якщо не використовують негайно, то заморожують при -20°C до використання. Кількість цитокінів у супернатантах оцінюють за допомогою комерційно доступних наборів для твердофазового імуноферментного аналізу (ELISA) (Diacone, США) чи за власною методикою ELISA, розробленою з використанням комерційно доступних антитіл (виробництва фірм Becton Dickinson/Pharmingen чи PBL).

Культури для потокового цитометричного аналізу активації НК-клітин

Кон'юговані з флуорохромом моноклональні антитіла до CD3 (маркер Т-клітин), CD56 (маркер НК-клітин) та CD69 (маркер ранньої активації НК-клітин та Т-клітин) були придбані у фірми Becton Dickinson. PBMC інкубують протягом 24-х годин з додаванням різних концентрацій ОДН чи без них на 96-лункових круглодонних планшетах. НК-клітини ідентифікують як CD56-позитивні та CD3-негативні клітини методом потокової цитометрії. Результати потокової цитометрії реєструють за допомогою приладу FACSCalibur (Becton Dickinson). Дані аналізують за допомогою комп'ютерної програми CellQuest (Becton Dickinson).

Потоковий цитометричний аналіз маркерів активації клітинної поверхні

Для вимірювання експресії В-клітинами ко-стимулюючої молекули CD86 як маркера активації, PBMC інкубують протягом 48-и годин з ОДН у вказаній концентрації, і клітини забарвлюють за допомогою моноклональних антитіл (mAb) до CD19 та CD86 (Pharmingen, Німеччина). Експресію CD86 на CD19-позитивних В-клітинах вимірюють методом потокової цитометрії.

Для вимірювання експресії моноцитами ко-стимулюючої молекули CD80 як маркера активації, PBMC інкубують протягом 48-и годин з ОДН у вказаній концентрації, і клітини забарвлюють за допомогою mAb до CD14, CD19 та CD80 (Pharmingen, Німеччина). Експресію CD80 на CD14-позитивних CD19-негативних моноцитах вимірюють методом потокової цитометрії. Результати обох вимірів наведені як середня інтенсивність Флуоресценції (MFI).

Приклад 1

Рівні інтерферону-альфа (IFN-α), IFN-γ, IL-10, IL-6 та ФНП-α, що секретуються PBMC людини після експонування цих клітин описаними тут CpG-олігонуклеотидами, наведені на супровідних Фіг.1-5. Досліджувані олігонуклеотиди позначені на Фіг. символом ▲. Олігонуклеотид, що використовувався як олігонуклеотид позитивного контролю, позначений символом ■. Досліджувані олігонуклеотиди, зображені на Фіг.1A, 2A, 3A, 4A та 5A,

включають SEQ ID NO:322, SEQ ID NO:323 та SEQ ID NO:324. Досліджувані олігонуклеотиди, зображені на Фіг.1B, 2B, 3B, 4B та 5B, включають SEQ ID NO:325, SEQ ID NO:326, SEQ ID NO:327 та SEQ ID NO:328. Концентрація олігонуклеотиду, використана для одержання певної точки даних, вказується по вісі X (мкМ). Під графіками наведений для кожного експерименту рівень цитокіну, що секретується клітинами, обробленими негативним контролем (середовище) та, у деяких випадках, ліпополісахаридом (LPS).

Як видно на Фіг.1-5, використані для аналізів олігонуклеотиди були здатними продукувати секретцію цитокінів при рівнях, приблизно еквівалентних чи кращих за рівні олігонуклеотидів позитивного контролю, які мають повністю фосфоротіоатний скелет. Негативний контроль викликав продукування значно меншої кількості цитокінів.

Приклад 2

Були вивчені рівні експресії CD69 (MFI) на NK-клітині у відповідь на обробку досліджуваними олігонуклеотидами порівняно з контрольними олігонуклеотидами. Експресія CD69 є індикатором активації T-клітин та NK-клітин. Клітини експонували досліджуваними олігонуклеотидами, позначеними на Фіг.6 символом ▲, порівняно з олігонуклеотидом позитивного контролю, позначеним символом ■. Досліджувані олігонуклеотиди, зображені на Фіг.6A, включають SEQ ID NO:322, SEQ ID NO:323 та SEQ ID NO:324. Досліджувані олігонуклеотиди, зображені на Фіг.6B, включають SEQ ID NO:325, SEQ ID NO:326, SEQ ID NO:327 та SEQ ID NO:328. Як олігонуклеотид позитивного контролю в цих дослідженнях використовували SEQ ID NO:329. Під графіками наведений для кожного експерименту рівень експресії CD69 на T- та NK-клітинах, оброблених негативним контролем (середовище) та LPS.

Як продемонстровано на Фіг.6, використані для аналізів олігонуклеотиди були здатними індукувати експресію CD69 при рівнях, приблизно еквівалентних чи кращих за рівні олігонуклеотидів позитивного контролю, які мають повністю фосфоротіоатний скелет. Негативний контроль викликав продукування значно меншої кількості CD69.

Приклад 3

Рівні інтерферону-альфа (IFN-α) та IL-10, що продукуються PBMC людини після експонування цих клітин описаними тут CrG-олігонуклеотидами, показані на супровідних Фіг.7-12 та 17. Досліджені олігонуклеотиди позначені на Фіг. символом ■. Олігонуклеотид SEQ ID NO:242, який використовувався як олігонуклеотид позитивного контролю, позначений символом ●. Олігонуклеотид SEQ ID NO:330, який використовувався як олігонуклеотид негативного контролю, позначений символом ◆. На Фіг.7A та 7B наведені результати для дослідного олігонуклеотиду SEQ ID NO:313. На Фіг.8A та 8B наведені результати для дослідного олігонуклеотиду SEQ ID NO:314. На Фіг.9A та 9B наведені результати для дослідного олігонуклеотиду SEQ ID NO:319. На Фіг.10A та 10B наведені результати для дослідного олігонуклеотиду SEQ ID NO:316. На Фіг.11A та 11B наведені результати для дослідного олігонуклеотиду SEQ ID NO:317. На Фіг.12A

та 12B наведені результати для дослідного олігонуклеотиду SEQ ID NO:320. На Фіг.17A та 17B наведені результати для дослідного олігонуклеотиду SEQ ID NO:321. Концентрація олігонуклеотиду, використана для одержання певної точки даних, вказується по вісі X (мкМ).

Як продемонстровано на Фіг.7-12 та 17, кожен з використаних для проведення аналізів олігонуклеотидів був здатним продукувати різні рівні та профілі секретії цитокінів. Наприклад, у приблизно еквівалентній чи нижчій концентрації більшість випробуваних ОДН призводили до кращого індукування одного чи більше цитокінів, ніж олігонуклеотид позитивного контролю, який мав повністю фосфоротіоатний скелет. Негативний контроль викликав продукування значно меншої кількості цитокінів.

Після інкубування з SEQ ID NO:313, PBMC секретують рівні інтерферону-альфа (IFNα) та інтерлейкіну-10 (IL-10), аналогічні до результатів, одержаних після інкубування з SEQ ID NO:242. SEQ ID NO:314 мав ефект на кількість IL-10, що секретується PBMC людини, аналогічний до SEQ ID NO:242, у той час як секретія IFNα істотно зростала. На відміну від SEQ ID NO:242, SEQ ID NO:319 індукує лише низькі рівні секретії IFNα у PBMC людини, у той час як кількість IL-10, що секретується, є порівняною для двох олігонуклеотидів. SEQ ID NO:316 був здатним індукувати рівні IFNα у PBMC людини у кілька разів вищі, ніж SEQ ID NO:242. Спостерігалось також зростання загальної кількості IL-10, що секретується. SEQ ID NO:317 продемонстрував властивості, аналогічні до SEQ ID NO:316, із сильно збільшеною секретією IFNα у PBMC людини порівняно з SEQ ID NO:242. Рівні секретії IL-10 були дещо підвищеними. Хоча SEQ ID NO:320 призводив до індукування IFNα та IL-10 у PBMC людини, це індукування було меншим, ніж для SEQ ID NO:242. SEQ ID NO:321 був здатним індукувати більш ніж у десять разів вищі рівні IFNα у PBMC людини порівняно з SEQ ID NO:242 (Фіг.17A). Порівняно з SEQ ID NO:242, секретія IL-10 у PBMC людини, індукована SEQ ID NO:321, є дещо підвищеною при більших концентраціях цього олігонуклеотиду (Фіг.17B).

Приклад 4

Рівні активації B-клітин та моноцитів після експонування цих клітин описаними тут CrG-олігонуклеотидами показані на супровідних Фіг.13-15, 16 та 18-20. Досліджені олігонуклеотиди позначені на Фіг. символом ■. Олігонуклеотид SEQ ID NO:242, який використовувався як олігонуклеотид позитивного контролю, позначений символом ●. Олігонуклеотид SEQ ID NO:330, який використовувався як олігонуклеотид негативного контролю, позначений символом ◆. На Фіг.13A та 13B наведені результати для дослідного олігонуклеотиду SEQ ID NO:313. На Фіг.14A та 14B наведені результати для дослідного олігонуклеотиду SEQ ID NO:314. На Фіг.15A та 15B наведені результати для дослідного олігонуклеотиду SEQ ID NO:319. На Фіг.16A та 16B наведені результати для дослідного олігонуклеотиду SEQ ID NO:316. На Фіг.18A та 18B наведені результати для дослідного олігонуклеотиду SEQ ID NO:321. На Фіг.19A та 19B на-

ведені результати для дослідного олігонуклеотиду SEQ ID NO:317. На Фіг.20А та 20В наведені результати для дослідного олігонуклеотиду SEQ ID NO:320. Концентрації олігонуклеотиду, використані для одержання певної точки даних, вказуються по вісі X (мкМ).

Як продемонстровано на Фіг.13-15, 16 та 18-20, кожен з використаних для проведення аналізів олігонуклеотидів був здатен продукувати різні рівні та профілі експресії маркерів клітинної поверхнею. Наприклад, у приблизно еквівалентній чи нижчій концентрації, більшість з випробовуваних ОДН призводили до кращого індукування маркерів клітинної поверхні, ніж олігонуклеотид позитивного контролю, який мав повністю фосфоротіоатний скелет.

Рівень експресії CD86 на В-клітинах та експресії CD80 на моноцитах, індукований SEQ ID NO:313, є порівняним з SEQ ID NO:242. На відміну від SEQ ID NO:242, SEQ ID NO:313 стимулює клітини у нижчій концентрації порівняно з SEQ ID NO:242, що дозволяє припустити його підвищену ефективність. Рівні експресії CD86 на В-клітинах та експресії CD80 на моноцитах, індуковані SEQ ID NO:314, є порівняними. Ефекти SEQ ID NO:314 спостерігаються при використанні нижчих концентрацій SEQ ID NO:314 порівняно з SEQ ID NO:242, що демонструє підвищену ефективність SEQ ID NO:314. На В-клітинах поверхнева експресія CD86 зазнає сильного підвищувального регулювання під дією SEQ ID NO:319, із силою сигналу, порівняною з SEQ ID NO:242. На моноцитах при використанні SEQ ID NO:319 можуть бути виявлені лише слабо підвищені рівні експресії CD80. Здатність SEQ ID NO:319 індукувати підвищувальну регуляцію CD86 на В-клітинах є дещо зниженою порівняно з SEQ ID NO:242. Порівняно з SEQ ID NO:242, SEQ ID NO:316 індукує вищі рівні маркера активації CD86 на В-клітинах (Фіг.16А) та маркера активації CD80 на моноцитах (Фіг.16В). В-клітини зазнають сильної активації при інкубуванні PBMC людини з SEQ ID NO:321, як видно з даних експресії CD86 (Фіг.18А). Рівень CD86 є вищим, ніж рівень, індукований SEQ ID NO:242. Активация моноцитів, визначена за експресією CD80, є також сильнішою для SEQ ID NO:321, ніж для SEQ ID NO:242 (Фіг.18В). SEQ ID NO:317 індукує експресію CD86 на В-клітинах у рівнях, порівняних з SEQ ID

NO:242 (Фіг.19А), у той час як експресія маркера активації CD80 на моноцитах є підвищеною порівняно з SEQ ID NO:242 (Фіг.19В). SEQ ID NO:320 індукує експресію CD86 на В-клітинах подібно до SEQ ID NO:242 (Фіг.20А).

Приклад 5. Напівм'які олігонуклеотиди виявляють імуностимулюючі властивості щодо PBMC людини *in vitro*.

У цьому прикладі напівм'які олігонуклеотиди оцінюють за їхньою здатністю індукувати цитокіни та хемокіни *in vitro*. Мононуклеарні клітини периферичної крові (PBMC) були одержані від трьох здорових людей-донорів та культивувалися у присутності різних концентрацій (0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 1,0 та 5,0мкМ) повністю стабілізованого CpG SEQ ID NO:242 чи напівм'якого SEQ ID NO:241. Через 6, 16 чи 48 годин збирають супернатанти культур і різні цитокіни (IFN- α , ФНП- α , IL-10) та хемокін IP-10 у супернатантах вимірюють методом ELISA. При низьких концентраціях олігонуклеотиду напівм'який та повністю стабілізований олігонуклеотиди індукують IFN- α аналогічно після 16-ти чи 48-ми годин у культурі. Однак, максимальне індукування IFN- α за допомогою ОДН 5476 досягається при концентрації олігонуклеотиду, удвічі нижчій, ніж потрібна для SEQ ID NO:242. У проміжній концентрації SEQ ID NO:242 індукує більшу кількість IFN- α , ніж SEQ ID NO:241, а при високих концентраціях ані SEQ ID NO:242, ані SEQ ID NO:241 не індукують більшу кількість IFN- α . Стимуляція хемокіну IP-10 відбувалася подібно та з аналогічними концентраційними залежностями для напівм'якого та повністю стабілізованого олігонуклеотидів. В обох випадках близько 700пг/мл IP-10 спостерігалось при нижчих концентраціях олігонуклеотиду, і менша кількість IP-10 індукувалася при вищих концентраціях олігонуклеотиду. Для цитокіну IL-10 спостерігався профіль, аналогічний до IP-10, за винятком того, що напівм'який олігонуклеотид при 0,05мкМ індукував значну кількість IL-10, тоді як повністю стабілізований олігонуклеотид при 0,05мкМ індукував майже нульову кількість IL-10. Напівм'який та повністю стабілізований олігонуклеотиди мали аналогічну здатність індукувати ФНП- α , тобто обидва типи олігонуклеотиду сильно індукують ФНП- α , особливо у високих концентраціях.

Таблиця 1. Цитокіни та хемокін (пг/мл)¹, індуковані олігонуклеотидами (мкМ)

	ОДН	0,05	0,1	0,2	0,5	1,0	5,0
IFN-α	SEQ ID NO:241	534,8 (3,5)	466,0 (7,5)	251,6 (22,9)	25,4 (21,4)	22,9 (26,3)	26,7 (22,1)
	SEQ ID NO:242	444,0 (23,9)	573,6 (41,7)	892,4 (58,0)	583,6 (51,5)	115,6 (2,5)	51,5 (12,8)
IP-10	SEQ ID NO:241	5677,8 (18,9)	6221,5 (22,4)	4936,6 (11,8)	1493,6 (5,5)	121,9 (0,4)	0,0 (0,0)
	SEQ ID NO:242	7287,4 (5,5)	6685,8 (12,8)	6967,4 (15,9)	4422,7 (11,0)	361,7 (2,6)	0,0 (0,0)
IL-10	SEQ ID NO:241	447,6 (3,7)	385,3 (4,9)	257,3 (3,1)	92,9 (1,6)	46,5 (0,2)	17,3 (1,5)
	SEQ ID NO:242	73,4 (1,0)	399,8 (3,0)	367,7 (9,8)	237,8 (2,6)	52,3 (1,3)	10,5 (0,3)
ФНП-α	SEQ ID NO:241	179,0 (18,3)	186,4 (15,9)	229,9 (23,4)	178,8 (9,0)	368,2 (22,3)	886,3 (31,7)
	SEQ ID NO:242	196,8 (25,9)	211,5 (8,7)	242,7 (5,5)	262,1 (6,3)	479,8 (33,5)	939,6 (69,7)

¹ Результати наведені як середнє значення (стандартний відхил).

Приклад 6. Стимулювання мишачих макрофагів in vitro напівм'яким SEQ ID NO:241 порівняно з повністю стабілізованим ОДН.

Клітинну лінію мишачих макрофагів (RAW264) інкубують протягом 16-ти годин з напівм'яким олігонуклеотидом SEQ ID NO:241, повністю стабілізованим олігонуклеотидом SEQ ID NO:242, повністю стабілізованим ОДН 1826, ліпополісахаридом (LPS) чи PBS. Напівм'який та повністю стабілізо-

ваний ОДН аналізують при концентраціях 0,02, 0,05, та 0,1мкМ.

Збирають супернатанти та вимірюють методом ELISA субодиницю p40 IL-12 (IL-12p40,пг/мл). Результати наведені у Таблиці 2. Напівм'який олігонуклеотид SEQ ID NO:241 був набагато сильнішим за результатами індукування макрофагів до секреції IL-12p40, ніж будь-який з повністю стабілізованих ОДН.

Таблиця 2. Секреція IL-12p40 мишачими макрофагами, стимульованими напівм'яким олігонуклеотидом SEQ ID NO:241

ОДН	Концентрація ОДН (мкМ)	IL- 12 p40, пг/мл середнє (станд. відх.)
SEQ ID NO:241	0,02	148,8 (37,5)
	0,05	149,8 (28,7)
	0,1	162,3 (8,4)
SEQ ID NO:242	0,02	41,4 (18,6)
	0,05	42,0 (26,2)
	0,1	23,0 (10,7)
SEQ ID NO:386	0,02	43,5 (23,0)
	0,05	38,3 (19,2)
	0,1	54,4 (4,1)
LPS	-	346,5 (20,5)
Фосфатно-сольовий буфер (PBS)	-	32,0 (12,1)

Приклад 7. Напівм'які олігонуклеотиди В-класу з послідовністю, оптимізованою для стимулювання імунних клітин людини, є сильними імуностимуляторами мишачих імунних клітин.

Повідомлялося, що людські та мишачі імунні клітини реагують на різні CpG-ОДН. Повністю стабілізований CpG-SEQ ID NO:242 вважався "оптимальним" для стимулювання імунних клітин людини, але не "оптимальним" для стимулювання мишачих імунних клітин. Навпаки, повністю стабі-

лізований CpG-ОДН 5890 (5'T*С*А*А*С*G*Т*Т3') вважався "оптимальним" для стимулювання мишачих імунних клітин, але не "оптимальним" для стимулювання імунних клітин людини. Повідомлялося, що як людські, так і мишачі В-клітини експресують TLR9. TLR9-експресуючі мишачі спленотицити HEK293 культивувалися у присутності різних концентрацій повністю стабілізованого CpG-SEQ ID NO:242, повністю стабілізованого CpG-ОДН 5890, чи напівм'якого SEQ ID NO:241, і TLR9-

активацію вимірювали, як описано далі. Клітини, що використовувалися для цього аналізу, експресують мишачий TLR9 і містять конструкт репортерного гена. Клітини інкубують з ОДН протягом 16-ти годин при 37°C у вологому інкубаторі. Виміри кожної точки даних проводять у трьох паралельних дослідах. Клітини лізують та аналізують на активність репортерного гена. Показники стимулювання обчислюють порівняно з активністю репортерного гена для середовища без добавки ОДН. Напівм'який олігонуклеотид SEQ ID NO:241 та повністю стабілізований олігонуклеотид SEQ ID

NO:242 мають ідентичну послідовність основ. Результати наведені у Таблиці 3. У найменших концентраціях SEQ ID NO:241 та SEQ ID NO:242 мали мінімальний імуностимулюючий ефект. Однак, зі зростанням концентрації до 14нМ та вище, SEQ ID NO:241 мав безсумнівно кращі імуностимулюючі властивості, ніж SEQ ID NO:242. У найвищих концентраціях, досліджених у цьому експерименті, SEQ ID NO:241 мав стимулюючі властивості, що найменше, не гірші за оптимізований для мишей повністю стабілізований олігонуклеотид ОДН 5890.

Таблиця 3. Коефіцієнт стимулювання мишачих HEK293-клітин, що експресують TLR9 напівм'яким ОДН з послідовністю, оптимізованою для клітин людини

Конц.	ОДН		
	5890	SEQ ID NO:241	SEQ ID NO:242
0,9 нМ	1,4	0,7	0,9
3,5 нМ	2,4	1,1	1,2
14 нМ	12,5	1,9	1,1
58 нМ	21,4	4,3	2,0
0,23 мкМ	25,2	12,0	6,2
0,94 мкМ	28,6	18,3	8,0
3,75 мкМ	29,3	32,1	10,3

Приклад 8-9. Напівм'які олігонуклеотиди індують активацію NK-клітин.

Напівм'які та повністю стабілізовані олігонуклеотиди порівнювали також за їхньою здатністю стимулювати активацію NK-клітин. Використовували стандартний тест на вивільнення хрому, у якому 10×10^6 клітин селезінки BALB/c культивують протягом 48-и годин у 2мл RPMI з добавкою 10% сироватки плоду корови (FBS) (термоінактивованої при 65°C протягом 30-ти хвилин), 50мкМ 2-меркаптоетанолу, 100Од./мл пеніциліну, 100мкг/мл стрептоміцину та 2мМ L-глутамату, з напівм'яким SEQ ID NO:241 або повністю стабілізованим SEQ ID NO:242 чи без них, причому кожен ОДН додають до кінцевої концентрації 1, 3 чи 10мкг/мл. Клітини промивають, а потім використовують як ефекторні клітини у прискореному тесті на вивільнення ^{51}Cr з двома NK-чутливими лініями клітин-мішеней - YAC-1 та 2C11 (Bailas Z.K. et al. (1993) J. Immunol. 150: 17-30). Ефекторні клітини додають у різних концентраціях до 10^4 клітин-мішеней, міче-

них ^{51}Cr , в об'ємі 0,2мл на мікротитрувальних планшетах з V-подібним дном, та інкубують у 5% CO_2 протягом 4-х годин при 37°C. Досліджені співвідношення "ефекторні клітини:клітини-мішені (Е:Т)" становили 6,25:1, 25:1, 50:1 та 100:1. Потім планшети центрифугували і підраховували радіоактивність аліквоти супернатанту. Процент специфічного лізису визначали шляхом розрахунку співвідношення ^{51}Cr , вивільненого у присутності ефекторних клітин, мінус кількість ^{51}Cr , вивільненого при культивації самих лише клітин-мішеней, до загальної радіоактивності, вивільненої після клітинного лізису у 2% оцтовій кислоті (100-процентний лізис) мінус радіоактивність (імпульсів за хвилину) ^{51}Cr , вивільненого при культивації самих лише клітин. Результати наведені у Таблиці 5 нижче. Загалом напівм'який олігонуклеотид SEQ ID NO:241 та повністю стабілізований SEQ ID NO:242 індують по суті порівняні рівні активації NK-клітин в усьому діапазоні досліджених концентрацій ОДН та співвідношень Е:Т.

Таблиця 5. Специфічний лізис, медіований NK-клітинами

ОДН	мкг/мл	Співвідношення Е:Т			
		6,25:1	25:1	50:1	100:1
SEQ ID NO:241	1	8	17	17,5	27,5
	3	2,5	5	8	15
	10	4	12,5	20	28
SEQ ID NO:242	1	7	8	12,5	22
	3	3,5	4	11	18
	10	5	12,5	23	32,5

Приклад 10. Напівм'які олігонуклеотиди мають загалом сильніші імуностимулюючі властивості, ніж повністю фосфоротіатні олігонуклеотиди з такою саме чи подібною послідовністю.

Усі випробувані напівм'які варіанти були більш активними за результатами тесту на TLR9 людини,

ніж відповідні рівномірно фосфоротіатні молекули (Таблиця 6). Середній коефіцієнт стимулювання розраховували за експериментальними результатами для чотирьох концентрацій (0,1мкМ, 0,5мкМ, 2мкМ та 8мкМ). У Таблиці U позначає 2'-дезоксиріацил.

Таблиця 6. Коефіцієнти відносно середнього стимулювання напівм'яких олігонуклеотидів порівняно з повністю фосфоротіатними олігонуклеотидами, що мають таку саме чи подібну послідовність

Послідовність	Відносний середній коефіцієнт стимулювання
T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*C*G*G*C*G*C*G (SEQ ID NO:247)	1,00
T*C*G*C*C*G*T*T*T*T*C_G*G*C_G*G*C*C_G*C*C*G (SEQ ID NO:248)	0,74
T*C*G*C*C*G*T*T*T*T*C_G*G*C_G*G*C*C_G*C*C*G (SEQ ID NO:249)	0,72
T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C_G*G*C_G*G*C*C_G*G*C*C*G (SEQ ID NO:250)	1,37
T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C_G*G*C_G*G*C*C_G*C*C*G (SEQ ID NO:251)	1,25
T*C_G*C*C_G*T*T*T*T*C_G*G*C_G*G*C*C_G*C*C*G (SEQ ID NO:252)	2,99
T*C_G*C*C_G*T*T*T*T*C_G*G*C_G*G*C*C_G*C*C*G (SEQ ID NO:253)	2,22
T*C_G*T*C_G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*G*C*C*G*C*C*G (SEQ ID NO:254)	3,46
T*C_G*T*C_G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*G*C*C*G*C*C*G (SEQ ID NO:255)	4,08
T*C_G*T*C_G*T*T*T*T*C_G*G*C_G*G*C*C_G*C*C*G (SEQ ID NO:256)	5,69
T*C_G*T*C_G*T*T*T*T*C_G*G*C_G*G*C*C_G*C*C*G (SEQ ID NO:257)	4,49
T*G*T*C*G*T*T*G*T*C*G*T*G*T*C*G*T*G*T*C*G*T*T (SEQ ID NO:244)	1,00
T*G*T*C_G*T*T*G*T*C_G*T*T*G*T*C_G*T*T*G*T*C_G*T*T (SEQ ID NO:258)	4,23
T*G*T*C_G*T*T*G*T*C_G*T*T*G*T*C_G*T*T*G*T*C_G*T*T (SEQ ID NO:243)	4,74
T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*T*C*G*T*T*T*G*T*C*G*T*T (SEQ ID NO:259)	1,00
T*C_G*T*C_G*T*T*T*T*C_G*T*C_G*T*T*T*G*T*C_G*T*T (SEQ ID NO:260)	1,80
T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*G*A*C*G*T*T*T*G*T*C*G*T*T (SEQ ID NO:261)	1,00
T*C_G*T*C_G*T*T*T*T*C_G*A*C_G*T*T*T*G*T*C_G*T*T (SEQ ID NO:262)	2,71

T*C_G*T*C_G*T*T*T_G*A*C_G*T*T*T*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T (SEQ ID NO:263)	3,01
T*C_G*T*C_G*T*T*T*T_G*A*C_G*T*T*T*T*T*T*T*G*T*C_G*T*T (SEQ ID NO:264)	3,06
T*C_G*T*C_G*T*T*T*T_G*A*C_G*T*T*T*T (SEQ ID NO:265)	2,06
T*C_G*T*C_G*T*T*T*T_G*A*C_G*T*T (SEQ ID NO:266)	1,43
T*C_G*T*C_G*T*T*T*T_G*A*C*G*T*T (SEQ ID NO:267)	0,91
G*T*T*C*T*C*G*C*T*G*G*T*G*A*G*T*T*T*C*A (SEQ ID NO:268)	1,00
G*T*T*C*T*C_G*C*T_G*G*T_G*A*G*T*T*T*C*A (SEQ ID NO:269)	3,45
T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*T*C*G*T*T (SEQ ID NO:270)	1,00
T*C_G*T*C_G*T*T*T*C_G*T*C_G*T*T*T*T_C_G*T*C_G*T*T (SEQ ID NO:271)	2,49
T*C_G*T*C_G*T*T*T*U_G*T*C_G*T*T*T*T_G*T*C_G*T*T (SEQ ID NO:272)	2,51
T*C*G*T*C*G*T*T*T*U*G*T*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T (SEQ ID NO:273)	1,00
T*C_G*T*C_G*T*T*T*U_G*T*C_G*T*T*T*T_G*T*C_G*T*T (SEQ ID NO:274)	2,62
T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T (SEQ ID NO:242)	1,00
T*C_G*T*C_G*T*T*T*T_G*T*C_G*T*T*T*T_G*T*C_G*T*T (SEQ ID NO:276)	1,95
T*C*G*U*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T*T*U*G*U*C*G*T*T (SEQ ID NO:277)	1,00
T*C_G*U*C_G*T*T*T*T_G*T*C_G*T*T*T*U_G*U*C_G*T*T (SEQ ID NO:278)	1,39
T*C*G*T*C*G*U*U*T*G*T*C*G*U*U*U*G*T*C*G*T*T (SEQ ID NO:279)	1,00
T*C_G*T*C_G*U*U*U*C_G*T*C_G*U*U*U*G*T*C_G*T*T (SEQ ID NO:280)	2,05
A*A*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*T*C*G*T*T (SEQ ID NO:281)	1,00
A*A*C_G*T*C_G*T*T*T*T*C_G*T*C_G*T*T (SEQ ID NO:282)	1,58

Приклад 11. Поліпшена in vitro ефективність напів'яких варіантів повністю стабілізованих олігонуклеотидів зі слабкими імуностимулюючими властивостями

(T*G*T*C*G*T*T*G*T*C*G*T*T*G*T*C*G*T*T*G*T*T, SEQ ID NO:244)

є

повністю стабілізованим, повністю фосфороті-
оатним CpG-олігонуклеотидом з низькою імунос-

тимуючою активністю порівняно з SEQ ID NO:242. Споріднені напів'які олігонуклеотиди

(T*G*T*C_G*T*T*G*T*C_G*T*T*G*T*C_G*T*T*G*T*T, SEQ ID NO:258)

та

(T*G*T*C_G*T*T*G*T*C_G*T*T_G*T*C_G*T*T_G*T*C_G*T*T, SEQ ID NO:243)

були у багато разів сильнішими, ніж SEQ ID NO:244, і навіть сильнішими, ніж SEQ ID NO:242.

T*G*T*C_G*T*T*G*T*C_G*T*T*G*T*C_G*T*T (SEQ ID NO:258)

T*G*T*C_G*T*T*G*T*C_G*T*T_G*T*C_G*T*T (SEQ ID NO:243)

T*G*T*C*G*T*T*G*T*C*G*T*T*G*T*C*G*T*T*G*T*C*G*T*T (SEQ ID NO:244)

Таблиця 7. Поліпшене імунне стимулювання напів'якими варіантами повністю стабілізованого олігонуклеотиду зі слабкими імуностимулюючими властивостями

ОДН	Концентрація ОДН, мкМ			
	0,1	0,5	2	8
SEQ ID NO:244	16,0	47,5	71,4	68,5
SEQ ID NO:243	19,3	40,5	78,2	77,9
SEQ ID NO:241	2,6	9,5	12,9	14,0
SEQ ID NO:242	10,6	34,2	38,3	40,8

Приклад 12. Напів'які олігонуклеотиди зменшеної довжини виявляють імуностимулюючі властивості in vitro.

Напів'який 16-мер SEQ ID NO:283, 16-мер SEQ ID NO:245, 17-мер SEQ ID NO:284 та 24-мер SEQ ID NO:241 порівнювали з повністю стабілізованими ОДН 24-мером SEQ ID NO:242 та 18-мером SEQ ID NO:285 за їхньою здатністю стимулювати передачу сигналів TLR9. Кожен олігонуклеотид додавали до клітин HEK293, трансфекованих TLR9 людини та репортерним генним конструктом у концентрації 1,6, 12 чи 24мкг/мл, і вимірювали активацію TLR9, як описано вище.

(16-мер) T*C_G*T*C_G*T*T*T*T*C_G*T*C_G*T (SEQ ID NO:283)

(16-мер) T*C_G*T*C_G*T*T*T*T*C_G*T*C_G*T (SEQ ID NO:245)

(17-мер) T*C_G*T*C_G*T*T*T*T*T*C_G*T*C_G*T (SEQ ID NO:284)

(18-мер) A*A*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*T*C*G*T (SEQ ID NO:285)

(24-мер) T*C_G*T*C_G*T*T*T*T_G*T*C_G*T*T*T*T*G*T*C_G*T (SEQ ID NO:241)

(24-мер) T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T*T*G*T*C*G*T (SEQ ID NO:242)

Якщо 18-мерний повністю стабілізований олігонуклеотид ОДН SEQ ID NO:285 мав слабкіші імуностимулюючі властивості, ніж 24-мерний повністю стабілізований олігонуклеотид SEQ ID NO:242 при всіх досліджених концентраціях, то 16-мерні та 17-мерні напів'які олігонуклеотиди мали стимулюючі властивості, які щонайменше дорівнювали 24-меру SEQ ID NO:242 у концентраціях 6мкг/мл та вище. Крім того, 16-мерні та 17-мерні напів'які олігонуклеотиди мали майже такі саме імуностимулюючі властивості, як і 24-мерний напів'який олігонуклеотид SEQ ID NO:241.

Таблиця 8. Імуностимулююча активність коротких напів'яких олігонуклеотидів порівняно з короткими та довгими повністю стабілізованими та напів'якими олігонуклеотидами

ОДН	Концентрація ОДН, мкг/мл			
	1	6	12	24
SEQ ID NO:283	1,2	17,1	29,0	39,5
SEQ ID NO:245	1,1	8,4	31,3	48,9
SEQ ID NO:284	3,4	23,9	35,9	45,6
SEQ ID NO:285	4,6	12,9	15,9	18,0
SEQ ID NO:241	6,4	33,0	50,8	58,6
SEQ ID NO:242	11,0	24,6	26,2	21,9

Приклад 13. Напів'які олігонуклеотиди виявляють імуностимулюючі властивості in vivo.

Мишей BALB/c розподіляли на групи та вводили підшкірно 400мкг напів'якого олігонуклеотиду SEQ ID NO:241, повністю стабілізованого імуностимулюючого олігонуклеотиду SEQ ID NO:242, повністю стабілізованого олігонуклеотиду негативного контролю (TGCTGCTTTTGTGCTTTTGTGCTT, SEQ ID NO:286) або еквівалентного об'єму фосфат-сольового буфера (PBS). Тварини знекровлювали через 3 години після ін'єкції та визначали рівні у сироватці IP-10, IFN-γ та ФНП-α методом відповідного цитокін-специфічного ELISA. Рівні IP-10 у сироватці були приблизно удвічі вищими у тварин, які одержували напів'який SEQ ID

NO:241 (8000-12000пг/мл), ніж у тих, які одержували повністю стабілізований імуностимулюючий олігонуклеотид SEQ ID NO:242 (3500-8000пг/мл). Рівні IP-10 у сироватці тварин, які одержували контрольний SEQ ID NO:286, були такими саме низькими, як і у тих, що одержували PBS. Напів'який олігонуклеотид SEQ ID NO:241 та повністю стабілізований імуностимулюючий олігонуклеотид SEQ ID NO:242 індукували аналогічну кількість IFN-γ - близько 150пг/мл. Напів'який олігонуклеотид SEQ ID NO:241 індукував на 30-45 процентів більше ФНП-α, ніж повністю стабілізований імуностимулюючий олігонуклеотид SEQ ID NO:242 (близько 1550пг/мл проти приблизно 1175пг/мл в одному

експерименті та близько 710пг/мл проти 490пг/мл в іншому експерименті).

В іншій серії *in vivo* експериментів напів'які та повністю стабілізовані олігонуклеотиди аналізували за їхньою здатністю виліковувати пухлини у мишей BALB/c. Трьом групам мишей BALB/c робили інтраперитонеально (i.p.) ін'єкції клітин мишачої ниркової аденокарциноми спонтанного походження (Rensa), з використанням визнаної пухлинної моделі (Salup R.R. et al. (1985) J. Immunopharmacol. 7:417-36). Кожна група мишей одержувала також 100мг напів'якого олігонуклеотиду SEQ ID NO:241, 100мг повністю стабілізованого імуностимулюючого олігонуклеотиду SEQ ID NO:242 або еквівалентний об'єм PBS. Мишей спостерігали протягом життя та визначали розмір пухлини на момент смерті. Миші, які одержували фіктивне лікування PBS, мали середню виживаність 44 днів, і 20 процентів доживали до 50-ти днів. На відміну від них, миші, які одержували напів'який олігонуклеотид SEQ ID NO:241, мали 80 процентів виживаності через 50 днів, а миші, які одержували повністю стабілізований імуностимулюючий олігонуклеотид SEQ ID NO:242, мали 70 процентів виживаності через 50 днів. За показниками розміру пухлин (кубічних міліметрів) миші, які одержували PBS, мали через 52 дні об'єм пухлин майже 1200 мм³, тоді як миші, які одержували напів'який олігонуклеотид SEQ ID NO:241 чи повністю стабілізований імуностимулюючий олігонуклеотид SEQ ID NO:242, мали пухлини розміром близько 250мм³ та 180мм³, відповідно. Таким чином, напів'який олігонуклеотид та повністю стабілізований олігонуклеотид виявляли обидва високу ефективність зменшення пухлинного навантаження та збільшення виживаності в експериментах на цій моделі.

Приклад 14. М'які чи напів'які олігонуклеотиди мають знижену нефротоксичність.

Було знайдено, що введення повністю стабілізованих імуностимулюючих олігонуклеотидів мавпам може бути асоційоване з розвитком гломерулонефриту, тобто запалення нирок. Гломерулонефрит може бути діагностований та контрольований за присутністю червоних кров'яних клітин та протеїну у сечі, яка часто супроводжується зниженою швидкістю клубочкової фільтрації (з азотемією), утриманням води та солі, гіпертензією та набряком. Нормальна сеча по суті не містить кров'яних клітин та протеїнів плазми. Діагноз може також бути поставлений шляхом гістологічного дослідження ниркової тканини. Повідомляється, що ниркова тканина має високий вміст нуклеаз, які очікувано будуть більш активними по відношенню до м'яких олігонуклеотидів, ніж до повністю стабілізованих імуностимулюючих олігонуклеотидів.

Мавпи розподіляють на дві групи, однієї з яких вводять м'які олігонуклеотиди, а іншій - повністю стабілізовані імуностимулюючі олігонуклеотиди. М'які олігонуклеотиди та повністю стабілізовані імуностимулюючі олігонуклеотиди мають ідентичні послідовності та відрізняються лише міжнуклеотидними зв'язками. Обидві групи мавп одержували однакову дозу імуностимулюючого олігонуклеотиду. Роблять початковий (базова лінія) та періодичні виміри в процесі лікування щонайменше одного параметра, придатного для оцінки наявності гломерулонефриту, включаючи, наприклад, імпрегновану паличку для аналізу сечі на наявність протеїнуриї та/або гематурії, мікроскопічний аналіз сечі на присутність червоних кров'яних клітин та/або циліндрів червоних кров'яних клітин, концентрацію протеїну у сечі, нітроген сечовини крові (BUN), креатинін сироватки, кров'яний тиск, вагу тіла та біопсію нирок шляхом світлового та/або електронномікроскопічного аналізу тканин. Установлювали кореляцію клінічних результатів з типом імуностимулюючого олігонуклеотиду, який вводився кожній мавпі, і результати для груп порівнювали для виявлення статистичної значущості.

Необов'язково, додаткові парні групи мавп, яким вводили м'які чи напів'які олігонуклеотиди або повністю стабілізовані імуностимулюючі олігонуклеотиди, як описано вище, але з використанням вищої чи меншої дози (доз) олігонуклеотиду, включали для додаткової оцінки результатів як функції дози олігонуклеотиду.

Мавпи, які одержували м'які олігонуклеотиди, є значно менш схильними до розвитку гломерулонефриту, ніж мавпи, які одержували повністю стабілізовані імуностимулюючі олігонуклеотиди.

Приклад 15. М'які олігонуклеотиди мають підвищену імуностимулюючу активність у високих концентраціях.

М'які олігонуклеотиди порівнювали з SEQ ID NO:242 за здатністю індукувати активність TLR9. М'які ОДН та контрольний SEQ ID NO:242 порівнювали при кожній з чотирьох концентрацій, 1мкг/мл, 6мкг/мл, 12мкг/мл та 24мкг/мл. Співвідношення активації кожним з м'яких олігонуклеотидів до активації SEQ ID NO:242 для кожної концентрації наведені у Таблиці 9 нижче. Ці результати свідчать, що м'які олігонуклеотиди мають сильніші імуностимулюючі властивості, ніж SEQ ID NO:242 при досліджених високих концентраціях.

T*G*T*C_G_T*T*G*T*C_G_T*T*G*T*C_G_T*T*G_T*C_G*T*T SEQ ID NO:287
T*C_G_T*T*T*T*T*T*T*T*C_G_T*T*T*T*T*T*T*T*C_G_T*T*T SEQ ID NO:288
T*C_G*T*C_G_T*T*T*T*T*T*T*T*C_G_T*T*C_G_T*T*T*T SEQ ID NO:289
T*C_G_T*C_G_T*T*T*T*T*T*T*T*C_G_T*G*C_G_T*T*T*T*T SEQ ID NO:290
T*C_G_T*C_G_T*T*T*T*T*C_G_T*T*T*T*T*T*T*T*T*C_G*T*T*T SEQ ID NO:291
T*C_G_T*T*T*T*T*G*T*C_G_T*T*T*T*T*T*T*T*T*C_G*A SEQ ID NO:292
T*C_G_T*C_G_T*T*T*T*T_G_T*C_G_T*T*T*T_G_T_C_G*T*T SEQ ID NO:293

Таблиця 9. Відносна ефективність м'яких олігонуклеотидів порівняно з SEQ ID NO:242 при кожній концентрації

Номер	Концентрація ОДН, мкг/мл			
	1	6	12	24
SEQ ID NO:287	0,11	0,12	1,00	1,68
SEQ ID NO:288	0,30	0,62	1,67	1,81
SEQ ID NO:289	0,13	0,52	1,67	1,97
SEQ ID NO:290	0,18	0,41	1,69	2,27
SEQ ID NO:291	0,16	0,35	1,56	1,81
SEQ ID NO:292	0,25	0,48	1,38	1,84
SEQ ID NO:293	0,10	0,11	1,20	2,05

Приклад 16. Стабільність олігонуклеотидів у сироватці та тканинах.

Мишам робили ін'єкції підшкірно 25мг/кг напів-м'якого олігонуклеотиду SEQ ID NO:241, м'якого олігонуклеотиду

(T'C'G'T'C'G'T'T'T'G_T_C_G_T'T'T'G'T'C'G'T'T; SEQ ID NO:294)

або

повністю стабілізованого олігонуклеотиду SEQ ID NO:242. Зразки тканин та сироватки одержують через визначену кількість годин і аналізують на інтактний олігонуклеотид та його фрагменти.

До зразків тканин чи сироватки вводили відому кількість ОДН внутрішнього стандарту (1,25мг полі-Т) і ОДН виділяли із зразків тканин та плазми за методами твердофазової екстракції (SPE), описаними нижче. Одержані розчини, які містять аналіт, метаболіти та внутрішній стандарт, аналізують за методом капілярного електрофорезу на гелі (CGE) та методами MALDI-TOF, також описаними нижче. Визначали загальну кількість виділеного ОДН (тобто аналіт плюс метаболіти) із зразків нирок, печінки, селезінки та сироватки, аналізованих за методом CGE. Обчислювали стандартний відхил. Відносну величину у процентах від загальної площі піка визначали для кожного метаболіту.

SPE. Для виділення ОДН з сироватки до 100мг зразка вводили 1,25мг ОДН внутрішнього стандарту, змішували та розчиняли у 5мл SAX-буфера. Цей розчин наносили на аніонообмінну колонку (SAX, Agilent), колонку промивали та ОДН елюювали буфером з підвищеною іонною силою. Одержаний елюат знесолювали з використанням оберненофазової (RP) колонки (Glen Research) чи еталонної колонки (HLB, Waters). Елюати з RP-колонки, які містять лише воду та ацетонітрил, висушують та солюбілізують у цій самій пробірці у 60мкл деіонізованої води. Для додаткового знесолювання зразків проводять мембранний діаліз. Зразки аналізують безпосередньо за методом капілярного електрофорезу на гелі. Для мас-спектрометричного аналізу за методом MALDI-TOF використовують зразки у нерозведених чи концентрованих формі, тобто 50мкл зразка ОДН висушують у вакуумі та розчиняють у деіонізованій воді й аналізують, як описано нижче.

ОДН з тканин ізолюють згідно з аналогічним протоколом SPE. 100мг тканини гомогенізують за

допомогою пристрою FastPrep. Додають протеїназу К та протеїни гідролізують протягом 2-х годин. Проводять екстракцію фенолом, а потім опрацьовують водорозчинну фракцію згідно з описаним вище методом SPE.

CGE. Знесолені зразки, що містять аналіт, його метаболіти та визначену кількість ОДН внутрішнього стандарту вводять електрокінетично до заповненого гелем капіляра (нейтральний, 30см, капіляр eCAP ДНК, Beckman # 477477) з боку зразка з попередньою ін'єкцією води. Прикладають напругу 300В/см і проводять детектування на 260нм. Проводять розділення при 25°C в буфері трис/борна кислота/ЕДТА, який містить 7М сечовину. Аналіт ідентифікують за його відносним часом міграції ($MT_{\text{оліго}}/MT_{\text{внутр.ст.}}$) порівняно зі стандартом, який готують аналогічно та аналізують супутно. Реєструють відносний час міграції та відносну площу у процентах будь-якого електрофоретичного піка, який має співвідношення сигнал:шум ($S:N$)>3. Висоти піків, які відповідають величині співвідношення сигнал:шум в інтервалі 3-10, реєструвалися як такі, що не можуть бути визначені кількісно.

% олігонуклеотиду= (площа піка/загальна площа піків з $S:N>3$) \times 100%

MALDI-TOF. Знесолені зразки, які містять аналіт та його метаболіти, аналізують за допомогою мас-спектрометра Applied Biosystems MALDI-TOF з джерелом уповільненого вивільнення, азотного лазера з довжиною хвилі 337нм, та пролітної трубки довжиною 1,2 метри. Використовували такі настройки інструмента: напруга 25кВ; напруга на сітці 95,4%; дротяний провідник 0,1%; час затримки 1200нс. Як матрицю використовували 3-оксипіколінову кислоту, що містила діамонійцитрат. Спектри зразків ОДН калібрували незалежно на цьому саме планшеті за ідентичних умов з використанням набору стандартних ОДН з відомою молекулярною масою.

Результати, одержані через 48 годин, зображені на Фіг.20. Фіг.20 показує, що рівні у нирках напівм'якого SEQ ID NO:241 та м'якого ОДН SEQ ID NO:294 були різко зниженими (на 93 процента та на 87 процентів, відповідно) порівняно з повністю фосфоротіоатним SEQ ID NO:242.

Приклад 17. Олігонуклеотиди С виявляють імуностимулюючі властивості in vitro.

Були одержані напів'які олігонуклеотиди С-класу з фосфодіефірними зв'язками у 5'-непаліндромній ділянці (ОДН SEQ ID NO:255), 3'-паліндромній ділянці (ОДН SEQ ID NO:251) і разом у 5'-непаліндромній ділянці та 3'-паліндромній ділянці (ОДН SEQ ID NO:295). Крім того, був одержаний ОДН SEQ ID NO:252 зі зв'язками, подібними до ОДН SEQ ID NO:295, але з 2'-О-Ме рибозними цукрами у нуклеотиді, що утворюють 3'-паліндромну ділянку (підкреслена нижче). Ці олігонуклеотиди були піддані аналізу з використанням описаного вище тесту на TLR9.

T*C_G*T*C_G*T*T*T*T*C*G*C*G*C*C*G*C*C*G (SEQ ID NO:255)
T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*C_G*G*C*C*G*C*C*G (SEQ ID NO:251)
T*C_G*T*C_G*T*T*T*T*C*G*C_G*G*C*C*G*C*C*G (SEQ ID NO:295)
T*C_G*C*C*G*T*T*T*T*C_G*G*C_G*G*C*C*G*C*C*G (SEQ ID NO:252)

Таблиця 10. Стимулювання TLR9 за допомогою напів'яких олігонуклеотидів С-класу

ОДН	Концентрація ОДН, мкг/мл			
	0,1	0,5	2,0	8,0
SEQ ID NO:255	2,3	16,9	36,4	35,7
SEQ ID NO:251	1,2	2,5	8,4	16,8
SEQ ID NO:295	2,0	11,6	29,8	37,3
SEQ ID NO:252	1,1	3,9	22,1	47,0

Напів'які олігонуклеотиди С-класу не лише зберігають свою здатність індукувати IFN-α у PBMC людини, але також є значно більш сильнодіючими у низьких концентраціях. Збільшена ефективність була найбільш вираженою у тих олігонуклеотидах С-класу, які включають напів'яку послідовність у 5'-непаліндромній ділянці (ОДН

Олігонуклеотиди С-класу з повністю стабілізованими скелетами загалом виявляють відносно низьку TLR9-активність порівняно з олігонуклеотидами В-класу. Як показано у Таблиці 10 нижче, включення напів'якої послідовності лише до 5'-непаліндромної ділянки (ОДН SEQ ID NO:255) істотно підвищує TLR9-активність порівняно з включенням напів'якої послідовності лише до 3'-паліндромної ділянки (ОДН SEQ ID NO:251). Включення напів'якої послідовності як до 5'-непаліндромної, так і до 3'-паліндромної ділянок (ОДН SEQ ID NO:295) приводить до посилення TLR9-активності порівняно з включенням напів'якої послідовності лише до 3'-паліндромної ділянки (ОДН SEQ ID NO:251).

SEQ ID NO:255 та ОДН SEQ ID NO:295). ОДН SEQ ID NO:255, SEQ ID NO:251 та SEQ ID NO:295 аналізували методом ELISA та порівнювали з SEQ ID NO:242 - повністю стабілізованою формою цих трьох напів'яких олігонуклеотидів, що є сильним олігонуклеотидним індуктором IFN-α С-класу. Результати представлені у Таблиці 11.

Таблиця 11. Індукування IFN-α (пг/мл) напів'якими варіантами олігонуклеотиду С-класу

ОДН	Концентрація ОДН, мкМ				
	0,1	0,2	0,5	1,0	2,0
SEQ ID NO:255	3202	7429	937	64	3
SEQ ID NO:251		688	3033	3083	
SEQ ID NO:295	2560	3363	3246	930	41
	50	504	3247	2114	1789

Приклад 18: Фізико-хімічні характеристики SEQ ID NO:313

Методи

Порошкова рентгенівська дифрактограма SEQ ID NO:313 показує гало, характерне для аморфної фази. Аналіз сорбції водяної пари показав, що SEQ ID NO:313 є сильно гігроскопічним. Схильність засобу до вологообміну може призводити до зміни вмісту води залежно від вологості середовища. Сполука виявляє високу розчинність у воді (>100мг/мл) і, таким чином, має достатню розчинність у застосовному інтервалі pH. Аналіз водних розчинів засобу при підвищеній температурі показав, що він швидко деградує у середовищі від слабо кислого до кислого, але розчини, забуферені до pH>6, мають, певно, достатню стабільність розчинів.

Результати

Було знайдено, що SEQ ID NO:313 є аморфним за природою та високогігроскопічним. Сполука виявляє високу розчинність у воді (>100мг/мл) і, таким чином, має достатню розчинність в робочому інтервалі pH. ОДН швидко деградує у середовищі від слабо кислого до кислого. Розчини, забуферені до pH >6, певно, мають достатню стабільність розчинів.

Приклад 19: Стимулювання TLR9-трансфектованих клітин in vitro

Методи

Клітини HEK 293, трансфектовані TLR9 людини, інкубують з SEQ ID NO:313 чи SEQ ID NO:329 протягом 16-ти годин. Вимірюють величину сигналу у люциферазному тесті.

Результати

Порівняно з SEQ ID NO:329, SEQ ID NO:313 є більш сильним стимулятором рецептора-мішені TLR9.

Приклад 20: Стимулювання імунних клітин людини *in vitro*

Методи

Мононуклеарні клітини периферичної крові людини від 6-ти донорів інкубують з SEQ ID NO:313 чи SEQ ID NO:329 протягом 24-х чи 48-и годин. Вимірюють секрецію цитокінів.

Результати

Результати наведені на Фіг.23. Порівняно з SEQ ID NO:329, SEQ ID NO:313 виявляє підвищену чи, щонайменше, аналогічну активність та/або ефективність як індуктор T1Я9-асоційованих цитокінів IL-6, IL-10, IFN α та IP-10.

Приклад 21: Стимулювання мишачих спленоцитів *in vitro*

Методи

Мишачі (BALB/c) спленоцити інкубують з SEQ ID NO:313 чи SEQ ID NO:329 протягом 48-и годин. Вимірюють секрецію цитокінів та IP-10.

Результати

Порівняно з SEQ ID NO:329, SEQ ID NO:313 виявляє підвищену чи, щонайменше, аналогічну активність та/або ефективність як індуктор цитокінів IL-6, IL-10, IL-12p40, IFN α , ФНП α та IP-10. Дані зображені на Фіг.24. Ці дані демонструють, що активність SEQ ID NO:313 у мишачих імунних клітинах є порівняною з результатами для клітин людини (вище) і, аналогічно, узгоджується з активацією через TLR9.

Приклад 22: Індукування цитокінових генів у мишей *in vivo*

Методи:

У цих дослідженнях оцінювали експресію цитокінів у мишачих легенях після введення дози SEQ ID NO:313 до дихальних шляхів. Для дослідження впливу на нирки оцінювали також індукування таких саме цитокінів (як описано у Прикладах 10 та 21) у цьому органі. Мишам (самці, BALB/c) вводили дози SEQ ID NO:313 чи SEQ ID NO:329 (по 1мг/кг кожного) шляхом інтраназальної інстиляції чи болюсної внутрішньовенної ін'єкції. Легені та нирки видаляли через 8 чи 15 годин після введення дози. Екстрагували РНК та проводили зворотну транскрипцію кДНК. Фрагменти-мішені сДНК ампліфікували та детектували за методом полімеразної ланцюгової реакції (PCR) в реальному масштабі часу (Roche LightCycler з детектуванням методом SYBR Green). Праймери GAPDH, IFN-гамма, IL-6, IP-10, та ФНП-альфа були спроектовані за допомогою комп'ютерної програми LC PROBE DESIGN фірми Roche (Version 1.0, Roche catalog No.3139174). Праймери IFN-альфа були сконструйовані за допомогою комп'ютерної програми PRIMER 3. Вихід продукту нормалізували по відношенню до експресії контрольного гена (GAPDH).

Результати

При введенні дози до дихальних шляхів, SEQ ID NO:313 індукував експресію T1P9-асоційованих генів (IL-6, ФНП α , IFN α , IFN γ та IP-10) у легенях. Результати зображені на Фіг.25. Однак, за винятком IP-10, ці гени не експресувалися у нирках ми-

шей, яким було здійснено введення дози цим шляхом. Оскільки IP-10 типово індукується інтерферонами, експресія цього хемокіну могла відбуватися опосередковано в результаті секреції інтерферонів до системного кровообігу з легень. При внутрішньовенному введенні SEQ ID NO:313 усі ці гени, крім IFN γ , індукувалися у нирках. Таким чином, відсутність впливу SEQ ID NO:313 на нирки після введення дози до дихальних шляхів була ймовірно спричинена низькими системними концентраціями.

СрG-ОДН можуть викликати ниркові ефекти шляхом ряду механізмів. Гостре ниркове грануломатозне запалення, викликане TLR9-залежним механізмом, спостерігалось після системної експозиції деякими СрG-ОДН. Наші результати дозволяють припустити, що системне експонування SEQ ID NO:313, введеним до дихальних шляхів, є недостатнім для прямого індукування TLR9-асоційованих генів у нирках.

Приклад 23: Вплив на антиген-індукований розвиток лімфатичних вузлів у мишей *in vivo*

Методи

У цьому дослідженні вивчали здатність SEQ ID NO:313 індукувати імунні відхилення від Th2-типу відповіді у дренувальних лімфатичних вузлах мишей. Мишей (самці, BALB/c) сенсibilізували ін'єкцією антигену (овальбумін, 100мг) у повному ад'юванті Фрейнда у подушечку правої задньої лапи. Мишам одночасно робили до тієї самої подушечки ін'єкції SEQ ID NO:313 чи SEQ ID NO:329 (1,5мг/кг) чи носія (сольовий розчин). Через шість днів після ін'єкції у подушечку лапи дренувальний підколінний лімфатичний вузол видаляли. Підраховували Т-клітини (CD3⁺) та В-клітини (B220⁺) за методом потокової цитометрії. Проводили *ex vivo* тест на „воскреслий” антиген у такий спосіб: 1 \times 10⁶ клітин (з дренувального підколінного лімфатичного вузла) інкубують у 220мкл середовища RPMI1640+10% сироватки плоду корови, яке містить оральбумін (100мг/мл) чи розріджувач. Через 36 годин видаляють культуральне середовище та вимірюють концентрації IL-1-бета, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, GM-CSF, IFN-гаммат ФНП-альфа за допомогою набору фірми LINCO Research, Inc. (14 Research Park Drive, St.Charles, Missouri 63304) і аналізують за допомогою системи Lumindex Multiplex (Lumindex Corporation, 12212 Technology Boulevard, Austin, Texas 78727-6115).

Результати

Кількість клітин у підколінних лімфатичних вузлах

Сенсibilізація спричинювала накопичення Т-клітин та В-клітин у дренувальних підколінних лімфатичних вузлах. Не спостерігалось істотного додаткового збільшення цього антиген-індукованого накопичення у мишей, які одержували також СрG-ОДН. Однак, кожний СрG-ОДН, при введенні його самого несенсibilізованим мишам, спричинював накопичення як Т-клітин, так і В-клітин. Дані зображені на Фіг.26.

Тест на „воскреслий” антиген

Клітини дренувального лімфатичного вузла, узяті від антиген-сенсibilізованих мишей, секретують IL-4, IL-5, IL-10 та IFN γ при повторному стимулюванні антигеном *ex vivo*. У сенсibilізованих

мишей, які одержували також CpG-ОДН, секреція цитокінів Тп2-типу IL-4, IL-5 та IL-10 була зниженою, тоді як секреція цитокіну ТМ-типу IFN γ була підвищеною. Наші дані, наведені на Фіг.27, підтримують гіпотезу про те, що SEQ ID NO:313, як і SEQ ID NO:329, пригнічує Th2-відповідь на антигенну сенсibilізацію. Результати наведені як середнє \pm стандартна помилка середнього (s.e.m.) (n=9-10). *P<0,05 порівняно із сенсibilізованою групою, яка одержувала носій (критерій множинного порівняння Крускала-Уолліса).

Приклад 24: Вплив на антиген-індуковане продукування IgE у мишей in vivo

Таблиця 12						
Стислий опис протоколу досліджень						
	Сенсibilізація		Сенсibilізація			
		↓		↓		
	ОДН	ОДН	ОДН	ОДН		
	↓	↓	↓	↓		
День:	-2	0	5	7		18
						↓
						Кінцева точка

Результати

У мишей, які одержували SEQ ID NO:313 чи SEQ ID NO:329, продукування антиген-специфічного IgE було повністю зупинене. На відміну від нього, продукування IgG2a зростало. Оскільки продукування IgE та IgG2a є характерним для Th2-типу та Th1-типу відповіді, відповідно, цей ефект є додатковим свідченням того, що SEQ ID NO:313 може пригнічувати Th2-тип відповіді на антигенну сенсibilізацію. Альтернативно, CpG-ОДН можуть безпосередньо індукувати експресію Т-бета та перемикання класу з IgE у В-клітинах. Дані наведені на Фіг.28. Результати наведені як середнє \pm s.e.m. (n=10-12, за винятком 5 для групи SEQ ID NO:329). *P<0,05 порівняно із сенсibilізованою групою, яка одержувала носій (критерій множинного порівняння Крускала-Уолліса).

Приклад 25: Дія проти антиген-індукованого запалення дихальних шляхів у мишей in vivo

Методи

Таблиця 13									
Стислий виклад протоколу досліджень									
	Сенсibilізація		Зараження		Зараження				
	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓		
			ОДН		ОДН				
			↓		↓				
День:	0	7	19	21	24	26	28	31	33
									↓
									Кінцеві точки

Результати

Антигенна стимуляція спричинювала підвищення загальної кількості лейкоцитів, переважно еозинофілів, у просвіті дихальних шляхів. Дані

Методи

Миші (самці, BALB/c) були сенсibilізовані в дні дослідження 0 та 7 антигеном (овальбумін, 100мкг, i.p.) з ад'ювантом гідроксидом алюмінію. Миші одержували SEQ ID NO:313 (0,15 чи 1,5мг/кг, i.p.) чи SEQ ID NO:17 (1,5мг/кг, i.p.) за два дні до кожної сенсibilізації та в день кожної сенсibilізації. Сироватку брали в день дослідження 18. Титри антиген (овальбумін)-специфічного IgE та IgG2a вимірювали за методом ELISA. Стислий виклад протоколу наведений у Таблиці 12.

Мишей (самці, BALB/c), сенсibilізованих у дні дослідження 0 та 7 антигеном (овальбумін, 100мкг, i.p.) з ад'ювантом гідроксидом алюмінію. Стимуляцію мишей антигеном здійснювали шляхом інгаляції аерозоллю овальбуміну двічі на тиждень протягом двох тижнів поспіль. Перше зараження робили в день досліджень 21. SEQ ID NO:313 (0,1-1000мкг/кг), SEQ ID NO:329 (1-1000мкг/кг) чи носій (сольовий розчин, 20мкл) вводили до дихальних шляхів інтраназальним інстилюванням раз на тиждень за два дні до першої антигенної стимуляції цього тижня. Кінцеві точки оцінювали через 48 годин після останньої антигенної стимуляції. Видобували клітини з дихальних шляхів бронхоальвеолярним промиванням та робили диференційні підрахунки клітин. Кількість еозинофілів (об'ємну густину еозинофілів) та секрецію слизу (PAS-зabarвлювання) у легених тканинах визначали шляхом гістопатологічного аналізу. Протокол представлений у Таблиці 13.

представлені на Фіг.29. Еозинофілія істотно пригнічувалася у доза-залежний спосіб SEQ ID NO:313 чи SEQ ID NO:329. Величини ED₅₀ для еозинофілії становили: SEQ ID NO:313: 23мкг/кг; SEQ ID

NO:329: 47мкг/кг. Зараження також спричинювало накопичення CD4⁺ Т-клітин (CD3⁺CD4⁺ клітини), яке значною мірою пригнічувалося SEQ ID NO:313. SEQ ID NO:313 також істотно пригнічував антиген-індуковане накопичення еозинофілів у легеневій тканині та епітеліальну секрецію слизу. Результати на Фіг.29 представлені як середнє \pm s.e.m. (n=15). *P<0,05 порівняно з антиген-стимульованою групою, яка одержувала носій (критерій множинного порівняння Крускала-Уолліса). Результати на Фіг.30 представлені як середнє \pm s.e.m. (n=6). *P<0,05, **P<0,001 порівняно з антиген-стимульованою групою, яка одержувала носій (ANOVA, критерій множинного порівняння Даннетта).

Приклад 26: Дія проти антиген-індукованої гіперреактивності дихальних шляхів у мишей *in vivo*
Методи

Миші (самці, BALB/c) були сенсibilізовані в дні дослідження 0 та 7 антигеном (овальбумін, 100мкг, i.p.) з ад'ювантом гідроксидом алюмінію. Мишей піддавали антигенній стимуляції шляхом експозиції інгальованим аерозолем овальбуміну двічі на тиждень два тижні поспіль. Перше зараження робили в день досліджень 19. SEQ ID NO:313 (10-1000мкг/кг) чи носій (сольовий розчин, 20мкл) вводили інтраназально раз на тиждень, за два дні до першої антигенної стимуляції цього тижня. Гіперреактивність дихальних шляхів оцінювали через 24 години після останньої антигенної стимуляції шляхом вимірювання бронхоконстрикції (підвищення опірності дихальних шляхів) у відповідь на метахолін внутрішньовенно. Для кожної тварини одержували криву залежності доза-відповідь на метахолін, а реактивність дихальних шляхів кількісно визначали як площу під кривою (AUC). Протокол наведений у Таблиці 14.

Таблиця 14									
Стислий опис протоколу досліджень									
	Сенсibilізація			Зараження			Зараження		
	↓	↓		↓	↓		↓	↓	
			ОДН			ОДН			
			↓			↓			
День:	0	7	17	19	22	24	26	29	30
									↓
									Кінцеві точки

Результати

Антигенна стимуляція спричинювала гіперреактивність дихальних шляхів. SEQ ID NO:313 пригнічує розвиток антиген-індукованої гіперреактивності дихальних шляхів у доза-залежний спосіб. Дані представлені на Фіг.31 та 32 як криві залежності доза-ефект зразка для метахоліну для виявлення ефекту SEQ ID NO:313 (1000мкг/кг). Криві доза-ефект для метахоліну кількісно визначають як площу під кривою (AUC). Результати наведені як середнє \pm s.e.m. (n=6-8). *P<0,05 порівняно з антиген-стимульованою групою, яка одержувала носій (критерій множинного порівняння Крускала-Уолліса).

Порівняльний аналіз кривих повна доза-ефект (RL) для мишей, яким було зроблено антигенну стимуляцію та введено носій, і кожної з відповідних мишей, яким було зроблено антигенну стимуляцію та введено SEQ ID NO:313, проводився за методом багатofакторного дисперсійного аналізу (MANOVA) з повторюваним визначенням критеріїв. Хоча спостерігалася значуща розбіжність (P<0,05) між кривими доза-ефект для груп, які одержали 100 та 1000мкг/кг SEQ ID NO:313, не було виявлено значущих розбіжностей для мишей, яким робили антигенну стимуляцію та вводили носій, і тваринами, яким робили аналогічні процедури і вводили 10мкг/кг SEQ ID NO:313.

Приклад 27: Фармакокінетичні (ФК) дослідження *in vivo* на щурах

ФК-дослідження були проведені на щурах з метою визначення, чи буде „напів'який" ОДН

SEQ ID NO:313 виводитися з плазми та тканин, зокрема, з нирок, швидше, ніж повністю фосфотіатний ОДН SEQ ID NO:329, який має ідентичну SEQ ID NO:313 послідовність основ.

Методи

56 щурів вводили внутрішньовенним (IV) та інтратрахеальним (IT) шляхами по 5мг/кг (для обох IV- та IT-шляхів) SEQ ID NO:313 та SEQ ID NO:329. Відбирали плазму, легені та нирки. Дослідження тривали 5 днів, з 14 часовими точками у кожній дозовій групі. Використовували 3 щури/часову точку для IV-групи (загалом - 42 щури) та 4 щури/часову точку для IT-групи.

Результати

Фіг.33 показує концентрації ОДН у плазмі щурів після IV- та IT-введення дози 5мг/кг. Дані для плазми показують, що SEQ ID NO:313 виводиться швидше, ніж SEQ ID NO:329, після як IV-, так і IT-введення.

Фіг.34 показує концентрації ОДН у легенях щурів після IV- та IT-введення в дозі 5мг/кг. Після IV-введення концентрація у легенях SEQ ID NO:313 є нижчою, ніж концентрація SEQ ID NO:329 при однаковому рівні доз. Після IT-введення розбіжності були менш вираженими. Для SEQ ID NO:329 дані для легень доступні лише до 48-и годин після введення дози.

Фіг.35 показує концентрації ОДН у нирках щурів після IV- та IT-введення в дозі 5мг/кг. Дані для нирок показують, що абсолютні рівні SEQ ID NO:313 у нирках є нижчими, ніж відповідні концентрації SEQ ID NO:329 після як IV-, так і IT-

введення. Експозиція нирок SEQ ID NO:313 після ІТ-введення є, зокрема, істотно зниженою порівняно з експозицією SEQ ID NO:329 при однаковому рівні доз. Це можна побачити краще на Фіг.36 та 37.

Фіг.36 показує концентрації ОДН у нирках щурів після ІV-введення в дозі 5мг/кг. Фіг.37 показує концентрації ОДН у нирках щурів після ІТ-введення в дозі 5мг/кг. Після ІТ-введення рівні як

SEQ ID NO:313, так і SEQ ID NO:329 знаходяться нижче нижньої межі кількісного визначення (0,4-0,6мкг/г) у нирках протягом періоду до 1-єї години після введення дози. Після 1-єї години SEQ ID NO:329 може бути детектований у зразках нирок, відібраних протягом періоду проведення досліджень (48 годин). SEQ ID NO:313, з іншого боку, присутній у вимірних рівнях лише протягом 7-й годин після введення дози.

Таблиця 15: Зведені усереднені ФК-параметри для SEQ ID NO:313 та SEQ ID NO:329 після ІV- та ІТ-введення щурам у дозі 5 мг/кг

Дозова група	Тканина	ОДН	C _{max} (мкг/мл)	T _{max} (год.)	T _{1/2} (год.)	AUC _{0-INF} (год·мкг/мл)	AUC _{0-48год*} (год·мкг/мл)
ІV (5 мг/кг)	Плазма	10	нд	нд	0,20	9,5	9,3
		17	нд	нд	0,62	62,8	62,2
	Легені	10	1,4	0,25	0,17	0,47	0,35
		17	14,4	0,083	2,5	23,7	20,8
	Нирки	10	6,6	0,083	24,9	184	123
		17	11,4	0,083	нр	нр	346
ІТ (5 мг/кг)	Плазма	10	1,9	0,75	1,20	2,68	2,35
		17	2,1	2	2,3	9,01	7,46
	Легені	10	632	0,25	28,1	5540	5350
		17	692	1	(31)**	(7908)**	6505
	Нирки	10	0,49	2	7,8	5,81	2,34
		17	3,8	7	нр	нр	134

нд – Немає даних

нр – Не піддається розрахункам. Не може бути точно обчислене через недостатність точок даних на кінцевій стадії чи недосягнення кінцевої стадії виведення протягом періоду досліджень.

* - AUC_{0-48год} чи AUC_{0-останн}, якщо остання вимірні концентрація була одержана до досягнення 48-и годин.

** - Дуже приблизна оцінка (за лише 2-ма точками даних на кінцевій стадії).

10 - SEQ ID NO:313

17 - SEQ ID NO:329

Таблиці-16 (а)-(с): Системна та тканинна експозиція SEQ ID NO:313 та SEQ ID NO:329 після ІТ- та ІV-введення щурам у дозі 5 мг/кг

(а) – Дані для плазми

ОДН	Шлях введення дози	AUC _{0-48год} (год·мкг/мл)	Відношення SEQ ID NO:313 : SEQ ID NO:329
SEQ ID NO:313	ІТ	2,35	0,32 (ІТ)
	ІV	9,30	0,15 (ІV)
	Відношення ІТ : ІV	0,25	
SEQ ID NO:329	ІТ	7,46	
	ІV	62,2	
	Відношення ІТ : ІV	0,12	

(b) – Дані для легень

ОДН	Шлях введення дози	AUC _{0-48год} (год·мкг/мл)	Відношення SEQ ID NO:313 : SEQ ID NO:329
SEQ ID NO:313	ІТ	5350	0,82 (ІТ)
	ІV	0,35	0,017 (ІV)
	Відношення ІТ : ІV	15286	
SEQ ID NO: 329	ІТ	6505	
	ІV	21	
	Відношення ІТ : ІV	313	

(с) - Дані для нирок

ОДН	Шлях введення дози	AUC _{0-48год} (год·мкг/мл)	Відношення SEQ ID NO:313 : SEQ ID NO:329
SEQ ID NO:313	ІТ	2,34	0,017 (ІТ)
	ІV	123	0,36 (ІV)
	Відношення ІТ : ІV	0,019	
SEQ ID NO: 329	ІТ	134	
	ІV	346	
	Відношення ІТ : ІV	0,39	

Було знайдено, що системна та ниркова експозиція SEQ ID NO:313 є значно нижчою, ніж експозиція SEQ ID NO:329 після введення двох ОДН внутрішньовенним (ІV) чи інтратрахеальним (ІТ) шляхами.

Величина AUC у плазмі для SEQ ID NO:313 після ІТ-введення в дозі 5мг/кг становила 2,7год·мкг/мл. Відповідне значення для SEQ ID NO:329 становило 9,0год·мкг/мл. Таким чином, системна експозиція SEQ ID NO:313 складає третину від показника для SEQ ID NO:329.

Величина AUC у нирках для SEQ ID NO:313 після ІТ-введення в дозі 5мг/кг становила 2,35год·мкг/мл. Відповідне значення для SEQ ID NO:329 становило 134год·мкг/мл. Таким чином, при однаковому рівні доз ниркова експозиція SEQ ID NO:313 складає лише близько 2% від експозиції SEQ ID NO:329.

На відміну від плазми та нирок, експозиція легень SEQ ID NO:313 після ІТ-введення не була зниженою настільки сильно порівняно з експозицією SEQ ID NO:329. Величина AUC у легенях для SEQ ID NO:313 становила приблизно 70-80% від значення AUC у легенях для SEQ ID NO:329 при однаковому рівні доз. Оскільки легені є тканиною-мішенню, кліренс ОДН з легень, краще, не буде

підвищуватися такою мірою, як для плазми та нирок.

Фіг.38 показує концентрації SEQ ID NO:313 та його октамерного метаболіту (метаболітів) у нирках щурів після ІV-введення SEQ ID NO:313 в дозі 5мг/кг.

Фіг.39 показує концентрації SEQ ID NO:313 та його октамерного метаболіту(метаболітів) у нирках щурів після ІТ-введення SEQ ID NO:313 в дозі 5мг/кг. З методологічних причин, дані для октамерного метаболіту SEQ ID NO:313 у плазмі та тканинах є неповними. Однак, дані для октамера є наявними для деяких з ІV- та усіх ІТ-зразків нирок. Ці дані показують, що більшість тих ниркових зразків, у яких концентрації октамера були успішно виміряні, рівні метаболіту перевищували рівні SEQ ID NO:313, вказуючи на те, що ендонуклеазна активність є важливим шляхом метаболізму SEQ ID NO:313.

Введення ряду фосфодіефірних зв'язків (SEQ ID NO:313) до повністю фосфотіоатного скелета (SEQ ID NO:329), певно, підвищує швидкість деградації ОДН, призводячи до більш швидкого кліренсу, особливо, з нирок.

Приклад 28: Активация TLR9 за допомогою напів'якого ОДН порівняно з повністю фосфоротіоатним ОДН

Методи

Стабільно трансфековані клітини HEK293, що експресують TLR9 людини, були описані раніше [Bauer et al.; PNAS; 2001]. Стисло, клітини HEK293 були трансфековані електропорацією векторами, які експресують TLR9 людини, та 6×NFκB-люциферазною репортерною плазмідною. Стабільні трансфековані клітини (3×10^4 клітин/лунку) інкубують з ОДН протягом 16-и годин при 37°C у вологому інкубаторі. Для одержання кожної точки даних проводять три паралельних досліди. Клітини піддають лізису та аналізують на активність люциферазного гена (з використанням аналітичного набору Brightlite фірми Perkin-Elmer, Ueberlingen, Німеччина). Коефіцієнти стимулювання обчислю-

ють порівняно з активністю репортерного гена у середовищі без добавки ОДН.

Результати

TLR9 легко активується ОДН, які містять оптимальні імуностимулюючі CpG-послідовності. Ми інкубували клітинну лінію, яка стабільно експресує TLR9 людини, з панеллю напівм'яких ОДН та панеллю повністю фосфоротіатних ОДН, що мають таку саму послідовність ОДН, як і напівм'які ОДН. Результати представлені на Фіг.40.

Результати демонструють, що кожен з напівм'яких ОДН, вказаних у Таблиці нижче, а саме, SEQ ID NOs:376, 378, 380, 382, 384 та 241, активують вищі рівні TLR9, ніж така сама послідовність ОДН, що має повністю фосфоротіатний скелет, відповідно, SEQ ID NOs:377, 379, 381, 383, 385 та 242.

SEQ ID NO:376	T*G*T*C_G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T
SEQ ID NO:377	T*G*T*C*G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T
SEQ ID NO:378	U*G*T*C_G*T*T*U*U*U*U*U*U*U*U*U*U
SEQ ID NO:379	U*G*T*C*G*T*T*U*U*U*U*U*U*U*U*U*U
SEQ ID NO:380	D*G*T*C_G*T*T*D*D*D*D*D*D*D*D*D*D*T
SEQ ID NO:381	D*G*T*C*G*T*T*D*D*D*D*D*D*D*D*D*D*T
SEQ ID NO:382	U*G*T*C_G*T*T*U*U*U*U*_G*_G*_A*_G*_G*_G
SEQ ID NO:383	U*G*T*C*G*T*T*U*U*U*U*G*G*A*G*G*G*G
SEQ ID NO:384	U*G*T*C_G*T*T*C*U*U*_G*_G*_A*_G*_G*_G
SEQ ID NO:385	U*G*T*C*G*T*T*C*U*U*G*G*A*G*G*G*G
SEQ ID NO:241	T*C*G*T*C_G*T*T*T*_G*T*C*_G*T*T*T*G*T*C*_G*T*T
SEQ ID NO:242	T*C*G*T*C*G*T*T*T*G*T*C*G*T*T*T*G*T*C*G*T*T

Приклад 29: Rp-міжнуклеотидні зв'язки як фосфодієфіроподібні зв'язки у напівм'яких олігонуклеотидах

Методи

Умови для клітинних культур та реагенти

Для аналізів проліферації B-клітин клітини селезінки мишей BALB/c (у віці 4-х - 18-ти тижнів) культивують при 2.5×10^5 - 10^6 клітин/мл у середовищі RPMI протягом 44-х годин на 96-лунковому мікротитрувальному планшеті, а потім піддають пульс-міченню $1 \text{ мкКи } ^3\text{H}$ -тимідином протягом 4-х - 6-ти годин, після чого збирають та вимірюють радіоактивність (срм) за допомогою сцинтиляційного лічильника, як описано раніше (Krieg et al., 1995). Для вестерн-блотування клітини WEHI-231 (Американська колекція типових культур (ATCC), Rockville, MD) культивують при 37°C у вологому інкубаторі з 5% CO₂ та утримують у середовищі RPMI 1640 (Life Technologies, Gaithersburg, MD) з добавкою 10% термоінактивованої сироватки плоду корови (FCS) (Life Technologies, Gaithersburg, MD), 1,5мМ L-глутаміну, 50мкМ 2-ME, 100од./мл пеніциліну та 100пг/мл стрептоміцину.

Олігонуклеотиди

Олігодезоксинуклеотиди (РО-олігонуклеотиди) та стереонерегулярні оліго(дезоксинуклеозидфосфоротіати) [Mix-PSJ-олігонуклеотиди були придбані у фірми Orogen Technologies (Alameda, CA) або синтезовані за стандартним фосфорамідитним методом (Caruthers, 1985; Stec et al., 1984). Олігонуклеотид

[змішаний-PS]-d(TCCATGACGTTCTGACGTT) ([змішаний-PSI-SEQ ID NO:386) був використаний як позитивний контроль, оскільки раніше було знайдено, що він має сильну імуностимулюючу дію на мишачі клітини (Yi et al., 1996). Для CpG-PS-олігонуклеотиду з мінімальним стимулюючим мотивом, для досліджень була вибрана послідовність PS-d(TCAACGTT)-2066 як типовий CpG-мотив з широким спектром імуностимулюючих ефектів, характерний для широкого сімейства CpG-ДНК. Ця послідовність, синтезована зі стереонерегулярним скелетом, була названа [Mix-PS]-2066. Коли цю октамерну послідовність одержували з повністю чи частково стереорегулярним скелетом, PS-олігонуклеотид позначали [цілком-Rp-PS]-2066 чи [цілком-Sp-PS]-2066, якщо весь скелет був стереорегулярним, або [CG-Rp-PS]-2066 чи [CG-Sp-PS]-2066, якщо лише CpG-динуклеотид був стереорегулярним. Інші використані PS-олігонуклеотиди включали CpG-PS-d(TCAACGTTGA) ([Mix-PSJ-SEQ ID NO:387) та його цілком-Rp- та цілком-Sp-стереорегулярні аналоги і контрольний He-CpG-PS-d(TCAAGCTTGA) [змішаний-PS]-SEQ ID NO:388.

Стереорегулярні фосфоротіатні олігодезоксинуклеотиди були одержані за оксатіофосфолановим методом, описаним (Stec et al., 1995; Stec et al., 1998). Синтези проводилися вручну. Перші нуклеозидні ланки з 3'-кінця закріплювалися на твердій основі за допомогою DBU-стійкого саркозинілового лінкера (Brown et al., 1989). Відповідно

захищені дезоксинуклеозидильні мономери, які містять 3'-О-(2-тіо-спіро-4,4-пентаметилен-1,3,2-оксатіофосфолановий) фрагмент, були синтезовані та розділені хроматографічно на чисті Р-діастереомери. У синтезі [CG-Rp-PS]-2066 та [CG-Sp-PS]-2066 нерозділені суміші обох Р-діастереомерів (у Rp:Sp співвідношенні близько 1:1) (Stec et al., 1998) були використані для збирання міжнуклеотидних зв'язків з нерегулярною конфігурацією атомів Р. Усі синтезовані олігомери були очищені за методом двостадійної обернено-фазової ВЕРХ: DMT-on (час утримання в інтервалі 23-24 хвилин) та DMT-off (час утримання 14-16 хвилин); хроматографічна система: колонка ODS Hypersil 5мкМ, 240х4,6мм, 0-40% CH₃CN у 0,1М триетиламоній бікарбонаті, pH7,5, градієнт 1%/хв. Їхню чистоту оцінювали за методом електрофорезу на поліакриламідному гелі.

Для досліджень поглинання PS-олігонуклеотиду були синтезовані флуоресцеїн-кон'юговані стереорегулярні PS-олігонуклеотиди шляхом твердофазової елонгації синтезованих вручну стереорегулярних PS-олігомерів. Після стадії детритилування додавали в установленому порядку флуоресцеїнфосфорамідит (ChemGenes Corporation, Ashland, MA; робоча концентрація 125мг/мл) та 1-Н-тетразол (час сполучення 120с), а потім проводили сульфурізацію реагентом S-Tetra (Stec et al., 1993). Відщеплення від основи та видалення захисту здійснювали за допомогою концентрованого гідроксиду амонію протягом 1-єї години при кімнатній температурі та 4-х годин при 55°C, відповідно. Одержані олігомери очищали одностадійною оберненофазовою ВЕРХ (см. вище). Через значну гідрофобність флуоресцеїнового фрагмента Rp- та Sp-олігомери елюювалися з часами утримання 14,5, 14,8 та 14,7, 15,0 хв., відповідно, тобто в кінці порушених послідовностей. В обох випадках два Р-діастереомери елюювалися через нестереоспецифічність фосфорамідитного/сульфуризаційного методу елонгації з флуоресцеїновим мономером.

Аналіз за методом вестерн-блотування

Клітини збирали та ресуспендували у свіжому середовищі в концентрації 2×10^6 клітин/мл. Клітинам дозволяли відпочити чотири години перед 40-хвилинним стимулюванням. Клітини збирали та

промивали три рази холодним PBS. Клітини піддавали лізису у 0,05М трис (pH7,4), 0,14М NaCl, 1% NP-40, 0,001М Na₃VO₄, 0,01М NaF, 4,3мг/мл β-гліцерофосфату, 0,002М DTT, 50мкг/мл PMSF, 12,5мкг/мл засобу антипаїн, 12,5мкг/мл апротиніну, 12,5мкг/мл лейпептину, 1,25мкг/мл пепстатину, 19мкг/мл бестатину, 10мкг/мл фосфорамідону, 12,5мкг/мл інгібітора трипсину заморожуванням та відтаюванням з наступним 30-хвилинним інкубуванням на льоді. Зразки потім центрифугували при 10000хг протягом 10-ти хвилин при 4°C. Супернатанти зберігали як цільні клітинні лізати для подальшого аналізу. Рівні кількості цільних клітинних лізатів (20мкг) кип'ятили у ДСН-буфері для зразків протягом 5-ти хвилин перед проведенням електрофорезу на 11% денатуруючому гелі. Після електрофорезу протеїни переносили на нітроцелюлозні мембрани за допомогою напівсухого блотера (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Блоти блокували 5 % знежиреним молоком перед гібридизацією фосфо-SAPK/JNK (Cell Signaling Technology, Beverly, MA), IκB-α та JNK1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA). Блоти візуалізували за допомогою реагентів для посиленої хемілюмінесценції (ECL, Amersham International) згідно з протоколом виробника.

Результати

Індукування клітин селезінки включенням ³H-тимідину до Sp-стереоізомеру CpG-PS-олігопротеїнів. З метою визначення стереоспецифічності імуностимулюючої дії CpG-ДНК клітини селезінки BALB/c культивували з стереорегулярними октануклеотидами PS-d(TCAACGTT)-2066, у яких усі міжнуклеотидні зв'язки знаходяться в Rp-чи Sp-конфігурації, в концентраціях, вказаних у Таблиці 17. Клітини культивували протягом 48-и годин, що є достатнім періодом часу для індукування В-клітин CpG-мотивами до проліферації (Krieg et al., 1995). Стереонерегулярний [змішаний-PS]-2066, який містить CpG-мотив, індукує сильну доза-залежну проліферацію клітин селезінки (Таблиця 17). Sp-ізомер також індукує проліферацію і, по-видимому, є незначною мірою сильнішим, ніж [змішаний-PS]-2066. На відміну від нього, Rp-стереоізомер не індукує ніякої виявної проліферації, що узгоджується з результатами Yu et al., (Yu et al., 2000).

Таблиця 17. Індукування проліферацією клітини селезінки Sp-стереоізомером CpG-октамерів.

Олігонуклеотид	Концентрація	імп./хв.	SI
Немає (середовище)		2170	1
2066 (стереонерегулярний CpG)	0,4 мкМ	3154	1,5
- " -	2,4 мкМ	16,525	7,6
- " -	4,8 мкМ	30,811	14,2
Rp (2066)	0,4 мкМ	1207	0,6
- " -	2,4 мкМ	985	0,5
- " -	4,8 мкМ	640	0,3
Sp (2066)	0,4 мкМ	9567	4,4
- " -	2,4 мкМ	35,372	16,3
- " -	4,8 мкМ	43,591	20,1
Rp (2066)+ 2066 ¹	0,4 мкМ	1,597	0,7
- " -	2,4 мкМ	10,255	4,7
- " -	4,8 мкМ	15,841	7,3

SI = коефіцієнт стимулювання порівняно з контрольним середовищем

¹ кожен з двох PS-олігонуклеотидів додають у вказаній концентрації на початку культивування

Проведені нами раніше дослідження продемонстрували, що декамерні CpG-PS-олігонуклеотиди мають поліпшену імуностимулюючу дію порівняно з октамерами, використаними у перших експериментах. Тому ці експерименти були повторені з використанням конструкту PS-SEQ ID NO:387, який був синтезований у стереонерегулярній [змішаний-PSI-SEQ ID NO:387, чи у цілком-Rp- чи цілком-Sp-формі. При цьому обидва [змішаний-PS]-SEQ ID NO:387 та [цілком-Sp-PS]-SEQ ID NO:387 індукували сильне включення ³H-тимідину у дозозалежний спосіб. Однак, у цьому разі [цілком-Rp-PS]-SEQ ID NO:387 був також здатен індукувати значне підвищення клітинної проліферації у найвищій концентрації, що свідчить про те, що він зберігає щонайменше часткову стимулюючу активність.

Переважає Rp-хіральності CpG-динуклеотиду в октамерних PS-олігонуклеотидах. Залишається непевним, чи була видима перевага Sp-стереоізомеру у початкових експериментах спричинена ефектами у самому CG-динуклеотиді, чи цей ефект не пов'язаний з CG. Для вирішення цього питання були синтезовані два октамери PS-2066 із стереонерегулярним скелетом, за винятком зв'язка між центральними CG, які були позначені як Sp чи Rp. Несподівано цей експеримент дав результати, які, певно, є протилежними результатам використання PS-олігонуклеотидів, у яких весь скелет був стереорегулярним, оскільки [CG-Rp-PS]-2066 спричинював таке саме сильне зростання включення ³H-тимідину до клітин селезінки, як і контрольний стереонерегулярний PS-олігонуклеотид. На відміну від них, PS-олігонуклеотид [CG-Sp-PS]-2066 був по суті неактивним.

Інгібування включення ³H-тимідину до клітин селезінки R-стереоізомером CpG-PS-

олігонуклеотиду. Рівень включення ³H-тимідину в лунках, в яких був доданий Rp-стереоізомер, був нижчим, ніж у контрольних лунках, що дозволяє припустити існування можливої інгібуючої активності, хоча мікроскопічні дослідження клітин не виявили ніякої цитотоксичності. Дійсно, при культивуванні клітин з еквімолярною сумішшю [змішаний-PS]-2066 та цілком-Rp-стереоізомерів спостерігалось приблизно 50% зниження рівня включення ³H-тимідину порівняно з клітинами, які культивували лише з [змішаний-PS]-2066 (Таблиця 17).

Переважає імунне стимулювання [Rp-PS]-олігонуклеотидами в ранніх часових точках. Аналізи включення ³H-тимідину, проведені у попередніх експериментах, є чутливими до артефактів, викликаних деградацією PS-олігонуклеотиду з вивільненням „холодного” тимідину, який конкурує з міченим матеріалом, штучно пригнічуючи його включення (Matson et al., 1992). Попередні дослідження продемонстрували, що [Rp-PS]-олігонуклеотиди є набагато сприйнятливими до нуклеазної деградації, ніж їхні Sp-аналоги. Таким чином, існувала можливість того, що видима відсутність стимулюючого ефекту [Rp-PS]-олігонуклеотиду в наших дослідженнях включення ³H-тимідину може бути оманливим артефактом, який не відображає справжній ефект [Rp-PS]-олігонуклеотиду. З метою детектування стимулюючого ефекту [Rp-PS]-олігонуклеотиду для ранніх часових точок, до можливої деградації PS-олігонуклеотиду, та як незалежний біологічний тест на CpG-індуковане стимулювання, ми перевірили здатність цих PS-олігонуклеотидів індукувати швидке фосфорилування регуляторної мітоген-активованої протеїнкінази JNK. Несподівано ми знайшли, що при обробці CpG-послідовностями PS-SEQ ID NO:386 та PS-SEQ ID NO:387 у межах

сорока хвилин JNK-фосфорилування сильно індукувалося не [Sp-PS]-ізомерами, а лише стереонерегулярними [змішаний-PS]- та [Rp-PS]-ізомерами. Контрольний не-CpG [змішаний-PSil-SEQ ID NO:388 не індукував виявляючого JNK-фосфорилування. Всі зразки містили порівняні кількості загального JNK-протеїну.

Хоча ніякого ефекту CpG-[Sp-PS]-олігонуклеотиду не було виявлено в тесті на JNK-фосфорилування, олігонуклеотид був біологічно активним у цьому експерименті, тому що рівень інгібуючого протеїну IκB-α знижувався усіма CpG-PS-олігонуклеотидами, незалежно від виду стереоізомеру, але не контрольним не-CpG PS-SEQ ID NO:388.

Стереонезалежне зв'язування PS-олігонуклеотидів з клітинною поверхнею та поглинання. Одним з потенційних пояснень, що може певною мірою спричинювати спостережувані розбіжності у біоактивності стереоізомерів PS-олігонуклеотидів, є те, що клітинне зв'язування чи поглинання PS-олігонуклеотидів може бути стереозалежним. Для перевірки цієї можливості були синтезовані Р-стерео-визначені PS-олігонуклеотиди з флуоресцентними мітками, які інкубувалися з клітинами. Несуперечливо з результатами раніших досліджень PS-олігонуклеотиди виявляли концентрація-залежні та температура-залежні профілі клітинного поглинання. Примітно, що не спостерігалось виявної розбіжності у зв'язуванні чи поглинанні Rp- чи Sp-PS-олігонуклеотидів.

Приклад 30: Напів'який олігонуклеотид ОДН 316 С-класу та напів'який олігонуклеотид ОДН 313 В-класу зменшують антиген-індуковане запалення дихальних шляхів *in vivo*

У цих дослідженнях оцінювали *in vivo* ефект ОДН 316 на мишачій моделі антиген-індукованого запалення дихальних шляхів. ОДН 313 В-класу був включений до досліджень для порівняння.

Методи. Мишей (самці, BALB/c) сенсibilізували в дні дослідження 0 та 7 антигеном (овальбумін, 10мкг, *i.p.*) з ад'ювантом гідроксидом алюмінію (Pierce Alum).

Мишей піддавали антигенній стимуляції шляхом експозиції інгаляційним аерозолем овальбуміну, двічі на тиждень два тижні поспіль. Першу провокаційну пробу вводили в день досліджень 21. Аерозоль генерували протягом 1-ї години з 1% розчину овальбуміну в PBS за допомогою розпилювача DeVilbiss Ultraneb. Окремі миші використовувалися як нестимульований контроль.

ОДН 316 чи ОДН 313 (1-100мкг/кг) чи носій (сольовий розчин, 20мкл) вводили інтраназально раз на тиждень за два дні до першої антигенної стимуляції цього тижня.

Кінцеві точки оцінювали в день досліджень 33 (тобто через 48 годин після останньої антигенної стимуляції). Клітини з дихальних шляхів одержували шляхом бронхоальвеолярного промивання. Диференційний підрахунок клітин робили за допомогою автоматизованого лічильника клітин Advia з вибірковою перевіркою зразків шляхом візуально-го підрахунку клітин у цитоцентрифугальних пре-

паратах, забарвлених за Райтом-Гімза (Wright-Giemsa). Кількість CD4⁺ Т-клітин (CD3⁺CD4⁺ клітини) підраховували за методом потокової цитометрії. Результати виражали як середнє ± стандартна помилка вимірів (SEM) для кожної групи. Значущість визначали за допомогою критерію множинного порівняння Крускал-Уолліс (Kruskal-Wallis).

Результати. Антигенна стимуляція спричинювала збільшення загальної кількості лейкоцитів у просвіті дихальних шляхів. Це зростання було викликане переважно накопиченням еозинофілів (наприклад, 3×10⁵ еозинофілів/мл у антигенстимульованих мишей, які одержували носій, порівняно з <1×10⁴ еозинофілів/мл у нести мул'юваних мишей). Еозинофілія значною мірою пригнічувалася ОДН 316 чи ОДН 313 (наприклад, близько 5×10⁴ еозинофілів/мл (P<0,05) у антигенстимульованих мишей, яким було введено 100мкг/мл будь-якого з ОДН).

Антигенна стимуляція також спричинювала накопичення CD4⁺ Т-клітин, яке значною мірою пригнічувалося будь-яким з ОДН (наприклад, близько 2×10⁴ CD4⁺ Т-клітин/мл у антигенстимульованих мишей, яким було введено 100мкг/мл будь-якого ОДН порівняно з близько 1,3×10⁵ CD4⁺ Т-клітин/мл (P<0,05) у антигенстимульованих мишей, які одержували носій).

Висновки^А Будь-який з напів'якого ОДН 316 С-класу та напів'якого олігонуклеотиду ОДН 313 В-класу пригнічує антиген-індуковану еозинофілію дихальних шляхів та накопичення CD4⁺ Т-клітин *in vivo*.

Приклад 31: Порівняння напів'яких ОДН В-, С- та Т-класів: Індукування секреції цитокінів мишачими спленоцитами *in vitro*

У цих дослідженнях вивчали здатність напів'яких ОДН В-, С- та Т-класів індукувати секрецію цитокінів мишачими спленоцитами *in vitro*.

Методи. Спленоцити мишей BALB/c збирали та об'єднували. Спленоцитів інкубували на 48-лункових культуральних планшетах при 1×10⁷ клітин/1мл у середовищі RPMI 1640+10% сироватки плоду корови, яке містить індивідуальні ОДН (0, 0,001, 0,01, 0,1, 1 чи 10мкг/мл). Досліджувані ОДН включали напів'який ОДН 20674 В-класу, напів'які ОДН 316 та ОДН 317 С-класу та напів'які ОДН 319 та ОДН 320 Т-класу.

Після 48-и годин інкубування (37°C, 5% CO₂) культуральне середовище видалляли і вимірювали концентрації IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, GM-CSF, IFN-γ та ФНП-α за допомогою багатоканальної системи для вимірювання цитокінів Lumiplex. Концентрації IL-12p40, IFN-α та IP-10 вимірювали за методом ELISA. Нижня межа точного виявлення дорівнювала 3,2-10пг/мл. Стан активації клітин оцінювали шляхом вимірювання експресії CD40, CD69 та CD86 на CD3⁺ та B220⁺ клітинах за методом потокової цитометрії.

Результати. Всі ОДН індукували активацію В-клітин (B220⁺ клітини), про що свідчить підвищена експресія CD40, CD69 та CD86, та активацію Т-клітин, (CD3⁺ клітини), яка підтверджується підвищеною експресією CD69.

ОДН індукують секрецію IL-6, IL-10, IL-12p40, IFN- α , ФНП- α та IP-10. Титри інших вимірюваних цитокінів не зростали. Наприклад, при концентра-

ції ОДН 1мкг/мл були знайдені такі рівні секреції цитокінів (усі в пг/мл):

Таблиця 18. Секреція цитокінів *in vitro* у відповідь на напівм'які ОДН В-, С- та

Т-класу

ОДН	IL-6	IL-10	IL-12p40	IFN- α	ФНП- α	IP-10
313	4000	410	300	12	150	400
316	3600	820	820	90	400	780
317	2200	410	790	140	340	760
319	1200	200	300	нв	50	30
320	150	нв	160	нв	15	25

нв – не виявлено

Порівняно з напівм'яким ОДН 313 В-класу, два напівм'які ОДН С-класу індукували вищі титри IL-10, IL-12p40, IFN- α , ФНП- α та IP-10, але не спричинювали більш помітної активації В-клітин. Два напівм'які ОДН Т-класу виявилися менш ефективними індукторами цитокінів, ніж напівм'які ОДН В- та С-класів.

Висновки. Всі ОДН В-класу та С-класу індукували профіль індукування цитокінів, який узгоджується з результатами активації TLR9, і всі викликали активацію В-клітин. ОДН Т-класу були менш ефективними індукторами цитокінів.

Порівняно з напівм'яким ОДН 313 В-класу, напівм'які ОДН 316 та 317 С-класу обидва індукували вищі концентрації імуномодуючих цитокінів, але без індукування сильнішої активації В-клітин. Ці дані дозволяють припустити, що ОДН С-класу є терапевтично корисними.

Приклад 32: Індукування цитокінів, антитіл та CTL *in vivo* у відповідь на CpG-ОДН

Вимірювання цитокінів: Мишам BALB/c вводили 400мг ОДН (SEQ ID NOs. 294 (м'який), 241 (напівм'який), 242 та 286) шляхом підшкірної (SC) ін'єкції. Тварин знекровлювали через 3 години після ін'єкції та вимірювали рівні IP-10, IFN-гамма і ФНП-альфа у плазмі за методом ELISA. Результати представлені на Фіг.41А та В (IP-10), С (IFN), та D та Е (ФНП).

Антитілогенез: Мишей BALB/c імунізували 1мг HBsAg самим чи у комбінації з CpG-ОДН шляхом внутрішньом'язової (IM) ін'єкції. Тваринам робили бустер-імунізацію через 4 тижні після первинної імунізації. Титри антитіл вимірювали за методом ELISA для кінцевих точок. Титри ізотипів IgG вимірювали через 2 тижні після бустер-імунізації за методом ELISA для кінцевих точок. Результати представлені на Фіг.42А та В.

Реакція цитотоксичних Т-лімфоцитів: Мишей BALB/c імунізували 1мг HBsAg самим чи у комбінації з CpG-ОДН шляхом IM ін'єкції. Тваринам робили бустер-імунізацію через 4 тижні після первинної імунізації. Активність цитотоксичних Т-лімфоцитів (CTL) вимірювали через 4 тижні після бустер-імунізації за допомогою тесту на вивільнення ⁵¹Cr. Результати представлені на Фіг.42 С.

Таким чином, м'які та напівм'які ОДН мають аналогічні властивості чи є кращими для активації мишачої імунної системи, про що свідчать резуль-

тати як *in vitro*, так і *in vivo* досліджень, а також можуть модифікувати антигенспецифічні імунні відповіді.

Приклад 33: Використання CpG-ОДН у *in vivo* протираковій терапії

ОДН за винаходом були перевірені на ефективність на трьох моделях раку як монотерапії. Спочатку ОДН вводили мишам, які мали нирково-клітинну карциному (гепса). Способи здійснювали таким чином: Індукували пухлини ін'єкціями 2×10^5 клітин гепса підшкірно (SC) у лівий бік мишей в день 0. Лікування, що проводилося після цього, включало SC-ін'єкції фосфатно-сольового буфера (PBS), CpG-ОДН 241 чи 242 щотижнево протягом 5-ти тижнів починаючи з дня 10 після ін'єкції пухлинних клітин. Результати представлені на Фіг.43А та В.

Другою випробуваною моделлю був мишачий недрібноклітинний рак легень (карцинома легень Льюїса). Пухлини індукували підшкірною (SC) ін'єкцією 2×10^6 клітин карциноми легень Льюїса у лівий бік мишей в день 0. Лікування, яке проводилося після цього, включало SC-ін'єкції PBS, 100мг CpG-ОДН 241 чи 242 в дні 1, 3, 7 та щотижнево протягом 2-х місяців. Результати представлені на Фіг.43 Е та F.

Третьою випробуваною моделлю була мишача нейробластома. Робили підшкірну (SC) ін'єкцію 1×10^6 клітин Neuro2a в лівий бік в день 0. SC-ін'єкції PBS, 100мг CpG-ОДН 241 чи 242 робили щоденно з дня 10 до дня 15. Результати представлені на Фіг.43 С та D.

Таким чином, напівм'які ОДН можуть контролювати ріст раку (мишача гепса, карцинома легень Льюїса (LLC), нейробластома) та збільшувати виживаність мишей з такими раками.

Приклад 34: Периренальне запалення, спричинене введенням м'яких, напівм'яких та жорстких ОДН у мишей BALB/c та у TLR-9 нокаут-мишей

Периренальне запалення оцінювали у мишей BALB/c та у TLR-9 нокаут-мишей. Результати наведені у Таблицях 19 та 20, відповідно. Напівм'який ОДН (241) індукував менше запалення в місці ін'єкції, не індукував (доза 100 мкг) чи індукував незначне (доза 250мг) периренальне запалення і мав кращу переносність після багатократного введення ОДН.

Таблиця 19

Група	Запалення паренхіми нирок	Гранульоматозне запалення ниркової капсули	Гранульоматозне запалення жирової тканини
PBS	Норма 5/5	Норма 5/5	Норма 5/5
242 100 мг	Слабке 2/5	Слабке до помірного 5/5	Слабке до помірного 4/5
242 250 мг	Слабке 1/4	Слабке до помірного 4/4	Помітне 4/4
241 100 мг	Норма 5/5	Норма 5/5	Норма 5/5
241 250 мг	Слабке 2/5	Слабке 2/5	Слабке до помірного 3/5

Таблиця 20

Група	Запалення паренхіми нирок	Гранульоматозне запалення ниркової капсули	Гранульоматозне запалення жирової тканини
PBS	Норма 5/5	Норма 5/5	Норма 5/5
242 100 мг	Норма 5/5	Норма 5/5	Норма 5/5
242 250 мг	Норма 5/5	Норма 5/5	Норма 5/5
241 100 мг	Норма 5/5	Норма 5/5	Норма 5/5
241 250 мг	Норма 5/5	Норма 5/5	Норма 5/5

Наведений вище опис вважається достатнім для того, щоб надати змогу фахівцю в цій галузі практикувати винахід. Цей винахід не повинен бути обмежений в обсязі наведеними прикладами, оскільки приклади передбачалися як проста ілюстрація одного аспекту винаходу, а інші функціонально еквівалентні варіанти втілення входять до

обсягу винаходу. Різні модифікації винаходу на додаток до розкритих та описаних тут будуть очевидними для фахівців у цій галузі техніки з наведеного вище опису та обсягу формули винаходу, що додається. Переваги та об'єкти винаходу не обов'язково входять до кожного варіанта втілення винаходу.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> COLEY PHARMACEUTICAL GROUP, INC.
COLEY PHARMACEUTICAL GmbH

<120> ІМУНОСТИМУЛЮЮЧІ НУКЛЕІНОВІ КИСЛОТИ

<130> C01037.70048.US

<140> US 60/404,820

<141> 2003-08-06

<150> US 60/404,479

<151> 2002-08-19

<150> US 60/447,377

<151> 2003-02-14

<150> US 60/404,820

<151> 2002-08-19

<160> 368

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 17

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 1

acgtcgtttt cgtcgtt

17

<210> 2

<211> 16

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 2

gcgtcgacgt cgacgc

16

<210> 3

<211> 16

<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 3
gcgtcgtttt cgtcgc

16

<210> 4
<211> 19
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 4
tccatgacgt tcctgatgc

19

<210> 5
<211> 17
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 5
tcgtcgtttt cgtcgtt

17

<210> 6
<211> 22
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 6
tcgtcgtttt cggcgccgc cg

22

<210> 7
<211> 17
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 7

tcgtcgtttt cgtcgtt

17

<210> 8

<211> 16

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 8

tcgtcgtttt cgtcgtt

16

<210> 9

<211> 17

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 9

tcgtcgtttt cgtcgtt

17

<210> 10

<211> 17

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 10

tcgtcgtttt cgtcgtt

17

<210> 11

<211> 17

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 11
tcgtcgtttt cgtcgtt

<210> 12
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> дезагуанін

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> дезагуанін

<400> 12
tcntcntttt gtcgttttgt cgtt

<210> 13
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> дезагуанін

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(22)
<223> дезагуанін

<400> 13
tcntcgtttt gtcgttttgt cntt

<210> 14
<211> 22
<212> ДНК

17

24

24

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 14

tcgccggtttt cggcggccgc cg

22

<210> 15

<211> 21

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 15

tcgtcggtttt acgacgtcgc g

21

<210> 16

<211> 21

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 16

tcgtcggtttt acgacgtcgt g

21

<210> 17

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 17

tcgtcggtttt acggcgccgc gccg

24

<210> 18

<211> 16

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> N позначає а, с, г чи т з фосфоротіоатним зв'язком, 3-10 нуклеотидів

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> N позначає а, с, г чи т, 0-20 нуклеотидів

<220>

<221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> N позначає а, с, г чи т, 0-20 нуклеотидів

<220>

<221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> N позначає а, с, г чи т з фосфоротіоатним зв'язком, 3-10 нуклеотидів

<400> 18

nngtcggttgt cgtnnn

16

<210> 19

<211> 28

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> N позначає а, с, г чи т, з фосфоротіоатним зв'язком, 3-10 нуклеотидів

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> N позначає а, с, г чи т, 0-20 нуклеотидів

<220>

<221> misc_feature

<222> (27)..(27\

<223> N позначає а, с, г чи т, 0-20 нуклеотидів

<220>

<221> misc_feature

<222> (28)..(28)

<223> N позначає а, с, г чи т, з фосфоротіоатним зв'язком, 3-10 нуклеотидів

<400> 19

nngtcggtgt cgttgctcgtt gtcgttnn

28

<210> 20

<211> 34

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> N позначає а, с, г чи т, з фосфоротіоатним зв'язком, 3-10 нуклеотидів

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> N позначає а, с, г чи т, 0-20 нуклеотидів

<220>

<221> misc_feature

<222> (33)..(33)

<223> N позначає а, с, г чи т, 0-20 нуклеотидів

<220>

<221> misc_feature

<222> (34)..(34)

<223> N позначає а, с, г чи т, з фосфоротіоатним зв'язком, 3-10 нуклеотидів

<400> 20

nngtcggtgt cgttgctcgtt gtcgtgtcgt ttnn

34

<210> 21

<211> 22

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 21
tcgtcgtttt cggcgcgcgc cg

22

<210> 22
<211> 17
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 22
tcgtcgtttt cgtcgtt

17

<210> 23
<211> 17
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 23
tcgtcgtttt cgtcgtt

17

<210> 24
<211> 17
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 24
tcgtcgtttt cgtcgtt

17

<210> 25
<211> 21
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

135

88255

136

<400> 25
tcgtcgtttt gcgacgtcgc g

21

<210> 26
<211> 21
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 26
tcgtcgtttt tcgacgtcga g

21

<210> 27
<211> 21
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 27
tcgtcgtttt tcgacgtcgc g

21

<210> 28
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> дезагуанін

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(19)
<223> дезагуанін

<400> 28
tcgtcntttt gtcgttttnt cgtt

24

<210> 29
<211> 16

<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 29
tcgtcgtttc gacggt

16

<210> 30
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 30
tcgtcgtttc gacgttttgc cgtt

24

<210> 31
<211> 28
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 31
tcgtcgtttc gtcgacgtcg ttctcgtcg

28

<210> 32
<211> 16
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 32
tcgtcgtttc gtcgat

16

<210> 33
<211> 17
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 33

tcgtcgtttc gtcgatt

17

<210> 34

<211> 15

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 34

tcgtcgtttc gtcgt

15

<210> 35

<211> 16

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 35

tcgtcgtttc gtcggt

16

<210> 36

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 36

tcgtcgtttc gtcgtttcgt cggt

24

<210> 37

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

141

88255

142

<400> 37
tcgtcgtttc gtcgttttgt cgtt

24

<210> 38
<211> 26
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 38
tcgtcgtttg tcgtcggcgg ccgscg

26

<210> 39
<211> 22
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 39
tcgtcgtttt cggcggcgcg cg

22

<210> 40
<211> 22
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 40
tcgtcgtttt cggcggcgcg cg

22

<210> 41
<211> 17
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 41
tcgtcgtttt cgtcgtt

17

<210> 42
<211> 22
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 42
tcgtcgtttt cggcgcgcgc cg

22

<210> 43
<211> 22
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 43
tcgtcgtttt cggcgcgcgc cg

22

<210> 44
<211> 16
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 44
tcgtcgtttt cgtcgt

16

<210> 45
<211> 17
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 45
tcgtcgtttt cgtcgtt

17

<210> 46
<211> 17

<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 46
tcgtcgtttt cgttggtt

17

<210> 47
<211> 21
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 47
tcgtcgtttt gtcgtcgttt t

21

<210> 48
<211> 23
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 48
tcgtcgtttt ttttcgtcgt ttt

23

<210> 49
<211> 17
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 49
tcgtcgtttt tgcgtgtt

17

<210> 50
<211> 17
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 50

tcgtcgtttt tggtggt

17

<210> 51

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<220>

<221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> дезагуанін

<220>

<221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> дезагуанін

<400> 51

tcgtcgtttt ntcnttttgt cggt

24

<210> 52

<211> 16

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 52

tcgtcgtttt gacggt

16

<210> 53

<211> 18

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 53

tcgtcgtttt gacgtttt

18

<210> 54

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 54

tcgtcgtttt gacgttttgt cggt

24

<210> 55

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 55

tcgtcgtttt gacgttttgt cggt

24

<210> 56

<211> 16

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 56

tcgtcgtttt gtcggt

16

<210> 57

<211> 40

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> N позначає а, с, г чи т, з фосфоротіоатним зв'язком, 3-10 нуклеотидів

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> N позначає а, с, г чи т, 0-20 нуклеотидів

<220>

<221> misc_feature

<222> (39)..(39)

<223> N позначає а, с, г чи т, 0-20 нуклеотидів

<220>

<221> misc_feature

<222> (40)..(40)

<223> N позначає а, с, г чи т, з фосфоротіоатним зв'язком, 3-10 нуклеотидів

<400> 57

nngtcgttgt cgttgctggt gtcgttgctg ttgtcgttnn

40

<210> 58

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<220>

<221> misc_feature

<222> (19)..(19)

<223> дезагуанін

<220>

<221> misc_feature

<222> (22)..(22)

<223> дезагуанін

<400> 58

tcgtcgtttt gtcgttttnt cntt

24

<210> 59

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 59

tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt

24

<210> 60

<211> 17

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<220>

<221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> 2 -дезоксіурацил

<400> 60

tcgtcgtttn gtcgttt

17

<210> 61

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<220>

<221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> 2 -дезоксіурацил

<400> 61

tcgtcgtttn gtcgttttgt cggt

24

<210> 62

<211> 16

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 62

tcgtcgtttg cgtcgt

16

155

88255

156

<210> 63
<211> 17
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 63
tcgtcgtttg cgtcgtt

17

<210> 64
<211> 14
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 64
tcgtcgtttg tcgt

14

<210> 65
<211> 15
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 65
tcgtcgtttg tcgtt

15

<210> 66
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(9)
<223> 2 -дезоксіурацил

<220>

<221> misc_feature
<222> (15)..(18)
<223> 2 -дезоксиурацил

<400> 66
tcgtcgnnnc gtcgnnnngt cgtt

<210> 67
<211> 15
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксиуклеотид

<400> 67
tcgttttgtc gtttt

<210> 68
<211> 19
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксиуклеотид

<400> 68
tcgttttgtc gtttttttt

<210> 69
<211> 17
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксиуклеотид

<400> 69
tcgttttttt tcgtttt

<210> 70
<211> 17
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксиуклеотид

<400> 70

24

15

19

17

159

88255

160

tcgttggtttt cgtcgtt

17

<210> 71

<211> 17

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 71

tcgttggtttt cgttggtt

17

<210> 72

<211> 17

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 72

tcgttggtttt tgcgtt

17

<210> 73

<211> 17

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 73

tcgttggtttt tgttggtt

17

<210> 74

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> 2 -дезоксіурацил

161

88255

162

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> 2 -дезоксіурацил

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(20)
<223> 2 -дезоксіурацил

<400> 74
tcgncgtttt gtcgtttngn cggt

24

<210> 75
<211> 25
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 75
tgtcgttgtc gttgtcggtg tcggt

25

<210> 76
<211> 25
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 76
tgtcgttgtc gttgtcggtg tcggt

25

<210> 77
<211> 15
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 77
tgtcgtttcg tcggt

15

<210> 78

163

88255

164

<211> 15
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 78
tgtcgttttg tcggtt

<210> 79
<211> 20
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 79
ttagttcgta gttcttcggtt

<210> 80
<211> 17
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 80
ttcgtcgttt cgtcgtt

<210> 81
<211> 18
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 81
ttcgtcgttt cgtcgttt

<210> 82
<211> 17
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

15

20

17

18

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 82

ttcgtcggtt tgcgtt

17

<210> 83

<211> 20

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 83

ttcgttctta gttcgtagt

20

<210> 84

<211> 14

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 84

tttcgacgtc gttt

14

<210> 85

<211> 21

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 85

ttttcgtcgt tttgctcgt t

21

<210> 86

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 86
ttttcgtcgt tttgtcgtcg tttt

24

<210> 87
<211> 23
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 87
ttttcgtcgt tttttttcgt cgt

23

<210> 88
<211> 26
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 88
ttttcgtcgt tttttttcgt cgtttt

26

<210> 89
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 89
ttttcgtcgt tttgtcgtcg tttt

24

<210> 90
<211> 15
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 90

169

88255

170

tttttcgtttt gtcgt

15

<210> 91

<211> 18

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 91

tttttcgtttt gtcgtttt

18

<210> 92

<211> 17

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 92

tttttcgtttt ttttcgt

17

<210> 93

<211> 20

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 93

tttttcgtttt ttttcgtttt

20

<210> 94

<211> 18

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 94

tttttcgtttt gtcgtttt

18

<210> 95

171

88255

172

<211> 19
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 95
tttttttttcg ttttgcgt

<210> 96
<211> 17
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 96
ttgtcgtttt cgtcgtt

<210> 97
<211> 17
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 97
ttgtcgtttt cgttggt

<210> 98
<211> 17
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 98
ttgtcgtttt tgcgtt

<210> 99
<211> 17
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

19

17

17

17

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 99

ttgtcgtttt tgttggt

17

<210> 100

<211> 23

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 100

tcgtcgtttt gtcgtttgtc gtt

23

<210> 101

<211> 16

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 101

tcgtcgtttt gtcggt

16

<210> 102

<211> 16

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 102

tcgtcgtttc gtcggt

16

<210> 103

<211> 25

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 103
tgctcggttgtc gttgtcgttg tcggt

25

<210> 104
<211> 22
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 104
tcgtcggtttt cggcggccgc cg

22

<210> 105
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 105
tcgtcggtttt gtcgttttgt cggt

24

<210> 106
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 106
tcgtcggtttt gtcgttttgt cggt

24

<210> 107
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 107

177

88255

178

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 108

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 108

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 109

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 109

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 110

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 110

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 111

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 111

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 112

<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 112
tcgctcgtttt gtcgttttgc cgtt

<210> 113
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 113
tcgctcgtttt gtcgttttgc cgtt

<210> 114
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 114
tcgctcgtttt gtcgttttgc cgtt

<210> 115
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 115
tcgctcgtttt gtcgttttgc cgtt

<210> 116
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

24

24

24

24

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 116

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 117

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 117

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 118

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 118

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 119

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 119

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 120

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

183

88255

184

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 120

tcgctcggtttt gtcgttttgt cggt

24

<210> 121

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 121

tcgctcggtttt gtcgttttgt cggt

24

<210> 122

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 122

tcgctcggtttt gtcgttttgt cggt

24

<210> 123

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 123

tcgctcggtttt gtcgttttgt cggt

24

<210> 124

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 124

185

88255

186

tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt

24

<210> 125

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 125

tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt

24

<210> 126

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 126

tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt

24

<210> 127

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 127

tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt

24

<210> 128

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 128

tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt

24

<210> 129

<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 129
tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt

<210> 130
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 130
tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt

<210> 131
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 131
tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt

<210> 132
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 132
tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt

<210> 133
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

24

24

24

24

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 133

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 134

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 134

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 135

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 135

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 136

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 136

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 137

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

191

88255

192

<400> 137
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 138
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 138
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 139
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 139
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 140
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 140
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 141
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 141
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 142
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 142
tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt

24

<210> 143
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 143
tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt

24

<210> 144
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 144
tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt

24

<210> 145
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 145
tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt

24

<210> 146
<211> 24

<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 146
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 147
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 147
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 148
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 148
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 149
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 149
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 150
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 150

tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt

24

<210> 151

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 151

tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt

24

<210> 152

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 152

tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt

24

<210> 153

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 153

tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt

24

<210> 154

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 154
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 155
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 155
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 156
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 156
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 157
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 157
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 158
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 158
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 159
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 159
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 160
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 160
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 161
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 161
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 162
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 162
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 163
<211> 24

<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 163
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

<210> 164
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 164
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

<210> 165
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 165
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

<210> 166
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 166
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

<210> 167
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

24

24

24

24

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 167

tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt

24

<210> 168

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 168

tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt

24

<210> 169

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 169

tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt

24

<210> 170

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 170

tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt

24

<210> 171

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 171
tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt

24

<210> 172
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 172
tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt

24

<210> 173
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 173
tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt

24

<210> 174
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 174
tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt

24

<210> 175
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 175
tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt

24

<210> 176
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 176
tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt

24

<210> 177
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 177
tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt

24

<210> 178
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 178
tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt

24

<210> 179
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 179
tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt

24

<210> 180
<211> 24

211	88255	212
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігодезоксинуклеотид		
<400> 180		
tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt		24
<210> 181		
<211> 24		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігодезоксинуклеотид		
<400> 181		
tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt		24
<210> 182		
<211> 24		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігодезоксинуклеотид		
<400> 182		
tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt		24
<210> 183		
<211> 24		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігодезоксинуклеотид		
<400> 183		
tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt		24
<210> 184		
<211> 24		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		

213

88255

214

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 184

tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt

24

<210> 185

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 185

tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt

24

<210> 186

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 186

tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt

24

<210> 187

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 187

tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt

24

<210> 188

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

215	88255	216
<400> 188 tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt		24
<210> 189 <211> 24 <212> ДНК <213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігодезоксинуклеотид		
<400> 189 tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt		24
<210> 190 <211> 24 <212> ДНК <213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігодезоксинуклеотид		
<400> 190 tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt		24
<210> 191 <211> 24 <212> ДНК <213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігодезоксинуклеотид		
<400> 191 tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt		24
<210> 192 <211> 24 <212> ДНК <213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігодезоксинуклеотид		
<400> 192 tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt		24

<210> 193
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 193
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 194
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 194
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 195
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 195
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 196
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 196
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 197
<211> 24

219

88255

220

<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 197
tcgctcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 198
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 198
tcgctcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 199
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 199
tcgctcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 200
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 200
tcgctcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 201
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

221

88255

222

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 201

tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt

24

<210> 202

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 202

tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt

24

<210> 203

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 203

tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt

24

<210> 204

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 204

tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt

24

<210> 205

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

223	88255	224
<p><400> 205 tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt</p> <p><210> 206 <211> 24 <212> ДНК <213> Штучна послідовність</p> <p><220></p> <p><223> Олігодезоксинуклеотид</p> <p><400> 206 tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt</p> <p><210> 207 <211> 24 <212> ДНК <213> Штучна послідовність</p> <p><220></p> <p><223> Олігодезоксинуклеотид</p> <p><400> 207 tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt</p> <p><210> 208 <211> 24 <212> ДНК <213> Штучна послідовність</p> <p><220></p> <p><223> Олігодезоксинуклеотид</p> <p><400> 208 tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt</p> <p><210> 209 <211> 24 <212> ДНК <213> Штучна послідовність</p> <p><220></p> <p><223> Олігодезоксинуклеотид</p> <p><400> 209 tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt</p>		<p>24</p> <p>24</p> <p>24</p> <p>24</p> <p>24</p> <p>24</p>

<210> 210
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 210
tcgctcggtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 211
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 211
tcgctcggtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 212
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 212
tcgctcggtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 213
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 213
tcgctcggtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 214
<211> 24

<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 214
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

<210> 215
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 215
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

<210> 216
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 216
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

<210> 217
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 217
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

<210> 218
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

24

24

24

24

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 218

tcgtcggtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 219

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 219

tcgtcggtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 220

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 220

tcgtcggtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 221

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 221

tcgtcggtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 222

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

231	88255	232
<p><400> 222 tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt</p> <p><210> 223 <211> 24 <212> ДНК <213> Штучна послідовність</p> <p><220></p> <p><223> Олігодезоксинуклеотид</p> <p><400> 223 tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt</p> <p><210> 224 <211> 24 <212> ДНК <213> Штучна послідовність</p> <p><220></p> <p><223> Олігодезоксинуклеотид</p> <p><400> 224 tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt</p> <p><210> 225 <211> 24 <212> ДНК <213> Штучна послідовність</p> <p><220></p> <p><223> Олігодезоксинуклеотид</p> <p><400> 225 tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt</p> <p><210> 226 <211> 24 <212> ДНК <213> Штучна послідовність</p> <p><220></p> <p><223> Олігодезоксинуклеотид</p> <p><400> 226 tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt</p>		<p>24</p> <p>24</p> <p>24</p> <p>24</p> <p>24</p> <p>24</p>

<210> 227
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 227
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

<210> 228
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 228
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

<210> 229
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 229
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

<210> 230
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 230
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

<210> 231
<211> 24

24

24

24

24

235

88255

236

<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 231
tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt

<210> 232
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 232
tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt

<210> 233
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 233
tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt

<210> 234
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 234
tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt

<210> 235
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

24

24

24

24

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 235

tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt

24

<210> 236

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 236

tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt

24

<210> 237

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 237

tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt

24

<210> 238

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 238

tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt

24

<210> 239

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

239	88255	240
<p><400> 239 tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt</p> <p><210> 240 <211> 24 <212> ДНК <213> Штучна послідовність</p> <p><220></p> <p><223> Олігодезоксинуклеотид</p> <p><400> 240 tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt</p> <p><210> 241 <211> 24 <212> ДНК <213> Штучна послідовність</p> <p><220></p> <p><223> Олігодезоксинуклеотид</p> <p><400> 241 tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt</p> <p><210> 242 <211> 23 <212> ДНК <213> Штучна послідовність</p> <p><220></p> <p><223> Олігодезоксинуклеотид</p> <p><400> 242 tcgtcgtttt gtcgttttgt cgt</p> <p><210> 243 <211> 25 <212> ДНК <213> Штучна послідовність</p> <p><220></p> <p><223> Олігодезоксинуклеотид</p> <p><400> 243 tgtcgttgtc gttgctggtg tcggt</p>		<p>24</p> <p>24</p> <p>24</p> <p>24</p> <p>23</p> <p>25</p>

241

88255

242

<210> 244
<211> 25
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 244
tgctcgttgtc gttgtcgttg tcggt

25

<210> 245
<211> 16
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 245
tcgtcgttttc gtcggt

16

<210> 246
<211> 16
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 246
tcgtcgttttt gtcggt

16

<210> 247
<211> 22
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 247
tcgtcgttttt cggcggcgcg cg

22

<210> 248
<211> 22

243

88255

244

<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 248
tcgccgtttt cggcggccgc cg

22

<210> 249
<211> 22
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 249
tcgccgtttt cggcggccgc cg

22

<210> 250
<211> 22
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 250
tcgtcgtttt cggcggccgc cg

22

<210> 251
<211> 22
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 251
tcgtcgtttt cggcggccgc cg

22

<210> 252
<211> 22
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 252

tcgcccgtttt cggcggccgc cg

22

<210> 253

<211> 22

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 253

tcgcccgtttt cggcggccgc cg

22

<210> 254

<211> 22

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 254

tcgtcgtttt cggcggccgc cg

22

<210> 255

<211> 22

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 255

tcgtcgtttt cggcggccgc cg

22

<210> 256

<211> 22

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

247	88255	248
<400> 256		
tcgtcgtttt cggcggccgc cg		22
<210> 257		
<211> 22		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігодезоксинуклеотид		
<400> 257		
tcgtcgtttt cggcggccgc cg		22
<210> 258		
<211> 25		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігодезоксинуклеотид		
<400> 258		
tgtcgttgtc gttgtcgttg tcggt		25
<210> 259		
<211> 24		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігодезоксинуклеотид		
<400> 259		
tcgtcgtttc gtcgttttgt cggt		24
<210> 260		
<211> 24		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігодезоксинуклеотид		
<400> 260		
tcgtcgtttc gtcgttttgt cggt		24

<210> 261
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 261
tcgtcgtttt gacgttttgt cggt

<210> 262
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 262
tcgtcgtttt gacgttttgt cggt

<210> 263
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 263
tcgtcgtttt gacgttttgt cggt

<210> 264
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 264
tcgtcgtttt gacgttttgt cggt

<210> 265
<211> 18

24

24

24

24

251

88255

252

<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 265
tcgtcgtttt gacgtttt

18

<210> 266
<211> 16
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 266
tcgtcgtttt gacgtt

16

<210> 267
<211> 16
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 267
tcgtcgtttt gacgtt

16

<210> 268
<211> 20
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 268
gtttctcgctg gtgagtttca

20

<210> 269
<211> 20
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

253	88255	254
<220>		
<223> Олігодезоксинуклеотид		
<400> 269		
gttctcgctg gtgagtttca		20
<210> 270		
<211> 24		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігодезоксинуклеотид		
<400> 270		
tcgtcgtttc gtcgtttcgt cggt		24
<210> 271		
<211> 24		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігодезоксинуклеотид		
<400> 271		
tcgtcgtttc gtcgtttcgt cggt		24
<210> 272		
<211> 24		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігодезоксинуклеотид		
<220>		
<221> misc_feature		
<222> (10)..(10)		
<223> 2 -дезоксіурацил		
<400> 272		
tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt		24
<210> 273		
<211> 24		
<212> ДНК		

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<220>

<221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> 2 -дезоксіурацил

<400> 273

tcgctcgtttn gtcgttttgt cggt

24

<210> 274

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<220>

<221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> 2 -дезоксіурацил

<400> 274

tcgctcgtttn gtcgttttgt cggt

24

<210> 275

<211> 22

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 275

tcgctcgctgtt cggcgscgsc cg

22

<210> 276

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 276
tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt

24

<210> 277
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> 2 -дезоксіурацил

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> 2 -дезоксіурацил

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(20)
<223> 2 -дезоксіурацил

<400> 277
tcgncgtttt gtcgtttngn cggt

24

<210> 278
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> 2 -дезоксіурацил

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> 2 -дезоксіурацил

<220>

259

88255

260

<221> misc_feature
<222> (20)..(20)
<223> 2 -дезоксіурацил

<400> 278
tcgncggtttt gtcgttttngn cggt

<210> 279
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(9)
<223> 2 -дезоксіурацил

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(18)
<223> 2 -дезоксіурацил

<400> 279
tcgtcggnnt gtcggnnngt cggt

<210> 280
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(9)
<223> 2 -дезоксіурацил

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(18)
<223> 2 -дезоксіурацил

<400> 280
tcgtcgnnnc gtcgnnnngt cggt

24

24

24

261

88255

262

<210> 281
<211> 18
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 281
aacgtcgttt tcgtcggtt

18

<210> 282
<211> 18
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 282
aacgtcgttt tcgtcggtt

18

<210> 283
<211> 16
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 283
tcgtcgtttt cgtcgtt

16

<210> 284
<211> 17
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 284
tcgtcgtttt cgtcgtt

17

<210> 285
<211> 18
<212> ДНК

263

88255

264

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 285
aacgtcgttt tcgtcgtt

18

<210> 286

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 286
tgctgctttt gtgcttttgt gctt

24

<210> 287

<211> 25

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 287
tgtcgttgtc gttgtcgttg tcggt

25

<210> 288

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 288
tcgttttttt cgtttttttc gttt

24

<210> 289

<211> 21

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

265

88255

266

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 289

tcgtcgtttt tcggtcgttt t

21

<210> 290

<211> 22

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 290

tcgtcgtttt tcgtgcgttt tt

22

<210> 291

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 291

tcgtcgtttt cgttttttttc gttt

24

<210> 292

<211> 21

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 292

tcgttttgtc gtttttttcg a

21

<210> 293

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

267	88255	268
<p><400> 293 tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt</p> <p><210> 294 <211> 24 <212> ДНК <213> Штучна послідовність</p> <p><220></p> <p><223> Олігодезоксинуклеотид</p> <p><400> 294 tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt</p> <p><210> 295 <211> 22 <212> ДНК <213> Штучна послідовність</p> <p><220></p> <p><223> Олігодезоксинуклеотид</p> <p><400> 295 tcgtcgtttt cggcggccgc cg</p> <p><210> 296 <211> 18 <212> ДНК <213> Штучна послідовність</p> <p><220></p> <p><223> Олігодезоксинуклеотид</p> <p><220> <221> misc_feature <222> (13)..(13) <223> n позначає а, с, г чи т</p> <p><220> <221> misc_feature <222> (16)..{16) <223> n позначає а, с, г чи т</p> <p><400> 296 tcgtcgtttt gancgntt</p> <p><210> 297 <211> 24</p>		<p>24</p> <p>24</p> <p>22</p> <p>18</p>

269	88255	270
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігодезоксинуклеотид		
<400> 297		
tcgtcgtttt gaccggttcg tggt		24
<210> 298		
<211> 24		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігодезоксинуклеотид		
<400> 298		
tcgtcgtttt gacgttttgt cggt		24
<210> 299		
<211> 18		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігодезоксинуклеотид		
<400> 299		
tcgtcgtttt gacgtttt		18
<210> 300		
<211> 16		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігодезоксинуклеотид		
<400> 300		
tcgtcgtttt gacgtt		16
<210> 301		
<211> 19		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<220>

<221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> n позначає а, с, г чи t

<220>

<221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> n позначає а, с, г чи t

<220>

<221> misc_feature

<222> (17)..(17)

<223> n позначає а, с, г чи t

<400> 301

tcgtatncgt tttncgntt

19

<210> 302

<211> 18

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> n позначає а, с, г чи t

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> n позначає а, с, г чи t

<220>

<221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> n позначає а, с, г чи t

<400> 302

tcgatncgtt ttncgntt

18

<210> 303

<211> 18

<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> n позначає a, c, g чи t

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> n позначає a, c, g чи t

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)
<223> n позначає a, c, g чи t

<400> 303
tcgttncggtt ttncgntt

<210> 304
<211> 23
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 304
tcgatacggtt ttcgtgcgtt ttt

<210> 305
<211> 21
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 305
tcgttttgac gttttgtcgt t

<210> 306
<211> 24

18

23

21

```

<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(9)
<223> n позначає а, с, г чи t

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> n позначає а, с, г чи t

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(17)
<223> n позначає а, с, г чи t

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(20)
<223> n позначає а, с, г чи t

<400> 306
tcgtcgnnnc gncgnnncgn cgtt

<210> 307
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(9)
<223> n позначає а, с, г чи t

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> n позначає а, с, г чи t

<220>
<221> misc_feature

```

<222> (15)..(17)
<223> н позначає а, с, г чи т

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(20)
<223> н позначає а, с, г чи т

<400> 307
tcgtcgnnnc gncgnnncgn cggt

24

<210> 308
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> н позначає а, с, г чи т

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(20)
<223> н позначає а, с, г чи т

<400> 308
tcgtcggttac gncggttacgn cggt

24

<210> 309
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(9)
<223> н позначає а, с, г чи т

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(17)
<223> н позначає а, с, г чи т

<400> 309
tcgtcgnnnc gtcgnnncgt cggt

24

<210> 310
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 310
tcgtcgttac gtcggttacgt cggt

24

<210> 311
<211> 16
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> n позначає а, с, g чи t

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(8)
<223> n позначає а, с, g чи t

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> n позначає а, с, g or t

<400> 311
tcgncgnnncg ntcggt

16

<210> 312
<211> 20
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> n позначає а, с, г чи т

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(8)
<223> n позначає а, с, г чи т

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(12)
<223> n позначає а, с, г чи т

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> n позначає а, с, г чи т

<400> 312
tcgncgncg nncgntcggt

20

<210> 313
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 313
tcgtcggtttt gacgttttgt cggt

24

<210> 314
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 314
tcgacgtttt gtcgttttgt cggt

24

<210> 315
<211> 13
<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> n позначає а, с, г чи т

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> n позначає а, с, г чи т

<400> 315

tcgscgncsgcsg cgn

13

<210> 316

<211> 22

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 316

tcgscgacggtt cggscgscgsc sg

22

<210> 317

<211> 20

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 317

tcgscgacggtt cgcgscgscgsc

20

<210> 318

<211> 21

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(5)
<223> n позначає а, с, г чи t

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(9)
<223> n позначає а, с, г чи t

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> n позначає а, с, г чи t

<400> 318
ttgnntgnnt tttntttttt t

21

<210> 319
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 319
ttgctgtgct tttgacgttt tttt

24

<210> 320
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 320
ttggctggct tttgacgttt tttt

24

<210> 321
<211> 22
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

287	88255	288
<p><400> 321 tcgcgcacgtt cggcgcgcgc cg</p> <p><210> 322 <211> 24 <212> ДНК <213> Штучна послідовність</p> <p><220></p> <p><223> Олігодезоксинуклеотид</p> <p><400> 322 tcgctcgttac gtcgttacgt cggt</p> <p><210> 323 <211> 23 <212> ДНК <213> Штучна послідовність</p> <p><220></p> <p><223> Олігодезоксинуклеотид</p> <p><400> 323 tcgatcgttt ttcgtgcgtt ttt</p> <p><210> 324 <211> 18 <212> ДНК <213> Штучна послідовність</p> <p><220></p> <p><223> Олігодезоксинуклеотид</p> <p><400> 324 tcgctcgtttt gacgtttt</p> <p><210> 325 <211> 16 <212> ДНК <213> Штучна послідовність</p> <p><220></p> <p><223> Олігодезоксинуклеотид</p> <p><400> 325 tcgctcgtttt gacgtt</p>		<p>22</p> <p>24</p> <p>23</p> <p>18</p> <p>16</p>

<210> 326
<211> 21
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 326
tcgttttgac gttttgtcgt t

21

<210> 327
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 327
tcgtcgtttt gaccggttcg tggt

24

<210> 328
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 328
tcgtcgtttt gacgttttgt cggt

24

<210> 329
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 329
tcgtcgtttt gacgttttgt cggt

24

<210> 330
<211> 20

<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 330
tccaggactt ctctcaggtt

20

<210> 331
<211> 21
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(5)
<223> n позначає а, с, г чи t

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(9)
<223> n позначає а, с, г чи t

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> n позначає а, с, г чи t

<400> 331
ttgnntgnnt tttntttttt t

21

<210> 332
<211> 13
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> n позначає а, с, г чи t

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> n позначає а, с, г чи т
<400> 332
tcgcgncgcg cgn

13

<210> 333
<211> 23
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 333
cgtcgttttg acgttttgtc gtt

23

<210> 334
<211> 22
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 334
gtcgttttga cgttttgtcg tt

22

<210> 335
<211> 21
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 335
tcgttttgac gttttgctg t

21

<210> 336
<211> 20
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

296

20

<220>

19

<220>

18

$\langle 220 \rangle$

17

<220>

16

<210> 341
<211> 15
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 341
tgacgttttg tcgtt

15

<210> 342
<211> 14
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 342
gacgttttgt cgtt

14

<210> 343
<211> 13
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 343
acgttttgtc gtt

13

<210> 344
<211> 11
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 344
gttttgtcgt t

11

<210> 345
<211> 11

299	88255	300
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігодезоксинуклеотид		
<400> 345		
gttttgtcgt t		11
<210> 346		
<211> 10		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігодезоксинуклеотид		
<400> 346		
ttttgtcgtt		10
<210> 347		
<211> 23		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігодезоксинуклеотид		
<400> 347		
tcgtcgtttt gacgttttgt cgt		23
<210> 348		
<211> 22		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Олігодезоксинуклеотид		
<400> 348		
tcgtcgtttt gacgttttgt cg		22
<210> 349		
<211> 21		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 349

tcgtcgtttt gacgttttgt c

21

<210> 350

<211> 20

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 350

tcgtcgtttt gacgttttgt

20

<210> 351

<211> 19

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 351

tcgtcgtttt gacgttttg

19

<210> 352

<211> 18

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 352

tcgtcgtttt gacgtttt

18

<210> 353

<211> 17

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

303

88255

304

<400> 353 tcgtcgtttt gacgttt	17
<210> 354 <211> 16 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Олігодезоксинуклеотид	
<400> 354 tcgtcgtttt gacgtt	16
<210> 355 <211> 15 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Олігодезоксинуклеотид	
<400> 355 tcgtcgtttt gacgt	15
<210> 356 <211> 14 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Олігодезоксинуклеотид	
<400> 356 tcgtcgtttt gacg	14
<210> 357 <211> 13 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Олігодезоксинуклеотид	
<400> 357 tcgtcgtttt gac	13

305

88255

306

<210> 358
<211> 12
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 358
tcgtcgtttt ga

12

<210> 359
<211> 11
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 359
tcgtcgtttt g

11

<210> 360
<211> 10
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 360
tcgtcgtttt

10

<210> 361
<211> 22
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 361
cgtcgttttg acgttttgtc gt

22

<210> 362
<211> 20

307

88255

308

<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 362
gtcgttttga cgttttgtcg

<210> 363
<211> 18
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 363
tcgttttgac gttttgtc

<210> 364
<211> 16
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 364
cgttttgacg ttttgt

<210> 365
<211> 14
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 365
gttttgacgt tttg

<210> 366
<211> 12
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

20

18

16

14

309

88255

310

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 366

ttttgacggtt tt

12

<210> 367

<211> 10

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 367

tttgacggtt

10

<210> 368

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 368

tcgtcggtttt gacgttttgt cggt

24

<210> 369

<211> 23

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 369

tcgtcgacgt tcggcgcgcg csg

23

<210> 370

<211> 21

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

311	88255	312
<p><400> 370 tcggacgttc ggcgcgcgcg g</p> <p><210> 371 <211> 19 <212> ДНК <213> Штучна послідовність</p> <p><220></p> <p><223> Олігодезоксинуклеотид</p> <p><400> 371 tcggacgttc ggcgcgcgcg</p> <p><210> 372 <211> 20 <212> ДНК <213> Штучна послідовність</p> <p><220></p> <p><223> Олігодезоксинуклеотид</p> <p><400> 372 tcgcgtcgtt cggcgcgcgcg</p> <p><210> 373 <211> 20 <212> ДНК <213> Штучна послідовність</p> <p><220></p> <p><223> Олігодезоксинуклеотид</p> <p><400> 373 tcgacgttcg gcgcgcgcgcg</p> <p><210> 374 <211> 18 <212> ДНК <213> Штучна послідовність</p> <p><220></p> <p><223> Олігодезоксинуклеотид</p> <p><400> 374 tcgacgttcg gcgcgcgcg</p>		<p>21</p> <p>19</p> <p>20</p> <p>20</p> <p>18</p>

<210> 375
<211> 18
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 375
tcgcgtcggtt cggcgccg

18

<210> 376
<211> 20
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 376
tgtcgtttttt tttttttttt

20

<210> 377
<211> 20
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 377
tgtcgtttttt tttttttttt

20

<210> 378
<211> 20
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> N = урацил

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(20)
<223> N = урацил

<400> 378
ngtcgttnnn nnnnnnnnnn 20

<210> 379
<211> 20
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Олігодезоксинуклеотид

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> N = урацил

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(20)
<223> N = урацил

<400> 379
ngtcgttnnn nnnnnnnnnn 20

<210> 380
<211> 20
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Олігодезоксинуклеотид

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> N позначає 2'-дезоксіурацил

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(20)
<223> N позначає 2'-дезоксіурацил

<400> 380
ngtcgttnnn nnnnnnnnnt 20

<210> 381
<211> 20
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> N позначає 2'-дезоксіурацил

<220>

<221> misc_feature

<222> (8)..(19)

<223> N позначає 2'-дезоксіурацил

<400> 381

ngtcgttnnn nnnnnnnnt

20

<210> 382

<211> 20

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> N позначає урацил

<220>

<221> misc_feature

<222> (8)..(12)

<223> N позначає урацил

<400> 382

ngtcgttnnn nngggagggg

20

<210> 383

<211> 20

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> N позначає урацил

<220>

<221> misc_feature

<222> (8)..(12)

<223> N позначає урацил

<400> 383

ngtcgttnnn nngggagggg

20

<210> 384

<211> 20

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> N позначає урацил

<220>

<221> misc_feature

<222> (10)..(12)

<223> N позначає урацил

<400> 384

ngtcgttccn nngggagggg

20

<210> 385

<211> 20

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Олігодезоксинуклеотид

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> N позначає урацил

321

88255

322

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(12)
 <223> N позначає урацил

 <400> 385
 ngtcgttccn nngggagggg

 <210> 386
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

20

<220>
 <223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 386
 tccatgacgt tcctgacgtt

20

<210> 387
 <211> 10
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 387
 tcaacgttga

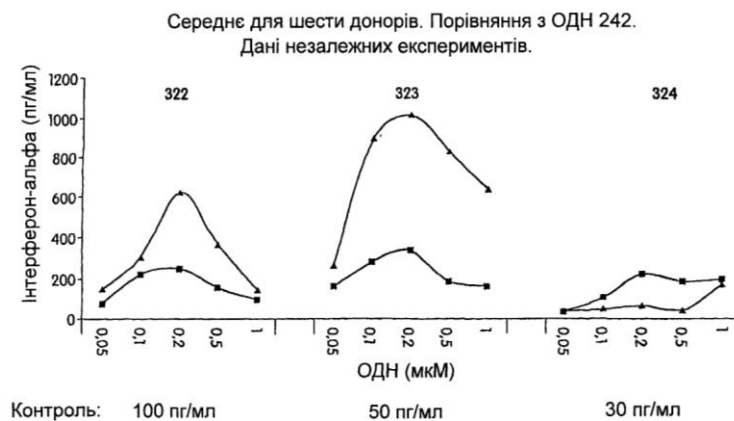
10

<210> 388
 <211> 10
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Олігодезоксинуклеотид

<400> 388
 tcaagcttga

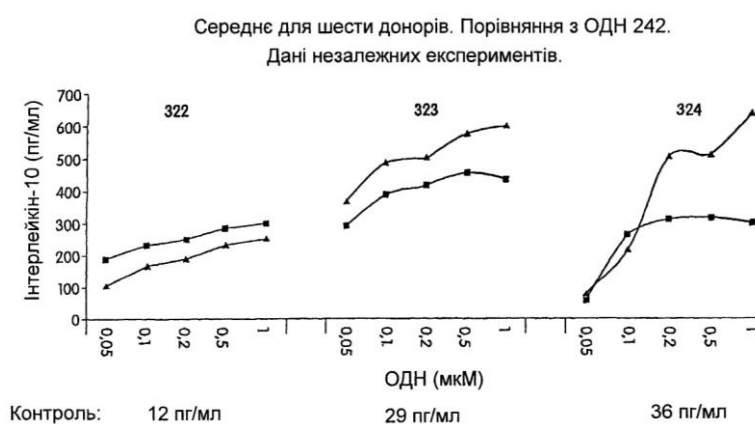
10



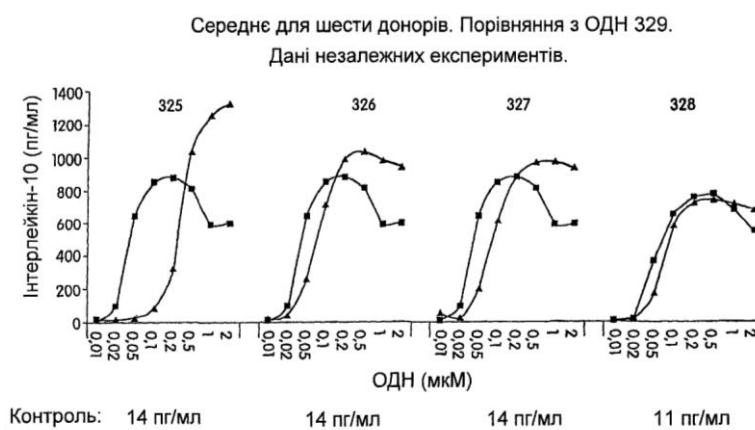
ФІГ. 1А



ФІГ. 1В

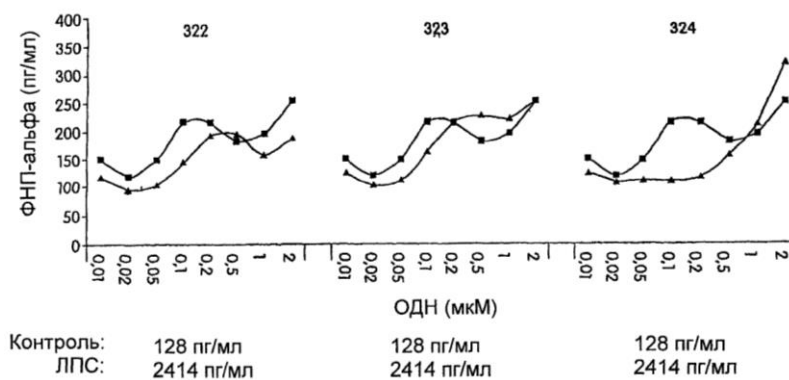


ФІГ. 2А



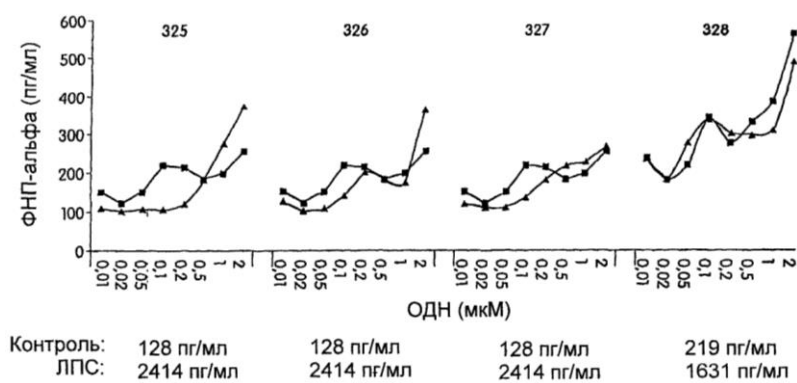
ФІГ. 2В

Середнє для трьох донорів. Порівняння з ОДН 329.



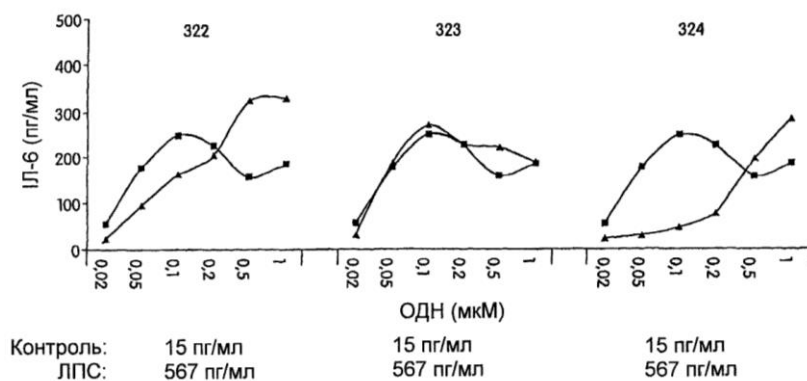
ФІГ. 3А

Середнє для трьох донорів. Порівняння з ОДН 329.
Дані незалежних експериментів.



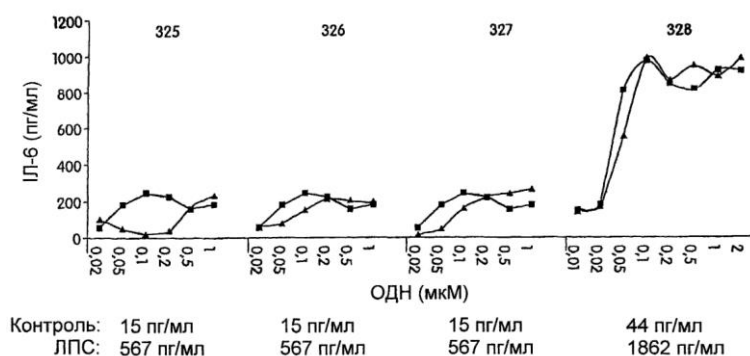
ФІГ. 3В

Середнє для трьох донорів. Порівняння з ОДН 329.
Дані незалежних експериментів.



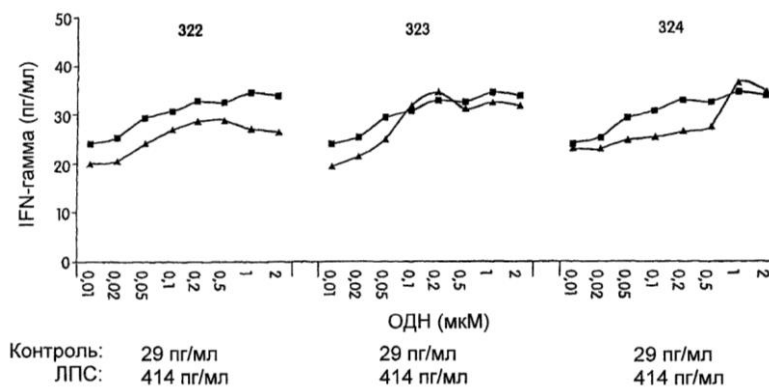
ФІГ. 4А

Середнє для трьох донорів. Порівняння з ОДН 329.
Дані незалежних експериментів.



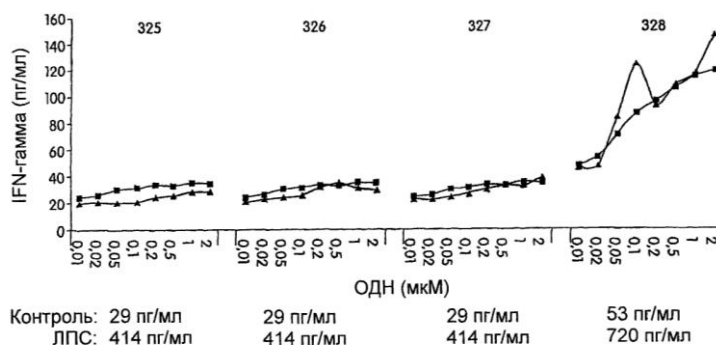
ФІГ. 4В

Середнє для трьох донорів. Порівняння з ОДН 329.



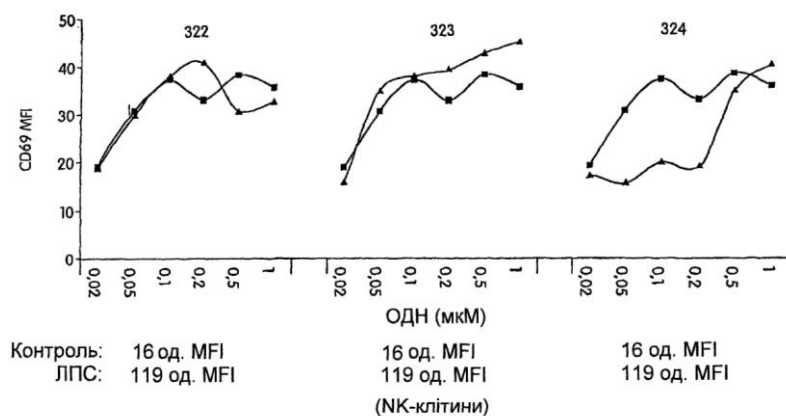
ФІГ. 5А

Середнє для трьох донорів. Порівняння з ОДН 329.
Дані незалежних експериментів.



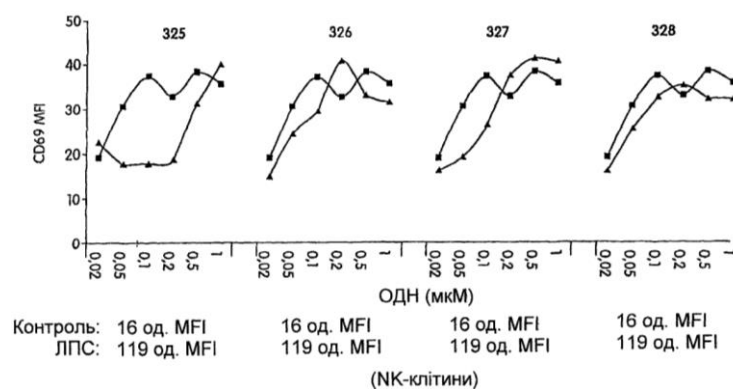
ФІГ. 5В

Середнє для трьох донорів. Порівняння з ОДН 329.

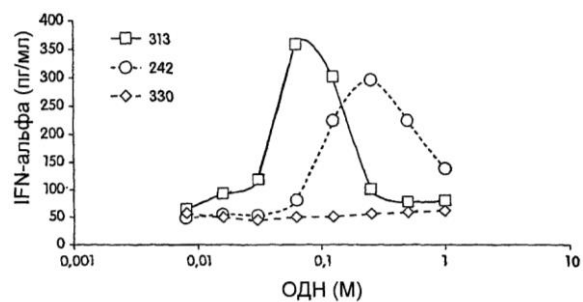


ФІГ. 6А

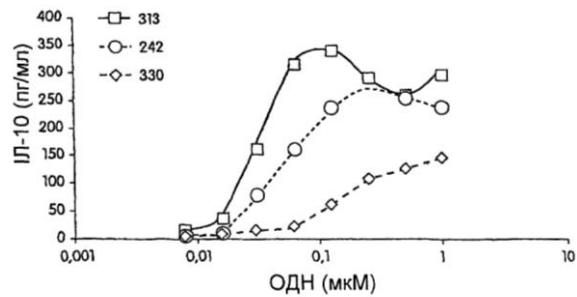
Середнє для трьох донорів. Порівняння з ОДН 329.



ФІГ. 6В

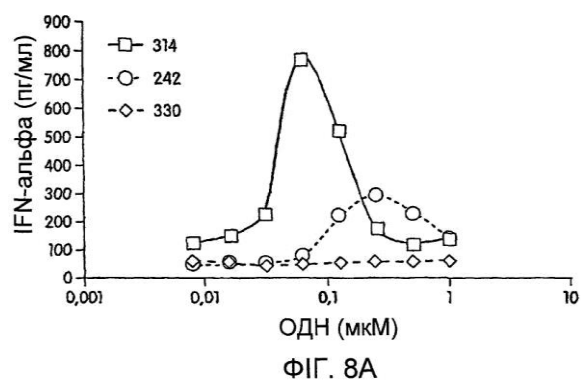


ФІГ. 7А



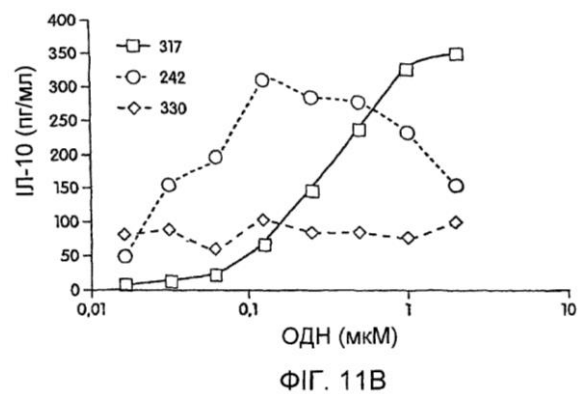
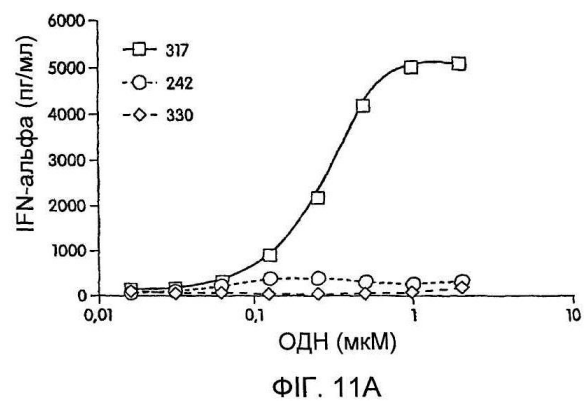
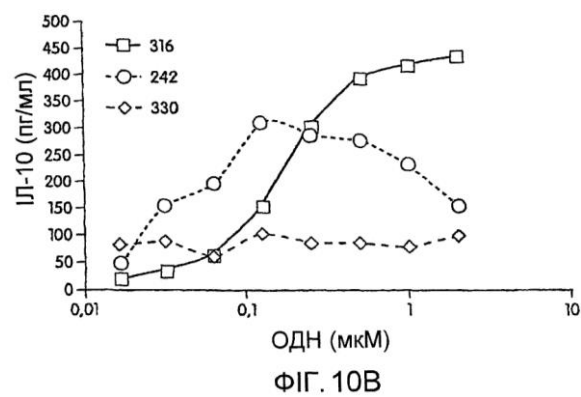
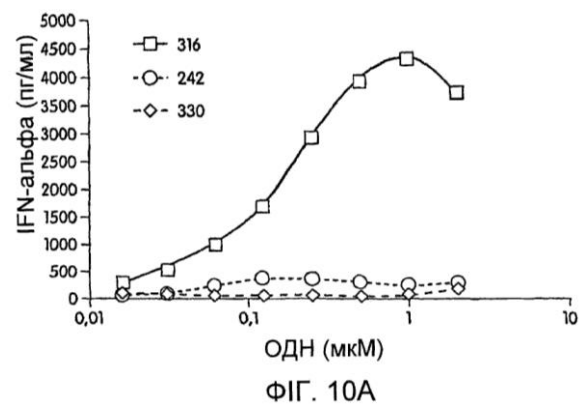
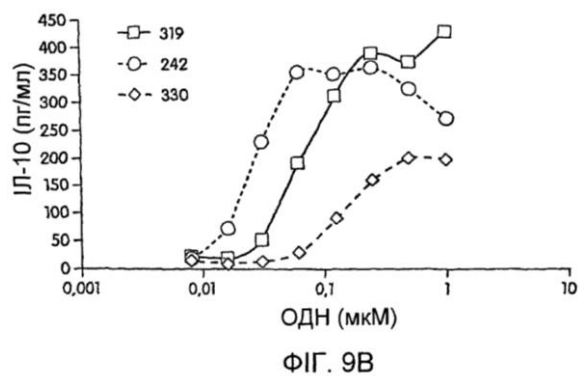
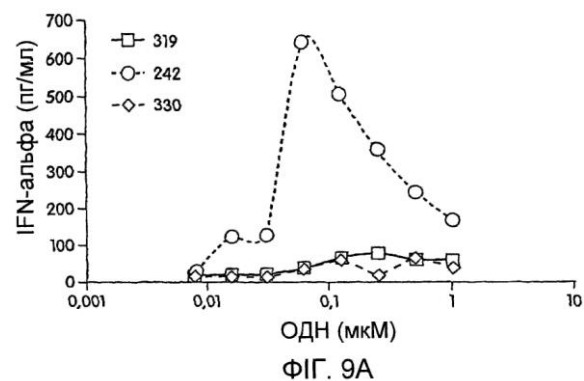
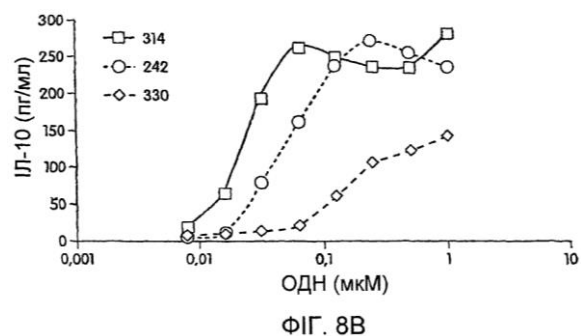
ФІГ. 7В

331

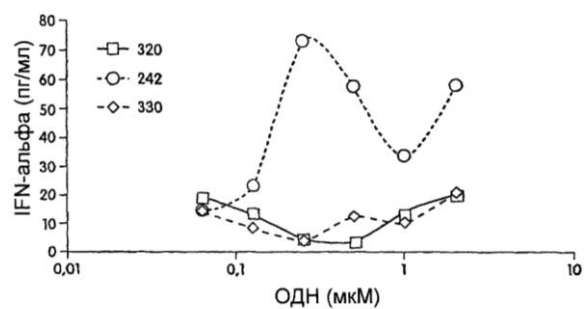


88255

332



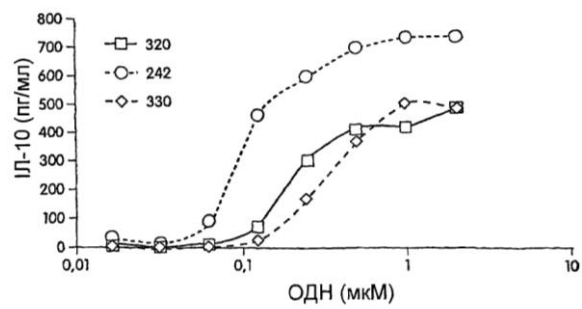
333



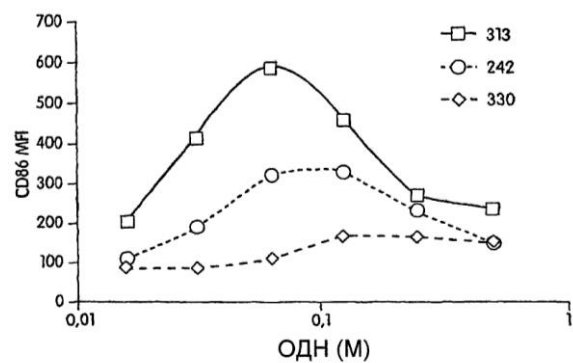
ФІГ. 12А

88255

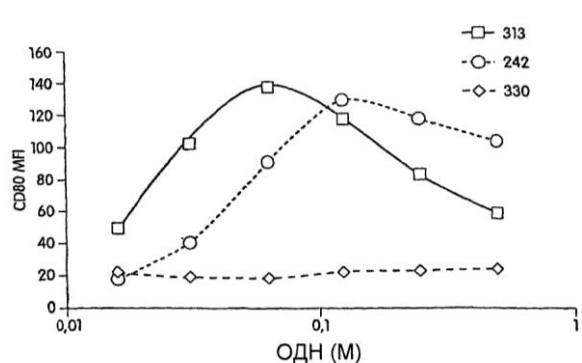
334



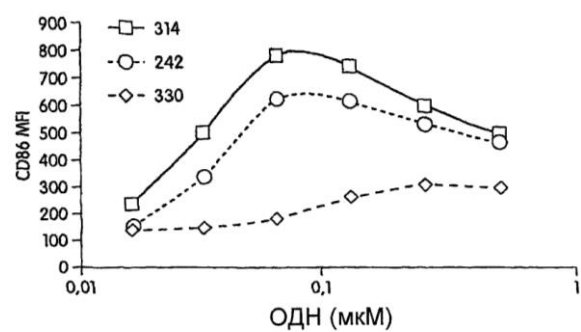
ФІГ. 12В



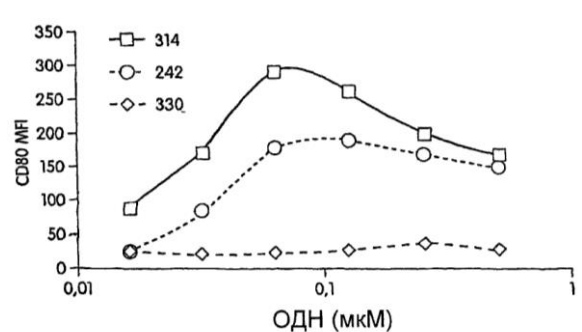
ФІГ. 13А



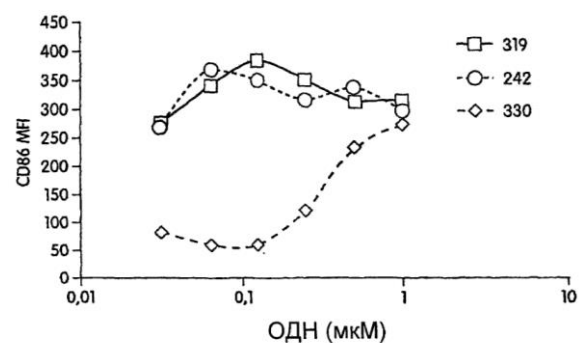
ФІГ. 13В



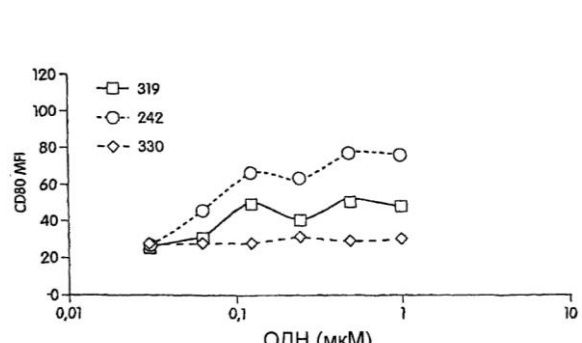
ФІГ. 14А



ФІГ. 14В

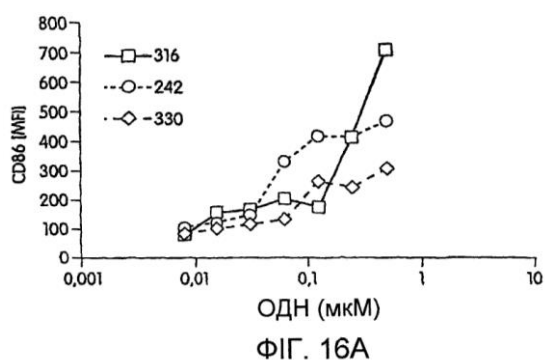


ФІГ. 15А



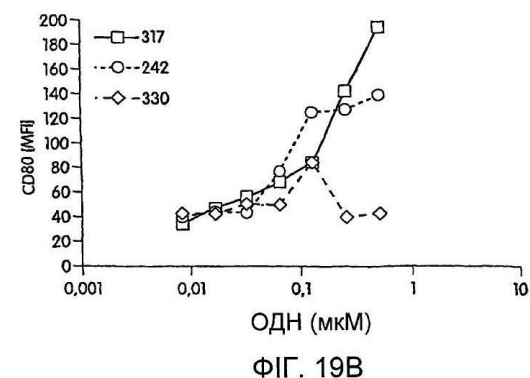
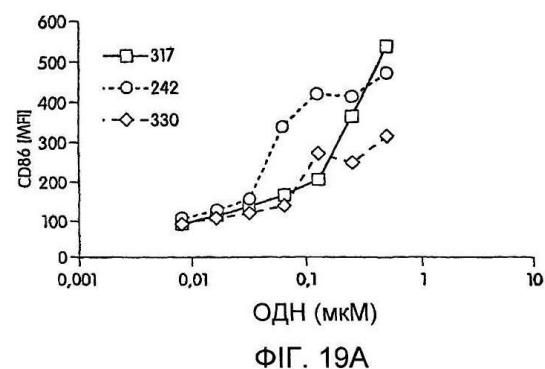
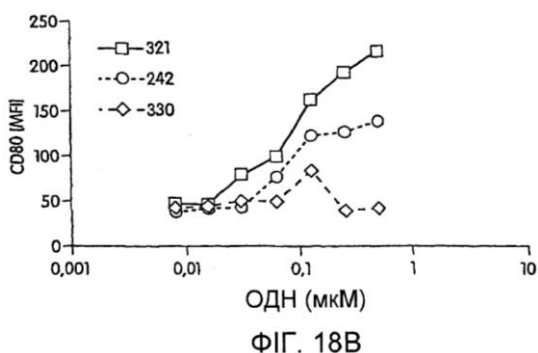
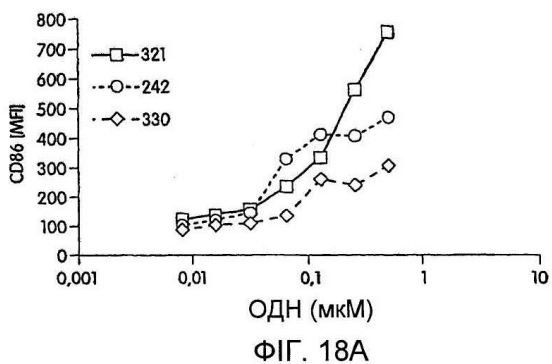
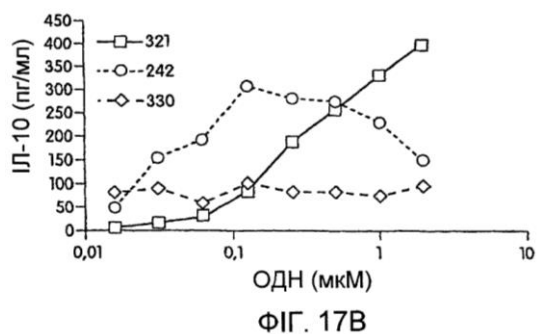
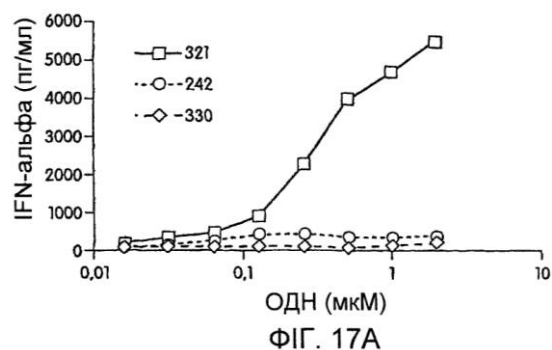
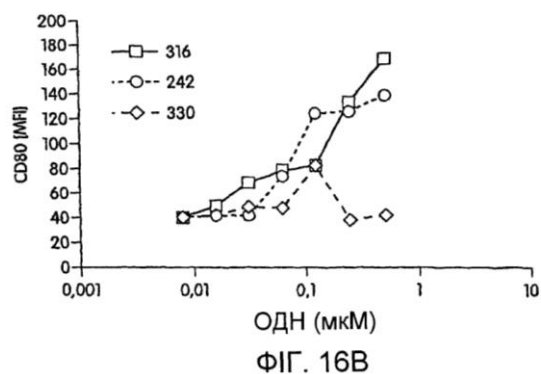
ФІГ. 15В

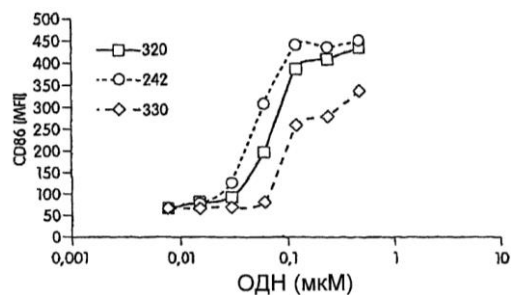
335



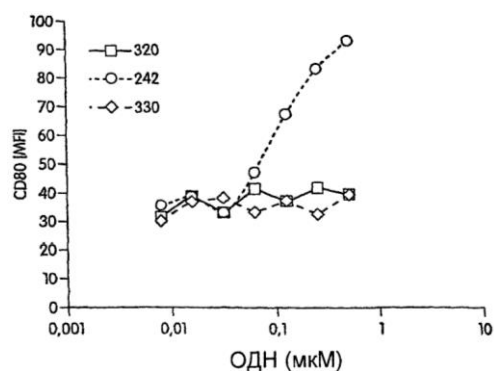
88255

336

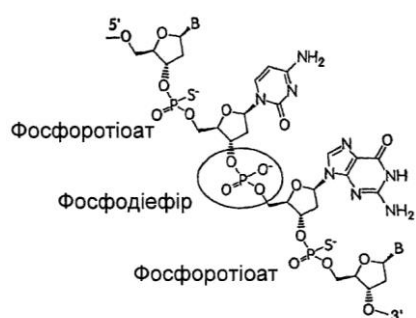




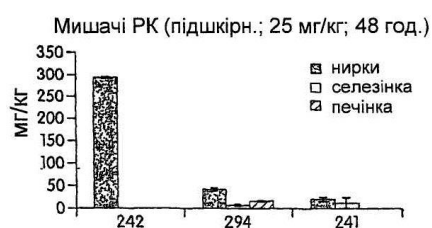
ФІГ. 20А



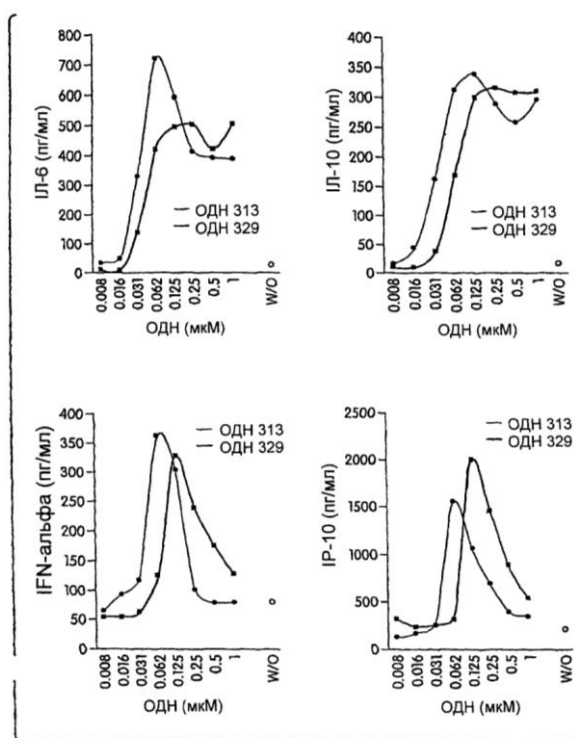
ФІГ. 20В



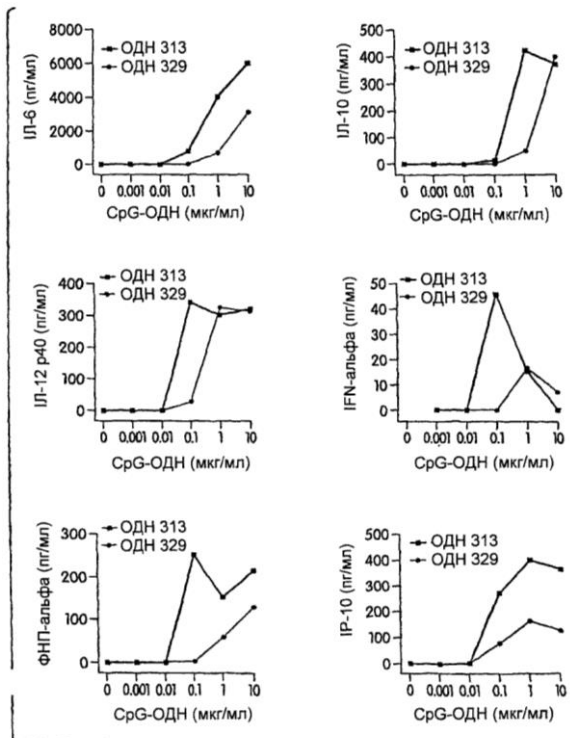
ФІГ. 21



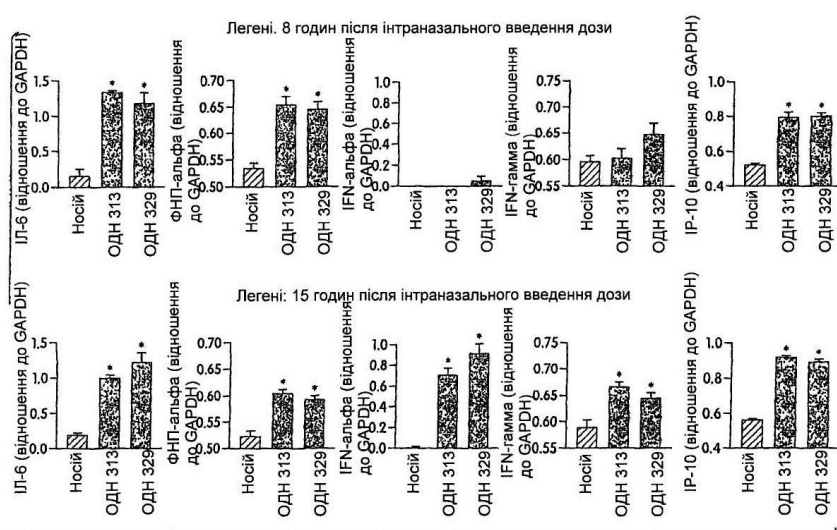
ФІГ. 22



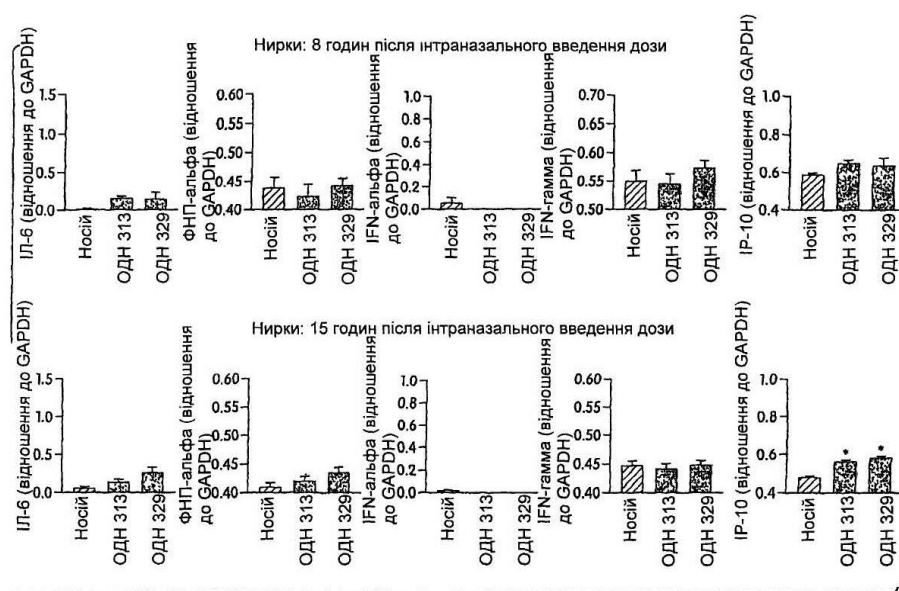
ФІГ. 23



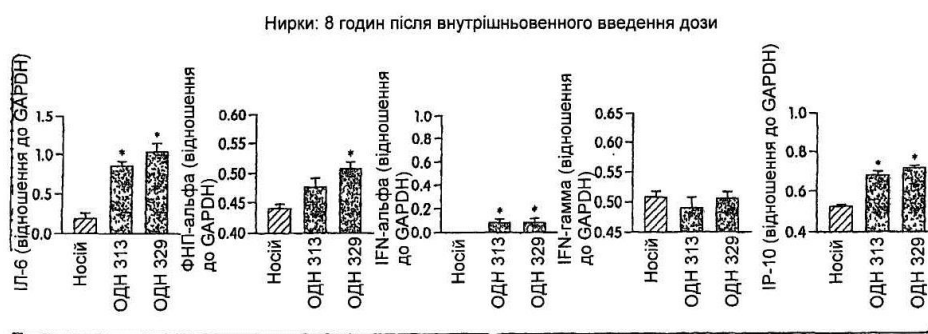
ФІГ. 24



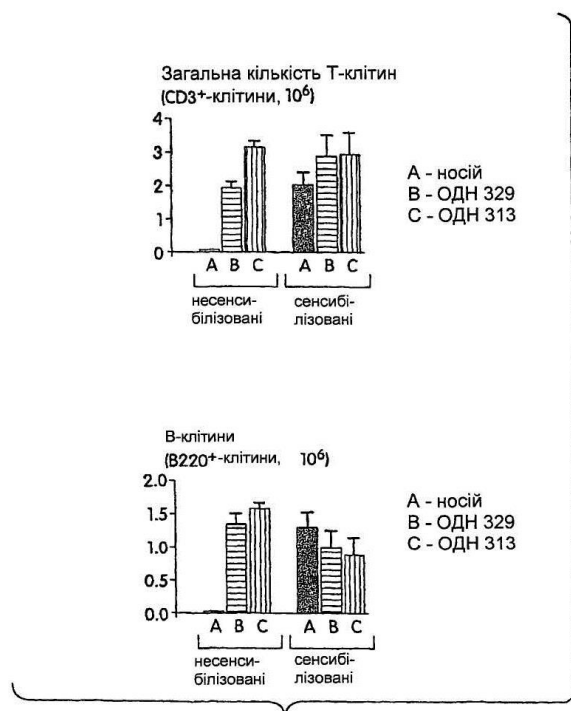
ФІГ. 25А



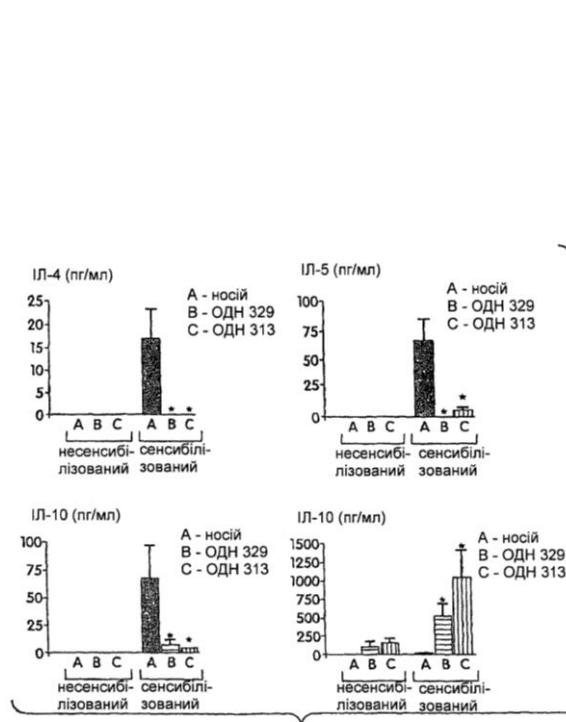
ФІГ. 25В-1



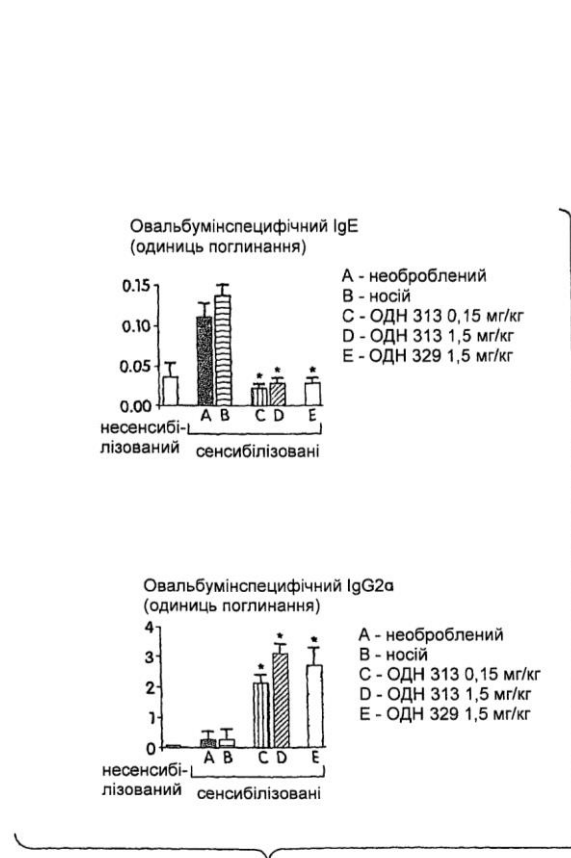
ФІГ. 25В-2



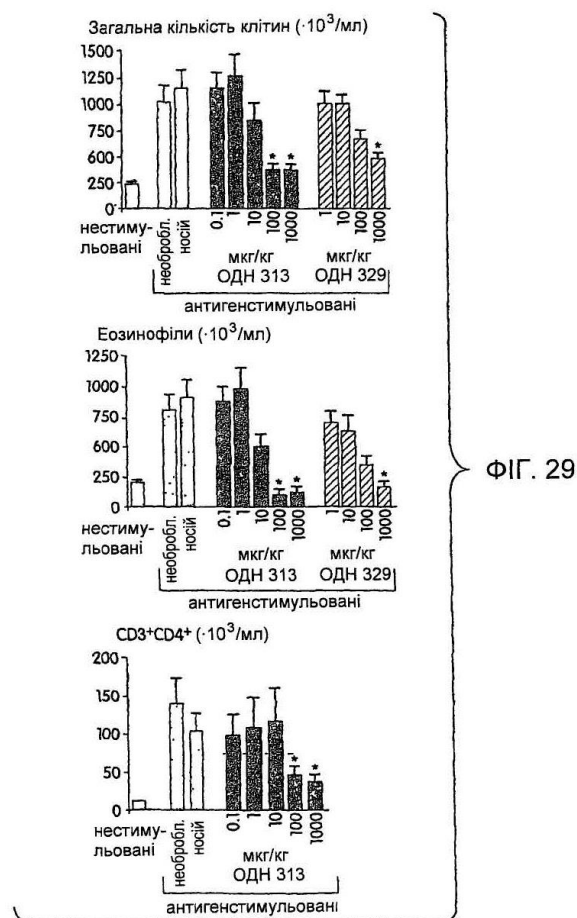
ФІГ. 26



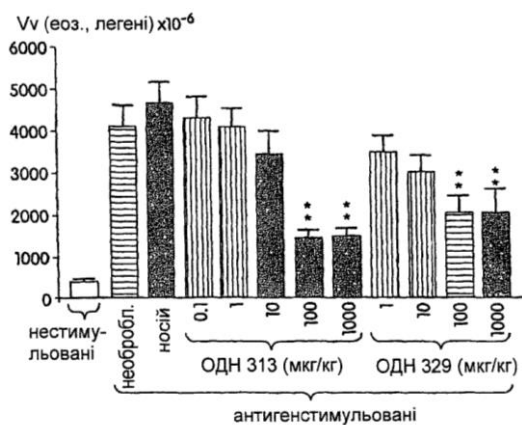
ФІГ. 27



ФІГ. 28

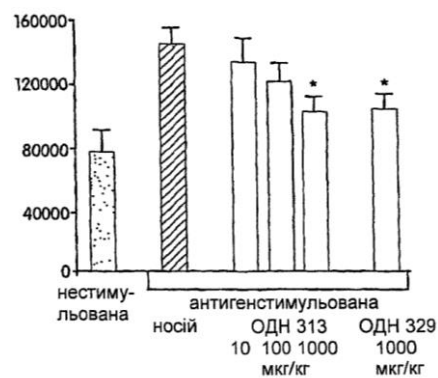


ФІГ. 29



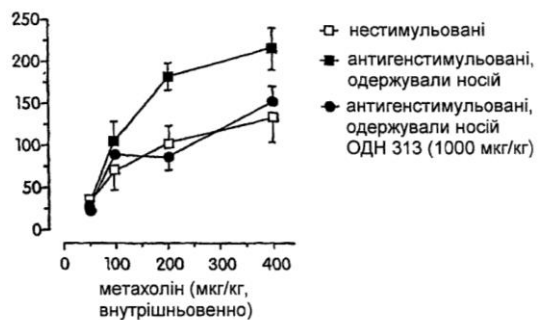
ФІГ. 30

Бронхоконстрикція у відповідь на метахолін
(площа під кривою опору дихальних шляхів)

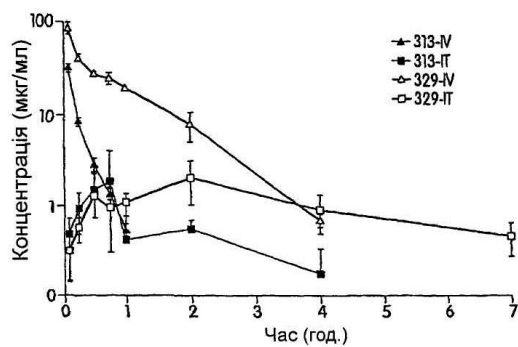


ФІГ. 31

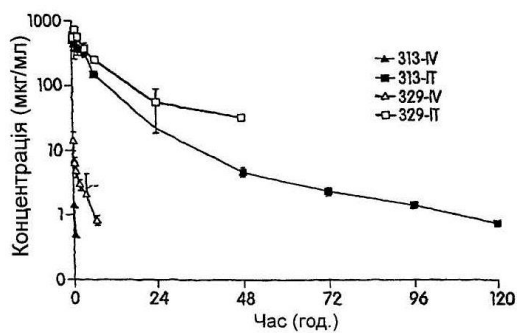
Бронхоконстрикція у відповідь на метахолін
(% збільшення опору дихальних шляхів)



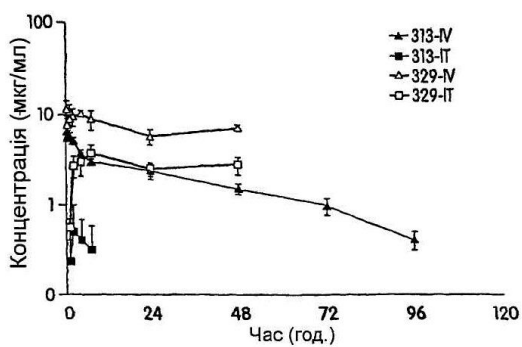
ФІГ. 32



ФІГ. 33

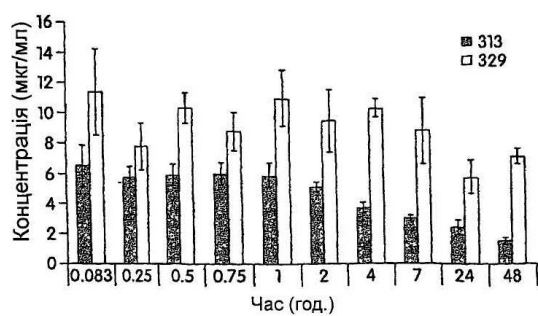


ФІГ. 34



ФІГ. 35

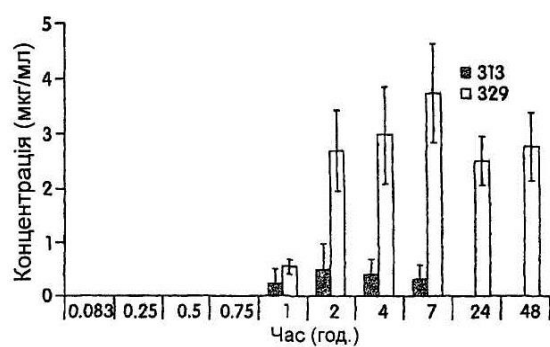
345



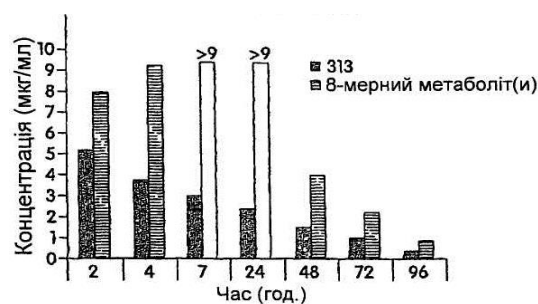
ФІГ. 36

88255

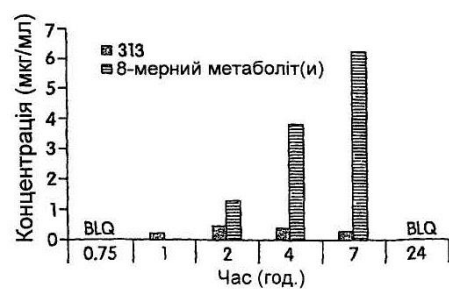
346



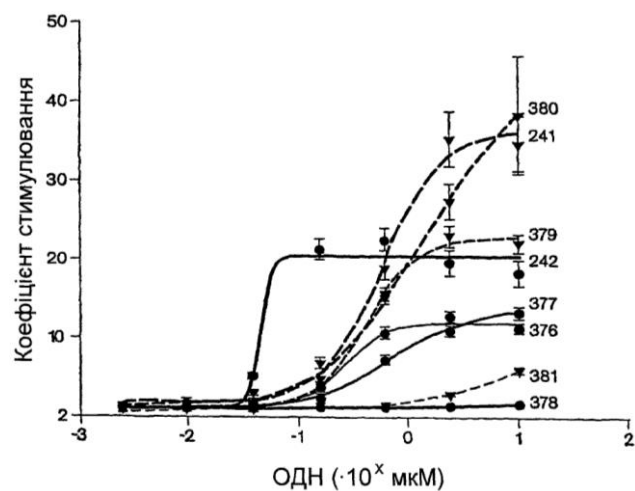
ФІГ. 37



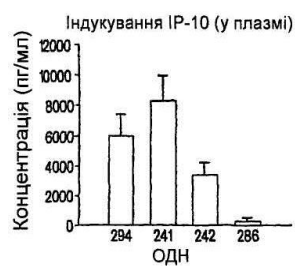
ФІГ. 38



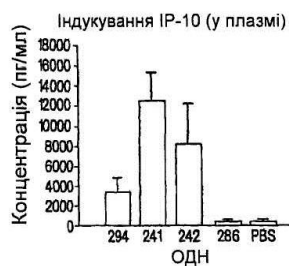
ФІГ. 39



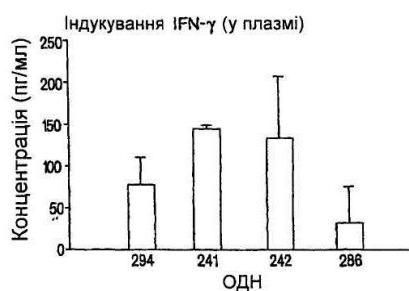
ФІГ. 40



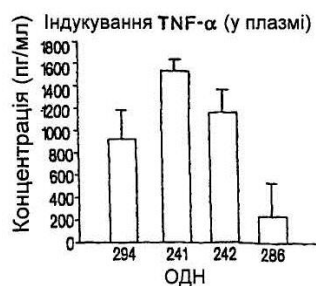
ФІГ. 41A



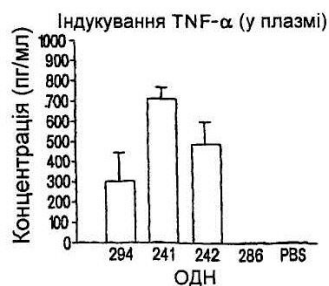
ФІГ. 41B



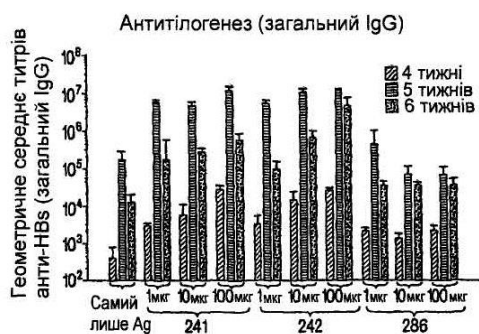
ФІГ. 41С



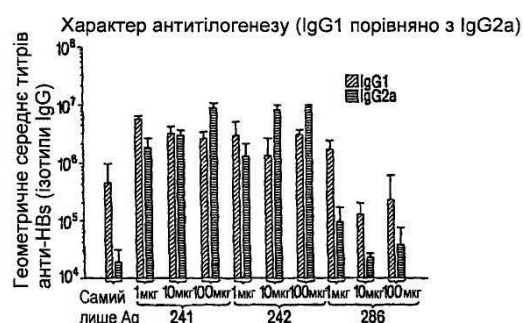
ФІГ. 41D



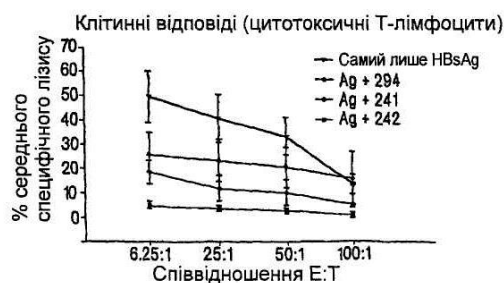
ФІГ. 41Е



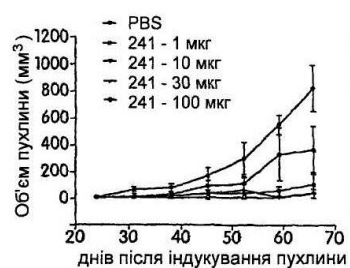
ФІГ. 42А



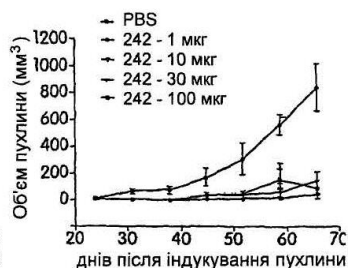
ФІГ. 42В



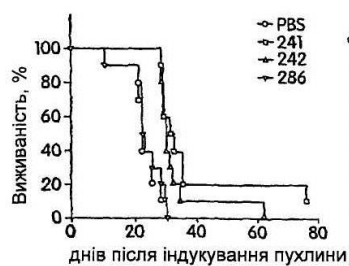
ФІГ. 42С



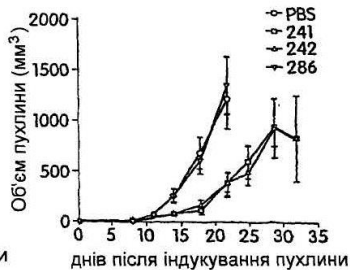
ФІГ. 43А



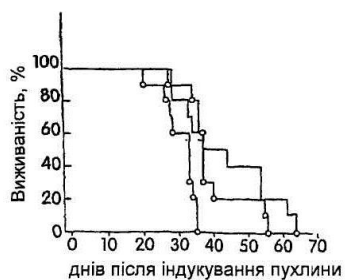
ФІГ. 43В



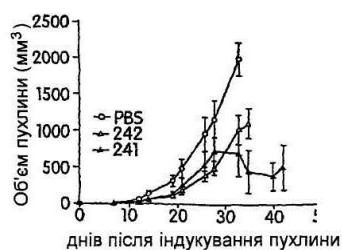
ФІГ. 43С



ФІГ. 43D



ФІГ. 43Е



ФІГ. 43F