



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102439153 B

(45) 授权公告日 2015. 07. 22

(21) 申请号 201080022634. 7

A61P 31/04(2006. 01)

(22) 申请日 2010. 03. 25

A61P 31/10(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61P 31/12(2006. 01)

61/163, 137 2009. 03. 25 US

A61P 37/04(2006. 01)

61/179, 246 2009. 05. 18 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2011. 11. 23

EP 1550458 A1, 2005. 07. 06, 第 1 栏第
[0001] 段, 第 14 栏第 [0050] 段, 第 16 栏第 [0054]
段, 第 18-19 栏第 [0058] 段.

(86) PCT国际申请的申请数据

W0 2008085549 A2, 2008. 07. 17, 全文.

PCT/US2010/028658 2010. 03. 25

陈永刚等. 脂质体喷雾剂在给药系统研究中的
应用. 《山西医药杂志》. 2006, 第 35 卷 (第 11
期), 第 983-985 页.

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/111485 EN 2010. 09. 30

(73) 专利权人 德克萨斯大学系统董事会

审查员 沈晶晶

地址 美国得克萨斯州

(72) 发明人 伯顿·迪基 迈克尔·图维姆

斯科特·埃文斯

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

公司 11227

代理人 顾晋伟 郑斌

(51) Int. Cl.

C12N 15/117(2006. 01)

A61K 38/06(2006. 01)

A61K 45/06(2006. 01)

C07K 14/705(2006. 01)

权利要求书1页 说明书53页

序列表11页 附图18页

(54) 发明名称

用于刺激哺乳动物对病原体的先天免疫抵抗力的组合物

(57) 摘要

本发明的实施方案涉及在患有微生物感染或有发生这种感染之风险的个体中治疗、抑制或减轻微生物感染的方法, 其包括向所述个体施用有效量的 TLR9 和 TLR2/6 激动剂的步骤。

1. TLR9 激动剂和 TLR2/6 激动剂用于制备在患有细菌感染或有发生或获得细菌感染之风险的个体中治疗、抑制或减轻细菌感染的药物的用途,其中所述 TLR9 激动剂是为 ODN2395 或 ODNM362 或 ODN10101 的 C 型寡脱氧核苷酸 (ODN),并且所述 TLR2/6 激动剂是 PAM2CSK4。

2. 权利要求 1 的用途,其中所述受试者已经接触了病原性细菌。

3. 权利要求 1 的用途,其中所述细菌是炭疽芽孢杆菌 (*Bacillus anthracis*)、鼠疫耶尔森氏菌 (*Yersinia pestis*)、土拉热弗朗西丝氏菌 (*Francisella tularensis*)、绿脓假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureas*)、肺炎葡萄球菌 (*Staphylococcus pneumonia*)、嗜麦芽糖寡养单胞菌 (*Staphlyococcus maltophilia*)、伯克霍尔德氏菌 (*Burholderia spp.*) 或莫拉氏菌 (*Moraxella spp.*)。

4. 权利要求 1 的用途,其中所述 TLR9 激动剂和所述 TLR2/6 激动剂配制成喷雾制剂。

5. 权利要求 1 的用途,其中所述有效量的 TLR9 激动剂和 TLR2/6 激动剂沉积在所述个体的肺中。

6. 权利要求 1 的用途,其中所述 TLR9 激动剂和所述 TLR2/6 激动剂以 0.1mg/kg 到 100mg/kg 个体体重的量施用。

7. 可药用组合物,其包含 TLR9 激动剂和 TLR2/6 激动剂、抗炎剂以及一种或多种药物赋型剂,其中所述组合物是无菌的并基本不含病原性微生物,其中所述 TLR9 激动剂是为 ODN2395 或 ODNM362 或 ODN10101 的 C 型寡脱氧核苷酸 (ODN),并且所述 TLR2/6 激动剂是 PAM2CSK4。

8. 权利要求 7 的组合物,其中所述组合物配制成用于喷雾。

用于刺激哺乳动物对病原体的先天免疫抵抗力的组合物

[0001] 本申请要求 2009 年 3 月 25 日提交的美国临时专利申请序列号 61/163, 137 和 2009 年 5 月 18 日提交的美国临时专利申请序列号 61/179, 246 的优先权, 它们均以援引方式整体并入本文。

[0002] 发明背景

[0003] I. 发明领域

[0004] 本发明一般地涉及微生物学、免疫学和抗微生物药物治疗学领域。具体而言, 本发明的组合物和方法涉及使用小分子组合物调节个体肺中的先天免疫, 以用于治疗或减轻微生物感染或侵入。

[0005] II. 发明背景

[0006] 肺对感染的易感性来自于空气交换的结构要求。为了支持换气, 人持续地将 100m² 肺表面积暴露于外界环境。肺不仅暴露于空气, 还暴露于其中所悬浮的颗粒、小液滴和病原体中。与包裹在不通透皮肤中的皮肤表面或具有厚吸附粘液层的胃肠道不同, 肺呈现出具有极小屏障防御的大环境界面。无妨碍气体扩散的需求将更大的屏障排除在外。

[0007] 尽管其结构脆弱, 但肺一般能通过多种机械、体液和细胞机制成功地防御感染 (Knowles 等, 2002 ; Martin 和 Frevert, 2005 ; Rogan, 等, 2006 ; Travis, 等, 2001) ; (Mizgerd, 2008 ; Bals 和 Hiemstra, 2004 ; Bartlett 等, 2008 ; Hiemstra, 2007 ; Hippenstiel 等, 2006 ; Schutte 和 McCray, 2002)。大多数被吸入的微生物病原体由于嵌入到气道壁中而不能穿透至肺泡, 它们由于粘液而滞留在气道壁, 然后通过粘液纤毛升降机系统 (mucociliary escalator system) 排出 (Knowles 等, 2002)。对于逃脱该命运的那些病原体, 气道内壁流体中抗微生物肽的组成型存在限制了它们的生长 (Rogan, 等, 2006 ; Travis, 等, 2001)。位于空气腔最远端的肺泡巨噬细胞能够摄取这些生物体, 由此清理肺以防止可能的感染。

[0008] 尽管经常被认为是被动气体交换的屏障, 但气道和肺泡上皮在遇到病原体刺激时通过发生重大的局部结构和功能改变而为基础肺部防御提供补充。应答于病毒、真菌或变应性炎症, 气道分泌细胞迅速提高其高度并在其顶端细胞质中充入分泌性颗粒, 该过程称为炎性化生 (inflammatory metaplasia) (Evans 等, 2004 ; Williams 等, 2006)。在病原体存在下, 肺泡上皮激活其质膜系统和分泌机器, 由此使白细胞参与肺部保护 (Evans 等, 2005)。可能最重要的是, 与呼吸道上皮模式识别受体的微生物相互作用使得许多微生物产物表达在气道内壁流体中, 包括防御素、cathelicidins、溶菌酶和活性氧簇 (Rogan 等, 2006 ; Forteza 等, 2005 ; Akinbi 等, 2000 ; Bals 和 Hiemstra, 2004 ; Bals 和 Hiemstra, 2006)。应注意的是, 肺炎 (细菌性的或病毒性的) 是全世界范围内的感染致死的首要原因。

[0009] 存在对抑制和 / 或治疗微生物感染的其他方法和组合物的需要。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明提供刺激先天抵抗力 (受激先天抵抗力 (Stimulated Innate Resistance, StIR)) 的组合物和使用此类组合物刺激 StIR 的方法。在某些实施方案中, StIR 是肺的 StIR。本发明的一方面提供更高的治疗 / 毒性比值或指数。本发明的一些实施方案包括用

于增强哺乳动物（例如人）受试者对感染的生物防御（例如受试者对感染的免疫力）的组合物、制剂和方法。在某些方面，本发明的组合物以有效量沉积在个体的肺中。本发明的一些方面提供针对微生物感染快速且暂时性的生物防御增强或放大。受试者免疫力的增强减轻了微生物感染。减轻可以是通过感染或微生物生长或存活的抑制、治疗或预防来实现的。本发明的一些方面增强了受试者肺和呼吸道的防御。

[0012] 在某些方面，考虑在患有微生物感染或具有发生该感染之风险的个体中治疗、抑制或减轻微生物感染的方法，所述方法包括施用有效量的 StIR 组合物，所述组合物包含一种或多种先天性受体 (innate receptor) 的一种或多种配体。已经鉴定了许多先天性受体，其包括但不限于 Toll 样受体 (TLR)、C 型凝集素受体 (CLR) 和核苷酸结合寡聚化结构域样受体 (Nod 样受体或 NLR)。TLR 是在先天免疫系统中起关键作用的一类蛋白质。它们是单次跨膜的非催化性受体，其识别来自微生物的结构上保守的分子。一旦这些微生物存在于皮肤或肠道、肺和泌尿生殖道粘膜上或存在于其中，它们即被 TLR 识别，激活免疫细胞应答。有趣的是，当单独施用，许多这些 TLR 激动剂不诱导显著的 StIR。通常，使用本文所述方法治疗的个体或受试者已经接触病原性微生物或具有这种接触的风险。

[0013] 某些实施方案涉及能够向呼吸道施用的组合物，以及使用这些组合物的方法，所述组合物包含 1、2、3、4 种或更多种 TLR 激动剂。所述 TLR 激动剂选自 TLR2/1、TLR2/6、TLR3、TLR4、TLR5、TLR9 或 TLR7 激动剂。在某些方面，所述 TLR 激动剂选自 TLR9 和 TLR2/6 激动剂。在另一方面，所述 TLR 激动剂选自 TLR5 激动剂。在又一方面，TLR5 激动剂可与 TLR2/6、TLR4、TLR9 或 TLR7 激动剂组合使用。在某些方面，TLR9 激动剂可与 TLR2/6、TLR4、TLR5 或 TLR7 组合使用。在另一方面，TLR2/6 激动剂可与 TLR4、TLR5、TLR9 或 TLR7 激动剂组合使用。在某些方面，TLR4 激动剂可与 TLR2/6、TLR5、TLR9 或 TLR7 激动剂组合使用。在另一方面，TLR7 激动剂可与 TLR2/6、TLR4、TLR5 或 TLR9 激动剂组合使用。在又一方面，任何这些两两组合可包括选自 TLR2/6、TLR4、TLR5、TLR9 或 TLR7 激动剂的第三种或第四种或第五种 TLR 激动剂。

[0014] 某些实施方案涉及治疗、抑制或减轻微生物感染的方法，其包括向患有微生物感染或者有发生或获得微生物感染之风险的个体施用有效量的 TLR9 激动剂和 TLR2/6 激动剂。在某些方面，所述 TLR2/6 激动剂是 PAM2CSK4。在另一方面，所述 TLR9 激动剂是 C 型寡聚脱氧核苷酸 (oligodeoxynucleotide, ODN)。C 型 ODN 可包括但不限于 ODN2395 或 ODNM362 或 ODN10101 或另一 C 型 ODN 或其类似物。在某些方面，受试者已经接触病原性微生物或有接触病原性微生物的风险。所述微生物可以是病毒、细菌或真菌。

[0015] 在另一些方面，以喷雾制剂施用所述 TLR9 激动剂和 TLR2/6 激动剂。以约 0.1、1、5、10、50 μg 或 mg/kg 至约 5、10、50、100 μg 或 mg/kg 个体体重（包括其间的所有数值和范围）的量施用所述 TLR9 激动剂和 / 或 TLR2/6 激动剂。

[0016] 某些实施方案涉及可药用组合物，其包含 TLR9 激动剂和 TLR2/6 激动剂、抗炎剂和一种或多种药物赋型剂，其中所述组合物是无菌的并基本上不含病原性微生物。在某些方面，所述 TLR2/6 激动剂是 PAM2CSK4。在另一方面，所述 TLR9 激动剂是 C 型寡聚脱氧核苷酸 (ODN)。C 型 ODN 可包括但不限于 ODN2395 或 ODNM362 或 ODN10101。

[0017] 在某些方面，所述 StIR 组合物包含鞭毛蛋白多肽或其区段或衍生物，所述鞭毛蛋白多肽包含称为 TLR5 激动剂的肽 QRLSTGSRINSKDDAAGLQIA (SEQ ID NO:2) 的 10、11、12、

13、14、15、16、17、18、19、20、21 或 22 个连续氨基酸。本发明的多肽也可包含与 SEQ ID NO : 2 具有至少 70、80 或 90% (包括其间所有值和范围) 同一性的氨基酸序列。在另一些方面, 鞭毛蛋白是合成的和 / 或纯化的或分离的鞭毛蛋白多肽或肽。术语“纯化的”或“分离的”表示该组分是之前从其他蛋白质或合成反应物或副产物中分离或纯化的, 并且所述组分在配制到组合物中之前的纯度为至少约 95%。在某些实施方案中, 所述纯化或分离的组分的纯度约为或至少约为 80、95、96、97、98、99、99.1、99.2、99.3、99.4、99.5% 或更高, 或其中可导出的任何范围。然后可将这种纯化的组分与其他组分混和, 以形成本文所述的组合物。

[0018] 重组鞭毛蛋白或其片段或区段包含 SEQ ID NO :2 或其他鞭毛蛋白多肽的 5、10、15、20、21、22、23、24、25、30、35、40、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、200、250、300、350 或 400 个连续氨基酸, 包括其间所有值和范围。这些片段或区段与 SEQ ID NO :2 或其他鞭毛蛋白多肽具有至少、至多或约 70、75、80、85、90、95、96、97、98、99 或 100% 的同一性。在某些方面, 鞭毛蛋白多肽或区段与 SEQ ID NO :2 的序列具有至少 75% 的同一性。在另一方面, 鞭毛蛋白多肽或区段与 SEQ ID NO :2 的序列具有至少 80% 的同一性。在另一方面, 鞭毛蛋白多肽或区段与 SEQ ID NO :2 的序列具有至少 85% 的同一性。在另一方面, 鞭毛蛋白多肽或区段与 SEQ ID NO :2 的序列具有至少 90% 的同一性。在另一方面, 鞭毛蛋白多肽或区段与 SEQ ID NO :2 的序列具有至少 95% 的同一性。鞭毛蛋白或其区段的衍生物或变体包括对 SEQ ID NO :2 的插入、缺失和点突变。一种特定的插入突变是融合蛋白, 其在羧基端或氨基端包含对鞭毛蛋白而言是外源的氨基酸序列。许多鞭毛蛋白为本领域所知, 包括但不限于以下登录号的鞭毛蛋白 BAB58984(gi | 14278896) ; YP_001330159(gi | 150402865) ; YP_001323483(gi | 150399716) ; CAA28975(gi | 1333716) ; CAA02137(gi | 1567895) ; CAA67105(gi | 1580779) ; AAR10473(gi | 38049688) ; CAR58992(gi | 197093531) ; YP_001217666(gi | 147675484) ; CAL12564(gi | 122089712) ; BAD14977(gi | 46093563) ; 或 CAD05707(gi | 16503200), 均以援引方式将其在本申请优先权日期时的内容整体并入本文。

[0019] 本发明的一些实施方案可通过呼吸道施用。本发明的方法包括通过吸入或其他给药方法向上呼吸道和 / 或下呼吸道施用组合物。在某些方面, 通过吸入进行施用。在某些方面, 所述 StIR 组合物在喷雾剂或气雾剂中施用。在另一方面, 所述组合物是气雾化的或喷雾化的, 或是可以被吸入或滴入受试者中的形式。所述组合物可通过吸入或吸气施用。可以约 0.01、0.05、0.1、0.5、1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70 μ g 或 mg/kg 至约 55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、200 μ g 或 mg/kg 个体体重的量施用所述 StIR 组合物, 包括单独的或凝集的 TLR 激动剂。在另一些方面, 可向受试者施用约 0.01、0.05、0.1、0.5、1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、200 μ g 或 mg 的 StIR 或每种 TLR 激动剂或全部 TLR 激动剂。所述受试者可以是有接触吸入的病毒、细菌或真菌的风险, 或者已经接触吸入的病毒、细菌或真菌。又一实施方案包括这样的方法, 其中在接触或疑似接触生物体或者接触生物体的风险提高之前 ; 之后 ; 过程中 ; 之前和之后 ; 之前和过程中 ; 过程中和之后 ; 之前、之后和过程中施用所述组合物。所述受试者可接触生物武器或条件性病原体。在一些特定方面中, 受试者是免疫受损的, 如癌症患者或 AIDS 患者。

[0020] 在又一实施方案中, 本发明涉及可药用组合物, 其包含一种或多种 TLR 激动剂 ; 抗炎剂 ; 抗微生物剂 ; 和 / 或一种或多种药物赋型剂。通常, 此类组合物是无菌的, 并且基本上

不含病原性微生物。

[0021] 在某些方面,所治疗的或针对其进行保护的病原性或潜在病原性微生物是病毒、细菌和 / 或真菌。在某些方面,微生物是病毒。病毒可来自腺病毒科 (Adenoviridae)、冠状病毒科 (Coronaviridae)、丝状病毒科 (Filoviridae)、黄病毒科 (Flaviviridae)、嗜肝 DNA 病毒科 (Hepadnaviridae)、疱疹病毒科 (Herpesviridae)、正粘病毒科 (Orthomyxoviridae)、副粘病毒科 (Paramyxovirinae)、肺病毒亚科 (Pneumovirinae)、小核糖核酸病毒科 (Picornaviridae)、痘病毒科 (Poxviridae)、逆转录病毒科 (Retroviridae) 或披膜病毒科 (Togaviridae) 的病毒;和 / 或副流感病毒 (Parainfluenza)、流感病毒 (Influenza)、H5N1、马尔堡病毒 (Marburg)、埃博拉病毒 (Ebola)、严重急性呼吸器官综合征冠状病毒、黄热病病毒、人呼吸道合胞体病毒、汉坦病毒 (Hantavirus) 或痘苗病毒。

[0022] 在又一方面,所治疗的或针对其进行保护的病原性或潜在病原微生物是细菌。细菌可以是胞内细菌、革兰氏阳性菌或革兰氏阴性菌。在另一方面,所述细菌包括但不限于葡萄球菌 (*Staphylococcus*)、芽孢杆菌 (*Bacillus*)、弗朗西丝氏菌 (*Francisella*) 或耶尔森氏菌 (*Yersinia*)。在又一方面,所述细菌是炭疽芽孢杆菌 (*Bacillus anthracis*)、鼠疫耶尔森氏菌 (*Yersinia pestis*)、土拉热弗朗西丝氏菌 (*Francisella tularensis*)、绿脓假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 或金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)。在某些实施方案中,细菌是炭疽芽孢杆菌和 / 或金黄色葡萄球菌。在又一方面,所述细菌是药物抗性菌,如多药物抗性金黄色葡萄球菌 (multiple drug resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)。代表性的医学相关性革兰氏阴性菌包括流感嗜血杆菌 (*Hemophilus influenzae*)、肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、嗜肺性军团病杆菌 (*Legionella pneumophila*)、绿脓假单胞菌、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、奇异变形菌 (*Proteus mirabilis*)、阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*)、粘质沙雷菌 (*Serratia marcescens*)、幽门螺旋杆菌 (*Helicobacter pylori*)、肠炎沙门氏菌 (*Salmonella enteritidis*) 和伤寒沙门菌 (*Salmonella typhi*)。代表性革兰氏阳性菌包括但不限于芽孢杆菌、李斯特菌 (*Listeria*)、葡萄球菌、链球菌 (*Streptococcus*)、肠球菌 (*Enterococcus*)、放线菌 (*Actinobacteria*) 和梭菌 (*Clostridium*)、缺少细胞壁并且不能革兰氏染色的支原体 (*Mycoplasma*), 包括来自这些形式的那些细菌。

[0023] 在又一方面,所治疗的或针对其进行保护的病原性或潜在病原性微生物是真菌,如曲霉 (*Aspergillus*)、假丝酵母 (*Candida*)、隐球菌 (*Cryptococcus*)、组织胞浆菌 (*Histoplasma*)、球孢子菌 (*Coccidioides*)、芽生菌 (*Blastomyces*)、肺囊虫 (*Pneumocystis*) 或接合菌 (*Zygomycetes*) 类的成员。在又一其他实施方案中,真菌包括但不限于烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*)、白色假丝酵母 (*Candida albicans*)、新型隐球菌 (*Cryptococcus neoformans*)、荚膜组织胞浆菌 (*Histoplasma capsulatum*)、粗球孢子菌 (*Coccidioides immitis*) 或卡氏肺囊虫 (*Pneumocystis carinii*)。接合菌类包括蛙粪霉目 (Basidiobolales) (蛙粪霉科 (Basidiobolaceae))、双珠霉目 (Dimargaritales) (双珠霉科 (Dimargaritaceae))、内囊霉目 (Endogonales) (内囊霉科 (Endogonaceae))、虫霉目 (Entomophthorales) (新月霉科 (Ancylistaceae)、蕨霉科 (Completoiriaceae)、虫霉科 (Entomophthoraceae)、顶裂霉科 (Meristacraceae)、新接霉科 (Neozygitaceae))、梳霉目 (Kickxellales) (梳霉科 (Kickxellaceae))、被孢霉目 (Mortierellales) (被孢

霉科 (Mortierellaceae))、毛霉菌目 (Mucorales) 和捕虫菌目 (Zoopagales)。曲霉类包括但不限于浅蓝灰曲霉 (*Aspergillus caesiellus*)、亮白曲霉 (*A. candidus*)、肉色曲霉 (*A. carneus*)、棒曲霉 (*A. clavatus*)、弯头曲霉 (*A. deflectus*)、黄曲霉 (*A. flavus*)、烟曲霉 (*A. fumigatus*)、灰绿曲霉 (*A. glaucus*)、构巢曲霉 (*A. nidulans*)、黑曲霉 (*A. niger*)、赭曲霉 (*A. ochraceus*)、米曲霉 (*A. oryzae*)、寄生曲霉 (*A. parasiticus*)、帚状 (*A. penicilloides*)、局限曲霉 (*A. restrictus*)、酱油曲霉 (*A. sojae*)、萨氏曲霉 (*A. sydowi*)、*A. tamari*、土曲霉 (*A. terreus*)、焦曲霉 (*A. ustus*)、杂色曲霉 (*A. versicolor*) 等。假丝酵母家族包括但不限于白色假丝酵母、杜氏假丝酵母 (*C. dubliniensis*)、光滑假丝酵母 (*C. glabrata*)、高里假丝酵母 (*C. guilliermondii*)、乳酒假丝酵母 (*C. kefir*)、克柔假丝酵母 (*C. krusei*)、葡萄牙假丝酵母 (*C. lusitaniae*)、*C. milleri*、*C. oleophila*、近平滑假丝酵母 (*C. parapsilosis*)、热带假丝酵母 (*C. tropicalis*)、产朊假丝酵母 (*C. utilis*) 等。

[0024] 在某些方面,病原菌是胞内细菌、革兰氏阳性菌或革兰氏阴性菌。在某些实施方案中,所述细菌是链球菌、葡萄球菌、芽孢杆菌、弗朗西丝氏菌或耶尔森菌。在又一些方面中,所述细菌是炭疽芽孢杆菌、鼠疫耶尔森氏菌、土拉热弗朗西丝氏菌、肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、金黄色葡萄球菌、绿脓假单胞菌和 / 或洋葱伯克霍尔德菌 (*Burkholderia cepacia*)。

[0025] 用于权利要求书和 / 或说明书时,术语“减轻”、“抑制”、“降低”或“防止”或这些术语的任何变型包括任何可测量的降低或完全抑制,以得到想要的结果,例如接触后的微生物负荷或生长减少。

[0026] 在权利要求书和 / 或说明书中与术语“包含”结合使用时,无数量词修饰的名词可以指一个 / 种,但也与“一个 / 种或多个 / 种”、“至少一个 / 种”和“一个 / 种或多于一个 / 种”的意思一致。

[0027] 本文讨论的任何实施方案可用本发明的任何方法或组合物来实施,反之亦然。此外,本发明的组合物和药盒可用于实现本发明的方法。

[0028] 在本申请中,术语“约”用于表示数值,包括用于测定该值的装置或方法的误差的标准差。

[0029] 权利要求中的术语“或”的使用用于表示“和 / 或”,除非明确地表明仅指备选方案或者备选方案是互斥的,但本公开内容支持仅指备选方案和“和 / 或”的定义。在包括“和 / 或”、“或”或者“和”的某些列举中,一个或多个所列成员可以明确地从所述列举中排除在外。

[0030] 如本说明书和权利要求中所用,词语“包含”、“具有”、“包括”或“含有”是包括式或开放式的,并且不排除其他未提及的要素或方法步骤。

[0031] 本发明的其他目标、特征和优势会从以下详细描述中变得更为明显。然而应理解,详细描述和具体实施例尽管表明了本发明的特定实施方案,但它们仅用于说明目的,因为基于该详细说明,本发明精神和范围内的多种改变和修改对本领域技术人员来说是很明显的。

[0032] 附图描述

[0033] 以下附图形成本说明书的一部分,并且为进一步说明本发明的某些方面而包括在内。通过参考这些附图中的一个或多个并结合本文呈现的对具体实施方案的详细说明,可

以更好地理解本发明。

[0034] 图 1. 天然内毒素 (TLR4 激动剂) 诱导一定的 StIR。在用 NTHi 溶胞产物 (“NTHi sup”)、NTHi 溶胞产物中的估计 LPS 浓度 (“内毒素 1x”)、认为溶胞产物中 LPS 的 10 倍 (“内毒素 10x”) 处理或不处理 24 小时后, 用肺炎链球菌 (5×10^{10} CFU/ml) 攻击野生型 Swiss-Webster 小鼠 (10 只 / 组)。

[0035] 图 2. 合成的六酰基化脂质 A (TLR4 激动剂) 不诱导 StIR。在用绿脓假单胞菌攻击前 24 小时, 用合成的脂质 A 悬液或 PBS 处理野生型 Swiss-Webster 小鼠 (8 只 / 组)。

[0036] 图 3. 显示了在用绿脓假单胞菌进行感染性攻击前 24 小时, 用高剂量或低剂量的咪喹莫特 (TLR7 激动剂) 或 PBS 处理 Swiss-Webster 小鼠 (8 只 / 组) 的代表性实验。

[0037] 图 4. 仅有 TLR9 刺激时诱导极小的保护。在用吸入的绿脓假单胞菌感染前 24 小时, 用 PBS 或 ODN2395 处理野生型 Swiss-Webster 小鼠 (8 只 / 组)。

[0038] 图 5. 利用 TLR2/6 激动剂进行的高剂量处理诱导了 StIR。在用绿脓假单胞菌感染前 24 小时, 用高剂量或低剂量的 Pam2CSK4 或 PBS 处理野生型 Swiss-Webster 小鼠。

[0039] 图 6. TLR 激动剂的组合比任何单独激动剂诱导更强的 StIR。用 ODN2395 (20 μ g/ml, 8 只小鼠)、Pam2CSK4 (20 μ g/ml, 8 只小鼠)、两种激动剂 (10 只小鼠) 或 PBS (10 只小鼠) 处理野生型 Swiss-Webster 小鼠。

[0040] 图 7. 合成的鞭毛蛋白片段 (TLR5 激动剂) 诱导 StIR。在用绿脓假单胞菌感染前 24 小时, 将鞭毛蛋白的 22 个氨基酸高保守性区段或仅有 PBS 雾化到野生型 Swiss-Webster 中。

[0041] 图 8. 甲型流感病毒 /HK 肺合并物 11-29-05 气雾剂感染对体重的影响: 一次 30 分钟气雾剂处理; 流感病毒剂量: ~ 100 倍 TCID₅₀/ 小鼠。体重开始时随感染的发展而下降, 反映了疾病的严重程度, 然后在恢复过程中上升。

[0042] 图 9. 甲型流感病毒 /HK 肺合并物 11-29-05 气雾剂感染对存活的影响: 一次 30 分钟气雾剂处理; 流感病毒剂量: ~ 100 倍 TCID₅₀/ 小鼠。

[0043] 图 10. 展示了 ODN/PAM2/PolyIC 的一次 30 分钟气雾剂预处理对感染甲型流感病毒 /HK 气雾剂的小鼠存活的影响; 病毒剂量 ~ 130 倍 TCID₅₀/ 小鼠。

[0044] 图 11. 甲型流感病毒 /HK 肺合并物 11-29-05 气雾剂感染对体重的影响: 一次 30 分钟气雾剂处理; 流感病毒剂量: ~ 100 倍 TCID₅₀/ 小鼠。体重开始时随感染的发展而下降, 反映了疾病的严重程度, 然后在恢复过程中上升。

[0045] 图 12A 和 12B. 细菌溶胞产物诱导的肺炎抵抗力需要的是 MyD88 (而不是 TRIF) 信号转导。图 12A. 在之前 24 小时用不可分型流感嗜血杆菌 (NTHi) 的雾化溶胞产物预处理或不进行预处理的情况下, 用绿脓假单胞菌吸入攻击 Myd88^{-/-} 和野生型小鼠。左, 存活 (N = 10 只小鼠 / 组, *p < 0.0001)。右, 感染后立即出现的肺细菌负荷 (右, N = 3 只小鼠 / 组, **p < 0.004. †p = 0.39 相对于野生型对照)。图 12B. 用细菌溶胞产物预处理或不预处理的情况下, Trif^{-/-} 小鼠的绿脓假单胞菌攻击。左, 存活 (N = 10 只小鼠 / 组, *p < 0.0001)。右, 感染后立即出现的肺细菌负荷 (右, N = 3 只小鼠 / 组, *p < 0.0001)。

[0046] 图 13. 所诱导的病原体杀伤在白细胞介素-1 受体缺陷型小鼠中不受损。在用绿脓假单胞菌攻击前 24 小时, 用气雾化的 PBS 或不可分型流感嗜血杆菌 (NTHi) 处理 Il1r^{-/-} 和野生型小鼠。所显示的是感染后立即出现的肺匀浆的细菌负荷。(N = 3 只小鼠 / 组, *p =

0.001 相对于野生型 +PBS, $^{**}p = 0.01$ 相对于 $I11r^{-/-}$, $^{\dagger}p = 0.66$ 相对于野生型 +PBS, $^{\ddagger}p = 0.89$ 相对于野生型 +NTHi)。

[0047] 图 14. 用单一合成 TLR 配体处理后支气管肺泡灌洗液中的白细胞计数。用 PBS 或以下 TLR 配体之一处理 24 小时后, 对小鼠进行 BAL : Pam3CSK4 (TLR2/1 激动剂, $1 \mu\text{g/ml}$ 、 $3 \mu\text{g/ml}$ 、 $10 \mu\text{g/ml}$)、Pam2CSK4 (TLR2/6 激动剂, $1 \mu\text{g/ml}$ 、 $3 \mu\text{g/ml}$ 、 $10 \mu\text{g/ml}$)、Poly (I:C) (TLR3 激动剂, $1 \mu\text{g/ml}$ 、 $10 \mu\text{g/ml}$ 、 $100 \mu\text{g/ml}$)、合成的脂质 A (MPLA, TLR4 激动剂, $1 \mu\text{g/ml}$ 、 $10 \mu\text{g/ml}$ 、 $100 \mu\text{g/ml}$)、Flg22 (合成的 22-mer 鞭毛蛋白, TLR5 激动剂, $10 \mu\text{g/ml}$ 、 $100 \mu\text{g/ml}$ 、 $1000 \mu\text{g/ml}$)、咪喹莫特 (TLR7 和 TLR8, $100 \mu\text{g/ml}$ 、 $300 \mu\text{g/ml}$ 、 $1000 \mu\text{g/ml}$) 或 ODN2395 (TLR9 激动剂, $2 \mu\text{g/ml}$ 、 $20 \mu\text{g/ml}$)。所显示的是 BAL 液内的嗜中性粒细胞 (黑色条) 和巨噬细胞 (灰色条)。

[0048] 图 15A-15G. 利用单一合成 TLR 配体进行雾化处理不诱导高水平的肺炎抵抗力。用 PBS 或以下合成 TLR 配体处理 (8ml 喷雾, 在 20 分钟中施用) 之后 24 小时, 利用绿脓假单胞菌攻击野生型小鼠 : 图 15A. TLR2/1 激动剂 Pam3CSK4 $100 \mu\text{g/ml}$, 图 15B. TLR2/6 激动剂 Pam2CSK4 $10 \mu\text{g/ml}$, 图 15C. TLR3 激动剂 poly (I:C) $100 \mu\text{g/ml}$, 图 15D. TLR4 激动剂 MPLA $100 \mu\text{g/ml}$, 图 15E. TLR5 激动剂 Flg22 $100 \mu\text{g/ml}$, 图 15F. TLR7 和 TLR8 激动剂咪喹莫特 1mg/ml , 或图 15G. TLR9 激动剂 ODN 2395 $20 \mu\text{g/ml}$ 。存活曲线是处理和未处理小鼠的至少三组不同实验的代表性实例 ($N = 8$ 只小鼠 / 组, $^*p = 0.5$, $^{**}p = 1.0$, $^{\dagger}p = 0.47$, $^{\ddagger}p = 0.2$)。

[0049] 图 16A-16C. TLR2/6 和 TLR9 激动剂协作诱导针对细菌性肺炎的抵抗力。图 16A. 左, 用 PBS、Pam2CSK4 $10 \mu\text{g/ml}$ 、ODN 2395 $20 \mu\text{g/ml}$ 、组合、或双倍剂量的组合处理后 24 小时, 用绿脓假单胞菌攻击的小鼠的存活 ($N = 6$ 只小鼠 / 组, $^{\ddagger}p = 0.008$ 相比于 PBS)。右, 绿脓假单胞菌感染后立即产生的肺匀浆的细菌负荷 ($N = 3$ 只小鼠 / 组, $\#p = 0.045$ 相比于 PBS, $\#\#p = 0.030$ 相比于 PBS)。图 16B. 左, 用 PBS、Pam2CSK4 $10 \mu\text{g/ml}$ 、ODN 2395 $20 \mu\text{g/ml}$ 、组合或双倍剂量组合处理后 24 小时, 用肺炎链球菌攻击的小鼠的存活 ($N = 10$ 只小鼠 / 组, $^{\ddagger}p < 0.0001$ 相比于 PBS 处理)。右, 肺炎链球菌感染 2×10^{10} 后立即产生的肺匀浆的细菌负荷 ($N = 3$ 只小鼠 / 组, $^{\dagger}p < 0.001$, $^{\ddagger}p < 0.0001$)。图 16C. PBS、Pam2CSK4 $10 \mu\text{g/ml}$ 、ODN2395 $20 \mu\text{g/ml}$ 或者 Pam2CSK4 与 ODN2395 的组合处理后 4 或 24 小时, 来自小鼠的 BAL 细胞计数 ($N = 3$ 只小鼠 / 组, $^*p = 0.016$ 相比于 PBS, $^{**}p < 0.0001$ 相比于 PBS, $^{\dagger}p = 0.041$ 相比于仅有 Pam2)。

[0050] 图 17A-17F. 并非所有的 TLR 激动剂组合都提供针对肺炎的显著保护。利用 PBS 或以下 TLR 激动剂组合处理后 24 小时, 用绿脓假单胞菌攻击野生型小鼠 : 图 17A. Pam2CSK4 和 poly (I:C), 图 17B. Pam2CSK4 和 Flg22, 图 17C. Pam2CSK4 和咪喹莫特, 图 17D. ODN2395 和 poly (I:C), 图 17E. ODN239 和 Flg22, 图 17F. ODN2395 和 Pam3CSK4。存活曲线是至少三个不同实验的代表性实例 ($N = 8$ 只小鼠 / 组, $^*p = 0.20$, $^{**}p = 0.08$, $^{\dagger}p = 1.0$, $^{\ddagger}p = 0.5$)。

[0051] 图 18A-18B. TLR2 足以促进保护性 Pam2CSK4 和 ODN2395 协同作用, 但并不是诱导抵抗力所必需的。图 18A. 左, 用或不用 ODN2395 和 Pam2CSK4 处理后 24 小时, 用绿脓假单胞菌攻击的 $Tlr2^{-/-}$ 和野生型小鼠的存活 ($N = 8$ 只小鼠 / 组, $^*p < 0.0002$)。右, 用绿脓假单胞菌感染后立即出现的肺匀浆的细菌负荷 ($N = 4$ 只小鼠 / 组, $^{**}p < 0.0001$ 相比于野

生型 +PBS, $\dagger p = 0.59$ 相比于 Tlr2^{-/-}+PBS)。图 18B. 左, 用或不用不可分型流感嗜血杆菌 (NTHi) 的雾化溶胞产物处理后 24 小时, 用绿脓假单胞菌攻击 TLR2^{-/-}和野生型小鼠的存活 (N = 10 只小鼠 / 组, $*p < 0.0002$)。右, 用绿脓假单胞菌感染后立即出现的肺匀浆的细菌负荷 (N = 3 只小鼠 / 组, $\ddagger p = 0.03$ 相比于野生型 +PBS, $\#p = 0.002$ 相比于 Tlr2^{-/-}+PBS)。

[0052] 图 19A-19B. C 型 (而不是 A 类和 B 类) 与 TLR9 结合的 CpG ODN 与 Pam2CSK4 协同作用, 以诱导对细菌性肺炎的抵抗力。图 19A. 绿脓假单胞菌攻击之前 24 小时, 用 Pam2CSK4 和 ODN2395 或者 Pam2CSK4 和乱序对照 ODN 处理的野生型小鼠的存活 (N = 10 只小鼠 / 组, $*p < 0.0001$)。FIG. 19B. 用 PBS 或 Pam2CSK4 组合 A 类 CpG ODN (ODN1585 或 ODN2216)、B 类 CpG ODN (ODN 2006-G5) 或 C 类 CpG ODN (M362 或 ODN2395) 处理后 24 小时, 用绿脓假单胞菌攻击的野生型小鼠的存活 (N = 10 只小鼠 / 组, $*p = 0.01$ 相比于 PBS, $**p = 0.0001$ 相比于 PBS; $\dagger p = 0.3$ 相比于 Pam2+ODN2395)。

[0053] 图 20A-20D. TLR2/6 和 TLR9 激动剂在体外协同诱导小鼠和人呼吸道上皮细胞的细菌杀伤。图 20A. 用炭疽芽孢杆菌 (1000 个芽孢) 感染前, 用 Pam2CSK4 (10 μ g/ml) 和 / 或 ODN2395 (20 μ g/ml) 处理 MLE-15 细胞 4 小时。所显示的是感染后 4 小时的细菌 CFU ($*p = 0.05$ 相比于 PBS, $**p = 0.016$ 相比于 PBS, $\#p > 0.05$ 相比于任一单一激动剂)。图 20B. 用 ODN2395 和 Pam2CSK4 处理 MLE 培养基 (无细胞), 4 小时后用炭疽芽孢杆菌 (1000 个芽孢) 感染并培养 ($\dagger p = 1.0$)。图 20C. 用绿脓假单胞菌 (2700CFU) 感染之前, 用 ODN2395 和 Pam2CSK4 处理 A549 细胞 4 小时。所显示的是感染后 4 小时的细菌 CFU ($*p = 0.01$ 相比于 PBS, $**p = 0.003$ 相比于 PBS, $***p = 0.001$ 相比于 PBS, $\#p = > 0.05$ 相比于任一单一激动剂)。图 20D. 用 ODN2395 和 Pam2CSK4 处理 MLE 培养基 (无细胞), 4 小时后用绿脓假单胞菌 (4000CFU) 感染并培养 ($\ddagger p = 0.58$)。

[0054] 图 21. 用多种合成的 TLR 激动剂免疫并用 5 倍 LD50 炭疽芽孢杆菌 Ames 芽孢 (MD-10-013) 鼻内攻击的 Swiss-Webster 小鼠的存活。如所示, 在用炭疽攻击前 24 小时, 用气雾化的 TLR 激动剂预处理小鼠。ALIIS = NTHi 细菌溶胞产物, 2395 = ODN2395, 10101 = ODN10101, M362 = ODN-M362. $1 \times = 40 \mu$ g/ml 的 ODN 和 20 μ g/ml 的 Pam2。

[0055] 图 22. 利用 ODN/Pam2 或 NTHi 溶胞产物进行气雾剂预处理对甲型流感病毒 /HK 感染的小鼠存活的影响。一次 30 分钟气雾剂处理; 流感病毒剂量: ~ 100 倍 TCID₅₀/小鼠。

[0056] 发明详述

[0057] 免疫系统是保护生物免受外界生物影响的特化细胞和器官的系统。当免疫系统功能正常时, 其保护机体免受微生物感染, 并破坏癌细胞和异物。如果免疫系统弱化, 其保护机体的能力也弱化, 使得病原体能够在机体内生长。

[0058] 免疫系统经常分成: (a) 先天免疫, 其包含提供直接“第一线”防御的组分, 以持续阻挡病原体, 和 (b) 适应性 (获得性) 免疫, 其包含抗体的产生和特异地设计用于靶向特定病原体的 T 细胞的产生或刺激。利用适应性免疫性, 身体可在一定时间后产生针对特定病原体的特异性免疫。该应答需要数天才能发生, 并对防止首次侵袭无效, 但通常会防止任何后续感染, 也帮助清除持续更久的感染。

[0059] 应答于某些炎性刺激, 小鼠和人呼吸道上皮的分泌细胞迅速发生显著的结构变化, 称为炎性化生。大多数结构变化是由于形成凝胶的分泌性粘蛋白的产生增加, 同时在粘蛋白分泌、微生物杀伤或炎症信号转导中起功能的其他大分子也上调。认为该应答的生理

功能是加强针对微生物病原体的局部防御,但该假说接受了正式测试有限。自相矛盾的是,形成凝胶的粘蛋白的过度产生和分泌是呼吸道常见炎症性疾病(如哮喘、囊性纤维化和肺慢性阻塞性疾病(COPD))中气流堵塞的主要原因。刺激不产生粘蛋白的先天免疫将通过预防和/或治疗受试者而提供一种减轻呼吸道感染的其他方法。

[0060] 本发明的一些实施方案包括用包含1、2、3、4种或更多种TLR激动剂(包括其区段或衍生物或类似物)的组合物刺激受试者的气道。施用本发明组合物的受试者被赋予针对潜在感染生物的治疗性、预防性或者治疗性和预防性应答。在一些具体方面中,将组合物雾化并通过呼吸道施用。所述组合物用于例如通过激活或增强肺的先天免疫来诱导或以其他方式引发保护作用。

[0061] 本发明的某些方面包括小分子和/或TLR激动剂,其来自不同的微生物,或是人工合成的。通常,所述小分子和/或TLR激动剂不引起分泌性粘蛋白的产生增加。本发明的实施方案可用作针对例如生物武器、新的有毒微生物或条件性微生物的预防性和先行性(preemptive)治疗剂。

[0062] I. StIR 组合物

[0063] A. 异源化合物和部分

[0064] 许多非宿主或异源分子可以刺激、增强或促进免疫应答的产生。这些部分包括多种先天性受体激动剂和/或微生物组分。

[0065] 1. 先天性受体配体

[0066] 模式识别受体(或称为PRR, pattern recognition receptor)(先天性受体)是先天免疫系统的细胞表达的用来识别病原体相关分子模式(或称为PAMP, pathogen-associated molecular pattern)(其与微生物病原体或细胞胁迫相关)的蛋白质。PAMP包括但不限于细菌碳水化合物(例如,脂多糖或LPS、甘露糖)、核酸(例如,细菌或病毒DNA或RNA)、肽聚糖和脂磷壁酸(来自革兰氏阳性菌)、N-甲酰甲硫氨酸、脂蛋白、真菌葡聚糖等。

[0067] PRR通常根据其配体特异性、功能、定位和/或进化关系进行分类。基于功能,PRR可分为胞吞PRR或信号转导PRR。信号转导PRR包括膜结合Toll样受体和胞质NOD样受体的大家族。胞吞PRR促进吞噬细胞对微生物的附着、吞食和破坏,但不传递胞内信号。这些PRR识别碳水化合物,并包括巨噬细胞的甘露糖受体、存在于所有吞噬细胞上的葡聚糖受体,以及存在于所有巨噬细胞的识别带电配体并介导凋亡细胞的清除的清道夫受体(scavenger receptor)。

[0068] 已经鉴定了许多先天性受体,包括但不限于Toll样受体(TLR)、C型凝集素受体(CLR)和与核苷酸结合的寡聚化结构域样受体(Nod样受体或NLR)。TLR是在先天免疫系统中起关键作用的一类蛋白质。它们是单次跨膜的非催化性受体,其识别来自微生物的结构上保守的分子。一旦这些微生物存在于皮肤或肠道粘膜其上或其中,它们即被激活免疫细胞应答的TLR所识别。有趣的是,当单独施用,许多这些TLR激动剂不诱导显著的StIR。通常,使用本文所述方法治疗的个体或受试者已经接触病原性微生物,或有这种接触的风险。

[0069] a. Toll样受体(TLR)激动剂

[0070] Toll样受体(TLR)是最充分表征的PRR(Ishii等,2008)。它们是高度保守的跨

膜蛋白,由外功能区 (ectodomain) (具有用于模式识别的多个富亮氨酸重复)、跨膜 α -螺旋和用于胞内信号转导的 Toll/ 白介素-1 受体 (TIR) 结构域组成。已经鉴定了至少 13 种哺乳动物 TLR,每一种均特异性定位在质膜或内体膜上,并且每一种检测 PAMP 中的独特对应物 (Akira 等,2006 ;Shi 等,2006)。PAMP 识别后,通过细胞溶胶 TIR 衔接蛋白组合的 TLR 特异性募集发生信号转导。与四种其他衔接蛋白中的一个或多个一起,TIR 衔接蛋白 MyD88 是始自大多数 TLR 的信号转导所需的。从 TLR3 和 TLR4 观察到的不依赖 MyD88 的信号转导事件需要 TIR 衔接蛋白 TRIF (也称为 TICAM-1),其有或没有 TRAM 的参与 (Yamamoto 等,2003)。TLR 特异性 TIR 衔接蛋白信号级联激活受体特异性转录因子如 NF- κ B,激活蛋白-1 和干扰素调节因子 (IRF),导致炎性基因和抗微生物基因的表达 (Akira 等,2006 ;O'Neill, L. A., 和 Bowie,2007 ;Takeda, K., 和 Akira,2004)。

[0071] TLR 激动剂是发挥激活 TLR (例如从而诱导通过 TLR 信号转导途径介导的信号转导事件) 的功能的任何化合物或物质。合适的 TLR 激动剂包括 TLR1 激动剂、TLR2 激动剂、TLR3 激动剂、TLR4 激动剂、TLR5 激动剂、TLR6 激动剂、TLR7 激动剂、TLR8 激动剂和 TLR9 激动剂。

[0072] 目前广泛公认的是,保护性免疫的产生不仅依赖于抗原接触,还依赖于遇到抗原时的环境。存在许多实例,其中在炎性环境中向宿主中引入新抗原产生免疫耐受而不是长期免疫,而在炎性试剂 (佐剂) 存在下接触抗原则诱导免疫 (Mondino 等,1996 ;Pulendran 等,1998 ;Jenkins 等,1994 ;和 Keamey 等)。由于这可意味着耐受与免疫之间的差异,所以已经付出大量努力用于发现感染原内存在的“佐剂”,其刺激参与产生抗原呈递的适当免疫原性环境的分子途径。目前已知的是,大量佐剂活性是由于微生物和病毒产物与免疫细胞上表达的 Toll 样受体 (TLR) 的不同成员之间的相互作用 (Beutler 等,2004 ;Kaisho, 2002 ;Akira 等,2003 ;以及 Takeda 和 Akira,2004)。TLR 得名于其与果蝇中的分子 (称为 Toll,其在果蝇发育中发挥功能并参与抗微生物免疫) 的同源性 (Lernaitre 等,1996 ;和 Hashimoto 等,1988)。

[0073] 早期工作显示,Toll 的哺乳动物同源物和 Toll 途径分子对先天免疫系统细胞应答微生物攻击和微生物副产物的能力而言至关重要 (Medzhitov 等,1997 ;Medzhitov 等,1998 ;Medzhitov 等,2000 ;和 Janeway 等,2002)。自从将 LPS 鉴定为 TLR4 激动剂以来 (Politorak 等,1998),已经描述了许多其他 TLR 激动剂,如三酰基多类型 HPV 多肽 (TLR1)、肽聚糖、脂磷壁酸和 Pam₃Cys (TLR2)、dsRNA (TLM)、鞭毛蛋白 (TLR5)、二酰基多类型 HPV 多肽,如 Malp-2 (TLR6),咪唑喹啉和单链 RNA (TLR7、8)、细菌 DNA、非甲基化的 CpG DNA 序列,甚至是人基因组 DNA 抗体复合体 (TLR9) (Takeuchi 等,2001 ;Edwards 等,2002 ;Hayashi 等,2003 ;Nagase 等,2003)。

[0074] 如本文所用,术语“激动剂”指可与受体 (例如,TLR) 组合产生细胞活性的化合物。激动剂可以是直接结合受体的配体。或者,激动剂可以通过以下与受体间接组合,例如,(a) 与直接结合受体的另一分子形成复合体,或 (b) 以其他方式导致其他化合物的修饰,使得所述其他化合物直接结合受体。激动剂可以称为特定 TLR 的激动剂 (例如,TLR7 激动剂) 或特定 TLR 组合的激动剂 (例如,TLR 7/8 激动剂——TLR 7 和 TLR 8 两者的激动剂)。

[0075] 在本文可互换使用的术语“CpG-ODN”、“CpG 核酸”、“CpG 多核苷酸”和“CpG 寡核苷酸”指这样的多核苷酸,其包含至少一个 5' -CG-3' 部分,并且在许多实施方案中包含未甲

基化的 5' -CG-3' 部分。一般而言, CpG 核酸是具有至少 6 个核苷酸碱基的单链或双链 DNA 或 RNA 多核苷酸, 其可包含修饰的核苷酸或修饰的核苷序列, 或由其组成。在一些实施方案中, CpG 核酸的 5' -CG-3' 部分是回文核苷酸序列的一部分。在一些实施方案中, CpG 核酸的 5' -CG-3' 部分是非回文核苷酸序列的一部分。

[0076] 合适的 TLR 激动剂包括分离的天然 TLR 激动剂, 以及合成的 TLR 激动剂。从天然的 TLR 激动剂来源分离的 TLR 激动剂一般是纯化的, 例如纯化的 TLR 激动剂的纯度为至少约 80%、至少约 90%、至少约 95%、至少约 98%、至少约 99% 或高于 99%。合成的 TLR 激动剂通过标准方法制备, 一般纯度为至少约 80%、至少约 90%、至少约 95%、至少约 98%、至少约 99%、或高于 99%。

[0077] 合适的 TLR 激动剂包括不附着到任何其他化合物上的 TLR 激动剂。合适的 TLR 激动剂包括共价或非共价附着到另一化合物上的 TLR 激动剂。在一些实施方案中, TLR 激动剂直接附着到另一化合物上。在另一些实施方案中, TLR 激动剂通过接头附着到另一化合物上。TLR 激动剂所附着的化合物包括载体、支架、不溶的支持物、微粒、微球等。载体包括治疗性多肽; 提供更高溶解度的多肽; 提高 TLR 激动剂在生理性介质 (例如血清或其他体液) 中的半衰期的多肽等。在一些实施方案中, TLR 激动剂将直接或通过接头缀合到另一 TLR 激动剂上。

[0078] 在一些实施方案中, TLR 激动剂是 TLR 激动剂的前药形式。前药由与活性治疗剂共价连接的前药部分组成。前药能够在体内通过其结构的某些化学或酶促修饰转化成药物 (活性治疗剂)。前药部分的实例为本领域所熟知, 并可见于以下参考文献中: Biological Approaches to the Controlled Delivery of Drugs, R. L. Juliano, New York Academy of Sciences, (1988); Hydrolysis in Drug and Prodrug Metabolism: Chemistry, Biochemistry, and Enzymology, Bernard Testa, Vch Verlagsgesellschaft Mbh, (2003); 和 Prodrugs: Topical and Ocular Drug Delivery, Kenneth Sloan, Marcel Dekker; (1992)。前药部分的实例是肽, 例如将 TLR 配体引导到作用位点上的肽, 和在其氨基端具有两个或更多个游离且未偶联的羧酸的肽。其他示例性可切割前药部分包括酯基、醚基、酰基、烷基、磷酸基、磺酸基、N 氧化物和叔丁氧基羰基。

[0079] 在一些实施方案中, TLR 激动剂是单体 TLR 激动剂。在另一些实施方案中, TLR 激动剂是多聚化的, 例如 TLR 激动剂是多聚体的。在一些实施方案中, 多聚化的 TLR 激动剂是同功能的, 例如由一种类型的 TLR 激动剂组成。在另一些实施方案中, 多聚化的 TLR 激动剂是异功能 TLR 激动剂。

[0080] 在一些实施方案中, TLR 配体是嵌合的 TLR 配体 (本文也称为“异功能”TLR 配体)。在一些实施方案中, 嵌合的 TLR 激动剂包含 TLR9 激动剂部分和 TLR2 激动剂部分。以下是异功能 TLR 激动剂的非限制性实例。

[0081] 在一些实施方案中, 嵌合的 TLR 配体具有以下通式: $(X)_n-(Y)_m$, 其中 X 是 TLR1 激动剂、TLR2 激动剂、TLR3 激动剂、TLR4 激动剂、TLR5 激动剂、TLR6 激动剂、TLR7 激动剂、TLR8 激动剂和 TLR9 激动剂, 而 Y 是 TLR2 激动剂、TLR3 激动剂、TLR4 激动剂、TLR5 激动剂、TLR6 激动剂、TLR7 激动剂、TLR8 激动剂和 TLR9 激动剂, n 和 m 独立地是 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更大 (包括其间的所有值和范围) 的整数。在某些实施方案中, X 或 Y 是 TLR9, 并且 X 或 Y 是 TLR2/6。

[0082] TLR2 激动剂. TLR2 激动剂包括分离的天然 TLR2 激动剂 ;和合成的 TLR2 激动剂。从天然 TLR2 激动剂来源分离的 TLR2 激动剂一般是纯化的,例如纯化的 TLR2 激动剂的纯度为至少约 80%、至少约 90%、至少约 95%、至少约 98%、至少约 99%或高于 99%。合成 TLR2 激动剂通过标准方法制备,纯度一般为至少约 80%、至少约 90%、至少约 95%、至少约 98%、至少约 99%或高于 99%。

[0083] TLR2 激动剂包括不附着到任何其他化合物上的 TLR2 激动剂。TLR2 激动剂包括共价或非共价附着到另一化合物上的 TLR2 激动剂。在一些实施方案中,TLR2 激动剂直接附着到另一化合物上。在另一些实施方案中,TLR2 激动剂通过接头附着到另一化合物上。

[0084] TLR2 激动剂包括合成的三酰基化的和二酰基化的脂肽。TLR2 配体的非限制性实例是 FSL-1 (来自唾液支原体 1 的合成脂蛋白)、Pam₃Cys (三棕榈酰基 -S- 甘油基半胱氨酸) 或 S-[2,3- 二 (棕榈酰基氧基) -(2RS)- 丙基]-N- 棕榈酰 -(R)- 半胱氨酸,其中 “Pam₃” 是 “三棕榈酰基 -S- 甘油基” (Aliprantis 等,1999)。Pam₃Cys 的衍生物也是合适的 TLR2 激动剂,其中衍生物包括但不限于 S-[2,3- 二 (棕榈酰基氧基) -(2-R, S)- 丙基]-N- 棕榈酰 -(R)-Cys-(S)-Ser-(Lys)₄- 羟基三盐酸化物 ;Pam₃Cys-Ser-Ser-Asn-Ala ; Pam₃Cys-Ser-(Lys)₄;Pam₃Cys-Ala-Gly ;Pam₃Cys-Ser-Gly ;Pam₃Cys-Ser ;Pam₃Cys-OMe ; Pam₃Cys-OH ;PamCAG, 棕榈酰 -Cys ((RS)-2,3- 二 (棕榈酰基氧基) - 丙基)-Ala-Gly-OH 等。合适的 TLR2 激动剂的另一非限制性实例是 Pam₂CSK₄。Pam₂CSK₄ (二棕榈酰基 -S- 甘油基半胱氨酸 - 丝氨酸 -(赖氨酸)₄或 Pam₂Cys-Ser-(Lys)₄) 是合成的二酰基化脂肽。已经在参考文献中描述了合成的 TLR 激动剂。参阅例如,Kellner 等 (1992) ;Seifer 等 (1990) ;Lee 等 (2003)。

[0085] TLR3 激动剂. TLR3 激动剂包括分离的天然的 TLR3 激动剂 ;和合成的 TLR3 激动剂。从天然 TLR3 激动剂来源分离的 TLR3 激动剂一般是纯化的,例如纯化的 TLR3 激动剂的纯度为至少约 80%、至少约 90%、至少约 95%、至少约 98%、至少约 99%、或高于 99%。合成的 TLR3 激动剂通过标准方法制备,纯度一般为至少约 80%、至少约 90%、至少约 95%、至少约 98%、至少约 99%或高于 99%。

[0086] TLR3 激动剂包括不附着到任何其他化合物上的 TLR3 激动剂。TLR3 激动剂包括共价或非共价附着到另一化合物上的 TLR3 激动剂。在一些实施方案中,TLR3 激动剂直接附着到另一化合物上。在另一些实施方案中,TLR3 激动剂通过接头附着到另一化合物上。

[0087] TLR3 激动剂包括天然的双链 RNA (dsRNA) ;合成的 dsRNA ;和合成的 dsRNA 类似物等 (Alexopoulou 等,2001)。合成的 ds RNA 类似物的示例性非限制实例是 poly (I:C)。

[0088] TLR4 激动剂. 合适的 TLR4 激动剂包括分离的天然 TLR4 激动剂 ;和合成的 TLR4 激动剂。从天然的 TLR4 激动剂来源分离的 TLR4 激动剂一般是纯化的,例如纯化的 TLR4 激动剂的纯度为至少约 80%、至少约 90%、至少约 95%、至少约 98%、至少约 99%或高于 99%。合成的 TLR4 激动剂通过标准方法制备,纯度一般为至少约 80%、至少约 90%、至少约 95%、至少约 98%、至少约 99%或高于 99%。

[0089] TLR4 激动剂包括不附着到任何其他化合物上的 TLR4 激动剂。合适的 TLR4 激动剂包括共价或非共价附着到另一化合物上的 TLR4 激动剂。在一些实施方案中,TLR4 激动剂直接附着到另一化合物上。在另一些实施方案中,TLR4 激动剂通过接头附着到另一化合物上。TLR4 激动剂所附着的合适的化合物包括载体、支架等。

[0090] TLR4 激动剂包括天然的脂多糖 (LPS), 例如来自多种革兰氏阴性菌的 LPS; 天然 LPS 的衍生物; 合成的 LPS; 细菌热休克蛋白 60 (Hsp60); 甘露糖醛酸聚合物; 黄脂素 (flavolipin); 糖醛酸磷壁酸; 肺炎链球菌 (*S. pneumoniae*) 的肺炎球菌溶血素 (pneumolysin); 细菌菌毛 (fimbriae), 呼吸道合胞体病毒外壳蛋白等。TLR4 激动剂也包括合成的单磷酸脂质 A (MPLA, Invivogen) 和磷酸化六酰基二糖 (PHAD, Avanti Polar Lipids), 以及其他合成的 TLR4 激动剂。

[0091] TLR5 激动剂. 合适的 TLR5 激动剂包括分离的天然 TLR5 激动剂; 和合成的 TLR5 激动剂。从天然的 TLR5 激动剂来源分离的 TLR5 激动剂一般是纯化的, 例如纯化的 TLR4 激动剂的纯度为至少约 80%、至少约 90%、至少约 95%、至少约 98%、至少约 99% 或高于 99%。合成的 TLR5 激动剂通过标准方法制备, 纯度一般为至少约 80%、至少约 90%、至少约 95%、至少约 98%、至少约 99% 或高于 99%。

[0092] TLR5 激动剂包括不附着到任何其他化合物上的 TLR5 激动剂。合适的 TLR5 激动剂包括共价或非共价附着到另一化合物上的 TLR5 激动剂。在一些实施方案中, TLR5 激动剂直接附着到另一化合物上。在另一些实施方案中, TLR5 激动剂通过接头附着到另一化合物上。TLR5 激动剂附着的合适的化合物包括载体、支架等。

[0093] TLR5 激动剂包括鞭毛蛋白的高度保守的 22 氨基酸区段以及全长鞭毛蛋白及其其他区段。

[0094] TLR7 激动剂. 合适的 TLR7 激动剂包括分离的天然 TLR7 激动剂; 和合成的 TLR7 激动剂。从天然的 TLR7 激动剂来源分离的 TLR7 激动剂一般是纯化的, 例如纯化的 TLR7 激动剂的纯度为至少约 80%、至少约 90%、至少约 95%、至少约 98%、至少约 99% 或高于 99%。合成的 TLR7 激动剂通过标准方法制备, 纯度一般为至少约 80%、至少约 90%、至少约 95%、至少约 98%、至少约 99% 或高于 99%。

[0095] TLR7 激动剂包括不附着到任何其他化合物上的 TLR7 激动剂。合适的 TLR7 激动剂包括共价或非共价附着到另一化合物上的 TLR7 激动剂。在一些实施方案中, TLR7 激动剂直接附着到另一化合物上。在另一些实施方案中, TLR7 激动剂通过接头附着到另一化合物上。

[0096] TLR7 配体包括咪唑喹啉化合物; 鸟苷类似物; 嘧啶化合物, 如溴匹立明和溴匹立明类似物等。起 TLR7 配体功能的咪唑喹啉化合物包括但不限于咪唑莫特 (也称为 Aldara、R-837、S-26308) 和 R-848 (也称为瑞喹莫德, S-28463; 具有以下化学结构: 4-氨基-2-乙氧基甲基- α , α -二甲基-1H-咪唑 [4,5-c] 喹啉-1-乙醇)。合适的咪唑喹啉剂包括咪唑喹啉胺、咪唑并吡啶胺、6,7-稠合的环烷基咪唑并吡啶胺和 1,2 桥接的咪唑喹啉胺。已经在美国专利 4,689,338、4,929,624、5,238,944、5,266,575、5,268,376、5,346,905、5,352,784、5,389,640、5,395,937、5,494,916、5,482,936、5,525,612、6,039,969 和 6,110,929 中描述了这些化合物。适用于本发明方法中的咪唑喹啉剂的具体种类包括 R-848 (S-28463); 4-氨基-2-乙氧基甲基- α , α -二甲基-1H-咪唑 [4,5-c] 喹啉-s-i-乙醇; 和 1-(2-甲基丙基)-1H-咪唑 [4,5-c] 喹啉-4-胺 (R-837 或咪唑莫特)。还适合使用的是化合物 4-氨基-2-(乙氧基甲基)- α , α -二甲基-6,7,8,9-四氢-1H-咪唑 [4,5-c] 喹啉-1-乙醇水合物 (参阅例如, BM-003, Gordon 等 (2005))。

[0097] 合适的化合物包括 2-氨基吡啶与五员含氮杂环稠合的那些化合物。此类化合物

包括如咪唑啉胺,包括但不限于取代的咪唑啉胺,例如酰胺取代的咪唑啉胺、磺酰胺取代的咪唑啉胺、尿素取代的咪唑啉胺、芳基醚取代的咪唑啉胺、杂环醚取代的咪唑啉胺、氨基醚取代的咪唑啉胺、磺酰胺醚取代的咪唑啉胺、尿素取代的咪唑啉醚、硫醚取代的咪唑啉胺,和 6-、7-、8- 或 9- 芳基或杂芳基取代的咪唑啉胺;四氢咪唑啉胺,包括但不限于酰胺取代的四氢咪唑啉胺、磺酰胺取代的四氢咪唑啉胺、尿素取代的四氢咪唑啉胺、芳基醚取代的四氢咪唑啉胺、杂环醚取代的四氢咪唑啉胺、氨基醚取代的四氢咪唑啉胺、磺酰胺醚取代的四氢咪唑啉胺、尿素取代的四氢咪唑啉醚和硫醚取代的四氢咪唑啉胺;咪唑并吡啶胺包括但不限于酰胺取代的咪唑并吡啶胺、磺酰胺取代的咪唑并吡啶胺、尿素取代的咪唑并吡啶胺、芳基醚取代的咪唑并吡啶胺、杂环醚取代的咪唑并吡啶胺、氨基醚取代的咪唑并吡啶胺、磺酰胺醚取代的咪唑并吡啶胺、尿素取代的咪唑并吡啶醚和硫醚取代的咪唑并吡啶胺;1,2- 桥接咪唑啉胺;6,7- 稠合的环烷基咪唑并吡啶胺;咪唑并萘啶胺;四氢咪唑并萘啶胺;咪唑并喹啉胺;咪唑并喹啉胺;咪唑并吡啶胺;咪唑并吡啶胺;咪唑并萘啶胺;咪唑并萘啶胺;和与吡啶胺稠合的 1H- 咪唑二聚体、喹啉胺、四氢喹啉胺、萘啶胺和四氢萘啶胺。

[0098] 化合物包括取代的咪唑啉胺、四氢咪唑啉胺、咪唑并吡啶胺、1,2- 桥接的咪唑啉胺、6,7- 稠合的环烷基咪唑并吡啶胺、咪唑并萘啶胺、四氢咪唑并萘啶胺、咪唑并喹啉胺、咪唑并喹啉胺、咪唑并吡啶胺、咪唑并吡啶胺、咪唑并萘啶胺和咪唑并萘啶胺。

[0099] 如本文所用,取代的咪唑啉胺指酰胺取代的咪唑啉胺、磺酰胺取代的咪唑啉胺、尿素取代的咪唑啉胺、芳基醚取代的咪唑啉胺、杂环醚取代的咪唑啉胺、氨基醚取代的咪唑啉胺、磺酰胺醚取代的咪唑啉胺、尿素取代的咪唑啉醚、硫醚取代的咪唑啉胺,或 6-、7-、8- 或 9- 芳基或杂芳基取代的咪唑啉胺。

[0100] 发挥 TLR7 配体功能的鸟苷类似物包括某些 C8- 取代的和 N7, C8- 二取代的鸟嘌呤核糖核苷酸和脱氧核糖核苷酸,包括但不限于罗唑利宾 (7- 烯丙基 -8- 氧鸟苷)、7- 硫代 -8- 氧鸟苷 (TOG)、7- 脱氮鸟苷和 7- 脱氮脱氧鸟苷 (Lee 等, 2003)。在参考文献中描述了溴匹立明 (PNU-54461) (5- 卤代 -6- 苯基嘧啶酮) 和溴匹立明类似物,并且其也适合使用。参阅如 Vroegop 等 (1999)。合适的 C8 取代鸟苷的额外实例包括但不限于,8- 巯基鸟苷、8- 溴代鸟苷、8- 甲基鸟苷、8- 氧代 -7,8- 二氢鸟苷、C8- 芳氨基 -2'- 脱氧鸟苷、C8- 丙炔基鸟苷、C8- 和 N7- 取代的鸟嘌呤核糖核苷酸,如 7- 烯丙基 -8- 氧鸟苷 (罗唑利宾) 和 7- 甲基 -8- 氧鸟苷、8- 氨基鸟苷、8- 羟基 -2'- 脱氧鸟苷和 8- 羟基鸟苷。

[0101] 在一些实施方案中,取代的鸟嘌呤 TLR7 配体是单体。在另一些实施方案中,取代的鸟嘌呤 TLR7 配体是多聚的。因此,在一些实施方案中,TLR7 配体具有通式: (B)_q, 其中 B 是取代的鸟嘌呤 TLR7 配体, q 是 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。多聚 TLR7 配体中的各 TLR7 配体单体直接或通过接头与另一配体共价或非共价连接。合适的 TLR7 激动剂包括如美国专利公开 2004/0162309 中描述的 TLR7 配体。

[0102] 在一些实施方案中,TLR7 激动剂是选择性 TLR7 激动剂,例如所述激动剂通过 TLR7 调节细胞活性,但不通过 TLR8 调节细胞活性。TLR7 选择性激动剂包括在美国专利公开 2004/0171086 中显示的那些。此类 TLR7 选择性激动剂化合物包括但不限于, N¹-[4-[4- 氨基 -2-(2- 甲氧基乙基) -6,7,8,9- 四氢 -1H- 咪唑 [4,5-c] 喹啉 -1- 基] 丁基] -4- 氟 -1- 苯磺酰胺、N¹-[4-(4- 氨基 -2-(2- 甲氧基乙基) -1H- 咪唑 [4,5-c] 喹啉 -1- 基) 丁

基]-4-氟-1-苯磺酰胺、N-[4-(4-氨基-2-丙基-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-1-基)丁基]甲磺酰胺、N-{3-[4-氨基-2-(2-甲氧基乙基)-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-1-基]-2,2-二甲丙基}苯甲酰胺、N-(2-{2-[4-氨基-2-(2-甲氧基乙基)-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-1-基]乙氧基}乙基)-N-甲基甲磺酰胺、N-(2-{2-[4-氨基-2-(2-甲氧基乙基)-6,7,8,9-四氢-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-1-基]乙氧基}乙基)苯甲酰胺、N-[4-(4-氨基-2-甲基-1H-咪唑基[4,5-c]喹啉基-1-基)丁基]环戊甲酰胺、1-[4-(1,1-二氧异噻唑烷-2-基)丁基]-2-(2-甲氧基乙基)-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-4-胺、2-甲基-1-[5-甲基磺酰基]戊基-6,7,8,9-四氢-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-4-胺、N-{2-[4-氨基-2-(乙氧基甲基)-6,7-二甲基-1H-咪唑[4,5-c]吡啶-1-基]-1,1-二甲基乙基}-N-环己基脲、N-[2-(4-氨基-2-乙基-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-1-基)-1,1-二甲基乙基]苯甲酰胺、N-[3-(4-氨基-2-丁基-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-1-基)-2,2-二甲基丙基]甲磺酰胺、1-[6-(甲磺酰基)己基]-6,7-二甲基-2-丙基-1H-咪唑[4,5-c]吡啶-4-胺、6-(6-氨基-2-丙基-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-1-基)-N-甲氧基-N-甲基己酰胺、1-[2,2-二甲基-3-(甲磺酰基)丙基]-2-(乙氧基甲基)-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-4-胺、N-[4-(4-氨基-2-甲基-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-1-基)丁基]-N-甲基-N-苯脲、1-{3-[4-氨基-1-(2-甲基丙基)-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-8-基]苯基}乙酮、7-(4-氨基-2-丙基-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-1-基)-2-甲基庚-2-醇、N-甲基-4-(4-氨基-2-乙基-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-1-基)丁烷-1-磺酰胺、N-(4-甲氧基苄基)-4-(4-氨基-2-乙基-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-1-基)丁烷-1-磺酰胺、N-{2-[4-氨基-3-(乙氧基甲基)-6,7-二甲基-1H-咪唑基[4,5-c]吡啶-1-基]-1,1-二甲基乙基}甲磺酰胺、2-乙氧甲基-1-(3-甲氧基丙基)-7-(5-羟甲基吡啶-3-基)-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-4-胺、1-[(2,2-二甲基-1,3-二氧戊环-4-基)甲基]-2-(乙氧基甲基)-7-(吡啶-3-基)-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-4-胺、4-[3-(4-氨基-6,7-二甲基-2-丙基-1H-imithizo[4,5-c]吡啶-1-基)丙烷-1-磺酰基]-苯甲酸乙酯、2-丁基-1-{2-[2-(甲基磺酰基)乙氧基]乙基}-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-4-胺、N-(2-{4-氨基-2-乙氧基甲基-7-[6-(甲磺酰基氨基)己氧基]-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-1-基}-1,1-二甲基乙基)甲磺酰胺、N-(6-{[4-氨基-2-乙氧基甲基-1-(2-甲磺酰基氨基-2-甲基丙基)-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-7-基]氧基}己基)乙酰胺、1-[4-(1,1-二氧异噻唑啉-2-基)丁基]-2-乙氧基甲基-7-(吡啶-3-基)-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-4-胺、1-[4-(1,1-二氧异噻唑啉-2-基)丁基]-2-乙氧基甲基-7-(吡啶-4-基)-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-4-胺、1-[4-(1,1-二氧异噻唑啉-2-基)丁基]-2-乙氧基甲基-7-苯基-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-4-胺、2-(乙氧基甲基)-1-{[1-(甲基磺酰基)哌啶-4-基]甲基}-7-(吡啶-3-基)-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-4-胺、2-(乙氧基甲基)-1-{[1-(吗啉-4-基羰基)哌啶-4-基]甲基}-7-(吡啶-3-基)-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-4-胺、环丙烷酸[3-(4-氨基-2-丙基-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-1-基)丙氧基]酰胺、异丙基氨基甲酸4-氨基-2-(2-甲氧基乙基)-1-丙基-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-7-基酯、4-(4-氨基-2-丙基-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-1-基)丁酸乙酯、1-[4-氨基-2-乙基-7-(吡啶-3-基)-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-1-基]-2-甲基丙-2-醇、1-(4-氨基-2-乙基-7-[5-{羟甲基}吡啶-3-基]-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-1-基)-2-甲基丙-2-醇、

1-(3-[4-氨基-2-(2-甲氧基乙基)-8-(吡啶-3-基)-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-1-基]丙基)吡咯烷-2-酮、N-(2-{4-氨基-2-乙氧基甲基-7-[6-(甲磺酰基氨基)己氧基]-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-1-基}-1,1-二甲基乙基)乙酰胺、1-{3-[4-氨基-7-(3-羟甲基苯基)-2-(2-甲氧基乙基)-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-1-基]丙基}吡咯烷-2-酮、N-{4-[4-氨基-2-乙氧基甲基-7-(吡啶-3-基)-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-1-基]丁基}-N'-丙基脲、N-{4-[4-氨基-2-乙氧基甲基-7-(吡啶-3-基)-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-1-基]丁基}丁酰胺、5-(4-氨基-2-丙基-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-1-基)-4,4-二甲基戊-2-酮、1-环己基甲基-2-乙氧基甲基-7-(5-羟甲基吡啶-3-基)-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-4-胺、N,N-二甲基-5-(4-氨基-2-乙氧基甲基-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-1-基)戊烷-1-磺酰胺、N-{3-[(4-氨基-2-乙氧基甲基-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-1-基)氨基]丙基}甲磺酰胺和/或N,N-二甲基-4-(4-氨基-2-乙氧基甲基-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-1-基)丁烷-1-磺酰胺。

[0103] 其他合适的TLR7选择性激动剂包括但不限于2-(乙氧基甲基)-1-(2-甲基丙基)-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-4-胺(美国专利5,389,640);2-甲基-1-[2-(3-吡啶-3-基丙氧基)乙基]-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-4-胺(WO 02/46193);N-(2-{2-[4-氨基-2-(2-甲氧基乙基)-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-1-基]乙氧基}乙基)-N-甲基环己烷羧酰胺(美国专利公开2004/0171086);1-[2-(苯甲氧基)乙基]-2-甲基-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-4-胺(WO 02/46189);N-{8-[4-氨基-2-(2-甲氧基乙基)-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-1-基]辛基}-N-苯脲(美国专利公开2004/0171086(IRM5));2-丁基-1-[5-(甲基磺酰基)戊基]-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-4-胺(WO 02/46192);N-{3-[4-氨基-2-(2-甲氧基乙基)-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-1-基]丙基}-4-甲基苯磺酰胺(美国专利6,331,539);和N-[4-(4-氨基-2-乙基-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-1-基)丁基]环己烷羧酰胺(美国专利公开2004/0171086(IRM8))。也适合使用的是TLR7选择性激动剂N-[4-(4-氨基-2-乙基-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-1-基)丁基]-甲磺酰胺(Gorden等,2005)。

[0104] TLR8激动剂。合适的TLR8激动剂包括分离的天然TLR8激动剂;和合成的TLR8激动剂。从天然的TLR8激动剂来源分离的TLR8激动剂一般是纯化的,例如纯化的TLR8激动剂的纯度为至少约80%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或高于99%。合成的TLR8激动剂通过标准方法制备,纯度一般为至少约80%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或高于99%。

[0105] TLR8激动剂包括不附着到任何其他化合物上的TLR8激动剂。TLR8激动剂包括共价或非共价附着到另一化合物上的TLR8激动剂。在一些实施方案中,TLR8激动剂直接附着到另一化合物上。在另一些实施方案中,TLR8激动剂通过接头附着到另一化合物上。

[0106] TLR8激动剂包括但不限于诸如R-848及其衍生物和类似物的化合物。合适的TLR8激动剂包括具有与五员含氮杂环稠合的2-氨基吡啶的化合物。此类化合物包括如咪唑喹啉胺,包括但不限于取代的咪唑喹啉胺,例如酰胺取代的咪唑喹啉胺、磺酰胺取代的咪唑喹啉胺、尿素取代的咪唑喹啉胺、芳基醚取代的咪唑喹啉胺、杂环醚取代的咪唑喹啉胺、氨基醚取代的咪唑喹啉胺、磺酰胺醚取代的咪唑喹啉胺、尿素取代的咪唑喹啉醚、硫醚取代的咪唑喹啉胺,和6-、7-、8-或9-芳基或杂芳基取代的咪唑喹啉胺;四氢咪唑喹啉胺,包括但不限于酰胺取代的四氢咪唑喹啉胺、磺酰胺取代的四氢咪唑喹啉胺、尿素取代的四氢咪唑喹啉

啉胺、芳基醚取代的四氢咪唑啉胺、杂环醚取代的四氢咪唑啉胺、氨基醚取代的四氢咪唑啉胺、磺酰胺醚取代的四氢咪唑啉胺、尿素取代的四氢咪唑啉醚和硫醚取代的四氢咪唑啉胺；咪唑并吡啶胺，包括但不限于酰胺取代的咪唑并吡啶胺、磺酰胺取代的咪唑并吡啶胺、尿素取代的咪唑并吡啶胺、芳基醚取代的咪唑并吡啶胺、杂环醚取代的咪唑并吡啶胺、氨基醚取代的咪唑并吡啶胺、磺酰胺醚取代的咪唑并吡啶胺、尿素取代的咪唑并吡啶醚和硫醚取代的咪唑并吡啶胺；1,2- 桥接的咪唑啉胺；6,7- 稠合的环烷基咪唑并吡啶胺；咪唑并萘啶胺；四氢咪唑并萘啶胺；咪唑并喹啉胺；咪唑并喹啉胺；咪唑并吡啶胺；咪唑并吡啶胺；咪唑并萘啶胺；咪唑并萘啶胺；和与吡啶胺稠合的 1H- 咪唑二聚体、喹啉胺、四氢喹啉胺、萘啶胺或四氢萘啶胺。

[0107] 在一个具体实施方案中，TLR8 激动剂是酰胺取代的咪唑啉胺。在一个备选实施方案中，TLR8 激动剂是磺酰胺取代的咪唑啉胺。在另一备选实施方案中，TLR8 激动剂是尿素取代的咪唑啉胺。在另一备选实施方案中，TLR8 激动剂是芳基醚取代的咪唑啉胺。在另一备选实施方案中，TLR8 激动剂是杂环醚取代的咪唑啉胺。在另一备选实施方案中，TLR8 激动剂是氨基醚取代的咪唑啉胺。在另一备选实施方案中，TLR8 激动剂是磺酰胺醚取代的咪唑啉胺。在另一备选实施方案中，TLR8 激动剂是尿素取代的咪唑啉醚。在另一备选实施方案中，TLR8 激动剂是硫醚取代的咪唑啉胺。在另一备选实施方案中，TLR8 激动剂是 6-、7-、8- 或 9- 芳基或杂芳基取代的咪唑啉胺。

[0108] 在另一备选实施方案中，TLR8 激动剂是酰胺取代的四氢咪唑啉胺。在另一备选实施方案中，TLR8 激动剂是磺酰胺取代的四氢咪唑啉胺。在另一备选实施方案中，TLR8 激动剂是尿素取代的四氢咪唑啉胺。

[0109] 在另一备选实施方案中，TLR8 激动剂是芳基醚取代的四氢咪唑啉胺。在另一备选实施方案中，TLR8 激动剂是杂环醚取代的四氢咪唑啉胺。在另一备选实施方案中，TLR8 激动剂是氨基醚取代的四氢咪唑啉胺。在另一备选实施方案中，TLR8 激动剂是磺酰胺醚取代的四氢咪唑啉胺。在另一备选实施方案中，TLR8 激动剂是尿素取代的四氢咪唑啉醚。在另一备选实施方案中，TLR8 激动剂是硫醚取代的四氢咪唑啉胺。

[0110] 在另一备选实施方案中，TLR8 激动剂是酰胺取代的咪唑并吡啶胺。在另一备选实施方案中，TLR8 激动剂是磺酰胺取代的咪唑并吡啶胺。在另一备选实施方案中，TLR8 激动剂是尿素取代的咪唑并吡啶胺。在另一备选实施方案中，TLR8 激动剂是芳基醚取代的咪唑并吡啶胺。在另一备选实施方案中，TLR8 激动剂是杂环醚取代的咪唑并吡啶胺。在另一备选实施方案中，TLR8 激动剂是氨基醚取代的咪唑并吡啶胺。在另一备选实施方案中，TLR8 激动剂是磺酰胺醚取代的咪唑并吡啶胺。在另一备选实施方案中，TLR8 激动剂是尿素取代的咪唑并吡啶醚。在另一备选实施方案中，TLR8 激动剂是硫醚取代的咪唑并吡啶胺。

[0111] 在另一备选实施方案中，TLR8 激动剂是 1,2- 桥接咪唑啉胺。在另一备选实施方案中，TLR8 激动剂是 6,7- 稠合的环烷基咪唑并吡啶胺。

[0112] 在另一备选实施方案中，TLR8 激动剂是咪唑并萘啶胺。在另一备选实施方案中，TLR8 激动剂是四氢咪唑并萘啶胺。在另一备选实施方案中，TLR8 激动剂是咪唑并喹啉胺。在另一备选实施方案中，TLR8 激动剂是咪唑并喹啉胺。在另一备选实施方案中，TLR8 激动剂是咪唑并吡啶胺。在另一备选实施方案中，TLR8 激动剂是咪唑并吡啶胺。在另一备选实施方案中，TLR8 激动剂是咪唑并萘啶胺。在另一备选实施方案中，TLR8 激动剂是咪唑并萘啶胺。

啶胺。

[0113] 在又一备选实施方案中,TLR8 激动剂是与吡啶胺耦合的 1H-咪唑二聚体、喹啉胺、四氢喹啉胺、茶啶胺或四氢茶啶胺。

[0114] 在一些实施方案中,TLR8 激动剂是选择性 TLR8 激动剂,例如所述激动剂通过 TLR8 调节细胞活性,但不通过 TLR7 调节细胞活性。TLR8 选择性激动剂包括在美国专利公开 2004/0171086 中显示的那些。此类 TLR8 选择性激动剂化合物包括但不限于美国专利公开 2004/0171086 中显示的化合物,其包括 N-{4-[4-氨基-2-(2-甲氧基乙基)-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-1-基]丁基}喹啉-3-羧酰胺、N-{4-[4-氨基-2-(2-甲氧基乙基)-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-1-基]丁基}喹啉-2-羧酰胺、和 N-[4-(4-氨基-2-丙基-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-1-基)丁基]吗啉-4-羧酰胺。

[0115] 其他合适的 TLR8 选择性激动剂包括但不限于 2-丙基噻唑[4,5-c]喹啉-4-胺(美国专利 6,110,929);N¹-[2-(4-氨基-2-丁基-1H-咪唑[4,5-c][1,5]萘啶-1-基)乙基]-2-氨基-4-甲基戊酰胺(美国专利 6,194,425);N¹-[4-(4-氨基-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-1-基)丁基]-2-苯氧基-苯甲酰胺(美国专利 6,451,810);N¹-[2-(4-氨基-2-丁基-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-1-基)乙基]-1-丙磺酰胺(美国专利 6,331,539);N-{2-[2-(4-氨基-2-乙基-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-1-基)乙氧基]乙基}-N'-苯脲(美国专利公开 2004/0171086);1-{4-[3,5-二氯苯基]硫基}丁基)-2-乙基-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-4-胺(美国专利公开 2004/0171086);N-{2-[4-氨基-2-(乙氧基甲基)-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-1-基]乙基}-N'-(3-氰基苯基)尿素(WO 00/76518 和美国专利公开号 2004/0171086);和 4-氨基- α , α -二甲基-2-甲氧基乙基-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-1-乙醇(美国专利 5,389,640)。用作 TLR8 选择性激动剂的包括美国专利公开号 2004/0171086 中的化合物。还适合使用的是化合物 2-丙基噻唑-4,5-c)喹啉-4-胺(Gorden 等,2005 同上)。

[0116] TLR9 激动剂。合适的 TLR9 激动剂包括分离的天然 TLR9 激动剂;和合成的 TLR9 激动剂。从天然的 TLR9 激动剂来源分离的 TLR9 激动剂一般是纯化的,例如纯化的 TLR9 激动剂的纯度为至少约 80%、至少约 90%、至少约 95%、至少约 98%、至少约 99%或高于 99%。合成的 TLR9 激动剂通过标准方法制备,纯度一般为至少约 80%、至少约 90%、至少约 95%、至少约 98%、至少约 99%或高于 99%。

[0117] TLR9 激动剂包括不附着到任何其他化合物上的 TLR9 激动剂。TLR9 激动剂包括共价或非共价附着到另一化合物上的 TLR9 激动剂。在一些实施方案中,TLR9 激动剂直接附着到另一化合物上。在另一些实施方案中,TLR9 激动剂通过接头附着到另一化合物上。

[0118] TLR9 激动剂(本文也称为“TLR9 配体”)的实例包括这样的核酸,其包含序列 5'-CG-3' (“CpG 核酸”),在某些方面 C 是未甲基化的。在 TLR9 配体分子的上下文中互换使用的术语“多核苷酸”和“核酸”指任何长度的多核苷酸,包括单链和双链寡核苷酸(包括脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸或两者皆有)、修饰的寡核苷酸和寡核苷等,它们是单独的,或者作为更大核酸构建体一部分,或作为与非核酸分子(如多肽)的缀合物的一部分。因此,TLR9 配体可以是例如单链 DNA(ssDNA)、双链 DNA(dsDNA)、单链 RNA(ssRNA)或双链 RNA(dsRNA)。TLR9 配体也包括粗制的经去毒的细菌(例如分枝杆菌)RNA 或 DNA,以及富集 TLR9 配体的富集质粒。在一些实施方案中,“富集 TLR9 配体的质粒”指线性或环形质粒,其

包含（或经改造而包含）比通常在哺乳动物 DNA 中发现的更多数量的 CpG 基序。

[0119] 在 Roman 等 (1997) 中描述了富集 TLR9 配体的质粒的非限制性实例。寡核苷酸的修饰包括但不限于 3' OH 或 5' OH 基团的修饰、核苷酸碱基的修饰、糖组分的修饰和磷酸基团的修饰。

[0120] TLR9 配体可包含至少一个核苷（其包含 L- 糖）。L- 糖可以是脱氧核糖、核糖、戊糖、脱氧戊糖、己糖、脱氧己糖、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖、木糖、来苏糖或糖“类似物”环戊基。L- 糖可以是吡喃糖基或呋喃糖基形式。

[0121] TLR9 配体一般不提供（也不需要它们提供）多核苷酸编码的任何氨基酸序列的表达，因此 TLR9 配体的序列可以是（并且通常是）非编码的。TLR9 配体可包含线性双链或单链分子、环形分子，或可包含线性和环形区段。TLR9 配体可以是单链的，或可以是完全或部分为双链的。

[0122] 在一些实施方案中，用于本发明方法中的 TLR9 配体是寡核苷酸，例如由长度约 5 个核苷酸到约 200 个核苷酸、约 10 个核苷酸到约 100 个核苷酸、约 12 个核苷酸到约 50 个核苷酸、约 15 个核苷酸到约 25 个核苷酸、20 个核苷酸到约 30 个核苷酸、约 5 个核苷酸到约 15 个核苷酸、约 5 个核苷酸到约 10 个核苷酸、约 5 个核苷酸到约 7 个核苷酸的序列组成。在一些实施方案中，长度少于约 15 个核苷酸、少于约 12 个核苷酸、少于约 10 个核苷酸、或少于约 8 个核苷酸的 TLR9 配体与更大的分子连接。

[0123] 在一些实施方案中，TLR9 配体不提供真核细胞中肽或多肽的表达，例如向真核细胞中引入 TLR9 配体不导致肽或多肽的产生，因为 TLR9 配体不提供编码肽或多肽的 mRNA 的转录。在这些实施方案中，TLR9 配体缺少真核细胞中转录所需的启动子区和其他控制元件。

[0124] TLR9 配体可从细菌中分离，例如从细菌来源分离；通过合成方法产生（例如通过化学合成多核苷酸的标准方法产生）；通过标准重组方法产生，然后从细菌来源分离；或上述方法的组合。在许多实施方案中，TLR9 配体是纯化的，例如纯度为至少约 80%、至少约 90%、至少约 95%、至少约 98%、至少约 99% 或更高，例如 99.5%、99.9% 或更高。在许多实施方案中，TLR9 配体是化学合成然后纯化的。

[0125] 在另一些实施方案中，TLR9 配体是更大核苷酸构建体（例如质粒载体、病毒载体或其他此类构建体）的一部分。大量质粒和病毒载体为本领域所知，并不需要在本文详细说明。已经在多种出版物，包括例如 Current Protocols in Molecular Biology, (1987 及更新) 中描述了大量此类载体。

[0126] 一般而言，用于本发明组合中的 TLR9 配体包含至少一种未甲基化的 CpG 基序。某些哺乳动物物种（例如，啮齿类）中，多核苷酸中任何 CpG 序列的相对位置是 5' -CG-3'（即，相对而言，C 在 5' 位置，G 在 3' 位置）。

[0127] 在一些实施方案中，TLR9 配体包含中央回文核心序列（其包含至少一个 CpG 序列），其中所述中央回文核心序列含有磷酸二酯骨架，并且其中所述回文核心序列一侧或两侧的侧翼为含硫代磷酸酯骨架的多聚鸟苷序列。

[0128] 在另一些实施方案中，TLR9 配体在核酸 5' 末端或其附近包含一个或多个 TCG 序列；和至少两个额外的 CG 二核苷酸。在一些这种实施方案中，所述至少两个额外的 CG 二核苷酸被三个核苷酸、两个核苷酸或一个核苷酸分隔开。在一些这种实施方案中，所述至少两个额外的 CG 二核苷酸彼此邻接。在一些这种实施方案中，TLR9 配体在核酸的 5' 末端包含

(TCG)_n, 其中 $n = 1$ 到 3 。在另一些实施方案中, TLR9 配体包含 (TCG)_n, 其中 $n = 1$ 到 3 , 并且其中 (TCG)_n 序列在 (TCG)_n 序列的 5' 末端侧翼有一个核苷酸、两个核苷酸、三个核苷酸、四个核苷酸或五个核苷酸。

[0129] 用于本发明的 TLR9 配体的示例性共有 CpG 基序包括但不限于: 5'-嘌呤-嘌呤-(C)-(G)-嘧啶-嘧啶-3', 其中 TLR9 配体包含侧翼是至少两个嘌呤核苷酸 (例如 GG、GA、AG、AA、II 等) 和至少两个嘧啶核苷酸 (CC、TT、CT、TC、UU 等) 的 CpG 基序; 5'-嘌呤-TCG-嘧啶-嘧啶-3'; 5'-TCG-N-N-3'; 其中 N 是任何碱基; 5'-N_x(CG)_nN_y, 其中 N 是任何碱基, 其中 x 和 y 独立地是 0 到 200 的任何整数, 例如 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11-15、16-20、21-25、25-30、30-50、50-75、75-100、100-150 或 150-200; 并且 n 是 1 或更大的任何整数, 例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更大。5'-N_x(TCG)_nN_y, 其中 N 是任何碱基, 其中 x 和 y 独立地是 0 到 200 的任何整数, 例如 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11-15、16-20、21-25、25-30、30-50、50-75、75-100、100-150 或 150-200; 并且 n 是 1 或更大的任何整数, 例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更大。5'-(TCG)_n-3', 其中 n 是 1 或更大的任何整数, 例如以提供基于 TCG 的 TLR9 配体 (例如, 其中 $n = 3$, 所述多核苷酸包含序列 5'-TCGNNTCGNNTCG-3'; SEQ ID NO: 3); 5'-Nm-(TCG)_n-Np-3', 其中 N 是任何核苷酸, 其中 m 是 0、1、2 或 3, 其中 n 是 1 或更大的任何整数, 并且其中 p 是 1、2、3 或 4; 5'-Nm-(TCG)_n-Np-3', 其中 N 是任何核苷酸, 其中 m 是 0 到 5, 并且其中 n 是 1 或更大的任何整数, 其中 p 是 4 或更大, 其中序列 N-N-N-N 包含彼此邻接或通过一个核苷酸、两个核苷酸或三个核苷酸分隔开的至少两个 CG 二核苷酸; 和 5'-嘌呤-嘌呤-CG-嘧啶-TCG-3'。

[0130] 当核酸 TLR9 配体包含以下通式的序列时: 5'-Nm-(TCG)_n-Np-3', 其中 N 是任何核苷酸, 其中 m 是 0 到 5, 并且其中 n 是 1 或更大的任何整数, 其中 p 是 4 或更大, 并且其中序列 N-N-N-N 包含彼此邻接或通过一个核苷酸、两个核苷酸或三个核苷酸分隔开的至少两个 CG 二核苷酸, 可用于本发明的示例性 TLR9 配体包括但不限于: (1) 该通式的序列, 其中 $n = 2$, Np 是 NNCGNCCG; (2) 该通式的序列, 其中 $n = 2$, Np 是 AACGTTCG; (3) 该通式的序列, 其中 $n = 2$, Np 是 TTCGAACG; (4) 该通式的序列, 其中 $n = 2$, Np 是 TACGTACG; (5) 该通式的序列, 其中 $n = 2$, Np 是 ATCGATCG; (6) 该通式的序列, 其中 $n = 2$, Np 是 CGCGCGCG; (7) 该通式的序列, 其中 $n = 2$, Np 是 GCCGGCCG; (8) 该通式的序列, 其中 $n = 2$, Np 是 CCCGGGCG; (9) 该通式的序列, 其中 $n = 2$, Np 是 GCGGCCCG; (10) 该通式的序列, 其中 $n = 2$, Np 是 CCCGTTTCG; (11) 该通式的序列, 其中 $n = 2$, Np 是 GCGGTTTCG; (12) 该通式的序列, 其中 $n = 2$, Np 是 TTCGCCCCG; (13) 该通式的序列, 其中 $n = 2$, Np 是 TTCGGGCG; (14) 该通式的序列, 其中 $n = 2$, Np 是 AACGCCCCG; (15) 该通式的序列, 其中 $n = 2$, Np 是 AACGGGCG; (16) 该通式的序列, 其中 $n = 2$, Np 是 CCCGAACG; 和 (17) 该通式的序列, 其中 $n = 2$, Np 是 GGCGAACG; 并且其中, 在 1-17 任何一项中, $m = 0、1、2$ 或 3 。

[0131] 当核酸 TLR9 配体包含以下通式的序列时: 5'-Nm-(TCG)_n-Np-3', 其中 N 是任何核苷酸, 其中 m 是 0、1、2 或 3, 其中 n 是 1 或更大的任何整数, 并且其中 p 是 1、2、3 或 4, 可用于本发明的示例性 TLR9 配体包括但不限于: (1) 该通式的序列, 其中 $m = 0$, $n = 1$, 并且 Np 是 T-T-T; (2) 该通式的序列, 其中 $m = 0$, $n = 1$, 并且 Np 是 T-T-T-T; (3) 该通式的序列, 其中 $m = 0$, $n = 1$, 并且 Np 是 C-C-C-C; (4) 该通式的序列, 其中 $m = 0$, $n = 1$, 并且 Np 是 A-A-A-A; (5) 该通式的序列, 其中 $m = 0$, $n = 1$, 并且 Np 是 A-G-A-T; (6) 该通式的序列, 其中

Nm 是 T, $n = 1$, 并且 Np 是 T-T-T; (7) 该通式的序列, 其中 Nm 是 A, $n = 1$, 并且 Np 是 T-T-T; (8) 该通式的序列, 其中 Nm 是 C, $n = 1$, 并且 Np 是 T-T-T; (9) 该通式的序列, 其中 Nm 是 G, $n = 1$, 并且 Np 是 T-T-T; (10) 该通式的序列, 其中 Nm 是 T, $n = 1$, 并且 Np 是 A-T-T; (11) 该通式的序列, 其中 Nm 是 A, $n = 1$, 并且 Np 是 A-T-T; 和 (12) 该通式的序列, 其中 Nm 是 C, $n = 1$, 并且 Np 是 A-T-T。

[0132] 可用于本发明的 TLR9 配体的核心结构上游和 / 或下游的侧翼可以是任何数量或组成的核苷酸或核苷。在一些实施方案中, TLR9 配体的核心序列长度至少是 6 个碱基或 8 个碱基, 而完整的 TLR9 配体 (核心序列加 5'、3' 或两者的侧翼序列) 的长度一般在 6 个碱基或 8 个碱基到高达约 200 个碱基之间。

[0133] 可用于本发明的基于 DNA 的 TLR9 配体包括但不限于这样的多核苷酸, 其包含一个或多个以下核苷酸序列: AGCGCT, AGCGCC, AGCGTT, AGCGTC, AACGCT, AACGCC, AACGTT, AACGTC, GGCGCT, GGCGCC, GGCGTT, GGCGTC, GACGCT, GACGCC, GACGTT, GACGTC, GTCGTC, GTCGCT, GTCGTT, GTCGCC, ATCGTC, ATCGCT, ATCGTT, ATCGCC, TCGTCG, 和 TCGTCGTCG。

[0134] 用于本发明的其他 TLR9 配体包括但不限于这样的多核苷酸, 其包含一个或多个以下核苷酸序列: TCGXXXX, TCGAXXX, XTCGXXX, XTCGAXX, TCGTCGA, TCGACGT, TCGAACG, TCGAGAT, TCGACTC, TCGAGCG, TCGATTT, TCGCTTT, TCGGTTT, TCGTTTT, TCGTCGT, ATCGATT, TTCGTTT, TTCGATT, ACGTTCG, AACGTTC, TGACGTT, TGTCGTT, TCGXXX, TCGAXX, TCGTCG, AACGTT, ATCGAT, GTCGTT, GACGTT, TCGXX, TCGAX, TCGAT, TCGTT, TCGTC, TCGA, TCGT, TCGX, 和 TCG (其中“X”是任何核苷酸)。

[0135] 可用于本发明的基于 DNA 的 TLR9 配体包括但不限于这样的多核苷酸, 其包含一个或多个以下八聚体核苷酸序列: AGCGCTCG, AGCGCCCG, AGCGTTCG, AGCGTCCG, AACGCTCG, AACGCCCG, AACGTTCG, AACGTCCG, GGCGCTCG, GGCGCCCG, GGCGTTCG, GGCGTCCG, GACGCTCG, GACGCCCG, GACGTTCG, 和 GACGTCCG。

[0136] 可用于实施本发明方法的 TLR9 配体可包含一个或多个上述任何 CpG 基序。例如, 可用于本发明的 TLR9 配体可包含一次或多次 (例如 2、3、4、5 或更多次) 出现的同一 CpG 基序。或者, TLR9 配体可包含多个 CpG 基序 (例如, 2、3、4、5 或更多), 其中所述多个 CpG 基序中的至少两个具有不同的共有序列, 或者所述 TLR9 配体中的所有 CpG 基序具有不同的共有序列。

[0137] 可用于本发明的 TLR9 配体可包括或不包括回文区。如果存在, 回文序列仅延伸至 CpG 基序中 (如果存在, 在核心六聚体或八聚体序列中), 或可包括更多六聚体或八聚体序列以及侧翼核苷酸序列。

[0138] 多聚体 TLR9 配体。在一些实施方案中, TLR9 配体是多聚体。多聚体 TLR9 配体包含 2、3、4、5、6、7、8、9、10 个或更多个体 (单体) 上述核酸 TLR9 配体, 其通过非共价键连接、通过共价键连接, 彼此直接连接或通过一个或多个间隔区连接。合适的间隔区包括核酸和非核酸分子, 只要它们是生物相容的即可。在一些实施方案中, 多聚体 TLR9 配体包含单体 TLR9 配体的线性阵列。在另一些实施方案中, 多聚体 TLR9 配体是单体 TLR9 配体的分支状或树枝状阵列。

[0139] 在一些实施方案中, 多聚体 TLR9 配体具有一般结构 $(X1)_n(X2)_n$, 其中 X 是如上所述的核酸 TLR9 配体, 并具有以下长度: 从约 6 个核苷酸到约 200 个核苷酸, 例如从约 6 个

核苷酸到约 8 个核苷酸、从约 8 个核苷酸到约 10 个核苷酸、从约 10 个核苷酸到约 12 个核苷酸、从约 12 个核苷酸到约 15 个核苷酸、从约 15 个核苷酸到约 20 个核苷酸、从约 20 个核苷酸到约 25 个核苷酸、从约 25 个核苷酸到约 30 个核苷酸、从约 30 个核苷酸到约 40 个核苷酸、从约 40 个核苷酸到约 50 个核苷酸、从约 50 个核苷酸到约 60 个核苷酸、从约 60 个核苷酸到约 70 个核苷酸、从约 70 个核苷酸到约 80 个核苷酸、从约 80 个核苷酸到约 90 个核苷酸、从约 90 个核苷酸到约 100 个核苷酸、从约 100 个核苷酸到约 125 个核苷酸、从约 125 个核苷酸到约 150 个核苷酸、从约 150 个核苷酸到约 175 个核苷酸或从 175 个核苷酸到约 200 个核苷酸；并且其中 n 是从 1 到约 100 的任何数值，例如 $n = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ ，从 10 到约 15、从 15 到约 20、从 20 到约 25、从 25 到约 30、从 30 到约 40、从 40 到约 50、从 50 到约 60、从 60 到约 70、从 70 到约 80、从 80 到约 90 或从 90 到约 100。在这些实施方案中， X 和 X_2 彼此在核苷酸序列上有至少一个核苷酸的差异，并且彼此在核苷酸序列上可有 2、3、4、5、6、7、8、9、10 个或更多个碱基的差异。

[0140] 如上指出，在一些实施方案中，本发明多聚体 TLR9 配体包含通过间隔区与邻近的 TLR9 配体分隔开的 TLR9 配体。在一些实施方案中，间隔区是非 TLR9 配体核酸。在另一些实施方案中，间隔区是非核酸部分。合适的间隔区包括在美国专利公开 20030225016 中描述的那些。使用任何已知的方法使 TLR9 配体发生多聚化。

[0141] TLR9 配体修饰。可以多种方式修饰适用于本发明组合物的 TLR9 配体。例如，TLR9 配体可包含骨架磷酸基团修饰（例如，甲基磷酸酯、硫代磷酸酯、氨基磷酸酯（phosphoroamidate）和二硫代磷酸酯核苷酸间连接），所述修饰例如可增强其体内稳定性，使得它们在治疗应用中特别有用。特别有用的磷酸基团修饰是转化成核酸 TLR9 配体的硫代磷酸酯或二硫代磷酸酯形式。硫代磷酸酯和二硫代磷酸酯比其未修饰的寡核苷酸对应物具有更高的体内降解抗性，提高了 TLR9 配体的半衰期并使得它们在受治者中的利用度更高。

[0142] 本发明包括的其他修饰的 TLR9 配体包括在 5' 末端、3' 末端、或 5' 和 3' 末端具有修饰的 TLR9 配体。例如，5' 和 / 或 3' 末端可共价或非共价结合分子（核酸、非核酸、或两者皆有），从而例如提高 TLR9 配体的生物利用度、需要时提高摄入效率、促进向目的细胞的递送等。用于与 TLR9 配体缀合的分子包括但不限于胆固醇、磷脂、脂肪酸、固醇、寡糖、多肽（例如，免疫球蛋白）、肽、抗原（例如，肽、小分子等）、线性或环形核酸分子（例如，质粒）、不溶性支持物、治疗性多肽等。适合于附着到 TLR9 激动剂上的治疗性多肽包括但不限于树突细胞生长因子（例如，GM-CSF）；细胞因子；干扰素（例如， $IFN-\alpha$ 和 $IFN-\beta$ 等）； $TNF-\alpha$ 拮抗剂等。

[0143] 在一些实施方案中，TLR9 配体与不溶性支持物连接（例如，缀合、共价连接、非共价连接、或吸附到其上）。不溶性支持物的示例性非限制实例是阳离子聚（D, L- 丙交酯-co- 乙交酯）。

[0144] 其他 TLR9 配体缀合物及其生产方法为本领域所知，并描述于例如 WO 98/16427 和 WO 98/55495 中。因此，术语“TLR9 配体”包括这样的缀合物，其包含核酸 TLR9 配体。

[0145] 多肽（例如治疗性多肽）可直接缀合或例如通过接头分子间接缀合到 TLR9 配体上。多种接头分子为本领域所知，并可用于缀合物中。肽与寡核苷酸的连接可以通过肽的反应性侧链或肽的 N 端或 C 端来实现。寡核苷酸与肽的连接可以是在 3' 或 5' 末端，或中

间。接头可以有机的、无机的或半有机分子，并可以有有机分子聚合物、无机分子或者包含无机和有机分子的共聚物。

[0146] 如果存在，接头分子的长度一般足以允许寡核苷酸和 / 或多核苷酸以及连接的多肽在所述寡核苷酸和多肽之间发生一定的柔性移动。接头分子的长度一般为约 6-50 个原子。接头分子也可以是例如芳基乙炔、含有 2-10 个单体单元的乙二醇寡聚物、二胺、二酸、氨基酸或其组合。也可基于本公开内容使用可与寡核苷酸结合的其他接头分子。

[0147] b. NOD 样受体 (NLR) 激动剂

[0148] NOD 样受体 (NLR) 是在炎性和凋亡应答的调节中可具有多种功能的胞质蛋白。已经在哺乳动物基因组中发现了大约 20 个这种蛋白质，并包括称为 NOD 和 NALP 的两个主要的亚家族、II 类 MHC 反式激活子 (CIITA) 和一些其他分子 (例如, IPAF 和 BIRC1)。目前的了解提出, 这些蛋白质中的一些识别内源分子或微生物分子或胁迫应答, 并形成激活炎性胱天蛋白酶 (例如, 胱天蛋白酶 1) (其引起重要炎性细胞因子如 IL-1 的切割和激活) 的寡聚物, 和 / 或激活 NF- κ B 信号途径, 以诱导炎性分子的产生。NLR 家族有若干不同名称, 包括 CATERPILLER (或 CLR) 或 NOD-LRR 家族。

[0149] 目前已知 NOD1 和 NOD2 的配体。NOD1 识别称为内消旋 DAP 的分子, 其仅为革兰氏阴性菌的肽聚糖组分。NOD2 蛋白识别胞内 MDP (胞壁酰二肽), 其为革兰氏阳性和阴性菌的肽聚糖组分。NODS 在 NF- κ B 和 MAP 激酶途径中通过丝氨酸 - 苏氨酸激酶 (称为 RIP2) 进行信号转导。NOD 蛋白的命名是因为它们含有与核苷酸三磷酸结合的核苷酸结合寡聚化结构域。NOD 通过 N 端 CARD 结构域进行信号转导, 以激活下游基因诱导事件, 并通过 C 端富亮氨酸重复 (leucin-rich repeat, LRR) 区与微生物分子相互作用。

[0150] 像 NOD 一样, NALP 蛋白含有 C 端的 LRR, 其看来作为调节结构域起作用, 并可参与微生物病原体的识别。同样像 NOD 一样, 这些蛋白质也含有核苷酸三磷酸的核苷酸结合位点 (NBS)。通过 N 端 pyrin (PYD) 结构域介导与其他蛋白质 (例如衔接分子 ASC) 的相互作用。在人中该亚家族具有 14 个成员 (称为 NALP1 至 NALP14)。NALP3 的突变导致自身炎性疾病家族性冷自身炎性综合征、穆 - 韦二氏综合征和新生儿发病多系统炎性疾病。NALP3 的激活子包括胞壁酰二肽、细菌 DNA、ATP、毒素、双链 RNA、副粘病毒和尿酸晶体。

[0151] 也已经显示其他 NLR 如 IPAF 和 NAIP5/Birc1e 应答于沙门氏菌和军团杆菌而激活胱天蛋白酶 1。

[0152] NLR 激动剂包括但不限于 GM 三肽 (弗氏志贺氏菌 (*Shigella flexneri*))、内消旋羊毛硫氨酸 (幽门螺旋杆菌)、内消旋 DAP、 γ -D-Glu-DAP (iEDAP) (肠侵袭性大肠杆菌)、D-乳酰基-L-ala- γ -Glu-内消旋-DAP-Gly (FK156) (假单胞菌)、庚酰基- γ -Glu-内消旋-DAP-D-ala (FK565) (衣原体 (*Chlamydia*))、单核李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*)、MDP (单核李斯特菌)、MurNAc-L-Ala- γ -D-Glu-L-Lys (M-TRILys) (肺炎链球菌、鼠伤寒沙门氏菌、*Salmonella flexneri*)、鞭毛蛋白、细菌 RNA、ATP、尼日利亚菌素 (Nigericin)、Maitotoxin、尿酸晶体、气单胞菌溶素 (Aerolysin) 和炭疽致死毒素。

[0153] c. RIG 样受体 (RLR) 激动剂

[0154] 体内多种细胞能够感受感染性病毒并启动统称为抗病毒先天应答的反应。这些应答包括产生抗病毒细胞因子 (如 I 型干扰素 (IFN)), 随后合成抗病毒酶, 其负责破坏病毒复制并促进适应性免疫应答。RIG (视黄酸诱导型基因) 样受体感受触发先天免疫系统组

分的病毒 RNA 分子。RLR 的配体包括但不限于 ssRNA、dsRNA、多聚肌苷-多聚胞嘧啶核苷酸 (“poly(rI:rC)”)、双链 RNA(dsRNA) 的合成类似物和其他病毒核酸及其类似物,包括部分 RNA 病毒基因组(例如,日本脑炎病毒(JEV)、水泡性口膜炎病毒(VSV)、流感病毒、登革热病毒、西尼罗病毒、呼肠病毒和脑炎心肌炎病毒(EMCV))。RNA 区段或类似物可以是至少 20、25、30、35、40 或更多个核苷酸或核苷酸对或等同物。在某些方面, RNA 是 5' 三磷酸 RNA。

[0155] d. 白细胞免疫球蛋白样受体 (Leukocyte Immunoglobulin-Like receptor, LIR) 激动剂

[0156] 八种 LIR-1 相关分子(参阅 Fanger 等,1999 和其中的参考文献)(与 LIR-1 具有 63-84% 的氨基酸同一性)的克隆建立了免疫受体的一个新家族(LIR)。LIR 可根据其结构来分组。五种 LIR(1、2、3、5 和 8)具有胞质结构域,其含有 2、3 或 4 个基于免疫受体酪氨酸的抑制性基序(Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif, ITIM)样序列。尽管基于酪氨酸的基序中的两个(2 号和 3 号基序;I/VxYxxL/V)与原始的 ITIM 共有序列匹配,但这些 LIR 中的一些含有基于酪氨酸的基序,其中天冬酰胺残基(1 号基序;NxYxxL/V)或丝氨酸残基(4 号基序;SxYxxL/V)定位在所述酪氨酸上游两个氨基酸处。与含有 ITIM 的 LIR 不同,三种 LIR(6a、6b 和 7)含有短的胞质区,并在跨膜结构域中含有带正电的精氨酸残基。

[0157] LIR 家族的成员结合 I 类 MHC 分子。LIR-1 和 LIR-2 识别 HLA-A(A0101、A0301)、HLA-B(B0702、B0802、B1501、B2702)和 HLA-C(C0304)等位基因和非典型 I 类分子 HLA-G1。LIR-1 和 LIR-2 的结合特异性因此不同于 KIR 的结合特异性,后者识别相对有限的 I 类 MHC 等位基因亚组以及 CD94/NKG2A。后一分子识别 HLA-E,其结合口袋被来自特异性 I 类 MHC 抗原的信号序列的肽占据。

[0158] 2. 微生物组分

[0159] a. EF2505

[0160] 在某些方面,涉及在患有微生物感染或者有发生这种感染之风险的个体中治疗、抑制或减轻微生物感染的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的 StIR 肽,例如粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)蛋白 EF2505(SEQ ID NO:1)或其片段或衍生物。通常,所述个体或受试者已经接触病原性微生物或者有这种接触的危险。在某些方面,StIR 肽是纯化的或分离的多肽或肽。术语“纯化的”或“分离的”表示组分之前从其他蛋白质中分离出来或纯化出来,并且所述组分在配制到组合物中之前的纯度为至少约 70、75、80、90、95、97 或 99%。在某些实施方案中,纯化的或分离的组分的纯度为约或至少约 95、96、97、98、99、99.1、99.2、99.3、99.4、99.5% 或更高,或可从其中导出的任何范围。这种纯化的组分然后可以与其他组分混和,以形成如本文所述的组合物。

[0161] 重组 StIR 蛋白(例如 EF2505)或其片段或区段或其类似物包含 SEQ ID NO:1 的至少、至多或约 5、10、15、20、25、30、35、40、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1500、1600 或 1651 个连续氨基酸,包括其间所有值和范围。在某些方面,其片段或类似物包含至少或至多或约这样的氨基酸序列:其来自 SEQ ID NO:1 的 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120 位氨基

酸到100、150、200、250、300、350、355、360、365、370、375、380、390、395、400、401、402、403、404、405、406、407、408、409、410、411、412、413、414、415、416、417、418、419、420、421、422、423、424、425、426、427、428、429、430、431、432、433、434、435、436、437、438、439、440、441、442、443、444、445、446、447、448、449、450位氨基酸,包括其间所有值和范围。在另一方面,其多肽片段或类似物包括但不限于这样的氨基酸序列,其包含SEQ ID NO:1的至少、至多或约20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30位氨基酸到440、441、442、443、444、445、446、447、448、449、450位氨基酸。在某些方面,其多肽区段或片段或类似物包括但不限于这样的氨基酸序列,其包含SEQ ID NO:1的至少或至多或约28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、200、250位氨基酸到440、441、442、443、444、445、446、447、448、449、450位氨基酸,包括其间所有值和范围。在再一方面,其多肽片段或类似物包含的氨基酸序列包含与SEQ ID NO:1的28到449、28到442、111到449、111到442、223到449、或223到442位氨基酸具有至少70、75、80、85、90、95、96、97、98、99或100%同一性的氨基酸序列,包括其间所有值和范围。StIR蛋白质或其区段的衍生物或变体包括插入、缺失和点突变。一种特定的插入突变是融合蛋白,其在羧基端或氨基端包含对EF2505蛋白质而言外源的氨基酸序列。

[0162] 在某些方面,StIR蛋白质或其片段或区段或衍生物在喷雾或气雾制剂中施用。可通过吸入或吸气施用所述组合物。StIR或其衍生物的片段可以约0.01、0.05、0.1、0.5、1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70 μg或mg/kg到约55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、200 μg或mg/kg个体体重的量施用。在另一些方面,可向受试者施用约0.01、0.05、0.1、0.5、1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、200 μg或mg的StIR多肽或肽或其变体或衍生物或类似物。基于以下公开内容,本领域技术人员能够容易地确定StIR多肽(例如粪肠球菌蛋白EF2505)的有用区段、片段或衍生物。在一个优选方面,片段、区段或衍生物与SEQ ID NO:1的序列具有至少75%的同一性。在另一方面,片段、区段或衍生物与SEQ ID NO:1的序列具有至少80%的同一性。在另一方面,片段、区段或衍生物与SEQ ID NO:1的序列具有至少85%的同一性。在另一方面,片段、区段或衍生物与SEQ ID NO:1的序列具有至少90%的同一性。在另一方面,片段、区段或衍生物与SEQ ID NO:1的序列具有至少95%的同一性。

[0163] 在又一实施方案中,本发明涉及可药用组合物,其包含一种或多种StIR多肽(例如,粪肠球菌蛋白EF2505)或其片段或区段或衍生物或类似物;抗炎剂;抗微生物剂;和/或一种或多种药物赋型剂。通常,此类组合物是无菌的并基本上不含病原性微生物。

[0164] b. 鞭毛蛋白

[0165] 在某些方面,StIR组合物包含鞭毛蛋白多肽或其区段或衍生物,其包含称为LTR5激动剂的肽QRLSTGSRINSAKDDAAGLQIA(SE Q ID NO:2)的10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21或22个连续氨基酸。本发明的多肽也可包含与SEQ ID NO:2具有至少70、80或90%(包括其间所有值和范围)同一性的氨基酸序列。在另一些方面,鞭毛蛋白是合成的和/或纯化的或分离的鞭毛蛋白多肽或肽。术语“纯化的”或“分离的”表示组分是之前从其他蛋白质或合成试剂或副产物中分离或纯化的,并且所述组分在配制到组合物中之前的纯度为至少约95%。在某些实施方案中,纯化的或分离的组分的纯度为约或至少约80、95、96、97、98、99、99.1、99.2、99.3、99.4、99.5%或更高,或其中可导出的任何范围。然后可将

该纯化的组分与其他组分混和,以形成本文所述的组合物。

[0166] 重组鞭毛蛋白或其片段或区段包含 SEQ ID NO:2 或其他鞭毛多肽的 5、10、15、20、21、22、23、24、25、30、35、40、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、200、250、300、350 或 400 个连续氨基酸(包括其间所有值和范围)。这些片段或区段与 SEQ ID NO:2 或其他鞭毛多肽具有至少、至多或约 70、75、80、85、90、95、96、97、98、99 或 100% 的同一性。在某些方面,鞭毛蛋白多肽或区段与 SEQ ID NO:2 的序列具有至少 75% 的同一性。在另一方面,鞭毛蛋白多肽或区段与 SEQ ID NO:2 的序列具有至少 80% 的同一性。在另一方面,鞭毛蛋白多肽或区段与 SEQ ID NO:2 的序列具有至少 85% 的同一性。在另一方面,鞭毛蛋白多肽或区段与 SEQ ID NO:2 的序列具有至少 90% 的同一性。在另一方面,鞭毛蛋白多肽或区段与 SEQ ID NO:2 的序列具有至少 95% 的同一性。鞭毛蛋白或其区段的衍生物或变体包括 SEQ ID NO:2 的插入、缺失和点突变。一种特定的插入突变是融合蛋白,其在羧基端或氨基端包含对鞭毛蛋白而言外源的氨基酸序列。许多鞭毛蛋白为本领域所知,包括但不限于具有登录号 BAB58984(gi|14278896);YP_001330159(gi|150402865);YP_001323483(gi|150399716);CAA28975(gi|1333716);CAA02137(gi|1567895);CAA67105(gi|1580779);AAR10473(gi|38049688);CAR58992(gi|197093531);YP_001217666(gi|147675484);CAL12564(gi|122089712);BAD14977(gi|46093563);或 CAD0_5707(gi|16503200) 的鞭毛蛋白,均以援引方式将其在本申请优先权日期时的内容整体并入本文。

[0167] c. 微生物溶胞产物

[0168] 本发明的实施方案还包括可药用组合物,其包含基本无病原性微生物的溶胞产物、抗炎剂和一种或多种药物赋型剂,其中所述组合物是无菌的并且基本上不含病原性微生物。微生物溶胞产物通常是经超声处理的;匀浆的;照射的;通过气压、呼吸、去污剂或酶方法及其组合裂解的。在一个特定方面,在裂解之前、过程中或之后用 UV 照射微生物溶胞产物。微生物溶胞产物可包括但不限于细菌、真菌或病毒溶胞产物。在某些实施方案中,微生物溶胞产物是细菌溶胞产物。从中制备溶胞产物的微生物不一定是有毒微生物,并且通常不会是有毒微生物。本发明的方面包括来自对受试者的健康影响有限的细菌的溶胞产物。影响有限指在至少、至多或约 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 天时间里对受试者的组织、器官或系统产生极低副作用和不显著的损伤。

[0169] 本发明的组合物不需要直接来自要针对其进行保护或治疗的有毒生物。细菌可来自嗜血杆菌属(Haemophilus),但不限于嗜血杆菌。可鉴定在受试者中构成最小副作用威胁的细菌。在某些方面,细菌是流感嗜血杆菌,特别是不可分型流感嗜血杆菌(NTHi)(Clement 等,2008;Clement 等,2009;Evans 等,2010;Tuvim 等,2009)。

[0170] 微生物溶胞产物的蛋白质浓度可为至少约、约或至多约 0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5 或 10mg/ml,包括其间所有值和范围。在某些方面,微生物溶胞产物的蛋白质浓度为至少约、约或至多约 10mg/ml。

[0171] 本发明的实施方案包括可通过呼吸道施用的微生物溶胞产物。在某些方面,通过吸入施用。在另一方面,组合物是雾化的或是可被受试者吸入的形式。在某些实施方案中,溶胞产物组合物包含抗炎剂,包括类固醇类和非类固醇类抗炎药(NSAID)。对于其他细节,参阅美国专利申请 11/830,622 “Compositions and methods for stimulation of lung

innate immunity”Dickey 等,以援引方式整体并入本文。

[0172] B. 宿主或自身组分

[0173] 来自受试者或宿主的细胞和组织的许多分子可刺激、增强或促进免疫应答的产生。这些部分称为宿主或自身部分或组分,包括从受伤的、受胁迫的或濒死细胞中释放的小分子;参与微生物杀伤或中和的组分;细胞因子;和从细胞或组织释放的大分子。

[0174] 1. 小分子宿主化合物

[0175] 与受伤的、受胁迫的或濒死的细胞相关或从中释放的小分子如腺苷 5'-三磷酸(ATP)、尿酸(尿酸盐)和腺苷。许多这些分子的受体及其调节炎症的途径已经充分确定。炎症是免疫系统针对感染或刺激作出的第一应答之一。炎症由受伤细胞所释放的化学因子刺激,并且作用于建立针对感染扩散的物理屏障,并在清除病原体后促进任何损伤组织的愈合。炎症过程中产生的化学因子(组胺、缓激肽、血清素、白三烯,还有前列腺素)使疼痛受体敏感,引起患处血管舒张,并吸引吞噬细胞,特别是嗜中性粒细胞。嗜中性粒细胞然后通过释放召集其他白细胞和淋巴细胞的因子来触发免疫系统的其他部分。

[0176] 可包含在本发明 StIR 组合物中的小分子宿主组分包括 ATP、腺苷、组胺、缓激肽、血清素、白三烯、前列腺素。

[0177] 2. 胞外宿主部分

[0178] 在指导微生物杀伤和/或信号转导中起作用的胞外宿主蛋白如补体、正五聚蛋白、防御素和 cathelicidin。这些分子经常组成型存在,但直至它们通过与微生物产物结合或被蛋白水解切割或一些其他激活机制而激活后才进行信号转导。此外,其产生可以提高。在某些方面,这些蛋白质处于激活形式(体外激活或加工,或通过改造蛋白质)。

[0179] 补体系统是帮助从生物体中清除病原体的生物化学级联。补体系统是非适应性且不在个体一生中发生改变的更大免疫系统的一部分;因此其属于先天免疫系统。然而,其可通过适应性免疫系统募集并发挥作用。

[0180] 补体系统由在血液中发现的许多小蛋白质组成,通常作为无活性酶原的形式循环。当受几种触发剂之一刺激时,该系统中的蛋白酶切割特定蛋白质,以释放细胞因子并启动进一步切割的放大级联。该激活级联的最终结果是应答的大规模放大和细胞杀伤性膜攻击复合物的激活。超过 20 种蛋白质和蛋白质片段组成了补体系统,包括血清蛋白质、浆膜蛋白质和细胞膜受体。这些蛋白质主要在肝中合成,它们占血清球蛋白级分的约 5%。

[0181] 可包括在 StIR 组合物中的补体系统组分包括但不限于 C1-复合物(C1q、C1r、C1s 和 C1qr2s2)、C1r2s2、C4、C2、C4a、C4b、C2a、C2b C3-转化酶(C4b2a 复合物)、C3a、C3b; C5 转化酶(C4bC2aC3b 复合物)、衰变加速因子(DAF)、因子 B、C3bB、因子 D、Ba、Bb、C3bBb、C3bBbC3b、C5、C5a、C5b、C6、C7、C8、C9,和膜攻击复合物(membrane attack complex, MAC)(C5b6789)。

[0182] 正五聚蛋白是通常具有钙依赖性配体结合和特征性扁平 β -凝胶卷结构(与豆科凝集素的结构类似)的蛋白质家族。“短”正五聚蛋白包括血清淀粉样 P 成分(SAP)和 C 反应蛋白(CRP)。“长”正五聚蛋白包括 PTX3(细胞因子调节的分子)和几种神经正五聚蛋白。

[0183] 防御素是在脊椎动物和无脊椎动物中均存在的小的富含半胱氨酸的阳离子蛋白质。它们对细菌、真菌和许多有被膜的和无被膜的病毒有活性。它们由 18-45 个氨基酸组成,包括 6 个(在脊椎动物中)到 8 个保守半胱氨酸残基。免疫系统的细胞含有这些肽,以

帮助杀死例如嗜中性粒细胞和几乎所有上皮细胞中被吞噬的细菌。大多数防御素通过与微生物细胞膜结合而发挥作用,并且一旦嵌入,就形成孔样膜缺损,其允许必需的离子和营养物质流出。

[0184] 可包含在本发明 StIR 组合物中的防御素包括但不限于 α -防御素 (DEFA1、DEFA1A3、DEFA3 和 / 或 DEFA4)、 β -防御素 (DEFB1、DEFB4、DEFB103A/DEFB103B 至 DEFB107A/DEFB107B、DEFB110 至 DEFB133)、和 / 或 θ -防御素 (DEFT1P)。

[0185] Cathelicidin 抗微生物肽是存在于多形核白细胞 (PMN) 的溶酶体中的多肽家族。Cathelicidin 家族抗微生物多肽的成员的成员的特征在于具有高度保守的区域 (cathelin 结构域) 和高度可变的 cathelicidin 肽结构域。已经从许多不同的哺乳动物物种中分离了 cathelicidin 肽。Cathelicidin 最初在嗜中性粒细胞中发现,但自此从许多其他细胞 (包括被细菌、病毒、真菌或激素 1,25-D 激活的巨噬细胞和上皮细胞) 中也发现了 cathelicidin。Cathelicidin 家族与组织蛋白酶家族的半胱氨酸蛋白酶抑制剂具有一级序列同源性,尽管一般缺少认为在该蛋白酶抑制中具有重要性的氨基酸残基。

[0186] 3. 细胞因子

[0187] 细胞因子是广泛用于细胞通讯的一类信号分子。它们是蛋白质、肽或糖蛋白。术语细胞因子包括大且多样的多肽调节子家族,其由全身不同胚胎起源的细胞广泛产生。细胞因子的作用可以是自分泌、旁分泌和内分泌。细胞因子对先天性和适应性免疫应答的发生和功能至关重要,尽管不限于仅仅免疫系统。它们经常由遇到病原体的免疫细胞分泌,由此激活并募集其他免疫细胞,以增强系统对该病原体的应答。

[0188] 细胞因子刺激先天免疫细胞 (特别是上皮细胞) 的抗微生物防御,如 IL-17、IL-22、IFN- γ 。在某些情况下,这代表了适应性先天免疫系统对先天炎症的放大,如 Th17 细胞产生 IL-17 时。在另一些情况下,细胞因子由不作为适应性免疫系统一部分的细胞释放,例如上皮细胞、间充质细胞或树突细胞。

[0189] 可包含在本发明 StIR 组合物中的细胞因子包括 IL-1 超家族 1 ((IL-1Ra)、IL-18、IL-33); IL-6 样 /gp130 利用家族 (IL-6、IL-11、IL-27、IL-30、IL-31、制瘤素 M、白血病抑制因子、睫状节神经细胞营养因子、Cardiotrophin 1); IL-10 家族 (IL-10、IL-19、IL-20、IL-22、IL-24、IL-26); 干扰素类型 III (IL-28、IL-29); 常见的 γ -链家族 (IL-2/15、IL-3、IL-4、IL-7、IL-9、IL-13、IL-21); IL-12 家族 (IL-12、IL-23、IL-27、IL-35)、IL-5; IL-8; IL-14; IL-16; IL-17/25; IL-32; CCL 趋化因子 (CCL1、CCL2、CCL3、CCL4、CCL5、CCL6、CCL7、CCL8、CCL9、CCL10、CCL11、CCL12、CCL13、CCL14、CCL15、CCL16、CCL17、CCL18、CCL19、CCL20、CCL21、CCL22、CCL23、CCL24、CCL25、CCL26、CCL27、CCL28); CXCL 趋化因子 (CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL4、CXCL5、CXCL6、CXCL7、CXCL8、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL14、CXCL15、CXCL16、CXCL17); CX3CL-1; XCL1; XCL 2; TNF (配体) 超家族 (4-1BB 配体、B 细胞激活因子、FAS 配体、淋巴细胞毒素、OX40L、RANKL、TRAIL); 分化细胞因子簇 (CD70、CD153、CD154); 干扰素 (IFN-I α (PEG 化的 2a、PEG 化的 2b)、IFN-I β (1a、1b))、IFN-II γ 、和 IFN-III。

[0190] 4. 大分子宿主部分

[0191] 大分子或其片段可从胞外基质、细胞表面或细胞内部释放,并激活先天免疫的信号转导,如 dectin、多功能蛋白聚糖 (versican)、HMGB-I、DNA 和 RNA。通常,这些大分子在

正常情况下被隐藏起来而不与靶受体接触,这是隐藏在细胞内部或者通过分子内或分子间相互作用掩蔽。细胞破裂后或者基质的细胞表面蛋白水解而显示出信号部分(或一些相似机制)后,它们被释放出来与靶受体相互作用。

[0192] II. 多肽和肽组合物

[0193] 在某些实施方案中,本发明涉及至少一种多肽或肽(例如,多肽区段)或其衍生物或变体。如本文所用,“蛋白质”、“多肽”、“肽”、“多肽或肽组合物”或“多肽或肽化合物”一般指(但不限于)至少5个氨基酸或氨基酸类似物(全部氨基分子,见下文)的蛋白质或多肽。上文描述的所有“多肽或肽”术语在本文中可互换使用。

[0194] 在某些实施方案中,所述至少一种多肽或肽分子的大小可包括但不限于这样的分子,其具有至少、至多或约5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、50、100、500、1000至约10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、50、100、500或更多个氨基酸残基,以及其中可引出的任何值或范围。本发明包括本文讨论的任何序列的连续氨基酸或其类似物的那些长度。

[0195] 多肽或肽的区段或片段包括本文公开的或提到的序列的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、300、350、400、450位氨基酸至10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、300、350、400、450、500、550、600位氨基酸(包括其间所有值和范围)。

[0196] 如本文所用,“氨基分子”指本领域普通技术人员已知的任何氨基酸、氨基酸衍生物或氨基酸模拟物。在某些实施方案中,多肽或肽分子的残基是连续的,没有任何非氨基分子中断氨基分子残基的序列。在另一些实施方案中,序列可包含一个或多个非氨基分子部分。在某些实施方案中,多肽或肽分子的残基序列可被一个或多个非氨基分子部分中断。

[0197] 因此,术语“多肽或肽组合物”包括这样的氨基分子序列,其包含天然合成的蛋白质中20种常见氨基酸中的至少一种,或至少一种修饰的或稀有的氨基酸。

[0198] 在某些实施方案中,多肽或肽组合物包含至少一种蛋白质、多肽或肽。在涉及TLR激动剂组合物的方法中,多肽或肽可具有鞭毛蛋白多肽(如SEQ ID NO:2或同源多肽)的全部或部分氨基酸序列。在某些实施方案中,含有蛋白质、多肽或肽的组合物一般是各自基本上不含毒素、病原体和有害免疫原的蛋白质或肽或者合成的蛋白质或肽。在某些方面,多肽是重组的或合成的氨基酸序列。

[0199] 多肽或肽组合物可通过本领域技术人员已知的任何技术来制备,包括通过标准分子生物学技术表达蛋白质、多肽或肽,从天然来源分离多肽或肽,或者化学合成多肽或肽材料。可使用本文公开的或本领域普通技术人员已知的技术扩增和/或表达这些多肽或肽的编码区。或者,蛋白质、多肽和肽的多种商品化制剂为本领域技术人员所知。

[0200] 在某些实施方案中,多肽或肽组合物可以是纯化的。一般地,“纯化的”指已经经过分级分离而去除多种其他蛋白质、多肽、肽和其他分子和化合物的特定的蛋白质、多肽或肽组合物,并且所述组合物基本上保留了其活性,这可通过例如本领域普通技术人员已知的用于特定的或期望的蛋白质、多肽或肽的蛋白质测定来评估。

[0201] 基本上含有任何蛋白质、多肽或肽的组分均可考虑用于本文公开的组合物和方法中。在某些实施方案中考虑的是,气雾剂制剂或喷雾的或雾化的或可喷雾的组合物可允许组合物通过吸入、呼吸等更精确或更容易地应用到呼吸系统。

[0202] A. 多肽或肽变体和衍生物

[0203] 本发明的蛋白质、多肽和肽的氨基酸序列变体或衍生物可以是替换、插入或缺失变体,以及包括氨基酸类似物或衍生物。缺失变体缺少天然蛋白质中对功能或免疫原性活性不是至关重要的一个或多个残基。另一常见类型的缺失变体是缺少分泌信号序列或指导蛋白质结合至细胞的特定部分的信号序列,或者跨膜区或体内活性不需要的其他功能序列。插入突变体通常包括在多肽的非末端位点上添加物质。这可包括插入免疫活性表位或仅插入单个残基。在下文中讨论了末端添加,称为融合蛋白。

[0204] 替换变体通常在多肽或肽的一个或多个位点上含有一个氨基酸与另一氨基酸的替换,并可设计来调节一种或多种特性,如对蛋白水解切割的稳定性,但不丧失其他功能或特性。这种类型的替换优选是保守的,即将一个氨基酸替换为具有相似形状和电荷的氨基酸。保守替换为本领域所熟知,并包括例如以下的改变:丙氨酸变成丝氨酸;精氨酸变成赖氨酸;天冬酰胺变成谷氨酰胺或组氨酸;天冬氨酸变成谷氨酸;半胱氨酸变成丝氨酸;谷氨酰胺变成天冬酰胺;谷氨酸变成天冬氨酸;甘氨酸变成脯氨酸;组氨酸变成天冬酰胺或谷氨酰胺;异亮氨酸变成亮氨酸或缬氨酸;亮氨酸变成缬氨酸或异亮氨酸;赖氨酸变成精氨酸;甲硫氨酸变成亮氨酸或异亮氨酸;苯丙氨酸变成酪氨酸、亮氨酸或甲硫氨酸;丝氨酸变成苏氨酸;苏氨酸变成丝氨酸;色氨酸变成酪氨酸;酪氨酸变成色氨酸或苯丙氨酸;缬氨酸变成异亮氨酸或亮氨酸。

[0205] 术语“生物功能等同物”为本领域所熟知,并在本文中进行了进一步详细定义。因此,生物功能等同物会具有这样的序列,其中约 70、75、80、85、90、95、96、97、98、99%的氨基酸与多肽或肽或其变体或类似物或衍生物的氨基酸相同或功能等同,并提供相似的生物活性/对鞭毛蛋白或其他 TLR 激动剂的应答。

[0206] 以下是基于改变多肽或肽的氨基酸来产生等同的(或甚至改善的)第二代分子的讨论。例如,多肽或肽中的某些氨基酸可替换成其他氨基酸,而不明显丧失特定活性,如免疫应答的增强。因为通常限定蛋白质功能活性的是多肽或肽的相互作用能力和特性,所以可在多肽或肽序列以及其相应 DNA 编码序列中进行某些氨基酸替换,但产生具有相似特性的蛋白质。因此,本发明人考虑在编码本发明的多肽或肽的 DNA 序列中进行多种改变,但不明显丧失其生物效用或活性,如下文所讨论。

[0207] 在产生这些改变时,可考虑氨基酸的亲水指数。亲水氨基酸指数在赋予蛋白质相互作用生物功能中的重要性一般为本领域所理解(Kyte&Doolittle,1982)。公认的是,氨基酸的相对亲水特征决定了所得蛋白质的二级结构,其继而限定了蛋白质与其他分子、细胞、组织等(例如酶、底物、受体、DNA、抗体、抗原、免疫细胞和系统等)的相互作用。

[0208] 本领域中也应理解的是,可在亲水性基础上有效地进行相似氨基酸的替换。以援引方式并入本文的美国专利 4,554,101 描述,蛋白质的最高局部平均亲水性(由临近氨基酸的亲水性决定)与蛋白质的生物学特性相关。如美国专利 4,554,101 中详细描述,已为氨基酸残基赋予以下亲水性值:精氨酸(+3.0);赖氨酸(+3.0);天冬氨酸(+3.0±1);谷氨酸(+3.0±1);丝氨酸(+0.3);天冬酰胺(+0.2);谷氨酰胺(+0.2);甘氨酸(0);苏氨酸(-0.4);脯氨酸(-0.5±1);丙氨酸(-0.5);组氨酸*-0.5;半胱氨酸(-1.0);甲硫氨酸(-1.3);缬氨酸(-1.5);亮氨酸(-1.8);异亮氨酸(-1.8);酪氨酸(-2.3);苯丙氨酸(-2.5);色氨酸(-3.4)。

[0209] 也应理解的是,氨基酸可替换成具有相似亲水性值的另一氨基酸,但仍然产生生物学等同且免疫学等同的蛋白质。在这种改变中,优选其亲水性值在 ± 2 内的氨基酸替换,特别优选其亲水性值在 ± 1 内的那些,甚至更优选其亲水性值在 ± 0.5 内的那些。

[0210] 如上文指出,氨基酸替换一般基于氨基酸侧链取代基的相对相似性,例如它们的疏水性、亲水性、电荷、大小等。将多种上述特征考虑在内的示例性替换为本领域技术人员所熟知,包括:精氨酸和赖氨酸;谷氨酸和天冬氨酸;丝氨酸和苏氨酸;谷氨酰胺和天冬酰胺;以及缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸。

[0211] 也可修饰本发明多肽或肽化合物的内部氨基酸和/或氨基端和/或羧基端,以产生本发明的其他化合物,即多肽或肽衍生物。氨基端修饰包括甲基化(例如, $-\text{NHCH}_3$ 或 $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$)、乙酰化(例如,用乙酸或其卤代衍生物,如 α -氯乙酸、 α -溴乙酸或 α -碘乙酸)、添加苄氧羰基(Cbz),或用含有以 RCOO^- 定义的羧酸官能团或 R-SO_2^- 定义的磺酰官能团及相似基团的任何封闭基封闭氨基端,其中 R 选自烷基、芳基、杂芳基、烷基芳基等。也可以在 N 端掺入无氨基的酸(从而没有 N 端氨基),以降低对蛋白酶的敏感性或限制多肽或肽化合物的构象。

[0212] 羧基端修饰包括用甲酰胺基团替换游离酸或在羧基端形成环形内酰胺,以引入结构限制。也可使本发明的肽环化,或在肽的末端掺入无氨基或无羧基的残基,从而没有末端氨基或羧基,来降低对蛋白酶的敏感性或限制肽的构象。本发明化合物的 C 端官能团包括酰胺、酰胺低级烷基、酰胺二(低级烷基)、低级烷氧基、羟基和羧基,及其低级酯衍生物和可药用盐。

[0213] 可将 20 种遗传编码氨基酸(或立体异构体 D 氨基酸)的天然侧链替换为其他侧链,例如用诸如烷基、低级烷基、环状 4、5、6 到 7 员烷基、酰胺、酰胺低级烷基、酰胺二(低级烷基)、低级烷氧基、羟基、羧基及其低级酯衍生物的基团以及用 4、5、6 至 7 员杂环。具体而言,可使用脯氨酸类似物,其中脯氨酸残基环大小从 5 员变成 4、6 或 7 员。环状基团可以是饱和的或不饱和的,如果是不饱和的可以是芳族的或非芳族的。杂环基团优选含有一个或多个氮、氧和/或硫杂原子。此类基团的实例包括呋喃基(furazanyl)、呋喃基、咪唑烷基、咪唑基、咪唑啉基、异噻唑基、异噻唑基、吗啉基(例如吗啉代)、噁唑基、哌嗪基(例如 1-哌嗪基)、哌啶基(例如 1-哌啶基、哌啶代(piperidino))、吡喃基、吡嗪基、吡唑烷基、吡唑啉基、吡唑基、哒嗪基、吡啶基、嘧啶基、吡咯烷基(例如 1-吡咯烷基)、吡咯啉基、吡咯基、噻二唑基、噻唑基、噻吩基、硫代吗啉基(例如硫代吗啉代(thiomorpholino))和三唑基。这些杂环基团可以是取代的或未取代的。基团是取代的时,取代基可以是烷基、烷氧基、卤素、氧,或者取代或未取代的苯基。

[0214] 也可通过磷酸化和其他方法(例如 Hruby 等(1990)中所述)便利地修饰多肽或肽。

[0215] 本发明的肽化合物也作为结构模块用于具有相似生物活性的非肽化合物。本领域的技术人员公认的是,可使用多种技术来构建这样的化合物,其与前导肽化合物具有相同的或相似的期望生物活性,但在溶解度、稳定性和对水解和蛋白质水解的敏感性方面比前导肽化合物具有更有利的活性(参阅, Morgan 和 Gainor, 1989)。这些技术包括将肽骨架替换为由磷酸酯、酰胺化物、氨基甲酸酯、磺酰胺、仲胺和 N-甲基氨基酸组成的骨架。

[0216] 此外,本发明的化合物可含有一个或多个分子内二硫键。在一个实施方案中,肽单

体或二聚体包含至少一个分子内二硫键。在一些优选的实施方案中,肽二聚体包含两个分子内二硫键。可通过使肽核心序列中的半胱氨酸残基氧化形成该二硫键。在一个实施方案中,通过选择有效优化期望的异构体形成的氧化剂类型和浓度来实施半胱氨酸键形成的控制。例如,当氧化剂是 DMSO 时,优先完成(与形成分子间二硫键相比)肽二聚体的氧化,以形成两个分子内二硫键(在每条肽链上各有一个)。在某些实施方案中,通过在肽合成过程中选择性使用巯基保护基来控制半胱氨酸键的形成。

[0217] 本发明的另一些实施方案提供这些二硫化物衍生物类似物,其中一个硫已经被 CH_2 基团或硫的其他电子等排体替换。可使用本领域已知的方法,通过分子内或分子间置换,由本发明化合物制备这些类似物,其中每一核心序列含有至少一个 Cys (C) 或高半胱氨酸残基以及代替第二个 C 残基的 α -氨基- γ -丁酸(参阅例如, Barker 等, 1992 和 Or 等, 1991)。本领域技术人员会容易地理解,也可使用 α -氨基- γ -丁酸和高半胱氨酸的其他同源物进行该置换。

[0218] 除了上述环化策略,也可使用其他非二硫化物肽环化策略。此类备选环化策略包括例如酰胺环化策略以及涉及硫醚键形成的那些策略。因此,本发明的化合物可以具有分子内酰胺键或分子内硫醚键的环化形式存在。例如,可合成肽,其中核心序列的一个半胱氨酸被赖氨酸替换,第二个半胱氨酸被谷氨酸替换。然后,可通过这两个残基的侧链之间的酰胺键来形成环状单体。或者,可合成肽,其中核心序列的一个半胱氨酸被赖氨酸替换。然后通过赖氨酸残基的侧链与核心序列的第二个半胱氨酸残基之间的硫醚连接来形成环状单体。这样,除了二硫化物环化策略外,还可容易地使用酰胺环化策略和硫醚环化策略,来环化本发明的化合物。或者,可用 α -取代的乙酸给肽的氨基端加帽,其中 α -取代基是离去基团,如 α -卤代乙酸,例如, α -氯乙酸、 α -溴乙酸或 α -碘乙酸。

[0219] 下文说明书中包括的 2004 年 5 月 12 日提交的美国专利申请序列号 10/844,933 以援引方式整体并入本文。水溶性聚合物如聚乙二醇 (PEG) 可用于共价修饰具有治疗重要性的多肽或肽。认为这类聚合物的附着增强了生物活性、提高了水溶性,并增强对蛋白酶消化的抗性。例如,已经报道, PEG 共价附着到治疗性多肽,如白细胞介素 (Knauf, 等, 1988 ; 15064 ; Tsutsumi 等, 1995)、干扰素 (Kita 等, 1990)、过氧化氢酶 (Abuchowski 等, 1977, 超氧化物歧化酶 (Beauchamp 等, 1983, 和腺苷脱氨酶 (Chen 等, 1981) 上延长了它们在体内的半衰期,和 / 或降低了它们的免疫原性和抗原性。

[0220] 本发明的化合物还可包含一个或多个水溶性聚合物部分。优选地,这些聚合物共价附着到该化合物上。水溶性聚合物可以是例如聚乙二醇 (PEG)、乙二醇 / 丙二醇的共聚物、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1,3-二氧戊烷、聚-1,3,6-三噁烷、乙烯 / 马来酸酐共聚物、聚氨基酸(同聚物或随机共聚物)、聚(n-乙烯吡咯酮)聚乙二醇、丙二醇同聚物、聚氧丙烯 / 氧乙烯共聚物和聚氧乙烯化多元醇。

[0221] 可使用多种化学方法中的任何方法将本发明的化合物附着到水溶性的聚合物上(例如, PEG), 以将水溶性聚合物连接到分子的受体结合部分上(例如, 肽 + 间隔区)。典型的实施方案使用单个附着接点, 用于将水溶性聚合物共价附着到受体结合部分上, 然而在一些备选实施方案中, 可使用多个附着接点, 包括其他变异, 其中不同类型的水溶性聚合物在不同的附着接点上附着到受体结合部分, 其可包括共价附着接合到间隔区和 / 或一条或两条肽链上。

[0222] PEG 试剂包括但不限于 mPEG2-NHS、mPEG2-ALD、多臂 PEG、mPEG (MAL)₂、mPEG2 (MAL)、mPEG-NH₂、mPEG-SPA、mPEG-SBA、mPEG- 硫 酯、mPEG- 双 酯、mPEG-BTC、mPEG-ButyrALD、mPEG-ACET、异 功 能 化 的 PEG (NH₂-PEG-COOH、Boc-PEG-NHS、Fmoc-PEG-NHS、NHS-PEG-VS、NHS-PEG-MAL)、PEG 丙烯酸酯 (ACRL-PEG-NHS)、PEG- 磷脂 (例如 mPEG-DSPE)、SUNBRITE 系列的多臂 PEG, 包括通过本领域技术人员选定的化学法激活的基于甘氨酸的 PEG 的 GL 系列、任何 SUNBRITE 激活的 PEG (包括但不限于羧基 -PEG、p-NP-PEG、Tresyl-PEG、醛 PEG、缩醛 -PEG、氨基 -PEG、巯基 -PEG、马来酰亚胺 -PEG、羟基 -PEG- 胺、氨基 -PEG-COOH、羟基 -PEG- 醛、羧酸酐型 -PEG、功能化的 PEG- 磷脂, 和本领域技术人员根据其特定应用和选择的其他类似和 / 或合适的活性 PEG)。

[0223] 附着的聚合物分子的数量可变化;例如, 可将 1、2、3 或更多个聚合物附着到本发明的多肽或肽上。多个附着的聚合物可以是相同或不同的化学部分 (例如, 不同分子量的 PEG)。在一些情况下, 附着反应中聚合物分子与肽分子的比例以及反应混合物中每一种的总浓度可影响聚合物附着的程度 (附着到肽上的聚合物部分的数量和 / 或附着有聚合物的肽的总数)。一般而言, 聚合物与肽的最佳比例 (就反应效率而言, 不提供过量的未反应肽和 / 或聚合物部分) 将基于以下因素确定: 如聚合物附着的期望程度 (例如, 单、二、三等)、所选聚合物的分子量、聚合物是分支的还是不分支的, 以及具体附着方法的反应条件。

[0224] 在另一些方面, 可通过添加水不溶性聚合物对本发明化合物进行衍生。代表性水不溶性聚合物包括但不限于聚磷腈 (polyphosphazine)、聚乙烯醇、聚酰胺、聚碳酸酯、聚亚烷基 (polyalkylene)、聚丙烯酰胺、聚烷基二醇、聚氧化乙烯、聚对苯二甲酸亚烷基酯 (polyalkylene terephthalate)、聚乙烯醚、聚乙烯酯、聚乙烯卤代物、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙醇酸交酯、聚硅氧烷、聚氨基甲酸酯、聚甲基丙烯酸甲酯、聚甲基丙烯酸乙酯、聚甲基丙烯酸丁酯、聚甲基丙烯酸异丁酯、聚甲基丙烯酸己酯、聚甲基丙烯酸异癸酯、聚甲基丙烯酸月桂酯、聚甲基丙烯酸苯酯、聚丙烯酸甲酯、聚丙烯酸异丙酯、聚丙烯酸异丁酯、聚丙烯酸十八酯、聚乙烯、聚丙烯、聚乙二醇、聚氧化乙烯、聚对苯二甲酸亚乙酯、聚乙酸乙烯酯、聚氯乙烯、聚苯乙烯、聚乙烯吡咯烷酮、普流罗尼和聚乙烯苯酚及其共聚物。

[0225] 用于本发明衍生物的合成修饰的天然聚合物包括但不限于烷基纤维素、羟烷基纤维素、纤维素醚、纤维素酯和硝酸纤维素。广泛类型的合成修饰天然聚合物的成员包括但不限于甲基纤维素、乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羟丁基甲基纤维素、乙酸纤维素、丙酸纤维素、醋酸丁酸纤维素、醋酸纤维素、羧甲基纤维素、三醋酸纤维素、纤维素硫酸钠盐以及丙烯酸和甲基丙烯酸酯和褐藻酸的共聚物。

[0226] 在某些方面, 可通过添加糖基或修饰的糖来修饰或衍生本发明的多肽或肽。本发明提供多肽和肽衍生物, 其含有修饰的糖、修饰的糖核苷酸和修饰的糖的缀合物。在本发明的修饰的糖化合物中, 糖部分优选为糖、脱氧糖、氨基糖或 N- 酰基糖。术语“糖”及其等同物“糖基”指单体、二聚物、寡聚物和多聚物。也可利用修饰基团使糖部分功能化。修饰基团通常通过与糖部分上的胺、巯基或羟基 (例如伯羟基) 缀合而缀合到糖部分上。在一个实施方案中, 修饰基团通过糖上的胺部分 (例如通过酰胺、氨基甲酸乙酯或尿素 (其通过胺与修饰基团的活性衍生物的反应而形成)) 附着。

[0227] 任何糖均可用作本发明缀合物的糖。此类糖包括但不限于葡萄糖、半乳糖、甘露糖、海藻糖和唾液酸。其他有用的糖包括氨基糖, 如葡糖胺、半乳糖胺、甘露糖胺、唾液酸的

5-胺类似物等。糖可以是自然界中发现的结构,或可被修饰以提供用于缀合额外的修饰基团的位点。

[0228] 本领域的技术人员会认识到,所述结构和组合物可一般性地应用到不同种类的糖基、修饰糖基、活化的修饰糖基和修饰糖基缀合物中。

[0229] III. 肺防御的刺激

[0230] 本发明人已经使用小鼠作为肺微生物感染的模型。在某些研究中,未处理的小鼠具有100%的死亡率,但经处理的小鼠受到高度保护。不希望受到任何特定机制或理论的约束,相信保护是由于局部防御或先天免疫的激活。已经测定了受试者单次和重复接触本发明组合物的效应,并没有观察到明显的严重病理学,如过早死亡、体重减轻或行为改变。

[0231] 本发明的一个非限制性益处是其可以快速并便利地递送并产生效果。同样,所述组合物可以经济地大量生产并易于保存,并可被人容易地转运到医院环境外。通常,本发明组合物的施用和本发明的方法导致甚至在细胞进入前对侵入病原体的有至少一定的杀伤或抑制。在一些病原体通过逃脱胞外杀伤而进入细胞或者在病原体接触后(先行性)而不是病原体接触前(预防性)施用组合物的情况下,考虑所述组合物和相关方法促进因肺中增强或放大的局部应答而引起的胞内杀伤。考虑所述组合物和相关方法针对多种呼吸道病原体具有或产生保护性或治疗性应答。

[0232] StIR 组合物给予个体的保护或治疗可因呼吸道抗微生物机制的广泛活性而延伸至额外的微生物病原体类别,包括革兰氏阴性菌、胞内细菌、真菌和病毒。本申请中描述的试剂会简化对抗措施的贮存和部署。同样,本发明的组合物和方法会排除生物武器攻击或其他接触或潜在接触事件过程中快速鉴定特定病原体的困难。

[0233] 此外,生产和购买在多种民用和生物防御情况下具有应用性的试剂的经济效益是显著的。增强局部上皮机制在经常患有嗜中性粒细胞减少症或适应性免疫功能受损的受试者(例如免疫力降低的受试者)中尤其具吸引力。该方法通常在局部而非全身起作用,并针对多种病原体提供广泛效应。该效应是快速的,并在生物防御、医学和流行病情况下有吸引力。

[0234] 在没有适应性免疫疫苗可用的流感或紧急呼吸病毒流行过程中增强正常宿主中肺的先天防御能力是有价值的。有突现或耐药生物的细菌爆发也可能是这样的情况,其中增强先天肺防御是有用的。同样地,在流行病过程中对医护人员的保护可以利于照顾患者,限制扩散。

[0235] 社区中的许多人针对感染的防御长期降低,如患有糖尿病的患者和由于自身免疫病或防止移植排斥而服用免疫抑制药物的患者。这些人在流行过程中或接触微生物的可能性升高的时候可能尤其受益于肺防御的增强。甚至更惊人的是,进行化学治疗的癌症患者(其具有暂时但严重的免疫防御降低)可受益于暂时保护。肺炎在这些患者经常发生,并且是感染性死亡的首要因素。许多化学治疗药物(如烷化剂和核苷类似物)引起严重的暂时性嗜中性粒细胞减少症。最初,嗜中性白细胞减少症患者易感于由来自正常宿主中可见的生物以及低毒性的细菌(如嗜麦芽糖寡养单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*))导致的细菌性肺炎。嗜中性粒细胞减少症延长时,患者开始易感于低毒力真菌(尤其是曲霉属物种)的感染。

[0236] 可刺激肺的防御,以在嗜中性粒细胞减少症的延长期提供暂时保护。其他癌症患

者（如接受氟达拉滨或抗淋巴细胞抗体的那些患者，或在造血干细胞移植后接受神经钙蛋白抑制剂和类固醇的那些患者）的适应性免疫受到损伤。这些患者也可受益于肺免疫的断续式刺激，以针对气道内定殖的真菌和细菌的侵袭提供保护，或针对流行性病毒的侵袭提供保护。季节性呼吸道“感冒”病毒（如副流感病毒和 RSV）的社区性爆发可在这些缺乏抵抗力的患者中引起致死性肺炎，并且可快速地从鼻涕中鉴定出许多这些病毒的感染。

[0237] 感染后，微生物的识别主要由先天免疫细胞上称为模式识别受体（PRR）的一组种系编码分子来介导（Medzhitov 和 Janeway, 1997）。这些模式识别受体表达为膜结合的或可溶性的蛋白质，其识别恒定的分子结构，称为病原体相关的分子模式（PAMP）（Janeway 和 Medzhitov, 2002）。病原体相关的分子模式是独特的、保守的，并且必要的微生物组分（如 LPS）在结构上不同于宿主分子（Medzhitov 和 Janeway, 1997 ; Janeway 和 Medzhitov, 2002）。

[0238] 大多数多细胞生物具有“先天免疫系统”，其在生物一生中不发生改变。相反，适应性免疫是在个体一生中改变并发生的对病原体的应答。具有适应性免疫的生物也具有先天免疫，并且因为系统之间的许多机制是共同的，因此并不是总可以在参与各免疫性的各组分之间勾画出清晰和快速的界限，尽管在运作上有明显的差别。高等脊椎动物和所有的哺乳动物都同时具有先天免疫系统和适应性免疫系统。

[0239] A. 先天免疫系统

[0240] 适应性免疫系统可在初次感染后几天或几周具有效果。然而，大多数生物处于病原体的持续袭击下，必须通过更快反应的先天免疫系统对其进行压制。先天免疫通过“先天”机制协调的快速应答来防御病原体，所述“先天”机制识别广泛的保守性病原体组分。对先天免疫的大多数研究着眼于白细胞，如嗜中性粒细胞、巨噬细胞和自然杀伤细胞。然而，上皮细胞在先天性防御中起关键作用，其包括提供微生物进入的机械屏障、向白细胞进行信号转导，并直接杀死病原体。重要的是，所有这些防御可应答于对微生物和宿主产物的感知而被高度诱导。在健康的肺中，先天免疫上皮功能为基线低水平。这由低水平的自发微生物杀伤和细胞因子释放来表示，反映了当粘液纤毛清除机制有效工作时几乎无菌的下呼吸道中的持续性低刺激。这与结肠相反，这里细菌持续存在，并且上皮细胞被持续激活。尽管肺表面呈现为微生物侵入的大靶标，但沉积的病原体附近的活化的肺上皮细胞理想地排布以进行微生物杀伤。（参阅 Evans 等, 2010）。植物和许多低等动物不具有适应性免疫系统，而是依赖于其先天免疫。微生物和非微生物来源的物质都能够刺激先天免疫应答。

[0241] 先天免疫系统在活化后具有广泛的效应细胞和机制。有几种不同类型的吞噬细胞，其摄取并破坏侵入病原体。最常见的吞噬细胞是嗜中性粒细胞、巨噬细胞和树突细胞。另一细胞类型（自然杀伤细胞）尤其善于破坏病毒感染的细胞。先天免疫系统的另一组分称为补体系统。补体蛋白质通常是血液的无反应性组分。然而，当被病原体或抗体识别激活时，多种蛋白质被活化以募集炎性细胞，包裹病原体以使得它们更容易被吞噬，并在病原体的表面上形成破坏性的孔。

[0242] “第一线”防御包括对感染的物理和化学屏障，如皮肤以及消化道和气道的粘液包被，在物理上防止宿主与病原体之间的相互作用。穿透这些屏障的病原体遇上限制感染的组成型表达的抗微生物分子（例如，溶菌酶）。“第二线”防御包括吞噬细胞（巨噬细胞和嗜中性粒细胞），其可吞食（吞噬）外来物质。

[0243] 吞噬作用涉及趋化,其中通过趋化化学物质(如微生物产物、补体、损伤细胞和白细胞碎片)将吞噬细胞吸引到微生物上。趋化后是粘着,其中吞噬细胞粘在微生物上。通过调理作用增强粘着,其中蛋白质(如调理素)包被在细菌表面上。这之后是消化,其中吞噬细胞伸出突起,形成吞食外来生物的伪突起。最后,溶酶体内的酶(包括活性氧簇和蛋白酶)将病原体消化。

[0244] 此外,如果病原体穿过了物理屏障,抗微生物蛋白质则可被激活。有几类抗微生物蛋白质,如急性期蛋白质(例如,C反应蛋白,当其与肺炎链球菌的C蛋白结合时增强吞噬并激活补体)、溶菌酶和补体系统。

[0245] 补体系统是非常复杂的一组血清蛋白质,其以级联方式被活化。补体活化涉及三条不同的途径:(a)经典途径,其识别抗原-抗体复合体,(b)替代途径,其与病原性细胞表面接触后自发地活化,和(c)甘露糖结合凝集素途径,其识别甘露糖,其通常仅在病原性细胞表面上出现。补体活化后是蛋白质活性的级联;该级联可产生多种效应,包括病原体的调理作用、膜攻击复合体的形成和激活对病原体的破坏作用和炎症。

[0246] 干扰素也是抗微生物蛋白质。这些分子是病毒感染的细胞分泌的蛋白质。这些蛋白质然后快速扩散到邻近细胞,诱导这些细胞抑制病毒感染的扩散。实际上,这些抗微生物蛋白质的作用是防止病毒的细胞至细胞扩增。

[0247] B. 适应性免疫系统

[0248] 适应性免疫系统(也称为“获得性免疫系统”)保证在病原体初次感染后存活的大多数哺乳动物一般对相同病原体引起的进一步疾病具有免疫力。适应性免疫系统基于称为白细胞(白血球)的专门免疫细胞,其由骨髓中的干细胞产生,并在胸腺和/或淋巴结中成熟。在许多物种(包括哺乳动物)中,适应性免疫系统可分为:(a)体液免疫系统,其通过B细胞产生称为免疫球蛋白(也称为抗体)的蛋白质对体液(例如,血液)中的细菌和病毒起作用;和(b)细胞免疫系统,其通过T细胞(也称为“T淋巴细胞”;“T”表示它们在胸腺中发生)破坏病毒感染的细胞(还发挥其他功能)。适应性免疫系统通常指向特定病原体,例如疫苗接种。

[0249] IV. 微生物

[0250] 本发明的实施方案包括针对多种病原体或潜在病原体(例如,NIAID类别A、B和C优先病原体)进行广泛保护的组合物和相关方法。例如,细菌性肺炎在正常宿主中以1/100人/年的发生率发生,主要是在老人和儿童中,并可由多种生物引起。其最经常为肺炎链球菌引起,其次是有荚膜的流感嗜血杆菌引起。其他细菌如肠道革兰氏阴性菌、厌氧菌和金黄色葡萄球菌是特定环境(如医疗护理场所)中肺炎的主要起因。结核分支杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)是高度感染性的,并且在历史上是世界范围内死亡率的重要起因。在发达国家已经用抗体进行了大部分的控制,但多药物抗性菌株仍继续引起问题并划分为类别C生物武器试剂。嗜肺性军团病杆菌首先在1978年费城的爆发中被鉴定出来,尽管目前认为其以与环境来源相关的低地方性速率广泛发生。同样,肺的真菌感染可在正常宿主中引起有症状的疾病。荚膜组织胞浆菌、粗球孢子菌(*Coccidioides immitis*)、皮炎芽生菌(*Blastomyces dermatitidis*)和新形隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)均可引起与局部暴露在高环境浓度下相关的肺炎。由这些病原性真菌引起的肺炎在正常宿主中一般是自限性的。一些额外的“非典型”微生物如支原体占正常宿主中其他肺炎的重要部分。

认为本发明的组合物可针对引起例如肺炎或其他疾病状况的多种病原体提供快速的暂时保护。在某些方面,本发明可用于与疫苗接种方案组合,从而为可能或已经接触一种或多种病原性或潜在病原性生物的受试者提供额外的保护。

[0251] 在本发明的一些特定方面,本发明的组合物和方法可用于预防或治疗感染或与生物武器/条件性微生物的接触或受试者与吸入的感染剂的接触,或降低其风险。在现代已经用作恐怖分子武器的唯一微生物病原体是炭疽芽孢杆菌,当通过呼吸途径发生感染时,即使使用合适的抗生素也具有 75% 的致死率。土拉热弗朗西丝氏菌是需氧的革兰氏阴性球杆菌,其为兼性胞内病原体。其为高度感染性、高度致病性,并可在恶劣环境条件下存活,使得其成为严重的生物恐怖威胁,即使其很难在人之间传播 (Dennis, 2001)。有疫苗可用,但仅有部分保护性。世界卫生组织估计,在有五百万居民的市区上气雾剂喷洒 50kg 的剧毒土拉热弗朗西丝氏菌会导致 250,000 个失能性伤亡,包括 19,000 例死亡;疾病控制中心 (CDC) 估计,这种攻击的经济成本是每 100,000 个接触人群 54 亿美元 (Dennis, 2001)。

[0252] 可通过气雾剂传播的其他 A 类生物恐怖试剂是鼠疫耶尔森氏菌、天花病毒和出血热病毒。此外,可通过呼吸道有效递送多种 B 类和 C 类试剂。总之,这些生物包含革兰氏阳性、革兰氏阴性、细胞内和细胞外的细菌,以及多种病毒类别。因为可能难以首先鉴定具体的生物恐怖试剂、本地贮存针对特定试剂的适应性免疫疫苗和抗生素的复杂性以及生物(如炭疽芽孢杆菌)即便正确处理仍有显著毒性,所以刺激肺的先天防御能力可以预防或先行阻止 (preempt) 或减轻通过呼吸道递送的生物恐怖剂的感染;这种效果可具有极大的公共卫生价值。

[0253] A. 病原性或潜在病原性微生物

[0254] 有许多微生物被认为具有病原性,或在某些条件下可能有病原性(即,条件性病原体/微生物)。在某些方面,相对于肺感染来确定病原性。细菌性微生物包括但不限于芽孢杆菌、耶尔森氏菌、*Fransciscella*、链球菌、葡萄球菌、假单胞菌、分枝杆菌、*Burkholderia* 属的多个物种。对受试者的保护所针对的具体细菌种类包括但不限于炭疽芽孢杆菌、鼠疫耶尔森氏菌、土拉热弗朗西丝氏菌、肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌、绿脓假单胞菌、*Burkholderia cepacia*、白喉棒状杆菌、梭菌 (*Clostridia* spp)、志贺氏菌 (*Shigella* spp.)、鸟分枝杆菌 (*Mycobacterium avium*)、*M. intracellulare*、*M. kansasii*、*M. paratuberculosis*、*M. scrofulaceum*、*M. simiae*、*M. habana*、*M. interjectum*、*M. xenopi*、*M. heckeshornense*、*M. szulgai*、*M. fortuitum*、*M. immunogenum*、*M. chelonae*、*M. marinum*、*M. genavense*、*M. haemophilum*、*M. celatum*、*M. conspicuum*、*M. malmoense*、*M. ulcerans*、*M. smegmatis*、*M. wolinskyi*、*M. goodii*、*M. thermoresistibile*、*M. neoaurum*、*M. vaccae*、*M. palustre*、*M. elephantis*、*M. bohemica* 和 *M. septicum*。

[0255] B. 病毒

[0256] 有多种病毒和病毒株被认为有病原性或在特定条件下有潜在病原性。病毒可分为以下七组之一:组 I:双链 DNA 病毒;组 II:单链 DNA 病毒;组 III:双链 RNA 病毒;组 IV:有义链单链 RNA 病毒;组 V:反义链单链 RNA 病毒;组 VI:逆转录二倍体单链 RNA 病毒;组 VII:逆转录环形双链 DNA 病毒。病毒包括腺病毒科、沙粒病毒科 (Arenaviridae)、杯状病毒科 (Caliciviridae)、冠状病毒科 (Coronaviridae)、丝状病毒科 (Filoviridae)、黄病毒科 (Flaviviridae)、嗜肝 DNA 病毒科 (Hepadnaviridae)、疱疹病毒科 (Herpesviridae) (α -疱

疹病毒亚科 (Alphaherpesvirinae)、 β 疱疹病毒亚科 (Betaherpesvirinae)、丙型疱疹病毒亚科 (Gammaherpesvirinae)、Nidovirales、乳头瘤病毒科 (Papillomaviridae)、副粘病毒科 (Paramyxoviridae) (副黏液病亚科 (Paramyxovirinae)、肺病毒亚科 (Pneumovirinae))、微小病毒科 (Parvoviridae) (Parvovirinae (微小病毒科))、小核糖核酸病毒科 (Picornaviridae)、痘病毒科 (Poxviridae) (脊椎动物痘病毒亚科 (Chordopoxvirinae))、呼肠孤病毒科 (Reoviridae)、逆转录病毒科 (Retroviridae) (Orthoretrovirinae) 和 / 或披膜病毒科 (Togaviridae)。这些病毒包括但不限于多种流感毒株, 如禽流感 (例如, H5N1)。对受试者的保护所针对的具体病毒包括但不限于巨细胞病毒 (Cytomegalovirus)、呼吸道合胞体病毒等。

[0257] 病原性病毒的实例包括但不限于甲型流感病毒、H5N1、马尔堡病毒、埃博拉病毒、登革热病毒、严重急性呼吸器官综合症、黄热病病毒、人呼吸道合胞体病毒、痘苗病毒等。

[0258] C. 真菌

[0259] 有许多真菌物种被认为是病原性或在特定条件下有潜在病原性。提供的保护可针对 (但不限于) 烟曲霉、白色假丝酵母、新型串酵母、荚膜组织胞浆菌、粗球孢子菌或卡氏肺囊虫和 / 或皮炎芽生菌。

[0260] V. 制剂和施用

[0261] 可通过受试者的呼吸系统施用本文公开的药物组合物。在某些方面, 通过本领域已知的方法和装置使组合物沉积在肺中。可在水中制备 StIR 组合物, 与表面活性剂如羟丙纤维素适当混和。也在甘油、液体聚乙二醇和其混合物以及油中制备分散剂。在普通储存和使用条件下, 这些制剂含有防腐剂, 防止微生物的生长。适合吸入的药物形式包括无菌水溶液或分散剂和用于临时制备无菌吸入溶液或分散剂的无菌粉剂。在所有情况下, 所述形式通常是无菌的, 并能够直接吸入或通过一些中间过程或装置吸入。其在制备和储存条件下必须稳定, 并且必须防止微生物 (如细菌和真菌) 的污染作用。载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇 (例如, 甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)、其合适的混合物和 / 或植物油的溶剂或分散介质。对微生物作用的预防可通过多种抗细菌和抗真菌剂来实现, 例如对羟苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等。

[0262] 根据所治疗的受试者的状况和接触或潜在接触的具体情况, 需要对剂量进行一定改变。在任何情况下, 负责施用的人都会为个体受试者确定适当剂量。此外, 对于人施用, 制剂应该满足 FDA 生物制品标准处或其他类似机构要求的无菌、致热原性、一般安全性和纯度标准。

[0263] 通过将活性组分以需要的量与上文列举的多种其他成分掺入适当溶剂中来制备无菌组合物, 需要时随后进行例如过滤灭菌。一般地, 通过将多种无菌活性成分掺入无菌载体中来制备分散剂, 所述无菌载体含有基本分散剂和来自上文列举的其他所需成分。在用于制备无菌组合物的无菌粉剂的情况下, 一些制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术, 其产生活性成分和来自前述无菌过滤溶液的任何额外所需成分的粉末。

[0264] 可通过不同方法 (包括液体喷雾器、基于气雾剂的定量吸入器 (MDI)、喷雾器、干粉分散装置等) 实施肺 / 呼吸道的药物递送。此类方法和组合物为本领域技术人员所熟知, 并如美国专利 6,797,258、6,794,357、6,737,045 和 6,488,953 所指示, 均以援引方式并入本文。根据本发明, 可通过本领域已知用于通过吸入施用治疗剂的任何多种吸入或

鼻装置递送至少一种药物组合物。适合引导肺或鼻施用的其他装置也为本领域所知。通常,为进行肺施用,以有效到达肺或窦的下气道的颗粒大小递送至少一种药物组合物。适于实施本发明的市售吸入装置的一些具体实例是 Turbohaler™ (Astra)、Rotahaler® (Glaxo)、Diskus® (Glaxo)、Spiros™吸入器 (Dura)、Inhale Therapeutics 销售的装置、AERx™ (Aradigm)、Ultravent® 喷雾器 (Mallinckrodt)、Acorn II® 喷雾器 (Marquest Medical Products)、Ventolin® 定量吸入器 (Glaxo)、Spinhaler® 干粉吸入器 (Fisons) 等。

[0265] 所有此类吸入装置均可用于施用气雾剂中的药物组合物。此类气雾剂可包含溶液(水溶液和非水溶液)或固体颗粒。定量吸入器通常使用抛射剂气体并需要在吸气过程中启动。参阅例如 W0 98/35888 ;W094/16970。干粉吸入器利用混和粉剂的呼吸启动。参阅美国专利 5,458,135 ;4,668,218 ;PCT 公开 W0 97/25086 ;W0 94/08552 ;W094/06498 ;和欧洲专利申请 EP 0237507,以援引方式整体并入本文。喷雾器从溶液产生气雾剂,而定量吸入器、干粉吸入器等产生小颗粒气雾剂。用于施用的合适制剂包括但不限于鼻腔喷雾或滴鼻剂,并可包括 StIR 组合物的水或油溶液。

[0266] 可通过迫使组合物的悬液或溶液在压力下通过喷嘴来产生包含本发明药物组合物的喷雾。可选择喷嘴大小和构型、施加的压力和液体给料速率,以实现期望的输出和颗粒大小。可以进行电喷雾,例如通过与毛细管或喷嘴给料连接的电场。

[0267] 可以通过喷雾器如喷射喷雾器或超声喷雾器施用本发明的药物组合物。通常,在喷射喷雾器中,压缩空气源用于产生通过喷嘴的高速空气射流。随着气体扩散到喷嘴外,产生低压区,其牵引着组合物通过连接贮液器的毛细管。来自毛细管的液体流在流出管外时被剪切成不稳定的丝和小滴,产生气雾剂。可使用广泛的构型、流速和挡板类型,以从给定的喷射雾化器中实现期望的性能特征。在超声喷雾器中,通常使用压电换能器将高频率电能用于产生震动性的机械能。该能量传递到组合物中,产生气雾剂。

[0268] 在定量吸入器 (MDI) 中,在罐中含有抛射剂、组合物和任何赋型剂或其他添加剂与压缩空气的混合物。计量阀的启动将混合物作为气雾剂释放。

[0269] 利用定量吸入器装置使用的药物组合物一般包括细粉,其含有本发明的组合物作为无水介质中的悬浮剂,例如在表面活性剂的帮助下悬浮于抛射剂中。抛射剂可以是用于该目的的任何常规材料,如氯氟烃、氢化氯氟烃、氢化碳氟化合物或碳氢化合物,包括三氯氟甲烷、二氯二氟甲烷、二氯四氟乙醇和 1,1,1,2- 四氟乙烷、HFA-134a (氢化氟链烷-134a)、HFA-227 (氢化氟链烷-227) 等。

[0270] 如本文所用,“载体”包括任何和所有溶剂、分散介质、载剂、包衣、稀释剂、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂、缓冲液、载体溶液、悬液、胶体等。此类介质和试剂用于药物活性物质的用途为本领域所熟知。任何常规介质或试剂除非与活性成份不相容,否则均考虑其在所述治疗性组合物中的用途。补充性活性成份也可掺入所述组合物中。

[0271] 短语“可药用”指当向受试者施用时不产生过敏或类似不良反应的分子实体和组合物。含有多肽或肽作为活性成份的水组合物的制剂为本领域所熟知。

[0272] VI. 组合治疗

[0273] 本发明的组合物和方法可用于许多治疗或预防应用的情况中。为了提高本发明组合物治疗的有效性或增强另一治疗(第二治疗)例如疫苗或抗微生物治疗的保护作用,可

能期望将这些组合物和方法与在治疗、降低感染危险或预防疾病和病原性状况的其他药剂和方法（例如抗细菌、抗病毒和 / 或抗真菌治疗）相组合。

[0274] 可应用多种组合；例如 StIR 组合物是“A”，第二种治疗是“B”：

[0275] A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B

[0276] B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A

[0277] B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

[0278] 向受试者施用本发明的组合物将遵循通过呼吸系统施用的一般方案，也遵循施用特定第二治疗的一般方案，将该治疗的毒性（如果有）考虑在内。预计必要时重复治疗循环。也考虑多种标准治疗以及疫苗接种可与所述治疗组合应用。

[0279] A. 抗病毒剂

[0280] 在本发明的某些方面，抗病毒剂可与 StIR 组合物组合使用。抗病毒药物是特异性用于治疗病毒感染的一类药剂，并且其应与杀病毒剂区分开，杀病毒剂主动灭活体外的病毒颗粒。目前可用的大多数抗病毒剂被设计成帮助处理 HIV、疱疹病毒、乙肝和丙肝病毒，和甲型流感病毒和乙型流感病毒。可用于本发明的抗病毒剂包括但不限于免疫球蛋白、金刚胺、干扰素、核苷酸类似物和蛋白酶抑制剂。

[0281] 一种抗病毒策略是干扰病毒渗入靶细胞的能力。可使用模拟病毒结合蛋白（VAP）并与细胞受体结合的试剂来抑制病毒复制的这个阶段。或者通过使用模拟细胞受体并与 VAP 结合的试剂。这包括抗 VAP 抗体、受体抗基因型抗体、外来受体和合成的受体模拟物。已经引入了两种此类“进入阻滞剂”金刚胺和金刚乙胺来对抗流感。

[0282] 抗病毒治疗的第二种方法是靶向病毒侵入细胞后合成病毒组分的过程。这样做的一种方式开发核苷酸或核苷类似物，其看起来像 RNA 或 DNA 的结构单元，但该类类似物一旦掺入即使合成 RNA 或 DNA 的酶失活。核苷酸类似物包括但不限于 ribivirin、阿糖腺苷、阿昔洛韦、gangcyclovir、叠氮胸苷、地达诺新、扎西他滨、司他夫定和拉米夫定。

[0283] 又一抗病毒技术是基于核酶的一组药物，所述核酶是在所选位点切开病毒 RNA 或 DNA 的酶。在其天然过程中，核酶作为病毒生产序列的一部分，但这些合成的核酶被设计成在使其丧失功能的位点上切割 RNA 和 DNA。

[0284] 一些病毒包括称为蛋白酶的酶，所述蛋白酶切割病毒蛋白链，所以它们可以装配成最终的构造。HIV 包括蛋白酶，并且已经进行了大量研究来寻找“蛋白酶抑制剂”，以在其生命周期的这一阶段攻击 HIV。从二十世纪九十年代开始有蛋白酶抑制剂可用，并且已证明有效，但它们具有不寻常的副作用，例如引起脂肪在不寻常的地方积累。改善的蛋白酶抑制剂目前正在开发中。

[0285] 病毒生命周期的最后阶段是从宿主细胞中释放完整的病毒，并且抗病毒药物开发者也已经靶向了该阶段。已经引入治疗流感的称为扎那米韦（RELENZA™）和奥塞米韦（TAMIFLU™）的两种药物通过阻断称为神经氨酸苷酶的分子来防止病毒颗粒的释放，所述神经氨酸苷酶存在于流感病毒的表面上，并且看起来在大量流感毒株中也恒定不变。

[0286] 抗病毒剂包括但不限于阿巴卡韦；乙酰吗啉；阿昔洛韦；阿昔洛韦钠；阿德福韦；阿洛夫定；阿韦舒托；盐酸金刚脍胺；安泼那韦；阿拉诺丁；阿里酮；阿的维定；阿夫立定；西多福韦；西潘茶碱；盐酸阿糖胞苷；地拉韦定甲磺酸；脱氧无环鸟苷；地达诺新；二噁沙利；依度尿苷；依法韦仑；恩韦拉登；恩韦肟；泛西洛维；盐酸氯苯氢异喹；非西他滨；非阿

尿苷;膦酸利脂;磷酸三钠甲酸盐;膦乙酸钠;羟甲基无环鸟苷;丙氧鸟苷钠;碘苷;印地那韦;乙氧丁酮醛;拉米夫定;洛布卡韦;盐酸甲氧苄异喹;甲吡噻踪;那非那韦;奈韦拉平;喷西洛维;吡罗达韦;三氮唑核苷;盐酸氨基乙基金刚烷;利托那韦;甲磺酸噻唑努佛;盐酸索金刚胺;索利夫定;葡枝青霉菌素;司他夫定;盐酸梯络龙;三氟尿苷;伐昔洛韦盐酸;阿糖腺苷;磷酸阿糖腺苷;阿糖腺苷磷酸钠;韦罗肪;扎西他宾;叠氮胸苷;净韦肪;干扰素、cyclovir、 α 干扰素和 / 或 β 球蛋白。

[0287] 在某些实施方案中,抗病毒剂是利巴韦林和高剂量的利巴韦林。利巴韦林是对许多 DNA 和 RNA 病毒有活性的抗病毒药物。其是核苷抗代谢物药物的成员,其干扰病毒遗传物质的复制。尽管不是对所有的病毒都有效,但利巴韦林具有广谱活性,包括针对流感病毒、虫媒病毒和许多病毒性出血热的病原体的重要活性。

[0288] 通常,利巴韦林(Ribavirin)的经口形式与聚乙二醇化干扰素药物组合用于治疗丙型肝炎。气雾剂形式在过去已经用于治疗儿童中呼吸道合胞体病毒相关疾病。然而,多项研究已经质疑其效力,并且大多数机构已经不再使用它了。

[0289] B. 抗菌剂

[0290] 抗菌剂的实例包括但不限于 β -内酰胺抗生素、青霉素(如,天然青霉素、氨基青霉素、青霉素酶抗性青霉素、羧基青霉素、脲基青霉素)、头孢菌素(第一代、第二代和第三代头孢菌素),和其他 β -内酰胺(如,亚胺培南、单酰胺菌素)、 β -内酰胺抑制剂、万古霉素、氨基糖甙类和大观霉素、四环霉素、氯霉素、乙琥红霉素、林可霉素、克林霉素、利福平、甲硝唑、多粘菌素类、磺胺类药物和甲氧苄氨嘧啶,和喹啉。抗细菌药物还包括但不限于:醋氨苯砒、醋胺磺氨苯砒钠、阿来霉素、阿来西定、氮卓脒青霉素、氮卓脒青霉素匹酯、阿密环素、氨氟哌酸、氨氟哌酸、阿米卡星、硫酸阿米卡星、氨基水杨酸、对氨基水杨酸钠、阿莫西林、安福霉素、氨卡青霉素、氨苄青霉素钠、萘啶青霉素钠、阿布拉霉素、门冬托星、硫酸阿司米星、阿维霉素、阿伏帕里、阿齐红霉素、阿洛西林、苯咪唑青霉素钠、盐酸卡巴西林、杆菌肽、亚甲基双水杨酸杆菌肽、杆菌肽锌、班贝霉素、苯酰胺水杨酸钙、去氧红霉素、硫酸倍他霉素、比阿培南、比尼霉素、盐酸苯柳胺酯、硫酸镁双硫氧吡啶、氨羟丁卡钠霉素、硫酸丁酰苷菌素、硫酸卷曲霉素、卡巴氧、羧苄基青霉素双钠盐、卡茆西林钠、羧苄青霉素钠、羧苄青霉素钾、卡鲁莫南钠、头孢克洛、头孢羟氨苄、头孢羟唑、头孢孟多甲酸酯钠、头孢孟多酯钠、头孢哌罗、头孢曲秦、头孢氟唑钠、头孢唑啉、头孢唑啉钠、头孢拉宗、头孢地尼、头孢平、盐酸头孢平、头孢替考、头孢克肟、Cefinenoxime Hydrochloride、Cefinetazole、Cefinetazole 钠、头孢尼西钠、头孢尼西钠、头孢哌酮钠、头孢胺四唑、头孢噻肟钠、头孢替坦二钠、头孢替坦二钠、盐酸头孢替安、头孢西丁、头孢西丁钠、头孢咪唑、头孢咪唑钠、头孢匹胺、头孢匹胺钠、硫酸头孢匹罗、头孢泊肟、头孢罗齐、头孢甲氧环烯胺、头孢磺啶钠、头孢他定、头孢布坦、头孢唑肟钠、头孢曲松钠、头孢呋新、头孢呋肟酯、头孢呋辛匹赛酯、头孢呋肟钠、头孢赛曲钠、头孢菌素 IV、头孢菌素 IV 盐酸、Cephaloglycini、头孢利素、头孢噻吩钠、头孢匹林钠、泛捷复、盐酸西托环素、乙酰霉素、氯霉素、Cliloramphenicol Palmitate、Chloramphenicol Pantotheniate Complex、丁二酸钠氯霉素、氨基苯磷酸氯己定、对氯间二甲酚、金霉素硫酸氢盐、盐酸金霉素、西诺沙星、环丙沙星、盐酸环丙沙星、西罗里霉素、克拉仙霉素、盐酸克林沙星、Clildamycin、Clindamycin Hydrochloride、盐酸氯林可霉素棕榈酸酯、氯林可霉素磷酸酯、氯苯吩嗪、苄星邻氯青霉素、氯唑西林钠、氯羟喹、多粘菌素 e

甲磺酸钠、硫酸多粘菌素 E、库马霉素、库马霉素钠、氨环己青霉素、环丝氨酸、达福普汀、氨苯砒、达托霉素、Demeclocycline、Demeclocycline Hydrochloride、去甲四环素、地奴真菌素、二氢黎芦啉、双氯青霉素、双氯西林钠、硫酸双氢链霉素、双硫氧吡啶、地红霉素、脱氧土霉素、强力霉素钙、多西环素磷酸复合物、盐酸多西环素、屈克沙星钠、氟啶酸、环烯氨甲青霉素、盐酸表四环素、乙琥红霉素、红霉素阿西曲酯、无味红霉素、红霉素丁二酸乙酯、葡庚糖酸红霉素、乳糖红霉素、红霉素丙酸酯、红霉素硬脂酸盐、盐酸乙胺丁醇、乙硫异烟胺、氟罗哌酸、氟氯青霉素、氟氘丙氨酸、氟甲喹、磷霉素、磷霉素氨丁三醇、呋莫西林、氯化呋喃咪唑、酒石酸呋喃咪唑、夫西地酸钠、夫西地酸、硫酸双生霉素、格洛莫南、短杆菌肽、卤苯炔醚、缩酮氯苄青霉素、海他西林钾、海可西定、依巴沙星、依巴沙星、双二氯苯唑、异帕米星、异烟肼、角沙霉素、硫酸卡那霉素、柱晶白霉素、左旋呋喃咪唑酮、苯氧丙基青霉素钾、来西索霉素、林可霉素、盐酸洁霉素、洛米沙星、盐酸洛米沙星、Lomefloxacin Mesylate、氯拉卡比、磺胺米隆、氯甲烯土霉素、氯甲烯土霉素磺基水杨酸盐、巨霉素磷酸二氢钾、甲喹氧、倍能、甲烯土霉素、盐酸甲烯土霉素、乌洛托品、马尿酸乌洛托品、甲硝唑、磺唑氨苄青霉素、美洛西林钠、米诺环素、盐酸米诺环素、盐酸米林霉素、莫能星、莫能星钠、萘夫西林钠、萘啶酮酸钠、萘啶酸、匹马霉素、妥布霉素、棕榈酸新霉素、硫酸新霉素、十一烯酸新霉素、硫酸萘替米星、中性霉素、硝呋拉定、硝呋地腺、硝呋噁酮、硝呋隆、硝呋达齐、硝呋米特、硝呋奎唑、硝呋噻唑、硝基四环素、呋喃妥因、二硝苯甲酰胺、氟哌酸、新生霉素钠、氧氟沙星、奥美普林、苯唑西林钠、肟莫南、肟莫南钠、奥索利酸、地霉素、土霉素钙、盐酸土霉素、帕地霉素、对氯酚、保洛霉素、培氟沙星、青霉素 G 双酯、苄星青霉素 G、青霉素 G 钾、普鲁卡因青霉素、青霉素 G 钠、青霉素 V、苄星青霉素 V、哈胺青霉素 V、青霉素 V 钾、戊胺唑酮钠、对氨水杨酸苯酯、哌拉西林钠、吡苄西林钠、吡地西林钠、盐酸吡利霉素、盐酸匹氨青霉素、双羟萘酸匹氨西林、丙苯酸匹氨青霉素、硫酸多粘菌素 B、泊非霉素、普匹卡星、吡嗪酰胺、巯氧吡啶锌、醋酸喹癸胺、奎奴普汀、消旋甲砒霉素、雷冒拉宁、雷尼霉素、雷洛霉素、里泼罗霉素、利福布汀、利福美坦、利福克昔、利福酰胺、利福平、利福喷丁、利福喷丁利福昔明、吡咯烷甲基四环素、硝酸罗列环素、罗沙米星、罗沙米星丁酸盐、罗沙米星丙酸盐、罗沙米星磷酸钠、罗沙米星硬脂酸盐、罗索沙星、硝酚肟酸、罗红霉素、去甲去氧四环素、山费培南钠、酚咪青霉素、沙匹西林、司可芬净西苏霉素、西索霉素、硫酸西索霉素、施怕沙星、盐酸壮观霉素、乙酰螺旋霉素、盐酸偏端菌素、司替霉素、硫酸链霉素、链霉素异烟肼、磺胺苯、苯甲酰磺胺、磺胺醋酰、磺胺醋酰钠、磺胺乙胞嘧啶、磺胺嘧啶、磺胺嘧啶钠、磺胺邻二甲氧嘧啶、磺胺甲氧吡嗪、磺胺甲基嘧啶、磺胺 (5) 对甲氧嘧啶、磺胺二甲基嘧啶、磺胺甲噻二唑、磺胺甲基异噻唑、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺二甲噻唑、磺胺酸锌、磺胺硝苯、柳氮磺吡啶、磺胺甲异噻唑、磺胺噻唑、磺胺甲苯吡唑、磺胺异噻唑、磺胺乙酰异噻唑、磺胺异噻唑二乙醇胺盐、磺粘菌素、硫培南、青霉烷砒、磺氨苄青霉素钠、氨苄青霉素酞酯盐酸盐、替考拉宁、盐酸替马氟沙星、替莫西林、四环素、盐酸四环素、四环素磷酸复盐、四氧普林、甲砒氯霉素、苯硫甲青霉素钾、羧噻吩青霉素甲酯钠、替卡西林二钠、替卡西林钠、氯苯异噻酮、氯化氯苯噻唑、妥布霉素、硫酸妥布霉素、多氟啶酸、甲氧苄氨嘧啶、硫酸甲氧苄啶、三磺嘧啶、醋竹桃霉素、硫酸丙大观霉素、短杆菌素、万古霉素、盐酸万古霉素、维吉霉素和 / 或拉来霉素。

[0291] B. 抗真菌剂

[0292] 抗真菌剂包括但不限于唑类、咪唑、聚烯、泊沙康唑、氟康唑、依曲康唑、两性霉素

B、5- 氟胞嘧啶、咪康唑、酮康唑、乙胺丁醇（盐酸乙胺丁醇）、氨苯砜（4,4'-二氨基二苯砜）、Paser 颗粒（氨基水杨酸颗粒）、利福喷丁、吡嗪酰胺、异烟肼、利福平 IV、利福平、吡嗪酰胺、硫酸链霉素、乙硫异烟胺-SC（乙硫异烟胺）和 / 或伏立康唑（Vfend™）。

[0293] C. 其他药剂

[0294] 在本发明的某些方面，抗炎剂可与 StIR 组合物组合使用。

[0295] 用于本文的甾类抗炎剂包括但不限于氟地松、倍氯米松、其任何可药用衍生物，及其任何组合。如本文所用，可药用衍生物包括其任何盐、酯、烯醇醚、烯醇酯、酸、碱、溶剂化物或水合物。可通过本领域技术人员使用此类衍生的已知方法制备此类衍生物。

[0296] 氟地松。丙酸氟替卡松是合成的皮质类固醇并具有经验式 $C_{25}H_{31}F_3O_5S$ 。其化学名为 S-(氟甲基)6 α ,9-二氟-11 β -17-二羟基-16 α -甲基-3-氧代雄甾-1,4-二烯-17 β -硫代甲酸酯,17-丙酸酯。丙酸氟替卡松是具有 500.6 分子量的白色到灰白色粉末，在水中基本不溶，易溶于二甲亚砜和二甲基甲酰胺，在甲醇和 95%乙醇中微溶。

[0297] 在一个实施方案中，本发明的制剂可包含甾类抗炎剂（例如，丙酸氟替卡松）。

[0298] 倍氯米松。在某些方面，甾类抗炎剂可以是倍氯美松双丙酸酯或其一水合物。倍氯美松双丙酸酯的化学名为 9-氯-11 β ,17,21-三羟基-16 β -甲基孕甾-1,4-二烯-3,20-二酮 17,21-二丙酸酯。该化合物可以是分子量为 521.25 的白色粉末；并且在水中极微溶解（Physicians' Desk Reference），在氯仿中极易溶解，并在丙酮和醇中易溶解。

[0299] 提供本发明的甾类抗炎剂可通过例如减轻任何不想要的炎症来增强本发明的组合物和方法。用于本文的其他甾类抗炎剂的实例包括但不限于倍他米松、去炎松、地塞米松、泼尼松、莫米松、氟尼缩松和布地奈德。

[0300] 根据本发明的又一方面，非甾类抗炎剂可包括阿斯匹林、水杨酸钠、扑热息痛、非那西汀、布洛芬、酮基布洛芬、吲哚美辛、氟吡洛芬、双氯芬酸、甲氧萘丙酸、吡罗昔康、替布费龙、依托度酸、萘普酮、替尼达普、alcofenac、安替比林、amimopyrine、安乃近、animopyrone、保泰松、氯苯氧酰胺、羟基保泰松、prexazone、阿扎丙宗、苄达明、丁环己巴比妥、辛可芬、氯尼辛、ditrazol、依匹唑、非诺洛芬、flectafenin1、氟芬那酸、甘氨酸、吲哚布洛芬、甲氯灭酸、甲芬那酸、尼氟灭酸、salidifamides、舒林酸、舒洛芬、托美汀、萘普酮、羟萘苯酮、普罗喹宗、丁苯羟酸、氟咪唑、氨苄噻吡酯、替美加定、氨苯砜、双氟尼酸、贝诺酯、磷柳酸、二氯苯氧苯乙酸、依托度酸、双苯噻酸、噻氯咪索、卡布洛芬、芬布芬、噁丙嗪、安得返萘丁美酮、吡洛芬、非普拉酮、吡罗昔康、舒多昔康、伊索昔康、塞来考昔、Vioxx®和 / 或替诺昔康。

[0301] VII. 药盒

[0302] 本文描述的任何组合物可包含在药盒中。在一个非限制性实例中，用于产生和 / 或递送 StIR 组合物的试剂包括在药盒中。在某些方面，所述药盒是可携带的，并可像哮喘吸入器一样随身携带。所述药盒还可包括病原体检测器。所述药盒还可含有用于本发明组合物的气体或机械抛射剂。

[0303] 所述药盒中的组分可以水、粉剂或冻干形式包装。药盒的容器一般包括至少一个吸入器、罐、管、试管、烧瓶、瓶、注射器或其他容器，其中可放置组分，并优选放置适当等分的组分。药盒中含有多于一种组分时（第二药剂等），所述药盒一般还含有第二个、第三个或其他额外的容器，其中可单独放置额外的组分。然而，可在管、罐或吸入器中包含多种组

分组合。本发明的容器可包括罐或吸入器,其可穿在带子上或容易地携带在口袋、背包或其他储存容器中。本发明的药盒通常还包括用于所述组合物的容器或其变体,和紧密包装以用于商品化出售的任何试剂容器。此类容器可包括注塑或吹塑的塑料容器,其中固定着想要的管。

[0304] 当在一种和 / 或多种液体溶液中提供药盒的组分时,例如液体溶液是水溶液,尤其优选无菌水溶液(但不必须)。然而,药盒的组分也可以干粉提供。当试剂和 / 或组分以干粉提供时,可通过添加合适的溶剂重新溶解粉剂或以粉剂形式施用。溶剂也可考虑在另一容器中提供。

[0305] 药盒还包括使用药盒组分以及使用药盒中不包括的任何其他试剂的说明书。说明书可包括可以实施的改变形式。

[0306] 考虑此类试剂是本发明药盒的实施方案。然而,此类药盒不限于上文鉴定的特定项目,并可包括在病原性微生物的检测或本发明 StIR 组合物的施用中直接或间接使用的任何试剂。

[0307] VIII. 实施例

[0308] 为阐明本发明多个实施方案目的而给出以下实施例,并且其不旨在以任何形式限制本发明。本领域的技术人员会容易地理解,本发明非常适于实现目的并获得所提及的目标和优点,以及本文固有的那些目的、目标和优点。本发明实施例与本文描述的方法代表某些实施方案,并不旨在限制本发明的范围。本领域技术人员会想到其中的改变和权利要求范围定义的本发明精神内包括的其他用途。

[0309] 实施例 1

[0310] 绿脓假单胞菌攻击。从 ATCC 获得菌株 PA103 并在 LB 培养基 (Bio101Systems) 中 20% 甘油中储存为冷冻贮存液 (1×10^8 CFU/ml)。将 1ml 贮存液在 37°C 下 5% CO_2 中 100ml LB 培养基中孵育 16 小时,然后在 1L 新鲜培养液中稀释,并在 37°C 下培养 6-7 小时,至 OD_{600} 达到 0.3,产生 $\sim 3 \times 10^{10}$ CFU。将悬液离心、洗涤、重悬浮并雾化攻击,通过将系列稀释液铺板到胰蛋白酶大豆琼脂平板 (Becton Dickinson) 上来测定细菌的浓度。为进行雾化,将 10ml 悬液置于通过 10L/ 分钟空气中 5% CO_2 驱动的 AeroMist CA-209 喷雾器 (CIS-US) 中,以促进深度换气。30 分钟后,再加入 5ml,使得在整个 60 分钟期间总共 10ml 悬液被雾化。

[0311] TLR 配体处理。感染攻击之前,用 TLR 配体的气雾剂(单独或组合)或用 PBS(阴性对照)处理小鼠。感染攻击前递送所有处理 18 小时,使用补充有 5% CO_2 的 10L/ 分钟驱动的 AeroMist CA-209 喷雾器以促进通风。对于每一处理,将 10ml 的 TLR 配体悬液或 PBS 置于喷雾器中,并在 20 分钟中施用。对于使用 TLR 配体组合的实验,将两种配体悬浮在同一 10ml 悬液中,并同时递送。对于每一种配体,通过诱导肺的嗜中性粒细胞浸润的最小悬液浓度来确定初始气雾剂剂量,该浓度通过处理后 24 小时支气管肺泡灌洗液中总的白细胞和嗜中性粒细胞计数来测定。

[0312] TLR 4 配体。与含有 5、6 和 7 个酰基的混合物的天然脂质 A 不同,单磷酸脂质 A- 合成物 (MPLA, Invivogen) 是含有 6 个脂肪酰基的纯合成物。以 100 $\mu\text{g/ml}$ 递送 MPLA 的悬液。以 100 $\mu\text{g/ml}$ 递送具有 6 个脂肪酰基的另一合成脂质 A——磷酸化六酰基二糖 (PHAD, Avanti Polar Lipids)。

[0313] TLR 2/6 配体。Pam2CSK4 和 FSL-1(两者均来自 Invivogen) 是已知通过 TLR2

和 TLR6 的异二聚体进行信号转导的合成二酰基脂肽。如所示,以 6 或 20 $\mu\text{g/ml}$ 递送 Pam2CSK4,并以 20 $\mu\text{g/ml}$ 递送 FSL-1。

[0314] TLR 9 配体。ODN 2395(Invivogen)是对人和鼠 TLR 9 具有高亲和力的 C 型 CpG 寡核苷酸。以 20 $\mu\text{g/ml}$ 雾化 ODN 2395。

[0315] TLR 7 配体。咪喹莫特 (R837, Invivogen) 是刺激 TLR7 (也可能刺激 TLR8) 的咪唑啉胺鸟苷类似物。如所示,以 1 或 300 $\mu\text{g/ml}$ 的气雾剂递送咪喹莫特。

[0316] TLR 5 配体。鉴定了鞭毛蛋白中高度保守的 22 氨基酸区段 (已知的 TLR5 配体)。该氨基酸区段在 Cell Essentials, Inc., Boston, MA 进行合成。基于 HPLC 和 Malidi-TOF 质谱验证肽的纯度 > 95%。以 100 $\mu\text{g/ml}$ 递送 Flg22 的合成片段。

[0317] 实施例 2

[0318] 材料和方法

[0319] 动物和试剂。所有一般试剂均从 Sigma (St Louis, MO) 获得,除非另有说明。根据德克萨斯大学 M. D. Anderson 癌症中心动物关怀和使用委员会的政策处理所有的小鼠。将 5 到 8 周龄的野生型雌性 Swiss-Webster 小鼠 (Charles River, Wilmington, MA) 用于大多数保护和细胞计数实验。如所示,将 Shizuo Akira (1998) 提供的 5 到 8 周龄雌性 MyD88^{-/-}小鼠、Trif^{-/-}小鼠 (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) 和 TLR2^{-/-}小鼠 (Jackson) 用于与野生型小鼠 C57BL/6J (Jackson) 进行比较。

[0320] 雾化处理。在巧克力琼脂 (Remel, Lenexa, KS) 上培养不可分型流感嗜血杆菌 (NTHi) 的冷冻贮存液,在补充有 3.5 $\mu\text{g/ml}$ NAD 的脑心浸液培养液 (Acumedia, Baltimore, MD) 中扩增,并如所述 (Clement 等, 2008 ; Evans 等, 2010 ; Moghaddam 等, 2008) 用 EmulsiFlex C5 (Avestin, Mannheim, Germany) 进行破碎。通过 bicinchoninic 测定 (Pierce, Rockford, IL) 在盐水中将蛋白质浓度调整至 2.5mg/ml,并将溶胞产物以 10ml 等分试样冷冻在 -80°C。为进行处理,将解冻的等分试样置于补充有 5% CO₂ (促进深呼吸) 的 10l/分钟空气驱动的 AeroMist CA-209 喷雾器 (CIS-US) 中 20 分钟。喷雾器通过聚乙烯管 (30cm x 22mm) 连接到 10 升聚乙烯接触室中,在其末端具有低抵抗力微生物过滤器 (BB50T, Pall, East Hills, NY) 的相同流出管道,排到生物安全罩中。

[0321] 从 InvivoGen (San Diego, California) 购买 Pam3CSK4、Pam2CSK4、Poly (I:C)、MPLA、咪喹莫特和 ODN 2395。通过 CellEssentials (Boston, MA) 合成 22-mer 的 Flg22,其为鞭毛蛋白的最保守结构域 (QRLSTGSRINS AKDDAAGLQIA)。为了处理小鼠,在无内毒素的水中重新溶解合成的 TLR 激动剂,并以所示浓度悬于 8ml 无菌 PBS 中,并使用用于 NTHi 溶胞产物处理的相同技术对动物进行雾化 20 分钟。

[0322] 体内感染攻击。如先前描述 (Clement 等, 2008 ; Clement 等, 2009 ; Evans 等, 2010),用定至 LD₅₀-LD₁₀₀ 的细菌接种物吸入攻击小鼠。从 ATCC 获得绿脓假单胞菌菌株 PA103 并在 LB 培养基 (Bio 101 Systems) 的 20% 甘油中储存为冷冻贮存液 (1×10⁸CFU/ml)。在 37°C 下 5% CO₂ 中,将 1ml 贮存液在 100ml LB 培养基中孵育 16 小时,然后在 11 新鲜培养液中稀释,并在 37°C 下培养 6-7 小时,至 OD₆₀₀ 达到 0.3,产生 1-4×10¹⁰CFU/ml。将肺炎链球菌血清型 4 在 Todd-Hewett 培养液 (Becton Dickinson) 的 20% 甘油中储存为冷冻贮存液 (1×10⁹CFU)。在 37°C 下 5% CO₂ 中,将 1ml 解冻的贮存液在 150ml Todd-Hewett 培养液中孵育 16 小时,然后在 1.5l 新鲜培养液中稀释,并在对数期内培养 6-7 小时,至 OD₆₀₀ 达到

0.3,产生 $2-6 \times 10^{10}$ CFU/ml。将细菌悬液离心、洗涤、重悬于 10ml PBS 中,并使用与用于处理的系统相同的系统在 60 分钟时间里进行雾化。通过在胰蛋白酶大豆琼脂平板 (Becton Dickinson) 上将连续稀释液进行铺板来测定细菌浓度。

[0323] 肺病原体负荷的定量。如先前所述 (Clement 等,2008 ;Clement 等,2009 ;Evans 等,2010),用细菌病原体感染后立即麻醉小鼠,收集它们的肺,并使用 2ml 的组织磨碎器 (Kontes, Vineland, NJ) 在 1ml PBS 中进行匀浆。在胰蛋白酶大豆琼脂 (TSA) 平板上将连续稀释的匀浆进行铺板,在 37℃ 下孵育 16 小时,并计数细菌菌落。

[0324] 支气管肺泡灌洗液分析。如先前所述 (Clement 等,2008 ;Clement 等,2009 ;Evans 等,2010),通过滴注并在指定的时间点上通过插入暴露导管的环中的大号短管接头插管收集两份等分试样 (各 1ml PBS) (Becton Dickinson),来获得支气管肺泡灌洗液 (BAL)。利用血细胞计数器 (Hauser Scientific, Horsham, PA),并通过在 2,000rpm 细胞离心 300 μ l 的 BAL 流体 5 分钟的微分计数,随后使用赖-吉染色来测定总的白细胞数量。

[0325] 体外杀伤测定。如先前所述 (Clement 等,2008 ;Clement 等,2009 ;Evans 等,2010),在 6 孔板中补充有 10% 热灭活 FCS 和 1% 青霉素 / 链霉素 (Invitrogen) 的 RPMI-1640 中培养 MLE-15 细胞和 A549 细胞。当生长至 ~ 80% 汇合时,用 PBS 洗涤细胞,提供含有 10% 热灭活 FCS 的新鲜无抗生素培养基,并用 20 μ l PBS 或含有 10% 热灭活 FCS 的 RPMI-1640 中 20 μ l 体积的 ODN 2395 (20 μ g/ml)、Pam2CSK4 (10 μ g/ml) 或者 ODN 2395 (20 μ g/ml) 和 Pam2CSK4 (10 μ g/ml) 进行处理。4 小时后,然后将炭疽芽孢杆菌 Sterne 菌株或 2000CFU 绿脓假单胞菌菌株 PA103 的 1000 个芽孢加到所有孔中。感染后 4 小时,从每个孔中吸出 20 μ l 上清液,连续稀释,平铺到 TSA 琼脂平板上,在 37℃ 下孵育 16 小时,并计数 CFU。

[0326] 免疫荧光显微术。在 Lab-Tek II chamber 载玻片 (Nunc, Rochester, NY) 上补充有 10% 热灭活 FCS 和 1% 青霉素 / 链霉素 (Invitrogen) 的 RPMI-1640 中培养 A549 细胞 48 小时,然后用含有 10% 热灭活 FCS 的 RPMI-1640 中 20ml 体积的 Texas Red- 标记的 ODN 2395 (20 μ g/ml, Invivogen)、异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的 Pam2CSK4 (10 μ g/ml, Invivogen) 或者 Texas Red- 标记的 ODN 2395 (20 μ g/ml, Invivogen) 和异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的 Pam2CSK4 (10 μ g/ml, Invivogen) 进行处理。2 小时后,吸取培养基,分离小室,并用冰冷的 PBS 洗涤细胞 3 次。然后用 4% 的多聚甲醛固定细胞,用甘氨酸猝灭,用 PBS 洗涤 3 次,用 4',6-二脒基-2-苯茚二酮 (DAPI ;0.1 μ g/ml) 复染细胞核,并利用荧光显微术 (Olympus BX-60 microscope, Melville, NY) 使用适当的光学 (Texas Red :激发 = 540nm ;发射 = 620nm ;FITC :激发 = 495nm,发射 = 520nm ;DAPI :激发 = 360nm ;发射 = 460nm) 进行检查。用计算机控制的 Spot RT Camera (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI) 连续收集图像并在 Photoshop CS3 (Adobe, San Jose, CA) 中组装。重叠的红色和绿色荧光呈现为黄色。

[0327] 统计学分析。使用 SAS/STAT 软件 (版本 8.2, SAS Institute) 进行统计学分析。将 Student's t- 检验用于比较组之间的肺细菌或病毒滴度。使用 Fisher's 精确检验比较病原体攻击后存活小鼠的百分比,而 log-rank 检验用于比较通过 Kaplan-Meier 方法估计的存活分布。单尾 ANOVA 和 Dunnett's 事后检验用于比较处理和未处理的动物之间的 BAL 流体微分计数。

[0328] 结果

[0329] 雾化细菌溶胞产物诱导对肺炎的抵抗力需要的是 MyD88 而不是 TRIF。通过 NTHi 的雾化溶胞产物刺激肺上皮诱导了对广泛微生物病原体 9 的高水平抵抗力 (Clement 等, 2008 ;Clement 等, 2009 ;Evans 等, 2010 ;Tuvim 等, 2009)。为了测试 TLR 信号转导是否是溶胞产物诱导的保护所需, 用绿脓假单胞菌吸入攻击缺乏通过 TIR 衔接蛋白进行 TLR 信号转导的小鼠。通过雾化细菌溶胞产物进行预处理, 野生型和 TRIF 缺陷型 (*Trif*^{-/-}) 小鼠针对致死性绿脓假单胞菌的感染得到完全保护, 而在 MyD88 缺陷型小鼠 (*Myd88*^{-/-}; FIG. 12A 和 12B, 左图) 中不能诱导抵抗力。保护与诱导肺中的快速病原体杀伤密切相关 (FIG. 12A 和 12B, 右图)。IL-1 受体也通过 MyD88 进行信号转导 (Adachi 等, 1998 ;Medzhitov 等, 1998), 但其应答于宿主细胞因子信号转导, 而不直接应答于微生物产物。病原体杀伤在被雾化细菌溶胞产物刺激的 IL-1 受体缺陷型小鼠 (*Il1r*^{-/-}; FIG. 13) 中完全保留。这一发现表明, 不是通过 MyD88 进行信号转导的所有受体均为溶胞产物诱导的保护所需, 并且提示, 通过 TLR 进行的直接微生物信号转导比通过宿主细胞因子的间接信号转导对于诱导性上皮抵抗力而言更为重要。

[0330] 个体 TLR 激动剂诱导对肺炎的低水平抵抗力。鉴于对 MyD88 信号转导的需求, 本发明人测试了任何单一的合成 TLR 激动剂是否可以诱导与雾化细菌溶胞产物提供的抵抗力相似的抵抗力。因为 TLR1 和 TLR6 表达为与 TLR2 的异二聚体, 并且 TLR7 和 TLR8 均识别咪喹莫特, 所以小鼠 TLR 1 到 9 均可用以下 7 种合成配体进行刺激: Pam3CSK4 (TLR2/1 激动剂)、Pam2CSK4 (TLR2/6 激动剂)、Poly (I:C) (TLR3 激动剂)、合成的脂质 A (MPLA, TLR4 激动剂)、Flg22 (合成的 22-mer 鞭毛蛋白, TLR5 激动剂)、咪喹莫特 (TLR7 和 TLR8) 或 ODN2395 (TLR9 激动剂)。

[0331] 这些激动剂的合适雾化剂量是未知的, 所以制定了策略以鉴定合适的剂量, 用于向肺中递送以避免 II (β) 类型的错误。所用的每一合成 TLR 激动剂均有刺激树突细胞最大细胞因子分泌的报道浓度 ([DCmax]) (Yamamoto 等, 2003 ;Aliprantis 等, 1999 ;Buwitt-Beckmann 等, 2005 ;Hayashi 等, 2001 ;Krug 等, 2001 ;Lee 等, 2003 ;Martin 等, 2003)。基于对雾化化合物的有效气道递送的计算 (Clement 等, 2009 ;Evans 等, 2004), 本发明人测定了在气道上皮表面上实现 [DCmax] 需要的喷雾器流体浓度。尽管雾化溶胞产物诱导的抵抗力不依赖于白细胞流入, 但保护现象与诱导的肺嗜中性白细胞增多症的周期和强度紧密相关 (Clement 等, 2008)。因此, 为了鉴定足以用于测试的 TLR 激动剂剂量, 本发明人从每一配体的报道 [DCmax] 开始, 并对数增加喷雾浓度, 直至实现白细胞浸润。

[0332] 如图 14 中所示, 在 PBS 处理的小鼠中, BAL 液中嗜中性粒细胞的数量是 $0.1 \times 10^3 \pm 0.2$ 个细胞 /ml。仅 Pam2CSK4 在 DCmax 处显示嗜中性粒细胞的显著增加, 尽管除 poly (I:C) 和 Flg22 外全部在高于 DCmax 一个或两个对数的浓度处显示嗜中性粒细胞水平的显著增加。另一方面, 在处理 24 小时后, poly (I:C) 和 Flg22 均在 BAL 上诱导巨噬细胞大量流入。Flg22 和咪喹莫特各自具有这样的配体浓度, 高于所述浓度处嗜中性粒细胞浸润减少。Pam2CSK4 诱导为 Pam3CSK4 近 5 倍的嗜中性粒细胞水平, 并且为任何其他配体 15 倍。

[0333] 各配体的选定浓度是诱导嗜中性粒细胞 /ml 增加 10 倍或诱导巨噬细胞翻番 (没有任何一个能同时实现这两者) 的最低剂量。一些配体诱导强烈的细胞浸润, 但没有一种

合成激动剂针对致死性绿脓假单胞菌肺炎提供有力保护（图 15）。Pam2CSK4、Flg22 和咪喹莫特有保护倾向，但这些都没有达到单个实验或多次实验平均值的统计学显著性。MPLA 处理的小鼠在病原体攻击后显示针对死亡率提高的非显著趋向。

[0334] TLR2/6 和 TLR9 激动剂的组合诱导了对肺炎的高水平抵抗力。尽管单一的合成 TLR 激动剂仅提供中等程度的保护，但可能的是多种 PRR 的同时刺激为诱导高水平抵抗力所需（Clement 等, 2008 ;Evans 等, 2010）。为了确定 TLR 激动剂的组合是否可以诱导抗性，本发明人测试了七种合成配体的配对排列。

[0335] 值得注意的是，利用 Pam2CSK4 和 ODN2395 (ODN+Pam2) 同时处理导致 100% 的小鼠在其他情况下为致死性的革兰氏阴性绿脓假单胞菌攻击下存活（图 16A, 左），和 80% 的小鼠在革兰氏阳性肺炎链球菌的致死性攻击下存活（图 16B, 左）。在气雾剂处理中将两种配体的浓度加倍导致 90% 在肺炎链球菌攻击下存活（图 16B）。保护小鼠免于致死性感染攻击与肺内病原体的协同杀伤相关（图 16A 和 16B, 右），并且将配体浓度加倍与更高病原体杀伤的倾向相关。在 4 小时和 24 小时，在白细胞向肺的募集中观察到了 Pam2CSK4 与 ODN2395 的协同相互作用（图 16C）。这些结果表明，TLR2/6 和 TLR9 的配体诱导抗微生物效应应答（包括病原体杀伤和白细胞募集的那些应答）的协同活化，其导致针对肺炎的保护的协同水平。与 NTHi 溶胞产物诱导的抵抗力的动力学类似，在处理 4 小时后存在保护。

[0336] 不是所有的 TLR 激动剂组合都产生针对感染的有力保护。本发明人测试了 TLR 激动剂的以下组合：Pam2+Poly (I:C)、Pam2+Flg22、Pam2+咪喹莫特、ODN+Poly (I:C)、ODN+Flg22 和 ODN+Pam3。本发明人发现这些组合与 Pam2-ODN 组合（图 16）相比，在针对绿脓假单胞菌进行保护时效力较低（图 17A-F）。这些结果揭示，不是所有的 TLR 激动剂组合都赋予与 Pam2-ODN 相同的免疫刺激。

[0337] TLR2 足以促进保护性 Pam2SCK4 和 ODN2395 协同性，但不是诱导抵抗力所必需的。TLR 配体 Pam2SCK4 和 ODN2395（其具有充分定义的受体特异性）的协同效应的检测提供了 TLR2/6 和 TLR9 参与的推定证据。本发明人使用敲除小鼠和其他配体寻找额外的证据。

[0338] 本发明人比较了在绿脓假单胞菌攻击前用 Pam2-ODN 或 PBS 预处理的野生型和 TLR2 缺陷型小鼠的存活。野生型小鼠被 Pam2-ODN 完全保护，但在 sham 处理的野生型组或任一 Tlr2^{-/-}组中没有存活（图 18A, 左图），证明在 Pam2-ODN 诱导的保护中需要 TLR2。Tlr2^{-/-}小鼠中缺少保护与缺乏 Pam2-ODN 诱导的肺内病原体杀伤密切相关（图 18A, 右图）。

[0339] 因为 Pam2CSK4 和 Pam3CSK4 区分 TLR2/6 和 TLR2/1，并且与 ODN2395 组合时，Pam2CSK4 产生强烈的协同保护效应而 Pam3CSK4 则不然，所以可能需要 TLR2/6 异二聚体来诱导肺上皮抵抗力。本发明人还在 NTHi 溶胞产物处理后攻击 Tlr2^{-/-}和野生型小鼠，并发现保护未丧失（图 18B, 左图），也未丧失溶胞产物诱导的细菌杀伤（图 18B, 右图）。总之，这些结果提示，TLR2/6 足以与 TLR9 协同相互作用，但并不是所有诱导的肺上皮抵抗力所必需的。

[0340] C 型 CpG ODN 与 Pam2SCK4 协同相互作用而诱导对细菌性肺炎的抵抗力，而 A 型和 B 型则不然。本发明人试图进一步评估 TLR9 是否为与 Pam2-ODN 的协同相互作用所需。因为没有 Tlr9^{-/-}小鼠可用，所以本发明人使用已知不结合 TLR9 的乱序 ODN 来测试 TLR9 的参与。用 Pam2-ODN 预处理导致绿脓假单胞菌攻击的小鼠 90% 存活，但用 Pam2SCK4 和对照 ODN 预处理时导致没有存活（图 19A），表明 ODN 与 TLR9 的结合为协同保护所需。

[0341] 为了进一步探索 Pam2-ODN 相互作用的特异性,本发明人在用绿脓假单胞菌攻击之前用 Pam2CSK4 和不同类型的 CpG ODN 处理野生型小鼠。A 型 ODN(ODN 1585 或 ODN 2216) 或 B 型 ODN(ODN 2006-G5) 与 Pam2SCK4 的组合不能赋予保护,而 Pam2SCK4 与 C 型 ODN(ODNM362 或 ODN 2395) 的组合促进对其他致死性肺炎的显著抵抗力(图 19B)。这些结果表明,TLR2/6 和 TLR9 配体不仅协同作用,而且特定的配体比其他配体更有利于相互作用。

[0342] Pam2CSK4 和 ODN2395 在体外通过上皮细胞诱导细菌杀伤。当用 NTHi 溶胞产物刺激时,肺上皮细胞被诱导以杀死细菌(Clement 等,2009;Evans 等,2010)。因为 Pam2-ODN 在体内重现了细菌溶胞产物的免疫刺激效应,本发明人测试了所述组合是否也可以在体外诱导分离的肺上皮细胞进行病原体杀伤。用 Pam2-ODN 预处理小鼠 MLE-15 呼吸道上皮细胞 4 小时显著减少了接种炭疽芽孢杆菌后的细胞培养基中的细菌 CFU(图 20A)。同样地,用 Pam2-ODN 处理人 A549 细胞导致感染后 4 小时绿脓假单胞菌 CFU 的显著减少(图 20C)。证明了病原体杀伤是通过刺激上皮细胞,而不是通过 Pam2-ODN 的直接抗生素效应,细菌在不含上皮细胞的孔中生长至相等数量,不管它们是用 Pam2-ODN 处理还是用 PBS 处理(图 20B 和 20D)。

[0343] 因此,在小鼠和人上皮细胞中均诱导了抗微生物效应,并且导致杀死革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌病原体。这些数据模拟了在体内 Pam2-ODN 处理后观察到的细菌杀伤。连续提高 Pam2-ODN 剂量至本文所示的 32 倍并未显著提高病原体杀伤。

[0344] Pam2CSK4 和 ODN2395 在体内细胞内共定位。Pam2CSK4 和 ODN2395 相互作用诱导协同作用的机制仍然未解出。因为 TLR2/6 被报道定位在质膜上,而 TLR9 被报道定位在内体中(Beutler,2009;Dostert 等,2008),所以人们无法预见到所述配体的物理相互作用。然而,因为 TLR4 可能需要内化来进行信号转导(Kagan 等,2008),于是本发明人研究了这两个配体是否被上皮细胞内化。在细胞培养载玻片上单层培养 A549 细胞,然后在病原体杀伤实验中使用的相同浓度的 FITC 标记的 Pam2CSK4(10 μ g/ml) 和 Texas Red 标记的 ODN2395(20 μ g/ml) 进行处理。2 小时后,洗涤细胞,用 DAPI 标记细胞核,并用荧光显微镜观察所述载玻片。Pam2CSK4 和 ODN2395 均被上皮细胞内化。此外,Pam2CSK4 和 ODN2395 在胞质区室内(推测在内体内)共定位。这些结果提示 Pam2CSK4 和 ODN2395 可能在内体内共定位。

[0345] 利用 Pam2CSK4、TLR2/6 激动剂和 C 型 ODN(2395、10101 或 M362)、TLR9 激动剂的组合进行预处理诱导了对炭疽芽孢杆菌和流感病毒肺感染的高水平抵抗力。在用炭疽芽孢鼻内攻击或利用流感病毒气雾剂攻击前 1 天,如所示用雾化的 TLR 配体预处理小鼠。监测了小鼠的存活。

[0346] 参考文献

[0347] 以下参考文献明确地以援引方式并入本文,其程度为它们为本文所述内容提供补充性示例方法或其他细节。

[0348] 美国专利 4,554,101

[0349] 美国专利 4,668,218

[0350] 美国专利 4,689,338

[0351] 美国专利 4,929,624

- [0352] 美国专利 5, 238, 944
- [0353] 美国专利 5, 266, 575
- [0354] 美国专利 5, 268, 376
- [0355] 美国专利 5, 346, 905
- [0356] 美国专利 5, 352, 784
- [0357] 美国专利 5, 389, 640
- [0358] 美国专利 5, 389, 640
- [0359] 美国专利 5, 389, 640
- [0360] 美国专利 5, 395, 937
- [0361] 美国专利 5, 458, 135
- [0362] 美国专利 5, 482, 936
- [0363] 美国专利 5, 494, 916
- [0364] 美国专利 5, 525, 612
- [0365] 美国专利 6, 039, 969
- [0366] 美国专利 6, 110, 929
- [0367] 美国专利 6, 110, 929
- [0368] 美国专利 6, 194, 425
- [0369] 美国专利 6, 331, 539
- [0370] 美国专利 6, 331, 539
- [0371] 美国专利 6, 451, 810
- [0372] 美国专利 6, 488, 953
- [0373] 美国专利 6, 737, 045
- [0374] 美国专利 6, 794, 357
- [0375] 美国专利 6, 797, 258
- [0376] 美国专利申请 11/830, 622
- [0377] 美国专利公开 20030225016
- [0378] 美国专利公开 2004/0162309
- [0379] 美国专利公开 2004/0171086
- [0380] 美国专利序列号 10/844, 933
- [0381] Abuchowski 等, J. Biol. Chem. , 252 :582, 1977.
- [0382] Adachi 等, Immunity, 9 :143-150, 1998.
- [0383] Akinbi 等, J. Immunol. , 165(10) :5760-6, 2000.
- [0384] Akira 等, Biochem. Soc. Trans. , 31(Pt 3) :637-42, 2003.
- [0385] Akira 等, Cell, 124 :783-801, 2006.
- [0386] Alexopoulou 等, Nature, 413 :732-738, 2001.
- [0387] Aliprantis 等, Science, 285 :736-739, 1999.
- [0388] Aliprantis 等, Science, 285 :736-739, 1999.
- [0389] Bals 和 Hiemstra, Curr. Drug Targets, 7(6) :743-50, 2006.
- [0390] Bals 和 Hiemstra, Eur. Respir. J. , 23(2) :327-33. 20, 2004.

- [0391] Bals 和 Hiemstra, Eur. Respir. J. , 23 :327-333, 2004.
- [0392] Barker 等, J. Med. Chem. , 35 :2040-2048, 1992.
- [0393] Bartlett 等, Microbiol. , 15 :147-163, 2008.
- [0394] Beauchamp 等, Anal. Biochem. , 131 :25, 1983.
- [0395] Beutler, Blood, 113 :1399-1407, 2009.
- [0396] Biological Approaches to the Controlled Delivery of Drugs, R. L. Juliano, New York Academy of Sciences, 1988.
- [0397] Buwitt-Beckmann 等, FEBS J. , 272 :6354-6364, 2005.
- [0398] Chen 等, Biochim. Biophys. Acta, 660 :293, 1981.
- [0399] Clement 等, Am. J. Respir. Crit. Care Med. , 177 :1322-1330, 2008.
- [0400] Clement 等, Respir. Res. , 10 :70, 2009.
- [0401] Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel 等 (Eds.), 1987.
- [0402] Dennis 等, JAMA, 285 :2763-2773, 2001.
- [0403] Dostert 等, Adv. Drug Deliv. Rev. , 60 :830-840, 2008.
- [0404] Edwards 等, Cancer Res. , 62 :4671-4677, 2002.
- [0405] European Appln. EP 0237507
- [0406] Evans 等, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. , 31 (4) :382-94, 2004.
- [0407] Evans 等, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. , 32 (6) :490-7, 2005.
- [0408] Evans 等, Am. J. Respir. Cell Molec. Biol. , 42 :40-50, 2010.
- [0409] Evans 等, Annu. Rev. Physiol. , (72) 413-35, 2010.
- [0410] Fanger 等, J. Leukocyte Biology, 66 :231-236, 1999.
- [0411] Forteza 等, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. , 32 (5) :462-9, 2005.
- [0412] Gorden 等, J. Immunol. , 174 :1259-1268, 2005.
- [0413] Hayashi 等, Nature, 410 :1099-1103, 2001.
- [0414] Hiemstra, Exp. Lung Res. , 33 :537-542, 2007.
- [0415] Hippenstiel 等, Respir. Res. , 7 :97, 2006.
- [0416] Hruby 等, Biochem J. , 268 :249-262, 1990.
- [0417] Hydrolysis in Drug and Prodrug Metabolism :Chemistry, Biochemistry, and Enzymology, Bernard Testa, Vch Verlagsgesellschaft MbH, 2003.
- [0418] Ishii 等, Cell Host Microbe. , 3 :352-363, 2008.
- [0419] Janeway, Jr. 和 Medzhibtov, Annu. Rev. Immunol. , 20 :197-216, 2002.
- [0420] Kagan 等, Nat. Immunol. , 9 :361-368, 2008.
- [0421] Kaisho 等, Biochim. Biophys. Acta, 1589 (1) :1-13, 2002.
- [0422] Keamey 等, Immunity, 1 :327, 1994.
- [0423] Kellner 等, Biol. Chem. 373 :1 :51-5, 1992.
- [0424] Kita 等, Drug Des. Delivery, 6 :157, 1990.
- [0425] Knauf 等, J. Biol. Chem. , 263 :15064, 1988.
- [0426] Knowles 等, J. Clin. Invest. , 109 (5) :571-7, 2002.
- [0427] Krug 等, Eur. J. Immunol. , 31 :2154-2163, 2001.

- [0428] Kyte 和 Doolittle, J. Mol. Biol. , 157(1) :105-132, 1982.
- [0429] Lee 等, J. Lipid Res. , 44 :479-486, 2003.
- [0430] Lee 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100 :6646-6651, 2003.
- [0431] Martin 和 Frevert, Proc. Am. Thorac. Soc. , 2(5) :403-11, 2005.
- [0432] Martin 等, Infect. Immun. , 71 :2498-2507, 2003.
- [0433] Medzhitov 和 Janeway, Jr. , Curr. Opin. Immunol. , 9(1) :4-9, 1997.
- [0434] Medzhitov 和 Janeway, Jr. , Trends Microbiol. , 8(10) :452-456, 2000.
- [0435] Medzhitov 等, Mol. Cell, 2(2) :253-8, 1998.
- [0436] Mizgerd, N. Engl. J. Med. , 358 :716-727, 2008.
- [0437] Moghaddam 等, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. , 38 :629-638, 2008.
- [0438] Mondino 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93(6) :2245-52, 1996.
- [0439] Morgan 和 Gainor, Ann. Rep. Med. Chem. , 24 :243-252, 1989.
- [0440] Nagase 等, J. Immunol. , 171(8) :3977-82, 2003.
- [0441] O' Neill 和 Bowie, Nat. Rev. Immunol. , 7 :353-364, 2007.
- [0442] Or 等, J. Org. Chem. , 56 :3146-3149, 1991.
- [0443] PCT 申请 WO 00/76518
- [0444] PCT 申请 WO 02/46189
- [0445] PCT 申请 WO 02/46192
- [0446] PCT 申请 WO 02/46193
- [0447] PCT 申请 WO 94/06498
- [0448] PCT 申请 WO 94/08552
- [0449] PCT 申请 WO 94/16970
- [0450] PCT 申请 WO 97/25086
- [0451] PCT 申请 WO 98/16427
- [0452] PCT 申请 WO 98/35888
- [0453] PCT 申请 WO 98/55495
- [0454] Poltorak 等, Science, 282(5396) :2085-8, 1998.
- [0455] Prodrugs :Topical and Ocular Drug Delivery, Kenneth Sloan, Marcel Dekker ; 1992.
- [0456] Pulendran 等, J. Exp. Med. , 188(11) :2075-82, 1998.
- [0457] Rogan 等, Respir. Res. , 7 :29, 2006.
- [0458] Roman 等, Nat. Med. , 3(8) :849-54, 1997.
- [0459] Schutte 和 McCray, Annu. Rev. Physiol. , 64 :709-748, 2002.
- [0460] Seifer 等, Biochem. J. , 26 :795-802, 1990.
- [0461] Shi 等, J. Biol. Chem. , 284 :20540-20547, 2009.
- [0462] Takeda 和 Akira, J. Dermatol. Sci. , 34(2) :73-82, 2004.
- [0463] Takeda 和 Akira, Semin. Immunol. , 16 :3-9, 2004.
- [0464] Takeuchi 等, Int. Immunopharmacol. , 1(4) :625-35, 2001.
- [0465] Travis 等, Curr. Opin. Immunol. , 13(1) :89-95, 2001.

-
- [0466] Tsutsumi 等, J. Controlled Rel., 33 :447, 1995.
- [0467] Tuvim 等, PLoS ONE, 4 :e4176, 2009.
- [0468] Vroegop 等, Intl. J. Immunopharmacol., 21 :647-662, 1999.
- [0469] Williams 等, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 34(5) :527-36. 10, 2006.
- [0470] Yamamoto 等, Science, 301 :640-643, 2003.

[0001]

序 列 表

<110> DICKY, BURTON

TUVIM, MICHAEL

EVANS, SCOTT

<120> 用于刺激哺乳动物对病原体的先天免疫抵抗力的组合物

<130> TAMK:252W0

<140> 未知

<141> 2010-03-25

<150> 61/163, 137

<151> 2009-03-25

<150> 61/179, 246

<151> 2009-05-18

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1651

<212> PRT

<213> 粪肠球菌

<400> 1

Met Lys Lys Lys Thr Phe Ser Phe Val Met Leu Ser Ile Leu Leu Ala
1 5 10 15

Gln Asn Phe Gly Phe Ala Val Asn Ala Tyr Ala Val Thr Thr Thr Glu
20 25 30

Ala Gln Thr Glu Thr Thr Asp Thr Ala Lys Lys Glu Ala Glu Leu Ser
35 40 45

Asn Ser Thr Pro Ser Leu Pro Leu Ala Thr Thr Thr Thr Ser Glu Met
50 55 60

[0002]

Asn Gln Pro Thr Ala Thr Thr Glu Ser Gln Thr Thr Glu Ala Ser Thr
65 70 75 80

Thr Ala Ser Ser Asp Ala Ala Thr Pro Ser Glu Gln Gln Thr Thr Glu
85 90 95

Asp Lys Asp Thr Ser Leu Asn Glu Lys Ala Leu Pro Asp Val Gln Ala
100 105 110

Pro Ile Thr Asp Glu Leu Leu Asp Ser Met Ser Leu Ala Pro Ile Gly
115 120 125

Gly Thr Glu Tyr Ser Gln Thr Glu Val His Arg Glu Leu Asn Thr Thr
130 135 140

Pro Val Thr Ala Thr Phe Gln Phe Ala Val Gly Asn Thr Gly Tyr Ala
145 150 155 160

Pro Gly Ser Val Tyr Thr Val Gln Leu Pro Glu His Leu Gly Tyr Ser
165 170 175

Thr Val Ser Gly Glu Val Thr Gly Ile Gly Ala Thr Trp Ala Val Asp
180 185 190

Ala Ala Thr Lys Thr Leu Ser Ile Thr Phe Asn Gln Arg Val Ser Asp
195 200 205

Thr Ser Phe Lys Val Glu Leu Lys Ser Tyr Leu Thr Thr Glu Ala Glu
210 215 220

Pro Leu Ile Lys Ile Glu Thr Pro Gly Lys Asn Lys Lys Thr Tyr Ser
225 230 235 240

Phe Asp Leu Tyr Glu Gln Val Glu Pro Ile Gln Tyr Asn Glu Arg Thr

[0003]

245	250	255
Arg Thr Thr Gly Leu Asp Gly Glu Ile Phe Tyr Asn Leu Asp Arg Thr		
260	265	270
Leu Thr Gly Asn Gln Thr Leu Glu Leu Leu Thr Thr Glu Thr Pro Gly		
275	280	285
Ala Val Phe Gly Lys Gln Asp Asn Leu Glu Pro Gln Val Phe Ser Tyr		
290	295	300
Asp Val Asp Ile Asn Gly Gln Ile Leu Pro Glu Thr Gln Thr Leu Leu		
305	310	315 320
Thr Pro Gly Lys Asp Tyr Thr Leu Ser Asp Asn Ser Leu Gly Arg Ile		
325	330	335
Ala Val Thr Val Pro Asn Met Asn Gln Gln Lys Ala Tyr Ser Leu Ser		
340	345	350
Ile Asn Arg Thr Ile Tyr Leu Glu Ser Ala Ser Asp Tyr Asn Tyr Leu		
355	360	365
Tyr Ser Gln Gln Tyr Pro Thr Thr Lys Ile Gly Ser Ile Ser Leu Lys		
370	375	380
Ser Thr Thr Gly Thr Lys Gln Thr Thr Asp Phe Thr Ala Lys Thr Ser		
385	390	395 400
Gln Thr Ser Lys Val Ile Ala Asp Arg Glu Met Arg Ser Met Ser Tyr		
405	410	415
Ile Ser Phe Gln Ser Lys Gly Lys Tyr Tyr Val Thr Ile Tyr Gly Thr		
420	425	430

[0004]

Leu Thr Glu Thr Lys Val Gly Gln Gln Ile Val Leu Glu Ser Thr Asn
435 440 445

Gly Gln Glu Ile Lys Asn Pro Lys Phe Thr Ala Tyr Gly Pro Leu Tyr
450 455 460

Glu Asn Val Lys Leu Glu Asp Tyr Phe Asp Ile Lys Thr Glu Gly Gly
465 470 475 480

Lys Leu Thr Leu Thr Ala Thr Lys Asp Ser Tyr Leu Arg Ile Asn Ile
485 490 495

Ser Asp Leu Thr Met Asp Phe Asp Lys Lys Asp Ile Asn Leu Ser Leu
500 505 510

Ser Thr Pro Val Ile Gly Pro Asn Lys Ala Ile Gln Leu Val Ser Asp
515 520 525

Gln Tyr Ile Glu Pro Ile Ser Val Val Asn Pro Leu Asn Ala Glu Thr
530 535 540

Ala Trp Gly Asn Tyr Asp Gln Asn Gly Ala Tyr Ser Ser Arg Thr Thr
545 550 555 560

Val Ser Val Met Gly Ser Lys Glu Lys Pro Ile Gln Asn Leu Glu Ile
565 570 575

Lys Val Lys His Pro Asn Tyr Leu Ser Leu Arg Ala Thr Lys Glu Ile
580 585 590

Tyr Phe Tyr Tyr Lys Leu Gly Thr Asp Tyr Thr Val Thr Pro Thr Ser
595 600 605

[0005]

Asp Gly Ser Val Ile Lys Phe Thr Thr Pro Ile Thr Asn Glu Ile Gln
610 615 620

Ile Pro Ile Gly Phe Asn Tyr Val Pro Asp Ser Leu Pro Lys Asp Lys
625 630 635 640

Ser Ile Pro Val Asp Thr Ile Pro Ile Thr Met Ser Ala Glu Gly Leu
645 650 655

Thr Pro Val Asp Thr Thr Val Thr Thr Asn Ser Lys Arg Gly Ser Glu
660 665 670

Arg Thr Leu Gln Ser Ser Lys Asn Gln Phe Leu Val Asn Ala Arg Asn
675 680 685

Asp Ser Phe Asp Ser Leu Ser Val Arg Thr Lys Ile Pro Ala Gly Ala
690 695 700

Asp Val Leu Phe Asp Ile Tyr Asp Val Ser Asn Asp Gln Val Asp Ser
705 710 715 720

Ile Tyr Pro Gln Tyr Trp Asp Arg Gly Gln Tyr Phe Asp Lys Pro Met
725 730 735

Thr Pro Asn Ser Pro Gly Tyr Pro Thr Ile Thr Phe Asp Glu Asn Thr
740 745 750

Asn Ser Tyr Thr Phe Asp Phe Gly Lys Thr Asn Lys Arg Tyr Ile Ile
755 760 765

Glu Tyr Lys Asn Ala Asn Gly Trp Ile Asp Val Pro Thr Leu Tyr Ile
770 775 780

[0006]

Thr Gly Thr Ala Lys Glu Pro Gln Ser Asn Asn Asn Glu Gly Ser Ala
785 790 795 800

Ser Val Ser Val Gln Asn Glu Ala Leu Asp Ile Leu Ser Ala Thr Gln
805 810 815

Ala Ala Asn Pro Thr Leu Lys Asn Val Thr Lys Thr Thr Val Thr Thr
820 825 830

Lys Asn Ile Asp Asn Lys Thr His Arg Val Lys Asn Pro Thr Ile Glu
835 840 845

Leu Thr Pro Lys Gly Thr Thr Asn Ala Gln Ile Asp Leu Asn Ser Ile
850 855 860

Thr Val Lys Gly Val Pro Glu Asp Ala Tyr Ser Leu Glu Lys Thr Thr
865 870 875 880

Asn Gly Ala Lys Val Ile Phe Lys Asp Tyr Thr Leu Thr Glu Asn Ile
885 890 895

Thr Ile Glu Tyr Asn Thr Val Ser Ala Asn Ala Gly Gln Ile Tyr Thr
900 905 910

Glu Thr Thr Ile Asp Ser Glu Thr Leu Asn Gln Met Ser Ala Ser Lys
915 920 925

Lys Lys Val Thr Thr Ala Pro Ile Thr Leu Lys Phe Ser Glu Gly Asp
930 935 940

Ala Glu Gly Ile Val Tyr Leu Ala Thr Ala Thr Phe Tyr Thr His Asn
945 950 955 960

Val Glu Asp Glu Asn Gln Ala Ile Ala Lys Val Ser Phe Glu Leu Ile

[0007]

965							970							975						
Asp	Asn	Val	Thr	His	Thr	Ala	Thr	Glu	Phe	Thr	Thr	Asp	Glu	Lys	Gly					
980							985							990						
Gln	Tyr	Ser	Phe	Asp	Ala	Ile	Met	Thr	Gly	Asp	Tyr	Thr	Leu	Arg	Val					
995							1000							1005						
Thr	Asn	Val	Pro	Gln	Glu	Tyr	Ser	Val	Asp	Glu	Glu	Tyr	Leu	Thr						
1010							1015							1020						
Gly	Lys	Ala	Ile	Lys	Leu	Val	Lys	Gly	Asp	Asn	Gln	Leu	Lys	Ile						
1025							1030							1035						
Pro	Leu	Thr	Lys	Thr	Ile	Asp	His	Ser	Arg	Leu	Gln	Val	Lys	Asp						
1040							1045							1050						
Ser	Thr	Ile	Tyr	Val	Gly	Asp	Ser	Trp	Lys	Pro	Glu	Glu	Asn	Phe						
1055							1060							1065						
Val	Ser	Ala	Thr	Asp	Lys	Thr	Gly	Gln	Asp	Val	Pro	Phe	Glu	Lys						
1070							1075							1080						
Ile	Thr	Val	Ser	Gly	Gln	Val	Asp	Asn	Thr	Lys	Ala	Gly	Val	Tyr						
1085							1090							1095						
Pro	Ile	Ile	Tyr	Ser	Asp	Glu	Gly	Lys	Glu	Glu	Thr	Ala	Tyr	Val						
1100							1105							1110						
Thr	Val	Lys	Pro	Asp	Gln	Ser	Lys	Leu	Glu	Val	Lys	Asp	Thr	Thr						
1115							1120							1125						
Ile	Tyr	Val	Gly	Asp	Ser	Trp	Lys	Pro	Glu	Asp	Asn	Phe	Val	Ser						
1130							1135							1140						

[0008]

Ala Thr	Asp Lys Thr Gly Gln	Asp Val Pro Phe Glu	Lys Ile Asp
1145	1150	1155	
Val Gln	Gly Thr Val Asn Val	Asp Lys Ile Gly Asp	Tyr Glu Ile
1160	1165	1170	
Val Tyr	Lys Asn Gly Lys Lys	Glu Ala Lys Ala Ile	Val His Val
1175	1180	1185	
Arg Asp	Asp Ser Gln Leu Glu	Val Lys Asp Thr Thr	Ile Tyr Val
1190	1195	1200	
Gly Asp	Ser Trp Lys Pro Glu	Asp Asn Phe Val Ser	Ala Thr Asp
1205	1210	1215	
Lys Thr	Gly Gln Asp Val Pro	Phe Glu Lys Ile Thr	Val Ser Gly
1220	1225	1230	
Gln Val	Asp Thr Ser Lys Ala	Gly Val Tyr Pro Ile	Val Tyr Ser
1235	1240	1245	
Tyr Glu	Gly Lys Glu Glu Thr	Ala Asn Val Thr Val	Lys Pro Asp
1250	1255	1260	
Gln Ser	Lys Leu Glu Val Lys	Asp Thr Thr Ile Tyr	Val Gly Asp
1265	1270	1275	
Lys Trp	Glu Pro Glu Asp Asn	Phe Val Ser Ala Thr	Asp Lys Thr
1280	1285	1290	
Gly Gln	Asp Val Pro Phe Glu	Lys Ile Asp Val Gln	Gly Thr Val
1295	1300	1305	

[0009]

Asn Val	Asp Lys Ile Gly Asp	Tyr Glu Ile Val Tyr	Lys Asn Gly
1310	1315	1320	
Thr Lys	Glu Ala Lys Ala Ile	Val His Val Arg Asp	Asp Ser Gln
1325	1330	1335	
Leu Glu	Val Lys Asp Thr Thr	Ile Tyr Val Gly Asp	Lys Trp Glu
1340	1345	1350	
Ala Glu	Asp Asn Phe Val Ser	Ala Thr Asp Lys Thr	Gly Gln Asp
1355	1360	1365	
Val Pro	Phe Glu Lys Ile Asp	Val Gln Gly Thr Val	Asn Val Asp
1370	1375	1380	
Lys Ile	Gly Asp Tyr Glu Ile	Val Tyr Lys Asn Gly	Thr Lys Glu
1385	1390	1395	
Ala Lys	Ala Ile Val His Val	Arg Asp Asp Ser Arg	Leu Gln Val
1400	1405	1410	
Lys Asp	Thr Thr Ile Tyr Val	Gly Asp Ser Trp Lys	Pro Glu Glu
1415	1420	1425	
Asn Phe	Val Ser Ala Thr Asp	Lys Thr Gly Gln Asp	Val Pro Phe
1430	1435	1440	
Glu Lys	Ile Thr Val Ser Gly	Gln Val Asp Thr Ser	Lys Ala Gly
1445	1450	1455	
Val Tyr	Pro Ile Ile Tyr Ser	Tyr Glu Gly Lys Glu	Glu Thr Ala
1460	1465	1470	

[0010]

His Val	Ala Val	Lys Pro	Asp Gln	Ser Lys	Leu Glu	Val Lys	Asp
1475			1480				1485
Thr Thr	Ile Tyr	Val Gly	Asp Ser	Trp Lys	Pro Glu	Asp Asn	Phe
1490			1495				1500
Val Ser	Ala Thr	Asp Arg	Asp Gly	His Ala	Ile Ser	Phe Asp	Lys
1505			1510				1515
Val Gln	Val Lys	Gly Glu	Val Asp	Thr Lys	Lys Thr	Gly Glu	Tyr
1520			1525				1530
Gln Ile	Ser Tyr	Thr Thr	Glu Pro	Val Asn	Glu Thr	Lys Pro	Ala
1535			1540				1545
Val Gln	Ser Arg	Leu Phe	Ser Met	Phe Ser	Asn Glu	Thr Pro	Arg
1550			1555				1560
Gln Leu	Thr Thr	Val Ala	Thr Val	His Val	Ile Asp	Arg Asn	Pro
1565			1570				1575
Thr Pro	Leu Pro	Asp Lys	Asn Glu	Asn Asn	Gln Thr	Ser Ser	Ser
1580			1585				1590
Thr Asn	Gln Thr	Thr Ile	Lys Ser	Ser Ser	Gln Tyr	Val Thr	His Ile
1595			1600				1605
Val Lys	Pro Asp	Lys Gln	Gly Arg	Tyr Pro	Lys Thr	Gly Glu	Gln
1610			1615				1620
Thr Asn	Gly Leu	Tyr Arg	Val Leu	Gly Leu	Val Val	Leu Leu	Ile
1625			1630				1635
Val Ile	Ile Ser	Gly Ile	Val Ile	Lys Lys	Lys Arg	Lys	

[0011]

1640

1645

1650

<210> 2

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 2

Gln Arg Leu Ser Thr Gly Ser Arg Ile Asn Ser Ala Lys Asp Asp Ala

1

5

10

15

Ala Gly Leu Gln Ile Ala

20

<210> 3

<211> 13

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<220>

<221> misc_feature

<222> (4).. (5)

<223> n 为 a、c、g 或 t

<220>

<221> misc_feature

<222> (9).. (10)

<223> n 为 a、c、g 或 t

<400> 3

tcgnntcggn tcg

13

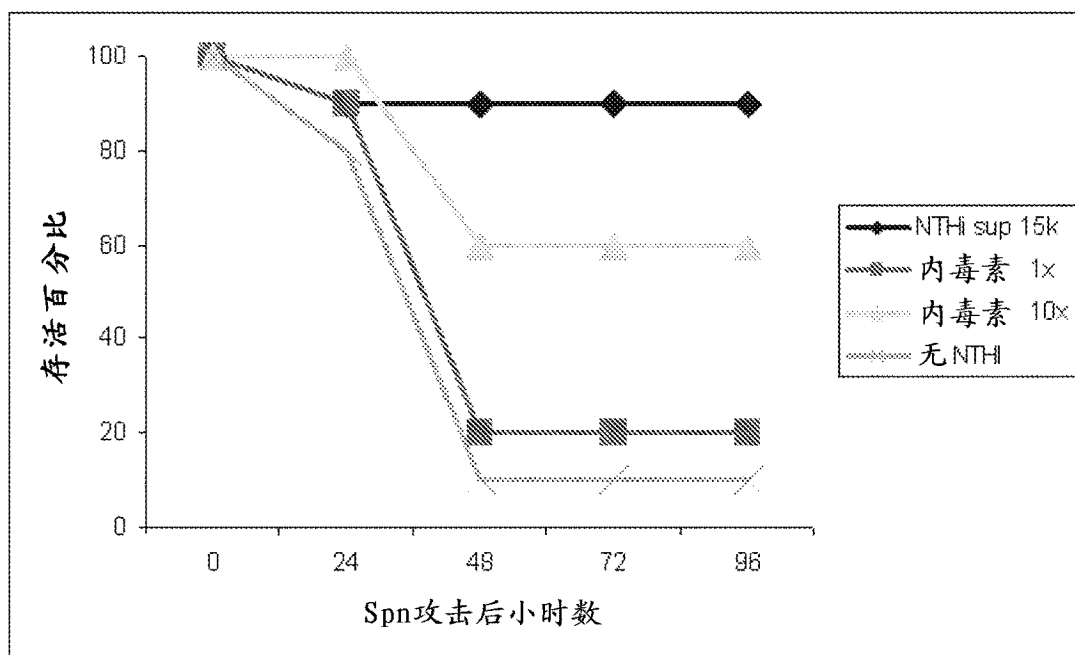


图 1

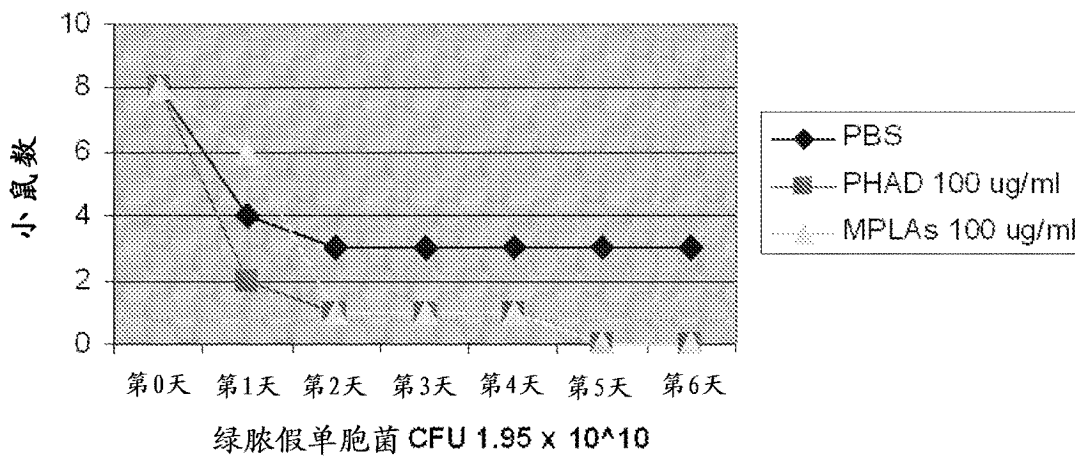
PHAD/MPLAs- 绿脓假单胞菌保护

图 2

咪喹莫特-绿脓假单胞菌保护

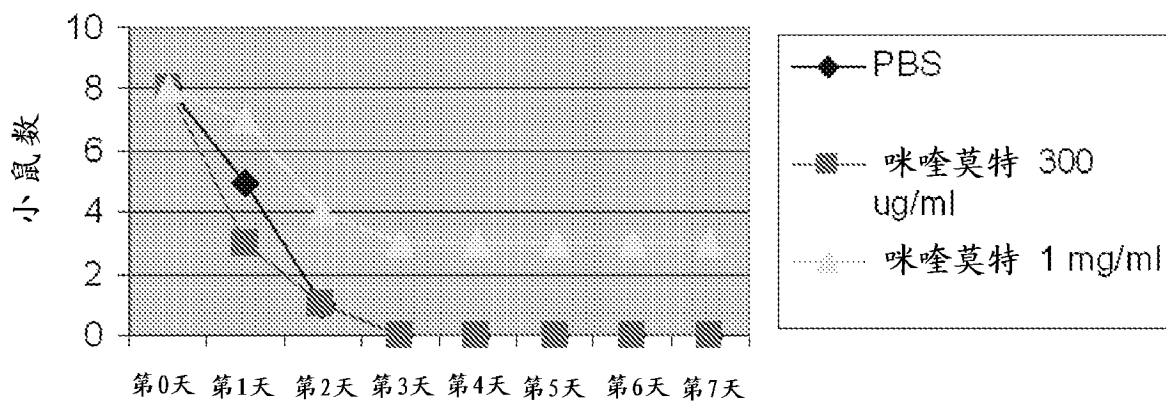
绿脓假单胞菌 $\text{CFU } 1.817 \times 10^{10}$

图 3

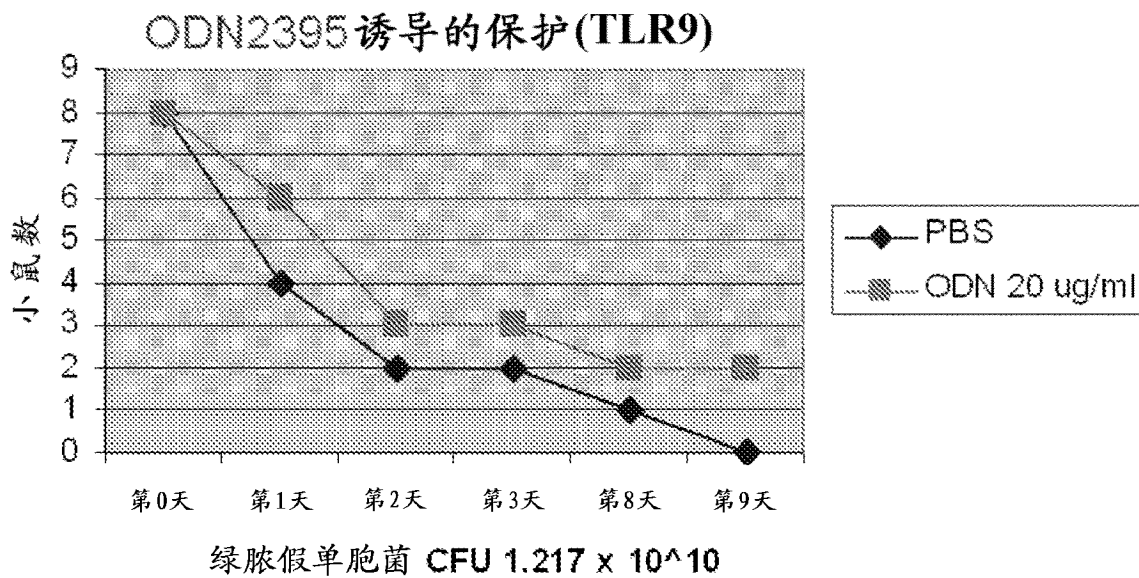
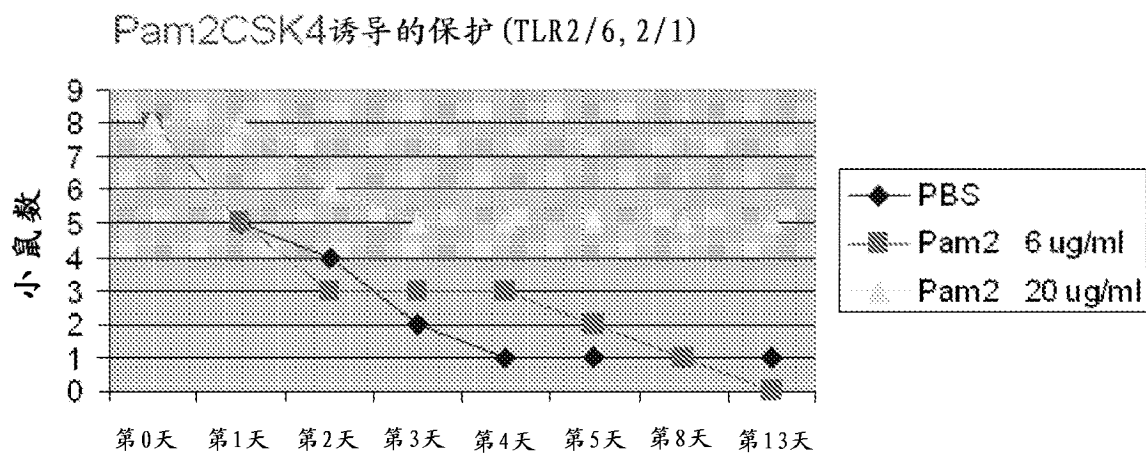
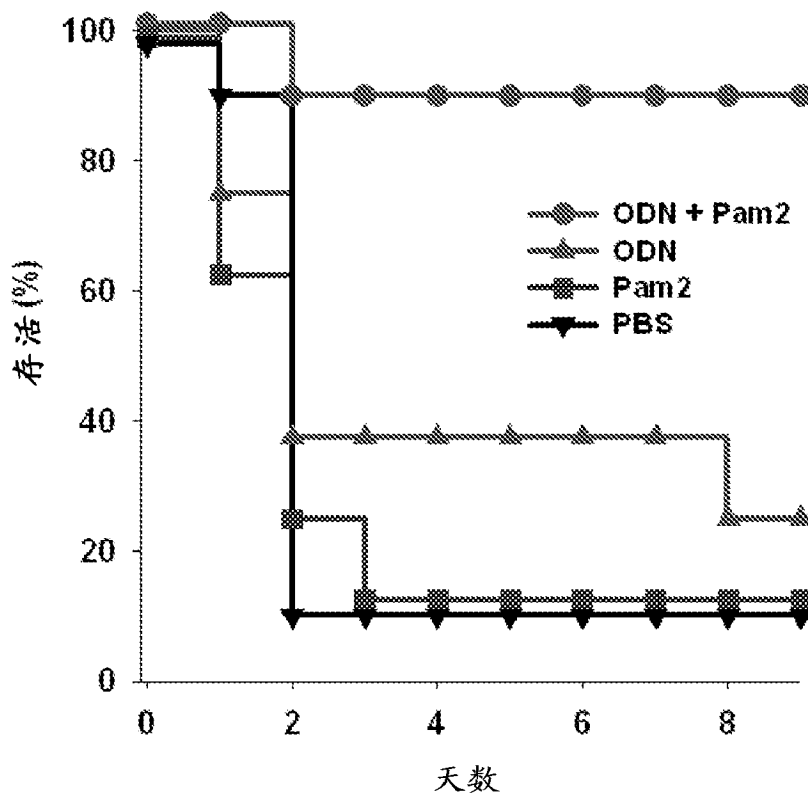


图 4



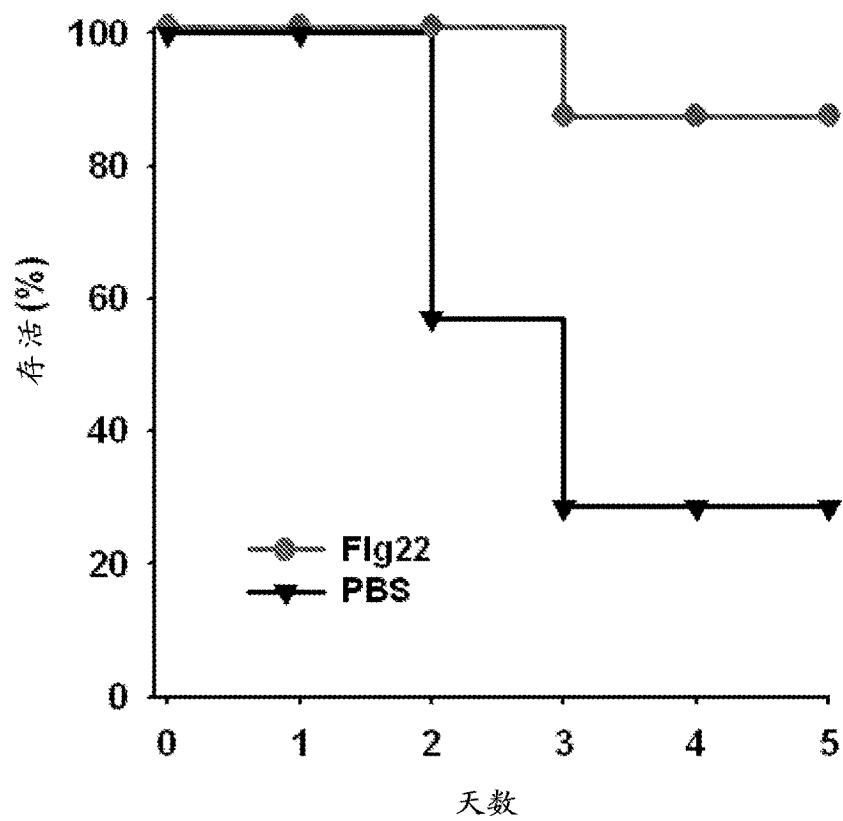
绿脓假单胞菌 $\text{CFU } 8.75 \times 10^9$

图 5



用绿脓假单胞菌攻击的Swiss-Webster小鼠 (2×10^{10} CFU/ml)

图 6



绿脓假单胞菌攻击 (2×10^{10} CFU/ml)

图 7

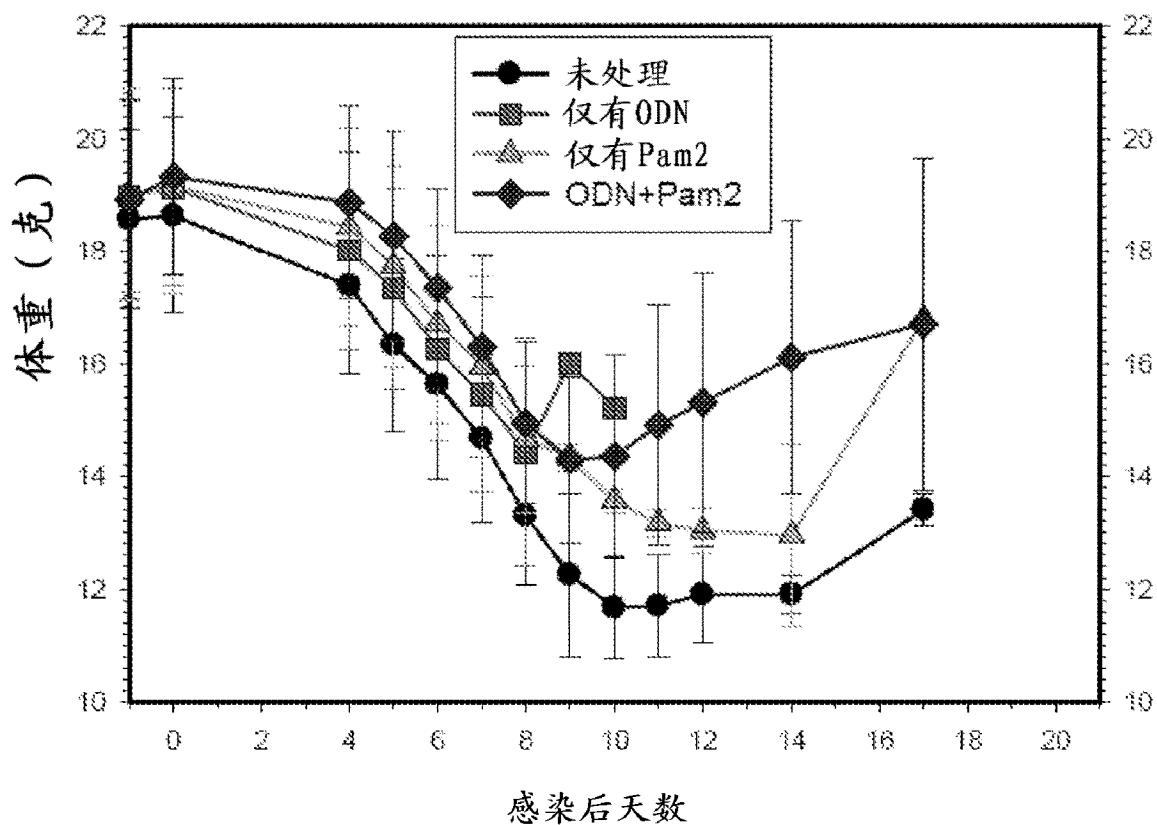


图 8

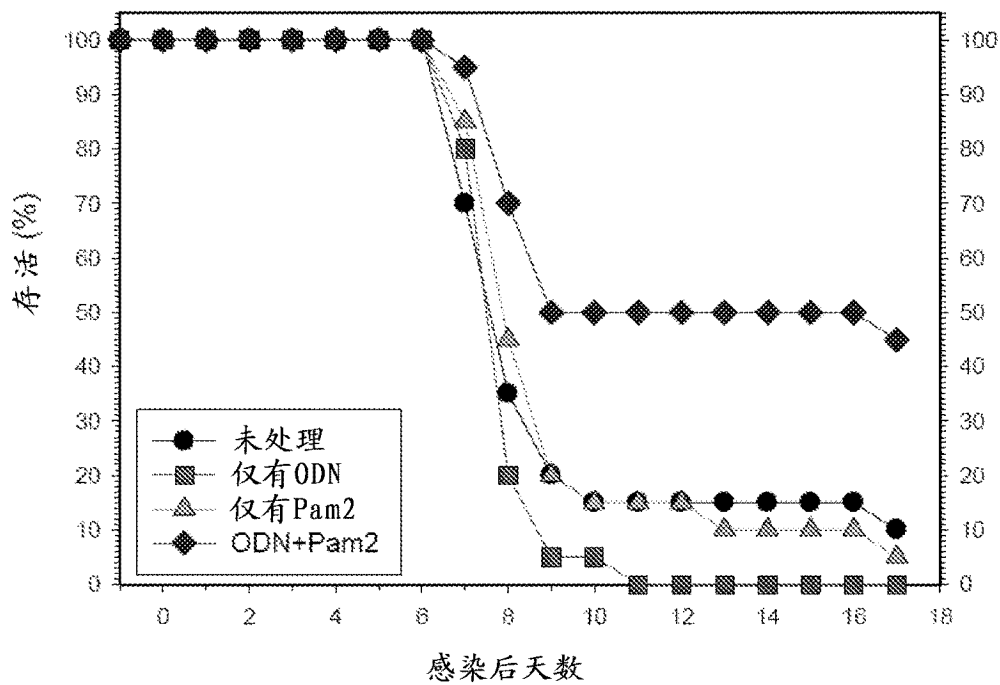


图 9

实验3 ODN/PAM2/PolyIC的一次30分钟气溶胶预处理(第1天)
对感染甲型流感病毒/HK气溶胶的
小鼠存活的影响; 病毒剂量~130 TCID₅₀/小鼠

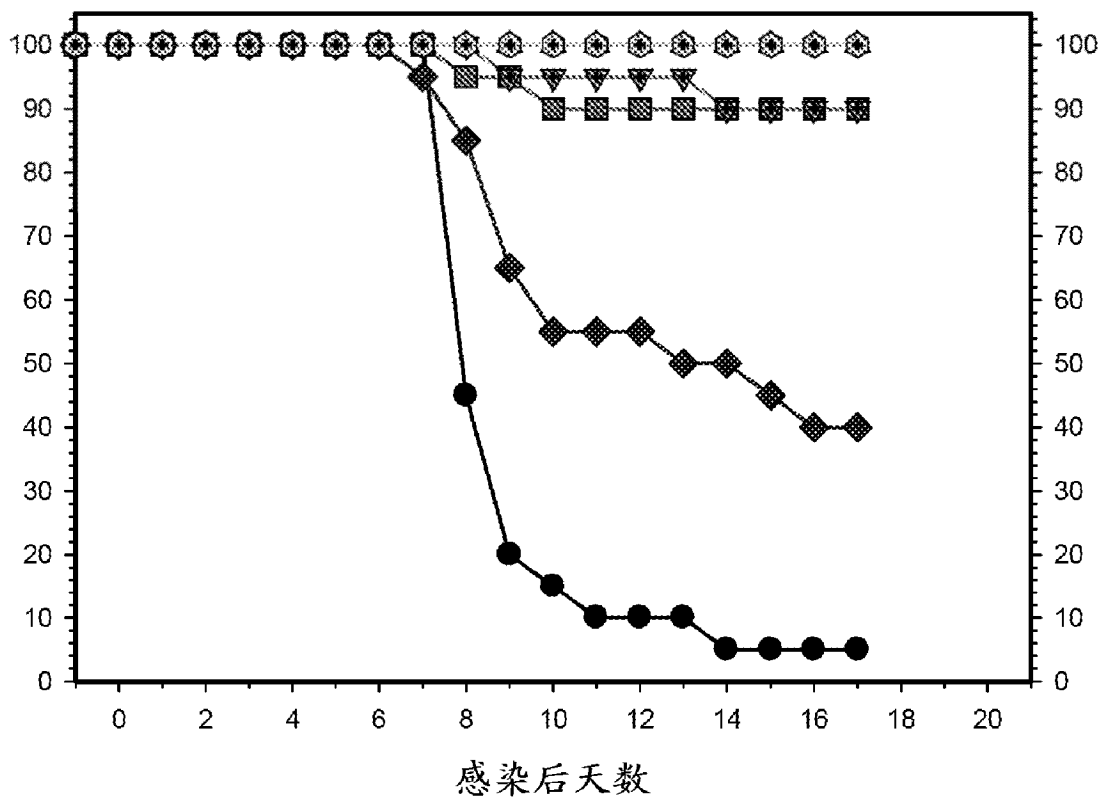


图 10

实验3 ODN/PAM2/PolyIC的一次30分钟气溶胶预处理（第1天）
对感染甲型流感病毒/HK气溶胶的
小鼠体重的影响；病毒剂量 $\sim 130 \text{ TCID}_{50}$ /小鼠

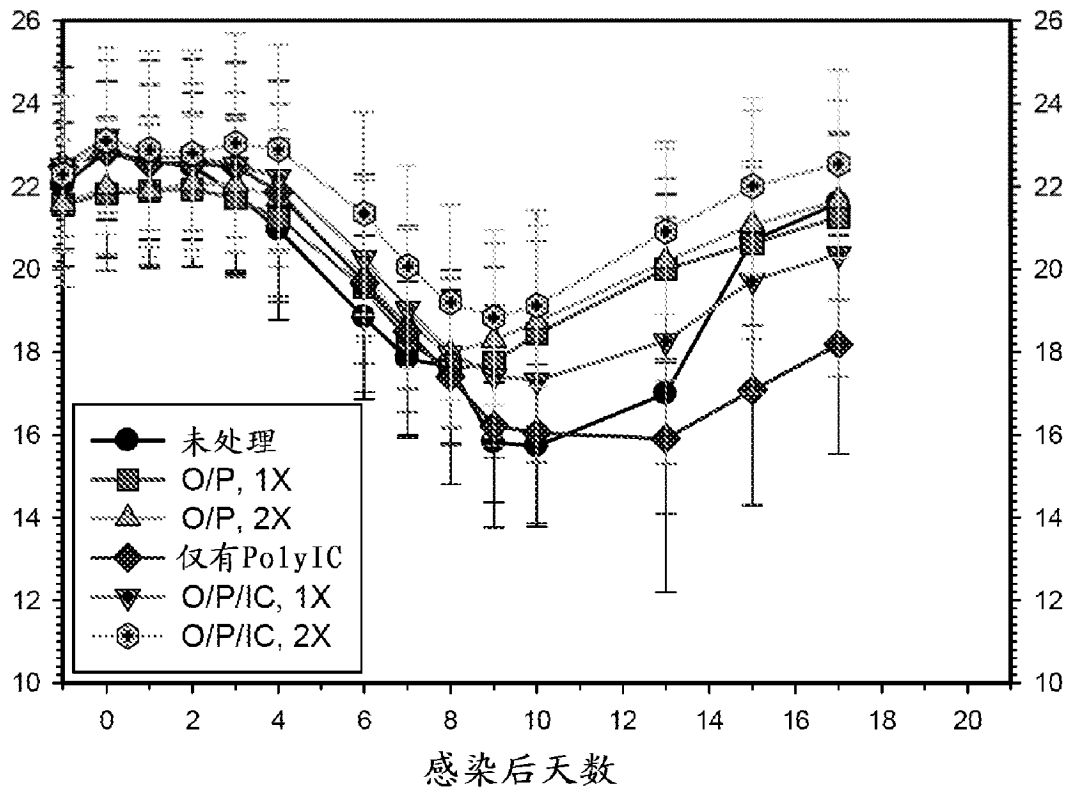


图 11

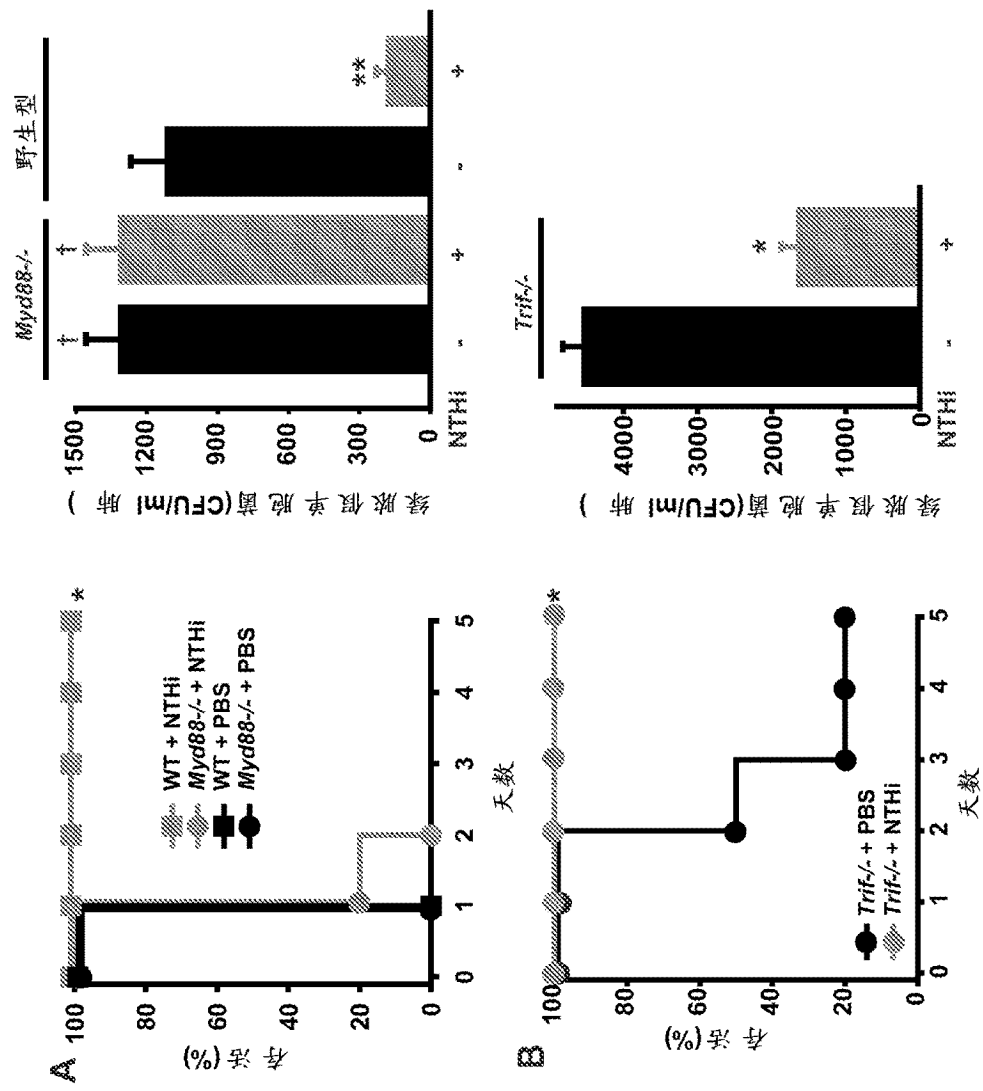


图 12A-B

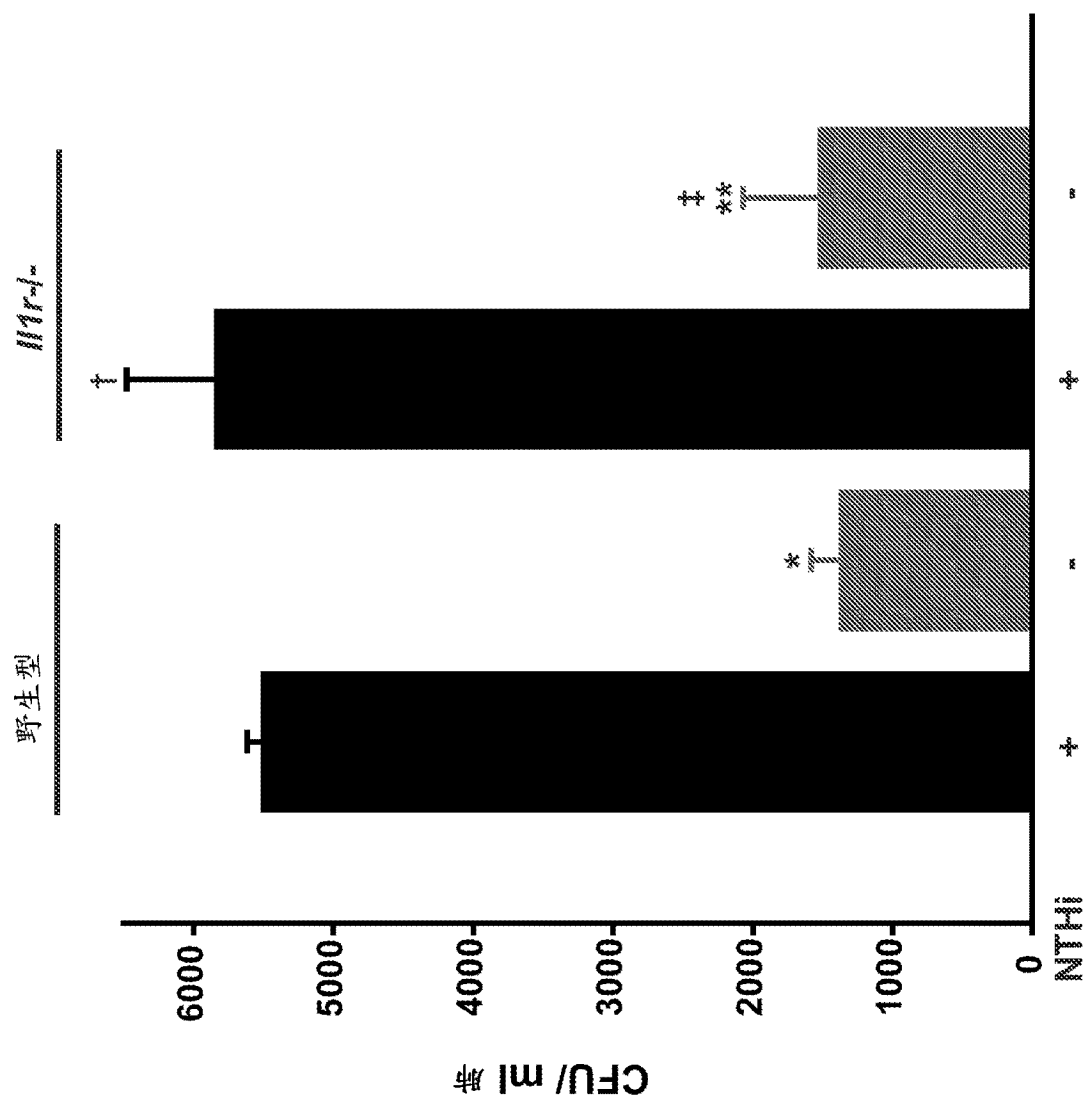


图 13

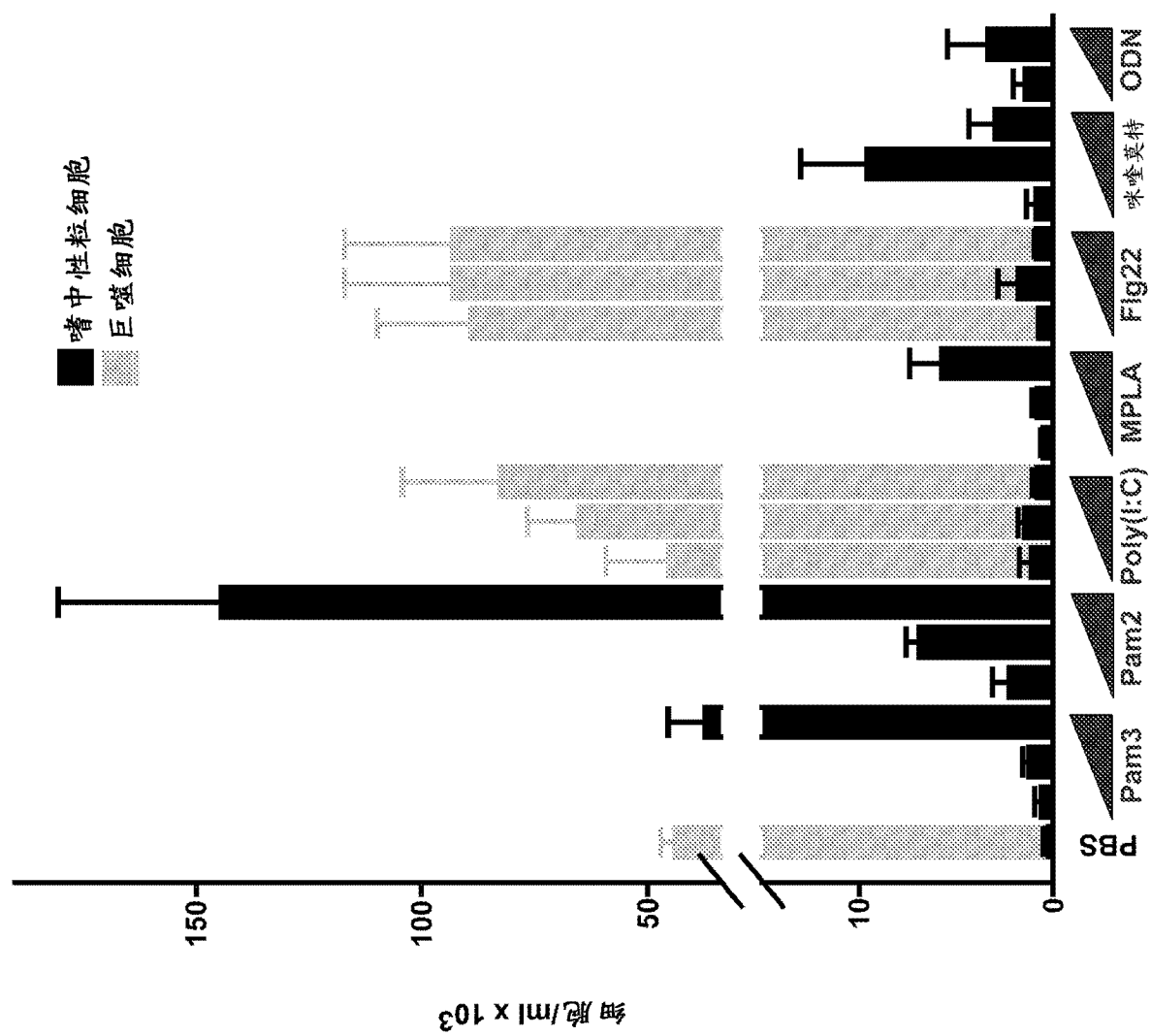


图 14

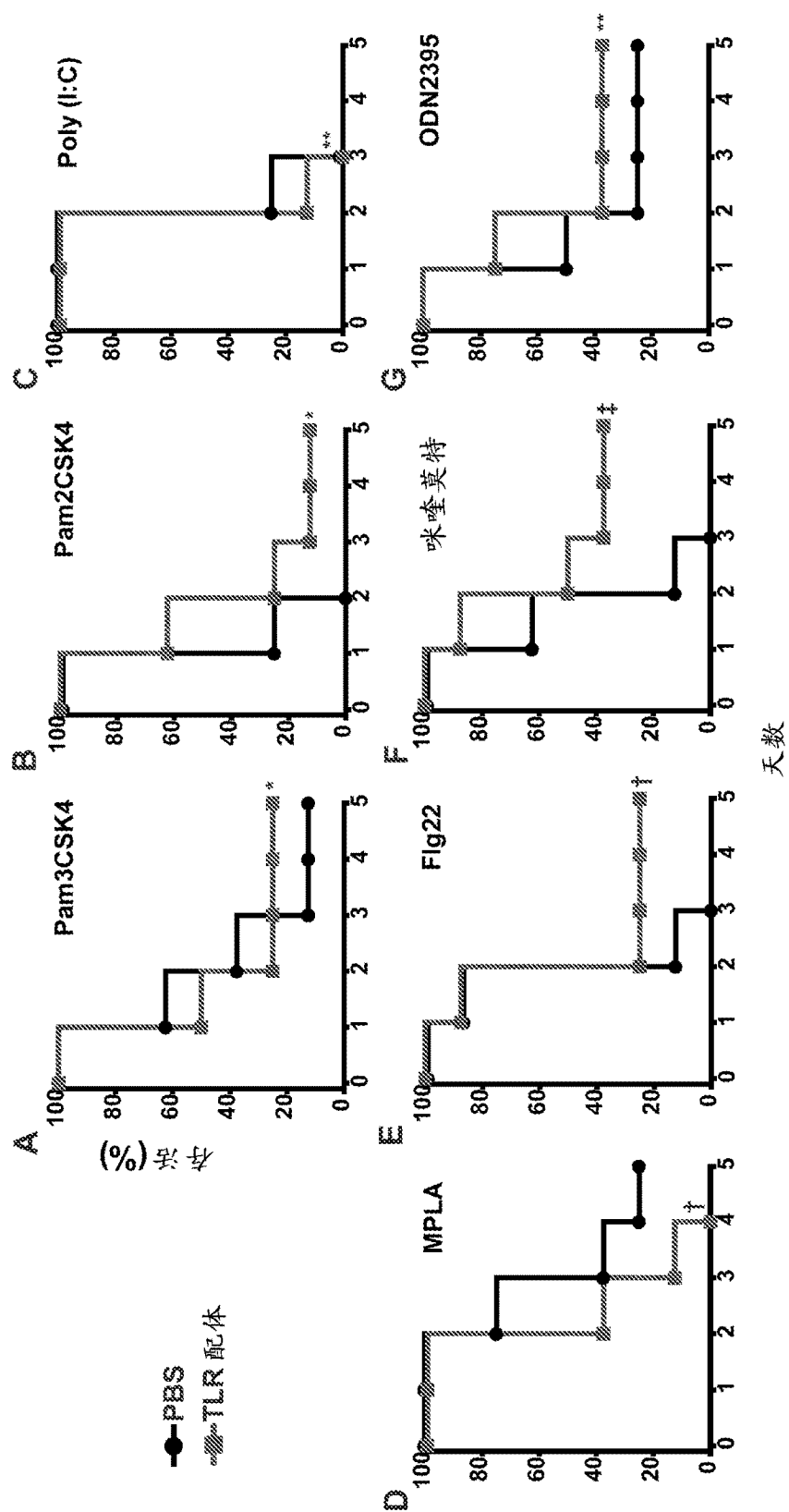


图 15

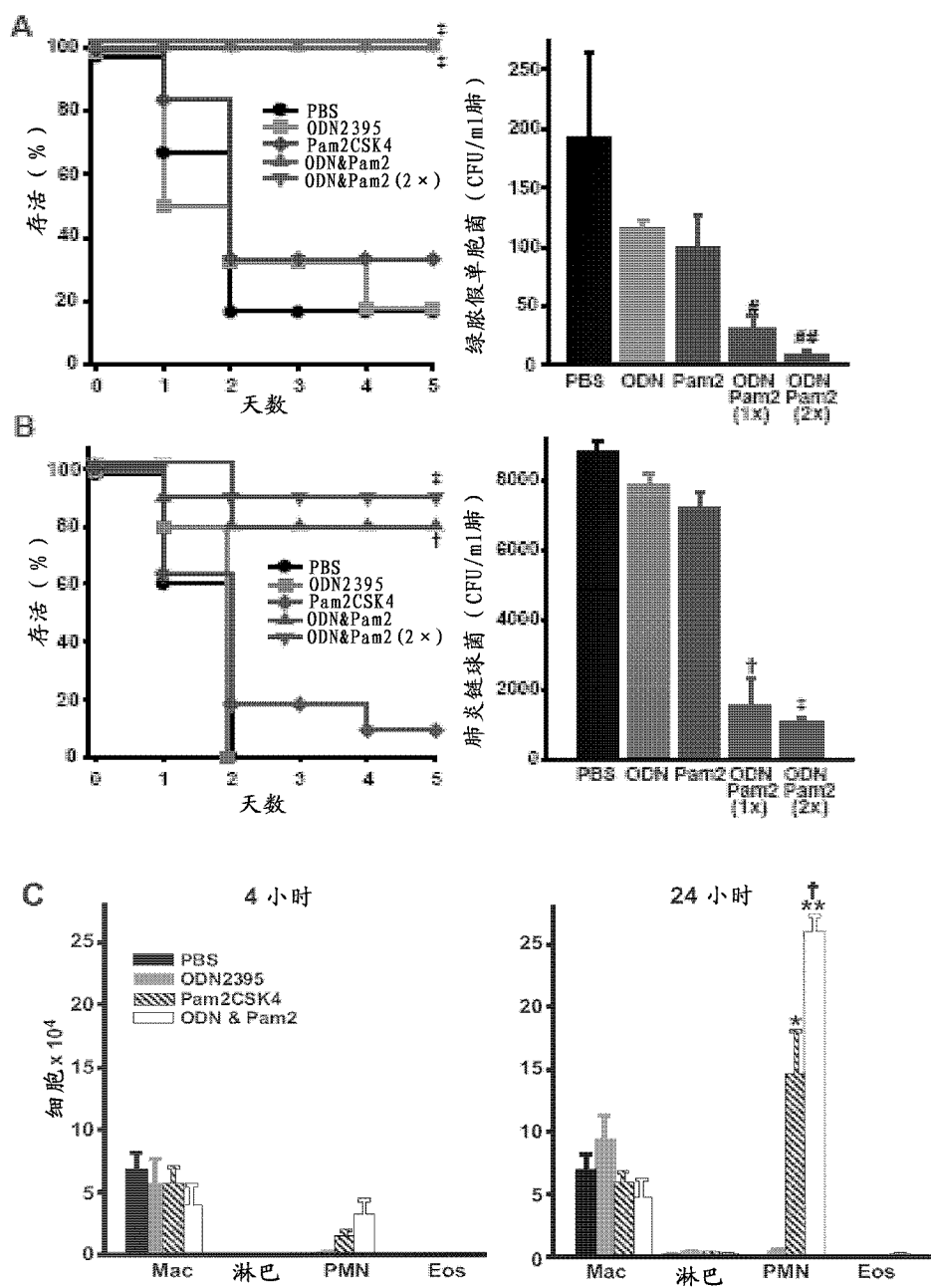


图 16A-C

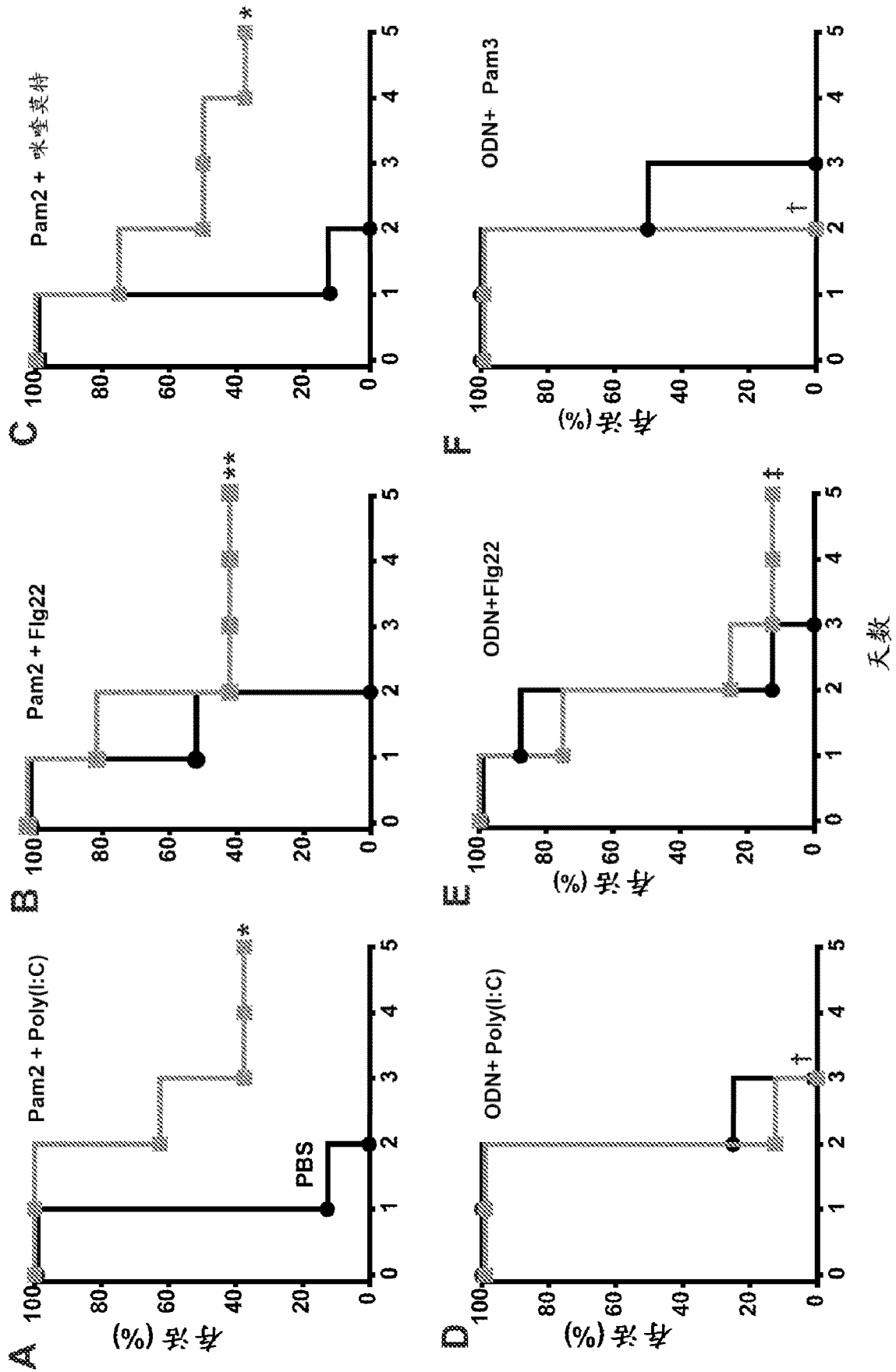


图 17A-F

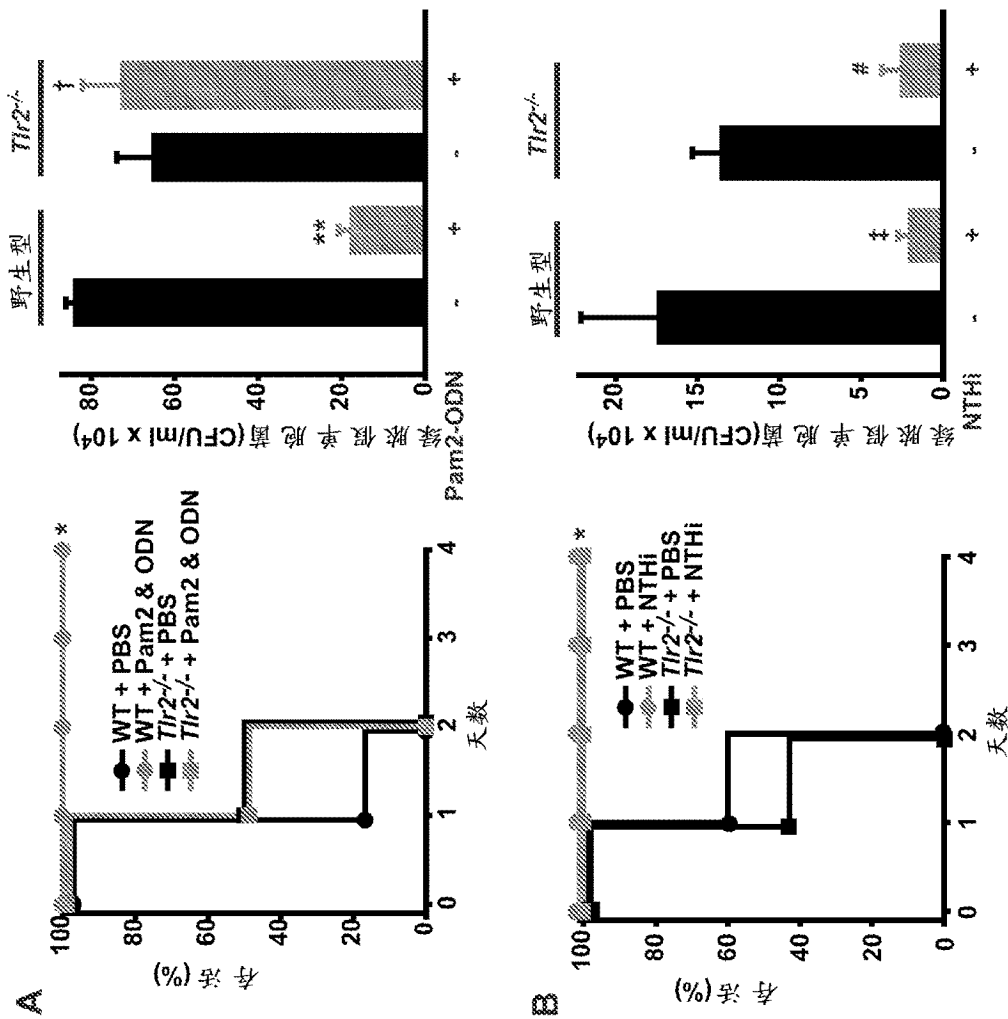


图 18A-B

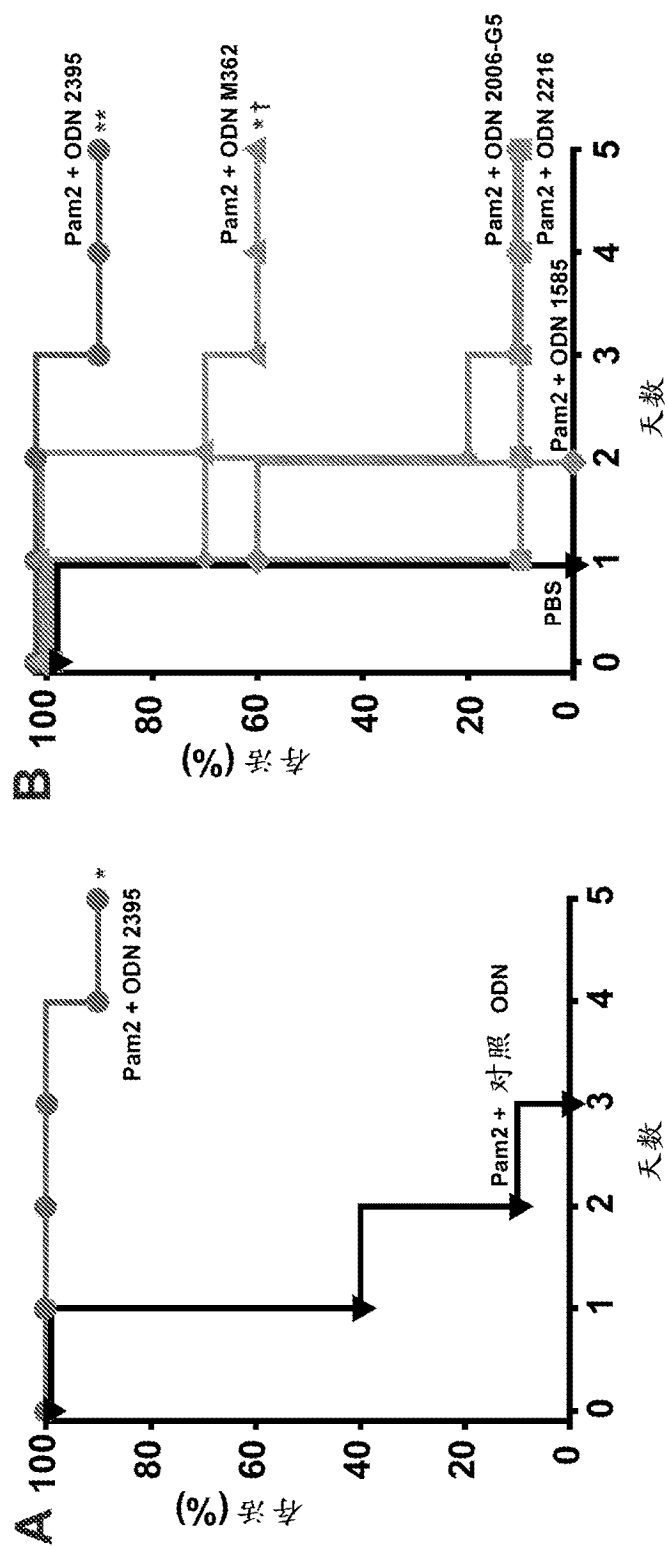


图 19A-B

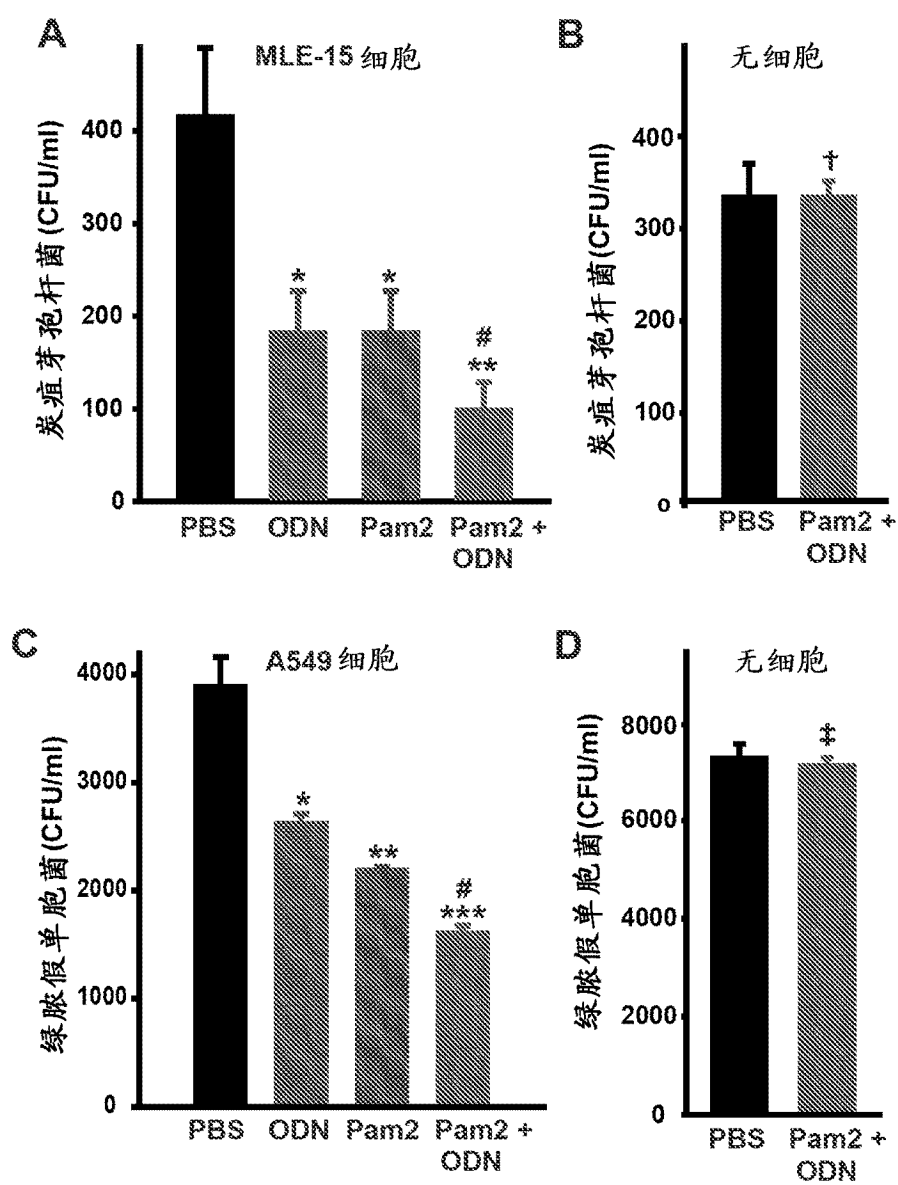


图 20A-D

用多种合成的TLR激动剂免疫并用5倍LD50炭疽杆菌Ames芽孢 (MD-10-013)

鼻内攻击的Swiss-Webster小鼠的存活

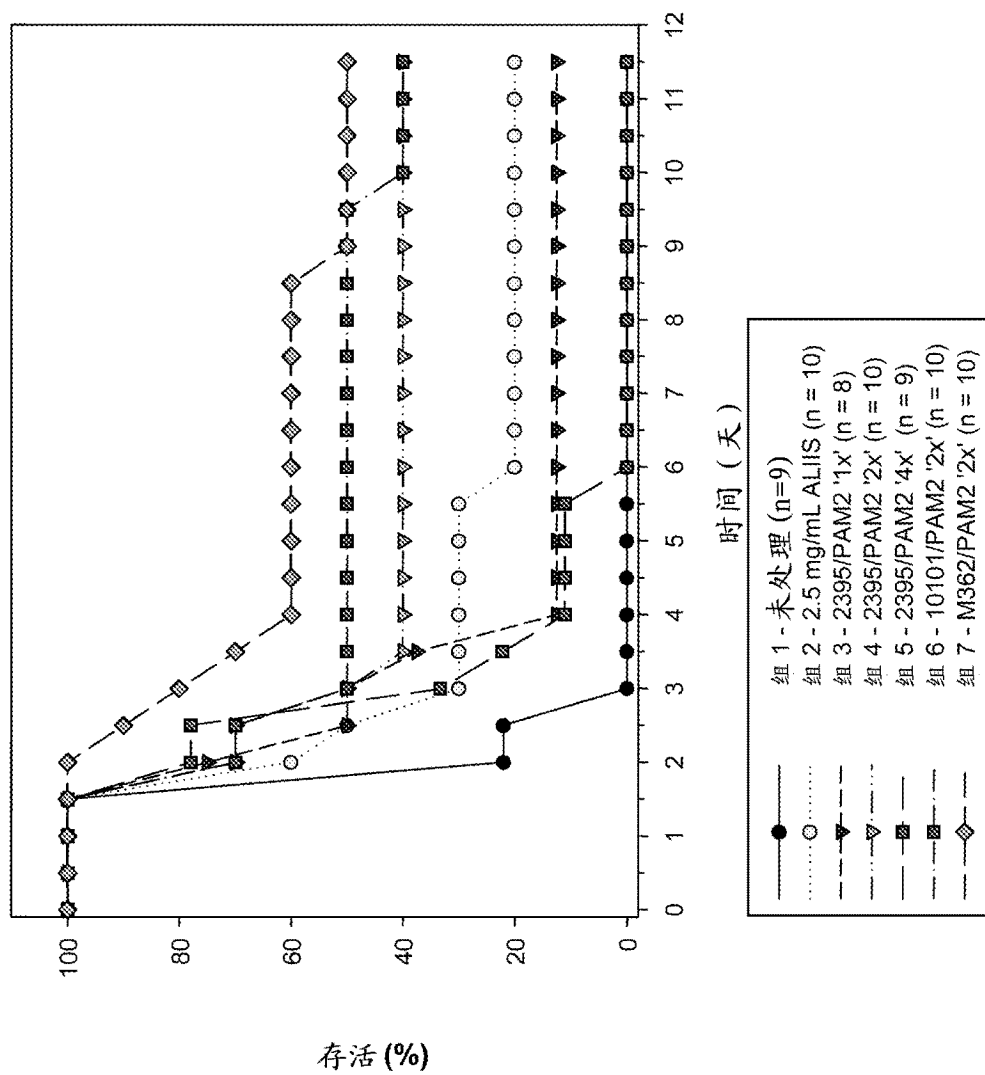


图 21

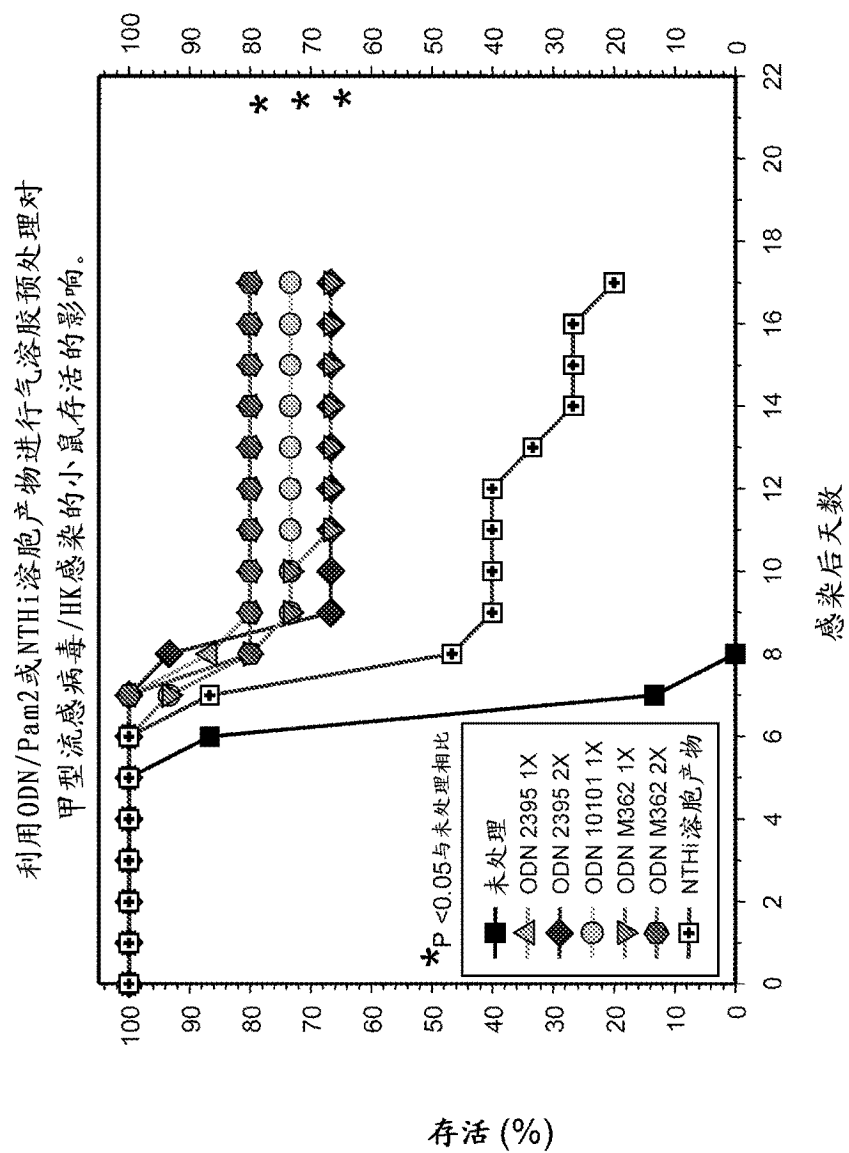


图 22