



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101287742 B

(45) 授权公告日 2016. 01. 06

(21) 申请号 200680038283. 2

(22) 申请日 2006. 10. 12

(30) 优先权数据

60/726, 034 2005. 10. 12 US

60/784, 243 2006. 03. 21 US

60/825, 440 2006. 09. 13 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2008. 04. 14

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2006/039954 2006. 10. 12

(87) PCT国际申请的公布数据

W02007/047396 EN 2007. 04. 26

(73) 专利权人 艾德拉药物股份有限公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 埃卡姆巴·R·坎迪马拉 王大庆

李玉魁 郁东 朱富刚

巴加特·莱克施米

阿格拉瓦尔·萨德尔

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 封新琴 巫肖南

(51) Int. Cl.

C07H 21/00(2006. 01)

(56) 对比文件

US 20040097719 A1, 2004. 05. 20,

审查员 王少华

权利要求书2页 说明书30页

序列表34页 附图25页

(54) 发明名称

基于变异应答调制 Toll 样受体的免疫调节寡核苷酸 (IRO) 化合物

(57) 摘要

本发明提供新的作为 TLR 拮抗剂的免疫调节寡核苷酸 (IRO) 和它们的使用方法。这些 IRO 具有独特的序列, 所述序列抑制或阻抑响应于 TLR 配体或 TLR 激动剂的 TLR 介导的信号传导。所述方法可以用于预防和治疗癌症、自身免疫病症、气道炎症、炎性病症、传染病、皮肤病症、变态反应、哮喘或由病原体引发的疾病。

1. 一种免疫调节性寡核苷酸 (IRO) 化合物, 所述 IRO 选自 5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'、5'-CTATCTGACGUUCTCTGT-3'、5'-CTATCTGUCGTTCTCTGT-3'、5'-CTATCTGACG₁TTCTCTGT-3'、3'-TCTTGCAGTCT-X₂-TCTGACGTTCT-3'、5'-CTATCTGAC₂GTTCTCTGT-3'、5'-CTATCTGACG₂TTCTCTGT-3'、5'-CTATCTGAC₃GTTCTCTGT-3'、5'-CTATCTGACG₃TTCTCTGT-3'、5'-CTATCTGACG₄TTCTCTGT-3'、5'-CTATCTGAC₄GTTCTCTGT-3'、5'-CTATCTGAC₅GTTCTCTGT-3'、5'-CTATCTGAC₆GTTCTCTGT-3'、5'-CTATCTAGCGTTCTCTGT-3'、5'-CTATCTGACG₁TTCTCUGU-3'、5'-CTATCTGUCG₁TTCTCUGU-3'、(5'-UGUCG₁TTCT)₂X₂、(5'-UGACG₁TTCT)₂X₂,

其中粗体的 G、A 或 U = 2'-OMe; 粗体的 T = 3'-OMe; G₁ = 7-脱氮 -dG; A₂、T₂、C₂和 G₂ = B-L-脱氧核苷; X₂ = 甘油接头; C₃和 G₃ = 3'-脱氧 -核苷; G₄ = 阿糖鸟苷 (araG); C₄ = 阿糖胞苷; C₅ = 5-OH-dC; C₆ = 1-(2'-脱氧 -β-D-呋喃核糖基)-2-氧代 -7-脱氮 -8-甲基 -嘌呤;

其中所述 IRO 如果没有抑制其活性的核苷酸衍生物则原本具有免疫刺激性;

其中所述 IRO 化合物是 TLR7、TLR8 和 / 或 TLR9 的拮抗剂。

2. 权利要求 1 所述的 IRO 化合物, 其中所述 IRO 化合物是 5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'。

3. 权利要求 1 所述的 IRO 化合物, 其中所述 IRO 化合物是 5'-CTATCTGACGUUCTCTGT-3'。

4. 权利要求 1 所述的 IRO 化合物, 其中所述 IRO 化合物是 5'-CTATCTGUCGTTCTCTGT-3'。

5. 权利要求 1 所述的 IRO 化合物, 其中所述 IRO 化合物是 5'-CTATCTGACG₁TTCTCTGT-3'。

6. 权利要求 1 所述的 IRO 化合物, 其中所述 IRO 化合物是 3'-TCTTGCAGTCT-X₂-TCTGACGTTCT-3'。

7. 权利要求 1 所述的 IRO 化合物, 其中所述 IRO 化合物是 5'-CTAICTGAC₂GTTCTCTGT-3'。

8. 权利要求 1 所述的 IRO 化合物, 其中所述 IRO 化合物是 5'-CTATCTGACG₂TTCTCTGT-3'。

9. 权利要求 1 所述的 IRO 化合物, 其中所述 IRO 化合物是 5'-CTATCTGACG₃GTTCTCTGT-3'。

10. 权利要求 1 所述的 IRO 化合物, 其中所述 IRO 化合物是 5'-CTATCTGACG₃TTCTCTGT-3'。

11. 权利要求 1 所述的 IRO 化合物, 其中所述 IRO 化合物是 5'-CTATCTGACG₄TTCTCTGT-3'。

12. 权利要求 1 所述的 IRO 化合物, 其中所述 IRO 化合物是 5'-CTATCTGAC₄GTTCTCTGT-3'。

13. 权利要求 1 所述的 IRO 化合物, 其中所述 IRO 化合物是 5'-CTATCTGAC₅GTTCTCTGT-3'。

14. 权利要求 1 所述的 IRO 化合物, 其中所述 IRO 化合物是 5'-CTATCTGAC₆GTTCTCTGT-3'。

15. 权利要求 1 所述的 IRO 化合物, 其中所述 IRO 化合物是 5'-CTATCTAGCGTTCTCTGT-3'。

16. 权利要求 1 所述的 IRO 化合物, 其中所述 IRO 化合物是

5'-CTATCTGACG₁TTCTCUGU-3'。

17. 权利要求 1 所述的 IRO 化合物, 其中所述 IRO 化合物是 5'-CTATCTGUCG₁TTCTCUGU-3'。

18. 权利要求 1 所述的 IRO 化合物, 其中所述 IRO 化合物是 (5'-UGUCG₁TTCT)₂X₂。

19. 权利要求 1 所述的 IRO 化合物, 其中所述 IRO 化合物是 (5'-UGACG₁TTCT)₂X₂。

20. 药物组合物, 其包含根据权利要求 1-19 所述的 IRO 化合物和药用载体。

基于变异应答调制 Toll 样受体的免疫调节寡核苷酸 (IRO) 化合物

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求 2005 年 10 月 12 日提交的美国临时申请流水号 60/726,034 ;2006 年 3 月 21 日提交的美国临时申请流水号 60/784,243 ;和 2006 年 9 月 13 日提交的美国临时申请流水号 60/825,440 的权益,并将它们的全部内容并入本文作为参考。

[0003] 发明背景

发明领域

[0004] 本发明概括地涉及免疫和免疫治疗领域,更具体地涉及免疫调节寡核苷酸 (IRO) 组合物和它们用于抑制和 / 或阻抑 Toll 样受体介导的免疫应答的用途。

[0005] 相关领域概述

[0006] Toll 样受体 (TLR) 存在于免疫系统的许多细胞中,并且已经被证明涉及先天性免疫应答 (Hornung, V. et al., (2002) J. Immunol. 168 :4531-4537)。在脊椎动物中,此家族由称为 TLR1 至 TLR10 的十种蛋白质组成,已知它们识别来自细菌、真菌、寄生物和病毒的病原体相关性分子图式 (Poltorak, a. et al. (1998) Science 282 :2085-2088 ; Underhill, D. M., et al. (1999) Nature 401 :811-815 ; Hayashi, F. et al. (2001) Nature 410 :1099-1103 ; Zhang, D. et al. (2004) Science 303 :1522-1526 ; Meier, A. et al. (2003) Cell. Microbiol. 5 :561-570 ; Campos, M. A. et al. (2001) J. Immunol. 167 :416-423 ; Hoebe, K. et al. (2003) Nature 424 :743-748 ; Lund, J. (2003) J. Exp. Med. 198 :513-520 ; Heil, F. et al. (2004) Science 303 :1526-1529 ; Diebold, S. S., et al. (2004) Science 303 :1529-1531 ; Hornung, V. et al. (2004) J. Immunol. 173 :5935-5943)。TLR 是哺乳动物识别和起始 (mount) 对于外源分子的免疫应答的关键手段,并且还提供将先天性和适应性免疫应答相关联的手段 (Akira, S. et al. (2001) Nature Immunol. 2 :675-680 ; Medzhitov, R. (2001) Nature Rev. Immunol. 1 :135-145)。还已经显示 TLR 在许多疾病 (包括 自身免疫病、传染病和炎症) 的发病机理中发挥作用 (Cook, D. N. et al. (2004) Nature Immunol. 5 :975-979), 并且使用适当的药物调节 TLR 介导的活化可提供用于疾病干涉 (disease intervention) 的方法。

[0007] 某些 TLR 位于细胞表面,探测胞外病原体并引发针对它们的应答 ;而其它 TLR 定位于细胞内部,探测胞内病原体并引发针对它们的应答。表 1 提供对 TLR 及其已知的激动剂的描述 (Diebold, S. S. et al. (2004) Science 303 :1529-1531 ; Liew, F. et al. (2005) Nature 5 :446-458 ; Hemmi H et al. (2002) Nat Immunol 3 :196-200 ; Jurk M et al., (2002) Nat Immunol 3 :499 ; Lee J et al. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100 :6646-6651) ; (Alexopoulou, L. (2001) Nature 413 :732-738)。

[0008] 表 1 :

[0009]

TLR 分子	激动剂
--------	-----

细胞表面 TLR :	
TLR2	细菌脂肽
TLR4	革兰氏阴性细菌
TLR5	能运动的细菌
TLR6	革兰氏阳性细菌
胞内体 (endosomal) TLR :	
TLR3	双链 RNA 病毒
TLR7	单链 RNA 病毒
TLR8	单链 RNA 病毒
TLR9	未甲基化的 DNA

[0010] 已经显示在细菌 DNA 和合成 DNA 中存在特定的非甲基化 CpG 基序,其活化免疫系统并且诱导抗肿瘤活性 (Tokunaga T et al., J. Natl. Cancer Inst. (1984) 72 :955-962 ; Shimada S, et al., Jpn. H cancer Res, 1986, 77, 808-816 ; Yamamoto S, et al., Jpn. J. Cancer Res., 1986, 79, 866-73)。其它研究中显示使用含有 CpG 二核苷酸的反义寡核苷酸激活免疫应答 (Zhao Q, et al. (1996) Biochem. Pharmacol. 26 :173-182)。接下来的研究说明 TLR9 识别存在于细菌 DNA 和合成 DNA 中的非甲基化 CpG 基序 (Hemmi, H. et al. (2000) Nature 408 :740-745)。对含有 CpG 的硫代磷酸酯寡核苷酸的其它修饰也能够影响它们通过 TLR9 调制免疫应答的能力 (参见,例如, Zhao et al., Biochem. Pharmacol. (1996) 51 : 173-182 ; Zhao et al. (1996) Biochem Pharmacol. 52 :1537-1544 ; Zhao et al. (1997) Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 7 :495-502 ; Zhao et al. (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9 :3453-3458 ; Zhao et al. (2000) Bioorg. Med. Chem. Lett. 10 :1051-1054 ; Yu, D. et al. (2000) Bioorg. Med. Chem. Lett. 10 :2585-2588 ; Yu, D. et al. (2001) Bioorg. Med. Chem. Lett. 11 :2263-2267 ; 和 Kandimalla, E. et al. (2001) Bioorg. Med. Chem. 9 :807-813)。另外,人们通过结构活性关系研究已经鉴定了多种合成基序和新的基于 DNA 的化合物,它们诱导的特异性免疫应答模式 (profile) 与非甲基化 CpG 二核苷酸产生的应答模式截然不同 (Kandimalla, E. et al. (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 102 :6925-6930. Kandimalla, E. et al. (2003) Proc. Nat. Acad. Sci. U S A 100 :14303-14308 ; Cong, Y. et al. (2003) Biochem Biophys Res. Commun. 310 :1133-1139 ; Kandimalla, E. et al. (2003) Biochem. Biophys. Res. Commun. 306 :948-953 ; Kandimalla, E. et al. (2003) Nucleic Acids Res. 31 :2393-2400 ; Yu, D. et al. (2003) Bioorg. Med. Chem. 11 :459-464 ; Bhagat, L. et al. (2003) Biochem. Biophys. Res. Commun. 300 :853-861 ; Yu, D. et al. (2002) Nucleic Acids Res. 30 :4460-4469 ; Yu, D. et al. (2002) J. Med. Chem. 45 :4540-4548. Yu, D. et al. (2002) Biochem. Biophys. Res. Commun. 297 :83-90 ; Kandimalla, E. et al. (2002) Bioconjug. Chem. 13 :966-974 ; Yu, D. et al. (2002) Nucleic Acids Res. 30 :1613-1619 ; Yu, D. et al. (2001) Bioorg. Med. Chem. 9 :2803-2808 ; Yu, D. et al. (2001) Bioorg. Med. Chem. Lett. 11 :2263-2267 ; Kandimalla, E. et al. (2001) Bioorg. Med. Chem. 9 :807-813 ; Yu, D. et al. (2000) Bioorg. Med. Chem. Lett. 10 :2585-2588 ; Putta, M. et al. (2006) Nucleic Acids Res. 34 :3231-3238)。

[0011] TLR 的选择性定位和由此产生的信号传导为它们在免疫应答中的功能提供了某些启示。根据应答中涉及的细胞的亚群不同,免疫应答包括先天性和适应性应答。例如,经典的细胞介导的功能,例如迟发型超敏反应和细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 活化中涉及的 T 辅

助(Th)细胞是Th1细胞。这种应答是身体对抗原(例如病毒感染、胞内病原体和肿瘤细胞)的先天性应答,并且导致IFN- γ 的分泌和伴随的CTL的活化。或者,参与充当B细胞活化辅助细胞的Th细胞是Th2细胞。已经显示Th2细胞响应于细菌和寄生虫而被活化,并且可通过IL-4和IL-5的分泌来介导身体的适应性免疫应答(例如IgE产生和嗜酸性粒细胞活化)。免疫应答的类型受到响应于抗原暴露而产生的细胞因子的影响,并且由Th1和Th2细胞分泌的细胞因子的差异可能是这两种亚群不同的生物功能导致的结果。

[0012] 免疫应答的起始涉及TLR的活化,但是在免疫妥协(immune compromised)的受试者中,不受控制地通过TLR刺激免疫系统可加重特定的疾病。在近几年中,几个小组显示了合成性寡脱氧寡核苷酸(ODN)作为炎症细胞因子抑制剂的用途(Lenert, P. et al. (2003) DNA Cell Biol. 22(10):621-631)。

[0013] Lenert等人报道了使用特定的合成ODN产生抑制性ODN的能力(Lenert, P. et al. (2003) DNA Cell Biol. 22(10):621-631)。这些抑制性ODN需要两个三联体序列,近端的“CCT”三联体和远端的“GGG”三联体。除这些含有三联体的抑制性ODN之外,几个小组报道了其它特异性DNA序列,它们能够抑制含CpG的ODN导致的TLR-9介导的活化。这些“抑制性”或“阻抑性”的基序富含多聚“G”(例如“GGGG”)或“GC”序列多被甲基化,存在于哺乳动物和特定病毒的DNA中(参见例如;Chen, Y., et al., Gene Ther. 8:1024-1032(2001); Stunz, L. L., Eur. J. Immunol. 32:1212-1222(2002)。Duramad, O., et al., J. Immunol., 174:5193-5200(2005)和Jurk等人(US 2005/0239733)描述了在序列内含有GGGG基序的抑制性DNA寡核苷酸结构。Patole等人证明含有GGGG的ODN将抑制全身性狼疮(systemic lupus)(Patole, P. et al. (2005) J. Am. Soc. Nephrol. 16:3273-3280)。另外, Gursel, I., et al., J. Immunol., 171:1393-1400(2003)记载,高频出现于哺乳动物端粒中的重复TTAGGG元件可下调CpG诱导的免疫活化。Shirota, H., et al., J. Immunol., 173:5002-5007(2004)证明,含有TTAGGG元件的合成寡核苷酸模仿这种活性,并且可能能够有效预防/治疗特定的Th1依赖性自身免疫疾病。

[0014] 与此相反,近来的研究使人们对含有多聚G的ODN起TLR拮抗剂作用的观点产生了怀疑。例如,US 6,426,334, Agrawal等人证明,施用含有GGGG串(string)的CpG寡核苷酸具有强力的抗病毒和抗癌活性,并且这些化合物的施用将引起血清IL-12浓度的增加。另外,已知含有多聚G序列的CpG寡聚体(oligo)通过TLR9活化诱导免疫应答(Verthelyi D et al, J Immunol. 166, 2372, 2001; Gursel M et al, J Leukoc Biol, 71, 813, 2001, Krug A et al, Eur J Immunol, 31, 2154, 2001)并且显示抗肿瘤、抗病毒活性(Ballas GK et al, J Immunol, 167, 4878, 2001; Verthelyi D et al, J Immunol, 170, 4717, 2003)。另外,还已知多聚G寡核苷酸抑制HIV和Rel A(McShan WM, et al, J Biol Chem., 267(8):5712-21, 1992; Rando, RF et al., J Biol Chem, 270(4):1754-60, 1995; Benimetskaya L, et al., Nucleic Acids Res., 25(13):2648-56, 1997)。另外,含有免疫刺激性CpG基序和4个连续G核苷酸的ODN(A类ODN)诱导干扰素 γ 产生和免疫应答中的Th1转变(Th1 shift)。此外,在临床前病变模型(preclinical disease model)中,已经证明A类ODN诱导TLR介导的免疫应答。

[0015] 另外,已经证明含有鸟苷串的寡核苷酸形成四链结构,充当适体,且抑制凝血酶活性(Bock LC et al., Nature, 355:564-6, 1992; Padmanabhan, K et al., J Biol Chem.,

268(24):17651-4,1993)。从而,人们不清楚是单链结构还是多链结构可有效抑制 TLR9 活化。

[0016] 因此,无需考虑其形成二级结构的有效 TLR 拮抗剂是人们所需要的。

[0017] 发明简述

[0018] 本发明提供作为 TLR 拮抗剂的新免疫调节性寡核苷酸 (IRO) 化合物及它们的使用方法。这些 IRO 在免疫调节性基序的旁侧序列中和 / 或在如果没有所述修饰则原本具有免疫刺激性的寡核苷酸基序中具有一种或多种化学修饰。

[0019] 本发明进一步提供新的 IRO 组合物,所述组合物具有结构 $5-N_m-N_3N_2N_1CGN^1N^2N^3-N^m-3'$,其中 CG 是寡核苷酸基序,并且 C 是胞嘧啶或嘧啶核苷酸衍生物或非核苷酸连接,而 G 是鸟苷或嘌呤核苷酸衍生物或非核苷酸连接;N1-N3 每次出现时独立地是核苷酸、核苷酸衍生物或非核苷酸连接;Nm 每次出现时独立地是核苷酸、核苷酸衍生物或非核苷酸连接;条件是 G 和 / 或 C 和 / 或 N1 至 N3 中至少一个是核苷酸衍生物或非核苷酸连接;进一步的条件是化合物含有少于 4 个连续的鸟苷核苷酸,其中若没有所述核苷酸衍生物或非核苷酸连接,该寡核苷酸基序本具有免疫刺激性;并且其中 m 是 0 至大约 30 的数字。

[0020] 本发明进一步提供药物组合物,其包含任何 IRO 和药用载体。

[0021] 本发明提供用于修饰包含免疫刺激寡核苷酸基序的 TLR 刺激性寡核苷酸的方法,包括将化学修饰引入所述免疫刺激寡核苷酸基序和 / 或免疫刺激寡核苷酸基序的旁侧序列,其中所述免疫刺激寡核苷酸基序的免疫刺激活性受所述化学修饰的阻抑。

[0022] 本发明进一步提供用于在脊椎动物中抑制 TLR 介导的免疫应答的方法,所述方法包括向脊椎动物以药学有效量施用 IRO 化合物,其中所述施用的途径是非消化道、黏膜递送、口服、舌下、经皮、局部 (topical)、吸入、鼻内、气溶胶、眼内、气管内、直肠内、阴道、通过基因枪、皮肤贴片或采取滴眼剂或漱口剂的形式。在某些优选的实施方式中,抑制 TLR 刺激包括施用根据本发明的 IRO 化合物,其中所述 TLR 选自 TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR7、TLR8 和 TLR9。

[0023] 本发明进一步提供用于抑制 TLR 激动剂活性的方法,其包括施用 IRO 化合物,其中将所述 IRO 在施用 TLR 激动剂的同时、之前或之后施用。在优选的实施方式中,TLR 激动剂选自 TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR7、TLR8 和 TLR9 的激动剂。

[0024] 本发明进一步提供用于治疗性处理患有由 TLR 介导的疾病的脊椎动物的方法,所述方法包括以药学有效量向所述脊椎动物施用根据本发明的 IRO 化合物。在优选的实施方式中,所述疾病是癌症、自身免疫病症、气道炎症 (airwayinflammation)、炎性病症、传染病、皮肤病症、变态反应 (allergy)、哮喘或由病原体引发的疾病。

[0025] 在某些优选的实施方式中,将 IRO 化合物与一种或多种疫苗、抗原、抗体、细胞毒剂、变应原、抗生素、反义寡核苷酸、TLR 激动剂、TLR 拮抗剂、肽、蛋白质、基因治疗载体、DNA 疫苗、佐剂或共刺激分子组合施用。在某些优选的实施方式中,施用的途径是非消化道、黏膜递送、口服、舌下、经皮、局部、吸入、鼻内、气溶胶、眼内、气管内、直肠内、阴道、通过基因枪、皮肤贴片或采取滴眼剂或漱口剂的形式。

[0026] 本发明进一步提供用于预防癌症、自身免疫病症、气道炎症、炎性病症、传染病、皮肤病症、变态反应、哮喘或由病原体引发的疾病的方法,所述方法包括以药学有效量向脊椎

动物施用根据本发明的 IRO 化合物。在某些优选的实施方式中,将所述 IRO 化合物与一种或多种疫苗、抗原、抗体、细胞毒剂、变应原、抗生素、反义寡核苷酸、TLR 激动剂、TLR 拮抗剂、肽、蛋白质、基因治疗载体、DNA 疫苗、佐剂或共刺激分子组合施用。在某些优选的实施方式中,施用的途径是非消化道、黏膜递送、口服、舌下、经皮、局部、吸入、鼻内、气溶胶、眼内、气管内、直肠内、阴道、通过基因枪、皮肤贴片或采取滴眼剂或漱口剂的形式。

[0027] 附图简述

[0028] 图 1 表示 IRO 抑制 IMO 的 TLR9 激动剂活性。

[0029] 图 2 表示一种 IRO 化合物作为 TLR9 的拮抗剂相对于 TLR3 的特异性。

[0030] 图 3 表示 IRO 的剂量依赖性抑制。

[0031] 图 4A-4D 表示预施用和同时施用 IRO 能够抑制 TLR9 的激动剂。

[0032] 图 5A 和 5B 表示在其 5' 端连接的两个 CpG 寡核苷酸显示 TLR 抑制特性。

[0033] 图 6 表示在人细胞培养中 IRO 抑制 TLR9 激动剂活性。

[0034] 图 7 表示 IRO 对 OVA 诱导的 Th2 和 Th1 免疫应答的影响。

[0035] 图 8 表示 IRO 逆转 Th2 抑制特性并且抑制 IMO 诱导的 Th1 免疫应答。

[0036] 图 9 表示抗体对 IMO 和 IRO 的应答。

[0037] 图 10 表示选择的 IRO 对 TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR7、TLR8 和 TLR9 的体内早期抑制活性。

[0038] 图 11 表示选择的 IRO 对 TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR7、TLR8 和 TLR9 的体内早期抑制活性。

[0039] 图 12 表示选择的 IRO 对 TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR7、TLR8 和 TLR9 的体内早期抑制活性。

[0040] 图 13 表示选择的 IRO 对 TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR7、TLR8 和 TLR9 的体内长期拮抗活性。

[0041] 图 14 表示选择的 IRO 对 TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR7、TLR8 和 TLR9 的体内长期拮抗活性。

[0042] 图 15 表示选择的 IRO 对 TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR7、TLR8 和 TLR9 的体内长期拮抗活性。

[0043] 图 16 表示 IRO 体外抑制野生型 (BALB/c) 的增殖和狼疮易发性 (lupusprone) (MRL-lpr) 小鼠 B 淋巴细胞增殖。

[0044] 图 17A 至 17C 表示 IRO 体外抑制野生型 (BALB/c) 和狼疮易发性 (MRL-lpr) 小鼠 B 淋巴细胞及狼疮易发性 (NZBW) 小鼠脾细胞的 IL-6 和 IL-12 产生。

[0045] 图 18A 至 18E 表示注射 IRO 的 MRL-lpr 小鼠血清和尿中蛋白质中的抗 DNA IgG1 和 IgG2a 抗体的水平降低。

[0046] 图 19 表示在 NZBW 小鼠中 IRO 抑制血清抗 -DNA IgG2a。

[0047] 优选实施方式详述

[0048] 本发明涉及新的寡核苷酸作为免疫调制剂 (immune modulatory agents) 用于免疫治疗应用的治疗用途。具体地,本发明提供免疫调节性寡核苷酸 (Immune Regulatory Oligonucleotide (IRO)) 化合物作为 toll 样受体 (TLR) 的拮抗剂来抑制和 / 或阻抑 TLR 介导的免疫应答。这些 IRO 具有独特的序列,所述序列抑制或阻抑响应于内源和 / 或外源 TLR

配体或激动剂的 TLR 介导的信号传导。本文引用的参考文献反映了本领域的知识水平,本文引证并入它们的全部内容。在引用的参考文件的教导和本说明书之间的任何矛盾,均应以有利于本说明书的方式来解决。

[0049] 本发明提供用于阻抑 TLR 引发的免疫应答的方法,并且能够用于免疫治疗应用,例如但不限于在成年和幼年的 (pediatric) 人类和兽医应用中治疗癌症、自身免疫病症、哮喘、呼吸性变态反应、食物过敏、皮肤过敏、全身性红斑狼疮 (SLE)、关节炎、胸膜炎、慢性感染、炎性疾病、炎性肠综合征 (inflammatory bowel syndrome)、脓毒病和细菌、寄生虫和病毒感染。因此,本发明进一步提供对于免疫治疗具有最佳水平的免疫调制效果的 IRO 化合物,和制造和使用这些化合物的方法。此外,本发明的 IRO 化合物与例如 DNA 疫苗、抗原、抗体和变应原组合;和与化疗剂 (传统化疗和现代定向治疗) 和 / 或反义寡核苷酸组合用于疾病的预防和治疗是有用的。

[0050] 定义

[0051] 术语“寡核苷酸”泛指包含多个相连的核苷单位的多聚核苷。所述寡核苷酸能够从现存的核酸来源,包括基因组或 cDNA 来源获得,但是优选通过合成方法产生。在优选的实施方式中,与野生型寡核苷酸相比,每个核苷单位可包含多种化学修饰和取代,包括但不限于修饰的核苷碱基和 / 或修饰的糖单位。化学修饰的实例是本领域技术人员已知的,并且在例如 Uhlmann E et al. (1990) Chem. Rev. 90 :543 ; " Protocols for Oligonucleotides and Analogs " Synthesis and Properties & Synthesis and Analytical Techniques, S. Agrawal, Ed, Humana Press, Totowa, USA 1993 ; 和 Hunziker, J. et al. (1995) Mod. Syn. Methods 7 :331-417 ; 和 Crooke, S. et al. (1996) Ann. Rev. Pharm. Tox. 36 :107-129 中有记载。核苷残基能够通过许多已知的核苷间连接 (internucleoside linkage) 中的任一种而相互偶联。这些核苷间连接包括但不限于磷酸二酯、硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、烷基膦酸酯、烷基硫代膦酸酯、磷酸三酯、氨基磷酸酯 (phosphoramidate)、硅氧烷、碳酸酯、烷氧羰基、乙酰胺化物 (acetamidate)、氨基甲酸酯、吗啉代、borano、硫醚、桥连 (bridged) 氨基磷酸酯、桥连亚甲基膦酸酯、桥连硫代磷酸酯和砷核苷间连接。术语“寡核苷酸”还包含具有一个或多个立体特异性核苷间连接 (例如, (R_p)- 或 (S_p)- 硫代磷酸酯、烷基膦酸酯或磷酸三酯连接) 的多聚核苷。如用于本文,术语“寡核苷酸”和“二核苷酸”明确地意图包括具有任何此类核苷间连接的多聚核苷和二核苷,无论该连接是否包含磷酸基团。在特定的优选实施方式中,这些核苷间连接可以是磷酸二酯、硫代磷酸酯或二硫代磷酸酯连接,或它们的组合。

[0052] 术语“2' - 取代的核糖核苷”或“2' - 取代的阿拉伯糖核苷”一般性地包括如下所述的核糖核苷或阿糖核苷 (arabinonucleoside) : 其中戊糖部分 2' 位置上的羟基被取代而产生 2' - 取代的或 2' -O- 取代的核糖核苷。在特定实施方式中,这种取代是用含有 1-6 个饱和或不饱和碳原子的低级烷基的取代,用卤素原子的取代,或用具有 6-10 个碳原子的芳基的取代; 其中这种烷基或芳基可以是非取代的或可以是取代的,例如用卤素、羟基、三氟甲基、氰基、硝基、酰基、酰氧基、烷氧基、羧基、烷氧羰基或氨基取代。2' -O- 取代的核糖核苷或 2' -O- 取代的阿拉伯糖核苷的实例包括但不限于 2' - 氨基、2' - 氟、2' - 烯丙基、2' -O- 烷基和 2' - 炔丙基核糖核苷或阿拉伯糖核苷, 2' -O- 甲基核糖核苷或 2' -O- 甲基阿拉伯糖核苷和 2' -O- 甲氧基乙氧基核糖核苷或 2' -O- 甲氧基乙氧基阿拉伯糖核苷。

[0053] 术语“3' ”在用来指方向时,通常指在相同的多核苷酸或寡核苷酸中位于某一区域或位置的 3' (下游) 的区域或位置。

[0054] 术语“5' ”在用来指方向时,通常指在相同的多核苷酸或寡核苷酸中位于某一区域或位置的 5' (上游) 的区域或位置。

[0055] 术语“大约”通常的意思是精确的数目不是关键的。因此,寡核苷酸中核苷残基的数目不是关键的,少一个或两个核苷残基或具有一个至几个额外的核苷残基的寡核苷酸看作是上述各种实施方式的等同物。

[0056] 术语“激动剂”通常指结合至细胞的受体并且诱导应答的物质。激动剂通常模仿天然存在的物质例如配体的作用。

[0057] 术语“拮抗剂”通常指减弱激动剂的效应的物质。

[0058] 术语“佐剂”通常指下述物质:当将该物质添加至免疫原性作用物例如疫苗或抗原时,该物质使暴露于该混合物的受体宿主体内对所述作用物的免疫应答提高或增强。

[0059] 术语“气道炎症”通常包括但不限于哮喘。

[0060] 术语“变应原”通常指如下所述的抗原或分子(通常是蛋白质)的抗原性部分:其在暴露于受试者时引起变应性应答。典型地,通过例如风团和潮红测试(wheal and flare test) 或任何本领域已知的方法,来指示所述受试者对变应原是变应性的。即使只有一小部分受试者在暴露于所述分子时呈现变应性免疫应答,也将该分子称为变应原。

[0061] 术语“变态反应”通常指以炎症为特征的不适当免疫应答,包括但不限于食物过敏和呼吸性变态反应。

[0062] 术语“抗体”通常指被抗体或 T 细胞抗原受体识别并且选择性结合,导致免疫应答的诱导的物质。抗原可以包括但不限于肽、蛋白质、核苷、核苷酸和它们的组合。抗原可以是天然的或合成的,并且通常诱导对该抗原具有特异性的免疫应答。

[0063] 术语“自身免疫病症”通常指“自身”组分遭受免疫系统攻击的病症。

[0064] 术语“TLR 介导的疾病”或“TLR 介导的病症”通常的意思是其中一种或多种 TLR 的活化是促成性因素的任何病理状况。这些状况包括但不限于癌症、自身免疫病症、气道炎症、炎性病症、传染病、皮肤病症、变态反应、哮喘或由病原体引起的疾病。

[0065] 术语“生理上可接受的”通常指不干扰 IRO 化合物的效力,并且与生物系统例如细胞、细胞培养物、组织或生物体相容的材料。优选地,所述生物系统是活体,例如脊椎动物。

[0066] 术语“载体”通常包含任何赋形剂、稀释剂、填充剂(filler)、盐、缓冲剂、稳定剂、增溶剂、油、脂质、含有脂质的小泡、微球、脂质体包囊(liposomal encapsulation) 或本领域公知用于药物制剂的其它材料。应理解所述载体、赋形剂、稀释剂的特性将取决于具体应用的施用途径。含有这些材料的可药物制剂的制备在例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, ed. A. Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990 中描述。

[0067] 术语“共同施用(co-administration)”通常指在充分接近的时间内施用至少两种不同的物质来调制免疫应答。共同施用指以任何顺序,在单一剂量或分开的剂量中,同时施用以及以相距多至几天的时间间隔顺序施用至少两种不同的物质。

[0068] 术语“互补的”通常的意思是具有与核酸杂交的能力。这种杂交通常是互补链之间氢键结合的结果,优选形成 Watson-Crick 或 Hoogsteen 碱基对,尽管其它形式的氢键结合以及碱基堆积也可导致杂交。

[0069] 术语“有效量”或“充分量”通常指足以影响期望的生物学效应如有益结果的量。因此，“有效量”或“充分量”将依赖于其施用的背景。就施用调制针对与其共同施用之抗原的免疫应答的组合物而言，IRO 化合物和抗原的有效量是足以达到与单独施用所述抗原所获得的免疫应答相比的期望调制的量。有效量可以在一次或多次施用中施用。

[0070] 术语“与……组合”通常的意思是在治疗患者的疾病或病症的过程中，施用 IRO 化合物和对于治疗所述疾病或病症有用的、不减少该 IRO 化合物免疫调节效应的作用物。这种组合治疗还可以包括施用 IRO 化合物和 / 或独立地施用作用物多于一次。IRO 化合物和 / 或作用物的施用可以通过相同或不同的途径。

[0071] 术语“个体”或“受试者”或“脊椎动物”通常指哺乳动物，例如人。哺乳动物通常包括但不限于人、非人的灵长类动物、大鼠、小鼠、猫、犬、马、牛 (cattle)、牛 (cows)、猪、绵羊和兔。

[0072] 术语“核苷”通常指由糖（通常是核糖或脱氧核糖）和嘌呤或嘧啶碱基组成的化合物。

[0073] 术语“核苷酸”通常指包含附接于糖的磷酸基的核苷。

[0074] 如用于本文，术语“嘧啶核苷”指所述核苷的碱基组分是嘧啶碱基（例如胞嘧啶 (C) 或胸腺嘧啶 (T) 或尿嘧啶 (U)）的核苷。类似地，术语“嘌呤核苷”指所述核苷的碱基组分是嘌呤碱基（例如腺嘌呤 (A) 或鸟嘌呤 (G)）的核苷。

[0075] 术语“类似物”或“衍生物”可以互换使用，通常指具有修饰的碱基和 / 或糖的任何嘌呤和 / 或嘧啶核苷酸或核苷。修饰的碱基是指不是鸟嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤、胸腺嘧啶或尿嘧啶的碱基。修饰的糖是指任何不是核糖或 2' 脱氧核糖并且其能够用在寡核苷酸主链中的糖。

[0076] 术语“抑制”或“阻抑”通常指应答的减少或应答的定性差异，所述应答原本可通过引发和 / 或刺激应答而发生。

[0077] 术语“非核苷酸接头”通常指能够通过不同于含磷连接的方式连接或被连接至寡核苷酸的任何连接或部分。优选这种接头的长度是大约 2 埃至大约 200 埃。

[0078] 术语“核苷酸连接”通常指通过含磷连接直接将两个核苷的 3' 和 5' 羟基相连的直接 3' -5' 连接。

[0079] 术语“寡核苷酸基序”的意思是寡核苷酸序列，包括二核苷酸。“寡核苷酸基序如果没有一种或多种修饰则原本具有免疫刺激性”意思是寡核苷酸基序在亲本寡核苷酸中具有免疫刺激性，但在衍生寡核苷酸中不具有免疫刺激性，其中所述衍生寡核苷酸基于亲本寡核苷酸，但具有一种或多种修饰。

[0080] 术语 CpG、C^{*}pG、C^{*}pG^{*}和 CpG^{*}指具有免疫刺激性的寡核苷酸基序，其包含胞嘧啶或胞嘧啶类似物，并且包含鸟嘌呤或鸟嘌呤类似物。

[0081] 术语“处理 / 治疗 (treatment)”通常指意在获得有益的或期望的结果的手段，所述结果可包括症状的减轻或疾病进展的延迟或改善。

[0082] 在第一方面，本发明提供免疫调节性寡核苷酸 (IRO) 化合物。术语“IRO”指免疫调节性寡核苷酸化合物，其是一种或多种 TLR 的拮抗剂，其中所述化合物包含寡核苷酸基序和至少一种修饰，其中所述寡核苷酸基序如果没有阻抑寡核苷酸基序活性的所述一种或多种修饰则原本具有免疫刺激性（例如，非甲基化的 CpG），条件是所述化合物含有少于 4 个

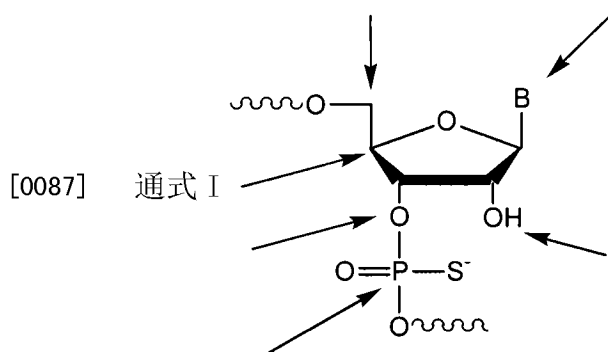
连续的鸟苷核苷酸,优选少于3个连续的鸟苷核苷酸。这些修饰可发生在寡核苷酸5'末端中,在寡核苷酸基序的旁侧序列中,和/或在寡核苷酸基序内。这些修饰导致IRO化合物阻抑TLR调制的免疫刺激。这些修饰可以是对寡核苷酸基序旁侧的或内部的核苷酸/核苷的碱基、糖残基和/或磷酸骨架的修饰。

[0083] 在优选的实施方式中,当修饰是2'烷基化或烷氧基化时,则所述修饰不发生在寡核苷酸基序的5'邻近;当修饰是不带电荷的核苷间连接时,则所述修饰不发生在寡核苷酸基序的5'邻近;并且当修饰是3'烷基化或烷氧基化时,则所述修饰不发生在寡核苷酸基序的5'或3'邻近。

[0084] 在优选的实施方式中,IRO化合物不是反义寡核苷酸。

[0085] IRO化合物的一般结构可表示为 $5'-N_m-N_3N_2N_1CGN^1N^2N^3-N^m-3'$,其中CG是免疫刺激性基序,C是胞嘧啶或嘧啶核苷酸衍生物或非核苷酸接头,G是鸟苷、嘌呤核苷酸衍生物或非核苷酸接头; N_1-N_3 每次出现时独立地是核苷酸、核苷酸衍生物或非核苷酸接头; N_m 每次出现时独立地是核苷酸、核苷酸衍生物或非核苷酸接头;条件是G和/或C和/或 N_1 至 N_3 中至少一个是核苷酸衍生物或非核苷酸接头;进一步的条件是化合物含有少于4个连续的鸟苷核苷酸,优选少于3个连续的鸟苷,其中CG的免疫刺激活性被所述核苷酸衍生物或非核苷酸接头所阻抑;并且其中m是0至大约30的数字。

[0086] 在本发明特定的实施方式中,IRO化合物可包含至少两个寡核苷酸,它们通过核苷酸连接或非核苷酸接头在它们的5'-、3'-或2'-端共价相连,或通过官能化糖或官能化核碱基经由非核苷酸接头或核苷酸连接共价相连。这样的IRO化合物可以是线性的或分支的。作为非限定性实例,接头可以附接于3'-羟基。在这样的实施方式中,接头包含官能团,所述官能团通过基于磷酸酯的连接或不基于磷酸酯的连接附接于3'-羟基,所述基于磷酸酯的连接例如磷酸二酯、硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、甲基磷酸酯。可能用于偶联核糖核苷酸的位点在以下通式I中标示,其中B代表杂环碱基,其中指向P的箭头表示对磷的任何附接物。



[0088] 在某些实施方式中,非核苷酸接头是小分子、大分子或生物分子,包括但不限于多肽、抗体、脂质、抗原、变应原和寡糖。在某些其它实施方式中,非核苷酸接头是小分子。就本发明而言,小分子是分子量少于1,000Da的有机部分。在某些实施方式中,小分子具有少于750Da的分子量。

[0089] 在某些实施方式中,小分子是脂族烃或芳族烃,它们均可任选地包括一种或多种官能团,这些官能团或者位于连接寡核糖核苷酸的直链中或者附接于其上,包括但不限于羟基、氨基、巯基、硫醚、醚、酰胺、硫代酰胺、酯、脲或硫脲。小分子可以是环状或非环状的。小分子接头的实例包括但不限于氨基酸、糖、环糊精、金刚烷、胆固醇、半抗原和抗生素。然

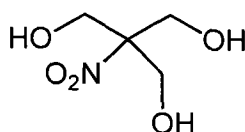
而,为了描述非核苷酸接头的目的,术语“小分子”意图不包括核苷。

[0090] 在某些实施方式中,非核苷酸接头是烷基接头或氨基接头。烷基接头可以是分支或非分支、环状或非环状、取代或未取代、饱和或不饱和、手性、非手性或消旋混合物。烷基接头可具有大约 2 至大约 18 个碳原子。在某些实施方式中,这些烷基接头具有大约 3 至大约 9 个碳原子。某些烷基接头包括一种或多种官能团,包括但不限于羟基、氨基、巯基、硫醚、醚、酰胺、硫代酰胺、酯、脲和硫脲。这些烷基接头可包括但不限于 1,2- 丙二醇、1,2,3- 丙三醇、1,3- 丙二醇、三乙二醇、六乙二醇、聚乙二醇接头(例如 $[-O-CH_2-CH_2-]_n$ ($n = 1-9$))、甲基接头、乙基接头、丙基接头、丁基接头或己基接头。在某些实施方式中,这些烷基接头可包括肽或氨基酸。

[0091] 在某些实施方式中,非核苷酸接头可包括但不限于表 2 所列。

[0092] 表 2 :代表性非核苷酸接头

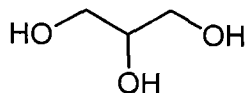
[0093]



[0094]

1,1,1- 三(羟甲基)硝基乙烷

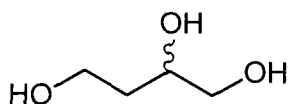
[0095]



[0096]

甘油(1,2,3- 丙三醇)

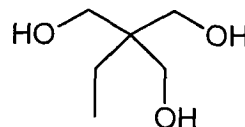
[0097]



[0098]

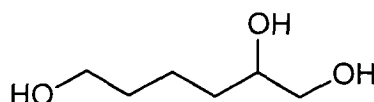
1,2,4- 丁三醇

[0099]



1,1,1- 三(羟甲基)丙烷

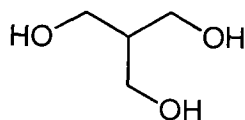
[0100]



[0101]

1,2,6- 己三醇

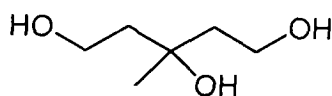
[0102]



[0103]

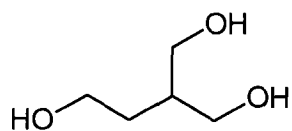
2-(羟甲基)-1,3- 丙二醇

[0104]



[0105]

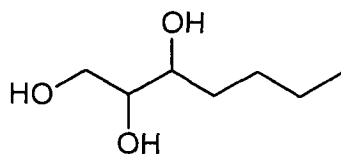
3- 甲基-1,3,5- 戊三醇



[0106]

2-(羟甲基)1,4-丁二醇

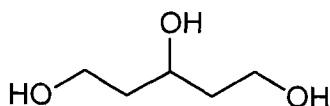
[0107]



[0108]

1,2,3-庚三醇

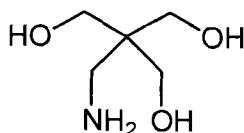
[0109]



[0110]

1,3,5-戊三醇

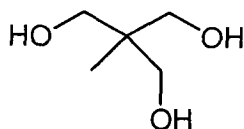
[0111]



[0112]

2-氨基-2-(羟甲基)-1,3-丙二醇

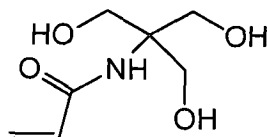
[0113]



[0114]

1,1,1-三(羟甲基)乙烷

[0115]

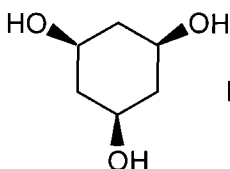


[0116]

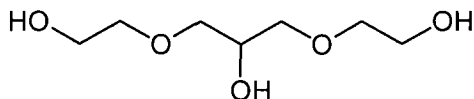
N-[三(羟甲基)甲基]丙烯酰胺

[0117]

表 2 :续



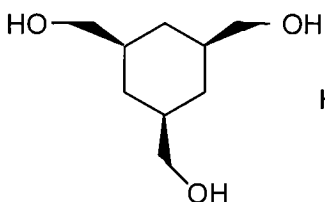
[0118]



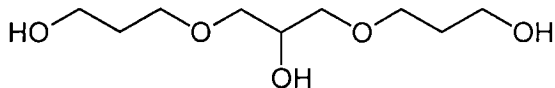
[0119]

顺式-1,3,5-环己三醇

1,3-二(羟乙氧基)-2-羟基丙烷



[0120]

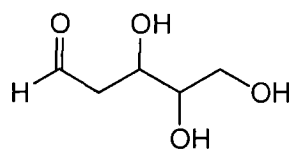


[0121]

顺式-1,3,5-三(羟甲基)环己烷

1,3-二(羟丙氧基)-2-羟基丙烷

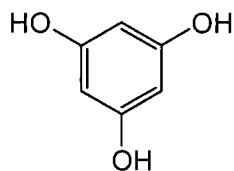
[0122]



[0123]

2- 脱氧 -D- 核糖

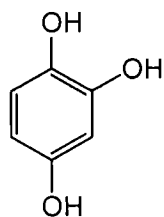
[0124]



[0125]

1,3,5- 三羟基苯

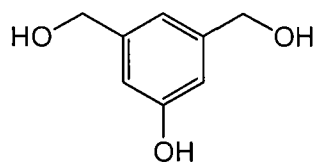
[0126]



[0127]

1,2,4- 三羟基苯

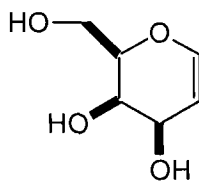
[0128]



[0129]

3,5- 二 (羟甲基) 苯酚

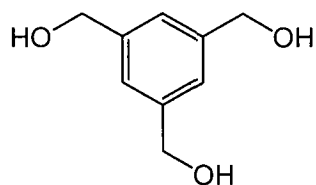
[0130]



[0131]

D-Galactal

[0132]



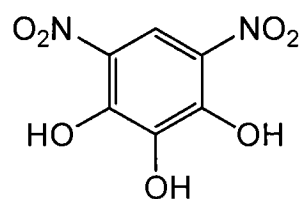
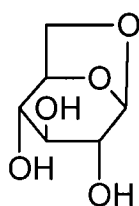
[0133]

1,3,5- 三 (羟甲基) 苯

[0134]

表 2 :续

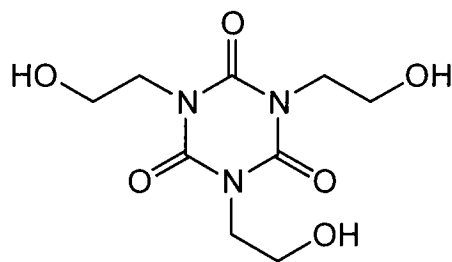
[0135]



[0136] 1,6-脱水-β-D-葡萄糖

4,6-硝基邻苯三酚

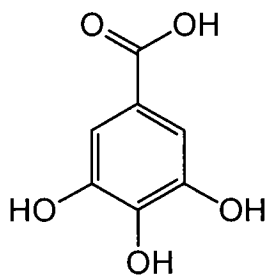
[0137]



[0138]

1,3,5-三(2-羟乙基)-三聚氰酸

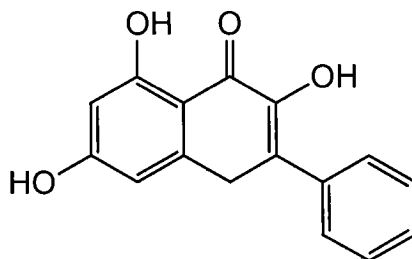
[0139]



[0140]

没食子酸

[0141]

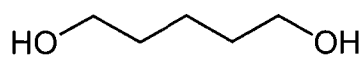


[0142]

3,5,7-三羟基黄酮

[0143] 表 2 :续

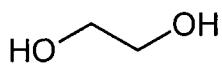
[0144]



[0145]

1,5-戊二醇

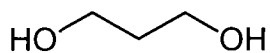
[0146]



[0147]

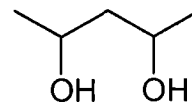
乙二醇

[0148]

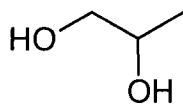


[0149] 1,3-丙二醇

[0150]



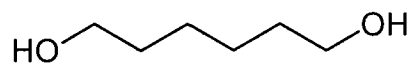
2,4-戊二醇



[0151]

1,2-丙二醇

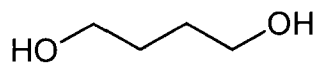
[0152]



[0153]

1,6-己二醇

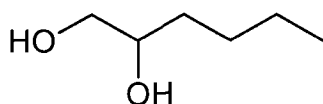
[0154]



[0155]

1,4-丁二醇

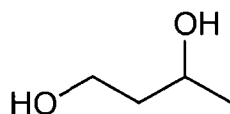
[0156]



[0157]

1,2-己二醇

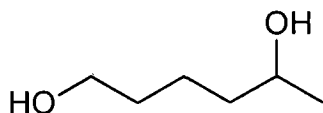
[0158]



[0159]

1,3-丁二醇

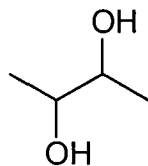
[0160]



[0161]

1,5-己二醇

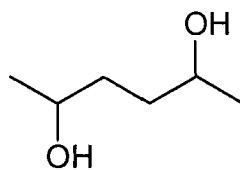
[0162]



[0163]

2,3-丁二醇

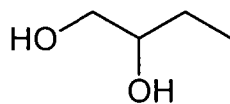
[0164]



[0165]

2,5-己二醇

[0166]

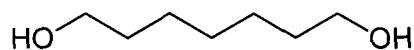


[0167]

1,2-丁二醇

[0168] 表 2 :续

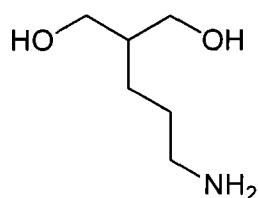
[0169]



[0170]

1,7-庚二醇

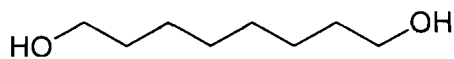
[0171]



[0172]

2-(1-氨基丙基)-1,3-丙二醇

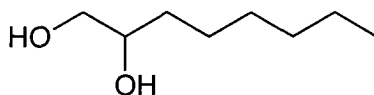
[0173]



[0174]

1,8-辛二醇

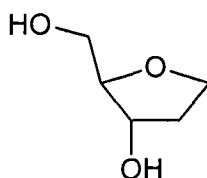
[0175]



[0176]

1,2-辛二醇

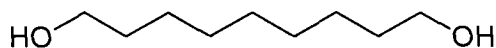
[0177]



[0178]

1,2-二脱氧核糖

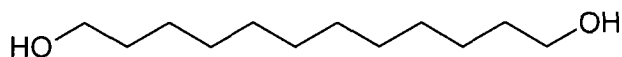
[0179]



[0180]

1,9-壬二醇

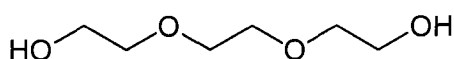
[0181]



[0182]

1,12-十二烷二醇

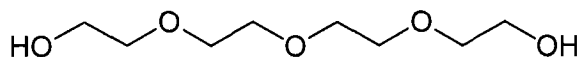
[0183]



[0184]

三乙二醇

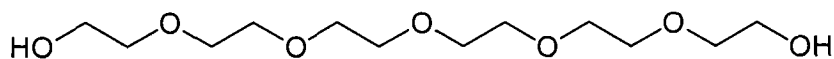
[0185]



[0186]

四乙二醇

[0187]



[0188]

六乙二醇

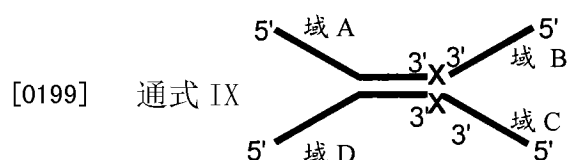
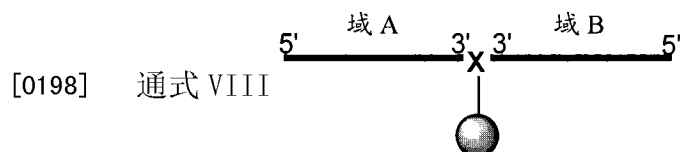
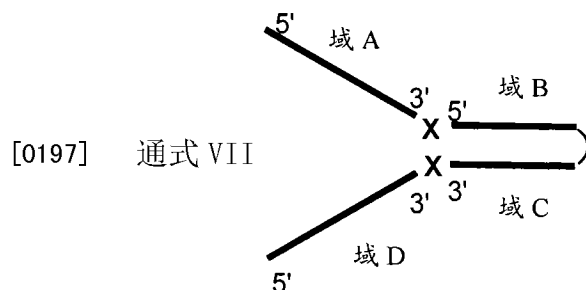
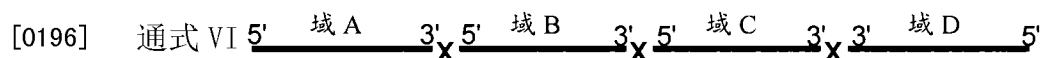
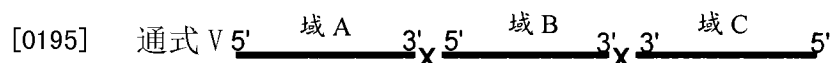
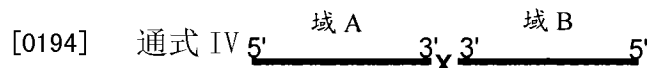
[0189] 在某些实施方式中,小分子接头是甘油或通式为 $\text{HO}-(\text{CH}_2)_o-\text{CH}(\text{OH})-(\text{CH}_2)_p-\text{OH}$ 的甘油同系物,其中 o 和 p 独立地是 1 至大约 6, 1 至大约 4 或 1 至大约 3 的整数。在某些其它实施方式中,小分子接头是 1,3-二氨基-2-羟基丙烷的衍生物。某些这样的衍生物具有通式 $\text{HO}-(\text{CH}_2)_m-\text{C}(\text{O})\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{NHC}(\text{O})-(\text{CH}_2)_n-\text{OH}$, 其中 m 是 0 至大约 10, 0 至大约 6, 2 至大约 6 或 2 至大约 4 的整数。

[0190] 根据本发明的某些非核苷酸接头允许附接多于两个寡核苷酸。例如,小分子接头甘油具有可共价附接寡核苷酸的三个羟基。因此,根据本发明的某些 IRO 包含两个或多个连接于核苷酸或非核苷酸接头的寡核苷酸。这些 IRO 称作“分支的”。

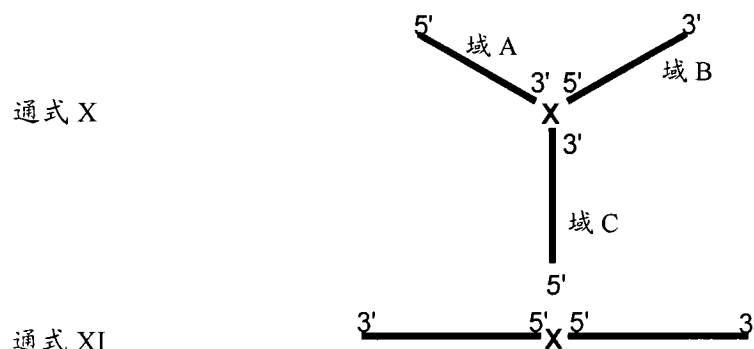
[0191] IRO 化合物可包含至少两个非共价连接的寡核苷酸,例如通过静电作用、疏水相互作用、 π -堆积相互作用(π -stacking interaction)、氢键和它们的组合连接的寡核苷酸。这些非共价连接的非限定性实例包括 Watson-Crick 碱基配对、Hoogsteen 碱基配对和碱基堆积。

[0192] 某些能够连接两个或多个寡核苷酸的方式示于表 3。

[0193] 表 3:寡聚核糖核苷酸通式 IV-XI

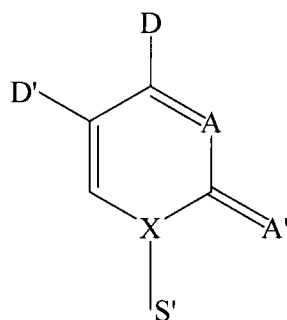


[0200]



[0201] 在特定的实施方式中,在根据本发明的组合物和方法中使用的免疫调节寡核苷酸中的嘧啶核苷具有结构 (II) :

[0202]



(II)

[0203] 其中：

[0204] D 是氢键供体；

[0205] D' 选自下组：氢、氢键供体、氢键受体、亲水基、疏水基、吸电子基团和给电子基团；

[0206] A 是氢键受体或亲水基；

[0207] A' 选自下组：氢键受体、亲水基、疏水基、吸电子基团和给电子基团；

[0208] X 是碳或氮；和

[0209] S' 是戊糖或己糖糖环，或糖类似物。

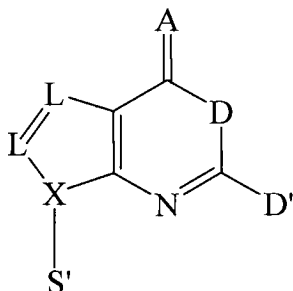
[0210] 在某些实施方式中，糖环被磷酸部分、修饰的磷酸部分或适合于将嘧啶核苷连接于其它核苷或核苷类似物其它接头部分衍生化。

[0211] 在某些实施方式中，氢键供体包括但不限于 -NH-、-NH₂、-SH 和 -OH。优选的氢键受体包括但不限于 C=O、C=S 和芳族杂环的环氮原子，例如胞嘧啶的 N3。

[0212] 在某些实施方式中，(II) 是嘧啶核苷衍生物。嘧啶核苷衍生物的实例包括但不限于 5-羟基胞嘧啶、5-羟甲基胞嘧啶、N4-烷基胞嘧啶或 N4-乙基胞嘧啶、阿糖胞苷 (araC)、5-OH-dC、N3-Me-dC 和 4-硫尿嘧啶。化学修饰的衍生物还包括但不限于胸腺嘧啶或尿嘧啶类似物。在某些实施方式中，(II) 中的糖部分 S' 是糖衍生物。合适的糖衍生物包括但不限于海藻糖或海藻糖衍生物、己糖或己糖衍生物、阿拉伯糖或阿拉伯糖衍生物。

[0213] 在某些实施方式中，根据本发明的组合物和方法中使用的免疫调节寡核苷酸中的嘌呤核苷具有结构 (III)：

[0214]



(III)

[0215] 其中：

[0216] D 是氢键供体；

[0217] D' 选自下组：氢、氢键供体和亲水基；

[0218] A 是氢键受体或亲水基；

[0219] X 是碳或氮；

[0220] 每个 L 各自独立地选自下组：C、O、N 和 S；和

[0221] S' 是戊糖或己糖糖环,或糖类似物。

[0222] 在特定的实施方式中,糖环被磷酸部分、修饰的磷酸部分或适合于将嘧啶核苷连接于其它核苷或核苷类似物的其它接头部分所衍生化。

[0223] 在特定的实施方式中,氢键供体包括但不限于 -NH-、-NH₂、-SH 和 -OH。在特定的实施方式中,氢键受体包括但不限于 C = O、C = S、-NO₂和芳族杂环的环氮原子,例如鸟嘌呤的 N1。

[0224] 在某些实施方式中,(III) 是嘌呤核苷衍生物。嘌呤核苷衍生物的实例包括但不限于鸟嘌呤类似物例如 7- 脱氮 -G、7- 脱氮 -dG、阿糖鸟苷 (ara-G)、6- 硫代 -G、肌苷 (Inosine)、异鸟苷 (Iso-G)、洛索立宾 (loxoribine)、TOG(7- 硫代 -8- 氧代)-G、8- 溴代 -G、8- 羟基 -G、5- 氨基间型霉素 B(5-aminoformycin B)、氧代间型霉素 (Oxoformycin)、7- 甲基 -G、9- 对 - 氯苯基 -8- 氮杂 -G、9- 苯基 -G、9- 己基 - 鸟嘌呤、7- 脱氮 -9- 苄基 -G、6- 氯 -7- 脱氮鸟嘌呤、6- 甲氧基 -7- 脱氮鸟嘌呤、8- 氮杂 -7- 脱氮 -G(PPG)、2-(二甲基氨基) 鸟苷、7- 甲基 -6- 硫代鸟苷、8- 苄氧基鸟苷、9- 脱氮鸟苷、1-(B-D- 呋喃核糖基)-2- 氧代 -7- 脱氮 -8- 甲基 - 嘌呤、1-(2' - 脱氧 -β -D- 呋喃核糖基)-2- 氧代 -7- 脱氮 -8- 甲基 - 嘌呤。化学修饰的衍生物还包括 但不限于腺嘌呤类似物例如 9- 苄基 -8- 羟基 -2-(2- 甲氧基乙氧基) 腺嘌呤、2- 氨基 -N2-0-, 甲基腺苷、8- 氮杂 -7- 脱氮 -A、7- 脱氮 -A、阿糖腺苷 (Vidarabine)、2- 氨基腺苷、N1- 甲基腺苷、8- 氮杂腺苷、5- 碘代杀结核菌素 (5-Iodotubercidin) 和 N1-Me-dG。在某些实施方式中,(III) 中的糖部分 S' 是如通式 II 中定义的糖衍生物。

[0225] 在本发明的特定实施方式中,免疫调节核酸包含含有至少一个 B-L- 脱氧核苷或 3' - 脱氧核苷的核酸序列。

[0226] 在本发明的特定实施方式中,免疫调节寡核苷酸包含含有至少一个二核苷酸的核酸序列,所述二核苷酸选自下组 :CpG、C^{*}pG、C^{*}pG^{*}和 CpG^{*},其中 C 是胞嘧啶或 2' - 脱氧胞苷, G 是鸟苷或 2' - 脱氧鸟苷,C^{*}是 2' - 脱氧胸苷、1-(2' - 脱氧 -β -D- 呋喃核糖基)-2- 氧代 -7- 脱氮 -8- 甲基 - 嘌呤、2' - 双脱氧 -5- 卤代胞嘧啶、2' - 双脱氧 -5- 硝基胞嘧啶、阿拉伯糖胞苷、2' - 脱氧 -2' - 取代阿糖胞苷、2' - 0- 取代阿糖胞苷、2' - 脱氧 -5- 羟基胞苷、2' - 脱氧 -N4- 烷基 - 胞苷、2' - 脱氧 -4- 硫代尿苷或其它嘧啶核苷类似物,G^{*}是 2' - 脱氧 -7- 脱氮鸟苷、2' - 脱氧 -6- 硫代鸟苷、阿糖鸟苷、2' - 脱氧 -2' 取代 - 阿糖鸟苷、2' - 0- 取代阿糖鸟苷、2' - 脱氧肌苷或其它嘌呤核苷类似物,并且 p 是选自磷酸二酯、硫代磷酸酯和二硫代磷酸酯的核苷间连接,并且其中所述至少一个二核苷酸的活性受旁侧序列的调节。

[0227] 在这些本研究中使用的通用结构内特异性 IRO 的序列包括但不限于表 4 所列。

[0228] 表 4

[0229]

IRO/SEQ ID NO :	序列
5	5' -CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
7	5' -CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
17	5' -CTATCTGACG ₁ TTCTCTGT-3'
37	5' -CTATCTGACG ₄ TTCTCTGT-3'
39	5' -CTATCTGAC ₄ GTTCTCTGT-3'
41	5' -CTATCTGAC ₅ GTTCTCTGT-3'

43	5' -CTATCTGAC ₆ GTTCTCTGT-3'
45	5' -CTATCTGACG ₅ TTCTCTGT-3'
47	5' -CTATCTGAC ₇ GTTCTCTGT-3'
64	5' -CTATCTAACGTTCTCTGT-3'

[0230]

67	5' -CTATCTAACG ₁ TTCTCTGT-3'
22	5' -CTATCTGAmCGTTCTCTGT-3'
9	5' -CTATCTGUCGTTCTCTGT-3'
10	5' -CTATCTGUCGTTCTCTGT-3'
19	5' -CTATCTGUCG ₁ TTCTCTGT-3'
38	5' -CTATCTGUCG ₄ TTCTCTGT-3'
40	5' -CTATCTGUC ₄ GTTCTCTGT-3'
42	5' -CTATCTGUC ₅ GTTCTCTGT-3'
44	5' -CTATCTGUC ₆ GTTCTCTGT-3'
46	5' -CTATCTGUCG ₅ TTCTCTGT-3'
48	5' -CTATCTGUC ₇ GTTCTCTGT-3'
66	5' -CTATCTAUCGTTCTCTGT-3'
69	5' -CTATCTAUCG ₁ TTCTCTGT-3'
65	5' -CTATCTAGCGTTCTCTGT-3'
68	5' -CTATCTAGCG ₁ TTCTCTGT-3'
23	5' -CTATCTGmACGTTCTCTGT-3'
24	5' -CTATCTGmAmCGTTCTCTGT-3'
25	5' -CTATCTGAC ₂ GTTCTCTGT-3'
27	5' -CTATCTGTC ₂ GTTCTCTGT-3'
33	5' -CTATCTGAC ₃ GTTCTCTGT-3'
35	5' -CTATCTGTC ₃ GTTCTCTGT-3'
26	5' -CTATCTGACG ₂ TTCTCTGT-3'
28	5' -CTATCTGTCG ₂ TTCTCTGT-3'
34	5' -CTATCTGACG ₃ TTCTCTGT-3'
36	5' -CTATCTGTCG ₃ TTCTCTGT-3'
49	5' -CTATCTAGCGTTCTCTGT-3'
50	5' -CTATCTAGCGTTCTCTGT-3'
6	5' -CTATCTGACGUUCTCTGT-3'
51	5' -CTATCTAGCGTTCTCTGT-3'
21	3' -TCTTGACGTTCT-X ₂ -TCTGACGTTCT-3'

[0231]

52	5' -CCTACTAGCGTX ₁ CTCATC-3'
53	5' -CCTACTAGCGX ₁ TCTCATC-3'
54	5' -CCTACTAG ₃ CGTTCTCATC-3'
55	5' -TCCATGA ₁ CGTTCCTGATGC-3'
56	5' -CTATCTGAC ₂ G ₂ TTCTCTGT-3'
57	5' -C ₂ T ₂ A ₂ T ₂ C ₂ T ₂ G ₂ A ₂ C ₂ G ₂ T ₂ C ₂ T ₂ C ₂ T ₂ G ₂ T ₂ -3'
29	5' -CTATCTGAX ₁ GTTCTCTGT-3'
30	5' -CTATCTGACX ₁ TTCTCTGT-3'
31	5' -CTATCTGTX ₁ GTTCTCTGT-3'
32	5' -CTATCTGTCX ₁ TTCTCTGT-3'
61	5' -CTATCTAGCGTX ₁ CTCTGT-3'
62	5' -CTATCTAGCGX ₁ TCTCTGT-3'
63	5' -CTATCTAGCGX ₁ X ₁ CTCTGT-3'
58	5' -CTATCTGACGTX ₃ CTCTGT-3'
59	5' -CTATCTGACGX ₃ TCTCTGT-3'
60	5' -CTATCTGACGX ₃ X ₃ CTCTGT-3'

70	5' -CTATCTAGCGTX ₃ CTCTGT-3'
71	5' -CTATCTAGCGX ₃ TCTCTGT-3'
72	5' -CTATCTAGCGX ₃ X ₃ CTCTGT-3'
74	5' -CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
75	5' -CTATCTGACG ₁ UUCTCTGT-3'
76	5' -CCTACTAG ₆ CGTTCTCATC-3'
77	5' -TCCATGACGU ₁ TCCTGATGC-3'
78	5' -CTATCTGX ₂ CGTTCTCTGT-3'
79	5' -CTATCTX ₂ ACGTTCTCTGT-3'
80	5' -CTATCTU ₂ ACGTTCTCTGT-3'
81	5' -CTATCTGU ₂ CGTTCTCTGT-3'
82	5' -CTATCTGACGX ₂ TCTCTGT-3'
83	5' -CTATCTGACGTX ₂ CTCTGT-3'
84	5' -CTATCTGX ₃ CGTTCTCTGT-3'

[0232]

85	5' -CTATCTX ₃ ACGTTCTCTGT-3'
86	(5' -TCTGACGTTCT) ₂ X ₂
87	(5' -TCTGACG ₁ TTCT) ₂ X ₂
88	(5' -TCTGACG ₄ TTCT) ₂ X ₂
89	(5' -TCTCTGACGTT) ₂ X ₂
90	5' -TCTGACG ₁ TTCT-X ₃ -TGACCGGTCA-3'
91	5' -CTATCTGTGCGUUCTCTGT-3'
92	5' -CTATCTGTGCGUUCTCTGT-3'
93	(5' -TCTGUCGTTCT) ₂ X ₂
94	(5' -TCTGUCG ₁ TTCT) ₂ X ₂
95	(5' -TCTGACG ₄ TTCT) X ₂
96	(5' -TCTGACG ₁ TT) ₂ X ₂
97	5' -TCTGACG ₁ TTCT-X ₃ -TCAACCACACA-3'
98	5' -CTATCTGACG ₁ TTCTCUGU-3'
99	5' -CTATCTGUCG ₁ TTCTCUGU-3'
100	(5' -UGUCG ₁ TTCT) ₂ X ₂
101	(5' -UGACG ₁ TTCT) ₂ X ₂

[0233] 粗体的 G、A 或 U = 2'-OMe ;粗体的 T = 3'-OMe ;A₁ = 3'-OMe ;G₁ = 7- 脱氮 -dG ; m = P-Me ;A₂、T₂、C₂和 G₂ = B-L- 脱氧核苷 ;X₁ = 脱碱基的 (abasic) ;X₂ = 甘油接头, X₃ = C3- 接头 ;C₃和 G₃ = 3'- 脱氧 - 核苷 ;G₄ = 阿糖鸟苷 (araG) ;C₄ = 阿糖胞苷 ;C₅ = 5-OH-dC ;C₆ = 1-(2'- 脱氧 - β-D- 呋喃核糖基)-2- 氧代 -7- 脱氮 -8- 甲基 - 嘌呤 ;G₅ = N1-Me-dG ;C₇ = N3-Me-dC ;U₁ = 3'-OMe ;U₂ = dU

[0234] 在某些实施方式中,寡核苷酸各有大约 6 至大约 35 个核苷残基,优选大约 9 至大约 30 个核苷残基,更优选大约 11 至大约 23 个核苷残基。在某些实施方式中,寡核苷酸具有大约 6 至大约 18。

[0235] 在第二个方面,本发明提供药物制剂,其包含根据本发明的 IRO 化合物和生理上可接受的载体。

[0236] 在第三个方面,本发明提供用于在脊椎动物中抑制或阻抑 TLR- 介导的免疫应答诱导的方法,这些方法包括向脊椎动物施用根据本发明的 IRO 化合物。在某些实施方式中,脊椎动物是哺乳动物。在优选的实施方式中,向需要免疫阻抑的脊椎动物施用 IRO 化合物。

[0237] 根据本发明的这个方面,IRO 化合物能够阻抑针对其它 TLR 配体或 TLR 激动剂的基于 TLR 的免疫应答。如在下文实施例中进一步讨论的,TLR 激动剂或 TLR 配体(例如免疫

调制性寡核苷酸)所活化的基于 TLR 的免疫应答能够被同时、预先或随后施用 IRO 化合物所阻抑/抑制,并且这种阻抑/抑制可以在施用之后保持一段时间(例如几天)。本发明这种有益的性质对于预防和/或治疗疾病或病症具有独特的优势。例如,在疾病治疗期间特定 TLR 激动剂的投与可能引起不希望的免疫刺激,IRO 化合物能够阻抑/抑制该免疫刺激。在施用 TLR 激动剂的同时、之前和/或之后施用 IRO,可在从 TLR 激动剂获得治疗益处的同时阻抑/抑制不希望的副作用。另外,预先施用 IRO 能够预防对接下来或后来由 TLR 激动剂的激发(challenge)引起的免疫应答(例如,变应性反应)。

[0238] 在根据本发明这个方面的方法中,IRO 化合物的施用可以通过任何合适的途径,包括但不限于非消化道、黏膜递送、口服、舌下、经皮、局部、吸入、鼻内、气溶胶、眼内、气管内、直肠内、阴道、通过基因枪、皮肤贴片或采取滴眼剂或漱口剂的形式。可使用已知方法,以有效减少疾病的症状或替代标志的剂量和时间段进行 IRO 化合物的治疗组合物的施用。在全身施用时,优选以足够实现 IRO 化合物的血液水平为大约 0.0001 微摩尔至大约 10 微摩尔的剂量施用治疗组合物。对于局部施用,与上述浓度相比低得多的浓度可能是有效的,而高得多的浓度可能得以耐受。优选地,IRO 化合物的总剂量范围在大约 0.001mg 每个患者每日至大约 200mg 每 kg 体重每日。同时或连续向个体施用有效量的一种或多种本发明的治疗组合物作为单一治疗段落(single treatment episode)可能是理想的。

[0239] IRO 化合物可任选地连接一个或多个变应原和/或抗原(自身或外源),免疫原性蛋白质,例如钥孔血蓝蛋白(KLH)、霍乱毒素 B 亚基,或任何其它免疫原性载体蛋白质。IRO 还能够与其它化合物(例如佐剂)组合使用,所述化合物包括但不限于 TLR 激动剂(例如 TLR2 激动剂和 TLR9 激动剂)、弗氏不完全佐剂、KLH、单磷酸类脂 A (MPL)、明矾和皂苷,包括 QS-21 和咪喹莫特(imiquimod),或它们的组合。

[0240] 根据本发明这个方面的方法对于免疫系统的模式研究是有用的。所述方法对于预防性或治疗性处理人或动物疾病也是有用的。例如,所述方法对于儿科用和兽用疫苗应用是有用的。

[0241] 在第四个方面,本发明提供用于治疗性处理具有疾病或病症的患者的方法,这些方法包括向患者施用根据本发明的 IRO 化合物。在多种实施方式中,待处理的疾病或病症是癌症、自身免疫病症、传染病、气道炎症、炎性病症、变态反应、哮喘或由病原体引起的疾病。病原体包括细菌、寄生虫、真菌、病毒、类病毒和朊病毒。如本发明的第三个方面所述进行施用。

[0242] 在第五个方面,本发明提供用于预防疾病或病症的方法,这些方法包括向患者施用根据本发明的 IRO 化合物。在多种实施方式中,待预防的疾病或病症是癌症、自身免疫病症、气道炎症、炎性病症、传染病、变态反应、哮喘或由病原体引起的疾病。病原体包括细菌、寄生物、真菌、病毒、类病毒和朊病毒。如本发明的第三个方面所述进行施用。

[0243] 在根据本发明这个方面的任何方法中,可将 IRO 化合物与对于治疗所述疾病或症候有用、且不减少 IRO 化合物免疫调制作用的任何其它作用物组合使用。在根据本发明的任何方法中,对于治疗疾病或症候有用的作用物包括但不限于一种或多种疫苗、抗原、抗体、细胞毒剂、变应原、抗生素、反义寡核苷酸、TLR 激动剂、TLR 拮抗剂、肽、蛋白质、基因治疗载体、DNA 疫苗和/或佐剂,以增强免疫应答的特异性或幅度;或共同刺激分子例如细胞因子、趋化因子、蛋白配体、反式激活因子、肽和包含修饰的氨基酸的肽。例如,在癌症的治

疗中,设想 IRO 化合物可以与一种或多种化疗化合物、靶向治疗剂和 / 或单克隆抗体组合施用。或者,所述作用物可以包括编码抗原或变应原的 DNA 载体。在这些实施方式中,本发明的 IRO 化合物能够发挥不同的作为佐剂的作用和 / 或产生直接的免疫调制效果。

[0244] 以下实施例旨在进一步说明本发明的特定示例性实施方式,并不意在限定本发明的范围。例如,在以下实施例中显示代表性的 TLR 配体,但是不限定本发明的 IRO 对其发挥拮抗剂作用的配体的范围。

[0245] 实施例 1

[0246] 合成含有寡核苷酸的免疫调节部分

[0247] 根据标准方法合成全部 IRO (参见例如美国专利公开 No. 20040097719)。

[0248] 使用自动 DNA 合成仪 (Expedite 8909 ;PerSeptive Biosystems, Framingham, Mass.), 根据标准线性合成或平行合成方法 (参见例如美国专利公开 No. 20040097719 的图 5 和 6), 以 1 μ M 规模合成寡核苷酸。

[0249] 脱氧核糖核苷亚磷酰胺从 (Aldrich-Sigma, St Louis, Mo) 获得。1', 2' - 双脱氧核糖亚磷酰胺、丙基 -1- 亚磷酰胺、2- 脱氧尿苷亚磷酰胺、1,3- 双 -[5-(4,4' - 二甲氧三苯甲基) 戊酰胺基] -2- 丙醇亚磷酰胺 (1,3-bis-[5-(4,4' - dimethoxytrityl) pentylamidyl] -2-propanol phosphoramidite) 和甲基亚磷酰胺 (methylphosphoramidite) 从 Glen Research (Sterling, Va.) 获得。β.-L-2' - 脱氧核糖核苷亚磷酰胺、α.-2' - 脱氧核糖核苷亚磷酰胺、单 -DMT- 甘油亚磷酰胺和二 -DMT- 甘油亚磷酰胺从 ChemGenes (Willmington, Mass.) 获得。(4- 氨基丁基) -1,3- 丙二醇亚磷酰胺从 Clontech (Palo Alto, Calif.) 获得。阿糖胞苷亚磷酰胺、阿糖鸟苷、阿糖胸苷和阿糖尿苷从 Reliable Pharmaceutical (St. Louis, Mo.) 获得。阿糖鸟苷亚磷酰胺、阿糖胸苷亚磷酰胺和阿糖尿苷亚磷酰胺在 Idera Pharmaceuticals, Inc. (Cambridge, Mass.) 合成 (Noronha et al. (2000) Biochem., 39 :7050-7062)。

[0250] 全部核苷亚磷酰胺通过 ^{31}P 和 ^1H NMR 谱表征。使用普通偶联循环将修饰的核苷掺入特异性位点。在合成之后,将寡核苷酸使用浓氢氧化铵脱保护,并通过反相 HPLC 随后透析来纯化。将纯化的钠盐形式的寡核苷酸在使用之前冻干。用 CGE 和 MALDI-TOF MS 测试纯度。

[0251] 实施例 2

[0252] 抑制 TLR9 活化

[0253] 将稳定表达 TLR9 的 HEK293 细胞 (Invivogen) 用报道基因 Seap (Invivogen) 瞬时转染 6 小时。用单独的 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' (小鼠 CpG 序列; IMO/SEQ ID NO 1; 0 剂量) 和各种浓度的 IRO 5 或 6 处理细胞 18 小时。根据制造商的方案 (Invivogen) 测定 TLR9 依赖性报道基因表达,将结果表示为 TLR9 刺激性寡核苷酸 (100%) 的 % 活性。结果示于图 1。这些结果说明 IRO 5 抑制了 IMO 的 TLR9 激动活性。

[0254] 实施例 3

[0255] IRO 特异性抑制 TLR9 刺激

[0256] 将稳定表达 TLR9 或 TLR3 的 HEK293 细胞 (Invivogen) 用报道基因 Seap (Invivogen) 瞬时转染 6 小时。用 0.5mg/ml IMO1 (0.5 $\mu\text{g/ml}$)、IRO 5 (2.0 $\mu\text{g/ml}$)、R848 (5.0 $\mu\text{g/ml}$) 或 poly (I). poly (C) + IRO 处理细胞 18 小时。根据制造商的方案

(Invivogen) 测定 TLR9 或 TLR3 依赖性报道基因表达,将结果表示为 NF- κ B 活性的变化倍数。结果示于图 2。这些结果证明 IRO 抑制 TLR9 激动剂的活性,但是不抑制 TLR3 的激动剂,更概括地说,IRO 能够选择性地抑制 TLR 活性。

[0257] 实施例 4

[0258] IRO 的剂量依赖性抑制

[0259] 在 C57BL/6 小鼠的左腋下皮下注射 (s. c.) 0.25mg/kg 的刺激性 5'-TCTGACG₁TTCT-X-TCTTG₁CAGTCT-5' (IMO/SEQ ID NO 3; G₁=7-脱氮 G, X=甘油),并且在右腋下皮下注射不同剂量的 IRO5。在刺激性 IMO3 注射之后 2 小时取得血清样品,并且通过 ELISA 测定 IL-12 水平。结果示于表 3。这些结果说明 IRO 的剂量依赖性抑制。

[0260] 实施例 5

[0261] IRO 的时间依赖性抑制

[0262] 在 C57BL/6 小鼠的左腋下皮下注射 0.25mg/kg 刺激性 IMO 3,并且在施用刺激性 IMO(0h) 一小时前 (-1h) 或与之同时在右腋下皮下注射 1mg/kg IRO 5 或 5'-CTATCTCACCTTCTCTGT-5' (非-CpG 非刺激对照;寡聚物/SEQ ID NO4)。在刺激性 IMO 注射之后 2 小时取得血清样品,并且通过 ELISA 测定 IL-12 水平。图 4A 中的结果说明,在施用刺激性 IMO(0h) 的 1 小时之前 (-1h) 或与之同时施用 IRO 5 或 (寡聚物 4) 之后,血清 IL-12 水平减少。

[0263] 在 C57BL/6 小鼠的左腋下皮下注射 0.25mg/kg 的刺激性 IMO 3,并且在施用刺激性 IMO(0h) 的同时鼻内施用 10mg/kg IRO 101。在刺激性 IMO 注射之后 2 小时取得血清样品,通过 ELISA 测定 IL-12 水平。图 4B 中的结果说明在皮下注射 IMO 的同时鼻内施用 IRO 101 之后,血清 IL-12 水平减少。

[0264] 在 C57BL/6 小鼠的左腋下皮下注射 0.25mg/kg 的刺激性 IMO 3,并且在施用刺激性 IMO(0h) 的 1 小时之前 (-1h)、24 小时之前 (-24) 或 72 小时之前 (-72) 在右腋下皮下注射 2mg/kg 或 10mg/kg 的 IRO 17、99、101。在刺激性 IMO 注射 2 小时之后取血清样品,并且通过 ELISA 测定 IL-12 水平。结果示于图 4C-D。这些结果说明预施用和同时施用 IRO 能够抑制 TLR9 的激动剂,更概括地说,IRO 能够抑制 TLR 活化。

[0265] 实施例 6

[0266] 抑制 TLR9 刺激

[0267] 在 C57BL/6 小鼠的左腋下皮下注射 0.25mg/kg 刺激性 IMO 3,并且在施用刺激性 IMO(0h) 的 1 小时之前 (-1h) 或同时在右腋下皮下注射 1mg/kg IRO21 或对照寡聚物 4。在刺激性 IMO 注射之后 2 小时取得血清样品,并且通过 ELISA 测定 IL-12 水平。结果示于图 5A 和 5B。这些结果说明在其 5' 端相连接的 CpG 寡核苷酸显示抑制特性,更概括的说,在它们的 5' 端相连接的免疫刺激性 CpG 寡核苷酸能够抑制 TLR 活化。

[0268] 实施例 7

[0269] 人细胞培养物中 TLR9 的抑制

[0270] 将人 pDC 和 PBMC 与 10ug 5'-CTATCTGTCGTTCTCTGT-3' (人 CpG 序列;IMO/SEQ ID NO 2) 和 40ug IRO10 温育 24 小时。结果示于图 6。这些结果说明 IRO 在人细胞培养物中抑制了 TLR9 激动剂活性,更概括地说,IRO 能够抑制人细胞中的 TLR。

[0271] 实施例 8

[0272] IRO对 OVA诱导的 Th2免疫应答的影响

[0273] 结果示于图 7。这些结果说明 IRO 对卵清蛋白 (“OVA”) 诱导的 Th2 免疫应答没有影响,而 IMO 化合物减少 OVA 诱导的 Th2 应答并且引起 Th1 细胞因子的产生。

[0274] 实施例 9

[0275] IRO抑制 IMO对 Th1和 Th2免疫应答的影响

[0276] 结果示于图 8。这些结果说明 IRO 能够逆转 Th2 抑制性质并且能够抑制 IMO 诱导的 Th1 免疫应答。

[0277] 实施例 10

[0278] 抗体对 IMO和 IRO的应答

[0279] 在第 0 周和第 2 周,在有和没有 IMO1 和 IRO 5 或 6 及其组合存在之条件下用 HBsAg 免疫小鼠,并且在第 4 周测量抗体应答。结果示于图 9,说明 IRO 降低了 IMO 所诱导的 IgG2A 免疫应答。

[0280] 实施例 11

[0281] 抑制免疫刺激性寡核苷酸

[0282] 将稳定表达 TLR9 的 HEK293 细胞 (Invivogen) 用报道基因 Seap (Invivogen) 瞬时转染 6 小时。用单独的 0.25 $\mu\text{g/ml}$ IMO (IMO1 ;0 剂量) 和多种浓度的 IRO 处理细胞 18 小时。根据制造商的方案 (Invivogen) 测定 TLR9 依赖性报道基因表达,将结果表示为免疫刺激性寡核苷酸活性的 % 抑制。结果示于以下表 5 和 6。这些结果说明 IRO 抑制了 IMO 的活性。

[0283] 表 5. 免疫刺激性寡核苷酸 1 的百分比抑制。IMO1 浓度是 0.25 $\mu\text{g/ml}$, IRO 浓度是 2 $\mu\text{g/ml}$

[0284]	IRO#	序列	%抑制
[0285]	5	5' -CTATCTGACGTTCTCTGT-3'	52.5%
[0286]	25	5' -CTATCTGAC ₂ GTTCTCTGT-3'	17.5%
[0287]	26	5' -CTATCTGACG ₂ TTCTCTGT-3'	15.3%
[0288]	33	5' -CTATCTGAC ₃ GTTCTCTGT-3'	38.1%
[0289]	39	5' -CTATCTGAC ₄ GTTCTCTGT-3'	52.8%
[0290]	41	5' -CTATCTGAC ₅ GTTCTCTGT-3'	42.6%
[0291]	43	5' -CTATCTGAC ₆ GTTCTCTGT-3'	23.6%

[0292] 含有各种修饰的 IRO 抑制表达 TLR9 的 HEK293 细胞中 IMO 的 NF- κ B 活化,更概括地说,含有各种修饰的 IRO 能够抑制 IMO 的 NF- κ B 活化。

[0293] 表 6. 免疫刺激性寡核苷酸 1 的百分比抑制。IMO1 浓度是 0.25 $\mu\text{g/ml}$, IRO 浓度是 3 $\mu\text{g/ml}$ 。

[0294]	IRO#	序列	%抑制
[0295]	5	5' -CTATCTGACGTTCTCTGT-3'	76.5%
[0296]	17	5' -CTATCTGACG ₁ TTCTCTGT-3'	76.4%
[0297]	34	5' -CTATCTGACG ₃ TTCTCTGT-3'	32.2%
[0298]	37.	5' -CTATCTGACG ₄ TTCTCTGT-3'	78.3%

[0299] 含有各种修饰的 IRO 抑制表达 TLR9 的 HEK293 细胞中 IMO 的 NF- κ B 活化,更概括

而言,含有各种修饰的 IRO 能够抑制 IMO 的 NF- κ B 活化。

[0300] 实施例 12

[0301] IRO的时间依赖性抑制

[0302] 在 C57BL/6 小鼠的左腋下用 0.25mg/kg 至 10mg/kg 的 TLR 激动剂皮下注射,并且在施用 TLR 激动剂 (0h) 的 1 小时之前 (-1h) 或多至 48 小时之前 (-1h) 或与之同时,在右腋下用 1mg/kg 至 20mg/kg 的 IRO 5、17 或 37 或 5'-TCCTGGCGGGGAAGT-3' (多聚 dG 对照;寡聚物/SEQ ID NO 49) 皮下注射。在刺激性 IMO 注射之后 2 小时取得血清样品,并且通过 ELISA 测定 IL-12 水平。结果示于以下表 7-22。这些结果说明预施用和同时施用 IRO 二者均抑制 TLR9 的激动剂,并且即使在 IMO 施用之前 48 小时施用的情况下,IRO 的抑制活性也有效。更概括而言,这些结果说明预施用和同时施用 IRO 都能够抑制 TLR 激动剂,并且即使在施用 TLR 激动剂之前数小时施用,也可见 IRO 的抑制活性。

[0303] 表 7. IRO 5 体内抑制 IMO3 诱导的 IL-12 (ng/ml $\pm$ SD), C57BL/6 小鼠 (n = 3)

[0304]

仅IMO (0.25 mg/kg)	仅IRO (2 mg/kg)	IRO+IMO			
		施用IRO之后施用IMO的时间			
		0小时	1小时	3小时	6小时
21.1 $\pm$ 1.84	0.81 $\pm$ 0	0.59 $\pm$ 0.48	1.54 $\pm$ 0.17	6.53 $\pm$ 0.81	10.41 $\pm$ 0.48

[0305] IRO5 抑制了 IRO 施用后长达 6 小时内注射的 IMO 所诱导的 IL-12 产生。更概括而言,这些结果说明,在 IRO 施用之后数小时施用 IMO 或开始存在 IMO 的情况下,IRO 能够抑制 TLR 活化和 IMO 诱导的 IL-12 产生。

[0306] 表 8. IRO 5 体内抑制 IMO 3 诱导的 IL-12 (ng/ml $\pm$ SD), C57BL/6 小鼠 (n = 3)

[0307]

仅IMO (0.25 mg/kg)	仅IRO (20 mg/kg)	IRO+IMO			
		施用IRO之后施用IMO的时间			
		0小时	1小时	3小时	6小时
33.8 $\pm$ 3.8	0.73 $\pm$ 0.7	0.87 $\pm$ 1.19	1.52 $\pm$ 2.01	2.2 $\pm$ 2.4	1.84 $\pm$ 3.18

[0308] IRO 5 强力抑制了 IRO 施用后长达 6 小时内注射的 IMO 所诱导的 IL-12 产生。更概括而言,这些结果说明,在 IRO 施用之后数小时施用 IMO 或开始存在 IMO 的情况下,IRO 能够显著抑制 TLR 活化和 IMO 诱导的 IL-12 产生。

[0309] 表 9. IRO 5 体内抑制 IMO 3 诱导的 IL-12 (ng/ml $\pm$ SD), C57BL/6 小鼠 (n = 3)

[0310]

仅IMO (0.25 mg/kg)	仅IRO (20 mg/kg)	IRO+IMO			
		施用IRO之后施用IMO的时间			
		6小时	14小时	24小时	48小时
25.8 $\pm$ 2.6	0.17 $\pm$ 0	0.04 $\pm$ 0	1.25 $\pm$ 0	1.8 $\pm$ 0.29	2.9 $\pm$ 0.1

[0311] IRO 5 强力抑制了 IRO 施用后长达 48 小时内注射的 IMO 所诱导的 IL-12 产生。更概括而言,这些结果说明,在 IRO 施用之后数小时施用 IMO 或开始存在 IMO 的情况下,IRO 能

够显著抑制 TLR 活化和 IMO 诱导的 IL-12 产生。

[0312] 表 10. IRO 17 体内抑制 IMO 3 诱导的 IL-12 (ng/ml $\pm$ SD), C57BL/6 小鼠 (n = 3)

[0313]

仅IMO (0.25 mg/kg)	仅IRO (2 mg/kg)	IRO+IMO		
		施用IRO之后施用IMO的时间		
		3小时	6小时	24小时
6.6 $\pm$ 0.64	0.67 $\pm$ 0.02	1.01 $\pm$ 0.06	1.25 $\pm$ 0.29	4.29 $\pm$ 1.12

[0314] IRO 17 抑制了 IRO 施用后长达 6 小时或更长时间内注射的 IMO 所诱导的 IL-12 产生。更概括而言,这些结果说明,在施用 IRO 之后数小时施用 IMO 或开始存在 IMO 的情况下, IRO 能够抑制 TLR 活化和 IMO 诱导的 IL-12 产生。

[0315] 表 11. IRO 37 体内抑制 IMO 3 诱导的 IL-12 (ng/ml $\pm$ SD), C57BL/6 小鼠 (n = 3)

[0316]

仅IMO (0.25 mg/kg)	仅IRO (2 mg/kg)	IRO+IMO		
		施用IRO之后施用IMO的时间		
		3小时		
6.6 $\pm$ 0.64	0.67 $\pm$ 0.02	0.91 $\pm$ 0.03		

[0317] IRO 37 抑制了 IRO 施用后长达 3 小时内注射的 IMO 所诱导的 IL-12 产生。更概括而言,这些结果说明,在施用 IRO 之后数小时施用 IMO 或开始存在 IMO 的情况下, IRO 能够抑制 TLR 活化和 IMO 诱导的 IL-12 产生。

[0318] 表 12. 对照多聚 dG (5' -TCCTGGAGGGGAAGT-3' (SEQ ID NO 73)) 体内抑制 IMO 3 诱导的 IL-12 (ng/ml $\pm$ SD), C57BL/6 小鼠 (n = 3)

[0319]

仅IMO (0.25 mg/kg)	仅IRO (10 mg/kg)	对照+IMO		
		施用对照之后施用IMO的时间		
		3小时	6小时	24小时
18.24 $\pm$ 0.22	1.47 $\pm$ 0	1.38 $\pm$ 0.18	10.03 $\pm$ 0.37	16.97 $\pm$ 0.52

[0320] 一种已知显示 TLR9 拮抗剂活性的多聚 dG 化合物抑制了在施用 IRO 后长达 6 小时内注射的 IMO 所诱导的 IL-12 产生。与 IRO 的数据比较 (例如表 7 中的 IRO5),对照多聚 dG 寡聚物拮抗效果是短期而瞬时的。

[0321] 表 13. 对照多聚 dG (5' -TCCTGGCGGGGAAGT-3' (SEQ ID NO 49)) 体内抑制 IMO 3 诱导的 IL-12 (ng/ml $\pm$ SD), C57BL/6 小鼠 (n = 3)

[0322]

仅IMO (0.25 mg/kg)	仅IRO (10 mg/kg)	对照+IMO		
		施用对照之后施用IMO的时间		
		3小时	6小时	24小时
18.24 $\pm$ 0.22	1.2 $\pm$ 0	0.81 $\pm$ 0.06	10.1 $\pm$ 0.09	19.02 $\pm$ 1.6

[0323] 一种已知显示 TLR9 拮抗剂活性的多聚 dG 化合物抑制了在施用 IRO 长达 6 小时后注射的所 IMO 诱导的 IL-12 产生。与 IRO 的数据比较 (例如表 7 中的 IR05), 对照多聚 dG 寡聚物拮抗效应是短期而瞬时的。

[0324] 表 14. IRO 5 体内抑制 R848 (一种 TLR7 及 TLR8 激动剂) 诱导的 IL-12 (ng/ml $\pm$ SD), C57BL/6 小鼠 (n = 3)

[0325]

仅R848	仅IRO	IRO+R848
(0.5 mg/kg)	(2 mg/kg)	施用IRO之后施用R848的时间
		1小时
128 $\pm$ 2.9	1.48 $\pm$ 0.17	56.0 $\pm$ 3.3

[0326] IRO 5 对 IRO 施用后长达 1 小时内注射的所 R848 诱导的 IL-12 产生显示出低度的瞬时抑制作用。更概括而言, 这些数据说明 IRO 能够抑制胞内 TLR 的活性。

[0327] 表 15. IRO 5 体内抑制 PolyI:PolyC (一种 TLR3 激动剂) 诱导的 IL-12 (ng/ml $\pm$ SD), C57BL/6 小鼠 (n = 3)

[0328]

仅PolyI:PolyC	仅IRO	IRO+PolyI:PolyC
(10 mg/kg)	(2 mg/kg)	施用IRO之后施用PolyI:PolyC的时间
		1小时
8.7 $\pm$ 0.6	1.48 $\pm$ 0.17	2.1 $\pm$ 0.07

[0329] IRO 5 对施用 IRO 后长达 1 小时内注射的 PolyI. PolyC 所诱导的 IL-12 产生显示出低度的瞬时抑制作用。更概括而言, 这些数据说明 IRO 能够抑制 TLR 活化和 PolyI. PolyC 诱导的 IL-12 产生。

[0330] 表 16. IRO 5 体内抑制 IMO 诱导的 MCP-1 (ng/ml $\pm$ SD), C57BL/6 小鼠 (n = 3)

[0331]

仅IMO	仅IRO	IRO+IMO
(0.25 mg/kg)	(2 mg/kg)	施用IRO之后施用R848的时间
		1小时
2.2 $\pm$ 0.25	NT	0.28 $\pm$ 0.73

[0332] IRO 5 对 IRO 施用后长达 1 小时内注射的 IMO 所诱导的 MCP-1 产生显示出强力的抑制作用。更概括而言, 这些数据说明 IRO 能够抑制 TLR 活化和 IMO 诱导的 MCP-1 产生。

[0333] 表 17. IRO 5 体内抑制 R848 (一种 TLR7 和 TLR8 激动剂) 诱导的 MCP-1 (ng/ml $\pm$ SD), C57BL/6 小鼠 (n = 3)

[0334]

仅R848 (0.5 mg/kg)	仅IRO (2 mg/kg)	IRO+R848 施用IRO之后施用R848的时间 1小时
11±1.4		7.2±1.7

[0335] IRO 5 对 IRO 施用后长达 1 小时内注射的 R848 所诱导的 MCP-1 产生显示出低度的瞬时抑制作用。更概括而言,这些数据说明 IRO 能够抑制 TLR 活化和经由胞内 TLR 的 MCP-1 产生。

[0336] 表 18. IRO 5 体内抑制 PolyI:PolyC(一种 TLR3 激动剂)诱导的 MCP-1 (ng/ml ± SD), C57BL/6 小鼠 (n = 3)

[0337]

仅 PolyI:PolyC (10 mg/kg)	仅IRO (2 mg/kg)	IRO+PolyI:PolyC 施用IRO之后施用PolyI:PolyC的时间 1小时
4.6±0.6		1.8.0±0.57

[0339] IRO 5 对施用 IRO 后长达 1 小时内注射的 PolyI. PolyC 所诱导的 MCP-1 产生显示出低度的瞬时抑制作用。更概括而言,这些数据说明 IRO 能够抑制 PolyI. PolyC 的 TLR 活化和 MCP-1 产生。

[0340] 表 19. IRO 5 体内抑制 IMO 3 诱导的 IL-12 (ng/ml ± SD), C57BL/6 小鼠 (n = 3)

[0341]

仅IMO (0.25 mg/kg)	仅IRO (20 mg/kg)	IRO+IMO 施用IRO之后施用IMO的时间 2天	5天	7天
33.2±8.7	NT	14.5±5.17	17.19±11.2	28.0±7.75

[0342] IRO 5 对 IRO 施用后长达 7 天内注射的 IMO 所诱导的 IL-12 产生显示出强力的抑制作用。更概括而言,这些数据说明 IRO 能够在哺乳动物体内抑制 TLR 活化和 IMO 诱导的 IL-12 产生。

[0343] 表 20. IRO 5 体内抑制 IMO 诱导的 IL-12 (ng/ml ± SD), C57BL/6 小鼠 (n = 3)

[0344]

仅IMO (0.25 mg/kg)	仅IRO (10 mg/kg)	IRO+IMO 施用IRO之后施用IMO的时间 72小时
53.39±2.71	2.03±2.03	28.72±0.79

[0345] IRO 5 对 IRO 施用后长达 72 小时内注射的 IMO 所诱导的 IL-12 产生显示出强力的

抑制作用。更概括而言,这些数据说明在施用 IRO 数小时后,IRO 能够在哺乳动物体内抑制 TLR 活化和 IMO 诱导的 IL-12 产生。

[0346] 表 21. IRO 5 体内抑制 R848(一种 TLR7 和 TLR8 激动剂)诱导的 IL-12($\text{ng/ml} \pm \text{SD}$), C57BL/6 小鼠 ($n = 3$)

[0347]

仅R848 (0.125 mg/kg)	仅IRO (10 mg/kg)	IRO+R848 施用IRO之后施用R848的时间 72小时
96.5 $\pm$ 3.4	2.03 $\pm$ 2.03	13.64 $\pm$ 0.47

[0348] IRO 5 对 IRO 施用后长达 72 小时内注射的 R848 所诱导的 IL-12 产生显示出抑制作用。更概括而言,这些数据说明在施用 IRO 数小时后,IRO 能够在哺乳动物体内抑制胞内 TLR 的激动剂的活性和 TLR 激动剂诱导的 IL-12 产生。

[0349] 表 22. IRO 5 体内抑制 PolyI.PolyC(一种 TLR3 激动剂)诱导的 IL-12($\text{ng/ml} \pm \text{SD}$), C57BL/6 小鼠 ($n = 3$)

[0350]

仅 PolyI:PolyC (10 mg/kg)	仅IRO (10 mg/kg)	IRO+PolyI:PolyC 施用IRO之后施用PolyI:PolyC的时间 72小时
28.42 $\pm$ 1.2	2.03 $\pm$ 2.03	26.61 $\pm$ 5.97

[0351] IRO 5 对 IRO 施用后 72 小时注射的 PolyI.PolyC 所诱导的 IL-12 产生没有显示抑制作用。

[0352] 实施例 13

[0353] IRO 针对 TLR 激动剂的短期和长期阻断活性

[0354] 为了评估 IRO 化合物的短期活性和选择性,在小鼠左肋皮下施用 TLR 激动剂之前 1 小时 (-1h),在小鼠右肋皮下注射 2mg/kg IRO。在 TLR 激动剂施用之后 2 小时取得血清样品,并且使用从 Biosource(Camarillo, CA)获得的多细胞因子/趋化因子检测 Luminex 试剂盒分析。遵循制造商建议的方案。根据落在用 Luminex 100 仪测定的标准曲线上的平均值求得细胞因子/趋化因子值。使用 STarStation 软件 (Applied Cytometry Systems, Sacramento, CA) 进行 Luminex 分析。以所示的剂量使用以下代表性激动剂:5'-TCTGACG₁TTCT-X-TCTTG₁CAGTCT-5' (TLR9 激动剂;0.25mg/kg, G₁=7-脱氮-dG), R848 (TLR7/8 激动剂,0.1mg/kg),洛索立宾 (Loxoribine) (TLR7 激动剂,100mg/kg),鞭毛蛋白 (TLR5 激动剂,0.25mg/kg), LPS (TLR4 激动剂,0.25mg/kg), PolyI.PolyC (TLR3 激动剂,20mg/kg) 和 MALP-2 (TLR2 激动剂,0.5mg/kg)。结果示于图 10-12。这些结果说明 IRO 能够抑制响应于 TLR 激动剂的细胞因子/趋化因子产生。与胞外 TLR 相比(例如 TLR2、TLR4 和 TLR5),对于胞内 TLR(例如 TLR3、TLR7、TLR8 和 TLR9)效果更强。

[0355] 为了评估 IRO 化合物的长期活性和选择性,在小鼠左肋皮下施用 TLR 激动剂(如上所述)之前 72 小时 (-72h),在小鼠右肋皮下注射 10mg/kg 的 IRO。在 TLR 激动剂施用之

后 2 小时取得血清样品,并且如上所述分析。结果示于图 13-15。这些结果说明预施用 IRO 能够抑制 TLR 激动剂,并且即使在施用激动剂之前 72 小时施用的情况下,IRO 的抑制活性也是有效的。

[0356] 实施例 14

[0357] 狼疮小鼠模型中 IRO 化合物的活性

[0358] 将来自野生型 (BALB/c) 和狼疮易发性 (MRL-lpr) 小鼠的纯化小鼠脾 B 细胞与 $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ IRO-17 在存在或不存在 $0.3\text{ }\mu\text{g/ml}$ IMO 或 $0.3\text{ }\mu\text{g/ml}$ IMO 或仅培养基的条件下培养 72 小时。结果示于图 16。这些结果说明 IRO 的施用能够抑制 B 淋巴细胞增殖。

[0359] 将来自野生型 (BALB/c) 和狼疮易发性 (MRL-lpr) 小鼠的纯化小鼠脾 B 细胞与 $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ IRO-17 在存在或不存在 $0.3\text{ }\mu\text{g/ml}$ IMO 或 $0.3\text{ }\mu\text{g/ml}$ IMO 或仅培养基的条件下培养 72 小时。结果示于图 17A。这些结果说明 IRO 的施用能够抑制小鼠 B 淋巴细胞产生 IL-6。将来自野生型 (BALB/c) 和狼疮易发性 (NZBW) 小鼠的纯化小鼠脾 B 细胞在 $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ IMO 存在下与 0.01 至 $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ IRO-17,或者仅与 $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ IRO-17、 $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ IMO 或培养基培养 72 小时。结果示于图 17B 和 17C。这些结果说明 IRO 的施用能够抑制小鼠脾细胞产生 IL-6 和 IL-12。

[0360] 向狼疮易发性 MRL-lpr 小鼠皮下注射 IRO-5,从第 9 至第 18 周和第 21 至 23 周每周一次 $100\text{ }\mu\text{g}$ 剂量;或者皮下注射 IRO-17,从第 10 至 15 周每周一次 $100\text{ }\mu\text{g}$ 剂量,第 18-21 周每周 $100\text{ }\mu\text{g}$ 三次,第 22-24 周每周 40mg 三次。每周在 IRO 注射之前收集血和尿。在第 24 周处死小鼠。用 ELISA 测定血清抗 DNA IgG1 水平。结果示于图 18A 至 18E。这些结果说明 IRO5 和 IRO17 能够抑制狼疮易发性小鼠中的 IgG1 和 IgG2A 产生和尿蛋白。

[0361] 从第 6 周开始每两周一次用 $300\text{ }\mu\text{g}$ IRO-5 的剂量对狼疮易发性 NZBW 小鼠定量给药。在第 16 和 20 周测定血清抗 DNA IgG2a 水平。结果示于图 19。这些结果说明 IRO 的施用抑制 NZBW 小鼠中的血清抗 DNA IgG2a。

序列表

序列表

<110> 艾德拉药物股份有限公司 (Idera Pharmaceuticals, Inc.)

KANDIMALLA, EKAMBAR R.

WANG, DAQING

LI, YUKUI

YU, DONG

ZHU, FUGANG

BHAGAT, LAKSHMI

AGRAWAL, SUDHIR

<120> 基于变异应答调制 Toll 样受体的免疫调节寡核苷酸 (IRO) 化合物

<130> IDR-036PC

<140> PCT/US06/039954

<141> 2006-10-12

<150> 60/825, 440

<151> 2006-09-13

<150> 60/784, 243

<151> 2006-03-21

<150> 60/726, 034

<151> 2005-10-12

<160> 101

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 : 合成寡核苷酸

<400> 1

ctatctgacg ttctctgt

18

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 : 合成寡核苷酸

<400> 2

ctatctgtcg ttctctgt

18

<210>3	
<211>11	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222> (7)	
<223>7- 脱氮 -G	
<400>3	
tctgacnttc t	11
<210>4	
<211>18	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸	
<400>4	
ctatctcacc ttctctgt	18
<210>5	
<211>18	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222> (7).. (8)	
<223>2' -OMe	
<400>5	
ctatctgacg ttctctgt	18
<210>6	
<211>18	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 联合 DNA/RNA 分子的描述 :	
合成寡核苷酸	

<220>	
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222> (11).. (12)	
<223> 2' -OMe	
<400>6	
ctatctgacg uuctctgt	18
<210>7	
<211>18	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222> (8)	
<223> 2' -OMe	
<400>7	
ctatctgacg ttctctgt	18
<210>8	
<211>10	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸	
<400>8	
tgaccggtca	10
<210>9	
<211>18	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 联合 DNA/RNA 分子的描述 :	
合成寡核苷酸	
<220>	
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 修饰的碱基	

<222>(8)	
<223>2' -OMe	
<400>9	
ctatctgucg ttctctgt	18
<210>10	
<211>18	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 联合 DNA/RNA 分子的描述 :	
合成寡核苷酸	
<220>	
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222>(7)..(8)	
<223>2' -OMe	
<400>10	
ctatctgucg ttctctgt	18
<210>11	
<211>11	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸	
<400>11	
tcaaccacac a	11
<210>12	
<211>15	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸	
<400>12	
tcctggcgagg gaagt	15
<210>13	
<400>13	
000	
<210>14	

<400>14
000
<210>15
<400>15
000
<210>16
<400>16
000
<210>17
<211>18
<212>DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸
<220>
<221> 修饰的碱基
<222> (7).. (8)
<223> 2' -OMe
<220>
<221> 修饰的碱基
<222> (10)
<223> 7- 脱氮 -dG
<400>17
ctatctgacn ttctctgt
<210>18
<400>18
000
<210>19
<211>18
<212>DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 联合 DNA/RNA 分子的描述 :
合成寡核苷酸
<220>
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸
<220>
<221> 修饰的碱基
<222> (7).. (8)

18

<223>2' -OMe	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222>(10)	
<223>7- 脱氮 -dG	
<400>19	
ctatctgucn ttctctgt	18
<210>20	
<400>20	
000	
<210>21	
<211>11	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸	
<400>21	
tctgacgttc t	11
<210>22	
<211>10	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸	
<400>22	
cgttctctgt	10
<210>23	
<211>11	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸	
<400>23	
acgttctctg t	11
<210>24	
<211>10	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	

<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸	
<400>24	
cgttctctgt	10
<210>25	
<211>18	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222>(9)	
<223>B-L- 脱氧核苷 -C	
<400>25	
ctatctgang ttctctgt	18
<210>26	
<211>18	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222>(10)	
<223>B-L- 脱氧核苷 -G	
<400>26	
ctatctgacn ttctctgt	18
<210>27	
<211>18	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222>(9)	
<223>B-L- 脱氧核苷 -C	
<400>27	
ctatctgtng ttctctgt	18

<210>28	
<211>18	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222>(10)	
<223>B-L- 脱氧核苷 -G	
<400>28	
ctatctgtcn ttctctgt	18
<210>29	
<211>8	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸	
<400>29	
ctatctga	8
<210>30	
<211>9	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸	
<400>30	
ctatctgac	9
<210>31	
<211>8	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸	
<400>31	
ctatctgt	8
<210>32	
<211>9	
<212>DNA	

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸	
<400>32	
ctatctgtc	9
<210>33	
<211>18	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222> (9)	
<223>3' - 脱氧 - 核苷 -C	
<400>33	
ctatctgang ttctctgt	18
<210>34	
<211>18	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222> (10)	
<223>3' - 脱氧 - 核苷 -G	
<400>34	
ctatctgacn ttctctgt	18
<210>35	
<211>18	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222> (9)	
<223>3' - 脱氧 - 核苷 -C	

<400>35	
ctatctgtng ttctctgt	18
<210>36	
<211>18	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222>(10)	
<223>3' - 脱氧 - 核苷 -G	
<400>36	
ctatctgtcn ttctctgt	18
<210>37	
<211>18	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222>(7)..(8)	
<223>2' -OMe	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222>(10)	
<223>araG	
<400>37	
ctatctgacn ttctctgt	18
<210>38	
<211>18	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 联合 DNA/RNA 分子的描述 :	
合成寡核苷酸	
<220>	
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸	

<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222> (7).. (8)	
<223> 2' -OMe	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222> (10)	
<223> araG	
<400> 38	
ctatctgucn ttctctgt	18
<210> 39	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述 : 合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222> (7).. (8)	
<223> 2' -OMe	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222> (9)	
<223> araC	
<400> 39	
ctatctgang ttctctgt	18
<210> 40	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 联合 DNA/RNA 分子的描述 :	
合成寡核苷酸	
<220>	
<223> 人工序列的描述 : 合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222> (7).. (8)	
<223> 2' -OMe	

<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222> (9)	
<223> araC	
<400> 40	
ctatctgung ttctctgt	18
<210> 41	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述 : 合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222> (7) .. (8)	
<223> 2' -OMe	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222> (9)	
<223> 5-OH-dC	
<400> 41	
ctatctgang ttctctgt	18
<210> 42	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 联合 DNA/RNA 分子的描述 :	
合成寡核苷酸	
<220>	
<223> 人工序列的描述 : 合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222> (7) .. (8)	
<223> 2' -OMe	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222> (9)	
<223> 5-OH-dC	

<400>42	
ctatctgung ttctctgt	18
<210>43	
<211>18	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222> (7).. (8)	
<223>2' -OMe	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222> (9)	
<223>1-(2' -脱氧 -beta-D- 呋喃核糖基)-2- 氧代 -7- 脱氮 -8- 甲基 - 嘌呤 -C	
<400>43	
ctatctgang ttctctgt	18
<210>44	
<211>18	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 联合 DNA/RNA 分子的描述 :	
合成寡核苷酸	
<220>	
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222> (7).. (8)	
<223>2' -OMe	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222> (9)	
<223>1-(2' -脱氧 -beta-D- 呋喃核糖基)-2- 氧代 -7- 脱氮 -8- 甲基 - 嘌呤 -C	
<400>44	
ctatctgung ttctctgt	18
<210>45	
<211>18	

<212>DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸
<220>
<221> 修饰的碱基
<222> (7).. (8)
<223> 2' -OMe
<220>
<221> 修饰的碱基
<222> (10)
<223> N1-Me-dG
<400>45
ctatctgacn ttctctgt
<210>46
<211>18
<212>DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 联合 DNA/RNA 分子的描述 :
合成寡核苷酸
<220>
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸
<220>
<221> 修饰的碱基
<222> (7).. (8)
<223> 2' -OMe
<220>
<221> 修饰的碱基
<222> (10)
<223> N1-Me-dG
<400>46
ctatctguen ttctctgt
<210>47
<211>18
<212>DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸

18

18

<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222> (7).. (8)	
<223> 2' -OMe	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222> (9)	
<223> N3-Me-dC	
<400> 47	
ctatctgang ttctctgt	18
<210> 48	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 联合 DNA/RNA 分子的描述 :	
合成寡核苷酸	
<220>	
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222> (7).. (8)	
<223> 2' -OMe	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222> (9)	
<223> N3-Me-dC	
<400> 48	
ctatctgung ttctctgt	18
<210> 49	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222> (12)	
<223> 3' -OMe	

<400>49	
ctatctagcg ttctctgt	18
<210>50	
<211>18	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222> (11)	
<223> 2' -OMe	
<400>50	
ctatctagcg ttctctgt	18
<210>51	
<211>18	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222> (11).. (12)	
<223> 2' -OMe	
<400>51	
ctatctagcg ttctctgt	18
<210>52	
<211>11	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸	
<400>52	
cctactagcg t	11
<210>53	
<211>10	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	

<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸

<400>53

cctactagcg

10

<210>54

<211>18

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (8)

<223>3' - 脱氧 - 核苷 -G

<400>54

cctactancg ttctcatc

18

<210>55

<211>19

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (7)

<223>3' -OMe-A

<400>55

tcctatgncgt tcctgatgc

19

<210>56

<211>18

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (9)

<223>B-L- 脱氧 - 核苷 -C

<220>

<221> 修饰的碱基

<222>(10)
<223>B-L- 脱氧核苷 -G
<400>56
ctatctgann ttctctgt
<210>57
<211>18
<212>DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸
<220>
<221> 修饰的碱基
<222>(1)
<223>B-L- 脱氧核苷 -C
<220>
<221> 修饰的碱基
<222>(2)
<223>B-L- 脱氧核苷 -T
<220>
<221> 修饰的碱基
<222>(3)
<223>B-L- 脱氧核苷 -A
<220>
<221> 修饰的碱基
<222>(4)
<223>B-L- 脱氧核苷 -T
<220>
<221> 修饰的碱基
<222>(5)
<223>B-L- 脱氧核苷 -C
<220>
<221> 修饰的碱基
<222>(6)
<223>B-L- 脱氧核苷 -T
<220>
<221> 修饰的碱基
<222>(7)
<223>B-L- 脱氧核苷 -G
<220>

18

<221> 修饰的碱基
<222> (8)
<223> B-L- 脱氧核苷 -A
<220>
<221> 修饰的碱基
<222> (9)
<223> B-L- 脱氧核苷 -C
<220>
<221> 修饰的碱基
<222> (10)
<223> B-L- 脱氧核苷 -G
<220>
<221> 修饰的碱基
<222> (11)
<223> B-L- 脱氧核苷 -T
<220>
<221> 修饰的碱基
<222> (12)
<223> B-L- 脱氧核苷 -T
<220>
<221> 修饰的碱基
<222> (13)
<223> B-L- 脱氧核苷 -C
<220>
<221> 修饰的碱基
<222> (14)
<223> B-L- 脱氧核苷 -T
<220>
<221> 修饰的碱基
<222> (15)
<223> B-L- 脱氧核苷 -C
<220>
<221> 修饰的碱基
<222> (16)
<223> B-L- 脱氧核苷 -T
<220>
<221> 修饰的碱基
<222> (17)
<223> B-L- 脱氧核苷 -G

<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222> (18)	
<223> B-L- 脱氧核苷 -T	
<400> 57	
nnnnnnnnnnn nnnnnnnn	18
<210> 58	
<211> 11	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述 : 合成寡核苷酸	
<400> 58	
ctatctgacg t	11
<210> 59	
<211> 10	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述 : 合成寡核苷酸	
<400> 59	
ctatctgacg	10
<210> 60	
<211> 10	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述 : 合成寡核苷酸	
<400> 60	
ctatctgacg	10
<210> 61	
<211> 11	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述 : 合成寡核苷酸	
<400> 61	
ctatctagcg t	11
<210> 62	

<211>10	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸	
<400>62	
ctatctagcg	10
<210>63	
<211>10	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸	
<400>63	
ctatctagcg	10
<210>64	
<211>18	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222> (7).. (8)	
<223>2' -OMe	
<400>64	
ctatctaacg ttctctgt	18
<210>65	
<211>18	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222> (7).. (8)	
<223>2' -OMe	
<400>65	
ctatctagcg ttctctgt	18

<210>66
<211>18
<212>DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 联合 DNA/RNA 分子的描述 :
合成寡核苷酸
<220>
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸
<220>
<221> 修饰的碱基
<222> (7).. (8)
<223> 2' -OMe
<400>66
ctatctaucg ttctctgt
<210>67
<211>18
<212>DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸
<220>
<221> 修饰的碱基
<222> (7).. (8)
<223> 2' -OMe
<220>
<221> 修饰的碱基
<222> (10)
<223> 7- 脱氮 -dG
<400>67
ctatctaacn ttctctgt
<210>68
<211>18
<212>DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸
<220>
<221> 修饰的碱基

18

18

<222>(7)..(8)	
<223>2'-OMe	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222>(10)	
<223>7- 脱氮 -dG	
<400>68	
ctatctagcn ttctctgt	18
<210>69	
<211>18	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 联合 DNA/RNA 分子的描述 :	
合成寡核苷酸	
<220>	
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222>(7)..(8)	
<223>2'-OMe	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222>(10)	
<223>7- 脱氮 -dG	
<400>69	
ctatctaucn ttctctgt	18
<210>70	
<211>11	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸	
<400>70	
ctatctagcg t	11
<210>71	
<211>10	
<212>DNA	
<213> 人工序列	

<220>	
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸	
<400>71	
ctatctagcg	10
<210>72	
<211>10	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸	
<400>72	
ctatctagcg	10
<210>73	
<211>15	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸	
<400>73	
tcctggaggg gaagt	15
<210>74	
<211>18	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222> (7)	
<223> 2' -OMe	
<400>74	
ctatctgacg ttctctgt	18
<210>75	
<211>18	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 联合 DNA/RNA 分子的描述 :	
合成寡核苷酸	

<220>	
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222> (10)	
<223> 7- 脱氮 -dG	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222> (11).. (12)	
<223> 2' -OMe	
<400> 75	
ctatctgacn uuctctgt	18
<210> 76	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222> (8)	
<223> 3' -OMe-G	
<400> 76	
cctactancg ttctcatc	18
<210> 77	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 联合 DNA/RNA 分子的描述 : 合成寡核苷酸	
<220>	
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222> (10)	
<223> 3' -OMe-U	
<400> 77	
tcctatgacgn tcctgatgc	19

<210>78	
<211>10	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸	
<400>78	
cgttctctgt	10
<210>79	
<211>11	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸	
<400>79	
acgttctctg t	11
<210>80	
<211>18	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 联合 DNA/RNA 分子的描述 :	
合成寡核苷酸	
<220>	
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222> (7)	
<223>dU	
<400>80	
ctatctnacg ttctctgt	18
<210>81	
<211>18	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 联合 DNA/RNA 分子的描述 :	
合成寡核苷酸	
<220>	

<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222> (8)	
<223>dU	
<400>81	
ctatctgncg ttctctgt	18
<210>82	
<211>10	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸	
<400>82	
ctatctgacg	10
<210>83	
<211>11	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸	
<400>83	
ctatctgacg t	11
<210>84	
<211>10	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸	
<400>84	
cgttctctgt	10
<210>85	
<211>11	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸	
<400>85	
acgttctctg t	11

<210>86
<211>11
<212>DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸
<220>
<221> 修饰的碱基
<222>(4).. (5)
<223>2' -OMe
<400>86
tctgacgttc t
<210>87
<211>11
<212>DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸
<220>
<221> 修饰的碱基
<222>(4).. (5)
<223>2' -OMe
<220>
<221> 修饰的碱基
<222>(7)
<223>7- 脱氮 -dG
<400>87
tctgacnttc t
<210>88
<211>11
<212>DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸
<220>
<221> 修饰的碱基
<222>(4).. (5)
<223>2' -OMe
<220>

11

11

<221> 修饰的碱基	
<222> (7)	
<223> araG	
<400> 88	
tctgacnttc t	11
<210> 89	
<211> 11	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述 : 合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222> (6) .. (7)	
<223> 2' -OMe	
<400> 89	
tctctgacgt t	11
<210> 90	
<211> 11	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述 : 合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222> (4) .. (5)	
<223> 2' -OMe	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222> (7)	
<223> 7- 脱氮 -dG	
<400> 90	
tctgacnttc t	11
<210> 91	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 联合 DNA/RNA 分子的描述 :	

合成寡核苷酸

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (11).. (12)

<223> 2' -OMe

<400>91

ctatctgtcg uuctctgt

18

<210>92

<211>18

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 联合 DNA/RNA 分子的描述 :

合成寡核苷酸

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (10)

<223> 7- 脱氮 -dG

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (11).. (12)

<223> 2' -OMe

<400>92

ctatctgtcn uuctctgt

18

<210>93

<211>11

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 联合 DNA/RNA 分子的描述 :

合成寡核苷酸

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222>(4)..(5)	
<223>2' -OMe	
<400>93	
tctgucgttc t	11
<210>94	
<211>11	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 联合 DNA/RNA 分子的描述 :	
合成寡核苷酸	
<220>	
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222>(4)..(5)	
<223>2' -OMe	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222>(7)	
<223>7- 脱氮 -dG	
<400>94	
tctgucnttc t	11
<210>95	
<211>11	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222>(4)..(5)	
<223>2' -OMe	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222>(7)	
<223>araG	
<400>95	
tctgacnttc t	11

<210>96
<211>9
<212>DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸
<220>
<221> 修饰的碱基
<222>(4).. (5)
<223>2' -OMe
<220>
<221> 修饰的碱基
<222>(7)
<223>7- 脱氮 -dG
<400>96
tctgacntt
<210>97
<211>11
<212>DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸
<220>
<221> 修饰的碱基
<222>(4).. (5)
<223>2' -OMe
<220>
<221> 修饰的碱基
<222>(7)
<223>7- 脱氮 -dG
<400>97
tctgacnttc t
<210>98
<211>18
<212>DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 联合 DNA/RNA 分子的描述 :
合成寡核苷酸

9

11

<220>
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸

<220>
<221> 修饰的碱基
<222> (7).. (8)

<223> 2' -OMe

<220>
<221> 修饰的碱基
<222> (10)

<223> 7- 脱氮 -dG

<220>
<221> 修饰的碱基
<222> (15).. (18)

<223> 2' -OMe

<400>98

ctatctgacn ttctcugu

18

<210>99

<211>18

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 联合 DNA/RNA 分子的描述 :
合成寡核苷酸

<220>
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸

<220>
<221> 修饰的碱基
<222> (7).. (8)

<223> 2' -OMe

<220>
<221> 修饰的碱基
<222> (10)

<223> 7- 脱氮 -dG

<220>
<221> 修饰的碱基
<222> (15).. (18)

<223> 2' -OMe

<400>99

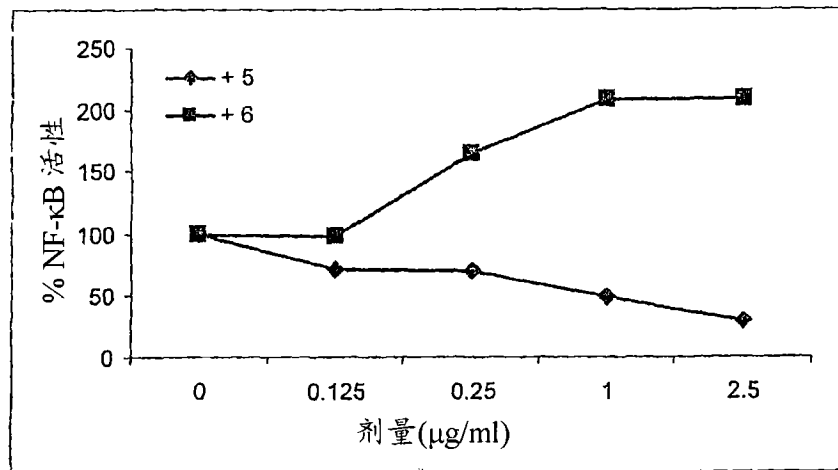
ctatctguen ttctcugu

18

<210>100
<211>9
<212>DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 联合 DNA/RNA 分子的描述 :
合成寡核苷酸
<220>
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸
<220>
<221> 修饰的碱基
<222>(1).. (3)
<223>2' -OMe
<220>
<221> 修饰的碱基
<222>(5)
<223>7- 脱氮 -dG
<400>100
ugucnttct
<210>101
<211>9
<212>DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 联合 DNA/RNA 分子的描述 :
合成寡核苷酸
<220>
<223> 人工序列的描述 :合成寡核苷酸
<220>
<221> 修饰的碱基
<222>(1).. (3)
<223>2' -OMe
<220>
<221> 修饰的碱基
<222>(5)
<223>7- 脱氮 -dG
<400>101
ugacnttct

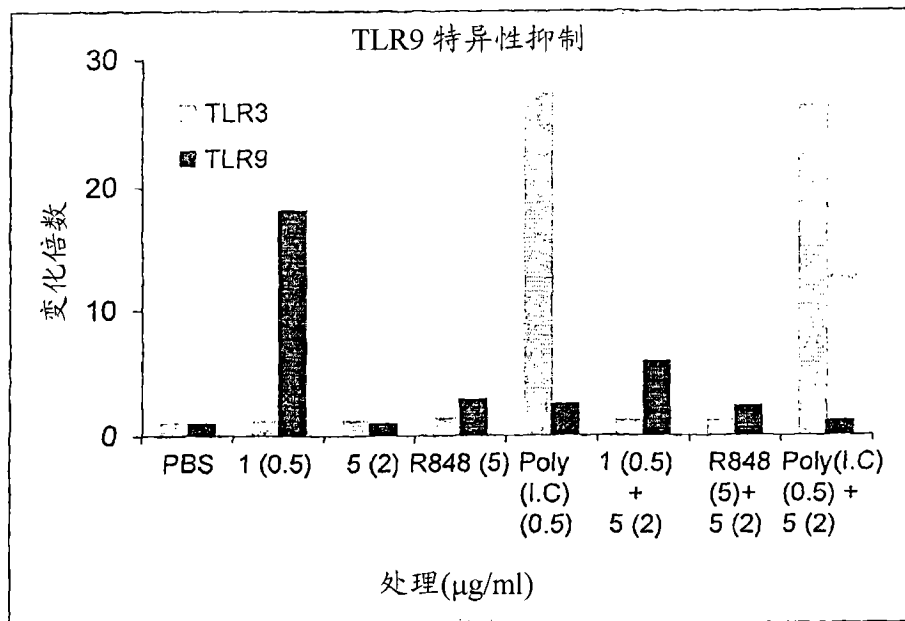
9

9



1 5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
 5 5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
 6 5'-CTATCTGACGUUCTCTGT-3'
 粗体显示的核苷酸是 2'-O-甲基核糖核苷酸

图 1



1 5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
 5 5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
 粗体显示的核苷酸是 2'-O-甲基核糖核苷酸

图 2

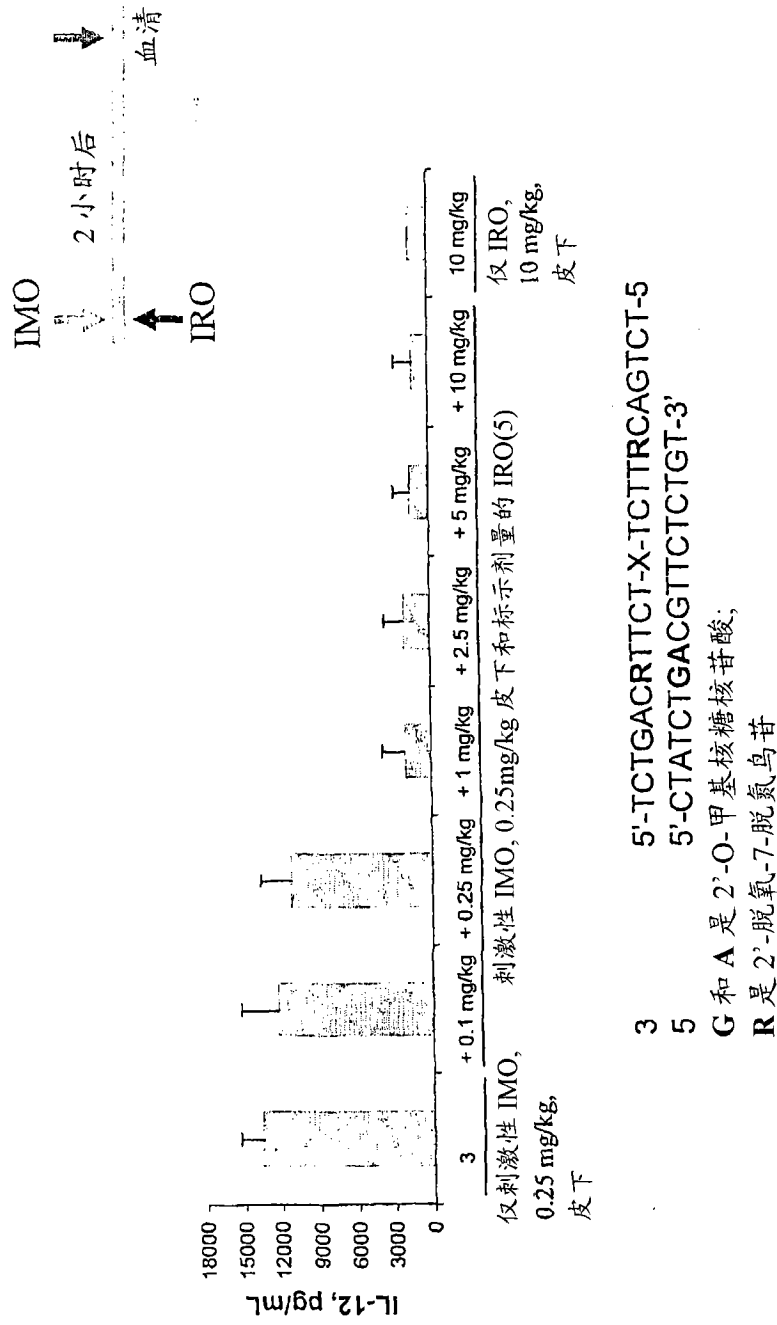


图 3

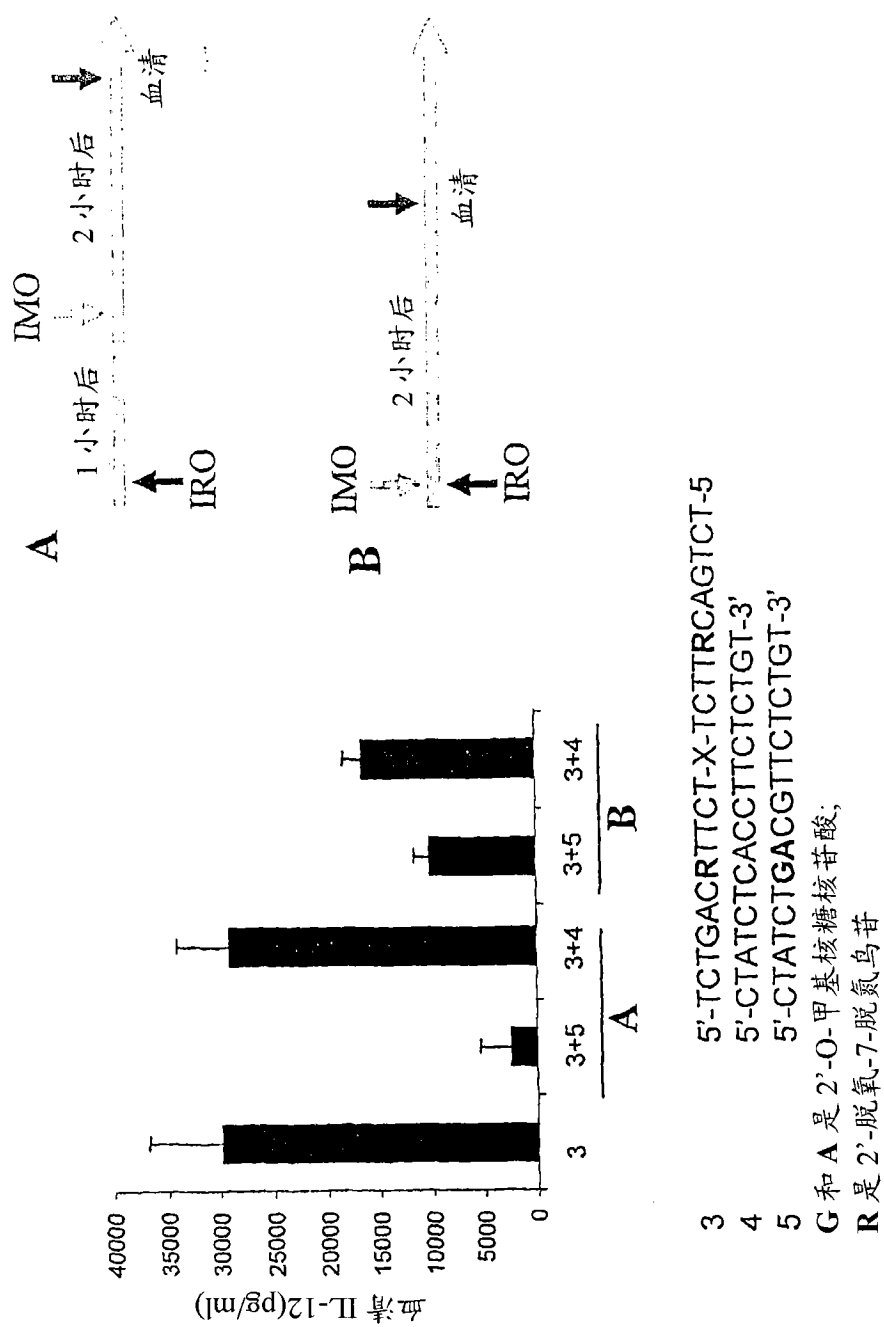


图 4A

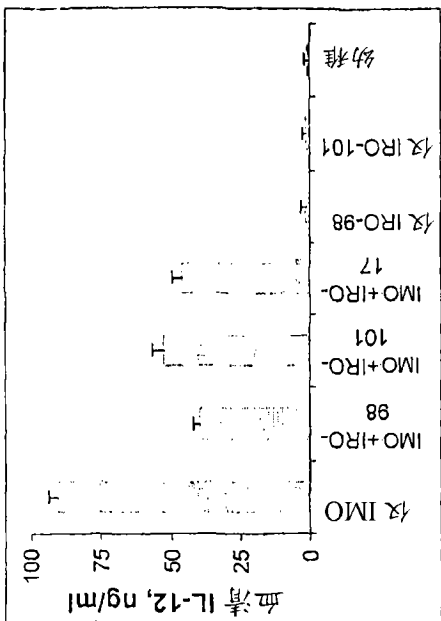


图 4C

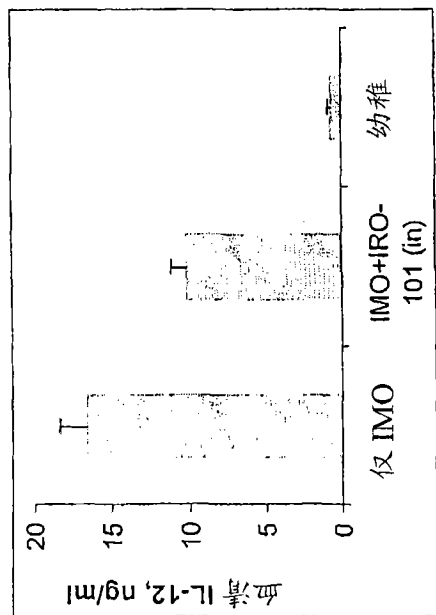


图 4B

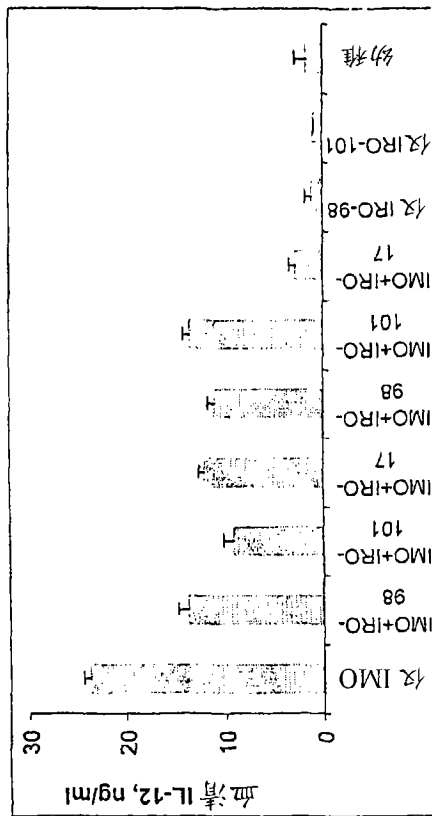
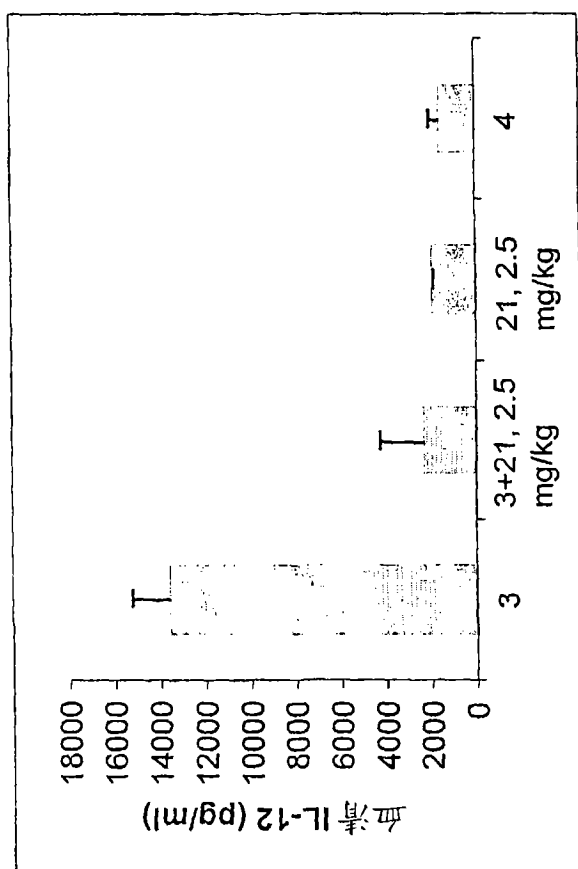
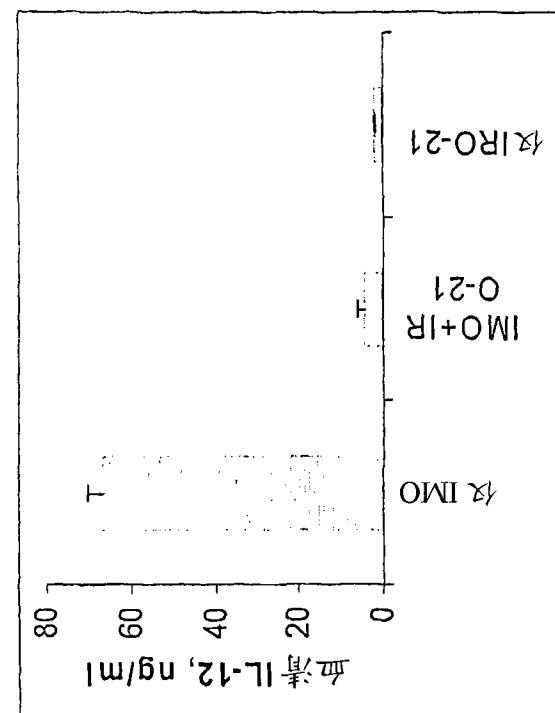


图 4D



3 5'-TCTGACRTTCT-X-TCTTRCAGTCT-5'
 21 3'-TCTTGCAGTCT-X-TCTGACGTTCT-3'
 4 5'-CTATCTCACCTTCTCTGT-3'
 G 和 A 是 2'-O-甲基核糖核苷酸;
 R 是 2'-脱氧-7-脱氮鸟苷

图 5B

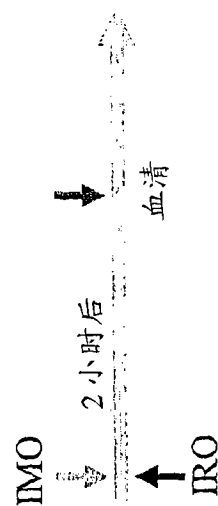
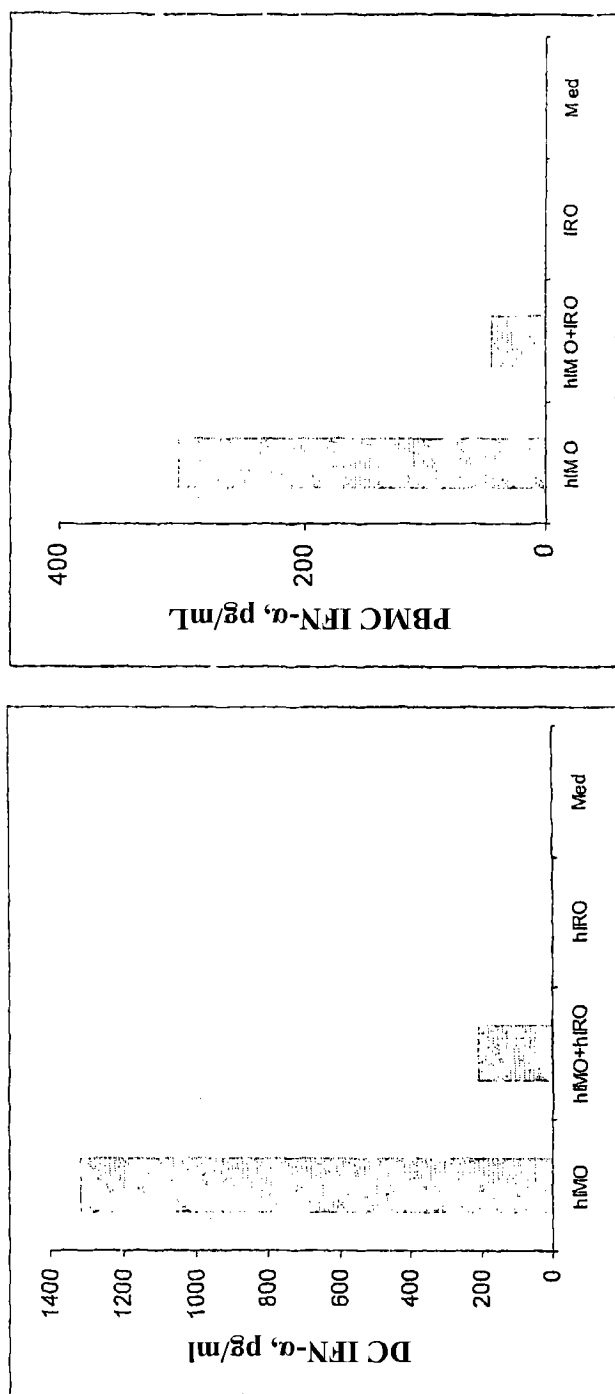


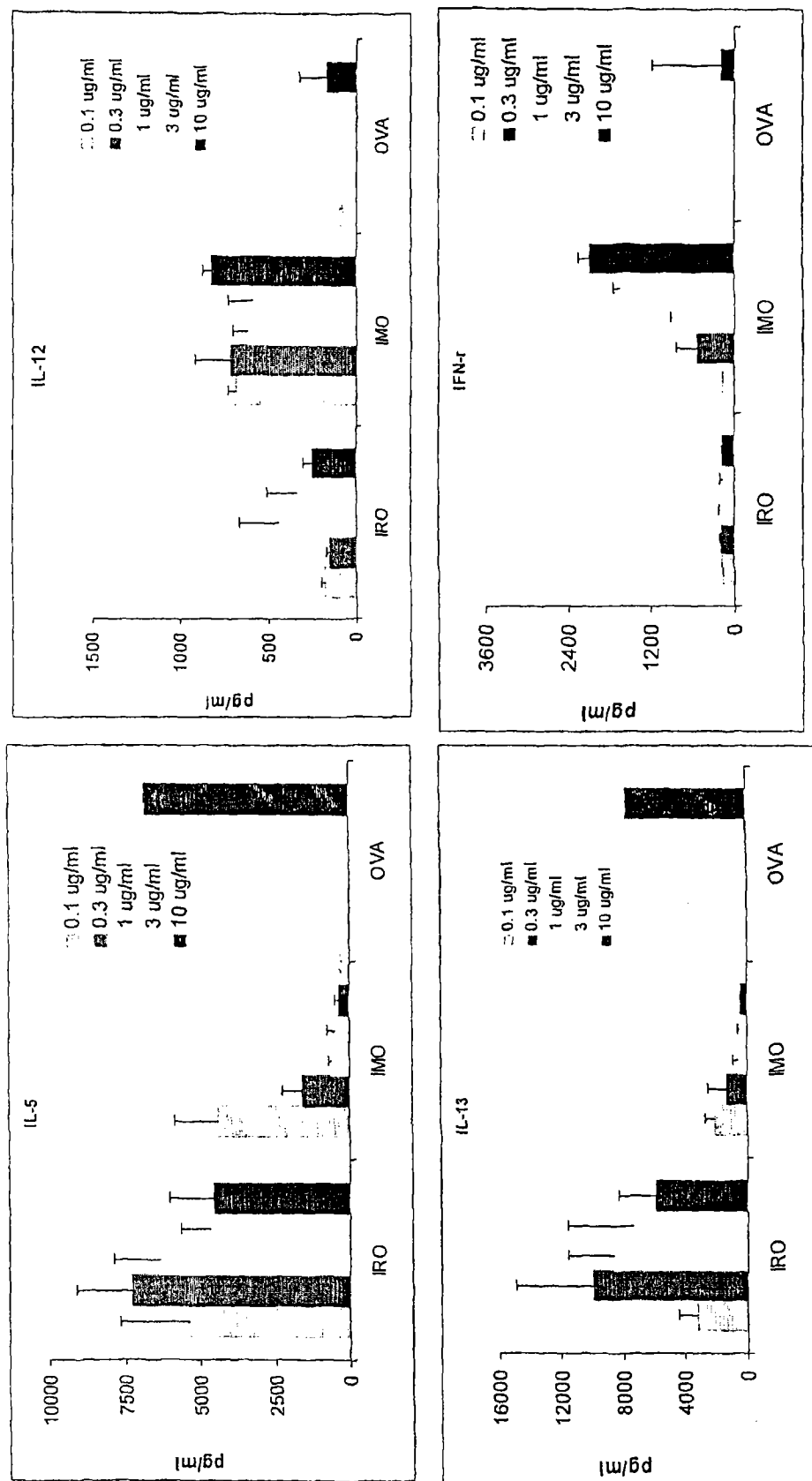
图 5A



n=7, 人 pDCs 和 PBMCs 与 10 μ g IMO 和 40 μ g IRO 温育 24 小时

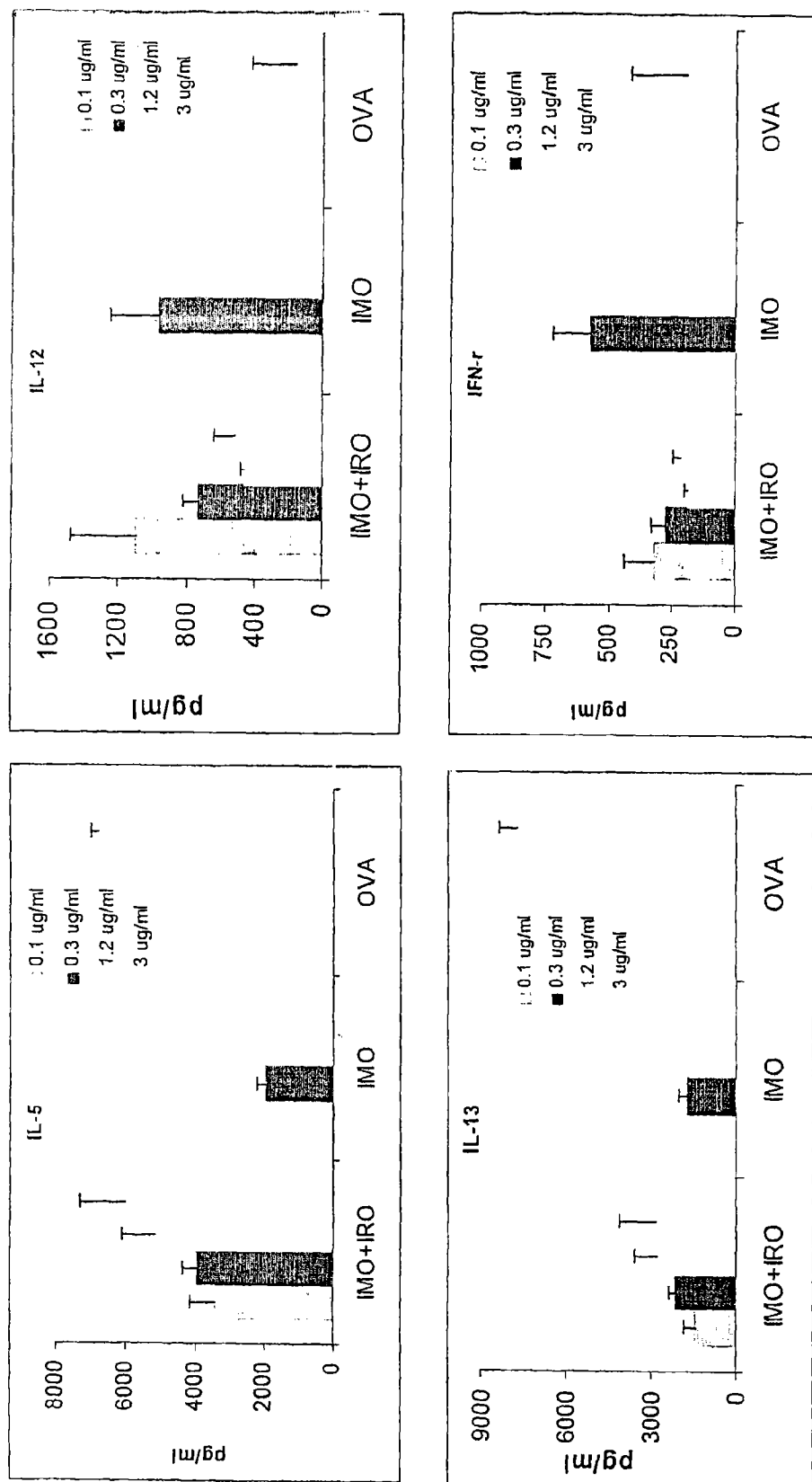
hIMO = 2 5'-CTATCTGTCGTTCTCTGT-3'
 hIRO = 10 5'-CTATCTGUCGTTCTCTGT-3'
 粗体显示的核苷酸是 2'-O-甲基核糖核苷酸

图 6



IMO = 1 5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
 IRO = 5 5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
 粗体显示的核苷酸是 2'-O-甲基核糖核苷酸

图 7



IMO = 1 5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
 IRO = 5 5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
 粗体显示的核苷酸是 2'-O-甲基核糖核苷酸

图 8

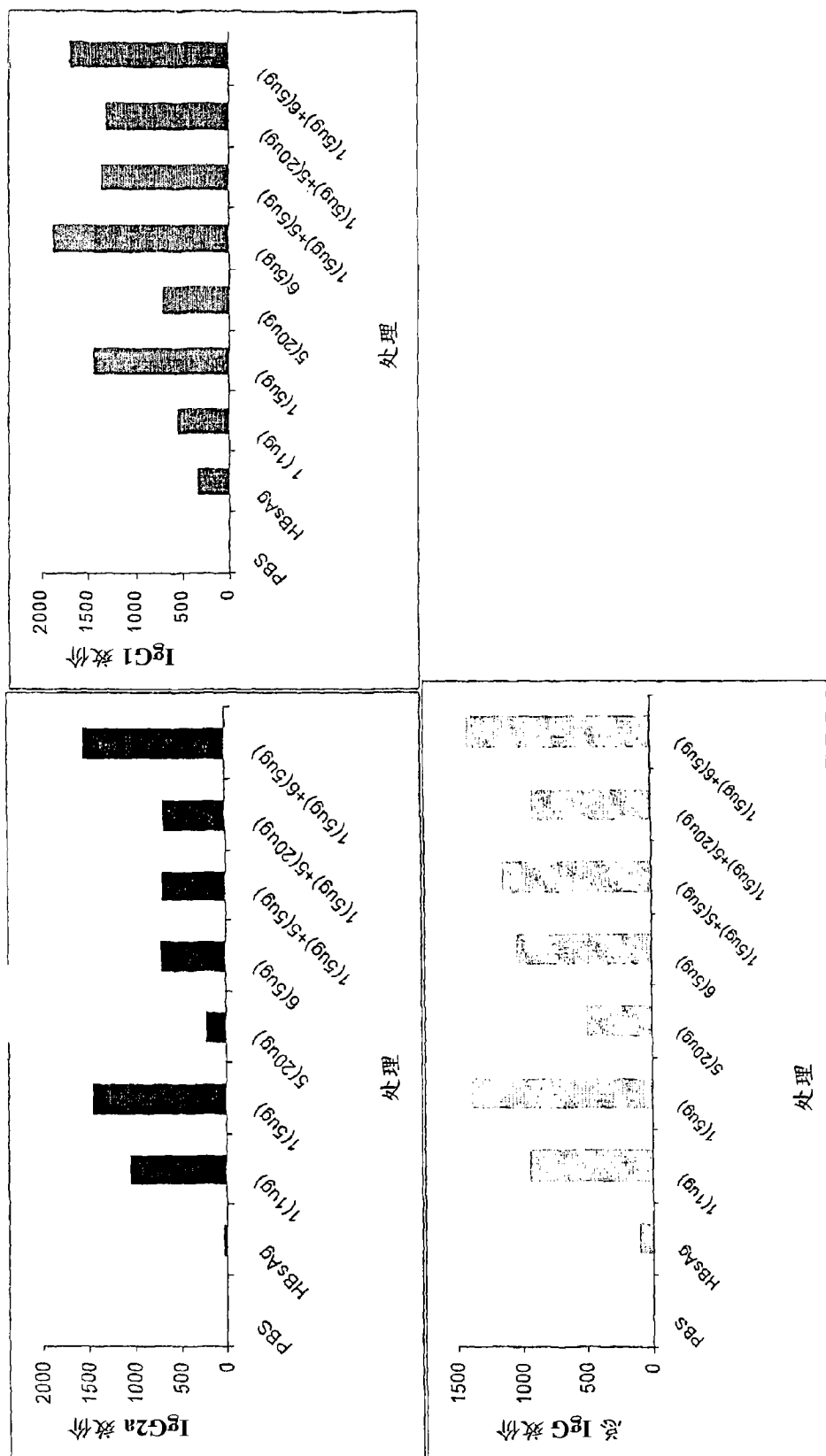


图 9

短期拮抗剂活性

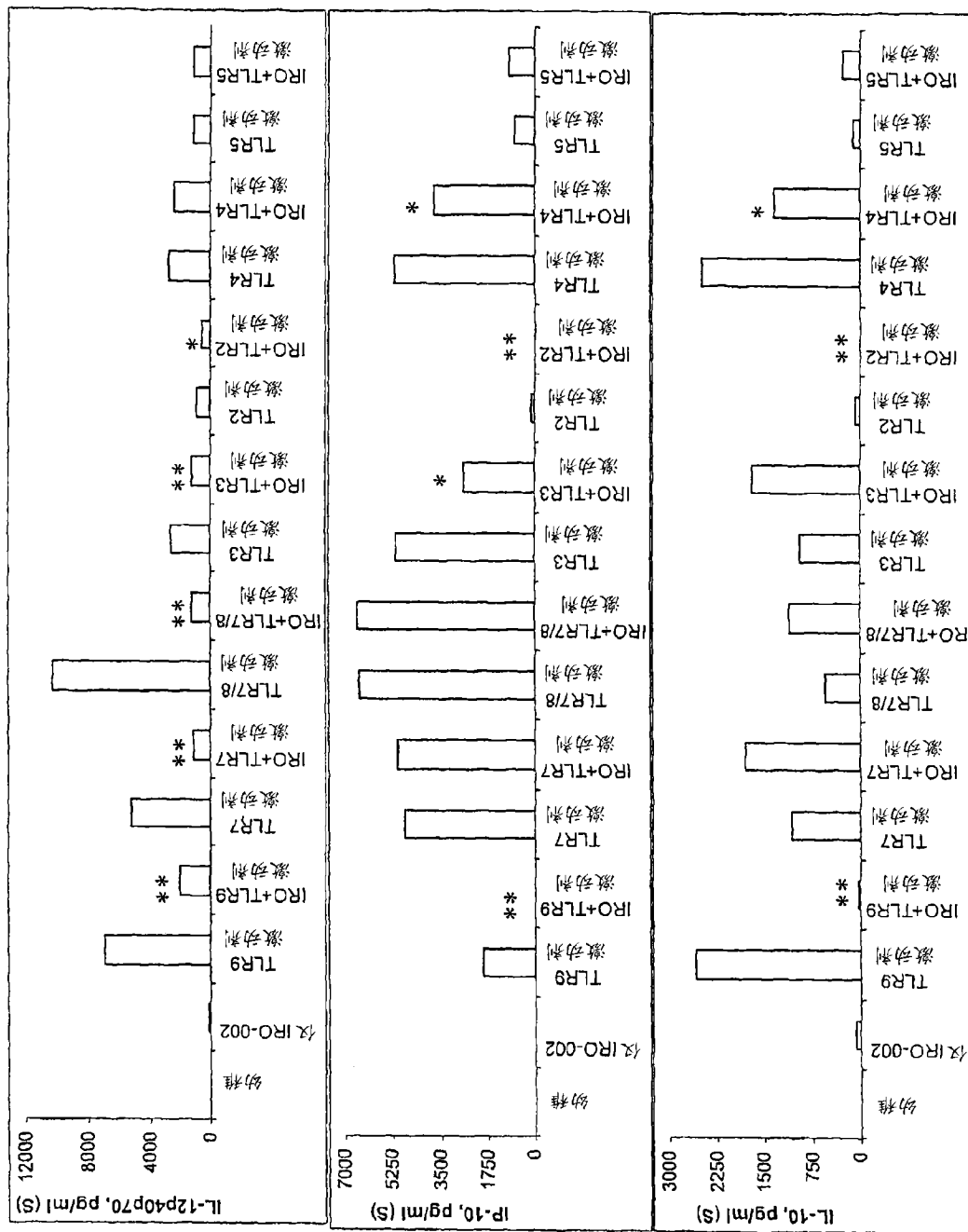


图 10

* 25-50% 抑制
** >50% 抑制

短期拮抗剂活性

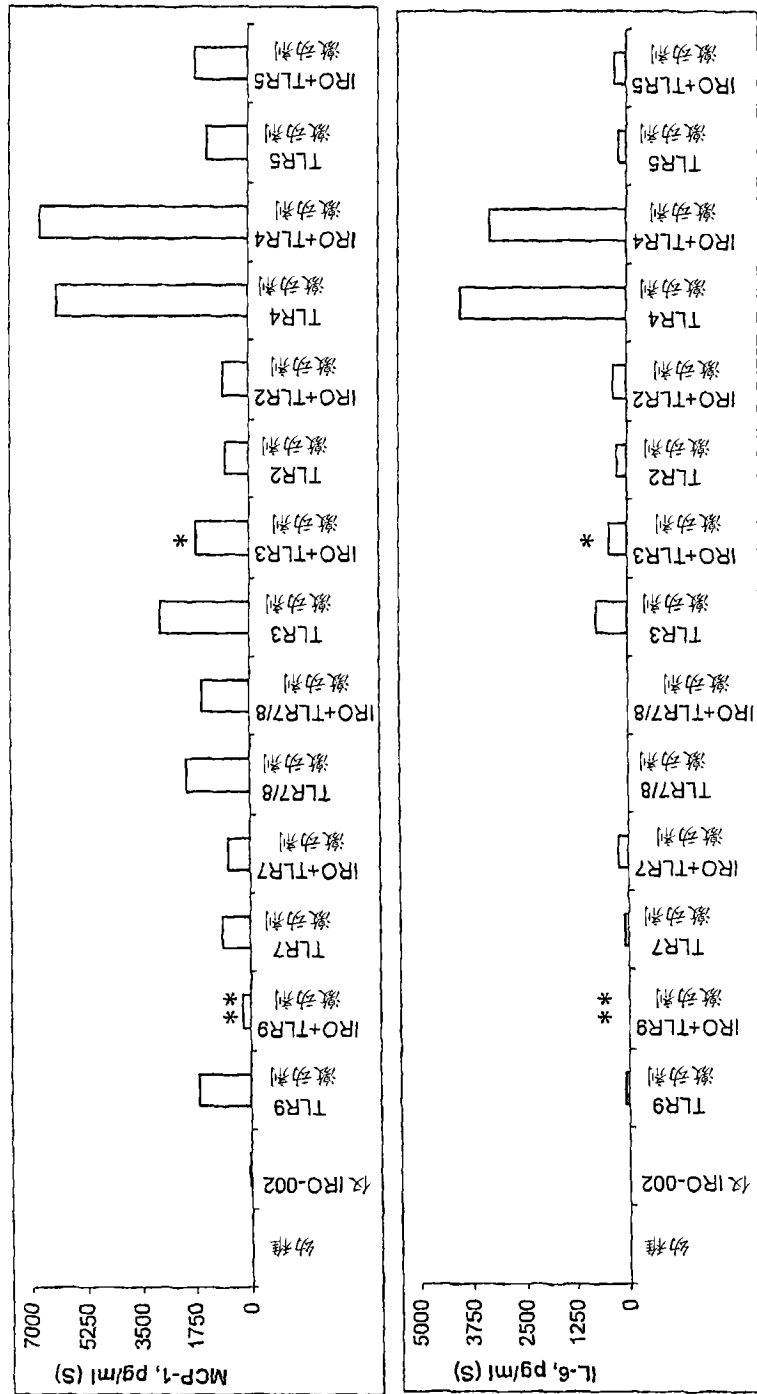


图 11

* 25-50% 抑制
** >50% 抑制

短期拮抗剂活性

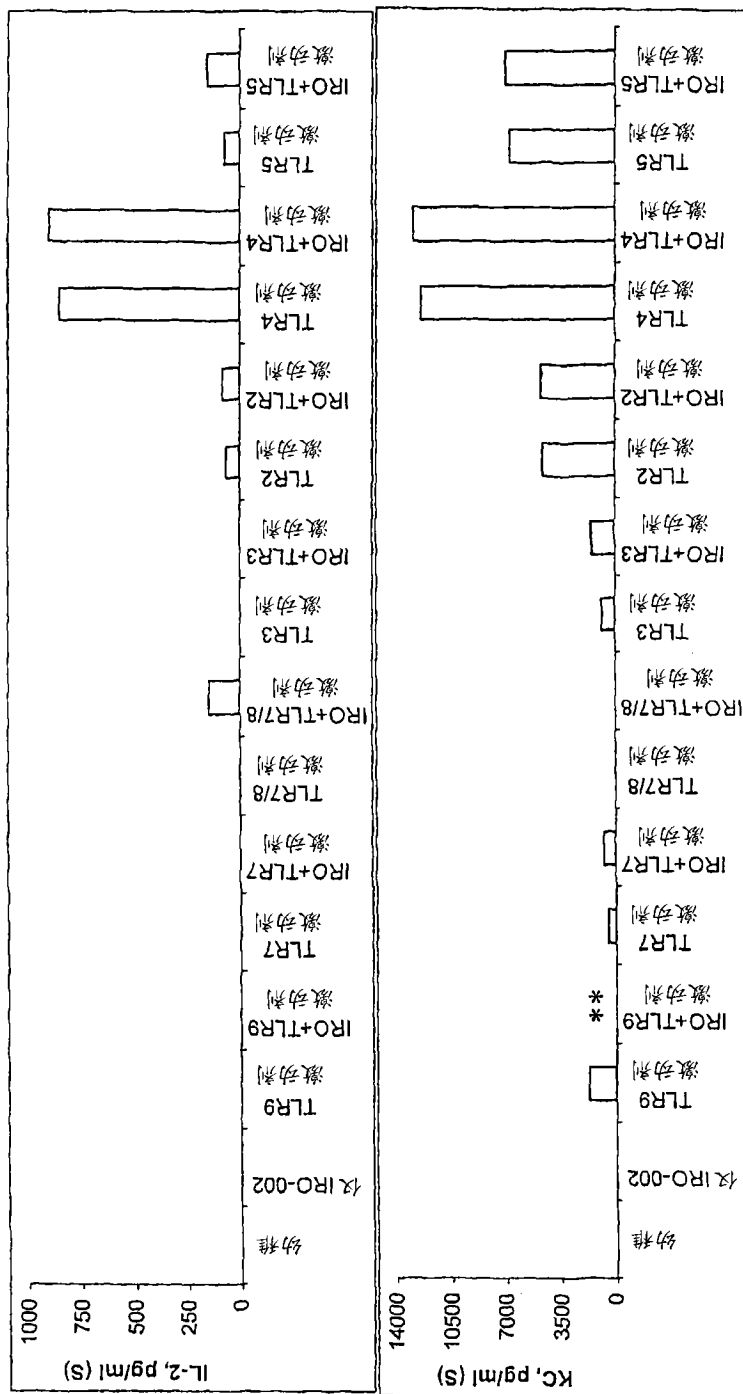


图 12

长期拮抗剂活性

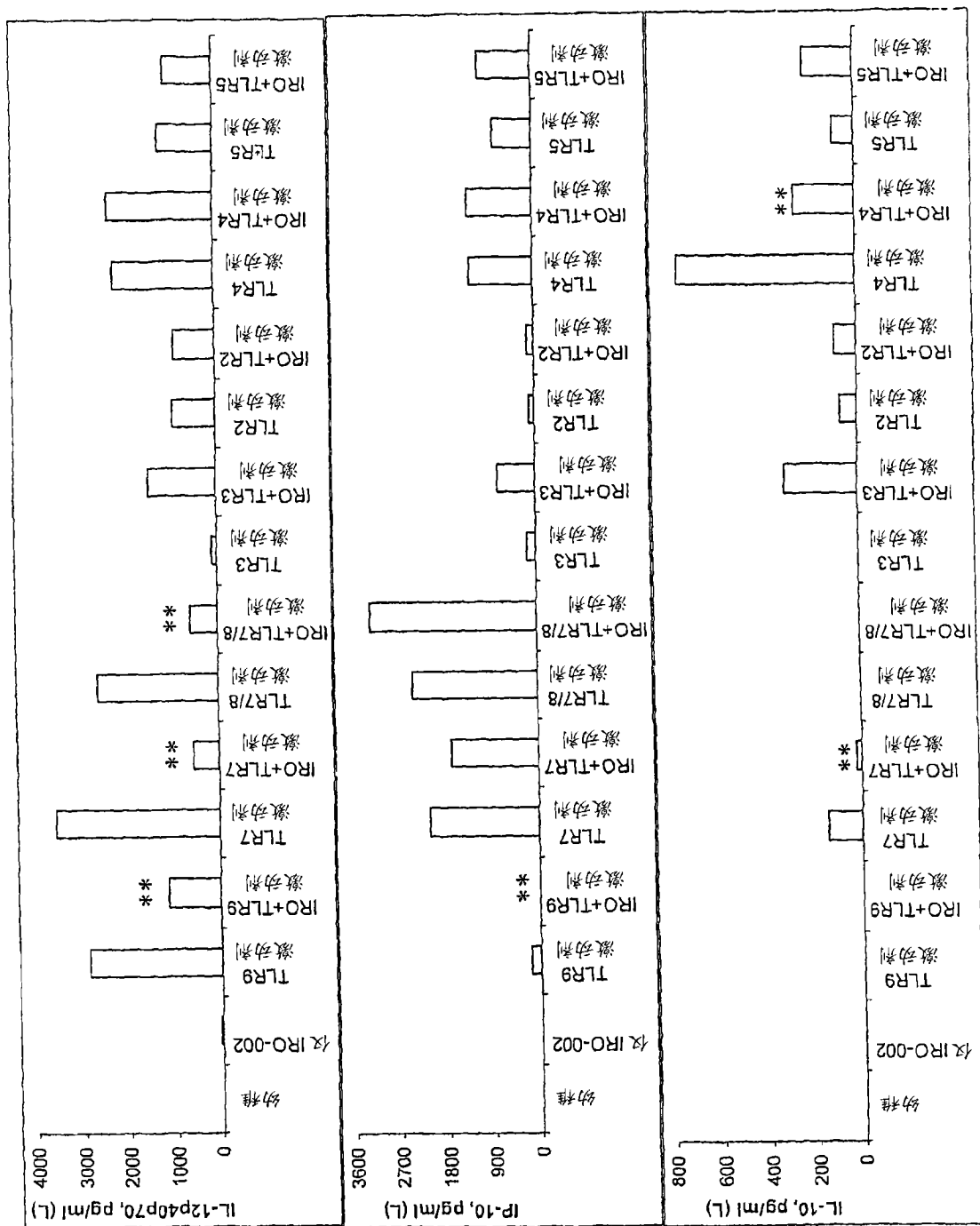
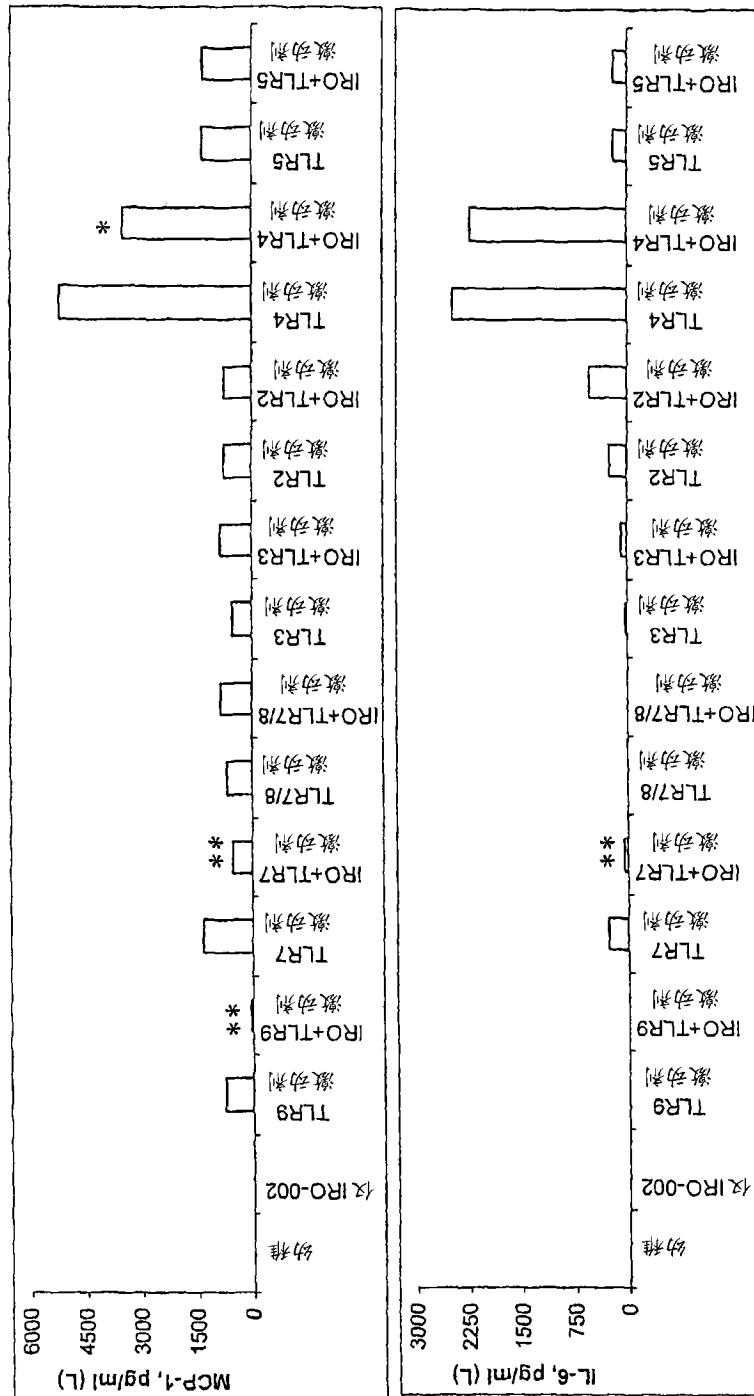


图 13

* 25-50% 抑制
** >50% 抑制

长期拮抗剂活性



* 25-50%抑制
** >50%抑制

图 14

长期拮抗剂活性

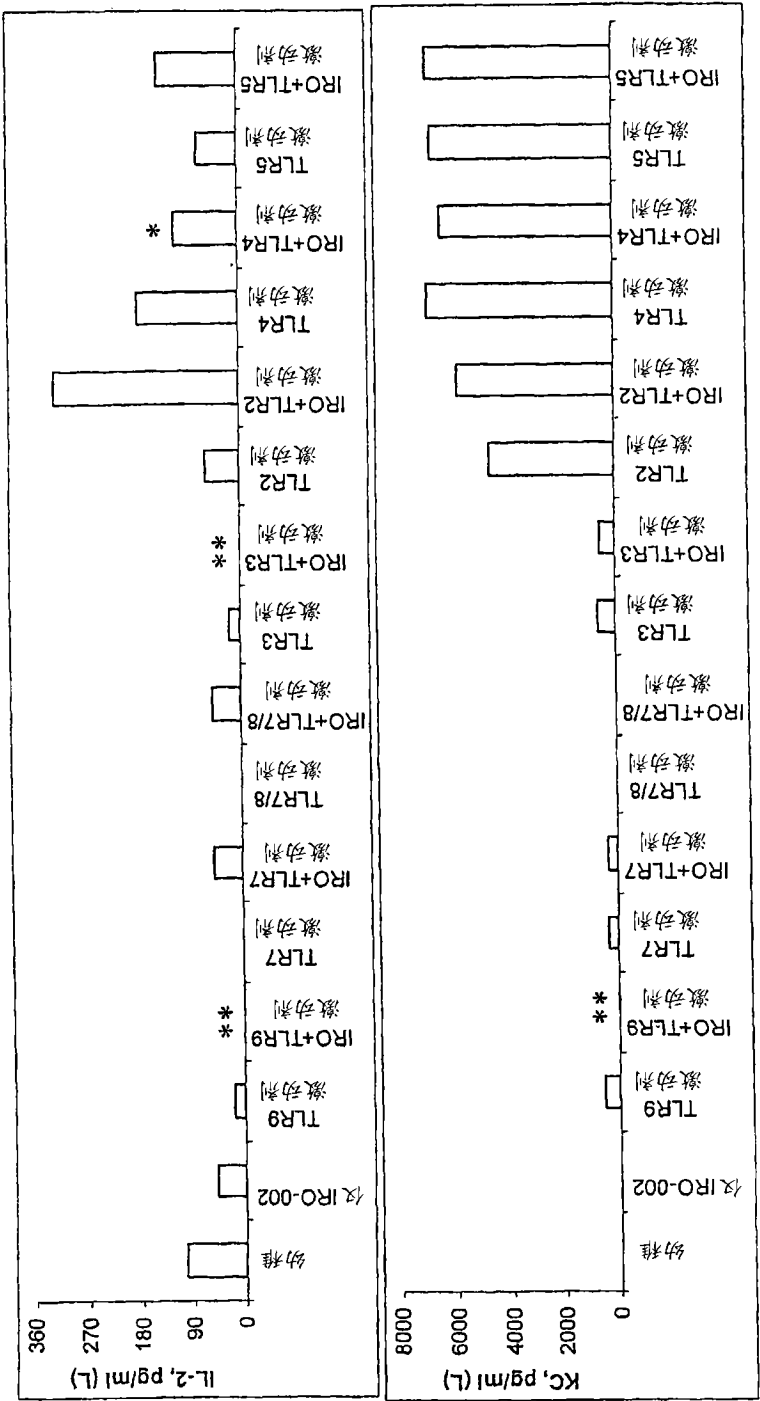


图 15

* 25-50% 抑制
** >50% 抑制

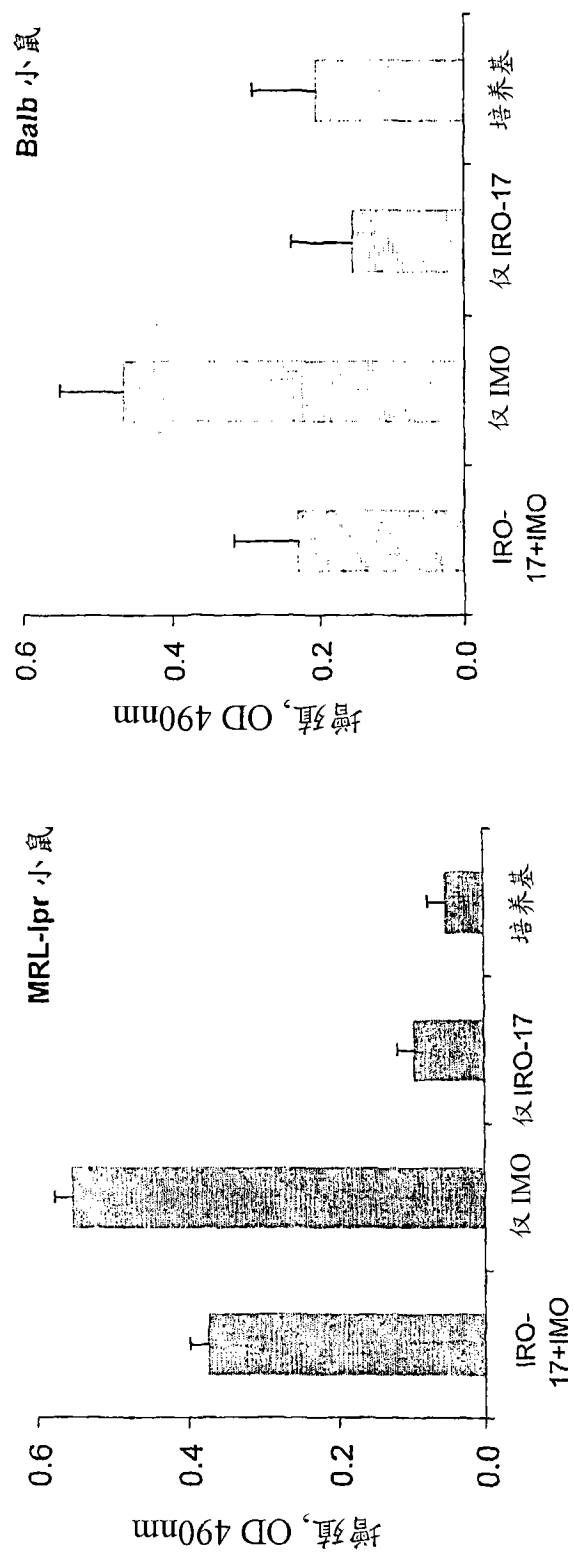


图 16

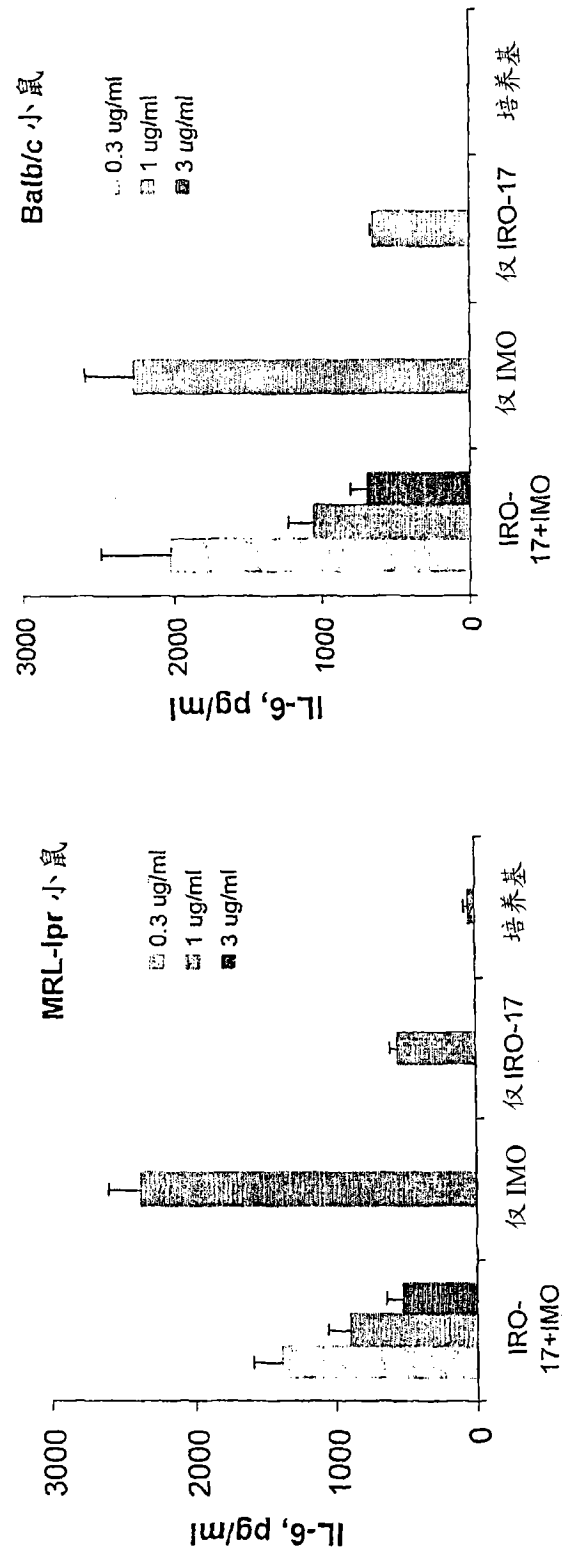


图 17A

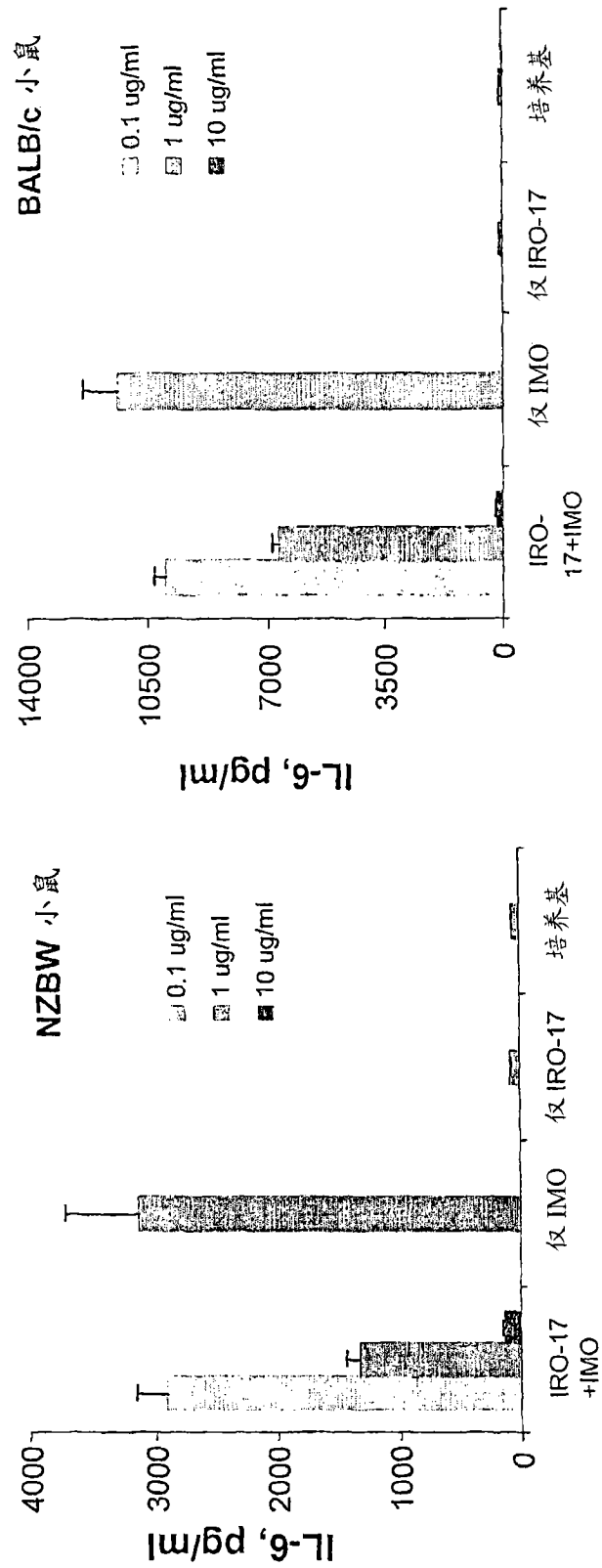


图 17B

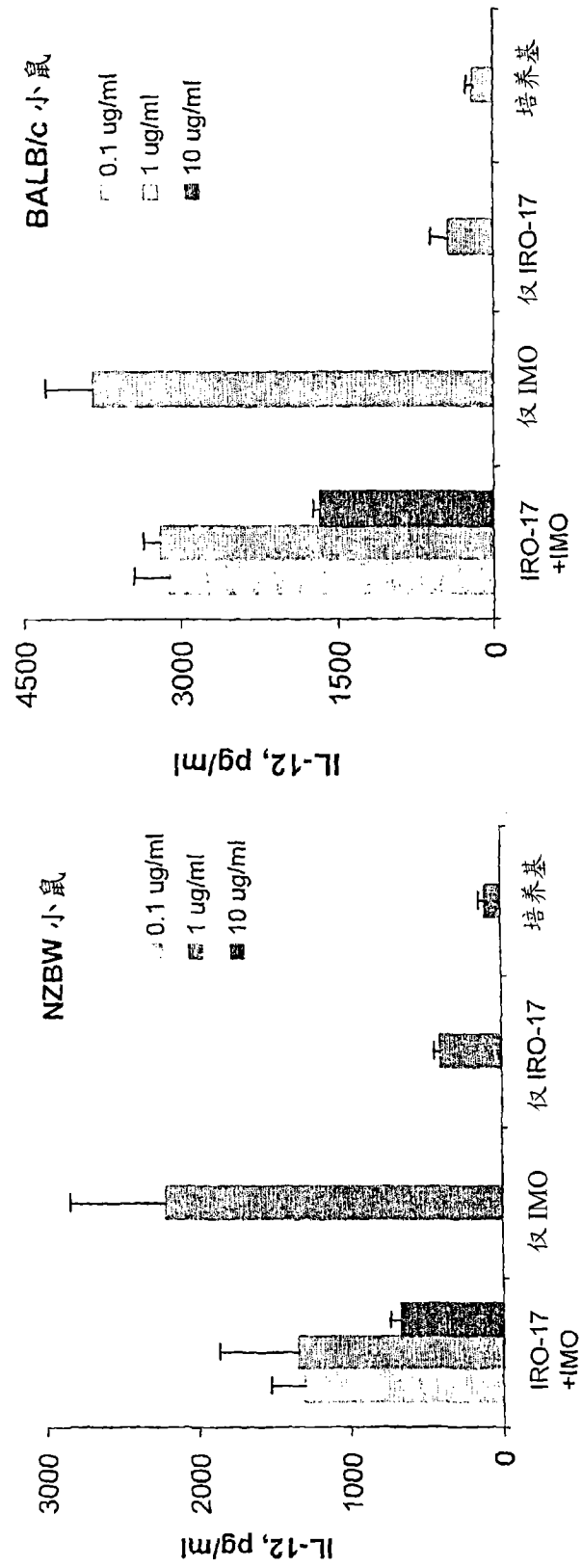


图 17C

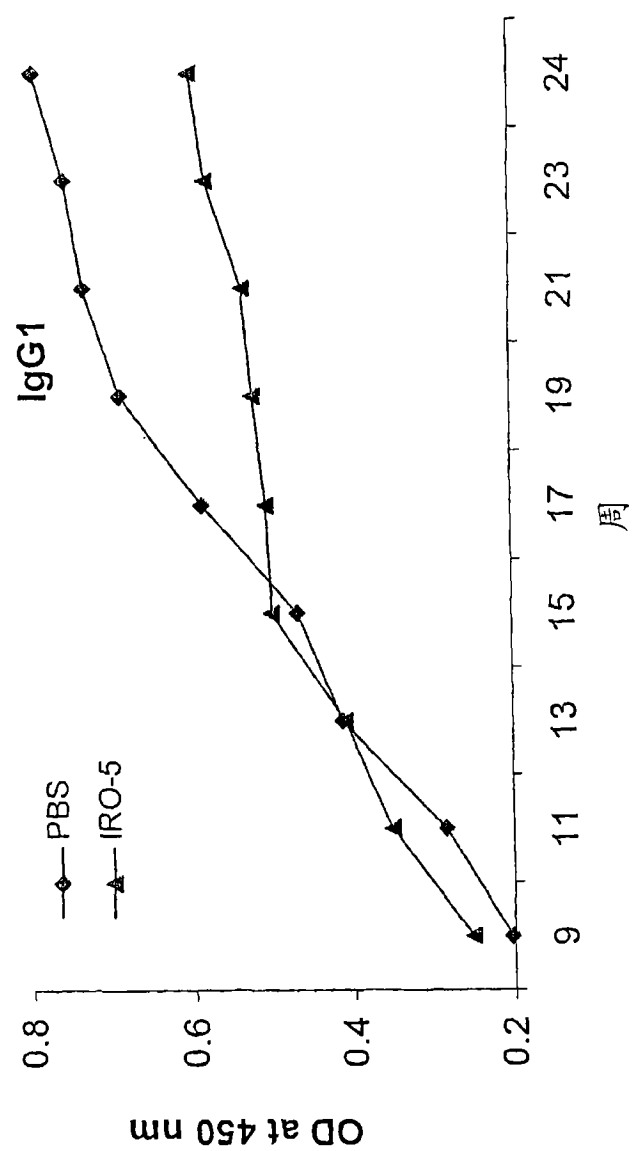


图 18A

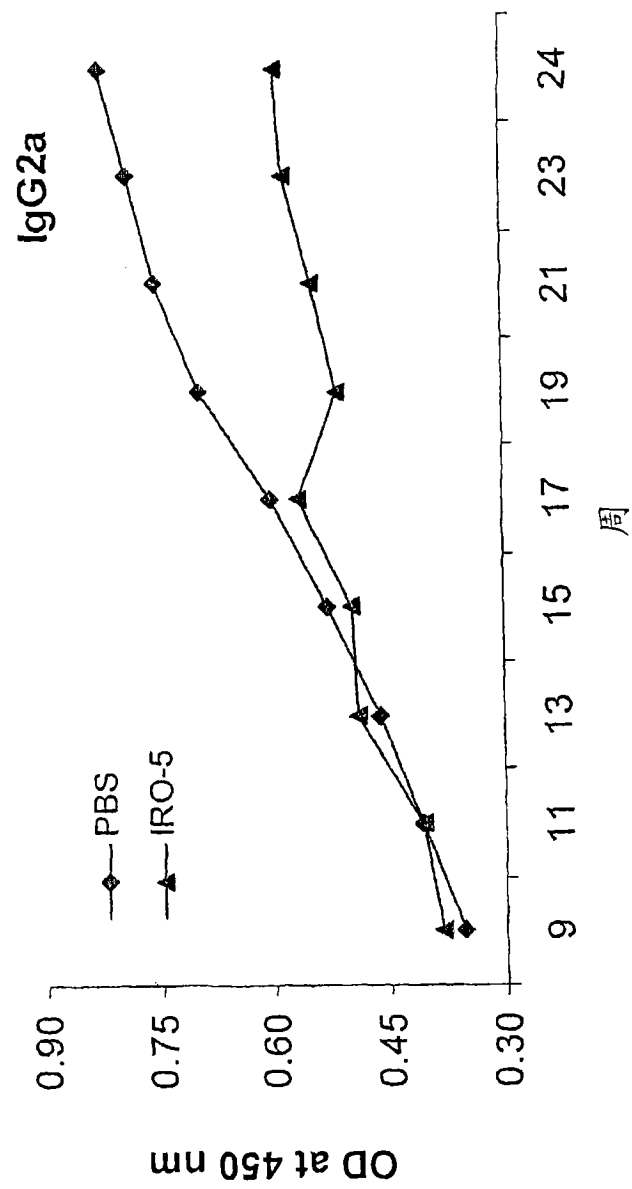


图 18B

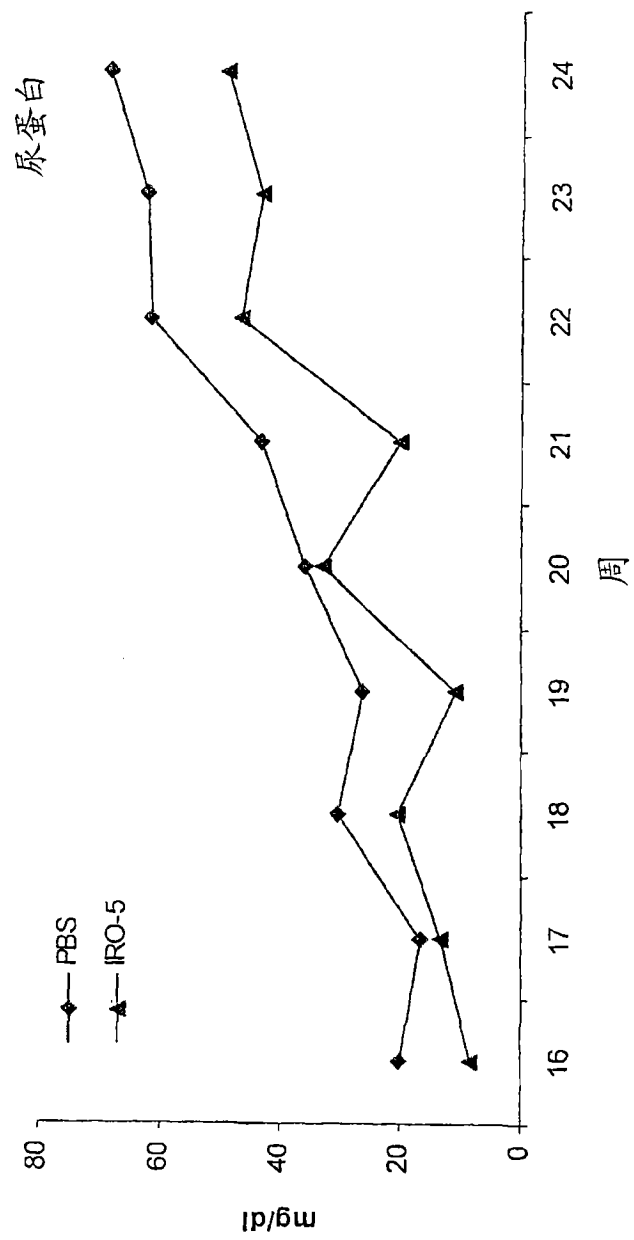


图 18C

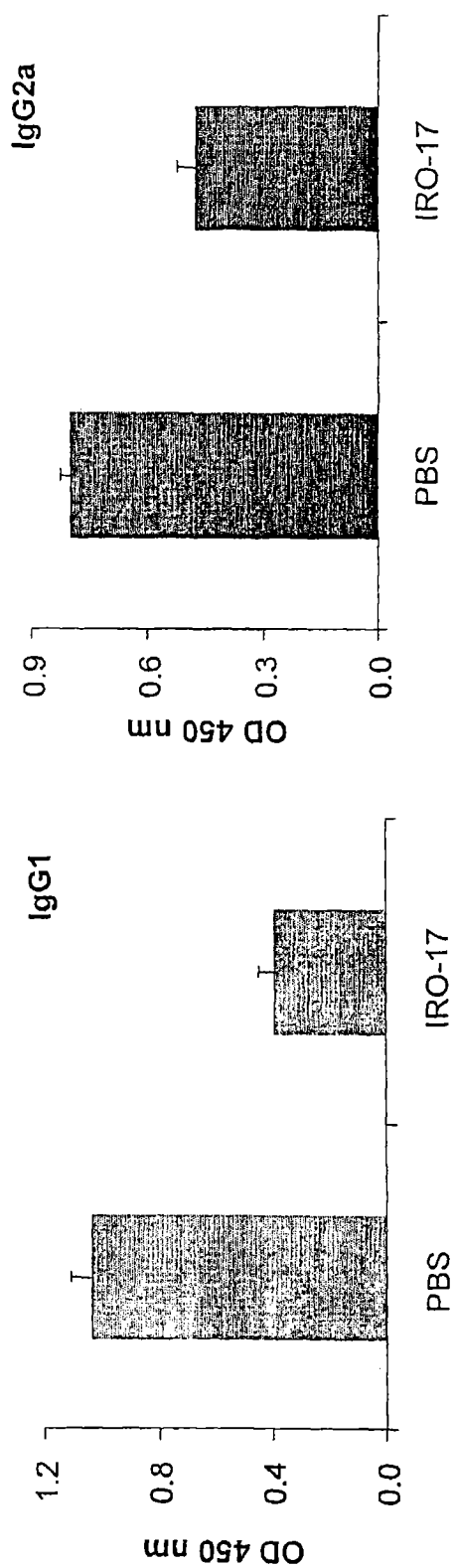


图 18D

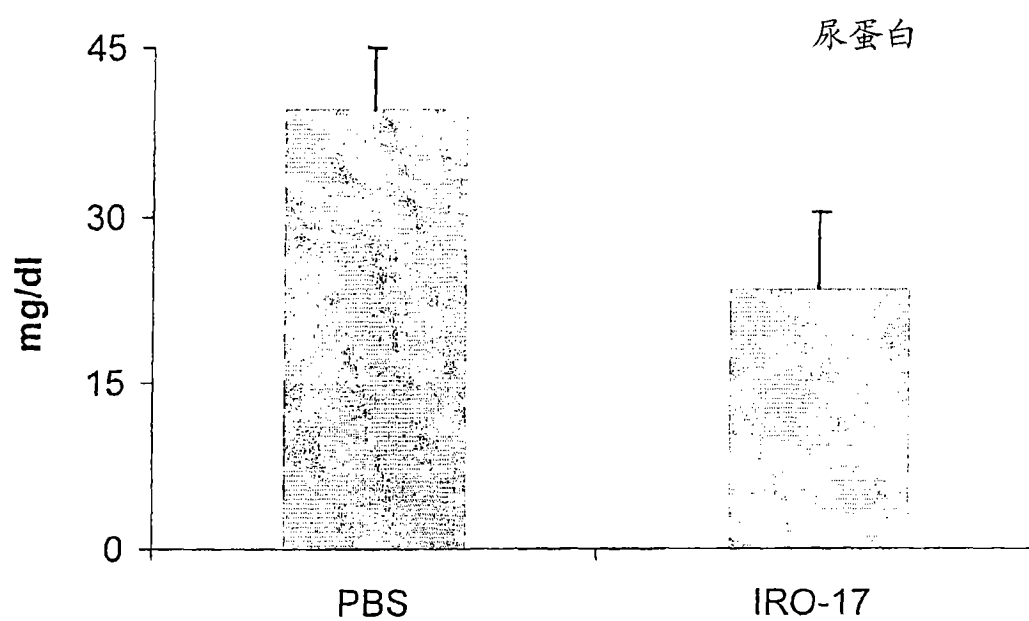


图 18E

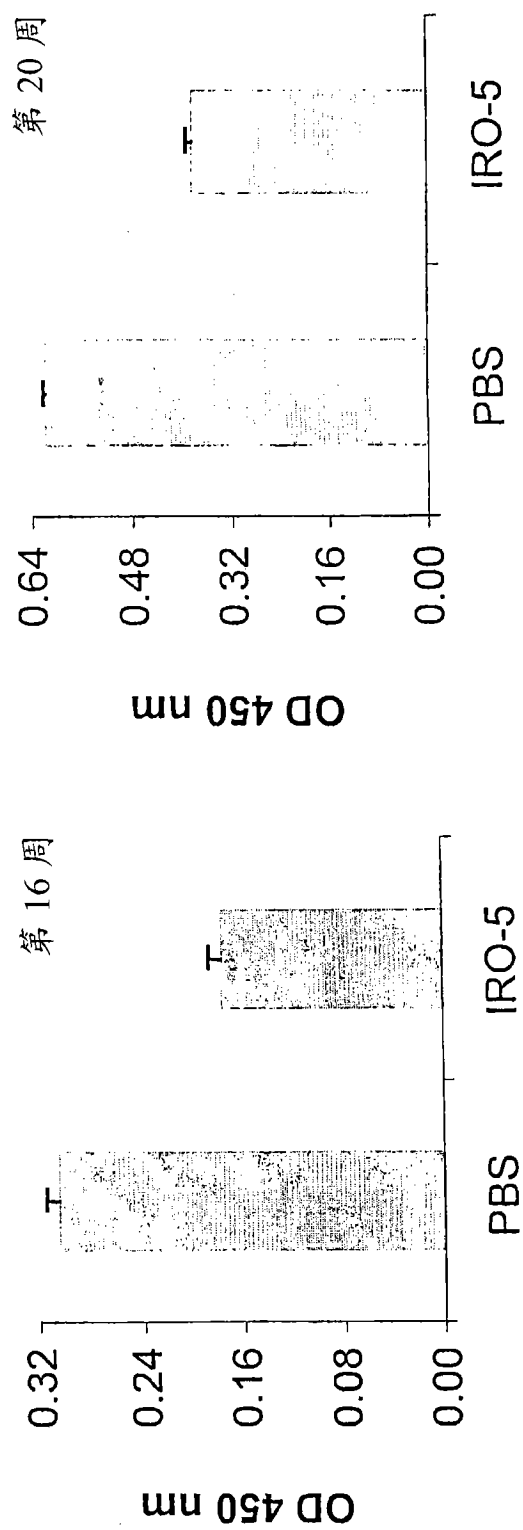


图 19