



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119548615 A

(43) 申请公布日 2025. 03. 04

(21) 申请号 202411599223.4

(22) 申请日 2018.06.29

(30) 优先权数据

2017902545 2017.06.30 AU

(62) 分案原申请数据

201880056934.3 2018.06.29

(71) 申请人 皇家墨尔本理工大学

地址 澳大利亚,维多利亚州

申请人 南澳大学

伊丽莎白女王在都柏林附近神圣不可分割的三一学院的教务长、研究员、基金会学者和其他董事会成员
莫纳什大学

(72) 发明人 S·塞勒米迪斯 D·A·布鲁克斯

J·欧莱里

(74) 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314

专利代理师 程伟 程云

(51) Int.Cl.

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

权利要求书4页 说明书37页

序列表(电子公布) 附图51页

(54) 发明名称

一种治疗方法

(57) 摘要

本发明一种治疗方法。本文教导了用于抑制由To11样受体介导的免疫刺激的试剂,其可用于治疗病毒和微生物病、涉及自身免疫和炎症要素的疾病以及癌症。该试剂拮抗To11样受体7(TLR7)的C98和C475之间的二硫键形成,从而防止TLR7激活。本文还实现了药物组合物。

1. 一种抑制受试者中TLR7介导的免疫刺激活性的方法,所述方法包括使表达TLR7的来自所述受试者的细胞与有效量的试剂接触,所述试剂拮抗TLR7的C98和C475之间或其相应位置之间的二硫键形成。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述试剂包含长度为约4至约190个氨基酸的肽,并且所述肽具有与TLR7的氨基酸4至194之间多达190个连续氨基酸具有至少70%的氨基酸序列相似性的氨基酸序列,条件是所述肽在等同于TLR7的98位的位置上包含半胱氨酸残基。

3. 根据权利要求2所述的方法,其中所述肽包含与TLR7的氨基酸48至148之间多达100个连续氨基酸具有至少70%的氨基酸序列相似性的氨基酸序列,条件是所述肽在等同于TLR7的98位的位置上包含半胱氨酸残基。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中所述肽包含与TLR7的氨基酸78至118之间多达40个连续氨基酸具有至少70%的氨基酸序列相似性的氨基酸序列,条件是所述肽在等同于TLR7的98位的位置上包含半胱氨酸残基。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中所述试剂包含具有与DX₁RCNCX₂PX₃X₄ (SEQ ID NO: 27) 具有至少70%相似性的氨基酸序列的肽,其中,X₁是L、F或M;X₂是V或I;X₃是V或I或A或P;和X₄是P或L或K或R,其对应于人TLR7的95位至X104位氨基酸,条件是所述肽在等同于TLR7的98位的位置上包含半胱氨酸残基。

6. 根据权利要求5所述的方法,其中所述肽包含氨基酸序列DFRCNCVPIP (SEQ ID NO: 26)。

7. 根据权利要求5所述的方法,其中所述肽包含氨基酸序列DLRCNCVPVL (SEQ ID NO: 1)。

8. 根据权利要求2至7中任一项所述的方法,其中所述肽还包含连接至所述肽的N-末端或C-末端的部分,其使得所述肽能够被摄取到细胞中。

9. 根据权利要求8所述的方法,其中所述部分是亲水性肽、两亲性肽、具有周期性氨基酸序列的肽或与胆甾醇的缀合物。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述亲水性肽选自TAT (SEQ ID NO: 2)、SynB1 (SEQ ID NO: 3)、SynB3 (SEQ ID NO: 4)、PTD-4 (SEQ ID NO: 5)、PTD-5 (SEQ ID NO: 6)、FHV包衣蛋白 (SEQ ID NO: 7)、BMV Gag- (7-25) (SEQ ID NO: 8)、HTLV-II Rex- (4-16) (SEQ ID NO: 9)、D-Tat (SEQ ID NO: 10) 和R9-Tat (SEQ ID NO: 11)。

11. 根据权利要求9所述的方法,其中所述两亲性肽选自运输蛋白嵌合体 (SEQ ID NO: 12)、MAP (SEQ ID NO: 13)、SBP (SEQ ID NO: 14)、FBP (SEQ ID NO: 15)、MPG[MPGac] (SEQ ID NO: 16)、MPG(NLS) (SEQ ID NO: 17)、Pep-1 (SEQ ID NO: 18) 和Pep-2 (SEQ ID NO: 19)。

12. 根据权利要求9所述的方法,其中所述具有周期性氨基酸序列的肽包含聚精氨酸或聚赖氨酸序列。

13. 根据权利要求1至12中任一项所述的方法,其中所述受试者是人或非人哺乳动物。

14. 根据权利要求13所述的方法,其用于抑制自身免疫性疾病、病毒或微生物病、炎症或癌症。

15. 拮抗TLR7的C98和C475之间或其相应位置之间的二硫键形成的试剂在制备抑制受试者中自身免疫性疾病、病毒或微生物病、炎症或癌症的药物中的用途。

16. 一种用于治疗受试者的自身免疫性疾病、病毒或微生物病、炎症或癌症的方法,所

述方法包括使表达TLR7的来自所述受试者的细胞与有效量的拮抗TLR7的C98至C475之间或其相应位置之间的二硫键形成的试剂接触。

17. 根据权利要求16所述的方法, 其中所述试剂包含长度为约4至约190个氨基酸的肽, 并且所述肽具有与TLR7的氨基酸4至194之间多达190个连续氨基酸具有至少70%的氨基酸序列相似性的氨基酸序列, 条件是所述肽在等同于TLR7的98位的位置上包含半胱氨酸残基。

18. 根据权利要求17所述的方法, 其中所述肽具有与TLR7的氨基酸48至148之间多达100个连续氨基酸具有至少70%的氨基酸序列相似性的氨基酸序列, 条件是所述肽在等同于TLR7的98位的位置上包含半胱氨酸残基。

19. 根据权利要求18所述的方法, 其中所述肽具有与TLR7的氨基酸78至118之间多达40个连续氨基酸具有至少70%的氨基酸序列相似性的氨基酸序列, 条件是所述肽在等同于TLR7的98位的位置上包含半胱氨酸残基。

20. 根据权利要求16所述的方法, 其中所述试剂是肽, 其具有与对应于D95至X104的DFRCNCVPIP (SEQ ID NO:26) 具有至少70%相似性的氨基酸序列, 其中X是P(人) 或L(小鼠), 条件是所述肽在等同于TLR7的98位的位置上包含半胱氨酸残基。

21. 根据权利要求20所述的方法, 其中所述肽包含氨基酸序列DFRCNCVPIP (SEQ ID NO:26)。

22. 根据权利要求17至21中任一项所述的方法, 其中所述肽还包含连接至所述肽的N-末端或C-末端的部分, 其使得所述肽能够被摄取到细胞中。

23. 根据权利要求20所述的方法, 其中所述部分是亲水性肽、两亲性肽或具有周期性氨基酸序列的肽。

24. 根据权利要求23所述的方法, 其中所述亲水性肽选自TAT (SEQ ID NO:2)、SynB1 (SEQ ID NO:3)、SynB3 (SEQ ID NO:4)、PTD-4 (SEQ ID NO:5)、PTD-5 (SEQ ID NO:6)、FHV包衣蛋白 (SEQ ID NO:7)、BMV Gag- (7-25) (SEQ ID NO:8)、HTLV-II Rex- (4-16) (SEQ ID NO:9)、D-Tat (SEQ ID NO:10) 和R9-Tat (SEQ ID NO:11)。

25. 根据权利要求23所述的方法, 其中所述两亲性肽选自运输蛋白嵌合体 (SEQ ID NO:12)、MAP (SEQ ID NO:13)、SBP (SEQ ID NO:14)、FBP (SEQ ID NO:15)、MPG (SEQ ID NO:16)、Pep-1 (SEQ ID NO:17) 和Pep-2 (SEQ ID NO:18)。

26. 根据权利要求23所述的方法, 其中所述具有周期性氨基酸序列的肽包括聚精氨酸或聚赖氨酸序列或与胆甾醇的缀合物。

27. 根据权利要求16至26中任一项所述的方法, 其中所述受试者是人或非人哺乳动物。

28. 拮抗TLR7的C98和C475之间或其相应位置之间二硫键形成的试剂, 用于抑制受试者的自身免疫性疾病、病毒或微生物病、炎症或癌症。

29. 根据权利要求15所述的用途或根据权利要求28所述的试剂, 其中所述试剂包含长度为约4至约190个氨基酸的肽, 并且所述肽具有与TLR7的氨基酸4至194之间多达190个连续氨基酸具有至少70%的氨基酸序列相似性的氨基酸序列, 条件是所述肽在等同于TLR7的98位的位置上包含半胱氨酸残基。

30. 根据权利要求29所述的用途或试剂, 其中所述试剂包含具有与DX₁RCNCX₂PX₃X₄ (SEQ ID NO:27) 具有至少70%相似性的氨基酸序列的肽, 其中, X₁是L、F或M; X₂是V或I; X₃是V或I

或A或P;和X₄是P或L或K或R,其对应于人TLR7的95位至104位氨基酸,条件是所述肽在等同于TLR7的98位的位置上包含半胱氨酸残基。

31.根据权利要求30所述的用途或试剂,其中所述肽包含氨基酸序列DFRCNCVPIP (SEQ ID NO:26)。

32.根据权利要求29至31中任一项所述的用途或试剂,其中所述肽进一步包含连接至所述肽的N-末端或C-末端的部分,其使得所述肽能够被摄取到细胞中。

33.根据权利要求32所述的用途或试剂,其中所述部分是亲水性肽、两亲性肽或具有周期性氨基酸序列的肽或与胆甾醇的缀合物。

34.根据权利要求33所述的用途或试剂,其中所述亲水性肽选自TAT (SEQ ID NO:2)、SynB1 (SEQ ID NO:3)、SynB3 (SEQ ID NO:4)、PTD-4 (SEQ ID NO:5)、PTD-5 (SEQ ID NO:6)、FHV包衣蛋白 (SEQ ID NO:7)、BMV Gag- (7-25) (SEQ ID NO:8)、HTLV-II Rex- (4-16) (SEQ ID NO:9)、D-Tat (SEQ ID NO:10)和R9-Tat (SEQ ID NO:11)。

35.根据权利要求33所述的用途或试剂,其中所述两亲性肽选自运输蛋白嵌合体 (SEQ ID NO:12)、MAP (SEQ ID NO:13)、SBP (SEQ ID NO:14)、FBP (SEQ ID NO:15)、MPG[MAGac] (SEQ ID NO:16)、MPG(NLS) (SEQ ID NO:17)、Pep-1 (SEQ ID NO:18)和Pep-2 (SEQ ID NO:19)。

36.根据权利要求33所述的用途或试剂,其中所述具有周期性氨基酸序列的肽包含聚精氨酸或聚赖氨酸序列。

37.根据权利要求29至36中任一项所述的用途或试剂,其中所述受试者是人或非人哺乳动物。

38.一种药物组合物,其包含拮抗TLR7的C98和C475之间或其相应位置之间二硫键形成的试剂和一种或多种药物载体、赋形剂和/或稀释剂。

39.根据权利要求38所述的药物组合物,其中所述试剂包含长度为约4至约190个氨基酸的肽,并且所述肽具有与TLR7的氨基酸4至194之间多达190个连续氨基酸具有至少70%的氨基酸序列相似性的氨基酸序列,条件是所述肽在等同于TLR7的98位的位置上包含半胱氨酸残基。

40.根据权利要求39所述的药物组合物,其中所述试剂包含肽,所述肽具有与DX₁RCNCX₂PX₃X₄ (SEQ ID NO:27)具有至少70%相似性的氨基酸序列,其中X₁是L、F或M;X₂是V或I;X₃是V或I或A或P;和X₄是P或L或K或R,其对应于人TLR7的95位至104位氨基酸,条件是所述肽在等同于TLR7的98位的位置上包含半胱氨酸残基。

41.根据权利要求40所述的药物组合物,其中所述肽包含氨基酸序列DFRCNCVPIP (SEQ ID NO:26)。

42.根据权利要求39至41中任一项所述的药物组合物,其中所述肽进一步包含连接至所述肽的N-末端或C-末端的部分,其使得所述肽能够被摄取到细胞中。

43.根据权利要求42所述的药物组合物,其中所述部分是亲水性肽、两亲性肽或具有周期性氨基酸序列的肽或与胆甾醇的缀合物。

44.根据权利要求43所述的药物组合物,其中所述亲水性肽选自TAT (SEQ ID NO:2)、SynB1 (SEQ ID NO:3)、SynB3 (SEQ ID NO:4)、PTD-4 (SEQ ID NO:5)、PTD-5 (SEQ ID NO:6)、FHV包衣蛋白 (SEQ ID NO:7)、BMV Gag- (7-25) (SEQ ID NO:8)、HTLV-II Rex- (4-16) (SEQ

ID NO:9)、D-Tat (SEQ ID NO:10) 和R9-Tat (SEQ ID NO:11)。

45. 根据权利要求39所述的药物组合物, 其中所述两亲性肽选自运输蛋白嵌合体 (SEQ ID NO:12)、MAP (SEQ ID NO:13)、SBP (SEQ ID NO:14)、FBP (SEQ ID NO:15)、MPG [MPGac] (SEQ ID NO:16)、MPG (NLS) (SEQ ID NO:17)、Pep-1 (SEQ ID NO:18) 和Pep-2 (SEQ ID NO:19)。

46. 根据权利要求43所述的药物组合物, 其中所述具有周期性氨基酸序列的肽包含聚精氨酸或聚赖氨酸序列。

47. 根据权利要求38至46中任一项所述的药物组合物, 其用于人或非人哺乳动物。

一种治疗方法

[0001] 本申请是2018年6月29日提交的专利申请2018800569343《一种治疗方法》的分案申请。本申请要求2017年6月30日提交的题为《一种治疗方法》的澳大利亚临时专利申请号2017902545的优先权。

技术领域

[0002] 本发明一般地涉及免疫调节领域。本文教导了用于抑制由Toll样受体介导的免疫刺激的试剂,其可用于治疗病毒和微生物病、涉及自身免疫和炎症要素的疾病以及癌症。本文还实现了药物组合物。

背景技术

[0003] 在本说明书的结尾按字母顺序收集了本说明书中作者所引用的出版物的书目详细信息。

[0004] 本说明书中对任何在先出版物(或从其衍生的信息)或任何已知事物的引用均不是、也不应该被视为承认或认可或任何形式地暗示在先出版物(或从其衍生的信息)或已知事物构成本说明书所涉及从事的领域中公知常识的一部分。

[0005] 免疫刺激是预防病毒和微生物病的主要组成部分。但是,免疫系统的调节是复杂、敏感和多方面的。不必要的刺激会导致自身免疫性疾病。如果医学专业人员要应对即将来临的病毒流行和大流行的威胁并控制自身免疫,则需要对控制免疫反应的调节过程有更全面的了解。不管感染株或自身免疫状况如何,迫切需要针对靶病理学的新治疗方法。

[0006] 活性氧(ROS)的产生是由NADPH氧化酶(NOX)家族的酶实现的高度协调的过程。NOX酶在15亿年前在单细胞真核生物中进化,并存在于大多数真核生物组群中,包括变形虫、真菌、藻和植物、线虫、棘皮动物、被囊类动物、昆虫、鱼、爬行动物和哺乳动物(Kawahara等人(2007)BMC Evolutionary Biology 7:109;Aguirre(2010)Free Radical Biology and Medicine 49(9):1342-1353)。真核生物中NADPH氧化酶的功能是多种多样的,但是,常见的功能是通过固有免疫细胞对病原体的反应产生ROS。实际上,植物(ArtbohD和ArtbohF)、真菌(NOXA/B)和无脊椎动物线虫(Celegans)(Duox直系同源物)、果蝇(Drosophila melongaster)(NOX5同源物,d-NOX和DUOX)和蚊子埃及伊蚊(aedes aegypti)(NOXM和DUOX)中的NADPH氧化酶的直系同源物产生具有保护宿主的杀菌活性的ROS(Kawahara等人(2007)同上;Aguirre(2010)同上)。脊椎动物(包括硬骨鱼、两栖动物、鸟和哺乳动物)具有NOX2 NADPH氧化酶,该酶在吞噬体内产生一串ROS,以杀死入侵的病原体,尤其是细菌。但是,ROS对病毒感染的影响在很大程度上尚不清楚。

[0007] ROS(例如超氧阴离子和过氧化氢(H₂O₂))由小鼠和人炎性细胞响应病毒感染产生,并增强由低至高致病性的病毒(包括甲型流感病毒)引起的病理(Imai等人(2008)Cell 133(2):235-249;Snelgrove等人(2006)Eur J Immunol 36(6):1364-1373;To等人(2014)Free Radical Research 48(8):940-947;Vlahos等人(2011)PLoS Pathogens 7(2):e1001271;Vlahos等人(2012)Trends in Pharmacological Sciences 33(1):308;Vlahos和

Selemidis (2014) *Molecular Pharmacology* 86(6):747-759)。炎性细胞ROS的主要来源是NOX2氧化酶(Vlahos和Selemidis (2014) 同上; Selemidis等人(2008) *Pharmacology & Therapeutics* 120(3):254-291; Drummond等人(2011) *Nature Reviews Drug Discovery* 10(6):453-471; Bedard和Krause (2007) *Physiological Reviews* 87(1):245-313)。尽管NOX2氧化酶通过吞噬体ROS的产生在杀死细菌和真菌中起作用,但NOX2氧化酶似乎并未以类似于细菌的方式消灭病毒。实际上,在没有NOX2的情况下,甲型流感病毒引起的肺损伤和功能障碍实质上更少,并导致较低的病毒载量,表明NOX2氧化酶衍生的ROS促进而不是抑制病毒感染(Imai等人(2008) 同上; Snelgrove等人(2006) 同上; To等人(2014) 同上; Vlahos等人(2011) 同上; Vlahos等人(2012) 同上; Vlahos和Selemidis (2014) 同上)。然而,鉴别病毒如何引起ROS产生具有暗示意义(allusive),因为这种高反应性氧分子如何导致疾病似乎在很大程度上局限于其所产生的部位。

[0008] 与质膜结合后(Cossart和Helenius (2014) *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6(8)),病毒通过多种机制进入细胞并最终进入内体,导致内体模式识别受体(包括Toll样受体3 (TLR3)、TLR7和TLR9 (Iwasaki和Pillai (2014) *Nature Reviews Immunology* 14(5):315-328)对病毒RNA的检测。特异性受体相互作用取决于病毒的组(I至V)或基因组方向(即ssRNA、dsRNA或DNA),并触发以I型IFN和IL-1产生为特征的免疫应答以及B细胞依赖性抗体产生(Iwasaki和Pillai (2014) 同上)。内体TLR也检测宿主核酸和自身抗原,在自身免疫性疾病中,介导相似的I型IFN反应并刺激针对自身RNA和抗原的抗体产生。值得注意的是,长期缺乏NOX2氧化酶的小鼠具有增加的发展自身抗体的趋势(Campbell等人(2012) *Science Translational Medicine* 4(157):157ra141),并且慢性肉芽肿病患者通过NOX2氧化酶产生ROS的能力具有缺陷,其循环中的I型IFN和自身抗体升高(Kelkka等人(2014) *Antioxidants & Redox Signaling* 21(16):2231-2245)。这些观察结果支持低水平的ROS导致增强的免疫反应的观点。然而,直到本发明出现之前,尚不清楚ROS如何调节炎症和由病原体引起的病理,也不清楚ROS的靶向(和急性)清除是否实际上可有益于治疗感染以及其他与免疫反应相关的病症,例如作为自身免疫性疾病的病症。

发明内容

[0009] 活性氧(ROS)促进病毒和微生物以及其他寄生虫的致病性。在导致本发明的工作中,确定了亚细胞ROS产生的位点和酶源,以及ROS对免疫刺激的影响。根据本发明,确定TLR7蛋白被TLR7的98位(C98)和475位(C475)半胱氨酸残基之间二硫键的形成激活,这导致通过NADPH氧化酶(NOX2)产生毒性ROS。ROS反过来抑制抗病毒和抗微生物活性。因此,本发明证实TLR7为治疗靶标。TLR7活性的降低还使得能够治疗自身免疫性疾病、炎症和癌症以及由TLR7活性加剧的其他疾病。

[0010] 本文提供了一种抑制受试者中TLR7介导的免疫刺激活性的方法,该方法包括使表达TLR7的来自受试者的细胞与有效量的试剂接触,该试剂拮抗人(或鼠)TLR7的C98和C475之间(或其其他TLR7中的对应位置)二硫键的形成。本文进一步教导了一种用于治疗受试者的自身免疫性疾病、病毒或微生物病、炎症或癌症的方法,该方法包括使来自受试者的表达TLR7的细胞与有效量的试剂接触,该试剂拮抗人(或鼠)TLR7的C98和C475之间(或其其他TLR7中的对应位置)二硫键的形成。本发明还能够减少由ROS引起的免疫刺激不足

(hypoimmunostimulation),并改善与TLR7活性相关或由TLR7活性加剧的病症。在一个实施方案中,该试剂抑制TLR7活性并且可用于治疗自身免疫性疾病。

[0011] 在一个实施方案中,所述试剂包含肽,在本文中被称作“诱饵肽”,其长度为约4至约190个氨基酸,并且具有与人(或鼠)TLR7的氨基酸4至194之间多达190个连续氨基酸具有至少70%的氨基酸序列相似性的氨基酸序列,其中包括具有与TLR7的氨基酸48至148之间多达100个连续氨基酸具有至少70%的氨基酸序列相似性的氨基酸序列的肽,并且其中还包括具有与TLR7的氨基酸78至118之间多达40个连续氨基酸具有至少70%的氨基酸序列相似性的氨基酸序列的肽,条件是肽在等同于TLR7的98位的位置上包含半胱氨酸残基(C98)。

[0012] 在一个实施方案中,诱饵肽包含对应于TLR7的氨基酸R97至C100的氨基酸序列RCNC(使用单个氨基酸代码)。在一个实施方案中,诱饵肽包含人TLR的95位至104位的10个氨基酸长度,并具有与DX₁RCNCX₂PX₃X₄(SEQ ID NO:27)具有至少70%相似性的氨基酸序列,其中

[0013] X₁是L、F或M;

[0014] X₂是V或I;

[0015] X₃是V或I或A或P;和

[0016] X₄是P或L或K或R。

[0017] 在一个实施方案中,诱饵肽是对应于人TLR7的D95和P104之间的DFRCNCVPIP(SEQ ID NO:26)。

[0018] 在另一个实施方案中,该肽包含对应于鼠TLR7的D95至L104的氨基酸序列DLRCNCVPVL(SEQ ID NO:1)。

[0019] 为有助于肽向细胞内的摄取,该肽可进一步包含连接至该肽的N-末端或C-末端的部分,该部分包括亲水性或阳离子肽、两亲或两亲性肽或具有周期性氨基酸序列的肽。或者,将肽缀合至胆甾醇。

[0020] 亲水性肽的示例包括选自TAT(SEQ ID NO:2)、SynB1(SEQ ID NO:3)、SynB3(SEQ ID NO:4)、PTD-4(SEQ ID NO:5)、PTD-5(SEQ ID NO:6)、FHV包衣蛋白(SEQ ID NO:7)、BMV Gag-(7-25)(SEQ ID NO:8)、HTLV-II Rex-(4-16)(SEQ ID NO:9)、D-Tat(SEQ ID NO:10)和R9-Tat(SEQ ID NO:11)的肽。

[0021] 两亲性肽的示例包括选自运输蛋白嵌合体(SEQ ID NO:12)、MAP(SEQ ID NO:13)、SBP(SEQ ID NO:14)、FBP(SEQ ID NO:15)、MPG[MPGac](SEQ ID NO:16)、MPG(NLS)(SEQ ID NO:17)、Pep-1(SEQ ID NO:18)和Pep-2(SEQ ID NO:19)的肽。

[0022] 具有周期性氨基酸序列的肽的示例包括具有聚精氨酸或聚赖氨酸序列的肽。Guidotti等人(2017)Trends in Pharmacological Sciences 38(4):406-424的表1中提供了其他示例,其内容通过引用并入。NOX2-胆甾醇-接头(PEG)-gp91ds-TAT构建体也可以促进细胞摄取。将胆甾醇和PEG连接至gp91ds-TAT有助于将gp91ds-TAT递送至内体。

[0023] 在一个实施方案中,受试者是人或非人哺乳动物。

[0024] 本文还实施拮抗TLR7的C98和C475之间或其相应位置之间的二硫键形成的试剂在制备抑制受试者中自身免疫性疾病、病毒或微生物病、炎症或癌症的药物中的用途。在相关的实施方案中,本发明教导了拮抗TLR7的C98和C475之间或其相应位置之间的二硫键形成

的试剂,其用于抑制受试者中自身免疫性疾病、病毒或微生物病、炎症或癌症。

[0025] 本文教导一种药物组合物,其包含拮抗TLR7的C98和C475之间或其相应位置之间的二硫键形成的试剂和一种或多种药物载体、赋形剂和/或稀释剂。在一个实施方案中,这种试剂包括以下试剂,其包含长度为约4至190个氨基酸、并且具有与TLR7的氨基酸4至194之间多达190个连续氨基酸具有至少70%的氨基酸序列相似性的氨基酸序列的肽。在另一个实施方案中,所述试剂包含长度为约4至100个氨基酸、并且具有与TLR7的氨基酸48至148之间多达100个连续氨基酸具有至少70%的氨基酸序列相似性的氨基酸序列的肽。在另一个实施方案中,所述试剂包含长度为约4至40个氨基酸、并且具有与TLR7的氨基酸78至118之间多达40个连续氨基酸具有至少70%的氨基酸序列相似性的氨基酸序列的肽。这些实施方案中的每一个均具有以下条件:该肽在等同于TLR7的98位的位置上包含半胱氨酸残基(C98)。替代地或另外地,该肽包含对应于TLR7的R97至C100的氨基酸序列RCNC。H₂N-RCNC-COOH的N-和/或C-末端可包含连同RCNC总共5至500个外来氨基酸。TLR7抑制肽的化学模拟物也构成本发明的一部分。

[0026] 表1中定义了本文使用的缩写。

[0027] 表1缩略语

[0028]

缩写	定义
AA	氨基酸
BMDM	骨髓来源的巨噬细胞
C98i	对应于TLR7的氨基酸95至104的诱饵肽
EEA1	早期内体抗原1
H ₂ O ₂	过氧化氢
HIV-TAT	人免疫缺陷病毒的TAT
IAV	甲型流感病毒
IFN	干扰素
MOI	多重感染
NOX	NADPH氧化酶
NP	核蛋白
PFU	菌斑形成单位
ROS	活性氧
TAT	反式激活转录因子
TLR	Toll样受体
TLR1	Toll样受体1
TLR2	Toll样受体2
TLR3	Toll样受体3
TLR4	Toll样受体4
TLR5	Toll样受体5
TLR6	Toll样受体6
TLR7	Toll样受体7
TLR8	Toll样受体8

TLR9	To11样受体9
TLR10	To11样受体10
WT	野生型
X31	小鼠适应性H3N2甲型流感病毒

[0029] 氨基酸序列由序列标识符编号 (SEQ ID NO) 指代。SEQ ID NO在数字上对应于序列标识符<400>1 (SEQ ID NO:1), <400>2 (SEQ ID NO:3) 等。除非另有说明, 否则以N-末端至C-末端方向 (分别为从左到右) 提供3个或单个字母代码或完整书写的氨基酸序列。

[0030] 表2提供了整个本说明书中使用的序列标识符的总结。

[0031] 表2序列标识符总结

[0032]

SEQUENCE ID NO:	描述
1	从鼠 TLR 7 的 D95 至 L104 的肽诱饵
2	细胞穿透肽 TAT
3	细胞穿透肽 SynB1
4	细胞穿透肽 SynB3
5	细胞穿透肽 PTD-4
6	细胞穿透肽 PTD-5
7	细胞穿透肽 FHV 包衣蛋白
8	细胞穿透肽 BMV Gag- (7-25)
9	细胞穿透肽 HTLV-II Rex- (4-16)
10	细胞穿透肽 D-Tat
11	细胞穿透肽 R9-Tat
12	细胞穿透肽运输蛋白嵌合体
13	细胞穿透肽 MAP
14	细胞穿透肽 SBP
15	细胞穿透肽 FBP
16	细胞穿透肽 MPGac
17	细胞穿透肽 MPG ^(NLS)
18	细胞穿透肽 Pep-1
19	细胞穿透肽 Pep-2
20	人 TLR7
21	流感聚合酶正向引物
22	流感聚合酶反向引物
23	Gp91 ds-TAT 肽
24	Sgp91ds-TAT 肽
25	鼠 TLR7
26	人 TLR7 的 D95 至 P104 的肽诱饵
27	TLR 的 95 位至 104 位的共有肽诱饵
28	人 TLR3
29	人 TLR9
30	人 TLR8
31	人 TLR5
32	人 TLR4
33	人 TLR2
34	人 TLR10
35	人 TLR1

[0033]

36	人 TLR6
37	安大略鲑 (Salmo salar) TLR7
38	热带非洲爪蟾 (Xenopus tropicalis) TLR7
39	原鸡 (Gallus gallus) TLR7
40	褐家鼠 (Rattus norvegicus) TLR7
41	人 TLR7
42	野猪 (Sus scrofa) TLR7
43	牛 (Bos Taurus) TLR7
44	乱序的 C98i 氨基酸序列的氨基酸序列
45	C98i 基序 RCNC 的氨基酸序列
46	RANC 的氨基酸序列
47	氨基酸序列 RANA
48	RCNA 的氨基酸序列
49	人 TLR7 基序的氨基酸序列, 始于 AA95
50	小鼠 TLR7 基序的氨基酸序列, 始于 AA95
51	大鼠 TLR7 基序的氨基酸序列, 始于 AA95
52	鸡 TLR7 基序的氨基酸序列, 始于 AA103
53	蛙 TLR7 基序的氨基酸序列, 始于 AA101
54	猪 TLR7 基序的氨基酸序列, 始于 AA95
55	鲑鱼 TLR7 基序的氨基酸序列, 始于 AA103
56	斑马鱼 TLR7 基序的氨基酸序列, 始于 AA90
57	具有 TAT 的 C98i 的氨基酸序列

[0034] 表3定义了本文所用氨基酸的单字母和三字母代码。

[0035] 表3氨基酸三字母和单字母

[0036]

氨基酸	三字母 缩写	单字母 符号
丙氨酸	Ala	A
精氨酸	Arg	R
天冬酰胺	Asn	N
天冬氨酸	Asp	D
半胱氨酸	Cys	C
谷氨酰胺	Gln	Q
谷氨酸	Glu	E
甘氨酸	Gly	G
组氨酸	His	H
异亮氨酸	Ile	I
亮氨酸	Leu	L
赖氨酸	Lys	K
蛋氨酸	Met	M
苯丙氨酸	Phe	F

[0037]	脯氨酸	Pro	P
	丝氨酸	Ser	S
	苏氨酸	Thr	T
	色氨酸	Trp	W
	酪氨酸	Tyr	Y
	缬氨酸	Val	V
	吡咯赖氨酸	Pyl	O
	硒代半胱氨酸	Sec	U
	任何残基	Xaa	X

[0038] 引物及其来源和参考序列的列表表示于表4中。流感聚合酶引物为定制合成,序列如下所示。

[0039] 表4引物

[0040]	基因	公司	基因表达测定	目录号	参考序列
	小鼠 IL-1 β TaqMan 引物	Applied Biosystems	Mm00434228_m1	4331182	NM_008361.3
	小鼠 CYBB TaqMan 引物	Applied Biosystems	Mm01287743_m1	4331182	NM_007807.5
	小鼠 IFNB1 TaqMan 引物	Applied Biosystems	Mm00439552_s1	4331182	NM_010510.1
	小鼠 TNF α TaqMan 引物	Applied Biosystems	Mm00443258_m1	4331182	NM_001278601.1
	小鼠 IL6 TaqMan 引物	Applied Biosystems	Mm00446190_m1	4331182	NM_031168.1
	小鼠 TLR7 TaqMan 引物	Applied Biosystems	Mm00446590_m1	4331182	NM_016562.3
	小鼠 GAPDH (X20)	Applied Biosystems		4352339E	
	流感聚合酶 正向引物	Applied Biosystems	5'- CGGTCCAAATTCCTGCTGA- 3'	SEQ ID NO:21	
	流感聚合酶 反向引物	Applied Biosystems	5'- CATTGGGTTCCCTCCATCCA- 3-3'	SEQ ID NO:22	

附图说明

[0041] 一些图包含彩色表示或实体。彩色照片可通过请求从专利权人或适当的专利局获得。如果从专利局获得,则可能要收费。

[0042] 图1A至图1J是照片和图形表示,其显示季节性和大流行的甲型流感病毒通过激活 NOX2氧化酶诱导内体ROS产生。(A-B) 共聚焦显微镜下的野生型(WT) 小鼠初级肺泡巨噬细胞,其感染了甲型流感病毒株HKx31 (MOI为10) 1小时,并标记有针对早期内体抗原1 (EEA1) 的抗体和A) 针对甲型流感病毒核蛋白(NP) 的抗体或B) 针对NOX2的抗体,然后加入4',6'-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI;蓝色)。还显示了结果的量化(n=5)。(C-D) 小鼠初级肺泡巨噬细胞中内体ROS对照水平的时间依赖性升高,通过OxyBURST(100M) 共聚焦荧光显微镜评估并用

DAPI标记 ($n=5$)。(E-F) WT、NOX2^{-/-}和超氧化物歧化酶(SOD; 300U/mL)处理的WT小鼠初级肺泡巨噬细胞中内体ROS的产生,通过OxyBURST共聚焦荧光显微镜在不存在或存在HKx31病毒的情况下评估,并用DAPI标记 ($n=5$)。(G) 用OxyBURST和酸化的内体标记物Lysotracker (50nM) 标记未感染和HKx31病毒感染的小鼠初级肺泡巨噬细胞。一些细胞用巴氟霉素A (bafilomycin A) (Baf-A; 100nM) 处理以抑制内体的酸化 ($n=4$)。(H) 人肺泡巨噬细胞感染季节性H3N2 (A/纽约/55/2004, A/布里斯班/9/2007)、季节性H1N1 (A/新喀里多尼亚/20/1999, A/所罗门群岛/3/2006) 和大流行的A (H1N1) pdm09株 (A/加利福尼亚/7/2009, A/奥克兰/1/2009), 并用OxyBURST标记内体ROS ($n=4$)。(I-J) WT小鼠初级肺泡巨噬细胞中内体ROS的产生,通过OxyBURST荧光显微镜评估暴露于热(56°C) 灭活的HKx-31病毒(以阻止病毒融合)或紫外线灭活的HKx-31病毒(以阻断复制)并用DAPI标记 ($n=4$)。(A, B, C, E, G, H和I) 图像代表每个实验中分析的>150个细胞。原始放大倍率X100。(A, B, D, F和J) 数据表示为平均值 $\pm$ SEM。(A和B) 学生未配对t检验* $P<0.05$ 。(D, F和J) 单因素方差分析(One-way ANOVA), 然后进行Dunnett事后检验进行多重比较。* $P<0.05$ 和** $P<0.01$ 。

[0043] 图2A至图2I是照片和图形表示,其显示TLR7与甲型流感病毒、NOX2和EEA1的共同定位是通过TLR7和PKC依赖性机制针对甲型流感病毒生成内体ROS的信号传导平台。(A-C) 共聚焦显微镜下的小鼠初级肺泡巨噬细胞,其未经处理或感染甲型流感病毒HKx31 (MOI为10), 并用TLR7抗体以及A) 甲型流感病毒NP、B) NOX2或C) EEA1标记,然后加入4', 6'-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)。还显示了来自多个实验的定量数据 ($n=5$)。(D) WT和TLR7^{-/-}小鼠初级肺泡巨噬细胞中内体ROS的产生,通过Oxyburst (100M) 荧光显微镜在不存在或存在HKx31病毒的情况下评估,并用DAPI标记 ($n=6$)。(E) 用于评估NOX2和p47phox结合的免疫荧光显微镜。在不存在或不存在巴氟霉素A (Baf-A; 100nM) 或dynasore (Dyna; 100M) 的情况下,未处理或用HKx31病毒 (MOI为10) 感染WT和TLR7^{-/-}永生化的骨髓来源巨噬细胞(BMDM), 然后用针对NOX2和p47phox的抗体标记。还显示了结果的量化 ($n=5$)。(F-I) WT和NOX2^{-/-}小鼠初级肺泡巨噬细胞中内体ROS的产生,通过Oxyburst荧光显微镜在不存在或存在F) 咪喹莫特 (Imiq; 10g/ml) 和G) ssRNA (100g/ml) 的情况下评估,并用DAPI共同标记 ($n=5$)。(H, I) 在WT和TLR7^{-/-} BMDM中通过FRET分析评估胞质的PKC活性。细胞用空载体对照(vehicle control)或巴氟霉素A (100nM) 或dynasore (100M) 处理,然后暴露于甲型流感病毒 (HKx31, MOI为10) 或咪喹莫特 (10g/ml) 25分钟 ($n=3$)。(A-F和H) 图像代表每个实验中分析的>150个细胞。原始放大倍率X100。所有数据均表示为平均值 $\pm$ SEM。(A, B, C, F和G) 学生未配对t检验* $P<0.05$ 。(D, E, H和I) 单因素方差分析,然后进行Dunnett事后检验进行多重比较。* $P<0.05$ 。

[0044] 图3A至图3B是照片和图形表示,其显示分别经TLR7和TLR9依赖性机制针对ssRNA和DNA病毒产生内体ROS。(A) 在WT和TLR7^{-/-}骨髓来源巨噬细胞中内体ROS的产生,通过OxyBURST (100M) 荧光显微镜在不存在或存在甲型流感病毒 (HKx31病毒)、鼻病毒(rhino)、呼吸道合胞病毒(RSV)、人副流感病毒(PIV)、人间质肺病毒(HMPV)、仙台病毒、登革热病毒、人免疫缺陷病毒(HIV)、腮腺炎病毒(MuV)、新城疫病毒(NDV)、轮状病毒(英国和牛株)、单纯疱疹病毒2 (HSV-2) 和牛痘病毒的情况下评估,并用4', 6'-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI) 标记。还显示了结果的量化 ($n=5$)。(B) WT和TLR9^{-/-}小鼠初级肺泡巨噬细胞中内体ROS的产生,通过OxyBURST荧光显微镜在不存在或存在HKx31病毒、鼻病毒、仙台病毒、登革热病毒和单纯疱疹病毒2 (HSV-2) 的情况下评估,并用DAPI标记 ($n=5$)。(A和B) 图像代表每个实验中分析

的>150个细胞。原始放大倍率X100。所有数据均表示为平均值±SEM。单因素方差分析,然后进行Dunnett事后检验进行多重比较。与WT对照相比, #P<0.05。*P<0.05比较由水平杠表示。

[0045] 图4A至图4B是照片和图形表示,其显示细菌诱导的ROS产生不同于病毒依赖性ROS机制 (A) WT和TLR7^{-/-}永生化的骨髓来源巨噬细胞中,针对流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*) 和肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 产生的吞噬体超氧化物,如通过OxyBURST (100M) 荧光显微镜评估的。图像代表每个实验中分析的>150个细胞。原始放大倍率X100。(B) 是结果的量化 (n=5)。所有数据均表示为平均值±SEM。单因素方差分析,然后进行Dunnett事后检验用于多重比较。与WT对照相比, *P<0.05。

[0046] 图5A至图5C是图形表示,其显示内体NOX2氧化酶在体外和体内抑制响应于TLR7激活的细胞因子表达。(A-B) 在不存在或存在A) 夹竹桃麻素 (Apocynin) (Apo; 300M) 或B) 巴氟霉素A (Baf-A; 100nM) 的情况下, WT和TLR7^{-/-}永生化的骨髓来源的巨噬细胞 (BMDM) 未经处理或用咪喹莫特 (Imiq; 10g/mL) 处理, 24小时后通过QPCR测定IFN-、IL-1、TNF-和IL-6 mRNA表达 (n=6)。(C-D) 向WT和NOX2^{-/-}小鼠施用咪喹莫特 (50μg/小鼠, 鼻内), 以及C) 通过支气管肺泡灌洗液分析定量总气道炎症, 以及D) 24小时后评估细胞因子表达 (n=5)。(A, B, D) 响应是相对于GAPDH的, 然后表示为相对WT对照的倍数变化。(A-D) 数据表示为平均值±SEM。(A, B和D) Kruskal-Wallis检验与Dunn事后分析用于多重比较。(C) 单因素方差分析, 然后进行Dunnett事后检验用于多重比较。当P<0.05时具有统计学显著性。*P<0.05; **P<0.01。

[0047] 图6A至图6L是照片和图形表示,其显示内体NOX2氧化酶衍生的过氧化氢 (H₂O₂) 在体外和体内抑制响应于TLR7活化的细胞因子表达。(A) 在感染HKx31病毒 (MOI为10) 之前, 未经处理或用FITC标记的过氧化氢酶处理5分钟的WT小鼠初级肺泡巨噬细胞。将细胞标记Lysotracker (50nM), 并通过共聚焦显微镜评估Lysotracker和FITC过氧化氢酶的共同定位。图像代表每个实验中分析的>100个细胞。原始放大倍率X100 (n=3)。(B) WT和TLR7^{-/-}永生化的骨髓来源的巨噬细胞 (BMDM) 未经处理或用过氧化氢酶 (1000U/mL) 处理1小时, 24小时后通过QPCR测定IFN-和IL-1 mRNA表达 (n=7)。(C) 在不存在或存在过氧化氢酶 (1000U/mL) 的情况下, WT BMDM未经处理或用咪喹莫特 (Imiq) 处理1小时, 24小时后通过QPCR评估IFN-和IL-1 mRNA表达 (n=6)。(D) 将WT BMDM用DMSO (0.1%) 或dynasore (Dyna; 100M) 处理30分钟, 然后用过氧化氢酶 (1000U/mL) 处理1小时。24小时后通过QPCR测定细胞因子mRNA表达 (n=6)。(E) 用过氧化氢酶 (1000U/mL) 处理WT和TLR2^{-/-}永生化的BMDM 1小时, 并在24小时后通过QPCR测定细胞因子mRNA表达 (n=6)。(F) 用过氧化氢酶 (1000U/mL) 处理WT和UNCB93^{-/-}永生化的BMDM 1小时, 并在24小时后通过QPCR测定细胞因子mRNA表达 (n=6)。(G-I) 用过氧化氢酶或咪喹莫特 (10g/mL) 处理WT BMDM 1小时, 并在24h后通过QPCR测定G) TLR7、H) NLRP3或I) TREML4 mRNA表达 (n=6)。(J) 用过氧化氢酶 (1000U/小鼠) 鼻内处理小鼠, 然后通过QPCR测定TREML4的肺表达 (n=5)。(K和L) 将过氧化氢酶 (1000U/小鼠, 鼻内) 施用于WT小鼠, 并且在24小时后评估K) 总BALF气道炎症和L) 肺细胞因子表达 (n=5)。(B-H和L) 反应相对于GAPDH, 然后表示为相对WT对照的倍数变化。(B-H和L) Kruskal-Wallis检验与Dunn事后分析用于多重比较。(I和J) Mann-Whitney Wilcoxon检验。所有数据均表示为平均值±SEM。当P<0.05时, 具有统计学显著性。*P<0.05。

[0048] 图7A至图7B图形表示,其显示TLR7上的C98调节受体活性并且是内体H₂O₂的靶标 (A) 用空载体、WT TLR7或半胱氨酸98、260、263、270、273和445突变为丙氨酸的TLR7 (TLR7

6mut)、半胱氨酸98和445突变为丙氨酸的TLR7 (TLR7C98A/445A) 或半胱氨酸445突变为丙氨酸的TLR7 (TLR7C445A) 或半胱氨酸98突变为丙氨酸的TLR7 (TLR7C98A) 中的转染TLR7^{-/-}BMDM。48小时后,细胞不经处理或用过氧化氢酶(1000U/mL)或咪喹莫特(Imiq,10g/ml)处理1小时,并在24小时后评估细胞因子表达(n=6)。反应相对于GAPDH,然后表示为相对于TLR7^{-/-}对照的倍数变化。数据表示为平均值±SEM。单因素方差分析,然后进行Dunnett事后检验用于多重比较。当P<0.05时,具有统计学显著性。*P<0.05。(n.s)表示不显著。(B)用CLUSTAL OMEGA进行的多序列比对显示了TLR7上Cys 98的种间保守性。

[0049] 图8A至图8I是图形表示,其显示抑制NOX2氧化酶增加I型IFN和IL-1的表达,以及针对甲型流感病毒感染的抗体产生(A)来自WT和NOX2^{-/-}小鼠的肺泡巨噬细胞或者未经处理(未经免疫)或者感染HKx31甲型流感病毒(MOI为10),以在24小时后通过QPCR分析IFN- γ 、IL-1、TNF- α 和IL-6 mRNA的表达(n=8)。(B-C) WT和NOX2^{-/-}小鼠被活的HKx31甲型流感病毒感染(每只小鼠1×10⁵PFU),并且B)3天后评估C)BALF或D)血清中的细胞因子mRNA表达和IFN- γ 蛋白表达(n=5)。(E-I) WT和NOX2^{-/-}小鼠感染灭活的HKx31甲型流感病毒(相当于每只小鼠1×10⁴PFU),以在第7天进行测量:E)体重;F)气道炎症和差异细胞计数(即巨噬细胞,嗜中性粒细胞和淋巴细胞);G)在整个肺中的细胞因子表达(反应显示为相对于GAPDH的倍数变化)和H)血清,以及I)BALF的抗体水平(n=6)。数据显示为平均值±SE。(A)Kruskal-Wallis检验与Dunn事后分析用于多重比较。(B-I)未配对的t检验;当P<0.05时具有统计学显著性。*P<0.05。**P<0.01。

[0050] 图9A至图9M是照片和图形表示,其显示在体内内体靶向递送NOX2氧化酶抑制剂保护甲型流感病毒感染后的小鼠(A-E)。来自WT小鼠的肺泡巨噬细胞用Cy5胆甾醇-PEG接头荧光团(Cy5-cho1;100nM)处理30分钟,并感染HKx31甲型流感病毒(MOI为10)。然后将细胞用针对以下的抗体进行相对显现:A)和B)EEA1,C)NOX2或D)甲型流感病毒核蛋白(NP)。然后将所有细胞用4',6'-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)染色,并用共聚焦显微镜成像。B)在暴露于Cy5-胆甾醇之前,用dynasore(100M)预处理细胞30分钟。E)量化来自(A-D,n=5)的数据。(F)RAW 264.7巨噬细胞未经处理或用各种浓度的胆甾醇偶联的gp91ds-TAT(Cgp91)、乙基偶联的gp91ds-TAT(Egp91)或未偶联的gp91ds-TAT(Ugp91)处理30分钟,然后通过L-012(100M)-增强的化学发光定量ROS产生(n=7)。(G)在不存在或存在Ugp91ds-TAT(1M)或Cgp91ds-TAT(1M)的情况下,通过黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶无细胞测定法测定超氧化物的产生(n=6)。(H-I)将Ugp91ds-TAT(0.02mg/kg/天)或Cgp91ds-TAT(0.02mg/kg/天)每天一次鼻内递送给WT小鼠,共4天。在第一剂量的抑制剂后24小时,用盐水处理小鼠或用HKx31甲型流感病毒(每只小鼠1×10⁵PFU)感染小鼠。在感染后第3天挑选小鼠,并且H)通过BALF细胞计数评估气道炎症,I)通过QPCR测定肺IFN- γ mRNA(n=7)。(n.s)表示不显著。(J-M)如H)对小鼠进行NOX2抑制剂治疗方案和病毒感染方案,不同之处在于以0.2mg/kg/天的剂量递送NOX2抑制剂(n=7)。J)通过BALF计数进行气道炎症分析;K)体重分析(与第-1天测得的值的重量变化%);L)通过L-012增强的化学发光测定由BALF炎性细胞产生的ROS;M)通过QPCR测定病毒mRNA。数据表示为平均值±SEM。E)未配对的t检验;当P<0.05时具有统计学显著性(F,G,H,J,K,L)。单因素方差分析,然后进行Dunnett事后检验用于多重比较。(I和M)Kruskal-Wallis检验与Dunn事后分析用于多重比较。当P<0.05时,具有统计学显著性。*P<0.05;**P<0.01。

[0051] 图10A至图10D显示了多序列比对分析,其证明了人TLR7上所有半胱氨酸残基的位置。从NCBI GenBank蛋白质数据库中获得人TLR的各个序列,其登录号如下TLR1 (CAG38593.1)、TLR2 (AAH33756.1)、TLR3 (ABC86910.1)、TLR4 (AAF07823.1)、TLR5 (AAI09119.1)、TLR6 (BAA78631.1)、TLR7 (AAZ99026.1)、TLR8 (AAZ95441.1)、TLR9 (AAZ95520.1)和TLR10 (AAY78491.1),然后使用CLUSTAL OMEGA (EMBL-EBI) 进行序列比对。用红色虚线矩形框显示的是人TLR7上的半胱氨酸,并标明了各自的位置。

[0052] 图11A至图11C显示了脊椎动物TLR7的多序列比对分析。从NCBI GenBank蛋白质数据库中获得TLR的各个序列,其登录号为安大略鲑 (CCX35457.1)、热带非洲爪蟾 (AAI66280.1)、原鸡 (ACR26243.1)、小鼠 (AAI32386.1)、褐家鼠 (NP_001091051.1)、人 (AAZ99026.1)、野猪 (ABQ52583.1)和牛 (NP_001028933.1),然后使用CLUSTAL OMEGA (EMBL-EBI) 进行序列比对。用红色虚线矩形框显示的是人TLR7上的半胱氨酸,并标明了各自的位置。

[0053] 图12是图形表示,其显示在不存在或存在C98i的情况下暴露于TLR7激动剂咪喹莫特后,由骨髓来源的巨噬细胞产生的IL-1 β 细胞因子表达的数据。C98i处理的持续时间为1小时,然后暴露于咪喹莫特,并在24小时期间后通过实时定量PCR测量细胞因子。

[0054] 图13是图形表示,其显示在不存在或存在C98i的情况下暴露于TLR7激动剂加地喹莫特 (gardiquimod) 后,由骨髓来源的巨噬细胞产生的IL-1 β 细胞因子表达的数据。C98i处理的持续时间为1小时,然后暴露于咪喹莫特,并在24小时期间后通过实时定量PCR测量细胞因子。

[0055] 图14是图形表示,其显示在暴露于C98i后由骨髓来源的巨噬细胞产生的IL-1 β 细胞因子表达的数据。C98i处理的持续时间为1小时,并且在24小时期间后通过实时定量PCR测量细胞因子。

[0056] 图15是图形表示,其显示在体外存在或不存在C98i的情况下,暴露于TLR7激动剂咪喹莫特后由骨髓来源的巨噬细胞产生的IL-1 β 细胞因子的蛋白表达的数据。C98i处理的持续时间为1小时,然后暴露于咪喹莫特,并且在24小时期间后通过ELISA测量细胞因子。

[0057] 图16A和图16B是响应TLR7激动剂咪喹莫特和无TAT (无TAT) 的C98i的IL-1 β 产生 (a) 和细胞活力 (b) 的示意图。

[0058] 图17是示意图,其显示C98i在体外抑制甲型流感 (X31) 病毒反应 (IL-6GAPDH) (C98i 30 μ M+X31-IL-6mRNA表达)。

[0059] 图18是示意图,其显示C98i的乱序的氨基酸序列对TLR7激动剂 (咪喹莫特) 没有影响。乱序的氨基酸序列是YGRKKRRQRRRCLVPNDCLV-NH₂ (SEQ ID NO:44)。

[0060] 图19是示意图,其显示C98i RCNC (SEQ ID NO:45) 中的短基序或任何其修饰形式 (RANC, SEQ ID NO:46; RANA, SEQ ID NO:47; 或RCNA, SEQ ID NO:48) 均不能在体外抑制TLR7激动剂 (咪喹莫特) 的反应。以100 μ M+10 μ g/ml咪喹莫特使用肽;测量IL-6mRNA表达。

具体实施方式

[0061] 在整个说明书中,除非上下文另外要求,否则词语“包括”或诸如“包含”或“含有”的变体将被理解为暗示包括所陈述的一个元素或整数或方法步骤或元素或整数或方法步骤的组,但不排除任何其他元素或整数或方法步骤或元素或整数或方法步骤的组。

[0062] 如在本说明书中使用的,单数形式的“一种(a)”、“一种(an)”和“该(the)”包括复数方面,除非上下文另外明确指出。因此,例如,提及“一种病原体”包括单个病原体,以及两个或更多个病原体;提及“一种试剂”包括单个试剂以及两个或多个试剂;提及“该公开”包括该公开教导的单个和多个方面;等等。本文所教导和实施的方面被术语“发明”涵盖。本文考虑的任何变体和衍生物都包括在本发明的“形式”中。本发明的所有方面能够在权利要求书的范围内实施。

[0063] 本发明部分地基于确定病毒进入细胞的内体区室中触发内体中NADPH氧化酶(NOX)依赖性的活性氧(ROS)的产生。确定内体ROS是赋予抗病毒免疫的分子机制的负调节剂,其依赖于Toll样受体7(TLR7)激活。通过拮抗TLR7激活来限制ROS产生的能力使得能够更广泛地产生通用抗病毒疗法以及抗病原体疗法。拮抗TLR7激活限制ROS的产生,否则ROS会拮抗免疫刺激。考虑到TLR7本身与炎症形式有关,本发明在微生物感染(例如细菌和真菌微生物)、自身免疫性疾病、炎症和癌症的治疗中具有更广泛的意义。因此,拮抗TLR7激活有助于改善与TLR7激活相关或被TLR7激活加剧的疾病和病症。

[0064] 因此,本发明能够降低激活的TLR7的水平,其导致:

[0065] (i) 通过NOX2降低内体ROS的产生;

[0066] (ii) 活性TLR7的降低导致降低的炎症病症;

[0067] (iii) 降低的免疫刺激不足;

[0068] (iv) 降低的体液免疫反应网络的负调节;

[0069] (v) 降低的病原体感染能力;

[0070] (vi) 降低的炎症;

[0071] (vii) 降低的癌症生长能力;和/或

[0072] (viii) 由此改善自身免疫性病症或疾病。

[0073] 因此,本文中提供了一种抑制受试者中TLR7介导的免疫刺激活性的方法,该方法包括使表达TLR7的来自受试者的细胞与有效量的试剂接触,所述试剂拮抗TLR7的C98和C475之间或其相应位置之间的二硫键形成。

[0074] 本文还提供一种用于治疗受试者的自身免疫性疾病、病毒或微生物病、炎症或癌症的方法,该方法包括使表达TLR7的来自受试者的细胞与有效量的试剂接触,所述试剂拮抗TLR7的C98和C475之间或其相应位置之间的二硫键形成。

[0075] 本文还提供一种用于治疗受试者过量产生活性氧的方法,该方法包括使表达TLR7的来自受试者的细胞与有效量的试剂接触,所述试剂拮抗TLR7的C98和C475之间或其相应位置之间的二硫键形成。

[0076] 本文中提供了一种用于治疗受试者的TLR7介导的炎症的方法,所述方法包括使表达TLR7的来自受试者的细胞与有效量的试剂接触,所述试剂拮抗TLR7的C98和C475之间或其相应位置之间的二硫键形成。

[0077] 本文还提供一种用于治疗受试者的自身免疫性病症的方法,所述方法包括使表达TLR7的来自受试者的细胞与有效量的试剂接触,所述试剂拮抗TLR7的C98和C475之间或其相应位置之间的二硫键形成。

[0078] 本文还进一步提供了一种用于治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括使表达TLR7的来自受试者的细胞与有效量的试剂接触,所述试剂拮抗TLR7的C98和C475之间或其

相应位置之间的二硫键形成。

[0079] 对TLR7的提及包括来自任何物种的任何TLR7。通常,提及的TLR7是来自被治疗的受试者的TLR7。因此,在受试者是人的情况下,拮抗剂将针对细胞表达的人TLR7。人TLR7的氨基酸序列在SEQ ID NO:20中列出。图11A至图11C中列出了来自不同物种的TLR7氨基酸序列的比较。重要的是在氨基酸位置98(C98)上的半胱氨酸残基(Cys;C),其与在氨基酸位置475(C475)或来自不同物种的同系物中相应位置的半胱氨酸形成二硫键。这些氨基酸位置在物种间的TLR7分子之间是保守的。在一个实施方案中,本发明拮抗该二硫键的形成,导致活化的TLR7水平降低。其然后降低了TLR7介导的免疫刺激,并降低了NADPH氧化酶介导的ROS形成。

[0080] 本文提出使用该二硫键形成对的拮抗剂。该试剂可以是蛋白质的或非蛋白质的。在一个实施方案中,提出了肽诱饵与TLR7的C475形成二硫键,这防止了C98-C475二硫键的形成。在一个实施方案中,所述试剂是肽诱饵的化学模拟物。

[0081] 微生物病原体的示例包括:幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)、伯氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*)、嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*)、分枝杆菌属(*Mycobacteria* spp.) (例如结核分枝杆菌(*M.tuberculosis*)、鸟分枝杆菌(*M.avium*)、胞内分枝杆菌(*M.intracellulare*)、堪萨斯分枝杆菌(*M.kansasii*)和戈登分枝杆菌(*M.gordonae*))、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、淋病奈瑟氏菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、脑膜炎奈瑟菌(*Neisseria meningitidis*)、单核细胞增生性李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)、化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*) (A组链球菌)、无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*) (B组链球菌)、链球菌(*viridans*组)、粪链球菌(*Streptococcus faecalis*)、牛链球菌(*Streptococcus bovis*)、链球菌(厌氧属)、肺炎链球菌、致病性弯曲杆菌属(*pathogenic Campylobacter* sp.)、肠球菌属(*Enterococcus* sp.)、流感嗜血杆菌、炭疽杆菌(*Bacillus anthracis*)、白喉棒状杆菌(*Corynebacterium diphtheriae*)、棒状杆菌属(*Corynebacterium* sp.)、红斑丹毒丝菌(*Erysipelothrix rhusiopathiae*)、产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)、破伤风梭菌(*Clostridium tetani*)、产气肠球菌(*Enterobacter aerogenes*)、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)、多杀性巴斯德螺旋菌(*Pasteurella multocida*)、拟杆菌属(*Bacteroides* sp.)、具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*)、莫尼氏链球菌(*Streptobacillus moniliformis*)、梅毒螺旋体(*Treponema pallidum*)、雅司螺旋体(*Treponema pertenue*)、钩端螺旋体(*Leptospira*)和以色列放线菌(*Actinomyces israelii*)。致病真菌的示例包括但不限于新隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)、荚膜组织胞浆菌(*Histoplasma capsulatum*)、粗球孢子菌(*Coccidioides immitis*)、皮肤芽孢杆菌(*Blastomyces dermatitidis*)、沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*)和白色念珠菌(*Candida albicans*)。

[0082] 病毒病原体的示例包括:逆转录病毒科(包括但不限于人免疫缺陷病毒(HIV));小RNA病毒科(例如脊髓灰质炎病毒、甲型肝炎病毒、肠病毒、人柯萨奇病毒、鼻病毒、艾柯病毒);杯状病毒科(如引起肠胃炎的株);披甲病毒科(例如马脑炎病毒、风疹病毒);黄病毒科(例如,登革热病毒、脑炎病毒、黄热病病毒);冠状病毒科(例如,冠状病毒);弹状病毒科(例如水泡性口炎病毒、狂犬病病毒);丝状病毒科(例如埃博拉病毒);副粘病毒科(例如副流感

病毒、腮腺炎病毒、麻疹病毒、呼吸道合胞病毒)；正粘病毒科(例如流感病毒)；布尼亚病毒科(例如,汉坦病毒、布尼亚病毒、白蛉病毒(phleboviruses)和内罗病毒)；砂砾病毒科(出血热病毒)；呼肠孤病毒科(例如呼肠孤病毒、环状病毒和轮状病毒)；双RNA病毒；嗜肝病毒科(乙型肝炎病毒)；细小病毒科(细小病毒)；乳头瘤病毒科(乳头瘤病毒、多瘤病毒)；腺病毒科(大多数腺病毒)；疱疹病毒科(单纯疱疹病毒(HSV)1和HSV-2、水痘带状疱疹病毒、巨细胞病毒(CMV))；痘病毒科(天花病毒、牛痘病毒、痘病毒)；和虹彩病毒科(如非洲猪瘟病毒)；以及未分类的病毒(例如,海绵状脑病的病原体、三角肝炎的病原体(被认为是乙型肝炎病毒的缺陷卫星)、非甲,非乙型肝炎的病原体(1类=内部传播;2类=肠胃外传播(即丙型肝炎))；诺如病毒和相关病毒,以及星形病毒)。

[0083] 癌症或肿瘤包括急性淋巴细胞白血病、B细胞淋巴瘤、神经胶质瘤、膀胱癌、胆道癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、结肠直肠癌、绒毛膜癌、上皮细胞癌、胃癌、肝细胞癌、霍奇金淋巴瘤、肺癌、淋巴样细胞源性白血病、黑色素瘤、骨髓瘤、非小细胞肺癌、鼻咽癌、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、肾癌、子宫颈和食道鳞状细胞癌、睾丸癌、T细胞白血病和黑色素瘤。

[0084] 自身免疫性疾病包括系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、炎症性肠疾病、干燥综合征、多发性肌炎、血管炎、韦格纳肉芽肿、结节病、强直性脊柱炎、赖特氏综合征、银屑病关节炎和白塞氏病。在一个实施方案中,自身免疫性疾病是免疫复合物相关的疾病。免疫复合物相关的疾病具体包括但不限于系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、结节性多动脉炎、链球菌后肾小球肾炎、冷沉球蛋白血症以及急性和慢性血清病。

[0085] 本发明考虑的炎性疾病病症的示例包括但不限于那些疾病和病症,其在某些区域导致发红、肿胀、疼痛和热感的反应,旨在保护组织免受损伤或病变的影响。可以使用本发明的方法治疗的炎性疾病包括但不限于痤疮、心绞痛、关节炎、哮喘、吸入性肺疾病、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、结肠炎、积脓症、肠胃炎、肠道流感、坏死性小肠结肠炎、盆腔炎性疾病、咽炎、胸膜炎、嗓子痛、红疹、咽喉痛、尿路感染、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经炎。

[0086] 肽诱饵包含长度为4至190的氨基酸、并且在一个实施方案中,对应于TLR7的R97至C100的氨基酸序列RCNC。该序列在物种间是保守的。重要的是TLR7中的C98或其在TLR7同源物或变体中的等同或对应位置。在一个实施方案中,肽诱饵包含:

[0087] (a) 长度为4至190的氨基酸;

[0088] (b) 氨基酸序列RCNC,其对应于TLR7的R97至C100;和

[0089] (c) 在对应于TLR7的C98位置的半胱氨酸。

[0090] 除了对应于C98的半胱氨酸之外,氨基酸可以取代构象上或功能上等同或相似的氨基酸。

[0091] 在一个实施方案中,试剂包含肽,在本文中被称作“诱饵肽”,其长度为4至190个氨基酸,并且具有与TLR7的氨基酸4和194之间多达190个连续氨基酸具有至少70%的氨基酸序列相似性的氨基酸序列,其包括具有与TLR7的氨基酸48和148之间多达100个连续氨基酸具有至少70%的氨基酸序列相似性的氨基酸序列的肽,并且还包含具有与TLR7的氨基酸78和118之间多达40个连续氨基酸具有至少70%的氨基酸序列相似性的氨基酸序列的肽,条件是所述肽在等同于TLR7的98位的位置上包含半胱氨酸残基(C98)。所述肽的长度可以是4至190个氨基酸。

[0092] 就诱饵肽的长度而言,表述“4至190”包括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、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189和190个氨基酸长度。氨基酸48和148之间的区域包括位置48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147和148。78和118之间的区域包括78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117和118。关于百分比相似性,表述“至少70%”包括70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99和100%。

[0093] 本文所用的术语“相似性”包括在氨基酸水平上比较的序列之间的精确同一性。在氨基酸水平上没有同一性时,“相似性”包括在结构、功能、生化和/或构象水平上仍然彼此相关的氨基酸。在一个特别优选的实施方案中,核苷酸和序列比较是在同一性而不是相似性的水平上进行的。

[0094] 用于描述两个或更多个多肽之间的序列关系的术语包括“参考序列”、“比较窗口”、“序列相似性”、“序列同一性”、“序列相似性百分比”、“序列同一性百分比”、“基本相似”和“基本相同”。“参考序列”的长度至少为4或以上,包括氨基酸残基。因为两个多肽各自可以包含:(1)两个多肽之间相似的序列(即,仅TLR7完整氨基酸序列的一部分);和(2)两个多肽之间有差异的氨基酸序列,所以两个(或更多个)多肽之间的序列比较通常是通过在“比较窗口”上比较序列进行,以鉴定和比较序列相似性的局部区域。“比较窗口”是指与参考序列比较的通常为4个连续氨基酸残基的概念区段。与参考序列(其不包括添加或缺失)相比,比较窗口可包含约20%或更少的添加或缺失(即空位),以进行两个序列的最佳比对。可以通过计算机实现的算法(美国威斯康星州麦迪逊市575Science Drive遗传计算机小组的威斯康星遗传软件包版本7.0中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA)来进行用于比对比较窗口的最佳序列比对,或者通过所选的各种任何方法生成的检查和最佳比对(即在比较窗口中产生最高同源性百分比)进行用于比对比较窗口的最佳序列比对。还可以参考例如Altschul等人(1997)Nucl. Acids. Res. 25:3389所公开的BLAST家族程序。序列分析的详细讨论见于Ausubel等人19.3单元(于:Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley&Sons Inc. 1994-1998。TLR7氨基酸序列的比较显示在图10A至图10D中。

[0095] 如本文所用,术语“序列相似性”和“序列同一性”是指在比较窗口上,在氨基酸与

氨基酸的基础上,相同或在功能上或结构上相似的序列的程度。因此,例如,通过以下计算“序列同一性百分比”:在比较窗口上比较两个最佳比对的序列,确定两条序列中存在的相同氨基酸残基(例如Ala、Pro、Ser、Thr、Gly、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、Arg、His、Asp、Glu、Asn、Gln、Cys和Met)的位置数,以得到匹配的位置数,将匹配的位置数除以比较窗口中的位置总数(即窗口大小),然后将结果乘以100,得出序列同一性的百分比。为了本发明的目的,“序列同一性”应理解是指由DNASIS计算机程序(用于Windows的版本2.5;由美国加利福尼亚州南旧金山的日立软件工程有限公司提供)、使用软件随附的参考手册中使用的标准默认值计算的“匹配百分比”。关于序列相似性,适用类似的描述。

[0096] 在一个实施方案中,与人TLR7的氨基酸4至194之间的氨基酸序列的相似性百分比为至少约80%或85%或90%或95%或99%。这也适用于人TLR7的氨基酸48和148之间以及78和118之间的相似性百分比。

[0097] 因此,试剂包括肽或肽诱饵以及非蛋白质化学试剂,其拮抗C98和C475之间二硫键的形成。非蛋白质化学试剂包括C98i的化学模拟物。肽诱饵包含与C98等同的半胱氨酸。肽诱饵也可以包含对应于人TLR7的R97至C100的氨基酸序列RCNC。

[0098] 在一个实施方案中,肽诱饵包含10个氨基酸,其具有氨基酸序列DX₁RCNCX₂PX₃X₄(SEQ ID NO:27),其中:

[0099] X₁是L、F或M;

[0100] X₂是V或I;

[0101] X₃是V或I或A或P;和

[0102] X₄是P或L或K或R,

[0103] 或在最佳比对后与SEQ ID NO:27具有至少约70%相似性的氨基酸序列,包括与SEQ ID NO:27具有至少约80%、85%、90%、95%或99%的相似性。上述序列对应于人TLR的氨基酸位置95至104或其等同物。人TLR7在104位上包含P。在鼠TLR7中,氨基酸L在104位。两者在95位上都具有D。

[0104] 在一个实施方案中,肽诱饵包含4至40个氨基酸,其选自人TLR7的氨基酸78至118之间,条件是肽在对应于人TLR7的C98的位置处包含半胱氨酸残基,或者该肽在对应于人TLR7的R97至C100的位置处包含氨基酸序列RCNC。

[0105] 在又一个实施方案中,肽诱饵包含氨基酸序列:DFRCNCVPIP(SEQ ID NO:26),其对应于人TLR7的D95至P104,或在最佳比对后与SEQ ID NO:20具有至少70%相似性的氨基酸序列,条件是肽在对应于TLR7的C98的位置包含半胱氨酸。在一个具体的实施方案中,肽诱饵包含SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列。相应的鼠TLR7诱饵肽序列是DLRCNCVPVL(SEQ ID NO:1)或在最佳比对后与SEQ ID NO:1具有70%的相似性,其条件是肽在对应于TLR7的C98位置上包含半胱氨酸。

[0106] 一个或多个氨基酸可以被一个或多个氨基酸类似物取代,或者一个或多个侧链可以被修饰。这样的修饰可以改善血清半衰期并改善稳定性。

[0107] 本发明考虑的侧链修饰的示例包括氨基的修饰,例如通过与醛反应然后通过用NaBH₄还原而进行的还原性烷基化;用乙亚氨酸甲酯酰胺化;用乙酸酐酰化;用氰酸酯对氨基的氨基甲酯化;用2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)对氨基的三硝基苄基化;用琥珀酸酐和四氢邻苯二甲酸酐对氨基的酰化;用5-磷酸吡哆醛对赖氨酸的吡啶氧化,然后用NaBH₄还原。

[0108] 可通过用试剂(诸如2,3-丁二酮、苯基乙二醛和乙二醛)形成杂环缩合产物来修饰精氨酸残基的胍基。

[0109] 可以通过O-酰基异脲的形成来活化石二胺,随后衍生化为例如相应的酰胺来修饰羧基。

[0110] 可通过以下方法来修饰巯基:例如用碘乙酸或碘乙酰胺进行羧甲基化;过甲酸氧化为半胱氨酸;与其他硫醇化合物形成混合的二硫化物;与马来酰亚胺、马来酸酐或其他取代的马来酰亚胺反应;使用4-氯巯基苯甲酸酯、4-氯巯基苯磺酸、氯化苯汞、2-氯巯基-4-硝基苯酚和其他汞形成汞衍生物;在碱性pH下用氰酸酯进行氨基甲酯化。

[0111] 色氨酸残基可通过例如用N-溴代琥珀酰亚胺氧化或用2-羟基-5-硝基苄基溴或亚磺酰基卤化物使吲哚环烷基化来修饰。另一方面,酪氨酸残基可以通过用四硝基甲烷硝化而改变,以形成3-硝基酪氨酸衍生物。

[0112] 组氨酸残基的咪唑环的修饰可通过用碘乙酸衍生物进行烷基化或用焦碳酸二乙酯进行N-乙酯基化来实现。

[0113] 在肽合成过程中掺入非天然氨基酸和衍生物的示例包括但不限于使用正亮氨酸、4-氨基丁酸、4-氨基-3-羟基-5-苯基戊酸、6-氨基己酸、叔丁基甘氨酸、正缬氨酸、苯基甘氨酸、鸟氨酸、肌氨酸、4-氨基-3-羟基-6-甲基庚酸、2-噻吩丙氨酸和/或氨基酸的D-异构体。

[0114] 例如可以使用交联剂来稳定3D构象,使用同双功能交联剂,例如具有(CH₂)_n间隔基团(其中n=1至n=6)的双功能酰亚胺酯、戊二醛、N-羟基琥珀酰亚胺酯和异双功能试剂,其通常包含氨基反应性部分,例如N-羟基琥珀酰亚胺和另一基团特异性反应性部分,例如马来酰亚胺或二硫部分(SH)或碳二亚胺(COOH)。另外,可以通过例如并入C和N-甲基氨基酸、在氨基酸的C和C原子之间引入双键、以及通过引入共价键(例如在N和C末端之间、在两个侧链之间或在侧链与N或C末端之间形成酰胺键),形成环肽或类似物,从而在构象上限制肽。

[0115] 模拟物是另一组有用的试剂,用于测试通过C98-C475二硫键拮抗TLR7激活的能力。该术语旨在指与其模拟的诱饵肽具有某种化学相似性但拮抗其与靶标(即人(或鼠)TLR7的C475)相互作用的物质。肽模拟物可以是模拟蛋白质二级结构元素的含肽分子(Johnson等人(1993)Peptide Turn Mimetics in Biotechnology and Pharmacy, Pezzuto等人Eds., Chapman and Hall, New York)。使用肽模拟物背后的基本原理是蛋白质的肽主链的存在主要用于氨基酸侧链的定向,以促进与TLR7的C475的分子相互作用。因此,肽模拟物被设计成类似于诱饵肽,以允许分子相互作用。本文还考虑了化学模拟物,其是非蛋白质的,但具有与C98i相同的作用和/或某些构象。

[0116] 肽诱饵可进一步包含促进肽被细胞摄取的部分。可以采用任何数量或类型的细胞摄取部分,例如但不限于TAT(SEQ ID NO:2);SynB1(SEQ ID NO:3)、SynB3(SEQ ID NO:4)、PTD-4(SEQ ID NO:5)、AD-5(SEQ ID NO:6)、FHV包衣蛋白(SEQ ID NO:7)、BMV Gag(7-25)(SEQ ID NO:8)、HTLV-III Rex-(4-16)(SEQ ID NO:9)、D-Tat(SEQ ID NO:10)和R9-Tat(SEQ ID NO:11)。这样的部分被称为亲水性或阳离子肽。其他摄取肽包括两亲性(或两亲)肽,例如但不限于运输蛋白嵌合体(SEQ ID NO:12)、MAP(SEQ ID NO:13)、SBP(SEQ ID NO:14)、FBPC(SEQ ID NO:15)、MPG[MPGac](SEQ ID NO:16)、MPG(NLS)(SEQ ID NO:17)、Pep-1(SEQ ID NO:18)和Pep-2(SEQ ID NO:19)。在另一个替代方案中,摄取部分包含周期性氨基

酸序列,例如包含聚精氨酸或聚赖氨酸。其他摄取肽是Guitoti等人(2017)同上的表1中列出的那些,其内容通过引用并入本文。

[0117] 尽管待治疗的受试者包括通过靶向人TLR7的人,但本发明具有兽医学应用,例如治疗家畜动物(例如牛、绵羊、猪、山羊、马)、家养宠物(例如猫、狗)、以及圈养的野生动物和实验室测试动物(例如小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠、兔子)。在一个实施方案中,受试者是人。

[0118] 因此,本文中提供了在人受试者中抑制TLR7介导的免疫刺激活性的方法,该方法包括使表达TLR7的来自受试者的细胞与有效量的试剂接触,所述试剂拮抗TLR7的C98和C475之间或其相应的位置之间的二硫键形成。

[0119] 本文进一步提供治疗人受试者的自身免疫性疾病、病毒或微生物病、炎症或癌症的方法,该方法包括使表达TLR7的来自受试者的细胞与有效量的试剂接触,所述试剂拮抗TLR7的C98和C475之间或其相应的位置之间的二硫键形成。

[0120] 本文还提供了治疗人受试者过量产生活性氧的方法,该方法包括使表达TLR7的来自受试者的细胞与有效量的试剂接触,所述试剂拮抗TLR7的C98和C475之间或其相应的位置之间的二硫键形成。

[0121] 本文中提供了一种用于治疗人受试者的TLR7介导的炎症的方法,该方法包括使表达TLR7的来自受试者的细胞与有效量的试剂接触,所述试剂拮抗TLR7的C98和C475之间或其相应的位置之间的二硫键形成。

[0122] 本文还提供一种治疗人受试者自身免疫性病症的方法,该方法包括使表达TLR7的来自受试者的细胞与有效量的试剂接触,所述试剂拮抗TLR7的C98和C475之间或其相应的位置之间的二硫键形成。

[0123] 本文还进一步提供了用于治疗人受试者的癌症的方法,该方法包括使表达TLR7的来自受试者的细胞与有效量的试剂接触,所述试剂拮抗TLR7的C98和C475之间或其相应的位置之间的二硫键形成。

[0124] 当试剂是肽诱饵时,氨基酸序列通常源自相同的被治疗物种的TLR7(例如治疗人受试者的人TLR7)。这被称为自体治疗。但是,在用于另一物种的情况下,存在某些物种的TLR之间的实质性氨基酸序列相似性,因此,本发明考虑到并涵盖了异源治疗。

[0125] 本文进一步教导了拮抗TLR7的C98和C475之间或其相应的位置之间的二硫键形成的试剂在制备抑制受试者中自身免疫性疾病、病毒或微生物病、炎症或癌症的药物中的用途。

[0126] 本文提供了拮抗TLR7的C98和C475之间或其相应的位置之间的二硫键形成的试剂,用于抑制受试者中自身免疫性疾病、病毒或微生物病、炎症或癌症。

[0127] 本文还进一步提供药物组合物,该药物组合物包含拮抗TLR7的C98和C475之间或其相应的位置之间的二硫键形成的试剂和一种或多种药物载体、赋形剂和/或稀释剂。

[0128] 本文还提供了用于治疗受试者过量产生活性氧或TLR7介导的炎症的用途和试剂。

[0129] 试剂包括该试剂的药学上可接受的盐。术语“药学上可接受的盐”是指本发明试剂的生理上和药学上可接受的盐:即,保留了母体试剂所需的生物学活性并且不赋予其不希望的毒理作用的盐。

[0130] 本发明的药物组合物可以以多种方式施用,这取决于是否需要局部或全身治疗以及待治疗的区域。施用可以是局部的(包括眼和粘膜施用,包括阴道和直肠递送)、肺部施

用,例如通过吸入或吹入粉末或气雾剂,包括通过喷雾器;气管内、鼻内,表皮和透皮)、口服或肠胃外施用。肠胃外施用包括静脉内、动脉内、皮下、腹腔内或肌内注射或输注;或颅内施用,例如鞘内或室内施用。用于局部施用的药物组合物和制剂可以包括透皮贴剂、软膏、洗剂、乳膏、凝胶、滴剂、栓剂、喷雾剂、液体和粉剂。常规药物载体、水性、粉末或油性基质、增稠剂等可以是必需的或期望的。

[0131] 可以根据制药工业中众所周知的常规技术来制备本发明的药物制剂,其可以方便地以单位剂型呈现。这样的技术包括使活性成分与一种或多种药物载体或赋形剂组合的步骤。通常,通过将活性成分与液体载体或细分的固体载体或两者均匀且紧密地组合在一起来制备制剂,然后,如果需要,将产品成型。

[0132] 本发明的组合物可以配制成许多可能的剂型中的任何一种,例如但不限于片剂、胶囊、凝胶胶囊、液体糖浆、软凝胶、栓剂和灌肠剂。本发明的组合物也可以配制成在水性、非水性或混合介质中的悬浮液。水性悬浮液可以进一步包含增加悬浮液粘度的物质,包括例如羧甲基纤维素钠、山梨糖醇和/或葡聚糖。悬浮液也可以包含稳定剂。

[0133] 本发明的制剂包括脂质体制剂。如本发明中所使用的,术语“脂质体”是指由布置在一个或多个球形双层中的两亲性脂质组成的囊泡。脂质体是单层或多层囊泡,其具有由亲脂性材料形成的膜和含有待递送组合物的水性内部。

[0134] 治疗组合物的制剂及其随后的施用(给药)被认为在本领域技术人员的能力范围内。给药取决于待治疗疾病状态的严重程度和反应性、以及持续数天至数月、或者直到治愈或实现疾病状态减轻的治疗过程。最佳给药方案可以根据患者体内药物蓄积的测量结果来计算。普通技术人员可以容易地确定最佳剂量、给药方法和重复率。最佳剂量可以根据各个寡核苷酸的相对效力而不同,并且通常可以根据在体外和体内动物模型中发现的有效 EC_{50} s进行估算。通常,剂量为每kg体重 $0.01\mu\text{g}$ 至 100g 肽诱饵,并且可以每天、每周、每月或每年一次或多次给药,甚至每2至20年一次给药。本领域普通技术人员可以基于测得的停留时间和体液或组织中药物的浓度,容易地估计给药的重复率。在成功治疗之后,可能希望让患者接受维持治疗以防止疾病状态的复发,其中以每kg体重 $0.01\mu\text{g}$ 至 100g 的维持剂量施用试剂,历经数天、数周或数月。

[0135] 靶向的细胞通常是固有和适应性免疫细胞或表达TLR7的任何细胞。示例包括吞噬细胞(例如巨噬细胞、嗜中性粒细胞和树突细胞)、NK细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、淋巴细胞(包括B-和T-淋巴细胞)和上皮细胞。

[0136] 实施例

[0137] 通过以下非限制性实施例进一步描述本文公开的方面。

[0138] 材料和方法

[0139] 病毒

[0140] 甲型流感病毒(IAV)疫苗株HKx31(H3N2)和BJx109(H3N2)由Deakin大学医学院,墨尔本大学免疫学和微生物学系,Peter Doherty感染与免疫研究所提供。病毒以 6.7×10^8 噬菌斑形成单位/ml(PFU/ml)提供,并储存在 -80°C 下。在使用当天解冻等分试样,并用磷酸盐缓冲液稀释(PBS;美国圣路易斯的Sigma Aldrich(美国,D837号),当需要用于体外感染时)。人IAV病毒,包括季节性H3N2(A/纽约/55/2004,A/布里斯班/9/2007)、季节性H1N1(A/巴西/11/1978,A/新喀里多尼亚/20/1999,A/所罗门群岛/3/2006)、A(H1N1)pdm09株(A/加

利福尼亚/7/2009,A/奥克兰/1/2009),鼻病毒(RV16株),呼吸道合胞病毒(A2株),人副流感病毒3型(C243),人间质肺病毒(CAN97-83株),腮腺炎病毒(Enders株)和新城疫病毒(V4株)由墨尔本大学免疫学和微生物学系,Peter Doherty感染与免疫研究所提供。以下机构还提供了其他病毒:登革热病毒血清型2(越南2005年分离株,莫纳什大学,维多利亚州克莱顿市);轮状病毒(Rhesus和UK株,Peter Doherty感染与免疫研究所微生物学和免疫学系);仙台病毒(Cantell株,莫纳什大学哈德森医学研究所),2型单纯疱疹病毒(186株,莫纳什大学哈德森医学研究所),牛痘病毒(Western Reserve株,WR NIH-TC;澳大利亚国立大学)和HIV(NL4-3(AD8)-EGFP株,墨尔本大学Peter Doherty感染与免疫研究所)。病毒在磷酸盐缓冲盐水(PBS,目录号#D8537,美国Sigma)中提供,并在-80℃储存直至使用。使用当天,将病毒快速融化并在感染前于37℃孵育。在指示处,通过加热(56℃)30分钟或紫外线(30分钟)灭活HKx31病毒。

[0141] 细菌

[0142] 在所有实验中,肺炎链球菌EF3030(荚膜19F型)被用作亲本肺炎链球菌株(澳大利亚墨尔本大学提供)。EF3030株是一种临床分离株,通常被用作人运输的模型,因为它通常定植在鼻咽中,而无细菌血症。对于感染实验,肺炎球菌在Todd-Hewitt肉汤中于37℃静态生长,并补充有0.5%w/v酵母提取物,至光密度(600nm)为0.4-0.45。将培养物在湿冰上放置5分钟,并于-70℃在8%v/v甘油中冷冻。在每个实验之前确认活细菌计数。如我们先前所示(King等人(2013)The Journal of Allergy and Clinical Immunology 131(5):1314-1321e1314),之前分型了一种明确的不可分型的流感嗜血杆菌(NTHi;MU/MMC-1)株,并测序证明其是NTHi。

[0143] 定制C98i肽

[0144] 以下的定制肽购自GenicBio Limited:YGRKKRRQRRDLRCNCVPVL-NH₂(SEQ ID NO:57)(C98i-TAT;10个氨基酸的TLR7抑制剂)。YGRKKRRQRRCLVPNDCLV-NH₂(SEQ ID NO:44)(乱序的C98i-TAT;10个氨基酸的TLR7抑制剂)。DLRCNCVPVL-NH₂(SEQ ID NO:1)(C98i-无TAT;10个氨基酸的TLR7抑制剂,HIV-TAT除外)。DFRCNCVPIV-NH₂(SEQ ID NO:26)(人C98i-无TAT;10个氨基酸的TLR7抑制剂,HIV-TAT除外)。RCNC-NH₂(SEQ ID NO:45)(4AA C98i-无TAT;4个氨基酸的TLR7抑制剂,HIV-TAT除外)。RANC-NH₂(SEQ ID NO:46)(4AA 98M C98i-无TAT;半胱氨酸98突变,4个氨基酸的TLR7抑制剂,HIV-TAT除外)。RANA-NH₂(SEQ ID NO:47)(4AA 98100M C98i-无TAT;半胱氨酸98和100突变,4个氨基酸的TLR7抑制剂,HIV-TAT除外)。RCNA-NH₂(SEQ ID NO:48)(4AA 100M C98i-无TAT;半胱氨酸100突变,4个氨基酸的TLR7抑制剂,HIV-TAT除外)。将所有肽溶解在无内毒素的水中,并制备为20μL、50μL和100μL等分试样中的10mM储备溶液。储存在-20℃下。

[0145] NOX2氧化酶抑制剂的缀合

[0146] 在Fmoc-PAL-PEG-PS树脂上通过标准的Fmoc固相肽合成(SPPS)(Life Technologies,美国,加载量为0.17mmol/g)进行gp91 ds-tat(YGRKK-RRQRR-RCSTR-IRRQL-NH₂-SEQ ID NO:23)的制备。使用20%v/v吡啶的N,N-二甲基甲酰胺(DMF)溶液进行Fmoc脱保护反应。使用Fmoc保护的氨基酸,用013(6-氯苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐(HCTU)作为偶联剂和N,N-二异丙基乙胺(DIPEA)作为激活剂进行偶联反应。使用2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)测试监控反应,以指示存在或不存在游离氨基。使用适当的Fmoc和

侧链保护的氨基酸,对所有20个氨基酸残基手动进行交替顺序的脱保护和偶联反应。在最后的脱保护步骤之后,使用三氟乙酸(TFA)/三异丙基硅烷(TIPS)/1,2-乙二硫醇(EDT)/水(92.5:2.5:2.5:2.5)持续4小时,将小部分肽从树脂上切割,在此过程中同时除去侧链保护基。然后使用反相高压液相色谱法(HPLC),使用Phenomenex Luna 5C8(2) 100 Å AXIA柱(10 Å, 250x 21.2mm)和0.1% TFA/水和0.1% v/v TFA/ACN作为缓冲溶液,纯化粗肽。通过ESI-MS分析确认纯化的gp91 ds-tat肽具有正确的分子量: $C_{109}H_{207}N_{52}O_{25}S[M+5H^+]$ 的计算值:m/z 535.3,观察值:m/z 535.7; $C_{109}H_{208}N_{52}O_{25}S[M+6H^+]$ 的计算值:m/z 446.3,观察值:m/z 446.6; $C_{109}H_{209}N_{52}O_{25}S[M+7H^+]$ 的计算值:m/z 382.7,观察值:m/z 382.9。

[0147] 使用Fmoc-PEG4-OH、Fmoc-PEG3-OH、Fmoc-PEG4-OH和Fmoc-Asp(OChol)-OH作为氨基酸,通过手动SPPS从树脂结合的gp91 ds-tat上进行胆甾醇缀合的gp91 ds-tat(cgp91 ds-tat;Ac-Asp(OChol)-PEG4-PEG3-PEG4-gp91-NH₂)的制备(如上所述)。在最后的脱保护步骤之后,使用乙酸酐和DIPEA的DMF溶液的混合物对N-末端加帽,并使用TFA/TIPS/EDT/水(92.5:2.5:2.5:2.5)从树脂上切割肽构建体。如前所述纯化粗肽,得到cgp91 ds-tat: $C_{173}H_{319}N_{56}O_{43}S[M+5H^+]$ 的计算值:m/z 780.3,观察值:m/z 780.6; $C_{173}H_{320}N_{56}O_{43}S[M+6H^+]$ 的计算值:m/z 650.4,观察值:m/z 650.7; $C_{173}H_{321}N_{56}O_{43}S[M+7H^+]$ 的计算值:m/z 557.6,观察值:m/z 558.0。

[0148] 以与cgp91 ds-tat相同的方式进行乙酯缀合的gp91 ds-tat(egp91 ds-tat;Ac-Asp(OEt)-PEG4-PEG3-PEG4-gp91-NH₂)的制备,不同之处在于,在最终偶联步骤中用Fmoc-Asp(OEt)-OH取代Fmoc-Asp(OChol)-OH: $C_{148}H_{277}N_{56}O_{43}S[M+5H^+]$ 的计算值:m/z 711.8,观察值:m/z 712.1; $C_{148}H_{278}N_{56}O_{43}S[M+6H^+]$ 的计算值:m/z 593.3,观察值:m/z 593.7; $C_{148}H_{279}N_{56}O_{43}S[M+7H^+]$ 的计算值:m/z 508.7,观察值:m/z 509.0。

[0149] 如上针对非乱序的gp91 ds-tat所述的,通过手动SPPS进行18个氨基酸乱序的gp91 ds-tat(Sgp91 ds-tat;Ac-Asp(OChol)-PEG4-PEG3-PEG4-RKK-RRQRR-RCLRI-TRQSR-NH₂-SEQ ID NO:24)肽的制备。然后使用与上述用于非乱序的cgp91 ds-tat相同的方法,通过PEG接头将树脂结合的sgp91 ds-tat与胆甾醇缀合。以相同的方式纯化粗肽,得到cgp91 ds-tat: $C_{162}H_{307}N_{54}O_{40}S[M+5H^+]$ 的计算值:m/z 736.3,观察值:m/z 736.5; $C_{162}H_{308}N_{54}O_{40}S[M+6H^+]$ 的计算值:m/z 613.7,观察值:m/z 614.0; $C_{162}H_{309}N_{54}O_{40}S[M+7H^+]$ 的计算值:m/z 526.2,观察值:m/z 526.3。

[0150] 甲型流感病毒的体内感染和药物治疗

[0151] 年龄相匹配(6-12周)的同窝雄性未经免疫WT对照和NOX2^{-/-}小鼠(也称为gp91 phox^{-/-}[Pollock等人(1995)Nature Genetics 9(2):202-209])通过戊烷吸入麻醉并经鼻内(i.n.)感染1×10⁴或1×10⁵噬菌斑形成单位(PFU)的Hkx31,其体积为35L,用PBS稀释。流感感染后第1、3或7天对小鼠实施安乐死。在某些实验中,在Hk-x31感染前一天经鼻内递送二甲亚砜(DMSO,对照;Sigma)、未缀合的gp91dstat(0.02mg/kg,0.2mg/kg)、胆甾醇缀合的gp91dstat(0.02mg/kg,0.2mg/kg)或胆甾醇缀合的乱序的gp91ds-TAT(0.02mg/kg)处理麻醉后的小鼠,此后每天处理,持续3天。在其他实验中,用咪喹莫特(50μg/小鼠,i.n.)或过氧化氢酶(1000U/小鼠,i.n.)处理麻醉的小鼠,然后在第1天对小鼠进行安乐死以进行分析。

[0152] 气道炎症和不同细胞的计数

[0153] 通过腹腔内(i.p)注射氯胺酮/亚二甲苯(100mg/kg)混合物处死小鼠。从下颌到胸

腔顶部切开一个切口,在此处将唾液腺分离以暴露气管表面。去除气管上的平滑肌层,在气管顶部附近做一个小切口。将带鞘的21号针头插入内腔,并重复灌洗300-400 μ l PBS(4次)。用0.4%w/v台盼蓝溶液(ThermoFisher Scientific,美国)对BALF中的细胞总数进行染色,并使用Countess(注册商标)自动细胞计数器(Invitrogen,目录号#C10227)评估活细胞。从BALF(5x10⁴细胞)制备不同的细胞分析,所述BALF在Cytospin 3(Shandon,UK)上以3xg离心5分钟。此后,将载玻片在100%v/v丙醇中固定1分钟,然后干燥过夜。最后,将样品用Rapid I Aqueous Red StainTM(澳大利亚AMBER Scientific)和Rapid II Blue StainTM(澳大利亚AMBER Scientific)染色10分钟,然后浸入70%v/v乙醇和无水乙醇两次,然后放入二甲苯中持续5分钟(2次)。然后将样品封装在DPX封装介质(Labchem,NSW,澳大利亚)中,将盖玻片牢固地放在顶部。通过标准的形态学标准,将来自随机视野的每个样品500个细胞分为巨噬细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和淋巴细胞。数据表示为通过各自细胞类型乘以总活细胞数计算得出的总细胞数,以及细胞群的百分比。

[0154] 细胞培养和原代细胞分离

[0155] 人肺泡巨噬细胞获自在澳大利亚克莱顿市莫纳什大学莫纳什医学中心接受支气管镜检查的受试者,以研究潜在的肺部疾病。将支气管镜楔入右中叶,然后用25-50mL盐水冲洗入气道,然后抽吸。使用前用PBS洗涤细胞两次,然后将其悬浮在含有10%v/v FCS、100U/mL青霉素和100g/mL链霉素的培养基(Roswell Park Memorial Institute (RPMI, Life Technologies,目录号#21870-076)中,持续约24小时。

[0156] 通过肺灌洗从年龄相匹配(6-12周)的雄性C57B1/6J(WT)、NOX2^{-/-}、NOX4^{-/-}(由澳大利亚墨尔本大学眼科研究中心提供)、TLR7^{-/-}(由纽卡斯尔大学健康与医学院生物医学科学与药学院、澳大利亚新南威尔士州亨特医学研究所提供)、TLR9^{-/-}(由澳大利亚维多利亚州墨尔本市贝克IDI心脏与糖尿病研究所提供)或SOD3^{-/-}小鼠(由RMIT大学健康与生物医学学院提供)中分离出肺泡巨噬细胞。从下颌到胸腔的顶部做一个薄而浅的中线切口,并分离喉以暴露气管的顶部。去除覆盖气管的平滑肌层,切开一个小切口并将带鞘的21号针头插入内腔。用300-400L PBS反复(3次)灌洗肺。离心沉淀细胞悬液(200xg在4 $^{\circ}$ C下离心5分钟)。除去上清液,然后将细胞重悬于1mL无菌PBS中,并使用Countess(注册商标)自动细胞计数器(Invitrogen,目录号#C10227)计数。然后将细胞接种到24孔板(1 $\times$ 10⁵细胞/孔)中,进行免疫细胞化学和荧光显微镜检查,如下所述。

[0157] 将永生化的细胞系RAW 264.7细胞(RAW 264.7(ATCC(注册商标)TIB-71(商标))和永生化的骨髓来源的巨噬细胞(BMDM;由莫纳什大学哈德逊医学研究所和德国波恩大学固有免疫研究所提供)保持于Dulbecco改良的Eagle's培养基(DMEM;Sigma)中,该培养基中补充有L-谷氨酰胺、葡萄糖(4500mg/L)、丙酮酸钠(110mg/L)和胎牛血清(FBS;10%v/v)。TLR2^{-/-}、TLR3^{-/-}、TLR4^{-/-}、TLR7^{-/-}、TRIF^{-/-}、RIG-I^{-/-}、MyD88^{-/-}、NLRP3^{-/-}和UNC93B1^{-/-}永生化的BMDM维持在RPMI培养基中,该培养基补充有葡萄糖(4500mg/L)、非必需氨基酸、丙酮酸钠、链霉素和FBS(10%v/v)和DMEM(20%v/v)(包含如上所述的所有补充剂)。将所有细胞在5%CO₂和95%v/v空气的湿润混合物中保持在37 $^{\circ}$ C。每周更换培养基2至3次,当汇合度为约80-90%时,通过刮擦对细胞传代培养,并使用Countess(注册商标)自动细胞计数器进行计数。

[0158] 永生化的细胞系RAW 264.7细胞(源自小鼠腹膜)和永生化的骨髓来源的巨噬细胞(BMDM)维持在Dulbecco改良的Eagle培养基(DMEM;Sigma)中,该培养基补充有L-谷氨酰胺、

葡萄糖 (4500mg/L)、丙酮酸钠 (110mg/L) 和胎牛血清 (FBS; 10%)。所有细胞保持在5%CO₂和95%空气的湿润混合物中在37°C下。每周更换培养基2至3次,当汇合度为约80-90%时,通过刮擦对细胞进行传代培养,并使用Countess (注册商标) 自动细胞计数器 (Invitrogen) 进行计数。

[0159] 共聚焦荧光显微镜

[0160] 将细胞接种到24孔板的玻璃盖玻片上,并允许在DMEM中粘附24小时。然后在无血清16培养基中、在不存在或存在HKx31甲型流感病毒 (MOI 0.1、1或10) 的情况下在不同时间点 (5分钟、15分钟、30分钟和1小时) 孵育细胞。在某些情况下,在用Dynasore (100M) 或Dynasore的空载体DMSO (0.1% w/v) 感染之前,将细胞预处理30分钟。接下来,将细胞用PBS (0.01M) 洗涤,并用4% v/v多聚甲醛 (PFA) 固定15分钟。用含Triton X-100 (0.25% v/v) 的PBS处理细胞10分钟,然后用PBS洗涤3次,15分钟。然后将样品与含10% v/v山羊血清的PBS,和/或在小鼠IgG封闭剂 (目录号#MKB-2213, Vector Laboratories) 上孵育2小时。随后添加核蛋白一抗 (1:1000) 在4°C下持续24小时以定位甲型流感病毒,加入纯化的小鼠抗NOX2 (1:500) 以定位NOX2,加入兔抗TLR7 (1:1000) 以定位TLR7,或加入小鼠抗早期内体抗原1 (EEA1; 1000) 以定位早期内体。在一些实验中,以指定的浓度使用抗体组合以确定蛋白质的共同定位。用PBS (0.01M) 在30分钟内将细胞洗涤3次。洗涤后,将二抗山羊抗兔alexa 594 (1:1000)、山羊抗兔红647 (1:500, 1:1000) 和/或生物素化抗小鼠IgG添加到适当的孔中,在黑暗中持续2小时。最后,将细胞在30分钟内用PBS (0.01M) 洗涤3次;并且在适当的情况下 (施加小鼠一抗和二抗Fluorescein Avidin DCS 5分钟)。使用10-20μL二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI),将盖玻片安装到显微镜载玻片上持续3分钟。在尼康立式倒置共聚焦荧光显微镜 (Nikon D-eclipse C1) 上观察玻片并拍照。在整个分析过程中,由对治疗组不知情的两名观察员评估所有免疫组化,并进行所有适当的对照,以便使用一抗和二抗的所有组合以确保不发生交叉反应。

[0161] 通过分别检查来自WT、TLR7^{-/-}和NOX2^{-/-}小鼠的肺泡巨噬细胞中的染色程度,验证了TLR7和NOX2两种抗体的特异性。TLR7^{-/-}巨噬细胞中没有TLR7染色 (图2C)。类似地,与WT细胞相比,使用NOX2抗体在NOX2^{-/-}小鼠的肺泡巨噬细胞中未观察到染色。可以在Judkins等人 (2010) American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology 298(1): H24-32的文献中找到有关此NOX2抗体特异性的进一步证据。

[0162] 内体的ROS产生

[0163] 人肺泡巨噬细胞; WT、TLR7^{-/-}、TLR2^{-/-}、TLR3^{-/-}、TLR4^{-/-}、TRIF^{-/-}、MyD88^{-/-}、RIG-I^{-/-}和NLRP3^{-/-} BMDM; 小鼠原代WT、NOX2^{-/-}、NOX4^{-/-}、TLR7^{-/-}、TLR9^{-/-}或SOD3^{-/-}肺泡巨噬细胞和RAW264.7细胞接种 (1 × 10⁵ 细胞/孔) 到24孔板的玻璃盖玻片上,使细胞在DMEM或RPMI培养基中粘附24小时,然后用OxyBURST Green H2HFF (100M) 和/或LysoTracker Deep Red (50nM) 预处理5分钟。接着用PBS (对照组; 0.01M)、咪喹莫特 (10g/mL)、单链RNA (ssRNA; 100M) 孵育,或在不同时间点 (5分钟、15分钟、30分钟和1小时) 在无血清培养基中感染H3N2流感病毒 (A/纽约/55/2004, A/布里斯班/9/2007)、季节性H1N1甲型流感病毒 (A/巴西/11/1978, A/新喀里多尼亚/20/1999, A/所罗门群岛/3/2006)、A (H1N1) pdm甲型流感病毒 (A/加利福尼亚/7/2009, A/奥克兰/1/2009), 或使用重配疫苗株HKx31 (MOI 0.1-10) 或BJx109 (MOI 10)。其他孔在类似条件下感染了登革热病毒 (MOI 10)、仙台病毒 (40HAU/mL)、人副流

感病毒(MOI 10)、人间质肺病毒(MOI 10)、鼻病毒(MOI 10)、呼吸道合胞病毒(MOI 10)、HIV(MOI 10)、新城疫病毒(MOI 10)、腮腺炎病毒(MOI 10)、恒河猴或UK轮状病毒(各为MOI 10)或单纯疱疹病毒2(MOI 10)。在某些情况下,在感染前用超氧化物歧化酶(SOD;300U/mL)、夹竹桃麻素(300M)、gp91dstat(50M)或巴氟霉素A(100nM)预处理细胞30分钟。接下来,将细胞用PBS(0.01M)洗涤并用4%PFA固定15分钟。固定后,然后在30分钟内用PBS洗涤细胞3次。然后用10-20 μ L DAPI将盖玻片安装在显微镜载玻片上持续3分钟,然后在尼康立式共聚焦荧光显微镜(Nikon D-eclipse C1)上进行分析和拍照。

[0164] NOX2氧化酶组装

[0165] 为了测量NOX2氧化酶活性,我们使用共聚焦荧光显微镜评估了p47phox和NOX2组装。对照和HKx31病毒感染的WT和TLR7^{-/-}肺泡巨噬细胞如上文在“共聚焦荧光显微镜”下所述进行处理。在另外的实验中,在病毒感染之前,用Dynasore(100M)或巴氟霉素A(100nM)处理WT细胞30分钟。用10%v/v含山羊血清的PBS暴露样品2小时后,添加兔抗p47phox抗体(1:1000)和小鼠抗NOX2抗体(1:500),然后添加适当的二抗,如上所述。

[0166] L-012增强的化学发光

[0167] 使用L-012增强的化学发光来定量ROS的产生。将RAW264.7细胞和原代小鼠肺泡巨噬细胞接种到96孔OptiView平板中(5×10^4 细胞/孔)。用DMSO(对照,适当浓度)、未缀合的gp91dstat(100nM-30M)、胆甾醇-缀合的gp91dstat(100nM-30M)或乙基缀合的gp91dstat(100nM-30M)处理RAW264.7细胞1h。从用DMSO(对照)、未缀合的gp91dstat(0.02mg/kg,0.2mg/kg)、胆甾醇缀合的gp91dstat(0.02mg/kg,0.2mg/kg)处理的和/或感染Hkx31甲型流感病毒(1×10^5 PFU)的小鼠中收集BALF。然后用37°C Krebs-HEPES缓冲液的介质洗涤细胞,然后在不存在(即基础的ROS产生)或存在(刺激的ROS产生)PKC和NADPH氧化酶激活剂佛波醇二丁酸酯(PDB; 10^{-6} mol/L)的情况下,将其暴露于含有L-012(10^{-4} mol/L)的Krebs-HEPES缓冲液中。在空白孔(即没有细胞)中进行相同的处理,其用作背景发光的对照。所有治疗组一式三份进行。使用Chameleon(商标)发光检测器(Hidex,型号425105,芬兰)检测光子发射[相对光单位(RLU)/s],并记录每孔1s,经60个循环。每组的各个数据点是从三个重复的平均值减去相应空白对照得出的。数据在剂量反应曲线中表示为对照%或原始值(离体实验)。

[0168] 为了测试未缀合的或胆甾醇缀合的gp91dstat是否表现出ROS清除特性,使用了黄嘌呤氧化酶无细胞测定法。简而言之,将含有L-012(100M)的Krebs-HEPES缓冲液添加到96孔Optiview平板中。随后,将0.1%w/v DMSO、未缀合的gp91dstat(Ugp91ds-TAT,1M)或胆甾醇缀合的gp91ds-TAT(1M)与黄嘌呤(100M)组合加入。加入黄嘌呤氧化酶(0.03U/mL)后,立即使用Chameleon(商标)发光检测器(Hidex,型号425105,芬兰)检测光子发射[相对光单位(RLU)/s],并从每个孔中记录1s,经60个循环。每组的各个数据点是从三个重复的平均值减去相应空白对照得出的。数据表示为原始值。

[0169] 定点诱变、测序和转染

[0170] HA-TLR7 cDNA购自Sino Biological(小鼠TLR7;目录号#MG50962-NY,基因库参考序列号为NM_133211.3)。使用QuikChange多点定向诱变试剂盒(目录号#200514,Agilent Technologies)将TLR7中的关键半胱氨酸残基(Cys260、Cys263、Cys270、Cys273、Cys98和Cys445)突变为丙氨酸。WT和突变体HA-TLR7的序列已由澳大利亚基因组研究机构确认。使

用线性聚乙烯亚胺 (PEI) 转染细胞 [Halls 等人 (2015) *Methods in Molecular Biology* 1335:131-161]。

[0171] 高含量比例FRET成像

[0172] 将细胞在黑、光学透明的96孔板中铺板,并使用PEI在200ng/孔FRET生物传感器DNA的悬浮液中转染48小时。实验前,将细胞在0.5% v/v FBS介质中部分血清饥饿过夜。使用高含量GE Healthcare INCell 2000分析仪和Nikon Plan Fluor ELWD 40x (NA 0.6) 物镜和FRET模块进行荧光成像,如所述 (Jensen 等人 (2014) *The Journal of Biological Chemistry* 289(29):20283-20294)。对于CFP/YFP (CKAR) 发射比分析,使用CFP过滤器 (430/24) 依次激发细胞,其中使用YFP (535/30) 和CFP (470/24) 过滤器测量发射,并针对CFP/YFP 过滤器对 (Quad3) 优化多色性。对于GFP/RFP (EKAR) 发射比分析,使用FITC过滤器 (490/20) 依次激发细胞,其中使用dsRed (605/52) 和FITC (525/36) 过滤器测量发射,并针对FITC/dsRed过滤器对 (Quad4) 优化多色性。每100秒对细胞成像20分钟 (每100秒在12个孔中捕获2个视野的图像)。使用用于Image J 34的FIJI分布编写的内部脚本分析数据,如所述 (Halls 等人 (2015) 同上)。

[0173] 通过QPCR对mRNA进行定量

[0174] 用咪喹莫特 (10g/ml)、聚I:C (100ng/ml)、CpG (10g/mL)、ssRNA (500g/mL) 或过氧化氢酶 (1000U/ml) 处理细胞24小时。在指示处,将细胞用夹竹桃麻素 (300M)、SOD (300U/mL) 或巴氟霉素A (100nM) 预处理30分钟。从用DMSO (对照)、未缀合的gp91dstat (0.02mg/kg, 0.2mg/kg)、胆甾醇缀合的gp91dstat (0.02mg/kg, 0.2mg/kg)、乱序的胆甾醇缀合的gp91dstat (0.02mg/kg) 处理的小鼠和/或感染Hk-x31甲型流感病毒 (1×10^5 PFU) 的感染3天后的小鼠肺组织中提取RNA,以评估病毒mRNA和细胞因子的表达。将右肺叶放在含有Buffer RLT (美国Qiagen) 和-巯基乙醇 (Sigma; 1%) 的混合物的Eppendorf管中,用弯曲剪刀将其切成小块。此后,使用超声匀浆器 (Hielscher Ultrasonics GmbH, 德国特尔托) 将肺样品匀浆,并以14000rpm离心5分钟。将1:1比例的裂解物与70% v/v不含RNase的乙醇混合,转移到RNeasy离心柱 (RNeasy Minikit; 目录号#74104, Qiagen) 中。将样品以10000rpm旋转15秒,然后用RW1缓冲液洗涤。丢弃流出液后,将5' DNase I (目录号#79254, Qiagen) 与351 RDD缓冲液混合,直接吸移到离心柱的膜上,并在室温下孵育15分钟。加入RPE缓冲液,并以10000rpm离心15秒。丢弃流出物后,重新添加RPE缓冲液,并以10000rpm旋转2分钟。再以14000rpm旋转另外1分钟,以从旋转柱中去除残余。最后,加入无RNase的水并离心以将RNA洗脱到Eppendorf管中。使用Nanodrop 1000分光光度计 (Thermo Scientific, 美国) 测量RNA样品。使用高容量cDNA反转录试剂盒 (目录号#4368814, Applied Biosystems, Foster City, 美国加利福尼亚)、使用1.0-2.0g总RNA进行cDNA合成。将RNA添加到高容量cDNA RT试剂盒中的试剂混合物中,使最终体积为20 μ l。使用BioRad Mycycler (商标) 热循环仪 (美国BioRad) 按照以下设置转录:25°C 10分钟,37°C 120分钟,85°C 5分钟和静止4°C。使用前将样品储存在-20°C下。使用TaqMan Universal PCR Master Mix (目录号#4304437, Applied Biosystems, Foster City, 美国加利福尼亚) 或SYBR Green PCR Master Mix (目录号#4367659, Applied Biosystems, Foster City, 美国加利福尼亚) 进行定量聚合酶链反应,并在ABI Step One TM和StepOnePlusTM实时PCR系统 (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, 美国加利福尼亚) 上进行分析。用于TNF-, IL-1, IFN-和IL-6的PCR引物包含在

Assayon-Demand Gene Expression Assay Mix中。另外,使用定制设计的流感病毒第3片段聚合酶(PA)的正向和反向引物测量病毒滴度(表4)。PCR程序运行设置:50°C 2分钟,然后95°C 1小时,然后95°C 15s+60°C 60s+平板读数(40个循环)。从阈值循环(Ct)数获得定量值129。每个样品的靶基因表达水平针对18s或GAPDH mRNA表达进行归一化,并且数据表示为相对于对照。

[0175] 将RAW264.7或BMDM细胞接种到6孔板(5×10^5 细胞/孔)中。对于C98i肽的所有迭代,将细胞用磷酸盐缓冲盐水(PBS;对照,合适的浓度)或合适的肽预处理1小时。然后将细胞用咪喹莫特(10 μ g/ml)处理另外一个小时。处理后,用PBS洗涤细胞,用新鲜的DMEM(10% FBS)补充培养基,并放置孵育24小时。

[0176] 使用RNeasy Mini Kit(Qiagen,Hilden,德国)制备总RNA,然后通过用双蒸水提取纯化总RNA。cDNA的合成使用高容量cDNA RT试剂盒(P/N4322171,Applied Biosystems,Foster City,美国加利福尼亚)、使用1.0-3.0 μ g总RNA进行。使用TaqMan Universal PCR Master Mix(Applied Biosystems,Foster City,美国加利福尼亚)进行定量聚合酶链反应,并在ABI StepOne™和StepOnePlus™实时PCR系统(Perkin-Elmer Applied Biosystems,Foster City,美国加利福尼亚)上进行分析。IL-1和IL-6的PCR引物包括在Assayon-Demand Gene Expression Assay Mix(Applied Biosystems,Foster City,美国加利福尼亚)中。PCR程序的运行设置:50°C 2分钟,然后95°C 1小时,然后95°C 15s+60°C 60s+平板读数(40个循环)。从阈值循环(Ct)数获得定量值。每个样品的靶基因表达水平针对18s或GAPDH mRNA表达进行归一化,并且数据表示为相对于WT未经免疫。

[0177] ELISA和多重免疫测定法

[0178] 使用ELISA测量分泌到感染HKx31(1×10^4 PFU)的野生型和NOX2^{-/-}小鼠BALF中的IFN- γ (VeriKine[™] HM小鼠IFN血清ELISA试剂盒;目录号#42410-1,PBL Assay Science)、IL-1(Quantikine[™] ELISA小鼠IL-1/IL-1F2;目录号#MLB00C,R&D Systems)、TNF- α (Quantikine[™] ELISA小鼠TNF α ,目录号#MTA00B,R&D Systems)和IL-6(Quantikine[™] ELISA小鼠IL-6,目录号#M6000B,R&D Systems)的蛋白水平,根据制造商的说明书使用市售试剂盒进行。通过使用标准曲线的4参数拟合绘制光密度来确定样品中的细胞因子滴度。

[0179] 抗体测定

[0180] 使用ProcartaPlex多重免疫测定法(小鼠Isotyping 7plex,目录号#EPX070-2815-901,eBioscience),根据制造商的说明书定量HKx31感染的(1×10^4 PFU)WT和NOX2^{-/-}小鼠中不同抗体同种型(IgA,IgE,IgG1,Ig2a,IgG2b,IgG3,IgM和总IgG)的血清和BALF水平。简而言之,将缀合抗体的磁珠添加到96孔板的每个孔中。将抗体标准品在通用测定缓冲液中系列稀释(1:4),以构建7-点标准曲线。将血清和BALF样品(在通用测定缓冲液中以1:20000稀释)和/或标准品添加到含有缀合抗体的磁珠的96孔板的适当孔中。然后,将检测抗体混合物添加到每个孔中,并将板在黑暗中在微孔板摇床(500rpm)上在室温孵育30分钟。洗涤后,将读取缓冲液添加到所有孔中。用Magpix(注册商标)多路读取器(Luminex,美国)和xPONENT(注册商标)软件(Luminex,美国)读取该板。使用Procartaplex(商标)Analyst 1.0软件(eBioscience,USA)从标准曲线插入每个样品中血清和BALF抗体浓度。

[0181] 数据表示为平均值+平均值的标准误差(SEM)。使用单因素方差分析(ANOVA),然后进行Tukey事后检验进行多重比较,对细胞因子mRNA表达和抗体滴度进行分析。所有测试均

由Graphpad Prism 7.0b(美国加利福尼亚州圣地亚哥)进行,统计学显著性为 $P<0.05$ 。

[0182] 统计学分析和图像分析

[0183] 为了量化荧光显微镜数据,在Image J中分析了从共聚焦系统获得的图像。除非在附图标记中另有说明,否则通过至少三个独立的实验分析每个治疗组大约100-150个细胞,以计算每个细胞中的荧光,然后取平均值,并表示为荧光面积的百分比。所有统计学测试均使用GraphPad Prism(GraphPad软件版本6.0,美国加利福尼亚州圣地亚哥)进行。 $P<0.05$ 表示显著性。对于分离的细胞培养工作,n代表一个单独的实验,其中使用了来自不同传代的细胞。

[0184] 化学品

[0185] 将咪喹莫特(目录号#tlrl-imq,Invivogen)、HMW poly I:C(目录号#tlrl-pic,Invivogen)和CpG ODN(目录号#tlrl-1668,Invivogen)溶于无内毒素的水中,制备为30L和100L等分溶液中的5-10mg/mL原液,储存在 -20°C 。将ssRNA(目录号#tr11-lna40,Invivogen)溶于无内毒素的水中,制备为50L等分溶液中的5mM原液,储存在 -20°C 。将Dynasore(目录号#D7693,Sigma)(当天新鲜制备)溶于DMSO(100%)中,制成10mM原液。FBS(目录号#12003C,Sigma)以50ml等分溶液存储在 -20°C 下。青霉素-链霉素溶液(目录号#P4333,Sigma)存储在 -20°C 。将SOD(目录号#S2515,Sigma)溶解在蒸馏水中,制成30000单位/ml的原液(10⁻¹)并储存在 -20°C 下。在使用前通过溶解在PBS中即刻生成OxyBURST Green H2HFF牛血清白蛋白(BSA)(目录号#1329,Molecular probes,Life Technologies)和LysoTracker Deep Red(目录号#L12492,Molecular probes,Life Technologies)的原液(1mg/mL)。巴氟霉素A(来自链霉菌,目录号#B 1793,Sigma)制备为10L等分溶液中的100M原液,并保存在 -20°C 下。使用当天新鲜制备的夹竹桃麻素(4'-羟基-3'-甲氧基苯乙酮,目录号#A10809;Sigma)和gp91dstat(目录号#AS-63818;Anaspec)分别制备成100mM和50mM的100%v/v DMSO中的原液。将佛波醇二丁酸酯(目录号#P1239;Sigma)溶解在100%v/v DMSO中作为10mM原液,并在当天新鲜制备。将过氧化氢酶(目录号#C1345,Sigma)制备成10⁶U/ml的蒸馏水原液,并储存在 -20°C 下。通过将一小瓶MitoSOX(商标)线粒体超氧化物指示剂(组分A)的内容物(50g)溶解在13L DMSO中,制备5mM的MitoSOX(目录号#M3600850;Molecular Probes,Life Technologies)。通过溶解在蒸馏水中至30U/ml,在当天新鲜制备黄嘌呤氧化酶(目录号#X1875;Sigma),并将黄嘌呤(目录号#X0626;Sigma)在0.1M NaOH.ML171(Cat#492002;Calbiochem)中制备为100mM的原液。

[0186] 流感病毒核蛋白的抗体(甲型流感病毒核蛋白[AA5H]的mAb;目录号#120-20343,AbCAM)、早期内体抗原1的抗体(目录号#120-02900,AbCAM)、小鼠抗gp91phox的抗体(目录号#611415,BD Transduction Laboratorie,纯化的小鼠抗gp91[phox]克隆53/gp91[phox](RUO)、兔抗TLR7(目录号#NBP2-24906,Novus Biologicals)、兔抗p47phox抗体(目录号#sc14015,Santa Cruz)、FITC山羊抗小鼠IgG(目录号#A-11029;Invitrogen)、山羊抗兔alexa 594(目录号#A-11037;Invitrogen)、山羊抗兔far red 647(目录号#A-21244,Invitrogen)和DAPI(目录号#H-1200,Vector Laboratories)储存在 -20°C 。

[0187] 实施例1

[0188] 流感病毒驱动内体ROS

[0189] 为了解决内体ROS的产生在病毒病理学中的潜在作用,首先考虑了甲型流感病毒,

其属于正粘病毒(Orthomyxoviridae)科的IV组反链ssRNA病毒,并通过内吞作用被内在化。小鼠肺泡巨噬细胞(AM)、小鼠腹膜RAW264.7细胞或骨髓来源的巨噬细胞(BMDM)暴露于甲型流感病毒株HKx31(H3N2)导致流感核蛋白(NP)荧光的剂量和时间依赖性增加,这几乎被强力蛋白(dynamin)抑制剂,Dynasore(100M)消除,表明网格蛋白包被的凹坑或小窝蛋白依赖性内在化机制。内在化病毒显示出与早期的内体标记物EEA1强的共同定位(图1A)。然而,并非所有的NP都与EEA1共同定位,这表明甲型流感病毒并非仅存在于早期的内体中(图1A),可能已经进入了晚期的内体和/或溶酶体。NOX2与EEA1共同定位于对照和流感感染的细胞中(图1B)。因此,早期内体中存在产生ROS的酶机制,并且其在甲型流感病毒感染中显著增强,从而促进了与内在化病毒的共同定位。用OxyBURST16评估了响应病毒摄取的内体ROS产生。暴露于一系列低至高致病性的季节性和大流行性甲型流感病毒导致小鼠初级AM(图1C和图1D)和人肺泡巨噬细胞(图1H)中OxyBURST荧光迅速且剂量依赖性地增加。通过添加超氧化物歧化酶(SOD;300U/mL),消除了OxyBURST来源的信号,该酶与病毒17一起内在化入内体,并将超氧化物转化为 H_2O_2 (图1E,图1F)。相反,在来自内体SOD缺陷小鼠($SOD3^{-/-}$ 小鼠)的AM中,ROS信号显著增加,从而建立了对超氧化物衍生物的检测。为了证实ROS的产生发生在酸性内体中,在存在流感病毒的情况下,用LysoTracker(50nM)证实了OxyBURST荧光的共同定位(图1G)。用巴氟霉素A(100nM)抑制肺泡V-ATPase泵,从而抑制内体酸化,消除了响应甲型流感病毒感染而产生的LysoTracker荧光和内体ROS(图1G)。内体ROS在 $NOX2^{-/-}$ 肺泡巨噬细胞中最少,但是在 $NOX4^{-/-}$ 巨噬细胞和用NOX1抑制剂ML171(100nM)处理的巨噬细胞中不受影响(图1E和图1F)。在 $NOX2^{-/-}$ 细胞中,甲型流感病毒进入AM的内在化没有受到损害,这表明减少的内体ROS产生不是由于减少的病毒进入。另外,热灭活和UV灭活形式的流感病毒(复制缺陷型)导致内体ROS产生的增加,这与活病毒对照相似(图1I和图1J)。因此,不论亚型、株和致病性如何,甲型流感病毒都刺激内体中的NOX2,但不刺激NOX4或NOX1氧化酶依赖性ROS的产生,这涉及内体酸化,但不需要病毒复制。

[0190] 实施例2

[0191] 内体TLR7-NOX2信号传导轴

[0192] RNA病毒被内体TLR7(对于ssRNA病毒)[Lund等人(2004)Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101(15):5598-5603,Diebold等人Science 303(5663):1529-1531]和TLR3(dsRNA病毒)、以及胞质传感器视黄酸诱导型基因I(RIG-I)(可以检测带有5'三磷酸的病毒RNA(Lund等人(2004)同上)和NOD样受体(NLR)[Iwasaki和Pillai(2014)同上;Ichinohe等人(2009)The Journal of Experimental Medicine 206(1):79-87;Allen等人(2009)Immunity 30(4):556-565]识别。假设甲型流感病毒进入酸化的内体,导致病毒RNA的释放,TLR7的激活以及刺激NOX2氧化酶依赖性ROS的产生。与此建议一致,TLR7与甲型流感病毒(图2A)、NOX2(图2B)和EEA1(图2C)共同定位,来自 $TLR7^{-/-}$ 小鼠以及 $TLR7^{-/-}$ 和MyD88缺陷型BMDM的初级AM在响应甲型流感病毒时,显示最小的内体ROS产生(图2D)。 $TLR7^{-/-}$ 和 $MyD88^{-/-}$ 细胞中响应病毒时缺乏内体的ROS产生,这并不是由于NOX2氧化酶本身的能力降低,因为在这些细胞中PKC激活剂佛波醇二丁酸酯(PDB;10-6M)对NOX2的激活与WT对照细胞相似。作为NOX2氧化酶活性的第二种测量,通过检查NOX2催化亚基与 $p47^{phox}$ 调节亚基的结合程度来评估酶组装。在未刺激的细胞中,NOX2和 $p47^{phox}$ 几乎没有共同定位(图2E)。但是,流感病毒引起NOX2和 $p47^{phox}$ 强的共同定位,

通过Dyasore或巴氟霉素A预处理减少了这种共同定位,并且在TLR7^{-/-}细胞中共同定位几乎消失(图2E)。为了提供进一步的证据表明TLR7的激活导致内体ROS的产生,使用了特异性的TLR7激动剂咪喹莫特(10g/mL)。咪喹莫特显著增加了人和野生型小鼠的AM中的内体ROS,但没有增加NOX2^{-/-}小鼠(图2F)或缺乏TLR7或MyD88的巨噬细胞中的内体ROS。最后,用富含胍和尿苷的ssRNA序列(ssRNA40;100M)对AM或RAW264.7细胞进行脉冲处理。在能够通过TLR7依赖性机制增加IL-1、IL-6和TNF-mRNA的浓度下,ssRNA40导致内体ROS的产生升高(图2G)。相反,响应甲型流感病毒的内体ROS产生在RIG-I^{-/-}、NLRP3^{-/-}、TLR2^{-/-}和TLR4^{-/-}巨噬细胞、以及用TLR3抑制剂(50M)处理的巨噬细胞中得以保留。

[0193] 然后检查了TLR7如何引发内体NOX2氧化酶的组装和激活。NOX2氧化酶可以被蛋白激酶C激活,从而触发p47^{phox}上关键丝氨酸残基的稳健磷酸化,从而导致NOX2氧化酶依赖性氧化爆发(Drummond等人(2011),同上)。为了定义PKC信号传导的时空调控并评估其通过TLR7的调控,表达了FRET生物传感器cytoCKAR以检测WT和TLR7^{-/-}巨噬细胞中的胞质PKC(Jensen等人(2014)同上;Violin等人(2003)The Journal of Cell Biology 161(5):899-909;Halls等人(2015)同上)。用甲型流感病毒或咪喹莫特处理WT巨噬细胞,在5分钟内升高了胞浆PKC活性,但是在TLR7^{-/-}巨噬细胞和用Dyasore或巴氟霉素A处理的WT巨噬细胞中没有这种应答(图2H和图2I)。用于胞质pERK1/2活性的FRET生物传感器方法(Allen等人(2009)同上;Halls等人(2015)同上)显示,流感病毒和咪喹莫特均以TLR7依赖性方式增加了胞质pERK1/2。相反,用PD98059(30M)阻断pERK1/2不影响响应于流感的内体ROS的产生或NOX2与p47^{phox}的结合。这些数据表明,甲型流感病毒通过TLR7增加内体NOX2氧化酶活性和下游的PKC激活(但不通过pERK1/2)。结论是,通过依赖于低pH值的过程,病毒感染触发了内体中NOX2氧化酶依赖性ROS的产生。实际上,以下实验证据支持了这一结论。首先,已知降低的内体酸化损害病毒RNA对TLR7的激活18,19。响应于病毒感染和TLR7激动剂咪喹莫特的NOX2依赖性ROS的产生在TLR7^{-/-}细胞中被消除,并且也通过用巴氟霉素A预处理而被消除。其次,巴氟霉素A抑制了由于流感病毒和咪喹莫特处理引起的PKC激活,而PKC是急性NOX2激活的上游(Drummond等人(2011)同上;Bedard和Krause(2007)同上)。第三,巴氟霉素A抑制p47^{phox}-NOX2的结合,这是NOX2组装和激活的关键步骤。

[0194] 实施例3

[0195] 内体ROS的病毒株非依赖性

[0196] 巨噬细胞暴露于鼻病毒(小RNA病毒科(picornaviridae),IV组)、呼吸道合胞病毒(副粘病毒科(paramyxoviridae),V组)、人副流感病毒(副粘病毒科(paramyxoviridae),V组)、人间质肺病毒(副粘病毒科(paramyxoviridae),V组)、仙台病毒(副粘病毒科(paramyxoviridae),V组)、登革热病毒(黄病毒科(flavoviridae),IV组)或HIV(逆转录病毒科(retroviridae),VI组,ssRNA-RT病毒)导致内体ROS的显著升高,这在TLR7^{-/-}巨噬细胞中明显被抑制,但在TLR9^{-/-}细胞中不受影响(图3A和图3B)。腮腺炎病毒(副粘病毒科(paramyxoviridae),V组)和新城疫病毒(NDV,副粘病毒科(paramyxoviridae),V组)均未产生显著的内体ROS(图3A和图3B),值得注意的是这些病毒主要通过细胞膜融合过程进入细胞,而不是通过内吞作用。巨噬细胞暴露于轮状病毒(恒河猴株或牛UK菌株,(呼肠孤病毒科(reoviridae),III组))也未产生内体ROS(图3A和图3B)。DNA病毒单纯疱疹病毒2(疱疹病毒科(herpesviridae),I组)和牛痘病毒(痘病毒科(poxyviridae),I组)均引起WT巨噬细胞和

TLR7^{-/-}巨噬细胞中内体ROS的升高,但未引起TLR9^{-/-}巨噬细胞中内体ROS的升高(图3A和图3B)。结论是,TLR7对ssRNA病毒或TLR9对DNA病毒的特异性识别导致NOX2氧化酶依赖性内体ROS的爆发。

[0197] 实施例4

[0198] 细菌和病毒激活不同的ROS通路

[0199] 质膜TLR,特别是TLR1、TLR2和TLR4,而不是内体中存在的那些TLR(例如TLR7),察觉到细菌致使线粒体募集到巨噬细胞吞噬体并线粒体依赖性地产生ROS(West等人(2011) Nature 472(7344):476-480)。然而,内体TLR的刺激未能增加线粒体ROS(West等人(2011),同上)。咪喹莫特的TLR7激活导致内体ROS显著升高(图2F),未能增加巨噬细胞线粒体超氧化物的产生。检查了响应于革兰氏阳性细菌肺炎链球菌(SP)或革兰氏阴性不可分型的流感嗜血杆菌(NTHI)产生的吞噬体ROS.SP和NTHI均引起WT小鼠巨噬细胞中ROS的产生(图4A至图4B),这在SOD3^{-/-}细胞中显著增强,但在TLR7^{-/-}巨噬细胞中不受影响(图4A至图4B)。因此,内体ROS的产生本身不是内吞作用的特征,而是“病原体(货物)特异性”反应。为抗菌目的而产生的ROS参与线粒体的必要作用,其作为中心枢纽促进固有免疫信号传导。相比之下,ssRNA病毒不使用这些抗菌ROS产生通路。

[0200] 实施例5

[0201] 内体H₂O₂抑制TLR7免疫

[0202] 为了确定内体ROS的功能重要性,评估了NOX2抑制对细胞因子产生的影响,该细胞因子产生是内体TLR7依赖性的并因此与病毒致病性相关(Diebold等人(2004),同上)。通过显示咪喹莫特导致WT巨噬细胞、而不是TLR7^{-/-}巨噬细胞(图5A)或用巴氟霉素A(100nM)处理的巨噬细胞(图5B)中IFN- γ , IL-1, TNF- α 和IL-6的表达显著升高,证实了内体和TLR7依赖性信号。其次,用NOX2氧化酶抑制剂和H₂O₂清除剂夹竹桃麻素(300M)进行预处理,在WT巨噬细胞、而不是TLR7^{-/-}巨噬细胞中响应咪喹莫特显著增强了IFN- γ , IL-1, TNF- α 和IL-6的表达,表明NOX2氧化酶衍生的ROS对细胞因子表达的抑制作用依赖于TLR7(图5A)。相比之下,夹竹桃麻素预处理抑制响应于TLR3激动剂,poly I:C(25g/mL)的IFN- γ , IL-1, TNF- α 和IL-6的表达,而由TLR9激动剂CpG(10g/mL)触发的这些相同细胞因子的增加不受夹竹桃麻素影响。进一步测试了NOX2氧化酶是否在体内影响TLR7免疫力。用单剂量咪喹莫特(50g/小鼠,鼻内)处理WT和NOX2^{-/-}小鼠,以在24小时后测量肺IFN- γ , IL-1, IL-6和TNF- α 。选择该时间点以反映RNA感染的早期阶段。响应于咪喹莫特的气道炎症没有明显变化(图5C),但是,咪喹莫特治疗导致NOX2^{-/-}小鼠中IFN- γ , IL-1, IL-6和TNF- α 水平升高。

[0203] 试图确定内体NOX2氧化酶活性如何导致TLR7-依赖性反应的抑制,并假设母体超氧化物物质及其直接下游产物H₂O₂是主要介质。通过添加外源SOD(300U/mL)使超氧化物失活不影响基础或咪喹莫特刺激的IFN- γ , IL-1, TNF- α 和IL-6的表达,表明超氧化物本身在调节TLR7反应中的作用很小。为了检查H₂O₂,使用过氧化氢酶使内体中产生的H₂O₂失活。在30分钟内,发现暴露于FITC标记的过氧化氢酶导致与LysoTracker共同定位,确认了向酸化内体区室的内在化(图6A)。1小时“脉冲”暴露于过氧化氢酶(1000U/mL)导致WT巨噬细胞在24小时后IFN- γ 和IL-1表达显著升高,而在TLR7^{-/-}巨噬细胞中则没有(图6B)。此外,在过氧化氢酶存在下,咪喹莫特依赖性反应显著增加(图6C)。在用Dynasore处理的WT巨噬细胞中,过氧化氢酶依赖性细胞因子的增加被显著抑制(图6D),但在TLR2^{-/-}巨噬细胞中不受影响(图6E)。

TLR7向内体的易位受伴侣蛋白UNCB93的作用支配。实际上,在缺少UNCB93的情况下,由于核苷酸敏感的TLR未能到达内溶酶体,在此启动MyD88/TRIF依赖性信号传导通路,因此存在实质性的信号传导缺陷。在UNCB93^{-/-}细胞中,过氧化氢酶处理导致的细胞因子增加明显小于WT细胞中观察到的增加(图6F)。因此,当TLR7位于内体区室内时,H₂O₂的抑制作用最有可能发生。过氧化氢酶对TLR7、TREML4或NLRP3的表达没有影响,表明H₂O₂不调节TLR7的表达,TLR7是TLR7活性(即TREML4 26)或NLRP3的正调节剂,所述NLRP3与TLR7类似地驱动抗病毒细胞因子(图6G-图6J)。因此,H₂O₂的作用可能是翻译后作用。检查了内体NOX2氧化酶衍生的H₂O₂是否在体内影响TLR7反应。过氧化氢酶(1000U/小鼠)鼻内施用给WT小鼠,24小时后显示肺IFN- γ , IL-1, TNF- α 和IL-6的3到4倍增加,并且这发生在明显的气道炎症之前(图6K和图6L)。

[0204] 出现了一个问题,即内体NOX2氧化酶释放的H₂O₂是否靶向调节受体活性并在内体区室中激活后暴露的TLR7蛋白结构域上的半胱氨酸残基(Kanno等人(2013) *International Immunology* 25 (7):413-422)。这些包括亮氨酸重复区域内的Cys260、Cys263、Cys270和Cys273,以及TLR7特有的另外两个半胱氨酸Cys98和Cys445(图10A至图10D和图11A至图11C)。进行定点诱变以产生一系列TLR7突变体,包括:1)具有所有这六个半胱氨酸残基都被丙氨酸取代的突变体;2)具有Cys98和Cys445双重突变的突变体(TLR^{7C98A/C445A});和3)Cys98(TLR^{7C98A})和Cys445(TLR^{7C445A})的单突变。将WT TLR7或TLR7^{C445A}转染至TLR7^{-/-}巨噬细胞恢复了咪喹莫特刺激这些细胞中的细胞因子表达的能力;但是,用含有6个突变的TLR7、TLR7^{C98A/C445A}或TLR7^{C98A}转染却不能(图7A)。过氧化氢酶(1000U/mL)处理对表达突变TLR7、TLR7^{C98A/C445A}或TLR7^{C98A}的细胞中细胞因子的表达影响很小或没有影响,而在具有WT TLR7或TLR7^{C445A}的细胞中,其显著增加了细胞因子的表达(图7A)。使用多序列分析算法(即CLUSTAL OMEGA)和成对序列分析(NCBI, Blast),以人TLR7作为参考点进行序列分析。使用多序列分析,发现Cys98是TLR7独有的,并且在脊椎动物TLR7中完全保守,包括从硬骨鱼到人(图7B、图10A至图10D和图11A至图11C)。成对序列比对显示,在TLR7上27个半胱氨酸中,Cys98是唯一的TLR7独有的、在脊椎动物中完全保守的半胱氨酸残基。在此建议由内体NOX2氧化酶产生的H₂O₂可能修饰单个且进化上保守的独特半胱氨酸残基,即,位于TLR7内体面的Cys98,导致抗病毒细胞因子响应减弱。这可能表明TLR7的Cys98是一种新的氧化还原传感器,在病毒感染期间控制免疫功能。

[0205] 实施例6

[0206] NOX2氧化酶减弱抗体产生

[0207] 检查了内体NOX2氧化酶活性对也发生在甲型流感病毒感染后的I型IFN和IL-1表达的抑制作用。首先,病毒触发了转录因子IRF-7向WT BMDM核的移位,但在TLR7^{-/-}BMDM中则没有,表明甲型流感病毒激活了巨噬细胞中TLR7依赖性抗病毒信号传导。其次,在NOX2^{-/-}AM中,病毒在更大程度上升高了IFN- γ , IL-1, IL-6和TNF- α 的表达(图8A)。第三,在小鼠体内感染甲型流感病毒(Hkx31;105PFU/小鼠)24h导致NOX2^{-/-}小鼠中肺IFN- γ , IL-1, TNF- α 和IL-6 mRNA(图8B),以及血清(图8C)和肺IFN- γ 蛋白(图8D)更大地增加。因此,全功能NOX2氧化酶抑制由甲型流感病毒触发的抗病毒细胞因子的产生。TLR7对于激活B细胞和抗体产生是至关重要的。为了测试NOX2氧化酶是否在体内抑制对甲型流感病毒的TLR7依赖性免疫,使用热灭活的复制缺陷型甲型流感病毒作为刺激,因此,预期其为一种病毒形式主要触发TLR7 PRR参

与而RIG-I和NLRP3 20的贡献不大。灭活病毒的鼻内接种对7天的体重减轻(图8E)或气道BALF炎症(图8F)没有影响。NOX2缺失导致肺IFN- γ , IL-1和TNF-mRNA的水平显著升高(图8G), 血清和BALF的IgA、总IgG、IgG1、IgG2b和IgG3的水平均显著升高(图8H和图8I)。因此,甲型流感病毒感染后内体NOX2氧化酶的激活可通过抑制抗体产生来抑制抗病毒细胞因子和体液免疫-最佳清除病毒和抵抗再感染的所需过程。

[0208] 实施例7

[0209] 内体靶向的NOX2抑制剂

[0210] 合成了新的分子靶向系统,以将特定的NOX2氧化酶抑制剂(即gp91ds-TAT)直接递送至内体,从而通过消除ROS产生来破坏病毒信号传导平台。为此,产生了一种三重结构,其包含在肽的N-末端区域通过PEG-接头缀合到膜锚定胆甾醇的gp91 ds-tat。以前已经显示类似的构建体增强酶 β 分泌酶抑制剂的体内定位(Rajendran等人(2008) Science 320 (5875):520-523)。使用相同的PEG接头与胆甾醇缀合的Cy5荧光团导致核周围区域出现胞质荧光,并在病毒感染后以dynasore (100M)敏感的方式与EEA1、NOX2和流感病毒NP共同定位,提供了证据表明内吞作用为细胞进入的主要模式(图9A-图9E)。与未缀合的药物(Ugp91ds-TAT;图9F)相比,胆甾醇缀合的gp91ds-TAT(Cgp91ds-TAT)可将体外巨噬细胞中的超氧化物生成抑制至少10倍效能,这不归因于化合物增强的ROS清除性能(图9G)。

[0211] 检查了Cgp91ds-TAT在体内是否抑制甲型流感病毒感染后的疾病严重性。从甲型流感病毒感染前1天到感染后3天,每天鼻内施用Cgp91 ds-TAT (0.02mg/kg/d),使气道炎症降低约40% (图9H),而Ugp91ds-TAT没有效果(图9H)。与对照病毒组相比,Cgp91ds-TAT显著增加了肺I型IFN-mRNA水平,而Ugp91ds-TAT不能(图9I)。为了消除gp91ds-TAT胆甾醇缀合物对NOX2抑制的这种改善归因于胆甾醇-PEG接头本身的可能性,将胆甾醇PEG-接头与乱序的gp91ds-TAT缀合(Sgp91ds-TAT)并检查其对体内流感感染的作用。Sgp91ds-TAT对气道炎症、肺IFN-mRNA水平和超氧化物产生没有影响。将Ugp91ds-TAT的剂量增加10倍至0.2mg/kg/天,显著减少第3天由甲型流感病毒引起的体重减轻,并且几乎消除了气道炎症,以及BALF炎症细胞中的超氧化物产生,与相同剂量的Cgp91ds-TAT类似(图9J-图9L)。引人注目的是,Cgp91ds-TAT (0.2mg/kg/天)和Ugp91ds-TAT (0.2mg/kg/天)引起了近10000倍的肺甲型流感病毒负荷减少(图9M)。因此,通过鼻内施用gp91ds-TAT抑制内体NOX2氧化酶导致甲型流感病毒的致病性实质性地降低。这是抑制发生在内体区室内的NOX2氧化酶活性的创新方法。由于胆甾醇的缀合,定制的抑制剂通过内吞区室特异性地和优先递送。为了支持这一点,图9A和图9B的结果表明,胆甾醇的缀合产生促进内体递送的药物递送系统,即该药物显示出与EEA1+内体强的共同定位程度,这被dynasore预处理消除。该递送系统将NOX2抑制剂带到与病毒感染有关的主要作用部位(图9D显示了病毒核蛋白和我们的NOX2抑制剂的强共同定位)。本文提出内在化进入内体后,药物最有可能在内体膜的腔面上,并且由于TAT部分可穿透该膜并抑制NOX2活性。药物可能仍然能够扩散到NOX2的其他部位或位置,但是,鉴于药物似乎是通过内吞途径选择性递送的,因此,认为直接和主要的作用部位是在内体上的NOX2活性。

[0212] 实施例8

[0213] NOX2的作用

[0214] 此处提供的证据表明病毒进入内体区室触发内体中NOX2氧化酶依赖性的ROS产

生。在此提出,内体超氧化物浓度的主要贡献者是在该区室中直接产生的超氧化物。超氧化物是NOX2的主要产物,由于NOX2的拓扑结构和电子通过该催化亚基的单向转移,其只能在内体区室内生成。于此一致地,人们公认超氧化物由于其带负电荷而不会远离其生成场所。与超氧化物不同,过氧化氢具有一定的渗透膜和扩散能力,因此,可以设想在细胞的其他部位(如质膜)表达的NOX2可能在其他地方产生了一些内体H₂O₂。有一些证据表明,非常可能极少有远程生成的H₂O₂进入内体区室。在以下情况下,病毒感染后的PKC激活(对于NOX2激活至关重要)受到显著损害:如果1)阻止病毒进入细胞(图2H和图2I);2)通过巴氟霉素A阻断内体酸化(图2H和图2I);或3)如果不存在TLR7(即,使用TLR7^{-/-}巨噬细胞)。因此,仅在病毒进入内体并激活内体特异性通路后才发生由内体NOX2引起的ROS生成,从而进一步证明了内体NOX2作为H₂O₂生成的主要位点。

[0215] 在这里,证明了内体ROS是病毒致病性的基本分子机制的关键负调控因子,其影响抗病毒免疫以及宿主抵抗和清除病毒感染的能力。重要的是,对于所有通过内吞途径进入细胞的病毒,无论是何种病毒分类,这种效应都是保守的,并且是TLR7依赖性的。这为引起世界范围内重大发病和死亡的各种病毒的抗病毒治疗提供了一个靶标。

[0216] 实施例9

[0217] 包含TLR7 C98的诱饵肽的生成

[0218] 生成诱饵肽,其包含与HIV-TAT摄取肽部分(YGRKKRRQRRR-SEQ ID NO:2)可操作地连接的鼠TLR7的D95至L104(DLRNCNVPVL-SEQ ID NO:1)。诱饵肽(本文称为C98i)防止C98和C475之间形成二硫键,从而防止TLR7活化。

[0219] 实施例10

[0220] C98i阻断对TLR7激动剂(咪喹莫特)的反应

[0221] 图12(原始数据)和图12(归一化数据)显示,在存在C98i的情况下,暴露于咪喹莫特(TLR7激动剂)后由骨髓来源的巨噬细胞产生的细胞因子IL-1 β 升高。图15显示了类似的结果。数据表明C98i阻断TLR7活性。

[0222] 实施例11

[0223] C98i阻断对TLR7激动剂(加地喹莫特)的反应

[0224] 图13显示C98i阻断TLR7对TLR7激动剂加地喹莫特的反应。显示对基础的未刺激的IL-1 β 水平没有影响(图13)。对TLR9(在98位具有色氨酸的密切相关的家族成员)或TLR4激动剂反应或TLR2激动剂反应也没有影响。TLR7与TLR4和TLR7与TLR2之间几乎没有序列同源性。

[0225] TLR5激动剂反应也观察到相似的结果。C98i对TLR7表达或细胞活力没有不利影响。

[0226] 数据表明,C98i阻断了TLR7的活性,并且不影响TLR2、TLR4、TLR5、TLR9的活性。因为序列的唯一性,它不太可能影响TLR家族的其他成员(即TLR1、TLR3、TLR6和TLR8)。发现C98i不影响TLR2、TLR4、TLR5和TLR9的活性,这也表明该药物对影响细胞因子IL-1 β 产生的细胞功能没有非特异性特性。

[0227] TLR7是参与病毒、自身免疫性疾病和癌症的靶标。针对TLR7的新药物具有巨大的潜能。

[0228] 实施例12

[0229] 无TAT的C98i版本的作用

[0230] 在没有TAT的情况下,C98i肽保留了其在体外抑制TLR7激动剂咪喹莫特反应的能力。没有TAT被称为“无TAT”。结果显示在图16A中。对细胞活力没有不利影响(图16B)。

[0231] 实施例13

[0232] C98i抑制甲型流感病毒反应

[0233] 图17显示C98i在体外抑制甲型流感病毒(X31)反应(IL-6-mRNA表达)。在没有C98i的情况下,与C98i+甲型流感病毒(X31)相比,IL-6mRNA表达显著更高。

[0234] 实施例14

[0235] 乱序的C98i氨基酸序列的作用

[0236] 打乱C98i的氨基酸序列以产生YGRKKRRQRRRCLVPNDCLV-NH₂(SEQ ID NO:44)。乱序的C98i肽序列不能抑制TLR7激动剂(咪喹莫特)。结果如图18所示。

[0237] 实施例15

[0238] 短肽对TLR7激动剂(咪喹莫特)反应的作用

[0239] 修饰C98i中诱饵肽的Arg-Cys-Asn-Cys(RCNC)[SEQ ID NO:45]基序,以形成RANC(SEQ ID NO:46)、RANA(SEQ ID NO:47)和RCNA(SEQ ID NO:48)。测试了这些短肽没有TAT,以确定它们对TLR7激动剂咪喹莫特的作用。图19显示,RANC、RCNC、RANC、RANA或RCNA均未抑制TLR7激动剂咪喹莫特的体外反应。

[0240] 实施例16

[0241] 检查病毒感染后C98i在体外和体内的抗氧化和免疫调节作用

[0242] 使用分离的巨噬细胞的体外实验:在不存在或存在C98i的情况下检查氧化应激和病毒复制的测定法。检查以下病毒:低至高致病性甲型流感病毒、呼吸道合胞病毒、鼻病毒、登革热病毒。

[0243] 预期通过C98i可抑制体内氧化应激和病毒复制。

[0244] 体内实验:感染甲型流感病毒后,向小鼠中鼻内递送C98i(通过鼻内递送)[To等人(2017)Nature Communications 8(69):1-17]。评估了肺和全身循环中肺氧化应激、炎症、损伤、病毒负荷和免疫细胞反应的潜在调控。

[0245] 实施例17

[0246] 检查C98i在自身免疫性狼疮样模型测试中体内的免疫调节作用

[0247] 用C98i处理野生型C57BL/6小鼠,然后每周3次用表皮局部TLR7激动剂咪喹莫特(Aldara Cream)对耳朵进行治疗。治疗后,检查小鼠的血清自身抗体和肌酐水平,以及肾脏、脾脏、肝脏、心脏和皮肤的组织病理学。通过免疫组织化学、定量逆转录-聚合酶链反应和荧光激活的细胞分选来分析免疫学异常。

[0248] 本领域技术人员将理解,本文所描述的公开内容除了具体描述的内容之外还可以进行变化和修改。应当理解,本公开考虑了所有这样的变化和修改。本公开还提供单独地或共同地在本说明书中提及或指明的所有步骤、特征、组合物和化合物,以及任何两个或多个步骤或特征或组合物或化合物的任何和所有组合。

[0249] 本文引用的所有专利、申请、出版物、测试方法、文献和其他材料均通过引用以其整体并入本文,如同其实体上存在于本说明书中一样。

[0250] 参考文献

- [0251] Aguirre(2010)Free Radical Biology and Medicine 49(9):1342-1353
- [0252] Allen等人(2009)Immunity 30(4):556-565
- [0253] Altschul等人(1997)Nucl.Acids.Res.25:3389
- [0254] Ausubel等人(In:Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons Inc.1994-1998
- [0255] Bedard和Krause(2007)Physiological Reviews 87(1):245-313
- [0256] Campbell等人(2012)Science Translational Medicine 4(157):157ra141
- [0257] Cossart和Helenius(2014)Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 6(8)
- [0258] Diebold等人Science 303(5663):1529-1531
- [0259] Drummond等人(2011)Nature Reviews Drug Discovery 10(6):453-471
- [0260] Guidotti等人(2017)Trends in Pharmacological Science 38(4):406-424
- [0261] Halls等人(2015)Methods in Molecular Biology 1335:131-161
- [0262] Ichinohe等人(2009)The Journal of Experimental Medicine 206(1):79-87
- [0263] Imai等人(2008)Cell 133(2):235-249
- [0264] Iwasaki和Pillai(2014)Nature Reviews Immunology 14(5):315-328
- [0265] Jensen等人(2014)The Journal of Biological Chemistry 289(20):20283-20294
- [0266] Johnson等人(1993)Peptide Turn Mimetics in Biotechnology and Pharmacy
- [0267] Judkins等人(2010)American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology 298(1):H24-32
- [0268] Kanno等人(2013)International Immunology 25(7):413-422
- [0269] Kawahara等人(2007)BMC Evolutionary Biology 7:109
- [0270] Kelkka等人(2014)Antioxidants&Redox Signaling 21(16):2231-2245
- [0271] King等人(2013)The Journal of Allergy and Clinical Immunology 131(5):1314-1321e1314
- [0272] Lund等人(2004)Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101(15):5598-5603
- [0273] Pezzuto等人Eds.,Chapman and Hall,New York
- [0274] Pollock等人(1995)Nature Genetics 9(2):202-209
- [0275] Rajendran等人(2008)Science 320(5875):520-523
- [0276] Selemidis等人(2008)Pharmacology&Therapeutics 120(3):254-291
- [0277] Snelgrove等人(2006)Eur J Immunol 36(6):1364-1373
- [0278] To等人(2014)Free Radical Research 48(8):940-947
- [0279] To等人(2017)Nature Communications 8(69):1-17
- [0280] Violin等人(2003)The Journal of Cell Biology 161(5):899-909
- [0281] Vlahos等人(2011)PLoS pathogens 7(2):e1001271
- [0282] Vlahos等人(2012)Trends in Pharmacological Sciences 33(1):308
- [0283] Vlahos和Selemidis(2014)Molecular Pharmacology 86(6):747-759

[0284] West等人(2011)Nature 472(7344):476-480。

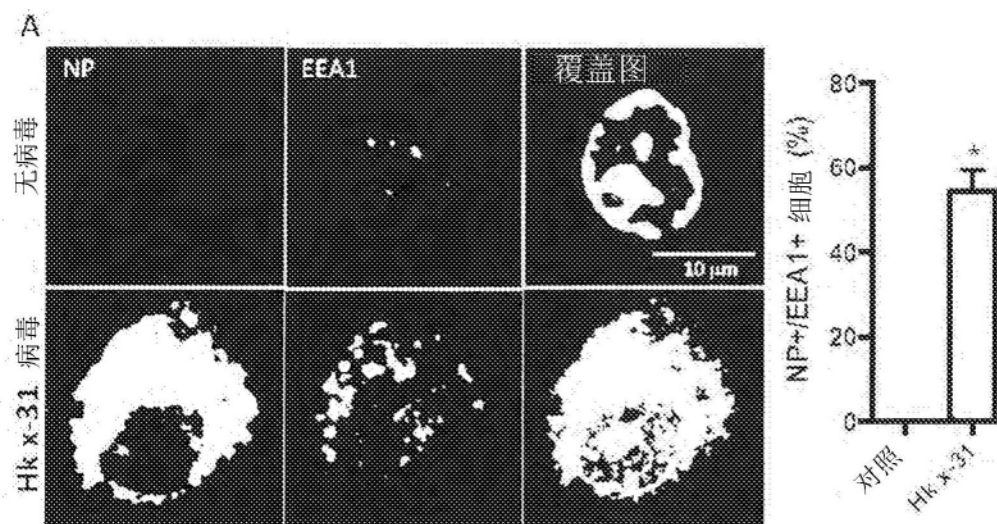


图1A

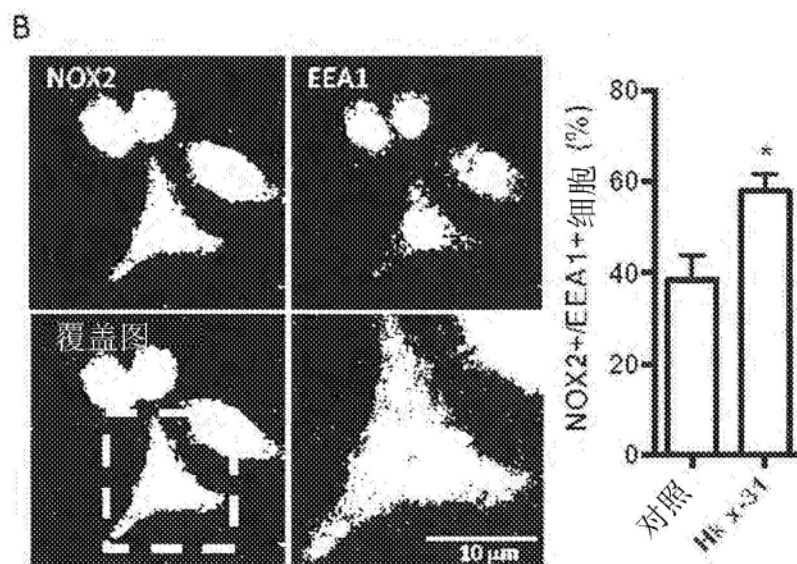


图1B

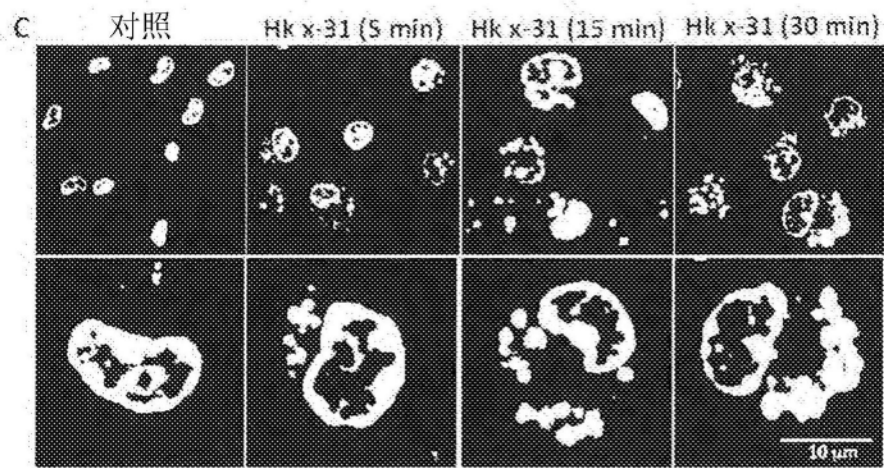


图1C

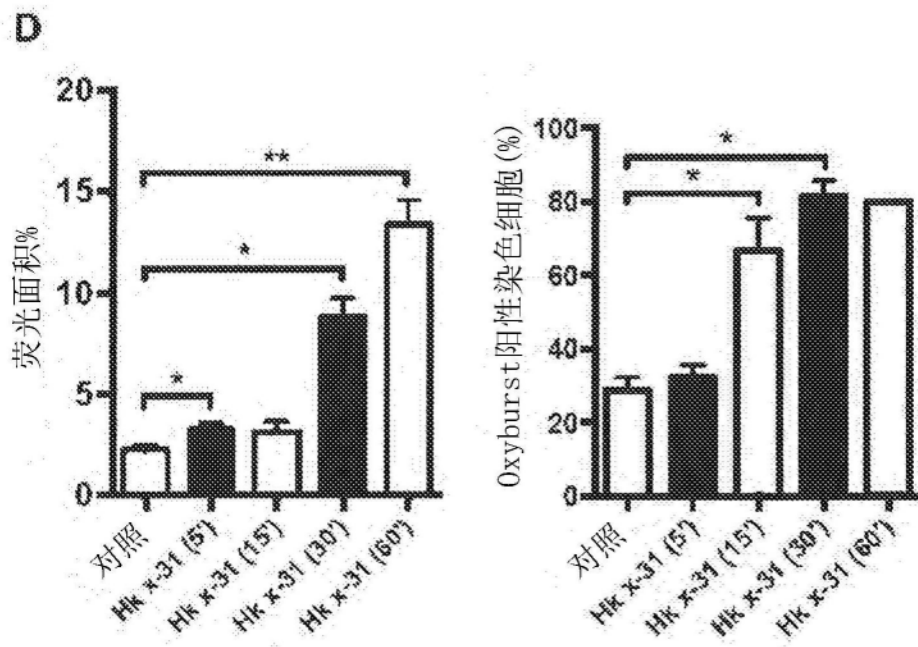


图1D

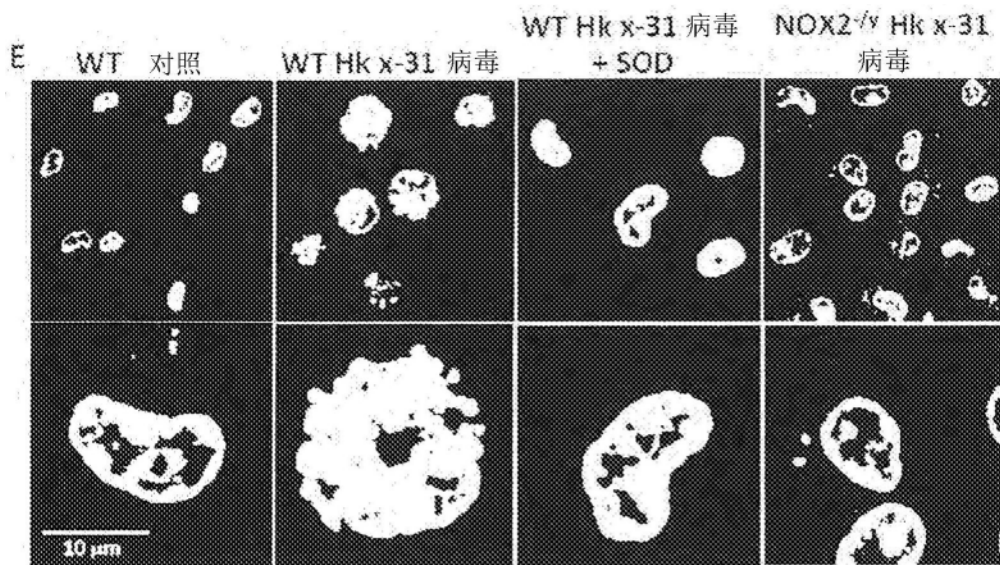


图1E

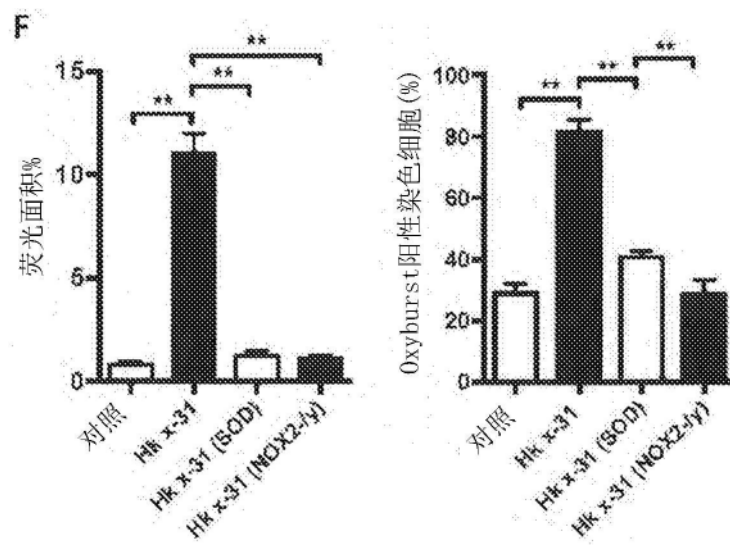


图1F

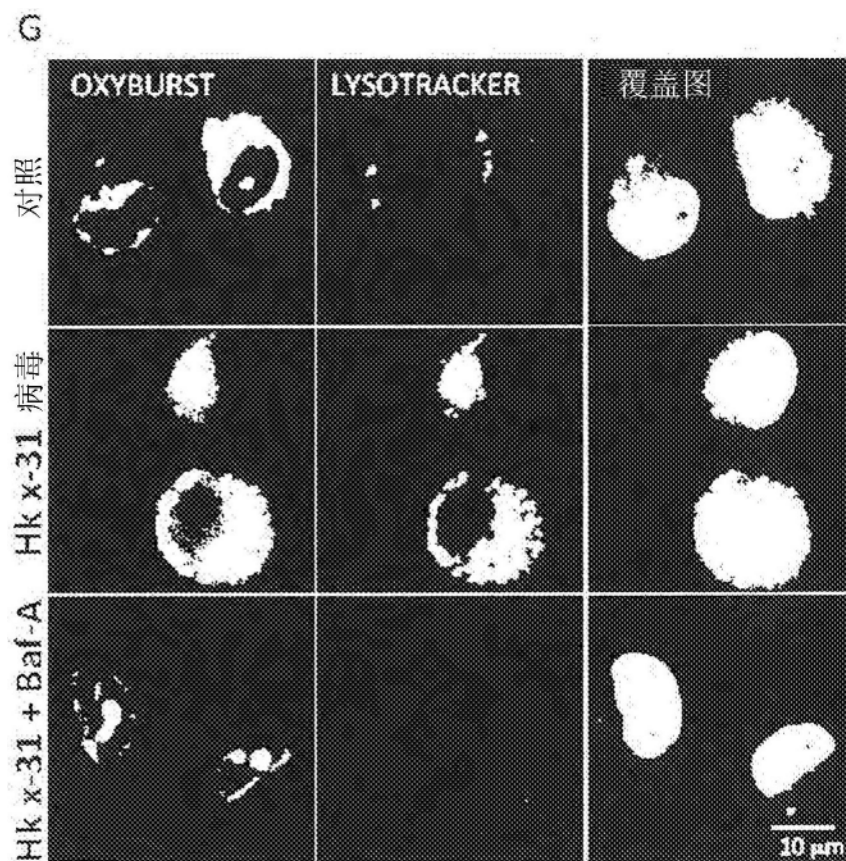


图1G

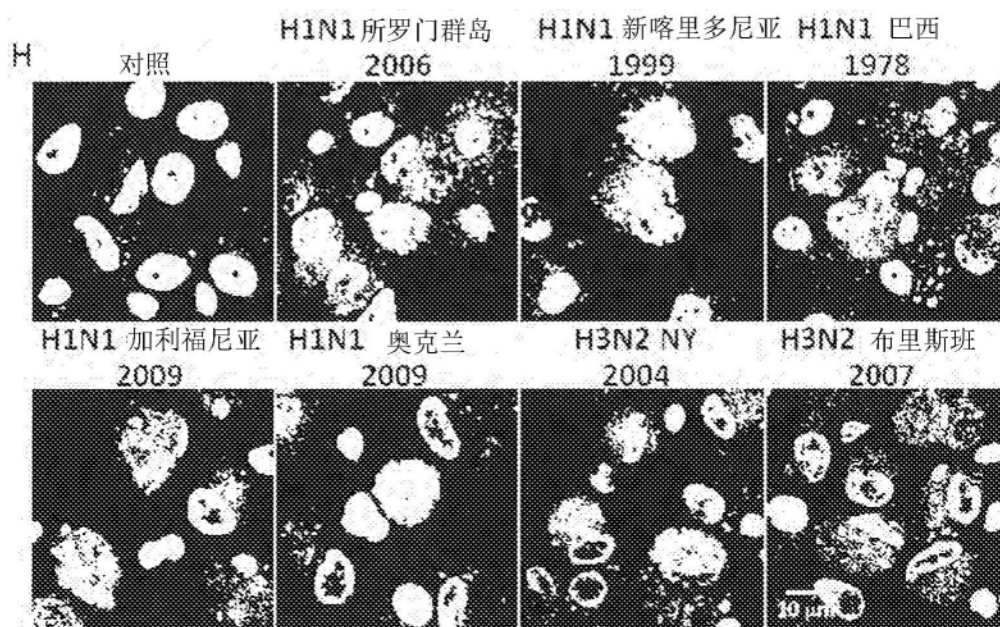


图1H

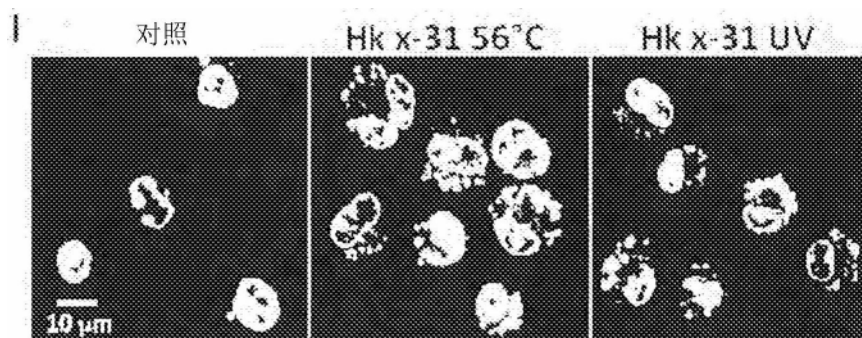


图1I

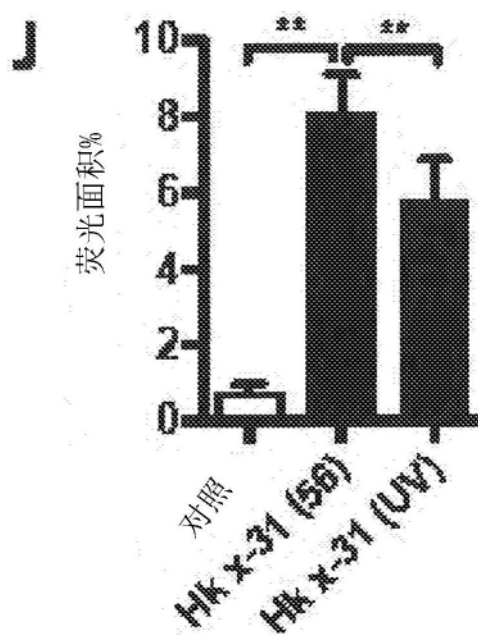


图1J

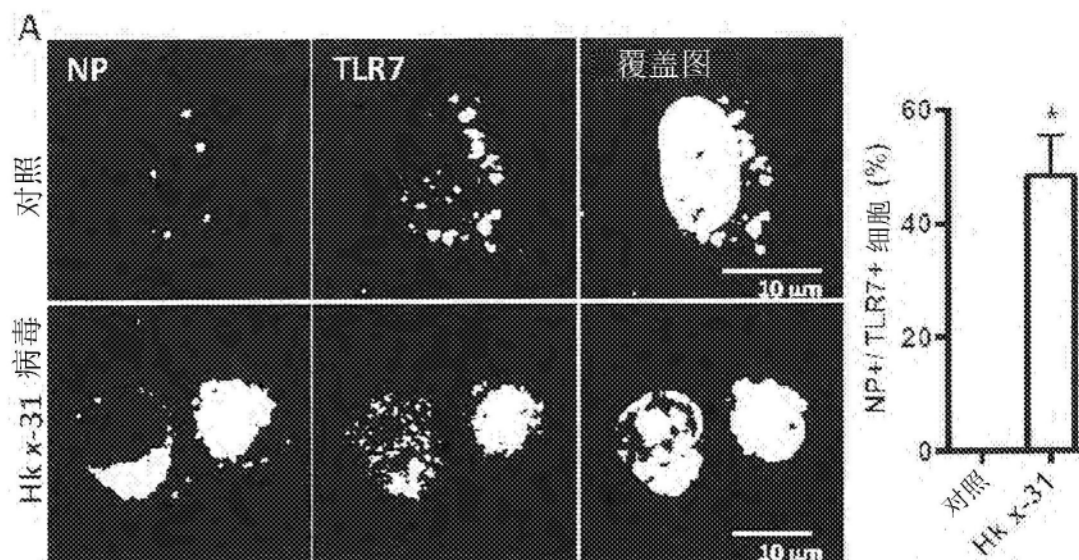


图2A

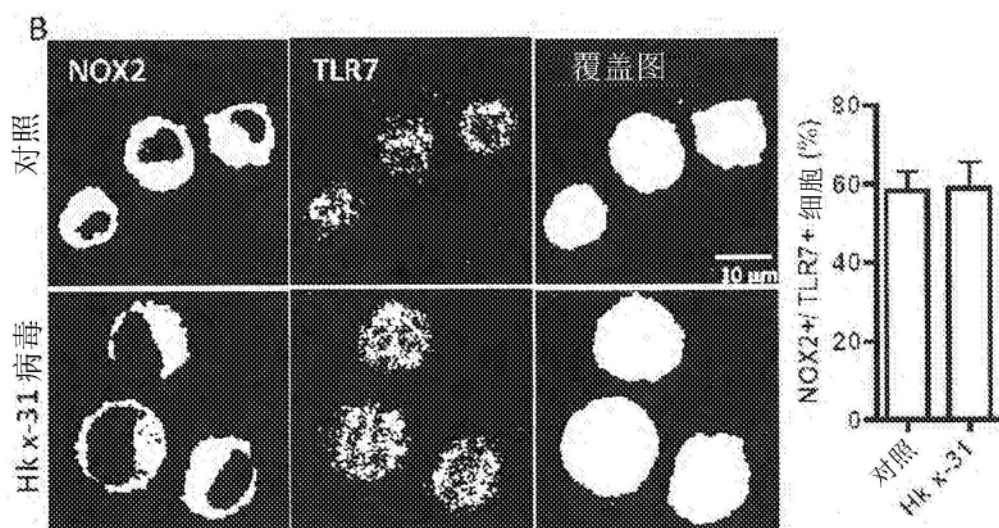


图2B

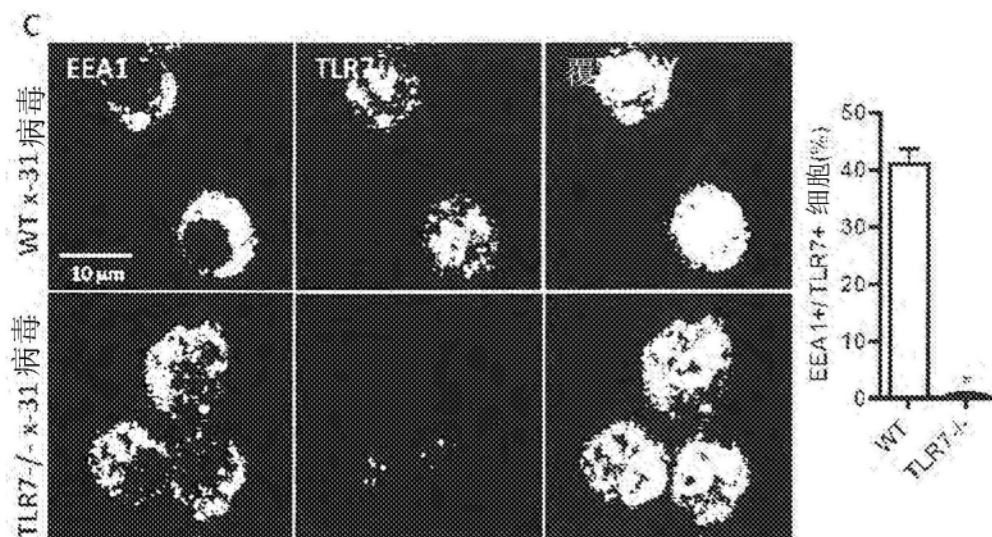


图2C

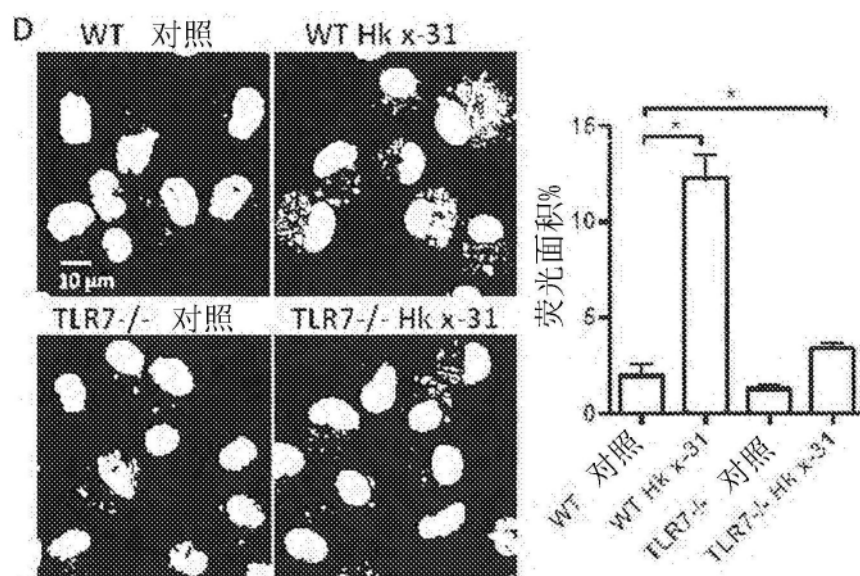


图2D

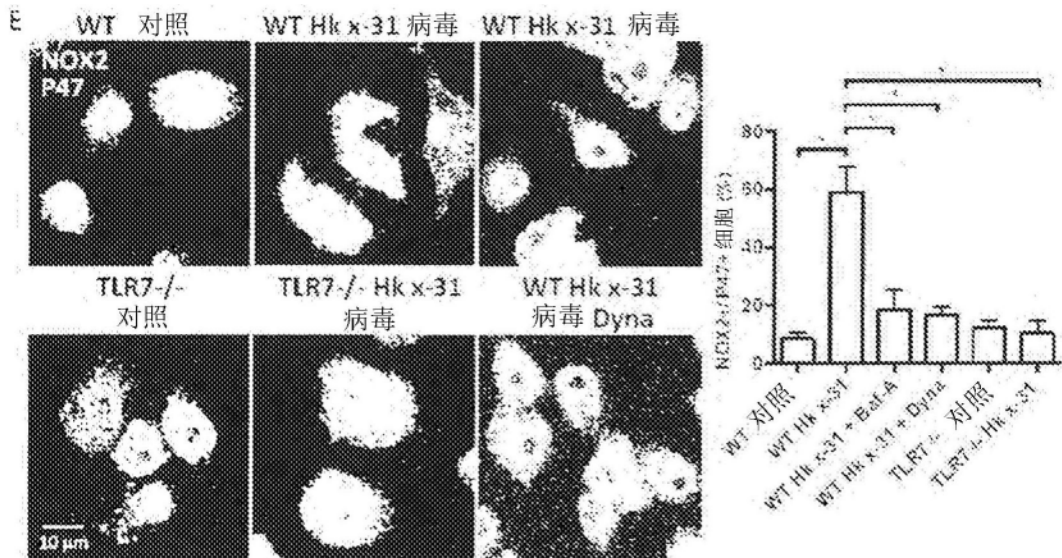


图2E

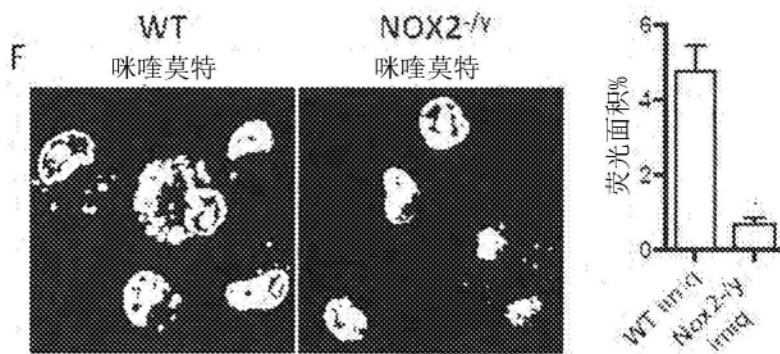


图2F

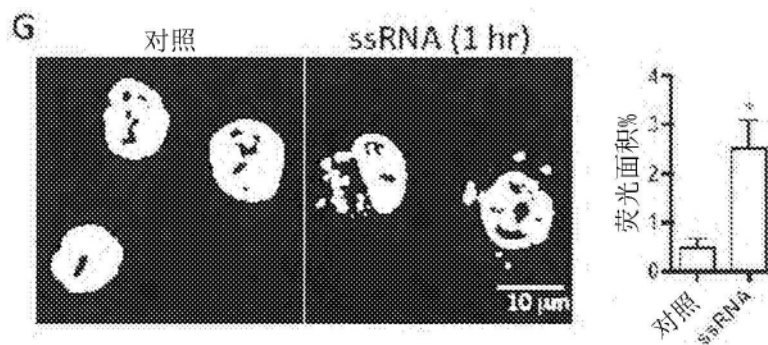


图2G

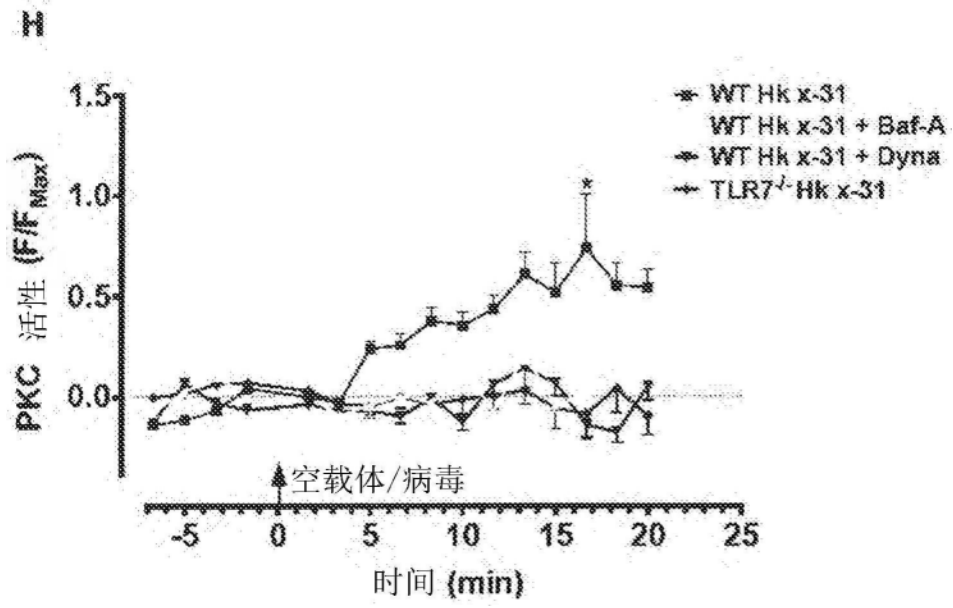


图2H

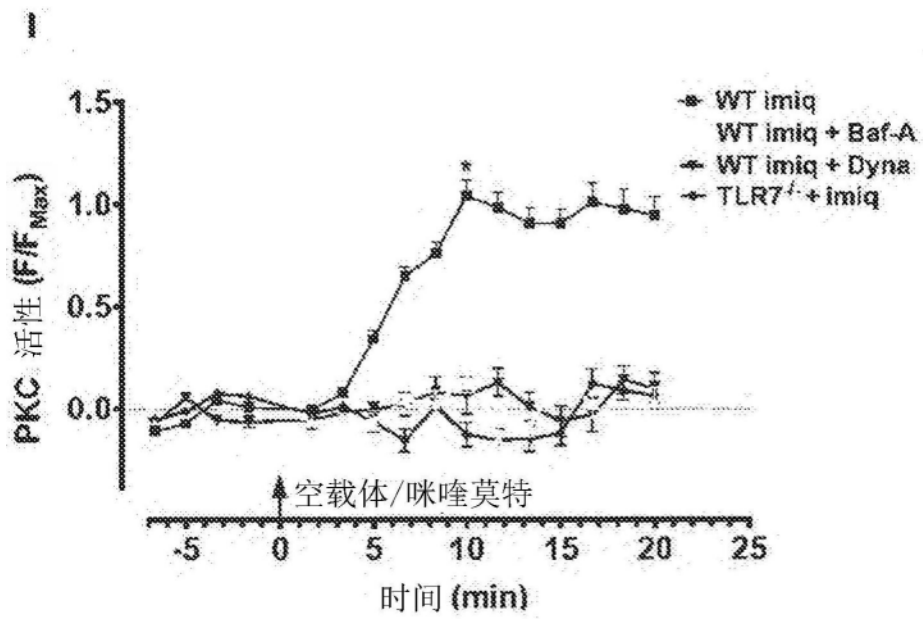


图2I

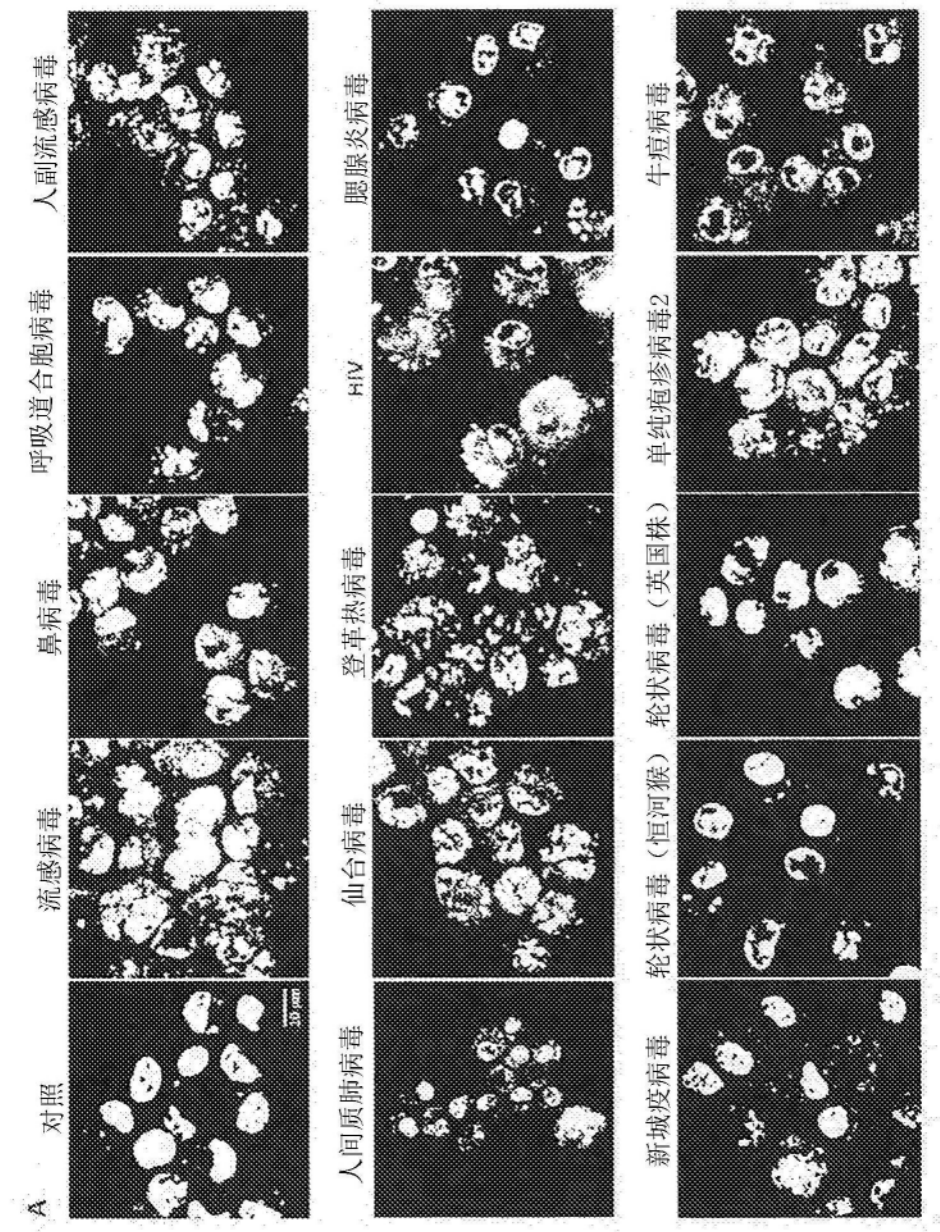


图3A

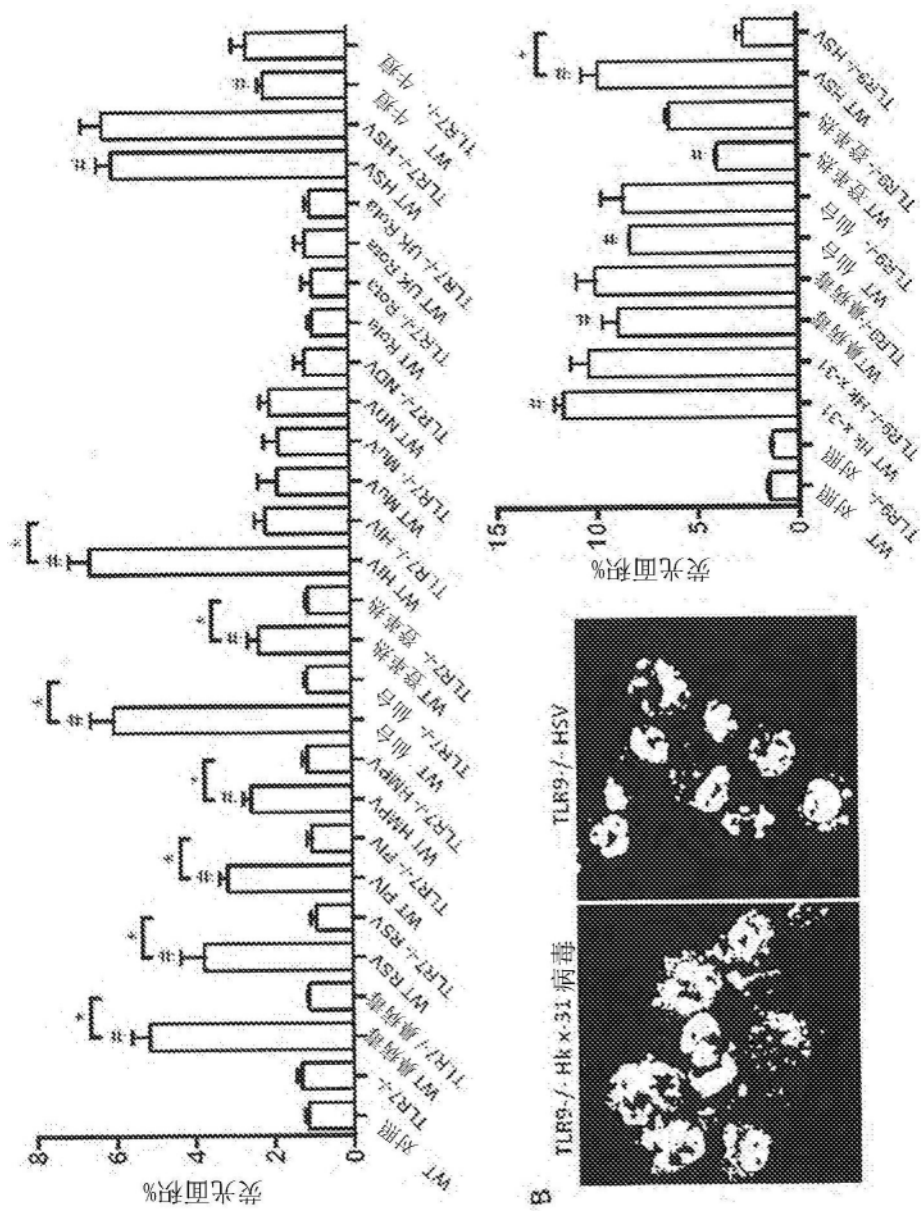


图3B

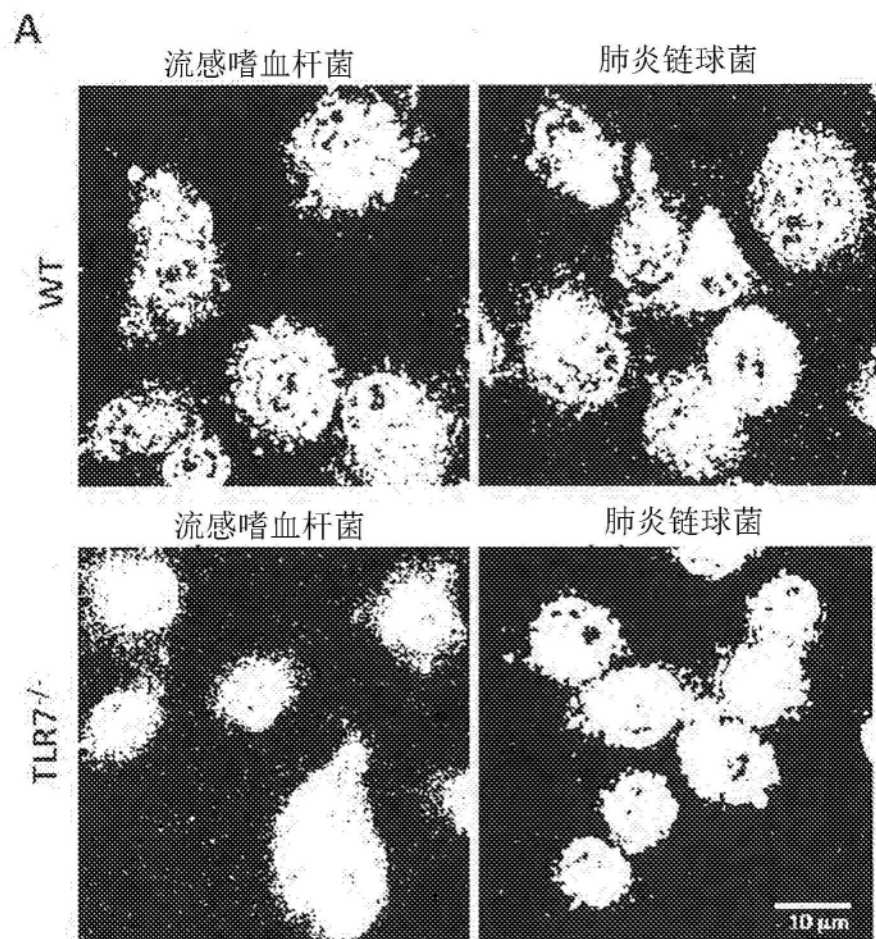


图4A

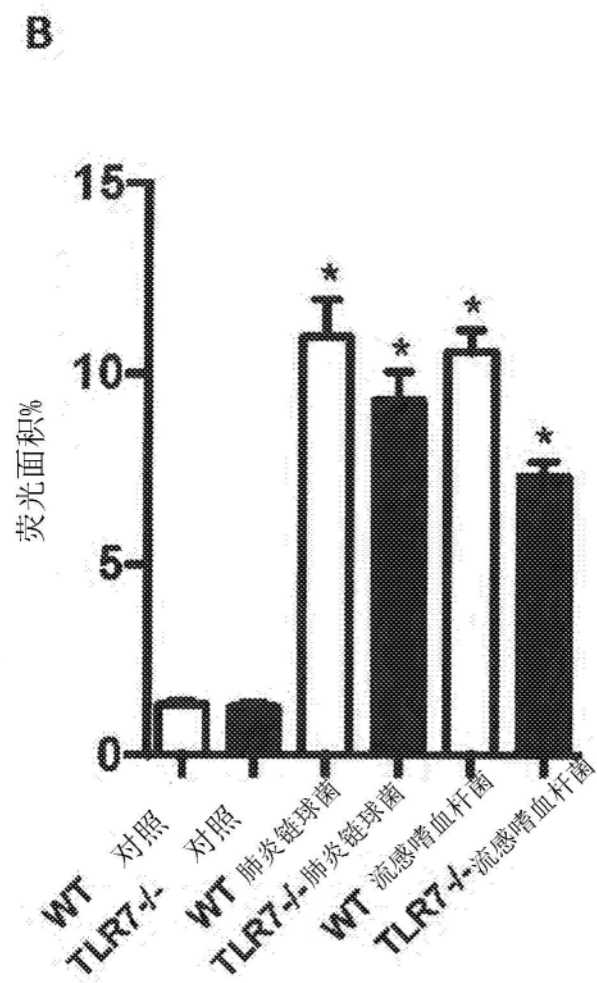


图4B

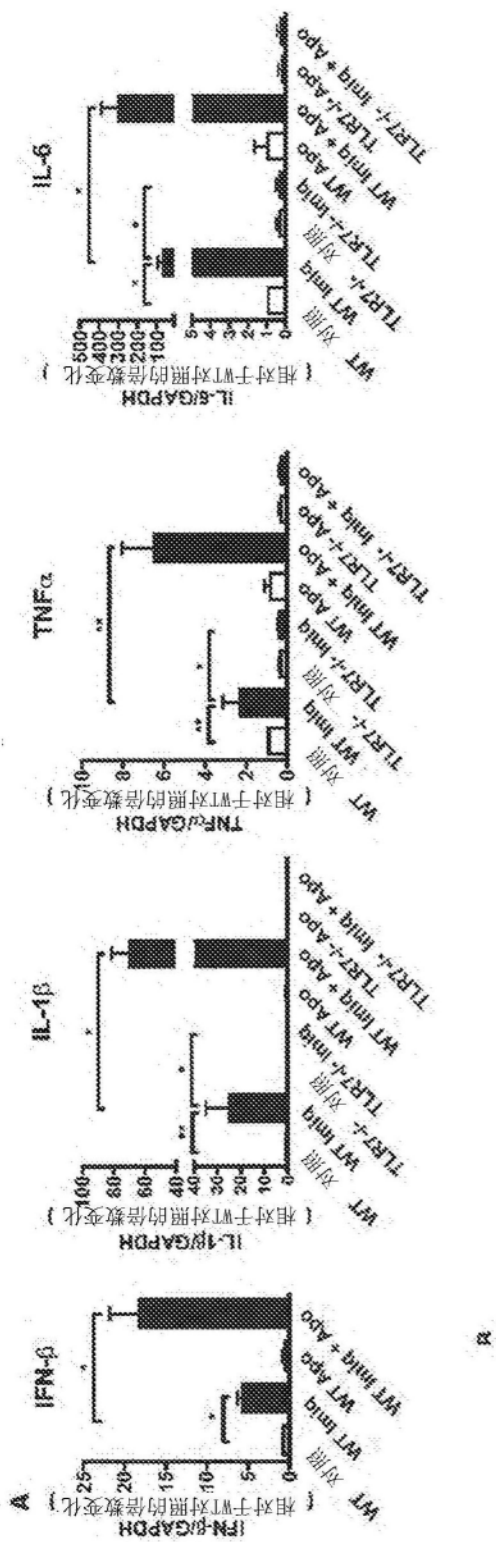


图5A

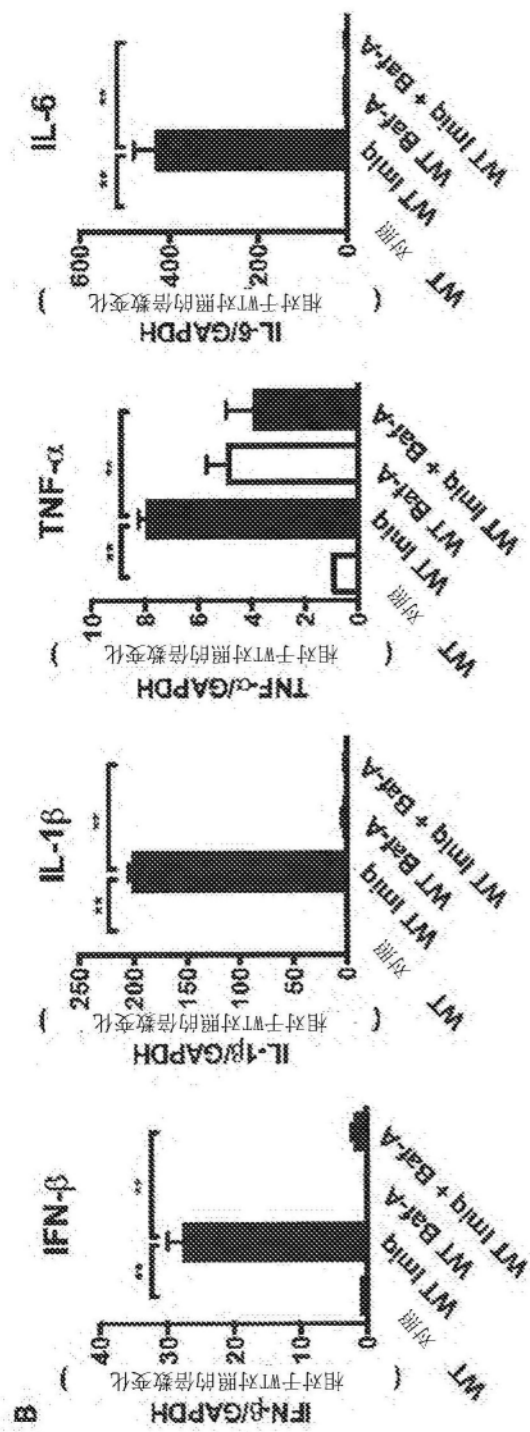


图5B

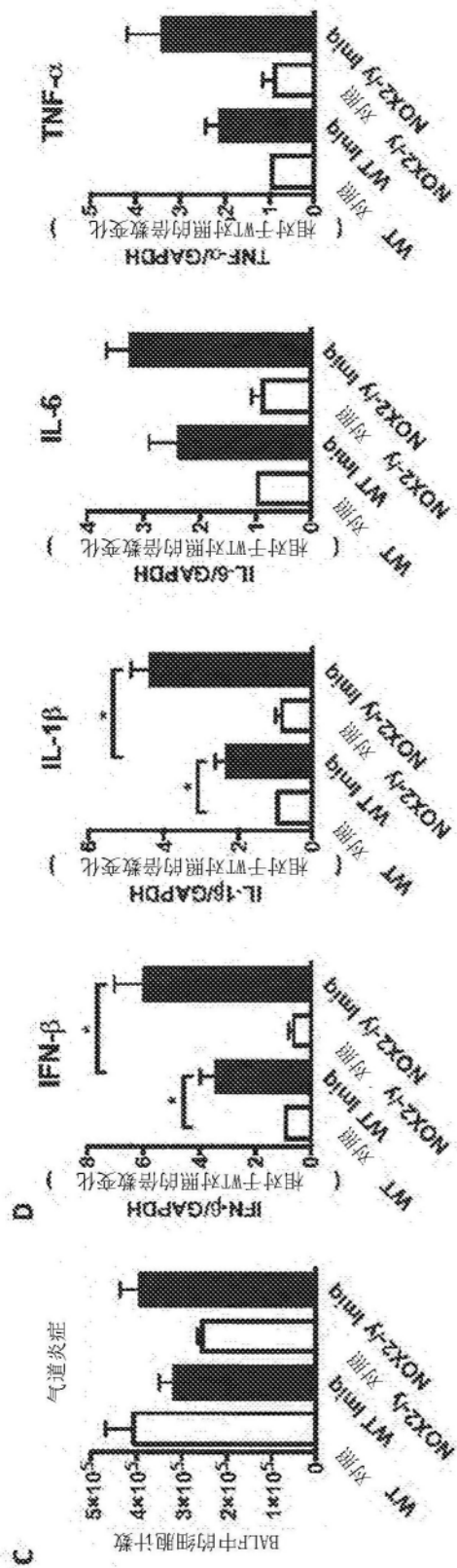


图5C

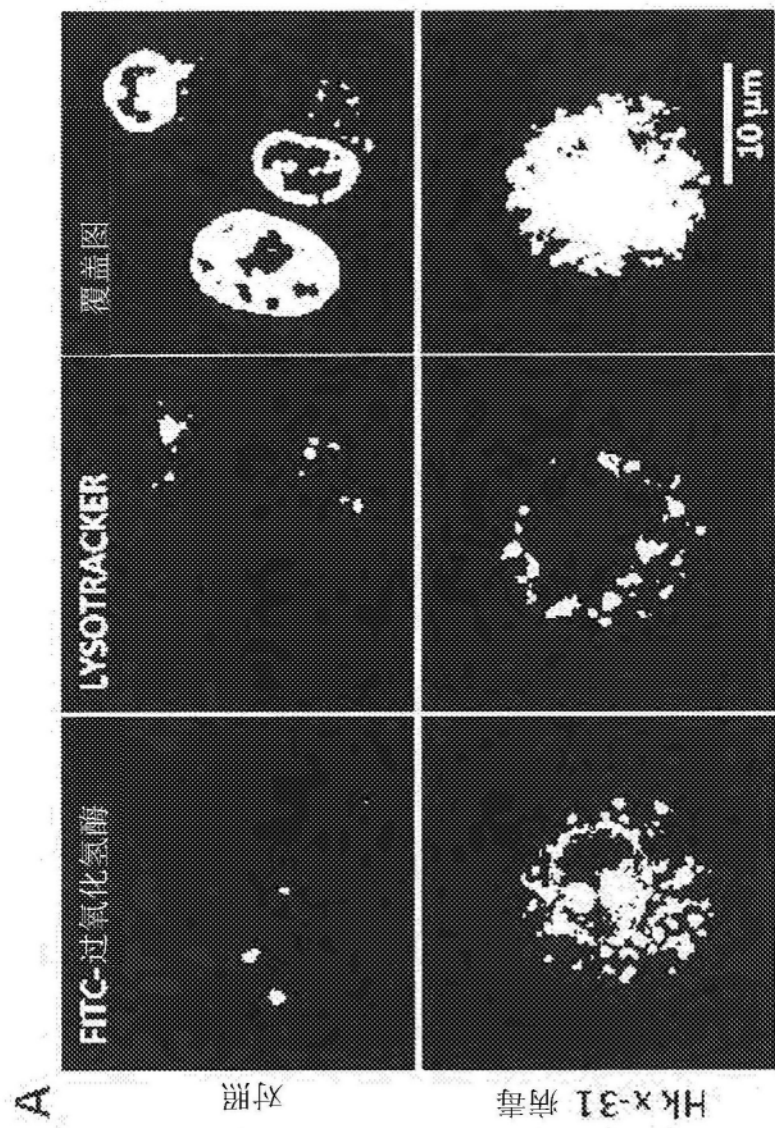


图6A

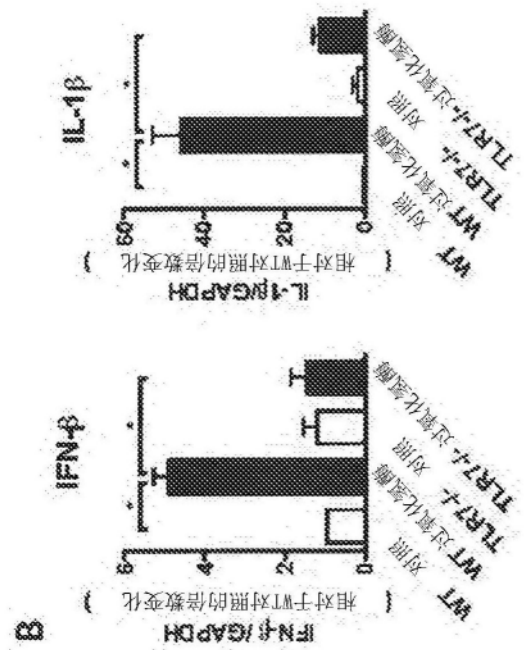


图6B

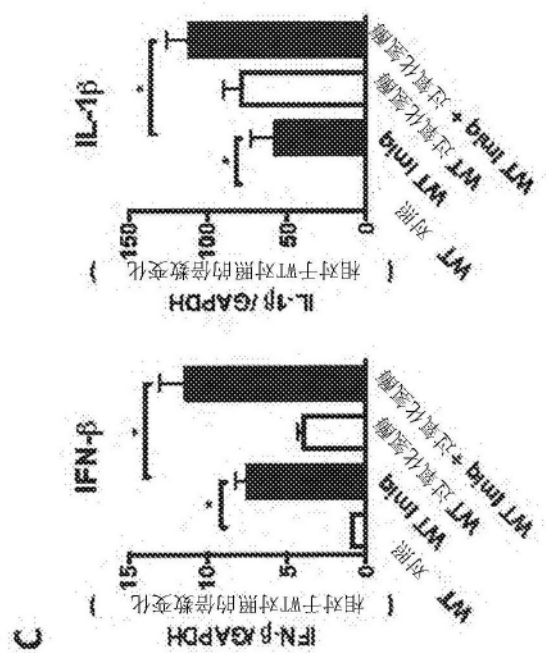


图6C

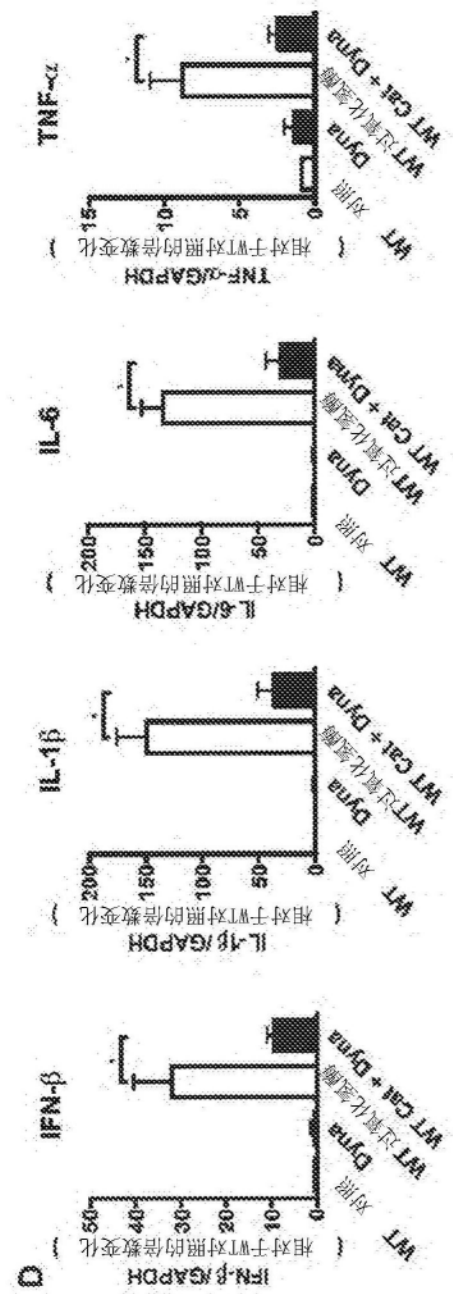


图6D

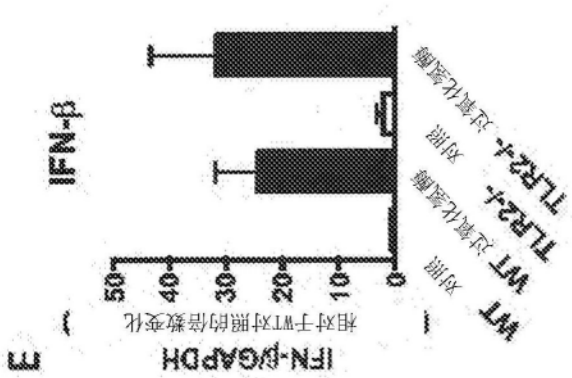


图6E

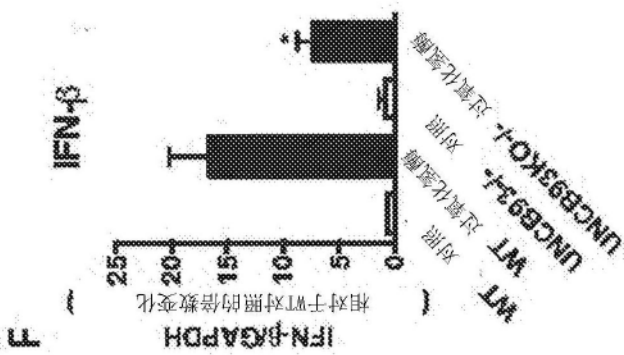


图6F

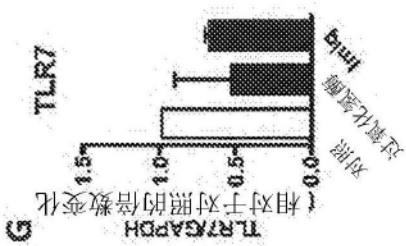


图6G

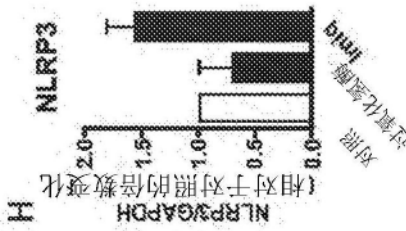


图6H

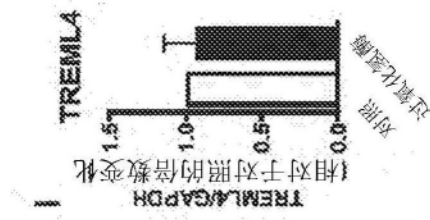


图6I

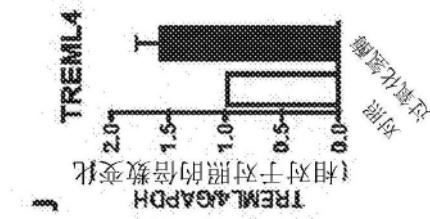


图6J

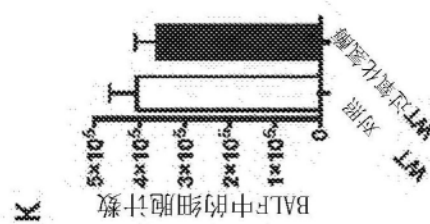


图6K

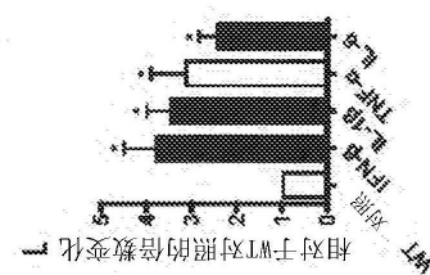


图6L

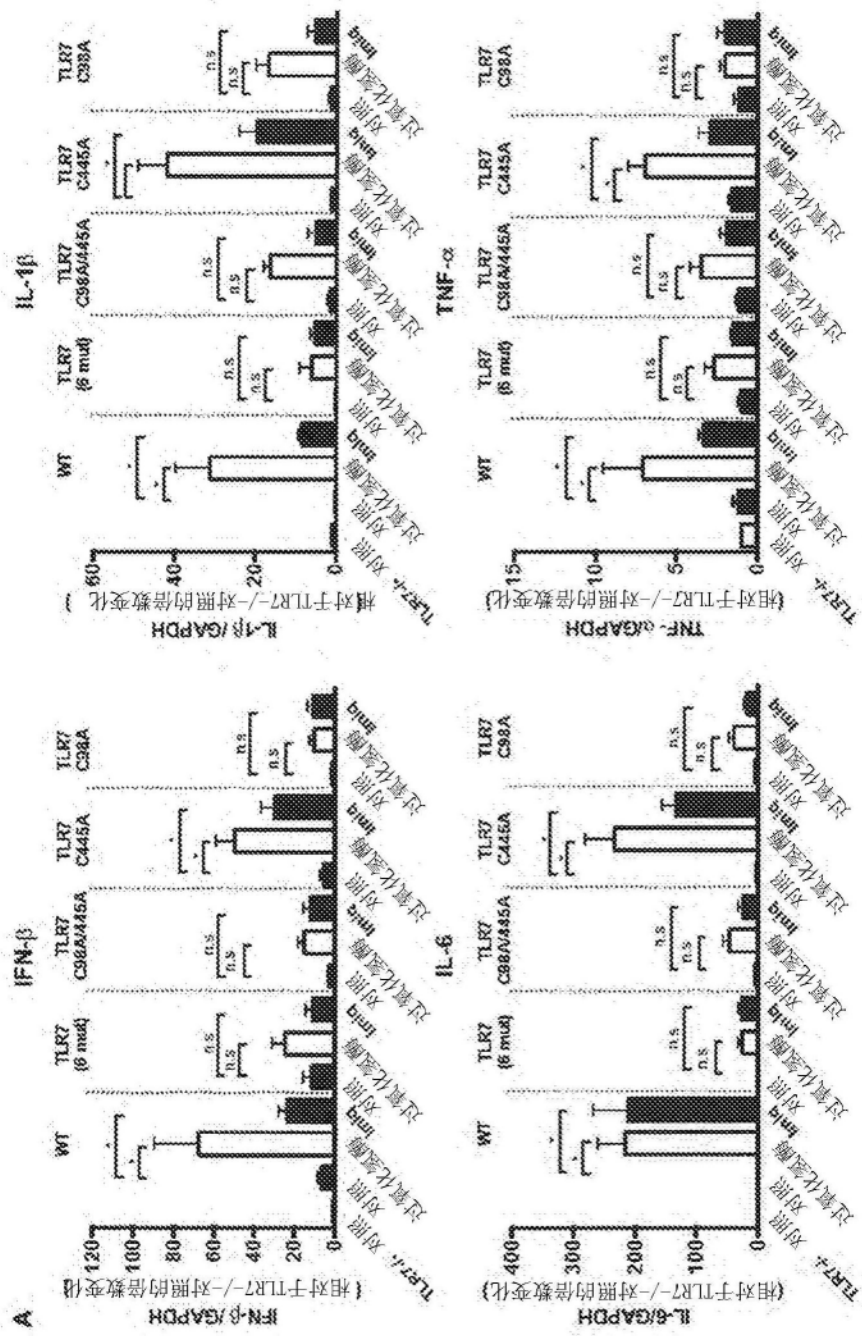


图7A

B

人	95	D	F	R	C	N	C	V	101	SEQ ID NO:49
小鼠	95	D	L	R	C	N	C	V	101	SEQ ID NO:50
大鼠	95	D	L	R	C	N	C	V	101	SEQ ID NO:51
鸡	103	D	L	R	C	N	C	V	109	SEQ ID NO:52
蛙	101	D	F	R	C	N	C	V	107	SEQ ID NO:53
猪	95	D	F	R	C	N	C	I	95	SEQ ID NO:54
鲑鱼	103	D	F	R	C	N	C	I	106	SEQ ID NO:55
斑马鱼	90	D	L	R	C	N	C	V	96	SEQ ID NO:56

图7B

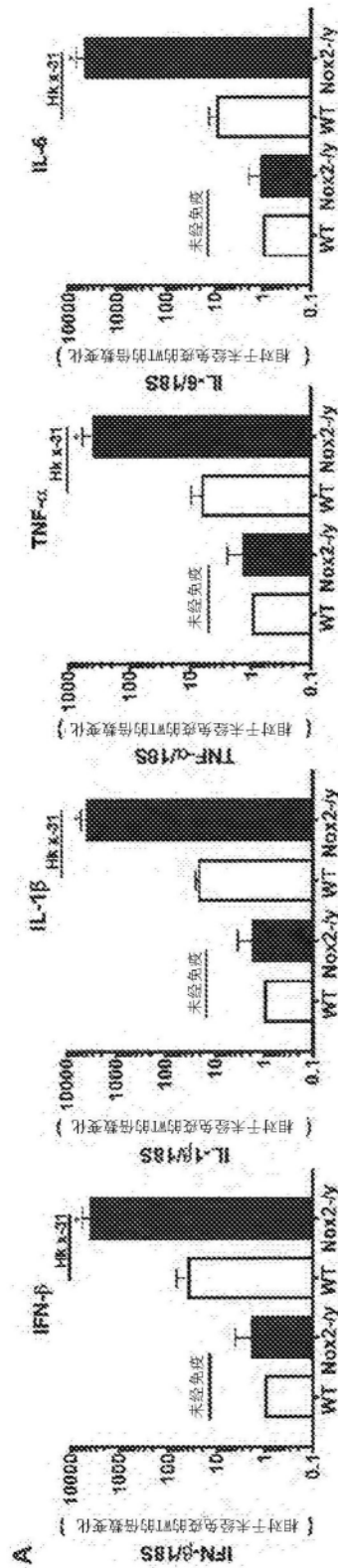


图8A

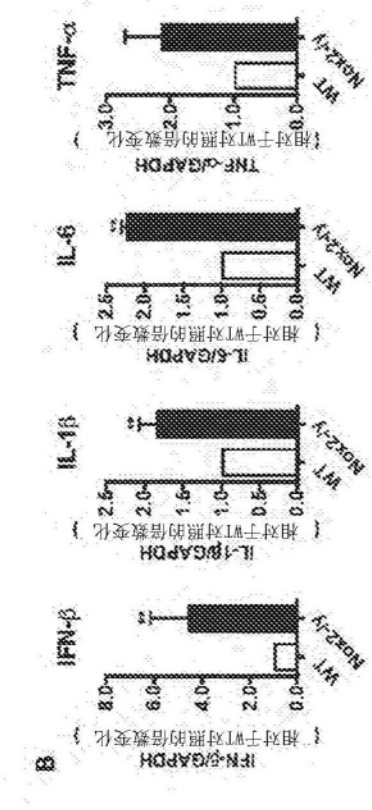


图8B

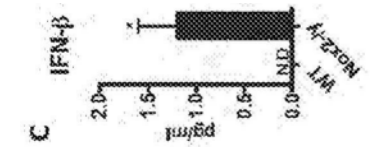


图8C

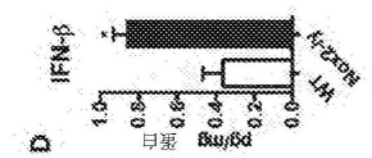


图8D

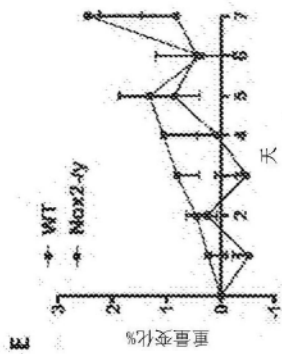


图8E

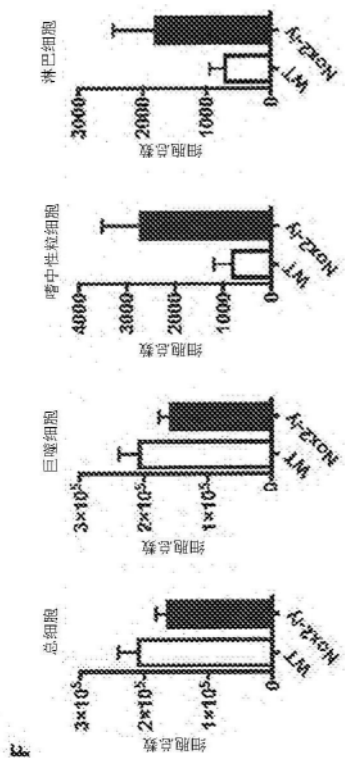


图8F

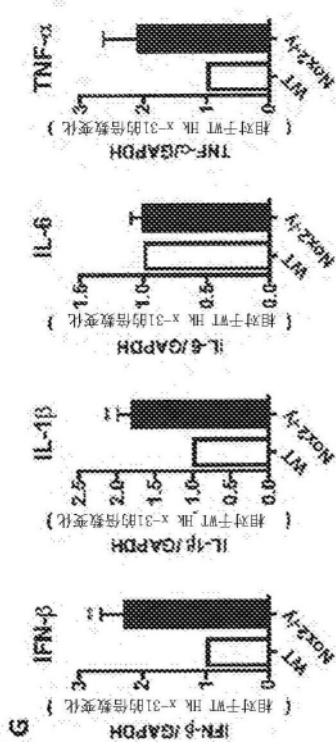


图8G

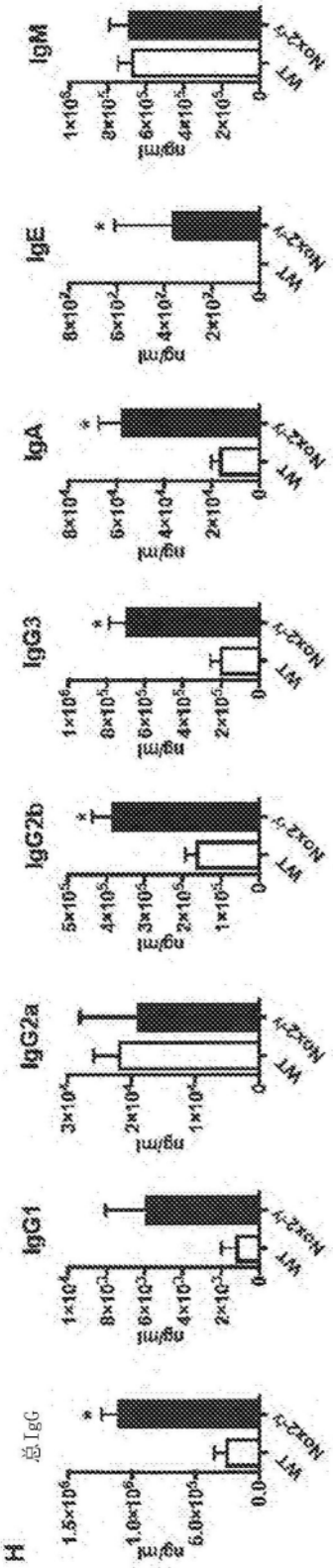


图8H

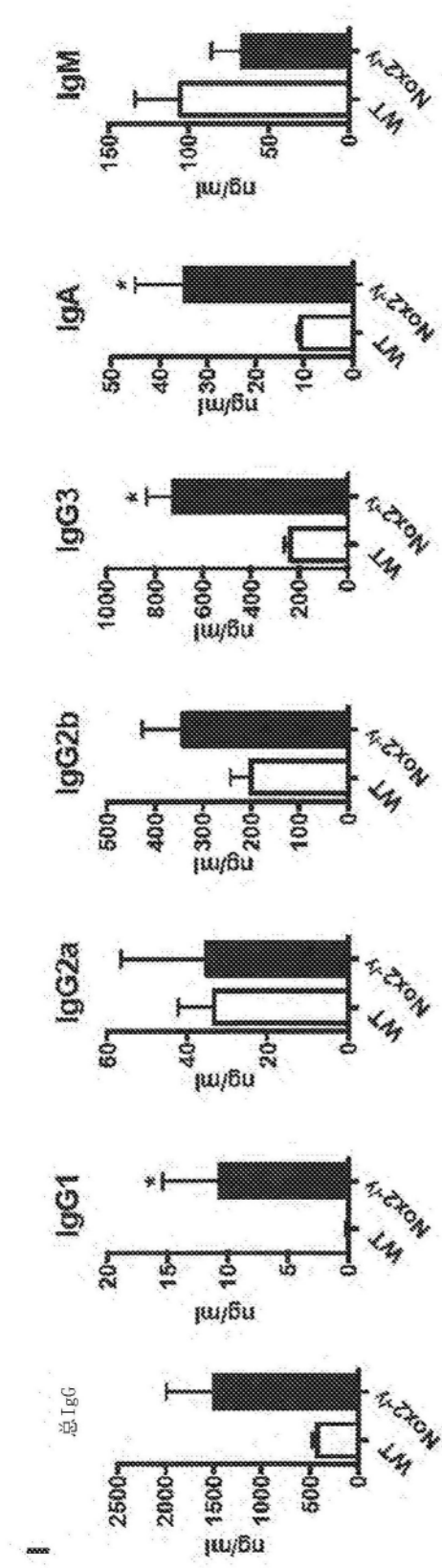


图8I

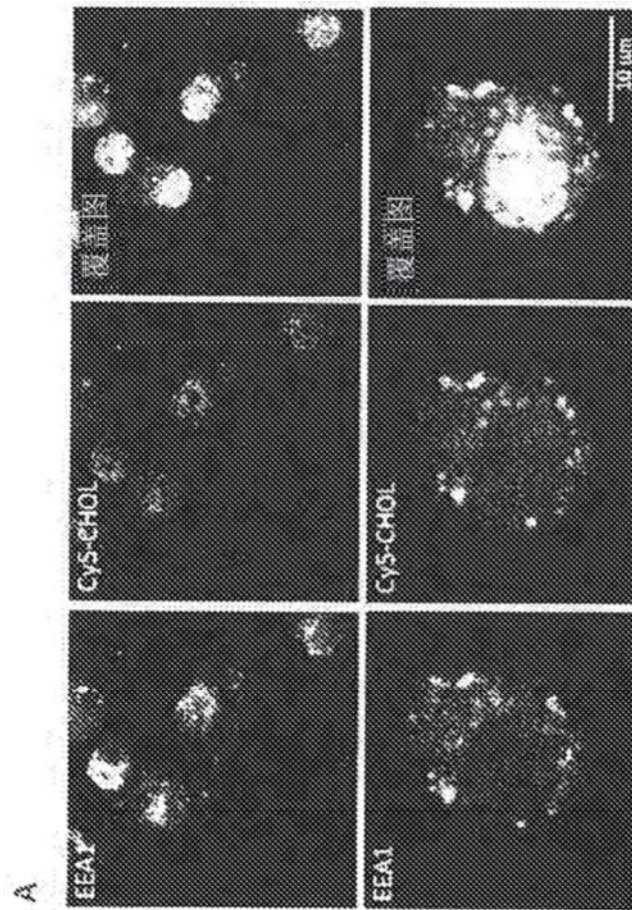


图9A

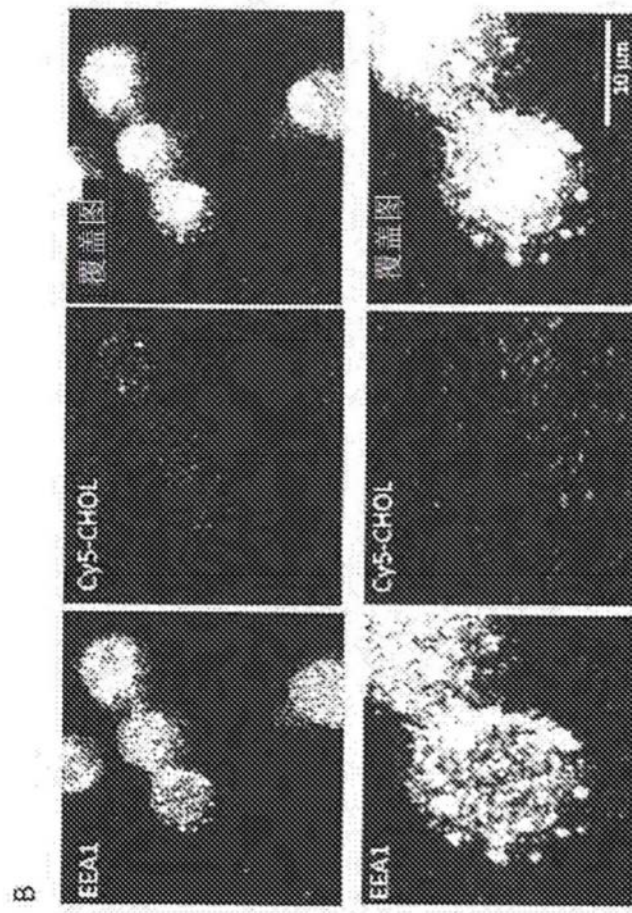


图9B

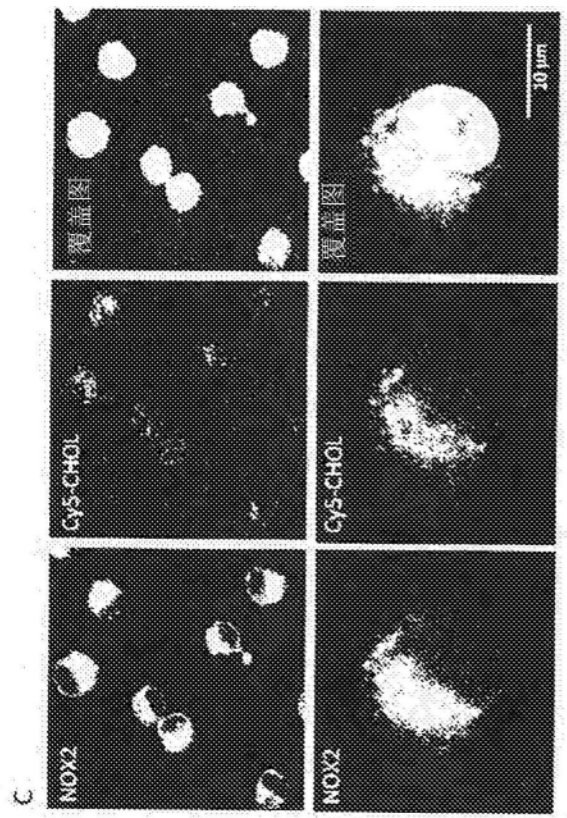


图9C

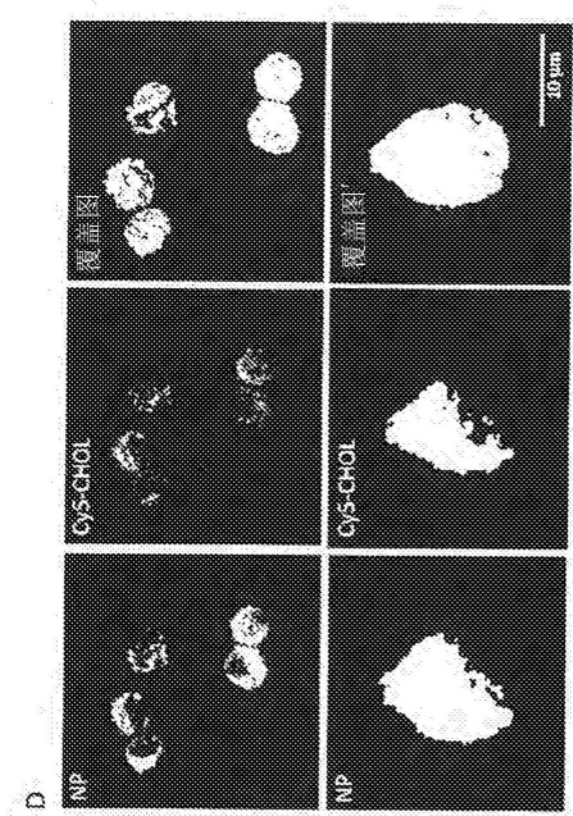


图9D

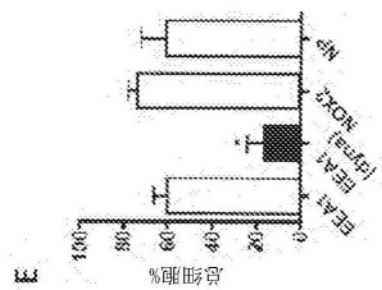


图9E

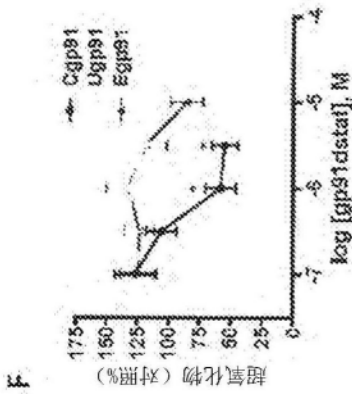


图9F

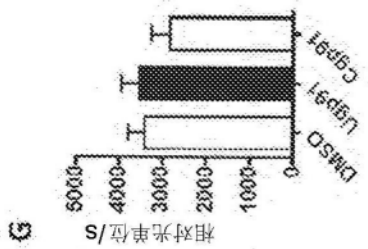


图9G

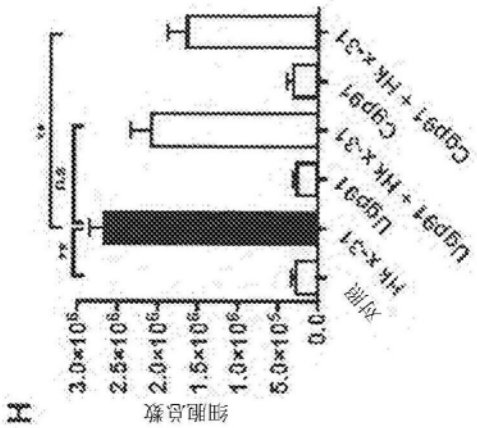


图9H

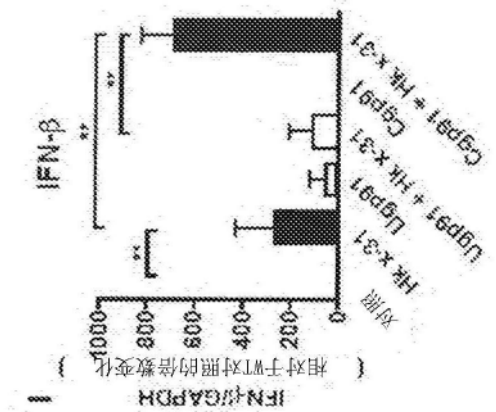


图9I

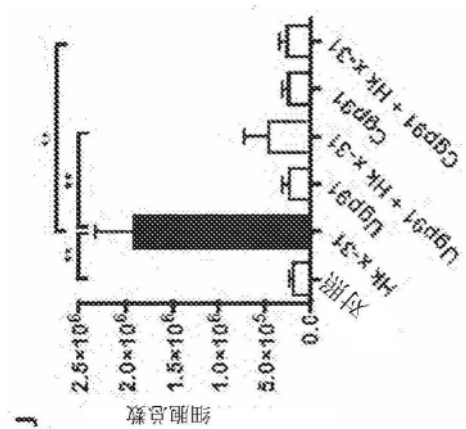


图9J

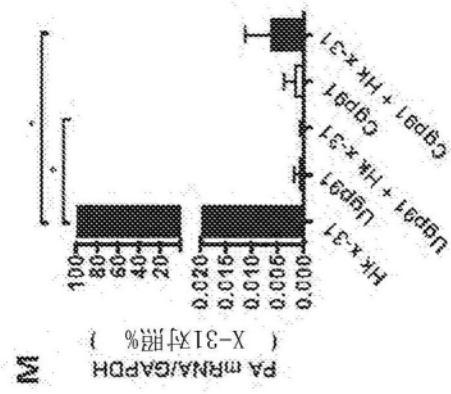


图9M

TLR3	-----MRQTLPCIIY-----FWGGLLPF-----GML	20
TLR9	-----MGFCRSA-----LHF-----LS-----LLVQAINLAMTLALGTLPA-----FLP	34
TLR7	-----MVFPMTLKRLLILILF-NIILISKLLGARWFPK-----TLP	35
TLR8	MKESSLQNSSCSLGRKTKKENMFLQSSMLTCIFLLISGSCELCABENFSR-----SYF	53
TLR5	-----MGDHLDLL-----LGVVLMAGPVFG-----IPS	23
TLR4	-----MMSASRLAGTL-----I-----PAMAFSLCVRKE-----SWEP	28
TLR2	-----MP-----HT-----LWMVWVLGVITISLSKESSNQA	26
TLR10	-----MRLIRNIYIFC-----SIVMTAEGDAPE-----	23
TLR1	-----MTSIFHFA-----IIFMLILQIRIQ-----	20
TLR6	-----MTKDKREPIVKSFFHV-----CLMIIIVGTIRIQ-----	27
C36 C51		
TLR3	CASSTTKCTVSHEVADCEHLKLTQVPD-----DLPTNITVLNLTHNQLRRLPAANFTRYISQ	76
TLR9	CEL-QP-----HGLVRCNWFLKSVPHFSMAAPRGNVTSLSLSSNRHHLHSDFAHLPS	88
TLR7	CDV-TLDVPMNHVIVDCTDKHLTEIPG-----GIFTNTNLTTLTINHIPDISPASFRHLDH	90
TLR8	CDE-KK-----QNDSVIAECNNRLQEVFPQ-----TVGKYVTELDLSDNFITHITNESFQGLQN	106
TLR5	CSF-----DGRIAPYR-----FCNLTQVPQ-----VL-NTTERLLLSPNYIRTVTASSFFPLEQ	71
TLR4	CVE-----VVPNITYQCMELNFKIPD-----NLPESTKNLDELSPNRLHLSYFFSFPE	79
TLR2	SLS-----CDRNGICKSSGSLNSIPS-----GLTEAVKSLDLSNNRITYISNSDLQRCVN	77
TLR10	-LP-----EERELMTNCSNMSLRKVA-----DLTPATTTLDLSEYLLFQLOSSDFHSVK	73
TLR1	-LS-----EESFLVDRKNGLIHVPK-----DLSQKTIILNISQYISELWTSILSLSK	70
TLR6	-FS-----DGNEFAVDKSKRGLIHVPK-----DLPLKTVLDMSONYIAELQVSDMSFLSE	77
C36 C106 C112		
TLR3	LTSLDVGFNTISK-----LEPELCQKLPMLKVLNLQHNELSQLSDKTFATC	122
TLR9	LRHLNLKWNCPVGLSPMR-----FPCHMTIEPSTFLAVPTLEELNLSYNNIMTVP-----ALP	142
TLR7	LVEIDFRNCNCPVPLGSKNNMCIKRLQIKRFSFSGLTPLKSLYLDGNQLLEIPQ-----GLP	147
TLR8	LTKINLNHNPNVQHNGNPGIQSNGLNITDGAFLNLKRLRELLLEDNQLFQIPS-----GLP	163
TLR5	LQLELGSDQVTEPL-----TIDKEAFRNLPNLRILDGSSKRIYFLHPDAFQGL	118
TLR4	LQVLDLSRC-EIQ-----TIEDGAYQSLSHLSTLILTGNFIQSLALGAFSGL	125
TLR2	LQALVLTSN-GIN-----TIEDSFSSLSLEHLDLSYNYLSNLSSSWFKPL	123
TLR10	LRVLILCHN-RIQ-----QLDLKTFEFNKELAYLDLSNNRLKSVT-----WYLL	116
TLR1	LRILITSHN-RIQ-----YLDISVFKFNQLEBYLDLSNNKLKVIS-----CHPT	113
TLR6	LTVLRLSHN-RIQ-----LLDLSVFKFNQDLEBYLDLSNNQLKIS-----CHPI	120
C183 C189		
TLR3	TNLTELHLSNSIQIKNNPFVK-----QKNLI	150
TLR9	KSLISLSLSHTNIMLDSASLAGLHALRFLFMDGNCYFNPCROALEVAPGALLGLGNLT	202
TLR7	PSLQLSLEANNIFSIRKENLTLANIEILYLGNQCYRNPCYVSYSIEKDAFINLTKLK	207
TLR8	ESLTELSTIQNNIYNITKEGISRLINLKNLYLAWNCYFNKVCCK-TNIEDGVFETLTNLE	222
TLR5	FHLFELRLYFCGL-----SDAVLKDGYFRNLKALT	148
TLR4	SSLQKLVAVET-----NLASLENFPIGHLKTLLK	153
TLR2	-----SSLT	127
TLR10	-----AGLR	120
TLR1	-----VNLK	117
TLR6	-----VSFR	124
C183 C189		
TLR3	TLDLSHNGLSSTFLGTQVQLENLQELLSNNKIQALKSEELDIFANSSLKKELSNNQIK	210
TLR9	HLSLKYNNLTVP-----RNLPSSELYLLLSYNRIVKLAPEDLANLTA-----LRVLDVGG-----	253
TLR7	VLSLKDNVNTAVP-----TVLPSTLTELYLYNNMIARIQEDDFNNLNQ-----LQILDLSG-----	258
TLR8	LLSLFSNLSHVP-----PKLPSSLRLKFLSNTQIKYISEEDFKGLIN-----LTLLDLSG-----	273
TLR5	RDLSSKNQIRSLY-----LHPSFGKLS-----LKSIDFSSNQIF	183
TLR4	ELNVAHNLIQSFK-----LPEYFSNLTN-----LEHLDLSSN-----	185
TLR2	FLNLLGNPYKTLG-----ETSLFSLHTK-----LQILRVGNMDDTF	162
TLR10	YLDLSFNDFDTMP-----ICKEAGNMSS-----LEILGLSGA-----	152
TLR1	HLDLSFNADFALP-----ICKEFGNMSQ-----LKFLGLSTT-----	149
TLR6	HLDLSFNDFKALP-----ICKEFGNLSQ-----LNFLGLSAM-----	156

图10A

	C260	C263	C270	C273	
TLR3	EEFSPGCFHAIGRLFGFLNN-VQLGPSLTEKLCLELANTSIRNLSLSNSQL-STTSNTTF				268
TLR9	-NCRHCDHAPNPMCEPRHFPO-LHFDT-----PSHLSRLEGVLKQSSSL-SWLNASWF				304
TLR7	-NCFRCYNAPFCAPCKNNSPLQIPVNA-----PDALTELKVLRLKSNEL-QHYPPRWF				310
TLR8	-NCFRCFNAPFCVPCDGGASINIDRPA-----FQNLTLQRLYLNLSTSL-RKINAAMF				325
TLR5	LVCE-----HELEFLQOK-----TISFFSLAANSLSYRVSVDWG				217
TLR4	-KIQSIYCTDLRLVLMOM-----PLNLSLQSLNPMNF-IQ-P				220
TLR2	TMQRNDFAGLTFLE-----EL-----EICASDLQS-YE-F				191
TLR10	-KIQKSDFOXIAHLN-----LNTVFLGERTL--PH-YE-E				182
TLR1	-HLKSSVLFIAHLN-----ISKVLLVLGETYGEK-ED-F				181
TLR6	-KLQKLDLPIAHLN-----LSYILLDLRNYIIE-NE-F				188
TLR3	LGLKWTNLT-----MLDLSYNNLN--VVGNDSEFAWLFQLEYFLEYNNIQHLFSHSL----				318
TLR9	RGL--GNLR-----VLDLSENFLYKCIITKAFQGLPQLRLKLNLSFNQKRVSPAHLSLAP				358
TLR7	KNI--NKLQ-----ELDLSONFLAKBIGDAKFLHFLPSLIQLDLSPNFELQVYRASMNLQ				364
TLR8	KNM--PHLE-----VLDLEFNVLGELIASSAFLTMLPRLEILDLSFNKSYQPHINISR				379
TLR5	KCMNPFRRNMVLEI-LDVSSNGWTVDT-----GNFSNAISKSQ				254
TLR4	GAFKEIRLHKLT-----RNNFDSLNVMT-CIQGLAGLEVHRL-----VLGEPRNE-GNLE				270
TLR2	KSLKSIQNV-SHLILHMKQHILLEIFVD-VTSSVECLELRDT-----DLDT-----F				237
TLR10	GSLPILNTTKLHIVLPMDFTFW--VLLRD-GIKTSKILEMTNI-----DGKS-----				226
TLR1	GGIQDFNTESLHIVFTNKFEH--FILDV-SVKTVANLELSNI-----KCVL--ED-SKCS				231
TLR6	ESLQILNARTLHLVHPTSLFA--IQVNI-SVNTLGCLQLTNI-----K--L--ND-DNCQ				236
TLR3	--HGLPNVRYLNLKRSYTKQSSISLASLPKIDPSPFQWLKCLEHLN-MEDNDIPGIKSNMF				375
TLR9	SFGSLVALKELDMHGIF-----FRSLDETTLRPLARLPLQLTLR-LQMNFINQAQLGIF				411
TLR7	AFSSLKSLKILRIRGYV-----FKELSPNLSPLHNLQNLVLD-LGTNFKIRIANLSMF				417
TLR8	NFSKLLSLRALHRLGYV-----FQELREDDFQPLMQLPNLSTIN-LGINFKIQIDFRLP				432
TLR5	AFSLILA-----HHIM-GAGFCGFHNKIDPDQ-----				279
TLR4	KFDKSA-----LEGLCNLT-IEEFRLAYLDYVLDIIDLFCNLTNVSSFSLSVSVTIERVKDF				326
TLR2	HF-SELS-----TGETNSI-IRKFTFRNVKITDESILPQVMKLLNQIS-----				277
TLR10	QFVSYEMQRNLSLEHAK-TSVLLNKVLDLWDBLFLILQPVWHTS-----				270
TLR1	YFLSILAK--LQTNPK-LSSLTLNNIETTWNSFIRILQLVWHTT-----				272
TLR6	VPIKFLSE--LTRGPT-LLNPTLNHIETTWKCLVRVVFQFLWPKP-----				277
TLR3	TGLINKYLSLSNSFTSLRT-I-----				396
TLR9	RAFPGLRYVDLSDNRISGASELTATMGADGGEXV-WLQPG-----DL-----				453
TLR7	KQPKRLKVIDLSVNIKSPSGDSSEVGFCNARTSVESYEPQVL-EQLHYFRYDKY----				471
TLR8	QNFSENLEIILSENRIISPLVRDTRQSYANSSSF-----QRHIRKRRSTDFEFDPH----				482
TLR5	-----NTFAGL-----ARS				268
TLR4	SYNFGWQHLELVNCKFGQFPYLAL-----KS-----				352
TLR2	-----GLLELEFDDCTLNGVGNFRA-----SDNDRVIDPCKVETL				312
TLR10	-----VEHFQIRNVTFGGKAYLDH-----NS--FDYSNTVMRTI				302
TLR1	-----VWYSSISNVKLQGG--LDF-----RD--FDYSGTSLKAL				302
TLR6	-----VEYLNINLTIIIES--IRE-----ED--PTYSKTTLKAL				307
TLR3	-----TNETFVSIANSPLHILMLTKNKISKIESDAPSWLGHLEVLDL				438
TLR9	-----AFAPVDTFSSDFRPNCSTLNFTLDSRNMLVTVQPEMPAQLSHLQCLRL				503
TLR7	-----ARSCRPNKKEASFMSVNESCYKYGQTLDSLKNSIFFVKSSDFQHLSPFLKCLNL				524
TLR8	-----SNFYHF-----TRPLIEPQCAAYGKALDSLNSIFFIGPNQFENLPDIACNL				530
TLR5	SVRHLDLSHGFFVPSLN-----SRVFETLKDLKVLNLAYNKINKIADAFYGLDNLQVLNL				343
TLR4	-----LKRLTFTSNK--GGNAFSEVDLPSLEFLDL				380
TLR2	TIRRLHIPRFYLFYDI-----STLYSLTERVKRITVENSAYFLVPCLLSQHLKSLEYLDL				367
TLR10	KLEHVHFRVFFYI--QQ-----DKIYILLTKMDIENLTISNAQMPHMLFPNYPTKPYLNF				355
TLR1	SINQVVSDFVGF--PQ-----SVIYEIPSNMNIKNFTVSGTRMVHMLCPSKISFPLHLDF				355
TLR6	TIEHITNQVFLF--SQ-----TALYTFVSEMNIIMLTISDTPFIHMLCPHAPSTPKFLNF				360

图10B

TLR3	GLNEIGQELTG----QEWKGLNIFEIYLSYNKYQLTRNSFALVPSIQRLMLRR----V	490
TLR9	SHNCISQAVNG----SQFLPLTGLQVLDLSHNLKLDYHEHSFTTELPRLEALDLSYNSQPF	559
TLR7	SGNLISQTLNG----SEFQPLAELRYLDFSNRLDLHSTAFEELHKLVLDTSSNSHYF	580
TLR6	SANSNAQVLSG----TEFSAIPHVKYLDLTNNRLDFDNASALTELSDLVLDSYNSHYF	586
TLR5	SYNLLGELYSS----NFYGLPKVAYIDLQKNHIAIIQDQTFKPLEKIQTLDLRDNALTT	398
TLR4	SRNGLS----FRGCCSQSDFGTTSKYLDSLSPNGVIT--MSSNFLGLEQLEHLDFQHSNLKQ	436
TLR2	SENLMVEEYLNKNSACED-----ANPSIQTLILRQNHLS	401
TLR10	ANNILTDLFLKRT--L-----QLPHLKTILNGNKLET	385
TLR1	SNLLTDTVFENC--G-----HLTELETILQMNQLKE	385
TLR6	TQNVFTDSIFEKC--S-----TLVKLETILQKNGLKO	391
* * *		
TLR3	ALKNVDSPPSPFQPLRNLITLDSLNNNIANIN--DDMLEGLEKLEIYLDLQHNHLARLWKHA	549
TLR9	GMQGVGHNFSPVAHLKTLRHLSLAHNNIHSQ--VSQQLCSTSLRALDFSGNALGHMWAEG	617
TLR7	QSEGITHMLNFTKNLKVLQKLMMDNDISS--TSRTMESESRLTEFRGNHLDVLWREG	638
TLR8	RIAGVTHLEFIQNTNLKVLNLSHNNIYTLT--DKYNLESKSLVELVFSGNRLDILWDD	645
TLR5	L-RFIPSIP-----DIFLSGNKLVLPKINLTANLIHLS--N-----R-L	435
TLR4	M-SE-----FSVFLSLRNLIIYLDISH-----T-H	458
TLR2	L-EK-----TGET-----	408
TLR10	L-SL-----VSCF-----	393
TLR1	L-SK-----IAEM-----	393
TLR6	L-FK-----VGLM-----	398
* * *		
TLR3	NPGGPIYFLKGLSHLHILNLESNGFDEIPVEVFKDLF-----	586
TLR9	D--LYLHFFQGLSGLIWLDSLQNRHLTLPLQTLRNLPRSLQVLRRLRDNYLA-----FFKW	670
TLR7	DN-RYLQFLKLLKLEELDISKNSLSFLPSGVDFGMPPNLRNLSLAKNGLK-----SPSW	692
TLR8	DN-RYISIFPKGLKNLTRLDLSLNLKHIPNEAFINLPASLTTELHINDNMLK-----FFNW	699
TLR5	ENLDILYFLLRVPHLQILILNQNRFSSECSGDQTFSENPSLEQLFLGENMLQLAWETELCW	495
TLR4	TRVAFNGIFNGLSSLEVLKMGANSFQENFLPDIFTEL-----	495
TLR2	-----LLTLKNLNIDISKNSF--HSMPTCQWPEKMKYLNLSSTRI-----H	449
TLR10	-----ANN--TPLEHLDSLQNLQ--HKNDENCSPWETVVMNLSYNKL-----SD	435
TLR1	-----TTQMSLQQLDISQNSVSYDEKKGDCSWTKSLLSLNMSNLI-----TD	437
TLR6	-----TKDMPSLBILDVSWNSLSGRHKENCTWVESIVVLNLSNNML-----TD	442
* * *		
C697 C721		
TLR3	-----ELKIIDLG-----LNNLNTLPASVFNNQVSLKS	614
TLR9	WSLHFL--PKLEVLDLAGNQLKALTNGSLPASTRLRLDVCNSISFVAPGFFSKAKELRE	729
TLR7	KELQCL--KNLETLDLSHNQLTTPBERLSNCSRLANLILKNNQIRSLTKYFLQDAFQLRY	751
TLR8	TLLQQF--PRLELLDLRGNKLLPLTDSLSDFFSSLRTLLSHNRISHLPSGFLSBVSSLKH	758
TLR5	DVERGL--SHLQVLYLNHNYLNSLPPGVFSHTALRGLSLNSNRLTVLSH--NDLEANLEI	552
TLR4	-----RNLTFDLDSQCQLEQLSPTAFNSLSLQVLNMSHNNFFSLDTFFYRCINSLQV	548
TLR2	SVTGCIPKTEILDVGNNNLNLF--S-----LNLPLQLKELYISRNKMLTLPD--ASLLPMLLV	503
TLR10	SVFRCLPKSIQILDNNNQIQTV--PKETHLMALRELNIAFNFLTDLPD--CSHPSRLSV	492
TLR1	TIFRCLPPRIKVLDLHSNKIRSI--PKQVVKLEALQELNVAFNSLTDLPG--CGSPSSLSV	494
TLR6	SVFRCLPPRIKVLDLHSNKISV--PKQVVKLEALQELNVAFNSLTDLPG--CGSPSSLSV	499
* * *		
C787 789		
TLR3	LNQKNLITSVEKKVFGP--AFRNLTELOMRNPFDCICESIAWFVNWINE--THNIPELS	672
TLR9	LNLSANALKTVDHSWFGP--LASALQILDVSANFLHCACG--AAFMDFLLE--VQAAVFGLP	785
TLR7	LDLSSNKIQMIQKTSFPEVNLNLMKLLHNRFLCTCD--AVWFVWVWNH--TEVTIPYLA	809
TLR8	LDLSSNLLKTINKSALETKTTTKLSMLELHGNPFECTCD--IGDFRRWMDERLNVKIPR-L	816
TLR5	LDISRNQLLAPNPQVFEV-----SLSVLDITHNKFICECE--LSTFINWLNHT--NVTIAGPP	605
TLR4	LDYSLNHIMTSKKQELQH--FPSSLAFLNLTQNDFACTCE--HQSFLQWIKDQRL--VEV	604
TLR2	LKISRNAITTFKSQELDS--FH--TLKTELAGGNFIC5CE--FLSFTQE--QQALAKVLTOWP	559
TLR10	LNEMNFILSPSLDFVQS--CQ--EVKTLNAGRNPFRCTCE--LKNFIQ--LETYSEVMVGWS	548
TLR1	LIIDHNSVSHPSADFFQS--CQ--KMRSIKAGDNPFQCTCE--LGEFVKNIDQVSSEVLEGWP	551
TLR6	LIIDHNSVSHPSADFFQS--CQ--KMRSIKAGDNPFQCTCE--LREFVKNIDQVSSEVLEGWP	556
* * *		

图10C

	C814	C833	
TLR3	SHYLCNTPPHYHGFEVRLFDTS--SCKDSAPFELFFMINTSILLIFIFIVLLIHFEGWRI	730	
TLR9	SRVKCGSPGQLQGLSIFAQDLR--LCLDEALSWDCFALSLLAVALGLGVFNLHHLCCGWDL	843	
TLR7	TDVTCVVGPGAHKQGSVISLRLY--TCELDLTNLILFSLISVSLEFLVMVMTASHLYFWDV	857	
TLR6	VUVICASPGEQQRKGSIVSLELT--TCVSDVTAVILFFPTFFITTMVMLAALAHRLFYWDV	874	
TLR5	ADIYCVYFDSFSGVSLFSL--TEGCDEREVLKSLKPSLFIIVCT---VTLTLFLMTILTV	660	
TLR4	ERMECATPSPDKQGMPLVSLNI---TCQMKTITIGSVLSVLVVS---VVAVLVYKPYFHL	658	
TLR2	ANYLCLSPSHVRGQVQVRLSVSECHRTALVSGMCCALPLL-----ILLTGVLCHRFHG	614	
TLR10	DSYTCYFPLNLGRTRIKDVHLHELSCNTALLIVTIVVIMLVL-----GLAVAFCCCLHFDI	603	
TLR1	DSYKCDYPESTRGTLKDFHMSLSNITLLIVTIVATMLVL-----AVTVTSLCIYLDL	606	
TLR6	DSYKCDYPESTRGSPLKDFHMSLSNITLLIVTIGATMLVL-----AVTVTSLCIYLDL	611	
	* * *		
	C874	C889 890	
TLR3	SFYWVSVHVRVLGFKEID-R-----QTEQFEYAAYIIHAYKD---KDWVWEHFSSMEKE	780	
TLR9	WYCFHLCLANLPWRGRQSGR-----DEDALPYDAFVVDKTSASAVADWVYNELRGQLEE	897	
TLR7	WYIYHFCARINGYQRLI-----SPDCYDAFIVDTKDPVTEWVLAELVAKLED	918	
TLR8	WFIYNVCLAKVGYRSL--TSQTFYDAYISYDTKDSVTDWVYNELRYHLEE	925	
TLR5	TKFRGFCFICYKTAQRLVFRDHPQGTEPDYKYDAYLFCSSKD---FTWVQNALLEHLDI	717	
TLR4	---MLLAGCINY---G-----RGENIYDAFVIYSSQD---EDWVRNELVKNLEE	698	
TLR2	IWMKMMMAWTLQA---KKPKPKAP---SRNICYDAFVSYSERD---AYWVENLMVQLEEN	665	
TLR10	PWYLRMLGQCTQT---WHRVKTTQEQLRKRVRFHAFISYSEHD---SLWVKNELIPNLEK	658	
TLR1	PWYLRMVCQWTQT---RRRARNIPLEELQRLQPHAFISYSEHD---SFWMRNELLPNLEK	661	
TLR6	PWYLRMVCQWTQT---RRRARNIPLEELQRLQPHAFISYSEHD---SAWVKSELVPLYEK	666	
	* * * * *		
	C927		
TLR3	----DQSLKECLEERDFRAGVFELEAIVN-SIKRSRKIIIFVITHHLLKDPCKRPFVHHA	835	
TLR9	CR-GRWALRLCLEERDWLPQKTLFENLWA-SVYGSRKTLFVLANTDRVSGLLR-ASFLIA	954	
TLR7	PR-EK-HFNLICLEERDWLPQPVLENLSQ-SIQLSKKTVPVMTDKYAKTENFK-IAFYLS	974	
TLR6	SR-DK-NVLLICLEERDWDPGLAIDNLMQ-SINQSKKTVPVLTCKYAKSWNEK-TAFYLA	981	
TLR5	QYSDQNRNLCFEERDFVPGENRIANIQC-AIWNRSRKIVCLVSRHFLRDCWCL-EAFSYA	775	
TLR4	G---VPPFQLCLHYRDFIPGVAIAANIHEGFHKSRRKIVVVSQHFIQSRWCI-FEYELA	754	
TLR2	F---NPPFKLCLHKRDFIPGKWIIDNIID-SIEKSHKTVPVLSNFVQSEWCK-YELDFS	720	
TLR10	E---DGSILICLYESYFDPGKSISENIVS-FIEKSYKSIFVLSNPFVQSEWCH-YEYFYA	713	
TLR1	E---G---MQICLHERNFVPGKSIVENIIT-CIEKSYKSIFVLSNPFVQSEWCH-YELYFA	714	
TLR6	E---D---IQICLHERNFVPGKSIVENIIN-CIEKSYKSIFVLSNPFVQSEWCH-YELYFA	719	
	* * * * *		
	C1008	C1028	
TLR3	VQQAIEQNLDSEIILVFLFEIPDYKLNHALCLRRGMFKSHCIINWPVQKERIGAFRRHQLQV	895	
TLR9	QQRLLLEDKRDVVLVILSPD---GRRSRYVRLRQRLC-RQSVLLWPHQPSGQPSFWAQLCM	1011	
TLR7	HQRLLMDEKVDVILIFLERP---FQKSKFLQLKRLC-GSSVLEWPTNPQAHFYFWQCLN	1031	
TLR6	LQRLMDENMDVILIFILLEPV---LQHSQYLKLRQRLC-KSSILQWPDNPKAEGFLWQTLN	1038	
TLR5	QGRCLSDLSALIMVVGSLSQYQLMKH-QSINGFVQKQYLRWPELDQVGVNFWLHLSQ	834	
TLR4	QTWQFLSSRAGIIPFIVLQKVEKTLRQQ-VELYRLLSRNTYLEWEDSVLGRHIFWRRLRK	813	
TLR2	HFRLFDENNDAAIILILLEPIEKKAIPQRFCKLRKIMNTKTYLEWPMDEAQREGFWANLRA	780	
TLR10	HHNLFHENSDDHILILLEPIFFYCIPTRYHKLKALLEKAYLEWPKDRKCGFLFWANLRA	773	
TLR1	HHNLFHEGSNLILILLEPIQYSIPSSYHKLKSLMARTTYLEWPKKSKBGLFWANLRA	774	
TLR6	HHNLFHEGSNLILILLEPIQNSIPNKHKLKALMTQRTTYLQWPKKSKBGLFWANLRA	779	
	* * * * *		
TLR3	ALGSKNSVH-----	904	
TLR9	ALTRDNHFFYNRNFCQGPTAE-----	1032	
TLR7	ALATDNHVAYSQVFKETV-----	1049	
TLR5	VVLTEENDSRYNMYVDSIKQY-----	1059	
TLR5	QILKKEKEKKDNFILOT-----VATIS-----	858	
TLR4	ALLDGKSWNPGSTV-GTGCNWQE---ATSI-----	839	
TLR2	AKS-----	784	
TLR10	AINVNVLATREMYELQTFTELNEESRGSTISLMRTDCL	811	
TLR1	AINIKLTEQAKK-----	786	
TLR6	AFNMKLTLVTERNDVKS-----	796	

图10D

图11A

			C485	
{ 安大略蛙	KITNLSYLMLXLFPAIINLSNKKISSPSSGQSVASGQBAIHGSPMSUAGRNANGVRE	473		
{ 热带非洲爪蟾	KVADPSLFPKPSLQTTILNNKISPSSEA-----NIOSCEASQV-----SSGMYIGRTFPQ	467		
{ 原鸡	KIADLVFVKFRSLKIDLSNNKISPSGEGNFYGFCEBHR	476		
{ 小鼠	KIADLNIPKHFEMIKLIDLSVNKISPS-EESKRVGFCFNAQT-----SVDRHGPPQVLEA	462		
{ 褐家鼠	KIADLNISQGFENLKFIDLSVNKISPS-EESKRVGFCFNAQT-----SVDRHGPPQVLEA	462		
{ 人	KIANLSMFKQFKRLKVIDLSVNKISPS-GDSSEVGFCEBNART-----SVESSEGFQVLEQ	462		
{ 野猪	KIANLSIFKQFKTLKFIDLSVNKISPS-GDSSESGFCBGMRT-----SASSEHGFPVLES	462		
{ 牛	KIANLSIFKQFKTLKFIDLSVNKISPS-GDSSEGGGECBNRT-----SVEGSGFPVLET	476		
	* * * * *			
	C491			
{ 安大略蛙	LHYFRYDEYARSCRYKXDMEDGTLNSFVNTQCSNPKTLDISRNINIFLHS-RFLNLADLR	532		
{ 热带非洲爪蟾	VHYFRYDENARMCANDKENFTFHLFLNESCQAYGQSLDLSQNNIFFVKATDFTNLSFLK	527		
{ 原鸡	MHYFRYDEYARSCRYKXDMEDGTLNSFVNTQCSNPKTLDISRNINIFLHS-RFLNLADLR	530		
{ 小鼠	LHYFRYDEYARSCRYKXDMEDGTLNSFVNTQCSNPKTLDISRNINIFLHS-RFLNLADLR	521		
{ 褐家鼠	LHYFRYDEYARSCRYKXDMEDGTLNSFVNTQCSNPKTLDISRNINIFLHS-RFLNLADLR	521		
{ 人	LHYFRYDKYARSCRYKXDMEDGTLNSFVNTQCSNPKTLDISRNINIFLHS-RFLNLADLR	520		
{ 野猪	LHYFRYDEYARSCRYKXDMEDGTLNSFVNTQCSNPKTLDISRNINIFLHS-RFLNLADLR	521		
{ 牛	LHYFRYDEYARSCRYKXDMEDGTLNSFVNTQCSNPKTLDISRNINIFLHS-RFLNLADLR	529		
	* * * * *			
	C521			
{ 安大略蛙	CINLSGNAMSGSLNGSEPTFTLTLQVLDFFENRDLILYSSAPQELNLAIVLIDISNNHNYF	592		
{ 热带非洲爪蟾	CINLSGNALISQTLNGSEFFNLRLKYLDFSNRRIDLLYSTAFQELTELEVLDISNNHNYF	587		
{ 原鸡	CINLSGNALISQTLNGSEFFNLRLKYLDFSNRRIDLLYSTAFQELTELEVLDISNNHNYF	590		
{ 小鼠	CINLSGNALISQTLNGSEFFNLRLKYLDFSNRRIDLLYSTAFQELTELEVLDISNNHNYF	581		
{ 褐家鼠	CINLSGNALISQTLNGSEFFNLRLKYLDFSNRRIDLLYSTAFQELTELEVLDISNNHNYF	581		
{ 人	CINLSGNALISQTLNGSEFFNLRLKYLDFSNRRIDLLYSTAFQELTELEVLDISNNHNYF	580		
{ 野猪	CINLSGNALISQTLNGSEFFNLRLKYLDFSNRRIDLLYSTAFQELTELEVLDISNNHNYF	581		
{ 牛	CINLSGNALISQTLNGSEFFNLRLKYLDFSNRRIDLLYSTAFQELTELEVLDISNNHNYF	589		
	* * * * *			
	C531			
{ 安大略蛙	ESGLTHMLNFTKNTLTKLILMMNNYRISTSTNTELESRSLEKLEPKGNRLDMLNRDGGT	652		
{ 热带非洲爪蟾	LARGITHVFNFTKNLEKILTKLMMNNYRISTSTNTELESRSLEKLEPKGNRLDMLNRDGGT	647		
{ 原鸡	LARGITHVFNFTKNLEKILTKLMMNNYRISTSTNTELESRSLEKLEPKGNRLDMLNRDGGT	650		
{ 小鼠	QARGITHMLNFTKNTLTKLILMMNNYRISTSTNTELESRSLEKLEPKGNRLDMLNRDGGT	641		
{ 褐家鼠	QARGITHMLNFTKNTLTKLILMMNNYRISTSTNTELESRSLEKLEPKGNRLDMLNRDGGT	641		
{ 人	QSEGITHMLNFTKNTLTKLILMMNNYRISTSTNTELESRSLEKLEPKGNRLDMLNRDGGT	640		
{ 野猪	QSEGITHMLNFTKNTLTKLILMMNNYRISTSTNTELESRSLEKLEPKGNRLDMLNRDGGT	641		
{ 牛	QSEGITHMLNFTKNTLTKLILMMNNYRISTSTNTELESRSLEKLEPKGNRLDMLNRDGGT	649		
	* * * * *			
	C541			
{ 安大略蛙	RYIDYFKLLNLRLVLDISNNHNYRISTSTNTELESRSLEKLEPKGNRLDMLNRDGGT	712		
{ 热带非洲爪蟾	RYIDYFKLLNLRLVLDISNNHNYRISTSTNTELESRSLEKLEPKGNRLDMLNRDGGT	707		
{ 原鸡	RYIDYFKLLNLRLVLDISNNHNYRISTSTNTELESRSLEKLEPKGNRLDMLNRDGGT	710		
{ 小鼠	RYIDYFKLLNLRLVLDISNNHNYRISTSTNTELESRSLEKLEPKGNRLDMLNRDGGT	701		
{ 褐家鼠	RYIDYFKLLNLRLVLDISNNHNYRISTSTNTELESRSLEKLEPKGNRLDMLNRDGGT	701		
{ 人	RYIDYFKLLNLRLVLDISNNHNYRISTSTNTELESRSLEKLEPKGNRLDMLNRDGGT	700		
{ 野猪	RYIDYFKLLNLRLVLDISNNHNYRISTSTNTELESRSLEKLEPKGNRLDMLNRDGGT	701		
{ 牛	RYIDYFKLLNLRLVLDISNNHNYRISTSTNTELESRSLEKLEPKGNRLDMLNRDGGT	709		
	* * * * *			
	C721			
{ 安大略蛙	LEVLDLSSNSISTVPFELSNCITSLTLILRRNQISKLAKFLKDAVSLKYLIDLSNNHIQ	772		
{ 热带非洲爪蟾	LEVLDLSSNSISTVPFELSNCITSLTLILRRNQISKLAKFLKDAVSLKYLIDLSNNHIQ	767		
{ 原鸡	LEVLDLSSNSISTVPFELSNCITSLTLILRRNQISKLAKFLKDAVSLKYLIDLSNNHIQ	770		
{ 小鼠	LEVLDLSSNSISTVPFELSNCITSLTLILRRNQISKLAKFLKDAVSLKYLIDLSNNHIQ	761		
{ 褐家鼠	LEVLDLSSNSISTVPFELSNCITSLTLILRRNQISKLAKFLKDAVSLKYLIDLSNNHIQ	761		
{ 人	LEVLDLSSNSISTVPFELSNCITSLTLILRRNQISKLAKFLKDAVSLKYLIDLSNNHIQ	760		
{ 野猪	LEVLDLSSNSISTVPFELSNCITSLTLILRRNQISKLAKFLKDAVSLKYLIDLSNNHIQ	761		
{ 牛	LEVLDLSSNSISTVPFELSNCITSLTLILRRNQISKLAKFLKDAVSLKYLIDLSNNHIQ	769		
	* * * * *			
	C727 C729			
{ 安大略蛙	NIEQTSIFPDVVDQMCITLVNNHKKFNCNCHALMFVMMNMTMVNIPRLATAVVCAAPGAG	832		
{ 热带非洲爪蟾	NIEQTSIFPDVVDQMCITLVNNHKKFNCNCHALMFVMMNMTMVNIPRLATAVVCAAPGAG	827		
{ 原鸡	NIEQTSIFPDVVDQMCITLVNNHKKFNCNCHALMFVMMNMTMVNIPRLATAVVCAAPGAG	830		
{ 小鼠	NIEQTSIFPDVVDQMCITLVNNHKKFNCNCHALMFVMMNMTMVNIPRLATAVVCAAPGAG	821		
{ 褐家鼠	NIEQTSIFPDVVDQMCITLVNNHKKFNCNCHALMFVMMNMTMVNIPRLATAVVCAAPGAG	821		
{ 人	NIEQTSIFPDVVDQMCITLVNNHKKFNCNCHALMFVMMNMTMVNIPRLATAVVCAAPGAG	820		
{ 野猪	NIEQTSIFPDVVDQMCITLVNNHKKFNCNCHALMFVMMNMTMVNIPRLATAVVCAAPGAG	821		
{ 牛	NIEQTSIFPDVVDQMCITLVNNHKKFNCNCHALMFVMMNMTMVNIPRLATAVVCAAPGAG	829		
	* * * * *			

图11B

{ 安大略蛙	RGHPVISLDELQACQHNYSIILYIILTSVLVSFVTLPISSHLEFLWDVWVYLXHFLLAKF	892
{ 热带非洲爪蟾	RGQSLVLLDL--YTCEQYHLNLILQALSASFIIICLMVSVSSHLFYWDFWFIYHLEFKAKI	885
{ 原鸡	KGRSLVFLEL--NTCELDTSYFIMYALSTSAVLCIMMFVMSHLYFWDVWVYSYRYCTAFL	888
{ 小鼠	KGQSVISLDEL--YTCELDLTNLILFSVSISSVLFMLVMTTSHLFFWDMWYIYYFWKAKI	879
{ 褐家鼠	KGQSVISLDEL--YTCELDLTNLILFSVSISSVLFMLVMTTSHLFFWDMWYIYYFWKAKI	879
{ 人	KGQSVISLDEL--YTCELDLTNLILFSVSISSVLFMLVMTTASHLYFWDVWYIYHFCKAKI	878
{ 野猪	KGQSVVSLDL--YTCELDLTNPFVLSLSLSAVLFLIVITIANHLYFWDVWVYSYHFCKAKI	879
{ 牛	KGQSVVSLDL--YTCELDLTNPFILSLSISAVLSLMMITIANHLYFWDVWVYSYHFCKAKI	887
*** CS898 C890 *** C927 ***		
{ 安大略蛙	KGYRRLSSPSAAYDAFVVDKDDPEVSEWVLKELLVQLEEHGDHPLQLCLEERDWIPGCF	952
{ 热带非洲爪蟾	HGYKRF--PKCCYDALIMYDTKDSAVSDWVFNLDVNILEKQGNKMLNLCLEERDFLAGQP	943
{ 原鸡	KGYRRIPLPDACYDAFIAYDNTDLAVNEWVNTLVEKLEDQKARQFNLCEERDWLPQGP	948
{ 小鼠	KGYQHLQSMESCDAFIVYDTKNSAVTEWVLQELVAKLEDPREKHFNLCEERDWLPQGP	939
{ 褐家鼠	KGYQHLQSMESCDAFIVYDTKNSAVTEWVLQELVAKLEDPREKHFNLCEERDWLPQGP	939
{ 人	KGYQRLISPDCDAFIVYDTKDPVTEWVLAELVAKLEDPREKHFNLCEERDWLPQGP	938
{ 野猪	KGYQRLISPNSCYDAFIVYDTKDPVTEWVLDLVAKLEDPREKHFNLCEERDWLPQGP	939
{ 牛	KGYRRLISPNSCYDAFIVYDTKDPVTEWVLDLVAKLEDPREKCFNLCEERDWLPQGP	947
***** C1008 ***** C1029 *****		
{ 安大略蛙	LIDNLSQSIHQSKRTVFILTNKYIKSGDFKTAIFYMAHQRLMDERDDVIVLIFLEKVPNSH	1012
{ 热带非洲爪蟾	FLDNLSQSIQISRTVFVLTRKYVKKGHFKTAIFYMAHQRLIEEKVEVILILILEKTLQRS	1003
{ 原鸡	VFDNLSQSIQLSKKTIFVLTNKYIKSGTFKTTIFYMAHQRLDDEKIDVILILIFLEKVLQKS	1008
{ 小鼠	VLENLSQSIQLSKKTVFVMTQKYAKTESFKMAFYLSHQRLDDEKVDVILILIFLEKPLQKS	999
{ 褐家鼠	VLENLSQSIQLSKKTVFVMTQKYAKTESFKMAFYLSHQRLDDEKVDVILILIFLEKPLQKS	999
{ 人	VLENLSQSIQLSKKTVFVMTDKYAKTENFKIAFYLSHQRLDDEKVDVILILIFLEKPFQKS	998
{ 野猪	VLENLSQSIQLSKKTVFVMTDKYAKTEKFKIAFYLSHQRLDDEKVDVILILIFLEKPLQKS	999
{ 牛	VLENLSQSIQLSKKTVFVMTDKYAKTENFKIAFYLSHQRLDDEKVDVILILIFLEKPLQKS	1007
***** C1008 ***** C1029 *****		
{ 安大略蛙	KYLRLRRLYRVSIEWPTNFPQAQYFWESLRSVLVTDSEKQYNSNLFKETR	1063
{ 热带非洲爪蟾	RYLRLRRLCANSVLYWPSNPNSQSYFWHCLKSAIATENQMAVDKLFKDHT	1054
{ 原鸡	RYVQLRKRLCRSSVLEWPTNFRSQPYFWQRLKNAIAMNNTLSYNKLLQETV	1059
{ 小鼠	KFLQLRKRLCRSSVLEWFPANPQAHFYFWQCLKNALTTDNHVAYSQMFKETV	1050
{ 褐家鼠	KFLQLRKRLCASSVLEWPTNFPQAHFYFWQCLKNALTTDNHVAYSQMFKETV	1050
{ 人	KFLQLRKRLCASSVLEWPTNFPQAHFYFWQCLKNALATDNHVAYSQVFKETV	1049
{ 野猪	KFFQLRKRLCASSVLEWPTNFPQAHFYFWQCLKNALATDNHVTYSQVFKETA	1053
{ 牛	KFLQLRKRLCASSVLEWPTNFPQAHFYFWQCLKNALATDNHVTYSQVFKETA	1058
***** C1008 ***** C1029 *****		

图11C

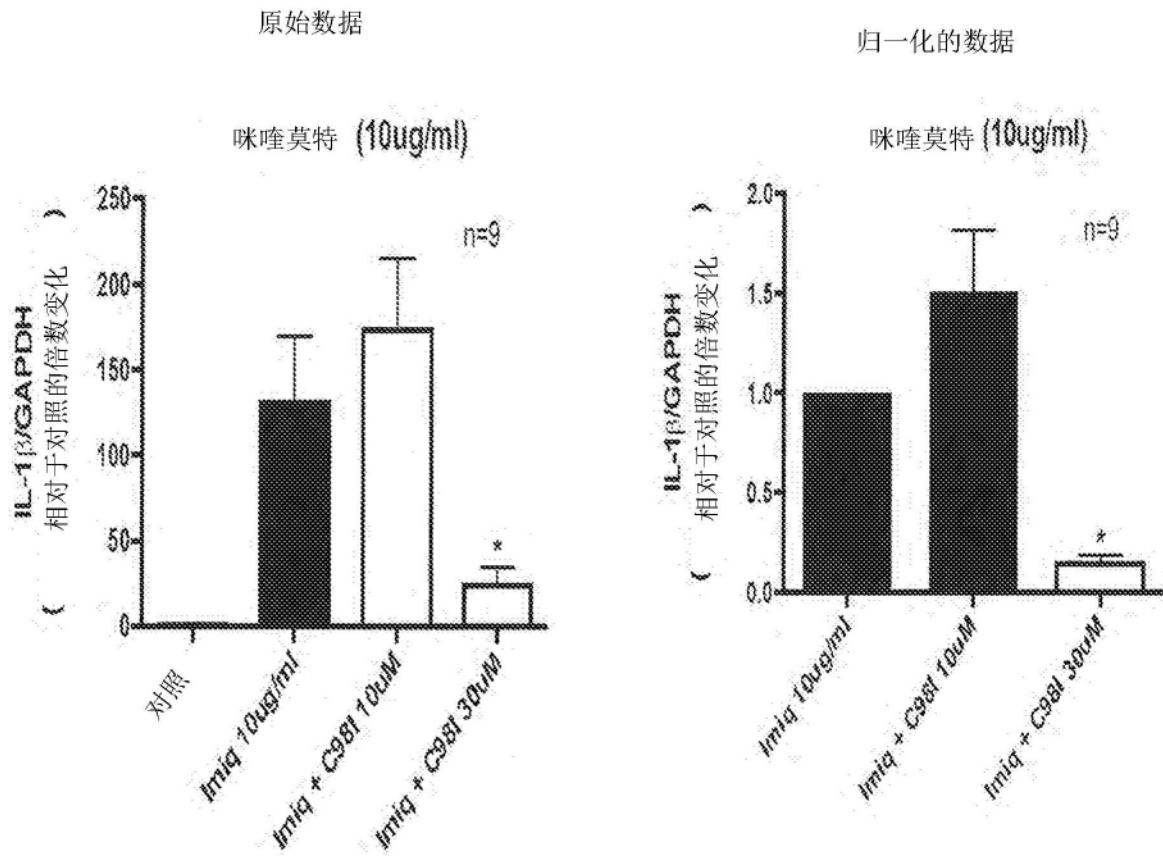


图12

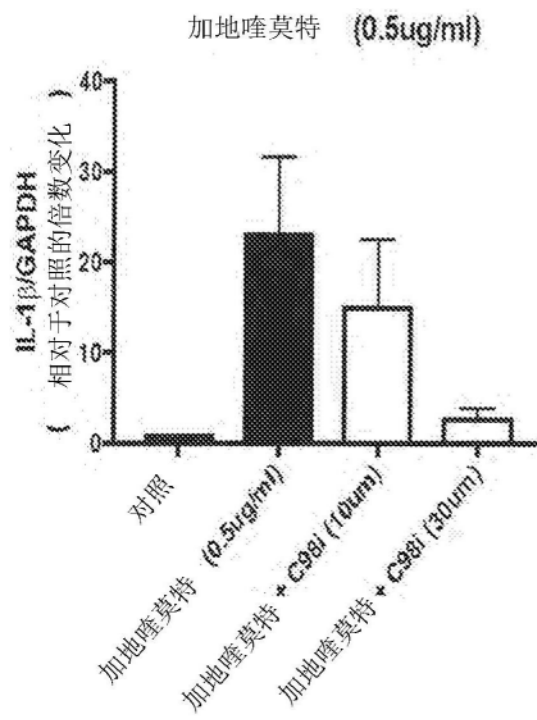


图13

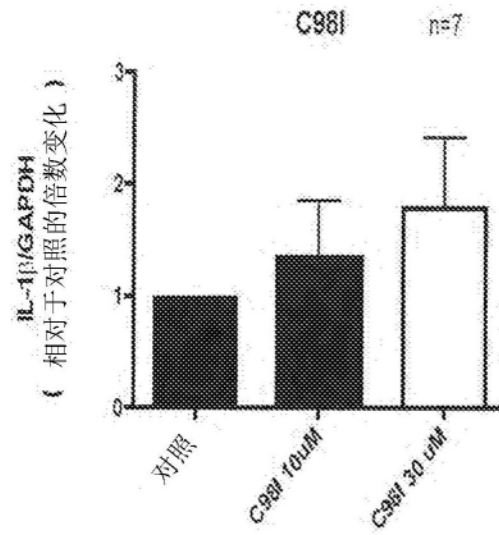


图14

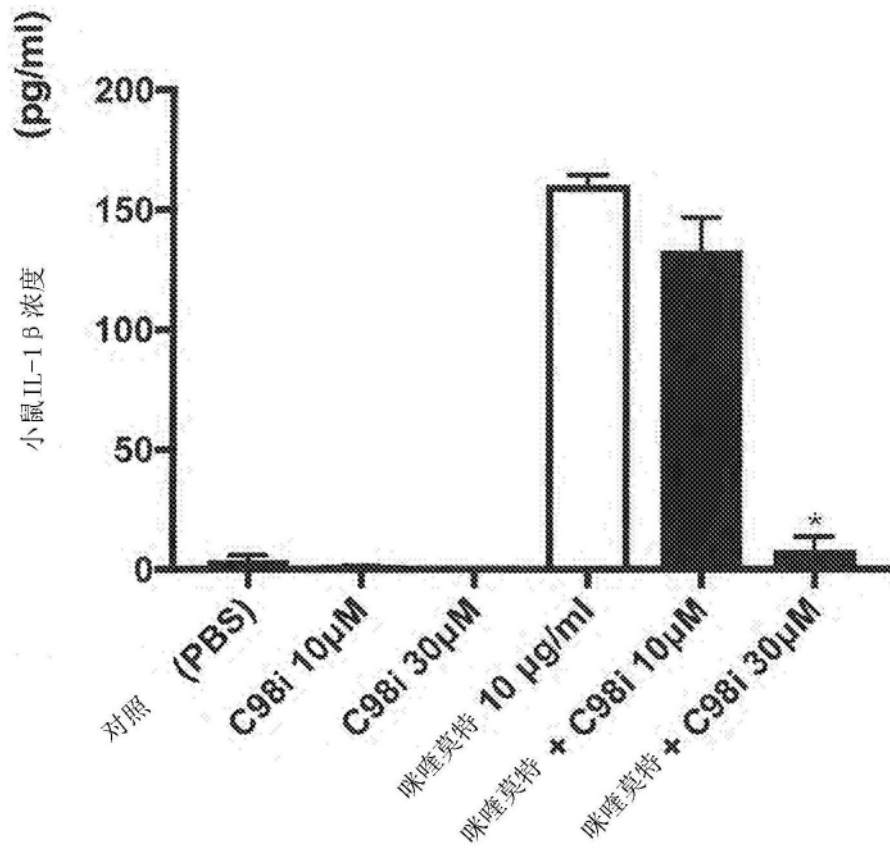


图15

(A)

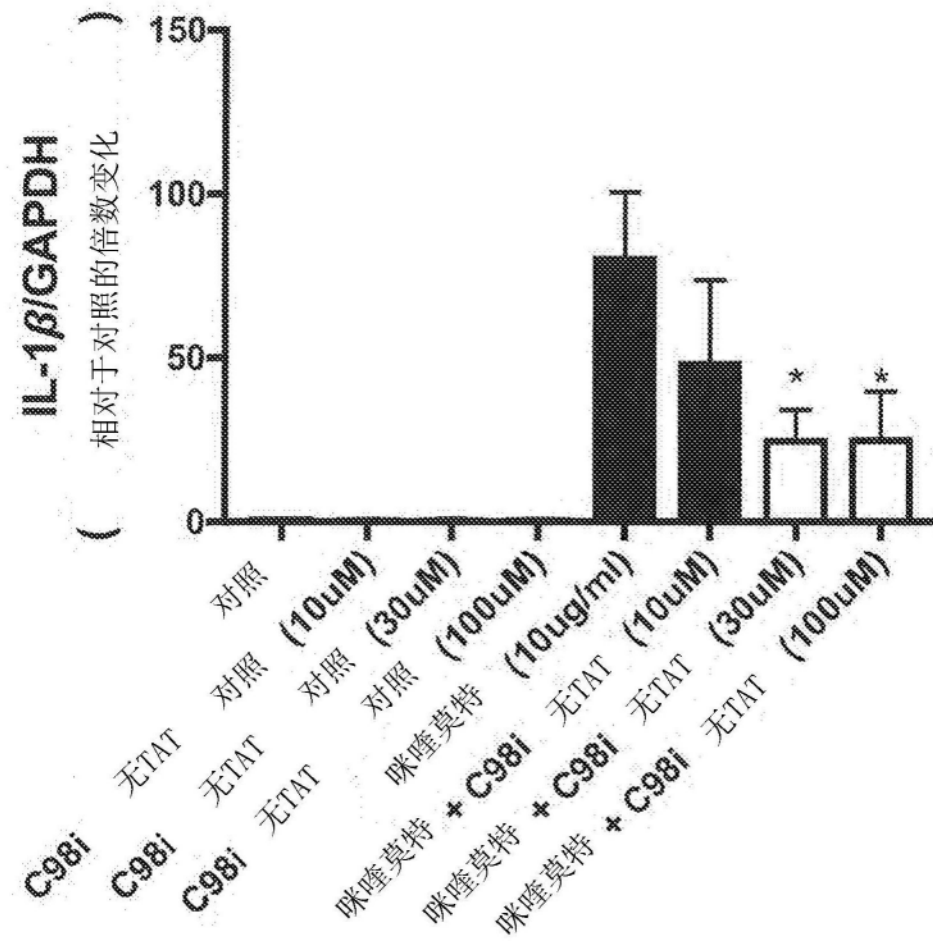


图16A

(B)

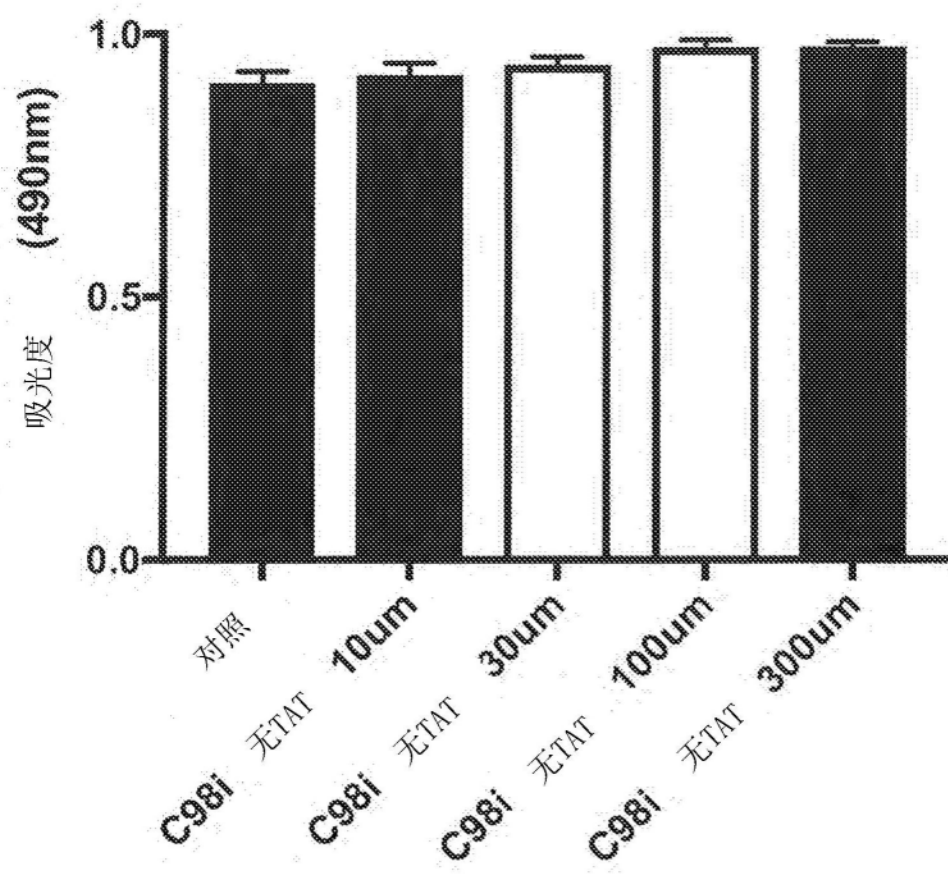


图16B

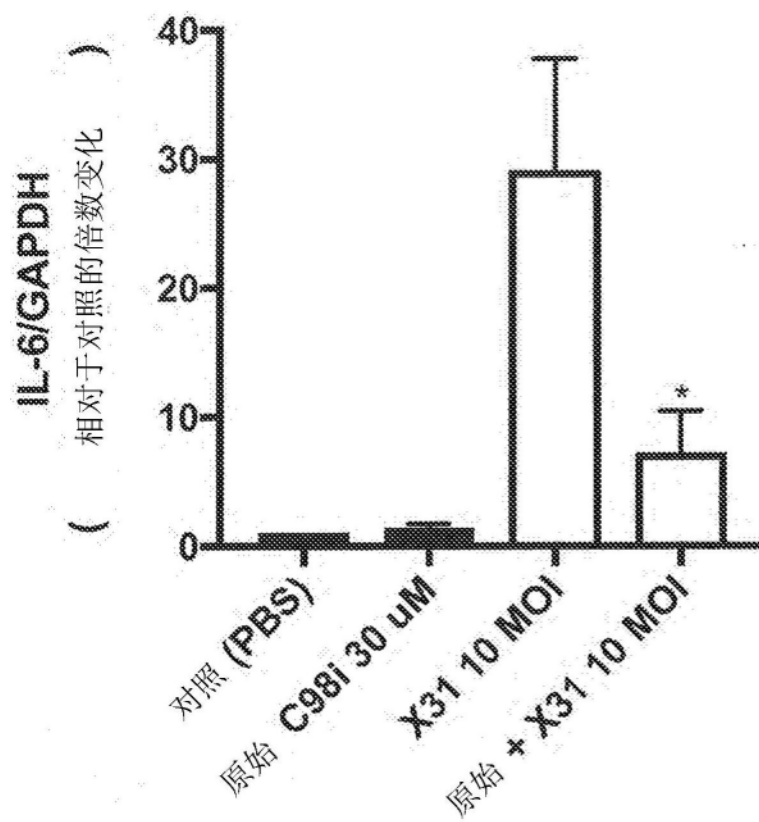


图17

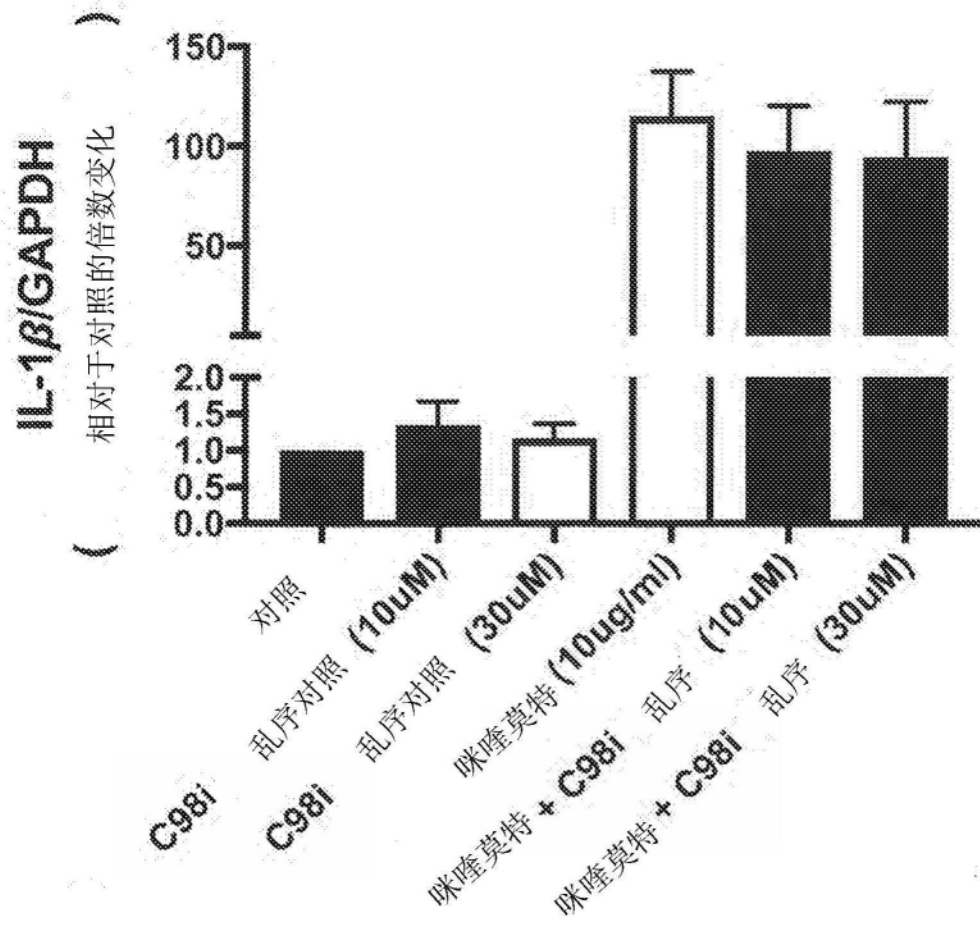


图18

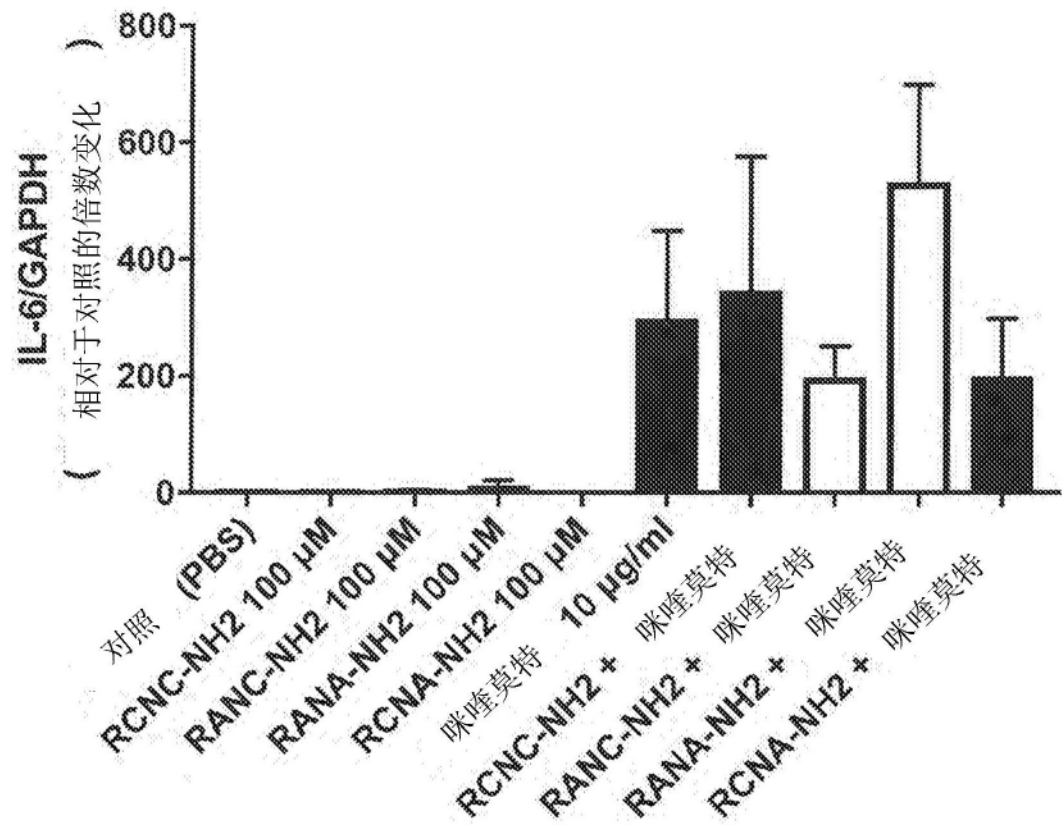


图19