



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105683372 A

(43) 申请公布日 2016. 06. 15

(21) 申请号 201480051586. 2

A61K 31/7125(2006. 01)

(22) 申请日 2014. 09. 19

A61K 31/713(2006. 01)

(30) 优先权数据

2013-196206 2013. 09. 20 JP

A61K 39/02(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2016. 03. 18

A61K 39/12(2006. 01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2014/074835 2014. 09. 19

A61P 33/00(2006. 01)

(87) PCT国际申请的公布数据

W02015/041318 JA 2015. 03. 26

A61P 35/00(2006. 01)

(71) 申请人 国立研究开发法人医疗基盘健康荣

A61P 37/04(2006. 01)

养研究所

A61P 37/08(2006. 01)

地址 日本大阪府

A61P 43/00(2006. 01)

申请人 第一三共株式会社

C07H 21/04(2006. 01)

(72) 发明人 石井健 小桧山康司 青枝大贵

武下文彦 粕谷裕司 丹羽贵子

小泉诚

(74) 专利代理机构 中国专利代理（香港）有限公司 72001

代理人 权陆军 彭昶

(51) Int. Cl.

C12N 15/09(2006. 01)

权利要求书2页 说明书28页

序列表3页 附图30页

(54) 发明名称

具有免疫增强活性的包含寡核苷酸的复合体

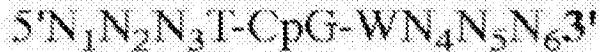
及其用途

(57) 摘要

本发明提供包含人源化 K 型 CpG 寡脱氧核苷酸和多脱氧腺苷酸的寡脱氧核苷酸，其中多脱氧腺苷酸位于人源化的 K 型 CpG 寡脱氧核苷酸的 3' 侧。本发明还提供了包含该寡脱氧核苷酸和 β -1, 3- 葡聚糖的复合体。

1. 一种寡脱氧核苷酸，其包含人源化K型CpG寡脱氧核苷酸和多脱氧腺苷酸，其中所述多脱氧腺苷酸位于人源化的K型CpG寡脱氧核苷酸的3'侧。

2. 权利要求1的寡脱氧核苷酸，其中所述人源化的K型CpG寡脱氧核苷酸具有不小于10个核苷酸的长度，且包含由下式代表的核苷酸序列：



其中中心的CpG基序未甲基化，W是A或T，且N₁、N₂、N₃、N₄、N₅和N₆可以是任何核苷酸。

3. 权利要求1或2的寡脱氧核苷酸，其中所述人源化的K型CpG寡脱氧核苷酸由SEQ ID NO:1显示的核苷酸序列组成。

4. 权利要求1-3中任一项的寡脱氧核苷酸，其中所述寡脱氧核苷酸中的磷酸二酯键部分或整体被硫代磷酸酯键取代。

5. 权利要求4的寡脱氧核苷酸，其中所述寡脱氧核苷酸中的磷酸二酯键整体被硫代磷酸酯键取代。

6. 权利要求1-5中任一项的寡脱氧核苷酸，其中所述多脱氧腺苷酸具有20-60个核苷酸的长度。

7. 包含权利要求1-6中任一项的寡脱氧核苷酸和β-1,3-葡聚糖的复合体。

8. 权利要求7的复合体，其中所述β-1,3-葡聚糖是香菇多糖、裂褶菌多糖、硬葡聚糖、凝胶多糖、茯苓多糖、灰树花多糖或昆布多糖。

9. 权利要求8的复合体，其中所述β-1,3-葡聚糖是香菇多糖、裂褶菌多糖或硬葡聚糖。

10. 一种复合体其由以下(i)中所述的寡脱氧核苷酸和(ii)中所述的β-1,3-葡聚糖组成：

(i) 寡脱氧核苷酸，其中长度20-60个核苷酸的多脱氧腺苷酸在由SEQ ID NO: 1显示的核苷酸序列组成的寡脱氧核苷酸的3'端结合，且所有磷酸二酯键被硫代磷酸酯键取代

(ii) 香菇多糖或裂褶菌多糖。

11. 权利要求7-10中任一项的复合体，其具有三链螺旋结构。

12. 权利要求7-11中任一项的复合体，其具有活化B细胞以产生IL-6的活性和活化树突细胞以产生IFN-α的活性。

13. 一种药物组合物，其包含权利要求1-6中任一项的寡脱氧核苷酸或权利要求7-12中任一项的复合体。

14. 权利要求13的药物组合物，其用于预防或治疗病毒感染、癌症、变应性疾病或细胞内寄生性原生动物或细菌感染。

15. 权利要求14的药物组合物，其用于预防或治疗病毒感染。

16. 权利要求15的药物组合物，其中所述病毒感染是RS病毒或流感病毒感染。

17. 一种用于诱导产生I型和/或II型干扰素的药剂，其包含权利要求7-12中任一项的复合体。

18. 一种免疫刺激剂，其包含权利要求1-6中任一项的寡脱氧核苷酸或权利要求7-12中任一项的复合体。

19. 权利要求18的免疫刺激剂，其为疫苗佐剂。

20. 用于病毒感染、癌症、变应性疾病、或细胞内寄生性原生动物或细菌感染的预防剂

或治疗剂,其包含权利要求1-6中任一项的寡脱氧核苷酸或权利要求7-12中任一项的复合体。

21. 权利要求20的预防剂或治疗剂,其中所述病毒感染是RS病毒或流感病毒感染。
22. 权利要求1-6中任一项的寡脱氧核苷酸或权利要求7-12中任一项的复合体用于生产药物组合物的用途。
23. 权利要求22的用途,其中所述药物组合物为用于预防或治疗病毒感染、癌症、变应性疾病或细胞内寄生性原生动物或细菌感染的药物组合物。
24. 权利要求23的用途,其中所述病毒感染是RS病毒或流感病毒感染。
25. 用于治疗或预防温血动物中的疾病的方法,其包括向所述温血动物施用药学上有效量的权利要求1-6中任一项的寡脱氧核苷酸或权利要求7-12中任一项的复合体。
26. 权利要求25的方法,其中所述疾病为病毒感染、癌症、变应性疾病或细胞内寄生性原生动物或细菌感染。
27. 权利要求26的方法,其中所述病毒感染是RS病毒或流感病毒感染。
28. 权利要求25-27中任一项的方法,其中所述温血动物是人。
29. 诱导温血动物中保护性免疫反应的方法,其包括向所述温血动物施用药学上有效量的权利要求1-6中任一项的寡脱氧核苷酸或权利要求7-12中任一项的复合体。
30. 权利要求1-6中任一项的寡脱氧核苷酸或权利要求7-12中任一项的复合体,其用于治疗或预防病毒感染、癌症、变应性疾病或细胞内寄生性原生动物或细菌感染。
31. 权利要求30的寡脱氧核苷酸或复合体,其中所述病毒感染是RS病毒或流感病毒感染。
32. 一种药物组合物,其包含
 - (a)权利要求1-6中任一项的寡脱氧核苷酸或权利要求7-12中任一项的复合体,和
 - (b)抗原。
33. 权利要求32的组合物,其用于诱导针对抗原的免疫反应。
34. 权利要求33的组合物,其中所述抗原来源于病原体。
35. 权利要求34的组合物,其用于预防或治疗病原体感染。
36. 权利要求35的组合物,其中所述病原体是病毒。
37. 权利要求36的组合物,其中所述病毒是RS病毒或流感病毒。

具有免疫增强活性的包含寡核苷酸的复合体及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及具有免疫刺激活性的包含寡核苷酸的复合体及其用途。更具体而言，本发明涉及包含具有免疫刺激活性的CpG寡脱氧核苷酸(ODN)和β-葡聚糖的复合体及其药物用途。

背景技术

[0002] CpG寡脱氧核苷酸(CpG ODN)是包含免疫刺激CpG基序的短的(约20个碱基对)、单链的合成DNA片段，是Toll样受体9(TLR9)的有效激动剂，活化树突细胞(DC)和B细胞以产生I型干扰素(IFN)和炎性细胞因子(非专利文件1、2)，并且作为对于Th1型体液和细胞免疫应答(包括细胞毒性T淋巴细胞(CTL)应答)的佐剂(非专利文件3、4)。因此，CpG ODN已假定为针对传染病、癌症、哮喘和花粉症的可能的免疫治疗剂(非专利文件2、5)。

[0003] 存在至少四种类型的CpG ODN，其每一种具有不同的骨架、序列和免疫刺激特性(非专利文件6)。D(也称为A)型CpG ODN通常包含具有磷酸二酯(P0)骨架和硫代磷酸酯(PS)多G尾的一个回文CpG基序，其活化类浆细胞DC(pDC)以产生大量的IFN- α ，但无法诱导pDC成熟和B细胞活化(非专利文件7、8)。其他三类ODN由PS骨架组成。K(也称为B)型CpG ODN含有非回文的多CpG基序，并且强烈活化B细胞以产生IL-6和pDC以成熟，但几乎不产生IFN- α (非专利文件8、9)。近期，C和P型CpG ODN已被开发；这些分别含有一个和两个回文CpG序列，其两个均可以如K型活化B细胞和如D型活化pDC，尽管相比于P型CpG ODN，C型CpG ODN诱导较弱的IFN- α 产生(非专利文件10-12)。许多优秀的K型CpG ODN描述于专利文件1中。

[0004] D和P型CpG ODN已显示形成高级结构Hoogsteen碱基配对以分别形成称为G四联体(tetrad)的平行四倍结构和顺式和反式回文部分之间的沃森克里克碱基配对，其对于通过pDC的活跃的IFN- α 产生是必需的(非专利文件12-14)。尽管此类更高级结构似乎对于定位至早期内体和经TLR9的信号传导是必需的，但它们受制于产物多态性、聚集和沉淀，因而阻碍了其临床应用(非专利文件15)。因此，仅K和C型CpG ODN通常可用作免疫治疗剂和疫苗佐剂用于人使用(非专利文件16和17)。虽然K型CpG ODN在人临床试验中增强靶向传染病和癌症的疫苗的免疫原性(非专利文件6、16)，但抗原和K型CpG ODN之间的化学和物理结合对于最优佐剂效应是必需的。这些结果表明这四种(K、D、P和C)类型的CpG ODN具有优点和缺点，然而开发活化B细胞和pDC两者而无聚集的“一体化(all-in-one)”CpG ODN尚未完成。

[0005] 裂褶菌多糖(SPG)，一种来源于裂褶菌(*Schizophyllum commune*)的可溶性β-1,3-葡聚糖，是在日本被批准作为宫颈癌患者的放疗增强剂的药物，持续最近三十年(非专利文件18)。类似地，香菇多糖(LNT)，一种来源于香菇的可溶性β-1,3-葡聚糖，是于1985年批准的药物，且与氟嘧啶药物组合使用，用于无法实施手术的和复发性胃癌患者(非专利文件19、20)。β-1,3-葡聚糖已显示与多脱氧腺苷酸(dA)形成作为三链螺旋结构的复合体(非专利文件21)。

[0006] 专利文件2-4公开了包括裂褶菌多糖和核酸(基因)作为基因载体的β-1,3-葡聚糖的复合体的用途。这些文件描述了形成复合体增强了基因的反义作用及其针对核酸酶的抗

性作用。

[0007] 专利文件5公开了具有 β -1,3-键的多糖作为载体(转染剂)增强具有CpG序列的免疫刺激寡核苷酸的用途,其中磷酸二酯键被硫代磷酸酯键或二硫代磷酸酯键所取代。

[0008] 专利文件6公开了由免疫刺激寡核苷酸和具有长的 β -1,6-葡萄糖苷键侧链的 β -1,3-葡萄糖组成的免疫刺激复合体。

[0009] 本发明人之前证实与SPG形成复合体的与在5'端具有磷酸二酯键的多dA连接的小鼠和人源化CpG ODN增强细胞因子产生并且用作流感疫苗佐剂和用于Th2细胞相关疾病的预防剂和治疗剂(非专利文件22、23,专利文件7)。当多(dA)加入到K型和D型的各CpG的5'端以形成与SPG的复合体时,两者显示增强的活性同时保持K型和D型的特性。然而,实现朝向其更有效且更成本节约的临床前以及临床开发的CpG-SPG复合体的高产量是困难的。近期,当具有硫代磷酸酯键的多(dA)连接至CpG ODN时,复合体形成的效率评价接近100%(非专利文件24)。然而,仍未进行彻底的研究以鉴定最佳的人源化CpG序列和因素的优化以获得四种类型的CpG ODN的“一体化”活性。

[0010] 专利文件8公开了抗原/CpG寡核苷酸/ β -1,3-葡萄糖类型三元复合体的生产方法。

[0011] [文件列表]

[专利文件]

专利文件1:US 8,030,285 B2

专利文件2:WO 01/034207 A1

专利文件3:WO 02/072152 A1

专利文件4:JP-A-2004-107272

专利文件5:WO 2004/100965 A1

专利文件6:JP-A-2007-70307

专利文件7:JP-A-2008-100919

专利文件8:JP-A-2010-174107

[非专利文件]

非专利文件1:Hemmi, H., 等人.A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA.Nature 408, 740-745 (2000).

非专利文件2:Krieg, A.M. Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation.Nature reviews.Drug discovery 5, 471-484 (2006).

非专利文件3:Brazolot Millan, C.L., Weeratna, R., Krieg, A.M., Siegrist, C.A.& Davis, H.L.CpG DNA can induce strong Th1 humoral and cell-mediated immune responses against hepatitis B surface antigen in young mice.Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95, 15553-15558 (1998).

非专利文件4:Chu, R.S., Targoni, O.S., Krieg, A.M., Lehmann, P.V.& Harding, C.V.CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity.The Journal of experimental medicine 186, 1623-1631 (1997).

非专利文件5:Klinman, D.M.Immunotherapeutic uses of CpG

oligodeoxynucleotides. *Nature reviews Immunology* 4, 249–258 (2004).

非专利文件6:Vollmer, J. & Krieg, A.M. Immunotherapeutic applications of CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonists. *Advanced drug delivery reviews* 61, 195–204 (2009).

非专利文件7:Krug, A., 等人. Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. *European journal of immunology* 31, 2154–2163 (2001).

非专利文件8:Verthelyi, D., Ishii, K.J., Gursel, M., Takeshita, F. & Klinman, D.M. Human peripheral blood cells differentially recognize and respond to two distinct CPG motifs. *Journal of immunology* 166, 2372–2377 (2001).

非专利文件9:Hartmann, G. & Krieg, A.M. Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *Journal of immunology* 164, 944–953 (2000).

非专利文件10:Hartmann, G., 等人. Rational design of new CpG oligonucleotides that combine B cell activation with high IFN-alpha induction in plasmacytoid dendritic cells. *European journal of immunology* 33, 1633–1641 (2003).

非专利文件11:Marshall, J.D., 等人. Identification of a novel CpG DNA class and motif that optimally stimulate B cell and plasmacytoid dendritic cell functions. *Journal of leukocyte biology* 73, 781–792 (2003).

非专利文件12:Samulowitz, U., 等人. A novel class of immune-stimulatory CpG oligodeoxynucleotides unifies high potency in type I interferon induction with preferred structural properties. *Oligonucleotides* 20, 93–101 (2010).

非专利文件13:Kerkemann, M., 等人. Spontaneous formation of nucleic acid-based nanoparticles is responsible for high interferon-alpha induction by CpG-A in plasmacytoid dendritic cells. *The Journal of biological chemistry* 280, 8086–8093 (2005).

非专利文件14:Klein, D.C., Latz, E., Espevik, T. & Stokke, B.T. Higher order structure of short immunostimulatory oligonucleotides studied by atomicforce microscopy. *Ultramicroscopy* 110, 689–693 (2010).

非专利文件15:Puig, M., 等人. Use of thermolytic protective groups to prevent G-tetrad formation in CpG ODN D type: structural studies and immunomodulatory activity in primates. *Nucleic acids research* 34, 6488–6495 (2006).

非专利文件16:Bode, C., Zhao, G., Steinhagen, F., Kinjo, T. & Klinman, D.M. CpG DNA as a vaccine adjuvant. *Expert review of vaccines* 10, 499–511 (2011).

非专利文件17:McHutchison, J.G., 等人. Phase 1B, randomized, double-blind,

dose-escalation trial of CPG 10101 in patients with chronic hepatitis C virus. *Hepatology* 46, 1341-1349 (2007).

非专利文件18:Okamura, K., 等人.Clinical evaluation of schizophyllan combined with irradiation in patients with cervical cancer.A randomized controlled study.*Cancer* 58, 865-872 (1986).

非专利文件19:Oba, K.; Kobayashi, M.; Matsui, T.; Kodera, Y.; Sakamoto, J. Individual patient based meta-analysis of lentinan for unresectable/recurrent gastric cancer. *Anticancer Res.*, 2009, 29, 2739-2746.

非专利文件20:Nakano, H.; Namatame, K.; Nemoto, H.; Motohashi, H.; Nishiyama, K.; Kumada, K. A multi-institutional prospective study of lentinan in advanced gastric cancer patients with unresectable and recurrent diseases: Effect on prolongation of survival and improvement of quality of life. *Hepato-Gastroenterol.*, 1999, 46, 2662-2668.

非专利文件21:Sakurai, K., Mizu, M. & Shinkai, S. Polysaccharide-polynucleotide complexes.2.Complementary polynucleotide mimic behavior of the natural polysaccharide schizophyllan in the macromolecular complex with single-stranded RNA and DNA. *Biomacromolecules* 2, 641-650 (2001).

非专利文件22:Shimada, N., 等人.A polysaccharide carrier to effectively deliver native phosphodiester CpG DNA to antigen-presenting cells. *Bioconjugate chemistry* 18, 1280-1286 (2007).

非专利文件23:Koyama, S., 等人.Plasmacytoid dendritic cells delineate immunogenicity of influenza vaccine subtypes. *Science translational medicine* 2, 25ra24 (2010).

非专利文件24:Minari, J., 等人.Enhanced cytokine secretion from primary macrophages due to Dectin-1 mediated uptake of CpG DNA/beta-1,3-glucan complex. *Bioconjugate chemistry* 22, 9-15 (2011).

[0012] 发明概述

本发明要解决问题

本发明要解决的问题是提供比常规CpG-ODN复合体具有更强活性的免疫刺激剂。

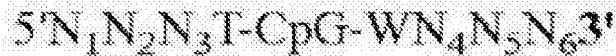
[0013] 解决问题的方法

本发明人已进行大量研究并鉴定了包含在3‘端具有多(dA)尾的K型CpG ODN (K3) (SEQ ID NO: 2)和SPG的新颖的复合体,即K3-SPG。其形成可以完全溶解的高级纳米颗粒。类似地,本发明也已成功生产包含上述K型CpG ODN和香菇多糖(LNT)的新颖的复合体K3-LNT。尽管K3-SPG和K3-LNT不具有D型CpG ODN序列,但它同时具有对于K型CpG ODN独特的免疫刺激活性(例如,活化B细胞(优选地,人B细胞)以产生IL-6的活性),和对于D型CpG ODN独特的免疫刺激活性(例如,活化浆细胞样树突细胞以产生IFN- α 的活性)。此外,K3-LNT和K3-SPG具有有效的疫苗佐剂活性和,当与抗原一同接种用于免疫时,它们诱导抗原特异性体液免疫和细胞免疫,且的确显示针对RSV病毒和流感病毒的非常有效的感染保护性作用。他们基于这些发现进一步研究并完成本发明。

[0014] 因此,本发明提供了以下:

[1] 包含人源化K型CpG寡脱氧核苷酸和多脱氧腺苷酸的寡脱氧核苷酸,其中所述多脱氧腺苷酸位于人源化的K型CpG寡脱氧核苷酸的3'侧。

[0015] [2] [1]的寡脱氧核苷酸,其中所述人源化的K型CpG寡脱氧核苷酸具有不小于10个核苷酸的长度,且包含由下式代表的核苷酸序列:



其中中心的CpG基序未甲基化,W是A或T,且N₁、N₂、N₃、N₄、N₅和N₆可以是任何核苷酸。

[0016] [3] [1]或[2]的寡脱氧核苷酸,其中所述人源化的K型CpG寡脱氧核苷酸由SEQ ID NO:1显示的核苷酸序列组成。

[0017] [4] [1]-[3]中任一项的寡脱氧核苷酸,其中所述寡脱氧核苷酸中的磷酸二酯键部分或整体被硫代磷酸酯键取代。

[0018] [5] [4]寡脱氧核苷酸,其中所述寡脱氧核苷酸中的磷酸二酯键整体被硫代磷酸酯键取代。

[0019] [6] [1]-[5]中任一项的寡脱氧核苷酸,其中所述多脱氧腺苷酸具有20-60个核苷酸的长度。

[0020] [7] 包含[1]-[6]中任一项的寡脱氧核苷酸和β-1,3-葡聚糖的复合体。

[0021] [8] [7]的复合体,其中所述β-1,3-葡聚糖是香菇多糖、裂褶菌多糖、硬葡聚糖、凝胶多糖、茯苓多糖、灰树花多糖或昆布多糖。

[0022] [9] [8]的复合体,其中所述β-1,3-葡聚糖是香菇多糖、裂褶菌多糖或硬葡聚糖。

[0023] [10] 由以下(i)中所述的寡脱氧核苷酸和(ii)中所述的β-1,3-葡聚糖组成的复合体:

(i)寡脱氧核苷酸,其中长度20-60个核苷酸的多脱氧腺苷酸在由SEQ ID NO: 1显示的核苷酸序列组成的寡脱氧核苷酸的3'端结合,且所有磷酸二酯键被硫代磷酸酯键取代

(ii)香菇多糖或裂褶菌多糖。

[0024] [11] [7]-[10]中任一项的复合体,其具有三链螺旋结构。

[0025] [12] [7]-[11]中任一项的复合体,其具有活化B细胞以产生IL-6的活性和活化树突细胞以产生IFN-α的活性。

[0026] [13] 药物组合物,其包含[1]-[6]中任一项的寡脱氧核苷酸或[7]-[12]中任一项的复合体。

[0027] [14] [13]的药物组合物,其用于预防或治疗病毒感染、癌症、变应性疾病或细胞内寄生性原生动物或细菌感染。

[0028] [15] [14]的药物组合物,其用于预防或治疗病毒感染。

[0029] [16] [15]的药物组合物,其中所述病毒感染是RS病毒或流感病毒感染。

[0030] [17] 用于诱导产生I型和/或II型干扰素的药剂,其包含[7]-[12]中任一项的复合体。

[0031] [18] 免疫刺激剂,其包含[1]-[6]中任一项的寡脱氧核苷酸或[7]-[12]中任一项的复合体。

[0032] [19] [18]的免疫刺激剂,其为疫苗佐剂。

[0033] [20] 用于病毒感染、癌症、变应性疾病、或细胞内寄生性原生动物或细菌感染的预防剂或治疗剂,其包含[1]-[6]中任一项的寡脱氧核苷酸或[7]-[12]中任一项的复合体。

[0034] [21] [20]的预防剂或治疗剂,其中所述病毒感染是RS病毒或流感病毒感染。

[0035] [22] [1]-[6]中任一项的寡脱氧核苷酸或[7]-[12]中任一项的复合体用于生产药物组合物的用途。

[0036] [23] [22]的用途,其中所述药物组合物为用于预防或治疗病毒感染、癌症、变应性疾病或细胞内寄生性原生动物或细菌感染的药物组合物。

[0037] [24] [23]的用途,其中所述病毒感染是RS病毒或流感病毒感染。

[0038] [25] 用于治疗或预防温血动物中的疾病的方法,其包括向所述温血动物施用药学上有效量的[1]-[6]中任一项的寡脱氧核苷酸或[7]-[12]中任一项的复合体。

[0039] [26] [25]的方法,其中所述疾病为病毒感染、癌症、变应性疾病或细胞内寄生性原生动物或细菌感染。

[0040] [27] [26]的方法,其中所述病毒感染是RS病毒或流感病毒感染。

[0041] [28] [25]-[27]中任一项的方法,其中所述温血动物是人。

[0042] [29] 在温血动物中诱导保护性免疫反应的方法,其包括向所述温血动物施用药学上有效量的[1]-[6]中任一项的寡脱氧核苷酸或[7]-[12]中任一项的复合体。

[0043] [30] [1]-[6]中任一项的寡脱氧核苷酸或[7]-[12]中任一项的复合体,其用于治疗或预防病毒感染、癌症、变应性疾病或细胞内寄生性原生动物或细菌感染。

[0044] [31] [30]的寡脱氧核苷酸或复合体,其中所述病毒感染是RS病毒或流感病毒感染。

[0045] [32] 药物组合物,其包含

(a) [1]-[6]中任一项的寡脱氧核苷酸或[7]-[12]中任一项的复合体,和

(b)抗原。

[0046] [33] [32]的组合物,其用于诱导针对抗原的免疫反应。

[0047] [34] [33]的组合物,其中所述抗原来源于病原体。

[0048] [35] [34]的组合物,其用于预防或治疗病原体感染。

[0049] [36] [35]的组合物,其中所述病原体是病毒。

[0050] [37] [36]的组合物,其中所述病毒是RS病毒或流感病毒。

[0051] 发明效果

本发明提供具有优秀的免疫刺激活性的寡脱氧核苷酸和包含其的复合体。具体而言,本发明的复合体同时具有针对K型CpG ODN独特的免疫刺激活性和针对D型CpG ODN独特的免疫刺激活性。此外,由于本发明的复合体具有强疫苗佐剂活性,当本方面的复合体与抗原一同进行免疫时,刺激抗原特异性体液免疫和细胞免疫两者以提供高度的强感染保护作用。因此,本发明的复合体可用作免疫刺激剂或疫苗佐剂。

[0052] 附图简述

图1显示CpG ODN和LNT或SPG的络合方法。

[0053] 图2显示通过PBMC的pan-IFN- α 产生。

[0054] 图3显示从用K3、K3-dA40或K3-SPG刺激人PBMC产生的细胞因子的概况。

[0055] 图4显示K3-SPG的扫描电子显微镜图像。

- [0056] 图5显示如由动态光散射分析的K3-SPG、SPG和D35的颗粒大小。
- [0057] 图6显示通过用K3、K3-SPG或D35刺激诱导PBMC产生pan-IFN- α 、-IFN- α 2和IFN- γ 。
- [0058] 图7显示由人PBMC产生pan-IFN- α 和IL-6，其由用K3、K3-dA40、K3-SPG、CpG21798(P型CpG ODN)、CpG21889(P)、CpG2395(C)或M362(C) (0.74、2.2、6.6或20 μ g/ml)刺激产生。
- [0059] 图8显示K3-SPG与含K型CpG ODN的内体的共定位。比例尺显示10 μ m。结果代表至少两个独立实验。
- [0060] 图9显示K3-SPG与含D型CpG ODN的内体的共定位。比例尺显示10 μ m。
- [0061] 图10显示用单独的OVA、OVA+K3或OVA+K3-SPG免疫的小鼠的抗原特异性血清抗体滴度。 $*p < 0.05$ (Mann-Whitney U检验)。
- [0062] 图11显示用单独的OVA、OVA+K3或OVA+K3-SPG免疫的小鼠的脾细胞的IFN γ 产生，其通过用抗原再刺激诱导。
- [0063] 图12显示通过用单独的OVA、OVA+K3或OVA+K3-SPG免疫诱导的OVA特异性CD8 T细胞的比例。 $*p < 0.05$ (Mann-Whitney U检验)。
- [0064] 图13显示通过用单独的OVA、OVA+K3、OVA+K3-dA40或OVA+K3-SPG免疫诱导的体内OVA特异性CTL活性。 $*p < 0.05$ (Mann-Whitney U检验)。
- [0065] 图14显示K3-SPG的肽疫苗佐剂作用。
- [0066] 图15显示K3-SPG的剂量依赖性佐剂作用。
- [0067] 图16显示用单独的OVA、OVA+K3或OVA+K3-SPG免疫的小鼠的抗原特异性血清抗体滴度。免疫时的OVA剂量显示在每一图上。 $*p < 0.05$ (Mann-Whitney U检验)。
- [0068] 图17显示用单独的OVA、OVA+K3或OVA+K3-SPG免疫的小鼠的脾细胞的IFN γ 产生，其通过用抗原再刺激诱导。免疫时的OVA剂量显示在每一图上。
- [0069] 图18显示SPG对空(载体)、树突状细胞相关性C型植物血凝素-1 (Dectin-1)、或树突状细胞相关性C型植物血凝素-2 (Dectin-2)转染子的结合。
- [0070] 图19显示K3或K3-SPG对空(载体)、树突状细胞相关性C型植物血凝素-1、或树突状细胞相关性C型植物血凝素-2转染子的结合。
- [0071] 图20显示C57BL/6J小鼠或树突状细胞相关性C型植物血凝素-1缺陷小鼠的脾细胞的TNF- α 产生，其通过酵母聚糖耗竭刺激诱导。
- [0072] 图21显示C57BL/6J小鼠或树突状细胞相关性C型植物血凝素-1缺陷小鼠的脾细胞的TNF- α 产生，其通过SPG刺激诱导。
- [0073] 图22显示酵母聚糖耗竭对C57BL/6J小鼠或树突状细胞相关性C型植物血凝素-1缺陷小鼠的脾细胞的TNF- α 产生的影响，其通过CpG ODN刺激诱导。 $*p < 0.05$ (t-检验)。
- [0074] 图23显示SPG对C57BL/6J小鼠的脾细胞的TNF- α 产生的影响，其通过CpG ODN刺激诱导。
- [0075] 图24显示由K3-SPG诱导的细胞因子产生依赖于TLR9。a)由FL-DC的IFN- α 产生，b)由脾细胞的IL-6和IL-20 p40产生，c)由FL-DC的IFN- α 产生，d)由脾细胞的IL-6和IL-12 p40产生。
- [0076] 图25显示用OVA+K3-SPG免疫的Tlr9+/+或Tlr9-/-小鼠的抗原特异性血清抗体滴度。 $*p < 0.05$ (Mann-Whitney U检验)。
- [0077] 图26显示用OVA+K3-SPG免疫的Tlr9+/+或Tlr9-/-小鼠的脾细胞的IFN γ 产生，其

通过用抗原再刺激诱导。 $*p < 0.05$ (Mann-Whitney U检验)。

[0078] 图27显示用OVA+K3-SPG免疫T1r9^{+/+}或T1r9^{-/-}小鼠诱导的OVA特异性CD8 T细胞的比例。 $*p < 0.05$ (Mann-Whitney U检验)。

[0079] 图28显示K3-SPG的佐剂作用不依赖于树突状细胞相关性C型植物血凝素-1。a) 血清中的抗原特异性抗体滴度。b) 由于抗原再刺激的由脾细胞的IFN- γ 产生。c) 体内诱导的抗原特异性的CD8 T细胞的比例。

[0080] 图29显示用OVA+K3-SPG免疫的树突状细胞相关性C型植物血凝素-1^{+/+}或树突状细胞相关性C型植物血凝素-1^{-/-}小鼠的抗原特异性血清抗体滴度。

[0081] 图30显示用OVA+K3-SPG免疫的树突状细胞相关性C型植物血凝素-1^{+/+}或树突状细胞相关性C型植物血凝素-1^{-/-}小鼠的脾细胞的IFN γ 产生，其通过用抗原再刺激诱导。

[0082] 图31显示用OVA+K3-SPG免疫树突状细胞相关性C型植物血凝素-1^{+/+}或树突状细胞相关性C型植物血凝素-1^{-/-}小鼠诱导的OVA特异性CD8 T细胞的比例。 $*p < 0.05$ (Mann-Whitney U检验)。

[0083] 图32显示施用Alexa 488-K3-SPG后1小时时K3-SPG在iLN表面上的定位。

[0084] 图33显示施用DQ-OVA后1小时时OVA、MARCO⁺细胞和Siglec-1⁺ 细胞在iLN中的定位。

[0085] 图34显示通过速度(Volocity)的图33中的OVA与MARCO⁺细胞或Siglec-1⁺ 细胞共定位的分析结果。 $*p < 0.05$ (t-检验)。

[0086] 图35显示施用Alexa 488-K3或Alexa 488-K3-SPG后1小时时K3、K3-SPG和MARCO⁺ 细胞在iLN中的定位。

[0087] 图36显示通过速度(Volocity)的图35中的K3或K3-SPG与MARCO⁺细胞共定位的分析结果。 $*p < 0.05$ (t-检验)。

[0088] 图37显示用氯膦酸盐脂质体的耗竭实验方案(上图)、血清中抗原特异性抗体滴度(左下图)和通过抗原刺激的细胞因子产生。 $*p < 0.05$ (t-检验)。

[0089] 图38显示在施用有K3或K3-SPG的C57BL/6J或T1r9^{-/-}小鼠的各种DC中的CD40表达。

[0090] 图39显示在用SV、WIV或SV+K3-SPG免疫的小鼠血清中的抗原特异性抗体滴度。

[0091] 图40显示当用SV、WIV或SV+K3-SPG免疫随后通过用流感病毒A/P/R8(H1N1)攻击时的体重的时间过程变化(左)和存活曲线(右)。

[0092] 图41显示在用SV+ K3或SV+K3-SPG免疫的食蟹猴(*Macaca fascicularis*)血清中的抗原特异性血清抗体滴度的时间过程变化。 $*p < 0.05$ (t-检验)。

[0093] 图42显示在用SV+ K3或SV+K3-SPG免疫的食蟹猴血清中的抗原特异性血清抗体滴度(在第110周)。

[0094] 图43显示K3和K3-SPG之间的疫苗佐剂作用的比较。

[0095] 图44显示通过K3、K3-LNT或K3-SPG的pan-IFN- α 产生的IL-6产生。

[0096] 图45显示接种有添加K3、K3-LNT或K3-SPG的RSV F亚单位疫苗的小鼠血清中的RSV F抗原特异性IgG抗体滴度。

[0097] 图46显示接种有添加K3、K3-LNT或K3-SPG的RSV F亚单位疫苗的小鼠中由RSV F抗原刺激特异性诱导的细胞因子产生。

[0098] 图47显示接种有添加K3或K3-LNT或K3-SPG的RSV F亚单位疫苗的棉鼠中的RSV感染保护作用。

[0099] 实施方案描述

1. 寡脱氧核苷酸

本发明提供包含K型CpG寡脱氧核苷酸和多脱氧腺苷酸(dA)的寡脱氧核苷酸(下文中称为本发明的寡脱氧核苷酸)。

[0100] 本发明的寡脱氧核苷酸包括其中修饰磷酸二酯键(例如,一部分或所有磷酸二酯键被硫代磷酸酯键所取代)的寡脱氧核苷酸。

[0101] 本发明的寡脱氧核苷酸包括药学上可接受的盐。

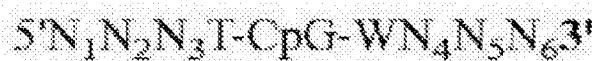
[0102] 在本说明书中,寡脱氧核苷酸和ODN含义相同。此外,“人源化的K型CpG寡脱氧核苷酸(CpG ODN)”和“人源化的K型CpG寡脱氧核苷酸(CpG ODN)残基”含义相同,而与结尾处术语“残基”存在与否无关,且可互换使用。此外,多脱氧腺苷酸(poly deoxyadenylate)和多脱氧腺苷酸(poly deoxyadenosine acid)(残基)含义相同。术语“残基”意指具有更高分子量的化合物的部分结构。本领域技术人员可以容易地从上下文中理解本说明书中的“人源化的K型CpG寡脱氧核苷酸(CpG ODN)”是否意指独立分子或具有更高分子量的化合物的部分结构。这同样适用于关于本发明的寡脱氧核苷酸中包含的其他部分结构的术语,诸如“多脱氧腺苷酸”等等。

[0103] CpG寡脱氧核苷酸(CpG ODN)是含有免疫刺激性非甲基化CpG基序的单链DNA且是TLR9激动剂。CpG ODN包括4种类型:K型(也称为B型)、D型(也称为A型)、C型和P型,其在骨架、序列和免疫刺激特性上有所不同(Advanced drug delivery reviews 61, 195-204 (2009))。其中,本发明寡脱氧核苷酸包含K型CpG ODN。

[0104] K型CpG ODN是具有这样的结构和功能特性的CpG ODN,其通常含有非回文、多个非甲基化的CpG基序,活化B细胞以产生IL-6,但几乎不诱导由浆细胞样树突细胞(pDC)的IFN- α 产生。非甲基化CpG基序是含有至少一个胞嘧啶(C)-鸟嘌呤(G)序列的段的核苷酸序列,其中胞嘧啶-鸟嘌呤序列中胞嘧啶的5-位置未甲基化。在以下解释中,除非另有具体说明,CpG意指非甲基化CpG。因此,本发明的寡脱氧核苷酸通过包含K型CpG ODN具有针对K型CpG ODN的独特的免疫刺激活性(例如,活化B细胞(优选地,人B细胞)以产生IL-6的活性)。许多人源化的K型CpG ODN在相关技术领域中是已知的(Journal of immunology 166, 2372-2377 (2001); Journal of immunology 164, 944-953 (2000); US 8, 030, 285 B2)。

[0105] 包含在本发明的寡脱氧核苷酸中的K型CpG ODN优选是人源化的。“人源化的”意指其具有人TLR9的激动剂活性。因此,本发明的包含K型CpG ODN的寡脱氧核苷酸具有对于人的免疫刺激活性,其对于K型CpG ODN是独特的(例如,活化人B细胞以产生IL-6的活性)。

[0106] 本发明中优选使用的K型CpG ODN具有不小于10个核苷酸的长度,且包含由下式代表的核苷酸序列:



其中中心的CpG基序未甲基化,W是A或T,且N₁、N₂、N₃、N₄、N₅和N₆可以是任何核苷酸。

[0107] 在一个实施方案中,本发明中的K型CpG ODN具有不小于10个核苷酸的长度,且包含由上述式代表的核苷酸序列。在上述式中,中心的4个碱基的CpG基序仅需要被包含在10

个核苷酸中,且不需要位于上述式中的N₃和N₄之间。此外,上述式中的N₁、N₂、N₃、N₄、N₅和N₆可以是任何核苷酸,且N₁和N₂、N₂和N₃、N₃和N₄、N₄和N₅,和N₅和N₆的至少一种(优选一种)的组合可以形成2碱基CpG基序。当具有4个碱基的上述CpG基序不位于之间时,上述式中心中的4个碱基(第4至第7碱基)中任何2个连续碱基为CpG基序,且其余2个碱基可以是任何核苷酸。

[0108] 本发明中更优选使用的K型CpG ODN包含含有一个或多个CpG基序的非回文结构。本发明中进一步优选使用的K型CpG ODN由含有一个或多个CpG基序的非回文结构组成。

[0109] 人源化的K型CpG ODN通常特征在于由TCGA或TCGT的4个碱基组成的CpG基序。在许多情况下,4碱基CpG基序的2个或3个包含在人源化的K型CpG ODN中。因此,在优选的实施方案中,包含在本发明的寡脱氧核苷酸中的K型CpG ODN包含由TCGA或TCGT组成的4碱基CpG基序中至少一个、更优选两个或更多、进一步优选2或3个。当K型CpG ODN具有4碱基CpG基序中的2个或3个时,这些4碱基CpG基序可以是相同的或不同的,且不特别限定,只要其具有针对人TLR9的激动剂活性。

[0110] 包含在本发明的寡脱氧核苷酸中的K型CpG ODN更优选包含由SEQ ID NO:1显示的核苷酸序列。

[0111] 尽管K型CpG ODN的长度没有特别限定只要本发明的寡脱氧核苷酸具有免疫刺激活性(例如,活化B细胞(优选人B细胞)以产生IL-6的活性),但其优选长度不多于100个核苷酸(例如,长度10-75个核苷酸)。K型CpG ODN的长度更优选长度不多于50个核苷酸(例如长度10-40个核苷酸)。K型CpG ODN的长度更优选长度不多于30个核苷酸(例如长度10-25个核苷酸)。K型CpG ODN的长度最优选为长度12-25个核苷酸。

[0112] 尽管多脱氧腺苷酸(dA)的长度并无具体限制只要其足以形成与β-1,3-葡聚糖(优选地,香菇多糖或裂褶菌多糖)链的三链螺旋结构,但从形成稳定的三链螺旋结构的方面而言,其通常长度不小于20个核苷酸,优选长度不小于40个核苷酸,进一步优选长度不小于60个核苷酸。理论上,多dA不具有长度上限,因为更长的多dA与β-1,3-葡聚糖形成更稳定的三链螺旋结构。然而,当其太长时,寡脱氧核苷酸长度在合成时变化。因此,其通常长度不多于100个、优选不多于80个核苷酸。在另一方面,从上述的稳定的三链螺旋结构的形成、以及每单位量的β-1,3-葡聚糖结合的本发明的寡脱氧核苷酸的量中的增加、避免寡脱氧核苷酸合成时长度变化、和络合效率的方面而言,多dA的长度优选为长度20-60个核苷酸(具体而言,长度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或60个核苷酸),更优选长度30-50个核苷酸(长度30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50个核苷酸),最优选长度30-45个核苷酸(长度30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45个核苷酸)。具体而言,当其不小于30个核苷酸长度时,实现良好的络合效率。包含多dA的本发明的寡脱氧核苷酸具有与两个裂褶菌多糖链形成三链螺旋结构的活性。注意多脱氧腺苷酸有时表示为“多(dA)”或“多(dA)”。

[0113] 尽管本发明的寡脱氧核苷酸的一个分子可以包含多个K型CpG ODN和/或多dA,但其优选含有K型CpG ODN和多dA各一个,最优选由K型CpG ODN和多dA各一个组成。

[0114] 本发明的寡脱氧核苷酸特征在于多dA位于K型CpG ODN的3'侧。通过这种排列,本发明的复合体(下文详述)变得具有针对K型CpG ODN独特的免疫刺激活性和针对D型CpG ODN独特的免疫刺激活性。

[0115] K型CpG ODN和多dA可以通过共价键直接连接,或经间隔序列连接。间隔序列意指在两个相邻构成要素之间插入一个或多个核苷酸的核苷酸序列。尽管间隔序列的长度并无具体限定,只要本发明的复合体具有免疫活性(优选地,活化B细胞以产生IL-6的活性,和活化树突细胞以产生IFN- α 的活性),但其通常长度为1-10个核苷酸,优选长度1-5个核苷酸,更优选长度1-3个核苷酸。最优选地,K型CpG ODN和多dA通过共价直接连接。

[0116] 本发明的寡脱氧核苷酸任选除了K型CpG ODN、多dA和任选的间隔序列外还具有在其5'端和/或3'端的额外的核苷酸序列。尽管额外的核苷酸序列的长度并无具体限定,只要本发明的复合体具有免疫活性(优选地,活化B细胞以产生IL-6的活性,和活化树突细胞以产生IFN- α 的活性),但其通常长度为1-10个核苷酸,优选长度1-5个核苷酸,更优选长度1-3个核苷酸。

[0117] 在优选的实施方案中,本发明的寡脱氧核苷酸在5'端和/或3'端不包含此类额外的核苷酸序列。即,本发明的寡脱氧核苷酸优选由K型CpG ODN、多dA和任选的间隔序列组成,更优选由K型CpG ODN和多dA组成。

[0118] 在最优选的实施方案中,本发明的寡脱氧核苷酸由K型CpG ODN(具体而言,例如,由SEQ ID NO: 1显示的核苷酸序列组成的寡脱氧核苷酸)和多dA组成,其中K型CpG ODN位于寡脱氧核苷酸的5'端且多dA位于其3'端。具体而言,它是这样的寡脱氧核苷酸,其中长度20-60个核苷酸(更优选地,长度30-50个核苷酸(长度30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50个核苷酸),最优选地,长度30-45个核苷酸(长度30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45个核苷酸))的多dA在由SEQ ID NO: 1显示的核苷酸序列组成的寡脱氧核苷酸的3'端结合,例如由SEQ ID NO: 2或9-12显示的核苷酸序列组成的寡脱氧核苷酸。

[0119] 本发明的全长寡脱氧核苷酸通常长度30-200个核苷酸,优选长度35-100个核苷酸,更优选长度40-80个核苷酸(具体而言,长度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或80个核苷酸),进一步优选长度50-70个核苷酸(具体而言,长度50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70个核苷酸),最优选长度50-65个核苷酸(具体而言,长度50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65个核苷酸)。

[0120] 本发明的寡脱氧核苷酸可以合适地修饰以对体内降解(例如,由外切核酸酶或内切核酸酶降解)有抗性。优选地,修饰包括硫代磷酸酯修饰和二硫代磷酸酯修饰。即,本发明的寡脱氧核苷酸中的部分或所有磷酸二酯键被硫代磷酸酯键或二硫代磷酸酯键所取代。

[0121] 优选地,本发明的寡脱氧核苷酸包括硫酸二酯键的修饰,更优选地,磷酸二酯键的修饰是硫代磷酸酯键(即,如WO 95/26204中所述,非交联氧原子之一被硫原子取代)。即,本发明的寡脱氧核苷酸中的部分或所有磷酸二酯键被硫代磷酸酯键或二硫代磷酸酯键所取代。

[0122] 本发明的寡脱氧核苷酸优选包含在K型CpG ODN中硫代磷酸酯或二硫代磷酸酯键的修饰,更优选地,K型CpG ODN中的所有磷酸二酯键被硫代磷酸酯键所取代。而且,本发明的寡脱氧核苷酸优选包含在多dA中硫代磷酸酯键或二硫代磷酸酯键,更优选地,多dA中的所有磷酸二酯键被硫代磷酸酯键所取代。进一步优选地,包含人源化的K型CpG寡脱氧核苷酸和多脱氧腺苷酸的本发明的寡脱氧核苷酸中的所有磷酸二酯键被硫代磷酸酯键取代。最

优选地，本发明的寡脱氧核苷酸是这样的寡脱氧核苷酸，其中长度20-60个核苷酸(更优选地，长度30-50个核苷酸(长度30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50个核苷酸)，最优选地，长度30-45个核苷酸(长度30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45个核苷酸))的多dA结合到人源化的K型CpG寡脱氧核苷酸(例如、SEQ ID NO: 1)的3'端，且包含在寡脱氧核苷酸中的所有磷酸二酯键被硫代磷酸酯键所取代。由于硫代磷酸酯键，本发明的寡脱氧核苷酸预期不仅显示对降解的抗性而且还显示免疫刺激活性的增强(例如，活化B细胞以产生IL-6的活性)和CpG-β-1,3-葡聚糖复合体的高产量。在本发明中，硫代磷酸酯键与硫代磷酸酯骨架含义相同，且磷酸二酯键与磷酸骨架含义相同。

[0123] 本发明的寡脱氧核苷酸包括上述寡脱氧核苷酸的任何药学上可接受的盐、酯、和此类酯的盐。

[0124] 本发明的寡脱氧核苷酸的药学上可接受的盐的优选实例包括金属盐诸如碱金属盐(例如钠盐、钾盐和锂盐)、碱土金属盐(例如钙盐和镁盐)、铝盐、铁盐、锌盐、铜盐、镍盐、钴盐等；胺盐诸如无机盐(例如铵盐)和有机盐(例如，叔辛基胺盐、二苄胺盐、吗啉盐、葡糖胺盐、苯基甘氨酸烷基酯盐、乙二胺盐、N-甲基葡糖胺盐、胍盐、二乙胺盐、三乙胺盐、二环己胺盐、N,N'-二苄基乙二胺盐、氯普鲁卡因盐、普鲁卡因盐、二乙醇胺盐、N-苄基-苯乙胺盐、哌嗪盐、四甲基铵盐、三(羟甲基)氨基甲烷盐)等；无机酸盐诸如卤代氢酸盐(例如，氢氟化物、氢氯化物、氢溴化物、氢碘化物)、硝酸盐、高氯酸盐、硫酸盐、磷酸盐等；有机酸盐诸如链烷磺酸盐(例如，甲磺酸盐、三氟甲磺酸盐、乙磺酸盐)，芳基磺酸盐(例如，苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐)、乙酸盐、苹果酸盐、富马酸盐、琥珀酸盐、柠檬酸盐、酒石酸盐、草酸盐、马来酸盐等；和氨基酸盐如甘氨酸盐、赖氨酸盐、精氨酸盐、鸟氨酸盐、谷氨酸盐和天冬氨酸盐。

[0125] 尽管本发明的寡脱氧核苷酸可以采用单链、双链和三链的任何形式，但其优选是单链。

[0126] 优选分离本发明的寡脱氧核苷酸。“分离的”意指已进行去除除了目标组分外的因素的操作，且寡脱氧核苷酸不处于天然存在的状态。“分离的寡脱氧核苷酸”的纯度(评价目标产物总重量中目标寡脱氧核苷酸的重量百分比)通常不少于70%，优选不少于80%，更优选不少于90%，进一步优选不少于99%。

[0127] 由于本发明的寡脱氧核苷酸具有优秀的免疫刺激活性(例如，活化B细胞(优选人B细胞)以产生IL-6的活性)，其可用作免疫刺激剂等。此外，由于本发明的寡脱氧核苷酸具有与两个β-1,3-葡聚糖(优选地，香菇多糖、裂褶菌多糖或硬葡聚糖)形成三链螺旋结构的特性，因此其可用于制备下文提及的本发明的复合体。

[0128] 2. 复合体

本发明提供包含上述的本发明的寡脱氧核苷酸和β-1,3-葡聚糖的复合体(下文称为本发明的复合体)。

[0129] 由于本发明的上述寡脱氧核苷酸包含K型CpG ODN，但其自身显示对于K型CpG ODN独特的免疫刺激活性(例如，活化B细胞(优选地，人B细胞)以产生IL-6的活性)，且在对于D型CpG ODN独特的免疫刺激活性(例如，活化浆细胞样树突细胞以产生IFN-α的活性)中是差的。然而，令人惊奇地，它通过与β-1,3-葡聚糖(优选地，香菇多糖或裂褶菌多糖)形成复合体而获得了针对D型CpG ODN独特的免疫刺激活性(例如，活化浆细胞样树突细胞以产生

IFN- α 的活性),而不需D型CpG ODN的序列。即,本发明的复合体具有对于K型CpG ODN独特的免疫刺激活性(例如,活化B细胞(优选地,人B细胞)以产生IL-6的活性)和对于D型CpG ODN独特的免疫刺激活性(例如,活化浆细胞样树突细胞(优选人浆细胞样树突细胞)以产生IFN- α 的活性)两者。

[0130] 本发明中使用的 β -1,3-葡聚糖的实例包括香菇多糖、裂褶菌多糖、硬葡聚糖、凝胶多糖、茯苓多糖、灰树花多糖、昆布多糖等。 β -1,3-葡聚糖优选是包含许多1,6-吡喃葡萄糖昔分支(侧链率33-40%)的 β -1,3-葡聚糖,诸如香菇多糖、裂褶菌多糖和硬葡聚糖,更优选香菇多糖或裂褶菌多糖,最优选香菇多糖。

[0131] 香菇多糖(LNT)是来源于香菇且具有 $(C_6H_{10}O_5)_n$ 分子式和约300,000 - 700,000的分子量的已知的 β -1,3-葡聚糖。尽管它难溶于水、甲醇、乙醇(95)和丙酮,但其可溶于极性有机溶剂(DMSO)和氢氧化钠水溶液。

[0132] 香菇多糖具有增强活化的巨噬细胞、杀伤性T细胞、自然杀伤细胞和抗体依赖性巨噬细胞介导的细胞毒性(ADMC)活性的作用(Hamuro, J., 等人.:Immunology, 39, 551-559, 1980, Hamuro, J., 等人.:Int. J. Immunopharmacol., 2, 171, 1980, Herlyn, D., 等人.:Gann, 76, 37-42, 1985)。在动物实验中,与化疗剂的组合施用显示对同系肿瘤和自体肿瘤的肿瘤生长抑制作用和延长生命的作用。而且,单独施用香菇多糖显示肿瘤生长抑制作用和延长生命作用。在临床试验中,与喃氟啶口服施用组合使用延长了无法做手术或复发性胃癌患者的存活周期(药品会诊(interview)形式“香菇多糖静脉内注射1 mg”Ajinomoto Co., Inc.),且已在日本获得批准。单独施用香菇多糖的作用目前尚未证实。

[0133] 裂褶菌多糖(SPG)是来源于裂褶菌的已知的可溶 β -葡聚糖。SPG由 β -(1→3)-D-葡聚糖的主链和一个 β -(1→6)-D-葡萄糖基侧链/3个葡萄糖组成(Tabata, K., Ito, W., Kojima, T., Kawabata, S. 和 Misaki A., “Carbohydr. Res.”, 1981, 89, 1, p.121-135)。SPG已实际用作用于妇科癌症的免疫佐剂疗法的肌内注射制剂临床药物有20年或更久(Shimizu, Chin, Hasumi, Masubuchi, “Biotherapy”, 1990, 4, p.1390 Hasegawa, “Oncology and Chemotherapy”, 1992, 8, p.225),且体内安全性已得到证实(Theresa, M. McIntire和David, A. Brant, “J. Am. Chem.Soc.”, 1998, 120, p.6909)。

[0134] 在本说明书中,“复合体”意指通过经非共价键或共价键诸如静电键、范德华键、氢键、疏水性相互作用等的多个分子结合获得的产物。

[0135] 本发明的复合体优选展示三链螺旋结构。在优选的实施方案中,形成三链螺旋结构的三个链中,两个为 β -1,3-葡聚糖链,且一个为本发明的上述寡脱氧核苷酸中的多脱氧腺苷酸链。复合体可以包含没有形成三链螺旋结构的部分。

[0136] 本发明的复合体中寡脱氧核苷酸和 β -1,3-葡聚糖的组成比例可以根据寡脱氧核苷酸中多脱氧腺苷酸的链长度、 β -1,3-葡聚糖的长度等而改变。例如,当 β -1,3-葡聚糖链和多脱氧腺苷酸的长度相同时,两个 β -1,3-葡聚糖链和一个本发明的寡脱氧核苷酸可以结合以形成三链螺旋结构。通常,由于多脱氧腺苷酸的链长度比 β -1,3-葡聚糖链长度短,因此本发明的多个寡脱氧核苷酸可以与两个 β -1,3-葡聚糖链经多脱氧腺苷酸结合以形成三链螺旋结构(参见图1)。

[0137] 本发明的复合体是包含人源化的K型CpG ODN和 β -1,3-葡聚糖(例如,香菇多糖、裂

褶菌多糖、硬葡聚糖、凝胶多糖、茯苓多糖、灰树花多糖、昆布多糖)的复合体,优选为由人源化的K型CpG ODN和 β -1,3-葡聚糖(例如香菇多糖、裂褶菌多糖、硬葡聚糖)组成的复合体。更优选地,其是由寡脱氧核苷酸和 β -1,3-葡聚糖(例如,香菇多糖、裂褶菌多糖)组成的复合体(例如,K3-dA20-60-LNT、K3-dA20-60-SPG),在所述寡脱氧核苷酸中长度20-60个核苷酸的多脱氧腺苷酸(具体而言,长度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或60个核苷酸)结合到由SEQ ID NO:1显示的核苷酸序列组成的寡脱氧核苷酸的3'侧,并且所有磷酸二酯键被硫代磷酸酯键取代,进一步优选地,其是由寡脱氧核苷酸和 β -1,3-葡聚糖(例如,香菇多糖、裂褶菌多糖)组成的复合体(例如,K3-dA30-50-LNT、K3-dA30-50-SPG),在所述寡脱氧核苷酸中长度30-50个核苷酸(具体而言,长度30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50个核苷酸)的多脱氧腺苷酸结合到由SEQ ID NO:1显示的核苷酸序列组成的寡脱氧核苷酸的3'侧,并且所有磷酸二酯键被硫代磷酸酯键取代,最优选地,其是由寡脱氧核苷酸和 β -1,3-葡聚糖(例如,香菇多糖、裂褶菌多糖)组成的复合体(K3-dA30-45-LNT、K3-dA30-45-SPG),在所述寡脱氧核苷酸中长度30-45个核苷酸(具体而言,长度30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45个核苷酸)的多脱氧腺苷酸结合到由SEQ ID NO:1显示的核苷酸序列组成的寡脱氧核苷酸的3'侧,并且所有磷酸二酯键被硫代磷酸酯键取代。

[0138] 本发明的复合体的制备方法可以在类似于非专利文件21-24和JP-A-2008-100919中描述的那些条件下进行。即, β -1,3-葡聚糖,其固有地天然存在作为三链螺旋结构,溶解于质子惰性的有机极性溶剂(二甲亚砜(DMSO)、乙腈、丙酮等)或含水碱性溶液(氢氧化钠、氢氧化钾、氨、氢氧化钙等)中以松散为单链。将由此获得的单链 β -1,3-葡聚糖的溶液和本发明的寡脱氧核苷酸溶液(水溶液、近似中性pH的缓冲水溶液、或酸性缓冲水溶液,优选地,水溶液或近似中性pH的缓冲水溶液)混合,调整pH至近似中性pH(需要时),且将混合物维持合适时间,例如,5°C下过夜。结果是,两个 β -1,3-葡聚糖链和寡脱氧核苷酸中的多dA链形成三链螺旋结构,由此可以形成本发明的复合体。所获的复合体可以通过尺寸排阻层析、超滤、透析等进行纯化以去除没有形成复合体的寡脱氧核苷酸。此外,所得的复合体可以通过阴离子交换层析进行纯化以去除未形成复合体的 β -1,3-葡聚糖。复合体可以合适地通过上述方法纯化。

[0139] 本发明的复合体的形成可以通过例如通过CD(圆二色性)谱、通过尺寸排阻层析的UV吸收迁移、凝胶电泳、微芯片电泳、毛细管电泳来测量构象改变,尽管方法并不限于此。

[0140] 尽管本发明的寡脱氧核苷酸和 β -1,3-葡聚糖的混合比例可以考虑多dA链的长度等而合适地确定,但摩尔比(SPG/ODN)通常为0.02 - 2.0,优选0.1 - 0.5。在进一步的实施方案中,摩尔比(β -1,3-葡聚糖(LNT等)/ODN)例如为0.005 - 1.0,优选0.020 - 0.25。

[0141] 本发明的复合体的制备方法通过采用CpG-ODN和LNT复合体作为实例来解释。LNT溶解于0.05 - 2N优选0.1 - 1.5N的碱性水溶液(例如,0.25N氢氧化钠水溶液),且将混合物静置于1°C - 40°C持续10hr-4天(例如,室温下静置过夜)以制备单链LNT水溶液(例如,50 mg/ml LNT水溶液)。将分别制备的上述LNT水溶液和CpG水溶液(例如,100 μM CpG水溶液)以0.005-1.0的摩尔比(LNT/ODN)混合,随后上述LNT水溶液用缓冲的酸性水溶液(例如NaH₂PO₄)中和并在1 - 40°C下保持6hr-4天(例如4°C下过夜)以完成络合。LNT水溶液可以最

后添加且混合用于上述络合。复合体的形成可以通过例如通过尺寸排阻层析在监测240–280 nm(例如260 nm)处吸收时CpG ODN向高分子量侧的迁移而确定。

[0142] 在一个实施方案中,本发明的复合体展示杆形颗粒的形式。颗粒大小等于由用作材料通过展示三链螺旋结构的β-1,3-葡聚糖(例如裂褶菌多糖)天然形成的颗粒大小。平均颗粒大小通常为10–100 nm,优选20–50nm。颗粒大小可以通过将复合体溶解于水中并将溶液进行通过使用Malvern Instruments Zeta Sizer在80°C下的动态光散射方法而测量。

[0143] 优选分离本发明的复合体。“分离的复合体”的纯度(目标复合体重量与评价目标产物的总重量的百分比)通常不少于70%,优选不少于80%,更优选不少于90%,进一步优选不少于99%。

[0144] 由于本发明的复合体具有优秀的免疫刺激活性并具有对于K型CpG ODN独特的免疫刺激活性(例如,活化B细胞(优选地,人B细胞)以产生IL-6的活性)和对于D型CpG ODN独特的免疫刺激活性(例如,活化浆细胞样树突细胞(优选人浆细胞样树突细胞)以产生IFN- α 的活性)两者,因此其可用作免疫刺激剂等。例如,含有K型CpG ODN(例如,SEQ ID NO: 2、11、12)和LNT (K3-LNT)的复合体和含有K型CpG ODN(例如,SEQ ID NO: 2)和SPG (K3-SPG)的复合体具有诱导炎症应答(pan-IFN- α 、IL-6等)的能力、增强病毒接种的个体血清中的抗原特异性IgG抗体滴度(总IgG、IgG2c等)的作用、在病毒接种的个体中抗原特异性产生细胞因子(IFN- γ 、IL2)的能力、和针对病毒的感染保护性作用。K3-LNT还具有在病毒接种的个体中增强Th2细胞因子(IL-13等)产生的能力。因此,它们可用作新颖的疫苗佐剂候选物。

[0145] 3. 药物组合物

本发明提供包含本发明的上述寡脱氧核苷酸或本发明的上述复合体的药物组合物。本发明的药物组合物可以通过根据常规方法配制本发明的上述寡脱氧核苷酸或本发明的上述复合体来获得。本发明的药物组合物包含本发明的寡脱氧核苷酸或复合体和药学上可接受的载体。而且,药物组合物可以进一步包含抗原。此类药物组合物以合适于口服或肠胃外施用的剂型提供。

[0146] 作为用于肠胃外施用的组合物,例如,使用注射剂、栓剂等,且注射剂可以涵盖剂型诸如静脉内注射剂、皮下注射剂、皮内注射剂、肌肉注射剂、滴注剂等。此类注射剂可以根据已知方法制备。注射剂的制备方法包括将上述本发明的寡脱氧核苷酸或复合体溶解或悬浮于通常用于注射的无菌含水溶剂中。作为用于注射的含水溶剂,可以使用例如,蒸馏水;生理盐水;缓冲液诸如磷酸盐缓冲液、碳酸盐缓冲液、tris缓冲液、乙酸盐缓冲液等;等。此类含水溶剂的pH为例如5–10,优选6–8。制备的注射剂优选填充在合适的安瓿中。

[0147] 还可以通过将本发明的寡脱氧核苷酸或复合体的悬浮液进行处理诸如真空干燥、冻干等来制备本发明的寡脱氧核苷酸或复合体的粉末制剂。本发明的寡脱氧核苷酸或复合体可以通过以粉剂状态将其保存并使用时在注射用含水溶剂中分散粉剂来使用。

[0148] 本发明的寡脱氧核苷酸或复合体在药物组合物中的含量通常约为整个药物组合物的0.1 – 100 wt%,优选约1 – 99 wt%,更优选约1 – 99 wt%。

[0149] 本发明的药物组合物可以包含作为活性成分的单独的本发明的寡脱氧核苷酸或复合体或者本发明的寡脱氧核苷酸或复合体与其他活性成分的组合。

[0150] 4. 药物用途

由于本发明的寡脱氧核苷酸和复合体具有优秀的免疫刺激活性,因此本发明的寡脱氧

核苷酸、复合体和药物组合物可以用作免疫刺激剂。向哺乳动物(灵长类动物诸如人等,啮齿类动物诸如小鼠等,等)施用本发明的寡脱氧核苷酸、复合体或药物组合物可以诱导哺乳动物中的免疫反应。具体而言,由于本发明的复合体具有D型CpG ODN活化特性并且刺激外周血单核细胞产生大量的I型干扰素(*pan*-IFN- α 、IFN- α 2等)和II型干扰素(IFN- γ),其可用作I型干扰素产生诱导剂、II型干扰素产生诱导剂或I型和II型干扰素产生诱导剂。因为本发明的复合体和包含所述复合体的药物组合物诱导产生I型和II型干扰素,因此它们可用于预防或治疗I型或II型干扰素或者I型和II型干扰素两者对它是有效的疾病。I型干扰素对其有效的疾病的实例包括病毒感染(例如丙型肝炎病毒(HCV)、疱疹病毒、乳头瘤病毒、RS病毒、流感病毒等)、癌症等。II型干扰素对其有效的疾病的实例包括变应性疾病、细胞内寄生性原生动物的感染(利什曼原虫等)、细菌(李斯特菌、结核分枝杆菌)等,等。由于用于RS病毒、流感病毒等的急性病毒感染,因为I型干扰素和II型干扰素两者增强与病毒消除相关的免疫应答,因此本发明的复合体和包含其的药物组合物预期对于急性病毒感染是有效的。

[0151] 而且,本发明的寡脱氧核苷酸和复合体,具体而言,本发明的复合体具有强的疫苗佐剂活性,且施用本发明的寡脱氧核苷酸和复合体连同抗原至哺乳动物可以诱导针对该抗原的强免疫反应。因此,本发明还提供诱导针对抗原的免疫反应的组合物,其包含(a)本发明的寡脱氧核苷酸或本发明的复合体,和(b)抗原。具体而言,本发明的复合体强烈诱导针对抗原的体液免疫反应(抗原特异性的抗体产生)和细胞免疫反应(抗原特异性CTL诱导)。因此,本发明的寡脱氧核苷酸、复合体和药物组合物,具体而言本发明的复合体和包含其的药物组合物可用作疫苗佐剂。

[0152] 在本说明书中,佐剂指促进免疫应答的药物助剂,其是当与抗原施用至活体时非特异性增强针对抗原的免疫应答的物质。

[0153] 抗原无具体限制只要其具有对于将作为施用对象的哺乳动物(灵长类动物诸如人等,啮齿类动物诸如小鼠等,等)的抗原性,且可以被抗体或细胞毒性T淋巴细胞(CTL、CD8⁺ T细胞)识别为抗原。可以使用成为抗原的任何物质(蛋白、肽、核酸、脂质、碳水化合物和上述物质的修饰(例如修饰引入有缺失、取代和/或添加一个或多个氨基酸(下文称为突变)等))。作为抗原,也可以使用来源于病原体诸如原生动物、真菌、细菌、病毒等的抗原和与癌症或具体疾病相关的抗原。

[0154] 在本说明书中,“来源于病原体X的抗原A”意指包含抗原A作为病原体X中的构成要素。例如,当抗原A是多肽时,其意指多肽的氨基酸序列存在于由病原体X的基因组编码的蛋白的氨基酸序列中。

[0155] 来源于病原体的抗原的实例包括病原体本身或其部分,灭活的或减毒的病原体本身或其部分,或引入有对其的突变的修饰等,等等。

[0156] 当来源于病原体的抗原用作抗原时,诱导针对该抗原的免疫反应,且建立从机体免疫消除含有该抗原的病原体的机制。因此,包含(a)本发明的寡脱氧核苷酸或本发明的复合体和(b)来源于病原体的抗原的用于诱导针对该抗原的免疫反应的组合物可用于预防或治疗病原体。

[0157] 本发明的复合体强烈诱导针对该抗原的体液免疫反应(抗原特异性的抗体产生)和细胞免疫反应(抗原特异性CTL诱导)两者。因此,来源于细胞内传染性病原体(病毒、原生

动物、真菌、细菌等)已知被细胞毒性T淋巴细胞识别的抗原、与癌症细胞相关的抗原(例如肿瘤抗原)等优先用作抗原。

[0158] 尽管细胞内传染性病毒并无具体限制,但其实例包括RS病毒、流感病毒、副流感病毒、丙型肝炎病毒(HCV)、甲型肝炎病毒(HAV)、乙型肝炎病毒(HBV)、埃博拉病毒、巨细胞病毒、腺病毒、脊髓灰质炎病毒、日本脑炎病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、德国麻疹病毒、狂犬病毒、黄热病病毒、水痘带状疱疹病毒、汉坦病毒、登革热病毒、诺如病毒、轮状病毒、细小病毒、冠状病毒、犬瘟热病毒、成人T细胞白血病病毒(HTLV-1)、人免疫缺陷病毒(HIV)、疱疹病毒、乳头瘤病毒等。细胞内传染性细菌的实例包括支原体等。细胞内传染性原生动物的实例包括疟原虫、血吸虫等。细胞内传染性病原体优选为病毒(具体而言,RS病毒或流感病毒等)。

[0159] 与癌细胞相关的抗原实例包括由癌细胞特异性表达的蛋白、糖链、肽,上述物质的变体(缺失的、取代的和/或添加的)或其修饰等。

[0160] 由于本发明的复合体强烈诱导I型和II型干扰素,在一个实施方案中,引起急性病毒感染的病毒(例如,RS病毒、流感病毒等)(对其I型和II型干扰素均有效)选作病毒。

[0161] 例如,包含(a)本发明的寡脱氧核苷酸、或本发明的复合体和(b)来源于病原体或癌症的抗原的用于诱导针对该抗原的免疫反应的组合物施用于具有病原体感染或癌症的患者或者潜在受病原体感染或癌症的影响的人,以在接受该施用的主体中抗原特异性活化细胞毒性T淋巴细胞(CTL),诱导抗原特异性抗体产生,即,诱导温血动物(优选人)中保护性免疫反应,由此可以预防或治疗感染或癌症。因此,将组合物用作疫苗用于预防或治疗上述疾病诸如感染、癌症等。

[0162] 此外,由于本发明的复合体可以强烈诱导针对抗原的体液免疫反应(抗原特异性抗体产生)和细胞免疫反应(抗原特异性CTL诱导),因此病原体和癌细胞的任何表面抗原和内在抗原可以用作抗原,且表面抗原和内在抗原的混合物的使用也是需要的。

[0163] 包含(a)本发明的寡脱氧核苷酸或本发明的复合体和(b)抗原的用于诱导针对该抗原的免疫反应的组合物可根据上述本发明的药物组合物进行制备。

[0164] 本说明书中引用的任何公开中公开的内容包括专利和专利申请,均以其整体通过引用并入本文至它们已在本文中公开的程度。

实施例

[0165] 本发明通过参考实施例在下文中更详尽地解释,其不应解释为限制性的。

[0166] [方法]

动物和试剂

产生Tlr9缺陷和树突状细胞相关性C型植物血凝素-1缺陷小鼠已描述于(Koyama, S., 等人., Science translational medicine 2, 25ra24 (2010); Saijo, S., 等人., Nature immunology 8, 39-46 (2007))。C57BL/6J小鼠购自NIHON CLEA。所有动物实验根据National Institute of Biomedical Innovation和Osaka University动物设施的机构指南进行。以下CpG ODN由GeneDesign, Inc合成。

[0167] (下划线表示硫代磷酸酯键)。

[0168] 表1

K3 (5'-ATC GAC TCT CGA GCG TTC TC-3') (SEQ ID NO: 1);
 K3-dA₄₀ (5'-ATC GAC TCT CGA GCG TTC TC-40mer A-3') (SEQ ID NO: 2);
 dA₄₀-K3 (5'-40mer A-ATC GAC TCT CGA GCG TTC TC-3') (SEQ ID NO: 3);
 D35 (5'-GGT GCA TCG ATG CAG CGG GG-3') (SEQ ID NO: 4);
 CpG21798 (5'-TCG TCG ACG ATC GGC GCG CGC CG-3') (SEQ ID NO: 5);
 CpG21889 (5'-TCG TCG ACG ATC GGC GCG CGC CG-3') (SEQ ID NO: 6);
 CpG2395 (5'-TCG TCG TTT TCG GCG CGC GCC G-3') (SEQ ID NO: 7);
 M362 (5'-TCG TCG TCG TTC GAA CGA CGT TGA T-3') (SEQ ID NO: 8);

Alexa 488-标记的K3;

Alexa 488-标记的K3-dA40;

Alexa 647-标记的K3;

Alexa 647-标记的K3-dA40。

[0169] 具体而言,描述了合成K3-dA35 (SEQ ID NO:12)、K3-dA30 (SEQ ID NO:11)、K3-dA25 (SEQ ID NO:10)和K3-dA20 (SEQ ID NO:9),除了上述的K3-dA40 (SEQ ID NO:2)之外(表2)。

[0170] 表2

K3-dA40:

A₁T₂C₃G₄A₅C₆T₇C₈G₉A₁₀G₁₁C₁₂G₁₃T₁₄T₁₅C₁₆S₁₇A₁₈A₁₉S₂₀A₂₁A₂₂A₂₃S₂₄A₂₅A₂₆A₂₇A₂₈A₂₉A₃₀A₃₁A₃₂A₃₃A₃₄A₃₅A

(序列表, SEQ ID NO:2)

K3-dA35:

A₁T₂C₃G₄A₅C₆T₇C₈G₉A₁₀G₁₁C₁₂G₁₃T₁₄T₁₅C₁₆S₁₇A₁₈A₁₉S₂₀A₂₁A₂₂A₂₃A₂₄A₂₅A₂₆A₂₇A₂₈A₂₉A₃₀A₃₁A₃₂A₃₃A₃₄A₃₅A

(序列表, SEQ ID NO:12)

K3-dA30:

A₁T₂C₃G₄A₅C₆T₇C₈G₉A₁₀G₁₁C₁₂G₁₃T₁₄T₁₅C₁₆S₁₇A₁₈A₁₉S₂₀A₂₁A₂₂A₂₃A₂₄A₂₅A₂₆A₂₇A₂₈A₂₉A₃₀A

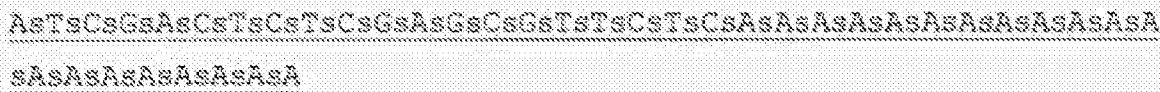
(序列表, SEQ ID NO:11)

K3-dA25:

A₁T₂C₃G₄A₅C₆T₇C₈G₉A₁₀G₁₁C₁₂G₁₃T₁₄T₁₅C₁₆S₁₇A₁₈A₁₉S₂₀A₂₁A₂₂A₂₃A₂₄A₂₅A

(序列表, SEQ ID NO:10)

K3-dA20:



(序列表, SEQ ID NO:9)

(在上述序列中,s显示核苷酸之间的磷酸二酯键被硫代磷酸酯键取代。)。

[0171] 通过常规方法固相亚磷酰胺法合成寡脱氧核苷酸(Nucleic Acids in Chemistry and Biology, 3.Chemical synthesis (1990)编辑G. Michael Blackburn 和 Michael J. Gait.Oxford University Press)。

[0172] 表3显示表2中所述的CpG ODN的分子量,和在以下条件下通过反相HPLC分析的保留时间(柱:Waters, X-Bridge C18 2.5 μm , 4.6 x 75 mm, 溶液A:100 mM六氟异丙醇、8 mM三乙胺,溶液B: 甲醇, B%:5%→30% (20 min, 线性梯度); 60°C; 1 ml/min; 260 nm)。

[0173] 表3

化合物	计算值	测量值	保留时间(min)
K3-dA40	19520.3	19519.0	14.9
K3-dA35	17873.9	17872.8	15.0
K3-dA30	16227.5	16225.7	14.9
K3-dA25	14581.1	14580.5	14.7
K3-dA20	12934.8	12933.3	14.6

[0174] 卵清蛋白(OVA)购自Seikagaku Kogyo.DQ-OVA, Alexa488-OVA, CFSE和Lipofectamine 2000购自Invitrogen。Hoechst33258、酵母多糖和凝胶多糖购自SIGMA。耗竭酵母多糖(Zymosan-Depleted)购自Invivogen。氯膦酸盐脂质体购自FormuMax。流感裂解产物疫苗、福尔马林灭活的完整病毒(WIV)和纯化的流感病毒(H1N1)如前所述制备(Koyama, S., 等人., Science translational medicine 2, 25ra24 (2010))。

[0175] CpG ODN和SPG的络合(图1)

将7.22 mg K3-dA40溶解在水中(3.7 mL)。将SPG (15 mg, Mitsui Sugar Co., Ltd.)溶解在0.25 N NaOH (1 mL)中。加入1 mL体积的330 mM NaH₂PO₄至DNA溶液,随后将SPG溶液加入到DNA/NaH₂PO₄溶液并在4°C下保持过夜以完成络合。摩尔比(MSPG/MDNA)保持为0.27。复合体的形成通过微芯片电泳仪确定(SHIMADZU:MultiNA)。

[0176] CpG ODN和LNT的络合(图1)

将香菇多糖(LNT:Ajinomoto Co., Inc., lot No.:2D8X1)溶解在0.25N NaOH至50 mg/ml,并将混合物在室温下静置过夜。将各种CpG ODN(表2、3)溶解在注射用水中至100 mM。将LNT溶液和各种CpG水溶液(K3-dA20 (SEQ ID NO:9)、K3-dA25 (SEQ ID NO:10)、K3-dA30 (SEQ ID NO:11)、K3-dA35 (SEQ ID NO:12)、K3-dA40 (SEQ ID NO:2))以表4中显示的比例混合,随后加入与LNT相同体积的330 mM NaH₂PO₄,并将混合物在4°C保持过夜以完成络合。复合体的形成可以通过例如通过尺寸排阻层析在监测260 nm处吸收时CpG ODN向更高分子量侧的迁移而确定。(系统:Agilent 1100系列,柱:Asahipak GF7 M-HQ (Shodex),连接的两个柱,流速:0.8 mL/min, 缓冲液:10 mM EDTA PBS, pH 7.4, 温度:40°C)。

[0177] [表4]

CpG-LNT	CpG ODN	LNT	
	类型	(μ g)	(μ g)
K3-dA20-LNT	K3-dA20	69	113
K3-dA20-LNT	K3-dA20	138	136
K3-dA25-LNT	K3-dA25	78	85
K3-dA30-LNT #1	K3-dA30	433	425
K3-dA30-LNT #2	K3-dA30	433	510
K3-dA35-LNT #1	K3-dA35	477	496
K3-dA35-LNT #2	K3-dA35	477	595
K3-dA40-LNT #1	K3-dA40	521	567
K3-dA40-LNT #2	K3-dA40	521	680
K3-dA35-LNT	K3-dA35	1527	1524
K3-dA40-LNT	K3-dA40	1667	1741

[0178] 人PBMC的制备和刺激(图2、3、6和7)

PBMC获自三个健康的成人男性志愿者(30-40岁龄)。所有使用人PBMC的实验均由National Institute of Biomedical Innovation的Institutional Review Board批准。使用Ficoll制备PBMC后,它们以 1×10^7 细胞/mL的浓度铺板。PBMC保持在完全RPMI(RPMI 1640, 补充有10% FCS、青霉素和链霉素)中。用K3 (0.24, 0.74, 2.2, 6.6, 20 μ g/mL)、K3-dA40、K3-SPG (K3-dA40的复合体)、dA40-K3、SPG-K3 (dA40-K3的复合体)、D35、CpG21798、CpG21889、CpG2395、或M362刺激PBMC 24小时。将上清液进行对于pan-IFN- α (Mabtech), IL-6 (R&D)和Milliplex (Millipore)的ELISA。

[0179] 电子显微镜分析(图4)

染色前,将样品滴在聚醋酸甲基乙烯脂-碳-包被的栅格上。对于阴性染色,将一滴2%乙酸铀酰(pH 4.0)置于栅格上并放置至风干。将栅格在电子显微镜(Hitachi H-7650)下以 $\times 40,000$ 的放大检查。

[0180] 动态光散射(图5)

使用动态光散射在Malvern Instruments Zeta Sizer上在80°C下测量水溶液中的平均纳米颗粒大小。

[0181] 脾细胞和树突状细胞培养(图8和9)

从6周龄的C57BL/6J、T1r9缺陷的和树突状细胞相关性C型植物血凝素-1缺陷的小鼠收集小鼠脾。悬浮脾细胞后,用ACK裂解缓冲液裂解红细胞(RBC)并将细胞保持在完全RPMI中。细胞以 1×10^7 细胞/mL铺板。骨髓来源的DC通过用人F1t3L (Peprotech) (100 ng/mL)培养7天产生。将细胞以 1×10^7 细胞/mL的浓度铺板。BMDM通过用小鼠M-CSF (Peprotech) (20 ng/mL)培养7天产生。这些细胞保持在完全RPMI中。

[0182] 细胞内分布(图8和9)

将BMDM以 5×10^7 细胞/mL铺板并用Alexa 488-K3 (1 μM) 加Alexa 647-K3-SPG (1 μM)或Alexa 488-D35 (1 μM)加Alexa 647-K3-SPG (1 μM)刺激3小时。用Hoechst33258染色细胞30 min以将核显像,随后固定细胞并使用荧光显微镜分析。

[0183] 免疫

将6周龄的C57BL/6J、Tlr9缺陷的和树突状细胞相关性C型植物血凝素-1缺陷的小鼠在第0和10天在尾基部施用:

OVA (0.1、1、10、或100 μg);

OVA (0.37、1.1、3.3、或10 μg)和K3(538 pmol);

OVA (0.37、1.1、3.3、或10 μg)和K3-dA40 (538 pmol); 或

OVA (0.37、1.1、3.3、或10 μg)和K3-SPG (538 pmol)。对于其他实验,将6周龄的C57BL/6J小鼠在第0和10天在尾基部施用:

单独的裂解疫苗(0.1 μg);

裂解疫苗加K3 (538 pmol);或

裂解疫苗加K3-SPG (538 pmol)。在第17天抽血并且通过ELISA测量抗原特异性血清抗体滴度(图10、15a、16、25、28a、29和43a)。在第17天收集小鼠脾并通过上述方法制备脾细胞。将细胞用以下再次刺激:

OVA257-264 (OVA257):SIINFEKL (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$);

OVA323-339 (OVA323):ISQAVHAAHAEINEAGR (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$);

完全OVA蛋白 (OVA) (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$);

NP260-283 (NP260):ARSALILRGSVAHKSCLPACVYGP (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$); 或

裂解疫苗 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

持续24或48小时。将上清液进行小鼠IFN- γ 的ELISA(图11、15b、17、26、28b、30和43b)。对于四聚体测定,将脾细胞用H-2Kb OVA四聚体(MBL)、抗-CD8 α (KT15)、抗-TCR β (H57-597)、抗-CD62L (MEL-14)、和抗-CD44 (IM7)抗体和7-AAD染色。通过FACS确定OVA 四聚体 $^{+}$ CD44 $^{+}$ CD8 α^{+} TCR β^{+} 细胞数 (图12、15c、27、28c和31)。

[0184] 体外CTL测定(图13)

将六周龄C57BL/6J小鼠在第0天在尾基部施用:

OVA (100 μg);

OVA 加 K3 (3.3 μg);

OVA 加 K3-dA40 (3.3 μg); 或

OVA和K3-SPG (3.3 μg)。

[0185] 免疫后7天时,初生的C57BL/6J脾细胞用不同浓度的CFSE (5或0.5 μM)在37°C下标记10 min。将以高浓度的染色的细胞用OVA257 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)在37°C下脉冲(pulsed)90 min。用培养基洗涤两次后,将标记的细胞混合并通过静脉内施用转移至经免疫的小鼠。转移后24天,收集脾细胞并通过FACS测量CFSE标记的细胞的百分比。

[0186] 肽免疫

C57BL/6J小鼠用以下免疫:

OVA257 (10 μg);

OVA257 加 K3 (10 μg);

OVA257 加 K3-dA40 (10 μg)；或

OVA257 加 K3-SPG (10 μg)。

[0187] 免疫后7天，制备脾细胞并用H-2Kb OVA四聚体、抗-CD8 α 、抗-TCR β 、抗-CD62L、和抗-CD44抗体染色。OVA 四聚体 $^+$ CD44 $^+$ CD8 α^+ TCR β^+ 细胞数通过FACS分析（图14左）。制备的脾细胞体外用OVA257 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)加Golgi Plug再刺激4小时。细胞用抗-IFN- γ 、抗-CD8 α 和抗-CD3e抗体染色，且IFN- γ^+ CD8 α^+ CD3e $^+$ 细胞数通过FACS确定(图14右)。

[0188] 转染和树突状细胞相关性C型植物血凝素-1结合测定(图18和19)

使用Lipofectamine 2000用空的、树突状细胞相关性C型植物血凝素-1或树突状细胞相关性C型植物血凝素-2表达质粒转染HEK293细胞。转染后48小时，将细胞用FITC-SPG (0.5 μM)、Alexa 488-标记的K3-dA40 (0.5 μM)或Alexa 488-标记的K3-SPG (0.5 μM)在37°C下处理60 min。处理后，收获细胞并通过FACS分析SPG或CpG ODN阳性细胞。

[0189] 免疫细胞的刺激(图20、21、22、23和24)

将来自C57BL/6J、Tlr9缺陷的或树突状细胞相关性C型植物血凝素-1缺陷小鼠的脾细胞和FL-DC用以下刺激24小时：K3-SPG (0.014、0.03、0.04、0.08、0.12、0.25、0.37、0.74、1.1、2.2、3.3、6.7、10、或20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、酵母多糖(3.7、11.1、33.3、或100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、凝胶多糖、耗竭的酵母多糖、或SPG。在其他实验中，来自C57BL/6J或树突状细胞相关性C型植物血凝素-1缺陷小鼠的脾细胞用以下刺激：耗竭的酵母多糖(100、33.3、或11.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)或SPG (100、33.3、或11.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，具有或不具有D35 (1 μM)，持续24小时。将上清液进行对IFN- α (PBL)、IL-6 (R&D)、IL-12 p40 (R&D)、IL-12 p70 (R&D)和Bioplex (BIO-RAD)的ELISA。

[0190] 免疫组织化学(图32)

将C57BL/6J小鼠在尾基部施用：

DQ-OVA (10 μg)；

Alexa 488-K3-SPG (10 μg)；

Alexa 647-K3-SPG (10 μg)；或

DQ-OVA加Alexa647-K3-SPG (10 μg)。

[0191] 收集iLN后，使用恒冷切片机(cryostat)制备冷冻切片。将冷冻切片用4%低聚甲醛固定10 min并与抗-Siglec-1 (MOMA-1)、抗-MARCO (ED31)、抗-CD3e (145-2C11)、或抗-CD11c (N418)抗体孵育。通过ImageJ分析成像结果。

[0192] 双光子显微镜(图33和35)

C57BL/6J、Tlr9-缺陷的或树突状细胞相关性C型植物血凝素-1-缺陷的小鼠用DQ-OVA (10 μg)、Alexa 488-K3 (10 μg)、或Alexa 488-K3-SPG (10 μg)在尾基部施用。iLN收集前30 min，将小鼠用抗-PE-MARCO或抗-PE-Siglec-1抗体在尾基部施用。施用抗原或佐剂后1小时，收集iLN并制备用于使用双光子显微镜(Olympus)的成像分析。使用速度共定位分析计算Pearson相关性。

[0193] 抗原和佐剂的体内分布(图34和36)

将C57BL/6J小鼠在尾基部施用：

Alexa 647-K3 (538 pmol)；

Alexa 647-K3-SPG (538 pmol)；

Alexa 488-OVA (10 μg)；

Alexa 488-OVA 加 K3 (10 μg);
Alexa 488-OVA加K3-SPG (10 μg);
DQ-OVA (10 μg);
DQ-OVA 加 Alexa 647-K3 (538 pmol); 或
DQ-OVA 加 Alexa 647-K3-SPG(538 pmol)。

[0194] 施用后24小时,收集iLN。为了制备单细胞悬浮液,将iLN与胶原蛋白酶D(1 mg/mL)和DNase I(0.1 mg/mL)在37°C下孵育30 min。将制备的细胞与抗B220 (RA3-6B2)、抗CD8 α (56-6.7)和抗-CD11c抗体孵育以分离不同的DC群。通过FACS分析OVA和CpG ODN的细胞摄取。

[0195] 氯膦酸盐脂质体注射(图37)

免疫前5天或2天在尾基部向六周龄C57BL/6J小鼠施用氯膦酸盐脂质体。在第0天在尾基部用OVA加K3-SPG免疫小鼠。在第8天收集血液和脾,并通过ELISA测量血清抗体滴度和T细胞应答。

[0196] 体内DC活化的研究(图38)

用K3 (10 μg)或K3-SPG (10 μg)向尾基部对C57BL/6J或T1r9缺陷小鼠施用。施用后24小时,通过上述方法制备iLN。将细胞用抗CD11c、抗mPDCA-1 (JF05-1C2.4.1)、抗CD8 α 、和抗CD40 (3/23)抗体孵育,随后通过FACS分析。

[0197] 针对流感病毒感染的防御应答的研究

将六周龄C57BL/6J小鼠用以下施用:

裂解疫苗(0.1 μg);
裂解疫苗加K3-SPG (10 μg); 或
WIV (0.2 μg)

在第0和14天。免疫后2周,通过ELISA测量血清抗体滴度(图39)并用 2.3×10^3 pfu (10 LD₅₀)的流感病毒A/PR/8/34鼻内攻击小鼠。监测攻击小鼠的体重改变和死亡率持续20天(图40)。

[0198] 食蟹猴的疫苗模型(图41和42)

将食蟹猴在第0和14天皮下施用:

流感裂解疫苗(5 μg)加K3(5 nmol),或
裂解疫苗和K3-SPG (5 nmol)

。在-2、2、4、6、8、110周收集血样,并通过ELISA测量血清抗体滴度。

[0199] 统计学分析

组间的统计学显著($P < 0.05$)使用Student's t检验或Mann-Whitney U检验来确定。

[0200] [结果]

1)K3-SPG的杆形纳米大小颗粒获得K和D型CpG ODN的双重特性。

[0201] CpG ODN和SPG之间的更好的络合效率需要如图1中所示的经变性-复性程序的对于在5'和3'端的多dA40的PS骨架的额外序列(Shimada, N., 等人., Bioconjugate chemistry 18, 1280-1286 (2007); Minari, J., 等人., Bioconjugate chemistry 22, 9-15 (2011))。在通过人源化的CpG ODN形成复合体的优化过程中,本发明人检查了CpG ODN的5'和3'端的免疫刺激影响。5'-K3-dA40-3'而不是5'-dA40-K3-3'与SPG活化的人外周

血单核细胞(PBMC)络合以产生大量的IFN- α ,尽管络合效率是可比较的(图2和3)。K3、K3-dA40和dA40-K3,其能够活化人PBMC以产生其他细胞因子,诸如IL-6,无法产生IFN- α (图2和3)。这些结果表明5'-CpG比3'-CpG作为新颖的TLR9激动剂是更期望的。

[0202] K3-SPG的鉴定和定量通过扫描电子显微镜(SEM)和动态光散射(DLS)来进行。K3-SPG具有杆样结构,与之前报道中可见的一致(Bae, A.H., 等人., Carbohydrate research 339, 251-258 (2004))(图4)。其似乎为具有30 nm的平均直径的可溶性单体纳米颗粒,与SPG本身相当且比D型CpG ODN (D35)更小(图5)(Klein, D.C. 等人., Ultramicroscopy 110, 689-693 (2010); Costa, L.T., 等人., Biochemical and biophysical research communications 313, 1065-1072 (2004))。

[0203] 考虑到K3-SPG形成纳米颗粒,将K3-SPG的免疫刺激活性与C、D和P型CpG ODN比较。用K3-SPG刺激PBMC产生更大量的IFN- α 和IFN- γ ,且以比由D35(图6)、P和C型CpG ODN(图7)诱导的那些更低的浓度。这些结果表明K3-SPG获得D型CpG ODN的特征,而没有丧失K型的特征,这是因为这些IFN已知是D型特异性的细胞因子(Krug, A., 等人., European journal of immunology 31, 2154-2163 (2001); Verthelyi, D. 等人., Journal of immunology 166, 2372-2377 (2001); Gursel, M. 等人., Journal of leukocyte biology 71, 813-820 (2002))。为了理解K和D型CpG ODN的双功能,本发明人分析了K3-SPG在骨髓来源的巨噬细胞中的胞内定位。K3-SPG不仅与包含K型CpG ODN的内体而且与包含D型CpG ODN的内体共定位(图8和9),如C型CpG ODN(Guiducci, C., 等人., The Journal of experimental medicine 203, 1999-2008 (2006)),表明K3-SPG可以转导经K和D型CpG ODN的内体介导的先天免疫信号传递途径。这些结果强烈表明K3-SPG形成纳米大小的高级和完全溶解的颗粒,并且发现这种“一体化”K3-SPG展示比任何其他CpG ODN和先前已知的CpG-SPG复合体更有效的活性和与其不同的特征。

[0204] 2)K3-SPG是诱导针对蛋白抗原的有效CTL应答无需缀合的有效疫苗佐剂。

[0205] 本发明人在鼠免疫模型中比较了K3、K3-dA40和K3-SPG的佐剂作用。当用单独的OVA、或OVA与每一K3来源的佐剂免疫野生型小鼠时,K3-SPG诱导比由K3诱导的显著更高的体液免疫应答(图10)和更强的T细胞应答(图11)。值得注意的是,四聚体测定揭示OVA特异性CD8 T细胞显著更高的数目(图12)。还观察到针对共施用的蛋白抗原而无任何共价缀合的非常强的体内CTL活性(图13)。由K3-SPG的这种强CTL诱导通过肽接种而再现(图14),且是剂量依赖性的(图15)。K3-SPG的抗原节约能力如此有效以致于使用百分之一的OVA抗原的量实现了相当的抗体和CD4 T细胞应答(图16和17)。这些结果明确地表明K3-SPG是比单独的K3更卓越的佐剂。

[0206] 3)SPG是可溶性树突状细胞相关性C型植物血凝素-1配体,但不是树突状细胞相关性C型植物血凝素-1激动剂。

[0207] 检查了树突状细胞相关性C型植物血凝素-1在细胞摄入SPG和K3-SPG及随后被其活化中的作用,因为树突状细胞相关性C型植物血凝素-1已显示是 β -葡聚糖诸如酵母多糖的受体(Herre, J., 等人., Blood 104, 4038-4045 (2004))。使用流式细胞术,发现表达树突状细胞相关性C型植物血凝素-1但不表达树突状细胞相关性C型植物血凝素-2或对照载体的HEK293细胞增加体外SPG或K3-SPG的摄入,而与ODN存在无关(图18和19)。近期已报道 β -葡聚糖的可溶形式不活化树突状细胞相关性C型植物血凝素-1信号传递(Goodridge,

H.S., 等人., *Nature* 472, 471–475 (2011)。此外,树突状细胞相关性C型植物血凝素-1信号传递经细胞因子信号传递蛋白的抑制蛋白1(SOCS1)诱导抑制TLR9介导的细胞因子产生(Eberle, M.E.& Dalpke, A.H., *Journal of immunology* 188, 5644–5654 (2012))。因此,检查SPG的激动剂活性。当脾细胞用耗竭的酵母多糖而非SPG刺激时,观察到剂量依赖性和树突状细胞相关性C型植物血凝素-1依赖性的TNF- α 和其他细胞因子产生(图20)(图21)。通过酵母多糖和凝胶多糖的细胞因子产生是树突状细胞相关性C型植物血凝素-1依赖性的。耗竭的酵母多糖抑制CpG ODN-诱导的IFN- α ,且这一抑制被树突状细胞相关性C型植物血凝素-1缺乏解除(图22)。相反,SPG不抑制CpG ODN-诱导的IFN- α 产生(图23)。这些结果表明SPG是树突状细胞相关性C型植物血凝素-1的配体而非激动剂;因此,SPG不干扰TLR9介导的IFN- α 产生。

[0208] 4)K3-SPG的佐剂作用依赖于TLR9和部分依赖于树突状细胞相关性C型植物血凝素-1。

[0209] 由于K3-SPG是CpG ODN和 β -葡聚糖的复合体,因此使用受体敲除小鼠检查TLR9 (Hemmi, H., 等人., *Nature* 408, 740–745 (2000))和树突状细胞相关性C型植物血凝素-1(Saijo, S., 等人., *Nature immunology* 8, 39–46 (2007))的作用。当将来自Tlr9缺陷的和树突状细胞相关性C型植物血凝素-1缺陷的小鼠的脾细胞和Flt3配体诱导的骨髓来源的DC(FL-DC)用K3-SPG刺激时,细胞因子产生完全依赖于TLR9而非树突状细胞相关性C型植物血凝素-1(图24)。与体外结果一致,用K3-SPG加OVA免疫Tlr9缺陷小鼠导致减小的体液和T细胞应答(图25–27)。当用OVA加10 μ g的K3-SPG免疫小鼠时,树突状细胞相关性C型植物血凝素-1缺陷小鼠显示与野生型小鼠相当的免疫应答(图28)。当用OVA加1 μ g的K3-SPG免疫树突状细胞相关性C型植物血凝素-1缺陷的小鼠时,根据四聚体测定小鼠展示出降低的CD8 T细胞应答(图31),且没有抗体和来自T细胞的细胞因子产生中的显著变化(图29和30)。这些结果表明K3-SPG的佐剂作用依赖于TLR9信号传递。尽管SPG和K3-SPG不刺激树突状细胞相关性C型植物血凝素-1信号传递,但K3-SPG的作用仍体内部分依赖于树突状细胞相关性C型植物血凝素-1。

[0210] 5) 引流淋巴结中的MARCO $^+$ 而不是Siglec-1 $^+$ 巨噬细胞主要捕获K3-SPG和抗原。

[0211] 由于K3-SPG提供经用简单抗原混合物免疫的体内有效佐剂作用,因此假设捕获抗原和K3-SPG的细胞应在介导佐剂作用中起关键作用。为了检查荧光标记的OVA和K3-SPG的体内分布,使用荧光显微镜和双光子显微镜。在尾基部注射后,在1小时内抗原和佐剂到达引流腹股沟淋巴结(iLN)的表面(图32、33和35)。24小时后,一些K3-SPG已移动至CD3e $^+$ T细胞区且与DO-OVA共定位。在iLN的T细胞区包含K3-SPG和DQ-OVA两者的那些细胞是CD11c $^+$ DCs。

[0212] 有趣的是,保留在iLN表面上的大部分荧光信号(图32)促使本发明人集中于两类已知分布在LN表面上的巨噬细胞,Siglec-1 (也称为CD169或MOMA-1) $^+$ 巨噬细胞(也称为被膜下淋巴窦巨噬细胞)和MARCO $^+$ 巨噬细胞(Martinez-Pomares, L. & Gordon, S., *Trends in immunology* 33, 66–70 (2012))。使用常规荧光显微镜的组织学分析没有合适地揭示整个iLN表面;此外,这些巨噬细胞难于分离用于流式细胞术分析(Aoshi, T., 等人., *European journal of immunology* 39, 417–425 (2009); Gray, E.E.& Cyster, J.G., *Journal of innate immunity* 4, 424–436 (2012))。因此,使用双光子显微镜成像

分析来阐明离体的抗原和K3-SPG的分布。注射抗MARCO和抗Siglec-1抗体后,将特异性巨噬细胞显像。当通过双光子显微镜在注射后1小时监测iLN时,OVA和K3-SPG与MARCO⁺而非Siglec-1⁺巨噬细胞共定位(图33和35)。之前报道表明免疫复合体和灭活的流感病毒被Siglec-1⁺巨噬细胞捕获以诱导体液免疫应答(Gonzalez, S.F., 等人., Nature immunology 11, 427-434 (2010); Suzuki, K. 等人., The Journal of experimental medicine 206, 1485-1493 (2009))。如由速度共定位分析所验证的,分布模式与iLN中的MARCO⁺巨噬细胞的分布模式完美匹配,但不与Siglec-1⁺巨噬细胞共定位(图34和36)。相反,相比于K3-SPG,K3在MARCO⁺和Siglec-1⁺区域之间更广泛地分布(图35和36)。此外,Tlr9缺陷和树突状细胞相关性C型植物血凝素-1缺陷小鼠显示相当的K3-SPG共定位。为了确定这些巨噬细胞对K3-SPG佐剂作用的贡献,检查了注射氯膦酸盐脂质体进入尾基部后巨噬细胞和DC的不同的恢复动力学。注射后,巨噬细胞在第2天完全耗竭。这些细胞没有恢复持续至少一周,而DC到第5天大部分恢复,如之前所报道的(Aoshi, T., 等人., Immunity 29, 476-486 (2008))。当巨噬细胞和DC均耗竭时,免疫应答显著抑制(图37; Clo-d2)。仅巨噬细胞而不是DC耗竭且免疫应答与未处理的小鼠中的那些相当(图37; Clo-d5)。这将表明尽管OVA和K3-SPG在注射后主要被iLN中的MARCO⁺巨噬细胞捕获,但巨噬细胞诱导适应性免疫应答。换言之,K3-SPG的佐剂作用很大程度上依赖于DC群。

[0213] 6)K3-SPG在体内靶向且强烈活化携带抗原的DC群。

[0214] 本发明人的发现表明尽管很大比例的纳米颗粒K3-SPG在注射后被iLN中的MARCO⁺巨噬细胞摄取,但佐剂作用似乎被DC所控制。聚焦于iLN中被DC群的抗原和佐剂摄取。注射后24小时,通过流式细胞术分析DC群的抗原和佐剂摄取。三个DC亚群(pDCs, CD8α⁺ DCs和CD8α⁻DCs)中CpG阳性频率在K3-SPG注射后比用K3注射后显著增加。相反,OVA阳性DC频率在K3和K3-SPG注射后相当。当聚焦于抗原和佐剂阳性的DC时,对于K3-SPG相对于K3存在实质增加。iLN中的pDC和CD8α⁺ DCs均被K3-SPG而非K3在注射后24小时强烈活化,且这完全依赖于TLR9(图38)。这些结果表明pDCs和CD8α⁺ DCs 有限捕获纳米颗粒K3-SPG而非非颗粒K3用于成熟,和实施佐剂作用。

[0215] 7)K3-SPG是鼠和非人灵长类动物模型中用于流感疫苗的有效佐剂。

[0216] 通过使用在小鼠和非人灵长类动物中的更多临床相关的流感接种模型来检查K3-SPG的佐剂作用。当用醚处理的血凝素抗原富集的无病毒体的裂解疫苗(SV)加所示佐剂免疫小鼠时,当比较抗体应答和T细胞应答时,K3-SPG证实比K3更优秀的佐剂作用(图43)。更重要的是,SV加K3-SPG免疫导致100倍更高的抗体应答,甚至与用完全(病毒体)灭活疫苗(WIV)(0.2 μg/小鼠)(图39)接种相比时,所述灭活疫苗包含病毒RNA作为内置佐剂(built in adjuvant) (Koyama, S., 等人., Science translational medicine 2, 25ra24 (2010))。用SV(0.1 μg/小鼠)和K3-SPG免疫的小鼠展示比WIV免疫的小鼠更低的体重降低(图40)。显著地,K3-SPG赋予针对致死的PR8病毒攻击100%的保护,而以该剂量仅10%的WIV接种的小鼠存活(图40)。这些结果强烈支持这一概念,即K3-SPG作为鼠模型中蛋白或基于蛋白的疫苗的有效佐剂起效,促使本发明人扩展这一发现至使用食蟹猴的非人灵长类动物模型。每组三只食蟹猴用SV加K3或K3-SPG在第0和14天免疫。血清抗体滴度随后监测持续8周。SV加K3-SPG诱导在免疫后2周时显著更高的抗体滴度,且滴度水平保持高位持续至少再6周(图41)。免疫后2年(110周)时,K3-SPG组比K3组具有显著更高的抗体滴度(图42和

43)。总之,这些结果表明K3-SPG在非人灵长类动物模型中是卓越的疫苗佐剂。

[0217] 8)使用人PBMC的K3-LNT和K3-SPG复合体的炎症应答诱导能力的研究。

[0218] 使用人PBMC (Lonza, 目录号CC-2702, 批次号0000396517), 评价单独的K3 (K3-dA30、K3-dA35、K3-dA40)、K3-LNT复合体(K3-dA30-LNT、K3-dA35-LNT、K3-dA40-LNT)和K3-SPG复合体(K3-dA40-LNT)诱导pan-IFN- α (hIFNa)和IL-6 (hIL-6)的产生的能力。

[0219] 结果显示于图44中。当以低剂量刺激时,相比于单独的K3,用K3-SPG(其为K3和SPG的复合体)和K3-LNT(其为K3和LNT的复合体)的pan-IFN- α 和IL-6的产生更高。此外,由具有不同dA尾长度(dA30、dA35、dA40)的K3-LNT诱导的炎症细胞因子可生产性被指出可能几乎相同。此外,当比较K3-SPG和K3-LNT的炎症细胞因子可生产性时,K3-LNT的pan-IFN- α 产生的可诱导性被指出可能比K3-SPG的更高。另一方面,K3-SPG和K3-LNT发现在IL-6产生中相等。

[0220] 9)用添加有K3-LNT和K3-SPG复合体的RSV F亚单位疫苗接种的小鼠血清中的RSV F抗原特异性IgG抗体滴度。

[0221] 将7周龄的C57BL/6小鼠在尾基部用RSV F抗原(0.5 μ g)和各种佐剂(10 μ g) (单独的K3(K3-dA30、K3-dA35、K3-dA40)、K3-LNT复合体(K3-dA30-LNT、K3-dA35-LNT、K3-dA40-LNT)和K3-SPG 复合体(K3-dA40-SPG)、磷酸铝(alum phosphate))每只小鼠以2周间隔免疫两次。最终免疫后一周时,回收外周血并制备血清,其用作评价样品。使用ELISA方法测量血清中结合RSV F疫苗抗原的抗体的滴度。如图45中所示,RSV F抗原特异性总IgG诱导相比于单独的RSV F抗原接种组(F)通过添加佐剂而得到增强,其表明单独的K3(F+K3-dA30、F+K3-dA35、F+K3-dA40)、K3-LNT (F+K3-dA30-LNT、F+K3-dA35-LNT、F+K3-dA40-LNT)和K3-SPG复合体(F+K3-dA40-SPG)和磷酸铝(F+Alum)的佐剂作用可能是相同的。在接种由磷酸铝(F+Alum)的小鼠组中,其为Th2佐剂,发现IgG1子类诱导能力比单独的RSV F抗原接种组更高。另一方面,结果显示接种有单独的K3 (F+K3-dA30、F+K3-dA35、F+K3-dA40)、K3-LNT (F+K3-dA30-LNT、F+K3-dA35-LNT、F+K3-dA40-LNT)、K3-SPG (F+K3-dA40-SPG)的免疫组在IgG2c子类抗体中比用磷酸铝(F+Alum)的组更高,其表明K3-LNT复合体可以是如K3-SPG的Th1佐剂。

[0222] 10)用添加有K3-LNT和K3-SPG复合体的RSV F亚单位疫苗接种的小鼠中的RSV F抗原特异性细胞因子生产能力。

[0223] 将7周龄的C57BL/6小鼠在尾基部用RSV F抗原(0.5 μ g)和各种佐剂(10 μ g) (单独的K3(K3-dA30、K3-dA35、K3-dA40)、K3-LNT (K3-dA30-LNT、K3-dA35-LNT、K3-dA40-LNT)和K3-SPG 复合体(K3-dA40-SPG)、磷酸铝(alum phosphate))每只小鼠以2周间隔免疫两次。最终免疫后一周时,回收脾,并制备脾细胞。将接种在96孔培养板中的脾细胞用MHC I类限制性表位肽、MHC II类限制性表位肽和RSV F抗原的疫苗抗原蛋白刺激,并培养24小时或48小时。通过细胞因子ELISA方法并使用培养上清液作为样品评价RSV F特异性细胞因子生产能力。在该研究中,评价三类细胞因子(IFN- γ , 其为Th1细胞因子; IL-2, 其产生自活化的T细胞; 和IL-3, 其为Th2细胞因子)。

[0224] 结果是,如图46中所示,表明对IFN- γ 产生和IL-2产生的RSV F抗原特异性诱导的增强作用在K3-LNT (F+K3-dA30-LNT、F+K3-dA35-LNT、F+K3-dA40-LNT)和K3-SPG (F+K3-dA40-SPG)中是相同的。在磷酸铝佐剂(Th2佐剂)接种组(F+Alum)中,IFN- γ 产生低于通过任何刺激的检测限水平。另一方面,IL-13产生增强作用在磷酸铝(Th2佐剂)接种组中高而在

K3-SPG(Th1佐剂)接种组中低。有趣的是,在K3-LNT接种组(F+K3-dA30-LNT、F+K3-dA 35-LNT、F+K3-dA 40-LNT)中,对IL-13产生的增强作用相比于相同的Th1佐剂(K3-SPG)接种组(F+K3-dA40-SPG)高。因此,这表明K3-LNT复合体具有除了由K3-SPG具有的高Th1应答增强作用外的Th2应答增强能力。

[0225] 11)用添加有K3-LNT和K3-SPG的RSV F亚单位疫苗接种的棉鼠中针对RSV感染的保护性作用。

[0226] 将6至7周龄的棉鼠在尾基部用RSV F抗原(1 μ g)和各种佐剂(10 μ g) (K3-LNT (K3-dA35-LNT、K3-dA40-LNT)和K3-SPG复合体(K3-dA40-SPG)、磷酸铝(alum phosphate))每只小鼠以2周间隔免疫两次。最终免疫后两周时,将棉鼠通过经鼻接种用RSV血清型A(长链)进行攻击,并在3天后测量肺内病毒量。Synagis(帕利珠单抗)施用组在攻击感染前一天肌内施用有Synagis(2.5 mg/kg),且以如上相同方式评价感染保护性能力。攻击感染前立即在麻醉下从大鼠的颈静脉收集血液样品并使用所获血清研究中和抗体滴度。

[0227] 肺内病毒量的结果显示于图47的左侧,且中和抗体滴度的结果显示于该图右侧。肺内病毒量的结果揭示在PBS施用组中观察到约 10^5 pfu/肺的病毒量,而在施用添加有磷酸铝的RSV F疫苗(F+Alum)的组中抑制至低约100倍的病毒量(平均值)。另一方面,诱导保护免于感染的活性也在添加K3-SPG的疫苗施用组(F+K3-dA40-SPG)中观察到。添加K3-LNT的疫苗组(F+K3-dA35-LNT、F+K3-dA40-LNT)显示对感染的最佳保护作用,因此表明成为新颖的疫苗佐剂候选的可能性,其相比于磷酸铝和K3-SPG有助于高感染防御能力。

[0228] 至于中和抗体诱导能力,在添加磷酸铝的疫苗施用组(F+Alum)中观察到等于Synagis的血液中的中和能力。另一方面由于在K3-SPG添加的疫苗施用组(F+K3-dA40-SPG)中的4只大鼠中的3只中几乎没有诱导中和抗体,因此认为K3-SPG产生的感染保护作用源自中和抗体不依赖的机制。此外,由于相比于K3-SPG,在K3-LNT施用组(F+K3-dA35-LNT、F+K3-dA40-LNT)发现高中和抗体,因此表明K3-LNT佐剂可以具有与K3-SPG的不同的特性,例如, Th2应答增强能力。

[0229] 产业实用性

本发明提供具有优秀的免疫刺激活性的寡脱氧核苷酸和包含其的复合体。具体而言,本发明的复合体同时具有针对K型CpG ODN独特的免疫刺激活性和针对D型CpG ODN独特的免疫刺激活性。此外,K3-SPG和K3-LNT具有强疫苗佐剂活性,并且用K3-SPG或K3-LNT连同抗原的免疫刺激抗原特异性体液免疫和细胞免疫两者。因此,本发明的复合体可用作药物领域中的免疫刺激剂或疫苗佐剂。

[0230] 本申请基于在日本提交的专利申请号2013-196206(申请日:2013年9月20日),其内容完整并入本文。

[0001]

SEQUENCE LISTING

〈110〉 National Institute of Biomedical Innovation
Daiichi Sankyo Company, Limited

〈120〉 具有免疫增强活性的包含寡核苷酸的复合体及其用途

〈130〉 092215

〈150〉 JP 2013-196206

〈151〉 2013-09-20

〈160〉 12

〈170〉 PatentIn 版本 3.5

〈210〉 1

〈211〉 20

〈212〉 DNA

〈213〉 人工序列

〈220〉

〈223〉 合成的寡核苷酸

〈400〉 1

atcgactctc gagcggttctc

20

〈210〉 2

〈211〉 60

〈212〉 DNA

〈213〉 人工序列

〈220〉

〈223〉 合成的寡核苷酸

〈400〉 2

atcgactctc gagcggttctc aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaa

60

〈210〉 3

〈211〉 60

〈212〉 DNA

〈213〉 人工序列

〈220〉

〈223〉 合成的寡核苷酸

〈400〉 3

aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaa atcgactctc gagcggttctc

60

〈210〉 4

〈211〉 20

〈212〉 DNA

〈213〉 人工序列

[0002]

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 4

ggtgtcatcga tgcagggggg

20

<210> 5

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 5

tcgtcgacga tcggcgcgcg ccg

23

<210> 6

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 6

tcgtcgacga tcggcgcgcg ccg

23

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 7

tcgtcgttt cggcgcgcg cg

22

<210> 8

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 8

tcgtcgct tcgaacgacg ttgat

25

[0003]

<210>	9	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	9	
atcgactctc gagcgttctc aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa		40
<210>	10	
<211>	45	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	10	
atcgactctc gagcgttctc aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaa		45
<210>	11	
<211>	50	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	11	
atcgactctc gagcgttctc aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa		50
<210>	12	
<211>	55	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	12	
atcgactctc gagcgttctc aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaa		55

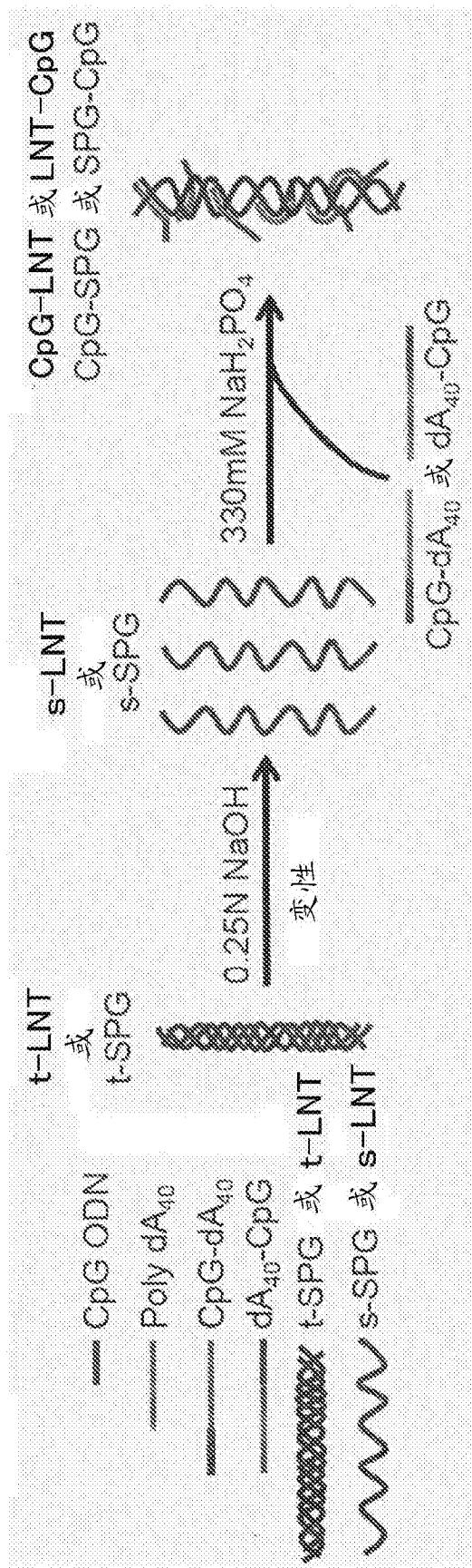


图 1

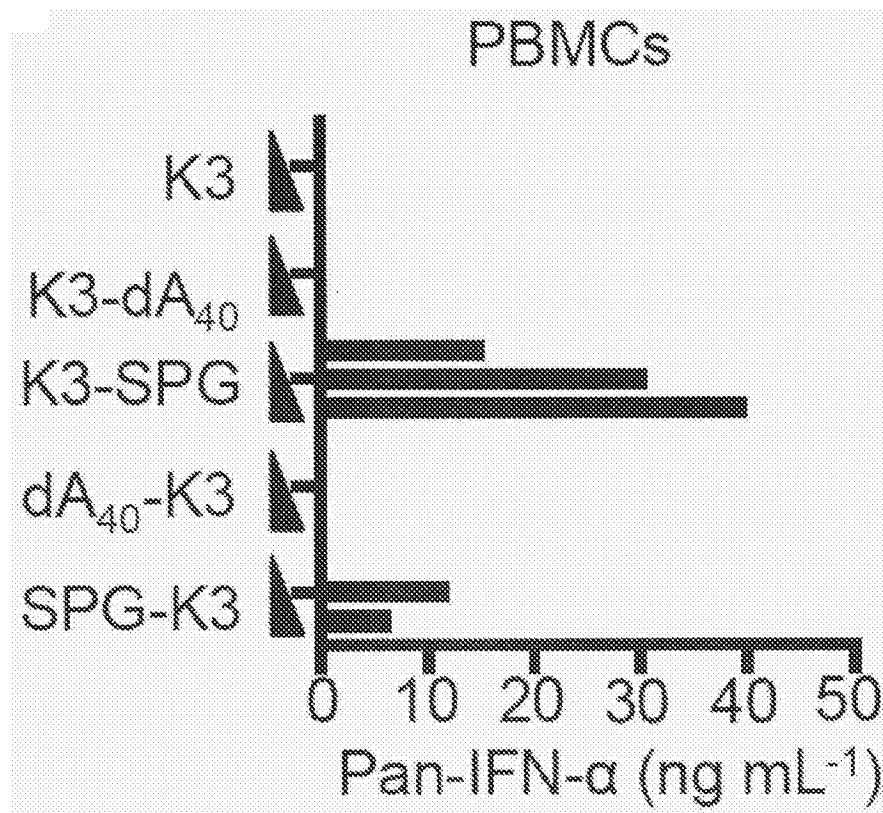


图 2

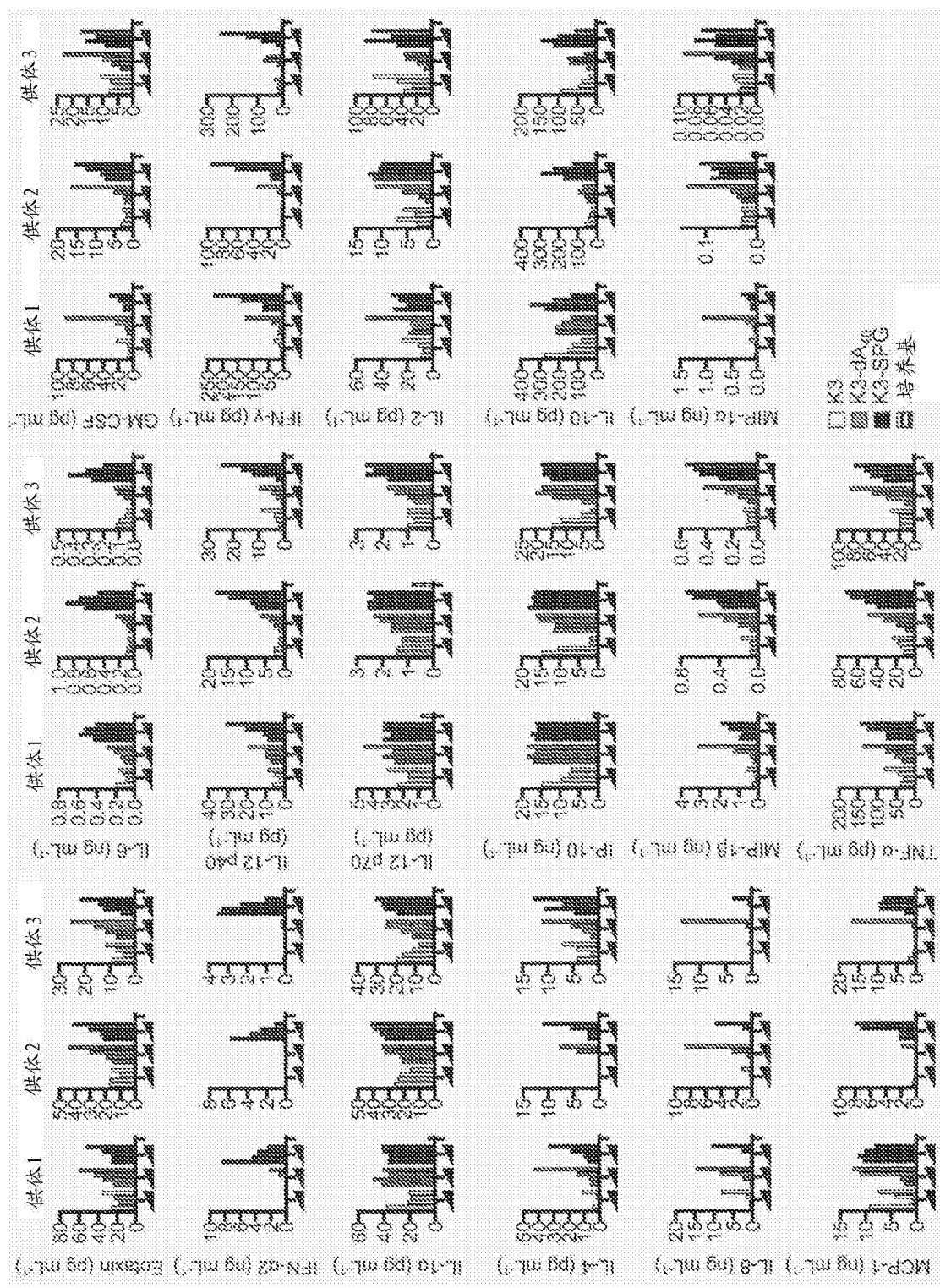


图 3

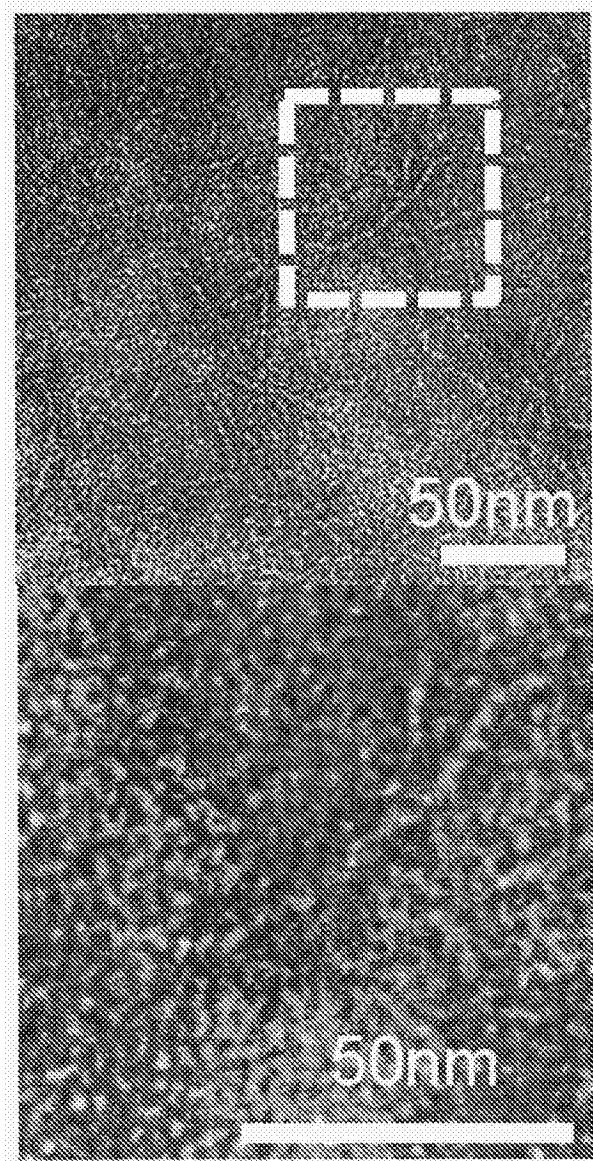


图 4

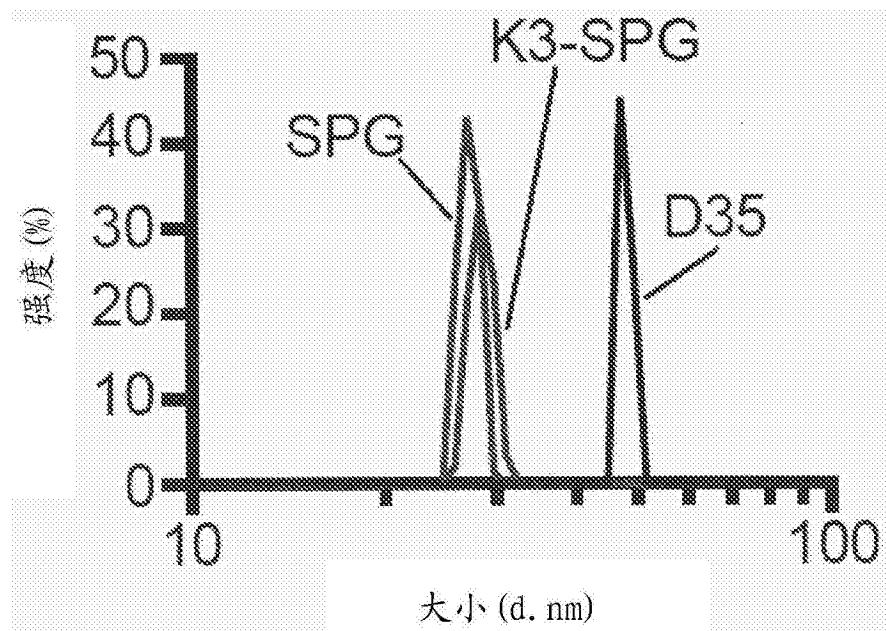


图 5

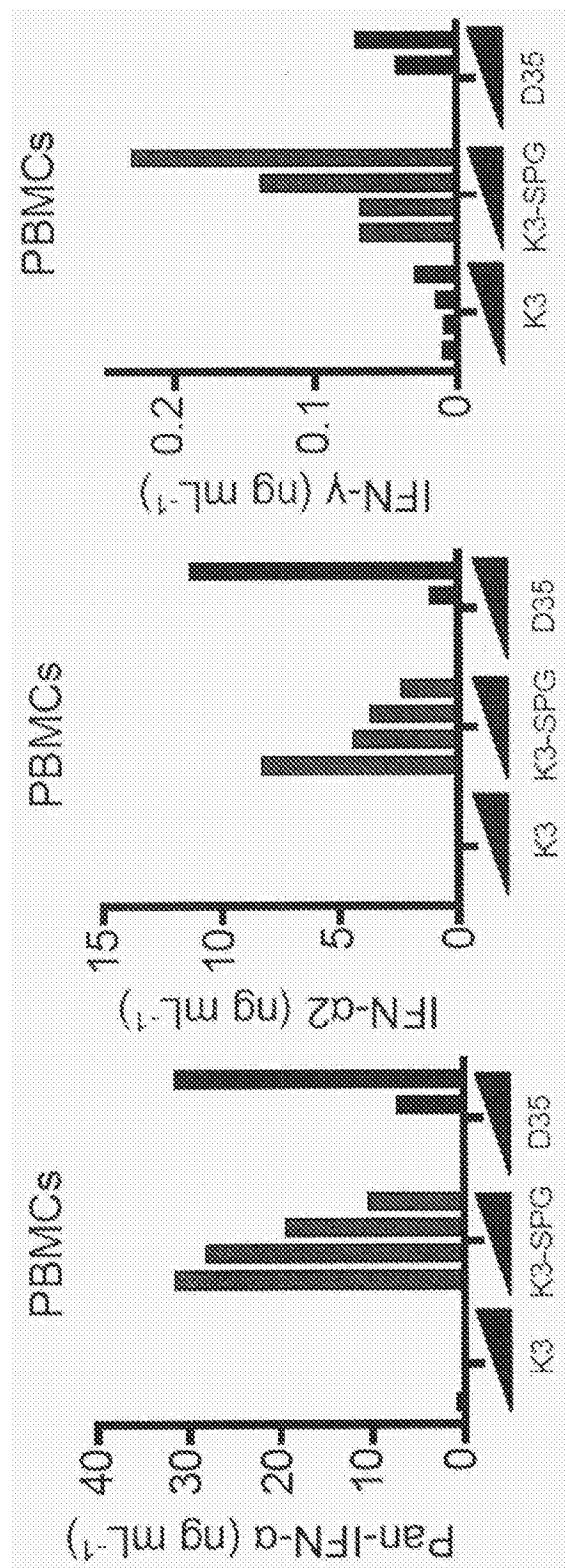


图 6

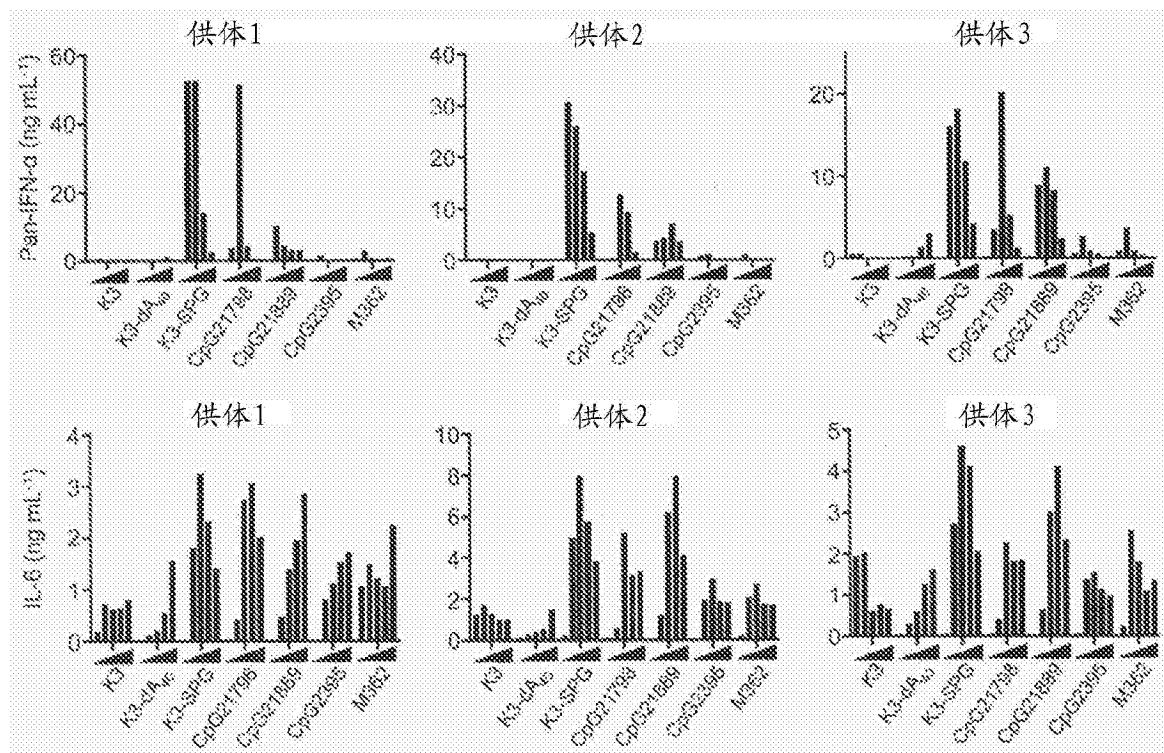


图 7

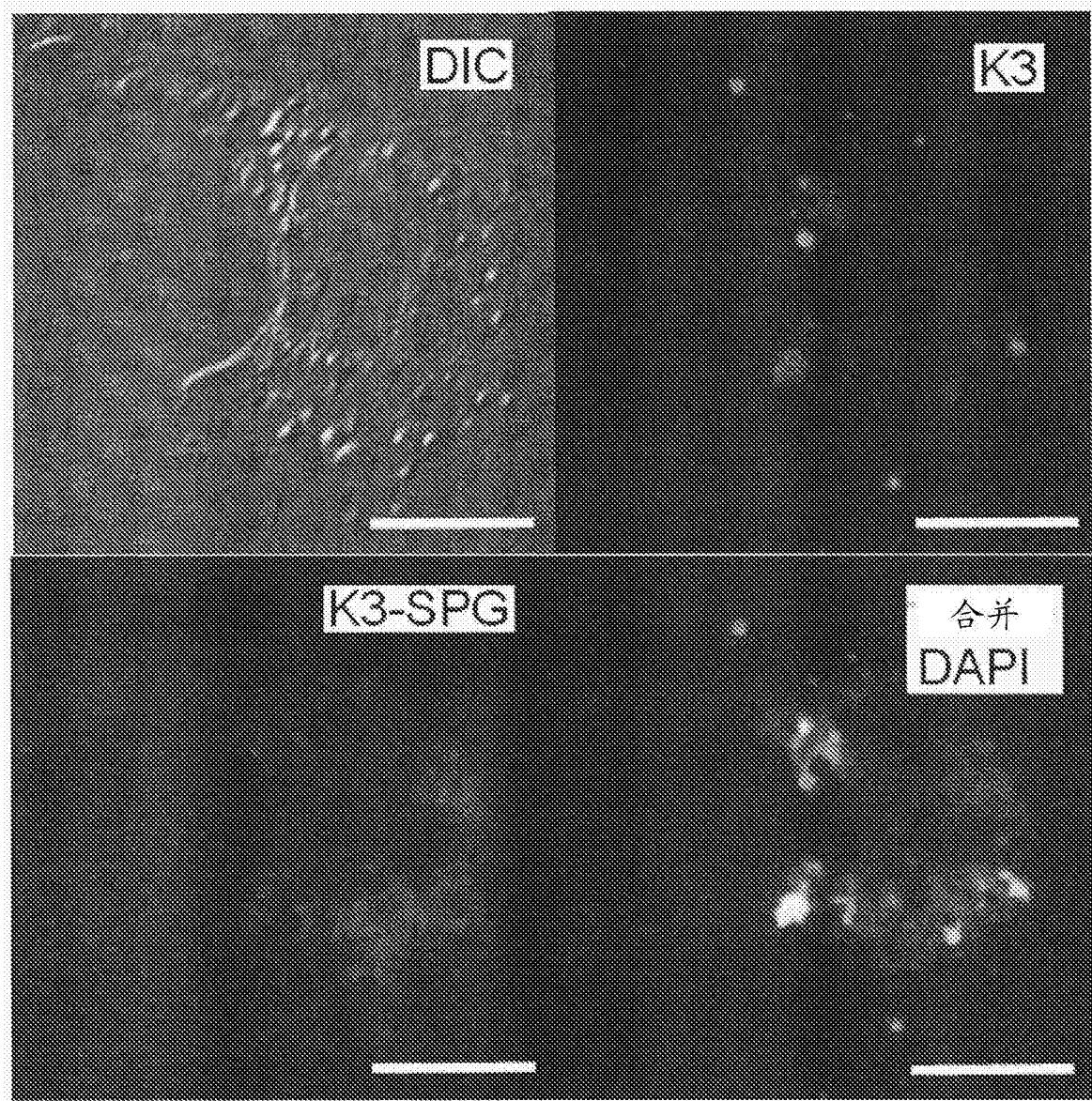


图 8

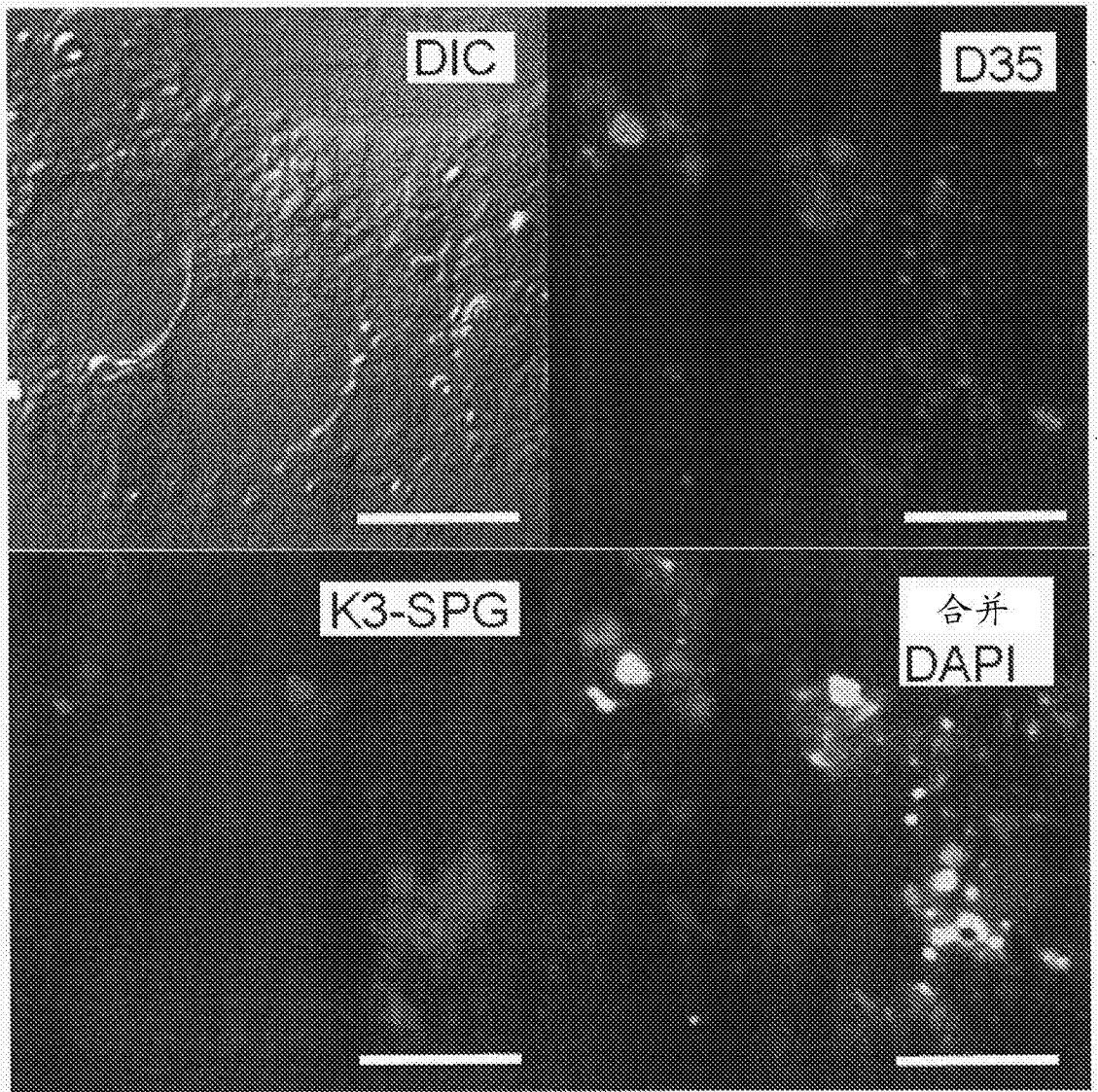


图 9

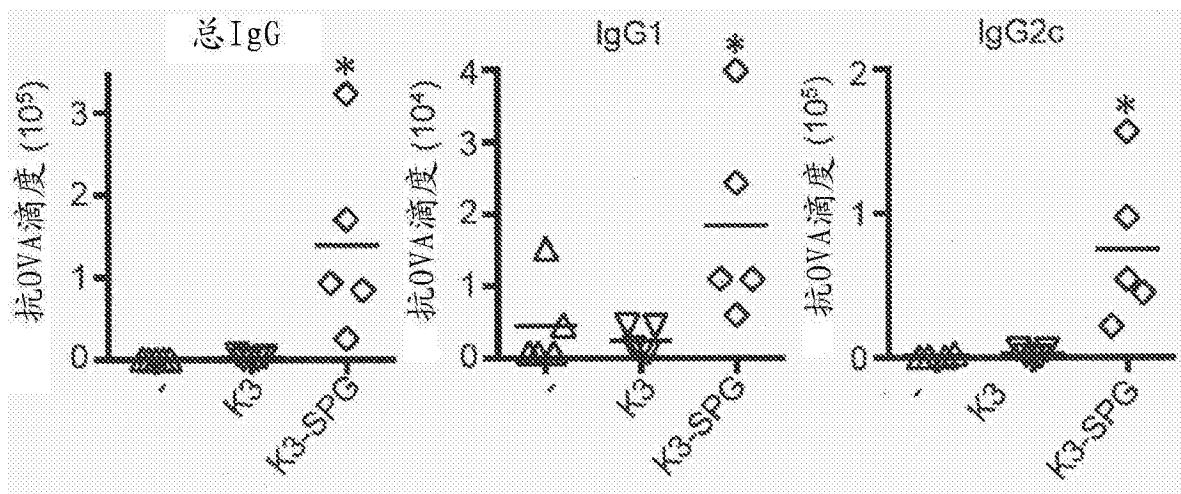


图 10

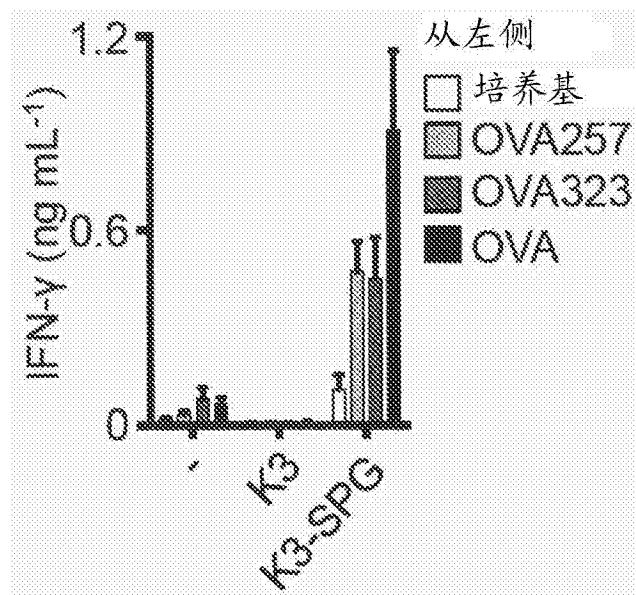


图 11

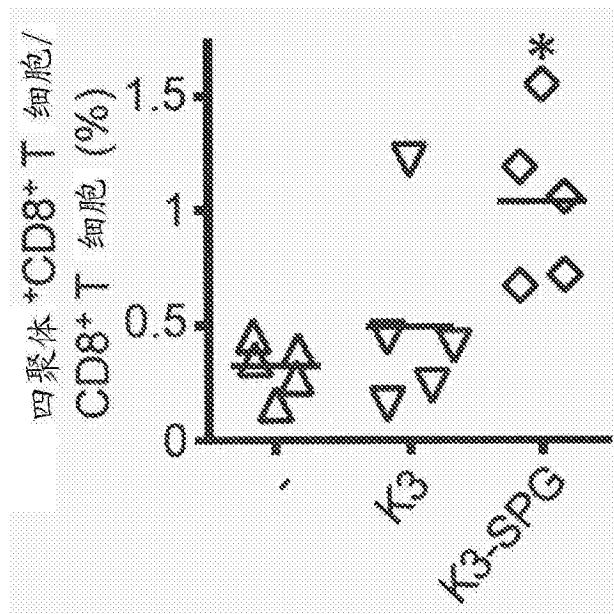


图 12

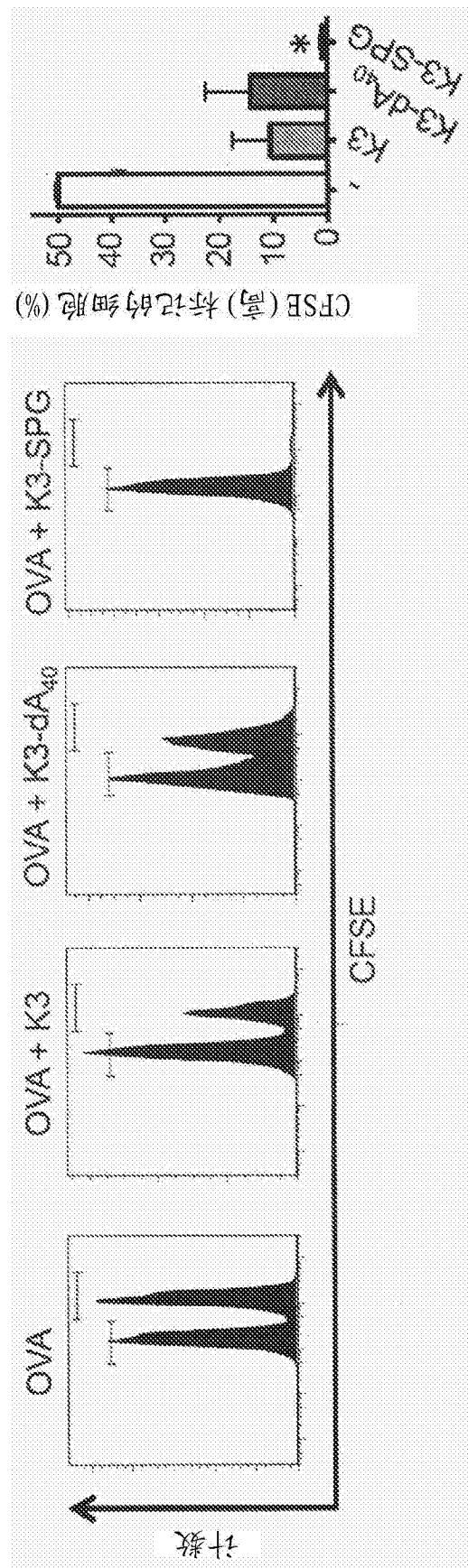


图 13

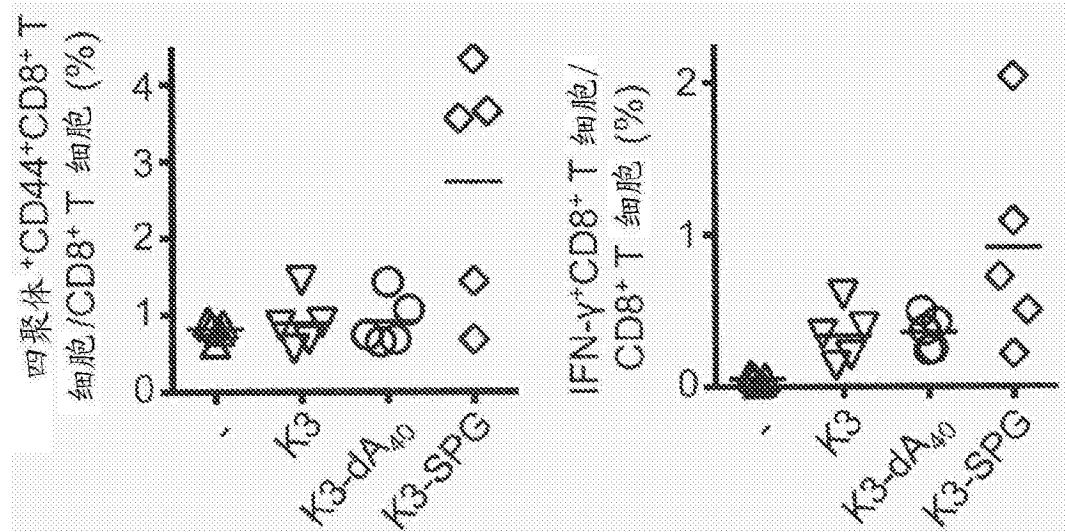


图 14

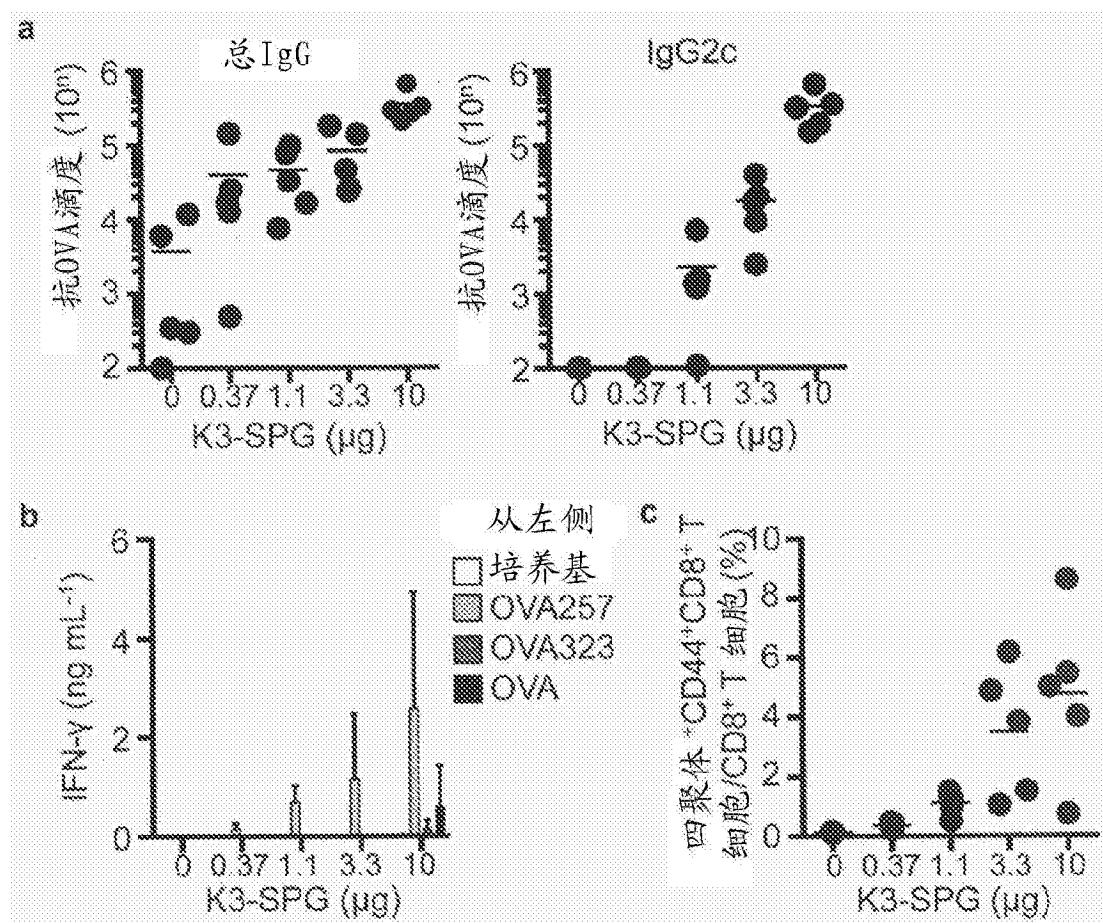


图 15

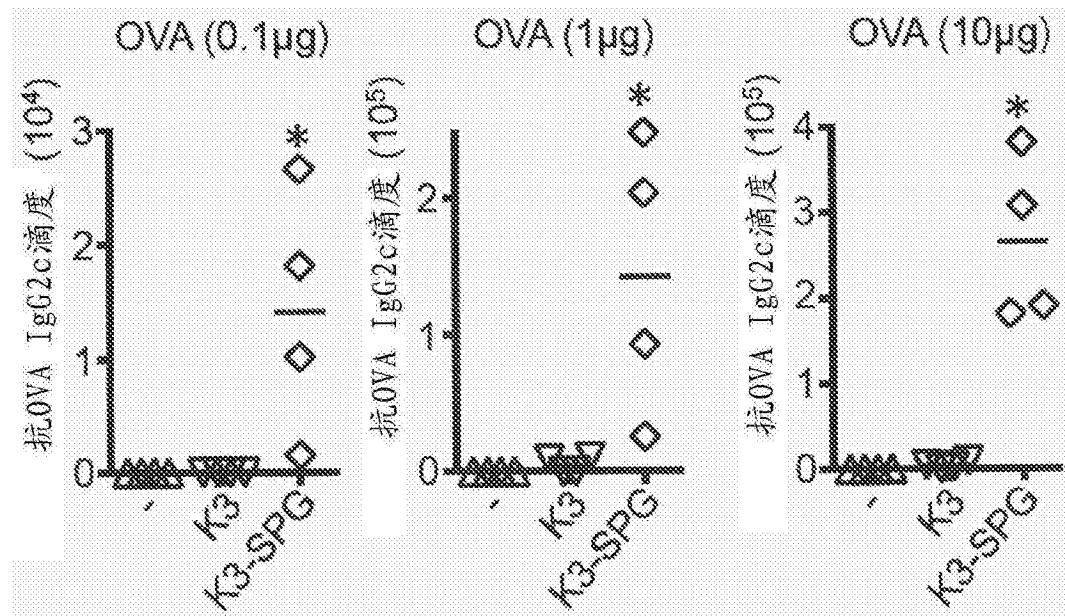


图 16

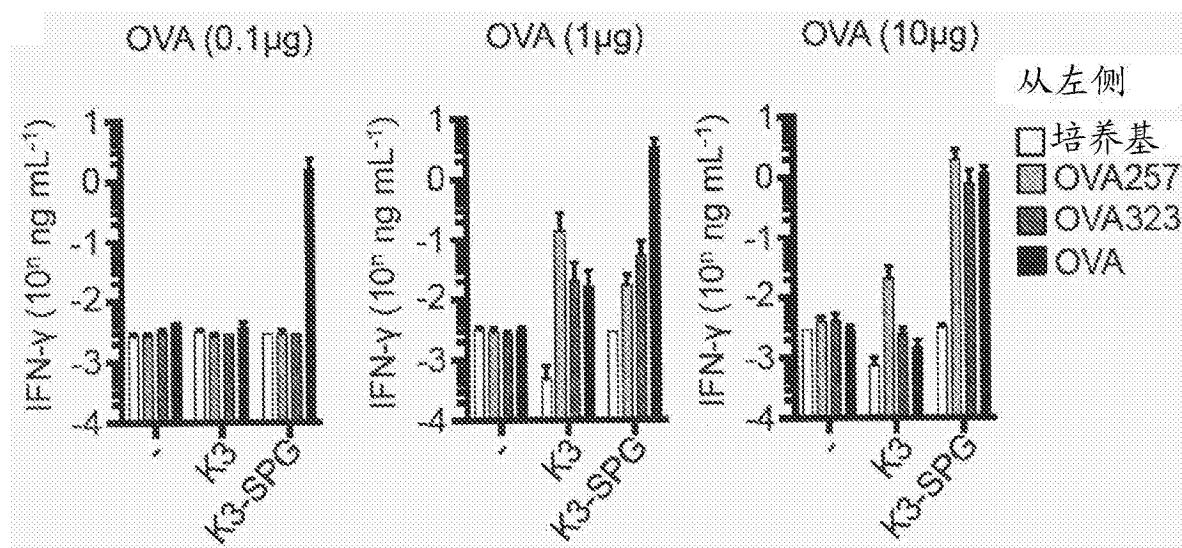


图 17

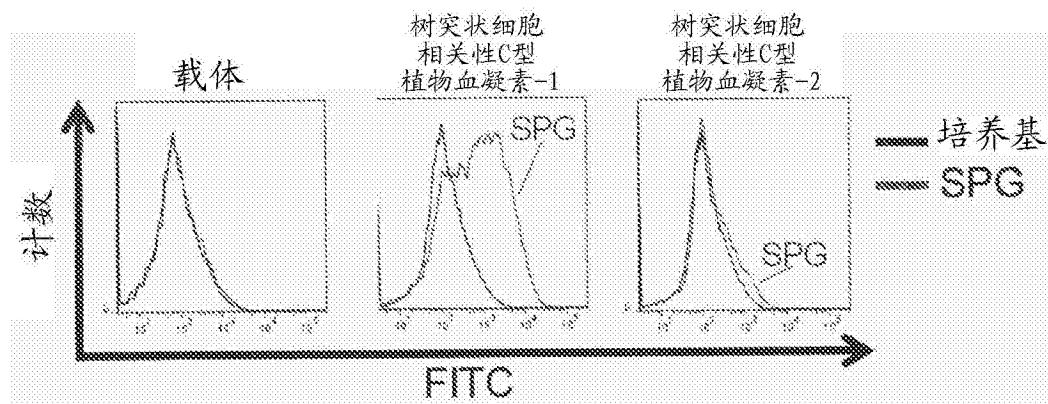


图 18

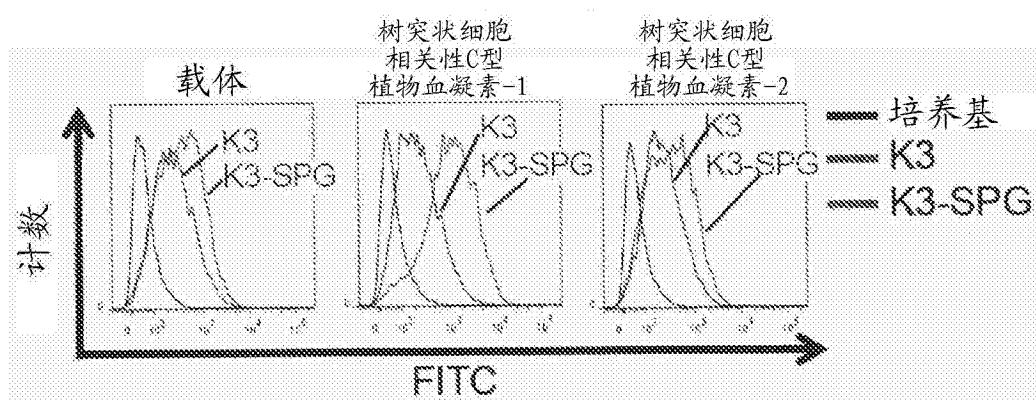


图 19

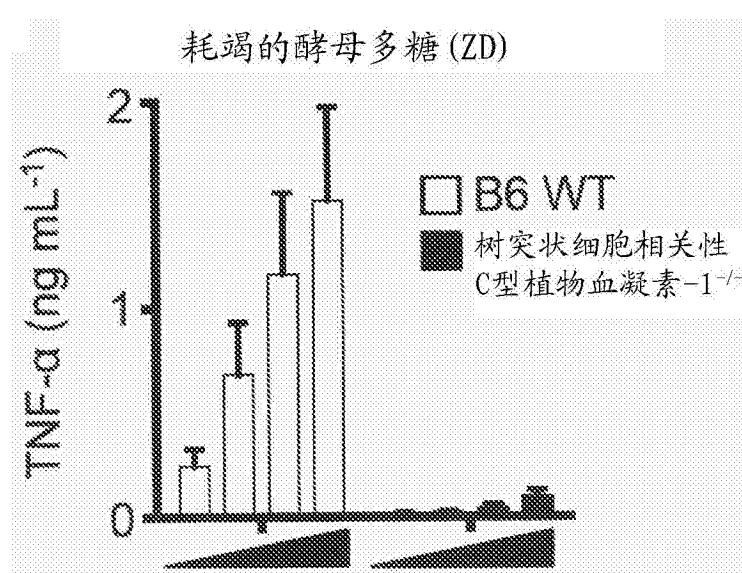


图 20

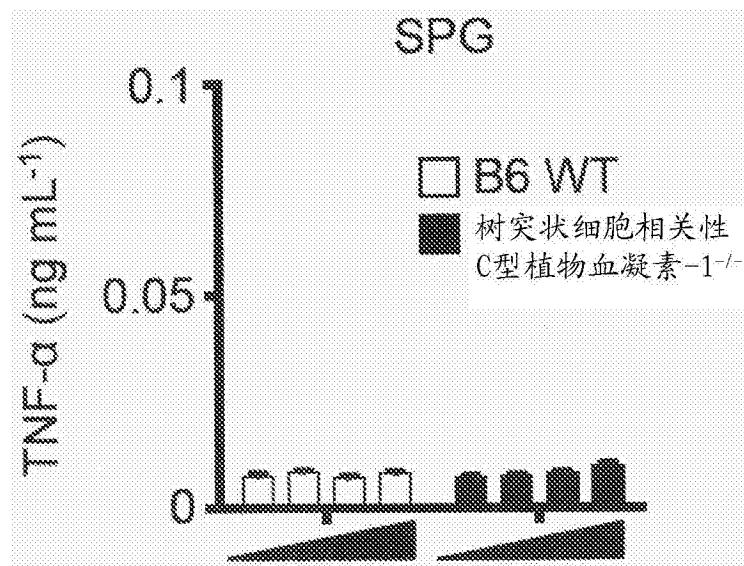


图 21

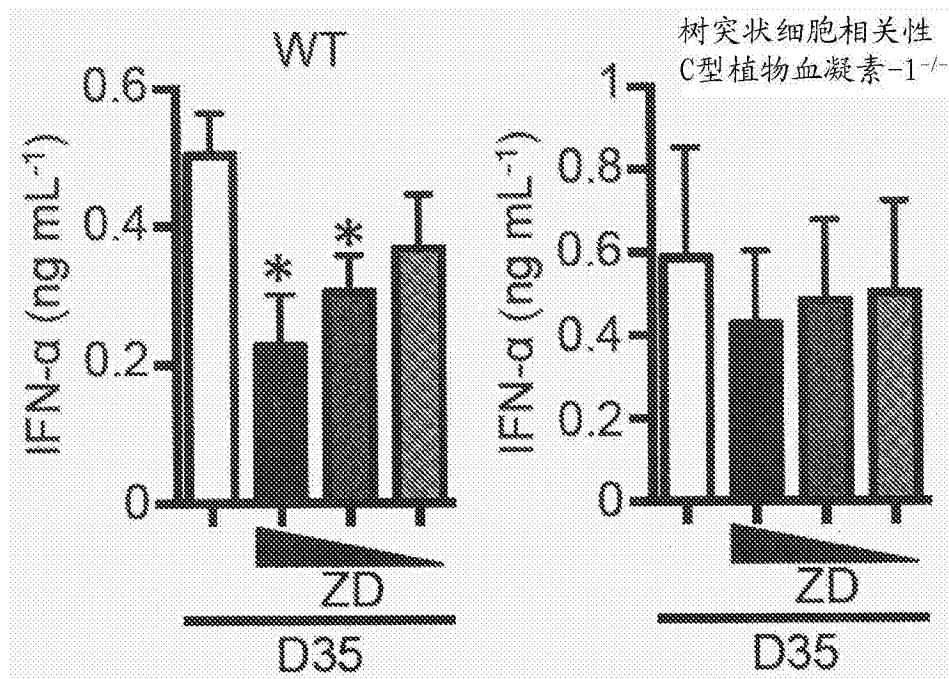


图 22

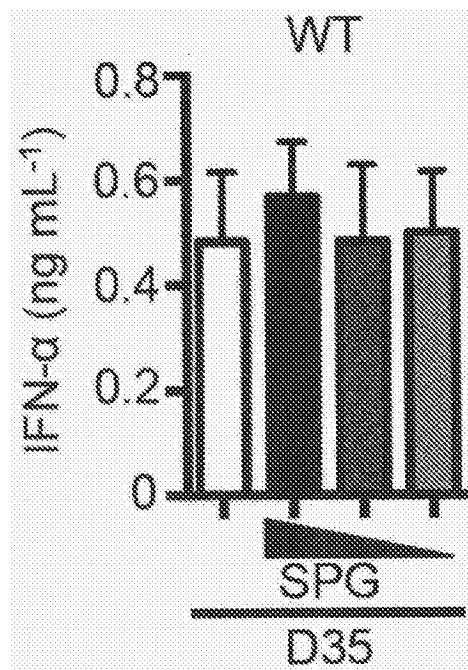


图 23

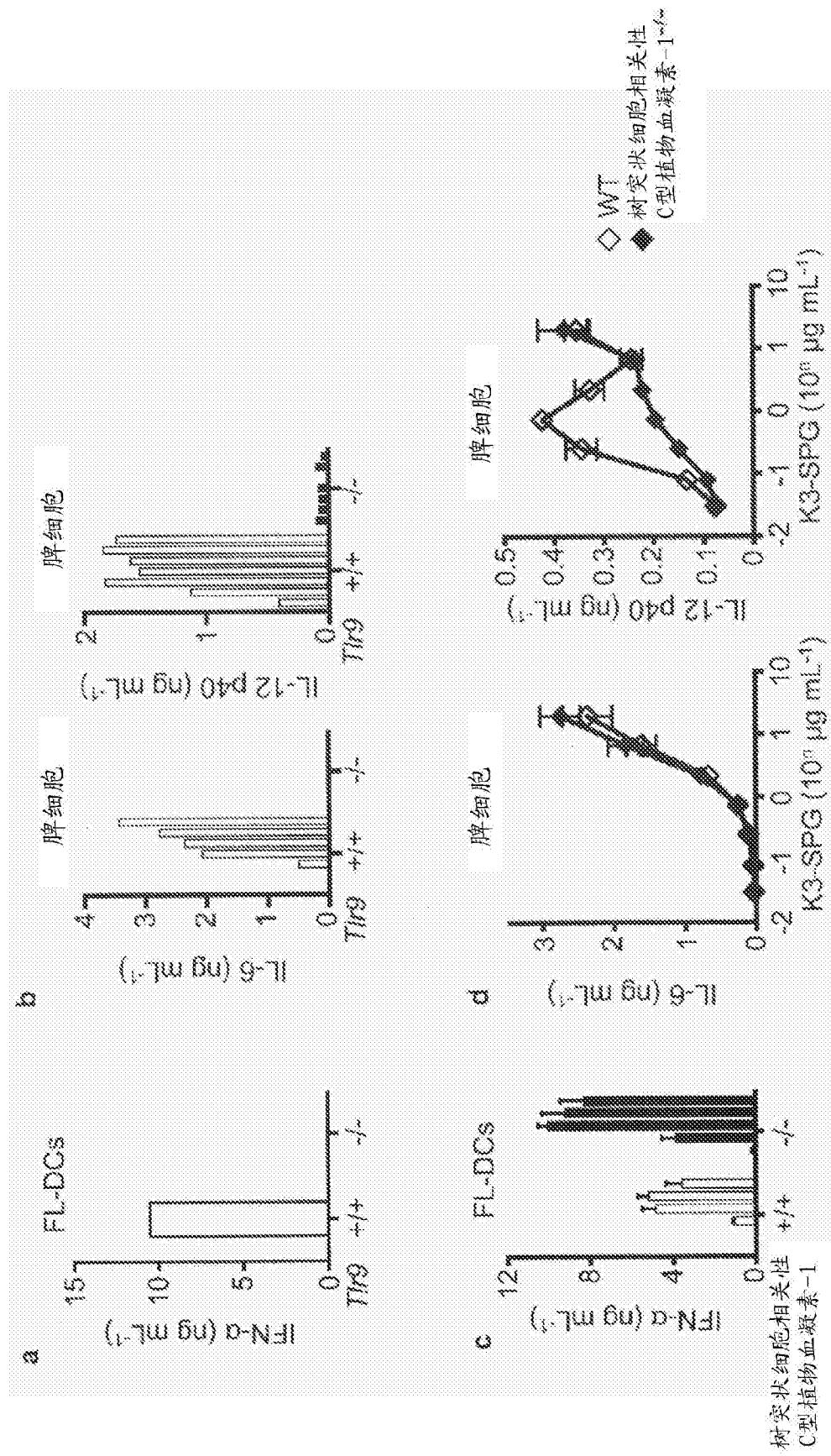


图 24

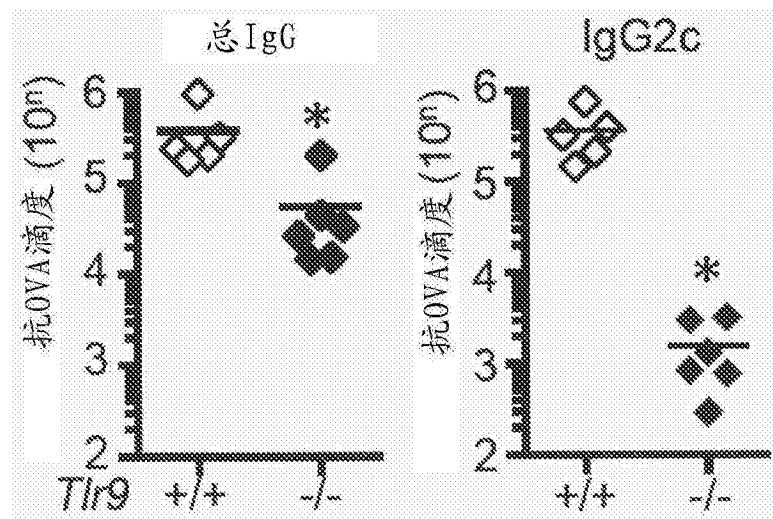


图 25

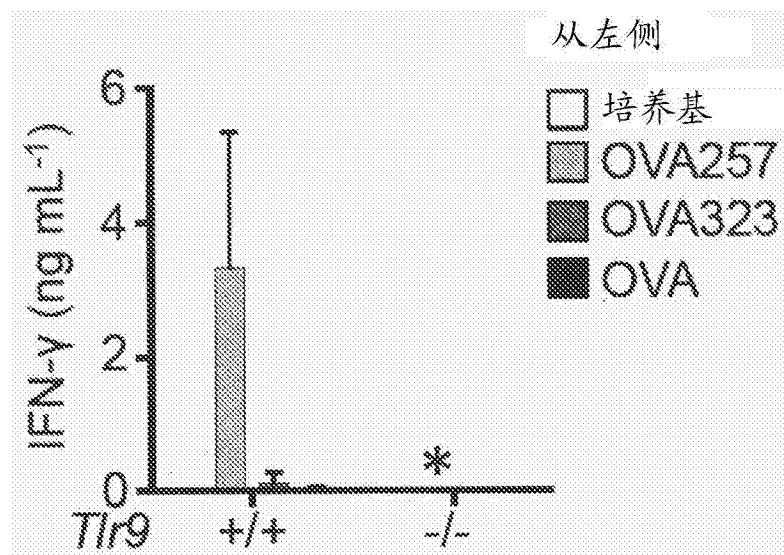


图 26

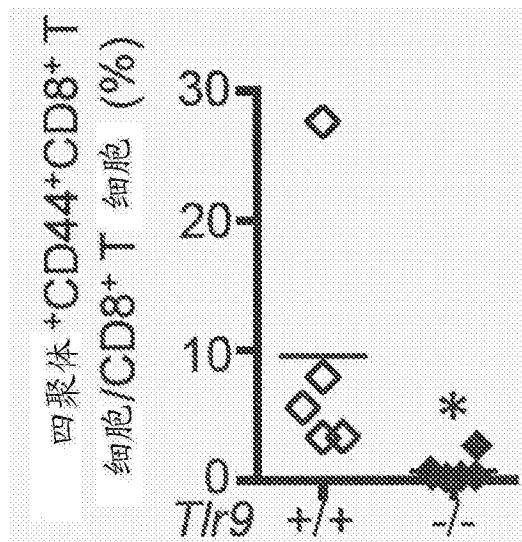


图 27

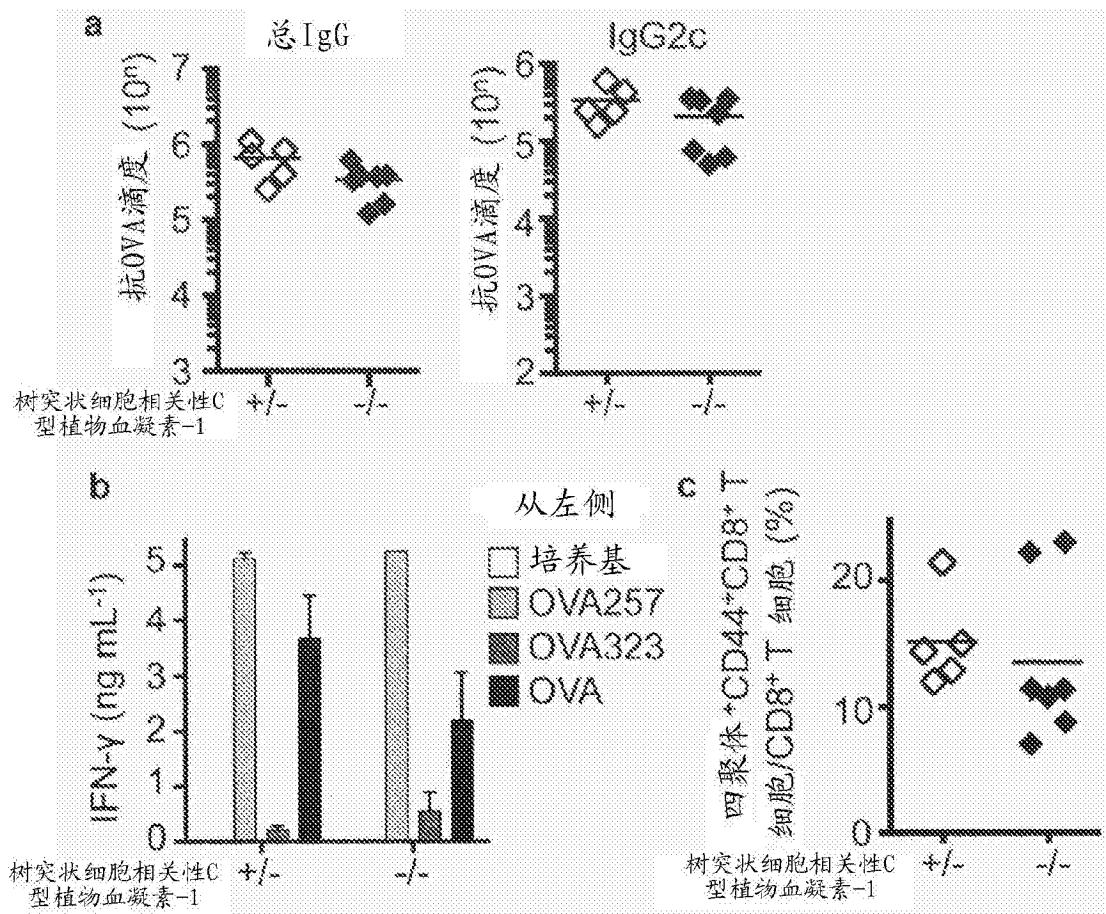


图 28

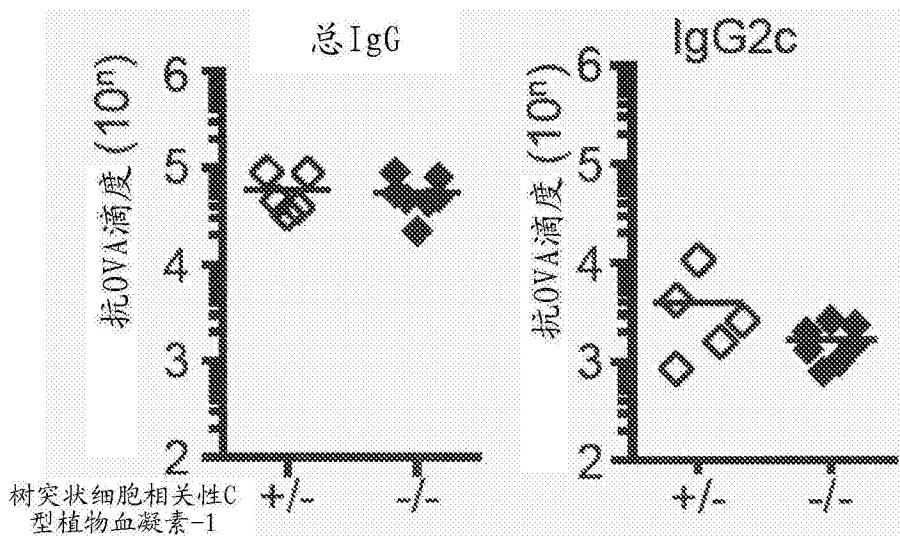


图 29

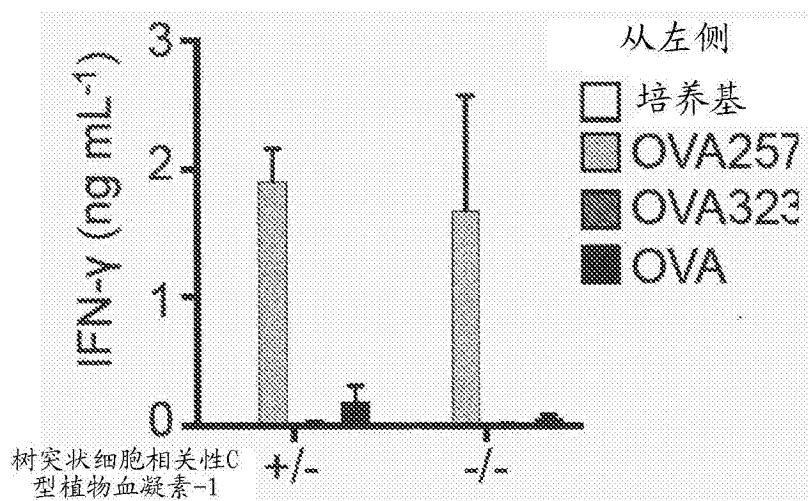


图 30

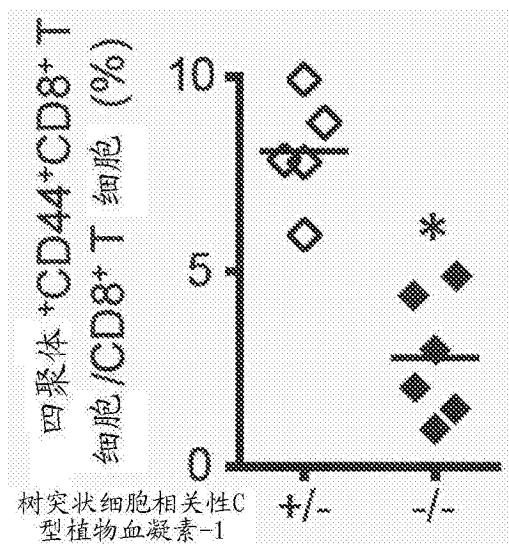


图 31

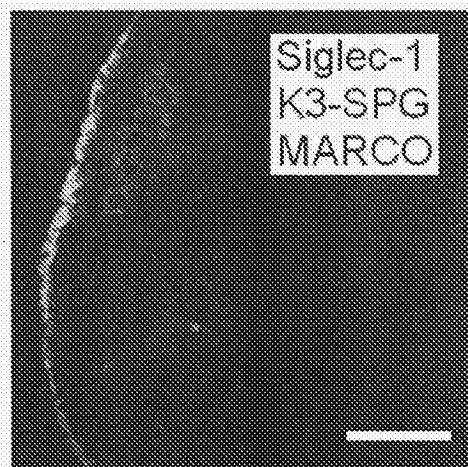


图 32

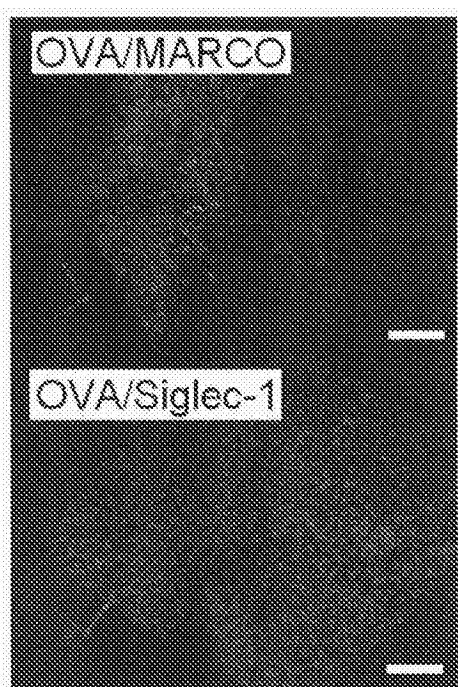


图 33

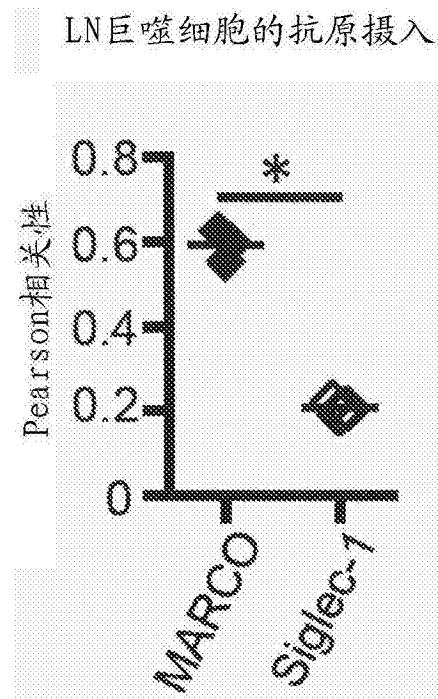


图 34

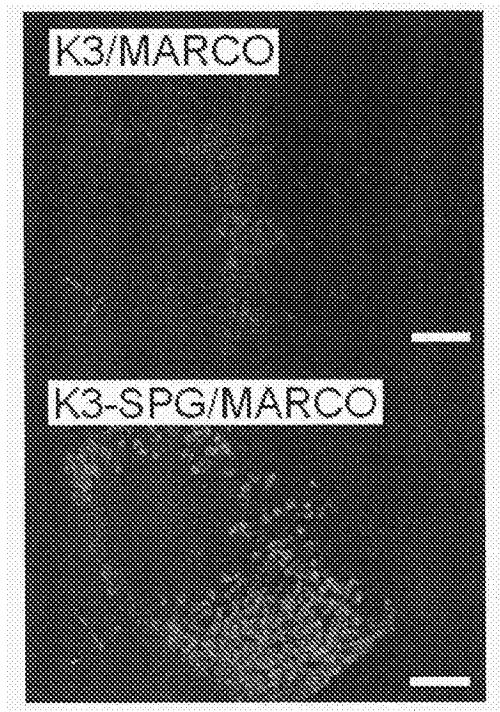


图 35

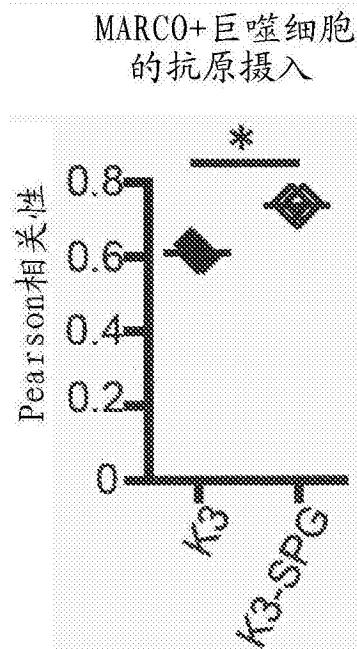


图 36

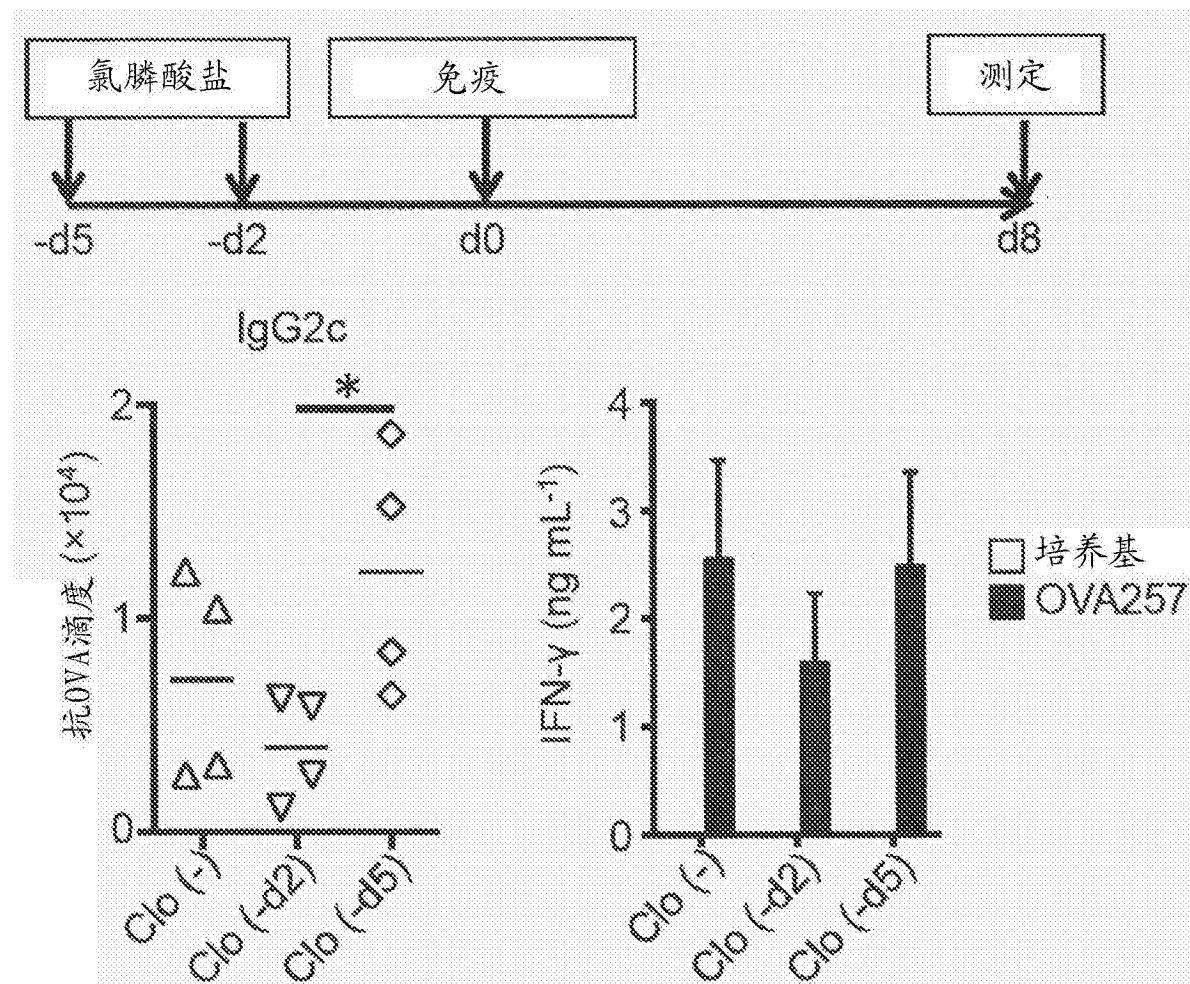


图 37

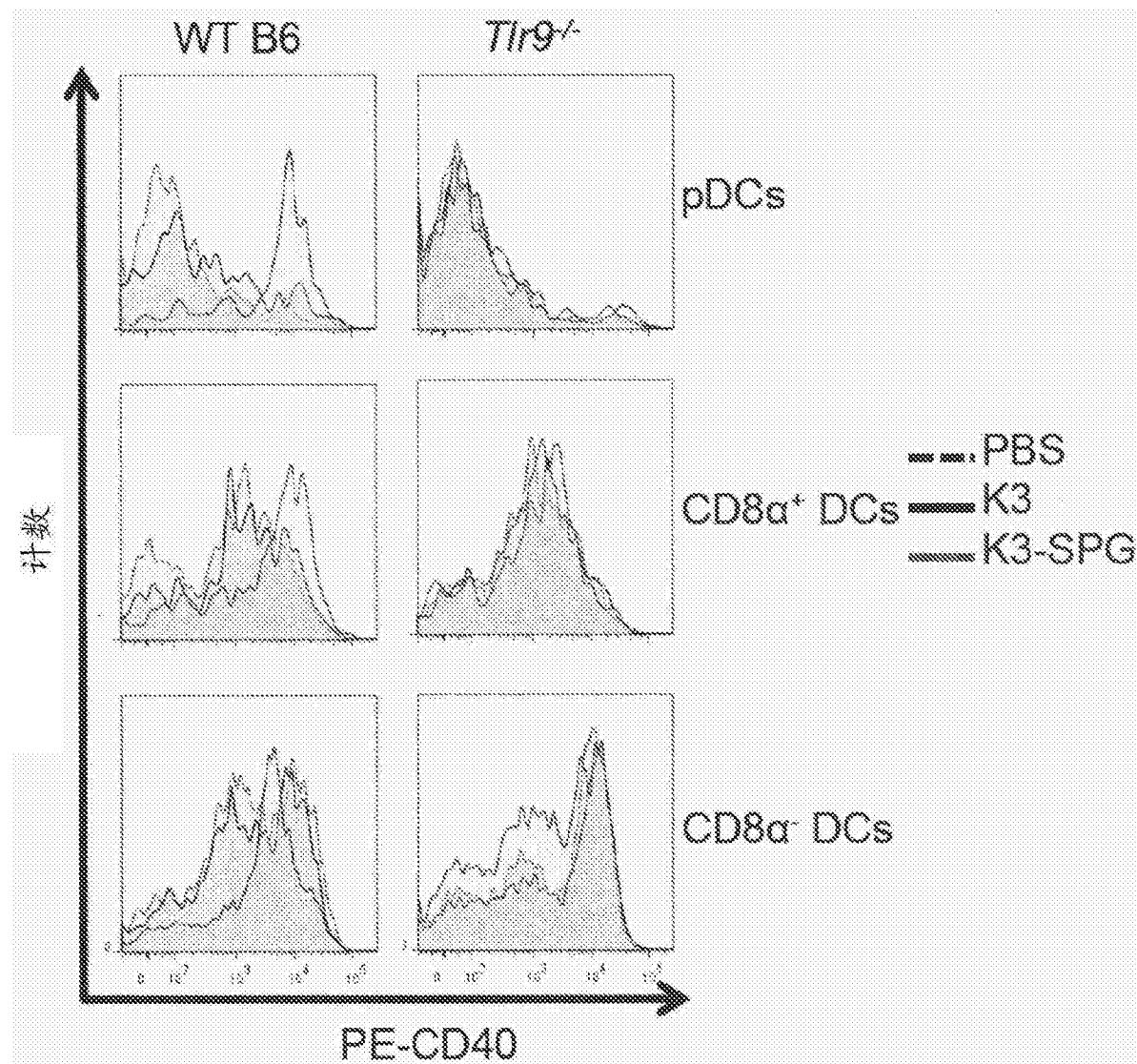


图 38

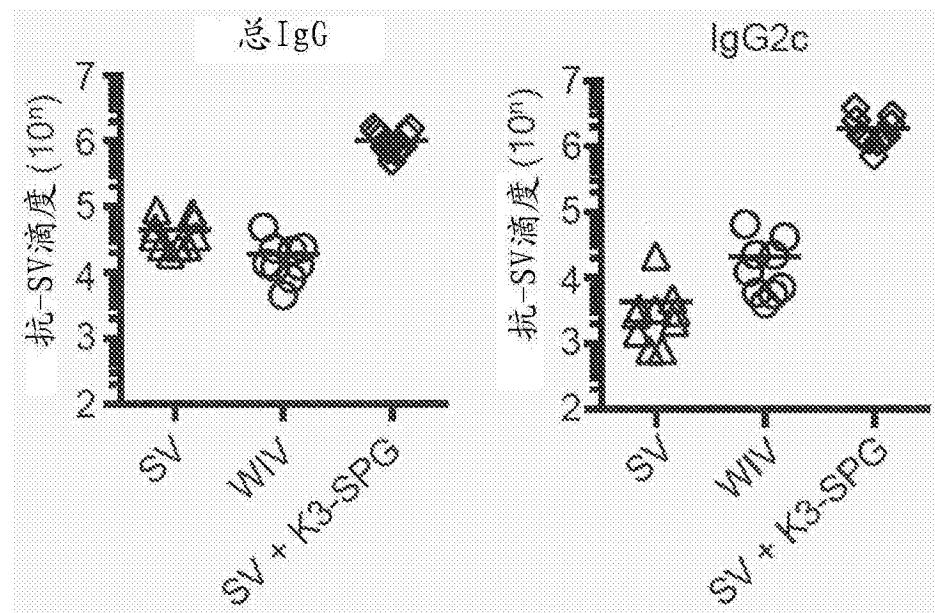


图 39

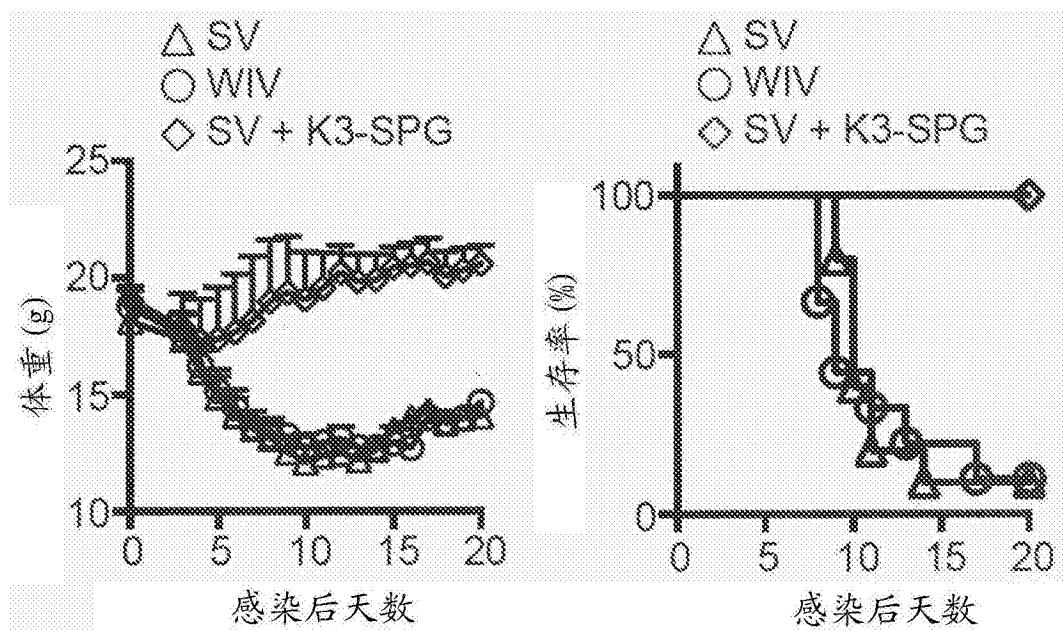


图 40

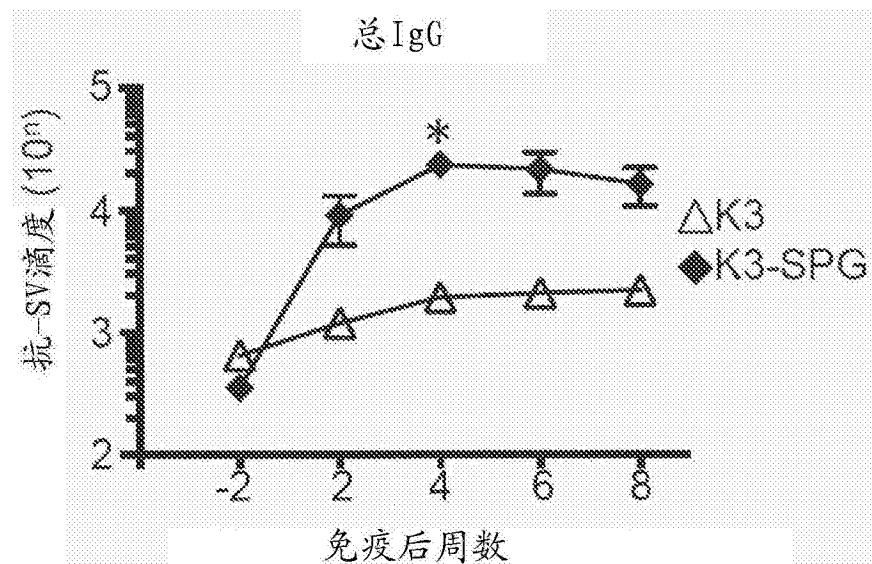


图 41

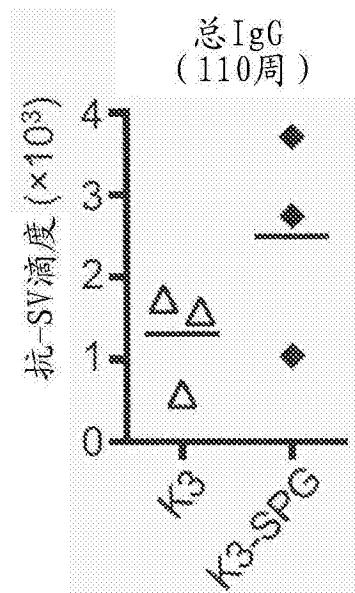


图 42

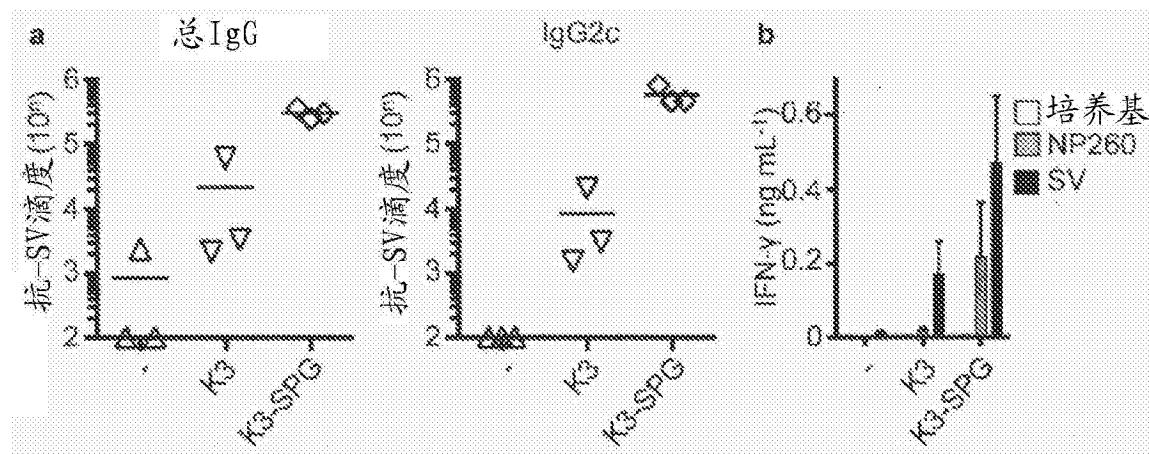


图 43

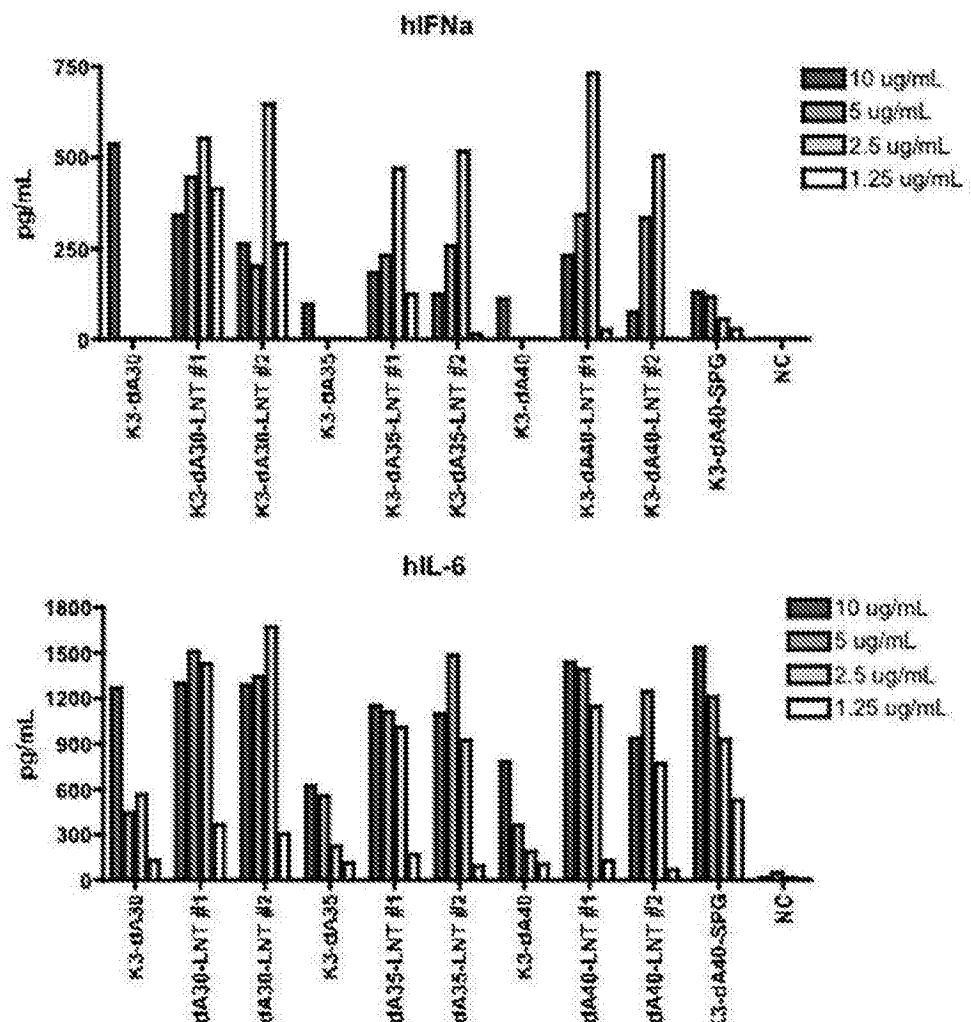


图 44

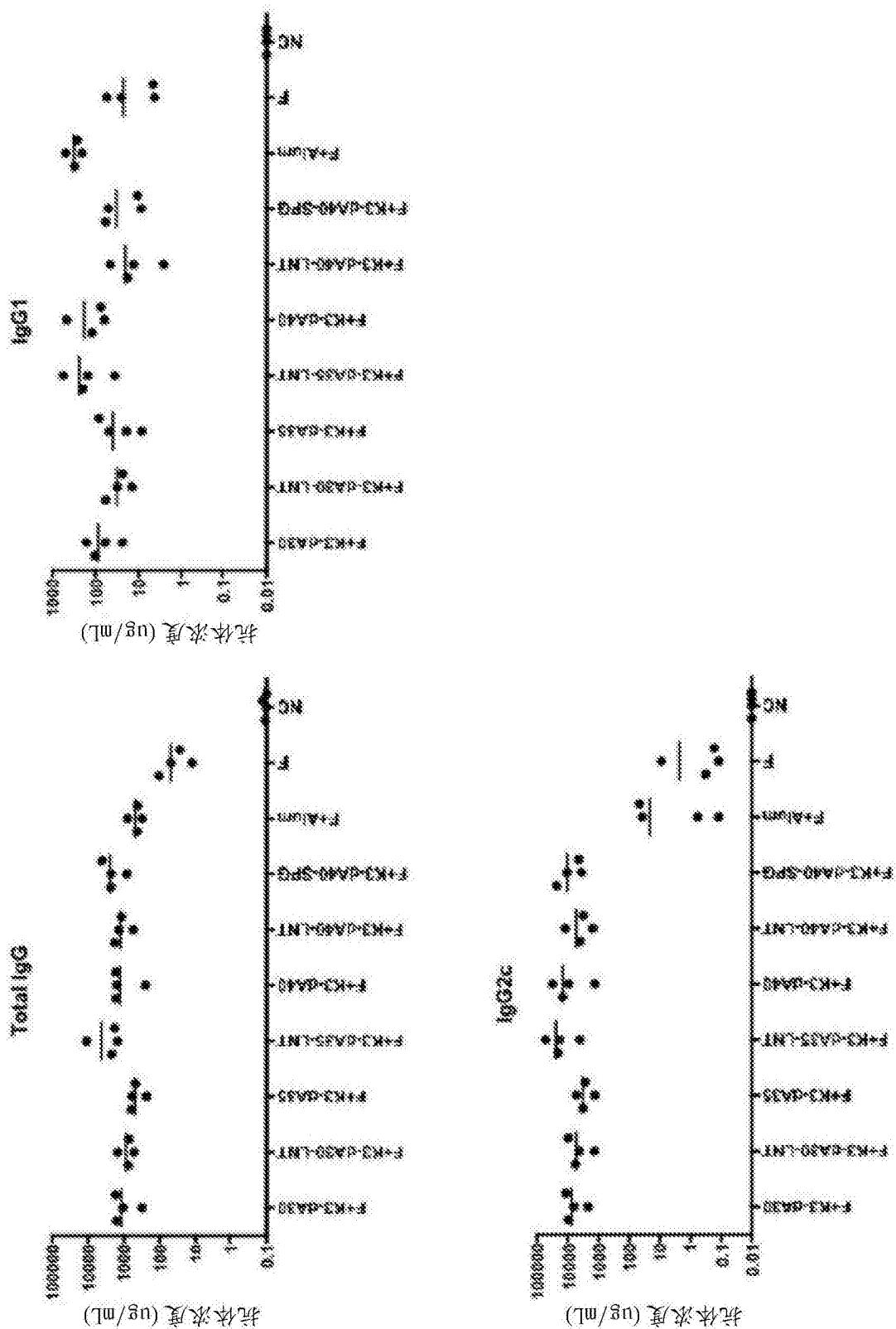


图 45

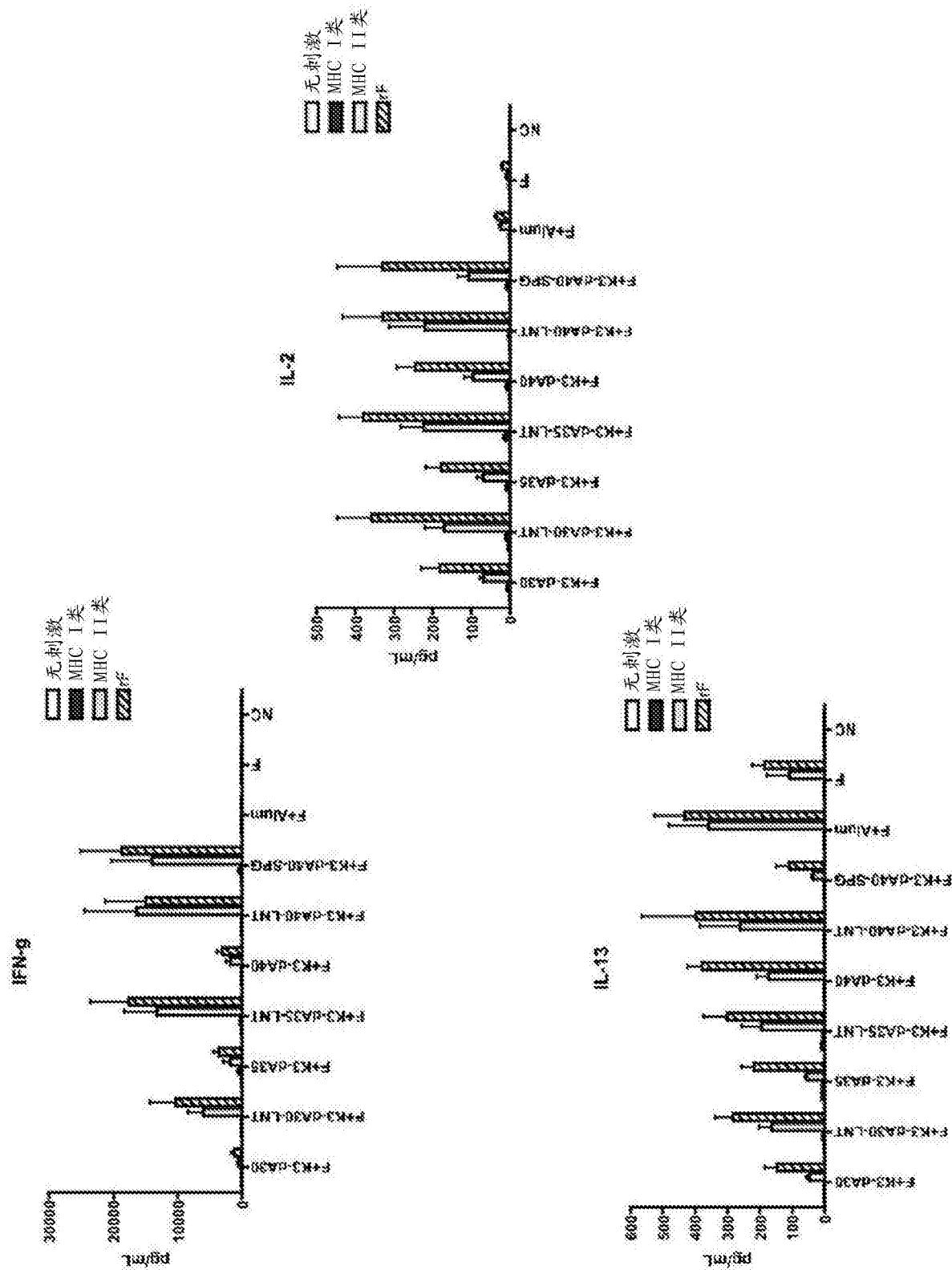


图 46

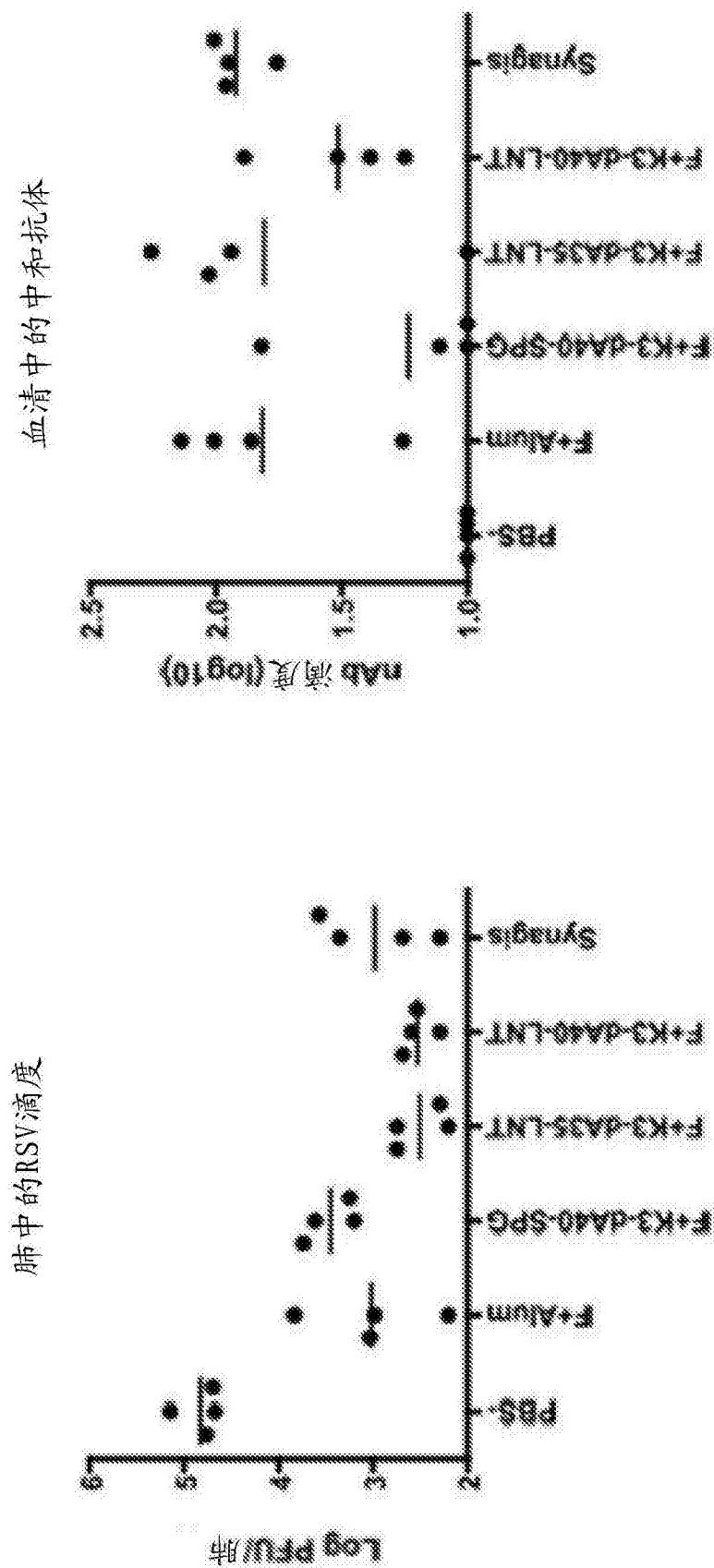


图 47