



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101821412 A

(43) 申请公布日 2010.09.01

(21) 申请号 200880111523.6

代理人 闵丹

(22) 申请日 2008.08.15

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

C12Q 1/68 (2006.01)

60/955,895 2007.08.15 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010.04.14

(86) PCT 申请的申请数据

PCT/US2008/073280 2008.08.15

(87) PCT申请的公布数据

W02009/023819 EN 2009. 02. 19

(71) 申请人 艾德拉药物股份有限公司

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 艾卡姆巴·R·坎迪马拉

拉克施米·巴加特

马利卡朱纳·普塔 王大庆

萨迪尔·阿格拉沃尔

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

权利要求书 2 页 说明书 26 页 附图 7 页

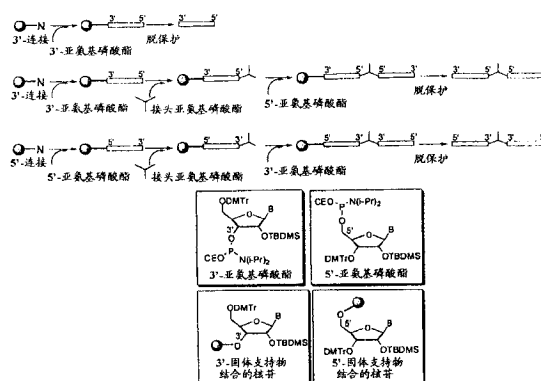
(54) 发明名称

TOLL 样受体调控剂

(57) 摘要

本发明涉及 TLR9 拮抗剂化合物及其治疗性或预防性用途。本发明提供了新的免疫调节寡核苷酸和免疫聚物作为 TLR 的拮抗剂及使用它们的方法。这些免疫调节寡核苷酸具有应答 TLR 配体或 TLR 信号传导激动剂而遏制但不完全消除 TLR 介导的信号传导的独特序列。该方法可用于自身免疫、炎症、炎性肠病、狼疮、变态反应、哮喘、感染、败血症、癌症和免疫缺陷的预防和治疗。

TLR 调控化合物的线性合成



1. 一种 TLR9 拮抗剂化合物,其包含具有结构 $5' - N_m - N_1 N_2 C_1 G_1 - N_p - N_3 N_4 C_2 G_2 - N_m - 3'$ 的基于寡核苷酸的化合物,其中 C_1 和 C_2 独立地为胞嘧啶或胞嘧啶衍生物,而 G_1 和 G_2 独立地为鸟苷或鸟苷衍生物,其中 C_1 和 G_1 中至少一项是经过修饰的核苷; N_1 和 N_2 在每次出现时独立地为核苷酸、2'-取代的(例如 2'-O-甲基)核苷酸或核苷酸衍生物或其它抑制 $C_1 G_1$ 之 TLR 刺激活性的封闭模块,前提是 N_1 或 N_2 中至少一项是抑制 $C_1 G_1$ 之 TLR 刺激活性的封闭模块; N_3 和 N_4 在每次出现时独立地为不抑制 $C_2 G_2$ 之 TLR 刺激活性的核苷酸或核苷酸衍生物; N_m 在每次出现时独立地为核苷酸、核苷酸衍生物或非核苷酸连接; N_p 在每次出现时独立地为核苷酸或核苷酸衍生物,前提是所述化合物含有少于 3 个连续鸟苷核苷酸;其中 m 是 0 至约 20 的数目,其中 p 是 0 至约 20 的数目;且其中所述寡核苷酸原本会是免疫刺激性的,但 2'-O-取代的核苷酸、核苷酸衍生物或其它抑制 $C_1 G_1$ 之 TLR 刺激活性的修饰的情况除外。

2. 依照权利要求 1 的 TLR9 拮抗剂化合物,其中所述化合物包含至少两条经由 2'、3' 或 5' 附着、或官能化核碱基附着、或其组合连接的寡核苷酸链。

3. 依照权利要求 2 的 TLR9 拮抗剂化合物,其中所述寡核苷酸是在它们的 2' 端、3' 端或 5' 端、或官能化核碱基处彼此直接连接的。

4. 依照权利要求 2 的 TLR9 拮抗剂化合物,其中所述寡核苷酸的 2' 端、3' 端或 5' 端、或官能化核碱基是连接至非核苷酸接头的。

5. 依照权利要求 4 的 TLR9 拮抗剂化合物,其中所述非核苷酸接头是烃基接头或氨基接头,其中所述烃基或氨基接头可以任选是分支的或不分支的,环状的或无环的,取代的或未取代的,饱和的或不饱和的,手性的、非手性的或外消旋的混合物。

6. 依照权利要求 5 的 TLR9 拮抗剂化合物,其中所述烃基接头具有约 2 个至约 18 个碳原子。

7. 依照权利要求 5 的 TLR9 拮抗剂化合物,其中所述烃基接头具有约 3 个至约 9 个碳原子。

8. 依照权利要求 5 的 TLR9 拮抗剂化合物,其中所述烃基接头选自 1,2,3- 丙三醇、1,2,4- 丁三醇、2- 羟甲基-1,3- 丙二醇、1,1,1- 三(羟甲基)乙烷、2- 氨基-2-(羟甲基)-1,3- 丙二醇、三(羟甲基)硝基甲烷、1,1,1- 三(羟甲基)丙烷、1,2,6- 己三醇、1,3,5- 己三醇、1,3,5- 戊三醇、3- 甲基-1,3,5- 戊三醇、1,2,3- 庚三醇、2-(羟甲基)-1,4- 丁二醇、1,3- 二(羟甲基)酚、1,3,5- 三(羟甲基)苯、1,3- 二(羟乙氧基)-2- 羟基-丙烷、1,3- 二(羟丙氧基)-2- 羟基-丙烷、D- 半乳糖、1,3,5- 三(2- 羟基乙基)氰尿酸、1,3,5- 三(4- 羟基苯基)苯、1,3- 丙二醇、1,2- 丙二醇、1,4- 丁二醇、1,3- 丁二醇、2,3- 丁二醇、1,4- 丁二醇、1,5- 戊二醇、2,4- 戊二醇、1,6- 己二醇、1,2- 己二醇、1,5- 己二醇、2,5- 己二醇、1,7- 庚二醇、1,8- 辛二醇、1,2- 辛二醇、1,9- 壬二醇、1,12- 十二烷二醇或 2-(1- 氨基丙基)-1,3- 丙二醇。

9. 一种药物组合物,其包含依照权利要求 1-8 任一项的 TLR9 拮抗剂化合物和药学可接受载体。

10. 一种用于降低脊椎动物中 TLR9 介导的免疫应答的方法,该方法包括以降低但不消除 TLR9 介导的免疫应答的量给所述脊椎动物施用依照权利要求 9 的药物组合物。

11. 一种用于治疗性处理患有降低 TLR9 介导的免疫应答有益的疾病或病症的脊椎动物的方法,该方法包括以药学有效量给患有此类病症或疾病的脊椎动物施用依照权利要求

9 的药物组合物。

12. 依照权利要求 11 的方法,其中所述疾病或病症选自癌症、自身免疫性疾病、气道炎症、炎性疾病、传染病、疟疾、莱姆病、眼部感染、皮肤病症、银屑病、硬皮病、心血管疾病、动脉粥样硬化、慢性疲劳综合征、结节病、变态反应、哮喘或由病原体引起的疾病。

13. 依照权利要求 12 的方法,其中所述自身免疫性病症选自红斑狼疮、多发性硬化、I 型糖尿病、肠易激综合征、克罗恩氏病、类风湿性关节炎、败血症性休克、普秃、急性播散性脑脊髓炎、阿狄森氏病、强直性脊柱炎、抗磷脂抗体综合征、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、大疱性类天疱疮、查加斯病、慢性阻塞性肺病、腹部疾病、皮炎、子宫内膜异位症、古德帕斯丘氏综合征、格雷夫斯氏病、格巴二氏综合征、桥本氏病、化脓性汗腺炎、特发性血小板减少性紫癜、间质性膀胱炎、硬斑病、重症肌无力、发作性睡病、神经性肌强直、天疱疮、恶性贫血、多肌炎、原发性胆汁性肝硬化、精神分裂症、斯耶格伦氏综合征、颞动脉炎(“巨细胞动脉炎”)、血管炎、白癜风、外阴痛和韦格纳氏肉芽肿病。

14. 依照权利要求 12 的方法,其中所述炎性病症选自气道炎症、哮喘、自身免疫性疾病、慢性炎症、慢性前列腺炎、肾小球肾炎、贝切特氏病、超敏感性、炎性肠病、再灌注损伤、类风湿性关节炎、移植排斥、溃疡性结肠炎、葡萄膜炎、结膜炎和血管炎。

15. 一种用于在脊椎动物中预防降低 TLR9 介导的免疫应答有益的疾病或病症的方法,该方法包括以药有效量给易患此类病症或疾病的脊椎动物施用依照权利要求 9 的药物组合物。

16. 依照权利要求 15 的方法,其中所述疾病或病症选自癌症、自身免疫性病症、气道炎症、炎性病症、传染病、疟疾、莱姆病、眼部感染、结膜炎、皮肤病症、银屑病、硬皮病、心血管疾病、动脉粥样硬化、慢性疲劳综合征、结节病、移植排斥、变态反应、哮喘或由病原体引起的疾病。

17. 依照权利要求 16 的方法,其中所述自身免疫性病症选自红斑狼疮、多发性硬化、I 型糖尿病、肠易激综合征、克罗恩氏病、类风湿性关节炎、败血症性休克、普秃、急性播散性脑脊髓炎、阿狄森氏病、强直性脊柱炎、抗磷脂抗体综合征、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、大疱性类天疱疮、查加斯病、慢性阻塞性肺病、腹部疾病、皮炎、子宫内膜异位症、古德帕斯丘氏综合征、格雷夫斯氏病、格巴二氏综合征、桥本氏病、化脓性汗腺炎、特发性血小板减少性紫癜、间质性膀胱炎、硬斑病、重症肌无力、发作性睡病、神经性肌强直、天疱疮、恶性贫血、多肌炎、原发性胆汁性肝硬化、精神分裂症、斯耶格伦氏综合征、颞动脉炎(“巨细胞动脉炎”)、血管炎、白癜风、外阴痛和韦格纳氏肉芽肿病。

18. 依照权利要求 16 的方法,其中所述炎性病症选自气道炎症、哮喘、自身免疫性疾病、慢性炎症、慢性前列腺炎、肾小球肾炎、贝切特氏病、超敏感性、炎性肠病、再灌注损伤、类风湿性关节炎、移植排斥、溃疡性结肠炎、葡萄膜炎、结膜炎和血管炎。

19. 依照权利要求 10-18 任一项的方法,其中施用路径是胃肠外、粘膜投递、口服、舌下、经皮、表面、吸入、鼻内、气溶胶、眼内、气管内、直肠内、阴道、通过基因枪、皮肤贴片或滴眼剂或漱口水形式。

20. 依照权利要求 10-19 任一项的方法,包括进一步施用一种或多种疫苗、抗原、抗体、细胞毒剂、变应原、抗生素、反义寡核苷酸、TLR 激动剂、TLR 拮抗剂、siRNA、miRNA、蛋白质、基因疗法载体、DNA 疫苗、佐剂、共刺激分子或其组合。

TOLL 样受体调控剂

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求 2007 年 8 月 15 日提交的美国临时申请流水号 60/955,895 的权益,通过述及将其内容完整收入本文。

发明领域

[0003] 一般而言,本发明涉及免疫学领域和使用基于寡核苷酸的化合物作为免疫调控剂的免疫疗法应用。更具体地,本发明涉及经由 TLR 调控免疫调节的基于经过化学修饰的寡核苷酸的化合物及使用它们的方法。

[0004] 发明背景

[0005] 基于应答中牵涉的细胞子集,免疫应答牵涉先天性和适应性应答两者。例如,经典的细胞介导的功能(诸如迟发型超敏感性和细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)活化)中牵涉的 T 辅助(Th)细胞是 Th1 细胞,而作为 B 细胞活化的辅助细胞牵涉的 Th 细胞是 Th2 细胞。免疫应答的类型受到响应抗原暴露而生成的细胞因子和趋化因子的影响。细胞因子通过影响 T 辅助细胞 1(Th1)和 T 辅助细胞 2(Th2)的平衡(其直接影响发生的免疫应答的类型)而为控制免疫应答提供一种手段。若平衡朝向更高数目的 Th1 细胞,则发生细胞介导的免疫应答,包括细胞毒性 T 细胞(例如 CTL)活化。在平衡朝向更高数目的 Th2 细胞时,则发生体液的或抗体的免疫应答。这每一种免疫应答导致不同的一组细胞因子自 Th1 和 Th2 细胞分泌。由 Th1 和 Th2 细胞分泌的细胞因子的差异可能是这两种 T 细胞子集的不同生物学功能的结果。

[0006] Th1 细胞牵涉身体对抗原(例如病毒感染、细胞内病原体、和肿瘤细胞)的先天性应答。对抗原的初始应答可以是自抗原呈递细胞(例如活化的巨噬细胞和树突细胞)分泌 IL-12 和伴随的 Th1 细胞活化。活化 Th1 细胞的结果是某些细胞因子(例如 IL-2、IFN- γ 和其它细胞因子)的分泌和伴随的抗原特异性 CTL 的活化。已知 Th2 细胞响应细菌、寄生物、抗原和变应原而活化,并且可经由分泌某些细胞因子(例如 IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10、IL-13 和其它细胞因子)和趋化因子而介导身体的适应性免疫应答(例如 IgM 和 IgG 生成和嗜曙红细胞活化)。这些细胞因子中某些的分泌可导致 B 细胞增殖和抗体生成升高。另外,这些细胞因子中的某些可刺激或抑制其它细胞因子的释放(例如 IL-10 抑制自 Th1 细胞分泌 IFN- γ 和自树突细胞分泌 IL-12)。Th1 和 Th2 细胞之间的平衡及响应选定的刺激物而释放的细胞因子和趋化因子能在身体的免疫系统如何响应疾病中具有重要作用。例如,IFN- α 可抑制丙型肝炎,而 MIP-1 α 和 MIP-1 β (分别也称为 CCL3 和 CCL4)可抑制 HIV-1 感染。Th1/Th2 免疫应答的最佳平衡呈现使用免疫系统治疗和预防多种疾病的机会。

[0007] 在哺乳动物中,可以通过例如引入细菌或含有非甲基化 CpG 二核苷酸的合成 DNA 来诱导 Th1 免疫应答,该免疫应答源自于特定寡核苷酸序列(例如非甲基化的 CpG)被呈递给某些免疫细胞上称为样式识别受体(PRR)的受体。这些 PRR 中的某些是 Toll 样受体(TLR)。

[0008] 在响应微生物感染而诱导先天性免疫应答中紧密牵涉 Toll 样受体(TLR)。在脊

椎动物中,已知称作 Toll 样受体的十种蛋白质 (TLR1 至 TLR10) 的一个家族识别病原体相关分子样式。在这十种蛋白质中,已知 TLR3、7、8、和 9 位于细胞内的内体中,而且识别核酸 (DNA 和 RNA) 和小分子诸如核苷和核酸代谢物。已知 TLR3 和 TLR9 分别识别存在于病毒的和细菌的和合成的 DNA 中的核酸诸如 dsRNA 和非甲基化 CpG 二核苷酸。已经显示了,细菌 DNA 活化免疫系统和抗肿瘤活性 (Tokunaga T 等, J. Natl. Cancer Inst. (1984) 72 :955-962 ; Shimada S 等, Jpn. H cancer Res, 1986, 77, 808-816 ; Yamamoto S 等, Jpn. J. Cancer Res. , 1986, 79, 866-73 ; Messina, J 等, J. Immunol. (1991) 147 :1759-1764)。使用含有 CpG 二核苷酸的反义寡核苷酸的其它研究已经显示了免疫应答的刺激 (Zhao Q 等, Biochem. Pharmacol. 1996, 26, 173-82)。随后的研究显示了 TLR9 识别存在于细菌的和合成的 DNA 中的非甲基化 CpG 基序 (Hemmi H 等, Nature. (2000) 408 :740-5)。对含有 CpG 的硫代磷酸酯寡核苷酸的其它修饰也能影响它们经由 TLR9 起免疫应答调控物作用的能力 (参见例如 Zhao 等, Biochem. Pharmacol. (1996) 51 :173-182 ; Zhao 等, Biochem Pharmacol. (1996) 52 : 1537-1544 ; Zhao 等, Antisense Nucleic Acid Drug Dev. (1997) 7 :495-502 ; Zhao 等, Bioorg. Med. Chem. Lett. (1999) 9 :3453-3458 ; Zhao 等, Bioorg. Med. Chem. Lett. (2000) 10 : 1051-1054 ; Yu 等, Bioorg. Med. Chem. Lett. (2000) 10 :2585-2588 ; Yu 等, Bioorg. Med. Chem. Lett. (2001) 11 :2263-2267 ; 及 Kandimalla 等, Bioorg. Med. Chem. (2001) 9 :807-813)。另外,结构活性关系研究已经容许鉴定如下的合成基序和新的基于 DNA 的结构,它们诱导的特异性免疫应答序型 (profile) 与那些源自于非甲基化 CpG 二核苷酸的截然不同 (Kandimalla ER 等, Proc Natl Acad Sci U S A. (2005) 102 :6925-30. Kandimalla ER 等, Proc Natl Acad Sci U S A. (2003) 100 :14303-8. Cong YP 等, Biochem Biophys Res Commun. (2003) 310 :1133-9. Kandimalla ER 等, Biochem Biophys Res Commun. (2003) 306 : 948-53. Kandimalla ER 等, Nucleic Acids Res. (2003) 31 :2393-400. Yu D 等, Bioorg Med Chem. (2003) 11 :459-64. Bhagat L 等, Biochem Biophys Res Commun. (2003) 300 :853-61. Yu D 等, Nucleic Acids Res. (2002) 30 :4460-9. Yu D 等, J Med Chem. (2002) 45 :4540-8. Yu D 等, Biochem Biophys Res Commun. (2002) 297 :83-90. Kandimalla ER 等, Bioconjug Chem. (2002) 13 :966-74. Yu D, K 等, Nucleic Acids Res. (2002) 30 :1613-9. Yu D 等, Bioorg Med Chem. (2001) 9 :2803-8. Yu D 等, Bioorg Med Chem Lett. (2001) 11 :2263-7. Kandimalla ER 等, Bioorg Med Chem. (2001) 9 :807-13. Yu D 等, Bioorg Med Chem Lett. (2000) 10 : 2585-8. Putta MR 等, Nucleic Acids Res. (2006) 34 :3231-8)。

[0009] 含有核糖或脱氧核糖的寡核苷酸和寡脱氧核苷酸已经在极其多种领域中使用,包括但不限于诊断探测、PCR 引发、基因表达的反义抑制、siRNA、微小 RNA、适体、核酶、和基于 Toll 样受体 (TLR) 的免疫治疗剂。最近,许多出版物已经证明了寡脱氧核苷酸作为免疫调控剂的用途,以及它们在对许多疾病诸如变态反应、哮喘、自身免疫、炎症疾病、癌症、和传染病的免疫疗法应用中单独的或作为佐剂的用途 (Marshak-Rothstein A, Nat Rev Immunol (2006) 6 :823-35)。

[0010] 由于 TLR 牵涉对炎症应答的调节,已经显示了 TLR 在许多疾病的发病机制中发挥作用,包括自身免疫、传染病和炎症 (Papadimitraki et al. (2007) J. Autoimmun 29 : 310-318 ; Sun et al. (2007) Inflamm Allergy Drug Targets 6 :223-235 ; Diebold (2008) Adv Drug Deliv Rev 60 :813-823 ; Cook, D. N. et al. (2004) Nature Immunol 5 :975-979 ;

Tse 和 Homer(2008)Semin Immunopathol30:53-62;Tobias & Curtiss(2008)Semin Immunopathol 30:23-27;Ropert et al.(2008)Semin Immunopathol 30:41-51;Lee et al.(2008)Semin Immunopathol30:3-9;Gao et al.(2008)Semin Immunopathol 30:29-40;Vijay-Kumar et al.(2008)Semin Immunopathol 30:11-21)。虽然免疫应答的发起中牵涉 TLR 的活化,但是经由 TLR 对免疫系统的不受控制的刺激在免疫受损的受试者中可加剧某些疾病。近年来,数个小组显示了合成寡脱氧寡核苷酸(ODN)作为炎性细胞因子抑制剂的用途(Lenert, P. et al.(2003)DNA Cell Biol. 22(10):621-631)。

[0011] 另外,数个小组使用与 TLR 蛋白相互作用的具有两段三联体序列(一个近端“CCT”三联体和一个远端“GGG”三联体)、一段聚“G”(例如“GGGG”或“GGG”)或“GC”序列的合成寡脱氧核苷酸来抑制它的活化和伴随的生成及促炎性细胞因子的释放(参加例如 Lenert, P. et al.(2003)DNA Cell Biol. 22(10):621-631;Patole, P. et al.(2005)J. Am. Soc. Nephrol. 16:3273-3280;Gursel, L. et al., J. Immunol, 171:1393-1400(2003);Shirota, H., et al., J. Immunol, 173:5002-5007(2004);Chen, Y., et al., Gene Ther 8:1024-1032(2001);Stunz, L. L., Eur. J. Immunol 32:1212-1222(2002);Kandimalla et al. WO2007/7047396)。然而,已经显示了含有鸟苷串的寡核苷酸形成四链结构,起适体的作用并抑制凝血酶活性(Bock LC et al., Nature, 355:564-6, 1992;Padmanabhan, K et al., J Biol Chem., 268(24):17651-4, 1993)。如此,这些抑制性寡脱氧核苷酸分子的效用在患者中可能实现不了。

[0012] 此外,最近的研究开始质疑含有 polyG 的 ODN 其 TLR 拮抗剂作用的观点。例如, Agrawal 等的 US 6,426,334 证明了施用含有“GGGG”串的 CpG 寡核苷酸会引起血清 IL-12 浓度升高,这证明 TLR 活化,与 TLR 抑制相反。另外,已知含有 polyG 序列的 CpG 寡聚物经由 TLR9 的活化而诱导免疫应答(Verthelyi D et al, J Immunol 166, 2372, 2001;Gursel M et al, J Leukoc Biol, 71, 813, 2001;Krieg A et al, Eur J Immunol, 31, 2154, 2001)并显示抗肿瘤和抗病毒活性(Ballas GK et al, J Immunol, 167, 4878, 2001;Verthelyi D et al, J Immunol, 170, 4717, 2003)。另外,含有免疫刺激性 CpG 基序和 4 个保守 G 核苷酸的 ODN(A 类 ODN)在免疫应答中诱导干扰素- γ 生成和 Th1 转换。

[0013] 最近, Agrawal 等(WO2007047396)发现了一类新的 TLR 拮抗剂,它们不具有先前鉴定的 TLR 拮抗剂的限制。这类新的化合物有效抑制 TLR 活性并阻断各种 TLR 激动剂活性。然而,在有些疾病状态中,可能希望只部分拮抗 TLR 活性。如此,需要能以剂量依赖性的、不完全的方式拮抗 TLR 活性的化合物。

[0014] 发明概述

[0015] 在第一个方面,本发明提供了一类新的免疫调节寡核苷酸化合物,其以受控方式降低但不消除 TLR9 介导的免疫应答。此类化合物具有两个或更多个 TLR9 诱导模块(moiety)及对所述 TLR9 诱导模块的和/或在最 5' TLR9 诱导模块侧翼序列中的一处或多处化学修饰,其中所述修饰抑制所述最 5' TLR9 诱导模块的活性,使之成为被封闭的 TLR9 诱导模块。

[0016] 在本发明这个方面的一个实施方案中,所述化合物具有结构 5'-N_m-N₁N₂C₁G₁-N_p-N₃N₄C₂G₂-N_m-3',其中 C₁ 为胞嘧啶, G₁ 为鸟苷, C₂ 为胞嘧啶或胞嘧啶衍生物,而 G₂ 为鸟苷或鸟苷衍生物; N₁ 和 N₂ 在每次出现时独立为核苷酸、2'-取代的(例如 2'-O-甲基)核苷酸或核苷

酸衍生物或其它抑制 C_1G_1 之 TLR 刺激活性的封闭模块,前提是 N1 或 N2 中至少一项是抑制 C_1G_1 之 TLR 刺激活性的封闭模块; N_3 和 N_4 在每次出现时独立为不抑制 C_2G_2 之 TLR 刺激活性的核苷酸或核苷酸衍生物; N_m 在每次出现时独立为核苷酸、核苷酸衍生物或非核苷酸连接; N_p 在每次出现时独立为核苷酸或核苷酸衍生物,前提是所述化合物含有少于 3 个连续鸟苷核苷酸;其中 m 是 0 至约 20 的数目,其中 p 是 0 至约 20 的数目;且其中所述寡核苷酸原本会是免疫刺激性的,但 2'-O- 取代的核苷酸、核苷酸衍生物或其它抑制 C_1G_1 之 TLR 刺激活性的修饰的情况除外。

[0017] 在本发明这个方面的另一个实施方案中,所述化合物具有结构 $5' -N_m-N_1N_2C_1G_1-N_p-N_3N_4C_2G_2-N_m-3'$,其中 C_1 和 C_2 独立为胞嘧啶或胞嘧啶衍生物,而 G_1 和 G_2 独立为鸟苷或鸟苷衍生物,其中 C_1 和 G_1 中至少一项为经过修饰的核苷; N_1 和 N_2 在每次出现时独立为核苷酸、2'-取代的(例如 2'-O- 甲基)核苷酸或核苷酸衍生物或其它抑制 C_1G_1 之 TLR 刺激活性的封闭模块,前提是 N1 或 N2 中至少一项为抑制 C_1G_1 之 TLR 刺激活性的封闭模块; N_3 和 N_4 在每次出现时独立为不抑制 C_2G_2 之 TLR 刺激活性的核苷酸或核苷酸衍生物; N_m 在每次出现时独立为核苷酸、核苷酸衍生物或非核苷酸连接; N_p 在每次出现时独立为核苷酸或核苷酸衍生物,前提是所述化合物含有少于 3 个连续鸟苷核苷酸;其中 m 是 0 至约 20 的数目,其中 p 是 0 至约 20 的数目;且其中所述寡核苷酸原本会是免疫刺激性的,但 2'-O- 取代的核苷酸、核苷酸衍生物或其它抑制 C_1G_1 之 TLR 刺激活性的修饰的情况除外。

[0018] 在本发明这个方面的又一个实施方案中,所述化合物具有结构 $5' -N_m-N_1N_2C_1G_1-N_p-N_3N_4C_2G_2-N_r-X-N_r-G_2C_2N_4N_3-N_p-G_1C_1N_2N_1-N_m-5'$ 其中 C_1 为胞嘧啶, G_1 为鸟苷, C_2 为胞嘧啶或胞嘧啶衍生物,而 G_2 为鸟苷或鸟苷衍生物; N_1 和 N_2 在每次出现时独立为核苷酸、2'-取代的(例如 2'-O- 甲基)核苷酸或核苷酸衍生物或其它抑制 C_1G_1 之 TLR 刺激活性的封闭模块,前提是 N1 或 N2 中至少一项是抑制 C_1G_1 之 TLR 刺激活性的封闭模块; N_3 和 N_4 在每次出现时独立为不抑制 C_2G_2 之 TLR 刺激活性的核苷酸或核苷酸衍生物; N_m 在每次出现时独立为核苷酸、核苷酸衍生物或非核苷酸连接; N_p 在每次出现时独立为核苷酸或核苷酸衍生物; N_r 在每次出现时独立为核苷酸或核苷酸衍生物,前提是所述化合物含有少于 3 个连续鸟苷核苷酸;其中 m 是 0 至约 20 的数目,其中 r 是 0 至约 20 的数目,其中 p 是 0 至约 20 的数目,其中 x 是非核苷酸接头;且其中所述寡核苷酸原本会是免疫刺激性的,但 2'-O- 取代的核苷酸、核苷酸衍生物或其它抑制 C_1G_1 之 TLR 刺激活性的修饰的情况除外。

[0019] 在本发明这个方面的又一个实施方案中,所述化合物具有结构 $5' -N_m-N_1N_2C_1G_1-N_p-N_3N_4C_2G_2-N_r-X-N_r-G_2C_2N_4N_3-N_p-G_1C_1N_2N_1-N_m-5'$,其中 C_1 和 C_2 独立为胞嘧啶或胞嘧啶衍生物,而 G_1 和 G_2 独立为鸟苷或鸟苷衍生物,其中 C_1 和 G_1 中至少一项为经过修饰的核苷; N_1 和 N_2 在每次出现时独立为核苷酸、2'-取代的(例如 2'-O- 甲基)核苷酸或核苷酸衍生物或其它抑制 C_1G_1 之 TLR 刺激活性的封闭模块,前提是 N1 或 N2 中至少一项是抑制 C_1G_1 之 TLR 刺激活性的封闭模块; N_3 和 N_4 在每次出现时独立为不抑制 C_2G_2 之 TLR 刺激活性的核苷酸或核苷酸衍生物; N_m 在每次出现时独立为核苷酸、核苷酸衍生物或非核苷酸连接; N_p 在每次出现时独立为核苷酸或核苷酸衍生物; N_r 在每次出现时独立为核苷酸或核苷酸衍生物,前提是所述化合物含有少于 3 个连续鸟苷核苷酸;其中 m 是 0 至约 20 的数目,其中 r 是 0 至约 20 的数目,其中 p 是 0 至约 20 的数目,其中 x 是非核苷酸接头;且其中所述寡核苷酸原本会是免疫刺激性的,但 2'-O- 取代的核苷酸、核苷酸衍生物或其它抑制 C_1G_1 之 TLR 刺激活性的修

饰的情况除外。

[0020] 在第二个方面,本发明提供了药物组合物。这些组合物包含本发明第一个方面中公开的任一种化合物和药学可接受载体。

[0021] 在第三个方面,本发明提供了一种用于降低哺乳动物中 TLR9 介导的免疫应答的方法,该方法包括以药学有效量给所述哺乳动物施用依照本发明的化合物或组合物。

[0022] 在第四个方面,本发明提供了一种用于治疗性处理患有降低 TLR9 介导的免疫应答会是有益的疾病或病症的哺乳动物的方法。依照这个方面的方法包括给哺乳动物施用依照本发明的化合物或组合物。

[0023] 在第五个方面,本发明提供了一种用于在哺乳动物中预防降低 TLR9 介导的免疫应答会是有益的或希望控制 TLR 拮抗作用的疾病或病症的方法。依照这个方面的方法包括给哺乳动物施用依照本发明的化合物或组合物。

[0024] 附图简述

[0025] 图 1 是本发明化合物的线性合成的合成方案。DMTr = 4,4'-二甲氧基三苯甲基(dimethoxytrityl);CE = 氰乙基(cyanoethyl)。

[0026] 图 2 是本发明化合物的平行合成的合成方案。DMTr = 4,4'-二甲氧基三苯甲基;CE = 氰乙基。

[0027] 图 3 描绘了由新的免疫调节寡核苷酸介导的 TLR9 活性。图 3 更一般地证明了所述新的抑制性寡核苷酸在较低浓度会发挥拮抗剂的功能而在较高浓度会发挥激动剂的功能,有效控制它们的抑制活性。

[0028] 图 4 描绘了由较低剂量的新的免疫调节寡核苷酸介导的 TLR9 活性。图 4 更一般地证明了所述新的抑制性寡核苷酸在较低浓度会发挥拮抗剂的功能而在较高浓度会发挥激动剂的功能。

[0029] 图 5 描绘了渐增剂量的新的免疫调节寡核苷酸的 TLR9 活性。图 5 更一般地证明了所述新的抑制性寡核苷酸在较低浓度会发挥拮抗剂的功能而在较高浓度会发挥激动剂的功能,有效控制它们的抑制活性。

[0030] 图 6 描绘了新的免疫调节寡核苷酸的 TLR9 活性。图 6 更一般地证明了所述新的抑制性寡核苷酸在较低浓度会发挥拮抗剂的功能而在较高浓度会发挥激动剂的功能,有效控制它们的抑制活性。

[0031] 图 7 描绘了渐增剂量的新的免疫调节寡核苷酸的 TLR9 活性。图 7 更一般地证明了所述新的抑制性寡核苷酸在较低浓度会发挥拮抗剂的功能而在较高浓度会发挥激动剂的功能,有效控制它们的抑制活性。

[0032] 发明详述

[0033] 本发明涉及寡核苷酸作为免疫调节剂用于免疫疗法应用的治疗用途。具体而言,本发明提供了经由 TLR9 调节免疫应答的基于寡核苷酸的化合物。通过降低但不消除 TLR9 介导的免疫应答,本发明提供了对治疗或预防多种疾病或病症(包括那些具有自身免疫成分的、使用剂量控制的 TLR9 拮抗剂会是有益的)有用的化合物和方法。通过述及将本文中所引用的已公告的专利、专利申请、和参考文献收入本文,其程度就像具体地和单独地指明通过述及收录每一篇一样。在本文中所引用的任何参考文献的任何教导与本说明书之间不一致的情况下,对本发明来说以后者为准。

[0034] 一起阅读下述描述和附图时,可以更完整地理解本发明的上述和其它目的、它们的各种特征、以及本发明自身,其中:

[0035] 术语“2’-取代的核苷”或“2’-取代的阿拉伯糖苷(arabinoside)”一般包括如下的核苷或阿拉伯糖核苷,其中戊糖或阿拉伯糖模块2’位置的羟基被取代而生成2’-取代的或2’-O-取代的核糖核苷。在某些实施方案中,所述取代是用含有1-6个饱和的或不饱和的碳原子的低级烷基、用卤素原子、或用具有6-10个碳原子的芳基进行的,其中所述烷基或芳基可以是未取代的或者可以是取代的,例如用卤素、羟基、三氟甲基、氰基、硝基、酰基、酰氧基、烷氧基、羧基、羧烷氧基(carboalkoxy)、或氨基取代。2’-O-取代的核糖核苷或2’-O-取代的阿拉伯糖苷的例子包括但不限于2’-氨基、2’-氟、2’-烯丙基、2’-O-烷基和2’-炔丙基核糖核苷或阿拉伯糖苷、2’-O-甲基核糖核苷或2’-O-甲基阿拉伯糖苷和2’-O-甲氧基乙氧基核糖核苷或2’-O-甲氧基乙氧基阿拉伯糖苷。

[0036] 术语“3’”在用于方向时一般指多核苷酸或寡核苷酸中位于同一多核苷酸或寡核苷酸中另一区域或位置3’(朝向寡核苷酸的3’位置)的区域或位置。

[0037] 术语“5’”在用于方向时一般指多核苷酸或寡核苷酸中位于同一多核苷酸或寡核苷酸中另一区域或位置5’(朝向寡核苷酸的5’位置)的区域或位置。

[0038] 术语“约”一般意味着确切的数目不是至关重要的。如此,寡核苷酸中核苷残基的数目不是至关重要的,而且涵盖少一个或两个核苷残基或者多一个至数个核苷残基的寡核苷酸作为上文所述每一个实施方案的等同方案。

[0039] 术语“气道炎症”一般包括但不限于由变应原引起的呼吸道炎症,包括哮喘。

[0040] 术语“变应原”一般指抗原或在暴露于受试者后引发变态反应的分子(通常是蛋白质)的抗原性部分。典型的是,受试者对变应原是过敏的,如通过例如风团(wheal)和潮红(flare)测试或本领域已知的任何方法所指出的。即使只有一小部分受试者在暴露于该分子后展现出变应性(例如IgE)免疫应答,也说该分子是变应原。

[0041] 术语“变态反应”一般包括但不限于食物变态反应、呼吸变态反应和皮肤变态反应。

[0042] 术语“抗原”一般指受到抗体或T细胞抗原受体识别和选择性结合的物质。抗原可以包括但不限于肽、蛋白质、核苷、核苷酸及其组合。抗原可以是天然的或合成的,而且一般诱导对该抗原特异性的免疫应答。

[0043] 术语“自身免疫性病症”一般指其中“自身”抗原遭受免疫系统攻击的病症。

[0044] 术语“载体”一般涵盖任何赋形剂、稀释剂、填充剂、盐、缓冲剂、稳定剂、增溶剂、油、脂、含脂的囊泡、微球体、脂质体封装、或本领域公知用于药物配制剂的其它物质。应当理解,载体、赋形剂、或稀释剂的特征会取决于用于特定应用的施用路径。含有这些物质的药学可接受配制剂的制备记载于例如《Remington's Pharmaceutical Sciences》第18版(A. Gennaro 编, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990)。

[0045] 术语“共施用”一般指在足够近的时间里施用至少两种不同物质以调控免疫应答。优选的是,共施用指同时施用至少两种不同物质。

[0046] 术语“药学有效量”一般指足以实现期望生物学效应(诸如有益结果,包括但不限于预防、抑制、减轻、改善或消除疾病或病症的体征或症状)的量。如此,“药学有效量”会取决于施用它的背景。药学有效量可以在一次或多次预防性或治疗性施用中施用。

[0047] 术语“预防有效量”一般指足以预防、降低或抑制不想要的生物学效应的量。

[0048] 术语“与... 组合”一般指在治疗同一患者的同一疾病的过程中施用依照本发明的化合物和 / 或对治疗疾病或疾患有用的且不降低本发明化合物的 TLR9 拮抗剂效应的其它药剂。此类施用可以以任意次序进行, 包括同时施用, 以及相隔几秒钟至长达数天的时间上有间隔的次序。此类组合处理还可包括超过一次的依照本发明的化合物和 / 或独立的其它药剂的施用。依照本发明的化合物和其它药剂的施用可以是通过相同或不同的路径的。

[0049] 术语“个体”或“受试者”一般指哺乳动物, 诸如人。哺乳动物一般包括但不限于人、非人灵长类、大鼠、小鼠、猫、犬、马、牛 (cattle)、奶牛 (cows)、猪、绵羊和家兔。

[0050] 术语“线性合成”一般指在寡核苷酸的一端开始并线性进展至另一端的合成。线性合成容许将相同或不同 (就所掺入的长度、碱基组成和 / 或化学修饰而言) 的单体单元掺入寡核苷酸。

[0051] 术语“经过修饰的”或“衍生的”在核苷或核苷酸的语境中使用时一般指包括经过修饰的杂环碱基、经过修饰的糖模块、或其任意组合的核苷或具有任何所述修饰或经过修饰的磷酸酯的核苷酸。在一些实施方案中, 经过修饰的核苷是非天然嘧啶或嘌呤核苷, 如本文所述。为了本发明, 经过修饰的核苷、嘧啶或嘌呤类似物或非天然存在的嘧啶或嘌呤可互换使用, 指包括非天然存在的碱基和 / 或非天然存在的糖模块的核苷。为了本发明, 如果某碱基不是鸟嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤、胸腺嘧啶或尿嘧啶, 那么认为该碱基是非天然的。

[0052] 术语“调控”或“调控性”一般指变化, 诸如响应的降低或 TLR9 介导的响应的定性差异。

[0053] 术语“接头”一般指能借助共价或非共价键合经由糖、碱基、或主链附着至寡核苷酸的任何模块。接头可用于附着两个或更多个核苷, 或者可附着至寡核苷酸的 5' 和 / 或 3' 末端核苷酸。所述接头可以是非核苷酸接头或核苷酸接头。

[0054] 术语“非核苷酸接头”一般指能借助共价或非共价键合附着至寡核苷酸的、核苷酸连接以外的化学模块。优选的是, 所述非核苷酸接头的长度是约 2 埃至约 200 埃, 而且可以是顺式或反式取向。

[0055] 术语“核苷酸连接”一般指经由它们的糖接合两个核苷的化学连接 (例如 3' -3'、2' -3'、2' -5'、3' -5'), 其由相邻核苷间的磷原子和带电荷的或中性的基团 (例如磷酸二酯、硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、烃基膦酸酯或氨基膦酸酯) 组成。

[0056] 术语“基于寡核苷酸的化合物”指自多个相连接的核苷单元形成的多核苷酸。所述寡核苷酸还可以自现有的核酸来源获得, 包括基因组或 cDNA, 但是优选是通过合成方法生成的。在优选的实施方案中, 每个核苷单元包括杂环碱基和呋喃戊糖基、海藻糖、阿拉伯糖、2' - 脱氧 -2' - 取代的阿拉伯糖、2' -O- 取代的阿拉伯糖或己糖基团。核苷残基可以通过多种已知的核苷间连接之每一种而彼此偶联。所述核苷间连接包括但不限于磷酸二酯 (phosphodiester)、硫代磷酸酯 (phosphorothioate)、二硫代磷酸酯 (phosphorodithioate)、烃基膦酸酯 (alkylphosphonate)、烃基硫代磷酸酯 (alkylphosphonothioate)、磷酸三酯 (phosphotriester)、亚氨基磷酸酯 (phosphoramidite)、硅氧烷 (siloxane)、碳酸酯 (carbonate)、羧烷氧基 (carboalkoxy)、氨基乙酸酯 (acetamidate)、氨基甲酸酯 (carbamate)、吗啉代 (morpholino)、硼代 (borano)、硫醚 (thioether)、桥接氨基磷酸酯 (bridgedphosphoramidate)、桥接亚甲基膦

酸酯 (bridged methylene phosphonate)、桥接硫代磷酸酯 (bridged phosphorothioate)、和砜 (sulfone) 核苷间连接。术语“基于寡核苷酸”还涵盖具有一个或多个立体有择 (stereospecific) 核苷间连接 (例如 (R_p)- 或 (S_p)- 硫代磷酸酯、烃基膦酸酯、或磷酸三酯连接) 的多核苷。如本文中所使用的, 术语“寡核苷酸”和“二核苷酸”明确意图包括具有任何所述核苷间连接的多核苷和二核苷, 无论所述连接是否包含磷酸根基团。在某些优选的实施方案中, 这些核苷间连接可以是磷酸二酯、硫代磷酸酯或二硫代磷酸酯连接, 或其组合。

[0057] 术语“肽”一般指长度和组成足以影响生物学应答 (例如抗体生成或细胞因子活性, 无论该肽是否是半抗原) 的多肽。术语“肽”可以包括经过修饰的氨基酸 (无论是天然存在的还是非天然存在的), 其中所述修饰包括但不限于磷酸化、糖基化、PEG 化、脂化 (lipidization) 和甲基化。

[0058] 术语“生理学可接受的”一般指不干扰依照本发明的化合物的效力和与生物学系统 (诸如细胞、细胞培养物、组织、或生物体) 相容的物质。优选的是, 所述生物学系统是活的生物体, 诸如脊椎动物。

[0059] 术语“TLR9 拮抗剂”一般指能够阻止或降低由 TLR9 介导的免疫刺激的基于寡核苷酸的化合物。

[0060] 术语“TLR9 诱导模块”指在基于寡核苷酸的化合物的语境中诱导 TLR9 介导的免疫应答的二核苷酸模块。在优选的实施方案中, 所述二核苷酸具有结构 Y-Z, 其中 Y 为胞苷、2'-脱氧胞苷、阿糖胞苷、2'-脱氧-2'-取代的阿糖胞苷、2'-O-取代的阿糖胞苷、2'-脱氧-5-羟基胞苷、2'-脱氧-N4-烃基-胞苷、2'-脱氧-4-硫尿苷或其它非天然嘧啶核苷; 而 Z 为鸟苷、2'-脱氧鸟苷、2'-脱氧-7-脱氮鸟苷、2'-脱氧-6-硫鸟苷、阿糖鸟苷、2'-脱氧-2'-取代的-阿糖鸟苷、2'-O-取代的-阿糖鸟苷、2'-脱氧肌苷、或其它非天然嘌呤核苷。

[0061] 术语“被封闭的 TLR9 诱导模块”指原本会具有 TLR9 激动活性, 但在如下事实的情况下除外的 TLR9 诱导模块, 所述事实即经由对 TLR9 诱导模块自身的修饰和 / 或通过基于寡核苷酸的化合物内的一处或多处化学修饰使诱导 TLR9 介导的免疫应答的功能被阻断或抑制。抑制 TLR9 诱导模块之活性的封闭模块包括但不限于 2'-OMe-核糖核苷、3'-OMe-核糖核苷、3-硝基吡咯、5-硝基咪唑、dU、β-L-脱氧核苷、α-脱氧核苷、无碱基核苷、丙二醇接头、氨基接头、异丙氧基、甘油接头、2'-5'-DNA、2'-5' RNA、和 P-Me DNA。

[0062] 术语“治疗”或“处理”一般指旨在获得有益的或期望的结果 (其可以包括症状的缓和或者疾病进展的延迟或改善) 的办法。

[0063] 在第一个方面, 本发明提供了一类新的免疫调节寡核苷酸化合物, 其以受控方式降低但不消除 TLR9 介导的免疫应答。此类化合物具有两个或更多个 TLR9 诱导模块及对所述 TLR9 诱导模块的和 / 或在最 5' TLR9 诱导模块的侧翼序列中的一处或多处化学修饰, 其中所述修饰抑制所述最 5' TLR9 诱导模块的活性, 使之成为被封闭的 TLR9 诱导模块。

[0064] 在本发明这个方面的一个实施方案中, 所述化合物具有结构 5'-N_m-N₁N₂C₁G₁-N_p-N₃N₄C₂G₂-N_m-3', 其中 C₁ 为胞嘧啶, G₁ 为鸟苷, C₂ 为胞嘧啶或胞嘧啶衍生物, 而 G₂ 为鸟苷或鸟苷衍生物; N₁ 和 N₂ 在每次出现时独立为核苷酸、2'-取代的 (例如 2'-O-甲基) 核苷酸或核苷酸衍生物或其它抑制 C₁G₁ 之 TLR 刺激活性的封闭模块, 前提是 N₁ 或 N₂ 中至少一项是抑制

C_1G_1 之 TLR 刺激活性的封闭模块; N_3 和 N_4 在每次出现时独立为不抑制 C_2G_2 之 TLR 刺激活性的核苷酸或核苷酸衍生物; N_m 在每次出现时独立为核苷酸、核苷酸衍生物或非核苷酸连接; N_p 在每次出现时独立为核苷酸或核苷酸衍生物, 前提是所述化合物含有少于 3 个连续鸟苷核苷酸; 其中 m 是 0 至约 20 的数目, 其中 p 是 0 至约 20 的数目; 且其中所述寡核苷酸原本会是免疫刺激性的, 但 2'-O- 取代的核苷酸、核苷酸衍生物或其它抑制 C_1G_1 之 TLR 刺激活性的修饰的情况除外。在这个实施方案中, 第一个 TLR9 诱导模块在第二个 TLR9 诱导模块的 5', 其中第一个 TLR9 诱导模块是被封闭的 TLR9 诱导模块, 其充当 TLR9 拮抗剂, 且其中第二个 TLR9 诱导模块是未被封闭的。

[0065] 在本发明这个方面的另一个实施方案中, 所述化合物具有结构 $5'-N_m-N_1N_2C_1G_1-N_p-N_3N_4C_2G_2-N_m-3'$, 其中 C_1 和 C_2 独立为胞嘧啶或胞嘧啶衍生物, 而 G_1 和 G_2 独立为鸟苷或鸟苷衍生物, 其中 C_1 和 G_1 中至少一项为经过修饰的核苷; N_1 和 N_2 在每次出现时独立为核苷酸、2'-取代的 (例如 2'-O- 甲基) 核苷酸或核苷酸衍生物或其它抑制 C_1G_1 之 TLR 刺激活性的封闭模块, 前提是 N_1 或 N_2 中至少一项为抑制 C_1G_1 之 TLR 刺激活性的封闭模块; N_3 和 N_4 在每次出现时独立为不抑制 C_2G_2 之 TLR 刺激活性的核苷酸或核苷酸衍生物; N_m 在每次出现时独立为核苷酸、核苷酸衍生物或非核苷酸连接; N_p 在每次出现时独立为核苷酸或核苷酸衍生物, 前提是所述化合物含有少于 3 个连续鸟苷核苷酸; 其中 m 是 0 至约 20 的数目, 其中 p 是 0 至约 20 的数目; 且其中所述寡核苷酸原本会是免疫刺激性的, 但 2'-O- 取代的核苷酸、核苷酸衍生物或其它抑制 C_1G_1 之 TLR 刺激活性的修饰的情况除外。在这个实施方案中, 第一个 TLR9 诱导模块在第二个 TLR9 诱导模块的 5', 其中第一个 TLR9 诱导模块是被封闭的 TLR9 诱导模块, 其充当 TLR9 拮抗剂, 且其中第二个 TLR9 诱导模块是未被封闭的。

[0066] 在本发明这个方面的又一个实施方案中, 本发明提供了一种免疫调节寡核苷酸, 其包含至少两条在它们的 3' 端、或核苷间连接或官能化核碱基或糖处连接至非核苷酸接头的寡核苷酸。例如, 这个实施方案的化合物具有结构 $5'-N_m-N_1N_2C_1G_1-N_p-N_3N_4C_2G_2-N_r-X-N_r-G_2C_2N_4N_3-N_p-G_1C_1N_2N_1-N_m-5'$, 其中 C_1 为胞嘧啶, G_1 为鸟苷, C_2 为胞嘧啶或胞嘧啶衍生物, 而 G_2 为鸟苷或鸟苷衍生物; N_1 和 N_2 在每次出现时独立为核苷酸、2'-取代的 (例如 2'-O- 甲基) 核苷酸或核苷酸衍生物或其它抑制 C_1G_1 之 TLR 刺激活性的封闭模块, 前提是 N_1 或 N_2 中至少一项是抑制 C_1G_1 之 TLR 刺激活性的封闭模块; N_3 和 N_4 在每次出现时独立为不抑制 C_2G_2 之 TLR 刺激活性的核苷酸或核苷酸衍生物; N_m 在每次出现时独立为核苷酸、核苷酸衍生物或非核苷酸连接; N_p 在每次出现时独立为核苷酸或核苷酸衍生物; N_r 在每次出现时独立为核苷酸或核苷酸衍生物, 前提是所述化合物含有少于 3 个连续鸟苷核苷酸; 其中 m 是 0 至约 20 的数目, 其中 r 是 0 至约 20 的数目, 其中 p 是 0 至约 20 的数目, 其中 x 是非核苷酸接头; 且其中所述寡核苷酸原本会是免疫刺激性的, 但 2'-O- 取代的核苷酸、核苷酸衍生物或其它抑制 C_1G_1 之 TLR 刺激活性的修饰的情况除外。

[0067] 在另一个实施方案中, 本发明提供了一种免疫调节寡核苷酸, 其包含至少两条在它们的 3' 端、或核苷间连接或官能化核碱基或糖处连接至非核苷酸接头的寡核苷酸。例如, 这个实施方案的化合物具有结构 $5'-N_m-N_1N_2C_1G_1-N_p-N_3N_4C_2G_2-N_r-X-N_r-G_2C_2N_4N_3-N_p-G_1C_1N_2N_1-N_m-5'$, 其中 C_1 和 C_2 独立为胞嘧啶或胞嘧啶衍生物, 而 G_1 和 G_2 独立为鸟苷或鸟苷衍生物, 其中 C_1 和 G_1 中至少一项为经过修饰的核苷; N_1 和 N_2 在每次出现时独立为核苷酸、2'-取代的 (例如 2'-O- 甲基) 核苷酸或核苷酸衍生物或其它抑制 C_1G_1 之 TLR 刺激活性的封闭模

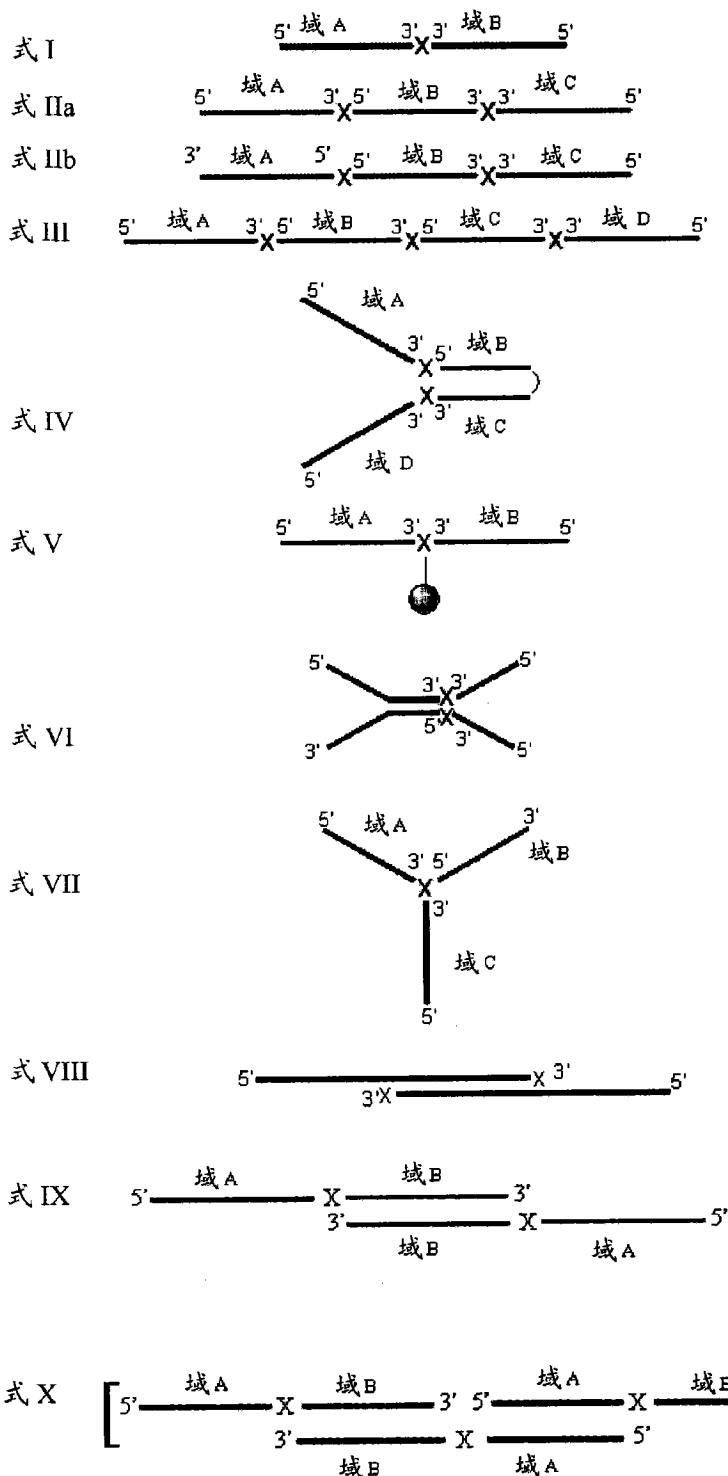
块,前提是 N_1 或 N_2 中至少一项是抑制 C_1G_1 之 TLR 刺激活性的封闭模块; N_3 和 N_4 在每次出现时独立为不抑制 C_2G_2 之 TLR 刺激活性的核苷酸或核苷酸衍生物; N_m 在每次出现时独立为核苷酸、核苷酸衍生物或非核苷酸连接; N_p 在每次出现时独立为核苷酸或核苷酸衍生物; N_l 在每次出现时独立为核苷酸或核苷酸衍生物,前提是所述化合物含有少于 3 个连续鸟苷核苷酸;其中 m 是 0 至约 20 的数目,其中 r 是 0 至约 20 的数目,其中 p 是 0 至约 20 的数目,其中 x 是非核苷酸接头;且其中所述寡核苷酸原本会是免疫刺激性的,但 2'-O- 取代的核苷酸、核苷酸衍生物或其它抑制 C_1G_1 之 TLR 刺激活性的修饰的情况除外。

[0068] 本发明的此类实施方案可具有至少一个可及的 5' 端。已经确定了这种结构给免疫调节寡核苷酸化合物提供进一步的稳定性(例如对外切核酸酶活性的抑制)。免疫调节寡核苷酸的 5'-末端没有以阻止免疫调节寡核苷酸化合物经由 TLR9 调控免疫应答的方式修饰。

[0069] 在本发明这个方面的另一个实施方案中,包含至少两条有多个寡核糖核苷酸的链,其中域 A、B、C、和 D 中至少一项包含 TLR9 拮抗剂,其具有至少一个 TLR9 诱导模块和该 TLR 诱导模块 5' 的被封闭的 TLR9 诱导模块,其中所述免疫调节化合物具有如下的结构,包括但不限于那些如表 1 式 I-X 中所详述的。

[0070] 表 1:寡核糖核苷酸式 I-X

[0071]



[0072] 域 A、B、C、和 D 可以独立为约 8 个至约 30 个核苷酸，更优选约 10 个至约 21 个核苷酸。域 A、B、C、和 / 或 D 可以是相同或不同的。域 A、B、C、和 D 可以独立为具有或不具有自我互补域、同源或异源核糖核苷酸序列、或接头的 5' -3' 或 2' -5' RNA，“n”可以为 1 至无限的数目。

[0073] “X”是将域 A、B、C、和 / 或 D 连接或给域 A、B、C、和 / 或 D 加帽的接头，所述连接或加帽可以经由 3' 或 5' 连接、磷酸根基团、非 RNA 核苷酸、或非核苷酸接头完成，所述非核苷酸接头可以是脂肪族的、芳香族的、芳基、环状的、手性的、非手性的、肽、碳水化合物、脂质、脂肪酸、单 - 或三 - 或六聚乙二醇、或杂环模块，或其组合。

[0074] 在又一个实施方案中,本发明提供了免疫调节寡核苷酸化合物,其包含至少两条通过非核苷酸接头连接的寡核苷酸,其中所述免疫调节寡核苷酸的序列可以是至少部分自我互补的。正如本领域技术人员会认识到的,所述寡核苷酸的互补序列容许分子间氢键合,由此给予寡核苷酸二级结构。别的寡核苷酸能结合在一起,由此创建依照本发明的寡核苷酸的链或多聚物。

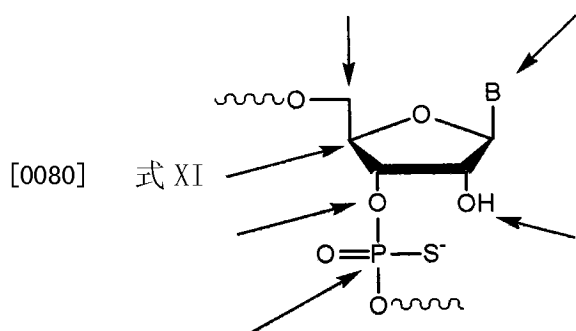
[0075] 依照这个方面的化合物在第一个剂量起 TLR9 拮抗剂的作用,而在第二个较高的剂量起 TLR9 的部分激动剂的作用。不希望受理论束缚,申请人认为在较低的浓度,依照这个方面的化合物主要经由第一个(最 5')TLR9 诱导模块结合 TLR9。这是因为认为 TLR9 首先与基于寡核苷酸的化合物在它们的 5'端起相互作用。在 TLR9 与该化合物主要在第一个(最 5')TLR9 诱导模块处起相互作用的情况中,由于第一个 TLR9 诱导模块的活性是被封闭的,因此该化合物起 TLR9 拮抗剂的作用。然而,在较高的浓度,认为第一个(最 5')TLR9 诱导模块变成饱和的,而且 TLR9 开始与该化合物在第二个(更 3')TLR9 诱导模块处起相互作用。因为第二个(更 3')TLR9 诱导模块是未被封闭的,所以该化合物然后开始起 TLR9 激动剂的作用。

[0076] 依照这个方面的化合物的优点在于虽然 TLR9 介导的免疫应答在该化合物的较低剂量被降低,但是它在较高剂量不被消除,因为该化合物在该点开始起 TLR9 激动剂的作用。如此,依照这个方面的化合物就它们的 TLR9 拮抗作用的程度而言是自我调节的。

[0077] 在依照本发明这个方面的一些实施方案中,所述化合物具有免疫聚物(immunomer)结构,如美国专利 No. 7, 276, 489 中所记载的。

[0078] 在一些实施方案中,线性寡核苷酸或一种或多种分支的寡核苷酸各自独立具有约 8 个至约 30 个核苷残基。如此,在某些实施方案中,所述寡核苷酸的长度可独立为 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 或 30 个核苷酸。优选的是,所述寡核苷酸为约 11 个至约 25 个核苷残基,更优选约 16 个至约 21 个核苷残基。在一些实施方案中,所述免疫调节寡核苷酸包含 21 个寡核苷酸。某些优选的实施方案包含 42 个核苷酸。优选的是,所述 TLR9 拮抗剂化合物包含至少一个磷酸二酯、硫代磷酸酯、或二硫代磷酸酯核苷间连接。

[0079] 在优选的实施方案中,每个核苷单元包括杂环碱基和呋喃戊糖基、2'-O-取代的呋喃戊糖基、海藻糖、阿拉伯糖、2'-脱氧-2'-取代的阿拉伯糖、2'-O-取代的核糖或阿拉伯糖或己糖糖基团。核苷残基可以通过多种已知的核苷间连接之每一种而彼此偶联。所述核苷间连接包括但不限于磷酸二酯(phosphodiester)、硫代磷酸酯(phosphorothioate)、二硫代磷酸酯(phosphorodithioate)、烃基磷酸酯(alkylphosphonate)、烃基硫代磷酸酯(alkylphosphonothioate)、磷酸三酯(phosphotriester)、氨基磷酸酯(phosphoramidate)、硅氧烷(siloxane)、碳酸酯(carbonate)、羰烷氧基(carboalkoxy)、氨基乙酸酯(acetamidate)、氨基甲酸酯(carbamate)、吗啉代(morpholino)、硼代(borano)、硫醚(thioether)、桥接氨基磷酸酯(bridgedphosphoramidate)、桥接亚甲基磷酸酯(bridged methylene phosphonate)、桥接硫代磷酸酯(bridged phosphorothioate)、和砜(sulfone)核苷间连接。下文式 XI 中指出了可以偶联核苷酸的位点,其中 B 代表杂环碱基。



[0081] 本发明的 TLR9 拮抗剂化合物可进一步包括天然存在的核糖核苷、经过修饰的核糖核苷、或其混合物。

[0082] 对杂环碱基的一些化学修饰包括但不限于鸟嘌呤类似物, 诸如 7-脱氮 -G、ara-G、6-硫 -G、肌苷、异 -G、洛索立宾、TOG (7-硫 -8-氧) -G、8-溴 -G、8-羟基 -G、5-氨基间型霉素 B、氧间型霉素、7-甲基 -G、9-*p*-氯苯基 -8-氮 -G、9-苯基 -G、9-己基 -鸟嘌呤、7-脱氮 -9-苄基 -G、6-氯 -7-脱氮鸟嘌呤、6-甲氧基 -7-脱氮鸟嘌呤、8-氮 7-脱氮 -G (PPG)、2-(二甲基氨基) 鸟苷、7-甲基 -6-硫鸟苷、8-苄氧基鸟苷、9-脱氮鸟苷、和 1-(B-D-呋喃糖基)-2-氧 -7-脱氮 -8-甲基 -嘌呤。化学修饰还包括但不限于腺嘌呤类似物, 诸如 9-苄基 -8-羟基 -2-(2-甲氧基乙氧基) 腺嘌呤、2-氨基 -N2-O-、甲基腺苷、8-氮 -7-脱氮 -A、7-脱氮 -A、Vidarabine (阿糖腺苷)、2-氨基腺苷、N1-甲基腺苷、8-氮腺苷、5-碘杀结核菌素。化学修饰还包括但不限于胞嘧啶类似物, 诸如 2'-脱氧 -5-羟基胞苷和 2'-脱氧 -N4-烃基 -胞苷。化学修饰还包括但不限于尿嘧啶类似物, 诸如 4-硫 -U。

[0083] 依照本发明的 TLR9 拮抗剂化合物包括如下的化合物, 其包含至少两条在它们的 3'-或 2'-端或官能化核糖或脱氧核糖 (包括取代的形式) 或官能化核碱基处经非核苷酸或核苷酸接头共价连接或非共价连接的寡核苷酸。表 2 列出了接头的数个例子。非共价连接包括但不限于静电相互作用、疏水相互作用、 π -叠加相互作用和氢键合。

[0084] 在其它实施方案中, 所述非核苷酸接头是具有容许附着至寡核苷酸的官能团的有机模块。此类附着优选是通过稳定的共价连接。作为一个非限制性例子, 所述接头可以附着至核苷酸上的任何合适位置。在一些优选的实施方案中, 所述接头附着至 3'-羟基。在此类实施方案中, 所述接头优选包含羟基官能团, 其优选依靠基于磷酸酯的连接 (像磷酸二酯、硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、甲基膦酸酯) 或非基于磷酸酯的连接附着至 3'-羟基。

[0085] 在一些实施方案中, 所述非核苷酸接头是小分子、大分子或生物分子, 包括但不限于多肽、抗体、脂质、抗原、变应原、和寡糖。在一些其它实施方案中, 所述非核苷酸接头是小分子。为了本发明, 小分子是分子量小于 1,000Da 的有机模块。在一些实施方案中, 所述小分子具有小于 750Da 的分子量。

[0086] 在一些实施方案中, 所述小分子是脂肪族或芳香族碳氢化合物 (烃), 二者任选可以在连接寡核苷酸或附着于寡核苷酸的线性链中包括一个或多个官能团, 包括但不限于羟基、氨基、硫醇、硫醚、醚、酰胺、硫代酰胺、酯、脲或硫脲。所述小分子可以是环状的或无环的。小分子接头的例子包括但不限于氨基酸、碳氢化合物、环糊精、金刚烷胺、胆固醇、半抗原和抗生素。然而, 出于描述非核苷酸接头的目的, 术语“小分子”并非意图包括核苷。

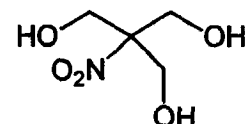
[0087] 在一些实施方案中, 所述非核苷酸接头是烃基接头或氨基接头。所述烃基接头可以是分支的或不分支的, 环状的或无环的, 取代的或未取代的, 饱和的或不饱和的, 手性的、

非手性的或外消旋的混合物。所述烃基接头可以具有约 2 个至约 18 个碳原子。在一些实施方案中,此类烃基接头具有约 3 个至约 9 个碳原子。一些烃基接头包括一个或多个官能团,包括但不限于羟基、氨基、硫醇、硫醚、醚、酰胺、硫代酰胺、酯、脲、和硫醚。此类烃基接头可包括但不限于 1-丙醇、1,2-丙二醇、1,3-丙二醇、1,2,3-丙三醇、三甘醇、六甘醇、聚乙二醇接头(例如 $[-O-CH_2-CH_2-]_n$ ($n = 1-9$))、甲基接头、乙基接头、丙基接头、丁基接头、或己基接头。在一些实施方案中,此类烃基接头可包括肽或氨基酸。

[0088] 在一些实施方案中,所述非核苷酸接头可以包括但不限于表 2 所列那些。

[0089] 表 2:代表性的非核苷酸接头

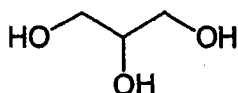
[0090]



[0091]

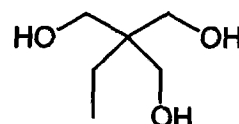
1,1,1-三(羟甲基)硝基甲烷

[0092]

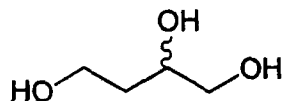


[0093] 甘油(1,2,3-丙三醇)

[0094]



[0095]

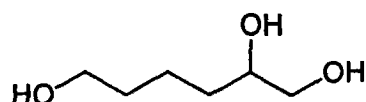


[0096]

1,1,1-三(羟甲基)丙烷

[0097] 1,2,4-丁三醇

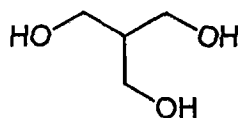
[0098]



[0099]

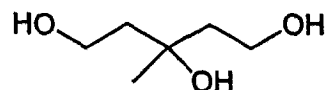
1,2,6-己三醇

[0100]



[0101] 2-(羟甲基)-1,3-丙二醇

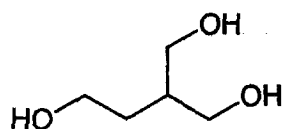
[0102]



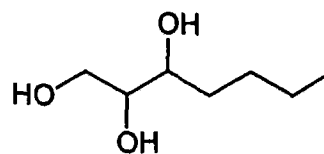
[0103]

3-甲基-1,3,5-戊三醇

[0104]



[0105] 2-(羟甲基)1,4-丁二醇

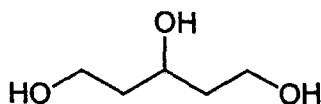


[0106]

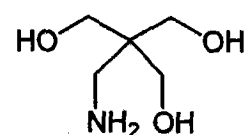
[0107]

1,2,3-庚三醇

[0108]



[0109] 1,3,5-戊三醇



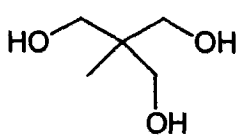
[0110]

[0111]

二醇

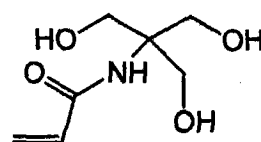
2-氨基-2-(羟甲基)-1,3-丙

[0112]



[0113] 1,1,1-三(羟甲基)乙烷

[0114]



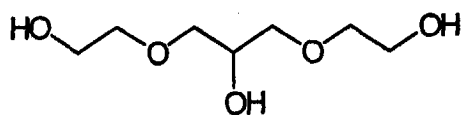
[0115]

酰胺

N-[三(羟甲基)甲基]丙烯

[0116] 表 2 :续

[0117]

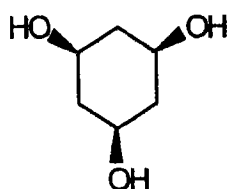


[0118]

基-丙烷

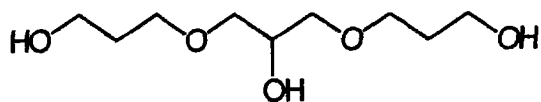
1,3-二(羟基乙氧基)-2-羟

[0119]



[0120] 顺-1,3,5-环己烷三醇

[0121]

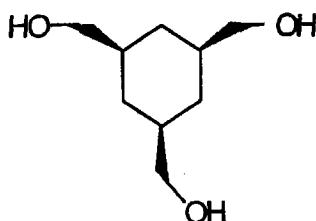


[0122]

基-丙烷

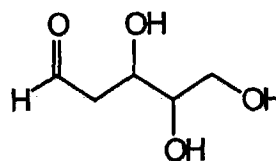
[0123]

1,3-二(羟基丙氧基)-2-羟



[0124] 顺-1,3,5-三(羟甲基)环己烷

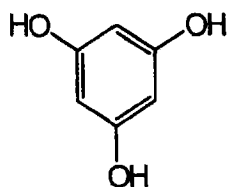
[0125]



[0126]

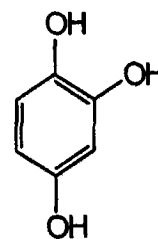
2-脱氧-D-核糖

[0127]



[0128] 1,3,5-三羟基-苯

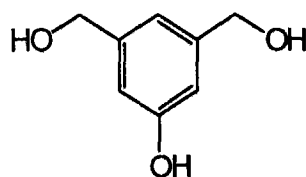
[0129]



[0130]

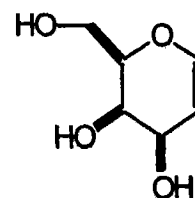
1,2,4-三羟基-苯

[0131]



[0132] 3,5-二(羟甲基)苯酚

[0133]

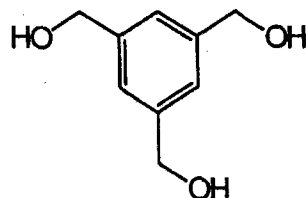


[0134]

(D-Galactal)

D-半乳糖缩醛

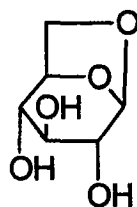
[0135]



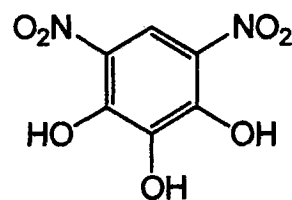
[0136] 1,3,5-三(羟甲基)苯

[0137] 表 2 :续

[0138]

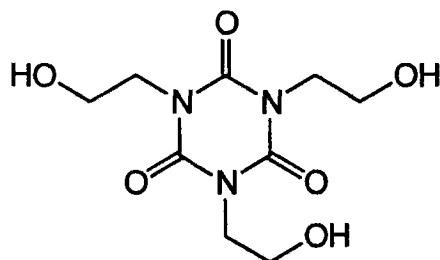


[0139] 1,6-脱水-β-D-葡萄糖



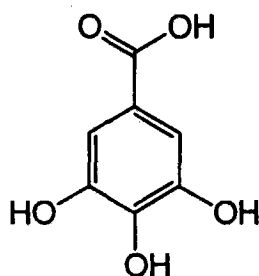
4,6-硝基连苯三酚

[0140]



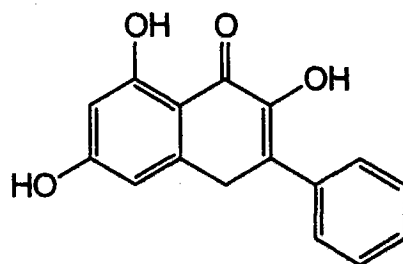
[0141] 1,3,5-三(2-羟乙基)-氰尿酸

[0142]



[0143] 没食子酸

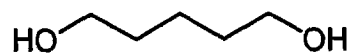
[0144]



[0145] 3,5,7-三羟基黄酮

[0146] 表 2 :续

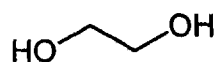
[0147]



[0148]

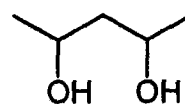
1,5-戊二醇

[0149]



[0150] 乙二醇

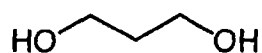
[0151]



[0152]

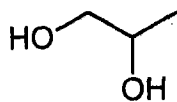
2,4-戊二醇

[0153]



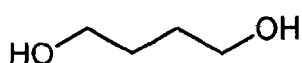
[0154] 1,3-丙二醇

[0155]



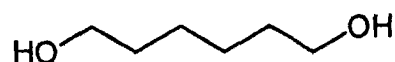
[0156] 1,2-丙二醇

[0157]

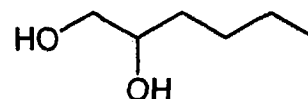


[0158] 1,4-丁二醇

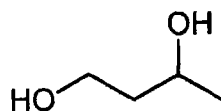
[0159]



1,6-己二醇

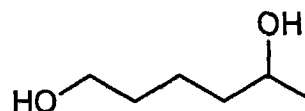


1,2-己二醇



[0160] 1,3-丁二醇

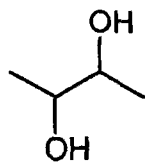
[0161]



[0162]

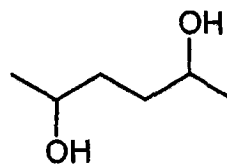
1,5-己二醇

[0163]



[0164] 2,3-丁二醇

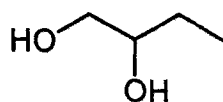
[0165]



[0166]

2,5-己二醇

[0167]



[0168] 1,4-丁二醇

[0169] 表 2 :续

[0170]



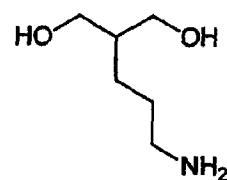
[0171] 1,7-庚二醇

[0172]



[0173] 1,8-辛二醇

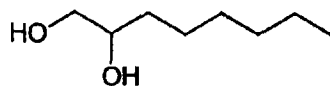
[0174]



[0175]

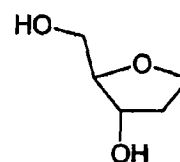
2-(1-氨基丙基)-1,3-丙二醇

[0176]



[0177] 1,2-辛二醇

[0178]



[0179]

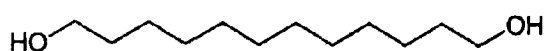
1,2-脱氧核糖

[0180]



[0181] 1,9-壬二醇

[0182]



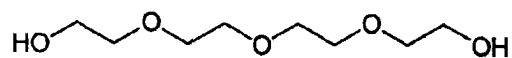
[0183] 1,12-十二烷二醇

[0184]



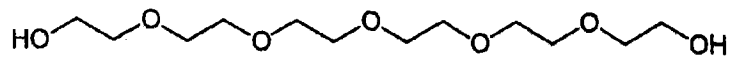
[0185] 三甘醇

[0186]



[0187] 四甘醇

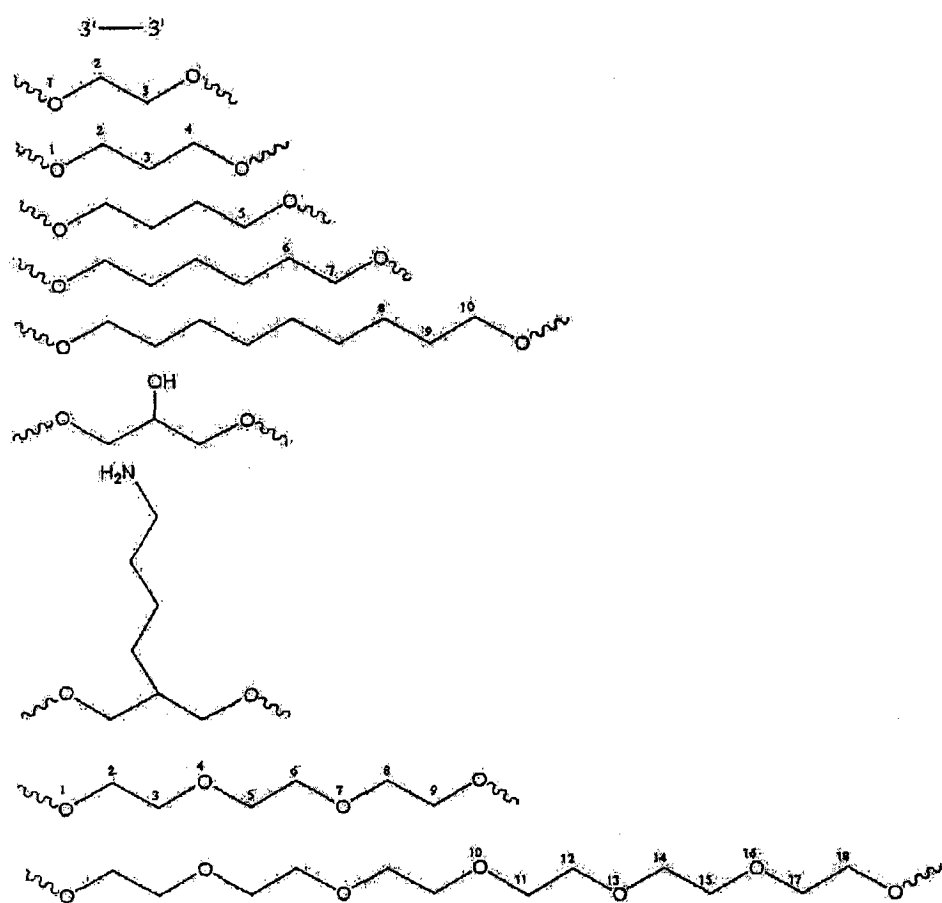
[0188]



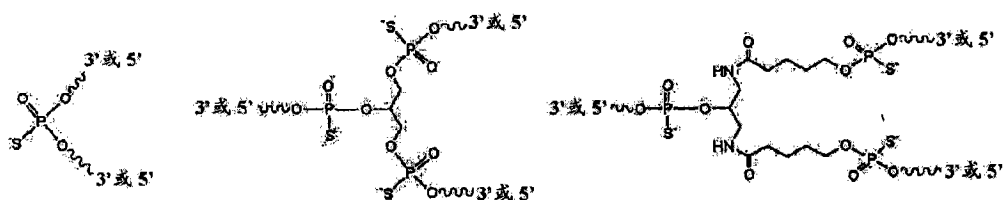
[0189] 六甘醇

[0190] 表 2 : 续

[0191]



[0192]



[0193] 无接头

S, 甘油分支物

B, Sym. 分支物

[0194]

短接头

长接头

[0195] 在一些实施方案中,所述小分子接头是甘油或式 $\text{HO}-(\text{CH}_2)_o-\text{CH}(\text{OH})-(\text{CH}_2)_p-\text{OH}$ 的甘油同系物,其中 o 和 p 独立为 1 至约 6、1 至约 4、或 1 至约 3 的整数。在一些其它实施

方案中,所述小分子接头是 1,3-二氨基-2-羟基丙烷的衍生物。一些此类衍生物具有式 $\text{HO}-(\text{CH}_2)_m-\text{C}(\text{O})\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{NHC}(\text{O})-(\text{CH}_2)_m-\text{OH}$, 其中 m 是 0 至约 10、0 至约 6、2 至约 6、或 2 至约 4 的整数。

[0196] 一些依照本发明的非核苷酸接头容许附着超过两条寡核苷酸,如表 1 所描绘的。例如,小分子接头甘油具有三个羟基,可供寡核苷酸共价附着。因此,一些依照本发明的免疫调节寡核苷酸包含超过两条经非核苷酸接头连接的寡核苷酸。

[0197] 在本发明这个方面的又一个实施方案中,TLR9 拮抗剂化合物可含有三条或更多条在它们的 3' 或 5' 端处、或经由核苷间连接或官能化核碱基或糖连接至两个或更多个接头的寡核苷酸,如表 1 所描绘的。本发明这个方面的寡核苷酸可具有相同或不同的序列。本发明这个方面的接头可以是相同的或不同的。

[0198] 用于证明本发明所涵盖的化合物的特性的特定免疫调节性硫代磷酸酯寡核苷酸化合物的序列包括表 3 所示的那些。

[0199] 表 3

[0200]

免疫调节寡核苷酸 / SEQ ID NO :	序列
1	5' -TCTGACGTTTTTTGACGTTCT-3'
2	5' -TCTGACGTTTTTTGACGTTCT-3'
3	5' -TCTGACGTTTTTTGACGTTCT-3'
4	5' -TCTGACGTTTTTTGACGTTCT-3'
5	5' -TCTGACG ₁ TTTTTTGACG ₁ TTCT-3'
6	5' -TCTGACG ₁ TTTTTTGACG ₁ TTCT-3'
7	5' -TCTGACG ₁ TTTTTTGACG ₁ TTCT-3'
8	5' -TCTGACG ₁ TTTTTTGACG ₁ TTCT-3'
9 (对照 TLR9 激动剂)	5' -CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
10 (对照 TLR9 激动剂)	5' -TCTGACG ₁ TTCT-X-TCTTG ₁ CAGTCT-5'
11 (对照非免疫刺激性寡核苷酸)	5' -ACACACCAACT-X-TCAACCACACA-5'
12	5' -TCTGACGTTTTTTGACGTTCT-X-TCTTGACGTTTTTTGACGTTCT-5'
13	5' -TCTGACGTTTTTTGACGTTCT-X-TCTTGACGTTTTTTGACGTTCT-5'
14	5' -TCTGACG ₁ TTTTTTGACG ₁ TTCT-X-TCTTG ₁ CAGTTTTTTG ₁ CAGTCT-5'

免疫调节寡核苷酸 / SEQ ID NO :	序列
15	5'-TCT <u>GAC</u> G ₁ TTTTT <u>GAC</u> G ₁ TTCT-X-TCTTG ₁ <u>CAG</u> TTTTTG ₁ <u>CAG</u> TCT-5'

[0201] 下划线的核苷代表 2'-O- 甲基核糖核苷 ;G1 = 2'- 脱氧 -7- 脱氮鸟苷 ;X = 非核苷酸性质的接头,例如甘油。

[0202] 本发明的 TLR9 拮抗剂化合物可以方便地使用自动化合成仪和亚氨基磷酸酯法像图 1 和图 2 示意描绘的和实施例进一步描述的那样合成。在一些实施方案中,免疫调节寡核苷酸是通过线性合成法合成的(图 1)。

[0203] 另一种合成模式是“平行合成”,其中自中央接头模块向外进行合成(见图 2)。可以使用附着于固体支持物的接头来进行平行合成,如美国专利 No. 5, 912, 332 中所记载的。或者,可以使用通用固体支持物(诸如附着有磷酸酯的受控孔径玻璃)。

[0204] 依照本发明的化合物的平行合成相对于线性合成具有数项优点:(1) 平行合成容许掺入相同的单体单元;(2) 与线性合成不同,所有单体单元都是在同一时间合成的,由此合成步骤的数目和合成所需要的时间与单体单元是相同的;和(3) 合成步骤的减少提高了最终的免疫调节寡核苷酸产物的纯度和产率。

[0205] 在通过线性合成或平行合成方案进行的合成结束时,可以用浓氨水溶液或像亚氨基磷酸酯供应商推荐的那样(如果掺入有经过修饰的核苷的话)方便地使免疫调节寡核苷酸脱保护。将产物免疫调节寡核苷酸优选通过反相 HPLC 纯化,脱三苯甲基化,脱氧和透析。

[0206] 在第二个方面,本发明提供了药物配制剂,其包含依照本发明的 TLR9 拮抗剂化合物和生理学可接受载体。

[0207] 在第三个方面,本发明提供了一种用于降低哺乳动物中 TLR9 介导的免疫应答的方法,该方法包括以降低 TLR9 介导的免疫应答的量给所述哺乳动物施用依照本发明的化合物或药物配制剂。

[0208] 在第四个方面,本发明提供了一种用于治疗性处理患有降低 TLR9 介导的免疫应答会是有益的疾病或病症的哺乳动物的方法,所述疾病或病症例如自身免疫性病症(autoimmune disorders)、气道炎症(airway inflammation)、炎性病症(inflammatory disorders)、变态反应(allergy)、哮喘(asthma)、关节炎(arthritis)、关节炎(arthritis)、疟疾(malaria)、变态反应(allergy)、移植排斥(transplant rejection)、传染病(infectious disease)、和其它具有自身免疫性成分的疾病和病症(other diseases and disorders that have an autoimmune component)。依照本发明这个方面的方法包括以药理学有效量给患有此类病症或疾病的哺乳动物施用依照本发明的化合物或药物配制剂。

[0209] 在第五个方面,本发明提供了一种用于在脊椎动物中预防降低 TLR9 介导的免疫应答会是有益的疾病或病症的方法,所述疾病或病症例如自身免疫性病症、癌症、气道炎症、炎性病症、传染病、疟疾、莱姆病(Lyme disease)、眼部感染(ocular infections)、皮肤病症(skin disorders)、银屑病(psoriasis)、硬皮病(scleroderma)、心血管疾病(cardiovascular disease)、动脉粥样硬化(atherosclerosis)、慢性疲劳综合征(chronic fatigue syndrome)、结节病(sarcoidosis)、变态反应、哮喘或由病原体引起的疾病(a

disease caused by apathogen)。依照本发明这个方面的方法包括以药理学有效量给易患此类病症或疾病的哺乳动物施用依照本发明的化合物或药物配制剂。

[0210] 在一些实施方案中,所述自身免疫性病症选自红斑狼疮 (lupus erythematosus)、多发性硬化 (multiple sclerosis)、I 型糖尿病 (type I diabetes mellitus)、肠易激综合征 (irritable bowel syndrome)、克罗恩氏病 (Crohn's disease)、类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis)、败血症性休克 (septic shock)、普秃 (alopecia universalis)、急性播散性脑脊髓炎 (acute disseminated encephalomyelitis)、阿狄森氏病 (Addison's disease)、强直性脊柱炎 (ankylosing spondylitis)、抗磷脂抗体综合征 (antiphospholipid antibody syndrome)、自身免疫性溶血性贫血 (autoimmune hemolytic anemia)、自身免疫性肝炎 (autoimmune hepatitis)、大疱性类天疱疮 (Bullous pemphigoid)、查加斯病 (Chagas disease)、慢性阻塞性肺病 (chronic obstructive pulmonary disease)、腹部疾病 (celiac disease)、皮肌炎 (dermatomyositis)、子宫内膜异位症 (endometriosis)、古德帕斯丘氏综合征 (Goodpasture's syndrome)、格雷夫斯氏病 (Graves' disease)、格巴二氏综合征 (Guillain-Barre syndrome)、桥本氏病 (Hashimoto's disease)、化脓性汗腺炎 (hidradenitis suppurativa)、特发性血小板减少性紫癜 (idiopathic thrombocytopenic purpura)、间质性膀胱炎 (interstitial cystitis)、硬斑病 (morphea)、重症肌无力 (myasthenia gravis)、发作性睡病 (narcolepsy)、神经性肌强直 (neuromyotonia)、天疱疮 (pemphigus)、恶性贫血 (pernicious anaemia)、多肌炎 (polymyositis)、原发性胆汁性肝硬化 (primary biliary cirrhosis)、精神分裂症 (schizophrenia)、斯耶格伦氏综合征 (Sjogren's syndrome)、颞动脉炎 (temporal arteritis) (“巨细胞动脉炎” (giant cell arteritis))、血管炎 (vasculitis)、白癜风 (vitiligo)、外阴痛 (vulvodynia) 和韦格纳氏肉芽肿病 (Wegener's granulomatosis)。

[0211] 在一些实施方案中,所述炎性病症选自气道炎症、哮喘、自身免疫性疾病、慢性炎症 (chronic inflammation)、慢性前列腺炎 (chronic prostatitis)、肾小球肾炎 (glomerulonephritis)、贝切特氏病 (Behcet's disease)、超敏感性 (hypersensitivities)、炎性肠病 (inflammatory bowel disease)、再灌注损伤 (reperfusion injury)、类风湿性关节炎、移植排斥、溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis)、葡萄膜炎 (uveitis)、结膜炎 (conjunctivitis) 和血管炎 (vasculitis)。

[0212] 在依照本发明的任何方法中,TLR9 拮抗剂化合物能通过单独地和 / 或与任何其它对治疗或预防疾病或疾患有用的、不降低该化合物的 TLR9 拮抗剂效应的药剂组合地产生直接 TLR9 拮抗效应而以各种方式起作用。在依照本发明的任何方法中,对治疗或预防疾病或疾患有用的药剂包括但不限于疫苗、抗原、抗体 (优选单克隆抗体)、细胞毒剂、变应原、抗生素、siRNA、反义寡核苷酸、其它 TLR 激动剂或拮抗剂 (例如 TLR7 的、TLR8 的和 / 或 TLR3 的激动剂或拮抗剂)、化疗剂 (传统的化疗和现代的靶向疗法二者)、靶向治疗剂、活化的细胞、肽、蛋白质、基因疗法载体、肽疫苗、蛋白质疫苗、DNA 疫苗、佐剂、和共刺激分子 (例如细胞因子、趋化因子、蛋白质配体、反式激活因子、肽或包含经修饰氨基酸的肽)、或其组合。或者,所述药剂可包括编码抗原或变应原的 DNA 载体。或者,所述化合物可以与其它佐剂组合施用以增强针对所述化合物的免疫应答的特异性或强度。

[0213] 在依照本发明的任何方法中,TLR9 拮抗剂化合物的施用 (单独的或与任何其

它药剂组合的)可通过任何合适路径来进行,包括但不限于胃肠外(parenteral)、粘膜投递(mucosal delivery)、口服(oral)、舌下(sublingual)、经皮(transdermal)、表面(topical)、吸入(inhalation)、鼻内(intranasal)、气溶胶(aerosol)、眼内(intraocular)、气管内(intratracheal)、直肠内(intrarectal)、阴道(vaginal)、通过基因枪(by gene gun)、皮肤贴片(dermal patch)或滴眼剂(eyedrop)或漱口水(mouthwash)形式。TLR9拮抗剂化合物的治疗性组合物的施用可使用已知规程以有效减轻疾病的症状或替代标志物的量和时间段来进行。例如,TLR9拮抗剂化合物用于治疗疾病和/或病症的有效量可以是缓和或减轻症状,或者延迟或改善自身免疫性应答所必需的量。任何具体应用的有效量可以随诸如所治疗的疾病或疾患、所施用的具体寡核苷酸、受试者的体型、或疾病或疾患的严重程度等因素而变化。本领域技术人员能凭经验决定具体寡核苷酸的有效量而没有过度实验的必要。

[0214] 在系统性施用时,优选以足够剂量施用治疗性组合物以使TLR9拮抗剂化合物的血液水平达到约0.0001微摩尔至约10微摩尔。对于局部施用,比这低得多的浓度可以是有效的,而且可耐受高得多的浓度。优选的是,TLR9拮抗剂化合物的总剂量的范围为约0.001mg每名患者每天至约200mg每kg体重每天。可能希望对个体同时地或顺序地施用治疗有效量的一种或多种本发明治疗性组合物作为单次处理事件(single treatment episode)。

[0215] TLR9拮抗剂化合物可任选是与一种或多种变应原和/或抗原(自身的或外来的)、免疫原性蛋白质相连接的,诸如匙孔藤血蓝蛋白(KLH)、霍乱毒素B亚基、或任何其它免疫原性载体蛋白。TLR9拮抗剂化合物还可与其它化合物(例如佐剂)组合使用,包括但不限于弗氏不完全佐剂、KLH、单磷酸基脂质A(MPL)、明矾、和皂苷(包括QS-21和咪喹莫特(imiquimod)),或其组合。

[0216] 依照本发明这个方面的方法对于免疫系统的模型研究是有用的。所述方法对于人或动物疾病的预防性或治疗性处理也是有用的。例如,所述方法对于儿科和兽医疫苗应用是有用的。

[0217] 以下实施例旨在进一步例示本发明的某些优选实施方案,并非意图限制本发明的范围。

[0218] 实施例

[0219] 实施例1:TLR9拮抗剂化合物的合成

[0220] 免疫调节寡核苷酸是在自动化DNA/RNA合成仪上使用亚氨基磷酸酯(phosphoramidite)化学合成的。受TAC保护的(除了U)2'-O-TBDMS RNA单体, A、G、C和U,购自Sigma-Aldrich。7-脱氮-G、肌苷和洛索立宾(loxoribine)单体购自ChemGenes Corporation。0.25M 5-乙基硫代-1H-四唑、PAC-酸酐CapA和Cap B购自Glen Research。溶于二氯甲烷(DCM)的3%三氯乙酸(TCA)和5% 3H-1,2-苯二硫杂环戊二烯(Benzodithiole)-3-酮-1,1-二氧化物(Beaucage试剂)是自己配制的。

[0221] TLR9拮抗剂化合物是使用标准DNA合成方案以1-2 μM规模合成的。

[0222] 切割和碱基脱保护

[0223] 自固体支持物切下TLR9拮抗剂化合物,并将溶液于65℃进一步加热以清除外环-胺的保护基团。将所得溶液在SpeedVac中完全干燥。

[0224] 离子交换 HPLC 纯化

[0225] 通过离子交换 HPLC 纯化 TLR9 拮抗剂化合物。

[0226] 柱 :Dionex DNAPac 100 柱 (22X250)

[0227] 柱加热器 :ChromTech TL-105HPLC 柱加热器,温度设置成 80℃。

[0228] 缓冲液 A :20mM Tris-HCl, pH 7.0, 20% 乙腈

[0229] 缓冲液 B :3.0M NaCl, 20mM Tris-HCl, pH 7.0, 20% 乙腈

[0230] 流速 :10ml/min

[0231] 梯度 :

[0232] 0-2min :0% B

[0233] 2-11min :0% B 至 35% B

[0234] 11-41min :35% B 至 90% B

[0235] 41-45min :100% B

[0236] 将粗制 TLR9 拮抗剂化合物溶液注射入 HPLC。实施上述梯度并收集级分。将所有含有超过 90% 期望产物的级分混合,然后通过 RotoVap 将溶液浓缩至几乎干。添加经蒸馏的去离子水,使终体积为 10ml。

[0237] C-18 反相脱盐

[0238] 首先用 10ml 乙腈接着用 10ml 0.5M 乙酸钠将购自 Waters 的 tC-18Sep-Pak 筒条件化。加载 10ml 免疫调节寡核苷酸溶液。然后用 15ml 水洗去盐。最后通过 1ml 溶于水的 50% 乙腈洗脱免疫调节寡核苷酸。

[0239] 将溶液在 SpeedVac 中放置 30 分钟。将剩余溶液经过 0.2 微米滤器过滤,然后冻干至干。然后在水中重新溶解固体,达到期望的浓度。

[0240] 最终的溶液低于 0℃ 保存。

[0241] 毛细管电泳

[0242] 合成和纯化后,通过毛细管电泳分析 TLR9 拮抗剂化合物。

[0243] 仪器 :Beckman 5010

[0244] 毛细管 :62cm ssDNA 毛细管

[0245] 样品制备 :0.2 OD TLR9 拮抗剂化合物在 200 μ l 经蒸馏的去离子水中溶解。

[0246] 注射 :5KV 电动注射 5 秒。

[0247] 运行条件 :30℃, 14KV, 50 分。

[0248] 离子交换 HPLC 分析

[0249] 合成和纯化后,通过离子交换 HPLC 分析 TLR9 拮抗剂化合物。

[0250] 柱 :Dionex DNAPac 保护柱 (guard column) (22X250)

[0251] 柱加热器 :ChromTech TL-105 HPLC 柱加热器,温度设置成 80℃。

[0252] 缓冲液 A :100mM Tris-HCl, pH 8.0, 20% 乙腈

[0253] 缓冲液 B :2.0M LiCl, 100mM Tris-HCl, pH 8.0, 20% 乙腈

[0254] 流速 :2ml/min

[0255] 梯度 :

[0256] 0-2min :0% B

[0257] 2-10min :0% B 至 100% B

[0258] 10-15min;100% B

[0259] PAGE 分析

[0260] 在 20%聚丙烯酰胺凝胶上加载 0.30D 免疫调节寡核苷酸,并以恒定功率 4 瓦电泳大约 5 小时。在短波 UV 光下观看凝胶。

[0261] 实施例 2:人细胞培养方案

[0262] HEK293/人 TLR7 或 HEK293/人 TLR8 细胞 (Invivogen, San Diego, CA) 在 5% CO₂ 温箱中的 48 孔板中培养,每孔 250 μ l DMEM 且补充有 10%热灭活 FBS。

[0263] 报告基因转化

[0264] 稳定表达小鼠 TLR9 的 HEK293 细胞 (Invivogen, San Diego, CA) 在 5% CO₂ 温箱中的 48 孔板中培养,每孔 250 μ l DMEM 且补充有 10%热灭活 FBS。在 80%汇合时,在培养基中存在 4 μ l/ml Lipofectamine (Invitrogen, Carlsbad, CA) 的情况中用 400ng/ml SEAP (分泌型人胚胎碱性磷酸酶) 报道质粒 (pNifty2-Seap) (Invivogen) 瞬时转染培养物。在无血清培养基中分开稀释质粒 DNA 和 Lipofectamine 并在室温温育 5 分钟。温育后,将稀释的 DNA 和 Lipofectamine 混合并将混合物在室温温育 20 分钟。25 μ l 含有 100ng 质粒 DNA 和 1 μ l Lipofectamine 的 DNA/Lipofectamine 混合物等分试样添加至细胞培养板的每个孔,并继续培养 4 小时。

[0265] TLR9 拮抗剂处理

[0266] 转染后,培养基更换为新鲜培养基,将 TLR9 拮抗剂化合物添加至培养物,并将培养物继续培养 18 小时。在处理结束时,从每个处理取出 30 μ l 培养物上清液,并用于遵循制造商的方案 (Invivogen) 进行的 SEAP 测定法。

[0267] SEAP 测定法

[0268] 简言之,将培养物上清与对硝基苯基磷酸酯 (p-nitrophenyl phosphate) 底物一起温育,所生成的黄色用读板仪在 405nm 测量。数据显示为 NF- κ B 活性相对于 PBS 对照的倍数增长。(Putta MR 等, Nucleic Acids Res., 2006, 34:3231-8)。结果显示于表 3。

[0269] 实施例 3:用剂量控制的 TLR9 拮抗剂化合物处理的小鼠模型中的体内 IL-12

[0270] 分泌

[0271] 6-8 周龄的 C57BL/6 小鼠和 BALB/c 小鼠得自 Taconic Farms (Germantown, NY) 并依照 Idera Pharmaceutical 的 IACUC 批准的动物方案来饲养。给小鼠 (n = 3) 皮下 (s.c) 注射表 3 的各免疫调节寡核苷酸 1、10、或 20mg/kg (单剂)。施用免疫调节寡核苷酸后 2 小时收集血清,并通过三明治式 ELISA 或 Luminex 多重测定法测定细胞因子和趋化因子浓度。IL-12 结果显示于图 4、5、和 7,并证明了体内施用含有免疫调节寡核苷酸的新的化学组合物产生独特的细胞因子谱。所有试剂 (包括细胞因子和趋化因子抗体和标准品) 都购自 PharMingen (San Diego, CA)。

[0272] 等同方案

[0273] 虽然出于澄清和理解的目的已经较为详细地描述了上述发明,但是本领域技术人员在阅读本公开内容后会领会,可以对形式和细节做各种改变而不背离本发明和所附权利要求的真正范围。

TLR 调控化合物的线性合成

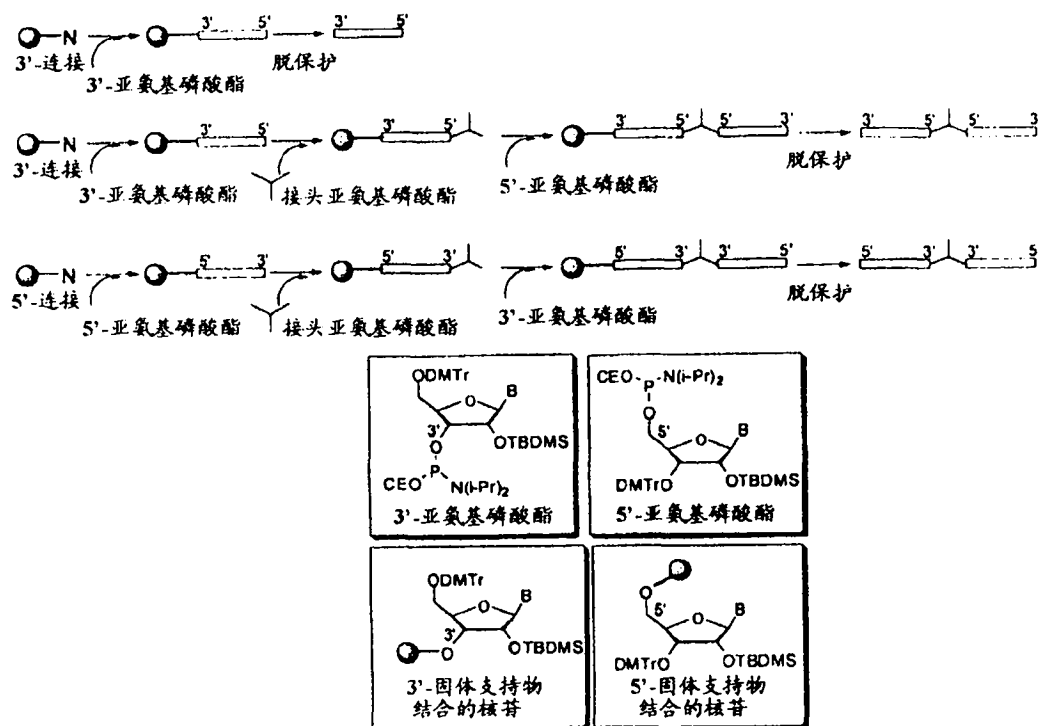


图 1

TLR 调控化合物的平行合成

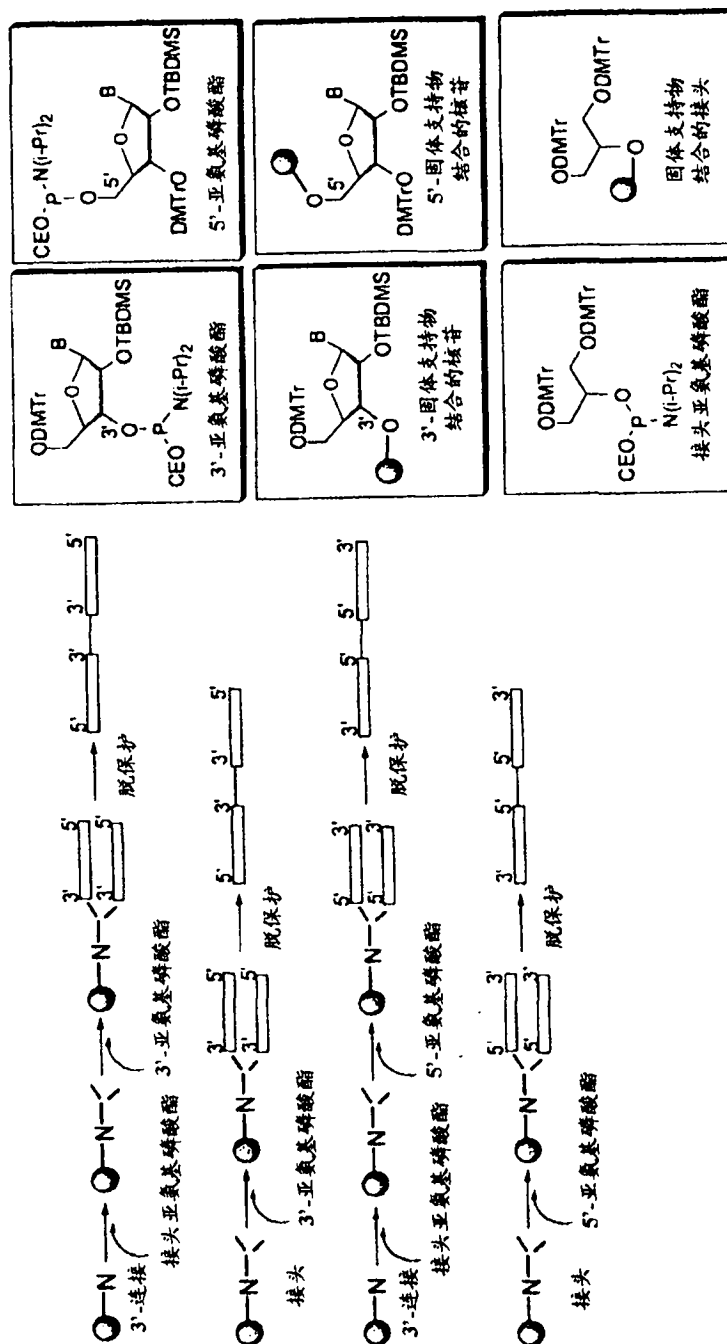


图 2

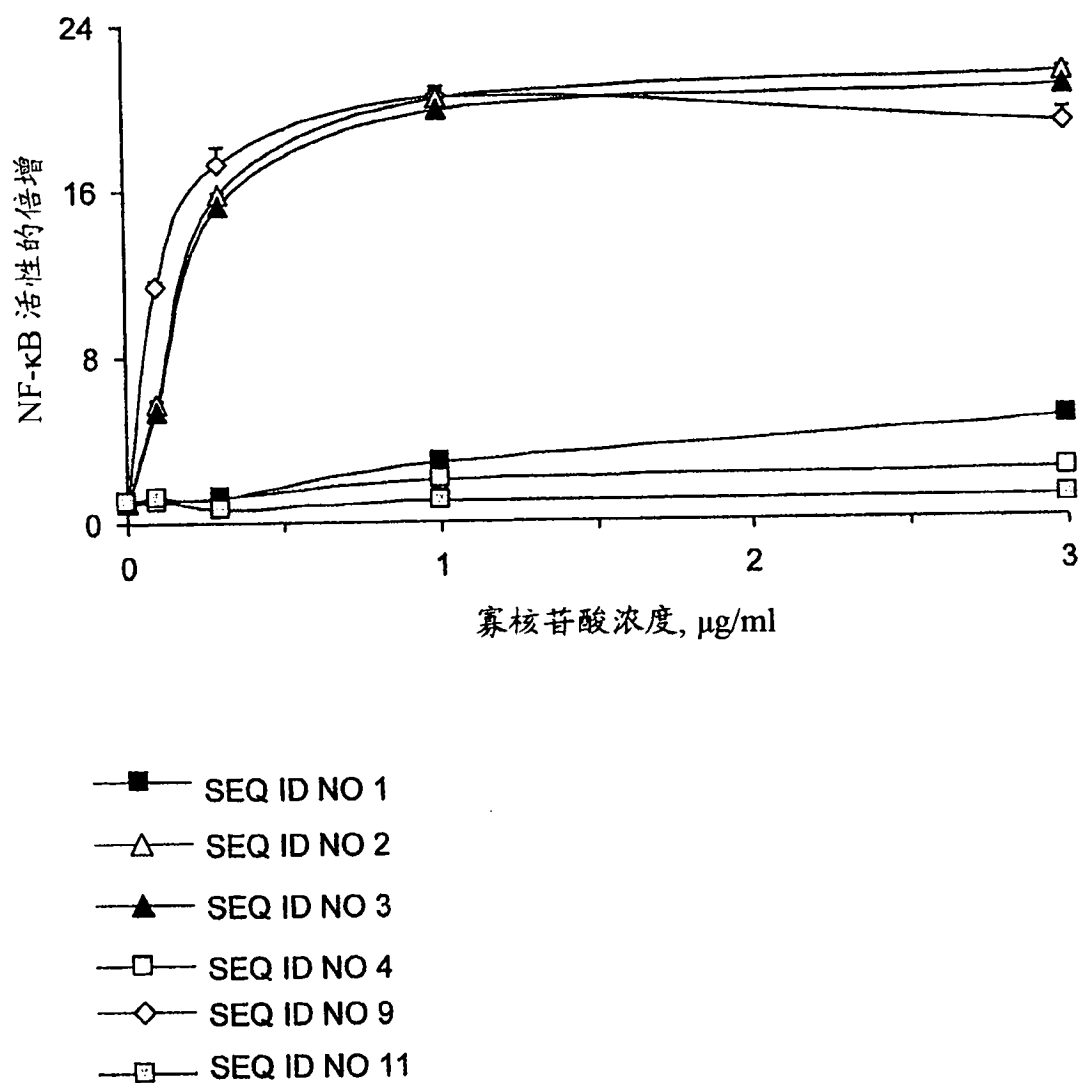


图 3

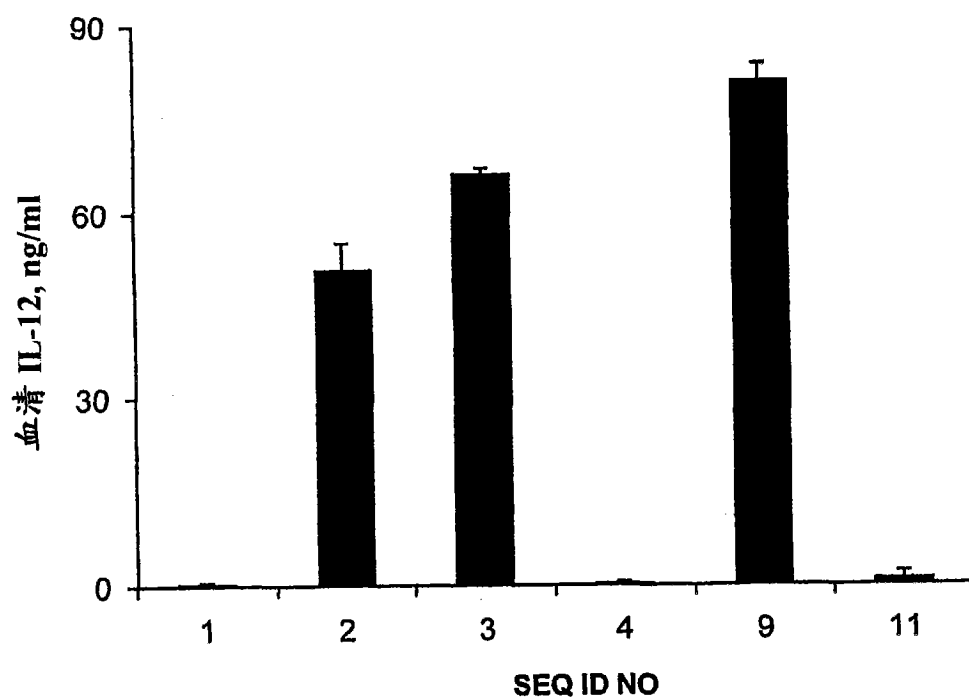


图 4

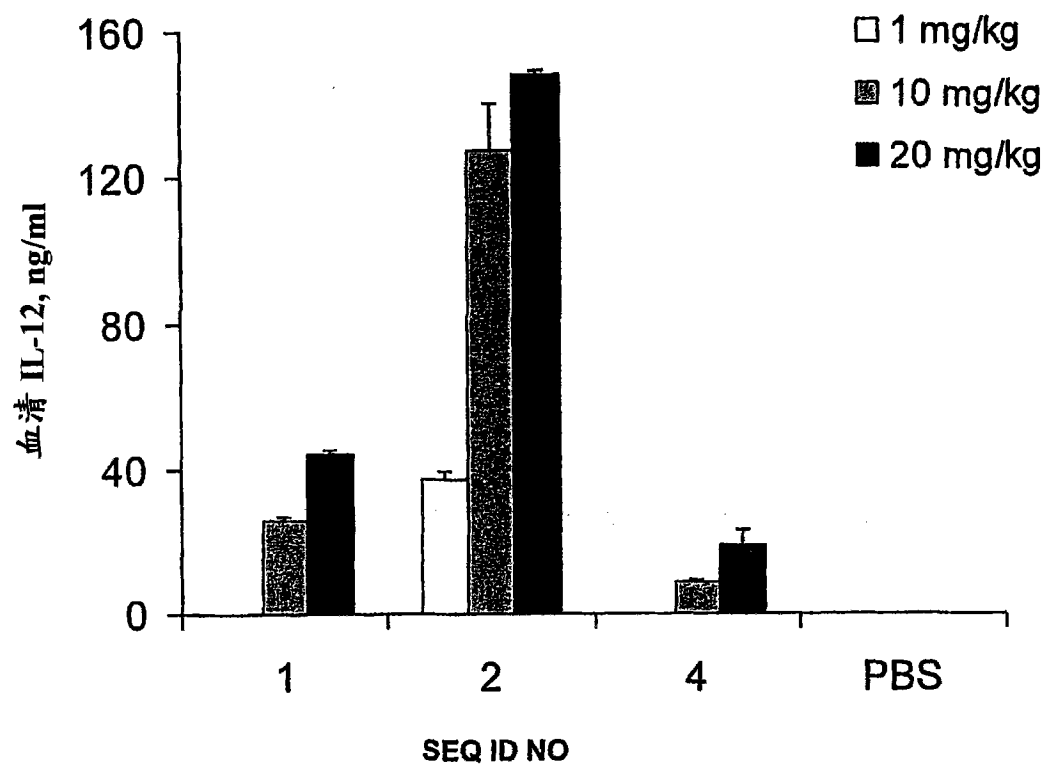


图 5

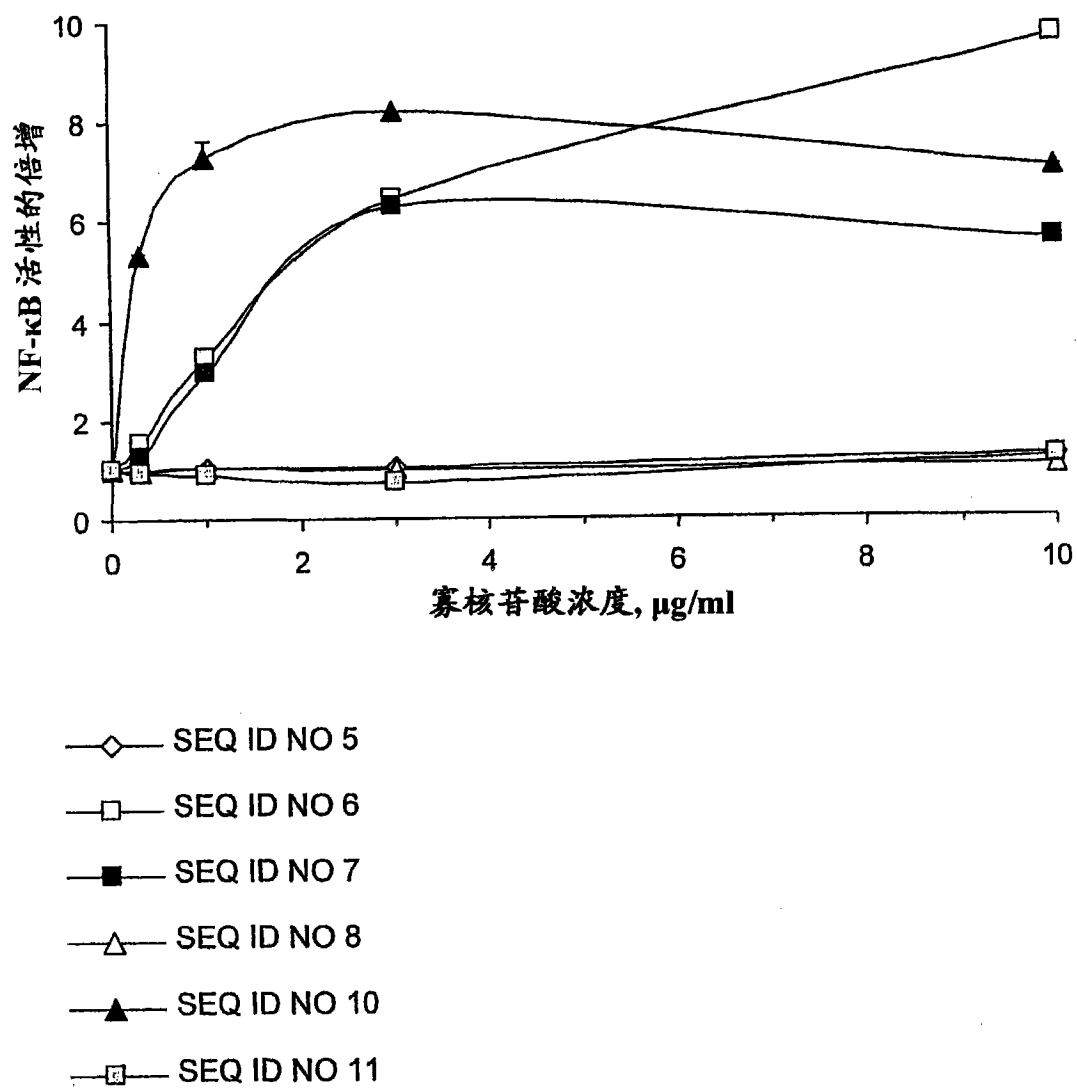


图 6

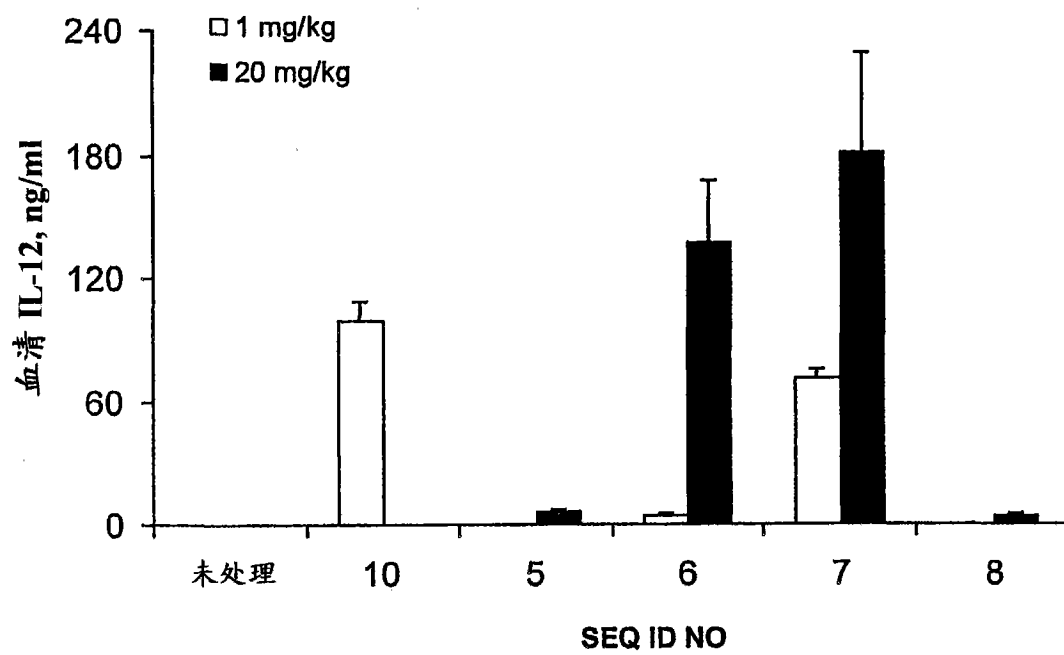


图 7