



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105658241 A

(43) 申请公布日 2016. 06. 08

(21) 申请号 201480052513. 5 *A61P 35/00*(2006. 01)

(22) 申请日 2014. 07. 25 *A61P 31/00*(2006. 01)

(30) 优先权数据 *A61P 37/00*(2006. 01)

61/858, 584 2013. 07. 25 US *A61P 37/04*(2006. 01)

A61P 37/08(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2016. 03. 24

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/048294 2014. 07. 25

(87) PCT国际申请的公布数据

W02015/013675 EN 2015. 01. 29

(71) 申请人 埃克西奎雷股份有限公司

地址 美国伊利诺斯

(72) 发明人 S·格亚兹诺夫 C·C·马德尔

T·L·哈洛 A·F·拉多维克莫雷诺

C·李施 S·安安塔木拉

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 李程达

(51) Int. Cl.

A61K 47/48(2006. 01)

权利要求书2页 说明书27页

序列表20页 附图10页

(54) 发明名称

作为免疫调节剂的基于球形核酸的构建体

(57) 摘要

本发明的方面涉及纳米级构建体及其相关方法和组合物。本发明的组合物有效用于治疗对免疫细胞活化水平敏感的紊乱,诸如自身免疫性疾病或其他基于炎症的疾病或紊乱。

1. 纳米级构建体,其包含:

核酸相互作用复合物的拮抗剂的冠部,其中所述核酸相互作用复合物的拮抗剂的表面密度为至少 $0.3\text{pmol}/\text{cm}^2$ 。

2. 纳米级构建体,其包含:

核酸相互作用复合物的拮抗剂的冠部,以及被并入所述冠部的抗原,其中所述抗原的表面密度为至少 $0.3\text{pmol}/\text{cm}^2$ 。

3. 权利要求2所述的纳米级构建体,其中所述抗原包括至少两种不同类型的抗原。

4. 纳米级构建体,其包含:

并入了核酸相互作用复合物的至少两种拮抗剂的冠部,其中所述拮抗剂选自由TLR 3、7/8和/或9的拮抗剂组成的组。

5. 权利要求1-4任一项所述的纳米级构建体,其中所述核酸相互作用复合物的拮抗剂含有间隔子。

6. 权利要求1-5任一项所述的纳米级构建体,其中所述核酸相互作用复合物的拮抗剂是RNA或DNA。

7. 权利要求6所述的纳米级构建体,其中所述核酸相互作用复合物的拮抗剂是双链RNA或双链DNA。

8. 权利要求6所述的纳米级构建体,其中所述核酸相互作用复合物的拮抗剂是单链RNA。

9. 权利要求1-8任一项所述的纳米级构建体,其中所述核酸相互作用复合物的拮抗剂的表面密度为至少 $15\text{pmol}/\text{cm}^2$ 。

10. 权利要求1-8任一项所述的纳米级构建体,其中所述核酸相互作用复合物的拮抗剂的表面密度为至少 $45\text{pmol}/\text{cm}^2$ 。

11. 权利要求6所述的纳米级构建体,其中所述核酸相互作用复合物的拮抗剂为未甲基化的脱氧核糖核酸。

12. 权利要求11所述的纳米级构建体,其中所述未甲基化的脱氧核糖核酸含有优化的免疫调节序列。

13. 权利要求1-12任一项所述的纳米级构建体,其中所述纳米级构建体含有纳米颗粒核心,所述纳米颗粒核心是金属的。

14. 权利要求13所述的纳米级构建体,其中该金属核心选自由金、银、铂、铝、钯、铜、钴、铟、镍及其混合物组成的组。

15. 权利要求13所述的纳米级构建体,其中所述纳米颗粒核心包含金。

16. 权利要求1-16任一项所述的纳米级构建体,其中所述纳米级构建体是可降解的。

17. 权利要求1-16任一项所述的纳米级构建体,其中所述纳米级构建体的直径是平均直径1nm至大约250nm、平均直径大约1nm至大约240nm、平均直径大约1nm至大约230nm、平均直径大约1nm至大约220nm、平均直径大约1nm至大约210nm、平均直径大约1nm至大约200nm、平均直径大约1nm至大约190nm、平均直径大约1nm至大约180nm、平均直径大约1nm至大约170nm、平均直径大约1nm至大约160nm、平均直径大约1nm至大约150nm、平均直径大约1nm至大约140nm、平均直径大约1nm至大约130nm、平均直径大约1nm至大约120nm、平均直径大约1nm至大约110nm、平均直径大约1nm至大约100nm、平均直径大约1nm至大约90nm、平均直径

大约1nm至大约80nm、平均直径大约1nm至大约70nm、平均直径大约1nm至大约60nm、平均直径大约1nm至大约50nm、平均直径大约1nm至大约40nm、平均直径大约1nm至大约30nm或者平均直径大约1nm至大约20nm或者平均直径大约1nm至大约10nm。

18. 纳米级构建体,其包含:

核酸相互作用复合物的拮抗剂的球形冠部,其中所述拮抗剂是具有至少一个核苷酸间磷酸二酯键的核酸。

19. 权利要求18所述的纳米级构建体,其中所述拮抗剂是CpG寡核苷酸。

20. 权利要求18-19任一项所述的纳米级构建体,其中所述核酸的每个核苷酸间键是磷酸二酯键。

21. 权利要求1-20任一项所述的纳米级构建体,其中所述冠部是球形冠部。

22. 包含权利要求1-21任一项的纳米级构建体和载体的疫苗。

23. 用于向细胞递送治疗剂的方法,其包括向所述细胞递送权利要求1-21任一项所述的纳米级构建体。

24. 用于调控靶分子的表达的方法,其包括向细胞递送权利要求1-21任一项所述的纳米级构建体。

25. 权利要求24所述的方法,其中所述靶分子是选自TLR3、7、8和9组成的组的TLR。

26. 用于拮抗TLR的方法,其包括向细胞递送权利要求1-21任一项所述的纳米级构建体。

27. 治疗受试者的方法,其包括

向所述受试者施用有效量的权利要求1-21任一项所述的纳米级构建体以降低免疫应答。

28. 权利要求27所述的方法,其中所述受试者患有感染性疾病。

29. 权利要求27所述的方法,其中所述受试者患有炎症诱导的癌症。

30. 权利要求27所述的方法,其中所述受试者患有自身免疫性疾病。

31. 权利要求27所述的方法,其中所述受试者患有变态反应。

32. 权利要求27所述的方法,其中所述受试者患有变应性疾病。

33. 权利要求27所述的方法,其中所述受试者患有炎性疾病。

34. 权利要求27所述的方法,其中所述受试者患有代谢性疾病。

35. 权利要求27所述的方法,其中所述受试者患有心血管疾病。

36. 权利要求27所述的方法,其中所述受试者是组织或器官移植的候选者或者接受者。

37. 调节受试者中免疫应答的方法,其包括

向所述受试者施用有效量的权利要求18-21任一项所述的纳米级构建体以调节免疫应答。

作为免疫调节剂的基于球形核酸的构建体

[0001] 相关申请

[0002] 本申请根据35U.S.C.§119(e)要求2013年7月25日提交的题为“作为用于预防和治疗用途的免疫刺激剂的基于球形核酸的构建体”的美国临时申请号61/858,584的优先权，通过引用将其全文并入本文中。

发明领域

[0003] 本发明涉及用于递送核酸相互作用复合物的拮抗剂的纳米级构建体及其方法和组合物。

[0004] 发明背景

[0005] 免疫细胞(特别是巨噬细胞、树突状细胞和B细胞)使用Toll样受体(TLR)来了解环境中的外源材料(诸如细菌成分和外源DNA或RNA⁴⁻¹⁰)。这些受体一旦活化之后,通过特定细胞信号传导途径(主要通过转录因子NF κ B¹¹)产生大的免疫应答。然后,NF κ B的活化导致产生几种分泌的信号传导分子(诸如TNF α),其促进免疫应答至相邻的免疫细胞¹¹。这种免疫感觉系统(sensory system)被称为固有免疫应答。在几种自身免疫性疾病中,身体将自身成分(诸如DNA或RNA)不正确地识别为外源成分,并会启动(mount)大规模的炎性应答,如果不受控制的话,其可以是破坏性的、痛苦的和威胁生命的。这种情况的最流行的实例包括如果没有进行仔细调控则主要侵袭关节并且会破坏软骨和骨的类风湿性关节炎以及如果不受控制则也会侵袭内部器官(诸如心、肾和肺)并可能致命的狼疮。目前的治疗主要依赖于通过TNF α 结合抗体(依那西普等)来隔绝(sequestering)免疫细胞所得到的细胞因子的产生以及用化学治疗剂(诸如氨甲蝶呤)进行全身(general)免疫抑制和消除B细胞群体以延缓(stave off)适应性免疫应答。但是,这些治疗常常很难容忍和/或随时间推移变得易于获得耐药性。因此,针对该信号传导级联的开始时TLR活化的拮抗剂的开发应当是阻断患有自身免疫性紊乱的患者中自身DNA和RNA的不适当识别的强效疗法。

[0006] TLR 7、8和9均驻留于免疫细胞的内体。TLR 9识别未甲基化的CpG基序,其在细菌DNA中常见但在人DNA中不常见^{5,10}。TLR7和8二者均识别在病毒感染中常见的短单链RNA的特异性序列⁶⁻⁸。重要的是,这些能够拮抗它们各自TLR并阻断下游信号传导的常见识别基序的模拟物是已知的¹²⁻¹⁷。但是,它们在治疗中的用途被它们能够被递送至病理部位而不被体内降解的能力所限制。

[0007] 发明概述

[0008] 本文中所述的是使用纳米级构建体通过调节受体相互作用(诸如TLR)用于调控免疫应答的新方法和组合物。本发明的方面涉及纳米级构建体,其具有核酸相互作用复合物的拮抗剂的冠部,其中核酸相互作用复合物的拮抗剂的表面密度为至少0.3pmol/cm²。

[0009] 在其他方面,本发明是构建体,其具有核酸相互作用复合物的拮抗剂的冠部,以及被并入冠部的抗原。在一些实施方案中,抗原的表面密度为至少0.3pmol/cm²。在其他实施方案中,抗原包括至少两种不同类型的抗原。

[0010] 在又一些其他方面,本发明是构建体,其具有并入了核酸相互作用复合物的至少

两种拮抗剂的冠部,其中拮抗剂选自由TLR 3、7/8和/或9的拮抗剂组成的组。

[0011] 在一些实施方案中,核酸相互作用复合物的拮抗剂含有间隔子。

[0012] 在其他实施方案中,核酸相互作用复合物的拮抗剂是RNA或DNA。核酸相互作用复合物的拮抗剂可以是例如双链RNA或双链DNA。备选地,核酸相互作用复合物的拮抗剂可以是单链RNA。在一些实施方案中,核酸相互作用复合物的拮抗剂为未甲基化的脱氧核糖核酸,诸如优化的免疫调节序列。

[0013] 在某些实施方案中,纳米级构建体包括纳米颗粒核心并且任选地纳米颗粒核心是金属的。在某些实施方案中,金属选自由金、银、铂、铝、钯、铜、钴、钨、镍及其混合物组成的组。在某些实施方案中,纳米颗粒核心包含金。在某些实施方案中,纳米颗粒核心是包括可降解金的晶格结构(lattice structure)。在一些实施方案中,纳米级构建体是可降解的。

[0014] 在某些实施方案中,纳米级构建体的直径是平均直径1nm至大约250nm、平均直径大约1nm至大约240nm、平均直径大约1nm至大约230nm、平均直径大约1nm至大约220nm、平均直径大约1nm至大约210nm、平均直径大约1nm至大约200nm、平均直径大约1nm至大约190nm、平均直径大约1nm至大约180nm、平均直径大约1nm至大约170nm、平均直径大约1nm至大约160nm、平均直径大约1nm至大约150nm、平均直径大约1nm至大约140nm、平均直径大约1nm至大约130nm、平均直径大约1nm至大约120nm、平均直径大约1nm至大约110nm、平均直径大约1nm至大约100nm、平均直径大约1nm至大约90nm、平均直径大约1nm至大约80nm、平均直径大约1nm至大约70nm、平均直径大约1nm至大约60nm、平均直径大约1nm至大约50nm、平均直径大约1nm至大约40nm、平均直径大约1nm至大约30nm或者平均直径大约1nm至大约20nm或者平均直径大约1nm至大约10nm。

[0015] 在其他方面,本发明是纳米级构建体,其具有核酸相互作用复合物的拮抗剂的球形冠部,其中拮抗剂是具有至少一个核苷酸间磷酸二酯键的核酸。在一些实施方案中,核酸的每个核苷酸间键是磷酸二酯键。

[0016] 在本发明的一些实施方案中,冠部是球形冠部。

[0017] 在本发明的其他方面中提供了由如本文中所述的纳米级构建体和载体组成的疫苗。

[0018] 在其他方面中提供了用于向细胞递送治疗剂的方法,其包括向细胞递送本发明的纳米级构建体。

[0019] 在本发明的其他方面中提供了用于调控靶分子的表达的方法。该方法涉及向细胞递送本发明的纳米级构建体。在一些实施方案中,靶分子是选自由TLR3、7、8和9组成的组的TLR。

[0020] 在本发明的其他方面中提供了用于拮抗TLR的方法,其通过向细胞递送如本文中所述的纳米级构建体。

[0021] 根据其他方面,本发明是治疗受试者的方法,其涉及向受试者施用有效量的如本文中所述的纳米级构建体以降低免疫应答。在一些实施方案中,受试者患有感染性疾病、癌症、自身免疫性疾病、哮喘或变应性疾病、炎性疾病、代谢性疾病、心血管疾病,或者受试者是组织或器官移植的候选者或者接受者。

[0022] 在其他方面,本发明是调节受试者中免疫应答的方法,其通过向受试者施用有效量的核酸相互作用复合物的拮抗剂的冠部的纳米级构建体以调节免疫应答,其中所述拮抗

剂是具有至少一个核苷酸间磷酸二酯键的核酸。

[0023] 在某些实施方案中,该方法涉及向细胞递送治疗或检测方式(modality)。

[0024] 本发明进一步的方面涉及试剂盒,其包含:纳米颗粒核心;拮抗剂和用于组装拮抗剂-纳米颗粒的说明。在某些实施方案中,该试剂盒进一步包含使用说明。

[0025] 本发明的每个限制可以涵盖本发明的各种实施方案。因此,预计涉及任一种元素或元素的组合的本发明的每个限制可以被包括于本发明的每个方面。本发明不限于所应用的以下说明中所列出的或附图中所示的成分的构建和排列的细节。本发明能够具有其他实施方案并以各种方式进行实践或执行。

附图说明

[0026] 附图并不旨在按比例绘制。在附图中,在各个图中示出的每个相同或近似相同的成分由相同的标号表示。为了清晰起见,在每幅图中并非每个成分均可被标记。在附图中:

[0027] 图1A-1D是证实本发明的构建体(AST-015)能够抑制巨噬细胞样RAW Blue细胞中CpG诱导的TLR9活化的一组图。图1A显示的是AST-012,图1B显示的是AST-013,图1C显示的是AST-014,图1D显示的是AST-015。

[0028] 图2A-2D是证实用本发明的构建体(AST-015)预处理能够抑制巨噬细胞样RAW-Blue细胞中CpG诱导的TLR9活化的一组图。在用TLR9的激动剂刺激之前用免疫调节构建体孵育细胞。IC50值以纳摩尔(nM)表示。“未处理”线是指从未经过任何刺激剂(stimulant)的细胞TLR活化水平。

[0029] 图3A-3D是证实用本发明的构建体(AST-015)和CpG DNA同时处理能够抑制巨噬细胞样RAW-Blue细胞中CpG诱导的TLR9活化的一组图。在RAW-Blue报告细胞系中针对TLR活化比较了游离免疫调节DNA(图3A和3B)和免疫调节SNA(图3C和3D)的效力。在这些条件下,在用TLR9的激动剂刺激的同时用免疫调节构建体孵育细胞。IC50值以纳摩尔(nM)表示。“未处理”线是指从未经过任何刺激剂的细胞TLR活化水平。

[0030] 图4是证实本发明的构建体(AST-015)能够抑制慢性刺激的巨噬细胞样RAW-Blue细胞中CpG诱导的TLR9活性的图。在RAW-Blue报告细胞系中针对TLR活化确定游离免疫调节DNA的效力。在这些条件下,先用TLR9的激动剂构建体预刺激细胞至慢性水平,然后在用TLR9激动剂再刺激的同时用免疫调节构建体孵育细胞。IC50值以纳摩尔(nM)表示。“未处理”线是指从未经过任何刺激剂的细胞TLR活化水平。“o/n未处理”线是指经过刺激剂过夜但在第二天没有接受第二剂量的刺激剂的细胞。

[0031] 图5A和5B是证实AST开发的免疫调节序列4084F7/8能够抑制巨噬细胞样RAW-Blue细胞中CpG诱导的TLR9活性和ssRNA诱导的TLR7/8活性的一组图。将AST-015中所使用的4084F序列和AST开发的修饰的4084F7/8序列与来自Dynavax的临床样品的IRS869和IRS954就对抗TLR9(图5A)和TLR7/8(图5B)的效力进行了比较。IC50值以纳摩尔(nM)表示。“未处理”线是指从未经过任何刺激剂的细胞TLR活化水平。

[0032] 图6显示的是表示含有免疫调节DNA(irDNA)的新的构建体的图。图6显示可以使用直径13nm的金纳米颗粒合成irSNA,所述金纳米颗粒作为用于添加硫醇化(thiolated)irDNA和短乙二醇聚合物的模板。

[0033] 图7A-7D是描绘本发明的构建体阻断各种激动剂的能力的图。两种所测试的构建

体均能够阻断所测试的所有三种激动剂:咪喹莫特(TLR7,图7B)、CpG 1826(CpG,TLR9,图7D)、细菌脂多糖(LPS,TLR4,图7C)的刺激或者能够同时阻断所有三种激动剂的刺激(图7B)。

[0034] 详述

[0035] 本发明不限于所应用的以下说明中所列出的或附图中所示的成分的构建和排列的细节。本发明能够具有其他实施方案并以各种方式进行实践或执行。此外,本文中使用的措辞和术语是为了说明的目的,而不应被视为限制。本文中使用“包括”、“包含”或“具有”、“含有”、“涉及”及其变型是指涵盖其后所列出的项目及其等价物以及其他项目。

[0036] 在一些方面,本发明涉及新的含有免疫调节DNA(irDNA)的构建体或颗粒。免疫调节DNA可以是例如拮抗TLR9、TLR7/8和/或TLR7/8/9的DNA寡核苷酸。颗粒具有吸附其的寡核苷酸结构的密集排列,其在本文中被等价地称为纳米颗粒构建体、纳米级构建体或irDNA。这些构建体能够拮抗TLR介导的信号传导,所述信号传导响应于几种自身免疫病理学常见的含有非甲基化CpG单链寡核苷酸和单链RNA的激动剂。在下面的实施例中呈现了一些示例性数据。在该数据中显示可以使用直径13nm的金纳米颗粒合成irDNA,所述金纳米颗粒作为用于添加巯醇化(thiolated)irDNA和短乙二醇聚合物的模板(示于方案1中,图6B)。发现对抗驻留内体的TLR的、含有irDNA的irDNA能够提供强效和新的向免疫细胞递送irDNA以阻断紊乱(诸如自身免疫性紊乱诸如类风湿性关节炎)中常见的TLR介导的信号传导途径的过度活化的方法。这些构建体比现有的用于递送用于治疗紊乱的irDNA的方法显著更有效的发现是相当出乎意料的。尽管申请人不被机制束缚,相信本发明的构建体中呈现的irDNA的密度大大增强核酸受体调节。

[0037] 实施例中呈现的数据证实,irDNA是鼠巨噬细胞样细胞(RAW)中TLR9和TLR7/8介导的NF κ B和TNF α 免疫活化信号传导的强效抑制剂。在一个实施例中,被并入irDNA的低nM剂量的免疫调节寡核苷酸序列能够阻断活化的TLR9和TLR7/8介导的NF κ B/TNF α 信号传导。重要的是,具有天然磷酸二酯主链的DNA在被并入irDNA时是有效的,而在作为溶液中的游离寡核苷酸被施用时无效的。并入含有硫代磷酸酯(ps)主链的序列的irDNA能够与游离DNA施用一样有效调节TLR的活化,但具有更长释放谱的附加优点。目前大多数基于DNA的疗法想要发挥任何效力需要硫代磷酸酯主链修饰,但由于硫代磷酸酯介导的全身毒性而被限于治疗窗口。本发明的构建体能够并入天然的和修饰的主链化学物质(chemistries)的事实大大增强了用于在该平台上开发的疗法的潜在治疗窗口。

[0038] NF κ B和TNF α 信号传导途径是自身免疫性紊乱(特别是RA)的急性病理学的主要贡献者¹⁸。传统疗法主要依赖于隔绝(sequestration)策略以下调过度活化的免疫系统的作用,并且本质上是保守的(reactionary)¹⁹⁻²¹。irDNA积极主动地通过阻断主要负责导致活化促炎细胞应答的信号传导级联的受体调控免疫信号传导。采用该作用机制给治疗自身免疫性患者(包括RA患者)提供显著潜在改善,例如导致增强的效力,降低的耐药性机会和用于更大的治疗窗口的潜力。与许多广谱治疗不同,由于irDNA仅阻断主要只存在于免疫细胞中的这些信号传导途径的过度活化,施用irDNA对于正常组织和细胞的副作用可以得到降低或者甚至被消除。

[0039] 本发明的方面涉及纳米级构建体。纳米级构建体是指具有容纳于几何位置中的一种或多种核酸的纳米大小的构建体。纳米级构建体通常被称为一组核酸的冠部。本文中使

用的冠部是指由核酸分子组成的外壳。冠部可以具有由核酸或其他材料(诸如金属)组成的纳米颗粒核心。备选地,冠部可以简单地以具有中空核心的几何形状排列的一组核酸,即核酸的三维形状的层。通常、但不总是如此,冠部具有球形形状。

[0040] 在该情况下,当冠部包括纳米颗粒核心时,核酸可以被直接连接至该核心。一些或所有的核酸可以通过共价键或非共价键被直接或间接连接至其他核酸。一种核酸与另一核酸的键可以是除了该核酸与核心的键之外的键,或者备选地是该核酸与核心的键。核酸的一种或多种还可以被连接至其他分子(诸如抗原)。

[0041] 当冠部不包括纳米颗粒核心时,核酸可以通过共价键或非共价键被直接或间接互相连接。在一些实施方案中,可以通过将核酸在晶格或其他可溶解结构上成层(layering)形成不包括纳米颗粒核心的冠部,然后溶解晶格或其他结构以产生空的中心。

[0042] 本文中使用的纳米级构建体是具有纳米级(即在大约1nm和1微米之间)平均直径(average diameter)的构建体。例如,在一些情况下,纳米级构建体的直径是平均直径(mean diameter)大约1nm至大约250nm、平均直径大约1nm至大约240nm、平均直径大约1nm至大约230nm、平均直径大约1nm至大约220nm、平均直径大约1nm至大约210nm、平均直径大约1nm至大约200nm、平均直径大约1nm至大约190nm、平均直径大约1nm至大约180nm、平均直径大约1nm至大约170nm、平均直径大约1nm至大约160nm、平均直径大约1nm至大约150nm、平均直径大约1nm至大约140nm、平均直径大约1nm至大约130nm、平均直径大约1nm至大约120nm、平均直径大约1nm至大约110nm、平均直径大约1nm至大约100nm、平均直径大约1nm至大约90nm、平均直径大约1nm至大约80nm、平均直径大约1nm至大约70nm、平均直径大约1nm至大约60nm、平均直径大约1nm至大约50nm、平均直径大约1nm至大约40nm、平均直径大约1nm至大约30nm、平均直径大约1nm至大约20nm、平均直径大约1nm至大约10nm、平均直径大约5nm至大约150nm、平均直径大约5至大约50nm、平均直径大约10至大约30nm、平均直径大约10至150nm、平均直径大约10至大约100nm、平均直径大约10至大约50nm、平均直径大约30至大约100nm或者平均直径大约40至大约80nm。

[0043] 在一些情况下,冠部包括附接至核酸相互作用复合物的一种或多种拮抗剂和/或抗原的纳米颗粒核心。本文中使用的纳米颗粒核心是指没有任何附接的形式(modality)的纳米颗粒构建体的纳米颗粒成分。在一些情况下,纳米颗粒核心是金属的。应当理解的是,纳米颗粒核心可以包含任何金属。金属的几种非限制性实例包括金、银、铂、铝、钯、铜、钴、铟、镍及其混合物。在一些实施方案中,纳米颗粒核心包含金。例如,纳米颗粒核心可以是包括可降解金的晶格结构。纳米颗粒还可以包含半导体和磁性材料。

[0044] 与本发明的方面相容的纳米颗粒的非限制性实例被描述于并被通过引用并入自:美国专利号7,238,472、美国专利公开号2003/0147966、美国专利公开号2008/0306016、美国专利公开号2009/0209629、美国专利公开号2010/0136682、美国专利公开号2010/0184844、美国专利公开号2010/0294952、美国专利公开号2010/0129808、美国专利公开号2010/0233270、美国专利公开号2011/0111974、PCT公开号W02002/096262、PCT公开号W02003/08539、PCT公开号W02006/138145、PCT公开号W02008/127789、PCT公开号W02008/098248、PCT公开号W02011/079290、PCT公开号W02011/053940、PCT公开号W02011/017690和PCT公开号W02011/017456。可以根据本领域已知的任何手段合成或可以市售获得与本发明相关的纳米颗粒。例如纳米颗粒的市售供应商的几个非限制性实例包括:Ted Pella,

Inc., Redding, CA, Nanoprobe, Inc., Yaphank, NY, Vacuum Metallurgical Co., Ltd., Chiba, Japan 和 Vector Laboratories, Inc., Burlington, CA。

[0045] 本文中使用的核酸相互作用复合物是指与核酸分子相互作用并且例如被刺激以产生响应于该相互作用的免疫应答的分子或分子的复合物。该分子或分子的复合物可以是受体。在一些实施方案中,核酸相互作用复合物是模式识别受体(PRR)复合物。PRR是由识别病原体相关分子模式(PAMP)的固有免疫系统的细胞所表达的蛋白质组成的免疫系统的原始(primitive)部分,所述PAMP与微生物病原体或细胞应激以及损伤相关分子模式(DAMP)相关,所述DAMP与细胞损伤过程中释放的细胞成分相关。PRR包括但不限于膜结合的PRR,诸如受体激酶、Toll样受体(TLR)和C型凝集素受体(CLR)(甘露糖受体和无唾液酸糖蛋白受体);胞质PRR,诸如RIG-I样受体(RLR)、RNA解旋酶、植物PRR和非RD激酶;以及分泌的PRR。

[0046] 核酸相互作用复合物包括但不限于TLR、RIG-I、转录因子、细胞翻译装置、细胞转录装置、核酸作用酶和核酸相关自体抗原。其为核酸相互作用复合物的拮抗剂的核酸分子包括但不限于TLR的拮抗剂和RIG-I、转录因子、细胞翻译装置、细胞转录装置、核酸作用酶和核酸相关自体抗原的拮抗剂。

[0047] 在一些实施方案中,核酸相互作用复合物的拮抗剂是TLR的拮抗剂。本文中使用的TLR的拮抗剂是与TLR相互作用并调节(即降低)TLR的活性的核酸分子。

[0048] Toll样受体(TLR)是在哺乳动物的固有免疫中具有关键作用的高度保守的多肽家族。已经鉴定了至少十个家族成员,被命名为TLR1-TLR10。各种TLR的胞质结构域的特征为Toll-白介素1(IL-1)受体(TIR)结构域。Medzhitov R等人(1998)Mol Cell 2:253-8。通过TLR识别微生物入侵触发在拟南芥和哺乳动物中进化保守的信号传导级联的活化。已经报道含有TIR结构域的接头蛋白MyD88与TLR相关并将IL-1受体相关激酶(IRAK)和肿瘤坏死因子(TNF)受体相关因子6(TRAF6)募集至TLR。MyD88依赖的信号传导途径被认为导致NF- κ B转录因子和c-Jun NH₂端激酶(Jnk)促分裂原活化的蛋白激酶(MAPK)的活化,这些是免疫活化和炎性细胞因子产生中的关键步骤。综述参见Aderem A等人(2000)Nature 406:782-87。

[0049] TLR被认为在各种组织中和各种类型的免疫细胞上差异表达。例如,已经报道,人TLR7表达于胎盘、肺、脾、淋巴结、扁桃体和类浆细胞前体树突状细胞(pDC)上。Chuang T-H等人(2000)Eur Cytokine Netw 11:372-8;Kadowaki N等人(2001)J Exp Med 194:863-9。已经报道,人TLR8表达于肺、外周血白细胞(PBL)、胎盘、脾、淋巴结中和单核细胞上。Kadowaki N等人(2001)J Exp Med 194:863-9;Chuang T-H等人(2000)Eur Cytokine Netw 11:372-8。据报道,人TLR9表达于脾、淋巴结、骨髓、PBL中和pDC和B细胞上。Kadowaki N等人(2001)J Exp Med 194:863-9;Bauer S等人(2001)Proc Natl Acad Sci USA 98:9237-42;Chuang T-H等人(2000)Eur Cytokine Netw 11:372-8。

[0050] 人和鼠TLR7的核苷酸序列和氨基酸序列是已知的。参见例如GenBank登录号:AF240467,AF245702,NM_016562,AF334942,NM_133211;和AAF60188,AAF78035,NP_057646,AAL73191以及AAL73192,其所有内容通过引用并入本文中。据报道,人TLR7长1049个氨基酸。据报道,鼠TLR7长1050个氨基酸。TLR7多肽包括具有富含亮氨酸的重复区域的胞外结构域、跨膜结构域和包括TIR结构域的胞内结构域。

[0051] 人和鼠TLR8的核苷酸序列和氨基酸序列是已知的。参见例如GenBank登录号:AF246971,AF245703,NM_016610,XM_045706,AY035890,NM_133212;和AAF64061,AAF78036,

NP_057694, XP_045706, AAK62677以及NP_573475,其所有内容通过引用并入本文中。据报道,人TLR8以至少两种异形体(isoform)的形式存在,一种长1041个氨基酸而另一种长1059个氨基酸。鼠TLR8长1032个氨基酸。TLR8多肽包括具有富含亮氨酸的重复区域的胞外结构域、跨膜结构域和包括TIR结构域的胞内结构域。

[0052] 人和鼠TLR9的核苷酸序列和氨基酸序列是已知的。参见例如GenBank登录号:NM_017442, AF259262, AB045180, AF245704, AB045181, AF348140, AF314224, NM_031178;和NP_059138, AAF72189, BAB19259, AAF78037, BAB19260, AAK29625, AAK28488以及NP_112455,其所有内容通过引用并入本文中。据报道,人TLR9以至少两种异形体的形式存在,一种长1032个氨基酸而另一种长1055个氨基酸。鼠TLR9长1032个氨基酸。TLR9多肽包括具有富含亮氨酸的重复区域的胞外结构域、跨膜结构域和包括TIR结构域的胞内结构域。

[0053] 本文中使用的术语“TLR信号传导”是指与通过TLR信号传导相关的胞内信号传导的任何方面。本文中使用的术语“TLR介导的免疫应答”是指与TLR信号传导相关的免疫应答。TLR信号传导或活性的降低是指信号传导或活性相对于基线的下降。基线水平可以是其中免疫刺激分子正引起TLR刺激的水平。在该情况下,信号传导或活性的降低是相对于免疫刺激分子所获得的信号传导水平或活性水平的信号传导或活性的降低。

[0054] TLR7介导的免疫应答是与TLR7信号传导相关的应答。TLR7介导的免疫应答通常特征为IFN- α 和IFN诱导型的细胞因子(诸如IP-10和I-TAC)的诱导。在TLR7介导的免疫应答中所诱导的细胞因子IL-1 α / β 、IL-6、IL-8、MIP-1 α / β 和MIP-3 α / β 的水平小于在TLR8介导的免疫应答中所诱导的那些。

[0055] TLR8介导的免疫应答是与TLR8信号传导相关的应答。该应答的特征进一步在于促炎细胞因子(诸如IFN- γ 、IL-12p40/70、TNF- α 、IL-1 α / β 、IL-6、IL-8、MIP-1 α / β 和MIP-3 α / β)的诱导。

[0056] TLR9介导的免疫应答是与TLR9信号传导相关的应答。该应答的特征进一步至少在于IFN- γ 和IL-12的产生/分泌,尽管其水平低于经TLR8介导的免疫应答所获得的水平。

[0057] 本文中使用的“TLR7/8的拮抗剂”统指能够相对于基线水平降低TLR7和/或TLR8的信号传导的任何核酸(即TLR7和/或TLR8的拮抗剂)。一些TLR7/8的拮抗剂只降低TLR7的信号传导(例如TLR7特异性拮抗剂),一些只降低TLR8的信号传导(例如TLR8特异性拮抗剂),而其他降低TLR7和TLR8二者的信号传导。

[0058] 本文中使用的术语“TLR9的拮抗剂”是指能够降低TLR9的信号传导的任何药剂(即TLR9的拮抗剂)。

[0059] 在一些实施方案中,TLR 7、8或9的拮抗剂包括免疫调节核酸。免疫调节核酸包括但不限于落入下式的核酸:5'R_nJGCN_z3',其中每个R是一种核苷酸,n是大约0至10的整数,J是U或T,每个N是一种核苷酸,并且z是大约1至大约100的整数。在一些实施方案中,n是0而z是大约1至大约50。在一些实施方案中,N是5'S₁S₂S₃S₄3',其中S₁、S₂、S₃和S₄独立地为G、I或7-脱氮杂-dG。在一些实施方案中,TLR7 TLR8和/或TLR9的拮抗剂选自由以下组成的组:

[0060] TCCTGGAGGGGTTGT(SEQ ID NO:1),

[0061] TGCTCCTGGAGGGGTTGT(SEQ ID NO:2),

[0062] TGCTGGATGGGAA(SEQ ID NO:3), TGCCCTGGATGGGAA(SEQ ID NO:4), TGCTTGACACCTGGATGGGAA(SEQ ID NO:5), TGCTGGATGGGAA/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/

(13nm AuNP;SEQ ID NO:6),

[0063] TGCCCTGGATGGGAA/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/(13nm AuNP;SEQ ID NO:7),

[0064] TGCTTGACACCTGGATGGGAA/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/(13nm AuNP;SEQ ID NO:8),

[0065] TCCTGAGCTTGAAGT/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/(SEQ ID NO:9),

[0066] TCCTGAGCTTGAAGT/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/(13nm AuNP;SEQ ID NO:10),

[0067] TTCTGGCGGGGAAGT/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/(SEQ ID NO:11),

CTCCTATTGGGGGTTTCCTAT/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/(SEQ ID NO:12),

[0068] ACCCCCTCTACCCCTCTACCCCTCT/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/(SEQ ID NO:13),

CCTGGATGGGAA/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/(SEQ ID NO:14),

[0069] TTCTGGCGGGGAAGT/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/(13nm AuNP;SEQ ID NO:15),

[0070] CTCCTATTGGGGGTTTCCTAT/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/(13nm AuNP;SEQ ID NO:16),

[0071] ACCCCCTCTACCCCTCTACCCCTCT/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/(13nm AuNP;SEQ ID NO:17),

[0072] CCTGGATGGGAA/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/(13nm AuNP;SEQ ID NO:18),

[0073] C*C*T*GGATGGGAA/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/(13nm AuNP;SEQ ID NO:19),

[0074] CCTGGATG*G*G*AA/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/(13nm AuNP;SEQ ID NO:20),

[0075] C*C*T*GGATG*G*G*AA/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/(13nm AuNP;SEQ ID NO:21),

[0076] /Chol/CCTGGATGGGAA/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/(13nm AuNP;SEQ ID NO:22),

[0077] /Stryl/CCTGGATGGGAA/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/(13nm AuNP;SEQ ID NO:23),

[0078] /Palm/CCTGGATGGGAA/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/(13nm AuNP;SEQ ID NO:24)

T*C*C*T*G*G*A*G*G*G*G*T*T*G*T(SEQ ID NO:25)

[0079] T*G*C*T*C*C*T*G*G*A*G*G*G*G*T*T*G*T(SEQ ID NO:26)

[0080] T*G*C*T*G*G*A*T*G*G*G*A*A(SEQ ID NO:27)

[0081] T*G*C*C*C*T*G*G*A*T*G*G*G*A*A(SEQ ID NO:28)

[0082] T*G*C*T*T*G*A*C*A*C*C*T*G*G*A*T*G*G*G*A*A(SEQ ID NO:29)

[0083] T*G*C*T*G*G*A*T*G*G*G*A*A*/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/(13nm AuNP;SEQ ID NO:30)

[0084] T*G*C*C*C*T*G*G*A*T*G*G*G*A*A*/iSp18//iSp18//3ThioM C3-D/(13nm AuNP;SEQ ID NO:31)

[0085] T*G*C*T*T*G*A*C*A*C*C*T*G*G*A*T*G*G*G*A*A*/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/(13nm AuNP;SEQ ID NO:32)

[0086] T*C*C*T*G*A*G*C*T*T*G*A*A*G*T*/iSp18//iSp18//3ThioM C3-D/(13nm AuNP;SEQ ID NO:33)

[0087] T*C*C*T*G*A*G*C*T*T*G*A*A*G*T*/iSp18//iSp18//3ThioM C3-D/(13nm AuNP;SEQ ID NO:34)

[0088] T*T*C*T*G*G*C*G*G*G*G*A*A*G*T*/iSp18//iSp18//3ThioM C3-D/(13nm AuNP;

SEQ ID NO:35)

[0089] C*T*C*C*T*A*T*T*G*G*G*G*G*T*T*T*C*C*T*A*T*/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/(13nm AuNP;SEQ ID NO:36)

[0090] A*C*C*C*C*T*C*T*A*C*C*C*C*C*T*C*T*A*C*C*C*C*T*C*T*/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/(13nm AuNP;SEQ ID NO:37)

[0091] C*C*T*G*G*A*T*G*G*G*A*A*/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/(13nm AuNP;SEQ ID NO:38)

[0092] T*T*C*T*G*G*C*G*G*G*A*A*G*T*/iSp18//iSp18//3ThioM C3-D/(13nm AuNP;SEQ ID NO:39)

[0093] C*T*C*C*T*A*T*T*G*G*G*G*G*T*T*T*C*C*T*A*T*/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/(13nm AuNP;SEQ ID NO:40)

[0094] A*C*C*C*C*T*C*T*A*C*C*C*C*C*T*C*T*A*C*C*C*C*T*C*T*/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/(13nm AuNP;SEQ ID NO:41)

[0095] C*C*T*G*G*A*T*G*G*G*A*A*/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/(13nm AuNP;SEQ ID NO:42)

[0096] (13nm AuNP)/5ThioMC3-D//iSp18//iSp18/*T*G*C*T*G*G*A*T*G*G*G*A*A

[0097] (13nm AuNP;SEQ ID NO:43)

[0098] /5ThioMC3-D//iSp18//iSp18/*T*G*C*C*C*T*G*G*A*T*G*G*G*A*A(SEQ ID NO:44)

[0099] (13nm AuNP)/5ThioMC3-D//iSp18//iSp18/*T*G*C*T*T*G*A*C*A*C*C*T*G*G*A*T*G*G*G*A*A(SEQ ID NO:45)

[0100] (13nm AuNP)/5ThioMC3-D//iSp18//iSp18/*T*C*C*T*G*A*G*C*T*T*G*A*A*G*T(SEQ ID NO:46)

[0101] (13nm AuNP)/5ThioMC3-D//iSp18//iSp18/*T*C*C*T*G*A*G*C*T*T*G*A*A*G*T(SEQ ID NO:47)

[0102] (13nm AuNP)/5ThioMC3-D//iSp18//iSp18/*T*T*C*T*G*G*C*G*G*G*A*A*G*T(SEQ ID NO:48)

[0103] (13nm AuNP)/5ThioMC3-D//iSp18//iSp18/*C*T*C*C*T*A*T*T*G*G*G*G*G*T*T*T*C*C*T*A*T(SEQ ID NO:49)

[0104] (13nm AuNP)/5ThioMC3-D//iSp18//iSp18/*A*C*C*C*C*T*C*T*A*C*C*C*C*C*T*C*T*A*C*C*C*C*T*C*T(SEQ ID NO:50)

[0105] (13nm AuNP)/5ThioMC3-D//iSp18//iSp18/*C*C*T*G*G*A*T*G*G*G*A*A(SEQ ID NO:51)

[0106] (13nm AuNP)/5ThioMC3-D//iSp18//iSp18/*T*T*C*T*G*G*C*G*G*G*A*A*G*T(SEQ ID NO:52)

[0107] (13nm AuNP)/5ThioMC3-D//iSp18//iSp18/*C*T*C*C*T*A*T*T*G*G*G*G*G*T*T*T*C*C*T*A*T(SEQ ID NO:53)

[0108] (13nm AuNP)/5ThioMC3-D//iSp18//iSp18/*A*C*C*C*C*T*C*T*A*C*C*C*C*C*T*C*T*A*C*C*C*C*T*C*T(SEQ ID NO:54)

- [0109] (13nm AuNP)/5ThioMC3-D//iSp18//iSp18/*C*C*T*G*G*A*T*G*G*G*A*A(SEQ ID NO:55)
- [0110] TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG(SEQ ID NO:56)
- [0111] T*T*A*G*G*G*T*T*A*G*G*G*T*T*A*G*G*G*T*T*A*G*G*G(SEQ ID NO:57)
- [0112] TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG(SEQ ID NO:58)/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/(13nm AuNP)
- [0113] T*T*A*G*G*G*T*T*A*G*G*G*T*T*A*G*G*G*T*T*A*G*G*G*(SEQ ID NO:59)/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/(13nm AuNP)
- [0114] (13nm AuNP)/5ThioMC3-D//iSp18//iSp18/TTAGGGTTAGGGTTAGGGTT AGGG(SEQ ID NO:60)
- [0115] (13nm AuNP)/5ThioMC3-D//iSp18//iSp18/*T*T*A*G*G*G*T*T*A*G*G*G*T*T*A*G*G*G*T*T*A*G*G*G(SEQ ID NO:61)
- [0116] CTATCTGUCGTTCTCTGU(SEQ ID NO:62)
- [0117] C*T*A*T*C*T*G*U*C*G*T*T*C*T*C*T*G*U(SEQ ID NO:63)
- [0118] CTATCTGUCGTTCTCTGU(SEQ ID NO:64)/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/(13nm AuNP)
- [0119] C*T*A*T*C*T*G*U*C*G*T*T*C*T*C*T*G*U*(SEQ ID NO:65)/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/(13nm AuNP)
- [0120] (13nm AuNP)/5ThioMC3-D//iSp18//iSp18/CTATCTGUCGTTCTCTGU(SEQ ID NO:66)
- [0121] (13nm AuNP)/5ThioMC3-D//iSp18//iSp18/*C*T*A*T*C*T*G*U*C*G*T*T*C*T*C*T*G*U(SEQ ID NO:67)
- [0122] (13nm AuNP)/5ThioMC3-D//iSp18//iSp18/TTAGGGTTAGGGTTAGGGTT AGGG(SEQ ID NO:68)
- [0123] (13nm AuNP)/5ThioMC3-D//iSp18//iSp18/T*T*A*G*G*G*T*T*A*G*G*G*T*T*A*G*G*G*T*T*A*G*G*G*(SEQ ID NO:69)
- [0124] (13nm AuNP)/5ThioMC3-D//iSp18//iSp18/CTATCTGUCGTTCTCTGU(SEQ ID NO:70)
- [0125] (13nm AuNP)/5ThioMC3-D//iSp18//iSp18/C*T*A*T*C*T*G*U*C*G*T*T*C*T*C*T*G*U*(SEQ ID NO:71)
- [0126] (13nm AuNP)/5ThioMC3-D//iSp18//iSp18/TGCTGGATGGGAA(SEQ ID NO:72)
- [0127] (13nm AuNP)/5ThioMC3-D//iSp18//iSp18/TGCCCTGGATGGGAA(SEQ ID NO:73)
- [0128] (13nm AuNP)/5ThioMC3-D//iSp18//iSp18/TGCTTGACACCTGGATGGGA A(SEQ ID NO:74)
- [0129] (13nm AuNP)/5ThioMC3-D//iSp18//iSp18/TCCTGAGCTTGAAGT(SEQ ID NO:75)
- [0130] (13nm AuNP)/5ThioMC3-D//iSp18//iSp18/TCCTGAGCTTGAAGT(SEQ ID NO:76)
- [0131] (13nm AuNP)/5ThioMC3-D//iSp18//iSp18/TTCTGGCGGGGAAGT(SEQ ID NO:77)
- [0132] (13nm AuNP)/5ThioMC3-D//iSp18//iSp18/CTCCTATTGGGGGTTTCCTAT(SEQ ID NO:78)
- [0133] (13nm AuNP)/5ThioMC3-D//iSp18//iSp18/ACCCCTCTACCCCTCTACC CCTCT(SEQ ID NO:79)
- [0134] (13nm AuNP)/5ThioMC3-D//iSp18//iSp18/CCTGGATGGGAA(SEQ ID NO:80)

- [0135] (13nm AuNP)/5ThioMC3-D//iSp18//iSp18/TTCTGGCGGGGAAGT(SEQ ID NO:81)
- [0136] (13nm AuNP)/5ThioMC3-D//iSp18//iSp18/CTCCTATTGGGGGTTTCCTAT(SEQ ID NO:82)
- [0137] (13nm AuNP)/5ThioMC3-D//iSp18//iSp18/ACCCCTCTACCCCTCTACC CCTCT(SEQ ID NO:83)
- [0138] (13nm AuNP)/5ThioMC3-D//iSp18//iSp18/CCTGGATGGGAA(SEQ ID NO:84)
- [0139] (13nm AuNP)/5ThioMC3-D//iSp18//iSp18/C*C*T*GGATGGGAA(SEQ ID NO:85)
- [0140] (13nm AuNP)/5ThioMC3-D//iSp18//iSp18/CCTGGATG*G*G*AA(SEQ ID NO:86)
- [0141] (13nm AuNP)/5ThioMC3-D//iSp18//iSp18/C*C*T*GGATG*G*G*AA(SEQ ID NO:87)
- [0142] (13nm AuNP)/5ThioMC3-D//iSp18//iSp18/CCTGGATGGGAA/Chol/(SEQ ID NO:88)
- [0143] (13nm AuNP)/5ThioMC3-D//iSp18//iSp18/CCTGGATGGGAA/Stryl/(SEQ ID NO:89)和
- [0144] (13nm AuNP)/5ThioMC3-D//iSp18//iSp18/CCTGGATGGGAA/Palm/(SEQ ID NO:90)。

[0145] 在一些实施方案中,核酸相互作用复合物的拮抗剂被描述于参考文献23和24中,将其各自通过引用并入。

[0146] 可互换使用术语“寡核苷酸”和“核酸”指多个核苷酸(即包含被连接至磷酸基团和被连接至可更换(exchangeable)的有机碱基的糖(例如核糖或脱氧核糖)的分子),所述碱基是取代的嘧啶(例如胞嘧啶(C)、胸腺嘧啶(T)或尿嘧啶(U))或取代的嘌呤(例如腺嘌呤(A)或鸟嘌呤(G))。因此,该术语包括DNA和RNA二者的寡核苷酸。该术语应当还包括多核苷(即多核苷酸去掉磷酸)和任何其他含有有机碱基的聚合物。可以从现有的核酸源(例如基因组或cDNA)获得寡核苷酸,但优选是合成的(例如通过核酸合成生产的)。纳米级构建体的并且任选被附接至纳米颗粒核心的多核苷酸可以是单链或双链的。双链多核苷酸在本文中也称为双链体。本发明的双链寡核苷酸可以包含两条分开的互补核酸链。

[0147] 本文中使用的“双链体”包括双链核酸分子,其中互补序列彼此氢键键合。互补序列可以包括有义链和反义链。反义核苷酸序列可以与靶基因相同或足够相同以介导对靶基因序列的有效靶基因抑制(例如至少大约98%相同、96%相同、94%、90%相同、85%相同或80%相同)。

[0148] 双链多核苷酸可以是在其全长上是双链的,这意味着它没有突出(overhanging)的单链序列并因此是平端的。在其他实施方案中,双链多核苷酸的两条链可以具有不同的长度,产生一个或多个单链突出端(overhang)。本发明的双链多核苷酸可以含有错配和/或环或凸起(bulge)。在一些实施方案中,在寡核苷酸至少大约70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的长度上它是双链的。在一些实施方案中,本发明的双链多核苷酸含有至少或达1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个错配。

[0149] 与本发明相关的多核苷酸可以在诸如糖部分、磷酸二酯键和/或碱基处被修饰。本文中使用的“糖部分”包括天然的、未修饰的糖(包括戊糖、核糖和脱氧核糖)、修饰的糖和糖类似物。糖部分的修饰可以包括用卤素、杂原子或脂肪族基团取代羟基,并且可以包括羟基官能化为例如醚、胺或硫醇。

[0150] 糖部分的修饰可以包括2'-O-甲基核苷酸,这被称为“甲基化的”。在一些情况下,

与本发明相关的多核苷酸可以只含有修饰的或未修饰的糖部分,而在其他情况下,多核苷酸含有一些修饰的糖部分和一些未修饰的糖部分。

[0151] 在一些情况下,修饰的核单体(nucleomonomer)包括糖被修饰的或主链被修饰的核糖核苷酸。修饰的核糖核苷酸可以含有非天然存在的碱基,诸如在5'位置被修饰的尿苷或胞苷,例如5'-(2-氨基)丙基尿苷和5'-溴尿苷;在8位置被修饰的腺苷和鸟苷,例如8-溴鸟苷;脱氮杂核苷酸,例如7-脱氮杂-腺苷;和N-烷基化的核苷酸,例如N6-甲基腺苷。此外,糖被修饰的核糖核苷酸可以具有用H、烷氧基(或OR)、R或烷基、卤素、SH、SR、氨基(诸如NH₂、NHR、NR₂)或CN基团取代的2'-OH基团,其中R是低级烷基、烯基(alkenyl)或炔基(alkynyl)。在一些实施方案中,修饰的核糖核苷酸可以具有用修饰的基团(诸如硫代磷酸酯基团)取代的连接至相邻核糖核苷酸的磷酸二酯基团。

[0152] 在一些方面,2'-O-甲基修饰对于降低细胞应激应答(诸如对双链核酸的干扰素应答)可能是有利的。修饰的糖可以包括D-核糖、2'-O-烷基(包括2'-O-甲基和2'-O-乙基),即2'-烷氧基、2'-氨基、2'-S-烷基、2'-卤素(halo)(包括2'-氟)、2'-甲氧乙氧基、2'-烯丙氧基(-OCH₂CH=CH₂)、2'-炔丙基、2'-丙基、乙炔基、乙烯基、丙烯基和氰基等。糖部分还可以是己糖。

[0153] 术语“烷基”包括饱和脂肪族基团,包括直链烷基(例如甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、庚基、辛基、壬基、癸基等),支链烷基(异丙基、叔丁基、异丁基等),环烷基(脂环族)基团(环丙基、环戊基、环己基、环庚基、环辛基),烷基取代的环烷基和环烷基取代的烷基。在一些实施方案中,直链或支链烷基在其主链中具有6个或更少的碳原子(例如直链C₁-C₆,支链C₃-C₆),并且更优选地4个或更少。同样,优选的环烷基在它们的环结构中具有3至8个碳原子,并且更优选地在环结构中具有5或6个碳。术语C₁-C₆包括含有1至6个碳原子的烷基。

[0154] 除另有规定外,术语烷基包括“未取代的烷基”和“取代的烷基”二者,其中后者是指具有独立选定的取代基的烷基部分,所述取代基取代烃主链的一个或多个碳上的氢。这样的取代基包括例如烯基,炔基,卤素,羟基,烷基羰氧基,芳基羰氧基,烷氧基羰氧基,芳氧基羰氧基,羧酸酯,烷基羰基,芳基羰基,烷氧基羰基,氨基羰基,烷基氨基羰基,二烷基氨基羰基,烷硫基羰基,烷氧基,磷酸基(phosphate),膦酸基(phosphonato),次膦酸基(phosphinato),氰基,氨基(包括烷基氨基,二烷基氨基,芳基氨基,二芳基氨基,和烷基芳基氨基),酰氨基(包括烷基羰基氨基,芳基羰基氨基,氨甲酰基和脲基),脒基,亚氨基,巯基(sulfhydryl),烷硫基,芳硫基,硫代羧酸基(thiocarboxylate),硫酸基(sulfate),烷基亚硫酸基,磺酸基(sulfonato),氨磺酰基,磺酰氨基(sulfonamido),硝基,三氟甲基,氰基,叠氮基,杂环基,烷基芳基,或芳族或杂芳族部分。环烷基可以被进一步取代,例如,用上述取代基取代。“烷基芳基”或“芳基烷基”部分是用芳基(例如苯甲基(苄基))取代的烷基。术语“烷基”还包括天然和非天然氨基酸的侧链。术语“正烷基”是指直链(即未分支的)未取代的烷基。

[0155] 术语“烯基”包括在长度和可能的取代上类似于上述烷基的不饱和脂肪族基团,但其含有至少一个双键。例如,术语“烯基”包括直链烯基(例如乙烯基(ethylenyl)、丙烯基、丁烯基、戊烯基、己烯基、庚烯基、辛烯基、壬烯基、癸烯基等),支链烯基,环烯基(脂环族)基团(环丙烯基、环戊烯基、环己烯基、环庚烯基、环辛烯基),烷基或烯基被取代的环烯基,和

环烷基或环烯基被取代的烯基。在一些实施方案中,直链或支链烯基在其主链中具有6个或更少的碳原子(例如直链 C_2-C_6 ,支链 C_3-C_6)。同样,环烯基在它们的环结构中具有3至8个碳原子,并且更优选地在环结构中具有5或6个碳。术语 C_2-C_6 包括含有2至6个碳原子的烯基。

[0156] 除另有规定外,术语烯基包括“未取代的烯基”和“取代的烯基”二者,其中后者是指具有独立选定的取代基的烯基部分,所述取代基取代烃主链的一个或多个碳上的氢。这样的取代基包括例如烷基,炔基,卤素,羟基,烷基羰氧基,芳基羰氧基,烷氧基羰氧基,芳氧基羰氧基,羧酸酯,烷基羰基,芳基羰基,烷氧基羰基,氨基羰基,烷基氨基羰基,二烷基氨基羰基,烷硫基羰基,烷氧基,磷酸基,膦酸基,次膦酸基,氰基,氨基(包括烷基氨基,二烷基氨基,芳基氨基,二芳基氨基,和烷基芳基氨基),酰氨基(包括烷基羰基氨基,芳基羰基氨基,氨甲酰基和脒基),脒基,亚氨基,巯基,烷硫基,芳硫基,硫代羧酸基,硫酸基,烷基亚硫酸基,磺酸基,氨磺酰基,磺酰氨基,硝基,三氟甲基,氰基,叠氮基,杂环基,烷基芳基,或芳族或杂芳族部分。

[0157] 术语“疏水修饰”是指碱基的修饰,使得总疏水性得到增加并且碱基仍然能够形成接近常规沃森-克里克相互作用。碱基修饰的非限制性实例包括5-位置尿苷和胞苷修饰像苯基、4-吡啶基、2-吡啶基、吡啶基、和异丁基、苯基(C_6H_5OH);色氨酸基(C_8H_6N) $CH_2CH(NH_2)CO$ 、异丁基、丁基、氨基苄基;苯基;和萘基。

[0158] 术语“杂原子”包括除碳或氢以外的任何元素的原子。在一些实施方案中,优选的杂原子是氮、氧、硫和磷。术语“羟基(hydroxy)”或“羟基(hydroxyl)”包括具有 $-OH$ 或 O^- (具有适当的配对离子(counterion))的基团。术语“卤素”包括氟、溴、氯、碘等。术语“全卤化的(perhalogenated)”一般是指其中所有的氢均用卤素原子取代的部分。

[0159] 术语“取代基(substituted)”包括独立选定的取代基,其能够被置于部分上并且其允许分子执行它的预期功能。取代基的实例包括烷基、烯基、炔基、芳基、 $(CR'R'')_{0-3}NR'R''$ 、 $(CR'R'')_{0-3}CN$ 、 NO_2 、卤素、 $(CR'R'')_{0-3}C(卤素)_3$ 、 $(CR'R'')_{0-3}CH(卤素)_2$ 、 $(CR'R'')_{0-3}CH_2(卤素)$ 、 $(CR'R'')_{0-3}CONR'R''$ 、 $(CR'R'')_{0-3}S(O)_{1-2}NR'R''$ 、 $(CR'R'')_{0-3}CHO$ 、 $(CR'R'')_{0-3}O(CR'R'')_{0-3}H$ 、 $(CR'R'')_{0-3}S(O)_{0-2}R'$ 、 $(CR'R'')_{0-3}O(CR'R'')_{0-3}H$ 、 $(CR'R'')_{0-3}COR'$ 、 $(CR'R'')_{0-3}CO_2R'$ 或 $(CR'R'')_{0-3}OR'$ 基团;其中每个 R' 和 R'' 各自独立地为氢、 C_1-C_5 烷基、 C_2-C_5 烯基、 C_2-C_5 炔基或芳基,或者 R' 和 R'' 一起为亚苄基(benzylidene group)或 $-(CH_2)_2O(CH_2)_2$ -基团。

[0160] 术语“胺”或“氨基”包括其中氮原子共价键合到至少一个碳或杂原子的化合物或部分。术语“烷基氨基”包括其中氮结合到至少一个另外的烷基的基团和化合物。术语“二烷基氨基”包括其中氮原子结合到至少两个另外的烷基的基团。

[0161] 术语“醚”包括含有键合到两个不同的碳原子或杂原子的氧的化合物或部分。例如,该术语包括“烷氧基烷基”,其是指共价键合到氧原子的烷基、烯基或炔基,所述氧原子共价键合到另一烷基。

[0162] 术语“碱基”包括已知的嘌呤和嘧啶杂环碱基、脱氮杂嘌呤,及其类似物(包括杂环被取代的类似物,例如氨基乙氧基吩噁嗪(aminoethoxy phenoxazine))、衍生物(例如1-烷基-、1-烯基-、杂芳族-和1-炔基衍生物)和互变异构体。嘌呤的实例包括腺嘌呤、鸟嘌呤、肌苷、二氨基嘌呤和黄嘌呤及其类似物(例如8-氧代- N^6 -甲基腺嘌呤或7-二氮杂黄嘌呤(diazaxanthine))和衍生物。嘧啶包括例如胸腺嘧啶、尿嘧啶和胞嘧啶,和它们的类似物(例如5-甲基胞嘧啶、5-甲基尿嘧啶、5-(1-丙炔基)尿嘧啶、5-(1-丙炔基)胞嘧啶和4,4-乙

醇胞嘧啶(ethanocytosine))。合适的碱基的其他实例包括非嘌呤基和非嘧啶基碱基,诸如2-氨基吡啶和三嗪。

[0163] 在一些方面,本发明的多核苷酸的核单体是RNA核苷酸,包括修饰的RNA核苷酸。

[0164] 术语“核苷”包括被共价附接至糖部分(优选核糖或脱氧核糖)的碱基。优选核苷的实例包括核糖核苷和脱氧核糖核苷。核苷还包括被连接至氨基酸或氨基酸类似物的碱基,所述氨基酸或氨基酸类似物可以包含游离羧基、游离氨基或保护基团。合适的保护基团是本领域众所周知的(参见P.G.M.Wuts和T.W.Greene,“Protective Groups in Organic Synthesis”,2nd Ed.,Wiley-Interscience,New York,1999)。

[0165] 术语“核苷酸”包括进一步包含磷酸基团或磷酸类似物的核苷。

[0166] 本文中使用的术语“键”包括天然存在的、未修饰的磷酸二酯部分($-O-(PO_3^{2-})-O-$),其共价连接相邻核单体。本文中使用的术语“取代键(substitute linkage)”包括共价连接相邻核单体的天然磷酸二酯基团的任何类似物或衍生物。取代键包括磷酸二酯类似物,例如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、和P-乙氧基磷酸二酯(P-ethoxyphosphodiester)、P-乙氧基磷酸二酯(P-ethoxyphosphodiester)、P-烷氧基磷酸三酯、磷酸甲酯和不含磷的键,例如缩醛和酰胺。这样的取代键是本领域已知的(例如Bjergarde等人1991.Nucleic Acids Res.19:5843;Caruthers等人1991.Nucleosides Nucleotides.10:47)。在某些实施方案中,优选不易水解的键,诸如硫代磷酸酯键。

[0167] 在一些方面,本发明的多核苷酸包含3'和5'末端(除了环形寡核苷酸)。可以通过例如修饰3'或5'键基本上保护多核苷酸的3'和5'末端免受核酸酶降解(参见美国专利号5,849,902和WO 98/13526)。可以通过包含“封闭基团(blocking group)”使寡核苷酸具有抗性。本文中使用的术语“封闭基团”是指能够被附接至寡核苷酸或核单体的取代基(例如除了OH基团),作为用于合成的保护基团或连接基团(例如FITC、丙基($CH_2-CH_2-CH_3$)、二醇($-O-CH_2-CH_2-O-$)、磷酸(PO_3^{2-})、膦酸氢基(hydrogen phosphonate)或亚磷酰胺(phosphoramidite))。“封闭基团”也包括保护寡核苷酸的5'和3'末端的“封端基团”或“阻止外切核酸酶的基团”,包括修饰的核苷酸和非核苷酸外切核酸酶抗性结构。

[0168] 示例性封端基团包括帽结构(例如7-甲基鸟苷帽)、倒位的核单体,例如具有3'-3'或5'-5'端倒位(inversion)(参见例如Ortiagao等人1992.Antisense Res.Dev.2:129)、膦酸甲酯、亚磷酰胺、非核苷酸基团(例如非核苷酸接头(linker)、氨基接头、缀合物)等。3'末端核单体可以包含修饰的糖部分。3'末端核单体包含能够任选地被封闭基团取代的3'-O,所述封闭基团防止3'-外切核酸酶降解寡核苷酸。例如,3'-羟基可以通过3'→3'核苷酸间键被酯化成核苷酸。例如,烷氧基可以是甲氧基、乙氧基或异丙氧基,并且优选乙氧基。任选地,在3'末端被3'→3'连接的核苷酸可以通过取代键进行连接。为了减少核酸酶降解,5'最末端3'→5'键可以是修饰的键,例如硫代磷酸酯键或P-烷氧基磷酸三酯键。优选地,两种5'最末端3'→5'键是修饰的键。任选地,5'末端羟基部分可以用含磷的部分进行酯化,例如磷酸酯、硫代磷酸酯或P-乙氧基磷酸酯。

[0169] 在一些方面,多核苷酸可以包含DNA和RNA二者。

[0170] 在一些方面,连续多核苷酸的至少一部分通过取代键(例如硫代磷酸酯键)进行连接。由于它们针对血清蛋白具有更高的亲和力,取代键的存在可以改善药物动力学。

[0171] 纳米级构建体的寡核苷酸优选在长6至100个碱基的范围中。但是,如果存在足够

多的免疫调节基序,任何大小大于6个核苷酸(甚至许多长kb)的核酸能够诱导根据本发明的免疫应答。优选地,核酸的大小范围在8至100个核苷酸之间并且在一些实施方案中在8至50个核苷酸之间或8至30个核苷酸之间。

[0172] 在一些实施方案中,免疫调节寡核苷酸具有修饰的主链,诸如硫代磷酸酯(PS)主链。在其他实施方案中,免疫调节寡核苷酸具有磷酸二酯(P0)主链。在又一些其他实施方案中,免疫调节寡核苷酸具有混合的P0和PS主链。

[0173] 与本发明相关的形式(modality)(包括核酸相互作用复合物的拮抗剂和抗原)可以通过本领域任何已知的手段被附接至纳米颗粒核心。用于将寡核苷酸附接至纳米颗粒的方法被详细描述于并通过引用并入自美国专利公开号2010/0129808。

[0174] 可以对纳米颗粒进行官能化以附接多核苷酸。备选地或另外,多核苷酸可以被官能化。官能化的一个机制是烷基硫醇法(alkanethiol method),从而在附接至金纳米颗粒或包含其他金属、半导体或磁性材料的纳米颗粒之前用烷基硫醇在寡核苷酸的3'或5'末端对寡核苷酸进行官能化。这样的方法被描述于例如Whitesides, *Proceedings of the Robert A. Welch Foundation 39th Conference On Chemical Research Nanophase Chemistry*, Houston, Tex., pages 109-121 (1995) 和 Mucic 等人 *Chem. Commun.* 555-557 (1996) 中。寡核苷酸还可以使用其他官能团(诸如硫代磷酸酯(phosphorothioate)基团)(如被描述于并通过引用并入自美国专利号5,472,881)或者取代的烷基硅氧烷(如被描述于并通过引用并入自Burwell, *Chemical Technology*, 4, 370-377 (1974) 和 Matteucci 和 Caruthers, *J. Am. Chem. Soc.*, 103, 3185-3191 (1981)) 被附接至纳米颗粒。在一些情况下,多核苷酸通过用5'或3'硫代核苷(thionucleoside)终止该多核苷酸被附接至纳米颗粒。在其他情况下,如描述于并通过引用并入自美国专利号6,361,944、6,506,569、6,767,702和6,750,016和PCT公开号WO 1998/004740、WO2001/000876、WO 2001/051665和WO 2001/073123,使用老化过程将多核苷酸附接至纳米颗粒。

[0175] 在一些情况下,核酸和/或抗原被共价附接至纳米颗粒核心,诸如通过金-硫醇键。间隔子序列可以被包括在附接部位和摄取控制部分和/或结合部分之间。在一些实施方案中,间隔子序列包含或由寡核苷酸、肽、聚合物或低聚乙烯组成。

[0176] 可以用多种化学物质设计纳米级构建体。例如,可以使用DTPA(二硫醇亚磷酰胺)键。DTPA抵抗硫醇产生的荧光(flare)的胞内释放并可以用于提高信噪比。

[0177] 由本文中所述方法产生的缀合物比其他方法产生的那些显著更稳定。该增加的稳定性是由于纳米颗粒核心表面上或形成冠部表面的寡核苷酸的密度增加。通过在表面活性剂(例如大致为0.01%的十二烷基硫酸钠(SDS)、吐温或聚乙二醇(PEG))的存在下进行盐加成,可以在大约一小时中进行盐老化过程。

[0178] 表面密度可以取决于纳米颗粒的大小和类型并取决于寡核苷酸的长度、序列和浓度。可以根据经验确定足以使纳米颗粒稳定的表面密度和针对纳米颗粒和寡核苷酸的期望的组合获得该表面密度的必要条件。一般而言,具有至少10皮摩尔/cm的表面密度将足以提供稳定的纳米颗粒-寡核苷酸缀合物。优选地,表面密度为至少15皮摩尔/cm。因为如果表面密度过大,则可以减弱缀合物的寡核苷酸与靶杂交的能力,表面密度任选地不大于大约35-40皮摩尔/cm²。还提供方法,其中寡核苷酸以至少10pmol/cm²、至少15pmol/cm²、至少20pmol/cm²、至少25pmol/cm²、30pmol/cm²、至少35pmol/cm²、至少40pmol/cm²、至少45pmol/

cm^2 、至少 $50\text{pmol}/\text{cm}^2$ 或 $50\text{pmol}/\text{cm}^2$ 或更多的表面密度结合至纳米颗粒。

[0179] 本发明的方面涉及将纳米级构建体递送至受试者用于治疗 and/或诊断用途。颗粒可以单独进行施用或者在任何适当的药物载体(诸如液体(例如盐水)、或粉末)中用于体内施用。它们还可以用更大的载体颗粒或在施用装置内进行共递送。颗粒可以被配制。本发明的制剂可以药学上可接受的溶液的形式被施用,所述溶液可以常规地含有药学上可接受的浓度的盐、缓冲剂、防腐剂、相容性载体、佐剂和任选地其他治疗成分。在一些实施方案中,与本发明相关的纳米级构建体与诸如洗剂(例如羊毛脂制剂(aquaphor))的物质混合并被施用至受试者的皮肤,从而该纳米级构建体通过受试者的皮肤进行递送。应当理解的是,本领域已知的任何递送纳米颗粒的方法可以与本发明的方面相容。

[0180] 对于治疗用途,可以任何将颗粒递送至期望细胞的模式将有效量的颗粒施用至受试者。可通过本领域技术人员已知的任何手段完成施用药物组合物。施用途包括但不限于口服、肠胃外、肌内、静脉内、皮下、粘膜、鼻内、舌下、气管内、吸入、眼、阴道、皮肤、直肠和通过直接注射。

[0181] 因此,本发明在一个方面涉及核酸相互作用复合物的拮抗剂高效介导免疫调节作用的发现。核酸相互作用复合物的这些拮抗剂治疗性和预防性用于调节免疫系统以治疗癌症、感染性疾病、变态反应、哮喘、自身免疫性疾病和其他基于炎性的疾病。

[0182] 根据其他方面,本发明是治疗受试者的方法,其涉及向受试者施用有效量的如本文中所述的纳米级构建体以降低免疫应答。在一些实施方案中,受试者患有感染性疾病、癌症、自身免疫性疾病、哮喘、或变应性疾病、炎性疾病、代谢性疾病、心血管疾病或者受试者是组织或器官移植的候选者或者接受者。

[0183] 代谢性疾病的实例包括、但不限于I型糖尿病、糖代谢、氨基酸代谢、有机酸代谢、脂肪酸氧化和线粒体代谢、卟啉代谢、嘌呤或嘧啶代谢、类固醇代谢、溶酶体线粒体功能、过氧化物酶体功能、溶酶体贮积的紊乱、尿素循环障碍(例如N-乙酰谷氨酸合成酶缺乏症、氨甲酰磷酸合成酶缺乏症、鸟氨酸氨甲酰基转移酶缺乏症、精氨酸琥珀酸尿(crginosuccinic aciduria)、瓜氨酸血症(citrullinaemia)、精氨酸酶缺乏症)、氨基酸障碍(例如非酮性高甘氨酸血症(Non-ketotic hyperglycinaemia)、酪氨酸血症(tyrosinaemia)(I型)、枫糖尿症)、有机酸血症(例如异戊酸血症、甲基丙二酸血症、丙酸血症、I型戊二酸尿、I&II型戊二酸血症)、线粒体障碍(例如羧化酶缺陷、线粒体肌病、乳酸性酸中毒(丙酮酸脱氢酶复合物缺陷)、先天性乳酸性酸中毒、线粒体呼吸链缺陷、胱氨酸贮积症、戈谢病、法布里病、II型糖原贮积症(Pompe's disease)、I型粘多糖贮积症(mucopolysaccharoidosis I)、II型粘多糖贮积症、VI型粘多糖贮积症)。

[0184] 心血管疾病是指心脏和血管系统的许多紊乱。通常,心血管疾病选自以下组成的组:心脏肥大;心肌梗死;中风;动脉硬化;以及心力衰竭。在一些情况下,心血管疾病与炎症相关,诸如与动脉粥样硬化相关的炎症。

[0185] 核酸相互作用复合物的拮抗剂在本发明的一些方面用作疫苗,所述疫苗用于治疗具有发展成以下疾病的风险的受试者或患有以下疾病的受试者:变态反应或哮喘、感染性生物的感染或者其中特定癌症抗原已被鉴定的癌症。在该情况下,疫苗可以是致耐受性(tolorigenic)疫苗。这些可以用免疫抑制剂(immunosuppresant)进行施用。它特别用于治疗变态反应、变应性疾病和自身免疫性疾病。核酸相互作用复合物的拮抗剂还可以在沒有

用于感染、变态反应或癌症防护的抗原或变应原的情况下进行给予,并且在该情况下,重复剂量可能允许更长期的防护。本文中使用的具有风险的受试者是其具有暴露于引起感染的病原体或癌症或变应原的风险或具有发展成癌症的风险的受试者。

[0186] 患有感染的受试者是已被暴露于感染性病原体并在体内具有急性或慢性可检测的病原体水平的受试者。免疫调节寡核苷酸可以被用于降低与感染相关的免疫应答。当受试者具有发展成脓毒症(sepsis)的风险时,这是特别期望的。本发明的构建体用于预防与感染(诸如脓毒症)相关的异常(aberrant)应答。

[0187] 患有变体反应的受试者是患有或者具有发展成响应于变应原的变态反应的风险的受试者。变态反应是指对物质(变应原)的获得性超敏反应。变应病况(condition)包括但不限于湿疹、变应性鼻炎或鼻炎(coryza)、花粉症(hay fever)、结膜炎、支气管哮喘、荨麻疹(麻疹(hives))和食物变态反应,以及其他特应性病况。

[0188] 患有癌症的受试者是具有可检测的癌细胞的受试者。特别地,癌症是与慢性炎症相关的癌症,例如与由感染引起的炎症相关的癌症或者诸如慢性炎性肠病的病况与大量癌症相关。增加癌症风险或进展的慢性炎症的一些触发器(trigger)包括感染(例如针对胃癌和粘膜淋巴瘤的幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*);分别针对颈部癌和肝癌的乳头瘤病毒和肝炎病毒)、自身免疫性疾病(例如针对结肠癌的炎性肠病)和具有不确定来源的炎性病况(例如针对前列腺癌的前列腺炎)。本发明的构建体有助于控制慢性炎症、减少引起或恶化癌症的触发器。

[0189] 受试者应当是指人或脊椎动物,包括但不限于狗、猫、马、牛、猪、绵羊、山羊、火鸡、鸡、灵长类动物例如猴、和鱼(水产养殖品种)例如鲑鱼。因此,本发明还可以被用于治疗非人受试者中的癌症和肿瘤、感染和变态反应/哮喘。

[0190] 本文中使用的术语“治疗(treat、treated或treating)”在针对诸如感染性疾病、癌症、变态反应或哮喘的紊乱使用时是指预防性治疗(其提高受试者对疾病发展(例如病原体的感染)的抗性或者换句话说降低受试者会发展成疾病(例如变成被病原体感染)的可能性)以及受试者已经发展成疾病之后为了抵抗疾病(例如降低或消除感染)或防止疾病变得恶化的治疗。

[0191] 本文中使用的抗原是能够激发免疫应答的分子。抗原包括但不限于细胞、细胞提取物、蛋白质、多肽、肽、多糖、多糖缀合物、多糖和其他分子的肽和非肽模拟物、小分子、脂质、糖脂、糖类、病毒和病毒提取物和多细胞生物诸如寄生物和变应原。术语抗原大致包括任何类型的分子,其被宿主免疫系统识别为外源的。抗原包括但不限于癌症抗原、微生物抗原和变应原。

[0192] 本文中使用的癌症抗原是与肿瘤或癌细胞表面相关的化合物(诸如肽或蛋白质)并且当在MHC分子中的抗原提呈细胞的表面上表达时其能够激发免疫应答。癌症抗原可以通过以下方法从癌症细胞制备:通过例如Cohen等人,1994,Cancer Research,54:1055中所述的制备癌细胞的粗提物、通过部分纯化抗原、通过重组技术或者通过已知抗原的从头合成。癌症抗原包括但不限于重组表达的抗原、整个肿瘤或癌症或其免疫原性部分。这样的抗原可以被分离或重组制备或通过本领域已知的任何其他手段制备。

[0193] 本文中使用的微生物抗原是微生物的抗原并且包括但不限于病毒、细菌、寄生物和真菌。这样的抗原包括完整的微生物以及其天然分离物和片段或衍生物,以及还包括与

天然微生物抗原相同或相似并诱导特异性针对该微生物的免疫应答的合成的化合物。如果化合物诱导对天然微生物抗原的免疫应答(体液的和/或细胞的),那么该化合物类似于天然微生物抗原。这样的抗原被常规用于本领域并且是本领域普通技术人员所众所周知的。

[0194] 变应原是指能够诱导易感受试者中变态反应性或哮喘性应答的物质(抗原)。变应原的列表是巨大的并可以包括花粉、昆虫毒液、动物皮屑尘、真菌孢子和药物(例如青霉素)。天然的、动物的和植物的变应原的实例包括但不限于特异性针对以下属的蛋白质:犬(Canine)(家犬(*Canis familiaris*));尘螨属(*Dermatophagoides*)(例如粉尘螨(*Dermatophagoides farinae*));猫属(*Felis*)(家猫(*Felis domesticus*));*Ambrosia*(*Ambrosia artemisiifolia*);黑麦草属(*Lolium*)(例如多年生黑麦草(*Lolium perenne*)或多花黑麦草(*Lolium multiflorum*));柳杉属(*Cryptomeria*)(日本柳杉(*Cryptomeria japonica*));链格孢属(*Alternaria*)(链格孢(*Alternaria alternata*));桦木(*Alder*);桤木属(*Alnus*)(欧洲桤木(*Alnus glutinosa*));桦木属(*Betula*)(垂枝桦(*Betula verrucosa*));栎属(*Quercus*)(美洲白栎(*Quercus alba*));木犀榄属(*Olea*)(橄榄(*Olea europaea*));蒿属(*Artemisia*)(北艾(*Artemisia vulgaris*));车前属(*Plantago*)(例如长叶车前(*Plantago lanceolata*));墙草属(*Parietaria*)(例如*Parietaria officinalis*或*Parietaria judaica*);小蠊(*Blattella*)(例如德国小蠊(*Blattella germanica*));蜜蜂(*Apis*)(例如*Apis multiflorum*);柏木属(*Cupressus*)(例如地中海柏木(*Cupressus sempervirens*)、绿干柏(*Cupressus arizonica*)和大果柏木(*Cupressus macrocarpa*));刺柏属(*Juniperus*)(例如*Juniperus sabinoides*、*Juniperus virginiana*、欧洲刺柏(*Juniperus communis*)和*Juniperus ashei*);崖柏属(*Thuja*)(例如侧柏(*Thuja orientalis*));扁柏属(*Chamaecyparis*)(例如日本扁柏(*Chamaecyparis obtusa*));大蠊(*Periplaneta*)(例如美洲大蠊(*Periplaneta americana*));冰草属(*Agropyron*)(例如匍匐冰草(*Agropyron repens*));黑麦属(*Secale*)(例如黑麦(*Secale cereale*));小麦(*Triticum*)(例如普通小麦(*Triticum aestivum*));鸭茅属(*Dactylis*)(例如鸭茅(*Dactylis glomerata*));羊茅属(*Festuca*)(例如欧洲羊茅(*Festuca elatior*));早熟禾属(*Poa*)(例如草地早熟禾(*Poa pratensis*)或加拿大早熟禾(*Poa compressa*));燕麦属(*Avena*)(例如燕麦(*Avena sativa*));绒毛草属(*Holcus*)(例如绒毛草(*Holcus lanatus*));黄花茅属(*Anthoxanthum*)(例如黄花茅(*Anthoxanthum odoratum*));燕麦草属(*Arrhenatherum*)(例如燕麦草(*Arrhenatherum elatius*));剪股颖属(*Agrostis*)(例如*Agrostis alba*);梯牧草属(*Phleum*)(例如梯牧草(*Phleum pratense*));鹧草属(*Phalaris*)(例如鹧草(*Phalaris arundinacea*));雀稗属(*Paspalum*)(例如百喜草(*Paspalum notatum*));高粱属(*Sorghum*)(例如石茅(*Sorghum halepensis*));和雀麦属(*Bromus*)(例如无芒雀麦(*Bromus inermis*))。

[0195] 本发明的纳米级构建体还可以用抗微生物剂进行涂覆或者与其组合施用。本文中使用的抗微生物剂是指天然存在的或合成的化合物,其能够杀灭或抑制感染性微生物。根据本发明有用的抗微生物剂的类型将依赖于微生物的类型,其感染受试者或者使受试者具有变得感染的风险。抗微生物剂包括但不限于抗细菌剂、抗病毒剂、抗真菌剂和抗寄生物剂。诸如“抗感染剂”、“抗细菌剂”、“抗病毒剂”、“抗真菌剂”、“抗寄生物剂”和“杀寄生物药”的短语对本领域普通技术人员具有公知的(well-established)含义,并以标准医学文本进

行定义。简而言之,抗细菌剂杀灭或抑制细菌,并且包括抗生素以及其他具有类似功能的合成的或天然的化合物。抗生素是低分子量的分子,其由细胞(诸如微生物)作为次级代谢物产生。一般而言,抗生素干扰一种或多种细菌功能或结构,其特异性针对微生物并且其不存在于宿主细胞中。可以从天然来源分离抗病毒剂或合成抗病毒剂,并且抗病毒剂用于杀灭或抑制病毒。抗真菌剂被用于治疗浅表真菌感染以及机会性和原发性全身真菌感染。抗寄生虫剂杀灭或抑制寄生虫。

[0196] 抗细菌剂杀灭或抑制细菌的生长或功能。一大类的抗细菌剂是抗生素。有效杀灭或抑制范围广泛的细菌的抗生素被称为广谱抗生素。其他类型的抗生素主要有效对抗革兰氏阳性或革兰氏阴性类的细菌。这些类型的抗生素被称为窄谱抗生素。有效对抗单个生物或疾病并且不对抗其他类型的细菌的其他抗生素被称为限谱抗生素(limited-spectrum antibiotics)。抗细菌剂有时基于它们的主要作用模式进行分类。一般而言,抗细菌剂是细胞壁合成抑制剂、细胞膜抑制剂、蛋白质合成抑制剂、核酸合成或功能抑制剂、以及竞争性抑制剂。

[0197] 抗病毒剂是阻止病毒感染细胞或细胞内病毒的复制的化合物。抗病毒药物比抗菌药物少得多,这是因为病毒复制的过程与宿主细胞内的DNA复制如此密切相关以至于非特异性的抗病毒剂常常会对宿主具有毒性。病毒感染过程内有几个阶段可以被抗病毒剂阻断或抑制。这些阶段包括病毒附着至宿主细胞(免疫球蛋白或结合肽)、病毒脱壳(例如金刚烷胺)、病毒mRNA的合成或翻译(例如干扰素)、病毒RNA或DNA的复制(例如核苷酸类似物)、新病毒蛋白质的成熟(例如蛋白酶抑制剂)和病毒的出芽和释放。

[0198] 可互换使用本文中使用的术语“癌症抗原”和“肿瘤抗原”指癌细胞差异表达,并从而可以利用其以靶向癌细胞的抗原。癌症抗原是能够潜在地刺激明显肿瘤特异性免疫应答的抗原。尽管并不必然表达,正常细胞编码这些抗原中的一些抗原。这些抗原可以被表征为在正常细胞中正常为沉默的(即不表达)的那些抗原、仅在分化的某些阶段表达的那些抗原以及暂时表达(诸如胚胎和胎儿抗原)的那些抗原。其他癌症抗原由突变细胞基因编码,诸如癌基因(例如活化的ras癌基因)、抑制基因(例如突变的p53)、来自内部缺失或染色体易位的融合蛋白。还有其他的癌症抗原可以由病毒基因编码,诸如RNA和DNA肿瘤病毒携带的那些。

[0199] 核酸相互作用复合物的拮抗剂还用于治疗 and 预防自身免疫性疾病。自身免疫性疾病是一类其中受试者的自身抗体与宿主组织反应或其中免疫效应T细胞对于内源性的自身肽是自身反应性的并引起组织破坏的疾病。因此,针对受试者的自体抗原(被称为自体抗原)启动免疫应答。自身免疫性疾病包括但不限于类风湿性关节炎、克罗恩病、多发性硬化、系统性红斑狼疮(SLE)、自身免疫性脑脊髓炎、重症肌无力(MG)、桥本甲状腺炎、肺出血肾炎综合征、天疱疮(例如寻常型天疱疮)、格雷夫斯病、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性血小板减少性紫癜、具有抗胶原抗体的硬皮病、混合性结缔组织病、多肌炎、恶性贫血、特发性艾迪生病、自身免疫相关不育、肾小球肾炎(例如新月体性肾小球肾炎、增生性肾小球肾炎)、大疱性类天疱疮、舍格伦综合征、胰岛素抵抗,以及自身免疫性糖尿病。

[0200] 本文中使用的“自体抗原”是指正常宿主组织的抗原。正常宿主组织不包括癌细胞。因此,在自身免疫性疾病的情形下,对抗自体抗原所启动的免疫应答是不期望的免疫应答并帮助破坏和损伤正常组织,而对抗癌症抗原所启动的免疫应答是期望的免疫应答并帮

助破坏肿瘤或癌症。因此,在本发明的致力于治疗自身免疫性紊乱的一些方面,不建议免疫调节核酸与自体抗原进行施用,特别是自身免疫性紊乱的靶标的那些。

[0201] 在其他情况下,免疫调节核酸可以与低剂量的自体抗原进行递送。许多动物研究已经证实粘膜施用低剂量的抗原可以导致免疫低响应性或“耐受”的状态。活性机制似乎是远离Th1而朝向主要Th2和Th3(即TGF- β 主导的)的细胞因子介导的免疫偏离。低剂量抗原递送的活性抑制也可以抑制不相关的免疫应答(旁路抑制(bystander suppression)),其在自身免疫性疾病(例如类风湿性关节炎和SLE)的治疗中相当令人感兴趣。旁路抑制涉及局部环境中Th1反调节、抑制细胞因子的分泌,其中促炎和Th1细胞因子以抗原特异性或抗原非特异性的方式进行释放。本文中使用的“耐受”被用来指这种现象。实际上,口服耐受已经有效用于治疗动物中的许多自身免疫性疾病,包括:实验自身免疫性脑脊髓炎(EAE)、实验自身免疫性重症肌无力、胶原诱导的关节炎(CIA)、以及胰岛素依赖的糖尿病。在这些模型中,自身免疫性疾病的防止和抑制与抗原特异性体液和细胞应答从Th1向Th2/Th3应答的转换(shift)有关。

[0202] 在另一方面,本发明涉及包括之前所讨论的一个或多个组合物的试剂盒。本文中使用的“试剂盒”通常定义包括例如之前所述的本发明的一个或多个组合物和/或与本发明相关的其他组合物的包装或套装(assembly)。如果存在的话,试剂盒的每种组合物可以液体形式(例如溶液中)或以固体形式(例如干粉)提供。在某些情况下,一些组合物可以是可组成型的或者否则可加工的(例如可加工成活性形式),例如通过加入合适的溶剂或其他物质,其可以与或不与试剂盒一起提供。可与本发明相关的其他组合物的实例包括、但不限于溶剂、表面活性剂、稀释剂、盐、缓冲剂、乳化剂、螯合剂、填充剂、抗氧化剂、粘合剂、填充剂、防腐剂、干燥剂、抗微生物剂、针、注射器、包装材料、管、瓶、烧瓶、烧杯、皿、筛板(frits)、滤器、环、夹具、包裹物(wraps)、贴片(patches)、容器、带子(tapes)、粘接剂等,例如用于使用、施用、修饰、组装、存储、包装、制备、混合、稀释和/或保存组合物成分用于特定用途,例如至样品和/或受试者。

[0203] 在一些实施方案中,与本发明相关的试剂盒包括一种或多种纳米颗粒核心,诸如包含金的纳米颗粒核心。试剂盒还可以包括核酸相互作用复合物的一种或多种拮抗剂。试剂盒还可以包括一种或多种抗原。

[0204] 在一些情况下,本发明的试剂盒包括任何形式的说明,与本发明的组合物相关的说明以这样的方式提供使得本领域普通技术人员将会认识到说明与本发明的组合物相关。例如,说明可以包括使用、修饰、混合、稀释、保存、施用、组装、存储、包装和/或制备该组合物和/或与该试剂盒相关的其他组合物的说明。在一些情况下,说明还可以包括组合物的使用说明,例如用于特定用途,例如至样品。可以本领域普通技术人员可认识到的以任何方式提供含有这样的说明的合适的载体的任何形式提供说明,例如书面的或发表的、口头的、可听的(例如电话)、数字的、光学的、可视化的(例如录像带、DVD等)或电子通信(包括互联网或基于网络的通信)。

[0205] 在一些实施方案中,本发明涉及推广本文中所讨论的本发明的一个或多个实施方案的方法。本文中使用的“推广”包括进行商业化的所有方法,包括、但不限于与本文中所讨论的本发明的系统、设备、装置、物品、方法、组合物、试剂盒等相关的销售、广告、分配、许可、合同、指导、教育、研究、进口、出口、谈判、融资、垫资、交易、自动售货、转售、分发、修理、

更换、保证、起诉、专利等。可以由任一方执行推广的方法,包括但不限于个人方、商业机构(公共或私人)、伙伴关系、公司、信托、合同或子合同代理、教育机构诸如学院和大学、研究机构、医院或其他临床机构、政府部门等。推广活动可以包括与本发明明确相关的任何形式的通信(例如书面的、口头的、和/或电子通信,诸如、但不限于电子邮件、电话、互联网、基于网络等)。

[0206] 在一组实施方案中,推广的方法可以涉及一种或多种说明。本文中使用的“说明”可以定义说明工具的组成(例如使用说明书、指南、警告、标记、注释、FAQ或“常见问题”等),并通常涉及关于本发明或与本发明相关和/或与本发明的包装一起的书面说明。说明还可以包括任何形式的说明性通信(例如口头的、电子的、可听的、数字的、光学的、可视化的等),以任何方式提供,使得用户将清楚地认识到说明与本发明例如本文中所讨论的相关。

[0207] 本发明通过下列实施例进一步说明,这决不应被解释为进一步限制。本申请所有的引用的参考文献(包括文献来源、授权的专利、公开的专利申请和共同未决的专利申请)的全部内容在此明确通过引用并入。

实施例

[0208] 实施例1:

[0209] 已经鉴定了抑制TLR9的四种主要强效序列ODN2088^{14,15}、ODN G^{12,17}、ODN MT01²²和ODN 4084F^{13,16}。这些序列示于表1中。我们使用这些序列开发了构建体。这些构建体在本文中有些地方被称为irSNA。本文证实了irSNA在各种刺激条件下有效抑制TLR9的活化。为了完成该任务,我们使用了RAW-Blue鼠巨噬细胞细胞系报告系统(murine macrophage reporter line system)(Invivogen)。简而言之,RAW-Blue系统由稳定表达报告质粒的鼠巨噬细胞组成,所述质粒应答TLR活化下游的NFκB信号传导。该受NFκB控制的质粒表达碱性磷酸酶,该酶由细胞分泌、可以被收集并使用显色检测剂进行定量以监测活细胞中TLR的活化。我们用浓度渐增的具有每种类型的天然磷酸二酯(po)或硫代磷酸酯(ps)主链的游离irDNA寡核苷酸或者载有各自免疫调节寡核苷酸的irSNA(参见表1)孵育RAW-Blue细胞两小时。孵育之后,用0.5μM具有硫代磷酸酯主链的含有CpG的DNA或者10μM具有磷酸二酯主链的含有CpG的DNA(已知二者刺激TLR9^{1,10})刺激细胞并将细胞孵育过夜。然后使用报告测定(assay)测量TLR9的活化,并且针对免疫调节DNA或SNA构建体的浓度绘制相对活化水平,并且使用GraphPad Prism软件假定Hill Slope为1使用非线性最小二乘拟合确定IC₅₀值。

[0210] 结果示于图1中。2088DNA显示IC₅₀为553nM的高纳摩尔效力,而由于在测定中剂量分配的限制而不能确定相应的irSNA构建体AST-012的IC₅₀值(图1A)。G DNA显示4.2nM的低纳摩尔IC₅₀,但是它与高浓度稳定并入SNA不相容(图1B)。MT01 DNA具有278.6nM的IC₅₀,而由于在测定中剂量分配的限制而不能确定相应irSNA AST-014的IC₅₀(图1C)。但是,4084F DNA显示IC₅₀为1.6nM的最强效的效力,而相应的AST-015 SNA类似物展示了具有IC₅₀为1.3nM的相等的效力。这证实AST-015与游离寡核苷酸一样有效,并且irDNA序列与SNA结构(architecture)相容。因此,如图1中所示,AST-015能够抑制巨噬细胞样RAW-Blue细胞中CpG诱导的TLR9活化。

[0211] 实施例2:

[0212] 目前利用免疫调节寡核苷酸的治疗需要使用硫代磷酸酯主链以防止寡核苷酸在

生物流体中的降解。但是,硫代磷酸酯主链引入不想要的毒性水平,并且如果能够使用天然的磷酸二酯主链则特别有利。我们测试了SNA并入天然磷酸二酯化学物质以阻断TLR活性的能力。我们首先检查了用免疫调节构建体(po或ps化学物质形式的游离的4084F DNA或po或ps化学物质形式的AST-015)预孵育细胞是否会引起巨噬细胞样细胞(RAW-Blue)变得对TLR9的拮抗剂CpG DNA不响应(refractory)。简而言之,将免疫调节构建体以渐增的浓度加至细胞持续两小时以允许摄取和并入内体室(endosomal compartment)。孵育之后,加入0.5 μ M CpG DNA 1668ps或10 μ M CpG DNA 1826po,并且细胞孵育过夜,然后如上所述对刺激进行定量。

[0213] 作为用于比较的基线,我们首先检查了游离4084F DNA的效力。结果示于图2中。当以磷酸二酯CpG刺激性DNA攻击时,4084F DNApo具有7.1nM的IC₅₀,而4084F DNAPS更有效大约一个数量级,其IC₅₀为0.4nM。这证实了游离4084F的磷酸二酯和硫代磷酸酯两种形式(version)均能够阻断游离磷酸二酯CpG诱导的免疫刺激(图2A)。在相同的系统中,当以更稳定的硫代磷酸酯CpG DNA攻击时,游离4084F DNApo不能阻断刺激,但是4084F DNAPS能够以4nM的IC₅₀阻断刺激(图2B)。以这些值作为用于比较的基线,接下来我们确定了AST-015的效力值。当以磷酸二酯CpG DNA攻击时,AST-015po具有7.1nM的IC₅₀,而AST015ps具有1.4nM的IC₅₀,二者几乎与游离DNA的值相同(图2C)。有趣的是,当以更稳定的硫代磷酸酯CpG DNA攻击时,AST-015po(它的游离DNA类似物之前针对硫代磷酸酯CpG DNA无效)有效,其IC₅₀为24.1nM。AST-015ps处理也有效,其IC₅₀为0.7nM(图2D)。这些数据证实,免疫调节DNA序列并入SNA结构相对于单独的游离DNA赋予独特的和新的优势。

[0214] 实施例3

[0215] 之前的实施例检查了在刺激含有CpG的免疫刺激DNA之前被加入时AST-015抑制TLR9诱导的信号传导的能力。接下来我们试图确定如果同时加入AST-015是否能够竞争出免疫刺激DNA。为了完成这一点,用0.5 μ M CpG DNA 1668ps或10 μ M CpG DNA 1826po与浓度渐增的po和ps二者形式的游离4084F DNA或po和ps二者形式的AST-015一起刺激RAW-Blue细胞。结果示于图3中。

[0216] 当以磷酸二酯CpG刺激性DNA同时攻击时,4084F DNApo具有11.2nM的IC₅₀,而4084F DNAPS更有效大约一个数量级,其IC₅₀为0.5nM(图3A)。在相同的系统中,当以更稳定的硫代磷酸酯CpG DNA攻击时,游离4084F DNApo不能阻断刺激,但是4084F DNAPS能够阻断刺激,其IC₅₀为17.6nM(图3B)。以这些值作为用于比较的基线,我们接下来确定了AST-015的效力值。当以磷酸二酯CpG DNA攻击时,AST-015po具有9.9nM的IC₅₀,而AST015ps具有2.3nM的IC₅₀,二者几乎与游离DNA的值相同(图3C)。与之前所述的用irSNA的预处理类似,当以更稳定的硫代磷酸酯CpG DNA攻击时,AST-015po(它的游离DNA类似物之前针对硫代磷酸酯CpG DNA无效)有效,其IC₅₀为77.3nM。AST-015ps处理也有效,其IC₅₀为1.9nM(图3D)。

[0217] 实施例4

[0218] 我们接下来检查了游离4084F DNA是否能够抑制已经作为临床情况的模型的处于慢性刺激状态的细胞中的CpG诱导的TLR9活化,在所述临床情况下患者已经正表现过度活化的免疫系统。为了完成这一点,以0.5 μ M CpG 1668ps刺激RAW-Blue细胞18小时以活化巨噬细胞,培养基更换为0.5 μ M CpG1668ps与浓度渐增的po或ps化学物质形式的游离4084F DNA一起的另外剂量再进行18小时,接着使用显色检测测定进行定量。结果示于图4中。

[0219] 游离4084F DNA_{po}在这些慢性处理的巨噬细胞中是有效的,其IC₅₀为241nM。这比具有0.9nM的IC₅₀的4084F DNA_{ps}的效力的有效性低大致两个数量级,表明磷酸二酯形式的游离DNA是TLR活化的相对差的抑制剂(图4)。

[0220] 重要的是,这些数据证实免疫调节序列的预处理对于构建体有效不是必需的。这是重要区别,因为它使得当临床中存在炎症症状时该技术能够既被用作预防又被用作急性治疗。

[0221] 有趣的是,po形式的AST-015对硫代磷酸酯活化TLR9的含有CpG的DNA显示低纳摩尔效力,而其相应的游离DNA等价物在阻断这种活化方面无效。ps形式的AST-015对其游离DNA等价物是等效的(equipotent)。这证实免疫调节DNA能够被载入SNA构建体而不失去其活性并且与游离DNA等价物所预期的相比具有不同的效力。鉴于该数据,可以以碱基序列的选择性修饰设计寡核苷酸构建体。例如可以进行在特异性位点选择性并入硫代磷酸酯主链和并入亲脂性剂(诸如胆固醇、十八烷基和/或软脂酰基)以促进膜结合(参见表2)。这允许利用SNA结构的有利性质(诸如增强的在生物流体中的降解抗性、增强的生物分布和构建体体内快速摄取)以相比于目前的游离DNA治疗方法开发更有效的疗法。

[0222] 实施例5:irSNA能够拮抗多种TLR

[0223] SNA构建体适合并入定制的调节序列以用作范围更广的TLR的拮抗剂。将这些构建体与拮抗剂的目前现有技术递送进行比较。为了完成这一点,设计新的TLR7/8/9的拮抗剂序列,并与由Dynavax^{23,24}开发的目前临床相关序列进行效力上的比较(表3)。使用如上所述的相同系统,将RAW-Blue细胞以浓度渐增的4084F、IRS869、IRS954或者AST开发的4084F7/8(所有的均具有硫代磷酸酯主链化学物质)孵育两小时以允许摄取和内体内化。然后以0.5μM的活化TLR9的具有硫代磷酸酯主链的CpG 1668 DNA或者以5μM的活化TLR7/8的单链RNA即ssRNA 06⁶⁻⁸攻击细胞过夜,使用上述显色测定测量TLR的活化。结果示于图5中。

[0224] 有趣的是,被并入AST-015的4084F序列对TLR9与现有技术Dynavax序列IRS869和IRS954(IC₅₀:4084F=2.8nM; IRS869=3.0nM; IRS954=9.4nM)一样有效,而AST开发的TLR7/8/9拮抗剂4084F7/8具有更弱但仍然有效的196nM的IC₅₀(图5A)。重要的是,4084F7/8相对(versus)其具有和Dynavax序列具有相同效力的碱基序列对应物4084F获得了拮抗TLR7/8活化的能力(IC₅₀:4084F>10,000nM; IRS869=4,775nM; IRS954=3,134nM; 4084F7/8=3,956nM)(图5B)。

[0225] 重要的是,该实施例证实可以通过碱基序列的修饰设计拮抗内体TLR范围的特异性序列。基于这些数据,本领域技术人员可以开发SNA形式的既是特异性TLR拮抗剂又是广谱TLR拮抗剂,其将与它们的游离DNA对应物或目前现有技术经临床测试的构建体相比同等地或优于其而执行功能。

[0226] 实施例6:各种toll样受体激动剂活性的脂质体球形核酸拮抗作用。

[0227] 通过形成由常规脂质体挤出方法所形成的由DOPC(1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱)组成的脂微团核心制备脂质体SNA。DOPC微团形成之后,序列4084F(5'-C*C*T*G*G*A*T*G*G*G*A*A-3'(SEQ ID NO:121),*表示硫代磷酸酯)或4084F-Ext(5'-T*G*C*T*T*G*A*C*A*C*C*T*G*G*A*T*G*G*G*A*A-3')(SEQ ID NO:122)的寡核苷酸被附接至脂质基团3'端,诸如二硬脂基或生育酚并通过简单混合被并入微团,接着通过切向流过滤(tangential flow filtration)纯化以获得大约~100条核苷酸/SNA的纯化的脂质体SNA。用所示TLR的激动剂

(咪喹莫特(TLR7,图7B)、CpG 1826(CpG,TLR9,图7D)、细菌脂多糖(LPS,TLR4,图7C)、或者所有的三种同时(图7A))孵育RAW-Blue巨噬细胞(InVivoGen)4小时,接着用所示脂质体SNA或PBS孵育过夜并参考未处理的。数据示于图7中。结果发现,两种构建体均能够阻断所有三种激动剂的刺激。

[0228]

免疫调节序列			
名称	序列	Ref.	SEQ ID NO:
2088 DNA	TTCTGGCGGGGAAGT/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/	14,25	91
G DNA	CTCCTATTGGGGGTTTCCTAT/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/	12,17	92
MT01 DNA	ACCCCCTCTACCCCCTCTACCCCCTCT/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/	22	93
4084F DNA	CCTGGATGGGAA/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/	13,16	94
AST-012	TTCTGGCGGGGAAGT/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/(13nm AuNP)	AST	95
AST-013	CTCCTATTGGGGGTTTCCTAT/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/(13nm AuNP)	AST	96
AST-014	ACCCCCTCTACCCCCTCTACCCCCTCT/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/(13nm AuNP)	AST	97
AST-015	CCTGGATGGGAA/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/(13nm AuNP)	AST	98
Ctrl DNA	TCCTGAGCTTGAAGT/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/	14,25	99
Ctrl SNA	TCCTGAGCTTGAAGT/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/(13nm AuNP)	AST	100
免疫刺激序列			
CpG 1826	TCCATGACGTTTCCTGACGTT	5,10	101
CpG 1668	TCCATGACGTTTCCTGATGCT	5,12	102

表 1: 在本研究中使用的 TLR 9 的拮抗剂和刺激序列的身份。
 所有序列由脱氧核糖核苷酸组成。/iSp18/=内部间隔子 18 接头; /3ThioMC3-D/=具有 3 个硫接头的 3'末端硫醇; 13nm AuNP = 直径 13 纳米的金纳米颗粒; 文本中的“po”是指所有的磷酸二酯主链化学部分; 文本中的“ps”是指所有的硫代磷酸酯主链化学部分。

[0229]

免疫调节序列			
名称	序列	Ref.	SEQ ID NO:
AST-015mod1	C*C*T*GGATGGGAA/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/(13nm AuNP)	AST	103
AST-015mod2	CCTGGATG*G*G*AA/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/(13nm AuNP)	AST	104
AST-015mod3	C*C*T*GGATG*G*G*AA/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/(13nm	AST	105

[0230]

	AuNP)		
AST-015mod4	/Chol/CCTGGATGGGAA/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/(13nm AuNP)	AST	106
AST-015mod5	/Stryl/CCTGGATGGGAA/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/(13nm AuNP)	AST	107
AST-015mod6	/Palm/CCTGGATGGGAA/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/(13nm AuNP)	AST	108

表 2: 设想的促进效力的对 AST-015 的修饰。
 所有序列由脱氧核糖核苷酸组成。/iSp18/=内部间隔子 18 接头; /3ThioMC3-D/=具有 3 个硫接头的 3'末端硫醇; 13nm AuNP = 直径 13 纳米的金纳米颗粒; *=硫代磷酸酯键; /Chol/=胆固醇; /Stryl/= C16/C18 硬脂基; /Palm/=棕榈酰基。

[0231]

免疫调节序列			
名称	序列	Ref.	SEQ ID NO:
IRS869	TCCTGGAGGGGTTGT	²⁴	109
IRS954	TGCTCCTGGAGGGGTTGT	²⁴	110
4084F7/8 DNA	TGCTGGATGGGAA	AST	111
4084F7/8Ext	TGCCCTGGATGGGAA	AST	112
4084D7/8Full	TGCTTGACACCTGGATGGGAA	AST	113
AST-016	TGCTGGATGGGAA/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/(13nm AuNP)	AST	114
AST-017	TGCCCTGGATGGGAA/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/(13nm AuNP)	AST	115
AST-018	TGCTTGACACCTGGATGGGAA/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/(13nm AuNP)	AST	116
Ctrl DNA	TCCTGAGCTTGAAGT/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/	²⁴	117
Ctrl SNA	TCCTGAGCTTGAAGT/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/(13nm AuNP)	AST	118
免疫刺激序列			
ssRNA06	TCCATGACGTTCTGACGTT	⁶⁻⁸	119
CpG 1668	TCCATGACGTTCTGATGCT	¹⁰	120

表 3: 在本研究中使用的 TLR7/8/9 的拮抗剂和刺激序列的身份。
 除了由核糖核苷酸组成的 ssRNA06 之外, 所有序列由脱氧核糖核苷酸组成。/iSp18/=内部间隔子 18 接头; /3ThioMC3-D/=具有 3 个硫接头的 3'末端硫醇; 13nm AuNP = 直径 13 纳米的金纳米颗粒; 文本中的“po”是指所有的磷酸二酯主链化学部分; 文本中的“ps”是指所有的硫代磷酸酯主链化学部分。

[0232] 参考文献

[0233] (1)Hornung,V.;Rothenfusser,S.;Britsch,S.;Krug,A.;Jahrsdorfer,B.; Giese,T.;Endres,S.;Hartmann,G.J Immunol2002,168,4531.

[0234] (2)Stacey,K.J.;Sweet,M.J.;Hume,D.A.J Immunol1996,157,2116.

[0235] (3)Zarembek,K.A.;Godowski,P.J.J Immunol2002,168,554.

[0236] (4)Bauer,M.;Redecke,V.;Ellwart,J.W.;Scherer,B.;Kremer,J.P.;Wagner,H.; Lipford,G.B.J Immunol2001,166,5000.

[0237] (5)Bauer,S.;Kirschning,C.J.;Hacker,H.;Redecke,V.;Hausmann,S.;Akira, S.;Wagner,H.;Lipford,G.B.Proceedings of the National Academy of Sciences of

the United States of America2001,98,9237.

[0238] (6)Diebold,S.S.;Massacrier,C.;Akira,S.;Paturel,C.;Morel,Y.;Reis e Sousa,C.European journal of immunology2006,36,3256.

[0239] (7)Forsbach,A.;Nemorin,J.G.;Montino,C.;Muller,C.;Samulowitz,U.;Vicari,A.P.;Jurk,M.;Mutwiri,G.K.;Krieg,A.M.;Lipford,G.B.;Vollmer,J.J Immunol2008,180,3729.

[0240] (8)Heil,F.;Hemmi,H.;Hochrein,H.;Ampenberger,F.;Kirschning,C.;Akira,S.;Lipford,G.;Wagner,H.;Bauer,S.Science2004,303,1526.

[0241] (9)Krieg,A.M.Journal of clinical immunology1995,15,284.

[0242] (10)Krieg,A.M.;Yi,A.K.;Matson,S.;Waldschmidt,T.J.;Bishop,G.A.;Teasdale,R.;Koretzky,G.A.;Klinman,D.M.Nature1995,374,546.

[0243] (11)West,A.P.;Koblansky,A.A.;Ghosh,S.Annual review of cell and developmental biology2006,22,409.

[0244] (12)Peter,M.;Bode,K.;Lipford,G.B.;Eberle,F.;Heeg,K.;Dalpke,A.H.Immunology2008,123,118.

[0245] (13)Lenert,P.;Yi,A.K.;Krieg,A.M.;Stunz,L.L.;Ashman,R.F.Antisense& nucleic acid drug development2003,13,143.

[0246] (14)Stunz,L.L.;Lenert,P.;Peckham,D.;Yi,A.K.;Haxhinasto,S.;Chang,M.;Krieg,A.M.;Ashman,R.F.European journal of immunology2002,32,1212.

[0247] (15)Krieg,J.;Hartmann,S.;Vicentini,A.;Glasner,W.;Hess,D.;Hofsteenge,J.Molecular biology of the cell1998,9,301.

[0248] (16)Lenert,P.;Rasmussen,W.;Ashman,R.F.;Ballas,Z.K.DNA and cell biology2003,22,621.

[0249] (17)Gursel,I.;Gursel,M.;Yamada,H.;Ishii,K.J.;Takeshita,F.;Klinman,D.M.J Immunol2003,171,1393.

[0250] (18)Goh,F.G.;Midwood,K.S.Rheumatology(Oxford)2012,51,7.

[0251] (19)Chabaud,M.;Durand,J.M.;Buchts,N.;Fossiez,F.;Page,G.;Frappart,L.;Miossec,P.Arthritis and rheumatism1999,42,963.

[0252] (20)van den Berg,W.B.;Miossec,P.Nature reviews.Rheumatology2009,5,549.

[0253] (21)Emery,P.;Fleischmann,R.;Filipowicz-Sosnowska,A.;Schechtman,J.;Szczepanski,L.;Kavanaugh,A.;Racewicz,A.J.;van Vollenhoven,R.F.;Li,N.F.;Agarwal,S.;Hessey,E.W.;Shaw,T.M.Arthritis and rheumatism2006,54,1390.

[0254] (22)Yang,G.;Wan,M.;Zhang,Y.;Sun,L.;Sun,R.;Hu,D.;Zhou,X.;Wang,L.;Wu,X.;Yu,Y.Immunology2010,131,501.

[0255] (23)Kanzler,H.;Barrat,F.J.;Hessel,E.M.;Coffman,R.L.Nature medicine2007,13,552.

[0256] (24)Barrat,F.J.;Meeker,T.;Gregorio,J.;Chan,J.H.;Uematsu,S.;Akira,S.;Chang,B.;Duramad,O.;Coffman,R.L.The Journal of experimental medicine2005,202,

1131.

[0257] (25)Krieg,A.M.;Wu,T.;Weeratna,R.;Efler,S.M.;Love-Homan,L.;Yang,L.;Yi,A.K.;Short,D.;Davis,H.L.Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America1998,95,12631.

[0258] 等价物

[0259] 本领域技术人员将认识到(或者能够使用不超过常规实验确定)本文中所述的本发明的特定实施方案的许多等价物。这样的等价物旨在由以下权利要求书所涵盖。

[0260] 本文中所公开的所有参考文献(包括专利文件)被通过引用全文并入。

序列表

[0001]	<110>	AuraSense, LLC Gryaznov, Sergei Mader, Christopher C. Halo, Tiffany L. Radovic-Moreno, Aleksandar F.	
	<120>	作为免疫调节剂的基于球形核酸的构建体	
	<130>	A1005.70003W000	
	<140>	Not Yet Assigned	
	<141>	2014-07-25	
	<150>	US 61/858,584	
	<151>	2013-07-25	
	<160>	120	
	<170>	PatentIn version 3.5	
	<210>	1	
	<211>	15	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成多核苷酸	
	<400>	1 tcctggaggg gttgt	15
	<210>	2	
	<211>	18	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成多核苷酸	
	<400>	2 tgctcctgga ggggttgt	18
	<210>	3	
	<211>	13	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成多核苷酸	
	<400>	3 tgctggatgg gaa	13
	<210>	4	
	<211>	15	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成多核苷酸	
	<400>	4 tgccctggat gggaa	15
	<210>	5	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		

	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 5 tgcttgacac ctggatggga a	21
	<210> 6 <211> 13 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 6 tgcttgatgg gaa	13
	<210> 7 <211> 15 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 7 tgccctggat gggaa	15
	<210> 8 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
[0002]	<400> 8 tgcttgacac ctggatggga a	21
	<210> 9 <211> 15 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 9 tcctgagctt gaagt	15
	<210> 10 <211> 15 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 10 tcctgagctt gaagt	15
	<210> 11 <211> 15 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 11 ttctggegga gaagt	15

	<210> 12	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 12	
	ctctatattgg gggtttcccta t	21
	<210> 13	
	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 13	
	aacccctcteta cccctctetac cctctet	26
	<210> 14	
	<211> 12	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 14	
	cctggatggg aa	12
[0003]	<210> 15	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 15	
	ttctggcgagg gaagt	15
	<210> 16	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 16	
	ctctatattgg gggtttcccta t	21
	<210> 17	
	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 17	
	aacccctcteta cccctctetac cctctet	26
	<210> 18	
	<211> 12	

[0004]	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成多核苷酸	
	<400>	18	
		cctggatggg aa	12
	<210>	19	
	<211>	12	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成多核苷酸	
	<400>	19	
		cctggatggg aa	12
	<210>	20	
	<211>	12	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成多核苷酸	
	<400>	20	
		cctggatggg aa	12
	<210>	21	
	<211>	12	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成多核苷酸	
	<400>	21	
		ccggatggg aa	12
	<210>	22	
	<211>	12	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成多核苷酸	
	<400>	22	
		ectggatggg aa	12
	<210>	23	
	<211>	12	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成多核苷酸	
	<400>	23	
		ectggatggg aa	12
	<210>	24	
	<211>	12	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		

	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 24 cctggatggg aa	12
	<210> 25 <211> 15 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 25 tcctggaggg gttgt	15
	<210> 26 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 26 tgcctcctgga ggggttgt	18
	<210> 27 <211> 13 <212> DNA <213> 人工序列	
[0005]	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 27 tgctggatgg gaa	13
	<210> 28 <211> 15 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 28 tgccctggat gggaa	15
	<210> 29 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 29 tgcttgacac ctggatggga a	21
	<210> 30 <211> 13 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 30 tgctggatgg gaa	13

	<210> 31	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 31	
	tgccctggat gggaa	15
	<210> 32	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 32	
	tgcttgacac ctggatggga a	21
	<210> 33	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 33	
	tcctgagctt gaagt	15
[0006]	<210> 34	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 34	
	tcctgagctt gaagt	15
	<210> 35	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 35	
	ttctggcggg gaagt	15
	<210> 36	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 36	
	ctctattgg gggttecta t	21
	<210> 37	
	<211> 26	

[0007]	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成多核苷酸	
	<400>	37	
		acccccctctta cccccctctac cccctct	26
	<210>	38	
	<211>	12	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成多核苷酸	
	<400>	38	
		cctggatggg aa	12
	<210>	39	
	<211>	15	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成多核苷酸	
	<400>	39	
		ttctggcggg gaagt	15
[0007]	<210>	40	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成多核苷酸	
	<400>	40	
		cicctattgg gggtttccca t	21
	<210>	41	
	<211>	26	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成多核苷酸	
	<400>	41	
		accccccteta cccccctctac cccctct	26
[0007]	<210>	42	
	<211>	12	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成多核苷酸	
	<400>	42	
		cctggatggg aa	12
	<210>	43	
	<211>	13	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		

[0008]	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 43	
	tgctggatgg gaa	13
	<210> 44	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 44	
	tgccctggat gggaa	15
	<210> 45	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 45	
	tgettgcacac ctggatggga a	21
	<210> 46	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 46	
	tcttgagctt gaagt	15
	<210> 47	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 47	
	tcttgagctt gaagt	15
	<210> 48	
	<211> 14	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 48	
	tctggcgggg aagt	14
	<210> 49	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 49	
	ctcctattgg gggtttccta t	21

	<210> 50 <211> 26 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成多核苷酸 <400> 50 accccctcta cccctctac cctctc	26
	<210> 51 <211> 12 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成多核苷酸 <400> 51 cctggatggg aa	12
	<210> 52 <211> 15 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成多核苷酸 <400> 52 ttctggcggg gaagt	15
[0009]	<210> 53 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成多核苷酸 <400> 53 ctctatttg gggtttcta t	21
	<210> 54 <211> 26 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成多核苷酸 <400> 54 accccctcta cccctctac cctctc	26
	<210> 55 <211> 12 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成多核苷酸 <400> 55 cctggatggg aa	12
	<210> 56 <211> 24	

[0010]	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 56	
	ttagggtag ggtaggggtt aggg	24
	<210> 57	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 57	
	ttagggtag ggtaggggtt aggg	24
	<210> 58	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 58	
	ttagggtag ggtaggggtt aggg	24
	<210> 59	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 59	
	ttagggtag ggtaggggtt aggg	24
	<210> 60	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 60	
	ttagggtag ggtaggggtt aggg	24
	<210> 61	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 61	
	ttagggtag ggtaggggtt aggg	24
	<210> 62	
	<211> 16	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 62 ctatctgcgt tctctg	16
	<210> 63 <211> 16 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 63 ctatctgcgt tctctg	16
	<210> 64 <211> 16 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 64 ctatctgcgt tctctg	16
	<210> 65 <211> 16 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
[0011]	<400> 65 ctatctgcgt tctctg	16
	<210> 66 <211> 16 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 66 ctatctgcgt tctctg	16
	<210> 67 <211> 16 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 67 ctatctgcgt tctctg	16
	<210> 68 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 68 ttagggtttag ggtagggtt aggg	24

	<210> 69 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成多核苷酸 <400> 69 ttagggtttag ggfttagggtt aggg	24
	<210> 70 <211> 16 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成多核苷酸 <400> 70 ctatctgcgt tctctg	16
	<210> 71 <211> 16 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成多核苷酸 <400> 71 ctatctgcgt tctctg	16
[0012]	<210> 72 <211> 13 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成多核苷酸 <400> 72 tgctggatgg gaa	13
	<210> 73 <211> 15 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成多核苷酸 <400> 73 tgccctggat gggaa	15
	<210> 74 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成多核苷酸 <400> 74 tgcttgacac ctggatggga a	21
	<210> 75 <211> 15	

[0013]	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 75	
	tcttgagctt gaagt	15
	<210> 76	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 76	
	tcctgagctt gaagt	15
	<210> 77	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 77	
	ttctggcggg gaagt	15
	<210> 78	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 78	
	cicctattgg gggttccca t	21
	<210> 79	
	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 79	
	acccctctta cccctctac cctctf	26
	<210> 80	
	<211> 12	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 80	
	cctggatggg aa	12
	<210> 81	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 81 ttctggcggg gaagt	15
	<210> 82 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 82 cicctattgg gggtttccta t	21
	<210> 83 <211> 26 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 83 acccctcteta cccctctctac cctctt	26
	<210> 84 <211> 12 <212> DNA <213> 人工序列	
[0014]	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 84 cctggatggg aa	12
	<210> 85 <211> 12 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 85 cctggatggg aa	12
	<210> 86 <211> 12 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 86 cctggatggg aa	12
	<210> 87 <211> 12 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 87 cctggatggg aa	12

	<210> 88 <211> 12 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成多核苷酸 <400> 88 cctggatggg aa	12
	<210> 89 <211> 12 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成多核苷酸 <400> 89 cctggatggg aa	12
	<210> 90 <211> 12 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成多核苷酸 <400> 90 cctggatggg aa	12
[0015]	<210> 91 <211> 15 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成多核苷酸 <400> 91 ttctggcggg gaagt	15
	<210> 92 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成多核苷酸 <400> 92 ctcctattgg gggtttccta t	21
	<210> 93 <211> 26 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成多核苷酸 <400> 93 acccctcta cccctetac cctct	26
	<210> 94 <211> 12	

[0016]	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成多核苷酸	
	<400>	94	
		cctggatggg aa	12
	<210>	95	
	<211>	15	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成多核苷酸	
	<400>	95	
		ttctggcggg gaagt	15
	<210>	96	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成多核苷酸	
	<400>	96	
		ctcctattgg gggtttccta t	21
	<210>	97	
	<211>	26	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成多核苷酸	
	<400>	97	
		acccccctta cccctctac cccctt	26
	<210>	98	
	<211>	12	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成多核苷酸	
	<400>	98	
		cctggatggg aa	12
	<210>	99	
	<211>	15	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成多核苷酸	
	<400>	99	
		tectgagctt gaagt	15
	<210>	100	
	<211>	15	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		

	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 100 tcttgagctt gaagt	15
	<210> 101 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 101 tccatgacgt tcttgacgtt	20
	<210> 102 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 102 tccatgacgt tcttgatgct	20
	<210> 103 <211> 12 <212> DNA <213> 人工序列	
[0017]	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 103 cctggatggg aa	12
	<210> 104 <211> 12 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 104 cctggatggg aa	12
	<210> 105 <211> 12 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 105 cctggatggg aa	12
	<210> 106 <211> 12 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成多核苷酸	
	<400> 106 cctggatggg aa	12

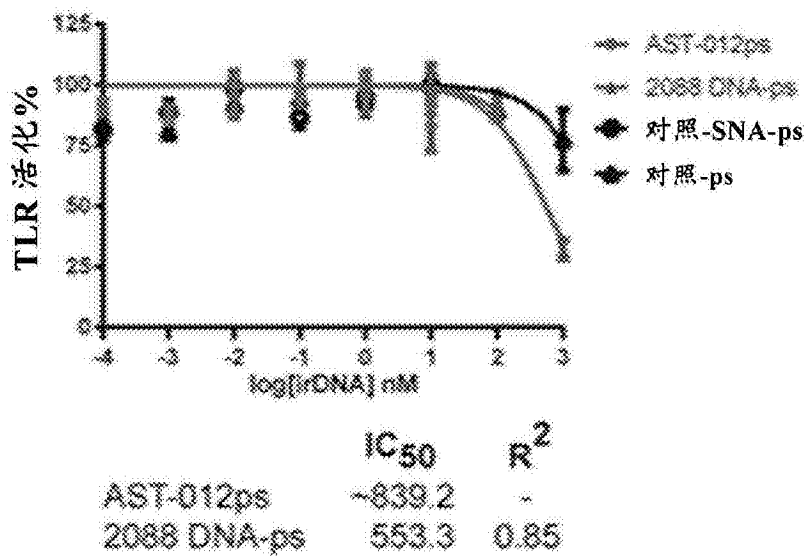
	<210> 107 <211> 12 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成多核苷酸 <400> 107 cctggatggg aa	12
	<210> 108 <211> 12 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成多核苷酸 <400> 108 cctggatggg aa	12
	<210> 109 <211> 15 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成多核苷酸 <400> 109 tcctggaggg gttgt	15
[0018]	<210> 110 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成多核苷酸 <400> 110 tgctcctgga ggggttgt	18
	<210> 111 <211> 13 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成多核苷酸 <400> 111 tgciggatgg gaa	13
	<210> 112 <211> 15 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成多核苷酸 <400> 112 tgccctggat gggaa	15
	<210> 113 <211> 21	

[0019]	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成多核苷酸	
	<400>	113	
		tgcttgacac ctggaiggga a	21
	<210>	114	
	<211>	13	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成多核苷酸	
	<400>	114	
		tgctggatgg gaa	13
	<210>	115	
	<211>	15	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成多核苷酸	
	<400>	115	
		tgccctggat gggaa	15
	<210>	116	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成多核苷酸	
	<400>	116	
		tgcttgacac ctggaiggga a	21
	<210>	117	
	<211>	15	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成多核苷酸	
	<400>	117	
		tccagagctt gaagt	15
	<210>	118	
	<211>	15	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成多核苷酸	
	<400>	118	
		tccagagctt gaagt	15
	<210>	119	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		

	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 119	
	tccatgacgt tcctgacgtt	20
[0020]	<210> 120	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成多核苷酸	
	<400> 120	
	tccatgacgt tcctgatget	20

A

抑制 CPG 诱导的 TLR9 的活化——AST-012

**B**

抑制 CPG 诱导的 TLR9 的活化——AST-013

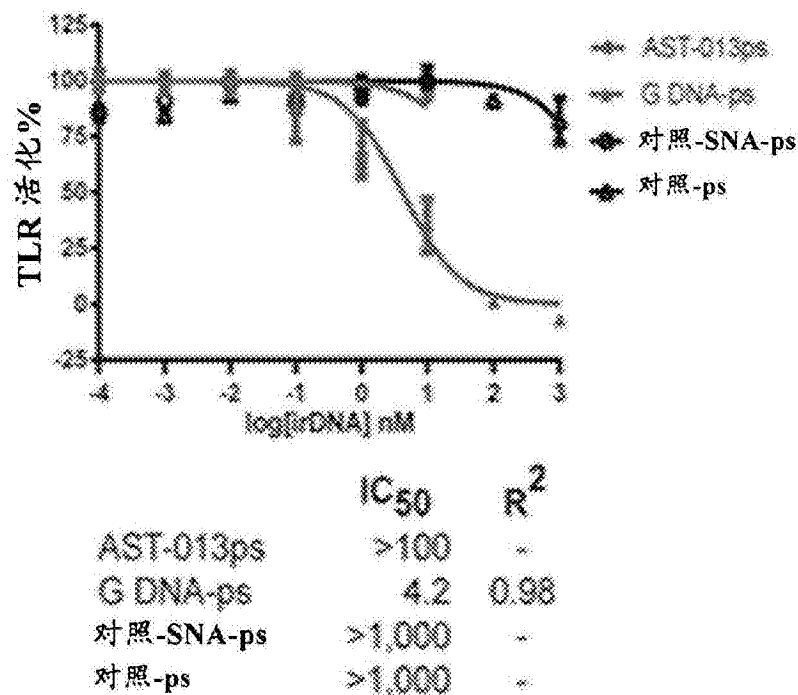
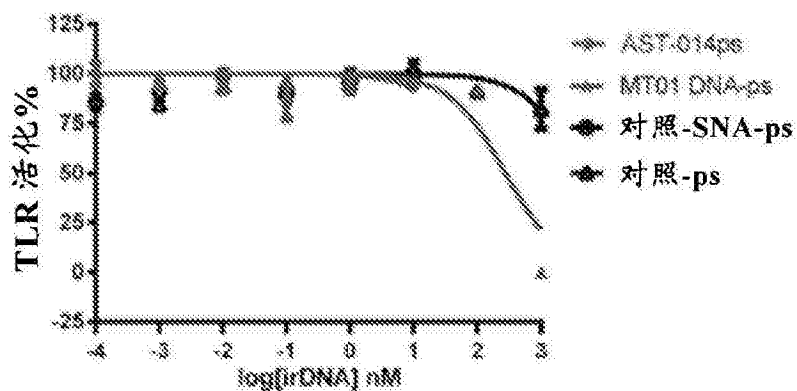


图1

C

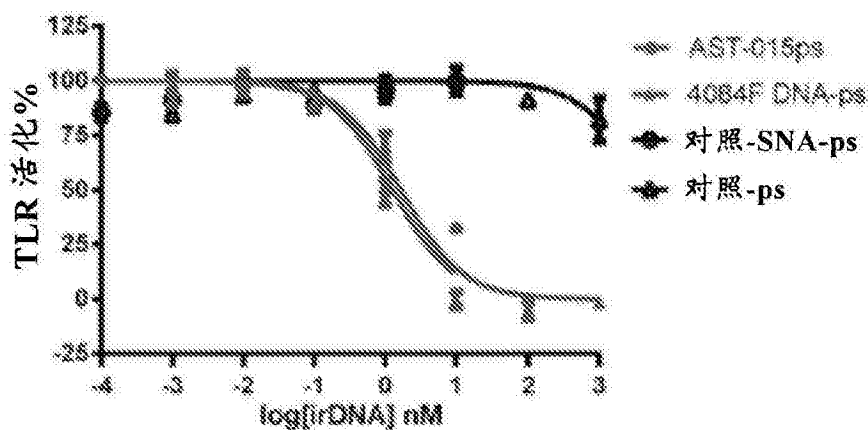
抑制 CPG 诱导的 TLR9 的活化——AST-014



	IC ₅₀	R ²
AST-014ps	>100	-
MT01 DNA-ps	278.6	0.90
对照-SNA-ps	>1,000	-
对照-ps	>1,000	-

D

抑制 CPG 诱导的 TLR9 的活化——AST-015

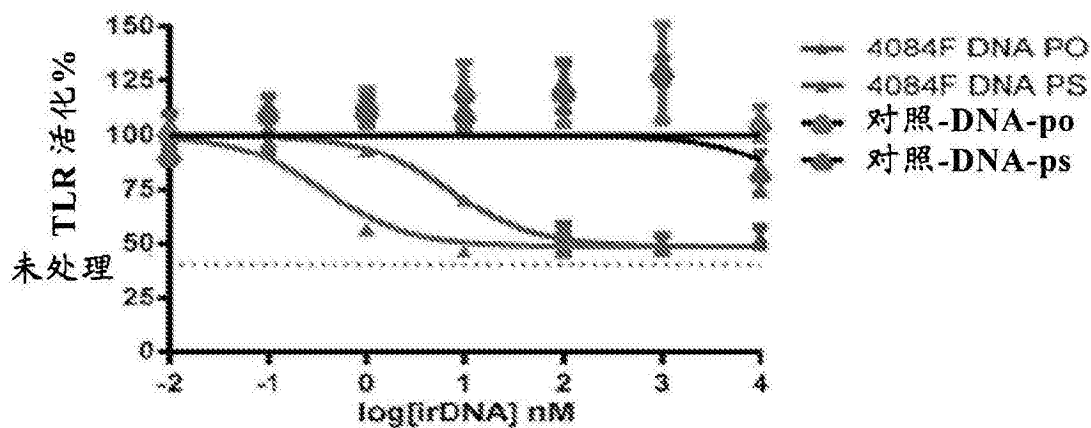


	IC ₅₀	R ²
AST-015ps	1.3	0.86
4084F DNA-ps	1.6	0.97
对照-SNA-ps	>1,000	-
对照-ps	>1,000	-

图1续

A

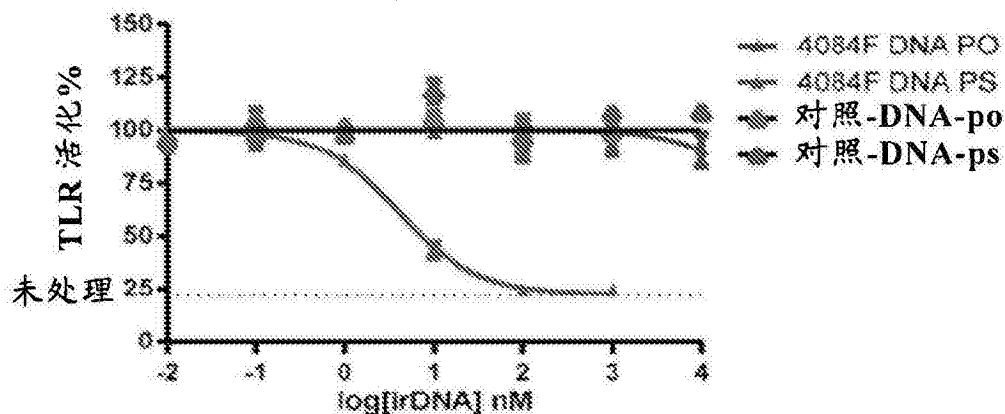
irDNA vs PO CpG —— 先用抑制剂



	IC ₅₀	R ²
4084F DNA PO	7.1	0.96
4084F DNA PS	0.4	0.94
对照-DNA-po	>10,000	-
对照-DNA-ps	>10,000	-

B

irDNA vs PS CpG —— 先用抑制剂

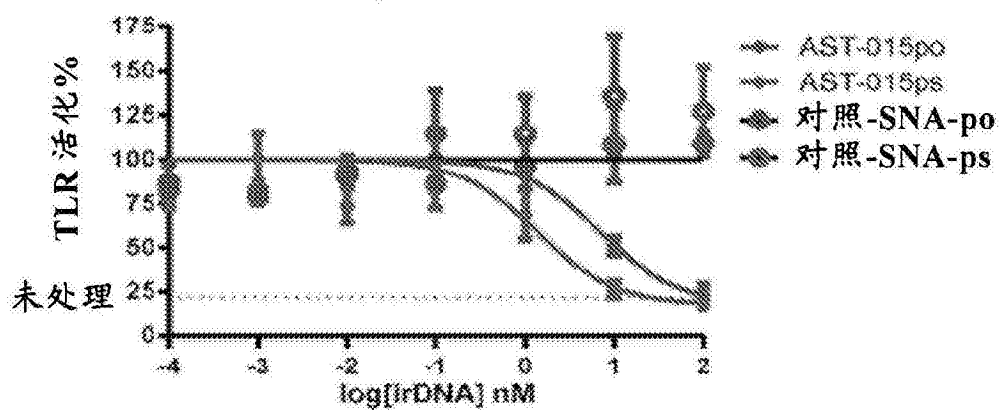


	IC ₅₀	R ²
4084F DNA PO	>10,000	-
4084F DNA PS	4.0	0.98
对照-DNA-po	>10,000	-
对照-DNA-ps	>10,000	-

图2

C

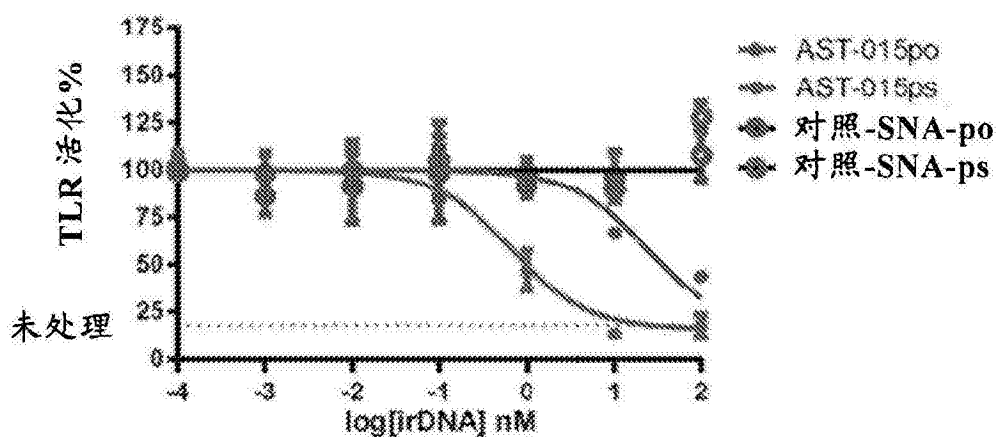
irRNA vs PO CpG —— 先用抑制剂



	IC ₅₀	R ²
AST-015po	7.1	0.76
AST-015ps	1.4	0.74
对照-SNA-po	>10,000	-
对照-SNA-ps	>10,000	-

D

irRNA vs PS CpG —— 先用抑制剂



	IC ₅₀	R ²
AST-015po	24.1	0.77
AST-015ps	0.7	0.95
对照-SNA-po	>10,000	-
对照-SNA-ps	>10,000	-

图2续

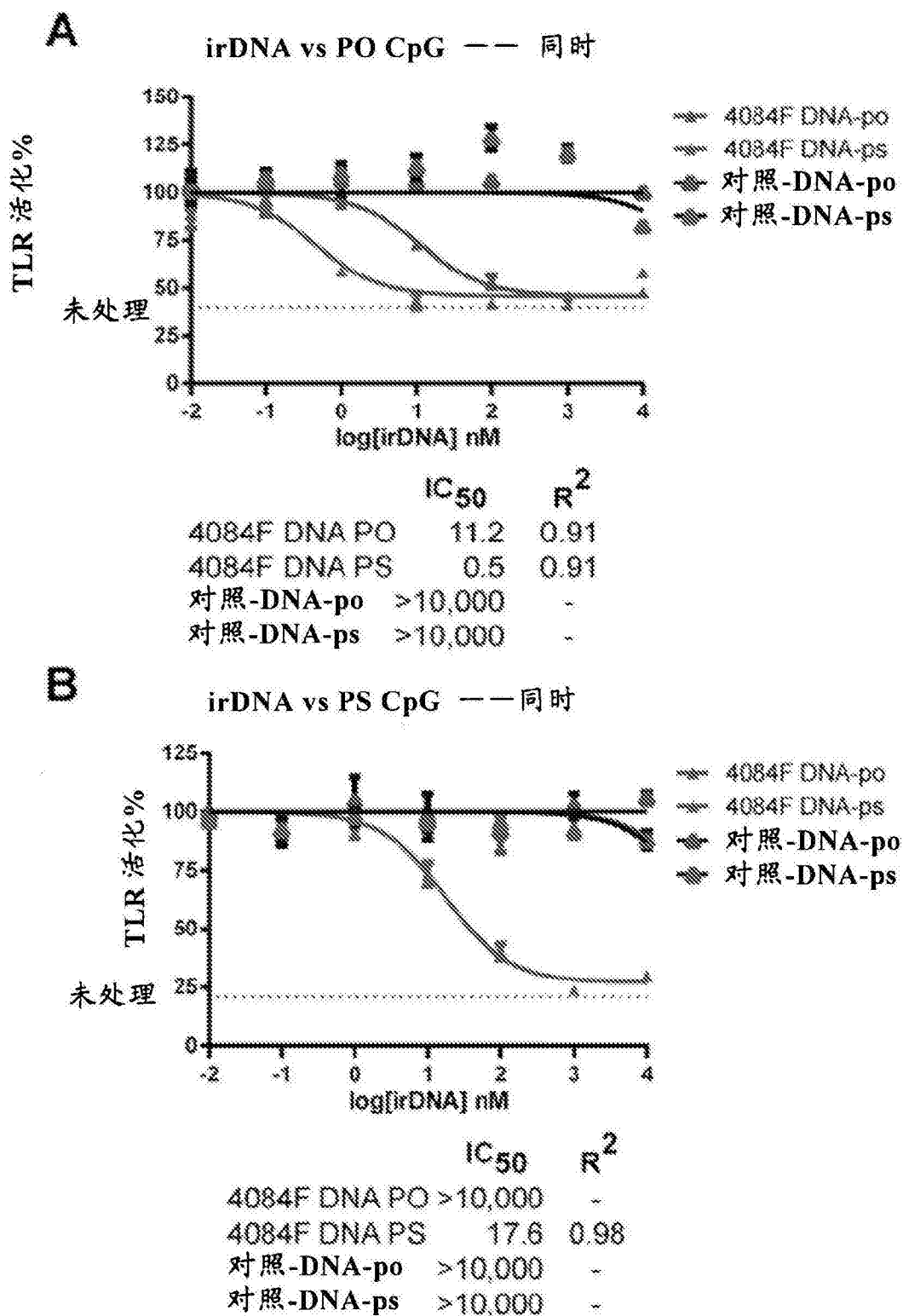
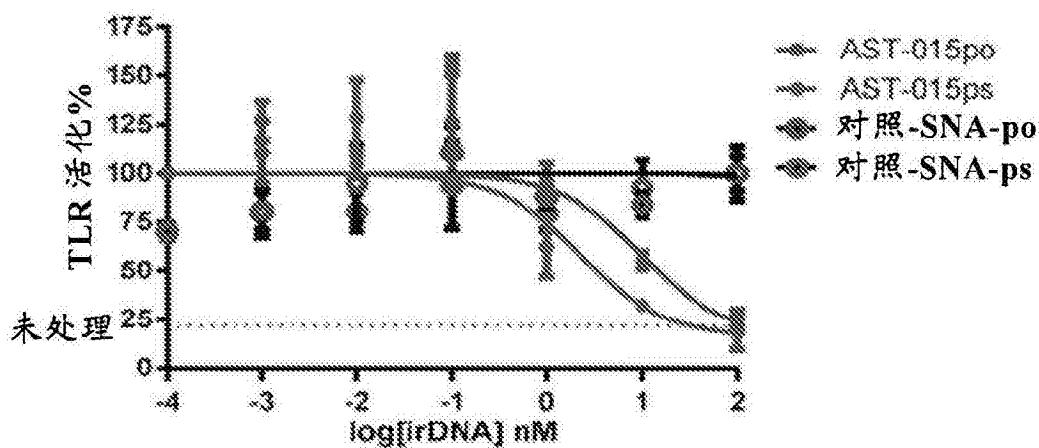


图3

C

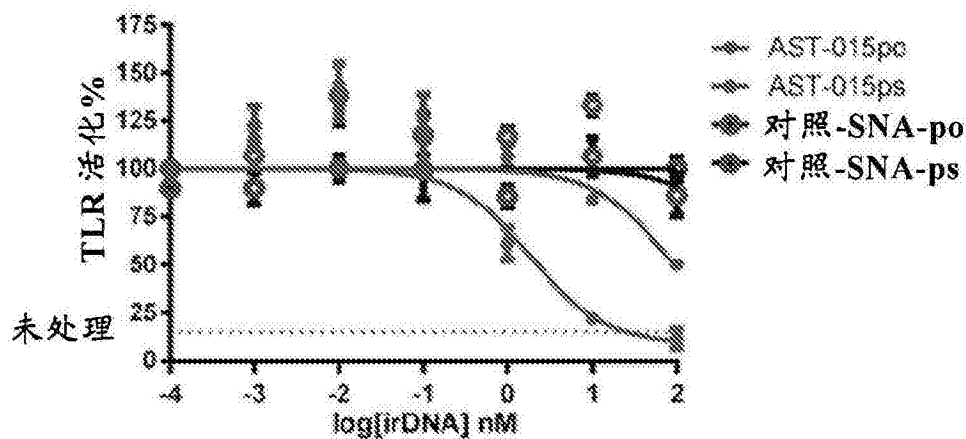
irSNA vs PO CpG —— 同时



	IC ₅₀	R ²
AST-015po	9.9	0.77
AST-015ps	2.3	0.66
对照-SNA-po	>1,000	-
对照-SNA-ps	>1,000	-

D

irSNA vs PS CpG —— 同时



	IC ₅₀	R ²
AST-015po	77.3	0.55
AST-015ps	1.9	0.79
对照-SNA-po	>1,000	-
对照-SNA-ps	>1,000	-

图3续

irDNA vs PS CpG —— 慢性

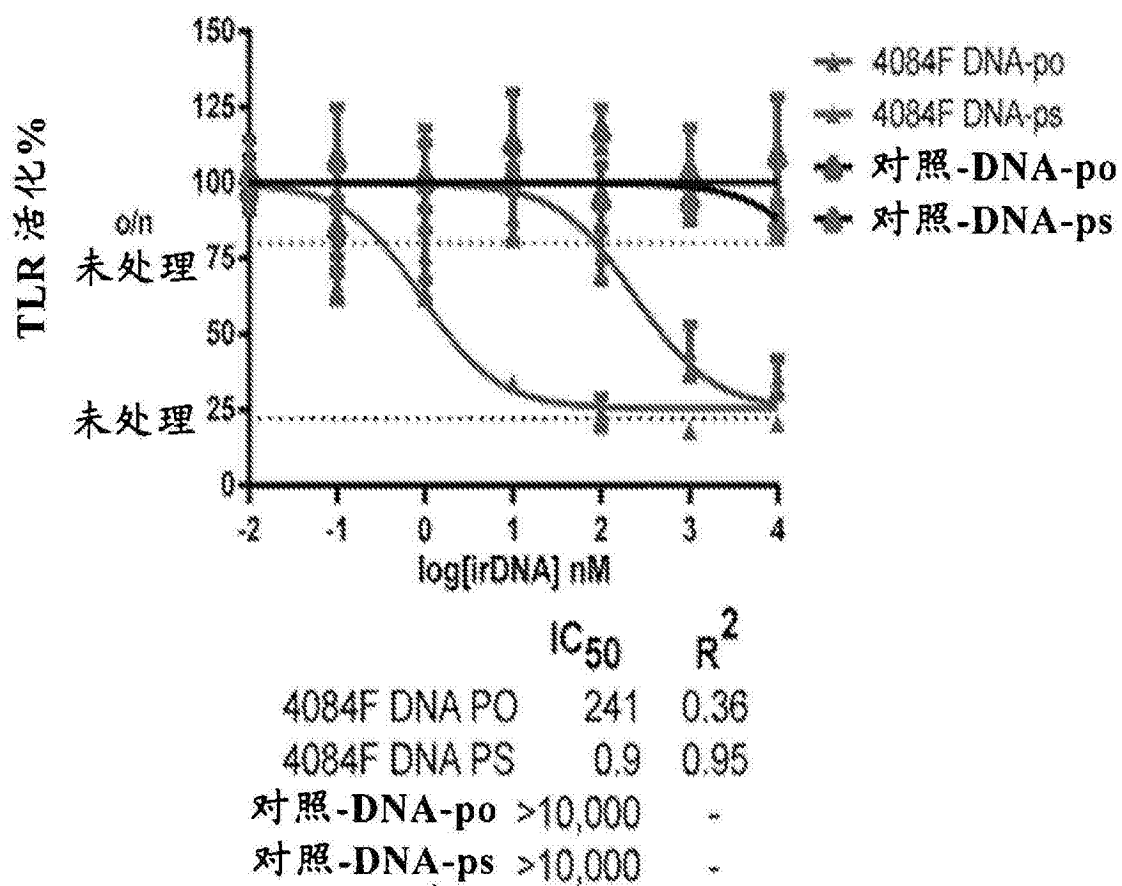


图4

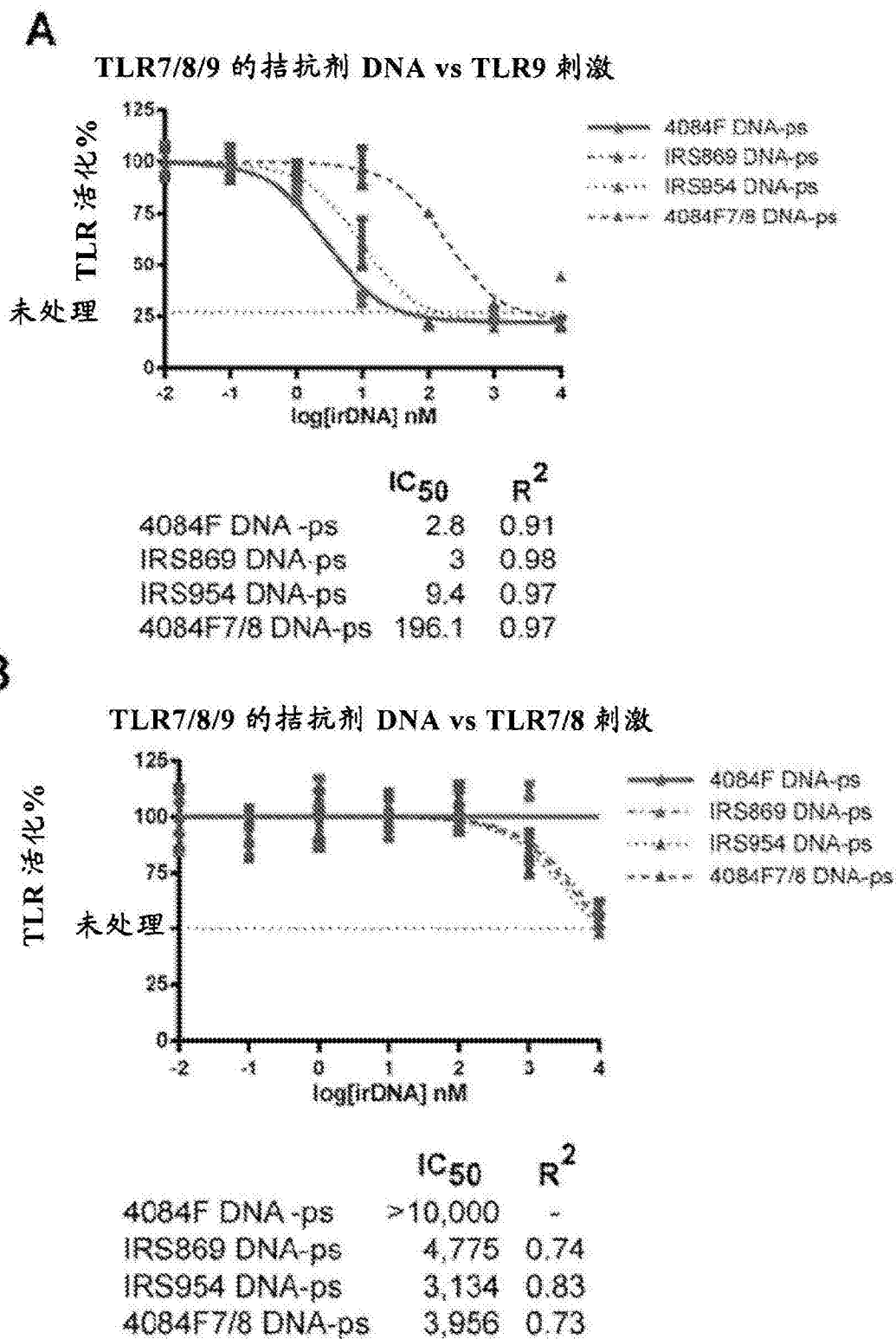


图5

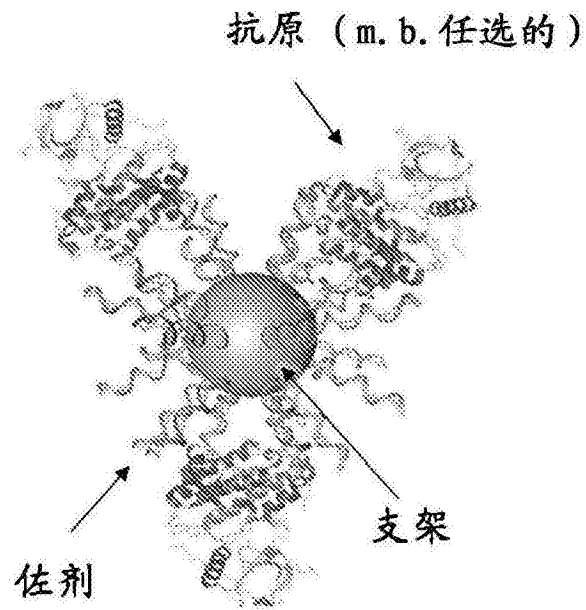


图6

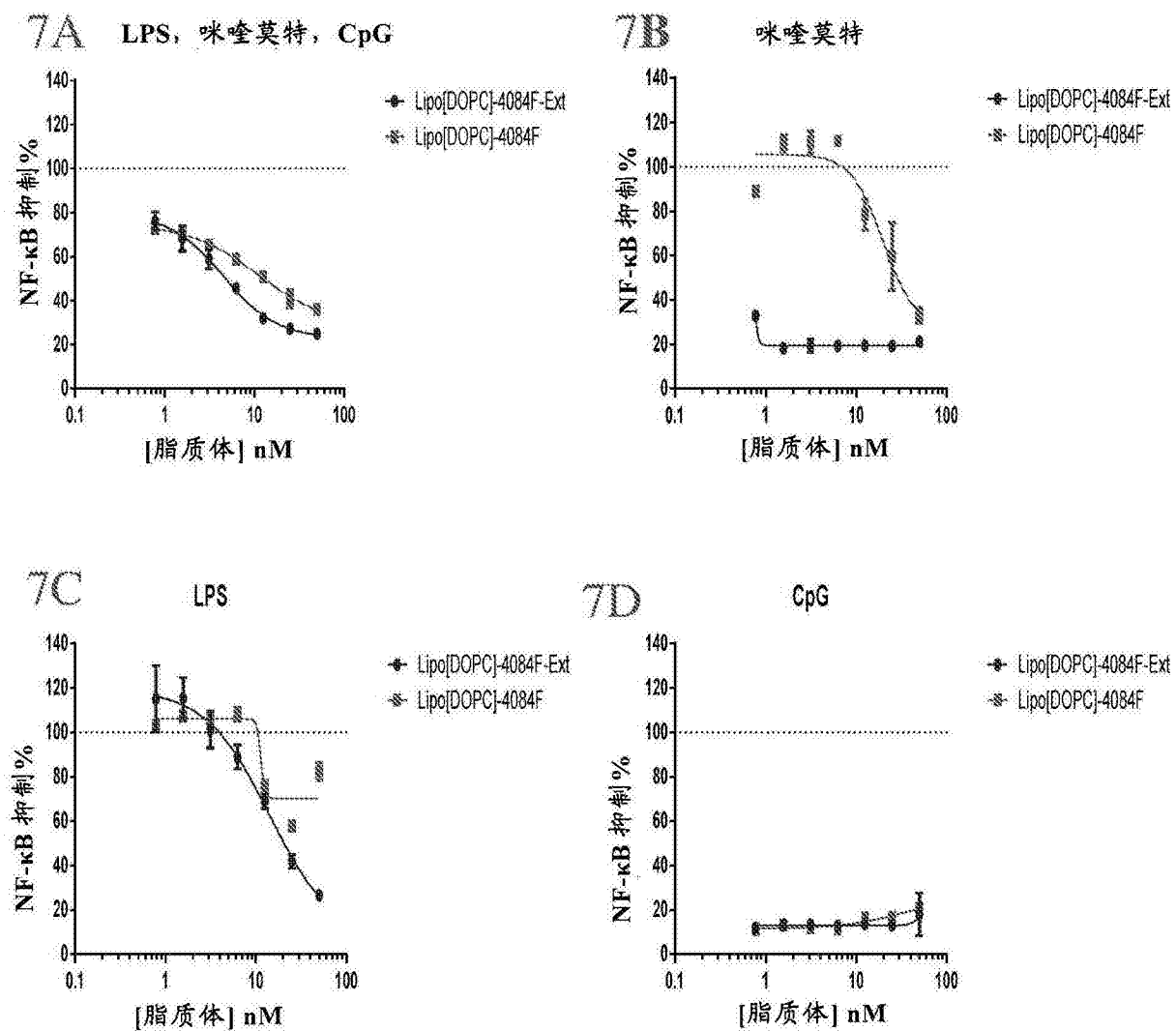


图7