



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102851295 B

(45) 授权公告日 2015. 01. 07

(21) 申请号 201210275214. 0

(22) 申请日 2007. 02. 07

(66) 本国优先权数据

200610111772. 8 2006. 08. 28 CN

(62) 分案原申请数据

200710003392. 7 2007. 02. 07

(73) 专利权人 长春华普生物技术有限公司

地址 130021 吉林省长春市新民大街

4-28/1102-54 号

(72) 发明人 王丽颖 胡大利 于永利

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任

公司 11021

代理人 张莹

(56) 对比文件

CN 1642982 A, 2005. 07. 20, 全文.

CN 1671412 A, 2005. 09. 21, 全文.

CN 1642982 A, 2005. 07. 20, 全文.

CN 1434718 A, 2003. 08. 06, 全文.

CN 1694621 A, 2005. 11. 09, 全文.

WO 03077832 A2, 2003. 09. 25, 全文.

审查员 汪未申

(51) Int. Cl.

C12N 15/117(2010. 01)

A61K 31/7088(2006. 01)

A61P 9/04(2006. 01)

A61P 3/10(2006. 01)

A61P 37/02(2006. 01)

权利要求书1页 说明书18页 附图4页

(54) 发明名称

To11 样受体调节性寡核苷酸及其用途

(57) 摘要

本发明涉及一种 To11 样受体调节性寡核苷酸及其功能性类似物以及应用该寡核苷酸及其功能性类似物在用于预防和治疗免疫介导的疾病中的用途。这个发明提供的寡核苷酸含有 CT 重复序列 [(CT)_n] 或 CCT 重复序列 [(CCT)_n] 或 TC 重复序列 [(TC)_n]，或为富含 CT 或 CCT 或 TC 的寡核苷酸。免疫介导的疾病包括自身免疫性疾病、移植排斥、超敏反应、微生物过强刺激宿主免疫系统引起的疾病和 TOLL 样受体激活相关性疾病。

1. Toll 样受体调节性寡核苷酸用于制备用于通过拮抗 Toll 样受体 TLR 的激活来治疗或预防免疫介导的疾病的药物的用途,所述疾病是扩张型心肌病,糖尿病或系统性红斑狼疮,其中所述 Toll 样受体调节性寡核苷酸的特征在于该寡核苷酸由 CT 重复单位 (CT) n 的序列组成,其中的 C 是胞嘧啶, T 是胸腺嘧啶, n 是 3-12 的整数,是重复单位的个数。

2. 权利要求 1 所述的用途,其中该寡核苷酸是 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:12-15 所示的序列之一。

3. 权利要求 1 所述的用途,其中该寡核苷酸是序列为 SEQ ID NO:1: 5'-ctctctctctctctctctct-3' 所示的寡核苷酸。

4. 按照权利要求 1-3 任一项所述的用途,其中的寡核苷酸是单独应用或与药学可接受的载体一起使用。

5. 按照权利要求 1-3 任一项所述的用途,其中所述药物为适于经肠内,肠外,外用和吸入施用的形式。

6. 按照权利要求 1-3 任一项所述的用途,其中所述药物的施用对象是脊椎动物。

7. 按照权利要求 1-3 任一项所述的用途,其中所述药物的施用对象是人。

8. 按照权利要求 1-3 任一项所述的用途,其中所述的寡核苷酸作为药物组合物中的有效成分进行使用。

9. 按照权利要求 1-3 任一项所述的用途,其中所述的寡核苷酸在给予个体时可以单独使用,或自身联合使用,或与一种或几种其他的活性物质联合使用。

10. 按照权利要求 1-3 任一项所述的用途,其中所述的寡核苷酸在给予个体时可以单独应用或 / 和递送载体联合应用。

11. 按照权利要求 1-3 任一项所述的用途,其中所述的寡核苷酸通过用来在体外处理个体免疫细胞,再将处理过的细胞回输给同一个体来使用。

12. 按照权利要求 1-3 任一项所述的用途,其中所述的寡核苷酸的应用剂量为治疗有效剂量。

To11 样受体调节性寡核苷酸及其用途

发明领域：

[0001] 本发明提供了含 CT 重复序列 [(CT)_n] 或 CCT 重复序列 [(CCT)_n] 或 TC 重复序列 [(TC)_n]，或富含 CT 或 CCT 或 TC 的 To11 样受体调节性寡核苷酸及其功能性类似物，以及应用该寡核苷酸及其功能性类似物在用于预防和治疗免疫介导的疾病中的用途。免疫介导的疾病包括自身免疫性疾病、移植排斥、超敏反应、微生物过强刺激宿主免疫系统引起的疾病和 To11 样受体 (TLR) 激活相关性疾病。

发明背景：

[0002] 免疫系统可保护机体免受细菌、寄生虫、真菌、病毒的感染，并可清除肿瘤细胞。在一些情况下，免疫系统发动的免疫反应是有害的，可引起免疫介导的疾病。这些免疫介导的疾病包括但不限于：自身免疫性疾病、移植排斥、超敏反应、微生物过强刺激宿主免疫系统引起的疾病和 TOLL 样受体激活相关性疾病。自身免疫性疾病由针对内源性抗原的获得性（特异性）免疫反应和天然免疫反应所引起。来源于细菌、寄生虫、真菌、病毒的外源物质可以模拟自身蛋白，刺激免疫系统发生针对自身细胞和组织的免疫反应，从而引起自身免疫性疾病。移植排斥是移植受体（宿主）对移植器官或组织的免疫反应。一个接受同种移植植物（如：肾、胰腺、心脏、肺、骨髓、角膜和皮肤）的受者，可以产生针对移植物的免疫应答。超敏反应是对身体有害的过强的免疫应答，可导致细胞组织破坏甚至机体的死亡。一些微生物感染机体后，可以刺激免疫系统产生过强的免疫反应，引起微生物过强刺激宿主免疫系统引起的疾病，如在禽流感病毒 H5N1 或 SARS 冠状病毒感染情况下，针对感染病毒的过强免疫反应可能成为感染者的致命因素。此免疫反应的特点是在被感染的个体产生了大量的细胞因子。这个现象被称为超量细胞因子血症 (hypercytokinemia) 或细胞因子风暴。TOLL 样受体激活相关性疾病是由于激活 To11 样受体 (Toll like receptors) 而引起的疾病。To11 样受体是一个识别微生物来源分子结构（病原体相关分子模型）的受体家族。表达 To11 样受体的免疫细胞通过结合这种病原体相关分子模型而被激活。在人类，To11 样受体家族共有 11 个成员。To11 样受体可以识别很多病原微生物来源的产物。TLR4 可以识别细菌脂多糖 (LPS)；TLR2 和 TLR6 的双体可以识别脂磷壁酸和双酰脂肽；TLR2 和 TLR1 的双体可以识别三酰脂肽；TLR9 可以识别合成的或来源于细菌和病毒含 CpG 寡核苷酸；TLR5 可以识别细菌鞭毛蛋白；TLR2 和 TLR6 的双体还可以识别酵母多糖；TLR4 可以识别呼吸道合胞病毒 F 蛋白；TLR3 可以识别聚肌苷酸胞嘧啶核苷酸、合成的或来源于病毒的双链 RNA；TLR7 和 TLR8 可以识别单链病毒 RNA；TLR4 可以识别原虫产物，如 GPI 锚定蛋白；TLR4 还可以识别炎症组织的产物，如 HSP60 和纤维原片段 (Foo Y. Liew, et al. Negative regulation of toll like receptor mediated immune responses Nature Reviews Immunology. Vol15, June 2005, 446-458)。两种免疫调节药物 R-837 和 R-848 是 TLR7 和 TLR8 的配体。近年的研究表明，TLRs 的激活和败血症、扩张性心肌病、糖尿病系统性红斑狼疮、实验性自身免疫性脑脊髓膜炎、动脉粥样硬化、哮喘、慢性阻碍性肺疾病和器官衰竭的发生有关 (Foo Y. Liew, et al. Negative regulation of toll like receptor mediated immune responses. Nature

Review Immunology, Vol15, 2005, 446-458)。

[0003] 综上所述,为了预防或治疗免疫介导的疾病,有必要研制能够抑制伤害性免疫反应的制剂。本发明发明提供了含 CT 重复序列 [(CT)_n] 或 CCT 重复序列 [(CCT)_n] 或 TC 重复序列 [(TC)_n], 或富含 CT 或 CCT 或 TC 的寡核苷酸及其功能性类似物, 以及应用该寡核苷酸在预防和治疗免疫介导的疾病中的用途。本发明提供的寡核苷酸可以抑制由 TLR9 激动剂激活的免疫反应。已经有研究者证实, TLR9 激动剂可以激活天然免疫反应和获得性免疫反应 (Arthur M. Krieg. Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. Nature Reviews Drug Discovery, Vol5. June 2006, 471-484)。在人类的免疫系统中, B 细胞和浆细胞样树突细胞 (pDCs) 表达 TLR9。含有 CpG 的寡核苷酸 (CpG ODN) 是 TLR9 的激动剂 (D. M. Klinman, Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides, 428 Nat. Rev., Immunol. 4(2004) 249-258)。根据功能特性, 含有 CpG 的寡核苷酸分为 3 个类型 (Tomoki Ito, et al. Specialization, kinetics, and repertoire of type 1 interferon responses by human plasmacytoid dendritic cells. Blood, 15 March 2006, Vol107, Num 6 :2423-2431)。A 型含 CpG 寡核苷酸可以激活人浆细胞样树突状细胞产生大量的 I 型干扰素 (IFN- α/β), 强烈地激活 NK 细胞。B 型含 CpG 寡核苷酸主要激活 B 细胞, 刺激 B 细胞增值和抗体分泌。C 型含 CpG 的寡核苷酸同时具有 A 型和 B 型含 CpG 寡核苷酸的功能。CpG2216 (5' gggggacgatcgtcggggg3') (Dominique De Wit, et al. Blood plasmacytoid dendritic cell responses to CpG oligonucleotides are impaired in human newborns. Blood, 1 Feb, 2004, Vol 103, Num 3 :1030-103), CpG2006 (5' -tcgtcgtttt tgctcgttttgctcgtt-3') (Dominique De Wit, et al. Blood plasmacytoid dendritic cell responses to CpG oligodeoxynucleotides are impaired in human newborns. Blood, 1 Feb, 2004, Vol 103, Num 3 :1030-103) and CpG C274 (5' -tcgtcgaacgttcgagatgat3') (Omar Duramad, et al. Inhibitors of TLR-9 Act on Multiple Cell Subsets in Mouse and Man In Vitro and Prevent Death In Vivo from Systemic Inflammation. The Journal of Immunology, 2005, 174 :5193-5200) 分别是典型的 A 型、B 型和 C 型的含 CpG 的寡核苷酸。CpG 302 (5' -tcg tcg ggt gcg acg tcg cag ggg gg-3') 也是一种 C 型的含 CpG 的寡核苷酸 (Musheng Bao, et al. Clinical Immunology. 2006. 118 :180-187)。TLR9 激动剂如 CpG 2216、CpG 2006、CpG C274 或 CpG 302 可以被胞吞到细胞间隙而激活 TLR9。在浆细胞样树突状细胞中, TLR9 激活可以启动一个快速的天然免疫反应, 其特征是分泌大量的促炎因子如 IL-6, 肿瘤坏死因子 - α (TNF α)、I 型干扰素 (IFN- α/β) 和干扰素诱导的趋化因子。通过干扰素依赖和干扰素非依赖两条通路, 此浆细胞样树突细胞可以继发激活天然免疫细胞如 NK 细胞、单核细胞和嗜中性粒细胞。通过 TLR9 的刺激, B 细胞增强了对抗原刺激的敏感性, 可以有效地分化成抗体分泌细胞。因此, TLR9 的刺激有助于获得性免疫应答, 特别是体液免疫应答。通过 TLR9 激活的浆细胞样树突状细胞可分泌 IFN α , 此 IFN α 可使浆细胞样树突细胞迁移聚集到淋巴结和其他周围淋巴组织。在这些部位, 此浆细胞样树突细胞可以激活未致敏的 T 细胞和记忆 T 细胞, 向 CD8⁺ 细胞毒性 T 细胞交叉提呈可溶性抗原, 促进 TH1 型的 CD4 和 CD8 T 细胞反应。以上分析清楚表明, 拮抗 CpG 2006、CpG C274、CpG 2216 或 CpG 302 活性的制剂可以通过抑制天然免疫和获得性免疫来预防和治疗免疫紊乱性疾病。因为, CpG2006、CpGC274、CpG 2216 或 CpG 302 均为 Toll 样受体 (TLR) 的激活剂,

本发明提供的能拮抗 CpG2006 或 CpG C274 或 CpG2216 或 CpG 302 激活 TLR 功能的寡核苷酸被称为 Toll 样受体调节性寡核苷酸。

发明内容：

[0004] 1、本发明提供了含 CT 重复序列 [(CT)_n] 或 CCT 重复序列 [(CCT)_n] 或 TC 重复序列 [(TC)_n]，或富含 CT 或 CCT 或 TC 的 Toll 样受体调节性寡核苷酸，该寡核苷酸可以被化学修饰，此修饰包括但不限于磷酸骨架修饰，如部分地或全部地磷硫酰或二硫代磷酸酯修饰。经化学修饰的由本发明提供的寡核苷酸是相对应的寡核苷酸的功能性类似物。

[0005] 2、本发明提供了应用该寡核苷酸或其功能性类似物在预防或治疗免疫介导的疾病中的用途。治疗的个体包括但不限于人类。免疫介导的疾病包括自身免疫性疾病、移植排斥、超敏反应、微生物过强刺激宿主免疫系统引起的疾病和 TOLL 样受体激活相关性疾病。

[0006] 3、本发明提供了应用该寡核苷酸或其功能性类似物通过抑制免疫反应进而预防或治疗免疫介导的疾病的使用方法。

[0007] 4、在应用本发明提供的寡核苷酸或其功能性类似物预防和治疗免疫介导的疾病时，可将该寡核苷酸或其功能性类似物用药物性载体承载后应用。本发明提供的寡核苷酸或其功能性类似物可经肠道、非肠道（如皮下注射、肌肉注射和静脉注射等）、局部和呼吸道途径应用。

[0008] 5、本发明提供的寡核苷酸或其功能性类似物作为主要成分可形成各种药物组合物或剂型。包含有效治疗剂量的该类寡核苷酸或其功能性类似物的这些药物组合物可被用来预防或治疗免疫介导的疾病。

[0009] 6、在预防和治疗免疫介导的疾病时，本发明提供的有效治疗剂量的寡核苷酸或其功能性类似物可以单独应用、或自身组合应用、或和其他一种或几种活性物质联合应用。

[0010] 7、在预防和治疗免疫介导的疾病时，本发明提供的有效治疗剂量的该类寡核苷酸或其功能性类似物可由递送载体承载应用。

[0011] 8、在预防和治疗免疫介导的疾病时，本发明提供的有效治疗剂量的该类寡核苷酸或其功能性类似物可被用于处理自身的免疫细胞，然后将此细胞做自体回输应用。

附图说明：

[0012] 图 1 描述了人外周血单个核细胞在 CpG2006 和 CpG274 刺激下增殖时，寡核苷酸 SAT05 表现的抑制作用。

[0013] 在存在各种剂量 SAT05、A151 及对照寡核苷酸条件下，应用 CpG 2006 (1 μg/ml) 或 CpG C274 (1 μg/ml) 刺激人外周血单个核细胞 48 小时，之后和 [³H] 胸腺嘧啶共孵育 16 小时。细胞增殖的程度用 cpm±SD 来表示。实验结果表明，和对照寡核苷酸相比，SAT05 可以抑制由 CpG 2006 或 CpG C274 刺激的人外周血单个核细胞增殖。该实验重复 4 次均得到类似的结果。

[0014] 下面是一些实验中应用的寡核苷酸序列：

[0015] CpG 2006 (5' -tcg tcg ttt tgt cgt tttg tcg tt-3')

[0016] CpG C274 (5' -tcgtcgaacgttcgagatgat 3')

[0017] SAT05 (5' -ctctctctctctctctctct-3')，也被命名为 SEQ ID NO:1

[0018] A151(5' -ttagggtttagggtttagggtttaggg-3')

[0019] Control ODN(对照寡核苷酸):(5' -gtttagagattaggca-3')

[0020] 图 2 描述了人外周血单个核细胞在 CpG2006 和 CpG274 刺激下增殖时,寡核苷酸 SAT05f 表现的抑制作用。

[0021] 在存在各种剂量 SAT05f、A151 及对照寡核苷酸的情况下,应用 CpG 2006(1 μ g/ml) 或 CpG C274(1 μ g/ml) 刺激人外周血单个核细胞 48 小时,之后和 [³H] 胸腺嘧啶共孵育 16 小时。细胞增殖的程度用 cpm±SD 表示。实验结果表明,和对照寡核苷酸相比, SAT05f 可以抑制由 CpG 2006 or CpG C274 刺激下的人外周血单个核细胞增殖。该实验重复 4 次均得到类似的结果。

[0022] 下面是一些实验中应用的寡核苷酸序列:

[0023] CpG2006(5' -tcg tcg ttt tgt cgt tttg tcg tt-3')

[0024] CpG C274(5' -tcgtcgaacgttcgagatgat 3')

[0025] SAT05f(5' -cctcctcctcctcctcctcctcct-3'),被命名为 SEQ ID NO :2

[0026] A151(5' -ttagggtttagggtttagggtttaggg-3')

[0027] Control ODN(对照寡核苷酸):(5' -gtttagagattaggca-3')

[0028] 图 3 描绘了 SAT05 可以有效抑制在 CpG 2216 刺激下人外周血单个核细胞抗病毒物质的产生。

[0029] 在存在各种剂量 SAT05、A151 及对照寡核苷酸的情况下,用 CpG2216 刺激人外周血单个核细胞获得培养上清,观察此上清保护 Vero E6 抵抗 10×TICD50 VSV 病毒攻击的作用。图中的各种符号代表了 OD 值 ±SD。结果表明, SAT05 可以抑制在 CpG 2216 刺激下人外周血单个核细胞抗病毒物质的产生。

[0030] 下面是实验中应用的寡核苷酸序列:

[0031] CpG2216(5' -gggggacgatcgtcgggggg-3')

[0032] SAT05(5' -ctctctctctctctctctct-3'),被命名为 SEQ ID NO :1

[0033] A151(5' -ttagggtttagggtttagggtttaggg-3')

[0034] Control ODN(对照寡核苷酸):(5' -gtttagagattaggca-3')

[0035] 图 4 描绘了 SAT05f 可以有效抑制在 CpG 274 刺激下人外周血单个核细胞抗病毒物质的产生。

[0036] 在存在各种剂量 SAT05f、A151 及对照寡核苷酸的情况下,用 CpG274 刺激人外周血单个核细胞获得培养上清,观察此上清保护 Vero E6 抵抗 10×TICD50VSV 病毒攻击的作用。图中的各种符号代表了 OD 值 ±SD。结果表明, SAT05f 可以强烈抑制在 CpG 274 刺激下人外周血单个核细胞抗病毒物质的产生。

[0037] 下面是一些实验中应用的寡核苷酸序列:

[0038] CpG C274(5' -tcgtcgaacgttcgagatgat-3')

[0039] SAT05f(5' -cctcctcctcctcctcctcctcct-3'),被命名为 SEQ ID NO :2

[0040] A151(5' -ttagggtttagggtttagggtttaggg-3')

[0041] Control ODN:(5' -gtttagagattaggca-3')

[0042] 图 5 描述了人外周血单个核细胞在 CpG274 刺激下增殖时,富含 CT 序列或 CT 重复序列或 CCT 重复序列寡核苷酸对其增殖的抑制作用。

[0043] 在存在各种寡核苷酸 (30 μ g/ml) 的条件下,应用 CpG C274 (5 μ g/ml) 刺激人外周血单个核细胞 48 小时,之后和 [³H] 胸腺嘧啶共孵育 16 小时。细胞增殖的程度用 cpm \pm SD 来表示。“细胞”代表未经 CpG274 刺激的人外周血单个核细胞组。“PBS”代表单独应用 CpG C274 (5 μ g/ml) 刺激人外周血单个核细胞组。该实验重复 4 次,均得到类似的结果。

[0044] 下面是本实验中应用的寡核苷酸序列:

[0045] CT151h (5' -ctctcttttagggtttagggctctct-3'), SEQ ID NO :3 ;

[0046] CT151g (5' -ttagggctctctctctcttttaggg-3'), SEQ ID NO :4 ;

[0047] CT151f (5' -ctctcttttagggtttagggtttaggg-3'), SEQ ID NO :5 ;

[0048] CT151e (5' -ttagggtttagggtttagggctctct-3'), SEQ ID NO :6 ;

[0049] CT151d (5' -ctctctctctcttttagggtttaggg-3'), SEQ ID NO :7 ;

[0050] CT151c (5' -ttagggtttagggctctctctctct-3'), SEQ ID NO :8 ;

[0051] CT151b (5' -ctctcttttagggctctcttttaggg-3'), SEQ ID NO :9 ;

[0052] CT151a (5' -ttagggctctcttttagggctctct-3'), SEQ ID NO :10 ;

[0053] 1612A4 (5' -gtagagattaggca-3'), 对照 CpG ;

[0054] SAT05f (5' -cctcctcctcctcctcctcctcct-3'), SEQ ID NO :2 ;

[0055] SAT05e (5' -cttctctctctctctctctctctt-3'), SEQ ID NO :11 ;

[0056] SAT05d (5' -ctctctctctctctctctctctctct-3'), SEQ ID NO :12 ;

[0057] SAT05c (5' -ctctctctctctctctct-3'), SEQ ID NO :13 ;

[0058] SAT05b (5' -ctctctctctct-3'), SEQ ID NO :14 ;

[0059] SAT05a (5' -ctctct-3'), SEQ ID NO :15 ;

[0060] SAT05 (5' -ctctctctctctctctctct-3'), SEQ ID NO :1 ;

[0061] A151 (5' -ttagggtttagggtttagggtttaggg-3')。

[0062] 图 6 描述了人外周血单个核细胞在 CpG 2006 或 CpG C274 或 CpG 684 刺激下增殖时,富含 TC 序列 MS08 寡核苷酸对其增殖的抑制作用。

[0063] 在存在 MS08 (5' -TCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTC-3', 见 SEQ ID NO :16) 及对照寡核苷酸 MS19 (5' -AAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAG-3') 的条件下,应用 CpG 2006 或 CpGC274 或 CpG 684 刺激人外周血单个核细胞 48 小时,之后和 [³H] 胸腺嘧啶共孵育 16 小时。细胞增殖的程度用 cpm \pm SD 来表示。实验结果表明,和对照寡核苷酸相比,MS08 可以抑制由 CpG 2006 或 CpG C274 或 CpG 684 刺激的人外周血单个核细胞增殖。

[0064] 图 7 描绘了 MS08 可以有效抑制在 CpG 2216 或 CpG C274 或 CpG 302 刺激下人外周血单个核细胞抗病毒物质的产生。

[0065] 在存在 MS08 (5' -TCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTC-3', SEQ ID NO :16) 及对照寡核苷酸 MS19 (5' -AAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAG-3') 的条件下,用 CpG 2216 或 CpG C274 或 CpG 302 (5' -tcg tcg ggt gcg acg tcg cag ggg gg-3') 刺激人外周血单个核细胞获得培养上清,观察此上清保护 Vero E6 抵抗 10 \times TICD50VSV 病毒攻击的作用。图中的各种符号代表了 OD 值 \pm SD。结果表明,MS08 可以抑制在 CpG 2216 或 CpG C274 或 CpG 302 刺激下人外周血单个核细胞抗病毒物质的产生。

[0066] 本发明的详细说明

[0067] 除非特别强调,本发明中的术语具有可以被本发明所属领域内技术人员所理解的

通常意义。若出现含义上的冲突,应遵从本详细解释的解释、界定或说明。

[0068] “寡核苷酸”:寡核苷酸是多核苷酸,是由糖(如脱氧核糖),磷酸基团和碱基组成的分子,其中糖分子和碱基连接成核苷(nucleoside),核苷由磷酸基团连接形成核苷酸(nucleotide),形成核苷的碱基有嘧啶和嘌呤,嘧啶有胸腺嘧啶(thymine,缩写为T或t)和胞嘧啶(cytosine,缩写为C或c),嘌呤有腺嘌呤(adenine,缩写为A或a)和鸟嘌呤(guanine,缩写为G或g)。在本发明中,寡核苷酸指的是寡脱氧核苷酸。本发明提供的寡核苷酸也被称为 Toll 样受体调节性寡核苷酸。寡核苷酸可由人工合成,也可以从细胞、细菌和病毒中获得。本发明中的寡核苷酸是由自动核酸合成仪器合成,因此这些寡核苷酸是人工合成的寡核苷酸。这个发明提供的寡核苷酸是含 CT 重复序列 [(CT)_n] 或 CCT 重复序列 [(CCT)_n] 或 TC 重复序列 [(TC)_n], 或富含 CT 或 CCT 或 TC 的寡核苷酸寡,其中的 C 是胞嘧啶或其衍生物, T 是胸腺嘧啶或其衍生物, n 是 2-50 的整数,表示的是重复单位的个数,在 [(CT)_n] 寡核苷酸中 CT 是一个重复单元,在 [(CCT)_n] 寡核苷酸中 CCT 是一个重复单元,在 [(TC)_n] 寡核苷酸中 TC 是一个重复单元。本发明提供的寡核苷酸包括但不限于序列为 5' -ctctctctctctctctctct-3' 的寡核苷酸 (SEQ ID NO:1)、序列为 5' -cctctctctctctctctctctct-3' 的寡核苷酸 (SEQ ID NO:2) 和序列为 5' -TCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTC-3' 的寡核苷酸 (SEQ ID NO:16)。5' -ctctctctctctctctctct-3' 是含有 CT 重复序列 [(CT)_n] 的寡核苷酸,这里 CT 是一个重复单元, n = 10。5' -cctctctctctctctctctctct-3' 是含有 CCT 重复序列 [(CCT)_n] 的寡核苷酸,这里 CCT 是一个重复单元, n = 8。5' -TCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTC-3', 是含有 TC 重复序列 [(TC)_n] 的寡核苷酸,这里 TC 是一个重复单元, n = 12。

[0069] 本发明提供的寡核苷酸包含符合 $(X \cdot \text{sub} \cdot a \cdot \text{CT} \cdot Y \cdot \text{sub} \cdot b)_n$ 或 $(X_{\text{sub}} \cdot a \cdot \text{TC} \cdot Y \cdot \text{sub} \cdot b)_n$ 公式序列的寡核苷酸。公式中的 C 是胞嘧啶或其衍生物, T 是胸腺嘧啶或其衍生物, n 是 2-50 的整数, 表示的是重复单位的个数。X · sub. 或 Y · sub. 代表 A、T、C、G 4 种碱基之一, a 或 b 代表 X · sub 或 Y · sub 的数目,范围是从 0 到 1 的整数。例如本发明的寡核苷酸中,5' -ctctctctctctctctctct-3' (SEQ ID NO:1) 符合公式 $(X \cdot \text{sub} \cdot a \cdot \text{CT} \cdot Y \cdot \text{sub} \cdot b)_n$ 的条件是 :a = 0, b = 0, n = 10 ;5' -cctctctctctctctctctctct-3' (SEQ ID NO:2) 符合公式 $(X \cdot \text{sub} \cdot a \cdot \text{CT} \cdot Y \cdot \text{sub} \cdot b)_n$ 的条件是 a = 1, b = 0, X · sub 是 C, n = 8。5' -cttctctctctctctctctctct-3' (SEQ ID NO:11) 符合公式 $(X \cdot \text{sub} \cdot a \cdot \text{CT} \cdot Y \cdot \text{sub} \cdot b)_n$ 的条件是 a = 0, b = 1, Y · sub 是 T, n = 8。5' -TCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTC-3' (SEQ ID NO:16) 符合公式 $(X \cdot \text{sub} \cdot a \cdot \text{TC} \cdot Y \cdot \text{sub} \cdot b)_n$ 的条件是 a = 0, b = 0, n = 12。

[0070] 本发明提供的寡核苷酸可包括含有 3 个以上符合 $(X \cdot \text{sub} \cdot a \cdot \text{CT} \cdot Y \cdot \text{sub} \cdot b)$ 或 $(X_{\text{sub}} \cdot a \cdot \text{TC} \cdot Y_{\text{sub}} \cdot b)$ 公式的结构寡核苷酸,这种寡核苷酸被成为富含 CT 或 TC 的寡核苷酸,如 SEQ ID NO:1(5' -ctctctctctctctctctct-3') 包含有 10 个 CT;SEQ ID NO:2:(5' -cctctctctctctctctctctct-3') 包含有 8 个 CT;SEQ ID NO:3:(5' -ctctcttttagggtttagggctctct-3') 包含有 6 个 CT;SEQ ID NO:4:(5' -ttagggctctctctctctcttttaggg-3') 包含有 6 个 CT;SEQ ID NO:5:(5' -ctctcttttagggtttaggg-3') 包含有 5 个 CT;SEQ ID NO:6:(5' -ttagggtttagggtttagggctctct-3') 包含有 3 个 CT;SEQ ID NO:7:(5' -ctctctctctctct

ttaggtgtaggg-3') 包含有 6 个 CT ;SEQ ID NO :8 : (5' -ttagggtagggctctctctct-3') 包含有 6 个 CT ;SEQ ID NO :9 : (5' -ctctcttagggctctcttaggg-3') 包含有 6 个 CT ;SEQ ID NO :10 : (5' -ttagggctctcttagggctctct-3') 包含有 6 个 CT。“富含 CT 或 TC 的寡核苷酸”同时也是指“含有 (X · sub · a · CT · Y · sub · b) 或 (Xsub · a · TC · Ysub · b) 的寡核苷酸”。

[0071] “化学修饰”:与自然的 DNA 相比,本发明中的寡核苷酸可以有各种化学修饰,修饰的部位可发生在核苷之间的磷酸二酯键,核糖单位或 / 和有机碱基 (A、T、C、G)。在寡核苷酸的合成期间或合成后都可以进行修饰。在合成期间的化学修饰可以在寡核苷酸的内部或 5' 端进行修饰。合成后的寡核苷酸可以但不限于在活性基团 (如 5' 或 3' 端的磷酸或羟基) 进行化学修饰。专业人员可以知道这些化学修饰具体方式。本发明中的寡核苷酸可以有一个或多个化学修饰。和相同序列的自然形态的寡核苷酸相比,本发明中的寡核苷酸的化学修饰可以位于局部的磷酸二酯键或 / 和局部的核糖单位或 / 和局部的核苷碱基。本发明中的化学修饰包括寡核苷酸的骨架修饰。在这里,寡核苷酸的骨架修饰包括但不限于磷酸骨架修饰。磷酸骨架修饰可以是在核苷酸分子的一个稳定的磷酸骨架中,其中至少一个核苷酸间键合中的非桥性磷酸氧原子被硫原子取代。在本发明中的寡核苷酸中,核苷酸间键合中的非桥性磷酸氧原子可以部分或全部被硫原子取代。本发明中的寡核苷酸的骨架也可发生非离子 DNA 类似物,如烷基、芳香 - 碳磷酸盐化合物 (带电荷的碳磷酸盐化合物氧原子被烷基、芳香基取代) 修饰,再如磷酸二酯和烷基磷酸三酯中的氧原子部分被烷基化修饰。本发明的寡核苷酸可以是磷硫酰和磷酸二酯的嵌合体。在本发明的寡核苷酸中,化学修饰还包括碱基替代,如 C-5 丙炔嘧啶和 7-deaza-7 替代嘌呤。替代的嘌呤和嘧啶包括但不限于:腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶、其它的自然和非自然出现的碱基。在本发明的寡核苷酸中,化学修饰还包括碱基修饰。修饰的碱基在化学上不同于典型的自然中的碱基 (如 A、T、C、G。),但具有它们基本的化学结构。本发明中的寡核苷酸还可以用胞嘧啶衍生物或胸腺嘧啶核苷衍生物修饰。这里胞嘧啶衍生物是指胞嘧啶样核苷 (除外胞嘧啶)。胸腺嘧啶核苷衍生物是指胸腺嘧啶样核苷 (不包括胸腺嘧啶)。另外,本发明中的寡核苷酸的修饰可以是在寡核苷酸的两个或一个末端连接连接一个二元醇,如四乙二醇或六乙二醇。本发明中的寡核苷酸经化学修饰可以产生出相应寡核苷酸的功能性类似物。

[0072] “免疫介导的疾病”:免疫介导的疾病是由有害的免疫反应引起的疾病,包括自身免疫性疾病、移植排斥、超敏反应、微生物过强刺激宿主免疫系统引起的疾病和 TOLL 样受体激活相关性疾病。本发明中寡核苷酸可以用来预防和治疗免疫介导的疾病。

[0073] “免疫反应”:免疫应答和免疫反应有相似的意义。免疫反应是免疫细胞如 B 细胞、T 细胞、NK 细胞、树突细胞和巨噬细胞等对抗原或其它刺激作出的反应。免疫应答包括天然免疫应答和获得性 (特异性) 免疫应答。获得性免疫应答包括细胞免疫应答和体液免疫应答。

[0074] “预防或治疗免疫介导的疾病”:这里的预防是指防止个体上发生严重的免疫介导的疾病;这里的治疗是指对个体采取治疗性措施,用来减轻免疫介导的疾病的症状、停止免疫介导的疾病的进展或消除免疫介导的疾病的病理条件。

[0075] “个体”:个体是指应用本发明寡核苷酸的人类个体和非人类脊椎动物个体。非人类脊椎动物包括非人类灵长类动物,畜牧动物和宠物动物。本发明提供的寡核苷酸可在

应用于个体后预防或治疗免疫介导的疾病。

[0076] “自身免疫性疾病”：自身免疫性疾病是指由于自身免疫耐受被打破而引起的疾病。针对自身抗原的天然免疫应答和获得性免疫应答可以引起自身组织和细胞的破坏。自身免疫性疾病的特征决定于其所涉及的器官、细胞、组织和器官。自身免疫性疾病还指“胶原”、“胶原-血管”、“结缔组织”疾病。自身免疫性疾病的发明机理和超敏反应有关。本发明的寡核苷酸可以用来预防或治疗自身免疫性疾病。这些自身免疫性疾病包括但不限于系统性红斑狼疮、胰岛素依赖型糖尿病、炎症性关节炎、类风湿性关节炎、多发性硬化、自身免疫性肝炎、慢性进展型肝炎、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性血小板减少症、自身免疫性萎缩性胃炎、自身免疫性恶性贫血、自身免疫性脑脊髓炎、自身免疫性睾丸炎、获得性血友病、强直性脊柱炎、慢性炎症性脱髓鞘性多神经病、斑痕性类天疱疮、抗磷脂综合症、心脏病、冷凝集素病, 冷凝集素疾病、盘状狼疮、交感性眼炎、特发性混合型冷沉淀球蛋白血症、IgA 肾病、幼年型关节炎、全身性硬化症、结节多动脉炎、多软骨炎、皮炎、原发性无丙种球蛋白血症、原发性胆汁性肝硬变、高免疫球蛋白 E 症、进展性全身硬化症、牛皮癣、莱特尔综合征、结节病、僵人综合征、葡萄膜炎、血管炎、白癜风、桥本(氏)甲状腺炎、Goopasture 病、恶性贫血、艾迪生氏病、斯耶格伦(氏)综合征、重症肌无力、Grave 病、变应性脑脊髓炎、肾小球肾炎等(N Engl J Med, Vol. 345, No. 5, August 2, 2001, p340-350)。在包含有 DNA 或 RNA 的微生物释放出 DNA 或 RNA 的刺激下, 可以产生出特异性的针对包含有自身 DNA 或 RNA 复合物的自身抗体, 导致自身免疫性疾病如系统性红斑狼疮的发生。

[0077] “超敏反应”：超敏反应是指由于针对内外源性抗原的细胞免疫或体液免疫应答引起的疾病, 分为四个类型。I 型超敏反应(也称过敏反应型、特应性的 IgE 介导的超敏反应或变态反应)通常起因于 IgE 致敏的嗜碱粒细胞和肥大细胞接触特异性外源性抗原后释放药理活性物质, 如组胺、过敏反应的慢反应物质(SRS-A)和嗜酸粒细胞趋化因子等。I 型超敏反应包括但不限于外源性哮喘、季节性变应性鼻炎和全身过敏反应。II 型超敏反应(也称细胞毒型、细胞溶解型、补体依赖型或细胞刺激性超敏反应)发生的条件是抗体识别了自身的细胞或组织的抗原, 或识别了和与细胞或组织偶联的抗原或半抗原。II 型超敏反应包括但不限于自身免疫性溶血性贫血、粒细胞减少症、胎儿成红细胞增多症、肾小球性肾炎咯血综合征。III 型超敏反应(也称毒性复合物、可溶性复合物、或免疫复合物型超敏反应)起因于循环中的可溶性抗原抗体复合物沉淀在血管或组织中而激发的炎症反应。III 型超敏反应包括但不限于 Arthurs 反应、血清病、系统性红斑狼疮和肾小球肾炎。IV 超敏反应(又称为细胞的、细胞介导的、迟发的、或结核菌素型超敏反应)是由致敏的 T 细胞接触了特异性抗原而引起的。IV 超敏反应包括但不限于接触性皮炎和同种异体移植排斥等(Richard A. Goldsby, Thomas J. Kindt, Barbara A. Osborne. Janis Kuby. Immunology, Fifth Edition, 2003, W. H. FREEMAN AND COMPANY)。

[0078] “微生物过强刺激宿主免疫系统引起的疾病”：微生物入侵如果非常严重, 有时可以在一个个体引起全身性炎症反应, 导致微生物过强刺激宿主免疫系统引起的疾病。如感染流感病毒 A(H5N1) 或 SARS 病毒的个体的血液中可出现高水平的下列物质: TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-12、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 化学因子干扰素诱导蛋白 10、单核细胞趋化蛋白 1、IL-8、IL-1- β 。这种由于微生物感染而引起的血液中细胞因子水平显著升高, 被称为细胞因子血症或细胞因子风暴。研究表明, 感染禽流感病毒或 SARS 病毒的病人, 除了

需要抗病毒的药物外,还需要抑制免疫反应的药物。微生物过强刺激宿主免疫系统引起的疾病可表现为脓毒症综合征 (sepsis)、急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 和多器官衰竭 (The Writing Committee of the World Health Organization (WHO) Consultation on Human Influenza A/H5. Avian Influenza A (H5N1) Infection in Humans. N Engl J Med 2005; 353:1374-85)。本发明中的寡核苷酸就可以用来预防和治疗微生物过强刺激宿主免疫系统引起的疾病。引起这类疾病的微生物包括病毒、细菌、寄生虫和真菌和海绵状脑病致病原。引起微生物过强刺激宿主免疫系统引起的疾病的病毒包括:SARS 病毒、流感病毒、禽流感病毒、HTV-1、脊髓灰质炎病毒、甲型肝炎病毒、肠道病毒、人柯萨奇病毒、鼻病毒属、埃可病毒、马脑炎病毒、风疹病毒、登革热病毒、脑炎病毒、黄热病病毒、冠状病毒、疱疹性口炎病毒、狂犬病病毒、埃博拉病毒、副流感病毒、腮腺炎病毒、麻疹病毒、呼吸道合胞病毒、汉坦病毒、bunga 病毒、静脉病毒、Nairo 病毒、出血热病毒、呼肠病毒、orbiviurses、轮状病毒、乙肝病毒、细小病毒组、乳头瘤病毒、多瘤病毒、腺病毒、I 型单纯疱疹病毒、II 型单纯疱疹病毒、水痘-带状疱疹病毒、巨细胞病毒、疱疹病毒、类天花病毒、痘苗病毒、痘病毒、非洲猪霍乱病毒、海绵状脑病致病原、丁型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、口蹄疫病毒。引起微生物过强刺激宿主免疫系统引起的疾病的细菌包括:幽门螺旋杆菌、Borelia burgdorferi、嗜肺性军团菌、分枝杆菌、金黄色葡萄球菌、淋病双球菌、脑膜炎双球菌、单核细胞增多性李司忒(氏)菌、A 组链球菌属、B 组链球菌属、链球菌属、粪链球菌、牛链球菌、链球菌属(厌氧的链球菌)、肺炎链球菌、致病性 Carnpylobacter 链球菌、肠道球菌、流感(嗜血)杆菌、antracis 杆菌、白喉棒状杆菌、棒状杆菌属、猪红斑丹毒丝菌、产气荚膜芽孢梭菌、破伤风杆菌、肠道细菌(属)aerogeytes、肺炎杆菌、Pasturella multocida、类杆菌属、具核梭杆菌、念珠状链杆菌、密螺旋体属、细弱密螺旋体、细螺旋体和放线菌属。引起微生物过强刺激宿主免疫系统引起的疾病的真菌包括但不限于:隐球菌属新型细球菌、荚膜组织胞浆菌、粗球孢子菌、皮炎芽生菌、沙眼衣原体、白色念珠菌。引起微生物过强刺激宿主免疫系统引起的疾病的真菌包括但不限于恶性疟原虫、鼠弓形体。

[0079] “移植排斥”:由于组织或器官移植引起的免疫介导的疾病。移植是移植物从供体向受体的转移。从供体向受体转移的移植物是活的细胞、组织或器官。自体移植是将自身的组织从一个部位转移到另一个部位。同系基因型移植是在同卵双生的孪生子间进行的移植。同种移植是在同一物种中具有遗传学上区别的不同个体间进行的移植。异种移植是在不同物种的个体间进行移植。当一个个体作为受体接受了同种移植或异种移植后,机体可以对供者的组织细胞产生免疫应答。在这种情况下,需要抑制免疫应答来避免移植物排斥 (Richard A. Goldsby, Thomas J. Kindt, Barbara A. Osborne, Janis Kubly. Immunology, Fifth Edition, 2003, W. H. FREEMAN AND COMPANY)。本发明中的寡核苷酸可以用来预防移植物排斥。移植物可以是:心脏、肾脏、肝脏、骨髓、皮肤、角膜、肺、胰腺、小肠、肢体、肌肉、神经、十二指肠和胰岛细胞等。

[0080] TOLL 样受体激活相关性疾病:TOLL 样受体激活相关性疾病是指和 TOLL 样受体 (TLR) 家族成员的激活相关的免疫介导的疾病。这些疾病包括但不限于:与 LPS 激活 TLR4 相关的脓毒症,与 TLR2,3,4,9 激活相关的扩张型心肌病,与 TLR2,3,4,9 激活相关的糖尿病、与 TLR3 激活相关的实验性自身免疫性脑脊髓炎,与 TLR9 激活相关的系统性红斑狼疮,与 TLR4 激活相关的动脉粥样硬化,与 LPS 激活 TLR4 相关的哮喘,与 TLR4 激活相

关的慢性阻塞性肺疾患,与 TLR4 激活相关的实验性变应性脑炎,与 TLR4 激活相关的器官衰竭等 (Foo Y et al. Negative regulation of toll like receptor mediated immune responses. Nature Review Immunology, Vol 5, 2005, 446-458). CpG-containing DNA (a TLR9 agonist)。已经证实,在系统性红斑狼疮患者的血清中存在来源于含核酸感染因子的含 CpG 的 DNA 物质,这些物质可引起以 IFN- α 分泌为主的免疫应答,促进系统性红斑狼疮的进展。本发明中提供的寡核苷酸可以用来预防或 / 和治疗 TOLL 样受体激活相关性疾病。

[0081] “药物学上可接受的载体”:药物学上可接受的载体是指一种或多种固体或液体的填充剂、稀释剂或包封物质,此载体适合将本发明中的寡核苷酸应用于个体。该载体可以是有机的、无机的、天然的或合成的。该载体包括各种溶液、稀释剂、溶剂、分散剂、脂质体、乳剂、糖衣、抗菌剂、抗真菌剂、等渗的和延缓吸收的试剂、和其他的适合本发明中的寡核苷酸应用的载体。药物学上可接受的载体的选择决定于本发明中寡核苷酸应用方式。可注射用的载体包括水、生理盐水、平衡盐溶液、葡萄糖溶液、甘油等。对于固体混合物(如粉末、丸、片剂、胶囊形式)而言,常用的非毒性固体载体包括:具有药理学纯度的甘露醇、乳糖、淀粉和硬脂酸镁等。另外,作为生物学上中性的载体,应用的药理学组分中可以含有非毒性的辅助物质,包括湿化或乳化剂、防腐剂、PH 缓冲试剂,醋酸钠和单月桂酸酯等。

[0082] “治疗有效剂量”:为了预防或治疗免疫介导的疾病,给个体应用本发明中的寡核苷酸的剂量是治疗有效剂量。该治疗有效剂量是指在预防或治疗免疫介导的疾病中,给予个体后可产生理想的预防或治疗效果的寡核苷酸的剂量。本发明中的寡核苷酸可以直接或放到药物学上可接受的载体中应用。这个“剂量”的多少决定于本领域技术熟练人员应知的标准技术,还要参考其他因素,包括并不限于个体的大小和健康情况和疾病的严重程度。本发明中的寡核苷酸可以用作单次治疗或多次治疗。本发明中的寡核苷酸每次应用到个体的剂量范围从 1 μ g 到 100mg。为了达到理想的治疗效果,本领域技术熟练人员可以对应用的剂量作调整,如主治医师在可靠的医疗判断的基础上,做出的剂量调整,其剂量范围可以是前述范围的 10 倍到 1000 倍。

[0083] “给药途径”:在应用时,本发明中的寡核苷酸可以单独应用或按配方制作成药物组合物应用,经由各种合适的途径来达到理想的治疗效果。本发明中的寡核苷酸的治疗途径可以是肠内、肠外、外用或吸入途径。本发明中的寡核苷酸的肠内治疗途径包括经口、胃、结肠或直肠给药。本发明中的寡核苷酸的肠外用途径包括经静脉、腹膜、鞘内、肌肉、皮下、局部注射,经阴道、外用、鼻粘膜和肺吸入等。本发明中的寡核苷酸的外用治疗途径包括经皮肤、口腔、眼睛、耳和鼻子。

[0084] “药物组合物”:药物组合物指的是本发明中治疗有效剂量的寡核苷酸或其与药物学上可接受的载体组成的混合物。药物组合物分可以包含一个或多个本发明中的寡核苷酸。药物组合物可以但不限于是水溶液、盐溶液、颗粒、气溶胶、片剂、粉剂、糖衣片剂、胶囊剂、栓剂、糖浆剂、乳剂、悬液、乳膏、滴剂和其它合适的物质。药物组合物的应用方式可以是:经肠外、经口、经直肠、经阴道、经腹膜内、经局部(粉剂、软膏剂、凝胶剂、滴剂、透皮贴剂)、含服或口腔和鼻腔喷雾等。在各种情况下,药物组合物必须是无菌和稳定的。本发明的注射剂药物组合物包括药理学上可接受的水溶液、非水溶液、分散剂、悬液、乳剂或粉剂,注射前用无菌的注射用水或分散剂溶解。本发明中的寡核苷酸可以用水相载体溶解,比如用 pH 3.0 到 pH8.0 的等渗的缓冲液, pH 值范围也可为 pH3.5-pH 7.4, pH 3.5-pH 6.0, pH

3.5-pH 5.0。缓冲液包括：柠檬酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、醋酸盐缓冲液。口服的药物组合可以可食用的载体按配方制成粉剂、片剂、丸剂、糖锭剂、胶囊、液体、凝胶、糖浆、膏剂或悬浊剂等。常规的非毒性固体载体作为固体组分可以是药理学级别的甘露醇、乳糖、淀粉和硬脂酸镁等。口腔含化给药法的药学药物组合可以是传统方式的片剂和锭剂。作为吸入法的药学药物组合是喷雾剂，相关领域技术熟练人员可以选择使用压力囊、喷雾器或干粉。在一些情况下，为了延长本发明中寡核苷酸的作用效果，药物组合可被处理于合适的持续释放系统后应用。发明中的寡核苷酸或药物组合可以被处理成带有结晶的悬胶液或水分较少的非结晶物质，来稳定地延缓释放。注射用的本发明中寡核苷酸的延缓释放可以通过用疏水物质（如，可接受的油性载体）来溶解寡核苷酸来实现。用于注射形式的药物组合，可以是脂质体包裹的寡核苷酸或乳粒，或可生物降解的半透性聚合物，如多乳酸化合物、多正酯类或聚酐。

[0085] “活性物质”：本发明中的寡核苷酸可以单独应用，或几种寡核苷酸联合应用，或应用药物可接受的载体，或和一种或几种其他的活性物质联合应用。本发明中的寡核苷酸和其它的活性物质联合应用，在时间上可以是同时的也可以是相继的。活性物质包括非类固醇类的抗炎试剂、类固醇、非特异性免疫抑制剂、生物反应调节剂、化合物、小分子、核酸分子、TLR 拮抗剂等。活性物质还指通过如下方式抑制免疫活性的试剂：拮抗趋化因子，诱导产生调节 T 细胞（CD4+CD25+T 细胞），抑制补体系统，抑制基质金属蛋白酶，抑制 NO 合成酶，阻断协同刺激分子，抑制免疫细胞的信号转导。非类固醇类的抗炎试剂的包括但不限于：双氯芬酸、双氟尼酸、乙哌乙酸、氟吡洛芬、布洛芬、吲哚美辛、酮基布洛芬、痛力克、萘普酮、甲氧萘丙酸、吡罗昔康、舒林酸、tohnetin、塞来考昔、罗非考昔。类固醇包括但不限于肾上腺皮质激素、地塞米松、氢化可的松、甲基氢化泼尼松、去氢氢化可的松、泼尼松和氢羟强的松龙。非特异性免疫抑制剂是指用来抑制免疫介导的疾病的试剂，包括但不限于：环磷酰胺、环孢霉素 A、氨甲喋呤、类固醇、FK506、他克莫司、霉酚酸和西罗莫司。生物反应调节剂包括：重组 IL-1 受体拮抗剂（Kineret or anakima）、可溶性 p75、TNF- α 受体 gG1 融合蛋白（etanercept or Enbrel）、抗 TNF- α 单克隆抗体（infliximab or RemicadeX），还包括干扰素 β -1a、白细胞介素 -10 和 TGF β 。

[0086] “递送载体”：本发明中的寡核苷酸可以用递送载体递送应用。递送载体包括但不限于：类固醇（如胆固醇）、络合物、乳化物、免疫刺激复合物（ISCOMs）、脂质（如阳离子脂质和阴离子脂质）、脂质体、活的细菌载体（如沙门氏菌、大肠杆菌、分枝杆菌志贺（氏）杆菌、乳酸杆菌）和活的病毒载体（如牛痘苗、腺病毒、单纯疱疹病毒）、病毒小体、病毒样颗粒、微球、核酸疫苗、高分子材料（如羧甲基纤维素、脱乙酰壳多糖）、环状多聚物。递送载体也可以通过特异性受体识别靶细胞的靶向性配体分子。

[0087] “体外处理免疫细胞”：可以应用本发明中的寡核苷酸在体外处理该个体的免疫细胞，然后将处理过的细胞输回该个体，达到预防或治疗免疫介导的疾病的目的是。被处理的细胞可以是树突细胞、巨噬细胞、T 细胞、B 细胞和天然杀伤细胞等免疫细胞由一种或数种免疫细胞所组成的细胞群。经处理的免疫细胞可以单独回输、和本发明中的寡核苷酸一起回输、和 / 或其他活性物质一起回输。免疫细胞的回输途径可以是全身性的也可以是局部性的。

具体实施方式

[0088] 技术熟练人员可以了解到本发明提供的寡核苷酸可以用于预防和治疗免疫介导的疾病。下面的非限定性的实施例将对本发明作出例证说明。

[0089] 在这些实施例中,4个寡核苷酸(CpG2216、CpG2006、CpG C274、CpG302)被用作刺激剂。CpG2216是典型的A型CpGODN,可以激活人浆细胞样树突状细胞,产生大量的I型干扰素(IFN- α/β),强烈地激活NK细胞。激活的浆细胞样树突状细胞可分泌IFN α ,后者可使浆细胞样树突状细胞迁移聚集到淋巴结和其他周围淋巴组织,在那里此浆细胞样树突状细胞可以激活未致敏的T细胞和记忆T细胞,帮助可溶性抗原交叉递呈给CD8⁺细胞毒性T细胞,促进TH1型的CD4和CD8T细胞反应。拮抗CpG2216活性的试剂可以抑制以分泌IFN和激活NK细胞为特征的自然免疫应答而间接地抑制获得性免疫应答,因此可以用来预防和治疗与天然免疫和获得性免疫相关的免疫介导的疾病。B型含CpG寡核苷酸主要激活B细胞,刺激B细胞增值和抗体分泌。CpG2006是典型的B型CpG ODN,能够激活B细胞,引起B细胞增殖和抗体分泌。对CpG2006有抑制作用的试剂可以抑制获得性免疫应答特别是体液免疫应答,因此可以用来预防和治疗和体液免疫应答相关的免疫介导的疾病。C型含CpG的寡核苷酸同时具有A型和B型含CpG寡核苷酸的功能。CpG C274和CpG 302是C型ODN,具有A型和B型的性质。抑制CpG274活性的试剂可以用来预防和治疗与天然免疫和获得性免疫相关的免疫介导的疾病。此外,作为TLR激动剂,CpG2006、CpG274、CpG2216、CpG302可以引发天然免疫应答,所以,拮抗CpG2006、CpG274、CpG2216、CpG 302活性的试剂能够用来治疗与TLR激活相关的免疫介导的疾病。

[0090] 在实施例中,以人外周血分离人外周血单个核细胞作为免疫细胞的来源,其中的免疫细胞有T细胞,B细胞,天然杀伤细胞,树突状细胞,粒细胞和单核细胞等。

[0091] 实施例中的寡核苷酸是由上海生工生物技术有限公司合成。实施例中所用的寡核苷酸都经无热源处理。寡核苷酸中的内毒素应用鲎变形细胞溶解法检测(Associates of Cape Cod, Inc)。以下显示的是在实施例中应用的寡核苷酸的序列和名称:

[0092] CpG2216(5'-gggggacgatcgtcggggg-3')

[0093] CpG2006(5'-tcgtcgttttgcgttttgcgtt-3')

[0094] CpG C274(5'-tcgtcgaacgttcgagatgat 3')

[0095] CpG 302(5'-tcg tcg ggt gcg acg tcg cag ggg gg-3')

[0096] A151(5'-ttagggttagggttagggttagg-3')(Hidekazu Shirota, et al. Suppressive Oligodeoxynucleotides Protect Mice from Lethal Endotoxic Shock. The Journal of Immunology, 2005, 174 :4579-4583)

[0097] SAT05(5'-ctctctctctctctctctct-3'), SEQ ID NO :1

[0098] SAT05f(5'-cctctctctctctctctctct-3'), SEQ ID NO :2

[0099] CT 151h(5'-ctctctttagggttagggctctct-3'), SEQ ID NO :3

[0100] CT151g(5'-ttagggctctctctctcttttaggg-3'), SEQ ID NO :4

[0101] CT151f(5'-ctctttagggttagggttagg-3'), SEQ ID NO :5

[0102] CT151e(5'-ttagggttagggttagggctctct-3'), SEQ ID NO :6

[0103] CT151d(5'-ctctctctctcttttagggttagg-3'), SEQ ID NO :7

[0104] CT151c(5'-ttagggttagggtctctctctct-3'), SEQ ID NO :8

- [0105] CT151b(5' -ctctcttttagggctctcttttaggg-3'), SEQ ID NO :9
- [0106] CT151a(5' -ttagggctctcttttagggctctct-3'), SEQ ID NO :10
- [0107] 1612A4(5' -gtttagagattaggca-3'), Control CpG(对照寡核苷酸)
- [0108] SAT05e(5' -cttctctctctctctctctctct-3'), SEQ ID NO :11
- [0109] SAT05d(5' -ctctctctctctctctctctct-3'), SEQ ID NO :12
- [0110] SAT05c(5' -ctctctctctctctctctct-3'), SEQ ID NO :13
- [0111] SAT05b(5' -ctctctctctct-3'), SEQ ID NO :14
- [0112] SAT05a(5' -ctctct-3'), SEQ ID NO :15
- [0113] MS08(5' -TCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTC-3'), SEQ ID NO :16
- [0114] MS19(5' -AAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAG-3'), Control CpG(对照寡核苷酸)
- [0115] 实施例 1、SAT05 对 CpG ODN 诱导人外周血单个核细胞 (PBMCs) 增殖的影响
- [0116] 用 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法从人外周血分离人外周血单个核细胞 (Ficoll 试剂购自 Pharmacia 公司, 血液样品由吉林省血液中心提供)。用台酚兰染色法确定人外周血单个核细胞的成活率为 95% -99%。用 [³H] 胸腺嘧啶掺入法检测人外周血单个核细胞的增殖情况。简略地说, 人外周血单个核细胞以 5×10^5 /孔的密度接种到 U 型底 96 孔板, 在存在 SAT05 或 A151 或对照寡核苷酸 (ODN) 的情况下, 与 CpG 2006(1 μ g/ml) 或 CpG C274(1 μ g/ml) 共孵育 48 小时, 之后加入 [³H] 胸腺嘧啶 (New England Nuclear, Boston, MA) 培养 16 小时。在玻璃纤维滤器上收获细胞, 用闪烁计数器检测结果。用平均 cpm \pm SD 表示细胞增殖情况。每个样品设 3 复孔。
- [0117] 如图 1 的结果所示, 由 CT 重复序列 [(CT)_n] 构成的 SAT05 可以抑制由 CpG 2006 或 CpGC274 刺激下的人外周血单个核细胞增殖。这个抑制效果明显强于 A151 诱导的抑制效果。对照的寡核苷酸未显现抑制作用。
- [0118] 实施例 2SAT05f 对 CpG ODN 诱导人外周血单个核细胞 (PBMCs) 增殖的影响
- [0119] 用 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法从人外周血分离人外周血单个核细胞 (Ficoll 试剂购自 Pharmacia 公司, 血液样品由吉林省血液中心提供)。用台酚兰染色法确定人外周血单个核细胞的成活率为 95% -99%。用 [³H] 胸腺嘧啶掺入法检测人外周血单个核细胞的增殖情况。简略地说, 人外周血单个核细胞以 5×10^5 /孔的密度接种到 U 型底 96 孔板, 在存在 SAT05f 或 A151 或对照寡核苷酸 (ODN) 的情况下, 与 CpG2006(1 μ g/ml) 或 CpG274(1 μ g/ml) 共孵育 48 小时, 之后加入 [³H] 胸腺嘧啶 (New England Nuclear, Boston, MA) 培养 16 小时。在玻璃纤维滤器上收获细胞, 用闪烁计数器检测结果。用平均 cpm \pm SD 表示细胞增殖情况。每个样品设 3 复孔。
- [0120] 如图 2 的结果所示, 由 CCT 重复序列 [(CCT)_n] 构成的 SAT05f 可以抑制由 CpG 2006 或 CpG C274 刺激下的人外周血单个核细胞增殖。这个抑制效果明显高于 A151 诱导的抑制效果。对照的寡核苷酸没有抑制作用。
- [0121] 实施例 3SAT05 对 CpG ODN 刺激下人外周血单个核细胞产生抗病毒活性的影响
- [0122] 用 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法从人外周血分离人外周血单个核细胞 (Ficoll 试剂购自 Pharmacia 公司, 血液样品由吉林省血液中心提供)。由台酚兰染色法确定人外周血单个核细胞的成活率为 95% -99%。
- [0123] Vero E6 细胞 (非洲绿猴肾细胞系, 源自 Type Culture Collection, 美国) 用

含 10% (v/v) 热灭活的胎牛血清和抗生素 (100 IU of penicillin/ml and 100 IU of streptomycin/ml) 的 IMDM 培养液在 37°C、5% CO₂ 的细胞孵箱内培养。采用 Vero E6 细胞病变法检测经 CpG ODN 处理人外周血单个核细胞培养上清的抗病毒活性。简略介绍如下：在存在 SAT05 或 A 151 或对照寡核苷酸 (ODN) 的情况下，将人外周血单个核细胞与 CpG2216 共同培养 48 小时，收集上清。将 Vero E6 细胞 (3×10⁴/孔) 接种到平底 96 孔板，培养 24 小时。之后，和 100 μl 上述收集的上清培养 18 小时，再加入 10×TCID₅₀ (TCID₅₀, 半数组织感染剂量) 的 VSV 病毒 (水泡性口炎病毒) 继续培养 48 小时。培养结束后，用 0.5% 的结晶紫染色。用多孔微量滴定板检测仪测定 OD 值 (A578nm)，以 OD 值来表示病毒的细胞病变效应。

[0124] 如图 3 所示，由 CT 重复序列 [(CT)_n] 构成的 SAT05 可以抑制由 CpG 2216 刺激下的人外周血单个核细胞抗病毒物质的产生。另一个实验证明，抑制抗病毒活性和 I 型干扰素产生的减少有关。

[0125] 实施例 4SAT05f 对 CpG ODN 刺激下人外周血单个核细胞抗病毒活性的影响

[0126] 用 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法从人外周血分离单个核细胞 (Ficoll 试剂购自 Pharmacia 公司，血液样品由吉林省血液中心提供)。由台酚兰染色法确定人外周血单个核细胞的成活率为 95% -99%。

[0127] Vero E6 细胞 (非洲绿猴肾细胞系, Type Culture Collection, 美国) 用含 10% (v/v) 热灭活的胎牛血清和抗生素 (100 IU of penicillin/ml and 100 IU of streptomycin/ml) 的 IMDM 培养液在 37°C、5% CO₂ 的细胞孵箱内培养。采用 Vero E6 细胞病变法检测经 CpG ODN 处理人外周血单个核细胞培养上清的抗病毒活性。简略介绍如下：在存在 SAT05f 或 A151 或对照寡核苷酸 (ODN) 的情况下，将人外周血单个核细胞与 CpG274 共同培养 48 小时，收集上清。将 Vero E6 cells (3×10⁴/孔) 接种到平底型 96 孔板，培养 24 小时。之后，用 100 μl 上述收集的上清培养 18 小时，再加入 10×TCID₅₀ (TCID₅₀, 半数组织感染剂量) 的 VSV 病毒 (水泡性口炎病毒) 继续培养 48 小时。培养结束后，用 0.5% 的结晶紫染色。用多孔微量滴定板检测仪测定 OD 值 (A578nm)，以 OD 值来表示病毒的细胞病变效应。

[0128] 如图 4 所示，由 CT 重复序列 [(CCT)_n] 构成的 SAT05f 可以抑制由 CpG 274 刺激下的人外周血单个核细胞抗病毒物质的产生。另一个实验证明，抑制抗病毒活性和 I 型干扰素产生的减少有关。

[0129] 实施例 5 含有 CT 重复序列、CCT 重复序列、富含 CT 序列的寡核苷酸对人外周血单个核细胞增殖的影响

[0130] 用 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法从人外周血分离单个核细胞 (Ficoll 试剂购自 Pharmacia 公司，血液样品由吉林省血液中心提供)。由台酚兰染色法确定人外周血单个核细胞的成活率为 95% -99%。人外周血单个核细胞以 5×10⁵/孔的密度接种到 U 型底 96 孔板，在存在如图 5 标明的各种浓度的寡核苷酸 (ODN) 的条件下，与 CpG274 (5 μg/ml) 共同培养 48 小时。之后加入 [³H] 胸腺嘧啶 (New England Nuclear, Boston, MA) 培养 16 小时。实验设 4 个对照组：“PBS”组是指人外周血单个核细胞只与 CpG274 (5 μg/ml) 共培养；“细胞”组是指培养的人外周血单个核细胞未与 CpG274 共培养；“A 151”组是指人外周血单个核细胞 CpG274 (5 μg/ml) 共培养，并加入 A151；“1612A4”组是指人外周血单个核细胞

CpG274 (5 μ g/ml) 共培养, 并加入 1612A4 (Control ODN)。在玻璃纤维滤器上收获细胞, 用闪烁计数器检测结果。用平均 cpm \pm SD 表示细胞增殖情况。每个样品设 3 个复孔。

[0131] 如图 5 所示, 含有 CT 重复序列、CCT 重复序列、富含 CT 序列的寡核苷酸可以抑制由 CpG274 刺激的人外周血单个核细胞增殖。

[0132] 实施例 6、MS08 对 CpG ODN 诱导人外周血单个核细胞 (PBMCs) 增殖的影响

[0133] 用 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法从人外周血分离人外周血单个核细胞 (Ficoll 试剂购自 Pharmacia 公司, 血液样品由吉林省血液中心提供)。用台酚兰染色法确定人外周血单个核细胞的成活率为 95% -99%。用 [³H] 胸腺嘧啶掺入法检测人外周血单个核细胞的增殖情况。简略地说, 人外周血单个核细胞以 5×10^5 /孔的密度接种到 U 型底 96 孔板, 在存在 MS08 (见 SQE ID NO:16) 或对照寡核苷酸 MS19 (5'-AAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAG-3') 的情况下, 与 CpG 2006 (1 μ g/ml) 或 CpG C274 (1 μ g/ml) 或 CpG684 (1 μ g/ml) 共孵育 48 小时, 之后加入 [³H] 胸腺嘧啶 (New England Nuclear, Boston, MA) 培养 16 小时。在玻璃纤维滤器上收获细胞, 用闪烁计数器检测结果。用平均 cpm \pm SD 表示细胞增殖情况。每个样品设 3 复孔。

[0134] 如图 6 的结果所示, 由 TC 重复序列 [(TC)_n] 构成的 MS08 可以抑制由 CpG 2006 或 CpG C274 或 CpG 684 刺激下的人外周血单个核细胞增殖。对照的寡核苷酸未显现抑制作用。

[0135] 实施例 7MS08 对 CpG ODN 刺激下人外周血单个核细胞产生抗病毒活性的影响

[0136] 用 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法从人外周血分离人外周血单个核细胞 (Ficoll 试剂购自 Pharmacia 公司, 血液样品由吉林省血液中心提供)。由台酚兰染色法确定人外周血单个核细胞的成活率为 95% -99%。

[0137] Vero E6 细胞 (非洲绿猴肾细胞系, 源自 Type Culture Collection, 美国) 用含 10% (v/v) 热灭活的胎牛血清和抗生素 (100IU of penicillin/ml and 100 IU of streptomycin/ml) 的 IMDM 培养液在 37°C、5% CO₂ 的细胞孵箱内培养。采用 Vero E6 细胞病变法检测经 CpG ODN 处理人外周血单个核细胞培养上清的抗病毒活性。简略介绍如下: 在存在 MS08 或对照寡核苷酸 MS19 (5'-AAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAG-3') 情况下, 将人外周血单个核细胞与 CpG2216 或 CpG C274 或 CpG 302 (5'-tcg tcg ggt gcg acg tcg cag ggg gg-3') 共同培养 48 小时, 收集上清。将 Vero E6 细胞 (3×10^4 /孔) 接种到平底 96 孔板, 培养 24 小时。之后, 和 100 μ l 上述收集的上清培养 18 小时, 再加入 $10 \times$ TCID₅₀ (TCID₅₀, 半数组织感染剂量) 的 VSV 病毒 (水泡性口炎病毒) 继续培养 48 小时。培养结束后, 用 0.5% 的结晶紫染色。用多孔微量滴定板检测仪测定 OD 值 (A578nm), 以 OD 值来表示病毒的细胞病变效应。

[0138] 如图 7 所示, 由 TC 重复序列 [(TC)_n] 构成的 MS08 可以抑制由 CpG 2216 或 CpG C274 或 CpG 302 刺激下的人外周血单个核细胞抗病毒物质的产生。另一个实验证明, 抑制抗病毒活性和 I 型干扰素产生的减少有关。

[0139] 序列表

[0140] <110> 长春华普生物技术有限公司

[0141] <120> To11 样受体调节性寡核苷酸及其用于治疗免疫介导疾病的用途

[0142] <160> 16

[0143]	<210>1	
[0144]	<211>20	
[0145]	<212>DNA	
[0146]	<213> 人工合成的	
[0147]	<400>1	
[0148]	ctctctctctct ctctctctctct	20
[0149]	<210>2	
[0150]	<211>24	
[0151]	<212>DNA	
[0152]	<213> 人工合成的	
[0153]	<400>2	
[0154]	cctcctcctc ctctcctctcc tect	24
[0155]	<210>3	
[0156]	<211>24	
[0157]	<212>DNA	
[0158]	<213> 人工合成的	
[0159]	<400>3	
[0160]	ctctctttag ggtagggct ctct	24
[0161]	<210>4	
[0162]	<211>24	
[0163]	<212>DNA	
[0164]	<213> 人工合成的	
[0165]	<400>4	
[0166]	ttagggctct ctctctcttt aggg	24
[0167]	<210>5	
[0168]	<211>24	
[0169]	<212>DNA	
[0170]	<213> 人工合成的	
[0171]	<400>5	
[0172]	ctctctttag ggtagggtt aggg	24
[0173]	<210>6	
[0174]	<211>24	
[0175]	<212>DNA	
[0176]	<213> 人工合成的	
[0177]	<400>6	
[0178]	ttagggtag ggtagggct ctct	24
[0179]	<210>7	
[0180]	<211>24	
[0181]	<212>DNA	

[0182]	<213> 人工合成的	
[0183]	<400>7	
[0184]	ctctctctct ctttagggtt aggg	24
[0185]	<210>8	
[0186]	<211>24	
[0187]	<212>DNA	
[0188]	<213> 人工合成的	
[0189]	<400>8	
[0190]	ttagggtag ggctctctct ctct	24
[0191]	<210>9	
[0192]	<211>24	
[0193]	<212>DNA	
[0194]	<213> 人工合成的	
[0195]	<400>9	
[0196]	ctctcttag ggctctcttt aggg	24
[0197]	<210>10	
[0198]	<211>24	
[0199]	<212>DNA	
[0200]	<213> 人工合成的	
[0201]	<400>10	
[0202]	ttagggctct ctttagggct ctct	24
[0203]	<210>11	
[0204]	<211>24	
[0205]	<212>DNA	
[0206]	<213> 人工合成的	
[0207]	<400>11	
[0208]	cttctcttc ttctctctct tctt	24
[0209]	<210>12	
[0210]	<211>24	
[0211]	<212>DNA	
[0212]	<213> 人工合成的	
[0213]	<400>12	
[0214]	ctctctctct ctctctctct ctct	24
[0215]	<210>13	
[0216]	<211>18	
[0217]	<212>DNA	
[0218]	<213> 人工合成的	
[0219]	<400>13	
[0220]	ctctctctct ctctctct	18

[0221]	<210>14	
[0222]	<211>12	
[0223]	<212>DNA	
[0224]	<213> 人工合成的	
[0225]	<400>14	
[0226]	ctctctctct ct	12
[0227]	<210>15	
[0228]	<211>6	
[0229]	<212>DNA	
[0230]	<213> 人工合成的	
[0231]	<400>15	
[0232]	ctctct	6
[0233]	<210>16	
[0234]	<211>24	
[0235]	<212>DNA	
[0236]	<213> 人工合成的	
[0237]	<400>16	
[0238]	tctctctctc tctctctctc tctc	24 。

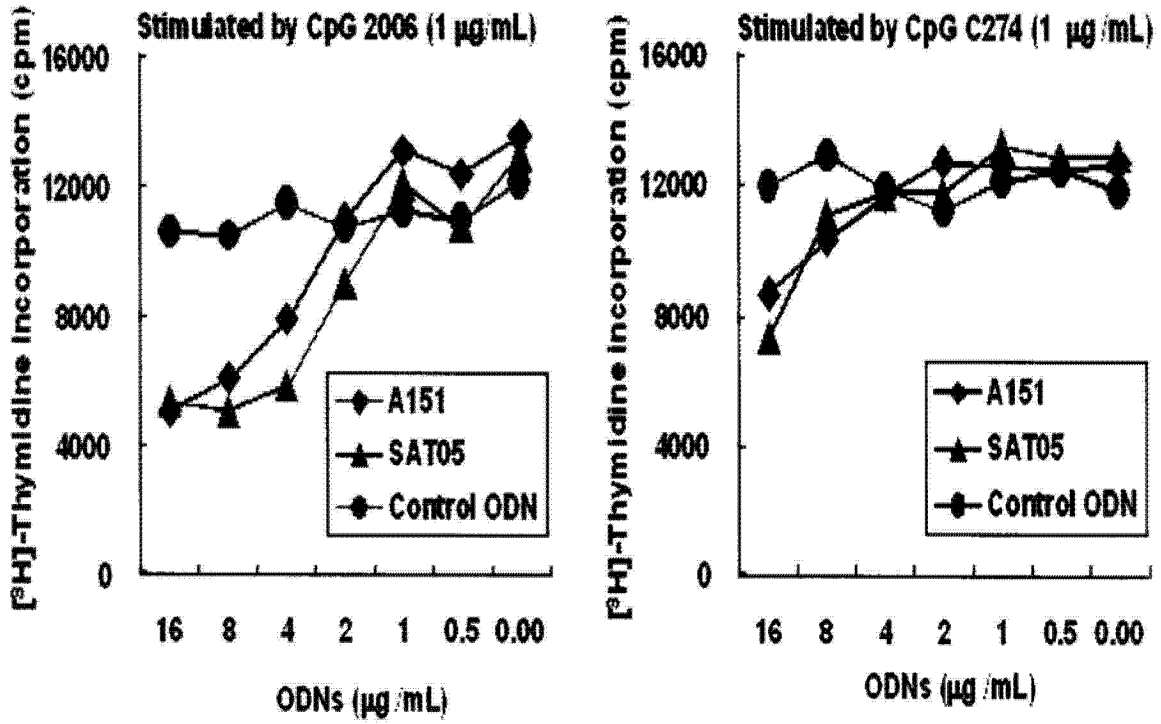


图 1

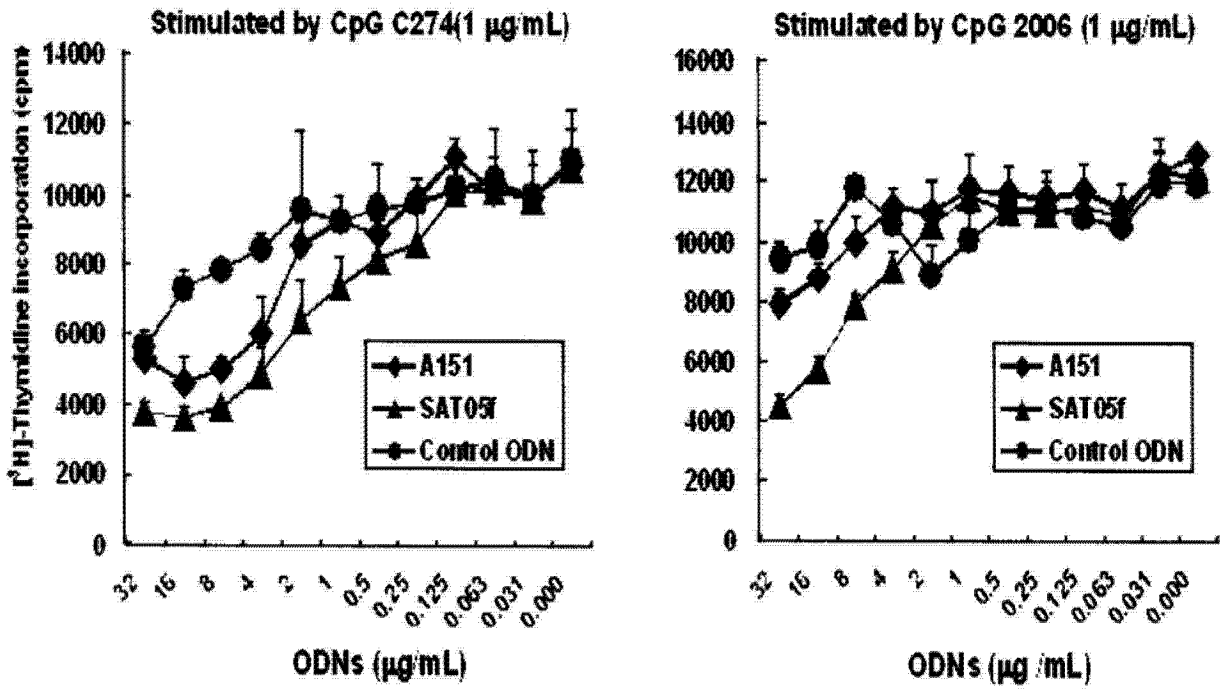


图 2

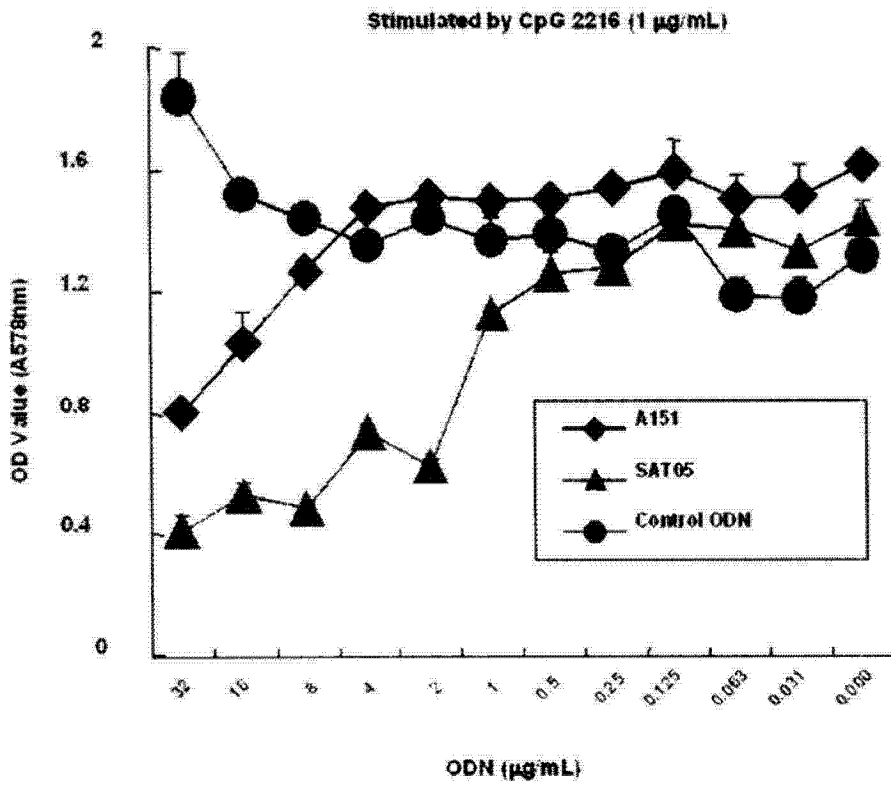


图 3

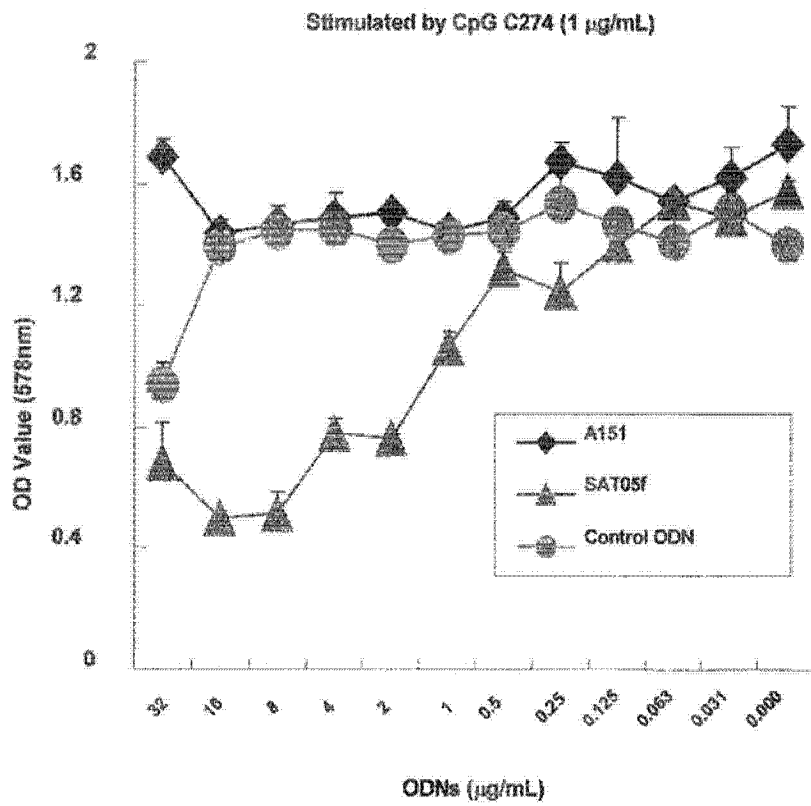


图 4

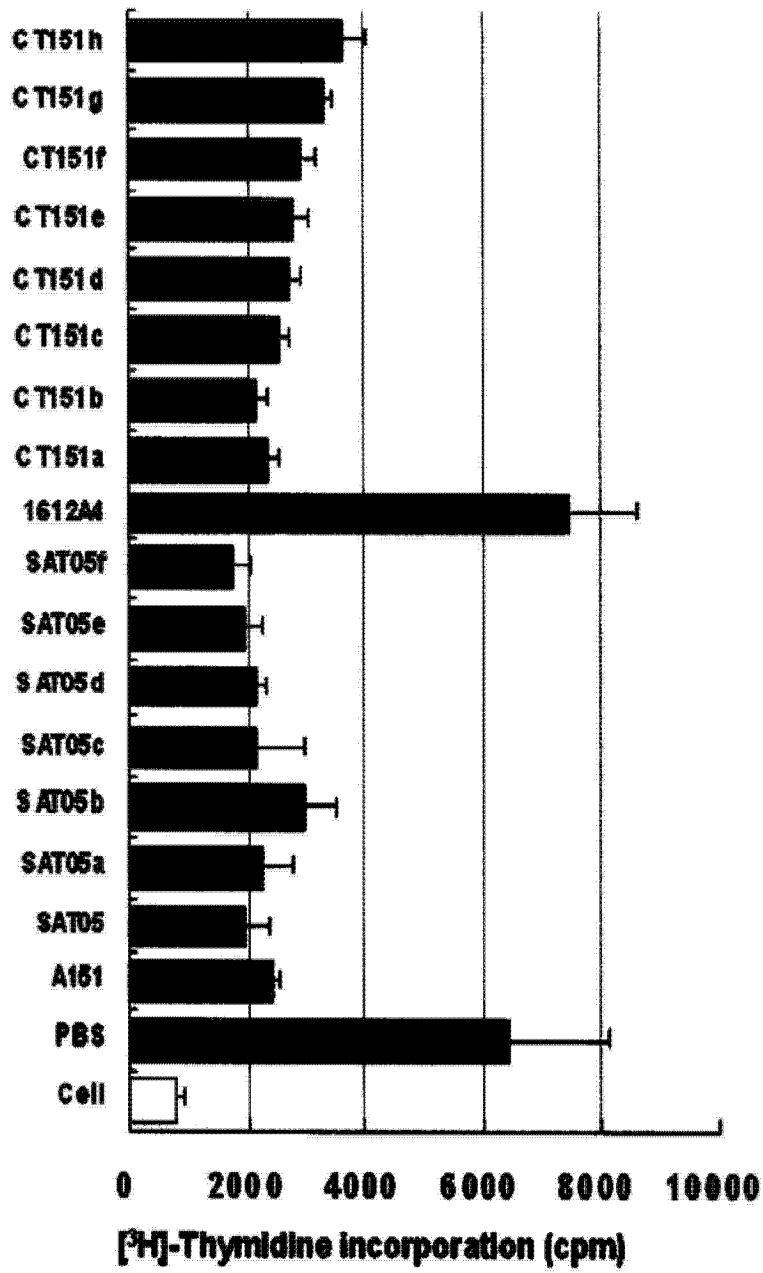


图 5

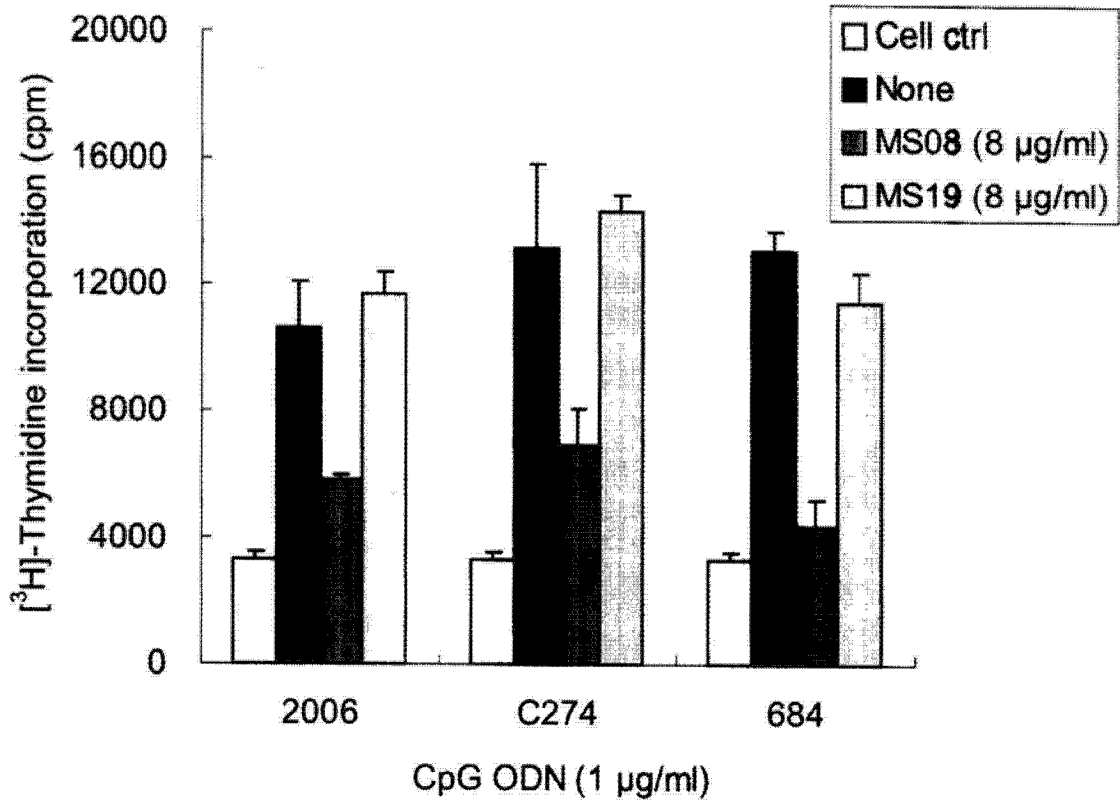


图 6

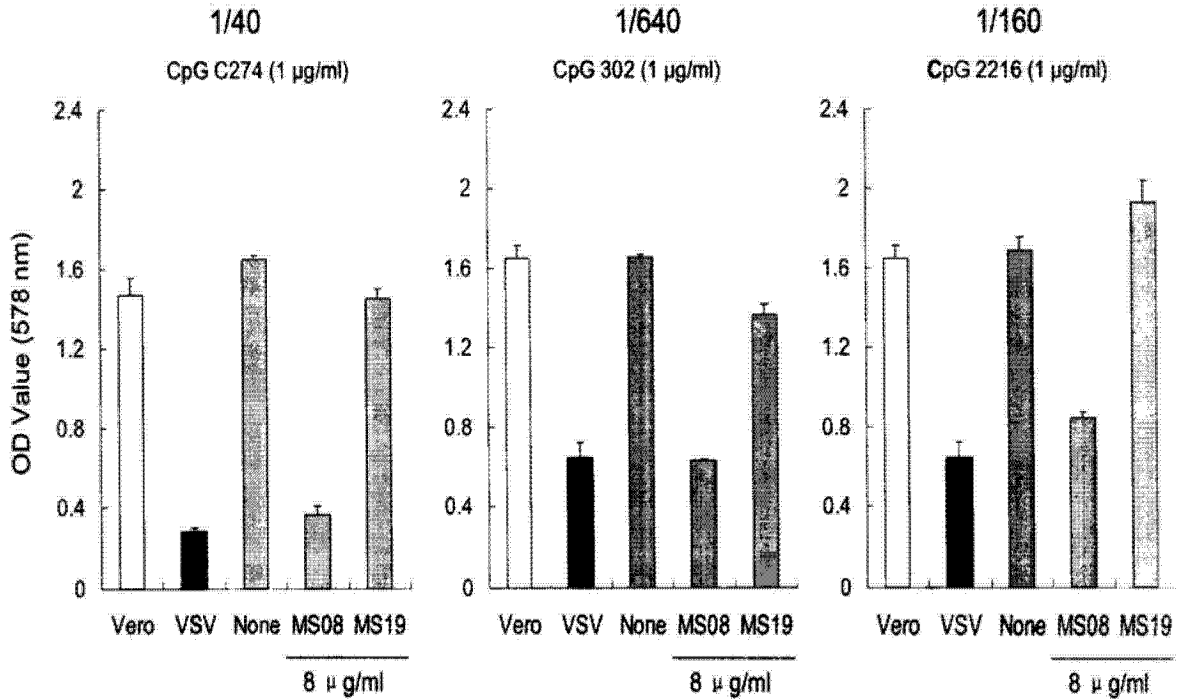


图 7