

DOI: 10.13376/j.cblls/2015057

文章编号: 1004-0374(2015)04-0439-06

Toll样受体靶向药物的研究进展

钟静静, 万岩岩, 刁昱文, 刘兵, 王竹林, 靳广毅, 高宁宁*

(深圳大学医学部, 深圳 518060)

摘要: Toll样受体是一类进化上高度保守的模式识别受体, 通过多种信号传递途径调节免疫系统功能, 活化后可诱导多个蛋白质家族的表达, 包括炎性细胞因子、I型干扰素和趋化因子。Toll样受体的过度活化或活化不足均会导致机体功能异常, 其与免疫系统疾病、肿瘤发病机制密切相关, 是个非常值得开发的新治疗靶点。现就目前已开发Toll样受体药物进行了研究, 对其治疗效果及临床进展做一简要综述, 以期临床预防和治疗疾病提供参考。

关键词: Toll样受体; 靶向治疗; 激动剂

中图分类号: Q819; R967 **文献标志码:** A

The research development of Toll-like receptors targeted drugs

ZHONG Jing-Jing, WAN Yan-Yan, DIAO Yu-Wen, LIU Bing, WANG Zhu-Lin, JIN Guang-Yi, GAO Ning-Ning*

(School of Medicine, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China)

Abstract: Toll-like receptors are highly conserved pattern recognition receptors (PRRs). The activation of Toll can regulate the systematic immunological function and induce the expression of many protein families, including inflammation cytokines, class I interferon and chemokines. The overexpression or insufficient of TLR activation would lead to the systematic disorder. TLRs are novel potential therapy targets based on their importance in immunological disease and tumor development mechanism. We summarized the effects and clinic progresses of TLRs targeted drugs for clinical prevention and therapy.

Key words: Toll-like receptors; targeted therapeutics; agonist

天然免疫系统通过机体自身的模式识别受体 (pattern recognition receptors, PRRs) 识别潜在的病原微生物和非致病性共生菌, 并执行清除病原微生物这一重要功能。Toll样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 是目前研究比较清楚的 PRRs, 也是识别病原体微生物中最具代表性的一类 PRRs。

Toll样受体是一类进化上高度保守的天然免疫受体, 广泛表达于多种组织和细胞, 是机体抵御病原体入侵的第一道屏障^[1-3]。

从结构来看, Toll样受体属于I型跨膜蛋白, 由胞外区、跨膜区、胞内区等3部分组成。胞外区富含亮氨酸重复序列, 能识别病原相关分子模式 (PAMPs) 或者宿主来源的危险信号分子 (DAMPs)。PAMPs, 如脂多糖 (LPS)、脂肽、鞭毛蛋白、细菌 DNA 和病毒的双链 RNA(dsRNA); DAMPs, 如高

迁移率族蛋白 B1 (HMGB1) 和 β -防御素^[4-5]。跨膜区和含有 Toll-IL-1 受体结构域 (Toll-IL-1 receptor domain, TIR 结构域) 的胞内区则能介导下游信号传递, 如识别 PAMPs/DAMPs 后, 发生构象改变, 从而募集一系列含有 TIR 结构域的胞内接头蛋白, 如髓样分化因子 88 (myd88)、髓样分化因子 88 样衔接蛋白 -Mal、诱导 IFN- β 包含 TIRs 结构域的接头分子 (TRIF) 和 TRIF 相关衔接分子 (TRAM) 等, 启动下游信号传递, 包括核因子 κ B (NF- κ B)、促分裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 和干扰素调节因子 (IRF)

收稿日期: 2014-11-06; 修回日期: 2014-12-05

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81273374);

中国博士后科学基金面上资助(2014M552235)

*通信作者: E-mail: gnnapril@163.com

途径^[6]。

TLRs 激活能引起与感染、炎症和天然免疫相关的多条细胞信号通路, 是这类疾病防治和药物开发的重要靶点。本文基于 Toll 样受体靶向药物研究进展做一简要总结, 以期对临床预防和治疗疾病提供参考。

1 Toll样受体作为治疗靶点

目前大量研究发现, TLRs 与许多疾病发病机制相关^[7]。TLRs 参与疾病主要表现为在疾病中的过表达及过度活化, 或是功能受抑引起 TLRs 信号通路异常, TLRs 基因敲除小鼠在这些疾病中反而不受影响, 基因中编码其接头蛋白的单核苷酸多态性 (SNPs) 与疾病的感受态有关^[8-9]。

TLRs 信号可被其特异性激动剂活化而增强免疫应答, 可用于肿瘤和传染性疾病的治疗, TLRs 信号也可被其特异性拮抗剂抑制而降低超敏反应, 可用于自身免疫性疾病、过度炎症和细菌引起的败血症等病理反应。总的来说, 这些具有激动或是拮抗作用的 TLRs 配体因其较好的特异性和易获得性, 而在未来靶向治疗中有着广阔的前景。

TLRs 在临床上应用范围非常广, 涉及肿瘤学、传染病、免疫性疾病。现有的 TLRs 靶向治疗药物大多为激动剂, 是针对 TLRs 的核酸衍生免疫调节序列, 如 TLR3、TLR7、TLR8、TLR9 等; 少数为拮抗剂, 如 TLR4 拮抗药物依立托仑 (Eisai 公司) 已用于脓毒症治疗^[10]。

1.1 TLR2和TLR4

TLR2 和 TLR4 都表达在细胞膜表面, 分别识别脂肽与脂多糖。TLR2 能够分别与 TLR1、TLR6 形成异源二聚体, 识别其配体脂肽^[11-12], 而 TLR4 与其自身形成同源二聚体识别其配体脂多糖。

TLRs 在败血症、类风湿关节炎和过敏反应等多种疾病中有重要作用, 其中 TLR2、TLR4 与缺血/再灌注 (I/R) 损伤引起的组织损伤传播, 如中风、心肌梗死和器官移植有密切关系。缺乏 TLR2 能够减少小鼠心肌梗塞范围并促进心脏功能, 封闭/阻断 TLR2 有益于减少肾脏 I/R 损伤^[13-14]。令人高兴的是, TLR2 表达在免疫细胞, 如中性粒细胞和单核细胞, 而不是表达在被认为的心肌 I/R 损伤所产生的心肌组织^[15-16]。TLR4 与内源性配体 (如 HMGB1) 的结合可能是 I/R 损伤中最主要的炎症应答的触发器, 并引起一系列导致炎症和免疫应答的级联反应。阻断两者的结合可能对各种缺血/再灌注损伤引

起的炎症反应和细胞损伤有保护作用。由此证明 TLR2、TLR4 可作为新型靶点应用于方案治疗, 预防该疾病。

OPN305 是 Opsona Therapeutics 公司开发的一种人源化的 anti-TLR2 单克隆抗体, 该抗体能够阻断 TLR2/1 和 TLR2/6 介导的信号转导, 降低 TLR2 介导的促炎细胞因子的产生。OPN305 在心肌 I/R 损伤猪模型实验中已取得非常好的疗效, 再灌注前静脉给药 OPN305 的动物表现出梗塞面积减少以及对收缩功能的保护作用^[17]。2009 年, OPN305 被认定为“孤儿药”, 用于预防与器官移植和相位相关的 I/R 损伤的 I 期临床试验已启动。目前已发布了健康成人受试者静脉注射 OPN305 后的安全性、耐受性、药物动力学和药效学研究数据, 并取得预期效果^[18]。OPN305 在治疗其他疾病, 如包括肾 I/R 损伤、败血症和人类风湿关节炎也取得了一些临床疗效^[19-20]。

与此相反, 由日本住友制药生产的 TLR2 激动剂 SMP105, 是一种卡介苗 (BCG) 细胞壁骨架成分的制剂, 已在癌症治疗中取得较好的疗效。SMP105 能够激活 TLR2 和 MyD88 依赖型产生 NF- κ B。SMP105 能增强小鼠细胞毒 T 淋巴细胞和干扰素的生成, 有效减缓小鼠肿瘤生长^[21]。从 SMP105 分离的阿拉伯糖基-分枝杆菌也被证实具有与 SMP105 相似的免疫刺激活性^[22]。

TLR4 是 TLR 家族中研究最多的成员, 可识别 LPS 的脂质 A 组分, LPS 与脂多糖结合蛋白 LBP 结合, 随后与 CD14 结合, 并与 TLR4、MD2 形成复合物而活化 MyD88 依赖的信号通路^[23-24]。TLR4 靶向抗体 NI0101 能够与 TLR4 表位结合, 从而抑制 TLR4 的二聚体化, 从而减少促炎细胞因子的产生。该抗体用于急性呼吸窘迫综合征、急性肺损伤、类风湿关节炎和哮喘等疾病的治疗, 正处于临床前研究阶段。

AV411 (异丁司特, Ibudilast) 属于 TLR4 拮抗剂, 已用于治疗神经系统疾病, 其口服药已在亚洲用于治疗哮喘和中风后神经性疼痛^[25]。它正在进行治疗阿片类戒断的神经性疼痛的 II 期临床试验^[26]。阿片类药物被证明具有 TLR4 激动剂活性, TLR4 激活后促炎因子, 如肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 和白介素 1β (IL- 1β) 的释放可增强传入感觉的输入, 引起或加重疼痛感觉。因此, 可通过 TLR4 拮抗剂阻断^[27]神经性疼痛的小胶质受体启动相关联的 TLR4 信号^[28]。AV411 在体外作用神经胶质细胞能抑制促炎

细胞因子的生成, 增强了抗炎因子白介素 10 (IL-10) 和神经营养因子的释放^[29]。

1.2 TLR3

TLR3 是定位于内涵体的模式识别受体, 识别病毒和寄生虫的双链 RNA (dsRNA)^[30], 其活化后分泌的 IFN- α/β 能建立局部抗病毒状态, 限制感染部位的病毒复制^[31]。TLR3 的配体是病毒, 所以关于 TLR3 的靶向药物多数是关于抗病毒感染治疗。

Hiltonol 是人工合成的病毒 dsRNA 类似物 Poly I:C (聚肌苷酸胞苷酸), 可在呼吸道中诱导 caspase (胱天蛋白酶) 介导的细胞凋亡和活性氧生成; 该路径参与可溶性 TNF 受体的切割和脱落, 后者是抑制 TNF 生物活性的重要因子^[32]。值得注意的是, Poly I:C 能防止呼吸道以及中枢神经系统 (CNS) 中的细菌感染^[33]。

Rintatolimod 是 Hiltonol 的改良版, 不需要黑色素瘤分化相关抗原 5 (MDA5), 就能诱导 I 型干扰素 (IFN) 的分泌^[34]。Rintatolimod 用于治疗慢性疲劳综合征、肝癌、人乳头瘤、艾滋、流感和癌症。在治疗慢性疲劳综合征的 III 期临床试验中发挥了超常疗效^[35]。目前, 该化合物作为 TLR3 靶向药物, 正开展肿瘤免疫治疗的研究^[36], 且其用于 HIV 治疗的 II 期临床试验已顺利完成。

1.3 TLR5

TLR5 可以识别细菌鞭毛蛋白, 通过 MyD88 依赖型信号通路激活 NF- κ B 信号通路, 进而诱导促炎因子分泌。鞭毛蛋白是目前为止发现的属于 TLR5 唯一的特异性配体, 可以此为基础构建 TLR5 的特异性激动剂。

VAX102 是 M2e (matrix protein2) 抗原的 4 个串联拷贝与鼠伤寒沙门菌鞭毛蛋白连接而成的重组融合蛋白构建而成的疫苗, 用于预防流行性感。在 I 期临床试验取得非常好的结果, 在人体非免疫原性区域能诱导 4 倍以上的 M2e 抗体^[37]。VAX125 是血凝素 H1 蛋白与鞭毛蛋白的融合蛋白, 作为季节性流感疫苗已完成 II 期临床试验研究, 有望成为老年人可使用的流感疫苗^[38]。另一种值得关注的 TLR5 激动剂是 CBLB502, 研究证明在急性缺血性肾功能衰竭小鼠模型中, 给药 30 min 后即能有效防止缺血性肾再灌注的伤害, 减少白细胞和中性粒细胞浸润, 减少与肾衰竭有关的肾功能障碍诊断标记物的增加^[39]。CBLB502 还具有辐射防护作用, 它通过与 TLR5 的特异性识别结合, 有助于抑制细胞凋亡、清除活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS)

和促进组织再生, 从而达到防辐射的目的。此外, 克利夫兰生物研究所正在开展 CBLB502 治疗不能被手术切除的晚期或转移性肿瘤患者的 I 期临床试验。

近来, TLR5/鞭毛蛋白结合相关的分子机制研究常以斑马鱼 TLR5 为模型^[40]。晶体结构显示 TLR5 的 N 端胞外区复合物是沙门菌鞭毛蛋白的 D1/D2 片段; 两者的化学计量关系、配体位置和结合区分析表明, TLR5/鞭毛蛋白结合较其他 TLR/配体有其独特性。基于这些对 TLR5/鞭毛蛋白的认识, 已研发了一些 TLR5 激动剂, 这将为制定更好的治疗方案提供参考。相同地, TLR7、TLR8、TLR9 的胞外结构域晶体结构分析也会为靶向治疗方案提供理论依据。

1.4 TLR7、TLR8、TLR9

Toll 样受体 7、8 和 9, 主要表达在细胞内的囊泡, 如内质网、内涵体、溶酶体和内溶酶体。除了能够识别含有 DNA 及 RNA 的自身抗原外, TLR7 和 TLR8 可识别外源单链 RNA 的 ssRNA 病毒和小分子咪唑并喹啉衍生物, TLR9 能识别 DNA 来源的 DNA 病毒和细菌^[41]。这些性质在与 TLR3 共同对抗病毒感染和自身免疫疾病的应答中尤为重要^[42]。

由 3M 制药公司开发的咪喹莫特是最成功的 TLR 靶向药物之一。它作为小分子 TLR7 激动剂, 激活 TLR7 依赖的 MyD88 信号通路, 诱导干扰素 α (IFN- α)、TNF- α 和其他炎性因子生成。1997 年, 咪喹莫特被批准用于人乳头状瘤病毒 (HPV) 所造成的湿疣治疗; 2004 年, 被批准用于光化角化病和浅表性基底细胞癌治疗^[43-46]; 咪喹莫特用于其他肿瘤治疗的效果正在评估中。PF-04878691 (852A) 是由辉瑞生产的 TLR7 激动剂, 在其安全性、耐受性、药代动力学和药效学评估中, 24 个健康志愿者接受口服剂量逐渐增加的药物, 评价其诱导的剂量和用药频率相关的免疫应答。结果显示, 其中两名受试者表现出严重的淋巴细胞减少流感样症状和低血压^[47]。

由美国 Gilead 公司研发的 GS-9620 是一种新型的 TLR7 激动剂, 已开始针对乙型肝炎和丙型肝炎患者的 I 期临床试验。临床前实验显示, 在感染乙型肝炎病毒 (HBV) 的黑猩猩体内, 该化合物有效地降低了血浆和肝脏中的病毒载量^[48]。虽然在健康受试者中给予高剂量 (8~12 mg) 药物会导致流感样副作用, 但是低剂量 (2 mg) 药物也同样可以获得理想的细胞因子的产生量, 提示该药物在慢性病毒感染

染治疗中有较好的应用前景^[49]。

TLR8 具有与 TLR7 相似的系统发育和识别人工合成小分子的特性, 虽功能上差异较大, 却也值得关注。TLR7 激动剂在诱导 IFN- α 和 IFN- γ 调节的趋化因子方面更有效, 而 TLR8 激动剂则偏向于诱导炎性细胞因子 TNF- α 和 IL-12^[50]。强效 TLR8 激动剂 VTX1463 已制成喷雾剂用于治疗过敏性鼻炎^[51]。它的活性成分作用于 TLR8, 诱导产生 T 辅助细胞 1 (Th1 细胞) 相关因子, 包括 IL-12、干扰素 (IFN) 和单核细胞趋化蛋白 -1 (MCP-1)。鼻炎或哮喘引起的过敏反应主要表现为诱导强 T 辅助细胞 2 (Th2 细胞) 应答无害的环境抗原, 可通过使用 TLR 激动剂激活 TLR 信号通路, 生成细胞因子、活化抗原呈递细胞、诱导 Th1 类型的反应与其相抵消^[52]。这种情况下的 Th1 型应答促使 Th1/Th2 趋向平衡而有利于减少过敏反应。

TLR9 也能用于治疗过敏性疾病。TLR9 能够识别未甲基化的 CpG (胞嘧啶 - 鸟嘌呤核苷酸) 双核苷酸修饰, 是天然免疫中主要的 DNA 识别受体, 即 CpG DNA。TLR7/TLR9 双拮抗剂 IMO3100 可抑制 TLR 配体诱导的基因表达, 目前已经成功地完成了 I 期临床试验^[8], 并在 II 期临床试验中取得良好的临床疗效, 即将在银屑病和其他自身免疫疾病患者中开展内涵体 TLR 激动剂研究。IMO8400 能够拮抗 TLR7、TLR8 和 TLR9 等 3 种受体, 在红斑狼疮小鼠模型中取得较好的治疗效果, 并在针对该疾病的 I 期临床试验中取得预期的疗效。

HEPLISAV 是由 B 型肝炎病毒表面抗原和有免疫刺激能力的 CpG 基 DNA 序列 ISS1018 为佐剂构建而成的 TLR9 激动剂疫苗, 已完成了预防和治疗乙肝病毒感染的 III 期临床试验^[53-54]。该试验中, HEPLISAV 的有效剂量比目前临床许可的乙肝疫苗剂量小, 且兼具见效快、防护力强的特点。SD101 是由 Dynavax 生物制药公司开发的另一种 TLR9 激动剂, 相较于第一代 TLR9 激动剂, 其在体外具有更强的诱导人外周血单核细胞生成 IFN- γ 和 TNF- α 的能力, 在治疗慢性 HCV 的 I 期临床试验中取得很好的疗效。DV1179 是由 Dynavax 生物制药公司开发的 TLR 拮抗剂药物, 在 2011 年完成了健康受试者的 I 期临床试验, 于 2011 年底启动系统性红斑狼疮 (SLE) 患者验证性机制的临床研究。SLE 患者体内浆样树突细胞 (pDCs 细胞) 上的 TLR7 和 TLR9 检测到自身抗原核酸, 进而诱导 IFN- α 水平升高和能产生自身抗体的 B 细胞增加^[55]。目前

SLE 的治疗常采用高水平的糖皮质激素, 它具有较强的免疫抑制特性, 易产生骨质疏松、高血压等多种副作用。在 pDCs 细胞和 SLE 动物模型中, 糖皮质激素的抗性可被 DV1179 逆转^[56-57]。DV1179 是 TLR7 和 TLR9 的双拮抗剂, 在 SLE 治疗中能有效降低类固醇水平, 这对 SLE 患者来说非常有益。DIMS0150 (Kappaproct[®], 已获得欧洲药品局的孤儿药物标识) 是 INDEX 制药公司研发的 TLR9 激动剂, 在治疗激素抵抗型溃疡性结肠炎中已经完成了它的第三个 II 期临床试验, 目前正在开展治疗难治性溃疡性结肠炎的 III 期临床试验。

2 结论与展望

以 TLR 为焦点的疾病研究和药物研发带给我们很多新的启发。首先, 大量研究表明, 在癌症和炎症反应中都能找到 TLR, TLR 在人类疾病中的作用和地位正在被越来越多的研究所证实。因此, 基于 TLR 的治疗方法毫无疑问将有助于改善现有治疗水平。其次, 有选择地调控机体内 TLR 活化水平, 可以在减缓严重程度疾病的同时减少毒副作用。虽然目前研发的多种 TLR 药物治疗未必都能进展顺利、获得批准, 但已经在临床前研究和早期临床研究中取得的良好疗效都将鼓励科研工作者和临床医生继续进行深入的研究和开拓。

[参 考 文 献]

- [1] Sussman DA, Santaolalla R, Strobel S, et al. Cancer in inflammatory bowel disease: lessons from animal models. *Curr Opin Gastroen*, 2012, 28: 327-33
- [2] Fukata M, Arditi M. The role of pattern recognition receptors in intestinal inflammation. *Mucosal Immunol*, 2013, 6: 451-63
- [3] Moresco EM, LaVine D, Beutler B. Toll-like receptors. *Curr Biol*, 2011, 21: R488-93
- [4] Knapp S, Muller S, Digilio G, et al. The long acidic tail of high mobility group box 1 (HMGB1) protein forms an extended and flexible structure that interacts with specific residues within and between the HMG boxes. *Biochemistry-us*, 2004, 43: 11992-7
- [5] Biragyn A, Ruffini PA, Leifer CA, et al. Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by β -defensin 2. *Science*, 2002, 298: 1025-9
- [6] O'Neill LAJ, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7: 353-64
- [7] Cook DN, Pisetsky DS, Schwartz DA. Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nat Immunol*, 2004, 5: 975-9
- [8] Hennessy EJ, Parker AE, O'Neill LA. Targeting Toll-like

- receptors: emerging therapeutics? *Nat Rev Drug Discov*, 2010, 9: 293-307
- [9] Misch EA, Hawn TR. Toll-like receptor polymorphisms and susceptibility to human disease. *Clin Sci*, 2008, 114: 347-60
- [10] Rossignol DP, Wasan MM, Choo E, et al. Safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and plasma lipoprotein distribution of eritoran (E5564) during continuous intravenous infusion into healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48: 3233-40
- [11] Jin MS, Kim SE, Heo JY, et al. Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a triacylated lipopeptide. *Cell*, 2007, 130: 1071-82
- [12] Kang JY, Nan X, Jin MS, et al. Recognition of lipopeptide patterns by Toll-like receptor 2-Toll-like receptor 6 heterodimer. *Immunity*, 2009, 31: 873-84
- [13] Favre J, Musette P, Douin-Echinard V, et al. Toll-like receptors 2-deficient mice are protected against postischemic coronary endothelial dysfunction. *Arterioscler Thromb Vas*, 2007, 27:1064-71
- [14] Leemans JC, Stokman G, Claessen N, et al. Renal-associated TLR2 mediates ischemia/reperfusion injury in the kidney. *J Clin Invest*, 2005, 115: 2894-903
- [15] Selejan S, Poss J, Walter F, et al. Ischaemia-induced up-regulation of Toll-like receptor 2 in circulating monocytes in cardiogenic shock. *Eur Heart J*, 2012, 33: 1085-94
- [16] Arslan F, Smeets MB, O'Neill LA, et al. Myocardial ischemia/reperfusion injury is mediated by leukocytic toll-like receptor-2 and reduced by systemic administration of a novel anti-toll-like receptor-2 antibody. *Circulation*, 2010, 121: 80-90
- [17] Arslan F, Houtgraaf JH, Keogh B, et al. Treatment with OPN-305, a humanized anti-Toll-like receptor-2 antibody, reduces myocardial ischemia/reperfusion injury in pigs. *Circ Cardiovasc Inter*, 2012, 5: 279-87
- [18] Reilly M, Miller RM, Thomson MH, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalating phase I, healthy subjects study of intravenous OPN-305, a humanized anti-TLR2 antibody. *Clin Pharmacol Ther*, 2013, 94: 593-600
- [19] Farrar CA, Keogh B, McCormack W, et al. Inhibition of TLR2 promotes graft function in a murine model of renal transplant ischemia-reperfusion injury. *FASEB J*, 2012, 26: 799-807
- [20] Ultaigh SN, Saber TP, McCormick J, et al. Blockade of Toll-like receptor 2 prevents spontaneous cytokine release from rheumatoid arthritis *ex vivo* synovial explant cultures. *Arthritis Res Ther*, 2011, 13: R33
- [21] Murata M. Activation of Toll-like receptor 2 by a novel preparation of cell wall skeleton from *Mycobacterium bovis* BCG Tokyo (SMP-105) sufficiently enhances immune responses against tumors. *Cancer Sci*, 2008, 99:1435-40
- [22] Miyauchi M, Murata M, Shibuya K, et al. Arabinoxylans derived from cell-wall skeleton of *Mycobacterium bovis* BCG as a prominent structure for recognition by host immunity. *Drug Discov Ther*, 2011, 5: 130-5
- [23] Shimazu R, Akashi S, Ogata H, et al. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med*, 1999, 189: 1777-82
- [24] Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, et al. Cd14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (Lps) and Lps binding-protein. *Science*, 1990, 249: 1431-3
- [25] Mizuno T, Kurotani T, Komatsu Y, et al. Neuroprotective role of phosphodiesterase inhibitor ibudilast on neuronal cell death induced by activated microglia. *Neuropharmacology*, 2004, 46: 404-11
- [26] Rolan P, Gibbons JA, He L, et al. Ibudilast in healthy volunteers: safety, tolerability and pharmacokinetics with single and multiple doses. *Br J Clin Pharmacol*, 2008, 66: 792-801
- [27] Hutchinson MR, Zhang Y, Shridhar M, et al. Evidence that opioids may have toll-like receptor 4 and MD-2 effects. *Brain Behav Immun*, 2010, 24: 83-95
- [28] Tanga FY, Nutile-McMenemy N, DeLeo JA. The CNS role of Toll-like receptor 4 in innate neuroimmunity and painful neuropathy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 5856-61
- [29] Ledebauer A, Liu T, Shumilla JA, et al. The glial modulatory drug AV411 attenuates mechanical allodynia in rat models of neuropathic pain. *Neuron Glia Biol*, 2006, 2: 279-91
- [30] Yu M, Levine SJ. Toll-like receptor, RIG-I-like receptors and the NLRP3 inflammasome: key modulators of innate immune responses to double-stranded RNA viruses. *Cytokine Growth F R*, 2011, 22: 63-72
- [31] Zhang SY, Herman M, Ciancanelli MJ, et al. TLR3 immunity to infection in mice and humans. *Curr Opin Immunol*, 2013, 25: 19-33
- [32] Yu M, Lam J, Rada B, et al. Double-stranded RNA induces shedding of the 34-kDa soluble TNFR1 from human airway epithelial cells via TLR3-TRIF-RIP1-dependent signaling: roles for dual oxidase 2- and caspase-dependent pathways. *J Immunol*, 2011, 186: 1180-8
- [33] Davis CG, Chang K, Osborne D, et al. TLR3 agonist improves survival to secondary pneumonia in a double injury model. *J Surg Res*, 2013, 182: 270-6
- [34] Gitlin L, Barchet W, Gilfillan S, et al. Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 8459-64
- [35] Strayer DR, Carter WA, Stouch BC, et al. A double-blind, placebo-controlled, randomized, clinical trial of the TLR-3 agonist rintatolimod in severe cases of chronic fatigue syndrome. *PLoS One*, 2012, 7: e31334
- [36] Nicodemus CF, Wang L, Lucas J, et al. Toll-like receptor-3 as a target to enhance bioactivity of cancer immunotherapy. *Am J Obst Gynecol*, 2010, 202: 608 e1-8
- [37] Turley CB, Rupp RE, Johnson C, et al. Safety and immunogenicity of a recombinant M2e-flagellin influenza vaccine (STF2.4xM2e) in healthy adults. *Vaccine*, 2011, 29: 5145-52
- [38] Taylor DN, Treanor JJ, Strout C, et al. Induction of a

- potent immune response in the elderly using the TLR-5 agonist, flagellin, with a recombinant hemagglutinin influenza-flagellin fusion vaccine (VAX125, STF2.HA1 SI). *Vaccine*, 2011, 29: 4897-902
- [39] Fukuzawa N, Petro M, Baldwin WM, et al. A TLR5 agonist inhibits acute renal ischemic failure. *J Immunol*, 2011, 187: 3831-9
- [40] Yoon SI, Kurnasov O, Natarajan V, et al. Structural basis of TLR5-flagellin recognition and signaling. *Science*, 2012, 335: 859-64
- [41] Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*, 2010, 11: 373-84
- [42] Kawai T, Akira S. Innate immune recognition of viral infection. *Nat Immunol*, 2006, 7: 131-7
- [43] A AG, Tyring SK, Rosen T. Beyond a decade of 5% imiquimod topical therapy. *J Drugs Dermatol*, 2009, 8: 467-74
- [44] Somani N, Rivers JK. Imiquimod 5% cream for the treatment of actinic keratoses. *Skin Therapy Letter*, 2005, 10: 1-6
- [45] Geisse JK, Rich P, Pandya A, et al. Imiquimod 5% cream for the treatment of superficial basal cell carcinoma: a double-blind, randomized, vehicle-controlled study. *J Am Acta Dermatol*, 2002, 47: 390-8
- [46] Schiessl C, Wolber C, Tauber M et al. Treatment of all basal cell carcinoma variants including large and high-risk lesions with 5% imiquimod cream: histological and clinical changes, outcome, and follow-up. *J Drugs Dermatol*, 2007, 6: 507-13
- [47] Fidock MD, Souberbielle BE, Laxton C, et al. The innate immune response, clinical outcomes, and *ex vivo* HCV antiviral efficacy of a TLR7 agonist (PF-4878691). *Clin Pharmacol Ther*, 2011, 89: 821-9
- [48] Lanford RE, Guerra B, Chavez D, et al. GS-9620, an oral agonist of Toll-like receptor-7, induces prolonged suppression of hepatitis B virus in chronically infected chimpanzees. *Gastroenterology*, 2013, 144: 1508-17, 17 e1-10
- [49] Lopatin U, Wolfgang G, Tumas D, et al. Safety, pharmacokinetics and pharmacodynamics of GS-9620, an oral Toll-like receptor 7 agonist. *Antivir Ther*, 2013, 18: 409-18
- [50] Gorden KB, Gorski KS, Gibson SJ, et al. Synthetic TLR agonists reveal functional differences between human TLR7 and TLR8. *J Immunol*, 2005, 174: 1259-68
- [51] Horak F. VTX-1463, a novel TLR8 agonist for the treatment of allergic rhinitis. *Expert Opin Inv Drug*, 2011, 20: 981-6
- [52] Kanzler H, Barrat FJ, Hessel EM, et al. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nat Med*, 2007, 13: 552-9
- [53] Sablan BP, Kim DJ, Barzaga NG, et al. Demonstration of safety and enhanced seroprotection against hepatitis B with investigational HBsAg-1018 ISS vaccine compared to a licensed hepatitis B vaccine. *Vaccine*, 2012, 30: 2689-96
- [54] Halperin SA, Ward B, Cooper C, et al. Comparison of safety and immunogenicity of two doses of investigational hepatitis B virus surface antigen co-administered with an immunostimulatory phosphorothioate oligodeoxyribonucleotide and three doses of a licensed hepatitis B vaccine in healthy adults 18-55 years of age. *Vaccine*, 2012, 30: 2556-63
- [55] Kim WU, Sreih A, Bucala R. Toll-like receptors in systemic lupus erythematosus; prospects for therapeutic intervention. *Autoimmun Rev*, 2009, 8: 204-8
- [56] Guiducci C, Gong M, Xu Z, et al. TLR recognition of self nucleic acids hampers glucocorticoid activity in lupus. *Nature*, 2010, 465: 937-41
- [57] Barrat FJ, Meeker T, Chan JH, et al. Treatment of lupus-prone mice with a dual inhibitor of TLR7 and TLR9 leads to reduction of autoantibody production and amelioration of disease symptoms. *Eur J Immunol*, 2007, 37: 3582-6