



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0065656
(43) 공개일자 2008년07월14일

(51) Int. Cl.

C12N 15/11 (2006.01) C07H 21/00 (2006.01)
A61K 31/7125 (2006.01) A61K 31/7088 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-7011347

(22) 출원일자 2008년05월13일

심사청구일자 없음

번역문제출일자 2008년05월13일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2006/067334

국제출원일자 2006년10월12일

(87) 국제공개번호 WO 2007/042554

국제공개일자 2007년04월19일

(30) 우선권주장

60/726,305 2005년10월12일 미국(US)

60/751,917 2005년12월20일 미국(US)

(71) 출원인

캔서 리서치 테크놀로지 리미티드

영국 런던 더블유씨2에이 3엔엘 사디니아 스트리트 사디니아 하우스

(72) 발명자

디에볼드 산드라

영국 런던 이3 5디에프, 아베리로드, 2 히페리온 하우스

레이스 이 수자 카에타노

영국 런던 더블유씨2에이 3피엑스, 44 링컨스 인 필드, 런던리서치 인스티튜트, 캔서 리서치 유케이, 이뮤노바이올로지연구소

파트렐 캐린

프랑스 에프-69573 다딜리 세덱스, 비피 78, 27 체민 데스퓨플리어스

(74) 대리인

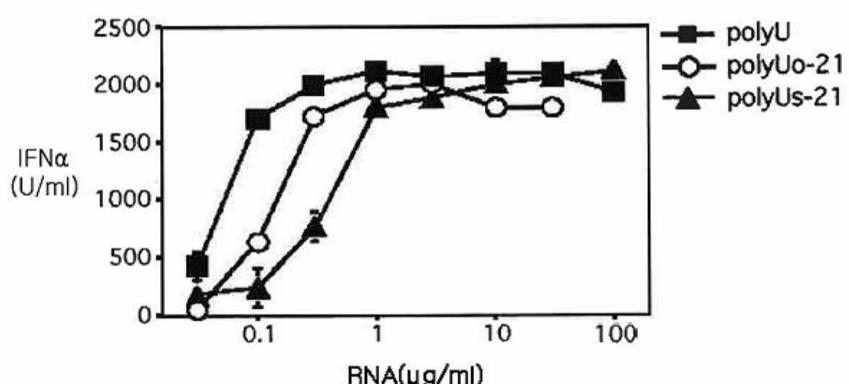
윤동열

전체 청구항 수 : 총 54 항

(54) 면역질환을 치료하기 위한 방법 및 조성물

(57) 요 약

본 발명은 올리고뉴클레오티드, 이를 포함하는 조성물 및 TLR-7 및/또는 TLR-8 수용체를 발현하는 세포를 자극하기 위해 뉴클레오티드 및 조성물을 사용하는 방법을 제공한다. TLR-7을 자극하기 위한 올리고뉴클레오티드는 우라실-리치(uracil-rich) 부분을 포함한다. TLR-8을 자극하기 위한 올리고뉴클레오티드는 구아닌-리치(guanine-rich) 부분을 포함한다. 본 발명의 방법 및 조성물은 무엇보다도 감염성 질환 및 암과 같은 이상을 치료 또는 예방하는데 유용하다.

대표도 - 도1a

특허청구의 범위

청구항 1

10 내지 50개의 뉴클레오티드로 이루어지고, $UUU_r-(X)_n-UUU_r$, $UU-X-UU-X-UU$ 또는 $Y(U)_pY$ 에서 선택된 서열을 포함하는 단일-가닥 올리고뉴클레오티드로서,

상기 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 비-우라실 함유 뉴클레오티드 또는 하나 이상의 비자연적인 결합을 포함하는 것임을 특징으로 하는 단일-가닥 올리고뉴클레오티드:

상기에서, 각각의 U는 우라실-함유 뉴클레오티드에서 독립적으로 선택되고;

각각의 Y는 비-우라실 함유 뉴클레오티드에서 독립적으로 선택되고;

각각의 X는 임의의 뉴클레오티드에서 독립적으로 선택되고;

r은 1 내지 3의 정수이고;

n은 1 내지 4의 정수이고; 및

p는 4 보다 큰 정수이다.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드가 10 내지 19개의 뉴클레오티드로 이루어지는 것임을 특징으로 하는 올리고뉴클레오티드.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드가 19 내지 50개의 뉴클레오티드로 이루어지는 것임을 특징으로 하는 올리고뉴클레오티드.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드가 15 내지 30개의 뉴클레오티드로 이루어지는 것임을 특징으로 하는 올리고뉴클레오티드.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드가 21 내지 30개의 뉴클레오티드로 이루어지는 것임을 특징으로 하는 올리고뉴클레오티드.

청구항 6

제 4항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드가 15 내지 21개의 뉴클레오티드로 이루어지는 것임을 특징으로 하는 올리고뉴클레오티드.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드가 15개의 뉴클레오티드 또는 21개의 뉴클레오티드로 이루어지는 것임을 특징으로 하는 올리고뉴클레오티드.

청구항 8

제 1항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드가 서열 $UUU_r-(X)_n-UUU_r$ 을 포함하며, r은 2이고, n은 1인 것을 특징으로 하는 올리고뉴클레오티드.

청구항 9

제 1항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드가 서열 $(UUU-(X)_n)_m$ 을 포함하며, 여기에서, n은 1 내지 4의 정수이고, m은 2 보다 큰 정수인 것을 특징으로 하는 올리고뉴클레오티드.

청구항 10

제 9항에 있어서, n 이 1인 것을 특징으로 하는 올리고뉴클레오티드.

청구항 11

제 9항에 있어서, m 이 3 또는 4인 것을 특징으로 하는 올리고뉴클레오티드.

청구항 12

제 1항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드가 서열 $Y(U)_p Y$ 를 포함하며, p 는 9 보다 큰 정수인 것을 특징으로 하는 올리고뉴클레오티드.

청구항 13

제 1항에 있어서, 각각의 U는 우리딘이고, 상기 올리고뉴클레오티드가 하나 이상의 비자연적인 결합을 포함하는 것임을 특징으로 하는 올리고뉴클레오티드.

청구항 14

제 1항에 있어서, 하나 또는 그 이상의 포스포로티오염 결합을 포함하고 전체가 우리딘으로 이루어진 21-mer; 10개 이상의 연속적인 우리딘을 포함하는 21-mer; 및 서열 UUXUUXUUXUUXUU을 포함하는 21-mer에서 선택되는 올리고뉴클레오티드로서, 여기에서, 각각의 U는 우리딘이고, 각각의 X는 임의의 뉴클레오티드에서 독립적으로 선택되는 것임을 특징으로 하는 올리고뉴클레오티드.

청구항 15

제 1항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드가 우라실-함유 뉴클레오티드를 50% 이상 포함하는 것임을 특징으로 하는 올리고뉴클레오티드.

청구항 16

제 1항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드가 구아닌-함유 뉴클레오티드를 50% 보다 적게 포함하는 것임을 특징으로 하는 올리고뉴클레오티드.

청구항 17

제 1항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드가 폴리Uo-21, 폴리Uo-15, 폴리Uo-10, 폴리Us-21, 폴리Us-15, 폴리dUo-21, 폴리dUs-21, SSD8, SSD9, SSD10, SSD13, SSD14, SSD15, SSD21, SSD22, SSD23, SSD24, SSD28 또는 SSD29에서 선택되는 것임을 특징으로 하는 올리고뉴클레오티드.

청구항 18

11 내지 50개의 뉴클레오티드로 이루어지고, GGG-(X) n -GGG, GG-X-GG-X-GG 또는 Z(G)pZ에서 선택된 서열을 포함하는 단일-가닥 올리고뉴클레오티드로서,

상기 올리고뉴클레오티드가 하나 이상의 비-구아닌 함유 뉴클레오티드 또는 하나 이상의 비자연적인 결합을 포함하는 것임을 특징으로 하는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드:

상기에서, 각각의 G는 구아닌-함유 뉴클레오티드에서 독립적으로 선택되고;

각각의 X는 임의의 뉴클레오티드에서 독립적으로 선택되고;

각각의 Z는 임의의 비-구아닌 뉴클레오티드에서 독립적으로 선택되며;

n 은 1 내지 4의 정수이고; 및

p 는 4 보다 큰 정수이다.

청구항 19

제 18항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열 GGG-(X) n -GGG을 포함하고, n 이 1인 것을 특징으로 하는 올

리고뉴클레오티드.

청구항 20

제 18항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열 $(GGG-(X)_n)_m$ 을 포함하며, n 은 1 내지 4의 정수이고, m 은 2 보다 큰 정수인 것을 특징으로 하는 올리고뉴클레오티드.

청구항 21

제 20항에 있어서, n 이 1인 것을 특징으로 하는 올리고뉴클레오티드.

청구항 22

제 20항에 있어서, m 이 3 또는 4인 것을 특징으로 하는 올리고뉴클레오티드.

청구항 23

제 18항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열 $Z(G)pZ$ 를 포함하고, p 는 9 보다 큰 정수인 것을 특징으로 하는 올리고뉴클레오티드.

청구항 24

제 18항에 있어서, 각각의 G 는 구아노신인 것을 특징으로 하는 올리고뉴클레오티드.

청구항 25

제 18항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드가 $UUU-(X)_n-UUU$, $UU-X-UU-X-UU$ 또는 $Y(U)_pY$ 에서 선택된 서열을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 올리고뉴클레오티드:

상기에서, 각각의 U 는 우라실 함유 뉴클레오티드에서 독립적으로 선택되고;

각각의 Y 는 임의의 비-우라실 함유 뉴클레오티드에서 독립적으로 선택되고;

각각의 n 은 독립적으로 선택되고; 및

각각의 p 는 독립적으로 선택된다.

청구항 26

제 1항 또는 제 18항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드가 하나 이상의 CpG 디뉴클레오티드를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 올리고뉴클레오티드.

청구항 27

a) 10 내지 50개의 뉴클레오티드로 이루어지고, $UUU-(X)_n-UUU$, $UU-X-UU-X-UU$ 또는 $Y(U)_pY$ 에서 선택된 서열을 포함하는 단일-가닥 올리고뉴클레오티드의 유효량,

상기에서, 각각의 U 는 우라실 함유 뉴클레오티드에서 독립적으로 선택되고; 각각의 X 는 임의의 뉴클레오티드에서 독립적으로 선택되고; n 은 1 내지 4의 정수이고; 및 p 는 4 보다 큰 정수이며; 및

b) 약제학적으로 허용가능한 담체(carrier)

를 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 28

a) 11 내지 50개의 뉴클레오티드로 이루어지고, $GGG-(X)_n-GGG$, $GG-X-GG-X-GG$ 또는 $Z(G)pZ$ 에서 선택된 서열을 포함하는 단일-가닥 올리고뉴클레오티드의 유효량,

상기에서, 각각의 G 는 구아닌 함유 뉴클레오티드에서 독립적으로 선택되고, 각각의 X 는 임의의 뉴클레오티드에서 독립적으로 선택되고; 각각의 Z 는 임의의 비-구아닌 뉴클레오티드에서 독립적으로 선택되고; n 은 1 내지 4의 정수이고; 및 p 는 4 보다 큰 정수이며; 및

b) 약제학적으로 허용가능한 담체

를 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 29

제 27항 또는 제 28항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드는 압축제(compact ion agent) 또는 리포좀과 복합체를 이루는 것임을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 30

제 29항에 있어서, 상기 압축제는 폴리에틸렌이민임을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 31

제 27항 또는 제28항에 있어서, 상기 조성물은 항원을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 32

제 31항에 있어서, 상기 항원은 바이러스 항원, 암 항원 또는 알레르겐(allergen)에서 선택되는 것임을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 33

제 27항 또는 제28항에 있어서, 상기 조성물은 이차 치료제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 34

제 33항에 있어서, 상기 이차 치료제는 화학 치료제, 방사선 치료제, 세포 독소, 항-혈관신생제, 암항원에 대항하는 단클론 항체, 면역 조절제, 사이토카인, 세포 표면 수용체 또는 GAP 결합의 상향조절에 작용하는 제제, 세포증식 억제제 또는 분화제, 세포 부착 저해제 또는 항바이러스제에서 선택되는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 35

TLR7을 발현하는 세포 내의 TLR7 활성을 자극하는 방법으로서, 상기 방법이 제 1항에 의한 올리고뉴클레오티드와 세포를 접촉시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 36

제 35항에 있어서, 상기 세포는 형질세포형 수지상 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 37

TLR8을 발현하는 세포 내의 TLR8 활성을 자극하는 방법으로서, 상기 방법이 제 18항에 의한 올리고뉴클레오티드와 세포를 접촉시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 38

제 37항에 있어서, 상기 세포가 골수 수지상 세포, 단핵구 또는 CD4⁺ 조절 T 세포에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 39

제 27항에 의한 조성물을 환자에게 투여하는 단계를 포함하여 환자의 면역 반응을 자극하는 방법.

청구항 40

제 28항에 의한 조성물을 환자에게 투여하는 단계를 포함하여 환자의 면역 반응을 자극하는 방법.

청구항 41

제 39항 또는 제 40항에 있어서, 상기 방법이 암, 감염성 질환, 알레르기, 천식 또는 자가면역질환의 치료 또는 예방하기 위해 사용되거나 또는 질병, 수술 또는 면역 억제제의 투여로 생긴 환자의 면역 기능 강화를 위해 사용되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 42

제 41항에 있어서, 상기 방법이 암 치료 또는 바이러스 질환의 치료 또는 예방을 위해 사용되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 43

제 39항 또는 제40항에 있어서, 조성물의 투여 후에 환자의 면역 세포 활성을 검출하는 추가적인 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 44

제 42항에 있어서, 상기 암이 방광암, 유방암, 결장암, 신장암, 간암, 폐암, 난소암, 전립선암, 췌장암, 위암, 경부암, 갑상선암 및 편평세포암종을 포함하는 피부암을 포함하는 암종; 백혈병, 급성 림프성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, B-세포 림프종, T-세포 림프종, 호지킨스 림프종, 비-호지킨스 림프종, 모발상 세포 림프종 및 베켓 림프종을 포함하는 림프계 조혈모 종양; 급성 및 만성 골수성 백혈병 및 전골수구 백혈병을 포함하는 골수형의 조혈 종양; 섬유 육종 및 횡문 근육종을 포함하는 간엽 유래 종양; 흑색종, 정상피종, 기형암종, 신경모세포종 및 신경교종을 포함하는 다른 종양; 성상세포종, 신경아세포종, 신경교종 및 신경초종을 포함하는 중추 및 말초 신경 시스템의 종양; 섬유육종, 횡문근육종 및 골육종을 포함하는 중간엽 유래 종양; 및 흑색종, 색소성 건피증, 각화극세포종, 정상피종, 갑상선 여포상암 및 기형암종을 포함하는 기타 종양에서 선택되는 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 45

제 44항에 있어서, 화학 치료제, 방사선 치료제, 항-헬관신생체, 표적 항독소, 표적 응고 리간드(coaguligand), 사이토카인, 호르몬 치료제 또는 치료 항체에서 선택된 제제를 환자에 투여하는 추가적인 단계를 포함하는 방법으로서, 상기 제제가 개별 복용 형태 또는 조성물의 일부분으로 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 46

제 42항에 있어서, 상기 바이러스 질환은 장내바이러스(폴리오 바이러스, 콕사키 바이러스, 에코 바이러스와 같은 피코나바이러스군(picornaviridae)의 바이러스를 포함하지만 이에 제한되지 않음), 로터바이러스, 아데노바이러스, 간염 바이러스에서 선택된 바이러스에 의해 유발되는 것을 특징으로 하는 방법:

상기 사람에게 발견되는 바이러스의 특정 예는 레트로바이러스과(예를 들어, HIV-I(또한 HTLV-III, LAV 또는 HTLV-III/LAV, 또는 HIV-III으로서도 언급됨)와 같은 인간 면역 결핍 바이러스; 및 HIV-LP와 같은 다른 분리물); 피코나바이러스과(Picornaviridae)(예를 들어, 폴리오 바이러스(polio virus), A형 간염 바이러스, 엔테로바이러스, 인간 콕사키바이러스(human Coxsackie virus), 리노바이러스(rhinovirus), 에코바이러스(echovirus)); 칼시바이러스과(Calciviridae)(예를 들어, 위장염의 원인이 되는 종); 토가바이러스과(Togaviridae)(예를 들어, 말 뇌염 바이러스(equine encephalitis virus), 풍진 바이러스(rubella virus)); 플라비바이러스과(Flaviviridae)(예를 들어, 뎅기 바이러스(dengue virus), 뇌염 바이러스(encephalitis virus), 황열 바이러스(yellow fever virus)); 코로나바이러스과(Coronaviridae)(예를 들어, 코로나바이러스(coronavirus)); 랍도바이러스과(Rhabdoviridae)(예를 들어, 수포성구내염바이러스(vesicular stomatitis virus), 광견병 바이러스(rabies virus)); 필로바이러스과(예를 들어, 에볼라 바이러스(ebola virus)); 파라믹소바이러스과(Paramyxoviridae)(예를 들어, 파라인플루엔자 바이러스(parainfluenza virus), 볼거리 바이러스(mumps virus), 홍역 바이러스(measles virus), 호흡기세포융합 바이러스(respiratory syncytial virus)); 오소믹소바이러스과(Orthomyxoviridae)(예를 들어, 인플루엔자 바이러스(influenza virus)); 부니아바이러스(Bunyaviridae)(예를 들어, 한탄 바이러스(Hantaan virus), 부니아 바이러스(bunya virus), 플레보바이러스(phlebovirus) 및 나airo 바이러스(Nairo virus)); 아래나바이러스과(출혈열 바이러스(hemorrhagic fever virus)); 레오바이러스과(Reoviridae)(예를 들어, 레오바이러스(reovirus), 오르비바이러스(orbivirus) 및 로타바이러스(rotavirus)); 보르나바이러스과(Bornaviridae); 해파드나바이러스과(Hepadnaviridae)(B형 간염 바이러스(Hepatitis B virus)); 파보바이러스과(Parvoviridae)(파보바이러스(Parvoviridae)); 파포바바이러스과

(Papovaviridae)(유두종 바이러스(papilloma virus), 폴리오마 바이러스(polyoma virus)); 아데노바이러스과(Adenoviridae)(대부분의 아데노바이러스(Adenovirus)); 헤르페스바이러스과(Herpesviridae)(단순 포진 바이러스(herpes simplex virus, HSV) 1 및 2, 수두 대상 포진 바이러스(varicella zoster virus), 사이토메갈로바이러스(cytomegalovirus, CMV), 헤르페스 바이러스(herpes virus); 폭스바이러스과(Poxviridae)(바리올라 바이러스(variola virus), 우두 바이러스(vaccinia virus), 폭스 바이러스(pox virus)); 및 이리도바이러스과(Iridoviridae)(예를 들어, 아프리카 돼지 콜레라 바이러스(African swine fever virus)); 및 미분류 바이러스들(예를 들어 델타 간염(delta hepatitis)(B형 간염의 결핍된 부수체(satellite)인 것으로 생각됨), C형 간염(Hepatitis C); 노워크(Norwalk) 및 관련 바이러스, 및 아스트로 바이러스(astro virus)의 제제)를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

청구항 47

제 46항에 있어서, 뉴클레오시드 유사체, 비-뉴클레오시드 역전사 억제제, 바이러스 프로테아제 억제제, 바이러스 단백질에 대항하는 항체, 바이러스 해체제 또는 사이토카인에서 선택된 제제를 대상에 투여하는 추가적인 단계를 포함하는 방법으로서, 상기 제제가 개별 복용 형태 또는 조성물의 일부분으로 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 48

제 27항 또는 제28항에 의한 조성물로 포화되거나 또는 조성물을 포함하는 피하 삽입 약물 방출 장치로서, 상기 조성물 내 올리고뉴클레오티드가 상기 장치로부터 방출되고 치료적 활성을 가지는 것임을 특징으로 하는 장치.

청구항 49

제 27항 또는 제 28항에 의한 조성물과 상기 약물 방출 장치를 접촉하는 단계를 포함하여 피하 삽입 약물 방출 장치에 주입 또는 충전시키는 방법.

청구항 50

- a) 제 27항 또는 제 28항에 의한 조성물; 및
 - b) 암치료에 유용한 치료제, 감염성 질환 치료에 유용한 치료제, 암 항원, 바이러스 항원 또는 알레르겐에서 선택되는 이차 제제;
- 를 포함하는 물질의 조성물로서, 상기 조성물 및 이차 제제는 개별 복용 형태이지만 서로 결합된 것임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 51

- a) 제 27항 또는 제 28항에 의한 조성물; 및
- b) 암치료에 유용한 치료제, 감염성 질환 치료에 유용한 치료제, 암 항원, 바이러스 항원 또는 알레르겐에서 선택되는 이차 제제;

를 개별 용기(vessels)에 포함하는 키트.

청구항 52

- a) 제 1항 또는 제 18항에 의한 올리고뉴클레오티드; 및
 - b) 검출 가능한 마커;
- 를 포함하는 컨쥬케이트.

청구항 53

- a) 제 52항에 의한 컨쥬케이트를 TLR7- 또는 TLR8-함유 물질과 접촉시키는 단계,
- 여기에서, 상기 컨쥬케이트의 올리고뉴클레오티드 부분이 테스트 올리고뉴클레오티드와 동일한 뉴클레오티드 서열 및 내부-뉴클레오티드 결합을 가지며; 및

b) 상기 검출 가능한 마커를 검출하는 단계;

를 포함하는 TLR7 또는 TLR8에 결합한 테스트 올리고뉴클레오티드의 검출 방법.

청구항 54

- a) 테스트 분자의 부재하에 제52항에 의한 컨쥬게이트를 TLR7- 또는 TLR8-함유 물질과 접촉시키는 단계;
- b) 상기 TLR7- 또는 TLR8-함유 물질에 결합된 검출 가능한 마커의 양을 정량화하는 단계;
- c) 테스트 분자의 존재 하에서 제52항에 의한 컨쥬게이트를 TLR7- 또는 TLR8-함유 물질과 접촉시키는 단계; 및
- d) 상기 테스트 분자의 존재가 TLR7- 또는 TLR8-함유 물질에 결합된 검출 가능한 마커의 양을 감소시켰는지 측정하는 단계;

를 포함하여 테스트 분자가 TLR7 또는 TLR8에 결합하였는지를 결정하는 방법.

명세서

기술분야

<1>

본 발명은 일반적으로 면역 분야에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명은 특히 형질세포형 수지상세포(plasmacytoid dendritic cells)와 같이 세포막에 존재하는 톨-유사 수용체 7(Toll-like receptor 7; TLR7) 및 톨-유사 수용체 8(TLR8)과 같은 자극 수용체에 의해 면역 기능을 바꾸는 조성물 및 그 방법에 관한 것이다.

배경기술

<2>

독감 및 다른 바이러스에 가장 먼저 반응하는 것 중 하나가 항바이러스 상태를 확립하고 선천적이고 적응성 있는 면역 시스템에 중개 역할을 하는 중요한 사이토카인인 I형 IFNs의 생산물이다(Le Bon et al., (2002) Curr. Opin. Immunol. 14:432). 포유동물의 선천적 면역 시스템은 톨-유사 수용체(TLR) 군에 속하는 수용체 군에 의해 침입하는 병원체의 존재를 인식한다. 모두 바이러스 병원체 결합 분자 패턴(pathogen-associated molecular patterns; PAMPs)을 인식하는데 관계하는 TLR3, TLR7, TLR8 및 TLR9와 같은 TLRs은 세포내 발현되고 이들 세포를 흡수하는 세포외 물질 사이에서 바이러스성 PAMPs의 존재에 대하여 엔도좀의 함량의 견본이 된다. 자가사멸 세포 유래 물질을 흡수하는 CD8a+ 수지상 세포(DCs)의 사례에서 이들 TLRs 센스 바이러스성 PAMPs는 감염된 세포 내에 존재하는 반면, 형질세포형 DC는 세포 물질보다 바이러스 입자들을 흡수하고 흡수 도중에 계놈 핵산 내부 바이러스 입자들을 인지한다.

<3>

이중 가닥 RNA(dsRNA) 및 고함량 CpG와 같은 바이러스 계놈의 개별적인 특성들은 비자기로서 숙주에 의해 식별될 수 있는 문자 지표로 이용할 수 있다. 감염된 세포들에 의한 I형 IFNs의 분비를 유도하는 숙주-바이러스 상호작용은 TLRs를 통한 패턴 인식을 적절하게 포함한다. 대부분의 세포 유형들이 바이러스 감염에서 IFN- α 및 IFN- β 를 생산할 수 있지만, 형질세포형 수지상 세포(pDCs)는 특히 특정 바이러스에 대한 반응에서 I형 IFNs의 매우 높은 수준을 분비하는 숙련자이다.

<4>

전염증성(pro-inflammatory) 인터류킨-1 수용체(IL-1R)군의 일원으로서, TLRs은 Toll/IL-1R 동족체(TIR) 도메인으로 불리는 그들의 세포질 도메인에서 동족체들을 공유한다(예를 들면, 공개된 PCT특허출원 제PCT/US98/08979호 및 제PCT/US01/16766호 참조; 참조에 의해 그 전체 내용이 본 명세서에 편입된다). TLRs에 의해 매개되는 세포내 시그널링 메커니즘은 중요한 역할을 하는 것으로 생각되는 MyD88 및 종양 괴사 인자 수용체 6(TRAF6)와 일반적으로 유사하다(Wesche H et al. (1997) Immunity 7:837-47; Medzhitov R et al. (1998) Mol Cell 2:253-8; Adachio et al. (1998) Immunity 9:143-50; Kawai Tetal. (1999) Immunity 11:115-22); Cao Z et al. (1996) Nature 383:443-6; Lomaga M A et al. (1999) Genes Dev 13:1015-24; 참조에 의해 그 전체 내용이 본 명세서에 편입된다). MyD88 및 TRAF6 사이에서 시그널 전달은 적어도 IRAK-1 및 IRAK-2를 포함하는 세린-트레오닌 키나아제 IL-1 수용체 결합 키나아제(IL-1 receptor-associated kinase; IRAK) 군의 일원을 포함하는 것이 알려져 있다(Muzio M et al. (1997) Science 278:1612-5).

<5>

TLRs의 활성에서, MyD88의 톤 동족체 도메인은 TLR의 TIR 도메인에 결합하고, MyD88의 사멸 도메인은 세린 키나아제 IRAK의 사멸 도메인에 결합한다. IRAK는 TRAF6와 상호작용하는데, 이는 전사인자 NF-kB의 활성을 유도하는 하나의 경로 및 활성제 단백질(activator protein-1; AP-1) 전자 인자 군의 일원인 Jun 및 Fos의 활성을 유도하는 다른 하나의 경로, 적어도 이 두 가지 경로에 대한 통로로서 활동한다. NF-kB의 활성을 MAP 3 키

나아제(MAPK) 군의 일원인 TAK-1 및 I_KB 키나아제들의 활성을 포함한다. I_KB 키나아제들은 I_KB 인산화하여 NF-_kB의 분해 및 전좌를 해까지 유도한다. Jun 및 Fos의 활성은 MAP 키나아제 키나아제들(MAPKKs) 및 MAP 키나아제 ERK, p38, 및 JNK/SAPK를 포함하는 것으로 생각된다. NF-_kB 및 AP-1 모두 여러 가지 사이토카인 및 공동자극 분자들에 대한 유전자들을 포함하는 다수의 핵심(key) 면역 반응 유전자들의 전사를 조절하는데 관계한다(예를 들면, Aderem A et al. (2000) Nature 406:782-7; Haicker H et al. (1999) EMBO J. 18:6973-82 참조).

<6> 모두가 그런 것은 아니지만 많은 TLRs에 대한 리간드들이 기술되었다. 예를 들면, 웨티도글리칸과 지질 웨타이드에 대한 반응에서 TLR2 시그널을 보내는 것이 보고되었다(Yoshimura A et al. (1999) J Immunol 163:1-5; Brightbill H D et al. (1999) Science 285:732-6; Aliprantis A O et al. (1999) Science 285:736-9; Takeuchi et al. (1999) Immunity 11:443-51; Underhill D M et al. (1999) Nature 401:811-5). TLR4는 지질다당류(lipopolysaccharide; LPS)에 대한 반응에서 시그널을 보내는 것이 보고되었다(Hoshino K et al. (1999) J Immunol 162:3749-52; Poltorak A et al. (1998) Science 282:2085-8; Medzhitov R et al. (1997) Nature 388:394-7). 세균의 플라제린이 TLR5에 대한 천연 리간드임이 보고되었다(Hayashi F et al. (2001) Nature 410:1099-1103). TLR2와 함께 TLR6가 단백다당류에 대한 반응에서 시그널을 보내는 것이 보고되었다(Ozinsky et al. (2000) PNAS 97:13766-71; Takeuchi et al. (2001) Int Immunol 13:933-40).

<7> TLR7은 게놈 바이러스 RNA의 검출을 위한 패턴 인식 수용체이다. 형질세포형 수지상 세포에서 TLR7-매개 IFN- α 유도는 바이러스 RNA, 포유동물 mRNA 및 RNA 서열과 관계없이 시험관 내에서 전사된 GFP RNA에 의해 유발될 수 있다. 다양한 서열들이 다양한 길이의 폴리U의 긴 가닥(Diebold et al. (2004) Science 303: 1529), 고비율의 GU 뉴클레오티드를 포함하는 올리고뉴클레오티드(Heil et al. (2004) Science 303: 1526; U.S. Patent application US2003/0232074), 어떤 특정 siRNA 서열(Hornung et al. (2005) Nature Med. 11:263); 및 구아닌 뉴클레오티드 유사체(Lee et al (2003) PNAS 100: 6646-6651)를 포함하는 어떤 등급에 대한 PDCs에서 TLR7을 자극하는 능력이 있는 것이 이전에 보여졌다. 이미퀴모드(imiquimod) 및 레시퀴모드(resiquimod; R848)와 같은 특정 항바이러스 이미다조퀴놀린(imidazoquinoline) 화합물이 TLR7을 활성화시킬 수 있다고 보고되었다(Hemmi H et al. (2002) Nat Immunol 3:196-200; Jurk M et al. (2002) Nat Immunol 3:499).

<8> TLR8은 단일 가닥 RNA의 검출에 대한 패턴 인식 수용체이다. 이는 인간 수지상 세포, 특히 골수의 수지상 세포에서 기능성이 나타났으나, 마우스 수지상 세포에서는 나타나지 않았다(Jurk M et al. (2002) Nat Immunol 3:499). 또한 TLR8은 CD4⁺ 조절 T-세포에서 기능성이 있다. GU-리치(rich) 리보뉴클레오티드 및 테옥시리보뉴클레오티드, 구아닌 뉴클레오티드 유사체 및, TLR7을 촉진하는 이미퀴모드 및 레시퀴모드(R848)와 같은 이미다조퀴놀린 화합물 또한 인간 TLR8을 촉진하는 것으로 보여졌다. 마우스에서 TLR8의 결손의 의의 및 TLR7 및 TLR8이 어째서 인간 면역 세포에서 다소 과다한 인식 기능들을 가지도록 나타나는지는 알려져 있지 않다.

<9> 바이러스 및 다른 감염성 제제에 대항하는 방어 및 일반적으로 암과 같은 이상의 치료 및 예방을 돋는 면역 반응을 촉진하기 위한 선천적인 면역 반응의 TLR7- 및 TLR8-매개 자극의 중요한 견지에서, 생체 내 및 시험관 내에서 서로 독립적으로 TLR7 및 TLR8을 효과적이고 확실하게 활성화하는 능력이 있는 신규 화합물에 대한 강한 요구가 당업계에 존재한다. 본 발명은 이러한 및 다른 요구들을 다룬다.

발명의 상세한 설명

<10> 하나의 관점에서, 본 발명은 분리된 단일 가닥 올리고뉴클레오티드, 이들을 포함하는 조성물 및 TLR-매개 시그널링, 특히 TLR7 수용체를 통한 시그널링을 가장 바람직하게 자극하는 방법을 제공한다. 본 명세서에 기재된 올리고뉴클레오티드, 조성물 및 방법은 TLR7-발현 세포, 예를 들면, 형질세포형 수지상 세포와 같은 수지상 세포 및 생체 내 및 시험관 내에서 T-세포를 조절하는 특정 작은 군(subset)의 활성을 증강시키는 데 유용하다. 이러한 올리고뉴클레오티드, 조성물 및 방법은 암 또는 감염성 질환, 특히 바이러스성 감염의 이상을 치료 또는 예방하기 위한 약학적 제제로서 및 방법으로서 포함하는 다수의 임상 적용에서 유용하다. 또한 본 발명의 올리고뉴클레오티드 및 조성물은 예를 들면, TLR7 또는 TLR7 발현 세포의 다른 후보 조절자를 동정하거나 또는 특성을 부여하는 분석에서 TLR7 활성에 대한 다른 화합물의 효과를 평가하는 방법에서 유용하다. 또한 상기 올리고뉴클레오티드 및 조성물은 특히 수지상 세포에 의한 IFN- α 생산 및/또는 방출을 유도하는 방법에서 유용하다.

<11> 현재 기재된 올리고뉴클레오티드는 다양한 구조 매개변수들이 TLR7 자극에 대한 가장 중요한 것을 결정하기 위하여 변경되는 본 명세서에 존재하는 연구들에 의거한다. 놀랍게도, 뉴클레오티드 우리단이 TLR7 수용체에 의한 인식 및 TLR7의 활성을 결정하는 본질적 특징이 되는 것이 발견되었다. 게다가, 하나의 구현예에서 본 발명은 10 내지 50 뉴클레오티드로 이루어지고 UUU_r-(X)_n-UUU_r 또는 UU_r-X-UU_r-X-UU_r에서 선택된 서열을 포함하는

단일 가닥 올리고뉴클레오티드를 제공하며, 여기에서 각각의 U는 독립적으로 선택된 우라실 함유 뉴클레오티드이고; 각각의 X는 임의의 뉴클레오티드에서 독립적으로 선택되며, 선택적으로 비-우라실 뉴클레오티드 또는 우라실이고; r은 1 내지 20의 정수이며, 바람직하게는 1 내지 10의 정수, 바람직하게는 1, 2, 3, 4 또는 5이고, n은 1 내지 4의 정수이며, 상기 올리고뉴클레오티드는 적어도 하나 이상의 비-우라실 함유 뉴클레오티드 또는 적어도 하나 이상의 비자연적인 결합을 포함한다.

<12> 바람직한 구현예에서, 본 발명의 뉴클레오티드(예를 들면, 비-우라실 뉴클레오티드, 유도체들)는 생물 시료, 특히 수지상 세포를 포함하는 시료(예를 들면, pDC 또는 다른 TLR7 발현 DC가 존재한다)와 접촉할 때 IL-6의 실질적인 양을 유도하는 능력을 올리고뉴클레오티드에 부여하지 않는다. 바람직하게는, 본 발명에 의한 TLR7 작용제들은 IL-6에 대립되는 IFN- α 를 유도하는 그들의 능력에 대하여 선택되고, 특히 예를 들면, 감염성 질환의 치료에 IFN- α :IL-6 유도의 최대비율을 가지는 올리고뉴클레오티드가 바람직하다.

<13> 예를 들면, 우리딘 또는 테옥시우리딘 뉴클레오티드의 전부를 이루는 정의된 길이의 짧은 올리고뉴클레오티드가 강력한 TLR7-자극 활성을 가지는 것이 발견되었다. 따라서, 하나의 바람직한 구현예에서 상기 올리고뉴클레오티드 내의 각각의 뉴클레오티드가 우라실 함유 올리고뉴클레오티드이고, 상기 올리고뉴클레오티드가 적어도 하나 이상의 비자연적인 골격 결합을 포함한다. 보다 바람직하게는, 각각의 뉴클레오티드는 우리딘이다. 또한 우리딘의 둘 또는 그 이상의 삼중체(triplets) 또는 우리딘의 다섯 또는 그 이상의 이중체를 포함하는 올리고뉴클레오티드가 특히 상기 이중체 또는 삼중체가 적은 수, 바람직하게는 하나의 간섭(intervening) 뉴클레오티드로 분리될 때 강력한 활성제가 되는 것이 발견되었다. 더욱이, 다른 바람직한 구현예에서 상기 올리고뉴클레오티드는 $(UUU_r-(X)_n)_m$ 또는 $(UUUU-(X)_n)_m$ 서열을 포함하며, 여기에서 X는 임의의 뉴클레오티드이고, m은 2보다 큰 정수이다. 선택적으로 X는 비-우라실 뉴클레오티드이며; 선택적으로 X는 우리딘이고, r은 1 내지 20의 정수이며, 바람직하게는 1 내지 10의 정수이고, 바람직하게는 1, 2, 3, 4 또는 5이다. 바람직하게는, m은 3 또는 4이다. 보다 바람직하게는, 각각의 U는 우리딘이다. 보다 더 바람직하게는, 각각의 n은 1이다. 또한 올리고뉴클레오티드 내의 5개 이상, 바람직하게는 10개 이상의 연속되는 우리딘의 직선형이 강한 TLR7-활성 능력을 부여하는데 충분한 것임이 발견되었다. 따라서, 다른 구현예에서 본 발명은 10 내지 50개의 뉴클레오티드로 이루어지고 Y(U)_pY 서열을 포함하는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드를 제공하며, 여기에서 각각의 U는 우라실 함유 뉴클레오티드로부터 독립적으로 선택되고; p는 4보다 큰 정수이다. 보다 바람직하게는 p가 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12 보다 큰 정수일 때이다. 각각의 이를 기술된 구현예에서, 각각의 U가 우리딘인 것이 바람직하다.

<14> 또한 단일 비-우리딘 뉴클레오티드에 의해 각각 분해된 다섯 개의 우리딘 이중체를 포함하는 올리고뉴클레오티드 및 열 개의 연속되는 우리딘을 가지는 유사한 크기의 올리고뉴클레오티드가 모두 우리딘 전부를 포함하는 동일한 크기의 올리고뉴클레오티드와 같이 TLR7을 자극하는 능력이 동일한 것을 발견하였다. 따라서, 다른 바람직한 구현예에 의하여 올리고뉴클레오티드는 UUXUUXUUXUUXUU 서열(서열번호 1)을 포함한다.

<15> 또한 이들 서열의 특징이 올리고뉴클레오티드 골격에서 독립적으로 유지되는 것을 발견하였다. 예를 들면, 올리고뉴클레오티드는 RNA 또는 DNA 뉴클레오티드 중 어느 것으로도 구성될 수 있다. 또한, 포스포로티오염(phosphorothioate) 결합을 포함하는 올리고뉴클레오티드는 포스포다이에스테르 결합을 포함하는 것만큼 효과적으로 작용한다. 포스포로티오염 및 다른 비자연적인 결합들은 이러한 결합을 포함하는 올리고뉴클레오티드에 증강된 안정성을 준다. 따라서, 하나 또는 그 이상의 상기 비자연적인 결합의 존재는 상술된 임의의 올리고뉴클레오티드에서 바람직하다. 바람직한 구현예에서 적어도 하나 이상의 비자연적인 결합은 포스포로티오염 결합이다.

<16> 하나의 구현예에서, 올리고뉴클레오티드 내의 모든 뉴클레오티드들은 리보뉴클레오티드이다. 다른 구현예에서, 올리고뉴클레오티드 내의 모든 뉴클레오티드들은 테옥시리보뉴클레오티드이다. 다른 구현예에서, 올리고뉴클레오티드의 길이는 10 내지 30 뉴클레오티드이다. 다른 구현예에서, 올리고뉴클레오티드의 길이는 15 내지 30 뉴클레오티드이다. 또 다른 구현예에서, 올리고뉴클레오티드의 길이는 15 내지 21 뉴클레오티드이다. 또 다른 구현예에서, 올리고뉴클레오티드의 길이는 21 내지 30 뉴클레오티드이다. 바람직한 올리고뉴클레오티드의 길이는 15 또는 21 뉴클레오티드이다. 보다 더 바람직한 구현예에서, 올리고뉴클레오티드의 길이는 21 뉴클레오티드이다. 다른 구현예에서, 올리고뉴클레오티드 내 우라실 함유 뉴클레오티드의 대부분은 적어도 하나 이상의 다른 우라실 함유 뉴클레오티드에 인접해 있다.

<17> 다른 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 SSD8(서열번호 12), SSD9(서열번호 13), SSD10(서열번호 14), SSD21(서열번호 18), SSD22(서열번호 19), SSD23(서열번호 20), SSD24(서열번호 21), SSD28(서열번호 24), SSD29(서열번호 25), 폴리Us-21(서열번호 5), 폴리Us-15(서열번호 6) 또는 폴리Us-10(서열번호 7)로 이루어진

군에서 선택된 서열을 포함한다. 다른 구현예에서, 올리고뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열은 SSD8, SSD9, SSD10, SSD21, SSD22, SSD23, SSD24, SSD28, SSD29, 폴리Us-21, 폴리dUs21(서열번호 9), 폴리Us-15 또는 폴리Us-10(서열번호 4)로 이루어진 군에서 선택된 서열로 이루어진다. 또 다른 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 폴리Uo15, 폴리Uo21(서열번호 8), 또는 폴리dUs21(서열번호 9)에서 선택된 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 상기 올리고뉴클레오티드는 적어도 하나 이상의 비-우라실 함유 염기 또는 적어도 하나 이상의 비자연적인 결합을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 적어도 하나 이상의 CG 디뉴클레오티드(dinucleotide)를 부가적으로 포함하고, 여기에서 C는 메틸화되지 않은 사이토신 함유 뉴클레오티드이며, G는 구아닌 함유 뉴클레오티드이다. 상기 CG 이중체는 UUU-(X)_n-UUU, UU-X-UU-X-UU, 또는 Y(U)_pY에서 선택된 서열 또는 이들 서열의 외부의 일부로서 존재할 수 있다. 이러한 서열은 특정 치료 및 본 발명의 올리고뉴클레오티드의 다른 용도들에서 요구되는 TLR9 수용체에 작용하는 것이 알려져 있다. 택일적인 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 특히 임의의 CG 이중체를 배제한다. 이러한 올리고뉴클레오티드는 TLR9 수용체에 작용한다. TLR9 수용체의 작용성(agonism)은 본 발명의 올리고뉴클레오티드의 특정 치료 및 다른 용도들에서 요구될 것이다.

<18>

하나의 실시예에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 표적 세포에서 자가사멸을 유도하는 TLR7 작용제이다. TLR7 및 TLR8뿐만 아니라 TLR3의 작용제인 화합물 이미퀴모드가 자가사멸을 유도하는 것이 보고되었다 (Meyer T, Nindl I, Schmook T, Ulrich C, Sterry W, Stockfleth E. Induction of apoptosis by Toll-like receptor-7 agonist in tissue cultures. Br J Dermatol. 2003 Nov;149 Suppl 66:9-14.; Schon et al. (2004) J. Invest. Dermatol. 122:1266-1276; 및 PCT국제출원공개공보 제WO/2006054177호 (Andre et al)). 하나의 구현예에서, 발명자들은 본 발명의 올리고뉴클레오티드가 하나의 바람직한 구현예에서 TLR7 폴리펩타이드를 발현하는 세포를 포함하는 표적 세포의 자가사멸을 유도하는데 사용될 수 있음을 제공한다. 상기 세포는 종양 세포가 바람직하다. 따라서, 하나의 관점에서 본 발명은 세포, 바람직하게는 TLR7 폴리펩타이드를 발현하는 종양 세포인지를 결정하는 단계, 및 상기 종양 세포가 TLR7 폴리펩타이드를 발현하는 경우, 본 발명의 올리고뉴클레오티드를 세포의 자가사멸을 유도하는 유효량으로 상기 세포에 접촉하는 단계를 제공한다. 다른 구현예에서, 본 발명은 TLR7 폴리펩타이드를 발현하는 개체 내 세포, 바람직하게는 종양 세포인지를 결정하는 단계, 및 상기 종양 세포가 TLR7 폴리펩타이드를 발현하는 경우, 본 발명의 올리고뉴클레오티드를 세포의 자가사멸을 유도하는 유효량으로 상기 개체에 투여하는 단계를 제공한다.

<19>

추가의 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 적어도 하나 이상의 CG 디뉴클레오티드를 포함하고, 여기에서 C는 메틸화되지 않은 사이토신 함유 뉴클레오티드이며, G는 구아닌 함유 뉴클레오티드이고, 상기 올리고뉴클레오티드는 UUUU, UUU-(X)_n-UUU, UU-X-UU-X-UU, 또는 Y(U)_pY를 포함하는 본 명세서에 기재된 서열을 포함하는 임의의 우리단을 포함하지 않는다. 이러한 올리고뉴클레오티드는 TLR7 수용체에 작용하지 않고 TLR9에 작용할 것이다.

<20>

또한 본 발명은 길이가 10 및 50 뉴클레오티드이고, UUU-(X)_n-UUU, UU-X-UU-X-UU, 또는 Y(U)_pY에서 선택된 서열을 포함하는 분리된 단일 가닥 올리고뉴클레오티드를 포함하는 조성물 및 그 약제학적으로 허용가능한 단체를 제공하며, 여기에서 각각의 U는 우라실 함유 뉴클레오티드에서 독립적으로 선택되고; 각각의 X는 임의의 뉴클레오티드에서 독립적으로 선택되며; 각각의 Y는 임의의 비-우라실 함유 뉴클레오티드에서 독립적으로 선택되고; n은 1 내지 4의 정수이며; p는 4 보다 큰 정수이다. 상술한 각각의 바람직한 우라실 함유 올리고뉴클레오티드는 본 발명의 조성물 내에 존재할 수 있다. 본 발명의 조성물 내에 존재할 수 있는 다른 바람직한 올리고뉴클레오티드는 폴리Uo15, 폴리Uo21, 또는 폴리dUo21에서 선택된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드 및 폴리Uo15, 폴리Uo21, 또는 폴리dUo21에서 선택된 뉴클레오티드 서열로 이루어진 올리고뉴클레오티드이다.

<21>

또한 본 발명의 올리고뉴클레오티드 조성물의 효능은 세포로 들어가는 올리고뉴클레오티드의 안정성 또는 역량을 증강시키는 이차 화합물의 능력을 가지는 올리고뉴클레오티드를 복합체화하여 증강시킬 수 있음이 발견되었다. 따라서, 바람직한 구현예에서, 상기 조성물은 PEI 또는 양이온성 리포좀과 같은 양이온성 화합물과 복합체를 이루는 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 특히 바람직한 구현예에서, 양이온성 화합물은 PEI이다.

<22>

다른 관점에서, 본 발명은 본 발명의 올리고뉴클레오티드 또는 조성물과 상기 세포를 접촉시키는 단계를 포함하는 방법으로서, 세포 내 TLR7-매개 시그널링을 증강하는 방법을 제공한다. 바람직한 구현예에서, 상기 방법은 환자에서 TLR7-매개 시그널링을 증강시키기 위하여 시험관 내에서 사용되고, 본 발명의 올리고뉴클레오티드 또는 조성물은 환자에게 투여된다. 다른 구현예에서, TLR7-매개 시그널링이 증강된 세포는 면역 세포이다. 다른 구현예에서, 상기 세포는 각각 TLR7를 발현하는 수지상 세포, B-세포 또는 단핵구이다. 다른 구현예에서, 수지상 세포는 형질세포형 수지상 세포(PDC)이다. 다른 구현예에서, TLR7 수용체의 자극이 세포의 활성에 기인

한다. 다른 구현예에서, 상기 세포는 마우스 세포이다. 다른 구현예에서, 상기 세포는 인간 세포이다. 다른 구현예에서, 상기 세포는 암 또는 감염성 질환을 앓는 환자로부터 분리된 것이다. 다른 구현예에서, 상기 세포는 자연적으로 TLR7을 발현한다. 다른 구현예에서, 상기 세포는 세포 내에서 TLR7의 발현을 유도하는 존재의 발현 벡터를 포함한다.

<23> 다른 구현예에서, 상기 방법은 상기 접촉하는 단계에 이어서 세포의 활성을 검출하는 단계를 더 포함한다. 다른 구현예에서, 상기 활성은 I형 인터페론, 예를 들면, IFN- α , IP-10, IL-8, RANTES, IFN- γ , IL-6, 및 IL-12 p40으로 이루어진 군에서 선택된 사이토카인의 세포에 의해 생산되는 수준을 조사하여 검출된다. 다른 구현예에서, 상기 조사하는 단계는 ELISA를 사용하여 수행된다. 하나의 구현예에서, 후보 TLR7 작용체를 동정 또는 특정하는 방법에서, IL-6에 대한 IFN- α 의 비율이 검출되고, IFN- α :IL-6의 최대 비율을 가지는 올리고뉴클레오티드가 후보 TLR7 작용체로서 선택된다.

<24> 다른 관점에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 임의의 올리고뉴클레오티드 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 제약 조성물을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 방법인 환자에서 면역반응을 자극하는 방법을 제공한다.

<25> 다른 구현예에서, 상기 환자는 암 또는 감염성 질환을 앓는다. 다른 구현예에서, 감염성 질환은 바이러스 감염이다. 다른 구현예에서, 상기 조성물의 투여는 환자 내에서 형질세포형 수지상 세포(PDC), B-세포 또는 단핵구의 자극에 기인한다.

<26> 다른 구현예에서, 상기 방법은 투여하는 단계에 이어 환자에서 면역 세포 활성을 검출하는 단계를 더 포함하고, 여기에서, 증가된 면역 세포 활성의 검출은 투여가 효과적임을 나타낸다. 다른 관점에서, 상기 활성은 상기 환자에서 형질세포형 수지상 세포(PDC), B-세포 또는 단핵구의 활성을 조사하여 검출된다. 다른 구현예에서, 세포의 활성은 I형 인터페론, 예를 들면, IFN- α , IP-10, IL-8, RANTES, IFN- γ , IL-6, 및 IL-12 p40으로 이루어진 군에서 선택된 사이토카인의 발현 수준을 조사하여 검출된다. 다른 구현예에서, 상기 조사하는 단계는 ELISA를 사용하여 수행된다. 바람직한 구현예에서, 본 발명의 TLR7 작용체 올리고뉴클레오티드는 IFN- α 의 발현 또는 분비를 유도하지만 IL-6의 발현은 실질적으로 유도하지 않는다.

<27> 다른 관점에서, 본 발명은 분리된 단일 가닥 올리고뉴클레오티드, 이를 포함하는 조성을 및 TLR8 수용체를 통한 TLR-매개 시그널링을 최적으로 자극하는 방법을 제공한다. 본 발명에 기재된 이들 올리고뉴클레오티드, 조성을 및 방법은 시험관 내에서 및 생체 내에서 TLR8 발현 세포, 예를 들면, 골수계 수지상 세포와 같은 인간 수지상 세포 및 조절 T-세포의 특정 부분의 활성을 증강시키는데 유용하다. 이러한 올리고뉴클레오티드, 조성을 및 방법은 암 또는 감염성 질환, 특히 바이러스 감염과 같은 이상을 치료 또는 예방하기 위한 약학 제제 및 방법을 포함하는 다수의 임상 적용에서 유용하다. 본 발명의 올리고뉴클레오티드 및 조성을은 또한 TLR8 활성에서 다른 화합물의 효과를 평가하는 방법, 예를 들면, TLR8 또는 TLR8 발현 세포의 다른 후보 조절자를 동정 또는 특정하는 분석시험에서 사용될 수 있다. 상기 올리고뉴클레오티드 및 조성을은 또한 특히 수지상 세포에 의해 IFN- α 생산 및/또는 방출을 유도하는 방법에서; 및 CD4 $^{+}$ 조절 T 세포의 면역억제 활성을 차단하는데 유용하다.

<28> TLR8 작용체 올리고뉴클레오티드는 TLR7 작용체에 대한 본 명세서에 존재하는 연구에 의거하고, G, U-리치 RNA 올리고뉴클레오티드의 TLR7 및 TLR8 작용제 활성(United States Patent Application No. 0030232074; 및 Heil, F. et al., (2004) Science 303, pp. 1526-29) 및 CD4 $^{+}$ 조절 T 세포에서 TLR8에 작용하는 다양한 포스포로티오염 결합된 데옥시구아노신 함유 올리고뉴클레오티드(Peng G., et al. (2005) Science 309, pp. 1380-1384)의 능력을 증명한 다른 경우에 의거한다. 따라서, 하나의 구현예에서, 본 발명은 11 내지 50 뉴클레오티드로 이루어지고 GGG-(X)_n-GGG, GG-X-GG-X-GG, 또는 Z(G)_pZ에서 선택된 서열을 포함하는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드를 제공하고, 여기에서 각각의 G는 구아닌 함유 뉴클레오티드에서 독립적으로 선택되며; 각각의 X는 임의의 뉴클레오티드에서 독립적으로 선택되고; 각각의 Z는 임의의 비-구아닌 뉴클레오티드에서 독립적으로 선택되며; n은 1 내지 4의 정수이고; 및 p는 4 보다 큰 정수이며, 여기에서 상기 올리고뉴클레오티드는 적어도 하나 이상의 비-구아닌 함유 뉴클레오티드 또는 적어도 하나 이상의 비자연적인 결합을 포함한다.

<29> 하나의 바람직한 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드 내의 각각의 뉴클레오티드는 구아닌 함유 올리고뉴클레오티드이고, 상기 올리고뉴클레오티드는 적어도 하나 이상의 비자연적인 골격 결합을 포함한다. 보다 바람직하게 각각의 뉴클레오티드는 구아노신 또는 데옥시구아노신이다.

- <30> 다른 바람직한 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 $(\text{GGG}-(X)_n)_m$ 에서 선택된 서열을 포함하고, 여기에서 m 은 2 보다 큰 정수이다. 바람직하게는 m 은 3 또는 4이다. 보다 바람직하게는, 각각의 G는 구아노신이다. 보다 더 바람직하게는 각각의 n은 1이다.
- <31> 다른 바람직한 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 서열 $Z(G)_pZ$ 를 포함하고; p는 9 보다 큰 정수이다. 더더욱 바람직하게는 각각의 G가 구아노신이거나 또는 각각의 G가 데옥시구아노신이다.
- <32> 다른 바람직한 구현예에 의하면, 올리고뉴클레오티드는 서열 GGXGGXGGXGGXGG를 포함한다.
- <33> 또한 하나 또는 그 이상의 비자연적인 결합의 존재가 상기 기재된 임의의 올리고뉴클레오티드에서 바람직하다. 바람직한 구현예에서, 적어도 하나 이상의 비자연적인 결합은 포스포로티오염 결합이다.
- <34> 하나의 구현예에서, 올리고뉴클레오티드 내의 모든 뉴클레오티드는 리보뉴클레오티드이다. 다른 구현예에서, 올리고뉴클레오티드 내의 모든 뉴클레오티드는 데옥시리보뉴클레오티드이다. 하나의 구현예에서, 올리고뉴클레오티드의 길이는 11 내지 30 뉴클레오티드이다. 다른 구현예에서, 올리고뉴클레오티드의 길이는 21 내지 30 뉴클레오티드이다. 또 다른 구현예에서, 올리고뉴클레오티드의 길이는 15 내지 21 뉴클레오티드이다. 다른 구현예에서, 올리고뉴클레오티드 내의 구아닌 함유 뉴클레오티드의 대부분이 적어도 하나 이상의 다른 구아닌 함유 올리고뉴클레오티드에 인접해 있다.
- <35> 또 다른 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 적어도 하나 이상의 CG 이중체를 부가적으로 포함하고, 여기에서 C는 메틸화되지 않은 사이토신 함유 뉴클레오티드이며, G는 구아닌 함유 뉴클레오티드이다. 상기 CG 이중체는 $\text{GGG}-(X)_n-\text{GGG}$, $\text{GG}-\text{X}-\text{GG}-\text{X}-\text{GG}$, 또는 $Z(G)_pZ$ 에서 선택된 서열의 일부로 또는 올리고뉴클레오티드 내의 이들 서열의 외부로 존재할 수 있다. 택일적인 구현예에서, 특히 올리고뉴클레오티드는 임의의 CG 이중체를 배제한다.
- <36> 다른 구현예에서, TLR8 작용제 올리고뉴클레오티드는 UUU-(X)_n-UUU, UU-X-UU-X-UU, 또는 Y(U)_pY에서 선택된 서열을 더 포함한다. 이러한 우라실 함유 서열들은 구아닌 함유 서열과 중복되거나 또는 올리고뉴클레오티드 내에서 완전히 분리될 수 있다. 이러한 올리고뉴클레오티드는 특정 인간 치료적 및 다른 용도에서 유용한 TLR7뿐만 아니라 TLR8에 작용할 것이다.
- <37> 또한 본 발명은 11 내지 50 뉴클레오티드의 길이를 가지고 $\text{GGG}-(X)_n-\text{GGG}$, $\text{GG}-\text{X}-\text{GG}-\text{X}-\text{GG}$, 또는 $Z(G)_pZ$ 에서 선택된 서열을 포함하는 분리된 단일 가닥 올리고뉴클레오티드를 포함하는 조성을 제공하고, 여기에서 각각의 G는 구아닌 함유 뉴클레오티드에서 독립적으로 선택되며; 각각의 X는 임의의 뉴클레오티드에서 독립적으로 선택되고; 각각의 Z는 임의의 비-구아닌 뉴클레오티드에서 독립적으로 선택되며; n은 1 내지 4의 정수이고; 및 p는 4 보다 큰 정수이다. 상술된 각각의 바람직한 구아닌 뉴클레오티드 함유 올리고뉴클레오티드는 본 발명의 조성을 내에 존재할 수 있다. 본 발명의 조성을 내에 존재할 수 있는 다른 바람직한 올리고뉴클레오티드는 포스포다이에스테르 결합을 통하여 다른 하나에 결합되는 구아닌 함유 뉴클레오티드가 전체를 이루는 올리고뉴클레오티드이다.
- <38> 바람직한 구현예에서, 상기 조성을 PEI 또는 양이온성 리포좀과 같은 양이온성 화합물과 복합체를 형성한 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 특히 바람직한 구현예에서, 양이온성 화합물을 PEI이다.
- <39> 다른 관점에서, 본 발명은 본 발명의 올리고뉴클레오티드 또는 조성을 세포를 접촉하는 단계를 포함하는 방법으로서, 세포에서 TLR8-매개 시그널링을 증강시키는 방법을 제공한다. 바람직한 구현예에서, 상기 방법은 환자의 생체 내에서 TLR8-매개 시그널링을 증강시키는데 사용되고 본 발명의 올리고뉴클레오티드 또는 조성이 환자에게 투여된다. 다른 구현예에서, TLR8-매개 시그널링이 증강된 세포는 면역 세포이다. 다른 구현예에서, 상기 세포는 수지상 세포이다. 다른 구현예에서, 상기 세포는 CD4⁺ 조절 T-세포이다. 다른 구현예에서, TLR8 수용체의 자극은 세포의 활성에 기인한다. 다른 구현예에서, TLR8 수용체의 자극은 CD4⁺ 조절 T-세포의 비활성에 기인한다. 다른 구현예에서, 상기 세포는 마우스 세포이다. 다른 구현예에서, 상기 세포는 인간 세포이다. 다른 구현예에서, 상기 세포는 암 또는 감염성 질환을 앓고 있는 환자로부터 분리된다. 다른 구현예에서, 상기 세포는 자연적으로 TLR8을 발현한다. 다른 구현예에서, 상기 세포는 세포 내에서 TLR8의 발현을 유도하는 존재의 발현 벡터를 포함한다.
- <40> 다른 구현예에서, 상기 방법은 상기 접촉하는 단계에 이어서 세포의 활성이 검출되는 단계를 더 포함한

다. 다른 구현예에서, 상기 활성은 I형 인터페론, 예를 들면, IFN- α , IP-10, IL-8, RANTES, IFN- γ , IL-6, 및 IL-12 p40로 이루어진 군에서 선택된 사이토카인의 세포에 의한 생산의 수준을 조사하여 검출된다. 다른 구현예에서, 조사하는 단계는 ELISA를 사용하여 수행된다.

<41> 다른 구현예에서, 상기 방법은 상기 접촉하는 단계에 이어서 CD4 $^{+}$ 조절 T-세포의 비활성이 검출되는 단계를 더 포함한다. 다른 구현예에서, 상기 비활성은 네이티브 CD4 $^{+}$ T 세포 증식을 억제하는 CD4 $^{+}$ 조절 T-세포의 능력을 결정하여 검출된다. 다른 구현예에서, 상기 조사하는 단계는 CD4 $^{+}$ 조절 T-세포와 함께 항온배양된 네이티브 CD4 $^{+}$ T 세포에 결합된 [3 H]티미딘을 검출하여 수행된다.

<42> 다른 관점에서, 본 발명은 환자에서 면역반응을 자극하는 반응으로서, 본 명세서에 기재된 임의의 올리고뉴클레오티드 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학 조성물을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

<43> 하나의 구현예에서, 환자는 암 또는 감염성 질환을 않는다. 다른 구현예에서 감염성 질환은 바이러스 감염이다. 다른 구현예에서, 조성물의 투여는 환자에서 수지상 세포의 자극에 기인한다.

<44> 다른 구현예에서, 상기 방법은 투여하는 단계에 이어서 면역 세포 활성이 환자에서 검출되는 단계를 더 포함하고, 여기에서 증가된 면역 세포 활성의 검출은 상기 투여가 효과적임을 나타낸다. 다른 구현예에서, 상기 활성은 상기 환자에서 수지상 세포의 활성을 조사하여 검출된다. 다른 구현예에서, 세포의 활성은 I형 인터페론, 예를 들면 IFN- α , IP-10, IL-8, RANTES, IFN- γ , IL-6, 및 IL-12 p40로 이루어진 군에서 선택된 사이토카인의 발현 수준을 조사하여 검출된다. 다른 구현예에서, 조사 단계는 ELISA를 사용하여 수행된다. 다른 구현예에서, 활성은 상기 환자에서 CD4 $^{+}$ 조절 T-세포의 활성을 조사하여 검출된다.

용어정의

<46> 다른 정의가 없다면 본 명세서에 기재된 모든 기술 및 과학 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다.

<47> 본 명세서에 사용된 "항원"이라는 용어는 T-세포 항원 수용체 또는 B-세포 항원 수용체에 의해 인지되는 능력이 있는 임의의 분자를 말한다. 상기 용어는 숙주 면역계에 의해 외부 것으로 인식되는 임의의 분자 유형을 폭넓게 포함한다. 항원들은 일반적으로 세포, 세포 추출물, 단백질, 폴리펩타이드, 웨타이드, 다당류, 다당류 컨쥬게이트, 다당류와 다른 분자들의 웨타이드 및 비웨타이드 모방체, 저분자물질, 지질, 당지질, 탄수화물, 바이러스 및 바이러스 추출물, 및 기생충 및 알레르겐과 같은 다세포 유기체를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 단백질, 폴리펩타이드 또는 웨타이드인 항원들과 관련하여, 이러한 항원들은 이 항원들을 인코딩하는 핵산 분자를 포함할 수 있다. 보다 상세하게, 항원은 암세포 및 암세포 내 또는 표면에서 발현된 분자들을 포함하는 암 항원; 완전하고 약화된 바이러스 및 바이러스 내 또는 표면에 발현된 분자들을 포함하는 바이러스 항원; 및 알레르겐을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

<48> 본 명세서에 기재된 "톨-유사 수용체"와 동등하게, "TLR"라는 용어는 병원체 결합 분자 패턴(PAMPs)을 인식하고 선천적인 면역에서 핵심 시그널링 요소로서 활동하는 적어도 11개의 높게 보존된 포유동물 패턴 인식 수용체 단백질(TLR1-TLR11) 군의 임의의 일원을 말한다. TLR 폴리펩타이드는 류신-리치 반복, 막횡단 도메인 및 TLR 시그널링에 관여하는 세포내(세포질) 도메인을 가지는 세포외(세포질외) 도메인을 포함하는 특정 구조를 공유한다. TLRs은 인간 TLRs을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

<49> 본 명세서에 언급된 "톨-유사 수용체-7" 또는 "TLR7"는 공개적으로 사용가능한 TLR7 서열, 예를 들면, 인간 TLR7에 관한 GenBank 등록번호 AF240467 또는 AAF60188; 또는 뮤린 TLR7에 관한 GenBank 등록번호 AY035889 또는 AAK62676에 대하여 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 그 이상의 서열 상동성을 공유하는 핵산 또는 폴리펩타이드를 말한다. 이러한 서열의 임의의 유도체 및 단편 또한 포함된다. 인간 TLR7에 대한 GenBank 등록번호는 AF240467(서열번호 31) 및 AAF60188(서열번호 32)이다.

<50> 본 명세서에 사용된 "TLR 시그널링"은 TLR 시그널 전달 경로라고도 말하는 톨/IL-1R(TIR) 시그널링 경로를 활성화하는 TLR 폴리펩타이드의 능력, 특히 TLR7 및/또는 TLR8의 능력을 말한다. TLR 활성의 변화는 예를 들면, NF-kB-민감성 프로모터 및 인핸서(enhancers)의 조절 하에 유전자의 발현을 측정하여 나타나는 분석에 의해 측정될 수 있다. 이러한 유전자들은 자연적으로 발생하는 유전자일 수 있거나, 또는 이들은 인위적으로 세포에 도입되는 유전자일 수 있다. 자연적으로 발생하는 유전자들은 IL-1 β , IL-6, IL-8, 인터류킨 12(IL-12 p40)

의 p40 서브유닛, 및 공동자극 분자 CD80 및 CD86을 인코딩하는 유전자들을 포함한다. 다른 유전자들은 이러한 조절 요소들의 조절 하에 확인될 수 있고 따라서 TLR 시그널링의 수준을 전하는 것을 제공할 수 있다.

<51> TLR7 또는 TLR8에 대한 본 명세서에 기재된 올리고뉴클레오티드의 효과에 관하여 본 명세서에서 사용된 "자극" 또는 "활성"이라는 용어는 세포의 표면 또는 세포질 분획 내에, 예를 들면, 엔도좀 표면에 존재하는 TLR7 또는 TLR8에 직접 또는 간접적으로 결합하고, TLR 시그널링을 유도하는 올리고뉴클레오티드의 능력을 말한다. TLR 시그널링에서 임의의 검출가능한 차이는 올리고뉴클레오티드가 TLR7 또는 TLR8 수용체를 자극 또는 활성화하는 것을 의미한다. 시그널링 차이는 표적 유전자의 발현에서, 시그널 전달 성분의 인산화에서, NK-kB와 같은 하류 요소의 세포내 위치에서, 다른 단백질 또는 세포내 구조를 가지는 특정 성분(예를 들면, IRAK)의 결합에서, 또는 키나아제(예를 들면, MAPK)와 같은 성분의 생화학적 활성에서의 변화를 포함하는 다수의 임의의 방법에서 명백해 질 수 있다. 사용된 분석에 관계없이, TLR 시그널링의 어떤 관점에서 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 1000%, 또는 그 이상의 변화는 자극 또는 활성을 나타낸다.

<52> 본 명세서에 사용된 "세포를 활성화하다"라는 용어는 세포가 IFN- α , IL-6, 및 IL-12 p40로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 그 이상의 사이토카인의 발현을 증가시키는 것을 의미한다.

<53> 본 명세서에 사용된 "유효량"이라는 용어는 기재된 성과를 완성하거나 또는 촉진하기 위하여 필요하거나 또는 충분한 임의의 양을 말한다. 임의의 경우에 유효량은 치료학적 유효량이다. 치료학적 유효량은 환자에서 원하는 생물 반응을 촉진하거나 또는 완성하기 위하여 필요한 또는 충분한 임의의 양이다. 임의의 특정한 사용에 대한 유효량은 치료되는 질병 또는 이상, 투여되는 개별 제제, 대상의 크기 또는 질병이나 이상의 심함과 같은 인자들에 의존하여 변화할 수 있다. 당업계의 통상적인 기술 중 하나는 과도한 실험을 필요로 하지 않는 개별 제제의 유효량을 경험적으로 결정할 수 있다.

<54> 본 명세서에 사용된 "면역 세포"라는 용어는 면역계에 속하는 세포를 말한다. 면역 세포는 T 림프구(T 세포), B 림프구(B 세포), 자연 살해(natural killer; NK) 세포, 과립구, 호중구, 대식세포, 단핵구, 수지상 세포, 및 앞서 말한 임의의 특정화된 형태, 예를 들면, 형질세포형 수지상 세포, 형질세포, NKT, T 헬퍼(helper), 조절 T 세포, 감마 텔타 T 세포 및 세포독성 T 림프구(CTL)를 포함한다.

<55> 본 명세서에 사용된 "암"과, 동등하게, "종양"이라는 용어는 숙주 기원의 세포를 비정상적으로 복제하여 환자에서 검출가능한 양으로 존재하는 이상을 말한다. 암은 악성종양 또는 비-악성종양 암이 될 수 있다. 암 또는 종양은 담관암(biliary tract cancer); 뇌암; 유방암; 자궁경부암; 용모상피암(choriocarcinoma); 결장암; 자궁내막암; 식도암; 위암; 상피내암(intraepithelial neoplasms); 백혈병; 임파종; 간암; 폐암(예를 들면, 소세포 폐암 및 비-소세포 폐암); 흑색종; 신경아세포종(neuroblastomas); 구강암; 난소암; 췌장암; 전립선암; 직장암; 신장암; 육종; 피부암; 고환암; 갑상선암; 뿐만 아니라 다른 암종 및 육종을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 암은 제1기 또는 전이성일 수 있다.

<56> 본 명세서에 사용된 "감염"과 동등하게, "감염성 질환"이라는 용어는 감염성 유기체 또는 제제가 환자의 혈액 내 또는 표준적으로 살균한 조직 또는 표준적으로 살균한 구획에서 검출가능한 양으로 존재하는 이상을 말한다. 감염성 유기체 및 제제는 바이러스, 세균, 곰팡이 및 기생충을 포함한다. 이 용어는 급성 및 만성 감염뿐만 아니라 패혈증을 포함한다.

<57> 본 명세서에 사용된 "선천적인 면역 반응"이라는 용어는 특정 병원체 결합 분자 패턴(PAMPs)에 대한 면역 반응의 임의의 유형을 말한다. 자연적 또는 네이티브 면역으로도 당업계에 알려진 선천적인 면역은 주로 호중구, 과립구, 단핵 식균세포, 수지상 세포, NKT 세포 및 NK 세포를 포함한다. 선천적인 면역 반응은 I형 인터페론 생산(예를 들면, IFN- α), 호중구 활성, 대식세포 활성, 식균작용, 옵소닌작용(opsonization), 보체 활성 및 이들의 임의의 조합을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

<58> 본 명세서에 사용된 "사이토카인"이라는 용어는 면역 세포의 활성 및 기능 상태에 영향을 주는 특이 수용체를 통하여 면역 세포에서 활동하는 다수의 임의의 가용성 단백질 또는 당단백을 말한다. 사이토카인은 인터류킨, 종양 피사 인자, 형질전환 성장 인자- β (transforming growth factor beta), 콜로니 자극인자(colony-stimulating factors; CSFs), 케모카인(chemokines)뿐만 아니라 다른 것들을 포함한다. 다양한 사이토카인은 선천적인 면역, 습득된 면역 둘 다에 영향을 준다. 특히 사이토카인은 IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-18, TNF- α , TGF- β , 과립구 콜로니 자극 인자(granulocyte colony-stimulating factor; G-CSF), 및 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자(granulocyte-

macrophage colony-stimulating factor; GM-CSF)를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 케모카인은 특히 IL-8, IP-10, I-TAC, RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , Gro- α , Gro- β , Gro- γ , MCP-1, MCP-2, 및 MCP-3를 포함하나 이에 한정되지 않는다.

<59>

본 명세서에서 질환, 질병 또는 이상과 관련하여 사용된 "치료", "치료요법" 또는 "치료학적"이라는 용어는 질환, 질병 또는 이상의 진전을 예방하거나 또는 느리게 하거나, 질환, 질병 또는 이상의 진행을 예방하거나, 느리게 하거나 또는 중지시키거나, 또는 질환, 질병 또는 이상을 제거하도록 계획된 방법으로 질환, 질병 또는 이상을 중재하는 의미이다. 상기 질환, 질병 또는 이상은 사실상 치료 또는 치료요법이 고려된 방법을 위하여 중지 또는 제거될 필요가 없음이 인식된다. 질환, 질병 또는 이상과 관련하여 "예방하다" 및 "예방의"라는 용어는 치료와 관련되지만, 질환, 질병 또는 이상을 진전하는 위험이 있는 개체로 사용되나, 상기 개체는 투여 시간에서 임의의 시그널 또는 정후를 보이지 않는다.

<60>

"핵산" 및 "올리고뉴클레오티드"라는 용어는 다른 하나에 결합되는 복합 뉴클레오티드의 사슬을 의미하여 서로 교환되어 사용된다. 본 명세서에 사용된 "뉴클레오티드"라는 용어는 인산염 그룹 및 교환가능한 유기 염기에 결합된 당을 포함하는 분자를 의미한다. 본 발명의 올리고뉴클레오티드 내 뉴클레오티드는 당, 인산염 및/또는 염기 부위에서 변형될 수 있다. 당 부위는 리보오스, 데옥시리보오스 또는 아라비노오스가 될 수 있으며, 보다 바람직하게는 리보오스이다. 또한 당은 이들 뉴클레오티드 상의 2' 위치(예를 들면, 2'-0-메틸 변형, 2'-0-메톡시에틸 변형, 2'-아미노 변형, 2'-데옥시 변형, 2'-플루오로와 같은 2'-할로 변형; 2'-데옥시-2'-플로우로 변형과 같은 상기의 조합)에서 다른 변형을 포함할 수 있다. 그러나, 이러한 다른 2' 당 변형은 TLR 작용 성에 대하여 중요하지 않은 뉴클레오티드로 한정된다. 따라서, 2' 당 변형은 본 발명의 올리고뉴클레오티드의 U-리치 영역 내 임의의 우라실 함유 뉴클레오티드 또는 G-리치 영역 내 임의의 구아닌 함유 뉴클레오티드에 존재하지 않는다. 보다 바람직하게는 2' 당 변형은 올리고뉴클레오티드의 U-리치 또는 G-리치 영역에서 임의의 뉴클레오티드로 존재하지 않는다. 핵산 분자들은 핵산 소스(예를 들면, 게놈의 또는 cDNA)를 보이는 것에서 획득 할 수 있으나, 바람직하게는 합성한다(예를 들면, 핵산 합성으로 생산된다).

<61>

뉴클레오티드의 염기 부분은 퓨린 또는 피리미딘이다. 퓨린 및 피리미딘은 아데닌, 사이토신, 구아닌, 티미딘 및 우라실과 같은 자연적으로 발생하는 염기; 및 이노신, 2,4-디아미노퓨린, 2,6-디아미노퓨린, 2-알킬 아데닌, 2-알킬 이노신, 2-아미노퓨린, 2-아미노-6-클로로퓨린, 2-할로퓨린, 2-티오크피리미딘(2-thiocytosine), 4-티오우라실(4-thiouracil), 5-(C1-C6)-알킬 피리미딘, 5-(C2-C6)-알케닐 피리미딘, 5-(C2-C6)-알키닐 피리미딘, 5-(하이드록시메틸)우라실, 5-아미노피리미딘, 5-할로피리미딘, 5-하이드록시피리미딘, 5-하이드록시메틸피리미딘, 6-아조피리미딘(6-azo pyrimidine), 6-메틸퓨린, 7-디아자퓨린(7-deazapurine), 7-메틸퓨린, 8-아자퓨린, 다른 8-치환된 퓨린, 디하이드로우라실(dihydrouracil), 하이포크산틴(hypoxanthine), N2-디메틸퓨린, 슈도우라실(pseudouracil), 치환된 7-디아자퓨린 및 크산틴과 같은 화학 변형된 염기를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 이 목록은 대표적인 것을 의미하고 제한되는 것으로 해석되어서는 안 된다.

<62>

본 발명의 올리고뉴클레오티드에 존재하는 뉴클레오티드의 인산염 그룹은 다른 뉴클레오티드에 결합하는 능력이 있는 부위를 포함하는 다른 인에 의해 변형될 수 있다. 이런 변형된 그룹은 포스포아미드염(phosphoramidate), 포스포로티오염(phosphorothioate) 및 포스포로디티오염(phosphorodithioate)을 포함한다. 포스포디에스테르 결합 이외의 임의의 결합에 의한 본 발명의 올리고뉴클레오티드 내 뉴클레오티드들 사이에서 생성된 결합은 "비자연적인 결합"이라고 불린다.

<63>

다른 변형은 본 발명의 올리고뉴클레오티드의 3'- 또는 5'- 말단 뉴클레오티드에 존재할 수 있고, 3'- 및/또는 5'-말단 캡, 말단 3'-5' 결합 및 5'-말단 인산염 그룹 또는 변형된 인산염 그룹을 포함할 수 있다.

<64>

5'-캡의 예는 글리세릴, 역전된 데옥시 염기 잔기(inverted deoxy abasic residue)(부위); 4',5'-메틸렌 뉴클레오티드; 1-(β -D-에리트로푸라노실) 뉴클레오티드, 4'-티오뉴클레오티드; 탄소환(carbocyclic) 뉴클레오티드; 1,5-무수헥시톨(anhydrohexitol) 뉴클레오티드; L-뉴클레오티드; α -뉴클레오티드; 변형된 염기 뉴클레오티드; 포스포로디티오염 결합; 트레오-펜토푸라노실(threo-pentofuranosyl) 뉴클레오티드; 아시클릭3',4'-세코(acyclic 3',4'-seco) 뉴클레오티드; 아시클릭 3,4-디하이드록시부틸 뉴클레오티드; 아시클릭 3,5-디하이드록시펜틸 뉴클레오티드, 3'-3'-역전된 뉴클레오티드 부위; 3'-3'-역전된 염기 부위(3'-3'-inverted abasic moiety); 3'-2'-역전된 뉴클레오티드 부위; 3'-2'-역전된 염기 부위(3'-2'-inverted abasic moiety); 1,4-부탄디올 인산염; 3'-포스포아미드염(3'-phosphoramidate); 헥실인산염(hexylphosphate); 아미노헥실 인산염; 3'-인산염; 3'-포스포로티오염; 포스포로디티오염; 또는 브릿징(bridging) 또는 비-브릿징(non-bridging) 메틸포스

포네이트(methylphosphonate) 부위를 포함하나 이에 한정되지 않는다.

<65> 3'-캡의 비제한적인 예는 글리세릴, 역전된 데옥시 염기 잔기 (부위); 4',5'-메틸렌 뉴클레오티드; 1-(β -D-에리트로푸라노실) 뉴클레오티드, 4'-티오뉴클레오티드; 탄소환 뉴클레오티드; 5'-아미노-알킬인산염; 1,3-디아미노-2-프로필인산염; 3-아미노프로필인산염; 6-아미노헥실인산염; 1,2-아미노도데실인산염; 하이드록시프로필인산염; 1,5-무수헥시톨 뉴클레오티드; L-뉴클레오티드; α -뉴클레오티드; 변형된 염기 뉴클레오티드; 포스포로디티오염; 트레오-펜토푸라노실 뉴클레오티드; 아시클릭 3',4'-세코 뉴클레오티드; 3,4-디하이드록시틸 뉴클레오티드; 3,5-디하이드록시펜틸 뉴클레오티드, 5'-5'-역전된 뉴클레오티드 부위; 5'-5'-역전된 염기 부위; 5'-포스포아미드염; 5'-포스포로티오염; 1,4-부탄디올 인산염; 5'-아미노; 브릿징 또는 비-브릿징 5'-포스포아미드염, 포스포로티오염 및/또는 포스포로디티오염, 브릿징 또는 비-브릿징메틸포스포네이트 및 5'-메르캅토 부위(보다 상세한 부분은 Beauchage and Iyer, 1993, Tetrahedron 49, 1925를 참조; 참조에 의해 본 명세서에 편입된다).

<66> 본 명세서에 사용된 "우라실 함유 뉴클레오티드"라는 용어는 우라실 및 데옥시우라실 및 변형된 우라실을 함유하는 임의의 뉴클레오티드를 포함한다. 본 명세서에 사용된 "비-우라실 함유 뉴클레오티드"라는 용어는 염기로서 우라실 또는 변형된 우라실을 포함하지 않는 임의의 뉴클레오티드를 의미한다. 본 명세서에 사용된 "비-구아닌 함유 뉴클레오티드"라는 용어는 염기로서 구아닌 또는 변형된 구아닌을 포함하지 않는 임의의 뉴클레오티드를 의미한다.

<67> 본 명세서에 사용된 코딩 서열 및 유전자 발현 서열은 그들이 유전자 발현 서열의 작용 또는 조절하에 코딩 서열의 발현 또는 전사 및/또는 번역을 배치하는 것과 같은 그런 방법으로 공유결합될 때 조작가능하게 결합된다고 말한다. 만약 5' 유전자 발현 서열에서 프로모터의 유도가 코딩서열의 전사에 기인하고, 두 개의 DNA 서열 사이의 결합 특성이 (1) 구조변경(frame-shift) 돌연변이의 도입에 기인하지 않거나, (2) 코딩 서열의 전사를 지시하는 프로모터 영역을 간섭하지 않거나, 또는 (3) 단백질로 번역되기 위해 대응하는 RNA 전사의 능력을 해손하지 않는다면, 두 개의 DNA 서열은 조작할 수 있게 결합된다고 말한다. 따라서, 유전자 발현 서열이 전사된 유전정보가 원하는 단백질 또는 폴리펩타이드로 번역되는 이러한 코딩 서열의 전사를 초래하는 능력이 있다면 유전자 발현 서열은 코딩 서열에 조작할 수 있게 결합될 것이다.

<68> 본 발명은 신규 올리고뉴클레오티드, 조성물 및 면역 반응을 자극하는 방법을 제공한다. 본 발명은 특히 형질세포형 수지상 세포와 같은 수지상 세포를 통하여 및 특히 TLR7 수용체를 통하여 TLR-매개 시그널링을 촉진하는 이들의 능력을 고려하여 다른 올리고뉴클레오티드의 체계적인 분석을 포함하는 연구들에 기초가 된다.

<69> 본 명세서에 기재된 올리고뉴클레오티드, 조성물 및 방법은 시험관 내 및 생체 내에서 면역 자극을 증강시키는 데 유용하다. 이러한 올리고뉴클레오티드, 조성물 및 방법은 암 또는 감염성 질환, 특히 바이러스 감염과 같은 이상을 치료 또는 예방하기 위한 약학 제제 및 방법으로서 포함하는 다수의 임상 적용에서 용도를 찾을 수 있을 것이다. 본 발명의 올리고뉴클레오티드 및 조성물은 또한 이러한 이상의 치료에서 사용하기 위한 약제를 제조하는 방법에서 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물은 TLR7 및 TLR8를 통하여 활동하는 것으로도 보고된 저분자량 항바이러스 화합물 R848 및 록소리빈보다 F1t3L-DC에 의한 IFN- α 유도에서 대략 30배 이상 강력하게 상승시켰다. 본 명세서에 기재된 올리고뉴클레오티드는 또한 TLR7 또는 TLR8의 조절자, 예를 들면, TLR7 또는 TLR8 시그널링, 또는 TLR7- 또는 TLR8-발현 세포의 활성화제 또는 억제제를 동정하기 위한 분석에서 사용될 수 있다.

<70> 본 발명은 뉴클레오티드 우리단 또는 디옥시우리단이 올리고뉴클레오티드가 TLR7을 활성화시킬 수 있는지 없는지를 결정하는데 필수적인 조절 요소라는 놀라운 발견에 기초한다. 따라서, 충분한 우라실-함유 올리고뉴클레오티드를 포함하는 짧은 올리고뉴클레오티드 조차도 우리단의 무명수(absolute number)에 의하여 또는 올리고뉴클레오티드 내의 분류에 의하여 효과적으로 생체내 또는 시험관내에서 TLR7 수용체를 자극하는데 사용될 수 있다.

본 발명의 올리고뉴클레오티드

<72> 일반적인 구현예에서, 본 발명은 10 내지 50 뉴클레오티드(예를 들어, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 또는 50 뉴클레오티드; 바람직하게는 길이가 10 내지 19 뉴클레오티드, 길이가 15 내지 30 뉴클레오티드, 길이가 19 내지 50 뉴클레오티드, 길이가 15 내지 21 뉴클레오티드, 또는 길이가 21 내지 30 뉴클레오티드; 보다 바람직하게는 길이가 15 또는 21 뉴클레오티드이고, 가장 바람직하게는 길이가 21 뉴클

레오티드)로 구성되고; UUU-(X)_n-UUU, 또는 UU-X-UU-X-UU, 또는 Y(U)_pY로부터 선택된 서열을 포함하는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드를 제공하며, 여기에서 각 U는 우라실-함유 뉴클레오티드로부터 독립적으로 선택되고; 각 X는 임의의 뉴클레오티드로부터 독립적으로 선택되며; n은 1~4의 정수이고; p는 4 이상의 정수이며; 상기 올리고뉴클레오티드는 적어도 하나의 비-우라실 함유 뉴클레오티드 또는 적어도 하나의 비자연적인 결합을 포함한다. 이러한 올리고뉴클레오티드는 TLR7을 자극하는데 항상된 능력을 설명할 것이다. 바람직하게 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 적어도 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개 계속 연속된 우리딘을 포함한다.

<73> 바람직한 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열 UUU-(X)_n-UUU를 포함하며, n은 1이다. 다른 바람직한 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 서열 (UUU-(X)_n)_m을 포함하며, 여기에서 n은 1~4의 정수이고, 더 바람직하게는 1이며; m은 2 이상의 정수이고, 바람직하게는 3 또는 4이다. 또 다른 바람직한 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열 Y(U)_pY를 포함하며, p는 9 이상의 정수이다. 이들 기술된 구현예의 각각에서, 각 U는 우리딘임이 바람직하다.

<74> 특히 오로지 우리딘으로 구성된 하나 또는 그 이상의 포스포로티오염 결합을 가진 21-mer 올리고뉴클레오티드(예를 들어, 폴리Us21); 적어도 10개 계속 연속된 우리딘을 포함하는 21-mer(예를 들어, SSD30); 및 각 U는 우리딘이고 각 X는 임의의 뉴클레오티드로부터 독립적으로 선택된 것인 서열 UUXUUXUUXUUXUU를 포함하는 21-mer(예를 들어, SSD28)가 바람직하다.

<75> 일반적으로, 올리고뉴클레오티드 내에 존재하는 우라실-함유 뉴클레오티드의 비율이 클수록, TLR7을 자극하는 능력이 더 크다. 따라서, 바람직한 구현예에서, 단일 가닥 올리고뉴클레오티드는 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 우라실-함유 뉴클레오티드를 포함한다. 바람직하게, 우라실-함유 뉴클레오티드의 각각은 우리딘이다. 특히 바람직한 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 오로지 우리딘으로 구성되고 적어도 하나의 비자연적인 결합을 포함한다.

<76> 다른 바람직한 올리고뉴클레오티드는 선택적으로 하나 또는 그 이상의 포스포로티오염 결합을 가지고, 길이가 10 내지 50 뉴클레오티드이며, 적어도 10개 계속 연속된 우리딘을 포함하는 올리고뉴클레오티드; 및 각 U는 우리딘이고 각 X는 G(구아닌)가 아니고, C가 아니며, 또는 G 및 C가 아닌 임의의 뉴클레오티드로부터 독립적으로 선택된 것인 서열 UUXUUXUUXUUXUU를 포함하는 올리고뉴클레오티드를 포함한다.

<77> 올리고뉴클레오티드의 구아닌 함량은 일반적으로 TLR7 활성에 중요하지 않다는 것이 또한 발견되었다. 따라서, 구현예에서, 존재하는 올리고뉴클레오티드는 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 또는 5% 이하 구아닌-함유 뉴클레오티드를 함유할 수 있다.

<78> 본 가르침에 따라서 TLR7을 자극할 수 있는 많은 올리고뉴클레오티드는 표 1에 나타내었고, 특히 폴리Uo-21, 폴리Uo-15, 폴리Uo-10, 폴리Us-21, 폴리Us-15, 폴리dUo-21, 폴리dUs-21, SSD8, SSD9, SSD10, SSD13, SSD14, SSD15, SSD21, SSD22, SSD23, SSD24, SSD28, SSD29, 및 SSD30이다. 이들 올리고뉴클레오티드 중 임의의 것, 또는 변형체(variant), 유도체(derivative), 또는 이들 올리고뉴클레오티드 중 임의의 것을 포함하는 더 긴 올리고뉴클레오티드들이 사용될 수 있다.

<79> 다른 일반적인 구현예에서, 본 발명은 11 내지 50 뉴클레오티드(예를 들어, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 또는 50 뉴클레오티드; 바람직하게는 길이가 10 내지 19 뉴클레오티드, 길이가 15 내지 30 뉴클레오티드, 길이가 19 내지 50 뉴클레오티드, 길이가 15 내지 21 뉴클레오티드, 또는 길이가 21 내지 30 뉴클레오티드; 보다 바람직하게는 길이가 15 또는 21 뉴클레오티드이고, 가장 바람직하게는 길이가 21 뉴클레오티드)로 구성되고; GGG-(X)_n-GGG, GG-X-GG-X-GG, 또는 Z(G)_pZ로부터 선택된 서열을 포함하는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드를 제공하며, 여기에서 각 G는 구아닌-함유 뉴클레오티드로부터 독립적으로 선택되고; 각 X는 임의의 뉴클레오티드로부터 독립적으로 선택되며; 각 Z는 임의의 비-구아닌 뉴클레오티드로부터 독립적으로 선택되고; n은 1~4의 정수이며; p는 4 이상의 정수이고; 상기 올리고뉴클레오티드는 적어도 하나의 비 구아닌-함유 뉴클레오티드 또는 적어도 하나의 비자연적인 결합을 포함한다. 이들 G-리치 올리고뉴클레오티드는 TLR8을 효능화시키는 항상된 능력을 나타낼 것이다.

<80> 바람직한 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열 GGG-(X)_n-GGG를 포함하며, n은 1이다. 다른 바람직한 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 서열 (GGG-(X)_n)_m을 포함하며, 여기에서 n은 1~4의 정수이고, 더 바람직하게는 1이며; m은 2 이상의 정수이고, 바람직하게는 3 또는 4이다. 또 다른 바람직한 구현예에서, 상기 올리고뉴클레

오토드는 서열 $Z(G)_pZ$ 를 포함하며, p 는 9 이상의 정수이다. 이를 기술된 구현예의 각각에서 각 G 는 구아노신임이 바람직하다.

<81> 본원에 기술된 올리고뉴클레오티드는 TLR7- 또는 TLR8- 자극 능력을 주는 것이 아닌 뉴클레오티드를 포함할 수 있는 것으로 평가될 것이다. 예를 들어, TLR7-활성 서열 (예를 들어, 표 1에 나타낸 서열) 또는 TLR-8 활성 서열은 예를 들어, 안정성을 향상, 특정한 세포 또는 세포간 구획(intracellular compartment)으로의 표적화를 명령, 다양한 단백질에 의한 결합을 향상시키기 위해 고안된 짧은 서열 등, 다른 서열 요소와 함께 올리고뉴클레오티드 내에 존재할 수 있다. 구현예에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 하나 또는 그 이상의 CpG 디뉴클레오티드를 추가적으로 포함할 수 있고, TLR7 또는 TLR8뿐만 아니라 TLR9를 효능화시킬 수 있을 것이다. 다른 구현예에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 TLR-7 및 TLR-8 활성 서열(즉, a) UUU-(X)_n-UUU, 또는 UU-X-UU-X-UU, 또는 Y(U)_pY로부터 선택된 서열; 및 b) GGG-(X)_n-GGG, GG-X-GG-X-GG, 또는 Z(G)_pZ로부터 선택된 서열, 여기에서 각 X, n 및 p는 독립적으로 선택된다)을 둘 다 포함할 것이다.

<82> 본원에 기술된 서열 특징이 실행되는 동안, 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 뉴클레오티드를 함께 결합한 골격의 관점에서 상대적으로 유연하다. 올리고뉴클레오티드의 인산염 골격을 변형시키는 것은, 예를 들어, TLR7-자극 및/또는 TLR8-자극 활성을 유지하는 반면, 시험관내에서 올리고뉴클레오티드의 안정성을 향상시킬 수 있다. 바람직한 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 적어도 하나의 포스포로티오염 결합을 포함한다. 특히 바람직한 구현예에서, 모든 결합은 포스포로티오염이다. 다른 변형된 핵산은, 그 중에서도, 알킬포스포네이트, 아릴포스포네이트, 알킬포스포로티오염, 아릴포스포로티오염, 메틸포스포네이트, 메틸포스포로티오염, 포스포로디티오에이트, p-에톡시, 모폴리노, 및 이들의 조합을 포함한다.

<83> 다른 예를 들면, 올리고뉴클레오티드는 선택적으로 특히 서열 $(G)_p$ 를 제외할 수 있고, 여기에서 p 는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이고, 선택적으로 각 G 는 디옥시리보뉴클레오티드이다. 다른 예를 들면, 올리고뉴클레오티드는 선택적으로 특히 서열 $(U)_p$ 를 제외할 수 있고, 여기에서 p 는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이고, 선택적으로 각 U 는 리보뉴클레오티드이다. 다른 예를 들면, 올리고뉴클레오티드는 선택적으로 특히 CUGU, UUGU, CUUU, UUUU, GUUGUUU, 및 GUUGU로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 제외할 수 있고, 선택적으로 여기에서 각 뉴클레오티드는 리보뉴클레오티드이다.

<84> 많은 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 다른 성분들과 함께 제형화될 수 있을 것이다. 예를 들면, 바람직한 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 PEI와 같은 양이온성 물질과 같이 복합체를 형성할 수 있다. 이러한 화합물은 분해로부터 올리고뉴클레오티드를 보호할 수 있고 또한 시험관내 또는 생체내에서 세포로의 흡수를 용이하게 할 수 있다. 다른 구현예에서, 하나 또는 그 이상의 올리고뉴클레오티드는 임상적 상황에서의 사용에 대비하여, 약제학적 담체와 함께 제형화될 것이다.

<85> 특정한 서열을 가지고 골격 및/또는 염기 변형을 포함하는 올리고뉴클레오티드의 합성은 당업계에 잘 알려져 있으며, 쉽게 실행된다. 예를 들어, 임의의 희망한 서열을 포함하고 많은 골격 또는 염기 변형 중 임의의 것을 포함하는 올리고뉴클레오티드는 자동화한 합성기를 사용하여 제조되거나 상업적인 제조업자에게서 주문될 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 핵산은 β -시아노에틸 포스포라미다이트(β -cyanoethyl phosphoramidite) 방법(Beaucage S L et al. (1981) Tetrahedron Lett 22:1859); 또는 뉴클레오시드 H-포스포네이트(nucleoside H-phosphonate) 방법(Garegg et al. (1986) Tetrahedron Lett 27:4051-4; Froehler et al. (1986) Nucl Acid Res 14:5399-407; Garegg et al. (1986) Tetrahedron Lett 27:4055-8; Gaffney et al. (1988) Tetrahedron Lett 29:2619-22)을 사용하여 새로이 합성될 수 있다.

<86> 포스포로티오염과 같은 변형된 골격은 포스포라미다이트 또는 H-포스포네이트 화학반응을 사용하는 자동화된 기술을 이용하여 합성될 수 있다. 아릴- 및 알킬-포스포네이트는 예를 들어, 미국등록특허 제4,469,863호에 기술된 바와 같이 제조될 수 있고; 알킬포스포트리에스테르(대전된(charged) 산소 부분은 미국등록특허 제5,023,243호 및 유럽특허 제092,574호에 기술된 바와 같이 알킬화된다)는 상업적으로 이용가능한 시약을 사용하여 자동화된 고체상 합성법(solid phase synthesis)으로 제조될 수 있다. 다른 DNA 골격 변형 및 치환을 위한 방법은 Uhlmann E et al. (1990) Chem Rev 90:544; Goodchild J (1990) Bioconjugate Chem 1:165에 기재되어 있다.

<87> TLR7 및 TLR8을 자극하는 올리고뉴클레오티드의 능력 분석

<88> 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 다양한 평가 중 임의의 것을 이용함으로써 pDCs 또는 다른 세포 형태에서 TLR7을 자극하는 능력이 있는 것으로 평가될 수 있다. 이러한 평가는 그 중에서도 본원에서 제공되는 서열의 유도체

를 테스트하는데 또는 올리고뉴클레오티드의 능력이 TLR7을 자극한다는 본 명세서의 설명에 따라서 고안된 신규한 서열을 평가하는데 사용될 수 있다. 이러한 평가는 예를 들어, 본원에서 기술된 올리고뉴클레오티드를 표준 또는 대조로서 사용함으로써 TLR7-발현 세포의 다른 조절자를 동정하는데에도 또한 사용될 수 있다. 시험관내에서 pDCs의 자극은 예를 들어, pDCs 또는 개체로부터 다른 TLR7-발현 세포를 평가하는데에도 또한 유용하다. 예를 들어, pDCs는 암 또는 전염병, 및 평가된 본원의 올리고뉴클레오티드를 사용함으로써 pDSs를 자극하는 능력을 가진 환자로부터 제거될 수 있다. pDCs는 이러한 평가로 자극될 수 있다는 발견은 환자는 본원의 올리고뉴클레오티드의 투여를 수반하는 치료 또는 예방 방법에 대한 적절한 후보자임을 나타낸다.

<89> 올리고뉴클레오티드는 시험관내에서 골수 수지상 세포(mDCs), 단핵구, 또는 CD4⁺, CD25⁺ T 조절(regulatory T, "Treg") 세포에서, 또는 유사한 여러 가지의 평가를 사용함으로써 다른 세포 형태에서 그것의 능력이 TLR8을 자극하는 것을 평가할 수 있다. 시험관내에서 이러한 세포 형태의 자극은 또한 본 발명의 올리고뉴클레오티드에 의해 면역자극된 환자의 능력을 평가하는데에도 유용하다.

<90> 시험관내에서 본 평가는 TLR7 또는 TLR8을 자연적으로 발현하는 분리된 세포 또는 필수적인 TLR은 정상적으로 발현 할 수 없지만 TLR7 및/또는 TLR8을 암호화하는 발현체가 도입된 세포로 실행될 수 있다.

<91> 구현예에서 세포는 자연적으로 기능적인 TLR을 발현하고 예를 들어 TLR7, B-세포, 단핵 백혈구, pDC 또는 다른 수지상 세포 형태; 및 TLR8, mDC, 단핵 백혈구 또는 Treg 세포를 나타낸다. pDC는 예를 들어, 골수, 혈액, 또는 비장으로부터 표준 방법(예를 들어, Diebold et al. (2004) Science 303:1529; Heil et al. (2004) Science 303/1526; Triantafilou et al. (2005) Eur J Immunol 35:2416; Lee et al. (2003) PNAS 100: 6646; Hornung et al. (2005) Nature Med 11:263; 미국특허공개공보 제2003/0232074호; 전체적으로 본원에 삽입된 각각의 공개내용 참조)을 이용하여 분리될 수 있다. 또한, TLR7을 발현하는 적절한 쥐 세포(murine cell)는 예를 들어 C57BL/6, Balb/c, CBA, 129 또는 예를 들어 Charles River UK로부터 입수할 수 있는 다른 쥐로부터 분리된 골수 전구체(progenitor)로부터 분리된 F1t3L-DC를 포함한다. 인간에서, TLR7을 발현하는 적절한 세포 형태는 또한 PBMC로부터 새로이 분리된 플라스마사이토이드(plasmacytoid) DC도 포함한다. 이 세포주는 다발성 골수증(IgG 람다 형태)의 진단시에 61세 노인의 말초 혈액(peripheral blood)로부터 성립되었다(Matsuoka Y et al. (1967) Proc Soc Exp Biol Med 125:1246-50, 참조에 의해 그 전체 내용에 대하여 본 명세서에 편입된다). RPMI 8226 세포는 면역촉진 핵산에 반응하여 IL-8, IL-10 및 IP-10을 포함하여 많은 케모카인 및 사이토카인을 분비 한다. RPMI 8226 세포주는 이미다조퀴놀린 화합물을 포함하여 어떤 작은 분자에 대하여 반응하는 것으로 알려져 있다. 예를 들어, 이미다조퀴놀린 화합물 R848(레시퀴모드, resiquimod)과 함께 RPMI 8226 세포의 배양은 IL-8, IL-10, 및 IP-10 생성을 유도한다. R848은 TLR7 및 TLR8을 통해 그것의 면역촉진 효과를 매개하는 것으로 최근에 보고되었다.

<92> TLR8을 분석하기 위한 골수 수지상 세포 및 단핵 백혈구는 또한 골수, 말초 혈액, 또는 태아 조직으로부터 분리될 수도 있다. Treg 세포는 전형적으로 말초 혈액으로부터 분리된다(Peng G. et al., (2005), Science 309, p.1380-84 참조). TLR8은 생쥐에서 기능이 없으므로, 오직 인간 세포주만 기능성 TLR8의 출처이다. 이러한 세포주는 TIL 102, TIL 164, 및 THP-1을 포함한다.

<93> 많은 다양한 세포주 중의 임의의 것은 본 분석을 위해서 TLR7 또는 TLR8을 발현하는데 만들어질 수 있다. 예를 들어, TLR7 또는 TLR8을 발현하지 않는 인간 293 섬유아세포(ATCC CRL-1573)가 사용될 수 있다. 이러한 세포는 TLR7 또는 TLR8을 발현하는 세포를 수확하기 위해 적절한 발현 벡터(또는 벡터들)로 일시적으로 또는 안정적으로 감염될 수 있다. 이러한 안정적으로 감염된 HEK-293 세포는 상업적으로 이용가능하다(InvivoGen, San Diego, CA). 하나의 구현예에서, 상응하는 발현 구성체의 존재에서보다는 유의한 낮은 수준임에도 불구하고 세포가 정상적으로 TLR7 또는 TLR8을 발현하는데 사용될 수 있다. 발현 구성체를 암호화하는(encoding) TLR7- 또는 TLR8-은 실시가능한 결합된 유전 암호 서열의 구성적으로 발현할 수 있도록 하는 조절 서열, 및 TLR7 또는 TLR8의 전체 또는 부분을 암호화하는 유전 암호 서열을 전형적으로 포함한 표준 분자 생물학 방법을 사용함으로써 만들어질 수 있다. 이러한 벡터는 업계에서 표준이며 예를 들어 Molecular Cloning: A Laboratory Manual(Sambrook et al.; Cold Spring Harbor Laboratory Press; 3rd edition (January 15, 2001)), 또는 Short Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al.; Current Protocols; 5 edition (October 18, 2002)), 각각 참조에 의해 그 전체 내용에 대하여 본 명세서에 편입된다.

<94> TLR7 또는 TLR8을 발현시키는데 사용될 수 있는 구조적인 포유류의 프로모터는 하기의 유전자에 대한 프로모터를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다: 하이포크산틴 포스포리보실 전이효소(hypoxanthine phosphoribosyl transferase, HPRT), 아데노신 데아미나아제(adenosine deaminase), 피루브산 키나아제(pyruvate kinase), β-

액틴 프로모터(β -actin promoter) 및 다른 구조적인 프로모터. 진핵 세포에서 구조적으로 기능하는 전형적인 바이러스의 프로모터는 예를 들어, 사이토메갈로바이러스(cytomegalovirus, CMV), 유인원 바이러스(simian virus, 예를 들어, SV40), 유두종 바이러스(papilloma virus), 아데노바이러스(adenovirus), 인체 면역 결핍 바이러스(human immunodeficiency virus, HIV), 라우스 육종 바이러스(Rous sarcoma virus), 몰로니 루케이마 바이러스(Molony leukemia virus)의 LTR(long terminal repeat) 및 다른 레트로바이러스(retrovirus)로부터의 프로모터, 및 단순 포진 바이러스(herpes simplex virus)의 티미딘 키나아제 프로모터를 포함한다. 다른 구조적인 프로모터는 당업자에게 알려져 있다.

<95> 본 발명의 유전자 발현 서열로서 유용한 프로모터는 또한 유도 프로모터(inducible promoter)도 포함한다. 유도 프로모터는 유도제의 존재하에서 발현된다. 예를 들어, 메탈로티오네인(metallothionein) 프로모터는 어떤 금속 이온의 존재하에서 전자 및 번역을 촉진시키는 것으로 유도된다. 다른 유도 프로모터는 당업자에게 알려져 있다.

<96> 인간 및 다른 종으로부터의 TLR7 및 TLR8에 대한 핵산 및 아미노산 서열은 GenBank와 같은 공공 데이터베이스로부터 이용가능하다. 예를 들어, 인간 TLR7(hTLR7)에 대한 핵산 및 아미노산 서열은 각각 GenBank 등록번호 AF240467(뉴클레오티드 135-3285에 걸친 암호화 부위) 및 AAF60188로서 알아낼 수 있다. 쥐 TLR7(mTLR7)에 대한 핵산 및 아미노산 서열은 각각 GenBank 등록번호 AY035889(뉴클레오티드 49-3201에 걸친 암호화 부위) 및 AAK62676으로서 알아낼 수 있다.

<97> 전형적으로, TLR-발현 세포는 예를 들어 96-공평판배양기와 같은 적절한 용기에 올리고뉴클레오티드 및 적절한 배지와 함께 도입될 것이다. 전형적으로, 후보 올리고뉴클레오티드는 다양한 농도에 대한 다른 반응을 얻기 위하여 다른 농도에서 동시에 테스트될 것이다. 전형적으로, 이를 농도 중의 하나는 음성대조군으로서, 즉 약품의 농도가 0에서 또는 분석 검출의 한계보다 낮은 농도에서 작용한다.

<98> 구성요소, 배양 온도, 배양 시간, 및 분석의 다른 파라미터의 부가 순서는 쉽게 결정될 수 있을 것이다. 이러한 실험은 분석의 기초적인 구성이 아닌, 단지 분석 파라미터의 최적화만을 수반한다. 배양 온도는 전형적으로 4°C 내지 40°C 사이이고, 보다 일반적으로는 37°C이다. 배양 시간은 보다 바람직하게 빠르고 높은 작업 처리량 스크리닝을 용이하게 할 수 있도록 최소화되고, 전형적으로 1분 내지 48시간 사이이다.

<99> 여러 가지 다른 시약 또한 혼합물에 포함될 수도 있다. 이들은 최적의 단백질-단백질 및/또는 단백질-핵산 결합을 용이하게 하는데 사용될 수 있는 염, 완충액, 중성 단백질(예를 들어, 알부민), 세제(detergent) 등과 같은 시약을 포함한다. 이러한 시약은 또한 반응 성분의 비특이적 또는 배경 작용(background interaction)을 감소시킬 수도 있다. 프로테아제 억제제, 뉴클레아제 억제제, 항균제와 같은 분석의 효율을 개선시키는 다른 시약, 및 기타 같은 종류의 것이 사용될 수도 있다.

<100> 배양(예를 들어 18~20시간) 후에, 세포의 활성(또는 그것의 결핍)은 많은 잠재적인 방법 중 임의의 것을 사용하여 평가될 수 있다. TLR7 및 TLR8을 검출하는 분석은 특히 Diebold et al. (2004) Science 303:1529; Heil et al. (2004) Science 303/1526; Triantafilou et al. (2005) Eur J Immunol 35:2416; Lee et al. (2003) PNAS 100:6646; Hornung et al. (2005) Nature Med 11:263; 미국특허공개공보 제US2003/0232074호; 전체적으로 본원에 삽입된 각각의 공개내용에 기술되어 있다.

<101> 바람직한 구현예에서, TLR7- 또는 TLR8-반응 사이토카인의 수준은 올리고뉴클레오티드와 함께 세포를 배양한 후 배지에서 측정된다. 예를 들어, 상층액은 배양 다음에 분리될 수 있고 IFN- α , IL-6, 또는 IL-12 p40(또는 TLR7 또는 TLR8 시그널링의 결과로서 유도된다고 알려진 다른 적절한 사이토카인)과 같은 사이토카인의 수준은 예를 들어 샌드위치 ELISA를 사용함으로써 결정될 수 있다.

<102> TLR7 및 TLR8 자극은 예를 들어, MyD88, TRAF, IRAK4, p38, 및/또는 ERK(Hcker H et al. (1999) EMBO J. 18:6973-82)를 수반한, TLR/IL-1R 시그널 변환 경로에 대부분 기초한, 여러 가지 가능한 해독(readout) 시스템 중 임의의 것을 사용함으로써 평가될 수 있다. 이를 경로는 KB 키나아제 복합체 및 c-Jun N-말단 키나아제를 포함하는 키나아제를 활성화시킨다. TLR7 및 TLR8 활성화는 TLR 시그널링의 임의의 면을 테스트함으로써 평가될 수 있다. 예를 들어, TLR 시그널링의 활성화는 단백질-단백질 조합(예를 들어, MyD88 및/또는 TRAF6와 IRAK), 단백질 활성(예를 들어, TAK-1과 같은 단백질의 키나아제 활성), 단백질의 세포내 위치(예를 들어 NK- κ B의 핵으로의 이동), 및 유전자 발현(예를 들어, NK- κ B 민감 유전자의 발현에서)에서 변화 및 사이토카인 생산(예를 들어 IFN- α , IL-6 및/또는 IL-12 p40의 생산 및 분비)을 일으킨다. 임의의 이러한 변화는 검출될 수 있고 TLR7 또는 TLR8 활성을 검출하는데 사용될 수 있다. 특히 바람직한 구현예에서, TLR7 자극은 18~20시간의 배양 후 상

총액을 수집하고 IFN- α , IL-6 및/또는 IL-12 p40의 수준을 샌드위치 ELISA로 측정함으로써 검출된다. 다른 바람직한 구현예에서, TLR8 자극은 18~20시간의 배양 후 상층액을 수집하고 IL-6, TNF- α 및/또는 IL-12 p40의 수준을 샌드위치 ELISA로 측정함으로써 검출된다.

<103>

다른 구현예에서, 세포는 TLR7 또는 TLR8 자극 및 시그널 변환 경로의 결과로서 생기는 활성화에서 검출될 수 있는 세포 생산물의 발현의 원인이 되는 리포터 구조체를 포함하는데 사용된다. 특히 분석에 유용한 리포터 유전자 및 리포터 유전자 구조체는 예를 들어 NF-kB에 민감한 프로모터에 유효하게 결합된 리포터 유전자를 포함한다. 이러한 프로모터의 예는 IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 p40, IP-10, CD80, CD86, 및 TNF- α 에 대한 프로모터를 포함하며, 이에 한정되는 것은 아니다. TLR-민감 프로모터에 유효하게 결합된 리포터 유전자는 효소(예를 들어, 루시페라아제, 알칼리 포스파타아제, β -갈락토시다아제, 크롤람페니콜 아세틸트랜스퍼라아제(CAT), 등), 생물발광 마커(예를 들어, 초록 형광 단백질(GFP, 예를 들어, 미국등록특허 제5,491,084호), 파랑 형광 단백질(BFP, 예를 들어, 미국등록특허 제6,486,382호), 등), 표면 발현 분자(surface-expressed molecule, 예를 들어, CD25, CD80, CD86), 및 분비 분자(예를 들어, IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 p40, TNF- α)를 포함하며, 이에 한정되는 것은 아니다. 예를 들어 Hcker H et al. (1999) EMBO J. 18:6973-82; Murphy TL et al. (1995) Mol Cell Biol 15:5258-67, 참조에 의해 그 전체 내용에 대하여 본 명세서에 편입된다. TLR 시그널링 리포터 플라스미드는 상업적으로 이용가능하다(InvivoGen, San Diego, CA).

<104>

효소 활성 해독에 의지하는 분석에서, 기질은 분석의 부분으로서 제공될 수 있고, 검출은 화학 발광, 형광, 발색 현상, 방사선 마커의 결합, 약물 내성, 광학 밀도, 또는 효소 활성의 다른 마커의 측정을 수반할 수 있다. 분자의 표면 발현에 의지하는 분석 동안, 검출은 유동 세포 분석법(flow cytometry, FACS) 또는 기능적인 분석을 이용함으로써 수행될 수 있다. 분비되는 분자는 효소 결합 면역 흡수 분석법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 또는 생물학적 분석(bioassay)을 이용함으로써 분석될 수 있다. 이들 및 다른 적절한 해독 시스템의 많은 것이 당업계에 잘 알려져 있으며, 상업적으로 이용가능하다. 바람직하게, 사용된 어떤 것이라도, 리포터 시스템은 정량화할 수 있다.

<105>

만약 올리고뉴클레오티드가 TLR7- 또는 TLR8-매개 활성을 평가하는데 사용되는 마커에서 검출될 수 있는 변화를 유도하면, 자극하는 것으로 말해진다. 예를 들어, 올리고뉴클레오티드는 마커 발현, 활성, 인산화반응, 분비 등에서 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400%, 500%, 1000%, 또는 그 이상의 변화를 일으킬 수 있다.

<106>

본원에 기재된 올리고뉴클레오티드는 TLR7 및/또는 TLR7-발현 세포의 신규한 조절자(modulator)을 동정하는 이러한 분석에서 사용될 수 있다. 일반적으로, 가려내는 방법은 TLR7을 통한 시그널링을 억제 또는 향상시키는 화합물에 대한 분석을 수반한다. 상기 방법은 TLR7, TLR에 대한 적절한 참고 리간드(예를 들어, 폴리Us-21과 같은 본원에 기술된 올리고뉴클레오티드 중의 하나), 및 후보 조절 화합물을 사용한다. 전형적으로, TLR7은 참고 올리고뉴클레오티드와 접촉되고 TLR-매개 참고 시그널이 측정된다. 선택된 TLR은 또한 후보 화합물과 접촉되고 TLR-매개 테스트 시그널은 측정된다. 그 다음 테스트 시그널 및 참고 시그널을 비교한다. 그 다음에 유리한 후보 화합물이 분석에서 참고 화합물로서 사용될 수 있다. 이러한 방법은 후보 서열 및 올리고뉴클레오티드 변형의 자동화한, 높은 처리량 스크리닝에 적응할 수 있다. 이러한 높은 처리량 스크리닝 방법의 예는 미국등록특허 제6,103,479호; 제6,051,380호; 제6,051,373호; 제5,998,152호; 제5,876,946호; 제5,708,158호; 제5,443,791호; 제5,429,921호; 제5,143,854호에 기재되어 있다. 동일한 방식으로, 본 발명의 TLR-8 활성 올리고뉴클레오티드는 TLR8 및/또는 TLR8-발현 세포의 조절자를 동정하는데 사용될 수 있다.

<107>

조성물

<108>

본 발명은 하나 또는 그 이상의 본 발명의 올리고뉴클레오티드 및 수용가능한 담체를 포함하는 조성물을 제공한다. 바람직하게, 본 발명의 조성물은 a) i) 10 내지 50 사이의 뉴클레오티드로 이루어지고, UUU-(X)_n-UUU, 또는 UU-X-UU-X-UU, 또는 Y(U)pY로부터 선택된 서열을 포함하는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드, 여기에서 각 U는 우라실-함유 뉴클레오티드로부터 독립적으로 선택되고; 각 X는 임의의 뉴클레오티드로부터 독립적으로 선택되며; n은 1~4의 정수이고; p는 4 이상의 정수이며; 또는 ii) 11 내지 50 사이의 뉴클레오티드로 이루어지고, GGG-(X)_n-GGG, GG-X-GG-X-GG, 또는 Z(G)pZ로부터 선택된 서열을 포함하는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드, 여기에서 각 G는 구아닌-함유 뉴클레오티드로부터 독립적으로 선택되고; 각 X는 임의의 뉴클레오티드로부터 독립적으로 선택되며; 각 Z는 임의의 비 구아닌(non-nucleotide) 뉴클레오티드로부터 독립적으로 선택되고; n은 1~4의 정수이며; p는 4 이상의 정수; 및 b) 약제학적으로 허용가능한 담체("약제학적 구성")의 효과적인 양을 포함한다.

- <109> 약제학적으로 허용가능한 용액은 전형적으로 염, 완충제, 방부제, 양립가능한 담체, 보조제(adjuvant), 및 선택적으로 다른 치료 성분의 약제학적으로 허용가능한 농도를 함유한다. 본 발명에서 유용한 약학 조성물에 사용될 수 있는 약제학적으로 허용가능한 담체, 보조제 및 부형제(vehicle)는 이온 교환체, 알루미나, 알루미늄 스테아레이트, 리세틴, 인간 혈청 알부민과 같은 혈청 단백질, 인삼염과 같은 완충 물질, 글리신, 소르브산, 소르브산 칼륨, 포화 식물성 지방산의 부분 글리세리드 혼합물, 물, 프로타민 세페이트와 같은 염 또는 전해물, 인산수소 이나트륨, 인산수소칼륨, 염화나트륨, 아연염, 콜로이드 실리카, 마그네슘 트리실리케이트, 폴리비닐 피롤리돈, 셀룰로오스 기초 물질(cellulose-based substance), 폴리에틸렌 글리콜, 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨, 폴리아크릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌-폴리옥시프로필렌-블록 폴리머, 폴리에틸렌 글리콜 및 양모지를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- <110> 치료에서 사용을 위해, 화합물의 효과적인 양을 예를 들어, pDCs, 단핵 백혈구, mDCs, Treg 세포와 같은 적절한 목표 세포에 의해 화합물이 흡수되도록 하는 방식에 의해 개체에 투여할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물을 "투여"하는 것은 숙련공에게 알려진 임의의 방법에 의해 수행될 수 있다. 본 발명의 조성물은 흡입 스프레이, 국부적으로, 경피로, 직장으로, 코로, 구강으로, 혀 밑으로(sublingually), 질로 또는 이식된 저장소를 통함으로써 경구적으로, 비경구적으로 투여될 수 있다. 본원에서 사용된 용어 "비경구적"은 피하, 정맥주사내, 근육내, 관절내, 활액내(intra-synovial), 흉골내, 경막내, 간내, 병변내 및 두개내(intracranial) 주사 또는 주입 기술을 포함한다. 바람직하게, 조성물은 경구로, 복강내 또는 정맥내로 투여된다. 주사는 볼러스(bolus) 또는 연속 주입으로 될 수 있다. 치료제를 제조 및 투여하는 다양한 방법은 당업계에 잘 알려져 있고 예를 들어, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 제15판, 참조에 의해 그 전체 내용에 대하여 본 명세서에 편입된다.
- <111> 약학 조성물은 바람직하게 1회 복용 단위(dose unit)로 제조되고 투여된다. 이러한 제조 방법은 하나 또는 그 이상의 보조 성분을 구성하는 담체와 같은 성분이 투여되도록 분자와 함께 일어나는 단계를 포함한다. 일반적으로, 조성물은 활성 성분을 액체 담체, 리포좀 또는 정교하게 분리된 고체 담체들 또는 두 가지 모두와 함께 균일하고 직접적으로 일어나도록 함으로써 제조되며, 그 다음 필요하다면 생성물을 형성한다.
- <112> 액체 1회 복용 단위는 주사 또는 다른 비경구적인 투여를 위해 유리병(vial) 또는 앰플(ampoule)이다. 고체 1회 복용 단위는 정제, 캡슐, 분말, 및 좌약이다. 화합물의 활성, 투여 방법, 투여 목적(즉, 예방 또는 치료), 질환의 성질 및 가혹함, 환자의 나이 및 체중에 따른 환자의 치료를 위해, 다른 복용량이 필요할 것이다. 주어진 복용량의 투여는 개체별 1회 복용 단위 또는 그 밖의 여러 가지 더 작은 1회 복용 단위의 형태에서 단일 투여에 의해 둘 다 실행될 수 있다. 일, 주, 또는 달 각각의 특정 간격에서 복용량의 반복 및 복합적인 투여는 또한 본 발명에 의해 예상된다. 본 발명의 방법에서 사용된 조성물에서 함유된 화합물의 농도는 약 1nM에서 약 100 μM까지 범위일 수 있다. 효과적인 복용량은 약 10피코몰/kg에서 약 100마이크로몰/kg까지 범위인 것으로 믿어진다.
- <113> 경구 투여에 적절한 본 발명의 조성물은 활성 성분의 미리 결정된 양을 각각 포함하는 캡슐, 봉지(sachet) 또는 정제와 같은 분리된 단위로서; 가루 또는 과립제로서; 수성 액체 또는 비수성 액체에서 용액 또는 혼탁액으로서; 또는 수중유(oil-in-water) 액체 에멀션 또는 유중수(water-in-oil) 액체 에멀션으로서 제공되거나, 또는 리포좀 내에 및 볼러스로서 등으로 포장될 수 있다. 부드러운 젤라틴 캡슐은 상기 혼탁액을 포함하는데 유용할 수 있으며, 화합물 흡수율을 유익하게 증가시킬 수 있다.
- <114> 정제는 압축 또는 소조(molding)에 의해, 선택적으로 하나 또는 그 이상의 보조 성분과 함께 만들어질 수 있다. 압축된 정제는 적절한 기계에서 선택적으로 바인더, 윤활제, 활성 없는 희석제, 방부제, 표면 활성제 또는 분산제와 혼합함으로써 가루 또는 과립제와 같은 자유 흐름(free-flowing) 형태에서 활성 성분을 압축함으로써 만들어질 수 있다. 소조된 정제는 적절한 기계에서 활성 없는 액체 희석제로 적시어진 가루화된 화합물의 혼합물을 소조함으로써 만들어질 수 있다. 정제는 선택적으로 코팅되거나 또는 선이 그어질 수 있고 거기에 활성 성분의 느린 또는 조절된 방출을 제공하기 위하여 제형화될 수 있다. 본원의 약제학적 유효 성분 및 당업계에 알려진 다른 화합물과 같은, 약제학적 유효 성분의 이러한 느린 또는 조절된 방출 조성물을 제형화하는 방법은 당업계에 알려져 있고, 미국등록특허 제4,369,172; 및 4,842,866호 및 거기에서 인용된 참고문헌을 포함하지만, 이에 한정되지 않는 여러 가지 발행된 미국특허에 기재되어 있다. 코팅은 장으로 화합물을 운반하는데 사용될 수 있다(예를 들어, 미국등록특허 제6,638,554호, 제5,217, 720호, 제6,569,457호, 제6,461,631호, 제6,528,080호, 제6,800,663호, 및 참조에 의해 그 전체 내용에 대하여 본 명세서에 편입된다).
- <115> 경구 사용을 위한 정제의 경우에, 일반적으로 사용된 담체는 락토오스 및 옥수수녹말을 포함한다. 스테아린산 마그네슘과 같은 윤활제는 또한 전형적으로 부가된다. 캡슐 형태에서 경구 투여를 위해 유용한 희석제는 락토오스 및 건조된 옥수수녹말을 포함한다. 수성 혼탁액이 경구로 투여될 때, 활성 성분은 유효제 및 혼탁제와 결합

된다. 원한다면, 어떤 감미제(sweetening agent) 및/또는 착향료(flavoring agent) 및/또는 착색제(coloring agent)가 부가될 수 있다. 라우릴 황산 나트륨과 같은 계면활성제가 용해 및 흡수를 향상시키는 데 유용할 것이다.

<116> 경구 투여에 유용한 조성물은 맛을 낸 주성분에 보통 수크로오스 및 아카시아 또는 트래거캔스 고무 성분을 포함하는 마름모꼴 정제; 및 불활성 주성분에 젤라틴 및 글리세린, 또는 수크로오스 및 아카시아와 같은 활성 성분을 포함하는 원뿔형의 정제를 포함한다.

<117> 비경구적 투여에 적절한 조성물은 항산화제, 완충액, 세균 발육 저지제 및 의도된 수령자의 혈액과 등장이 되는 제형이 되는 용질을 포함할 수 있는 수성 및 비수성 무균 주사 용액; 및 혼탁제 및 농유제(thickening agent)를 포함할 수 있는 수성 및 비수성 무균 혼탁액을 포함한다. 제형화는 단위-복용 또는 복수-복용 용기, 예를 들어, 밀봉된 앰플 및 유리병(vial)으로 제공될 수 있고, 사용하기 직전에, 예를 들어, 주사에 사용되는 물과 같은 무균 액체 담체의 부가만을 요구하는 동결건조된(감압하에 동결건조된) 상태로 저장될 수 있다. 즉석 주사 용액 및 혼탁물질은 무균 가루, 과립제 및 정제로부터 제조될 수 있다.

<118> 이러한 주사 용액은 예를 들어, 무균 주사 가능한 수성 또는 유성의 혼탁액 상태일 수 있다. 이러한 혼탁액은 적절한 분산제 또는 침윤제(예를 들어, Tween 80) 및 혼탁제를 사용하는 당업계에 알려진 기술에 따라서 제형화될 수 있다. 무균 주사 가능한 제조는 또한, 예를 들어 1,3-부탄디올에서의 용액과 같은, 비독성 비경구적으로 수용가능한 회석제 또는 용매에서 무균 주사 가능한 용액 또는 혼탁액일 수도 있다. 사용될 수 있는 수용가능한 부형제 및 용매 중에는 만니톨, 물, 립거액 및 등장 염화나트륨 용액이 있다. 게다가, 무균의 비휘발성유는 용매 또는 혼탁 매개물로서 전형적으로 사용된다. 이러한 목적을 위해 자극성이 적은 비휘발성유(fixed oil)는 합성 모노- 또는 디글리세리드를 포함하여 사용될 수 있다. 올리브유 또는 피마자유와 같은 자연적인 약제학적으로 허용가능한 오일과 같이 올레산 및 그것의 글리세리드 유도체와 같은 지방산은 주사 가능 물질의 제조, 특히 폴리옥시에틸화된 변형에 유용하다. 이들 오일 용액 또는 혼탁액은 또한 Ph. Helv 또는 유사 알코올과 같은 긴 사슬 알코올 회석제 또는 분산제를 포함할 수도 있다.

<119> 본 발명의 약학 조성물은 직장 또는 질의 투여를 위한 좌약의 형태로 투여될 수 있다. 이를 조성물은 본 발명의 화합물을 실온에서 고체이지만 직장 온도에서는 액체인 적절한 비염증 부형제와 혼합함으로써 제조될 수 있고 따라서 직장내에서 녹아 유효성분을 방출할 것이다. 이러한 물질은 카카오 기름(cacao butter), 밀랍(beeswax) 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

<120> 본 발명의 약학 조성물의 국부적인 투여는 원하는 치료가 국부적인 적용으로 쉽게 접근할 수 있는 부위 또는 기관을 수반할 때 특히 유용하다. 피부에 대하여 국부적으로 적용하기 위해서, 약학 조성물은 담체내에서 혼탁되거나 용해된 활성 성분을 함유하는 적정한 연고로 제형화될 것이다. 본 발명의 화합물의 국부적인 투여를 위한 담체는 광유(mineral oil), 액체 석유, 백색 석유(white petroleum), 프로필렌 글리콜, 폴리옥시에틸렌 폴리옥시프로필렌 화합물, 유화 왁스 및 물을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 그 대신에, 약학 조성물은 담체내에서 혼탁되거나 용해된 활성 성분을 함유하는 적절한 로션 또는 크림으로 제형화될 수 있다. 적절한 담체는 광유, 소르비탄 모노스테아레이트(sorbitan monostearate), 폴리소르베이트 60, 세틸 에스테르 왁스, 세테아릴 알코올, 2-옥틸도데카놀, 벤질 알코올 및 물을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약학 조성물은 또한 직장 좌약 제형에 의해 또는 적절한 관장 제형에서 하위 장관(lower intestinal tract)에 국부적으로 적용될 수도 있다. 국부적으로 경피 패치 및 전리 요법의 투여 또한 본 발명에 포함된다.

<121> 본 발명의 약학 조성물은 비강 분무(nasal aerosol) 또는 흡입에 의해 투여될 수 있다. 이러한 조성물은 약제학적 제형 업계에서 잘 알려진 기술에 따라서 제조될 수 있고 벤질 알코올 또는 다른 적절한 방부제, 생물학적 이용도를 향상시키는 흡수 프로모터, 탄화 플루오르, 및/또는 업계에 알려진 다른 가용화제 또는 분산제를 사용함으로써, 식염수에서 용액으로서 제조될 수 있다. 본 발명의 방법에서 사용될 수 있는 에어로졸 제형은 또한 미국등록특허 제6,811,767호, 참고문헌에 의해 본원에 삽입된 공개내용에 기재된 것을 포함할 수도 있다.

<122> 조성물은 그 자체로(순수한) 또는 약제학적으로 허용가능한 염의 형태로 투여될 수 있다. 약에서 사용될 때 염은 약제학적 수용가능하지만, 비약제학적으로 허용가능한 염은 그것의 약제학적으로 허용가능한 염을 제조하는데 편리하게 사용될 수 있다. 이러한 염은 하기의 산으로부터 제조된 것들을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다: 염산, 브롬화수소산, 황산, 질산, 인산, 말레산, 아세트산, 살리실산, p-톨루엔 술폰산, 타르타르산, 시트르산, 메탄 술폰산, 포름산, 말론산, 숙신산, 나프탈렌-2-술폰산, 및 벤젠 술폰산. 또한, 이러한 염은 예를 들어, 카르복시산 그룹의 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염과 같은 일칼리 금속 또는 일칼리 토금속으로서 제조될 수 있다.

- <123> 적절한 완충제는 하기를 포함한다: 아세트산 및 염(1-2% w/v); 시트르산 및 염(1-3% w/v); 봉산 및 염(0.5-2.5% w/v); 인산 및 염(0.8-2% w/v). 적절한 방부제는 염화벤잘코늄(0.003-0.03% w/v); 클로로부탄올(0.3-0.9% w/v); 파라벤(0.01-0.25% w/v) 및 티메로살(0.004-0.02% w/v).
- <124> 다른 전달 시스템은 시간지연방출(time-release), 지연방출(delayed release) 또는 지속방출(sustained release) 전달 시스템(본원에서 종체적으로 "주입가능한 약물 방출 장치"로서 언급되어 있음)을 포함할 수 있다. 이러한 시스템은 환자와 내과의사에 대한 편의를 증가시킴으로써, 화합물의 반복된 투여를 피할 수 있다. 방출 전달 시스템의 많은 형태가 업계에 통상의 지식을 가진 자에게 이용가능하고 알려져 있다. 그것은, 예를 들어 폴리(락티드-글리콜리드), 코폴리옥살레이트, 폴리카프로락톤, 폴리에스테르아미드, 폴리오르토에스테르, 폴리히드록시부티르산, 및 폴리무수물(polyanhydride)과 같은 폴리머 주성분 시스템을 포함한다. 약물을 포함하는 위에서 언급한 폴리머의 마이크로캡슐은 예를 들어 미국등록특허 제5,075,109호에 기재되어 있다. 전달 시스템은 또한 비폴리머 시스템, 즉 콜레스테롤, 콜레스테롤 에스테르 및 지방산과 같은 스테롤 또는 모노-디-및 트리-글리세리드와 같은 중성 지방을 포함하는 리피드; 히드로겔 방출 시스템; 실라스틱(silastic) 시스템; 펩티드 기초 시스템; 왁스 코팅; 전통적인 바인더 및 첨가제를 사용하는 압축된 정제; 부분적으로 융해된 이식(implant); 및 등등;을 포함한다. 구체적인 예는 하기를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다: (a) 본 발명의 약제(agent)가 예를 들어 미국등록특허 제4,452,775호, 제4,675,189호, 및 제5,736,152호에 기재된 것과 같은 매트릭스내의 형태에서 함유되는 것에서 부식 시스템, 및 (b) 예를 들어 미국등록특허 제3,854,480호, 제5,133,974호 및 제5,407,686호에 기재된 것과 같은 폴리머로부터 조절된 속도에서 활성 성분이 침투하는 핵산시스템. 게다가, 펌프-기초 하드웨어 전달 시스템이 사용될 수 있고, 이중 어떤 것은 이식에 적합하다.
- <125> 그러므로, 다른 구현예에 따라서, 본 발명은 TLR 작용제 올리고뉴클레오티드와 함께 상기 약물 방출 장치를 접촉하는 단계를 포함하는 주입할 수 있는 약물 방출 장치에 함침시키거나 충전시키는 방법 또는 본 발명의 TLR 작용제 올리고뉴클레오티드를 포함하는 조성물을 제공한다.
- <126> 다른 구현예에 따라서, 본 발명은 TLR 작용제 올리고뉴클레오티드와 함께 또는 함유함으로써 함침되는 주입할 수 있는 약물 방출 장치 또는 본 발명의 TLR 작용제 올리고뉴클레오티드를 포함하는 조성물을 제공하고, 상기 TLR 작용제는 상기 장치로부터 방출되고 치료상으로 활성이 있다.
- <127> 본 올리고뉴클레오티드는 또한 생체내에서 안정성을 높이기 위해 또는 다른 목적으로 세포에 도달하거나 들어가는 능력을 향상시키기 위하여 고안된 다른 화합물과 함께 투여(또는 시험관내에서 사용)될 수 있다. 바람직한 상기 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 폴리에틸렌이민(PEI)과 같은 양이온 화합물과 함께 복합체를 형성하고, 핵산을 분해로부터 보호하고 세포내로의 흡수를 용이하게 함으로써, 핵산에 결합하고 핵산을 압축시킨다(예를 들어, Boussif et al. (1995) PNAS 92: 7297; Godbey (1999) PNAS 96: 5177 참조). 이것은 PEI가 바람직하지만, 다른 압축제(compactant agent) 또는 양이온 물질도 또한 사용될 수 있는 것으로 이해될 수 있다.
- <128> 압축제는 또한 단독으로, 또는 생물학적 또는 화학적/물리적 벡터와 조합하여 사용될 수도 있다. 본원에서 사용된 "압축제"는 핵산의 음전하를 중화시키고 그것에 의하여 미세한 과립제로 핵산을 압축시키는 히스톤과 같은 약품을 가리킨다. 핵산의 압축은 목표 세포에 의한 핵산의 흡수를 용이하게 한다. 압축제는 단독으로 사용될 수 있고 즉, 세포에 의해 더 효율적으로 흡수되는 형태에서, 보다 바람직하게는, 하나 또는 그 이상의 상기한 벡터와 조합하여 핵산을 전달하는데 사용될 수 있다.
- <129> 다른 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 리포좀과 복합체를 형성한다. 리포좀은 무엇보다도 단클론 항체, 당, 당지질, 또는 단백질과 같은 특정 리간드와 리포좀을 결합함으로써 특정 세포로 목표가 정해질 수 있다는 점에서 유용하다. 면역 세포로 리포좀을 목표로 정하는데 유용할 수 있는 리간드는 예를 들어 면역 세포의 세포 표면 마커와 작용하는, 항체와 같은, 면역 세포 특정 수용체 및 분자와 서로 작용하는 분자의 원래대로의 또는 단편을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 리간드는 당업자에게 잘 알려진 결합 분석에 의해 쉽게 동정될 수 있다.
- <130> 리포좀은 두 가지 큰 분류로 나뉜다. 양이온 리포좀은 안정한 복합체를 형성하기 위해 음전기로 대전된 ssRNA 분자와 작용하는 양전기로 대전된 리포즘이다. 양전기로 대전된 ssRNA/리포좀 복합체는 음전기로 대전된 세포 표면에 결합하고 엔도좀내에 수용된다. 엔도좀내는 산성 pH이기 때문에, 리포좀은 파열되고, 세포 세포질내로 내용물을 방출한다(Wang et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1987, 147, 980-985).
- <131> pH-민감 또는 음전기로 대전된 리포좀은 ssRNA와 복합체를 형성하기보다 ssRNA를 잡는다. ssRNA와 지질 모두 유

사하게 대전되어 있으므로, 복합체 형성보다 반발 작용이 일어난다. 그래서 ssRNA는 리포좀의 수성 내부에 잡힌다. pH-민감 리포좀은 예를 들어, 배양물에서 세포 단층으로 티미딘 키나아제 유전자를 암호화하는 ssRNA를 전달하는데 사용되었다(Zhou et al., Journal of Controlled Release, 1992, 19, 269-274).

<132> 리포좀의 조성물의 한가지 주요한 형태는 자연적으로 전달된 포스파티딜콜린보다 인지질을 포함한다. 예를 들어 중성 리포좀 조성물은 디미리스토일 포스파티딜콜린(dimyristoyl phosphatidylcholine, DMPC) 또는 디팔미토일 포스파티딜콜린(dipalmitoyl phosphatidylcholine, DPPC)으로부터 형성될 수 있다. 음이온 리포좀 조성물은 일반적으로 디미리스토일 포스파티딜글리세롤로부터 형성되지만, 반면 음이온 융합유전자 리포좀(anionic fusogenic liposome)은 주로 디올레오일 포스파티딜에탄올아민(dioleoyl phosphatidylethanolamine, DOPE)로부터 형성된다. 리포좀 조성물의 다른 형태는, 예를 들어, 콩(soybean) PC, 및 계란(egg) PC와 같은 포스파티딜콜린(PC)으로부터 형성된다. 다른 형태는 인지질 및/또는 포스파티딜콜린 및/또는 콜레스테롤의 혼합물로부터 형성된다.

<133> 핵산을 포함하는 리포좀은 예를 들어, Thierry et al., WO 96/40062 (리포좀내에 고분자량 핵산을 넣는 방법(methods for encapsulating high molecular weight nucleic acids in liposomes)); Tagawa et al., 미국등록 특허 제5,264,221호 (RNA를 함유하는 단백질 결합된 리포좀(protein-bonded liposomes containing RNA)); Rahman et al., 미국등록특허 제5,665,710호 (리포좀내에 올리고디옥시뉴클레오티드를 넣는 방법(methods of encapsulating oligodeoxynucleotides in liposomes)); Love et al., WO 97/04787 (안티센스 올리고뉴클레오티드를 포함하는 리포좀(liposomes that include antisense oligonucleotides))에 기재되어 있다.

<134> 리포좀의 다른 형태인 트랜스퍼좀은 약물 전달 부형제를 흡인하는 고도로 변형가능한 지질 집단이다(Cevc et al., 1998, Biochim Biophys Acta. 1368(2): 201-15). 트랜스퍼좀은 작은 방울(droplet)보다 더 작은 구멍을 통해 관통할 수 있는 매우 고도로 변형가능한 지질 방울(lipid droplet)로서 기재될 수 있다. 트랜스퍼좀은 예를 들어, 형상 적응, 자가 수리(self-repairing)와 같이 그것이 사용되는 환경에 대해 쉽게 적응할 수 있고, 분해(fragmenting), 및 자주 자가 로딩(self-loading) 하지 않고 빈번하게 그것의 목표에 도달한다. 트랜스퍼좀은 예를 들어 표면 가장자리-활성제(surface edge-activator), 일반적으로 계면활성제를 표준 리포좀 조성물에 첨가함으로써 만들어질 수 있다.

<135> 트랜스펙션에 대한 지질 제형화는 예를 들어, EFFECTENE™(인핸서를 응축시키는 특별한 DNA를 가진 비리포좀의 지질) 및 SUPERFECT™(신규한 활성이 있는 텐드리머 기술(dendrimeric technology)과 같은 QIAGEN으로부터 상업적으로 이용가능하다. 리포좀은 예를 들어, LIPOFECTIN™ 및 LIPOFECTACE™와 같은 Gibco BRL로부터 상업적으로 이용가능하고, N-[1-(2,3 디올레일옥시)-프로필]-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드(N-[1-(2,3dioleyloxy)-propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride, DOTMA), DOTAP 및 디메틸 디옥타데실암모늄 브로마이드(dimethyl dioctadecylammonium bromide, DDAB)와 같은 양이온 지질을 형성한다. 리포좀을 제조하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며 많은 간행물에 기재되어 있다. 리포좀은 또한 특히 Gregoriadis (1985) Trends Biotechnol 3:235-241에 의해 재검토되었다.

<136> 본 발명의 조성물은 관련된 상태 예를 들어 암 또는 바이러스 감염과 같은 감염의 치료 또는 예방에 유용한 다른 약제를 포함할 수 있다.

<137> 하나의 구현예에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 항원과 함께 조성물에서 제형화된다. 항원은 별개의 성분으로서 또는, 그 대신에 복합체를 형성하는 올리고뉴클레오티드에 결합됨으로써 조성물에서 존재할 수 있다. 복합체에서, 두 가지 약제가 공유 결합되거나 또는 서로 직접적으로 결합되거나 또는 링커 또는 테터 부분(tether moiety)을 통해 부착될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 항원은 바이러스 항원, 암 항원 또는 알레르겐이다. 이러한 조성물은 항원으로 특징지어지는 질병 또는 상태에 대한 항원-특이 반응을 자극하는데 사용된다.

<138> 본원에서 사용되는 용어 "바이러스 항원"은 원래대로의, 감쇄된 또는 죽인 전체 바이러스, 임의의 구조적 또는 기능적인 바이러스 단백질, 또는 항원성인 충분한 길이(전형적으로 약 8 아미노산 또는 그 이상)의 바이러스 단백질의 임의의 펩티드 부분을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 바이러스 항원의 원천은 하기 군으로부터의 바이러스를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다: 레트로바이러스파(예를 들어, HIV-I(또한 HTLV-III, LAV 또는 HTLV-III/LAV, 또는 HIV-III으로서도 언급됨)와 같은 인간 면역 결핍 바이러스; 및 HIV-LP와 같은 다른 분리물); 피코나바이러스파(Picornaviridae)(예를 들어, 폴리오 바이러스(polio virus), A형 간염 바이러스, 엔테로바이러스, 인간 콕사키바이러스(human Coxsackie virus), 리노바이러스(rhinovirus), 에코바이러스(echovirus)); 칼시바이러스파(Calciviridae)(예를 들어, 위장염의 원인이 되는 종); 토가바이러스파(Togaviridae)(예를 들어, 말 뇌염 바이러스(equine encephalitis virus), 풍진 바이러스(rubella virus)); 폴

라비비아러스과(Flaviviridae)(예를 들어, 뎅기 바이러스(dengue virus), 뇌염 바이러스(encephalitis virus), 황열 바이러스(yellow fever virus)); 코로나바이러스과(Coronaviridae)(예를 들어, 코로나바이러스(coronavirus)); 랍도바이러스과(Rhabdoviridae)(예를 들어, 수포성구내염바이러스(vesicular stomatitis virus), 광견병 바이러스(rabies virus)); 필로바이러스과(예를 들어, 에볼라 바이러스(ebola virus)); 파라믹 소바이러스과(Paramyxoviridae)(예를 들어, 파라인플루엔자 바이러스(parainfluenza virus), 볼거리 바이러스(mumps virus), 홍역 바이러스(measles virus), 호흡기세포융합 바이러스(respiratory syncytial virus)); 오소믹소바이러스과(Orthomyxoviridae)(예를 들어, 인플루엔자 바이러스(influenza virus)); 부니아바이러스(Bunyaviridae)(예를 들어, 한탄 바이러스(Hantaan virus), 부니아 바이러스(bunya virus), 플레보바이러스(phlebovirus) 및 나이로 바이러스(Nairo virus)); 아레나바이러스과(출혈열 바이러스(hemorrhagic fever virus)); 레오바이러스과(Reoviridae)(예를 들어, 레오바이러스(reovirus), 오르비바이러스(orbivirus) 및 로타바이러스(rotavirus)); 보르나바이러스과(Bornaviridae); 헤파드나바이러스과(Hepadnaviridae)(B형 간염 바이러스(Hepatitis B virus)); 파보바이러스과(Parvoviridae)(파보바이러스(Parvoviridae)); 파포바바이러스과(Papovaviridae)(유두종 바이러스(papilloma virus), 폴리오마 바이러스(polyoma virus)); 아데노바이러스과(Adenoviridae)(대부분의 아데노바이러스(Adenovirus)); 헤르페스바이러스과(Herpesviridae)(단순 포진 바이러스(herpes simplex virus, HSV) 1 및 2, 수두 대상 포진 바이러스(varicella zoster virus), 사이토메갈로바이러스(cytomegalovirus, CMV), 헤르페스 바이러스(herpes virus); 폭스바이러스과(Poxviridae)(바리올라 바이러스(variola virus), 우두 바이러스(vaccinia virus). 폭스 바이러스(pox virus)); 및 이리도바이러스과(Iridoviridae)(예를 들어, 아프리카 돼지 콜레라 바이러스(African swine fever virus)); 및 미분류 바이러스들(예를 들어 델타 간염(delta hepatitis)(B형 간염의 결핍된 부수체(satellite)인 것으로 생각됨), C형 간염(Hepatitis C); 노워크(Norwalk) 및 관련 바이러스, 및 아스트로 바이러스(astro virus)의 제제). 그 대신에, 바이러스 항원은 재조합으로 생산될 수 있다.

<139> 본원에서 사용된, 용어 "암 항원" 및 "종양 항원"은 교환되어 사용되고 암세포에 의해 특징적으로 발현된 항원을 가리키며 그것에 의하여 암세포를 목표로 하기 위하여 개발될 수 있다. 암 항원은 명백히 종양-특이적인 면역 반응을 잠재적으로 자극할 수 있는 항원이다. 비록 필수적으로 발현되지 않더라도, 이들 항원 중 어떤 것은 정상 세포에 의해 암호화된다. 이들 항원은 정상 세포에서 정상적으로 작동하지 않고(즉, 발현되지 않는), 분화의 특정 단계에서만 발현되며 예를 들어 배아 및 태아 항원과 같은 일시적으로 발현되는 항원으로서 특징지어질 수 있다. 다른 암 항원은 예를 들어 발암유전자(예를 들어, 활성화된 라스 발암유전자(ras oncogene)), 억제 유전자(예를 들어, 돌연변이 p53), 내부 결실 또는 염색체 전이로 생기는 융합 단백질과 같은 돌연변이 세포 유전자에 의하여 암호화된다. 그럼에도 다른 암 항원은 RNA 및 DNA 종양 바이러스에서 운반된 것과 같은 바이러스 유전자에 의해 암호화될 수 있다.

<140> 본원에서 사용된 암 항원은 펩티드, 단백질, 또는 당단백질과 같은 화합물이고, 종양 또는 암 세포 표면과 결합되어 있으며 주요 조직 적합 유전자 복합체(major histocompatibility complex, MHC) 분자의 환경에서 항원제시 세포(antigen-presenting cell)의 표면에 발현될 때 면역 반응을 유발시킬 수 있다. 암 항원은 예를 들어, Cohen P A et al. (1994) Cancer Res 54:1055-8에 기재된 것과 같이 암 세포의 정제하지 않은 추출물을 제조함으로써, 항원을 부분적으로 정제함으로써, 제조함 기술에 의해, 또는 공자의 항원을 새로이 합성함으로써 암 세포로부터 제조될 수 있다. 암 항원은 재조합으로 발현된 항원, 그것의 전체 종양 또는 암 또는 세포의 면역성 부분을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 항원은 재조합으로 또는 업계에 공지된 다른 수단으로 분리되거나 제조될 수 있다.

<141> 종양 항원의 예는 MAGE, MART-1/Melan-A, gp100, 디펩ти딜 펩티다아제 IV (dipeptidyl peptidase IV, DPPIV), 아데노신 테아미나아제-결합 단백질(adenosine deaminase-binding protein, ADAbp), 사이클로필린 b(cyclophilin b), 직장 결합 항원(colorectal associated antigen)(CRC)-CO17-1A/GA733, 암성태아성 항원(carcinoembryonic antigen, CEA) 및 그것의 면역성 애피토프(epitope) CAP-I 및 CAP-2, etv6, am11, 전립선 특이 항원(prostate specific antigen, PSA) 및 그것의 면역성 애피토프 PSA-1, PSA-2, 및 PSA-3, 전립선-특이 세포막 항원(prostate-specific membrane antigen, PSMA), T-cell 수용체/CD3-제타 사슬(T-cell receptor/CD3-zeta chain), 종양 항원의 MAGE-군(예를 들어, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, MAGE-Xp2(MAGE-B2), MAGE-Xp3(MAGE-B3), MAGE-Xp4(MAGE-B4), MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-C4, MAGE-C5), 종양 항원의 GAGE-군(예를 들어, GAGE-I, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, GAGE-8, GAGE-9), BAGE, RAGE, LAGE-I, NAG, GnT-V, MUM-1, CDK4, 티로시나아제, p53, MUC 군, VEGF, VEGF 수용체, A-Raf, B-Raf, C-Raf, Raf-1, HSP70, HSP90, PDGF, TGF-알파, EGF, EGF 수용체, HER-2/neu, HER-3, HER-4 또는 적어도 하나의 HER 서브유닛으로 이루어진 혜테로

다이며 수용체(heterodimeric receptor)와 같은 인간 EGF-유사 수용체 군(human EGF-like receptor family)의 부분, 가스트린 방출 웹티드 수용체 항원(gastrin releasing peptide receptor antigen), Muc-1, CA125, αvβ3 인테그린(integrin), α5β1 인테그린, αIIbβ3-인테그린, CTLA-4, CD20, CD22, CD30, CD33, CD52, CD56, CD80, PDGF 베타 수용체, Src, VE-카드헤린(VE-cadherin), IL-8, hCG, IL-6, IL-6 수용체, IL-15, p21ras, RCAS1, α-태아단백질(α-fetoprotein), E-카드헤린, α-カテ닌(α-catenin), β-カテ닌 및 γ-カテ닌, p120ctn, gp100.sup.Pme1117, PRAME, NY-ESO-1, cdc27, 선종성 폴립 콜리 단백질(adenomatous polyposis coli protein, APC), 포드린(fodrin), 코넥신 37(Connexin 37), Ig-유전자형(Ig-idiotype), p15, gp75, GM2 및 GD2 강글리오시드(ganglioside), 인간 유두종 바이러스 단백질(human papillomavirus protein)과 같은 바이러스 생성물, 종양 항원의 Smad 군, imp-1, P1A, EBV-암호화된 핵 항원-1(EBV-encoded nuclear antigen(EBNA)-1), 뇌 글리코겐 포스포릴라아제(brain glycogen phosphorylase), SSX-1, SSX-2(HOM-MEL-40), SSX-1, SSX-4, SSX-5, SCP-1 및 CT-7, 및 c-erbB-2, 또는

<http://oncologyknuwlcgcbasc.com/oksite/TargctedTherapeutics/TTOExhibit2.pdf> 및

<http://oncologyknuwlcgcbasc.com/oksite/TargctedTherapeutics/TTOExhibit3.pdf>, 참고문헌에 의해 본원에 삽입된 공개내용에서 설명된 임의의 부가적인 단백질 표적을 포함한다. 이 리스트는 한정을 의미하지 않는다.

<142>

본 발명의 조성물(및 방법)에서 사용될 수 있는 알레르겐은 너무 많아서 열거할 수 없다. 상기 알레르겐의 소수 예는 꽃가루, 곤충독(insect venoms), 동물 비듬 먼지, 곰팡이 포자 및 약물(예를 들어, 페니실린)을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 자연적인 동물 및 식물 알레르겐의 예는 하기 속에 특이한 단백질을 포함한다: 개속(Canis)(개(Canis familiaris)); 더마토파고이데스속(Dermatophagoides)(예를 들어, 큰다리집먼지진드기(Dermatophagoides farinae)); 고양이속(Felis)(고양이(Felis domesticus)); 돼지풀속(Ambrosia)(돼지풀(Ambrosia artemisiifolia)); 룰름속(Lolium)(예를 들어, 호밀풀(Lolium perenne) 및 가지쥐보리(Lolium multiflorum)); 삼나무속(Cryptomeria)(삼나무(Cryptomeria japonica)); 알테마리아(Alternaria)(알터나리아 알터네이트(Alternaria alternate)); 오리나무속(Alder); 오리나무속(Alnus)(오리나무(Alnus glutinosa)); 자작나무속(Betula)(자작나무(Betula verrucosa)); 참나무속(Quercus)(미국 참나무(Quercus alba)); 올리아속(Olea)(올리브나무(Olea europaea)); 향쑥속(Artemisia)(메쑥(Artemisia vulgaris)); 플란타고속(Plantago)(예를 들어, 창질경이(Plantago lanceolata)); 파리에타리아(Parietaria)(예를 들어, 파리에타리아 오피시날리스(Parietaria officinalis) 및 파리에타리아 주다이카(Parietaria judaica)); 블라텔라속(Blattella)(예를 들어, 독일 바퀴(Blattella germanica)); 아파스속(Apis)(예를 들어, 아파스 멀티플로럼(Apis multiflorum)); 쿠프레서스속(Cupressus)(예를 들어, 사이프러스(Cupressus sempervirens), 쿠프레서스 아리조니카(Cupressus arizonica) 및 쿠프레서스 마크로카르파(Cupressus macrocarpa); 향나무속(Juniperus)(예를 들어, 주니퍼러스 사비노이데스(Juniperus sabinae), 주니퍼러스 베지니아나(Juniperus virginiana), 주니퍼러스 코뮤니스(Juniperus communis), 및 주니퍼러스 아쉐이(Juniperus ashei)); 투야속(Thuya)(예를 들어, Thuya orientalis); 노송나무속(Chamaecyparis)(예를 들어, 편백나무(Chamaecyparis obtuse)); 페리플라네타(Periplaneta)(예를 들어, 이질바퀴(Periplaneta Americana)); 개밀속(Agropyron)(예를 들어, 개밀(Agropyron repens)); 호밀속(Secale)(예를 들어, 호밀(Secale cereale)); 트리티쿰(Triticum)(예를 들어, 밀(Triticum aestivum)); 오리새속(Dactylis)(예를 들어, 오리새(Dactylis glomerata)); 폐추카속(Festuca)(예를 들어, 폐추카 엘라티어(Festuca elatior)); 포아속(Poa)(예를 들어, 왕포아풀(Poa pratensis) 및 좀포아풀(Poa compressa)); 귀리속(Avena)(예를 들어, 귀리(Avena sativa)); 홀커스속(Holcus)(예를 들어, 홀커스 라나투스(Holcus lanatus)); 향기풀속(Anthoxanthum)(예를 들어, 향기풀(Anthoxanthum odoratum)); 쇠미기풀속(Arrhenatherum)(예를 들어, 쇠미기풀(Arrhenatherum elatius)); 겨이삭속(Agrostis)(예를 들어, 흰겨이삭(Agrostis alba)); 산조아재비속(Phleum)(예를 들어, 큰조아재비(Phleum pretense)); 갈풀속(Phalaris)(예를 들어, 갈풀(Phalaris arundinacea)); 참새피속(Paspalum)(예를 들어, 바히아그라스(Paspalum notatum)); 수수속(Sorghum)(예를 들어, 소르굼 할레펜시스(Sorghum halepensis)); 및 귀리속(Bromus)(예를 들어, 좀참새귀리(Bromus inermis)).

<143>

앞에서 기재한 바와 같이, 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 향상된 pDC 활성에 의해, 또는 알레르기, 천식, 자가면역 질병, 및 다양한 잠재적인 원인의 어떤 것으로 인하여 악화된 면역 시스템의 임의의 형태에 대한 것과 같은, 임의의 TLR7-발현 세포 또는 TLR8-발현 세포의 향상된 활성에 의해 유익하게 영향을 받을 수 있는 어떤 상태를 치료 또는 예방하는데 사용될 수 있다. 치료되고 있는 상태에 불구하고, 관련된 상태를 치료하는데 사용될 수 있는 다른 약제가 본원에 기재된 TLR 작용제(agonist) 올리고뉴클레오티드와 함께 본 발명의 조성물에 존재할 수 있다고 평가될 것이다.

<144>

다른 구현예에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 암의 치료에 유용한 다른 치료 약제와 함께 조성물에서 제형

화된다. 이러한 약제는 다른 TLRs(예를 들어, TLR3, TLR7, TLR8, TLR9)의 작용제; 올리고뉴클레오티드가 효능화 시키지만 다른 분자 구조를 갖는(즉, 다른 뉴클레오티드 서열) 동일한 TLR의 작용제; 예를 들어 약물(drug), 독소(toxin), 면역 조절 인자(immunomodulator), 호르몬, 호르몬 길항제(hormone antagonist), 효소, 올리고뉴클레오티드, 효소 억제제(enzyme inhibitor), 치료상의 방사성 핵종(therapeutic radionuclide), 혈관신생 억제제(angiogenesis inhibitor), 화학요법 약물, 빈카알칼로이드(vinca alkaloid), 안트라사이클린(anthracycline), 에피도필로톡신(epidophyllotoxin), 택센(taxane), 대사길항물질(antimetabolite), 알킬화약제(alkylating agent), 항생물질(antibiotics), COX-2 억제제, SN-38, 항분열제(antimitotics), 항혈관신생제(antiangiogenic agent) 및 세포사멸제(apoptotic agent), 특히 독소루비신(doxorubicin), 메토트렉사트(methotrexate), 택솔(taxol), CPT-11, 캄토테칸(camptothecan), 니트로겐마스터드(nitrogen mustard), 켐시타빈(gemcitabine), 알킬 살포네이트(alkyl sulfonate), 니트로소우레이(nitrosourea), 트리아젠(triazene), 폴산 유사체(folic acid analog), 피리미딘 유사체, 퓨린 유사체, 백금 배위 결합체(platinum coordination complex), 슈도모나스 외독소(Pseudomonas exotoxin), 리신(ricin), 아브린(abrin), 5-플루오로우리딘(5-fluorouridine), 리보뉴클레아제(ribonuclease, RNase), DNase I, 포도상구균 장독소-A(Staphylococcal enterotoxin-A), 미국자리공 항바이러스 단백질(pokeweed antiviral protein), 젤로닌(gelonin), 디프테린 독소(diphtherin toxin), 슈도모나스 외독소(Pseudomonas exotoxin), 슈도모나스 내독소(Pseudomonas endotoxin) 및 기타(Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th Ed. (Mack Publishing Co. 1995); Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics (McGraw Hill, 2001); Pastan et al. (1986) Cell 47:641; Goldenberg (1994) Cancer Journal for Clinicians 44:43; U.S. Pat. No. 6,077,499; <http://oncologyknowledgebase.com/oks/TargetedTherapeutics/TTQExhibit4.pdf> 및

<http://oncologyknowledgebase.com/oks/TargetedTherapeutics/TTQExhibit5.pdf>, 참고문헌에 의해 본원에 삽입된 전체 공개내용 참조)와 같은 방사성 동위 원소(radioisotope), 독성 단백질(toxic protein), 독성 소분자(toxic small molecule) 포함하지만, 이에 한정되지는 않는 세포 독성 약제(cytotoxic agent); VEGF, VEGF 수용체, A-Raf, B-Raf, C-Raf, Raf-1, HSP70, HSP90, PDGF, TGF-알파, EGF, EGF 수용체, HER-2/neu, HER-3, HER-4 또는 적어도 하나의 HER 서브유닛으로 이루어진 헤테로다이머 수용체와 같은 인간 EGF-유사 수용체 군의 부분, 암태아항원(carcinoembryonic antigen), 가스트린 방출 펩티드 수용체 항원 (gastrin releasing peptide receptor antigen), Muc-1, CA125, αγβ3 인테그린(integrin), α5β1 인테그린, αIβ3-인테그린, CTLA-4, CD20, CD22, CD30, CD33, CD52, CD56, CD80, PDGF 베타 수용체, Src, VE-카드레린(cadherin), IL-8, hCG, IL-6, IL-6 수용체, IL-15, IL-15, 또는

<http://oncologyknowledgebase.com/oks/TargetedTherapeutics/TTOExhibit2.pdf> 및
<http://oncologyknowledgebase.com/oks/TargetedTherapeutics/TTOExhibit3.pdf>, 참고문헌에 의해 본원에 삽입된 공개내용에서 설명된 임의의 부가적인 단백질 목표를 암호화하는 mRNA에 대하여 목표되는 siRNA와 같은 종양 항원 또는 종양 증식성 단백질(tumor proliferative protein)을 목표로 하는 약제; 시스플라틴(cisplatin, CDDP), 카보플라틴(carboplatin), 옥살리플라틴(oxaliplatin), 프로카바진(procarbazine), 메클로레타민(mechlorethamine), 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 캄포테cin(camptothecin), 이포스파미드(ifosfamide), 멜팔란(melphalan), 클로람부실(chlorambucil), 부설판(busulfan), 니트로스우레이(nitrosourea), 닉티노마이신(dactinomycin), 다우노루비신(daunorubicin), 독소루비신(doxorubicin), 블레오마이신(bleomycin), 플리코마이신(plicomycin), 미토마이신(mitomycin), 에토포사이드(etoposide)(VP 16), 타목시펜(tamoxifen), 라록시펜(raloxifene), 에스트로겐 수용체 결합 약제(estrogen receptor binding agent), 택솔(taxol), 켐시타빈(gemcitabine), 나벨빈(navellbine), 파메실-단백질 트랜스퍼라제 억제제(famesyl-protein transferase inhibitor), 트랜스플라티늄(transplatin), 5-플루오로유러실(fluorouracil), 빈크리스틴(vincristin), 빈블라스틴(vinblastin) 및 메토트렉사트(methotrexate), 또는 상기의 임의의 유사체 또는 유도 변형체(derivative variant)를 포함하지만, 이에 한정되지 않는 화학요법 약제; 유방암에 대해서: 독소루비신(doxorubicin), 에피루비신(epirubicin), 독소루비신 및 시클로포스파미드(cyclophosphamide)의 조합(AC), 시클로포스파미드, 독소루비신 및 5-플루오로유러실의 조합(CAF), 시클로포스파미드, 에피루비신 및 5-플루오로유러실의 조합(CEF), 헤셉틴™(Herceptin™), 타목시펜(tamoxifen), 타목시펜 및 세포 독소(cytotoxin)의 조합, 도세탁셀(docetaxel) 및 파클리탁셀(Paclitaxel)을 포함하는 택센(taxane), 독소루비신 및 시클로포스파미드를 더한 택센의 조합; 결장암에 대해서: 5-FU 및 류코보린(leucovorin)의 조합, 5FU 및 레바미솔(levamisole)의 조합, 이리노테칸(irinotecan)(CPT- 11) 또는 이리토테칸, 5-FU 및 류코보린의 조합(IFL) 또는 옥살리플라틴(oxaliplatin); 전립선암에 대해서: 방사성 동위 원소(즉, 팔라듐(palladium), 스트론튬-89(strontium-89) 및 이리듐(Iridium)), 류프롤리드(leuprolide) 또는 다른 LHR 작용제, 비스테로이드 항안드

로겐(플루타미드(Flutamide), 닐루타미드(nilutamide), 및 비칼루타미드(bicalutamide)), 스테로이트 항안드로겐(시프로테론 아세테이트(cyproterone acetate)), 류프롤리드 및 플루타미드(Flutamide)의 조합, DES, 클로로트리아니센(chlorotrianiisene), 에티닐 에스트라디올(ethinyl estradiol), 결합된 에스트로겐 U.S.P., DES-디포스페이트(diphosphate)와 같은 에스트로겐, 아미노글루테트이미드(aminoglutethimide), 히드로코르티손(hydrocortisone), 플루타미드 투여 정지(Flutamide withdrawal), 프로게스테론, 및 케토코나졸(ketoconazole)과 같은 2차 호르몬 치료(second-line hormonal therapies), 낮은 복용량의 프레드니손(low-dose prednisone), 또는 다른 화학요법 약제 또는 도세탁셀(docetaxel), 파클리탁셀(paclitaxel), 에스트라마스틴(estramustine)/도세탁셀. 에스트라마스틴/에토포사이드, 에스트라마스틴/빈블라스틴, 및 에스트라마스틴/파클리탁셀을 포함함으로써 종상에서 개인적인 개선 및 PSA 수준에서 감소를 보여주는 것으로 기록된 약제의 조합; 흑색소 세포종(melanoma)에 대해서: 다카바진(dacarbazine, DTIC), 카무스틴(carmustine, BCNU) 및 로무스틴(lomustine, CCNU)과 같은 니트로소우레아(nitrosourea), 빈카 알칼로이드(vinca alkaloids), 백금 화합물(platinum compounds), 및 택센(taxane)을 포함함으로써 적당한 단일 약제 활성을 가지는 약제, 닉스머스 식이요법(Dartmouth regimen)(시스플라틴(cisplatin), BCNU, 및 DTIC), 인터페론 알파(IFN- α), 및 인터루킨-2(IL-2); 난소암에 대해서: 파클리탁셀(paclitaxel), 도세탁셀(docetaxel), 시스플라틴(cisplatin), 옥살리플라틴(oxaliplatin), 헥사메틸멜라민(hexamethylmelamine), 타목시펜(tamoxifen), 이포스파미드(ifosfamide), 파클리탁셀(택솔(Taxol)) 또는 도세탁셀(택소테르(Taxotere)) 및 시스플라틴 또는 카보플라틴(carboplatin)의 조합, 시클로포스파미드 및 시스플라틴의 조합, 시클로포스파미드 및 카보플라틴의 조합, 5-플루오로유리실(5-fluorouracil, 5FU) 및 류코보린(leucovorin)의 조합, 에토포사이드, 리포좀 독소루비신, 젠시타빈(gerucitabine) 또는 토포테칸(topotecan); 폐암에 대해서: 시스플라틴, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 미토마이신(mitomycin), 독소루비신, 및 에토포사이드, 시클로포스파미드, 독소루비신, 빈크리스틴/에토포사이드, 및 시스플라틴의 조합(CAV/EP), 조합에서 단독, 시스플라틴 및 비노렐빈의 조합, 파클리탁셀, 도세탁셀 또는 젠시타빈, 카보플라틴 및 파클리탁셀의 조합과 같은 특정 암의 치료에 대한 치료 약제 및 치료 약제의 조합;을 포함한다.

<145> 본 발명의 올리고뉴클레오티드 조성물은 또한 항신생혈관제(anti-angiogenic agent)를 포함할 수도 있다. 이러한 약제는 하기를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다: VEGF-관련 유전자 군 단백질(VEGF-related gene family protein)에 대한 소분자 억제제(small molecule inhibitor), 중화시키는 항체(neutralizing antibody), 안티센스 전략(antisense strategies), siRNA, RNA 앱타머(aptamer) 및 리보자임; 양립할 수 없는 특성을 가진 VEGF의 변형체(즉, 특히 참고문헌에 의해 본원에 삽입된 WO 98/16551에 기재된 것과 같음); 미국등록특허 제6,524,583호의 표 D, 약제 및 종상은 특히 참고문헌에 의해 본원에 삽입된 공개내용에 열거된 약제; 하기를 포함하지만, 이에 한정되지는 않는 수용체 티로신 키나아제에 의한 시그널링을 억제하는 약제: VEGFR1, VEGFR-2, 3 PDGFR-베타, Flt-3, c-Kit, p38 알파 및 FGFR-1; EGFR, HER-2, COX-2, 또는 HIF-1 α 와 같은 VEGF 발현 및 생산의 하나 또는 그 이상의 다양한 조절제(regulator)를 억제하는 약제; 탈리도마이드(thalidomide) 또는 그것의 유사체 CC-5013; 베바시주맙(Bevacizumab)(mAb, VEGF-A 억제, 지넨테크(Genentech)); IMC-1121B(mAb, VEGFR-2 억제, 임클론 시스템즈(ImClone Systems)); CDP-791(페길화(Pegylated) DiFab, VEGFR-2, 셀텍(Celldex)); 2C3(mAb, VEGF-A, 펠그린 제약(Peregrine Pharmaceuticals); PTK-787(TKI, VEGFR-1, -2, 노바티스(Novartis)); AEE788(TKI, VEGFR-2 및 EGFR, 노바티스(Novartis)); ZD6474(TKI, VEGFR-1, -2, -3, EGFR, 아스트라제네카(AstraZeneca)); AZD2171(TKI, VEGFR-1, -2, 아스트라제네카(AstraZeneca)); SU11248(TKI, VEGFR-1, -2, PDGFR, 파이저(Pfizer)); AG13925(TKI, VEGFR-1, -2, 파이저(Pfizer)); AG013736(TK1, VEGFR-1, -2, 파이저(Pfizer)); CEP-7055(TKI, VEGFR-1, -2, -3, 세팔론(Cephalon)); CP-547,632(TKI, VEGFR-1, -2, 파이저(Pfizer)); VEGF-trap (가용성 하이브리드 수용체(Soluble hybrid receptor) VEGF-A, P1GF(태반 성장 인자(placenta growth factor) 아벤티스/리제너론(Aventis/Regeneron)); GW786024(TKI, VEGFR-1, -2, -3, 글락소미스클라인(GlaxoSmithKline)); Bay 93-4006(TKI, VEGFR-1, -2, PDGFR 바이엘/온익스(Bayer/Onyx)); 및 AMG706(TKI, VEGFR-1, -2, -3, 암젠(Amgen)).

<146> 또한, 올리고뉴클레오티드 조성물은 세포 사멸 인자, 인터페론- α , - β 및 - γ , IL-2, IL-12, IL-15, IL-21, CpG-함유 단일-가닥 DNA, 기타 TLRs의 작용제, 기타 사이토카인 및 면역억제제 등의 면역 조절제; F42K 및 기타 사이토카인 유사체; 또는 MIP-1, MIP-1베타, MCP-1, 랜테스(RANTES) 및 기타 케모카인(chemokines); 세포 표면 수용체 및 GAP 결합의 상향조절에 작용하는 제제; 세포증식 억제제 및 분화제; 또는 세포 부착 저해제와 같은 다른 치료제를 포함할 수 있다.

<147> 또 다른 실시예에서, 올리고뉴클레오티드 조성물은 항-바이러스제를 추가적으로 포함할 수 있다. 본 발명의 분자와 함께 사용될 수 있는 유용한 항-바이러스제는 프로테아제 억제제, 뉴클레오시드 역전사효소 억제제, 비-뉴클레오시드 역전사효소 억제제 및 뉴클레오시드 유사체를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 항바이러스제의 예

는 포스카르네트(foscarnet), 아만타딘(amantadine), 리만타딘(rimantadine), 사퀴나비르(saquinavir), 인디나비르(indinavir), 암프레나비르(amprenavir), 로피나비르(lopinavir), 리토나비르(ritonavir), 알파-인더페론, 아데포비르(adefovirus), 클레바딘(clevadine), 엔테카비르(entecavir), 플레코나릴(pleconaril)뿐만 아니라, 지도부딘(zidovudine), 아시클로비르(acyclovir), 강시클로비르(gancyclovir), 비다라빈(vidarabine), 이독수리딘(idoxuridine), 트리플루리딘(trifluridine) 및 리바비린(ribavirin)을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

<148> 동물 및 인간을 위한 복용량의 상호 관계(신체 표면의 평방미터 당 밀리그램 기준)는 Freireich et al., (1966) Cancer Chemother Rep 50: 219에 기재되어 있다. 신체 표면적은 환자의 키 및 몸무게로부터 대략적으로 결정될 수 있다. Scientific Tables, Geigy Pharmaceuticals, Ardley, N.Y., 1970, 537 참조. 본 발명의 화합물의 유효량은 약 0.001 mg/kg 내지 약 1000 mg/kg의 범위이며, 바람직하게는 약 0.01 mg/kg 내지 약 100 mg/kg, 더욱 바람직하게는 약 0.1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 또는 0.001 mg/kg 내지 900 mg/kg의 하한값과 0.1 mg/kg 내지 1000 mg/kg의 상한값을 갖는 범위 내(예를 들어, 0.005 mg/kg 및 200 mg/kg, 0.5 mg/kg 및 20 mg/kg)에 있다. 효과적인 복용량은 치료 질병, 투여 경로, 부형제 사용 및 다른 제제의 사용과 같은 치료학적 처치와의 겸용 가능성에 따라서 당업자에 의해 달라질 수 있다.

<149> 추가적인 치료제를 포함하는 약제학적 조성물에 있어서, 추가적인 치료제의 유효량은 추가 제제만 사용된 단일 치료 요법에서 일반적으로 사용되는 복용량의 약 20% 내지 100%이다. 바람직하게 유효량은 일반적인 단일 치료 복용량의 70% 내지 100%이다. 이러한 추가 제제의 일반적인 단일 치료 복용량은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, Wells et al., eds., Pharmacotherapy Handbook, 2차 개정판, Appleton and Lange, Stamford, Conn. (2000); PDR Pharmacopoeia, Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000, Deluxe Edition, Tarascon Publishing, Loma Linda, Calif. (2000) 참조. 상기의 참고문헌 각각은 참조에 의해 그 전체 내용에 대하여 본 명세서에 편입된다.

<150> 상기 추가적인 치료제의 일부는 본 발명의 화합물과 상승적으로 작용할 것이라고 예상된다. 상승 작용이 발생할 경우, 추가 치료제 및/또는 본 발명의 화합물의 효과적인 복용량은 단일 치료에서 요구되는 복용량보다 감소될 수 있다. 본 발명의 화합물 및 추가 치료제의 독성 부작용을 최소화, 효능의 상승적 증가, 투여 또는 사용의 향상된 간편함 및/또는 화합물 제조 또는 제형화의 절감된 전체 비용의 장점을 갖는다.

<151> 상기의 특정 치료제들은 둘 이상의 상기 범주에 포함될 수 있음이 당업자에게 공지되어 있다. 본 발명의 목적을 위해, 치료제들은 이러한 치료적 범주의 각각에 구성 성분으로 간주되며, 특정 범주에 포함된 치료제의 특성이 또 다른 특정 범주내의 것으로 여겨지더라도 제외될 수 없다.

<152> 또 다른 실시예에서, 본 발명은 TLR7 또는 TLR8 작용제 및 암치료에 효과적인 치료제, 감염성 질병 치료에 유용한 치료제, 암 항원, 바이러스 항원 또는 알레르겐에서 선택된 기타 제제를 포함하는 물질의 조성물을 서로 결합된 개별 투여 형태로 제공한다. 본 발명에 사용된 용어 "서로 결합된"은 개별 투여 형태가 동일 요법의 일부로 판매되고 투여됨이 매우 명백하도록 개별 투여 형태가 서로 함께 포장되거나 부착된 것을 의미한다. 제제 및 TLR7 작용제는 바람직하게 사용자에 의해 분리될 수 있는(예를 들어, 두 용기 사이의 경계선을 잡아뜯는 방식 등) 블리스터 팩 또는 멀티-캡버 포장 또는 결합된, 분리 밀봉된 용기(포일 파우치 등)에 함께 포장된다.

<153> 다른 실시예에서, 본 발명은 a)본 발명의 TLR7 작용제 또는 TLR8 작용제; 및 b)암 치료에 유용한 치료제, 감염성 질병 치료에 유용한 치료제, 암 항원, 바이러스 항원 또는 알레르겐에서 선택된 다른 제제를 개별 용기 안에 포함하는 키트를 제공한다.

치료 방법

<155> 본 발명의 다양한 실시예에서, 본 발명의 단일 가닥, 우리딘-리치 또는 구아니딘-리치 올리고뉴클레오티드는 특정 약효를 얻을 수 있도록 환자 또는 개인에게 치료적인 또는 병을 예방하는 유효량으로 투여될 수 있다. 따라서, 본 발명은 암 또는 감염성 질병, 예를 들어, 바이러스성 감염과 같이 강화된 면역 반응이 유용하고/또는 필요한 질병의 치료 또는 예방에 유용한 면역자극용 올리고뉴클레오티드를 사용하는 방법을 제공한다. 상기 방법들은 본 발명의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 조성물을 환자에게 투여하는 단계를 포함한다. 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 강화 pDC활성, 강화 단핵구 활성, 강화 mDC활성, 강화 Treg 세포 활성 또는 TLR7 또는 TLR8 발현 세포의 강화 활성에 의해 유리하게 영향을 받을 수 있는 이상을 치료 또는 예방하기 위해 사용될 수 있다고 평가된다. 따라서, 본 발명의 방법 및 조성물은 알레르기, 천식, 자가면역 질병과 같은 이상을 치료 또는 예방하는데 사용될 수 있고, 또한 일반적으로 질병, 수술, 화학요법 제제 또는 다른 약물과 같은 면역 억제제의 투여 또는 치료로 인해 약화된 면역 시스템을 갖는 환자의 면역 기능을 강화시킨다.

- <156> 특정 실시예에서, 본 발명에 따라 대상의 면역 반응을 자극하는 방법은 본 발명의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 조성물의 투여 후 대상의 면역 세포 활성을 검출하는 추가적인 단계를 포함한다. 활성의 검출은 올리고뉴클레오티드 조성물의 투여 후에 대상으로부터 얻은 수지상 세포, 단핵구 또는 조절 T세포에서 바람직하게 수행된다. 상기 세포는 대상의 말초 혈관, 비장, 골수 또는 림프구, 바람직하게는 말초 혈관 또는 골수로부터 얻을 수 있다. 상기 세포는 투여된 조성물 내의 올리고뉴클레오티드가 대상의 면역 세포에 영향을 끼칠 수 있도록 충분한 시간이 지난 후에 획득되어야만 한다. 일반적으로, 상기 시간은 투여 후 1 내지 48시간 사이에 있다. 말초 혈관 및/또는 골수는 바람직하게 공지된 기술로 더 정제된다. 일반적으로, 상기 기술은 분석될 세포 종류에 특이적인 적절한 시약을 사용하는 형광-활성 또는 자기-활성 세포 분리와 같은 세포 분류 기술이다.
- <157> 얻어진 면역 세포의 활성을 TLR7 또는 TLR8의 작용성에 의해 특정 세포에 영향을 끼친다고 알려진 활성을 측정함으로써 결정될 수 있다. TLR7활성을 결정하기 위해, 검사될 우선 세포는 대상에서의 pDC이다. 분리된 pDC 또는 pDC 개체군은 IFN- α , IL-6 및 IL-12 p40을 포함하는 군에서 선택된 사이토카인의 발현 수준을 평가하여 분석된다. TLR8활성을 결정하기 위해, 검사될 우선 세포는 mDC, 단핵세포 또는 조절 T세포로부터 선택될 수 있다. mDC 또는 단핵세포의 분석을 위해, TNF α , IL-6 또는 IL-12 p40의 발현 수준이 측정된다. 조절 T세포에서 사용되는 분석은 IL-10 또는 형질변환 성장 인자 β 의 발현 수준 또는 공배양액에서 CD4 $^+$ T-세포의 증식을 억제하는 상기 세포의 능력을 시험한다.
- <158> 본 발명의 올리고뉴클레오티드를 사용하여 여러 가지 종류의 암을 치료하거나 예방할 수 있다. 필수적으로, pDCs, mDCs, 단핵구, Treg 세포 또는 기타 TLR7- 또는 TLR8-발현 세포의 활성 증가에 의해 치료되거나 진행을 늦추거나 또는 예방할 수 있는 암(또는 다른 이상)은 치료될 수 있다. 치료 가능한 암의 종류 또는 증식성 질병의 예는 방광, 유방, 결장, 신장, 간, 폐, 난소, 전립선, 췌장, 위, 경부, 갑상선 및 피부를 포함하는 악성 종양; 급성 및 만성 골수성 백혈병 및 전골수성 백혈병을 포함하는 임파직계의 조혈암; 섬유 육종, 골육종 및 횡문 근육종을 포함하는 간엽 유래 종양; 흑색종, 색소성 건피증, 각화극세포종, 정상피종, 갑상선 여포상암, 기형암, 신경아 세포종 및 신경교종을 포함하는 기타 종양; 성상세포종, 신경아세포종, 신경교종 및 기타 신경초종을 포함하는 중추 및 말초 신경 시스템의 종양을 포함한다.
- <159> 암 치료를 위한 실시예에서, TLR7- 또는 TLR8-발현 세포의 시료는 올리고뉴클레오티드의 투여 전 환자로부터 얻고, 하나 이상의 본 발명의 올리고뉴클레오티드가 세포를 활성화시키는 능력은 시료 일부에서 평가될 수 있다. 적절하게 활성화된 올리고뉴클레오티드가 확인되면, 이것은 환자의 TLR7- 또는 TLR8-발현 세포(임의로 활성화하기 전 생체 밖에서 팽창시킴)의 잔여 부분 또는 다른 시료를 생체 밖에서 활성화시키기 위해 사용될 수 있고, 올리고뉴클레오티드는 시험관내에서 세포에 적용되고 활성화된 세포를 환자에게 돌려준다. 선택적으로, 활성화 가능성의 평가에 이어, 올리고뉴클레오티드(적절한 약제학적 제형 내)를 환자에게 직접 투여하여 환자 세포를 생체 내에서 활성화시킬 수 있다. 한 실시예에서, pDCs 또는 다른 TLR7- 또는 TLR8 발현 세포의 시료는 그 후에 (올리고뉴클레오티드의 투여 후) 생체 내 활성을 평가하기 위해 환자로부터 획득된다. 활성은 상기 방법, 예를 들어, 사이토카인 생산, TLR 시그널 유도 유전자 발현, 다른 세포의 증식에 작용 등을 사용하여 평가될 수 있다. 이러한 실시예에서, pDCs 또는 다른 TLR-발현 세포가 활성화된 (또는 증가된 증식을 가짐) 검출은 올리고뉴클레오티드가 원하는 효과를 갖는다는 표시이다.
- <160> 본 발명의 올리고뉴클레오티드를 사용하는 암의 치료 시, 본 발명의 방법은 다른 항암 화합물을 환자에게 투여하거나 또는 다른 치료 방법을 환자가 받도록 하는 추가적인 단계를 포함한다. 고체 종양 치료에 있어서, 예를 들어, 본 발명의 조성물의 투여는 수술, 방사선 요법, 화학 요법 등과 같은 고전적인 방법과 함께 사용될 수 있다. 그러므로 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 수술 또는 방사선 치료와 동시에, 전에 또는 후에 사용되거나; 또는 통상적인 화학 요법, 방사선 치료 또는 항-혈관신생제 또는 표적화된 면역독소 또는 응혈제와 동시에, 전에 또는 후에 투여되는 복합 요법으로 제공될 수 있다. 올리고뉴클레오티드가 다른 제제와 함께 환자에게 투여될 때, 두 구성 성분들은 개별적으로 제형화된 조성물(즉, 다중 투여 형태) 또는 단독 조성물(본 발명의 올리고뉴클레오티드 및 기타 치료제를 포함하는 상기 단독 투여 형태의 조합)로 투여될 수 있다.
- <161> 본 발명의 TLR7- 및/또는 TLR8-자극 올리고뉴클레오티드와 함께 투여될 수 있는 다른 항암 화합물의 예는 사이토카인을 포함한다. 본 발명의 복합 조성물에 유용한 상기 사이토카인 종류들을 포함하여 다양한 사이토카인들이 상기 복합 방법에 사용될 수 있다. 사이토카인의 바람직한 예는 IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-21, TGF- β , GM-CSF, M-CSF, G-CSF, TNF- α , TNF- β , LAF, TCGF, BCGF, TRF, BAF, BDG, MP, LIF, OSM, TMF, PDGF, IFN- α , IFN- β 및 IFN- γ 를 포함한다. IL-2, IL-12 또는 IL-15과 같이 NK세포의 세포 독성 활성을 자극하는 사이토카인이 특히 바람직하다.

사이토카인은 기본 요법에 따라 환자의 상태 및 사이토카인 관련 독성과 같은 임상적인 징후와 일치하도록 투여된다.

<162> 다른 실시예에서, 본 발명의 TLR7- 및/또는 TLR8-자극 올리고뉴클레오티드 조성물은 화학치료제 또는 호르몬 치료제와 함께 투여될 수 있다. 다양한 호르몬 치료제 및 화합치료제는 본 발명의 복합 조성물에 사용될 수 있는 상기 제제들을 포함하는 본원의 치료 방법과 함께 사용될 수 있다. 바람직한 화학치료제는 알킬화제, 대사길항물질, 세포 독성 항생제, 빙카 알칼로이드, 예를 들어, 아드리아마이신, 닥티노마이신, 미토마이신, 카르미노마이신, 다우노마이신, 독소루비신, 타목시펜, 탁솔, 탁소티어(taxotere), 빙크리스틴, 빙블라스틴, 빙오렐빈(vinorelbine), 에토포시드(etoposide; VP-16), 5-플루오로유라실(5FU), 시토신 아라비노시드, 시클로포스파미드, 티오테파, 메토트렉세이트, 캄토테신, 악티노마이신-D, 미토마이신C, 시스플라틴(CDDP), 아미놉테린, 콤브레타스타틴, 그의 유도체 및 프로드러그를 포함한다. 또한 키나아제 억제제 및 특히 혈관 신생 억제제는 예를 들어, 억제제 또는 VEGFR1, VEGFR2, PDGFR, C-KIT 및/또는 하나 이상의 Raf 키나아제 (예를 들어, Raf-a, raf-b 및/또는 raf-c)를 포함한다. 바람직한 호르몬제는 예를 들어, 류프로렐린(lupron), 고세렐린(goserelin), 트립토렐린(triptorelin) 및 부세렐린(buserelin)과 같은 LHRH 작용제; 타목시펜(tamoxifen) 및 토레미펜(toremifene)과 같은 항-에스트로겐; 플루타미드, 닐루타미드(nilutamide), 사이프로테론(cyproterone) 및 비카루타미드(bicalutamide)와 같은 항-안드로겐; 아나스트로졸, 엑스메스탄(exemestane), 레트로졸(letrozole) 및 파드로졸(fadrozole)과 같은 아로마타제(aromatase) 억제제; 및 메드록시(medroxy), 클로르마디논(chlormadinone) 및 메게스트롤(megestrol)과 같은 프로게스터론(progestagen)을 포함한다.

<163> 또 다른 실시예에서, 본 발명의 TLR7- 및/또는 TLR8-자극 올리고뉴클레오티드 조성물은 치료 항체와 함께 투여될 수 있다. 한 실시예에서, TLR7- 및/또는 TLR8-자극 올리고뉴클레오티드 조성물은 표적 세포에 대한 ADCC 활성을 강화하고, 소모될 표적 세포의 항원에 결합하는 항체를 환자에게 투여하는 단계와 함께 투여되는 것이 바람직하다. 상기 치료 항체가 다른 서브타입 및 변형된 형태(예를 들어, 변형된 Fc 영역)라고 쉽게 예상되더라도, IgG1 또는 IgG3 서브타입이다. 본 발명에 따라 유리하게 사용될 수 있는 치료 항체의 예는 Innate Pharma에게 양도된 PCT 출원 번호 WO2005/009465에 있고, 출원 명세서는 본 발명의 참고문헌으로 통합 수록되었다.

<164> 또한, 본 발명은 본 발명에 의한 조성물을 환자에게 투여하는 단계를 포함하여 대상의 감염성 질병을 치료 또는 예방하는, 특히 바이러스성 감염을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다. 감염성 질환을 갖는 대상은 전염성 생물에 노출되고, 신체 내에 감염성 생물의 급성 또는 만성의 검출 가능 수준을 갖는다. 감염성 생물에의 노출은 일반적으로 대상의 외피, 예를 들어, 피부 또는 점막 및/또는 생물에 의한 대상의 외피 침투로 발생한다. 감염성 질환뿐만 아니라, 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 또한 박테리아, 프라이온(prion), 곰팡이 및 다양한 기생충을 포함하는 다른 종류의 감염성 제제를 없애는데 사용될 수 있다. 예를 들어, C. G. A Thomas, Medical Microbiology, Bailliere Tindall, Great Britain 1983 참조. 이는 본 발명의 참고문헌으로 통합 수록되었다.

<165> 바이러스성 감염의 예방이 요구되는 대상은 바이러스성 질병에 대한 백신 지원자이다. 특정 바이러스성 질병에서, 상기 대상은 신생아, 유아 또는 청소년이다. 다른 바이러스성 질환에 있어서, 대상은 면역력이 약화되어 있는 구성원 또는 개체군이다.

<166> 본 발명의 올리고뉴클레오티드를 사용하여 치료할 수 있는 바이러스는 장내바이러스(폴리오 바이러스, 쿡사키 바이러스, 에코 바이러스와 같은 피코나바이러스군(picornaviridae)의 바이러스를 포함하지만 이에 제한되지 않음), 로터바이러스, 아데노바이러스, 간염 바이러스를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 사람에게 발견되는 바이러스의 특정한 예는 레트로바이러스과(Retroviridae)((예를 들어, HIV-I (또한 HTLV-III, LAV 또는 HTLV-III/LAV 또는 HIV-III으로서도 언급됨)와 같은 인간 면역 결핍 바이러스; 및 HIV-LP와 같은 다른 분리물(isolates); 피코나바이러스과(예를 들어, 폴리오 바이러스, A형 감염 바이러스, 엔테로 바이러스, 인간 쿡사키 바이러스, 리노 바이러스, 에코 바이러스); 칼시바이러스과(예를 들어, 위장염의 원인이 되는 종); 토가바이러스과(예를 들어, 말 뇌염 바이러스, 풍진 바이러스); 플라비바이러스과(예를 들어, 뎅기 바이러스, 뇌염 바이러스, 황열 바이러스); 코로나바이러스과(예를 들어, 코로나 바이러스); 랍도바이러스과(예를 들어, 소포성 구내염 바이러스, 광견병 바이러스); 필로바이러스과(예를 들어, 에볼라 바이러스); 파라믹소바이러스과(예를 들어, 파라인플루엔자 바이러스, 볼거리 바이러스, 홍역 바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스); 오소믹소바이러스과(예를 들어, 인플루엔자 바이러스) 또는 조류 인플루엔자 바이러스(예를 들어, H5N1 또는 관련 바이러스); 부니아 바이러스과(한탄 바이러스, 부니아 바이러스, 플레보 바이러스 및 나이로 바이러스); 아레나바이러스과(Arenaviridae)(예를 들어, 출혈열 바이러스); 레오바이러스과(Reoviridae)(예를 들어, 레오바이러스, 오르비바이러스 및 로타바이러스); 보르나바이러스과(Bornaviridae); 헤파드나바이러스과(Hepadnaviridae)(예를 들어, B

형 간염 바이러스); 파보바이러스과(Parvoviridae)(예를 들어, 파보바이러스); 파포바바이러스과(Papovaviridae)(예를 들어, 유두종 바이러스, 폴리오마 바이러스); 아데노바이러스과(Adenoviridae)(예를 들어, 대부분의 아데노바이러스); 헤르페스바이러스과(Herpesviridae)(예를 들어, 단순 포진 바이러스(HSV)1 및 2, 수두 대상 포진 바이러스, 사이토메갈로바이러스(CMV); 폭스바이러스과(Poxviridae)(예를 들어, 바리올라 바이러스, 우두 바이러스, 폭스 바이러스); 이리도바이러스과(Iridoviridae)(예를 들어, 아프리카 돼지 클레라 바이러스); 및 미분류 바이러스들(예를 들어, 해면상 뇌병증(Spongiform encephalopathies)의 병인들, 텔타 간염 물질(B형 간염의 결핍된 부수체(satellite)인 것으로 생각됨), 비-A형, 비-B형 간염 물질(클래스 1= 내부 전 이됨; 클래스 2 = 비경구로 전이됨(즉, C형 간염); 노워크(Norwalk)와 관련 바이러스 및 아스트로바이러스(astrovirus))을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

<167> 암에 있어서, 본 발명의 방법은 감염 치료에 유용한 다른 제제를 대상에게 투여하는 추가적인 단계를 포함할 수 있다. 감염성 질병 약물은 항균제, 항바이러스제, 항진균제 및 구충제를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

<168> 항바이러스제는 바이러스에 의한 세포의 감염 또는 세포 내 바이러스의 복제를 방지하는 화합물을 포함한다. 바이러스성 감염의 과정에는 항바이러스제에 의해 방지 또는 억제될 수 있는 몇 단계가 있다. 상기 단계들은 바이러스의 숙주 세포 부착(면역글로불린 또는 결합 웹티드), 바이러스의 해체(uncoating)(예를 들어, 아만타딘), 바이러스성 mRNA의 합성 또는 번역(예를 들어, 인터페론), 바이러스성 RNA 또는 DNA의 복제(예를 들어, 뉴클레오시드 유사체), 새로운 바이러스성 단백질의 성숙 분열(예를 들어, 프로테아제 억제제) 및 바이러스의 발아 및 방출 단계를 포함한다. 본 발명의 올리고뉴클레오티드와 함께 투여될 수 있는 항바이러스제는 상기 본 발명의 올리고뉴클레오티드/항바이러스제 결합 조성물이다.

<169> 바람직한 뉴클레오시드 유사체는 아시클로비르(단순 포진 바이러스 및 수두-포진 바이러스의 치료에 사용됨), 강시클로비르(사이토메갈로바이러스 치료에 유용함), 이독수리딘, 리바비린(호흡기 세포융합 바이러스의 치료에 유용함), 디데옥시이노신(dideoxyinosine), 디데옥시시티딘(dideoxycytidine) 및 지도부딘(zidovudine)(아지도티미딘)을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 올리고뉴클레오티드와 투여될 수 있는 항바이러스제의 다른 종류는 인터페론, 예를 들어, 알파 및 베타-인터페론과 같은 사이토카인을 포함한다. 또한, 정상 면역 글로불린 치료 및 과면역 글로불린(Hyperimmune globulin) 치료를 포함하는 면역 글로불린 치료가 가능하다. 정상 면역 글로불린 치료는 정상 혈액 제공자의 혈청으로부터 제조되고 얻어진 항체 산물을 이용한다. 얻어진 산물은 A형 감염, 파보바이러스, 장내바이러스(특히, 신생아)와 같은 광범위한 영역의 인간 바이러스에서 낮은 적정 농도의 항체를 포함한다. 과면역 글로불린 치료는 특정 바이러스에 대한 항체의 높은 적정 농도를 갖는 개인의 혈청으로 제조된 항체를 이용한다. 과면역 글로불린의 예는 포진 면역 글로불린(면역력이 약화된 유아 및 신생아의 수두 예방에 유용함), 인간 광견병 면역 글로불린(광견병 동물에 물린 대상의 노출 후 예방에 유용함), B형 간염 면역 글로불린(B형 간염 바이러스의 예방, 특히 바이러스에 노출된 대상에게 유용함) 및 RSV 면역 글로불린(호흡기 세포융합 바이러스 감염의 치료에 유용함)을 포함한다.

<170> 본 발명의 방법이 바이러스 감염을 예방하기 위해 고안되었을 때, 상기 방법은 일반적으로 바이러스 항원을 대상에게 투여하는 추가 단계를 포함한다. 바이러스 항원의 선택은 본 발명의 조성물과 결합되어 유용한 상기 동일한 바이러스 항원으로부터 만들어질 수 있다.

<171> 하나 이상의 제제가 본 발명의 올리고뉴클레오티드계 치료와 함께 사용될 때, 각각의 치료가 개별적으로 실시되었을 경우에 관측되는 효과에 부가되는 복합 효능의 필요성이 없다. 일반적으로 최소한의 부가 효능이 바람직할지라도, 상기 단독 치료의 증가된 항암 또는 항감염 효능이 이익이 될 수 있다. 또한, 복합 치료가 가능하고 이익이 될지라도, 상승 효과를 나타내기 위한 특정 필요성은 없다.

<172> 본 발명의 방법에 유용한 기타 치료제의 유효량은 당업계의 숙련인들에게 공지되어 있다. 하지만, 기타 치료제의 최적 유효량 범위를 결정하는 것은 숙련인의 범위 내에 있다. 기타 치료제를 동물에 투여하는 본 발명의 실시예에서, 본 발명의 화합물의 유효량은 기타 치료제가 투여되지 않을 때의 유효량보다 적다. 다른 실시예에서, 통상적인 제제의 유효량은 본 발명의 화합물이 투여되지 않을 때의 유효량보다 적다. 이러한 경우, 제제들의 높은 복용량과 연관된 바람직하지 않은 부작용을 최소화시킬 수 있다. 다른 가능한 장점(향상된 복용량 요법 및/또는 감소된 약물 가격을 제한없이 포함함)들은 당업자에게 명백할 것이다.

<173> 본 발명의 또 다른 실시예는 검출 가능한 마커에 컨쥬게이트된 상기 올리고뉴클레오티드를 제공한다. 본원에 사용되는 용어 "검출 가능한 마커"는 양적 또는 질적으로 관측되거나 또는 측정될 수 있는 분자를 말한다. 본 발명의 컨쥬게이트된 올리고뉴클레오티드에 유용한 검출 가능한 마커의 예는 방사성 동위원소, 형광성 염료 또는 항원/항체, 렉틴/탄수화물, 아비딘/비오틴, 수용체/리간드 또는 분자 각인 폴리머/프린트 분자 시스템에 포함된

어느 하나와 같은 상보성 결합 쌍의 성분이다.

<174> 올리고뉴클레오티드에 대한 검출 가능한 마커의 컨쥬케이션은 당업계에 공지된 방법에 의해 성취될 수 있다. 올리고뉴클레오티드 컨쥬케이트의 제조가 기재된 미국 등록 특허는 예를 들어, 제4,828,979호; 제4,948,882호; 제5,218,105호; 제5,525,465호; 제5,541,313호; 제5,545,730호; 제5,552,538호; 제5,578,717호; 제5,580,731호; 제5,580,731호; 제5,591,584호; 제5,109,124호; 제5,118,802호; 제5,138,045호; 제5,414,077호; 제5,486,603호; 제5,512,439호; 제5,578,718호; 제5,508,046호; 제4,587,044호; 제4,605,735호; 제4,667,025호; 제4,752,779호; 제4,789,737호; 제4,824,941호; 제4,835,263호; 제4,876,335호; 제4,904,582호; 제4,958,013호; 제5,482,830호; 제5,112,963호; 제5,214,136호; 제5,254,469호; 제5,258,506호; 제5,262,536호; 제5,112,963호; 제5,214,136호; 제5,245,022호; 제5,254,469호; 제5,258,506호; 제5,262,536호; 제5,272,250호; 제5,292,873호; 제5,317,098호; 제5,371,241호; 제5,391,723호; 제5,416,203호, 제5,451,463호; 제5,510,475호; 제5,512,667호; 제5,514,785호; 제5,565,552호; 제5,567,810호; 제5,574,142호; 제5,585,481호; 제5,587,371호; 제5,595,726호; 제5,597,696호; 제5,599,923호; 제5,599,928호 및 제5,688,941호를 포함하고, 각각은 본 발명에 참고문헌으로 통합 수록되었다.

<175> 본 발명의 올리고뉴클레오티드가 컨쥬케이트된 검출 가능한 마커는 TLR에 대응하는 올리고뉴클레오티드 결합을 검출하기 위해 사용될 수 있다. 그러므로 또 다른 실시예에 따라, 본 발명은 TLR7 또는 TLR8에서 a) UUU-(X)n-UUU 또는 UU-X-UU-X-UU 또는 Y(U)pY; 또는 b) GGG-(X)n-GGG, GG-X-GG-X-GG 또는 Z(G)pZ로부터 선택된 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드 결합을 검출하는 방법을 제공한다. 식 중에서, 각각의 U, G, X, n 및 p는 상기에 정의되어 있다. 상기 방법은 TLR7 또는 TLR8-함유 물질과 검출 가능 마커에 컨쥬케이트된 상기 올리고뉴클레오티드를 포함하는 문자와 접촉하는 단계 및 상기 검출 가능 마커를 검출하는 단계를 포함한다. TLR7 또는 TLR8-포함 물질은 분리된 TLR7 또는 TLR8, 작용성 올리고뉴클레오티드 결합 도메인을 포함하는 TLR7 또는 TLR8 단백질 단편 또는 TLR7 또는 TLR8를 발현하는 세포를 포함한다. 선택적으로, 본 발명의 TLR7 작용 올리고뉴클레오티드는 대체로 시그널 및/또는 TLR8 결합을 유도하지 않고, 선택적으로, 본 발명의 TLR8 작용 올리고뉴클레오티드는 대체로 시그널 및/또는 TLR7 결합을 유도하지 않는다.

<176> 또 다른 실시예에 따라, 본 발명은

<177> a) UUU-(X)n-UUU 또는 UU-X-UU-X-UU 또는 Y(U)pY; 또는 b) GGG-(X)n-GGG, GG-X-GG-X-GG 또는 Z(G)pZ(식 중에서, 각각의 U, G, X, n 및 p는 상기에 정의되어 있음)에서 선택된 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드 및 검출 가능한 마커를 포함하는 컨쥬케이트와 TLR7 또는 TLR8-함유 물질을 접촉시키는 단계;

<178> TLR7 또는 TLR8-함유 물질에 결합된 검출 가능한 마커를 정량화하는 단계;

<179> 상기 테스트 문자의 존재 하에서 TLR7 또는 TLR8-함유 물질과 상기 컨쥬케이트를 접촉시키는 단계;

<180> 상기 테스트 문자의 존재가 TLR7 또는 TLR8-함유 물질에 결합된 검출 가능한 마커의 양을 감소시켰는지 측정하는 단계

<181> 를 포함하는 테스트 문자가 TLR7 또는 TLR8에 결합하는지 결정하는 방법을 제공한다. 테스트 문자의 존재 하에 TLR7 또는 TLR8-함유 물질과 결합하는 검출 가능한 마커의 감소량은 테스트 문자가 TLR7 또는 TLR8에 결합하는 것을 가리킨다. 이어서, 테스트 문자는 상기 분석법에 의해 TLR7 또는 TLR8을 활성화시키는 능력이 더 분석되었다.

<182> 관련된 실시예에서, 본 발명은 개별 용기에 UUU-(X)n-UUU 또는 UU-X-UU-X-UU 또는 Y(U)pY; 또는 b) GGG-(X)n-GGG, GG-X-GG-X-GG 또는 Z(G)pZ에서 선택된 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드(식 중에서 U, G, X, n 및 p 각각은 상기에 기재되어 있음)를 포함하는 컨쥬케이트, 검출 가능한 마커 및 TLR7 또는 TLR8 포함 물질을 포함하는 키트를 제공한다.

실시예

<191> 본 발명의 형태 및 장점을 하기 실험 부분에 보다 구체적으로 기재하였으며, 이는 발명을 자세히 설명하기 위함이며, 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다.

<192> 실험 과정

<193> **시약.** 폴리I:C는 파마시아(Pharmacia), 폴리U는 시그마(Poole, UK)에서 구입하였다. CpG-함유 올리고뉴클레오티드 1668는 CRUK에서 제조되거나 또는 시그마(Poole, UK)에서 구입하였다. DNA 21-mer 올리고뉴클레오티드는 CRUK

에서 합성되었고, RNA 올리고뉴클레오티드는 앰비온(Ambion) 또는 씨모 일렉트론(Thermo Electron)로부터 얻었다. 폴리에틸렌이민(2kD)은 시그마-알드리치로부터 구입하였다. 폴리U를 제외한 모든 시약은 균체 내 독소가 없다.

<194> **동물 및 세포.** C57BL/6은 샤를 리버 UK(Charles River UK)로부터 얻었다. TLR7^{-/y} 및 TLR7^{+/y} 한배 새끼 대조군 마우스는 미생물 질병 연구 기관에서 사육되었다. F1t3L-DC는 10% 태아 우혈청, 2mM 글루타민, 100개/ml 페니실린, 100개/ml 스트렙토마이신, 50μM 2-메르캅토에탄올 및 50ng/ml 쥐 F1t3L (R&D시스템)을 포함하는 RPMI 1640 배양액 내 골수 세포 혼탁액에서 생성되었고, 배양 10일 또는 11일에 사용되었다.

<195> **활성화 분석.** 올리고뉴클레오티드와의 자극을 위해, 2×10^5 F1t3L-DC는 96-공평판배양기에 3중으로 시드(seeded)했다. 올리고뉴클레오티드를 첨가하고, 세포는 200μl의 최종 부피로 밤새 배양되었다. 대조군은 배양액 단독, 0.5 μg/ml CpG 1668, 100mM 록소리빈 또는 1 μM R848을 포함하였다.

<196> CpG 1668를 제외한 올리고뉴클레오티드와의 자극의 위해, 각각 실험 올리고뉴클레오티드의 다른 복용량을 150mM NaCl용액에 희석하고, 150mM NaCl용액 +/- 폴리에틸렌이민(PEI; 3 μl/ml PEI는 RNA복용량과 관계없이 사용됨)의 동일 부피와 혼합하였다. 실온에서 15분 배양 후, 올리고뉴클레오티드/PEI 복합체를 세포에 첨가하였다. 배양 18시간 내지 20시간 후에 상청액을 모으고, IFN-α, IL-6 및 IL-12p40의 수준을 샌드위치 ELISA로 측정하였다.

<197> **인간 pDC 활성화 분석.** LyoVec와 복합체를 형성한 R848 및 RNA9.2DR은 인비보젠(Invivogen)에서 얻었다. RNA 올리고뉴클레오티드는 시그마 프로리고(Sigma Proligo)로부터 구입하였다. 인간PMBCs는 정상 인간의 말초 혈관으로부터 Ficoll-Hypaque 원심분리에 의해 정제되었다. BDCA4⁺ 형질세포형DC는 전체 PBMC에서 밀테니바이오테크(MiltenyiBiotec)의 CD304⁺ 마이크로비즈 및 미니막스를 사용한 양성 선택에 의해 정제되었다. 상기에 따라 제조된 올리고뉴클레오티드/PEI 복합체는 96-공 평판배양기에 이중으로 시드된 $1-2 \times 10^5$ DC로 첨가되었다. 세포를 200μl의 최종 부피로 밤새 배양하고, 배양 18시간 내지 20시간 후에 상청액을 수집해서, IFN-α 및 IL-6 수준을 샌드위치 ELISA로 측정하였다.

결과

<199> 우선, 본 발명자는 이전에 연구된 불확정 길이의 호모폴리머, 폴리U RNA에 의한 IFN-α 유도와 천연 RNA와 폴리U 호모폴리머에 존재하는 포스포디에스테르 결합의 21-mer RNA 올리고뉴클레오티드(폴리Uo-21) 및 포스포로티오염 글격 변형의 21-mer RNA 올리고뉴클레오티드(폴리Us-21)에 의한 IFN-α 유도를 비교하였다. 글격 변형에 관계없이 두 21-mer 폴리U 올리고뉴클레오티드는 복용량 의존 방식으로 F1t 3L-DC에 의해 IFN-α를 유도하였다(도 1A). 두 21-mer 올리고뉴클레오티드가 F1t3L 배양액에 PEI와의 복합체의 형태로 주어지고, 동일한 감도로 인지될 경우, 유사한 IFN-α를 유도한다. PEI는 핵산에 결합하고 응축하여 분해로부터 RNA를 보호하는 능력을 갖는 폴리양이온(polycation)이다. 이러한 보호 기능뿐만 아니라, PEI는 유리 RNA 흡수와 다른 메커니즘으로 복합체의 세포 내 흡수를 증가한다.

<200> 본원에 기재된 모든 실험에서, 본 발명자는 PEI 고농도에서의 세포독성을 방지하기 위해서 RNA의 양과 무관하게 동일한 농도의 PEI를 사용하였다. 하지만 PEI가 없는 배양액에 주어질 경우, 폴리Us-21 올리고뉴클레오티드는 F1t3L-DC에 의해 IFN-α가 유도되기 때문에, PEI는 핵산 리간드의 흡수 및 TLR7 인식을 위해 절대적으로 많지 않다(도 1B). 반대로, 폴리Uo-21 올리고뉴클레오티드는 뉴클레아제 소화에 결합하는 포스포디에스테르의 보다 큰 감도로 인하여 동일 상태에서 IFN-α를 유도하지 못했다(도 1C). 이어진 실험에서, 본 발명자는 뉴클레아제에 의한 분해 감도 차이로 인한 자극 활성의 차이를 피하기 위해서 F1t3L-DC 자극용으로 유리 RNA보다 RNA/PEI 복합체를 사용하였다.

<201> 11 및 6 뉴클레오티드에 의한 폴리U 올리고뉴클레오티드의 감소가 그들의 자극 활성에 미치는 영향을 결정하기 위해, 본 발명자는 10-mer 및 15-mer 포스포디에스테르 및 포스포로티오염 폴리U RNA 올리고뉴클레오티드를 폴리Uo-21 및 폴리Us-21과 비교하였다. 포스포디에스테르 폴리U RNA에 있어서, 더 짧은 15-mer 및 10-mer 올리고뉴클레오티드는 복용량 반응 변화를 나타내고, F1t3L-DC에 의해 유도된 IFN-α 보다 약 20배 효능이 적었다(도 2A). 포스포로티오염 폴리U RNA에 있어서, 경향은 동일하지만 15-mer 올리고뉴클레오티드에서 보여지는 IFN-α 유도의 감소는 21-mer와 일어진 반응과 구별되지 않는다. 반면에 10-mer는 실험되는 복용량에서 측정 가능한 수준의 IFN-α를 유도하지 않는다. 그러므로 10-mer 및 15-mer은 IFN-α를 유도할 수 있는 것으로 결론 내릴 수 있다.

- <202> 이어서, 본 발명자는 골격 변형이 TLR7에 의해 ssRNA 리간드 인지에 영향을 미치는지 시험하였다. 우선, ssDNA 올리고뉴클레오티드가 F1t3L- DC에 의해 IFN- α 를 유도하는지 측정하였다. 21-mer 폴리U 포스포디에스테르 DNA 올리고뉴클레오티드로 자극되었을 때, F1t3L- DC는 IFN- α 를 생성하였다. 흥미롭게도, IFN- α 반응 자극시 낮은 복용량에서 DNA 올리고뉴클레오티드(폴리dUo-21)는 대응되는 RNA 올리고뉴클레오티드(폴리Uo-21)보다 약효가 낮고, 반대로 높은 복용량에서 폴리Uo-21보다 IFN- α 를 유도하는 효능이 훨씬 높았다(도 3A). 포스포로티오염 폴리U 21-mer RNA 및 DNA 올리고뉴클레오티드를 비교했을 때(각각, 폴리Us-21 및 폴리dUs-21), 복용량 반응의 변화는 유사하지만, RNA 올리고뉴클레오티드는 시험되는 모든 복용량에서 IFN- α 의 더 높은 수준을 유도하였다(도 3B). 당의 C2위치에서 골격 변형이 영향을 끼치지만, 리간드 인지를 방해하지 않는 것으로 결론 내릴 수 있다.
- <203> ssRNA의 GU-리치 모티프는 TLR7 인지에 매우 중요하다고 보고되어 있다. 이를 검토하기 위해, 본 발명자는 폴리Us-21를 GU-리치 RNA40 올리고뉴클레오티드에 직접 비교하였다(Heil et al. (2004) Science 303: 1526). F1t3L-DC 활성 분석에서, 폴리Us-21 RNA 올리고뉴클레오티드는 RNA40보다 IFN- α 의 유도 효능이 훨씬 높았다(도 4A). 이는 TLR7가 우리딘 부분을 독점적으로 인지하고, 다른 모든 RNA 뉴클레오티드는 무시한다는 결론을 뒷받침한다.
- <204> TLR7이 우리딘 부분을 독점적으로 인지한다는 가설을 더 시험하기 위해, 본 발명자는 우리딘 및 시토신 부분의 다른 조성물들과 21-mer 포스포로티오염 RNA 올리고뉴클레오티드를 비교하였다. 아데노신 부분과 우리딘의 접합에 의한 dsRNA 구조의 형성을 피하기 위하여 시토신 부분이 아데노신에서 선택되고, GU-리치 모티프를 피하기 위해서는 구아노신 부분이 바람직하다. 다른 RNA 올리고뉴클레오티드의 조성물은 표 1을 참조한다. 우선, 우리딘 및 시토신 뉴클레오티드로 구성되고, 우리딘의 네 개, 세 개 또는 두 개의 삼중체를 포함하는 21-mer 포스포로티오염 올리고뉴클레오티드(각각 올리고뉴클레오티드 SSD8, SSD9 및 SSD10)를 비교하였다. 올리고뉴클레오티드 SSD8 및 SSD9의 차이점은 가장자리뿐이지만, SSD10에 의한 IFN- α 의 유도가 약간 감소되었다(도 4B). 우리딘 및 시토신 부분의 혼합물을 함유하는 세 올리고뉴클레오티드 모두는 우리딘 뉴클레오티드의 전체를 포함하는 21-mer 올리고뉴클레오티드보다 더 낮은 수준의 IFN- α 를 제조하였다.
- <205> 21-mer 포스포로티오염 올리고뉴클레오티드의 또 다른 쌍에서, 본 발명자는 우리딘의 세 삼중체에서 우리딘 부분량은 일정하게 유지했지만, 한 개 내지 다섯 개 시토신으로부터 세 우리딘 삼중체 사이의 거리가 변하였다(올리고뉴클레오티드 SSD21-SSD25). 우리딘 삼중체 사이 거리가 가장 짧은 올리고뉴클레오티드(SSD21, 삼중체 사이의 한 시토신)는 올리고뉴클레오티드 그룹 중에서 가장 높은 수준의 IFN- α 를 유도하였다. 하지만, 예상되는 바와 같이 우리딘 뉴클레오티드로 전체가 구성되는 폴리Us-21보다 IFN- α 유도 효율이 더 낮았다(도 4C). IFN- α 의 수준 감소는 우리딘 삼중체들 사이의 거리 증가와 관련된다. 올리고뉴클레오티드 SSD25에 있어서, 우리딘 삼중체 사이 거리는 다섯 시토신의 스트레치(stretch)이고, 거의 측정 불가능한 수준의 IFN- α 를 유도하였다(도 4C). 각각 다른 우리딘 부분들 사이 거리가 IFN- α 유도에 미치는 효과를 확인하기 위해서, 열 개의 우리딘 뉴클레오티드를 모두 포함하지만, 단일 시토신 뉴클레오티드(SSD27)에 의해 분리된 열 개의 단일 우리딘 뉴클레오티드, 단일 시토신 뉴클레오티드(SSD28)에 의해 분리된 다섯 개 더블 우리딘 뉴클레오티드 또는 시토신 뉴클레오티드(SSD29)의 스트레치에 의해 측면에 위치한 10 우리딘 뉴클레오티드의 스트레치의 형태인 21-mer 올리고뉴클레오티드의 두 번째 쌍을 시험하였다. 놀랍게도, 10 우리딘 부분의 스트레치 또는 우리딘의 5 더블렛을 포함하는 올리고뉴클레오티드는 IFN- α 를 유도하는 효능이 강하고, 보다 높은 농도에서 폴리Us-21 올리고뉴클레오티드와 유사한 IFN- α 의 수준을 만든다(도 4D). 이와 반대로, F1t3L-DC 배양액에서 우리딘과 시토신 뉴클레오티드(SSD27)를 교대로 포함하는 올리고뉴클레오티드는 IFN- α 유도를 비교적 못했다.
- <206> 또한, 올리고뉴클레오티드 중의 우리딘의 위치가 IFN- α 유도에 영향을 끼치는지 시험하기 위하여, 본 발명자는 동일 수의 우리딘 뉴클레오티드와 우리딘 부분 사이의 동일한 거리를 갖지만, 올리고뉴클레오티드의 끝에 우리딘 부분이 위치하거나(SSD 13 및 SSD 15) 또는 끝에 우리딘 부분이 없는(SSD 8 및 SSD 14) 21-mer 올리고뉴클레오티드를 비교하였다. 상기 뉴클레오티드 두 쌍들을 비교하였고, 끝에 우리딘 부분이 없는 올리고뉴클레오티드의 두 경우는 IFN- α 유도 효과가 조금 더 높았고, 약 절반의 로그자(logarithmic scale)에 의해 복용량 반응이 변하였다(도 4E 및 4F).
- <207> 요약하면, 본 발명자는 상기 일련의 실험으로 IFN- α 유도 수준은 우리딘 부분의 절대 수가 결정하는 것뿐만 아니라, 단일 우리딘 부분 사이의 거리도 IFN- α 유도에 영향을 미친다는 것을 알 수 있었다. 또한, 실험 데이터는 올리고뉴클레오티드의 끝의 우리딘 부분이 올리고뉴클레오티드의 가운데에 더 위치한 우리딘 부분과 IFN- α 유도에 동일한 양으로 참여하지 않음을 의미한다.
- <208> PoIyU RNA는 낮은 pH에서 이중 나선형 구조를 형성할 수 없기 때문에 다른 RNA 호모폴리머와는 구분된다. 고전

적인 왓슨-크릭 핵산의 염기쌍에 균거하지 않게 다른 RNA 호모폴리머가 낮은 pH에서 두 개 단일 가닥 사이에 결합을 형성할 수 있는 반면, 폴리U RNA는 분자 구성으로 인해 형성할 수 없다. 그러므로, 폴리U만이 TLR7에 의해 인지된다는 사실에 대한 한가지 가능한 설명은 TLR7 인지가 발생하는 세포내(endosomal) 구획에서 발견되는 바와 같이 낮은 pH에서 단일-가닥 핵산으로 유지하는 능력이다. F1t3L-BMDC와의 활성 분석으로 가설을 시험하기 위해, F1t3L-BMDC에 의해 IFN- α 를 유도하는 합성 21-mer 포스포로티오염 폴리T RNA 올리고뉴클레오티드(폴리Ts-21)의 능력을 시험하였다. 티미딘은 C5 위치의 추가적인 메틸기로 인해 우리던 뉴클레오티드와 구별되고(도 6A 및 B), 폴리U와 같은 호모폴리머 폴리T RNA는 낮은 pH에서 이중 가닥 구조를 형성할 수 없다. 티미딘 뉴클레오티드가 단지 DNA의 일부분이며 RNA 분자에 자연적으로 존재하지 않기 때문에, 티미딘-함유 RNA는 TLR7 활성 분석에서 시험된 적이 없었다. 높은 구조적 유사성에도 불구하고, 폴리Ts-21은 시험된 농도 어디에서도 측정 가능한 수준의 IFN- α 를 유도할 수 없었다(도 5A). 폴리Ts-21 올리고뉴클레오티드와 같이, 포스포로티오염 RNA 올리고뉴클레오티드 폴리As-21 및 폴리Cs-21 또한 IFN- α 를 유도하지 못한다. 하지만 이는 불확정 길이의 폴리A 및 폴리C 포스포디에스테르 RNA가 IFN- α 발생을 유발하지 못함이 이전의 실험에서 밝혀졌기 때문에 예상할 수 있었다.

<209> 폴리U RNA의 단일-가닥 특성이 실제 폴리U부분보다 TLR7 활성을 위해 중요한지 실험하기 위한 시도에서, 본 발명자는 염기 없이 오직 당/인산염 골격으로 이루어진 리보스페이서(ribospacier) "뉴클레오티드"를 이용하였다. 우리던 및 리보스페이서의 혼합물(폴리U 스페이서) 또는 시티딘 및 리보스페이서 뉴클레오티드의 혼합물(폴리C 스페이서)로 이루어진 올리고뉴클레오티드를 고안하였다. 우리던 부분과 같이, 낮은 pH에서 리보스페이서 뉴클레오티드는 이중 나선형 구조를 형성하도록 하는 두 단일 RNA 가닥 사이에 결합을 형성할 수 없다. 본 발명자는 폴리U 스페이서가 폴리Us-21 또는 TLR7에 의해 인지되지 않는 우리던 부분 및 다른 뉴클레오티드로 이루어진 올리고뉴클레오티드(SSD 13)와 유사한 수준으로 IFN- α 를 유도하는지 알기를 원했다. 또한, 폴리C 스페이서가 우리던 및 시토신 부분을 함유하는 올리고뉴클레오티드(SSD 13)와 유사한 수준의 IFN- α 를 유발하는지 또는 IFN- α 를 전혀 유발하지 않는지 실험하였다.

<210> 올리고뉴클레오티드를 함유하는 두 리보스페이서를 폴리Us-21 및 SSD 13 올리고뉴클레오티드와 비교했을 때, 폴리C 스페이서는 시험된 농도 어디에서도 측정 가능한 IFN- α 를 유도하지 못했고, 폴리U 스페이서는 폴리Us-21 또는 SSD 13 올리고뉴클레오티드 자극에 의해 얻어지는 수준을 유도하였다(도 5B). 이를 종합하면, TLR7자극에 대하여 우리던 부분을 교체하는 티미딘 및 리보스페이서 "뉴클레오티드"의 실패는 단지 TLR7 인지 및 자극을 일으키는 낮은 pH에서 유지되는 폴리U RNA의 단일 가닥 특성이 아니라, TLR7의 인지 모티프의 부분을 형성하는 우라실의 분자 구조를 의미한다.

<211> 바이러스성 ssRNA를 TLR7의 천연 리간드로 확인하기 전, 이미다조퀴놀린(imidazoquinolines) 및 뉴클레오시드 유사체(nucleoside analogues)와 같은 저 분자량 면역 반응 조절제가 TLR7-의존 경로를 통해 고유 면역 시스템을 자극함이 보여졌다. 작은 항-바이러스성 화합물의 활성을 합성 우리던-리치 RNA 리간드와 비교하기 위해, F1t3L-DC를 폴리Us-21/PEI 복합체, 이미다조퀴놀린 R848 또는 치환된 구아노신 뉴클레오시드 록소리빈(loxoribine)의 존재 하에 배양하였다. 대조군으로, 세포를 TLR9을 자극하는 DNA 올리고뉴클레오티드 CpG 1668으로 처리하였다. 모든 TLR 리간드들은 이전 실험에서 최대로 사이토카인을 유도한 농도에서 사용되었다(데이터는 보여지지 않음). 놀랍게도 핵산 리간드 폴리Us-21 및 CpG는 저 분자량 항-바이러스성 화합물 R848 및 록소리빈보다 F1t3L-DC에 의한 IFN- α 유발에 약 30배 높은 효능을 나타냈다(도 7A). 반대로, IFN- α 를 유도하기 위한 RNA 리간드 및 작은 항-바이러스성 화합물 사이의 사이토카인 유도 차이가 더 극적임에도 불구하고, 이미다조퀴놀린 및 뉴클레오시드 유사체는 폴리Us-21보다 IL-6의 훌륭한 유도체이다(도 7B). 이와 같은 결과는 다른 TLR7 리간드들이 특정 사이토카인 유발을 위한 우선권을 가질 수 있음을 의미한다. 상기 현상의 한가지 가능한 설명은 IFN- α 와 같은 사이토카인의 유도를 발생시키는 특정 시그널 전달 경로의 자극에 더 중요할 수 있는 TLR/리간드 복합체에 대한 조수용체(co-receptor)의 점증이다. 또 다른 가능한 설명은 TLR7의 다른 시그널 전달 경로 하류의 발생이 리간드의 친화력에 의해 영향을 받을 수 있다. 사이토카인 유도의 상기 차이점에 대한 설명은 명확하지 않지만, 생체 내 치료 시 유도되어 치료 성과에 영향을 주는 면역 반응의 종류 및 강도에 상당한 차이를 이끌어 낼 수 있다.

<212> 또한, 짧은 우리던계 호모폴리머 올리고뉴클레오티드가 인간 pDC를 활성화시키는 능력이 평가되었다. GU-리치 ssRNA뿐만 아니라, 이미다조퀴놀린 및 뉴클레오시드 유사체와 같은 저분자량 면역 반응 조절자는 인간 형질세포형 수지상 세포들을 활성화시키기 위해 이전에 연구되었다. U-계 올리고뉴클레오티드가 인간 세포를 효과적으로 활성화시킬 수 있는지 평가하기 위해, 형질세포형 DC(pDC)는 인간 PBMC로부터 정제되고, 약효가 가장 높은 포스포로티오염-결합 RNA 올리고뉴클레오티드(폴리Us-21)로 활성화되었다. 도 xA에서 알 수 있는 바와 같이, 폴리Us

21+PEI은 복용량-의존 방식으로 인간 pDC에 의한 IFN- α 생산을 유도하였다. 하지만, ssRNA의 최적 복용량은 마우스 F1t3L에서보다 인간 pDC에서 더 높았다(각각, 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$). 상기 마우스 연구로부터 예상되는 바와 같이, 포스포로티오염-결합 RNA 올리고뉴클레오티드 폴리As-21은 IFN- α 를 유도하지 못했다(도 8A).

<213> 다른 TLR7/8 작용제의 인간 세포상 활성을 비교하기 위해, pDC는 폴리Us21/PEI 복합체, 대조군 폴리As21/PEI 복합체, 이미다조퀴놀린 R848, RNA9.2DR 올리고뉴클레오티드/LyoVec복합체로 자극되었다. 특히, 폴리Us21, R848 및 RNA9.2DR은 인간 pDC에 의한 동등한 수준의 IFN- α 생산을 유도하였다(도 8B). 또한, R848 및 RNA9.2DR가 인간 pDC에 의한 IL-6의 좋은 유도 물질인 것에 반해, 폴리Us21은 pDC로 IL-6분비를 유도하는데 실패했다. 상기 연구된 마우스 세포에서, 이러한 결과는 다른 TLR7 작용제가 다른 세포 및 사이토카인 반응을 유도할 수 있다고 제안한다.

<214> 각각의 출판물 또는 특히 출원이 참고문헌으로 통합된다고 명확히 개별적으로 기재되어 있을 경우, 본 명세서에 언급된 모든 출판물 및 특히 출원은 전체가 참고 문헌으로 통합 수록되었다.

<215> 상기 발명의 이해를 분명히 하기 위한 목적으로 도면 및 실시예의 방법으로 상세히 기재하였으나, 본 발명의 청구 범위에서 벗어나지 않는 특정한 변화 및 변경은 당업계의 숙련인에게 매우 명백할 것이다.

표 1

RNA 올리고	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	설명	서열번호
polyUo-21	Uo	포스포디에스테르 21-mer	2																				
polyUo-15	Uo	포스포디에스테르 15-mer	3																				
polyUo-10	Uo													포스포디에스테르 10-mer	4								
polyUs-21	Us	포스포로티오에이트 21-mer	5																				
polyUs-15	Us	포스포로티오에이트 15-mer	6																				
polyUs-10	Us	포스포로티오에이트 10-mer	7																				
polydUo-21	dUo	포스포디에스테르 DNA 21-mer	8																				
polydUs-21	dUs	포스포로티오에이트 DNA 21-mer	9																				
polyUm-21	Um	2'-O-데릴 벤미	10																				
RNA40	Gs	Cs	Cs	Cs	Gs	Us	Gs	As	Cs	Us	Cs			세실(Hell) 등, 2004 / 20-mer	11								
SSD6	Cs	Cs	Us	Us	Us	Cs	Cs	Us	Us	Cs	Us	Us	Cs	Cs	Us	Us	Us	Cs	Cs			4x 브리풀 U	12
SSD9	Cs	Us	Us	Cs	Us	Us	Cs	Cs	Us	Us	Cs	Cs			3x 브리풀 U	13							
SSD10	Cs	Us	Us	Cs	Us	Us	Cs	Cs	Cs	Cs	Cs	Cs			2x 브리풀 U	14							
SSD13	Us	Us	Us	Cs	Cs	Cs	Us	Us	Cs	Cs	Us	Us	Cs	Cs	Cs	Cs	Us	Us	Us	Us		4x 브리풀 U	15
SSD14	Cs	Cs	Us	Us		5x 디플 U, 끝에 U 없음	16																
SSD15	Us	Us	Cs	Cs	Cs	Us	Cs	Cs	Cs	Us	Cs		5x 디플 U, 끝에 U 있음	17									
SSD21	Cs	Cs	Cs	Cs	Cs	Cs	Us	Us	Cs	Us	Us	Cs	Us	Us	Cs	Cs	Cs	Cs	Cs	Cs		3x 브리풀 U, C 한 개가 떨어짐	18
SSD22	Cs	Cs	Cs	Cs	Cs	Cs	Us	Cs	Cs	Cs	Us	Us	Cs		3x 브리풀 U, C 두 개가 떨어짐	19							
SSD23	Cs	Cs	Cs	Us	Us	Cs	Cs	Cs	Cs	Us	Us	Cs		3x 브리풀 U, C 세 개가 떨어짐	20								
SSD24	Cs	Cs	Us	Us	Cs	Cs	Cs	Cs	Cs	Us	Us	Cs		3x 브리풀 U, C 네 개가 떨어짐	21								
SSD25	Cs	Us	Us	Us	Cs	Cs	Cs	Cs	Cs	Us	Us	Cs		3x 브리풀 U, C 나섯 개가 떨어짐	22								
SSD27	Cs	Us	Cs	Cs	Cs	Cs	Cs	Cs		10x 성장 U, C 한 개가 떨어짐	23												
SSD28	Cs		5x 디플 U, C 한 개가 떨어짐	24																			
SSD29	Cs		한 개가 내외 10x U	25																			
polyAs-21	As	polyA RNA 21-mer	26																				
polyCs-21	Cs	polyC RNA 21-mer	27																				
polyTs-21	Ts	polyT RNA 21-mer	28																				
polyUpacer	Us	Us	Us	Rsp	Rsp	Rsp	Us	Us	Rsp	Rsp	Rsp	Us	Us	Rsp	Rsp	Rsp	Us	Us	Us	Us	Us	리보스페이서 한유 Us 부분	29
polyCapacer	Rsp	Rsp	Rsp	Rsp	Cs	Cs	Cs	Rsp	Rsp	Rsp	Cs	Cs	Rsp	Rsp	Rsp	Cs	Cs	Rsp	Rsp	Rsp	Rsp	리보스케이시 함유 Cs 부분	30

<216>

<217> 포스포디에스테르 결합(Uo), 포스포로티오염 결합(Us, As, Cs, Gs, Ts), 2'-O-메틸 변형(Um)과의 또는 DNA 올리고뉴클레오티드(dUs, dUo)로서의 RNA 올리고뉴클레오티드 목록

도면의 간단한 설명

<183> 도 1은 폴리U RNA 21-mer 올리고뉴클레오티드가 포스포다이에스테르 또는 포스포로티오염 결합에 관계없이 F1t3L-DC에 의해 IFN을 유도하는 것을 보여준다. C57BL/6 F1t3L-DC의 별크 배양은 RNA의 다른 복용량으로 자극되고 상청액 내의 IFN 수준은 하룻밤 배양 후 ELISA에 의해 측정된다(삼중 시료±1 SD). (A) 확정되지 않은 길이의 동종종합(homopolymeric) 폴리U 포스포다이에스테르 RNA를 가지는 PEI 복합체를 21-mer 폴리U RNA 포스포다이에스테르(폴리Uo-21) 및 포스포로티오염(폴리Us-21) 올리고뉴클레오티드를 가지는 PEI 복합체와 비교하였다. 포스포다이에스테르(B) 또는 포스포로티오염(C) 폴리U RNA 21-mer는 PEI (+ PEI)를 가지거나 또는 올리고뉴클레오티드가 없는(w/o PEI) 복합체의 형태에서 F1t3L 유도 BM-DC의 자극을 위하여 사용되었다. 폴리U 제조의 평균 분자량이 알려져 있지 않으므로 RNA 농도는 μ 몰보다 μ g/ml로 묘사된다. 자료는 적어도 세 개의 독립적인 실험을 나타낸다.

<184> 도 2는 F1t3L-DC 배양에서 IFN의 폴리U RNA 올리고뉴클레오티드 매개 유도가 올리고뉴클레오티드의 크기와 서로 관련있음을 보여준다. C57BL/6 F1t3L-DC의 별크 배양은 RNA 올리고뉴클레오티드의 다른 복용량으로 자극되었고 상청액 내의 IFN 수준은 하룻밤 배양 후 ELISA에 의해 측정되었다(삼중 시료±1 SD). 21-mer, 15-mer 및 10-mer 폴리U 포스포다이에스테르(A) 또는 포스포로티오염(B) RNA 올리고뉴클레오티드를 가지는 PEI 복합체들은 세포의 자극을 위하여 사용되었다. RNA 농도는 다른 올리고뉴클레오티드의 분자량에 대하여 표준화하는 μ 몰로 기재된다. 자료는 적어도 세 개의 독립적인 실험을 나타낸다.

<185> 도 3은 골격 변형이 폴리U 올리고뉴클레오티드의 IFN 자극 활성에 영향을 주는 것을 보여준다. C57BL/6 F1t3L-DC의 별크 배양은 21-mer RNA 올리고뉴클레오티드/PEI 복합체의 다른 복용량으로 자극되었고, 상청액 내 IFN 수준은 하룻밤 배양 후 ELISA로 측정되었다(삼중 시료±1 SD). (A) 폴리U 포스포다이에스테르 RNA 올리고뉴클레오티드(폴리Uo-21)를 폴리U 포스포다이에스테르 DNA 올리고뉴클레오티드(폴리dUo-21)와 비교하였다. (B) 유사하게, 폴리U 포스포로티오염 RNA(폴리Us-21) 및 DNA(폴리dUs-21) 올리고뉴클레오티드는 F1t3L-DC의 자극을 위하여 사용되었다. (C) 세포들은 폴리U RNA 올리고뉴클레오티드 함유 포스포로티오염(폴리Us-21) 또는 2'-O-메틸(폴리Um-21) 골격 변형으로 처리되었다. 자료는 적어도 세 개의 독립적인 실험을 나타낸다.

<186> 도 4는 RNA 올리고뉴클레오티드의 자극 활성이 그들이 함유하는 우리딘의 수와 서로 관련이 있고, 이중 및 삼중 우리딘 부위가 단일 우리딘 부위보다 더 자극적임을 보여준다. (A-D) C57BL/6 F1t3L-DC의 별크 배양은 21-mer RNA 올리고뉴클레오티드/PEI 복합체의 다른 복용량으로 자극되었고, 상청액 내 IFN 수준은 하룻밤 배양 후 ELISA로 측정되었다(삼중 시료±1 SD). 폴리U 포스포로티오염 RNA 올리고뉴클레오티드(폴리Us-21)는 모든 실험에서 참조(대조) TLR7 리간드로 공급되었다. 다른 21-mer 올리고뉴클레오티드의 조성물에 관해서는 표 1을 참조한다. 자료는 적어도 세 개의 독립적인 실험을 나타낸다.

<187> 도 5는 폴리A, 폴리C, 폴리T RNA 올리고뉴클레오티드도 리보스페이서(ribosSpacer) 부위들도 F1t3L-DC 내 IFN 유도(도입)을 유도하지 않는 것을 보여준다. (A, B) C57BL/6 F1t3L-DC의 별크 배양은 21-mer RNA 올리고뉴클레오티드/PEI 복합체의 다른 복용량으로 자극되었고, 상청액 내 IFN 수준은 하룻밤 배양 후 ELISA로 측정되었다(삼중 시료±1 SD). (A) 폴리U(폴리Us-21), 폴리A(폴리As-21), 폴리C(폴리Cs-21) 및 폴리T(폴리Ts-21) 포스포로티오염 RNA 올리고뉴클레오티드는 F1t3L-DC의 자극을 위하여 사용되었다. (B) 동종종합 폴리U 올리고뉴클레오티드에 의해 유도된 IFN을 우리딘 및 시스티딘 부위(SSD13), 우리딘 및 리보스페이서 부위(폴리Uspacer) 또는 시스티딘 및 리보스페이서 부위(폴리Cspaccer)의 혼합물을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 조성하여 유도된 IFN- α 와 비교하였다. 다른 21-mer 올리고뉴클레오티드의 조성물에 대해서는 표 1을 참조한다. 자료는 적어도 세 개의 독립적인 실험을 나타낸다.

<188> 도 6은 RNA 뉴클레오티드 및 뉴클레오티드 유사체 록소리빈(loxoribine) 및 R848의 분자 구조의 개요도를 제공한다. (A) 우리딘 RNA 뉴클레오티드를 구성하는 이량체의 묘사(서술). 시험된 골격변형(DNA 대 RNA, 2'-O-메틸 및 포스포로티오염변형)은 파란색으로 나타나고, 유기 염기는 가장 밝은 회색이다. (B) 퓨린 사이토신 및 티민 가장 밝은 회색의 유기 염기 구조의 개요도. (C) R848, 록소리빈 및 우리딘 뉴클레오티드의 분자 구조의 묘사(서술). 이 세 개의 분자들의 구조 사이에서 공유되고 TLR7에 의한 이들 리간드의 인식에서 역할을 하는 것을 나타내는 부위들을 가장 밝은 회색이다.

<189> 도 7은 폴리U RNA 올리고뉴클레오티드가 TLR7 리간드 록소리빈 및 R848와 달리 IL-6유도에 보다 더 좋

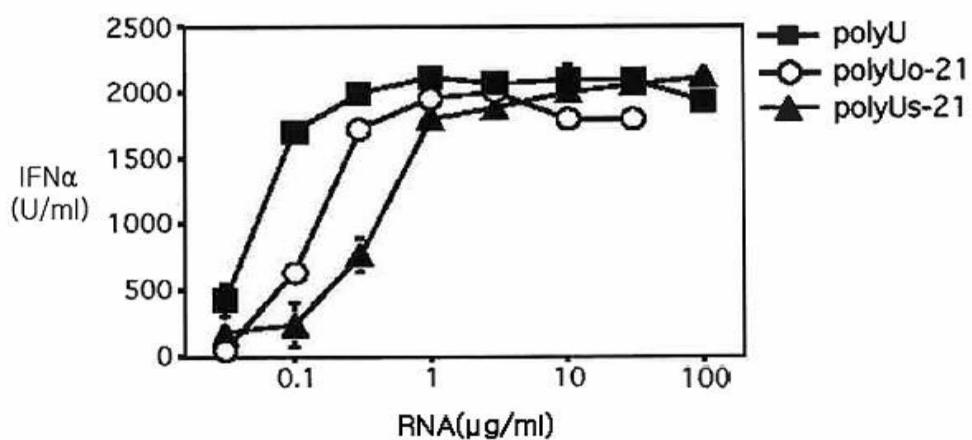
은 형질세포형 DC로부터 IFN의 강한 유도제임을 보여준다. C57BL/6 F1t3L-DC의 벌크 배양은 다른 TLR7 리간드 및 TLR9를 자극하는 DNA 올리고뉴클레오티드 CpG 1668($0.5 \mu\text{g/ml}$)로 자극되었다. 사용된 TLR7 리간드는 PEI와 이미다조퀴놀린 록소리빈(100mM) 및 R848($10 \mu\text{g/ml}$)가 복합체를 형성한 RNA 올리고뉴클레오티드 폴리Us-21($1 \mu\text{g/ml}$)이다. 모든 TLR은 형질세포형 DC에 의한 사이토카인 생산의 최대 수준을 유도하는 복용량으로 사용되었다. 상청액 내 IFN (A) 및 IL-6 (B) 수준은 하룻밤 배양 후 ELISA에 의해 측정되었다(삼중 시료 \pm 1 SD). 자료는 적어도 세 개의 독립적인 실험을 나타낸다.

<190>

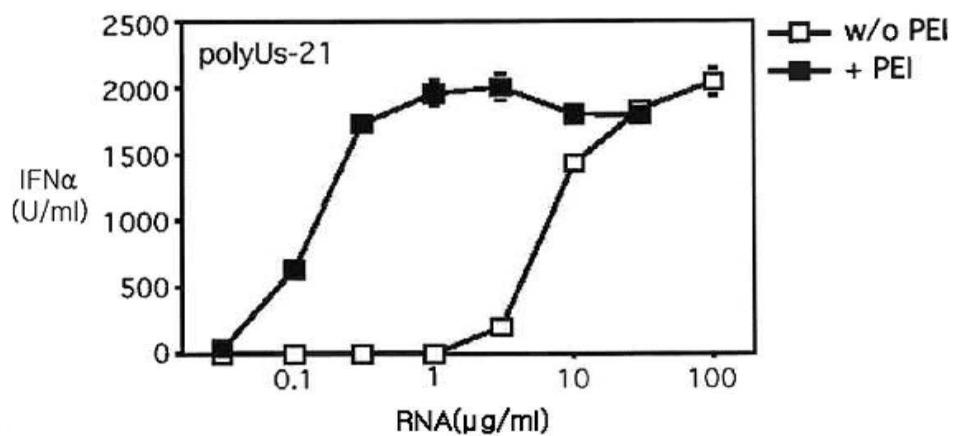
도 8은 TLR7 리간드가 인간 형질세포형 DC에서 IFN 및 IL-6을 유도함을 보여준다. (A) 인간 pDC의 배양은 둘다 PEI 복합체로서 폴리As 21-mer ($1 \mu\text{M}$)에 대한 폴리Us 21-mer (μM 으로 표현된다)의 다른 복용량으로 자극되었다. 상청액 내 IFN 수준은 하룻밤 배양 후 ELISA에 의해 측정되었다. (B) 인간 pDC의 배양은 PEI 복합체로서 As 21-mer ($10 \mu\text{M}$), LyoVec 복합체로서 RNA9.2DR ($1 \mu\text{M}$) 및 R848 ($1 \mu\text{M}$)에 대한 PEI 복합체로서 폴리Us 21-mer ($10 \mu\text{M}$)로 자극되었다. 상청액 내 IFN (B) 및 IL-6 (C)의 수준은 하룻밤 배양 후 ELISA에 의해 측정되었다. 자료는 삼중 시료 \pm 1 SEM의 평균이고 적어도 세 개를 독립적으로 나타낸다.

도면

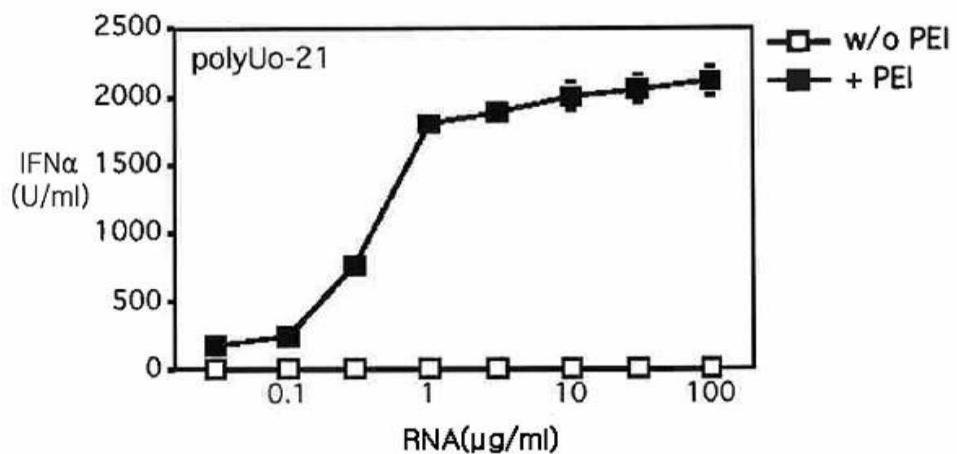
도면1a



도면1b

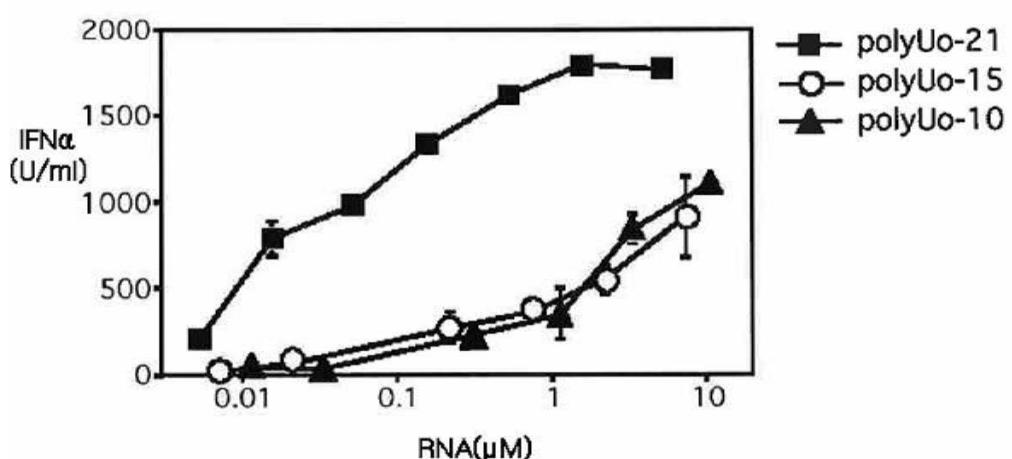


도면1c

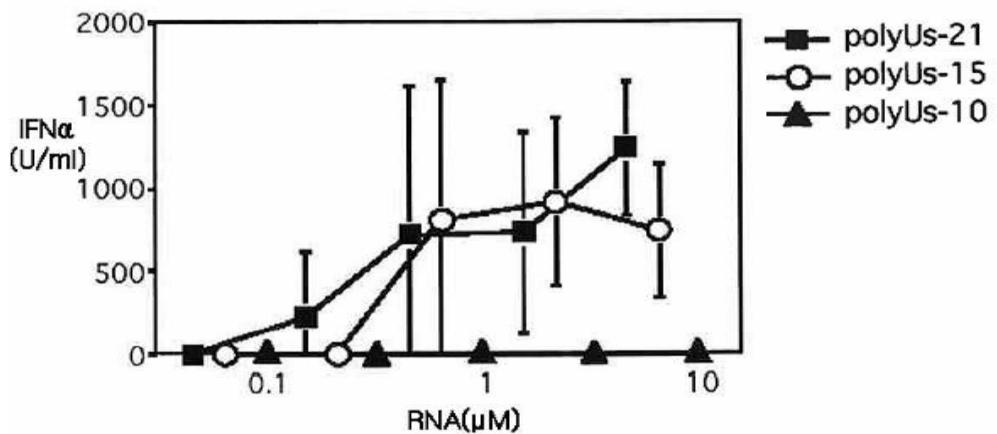


polyU의 크기가 알려져 있지 않기 때문에 x-축은 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이고,
polyUs-21 및 polyUo-21은 동일한 분자량을 갖는다.

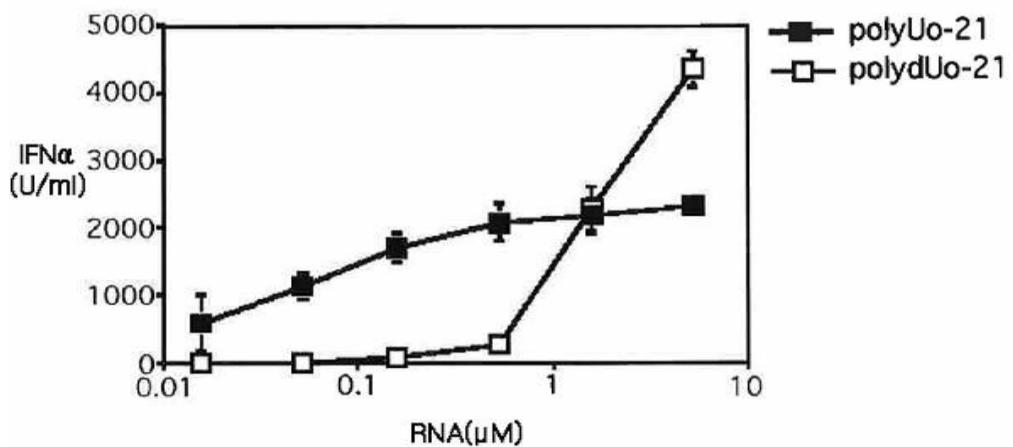
도면2a



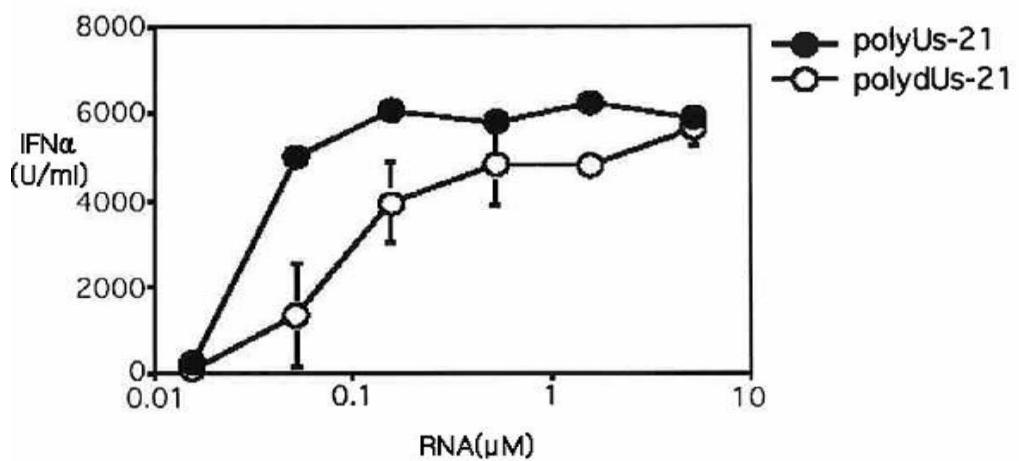
도면2b



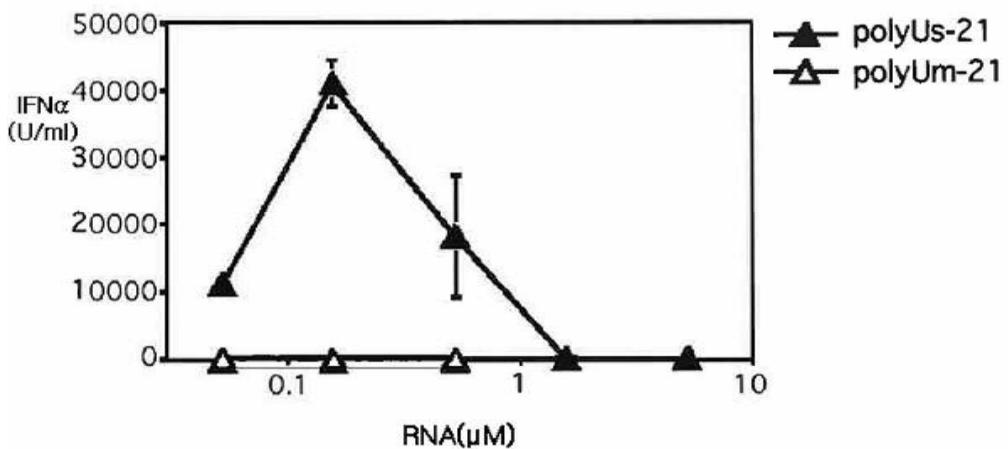
도면3a



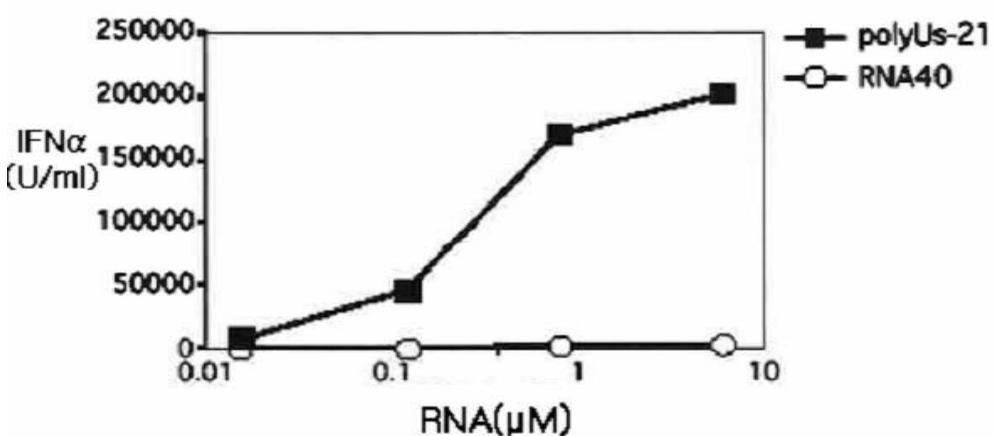
도면3b



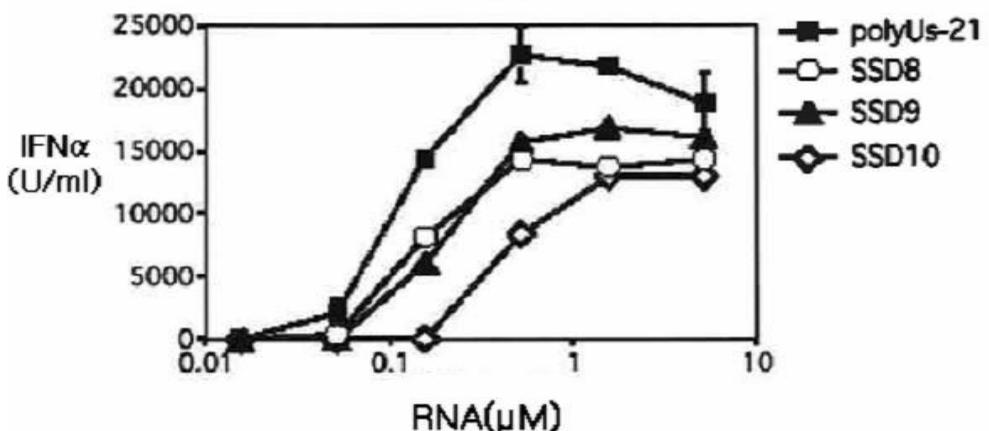
도면3c



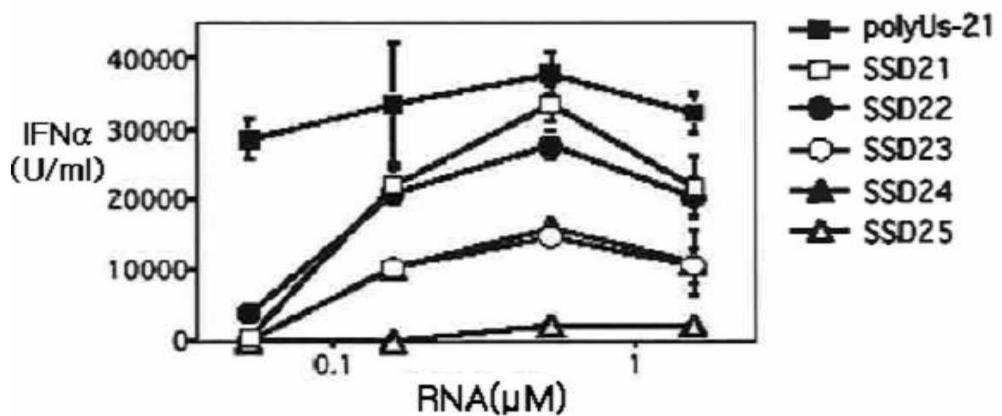
도면4a



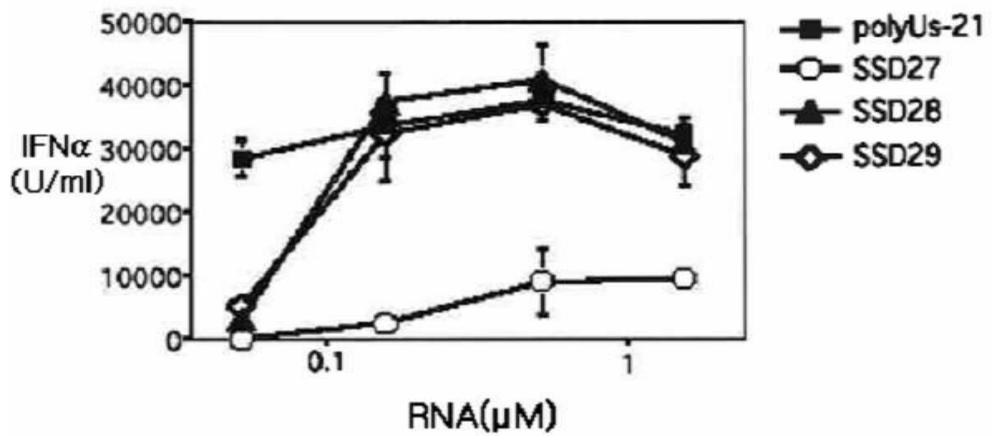
도면4b



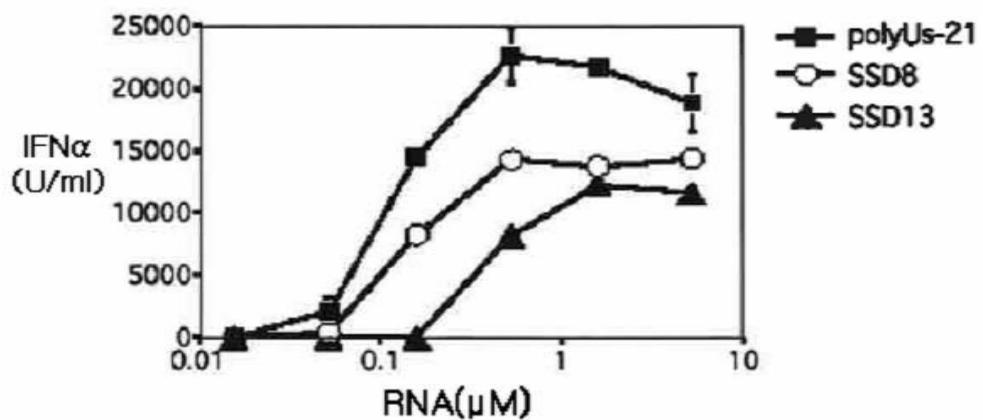
도면4c



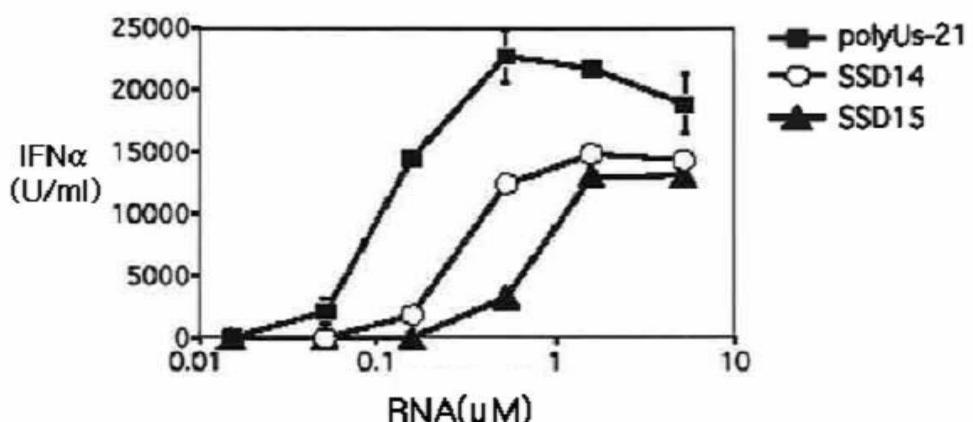
도면4d



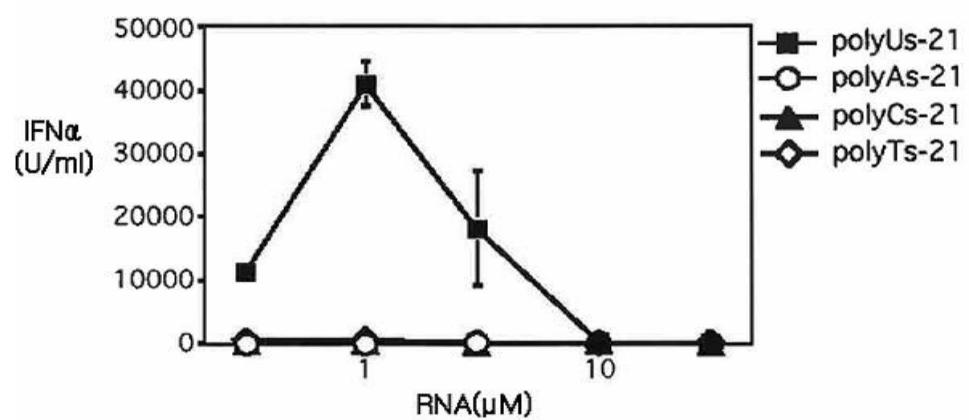
도면4e



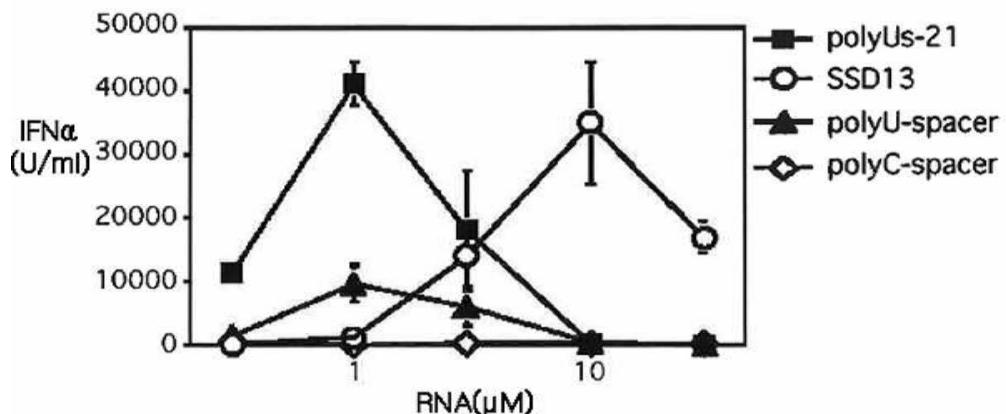
도면4f



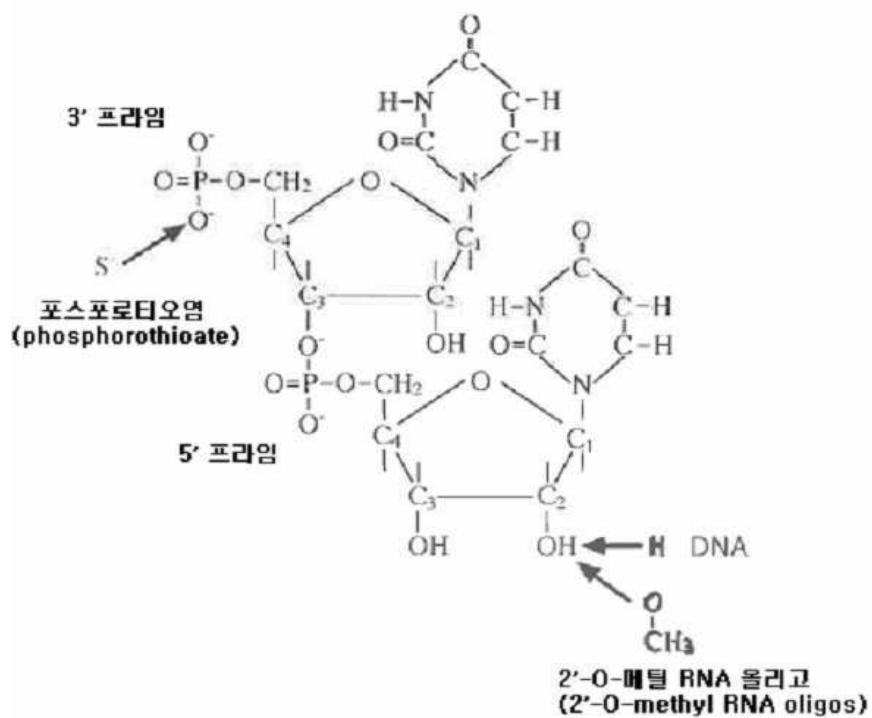
도면5a



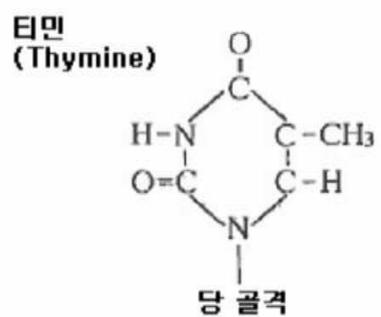
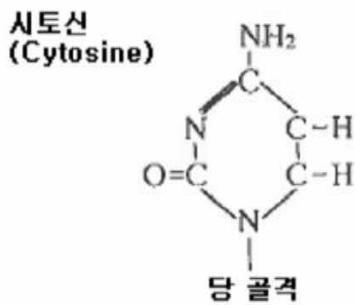
도면5b



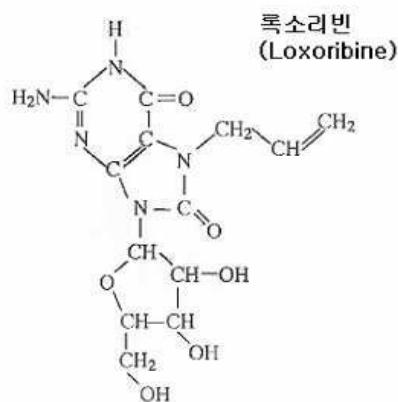
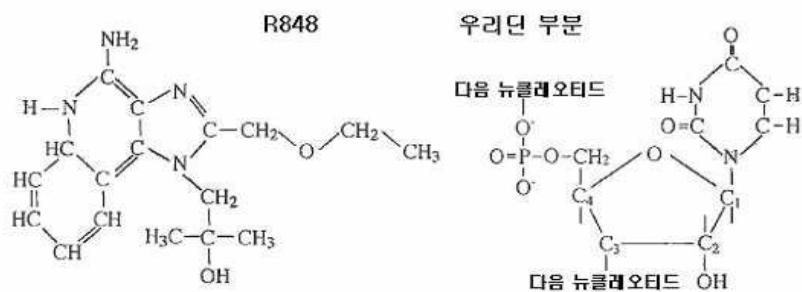
도면6a



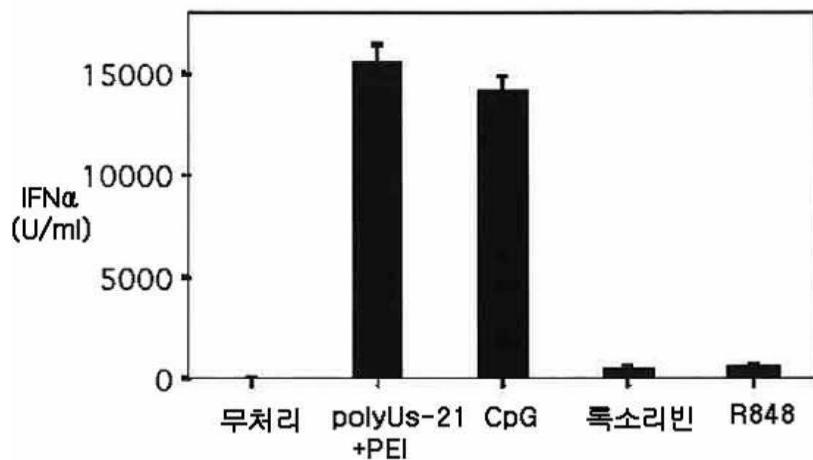
도면6b



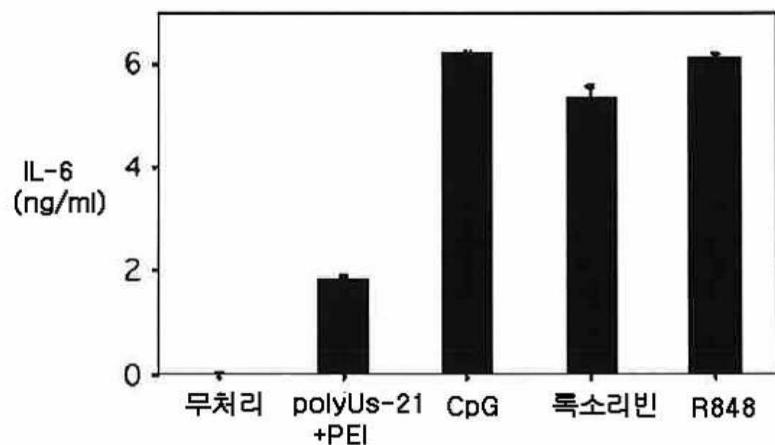
도면6c



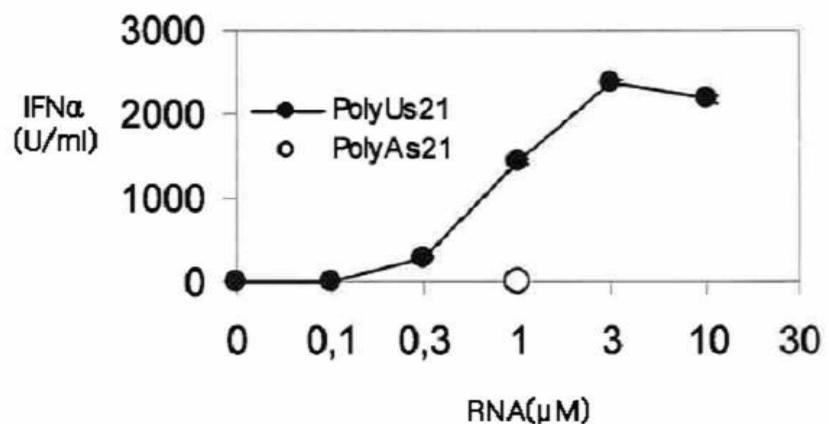
도면7a



도면7b



도면8a



도면8b

