



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0018029
(43) 공개일자 2010년02월16일

(51) Int. Cl.

A61K 31/7088 (2006.01) A61P 37/00 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

- (21) 출원번호 10-2010-7000021(분할)
(22) 출원일자 2005년07월18일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2007-7003778
원출원일자 2007년02월16일
심사청구일자 2008년01월30일
(85) 번역문제출일자 2010년01월04일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2005/004186
(87) 국제공개번호 WO 2007/026190
국제공개일자 2007년03월08일
(30) 우선권주장
60/589,259 2004년07월18일 미국(US)

(71) 출원인

씨에스엘 리미티드

오스트레일리아 빅토리아 3052 파크빌 포플라 로드 45

콜리 파마슈티칼 그룹, 리미티드

캐나다 케이2케이 3에이2 온타리오 카나타 (오타와) 스위트 200 테리 폭스 드라이브 340

(72) 발명자

데이비스, 헤더 엘.

캐나다 케이0에이 1티0 온타리오 던로빈 바를로 크레센트 3090

맥클루스키, 마이클 제이.

캐나다 케이1케이 4브이3 온타리오 오타와 카우드 서클 6

드레인, 데보라 피.

호주 3437 빅토리아 불렌가르크 몰카히 로드 72

(74) 대리인

김영, 장수길

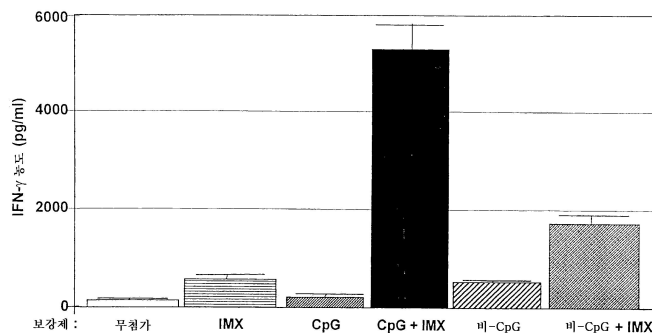
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 면역자극 복합체 및 향상된 인터페론-감마 반응을 유도하기 위한 올리고뉴클레오타이드 제제

(57) 요약

(a) 올리고뉴클레오타이드, (b) 면역자극 복합체 및 (c) 항원을 포함하는 백신 조성물은 강한 인터페론-감마 면역 반응을 유도한다. 면역 자극 모티프를 함유하는 올리고뉴클레오타이드 및 면역 자극 모티프가 결합된 올리고뉴클레오타이드는 모두 면역자극 복합체와 함께 투여될 때 인터페론-감마 반응에 기여한다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

(a) 면역자극성 올리고뉴클레오타이드 성분, (b) 면역자극 복합체 성분, 및 (c) 항원 성분을 포함하는, 포유동물에 투여될 때 인터페론-감마 반응을 유도하는 의약.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 의약에 의해 유도된 상기 인터페론-감마 반응이, (a) 상기 올리고뉴클레오타이드 성분 및 (b) 상기 항원 성분을 포함하지만 면역자극 복합체를 포함하지 않는 제2 의약에 의해 유도된 인터페론-감마 반응보다 더 큰 것인 의약.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드가 하나 이상의 CpG 모티프를 함유하는 것인 의약.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드가 A 클래스 CpG 올리고뉴클레오타이드, B 클래스 CpG 올리고뉴클레오타이드 또는 C 클래스 CpG 올리고뉴클레오타이드인 의약.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드가 하나 이상의 비-CpG 모티프를 함유하는 것인 의약.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드가 T-풍부 올리고뉴클레오타이드, 폴리-T 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리-G 올리고뉴클레오타이드인 의약.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드가 적어도 하나의 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 다리를 함유하는 것인 의약.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드가 팔린드롬(palindrome)을 포함하는 것인 의약.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드가 상기 면역자극 복합체 내로 포함되는 것인 의약.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 면역자극 복합체가 사포닌 및 스테롤을 포함하는 것인 의약.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 항원이 암 항원인 의약.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 항원이 암-특이적인 의약.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 항원이 미생물 항원인 의약.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 항원이 알레르겐인 의약.

청구항 15

제1항에 있어서, 2 이상의 성분이 투여 전에 혼합되는 것인 의약.

청구항 16

제1항에 있어서, 상기 면역자극 복합체가 사포닌 및 스테롤을 포함하고, 상기 항원이 암 항원인 의약.

청구항 17

제1항에 있어서, 성분 (a), (b) 및 (c)가 조합 투여되는 것인 의약.

청구항 18

제1항에 있어서, 성분 (a) 및 (c)가 별개로 투여되는 것인 의약.

청구항 19

제1항에 있어서, 근내 또는 피하 투여용 의약.

청구항 20

제1항에 있어서, 점막 투여용 의약.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 면역자극 복합체 및 면역자극성 올리고뉴클레오티드를 포함하는 제제, 및 상기 제제의 백신 요법에서의 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0002] <관련 특허 출원에 대한 교차 언급>

[0003] 본원은 전문을 본원에 참고로 포함시킨 미국 특허 출원 60/589,259 (2004년 7월 18일 출원)을 기초로 한 우선권을 주장한다.

[0004] 세균 DNA는 B 세포 및 천연 킬러 세포를 활성화시키는 면역 자극 효과를 갖지만, 척추동물 DNA는 그러한 효과를 갖지 않는다 (Tokunaga, T., et al., 1988. Jpn. J. Cancer Res. 79:682-686; Tokunaga, T., et al., 1984, JNCI 72:955-962; Messina, J.P., et al., 1991, J. Immunol. 147:1759-1764; 및 Krieg, 1998, In: Applied Oligonucleotide Technology, C.A. Stein and A.M. Krieg, (Eds.), John Wiley and Sons, Inc., New York, NY, pp. 431-448). 현재, 세균 DNA의 상기 면역 자극 효과는 특정 염기 컨텍스트 (context) 내의 비메틸화된 CpG 디뉴클레오티드 (CpG 모티프)의 존재에 기인하는 것으로 이해되고 있다. 상기 모티프는 세균 DNA에서는 공통적이지만, 척추동물 DNA에서는 메틸화되고 낮은 수준으로 제시된다 (Krieg et al, 1995 Nature 374:546-549; Krieg, 1999 Biochim. Biophys. Acta 93321:1-10). 세균 DNA의 면역 자극 효과는 CpG 모티프를 함유하는 합성 올리고뉴클레오티드 (ODN)를 사용하여 모방할 수 있다. 상기 CpG ODN은 인간 및 쥐 백혈구에 대해 높은 자극 효과, 예를 들어 B 세포 증식, 시토킨 및 면역글로불린 분비, 천연 킬러 (NK) 세포 용해 활성 및 IFN- γ 분비 유도; 및 동시자극 분자를 발현하고 시토킨, 특히 Th1-유사 T 세포 반응을 촉진시키는데 중요한 Th1-유사 시토킨을 분비하도록 수지상 세포 (DC) 및 다른 항원 제시 세포의 활성화 효과를 갖는다. 천연 포스포디에스테르 주쇄 CpG ODN의 상기 면역 자극 효과는 CpG 모티프의 시토신 잔기가 메틸화되거나 CpG 모티프가 GpC로 변경되거나 달리 제거 또는 변형되는 경우 효과가 크게 감소한다는 점에서 CpG에 고도로 특이적이다 (Krieg et al, 1995 Nature 374:546-549; Hartmann et al, 1999 Proc. Natl. Acad. Sci USA 96:9305-10).

[0005] 또한, CpG 면역자극성 올리고뉴클레오티드는 백신 세팅에서 보강제의 효과를 향상시키는 것으로 보고되었다. 미국 특허 6,406,705 B1에는 항원 특이적 면역 반응을 유도하기 위한 CpG 올리고뉴클레오티드, 비-핵산 보강제

및 항원의 조합 사용이 기재되어 있다. 비-핵산 보강제는 데포 (depot) 효과를 생성시키는 보강제, 면역계를 자극하는 보강제 및 상기 두 활성을 모두 갖는 보강제를 포함하였다. 상기 특허에는 비-CpG 올리고뉴클레오타이드를 비-핵산 보강제와 함께 사용하는 것에 대해서는 교시되거나 제안된 바 없었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] <발명의 개요>

[0007] 본 발명은 이전에 확인된 면역자극성 올리고뉴클레오타이드 (예를 들어 CpG 올리고뉴클레오타이드, 이로 제한되지 않음) 및 면역자극 복합체 (예를 들어, ISCOM(등록상표) 및 ISCOMATRIX(등록상표) 보강제)의 조합물이 면역자극성 올리고뉴클레오타이드와 다른 비-핵산 보강제보다 훨씬 더 큰 수준의 인터페론-감마 (IFN-감마)를 자극한다는 예기치 않은 발견에 부분적으로 기초한 것이다. IFN-감마의 생산은 그 자체로, 및 항원 특이적 면역 반응의 생성 과정에서, 특히 감염 질병 및 암의 치료시에 한 단계로서 유용하다. 따라서, 본 발명은 (a) 면역자극성 올리고뉴클레오타이드 및 면역자극 복합체를 포함하고 (b) 항원과 함께 투여되는 제제를 통한 IFN-감마 매개 항원 특이적 면역 반응의 유도에 관련된 방법 및 조성물을 제공한다.

[0008] 본 발명은 추가로 면역자극성이 아닌 것으로 이전에 보고된 올리고뉴클레오타이드가 백신 요법에서 면역자극 복합체와 조합될 때 실제로 면역자극 능력을 갖는다는 관찰에 부분적으로 기초한다. 상기 관찰은 이전에 관찰된 면역자극의 결여가 올리고뉴클레오타이드의 표적 세포 및 수용체 (예를 들어, 수용체의 TLR 패밀리에) 대한 비효율적인 전달 때문임을 제시한다. 따라서, 본 발명은 이전에 특성화된 많은 면역학적으로 불활성인 올리고뉴클레오타이드를 면역자극성 올리고뉴클레오타이드로 전환시킨다.

과제의 해결 수단

[0009] 한 측면에서, 따라서, 본 발명은 항원 특이적 면역 반응, 바람직하게는 향상된 인터페론-감마 반응을 위한 의약을 제공한다. 의약은 올리고뉴클레오타이드 성분, 면역자극 복합체 성분 및 항원 성분을 포함한다. 특정 실시태양에서, 올리고뉴클레오타이드 성분은 하나 이상의 CpG 모티프를 포함한다. 다른 실시태양에서, 올리고뉴클레오타이드 성분은 하나 이상의 비-CpG 모티프를 포함한다. 또다른 실시태양에서, 올리고뉴클레오타이드 성분에는 임의의 CpG 모티프 또는 다른 공지된 면역자극성 모티프가 결합된다. 바람직하게는, 면역자극 복합체는 사포닌 및 스테롤을 포함한다. 또한, 바람직하게는 의약의 적어도 두 성분은 의약 투여 전에 함께 혼합된다.

[0010] 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 의약을 투여함으로써 항원 특이적 면역 반응, 바람직하게는 향상된 인터페론-감마 반응을 유도하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 (a) 올리고뉴클레오타이드 성분, 면역자극 복합체 성분 및 항원 성분을 얻는 단계, 및 (b) 3개의 성분을 별개로 또는 임의의 이들의 조합물로서 환자에게 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 방법은 환자의 인터페론-감마 반응을 측정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 환자는 백신이 투여되는 임의의 척추동물 대상을 포함한다. 바람직하게는, 환자는 인간이지만, 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 칠면조, 염소, 어류, 원숭이, 닭, 래트, 마우스 또는 양일 수 있다.

[0011] 바람직한 실시태양에서, 본 발명에 의해 유도된 항원 특이적 면역 반응은 향상된 IFN-감마 생산을 포함한다. 항원 특이적 면역 반응은 세포성 면역 반응을 포함할 수 있고, 따라서 CD8+ 세포독성 T 림프구의 유도를 포함할 수 있다. 또한, 항원 특이적 면역 반응은 체액성 반응을 포함할 수 있고, 따라서 항원 특이적 Th1- 또는 Th2-유도 면역글로불린의 유도를 포함할 수 있다.

[0012] 몇몇 실시태양에서, 올리고뉴클레오타이드는 면역자극 복합체 내로 혼입된다. 다른 실시태양에서, 올리고뉴클레오타이드는 복합체와 단순히 회합된다 (예를 들어, 비공유결합으로 및 비이온결합으로).

[0013] 몇몇 실시태양에서, 항원은 면역자극 복합체 내로 통합된다. 다른 실시태양에서, 항원은 복합체와 단순히 회합된다.

[0014] 본원에서 사용되는 바와 같이, 올리고뉴클레오타이드 및 면역자극 복합체를 포함하는 제제는 올리고뉴클레오타이드/면역자극 복합체 제제로 언급된다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 항원 및 면역자극 복합체를 포함하는 제제는 면역자극 복합체/항원 제제로 언급된다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 올리고뉴클레오타이드, 항원 및 면역자극 복합체를 포함하는 제제는 올리고뉴클레오타이드/면역자극 복합체/항원 제제로 언급된다.

[0015] 몇몇 실시태양에서, 의약은 올리고뉴클레오타이드와 면역자극 복합체를 함께 혼합함으로써 제조된다. 또한, 항원

이 포함될 수 있다. 몇몇 실시태양에서, 올리고뉴클레오타이드는 면역자극 복합체 내에 통합되는 잔기, 예를 들어 스테롤 (예를 들어, 콜레스테롤), 지질화 태그 (예를 들어 팔미트산, 올레산) 또는 사포닌을 포함한다. 올리고뉴클레오타이드는 이어서 면역자극 복합체의 일부를 형성하는 잔기에 의해 복합체 내로 통합될 수 있다.

[0016] 따라서, 올리고뉴클레오타이드 면역자극 복합체 (ISC) 및 항원은 그 자체로 함께 제제화될 수 있거나, 별법으로 별개로 제제화될 수 있다. 함께 제제화될 경우, 항원 면역자극 복합체 및 올리고뉴클레오타이드는 각각 복합체의 비율로 존재할 수 있다 (예를 들어, 적어도 1%, 적어도 10%, 적어도 25%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 모든 복합체). 별개로 제제화될 경우, 이들은 동일한 위치 또는 상이한 위치에서 투여될 수 있다. 상이한 위치에서 투여될 경우, 위치는 바람직하게는 동일한 배출 림프절로 모인다. 몇몇 실시태양에서, 성분은 함께, 별개로 또는 부분적으로 조합되어 근내 또는 피하 투여된다. 다른 실시태양에서, 성분은 점막에, 예를 들어 경구, 설하, 비강내, 폐내, 직장내 및 질내 투여되고, 이로 제한되지 않는다.

[0017] 바람직하게는, 본 발명의 의약의 3개의 성분 동시에 투여된다.

[0018] 본 발명의 항원은 단리된 항원, 세포 추출물 (예를 들어, 세균 세포 추출물, 바이러스 추출물, 진균 추출물, 항산균 (mycobacteria) 추출물), 약독화 전체 세포 백신, 전체 불활성화 세포 백신, 수지상 세포 백신 또는 DNA 백신으로서 제공될 수 있다. 단리된 항원은 펩티드, 지질, 당지질 또는 탄수화물, 또는 이들의 조합물일 수 있고, 이로 제한되지 않는다.

[0019] 몇몇 실시태양에서, 올리고뉴클레오타이드는 면역자극성 올리고뉴클레오타이드이다. 바람직한 실시태양에서, 면역자극성 올리고뉴클레오타이드는 CpG 올리고뉴클레오타이드, T-풍부 올리고뉴클레오타이드, 폴리-G 올리고뉴클레오타이드, 또는 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드이다. CpG 올리고뉴클레오타이드는 비메틸화된 CpG 디뉴클레오타이드 모티프를 포함한다. CpG 올리고뉴클레오타이드는 A 클래스 CpG 올리고뉴클레오타이드, B 클래스 CpG 올리고뉴클레오타이드 또는 C 클래스 CpG 올리고뉴클레오타이드일 수 있다.

[0020] 올리고뉴클레오타이드는 비-CpG 면역자극성 올리고뉴클레오타이드일 수 있다. 비-CpG 올리고뉴클레오타이드에는 비메틸화된 CpG 디뉴클레오타이드 모티프가 결여된다. 따라서, 비-CpG 올리고뉴클레오타이드는 메틸화된 CpG 모티프, T-풍부 올리고뉴클레오타이드, 폴리-G 올리고뉴클레오타이드 및 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 뉴클레오타이드일 수 있다.

[0021] 또한, 올리고뉴클레오타이드는 공지의 면역자극성 모티프, 예를 들어 상기 언급한 것이 결여된 올리고뉴클레오타이드일 수 있고, 따라서 본 발명 이전에는 면역학적으로 불활성인 것으로 간주되었다. 상기 올리고뉴클레오타이드는 "불활성 올리고뉴클레오타이드"로 본원에서 언급된다.

[0022] 몇몇 실시태양에서, 올리고뉴클레오타이드는 부분적으로 또는 완전히 변형된 포스포에이트 주쇄, 예를 들어 부분적으로 또는 완전히 포스포로티오에이트인 주쇄를 갖는다.

[0023] 본 발명의 방법은 다양한 병태 또는 질병에 걸리거나 걸릴 위험이 있는 대상을 포함하는, 다양한 백신 세팅에 대해 지정될 수 있다. 몇몇 실시태양에서, 환자는 암이 발생하였거나 발생할 위험이 있다. 상기 환자는 항원 특이적 면역 반응이 대상에서 암 또는 감염 질병을 치료하기 위해 의도되는지에 따라 암 항원 및(또는) 미생물 항원을 투여받을 수 있다. 기회 감염 질병은 면역 약화 환자, 예를 들어 항암 치료를 받고 있는 암 환자에서 흔하다. 몇몇 실시태양에서, 암은 암종 또는 육종이다.

[0024] 암은 담관암, 유방암, 자궁경부암, 용모막암종, 결장암, 자궁내막암, 위암, 상피내 신생물, 간암, 폐암 (예를 들어 소세포 및 비-소세포암), 림프종, 흑색종, 신경모세포종, 구내암, 난소암, 췌장암, 전립선암, 직장암, 신장암 및 갑상선암으로 이루어진 군 중에서 선택될 수 있다. 몇몇 중요한 실시태양에서, 암은 골암, 뇌 및 CNS 암, 결합조직암, 식도암, 안암, 호지킨 림프종, 후두암, 구강암, 피부암 및 고환암으로 이루어진 군 중에서 선택될 수 있다. 또한, 암은 흑색종, 전립선암, 유방암 및 결직장암으로 이루어진 군 중에서 선택될 수 있고, 일부 관련 실시태양에서, 암 항원은 각각 흑색종 항원 (예를 들어 항원의 MAGE 패밀리), 전립선암 항원 (예를 들어 PSMA), 유방암 항원 (예를 들어 HER2) 또는 결직장암 항원 (예를 들어 APC)이다.

[0025] 암 항원은 MART-1/Melan-A, gp100, 아데노신 데아미나제-결합 단백질 (ADAbp), FAP, 시클로필린 b, 결직장 관련 항원 (CRC)-C017-1A/GA733, 암배아 항원 (CEA), CAP-1, CAP-2, etv6, AML1, 전립선 특이적 항원 (PSA), PSA-1, PSA-2, PSA-3, 전립선-특이적 막 항원 (PSMA), T-세포 수용체/CD3-제타 사슬 또는 CD20을 포함한다.

[0026] 암 항원은 또한 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 및 MAGE-C5를 포함한다.

[0027] 암 항원은 추가로 GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, GAGE-8 및 GAGE-9를 포함한다.

[0028] 암 항원은 추가로 BAGE, RAGE, LAGE-1, NAG, GnT-V, MUM-1, CDK4, 티로시나제, p53, MUC 패밀리, HER2/neu, p21ras, RCAS1, α-태아단백질, E-카드헤린, α-카테닌, β-카테닌, γ-카테닌, p120ctn, gp100^{Pme1117}, PRAME, NY-ESO-1, cdc27, 선종성 결장폴립증 단백질 (APC), 포드린, 코넥신 (Connexin) 37, Ig-개별특이형, p15, gp75, GM2 ganglioside, GD2 ganglioside, 인간 유두종 바이러스 단백질, 종양 항원의 Smad 패밀리, Imp-1, P1A, EBV-코딩 핵 항원 (EBNA)-1, 뇌 글리코젠 포스포릴라제, SSX-1, SSX-2 (HOM-MEL-40), SSX-1, SSX-4, SSX-5, SCP-1 및 CT-7 및 c-erbB-2를 포함한다.

[0029] 암 항원은 또한 CD20, CD22, CD52, CD33, CD10 (gp100), CD3/T-세포 수용체 (TCR), CD79/B-세포 수용체 (BCR), CD26, 인간 백혈구 항원 (HLA)-DR, HLA-DP, 및 HLA-DQ, RCAS1, 전립선 특이적 막 항원 (PSMA), PSA, EGFR/HER1/erbB1, EGFRvIII, erbB2/HER2/neu), erbB3/HER3, erbB4/HER4m 티로시나제, Melan-A/MART-1, 티로시나제 관련 단백질 (TRP)-1/gp75, 다형 상피 뮤신 (PEM), 인간 상피 뮤신 (MUC1), 알파-태아단백질, 칼리크레인 6 및 10, 가스트린-방출 펩티드/봄베신, 전립선 특이적 항원, 및 암 고환 (CT) 항원을 포함한다.

[0030] 본 발명의 일부 실시태양에서, 환자는 감염이 발생하였거나 발생할 위험이 있다. 감염은 세균 감염, 바이러스 감염, 진균 감염, 기생충 감염 및 항산균 감염으로 이루어진 군 중에서 선택될 수 있다. 한 실시태양에서, 감염은 만성 바이러스 감염, 예를 들어 B형 간염 감염, C형 간염 감염, HIV 감염, HSV 감염 또는 HPV 감염일 수 있고, 이로 제한되지 않는다. 몇몇 실시태양에서, 기생충 감염은 세포내 기생충 감염이다. 다른 실시태양에서, 기생충 감염 비-연충 기생충 감염이다.

[0031] 미생물 감염의 다른 예가 본원에서 언급된다. 치료되는 대상에 따라, 항원은 세균 항원, 바이러스 항원, 진균 항원, 기생충 항원 또는 항산균 항원이다. 몇몇 실시태양에서, 항원은 프리온이다.

[0032] 다른 실시태양에서, 환자는 알레르기 또는 천식이 발생하였거나 발생할 위험이 있고, 항원은 알레르겐이다.

[0033] 본 발명의 방법은 치료법, 예를 들어 수술, 방사선 또는 화학요법제와 함께 수행될 수 있다. 화학요법제는 항암제, 항균제, 항-바이러스제, 항-진균제, 항-기생충제, 항-항산균제, 항-알레르기제 및 항-천식제일 수 있고, 이로 제한되지 않는다. 암이 발생했거나 발생할 위험이 있는 대상의 치료에 대한 실시태양에서, 상기 방법은 추가로 본 발명의 제제 내의 또는 이와 별도로 인터페론-알파의 투여를 포함할 수 있다.

[0034] 다른 측면에서, 본 발명은 면역 세포를 면역 세포 활성화에 효과적인 양의 본 발명의 의약과 접촉시키는 것을 포함하는 항원 특이적 면역 반응 유도 방법을 제공한다. 면역 세포는 림프구, 예를 들어 B 또는 T 세포, 항원 제시 세포, 예를 들어 수지상 세포 또는 천연 킬러 (NK) 세포일 수 있다. 활성화는 생체 내에서, 시험관 내에서 또는 생체 외에서, 즉 면역 세포를 대상으로부터 단리하고, 면역 세포를 제제와 접촉시키고, 활성화된 면역 세포를 대상에 재투여함으로써 수행할 수 있다.

[0035] 본 발명의 각각의 측면은 상이한 제한 및 실시태양을 포함할 수 있다. 따라서, 임의의 성분 또는 성분의 조합을 수반하는 본 발명의 각각의 제한은 본 발명의 다른 측면 및 실시태양에 포함될 수 있다. 본 발명은 본원에 개시된 구성의 상세한 설명 및 성분의 배열로 한정되지 않는다. 오히려, 본 발명은 구체적으로 설명되지 않은 실시태양을 포함하고, 상이한 방식으로 수행될 수 있다.

[0036] 본원에서 사용되는 표현 및 용어는 설명하기 위한 것으로서, 제한적인 의미로 생각하지 않아야 한다. 본원에서 "포함하는", "포괄하는", "갖는", "함유하는", "수반하는" 및 그의 변형 표현을 사용하는 것은 그 용어 다음에 나열되는 대상 및 그의 균등체 및 추가의 대상을 포함하는 의미이다.

발명의 효과

[0037] (a) 올리고뉴클레오타이드, (b) 면역자극 복합체 및 (c) 항원을 포함하는 백신 조성물은 강한 인터페론-감마 면역 반응을 유도한다. 면역 자극 모티프를 함유하는 올리고뉴클레오타이드 및 면역 자극 모티프가 결합된 올리고뉴클레오타이드는 모두 면역자극 복합체와 함께 투여될 때 인터페론-감마 반응에 기여한다.

도면의 간단한 설명

[0038] 도면은 단지 예시적인 것으로서, 본원에서 개시되는 본 발명의 실행을 위해 필요한 것이 아니다.

- 도 1은 인터페론-감마 (IFN-g) 수준 (SC 면역화)에 대한 상이한 보강제의 효과를 보여주는 막대 그래프이다.
- 도 2는 인터페론-감마 (IFN-g) 수준 (IM 면역화)에 대한 상이한 보강제의 효과를 보여주는 막대 그래프이다.
- 도 3은 인터페론-감마 (IFN-g) 수준 (SC 면역화)에 대한 상이한 올리고뉴클레오타이드의 효과를 보여주는 막대 그래프이다.
- 도 4는 인터페론-감마 (IFN-g) 수준 (SC 면역화)에 대한 상이한 올리고뉴클레오타이드의 효과를 보여주는 막대 그래프이다.
- 도 5는 항-HBs (SC 면역화)의 총 IgG 역가에 대한 상이한 보강제의 효과를 보여주는 막대 그래프이다.
- 도 6은 HBsAg 특이적 CTL 반응 (SC 면역화)에 대한 상이한 보강제의 효과를 보여주는 그래프이다.
- 도 7은 백반의 존재 및 부재 하에 인터페론-감마 (IFN-g) 수준에 대한 상이한 보강제의 효과를 보여주는 막대 그래프이다.
- 도 8은 백반의 존재 및 부재 하에 인터페론-감마 (IFN-g) 수준에 대한 상이한 보강제의 효과를 보여주는 막대 그래프이다.
- 도 9는 면역자극 복합체와 함께 제제화된 올리고뉴클레오타이드를 사용한, B16-OVA 흑색종에 대한 백신 요법의 결과를 보여주는 다이어그램이다.
- 도 10은 B16-OVA 흑색종의 면역요법의 결과를 보여주는 다이어그램이다.
- 도 11은 백신 접종된 동물에서 OVA-특이적 CTL의 유도를 보여주는 그래프이다.
- 도 12는 백신 접종된 동물에서 OVA-특이적 IFN-감마 분비를 보여주는 그래프이다.
- 도 13은 OVA-로딩 (loaded) 펜타머를 사용하여 비장세포에서 OVA-특이적 CD8+ T 세포를 보여주는 그래프이다.
- 도 14는 유도된 자궁경부 세포 암종을 갖고 E6/E7 펩티드 항원으로 백신 접종된 동물의 생존 데이터를 보여주는 그래프이다.
- 도 15는 유도된 자궁경부 세포 암종을 갖고 E6/E7 펩티드 항원으로 백신 접종된 동물의 중앙 부피 데이터를 보여주는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0039] 본 발명은 올리고뉴클레오타이드 및 항원에 대한 예상치 못한 효율적인 전달 비히클로서의 특정 제제에 관한 것이다. 제제는 면역자극 복합체 (예를 들어, ISCOM(등록상표) 또는 ISCOMATRIX(등록상표) 보강제)를 포함한다. 본 발명은 면역자극 복합체가 이전에 면역자극성으로서 특성화된 올리고뉴클레오타이드 및 이전에 면역학적으로 불활성인 것으로 특성화된 올리고뉴클레오타이드의 전달에 특히 효과적인 비히클이라는 예기치 못한 발견을 부분적으로 전제로 한다. 임의의 특정 메커니즘에 매이기를 의도하지 않지만, 면역자극 복합체가 두 종류의 올리고뉴클레오타이드를 특정 수용체 (예를 들어 수용체의 TLR 패밀리에 대한 및(또는) 수용체와 무관하게 특정 세포에 대한 전달을 향상시킨다고 가정한다. 이것은 올리고뉴클레오타이드 제제가 백신 세팅으로 투여될 때 Th1-편향된 항원 특이적 면역 반응의 관찰된 향상을 야기하였다.
- [0040] 올리고뉴클레오타이드 및 면역자극 복합체 조합물 (백신 세팅에서)에 대해 관찰된 상승작용은 이전에 면역자극성 올리고뉴클레오타이드 및 다른 비-핵산 보강제 (백신 세팅에서)에 대해 관찰된 상승작용의 수준보다 훨씬 더 컸다. 상기 차이는 전혀 예상되지 않은 것이었다. 추가로, 면역자극 복합체를 사용하면 이전에 면역학적으로 불활성인 것으로 특성화된 올리고뉴클레오타이드를 본질적으로 면역자극성 올리고뉴클레오타이드로 전환시킬 수 있다는 것은 예상치 못한 것이었다. 후자의 관찰은 이전에 특성화된 면역자극성 모티프를 갖지 않은 올리고뉴클레오타이드를 포함하도록, 면역자극을 위해 사용될 수 있는 올리고뉴클레오타이드의 범위를 확장시킨다.
- [0041] 실시예에서 보다 상세하게 설명되는 바와 같이, 본 발명에 따라 쥐 백신 모델에서 면역자극 복합체 (ISCOMATRIX(등록상표) 보강제)를 서열 TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (서열 1) (ODN 7909)의 CpG 면역자극성 올리고뉴클레오타이드 또는 서열 TGC TGC TTT TGT GCT TTT GTG CTT (서열 2) (ODN 2137)의 "불활성" 올리고뉴클레오타이드와 동시투여하면 시험된 올리고뉴클레오타이드 또는 복합체 단독의 경우보다 훨씬 더 높은 수준의 IFN-감마를 생성시켰음이 관찰되었다. 면역자극 복합체와 면역자극성 또는 "불활성" 올리고뉴클레오타이드 사이의 상

승작용은 피하 (SC) 및 근육내 (IM) 주사 후에 관찰되었다.

[0042] CpG 면역자극성 올리고뉴클레오타이드 (서열 TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (서열 1)을 갖는다) (ODN 7909) 및 면역자극 복합체 및 B형 간염 표면 항원 (HbsAg)의 피하 (SC) 주사는 보강제 단독 및 CpG 올리고뉴클레오타이드와 다른 비-핵산 보강제의 조합물에 비해 유의하게 더 큰 항-HBs IgG 수준을 생성시켰다. 또한, 면역자극 복합체를 이전에 저자극성 또는 비-자극성인 것으로 특성화된 비-CpG 올리고뉴클레오타이드 (서열 TGC TGC TTT TGT GCT TTT GTG CTT (서열 2)를 갖는다) (ODN 2137)에 부가하면 보강제 단독에 비해 항-HBs IgG 수준을 유의하게 증가시켰다.

[0043] 면역자극 복합체와 CpG 면역자극성 올리고뉴클레오타이드의 동시투여도 보강제 단독 및 CpG 면역자극성 올리고뉴클레오타이드와 다른 비-핵산 보강제의 조합물에 비해 세포용해 T 림프구 (CTL) 활성을 크게 향상시켰다. 유사한 결과가 "불활성" 올리고뉴클레오타이드에 대해 관찰되었다.

[0044] 따라서, 면역자극 복합체를 면역자극성 또는 "불활성" 올리고뉴클레오타이드에 부가하면, IFN-감마 생산 및 CTL 활성화에 의해 제시되는 강한 Th1-편향된 항원 특이적 면역 반응을 유도한다. 이러한 발견은 적어도 부분적으로 시험된 일부 올리고뉴클레오타이드의 면역학적으로 "불활성"인 특성 때문에 예상치 못한 것이다. 또한, 이러한 발견은 관찰된 상승작용이 다른 보강제 조합물에 비해 올리고뉴클레오타이드와 면역자극 복합체의 조합물에서 가장 컸기 때문에 예상치 못한 것이다.

[0045] 상기 발견은 면역자극 복합체 및 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 제제가 감염 질병, 암, 알레르기 및 천식에 대한 요법을 포함하여 이로 제한되지 않는 백신 용법의 최적화시에 유용함을 나타낸다.

[0046] 면역자극 복합체:

[0047] 면역자극 복합체는 10 nm내지 100 nm, 보다 일반적으로 30 nm 내지 50 nm 크기 범위의 직경을 갖고 항원이 그에 대해 다량체화될 수 있는 매트릭스를 형성하는 글리코시드 및 스테롤로 이루어진 입자이다. 복합체는 보강제 및 항원 전달체로서 기능할 수 있다. 보강제로서, 이들은 면역계를 자극할 수 있다. 동물 모델을 사용하여, 이들 복합체는 인플루엔자 바이러스, C형 간염 바이러스 및 인간 유두종 바이러스 항원을 포함한 많은 항원에 대해 세포성 및 체액성 면역 반응을 향상시키는 것으로 나타났다.

[0048] 면역자극 복합체는 글리코시드, 예를 들어 퀴라아 (Quillaia) 사포닌, 스테롤 (예를 들어 콜레스테롤) 및 바람직하게는 인지질 (비제한적인 예를 들어 포스파티딜콜린 및 포스파티딜 에탄올아민)을 함유한다. 바람직하게는, 글리코시드는 퀴라야 사포나리아 (Quillaja saponaria) 나무의 껍질로부터 얻은 Quil A로부터 유도가 가능한 정제된 사포닌 분획인 ISCOMPREP(등록상표) 사포닌이다. 면역자극 복합체 형성은 EP 109942 A 및 EP 231039 A에 보다 상세히 설명되어 있다. 면역자극 복합체는 또한 미국 특허 5,178,860에 기재된 바와 같이 제조될 수 있다. 상기 참고 문헌의 전체 내용은 본원에 참고로 포함된다.

[0049] 본 발명은 항원 함유 및 항원 비함유 복합체를 포함하는 특정 범위의 면역자극 복합체의 사용을 포함한다. ISCOM(등록상표) 및 ISCOMATRIX(등록상표) 보강제가 문헌에 기재된 공지의 기술을 사용하여 연구 규모로 제조될 수 있는 면역자극 복합체의 예이다 (Morein et al., 1989, In: Vaccine: Recent trends and Progress, Gergoriadis et al. (Eds.), Plenum Press, New York, pp. 153-161; Cox et al., 1997, In: Vaccine Design: The Role of Cytokine Networks, Gergoriadis et al. (Eds.), Plenum Press, New York, pp. 33-49; Coulter et al., 1998, Vaccine 16:1243-1253). ISCOM(등록상표) 및 ISCOMA TRIX(등록상표) 보강제는 또한 문헌에 기재된 공지의 기술을 사용하여 대규모로 제조될 수도 있다 (Kersten et al., 2004, In: Novel Vaccination Strategies, Kaufmann (Ed.), WILEY-VCR, Germany).

[0050] 제제:

[0051] 올리고뉴클레오타이드 및 항원은 함께 또는 별개로 임의의 수의 방식으로 면역자극 복합체와 함께 제제화될 수 있다. 예를 들어, 올리고뉴클레오타이드는 항원의 존재 또는 부재 하에 단순히 면역자극 복합체와 혼합될 수 있다. 별법으로, 올리고뉴클레오타이드는 예를 들어 매트릭스의 하나 이상의 성분을 제공함으로써 그 자체가 복합체의 매트릭스의 일부일 수 있다. 일례로서, 올리고뉴클레오타이드는 스테롤, 예를 들어 콜레스테롤에 컨주게이팅될 수 있다. 이어서, 올리고뉴클레오타이드는 스테롤에 대한 연결에 의해 복합체의 매트릭스의 일부가 될 수 있다. 올리고뉴클레오타이드는 또한 다른 물질, 예를 들어 소수성 분자 (예를 들어, 팔미트산, 올레산, 리놀레산 등)에 컨주게이팅될 수 있다. 이어서 상기 방식으로 컨주게이팅된 올리고뉴클레오타이드는 양친화성 분자를 복합체의 매트릭스에 제공하면서 복합체 내로 통합될 수 있다.

- [0052] 항원은 유사하게 혼합되거나 복합체 내로 통합될 수 있다.
- [0053] 올리고뉴클레오타이드 제제의 경우, 올리고뉴클레오타이드 대 면역자극 복합체의 비는 100:1 내지 1:100일 수 있다. 바람직한 실시태양에서, 비는 1:1, 3:1, 10:1 또는 20:1이다.
- [0054] 항원 제제에서, 항원 대 면역자극 복합체의 비율은 100:1 내지 1:100일 수 있다. 바람직한 실시태양에서, 비율은 1:10 내지 10:1이다.
- [0055] **면역자극성 올리고뉴클레오타이드:**
- [0056] 본 발명은 넓은 범위의 올리고뉴클레오타이드의 사용을 포함한다. 이들 중 일부는 이전에 면역자극성인 것으로 특성화되고(되거나) 이전에 특성화된 면역자극성 모티프 (아래에 설명되는 바와 같이)를 포함한다. 일반적으로, 면역자극성 올리고뉴클레오타이드는 면역자극 복합체의 부재시에도 면역자극 효능을 보이는 올리고뉴클레오타이드이다. 그 예는 비메틸화된 및 메틸화된 CpG 디뉴클레오타이드 모티프를 포함하는 CpG 면역자극성 올리고뉴클레오타이드, T-풍부 및 폴리-T 면역자극성 올리고뉴클레오타이드, 폴리-G 면역자극성 올리고뉴클레오타이드 및 포스포로티오에이트 면역자극성 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 이들은 각각 아래에서 보다 상세하게 논의된다.
- [0057] 본 발명에 의해 포함되는 올리고뉴클레오타이드의 제2 카테고리는 특히 백신 세팅에서 이전에 면역학적으로 불활성으로 특성화된 올리고뉴클레오타이드이다. 그 예는 임의의 공지의 면역자극성 모티프를 포함하지 않는 올리고뉴클레오타이드 및 이전에 Th1 면역자극 효능을 갖는 것으로 관찰되지 않은 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 후자의 올리고뉴클레오타이드 카테고리는 종종 본원에서 "불활성" 올리고뉴클레오타이드로 언급된다. 상기 클래스의 올리고뉴클레오타이드와 면역자극 복합체의 조합물은 이들을 면역자극성 올리고뉴클레오타이드로 전환시킨다. 활성의 변경은 상기 올리고뉴클레오타이드의 특정 수용체 및 세포에 대한 효율적인 전달 및 상기 수용체 및 세포에 의한 흡수에 의한 것일 수 있다.
- [0058] 상기한 바와 같이, 면역자극성 올리고뉴클레오타이드는 면역 반응을 유도하는 것으로 이전에 증명된 특이적 서열을 포함한다. 이들 특이적 서열은 "면역자극성 모티프"로 언급되고, 적어도 하나의 면역자극성 모티프를 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 "면역자극성 올리고뉴클레오타이드"로 언급된다. 몇몇 실시태양에서, 면역자극성 모티프는 바람직하게는 "내부 면역자극성 모티프"이다. 용어 "내부 면역자극성 모티프"는 면역자극성 모티프 서열의 5' 및 3' 말단 모두에 연결된 적어도 하나의 뉴클레오타이드에 의해 모티프 서열보다 길이가 더 긴 핵산 서열 내의 모티프 서열의 위치를 나타낸다.
- [0059] 본 발명은 사실상 DNA 또는 RNA인 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 그 결과, 용어 "올리고뉴클레오타이드"는 올리고데옥시뉴클레오타이드 (DNA) 및 올리고리보데옥시뉴클레오타이드 (RNA)를 모두 의미한다.
- [0060] **CpG 올리고뉴클레오타이드:**
- [0061] 몇몇 경우에, 면역자극성 올리고뉴클레오타이드는 비메틸화된 CpG 면역자극성 모티프를 포함한다. 상기 올리고뉴클레오타이드는 CpG 올리고뉴클레오타이드로 언급된다. 본원에서 사용되는 바와 같이, CpG 올리고뉴클레오타이드는 면역자극성 CpG 올리고뉴클레오타이드를 의미하고, 따라서 상기 용어는 달리 나타내지 않으면 서로 교환가능하게 사용된다. CpG 면역자극성 모티프의 메틸화 상태는 일반적으로 디뉴클레오타이드 내의 시토신 잔기를 나타낸다. 적어도 하나의 비메틸화된 CpG 디뉴클레오타이드를 포함하는 면역자극성 올리고뉴클레오타이드는, 포스페이트 결합에 의해 3' 구아닌에 연결된 5' 비메틸화된 시토신을 포함하고 면역계를 활성화시키는 올리고뉴클레오타이드이다. 적어도 하나의 메틸화된 CpG 디뉴클레오타이드를 포함하는 면역자극성 올리고뉴클레오타이드는, 포스페이트 결합에 의해 3' 구아닌에 연결된 5' 메틸화된 시토신을 포함하고 면역계를 활성화시키는 올리고뉴클레오타이드이다. CpG 면역자극성 올리고뉴클레오타이드는 CpG 디뉴클레오타이드를 포함할 수 있는 팔린드롬을 포함할 수 있다.
- [0062] CpG 올리고뉴클레오타이드는 많은 등록된 특허, 공개된 특허 출원 및 다른 간행물, 예를 들어 미국 특허 6,194,388; 6,207,646; 6,214,806; 6,218,371; 6,239,116; 및 6,339,068에 기재되었다.
- [0063] 다른 실시태양에서, 면역자극성 올리고뉴클레오타이드는 CpG 디뉴클레오타이드를 포함하지 않는다.
- [0064] 비메틸화된 CpG 디뉴클레오타이드를 포함하지 않는 면역자극성 올리고뉴클레오타이드는 "비-CpG 면역자극성 올리고뉴클레오타이드"로 언급되고, 비-CpG 면역자극성 모티프를 갖거나, 또는 임의의 공지의 면역자극성 모티프가 결합될 수 있다.
- [0065] 본 발명의 면역자극성 올리고뉴클레오타이드는 추가로 메틸화된 및 비메틸화된 CpG와 비-CpG 면역자극성 모티프의

조합물을 포함할 수 있다.

[0066] CpG 올리고뉴클레오타이드의 상이한 클래스:

[0067] 상이한 클래스의 CpG 면역자극성 올리고뉴클레오타이드가 최근에 확인되었다. 이들은 A, B 및 C 클래스로 언급되고, 아래에서 보다 상세하게 설명된다. 본 발명의 방법은 상기 상이한 클래스의 CpG 면역자극성 올리고뉴클레오타이드의 사용을 포함한다.

[0068] "A 클래스" CpG 면역자극성 올리고뉴클레오타이드는 높은 수준의 인터페론-알파를 유도하고, B 세포 활성화에 대한 최소의 효과를 가지면서 NK 세포 활성화를 유도하는 능력에 의해 기능적으로 특성화된다. 구조적으로, 상기 클래스는 일반적으로 5' 및 3' 말단에 안정화된 폴리-G 서열을 갖는다. 또한, 상기 클래스는 적어도 6개의 뉴클레오타이드, 팔린드롬 포스포디에스테르 CpG 디뉴클레오타이드-함유 서열을 갖지만, 문헌 [Yamamoto S et al. J Immunol 148:4072-6 (1992)]에 기재된 바와 같은 헥사머인 팔린드롬 GACGTC (서열 3), AGCGCT (서열 4) 또는 AACGTT (서열 5) 중의 하나를 반드시 포함하는 것은 아니다. A 클래스 CpG 면역자극성 올리고뉴클레오타이드 및 상기 클래스의 예시적인 서열은 모두 2000년 9월 27일 출원된 미국 특허 출원 09/672,126 및 PCT 출원 PCT/US00/26527 (WO 01/22990)에 기재되어 있다.

[0069] "B 클래스" CpG 면역자극성 올리고뉴클레오타이드는 B 세포를 활성화시키는 능력에 의해 기능적으로 특성화되지만, IFN- α 및 NK 세포 활성화 유도는 비교적 약하다. 구조적으로, 상기 클래스는 일반적으로 충분히 안정화되고, 임의로 바람직한 특정 염기 컨텍스트 내에 비메틸화된 CpG 디뉴클레오타이드를 포함한다.

[0070] 한 실시태양에서, 본 발명은 적어도 하기 식으로 표시되는 B 클래스 CpG 올리고뉴클레오타이드를 제공한다:

[0071] 5' $X_1X_2CGX_3X_4$ 3'

[0072] 여기서, X_1 , X_2 , X_3 및 X_4 는 뉴클레오타이드이다. 한 실시태양에서, X_2 는 아데닌, 구아닌 또는 티민이다. 다른 실시태양에서, X_3 은 시토신, 아데닌 또는 티민이다.

[0073] 다른 실시태양에서, 본 발명은 적어도 하기 식으로 표시되는 단리된 B 클래스 CpG 올리고뉴클레오타이드를 제공한다:

[0074] 5' $N_1X_1X_2CGX_3X_4N_2$ 3'

[0075] 여기서, X_1 , X_2 , X_3 및 X_4 는 뉴클레오타이드이고, N은 임의의 뉴클레오타이드이고, N_1 및 N_2 는 각각 약 0-25개의 N으로 이루어진 핵산 서열이다. 한 실시태양에서, X_1X_2 는 GpT, GpG, GpA, ApA, ApT, ApG, CpT, CpA, CpG, TpA, TpT 및 TpG로 이루어지는 군 중에서 선택되는 디뉴클레오타이드이고, X_3X_4 는 TpT, ApT, TpG, ApG, CpG, TpC, ApC, CpC, TpA, ApA 및 CpA로 이루어지는 군 중에서 선택되는 디뉴클레오타이드이다. 바람직하게는, X_1X_2 는 GpA 또는 GpT이고, X_3X_4 는 TpT이다. 다른 실시태양에서, X_1 또는 X_2 또는 둘 모두는 퓨린이고, X_3 또는 X_4 또는 둘 모두는 피리미딘이거나 또는 X_1X_2 는 GpA이고 X_3 또는 X_4 또는 둘 모두는 피리미딘이다. 한 바람직한 실시태양에서, X_1X_2 는 TpA, ApA, ApC, ApG 및 GpG로 이루어지는 군 중에서 선택되는 디뉴클레오타이드이다. 또다른 실시태양에서, X_3X_4 는 TpT, TpA, TpG, ApA, ApG, GpA 및 CpA로 이루어지는 군 중에서 선택되는 디뉴클레오타이드이다. 다른 실시태양에서, X_1X_2 는 TpT, TpG, ApT, GpC, CpC, CpT, TpC, GpT 및 CpG로 이루어지는 군 중에서 선택되는 디뉴클레오타이드이고; X_3 은 A 및 T로 이루어지는 군 중에서 선택되는 뉴클레오타이드이고, X_4 는 뉴클레오타이드이되, X_1X_2 가 TpC, GpT 또는 CpG일 때, X_3X_4 는 TpC, ApT 또는 ApC가 아니다.

[0076] 또다른 바람직한 실시태양에서, CpG 올리고뉴클레오타이드는 서열 5' $TCN_1TX_1X_2CGX_3X_4$ 3' (서열 6)을 갖는다. 본 발명의 CpG 올리고뉴클레오타이드는 몇몇 실시태양에서 GpT, GpG, GpA 및 ApA로 이루어지는 군 중에서 선택되는 X_1X_2 및 TpT, CpT 및 TpC로 이루어지는 군 중에서 선택되는 X_3X_4 를 포함한다.

[0077] 본 발명의 B 클래스 CpG 올리고뉴클레오타이드 서열은 상기와 같이 문헌에 널리 기재된 것 및 PCT 특허 출원 PCT/US95/01570 및 PCT/US97/19791, 및 미국 특허 6,194,388, 6,207,646, 6,214,806, 6,218,371, 6,239,116 및 6,339,068에 개시된 것이다. 예시적인 서열은 후자의 출원 및 특허에 개시된 것을 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

- [0078] "C 클래스"의 CpG 면역자극성 올리고뉴클레오타이드는 B 세포 및 NK 세포를 활성화시키고 IFN- α 를 유도하는 능력에 의해 기능적으로 특성화된다. 구조적으로, 상기 클래스는 일반적으로 B 클래스-타입 면역자극성 모티프 서열, 및 GC-풍부 팔린드롬 또는 준 (near)-팔린드롬을 포함한다. 상기 올리고뉴클레오타이드의 일부는 전통적인 "자극성" CpG 서열 및 "GC-풍부" 또는 "B-세포 중화" 모티프를 모두 갖는다. 상기 조합 모티프 올리고뉴클레오타이드는 전통적인 B 클래스 CpG 올리고뉴클레오타이드와 관련된 효과 (즉, B 세포 활성화 및 수지상 세포 (DC) 활성화의 강한 유도)와 A 클래스 CpG ODN과 관련된 효과 (즉, IFN- α 및 NK 세포 활성화의 강한 유도, 그러나 B 세포 및 DC 활성화의 비교적 약한 유도) 사이에 해당하는 면역 자극 효과를 갖는다 (Krieg AM et al. (1995) Nature 374:546-9; Ballas ZK et al. (1996) J Immunol 157:1840-5; Yamamoto S et al. (1992) J Immunol 148:4072-6). 또한, 바람직한 B 클래스 CpG 올리고뉴클레오타이드는 종종 포스포로티오에이트 주쇄를 갖고, 바람직한 A 클래스 CpG 올리고뉴클레오타이드는 혼합 또는 키메릭 주쇄를 갖고, C 클래스의 조합 모티프 면역 자극 올리고뉴클레오타이드는 안정화된, 예를 들어 포스포로티오에이트, 키메릭 또는 포스포디에스테르 주쇄를 가질 수 있고, 몇몇 바람직한 실시태양에서, 이들은 반연성 주쇄를 가질 수 있다. 상기 클래스는 2002년 8월 19일 출원된 미국 특허 출원 US 10/224,523에 기재된 바 있다.
- [0079] C 클래스 CpG 올리고뉴클레오타이드의 한 자극성 도메인 또는 모티프는 식 5' X_1 DCGHX₂ 3'에 의해 규정된다. D는 C 이외의 다른 뉴클레오타이드이다. C는 시토신이다. G는 구아닌이다. H는 G 이외의 다른 뉴클레오타이드이다. X_1 및 X_2 는 0 내지 10개 뉴클레오타이드 길이의 임의의 핵산 서열이다. X_1 은 CG를 포함할 수 있고, 이 경우에 바람직하게는 상기 CG 바로 앞에 T가 존재한다. 몇몇 실시태양에서, DCG는 TCG이다. X_1 은 바람직하게는 0 내지 6개 뉴클레오타이드 길이이다. 몇몇 실시태양에서, X_2 는 임의의 폴리 G 또는 폴리 A 모티프를 포함하지 않는다. 다른 실시태양에서, 면역자극성 올리고뉴클레오타이드는 폴리-T 서열을 5' 말단 또는 3' 말단에 갖는다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "폴리-A" 또는 "폴리-T"는 각각 4개 이상의 연속적인 A 또는 T의 스트레치, 예를 들어 5' AAAA 3' 또는 5' TTTT 3'을 의미한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "폴리-G 말단"은 핵산의 5' 말단 또는 3' 말단에 존재하는 4개 이상의 연속적인 G의 스트레치, 예를 들어 5' GGGG 3'을 의미한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "폴리-G 올리고뉴클레오타이드"는 식 5' X_1X_2 GGGX₃ X_4 3'의 올리고뉴클레오타이드를 의미하고, 상기 식에서 X_1 , X_2 , X_3 및 X_4 는 뉴클레오타이드이고, 바람직하게는 X_3 및 X_4 의 적어도 하나는 G이다. 상기 식에서 B 세포 자극성 도메인을 위한 몇몇 바람직한 디자인은 TTTTCG (서열 7), TCG (서열 8), TTCG (서열 9), TTTCG (서열 10), TTTTCG (서열 11), TCGT (서열 12), TTCGT (서열 13), TTTCGT (서열 14), TCGTCGT (서열 15)를 포함한다.
- [0080] C 클래스 CpG 올리고뉴클레오타이드의 제2 모티프는 P 또는 N으로 언급되고, X_1 의 바로 5'측에 또는 X_2 의 바로 3'측에 위치한다.
- [0081] N은 CGG 트리뉴클레오타이드로 시작되는 B-세포 중화 서열이며 길이가 10개 뉴클레오타이드 이상이다. B-세포 중화 모티프는 CG의 앞에 C가 오거나 뒤에 G가 오는 하나 이상의 CpG 서열을 포함하거나 (Krieg AM et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95: 12631-12636), CG의 C가 메틸화되어 있는 CG 함유 DNA 서열이다. 중화 모티프 또는 서열은 다른 면에서는 비자극성인 모티프 중에 존재하는 경우에는 어느 정도의 면역자극능을 갖지만 다른 면역자극성 모티프의 컨텍스트에 존재하는 경우에는 그 다른 모티프의 면역자극 효능을 저하시키는 역할을 하는 모티프이다.
- [0082] P는 적어도 10개의 뉴클레오타이드를 포함하는 GC-풍부 팔린드롬 서열이다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "팔린드롬" 및 동등하게 "팔린드롬 서열"은 역순 반복, 즉, ABCDEE'D'C'B'A' (여기서, A와 A', B와 B' 등은 통상의 왓슨-크릭 염기쌍을 형성할 수 있는 염기들임)와 같은 서열을 말한다.
- [0083] 본원에서 사용되는 바와 같이, "GC-풍부 팔린드롬"은 적어도 2/3의 G 및 C의 염기 조성을 갖는 팔린드롬으로 언급된다. 몇몇 실시태양에서, GC-풍부 도메인은 바람직하게는 "B 세포 자극성 도메인"의 3'에 존재한다. 10개 염기 길이의 GC-풍부 팔린드롬의 경우에, 팔린드롬은 따라서 적어도 8개의 G 및 C를 포함한다. 12개 염기 길이의 GC-풍부 팔린드롬의 경우에, 팔린드롬은 또한 적어도 8개의 G 및 C를 포함한다. 14-mer GC-풍부 팔린드롬의 경우에, 팔린드롬의 적어도 10개의 염기는 G 및 C이다. 몇몇 실시태양에서, GC-풍부 팔린드롬은 G 및 C로만 이루어진다.
- [0084] 몇몇 실시태양에서, GC-풍부 팔린드롬은 적어도 81% G 및 C의 염기 조성을 갖는다. 상기 10개 염기 길이의 GC-풍부 팔린드롬의 경우에, 팔린드롬은 따라서 G 및 C로만 이루어진다. 상기 12개 염기 길이의 GC-풍부 팔린드롬의 경우에, 팔린드롬의 적어도 10개의 염기 (83%)가 G 및 C인 것이 바람직하다. 몇몇 바람직한 실시태양에서,

12개 염기 길이의 GC-풍부 팔린드롬은 G 및 C로만 이루어진다. 14-mer GC-풍부 팔린드롬의 경우에, 팔린드롬의 적어도 12개의 염기 (86%)가 G 및 C이다. 몇몇 바람직한 실시태양에서, 14개 염기 길이의 GC-풍부 팔린드롬은 G 및 C로만 이루어진다. GC-풍부 팔린드롬의 C는 비메틸화되거나 메틸화될 수 있다.

- [0085] 일반적으로, 상기 도메인은 적어도 3개, 보다 바람직하게는 각각 4개, 가장 바람직하게는 5개 이상의 C 및 G를 갖는다. 상기 도메인 내의 C 및 G의 수가 동일할 필요는 없다. C 및 G는 이들이 자가상보성 이중체 또는 팔린드롬, 예를 들어 CCGCGCGG (서열 16)을 형성할 수 있도록 배열되는 것이 바람직하다. 여기에는 A 또는 T가 개재될 수 있지만, 예를 들어 모티프 CGACGTTCGTCG (서열 17) 또는 CGGCGCCGTGCCG (서열 18)에서와 같이 자가상보성이 적어도 부분적으로 보존되는 것이 바람직하다. 상보성이 보존되지 않을 경우, 비상보성 염기쌍이 TG인 것이 바람직하다. 바람직한 실시태양에서, 팔린드롬의 일부가 아닌 3개 이하, 바람직하게는 2개 이하, 그리고 가장 바람직하게는 단 1개의 연속되는 염기가 존재한다. 일부 실시태양에서, GC-풍부 팔린드롬은 하나 이상의 CGG 트리머, 하나 이상의 CCG 트리머 또는 하나 이상의 CGCG 테트라머를 포함한다. 다른 일부 실시태양에서, GC-풍부 팔린드롬은 CCCCCCGGGGG (서열 19) 또는 GGGGGGCCCCC (서열 20), CCCCCGGGG (서열 21) 또는 GGGGGCCCC (서열 22)가 아니다.
- [0086] GC 풍부 영역의 G의 적어도 하나는 이노신 (I)으로 치환될 수 있다. 몇몇 실시태양에서, P는 1 초과인 I를 포함한다.
- [0087] 특정 실시태양에서, 번역자극성 올리고뉴클레오타이드는 5' NX₁DCGHX₂ 3', 5' X₁DCGHX₂N 3', 5' PX₁DCGHX₂ 3', 5' X₁DCGHX₂P 3', 5' X₁DCGHX₂PX₃ 3', 5' X₁DCGHPX₃ 3', 5' DCGHX₂PX₃ 3', 5' TCGHX₂PX₃ 3', 5' DCGHPX₃ 3' 또는 5' DCGHP 3' 중의 하나의 식으로 표시된다.
- [0088] 본 발명은 식 5' N₁PyGN₂P 3'로 규정되는 다른 번역 자극 올리고뉴클레오타이드를 제공한다. N₁은 1 내지 6개 뉴클레오타이드 길이의 임의의 서열이다. Py는 피리미딘이다. G는 구아닌이다. N₂는 0 내지 30개 뉴클레오타이드 길이의 임의의 서열이다. P는 적어도 10개 뉴클레오타이드 길이의 서열을 포함하는 GC-풍부 팔린드롬이다.
- [0089] N₁ 및 N₂는 50% 넘게 피리미딘을 함유할 수 있으며, 더 바람직하게는 50% 넘게 T를 함유할 수 있다. N₁은 CG를 포함할 수 있으며, 이때 바람직하게는 T가 상기 CG의 바로 앞에 온다. 일부 실시태양에서, N₁PyG가 TCG (서열 8)이고, 가장 바람직하게는 TCGN₂ (여기서, N₂는 G가 아님)이다.
- [0090] N₁PyGN₂P는 하나 이상의 이노신 (I) 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. N₁ 중에 있는 C 또는 G는 이노신에 의해 치환될 수 있으나, CpI가 IpG보다 바람직하다. IpG와 같은 이노신 치환의 경우, 최적 활성은 IG 또는 CI 사이의 연결기가 포스포디에스테르인 '반연성 (semi-soft)' 또는 키메릭 주쇄의 사용시에 얻어질 수 있다. N₁은 하나 이상의 CI, TCI, IG 또는 TIG 모티프를 포함할 수 있다.
- [0091] 특정 실시태양에서, N₁PyGN₂는 TTTTTCG (서열 7), TCG (서열 8), TTCG (서열 9), TTTCG (서열 10), TTTTCG (서열 11), TCGT (서열 12), TTCGT (서열 13), TTTCGT (서열 14) 및 TCGTCGT (서열 15)로 이루어지는 군 중에서 선택되는 서열이다.
- [0092] C-클래스 올리고뉴클레오타이드의 몇몇 비제한적인 예는 다음을 포함한다:
- [0093] T*C₁G*C₂G*T*C₃G*T*T*C₄G*C₅G*C₆G*C₇G*C₈G (서열 31)
- [0094] T*C₁G*T*C₂G*A*C₃G*T*T*C₄G*C₅G*C₆G*C₇G*C₈G (서열 23)
- [0095] T*C₁G*C₂G*A*C₃G*T*T*C₄G*C₅G*C₆G*C₇G*C₈G (서열 24)
- [0096] T*C₁G*C₂G*A*C₃G*T*T*C₄G*C₅G*C₆G*C₇G*C₈G (서열 25)
- [0097] T*C₁G*C₂G*T*C₃G*T*T*C₄G*C₅G*C₆G*C₇G*C₈G (서열 26)
- [0098] T*C₁G*A*C₂G*T*T*C₃G*C₄G*C₅G*C₆G*C₇G*C₈G (서열 27)
- [0099] T*C₁G*A*C₂G*T*T*C₃G*C₄G*C₅G*C₆G*C₇G*C₈G (서열 28)
- [0100] T*C₁G*C₂G*T*T*C₃G*T*T*C₄G*C₅G*C₆G*C₇G*C₈G (서열 29)
- [0101] T*C₁G*C₂G*A*C₃G*T*T*C₄G*C₅G*C₆G*C₇G*C₈G (서열 30)

- [0102] 여기서, *는 포스포로티오에이트 결합을 의미하고, -는 포스포디에스테르 결합을 의미한다.
- [0103] **다른 면역자극성 올리고뉴클레오타이드:**
- [0104] 다른 면역자극성 올리고뉴클레오타이드는 T-풍부이고(이거나) 폴리-T 모티프를 갖는다. 이들은 미국 특허 출원 공개 US 2003/0212026 A1에 보다 상세하게 기재되어 있다. 폴리-T 모티프는 일반적으로 4개 이상의 연속적인 티민 잔기에 의해 특성화된다. 또다른 면역자극성 올리고뉴클레오타이드는 폴리-G 모티프를 갖는다. 이들은 2000년 3월 16일 공개된 PCT 출원 공개 WO 00/14217에 보다 상세하게 기재되어 있다. 폴리-G 모티프는 일반적으로 4개 이상의 연속적인 구아닌 잔기에 의해 특성화된다.
- [0105] 상기에서 알 수 있는 바와 같이, 본 발명의 몇몇 실시태양은 비-CpG 올리고뉴클레오타이드를 사용한다. 비-CpG 올리고뉴클레오타이드는 면역자극성이거나 면역자극성이 아니거나 상관없이 비메틸화된 CpG 모티프가 결여된 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 따라서, T-풍부, 폴리-T, 폴리-C, 메틸화된 CpG 및 다른 CpG-유사 모티프가 비-CpG 올리고뉴클레오타이드의 군에 존재할 수 있다.
- [0106] **TLR 리간드:**
- [0107] 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 TLR 리간드일 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, TLR 리간드는 TLR (즉, Toll-유사 수용체)에 결합하는 분자이다. TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10 및 TLR11을 포함하여 현재까지 확인된 많은 TLR이 존재한다. 유사하게 현재까지 확인된 많은 TLR 리간드가 존재하고, 이중 일부는 면역자극성 (예를 들어, CpG 올리고뉴클레오타이드)인 것으로 관찰되었다. 본 발명은 이전에 TLR 리간드로서 확인되었지만 또한 면역학적으로 불활성인 것으로 관찰된 TLR 리간드를 포함한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 면역학적으로 불활성인 TLR 리간드는 면역자극성 효능이 전혀 없거나 낮은 것으로 관찰된 것이다. 또한, 본 발명은 본 발명에 따라 면역자극 복합체 (백신 세팅에서)의 존재 및 부재 하에 시험되어 불활성 화합물로부터 면역자극성 화합물로 전환되는 것으로 밝혀진 화합물을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, TLR 리간드는 예를 들어 비메틸화된 CpG 모티프, 메틸화된 CpG 모티프, 폴리 T 모티프, T-풍부 모티프, 폴리-G 모티프 등을 포함하여 이로 제한되지 않는, 이전에 특성화된 면역자극성 모티프를 갖지 않는 올리고뉴클레오타이드이다. 면역자극성 모티프의 예는 각각 2003년 9월 25일 및 2003년 11월 13일 공개된 미국 특허 출원 공개 US 2003/018406 A1 및 US 2003/0212026 A1 (그 전체 내용이 본원에 참고로 포함됨)에 보다 상세하게 기재되어 있다.
- [0108] TLR 리간드에 대한 스크리닝 분석은 2003년 6월 5일 공개된 미국 특허 출원 공개 US 2003/0104523 (그 전체 내용이 본원에 참고로 포함됨)에 기재된 바 있다. 본 발명은 TLR 리간드로 밝혀졌지만 (예를 들어 방사성 표지된 리간드-수용체 분석을 통해), 예를 들어 비교시에 그의 상대적 면역자극성 효능이 무시할 정도이거나 치료적으로 유용하지 않기 때문에 면역자극성 올리고뉴클레오타이드에 비해 불활성인 것으로 보이는 화합물의 사용을 포함한다.
- [0109] 상기 불활성 TLR 리간드의 한 카테고리는 면역자극 복합체의 부재 하에 면역자극성 효능이 존재하지 않거나 낮지만, 면역자극 복합체와 함께 제제화될 경우에는 당업계에 공지된 분석으로 측정시에 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 10배, 적어도 20배, 적어도 50배의 또는 이를 초과하는 면역자극성 효능의 증가를 보이는 것이다.
- [0110] 몇몇 불활성 TLR 리간드는 진성 음성 대조군 (예를 들어, 염수, 또는 면역자극 복합체의 존재시에 배경 수준 초과 면역자극성 효능의 증가를 보이지 않는 화합물)과 거의 동일한, 면역자극 복합체의 부재시의 활성을 보인다. 이들은 음성 대조군의 5% 이내, 10% 이내, 25% 이내, 50% 이내 또는 75% 이내의 면역자극성 효능을 보일 수 있다.
- [0111] 몇몇 중요한 실시태양에서, TLR 리간드는 TLR3 리간드, TLR7 리간드, TLR8 리간드 및 TLR9 리간드이다.
- [0112] 이전에 스크리닝되어 비-TLR 리간드로 특성화된 많은 물질이 특정 스크리닝 분석 (예를 들어 TLR 결합보다는 TLR 신호전달 관독을 사용하는 분석)에서 단순히 면역자극성이 아니었지만 실제로는 TLR 리간드일 가능성이 있다. 본 발명은 면역자극 복합체와 조합될 때 면역자극성으로 판독될 경우 이전에 무시된 다양한 상기 화합물을 포함한다.
- [0113] **주쇄 변형, 키메릭 등:**
- [0114] 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 바람직하게는 부분적으로 분해에 대해 저항한다 (예를 들어, 안정화된다). "안정화된 올리고뉴클레오타이드 분자"는 생체내 분해 (예를 들어 엑소- 또는 엔도-뉴클레아제를 통한)에 비교적

저항성인 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 핵산 안정화는 주쇄 변형을 통해 달성될 수 있다. 포스포로티오에이트 연결을 갖는 올리고뉴클레오타이드는 최대 활성을 제공하고, 올리고뉴클레오타이드를 세포내 엑소뉴클레아제 및 엔도뉴클레아제에 의한 분해로부터 보호한다. 다른 변형 올리고뉴클레오타이드는 포스포디에스테르 변형된 올리고뉴클레오타이드, 포스포디에스테르와 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드의 조합물, 메틸포스포네이트, 메틸포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, p-에톡시 및 이들의 조합물을 포함한다.

[0115] 번역자극성 올리고뉴클레오타이드는 키메릭 주쇄를 포함할 수 있다. 본 발명의 목적을 위해, 키메릭 주쇄는 부분적으로 안정화된 주쇄로서, 적어도 하나의 뉴클레오타이드간 연결은 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 연결이고, 적어도 하나의 다른 뉴클레오타이드간 연결은 안정화된 뉴클레오타이드간 연결이고, 적어도 하나의 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르 유사 연결 및 적어도 하나의 안정화된 연결은 상이하다. 보라노포스포네이트 연결은 포스포디에스테르 연결에 비해 안정화되는 것으로 보고되었기 때문에, 주쇄의 키메릭 특성을 위해 보라노포스포네이트 연결은 컨텍스트에 따라 포스포디에스테르-유사 또는 안정화된 것으로서 분류될 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 따른 키메릭 주쇄는 몇몇 실시태양에서 적어도 하나의 포스포디에스테르 (포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사) 연결 및 적어도 하나의 보라노포스포네이트 (안정화된) 연결을 포함한다. 다른 실시태양에서, 본 발명에 따른 키메릭 주쇄는 보라노포스포네이트 (포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사) 및 포스포로티오에이트 (안정화된) 연결을 포함할 수 있다. "안정화된 뉴클레오타이드간 연결"은 포스포디에스테르 뉴클레오타이드간 연결에 비해 생체내 분해 (예를 들어 엑소- 또는 엔도-뉴클레아제를 통한)에 비교적 저항성인 연결을 의미한다. 바람직한 안정화된 뉴클레오타이드간 연결은 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 메틸포스포네이트 및 메틸포스포로티오에이트를 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 다른 안정화된 뉴클레오타이드간 연결은 펩티드, 알킬, 데포스포 (dephospho) 및 상기 설명한 바와 같은 다른 것을 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

[0116] 변형 주쇄, 예를 들어 포스포로티오에이트는 포스포르아미데이트 또는 H-포스포네이트 화학반응을 이용하는 자동화된 기법을 이용하여 합성할 수 있다. 아릴- 및 알킬-포스포네이트는 예컨대 미국 특허 4,469,863에 기재된 것과 같이 제조할 수 있고; 알킬포스포트리에스테르 (전하를 띤 산소 잔기가 미국 특허 5,023,243 및 유럽 특허 092,574에 기재된 바와 같이 알킬화된 것)는 시판되는 시약을 사용하여 자동화된 고체상 합성에 의해 제조할 수 있다. 다른 DNA 주쇄 변형 및 치환을 행하는 방법들도 문헌에 기재되어 있다 [Uhlmann E et al. (1990) Chem Rev 9 0:544; Goodchild J (1990) Bioconjugate Chem 1:165]. 키메릭 올리고뉴클레오타이드를 제조하는 방법도 공지되어 있다. 예를 들어, 울만 (Ullmann) 등에게 등록된 특허는 상기 기술을 개시한 바 있다.

[0117] 혼합된 주쇄 변형 ODN은 시판되는 DNA 합성기 및 표준 포스포르아미다이트 화학을 이용하여 합성할 수 있다 (F. E. Eckstein, "Oligonucleotides and Analogues - A Practical Approach" IRL Press, Oxford, UK, 1991, 및 M. D. Matteucci and M. H. Caruthers, Tetrahedron Lett. 21, 719 (1980)). 커플링 후에, PS 연결이 Beaucage 시약 (R. P. Iyer, W. Egan, J. B. Regan and S. L. Beaucage, J. Am. Chem. Soc. 112, 1253 (1990)) (아세트니트릴 중의 0.075 M) 또는 페닐 아세틸 디술피드 (PADS)를 사용한 황화, 이어서 테트라히드로푸란 중의 아세트산 무수물, 2,6-루티딘 (1:1:8; v:v:v) 및 N-메틸이미다졸 (테트라히드로푸란 중의 16%)을 사용한 캐핑 (capping)에 의해 도입된다. 상기 캐핑 단계는 포스포로티오에이트 연결이 존재하여야 하는 위치에 바람직하지 않은 포스포디에스테르 (PO) 연결의 형성을 최소화하기 위해 황화 반응 후에 수행된다. 예를 들어 CpG 디뉴클레오타이드에 포스포디에스테르 연결을 도입하는 경우에, 중간체 인-III은 물/피리딘 중의 요오드 용액을 사용할 처리에 의해 산화된다. 고체 지지체로부터의 절단 및 진한 암모니아를 사용한 처리 (50°C에서 15 hr)에 의한 탈보호 후에, ODN은 NaCl-구배 (예를 들어 버퍼 A: 아세트니트릴/물 = 1:4/v:v 중의 10 mM NaH₂PO₄, pH 6.8; 버퍼 B: 아세트니트릴/물 = 1:4/v:v 중의 10 mM NaH₂PO₄, 1.5 M NaCl; 5 내지 60% B, 1 ml/min에서 30 분)를 사용한 Gen-Pak Fax 컬럼 (Millipore-Waters)에 대한 HPLC 또는 모세관 겔 전기영동에 의해 분석한다. ODN은 Source High Performance 컬럼 (아머삼 파마시아 (Amersham Pharmacia))에 대한 HPLC 또는 FPLC에 의해 정제될 수 있다. HPLC-균질 분획을 합하여 C18 컬럼을 통해 또는 한외여과에 의해 탈염시킨다. ODN은 계산된 질량을 확인하기 위해 MALDI - TOF 질량분광계로 분석하였다.

[0118] 또한, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 다른 변형을 포함할 수 있다. 이들은 비이온성 DNA 유사체, 예컨대 알킬- 및 아릴포스페이트 (전하를 띤 포스포네이트 산소가 알킬 또는 아릴기로 치환된 것), 포스포디에스테르 및 알킬포스포트리에스테르 (전하를 띤 산소 잔기가 알킬화된 것)를 포함한다. 테트라에틸렌글리콜 또는 헥사에틸렌글리콜과 같은 디올을 한측 또는 양측 말단에 함유하는 핵산 역시 뉴클레아제 분해에 대해 실질적으로 저항성인 것으로 밝혀졌다.

[0119] **연성 및 반연성 ODN:**

[0120] 본 발명의 일부 실시태양에서, 올리고뉴클레오타이드는 연성 또는 반연성 올리고뉴클레오타이드일 수 있다. 연성 올리고뉴클레오타이드는 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르 유사 뉴클레오타이드간 연결이 하나 이상의 내부 피리미딘-퓨린 디뉴클레오타이드 (YZ) 내에, 그리고 그에 직접 인접하여서만 존재하는, 부분적으로 안정화된 주쇄를 갖는 번역자극성 올리고뉴클레오타이드이다. 바람직하게는 YZ는 YG, 즉 피리미딘-구아노신 (YG) 디뉴클레오타이드이다. 적어도 하나의 내부 YZ 디뉴클레오타이드 자체는 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 뉴클레오타이드간 연결을 갖는다. 적어도 하나의 내부 YZ 디뉴클레오타이드 직접 인접하여 존재하는 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 뉴클레오타이드간 연결은 적어도 하나의 내부 YZ 디뉴클레오타이드의 5', 3' 또는 5'과 3' 모두일 수 있다.

[0121] 특히, 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 뉴클레오타이드간 연결은 "내부 디뉴클레오타이드"를 수반한다. 내부 디뉴클레오타이드는 일반적으로 뉴클레오타이드의 쌍 내의 어느 뉴클레오타이드도 말단 뉴클레오타이드가 아닌, 즉 뉴클레오타이드의 쌍 내의 어느 뉴클레오타이드도 올리고뉴클레오타이드의 5' 또는 3' 말단을 규정하는 뉴클레오타이드가 아닌, 뉴클레오타이드간 연결에 의해 연결된 임의의 쌍의 인접한 뉴클레오타이드를 의미한다. 따라서, n개의 뉴클레오타이드 길이인 선형 올리고뉴클레오타이드는 총 n-1개의 디뉴클레오타이드 및 단지 n-3개의 내부 디뉴클레오타이드를 갖는다. 내부 디뉴클레오타이드 내의 각각의 뉴클레오타이드간 연결은 내부 뉴클레오타이드간 연결이다. 따라서, n개의 뉴클레오타이드 길이인 선형 올리고뉴클레오타이드는 총 n-1개의 디뉴클레오타이드간 연결 및 단지 n-3개의 내부 디뉴클레오타이드간 연결을 갖는다. 전략적으로 배치된 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 뉴클레오타이드간 연결은 따라서 핵산 서열 내의 임의의 뉴클레오타이드 쌍 사이에 위치한 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 뉴클레오타이드간 연결을 의미한다. 몇몇 실시태양에서 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 뉴클레오타이드간 연결은 5' 또는 3' 말단에 가장 근접한 뉴클레오타이드쌍 사이에 위치하지 않는다.

[0122] 바람직하게는, 적어도 하나의 내부 YZ 디뉴클레오타이드에 바로 인접하여 존재하는 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 뉴클레오타이드간 연결은 자체가 내부 뉴클레오타이드간 연결이다. 따라서, 서열 N_1 YZ N_2 (여기서 N_1 및 N_2 는 각각 서로 독립적으로 임의의 단일 뉴클레오타이드임)의 경우에, YZ 디뉴클레오타이드는 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 뉴클레오타이드간 연결을 갖고, 또한 (a) N_1 및 Y는 N_1 이 내부 뉴클레오타이드일 때 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 뉴클레오타이드간 연결에 의해 연결되거나, (b) Z 및 N_2 는 N_2 가 내부 뉴클레오타이드일 때 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 뉴클레오타이드간 연결에 의해 연결되거나 (c) N_1 및 Y는 N_1 이 내부 뉴클레오타이드일 때 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 뉴클레오타이드간 연결에 의해 연결되고 Z 및 N_2 는 N_2 가 내부 뉴클레오타이드일 때 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 뉴클레오타이드간 연결에 의해 연결된다.

[0123] 연성 올리고뉴클레오타이드는 완전히 안정화된 올리고뉴클레오타이드에 비해 뉴클레아제 절단에 대해 비교적 감수성인 것으로 생각된다. 특정 이론 또는 메카니즘에 매이기를 의미하지 않으면서, 본 발명의 연성 올리고뉴클레오타이드는 전장 연성 올리고뉴클레오타이드에 비해 번역자극 활성이 감소되거나 전혀 없는 단편으로 절단가능한 것으로 생각된다. 특히 올리고뉴클레오타이드의 중앙 근처에 적어도 하나의 뉴클레아제-감수성 뉴클레오타이드간 연결의 도입은 올리고뉴클레오타이드의 최대 번역자극 활성의 지속 기간을 감소시키기 위해서 올리고뉴클레오타이드의 약동학을 변경시키는 "오프 스위치 (off switch)"를 제공하는 것으로 생각된다. 이것은 만성 국소 염증 또는 번역자극에 관련된 손상의 방지가 바람직한 조직 또는 임상 적용, 예를 들어 신장에서 특히 유용할 수 있다.

[0124] 반연성 올리고뉴클레오타이드는 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 뉴클레오타이드간 연결이 적어도 하나의 내부 피리미딘-퓨린 (YZ) 디뉴클레오타이드 내에서만 발생하는 부분적으로 안정화된 주쇄를 갖는 번역자극성 올리고뉴클레오타이드이다. 반연성 올리고뉴클레오타이드는 일반적으로 대응하는 충분히 안정화된 번역자극성 올리고뉴클레오타이드에 비해 증가된 번역자극성 효력을 갖는다. 반연성 올리고뉴클레오타이드의 보다 큰 효력에 의해, 반연성 올리고뉴클레오타이드는 몇몇 경우에 보다 낮은 유효 농도에서 사용될 수 있고, 요구되는 생물학적 효과를 달성하기 위해서 통상적인 충분히 안정화된 번역자극성 올리고뉴클레오타이드보다 낮은 유효 투여량을 보일 수 있다.

[0125] 반연성 올리고뉴클레오타이드의 상기 특성은 일반적으로 내부 YZ 디뉴클레오타이드를 수반하는 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 뉴클레오타이드간 연결의 "투여량" 증가와 함께 증가할 것으로 생각된다. 따라서, 예를 들어 일반적으로 5개의 내부 YZ 디뉴클레오타이드를 갖는 소정의 올리고뉴클레오타이드 서열의 경우, 5개의 내부

포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 YZ 뉴클레오타이드간 연결을 갖는 올리고뉴클레오타이드는 4개의 내부 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 YG 뉴클레오타이드간 연결을 갖는 올리고뉴클레오타이드보다 더 면역자극성이고, 4개의 내부 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 YG 뉴클레오타이드간 연결을 갖는 올리고뉴클레오타이드는 다시 3개의 내부 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 YZ 뉴클레오타이드간 연결을 갖는 올리고뉴클레오타이드보다 더 면역자극성이고, 3개의 내부 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 YZ 뉴클레오타이드간 연결을 갖는 올리고뉴클레오타이드는 다시 2개의 내부 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 YZ 뉴클레오타이드간 연결을 갖는 올리고뉴클레오타이드보다 더 면역자극성이고, 2개의 내부 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 YZ 뉴클레오타이드간 연결을 갖는 올리고뉴클레오타이드는 다시 1개의 내부 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 YZ 뉴클레오타이드간 연결을 갖는 올리고뉴클레오타이드보다 더 면역자극성이다. 중요한 사실은, 단지 1개의 내부 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 YZ 뉴클레오타이드간 연결을 포함시킨 경우에도 내부 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 YZ 뉴클레오타이드간 연결이 없는 것보다는 유리하다고 생각된다는 것이다. 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 뉴클레오타이드간 연결의 수 이외에, 핵산의 길이를 따른 위치도 효력에 영향을 줄 수 있다.

[0126] 연성 및 반연성 올리고뉴클레오타이드는 바람직한 내부 위치에서의 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 뉴클레오타이드간 연결 이외에 일반적으로 분해에 저항성인 5' 및 3' 말단을 포함한다. 상기 분해-저항성 말단은 대응하는 비변형 말단에 대한 엑소뉴클레아제 소화에 대해 저항성을 증가시키는 임의의 적합한 변형을 수반할 수 있다. 예를 들어, 5' 및 3' 말단은 주쇄의 적어도 하나의 포스페이트 변형의 포함에 의해 안정화될 수 있다. 바람직한 실시태양에서, 한 말단에서 주쇄의 적어도 하나의 포스페이트 변형은 독립적으로 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 메틸포스포네이트 또는 메틸포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결이다. 다른 실시태양에서, 분해-저항성 말단은 3' 말단에서 펩티드 또는 아마이드 연결에 의해 연결된 하나 이상의 뉴클레오타이드 단위를 포함한다.

[0127] 포스포디에스테르 뉴클레오타이드간 연결은 자연에서 발견되는 핵산의 특유한 연결 형태이다. 포스포디에스테르 뉴클레오타이드간 연결은 2개의 가교 산소 원자에 인접하고 2개의 추가의 산소 원자 (하나는 하전되고 다른 하나는 비하전됨)에 의해 결합된 인 원자를 포함한다. 포스포디에스테르 뉴클레오타이드간 연결은 올리고뉴클레오타이드의 조직 반감기를 감소시키는 것이 중요할 경우에 특히 바람직하다.

[0128] 포스포디에스테르-유사 뉴클레오타이드간 연결은 포스포디에스테르에 화학적으로 맞(또는) 디아스테레오머상으로 유사한 인 함유 가교기이다. 포스포디에스테르에 대한 유사성의 척도는 뉴클레아제 소화에 대한 감수성 및 RNase H를 활성화시키는 능력을 포함한다. 따라서, 예를 들어 포스포디에스테르 (포스포로티오에이트는 아님) 올리고뉴클레오타이드는 뉴클레아제 소화에 감수성이지만, 포스포디에스테르와 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드는 모두 RNase H를 활성화시킨다. 바람직한 실시태양에서, 포스포디에스테르-유사 뉴클레오타이드간 연결은 보라노포스페이트 (또는 동등하게 보라노포스포네이트) 연결이다 (미국 특허 5,177,198; 미국 특허 5,859,231; 미국 특허 6,160,109; 미국 특허 6,207,819; Sergueev et al., (1998) J Am Chem Soc 120:9417-27). 또다른 바람직한 실시태양에서, 포스포디에스테르-유사 뉴클레오타이드간 연결은 디아스테레오머상으로 순수한 Rp 포스포로티오에이트이다. 디아스테레오머상으로 순수한 Rp 포스포로티오에이트는 뉴클레아제 소화에 보다 감수성이고 혼합 또는 디아스테레오머상으로 순수한 Sp 포스포로티오에이트보다 RNase H를 잘 활성화시키는 것으로 생각된다. CpG 올리고뉴클레오타이드의 입체이성질체는 동시 계류 중인, 1999년 7월 27일 출원된 미국 특허 출원 09/361,575 및 PCT 출원 PCT/US99/17100 (WO 00/06588)의 기술 대상이다. 본 발명의 목적을 위해, 용어 "포스포디에스테르-유사 뉴클레오타이드간 연결"은 구체적으로 포스포로디티오에이트 및 메틸포스포네이트 뉴클레오타이드간 연결을 배제함을 유의하여야 한다.

[0129] 상기 설명한 바와 같이, 연성 및 반연성 올리고뉴클레오타이드는 C와 G 사이의 포스포디에스테르 유사 연결을 가질 수 있다. 포스포디에스테르 유사 연결의 한 예는 Rp 배열에서의 포스포로티오에이트 연결이다. 올리고뉴클레오타이드 p-키랄성은 활성이 측정되는 시점에 따라 CpG 올리고뉴클레오타이드의 면역 활성화에 대해 분명히 반대되는 효과를 가질 수 있다. 40분의 초기 시점에서, 포스포로티오에이트 CpG 올리고뉴클레오타이드의 Rp 입체이성질체 (Sp 입체이성질체는 아님)는 마우스 비장 세포에서 JNK 인산화를 유도한다. 이와 대조적으로, 44 hr의 늦은 시점에서 분석할 때, Sp 입체이성질체 (Rp 입체이성질체는 아님)는 비장 세포 증식 자극시에 활성을 보인다. 이와 같은 Rp와 Sp 입체이성질체의 동역학 및 생물학의 차이는 임의의 세포 흡수의 차이에 의한 것이 아니라, p-키랄성의 2개의 반대되는 생물학적 역할에 의한 것일 가능성이 가장 크다. 먼저, 초기 시점에서 면역 세포 자극에 대해서 Sp에 비해 Rp 입체이성질체의 향상된 활성은 CpG 수용체, TLR9와의 상호작용 또는 하류 신호전달 경로의 유도시에 Rp가 보다 효과적일 수 있음을 나타낸다. 다른 한편으로, Sp 결과에 비해 Rp PS-올리고뉴클레

오티드의 보다 빠른 분해는 신호전달 지속시간을 훨씬 더 짧게 만들어, Sp PS-올리고뉴클레오타이드는 보다 늦은 시점에서 시험될 때 생물학적으로 보다 큰 활성을 갖는 것으로 보인다.

[0130] 놀랍게도, 강한 효과가 CpG 디뉴클레오타이드 자체에서 p-키랄성에 의해 달성된다. 입체 랜덤 (stereo-random) CpG 올리고뉴클레오타이드와 비교시에, 단일 CpG 디뉴클레오타이드가 Rp에 연결된 동류체 (congener)가 비장 세포 증식 유도시에 약간 더 큰 활성을 보였고, Sp 연결을 포함하는 동류체는 거의 활성을 보이지 않았다.

[0131] **크기, 합성, 변형 염기 및 다른 올리고뉴클레오타이드 특성**

[0132] 번역자극성 올리고뉴클레오타이드의 크기 (즉, 올리고뉴클레오타이드의 길이를 따른 뉴클레오타이드 잔기의 수)도 올리고뉴클레오타이드의 자극성 활성에 기여할 수 있다. 세포 내로의 흡수를 촉진시키기 위해, 번역자극성 올리고뉴클레오타이드는 바람직하게는 6개 뉴클레오타이드 잔기의 최소 길이를 갖는다. 6개 뉴클레오타이드보다 큰 임의의 크기 (심지어 많은 kb 길이)의 올리고뉴클레오타이드는 충분한 번역자극성 모티프가 존재할 경우 번역 반응을 유도할 수 있고, 이것은 보다 큰 올리고뉴클레오타이드가 세포 내에서 분해되기 때문이다. 4개의 뉴클레오타이드만큼 짧은 반연성 올리고뉴클레오타이드도 세포 내부로 전달될 수 있다면 번역자극성일 수 있다. 특정 실시태양에서, 번역자극성 올리고뉴클레오타이드의 길이는 4 내지 100개의 뉴클레오타이드, 6 내지 100개의 뉴클레오타이드 또는 8 내지 100개의 뉴클레오타이드이다. 전형적인 실시태양에서, 번역자극성 올리고뉴클레오타이드의 길이는 4 내지 40개의 뉴클레오타이드, 6 내지 40개의 뉴클레오타이드, 8 내지 40개의 뉴클레오타이드, 4 내지 20개의 뉴클레오타이드, 6 내지 20개의 뉴클레오타이드, 8 내지 20개의 뉴클레오타이드, 4 내지 10개의 뉴클레오타이드, 6 내지 10개의 뉴클레오타이드 또는 8 내지 10개의 뉴클레오타이드이다. 중요한 실시태양에서, 핵산 및 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 플라스미드 또는 발현 벡터가 아니다.

[0133] 용어 올리고뉴클레오타이드는 또한 예를 들어 염기 및(또는) 당의 치환 또는 변형을 갖는 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 예를 들어, 이들은 2' 위치에서 히드록실기 이외의 다른 저분자량 유기기 및 5' 위치에서 포스페이트기 또는 히드록시기 이외의 다른 저분자량 유기기에 공유결합으로 부착된 주쇄 당을 갖는 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 이와 같이 변형된 올리고뉴클레오타이드는 2'-O-알킬화된 리보스를 포함할 수 있다. 또한, 변형된 올리고뉴클레오타이드는 리보스 대신에 아라비노스 또는 2'-플루오로아라비노스와 같은 당을 포함할 수 있다. 따라서, 올리고뉴클레오타이드는 주쇄 조성에서 불균질일 수 있고, 이에 의해 함께 연결된 중합체 단위의 임의의 가능한 조합물, 예를 들어 펩티드-핵산 (핵산 염기를 갖는 아미노산 주쇄를 포함)을 포함할 수 있다. 상기 내용은 본원에 개시된 핵산에 동일하게 적용된다.

[0134] 번역자극성 올리고뉴클레오타이드는 천연 RNA 및 DNA에 비해, 포스포디에스테르 뉴클레오타이드간 다리, β -D-리보스 단위 및(또는) 천연 뉴클레오타이드 염기 (아데닌, 구아닌, 시토신, 티민, 우라실)가 관련된 다양한 화학적 변형 및 치환을 포괄할 수 있다. 화학적 변형의 예는 당업자들에게 알려져 있으며, 예컨대 문헌 [Uhlmann E et al. (1990) Chem Rev 90:543; 'Protocols for Oligonucleotides and Analogs' Synthesis and Properties & Synthesis and Analytical Techniques, S. Agrawal, Ed, Humana Press, Totowa, USA 1993; Crooke ST et al.(1996) Annu Rev Pharmacol Toxicol 36:107-129; 및 Hunziker J et al. (1995) Mod Synth Methods 7: 331-417]에 기재되어 있다. 올리고뉴클레오타이드는 하나 이상의 변형을 가질 수 있으며, 각 변형은 천연 DNA 또는 RNA로 이루어진 동일한 서열의 올리고뉴클레오타이드에 대비하여 특정 포스포디에스테르 뉴클레오타이드간 다리 및 (또는) 특정 β -D-리보스 단위 및(또는) 특정한 천연 뉴클레오타이드 염기 위치에 자리한다.

[0135] 예를 들어, 본 발명은 하나 이상의 변형을 포함할 수 있으면서 각각의 변형이

[0136] a) 뉴클레오타이드의 3' 및(또는) 5' 말단에 위치한 포스포디에스테르 뉴클레오타이드 다리의 변형된 뉴클레오타이드간 다리에 의한 치환,

[0137] b) 뉴클레오타이드의 3' 및(또는) 5' 말단에 위치한 포스포디에스테르 다리의 데포스포 다리에 의한 치환,

[0138] c) 당 포스페이트 주쇄에서 당 포스페이트 단위의 다른 단위에 의한 치환,

[0139] d) 변형된 당 단위에 의한 β -D-리보스 단위의 치환, 및

[0140] e) 변형된 뉴클레오타이드 염기에 의한 천연 뉴클레오타이드 염기의 치환으로부터 독립적으로 선택되는 올리고뉴클레오타이드에 관련된 것이다.

[0141] 올리고뉴클레오타이드의 화학적 변형의 보다 상세한 예는 다음과 같다.

[0142] 뉴클레오타이드의 3' 및(또는) 5' 말단에 위치한 포스포디에스테르 뉴클레오타이드간 다리는 변형된 뉴클레오타이드간

다리에 의해 치환될 수 있고, 여기서 변형 뉴클레오티드간 다리는 예를 들어 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, NR^1R^2 -포스포르아미데이트, 보라노포스페이트, α -히드록시벤질 포스포네이트, 포스페이트-(C_1-C_{21})-O-알킬 에스테르, 포스페이트-[(C_6-C_{12})아릴-(C_1-C_{21})-O-알킬]에스테르, (C_1-C_8)알킬포스포네이트 및(또는) (C_6-C_{12})아릴포스포네이트 다리, (C_7-C_{12})- α -히드록시메틸-아릴 (예를 들어 WO 95/01363에 개시된 것)로부터 선택되고, 여기서 (C_6-C_{12})아릴, (C_6-C_{20})아릴 및 (C_6-C_{14})아릴은 할로젠, 알킬, 알콕시, 니트로, 시아노로 임의 치환되고, R^1 및 R^2 는 서로 독립적으로 수소, (C_1-C_{18})-알킬, (C_6-C_{20})-아릴, (C_6-C_{14})-아릴-(C_1-C_8)-알킬, 바람직하게는 수소, (C_1-C_8)-알킬, 바람직하게는 (C_1-C_4)-알킬 및(또는) 메톡시에틸이거나 또는 R^1 및 R^2 는 이들을 함유하는 질소 원자와 함께 5-6원 헤테로시클릭 고릴 형성하고, 상기 고리는 O, S 및 N으로부터 선택되는 추가의 헤테로원자를 포함할 수 있다.

[0143] 뉴클레오티드의 3' 및(또는) 5' 말단에 위치한 포스포디에스테르 다리는 데포스포 다리에 의해 치환될 수 있고 (데포스포 다리는 예를 들어 Uhlmann E and Peyman A in "Methods in Molecular Biology", Vol. 20, "Protocols for Oligonucleotides and Analogs", S. Agrawal, Ed., Humana Press, Totowa 1993, Chapter 16, pp. 355 ff에 기재됨), 데포스포 다리는 예를 들어 데포스포 다리 포름아세탈, 3'-티오포름아세탈, 메틸히드록실아민, 옥심, 메틸렌디메틸-히드라조, 디메틸렌술폰 및(또는) 실릴기로부터 선택된다.

[0144] 당 포스페이트 주쇄 (즉, 당 포스페이트 주쇄는 당 포스페이트 단위들로 구성됨)에서 당 포스페이트 단위 (즉, 함께 당 포스페이트 단위를 형성하는 β -D-리보스와 포스포디에스테르 뉴클레오티드간 다리)는 '모르폴리노-유도체' 올리고머 (예컨대 문헌 [Stirchak EP et al. (1989) Nucleic Acids Res 17: 6129-41]에 기재된 것)를 형성하는 데 적절한 다른 단위에 의해 치환, 즉, 모르폴리노-유도체 단위 등에 의해 치환되거나; 또는 폴리아미드 핵산 ('PNA'; 예컨대 문헌 [Nielsen PE et al. (1994) Bioconjug Chem 5: 3-7]에 기재된 것)을 형성하기에 적합한 다른 단위에 의해 치환, 예를 들어 PNA 주쇄 단위, 예컨대 2-아미노에틸글리신 등에 의해 치환될 수 있다.

[0145] β -리보스 단위 또는 β -D-2'-데옥시리보스 단위는 변형된 당 단위에 의해 치환될 수 있는데, 상기 변형된 당 단위는 예를 들면 β -D-리보스, α -D-2'-데옥시리보스, L-2'-데옥시리보스, 2'-F-2'-데옥시리보스, 2'-O-(C_1-C_6)알킬-리보스 (바람직하게는 2'-O-(C_1-C_6)알킬-리보스는 2'-O-메틸리보스임), 2'-O-(C_2-C_6)알케닐-리보스, 2'-[O-(C_1-C_6)알킬-O-(C_1-C_6)알킬]-리보스, 2'-NH₂-2'-데옥시리보스, β -D-크실로-푸라노스, α -아라비노푸라노스, 2,4-디데옥시- β -D-에리트르-헥소-피라노스, 및 카르보시클릭 (예컨대 문헌 [Froehler J (1992) Am Chem Soc 114: 8320]에 기재된 것) 및(또는) 개방 사슬 당 유사체 (예컨대 문헌 [Vandendriessche et al. (1993) Tetrahedron 49: 7223]에 기재된 것) 및(또는) 비시클로당 유사체 (예컨대 문헌 [Tarkov M et al. (1993) Helv Chim Acta 76:481]에 기재된 것)로부터 선택된다.

[0146] 일부 바람직한 실시태양에서, 당은 특히 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 뉴클레오티드간 연결에 의해 연결된 하나 또는 두개의 뉴클레오티드에 대해 2'-O-메틸리보스이다.

[0147] 올리고뉴클레오티드는 또한 치환된 퓨린 및 피리미딘, 예를 들어 C-5 프로핀 피리미딘 및 7-데아자-7-치환 퓨린 변형 염기를 포함한다 (Wagner RW et al. (1996) Nat Biotechnol 14:840-4). 아데닌, 시토신, 구아닌, 티민 및 우라실의 보다 통상적인 자연 발생 염기 이외에, 올리고뉴클레오티드는 또한 다른 자연 및 비-자연 발생 염기, 치환 및 비치환된 방향족 잔기를 포함할 수 있다. 변형된 염기는 일반적으로 DNA 및 RNA에서 발견되는 자연 발생 염기, 예를 들어 티민, 아데닌, 시토신, 구아닌 및 우라실과 화학적으로 구별되지만 상기 자연 발생 염기와 염기의 화학적 구조를 공유하는 임의의 염기이다. 변형 뉴클레오티드 염기는 예를 들어 5-(C_2-C_6)-알케닐 시토신, 5-(C_2-C_6)-알케닐우라실, N4-알킬시토신, 예를 들어, N4-에틸시토신, N4-알킬데옥시시티딘, 예를 들어 N4-에틸데옥시시티딘, 5-(C_1-C_6)-알킬시토신, 5-(C_1-C_6)-알킬우라실, 5-(C_2-C_6)-알킬닐시토신, 5-(C_2-C_6)-알킬닐우라실, 2-아미노-6-클로로퓨린, 2-아미노퓨린, 5-아미노우라실, 8-아자퓨린, 5-브로모시토신, 5-브로모우라실, 5-클로로시토신, 5-클로로우라실, 니트로피롤의 데옥시리보뉴클레오티드, 디아미노퓨린, 예를 들어 2,4-디아미노퓨린 및 2,6-디아미노퓨린, 디히드로우라실, N²-디메틸구아닌, 5-플루오로시토신, 5-플루오로우라실, 5-히드록시시토신, 5-히드록시데옥시시티딘, 5-히드록시메틸시토신, 5-히드록시메틸데옥시시티딘, 5-히드록시메틸우라실, 히포잔틴, 이노신, 5-메틸시토신, C5-프로피닐피리미딘, 슈도우라실, 치환 7-데아자퓨린, 바람직하게는 7-데아자-7-치환 및(또는) 7-데아자-8-치환 퓨린, 6-티오데옥시구아노신, 2-티오우라실, 4-티오우라실, 우라실 등

을 포함한다. 상기 나열된 염기는 예시적인 것이고 제한의 의미는 없다. 다른 변형이 당업자에게 공지되어 있다.

[0148] 본원에 설명된 바와 같은 특정 식에서, 변형 염기의 세트가 규정된다. 예를 들어, 문자 Y는 시토신 또는 변형된 시토신을 함유하는 뉴클레오타이드를 나타내도록 사용된다. 본원에서 사용되는 변형된 시토신은 올리고뉴클레오타이드의 번역자극 활성을 손상시키지 않으면서 시토신을 대체할 수 있는 시토신의 자연 발생 또는 비-자연 발생 피리미딘 염기 유사체이다. 변형된 시토신은 5-치환 시토신 (예를 들어 5-메틸-시토신, 5-플루오로-시토신, 5-클로로-시토신, 5-브로모-시토신, 5-요오도-시토신, 5-히드록시-시토신, 5-히드록시메틸-시토신, 5-디플루오로메틸-시토신, 및 비치환 또는 치환 5-알킬닐-시토신), 6-치환 시토신, N4-치환 시토신 (예를 들어 N4-에틸-시토신), 5-아자-시토신, 2-머캅토-시토신, 이소시토신, 슈도-이소시토신, 축합 고리계를 갖는 시토신 유사체 (예를 들어 N,N'-프로필렌 시토신 또는 페녹사진), 및 우라실 및 그의 유도체 (예를 들어 5-플루오로-우라실, 5-브로모-우라실, 5-브로모비닐-우라실, 4-티오-우라실, 5-히드록시-우라실, 5-프로피닐-우라실)을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 바람직한 시토신의 일부는 5-메틸시토신, 5-플루오로시토신, 5-히드록시시토신, 5-히드록시메틸-시토신, 및 N4-에틸시토신을 포함한다. 다른 실시태양에서, 시토신 염기는 보편적인 염기 (예를 들어 3-니트로피롤, P-염기), 방향족 고리계 (예를 들어 플루오로벤젠 또는 디플루오로벤젠) 또는 수소 원자 (dSpacer)에 의해 치환된다.

[0149] 문자 Z는 구아닌 또는 변형된 구아닌 염기를 나타내도록 사용된다. 본원에서 사용되는 변형된 구아닌은 올리고뉴클레오타이드의 번역자극 활성을 손상시키지 않으면서 구아닌을 대체할 수 있는 구아닌의 자연 발생 또는 비-자연 발생 퓨린 염기 유사체이다. 변형된 구아닌은 7-데아자구아닌, 7-데아자-7-치환 구아닌 (예를 들어 7-데아자-7-(C₂-C₆)알킬닐구아닌), 7-데아자-8-치환 구아닌, 히포잔틴, N2-치환 구아닌 (예를 들어 N2-메틸-구아닌), 5-아미노-3-메틸-3H,6H-티아졸로[4,5-d]피리미딘-2,7-디온, 2,6-디아미노퓨린, 2-아미노퓨린, 퓨린, 인돌, 아데닌, 치환 아데닌 (예를 들어 N6-메틸-아데닌, 8-옥소-아데닌), 8-치환 구아닌 (예를 들어 8-히드록시구아닌 및 8-브로모구아닌) 및 6-티오구아닌을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 본 발명의 다른 실시태양에서, 구아닌 염기는 보편적인 염기 (예를 들어 4-메틸-인돌, 5-니트로-인돌 및 K-염기), 방향족 고리계 (예를 들어 벤즈이미다졸 또는 디클로로-벤즈이미다졸, 1-메틸-1H-[1,2,4]트리아졸-3-카르복실산 아마이드) 또는 수소 원자 (dSpacer)에 의해 치환된다.

[0150] 올리고뉴클레오타이드는 하나 이상의 접근가능한 5' 말단을 가질 수 있다. 상기 5' 말단을 2개 갖는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 생성시킬 수 있다. 이것은 예를 들어 2개의 올리고뉴클레오타이드를 3'-3' 연결을 통해 부착시켜 1개 또는 2개의 접근가능한 5' 말단을 생성시킴으로써 달성할 수 있다. 3'3'-연결은 포스포디에스테르, 포스포로티오에이트 또는 임의의 다른 변형 뉴클레오타이드간 다리일 수 있다. 상기 연결을 달성하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 상기 연결은 문헌 [Seliger, H.; et al., Oligonucleotide analogs with terminal 3'-3'- and 5'-5'-internucleotidic linkages as antisense inhibitors of viral gene expression, Nucleotides & Nucleotides (1991), 10(1-3), 469-77 및 Jiang, et al., Pseudo-cyclic oligonucleotides: in vitro and in vivo properties, Bioorganic & Medicinal Chemistry (1999), 7(12), 2727-2735]에 기재된 바 있다.

[0151] 추가로, 3'-말단 뉴클레오타이드 사이의 연결이 포스포디에스테르, 포스포로티오에이트 또는 다른 변형 다리가 아닌 3'3'-연결된 올리고뉴클레오타이드를 추가의 스페이서, 예를 들어 트리- 또는 테트라-에틸렌글리콜 포스페이트 잔기를 사용하여 제조할 수 있다 (Durand, M. et al, Triple-helix formation by oligonucleotide containing one (dA)₁₂ and two (dT)₁₂ sequence bridged by two hexaethylene glycol chains, Biochemistry (1992), 31(38), 9197-204, 미국 특허 5658738 및 미국 특허 5668265). 별법으로, 비-뉴클레오타이드 링커는 표준 포스포아미다이트 화학법을 사용하여 에탄디올, 프로판디올 또는 염기 결핍 (abasic) 데옥시리보스 (dSpacer) 단위로 부터 유도될 수 있다 (Fontanel, Marie Laurence et al., Sterical recognition by T4 polynucleotide kinase of non-nucleosidic moieties 5'-attached to oligonucleotides; Nucleic Acids Research (1994), 22(11), 2022-7). 비-뉴클레오타이드 링커는 연결되는 2개의 ODN의 3' 말단 사이의 임의의 바람직한 거리를 허용하도록 1회 또는 다수회 도입되거나 서로 조합될 수 있다.

[0152] **분지쇄 ODN 및 덴드리머 (dendrimer)**

[0153] 또한, 번역자극성 올리고뉴클레오타이드는 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드-유사 잔기 사이의 하나 이상의 통상적이지 않은 연결을 포함할 수 있다. 통상적인 뉴클레오타이드간 연결은 3'5'-연결이다. 모든 다른 연결은 통상적이지 않은 뉴클레오타이드간 연결, 예를 들어 2'5'-, 5'5'-, 3'3'-, 2'2'-, 2'3'-연결로 간주된다. 2' 내지 5'

의 명칭은 리보스의 탄소 원자에 따라 선택된다. 그러나, 비천연 당 잔기, 예를 들어 고리 확장된 당 유사체 (예를 들어 헥사노스, 시클로헥센 또는 피라노스) 또는 비- 또는 트리시클릭 당 유사체가 사용될 경우, 상기 명칭은 모노머의 명칭에 따라 변한다. 3'-테옥시-β-D-리보피라노스 유사체 (p-DNA로도 불림)에서, 모노뉴클레오타이드는 예를 들어 4'2'-연결을 통해 연결된다.

[0154] 올리고뉴클레오타이드가 1개의 3'3'-연결을 포함할 경우, 이 올리고뉴클레오타이드는 2개의 비연결된 5'-말단을 포함할 수 있다. 유사하게, 올리고뉴클레오타이드가 1개의 5'5'-연결을 포함할 경우, 이 올리고뉴클레오타이드는 2개의 비연결된 3'-말단을 포함할 수 있다. 올리고뉴클레오타이드의 비연결된 말단에는 그의 수용체가 보다 우수하게 접근할 수 있다. 두 종류의 통상적이지 않은 연결 (3'3'- 및 5'5')은 문헌에 기재된 바 있고 [Ramalho Ortigao et al. Antisense Research and Development (1992) 2, 129-46], 이 문헌에서 3'3'-연결을 갖는 올리고뉴클레오타이드는 뉴클레아제에 의한 절단에 대해 향상된 안정성을 보이는 것으로 보고되었다.

[0155] 또한, 상이한 종류의 연결을 한 분자 내에 조합하여 올리고머의 분지를 야기할 수 있다. 올리고뉴클레오타이드의 한 부분이 3'3'-연결을 통해 3'-말단에서 제2 올리고뉴클레오타이드 부분에, 2'3'-연결을 통해 2'-말단에서 제3 올리고뉴클레오타이드 부분에 연결될 경우, 예를 들어 3개의 5'-말단을 갖는 분지체 (3'3'-, 2'3'-분지체) 올리고뉴클레오타이드가 생성된다.

[0156] 원칙적으로, 올리고뉴클레오타이드의 상이한 부분들 사이 또는 상이한 올리고뉴클레오타이드 사이의 연결은 그의 수용체에 의한 인식을 불리하게 방해하지 않는 한 각각 분자의 모든 부분을 통해 발생할 수 있다. 올리고뉴클레오타이드의 특성에 따라, 연결은 당 잔기 (Su), 헤테로시클릭 핵염기 (Ba) 또는 포스페이트 주쇄 (Ph)를 포함할 수 있다. 따라서, 타입 Su-Su, Su-Ph, Su-Ba, Ba-Ba, Ba-Su, Ba-Ph, Ph-Ph, Ph-Su 및 Ph-Ba의 연결이 가능하다. 올리고뉴클레오타이드가 특정 비-뉴클레오타이드 치환체에 의해 추가로 변형되면, 연결은 또한 올리고뉴클레오타이드의 변형 부분을 통해 발생할 수 있다. 또한, 상기 변형은 변형된 올리고뉴클레오타이드, 예를 들어 PNA, LNA 또는 모르폴리노 올리고뉴클레오타이드 유사체를 포함한다.

[0157] 연결은 바람직하게는 C, H, N, O, S, B, P 및 할로젠으로 이루어지고, 3 내지 300개의 원자를 포함한다. 3개의 원자를 갖는 예는 예를 들어 한 뉴클레오타이드의 3'-히드록시기를 제2 올리고뉴클레오타이드의 3'-히드록시기에 연결시키는 아세탈 연결 (ODN1-3'-O-CH₂-O-3'-ODN2)이다. 약 300개의 원자를 갖는 예는 PEG-40 (테트라콘타 폴리에틸렌글리콜)이다. 바람직한 연결은 포스포디에스테르, 포스포로티오에이트, 메틸포스포네이트, 포스포르아미데이트, 보라노포스포네이트, 아마이드, 에테르, 티오에테르, 아세탈, 티오아세탈, 우레아, 티오우레아, 술폰아마이드, 시프 (Schiff) 염기 및 디설피드 연결이다. 또한, "trilinkbiotech" 웹사이트에서 입수가능한 Solulink BioConjugation System을 사용할 수도 있다.

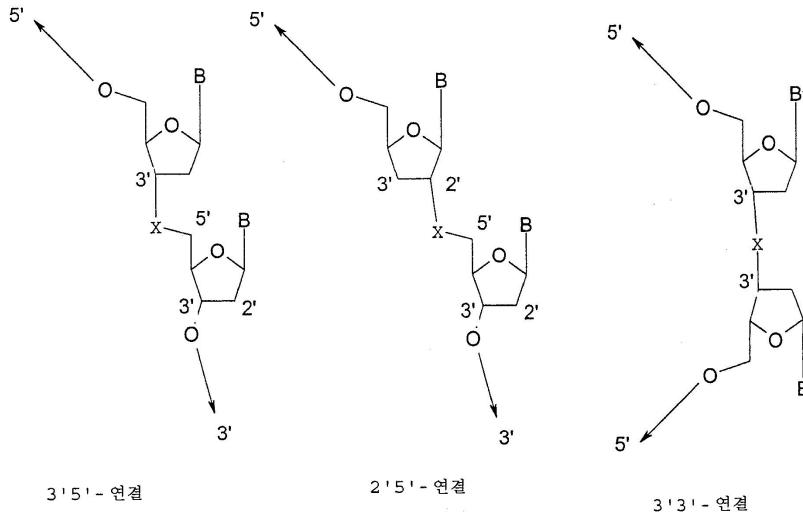
[0158] 올리고뉴클레오타이드가 2개 이상의 서열 부분으로 이루어진 경우, 이들 부분은 동일하거나 상이할 수 있다. 따라서, 3'3'-연결을 갖는 올리고뉴클레오타이드에서, 서열은 동일한 5'-ODN1-3'3'-ODN1-5'이거나 상이한 5'-ODN1-3'3'-ODN2-5'일 수 있다. 또한, 상이한 올리고뉴클레오타이드 부분 및 이들을 연결하는 링커의 화학적 변형은 상이할 수 있다. 짧은 올리고뉴클레오타이드의 흡수는 긴 올리고뉴클레오타이드보다 효율이 낮은 것으로 보이기 때문에, 2개 이상의 짧은 서열의 연결은 번역 자극을 개선시킨다. 짧은 올리고뉴클레오타이드의 길이는 바람직하게는 2-20개의 뉴클레오타이드, 보다 바람직하게는 3-16개의 뉴클레오타이드, 가장 바람직하게는 5-10개의 뉴클레오타이드이다. 2개 이상의 연결되지 않은 5'-말단을 갖는 연결된 올리고뉴클레오타이드가 바람직하다.

[0159] 올리고뉴클레오타이드 부분 서열은 또한 비-뉴클레오타이드 링커, 특히 염기 결핍 링커 (dSpacer), 트리에틸렌 글리콜 단위 또는 헥사에틸렌 글리콜 단위에 의해 연결될 수 있다. 추가로 바람직한 링커는 알킬 아마노 링커, 예를 들어 C3, C6, C12 아마노링커, 및 알킬티올 링커, 예를 들어 C3 또는 C6 티올 링커이다. 올리고뉴클레오타이드는 또한 알킬 또는 치환된 알킬기에 의해 추가로 치환될 수 있는 방향족 잔기에 의해 연결될 수 있다. 또한, 올리고뉴클레오타이드, 특히 3'3'-연결을 갖는 올리고뉴클레오타이드는 "glenres" 웹사이트에 설명된 바와 같이 이배체화기 (Doublers) 또는 세배체화기 (Trebler) 단위를 포함할 수 있다. 다수의 이배체화기, 세배체화기 또는 다른 다배체화기 (multiplier) 단위에 의한 올리고뉴클레오타이드의 분지화는 본 발명의 추가의 실시태양인 덴드리머를 생성시킨다. 올리고뉴클레오타이드는 또한 "glenres" 웹사이트에 설명된 바와 같이 펩티드 변형 시약 또는 올리고뉴클레오타이드 변형 시약에 의해 생성된 링커 단위를 포함할 수 있다. 또한, 올리고뉴클레오타이드는 펩티드 (아마이드) 연결에 의해 연결된 하나 이상의 천연 또는 비천연 아미노산 잔기를 포함할 수 있다.

[0160] 올리고뉴클레오타이드를 연결시키기 위한 다른 가능성은 헤테로시클릭 염기의 가교결합을 통하는 것이다 (Verma and Eckstein; Annu. Rev. Biochem. (1998) 67: 99-134; page 124). 한 서열 부분의 당 잔기와 다른 서열 부분의 헤테로시클릭 염기 사이의 연결 (Iyer et al. Curr. Opin. Mol. Therapeutics (1999) 1:344-358; page

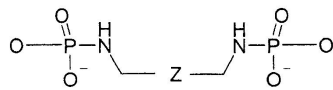
352)도 사용할 수 있다.

[0161] 상이한 올리고뉴클레오타이드는 확립된 방법으로 합성되고, 고상 합성 동안 온-라인 (on-line)으로 함께 연결될 수 있다. 별법으로, 이들은 개별적인 부분 서열의 합성 후에 함께 연결될 수 있다.

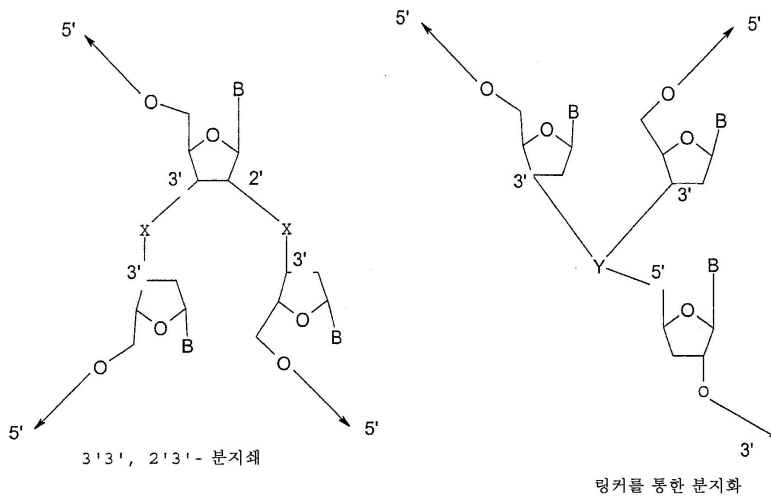


[0162]

[0163] X는 예를 들어 다음과 같다:



[0164]



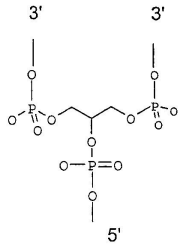
[0165]

[0166] X는 예를 들어 다음과 같다:



[0167]

[0168] Y는 예를 들어 다음과 같다:



[0169]

[0170] **항원:**

[0171] 본 발명의 항원은 올리고뉴클레오타이드처럼 면역자극 복합체와 함께 제제화될 수 있다. 항원 및 올리고뉴클레오타이드는 함께 제제화될 필요가 없다. 항원은 몇몇 실시태양에서 올리고뉴클레오타이드에 컨쥬게이팅될 수 있다 (예를 들어, 공유 수단에 의해).

[0172] 대상에 대한 항원 투여는 당업계에 공지되어 있고 일반적으로 능동적 백신 처리로 부른다. 항원 및(또는) 올리고뉴클레오타이드는 국소 또는 전신 투여될 수 있다. 본 발명에 따르면, 항원 제제는 올리고뉴클레오타이드 제제와 동일한 부위에 투여될 수 있다. 일부 바람직한 실시태양에서, 항원 및 올리고뉴클레오타이드는 이들이 신체의 상이한 부위에 투여되더라도 적어도 동일한 림프절로 배출한다. 일부 바람직한 투여 경로는 근육내 (IM) 및 피하 (SC) 투여를 포함한다. 항원 및(또는) 올리고뉴클레오타이드는 또한 점막 경로, 예를 들어 경구, 설하, 비강내, 기관내, 폐내, 직장내 및 질내 투여될 수 있다. 또다른 실시태양에서, 항원 및(또는) 올리고뉴클레오타이드는 국소 투여될 수 있다 (예를 들어, 피부 또는 노출된 점막 표면에).

[0173] 항원 제제는 올리고뉴클레오타이드 제제와 실질적으로 동시에 대상에게 투여된다. 실질적으로 동시에는 항원이 올리고뉴클레오타이드 투여의 수분 내에 투여되는 것을 의미한다. 항원은 제제 투여 전에, 동시에 또는 후에 투여될 수 있다.

[0174] 항원 제제는 복수로 투여될 수 있다. 이 경우, 항원 제제의 제1 투여는 초회 (prime) 용량으로 칭하고, 후속 투여는 추가 (boost) 용량으로 칭한다. 올리고뉴클레오타이드 제제는 초회 및 추가 용량 중 어느 하나 또는 둘 모두와 함께 투여될 수 있다. 초회 및 추가 용량은 바람직하게는 모두 면역자극 복합체와 함께 제제화된다.

[0175] 본 발명은 주어진 백신 처리 프로토콜에서 하나 이상의 항원의 투여를 포함한다. 따라서, 임의의 주어진 항원 제제는 하나 이상의 항원을 포함할 수 있고, 추가로 후속 항원 제제는 이전 또는 후속 항원 제제와 동일하거나 상이한 항원을 포함할 수 있다.

[0176] 본원에서 사용되는 항원은 면역 반응을 야기할 수 있는 분자이다. 대부분의 경우, 항원은 항원 제시 분자, 예를 들어 MHC 또는 CD1 분자의 컨텍스트에서 항원 제시 세포에 의해 제시될 때 면역 반응을 야기한다. 항원은 세포, 세포 추출물, 단백질, 폴리펩티드, 펩티드, 다당류, 다당류 컨쥬게이트, 다당류 및 다른 분자의 펩티드 및 비-펩티드 모방체, 소분자, 지질, 당지질, 탄수화물, 바이러스 및 바이러스 추출물, 다세포 유기체, 예를 들어 장 기생충, 및 알레르겐을 포함한다. 상기 용어는 넓게는 숙주 면역계에 의해 외래물질로 인식되는 임의의 종류의 분자를 포함한다. 항원은 암 항원, 미생물 항원 및 알레르겐을 포함한다.

[0177] 본원에서 사용되는 암 항원은 항원 제시 분자, 예를 들어 MHC 또는 CD1 분자의 컨텍스트에서 항원 제시 세포에 의해 제시될 때 면역 반응을 야기할 수 있는 암 세포에 의해 발현된 분자이다. 본원에서 사용되는 용어 "암 항원" 및 "종양 항원"은 서로 교환가능하게 사용된다. 암 항원은 암 세포로부터 예를 들어, 문헌 [Cohen, et al., 1994, Cancer Research, 54:1055]에 설명된 바와 같이 암 세포의 조질 추출물을 제조함으로써, 항원을 부분적으로 정제함으로써, 재조합 기술에 의해, 또는 공지된 항원의 드 노보 (de novo) 합성에 의해 제조할 수 있다. 암 항원은 천연 공급원으로부터 단리되거나, 재조합적으로 또는 당업계에 공지된 임의의 다른 수단에 의해 제조될 수 있다.

[0178] 일부 암 항원은 반드시 발현되지는 않지만 정상 세포에 의해 코딩된다. 이들 항원은 정상 세포에서 정상적으로는 침묵하는 (즉, 발현되지 않는) 것, 정상 세포 분화의 특정 단계에서만 발현되는 것, 또는 발달의 배아 또는 태아 단계에서와 같이 정상적으로는 일시적으로 발현되는 것을 특징으로 할 수 있다. 다른 암 항원은 돌연변이체 세포 유전자, 예를 들어 종양유전자 (예를 들어, 활성화된 ras 종양유전자), 서프레스 유전자 (예를 들어, 돌연변이체 p53), 내부 결손 또는 염색체 전위로부터 생성된 융합 단백질에 의해 코딩된다. 또 다른 암 항원은

RNA 및 DNA 종양 바이러스 상에 존재하는 것과 같은 바이러스 유전자에 의해 코딩될 수 있다.

- [0179] 일부 실시태양에서, 암 항원은 MART-1/Melan-A, gp100, 아테노신 데아미나제-결합 단백질 (ADAbp), FAP, 시클로필린 b, 결직장 관련 항원 (CRC)--C017-1A/GA733, 암배아 항원 (CEA), CAP-1, CAP-2, etv6, AML1, 전립선 특이적 항원 (PSA), PSA-1, PSA-2, PSA-3, 전립선-특이적 막 항원 (PSMA), T-세포 수용체/CD3-제타 사슬 및 CD20로 이루어진 군 중에서 선택된다.
- [0180] 다른 실시태양에서, 암 항원은 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 및 MAGE-C5로 이루어진 군 중에서 선택된다.
- [0181] 또다른 실시태양에서, 암 항원은 GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, GAGE-8, GAGE-9로 이루어진 군 중에서 선택된다.
- [0182] 또다른 실시태양에서, 암 항원은 BAGE, RAGE, LAGE-1, NAG, GnT-V, MUM-1, CDK4, 티로시나제, p53, MUC 패밀리, HER2/neu, p21ras, RCAS1, α -태아단백질, E-카드헤린, α -카테닌, β -카테닌, γ -카테닌, p120ctn, gp100^{Pme1117}, PRAME, NY-ESO-1, cdc27, 선종성 결장폴립증 단백질 (APC), 포드린, 코넥신 37, Ig-개별특이형, p15, gp75, GM2 ganglioside, GD2 ganglioside, 인간 유두종 바이러스 단백질, 종양 항원의 Smad 패밀리, Imp-1, P1A, EBV-코딩 핵 항원 (EBNA)-1, 뇌 글리코젠 포스포릴라제, SSX-1, SSX-2 (HOM-MEL-40), SSX-1, SSX-4, SSX-5, SCP-1 및 CT-7, 및 c-erbB-2로 이루어진 군 중에서 선택된다.
- [0183] 또다른 실시태양에서, 암 항원은 CD20, CD22, CD52, CD33, CD10 (gp100), CD3/T-세포 수용체 (TCR), CD79/B-세포 수용체 (BCR), CD26, 인간 백혈구 항원 (HLA)-DR, HLA-DP 및 HLA-DQ, RCAS1, 전립선 특이적 막 항원 (PSMA), PSA, EGFR/HER1/erbB1, EGFRvIII, erbB2/HER2/neu), erbB3/HER3, erbB4/HER4m 티로시나제, Melan-A/MART-1, 티로시나제 관련 단백질 (TRP)-1/gp75, 다형 상피 뮤신 (PEM), 인간 상피 뮤신 (MUC1), α -태아단백질, 칼리크레인 6 및 10, 가스트린-방출 펩티드/보메신, 전립선 특이적 항원, 및 암 고환 (CT) 항원으로 이루어진 군 중에서 선택된다.
- [0184] 본원에서 사용되는 미생물 항원은 세균, 바이러스, 진균, 기생충 및 항산균을 포함하고 이로 제한되지 않는 감염성 병원체로부터 유래하고, 항원 제시 분자, 예를 들어 MHC 또는 CD1 분자의 컨텍스트에서 항원 제시 세포에 의해 제시될 때 면역 반응을 야기할 수 있는 분자이다. 상기 항원은 무손상 미생물 및 천연 단리물 및 그의 단편 또는 유도체, 및 천연 미생물 항원과 동일하거나 유사하고 그 미생물에 특이적인 면역 반응을 유도하는 합성 화합물을 포함한다. 화합물은 천연 미생물 항원에 대한 면역 반응 (체액성 및/또는) 세포성)을 유도하면 천연 미생물 항원과 유사하다. 상기 항원은 당업계에서 일상적으로 사용되고 당업자에게 공지되어 있다.
- [0185] 인간에서 발견되고 본 발명에 따른 항원 또는 바이러스 항원 공급원으로서 사용될 수 있는 바이러스의 카테고리는 레트로바이러스과 (Retroviridae) (예를 들어, 인간 면역결핍 바이러스, 예를 들어 HIV-1 (또한 HDTV-III, LAV 또는 HTLV-III/LAV 또는 HIV-III으로도 불림); 및 다른 단리물, 예를 들어 HIV-LP; 피코르나바이러스과 (Picornaviridae) (예를 들어, 폴리오 바이러스, A형 간염 바이러스; 장바이러스, 인간 콕사키 바이러스, 리노 바이러스, 에코바이러스); 칼시바이러스과 (Calciviridae) (예를 들어, 위장염을 유발시키는 주); 토가바이러스과 (Togaviridae) (예를 들어, 말 뇌염 바이러스, 풍진 바이러스); 플라바이러스과 (Flaviridae) (예를 들어, 뎡기 바이러스, 뇌염 바이러스, 황열병 바이러스); 코로나바이러스과 (Coronaviridae) (예를 들어, 코로나바이러스); 람도바이러스과 (Rhabdoviridae) (예를 들어, 소포 구내염 바이러스, 광견병 바이러스); 필로바이러스과 (Filoviridae) (예를 들어, 에볼라 바이러스); 파라믹소바이러스과 (Paramyxoviridae) (예를 들어, 파라인플루엔자 바이러스, 볼거리 바이러스, 홍역 바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스); 오르소믹소바이러스과 (Orthomyxoviridae) (예를 들어, 인플루엔자 바이러스); 붕가바이러스과 (Bungaviridae) (예를 들어, 한탄 바이러스, 붕가 바이러스, 플레보바이러스 및 나이로 바이러스); 아레나바이러스과 (Arenaviridae) (출혈열 바이러스); 리오바이러스과 (Reoviridae) (예를 들어, 리오바이러스, 오르비바이러스 및 로타바이러스); 비르나바이러스과 (Birnaviridae); 헤파드나바이러스과 (Hepadnaviridae) (B형 간염 바이러스); 파보바이러스과 (Parvoviridae) (파보바이러스); 파포바이러스과 (Papovaviridae) (유두종 바이러스, 폴리오마 바이러스); 아데노바이러스과 (Adenoviridae) (대부분의 아데노바이러스); 헤르페스바이러스과 (Herpesviridae) (1형 및 2형 단순포진 바이러스 (HSV), 대상포진 바이러스, 사이토메갈로바이러스 (CMV), 헤르페스 바이러스); 포크바이러스과 (Poxviridae) (두창 바이러스, 우두 바이러스, 수두 바이러스); 및 이리도바이러스과 (Iridoviridae) (예를 들어, 아프리카 돼지열 바이러스); 및 비분류 바이러스 (예를 들어, 델타 간염의 원인체 (B형 간염 바이러스의 결합 종속체 (satellite)인 것으로 생각됨), 비-A, 비-B 간염의 원인체 (클래스 1 = 내부 전염; 클래스 2 = 비

경구 전염 (즉, C형 간염); 노워크 (Norwalk) 및 관련 바이러스, 및 아스트로바이러스)를 포함한다.

[0186] 그람 음성 및 그람 양성 세균이 모두 척추동물에서 항원 또는 항원 공급원으로서 역할을 한다. 상기 그람 양성 세균은 파스퇴렐라 (*Pasteurella*) 중, 포도상구균 (*Staphylococci*) 중 및 연쇄상구균 (*Streptococcus*) 중을 포함한다. 그람 음성 세균은 대장균 (*Escherichia coli*), 슈도모나스 (*Pseudomonas*) 중 및 살모넬라 (*Salmonella*) 중을 포함한다. 감염성 세균의 구체적인 예는 헬리코박터 파일로리 (*Helicobacter pylori*), 보렐리아 부르그도르페리 (*Borelia burgdorferi*), 폐렴 레지오넬라 (*Legionella pneumophila*), 미코박테리움 (*Mycobacterium*) 중 (예를 들어, 결핵균 (*M. tuberculosis*), 조류형 결핵균 (*M. avium*), 세포내형 결핵균 (*M. intracellulare*), 엠. 칸사이 (*M. kansasii*), 엠. 고르도나 (*M. gordonae*)), 황색포도상구균 (*Staphylococcus aureus*), 임균 (*Neisseria gonorrhoeae*), 수막염균 (*Neisseria meningitidis*), 단구성 리스테리아 (*Listeria monocytogenes*), 화농연쇄상구균 (*Streptococcus pyogenes*) (그룹 A 연쇄상구균), 무유성 연쇄상구균 (*S. agalactiae*) (그룹 B 연쇄상구균), 연쇄상구균 (녹색연쇄상구균 (*viridans*)), 대변연쇄상구균 (*S. faecalis*), 소 연쇄상구균 (*S. bovis*), 연쇄상구균 (협기성 중), 폐렴연쇄상구균 (*S. pneumoniae*), 병원성 캄필로박터 (*Campylobacter*) 중, 장내구균 (*Enterococcus*) 중, 헤모필루스 인플루엔자 (*Haemophilus influenzae*), 탄저균 (*Bacillus anthracis*), 디프테리아균 (*Corynebacterium diphtheriae*), 코리네박테리움 중, 단독균 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*), 클로스트리듐 펄프리젠스 (*Clostridium perfringens*), 파상풍균 (*Clostridium tetani*), 엔테로박터 에어로게네스 (*Enterobacter aerogenes*), 폐렴간균 (*Klebsiella pneumoniae*), 파스투렐라 톨토시다 (*Pasturella multocida*), 박테로이데스 (*Bacteroides*) 중, 푸소박테륨 뉴클레아툼 (*Fusobacterium nucleatum*), 모닐리포르미스 연쇄상간균 (*Streptobacillus moniliformis*), 매독균 (*Treponema pallidum*), 프람베지아 트레포네마 (*Treponema pertenue*), 랩토스피라, 리켓차 및 악티노마이세스 이즈라엘리 (*Actinomyces israeli*)를 포함한다.

[0187] 세균 병원체의 폴리펩티드 항원은 철-조절 외부 막 단백질 (IOMP), 외부 막 단백질 (OMP), 및 절종증 (furunculosis)을 유발하는 에어로모나스 살모니시다 (*Aeromonas salmonicida*)의 A-단백질, 세균 신장병 (BKD)을 유발하는 레니박테륨 살모니나룸 (*Renibacterium salmoninarum*)의 p57 단백질, 주표면 관련 항원 (msa), 표면 발현된 시토크신 (mpr), 표면 발현된 헤몰리신 (ish), 및 예르시니아증 (Yersiniosis)의 편모 항원; 세포 외 단백질 (ECP), 철-조절 외부 막 단백질 (IOMP), 및 파스퇴렐라감염증의 구조 단백질; 비브로시스 양기라룸 (*Vibrosis anguillarum*) 및 브이. 오르달리 (*V. ordalii*)의 OMP 및 편모 단백질; 에드워드지엘로시스 익탈루리 (*Edwardsiella ictaluri*) 및 이. 타르다 (*E. tarda*)의 편모 단백질, OMP 단백질, aroA 및 purA; 이치티 오프티리우스 (*Ichthyophthirius*)의 표면 항원; 사이토파가 칼럼나리 (*Cytophaga columnari*)의 구조 및 조절 단백질; 및 리켓차의 구조 및 조절 단백질을 포함한다.

[0188] 항원 또는 항원 공급원으로서 작용하는 진균의 예는 크립토코쿠스균 (*Cryptococcus neoformans*), 히스토플라스마균 (*Histoplasma capsulatum*), 콕시디오이데스 임미티스 (*Coccidioides immitis*), 분아균 (*Blastomyces dermatitidis*), 클라미디아 트라코마티스 (*Chlamydia trachomatis*), 및 칸디다 알비칸스 (*Candida albicans*)을 포함할 수 있다.

[0189] 항원 또는 항원 공급원인 다른 감염성 유기체는 열원충 (*Plasmodium*) 중, 예를 들어 열대열원충 (*P. falciparum*), 사일열원충 (*P. malariae*), 난형열원충 (*P. ovale*) 및 삼일열원충 (*P. vivax*) 및 톡소포자충 (*Toxoplasma gondii*)을 포함한다. 혈액감염성 및(또는) 조직 기생충은 열원충, 바베시아 미크로티 (*Babesia microti*), 바베시아 디베르겐스 (*B. divergens*), 피부리슈만편모충 (*Leishmania tropica*), 리슈만충, 피하리슈만편모충 (*L. braziliensis*), 내장리슈만편모충 (*L. donovani*), 감비아파동편모충 (*Trypanosoma gambiense*) 및 로데시아파동편모충 (*T. rhodesiense*) (아프리카 수면병), 크루즈파동편모충 (*T. cruzi*) (샤가스 (Chagas) 병) 및 톡소포자충을 포함한다.

[0190] 항원 또는 항원 공급원으로서 작용하는 미코박테리움은 나병균 (*Mycobacterium leprae*) 및 결핵균을 포함한다.

[0191] 다른 의학 관련 미생물은 문헌에서 광범하게 설명되었다 (예를 들어 그 전문을 본원에 참고로 포함하는 C.G.A Thomas, Medical Microbiology, Bailliere Tindall, Great Britain 1983 참조).

[0192] 알레르겐은 감수성 대상에서 알레르기 또는 천식 반응을 유도할 수 있는 항원이다. 알레르겐의 목록은 광대하고, 꽃가루, 곤충독, 동물 비듬 가루, 진균 포자 및 약물 (예를 들어, 페니실린)을 포함한다. 천연, 동물 및 식물 알레르겐의 예는 다음 속에 특이적인 단백질을 포함한다: 개속 (개 (*Canis familiaris*)); 더마토파고이데스속 (*Dermatophagoides*) (예를 들어, 집먼지진드기 (*D. farinae*)); 고양이속 (고양이 (*Felis domesticus*)); 돼지풀속 (*Ambrosia*) (돼지풀 (*A. artemisiifolia*)); 호밀풀속 (*Lolium*) (예를 들어, 호밀풀 (*L. perenne*) 또는

쥐보리 (*L. multiflorum*)); 삼나무속 (*Cryptomeria*) (삼나무 (*C. japonica*)); 알터나리아 (*Alternaria*) (검은 무늬병 (*A. alternata*)); 오리나무; 오리나무속 (*Alnus*) (알누스 굴티노아사 (*A. gultinoasa*)); 자작나무속 (*Betula*) (자작나무 (*B. verrucosa*)); 참나무속 (*Quercus*) (미국백참나무 (*Q. alba*)); 올리브나무속 (*Olea*) (올리브나무 (*O. europa*)); 쑥속 (*Artemisia*) (쑥 (*A. vulgaris*)); 질경이속 (*Plantago*) (예를 들어, 참질경이 (*P. lanceolata*)); 개물통이속 (*Parietaria*) (예를 들어, 파리에타리아 오피시날리스 (*P. officinalis*) 또는 파리에타리아 주다िका (*P. judaica*)); 바퀴속 (*Blattella*) (예를 들어, 바퀴 (*B. germanica*)); 꿀벌속 (*Apis*) (예를 들어 아피스 멀티플로룸 (*A. multiflorum*)); 실측백나무속 (*Cupressus*) (예를 들어 사이프러스 (*C. sempervirens*), 쿠프레수스 아리조니카 (*C. arizonica*) 및 울마 (*C. macrocarpa*)); 향나무속 (*Juniperus*) (예를 들어 주니페루스 사비노이데스 (*J. sabinoides*), 연필향나무 (*J. virginiana*), 곱향나무 (*J. communis*) 및 시더우드 (*J. ashei*)); 측백나무속 (*Thuya*) (예를 들어, 측백나무 (*T. orientalis*)); 편백속 (*Chamaecyparis*) (예를 들어, 편백 (*C. obtusa*)); 페리플라네타 (*Periplaneta*) (예를 들어, 미국 바퀴 (*P. americana*)); 개밀속 (*Agropyron*) (예를 들어, 구주개밀 (*A. repens*)); 호밀속 (*Secale*) (예를 들어, 호밀 (*S. cereale*)); 밀속 (*Triticum*) (예를 들어, 밀 (*T. aestivum*)); 오리새속 (*Dactylis*) (예를 들어, 오리새 (*D. glomerata*)); 김의 털속 (*Festuca*) (예를 들어, 큰김의털 (*F. elatior*)); 포아풀속 (*Poa*) (예를 들어, 왕포아풀 (*P. pratensis*) 또는 쏘포아풀 (*P. compressa*)); 귀리속 (*Avena*) (예를 들어, 귀리 (*A. sativa*)); 흰털새속 (*Holcus*) (예를 들어, 흰털새 (*H. lanatus*)); 향기풀속 (*Anthoxanthum*) (예를 들어, 향기풀 (*A. odoratum*)); 개나래새속 (*Arrhenatherum*) (예를 들어, 개나래새 (*A. elatius*)); 겨이삭속 (*Agrostis*) (예를 들어, 흰겨이삭 (*A. alba*)); 산조아재비속 (*Phleum*) (예를 들어, 큰조아재비 (*P. pratense*)); 갈풀속 (*Phalaris*) (예를 들어, 갈풀 (*P. arundinacea*)); 참새피속 (*Paspalum*) (예를 들어, 바이하그라스 (*P. notatum*)); 수수속 (*Sorghum*) (예를 들어, 시리아수수새 (*S. halepensis*)); 및 참새귀리속 (*Bromus*) (예를 들어, 쏘참새귀리 (*B. inermis*)).

[0193] 항원은 핵산 벡터에 의해 코딩될 수 있거나, 핵산 벡터에 의해 코딩되지 않을 수 있다. 전자의 경우, 핵산 벡터는 대상에게 투여되고, 항원은 생체 내에서 발현된다. 후자의 경우, 항원은 대상에게 직접 투여될 수 있다. 핵산 벡터에서 코딩되지 않는 항원은 핵산이 아닌 임의의 종류의 항원을 의미한다. 예를 들어, 본 발명의 일부 측면에서, 핵산 벡터에서 코딩되지 않는 항원은 폴리펩티드이다. 폴리펩티드 항원의 일차 아미노산 서열의 근소한 변형은 또한 비변형 상대 폴리펩티드에 비해 실질적으로 동등한 항원 활성을 갖는 폴리펩티드를 생성시킬 수 있다. 상기 변형은 부위-지정 돌연변이 유발에 의한 것과 같이 계획적일 수 있거나 자발적일 수 있다. 이들 변형에 의해 생산된 모든 폴리펩티드는 항원성이 여전히 존재하는 한 본원에 포함된다. 폴리펩티드는 예를 들어 바이러스 폴리펩티드일 수 있다.

[0194] 본 발명은 또한 항원성 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 사용한다. 항원은 항원이 반드시 생체 내에서 발현되도록 항원을 코딩하는 핵산 분자 내에서 대상에게 전달될 수 있음이 고안된다. 핵산 벡터 내에서 대상에게 전달된 항원은 핵산 벡터에 의해 코딩된 항원으로 불린다. 항원을 코딩하는 핵산은 진핵 세포 내에서 항원 핵산의 발현을 지시하는 유전자 발현 서열에 작동가능하게 연결된다. 유전자 발현 서열은 그가 작동가능하게 연결된 항원 핵산의 효율적인 전사 및 번역을 용이하게 하는 임의의 조절 뉴클레오티드 서열, 예를 들어 프로모터 서열 또는 프로모터-인핸서 조합서열이다. 유전자 발현 서열은 예를 들어, 포유동물 또는 바이러스 프로모터, 예를 들어 구성 또는 유도 프로모터일 수 있다. 구성 포유동물 프로모터는 다음 유전자에 대한 프로모터를 포함하고 이로 제한되지 않는다: 히포잔틴 포스포리보실 트랜스퍼라제 (HPTR), 아데노신 데아미나제, 피루베이트 키나제, b-액틴 프로모터 및 다른 구성 프로모터. 진핵 세포 내에서 구성적 기능을 하는 예시적인 바이러스 프로모터는 예를 들어 사이토메갈로바이러스 (CMV), 원숭이 바이러스 (예를 들어, SV40), 유두종 바이러스, 아데노바이러스, 인간 면역결핍 바이러스 (HIV), 라우스 육종 바이러스, 사이토메갈로바이러스, 몰로니 (Moloney) 백혈병 바이러스의 긴 말단 반복체 (LTR) 및 다른 레트로바이러스로부터의 프로모터, 및 단순포진 바이러스의 티미딘 키나제 프로모터를 포함한다. 다른 구성 프로모터는 당업자에게 공지되어 있다. 본 발명의 유전자 발현 서열로서 유용한 프로모터는 또한 유도 프로모터를 포함한다. 유도 프로모터는 유도제의 존재하에 발현된다. 예를 들어, 메탈로티오네인 프로모터는 특정 금속 이온의 존재 하에 전사 및 번역을 촉진하도록 유도된다. 다른 유도 프로모터는 당업자에게 공지되어 있다.

[0195] 일반적으로, 유전자 발현 서열은 필요하면 각각 전사 및 번역의 개시에 관여하는 5' 비-전사 및 5' 비-번역 서열, 예를 들어 TATA 박스, 캐핑 서열, CAAT 서열 등을 포함할 것이다. 특히, 상기 5' 비-전사 서열은 작동가능하게 연결된 항원 핵산의 전사 제어를 위한 프로모터 서열을 포함하는 프로모터 영역을 포함할 것이다. 유전자 발현 서열은 원하는 경우 임의로 인핸서 서열 또는 상류 액티베이터 (activator) 서열을 포함한다.

[0196] 항원 핵산은 유전자 발현 서열에 작동가능하게 연결된다. 본원에서 사용되는 항원 핵산 서열 및 유전자 발현

서열은 항원 코딩 서열의 발현 또는 전사 및(또는) 번역을 유전자 발현 서열의 영향 또는 제어 하에 놓는 방식으로 공유결합으로 연결될 때 작동가능하게 연결된 것으로 말해진다. 2개의 DNA 서열은 5' 유전자 발현 서열 내의 프로모터의 유도가 항원 서열의 전사를 일으키는 경우, 및 2개의 DNA 서열 사이의 연결의 속성이 (1) 구조 이동 (frame-shift) 돌연변이의 도입을 일으키거나, (2) 항원 서열의 전사를 지시하는 프로모터 영역의 능력을 저해하거나, (3) 단백질로 번역되는 대응하는 RNA 전사체의 능력을 저해하는 것이 아닌 경우 작동가능하게 연결된 것으로 말해진다. 따라서, 유전자 발현 서열이 생성되는 전사체가 목적하는 단백질 또는 폴리펩티드로 번역되도록 항원 핵산 서열의 전사를 달성할 수 있는 경우에 유전자 발현 서열은 항원 핵산 서열에 작동가능하게 연결될 것이다.

[0197] 항원-코딩 핵산은 단독으로 또는 벡터와 조합하여 면역계에 전달될 수 있다. 가장 넓은 의미로 벡터는 항원이 면역 세포의 표면 상에 발현되고 제시될 수 있도록 항원-코딩 핵산의 면역계의 세포로의 전달을 용이하게 수 있는 임의의 비히클이다. 벡터는 일반적으로 벡터의 부재시 발생할 분해 정도에 비해 분해가 감소되도록 핵산을 면역 세포에 전달한다. 벡터는 임의로 면역 세포 내에서 항원 핵산의 발현을 향상시키기 위해 상기한 유전자 발현 서열을 포함한다. 일반적으로, 본 발명에 유용한 벡터는 플라스미드, 파지미드, 바이러스, 항원 핵산 서열의 삽입 또는 편입에 의해 조작된 바이러스 또는 세균 공급원으로부터 유래된 다른 비히클을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 바이러스 벡터가 바람직한 종류의 벡터이고, 다음 바이러스로부터의 핵산 서열을 포함하고 이로 제한되지 않는다: 레트로바이러스, 예를 들어 몰로니 쥐 백혈병 바이러스, 하비 (Harvey) 쥐 육종 바이러스, 쥐 유방 종양 바이러스, 및 라우스 육종 바이러스; 아데노바이러스, 아데노 관련 바이러스; SV40-타입 바이러스; 폴리오마 바이러스; 엡스타인 바 (Epstein-Barr) 바이러스; 유두종 바이러스; 헤르페스 바이러스; 우두 바이러스; 폴리오 바이러스; 및 RNA 바이러스 예를 들어 레트로바이러스. 나열하지 않았지만 당업계에 공지된 다른 벡터를 쉽게 사용할 수 있다.

[0198] 바람직한 바이러스 벡터는 비-필수 유전자가 관심있는 유전자로 교체된 비-세포변성 진핵 바이러스에 기초한다. 비-세포변성 바이러스는 그의 생활주기가 숙주 세포 DNA로의 후속적인 프로바이러스 통합과 함께 게놈 바이러스 RNA의 DNA로의 역전사를 포함하는 레트로바이러스를 포함한다. 레트로바이러스는 인간 유전자 치료 시험을 위해 승인되었다. 복제-결합인 (즉, 목적하는 단백질의 합성을 지시할 수 있지만, 감염성 입자를 제조할 수 없는) 레트로바이러스가 가장 유용하다. 상기 유전적으로 변경된 레트로바이러스 발현 벡터는 생체 내에서 유전자의 고효율 도입을 위한 일반적인 효용을 갖는다. 복제-결합 레트로바이러스를 생산하기 위한 표준 프로토콜 (외인성 유전 물질의 플라스미드 내로 통합, 플라스미드를 사용하여 패키징 (packaging)하는 세포주의 형질 감염, 패키징하는 세포주에 의한 재조합 레트로바이러스의 생산, 조직 배양 배지로부터 바이러스 입자의 수집, 및 바이러스 입자를 사용한 표적 세포의 감염 단계 포함)은 문헌 [Kriegler, M., Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual W. H. Freeman C.O., New York (1990) 및 Murry, E. J. Methods in Molecular Biology, vol. 7, Humana Press, Inc., Clifton, New Jersey (1991)]에 제공되어 있다.

[0199] 특정 용도에 바람직한 바이러스는 이중 스트랜드 DNA 바이러스인 아데노 관련 바이러스이다. 아데노 관련 바이러스는 복제-결합이 되도록 공학처리될 수 있고, 광범위한 세포 종류 및 종을 감염시킬 수 있다. 상기 바이러스는 추가로 열 및 지질 용매 안정성; 조혈 세포를 포함한 다양한 계통의 세포에서 고빈도 형질도입; 및 중복감염 억제제의 결핍으로 다수의 일련의 형질도입을 허용하는 것과 같은 잇점을 갖는다. 아데노 관련 바이러스는 인간 세포 DNA 내로 부위-특이적 방식으로 통합될 수 있어서, 레트로바이러스 감염의 특징인 삽입 돌연변이 유발 가능성 및 삽입된 유전자 발현의 변이성을 최소화하는 것으로 보고되었다. 또한, 조직 배양에서 선택 압력의 부재 하에 100을 초과하는 계대배양을 위해 야생형 아데노 관련 바이러스 감염이 이어졌고, 이는 아데노 관련 바이러스 게놈 통합이 비교적 안정한 사건임을 의미한다. 아데노 관련 바이러스는 또한 염색체의 방식으로 기능할 수 있다.

[0200] 다른 벡터는 플라스미드 벡터를 포함한다. 플라스미드 벡터는 당업계에 광범하게 설명되었고 당업자에게 잘 알려져 있다 (예를 들어, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 참조). 최근 수년 동안, 플라스미드 벡터는 숙주 게놈 내에서 복제되어 게놈 내로 통합하는 능력이 없기 때문에 유전자를 생체 내에서 세포에 전달하기 위해 특히 유리한 것으로 밝혀졌다. 그러나, 숙주 세포에 적합성인 프로모터를 갖는 이들 플라스미드는 플라스미드 내에서 작동가능하게 코딩된 유전자로부터 펩티드를 발현할 수 있다. 일반적으로 사용되는 일부 플라스미드는 pBR322, pUC18, pUC19, pRC/CMV, SV40 및 pBlueScript를 포함한다. 다른 플라스미드 당업자에게 잘 알려져 있다. 추가로, 플라스미드는 DNA의 특이적 단편을 제거하고 첨가하기 위해 제한 효소 및 라이게이션 반응을 이용하여 주문 설계될 수 있다.

- [0201] 최근에 유전자 운반 플라스미드가 세균을 사용하여 면역계에 전달될 수 있음이 밝혀졌다. 세균, 예를 들어 살모넬라의 변형된 형태는 플라스미드로 형질감염되어 전달 비히클로서 사용될 수 있다. 세균 전달 비히클은 숙주 대상에게 경구 또는 다른 투여 수단으로 투여될 수 있다. 세균은 아마도 소화관 장벽을 통해 통과함으로써 플라스미드를 면역 세포, 예를 들어 B 세포, 수지상 세포로 전달한다. 상기 방법을 사용하여 높은 수준의 면역 보호가 확립되었다. 상기 전달 방법은 항원, 면역자극성 핵산 및(또는) 다른 치료제의 전신 전달을 이용하는 본 발명의 측면에 유용하다.
- [0202] **단리된:**
- [0203] 본 발명의 항원은 일반적으로 그의 단리된 형태로 사용된다. 단리된 형태는 물질이 정상적으로 존재하거나 발견될 수 있는 성분으로부터 물리적으로 분리된 것이다. 예를 들어, 종양으로부터의 항원은 그가 유래된 종양으로부터, 가능하게는 상기 항원을 발현하는 세포로부터, 및 또한 가능하게는 상기 세포의 다른 성분으로부터 물리적으로 분리되면 단리된 것으로 말해진다.
- [0204] 본원에서 사용되는 용어 실질적으로 정제된 단백질, 지질, 탄수화물 또는 자연적으로 연합된 다른 물질이 실질적으로 없는 물질을 의미한다. 당업자는 단백질 정제를 위한 표준 기술을 이용하여 바이러스 또는 세균 폴리펩티드를 정제할 수 있다. 실질적으로 순수한 폴리펩티드는 종종 비-환원 폴리아크릴아미드 겔 상에 단일 주요 밴드를 생성시킬 것이다. 부분적 글리코실화 폴리펩티드 또는 몇몇 개시 코돈을 갖는 것의 경우에, 비-환원 폴리아크릴아미드 겔 상에 몇몇 밴드가 존재할 수 있지만, 이들은 그 폴리펩티드에 대한 특유한 패턴을 형성할 것이다. 바이러스 또는 세균 폴리펩티드의 순도는 또한 아미노-말단 아미노산 서열 분석에 의해 결정될 수 있다.
- [0205] 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 또한 일반적으로 그의 단리된 형태로 사용된다. 단리된 올리고뉴클레오티드는 정상적으로 회합된 물질로부터 물리적으로 분리된 올리고뉴클레오티드이다. 올리고뉴클레오티드가 자연 발생 공급원으로부터 생산되면, 그 자연 발생 공급원의 다른 성분, 예를 들어 세포, 단백질, 핵, 염색체 등으로부터 물리적으로 분리되면 단리된다.
- [0206] **질병 치료:**
- [0207] 질환, 예를 들어 감염 질병, 암 또는 알레르기에 관하여 사용될 때 본원에서 사용되는 용어 '치료하다', '치료된' 또는 '치료하는'은 질병의 발병 (예를 들어, 병원체의 감염)에 대한 대상의 내성을 증가시키거나 또는 즉, 대상이 질병을 발병할 (예를 들어, 병원체로 감염될) 가능성을 감소시키는 예방 처리, 및 투병하거나 (예를 들어, 감염을 감소하거나 제거하거나) 질병이 악화되는 것을 방지하기 위해 대상이 질병을 발병한 후의 치료 처리를 의미한다.
- [0208] 본원에 설명된 의약은 암, 감염 질병, 알레르기, 천식 및 다른 질환을 치료하기 위해 필요한 항원 특이적 면역 반응을 형성하도록 면역계를 자극하기 위해 치료상 및 예방상 유용하다. 상기 의약은 다른 보강제 조합물에 비해 예상치 않게 보다 우수한 면역 자극 효과를 나타낸다. 예를 들어, 의약은 예상치 않게 높은 수준의 IFN-감마를 유도하고, CTL을 활성화시키고 Th-1-유도된 면역글로불린 생산을 향상시키고, 이는 백신 처리에 대해 원래 예상되는 것보다 더 효과적인일 (또한 데포 효과 및 면역 자극 활성을 갖는 보강제를 포함하는 다른 조합물보다 더 효과적인일) 것임을 나타낸다 .
- [0209] **대상:**
- [0210] 용어 "대상" 및 "환자"는 본원에서 서로 교환가능하게 사용되고, 인간 또는 다른 척추동물, 비제한적인 예를 들어 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 양, 염소, 칠면조, 닭, 영장류, 예를 들어, 원숭이, 및 어류 (양식 종), 예를 들어 연어를 의미한다. 본 발명은 인간 및 비-인간 대상에서 암 및 종양, 감염, 및 알레르기/천식을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 암은 반려 동물 (예를 들어, 고양이 및 개)에서 주요 사인 중 하나이다.
- [0211] 본원에서 사용되는 위험이 있는 대상은 감염 또는 암 또는 알레르기를 발병할 위험이 보통보다 높은 대상이다.
- [0212] 감염에 걸릴 위험이 있는 대상은 특정 종류의 감염체가 유행하는 지역으로 여행을 계획하는 대상일 수 있거나, 생활양식 또는 의료 처리를 통해 감염성 유기체를 포함할 수 있는 체액, 또는 유기체 또는 심지어 감염성 유기체가 확인된 지역에 사는 임의의 대상에 직접 노출되는 대상일 수 있다. 감염에 걸릴 위험이 있는 대상은 또한 의료 기관에서 특정 미생물 항원을 사용한 백신 처리를 권장하는 전체 인구집단을 포함한다.
- [0213] 감염에 걸린 대상은 감염성 병원체에 노출되었거나 체내에 급성 또는 만성 감염증의 검출가능한 수준의 병원체를 갖는 대상이다. 본원에서 사용되는 감염 질병은 체내의 외래 미생물의 존재로부터 발생하는 질병이다. 일차 병원체

도입 부위인 인체 점막 표면을 보호하기 위한 효과적인 백신 전략 및 치료법을 개발하는 것이 특히 중요하다.

- [0214] 감염 질병은 세균 감염, 바이러스 감염, 진균 감염, 기생충 감염 또는 항산균 감염일 수 있지만 이로 제한되지 않는다. 이들의 예는 본원에 나열되고 아래 보충된다.
- [0215] 세균 감염은 방선균 (Actinomyces) 감염, 탄저균 감염, 박테리오테스 (Bacteriodes) 감염, 보르렐리아 (Borrelia) 감염, 캄필로박터 감염, 시트로박터 (Citrobacter) 감염, 클로스트리듐 디피실레 (C. difficile) 감염, 코리네박테리움 감염, 대장균 감염, 엔테로박터 감염, 가드네렐라 (Gardnerella) 감염, 헤모필루스 감염, 에이치. 파일로리 감염, 클렙시엘라 감염, 레지오넬라 감염, 리스테리아 감염, 나이세리아 감염, 노카르디아 (Nocardia) 감염, 파스퇴렐라 감염, 폐렴구균 감염, 프로테우스 (Proteus) 감염, 슈도모나스 감염, 살모넬라 감염, 시겔라 (Shigella) 감염, 나선균 (Spirillum) 감염, 스피로헤타 (Spirochaeta) 감염, 포도상구균 감염, 연쇄상구균 감염, 연쇄상구균 감염 및 트레포네마 감염일 수 있지만 이로 제한되지 않는다.
- [0216] 바이러스 감염은 아데노바이러스 감염, 레트로바이러스 감염, 로타바이러스 감염 등일 수 있지만 이로 제한되지 않는다. 바이러스 감염은 사이토메갈로바이러스 감염, 엡스타인 바 바이러스 감염, A형 간염 바이러스 감염, B형 간염 바이러스 감염, C형 간염 바이러스 감염, 1형 단순포진 바이러스 감염, 2형 단순포진 바이러스 감염, HIV 감염, 인간 유두종 바이러스 감염, 인플루엔자 A 바이러스 감염, 원숭이 수두 감염, 호흡기 세포융합 바이러스 감염, SARS 감염, 천연두 감염, 수두대상포진 바이러스 감염일 수 있지만 이로 제한되지 않는다. 몇몇 실시태양에서, 감염 질병은 만성 감염 질병, 예를 들어 만성 바이러스 감염이다. 그 예는 간염 바이러스 감염, 인간 유두종 바이러스 감염, HIV 감염 및 단순포진 바이러스 감염을 포함한다.
- [0217] 인간 및 비-인간 척추동물의 감염성 바이러스는 레트로바이러스, RNA 바이러스 및 DNA 바이러스를 포함한다. 이 군의 레트로바이러스는 단순 레트로바이러스 및 복합 레트로바이러스를 모두 포함한다. 단순 레트로바이러스는 B-타입 레트로바이러스, C-타입 레트로바이러스 및 D-타입 레트로바이러스의 하위군을 포함한다. B-타입 레트로바이러스의 예는 마우스 유방종양 바이러스 (MMTV)이다. C-타입 레트로바이러스는 하위군 C-타입 A군 (라우스 육종 바이러스 (RSV), 조류 백혈병 바이러스 (ALV) 및 조류 골수아세포종 바이러스 (AMV) 포함) 및 C-타입 B군 (고양이 백혈병 바이러스 (FeLV), 긴팔원숭이 백혈병 바이러스 (GALV), 비장 괴사 바이러스 (SNV), 세망내피증 바이러스 (RV) 및 원숭이 육종 바이러스 (SSV) 포함)를 포함한다. D-타입 레트로바이러스는 메이슨-화이자 (Mason-Pfizer) 원숭이 바이러스 (MPMV) 및 원숭이 레트로바이러스 타입 1 (SRV-1)을 포함한다. 복합 레트로바이러스는 렌티바이러스, T-세포 백혈병 바이러스 및 거품 형성 바이러스의 하위군을 포함한다. 렌티바이러스는 HIV-1을 포함하지만, 또한 HIV-2, SIV, 비스나 (Visna) 바이러스, 고양이 면역결핍 바이러스 (FIV) 및 말 감염성 빈혈 바이러스 (EIAV)를 포함한다. T-세포 백혈병 바이러스는 HTLV-1, HTLV-II, 원숭이 T-세포 백혈병 바이러스 (STLV) 및 소 백혈병 바이러스 (BLV)를 포함한다. 거품 형성 바이러스는 인간 거품 형성 바이러스 (HFV), 원숭이 거품 형성 바이러스 (SFV) 및 소 거품 형성 바이러스 (BFV)를 포함한다.
- [0218] 척추동물에서 항원인 다른 RNA 바이러스의 예는 리오바이러스과의 구성원, 예를 들어 오르소리오바이러스속 (Orthoreovirus) (포유동물 및 조류 레트로바이러스의 다수 혈청형), 오르비바이러스속 (청설병 바이러스, 유게난지 (Eugeneangee) 바이러스, 케메로보 (Kemerovo) 바이러스, 아프리카 말병 바이러스, 및 콜로라도 진드기열 바이러스), 로타바이러스속 (인간 로타바이러스, 네브라스카 소 설사 바이러스, 원숭이 로타바이러스, 소 또는 양 로타바이러스, 조류 로타바이러스); 피코르나바이러스과, 예를 들어 엔테로바이러스속 (폴리오바이러스, 콕사키 바이러스 A 및 B, 소장 세포변성 인간 고아 (ECHO) 바이러스, A형 간염 바이러스, 원숭이 엔테로바이러스, 쥐 뇌척수염 (ME) 바이러스, 폴리오바이러스 뮤리스, 소 엔테로바이러스, 돼지 엔테로바이러스), 카디오바이러스속 (Cardiovirus) (뇌심근염 바이러스 (EMC), 멧고바이러스), 리노바이러스속 (적어도 113 서브타입을 포함하는 인간 리노바이러스; 다른 리노바이러스), 압토바이러스속 (Aphthovirus) (구제역 바이러스 (FMDV)); 칼시바이러스과, 예를 들어 소포성 발진 돼지 바이러스, 산 미구엘 바다사자 바이러스, 고양이 피코르나바이러스 및 노르워크 바이러스; 토가바이러스과, 예를 들어 알파바이러스속 (Alphavirus) (동부 말 뇌염 바이러스, 쉼리키 숲 (Semliki forest) 바이러스, 신드비스 (Sindbis) 바이러스, 치쿤구니아 (Chikungunya) 바이러스, 옹-옹 (O'Nyong-Nyong) 바이러스, 로스강 (Ross river) 바이러스, 베네수엘라 말 뇌염 바이러스, 서부 말 뇌염 바이러스), 플라비바이러스속 (Flavivirus) (모기 전염성 황열 바이러스, 뎅기 바이러스, 일본 뇌염 바이러스, 세인트루이스 뇌염 바이러스, 머레이 밸리 (Murray Valley) 뇌염 바이러스, 서나일 (West Nile) 바이러스, 군진 (Kunjin) 바이러스, 중유럽 진드기 전염 바이러스, 극동 진드기 전염 바이러스, 카사누르 숲 (Kyasanur forest) 바이러스, 루핑 (Louping) III 바이러스, 포와산 (Powassan) 바이러스, 옴스크 (Omsk) 출혈열 바이러스), 루비 바이러스속 (Rubivirus) (풍진 바이러스) 및 페스티바이러스속 (Pestivirus) (점막 질환 바이러스, 돼지 콜레라 바이러스, 국경 질환 바이러스); 분야바이러스과 (Bunyaviridae), 예를 들어 부니바이러스속 (Bunyvirus) (분암

웨라 (Bunyamwera) 및 관련 바이러스, 캘리포니아 뇌염 군 바이러스), 플레보바이러스속 (Phlebovirus) (모래파리 열 시칠리안 바이러스, 리프트 밸리 (Rift Valley) 열 바이러스), 나이로바이러스속 (Nairovirus) (크림-콩고 (Crimean-Congo) 출혈열 바이러스, 나이로비 (Nairobi) 양 질환 바이러스), 및 유쿠바이러스속 (Uukuvirus) (유쿠니에미 (Uukuniemi) 및 관련 바이러스); 오르소믹소바이러스과, 예를 들어 인플루엔자 바이러스속 (A형 인플루엔자 바이러스, 많은 인간 아형), 돼지 인플루엔자 바이러스 및 조류 및 말 인플루엔자 바이러스; B형 인플루엔자 (많은 인간 아형) 및 C형 인플루엔자 (가능한 별개의 속); 파라믹소바이러스과, 예를 들어 파라믹소바이러스속 (1형 파라인플루엔자 바이러스, 센다이 (Sendai) 바이러스, 혈구흡착 바이러스, 2형 내지 5형 파라인플루엔자 바이러스, 뉴캐슬병 바이러스, 볼거리 바이러스), 모르빌리바이러스속 (Morbillivirus) (홍역 바이러스, 아급성 경화 범뇌염 바이러스, 디스토퍼 바이러스, 우역 (Rinderpest) 바이러스), 뉴모바이러스속 (Pneumovirus) (호흡기 세포융합 바이러스 (RSV), 소 호흡기 세포융합 바이러스 및 페렴 바이러스); 랩도바이러스과, 예를 들어 베지쿨로바이러스속 (VSV), 칸디푸라 (Chandipura) 바이러스, 플란더스-하트 파크 (Flanders-Hart Park) 바이러스), 리사바이러스속 (Lyssavirus) (광견병 바이러스), 어류 랩도바이러스, 및 2개의 가능한 랩도바이러스 (마르부르크 (Marburg) 바이러스 및 에볼라 바이러스); 아레나바이러스과, 예를 들어 림프구성 용모막수막염 바이러스 (LCM), 타카리브 (Tacaribe) 바이러스 복합체, 및 라사 (Lassa) 바이러스; 코로노아바이러스과 (Coronoviridae), 예를 들어 감염성 기관지염 바이러스 (IBV), 간염 바이러스, 인간 장 코로나 바이러스, 및 고양이 감염성 복막염 (고양이 코로나바이러스)를 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0219] 척추동물에서 항원성인 예시적인 DNA 바이러스는 포크바이러스과, 예를 들어 오르소포크바이러스속 (대두창, 소두창, 원숭이 두창, 우두, 버팔로 두창, 토끼 두창, 팔다리결손증), 레포리포크바이러스속 (점액종, 섬유종), 조류 포크바이러스속 (계두, 다른 조류 포크바이러스), 카프리포크바이러스속 (양 포크, 염소 포크), 수이포크바이러스속 (돼지 포크), 파라포크바이러스속 (전염성 농포성 피부염 바이러스, 가성우두, 소 유행성 구내염 바이러스); 이리도바이러스과 (아프리카 돼지열 바이러스, 개구리 바이러스 2 및 3, 어류의 임파낭종 바이러스); 헤르페스바이러스과, 예를 들어 알파-헤르페스바이러스 (1형 및 2형 단순포진, 수두대상포진, 말 유산 바이러스, 2형 및 3형 말 헤르페스 바이러스, 가성광견병 바이러스, 감염성 소 각막결막염 바이러스, 감염성 소 비기관염 바이러스, 고양이 비기관염 바이러스, 감염성 후두기관염 바이러스), 베타-헤르페스바이러스 (인간 사이토메갈로바이러스 및 돼지 및 원숭이의 사이토메갈로바이러스); 감마-헤르페스바이러스 (엡스타인 바 바이러스 (EBV), 마렉 (Marek) 병 바이러스, 헤르페스 사이미리 (H. saimiri), 헤르페스바이러스 아텔레스 (H. ateles), 헤르페스바이러스 실빌라구스 (H. sylvilagus), 기니아 피그 헤르페스 바이러스, 루크 (Lucke) 종양 바이러스); 아테노바이러스과, 예를 들어 마스트아테노바이러스속 (인간 하위군 A,B,C,D,E 및 그룹에 속하지 않는 것; 원숭이 아테노바이러스 (적어도 23 혈청형), 감염성 개 간염, 및 소, 돼지, 양, 개구리 및 많은 다른 종의 아테노바이러스, 아비아테노바이러스속 (조류 아테노바이러스); 및 비-배양가능 아테노바이러스; 파보바이러스과 (Papoviridae), 예를 들어 유두종바이러스속 (인간 유두종 바이러스, 소 유두종 바이러스, 쇼프 (Shope) 토끼 유두종 바이러스, 및 다른 종의 다양한 병원성 유두종 바이러스), 폴리오마바이러스속 (폴리오마바이러스, 원숭이 공포형성체 (SV-40), 토끼 공포형성체 (RKV), K 바이러스, BK 바이러스, JC 바이러스, 및 다른 영장류 폴리오마 바이러스, 예를 들어 림프구친화성 유두종 바이러스); 파보바이러스과, 예를 들어 아테노 관련 바이러스속, 파보바이러스속 (고양이 범백혈구감소 바이러스, 소 파보바이러스, 개 파보바이러스, 알류산 밍크병 바이러스 등)을 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0220] 진균 감염은 아스페르길루스증, 분아균증, 칸디다증, 색소진균증, 효모균증, 히스토플라스마증, 균증 감염, 파라콕시디오이데스진균증, 슈달레세리아증, 백선증, 및 진풍 감염을 포함할 수 있고 이로 제한되지 않는다.

[0221] 기생충 감염은 아메바증, 에키노코쿠스 (Echinococcus) 감염, 간질증, 조충 감염, 리슈만편모충증, 회선사상충증, 아메리카구충 감염, 신경낭미충증, 폐흡충증, 열원충 감염, 폐포자충 감염, 주혈흡충증, 촌충 감염, 질편모충 감염, 편충 감염, 브루스파동편모충 (T. brucei) 감염 및 크루즈파동편모충 감염을 포함할 수 있고 이로 제한되지 않는다.

[0222] 항산균 감염은 결핵균 및 나병균을 포함할 수 있고 이로 제한되지 않는다.

[0223] 항원 특이적 면역 반응을 유도하는 방법은 새, 예를 들어 암탉, 닭, 칠면조, 오리, 거위, 메추라기 및 꿩의 치료에 매우 적합하다. 새는 많은 종류의 감염에 대한 주요 표적이다.

[0224] 부화하는 새는 탄생 직후에 병원성 미생물에 노출된다. 이들 새는 초기에는 모체 유래된 항체에 의해 병원체에 대해 보호되지만, 이 보호는 단지 일시적이고, 새 자신의 미숙한 면역계가 병원체에 대해 새를 보호하기 시작해야 한다. 가장 감수성인 때인 어린 새에서 감염을 예방하는 것이 종종 바람직하다. 나이드는 새, 특히 새가 밀

폐된 숙소에 수용되어 질병이 신속하게 확산할 때 감염에 대해 예방하는 것이 또한 바람직하다. 따라서, 항원 특이적 면역 반응을 향상시키기 위해 본 발명의 제제를 새에 투여하는 것이 바람직하다.

- [0225] 닭에서 흔한 감염의 예는 닭 감염성 빈혈 바이러스 (CIAV)이다. CIAV는 1979년에 일본에서 마렉병 백신 처리 브레이크 (break)의 조사 동안 처음 단리되었다 (Yuasa et al., 1979, Avian Dis. 23:366-385). 그 이래로, CIAV는 모든 주요 가금류 생산 국가에서 상업적 가금류에서 검출되었다 (van Bulow et al., 1991, pp.690-699, in Diseases of Poultry, 9th edition, Iowa State University Press).
- [0226] CIAV 감염은 어린 감수성 닭에서 빈혈, 출혈 및 면역억제를 특징으로 하는 임상 질병을 일으킨다. CIAV-감염된 닭의 흉선 및 골수의 위축 및 지속 병변이 또한 CIAV 감염의 특징이다. 흉선 및 때때로 파브리시우스낭에서 림프구 고갈은면역억제를 일으키고 2차 바이러스, 세균 또는 진균 감염에 대한 감수성을 증가시켜 질병의 경과를 복잡하게 한다. 면역억제는 마렉병 바이러스 (MDV), 감염성 점액낭병 바이러스, 세망내피증 바이러스, 아데노 바이러스 또는 리오바이러스 중 하나 이상으로 감염 후 질병을 악화시킬 수 있다. MDV의 발병기전이 CIAV에 의해 강화된 것으로 보고되었다 (DeBoer et al., 1989, p.28 In Proceedings of the 38th Western Poultry Diseases Conference, Tempe, Ariz.). 또한, CIAV가 감염성 점액낭병의 징후를 악화시키는 것이 보고되었다 (Rosenberger et al., 1989, Avian Dis. 33:707-713). 닭은 CAA로 인한 실험적으로 유도된 질병에 연령 내성을 나타낸다. 이는 본질적으로 2주령에 완성되지만, 나이든 새는 여전히 감염에 대해 감수성이다 (Yuasa, N. et al., 1979 상기 문헌; Yuasa, N. et al., Avian Diseases 24, 202-209, 1980). 그러나, 닭이 CAA 및 면역억제제 (IBDV, MDV 등)로 이중 감염되면, 질병에 대한 연령 내성은 지연된다 (Yuasa, N. et al., 1979 and 1980 상기 문헌; Bulow von V. et al., J. Veterinary Medicine 33, 93-116, 1986). 질병 전염을 강화시킬 수 있는 CIAV의 특징은 환경 불활성화 및 일부 일반 소독제에 대한 높은 내성을 포함한다. 질병 돌발기에 감염된 새의 10% 내지 30%가 폐사하는 사실로부터 가금류에서 CIAV 감염의 경제적 영향은 분명하다.
- [0227] 다른 척추동물처럼 조류의 백신 처리는 임의의 연령에서 수행할 수 있다. 통상, 백신 처리는 살아있는 미생물에 대해 12주령 이하에서 수행하고 불활성화 미생물 또는 다른 종류의 백신에 대해 14-18주령에서 수행한다. 난 백신 처리에 대해, 백신 처리는 배 발달의 마지막 분기에 수행될 수 있다. 따라서, 본원에 제공된 제제는 임상 백신 처리 스케줄을 이용하여 새 및 다른 비-인간 척추동물에 투여될 수 있고, 항원은 본원에 설명된 바와 같이 적절한 시간 후 투여될 수 있다.
- [0228] 축우 및 가축은 또한 감염에 감수성이다. 이들 동물을 침범하는 질병은 특히 축우 사이에 심각한 경제적 손실을 일으킬 수 있다. 본 발명의 방법은 가축, 예를 들어 소, 말, 돼지, 양 및 염소에서 감염에 대해 보호하기 위해 사용될 수 있다.
- [0229] 소는 소 바이러스에 의해 감염될 수 있다. 소 바이러스 설사 바이러스 (BVDV)는 작은 외피소유 포지티브-스트랜드 RNA 바이러스이고, 돼지 콜레라 바이러스 (HOCV) 및 양 보더 (border) 병 바이러스 (BDV)와 함께 페스티바이러스속으로 분류된다. 페스티바이러스는 이전에 토가바이러스과로 분류되었지만, 일부 연구에서 플라비바이러스 및 C형 간염 바이러스 (HCV) 군과 함께 플라비바이러스과로 재분류가 제안되었다 (Francki, et al., 1991).
- [0230] 축우의 중요한 병원체인 BVDV는 세포 배양 분석을 기초로 세포변성 (CP) 및 비세포변성 (NCP) 생물형으로 구분될 수 있다. 두 생물형이 축우에서 발견될 수 있지만 NCP 생물형이 더 만연하다. 임신한 소가 NCP주로 감염되면, 소는 살아있는 동안 바이러스를 퍼뜨릴 지속 감염되고 특이적 면역관용성인 송아지를 낳는다. 지속 감염된 축우는 점막 질병으로 쓰러질 수 있고, 이어서 두 생물형이 모두 동물로부터 단리될 수 있다. 임상 징후는 유산, 기형발생 및 호흡 문제, 점막 질병 및 약한 설사를 포함할 수 있다. 또한, 동물의 폐사를 일으킬 수 있는 집단 유행과 연관된 중증 저혈소판증이 설명되었고, 이 질환과 연관된 균주가 전형적 BVDV보다 더 치명적인 것으로 보인다.
- [0231] 말 헤르페스 바이러스 (EHV)는 말에서 무증상에서 치명적 질병에 이르기까지 다양한 감염을 일으키는 항원적으로 구분되는 생물학적 물질군을 포함한다. 이들은 말에서 편재하는 병원체인 말 헤르페스바이러스-1 (EHV-1)을 포함한다. EHV-1은 유산, 기도 질병 및 중추신경계 질환의 유행과 관련된다. 어린 말의 상기도의 일차 감염은 8 내지 10일간 지속하는 열병을 일으킨다. 면역학적 경험이 있는 암말은 질병이 명백해지지 않으면서 기도를 통해 재감염될 수 있어서, 유산은 보통 갑자기 발생한다. 신경학적 증후군은 호흡기 질병 또는 유산과 관련되고, 임의의 나이의 양성 모두의 동물에 영향을 미칠 수 있어서, 협응 결핍, 쇠약 및 후방 마비를 일으킨다 (Telford, E.A.R. et al., Virology 189, 304-316, 1992). 다른 EHV는 EHV-2 또는 말 사이토메갈로바이러스, EHV-3, 말 교배 발진 바이러스, 및 EHV-4 (이전에 EHV-1 서브타입 2로 분류됨)를 포함한다.

- [0232] 양 및 염소는 비스나-매디 (visna-maedi)를 포함한 다양한 위험한 미생물에 감염될 수 있다.
- [0233] 영장류, 예를 들어 원숭이, 유인원 및 짧은꼬리원숭이는 원숭이 면역결핍 바이러스에 의해 감염될 수 있다. 불활성화 세포-바이러스 및 무세포 전체 원숭이 면역결핍 백신이 짧은꼬리원숭이에서 보호를 제공하는 것으로 보고되었다 (Stott et al. (1990) Lancet 36:1538-1541; Desrosiers et al. PNAS USA (1989) 86:6353-6357; Murphey-Corb et al. (1989) Science 246:1293-1297; 및 Carlson et al. (1990) ADS Res. Human Retroviruses 6:1239-1246). 제조함 HIV gp120 백신은 침팬지에서 보호를 제공하는 것으로 보고되었다 (Berman et al. (1990) Nature 345:622-625).
- [0234] 집 및 야생 고양이는 다양한 미생물의 감염에 대해 감수성이다. 예를 들어, 고양이 감염성 복막염은 집 및 야생 고양이, 예를 들어 사자, 표범, 치타 및 재규어에서 발생하는 질병이다. 고양이에서 상기 및 다른 종류의 병원성 유기체의 감염을 예방하기를 원하는 경우, 본 발명의 방법은 감염에 대해 이들을 보호하도록 고양이를 백신 처리하기 위해 사용될 수 있다.
- [0235] 집 고양이는 고양이 백혈병 바이러스 (FeLV), 고양이 육종 바이러스 (FeSV), 내재형 콘코르나바이러스 (Concornavirus) (RD-114), 및 고양이 합포체 형성 바이러스 (FeSFV)를 포함하지만 이로 제한되지 않는 몇몇 레트로바이러스로 감염될 수 있다. 이들 중, FeLV가 림프세망 및 골수성 신생물, 빈혈, 면역 매개 질환, 및 인간 후천성 면역 결핍 증후군 (AIDS)과 유사한 면역결핍 증후군을 포함한 다양한 증상을 유발하는 가장 심각한 병원체이다. 최근에, FeLV-AIDS로 명명된 특정 복제-결핍 FeLV 돌연변이체가 면역억제 특성과 보다 특히 관련되었다.
- [0236] 고양이 T-림프친화성 렌티바이러스 (고양이 면역결핍으로도 언급됨)의 발견은 문헌 [Pedersen et al. (1987) Science 235:790-793]에 처음 보고되었다. FIV의 특징은 문헌 [Yamamoto et al. (1988) Leukemia, December Supplement 2:204S-215S; Yamamoto et al. (1988) Am. J. Vet. Res. 49:1246-1258; 및 Ackley et al. (1990) J. Virol. 64:5652-5655]에 보고되었다. FIV의 클로닝 및 서열 분석은 문헌 [Olmsted et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2448-2452 and 86:4355-4360]에 보고되었다.
- [0237] 고양이 감염성 복막염 (FIP)은 집 및 야생 고양이과에서 예측불가능하게 발생하는 산발 질병이다. FIP는 주로 집 고양이의 질병이지만, 사자, 쿠거, 표범, 치타 및 재규어에서 진단되었다. FIP에 걸린 보다 작은 야생 고양이는 살렝이 및 카라칼 (caracal), 모래 고양이 및 팔라스 고양이를 포함한다. 집 고양이에 있어서 질병은 주로 어린 동물에서 발생하지만, 모든 나이의 고양이에게 감수성이다. 피크 발생률은 6 내지 12살에서 발생한다. 5 내지 13살에서 발생률이 감소한 후, 14 내지 15살의 고양이에서 발생률이 증가한다.
- [0238] 어류, 조개류 또는 다른 수생 생물형에서 바이러스, 세균 및 기생충 질병은 양식업에 심각한 문제를 제기한다. 부화 탱크 또는 닫힌 해양 양식장 내의 동물의 고밀도 때문에, 감염 질병은 예를 들어, 어류, 조개류 또는 다른 수생 생물형 설비 내의 양식생물의 큰 비율을 박멸시킬 수 있다. 질병 예방이 질병 진행 중의 개입보다 어류에 대한 이들 위협에 대한 보다 요망되는 구체법이다. 어류의 백신 처리가 면역을 통해 장기간 보호를 제공할 수 있는 유일한 예방 방법이다. 핵산에 기초한 백신 처리는 미국 특허 5,780,448 (데이비스 (Davis))에 설명되었다.
- [0239] 어류 면역계는 포유동물 면역계와 유사한 많은 특징, 예를 들어 B 세포, T 세포, 림포킨, 보체 및 면역글로불린의 존재를 갖는다. 어류는 포유동물의 B 및 T 세포와 많은 면에서 유사하게 보이는 역할을 하는 림프구 서브클래스를 갖는다. 백신은 담금 또는 경구 투여될 수 있다.
- [0240] 양식 종은 어류, 조개류 및 다른 수생 동물을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 어류는 뼈가 있는 또는 연골성 어류일 수 있는 모든 척추동물 어류, 예를 들어 연어과, 잉어, 메기, 방어, 감성돔 및 농어를 포함한다. 연어과는 송어 (무지개 송어 포함), 연어 및 북극 민물송어를 포함하는 어류의 과이다. 조개류의 예는 대합조개, 랍스터, 새우, 게 및 굴을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 다른 양식 수생 동물은 뱀장어, 오징어 및 문어를 포함하고 이로 제한되지 않는다.
- [0241] 바이러스성 양식 병원체의 폴리펩티드는 바이러스 출혈성 패혈증 바이러스 (VHSV)의 당단백질 (G) 또는 핵단백질 (N); 감염성 조혈 괴사 바이러스 (IHNV)의 G 또는 N 단백질; 감염성 체장 괴사 바이러스 (IPNV)의 VP1, VP2, VP3 또는 N 구조 단백질; 잉어의 붉은 바이러스혈증 (SVC)의 G 단백질; 및 얼룩메기 (channel catfish) 바이러스 (CCV)의 막 관련 단백질, 테구민 또는 캡시드 단백질 또는 당단백질을 포함하고 이로 제한되지 않는다.
- [0242] 말을 감염시키는 대표적인 기생충은 가스트로필러스 (Gasterophilus) 종; 아이메리아 류카르티 (Eimeria

leuckarti), 편모충 (Giardia) 종; 말세모편모충 (Tritrichomonas equi); 바베시아종 (RBC), 타일레리아 에퀴 (Theileria equi); 파동편모충종; 클로시엘라 에퀴 (Klossiella equi); 근육포자충 (Sarcocystis) 종이다.

[0243] 돼지를 감염시키는 대표적인 기생충은 아이메리아 베블리엑키 (E. bebliecki), 아이메리아 스카브라 (E. scabra), 이소스포라 수이스 (Isospora suis), 편모충종; 대장섬모충 (Balantidium coli), 이질아메바 (Entamoeba histolytica); 톡소포자충 및 근육포자충종, 및 선모충 (Trichinella spiralis)을 포함한다.

[0244] 젖소 및 육우의 주요 기생충은 아이메리아종, 와포자충 (Cryptosporidium) 종, 편모충종; 톡소포자충; 쇠바베시아 (B. bovis) (RBC), 텍사스바베스열원충 (B. bigemina) (RBC), 파동편모충종 (혈장), 타일레리아원충종 (RBC); 타일레리아 파르바 (T. parva) (림프구); 쇠세모편모충 (T. foetus); 및 근육포자충종을 포함한다.

[0245] 맹금의 주요 기생충은 트리코모나스 갈리내 (Trichomonas gallinae); 구충류 (Coccidia) (아이메리아종); 플라즈모디움 레릭툼 (Plasmodium relictum), 류코사이토준 다닐레브스키 (Leucocytozoon danilewskyi) (올빼미), 헤모프로테우스 (Haemoproteus) 종, 파동편모충종; 히스토모나스편모충 (Histomonas); 칠면조와포자충 (Cryptosporidium meleagridis), 닭와포자충 (C. baileyi), 편모충종, 아이메리아; 톡소플라즈마를 포함한다.

[0246] 양 및 염소를 감염시키는 대표적인 기생충은 아이메리아종, 와포자충종, 편모충종; 톡소포자충; 바베시아종 (RBC), 파동편모충종 (혈장), 타일레리아원충종 (RBC); 및 근육포자충종을 포함한다.

[0247] 가금류에서 대표적인 기생충 감염은 아이메리아 아세르블리나 (E. acervulina), 이. 네카트릭스 (E. necatrix), 이. 테넬라 (E. tenella), 이소스포라종 및 아이메리아 트렁카타 (E. truncata)에 의해 유발된 콕시듐증; 칠면조편모충 (Histomonas meleagridis) 및 닭편모충 (H. gallinarum)에 의해 유발된 히스토모나스병; 트리코모나스 갈리내에 의해 유발된 트리코모나스증; 및 칠면조육편모충 (Hexamita meleagridis)에 의해 유발된 헥사미타증을 포함한다. 가금류는 또한 에메리아 맥시마 (Eimeria maxima), 에메리아 멜레아그리디스 (E. meleagridis), 아이메리아 아데노에이데스 (E. adenoeides), 아이메리아 멜레아그리미티스 (E. meleagrimitis), 와포자충, 아이메리아 브루네티 (E. brunetti), 에메리아 아데노에이데스 (E. adenoeides), 류코사이토준종, 열원충종, 헤모프로테우스 멜레아그리디스 (H. meleagridis), 톡소포자충 및 근육포자충에 감염될 수 있다.

[0248] 본 발명의 방법은 또한 개, 고양이, 새, 어류 및 페렛 (ferret)에서 기생충 감염의 치료 및(또는) 예방에 적용될 수 있다. 새의 대표적인 기생충은 트리코모나스 갈리내; 아이메리아종, 이소스포라종, 편모충; 와포자충; 근육포자충종, 톡소포자충, 헤모프로테우스/파라헤모프로테우스, 열원충종, 류코사이토준/아키바 (Akiba), 아톡소플라즈마 (Atoxoplasma), 파동편모충종을 포함한다. 개를 감염시키는 대표적인 기생충은 선모충; 이소포라 (Isospora) 종, 근육포자충종, 와포자충종, 함몬디아 (Hammondia) 종, 지아르디아 듀오테날리스 (Giardia duodenalis) (개흡반편모충); 대장섬모충, 이질아메바; 헤파토준 카니스 (Hepatozoon canis); 톡소포자충, 크루즈파동편모충; 개바베시아 (B. canis); 리슈만 아마스티고테스 (L. amastigotes); 네오포자충 (Neospora caninum)을 포함한다.

[0249] 고양이종을 감염시키는 대표적인 기생충은 이소스포라종, 톡소포자충, 근육포자충종, 함몬디아 함몬디 (H. hammondi), 베스노이티아 (Besnoitia) 종, 편모충종; 이질아메바; 헤파토준 카니스, 사이타옥스준 (Cytauxzoon) 종, 사이타옥스준종, 사이타옥스준종 (적혈구, RE 세포)를 포함한다.

[0250] 어류를 감염시키는 대표적인 기생충은 육편모충종, 아이메리아종; 크립토비아 (Cryptobia) 종, 노제마 (Nosema) 종, 점액포자충 (Myxosoma) 종, 킬로도넬라 (Chilodonella) 종, 트리코디나 (Trichodina) 종; 플리스토포라 (Plistophora) 종, 믹소소마 헨네푸야 (Myxosoma Henneguya); 코스티아 (Costia) 종, 이치티오피티리우스 (Ichthyophthirius) 종 및 오디늄 (Oodinium) 종을 포함한다.

[0251] 야생 포유동물의 대표적인 기생충은 편모충종 (육식동물, 초식동물), 이소스포라종 (육식동물), 아이메리아종 (육식동물, 초식동물); 타일레리아원충종 (초식동물), 바베시아종 (육식동물, 초식동물), 파동편모충종 (육식동물, 초식동물); 주혈흡충 (Schistosoma) 종 (초식동물); 간질충 (Fasciola hepatica) (초식동물), 큰거머흡충 (Fascioloides magna) (초식동물), 거대간질충 (F. gigantica) (초식동물), 선모충 (육식동물, 초식동물)을 포함한다.

[0252] 동물원에서 기생충 감염은 또한 심각한 문제를 제기할 수 있다. 소과 (블레스복 (blesbok), 영양, 들소, 큰영양 (eland), 큰들소 (gaur), 임팔라, 작은영양 (klipspringer), 얼룩영양 (kudu), 가젤)의 대표적인 기생충은 아이메리아종을 포함한다. 기각과 (pinnipidae) (바다표범, 바다사자)에서 대표적인 기생충은 아이메리아 포카에 (E. phocae)를 포함한다. 낙타과 (낙타, 라마)에서 대표적인 기생충은 아이메리아종을 포함한다. 기린과 (기린)의 대표적인 기생충은 아이메리아종을 포함한다. 코끼리과 (아프리카 및 아시아)에서 대표적인 기생충은

간질흡충증을 포함한다. 하등 영양류 (침팬지, 오랑우탄, 유인원, 개코원숭이, 짧은꼬리원숭이, 원숭이)의 대표적인 기생충은 편모충증; 대장섬모충, 이질아메바, 근육포자충증, 특소포자충; 열원충증 (RBC), 바베시아증 (RBC), 파동편모충증 (혈장), 리슈만증 (대식세포)을 포함한다.

[0253] 알레르기 또는 천식을 발병할 위험이 있는 대상은 알레르기 또는 천식을 갖는 것으로 확인되었지만 면역자극성 올리고뉴클레오티드 치료 동안 활성 질병을 갖지 않는 대상, 및 유전적 또는 환경적 요인으로 인해 이들 질병을 발병할 위험이 있는 것으로 간주되는 대상을 포함한다. 항원이 알레르겐이고, 대상이 그 특정 항원에 대한 알레르기 반응을 일으키고 대상이 예를 들어, 꽃가루 시기 동안 항원에 노출될 수 있으면, 대상은 알레르겐에 노출될 위험이 있다.

[0254] 알레르기를 갖는 대상은 알레르겐에 대한 반응에서 알레르기 반응을 갖거나 알레르기 반응을 발병할 위험이 있는 대상이다. 알레르기는 물질 (알레르겐)에 대해 획득된 과민증을 나타낸다. 알레르기 병태는 습진, 알레르기 비염 또는 코감기, 건초열, 결막염, 기관지 천식, 두드러기 (발진) 및 식품 알레르기, 및 다른 아토피 병태를 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0255] 암을 발병할 위험이 있는 대상은 암 발병 확률이 정상보다 더 높은 (즉, 전체 집단의 확률보다 더 큰) 대상이다. 이들 대상은 예를 들어, 그의 존재가 정상보다 더 높은 암 발병 가능성과 상관관계가 있는 것으로 나타난 유전적 이상이 있는 대상, 및 암 유발제, 예를 들어 담배, 석면 또는 다른 화학 독소에 노출된 대상 또는 이전에 암을 치료하였고 명백히 완화 상태인 대상을 포함한다. 암을 발병할 위험이 있는 대상을 대상이 발병할 위험이 있는 종류의 암에 특이적인 항원 제제 및 올리고뉴클레오티드 제제로 치료할 때, 대상은 그들의 발병하는 암 세포에 대한 항원 특이적 면역 반응을 나타낼 수 있다.

[0256] 암에 걸린 대상은 검출가능한 암세포를 갖는 대상이다.

[0257] 암은 암종 또는 육종일 수 있지만 이로 제한되지 않는다. 예를 들어, 암은 기저세포 암종, 담관암, 방광암, 골암, 뇌암, 유방암, 자궁경부암, 용모막암종, CNS암, 결장 및 직장암, 결합조직암, 소화계암, 자궁내막암, 식도암, 안암, 두경부암, 위암, 상피내 신생물, 신장암, 후두암, 백혈병, 급성 림프성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 만성 림프성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 피부 T-세포 백혈병, 털세포 백혈병, 간암, 비-소세포 폐암, 소세포 폐암, 림프종, 소포 림프종, 호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종, 흑색종, 골수종, 다발 골수종, 신경모세포종, 구강암, 난소암, 췌장암, 전립선암, 직장암, 신장암, 호흡기계암, 망막모세포종, 횡문근육종, 피부암, 편평 세포암, 위암, 고환암, 갑상선암, 비뇨기계암 및 자궁암일 수 있다.

[0258] 본 발명은 비인간 대상에서 암 및 종양을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 암은 반려 동물 (즉, 고양이 및 개)의 주요 사인 중 하나이다. 암은 보통 애완동물의 경우 가족으로 통합되는 나이든 동물에 침범한다. 10살을 넘은 개의 45%가 상기 질병으로 쓰러지는 것 같다. 가장 일반적인 치료 선택은 수술, 화학요법 및 방사선 요법을 포함한다. 일부 성공적으로 사용된 다른 치료 양식은 레이저요법, 냉동요법, 온열요법 및 면역요법이다. 치료법의 선택은 암 종류 및 파종 정도에 따른다. 악성물 성장이 체내에서 분리된 영역으로 한정되지 않으면, 정상 세포에 또한 영향을 미치지 않으면서 악성 조직만을 제거하기는 어렵다.

[0259] 개 및 고양이에서 일반적으로 진단되는 악성 질환은 림프육종, 골육종, 유방 종양, 비만세포종, 뇌종양, 흑색종, 선편평 암종, 유암종 폐 종양, 기관지선 종양, 세기관지 선암종, 섬유종, 점액연골종, 폐 육종, 신경육종, 골종, 유두종, 망막모세포종, 유잉 (Ewing) 육종, 윌름 (Wilm) 종양, 버킷 림프종, 소교세포종, 신경모세포종, 파골세포종, 구강 신생물, 섬유육종, 골육종 및 횡문근육종을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 개의 다른 신생물은 생식 편평세포 암종, 전염성 성병 종양, 고환 종양, 정상피종, 세르톨리 세포 종양, 혈관주위세포종, 조직구종, 녹색종 (과립구 육종), 각막 유두종, 각막 편평 세포 암종, 혈관육종, 흉막 중피종, 기저 세포 종양, 흉선종, 위 종양, 부신 암종, 구강 유두종, 혈관내피종 및 낭샘종을 포함한다. 고양이에서 진단된 추가의 악성 종양은 소포 림프종, 장 림프육종, 섬유육종 및 폐 편평 세포 암종을 포함한다. 더욱 인기를 얻고 있는 애완동물인 페렛은 인슐린종, 림프종, 육종, 신경종, 췌장 섬세포 종양, 위 MALT 림프종 및 위 선암종을 발병하는 것으로 알려져 있다.

[0260] 농가 가축에 영향을 주는 신생물은 백혈병, 혈관주위세포종 및 소 눈 신생물 (축우에서); 포피 섬유육종, 폐양성 편평 세포 암종, 포피 암종, 결합조직 신생물 및 비만세포종 (말에서); 간세포성 암종 (돼지에서); 림프종 및 폐 선종증 (양에서); 폐 육종, 림프종, 라우스 육종, 세망내피증, 섬유육종, 신모세포종, B-세포림프종 및 림프양 백혈증 (조류 종에서); 망막모세포종, 간 종양, 림프육종 (림프아구성 림프종), 형질세포상 백혈병 및 부레 육종 (어류에서), 건락성 림프절염 (CLA): 세균 가성결핵균 (*Corynebacterium pseudotuberculosis*)에 의

해 발생하는 양 및 염소의 만성 감염성 전염병, 및 폐선종증 (jaagsiekte)에 의해 발생하는 양의 전염성 폐 종양을 포함한다.

[0261] 프리온 질병은 비정상적인 형상으로 존재하는 정상 단백질의 응집물에 의해 발생하는 것으로 생각되는 많은 치명적인 신경변성 질환을 포함한다. 정상 프리온 단백질은 보통 많은 조직, 특히 신경 조직의 세포막 내에 존재한다. 비정상적 배위의 프리온 단백질은 정상적 형상의 프리온 단백질을 보다 많은 비정상적 형상의 프리온 단백질로 전환시키는데 직접 관여되는 것으로 생각되고, 이는 이어서 신경 조직 해부학 및 기능을 손상시키는 응집물로 자가조립된다.

[0262] 프리온 질병의 적어도 일부는 전염성이다. 그러나, 세균, 바이러스, 진균, 기생충 및 다른 복제 병원체와는 달리, 전염성 프리온은 단순 단백질이고; 임의의 동반하는 핵산없이 전염성이다. 아직 충분히 이해되지 않은 이유로, 비정상적 형상의 프리온 단백질은 일반적으로 면역 반응을 유도하지 않는다. 따라서, 건강한 개인을 비정상적 형상의 프리온 단백질에 노출시키면 면역계에 의해 검토되지 않고 지나갈 수 있는 프리온 질병을 일으킬 수 있다.

[0263] 본 발명의 제제는 크로이츠펔트-야콥병 (CJD), 소 해면 뇌병증 (BSE) 및 변형형 프리온 질병의 치료에 유용하다. CJD는 의원성 CJD (iCJD), 변이성 CJD (vCJD) 또는 산발형 CJD (sCJD)일 수 있다. 제제는 또한 비정상 단백질 침착물 또는 응집물을 포함하는 다른 신경 질환의 치료에 유용하다. 상기 질병은 아밀로이드의 침착물을 포함하는 알츠하이머병을 포함한다. 아밀로이드 플라크의 주성분은 세포 외에 축적되고 신경 사멸을 유발시키는 원섬유 40-42 아미노산 펩티드인 아밀로이드-베타 펩티드 (Abeta)이다. 프리온 질병에 대해, 프리온 질병의 위험이 있는 대상 및 프리온 질병에 걸린 대상의 진단은 2004년 1월 22일 공개된 PCT 특허 출원 공개 WO 2004/007743 (그 전체 내용이 본원에 참고로 포함됨)에서 추가로 찾을 수 있다.

[0264] **다른 요법:**

[0265] 대상에게 다른 치료제 또는 요법제를 추가로 투여할 수 있다. 그 예는 항-미생물제, 항암제, 항-알레르기제 및 항-천식제를 포함한다. 이들 다른 약제는 본 발명의 올리고뉴클레오타이드/면역자극 복합체/항원 제제와 함께 또는 별개로 제제화될 수 있다.

[0266] 본원에서 사용되는 항-미생물제는 감염성 미생물을 죽이거나 억제할 수 있는 자연발생 또는 합성 화합물을 의미한다. 본 발명에 따라 유용한 항-미생물제의 종류는 대상이 감염되거나 감염될 위험이 있는 미생물의 종류에 따라 것이다. 항-미생물제는 항균제, 항-바이러스제, 항-진균제, 항-기생충제 및 항-항산균제를 포함하고 이로 제한되지 않는다. "항-감염제", "항균제", "항-바이러스제", "항-진균제", "항-기생충제", "구충제" 및 항-항산균제"와 같은 구문은 당업자에게 확립된 의미를 갖고 표준 의학 문헌에 규정되어 있다.

[0267] 항균제는 세균을 죽이거나 억제하고, 항생제 및 유사한 기능을 갖는 다른 합성 또는 천연 화합물을 포함한다. 항생제는 세포, 예를 들어 미생물에 의해 2차 대사체로서 생산되는 저분자량 분자이다. 일반적으로, 항생제는 미생물에 특이적이고 숙주 세포 내에 존재하지 않는 하나 이상의 세균 기능 또는 구조를 저해한다. 항-바이러스제는 천연 공급원으로부터 단리되거나 합성될 수 있고, 바이러스를 죽이거나 억제하기 위해 유용하다. 항-진균제는 표제 진균 감염, 및 기회 및 원발 진신 진균 감염을 치료하기 위해 사용된다. 항-기생충제는 기생충을 죽이거나 억제한다. 항-항산균제는 항산균을 죽이거나 억제한다.

[0268] 항균제는 세균의 성장 또는 기능을 억제하거나 죽인다. 많은 클래스의 항균제는 항생제이다. 광범위한 세균을 죽이거나 억제하는데 효과적인 항생제는 광범위 항생제로 불린다. 다른 종류의 항생제는 그람 양성 또는 그람 음성균의 세균에 대해 주로 효과적이다. 이들 종류의 항생제는 좁은 범위 항생제로 불린다. 단일 유기체 또는 질병에 대해 효과적이지만 다른 종류의 세균에는 효과적이지 않은 다른 항생제는 제한 범위 항생제로 불린다. 항균제는 때때로 작용 방식을 기초로 분류된다. 일반적으로, 항균제는 세포벽 합성 억제제, 세포막 억제제, 단백질 합성 억제제, 핵산 합성 또는 기능 억제제, 및 경쟁적 억제제이다.

[0269] 항-바이러스제는 바이러스에 의한 세포 감염 또는 세포 내에서 바이러스의 복제를 방지하는 화합물이다. 바이러스 복제 과정은 숙주 세포 내의 DNA 복제와 밀접하게 관련되어 비특이적 항바이러스제는 종종 숙주에 독성이기 때문에, 항균 약물보다 항바이러스 약물의 수가 훨씬 더 적다. 바이러스 감염 과정에는 항바이러스제에 의해 차단되거나 억제될 수 있는 몇몇 단계가 존재한다. 이들 단계는 바이러스의 숙주 세포로의 부착 (면역글로불린 또는 결합 펩티드), 바이러스의 탈외피 (예를 들어, 아만타딘), 바이러스 mRNA의 합성 또는 번역 (예를 들어, 인터페론), 바이러스 RNA 또는 DNA의 복제 (예를 들어, 뉴클레오타이드 유사체), 새로운 바이러스 단백질의 성숙 (예를 들어, 프로테아제 억제제), 및 바이러스의 버딩 및 방출을 포함한다.

- [0270] 뉴클레오타이드 유사체인 항-바이러스제는 아시클로비르 (단순포진 바이러스 및 수두대상포진 바이러스의 치료에 사용됨), 간시클로비르 (사이토메갈로바이러스의 치료에 사용됨), 이독스유리딘, 리바비린 (호흡기 세포융합 바이러스의 치료에 유용함), 디데옥시이노신, 디데옥시시티딘, 지도부딘 (아지도티미딘), 이미퀴모드, 및 레시미퀴모드를 포함하지만 이로 제한되지 않는다.
- [0271] 본 발명에 유용한 항-바이러스제는 면역글로불린, 아만타딘, 인터페론, 뉴클레오타이드 유사체 및 프로테아제 억제제를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 항-바이러스제의 구체적인 예는 아세마만; 아시클로비르; 아시클로비르 나트륨; 아데포비르; 알비르셉트; 알비르셉트 수도독스; 아만타딘 히드로클로라이드; 아라노딘; 아탈론; 아테비르딘 메실레이트; 아브리딘; 시도포비르; 시판필린; 시타라빈 히드로클로라이드; 텔라비르딘 메실레이트; 데스시클로비르; 디다노신; 디숙살릴; 에독수딘; 엔비라텐; 엔비록심; 파른시클로비르; 파모틴 히드로클로라이드; 피아시타빈; 피알루리딘; 포사틸레이트; 포스카메트 나트륨; 포스포넛 나트륨; 간시클로비르; 간시클로비르 나트륨; 이독수리딘; 케톡살; 라미부딘; 로부카비르; 메모틴 히드로클로라이드; 메티사존; 네비라핀; 펜시클로비르; 피로다비르; 리바비린; 리만타딘 히드로클로라이드; 사퀴나비르 메실레이트; 소만타딘 히드로클로라이드; 소리부딘; 스타톨론; 스타부딘; 티로론 히드로클로라이드; 트리플루리딘; 발라시클로비르 히드로클로라이드; 비다라빈; 비다라빈 포스페이트; 비다라빈 나트륨 포스페이트; 비록심; 잘시타빈; 지도부딘 및 진비록심을 포함하고 이로 제한되지 않는다.
- [0272] 항-진균제는 감염성 진균의 치료 및 예방에 유용하다. 항-진균제는 때때로 그들의 작용 메커니즘에 의해 분류된다. 일부 항-진균제는 글루코스 신타제를 억제함으로써 세포벽 억제제로서 기능한다. 이들은 바시운진/ECB를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 다른 항-진균제는 막 완전성을 파괴함으로써 기능한다. 이들은 이미다졸, 예를 들어 클로트리마졸, 세르타콘azole, 플루코나졸, 이트라코나졸, 케토코나졸, 미코나졸 및 보리코나졸, 및 FK 463, 암포테리신 B, BAY 38-9502, MK 991, 프라디미신, UK 292, 부테나핀 및 테르비나핀을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 다른 항-진균제는 키틴 분해 (예를 들어 키티나제) 또는 면역억제 (501 크립)에 의해 기능한다.
- [0273] 인간 투여에 유용한, 구충제로도 불리는 항-기생충제는 알벤다졸, 암포테리신 B, 벤즈니다졸, 비티오놀, 클로로퀸 HCl, 클로로퀸 포스페이트, 클린다마이신, 데히드로에메틴, 디에틸카르바마진, 딜록사니드 푸로에이트, 에플로니틴, 푸라졸리다온, 글루코코르티코이드, 할로판트린, 요오도퀸, 이베넥틴, 메벤다졸, 메플로퀸, 메글루민 안티모니에이트, 펠라르소프롤, 메트리포네이트, 메트로니다졸, 니클로사미드, 니푸르티모스, 옥삼니퀸, 파로모마이신, 펜타미딘 이세티오네이트, 피페라진, 프라지쿠안텔, 프리마퀸 포스페이트, 프로구아닐, 피란텔 파모에이트, 피리메탄민-술폰아미드, 피리메탄민-술폰독신, 퀴나크린 HCl, 퀴닌 술폰에이트, 퀴닌 글루코네이트, 스피라마이신, 스티보글루코네이트 나트륨 (나트륨 안티몬 글루코네이트), 수라민, 테트라시클린, 독시시클린, 티아벤다졸, 티니다졸, 트리메트로프림-술폰메톡사졸 및 트리파르사미드 (이중 일부는 단독으로 또는 다른 약제와 조합되어 사용된다)를 포함하고 이로 제한되지 않는다.
- [0274] 또한, 본 발명의 의약은 항암제와 함께 투여될 수 있다. 항암제는 암 치료를 위해 대상에 투여되는 약제이고, 바람직하게는 특히 증식하는 세포에 대해 세포독성을 갖는다. 본원의 목적을 위해 항암제는 화학치료제, 면역치료제, 호르몬 치료제 및 생물학적 반응 조절제로 분류된다.
- [0275] 화학치료제는 메토트렉세이트, 빈크리스틴, 아드리아마이신, 시스플라틴, 당 비함유 클로로에틸니트로소우레아, 5-플루오로우라실, 미토마이신 C, 블레오마이신, 독소루비신, 다카르바진, 탁솔, 프라길린, 메글라민 GLA, 발루비신, 카르무스타인 및 폴리페르포산, MMI270, BAY 12-9566, RAS 파르네실 트랜스퍼라제 억제제, 파르네실 트랜스퍼라제 억제제, MMP, MTA/LY231514, LY264618/로메텍솔, 글라몰렉, CI-994, TNP-470, 히캄틴/토포테칸, PKC412, 발스포다르/PSC833, 노반트론/미트록산트론, 메타레트/수라민, 바티마스타트, E7070, BCH-4556, CS-682, 9-AC, AG3340, AG3433, 인셀/VX-710, VX-853, ZD0101, ISI641, ODN 698, TA 2516/마르미스타트, BB2516/마르미스타트, CDP 845, D2163, PD183805, DX8951f, 레모날 DP 2202, FK 317, 피시바닐/OK-432, AD 32/발루비신, 메타스트론/스트론튬 유도체, 테모달/테모졸로미드, 에마세트/리포솜 독소루비신, 예탁산/파클리탁셀, 탁솔/파클리탁셀, 젤로아드/카페시타빈, 푸르톨론/독시플루리딘, 시클로팍스/경구 파클리탁셀, 경구 탁소이드, SPU-077/시스플라틴, HMR 1275/플라보피리돌, CP-358 (774)/EGFR, CP-609 (754)/RAS 종양유전자 억제제, BMS-182751/경구 백금, UFT (테가푸르/우라실), 에르가미솔/레바미솔, 에닐우라실/776C85/5FU 증강제, 캄프토/레바미솔, 캄프토사르/이리노테칸, 투모텍스/알리트렉세드, 류스타틴/클라드리빈, 팍섹스/파클리탁셀, 독실/리포솜 독소루비신, 카엘릭스/리포솜 독소루비신, 플루다라/플루다라빈, 파르마루비신/에피루비신, DepoCyt, ZD1839, LU 79553/비스-나프탈리미드, LU 103793/돌라스타인, 카에릭스/리포솜 독소루비신, 겐자르/겐시타빈, ZD 0473/아노르메드, YM 116, 요오드 씨드, CDK4 및 CDK2 억제제, PARP 억제제, D4809/텍스포사미드, 이페스/메스넥스/이포사미드, 부몬/테니포시드, 파라플라틴/카르보플라틴, 플란티놀/시스플라틴, 베페시드/에토포시드, ZD 9331,

탁소테레/도세탁셀, 구아닌 아라비노시드의 전구약물, 탁산 유사체, 니트로소우레아, 알킬화제, 예를 들어 멜펠란 및 시클로포스파미드, 아미노글루테미드, 아스파라기나제, 부술판, 카르보플라틴, 클로롬부실, 시타라빈 HCl, 닥티노마이신, 다우노루비신 HCl, 에스트라무스틴 포스페이트 나트륨, 에토포시드 (VP16-213), 플록스우리딘, 플루오로우라실 (5-FU), 플루타미드, 히드록시우레아 (히드록시카르바미드), 이포스파미드, 인터페론 알파-2a, 알파-2b, 류프롤리드 아세테이트 (LHRH-방출 인자 유사체), 로무스틴 (CCNU), 메클로로에타민 HCl (질소 머스타드), 머캅토포린, 메스나, 미토탄 (o.p'-DDD), 미톡산트론 HCl, 옥트레오티드, 플리카마이신, 프로카르바진 HCl, 스트렙토조신, 타목시펜 시트레이트, 티오구아닌, 티오데파, 빈블라스틴 술페이트, 암사크린 (m-AMSA), 아자시티딘, 에르트로포이에틴, 핵사메틸멜라민 (HMM), 인터루킨 2, 미토구아존 (메틸-GAG; 메틸 글리옥살 비스-구아닐히드라존; MGBG), 펜토스타틴 (2'-데옥시코포르마이신), 세무스틴 (메틸-CCNU), 테니포시드 (VM-26) 및 빈데신 술페이트로 이루어진 군 중에서 선택될 수 있고 이로 제한되지 않는다.

[0276] 제제는 또한 항체 요법과 함께 사용될 수 있다. 암 항원에 대해 작용하는 항체는 리부탁신, 헤르셉틴, 쿠아드라메트, 파노렉스, IDEC-Y2B8, BEC2, C225, 온콜립, SMART M195, 아트라젠, 오바렉스, 벡사르, LDP-03, ior t6, MDX-210, MDX-11, MDX-22, OV103, 3622W94, 항-VEGF, 제나팍스, MDX-220, MDX-447, 멜리문-2, 멜리문-1, 세아시드, 프레타겟, NovoMAb-G2, TNT, 글리오맵-H, GNI-250, EMD-72000, 림포시드, CMA 676, 모노팜-C, 4B5, ior egf.r3, ior c5, BABS, 항-FLK-2, MDX-260, ANA Ab, SMART ID10 Ab, SMART ABL 364 Ab 및 ImmuRAIT-CEA를 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0277] 항-천식/알레르기제는 PDE-4 억제제, 기관지 확장제/베타-2 작용제, K⁺ 채널 개방제, VLA-4 길항제, 뉴로킨 길항제, TXA2 합성 억제제, 잔타닌, 아라키돈산 길항제, 5-리폭시게나제 억제제, 트롬복산 A2 수용체 길항제, 트롬복산 A2 길항제, 5-리폭스 활성화 단백질의 억제제, 및 프로테아제 억제제로 이루어지는 군 중에서 선택되고 이로 제한되지 않는다. 몇몇 중요한 실시태양에서, 천식/알레르기 의약은 살메테롤, 살부타몰, 테트부탈린, D2522/포르모테롤, 페노테롤 및 오르시프레날린으로 이루어진 군 중에서 선택되는 기관지 확장제/베타-2 작용제이다.

[0278] 항-천식/알레르기 약제는 또한 항-히스타민제 및 프로스타글란딘 유도제일 수 있다. 한 실시태양에서, 항-히스타민제는 로라티딘, 세티리진, 부클리진, 세테리진 유사체, 펙소페나딘, 테르페나딘, 데스로라타딘, 노라스테미졸, 에피나스틴, 에바스틴, 에바스틴, 아스테미졸, 레보카바스틴, 아젤라스틴, 트라닐라스트, 테르페나딘, 미졸라스틴, 베타타스틴, CS 560 및 HSR 609로 이루어진 군 중에서 선택된다. 다른 실시태양에서, 프로스타글란딘 유도제는 S-5751이다.

[0279] 항-천식/알레르기 약제는 스테로이드 및 면역조절물질일 수 있다. 면역조절물질은 소염제, 류코트리엔 길항제, IL-4 뮤테인, 가용성 IL-4 수용체, 면역억제제, 항-IL-4 항체, IL-4 길항제, 항-IL-5 항체, 가용성 IL-13 수용체-cFc 융합 단백질, 항-IL-9 항체, CCR3 길항제, CCR5 길항제, VLA-4 억제제, 및 IgE의 하향조절제로 이루어진 군 중에서 선택될 수 있지만 이로 제한되지 않는다. 한 실시태양에서, IgE의 하향조절제는 항-IgE이다. 스테로이드는 베클로메타손, 플루티카손, 트람시놀론, 부테소니드 및 부테소니드일 수 있다.

[0280] **시토킨과 함께:**

[0281] 본 발명의 대상에는 또한 시토킨 (Bueler & Mulligan, 1996; Chow et al., 1997; Geissler et al., 1997; Iwasaki et al., 1997; Kim et al., 1997) 또는 B-7 동시자극 분자 (Iwasaki et al., 1997; Tsuji et al., 1997)를 올리고뉴클레오티드/면역자극 복합체/항원 의약과 함께 또는 별개로 동시투여할 수 있다. 용어 시토킨은 나노몰 내지 피코몰 농도에서 체액성 조절제로서 작용하고 정상 또는 병리적 조건 하에 개별적인 세포 및 조직의 기능 활성을 조정하는 다양한 군의 가용성 단백질 및 펩티드에 대한 일반명으로 사용된다. 상기 단백질은 또한 세포간의 상호작용을 직접 매개하고, 세포외 환경에서 일어나는 과정을 조절한다. 시토킨의 예는 IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자 (GM-CSF), 과립구 콜로니 자극 인자 (G-CSF), IFN- α , 종양 괴사 인자 (TNF), TGF- β , FLT-3 리간드 및 CD40 리간드를 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0282] **다른 보강제와 함께:**

[0283] 본 발명의 의약은 추가의 비-핵산 보강제와 조합으로 사용될 수 있다. 비-핵산 보강제는 예를 들어, 데포 효과를 발생시키는 보강제, 면역 자극 보강제, 및 데포 효과를 발생시키고 면역계를 자극하는 보강제이다.

[0284] "데포 효과를 발생시키는 보강제"는 항원이 체내에서 서서히 방출되도록 하여, 면역 세포가 항원에 노출되는 것을 지속시키는 보강제이다. 이 클래스의 보강제는 백반 (예를 들어, 수산화알루미늄, 인산알루미늄); 또는 예

멸전제 제제, 예를 들어 광물유, 비-광물유, 유중수 또는 유중수중유 에멀전, 수중유 에멀전, 예를 들어 Seppic ISA 계열의 몬타나이드 (Montanide) 보강제 (예를 들어, 몬타나이드 ISA 720 (에어리퀴드 (AirLiquide, 프랑스 파리)); MF-59 (Span 85 및 Tween 80으로 안정화된 수중 스쿠알렌 에멀전; 키론 코퍼레이션 (Chiron Corporation, 미국 캘리포니아주 에머리빌); 및 PROVAX (안정화 세제 및 미셀-형성제를 함유하는 수중유 에멀전; 아이텍 파마슈티칼스 코퍼레이션 (IDEC Pharmaceuticals Corporation, 미국 캘리포니아주 샌 디에고))를 포함한다.

[0285] "면역 자극 보강제"는 면역계 세포의 활성화를 유도하는 보강제이다. 상기 보강제는 예를 들어 면역 세포가 시토킨을 생산하고 분비하도록 할 수 있다. 이 클래스의 보강제는 비누나무 (Q. saponaria)의 껍질로부터 정제된 사포닌, 예를 들어 QS21 (HPLC 분획화를 사용하여 제21 피크에서 용출하는 당지질; 아퀼라 바이오파마슈티칼스, 인크. (Aquila Biopharmaceuticals, Inc., 미국 매사추세츠주 워체스터); 폴리[디(카복실라토페녹시)포스포젠 (PCPP 중합체; 바이러스 리서치 인스티튜트 (Virus Research Institute, 미국)); 지질다당류의 유도체, 예를 들어 모노포스포릴 리피드 A (MPL; 리비 이뮤노켄 리서치, 인크. (Ribi ImmunoChem Research, Inc., 미국 몬타나주 해밀턴), 무라밀 디펩티드 (MDP; Ribi) 및 트레오닐-무라밀 디펩티드 (t-MDP; Ribi); OM-174 (지질 A에 관련된 글루코사민 이당류; 오엠 파마 에스에이 (OM Pharma SA, 스위스 메이린)); 및 리슈만 연장 인자 (정제된 리슈만 단백질; 코릭사 코퍼레이션 (Corixa Corporation, 미국 워싱턴주 시애틀))을 포함한다.

[0286] "데포 효과를 발생시키고 면역계를 자극하는 보강제"는 상기 확인된 두 기능을 갖는 화합물이다. 이 클래스의 보강제는 SB-AS2 (MPL 및 QS21을 함유하는 수중유 에멀전인 스미스클라인 비참 (SmithKline Beecham) 보강제 시스템 #2: 스미스클라인 비참 바이오로지칼스 (SmithKline Beecham Biologicals [SBB], 벨기에 릭섹사르트)); SB-AS4 (백반 및 MPL을 함유하는 스미스클라인 비참 보강제 시스템 #4; SBB); 미셀을 형성하는 비이온성 블록 공중합체, 예를 들어 CRL 1005 (이들은 폴리옥시에틸렌 사실이 연결된 소수성 폴리옥시프로필렌의 직선 사슬을 포함한다; 박셀, 인크. (Vaxcel, Inc., 미국 조지아주 노르크로스)); 및 Syntex 보강제 제제 (SAF, Tween 80 및 비이온성 블록 공중합체를 함유하는 수중유 에멀전; 신텍스 케미칼스, 인크. (Syntex Chemicals, Inc., 미국 콜로라도주 보울더))를 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0287] 올리고뉴클레오타이드/면역자극 복합체/항원 의약품은 다른 치료제 및(또는) 치료법과 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다. 다른 치료제가 본 발명의 제제와 실질적으로 동시에 투여될 때, 이들은 실질적으로 동시에 (즉, 일반적으로 서로 수분 내에 또는 의학 또는 약학 분야의 숙련인이 2가지 물질을 투여하기 위해 요구되는 시간 이내에) 투여된다면 동일한 제제 또는 별개의 제제로 투여될 수 있다. 다른 치료제가 본 발명의 제제와 순차적으로 투여되면, 다른 치료제 및 제제의 투여는 일시적으로 분리된다. 이들 화합물의 투여 사이의 시간 간격은 분, 시간, 일 또는 더 오래일 수 있다.

[0288] **제제화, 전달 비히클, 유효량 등:**

[0289] 의약품의 유효량은 목적하는 생물학적 효과를 실현하기 위해 필요하거나 실현하기에 충분한 양을 의미한다. 예를 들어, 항원 특이적 면역 반응을 유도하기 위한 항원 및 면역자극 복합체와 함께 투여되는 올리고뉴클레오타이드 제제의 유효량은 IFN-감마 또는 항원 특이적 Th-1-유도 면역글로불린의 생산 또는 항원 특이적 CTL의 활성화를 자극하기 위해 필요한 양이다.

[0290] 본원에 제공된 교시내용과 함께, 다양한 활성 화합물들 중에서 선택하고 효력, 상대적 생체이용성, 환자 체중, 이상 부작용의 중증도 및 바람직한 투여 방식과 같은 인자를 평가함으로써, 실질적인 독성을 일으키지 않으면서 특정 대상을 치료하기 위해 전적으로 효과적인 예방 또는 치료 처리 방법이 계획될 수 있다. 임의의 특정 용도에 대한 유효량은 치료될 질병 또는 병태, 투여되는 특정 면역자극성 올리고뉴클레오타이드, 면역자극 복합체의 용량, 대상의 크기 또는 질병 또는 병태의 중증도와 같은 인자에 따라 변할 수 있다. 당업자는 과도한 실험을 필요로 하지 않으면서 특정 올리고뉴클레오타이드 제제 및(또는) 항원 제제 및(또는) 다른 치료제의 유효량을 경험적으로 결정할 수 있다.

[0291] 점막, 국소 또는 비경구 전달을 위한 본원에 설명된 화합물의 대상 용량은 일반적으로 투여 당 약 0.1 μg 내지 10 mg 범위이고, 이는 용도에 따라 예를 들어 매일, 매주 또는 임의의 다른 시간 간격으로 제공될 수 있다. 보다 일반적으로 점막, 국소 또는 비경구 용량은 투여 당 약 1 μg 내지 10 mg, 훨씬 더 일반적으로는 투여 당 약 10 μg 내지 5 mg, 보다 더 일반적으로는 약 10 μg 내지 1 mg, 가장 일반적으로는 약 100 μg 내지 1 mg 범위이고, 2-4 투여가 매일 또는 매주 간격으로 제공된다.

[0292] 본원에 설명된 임의의 화합물에 대해, 치료 유효량은 처음에 동물 모델로부터 결정할 수 있다. 치료 유효량은

또한 인간에서 개별적으로 시험된 (인간 임상 시험이 개시된) 면역자극성 올리고뉴클레오타이드, 항원 및 복합체에 대한 인간 데이터로부터 결정할 수 있다. 투여 용량은 투여된 화합물의 상대적 생체이용성 및 효력을 기초로 조정할 수 있다. 상기 설명된 방법 및 다른 방법을 기초로 최대 효능을 달성하기 위해 용량을 조정하는 것은 당업계에 잘 알려져 있고 당업자의 능력 내에 있다.

[0293] 본 발명의 의약은 순수하게 또는 제약상 허용되는 용액 중에서 투여될 수 있고, 상기 용액은 다시 제약상 허용되는 농도의 염, 완충제, 방부제, 세제, 변성제, 상용성 담체 및 임의로 다른 치료 성분을 함유할 수 있다.

[0294] 올리고뉴클레오타이드, 면역자극 복합체 및 항원은 혼합되어, 별개로 또는 임의의 조합물로 임의의 투여 방식에 의해 환자에게 투여될 수 있다. 바람직한 투여 경로는 비경구 투여, 예를 들어 근육내 및 피하; 및 점막 투여, 예를 들어 경구, 설하, 기관내, 비강내, 흡입, 폐내, 질 및 직장 투여를 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0295] 경구 투여를 위해, 의약은 활성 성분(들)을 당업계에 공지된 제약상 허용되는 담체와 함께 배합함으로써 쉽게 제제화할 수 있다. 상기 담체는 본 발명의 성분을 치료되는 대상에 의한 경구 섭취를 위해 정제, 환제, 당의정제, 캡슐제, 액제, 젤제, 시럽제, 슬러리 및 현탁액제 등으로 제제화되도록 할 수 있다. 경구 사용을 위한 제약 제제는 고체 부형제와 혼합하고, 임의로 생성되는 혼합물을 연마하고, 원하는 경우 적합한 보조제를 첨가한 후 과립 혼합물을 가공하여 정제 또는 당의정제 코어를 얻음으로써 얻을 수 있다. 적합한 부형제는 특히, 충전제, 예를 들어 당, 예를 들어 락토스, 수크로스, 만니톨 또는 소르비톨; 셀룰로스 제제, 예를 들어 옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분, 감자 전분, 젤라틴, 트라가칸트검, 메틸 셀룰로스, 히드록시프로필메틸-셀룰로스, 나트륨 카르복시메틸셀룰로스 및(또는) 폴리비닐피롤리돈 (PVP)이다. 원하는 경우, 붕해제, 예를 들어 가교결합된 폴리비닐 피롤리돈, 아가 또는 알긴산 또는 그의 염, 예를 들어 알긴산나트륨을 첨가할 수 있다. 임의로, 경구 제제는 내부 산성 상태를 중화시키기 위해 염수 또는 완충액, 즉 EDTA 중에 제제화될 수 있거나, 임의의 담체 없이 투여될 수 있다.

[0296] 또한, 상기 성분들의 경구 투여형이 특히 고려된다. 성분은 유도체의 경구 전달이 효과적이도록 화학적으로 변형될 수 있다. 일반적으로, 고려되는 화학적 변형은 성분 분자 자체에 대한 적어도 하나의 잔기의 부착이고, 여기서 상기 잔기는 (a) 단백질분해의 억제; 및(또는) (b) 위 또는 장으로부터 혈류로의 흡수를 허용한다. 성분의 전체 안정성의 증가 및 체내 순환 시간의 증가가 또한 요망된다. 상기 잔기의 예는 폴리에틸렌 글리콜, 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 공중합체, 카르복시메틸 셀룰로스, 덱스트란, 폴리비닐 알콜, 폴리비닐 피롤리돈 및 폴리프롤린을 포함한다 (Abuchowski and Davis, 1981, "Soluble Polymer-Enzyme Adducts" In: Enzymes as Drugs, Hocenberg and Roberts, eds., Wiley-Interscience, New York, NY, pp. 367-383; Newmark, et al., 1982, J. Appl. Biochem. 4: 185-189.) 사용될 수 있는 다른 중합체는 폴리-1,3-디옥솔란 및 폴리-1,3,6-트리옥소칸이다. 상기한 바와 같이 제약 용도에 바람직한 것은 폴리에틸렌 글리콜 잔기이다.

[0297] 방출 위치는 위, 소장 (십이지장, 공장 또는 회장), 또는 대장일 수 있다. 당업자는 위에서 용해되지 않지만 십이지장 또는 창자 내의 다른 위치에서 물질을 방출시킬 이용가능한 제제를 갖는다. 바람직하게는, 방출은 올리고뉴클레오타이드의 보호에 의해 또는 위 환경을 넘어, 예를 들어 창자 내에 생물학적 활성 물질의 방출에 의해 위 환경의 유해 효과를 피할 것이다.

[0298] 충분한 위산 내성을 보장하기 위해, 적어도 pH 5.0에 불투과성인 코팅이 필수적이다. 장용성 코팅으로 사용되는 보다 일반적인 불활성 성분의 예는 셀룰로스 아세테이트 트리멜리테이트 (CAT), 히드록시프로필메틸셀룰로스 프탈레이트 (HPMCP), HPMCP 50, HPMCP 55, 폴리비닐 아세테이트 프탈레이트 (PVAP), 유드라지트(Eudragit) L30D, 아쿠아테릭, 셀룰로스 아세테이트 프탈레이트 (CAP), 유드라지트 L, 유드라지트 S 및 셀락 (Shellac)이다. 이들 코팅은 혼합 필름으로 사용될 수 있다.

[0299] 코팅 또는 코팅 혼합물은 또한 위에 대한 보호가 의도되지 않는 정제에도 사용될 수 있다. 이는 당 코팅, 또는 정제를 보다 삼키기 쉽게 만드는 코팅을 포함할 수 있다. 캡슐은 건조 성분, 즉, 분말의 전달을 위해 경질 외피 (예를 들어, 젤라틴)로 이루어질 수 있고; 액체형을 위해서는 연질 젤라틴 외피가 사용될 수 있다. 카세제의 외피 물질은 점조성 전분 또는 다른 식용 종이일 수 있다. 환제, 로젠지제, 성형 정제 또는 정제 연마분에 대해, 습식 매싱 (massing) 기술이 사용될 수 있다.

[0300] 성분은 제제 내에 약 1 mm 입자 크기의 과립 또는 펠렛 형태의 미세한 다수입자로서 포함될 수 있다. 캡슐 투여용 물질의 제제는 분말, 가볍게 압축된 플러그 (plug) 또는 심지어 정제로 존재할 수 있다. 성분은 압축에 의해 제조될 수 있다.

[0301] 착색제 및 향미제가 모두 포함될 수 있다. 예를 들어, 올리고뉴클레오타이드 및 복합체 성분은 식용 제품, 예를

들어 착색제 및 향미제를 함유하는 냉장 음료 내에 포함될 수 있다.

- [0302] 불활성 물질을 사용하여 성분의 부피를 희석하거나 증가시킬 수 있다. 이들 희석제는 탄수화물, 특히 만니톨, α-락토스, 무수 락토스, 셀룰로스, 수크로스, 변형 텍스트란 및 전분을 포함할 수 있다. 일부 무기 염, 예를 들어, 칼슘 트리포스페이트, 탄산마그네슘 및 염화나트륨이 또한 충전제로서 사용될 수 있다. 일부 시판 희석제로는 패스트-플로 (Fast-Flo), 엠텍스 (Emdex), STA-Rx 1500, 엠콤프레스 (Emcompress) 및 아비셀 (Avicel 1)이 있다.
- [0303] 성분의 고체 투여형으로의 제제화에서 봉해제가 포함될 수 있다. 봉해제로서 사용되는 물질은 전분, 예를 들어 전분에 기초한 시판 봉해제인 엑스플로탭 (Explotab)을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 나트륨 전분 글리콜레이트, 엠버라이트, 나트륨 카르복시메틸셀룰로스, 울트라마일로펙틴, 나트륨 알기네이트, 젤라틴, 오렌지 겹질, 산 카르복시메틸 셀룰로스, 천연 스폰지 및 벤토나이트가 모두 사용될 수 있다. 다른 형태의 봉해제는 불용성 양이온 교환 수지이다. 분말화 검이 봉해제 및 결합제로서 사용될 수 있고, 이들은 아가, 카라야 또는 트라가칸트와 같은 분말화 검을 포함할 수 있다. 알긴산 및 그의 나트륨염이 또한 봉해제로서 유용하다.
- [0304] 경질 정제를 형성하도록 성분들을 함께 유지하기 위해 결합제가 사용될 수 있고, 아카시아, 트라가칸트, 전분 및 젤라틴과 같은 천연 제품으로부터의 물질을 포함한다. 다른 것은 메틸 셀룰로스 (MC), 에틸 셀룰로스 (EC) 및 카르복시메틸 셀룰로스 (CMC)를 포함한다. 폴리비닐 피롤리돈 (PVP) 및 히드록시프로필메틸 셀룰로스 (HPMC)가 모두 치료제를 과립화하기 위해 알콜 용액에서 사용될 수 있다.
- [0305] 제제화 공정 동안 점착을 방지하기 위해 항마찰제를 제제에 포함시킬 수 있다. 윤활제는 치료제와 다이 벽 사이의 층으로서 사용될 수 있고, 스테아르산 및 그의 마그네슘 및 칼슘염, 폴리테트라플루오로에틸렌 (PTFE), 액체 파라핀, 식물유 및 왁스를 포함할 수 있고 이로 제한되지 않는다. 가용성 윤활제, 예를 들어 나트륨 라우릴 술페이트, 마그네슘 라우릴 술페이트, 다양한 분자량의 폴리에틸렌 글리콜, 카르보왁스 (Carbowax) 4000 및 6000이 또한 사용될 수 있다.
- [0306] 압축 동안 재배열을 돕기 위해 제제의 유동성을 개선시킬 수 있는 활택제가 또한 첨가될 수 있다. 활택제는 전분, 활석, 발열원성 실리카 및 수화 실리코알루미네이트를 포함할 수 있다.
- [0307] 수성 환경 내로 성분의 용해를 돕기 위해 계면활성제가 습윤제로서 첨가될 수 있다. 계면활성제는 음이온성 세제, 예를 들어 나트륨 라우릴 술페이트, 디옥틸 나트륨 술포숙시네이트 및 디옥틸 나트륨 술포네이트를 포함할 수 있다. 양이온성 세제가 사용될 수 있고, 벤즈알코늄 클로라이드 또는 벤즈에토늄 클로라이드를 포함할 수 있다. 계면활성제로서 제제에 포함될 수 있는 가능한 비이온성 세제의 목록은 라우로마크로콜 400, 폴리옥실 40 스테아레이트, 폴리옥시에틸렌 수소화 피마자유 10, 50 및 60, 글리세롤 모노스테아레이트, 폴리소르베이트 40, 60, 65 및 80, 수크로스 지방산 에스테르, 메틸 셀룰로스 및 카르복시메틸 셀룰로스가 있다. 이들 계면활성제는 제제 내에 단독으로 또는 상이한 비의 혼합물로서 존재할 수 있다.
- [0308] 경구로 사용될 수 있는 제약 제제는 젤라틴으로 제조된 푸쉬-핏 (push-fit) 캡슐제, 및 젤라틴 및 가소제, 예컨대 글리세롤 또는 소르비톨로 제조된 연질 밀봉 캡슐제를 포함한다. 푸쉬-핏 캡슐제는 활성 성분을 락토스와 같은 충전제, 전분과 같은 결합제 및(또는) 활석 또는 스테아르산마그네슘과 같은 윤활제 및 임의로 안정화제와 혼합물로 함유할 수 있다. 연질 캡슐에서는, 활성 화합물은 적절한 액체, 예를 들어 지방 오일, 액체 파라핀, 또는 액체 폴리에틸렌 글리콜에 용해되거나 현탁될 수 있다. 또한, 안정화제를 첨가할 수 있다. 경구 투여용으로 제제화된 미세구가 사용될 수도 있다. 상기 미세구는 당업계에서 잘 규정되어 있다. 경구 투여용의 모든 제제는 상기 투여에 적합한 투여형으로 존재해야 한다.
- [0309] 구강 투여를 위해, 제제는 정제 또는 통상의 방식으로 제제화된 로젠지제 형태일 수 있다.
- [0310] 흡입 투여를 위해, 제제는 적합한 추진제, 예를 들어 디클로로디플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로메탄, 이산화탄소 또는 다른 적합한 기체를 사용하여 가압 팩 또는 네블라이저로부터 에어로졸 스프레이 제공 형태로 편리하게 전달될 수 있다. 가압 에어로졸의 경우, 투여 단위는 계량된 양을 전달하는 밸브를 제공하여 결정할 수 있다. 흡입기 또는 취입기에 사용하기 위한 예를 들어, 젤라틴의 카트리지 및 캡슐은 화합물 및 적합한 분말 기체, 예를 들어 락토스 또는 전분의 분말 혼합물을 함유하도록 제제화될 수 있다.
- [0311] 제제의 폐 전달이 본원에서 또한 고려된다. 제제는 흡입할 때 포유동물의 폐에 전달되고 폐 상피 내층을 가로질러 혈류로 들어간다. 흡입 물질에 대한 다른 보고는 문헌 [Adjei et al., 1990, Pharmaceutical Research, 7:565-569; Adjei et al., 1990, International Journal of Pharmaceutics, 63:135-144 (류프폴리드 아세테이트); Braquet et al., 1989, Journal of Cardiovascular Pharmacology, 13 (suppl. 5):143-146 (엔도텔린-1);

Hubbard et al., 1989, Annals of Internal Medicine, Vol.III, pp. 206-212 (a1-안티트립신); Smith et al., 1989, J. Clin. Invest. 84:1145-1146 (a-1-프로테이나제); Oswein et al., 1990, "Aerosolization of Proteins", Proceedings of Symposium on Respiratory Drug Delivery II, Keystone, Colorado, March, (제조 합 인간 성장 호르몬); Debs et al., 1988, J. Immunol. 140:3482-3488 (IFN-감마 및 종양 괴사 인자 알파) 및 Platz et al., 미국 특허 5,284,656 (과립구 콜로니 자극 인자)]을 포함한다. 전신 효과를 위한 약물의 폐 전달을 위한 방법 및 조성물은 1995년 9월 19일에 등록된 미국 특허 5,451,569 (왕 (Wong) 등)에 설명되어 있다.

[0312] 치료 제품의 폐 전달을 위해 고안된 광범위한 기계 장치가 본 발명의 실시에서 사용이 고려되고, 네블라이저, 계량 용량 흡입기, 및 분말 흡입기를 포함하고 이로 제한되지 않으며 이들은 모두 당업자에게 친숙하다.

[0313] 본 발명의 실시에 적합한 시판 장치의 몇몇 특정한 예는 울트라벤트 (Ultravent) 네블라이저 (말린크로트, 인크. (Mallinckrodt, Inc., 미국 미저리주 세인트루이스) 제품); 아콘 (Acorn) II 네블라이저 (마르퀘스트 메디칼 프러덕츠 (Marquest Medical Products, 미국 콜로라도주 이글우드) 제품); 벤톨린 (Ventolin) 계량 용량 흡입기 (글락소 인크. (Glaxo Inc., 미국 노스캐롤라이나주 리서치 트라이앵글 파크) 제품); 및 스핀할러 (Spinhaler) 분말 흡입기 (피슨스 코프. (Fisons Corp., 미국 매사추세츠주 베드포드))가 있다.

[0314] 본 발명의 제약 조성물의 비강내 전달이 또한 고려된다. 비강내 전달은 치료 제품을 코로 투여한 후 폐에서 제품 침착의 필요 없이 본 발명의 제약 조성물이 혈류로 직접 통과되도록 허용한다. 비강내 전달용 제제는 텍스트란 또는 시클로텍스트란을 갖는 것을 포함한다.

[0315] 비강내 투여를 위해, 유용한 장치는 계량 용량 분무기가 부착된 작은 경질 병 (bottle)이다. 한 실시태양에서, 계량 용량은 본 발명의 제약 조성물을 한정된 부피의 챔버 내로 통하게 함으로써 전달되고, 상기 챔버는 챔버 내의 액체가 압축될 때 스프레이를 형성함으로써 에어로졸 제제를 에어로졸화하기 위한 크기의 천공을 갖는다. 챔버가 압축되어 본 발명의 제약 조성물을 투여한다. 특정 실시태양에서, 챔버는 피스톤 배열이다. 상기 장치는 시판된다.

[0316] 별법으로, 압축될 때 스프레이를 형성함으로써 에어로졸 제제를 에어로졸화하기 위한 크기의 천공 또는 개구부를 갖는 플라스틱 압축 (squeeze) 병이 사용된다. 상기 개구부는 보통 병의 상단부에서 발견되고, 상기 상단부는 일반적으로 에어로졸 제제의 효율적인 투여를 위해 비강 통로에 부분적으로 맞도록 끝이 가늘어진다. 바람직하게는, 코 흡입기는 계량된 약물 용량의 투여를 위해 계량된 양의 에어로졸 제제를 제공할 것이다.

[0317] 전신 전달을 원하는 경우 의약은 주사, 예를 들어, 볼러스 주사 또는 연속 주입에 의한 비경구 투여를 위해 제제화될 수 있다. 주사용 제제는 방부제가 첨가된 단위 투여 형태, 예를 들어, 앰플 또는 다중 투여 용기 내에 제공될 수 있다. 조성물은 유성 또는 수성 비히클 중 현탁액, 용액 또는 에멀전과 같은 형태일 수 있고, 제제화제, 예를 들어 현탁제, 안정화제 및(또는) 분산제를 함유할 수 있다.

[0318] 비경구 투여용 제약 제제는 수용성 형태의 활성 화합물의 수용액을 포함한다. 추가로, 활성 화합물의 현탁액이 적절한 유성 주사 현탁액으로서 제조될 수 있다. 적합한 친지성 용매 또는 비히클은 지방 오일, 예를 들어 참기름, 또는 합성 지방산 에스테르, 예를 들어 에틸 올레레이트 또는 트리글리세리드, 또는 리포솜을 포함한다. 수성 주사 현탁액은 현탁액의 점도를 증가시키는 물질, 예를 들어 나트륨 카르복시메틸 셀룰로스, 소르비톨 또는 텍스트란을 함유할 수 있다. 임의로, 현탁액은 또한 화합물의 용해도를 증가시켜 고농축 용액의 제조를 가능하게 하는 적합한 안정화제 또는 물질을 함유할 수 있다.

[0319] 별법으로, 의약은 사용하기 전에 적합한 비히클, 예를 들어, 무균 무발열원의 물에 재구성하는 분말형태일 수 있다.

[0320] 의약은 또한 예를 들어 코코아 버터 또는 다른 글리세리드와 같은 통상의 좌약 기제를 함유하는 좌제 또는 정제 관장제와 같은 직장 또는 질내 조성물로 제제화할 수 있다.

[0321] 의약은 또한 적합한 고체 또는 겔상 담체 또는 부형제를 포함할 수 있다. 상기 담체 또는 부형제의 예는 탄산칼슘, 인산칼슘, 각종 당, 전분, 셀룰로스 유도체, 젤라틴 및 중합체, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜을 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0322] 적합한 액체 또는 고체 제약 제제형은 예를 들어 흡입용 수용액 또는 염수 용액, 미세캡슐화, 달팽이껍질화 (encocheated), 초소형 금 입자 상으로 코팅된, 리포솜 내에 함유된, 분무된, 에어로졸, 피부 이식용 펠렛, 또는 피부를 긁기 위한 날카로운 물체 상에 건조된 형태가 있다. 의약은 또한 과립, 분말, 정제, 코팅 정제, (미세)캡슐제, 좌제, 시럽제, 에멀전, 현탁액, 크림, 점적제 또는 활성 화합물을 지속 방출시키는 제제를

포함하며, 상기 제제에서 부형제 및 첨가제 및(또는) 보조제, 예를 들어 봉해제, 결합제, 코팅제, 팽창제, 윤활제, 향미제, 감미제 또는 가용화제를 상기 설명된 바와 같이 통상적으로 사용한다. 의약은 다양한 약물 전달계에서 사용하기에 적합하다. 약물 전달 방법에 대한 간단한 검토를 위해 본원에 참고로 포함시킨 문헌 [Langer, Science 249:1527-1533, 1990]을 참조한다.

[0323] 적합한 완충제는 아세트산 및 그의 염 (1-2% w/v); 시트르산 및 그의 염 (1-3% w/v); 붕산 및 그의 염 (0.5-2.5% w/v); 및 인산 및 그의 염 (0.8-2% w/v)을 포함한다. 적합한 방부제는 벤즈알코늄 클로라이드 (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)을 포함한다.

[0324] 의약은 임의로 제약상 허용되는 담체를 포함한다. 용어 '제약상 허용되는 담체'는 인간 또는 다른 척추동물에 투여하기에 적합한 하나 이상의 상용성 고체 또는 액체 충전제, 희석제 또는 캡슐화 물질을 의미한다. 용어 '담체'는 투여를 용이하게 하기 위해 활성 성분이 그와 함께 배합되는 천연 또는 합성의 유기 또는 무기 성분을 나타낸다.

[0325] 본 발명은 제한하는 의미가 아닌 하기 실시예에 의해 추가로 설명된다. 본원 전체에 인용된 모든 참조문 (학술 문헌, 특허, 공개된 특허 출원, 및 동시계류중의 특허 출원 포함)의 전체 내용은 명백하게 본원에 참고로 포함된다.

[0326] **실시예:**

[0327] **실시예 1: 백신 세팅에서 면역자극 복합체 및 올리고뉴클레오타이드를 사용하는 항원-특이적 면역 반응의 유도**

[0328] **도입:**

[0329] 항원-특이적 Th1 세포 매개 면역의 유도는 (i) 그의 표면 단백질을 신속히 돌연변이시키는 바이러스 (예를 들어, HIV, HCV)의 능력 때문에 불임 (sterilizing) 면역을 달성하기 어려운 바이러스 병원체에 대한 예방적 백신 처리, 및 (ii) 만성 바이러스 또는 세균 감염에 대한 치료적 면역화, 또는 (iii) 암을 치료하기 위한 치료적 면역화를 포함하는 몇몇 상황에서 매우 바람직하다.

[0330] Th1-형 면역은 용해 및 비용해 메카니즘에 의해 작용할 수 있는 CD8+ 세포독성 T 림프구와 관련된다. 용해 CTL은 MHC 클래스 I 분자에 의해 그 표면 상에 외래 항원 (회합된 종양 또는 병원체)으로부터의 펩티드를 제시하는 세포를 만날 때 화학물질 페르포린을 분비한다. 이어서, 페르포린은 세포막에 구멍을 형성하여 세포를 죽인다. 비용해 CTL은 Th1-형 시토킨, 예를 들어 IL-12 및 IFN- γ 를 분비한다.

[0331] IFN- γ 는 CD8+ CTL을 유도하기 위해 CD4+ T 세포로부터 분비된 일차 시토킨이기 때문에 Th1형 세포 반응의 특질이다. 또한, CD4+ 및 CD8+ T 세포에 의해 분비된 IFN- γ 는 만성 바이러스 감염의 비용해 제어를 책임지는 주요 시토킨이다.

[0332] Th1형 CD8+ CTL은 나이브 (naive) CD8+ T 세포가 또한 동일한 항원을 인식하는 자극된 CD4+ T 세포에 의해 분비된 Th1 시토킨의 존재 하에 전문적인 항원 제시 세포, 예를 들어 수지상 세포에 의해 제시된 항원을 검출할 때 생성된다. Th1-형 CTL을 검출하기 위한 다양한 방식이 존재한다. 직접적 방법은 항원을 발현하고 또한 이후 치사 정도를 정량하기 위한 수단으로 검출되는 방사성 표지된 물질이 로딩된 표적 세포를 용해하는 그들의 능력을 측정하는 것이다. 상기 방법은 어렵고 성가신 방식이므로, Th1 T 세포 반응을 검출하는 간접적 방법을 사용하는 것이 잘 인정된다.

[0333] CTL 또는 Th1 세포성 면역을 검출하기 위한 간접적 방법은 모두 IFN-감마 반응을 측정하는 것에 의존한다. 한 방법에서, 비장세포 또는 PBMC를 배양액 내에서 항원으로 재자극하고, T-세포에 의해 배양 배지 내로 분비된 IFN-감마의 양을 ELISA 분석에 의해 측정한다. 상기 방법이 본 발명의 연구에서 사용되는 방법이다. 다른 방법에서, 면역화된 동물 (비장 세포 또는 말초혈 단핵 세포 = PBMC) 또는 인간 (PBMC)으로부터 회수된 면역 세포를 FACS 분석에 의해 IFN-감마를 분비하는 T 세포로 분류될 수 있고; CD4+ 및 CD8+ T 세포는 따로 분류되고 계수될 수 있다. 세번째 방법에서, ELISPOT으로 공지된 방법에 의해 IFN- γ 분비 세포의 수를 추정하는 것이 가능하다.

[0334] **물질 및 방법:**

[0335] 마우스의 면역화: 모든 실험은 실험군 또는 대조군당 10마리의 마우스로 6-8주령의 암컷 BALB/c 마우스를 사용하여 수행하였다. 모든 면역화에 대해, 마우스를 Isoflurane(등록상표) (CDMV, 캐나다 퀘벡주 세인트

히아신스)로 가볍게 마취시켰다.

- [0336] 항원: 재조합 HBsAg (ay 아형, 세라다인 (Seradyne, 미국 인디애나주 인디애나폴리스)).
- [0337] 올리고뉴클레오타이드: 모든 올리고뉴클레오타이드 (표 1 참조)는 콜리 파마슈티칼 게엠베하 (Coley Pharmaceutical GmbH, 독일 랑겐펠트)로부터 입수하였다.
- [0338] 면역자극 복합체: ISCOMATRIX(등록상표) 보강제 (본원에서 IMX로 칭함)가 본 실시예에서 사용된 면역자극 복합체이다. IMX는 특히 문헌 [Morein et al., 1998]의 방법에 의해 투석을 이용하여 실험실 규모로 제조하였다. 간단히 설명하면, 800 μ l의 인산염 완충 염수 (PBS) (pH 6.2)에 20% w/v Mega-10 중 17 mg/ml 콜레스테롤 및 10 mg/ml 디팔미토일포스파티딜콜린 (DPPC)를 함유하는 용액 100 μ l를, 이어서 PBS (pH 6.2) 중 32 mg/ml ISCOPREP(등록상표) 사포닌 (씨에스엘 리미티드 (CSL Limited, 오스트레일리아 빅토리아주 파크빌)) 100 μ l를 첨가하였다. 용액을 부드럽게 혼합하면서 25°C에서 1시간 동안 유지시킨 후, PBS (pH 6.2)에 대해 심도있게 투석하였다. 투석하는 동안, ISCOPREP(등록상표) 사포닌, 콜레스테롤 및 DPPC를 함유하는 IMX가 형성되었다.
- [0339] 근내 면역화: 각각의 마우스에게 0일 및 28일에 1.0 ml 인슐린 주사기 (백톤 디킨슨 (Becton Dickenson), 미국 뉴저지주 프랭클린 레이크스)를 사용하여 1 μ g HBsAg (ay 아형, 세라다인)+/-CpG 또는 비-CpG ODN (콜리 파마슈티칼 게엠베하) $\pm$ IMX+/-백반 (Al_2O_3 , Alhydrogel "85", 수퍼포스 바이오섹터 (Superfos Biosector, 덴마크 베드백); 25 mg Al^{3+} /mg HBsAg가 되도록 하는, 1 μ g HBsAg당 2.5 μ g 2% Al_2O_3)을 인산염 완충 염수 (시그마 케미칼 컴퍼니 (Sigma Chemical Co. 미국 미주리주 세인트루이스)로 최종 부피 50 μ g로 만들어 좌측 전경골 (TA) 근 내로 단일 근내 (IM) 주사하였다.
- [0340] 피하 면역화: 각각의 마우스에게 1.0 ml 인슐린 주사기 (백톤 디킨슨)를 사용하여 1 μ g HBsAg (ay 아형, 세라다인)+/-CpG 또는 비-CpG ODN $\pm$ IMX+/-백반 (Al_2O_3 , Alhydrogel "85", 수퍼포스 바이오섹터); 25 mg Al^{3+} /mg HBsAg가 되도록 하는, 1 μ g HBsAg당 2.5 μ g 2% Al_2O_3)을 인산염 완충 염수 (시그마 케미칼 컴퍼니)로 최종 부피 100 μ l로 만들어 등 아래쪽 내로 단일 피하 (SC) 주사하였다.
- [0341] 혈장의 수집: 혈장은 마우스로부터 면역화 후 다양한 시간에 안와후방 출혈에 의해 회수하고 분석시까지 -20°C에서 보관하였다.
- [0342] 면역 반응의 평가:
- [0343] HBsAg-특이적 IgG (항-HBs): 개별 동물에 대해 앞서 설명된 바와 같이 (Davis et al., 1998) 종말점 회석 ELISA 분석 (삼중으로)에 의해 마우스 혈장 내 항원 특이적 항체를 검출하고 정량하였다. 간단히 설명하면, 밤새 (RT) HBsAg 입자 (0.05 M 탄산나트륨-중탄산나트륨 완충액 (pH 9.6) 중 1 μ g/ml HBsAg 100 μ l)로 코팅한 96-웰 폴리스티렌 플레이트 (코닝 (Corning))를 혈장과 함께 1 hr 동안 37°C에서 인큐베이팅하였다. 이어서, 포획된 항체를 양고추냉이 페록시다제 (HRP)-컨쥬게이팅된 염소 항-마우스 IgG, IgG1 또는 IgG2a (PBS-Tween 중 1:4000, 10% FCS: 100 μ l/웰; 서던 바이오테크놀로지 인크. (Southern Biotechnology Inc., 미국 앨라배마주 버밍햄)로 검출한 후, o-페닐렌디아민 이염산염 용액 (OPD, 시그마)을 100 μ l/웰로 30분 동안 RT에서 암소에서 첨가하였다. 2M H_2SO_4 을 50 μ l/웰로 첨가하여 반응을 중지시켰다. 각 막대는 최종 면역화 4주 후 취한 혈장 내 특이적 항체에 대한 ELISA 종말점 회석 역가의 그룹 기하 평균 ($\pm$ SEM)을 나타낸다. 역가는 0.05의 컷오프 (cut-off) 값을 갖는 비-면역 혈장의 2배의 흡광도값을 생성시키는 최고 혈장 회석으로서 정의된다.
- [0344] 인터페론-감마 (IFN- γ) 분비: 면역화된 동물로부터의 비장세포의 항원 재-자극 후 IFN- γ 분비를 측정하였다. 비장 세포 현탁액을 제조하고, 2% 정상 마우스 혈청 (세다레인 래보라토리스 (Cedarlane Laboratories, 캐나다 온타리오)), 페니실린-스트렙토마이신 용액 (각각 1000 U/ml 및 1 mg/ml의 최종 농도; 시그마 (영국 어빈)) 및 5×10^{-5} M β -머캅토에탄올 (시그마)을 보충한 RPMI 1640 (라이프 테크놀로지스 (Life Technologies, 미국 뉴욕 주 그랜드 아일랜드)) 조직 배양 배지 (완전 RPMI 1640) 중에 5×10^6 세포/ml의 최종 농도로 조정하였다. 비장 세포 현탁액을 96-웰 U자형 바닥 조직 배양 플레이트 (100 μ l/웰) 상으로 완전 RPMI 1640 중에 적절한 농도로 희석된 각각의 자극제 100 μ l과 함께 플레이트하였다. 사용된 자극제는 HBsAg 5.0 및 2.5 μ g/ml이었다. 콘카나발린 A (10 μ g/ml, 시그마)를 양성 대조군으로 사용하고, 배지만 사용하여 배양한 세포를 음성 대조군으로 사용하였다. 각 비장세포 샘플을 삼중으로 플레이트하고, 세포를 가습 5% CO_2 인큐베이터에서 37°C에서 48 및 72 hr 동안 인큐베이팅하였다. 인큐베이션 기간 종료시에, 96-웰 플레이트를 5분 동안 1200 rpm에서

원심분리하고, 배양 상등액을 수확하고 분석시까지 -80°C 에서 보관하였다. 72 hr에서 취한 배양 상등액 중 시토크 수준을 분석하기 위해 시판 분석 키트 (마우스 IFN- γ OptEIA; 파밍엔 (PharMingen, 미국 온타리오주 미시사우가)를 제조사의 지시에 따라 사용하였다.

[0345] 세포독성 T 림프구 활성화 (CTL 활성): HBsAg+/-면역자극 복합체+/-올리고뉴클레오타이드+/-백반으로 미리 면역화시킨 마우스로부터 비장을 멸균 조건 하에 회수하였다. 단일 세포 현탁액을 제조하고, 10% FBS (라이프 테크놀로지스) 및 페니실린-스트렙토마이신 용액 (각각 1000 U/ml 및 1 mg/ml의 최종 농도), (시그마 (영국 어빈))과 5×10^{-5} M β -머캅토에탄올 (시그마) 및 IL-2의 공급원으로서 3% EL-4 상등액을 보충한 RPMI 1640 (라이프 테크놀로지스) 조직 배양 배지에 현탁시켰다. 비장세포 (3×10^7)를 방사선 조사 ($20,000 \text{ rad}$)에 의해 불활성화시킨 1×10^6 동계 HBsAg-발현 자극제 세포 (P815-preS)와 동시배양하였다. 배양액을 직립 25 cm^2 조직 배양 플라스크 내에서 10 ml의 배지 중에 5일 동안 가습 분위기 ($5\% \text{ CO}_2$)에서 37°C 에서 유지한 후 수확하고 배지로 세척하였다. 상기 효과기 세포를 계열 희석하고, 둥근 바닥 96-웰 마이크로적정 플레이트에서 37°C 에서 5×10^3 ^{51}Cr -표지된 HBsAg-발현 표적 (P815S) 또는 대조 표적 세포 (P815)와 함께 각각의 샘플을 삼중으로 하여 배양하였다. 4 h 인큐베이션 후, 방사선 (감마) 계수를 위해 $100 \mu\text{l}$ 의 상등액을 제거하였다. 용해율은 다음과 같이 계산하였다: [(실험시 방출 - 자연적 방출)/(총 방출 - 자연적 방출)] x 100. 자연적 방출은 효과기 세포 없이 표적 세포를 인큐베이팅하여 결정하였고, 총 방출은 $100 \mu\text{g}$ 의 2% Triton X-100을 표적 세포에 첨가하여 결정하였다. 특이적 용해율은 다음과 같이 계산하였다: P815S 세포를 사용한 용해% - P815 세포 용해%.

[0346] 결과 및 결론:

[0347] 도 1은 HBsAg (2.5 또는 5.0 mg/ml)로 자극된 비장세포로부터의 상등액에서 측정된 인터페론-감마 (IFN-g) 수준에 대한 상이한 보강제의 효과를 보여주는 막대 그래프이고, 여기서 BALB/c 마우스를 1일 및 28일에 HBsAg ($1 \mu\text{g}$)으로 10 mg CpG 올리고뉴클레오타이드 서열 **7909** 또는 비-CpG 올리고뉴클레오타이드 서열 **2137** 및(또는) 5 μg IMX 없이 또는 그와 조합하여 SC 주사에 의해 면역화시켰다. 추가접종 4주 후에, 비장을 제거하고, IFN-g를 HBsAg (2.5 또는 5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 자극된 비장세포로부터의 상등액에서 측정하였다. 막대는 5.0 mg/ml HBsAg로 자극한 후 상등액 중 IFN-g 농도 (pg/ml) +/-SD를 보여준다. 2.5 mg/ml 자극에서 동등한 결과가 얻어졌다 (결과 미제시). 배지만으로 자극된 추가의 샘플은 자극이 항원 특이적임을 확인하였다 (결과 미제시).

[0348] 도 2는 HBsAg (2.5 또는 5.0 mg/ml)로 자극된 비장세포로부터의 상등액에서 측정된 인터페론-감마 (IFN-g) 수준에 대한 상이한 보강제의 효과를 보여주는 막대 그래프이고, 여기서 BALB/c 마우스를 1일 및 28일에 HBsAg ($1 \mu\text{g}$)으로 10 mg CpG 올리고뉴클레오타이드 서열 **7909** 또는 비-CpG 올리고뉴클레오타이드 서열 **2137** 및(또는) 5 μg IMX 없이 또는 그와 조합하여 IM 주사에 의해 면역화시켰다. 추가접종 4주 후에, 비장을 제거하고, IFN-g를 HBsAg (2.5 또는 5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 자극된 비장세포로부터의 상등액에서 측정하였다. 막대는 5.0 mg/ml HBsAg로 자극한 후 상등액 중 IFN-g 농도 (pg/ml) +/-SD를 보여준다. 2.5 mg/ml 자극에서 동등한 결과가 얻어졌다 (결과 미제시). 배지만으로 자극된 추가의 샘플은 자극이 항원 특이적임을 확인하였다 (결과 미제시).

[0349] IFN-감마 분비는 HBsAg $\pm$ ODN $\pm$ IMX로 SC 또는 IM 주사를 통해 미리 면역화시킨 마우스로부터 회수한 후 재자극된 비장세포로부터 관찰되었다 (도 1 및 2). CpG 올리고뉴클레오타이드 제제 (즉, 면역자극 복합체 사용) 및 불활성 올리고뉴클레오타이드 제제 ("비-CpG"로 표지함)으로부터의 반응은 IMX와 올리고뉴클레오타이드 단독의 상가 (additive) 효과보다 훨씬 더 컸다.

[0350] 도 3은 HBsAg (2.5 또는 5.0 mg/ml)로 자극된 비장세포로부터의 상등액에서 측정된 인터페론-감마 (IFN-g) 수준에 대한 상이한 올리고뉴클레오타이드의 효과를 보여주는 막대 그래프이고, 여기서 BALB/c 마우스를 1일 및 28일에 HBsAg ($1 \mu\text{g}$)으로 10 mg CpG 올리고뉴클레오타이드 (서열 **7909**) 또는 비-CpG 올리고뉴클레오타이드 (서열 **21736**, **2117**, **1982**, **2091**, 또는 **2137**) 및(또는) 5 μg IMX 없이 또는 그와 조합하여 SC 주사에 의해 면역화시켰다. 추가접종 4주 후에, 비장을 제거하고, IFN-g를 HBsAg (2.5 또는 5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 자극된 비장세포로부터의 상등액에서 측정하였다. 막대는 5.0 mg/ml HBsAg로 자극한 후 상등액 중 IFN-g 농도 (pg/ml) +/-SD를 보여준다. 2.5 mg/ml 자극에서 동등한 결과가 얻어졌다 (결과 미제시). 배지만으로 자극된 추가의 샘플은 자극이 항원 특이적임을 확인하였다 (결과 미제시).

[0351] 도 4는 HBsAg (2.5 또는 5.0 mg/ml)로 자극된 비장세포로부터의 상등액에서 측정된 인터페론-감마 (IFN-g) 수준에 대한 상이한 올리고뉴클레오타이드의 효과를 보여주는 막대 그래프이고, 여기서 BALB/c 마우스를 1일 및 28일에 HBsAg ($1 \mu\text{g}$)으로 10 mg 비-CpG 올리고뉴클레오타이드 (서열 **21732**, **21733**, **21734**, **21735**, 또는 **2137**) 및(또

는) 5 μg IMX 없이 또는 그와 조합하여 SC 주사에 의해 면역화시켰다. 추가접종 4주 후에, 비장을 제거하고, IFN-g를 HBsAg (2.5 또는 5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 자극된 비장세포로부터의 상등액에서 측정하였다. 막대는 5.0 mg/ml HBsAg로 자극한 후 상등액 중 IFN-g 농도 (pg/ml) $\pm$ SD를 보여준다. 2.5 mg/ml 자극에서 동등한 결과가 얻어졌다 (결과 미제시). 배지만으로 자극된 추가의 샘플은 자극이 항원 특이적임을 확인하였다 (결과 미제시).

[0352] 도 3 및 4는 불활성 올리고뉴클레오타이드 (예를 들어, 1982 및 2137)라도 항원 투여의 맥락에서 면역자극 복합체와 함께 제제화될 때 상승적 수준의 IFN-감마를 유도할 수 있음을 명백히 보여준다. 공지의 면역자극성 올리고뉴클레오타이드 (예를 들어, 7909)에 대해 훨씬 더 큰 효과가 관찰되었다.

[0353] 도 5는 항-HBs의 총 IgG 역가에 대한 상이한 보강제의 효과를 보여주는 막대 그래프이고, 여기서 BALB/c 마우스를 1일 및 28일에 HBsAg (1 μg)으로 10 mg CpG 올리고뉴클레오타이드 서열 7909 또는 비-CpG 올리고뉴클레오타이드 서열 2137 및(또는) 5 μg IMX 없이 또는 그와 조합하여 SC 주사에 의해 면역화시켰다. 추가접종 4주 후에, 동물을 출혈시키고, 혈장을 수집하고, 항-HBs 수준을 ELISA에 의해 결정하였다. 막대는 총 IgG (패널 A) 또는 IgG2a 및 IgG1 (패널 B)에 대한 항-HBs 그룹 기하 평균 역가 $\pm$ SEM을 보여준다.

[0354] IFN-감마 유도에서 볼 수 있는 바와 같이, 면역자극성 올리고뉴클레오타이드 또는 불활성 올리고뉴클레오타이드를 포함하든 그렇지 않든 올리고뉴클레오타이드/면역자극 복합체/항원 제제는 도 5에 나타난 바와 같이 항-HBs 총 IgG의 생산 및 IgG2a의 유도도 증명되는 바와 같이 Th1-편향된 항원 특이적 면역 반응을 유도할 수 있다.

[0355] 도 6은 HBsAg 특이적 CTL 반응에 대한 상이한 보강제의 효과를 보여주는 막대 그래프이고, 여기서 BALB/c 마우스를 1일 및 28일에 HBsAg (1 μg)으로 10 mg CpG 올리고뉴클레오타이드 서열 7909 또는 비-CpG 올리고뉴클레오타이드 서열 2137 및(또는) 5 μg IMX 없이 또는 그와 조합하여 SC 주사에 의해 면역화시켰다. 면역화 4주 후에, 마우스를 할로탄 과다투여로 치사시키고, 비장세포를 분리하여 HBsAg 특이적 CTL 활성을 ^{51}Cr 방출 분석으로 결정하였다.

[0356] IFN-감마 및 항원 특이적 면역글로불린 생산에서 볼 수 있는 바와 같이, 면역자극성 올리고뉴클레오타이드 또는 불활성 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드/면역자극 복합체/항원 제제는 도 6에 나타난 바와 같이 항원 특이적 CTL을 활성화시킬 수 있다.

[0357] 도 7은 HBsAg (2.5 또는 5.0 mg/ml)로 자극된 비장세포로부터의 상등액에서 측정된 인터페론-감마 (IFN-g) 수준에 대한 상이한 보강제의 효과를 보여주는 막대 그래프이고, 여기서 BALB/c 마우스를 1일 및 28일에 HBsAg (1 μg)으로 10 mg CpG 올리고뉴클레오타이드 서열 7909 및(또는) 5 μg IMX 및(또는) 백반 없이 또는 그와 조합하여 SC 주사에 의해 면역화시켰다. 추가접종 4주 후에, 비장을 제거하고, IFN-g를 HBsAg (2.5 또는 5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 자극된 비장세포로부터의 상등액에서 측정하였다. 막대는 5.0 mg/ml HBsAg로 자극한 후 상등액 중 IFN-g 농도 (pg/ml) $\pm$ SD를 보여준다. 2.5 mg/ml 자극에서 동등한 결과가 얻어졌다 (결과 미제시). 배지만으로 자극된 추가의 샘플은 자극이 항원 특이적임을 확인하였다 (결과 미제시).

[0358] 도 8은 HBsAg (2.5 또는 5.0 mg/ml)로 자극된 비장세포로부터의 상등액에서 측정된 인터페론-감마 (IFN-g) 수준에 대한 상이한 보강제의 효과를 보여주는 막대 그래프이고, 여기서 BALB/c 마우스를 1일 및 28일에 HBsAg (1 μg)으로 10 mg CpG 올리고뉴클레오타이드 서열 7909 및(또는) 5 μg IMX 및(또는) 백반 없이 또는 그와 조합하여 IM 주사에 의해 면역화시켰다. 추가접종 4주 후에, 비장을 제거하고, IFN-g를 HBsAg (2.5 또는 5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 자극된 비장세포로부터의 상등액에서 측정하였다. 막대는 5.0 mg/ml HBsAg로 자극한 후 상등액 중 IFN-g 농도 (pg/ml) $\pm$ SD를 보여준다. 2.5 mg/ml 자극에서 동등한 결과가 얻어졌다 (결과 미제시). 배지만으로 자극된 추가의 샘플은 자극이 항원 특이적임을 확인하였다 (결과 미제시).

[0359] 도 7 및 8은 올리고뉴클레오타이드/면역자극 복합체/항원 제제에 백반을 첨가하면 투여가 IM에 의한 것이든 SC에 의한 것이든 무관하게 올리고뉴클레오타이드/면역자극 복합체/항원 제제에서 관찰된 상승적 반응을 감소시키지만 제거하지는 않음을 증명한다.

[0360] 일반적인 결론:

[0361] 바이러스-특이적 IFN- γ 는 Th1 면역 반응에 대한 우수한 마커이고, 따라서 세포성 면역의 인디케이터인 것으로 일반적으로 인정된다. Th1 반응은 특정 바이러스 감염, 예를 들어 HIV, HBV, HSV 및 CMV에서 다양한 예방 및 치료 백신 세팅에서 요구되는 것으로 널리 인정된다.

[0362] IFN- γ 는 다양한 기능을 갖는 고도 다면발현성 시토킨이다. 백신 세팅에서, 높은 IFN- γ 반응은 아래의 것을 포함하여 이로 제한되지 않는 많은 방식에서 유익할 것이다:

- [0363] 직접적인 항바이러스 효과:
- [0364] IFN- γ 는 인간 간세포에서 HBV 전사 및 복제를 모두 억제하는 것으로 나타났다 (Suri et al 2001, J. Hepatol. 35:709-7).
- [0365] IFN- γ 생산은 만성 HBV 감염에 대한 치료 면역화에 대한 반응과 상호관련되는 것으로 밝혀졌다 (Ren et al 2003, J. Med. Virol. 71:376-84).
- [0366] IFN- γ 는 직접적 항바이러스 효과에 의해 신경 축삭에서 표피세포로 HSV-1의 전염을 억제한다. 이것은 IFN- γ 가 재발성 포진 병변에서 HSV-1 확산 및 방출의 제어에 기여함을 제안한다. 따라서, 높은 IFN- γ 발현은 치료 HSV 백신에 유용한 특징이 될 것이다.
- [0367] CD8 T-세포 (CTL) 반응:
- [0368] CTL의 유도는 일반적으로 Th1 시토킨, 예를 들어 IFN- γ 의 핵심 성분인 CD4 T-세포 헬프 (help)의 제공에 의존적이다.
- [0369] HIV 감염의 초기 단계에서, 세포성 면역 (CD4 및 CD8 모두)은 바이러스 확산을 제한하는데 중요한 역할을 한다. 그러나, 질병이 진행되고 CD4 세포 계수가 감소함에 따라, 결국 CD8 반응을 유지하기에 충분하지 않은 수준에 도달하고, 그 이후 또한 감소된다. 따라서, 바이러스 복제는 "검토되지 않으면서" 진행되어, 본격적인 AIDS를 발병시킨다.
- [0370] 치료 HIV 백신의 일부로서, IMX/CpG/HIV 항원 조합체는 효과적인 HIV-특이적 CD8 T-세포 반응을 시작하도록 나머지 CD4 T-세포로부터 충분한 T 헬프를 유도할 수 있다. 상기 백신의 목표는 바이러스혈증을 제어하고 면역적 격을 복원하는 것일 것이다.
- [0371] 암 면역요법:
- [0372] 고수준의 IFN- γ 는 혈관신생을 방해하고, 결과적으로 신생물 성장을 억제하는 것으로 나타났다 (Rankin et al, Cancer Biol. Ther. 2:687-93).
- [0373] 그 결과, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드/면역자극 복합체/항원 백신 제제에서 관찰된 실질적으로 증가된 IFN- γ 반응은 예방 또는 치료를 필요로 하는 대상에게 투여될 때 중요한 예방 및 치료 이익을 부여할 것으로 예상된다.
- [0374] 실시예 2: 암 백신 세팅에서 면역자극 복합체 및 올리고뉴클레오타이드를 사용하는 항원 특이적 면역 반응의 유도
- [0375] 물질 및 방법:
- [0376] 여기서 구체적으로 열거하지 않은 물질 및 방법에 대해서는 실시예 1을 참조한다.
- [0377] 암 마우스 모델:
- [0378] B16은 실험적 흑색종 쥐 암 모델이다. 종양은 OVA 항원을 발현한다. 암컷 C57B1/6 마우스를 -21일 및 -7일에 IM으로 백신 처리하였다. 백신 처리군은 다음과 같았다: (i) OVA (50 μ g) 단독; (ii) OVA 및 CpG 7909 (25 μ g); (iii) OVA 및 IMX (5 μ g); (iv) OVA 및 CpG 7909 및 IMX; (v) CpG 7909 (25 μ g) 단독; (vi) IMX (5 μ g) 단독; 및 (vii) CpG 7909 및 IMX. 0일에, 마우스에 종양 접종 (challenge)으로서 5×10^5 세포를 접종하였다. 28일에, 마우스를 희생시키고, 수확한 조직에 대해 면역 분석을 수행하였다.
- [0379] 제2 실험에서, HPV E6/E7 단백질을 발현하는 자궁경부 암종을 마우스에 접종하였다. 1×10^6 자궁경부 세포 암종 세포를 0일에 SC 주사하였다. 치료 계획은 다음과 같았다: 7일 및 그 후 2개월 동안 매주 25 μ g CpG 7909, 5 μ g IMX 및(또는) 10 μ g E6/E7 펩티드 SC.
- [0380] 결과:
- [0381] 도 9-13은 B16 흑색종 실험의 결과를 보여준다. CpG 7909와 IMX 사이의 상승작용이 증명되었다. 상기 상승작용은 흑색종 모델에서 보강제 단독을 사용한 것에 비해 OVA 및 CpG 7909 및 IMX를 백신 처리한 동물에서 OVA 특이적 CMI에서 관찰되었다.
- [0382] 도 14-15는 자궁경부 암종 실험의 결과를 보여준다. C3 자궁경부 암종 모델에서 보강제 단독에 비해 E6/E7 및 CpG 7909 및 IMX를 백신 처리한 동물에서 생존 및 종양 성장의 제어가 더 우수하였다.

[0383] 이들 결과는 IFN-감마의 압도적인 생산 수준을 가정하면 최적 미만 용량의 보강제 및 임의로 항원이 치료 프로토콜에서 사용될 수 있음을 제한한다.

[0384] 결론:

[0385] 바이러스-특이적 IFN-감마는 Th1 면역 반응에 대한 우수한 마커이고, 따라서 세포성 면역의 인디케이터이다. Th1 반응은 다양한 예방 및 치료 백신 세팅, 예를 들어 특정 바이러스 감염, 예를 들어 HIV, HBV, HSV 및 CMV에서 유용하다. 실시예에서 유도된 IFN-감마의 수준은 매우 놀라운 수준이고, 면역자극 복합체가 TLR 리간드, 특히 불활성 TLR 리간드와 함께 많은 백신 적응증에 대해 치료상 유용함을 나타낸다.

[0386] 균등물:

[0387] 상기 상세한 설명은 당업자가 본 발명을 구현하여 실시할 수 있기에 충분하다. 제시된 실시예는 단지 본 발명의 한 측면에 대한 일례로서 의도되고 다른 기능적으로 균등한 실시태양이 본 발명의 범위 내에 포함되기 때문에, 본 발명은 실시예에 의해 그 범위가 제한되지 않아야 한다. 제시되고 본원에서 설명된 것에 추가하여 당업자는 상기 상세한 설명을 통해 본 발명의 다양한 변형을 분명하게 알 수 있을 것이고, 상기 변형은 첨부된 청구의 범위에 포함된다. 본 발명의 잇점 및 목적이 본 발명의 각각의 실시태양에 의해 포함될 필요는 없다.

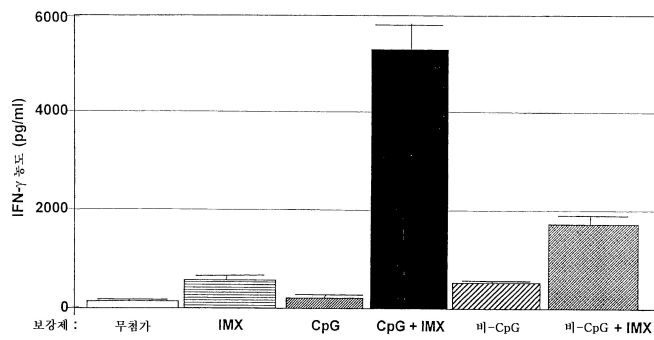
[0388] $\langle \underline{\underline{H}} \ 1 \rangle$

[illegible]

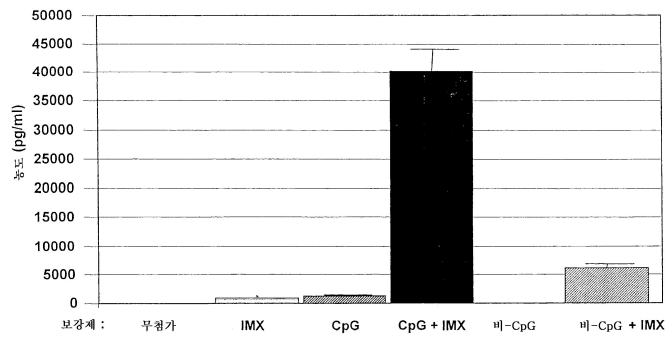
[0389]

도면

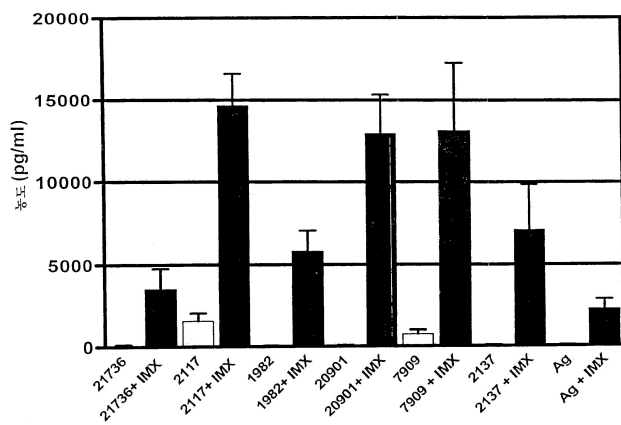
도면1



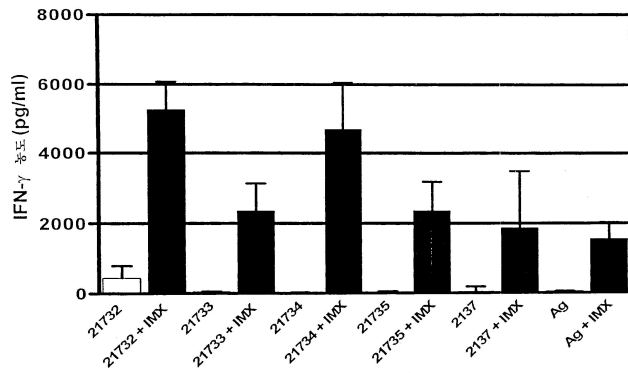
도면2



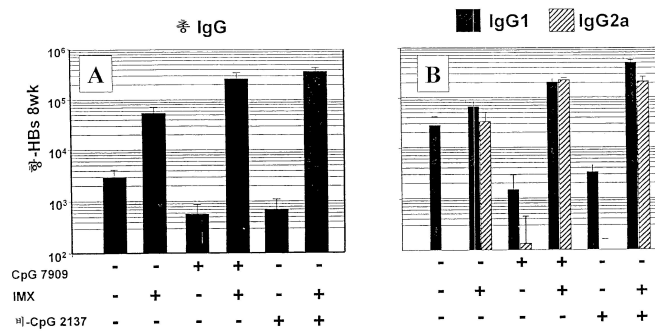
도면3



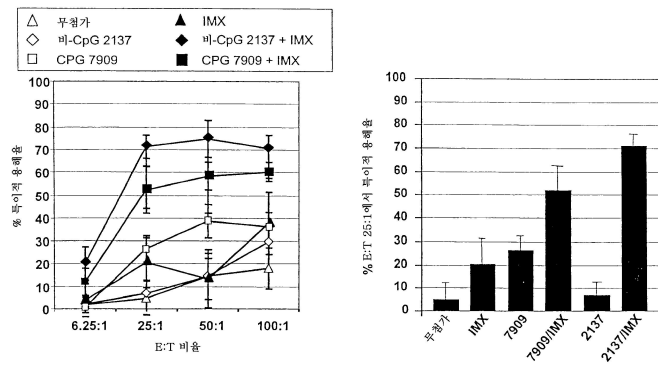
도면4



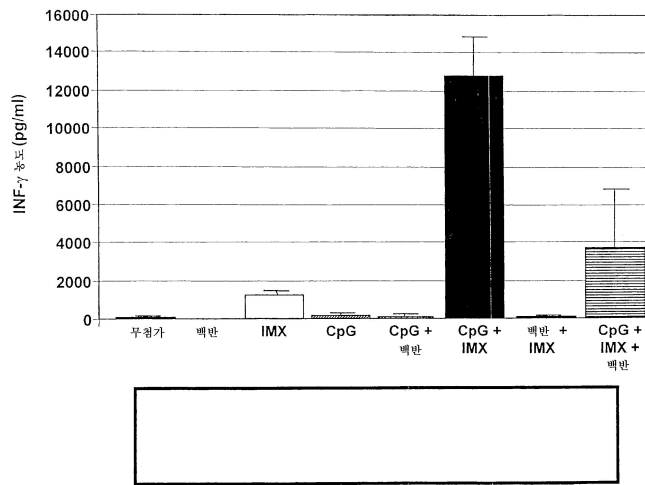
도면5



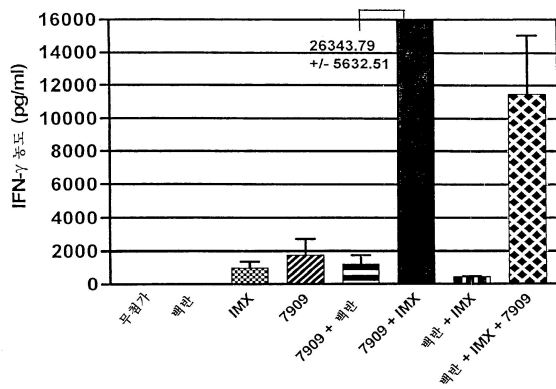
도면6



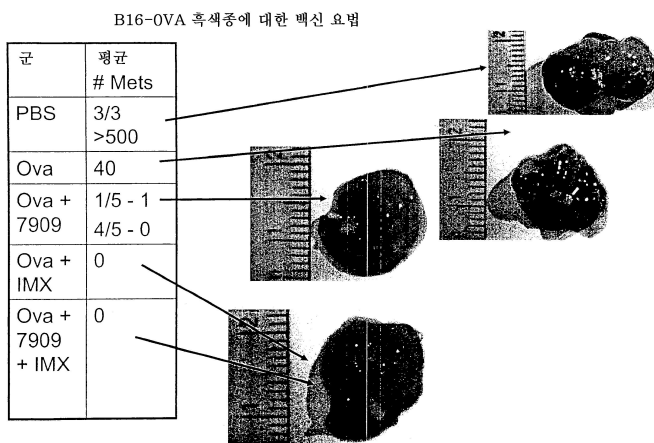
도면7



도면8

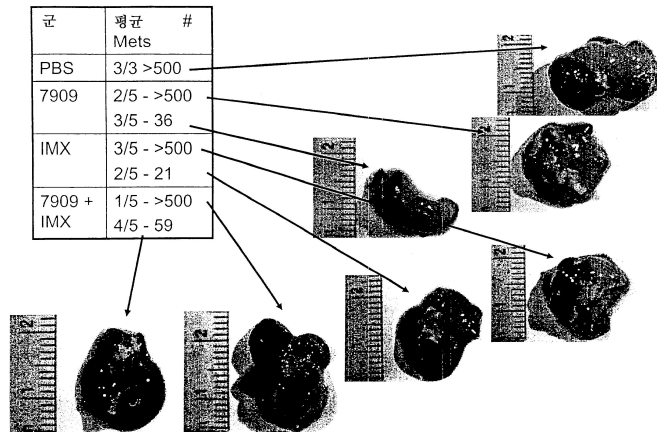


도면9



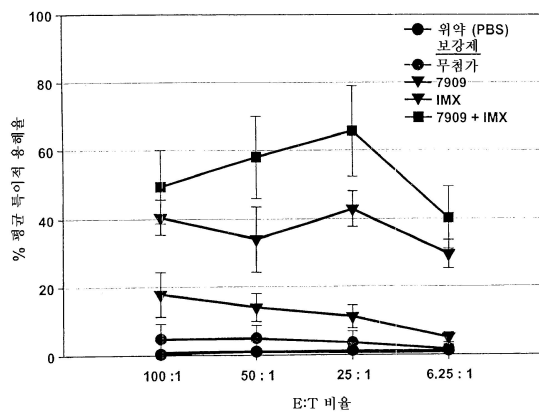
도면10

B16-OVA 흡색증에 대한 면역 요법
종양 접종 전 -21일 및 -7일에 단지 2회의 처리



도면11

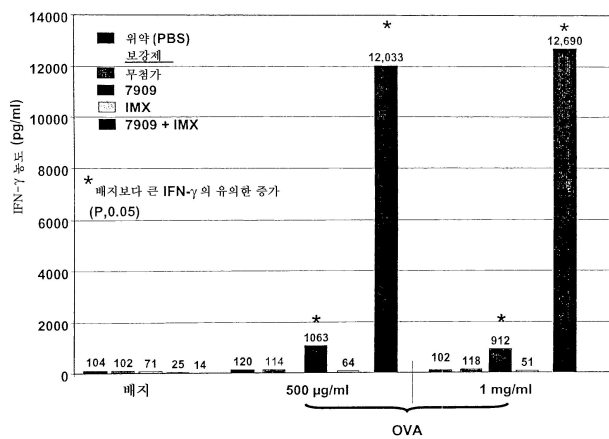
백신 접종된 동물에서 OVA 특이적 CTL



백신 접종되지 않은 동물에서 CTL가 검출되지 않음

도면12

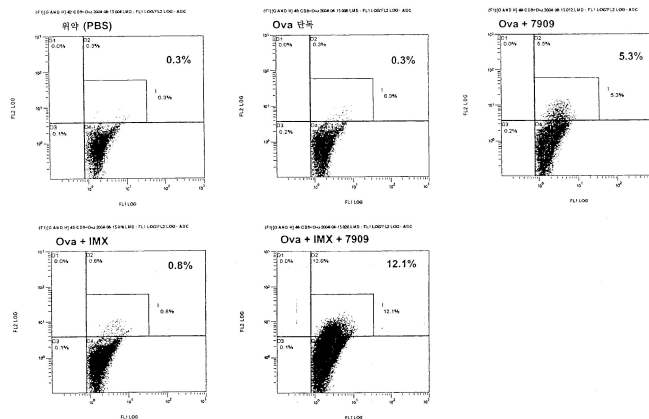
백신 접종된 동물에서 OVA 특이적 IFN- γ 분비



백신 접종되지 않은 동물에서 배지보다 큰 IFN- γ 가 검출되지 않음

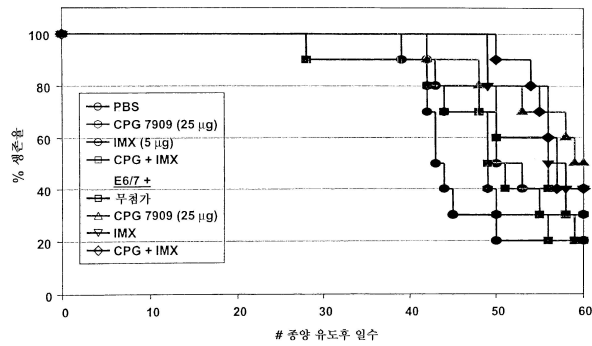
도면13

OVA-로딩 덴타머를 사용하여 비장세포에서의 OVA 특이적 CD8+ T 세포



도면14

생존

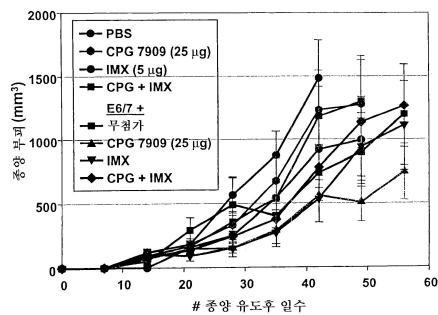


종양 유도: 1×10^6 자궁경부 세포 암종을 0일에 SC 주사.

처리: 25 µg CPG 7909, 5 µg IMX 및(또는) 10 µg E6/E7 펩티드를 2달 동안 제7일 및 매주 SC 투여.

도면15

종양 부피



종양 유도: 1×10^6 자궁경부 세포 암종을 0일에 SC 주사.

처리: 25 µg CPG 7909, 5 µg IMX 및(또는) 10 µg E6/E7 펩티드를 2달 동안 제7일 및 매주 SC 투여.

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> DAVIS, HEATHER L.

MCCLUSKIE, MICHAEL J.

DRANE, DEBORAH P.

<120> METHODS AND COMPOSITIONS FOR INDUCING ANTIGEN-SPECIFIC
IMMUNE RESPONSES

<130> 029860-0129

<140> 11/183,187

<141> 2005-07-18

<150> 60/589,259

<151> 2004-07-18

<160> 31

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 1

tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt

24

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 2

tgctgctttt gtgcttttgt gctt

24

<210> 3

<211> 6

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 3

gacgtc

6

<210> 4

<211> 6

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 4

agcgct

6

<210> 5

<211> 6

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 5

aacgtt

6

<210> 6

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (3)..(27)

<223> This region may encompass 0-25 variable nucleotides

<220><221> modified_base

<222> (29)..(30)

<223> This region may encompass gt, gg, ga, or aa

<220><221> modified_base

<222> (33)..(34)

<223> This region may encompass tt, ct, or tc

<400> 6

tcnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnntnn cgnn

34

<210> 7

<211> 7

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 7

tttttcg

7

<210> 8

<211> 3

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 8

tcg

3

<210> 9

<211> 4

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 9	
ttcg	4
<210> 10	
<211> 5	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 10	
tttcg	5
<210> 11	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 11	
ttttcg	6
<210> 12	
<211> 4	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 12	
tcgt	4
<210> 13	
<211> 5	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 13	
ttcgt	5
<210> 14	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 14	
tttcgt	6
<210> 15	
<211> 7	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 15	
tcgtcgt	7
<210> 16	
<211> 8	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<400> 16	
ccgcgcgg	8
<210> 17	
<211> 12	

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 17
 cgacgttcgt cg 12
 <210> 18
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 18
 cggcgccgtg ccg 13
 <210> 19
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 19
 cccccgggg gg 12
 <210> 20
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 20

ggggggcccc cc	12
<210> 21	
<211> 10	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 21	
cccccgggggg	10
<210> 22	
<211> 10	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 22	
gggggcccccc	10
<210> 23	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<220><221> misc_feature	
<222> (1)..(2)	
<223> phosphorothioate bond	
<220><221> misc_feature	
<222> (2)..(3)	
<223> phosphodiester bond	
<220><221> misc_feature	

<222> (3)..(4)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(5)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> phosphodiester bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (6)..(7)
 <223> phosphorothioate bond

 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(8)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..(9)
 <223> phosphodiester bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (9)..(10)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(11)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(12)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> phosphodiester bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (13)..(14)
 <223> phosphorothioate bond

 <220><221> misc_feature

<222> (14)..(15)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (15)..(16)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (16)..(17)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> phosphodiester bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (18)..(19)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(20)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> phosphorothioate bond

<220><221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (22)..(23)
 <223> phosphorothioate bond

<400> 23

tcgtcgacgt tcggcgcgcg ccg

23

<210> 24

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> phosphorothioate bond

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> phosphodiester bond

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(4)

<223> phosphorothioate bond

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(5)

<223> phosphorothioate bond

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(6)

<223> phosphorothioate bond

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(7)

<223> phosphodiester bond

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(8)

<223> phosphorothioate bond

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(9)

<223> phosphorothioate bond

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(10)

<223> phosphorothioate bond

<220>

><221> misc_feature

<222> (10)..(11)

<223> phosphodiester bond

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(12)

<223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (13)..(14)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (14)..(15)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (15)..(16)
 <223> phosphodiester bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (16)..(17)
 <223> phosphorothioate bond

 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (18)..(19)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(20)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> phosphorothioate bond
 <400> 24
 tcggacgttc ggcgcgccg cc g
 <210> 25
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

21

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> phosphorothioate bond

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> phosphodiester bond

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(4)

<223> phosphorothioate bond

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(5)

<223> phosphorothioate bond

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(6)

<223> phosphorothioate bond

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(7)

<223> phosphodiester bond

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(8)

<223> phosphorothioate bond

<220><

221> misc_feature

<222> (8)..(9)

<223> phosphorothioate bond

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(10)

<223> phosphorothioate bond

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(11)

<223> phosphodiester bond

<220><221> misc_feature
 <222> (11)..(12)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (13)..(14)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (14)..(15)
 <223> phosphorothioate bond

<220><221> misc_feature
 <222> (15)..(16)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (16)..(17)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (18)..(19)
 <223> phosphorothioate bond

<400> 25

tcggacgttc ggcgcgccg

19

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide

<220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> phosphodiester bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (3)..(4)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(5)
 <223> phosphodiester bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (6)..(7)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(8)
 <223> phosphodiester bond
 <220><221>
 > misc_feature
 <222> (8)..(9)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (9)..(10)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(11)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(12)
 <223> phosphodiester bond
 <220><221> misc_feature

<222> (12)..(13)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (13)..(14)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (14)..(15)
 <223> phosphorothioate bond
 <220>
 ><221> misc_feature
 <222> (15)..(16)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (16)..(17)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (18)..(19)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(20)
 <223> phosphorothioate bond
 <400> 26
 tcgcgtcggtt cggcgcgccg
 <210> 27
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><221> misc_feature

20

<222> (1)..(2)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> phosphodiester bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (3)..(4)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(5)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> phosphodiester bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (6)..(7)
 <223> phosphorothioate bond

 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(8)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..(9)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (9)..(10)
 <223> phosphodiester bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(11)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(12)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)

<223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (13)..(14)
 <223> phosphorothioate bond

<220><221> misc_feature
 <222> (14)..(15)
 <223> phosphodiester bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (15)..(16)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (16)..(17)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (18)..(19)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(20)
 <223> phosphorothioate bond
 <400> 27

tcgacgttcg gcgcgcgccg

20

<210> 28
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(2)

<223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> phosphodiester bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (3)..(4)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(5)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> phosphodiester bond
 <220>
 ><221> misc_feature
 <222> (6)..(7)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(8)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..(9)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (9)..(10)
 <223> phosphodiester bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(11)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(12)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> phosphorothioate bond

<

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(14)

<223> phosphorothioate bond

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(15)

<223> phosphorothioate bond

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(16)

<223> phosphorothioate bond

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(17)

<223> phosphorothioate bond

<220><221> misc_feature

<222> (17)..(18)

<223> phosphorothioate bond

<400> 28

tcgacgttcg gcgcgccg

18

<210> 29

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> phosphorothioate bond

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> phosphodiester bond

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(4)

<223> phosphorothioate bond

<220><221> misc_feature
 <222> (4)..(5)
 <223> phosphodiester bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (6)..(7)
 <223> phosphorothioate bond

 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(8)
 <223> phosphodiester bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..(9)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (9)..(10)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(11)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(12)
 <223> phosphodiester bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (13)..(14)
 <223> phosphorothioate bond

 <220><221> misc_feature
 <222> (14)..(15)
 <223> phosphorothioate bond

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(16)

<223> phosphorothioate bond

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(17)

<223> phosphorothioate bond

<220><221> misc_feature

<222> (17)..(18)

<223> phosphorothioate bond

<400> 29

tcgcgtcggtt cggcgccg

18

<210> 30

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> phosphorothioate bond

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> phosphodiester bond

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(4)

<223> phosphorothioate bond

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(5)

<223> phosphodiester bond

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(6)

<223> phosphorothioate bond

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(7)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(8)
 <223> phosphodiester bond
 <220><221>
 > misc_feature
 <222> (8)..(9)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (9)..(10)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(11)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(12)
 <223> phosphodiester bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (13)..(14)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (14)..(15)
 <223> phosphorothioate bond
 <220>
 ><221> misc_feature
 <222> (15)..(16)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (16)..(17)
 <223> phosphodiester bond
 <220><221> misc_feature

<222> (17)..(18)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (18)..(19)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(20)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> phosphorothioate bond
 <220><221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 <223> phosphorothioate bond

<400> 30

tcgcgacgtt cggcgcgcgc cg

22

<210> 31

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> phosphorothioate bond

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> phosphodiester bond

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(4)

<223> phosphorothioate bond

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(5)

<223> phosphodiester bond

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(6)

<223> phosphorothioate bond

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(7)

<223> phosphorothioate bond

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(8)

<223> phosphodiester bond

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(9)

<223> phosphorothioate bond

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(10)

<223> phosphorothioate bond

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(11)

<223> phosphorothioate bond

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(12)

<223> phosphodiester bond

<

220><221> misc_feature

<222> (12)..(13)

<223> phosphorothioate bond

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(14)

<223> phosphorothioate bond

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(15)

<223> phosphorothioate bond

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(16)

<223> phosphorothioate bond

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(17)

<223> phosphodiester bond

<220><221> misc_feature

<222> (17)..(18)

<223> phosphorothioate bond

<220><221> misc_feature

<222> (18)..(19)

<223> phosphorothioate bond

<220><221> misc_feature

<222> (19)..(20)

<223> phosphorothioate bond

<220><221> misc_feature

<222> (20)..(21)

<223> phosphorothioate bond

<220><221> misc_feature

<222> (21)..(22)

<223> phosphorothioate bond

<400> 31

tcgcgtcggt cggcgcgcgc cg

22