



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2010년03월02일  
(11) 등록번호 10-0945104  
(24) 등록일자 2010년02월23일

(51) Int. Cl.  
*C12N 15/09* (2006.01) *A61K 39/39* (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2004-7006160  
(22) 출원일자 2002년10월24일  
심사청구일자 2007년07월25일  
(85) 번역문제출일자 2004년04월24일  
(65) 공개번호 10-2004-0047969  
(43) 공개일자 2004년06월05일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2002/034247  
(87) 국제공개번호 WO 2003/057822  
국제공개일자 2003년07월17일  
(30) 우선권주장  
60/344,767 2001년10월24일 미국(US)  
(56) 선행기술조사문헌  
US6172208 A\*  
US6218371 A\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
이데라 파마슈티칼즈, 인코포레이티드  
미국 매사추세츠 캠브리지 바싸르 스트리트 345  
(우 02139)  
(72) 발명자  
에그라왈, 수드히르  
미국01545매사추세츠슈루즈베리램플라이터드라이브61  
칸디탈라, 에캄바, 엠.  
미국01772매사추세츠사우스보로캔들우드레인6  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
남상선

전체 청구항 수 : 총 33 항

심사관 : 김정희

(54) 5' 말단의 최적 제공에 의한 올리고뉴클레오타이드-기초 화합물의 번역자극 특성의 조절

(57) 요약

본 발명은 번역요법 분야에서의 번역자극제로서의 올리고뉴클레오타이드의 치료적 용도에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 번역 반응을 발생하기 위한 방법 또는 번역자극이 필요한 환자를 치료하기 위한 방법에 사용되는 이뮤노머를 제공한다. 본 발명의 이뮤노머는 3' 말단, 뉴클레오시드간 연결부 또는 작용기화된 뉴클레오타이드 또는 당에서 비-뉴클레오타이드 링커에 연결된 2개 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하며, 이러한 올리고뉴클레오타이드중 하나 이상은 번역자극성 올리고뉴클레오타이드이고 접근가능한 5' 말단을 가지고 있다.

(72) 발명자

유, 동

미국01581매사추세츠웨스트보로인디안폰드로드25

바가트, 라크쉬미

미국02446

매사추세츠브록라인페어뱅크스스트리트17에이아  
파트먼트3

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

3' 말단, 뉴클레오시드간 연결부, 작용기화된 뉴클레오염기 또는 당에서 비-뉴클레오티드 링커에 연결된 2개 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 이류노머로서, 상기 올리고뉴클레오티드 중 하나 이상이 접근가능한 5' 말단을 지니며, CpG, C<sup>\*</sup>pG, CpG<sup>\*</sup>, 및 C<sup>\*</sup>pG<sup>\*</sup>(여기서 C는 시티딘 또는 2'-데옥시시티딘이고, C<sup>\*</sup>은 2'-데옥시티미딘, 아라비노시티딘, 2'-데옥시-2'-치환된 아라비노시티딘, 2'-0-치환된 아라비노시티딘, 2'-데옥시-5-히드록시시티딘, 2'-데옥시-N4-알킬-시티딘, 2'-데옥시-4-티오우리딘 또는 그 밖의 비-천연 피리미딘 뉴클레오시드이고, G는 구아노신 또는 2'-데옥시구아노신이고, G<sup>\*</sup>은 2'-데옥시-7-테아자구아노신, 2'-데옥시-6-티오구아노신, 아라비노구아노신, 2'-데옥시-2' 치환된-아라비노구아노신, 2'-0-치환된-아라비노구아노신, 또는 그 밖의 비-천연 퓨린 뉴클레오시드이고, p는 포스포디에스테르, 포스포로티오에이트, 및 포스포로디티오에이트로 이루어진 군에서 선택된 뉴클레오시드간 연결임을 특징으로 함)로 이루어진 군에서 선택된 번역자극성 디뉴클레오티드를 포함하는, 번역자극성 올리고뉴클레오티드인 이류노머.

### 청구항 2

삭제

### 청구항 3

제 1항에 있어서, 올리고뉴클레오티드중 하나 이상이 하기 구조식 (III)을 지님을 특징으로 하는 이류노머:



상기 식에서,

Y는 시티딘, 2' 데옥시시티딘 아라비노시티딘, 2'-데옥시티미딘, 2'-데옥시-2'-치환된 아라비노시티딘, 2'-0-치환된 아라비노시티딘, 2'-데옥시-5-히드록시시티딘, 2'-데옥시-N4-알킬-시티딘, 2'-데옥시-4-티오우리딘 또는 그 밖의 비-천연 피리미딘 뉴클레오시드이고;

Z는 구아노신, 2'-데옥시구아노신, 2'-데옥시-7-테아자구아노신, 2'-데옥시-6-티오구아노신, 아라비노구아노신, 2'-데옥시-2' 치환된-아라비노구아노신, 2'-0-치환된-아라비노구아노신, 2' 데옥시이노신, 또는 그 밖의 비-천연 퓨린 뉴클레오시드이고;

N1은 각각 천연 또는 합성 뉴클레오시드, 또는 비염기성(abasic) 뉴클레오시드, 아라비노뉴클레오시드, 2'-데옥시우리딘, α-데옥시리보뉴클레오시드, β-L-데옥시리보뉴클레오시드, 및 포스포디에스테르 또는 변형된 뉴클레오시드간 연결에 의해 인접한 뉴클레오시드에 3' 쪽에서 연결된 뉴클레오시드로 이루어지는 군으로부터 선택된 번역자극성 부분이며, 여기서 변형된 뉴클레오시드간 연결은 2 Å 내지 200 Å의 길이를 가지는 링커, C2-C18 알킬 링커, 폴리(에틸렌 글리콜) 링커, 2-아미노부틸-1,3-프로판디올 링커, 글리세릴 링커, 2'-5' 뉴클레오시드간 연결, 및 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 또는 메틸포스포네이트 뉴클레오시드간 연결로부터 선택되지만 이들에 제한되지 않고;

Nn은 각각 천연 뉴클레오시드, 또는 비염기성 뉴클레오시드, 아라비노뉴클레오시드, 2'-데옥시우리딘, α-데옥시리보뉴클레오시드, 2'-0-치환된 또는 2'-치환된 리보뉴클레오시드, 및 변형된 뉴클레오시드간 연결에 의해 인접한 뉴클레오시드에 3' 쪽에서 연결된 뉴클레오시드로 이루어지는 군으로부터 선택된 번역자극성 부분이며, 변형된 뉴클레오시드간 연결은 아미노 링커, 2'-5' 뉴클레오시드간 연결, 및 메틸포스포네이트 뉴클레오시드간 연결로 이루어지는 군으로부터 선택되고;

n은 0 내지 30의 수임을 특징으로 하는 이류노머.

### 청구항 4

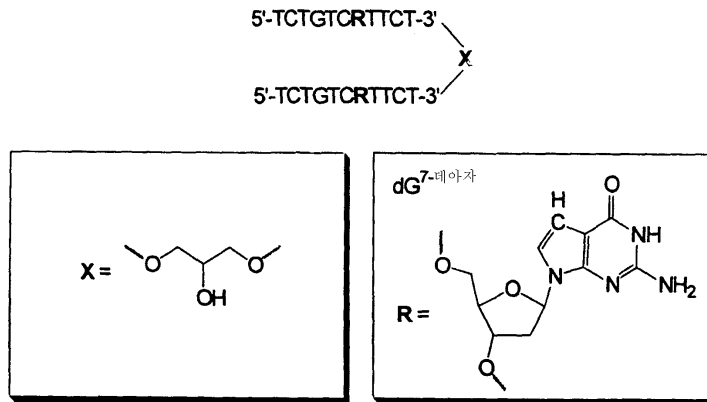
제 1항에 있어서, 인접한 뉴클레오티드 사이의 뉴클레오티드간 연결이 포스포로티오에이트 연결을 포함함을 특징으로 하는 이류노머.

### 청구항 5

제 1항에 있어서, G\*가 2'-데옥시-7-테아자구아노신임을 특징으로 하는 이뮤노머.

#### 청구항 6

제 1항에 있어서, 하기 구조식을 지님을 특징으로 하는 이뮤노머:



#### 청구항 7

제 1항에 있어서, 이뮤노머가 유전자에 상보적인 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함함을 특징으로 하는 이뮤노머.

#### 청구항 8

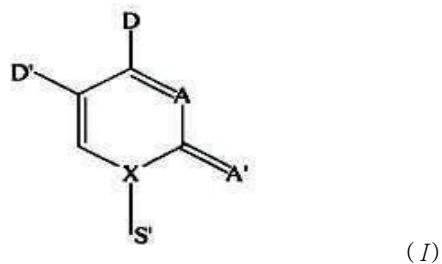
제 1항에 있어서, 이뮤노머가 하나 이상의 리보자임 또는 유인(decoy) 올리고뉴클레오타이드를 포함함을 특징으로 하는 이뮤노머.

#### 청구항 9

제 1항에 있어서, 이뮤노머가 G4 테트라뉴클레오타이드를 포함하는 하나 이상의 Nn 부분을 포함함을 특징으로 하는 이뮤노머.

#### 청구항 10

제 1항에 있어서, 비-천연 피리미딘이 하기 구조식 (I)을 지님을 특징으로 하는 이뮤노머:



상기 식에서,

D는 수소 결합 공여체이고;

D'은 수소, 수소 결합 공여체, 수소 결합 수용체, 친수성 기, 소수성 기, 전자 끌개기 및 전자 주개기로 이루어지고, 브롬이 제외되는 군으로부터 선택되고;

A는 수소 결합 수용체 또는 친수성 기이고;

A'은 수소 결합 수용체, 친수성 기, 소수성 기, 전자 끌개기 및 전자 주개기로 이루어지는 군으로부터 선택되고;

X는 탄소 또는 질소이고;

S'은 펜토스 또는 헥소스 당 고리, 또는 비-천연 당이다.

#### 청구항 11

제 10항에 있어서, 당 고리가 포스페이트 부분, 변형된 포스페이트 부분, 또는 피리미딘 뉴클레오시드를 또 다른 뉴클레오시드 또는 뉴클레오시드 유사체에 연결시키기 위한 그 밖의 비-뉴클레오티드 링커 부분으로 유도체 화됨을 특징으로 하는 이류노며.

#### 청구항 12

제 10항에 있어서, 수소 결합 공여체가 -NH-, -NH<sub>2</sub>, -SH 및 -OH로 이루어지는 군으로부터 선택됨을 특징으로 하는 이류노며.

#### 청구항 13

제 10항에 있어서, 수소 결합 수용체가 C=O, C=S, 및 방향족 헤테로사이클의 고리 질소 원자로 이루어지는 군으로부터 선택됨을 특징으로 하는 이류노며.

#### 청구항 14

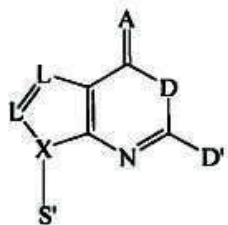
제 10항에 있어서, 비-천연 피리미딘 염기가 5-히드록시시토신, 5-히드록시메틸시토신, N4-알킬시토신, N4-에틸시토신, 및 4-티오우라실로 이루어지는 군으로부터 선택됨을 특징으로 하는 이류노며.

#### 청구항 15

제 10항에 있어서, 비-천연 당이 아라비노스 및 아라비노스 유사체로부터 선택됨을 특징으로 하는 이류노며.

#### 청구항 16

제 1항에 있어서, 퓨린 뉴클레오시드가 하기 구조식 (II)을 지님을 특징으로 하는 이류노며:



(II)

상기 식에서,

D는 수소 결합 공여체이고;

D'은 수소, 수소 결합 공여체, 및 친수성 기로 이루어지는 군으로부터 선택되고;

A는 수소 결합 수용체 또는 친수성 기이고;

X는 탄소 또는 질소이고;

각각의 L은 독립적으로 C, O, N, 및 S로 이루어지는 군으로부터 선택되고;

S'은 펜토스 또는 헥소스 당 고리, 또는 비-천연 당이다.

#### 청구항 17

제 16항에 있어서, 당 고리가 포스페이트 부분, 변형된 포스페이트 부분, 또는 피리미딘 뉴클레오시드를 또 다른 뉴클레오시드 또는 뉴클레오시드 유사체에 연결시키기 위한 그 밖의 링커 부분으로 유도체화됨을 특징으로 하는 이류노며.

#### 청구항 18

제 16항에 있어서, 수소 결합 공여체가 -NH-, -NH<sub>2</sub>, -SH 및 -OH로 이루어지는 군으로부터 선택됨을 특징으로 하는 이뮤노머.

#### 청구항 19

제 16항에 있어서, 수소 결합 수용체가 C=O, C=S, -N= 및 방향족 헤테로사이클의 고리 질소 원자로 이루어지는 군으로부터 선택됨을 특징으로 하는 이뮤노머.

#### 청구항 20

제 16항에 있어서, 비-천연 푸린이 6-티오구아닌 또는 7-테아자구아닌임을 특징으로 하는 이뮤노머.

#### 청구항 21

제 1항에 있어서, 비-뉴클레오타이드 링커가 2 Å 내지 200 Å의 길이를 가지는 링커, 금속, 가용성 또는 불용성 생분해성 중합체 비드, 올리고뉴클레오타이드의 3'-말단 뉴클레오타이드에 부착되는 것을 가능하게 하는 작용기를 지닌 유기 부분, 생체 분자, 고리형 또는 비고리형 작은 분자, 지방족 또는 방향족 탄화수소, 아미노산, 탄수화물, 시클로덱스트린, 아다만탄, 콜레스테롤, 합텐, 항생물질, 글리세롤, 또는 화학식 HO-(CH<sub>2</sub>)<sub>o</sub>-CH(OH)-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-OH의 글리세롤 유사체 (o 및 p는 독립적으로 1 내지 6의 정수임), 및 1,3-디아미노-2-히드록시프로판의 유도체로 이루어지는 군으로부터 선택되며, 상기 지방족 또는 방향족 탄화수소중 어느 하나는 올리고뉴클레오타이드를 연결시키거나 올리고뉴클레오타이드에 부착되는 선형 사슬에 히드록시, 아미노, 티올, 티오에테르, 에테르, 아미드, 티오아미드, 에스테르, 우레아, 및 티오우레아로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 작용기를 포함할 수 있음을 특징으로 하는 이뮤노머.

#### 청구항 22

제 1항에 있어서, 뉴클레오타이드간 연결이 필수적으로 포스포디에스테르 연결로 구성됨을 특징으로 하는 이뮤노머.

#### 청구항 23

제 1항에 따른 이뮤노머 및 접근가능한 5' 말단 이외의 위치에서 이뮤노머에 컨쥬게이션되는 항원을 포함하는 이뮤노머 컨쥬게이트.

#### 청구항 24

제 1항에 있어서, C\*가 아라비노시토신 또는 2'-데옥시-2'-치환된 아라비노시토신이고, G\*가 아라비노구아노신 또는 2'-데옥시-2'-치환된 아라비노구아노신, 2'-데옥시-7-테아자구아노신, 2'-데옥시-6-티오구아노신, 또는 2'-데옥시이노신임을 특징으로 하는 이뮤노머.

#### 청구항 25

제 1항에 따른 이뮤노머 및 생리적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 제형.

#### 청구항 26

제 1항에 있어서, 뉴클레오타이드간 연결이 포스포로티오에이트 연결을 포함함을 특징으로 하는 이뮤노머.

#### 청구항 27

제 1항에 있어서, 뉴클레오타이드간 연결이 필수적으로 포스포로티오에이트 연결로 구성됨을 특징으로 하는 이뮤노머.

#### 청구항 28

제 25항에 있어서, 백신을 추가로 포함함을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

#### 청구항 29

제 6항에 따른 이뮤노머 및 생리학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 제형.

#### 청구항 30

제 23항에 따른 이뮤노머 및 생리학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 제형.

#### 청구항 31

제 1항에 있어서, 상기 뉴클레오타이드 연결부가 포스포로티오에이트 연결을 포함하는 것을 특징으로 하는 이뮤노머.

#### 청구항 32

제 1항에 있어서, 상기 뉴클레오타이드 연결부가 포스포로티오에이트 연결로 이루어짐을 특징으로 하는 이뮤노머.

#### 청구항 33

제 1항에 따른 이뮤노머를 필수 성분으로 포함하는 면역자극제.

#### 청구항 34

제 1항에 따른 이뮤노머를 필수 성분으로 포함하는 애주번트(adjuvant).

#### 청구항 35

삭제

#### 청구항 36

삭제

### 명세서

#### 기술분야

[0001] 본 발명은 면역자극제로서 올리고뉴클레오타이드를 사용하는 면역학 및 면역요법 분야에 관한 것이다.

#### 배경기술

[0002] 올리고뉴클레오타이드는 진단용 프로브 방법으로부터 PCR에서 유전자 발현의 안티센스 억제 및 면역요법 분야에 이르기까지 광범위한 기법에 사용되는, 현대 분자 생물학에서는 없어서는 안되는 도구가 되어왔다. 올리고뉴클레오타이드의 이러한 광범위한 사용은 올리고뉴클레오타이드를 합성하는 신속하고 효과적이면서도 값싼 방법에 대한 요구가 증가하는 추세를 낳았다.

[0003] 안티센스 및 진단적 적용을 위한 올리고뉴클레오타이드의 합성은 현재 일상적으로 이루어질 수 있다 (*Methods in Molecular Biology*, Vol. 20: *Protocols for Oligonucleotides and Analogs* pp.165-189 (S. Agrawal, ed., Humana Press, 1993) ; *Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach*, pp.87-108 (F. Eckstein, ed., 1991); 및 Uhlmann & Peyman, supra; Agrawal and Iyer, *Curr. Op. in Biotech.* 6:12 (1995); 및 *Antisense Research and Applications* (Crooke and Lebleu, eds., CRC Press, Boca Raton, 1993)). 초기의 합성 방법은 포스포디에스테르 및 포스포트리에스테르 화학을 포함하였다. 예컨대 코라나 등은 올리고뉴클레오타이드 합성에 대한 포스포디에스테르 화학을 개시하였다 (Khorana et al., *J. Molec. Biol.* 72:209 (1972)). 리스는 문헌에서 올리고뉴클레오타이드 및 폴리뉴클레오타이드의 합성을 위한 포스포트리에스테르 화학을 개시하였다 (Reese, *Tetrahedron Lett.* 34:3143-3179 (1978)). 이들 초기 방법은 합성에 대한 보다 효율적인 포스포라미다이트 및 H-포스포네이트 방법에 대한 길을 대대적으로 열어주었다. 예를 들어 뷰케이지와 카루테르는 폴리뉴클레오타이드 합성에서 테옥시리보뉴클레오타이드 포스포라미다이트를 사용하는 것에 대해 개시하였다 (Beaucage and Caruthers, *Tetrahedron Lett.* 22:1859-1862 (1981)). 아그라월과 잠백닉은 미국 특허 제 5,149,798호 (1992)에서 H-포스포네이트 방법에 의한 올리고뉴클레오타이드의 최적화된 합성을 개시하였다. 이들 현대적인 방법 둘

모두는 다양한 변형된 뉴클레오타이드간 연결을 가지고 있는 올리고뉴클레오타이드를 합성하기 위해 사용되었다. 아그라월과 굿차일드는 포스포라미다이트 화학을 사용하는 올리고뉴클레오타이드 메틸포스포네이트의 합성을 문헌에서 교시하였다 (Agrawal and Goodchild, *Tetrahedron Lett.* 28:3539-3542 (1987)). 커널리 등은 포스포라미다이트 화학을 사용하는 올리고뉴클레오타이드 포스포로티오에이트의 합성을 개시하였다 (Connolly et al., *Biochem.* 23:3443 (1984)). 제이거 등은 포스포라미다이트 화학을 사용하는 올리고뉴클레오타이드 포스포라미데이트의 합성을 개시하였다 (Jager et al., *Biochem.* 27:7237 (1988)). 아그라월 등은 H-포스포네이트 화학을 사용하는 올리고뉴클레오타이드 포스포라미데이트 및 포스포로티오에이트의 합성을 개시하였다 (Agrawal et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 85:7079-7083 (1988)).

[0004] 보다 최근에 이르러, 여러 연구자들에 의해 면역요법 분야에서 면역자극제로서의 올리고뉴클레오타이드의 사용의 타당성이 입증되었다. 포스포디에스테르 및 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드가 면역 자극을 유도할 수 있다는 관찰은 이러한 부수 효과를 치료적 도구로서 개발하는 데에 있어서 관심을 불러 일으켰다. 이런 노력들은 디뉴클레오타이드 천연 CpG를 함유하고 있는 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드에 초점이 모아졌다. 구라모토 등은 CpG 디뉴클레오타이드를 포함하는 팔린드롬 (palindrome)을 함유하고 있는 포스포디에스테르 올리고뉴클레오타이드가 인터페론-알파 및 감마 합성을 유도하고 천연 킬러 활성을 증강시킬 수 있다고 교시하고 있다 (Kuramoto et al., *Jpn. J. Cancer Res.* 83:1128-1131 (1992)). 크리그 등은 포스포로티오에이트 CpG-함유 올리고뉴클레오타이드가 면역자극성이라는 것을 개시하였다 (Krieg et al., *Nature* 371:546-549 (1995)). 리양 등은 그러한 올리고뉴클레오타이드가 사람 B 세포를 활성화시킨다고 설명하였다 (Liang et al., *J. Clin. Invest.* 98:1119-1129 (1996)). 몰도베뉴 등은 CpG-함유 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드가 인플루엔자 바이러스에 대한 면역 반응을 증강시킨다고 교시하였다 (Moldoveanu et al., *Vaccine* 16:1216-124 (1998)). 맥클러스키와 데이비스는 CpG-함유 올리고뉴클레오타이드가 강력한 보조제로서 작용하여 B형 간염 표면 항원에 대한 면역 반응을 증강시킨다고 교시하였다 (McCluskie and Davis, *J. Immunol.* 161: 4463-4466 (1998)).

[0005] CpG-함유 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드의 다른 변형도 면역 반응의 조절제로서 작용하는 이들의 능력에 또한 영향을 줄 수 있다 (참조: Zhao et al., *Biochem. Pharmacol.* (1996) 51:173-182; Zhao et al., *Biochem Pharmacol.* (1996) 52:1537-1544; Zhao et al., *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* (1997) 7:495-502; Zhao et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (1999) 9:3453-3458; Zhao et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (2000) 10:1051-1054; Yu et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (2000) 10:2585-2588; Yu et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (2001) 11:2263-2267; 및 Kandimalla et al., *Bioorg. Med. Chem.* (2001) 9:807-813).

[0006] 이들 보고는 면역자극성 올리고뉴클레오타이드에 의해 야기된 면역 반응을 증강시킬 필요성이 있음을 명백히 보여준다.

[0007] 발명의 개요

[0008] 본 발명은 올리고뉴클레오타이드 화합물에 의해 유발되는 면역 반응을 증강시키는 방법을 제공한다. 본 발명에 따른 방법은 면역요법 적용을 위해 면역자극 올리고뉴클레오타이드의 면역자극 효과를 증가시킬 수 있다. 본 발명자들은 놀랍게도 면역자극 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단을 최적으로 제공하는 변형이 그 올리고뉴클레오타이드의 면역 자극 능력을 극적으로 증강시킨다는 것을 발견하였다. 그러한 올리고뉴클레오타이드를 본원에서는 "이뮤노머 (immunomer)" 로 언급한다.

[0009] 그러므로, 제 1 측면으로, 본 발명은 3' 말단, 뉴클레오타이드간 연결부, 또는 작용기화된 뉴클레오타이드 또는 당에서 비-뉴클레오타이드 링커를 통해 연결된 2개 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하며, 이러한 올리고뉴클레오타이드중 하나 이상이 면역자극성 올리고뉴클레오타이드이고 접근가능한 5' 말단을 지닌 이뮤노머를 제공한다.

[0010] 한 구체예에서 이뮤노머는 식 5'-Pyr-Pur-3'의 면역자극성 올리고뉴클레오타이드를 포함하는데, 상기 식에서 Pyr은 천연 또는 비-천연 피리미딘 뉴클레오시드이고, Pur은 천연 또는 비-천연 푸린 뉴클레오시드이다.

[0011] 또 다른 구체예에서 이뮤노머는 CpG, C<sup>\*</sup>pG, CpG<sup>\*</sup>, 및 C<sup>\*</sup>pG<sup>\*</sup>로 이루어지는 군으로부터 선택된 면역자극성 디뉴클레오타이드를 포함하는데, 여기서 C는 시티딘 또는 2'-데옥시시티딘이고, C<sup>\*</sup>은 2'-데옥시티미딘, 아라비노시티딘, 2'-데옥시-2'-치환된아라비노시티딘, 2'-0-치환된아라비노시티딘, 2'-데옥시-5-히드록시시티딘, 2'-데옥시-N4-알킬-시티딘, 2'-데옥시-4-티오우리딘 또는 그 밖의 비-천연 피리미딘 뉴클레오시드이며, G는 구아노신 또는 2'-데옥시구아노신이고, G<sup>\*</sup>은 2' 데옥시-7-데아자구아노신, 2'-데옥시-6-티오구아노신, 아라비노구아노신, 2'-데옥시-2' 치환된-아라비노구아노신, 2'-0-치환된-아라비노구아노신, 또는 그 밖의 비-천연 푸린 뉴클레오시드

이며, p는 포스포디에스테르, 포스포로티오에이트, 및 포스포로디티오에이트로 이루어지는 군으로부터 선택된 뉴클레오시드간 연결이다. 특정한 바람직한 구체예에서, 면역자극성 디뉴클레오티드는 CpG가 아니다.

[0012] 또 다른 구체예에서, 면역자극성 올리고뉴클레오티드는 하기 식 (III)의 면역자극성 도메인을 포함한다:

[0013] 
$$5'-N_n-N_1-Y-Z-N_1-N_n-3' \quad (III)$$

[0014] 상기 식에서,

[0015] Y는 시티딘, 2'-데옥시시티미딘, 2'-데옥시시티딘, 아라비노시티딘, 2'-데옥시시티미딘, 2'-데옥시-2'-치환된 아라비노시티딘, 2'-O-치환된 아라비노시티딘, 2'-데옥시-5-히드록시시티딘, 2'-데옥시-N4-알킬-시티딘, 2'-데옥시-4-티오우리딘 또는 그 밖의 비-천연 피리미딘 뉴클레오시드이고;

[0016] Z는 구아노신, 2'-데옥시구아노신, 2'-데옥시-7-데아자구아노신, 2'-데옥시-6-티오구아노신, 아라비노구아노신, 2'-데옥시-2' 치환된-아라비노구아노신, 2'-O-치환된-아라비노구아노신, 2'-데옥시이노신, 또는 그 밖의 비-천연 퓨린 뉴클레오시드이고;

[0017] N1은 각각 바람직하게는 천연 또는 합성 뉴클레오시드, 또는 비염기성(abasic) 뉴클레오시드, 아라비노뉴클레오시드, 2'-데옥시우리딘, α-데옥시리보뉴클레오시드, β-L-데옥시리보뉴클레오시드, 및 포스포디에스테르 또는 변형된 뉴클레오시드간 연결을 통해 인접한 뉴클레오시드에 3' 쪽으로 연결된 뉴클레오시드로 이루어지는 군으로부터 선택된 면역자극성 부분이며, 여기서 변형된 뉴클레오시드간 연결은, 제한없이, 약 2 Å 내지 약 200 Å의 길이를 가지는 링커, C2-C18 알킬 링커, 폴리(에틸렌 글리콜)링커, 2-아미노부틸-1,3-프로판디올 링커, 글리세릴 링커, 2'-5' 뉴클레오시드간 연결, 및 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 또는 메틸포스포네이트 뉴클레오시드간 연결로부터 선택되고;

[0018] Nn은 각각 천연 뉴클레오시드 또는 면역자극성 부분이며, 바람직하게는 비염기성 뉴클레오시드, 아라비노뉴클레오시드, 2'-데옥시우리딘, α-데옥시리보뉴클레오시드, 2'-O-치환된 리보뉴클레오시드, 및 변형된 뉴클레오시드간 연결을 통해 인접한 뉴클레오시드에 3' 쪽으로 연결된 뉴클레오시드로 이루어지는 군으로부터 선택되며, 여기서 변형된 뉴클레오시드간 연결은 아미노 링커, 2'-5' 뉴클레오시드간 연결, 및 메틸포스포네이트 뉴클레오시드간 연결로 이루어지는 군으로부터 선택되고;

[0019] 단, N1 또는 Nn 중 최소한 하나는 면역자극성 부분이며;

[0020] n은 0 내지 30의 수이고;

[0021] 3' 말단, 뉴클레오티드간 연결부, 또는 작용기화된 뉴클레오티드 또는 당은 면역자극성일 수도 있고 그렇지 않을 수도 있는 또 다른 올리고뉴클레오티드 직접 연결되거나 비-뉴클레오티드 링커를 통해 연결된다.

[0022] 제 2의 측면으로, 본 발명은 상기 설명된 이뮤노머 및 접근가능한 5' 말단 외의 위치에서 이뮤노머에 컨쥬게이션된 항원을 포함하는 이뮤노머 컨쥬게이트를 제공한다.

[0023] 제 3 측면으로 본 발명은 본 발명에 따른 이뮤노머 또는 이뮤노머 컨쥬게이트 및 생리적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 제형을 제공한다.

[0024] 제 4 측면으로, 본 발명은 본 발명에 따른 이뮤노머 또는 이뮤노머 컨쥬게이트를 척추동물에게 투여하는 것을 포함하여 척추동물에게서 면역 반응을 생성하기 위한 방법을 제공한다. 몇몇 구체예에서, 척추동물은 포유류이다.

[0025] 제 5 측면으로, 본 발명은 본 발명에 따른 이뮤노머 또는 이뮤노머 컨쥬게이트를 환자에게 투여하는 것을 포함하여 질병 또는 장애에 걸린 환자를 치료적으로 처리하는 방법을 제공한다. 다양한 구체예에서, 치료될 질병 또는 장애는 암, 자가면역 질병, 기도 염증, 천식, 알레르기, 또는 병원체에 의해 유발되는 질병이다.

### 발명의 상세한 설명

[0056] 본 발명은 면역요법 적용을 위한 면역자극제로서의 올리고뉴클레오티드의 치료적 용도에 관한 것이다. 본원에서 인용되는 공개 특허, 특허 출원 및 참고문헌들은 본원에 참고로 삽입된다. 본원에서 인용된 참고문헌이 교시하는 것과 본 발명의 상세한 설명이 일치하지 않는 경우, 본 발명의 목적상, 본 발명의 상세한 설명이 우선한다.

[0057] 본 발명은 면역요법 분야, 예컨대, 그것들에 한정되는 것은 아니지만 성인 및 소아 및 수의학 분야에서의 암, 자가면역 질병, 천식, 호흡기 알레르기, 음식 알레르기, 및 세균, 기생충, 및 바이러스 감염의 치료에 사용되는

면역자극성 화합물에 의해 유발된 면역 반응을 증강시키는 방법을 제공한다. 그러므로, 본 발명은 또한 면역요법을 위한 최적 수준의 면역자극성 효과를 가지는 화합물 및 이러한 화합물의 제조하고 사용하는 방법을 제공한다. 또한, 본 발명의 이뮤노머는 DNA 백신, 항체, 알레르겐, 화학요법제, 및 안티센스 올리고뉴클레오타이드와 함께 사용되는 보조제(adjuvant)로서 유용하다.

[0058] 본 발명자들은 놀랍게도 면역자극성 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단을 최적으로 제공하는 변형이 그 올리고뉴클레오타이드의 면역자극성 능력에 극적으로 영향을 준다는 것을 발견하였다. 그러한 올리고뉴클레오타이드를 본원에서 "이뮤노머"로 언급한다.

[0059] 제 1 측면으로, 본 발명은 3' 말단, 또는 뉴클레오시드간 연결부 또는 작용기화된 뉴클레오타이드 또는 당에서 비-뉴클레오타이드 링커에 연결된 2개 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하며, 이러한 올리고뉴클레오타이드중 하나는 면역자극성 올리고뉴클레오타이드이고 접근가능한 5' 말단을 지닌 이뮤노머를 제공한다. 본원에서 사용되는 용어 "접근가능한 5' 말단"이란 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단이 이뮤노머를 인지하고 이것에 결합하여 면역계를 자극하는 인자들이 이것에 접근하도록 충분히 접근가능함을 의미한다. 접근가능한 5' 말단을 가지고 있는 올리고뉴클레오타이드에서, 말단 당의 5' OH 위치는 2개 이상의 뉴클레오시드 잔기에 공유결합되지 않는다. 임의로, 5' OH는 포스페이트, 포스포로티오에이트, 또는 포스포로디티오에이트 부분, 방향족 또는 지방족 링커, 콜레스테롤, 또는 접근성을 방해하지 않는 또 다른 물질에 연결될 수 있다.

[0060] 본 발명의 목적상, "이뮤노머"는 3' 말단, 또는 뉴클레오시드간 연결부 또는 작용기화된 뉴클레오타이드 또는 당에서 직접 또는 비-뉴클레오타이드 링커를 통해 연결된 2개 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하며, 이러한 올리고뉴클레오타이드 (이뮤노머와 관련하여)중 하나 이상이 면역자극성 올리고뉴클레오타이드이고 접근가능한 5' 말단을 가지는 임의의 화합물을 의미하는데, 이 화합물은 척추동물에 투여될 때 면역 반응을 유도한다. 어떤 구체예에서 척추동물은 사람을 포함한 포유류이다.

[0061] 어떤 구체예에서, 이뮤노머는 동일하거나 상이한 둘 이상의 면역자극성 올리고뉴클레오타이드 (이뮤노머와 관련하여)를 포함한다. 바람직하게는, 각각의 그러한 면역자극성 올리고뉴클레오타이드는 하나 이상의 접근가능한 5' 말단을 갖는다.

[0062] 특정 구체예에 있어서, 면역자극성 올리고뉴클레오타이드(들) 이외에, 이뮤노머는 또한 유전자에 상보적인 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 본원에서 사용되는 용어 "상보적인"은 생리적 조건하에서 유전자 영역에 하이브리드화하는 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 어떤 구체예에서, 올리고뉴클레오타이드는 유전자의 발현을 하향조절한다. 그러한 하향조절성 올리고뉴클레오타이드는 바람직하게는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 리보자임 올리고뉴클레오타이드, 작은 억제성 RNA 및 유인(decoy) 올리고뉴클레오타이드로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 본원에서 사용되는 용어 "유전자를 하향조절한다"는 것은 유전자의 전사 또는 유전자 생성물의 번역을 억제하는 것을 의미한다. 그러므로 본 발명의 이들 구체예에 따른 이뮤노머는 면역계를 여전히 자극하면서도 하나 이상의 특이한 질병 표적을 표적화하는 데 사용될 수 있다.

[0063] 특정 구체예에서, 이뮤노머는 리보자임 또는 유인 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 본원에서 사용되는 용어 "리보자임"은 촉매적 활성을 가지고 있는 올리고뉴클레오타이드를 말한다. 바람직하게는 리보자임은 특이한 핵산 표적에 결합하여 그 표적을 절단한다. 본원에서 사용되는 용어 "유인 올리고뉴클레오타이드"는 서열-특이적인 방식으로 전사 인자에 결합하여 전사 활성을 정지시키는 올리고뉴클레오타이드를 말한다. 바람직하게는 리보자임 또는 유인 올리고뉴클레오타이드는 제한없이, 스템-루프 또는 헤어핀 구조를 포함하는 2차 구조를 나타낸다. 어떤 구체예에서 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드는 폴리(I)-폴리(dC)를 포함한다. 특정 구체예에서는 하나 이상의 Nn 세트가 3 내지 10개의 dG 및/또는 G 또는 2'-치환된 리보 또는 아라비노 G로 된 스트링(string)을 포함한다.

[0064] 본 발명의 목적상, 용어 "올리고뉴클레오타이드"는 다수의 연결된 뉴클레오시드 단위로부터 형성된 폴리뉴클레오시드를 말한다. 그러한 올리고뉴클레오타이드는 게놈 또는 cDNA를 포함하는 기존의 핵산 공급원으로부터 얻어질 수 있지만, 바람직하게는 합성 방법에 의해 제조된다. 바람직한 구체예에서 각 뉴클레오시드 유닛은 헤테로시클릭 염기 및 펜토푸라노실, 트레할로스, 아라비노스, 2'-데옥시-2'-치환된아라비노스, 2'-O-치환된 아라비노스 또는 핵소스 당 기를 포함한다. 뉴클레오시드 잔기는 공지된 수많은 뉴클레오시드간 연결중 어느 하나에 의해 상호간에 결합될 수 있다. 그러한 뉴클레오시드간 연결로는 제한없이 포스포디에스테르, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 알킬포스포네이트, 알킬포스포노티오에이트, 포스포트리에스테르, 포스포라미데이트, 실록산, 카보네이트, 카르보알콕시, 아세트아미데이트, 카바메이트, 모르폴리노, 보라노, 티오에테르, 가교된 포스포라미데이트, 가교된 메틸렌 포스포네이트, 가교된 포스포로티오에이트, 및 술폰 뉴클레오시드간 연결이 있다. 용어 "올리고뉴클레오타이드"는 또한 하나 이상의 입체 특이적 뉴클레오시드간 연결 (예컨대 (Rp)- 또는

(Sp)-포스포로티오에이트, 알킬포스포네이트, 또는 포스포트리에스테르 연결)을 가지고 있는 폴리뉴클레오시드를 포함한다. 본원에서 사용되는 용어 "올리고뉴클레오티드" 및 "디뉴클레오티드"는 연결이 포스페이티기를 포함하고 있는 연결이든 또는 그렇지 않든간에 그러한 임의의 뉴클레오시드간 연결을 가지고 있는 폴리뉴클레오시드 및 디뉴클레오시드를 포함하는 것으로 명백하게 의도된다. 어떤 바람직한 구체예에서 이들 뉴클레오시드간 연결은 포스포디에스테르, 포스포로티오에이트, 또는 포스포로디티오에이트 연결, 또는 이들의 조합일 수 있다.

[0065] 어떤 구체예에서, 각각의 올리고뉴클레오티드는 약 3 내지 약 35 개의 뉴클레오시드 잔기, 바람직하게는 약 4 내지 약 30 개의 뉴클레오시드 잔기, 보다 바람직하게는 약 4 내지 약 20 개의 뉴클레오시드 잔기를 가진다. 어떤 구체예에서 올리고뉴클레오티드는 약 5 내지 약 18 개, 또는 약 5 내지 약 14 개의 뉴클레오시드 잔기를 가진다. 본원에서 사용되는 용어 "약"은 정확한 수가 결정적이지 않다는 의미를 함축한다. 그러므로 올리고뉴클레오티드에서 뉴클레오시드 잔기의 수는 중요하지 않으며, 하나 또는 2개 더 적은 뉴클레오시드 잔기, 또는 하나 내지 여러 개의 추가의 뉴클레오시드 잔기를 가지고 있는 올리고뉴클레오티드도 상술된 구체예의 각각의 균등물로서 포함된다. 어떤 구체예에서는 하나 이상의 올리고뉴클레오티드가 11개의 뉴클레오티드를 가진다.

[0066] 용어 "올리고뉴클레오티드"는 또한 제한없이, 단백질 기, 친유성 기, 인터칼레이팅 제제, 디아민, 폴산, 콜레스테롤 및 아다만탄을 포함하는 추가의 치환체를 가지는 폴리뉴클레오시드를 포함한다. 용어 "올리고뉴클레오티드"는 또한 중합체를 함유하고 있는 어떠한 다른 뉴클레오염기를 포함하며, 이들로는 제한없이 펩티드 핵산 (PNA), 포스페이티기를 가지고 있는 펩티드 핵산 (PHONA), 록킹 (locking)된 핵산 (LNA), 모르폴리노-골격 올리고뉴클레오티드, 및 알킬 링커 또는 아미노 링커가 있는 골격 부분을 가지고 있는 올리고뉴클레오티드가 있다.

[0067] 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 천연 뉴클레오시드, 변형된 뉴클레오시드, 또는 이들의 혼합물을 포함한다. 본원에서 사용되는 용어 "변형된 뉴클레오시드"는 변형된 헤테로시클릭 염기, 변형된 당 부분, 또는 이들의 조합물을 포함하는 뉴클레오시드이다. 어떤 구체예에서 변형된 뉴클레오시드는 본원에서 설명되는 바와 같이 비-천연 피리미딘 또는 퓨린 뉴클레오시드이다. 어떤 구체예에서, 변형된 뉴클레오시드는 2'-치환된 리보뉴클레오시드, 아라비노뉴클레오시드 또는 2'-데옥시-2'-플루오로아라비노시드이다.

[0068] 본 발명의 목적상, 용어 "2'-치환된 리보뉴클레오시드"는 펜토스 부분의 2' 위치에 있는 히드록실기가 치환되어 2'-O-치환된 리보뉴클레오시드를 생성하게 되는 리보노클레오시드를 포함한다. 바람직하게 그러한 치환은 1 내지 6개의 포화 또는 불포화 탄소 원자를 함유하고 있는 저급 알킬기, 또는 6 내지 10개의 탄소 원자를 가지고 있는 아릴기로 이루어지며, 그러한 알킬, 또는 아릴기는 치환되지 않을 수 있거나 예컨대 할로, 히드록시, 트리플루오로메틸, 시아노, 니트로, 아실, 아실옥시, 알콕시, 카르복실, 카르보알콕시, 또는 아미노기로 치환될 수 있다. 그러한 2'-O-치환된 리보뉴클레오시드의 예로는 제한 없이 2'-O-메틸리보뉴클레오시드 및 2'-O-메톡시에틸리보뉴클레오시드가 있다.

[0069] 용어 "2'-치환된 리보뉴클레오시드"는 또한 2'-히드록실기가 1 내지 6개의 포화 또는 불포화 탄소 원자를 함유하고 있는 저급 알킬기, 또는 아미노 또는 할로기로 치환된 리보뉴클레오시드를 포함한다. 그러한 2'-치환된 리보뉴클레오시드의 예로는 제한 없이 2'-아미노, 2'-플루오로, 2'-알릴, 및 2'-프로파르길 리보뉴클레오시드가 있다.

[0070] 용어 "올리고뉴클레오티드"는 하이브리드 및 키메라 올리고뉴클레오티드를 포함한다. "키메라 올리고뉴클레오티드"는 한가지 이상의 유형의 뉴클레오시드간 연결을 가지고 있는 올리고뉴클레오티드이다. 그러한 키메라 올리고뉴클레오티드의 바람직한 한가지 예는 포스포로티오에이트, 포스포디에스테르 또는 포스포로디티오에이트 영역 및 비-이온성 연결, 예컨대 알킬포스포네이트 또는 알킬포스포노티오에이트 연결을 포함하는 키메라 올리고뉴클레오티드이다 (참조: Pederson et al., 미국 특허 제 5,635,377호 및 5,366,878호).

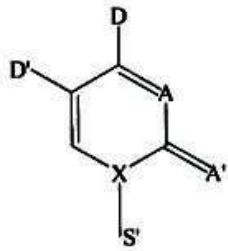
[0071] "하이브리드 올리고뉴클레오티드"는 한가지 이상의 유형의 뉴클레오시드를 가지고 있는 올리고뉴클레오티드이다. 그러한 하이브리드 올리고뉴클레오티드의 바람직한 한 가지 예는 리보뉴클레오티드 또는 2'-치환된 리보뉴클레오티드 영역, 및 데옥시리보뉴클레오티드 영역을 포함한다 (참조: Meteleev 및 Agrawal, 미국 특허 제 5,652,355호, 6,346,614호 및 6,143,881호).

[0072] 본 발명의 목적상, 용어 "면역자극성 올리고뉴클레오티드"는 상술된 바와 같이 척추동물, 예컨대 어류, 가금류, 또는 포유류에 투여되었을 때 면역 반응을 유도하는 올리고뉴클레오티드를 말한다. 본원에서 사용되는 용어 "포유류"는 제한 없이 래트, 마우스, 개, 고양이, 말, 소, 젖소, 돼지, 토끼, 사람 이외의 영장류, 및 사람을 포함한다. 유용한 면역자극성 올리고뉴클레오티드는 문헌에 설명되어 있다 (Agrawal et al., WO 98/49288, 1998).

11. 5. 공개; WO 01/12804, 2001. 2. 22. 공개; WO 01/55370, 2001. 8. 2. 공개; PCT/US01/13682, 2001. 4. 30. 출원; 및 PCT/US01/30137, 2001. 9. 26. 출원). 바람직하게는, 번역자극성 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 포스포디에스테르, 포스포로티오에이트, 또는 포스포로디티오에이트 뉴클레오시드간 연결을 포함한다.

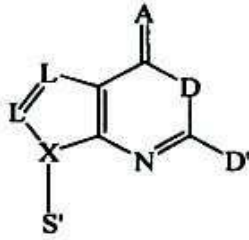
[0073] 어떤 구체예에서 번역자극성 올리고뉴클레오티드는 식 5'-Pyr-Pur-3'의 번역자극성 디뉴클레오티드를 포함하는데, 식에서 Pyr은 천연 또는 합성 피리미딘 뉴클레오시드이고 Pur은 천연 또는 합성 푸린 뉴클레오시드이다. 본원에서 사용되는 용어 "피리미딘 뉴클레오시드"는 뉴클레오시드의 염기 성분이 피리미딘 염기인 뉴클레오시드를 말한다. 마찬가지로 용어 "푸린 뉴클레오시드"는 뉴클레오시드의 염기 성분이 푸린 염기인 뉴클레오시드를 말한다. 본 발명의 목적상, "합성" 피리미딘 또는 푸린 뉴클레오시드는 비-천연 피리미딘 또는 푸린 염기, 비-천연 당 부분, 또는 이들의 조합물을 포함한다.

[0074] 본 발명에 따른 바람직한 피리미딘 뉴클레오시드는 다음의 구조식 (I)을 갖는다:



(I)

- [0075] 상기 식에서,
- [0076] D는 수소 결합 공여체이고;
- [0077] D'은 수소, 수소 결합 공여체, 수소 결합 수용체, 친수성 기, 소수성 기, 전자 끌개기 및 전자 주개기로 이루어지는 군으로부터 선택되며;
- [0079] A는 수소 결합 수용체 또는 친수성 기이고;
- [0080] A'는 수소결합 수용체, 친수성 기, 소수성 기, 전자 끌개기 및 전자 주개기로 이루어지는 군으로부터 선택되고;
- [0081] X는 탄소 또는 질소이고;
- [0082] S'은 펜토스 또는 헥소스 당 고리, 또는 비-천연 당이다.
- [0083] 바람직하게는, 당 고리는 포스페이트 부분, 변형된 포스페이트 부분, 또는 피리미딘 뉴클레오시드를 다른 뉴클레오시드 또는 뉴클레오시드 유사체에 연결시키기에 적절한 다른 링커 부분으로 유도체화된다.
- [0084] 바람직한 수소 결합 공여체로는 제한 없이 -NH-, -NH<sub>2</sub>, -SH 및 -OH가 있다. 바람직한 수소 결합 수용체로는 제한 없이 C=O, C=S, 및 방향족 헤테로사이클의 고리 질소 원자, 예컨대 시토신의 N3가 있다.
- [0085] 어떤 구체예에서 (I)의 염기 부분은 비-천연 피리미딘 염기이다. 바람직한 비-천연 피리미딘 염기의 예로는, 제한 없이 5-히드록시시토신, 5-히드록시메틸시토신, N4-알킬시토신, 바람직하게는 N4-에틸시토신, 및 4-티오우라실이다. 그러나 어떤 구체예에서는 5-브로모시토신이 특별히 배제된다.
- [0086] 어떤 구체예에서 (I)의 당 부분 S'은 비-천연 당 부분이다. 본 발명의 목적상, "천연 당 부분"은 핵산의 일부로서 천연 당 부분, 예컨대 리보스 및 2'-데옥시리보스이고, "비-천연 당 부분"은 핵산의 일부로서 천연적으로 발생하지 않지만 올리고뉴클레오티드의 골격으로서 사용될 수 있는 임의의 당, 예컨대 헥소스이다. 아라비노스와 아라비노스 유도체가 바람직한 당 부분의 예이다.
- [0087] 본 발명에 따른 바람직한 푸린 뉴클레오시드 유사체는 다음 구조식 (II)를 갖는다:



(II)

- [0088] 상기 식에서,
- [0089] D는 수소 결합 공여체이고;
- [0090] D'은 수소, 수소 결합 공여체, 및 친수성 기로 이루어지는 군으로부터 선택되고;
- [0091] A는 수소 결합 수용체 또는 친수성 기이고;
- [0092] X는 탄소 또는 질소이며;
- [0093] 각각의 L은 독립적으로 C, O, N, 및 S로 이루어지는 군으로부터 선택되고;
- [0094] S'은 펜토스 또는 헥소스 당 고리, 또는 비-천연 당이다.
- [0095] 바람직하게는, 당 고리는 포스페이트 부분, 변형된 포스페이트 부분, 또는 피리미딘 뉴클레오시드를 다른 뉴클레오시드 또는 뉴클레오시드 유사체에 연결시키기에 적절한 다른 링커 부분으로 유도체화된다.
- [0096] 바람직한 수소 결합 공여체로는 제한 없이 -NH-, -NH<sub>2</sub>, -SH 및 -OH가 있다. 바람직한 수소 결합 수용체로는 제한 없이 C=O, C=S, -NO<sub>2</sub> 및 방향족 헤테로사이클의 고리 질소 원자, 예컨대 구아닌의 N1이 있다.
- [0097] 어떤 구체예에서 (II)의 염기 부분은 비-천연 푸린 염기이다. 바람직한 비-천연 푸린 염기의 예로는 제한 없이 6-티오구아닌 및 7-테아자구아닌이 있다. 어떤 구체예에서, (II)의 당 부분 S'은 상기 구조식 (I)에 대하여 설명된 것과 같이 천연 당 부분이다.
- [0098] 바람직한 구체예에서, 번역자극성 디뉴클레오티드는 CpG, C<sup>\*</sup>pG, CpG<sup>\*</sup>, 및 C<sup>\*</sup>pG<sup>\*</sup>로 이루어지는 군으로부터 선택되며, 여기서 C는 시티딘 또는 2'-데옥시시티딘이고, C<sup>\*</sup>은 2'-데옥시티미딘, 아라비노시티딘, 2'-데옥시티미딘, 2'-데옥시-2'-치환된 아라비노시티딘, 2'-O-치환된 아라비노시티딘, 2'-데옥시-5-히드록시시티딘, 2'-데옥시-N4-알킬-시티딘, 2'-데옥시-4-티오우리딘 또는 그 밖의 비-천연 피리미딘 뉴클레오시드이며, G는 구아노신 또는 2'-데옥시구아노신이고, G<sup>\*</sup>은 2' 데옥시-7-테아자구아노신, 2'-데옥시-6-티오구아노신, 아라비노구아노신, 2'-데옥시-2' 치환된-아라비노구아노신, 2'-O-치환된-아라비노구아노신, 2'-데옥시이노신, 또는 그 밖의 비-천연 푸린 뉴클레오시드이며, p는 포스포디에스테르, 포스포로티오에이트, 및 포스포로디티오에이트로 이루어지는 군으로부터 선택된 뉴클레오시드간 연결이다. 어떤 바람직한 구체예에서, 번역자극성 디뉴클레오티드는 CpG가 아니다.
- [0099] 번역자극성 올리고뉴클레오티드는 번역자극성 디뉴클레오티드의 한 쪽 또는 양쪽에 번역자극성 부분을 포함할 수 있다. 그러므로, 어떤 구체예에서, 번역자극성 올리고뉴클레오티드는 다음 구조식 (III)의 번역자극성 도메인을 포함한다:
- [0100] 5'-Nn-N1-Y-Z-N1-Nn-3' (III)
- [0101] 상기 식에서,
- [0102] Y는 시티딘, 2'-데옥시티미딘, 2'-데옥시시티딘 아라비노시티딘, 2'-데옥시-2'-치환된 아라비노시티딘, 2'-데옥시티미딘, 2'-O-치환된 아라비노시티딘, 2'-데옥시-5-히드록시시티딘, 2'-데옥시-N4-알킬-시티딘, 2'-데옥시-4-티오우리딘 또는 그 밖의 비-천연 피리미딘 뉴클레오시드이고;
- [0103] Z는 구아노신, 2'-데옥시구아노신, 2' 데옥시-7-테아자구아노신, 2'-데옥시-6-티오구아노신, 아라비노구아노신, 2'-데옥시-2' 치환된-아라비노구아노신, 2'-O-치환된-아라비노구아노신, 2'-데옥시이노신, 또는 그 밖의 비-천연 푸린 뉴클레오시드이고;

- [0105] N1은 각각 바람직하게는 천연 또는 합성 뉴클레오시드, 또는 비염기성 뉴클레오시드, 아라비노뉴클레오시드, 2'-데옥시우리딘, α-데옥시리보뉴클레오시드, β-L-데옥시리보뉴클레오시드, 및 포스포디에스테르 또는 변형된 뉴클레오시드간 연결에 의해 인접한 뉴클레오시드에 3' 쪽으로 연결된 뉴클레오시드로 이루어지는 군으로부터 선택된 면역자극성 부분이며, 여기서 변형된 뉴클레오시드간 연결은, 제한없이, 약 2 Å 내지 약 200 Å의 길이를 가지는 링커, C2-C18 알킬 링커, 폴리(에틸렌 글리콜)링커, 2-아미노부틸-1,3-프로판디올 링커, 글리세릴 링커, 2'-5' 뉴클레오시드간 연결, 및 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 또는 메틸포스포네이트 뉴클레오시드간 연결로 이루어지는 군으로부터 선택되고;
- [0106] Nn은 각각 천연 뉴클레오시드 또는 면역자극성 부분이고, 바람직하게는 비염기성 뉴클레오시드, 아라비노뉴클레오시드, 2'-데옥시우리딘, α-데옥시리보뉴클레오시드, 2'-O-치환된 리보뉴클레오시드, 및 변형된 뉴클레오시드간 연결에 의해 인접한 뉴클레오시드에 3' 쪽으로 연결된 뉴클레오시드로 이루어지는 군으로부터 선택되며, 여기서 변형된 뉴클레오시드간 연결은 아미노 링커, 2'-5' 뉴클레오시드간 연결, 및 메틸포스포네이트 뉴클레오시드간 연결로 이루어지는 군으로부터 선택되고;
- [0107] 단, N1 또는 Nn 중 하나 이상은 면역자극성 부분이고;
- [0108] n은 0 내지 30의 수이고;
- [0109] 3' 말단, 뉴클레오시드간 연결부, 또는 유도체화된 뉴클레오염기 또는 당은 면역자극성일 수도 있고 그렇지 않을 수도 있는 또 다른 올리고뉴클레오타이드에 직접 연결되거나 비-뉴클레오타이드 링커를 통해 연결된다.
- [0110] 어떤 바람직한 구체예에서 YZ는 아라비노시티딘 또는 2'-데옥시-2'-치환된 아라비노시티딘 및 아라비노구아노신 또는 2'-데옥시-2'-치환된 아라비노구아노신이다. 바람직한 면역자극성 부분은 제한 없이 메틸포스포네이트, 메틸포스포로티오에이트, 포스포트리에스테르, 포스포티오텐트리에스테르, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 트리에스테르 전구약물, 술폰, 술폰아미드, 술폰메이트, 포름아세탈, N-메틸히드록실아민, 카보네이트, 카바메이트, 모르폴리노, 보라노포스포네이트, 포스포라미데이트, 특히 일차 아미노-포스포라미데이트, N3 포스포라미데이트 및 N5 포스포라미데이트, 및 입체 특이적 연결 (예컨대 (*Rp*)- 또는 (*Sp*)-포스포로티오에이트, 알킬 포스포네이트, 또는 포스포트리에스테르 연결)을 포함하는 포스페이트 골격의 변형을 포함한다.
- [0111] 본 발명에 따른 바람직한 면역자극성 부분은 또한 당 변형, 예컨대 제한 없이, 2'-치환된 펜토스 당, 예를 들면 그것들에 한정되는 것은 아니나 2'-O-메틸리보스, 2'-O-메톡시에틸리보스, 2'-O-프로파르길리보스, 및 2'-데옥시-2'-플루오로리보스; 3'-치환된 펜토스 당, 예를 들면, 그것에 한정되는 것은 아니나 3'-O-메틸리보스; 1',2'-디데옥시리보스; 아라비노스; 치환된 아라비노스 당, 예를 들면 그것들에 한정되는 것은 아니나 1'-메틸아라비노스, 3'-히드록시메틸아라비노스, 4'-히드록시메틸-아라비노스, 및 2'-치환된 아라비노스 당; 핵소스 당, 예를 들면 그것에 한정되는 것은 아니나 1,5-안히드로핵시톨; 및 알파-아노머를 가지고 있는 뉴클레오시드를 포함한다. 변형된 당이 3'-데옥시리보뉴클레오시드 또는 3'-O-치환된 리보뉴클레오시드인 구체예에서 면역자극성 부분은 2'-5' 뉴클레오시드간 연결에 의하여 인접한 뉴클레오시드에 부착된다.
- [0112] 본 발명에 따른 바람직한 면역자극성 부분은 추가로 그 밖의 탄수화물 골격 변형 및 치환, 예를 들면 펩티드 핵산 (PNA), 포스페이트 기를 가지고 있는 펩티드 핵산 (PHONA), 록킹된 핵산 (LNA)을 가지는 올리고뉴클레오타이드, 모르폴리노 골격 올리고뉴클레오타이드, 및 약 2 Å 내지 약 200 Å의 길이를 가지는 골격 링커 단편, 예컨대 그것에 한정되는 것은 아니지만 알킬 링커 또는 아미노 링커를 가지고 있는 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 알킬 링커는 분지된 또는 분지되지 않은, 치환된 또는 치환되지 않은, 그리고 키랄적으로 순수한 또는 라세미 화합물의 혼합물일 수 있다. 가장 바람직한 것은 그러한 알킬 링커가 약 2 내지 약 18개의 탄소 원자를 가지는 것이다. 어떤 바람직한 구체예에서 그러한 알킬 링커는 약 3 내지 약 9 개의 탄소 원자를 갖는다. 어떤 알킬 링커들은 히드록시, 아미노, 티올, 티오에테르, 에테르, 아미드, 티오아미드, 에스테르, 우레아, 및 티오에테르로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 작용기를 포함한다. 그러한 작용기화된 어떤 알킬 링커는 식 -O-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub> (n=1 내지 9)의 폴리(에틸렌 글리콜) 링커이다. 다른 작용기화된 알킬 링커는 펩티드 또는 아미노산이다.
- [0113] 본 발명에 따른 바람직한 면역자극성 부분은 추가로 DNA 이소폼 (isoform), 예컨대 제한없이 β-L-데옥시리보뉴클레오시드 및 α-데옥시리보뉴클레오시드를 포함한다. 본 발명에 따른 바람직한 면역자극성 부분은 3' 변형을 포함하며, 추가로 비천연 뉴클레오시드간 연결 위치, 예컨대 제한 없이 2'-5', 2'-2', 3'-3' 및 5'-5' 연결 위치를 가지는 뉴클레오시드를 포함한다.

[0114] 본 발명에 따른 바람직한 번역자극성 부분은 변형된 헤테로시클릭 염기, 예컨대 제한 없이 5-히드록시시토신, 5-히드록시메틸시토신, N4-알킬시토신, 바람직하게는 N4-에틸시토신, 4-티오우라실, 6-티오구아닌, 7-데아자구아닌, 이노신, 니트로피롤, C5-프로피닐피리미딘, 및 디아미노푸린, 예컨대 제한 없이 2,6-디아미노푸린을 가지는 뉴클레오시드를 추가로 포함한다.

[0115] 제한하는 것이 아닌 구체적인 예시로서, 예를 들면 구조식 (III)의 번역자극성 도메인에서 위치 N1 또는 Nn에 있는 메틸포스포네이트 뉴클레오시드간 연결이 약 2 Å 내지 약 200 Å의 길이를 가지는 링커인 번역자극성 부분이고, 위치 X1에 있는 C2-C18 알킬 링커가 번역자극성 부분이며, 위치 X1에 있는 β-L-데옥시리보뉴클레오시드가 번역자극성 부분이다. 하기 표 1에는 번역자극성 부분의 대표적인 위치와 구조가 제시되어 있다. 특정 위치에서의 번역자극성 부분으로서의 링커에 대한 언급은 그 위치에 있는 뉴클레오시드 잔기가 그것의 3'-히드록실에서 표시된 링커로 치환되고, 그로써 그 뉴클레오시드 잔기와 3' 쪽에 인접한 뉴클레오시드 사이에 변형된 뉴클레오시드간 연결이 생성되었음을 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 마찬가지로, 특정 위치에서의 번역자극성 부분으로서의 변형된 뉴클레오시드간 연결에 대한 언급은 그 위치에 있는 뉴클레오시드 잔기가 열거된 연결에 의하여 3' 쪽에서 인접한 뉴클레오시드에 연결되는 것을 의미한다.

[0116] 표 1

위치	전형적인 번역자극성 부분
N1	천연 뉴클레오시드, 비염기성 뉴클레오시드, 아라비노뉴클레오시드, 2'-데옥시우리딘, β-L-데옥시리보뉴클레오시드 C2-C18 알킬 링커, 폴리(에틸렌 글리콜)연결, 2-아미노부틸-1,3-프로판디올 링커 (아미노 링커), 2'-5' 뉴클레오시드간 연결, 메틸포스포네이트 뉴클레오시드간 연결.
Nn	천연 뉴클레오시드, 비염기성 뉴클레오시드, 아라비노뉴클레오시드, 2'-데옥시우리딘, 2'-O-치환된 리보뉴클레오시드, 2'-5' 뉴클레오시드간 연결, 메틸포스포네이트 뉴클레오시드간 연결, 단, N1과 N2는 둘 모두 비염기성 연결이 될 수 없다.

[0118] 하기 표 2는 업스트림 (upstream) 강화 도메인을 가지고 있는 번역자극성 올리고뉴클레오티드내의 번역자극성 부분의 대표적인 위치 및 구조를 제시한다. 본원에서 사용되는 용어 "스페이서 (spacer) 9"는 식 -O-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>- (여기서, n=3)의 폴리(에틸렌 글리콜) 링커를 나타낸다. 용어 "스페이서 18"은 식 -O-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>- (여기서, n=6)의 폴리(에틸렌 글리콜) 링커를 나타낸다. 본원에서 사용되는 용어 "C2-C18 알킬 링커"는 식 -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>-O- (식에서 q는 2 내지 18의 정수)의 링커를 나타낸다. 따라서 용어 "C3-링커" 및 "C3-알킬 링커"는 식 -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-O- 의 링커를 의미한다. 스페이서 9, 스페이서 18, 및 C2-C18 알킬 링커의 각각에 대하여, 링커는 포스포디에스테르, 포스포로티오에이트, 또는 포스포로디티오에이트 연결에 의하여 인접한 뉴클레오시드에 연결된다.

[0119] 표 2

위치	전형적인 번역자극성 부분
5'N2	천연 뉴클레오시드, 2-아미노부틸-1,3-프로판디올 링커
5'N1	천연 뉴클레오시드, β-L-데옥시리보뉴클레오시드, C2-C18 알킬 링커, 폴리(에틸렌 글리콜), 비염기성 링커, 2-아미노부틸-1,3-프로판디올 링커
3'N1	천연 뉴클레오시드, 1',2'-디데옥시리보스, 2'-O-메틸리보뉴클레오시드, C2-C18 알킬 링커, 스페이서 9, 스페이서 18
3'N2	천연 뉴클레오시드, 1',2'-디데옥시리보스, 3'-데옥시리보뉴클레오시드, β-L-데옥시리보뉴클레오시드, 2'-O-프로파르길리보뉴클레오시드, C2-C18 알킬 링커, 스페이서 9, 스페이서 18, 메틸포스포네이트 뉴클레오시드간 연결
3'N3	천연 뉴클레오시드, 1',2'-디데옥시리보스, C2-C18 알킬 링커, 스페이서 9, 스페이서 18, 메틸포스포네이트 뉴클레오시드간 연결, 2',5' 뉴클레오시드간 연결, d(G)n, 폴리I-폴리dC
3'N2 + 3'N3	1',2'-디데옥시리보스, β-L-데옥시리보뉴클레오시드, C2-C18 알킬 링커, d(G)n, 폴리I-폴리dC
3'N3 + 3'N4	2'-O-메톡시에틸-리보뉴클레오시드, 메틸포스포네이트 뉴클레오시드간 연결, d(G)n, 폴리I-폴리dC
3'N5 + 3'N6	1',2'-디데옥시리보스, C2-C18 알킬 링커, d(G)n, 폴리I-폴리dC
5'N1 + 3'N3	1',2'-디데옥시리보스, d(G)n, 폴리I-폴리dC

[0121] 하기 표 3은 다운스트림 강화 도메인을 가지고 있는 번역자극성 올리고뉴클레오티드내의 번역자극성 부분의 대

표적인 위치 및 구조를 제시한다.

[0122]

표 3

[0123]

위치	전형적인 면역자극성 부분
5'N2	메틸포스포네이트 뉴클레오타이드간 연결
5'N1	메틸포스포네이트 뉴클레오타이드간 연결
3'N1	1',2'-디데옥시리보스, 메틸포스포네이트 뉴클레오타이드간 연결, 2'-O-메틸
3'N2	1',2'-디데옥시리보스, β-L-데옥시리보뉴클레오타이드, C2-C18 알킬 링커, 스페이서 9, 스페이서 18, 2-아미노부틸-1,3-프로판디올 링커, 메틸포스포네이트 뉴클레오타이드간 연결, 2'-O-메틸
3'N3	3'-데옥시리보뉴클레오타이드, 3'-O-치환된 리보뉴클레오타이드, 2'-O-프로파르길-리보뉴클레오타이드
3'N2 + 3'N3	1',2'-디데옥시리보스, β-L-데옥시리보뉴클레오타이드

[0124]

본 발명에 따른 이뮤노머는 3' 말단 또는 뉴클레오타이드간 연결부 또는 작용기화된 뉴클레오타이드 또는 당에서 비-뉴클레오타이드 링커를 통해 연결된 2개 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 본 발명의 목적상, "비-뉴클레오타이드 링커 (non-nucleotidic linker)"는 공유 또는 비-공유 연결에 의해 올리고뉴클레오타이드에 연결될 수 있는 임의의 부분이다. 바람직하게는, 그러한 링커는 약 2 Å 내지 약 200 Å의 길이를 갖는다. 바람직한 링커의 여러 예를 하기에 나타낸다. 비-공유 연결로는, 그것들에 한정되는 것은 아니지만, 정전기적 상호작용, 소수성 상호작용, π-스택킹 (stacking) 상호작용, 및 수소 결합이 있다. 용어 "비-뉴클레오타이드 링커"는 2개의 뉴클레오타이드의 3'-히드록실기를 직접적으로 연결시키는 상술된 바와 같은 뉴클레오타이드간 연결, 예컨대 포스포디에스테르, 포스포로티오에이트, 또는 포스포로디티오에이트를 의미하고자 하는 것이 아니다. 본 발명의 목적상, 이러한 직접적인 3'-3' 연결은 "뉴클레오타이드 연결"로서 간주된다.

[0125]

어떤 구체예에서, 비-뉴클레오타이드 링커는 금 입자를 포함하지만 이에 제한되지 않는 금속이다. 그 밖의 구체예에서, 비-뉴클레오타이드 링커는 가용성 또는 불용성 생분해성 중합체 비드이다.

[0126]

그 밖의 구체예에서, 비-뉴클레오타이드 링커는 올리고뉴클레오타이드에 대한 부착을 가능하게 하는 작용기를 가지고 있는 유기 부분이다. 그러한 부착은 바람직하게는 임의의 안정한 공유 연결에 의한 것이다. 비-제한적인 예로서, 링커는 도 13에서 도시된 바와 같이 뉴클레오타이드의 임의의 적합한 위치에 부착될 수 있다. 어떤 바람직한 구체예에서 링커는 3'-히드록실에 부착된다. 그러한 구체예에서 링커는 바람직하게는 히드록실 작용기를 포함하는데, 그것은 바람직하게는 포스포디에스테르, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 또는 비-포스페이트-기초 연결에 의하여 3'-히드록실에 부착된다.

[0127]

어떤 구체예에서, 비-뉴클레오타이드 링커는 생체분자, 예를 들면, 제한없이, 폴리펩티드, 항체, 지질, 항원, 알레르겐, 및 올리고사카라이드이다. 다른 구체예에서, 비-뉴클레오타이드 링커는 작은 분자이다. 본 발명의 목적상, 작은 분자는 1,000 Da 미만의 분자량을 가지고 있는 유기 부분이다. 어떤 구체예에서, 작은 분자의 분자량은 750 Da 미만이다.

[0128]

어떤 구체예에서 작은 분자는 지방족 또는 방향족 탄화수소이며, 둘 중 어느 하나는 임의로 올리고뉴클레오타이드를 연결하거나 올리고뉴클레오타이드에 첨부되는 선행사슬에서 히드록시, 아미노, 티올, 티오에테르, 에테르, 아미드, 티오아미드, 에스테르, 우레아, 및 티오우레아로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 작용기를 포함할 수 있다. 작은 분자는 고리형이거나 비고리형이다. 작은 분자 링커의 예로는, 그것들에 한정되는 것은 아니나 아미노산, 탄수화물, 시클로텍스트린, 아단만탄, 콜레스테롤, 합텐 및 항생물질이 있다. 그러나, 비-뉴클레오타이드 링커를 설명하기 위한 목적상, "작은 분자"는 뉴클레오타이드를 포함하는 것을 의도되지 않는다.

[0129]

어떤 구체예에서, 작은 분자 링커는 글리세롤 또는 식  $\text{HO}-(\text{CH}_2)_o-\text{CH}(\text{OH})-(\text{CH}_2)_p-\text{OH}$ 의 글리세롤 동족체이며, 여기서 o와 p는 독립적으로 1 내지 약 6의 정수, 1 내지 약 4의 정수, 또는 1 내지 약 3의 정수이다. 다른 어떤 구체예에서, 작은 분자 링커는 1,3-디아미노-2-히드록시프로판의 유도체이다. 그런 유도체는 식  $\text{HO}-(\text{CH}_2)_m-\text{C}(\text{O})\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{NHC}(\text{O})-(\text{CH}_2)_n-\text{OH}$ 을 가지며, 여기서 m은 0 내지 약 10, 0 내지 약 6, 2 내지 약 6, 또는 2 내지 약 4의 정수이다.

[0130]

본 발명에 따른 어떤 비-뉴클레오타이드 링커는 도 1에 개략적으로 도시된 바와 같이 2개 이상의 올리고뉴클레오타이드의 부착을 가능하게 한다. 예를 들어 작은 분자 링커인 글리세롤은 3개의 히드록실기를 가지고 있는데, 여기에 올리고뉴클레오타이드가 공유적으로 부착될 수 있다. 그러므로 본 발명에 따른 몇몇 이뮤노머는 3' 말단에서

비-뉴클레오타이드 링커에 연결된 2개 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 그러한 이뮤노머는 2개 이상의 면역자극성 올리고뉴클레오타이드를 포함하며, 이러한 각각의 올리고뉴클레오타이드는 접근가능한 5' 말단을 가지고 있다.

[0131] 본 발명의 이뮤노머는 도 5 및 6에 개략적으로 도시되고, 또한 실시예에서도 설명되는 바와 같이 자동 합성기 및 포스포라미다이트 방법을 사용하여 편리하게 합성될 수 있다. 어떤 구체예에서 이뮤노머는 선형 합성 방법에 의하여 합성된다 (도 5 참조). 본원에서 사용되는 용어 "선형 합성"이란 이뮤노머의 한쪽 끝에서 출발하여 다른 쪽 끝으로 선형으로 진행되는 합성을 말한다. 선형 합성은 동일하거나 동일하지 않은 (길이, 염기 조성 및/또는 포함된 화학적 변형의 관점에서) 단량체 단위의 이뮤노머내로 통합되는 것을 가능하게 한다.

[0132] 또 다른 합성 방식은 "병렬 합성"으로, 이 방식에서는 중심 링커 부분으로부터 바깥쪽으로 합성이 진행된다 (도 6 참조). 링커에 부착된 고체 지지체는 미국 특허 제 5,912,332호에서 설명되는 바와 같이 병렬 합성에 대해 사용될 수 있다. 또한, 보편적인 고체 지지체, 예컨대 포스페이트가 부착되고 기공 조절된 유리 지지체가 사용될 수 있다.

[0133] 이뮤노머의 병렬 합성은 선형 합성에 비해 여러가지 장점을 가지고 있다: (1) 병렬 합성은 동일한 단량체 단위의 통합을 가능하게 하고; (2) 선형 합성과는 달리 2개의 (또는 모든) 단량체 단위가 동시에 합성되고, 이로써 합성 단계의 수 및 합성에 필요한 시간이 단량체 단위에 대한 것과 동일하며; (3) 합성 단계의 감소로 최종 이뮤노머 생성물의 순도 및 수율을 개선시킨다.

[0134] 선형 합성 또는 병렬 합성 프로토콜에 의한 합성의 종료시에, 변형된 뉴클레오타이드가 통합되어 있는 경우, 이뮤노머는 농축 암모니아 용액으로 또는 포스포라미다이트 공급자에 의해 추천받은 바와 같이 편리하게 탈보호될 수 있다. 생성된 이뮤노머는 바람직하게는 역상 HPLC에 의해 정제되고, 탈트리틸화되고, 탈염되고 투석된다.

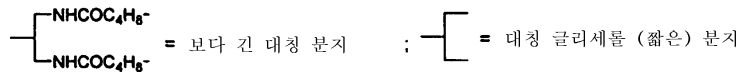
[0135] 하기 표 4는 본 발명에 따른 대표적인 이뮤노머를 제시한다. 추가의 이뮤노머는 하기 실시예에서 설명된다.

[0136] 표 4. 이뮤노머 서열의 예

올리고 또는 이뮤노머 번호	서열 및 변형 (5'-3')
1	5'-GAGAACGCTCGACCTT-3'
2	5'-GAGAACGCTCGACCTT-3'-3'-TTCCAGCTCGCAAGAG-5'
3	3'-TTCCAGCTCGCAAGAG-5'-5'-GAGAACGCTCGACCTT-3'
4	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
5	5'-T-3' $\left\{ \begin{array}{l} \text{HNCO-C}_4\text{H}_8\text{-5'-CTATLTGACGTTCTCTGT-3'} \\ \text{HNCO-C}_4\text{H}_8\text{-5'-CTATLTGACGTTCTCTGT-3'} \end{array} \right.$
6	5'-CTATLTGACGTTCTCTGT-3'-C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> -CONH $\left\{ \begin{array}{l} \text{5'-CTATLTGACGTTCTCTGT-3'-C}_4\text{H}_8\text{-CONH} \\ \text{5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'-C}_4\text{H}_8\text{-CONH} \end{array} \right.$ 3'-C-5'
7	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'-C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> -CONH $\left\{ \begin{array}{l} \text{5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'-C}_4\text{H}_8\text{-CONH} \\ \text{5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'-C}_4\text{H}_8\text{-CONH} \end{array} \right.$ 3'-C-5'
8	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' $\left\{ \begin{array}{l} \text{5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'} \\ \text{5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'} \end{array} \right.$ 3'-C-5'
9	5'-CTATCTGAYGTTCTCTGT-3' $\left\{ \begin{array}{l} \text{5'-CTATCTGAYGTTCTCTGT-3'} \\ \text{5'-CTATCTGAYGTTCTCTGT-3'} \end{array} \right.$ 3'-C-5'
10	5'-CTATCTGACRTTCTCTGT-3' $\left\{ \begin{array}{l} \text{5'-CTATCTGACRTTCTCTGT-3'} \\ \text{5'-CTATCTGACRTTCTCTGT-3'} \end{array} \right.$ 3'-C-5'
11	5'-CTALCTGAYGTTCTCTGT-3' $\left\{ \begin{array}{l} \text{5'-CTALCTGAYGTTCTCTGT-3'} \\ \text{5'-CTALCTGAYGTTCTCTGT-3'} \end{array} \right.$ 3'-C-5'
12	5'-CTALCTGACRTTCTCTGT-3' $\left\{ \begin{array}{l} \text{5'-CTALCTGACRTTCTCTGT-3'} \\ \text{5'-CTALCTGACRTTCTCTGT-3'} \end{array} \right.$ 3'-C-5'
13	5'-CTGACGTTCTCTGT-3'
14	5'-CTGACGTTCTCTGT-3' $\left\{ \begin{array}{l} \text{5'-CTGACGTTCTCTGT-3'} \\ \text{5'-CTGACGTTCTCTGT-3'} \end{array} \right.$ 3'-C-5'
15	5'-CTGAYGTTCTCTGT-3' $\left\{ \begin{array}{l} \text{5'-CTGAYGTTCTCTGT-3'} \\ \text{5'-CTGAYGTTCTCTGT-3'} \end{array} \right.$ 3'-C-5'
16	5'-CTGACRTTCTCTGT-3' $\left\{ \begin{array}{l} \text{5'-CTGACRTTCTCTGT-3'} \\ \text{5'-CTGACRTTCTCTGT-3'} \end{array} \right.$ 3'-C-5'

[0137]

17	5'-XXTGACGTTCTCTGT-3'
18	5'-XXXTGACGTTCTCTGT-3' 5'-XXXTGACGTTCTCTGT-3' } 3'-C-5'
19	5'-XXXTGAYGTTCTCTGT-3' 5'-XXXTGAYGTTCTCTGT-3' } 3'-C-5'
20	5'-XXXTGACRTTCTCTGT-3' 5'-XXXTGACRTTCTCTGT-3' } 3'-C-5'
21	5'-TCTGACGTTCT-3'
22	5'-XXXTCTGACGTTCT-3' 5'-XXXTCTGACGTTCT-3' } 3'-C-5'
23	5'-XXXTCTGAYGTTCT-3' 5'-XXXTCTGAYGTTCT-3' } 3'-C-5'
24	5'-XXXTCTGACRTTCT-3' 5'-XXXTCTGACRTTCT-3' } 3'-C-5'



L = C3-알킬 링커; X = 1',2'-디테옥시리보시드; Y = <sup>50H</sup> dC; R = 7-테아자-dG

[0138]

[0139]

제 2 측면으로 본 발명은 상술된 바와 같은 이뮤노머와, 접근가능한 5' 말단 외의 위치에서 이뮤노머에 컨쥬게이션된 항원을 포함하고 있는 이뮤노머 컨쥬게이트를 제공한다. 어떤 구체예에서 비-뉴클레오티드 링커는 올리고뉴클레오티드에 컨쥬게이션된 항원을 포함한다. 어떤 다른 구체예에서는 항원은 3' 말단 이외의 위치에서 올리고뉴클레오티드에 컨쥬게이션된다. 어떤 구체예에서, 항원은 백신 효과를 생성한다.

[0140]

항원은 바람직하게는 병원체와 관련된 항원, 암과 관련된 항원, 자가면역 질병과 관련된 항원, 및 다른 질병, 예컨대 그것들에 한정되는 것은 아니지만, 수의학적 또는 가금류 질병과 관련된 항원으로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 본 발명의 목적상, "~과 관련된"은 항원이 병원체, 암, 자가 면역 질병, 음식 알레르기, 호흡기 알레르기, 천식 또는 다른 질병이 존재하는 경우에 존재하지만, 병원체, 암, 자가면역 질병, 음식 알레르기, 호흡기 알레르기, 또는 질병이 없는 경우, 존재하지 않거나 감소된 양으로 존재함을 의미한다.

[0141]

이뮤노머는 항원에 공유적으로 연결되거나, 항원과 작동가능하게 결합된다. 본원에서 사용되는 용어 "작동가능하게 결합된다"는 것은 이뮤노머와 항원 두가지의 활성이 모두 유지되는 모든 결합을 의미한다. 그러한 작동가능한 결합의 가능한 예는 동일한 리포솜 또는 다른 그러한 전달 비히클 또는 시약의 일부가 되는 것을 포함한다. 이뮤노머가 항원에 공유적으로 연결되는 구체예에서 그러한 공유 연결은 바람직하게는 면역자극성 올리고뉴클레오티드의 접근가능한 5' 말단 이외의 이뮤노머의 어떠한 위치에서든 일어난다. 예를 들어 항원은 뉴클레오티드간 연결에 부착될 수 있거나 비-뉴클레오티드 링커에 부착될 수 있다. 또한, 항원은 그 자체가 비-뉴클레오티드 링커일 수 있다.

[0142]

제 3 측면으로, 본 발명은 본 발명에 따른 이뮤노머 또는 이뮤노머 컨쥬게이트와 생리적으로 허용될 수 있는 담체를 포함하는 약제학적 제형을 제공한다. 본원에서 사용되는 용어 "생리적으로 허용될 수 있는"은 이뮤노머의 효력을 방해하지 않고 세포, 세포 배양물, 조직, 또는 유기체와 같은 생물학적 시스템과 양립할 수 있는 물질을 말한다. 바람직하게는 생물학적 시스템은 살아있는 유기체, 예컨대 척추동물이다.

[0143]

본원에서 사용되는 용어 "담체"는 어떠한 부형제, 희석제, 충전제, 염, 완충제, 안정화제, 가용화제, 지질, 또는 약제학적 제형에 사용되는 당해 기술분야에 잘 알려져 있는 다른 물질을 포함한다. 담체, 부형제, 또는 희석제의 특징은 특정 적용에 대한 투여 경로에 따라 좌우되는 것으로 이해되어야 한다. 이들 물질을 함유하고 있는 약제학적으로 허용될 수 있는 제형의 제법은 문헌에 기술되어 있다 (예컨대 *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Edition, ed., A. Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990).

[0144]

제 4 측면으로, 본 발명은 본 발명에 따른 이뮤노머 또는 이뮤노머 컨쥬게이트를 척추동물에 투여하는 것을 포함하여 척추동물에게서 면역 반응을 유발시키기 위한 방법을 제공한다. 어떤 구체예에서, 척추동물은 포유류이다. 본 발명의 목적상, 용어 "포유류"는 사람을 포함하는 것으로 명백하게 의도된다. 바람직한 구체예에서 이뮤노머 또는 이뮤노머 컨쥬게이트는 면역자극이 필요한 척추동물에 투여된다.

[0145]

본 발명의 이러한 측면에 따른 방법에서 이뮤노머는 어떠한 적당한 경로, 예컨대 제한 없이, 비경구, 경구, 허밀, 경피, 비내, 에어로솔, 안내 (intraocular), 기관지내, 직장내, 질내, 유전자 총 (gene gun)에 의해, 피부 패치 또는 점안액으로, 또는 구강세척액 형태로 투여될 수 있다. 이뮤노머의 치료적 조성물의 투여는 질병의 징후 또는 대용 마커를 감소시키는 데에 효과적인 용량으로 및 기간동안 공지된 절차를 사용하여 수행될 수 있다.

전신적으로 투여될 때 치료적 조성물은 바람직하게는 약 0.0001  $\mu\text{M}$  내지 약 10  $\mu\text{M}$  의 이뮤노머 혈중 수준을 수득하기에 충분한 용량으로 투여된다. 국소 투여를 위해서는 이것보다 훨씬 더 낮은 농도가 효과적일 것이며, 훨씬 더 높은 농도도 허용될 수 있다. 바람직하게는 이뮤노머의 전체 용량 범위는 환자당 약 0.001 mg 내지 약 200 mg/kg 체중/일일 것이다. 치료적 유효량의 하나 이상의 본 발명의 치료 조성물을 개체에게 단일 치료 에피소드로서 동시에, 또는 차례로 투여하는 것이 바람직할 수 있다.

[0146] 어떤 바람직한 구체예에서 본 발명에 따른 이뮤노머는 백신, 항체, 세포독성 제제, 알레르겐, 항생물질, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 펩티드, 단백질, 유전자 요법 벡터, DNA 백신 및/또는 면역 반응의 특이성 또는 크기를 증강시키기 위한 보조제와 함께 투여된다. 이들 구체예에서, 본 발명의 이뮤노머는 보조제로서 다양하게 작용할 수 있고/있거나 직접적인 면역자극 효과를 생성시킬 수 있다.

[0147] 이뮤노머는 백신이든, 또는 둘 다이든, 임의로 면역원성 단백질, 예컨대 키호울 림펫 헤모시아닌 (KLH), 콜레라 독소 B 서브유닛, 또는 다른 어떠한 면역원성 담체 단백질에 결합될 수 있다. 임의의 보조제, 예를 들면 제한 없이, 프로인트 완전 보조제, KLH, 모노포스포릴 지질 A (MPL), 명반, 및 사포닌, 예컨대 QS-21, 이미퀴모드 (imiquimod), R848, 또는 이들의 조합물이 과잉으로 사용될 수 있다.

[0148] 본 발명의 이러한 측면의 목적상, 용어 "∼과 함께"는 동일한 환자의 동일한 질병을 치료하는 과정중에 있는 것을 의미하고, 이뮤노머 및/또는 백신 및/또는 보조제를 어떠한 순서로든, 예를 들어 동시에 투여하는 것 뿐 아니라 일시적으로 여러날 간격을 두고 순차적으로 투여하는 것을 포함한다. 그러한 병용 처리는 또한 이뮤노머, 및/또는 독립적으로 백신, 및/또는 독립적으로 보조제의 1회 이상의 투여를 포함할 수 있다. 이뮤노머 및/또는 백신 및/또는 보조제의 투여는 동일하거나 상이한 경로에 의해 이루어질 수 있다.

[0149] 본 발명의 이러한 측면에 따른 방법은 면역계의 모델 연구에 유용하다. 이 방법은 또한 사람 또는 동물 질병의 예방 또는 치료적 처리에도 유용하다. 예를 들면 방법은 가금류 및 수의학적 백신 분야에 유용하다.

[0150] 제 5 측면으로, 본 발명은 환자에게 본 발명의 이뮤노머 또는 이뮤노머 컨쥬게이트를 투여하는 것을 포함하여 질병 또는 장애를 가지고 있는 환자를 치료적으로 처리하는 방법을 제공한다. 다양한 구체예에서 처리될 질병 또는 장애는 암, 자가면역 질병, 기도 염증, 염증성 질병, 알레르기, 천식 또는 병원체에 의해 유발되는 질병이다. 병원체에는 세균, 기생충, 진균, 바이러스, 비로이드, 및 프리온이 있다. 투여는 발명의 제 4 측면에서 설명된 것과 같이 수행된다.

[0151] 본 발명의 목적상, 용어 "알레르기"는 제한 없이 음식 알레르기 및 호흡기 알레르기를 포함한다. 용어 "기도 염증"은 제한 없이 천식을 포함한다. 본원에서 사용되는 용어 "자가면역 질병"은 "자기 (self)" 단백질이 면역계에 의해 공격을 받는 질병을 나타낸다. 그러한 용어는 자가면역 천식을 포함한다.

[0152] 본 발명의 이러한 측면에 따른 방법중 어떠한 것에서도 이뮤노머 또는 이뮤노머 컨쥬게이트는 질병 또는 질환을 치료하는데 유용하면서 이뮤노머의 면역자극성 효과를 감소시키지 않는 다른 어떠한 제제와 함께 투여될 수 있다. 예를 들면 암의 치료에서, 이뮤노머 또는 이뮤노머 컨쥬게이트는 화학요법용 화합물과 함께 투여될 수 있는 것으로 고려된다.

[0153] 하기의 실시예는 발명의 특정한 바람직한 구체예를 추가로 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범주를 제한하려는 의도는 없다.

## 실시예

[0154] **실시예 1: 면역자극성 부분을 함유하고 있는 올리고뉴클레오타이드의 합성**

[0155] 올리고뉴클레오타이드를 1  $\mu\text{m}$  규모로 자동 DNA 합성기 (Expedite 8909; PerSeptive Biosystems, Framingham, MA)를 사용하여, 도 5 및 6에 개략적으로 도시된 선형 합성 또는 병렬 합성 절차에 따라 합성하였다.

[0156] 어플라이드 바이오시스템스사 (Applied Biosystems, Foster City, CA)로부터 테옥시리보뉴클레오타이드 포스포라미다이트를 얻었다. 1',2'-디테옥시리보스 포스포라미다이트, 프로필-1-포스포라미다이트, 2-테옥시우리딘 포스포라미다이트, 1,3-비스-[5-(4,4'-디메톡시트리틸)펜틸아미달]-2-프로판올 포스포라미다이트 및 메틸 포스포라미다이트를 글렌 리서치(Glen Research, Sterling, VA)로부터 얻었다.  $\beta$ -L-2'-테옥시리보뉴클레오타이드 포스포라미다이트,  $\alpha$ -2'-테옥시리보뉴클레오타이드 포스포라미다이트, 모노-DMT-글리세롤 포스포라미다이트 및 디-DMT-글리세롤 포스포라미다이트를 캄젠스 (ChemGens, Ashland, MA)로부터 얻었다. (4-아미노부틸)-1,3-프로판디올 포스포라미다이트를 클론테크 (Clontech, Palo Alto, CA)로부터 얻었다. 아라비노시티딘 포스포라미다이트, 아

라비노구아노신, 아라비노티미딘 및 아라비노우리딘을 릴라이어블 파마슈티칼 (Reliable Pharmaceutical, St. Louis, MO)로부터 얻었다. 아라비노구아노신 포스포라미다이트, 아라비노티미딘 포스포라미다이트 및 아라비노우리딘 포스포라미다이트를 하이브리돈, 인크. (Hybridon, Inc., Cambridge, MA)에서 합성하였다 (Noronha et al., (2000) *Biochem.* 39:7050-7062).

[0157] 모든 뉴클레오시드 포스포라미다이트를  $^{31}\text{P}$ 와  $^1\text{H}$  NMR 스펙트럼을 사용하여 특성을 확인하였다. 변형된 뉴클레오시드를 특정 부위에서 정상적인 커플링 사이클을 사용하여 통합시켰다. 합성 후에 올리고뉴클레오타이드를 농축된 수산화 암모늄으로 탈보호시키고 역상 HPLC에 의하여 정제한 다음 투석하였다. 나트륨염 형태로서의 정제된 올리고뉴클레오타이드를 사용전에 동결건조시켰다. 순도는 CGE 및 MALDI-TOF MS에 의해 시험하였다.

[0158] **실시예 2: 비장 세포 증식의 분석**

[0159] 비장세포 증식의 시험관내 분석은 전술한 바와 같은 표준 절차를 사용하여 수행하였다 (참조: Zhao et al., *Biochem Pharma* 51:173-182 (1996)). 그 결과는 도 8a에 도시된다. 이들 결과는 고농도에서 2 개의 접근가능한 5' 말단을 가지고 있는 이뮤노머 6이 접근가능한 5' 말단이 없는 이뮤노머 5 또는 접근가능한 5' 말단이 하나 있는 올리고뉴클레오타이드 4보다 더 큰 폭으로 비장세포 증식을 유발하였음을 입증한다. 이뮤노머 6은 또한 LPS 포지티브 대조표준보다 더 큰 폭의 비장세포 증식을 유발한다.

[0160] **실시예 3: 생체내 비장비대 분석**

[0161] 시험관내 결과의 생체내 모델로의 적응성을 시험하기 위하여 선택된 올리고뉴클레오타이드를 마우스에 투여하고 비장비대의 정도를 면역자극 활성의 수준의 지표로서 측정하였다. 5 mg/kg의 단일 용량을 BALB/c 마우스 (암컷, 생후 4-6주, Harlan Sprague Dawley Inc., Baltic, CT)에 복강내로 투여하였다. 마우스를 올리고뉴클레오타이드 투여후 72시간 후에 희생시키고, 비장을 꺼내어 무게를 측정하였다. 그 결과는 도 8b에 도시된다. 이들 결과는 2 개의 접근가능한 5' 말단을 가지고 있는 이뮤노머 6이 올리고뉴클레오타이드 4 또는 이뮤노머 5보다 더 훨씬 큰 면역자극 효과를 가지고 있음을 입증한다.

[0162] **실시예 4: 시토킨 분석**

[0163] 척추동물 세포, 바람직하게는 BALB/c 마우스 비장 세포 또는 사람 PBMC에서의 IL-12 및 IL-6의 분비를 샌드위치 ELISA에 의해 측정하였다. 시토킨 항체와 시토킨 표준을 포함하는 필요한 시약들은 파밍겐 (PharMingen, San Diego, CA)으로부터 구입하였다. ELISA 플레이트 (Costar)를 PBSN 완충액 (PBS/0.05 % 나트륨 아지드, pH 9.6)중의 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도의 적절한 항체와 함께 밤새 4  $^{\circ}\text{C}$ 에서 인큐베이션한 후, PBS/1 % BSA로 37  $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분동안 차단하였다. 세포 배양 상층액 및 시토킨 표준을 PBS/10 % FBS로 적당하게 희석하고 플레이트에 삼중으로 첨가한 다음 25  $^{\circ}\text{C}$ 에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트 위를 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 적당한 비오틴화된 항체로 덮고 25 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1.5 시간 동안 인큐베이션하였다. 그런 다음 플레이트를 PBS-T 완충액 (PBS/0.05 % 트윈 20)으로 집중적으로 세척하고 다시 25  $^{\circ}\text{C}$ 에서 1.5 시간 동안 인큐베이션한 후, 스트렙타비딘 키뉴게이션된 퍼옥시다제 (Sigma, St. Louis, MO)를 첨가하였다. 플레이트를 Sure Blue<sup>TM</sup> (Kirkegaard and Perry) 발색 시약으로 전개시키고 스탑 용액 (Stop Solution) (Kirkegaard and Perry)을 첨가함으로써 반응을 종결지었다. 색 변화를 Ceres 900 HDI 분광계 (Bio-Tek Instruments)상에서 측정하였다. 그 결과를 하기 표 5A에 나타내었다.

[0164] 사람 말초혈 단핵세포 (PBMC)를 건강한 자원자의 말초혈로부터 Ficoll-Paque 밀도 구배 원심분리 (Histopaque-1077, Sigma, St. Louis, MO)에 의해 분리하였다. 간단하게 설명하면, 헤파린 처리된 혈액을 원추형 원심분리기에서 Histopaque-1077 (동일한 부피)위에 놓고 400 $\times g$ 에서 30분 동안 실온에서 원심분리하였다. 단핵세포를 함유하고 있는 담황갈색의 막 (buffy coat)을 조심스럽게 제거하여 등장성 인산염 완충된 식염수 (PBS)로 250 $\times g$ 에서 10분 동안 원심분리함으로써 2회 세척하였다. 그런 다음 그 결과의 세포 펠릿을 L-글루타민 (Media Tech, Inc., Herndon, VA)을 함유하고 10 % 열처리 비활성화된 FCS 및 페니실린-스트렙토마이신 (100 U/ml)이 첨가되어 있는 RPMI 1640 배지에 재현탁시켰다. 세포를 올리고뉴클레오타이드의 존재 또는 부재하에 1 $\times 10^6$  세포/ml/웰에서 상이한 기간동안 24웰 플레이트에서 배양하였다. 배양 기간의 종료시에, 상층액을 수득하여 -70  $^{\circ}\text{C}$ 에서 동결건조시켜서 저장한 후에 다양한 시토킨, 예를 들면 IL-6 (BD Pharmingen, San Diego, CA), IL-10 (BD Pharmingen), IL-12 (BioSource International, Camarillo, CA), IFN- $\alpha$  (BioSource International) 및 - $\gamma$  (BD Pharmingen) 및 TNF- $\alpha$  (BD Pharmingen)를 샌드위치 ELISA에 의하여 분석하였다. 그 결과를 하기 표 5에 나타내었다.

[0165] 모든 경우에 세포 배양 상층액중의 IL-12 및 IL-6의 수준을, IL-12 및 IL-6 각각에 대하여 동일한 실험 조건하

에서 작성된 표준 곡선으로부터 계산하였다. 세포 배양 상층액중의 IL-10, IFN- $\gamma$  및 TNF- $\alpha$ 의 수준을 IL-10, IFN- $\gamma$  및 TNF- $\alpha$  각각에 대하여 동일한 실험 조건하에서 작성된 표준 곡선으로부터 계산하였다.

[0166] 표 5. 이뮤노머 구조 및 사람 PBMC 배양물중의 면역자극 활성

올리고 번호	서열 및 변형 (5'-3')	올리고 길이/ 또는 각 사슬	IL-12 (pg/ml)		IL-6 (pg/ml)	
			D1	D2	D1	D2
25	5'-CTATCTGTCGTTCTCTGT-3'	18량체 (PS)	184	332	3077	5369
26	5'-TCTGTCR <sub>1</sub> TTCT-3' \	11량체 (PS)	237	352	3724	4892
	X <sub>1</sub> 5'-TCTGTCR <sub>1</sub> TTCT-3' /					

올리고 번호	서열 및 변형 (5'-3')	올리고 길이/ 또는 각 사슬	IL-10 (pg/ml)		IFN- $\gamma$ (pg/ml)	
			D1	D2	D1	D2
25	5'-CTATCTGTCGTTCTCTGT-3'	18량체 (PS)	37	88	125	84
26	5'-TCTGTCR <sub>1</sub> TTCT-3' \	11량체 (PS)	48	139	251	40
	X <sub>1</sub> 5'-TCTGTCR <sub>1</sub> TTCT-3' /					

올리고 번호	서열 및 변형 (5'-3')	올리고 길이/ 또는 각 사슬	TNF- $\alpha$ (pg/ml)	
			D1	D2
25	5'-CTATCTGTCGTTCTCTGT-3'	18량체 (PS)	537	nt
26	5'-TCTGTCR <sub>1</sub> TTCT-3' \	11량체 (PS)	681	nt
	X <sub>1</sub> 5'-TCTGTCR <sub>1</sub> TTCT-3' /			

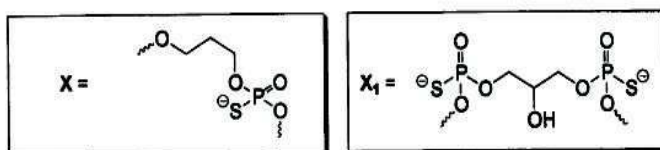
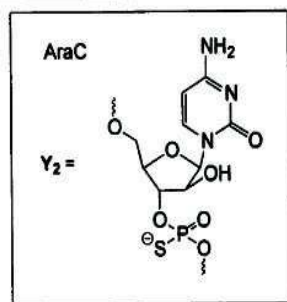
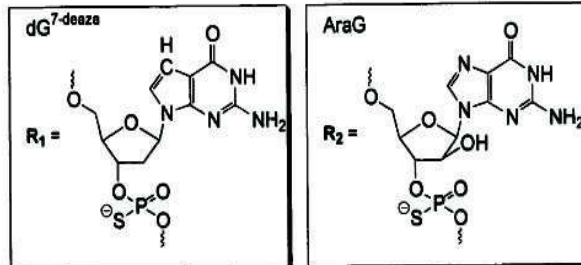
[0170] D1 및 D2는 공여체 1 및 2이다.

[0171] 표 5A. 이뮤노머 구조 및 BALB/c 마우스 비장 세포 배양물 중의 면역자극 활성

올리고 번호	서열 및 변형 (5'-3')	올리고 길이/ 또는 각 사슬	IL-12 (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)
			3 $\mu$ g/mL	10 $\mu$ g/mL
26	5'-TCTGTCR <sub>1</sub> TTCT-3' 5'-TCTGTCR <sub>1</sub> TTCT-3' $\times_1$	11량체 (PS)	870	10670
27	5'-TCTGTCR <sub>2</sub> TTCT-3' 5'-TCTGTCR <sub>2</sub> TTCT-3' $\times_1$	11량체 (PS)	1441	7664
28	5'-TCTGTY <sub>2</sub> R <sub>2</sub> TTCT-3' 5'-TCTGTY <sub>2</sub> R <sub>2</sub> TTCT-3' $\times_1$	11량체 (PS)	1208	1021
29	5'-XXTCTGTCR <sub>1</sub> TTCT-3' 5'-XXTCTGTCR <sub>1</sub> TTCT-3' $\times_1$	11량체 (PS)	162	1013
30	5'-CTGTCR <sub>2</sub> TTCTCTGT-3' 5'-CTGTCR <sub>2</sub> TTCTCTGT-3' $\times_1$	14량체 (PO)	264	251
31	5'-CTGTY <sub>2</sub> R <sub>2</sub> TTCTCTGT-3' 5'-CTGTY <sub>2</sub> R <sub>2</sub> TTCTCTGT-3' $\times_1$	14량체 (PO)	149	119
32	5'-TCTGACR <sub>1</sub> TTCT-3' 5'-TCTGACR <sub>1</sub> TTCT-3' $\times_1$	11량체 (PS)	2520	9699
33	5'-XXTCTGACR <sub>1</sub> TTCT-3' 5'-XXTCTGACR <sub>1</sub> TTCT-3' $\times_1$	11량체 (PS)	2214	16881
34	5'-TCTGACR <sub>2</sub> TTCT-3' 5'-TCTGACR <sub>2</sub> TTCT-3' $\times_1$	11량체 (PS)	3945	10766
35	5'-TCTGAY <sub>2</sub> R <sub>2</sub> TTCT-3' 5'-TCTGAY <sub>2</sub> R <sub>2</sub> TTCT-3' $\times_1$	11량체 (PS)	2573	19411
36	5'-CTGAY <sub>2</sub> GTTCTCTGT-3' 5'-CTGAY <sub>2</sub> GTTCTCTGT-3' $\times_1$	14량체 (PO)	2699	408
37	5'-CTGACR <sub>2</sub> TTCTCTGT-3' 5'-CTGACR <sub>2</sub> TTCTCTGT-3' $\times_1$	14량체 (PO)	839	85
38	5'-CTGAY <sub>2</sub> R <sub>2</sub> TTCTCTGT-3' 5'-CTGAY <sub>2</sub> R <sub>2</sub> TTCTCTGT-3' $\times_1$	14량체 (PO)	143	160

[0172]

[0173] 정상적인 글씨체는 포스포로티오에이트 연결을 나타내고; 이탤릭체는 포스포디에스테르 연결을 나타낸다.



[0174]

[0175] 또한, 도 7a 내지 7c에 도시된 결과는 2 개의 접근가능한 5' 말단을 가지고 있는 올리고뉴클레오타이드 2가 낮은 농도에서 각각 하나의 접근가능한 5' 말단을 가지고 있거나 없는 올리고뉴클레오타이드 1 또는 3보다 IL-12와 IL-6을 상승시키지만, IL-10은 그렇지 않았음을 입증한다.

[0176] 실시예 5: 사슬 길이가 이뮤노머의 면역자극 활성화에 미치는 효과

[0177] 올리고뉴클레오타이드 사슬의 길이의 효과를 연구하기 위하여 각 사슬에 18, 14, 11 및 8개의 뉴클레오타이드를 함유하고 있는 이뮤노머를 합성하고, BALB/c 마우스 비장 세포 배양물중에서 시토킨 IL-12 및 IL-6의 분비를 유도하는 그것들의 능력에 의해 측정하여, 면역자극 활성화에 대하여 시험하였다 (표 6-8). 이 실시예와 후속하는 모든 실시예에서 시토킨 검정은 실시예 4에서 설명된 것처럼 BALB/c 마우스 비장 세포 배양물에서 수행하였다.

[0178] 표 6. 이뮤노머 구조 및 면역자극 활성화

번호	서열 및 변형 (5'-3')	올리고 길이/ 또는 각 사슬	IL-12 (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)
			@ 0.3 µg/mL	@ 0.3 µg/mL
4	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'	18량체	1802	176
39	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' 5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' } 3'-T-5'	18량체	1221	148
40	5'-CTGACGTTCTCTGT-3' 5'-CTGACGTTCTCTGT-3' } 3'-T-5'	14량체	2107	548
41	5'-TCTGACGTTCT-3' 5'-TCTGACGTTCT-3' } 3'-T-5'	11량체	3838	1191
42	5'-GACGTTCT-3' 5'-GACGTTCT-3' } 3'-T-5'	8량체	567	52

[0179]

[0180] 표 7. 이뮤노머 구조 및 면역자극 활성화

번호	서열 및 변형 (5'-3')	올리고 길이/ 또는 각 사슬	IL-12 (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)
			1 µg/mL	1 µg/mL
25	5'-CTATCTGTCGTTCTCTGT-3'	18량체	291	65
43	5'-CTATCTGTCGTTCTCTGT-3' 5'-CTATCTGTCGTTCTCTGT-3' } 3'-T-5'	18량체	430	39
44	5'-CTGTCGTTCTCTGT-3' 5'-CTGTCGTTCTCTGT-3' } 3'-T-5'	14량체	813	59
45	5'-CTGTCGTTCTCT-3' 5'-CTGTCGTTCTCT-3' } 3'-T-5'	12량체	1533	123
46	5'-TCTGTCGTTCT-3' 5'-TCTGTCGTTCT-3' } 3'-T-5'	11량체	2933	505
47	5'-GTCGTTCT-3' 5'-GTCGTTCT-3' } 3'-T-5'	8량체	1086	26
48	5'-GTCGTTCT-3' 5'-GTCGTTCT-3' } 3'-T-5'	7량체	585	34
49	5'-GTCGTT-3' 5'-GTCGTT-3' } 3'-T-5'	6량체	764	76
50	5'-TCGTT-3' 5'-TCGTT-3' } 3'-T-5'	5량체	28	29

[0181]

[0182] 표 8. 이뮤노머 구조 및 면역자극 활성화

번호	서열 및 변형 (5'-3')	올리고 길이/ 또는 각 사슬	IL-12 (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)
			1 µg/mL	1 µg/mL
51	5'-CTCACTTTCGTTCTCTGT-3'	18량체	91	73
52	5'-CTCACTTTCGTTCTCTGT-3' 5'-CTCACTTTCGTTCTCTGT-3' } 3'-T-5'	18량체	502	99
53	5'-CTTTTCGTTCTCTGT-3' 5'-CTTTTCGTTCTCTGT-3' } 3'-T-5'	14량체	683	119
54	5'-CTTTTCGTTCTCT-3' 5'-CTTTTCGTTCTCT-3' } 3'-T-5'	12량체	633	102
55	5'-TTCGTTCT-3' 5'-TTCGTTCT-3' } 3'-T-5'	8량체	687	243
56	5'-TCGTTCT-3' 5'-TCGTTCT-3' } 3'-T-5'	7량체	592	1252

[0183]

[0184] 상기의 결과들은 이뮤노머의 면역자극 활성화가 올리고뉴클레오타이드 사슬의 길이가 18-량체로부터 7-량체로 감소함에 따라 증가되었음을 보여준다. 6-량체 또는 5-량체 정도의 짧은 올리고뉴클레오타이드 사슬을 가지고 있는 이뮤노머는 단일 5' 말단을 가지고 있는 18-량체의 올리고뉴클레오타이드의 면역자극 활성화에 필적하는 면역자극 활

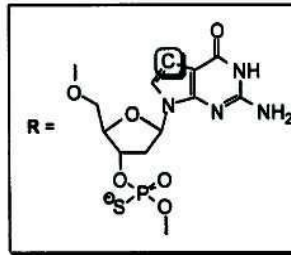
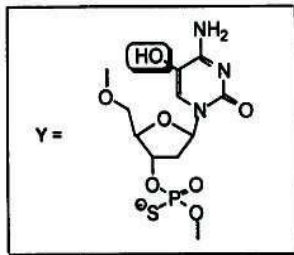
성을 보였다. 그러나, 6-량체 또는 5-량체 정도의 짧은 올리고뉴클레오타이드 사슬 길이를 가지는 이뮤노머는 링 커가 약 2 Å 내지 약 200 Å의 길이인 경우에 면역자극 활성을 증가시켰다.

**실시예 6: 비-천연 피리미딘 또는 비-천연 푸린 뉴클레오시드를 함유하고 있는 이뮤노머의 면역자극 활성**

하기 표 9 내지 11에서 나타내는 바와 같이 면역자극 활성은 면역자극성 디뉴클레오타이드 모티프에 비-천연 피리미딘 뉴클레오시드 또는 비-천연 푸린 뉴클레오시드를 가지고 있는 다양한 길이의 이뮤노머에 대해 유지되었다.

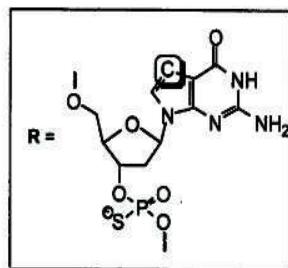
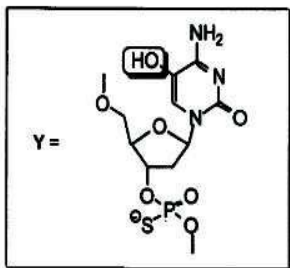
**표 9. 이뮤노머 구조 및 면역자극 활성**

번호	서열 및 변형 (5'-3')	올리고 길이/ 또는 각 사슬	IL-12 (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)
			@ 3 µg/mL	@ 3 µg/mL
51	5'-CTCACTTCGTTCTCTGT-3'	18량체	404	348
57	5'-TCITTYGTTCT-3' 5'-TCTTTYGTTCT-3' } 3'-T-5'	11량체	591	365
58	5'-TCTTTCRTTCT-3' 5'-TCTTTCRTTCT-3' } 3'-T-5'	11량체	303	283
59	5'-TTYGTTCT-3' 5'-TTYGTTCT-3' } 3'-T-5'	8량체	55	66
60	5'-TTCRTTCT-3' 5'-TTCRTTCT-3' } 3'-T-5'	8량체	242	143



**표 10. 이뮤노머 구조 및 면역자극 활성**

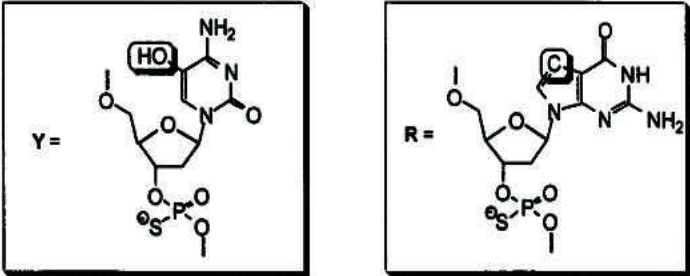
번호	서열 및 변형 (5'-3')	올리고 길이/ 또는 각 사슬	IL-12 (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)
			3 µg/mL	3 µg/mL
25	5'-CTATCTGTCGTTCTCTGT-3'	18량체	379	339
61	5'-TCTGYGTTCT-3' 5'-TCTGYGTTCT-3' } 3'-T-5'	11량체	1127	470
62	5'-TCTGTCRTTCT-3' 5'-TCTGTCRTTCT-3' } 3'-T-5'	11량체	787	296
63	5'-GTYGTTCT-3' 5'-GTYGTTCT-3' } 3'-T-5'	8량체	64	126
64	5'-GTCRTTCT-3' 5'-GTCRTTCT-3' } 3'-T-5'	8량체	246	113



[0193] 표 11. 이뮤노머 구조 및 면역자극 활성

번호	서열 및 변형 (5'-3')	올리고 길이/ 또는 각 사슬	IL-12 (pg/mL)		IL-6 (pg/mL)	
			3 µg/mL	3 µg/mL	3 µg/mL	3 µg/mL
4	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'	18량체	1176	1892		
65	5'-CTATCTGAYGTTCTCTGT-3' 5'-CTATCTGAYGTTCTCTGT-3' } 3'-T-5'	18량체	443	192		
66	5'-CTATCTGACRTTCTCTGT-3' 5'-CTATCTGACRTTCTCTGT-3' } 3'-T-5'	18량체	627	464		
67	5'-CTGAYGTTCTCTGT-3' 5'-CTGAYGTTCTCTGT-3' } 3'-T-5'	14량체	548	152		
68	5'-CTGACRTTCTCTGT-3' 5'-CTGACRTTCTCTGT-3' } 3'-T-5'	14량체	1052	1020		
69	5'-TCTGAYGTTCT-3' 5'-TCTGAYGTTCT-3' } 3'-T-5'	11량체	2050	2724		
70	5'-TCTGACRTTCT-3' 5'-TCTGACRTTCT-3' } 3'-T-5'	11량체	1780	1741		
71	5'-GAYGTTCT-3' 5'-GAYGTTCT-3' } 3'-T-5'	8량체	189	55		
72	5'-GACRTTCT-3' 5'-GACRTTCT-3' } 3'-T-5'	8량체	397	212		

[0194]



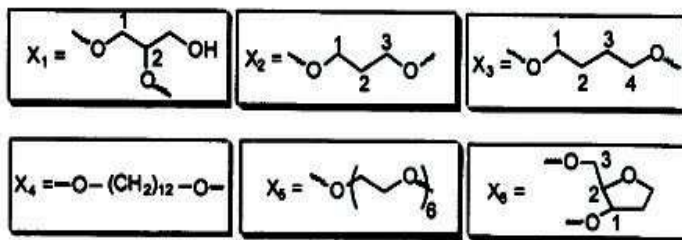
[0195]

[0196] 실시예 7: 링커가 면역자극 활성에 미치는 효과

[0197] 2개의 올리고뉴클레오타이드를 연결시키는 링커의 길이의 효과를 조사하기 위하여, 동일한 올리고뉴클레오타이드를 함유하지만 링커는 상이한 이뮤노머들을 합성하여 면역자극 활성에 대하여 시험하였다. 하기 표 12에 나타난 그 결과는 링커의 길이가 이뮤노머의 면역자극 활성에 중요한 역할을 한다는 것을 시사한다. 가장 좋은 면역자극 효과는 산재된 포스페이트 전하를 가지고 있는 비염기성 링커 또는 C3- 내지 C6-알킬 링커를 사용하는 경우에 달성되었다.

[0198] 표 12. 이뮤노머 구조 및 면역자극 활성

번호	서열 및 변형 (5'-3')	올리고 길이/ 또는 각 사슬	IL-12 (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)
			0.3 µg/mL	1 µg/mL
4	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'	18량체	257	635
73	5'-CTGACGTTCT-3' 5'-CTGACGTTCT-3' > X <sub>1</sub>	10량체	697	1454
74	5'-CTGACGTTCT-3' 5'-CTGACGTTCT-3' > X <sub>2</sub>	10량체	1162	669
75	5'-CTGACGTTCT-3' 5'-CTGACGTTCT-3' > X <sub>3</sub>	10량체	1074	1375
76	5'-CTGACGTTCT-3' 5'-CTGACGTTCT-3' > X <sub>4</sub>	10량체	563	705
77	5'-CTGACGTTCT-3' 5'-CTGACGTTCT-3' > X <sub>5</sub>	10량체	264	543
78	5'-CTGACGTTCT-3' 5'-CTGACGTTCT-3' > X <sub>6</sub>	10량체	1750	2258
79	5'-CTGACGTTCT-3' 5'-CTGACGTTCT-3' > (X <sub>3</sub> psX <sub>3</sub> )	10량체	2255	2034
80	5'-CTGACGTTCT-3' 5'-CTGACGTTCT-3' > (X <sub>3</sub> psX <sub>3</sub> psX <sub>3</sub> )	10량체	1493	1197
81	5'-CTGACGTTCT-3' 5'-CTGACGTTCT-3' > (X <sub>6</sub> psX <sub>6</sub> )	10량체	3625	2642
82	5'-CTGACGTTCT-3' 5'-CTGACGTTCT-3' > (X <sub>6</sub> psX <sub>6</sub> psX <sub>6</sub> )	10량체	4248	2988
83	5'-CTGACGTTCT-3' 5'-CTGACGTTCT-3' > PO <sub>3</sub> S	10량체	1241	1964



[0200] 실시예 8: 올리고뉴클레오타이드 골격이 면역자극 활성에 미치는 효과

[0201] 일반적으로 천연 포스포디에스테르 골격을 함유하는 면역자극성 올리고뉴클레오타이드는 포스포로티오에이트 골격을 가지고 있는 동일한 길이의 올리고뉴클레오타이드보다 면역자극성이 덜하다. 이런 더 낮은 정도의 면역자극 활성은 부분적으로는 실험 조건하에서의 포스포디에스테르 올리고뉴클레오타이드의 빠른 분해에 기인하는 것일 수 있다. 올리고뉴클레오타이드의 분해는 일차적으로 3' 말단으로부터 올리고뉴클레오타이드를 분해시키는 3'-엑소뉴클레아제의 결과이다. 이 실시예의 이뮤노머는 유리 3' 말단을 함유하지 않는다. 그러므로 포스포디에스테르 골격을 가지고 있는 이뮤노머는 실험 조건하에서 상응하는 단량체 올리고뉴클레오타이드보다 더 긴 반감기를 가져야 하고, 따라서 개선된 면역자극 활성을 나타내야 한다. 하기 표 13에 나타낸 결과는 BALB/c 마우스 비장 세포 배양물중에서 시토킨 유도에 의해 측정된 면역자극 활성을 나타내는 이뮤노머 84 및 85를 사용하여 이런 효과를 증명한다.

[0203] 표 13. 이뮤노머 구조 및 면역자극 활성

번호	서열 및 변형 (5'-3')	올리고 길이/ 또는 각 사슬	IL-12 (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)
			0.3 µg/mL	1 µg/mL
4	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'	18량체	225	1462
84	5'-CTGACGTTCTCTGT-3' 5'-CTGACGTTCTCTGT-3' > 3'-T-5' (PO)	14량체	1551	159
85	5'-LLCTGACGTTCTCTGT-3' 5'-LLCTGACGTTCTCTGT-3' > 3'-T-5' (P)	14량체	466	467

L = C3- 링커

[0205] 실시예 9: 이뮤노머 73 내지 92의 합성

[0206] 올리고뉴클레오타이드를 1  $\mu$ M 규모로 자동 DNA 합성기 (Expedite 8909 PerSeptive Biosystems)를 사용하여 합성하였다. 데옥시뉴클레오시드 포스포라미다이트는 어플라이드 바이오시스템스 (Applied Biosystems, Foster City, CA)로부터 얻었다. 7-데아자-2'-데옥시구아노신 포스포라미다이트를 글렌 리서치 (Glen Research, Sterling Virginia)로부터 얻었다. 1,3-비스-DMT-글리세롤-CPG 를 켐젠스 (ChemGens, Ashland, MA)로부터 얻었다. 변형된 뉴클레오시드를 정상적인 커플링 사이클을 사용하여 특정 부위에서 올리고뉴클레오타이드에 통합하였다. 합성후에 올리고뉴클레오타이드를 농축된 수산화 암모늄을 사용하여 탈보호하고, 역상 HPLC에 의하여 정제하고, 투석하였다. 나트륨 염으로서 정제된 올리고뉴클레오타이드를 사용전에 동결건조시켰다. 올리고뉴클레오타이드의 순도를 CGE 및 MALDI-TOF MS (Bruker Proflex III MALDI-TOF 질량 분광계)에 의해 체크하였다.

[0207] 실시예 11: 이뮤노머 안정성

[0208] 올리고뉴클레오타이드를 10 % 우혈청이 함유되어 있는 PBS 중에서 37 °C에서 4, 24 또는 48 시간 동안 인큐베이션하였다. 온전한 올리고뉴클레오타이드를 모세관 겔 전기영동에 의하여 측정하였다. 그 결과를 하기 표 14에 나타낸다.

[0209] 표 14. 10 % 우혈청 PBS 용액중에서의 올리고뉴클레오타이드의 분해

올리고 번호	서열 및 변형 (5'- 3')	올리고의 CE 분석 (분해 후 남아있는 무손상 올리고 %)		
		4시간 후	24시간 후	48시간 후
4	5-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'/PS	90.9	71.8	54.7
26	(5'-TCTGTCGTTCTCTGT) <sub>2</sub> S/PS (G=dG <sub>데아자</sub> )	97.1	91.0	88.1
86	(5'-CTGTCGTTCTCTGT) <sub>2</sub> S/PO		37.8	22.5
87	(5'-XXCTGTCGTTCTCTGT) <sub>2</sub> S/PO	73.1	56.8	36.8
88	(5'-UCTGTCGTTCTCTGT) <sub>2</sub> S/PO		48.4	36.7

X = C3-링커, U, C = 2'-OMe-리보뉴클레오타이드

[0210] 실시예 12: 접근가능한 5' 말단이 면역자극 활성화에 미치는 효과

[0212] BALB/c 마우스 (4 내지 8 주) 비장 세포를 RPMI 완전 배지중에서 배양하였다. 무린 대식세포-유사 세포인 J774 (ATCC, Rockville, MD)를 10 % (v/v)의 FCS 및 항생물질 (100 IU/ml의 페니실린 G/스트렙토마이신)가 첨가되어 있는 돌베코 변형 이글스 배지중에서 배양하였다. 모든 다른 배양 시약은 메디아테크 (Mediatech, Gaithersburg, MD)로부터 구입하였다.

[0213] IL-12 및 IL-6에 대한 ELISA. BALB/c 마우스 비장 또는 J774 세포를 24-웰 디쉬에 각각  $5 \times 10^6$  또는  $1 \times 10^6$  세포/ml의 밀도로 플레이팅하였다. TE 완충액 (10 mM 트리스-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA)에 용해된 CpG DNA를, 마우스 비장 세포 배양물에는 최종 농도가 0.03, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 또는 10.0  $\mu$ g/ml이 되도록, 그리고 J774 세포 배양물에 대해서는 최종 농도가 1.0, 3.0 또는 10.0  $\mu$ g/ml이 되도록 첨가하였다. 그런 다음 세포를 37 °C에서 24 시간 동안 인큐베이션하고, 그 상층액을 수집하여 ELISA 검정을 수행하였다. 실험을 각 농도에 대하여 삼중으로 각 CpG DNA에 대하여 2 또는 3회 수행하였다.

[0214] IL-12 및 IL-6의 분비는 샌드위치 ELISA에 의해 측정하였다. 시토킨 항체 및 표준을 포함하여 필요한 시약들은 파밍겐 (PharMingen)으로부터 구입하였다. ELISA 플레이트 (Costar)를 PBSN 완충액 (PBS/0.05 % 나트륨 아지드, pH 9.6)중의 5  $\mu$ g/ml 농도의 적절한 항체와 함께 밤새 4 °C에서 인큐베이션한 후, PBS/1 % BSA로 37 °C에서 30분동안 차단하였다. 세포 배양 상층액 및 시토킨 표준을 PBS/1 % BSA로 적당하게 희석하고 플레이트에 삼중으로 첨가한 다음 25 °C에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 세척하고 1  $\mu$ g/ml의 적당한 비오틴화된 항체와 함께 25°C에서 1.5 시간 동안 인큐베이션하였다. 그런 다음 플레이트를 PBS/0.05 % 트윈 20으로 집중적으로 세척한 후 다시 25 °C에서 1.5 시간 동안 인큐베이션한 후, 스트렙타비딘 컨쥬게이션된 퍼옥시다제 (Sigma)를 첨가하였다. 플레이트를 Sure Blue<sup>TM</sup> (Kirkegaard and Perry) 발색 시약으로 전개시키고 스타프 용액 (Kirkegaard and Perry)을 첨가함으로써 반응을 종결지었다. 색 변화를 Ceres 900 HDI 분광계 (Bio-Tek Instruments)상에서 측정하였다. 세포 배양 상층액중의 IL-12 및 IL-6의 수준은 각각 IL-12 와 IL-6에 대한 동일한 실험 조건하에서 작성된 표준 곡선으로부터 계산하였다. 그 결과를 하기 표 15에 나타내었다.

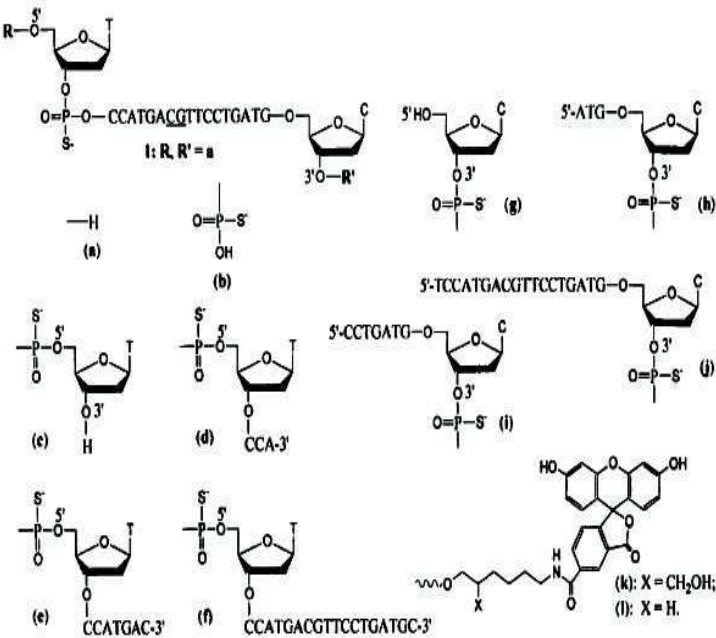
[0215] 표 15. 연구에 사용된 포스포로티오에이트 CpG DNA 서열 및 변형<sup>a</sup>

CpG DNA #	서열	길이	5'-말단	3'-말단
89	5'-TCCATGACGTTTCCTGATGC-3'	19-량체	1	1
90	5'-TCCATGACGTTTCCTGATGC-3'-b	19-량체	1	차단됨
91	5'-TCCATGACGTTTCCTGATGC-3'-3'-g-5'	20-량체	2	차단됨
92	5'-TCCATGACGTTTCCTGATGC-3'-3'-h-5'	23-량체	2	차단됨
93	5'-TCCATGACGTTTCCTGATGC-3'-3'-i-5'	27-량체	2	차단됨
94	5'-TCCATGACGTTTCCTGATGC-3'-3'-j-5'	38-량체	2	차단됨
95	b-5'-TCCATGACGTTTCCTGATGC-3'	19-량체	차단됨	1
96	3'-e-5'-5'-TCCATGACGTTTCCTGATGC-3'	20-량체	차단됨	2
97	3'-d-5'-5'-TCCATGACGTTTCCTGATGC-3'	23-량체	차단됨	2
98	3'-e-5'-5'-TCCATGACGTTTCCTGATGC-3'	27-량체	차단됨	2
99	3'-f-5'-5'-TCCATGACGTTTCCTGATGC-3'	38-량체	차단됨	2
100	5'-TCCATGACGTTTCCTGATGC-3'-k	19-량체	1	차단됨
101	i-5'-TCCATGACGTTTCCTGATGC-3'	19-량체	차단됨	1

[0216]

[0217] <sup>a</sup>: 화학적 구조 b ~ l에 대해서는 차트 1 참조; 5'-CG-3' 디뉴클레오타이드는 밑줄로 표시한다.

[0218] 차트 1



[0219]

[0220] 표 16. BALB/c 마우스 비장 세포 배양물중의 CpG DNA-컨쥬게이트에 의한 IL-12 및 IL-6 분비의 유도

CpG DNA # <sup>a</sup>	IL-12 (pg/mL)±SD					IL-6 (pg/mL)±SD				
	0.1µg/mL	0.3µg/mL	1.0µg/mL	3.0µg/mL	10.0µg/mL	0.1µg/mL	0.3µg/mL	1.0µg/mL	3.0µg/mL	10.0µg/mL
89	991±121	1820±224	2391±175	3507±127	2615±279	652±48	2858±180	13320±960	18625±1504	17229±1750
90	526±32	2100±175	1499±191	3019±35	3489±162	1387±152	1426±124	5420±370	19096±484	19381±2313
91	1030±11	1348±102	2060±130	3330±130	3582±239	923±22	2542±81	9054±120	14114±179	13693±264
92	1119±159	1726±207	2434±100	2966±204	3215±464	870±146	1905±56	7841±350	17146±1246	15713±693
93	1175±68	2246±124	1812±75	2388±320	2543±202	1152±238	3499±116	7142±467	14064±167	13566±477
94	1087±121	1705±163	1797±141	2522±195	3054±103	1039±105	2043±157	4848±288	15527±224	21021±1427
95	1173±107	2170±155	2132±58	2812±203	3689±94	807±0.5	927±0.5	3344±0.5	10233±0.5	9213±0.5
96	866±51	1564±63	1523±63	2666±97	4030±165	750±63	1643±30	5559±415	11549±251	11060±651
97	227±3	495±96	1007±68	897±15	1353±97	302±18	374±22	1000±68	9106±271	13077±381
98	139±18	211±12	452±22	458±29	1178±237	220±23	235±18	383±35	1706±33	11530±254
99	181±85	282±105	846±165	2082±185	3185±63	467±122	437±85	1697±283	9781±13	11213±294
백지	86±6					60±12				

<sup>a</sup>: 시험에 대해서는 표 1을 참조하라.

[0221]

[0222]

이들 결과를 함께 고려하면, CpG DNA의 접근가능한 5'-말단은 그것의 최적 면역자극 활성화에 필요하며, 더 작은 기, 예컨대 포스포로티오에이트, 모노뉴클레오티드, 또는 디뉴클레오티드는 면역자극 경로에 포함된 수용체 또는 인자들에 대한 CpG DNA의 5'-말단의 이용성을 효과적으로 차단하지 못하는 것으로 나타난다. 그러나 CpG DNA의 5'-말단에서 플루오레신 또는 더 큰 분자같이 큰 분자의 컨쥬게이션은 면역자극 활성을 제거할 수 있다. 이들 결과는 CpG DNA-항원/백신/모노클로날 항체 (mAb) 컨쥬게이트의 면역자극 활성을 연구하는 데 직접적인 영향을 준다. CpG DNA의 5'-말단에서의 백신 또는 mAb와 같은 큰 분자의 컨쥬게이션은 CpG DNA의 차선의 면역자극 활성을 유도할 수 있다. CpG DNA의 3'-말단에서의 기능성 리간드의 컨쥬게이션은 증가된 뉴클레아제 안정성에 기여할 뿐 아니라 생체내에서 CpG DNA의 증가된 면역자극 능력에도 기여한다.

[0223]

### 실시예 13: 링커가 시토킨 분비에 미치는 효과

[0224]

본 연구를 위하여 다음의 올리고뉴클레오티드를 합성하였다. 이들 변형된 올리고뉴클레오티드의 각각은 이뮤노머내로 통합될 수 있다.

[0225] 표 17. 치환 위치를 나타내는 CpG DNA의 서열

CpG DNA 번호	서열 (5'→3') <sup>a</sup>
102	CCTACTAGCGTTCTCATC
103	CCTACTAGC2TTCTCATC
104	CCTACT2GCGTTCTCATC
105	CCTA2TAGCGTTCTCATC
106	CCT2TAGCGTTCTCATC
107	22TAGCGTTCTCATC
108	CCTACTAGCGT2CTCATC
109	CCTACTAGCGTTC2CATC
110	CCTACTAGCGTTC22ATC
111	CCT6TAGCGTTCTCATC
112	CCTACTAGCGTTC6CATC
113	CCT7TAGCGTTCTCATC
114	CCTACTAGCGTTC7CATC
4	CTATCTGACGTTCTCTGT
115	CTAT1TGACGTTCTCTGT
116	CTA1CTGACGTTCTCTGT
117	CTATCTG2CGTTCTCTGT
118	CTATC2GACGTTCTCTGT
119	CTA2CTGACGTTCTCTGT
120	2222TGACGTTCTCTGT
121	2222TGACGTTCTCTGT
122	222TGACGTTCTCTGT
123	22TGACGTTCTCTGT
124	2TGACGTTCTCTGT
125	CTAT3TGACGTTCTCTGT
126	CTA3CTGACGTTCTCTGT
127	CTA33TGACGTTCTCTGT
128	33TGACGTTCTCTGT
129	CTAT4TGACGTTCTCTGT
130	CTA4CTGACGTTCTCTGT
131	CTA44TGACGTTCTCTGT
132	44TGACGTTCTCTGT
133	CTAT5TGACGTTCTCTGT
134	CTA5CTGACGTTCTCTGT
135	CTA55TGACGTTCTCTGT

136	55TGACGTTCTCTGT
137	CTA6CTGACGTTCTCTGT
138	CTATCTGACGTTCTCTGT
139	CTA7CTGACGTTCTCTGT
140	CTATCTGACGTTCTCTGT
141	CTATCTG8CGTTCTCTGT
142	CTATCT8ACGTTCTCTGT
143	CTATC8GACGTTCTCTGT
144	CTAT8TGACGTTCTCTGT
145	CTA8CTGACGTTCTCTGT
146	CTATCTGACG8TCTCTGT
147	CTATCTGACG8CTCTGT
148	CTATCTGACGTT8TCTGT
149	CTATCTGACGTT8CTGT
150	CTATCTG9CGTTCTCTGT
151	CTATCT9ACGTTCTCTGT
152	CTA9CTGACGTTCTCTGT
153	CTATCTGACG9TCTCTGT
154	CTATCTGACGTT9CTGT

[0227]

[0228]

<sup>a</sup>: 치환 1 내지 9의 화학적 구조에 대해서는 도 14를 참조하라. 모든 CpG DNA는 포스포로티오에이트 골격이 변형되었다.

[0229]

면역자극 활성의 강화를 위한 최적 링커 크기를 평가하기 위해서 본 발명자들은, BALB/c 마우스 비장 세포 배양물에서 변형된 CpG DNA에 의해 유도된 IL-12 및 IL-6의 분비를 측정하였다. 모든 CpG DNA는 농도-의존성 IL-12 및 IL-6 분비를 유도하였다. 도 15는 모 CpG DNA와 비교하여, CpG 디뉴클레오티드에 대해 5'-플랭킹 서열에서 다섯번째 뉴클레오티드에 링커를 가지고 있는 선택된 CpG DNA, 116, 119, 126, 130 및 134의 1 µg/ml의 농도에서 얻어진 결과를 나타낸다. C2-(1), C3-(2), 및 C4-링커 (3)을 함유한 CpG DNA는 모 CpG DNA 4의 것과 유사한 IL-12 생성물의 분비를 유도하였다. 5'-플랭킹 서열에서 CpG 디뉴클레오티드로부터 다섯번째 뉴클레오티드에 있는 C6 및 C9-링커 (4 및 5)를 함유한 CpG DNA는 모 CpG DNA가 유도한 것보다 더 낮은 수준의 IL-12 분비를 유도하였는데 (도 15), 이것은 C4-링커보다 더 긴 링커의 치환이 더 낮은 수준의 IL-12를 유도하는 결과를 초래하였음을 시사한다. 링커가 있는 다섯개의 모든 CpG DNA는 모 CpG DNA보다 2배 내지 3배 더 높은 IL-6 분비를 유

도하였다. 이들 CpG DNA에서 링커의 존재는 링커를 가지고 있지 않은 CpG DNA와 비교하여 IL-6의 유도에 상당한 영향을 주었다. 그러나 본 발명자들은 IL-6 분비에 대한 길이-의존성 링커 효과는 관찰하지 못하였다.

[0230] 에틸렌글리콜-링커를 함유하고 있는 CpG DNA의 면역자극 활성화에 미치는 효과를 조사하기 위해, 본 발명자들은 트리에틸렌글리콜-링커 (6)가 각각 CpG 디뉴클레오타이드에 대해 5'-말단의 다섯번째 뉴클레오타이드 위치 및 3'-플랭킹 서열의 네번째 뉴클레오타이드 위치에 통합되어 있는 CpG DNA 137 및 138을 합성하였다. 마찬가지로 CpG DNA 139 및 140은 헥사에틸렌글리콜-링커 (7)를 각각 CpG 디뉴클레오타이드에 대해 5'- 또는 3'-플랭킹 서열에 함유하고 있다. 네 개의 변형된 CpG DNA (137 ~ 140)를 모두 BALB/c 마우스 비장 세포 배양물에서 시토킨 유도 (IL-12, IL-6 및 IL-10)에 대하여 시험하고, 모 CpG DNA 4와 비교하였다. 모든 CpG DNA는 시험된 농도 범위 (0.03 내지 10.0  $\mu\text{g/ml}$ )에 걸쳐 농도-의존성 시토킨 생성을 유도하였다 (데이터는 제시하지 않음). 0.3  $\mu\text{g/ml}$  농도의 CpG DNA 137 ~ 140에 의해 유도된 시토킨의 수준은 하기 표 18에 나타낸다. 5'-플랭킹 서열에 에틸렌글리콜-링커를 가지고 있는 CpG DNA 137 및 139는 모 CpG DNA 4가 유도한 것보다 더 높은 수준으로 IL-12 ( $2106 \pm 143$  및  $2066 \pm 153$  pg/ml) 및 IL-6 ( $2362 \pm 166$  및  $2507 \pm 66$  pg/ml) 분비를 유도하였다 (표 18). 동일한 농도에서 137과 139는 모 CpG DNA보다는 약간 더 낮은 수준의 IL-10 분비를 유도하였다 (표 18). 3'-플랭킹 서열에 더 짧은 에틸렌글리콜-링커 (6)를 가지고 있는 CpG DNA 138은 모 CpG DNA와 유사한 IL-12 분비를 유도하였지만, IL-6 및 IL-10의 수준은 상당히 더 낮았다 (표 18). 더 긴 에틸렌글리콜-링커 (7)를 가지고 있는 CpG DNA 140은 모 CpG DNA와 비교하여, 세 가지의 시험된 모든 시토킨을 상당히 더 낮은 수준으로 유도하였다 (표 18).

[0231] 트리에틸렌글리콜-링커 (6)가 C9-링커 (5)와 유사한 사슬 길이를 가지고 있긴 하지만, 트리에틸렌글리콜-링커를 함유하고 있는 CpG DNA는 비장 세포 배양물에서 시토킨 분비의 유도에 의해 측정하여 C9-링커를 함유하고 있는 CpG DNA 보다 더 좋은 면역자극 활성을 가지고 있다. 이들 결과는 더 긴 알킬-링커 (4 및 5)를 함유하고 있는 CpG DNA로 관찰된 더 낮은 면역자극 활성이 그것들의 증가된 길이가 아니라 소수성 특성과 관련이 있을 것이라는 점을 시사한다. 이러한 관찰은 본 발명자들로 하여금 면역자극 활성화에 대해 친수성 작용기를 함유하고 있는 분지된 알킬-링커의 치환을 조사하게 하였다.

[0232] **표 18.** BALB/c 마우스 비장 세포 배양물에서 에틸렌글리콜-링커를 함유하는 CpG DNA에 의해 유도된 시토킨 분비.

[0233]

CpG DNA 번호	시토킨, pg/ml		
	IL-12	IL-6	IL-10
<b>4</b>	$1887 \pm 233$	$2130 \pm 221$	$86 \pm 14$
<b>137</b>	$2106 \pm 143$	$2362 \pm 166$	$78 \pm 21$
<b>138</b>	$1888 \pm 259$	$1082 \pm 25$	$47 \pm 14$
<b>139</b>	$2066 \pm 153$	$2507 \pm 66$	$73 \pm 17$
<b>140</b>	$1318 \pm 162$	$476 \pm 13$	$25 \pm 5$
매질	$84 \pm 13$	$33 \pm 6$	$2 \pm 1$

[0234] 분지된 알킬-링커를 함유하고 있는 CpG DNA의 면역자극 활성화에 미치는 효과를 시험하기 위하여 히드록실 (8) 또는 아민 (9) 작용기를 함유하는 2개의 분지된 알킬-링커를 모 CpG DNA 4에 통합시키고 그 결과 변형된 CpG DNA (150 ~ 154-표 19)의 면역자극 활성화에 미치는 효과를 조사하였다. 상이한 뉴클레오타이드 위치에 아미노-링커 (9)를 함유하고 있는 CpG DNA 150 내지 154를 사용하여 BALB/c 마우스 비장 세포 배양물에서 (증식) 및 생체내에서 (비장비대) 얻어진 데이터를 하기 표 19에 나타내었다.

[0235] **표 19.** BALB/c 마우스 비장 세포 배양물 및 BALB/c 마우스의 비장 비대에서 아미노부틸 프로판디올-링커를 함유하고 있는 CpG DNA에 의해 유도된 비장 세포 증식

[0236]

CpG DNA 번호 <sup>a</sup>	비장 세포 증식 (PI) <sup>b</sup>	비장 무게 (mg) <sup>c</sup>
4	$3.7 \pm 0.8$	$121 \pm 16$
150	$2.5 \pm 0.6$	$107 \pm 11$
151	$9.2 \pm 0.7$	$169 \pm 16$
152	$8.8 \pm 0.4$	$220 \pm 8$
153	$7.6 \pm 0.7$	$127 \pm 24$
154	$7.8 \pm 0.04$	$177 \pm 12$
M/V	$1.2 \pm 0.3$	$102 \pm 8$
LPS	$2.8 \pm 0.5$	ND 10

- [0237] 모 (parent) CpG DNA 4는 0.1  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서  $3.7 \pm 0.8$ 의 증식 지수를 보였다. 동일한 농도에서 상이한 위치에 아미노-링커 9를 가지고 있는 변형된 CpG DNA 151 내지 154는 모 CpG DNA보다 더 높은 수준으로 비장 세포 증식을 유발하였다 (표 19). 다른 링커들로도 관찰된 바와 같이 치환이 CpG 디뉴클레오타이드와 인접하여 일어난 경우 (150), 모 CpG DNA와 비교하여 더 낮은 증식 지수가 관찰되었고, 이것은 추가로 CpG 디뉴클레오타이드에 인접하여 링커 치환이 일어나는 것이 면역자극 활성화에는 불리한 영향을 미친다는 것을 확인해준다. 일반적으로 5'-플랭킹 서열에서 2'-데옥시리보뉴클레오타이드에 대한 아미노-링커의 치환 (151 및 152)은 3'-플랭킹 서열에서의 치환 (153 및 154)으로 발견된 것보다 더 높은 비장 세포 증식을 초래하였다. 유사한 결과를 비장비대 분석에서도 관찰하였고 (표 19), 그것은 비장 세포 배양물에서 관찰된 결과를 확인해준다. 글리세롤-링커 (8)를 함유하고 있는 변형된 CpG DNA는 아미노-링커 (9)를 함유하고 있는 변형 CpG DNA로 관찰된 것과 유사하거나 약간 더 높은 면역자극 활성을 보였다 (데이터는 제시되지 않음).
- [0238] 링커 8 및 9를 함유하고 있는 CpG DNA의 면역자극 효과를 비교하기 위해, 본 발명자들은 5'-플랭킹 서열에 치환이 일어난 CpG DNA 145 및 152를 선택하여 BALB/c 마우스 비장 세포 배양물에서 시토킨 IL-12 및 IL-6 분비를 유도하는 그것들의 능력을 분석하였다. CpG DNA 145 및 152는 둘 다 농도-의존성 시토킨 분비를 유도하였다. 도 4는 모 CpG DNA 4와 비교된, 0.3  $\mu\text{g/ml}$  농도에서의 145 및 152에 의해 유도된 마우스 비장 세포 배양물중의 IL-12 및 IL-6 수준을 도시한다. 두 가지 CpG DNA는 모두 모 CpG DNA 4보다 더 높은 수준의 IL-12 및 IL-6 을 유도하였다. 글리세롤-링커 (8)를 함유하고 있는 CpG DNA는 아미노-링커 (9)를 함유하고 있는 CpG DNA보다 약간 더 높은 수준의 시토킨 (특히 IL-12)을 유도하였다 (도 16). 이들 결과는 추가로 친수성 기를 함유하고 있는 링커가 CpG DNA의 면역자극 활성화에는 더 유리하다는 것을 확인해준다.
- [0239] 본 발명자들은 CpG DNA의 다중 링커 치환의 2 가지의 상이한 측면을 조사하였다. 한 세트의 실험에서, 본 발명자들은 13-량체에 대한 뉴클레오타이드 서열의 길이를 유지시켰고, 1 내지 5 개의 C3-링커 (2)를 5'-말단 위치에 통합시켰다 (120 ~ 124). 이들 변형된 CpG DNA는 용해도에 문제를 일으키지 않으면서 링커의 길이의 증가가 미치는 영향을 연구하는 것을 가능하게 해주었다. 두번째 세트의 실험에서는, 본 발명자들은 CpG 디뉴클레오타이드에 대한 5'-플랭킹 서열에 인접한 위치에 2개의 동일한 링커 치환 (3, 4 또는 5)을 통합하였고, 그것이 면역자극 활성화에 어떠한 추가의 부가 효과를 나타내는지를 연구하였다.
- [0240] 변형된 CpG DNA를, BALB/c 마우스 비장 세포 배양물에서 모 CpG DNA 4와 비교하여 시토킨 생성을 유도하는 능력에 대하여 연구하였다. 모든 CpG DNA는 농도-의존성 시토킨 생성을 유도하였다. 1.0  $\mu\text{g/ml}$  농도의 CpG DNA에서 얻어진 데이터를 하기 표 20에 나타낸다. 이 분석에서 모 CpG DNA 4는 1  $\mu\text{g/ml}$  농도에서  $967 \pm 28$  pg/ml의 IL-12,  $1593 \pm 94$  pg/ml의 IL-6, 및  $14 \pm 6$  pg/ml의 IL-10 분비를 유도하였다. 표 20에 나타낸 데이터는 링커 치환의 수가 감소함에 따라 IL-12 유도 또한 감소되었음을 나타낸다. 그러나 CpG DNA 123 및 124에 의한 IL-12 분비의 더 낮은 수준의 유도는 CpG DNA의 더 짧은 길이의 결과일 수 있다. 15-뉴클레오타이드보다 더 짧은 변형되지 않은 CpG DNA를 사용한 본 발명자들의 연구 결과는 별 의미없는 면역자극 활성을 보였다 (데이터는 제시되지 않음). 링커 치환의 길이나 수가 IL-6 분비에 대한 효과를 반감시키는 것은 아니다. IL-10 분비가 링커 치환에 따라 증가되긴 하였지만, 이들 CpG DNA에 의한 전체적인 IL-10 분비는 최소였다.
- [0241] CpG 디뉴클레오타이드에 대한 5'-플랭킹 서열의 4번째 및 5번째 위치에 2개의 링커 치환을 함유하고 있는 CpG DNA (링커 3-127; 링커 4-131; 링커 5-135) 및 상응하는 5'-절단된 변형체 128, 132, 및 136 각각을, BALB/c 마우스 비장 세포 배양물중에서 시토킨 분비를 유도하는 능력에 대하여 시험하였다. 1.0  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 분비된 IL-12 및 IL-6의 수준은 도 17에 도시된다. 도 17에 제시된 결과는 면역자극 활성이 통합된 링커의 성질에 좌우됨을 시사한다. C4-링커 3으로 4번째와 5번째 뉴클레오타이드를 치환한 것 (CpG DNA 127)은 모 CpG DNA 4와 비교하여 시토킨 분비에 대해 미미한 영향을 나타냈고, 이것은 이들 위치에 있는 뉴클레오타이드 및 당이 수용체 인지 및/또는 결합에 불필요함을 시사한다. 링커 치환 (CpG DNA 128)을 지나친 뉴클레오타이드의 결실은 CpG DNA 4 및 127로 발견된 것보다 더 높은 수준의 IL-12 및 IL-6 분비를 유도하였다. 예상했던 바와 같이 2개의 C6-링커 (4)의 치환은 모 CpG DNA 4에 의해 유도된 것보다 더 낮은 수준의 IL-12 분비 및 유사한 IL-6 분비를 초래하였다. 5'-절단된 CpG DNA 132는 CpG DNA 131보다 더 높은 수준의 시토킨 분비를 유도하였다. 2개의 C9-링커 (5)를 가지고 있는 CpG DNA 135 및 136은 미미한 시토킨 분비를 유도하였으며, 이것은 상술한 바와 같이 동일한 링커를 함유하고 있는 단일-치환된 CpG DNA로 얻어진 결과를 확인해준다.

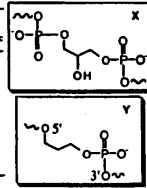
[0242] **실시예 14: 포스포디에스테르 연결이 시토킨 유도에 미치는 효과**

[0243] 이뮤노머-유도된 시토킨 유도에 미치는 포스포디에스테르 연결의 효과를 시험하기 위하여 다음의 분자들을 합성

하였다.

표 21. PO-이뮤노머 서열 및 분석 데이터

CpG DNA	서열 <sup>a</sup>	골격 <sup>b</sup>	분자량	
			계산치	실측치
4	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'	PS	5702	5704
155	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'	PO	5432	5428
156	5'-CTGACGTTCTCTGT-X-TGTCTCTTGCAGTC-5'	PO	8656	8649
157	5'-YVCTGACGTTCTCTGT-X-TGTCTCTTGCAGTCYY-5'	PO	9208	9214



<sup>a</sup> 화살표는 각각의 DNA 분자에서 CpG 디뉴클레오타이드의 5'-3'방향성을 나타내고 X 및 Y의 구조는 박스안에 도시되어 있다.

<sup>b</sup> PS 및 PO는 각각 포스포로티오에이트 및 포스포디에스테르 골격을 나타낸다.

<sup>c</sup> MALDI-TOF 질량 분광계에 의해 측정됨.

PS-CpG DNA 4 (표 21)는 마우스에서 면역 반응을 유도하는 것으로 밝혀졌고 (데이터는 제시하지 않음) PO-CpG DNA 155는 대조표준으로 작용하였다. PO-이뮤노머 156 및 157은 각각 글리세릴 링커 X (표 21)를 통해 3'-말단에 의해 결합된 모 CpG DNA 155의 2개의 동일한 절단된 복사물을 함유한다. 156과 157 각각이 14 염기의 동일한 올리고뉴클레오타이드 절편을 함유하고 있는 반면, 157의 5'-말단은 2 개의 C3-링커, Y (표 21)의 첨가에 의해 변형되었다. 모든 올리고뉴클레오타이드 4, 155 내지 157은 마우스 면역계를 활성화시키는 것으로 알려진 'GACGTT' 6량체 모티프를 함유한다.

뉴클레아제에 대한 PO-이뮤노머의 안정성을, 10 % 우태아 혈청 (FBS)(열로 인해 비활성화되지 않았음)을 함유하고 있는 세포 배양 배지중에서 CpG DNA 4, 155 내지 157을 37 °C에서 4, 24, 및 48 시간 동안 인큐베이션함으로써 분석하였다. 그런 다음 반응 혼합물중에 남아있는 온전한 CpG DNA를 CGE에 의해 측정하였다. 도 18A 내지 D는 10 % FBS에서 24시간 동안 인큐베이션된 CpG DNA 4, 155 ~ 157의 뉴클레아제 분해 프로필을 도시한다. 각 시점에서 남아있는 전장 CpG DNA의 양을 도 18E에 도시한다. 예상했던 바와 같이 모 CpG DNA 4가 혈청 뉴클레아제에 대해 가장 큰 내성을 나타냈다. 18-량체 4는 약 55 %가 48시간 인큐베이션 후에 분해되지 않은 채로 남아있었다. 대조적으로 전장 PO-이뮤노머 155는 단지 약 5 %만이 동일한 실험 조건하에서 약 4 시간 후에 남아있었고, 이것은 포스포디에스테르 연결을 함유하고 있는 DNA가 빠르게 분해된다는 것을 확인해준다. 예상했던 바와 같이 PO-이뮤노머 156과 157은 둘 다 혈청 뉴클레아제에 대해 155 보다는 더 내성이었다. 4 시간 후에 155의 약 5 %와 비교했을 때 156과 157 각각의 약 62 % 및 73 %가 온전하게 남아있었다 (도 18 E). 48시간 후에는, 156과 157의 약 23 % 및 37 %가 분해되지 않은 채로 남아있었다. 이들 연구 결과는 3'-3'-연결된 PO-이뮤노머가 혈청 뉴클레아제에 대해 더 안정함을 보여줄 뿐 아니라, 5'-말단에서의 화학적 변형이 추가로 뉴클레아제 안정성을 증가시킬 수 있음을 나타낸다.

CpG DNA의 면역자극 활성을 BALB/c 및 C3H/HeJ 마우스 비장 세포 배양물중에서 분비된 시토킨 IL-12 및 IL-6의 수준을 측정함으로써 연구하였다. 모든 CpG DNA는 BALB/c 마우스 비장 세포 배양물중에서 농도-의존성 시토킨 분비를 유도하였다 (도 19). PS-CpG DNA 4는 3 µg/ml에서 각각 2656±256 및 12234±1180 pg/ml의 IL-12 및 IL-6을 유도하였다. 모 PO-CpG DNA 155는 10 µg/ml 농도에서를 제외하면 바탕값 이상으로 시토킨 수준을 상승시키지 못하였다. 이 관찰은 뉴클레아제 안정성 분석 결과와 일치한다. 대조적으로 PO-이뮤노머 156 및 157은 BALB/c 마우스 비장 세포 배양물중에서 IL-12 및 IL-6 두 가지 모두의 분비를 유도하였다.

도 19에 도시된 결과는 PS- 및 PO-CpG DNA의 시토킨 유도 프로필의 분명한 차이를 보여준다. PO-이뮤노머 156 및 157은 BALB/c 마우스 비장 세포 배양물중에서 PS-CpG DNA 4보다 더 높은 수준의 IL-12를 유도하였다 (도 19A). 대조적으로 3 µg/ml의 농도에서는 무시해도 좋을 정도의 양으로 IL-6을 생성하였다 (도 19B). 가장 높은 농도 (10 µg/ml)에서조차도 PO-이뮤노머 156은 PS-CpG DNA 4보다 상당히 덜 IL-6을 유도하였다. PO-이뮤노머 157의 5'-말단에 있는 C3 링커의 존재는 156과 비교하여 약간 더 높은 수준의 IL-6 분비를 초래하였다. 그러나 중요한 것은 PO-이뮤노머 157에 의해 유도된 IL-6의 수준은 PS CpG DNA 4에 의해 유도된 IL-6보다 훨씬 더 낮다는 사실이다. 도 19A의 삽입도는 3 µg/ml 농도에서 분비된 IL-6에 대한 IL-12의 비율을 나타낸다. IL-12 분비를 증가시키는 것 외에 PO-이뮤노머 156 및 157은 BALB/c 마우스 비장 세포 배양물중에서 PS-CpG DNA 4보다 더 높

은 수준의 IFN- $\gamma$ 를 유도하였다 (데이터는 제시되지 않음).

[0253] BALB/c 마우스 비장 세포 배양물중에서 PO- 및 PS-CpG DNA에 의해 유도된 상이한 시토킨 프로파일로 인해, 본 발명자들은 C3H/HeJ 마우스 비장 세포 배양물 (LPS 저-반응성 스트레인)중에서 CpG DNA에 의한 시토킨 유도 패턴을 연구하게 되었다. 이 분석에서 시험된 3개의 모든 CpG DNA는 농도-의존성 시토킨 분비를 유도하였다 (도 20A 및 B). BALB/c 마우스 비장 세포 배양물중에서 PO-CpG DNA 155가 시토킨 분비를 못하였기 때문에 그것은 C3H/HeJ 비장 세포 배양물 중에서는 더 이상 시험하지 않았다. PO-이뮤노머 156 및 157은 둘 다 PS-CpG DNA 4보다 더 높은 IL-12 생성을 유도하였다 (도 20A). 그러나 3  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 아무 것도 IL-6을 유도하지 못하였다. 가장 높은 시험 농도 (10  $\mu\text{g/ml}$ )에서는 두 가지 모두 PS-CpG DNA 4보다 상당히 더 적은 양으로 IL-6을 유도하였다 (도 20B).

[0254] 분비된 IL-6에 대한 IL-12의 비율을 계산하여 PS 및 PO CpG DNA의 시토킨 분비 프로파일을 구별하는 데 사용하였다 (도 20A 삽입도). 또한 C3H/HeJ 비장 세포 배양물의 결과는 CpG DNA로 관찰된 반응이 LPS 오염에 의한 것이 아님을 보여준다.

[0255] PS-CpG DNA는 생체내에서 강력한 항종양 활성을 유도하는 것으로 밝혀졌다. PO-CpG DNA가 더 큰 뉴클레아제 안정성을 나타내고 시험관내 분석에서 더 높은 수준의 IL-12 및 IFN- $\gamma$  분비를 유도하였기 때문에 본 발명자들은 PO-이뮤노머의 이런 바람직한 성질이 생체내에서 항종양 활성을 개선시키는지를 밝혀내는 데 관심을 모았다. 본 발명자들은 PO-이뮤노머 157을, 야생형 p53을 발현하는 MCF-7 유방암 세포 또는 돌연변이된 p53을 발현하는 DU-145 전립선암 세포의 종양 이종이식편을 내포하고 있는 누드 마우스에 0.5 mg/kg의 용량으로 격일로 피하 투여하였다. PO-이뮤노머 157은 식염수 대조표준과 비교하여 제 15일에 MCF-7 종양 성장을 57 % 억제하였다 (도 21A). 그것은 또한 제 34일에 DU-145 종양 성장을 52 % 억제하였다 (도 21B). 이들 항종양 연구는 제안된 디자인의 PO-이뮤노머가 생체내에서 강력한 항종양 활성을 나타낸다는 것을 시사한다.

[0256] 실시예 22: 짧은 이뮤노머

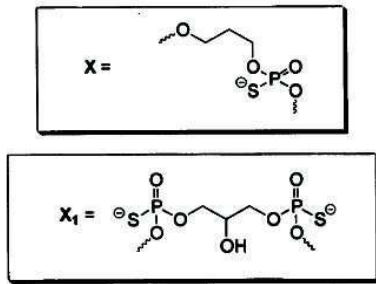
[0257] 시토킨 유도에 미치는 짧은 이뮤노머의 영향을 시험하기 위하여 다음의 이뮤노머들을 사용하였다. 이들 결과는 절편 당 5 뉴클레오티드 정도로 짧은 이뮤노머가 시토킨 생성을 유도하는 데 효과적임을 나타낸다.

[0258] 표 22. 이뮤노머 구조 및 BALB/c 마우스 비장 세포 배양물중의 면역자극 활성

올리고 번호	시열 및 변형 (5'-3')	올리고 길이/ 또는 각 사슬	IL-12 (pg/mL) 10 $\mu\text{g/mL}$	IL-6 (pg/mL) 10 $\mu\text{g/mL}$
4	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'	18량체	2731	4547
25	5'-CTATCTGTCGTTCTCTGT-3'	18량체	795	789
158	5'-TCTGACGTTCT-3' 5'-TCTGACGTTCT-3'	11량체	3490	5319
159	5'-TCTGTCGTTCT-3' 5'-TCTGTCGTTCT-3'	11량체	3265	4625
160	5'-TCGTTG-3' 5'-TCGTTG-3'	6량체	2085	2961
161	5'-TCGTTG-3'XX 5'-TCGTTG-3'XX	6량체	3169	5194
162	5'-TCGTTG-3'X 5'-TCGTTG-3'X	6량체	1015	705
163	5'-TCGTT-3'X 5'-TCGTT-3'X	5량체	2623	3619
164	5'-TCGTT-3'X 5'-ACGTTG-3'X	6량체	564	845
165	5'-GCGTTG-3'X 5'-GCGTTG-3'X	6량체	196	0
166	5'-CCGTTG-3'X 5'-CCGTTG-3'X	6량체	219	0
167	5'-GTCGTT-3'X 5'-GTCGTT-3'X	6량체	1441	5056
168	5'-TGTCGT-3'X 5'-TGTCGT-3'X	6량체	198	0
169	5'-TCGTTG-3'X 5'-TCGTTG-3'X-X3'-GTTGCT-3'	6량체	2410	4857

[0259]

[0260] 정상적인 글씨체는 포스포로티오에이트 연결을 나타낸다.



[0261]

[0262] 균등물

[0263] 전술한 발명이 명료함과 이해를 목적으로 어느 정도 상세하게 설명되긴 하였지만, 당업자에게는 본 명세서를 숙지함에 따라 본 발명의 범주 및 첨부되는 특허청구범위를 벗어남이 없이 외형 및 상세한 부분에 다양한 변화가 이루어질 수 있음이 분명할 것이다.

### 도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 본 발명의 대표적인 이뮤노머의 개략적인 도면이다.

[0027] 도 2는 본 발명의 여러가지 대표적인 이뮤노머를 도시한다.

[0028] 도 3은 본 발명의 이뮤노머의 선형 합성을 위해 적합한 대표적인 작은 분자 링커의 균을 도시한다.

[0029] 도 4는 본 발명의 이뮤노머의 병렬 합성을 위해 적합한 대표적인 작은 분자 링커의 균을 도시한다.

[0030] 도 5는 본 발명의 이뮤노머의 선형 합성에 대한 합성 반응식이다. DMTr = 4,4'-디메톡시트리틸; CE = 시아노에틸.

[0031] 도 6은 본 발명의 이뮤노머의 병렬 합성에 대한 합성 반응식이다. DMTr = 4,4'-디메톡시트리틸; CE = 시아노에틸.

[0032] 도 7a는 BALB/c 마우스 비장 세포 배양물중에서의 이뮤노머 1 내지 3에 의한 IL-12의 유도를 그래프로 도시한다. 이들 데이터는 접근가능한 5'-말단을 가지고 있는 이뮤노머 2가 단량체 올리고 1 보다 더 강한 IL-12의 유도인자라는 것과, 접근가능한 5'-말단이 없는 이뮤노머 3이 올리고 1을 사용할 때와 비교하여 면역 자극을 생성하는데 동일하거나 더 약한 능력을 가지고 있음을 시사한다.

[0033] 도 7b는 BALB/c 마우스 비장 세포 배양물중에서의 이뮤노머 1 내지 3에 의한 IL-6의 유도 (각각 상부에서 바닥까지)를 그래프로 도시한다. 이들 데이터는 접근가능한 5'-말단을 가지고 있는 이뮤노머 2가 단량체 올리고 1 보다 더 강한 IL-6의 유도인자라는 것과, 접근가능한 5'-말단이 없는 이뮤노머 3은 올리고 1을 사용할 때와 비교하여 면역 자극을 생성하는데 동일하거나 더 약한 능력을 가지고 있음을 시사한다.

[0034] 도 7c는 BALB/c 마우스 비장 세포 배양물중에서의 이뮤노머 1 내지 3에 의한 IL-10의 유도 (각각 상부에서 바닥까지)를 그래프로 도시한다.

[0035] 도 8a는 각각 이용불가능한 5'-말단과 접근가능한 5'-말단을 가지고 있는 다양한 농도의 이뮤노머 5와 6에 의한, 세포 배양물중에서의 BALB/c 마우스 비장 세포 증식의 유도를 그래프로 도시한다.

[0036] 도 8b는 CpG 모티프의 5'-플랭킹 (flanking) 서열에서 면역원성 화학적 변형이 일어난 이뮤노머 4 내지 6에 의한 BALB/c 마우스 비장 비대를 그래프로 도시한다. 다시 말하면, 접근가능한 5'-말단을 가지고 있는 이뮤노머 6은 접근가능한 5'-말단이 없는 이뮤노머 5 및 단량체 올리고 4와 비교할 때 비장 비대를 증가시키는 능력이 보다 크다.

[0037] 도 9a는 BALB/c 마우스 비장 세포 배양물중에서 다양한 농도의 올리고 4 및 이뮤노머 7과 8에 의한 IL-12의 유도를 그래프로 도시한다.

[0038] 도 9b는 BALB/c 마우스 비장 세포 배양물중에서 다양한 농도의 올리고 4 및 이뮤노머 7과 8에 의한 IL-6의 유도를 그래프로 도시한다.

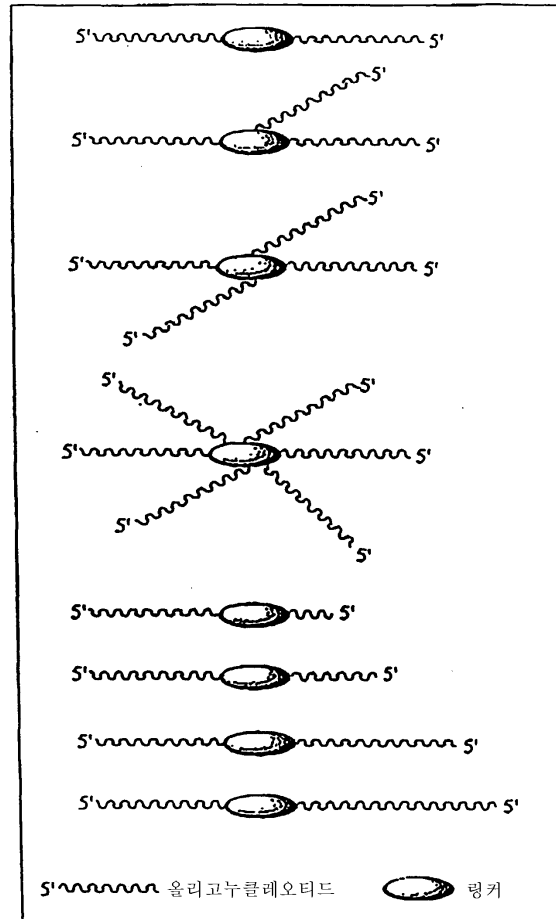
- [0039] 도 9c는 BALB/c 마우스 비장 세포 배양물중에서 다양한 농도의 올리고 4 및 이뮤노머 7과 8에 의한 IL-10의 유도를 그래프로 도시한다.
- [0040] 도 10a는 BALB/c 마우스 비장 세포 배양물중에서 이뮤노머 14, 15 및 16에 의한 세포 증식의 유도를 그래프로 도시한다.
- [0041] 도 10b는 BALB/c 마우스 비장 세포 배양물중에서 다양한 농도의 이뮤노머 14 및 16에 의한 IL-12에 의한 세포 증식의 유도를 그래프로 도시한다.
- [0042] 도 10c는 BALB/c 마우스 비장 세포 배양물중에서 다양한 농도의 이뮤노머 14 및 16에 의한 IL-6에 의한 세포 증식의 유도를 그래프로 도시한다.
- [0043] 도 11a는 BALB/c 마우스 비장 세포 배양물중에서 올리고 4 및 17과 이뮤노머 19 및 20에 의한 세포 증식의 유도를 그래프로 도시한다.
- [0044] 도 11b는 BALB/c 마우스 비장 세포 배양물중에서 다양한 농도의 올리고 4 및 17과 이뮤노머 19 및 20에 의한 IL-12에 의한 세포 증식의 유도를 그래프로 도시한다.
- [0045] 도 11c는 BALB/c 마우스 비장 세포 배양물중에서 다양한 농도의 올리고 4 및 17과 이뮤노머 19 및 20에 의한 IL-6에 의한 세포 증식의 유도를 그래프로 도시한다.
- [0046] 도 12는 올리고뉴클레오티드 4 및 이뮤노머 14, 23 및 24를 사용한 BALB/c 마우스 비장 비대를 그래프로 도시한다.
- [0047] 도 13은 비-뉴클레오티드 연결이 뉴클레오염기에 있는 뉴클레오시드에 3' 위치, 또는 2' 위치에서 부착될 수 있음을 보여주는, 올리고뉴클레오티드의 3'-말단 뉴클레오시드의 개략도이다.
- [0048] 도 14는 실시예 13에서 사용된 화학적 치환을 도시한다.
- [0049] 도 15는 실시예 13의 변형된 올리고뉴클레오티드를 사용하여 얻어진 시토킨 프로필을 도시한다.
- [0050] 도 16은 아미노 링커와 비교하여 글리세롤 링커에 대한 상대적인 시토킨 유도를 도시한다.
- [0051] 도 17은 다양한 링커 및 링커 조합물에 대한 상대적인 시토킨 유도를 도시한다.
- [0052] 도 18a 내지 18e는 다양한 PS 및 PO 이뮤노머와 올리고뉴클레오티드에 대한 상대적인 뉴클레아제 내성을 도시한다.
- [0053] 도 19는 BALB/c 마우스 비장 세포 배양물중에서 PS 이뮤노머와 비교하여 PO 이뮤노머에 대한 상대적인 시토킨 유도를 도시한다.
- [0054] 도 20은 C3H/HeJ 마우스 비장 세포 배양물중에서 PS 이뮤노머와 비교하여 PO 이뮤노머에 대한 상대적인 시토킨 유도를 도시한다.
- [0055] 도 21은 고농도의 이뮤노머에서 C3H/HeJ 마우스 비장 세포 배양물중에서의 PS 이뮤노머와 비교하여 PO 이뮤노머에 대한 상대적인 시토킨 유도를 도시한다.

도면

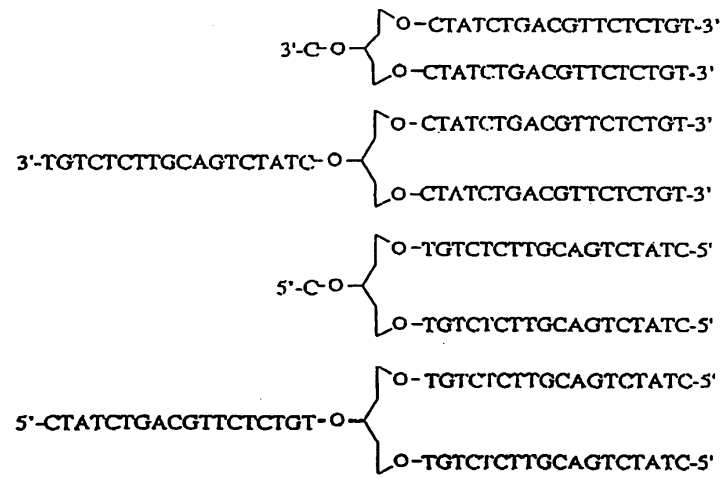
도면1

5' ~~~~~ 3' 번역자극성 올리고뉴클레오타이드

이류노매

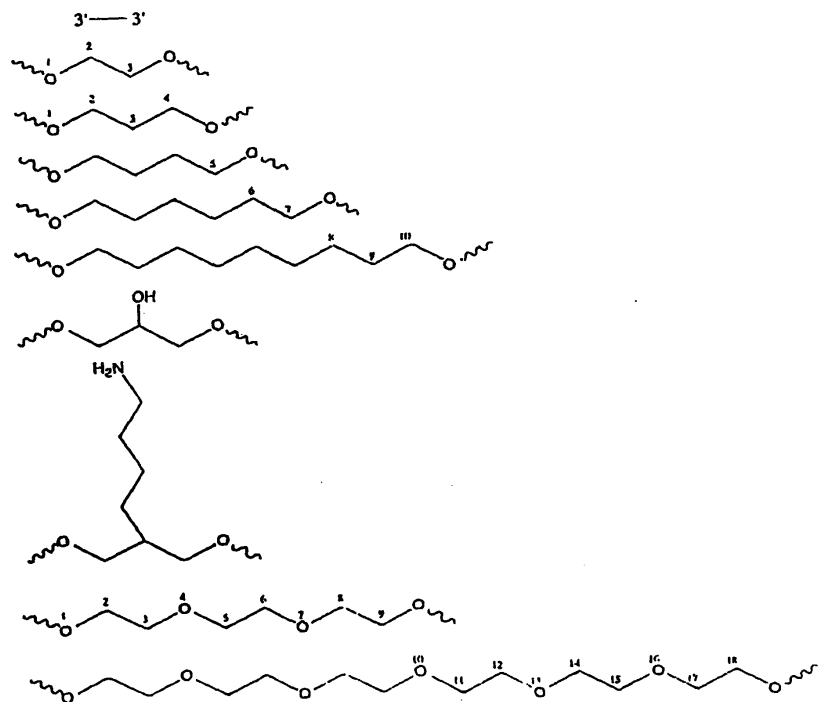


도면2

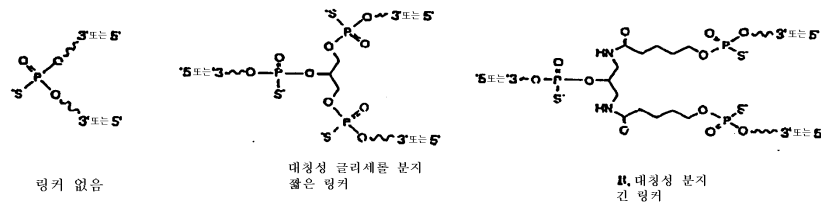


도면3

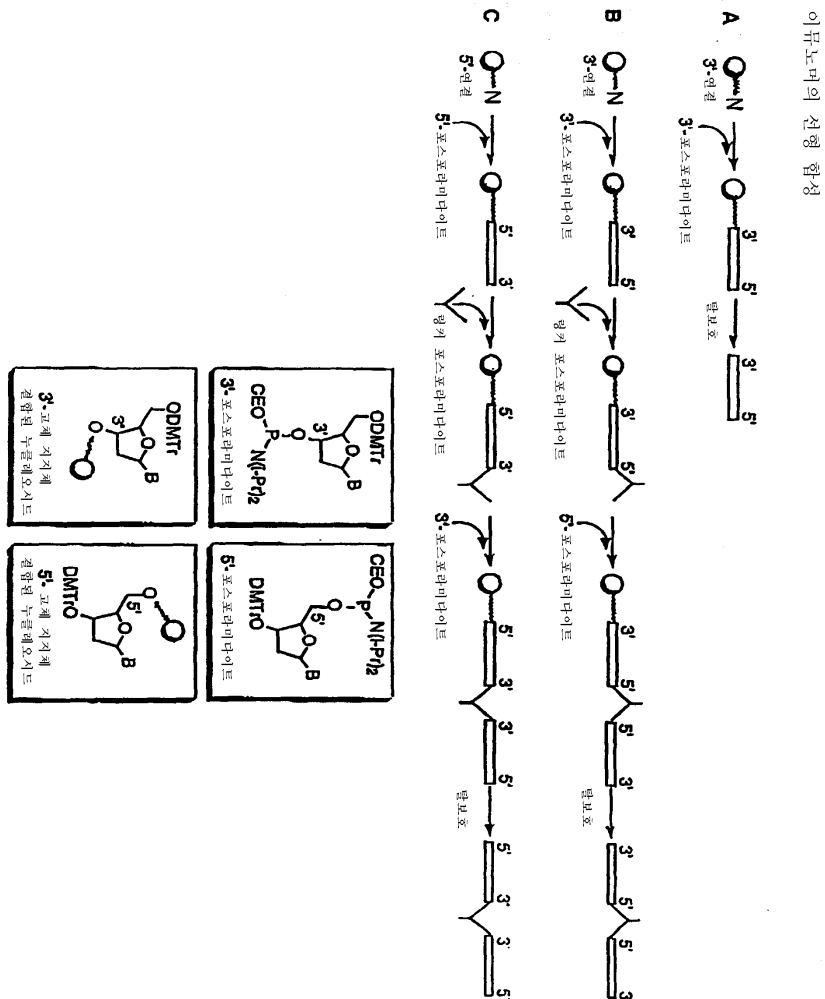
선형 합성을 위한 링커



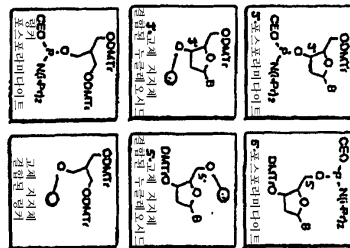
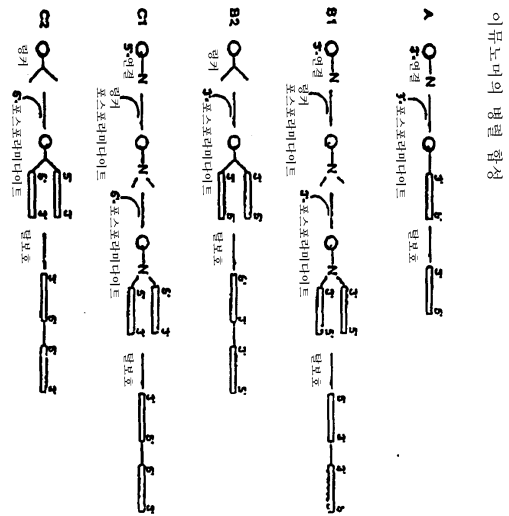
도면4



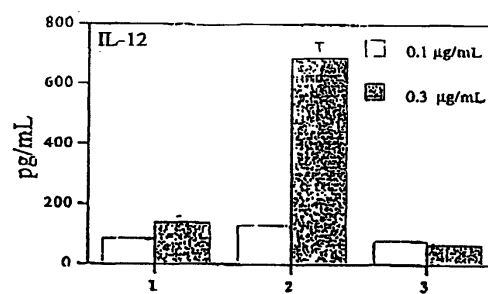
도면5



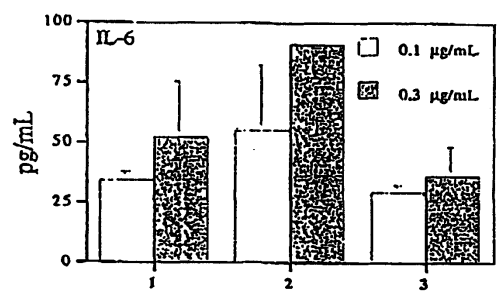
도면6



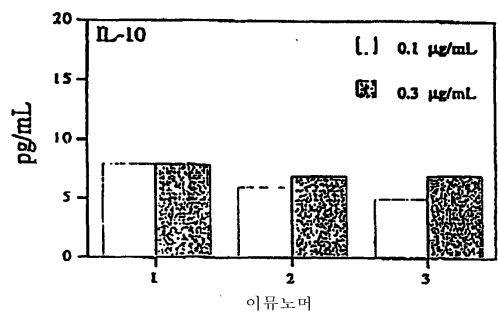
도면7a



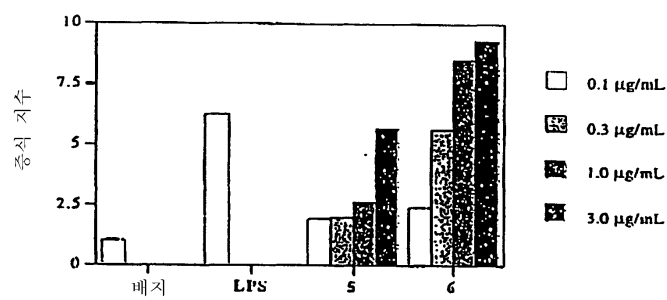
도면7b



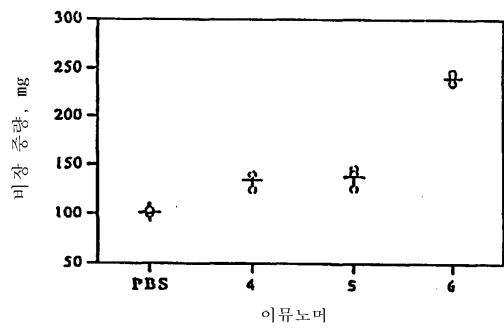
도면7c



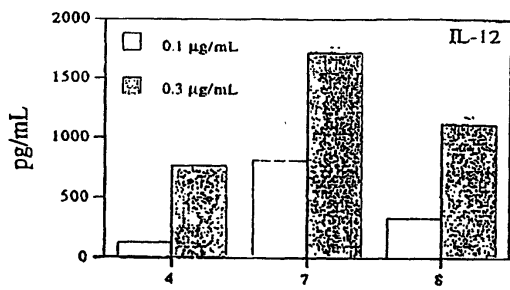
도면8a



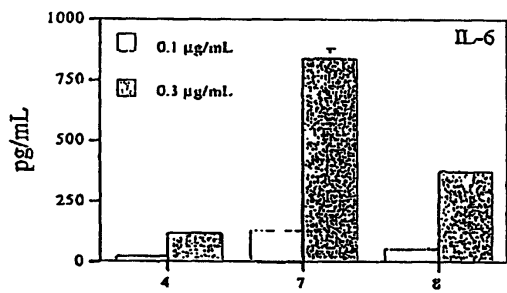
도면8b



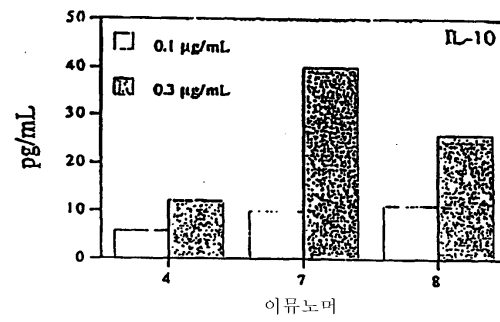
도면9a



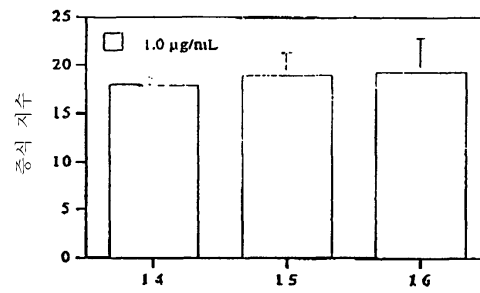
도면9b



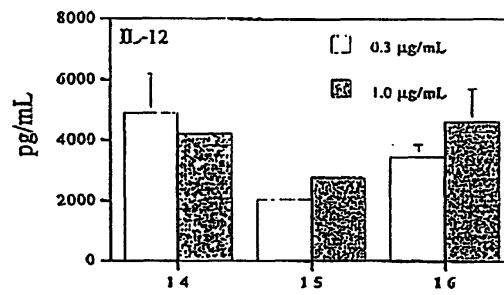
도면9c



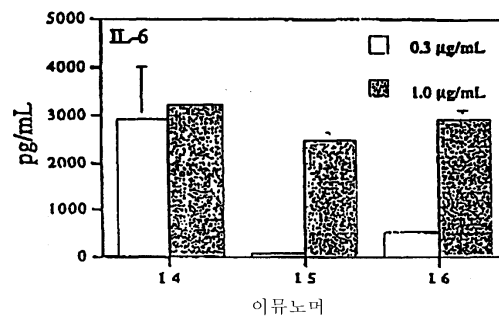
도면10a



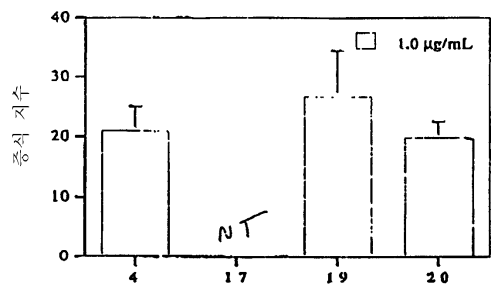
도면10b



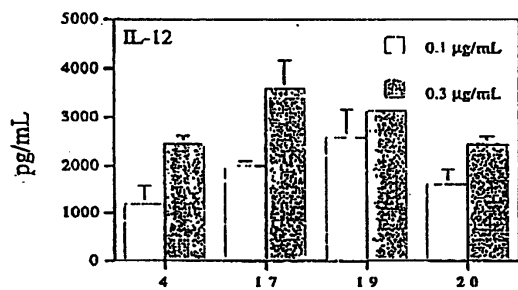
도면10c



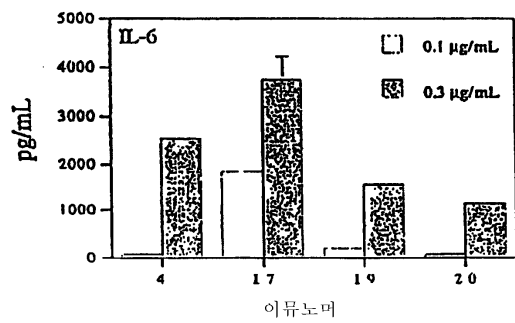
도면11a



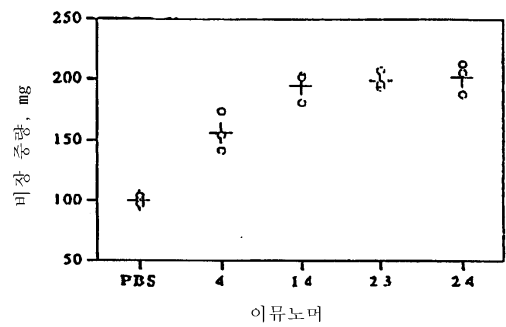
도면11b



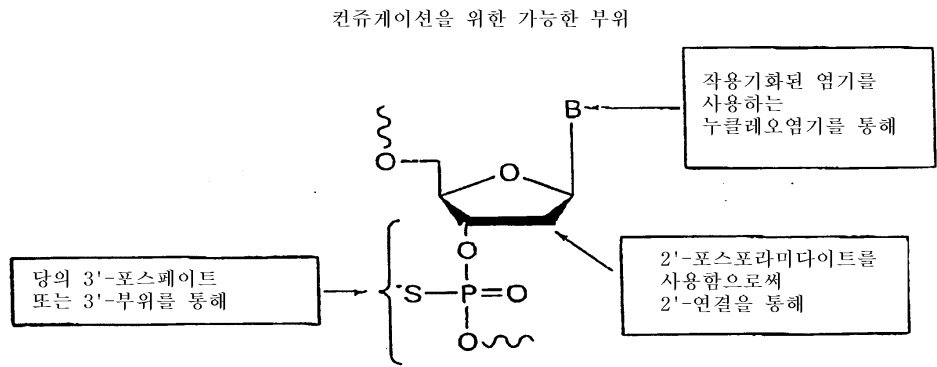
도면11c



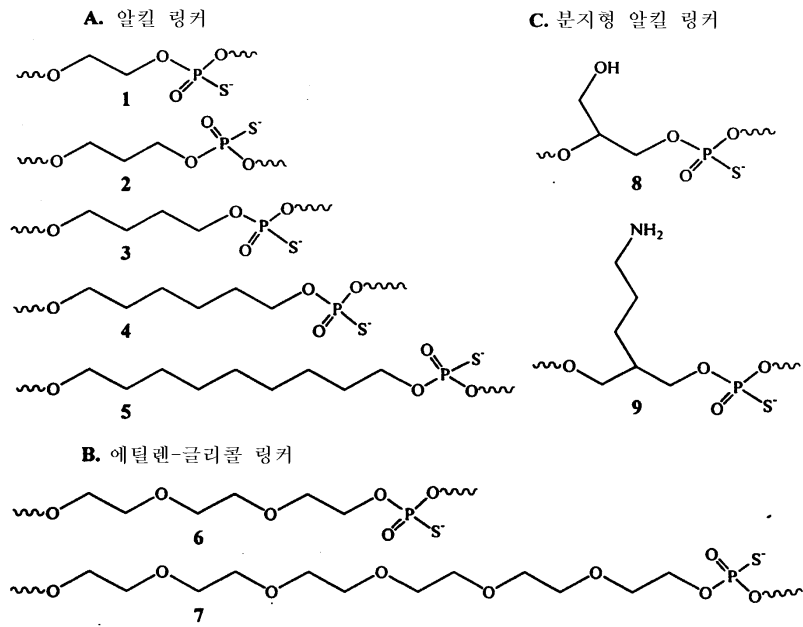
도면12



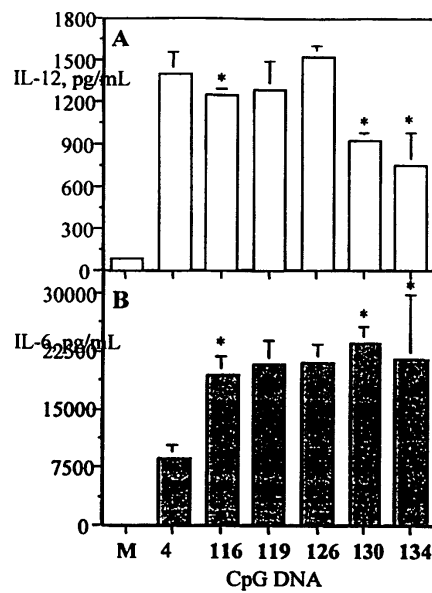
도면13



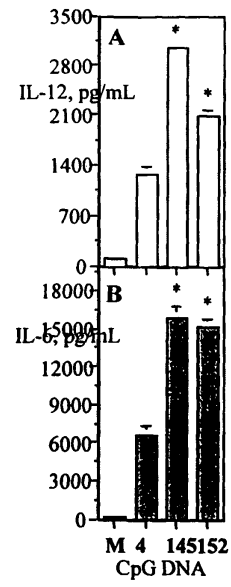
도면14



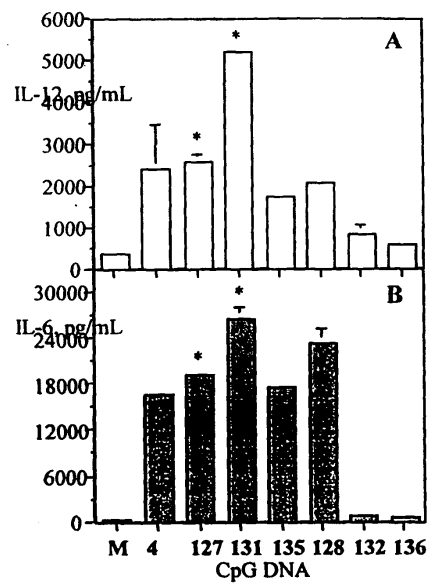
도면15



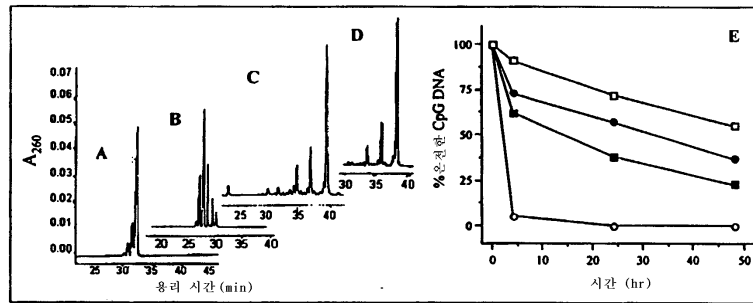
도면16



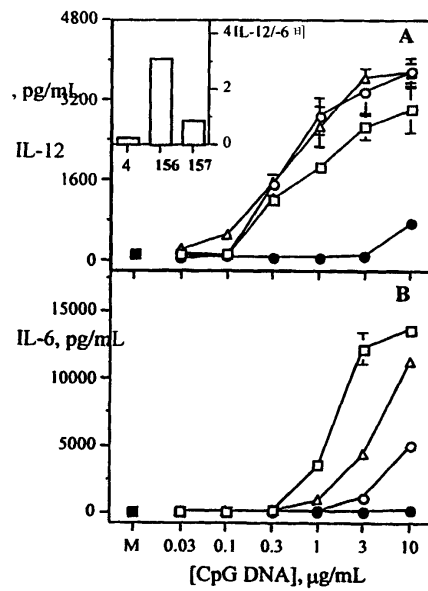
도면17



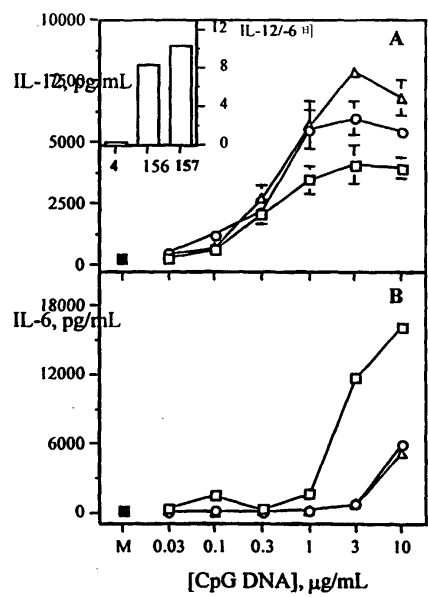
도면18



도면19



도면20



도면21

