



## (19) 대한민국특허청(KR)

## (12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년10월27일

(11) 등록번호 10-1455081

(24) 등록일자 2014년10월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/11 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-7011265

(22) 출원일자(국제) 2006년10월12일

심사청구일자 2011년10월12일

(85) 번역문제출일자 2008년05월09일

(65) 공개번호 10-2008-0065653

(43) 공개일자 2008년07월14일

(86) 국제출원번호 PCT/US2006/039954

(87) 국제공개번호 WO 2007/047396

국제공개일자 2007년04월26일

(30) 우선권주장

60/726,034 2005년10월12일 미국(US)

(뒷면에 계속)

(56) 선행기술조사문헌

Petar Lenert 등. Antisense and Nucleic acid  
 Drug Development. Vol. 13, No. 3, 페이지  
 143-150 (2003.)\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

이테라 파마슈티칼즈, 인코포레이티드

미국 매사추세츠 캠브리지 시드니 스트리트 167  
 (우: 02139)

(72) 발명자

칸디말라, 에캄바, 알.

미국 01772 매사추세츠 사우쓰보로 캔들우드 레인  
 6

다켕, 왕

미국 01730 매사추세츠 베드포드 셀프리지 로드 7  
 (뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 남앤드남

전체 청구항 수 : 총 23 항

심사관 : 이영기

(54) 발명의 명칭 틀-유사 수용체 기초 면역 반응을 조절하기 위한 면역조절 올리고누클레오티드 (I R O)

## (57) 요약

본 발명은 TLR의 아고니스트로서 신규한 면역 조절 올리고누클레오티드 (IRO) 및 이의 사용 방법을 제공한다. 이러한 IRO는 TLR 리간드 또는 TLR 아고니스트에 대한 반응에서 TLR-매개된 시그널링을 억제 또는 억압하는 독특한 서열을 갖는다. 본 방법은 암, 자가면역 질환, 기도 염증, 염증성 질환, 감염성 질환, 피부 질환, 알레르기, 천식 또는 병원체에 의해 초래되는 질환의 예방 및 치료에 사용될 수 있다.

(72) 발명자  
리, 유쿠이

미국 02465 매사추세츠 뉴턴 프로스펙트 스트리트  
69

유, 동

미국 01581 매사추세츠 웨스트보로 인디안 폴드 로  
드 25

푸강, 주

미국 01730 매사추세츠 베드포드 우드랜드 로드 16

락쉬미, 바게트

미국 01702 매사추세츠 레이밍햄 유니트 605 우  
스터 스트리트1550

서드히트, 아그라왈

미국 01545 매사추세츠 슈루즈버리 램플라이터 드  
라이브 61

(30) 우선권주장

60/784,243 2006년03월21일 미국(US)

60/825,440 2006년09월13일 미국(US)

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

3'-말단에서 비-누클레오티드 링커, 또는 작용기화된 당 또는 작용기화된 핵염기에 의해 연결된 2개 이상의 올리고누클레오티드를 포함하는, TLR7, TLR8 및 TLR9로 구성된 군으로부터 선택된 TLR, 또는 이의 조합의 활성을 억제하는 면역 조절 올리고누클레오티드 (IRO) 화합물로서, 여기서 하나 이상의 올리고누클레오티드는 하기 구조를 갖고:



여기서, CG는 CpG, C<sup>\*</sup>pG, C<sup>\*</sup>pG<sup>\*</sup> 및 CpG<sup>\*</sup>인 올리고누클레오티드 모티프이며, C는 시토신 또는 2'-데옥시시티딘이고, C<sup>\*</sup>는 2'-데옥시티미딘, 1-(2'-데옥시-β-D-리보푸라노실)-2-옥소-7-데아자-8-메틸-퓨린, 2'-디데옥시-5-할로시토신, 2'-디데옥시-5-니트로시토신, 아라비노시티딘, 2'-데옥시-5-히드록시시티딘, 2'-데옥시-N4-알킬-시티딘, 또는 2'-데옥시-4-티오우리딘으로부터 선택된 피리미딘 누클레오티드 유도체이며, G는 구아노신 또는 2'-데옥시구아노신이고, G<sup>\*</sup>는 2'-데옥시-7-데아자구아노신, 2'-데옥시-6-티오구아노신, 아라비노구아노신, 또는 2'-데옥시이노신으로부터 선택된 퓨린 누클레오티드 유도체이고;

N<sub>1</sub>은 2'-치환된 리보누클레오시드, 2'-0-치환된 리보누클레오시드, 2'-치환된 아라비노시드, 또는 2'-0-치환된 아라비노시드로부터 선택된 올리고누클레오티드 모티프의 활성을 억제하는 누클레오티드 유도체이고;

N<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>은 각각의 경우에서 독립적으로, 2'-치환된 리보누클레오시드, 2'-0-치환된 리보누클레오시드, 2'-치환된 아라비노시드, 또는 2'-0-치환된 아라비노시드로부터 선택된 올리고누클레오티드 모티프의 활성을 억제하는 누클레오티드 또는 뉴클레오티드 유도체이고;

N<sup>1</sup>-N<sup>3</sup>은 각각의 경우에 독립적으로, 누클레오티드이고;

N<sub>m</sub> 및 N<sup>m</sup>은 각각의 경우에서 독립적으로, 누클레오티드이며;

단, 상기 화합물은 3개 미만의 연속적인 구아노신 누클레오티드를 함유하며, 여기서, 상기 올리고누클레오티드 모티프는 올리고누클레오티드 모티프의 활성을 억제하는 누클레오티드 유도체를 갖지 않는 경우, 면역 자극성이 있고;

m은 0 내지 30이며;

3'-말단에서 또는 작용기화된 당 또는 작용기화된 핵염기에 의해 2개 이상의 올리고누클레오티드를 연결시키는 상기 비-누클레오티드 링커가 글리세롤 (1,2,3-프로판트리올), 1,2,4-부탄트리올, 2-(히드록시메틸)-1,3-프로판디올, 2-(히드록시메틸)1,4-부탄디올, 1,3,5-펜탄트리올, 1,1,1-트리스(히드록시메틸)에탄, 1,1,1-트리스(히드록시메틸)니트로메탄, 1,1,1-트리스(히드록시메틸)프로판, 1,2,6-헥산트리올, 3-메틸-1,3,5-펜탄트리올, 1,2,3-헵탄트리올, 2-아미노-2-(히드록시메틸)-1,3-프로판디올, N-[트리스(히드록시메틸)메틸]아크릴아미드, 시스-1,3,5-시클로헥산트리올, 시스-1,3,5-트리(히드록시메틸)시클로헥산, 3,5-디(히드록시메틸)페놀, 1,3,5-트리히드록실-벤젠, 3,5-디(히드록시메틸)벤젠, 1,3-디(히드록시에톡시)-2-히드록실-프로판, 1,3-디(히드록시프로포록시)-2-히드록실-프로판, 2-데옥시-D-리보오스, 1,2,4-트리히드록실-벤젠, D-갈락토알, 1,6-안히드로-β-D-글루코오스, 1,3,5-트리스(2-히드록시에틸)시아누르산, 갈릭산, 3,5,7-트리히드록시플라본, 4,6-니트로페로갈롤, 에틸렌 글리콜, 1,3-프로판디올, 1,2-프로판디올, 1,4-부탄디올, 1,3-부탄디올, 2,3-부탄디올, 1,4-부탄디올, 1,5-펜탄디올, 2,4-펜탄디올, 1,6-헥산디올, 1,2-헥산디올, 1,5-헥산디올, 2,5-헥산디올, 1,7-헵탄디올, 1,8-옥탄디올, 1,2-옥탄디올, 1,9-노난디올, 1,12-도데칸디올, 트리에틸렌 글리콜, 테트라에틸렌 글리콜, 2-(1-아미노프로필)-1,3-프로판디올 또는 1,2-디데옥시리보오스인 IRO 화합물.

### 청구항 2

제 1항에 있어서, 3'-말단에서 비-누클레오티드 링커, 또는 작용기화된 당 또는 작용기화된 핵염기에 의해 연결된 2개의 IRO 화합물을 포함하는 IRO 화합물.

**청구항 3**

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 2'-0-치환된 리보누클레오시드가 2'-OMe-리보누클레오시드인 IRO 화합물.

**청구항 4**

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 3'-말단에서 또는 작용기화된 당 또는 작용기화된 핵염기에 의해 2개 이상의 올리고누클레오티드를 연결시키는 상기 비-누클레오티드 링커가 글리세롤 (1,2,3-프로판트리올)인 IRO 화합물.

**청구항 5**

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 IRO 화합물 중 하나 이상이 TCTGACGTTCT (SEQ ID NO: 86, 여기서, 4번째 위치의 G 및 5번째 위치의 A는 2'-OMe을 의미한다), TCTGACG<sub>1</sub>TTCT (SEQ ID NO: 87, 여기서, 4번째 위치의 G 및 5번째 위치의 A는 2'-OMe을 의미한다), TCTGACG<sub>4</sub>TTCT (SEQ ID NO: 88, 여기서, 4번째 위치의 G 및 5번째 위치의 A는 2'-OMe을 의미한다), TCTCTGACGTT (SEQ ID NO: 89, 여기서, 6번째 위치의 G 및 7번째 위치의 A는 2'-OMe을 의미한다), TCTGUCGTTCT (SEQ ID NO: 93, 여기서, 4번째 위치의 G 및 5번째 위치의 U는 2'-OMe을 의미한다), TCTGUCG<sub>1</sub>TTCT (SEQ ID NO: 94, 여기서, 4번째 위치의 G 및 5번째 위치의 U는 2'-OMe을 의미한다), TCTGACG<sub>4</sub>TTCT (SEQ ID NO: 95, 여기서, 4번째 위치의 G 및 5번째 위치의 A는 2'-OMe을 의미한다), TCTGACG<sub>1</sub>TT (SEQ ID NO: 96, 여기서, 4번째 위치의 G 및 5번째 위치의 A는 2'-OMe을 의미한다), UGUCG<sub>1</sub>TTCT (SEQ ID NO: 100, 여기서, 1번째 위치의 U, 2번째 위치의 G 및 3번째 위치의 U는 2'-OMe을 의미한다) 또는 UGACG<sub>1</sub>TTCT (SEQ ID NO: 101, 여기서, 1번째 위치의 U, 2번째 위치의 G 및 3번째 위치의 A는 2'-OMe을 의미한다)로부터 선택된 서열을 지니는 IRO 화합물로서, 여기서, G<sub>1</sub>은 7-데아자-dG를 의미하고, G<sub>4</sub>는 araG를 의미하는 것인, IRO 화합물.

**청구항 6**

제 1항에 있어서, 상기 IRO가 5'-(TCTGACGTTCT)<sub>2</sub>X<sub>2</sub> (여기서, 4번째 위치의 G 및 5번째 위치의 A는 2'-OMe을 의미한다); 5'-(TCTGACG<sub>1</sub>TTCT)<sub>2</sub>X<sub>2</sub> (여기서, 4번째 위치의 G 및 5번째 위치의 A는 2'-OMe을 의미한다); 5'-(TCTGACG<sub>4</sub>TTCT)<sub>2</sub>X<sub>2</sub> (여기서, 4번째 위치의 G 및 5번째 위치의 A는 2'-OMe을 의미한다); 5'-(TCTCTGACGTT)<sub>2</sub>X<sub>2</sub> (여기서, 6번째 위치의 G 및 7번째 위치의 A는 2'-OMe을 의미한다); 5'-(TCTGUCGTTCT)<sub>2</sub>X<sub>2</sub> (여기서, 4번째 위치의 G 및 5번째 위치의 U는 2'-OMe을 의미한다); 5'-(TCTGUCG<sub>1</sub>TTCT)<sub>2</sub>X<sub>2</sub> (여기서, 4번째 위치의 G 및 5번째 위치의 U는 2'-OMe을 의미한다); 5'-(TCTGACG<sub>4</sub>TTCT)<sub>2</sub>X<sub>2</sub> (여기서, 4번째 위치의 G 및 5번째 위치의 A는 2'-OMe을 의미한다); 5'-(TCTGACG<sub>1</sub>TT)<sub>2</sub>X<sub>2</sub> (여기서, 4번째 위치의 G 및 5번째 위치의 A는 2'-OMe을 의미한다); 5'-(UGUCG<sub>1</sub>TTCT)<sub>2</sub>X<sub>2</sub> (여기서, 1번째 위치의 U, 2번째 위치의 G 및 3번째 위치의 U는 2'-OMe을 의미한다); 또는 5'-(UGACG<sub>1</sub>TTCT)<sub>2</sub>X<sub>2</sub> (여기서, 1번째 위치의 U, 2번째 위치의 G 및 3번째 위치의 A는 2'-OMe을 의미한다)로부터 선택되는 IRO 화합물로서, 여기서, G<sub>1</sub>은 7-데아자-dG를 의미하고, G<sub>4</sub>는 araG를 의미하며, X<sub>2</sub>는 글리세롤 링커를 의미하는 것인, IRO 화합물.

**청구항 7**

제 1항 또는 제 2항에 따른 IRO 화합물 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 암, 자가면역 질환, 기도염증, 염증성 질환, 감염성 질환, 피부 질환, 알레르기, 천식, 또는 박테리아, 기생충, 진균류, 바이러스, 비로이드 및 프리온에 의해 초래되는 질환을 치료하기 위한 약제학적 조성물.

**청구항 8**

제 7항에 있어서, 상기 조성물이 비경구, 점막 전달, 경구, 설하, 경피, 국소, 흡입, 비내, 에어로졸, 안내, 기관내, 직장내, 질, 유전자총, 피부 패치 또는 안약 또는 구강세정 형태로 투여되는 조성물.

**청구항 9**

제 7항에 있어서, 상기 IRO 화합물을 하나 이상의 백신, 항원, 항체, 세포독성 제제, 알레르겐, 항생제, 안티센스 올리고누클레오티드, TLR 안타고니스트, 웨터드, 단백질, 유전자 치료 벡터, DNA 백신, 애쥬번트 또는 화

학요법제와 함께 포함하는 조성물.

#### 청구항 10

약제학적 유효량의 제 1항 또는 제 2항에 따른 IRO 화합물을 포함하는 암, 자가면역 질환, 기도 염증, 염증성 질환, 감염성 질환, 피부 질환, 알레르기, 천식 또는 박테리아, 기생충, 진균류, 바이러스, 비로이드 및 프리온에 의해 초래되는 질환을 예방하기 위한 약제학적 조성물.

#### 청구항 11

제 10항에 있어서, 상기 IRO 화합물을 하나 이상의 백신, 항원, 항체, 세포독성 제제, 알레르겐, 항생제, 안티센스 올리고누클레오티드, TLR 안타고니스트, 펩티드, 단백질, 유전자 치료 백터, DNA 백신, 애쥬번트 또는 화학요법제와 함께 포함하는 조성물.

#### 청구항 12

제 10항에 있어서, 상기 조성물이 비경구, 점막 전달, 경구, 설하, 경피, 국소, 흡입, 비내, 에어로졸, 안내, 기관내, 직장내, 질, 유전자총, 피부 패치 또는 안약 또는 구강세정 형태로 투여되는 조성물.

#### 청구항 13

제 1항 또는 제 2항에 따른 IRO 화합물을 포함하는, 척추동물에서 TLR-매개 면역 반응을 저해하기 위한 조성물.

#### 청구항 14

제 1항 또는 제 2항에 따른 IRO 화합물을 포함하는, TLR7, TLR8 및 TLR9로 구성된 군으로부터 선택된 TLR, 또는 이의 조합의 자극을 저해하기 위한 조성물.

#### 청구항 15

제 1항 또는 제 2항에 따른 IRO 화합물을 포함하는, TLR7 아고니스트, TLR8 아고니스트 및 TLR9 아고니스트로 구성된 군으로부터 선택된 TLR의 아고니스트, 또는 이의 조합의 활성을 저해하기 위한 조성물.

#### 청구항 16

제 15항에 있어서, 상기 IRO 화합물을 TLR 아고니스트와 함께 포함하는 조성물.

#### 청구항 17

제 15항에 있어서, TLR 아고니스트 투여 전에 상기 IRO 화합물을 투여하는 것을 포함하는 조성물.

#### 청구항 18

제 6항에 따른 IRO 화합물 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 암, 자가면역 질환, 기도 염증, 염증성 질환, 감염성 질환, 피부 질환, 알레르기, 천식 또는 박테리아, 기생충, 진균류, 바이러스, 비로이드 및 프리온에 의해 초래되는 질환을 치료하기 위한 약제학적 조성물.

#### 청구항 19

약제학적 유효량의 제 6항에 따른 IRO 화합물을 포함하는 암, 자가면역 질환, 기도 염증, 염증성 질환, 감염성 질환, 피부 질환, 알레르기, 천식 또는 박테리아, 기생충, 진균류, 바이러스, 비로이드 및 프리온에 의해 초래되는 질환을 예방하기 위한 약제학적 조성물.

#### 청구항 20

제 6항에 따른 IRO 화합물을 포함하는, 척추동물에서 TLR-매개 면역 반응을 저해하기 위한 조성물.

#### 청구항 21

제 6항에 따른 IRO 화합물을 포함하는, TLR7, TLR8 및 TLR9로 구성된 군으로부터 선택된 TLR, 또는 이의 조합의 자극을 저해하기 위한 조성물.

## 청구항 22

제 6항에 따른 IRO 화합물을 포함하는, TLR7 아고니스트, TLR8 아고니스트 및 TLR9 아고니스트로 구성된 군으로부터 선택된 TLR의 아고니스트, 또는 이의 조합의 활성을 저해하기 위한 조성물.

## 청구항 23

제 18항 내지 제 22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IRO 화합물을 하나 이상의 백신, 항원, 항체, 세포독성 제제, 알레르겐, 항생제, 안티센스 올리고누클레오티드, TLR 안타고니스트, 웹티드, 단백질, 유전자 치료 벡터, DNA 백신, 애쥬번트 또는 화학요법제와 함께 포함하는 조성물.

## 명세서

### 기술 분야

[0001]

본 발명은 일반적으로 면역학 및 면역 치료법에 관한 것이며, 더욱 특히, 면역 조절 올리고누클레오티드 (IRO) 조성물 및 툴-유사 수용체-매개된 면역 반응의 억제 및/또는 억압에 있어서 이들의 용도에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002]

툴-유사 수용체 (TLR)는 면역계의 많은 세포상에 존재하며, 본질적으로 면역 반응에 관련된 것으로 입증되었다 (Hornung, V. et al. (2002) *J. Immunol.* 168:4531-4537). 척추동물에서, 이러한 패밀리는 TLR1 내지 TLR10 으로 불리는 10개의 단백질로 이루어지며, 이는 박테리아, 진균류, 기생충 및 바이러스로부터의 병원체 관련 분자 패턴을 인지하는 것으로 공지되어 있다 (Poltorak, a. et al. (1998) *Science* 282:2085-2088; Underhill, D.M., et al. (1999) *Nature* 401:811- 815; Hayashi, F. et. al (2001) *Nature* 410:1099-1103; Zhang, D. et al. (2004) *Science* 303:1522-1526; Meier, A. et al. (2003) *Cell. Microbiol.* 5:561-570; Campos, M.A. et al. (2001) *J. Immunol.* 167: 416-423; Hoebe, K. et al. (2003) *Nature* 424: 743-748; Lund, J. (2003) *J. Exp. Med.* 198:513-520; Heil, F. et al. (2004) *Science* 303:1526- 1529; Diebold, S.S., et al. (2004) *Science* 303:1529-1531; Hornung, V. et al. (2004) *J. Immunol.* 173:5935-5943). TLR은 포유동물이 이종 분자를 인지하고, 이종 분자에 대한 면역 반응을 개시하기 위한 주요 수단이며, 고유의 면역 반응과 적응성 면역 반응을 연결하는 수단을 제공한다 (Akira, S. et al. (2001) *Nature Immunol.* 2:675-680; Medzhitov, R. (2001) *Nature Rev. Immunol.* 1 :135-145). TLR은 자가면역, 감염성 질환 및 염증을 포함한 많은 질환의 병인에 작용하는 것으로 입증되었으며 (Cook, D.N. et al. (2004) *Nature Immunol.* 5:975-979), 적합한 제제를 사용한 TLR-매개된 활성화의 조절은 질환 중재를 위한 수단을 제공할 수 있다.

[0003]

일부 TLR은 세포 표면상에 위치하여 세포외 병원체를 탐지하여 이에 대한 반응을 개시하며, 기타 TLR은 세포 내부에 위치하여 세포내 병원체를 탐지하여 이에 대한 반응을 개시한다. 표 1은 대표적인 TLR 및 이의 공지된 아고니스트를 나타낸다 (Diebold, S. S. et al. (2004) *Science* 303:1529-1531; Liew, F. et al. (2005) *Nature* 5:446-458; Hemmi H et al. (2002) *Nat Immunol* 3:196-200; Jurk M et al., (2002) *Nat Immunol* 3:499; Lee J et al. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:6646-6651); (Alexopoulou, L. (2001) *Nature* 413:732-738).

[0004]

표 1:

[0005]

TLR 분자	아고니스트
세포 표면 TLR:	
TLR2	박테리아 리포웹티드
TLR4	그람 네거티브 박테리아
TLR5	운동성 박테리아
TLR6	그람 파지티브 박테리아
엔도좀 TLR:	
TLR3	이중 가닥 RNA 바이러스
TLR7	단일 가닥 RNA 바이러스
TLR8	단일 가닥 RNA 바이러스
TLR9	비메틸화된 DNA

[0006]

박테리아내에 존재하는 특정의 비메틸화된 CpG 모티프 및 합성 DNA는 면역 시스템을 활성화시키고, 항종양 활성

을 유도하는 것으로 입증되었다 (Tokunaga T et al., J. Natl. Cancer Inst. (1984) 72:955-962; Shimada S, et al., Jpn. J. Cancer Res., 1986, 77, 808-816; Yamamoto S, et al., Jpn. J. Cancer Res., 1986, 79, 866-73). CpG 디누클레오티드를 함유하는 안티센스 올리고누클레오티드를 이용한 기타 연구는 면역 반응을 자극하는 것으로 입증되었다 (Zhao Q, et al. (1996) Biochem Pharmacol. 26:173-182). 후속 연구는, TLR9가 박테리아 및 합성 DNA에 존재하는 비메틸화된 CpG 모티프를 인지한다는 것을 입증하였다 (Hemmi, H. et al. (2000) Nature 408:740-745). CpG-함유 포스포로티오에이트 올리고누클레오티드의 기타 변형이 또한 TLR9를 통한 면역 반응의 조절제로서 작용하는 이들의 능력에 영향을 끼칠 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Zhao et al., Biochem. Pharmacol. (1996) 51:173-182; Zhao et al. (1996) Biochem Pharmacol. 52:1537-1544; Zhao et al. (1997) Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 7:495-502; Zhao et al (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:3453-3458; Zhao et al. (2000) Bioorg. Med. Chem. Lett. 10:1051- 1054; Yu, D. et al. (2000) Bioorg. Med. Chem. Lett. 10:2585-2588; Yu, D. et al. (2001) Bioorg. Med. Chem. Lett. 11 :2263-2267; and Kandimalla, E. et al. (2001) Bioorg. Med. Chem. 9:807-813] 참조). 또한, 구조 활성 관계 연구는 비메틸화된 CpG 디누클레오티드로부터 생성된 것과 구별되는 특이적 면역 반응 프로필을 유도하는 신규한 DNA-기재 화합물 및 합성 모티프를 식별 가능하게 한다 (Kandimalla, E. et al. (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 102:6925-6930. Kandimalla, E. et al. (2003) Proc. Nat. Acad. Sci. U S A 100:14303-14308; Cong, Y. et al. (2003) Biochem Biophys Res. Commun. 310:1133- 1139; Kandimalla, E. et al. (2003) Biochem. Biophys. Res. Commun. 306:948-953; Kandimalla, E. et al. (2003) Nucleic Acids Res. 31:2393-2400; Yu, D. et al. (2003) Bioorg. Med. Chem. 11 :459-464; Bhagat, L. et al. (2003) Biochem. Biophys. Res. Commun. 300:853-861; Yu, D. et al. (2002) Nucleic Acids Res. 30:4460-4469; Yu, D. et al. (2002) J. Med. Chem. 45:4540-4548; Yu, D. et al. (2002) Biochem. Biophys. Res. Commun. 297:83-90; Kandimalla. E. et al. (2002) Bioconjug. Chem. 13:966-974; Yu, D. et al. (2002) Nucleic Acids Res. 30:1613-1619; Yu, D. et al. (2001) Bioorg. Med. Chem. 9:2803-2808; Yu, D. et al. (2001) Bioorg. Med. Chem. Lett. 11:2263- 2267; Kandimalla, E. et al. (2001) Bioorg. Med. Chem. 9:807-813; Yu, D. et al. (2000) Bioorg. Med. Chem. Lett. 10:2585-2588; Putta, M. et al. (2006) Nucleic Acids Res. 34:3231-3238).

[0007] TLR의 선택적 위치화 및 이들로부터 생성된 시그널링은 면역 반응에서의 이들의 역할에 대한 일부 통찰을 제공한다. 면역 반응은 면역 반응과 관련된 세포 서브셋에 기초한 고유의 반응 및 적응성 반응 둘 모두를 포함한다. 예를 들어, 전형적인 세포-매개된 작용 예컨대, 지연-형 과민반응 및 세포독성 T 림프구 (CTL)의 활성화에 관련된 T 헬퍼 (Th) 세포는 Th1 세포이다. 이러한 반응은 항원 (예를 들어, 바이러스 감염물, 세포내 병원체, 및 종양 세포)에 대한 몸체 고유의 반응이며, IFN-감마의 분비 및 CTL의 동반된 활성화를 초래한다. 대안적으로, B-세포 활성화를 위한 헬퍼 세포로서 관련된 Th 세포는 Th2 세포이다. Th2 세포는 박테리아 및 기생충에 대한 반응을 활성화시키는 것으로 입증되었으며, IL-4 및 IL-5 분비를 통한 몸체의 적응성 면역 반응 (예를 들어, IgE 생성 및 호산구 활성화)을 매개할 수 있다. 이러한 유형의 면역 반응은 항원 노출에 대한 반응으로 생성된 사이토kin에 의해 영향을 받으며, Th1 및 Th2 세포에 의해 분비된 사이토kin의 차이는 이를 두 서브셋의 상이한 생물학적 작용의 결과일 수 있다.

[0008] TLR의 활성화가 면역 반응을 개시하는데 관련되지만, TLR을 통한 면역계의 비조정된 자극은 면역 손상된 피검체에서 특정 질환을 악화시킬 수 있다. 최근에는, 몇몇 그룹이 염증성 사이토kin의 억제제로서 합성 올리고데옥시누클레오티드 (ODN)의 용도를 입증하였다 (Lenert, P. et al. (2003) DNA Cell Biol. 22(10):621-631).

[0009] 특정 합성 ODN을 사용하여, 레너트 (Lenert) 등은 억제성 ODN을 생성시키는 능력에 대해 보고하였다 (Lenert, P. et al. (2003) DNA Cell Biol. 22(10):621-631). 이들 억제성 ODN은 2개의 트리플렛, 즉 근위 "CCT" 트리플렛 및 원위 "GGG" 트리플렛을 필요로 한다. 이들 트리플렛-함유 억제성 ODN 이외에, 몇몇 그룹은 CpG-함유 ODN에 의해 TLR-9-매개된 활성화를 억제할 수 있는 기타 특이적 DNA 서열을 보고하였다. 이들 "억제성" 또는 "억압성" 모티프는 폴리 "G" (예를 들어, "GGGG") 또는 "GC" 서열이 풍부하며, 이들은 메틸화되는 경향이 있으며, 포유동물 및 특정 바이러스의 DNA에 존재한다 (예를 들어, 문헌 [Chen, Y., et al., Gene Ther. 8: 1024-1032 (2001); Stunz, L.L., Eur. J. Immunol. 32: 1212-1222 (2002). Duramad, O., et al., J. Immunol., 174: 5193-5200 (2005)] 참조, 주크 (Jurk) (US 2005/0239733) 등은 서열내의 GGGG 모티프를 함유하는 억제성 DNA 올리고누클레오티드의 구조를 기술한다). 파톨 (Patole) 등은 GGGG 함유 ODN이 전신 류푸스를 억제한다는 것을 입증하였다 (Patole, P. et al. (2005) J. Am. Soc. Nephrol. 16:3273-3280). 또한, 구르셀, 아이. (Gursel, I.) (J. Immunol., 171: 1393-1400 (2003)) 등은 포유동물 텔로머에서 높은 빈도로 존재하며, CpG-유도된 면역 활성화를 하향 조절하는, 반복적인 TTAGGG 엘리먼트를 기술하였다. 시로타, 에이취. (Shirota, H., et al., J. Immunol., 173: 5002-5007 (2004)) 등은 TTAGGG 엘리먼트를 함유하는 합성 올리고누클레오티드가 이

러한 활성을 모방하며, 특정 Th1-의존성 자가면역 질환의 예방/치료에 효과적일 수 있음을 입증하였다.

[0010] 반대로, 최근 연구는 폴리 G 함유 ODN이 TLR의 안타고니스트로서 작용한다는 관점에 의문을 제기하고 있다. 예를 들어, US 6,426,334 (Agrawal et al.)은 GGGG 스트링을 함유하는 CpG 올리고누클레오티드 투여가 잠재적인 항바이러스 및 항암 활성을 가지며, 추가로, 이들 화합물의 투여가 혈청 IL-12 농도의 증가를 유도한다는 것을 입증하였다. 또한, 폴리G 서열을 함유하는 CpG 올리고는 TLR9 활성화를 통해 면역 반응을 유도하며 (Verthelyi D et al., J Immunol. 166, 2372, 2001; Gursel M et al., J Leukoc Biol. 71, 813, 2001, Krug A et al., Eur J Immunol. 31, 2154, 2001), 항종양, 항바이러스 활성을 나타내는 것으로 공지되어 있다 (Ballas GK et al., J Immunol. 167, 4878, 2001; Verthelyi D et al., J Immunol. 170, 4717, 2003). 또한, 폴리G 올리고누클레오티드는 HIV 및 Rel A를 억제하는 것으로 공지되어 있다 (McShan WM, et al., J Biol Chem., 267(8):5712-21, 1992; Rando, RF et al., J Biol Chem., 270(4):1754-60, 1995; Benimetskaya L, et al., Nucleic Acids Res., 25(13):2648-56, 1997). 또한, 면역 자극성 CpG 모티프 및 4개의 연속적인 G 누클레오티드를 함유하는 ODN (클래스 A ODN)이 면역반응에서 인터페론-γ 생성 및 Th1 이동을 유도한다. 게다가, 증상을 나타내기 전의 질환 모델에서, 클래스 A ODN은 TLR-매개된 면역 반응을 유도하는 것으로 입증되었다.

[0011] 또한, 구아노신 스트링을 함유하는 올리고누클레오티드는 테트라플렉스 구조를 형성하고, 앱타머 (aptamer)로서 작용하고, 트롬빈 활성을 억제하는 것으로 공지되어 있다 (Bock LC et al., Nature, 355:564-6, 1992; Padmanabhan, K et al., J Biol Chem., 268(24): 17651-4, 1993). 따라서, 단일 가닥 또는 다중 가닥 구조가 TLR9 활성화 억제에 효과적인지의 여부는 분명하지 않다.

[0012] 따라서, 이차 구조를 형성할 것이라는 고려 없이 TLR의 효과적인 안타고니스트가 필요하다.

[0013] 본 발명의 간단한 요약

[0014] 본 발명은 TLR의 안타고니스트로서 신규한 면역 조절 올리고누클레오티드 (IRO) 화합물 및 이의 사용 방법을 제공한다. 이러한 IRO는 면역 자극성 모티프의 측면 서열 및/또는 올리고누클레오티드 모티프에 하나 이상의 화학적 변형부를 가지며, 올리고누클레오티드 모티프는 변형부를 갖지 않는 경우 면역 자극성이다.

[0015] 본 발명은 추가로, 구조  $5\text{-N}_m - \text{N}_3\text{N}_2\text{N}_1\text{CGN}^1\text{N}^2\text{N}^3 - \text{N}^m - 3'$ 을 갖는 신규한 IRO 조성물을 제공하며, 여기서, CG는 올리고누클레오티드 모티프이며, C는 시토신 또는 피리미딘 누클레오티드 유도체 또는 비-누클레오티드 연결이며, G는 구아노신 또는 퓨린 누클레오티드 유도체 또는 비-누클레오티드 연결이며; N1-N3은 각각의 경우에서 독립적으로, 누클레오티드, 누클레오티드 유도체 또는 비-누클레오티드 연결이며; Nm은 각각의 경우에서 독립적으로, 누클레오티드, 누클레오티드 유도체 또는 비-누클레오티드 연결이며; 단, 하나 이상의 N1 내지 N3 및/또는 C 및/또는 G는 누클레오티드 유도체 또는 비-누클레오티드 연결이며; 또한, 화합물은 4개 미만의 연속적인 구아노신 누클레오티드를 함유하며, 여기서, 올리고누클레오티드 모티프는 누클레오티드 유도체 또는 비-누클레오티드 연결을 갖지 않는 경우, 면역 자극성이며; m은 0 내지 약 30이다.

[0016] 본 발명은 추가로 IRO 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.

[0017] 본 발명은 화학적 변형부를 면역 자극성 올리고누클레오티드 모티프 및/또는 면역 자극성 올리고누클레오티드 모티프의 측면 서열에 혼입시키는 것을 포함하여, 면역 자극성 올리고누클레오티드 모티프를 포함하는 TLR-자극 올리고누클레오티드를 변형시키는 방법을 제공하며, 여기서, 면역 자극성 올리고누클레오티드 모티프의 면역 자극 활성이 화학적 변형에 의해 억제된다.

[0018] 본 발명은 추가로, 약제학적 유효량의 IRO 화합물을 척추동물에 투여하는 것을 포함하여, 척추동물에서 TLR-매개된 면역 반응을 억제하는 방법을 제공하며, 여기서 투여 경로는 비경구, 점막 전달, 경구, 설하, 경피, 국소, 흡입, 비내, 에어로졸, 안내, 기관내, 직장내, 질, 유전자총, 피부 패치 또는 안약 또는 구강세정 형태이다. 일부 바람직한 구체예에서, TLR 자극을 억제하는 것은 본 발명에 따른 IRO 화합물을 투여하는 것을 포함하며, 여기서, TLR은 TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR8, 및 TLR9로부터 선택된다.

[0019] 본 발명은 추가로, IRO 화합물을 투여하는 것을 포함하여 TLR 아고니스트의 활성을 억제하는 방법을 제공하며, IRO는 TLR 아고니스트와 동시에, 전에 또는 후에 투여된다. 바람직한 구체예에서, TLR 아고니스트는 TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR8, 및 TLR9의 아고니스트로부터 선택된다.

[0020] 본 발명은 추가로, 약제학적 유효량의 본 발명에 따른 IRO 화합물을 척추동물에 투여하는 것을 포함하여, TLR에 의해 매개된 질환을 갖는 척추동물을 치료학적으로 처리하는 방법을 제공한다. 바람직한 구체예에서, 질환은 암, 자가면역 질환, 기도 염증, 염증성 질환, 감염성 질환, 피부 질환, 알레르기, 천식 또는 병원체에 의해 야

기되는 질환이다.

[0021] 일부 바람직한 구체예에서, IRO 화합물은 하나 이상의 백신, 항원, 항체, 세포독성 제제, 알레르겐, 항생제, 안티센스 올리고누클레오티드, TLR 아고니스트, TLR 안타고니스트, 웨티드, 단백질, 유전자 치료 벡터, DNA 백신, 애쥬번트 또는 공동자극 분자와 함께 투여된다. 일부 바람직한 구체예에서, 투여 경로는 비경구, 점막 전달, 경구, 설하, 경피, 국소, 흡입, 비내, 에어로졸, 안내, 기관내, 직장내, 질, 유전자총, 피부 패치 또는 안약 또는 구강세정 형태이다.

[0022] 본 발명은 추가로 약제학적 유효량의 본 발명에 따른 IRO 화합물을 척추동물에 투여하는 것을 포함하여, 암, 자가면역 질환, 기도 염증, 염증성 질환, 감염성 질환, 피부 질환, 알레르기, 천식 또는 병원체에 의해 야기되는 질환을 예방하는 방법을 제공한다. 일부 바람직한 구체예에서, IRO 화합물은 하나 이상의 백신, 항원, 항체, 세포독성 제제, 알레르겐, 항생제, 안티센스 올리고누클레오티드, TLR 아고니스트, TLR 안타고니스트, 웨티드, 단백질, 유전자 치료 벡터, DNA 백신, 애쥬번트 또는 공동자극 분자와 함께 투여된다. 일부 바람직한 구체예에서, 투여 경로는 비경구, 점막 전달, 경구, 설하, 경피, 국소, 흡입, 비내, 에어로졸, 안내, 기관내, 직장내, 질, 유전자총, 피부 패치 또는 안약 또는 구강세정 형태이다.

[0023] 도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 IMO의 TLR9 아고니스트 활성의 IRO 억제를 보여준다.

[0025] 도 2는 TLR9 대 TLR3의 안타고니스트로서의 한 IRO 화합물의 특이성을 보여준다.

[0026] 도 3은 IRO에 의한 용량-의존적 억제를 보여준다.

[0027] 도 4A-4D는 IRO의 사전 투여 및 동시 투여가 TLR9의 아고니스트를 억제할 수 있음을 보여준다.

[0028] 도 5A 및 5B는 5' 말단에서 연결된 두개의 CpG 올리고누클레오티드가 TLR-억제 특성을 나타낸다는 것을 보여준다.

[0029] 도 6은 IRO가 인간 세포 배양물에서 TLR9 아고니스트 활성을 억제함을 보여준다.

[0030] 도 7은 IRO가 OVA 유도된 Th2 및 Th1 면역 반응에 효과적이라는 것을 보여준다.

[0031] 도 8은 IRO가 Th2 억제 특성을 역전시키고, IMO에 의해 유도된 Th1 면역 반응을 억제한다는 것을 보여준다.

[0032] 도 9는 IMO 및 IRO에 대한 항체 반응을 보여준다.

[0033] 삭제

[0034] 도 10은 생체내에서 TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR8, 및 TLR9에 대한 선택된 IRO의 초기 억제 활성을 보여준다.

[0035] 도 11은 생체내에서 TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR8, 및 TLR9에 대한 선택된 IRO의 초기 억제 활성을 보여준다.

[0036] 도 12는 생체내에서 TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR8, 및 TLR9에 대한 선택된 IRO의 초기 억제 활성을 보여준다.

[0037] 도 13은 생체내에서 TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR8, 및 TLR9에 대한 선택된 IRO의 장기간 안타고니스트 활성을 보여준다.

[0038] 도 14는 생체내에서 TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR8, 및 TLR9에 대한 선택된 IRO의 장기간 안타고니스트 활성을 보여준다.

[0039] 도 15은 생체내에서 TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR8, 및 TLR9에 대한 선택된 IRO의 장기간 안타고니스트 활성을 보여준다.

[0040] 도 16은 IRO가 생체내에서 야생형 (BALB/c) 및 루푸스에 걸리기 쉬운 (MRL-1pr) 마우스의 B 림프구 증식을 억제 한다는 것을 보여준다.

[0041] 도 17A 내지 17C는 IRO가 실험관내에서 야생형 (BALB/c) 및 루푸스에 걸리기 쉬운 (MRL-1pr) 마우스의 B 림프구

및 루프스에 걸리기 쉬운 (NZBW) 마우스의 비장 세포에 의한 IL-6 및 IL-12 생성을 억제한다는 것을 보여준다.

[0042] 도 18A 내지 18E는 IRO가 주입된 MRL-1pr 마우스가 요단백질 및 혈청중의 항-DNA IgG1 및 IgG2a 항체의 수준을 저하시킨다는 것을 보여준다.

[0043] 도 19는 IRO가 NZBW 마우스에서 혈청 항-DNA IgG2a를 억제시킨다는 것을 보여준다.

### 발명의 상세한 설명

[0044] 본 발명은 면역치료 적용을 위한 면역 조절제로서의 신규한 올리고누클레오티드의 치료학적 용도에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 TLR-매개된 면역 반응을 억제하고/거나 억합하기 위해 톤-유사 수용체 (TLR)의 안타고니스트로서의 면역 조절 올리고누클레오티드 (IRO) 화합물을 제공한다. 이러한 IRO는 내인성 및/또는 외인성 TLR 리간드 또는 아고니스트에 대하여 TLR-매개된 시그널링을 억제하거나 억합하는 독특한 서열을 갖는다. 본 원에 언급된 참조는 당해분야의 지식 수준을 반영하며, 이들 전체 내용이 이하에 통합되어 있다. 인용된 참조의 교시 내용과 본 명세서 간의 대립시 본 명세서를 기준으로 한다.

[0045] 본 발명은 TLR에 의해 초래된 면역 반응을 억제하는 방법을 제공하며, 이는 면역치료 적용 예컨대, 비제한적으로, 성인 및 소아 및 가축물의 암, 자가면역 질환, 천식, 호흡기 알레르기, 음식 알레르기, 피부 알레르기, 전신 홍반성 루푸스 (SLE), 관절염, 늑막염, 만성 감염, 염증 질환, 염증성 장 증후군, 패혈증, 및 박테리아, 기생충 및 바이러스 감염의 치료에 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 추가로, 면역치료를 위한 최적의 면역 조절 효과 수준을 갖는 IRO 화합물, 및 이러한 화합물을 제조하고 이용하는 방법을 제공한다. 또한, 예를 들어, DNA, 백신, 항원, 항체 및 알레르겐; 및 화학치료제 (전통적인 화학치료 및 현대적으로 표적화된 치료) 및/또는 안티센스 올리고누클레오티드와 함께 본 발명의 IRO 화합물은 질환의 예방 및 치료에 유용하다.

[0046] 정의

[0047] 용어 "올리고누클레오티드"는 일반적으로 다수의 연결된 누클레오티드 유닛을 포함하는 폴리누클레오티드를 의미한다. 이러한 올리고누클레오티드는 계놈 또는 cDNA를 포함하는 존재하는 핵산 공급원으로부터 수득될 수 있으나, 바람직하게는, 합성법에 의해서 생성된다. 바람직한 구체예에서, 각각의 누클레오시드 유닛은 변형된 누클레오시드 염기 및/또는 변형된 당 유닛을 포함하나 이에 제한되지 않는, 야생형 올리고누클레오티드와 비교하여 다양한 화학적 변형부 및 치환부를 포함할 수 있다. 화학적 변형부의 예는 당업자에게 공지되어 있으며, 예를 들어, 문헌 [Uhlmann E et al. (1990) Chem. Rev. 90:543; "Protocols for Oligonucleotides and Analogs" Synthesis and Properties & Synthesis and Analytical Techniques, S. Agrawal, Ed3 Humana Press, Totowa, USA 1993; and Hunziker, J. et al. (1995) Mod. Syn. Methods 7:331-417; and Crooke, S. et al. (1996) Ann. Rev. Pharm. Tox. 36:107-129]에 기술되어 있다. 누클레오시드 잔기는 공지된 수많은 누클레오시드간 결합 중 임의의 결합에 의해 상호간에 결합될 수 있다. 그러한 누클레오시드간 결합으로는 비제한적으로 포스포디에스테르, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 알킬포스포네이트, 알킬포스포노티오에이트, 포스포트리에스테르, 포스포라미데이트, 실록산, 카보네이트, 카르보알콕시, 아세트아미데이트, 카바메이트, 모르폴리노, 보라노, 티오에테르, 다리결합된 포스포라미데이트, 다리결합된 메틸렌 포스포네이트, 다리결합된 포스포로티오에이트, 및 설폰 누클레오시드간 결합을 포함한다. 용어 "올리고누클레오티드"는 또한 하나 이상의 입체특이적 누클레오시드간 결합(예를 들면, (R<sub>p</sub>)- 또는 (S<sub>p</sub>)-포스포로티오에이트, 알킬포스포네이트, 또는 포스포트리에스테르 결합)을 갖는 폴리누클레오시드를 포함한다. 본원에서 사용되는 용어 "올리고누클레오티드" 및 "디누클레오티드"는 결합이 포스페이트기를 포함하고 있는 결합이든 또는 그렇지 않은 간에 그러한 임의의 누클레오시드간 결합을 갖는 폴리누클레오시드 및 디누클레오시드를 포함하는 것으로 명백하게 의도된다. 특정 바람직한 구체예에서, 이들 누클레오시드간 결합은 포스포디에스테르, 포스포로티오에이트, 또는 포스포로디티오에이트 결합, 또는 이들의 조합일 수 있다.

[0048] 용어 "2'-치환된 리보누클레오시드" 또는 "2'-치환된 아라비노시드"는 오탄당 부분의 2'번 위치에서 히드록실기가 치환되어 2'-치환된 또는 2'-0-치환된 리보누클레오시드를 생성하는 리보누클레오시드 또는 아라비노누클레오시드를 포함한다. 특정 구체예에서, 상기 치환은 1개 내지 6개의 포화 또는 불포화 탄소 원자를 함유하는 저급 히드로카르빌기, 할로겐 원자 또는 6개 내지 10개 탄소 원자를 가지는 아릴기를 지니고, 여기서 상기 히드로카르빌, 또는 아릴기는 비치환될 수 있거나 예를 들어 할로, 히드록시, 트리플루오로메틸, 시아노, 니트로, 아실, 아실옥시, 알콕시, 카르복실, 카르보알콕시, 또는 아미노기로 치환될 수 있다. 2'-0-치환된 리보누클레오시드 또는 2'-0-치환된-아라비노시드의 예는 비제한적으로, 2'-아미노, 2'-플루오로, 2'-알릴, 2'-0-알킬 및 2'-프로파르길 리보누클레오시드 또는 아라비노시드, 2'-0-메틸리보누클레오시드 또는 2'-0-메틸아라비노시드

및 2'-0-메톡시에톡시리보누클레오시드 또는 2'-0-메톡시에틸아라비노시드를 포함한다.

[0049] 방향적으로 사용된 경우, 용어 "3'"은 일반적으로, 폴리누클레오티드 또는 올리고누클레오티드의 특정 영역 또는 위치로부터 동일한 폴리누클레오티드 또는 올리고누클레오티드 3' (다운스트림)에 존재하는 또 다른 영역 또는 위치를 나타낸다.

[0050] 본원에 방향적으로 사용된 경우, 용어 "5'"는 일반적으로, 폴리누클레오티드 또는 올리고누클레오티드의 특정 영역 또는 위치로부터 동일한 폴리누클레오티드 또는 올리고누클레오티드 5' (업스트림)에 존재하는 또 다른 영역 또는 위치를 나타낸다.

[0051] 본원에서 사용되는 용어 "약"은 일반적으로, 정확한 수가 결정적이지 않다는 것을 의미한다. 따라서, 올리고누클레오티드에서 누클레오시드 잔기의 수는 중요하지 않으며, 1개 또는 2개의 누클레오시드 잔기를 덜 갖거나, 1개 내지 수개의 추가의 누클레오시드 잔기를 갖는 올리고누클레오티드도 상기 기술된 각 구체예의 각각의 동등물로서 주시된다.

[0052] 용어 "아고니스트"는 일반적으로 세포의 수용체에 결합하여 반응을 유도하는 물질을 의미한다. 아고니스트는 종종 자연적으로 발생하는 물질 예컨대, 리간드의 작용을 모방한다.

[0053] 용어 "안타고니스트"는 일반적으로, 아고니스트의 효과를 감쇄시키는 물질을 의미한다.

[0054] 용어 "애쥬번트"는 일반적으로 면역원성 제제 예컨대, 백신 또는 항원에 첨가되는 경우, 이러한 혼합물에 노출시 수용 숙주에서 제제에 대한 면역 반응을 증강시키거나 효력을 증가시키는 물질을 나타낸다.

[0055] 용어 "기도 염증"은 일반적으로, 천식을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0056] 용어 "알레르겐"은 피검체에 노출시 알레르기 반응을 유도해내는 문자, 일반적으로, 단백질의 항원 또는 항원부를 나타낸다. 전형적으로, 피검체는 예를 들어, 당업계에 공지된 방법 또는 헬 및 플레이 테스트 (wheal and flare test)에 의해 나타나는 바와 같이 알레르겐에 대해 알레르기성을 띤다. 피검체의 단지 작은 서브셋이 문자에 노출시 알레르기 면역 반응을 나타내는 경우에도 상기 문자는 알레르겐으로 불린다.

[0057] 용어 "알레르기"는 일반적으로, 염증에 의해 특성결정된 부적당한 면역 반응을 나타내며, 비제한적으로 음식물 알레르기 및 호흡기 알레르기를 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0058] 용어 "항원"은 일반적으로, 항체 또는 T 세포 항원 수용체에 의해 인지되고 선택적으로 결합되어, 면역 반응을 유도하는 물질을 나타낸다. 항원은 웨티드, 단백질, 누클레오시드, 누클레오티드 및 이의 조합을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 항원은 천연 항원 또는 합성 항원일 수 있으며, 일반적으로, 그러한 항원에 특이적인 면역 반응을 유도한다.

[0059] 용어 "자가면역 질환"은 일반적으로 "자가" 성분이 면역 시스템에 의해 공격받는 질환을 의미한다.

[0060] 용어 "TLR-매개된 질환" 또는 "TLR-매개된 장애"는 일반적으로 하나 이상의 TLR의 활성화가 기여 인자인 병리학적 상태를 의미한다. 이러한 질환은 암, 자가면역 질환, 기도 염증, 염증성 장애, 김염성 질환, 피부 질환, 알레르기, 천식 또는 병원체에 의해 초래되는 질환을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0061] 용어 "생리학적으로 허용되는"은 일반적으로, IRO 화합물의 유효성을 간섭하지 않으며, 생물학적 시스템 예컨대, 세포, 세포 배양물, 조직 또는 유기체와 양립되는 물질을 나타낸다. 바람직하게는, 생물학적 시스템은 살아있는 유기체 예컨대, 척추동물이다.

[0062] 용어 "담체"는 일반적으로 부형제, 희석제, 충전제, 염, 완충제, 안정화제, 가용화제, 오일, 지질, 지질 함유 비히클, 미소구체, 리포좀 캡슐화물 또는 약제학적 제형에 사용되는 당해 기술분야에 잘 알려져 있는 다른 물질을 포함한다. 담체, 부형제, 또는 희석제의 특징은 특정적용에 대한 투여 경로에 따라 좌우되는 것으로 이해되어어야 한다. 이를 물질을 함유하고 있는 약제학적으로 허용가능한 제형의 제법은 문헌에 기술되어 있다 (예를 들면, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Edition, ed., A. Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990).

[0063] 용어 "공동-투여"는 일반적으로 면역 반응을 조절하기 위해 충분히 근접한 시간에 2개 이상의 상이한 물질을 투여하는 것을 의미한다. 공동-투여는 동시 투여 뿐만 아니라, 단일 용량 또는 개별 용량으로 임의의 순서로 2개 이상의 상이한 물질을 수일 이하의 일시적 간격을 둔 순차적 투여를 의미한다.

[0064] 용어 "상보적인"은 일반적으로, 핵산에 하이브리드화되는 능력을 가진 것을 의미한다. 이러한 하이브리드화는

보통 염기 스태킹(base stacking) 뿐만 아니라 그 밖의 수소결합 모드가 하이브리드화를 초래할 수 있지만, 바람직하게는, 왓슨-크릭(Watson-Crick) 또는 휴그스틴(Hoogsteen) 염기쌍을 형성하기 위한 상보적인 가닥 사이의 수소 결합의 결과이다.

[0065] 용어 "유효량" 또는 "충분량"은 일반적으로, 유익한 결과와 같은 목적하는 생물학적 효과에 영향을 미치기에 충분한 양을 의미한다. 따라서, "유효량" 또는 "충분량"은 투여되는 상황에 의존적일 것이다. 공동-투여된 항원에 대한 면역 반응을 조절하는 조성물의 투여시에는, IRO 화합물 및 항원의 유효량은 항원이 단독으로 투여되는 경우에 수득된 면역 반응과 비교하여 목적하는 조절을 달성하기에 충분한 양이다. 유효량은 1회 또는 그 초과의 투여로 투여될 수 있다.

[0066] 용어 "~과 함께"는 일반적으로, IRO 화합물 및 IOR 화합물의 면역 조절 효과를 저하시키지 않는 질환 또는 질병 치료에 유용한 제제를 투여하는, 환자의 질환 또는 질병을 치료하는 과정중에 있는 것을 의미한다. 그러한 병용 처리는 또한 IRO 화합물 및/또는 독립적으로 제제의 1회 초과의 투여를 포함할 수 있다. IRO 화합물 및/또는 제제의 투여는 동일하거나 상이한 경로에 의해 이루어질 수 있다.

[0067] 용어 "개체" 또는 "피검체" 또는 "척추동물"은 일반적으로, 인간과 같은 포유동물을 의미한다. 포유동물은 일반적으로, 인간, 인간외 영장류, 래트, 마우스, 고양이, 개, 말, 소, 젖소, 돼지, 양 및 토끼를 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0068] 용어 "누클레오시드"는 일반적으로, 당, 보통 리보오스 또는 데옥시리보오스, 및 퓨린 또는 피리미딘 염기로 이루어진 화합물을 의미한다.

[0069] 용어 "누클레오티드"는 일반적으로 당에 부착된 포스페이트기를 포함하는 누클레오시드를 나타낸다.

[0070] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "피리미딘 누클레오시드"는 누클레오시드의 염기 성분이 피리미딘 염기 (예를 들어, 시토신 (C) 또는 티민 (T) 또는 우라실 (U))인 누클레오시드를 의미한다. 유사하게는, 용어 "퓨린 누클레오시드"는 누클레오시드의 염기 성분이 퓨린 염기 (예를 들어, 아데닌 (A) 또는 구아닌 (G))인 누클레오시드를 의미한다.

[0071] 용어 "유사체" 또는 "유도체"는 변형된 염기 및/또는 당을 갖는 임의의 퓨린 및/또는 피리미딘 누클레오티드 또는 누클레오시드를 일반적으로 나타내기 위해 상호교환적으로 사용될 수 있다. 변형된 염기는 구아닌, 시토신, 아데닌, 티민 또는 우라실이 아닌 염기이다. 변형된 당은 리보오스 또는 2' 데옥시리보오스가 아니며, 올리고누클레오티드에 대한 백분에 사용될 수 있는 임의의 당이다.

[0072] 용어 "억제하는" 또는 "억압하는"은 반응의 저하 또는 반응에서의 정성적 차이를 나타내며, 그렇지 않으면 반응의 유도 및/또는 자극으로부터 발생할 수 있다.

[0073] 용어 "비-누클레오티드 링커"는 일반적으로, 인-함유 결합 이외에 올리고누클레오티드에 연결될 수 있거나 연결되는 임의의 연결 또는 부분을 나타낸다. 바람직하게는, 이러한 링커는 약 2 옹스트롬 내지 약 200 옹스트롬의 길이를 갖는다.

[0074] 용어 "누클레오티드 연결"은 일반적으로, 인-함유 연결을 통해 두개의 누클레오시드의 3' 및 5' 히드록시기를 직접 연결시키는 직접적인 3'-5' 연결을 나타낸다.

[0075] 용어 "올리고누클레오티드 모티프"는 디누클레오티드를 포함하는 올리고누클레오티드 서열을 의미한다. "하나 이상의 변형부가 없는 경우 면역 자극성인 올리고누클레오티드 모티프"는 어미 올리고누클레오티드에서는 면역 자극성이나 올리고누클레오티드 유도체에서는 면역 자극성을 띠지 않는 올리고누클레오티드 모티프를 의미하며, 여기서 올리고누클레오티드 유도체는 어미 올리고누클레오티드에 기초하나, 하나 이상의 변형부를 갖는다.

[0076] 용어 CpG, C\*pG, C\*pG\* 및 CpG\*는 면역 자극성이며, 시토신 또는 시토신 유사체 및 구아닌 또는 구아닌 유사체를 포함하는 올리고누클레오티드 모티프를 의미한다.

[0077] 용어 "치료"는 유익하거나 목적하는 결과를 수득하고자 하는 방안으로서, 종상의 완화 또는 질환 진행의 지연 또는 개선을 포함할 수 있다.

[0078] 제 1 양태에서, 본 발명은 면역 조절 올리고누클레오티드 (IRO) 화합물을 제공한다. 용어 "IRO"는 하나 이상의 TLR에 대한 안타고니스트인 면역 조절 올리고누클레오티드 화합물이며, 여기서 화합물은 올리고누클레오티드 모티프 및 하나 이상의 변형부를 포함하며, 올리고누클레오티드 모티프의 활성을 억제하는 하나 이상의 변형부가 없는 경우 올리고누클레오티드 모티프는 면역 자극성이며 (예를 들어, 비메틸화된 CpG), 단, 화합물은 4개 미만

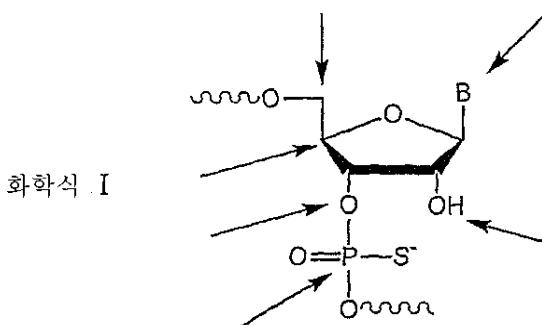
의 연속되는 구아노신 뉴클레오티드 바람직하게는, 3개 미만의 연속되는 구아노신 뉴클레오티드를 함유한다. 이러한 변형부는 올리고뉴클레오티드 5' 말단, 올리고뉴클레오티드 모티프의 측면 서열 및/또는 올리고뉴클레오티드 모티프 내에 존재할 수 있다. 이러한 변형부에 의해 IRO 화합물이 TLR-조절된 면역 자극을 억제한다. 이러한 변형부는 올리고뉴클레오티드 모티프 측면의 뉴클레오티드/뉴클레오시드의 염기, 당 잔기 및/또는 포스페이트 백분에 있을 수 있거나, 올리고뉴클레오티드 모티프내에 존재할 수 있다.

[0079] 바람직한 구체예에서, 변형부가 2' 알킬화 또는 알콕실화인 경우, 변형부는 올리고뉴클레오티드 모티프의 5'에 인접하지 않으며; 변형부가 비하전된 뉴클레오시드간 연결인 경우, 변형부는 올리고뉴클레오티드 모티프의 5'에 인접하지 않으며; 변형이 3' 알킬화 또는 알콕실화인 경우, 변형부는 올리고뉴클레오티드 모티프의 5' 또는 3'에 인접하지 않다.

[0080] 바람직한 구체예에서, IRO 화합물은 안티센스 올리고뉴클레오티드가 아니다.

[0081] IRO 화합물의 일반적 구조는  $5'-N_m-N_3N_2N_1CGN^1N^2N^3-N^m-3'$ 으로서 나타낼 수 있으며, 여기서, CG는 면역 자극 모티프이며, C는 시토신 또는 피리미딘 뉴클레오티드 유도체 또는 비-뉴클레오티드 링커이며, G는 구아노신, 퓨린 뉴클레오티드 유도체 또는 비-뉴클레오티드 링커이며; 각각의 경우에서 N1-N3은 독립적으로, 뉴클레오티드, 뉴클레오티드 유도체 또는 비-뉴클레오티드 링커이며; 각각의 경우에서  $N_m$ 은 독립적으로, 뉴클레오티드, 뉴클레오티드 유도체 또는 비-뉴클레오티드 링커이며; 단, 하나 이상의 N1 내지 N3 및/또는 C 및/또는 G는 뉴클레오티드 유도체 또는 비-뉴클레오티드 링커이며; 또한, 화합물은 4개 미만의 연속적인 구아노신 뉴클레오티드, 바람직하게는, 3개 미만의 연속적인 구아노신을 함유하며, 여기서, CG의 면역 자극 활성은 뉴클레오티드 유도체 또는 비-뉴클레오티드 링커에 의해 억압되며;  $m$ 은 0 내지 약 30이다.

[0082] 본 발명의 특정 구체예에서, IRO 화합물은 5', 3'- 또는 2'-말단에서 뉴클레오티드 링커 또는 비-뉴클레오티드 연결에 의해, 또는 비-뉴클레오티드 링커 또는 뉴클레오티드 연결을 통해 작용기화된 핵염기 또는 작용기화된 당에 의해 공유적으로 연결된 2개 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 이러한 IRO 화합물은 선형 또는 분지형일 수 있다. 비제한된 예로서, 링커는 3'-히드록실에 부착될 수 있다. 이러한 구체예에서, 링커는 작용기를 포함하며, 이러한 작용기는 포스페이트-기재 연결 예컨대, 포스포디에스테르, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 메틸포스포네이트, 또는 비-포스페이트-기재 연결에 의해 3'-히드록실에 부착된다. 리보뉴클레오티드에 대한 가능한 컨쥬게이트 부위는 하기 화학식 I에서 나타내었다:



[0083]

[0084] 상기 식에서, B는 헤테로시클릭 염기이며, P로의 화살표는 인으로의 임의의 부착을 나타낸다.

[0085] 일부 구체예에서, 비-뉴클레오티드 링커는 비제한적으로, 폴리펩티드, 항체, 지질, 항원, 알레르겐 및 올리고사카라이드를 포함하는 소분자, 거대분자 또는 생분자이다. 일부 다른 구체예에서, 비-뉴클레오티드 링커는 소분자이다. 본 발명의 목적을 위해, 소분자는 1,000Da 미만의 분자량을 갖는 유기 부분이다. 일부 구체예에서, 소분자는 750Da 미만의 분자량을 갖는다.

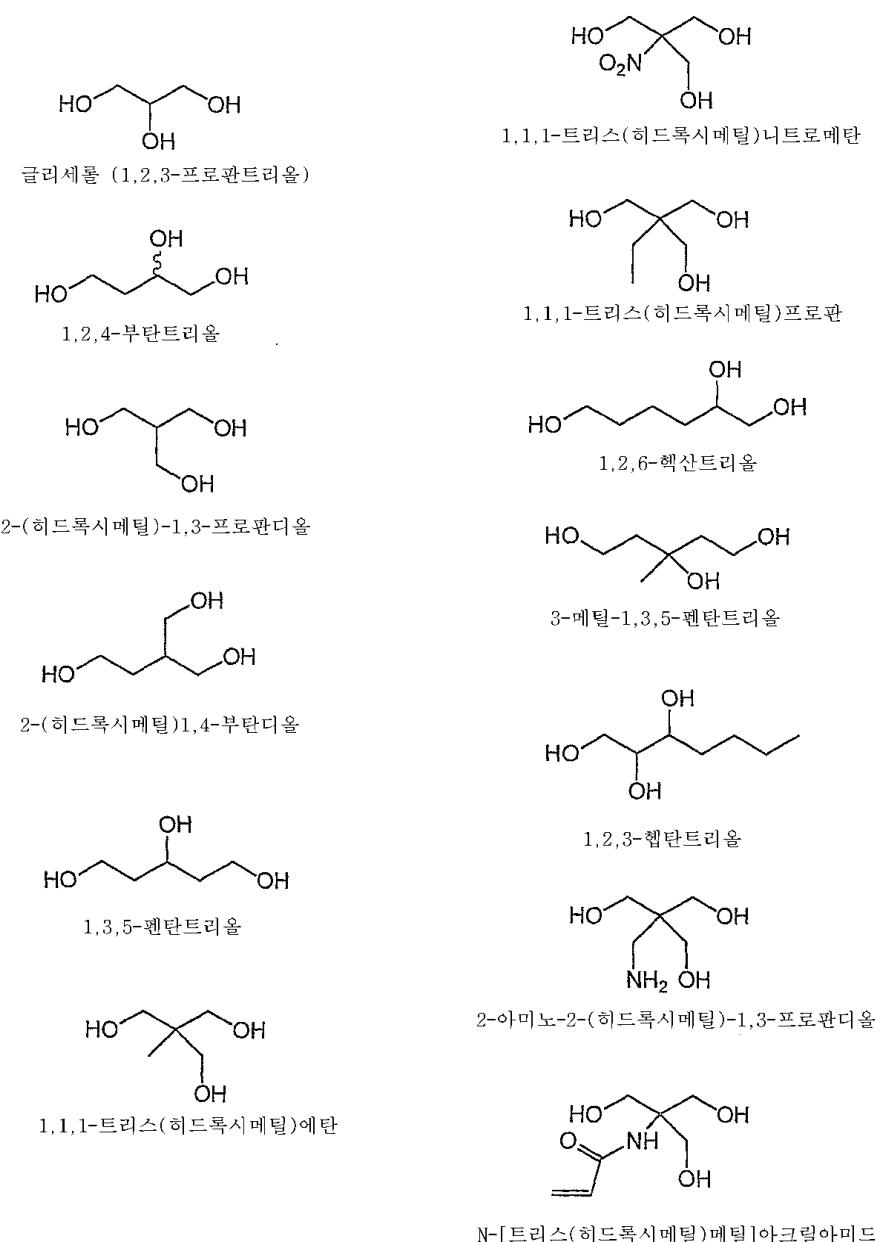
[0086] 일부 구체예에서, 소분자는 지방족 또는 방향족 탄화수소이며, 이중 하나는 선택적으로, 올리고리보뉴클레오티드를 연결하거나 여기에 부착된 선형 사슬, 히드록시, 아미노, 티올, 티오에테르, 에테르, 아미드, 티오아미드, 에스테르, 우레아 또는 티오우레아를 포함하나 이에 제한되지 않는 하나 이상의 작용기를 포함할 수 있다. 소분자는 시클릭 또는 비시클릭 (acyclic)일 수 있다. 소분자 링커의 예로는 비제한적으로, 아미노산, 카르보히드레이트, 시클로덱스트린, 아다만탄, 콜레스테롤, 합텐 및 항생제를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 그러나, 비-뉴클레오티드 링커를 기술하기 위한 목적으로, 용어 "소분자"는 뉴클레오시드를 포함하는 것으로 의도되지

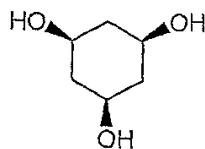
않는다.

[0087] 일부 구체예에서, 비-누클레오티드 링커는 알킬 링커 또는 아미노 링커이다. 알킬 링커는 분자형 또는 비분자형, 시클릭 또는 비시클릭, 치환된 또는 비치환된, 포화된 또는 불포화된, 키랄, 아키랄 (achiral) 또는 라세미체 혼합물일 수 있다. 알킬 링커는 약 2 내지 약 18개 탄소 원자를 가질 수 있다. 일부 구체예에서, 이러한 알킬 링커는 약 3 내지 약 9개 탄소 원자를 갖는다. 일부 알킬 링커는 히드록시, 아미노, 티올, 티오에테르, 에테르, 아미드, 티오아미드, 에스테르, 우레아 및 티오에테르를 포함하나 이에 제한되지 않는 하나 이상의 작용기를 포함한다. 이러한 알킬 링커는 1,2 프로판디올, 1,2,3 프로판트리올, 1,3 프로판디올, 트리에틸렌 글리콜 헥사에틸렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜링커 (예를 들어,  $[-0\text{-CH}_2\text{-CH}_2-]_n$  ( $n = 1\text{-}9$ )), 메틸 링커, 에틸 링커, 프로필 링커, 부틸 링커 또는 헥실 링커를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 일부 구체예에서, 이러한 알킬 링커는 켙티드 또는 아미노산을 포함할 수 있다.

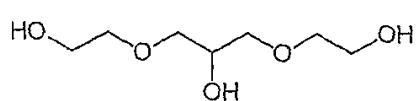
[0088] 일부 구체예에서, 비-누클레오티드 링커는 표 2에 기술된 것을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0089] 표 2: 대표적인 비-누클레오티드 링커

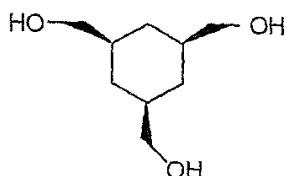




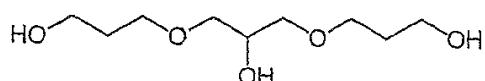
시스-1,3,5-시클로헥산트리올



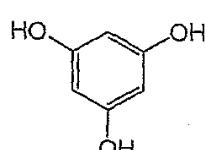
1,3-디(하드록시에톡시)-2-하드록실-프로판



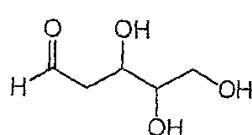
시스-1,3,5-트리(하드록시메틸)시클로헥산



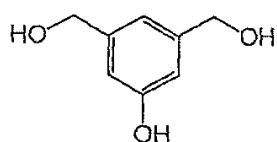
1,3-디(하드록시프로포시)-2-하드록실-프로판



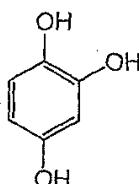
1,3,5-트리하드록시-벤젠



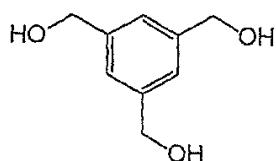
2-데옥시-D-리보오스



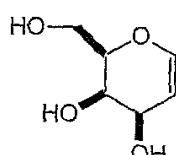
3,5-디(하드록시메틸)페놀



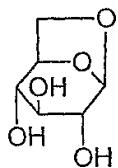
1,2,4-트리하드록실-벤젠



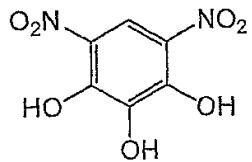
1,3,5-트리(하드록시메틸)벤젠



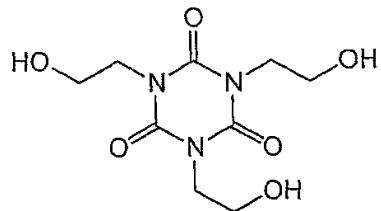
D-갈락토알



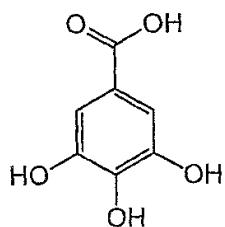
1,6-안하드로- $\beta$ -D-글루코오스



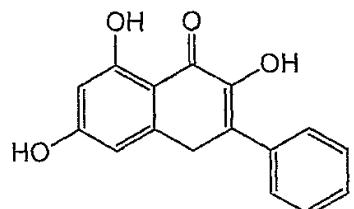
4,6-니트로피로갈룰



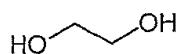
1,3,5-트리스(2-하드록시에틸)-시아누르산



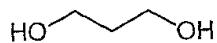
갈릭산



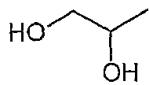
3,5,7-트리하드록시플라본



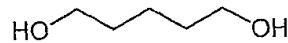
에틸렌 글리콜



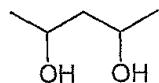
1,3-프로판디올



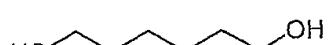
1,2-프로판디올



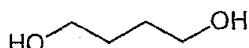
1,5-펜탄디올



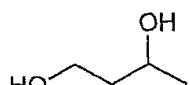
2,4-펜탄디올



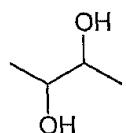
1,6-헥산디올



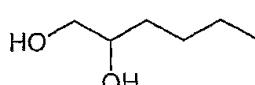
1,4-부탄디올



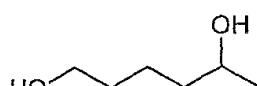
1,3-부탄디올



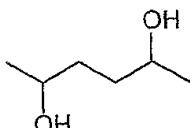
2,3-부탄디올



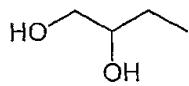
1,2-헥산디올



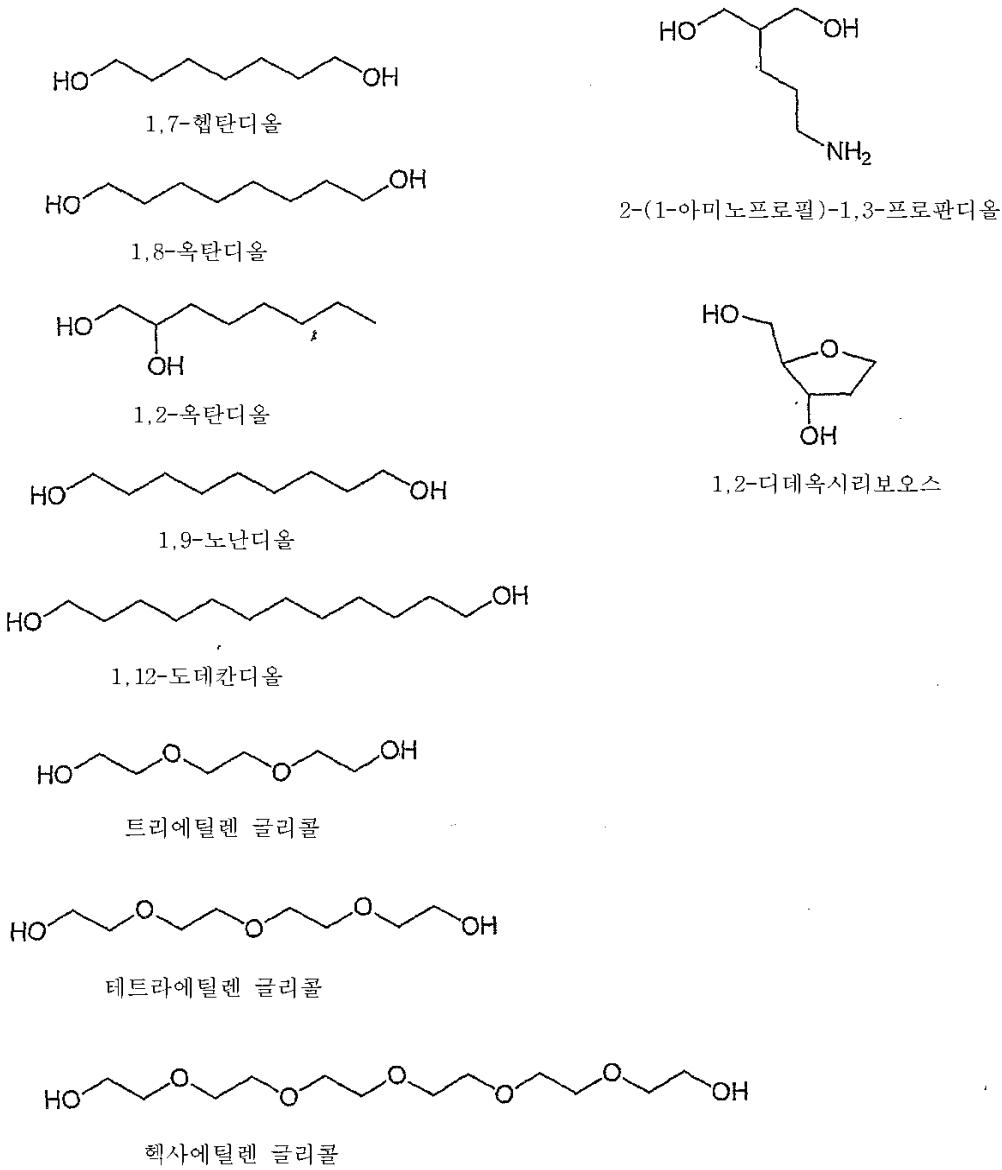
1,5-헥산디올



2,5-헥산디올



1,4-부탄디올



[0094]

[0095] 일부 구체예에서, 소분자 링커는 글리세롤 또는 화학식  $\text{HO}-(\text{CH}_2)_o-\text{CH}(\text{OH})-(\text{CH}_2)_p-\text{OH}$ 의 글리세롤 유사체이며, 여기서,  $o$  및  $p$ 는 독립적으로, 1 내지 약 6, 1 내지 약 4, 또는 1 내지 약 3의 정수이다. 일부 기타 구체예에서, 소분자 링커는 1,3-디아미노-2-히드록시프로판의 유도체이다. 일부 이러한 유도체는 화학식  $\text{HO}-(\text{CH}_2)_m-\text{C}(\text{O})\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{NHC}(\text{O})-(\text{CH}_2)_n-\text{OH}$ 를 가지며, 여기서,  $m$ 은 0 내지 약 10, 0 내지 약 6, 2 내지 약 6, 또는 2 내지 약 4의 정수이다.

[0096]

본 발명에 따른 일부 비-누클레오티드 링커는 두개 초과의 올리고누클레오티드의 부착을 허용한다. 예를 들어, 소분자 링커 글리세롤은 올리고누클레오티드가 공유적으로 부착될 수 있는 3개의 히드록실 기를 갖는다. 따라서, 본 발명에 따른 일부 IRO는 누클레오티드 또는 비-누클레오티드 링커에 연결된 2개 이상의 올리고누클레오티드를 포함한다. 이러한 IRO는 "분자된"것으로서 언급된다.

[0097]

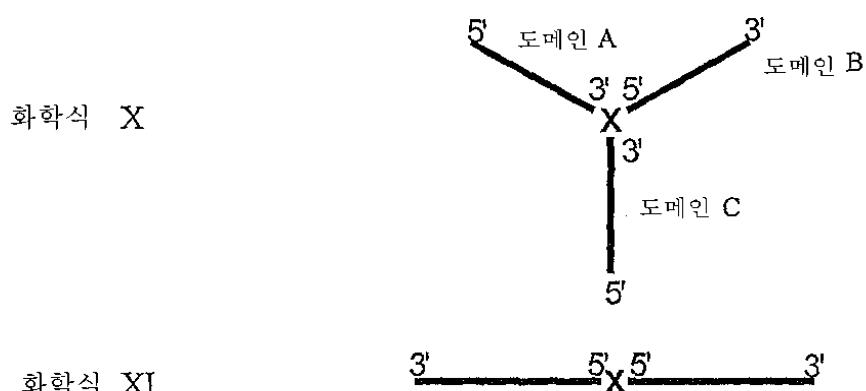
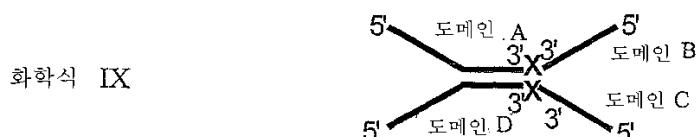
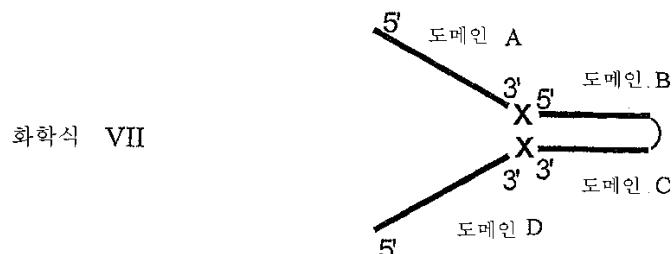
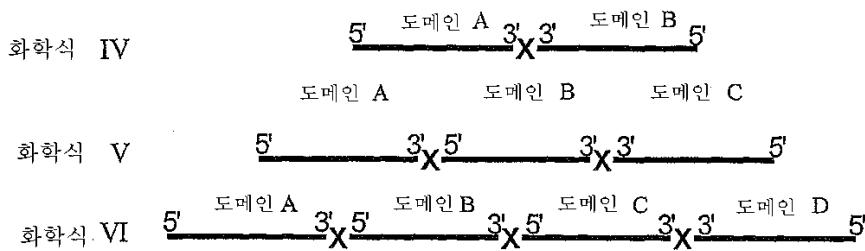
IRO 화합물은 예컨대, 정전기 상호작용, 소수성 상호작용,  $\pi$ -스태킹 상호작용, 수소 결합 및 이의 조합에 의해 비-공유적으로 연결된 2개 이상의 올리고누클레오티드를 포함할 수 있다. 이러한 비-공유적 연결의 비제한적 예는 왓슨-크릭 염기 쌍, 후그스텐 (Hoogsteen) 염기 쌍 및 염기 스태킹을 포함한다.

[0098]

2개 이상의 올리고누클레오티드가 연결될 수 있는 방식중 일부를 하기 표 3에 나타내었다.

[0099]

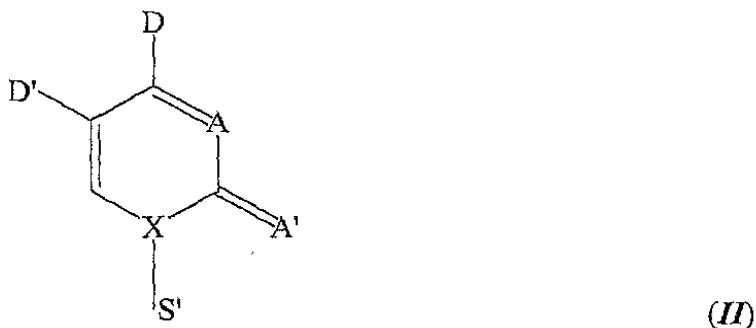
표 3: 올리고누클레오티드 화학식 IV-XI



[0100]

[0101]

특정 구체예에서, 본 발명에 따른 조성물 및 방법에 사용된 면역 조절 올리고누클레오티드에서 피리미딘 누클레오시드는 하기 구조 (II)를 갖는다:



[0103]

상기 식에서,

[0104]

D는 수소 결합 공여체이며;

[0105]

D'는 수소, 수소 결합 공여체, 수소 결합 수용체, 친수성 기, 소수성 기, 전자 끄는 기 또는 전자 주는 기로 구성된 군으로부터 선택되며;

[0106]

A는 수소 결합 수용체 또는 친수성 기이며;

[0107]

A'는 수소 결합 수용체, 친수성 기, 소수성 기, 전자 끄는 기 및 전자 주는 기로 구성된 군으로부터 선택되며;

[0108]

X는 탄소 또는 질소이며;

[0109]

S'는 펜토오스 또는 헥소오스 당 고리, 또는 당 유사체이다.

[0110]

특정 구체예에서, 당 고리는 포스페이스 부분, 변형된 포스페이트 부분, 또는 피리미딘 누클레오시드를 또 다른 누클레오시드 또는 누클레오시드 유사체에 연결하기에 적합한 다른 링커 부분으로 유도체화된다.

[0111]

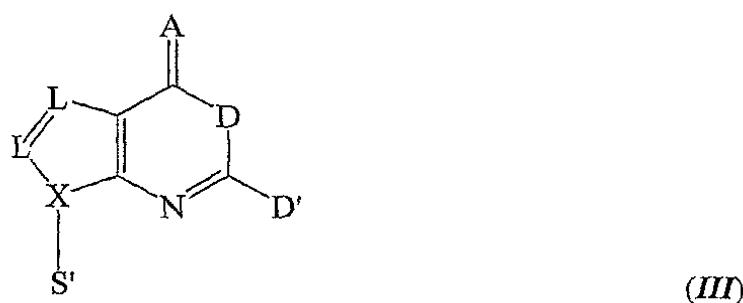
일부 구체예에서, 수소 결합 공여체는 비제한적으로,  $-\text{NH}-$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{SH}$  및  $-\text{OH}$ 를 포함한다. 바람직한 수소 결합 수용체는 비제한적으로,  $\text{C}=\text{C}$ ,  $\text{C}=\text{S}$ , 및 방향족 헤테로사이클의 고리 질소 원자 예를 들어, 시토신의 N3를 포함한다.

[0112]

일부 구체예에서, 화학식 (II)는 피리미딘 누클레오시드 유도체이다. 피리미딘 누클레오시드 유도체의 예로는 비제한적으로, 5-히드록시시토신, 5-히드록시메틸시토신, N4-알킬시토신, 또는 N4-에틸시토신, araC, 5-OH-dC, N3-Me-dC, 및 4-티오우라실을 포함한다. 화학적 변형된 유도체는 또한, 비제한적으로, 티민 또는 우라실 유사체를 포함한다. 일부 구체예에서, 화학식 (II)에서 당 부분 S'는 당 유도체이다. 적합한 당 유도체는 비제한적으로, 트레할로스 또는 트레할로스 유도체, 헥소오스 또는 헥소오스 유도체, 아라비노오스 또는 아라비노오스 유도체를 포함한다.

[0113]

일부 구체예에서, 본 발명에 따른 조성물 및 방법에 사용된 면역 조절 올리고누클레오티드에서의 퓨린 누클레오시드는 하기 구조 (III)를 갖는다:



[0114]

상기 식에서,

[0115]

D는 수소 결합 공여체이며;

[0116]

D'는 수소 결합 공여체이며;

- [0118] D'는 수소, 수소 결합 공여체, 및 친수성 기로 구성된 군으로부터 선택되며;
- [0119] A는 수소 결합 수용체 또는 친수성 기이며;
- [0120] X는 탄소 또는 질소이며;
- [0121] 각각의 L은 독립적으로, C, O, N 및 S로 구성된 군으로부터 선택되며;
- [0122] S'는 펜토오스 또는 헥소오스 당 고리, 또는 당 유사체이다.
- [0123] 특정 구체예에서, 당 고리는 포스페이트 부분, 변형된 포스페이트 부분, 또는 페리미딘 누클레오시드를 또 다른 누클레오시드 또는 누클레오시드 유사체에 연결시키기에 적합한 또 다른 링커 부분으로 유도체화된다.
- [0124] 특정 구체예에서, 수소 결합 공여체는 비제한적으로, -NH-, -NH<sub>2</sub>, -SH 및 -OH를 포함한다. 특정 구체예에서, 수소 결합 수용체는 비제한적으로, C=O, C=S, -NO<sub>2</sub> 및 방향족 헤테로사이클의 고리 질소 원자 예를 들어, 구아닌의 N1을 포함한다.
- [0125] 일부 구체예에서, 화학식 (III)은 퓨린 누클레오시드 유도체이다. 퓨린 누클레오시드 유도체의 예로는 비제한적으로, 구아닌 유사체 예컨대, 7-데아자-G, 7-데아자-dG, 아라-G, 6-티오-G, 이노신, 이소-G, 록소리빈 (loxoridine), TOG(7-티오-8-옥소)-G, 8-브로모-G, 8-히드록시-G, 5-아미노포르마이신 B, 옥소포르마이신, 7-메틸-G, 9-p-클로로페닐-8-아자-G, 9-페닐-G, 9-헥실-구아닌, 7-데아자-9-벤질-G, 6-클로로-7-데아자구아닌, 6-메톡시-7-데아자구아닌, 8-아자-7-데아자-G(PPG), 2-(디메틸아미노)구아노신, 7-메틸-6-티오구아노신, 8-벤질옥시구아노신, 9-데아자구아노신, 1-(B-D-리보푸라노실)-2-옥소-7-데아자-8-메틸-퓨린, 1-(2'-데옥시-β-D-리보푸라노실)-2-옥소-7-데아자-8-메틸-퓨린을 포함한다. 화학적으로 변형된 유도체는 비제한적으로, 아데닌 유사체 예컨대, 9-벤질-8-히드록시-2-(2-메톡시에톡시)아데닌, 2-아미노-N2-O-, 메틸아데노신, 8-아자-7-데아자-A, 7-데아자-A, 비다라빈 (Vidarabine), 2-아미노아데노신, N1-메틸아데노신, 8-아자아데노신, 5-요오도투베르시딘 (Iodotubercidin), 및 N1-Me-dG을 포함한다. 일부 구체예에서, 화학식 (III)에서 당 부분 S'는 화학식 II에서 정의된 바와 같은 당 유도체이다.
- [0126] 본 발명의 특정 구체예에서, 면역 조절 핵산은 하나 이상의 B-L-데옥시 누클레오시드 또는 3'-데옥시 누클레오시드를 함유하는 핵산 서열을 포함한다.
- [0127] 본 발명의 특정 구체예에서, 면역 조절 올리고누클레오티드는 CpG, C\*pG, C\*pG\* 및 CpG\*로부터 선택된 하나 이상의 디누클레오티드를 함유하는 핵산 서열을 포함하며, 여기서, C는 시토신 또는 2'-데옥시시티딘이며, G는 구아노신 또는 2'-데옥시구아노신이며, C\*는 2'-데옥시티미딘, 1-(2'-데옥시-β-D-리보푸라노실)-2-옥소-7-데아자-8-메틸-퓨린, 2'-디데옥시-5-할로시토신, 2'-디데옥시-5-니트로시토신, 아라비노시티딘, 2'-데옥시-2'-치환된 아라비노시티딘, 2'-0-치환된 아라비노시티딘, 2'-데옥시-5-히드록시시티딘, 2'-데옥시-N4-알킬-시티딘, 2'-데옥시-4-티오우리딘, 또는 기타 페리미딘 누클레오시드 유사체이며, G\*는 2'-데옥시-7-데아자구아노신, 2'-데옥시-6-티오구아노신, 아라비노구아노신, 2'-데옥시-2'치환된-아라비노구아노신, 2'-0-치환된-아라비노구아노신, 2'-데옥시이노신, 또는 기타 퓨린 누클레오시드 유사체이며, p는 포스포디에스테르, 포스포로티오에이트 및 포스포로디티오에이트로 구성된 군으로부터 선택된 누클레오시드간 연결이며, 하나 이상의 디누클레오티드의 활성을 측면 서열에 의해 조절된다.
- [0128] 본 연구에 사용된 이러한 일반적 구조내의 특이적 IRO의 서열은 표 4에 제시된 것을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0129]

표 4

IRO/SEQ ID NO:	서열
5	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
7	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
17	5'-CTATCTGACG <sub>1</sub> TTCTCTGT-3'
37	5'-CTATCTGACG <sub>4</sub> TTCTCTGT-3'
39	5'-CTATCTGAC <sub>4</sub> GTTCTCTGT-3'
41	5'-CTATCTGAC <sub>5</sub> GTTCTCTGT-3'
43	5'-CTATCTGAC <sub>6</sub> GTTCTCTGT-3'
45	5'-CTATCTGACG <sub>5</sub> TTCTCTGT-3'
47	5'-CTATCTGAC <sub>7</sub> GTTCTCTGT-3'
64	5'-CTATCTAACGTTCTCTGT-3'
67	5'-CTATCTAACG <sub>1</sub> TTCTCTGT-3'
22	5'-CTATCTGAmCGTTCTCTGT-3'
9	5'-CTATCTGUCCGTTCTCTGT-3'
10	5'-CTATCTGUCCGTTCTCTGT-3'
19	5'-CTATCTGUCCG <sub>1</sub> TTCTCTGT-3'

[0130]

38	5'-CTATCTGUCG <sub>4</sub> TTCTCTGT-3'
40	5'-CTATCTGUC <sub>4</sub> GTTCTCTGT-3'
42	5'-CTATCTGUC <sub>5</sub> GTTCTCTGT-3'
44	5'-CTATCTGUC <sub>6</sub> GTTCTCTGT-3'
46	5'-CTATCTGUC <sub>5</sub> TTCTCTGT-3'
48	5'-CTATCTGUC <sub>7</sub> GTTCTCTGT-3'
66	5'-CTATCTAUCGTTCTCTGT-3'
69	5'-CTATCTAUCG <sub>1</sub> TTCTCTGT-3'
65	5'-CTATCTAGCGTTCTCTGT-3'
68	5'-CTATCTAGCG <sub>1</sub> TTCTCTGT-3'
23	5'-CTATCTGmACGTTCTCTGT-3'
24	5'-CTATCTGmAmCGTTCTCTGT-3'
25	5'-CTATCTGAC <sub>2</sub> GTTCTCTGT-3'
27	5'-CTATCTGTC <sub>2</sub> GTTCTCTGT-3'
33	5'-CTATCTGAC <sub>3</sub> GTTCTCTGT-3'
35	5'-CTATCTGTC <sub>3</sub> GTTCTCTGT-3'
26	5'-CTATCTGACG <sub>2</sub> TTCTCTGT-3'
28	5'-CTATCTGTCG <sub>2</sub> TTCTCTGT-3'
34	5'-CTATCTGACG <sub>3</sub> TTCTCTGT-3'
36	5'-CTATCTGTCG <sub>3</sub> TTCTCTGT-3'
49	5'-CTATCTAGCGTTCTCTGT-3'
50	5'-CTATCTAGCGTTCTCTGT-3'
6	5'-CTATCTGACGUUUCTCTGT-3'
51	5'-CTATCTAGCGTTCTCTGT-3'
21	3'-TCTTGCAGTCT-X <sub>2</sub> -TCTGACGTTCT-3'
52	5'-CCTACTAGCGTX <sub>1</sub> CTCATC-3'
53	5'-CCTACTAGCGX <sub>1</sub> TCTCATC-3'
54	5'-CCTACTAG <sub>3</sub> CGTTCTCATC-3'
55	5'-TCCATGA <sub>1</sub> CGTTCTGATGC-3'
56	5'-CTATCTGAC <sub>2</sub> G <sub>2</sub> TTCTCTGT-3'
57	5'-C <sub>2</sub> T <sub>2</sub> A <sub>2</sub> T <sub>2</sub> C <sub>2</sub> T <sub>2</sub> G <sub>2</sub> A <sub>2</sub> C <sub>2</sub> G <sub>2</sub> T <sub>2</sub> T <sub>2</sub> C <sub>2</sub> T <sub>2</sub> C <sub>2</sub> T <sub>2</sub> G <sub>2</sub> T <sub>2</sub> -3'
29	5'-CTATCTGAX <sub>1</sub> GTTCTCTGT-3'

30	5'-CTATCTGACX <sub>1</sub> TTCTCTGT-3'
31	5'-CTATCTGTX <sub>1</sub> GTTCTCTGT-3'
32	5'-CTATCTGTCX <sub>1</sub> TTCTCTGT-3'
61	5'-CTATCTAGCGTX <sub>1</sub> CTCTGT-3'
62	5'-CTATCTAGCGX <sub>1</sub> TCTCTGT-3'
63	5'-CTATCTAGCGX <sub>1</sub> X <sub>1</sub> CTCTGT-3'
58	5'-CTATCTGACGTX <sub>3</sub> CTCTGT-3'
59	5'-CTATCTGACGX <sub>3</sub> TCTCTGT-3'
60	5'-CTATCTGACGX <sub>3</sub> X <sub>3</sub> CTCTGT-3'
70	5'-CTATCTAGCGTX <sub>3</sub> CTCTGT-3'
71	5'-CTATCTAGCGX <sub>3</sub> TCTCTGT-3'
72	5'-CTATCTAGCGX <sub>3</sub> X <sub>3</sub> CTCTGT-3'
74	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
75	5'-CTATCTGACG <sub>1</sub> UUCTCTGT-3'
76	5'-CCTACTAG <sub>6</sub> CGTTCTCATC-3'
77	5'-TCCATGACGU <sub>1</sub> TCCTGATGC-3'
78	5'-CTATCTGX <sub>2</sub> CGTTCTCTGT-3'
79	5'-CTATCTX <sub>2</sub> ACGTTCTCTGT-3'
80	5'-CTATCTU <sub>2</sub> ACGTTCTCTGT-3'
81	5'-CTATCTGU <sub>2</sub> CGTTCTCTGT-3'
82	5'-CTATCTGACGX <sub>2</sub> CTCTGT-3'
83	5'-CTATCTGACGTX <sub>2</sub> CTCTGT-3'
84	5'-CTATCTGX <sub>3</sub> CGTTCTCTGT-3'
85	5'-CTATCTX <sub>3</sub> ACGTTCTCTGT-3'
86	(5'-TCTGACGTTCT) <sub>2</sub> X <sub>2</sub>
87	(5'-TCTGACG <sub>1</sub> TTCT) <sub>2</sub> X <sub>2</sub>
88	(5'-TCTGACG <sub>4</sub> TTCT) <sub>2</sub> X <sub>2</sub>
89	(5'-TCTCTGACGTT) <sub>2</sub> X <sub>2</sub>
90	5'-TCTGACG <sub>1</sub> TTCT-X <sub>3</sub> -TGACCGGTCA-3'
91	5'-CTATCTGTCGUUUCTCTGT-3'
92	5'-CTATCTGTCG <sub>1</sub> UUUCTCTGT-3'
93	(5'-TCTGUCGTTCT) <sub>2</sub> X <sub>2</sub>

[0132]

94	(5'-TCTGUCG <sub>1</sub> TTCT) <sub>2</sub> X <sub>2</sub>
95	(5'-TCTGACG <sub>4</sub> TTCT) <sub>2</sub> X <sub>2</sub>
96	(5'-TCTGACG <sub>1</sub> TT) <sub>2</sub> X <sub>2</sub>
97	5'-TCTGACG <sub>1</sub> TTCT-X <sub>3</sub> -TCAACCACACA-3'
98	5'-CTATCTGACG <sub>1</sub> TTCTCUGU-3'
99	5'-CTATCTGUCG <sub>1</sub> TTCTCUGU-3'
100	(5'-UGUCG <sub>1</sub> TTCT) <sub>2</sub> X <sub>2</sub>
101	(5'-UGACG <sub>1</sub> TTCT) <sub>2</sub> X <sub>2</sub>

[0133]

[0134]

굵은 글씨체 G, A 또는 U = 2'-OMe; 굵은 글씨체 T = 3'-OMe; A<sub>1</sub> = 3'-OMe; G<sub>1</sub>=7-데오리제-*dG*; m= P-Me; A<sub>2</sub>, T<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>, 및 G<sub>2</sub> = B-L-데옥시 누클레오시드; X<sub>1</sub> = 아베이직 (abasic); X<sub>2</sub> = 글리세롤 링커, X<sub>3</sub> = C3-링커; C<sub>3</sub> 및 G<sub>3</sub> =

3'-데옥시-누클레오시드;  $G_4 = \text{araG}$ ;  $C_4 = \text{araC}$ ;  $C_5 = 5\text{-OH-dC}$ ;  $C_6 = 1\text{-(2'-데옥시-}\beta\text{-D-리보푸라노실)-2-옥소-7-데아자-8-메틸-퓨린}$ ;  $G_5 = N_1\text{-Me-dG}$ ;  $C_7 = N_3\text{-Me-dC}$ ;  $U_1 = 3'\text{-OMe}$ ;  $U_2 = \text{dU}$

- [0135] 일부 구체예에서, 올리고누클레오티드 각각은 약 6 내지 약 35개 누클레오시드 잔기, 바람직하게는, 약 9 내지 약 30개의 누클레오시드 잔기, 더욱 바람직하게는, 약 11 내지 약 23개의 누클레오시드 잔기를 갖는다. 일부 구체예에서, 올리고누클레오티드는 약 6 내지 약 18개의 누클레오시드 잔기를 갖는다.
- [0136] 제 2 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 IRO 화합물 및 생리학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제 제형을 제공한다.
- [0137] 제 3 양태에서, 본 발명은 척추동물에 본 발명에 따른 IRO 화합물을 투여하는 것을 포함하여, 척추동물에서 면역 반응의 TLR-매개된 유도를 억제하거나 억압하는 방법을 제공한다. 일부 구체예에서, 척추동물은 포유동물이다. 바람직한 구체예에서, IRO 화합물은 면역 억제가 필요한 척추동물에 투여된다.
- [0138] 본 발명의 이러한 양태에 있어서, IRO 화합물은 추가의 TLR 리간드 또는 TLR 아고니스트에 대한 TLR-기반 면역 반응을 억제할 수 있다. 하기 실시예에서 추가로 논의된 바와 같이, TLR 아고니스트 또는 TLR 리간드 (예를 들어, 면역 조절 올리고누클레오티드)에 의한 TLR-기반 면역 반응의 활성화는 IRO 화합물의 동시, 전 또는 후 투여에 의해 억압/억제될 수 있으며, 이러한 억압/억제는 투여 후 연장된 기간 (예를 들어, 몇일) 동안 유지될 수 있다. 본 발명의 이러한 유리한 특성은 질환 또는 질병의 예방 및/또는 치료에 독특한 이점을 갖는다. 예를 들어, 질환 치료 과정 중 특정 TLR-아고니스트의 적용은 원하지 않는 면역 자극을 초래할 수 있으나, 이는 IRO 화합물이 억압/억제할 수 있다. TLR-아고니스트와 IRO의 동시, 사전 및/또는 후 투여는 TLR-아고니스트로부터의 치료학적 이점을 허용하는 반면, 원하지 않는 부작용(들)은 억압/억제한다. 또한, IRO의 사전 투여는 TLR-아고니스트에 의한 후속 자극에 대한 면역 반응 (예를 들어, 알레르기 반응)을 예방할 수 있다.
- [0139] 본 발명의 이러한 양태에 따른 방법에서, IRO 화합물의 투여는 비제한적으로, 비경구, 점막 전달, 경구, 설하, 경피, 국소, 흡입, 비내, 에어로졸, 안내, 기관내, 직장내, 질, 유전자총, 피부 패치 또는 안약 또는 구강세정 형태를 포함하는 임의의 적합한 경로에 의해 수행될 수 있다. IRO 화합물의 치료학적 조성물의 투여는 질환의 증상 또는 대리 마커를 감소시키는데 효과적인 투여량 및 기간 동안 공지된 공정을 이용하여 수행될 수 있다. 전신 투여되는 경우, 치료학적 조성물은 바람직하게는, 약 0.0001 마이크로몰 내지 약 10 마이크로몰의 IRO 화합물의 혈중 수준을 달성하기에 충분한 투여량으로 투여된다. 국소화된 투여에 있어서, 이 보다 훨씬 더 적은 농도가 효과적일 수 있으며, 더 높은 농도에도 내약성이 있다. 바람직하게는, IRO 화합물의 전체 투여량은 일일당 환자 체중 kg당 약 0.001mg 내지 약 200mg이다. 단일 치료 요법으로서 본 발명의 하나 이상의 치료학적 조성물이 개체에 치료학적 유효량으로 동시에, 또는 순차적으로 투여되는 것이 바람직할 수 있다.
- [0140] IRO 화합물은 선택적으로, 하나 이상의 알레르겐 및/또는 항원 (자가 또는 이종), 면역원성 단백질 예컨대, 키홀 림펫 해모시아닌 (KLH), 콜레라 독소 B 서브유닛, 또는 임의의 기타 면역원성 담체 단백질에 연결될 수 있다. IRO는 또한, 비제한적으로, TLR 아고니스트 (예를 들어, TLR2 아고니스트 및 TLR9 아고니스트), 프레온드 불완전 애쥬번트 (Freund's incomplete adjuvant), KLH, 모노포스포릴 지질 A (MPL), 알룸, 및 QS-21 및 이미퀴모드를 포함하는 사포닌, 또는 이들의 조합물을 포함하는 기타 화합물 (예를 들어, 애쥬번트)와 함께 사용될 수 있다.
- [0141] 본 발명의 이러한 양태에 따른 방법은 면역계의 모델 연구에 유용하다. 본 방법은 또한, 인간 또는 동물 질환의 예방학적 또는 치료학적 처치에 유용하다. 예를 들어, 본 방법은 소아 및 가축 백신 적용에 유용하다.
- [0142] 제 4 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 IRO 화합물을 환자에게 투여하는 것을 포함하여, 질환 또는 질병을 갖는 환자를 치료학적으로 치료하는 방법을 제공한다. 다양한 구체예에서, 치료할 질환 또는 질병은 암, 자가면역 질환, 감염성 질환, 기도 염증, 염증성 질환, 알레르기, 천식 또는 병원체에 의해 초래된 질환이다. 병원체는 박테리아, 기생충, 진균류, 바이러스, 비로이드 및 프리온을 포함한다. 투여는 본 발명의 제 3 양태에 있어서 기술된 바와 같이 수행된다.
- [0143] 제 5 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 IRO 화합물을 환자에게 투여하는 것을 포함하여, 질환 또는 질병을 예방하는 방법을 제공한다. 다양한 구체예에서, 예방하고자 하는 질병 또는 질환은 암, 자가면역 질환, 기도 염증, 염증성 질환, 감염성 질환, 알레르기, 천식 또는 병원체에 의해 초래되는 질환이다. 병원체는 박테리아, 기생충, 진균류, 바이러스, 비로이드 및 프리온을 포함한다. 투여는 본 발명의 제 3 양태에 있어서 기술된 바와 같이 수행된다.

[0144] 본 발명의 이러한 양태에 따른 방법에서, IRO 화합물은 IRO 화합물의 면역 조절 효과를 저하시키지 않으며 질환 또는 질병을 치료하는데 유용한 기타 제제와 함께 투여될 수 있다. 본 발명에 따른 방법에서, 질병 또는 질환 치료에 유용한 제제는 비제한적으로, 하나 이상의 백신, 항원, 항체, 세포독성 제제, 알레르겐, 항생제, 안티센스 올리고누클레오티드, TLR 아고니스트, TLR 안타고니스트, 웨პ티드, 단백질, 유전자 치료 벡터, DNA 백신 및/ 또는 면역 반응의 특이성 또는 크기를 향상시키기 위한 애쥬번트, 또는 공동-자극 분자 예컨대, 사이토kin, 케모킨, 단백질 리간드, 트랜스-활성화 인자, 웨პ티드 및 변형된 아미노산을 포함하는 웨პ티드를 포함한다. 예를 들어, 암 치료에서, IRO 화합물은 하나 이상의 화학치료 화합물, 표적화된 치료제 및/또는 모노클로날 항체와 함께 투여될 수 있는 것으로 고려된다. 대안적으로, 제제는 항원 또는 알레르겐에 대해 엔코딩하는 DNA 벡터를 포함할 수 있다. 이러한 구체예에서, 본 발명의 IRO 화합물은 애쥬번트로서 다양하게 작용할 수 있고/거나 직접적인 면역 조절 효과를 유도할 수 있다.

[0145] 하기 실시예는 본 발명의 특정한 예시적인 구체예를 추가로 설명하고자 하는 것이며, 본 발명의 범위를 제한하고자 하는 것은 아니다. 예를 들어, 대표적인 TLR-리간드는 하기 실시예에 도시되어 있으나, 본 발명의 IRO가 안타고니스트로서 작용하는 리간드의 범위를 한정하지는 않는다.

### 실시예

[0146] 실시예 1

[0147] 면역 조절 부분을 함유하는 올리고누클레오티드의 합성

[0148] 모든 IRO를 표준 공정에 따라 합성하였다 (예를 들어, U.S. 특허 공개 20040097719 참조).

[0149] 올리고누클레오티드를 표준 선형 합성 또는 평행 합성 공정 후, 자동화된 DNA 합성기 (Expedite 8909; PerSeptive Biosystems, Framingham, Mass.)를 사용하여 1 μM 스케일로 합성하였다 (예를 들어, U.S. 특허 공개 20040097719의 도 5 및 6 참조).

[0150] 데옥시리보누클레오시드 포스포르아미디트를 (Aldrich-Sigma, St Louis, Mo)로부터 수득하였다. 1',2'-디데옥시리보오스 포스포르아미디트, 프로필-1-포스포르아미디트, 2-데옥시우리딘 포스포르아미디트, 1,3-비스-[5-(4,4'-디메톡시트리틸)페닐아미딜]-2-프로판올 포스포르아미디트 및 메틸 포스폰아미디트를 글렌 리서치 (Glen Research (Sterling, Va.))로부터 수득하였다. 베타-L-2'-데옥시리보누클레오시드 포스포르아미디트, 알파-2'-데옥시리보누클레오시드 포스포르아미디트, 모노-DMT-글리세롤 포스포르아미디트 및 디-DMT-글리세롤 포스포르아미디트를 캠 젠 (ChemGenes (Wilmington, Mass.))으로부터 수득하였다. (4-아미노부틸)-1,3-프로판디올 포스포르아미디트를 클론테크 (Clontech (Palo Alto, Calif.))로부터 수득하였다. 아라비노시티딘 포스포르아미디트, 아라비노구아노신, 아라비노티미딘 및 아라비노우리딘을 릴라이어블 파마슈티컬 (Reliable Pharmaceutical (St. Louis, Mo.))로부터 입수하였다. 아라비노구아노신 포스포르아미디트, 아라비노티미딘 포스포르아미디트 및 아라비노우리딘 포스포르아미디트는 이데라 파마슈티컬스, 인코포레이티드 (Idera Pharmaceuticals, Inc.)에서 합성되었다 (Cambridge, Mass.) (Noronha et al. (2000) Biochem., 39:7050-7062).

[0151] 모든 누클레오시드 포스포르아미디트를 <sup>31</sup>P 및 <sup>1</sup>H NMR 스펙트럼에 의해 특성결정하였다. 변형된 누클레오시드를 일반의 결합 사이클을 이용하여 특이적 부위에 혼입하였다. 합성 후, 올리고누클레오티드를 진한 수산화암모늄을 사용하여 탈보호하고, 역상 HPLC에 의해 정제한 후, 투석하였다. 나트륨 염 형태로서의 정제된 올리고누클레오티드를 사용전에 냉동건조시켰다. 순도를 CGE 및 MALDI-TOF MS에 의해 시험하였다.

[0152] 실시예 2

[0153] TLR9 자극의 억제

[0154] TLR9 (Invivogen)를 안정하게 발현시키는 HEK293 세포를 리포터 유전자 Seap (Invivogen)으로 6시간 동안 일시적으로 트랜스펙션시켰다. 세포를 0.5 μg/ml의 5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' (마우스 CpG 서열; IMO/SEQ ID NO 1; 0 투여)로 단독으로 처리하고, 다양한 농도의 IRO 5 또는 6을 18시간 동안 처리하였다. TLR9-의존성 리포터 유전자 발현을 제조업자의 프로토콜 (Invivogen)에 따라 측정하고, 결과는 TLR9 자극 올리고누클레오티드의 활성% (100%)으로서 나타내었다. 결과는 도 1에 도시하였다. 이들 결과는 IRO 5가 IMO의 TLR9 아고니스트 활성을 억제한다는 것을 입증해준다.

[0155] 실시예 3

[0156] IRO는 TLR9 자극을 특이적으로 억제한다.

[0157] TLR9 또는 TLR3 (Invivogen)을 안정하게 발현하는 HEK293 세포를 리포터 유전자 Seap (Invivogen)으로 6시간 동안 일시적으로 트랜스펙션시켰다. 세포를 0.5 mg/ml IMO1 (0.5  $\mu$ g/ml), IRO 5 (2.0  $\mu$ g/ml), R848 (5.0  $\mu$ g/ml), 또는 폴리(I).폴리(C) (0.5  $\mu$ g/ml), 및 IMO+IRO, R848+IRO, 또는 폴리(I).폴리(C)+IRO의 조합물로 18시간 동안 처리하였다. TLR9- 또는 TLR3-의존성 리포터 유전자 발현을 제조업자의 프로토콜 (Invivogen)에 따라 측정하고, 결과는 NF- $\kappa$ B 활성에서의 폴드 변화로서 나타내었다. 결과는 도 2에 도시하였다. 이들 결과는 IRO 5가 TLR9 아고니스트의 활성을 억제하나, TLR3 아고니스트의 활성을 억제하지 않으며, 더욱 일반적으로, IRO가 TLR 활성화를 선택적으로 억제한다는 것을 보여준다.

[0158] 실시예 4

[0159] IRO에 의한 용량 의존적 억제

[0160] C57BL/6 마우스에 0.25 mg/kg의 자극성 5'-TCTGACG<sub>1</sub>TTCT-X-TCTTG<sub>1</sub>CAGTCT-S' (IMO/SEQ ID NO 3; G<sub>1</sub> = 7-데아자G, X=글리세롤)를 왼쪽 겨드랑이에 그리고, 상이한 용량의 IRO 5를 오른쪽 겨드랑이에 피하 (s.c.) 주입하였다. IMO3 주입 자극 2시간 후, 혈청 샘플을 채취하고, ELISA에 의해 IL-12 수준을 측정하였다. 이들 결과는 도 3에 도시되어 있다. 이들 결과는 IRO에 의한 용량-의존적 억제를 입증한다.

[0161] 실시예 5

[0162] IRO에 의한 시간 의존적 억제

[0163] C57BL/6 마우스에 0.25 mg/kg의 자극성 IMO 3를 왼쪽 겨드랑이에 그리고, IMO 투여 1시간 전 (-1h) 또는 IMO 투여와 동시에 (0h) 1mg/kg의 IRO 5 또는 5'-CTATCTCACCTTCTCTGT-5' (비-CpG 비-자극성 대조군; 올리고/SEQ ID NO 4)을 오른쪽 겨드랑이에 s.c. 주입하였다. 혈청 샘플을 자극성 IMO 주입 후 2시간째에 채취하고, ELISA에 의해 IL-12 수준을 측정하였다. 도 4A에서의 결과는 자극성 IMO 투여 1시간 전 (-1h) 또는 IMO 투여와 동시에 (0h) IRO 5 또는 (올리고 4)를 투여한 후, 혈청 IL-12 수준이 저하되었음을 입증한다.

[0164] C57BL/6 마우스에 0.25 mg/kg의 자극성 IMO 3를 왼쪽 겨드랑이에 s.c. 주입하고, 자극성 IMO와 동시에 (0h) 10 mg/kg의 IRO 102를 비내 투여하였다. 자극성 IMO 주입 후 2시간째에, 혈청 샘플을 채취하고, ELISA에 의해 IL-12 수준을 측정하였다. 도 4B의 결과는 IRO 102를 비내 투여하고, 동시에 IMO를 s.c. 투여한 후에, 혈청 IL-12 수준이 저하됨을 입증한다.

[0165] C57BL/6 마우스에 0.25 mg/kg의 자극성 IMO 3를 왼쪽 겨드랑이에 s.c. 주입하고, 자극성 IMO 주입 (0h) 1시간 전 (-1h), 24시간 전 (-24) 또는 72시간 전 (-72h)에 2 mg/kg 또는 10 mg/kg의 IRO 17, 99, 102를 오른쪽 겨드랑이에 s.c. 주입하였다. 자극성 IMO 주입 2시간 후, 혈청 샘플을 채취하고, ELISA에 의해 IL-12 수준을 측정하였다. 도 4C-D에 결과가 도시되어 있다. 이들 결과는 IRO의 사전 투여 및 동시 투여가 TLR9의 아고니스트를 억제할 수 있으며, 더욱 일반적으로는 IRO가 TLR 활성화를 억제할 수 있음을 입증한다.

[0166] 실시예 6

[0167] TLR9 자극의 억제

[0168] C57BL/6 마우스에 0.25 mg/kg의 자극성 IMO 3를 왼쪽 겨드랑이에 s.c. 주입하고, 자극성 IMO 주입 1시간 전 (-1h) 또는 자극성 IMO와 동시에 (0h) 1 mg/kg의 IRO 21 또는 대조군 올리고 4를 오른쪽 겨드랑이에 s.c. 주입하였다. 자극성 IMO 주입 2시간 후, 혈청 샘플을 채취하고, ELISA에 의해 IL-12 수준을 측정하였다. 도 5A 및 5B에 결과가 도시되어 있다. 이들 결과는 이의 5' 말단에 연결된 CpG 올리고누클레오티드가 억제 특성을 나타내며, 더욱 일반적으로는, 이의 5' 말단에 연결된 면역 자극성 CpG 올리고누클레오티드가 TLR 활성화를 억제할 수 있음을 입증한다.

[0169] 실시예 7

[0170] 인간 세포 배양물중의 TLR9의 억제

[0171] 인간 pDC 및 PBMC를 10ug의 5'-CTATCTGTCGTTCTCTGT-3' (인간 CpG 서열; IMO/SEQ ID NO 2) 및 40 ug의 IRO10와 24hr 동안 인큐베이션시켰다. 결과는 도 6에 도시하였다. 이들 결과는 IRO가 인간 세포 배양물중의 TLR9 아고니스트 활성을 억제하고, 더욱 일반적으로는, IRO가 인간 세포에서 TLR을 억제할 수 있음을 입증한다.

[0172] 실시예 8

[0173] OVA 유도된 Th2 면역 반응에 대한 IRO 효과

[0174] 결과는 도 7에 도시되어 있다. 이들 결과는 IRO가 오브알부민 ("OVA") 유도된 Th2 면역 반응에 대해 영향을 끼치지 않는 반면, IMO 화합물이 OVA 유도된 Th2 반응을 저하시켜, Th1 사이토킨의 생성을 유도한다는 것을 입증한다.

[0175] 실시예 9

[0176] Th1 및 Th2 면역 반응에 대한 IMO 효과의 IRO 억제

[0177] 결과는 도 8에 도시되어 있다. 이들 결과는 IRO가 Th2 억제 특성을 역전시킬 수 있으며, IMO에 의해 유도된 Th1 면역 반응을 억제할 수 있음을 입증한다.

[0178] 실시예 10

[0179] IMO 및 IRO에 대한 항체 반응

[0180] 마우스를 IMO 1 및 IRO 5 또는 6, 및 이들의 조합물의 존재 및 부재하에 0주 및 2주에 HBsAg로 면역화시키고, 항체 반응을 4주째에 측정하였다. 결과는 도 9에 나타냈으며, IMO 유도된 IgG2A 면역 반응에서의 IRO에 의한 저하를 입증한다.

[0181] 실시예 11

[0182] 면역 자극성 올리고누클레오티드의 억제

[0183] TLR9 (Invivogen)을 안정적으로 발현하는 HEK293 세포를 리포터 유전자 Seap (Invivogen)으로 6시간 동안 일시적으로 트랜스펙션시켰다. 세포를 0.25  $\mu$ g/ml IMO를 단독으로 (IMO1; 0 투여) 및 다양한 농도의 IRO로 18hr 동안 처리하였다. TLR9-의존성 리포터 유전자 발현을 제조업자의 프로토콜 (Invivogen)에 따라 측정하고, 결과는 면역 자극성 올리고누클레오티드 활성의 억제율%로서 표시하였다. 결과는 하기 표 5 및 6에 도시되어 있다. 이러한 결과는, IRO가 IMO의 활성을 억제한다는 것을 입증한다.

[0184] 표 5. 면역 자극성 올리고누클레오티드 1의 억제율%. IMO1 농도는 0.25  $\mu$ g/ml이며, IRO 농도는 2  $\mu$ g/ml이다.

IRO #	서열	억제율 %
5	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'	52.5%
25	5'-CTATCTGAC <sub>2</sub> GTTCTCTGT-3'	17.5%
26	5'-CTATCTGAC <sub>2</sub> TTCTCTGT-3'	15.3%
33	5'-CTATCTGAC <sub>3</sub> GTTCTCTGT-3'	38.1%
39	5'-CTATCTGAC <sub>4</sub> GTTCTCTGT-3'	52.8%
41	5'-CTATCTGAC <sub>5</sub> GTTCTCTGT-3'	42.6%
43	5'-CTATCTGAC <sub>6</sub> GTTCTCTGT-3'	23.6%

[0185]

[0186] 다양한 변형부를 갖는 IRO는 TLR9를 발현하는 HEK293 세포에서 IMO의 NF- $\kappa$ B 활성화를 억제하며, 더욱 일반적으로, 다양한 변형부를 갖는 IRO는 IMO의 NF- $\kappa$ B 활성화를 억제할 수 있다.

[0187]

표 6. 면역 자극성 올리고누클레오티드 1의 억제율%. IMO1 농도는 0.25  $\mu$ g/ml이며, IRO 농도는 3  $\mu$ g/ml이다.

IRO #	서열	억제율 %
5	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'	76.5%
17	5'-CTATCTGACG <sub>1</sub> TTCTCTGT-3'	76.4%
34	5'-CTATCTGACG <sub>3</sub> TTCTCTGT-3'	32.2%
37.	5'-CTATCTGACG <sub>4</sub> TTCTCTGT-3'	78.3%

[0188]

[0189] 다양한 변형부를 갖는 IRO는 TLR9를 발현하는 HEK293 세포에서 IMO의 NF- $\kappa$ B 활성화를 억제하며, 더욱 일반적으로, 다양한 변형부를 갖는 IRO는 IMO의 NF- $\kappa$ B 활성화를 억제할 수 있다.

[0190] 실시예 12

IRO에 의한 시간 의존성 억제

[0192] C57BL/6 마우스에 0.25 mg/kg 내지 10 mg/kg의 TLR 아고니스트를 왼쪽 겨드랑이에 그리고, TLR 아고니스트 투여 1시간 전 (-1h), 48시간 이내 (-48) 또는 TLR 아고니스트와 동시에 (0h) 1mg/kg 내지 20mg/kg의 IRO 5, 17 또는 37, 또는 5'-TCCTGGCGGGAAAGT-3' (폴리 dG 대조군; 올리고/SEQ ID NO 49)을 오른쪽 겨드랑이에 s.c. 주입하였다. 혈청 샘플을 자극성 IMO 주입 후 2시간째에 채취하고, ELISA에 의해 IL-12 수준을 측정하였다. 결과는 하기 표 7-22에 도시되어 있다. 이들 결과는 IRO의 사전 투여 및 동시 투여가 TLR9의 아고니스트를 억제하며, IRO의 억제 활성이 IMO를 투여하기 48시간 전에 투여하는 경우에도 효과적임을 입증한다. 더욱 일반적으로, 이러한 결과는 IRO의 사전 투여 및 동시 투여가 TLR 아고니스트를 억제할 수 있으며, IRO의 억제 활성이 심지어 TLR 아고니스트가 투여되기 수시간 전에 투여될 지라도 관찰될 수 있음을 입증한다.

표 7. C57BL/6 마우스 (n=3) 생체내에서 IRO 5에 의한 IMO 3 유도된 IL-12 (ng/ml  $\pm$  SD)의 억제

IMO 단독 (0.25mg/kg)	IRO 단독 (2mg/kg)	IRO+IMO			
		IRO 투여 후의 IMO 투여 시점			
		0hr	1hr	3hr	6hr
21.1 $\pm$ 1.84	0.81 $\pm$ 0	0.59 $\pm$ 0.48	1.54 $\pm$ 0.17	6.53 $\pm$ 0.81	10.41 $\pm$ 0.48

[0195] IRO 투여 후 6시간 이내에 주입되는 경우에는, IRO 5는 IMO 유도된 IL-12 생성을 억제한다. 더욱 일반적으로, 이러한 결과는, IRO 투여 후, IMO 투여시 또는 상기 지정된 시간에 도달하는 경우, IRO는 TLR 활성화 및 IMO 유도된 IL-12 생성을 억제할 수 있음을 입증한다.

표 8. C57BL/6 마우스 (n=3) 생체내에서 IRO 5에 의한 IMO 3 유도된 IL-12 (ng/ml  $\pm$  SD)의 억제

IMO 단독 (0.25mg/kg)	IRO 단독 (20mg/kg)	IRO+IMO			
		IRO 투여 후의 IMO 투여 시점			
		0hr	1hr	3hr	6hr
33.8 $\pm$ 3.8	0.73 $\pm$ 0.7	0.87 $\pm$ 1.19	1.52 $\pm$ 2.01	2.2 $\pm$ 2.4	1.84 $\pm$ 3.18

[0198] IRO 투여 후 6시간 이내에 주입되는 경우에, IRO 5는 IMO 유도된 IL-12 생성을 효과적으로 억제하였다. 더욱 일반적으로, 이들 결과는, IRO 투여 후, IMO 투여시 또는 상기 지정된 시간에 도달하는 경우, IRO는 TLR 활성화 및 IMO 유도된 IL-12 생성을 실질적으로 억제할 수 있음을 입증한다.

표 9. C57BL/6 마우스 (n=3) 생체내에서 IRO 5에 의한 IMO 3 유도된 IL-12 (ng/ml  $\pm$  SD)의 억제

IMO 단독 (0.25mg/kg)	IRO 단독 (20mg/kg)	IRO+IMO			
		IRO 투여 후의 IMO 투여 시점			
		6hr	14hr	24hr	48hr
25.8 $\pm$ 2.6	0.17 $\pm$ 0	0.04 $\pm$ 0	1.25 $\pm$ 0	1.8 $\pm$ 0.29	2.9 $\pm$ 1.1

[0201] IRO 투여 후 48시간 이내에 주입되는 경우에, IRO 5는 IMO 유도된 IL-12 생성을 잠재적으로 억제하였다. 더욱 일반적으로, 이들 결과는, IRO 투여 후, IMO 투여시 또는 상기 지정된 시간에 도달하는 경우, IRO는 TLR 활성화 및 IMO 유도된 IL-12 생성을 실질적으로 억제할 수 있음을 입증한다.

표 10. C57BL/6 마우스 (n=3) 생체내에서 IRO 17에 의한 IMO 3 유도된 IL-12 (ng/ml  $\pm$  SD)의 억제

IMO 단독 (0.25mg/kg)	IRO 단독 (2mg/kg)	IRO+IMO			
		IRO 투여 후의 IMO 투여 시점			
		3hr	6hr	24hr	
6.6 $\pm$ 0.64	0.67 $\pm$ 0.02	1.01 $\pm$ 0.06	1.25 $\pm$ 0.29	4.29 $\pm$ 1.12	

[0204] IRO 투여 후 6시간 또는 이 초과의 시간 이내에 주입되는 경우, IRO 17은 IMO 유도된 IL-12 생성을 억제하였다.

더욱 일반적으로, 이들 결과는, IRO 투여 후, IMO 투여시 또는 상기 지정된 시간에 도달하는 경우, IRO는 TLR 활성화 및 IMO 유도된 IL-12 생성을 억제할 수 있음을 입증한다.

표 11. C57BL/6 마우스 (n=3) 생체내에서 IRO 37에 의한 IMO 3 유도된 IL-12 (ng/ml ± SD)의 억제

IMO 단독 (0.25mg/kg)	IRO 단독 (2mg/kg)	IRO+IMO		
		IRO 투여 후의 IMO 투여 시점		
		3hr		
6.6±0.64	0.67±0.02	0.91±0.03		

IRO 투여 후 3시간 이내에 주입되는 경우, IRO 37은 IMO 유도된 IL-12 생성을 억제하였다. 더욱 일반적으로, 이들 결과는, IRO 투여 후, IMO 투여시 또는 상기 지정된 시간에 도달하는 경우, IRO는 TLR 활성화 및 IMO 유도된 IL-12 생성을 억제할 수 있음을 입증한다.

표 12. C57BL/6 마우스 (n=3) 생체내에서 대조군 폴리 dG (5'-TCCTGGAGGGGAAGT-3' (SEQ ID NO 73))에 의한 IMO 3 유도된 IL-12 (ng/ml ± SD)의 억제

IMO 단독 (0.25mg/kg)	IRO 단독 (10mg/kg)	대조군+IMO		
		대조군 투여 후의 IMO 투여 시점		
		3hr		
18.24±0.22	1.47±0	1.38±0.18	10.03±0.37	16.97±0.52

IRO 투여 후 6시간 이내에 주입되는 경우, TLR9 안타고니스트 활성을 나타내는 것으로 공지된 폴리 dG 화합물은 IMO 유도된 IL-12 생성을 억제하였다. IRO에 대한 데이터와 비교할 경우 (예를 들어, 표 7의 IRO 5), 대조군 폴리 dG 올리고 안타고니스트 효과는 단기간 및 일시적이었다.

표 13. C57BL/6 마우스 (n=3) 생체내에서 대조군 폴리 dG (5'-TCCTGGCGGGGAAGT-3' (SEQ ID NO 49))에 의한 IMO 3 유도된 IL-12 (ng/ml ± SD)의 억제

IMO 단독 (0.25mg/kg)	IRO 단독 (10mg/kg)	대조군+IMO		
		대조군 투여 후의 IMO 투여 시점		
		3hr		
18.24±0.22	1.2±0	0.81±0.06	10.1±0.09	19.02±1.6

IRO 투여 후 6시간 이내에 주입되는 경우, TLR9 안타고니스트 활성을 나타내는 것으로 공지된 폴리 dG 화합물은 IMO 유도된 IL-12 생성을 억제하였다. IRO에 대한 데이터와 비교할 경우 (예를 들어, 표 7의 IRO 5), 대조군 폴리 dG 올리고 안타고니스트 효과는 단기간 및 일시적이었다.

표 14. C57BL/6 마우스 (n=3) 생체내에서 IRO 5에 의한 R848, TLR7 및 TLR8 아고니스트 유도된 IL-12 (ng/ml ± SD)의 억제

R848 단독 (0.5mg/kg)	IRO 단독 (2mg/kg)	IRO+R848		
		IRO 투여 후의 R848 투여 시점		
		1hr		
128±2.9	1.48±0.17	56.0±3.3		

IRO 투여 후 1시간 이내에 주입되는 경우, IRO 5는 R848 유도된 IL-12 생성의 낮은 일시적 억제를 나타내었다. 더욱 일반적으로, 이들 데이터는 IRO가 세포내 TLR의 활성을 억제할 수 있음을 입증해준다.

표 15. C57BL/6 마우스 (n=3) 생체내에서 IRO 5에 의한 폴리I:폴리C, TLR3 아고니스트 유도된 IL-12 (ng/ml ± SD)의 억제

폴리I. 폴리C 단독 (10mg/kg)	IRO 단독 (2mg/kg)	IRO+폴리I. 폴리C		
		IRO 투여 후의 폴리I. 폴리C 투여 시점		
		1hr		
8.7±0.6	1.48±0.17	2.1±0.07		

[0219] IRO 투여 후 1시간 이내에 주입되는 경우, IRO 5는 폴리I.폴리C 유도된 IL-12 생성의 낮은 일시적 억제를 나타낸다. 더욱 일반적으로, 이들 데이터는 IRO가 TLR 활성화 및 폴리I.폴리C 유도된 IL-12 생성을 억제할 수 있음을 입증해준다.

[0220] 표 16. C57BL/6 마우스 (n=3) 생체내에서 IRO 5에 의한 IMO 유도된 MCP-1 (ng/ml  $\pm$  SD)의 억제

IMO (0.25mg/kg)	단독	IRO (2mg/kg)	단독	IRO+IMO
				IRO 투여 후의 R848 투여 시점
				1hr
2.2 $\pm$ 0.25		NT		0.28 $\pm$ 0.73

[0222] IRO 투여 후 1시간 이내에 주입되는 경우, IRO 5는 IMO 유도된 MCP-1 생성의 잠재적 억제를 나타낸다. 더욱 일반적으로, 이들 데이터는 IRO가 TLR 활성화 및 IMO 유도된 MCP-1 생성을 억제할 수 있음을 입증한다.

[0223] 표 17. C57BL/6 마우스 (n=3) 생체내에서 IRO 5에 의한 R848, TLR7 및 TLR8 아고니스트 유도된 MCP-1 (ng/ml  $\pm$  SD)의 억제

R848 (0.5mg/kg)	단독	IRO (2mg/kg)	단독	IRO+IMO
				IRO 투여 후의 R848 투여 시점
				1hr
11 $\pm$ 1.4				7.2 $\pm$ 1.7

[0225] IRO 투여 후 1시간 이내에 주입되는 경우, IRO 5는 R848 유도된 MCP-1 생성의 낮은 일시적 억제를 나타낸다. 더욱 일반적으로, 이들 데이터는 IRO가 TLR 활성화 및 세포내 TLR 활성화를 통한 MCP-1 생성을 억제할 수 있음을 입증한다.

[0226] 표 18. C57BL/6 마우스 (n=3) 생체내에서 IRO 5에 의한 폴리I.폴리C, TLR3 아고니스트 유도된 MCP-1 (ng/ml  $\pm$  SD)의 억제

폴리I.폴리C (10mg/kg)	단독	IRO (2mg/kg)	단독	IRO+폴리I.폴리C
				IRO 투여 후의 폴리I.폴리C 투여 시점
				1hr
4.6 $\pm$ 0.6				1.8.0 $\pm$ 0.57

[0228] IRO 투여 후 1시간 이내에 주입되는 경우, IRO 5는 폴리I.폴리C 유도된 MCP-1 생성의 낮은 일시적 억제를 나타낸다. 더욱 일반적으로, 이들 데이터는 IRO가 TLR 활성화 및 폴리I.폴리C의 MCP-1 생성을 억제할 수 있음을 입증해준다.

[0229] 표 19. C57BL/6 마우스 (n=3) 생체내에서 IRO 5에 의한 IMO 3 유도된 IL-12 (ng/ml  $\pm$  SD)의 억제

IMO (0.25mg/kg)	단독	IRO (2mg/kg)	단독	IRO+IMO		
				IRO 투여 후의 IMO 투여 시점		
				2일	5일	7일
33.2 $\pm$ 8.7		NT		14.5 $\pm$ 5.17	17.19 $\pm$ 11.2	28.0 $\pm$ 7.75

[0231] IRO 투여 후 7일 이내에 주입되는 경우, IRO 5는 IMO 유도된 IL-12 생성을 잠재적으로 억제하였다. 더욱 일반적으로, 이들 데이터는, IRO가 포유동물에서 TLR 활성화 및 IMO 유도된 IL-12 생성을 억제할 수 있음을 입증한다.

[0232] 표 20. C57BL/6 마우스 (n=3) 생체내에서 IRO 5에 의한 IMO 유도된 IL-12 (ng/ml  $\pm$  SD)의 억제

IMO (0.25mg/kg)	단독	IRO (10mg/kg)	단독	IRO+IMO
				IRO 투여 후의 IMO 투여 시점
				72hr
53.39 $\pm$ 2.71		2.03 $\pm$ 2.03		28.72 $\pm$ 0.79

[0234] IRO 투여 후 72시간 이내에 주입되는 경우, IRO 5는 IMO 유도된 IL-12 생성의 잠재적인 억제를 나타낸다. 더욱 일반적으로, 이들 데이터는, IRO가 투여된 후 수시간에 IRO가 포유동물에서 TLR 활성화 및 IMO 유도된 IL-12 생성을 억제할 수 있음을 입증한다.

[0235] 표 21. C57BL/6 마우스 (n=3) 생체내에서 IRO 5에 의한 R848, TLR7 및 TLR8 아고니스트 유도된 IL-12 (ng/ml ± SD)의 억제

R848 (0.125mg/kg)	단독	IRO (10mg/kg)	단독	IRO+R848
				IRO 투여 후의 R848 투여 시점
96.5±3.4		2.03±2.03		72hr
				13.64±0.47

[0237] IRO 투여 후 72시간 이내에 주입되는 경우, IRO 5는 R848 유도된 IL-12 생성의 억제를 나타낸다. 더욱 일반적으로, 이들 데이터는, IRO가 투여된 후 수시간에 IRO가 포유동물에서 세포내 TLR의 아고니스트의 활성 및 TLR 아고니스트 유도된 IL-12 생성을 억제할 수 있음을 입증한다.

[0238] 표 22. C57BL/6 마우스 (n=3) 생체내에서 IRO 5에 의한 폴리I.폴리C, TLR3 아고니스트 유도된 IL-12 (ng/ml ± SD)의 억제

폴리I.폴리C (10mg/kg)	단독	IRO (10mg/kg)	단독	IRO+폴리I.폴리C
				IRO 투여 후의 폴리I.폴리C 투여 시점
28.42±1.2		2.03±2.03		72hr
				26.61±5.97

[0240] IRO 투여 후 72시간에 주입되는 경우, IRO 5는 폴리I.폴리C 유도된 IL-12 생성을 억제하지 못하였다.

[0241] 실시예 13

[0242] TLR 아고니스트에 대한 IRO의 단기간 및 장기간 차단 활성

[0243] IRO 화합물의 단기간 활성도 및 선택성을 평가하기 위해, 마우스에 TLR 아고니스트를 왼쪽 옆구리에 피하 투여하기 1시간 전 (-1h)에 오른쪽 옆구리에 2mg/kg IRO를 피하 주입하였다. TLR 아고니스트의 투여 후 2시간째에 혈청 샘플을 수집하고, 바이오소스 (Biosource) (Camarillo, CA)로부터 수득된 다중 사이토킨/케모킨 검출 루미넥스 키트를 사용하여 분석하였다. 제조업자의 권고된 프로토콜에 따랐다. 사이토킨/케모킨 값은 루미넥스 100 (Luminex 100) 장치로 측정된 표준 곡선에 접하는 평균 값으로부터 결정하였다. 루미넥스 분석은 스타스테이션 소프트웨어 (StarStation software) (Applied Cytometry Systems, Sacramento, CA)를 사용하여 수행하였다. 하기 대표적인 아고니스트를 지시된 용량으로 사용하였다: 5'-TCTGACG<sub>1</sub>TTCT-X-TCTTG<sub>1</sub>CAGTCT-5' (TLR9 아고니스트; 0.25 mg/kg, G<sub>1</sub>=7-데아자- dG), R848 (TLR7/8 아고니스트, 0.1 mg/kg), 록소리빈 (Loxoribine) (TLR7 아고니스트, 100 mg/kg), 플라겔린 (Flagellin) (TLR5 아고니스트, 0.25 mg/kg), LPS (TLR4 아고니스트, 0.25 mg/kg), 폴리I.폴리C (TLR3 아고니스트, 20 mg/kg), 및 MALP-2 (TLR2 아고니스트, 0.5 mg/kg). 결과는 도 10-12에 도시되어 있다. 이들 데이터는, IRO가 TLR 아고니스트에 대한 반응에서 사이토킨/케모킨 생성을 억제할 수 있음을 입증한다. 효과는 세포외 TLR (예를 들어, TLR2, TLR4, 및 TLR5)와 비교하여 세포내 TLR (예를 들어, TLR3, TLR7, TLR8, 및 TLR9)에 있어서 더욱 크다.

[0244] IRO 화합물의 장기간 활성도 및 선택성을 평가하기 위해, 마우스에 TLR 아고니스트 (상기 기술된 바와 같음)를 왼쪽 옆구리에 피하 투여하기 72시간 전 (-72h)에 오른쪽 옆구리에 10mg/kg IRO를 피하 주입하였다. TLR 아고니스트의 투여 후 2시간째에 혈청 샘플을 수집하고, 상기 기술된 바와 같이 분석하였다. 결과는 도 13-15에 도시되어 있다. 이들 결과는 IRO의 사전 투여가 TLR 아고니스트를 억제할 수 있으며, IRO의 억제 활성은 아고니스트 투여 전 72시간에 투여한 경우에도 유효함을 입증한다.

[0245] 실시예 14

[0246] 루푸스 마우스 모델에서 IRO 화합물의 활성

[0247] 야생형 (BALB/c) 및 루푸스에 걸리기 쉬운 (MRL-lpr) 마우스로부터의 정제된 마우스 비장 B 세포를 0.3 µg/ml IMO의 존재 또는 부재 하에 1 µg/ml IRO-17, 또는 0.3 µg/ml IMO 또는 배지 단독하에 72시간 동안 배양하였다.

결과는 도 16에 도시되어 있다. 이들 결과는 IRO의 투여가 B 림프구 증식을 억제할 수 있음을 입증한다.

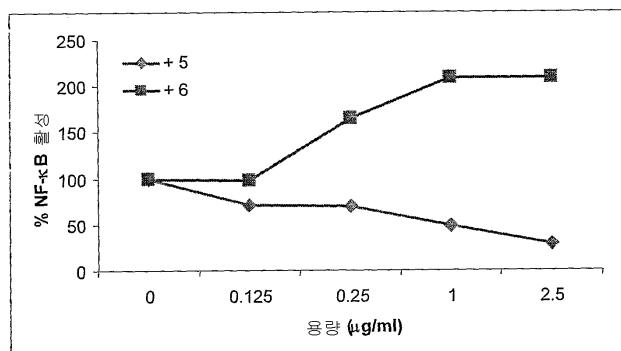
[0248] 야생형 (BALB/c) 및 루푸스에 걸리기 쉬운 (MRL-1pr) 마우스로부터의 정제된 마우스 비장 B 세포를  $0.3 \mu\text{g}/\text{ml}$  IMO의 존재 또는 부재하에  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  IRO-17, 또는  $0.3 \mu\text{g}/\text{ml}$  IMO 또는 배지 단독하에 72시간 동안 배양하였다. 결과는 도 17A에 도시되어 있다. 이들 결과는 IRO의 투여가 마우스 B 림프구에 의한 IL-6 생성을 억제할 수 있음을 입증한다. 야생형 (BALB/c) 및 루푸스에 걸리기 쉬운 (NZBW) 마우스로부터의 정제된 마우스 비장 B 세포를  $0.01$  내지  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  IRO-17과 함께  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  IMO의 존재하에, 또는  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  IRO-17,  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  IMO 또는 배지 단독으로 72h 동안 배양하였다. 결과는 도 17B 및 17C에 도시되어 있다. 이들 결과는, IRO의 투여가 마우스 비장 세포에 의한 IL-6 및 IL-12 생성을 억제할 수 있음을 입증한다.

[0249] 루푸스에 걸리기 쉬운 MRL-1pr 마우스에 IRO-5는 9주 내지 18주, 및 21 내지 23주에 주당 1회  $100 \mu\text{g}$  투여량으로 주입되거나, IRO-17는 10주 내지 15주에 주당 1회  $100 \mu\text{g}$  투여량으로 시작하여, 18-21주에 주당 3회씩  $100 \mu\text{g}$  및 22 내지 24주에 주당 3회씩 40mg을 주입하였다. 혈액 및 소변을 IRO 주입 전 매주마다 수집하였다. 마우스를 24주에 희생시켰다. 혈청 항-DNA IgG1 수준을 ELISA에 의해 측정하였다. 결과는 도 18A 내지 18E에 도시되어 있다. 이들 결과는, IRO5 및 IRO17이 루푸스에 걸리기 쉬운 마우스에서 뇨단백질 및 IgG1 및 IgG2A 생성을 억제할 수 있음을 입증한다.

[0250] 루푸스에 걸리기 쉬운 NZBW 마우스에 6주부터 출발하여 매 2주당 1회씩  $300 \mu\text{g}$  IRO-5로 s.c. 투여하였다. 혈청 항-DNA IgG2a 수준을 16주 내지 20주에 측정하였다. 결과는 도 19에 도시되어 있다. 결과는 IRO의 투여가 NZBW 마우스에서 혈청 항-DNA IgG2a를 억제함을 입증한다.

## 도면

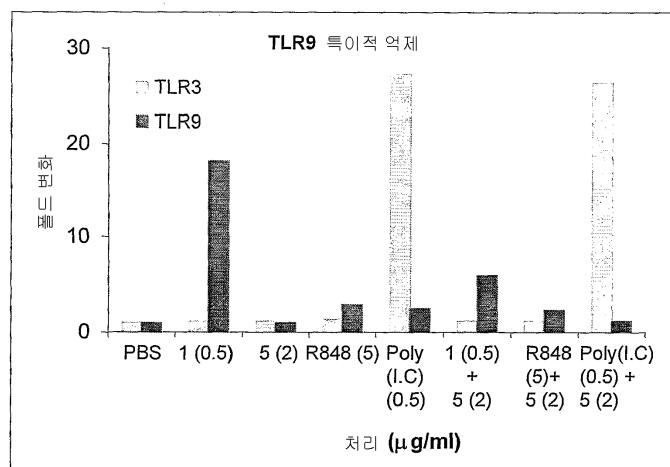
### 도면1



1 5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'  
 5 5'-CTATCT**G**ACGTTCTCTGT-3'  
 6 5'-CTATCTGACGU**U**CTCTGT-3'

굵은 글씨체의 누클레오티드는 2'-O-메틸리보누클레오티드이다.

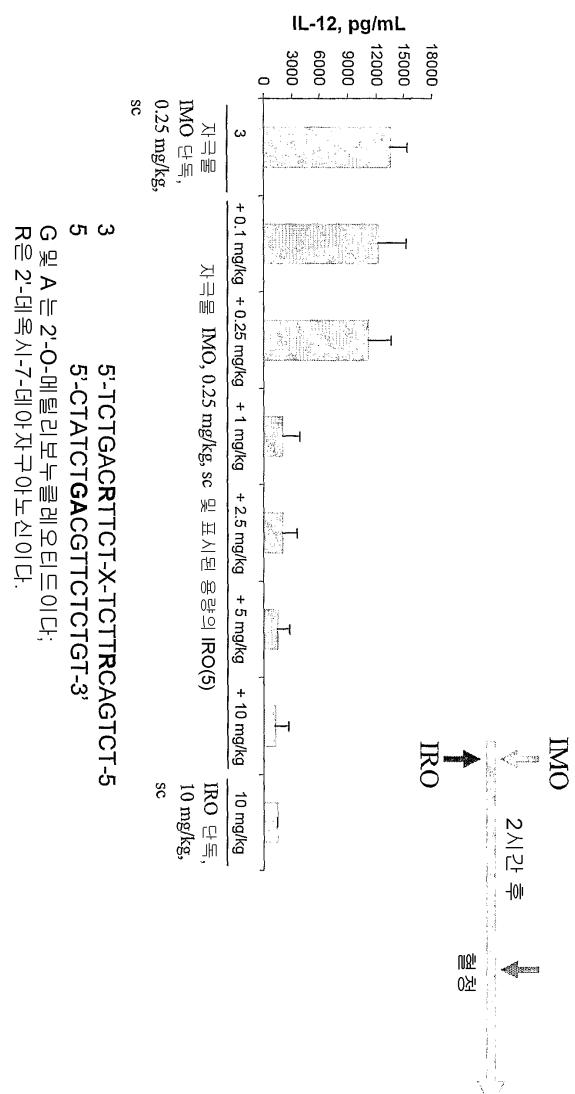
## 도면2



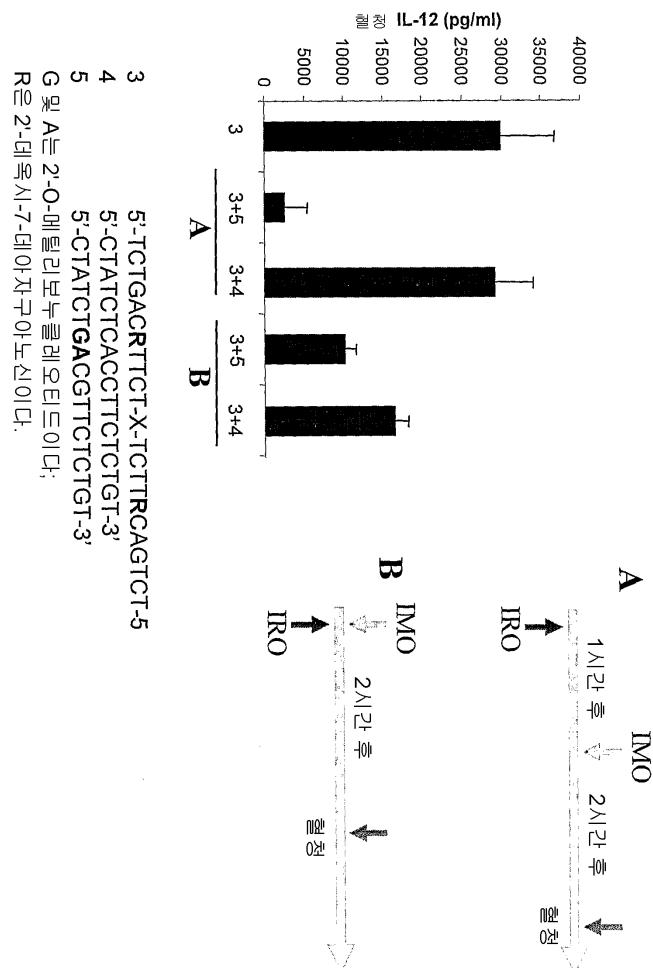
1            5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'  
 5            5'-CTATCT**G**ACGTTCTCTGT-3'

굵은 글씨체의 누클레오티드는 2'-O-메틸리보누클레오티드이다.

## 도면3

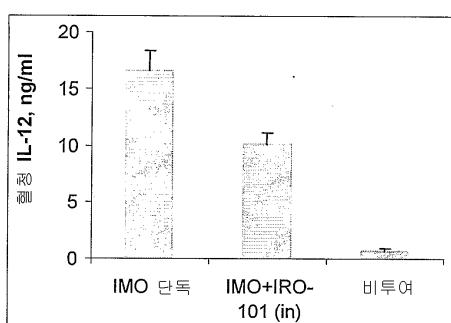


도면4A

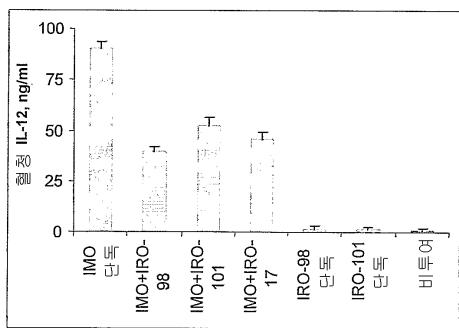


3 5'-TCTGACRTTCT-X-TCTTRCAGTCT-5  
4 5'-CTATCTCACCTTCTCTGT-3'  
5 5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'  
G 및 A는 2'-O-메틸리보뉴클레오티드이다;  
R은 2'-데옥시-7-데아자구아노신이다.

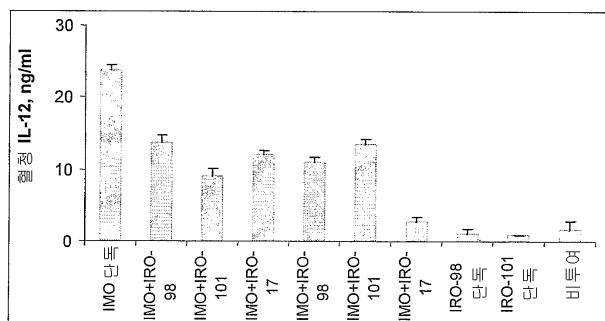
도면4B



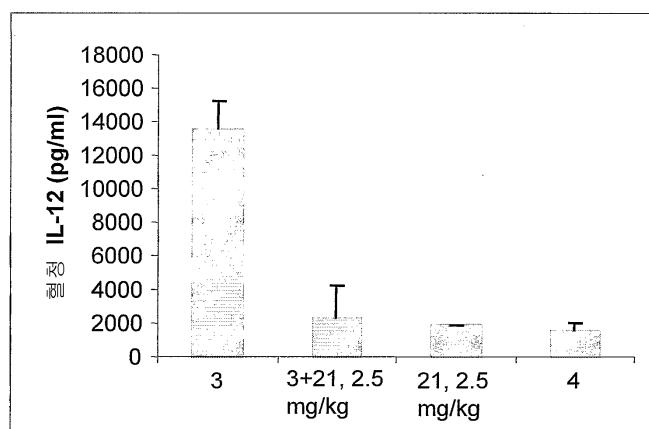
도면4C



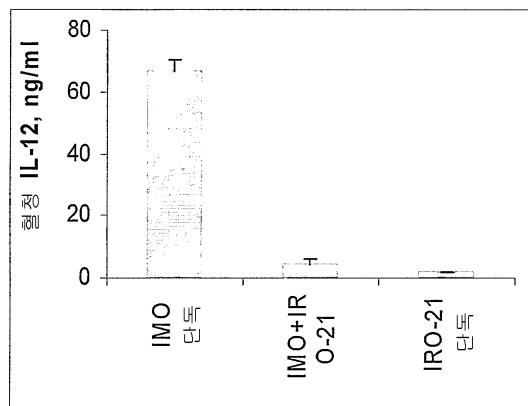
도면4D



도면5A

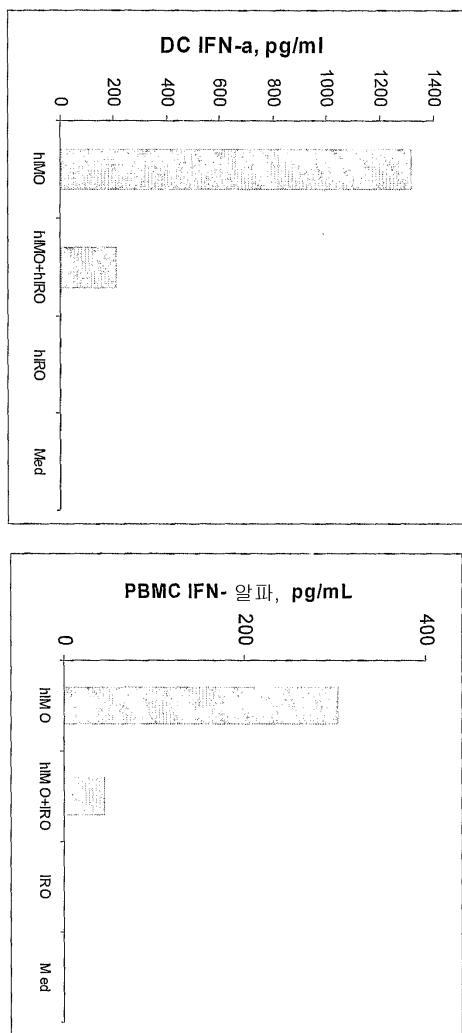


## 도면5B



3            5'-TCTGACRTTCT-X-TCTTRCAGTCT-5  
 21           3'-TCTTGCAGTCT-X-TCTGACGTTCT-3'  
 4            5'-CTATCTCACCTTCTCTGT-3'  
 G 및 A는 2'-O-메틸리보누클레오티드이다;  
 R은 2'-데옥시-7-데아자구아노신이다.

## 도면6

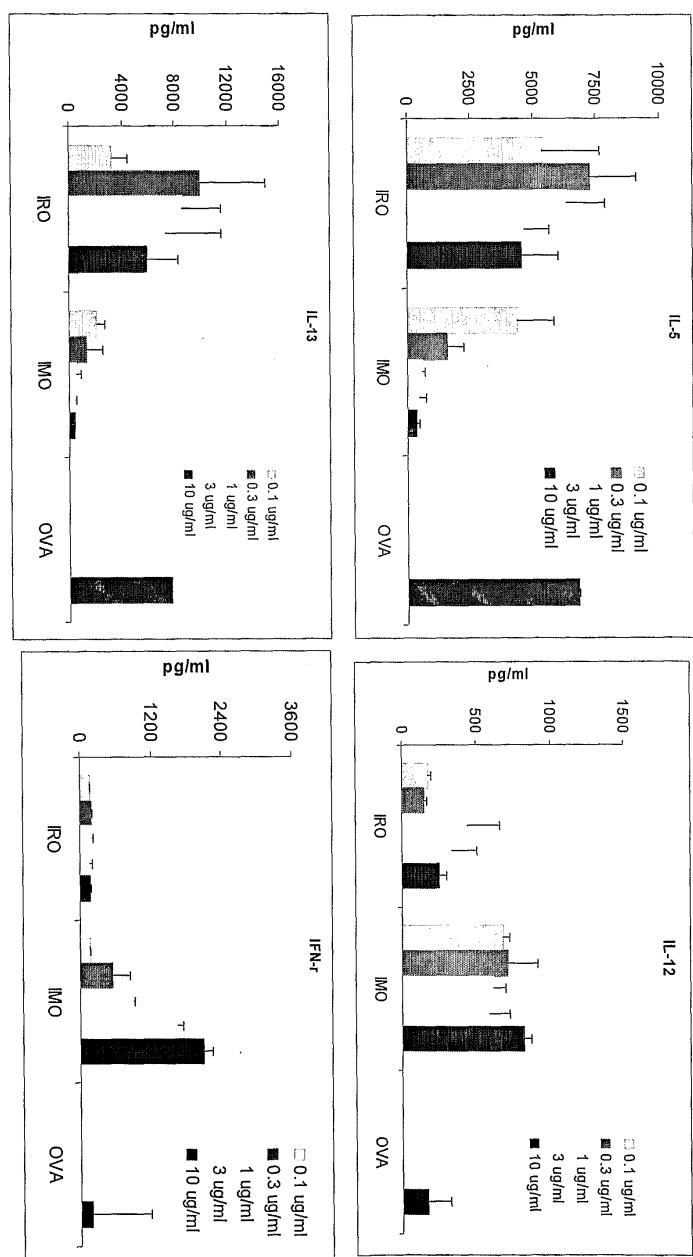


인간 pDCs 및 PBMCs를 10ug hIMO 및 40ug IRO와 24시간 동안 인큐베이션하였다.

hIMO = 2'5'-CTATCTGTCGGTCTCTGT-3'  
hIRO = 10'5'-CTATCTGUCCGTTCTCTGT-3'

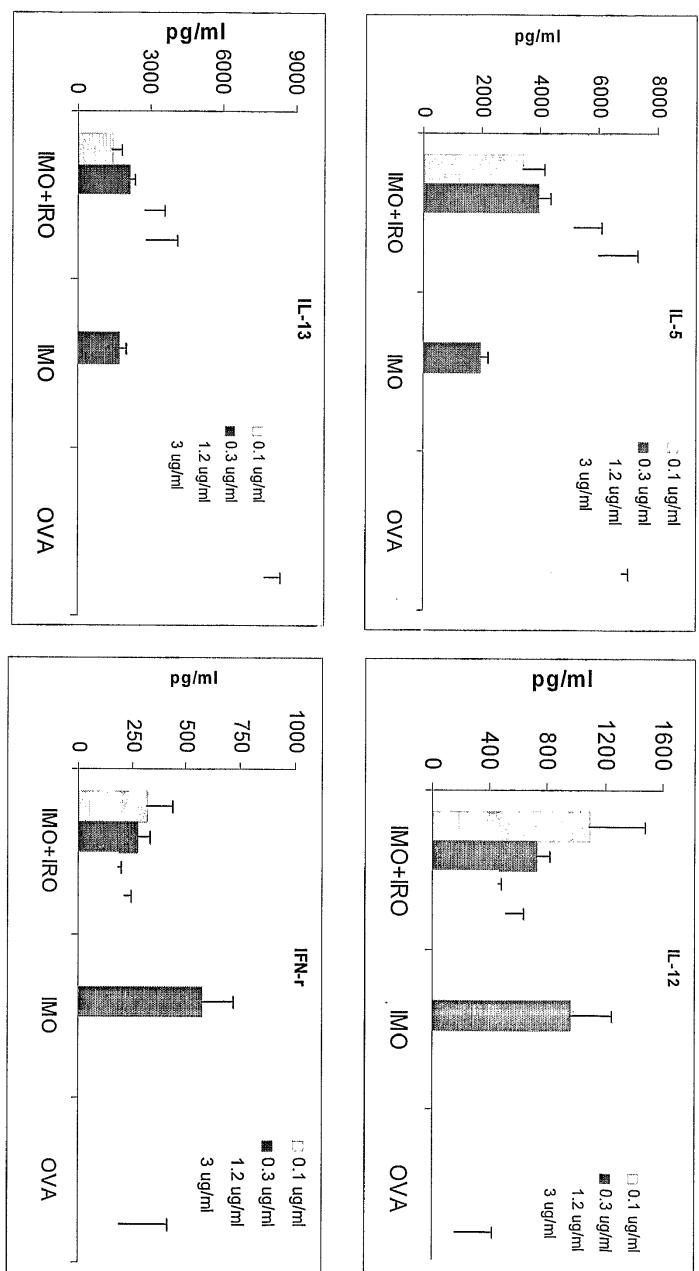
굵은 글씨체의 누클레오티드는 2'-O-메틸리보누클레오티드이다.

## 도면7



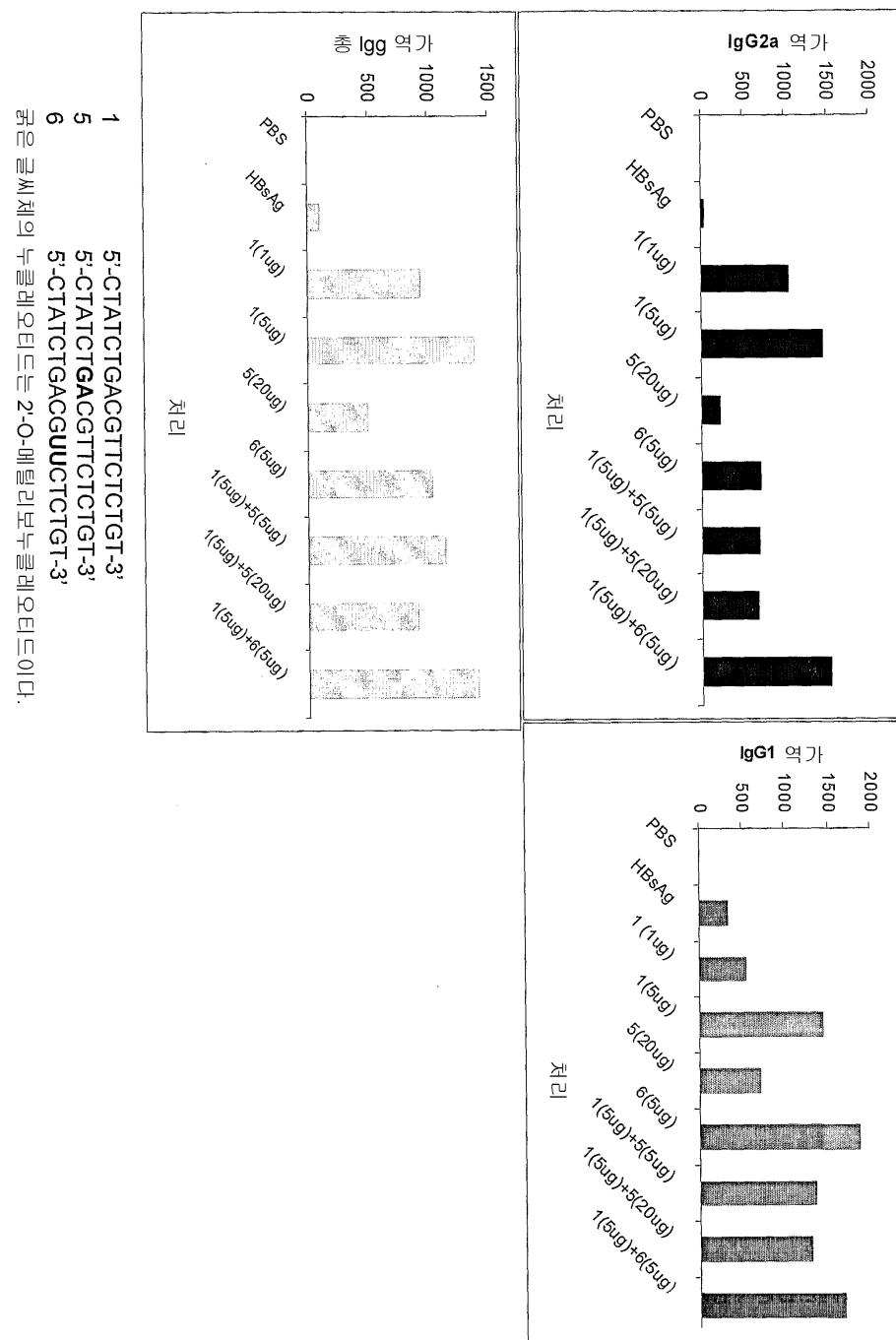
IMO = 1' 5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'  
 IRO = 5' 5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'  
 이것은 글씨체의 누클레오티드는 2'-O-메틸리보누클레오티드이다.

## 도면8



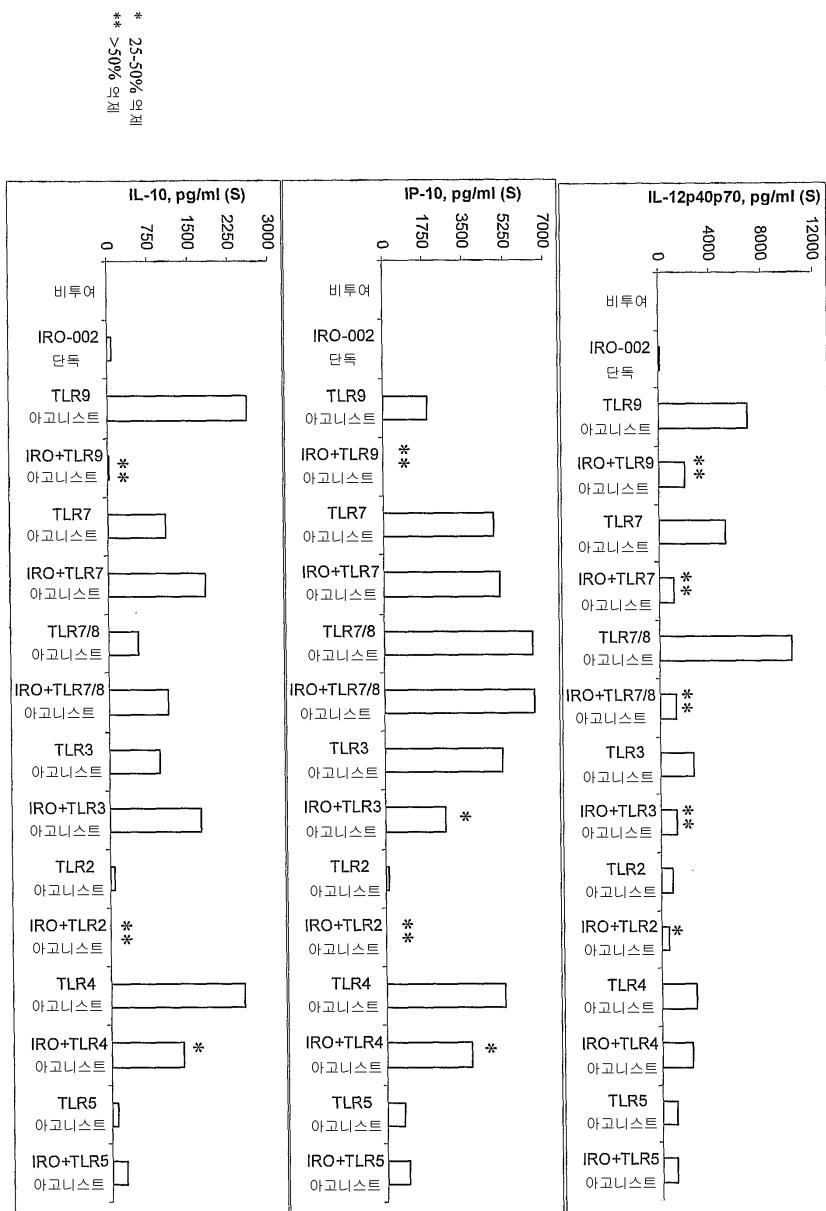
IMO = 1  
 IRO = 5      5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'  
 이것은 글씨체의 누클레오티드는 2'-O-메틸리보누클레오티드이다.

## 도면9



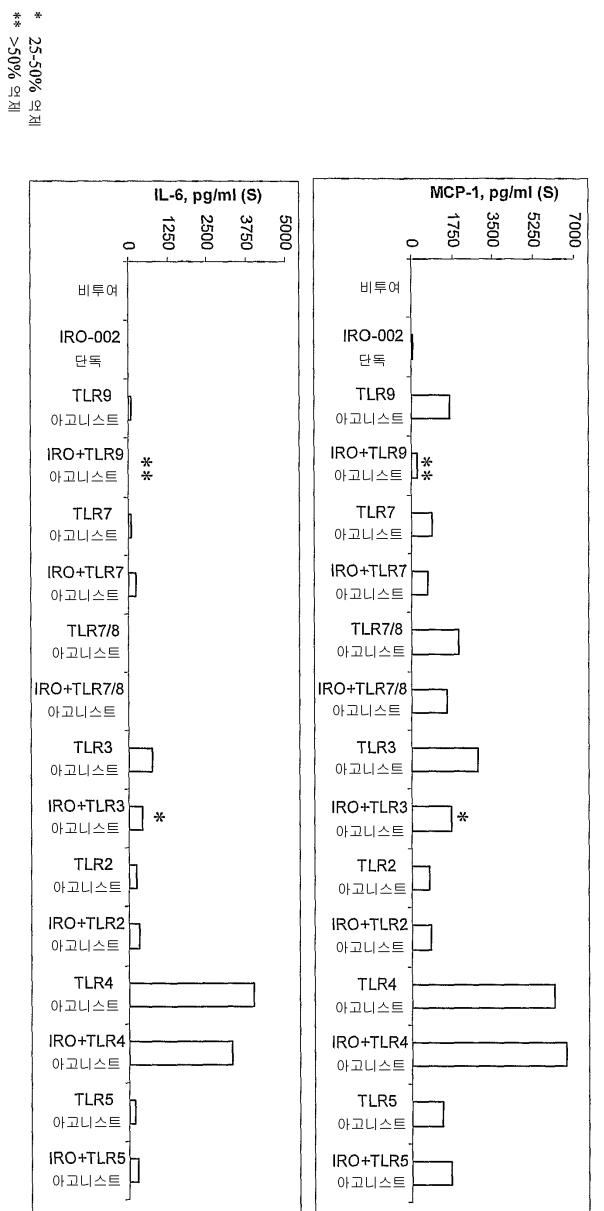
5'-CTATCTGACGGTCTCTGT-3'  
 5'-CTATCTGACGGuCTCTGT-3'  
 같은 글씨체의 누클레오티드는 2'-O-메틸리보누클레오티드이다.

도면10



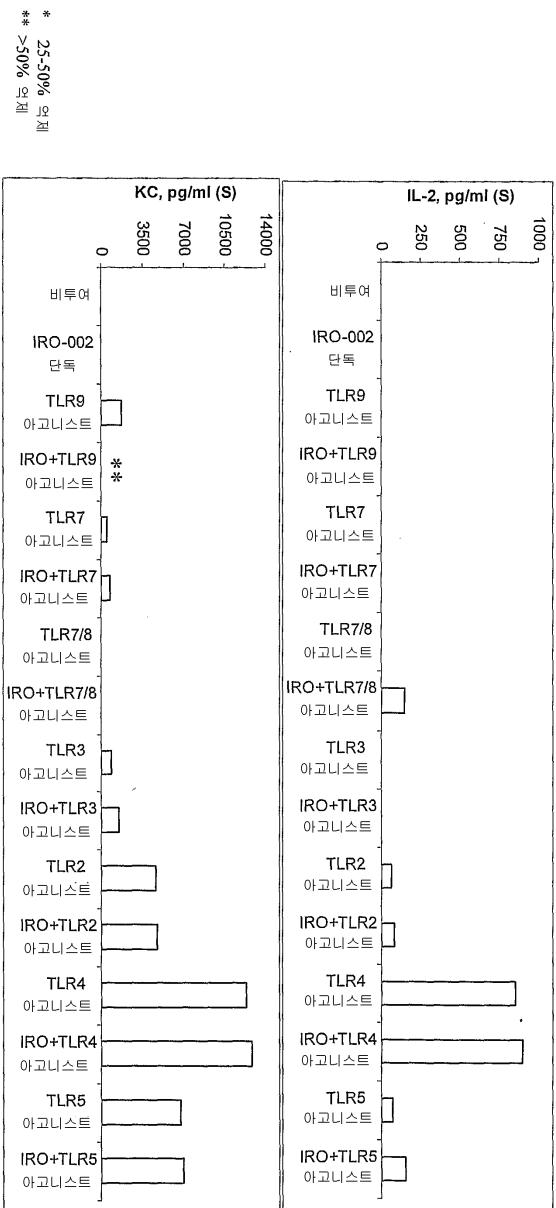
## 단기간 안타고니스트 흡수

## 도면11



## 단기간 안타고니스트 활성

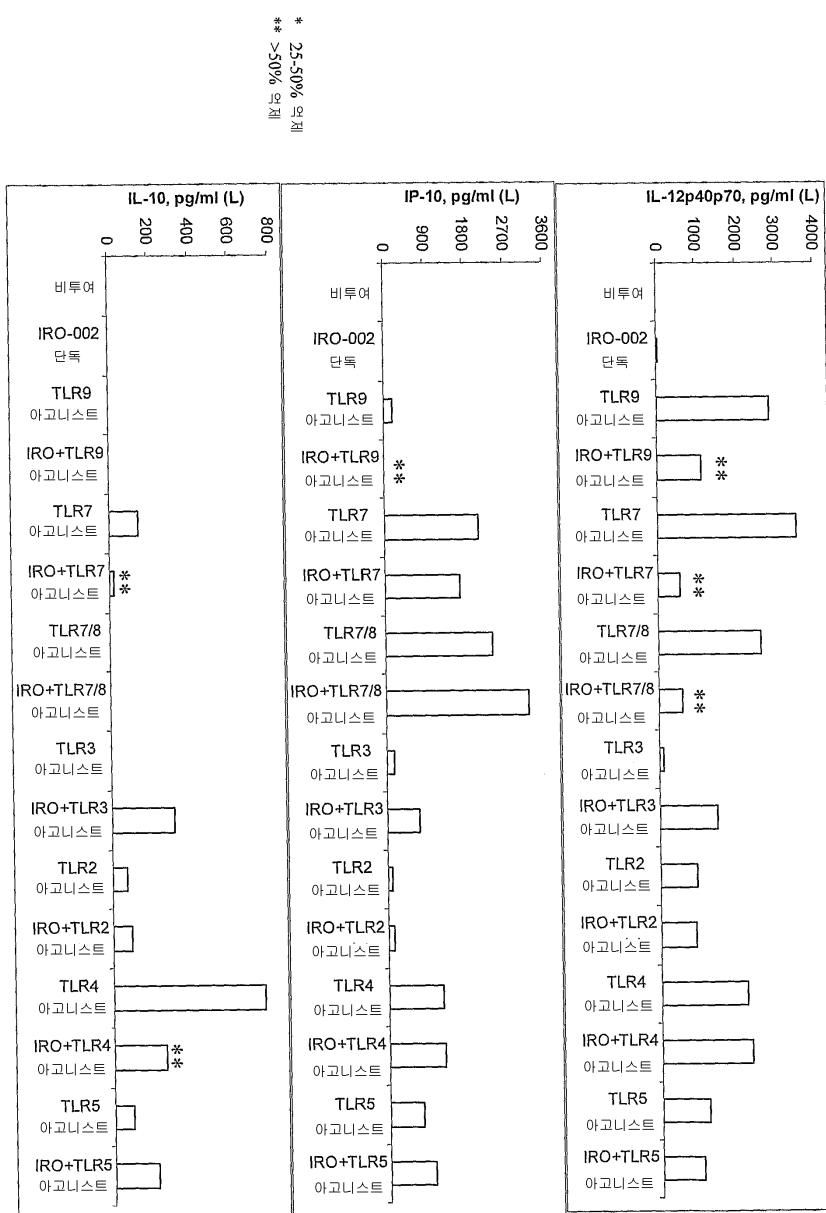
## 도면12



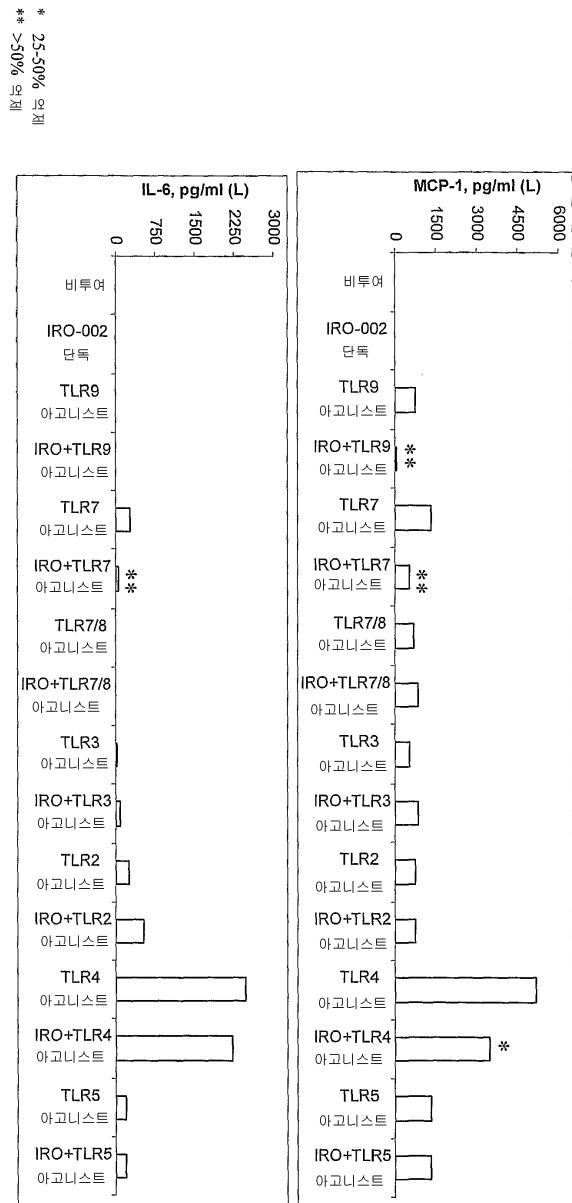
## 단기간 안토고니스트 활성

## 도면13

## 장기간 안고니스트 활성



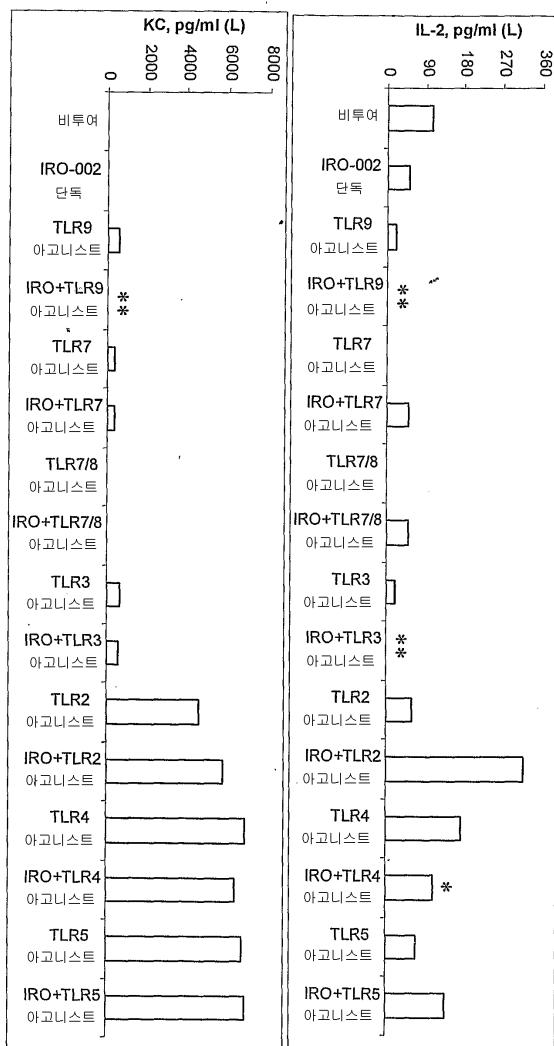
도면14



## 장기간 안타고니스트 활성

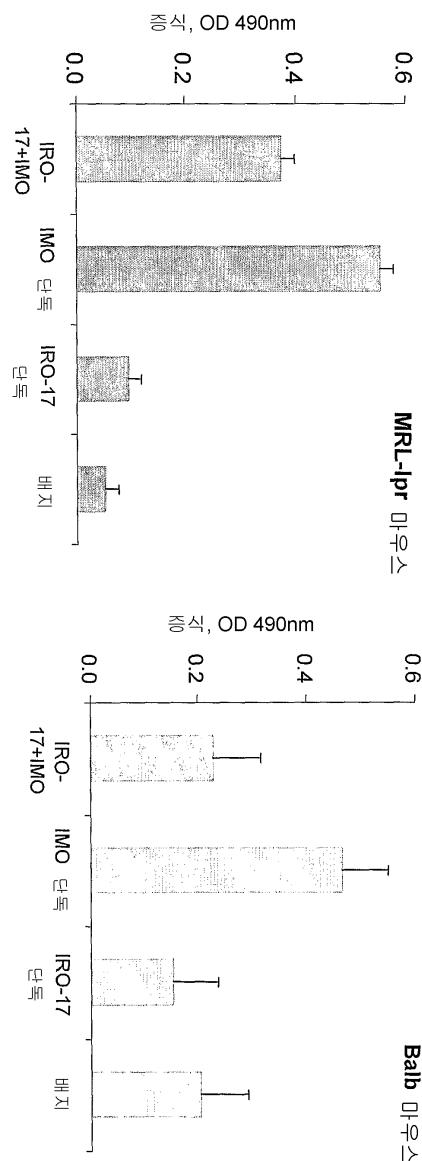
## 도면15

\* 25-50% 억제  
\*\* >50% 억제

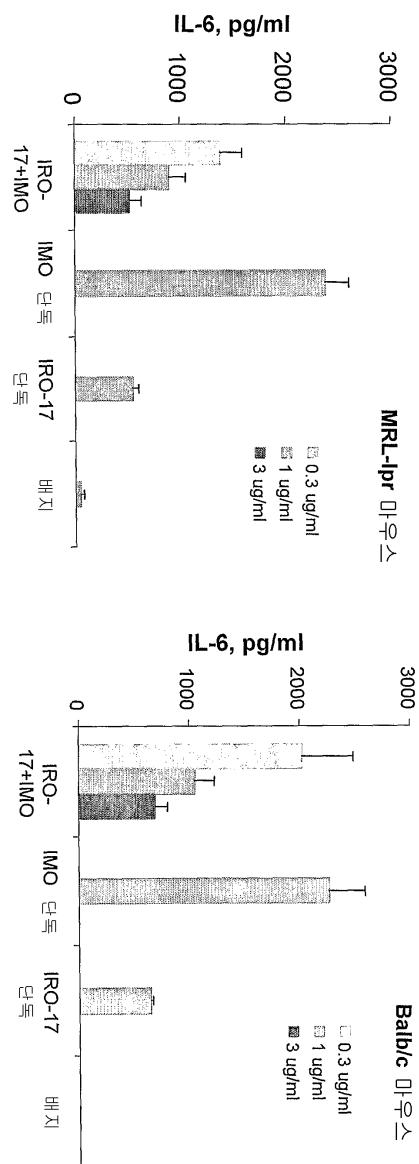


## 장기간 안고니스트 향상

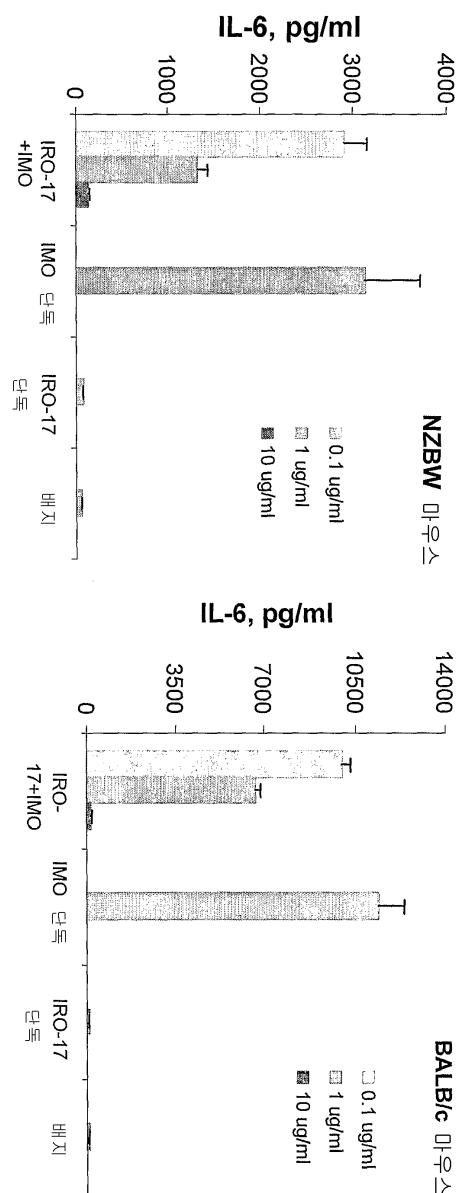
도면16



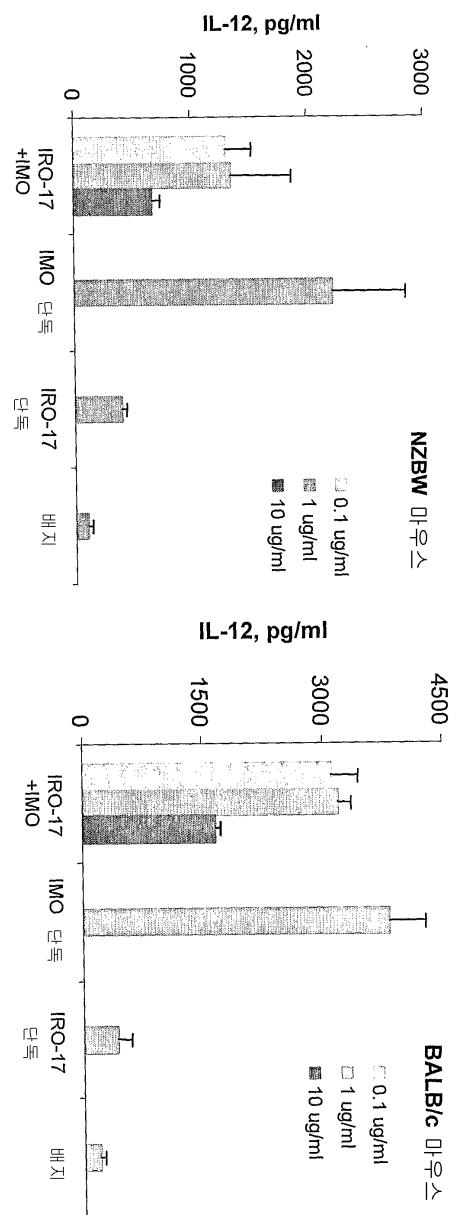
## 도면17A



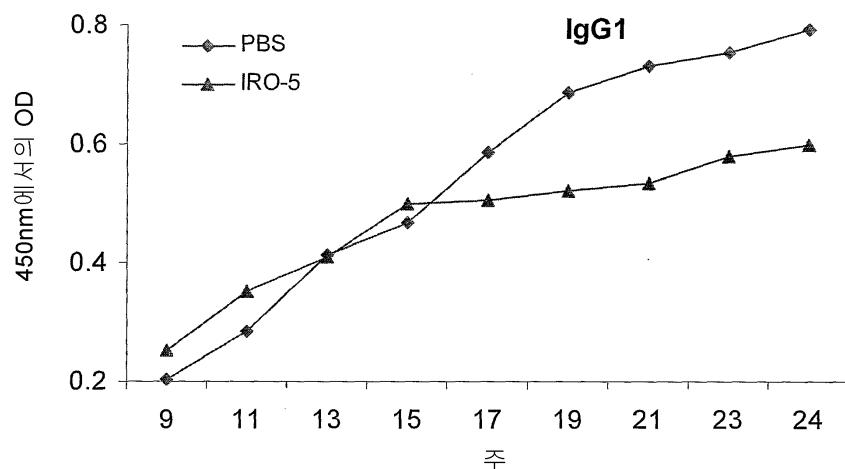
## 도면17B



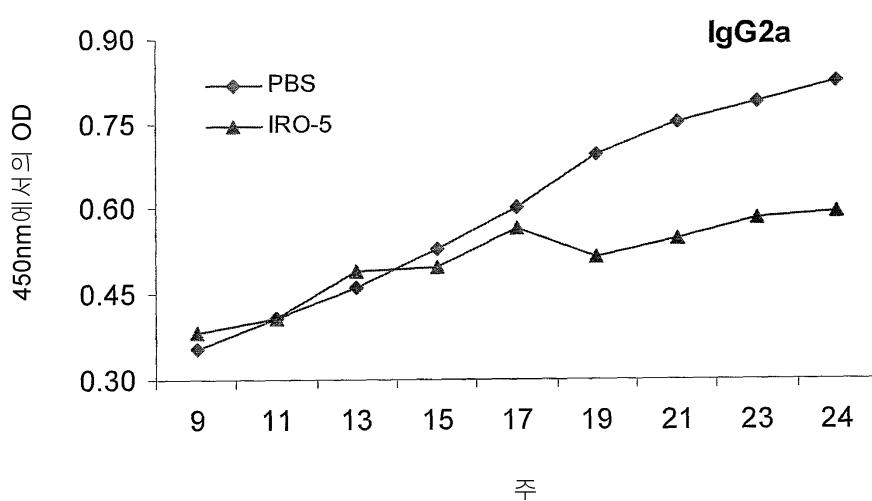
## 도면17C



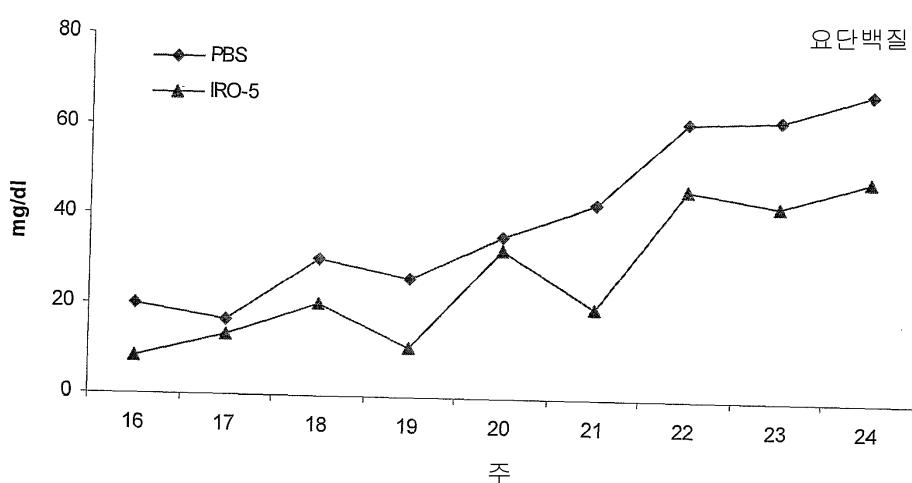
도면18A



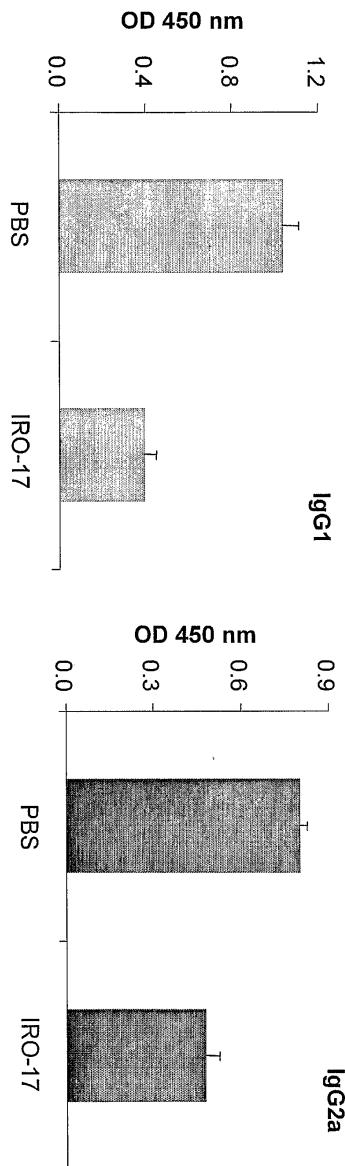
도면18B



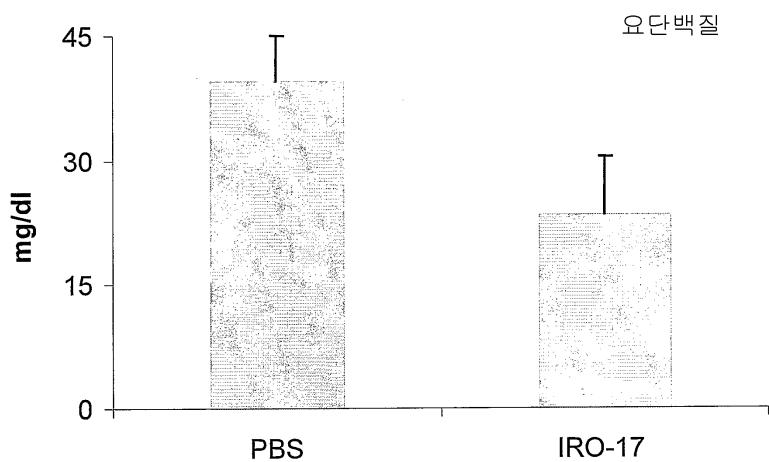
도면18C



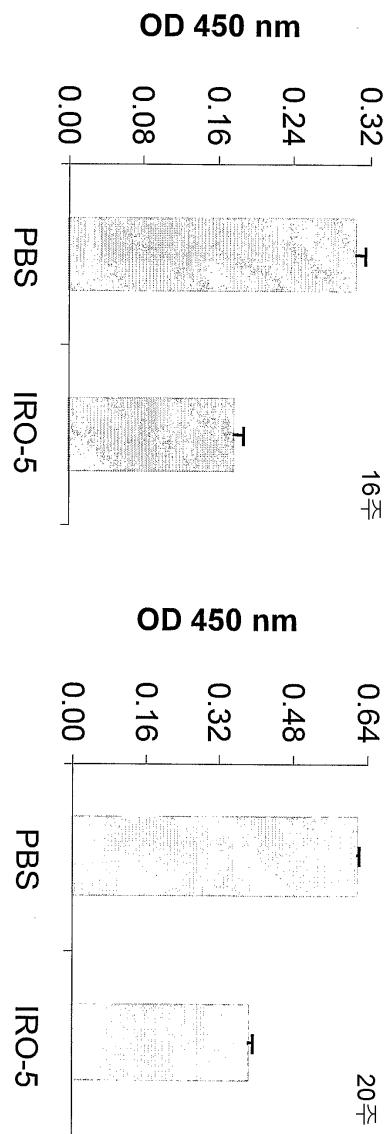
도면18D



도면18E



도면19



## 서열목록

### SEQUENCE LISTING

<110> KANDIMALLA, EKAMBAR R.

WANG, DAQING

LI, YUKUI

YU, DONG

ZHU, FUGANG

BHAGAT, LAKSHMI

AGRAWAL, SUDHIR

<120> IMMUNE REGULATORY OLIGONUCLEOTIDE (IRO) COMPOUNDS TO  
MODULATE TOLL-LIKE RECEPTOR BASED IMMUNE RESPONSE

<130> IDR-036PC

<140> PCT/US06/039954

<141> 2006-10-12

<150> 60/825,440

<151> 2006-09-13

<150> 60/784,243

<151> 2006-03-21

<150> 60/726,034

<151> 2005-10-12

<160> 101

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 1  
ctatctgacg ttctctgt 18

<210> 2  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 2  
ctatctgtcg ttctctgt 18

<210> 3  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (7)  
<223> 7-deaza-G

<400> 3  
tctgacnttc t 11

<210> 4  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 4  
 ctagtttacc ttctctgt 18

<210> 5  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (7)..(8)  
 <223> 2'-OMe

<400> 5  
 ctagtttacc ttctctgt 18

<210> 6  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Combined DNA/RNA Molecule:  
 Synthetic oligonucleotide

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (11)..(12)  
 <223> 2'-OMe

<400> 6  
 ctagtttacc uuuctctgt 18

<210> 7  
 <211> 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; modified\_base

&lt;222&gt; (8)

&lt;223&gt; 2'-OMe

&lt;400&gt; 7

ctatctgacg ttctctgt

18

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

&lt;400&gt; 8

tgaccggtca

10

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Combined DNA/RNA Molecule:  
Synthetic oligonucleotide

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; modified\_base

&lt;222&gt; (8)

<223> 2'-OMe

<400> 9  
ctatctgucg ttctctgt

18

<210> 10  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Combined DNA/RNA Molecule:  
Synthetic oligonucleotide

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (7)..(8)  
<223> 2'-OMe

<400> 10  
ctatctgucg ttctctgt

18

<210> 11  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 11  
tcaaccacac a

11

<210> 12  
<211> 15  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 12

tcctggcgaa gaagt

15

<210> 13

<400> 13

000

<210> 14

<400> 14

000

<210> 15

<400> 15

000

<210> 16

<400> 16

000

<210> 17

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<220>

<221> modified\_base  
 <222> (7)..(8)  
 <223> 2'-OMe

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (10)  
 <223> 7-deaza-dG

<400> 17  
 ctatctgacn ttctctgt 18

<210> 18

<400> 18  
 000

<210> 19  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Combined DNA/RNA Molecule:  
 Synthetic oligonucleotide

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (7)..(8)  
 <223> 2'-OMe

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (10)  
 <223> 7-deaza-dG

<400> 19  
 ctatctgucn ttctctgt 18

<210> 20

<400> 20

000

<210> 21

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 21

tctgacgttc t

11

<210> 22

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 22

cgttctctgt

10

<210> 23

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 23

acgttctctg t

11

<210> 24  
<211> 10  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 24  
cgttctctgt 10

<210> 25  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (9)  
<223> B-L-deoxy nucleoside-C

<400> 25  
ctatctgang ttctctgt 18

<210> 26  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (10)

<223> B-L-deoxy nucleoside-G

<400> 26

ctatctgacn ttctctgt

18

<210> 27

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<220>

<221> modified\_base

<222> (9)

<223> B-L-deoxy nucleoside-C

<400> 27

ctatctgtng ttctctgt

18

<210> 28

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<220>

<221> modified\_base

<222> (10)

<223> B-L-deoxy nucleoside-G

<400> 28

ctatctgtcn ttctctgt

18

<210> 29

<211> 8

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 29

ctatctga

8

<210> 30

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 30

ctatctgac

9

<210> 31

<211> 8

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 31

ctatctgt

8

<210> 32

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

&lt;400&gt; 32

ctatctgtc

9

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; modified\_base

&lt;222&gt; (9)

&lt;223&gt; 3'-deoxy-nucleoside-C

&lt;400&gt; 33

ctatctgang ttctctgt

18

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; modified\_base

&lt;222&gt; (10)

&lt;223&gt; 3'-deoxy-nucleoside-G

&lt;400&gt; 34

ctatctgacn ttctctgt

18

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (9)  
<223> 3'-deoxy-nucleoside-C

<400> 35  
ctatctgtng ttctctgt 18

<210> 36  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (10)  
<223> 3'-deoxy-nucleoside-G

<400> 36  
ctatctgtcn ttctctgt 18

<210> 37  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (7)..(8)  
<223> 2'-OMe

<220>  
<221> modified\_base

&lt;222&gt; (10)

&lt;223&gt; araG

&lt;400&gt; 37

ctatctgacn ttctctgt

18

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Combined DNA/RNA Molecule:  
Synthetic oligonucleotide

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; modified\_base

&lt;222&gt; (7)..(8)

&lt;223&gt; 2'-OMe

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; modified\_base

&lt;222&gt; (10)

&lt;223&gt; araG

&lt;400&gt; 38

ctatctgucn ttctctgt

18

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; modified\_base

&lt;222&gt; (7)..(8)

<223> 2'-OMe

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (9)  
 <223> araC

<400> 39  
 ctatctgang ttctctgt 18

<210> 40  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Combined DNA/RNA Molecule:  
 Synthetic oligonucleotide

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (7)..(8)  
 <223> 2'-OMe

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (9)  
 <223> araC

<400> 40  
 ctatctgung ttctctgt 18

<210> 41  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (7)..(8)  
<223> 2'-OMe

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (9)  
<223> 5-OH-dC

<400> 41  
ctatctgang ttctctgt 18

<210> 42  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Combined DNA/RNA Molecule:  
Synthetic oligonucleotide

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (7)..(8)  
<223> 2'-OMe

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (9)  
<223> 5-OH-dC

<400> 42  
ctatctgung ttctctgt 18

<210> 43  
<211> 18  
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<220>

<221> modified\_base

<222> (7)..(8)

<223> 2'-OMe

<220>

<221> modified\_base

<222> (9)

<223> 1-(2'-deoxy-beta-D-ribofuranosyl)-2-oxo-7-deaza-8-  
methyl-purine-C

<400> 43

ctatctgang ttctctgt

18

<210> 44

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Combined DNA/RNA Molecule:  
Synthetic oligonucleotide

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<220>

<221> modified\_base

<222> (7)..(8)

<223> 2'-OMe

<220>

<221> modified\_base

<222> (9)

<223> 1-(2'-deoxy-beta-D-ribofuranosyl)-2-oxo-7-deaza-8-  
methyl-purine-C

<400> 44

ctatctgung ttctctgt

18

<210> 45  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (7)..(8)  
 <223> 2'-OMe

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (10)  
 <223> N1-Me-dG

<400> 45  
 ctatctgacn ttctctgt

18

<210> 46  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Combined DNA/RNA Molecule:  
 Synthetic oligonucleotide

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (7)..(8)  
 <223> 2'-OMe

<220>  
 <221> modified\_base

<222> (10)  
 <223> N1-Me-dG

<400> 46  
 ctatctgucn ttctctgt 18

<210> 47  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (7)..(8)  
 <223> 2'-OMe

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (9)  
 <223> N3-Me-dC

<400> 47  
 ctatctgang ttctctgt 18

<210> 48  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Combined DNA/RNA Molecule:  
 Synthetic oligonucleotide

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (7)..(8)

&lt;223&gt; 2'-OMe

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (9)  
 <223> N3-Me-dC

<400> 48  
 ctatctgung ttctctgt 18

<210> 49  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (12)  
 <223> 2'-OMe

<400> 49  
 ctatcttagcg ttctctgt 18

<210> 50  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (11)  
 <223> 2'-OMe

<400> 50  
 ctatcttagcg ttctctgt 18

<210> 51  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (11)..(12)  
 <223> 2'-OMe

<400> 51  
 ctagctatcg 18  
 ttctctgt

<210> 52  
 <211> 11  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide

<400> 52  
 cttactatcg 11  
 t

<210> 53  
 <211> 10  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide

<400> 53  
 cttactatcg 10

<210> 54  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (8)  
 <223> 3'-deoxy-nucleoside-G

<400> 54  
 cctactancg ttctcatc 18

<210> 55  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (7)  
 <223> 3'-OMe-A

<400> 55  
 tccatgncgt tcctgatgc 19

<210> 56  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (9)  
 <223> B-L-deoxy-nucleoside-C

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (10)  
 <223> B-L-deoxy nucleoside-G

<400> 56  
 ctatctgann ttctctgt 18

<210> 57  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (1)  
 <223> B-L-deoxy nucleoside-C

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (2)  
 <223> B-L-deoxy nucleoside-T

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (3)  
 <223> B-L-deoxy nucleoside-A

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (4)  
 <223> B-L-deoxy nucleoside-T

<220>  
 <221> modified\_base

<222> (5)

<223> B-L-deoxy nucleoside-C

<220>

<221> modified\_base

<222> (6)

<223> B-L-deoxy nucleoside-T

<220>

<221> modified\_base

<222> (7)

<223> B-L-deoxy nucleoside-G

<220>

<221> modified\_base

<222> (8)

<223> B-L-deoxy nucleoside-A

<220>

<221> modified\_base

<222> (9)

<223> B-L-deoxy nucleoside-C

<220>

<221> modified\_base

<222> (10)

<223> B-L-deoxy nucleoside-G

<220>

<221> modified\_base

<222> (11)

<223> B-L-deoxy nucleoside-T

<220>

<221> modified\_base

<222> (12)

<223> B-L-deoxy nucleoside-T

<220>

<221> modified\_base

<222> (13)

<223> B-L-deoxy nucleoside-C

<220>

<221> modified\_base

<222> (14)

<223> B-L-deoxy nucleoside-T

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (15)  
 <223> B-L-deoxy nucleoside-C

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (16)  
 <223> B-L-deoxy nucleoside-T

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (17)  
 <223> B-L-deoxy nucleoside-G

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (18)  
 <223> B-L-deoxy nucleoside-T

<400> 57	18
nnnnnnnnnn nnnnnnnn	

<210> 58  
 <211> 11  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide

<400> 58	11
ctatctgacg t	

<210> 59  
 <211> 10  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 59  
ctatctgacg 10

<210> 60  
<211> 10  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 60  
ctatctgacg 10

<210> 61  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 61  
ctatcttagcg t 11

<210> 62  
<211> 10  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 62  
ctatcttagcg 10

<210> 63  
 <211> 10  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide

<400> 63  
 ctatcttagcg 10

<210> 64  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (7)..(8)  
 <223> 2'-OMe

<400> 64  
 ctatctaacttctctgt 18

<210> 65  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (7)..(8)  
 <223> 2'-OMe

<400> 65

ctatcttagcg ttctctgt

18

<210> 66  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Combined DNA/RNA Molecule:  
 Synthetic oligonucleotide

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (7)..(8)  
 <223> 2'-OMe

<400> 66  
 ctatctaugh ttctctgt

18

<210> 67  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (7)..(8)  
 <223> 2'-OMe

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (10)  
 <223> 7-deaza-dG

<400> 67

ctatctaacn ttctctgt

18

<210> 68  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (7)..(8)  
 <223> 2'-OMe

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (10)  
 <223> 7-deaza-dG

<400> 68  
 ctatctagcn ttctctgt

18

<210> 69  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Combined DNA/RNA Molecule:  
 Synthetic oligonucleotide

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (7)..(8)  
 <223> 2'-OMe

<220>  
 <221> modified\_base

<222> (10)  
 <223> 7-deaza-dG

<400> 69  
 ctagatctaucn ttctctgt 18

<210> 70  
 <211> 11  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide

<400> 70  
 ctagatctagcg t 11

<210> 71  
 <211> 10  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide

<400> 71  
 ctagatctagcg 10

<210> 72  
 <211> 10  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide

<400> 72  
 ctagatctagcg 10

<210> 73  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide

<400> 73  
 tcctggaggg gaagt 15

<210> 74  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (7)  
 <223> 2'-OMe

<400> 74  
 ctagtgcacg ttctctgt 18

<210> 75  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Combined DNA/RNA Molecule:  
 Synthetic oligonucleotide

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (10)  
 <223> 7-deaza-dG

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (11)..(12)  
 <223> 2'-OMe

<400> 75  
 ctatctgacn uuctctgt 18

<210> 76  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (8)  
 <223> 3'-OMe-G

<400> 76  
 cctactancg ttctcatc 18

<210> 77  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Combined DNA/RNA Molecule:  
 Synthetic oligonucleotide

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide

<220>

<221> modified\_base  
 <222> (10)  
 <223> 3'-OMe-U

<400> 77  
 tccatgacgn tcctgatgc 19

<210> 78  
 <211> 10  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide

<400> 78  
 cgttctctgt 10

<210> 79  
 <211> 11  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide

<400> 79  
 acgttctctg t 11

<210> 80  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Combined DNA/RNA Molecule:  
 Synthetic oligonucleotide

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (7)  
<223> dU

<400> 80  
ctatctnacg ttctctgt 18

<210> 81  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Combined DNA/RNA Molecule:  
Synthetic oligonucleotide

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (8)  
<223> dU

<400> 81  
ctatctgnacg ttctctgt 18

<210> 82  
<211> 10  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 82  
ctatctgacg 10

<210> 83  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 83  
ctatctgacg t 11

<210> 84  
<211> 10  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 84  
cgttctctgt 10

<210> 85  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 85  
acgttctctg t 11

<210> 86  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; modified\_base

&lt;222&gt; (4)..(5)

&lt;223&gt; 2'-OMe

&lt;400&gt; 86

tctgacgttc t

11

&lt;210&gt; 87

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; modified\_base

&lt;222&gt; (4)..(5)

&lt;223&gt; 2'-OMe

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; modified\_base

&lt;222&gt; (7)

&lt;223&gt; 7-deaza-dG

&lt;400&gt; 87

tctgacnttc t

11

&lt;210&gt; 88

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

&lt;220&gt;

<221> modified\_base  
 <222> (4)..(5)  
 <223> 2'-OMe

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (7)  
 <223> araG

<400> 88  
 tctgacnttc t 11

<210> 89  
 <211> 11  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (6)..(7)  
 <223> 2'-OMe

<400> 89  
 tctctgacgt t 11

<210> 90  
 <211> 11  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (4)..(5)  
 <223> 2'-OMe

<220>

<221> modified\_base  
 <222> (7)  
 <223> 7-deaza-dG

<400> 90  
 tctgacnttc t

11

<210> 91  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Combined DNA/RNA Molecule:  
 Synthetic oligonucleotide

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (11)..(12)  
 <223> 2'-OMe

<400> 91  
 ctatctgtcg uuctctgt

18

<210> 92  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Combined DNA/RNA Molecule:  
 Synthetic oligonucleotide

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (10)

<223> 7-deaza-dG

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (11)..(12)  
 <223> 2'-OMe

<400> 92  
 ctatctgtcn uuctctgt

18

<210> 93  
 <211> 11  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Combined DNA/RNA Molecule:  
 Synthetic oligonucleotide

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (4)..(5)  
 <223> 2'-OMe

<400> 93  
 tctgucgttc t

11

<210> 94  
 <211> 11  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Combined DNA/RNA Molecule:  
 Synthetic oligonucleotide

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (4)..(5)  
 <223> 2'-OMe

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (7)  
 <223> 7-deaza-dG

<400> 94  
 tctgucnttc t 11

<210> 95  
 <211> 11  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (4)..(5)  
 <223> 2'-OMe

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (7)  
 <223> araG

<400> 95  
 tctgacnttc t 11

<210> 96  
 <211> 9  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (4)..(5)  
<223> 2'-OMe

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (7)  
<223> 7-deaza-dG

<400> 96  
tctgacntt 9

<210> 97  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (4)..(5)  
<223> 2'-OMe

<220>  
<221> modified\_base  
<222> (7)  
<223> 7-deaza-dG

<400> 97  
tctgacnttc t 11

<210> 98  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Combined DNA/RNA Molecule:

Synthetic oligonucleotide

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<220>

<221> modified\_base  
<222> (7)..(8)  
<223> 2'-OMe

<220>

<221> modified\_base  
<222> (10)  
<223> 7-deaza-dG

<220>

<221> modified\_base  
<222> (15)..(18)  
<223> 2'-OMe

<400> 98

ctatctgacn ttctcugu

18

<210> 99

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Combined DNA/RNA Molecule:  
Synthetic oligonucleotide

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<220>

<221> modified\_base  
<222> (7)..(8)  
<223> 2'-OMe

<220>

<221> modified\_base  
<222> (10)

<223> 7-deaza-dG

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (15)..(18)  
 <223> 2'-OMe

<400> 99  
 ctatctgucn ttctcugu

18

<210> 100  
 <211> 9  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Combined DNA/RNA Molecule:  
 Synthetic oligonucleotide

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (1)..(3)  
 <223> 2'-OMe

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (5)  
 <223> 7-deaza-dG

<400> 100  
 ugucnttct

9

<210> 101  
 <211> 9  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Combined DNA/RNA Molecule:

Synthetic oligonucleotide

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<220>

<221> modified\_base

<222> (1)..(3)

<223> 2'-OMe

<220>

<221> modified\_base

<222> (5)

<223> 7-deaza-dG

<400> 101

ugacnttct

9