(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0016648
(43) 공개일자 2012년02월24일

(51) Int. Cl.
A61K 31/7088 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01) *A61K 9/20* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-7029818
(22) 출원일자(국제출원일자) 2010년06월16일
심사청구일자 2011년12월14일
(85) 번역문제출일자 2011년12월13일
(86) 국제출원번호 PCT/KR2010/003878
(87) 국제공개번호 WO 2010/147387
국제공개일자 2010년12월23일
(30) 우선권주장
1020090054589 2009년06월18일 대한민국(KR)

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원 춘천시 한림대학길 39 한림대학교
(72) 발명자
권형주
충청북도 청주시 상당구 용암동 현대1차아파트 103동 506호
(74) 대리인
양부현

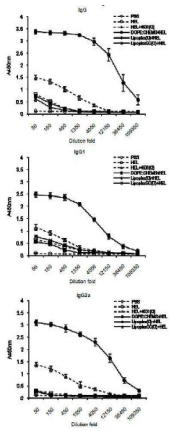
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 리포좀에 포집된 올리고뉴클레오타이드를 유효성분으로 하는 면역증강 조성물

(57) 요 약

본 발명은 DOPE(dioleyl phosphatidylethanolamine) 및 CHEMS(cholesterylhemisuccinate)를 포함하는 리포좀에 포집된 면역자극 올리고뉴클레오타이드를 유효성분으로 포함하는 면역 증강용 조성물 및 신규한 면역자극 CpT-모티프 올리고뉴클레오타이드에 관한 것이다. 본 발명은 DOPE 및 CHEMS로 이루어진 복합 지질(fusogenic lipid)을 포함하는 리포좀이 면역자극 올리고뉴클레오타이드에 대하여 가장 우수한 DDS임을 제시하고 있다. 본 발명은 특히 포스포로디티오에이트 골격을 가지는 면역자극 올리고뉴클레오타이드에 대하여도 잘 적용된다. 본 발명은 면역강화를 통해 다양한 면역결핍 관련 질환에 예방 및 치료에 응용될 수 있으며, 또한 면역보조제(adjuvants)로 유용하게 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도4a



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 F104AC010001-08A0301-00130
부처명 교육과학기술부
연구관리전문기관 한림대학교 산학협력단
연구사업명 차세대성장동력사업 (Next Generation Growth Engine Program)
연구과제명 아토피 피부조직에서 싸이토카인 및 키모카인 발현 조절기술 개발(Regulation of cytokine and chemokine expression in the skin of atopic dermatitis)
기여율 1/4
주관기관 한림대학교 산학협력단
연구기간 2008.07.31 ~ 2009.07.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 20090083296
부처명 교육과학기술부
연구관리전문기관 한림대학교 산학협력단
연구사업명 미래원천기술개발사업 (National Research Foundation grant)
연구과제명 인간 TLR9의 리간드 발굴 및 선천성면역 조절기술 개발(Identification of human TLR9 ligand and TLR9-mediated innate immune response regulation)
기여율 1/4
주관기관 한림대학교 산학협력단
연구기간 2008.08.01 ~ 2010.07.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 20090081761
부처명 교육과학기술부
연구관리전문기관 한림대학교 산학협력단
연구사업명 미래원천기술개발사업(National Research Foundation grant)
연구과제명 세포외기질 재구성 기전 규명에 근거한 면역반응조절 및 활용기술 개발(Development of application technology based on identification of ECM remodeling mechanism)
기여율 1/4
주관기관 한림대학교 산학협력단
연구기간 2009.05.01 ~ 2012.03.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2009-0093812
부처명 교육과학기술부
연구관리전문기관 한림대학교 산학협력단
연구사업명 대학중점연구소지원사업(National Research Foundation grant)
연구과제명 새로운 Biomolecule Delivery System을 이용한 질환 치료제 개발 (Development of therapeutic bioactive molecules using novel delivery system)
기여율 1/4
주관기관 한림대학교 산학협력단
연구기간 2009.09.01 ~ 2012.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

DOPE(dioleyl phosphatidylethanolamine) 및 CHEMS(cholesterylhemisuccinate)를 포함하는 리포좀에 포집된 면역자극 올리고뉴클레오타이드를 유효성분으로 포함하는 면역 증강용 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 면역자극 올리고뉴클레오타이드는 CpG 올리고뉴클레오타이드 또는 CpT 올리고뉴클레오타이드인 것을 특징으로 하는 면역 증강용 조성물.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 면역자극 올리고뉴클레오타이드는 서열목록 제1서열 인 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 CpG 올리고뉴클레오타이드 또는 서열목록 제2서열 내지 제49서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 CpT 올리고뉴클레오타이드인 것을 특징으로 하는 면역 증강용 조성물.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 면역자극 올리고뉴클레오타이드는 서열목록 제2, 3, 4, 19, 24, 35, 39 및 46 내지 49 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 CpT 올리고뉴클레오타이드인 것을 특징으로 하는 면역 증강용 조성물.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 면역자극 올리고뉴클레오타이드는 서열목록 제2서열 인 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 CpG 올리고뉴클레오타이드인 것을 특징으로 하는 면역 증강용 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 면역자극 올리고뉴클레오타이드는 포스포로다이에스테르 골격을 가지는 것을 특징으로 하는 면역 증강용 조성물.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 DOPE:CHEMS의 몰 비율은 4.5:5.5-5.5:4.5인 것을 특징으로 하는 면역 증강용 조성물.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 상기 DOPE:CHEMS의 몰 비율은 5.0:5.0인 것을 특징으로 하는 면역 증강용 조성물.

청구항 9

제 1 항에 있어서, 상기 면역 증강용 조성물은 암, 바이러스에 의한 감염성 질환, 박테리아에 의한 감염성

질환, 진균성 질병, 기생충성 질환, 아토피질환, 자가면역질환, 염증성 질환, 켈로이드 또는 상처의 예방 또는 치료에 이용되는 것을 특징으로 하는 면역 증강용 조성물.

청구항 10

다음 일반식 1 또는 2로 표시되는 뉴클레오타이드 서열을 필수서열로 포함하는 면역자극 CpT 올리고뉴클레오타이드를 유효성분으로 포함하는 면역 증강용 조성물:

일반식 1

$CTX_1X_2CTX_3X_4X_5CT$

상기 일반식에서, X_1-X_5는 A, T, G 또는 C이다.

일반식 2

$CTX_1X_2X_3CTX_4X_5X_6CT$

상기 일반식에서, X_1-X_6는 A, T, G 또는 C이다.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 상기 일반식 1의 X_1은 A 또는 T이고, X_2는 A, T 또는 G이며, X_3은 T 또는 G이고, X_4은 A, T 또는 G이며, X_5는 T인 것을 특징으로 하는 면역 증강용 조성물.

청구항 12

제 11 항에 있어서, 상기 일반식 2의 X_1은 T이고, X_2는 T 또는 G이며, X_3은 A, T 또는 G이고, X_4은 T 또는 G이며, X_5는 A 또는 T이고, X_6는 A 또는 T인 것을 특징으로 하는 면역 증강용 조성물.

청구항 13

제 10 항에 있어서, 상기 면역자극 CpT 올리고뉴클레오타이드는 서열목록 제2, 3, 4, 19, 24, 35, 39 및 46 내지 49서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 면역 증강용 조성물.

청구항 14

제 13 항에 있어서, 상기 면역자극 CpT 올리고뉴클레오타이드는 서열목록 제2 서열인 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 면역 증강용 조성물.

청구항 15

제 1 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항의 조성물을 대상(subject)에 투여하는 단계를 포함하는 면역반응 증강방법.

청구항 16

제 15 항에 있어서, 상기 대상(subject)은 암, 바이러스에 의한 감염성 질환, 박테리아에 의한 감염성 질환, 진균성 질병, 기생충성 질환, 아토피질환, 자가면역질환, 염증성 질환, 켈로이드 또는 상처를 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 리포좀에 포집된 올리고뉴클레오타이드를 유효성분으로 하는 면역증강 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 박테리아 및 이들의 산물을 숙주의 방어 기작 초기에 즉각적으로 인식하는 것은 태고로부터의 선천적인 면역 반응에 의해 매개된다. 선천적 면역 체계는 보존적 패턴 인식 수용체를 이용하여 스스로와 박테리아 구성물의 병원균-관련 분자패턴 형태를 구분한다(Janeway and Medzhitov. (1998); Aderem and Ulevitch. (2000)). TLR(toll-like receptor)과 같은 패턴 인식 수용체는 LPS(lipopolysaccharide), 박테리아 DNA, 펩티도글리칸 및 LTA(lipoteichoic acid)를 포함하는 다양한 박테리아 구성물을 비자기(nonself) 감염물질로 인식할 수 있다(Beckman et al.(1994);Marrack and Kappler.(1994)).

[0003] 선천적 면역체계는 특정 염기 서열(CpG-DNA)의 일부인 비메틸화 CG 디뉴클레오타이드를 함유하는 박테리아 DNA를 인식한다. CpG DNA에 의한 면역 활성화는 TLR9(Toll-like receptor 9)에 의해 좌우된다. CpG 모티프의 특이성을 결정하는 이 수용체는 TLR4(Toll-like receptor 4)와 높은 유사성을 가지는 막 관통 수용체이다(Hemmi et al. (2000)). CpG 모티프(CpG-ODNs)를 포함하는 합성 올리고디옥시뉴클레오타이드(ODN)는 천연의 박테리아 DNA에 의한 직접적인 면역촉진 효과를 흉내내며, 이들은 대식세포, 수지상 세포, NK 세포 및 B 림프구를 포함하는 다양한 종류의 세포를 활성화시킨다(Tokunaga et al.(1984); Messina et al.(1991); Krieg et al.(1995); Stacey et al.(1996); Klinman et al.(1996); Hartmann et al.(1999)). 최적화 상태로 활성화된 CpG 모티프는 종에 따라 다양하다. 마우스에 있어서, 최적의 면역 반응은 중앙의 비메틸화 CG 디뉴클레오타이드가 2개의 5' 퓨린 및 2개의 3' 피리미딘과 인접하는 CpG 모티프에 의해 활성화된다(Krieg et al. (1995)). 예를 들어, 6개의 뉴클레오타이드 'GACGTT' 모티프를 포함하는 ODN은 마우스의 면역 체계를 촉진할 수 있다. 그러나, 마우스에서 강력한 면역촉진 활성을 만들어내는 CpG-ODN은 인간에서는 상대적으로 낮은 활성만을 만들 것이다(Hartmann and Krieg. (2000)). 예를 들어, 인간의 말초혈액 단핵세포는 마우스에서 최적화되어 활성화되는 CpG-ODN에 잘 반응하지 않으나, 'GTCGTT' 또는 'TTCGTT' 모티프를 포함하는 CpG-ODN에 의해서는 활성화될 가능성이 있다(Zimmermann et al. (1998)).

[0004] CpG-ODN은 그 면역촉진 활성으로 인해 면역 보조 치료제의 유용한 형태로써 그 가능성이 주목받아왔다; CpG-ODN은 또한 면역 방어 시약 및 염증성 질병과 알레르기성 질병에 대한 면역 치료의 수단으로써의 잠재력도 가지는 것으로 여겨진다. 몇몇 연구실에서의 최근의 연구에서 CpG-ODN의 임상적 응용을 위해 PS-ODN(phosphorothioate-modified oligodeoxynucleotide)를 사용해 왔다(Ballas et al. (1996); Zimmermann et al. (1998); Broide et al. (1998); Krieg and Davis, 2001)). PS-ODN은 골격의 브릿지 산소가 황(sulfur)으로 치환되어 뉴클리에이즈에 저항성을 가지고(Stein et al. (1998)), 세포 내로 효율적으로 유입된다(Zhao et al.(1993); Zhao et al. (1994)).

[0005] 최근의 치료적 CpG-DNA에 대한 연구가 PS-ODN에 초점이 맞추어져 있으나, 포스포로티오에이트 골격 결합은 CpG-의존성 부작용을 유발하는 것으로 알려졌다(Monteith *et al.*, 1997; Liang and Lipsky, 2000). 본 발명자들은 천연 박테리아 DNA의 잠재적 면역촉진 DNA서열의 동정 및 이의 사용은 부작용 없는 최적의 선천적 면역 반응에 유용하다고 가정하였다. 면역촉진 효과를 가지는 박테리아 DNA서열의 특정을 위해서 본 발명자들은 *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*)의 게놈 DNA 서열을 컴퓨터로 분석하였다. 본 발명자들은 CpG 모티프(*M. bovis*의 게놈 DNA에서 유래한 CpG-DNA의 경우에는 MB-ODN임)를 가지는 20bp 길이의 합성 PO-ODN를 합성하였다. 실험적 분석에 의해 *M. bovis* 게놈 DNA의 잠재적 CpG-DNA가 Th1-민감성 아쥬번트로써의 기능을 한다는 사실과 전사인자인 NF-kB를 활성화시킨다는 사실을 확인하였다(Lee et al. *Mol. Immunol.* 43:2107-2118(2006)). PS-ODN과 달리, PO-ODN의 효과는 인간 세포에서 관찰되지 않았다(Krieg. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 709-760(2002)). 그러나, 인간세포에서도 DOTAP로 포집된 PO-ODN 및 non-CpG-DNA에 의해 효율적인 면역반응이 유도된다고 보고되었다(Haas et al. *Immunity* 28, 315-323(2008); Yasuda et al. *J. Immunol.* 174, 6129-

6136(2005)).

[0006] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은 면역자극 올리고뉴클레오타이드의 면역반응 유도능을 최대화할 수 있는 면역자극 올리고뉴클레오타이드의 운반체(drug delivery system)를 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 면역자극 올리고뉴클레오타이드를 특정 조성의 리포좀에 포집시킬 경우 크게 증가된 면역촉진 효과가 있다는 사실을 규명함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0008] 따라서 본 발명의 목적은 면역 증강용 조성물을 제공하는 데 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 면역-관련 질환의 예방 또는 치료방법을 제공하는 데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 DOPE(dioleyl phosphatidylethanolamine) 및 CHEMS(cholesteryl hemisuccinate)를 포함하는 리포좀에 포집된 면역자극 올리고뉴클레오타이드를 유효성분으로 포함하는 면역 증강용 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명자들은 면역자극 올리고뉴클레오타이드의 면역반응 유도능을 최대화할 수 있는 면역자극 올리고뉴클레오타이드의 운반체(drug delivery system: DDS)를 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 면역자극 올리고뉴클레오타이드를 특정 조성의 리포좀에 포집시킬 경우 크게 증가된 면역촉진 효과가 있다는 사실을 규명하였다.

[0013] 본 명세서에서 용어 “면역자극(immunostimulatory)”은 초기 면역 반응을 유도하거나 항원에 대한 기존의 면역반응을 측정 가능할 정도로 증가시키는 것을 말한다.

[0014] 본 발명의 가장 큰 특징은 면역자극 올리고뉴클레오타이드의 DDS로 리포좀을 이용하되, pH-민감성 중성 지질인 DOPE(dioleyl phosphatidylethanolamine) 및 음이온성 스테론 CHEMS(cholesteryl hemisuccinate)로 이루어진 복합 지질(fusogenic lipid)을 이용하여 제조된 리포좀을 이용하는 것이다. 놀랍게도, DOPE 및 CHEMS 복합 지질로 이루어진 리포좀은 다른 리포좀 조성보다 포집된 면역자극 올리고뉴클레오타이드의 크게 증가된 면역자극 활성을 나타내도록 하였다.

[0015] 본 명세서에서 용어 “포집(encapsulation)”은 전달물질을 둘러싸서 효율적으로 생체내로 함입시키기 위해 캡슐화하는 것을 말한다.

[0016] 본 명세서에서 용어 “리포좀(liposome)”은 폐쇄된 지질 이중막을 형성함으로서 만들어지는 지질 운반체를 말한다. 리포좀은 지질 이중막으로 생체 친화적이며 양쪽 친매성을 가지고 있어 내부의 친수성 물질을 포함한 채로 소수성 막을 통과할 수 있다. 리포좀의 직경은 일반적으로 20-2000 nm이나, 이에 제한되지는 않고 제조 방법 및 운반하는 뉴클레오타이드의 길이에 따라 다양한 크기일 수 있다.

[0017] 본 발명에 있어서 리포좀의 제조에는 pH-민감성 중성 지질인 DOPE 및 음이온성 스테론 CHEMS(cholesteryl hemisuccinate)가 이용된다. 본 발명에서 사용하는 리포좀 내에서의 DOPE:CHEMS의 몰비율은 바람직하게는 7:3-3:7이고, 보다 바람직하게는 4.5:5.5-5.5:4.5이며, 가장 바람직하게는 5:5이다.

[0018] 본 발명의 리포좀의 제조는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 이루어질 수 있으며, 바람직하게는 유기용매 혼합 또는 계면제 혼합 방법을 이용한다(미국 특허등록 제5705385호; 미국 특허출원제 08/660.025호). 보다 바람직하게는, DOPE 및 CHEMS를 혼합하고, 이를 질소가스와 함께 증발시켜 무용매(solvent-free) 지방 필름을 만든 후, 알코올 용액에서 혼합하고, 수용성 뉴클레오타이드 혼합물에 섞는 과정을 통해 제조한다. 본 발명의 리포좀 제조를 유기용매 혼합을 통해 실시하는 경우에 이용되는 유기용매는 클로로포름, 메탄올, 에탄올, n-프로판올 또는 부탄올 등의 알코올류를 포함하며, 바람직하게는 에탄올이다.

[0019] 본 발명에서 이용되는 면역자극 올리고뉴클레오타이드는 당업계에 공지된 어떠한 면역자극 올리고뉴클레오타이드도 포함한다. 면역자극 올리고뉴클레오타이드는 예를 들어 헤어핀 이차 구조를 형성하는 특정 팰린드롬, CpG 모티프, CpT 모티프, 다중 G 도메인 또는 다른 공지된 ISS(immunostimulatory sequence)일 수 있다. 예를 들어, 본 발명에서 이용되는 면역자극 올리고뉴클레오타이드는 미국 특허출원공개 제20080045473호, WO 2006/063152 및 WO 1998/18810에 개시된 면역자극 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.

[0020] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 면역자극 올리고뉴클레오타이드는 CpG 올리고뉴클레오타이드 또는 CpT 올리고뉴클레오타이드이다.

[0021] 본 명세서에서 용어 “CpG 올리고뉴클레오타이드” 또는 “CpT 올리고뉴클레오타이드”는 각각 비메틸화 또는 메틸화된 시토신-구아닌 또는 시토신-티민 디뉴클레오타이드를 적어도 2개 이상 함유하여 면역반응을 활성화시키는 염기서열을 말한다. CpG 모티프(CpG-ODNs)를 포함하는 합성 올리고뉴클레오타이드는 대식세포, 수지상 세포, NK 세포 및 B 림프구를 포함하는 다양한 종류의 면역 세포를 활성화시킴으로서 천연의 박테리아 DNA에 의한 직접적인 면역촉진 효과와 유사한 면역증진 효과를 보인다. 또한 본 발명자들은 구체적 실험을 통해 CG염기서열을 CT로 변형시킨 CpT 올리고뉴클레오타이드가 면역세포의 IL-8프로모터를 활성화시킨다는 사실을 규명하였다.

[0022] 본 발명에서 CpG 올리고뉴클레오타이드가 이용되는 경우, 바람직하게는 WO 2006/080596에 개시된 본 발명자들에 의해 개발된 CpG 올리고뉴클레오타이드를 이용한다. 예를 들어, 다음의 일반식으로 표현되는 CpG 올리고뉴클레오타이드를 이용한다: HKCGTTCRTGTCSGM [R은 A 또는 G; S는 C 또는 G; H는 A, T 또는 C; K는 G 또는 T; M은 C 또는 A]. 예시적인 CpG 올리고뉴클레오타이드는 서열목록 제1서열에 기재되어 있다.

[0023] 본 발명에서 CpT 올리고뉴클레오타이드가 이용되는 경우, 바람직하게는 다음의 일반식으로 표현되는 뉴클레오타이드 서열을 필수서열로 포함하는 면역자극 CpT 올리고뉴클레오타이드를 이용한다:

[0024] **일반식 1**

[0025] $CTX_1X_2CTX_3X_4X_5CT$

[0026] 상기 일반식에서, X_1-X_5는 A, T, G 또는 C이다.

[0027] **일반식 2**

[0028] $CTX_1X_2X_3CTX_4X_5X_6CT$

[0029] 상기 일반식에서, X_1-X_6는 A, T, G 또는 C이다.

[0030] 보다 바람직하게는, 서열목록 제2서열 내지 제49서열로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 CpT 올리고뉴클레오타이드이다.

[0031] 본 발명의 보다 더 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에서 이용되는 면역자극 올리고뉴클레오타이드는 서열목록 제2, 3, 4, 19, 24, 35, 39 및 46 내지 49서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 CpT 올리고뉴클레오타이드이다. 가장 바람직한 구현예에 따르면, 상기 면역자극 올리고뉴클레오타이드는 서열목록 제2서열의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 CpT 올리고뉴클레오타이드이다.

[0032] 본 발명에서 유효성분으로 이용되는 면역자극 올리고뉴클레오타이드는 천연(natural-occurring) 뉴클레오타이드 또는 골격 변형된 뉴클레오타이드 예컨대, 펩타이드 핵산 (PNA) (M. Egholm et al. *Nature*, 365:566-568(1993)), 포스포로티오에이트 DNA, 포스포로디티오에이트 DNA, 포스포로아미데이트 DNA, 아마이드-연결된 DNA, MMI-연결된 DNA, 2'-O-메틸 RNA, 알파-DNA 및 메틸포스포네이트 DNA, 당 변형된 뉴클레오타이드 예컨대, 2'-O-메틸 RNA, 2'-플루오로 RNA, 2'-아미노 RNA, 2'-O-알킬 DNA, 2'-O-알릴 DNA, 2'-O-알카이닐 DNA, 헥소스 DNA, 피라노실 RNA 및 안히드로헥시톨 DNA, 및 염기 변형을 갖는 뉴클레오타이드 예컨대, C-5 치환된 피리미딘

(치환기는 플루오로-, 브로모-, 클로로-, 아이오도-, 메틸-, 에틸-, 비닐-, 포르밀-, 에티틸-, 프로피닐-, 알카이닐-, 티아조릴-, 이미다조릴-, 피리딜- 포함), C-7 치환기를 갖는 7-데아자퓨린 (치환기는 플루오로-, 브로모-, 클로로-, 아이오도-, 메틸-, 에틸-, 비닐-, 포르밀-, 알카이닐-, 알켄일-, 티아조릴-, 이미다조릴-, 피리딜-), 이노신 및 디아미노퓨린을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 천연뉴클레오타이드로 이루어져 있다.

[0033] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에서 이용되는 면역자극 올리고뉴클레오타이드는 포스포다이에스테르 골격을 가진다.

[0034] 본 명세서에서 용어 "포스포다이에스테르 골격"은 올리고뉴클레오타이드에서 단일 뉴클레오타이드간의 공유 결합을 형성하는 포스포다이에스테르 결합의 브릿지 산소가 황(sulfur)이나 그 밖의 다른 원소로 치환되지 않은 것을 말한다. DNA의 기본 골격인 포스포다이에스테르 골격은 생체 내 뉴클레아제에 의해 쉽게 분해되기 때문에 독성을 유발할 위험이 적다.

[0035] 본 발명에서 이용되는 면역자극 올리고뉴클레오타이드의 길이는 특별하게 제한되지 않으며, 바람직하게는 8-100 뉴클레오타이드 길이이고, 보다 바람직하게는 15-50 뉴클레오타이드 길이이며, 가장 바람직하게는 약 15-30 뉴클레오타이드 길이이다.

[0036] 본 발명에 따르면, 본 발명의 조성물을 제조함에 있어서 수용액에 용해되어 있는 상태의 뉴클레오타이드를 이용하는 것이 바람직하다. 보다 바람직하게는, 본연의 활성을 유지할 수 있도록 뉴클레오타이드의 최적(optimum) pH에서 완충력을 가지는 완충용액에 용해되어 있는 것이다. 예컨대, 뉴클레오타이드는 중성상태에서 최적의 pH를 가지므로 pH 6.5-7.5에서 완충력을 가지는 NaH_2PO_4, 소듐 바이카보네이트, 이미다졸(glyoxaline)-HCl 또는 MOPS 완충액에 용해되어 있는 것이 바람직하다.

[0037] 본 발명의 조성물에는 기타 약물 또는 다른 면역 보조제가 포함되어 추가적인 면역 자극 효과를 제공할 수 있다. 추가되는 면역 보조제는 예를 들어 리포폴리사카라이드(LPS), 프레운트 완전 보조제(Freund's complete adjuvant), 유지, 알루미늄염, 크레스틴(Krestin), 렌티난(Lentinan) 및 AHCC(Active Hexose Correlated Compound)를 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0038] 본 발명의 면역 증강용 조성물은 다양한 질환에 적용될 수 있으며, 바람직하게는 (i) 암(예컨대, 위암, 폐암, 유방암, 난소암, 간암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 췌장암, 방광암, 대장암, 결장암, 자궁경부암, 뇌암, 전립선암, 골암, 피부암, 갑상선암, 부갑상선암 및 요관암);

[0039] (ii) 바이러스(예컨대 아데노바이러스, 허르페스바이러스(예를 들어 HSV-I, HSV-II, CMV 또는 VZV), 폭스바이러스(예를 들어 천연두(variola), 백시니아 또는 물사마귀바이러스(molluscum contagiosum)와 같은 진성두창바이러스(orthopoxvirus), 피코르나바이러스(예를 들어 리노바이러스 또는 엔테로바이러스)), 오르토믹소바이러스(예를 들어 인플루엔자바이러스), 파라믹소바이러스(예를 들어 5-파라인플루엔자바이러스, 유핸성 이하선염 바이러스(mumps virus), 홍역 바이러스 및 호흡기합포체 바이러스), 코로나 바이러스(예를 들어 SARS), 파포바바이러스(예를 들어 성기사마귀, 보통사마귀 또는 족저 사마귀를 유발하는 파필로마 바이러스), 헤파드나바이러스(예를 들어 B형간염 바이러스), 플라비바이러스(예를 들어 C형간염 바이러스 또는 뎅기열바이러스(Dengue virus)) 또는 레트로바이러스(예를 들어 HIV와 같은 렌티바이러스))에 의한 감염성 질환;

[0040] (iii) 박테리아(예컨대 에스케리치아, 엔테로박터, 살모넬라, 스타필로코커스, 쉬겔라, 리스테리아, 에어로박터, 헬리코박터, 클레브시엘라, 프로테우스, 수도모나스, 나이세리아, 클로스트리듐, 바실러스, 코리네박테리움, 마이코박테리움, 캠필로박터,비브리오, 세라티아, 프로비덴시아, 크로모박테리움, 브루셀라, 예르시니아, 해모필러스 또는 보르데텔라 속)에 의한 감염성 질환;

[0041] (iv) 그 밖의 다른 감염성 질병(예를 들어 클라미디아와 칸디다증, 국균증, 히스토마플라스마증 및 크립토콕쿠스 뇌막염을 포함하는 진균성 질병 및 말라리아, 뉴머시스터스성 폐렴, 리슈마니아증, 립토스포리디움증, 톡소포자충증 및 트리파소노마 감염을 포함하는 기생충성 질환);

[0042] (v) 아토피성 피부염 또는 습진, 호산구증가증, 천식, 알레르기, 알레르기비염 및 오멘 증후군과 같은 Th2-매개된 아토피질환;

[0043] (vi) 알로페시아 그레아타(alopecia greata), 강직성 척추염, 항인지질 증후군, 자가면역 아디슨 질환, 부신의 자가면역 질환, 자가면역 용혈성 빈혈, 자가면역 간염, 자가면역 난소염 및 고환염, 자가면역 혈소판감소증, 베체트병, 수포성 유천포창, 심근병증, 복강 스프루우-피부염(celiac sprue-dermatitis), 만성 피로 면역이상 증

후군, 만성염증성 탈수초 다발성 신경병증, Churg-Strauss 증후군, 반흔성유천포창, CREST 증후군, 한냉 응집소 질환, 크론씨병, 원판성 낭창, 복태성복합한냉글로불린혈증, 섬유근통-섬유근염, 사구체신염, 그레이브스 질환, 귈레인 바레 증후군, 하시모토 갑상선염, 특발성 폐섬유화증, 특발성 혈소판 감소성 자반증, IgA 신경염, 연소자성 관절염, 편평태선, 홍반성 루푸스, 메니에르병, 혼합성 연결 조직 질환, 다발성 경화증, 타입 I 또는 면역-매개 당뇨병, 중증근무력증, 심상성 천포창, 악성 빈혈, 결정성 다발동맥염, 다발연골염, 자가면역성 다선 증후군, 류마티스 다발성근통, 다발성 근염과 피부근염, 일차성 무감마글로불린혈증, 일차성 담증성 간경변, 건선, 건선성 관절염, 레이노 현상, 라이터 증후군, 류마티스 관절염, 사르코이드증, 공피증, 강직인간 증후군, 전신성 홍반성 루푸스, 홍반성 루푸스, 다가야스 동맥염, 일시적 동맥염, 거대세포 동맥염, 궤양성 대장염, 포도막염, 백반증 및 베게너 육아종증과 같은 자가면역질환;

[0044] (vii) 천식, 엔세필리티스(encephilitis), 염증성 장염, 만성 폐쇄성 폐질환, 알러지, 폐혈병성 쇼크증, 폐섬유증, 미분화 척추관절증, 미분화 관절병증, 관절염, 염증성 골용해, 및 만성 바이러스 또는 박테리아 감염에 의한 만성 염증을 포함하는 염증성 질환; 및

[0045] (viii) 켈로이드 및 다른 형태의 흉터생성 억제(예를 들어 만성상처 등의 치유촉진)와 같은 상처 치유와 관련된 질병의 예방 또는 치료에 이용된다.

[0046] 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 *Remington's Pharmaceutical Sciences* (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

[0047] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 바람직하게는 비경구 투여이고, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다.

[0048] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 한편, 본 발명의 약제학적 조성물의 경구 투여량은 바람직하게는 1일 당 0.001-100 mg/kg(체중)이다.

[0049] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캅셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0050] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음 일반식 1 또는 2로 표시되는 뉴클레오타이드 서열을 필수서열로 포함하는 면역자극 CpT 올리고뉴클레오타이드를 유효성분으로 포함하는 면역 증강용 조성물을 제공한다:

[0051] **일반식 1**

[0052] $CTX_1X_2CTX_3X_4X_5CT$

[0053] 상기 일반식에서, X_1-X_5는 A, T, G 또는 C이다.

[0054] **일반식 2**

[0055] $CTX_1X_2X_3CTX_4X_5X_6CT$

[0056] 상기 일반식에서, X_1-X_6는 A, T, G 또는 C이다.

[0057] 본 발명의 면역 증강용 조성물에 대한 가능한 첨가물 및 투여 방법 등은 앞선 발명의 일 양태에서 서술하였으므로 과도한 중복을 피하기 위해 그 기재를 생략한다.

[0058] 본 발명의 면역자극 CpT 올리고뉴클레오타이드를 나타내기 위하여 일반식 1 또는 2를 언급하면서 사용되는 용어

"필수서열"은 올리고뉴클레오타이드가 면역자극을 발휘하기 위하여 반드시 요구되는 최소한의 서열을 의미한다. 따라서, 본 발명의 면역자극 CpT 올리고뉴클레오타이드는 일반식 1 또는 2로 표시되는 올리고뉴클레오타이드의 5'-말단 및/또는 3'-말단에 추가적으로 다른 뉴클레오타이드 서열이 포함될 수 있다.

[0059] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 일반식 1의 X_1은 A 또는 T이고, X_2는 A, T 또는 G이며, X_3은 T 또는 G이고, X_4은 A, T 또는 G이며, X_5는 T이다.

[0060] 본 발명의 보다 바람직한 구현예에 따르면, 상기 일반식 2의 X_1은 T이고, X_2는 T 또는 G이며, X_3은 A, T 또는 G이고, X_4은 T 또는 G이며, X_5는 A 또는 T이고, X_6는 A 또는 T이다.

[0061] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 면역자극 CpT 올리고뉴클레오타이드는 서열목록 제2, 3, 4, 19, 24, 35, 39 및 46 내지 49서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열이다.

[0062] 본 발명의 보다 바람직한 구현예에 따르면, 상기 면역자극 CpT 올리고뉴클레오타이드는 서열목록 제2서열의 뉴클레오타이드 서열이다.

[0063] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 제 1 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항의 조성물을 대상(subject)에 투여하는 단계를 포함하는 면역반응 증강방법을 제공한다:

[0064] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 대상(subject)은 암, 바이러스에 의한 감염성 질환, 박테리아에 의한 감염성 질환, 진균성 질병, 기생충성 질환, 아토피질환, 자가면역질환, 염증성 질환, 켈로이드 또는 상처를 가진다.

발명의 효과

[0065] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0066] (a) 본 발명은 DOPE(dioleyl phosphatidylethanolamine) 및 CHEMS(cholesterylhemisuccinate)를 포함하는 리포좀에 포집된 면역자극 올리고뉴클레오타이드를 유효성분으로 포함하는 면역 증강용 조성물 및 면역자극 CpT 올리고뉴클레오타이드를 유효성분으로 포함하는 면역 증강용 조성물을 제공한다.

[0067] (b) 본 발명은 DOPE 및 CHEMS로 이루어진 복합 지질(fusogenic lipid)을 포함하는 리포좀이 면역자극 올리고뉴클레오타이드에 대하여 가장 우수한 DDS임을 제시하고 있다.

[0068] (c) 본 발명은 특히 포스포로디티오에이트 골격을 가지는 면역자극 올리고뉴클레오타이드에 대하여도 잘 적용된다.

[0069] (d) 본 발명은 면역강화를 통해 다양한 면역결핍 관련 질환에 예방 및 치료에 유용하게 이용될 수 있으며, 또한 면역보조제(adjuvants)로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0070] 도 1은 포스포다이에스터 결합 형태로 합성한 MB-ODN 4531(O)이 리포좀과 복합체를 이루었을 때 인간 면역세포인 RPMI 8226 세포주(B 세포주)에서 IL-8 프로모터를 활성화하는 것을 보여 주는 그림이다. 도 1a는 MB-ODN 4531(O) 형태의 합성 올리고뉴클레오타이드가 대식세포의 IL-8 프로모터를 활성화시키나, 인간의 면역세포인 RPMI8226 세포는 활성화시키지 못함을 보여준다. 그러나 MB-ODN 4531(O) 형태의 합성 올리고뉴클레오타이드가 DOTAP 또는 DOPE/CHEMS 복합체(리포플렉스)와 복합체를 형성하였을 때 인간의 면역세포인 RPMI 8226 세포에서 IL-8 프로모터를 활성화시키는 결과를 나타내는 그림이다. MB-ODN 4531(S) 형태의 합성 올리고뉴클레오타이드도 리포좀들과 복합체를 형성하였을 때 IL-8 프로모터의 활성화가 높게 나타났다. 도 1b는 MB-ODN 4531(O) 형태의 합성 올리고뉴클레오타이드가 여러 종류의 리포좀과 복합체를 형성하였을 때 인간의 면역세포인 RPMI 8226 세포에서 IL-8 프로모터를 활성화시키는 정도를 비교한 그림이다. "4531GC"는 MB-ODN 4531 올리고뉴클레오타이드의 CG서열이 GC서열로 치환된 유도체를 의미한다.

도 2는 포스포다이에스터 결합형태로 합성한 MB-ODN 4531(O)가 리포좀(DOPE:CHEMS(1:1))과 복합체를 이루었을 때 세포유입이 증가하고 앤도좀으로의 이동 및 수용체인 TLR9과의 결합이 증가함을 나타내는 그림이다. 도 2a는 CpG-DNA의 유입에 있어서 DOPE:CHEMS(1:1) 포집의 효과를 나타낸 그림이다. RPMI 8226 및 RAW264.7 세포는 CpG-DNA(MB-ODN4531, 4531이라 표시) 또는 DOPE:CHEMS-포집된 FITC-표지 MB-ODN4531(lipoplex라 표시)로 10분간 처리되었다. 세포들을 0.1% BSA를 함유하는 PBS로 세척한 후, 유입된 형광물질을 FACS로 분석하였다. 도 2b는 24시간동안 IL-8 프로모터 루시퍼라제 컨스트럭트로 일시적 형질전환된 RPMI 8226 세포들을 나타낸 그림이다. 세포들을 미리 클로로퀸(10 μM)으로 1시간동안 처리한 후 MB-ODN 4531, DOPE:CHEMS(1:1), DOPE:CHEMS(1:1)-포집 MB-ODN 4531(lipoplex(O)라 표시) 또는 LPS로 12시간동안 촉진시켰다. 배양물을 수집한 후 루시퍼라제 활성을 분석하였다. 도 2c는 RPMI 8226 세포들이 IL-8 프로모터 루시퍼라제 컨스트럭트 및 대조군 벡터 또는 IkBaSR 및 MyD88의 열위종(dominant negative) 돌연변이로 24시간동안 일시적 형질전환된 모습을 나타낸 그림이다. 루시퍼라제 활성을 분석하기 전에 미리 세포들을 MB-ODN 4531 또는 DOPE:CHEMS(1:1)-포집 MB-ODN 4531(lipoplex라고 표시)로 12시간동안 처리하였다(윗쪽 패널). RPMI 8226 세포들을 IL-8 프로모터-루시퍼라제 컨스트럭트로 일시적 형질전환시키고 MB-ODN 4531 또는 DOPE:CHEMS(1:1)-포집 MB-ODN 4531(lipoplex라고 표시)로 12시간동안 처리하기 전에 미리 PDTC (200 μM) 또는 BMS-345541(50 μM)로 1시간동안 처리하였다. 배양물을 수집한 후 루시퍼라제 활성을 분석하였다.

도 3은 포스포다이에스터 결합 형태로 합성한 MB-ODN 4531(O)가 리포좀(DOPE:CHEMS(1:1))과 복합체를 이루었을 때 hPBMC(도 3a) 및 마우스의 비장세포(도 3b)에 작용하여 사이토카인의 발현을 증가시키는 것을 보여주는 그림으로서 CpG-DNA 또는 DOPE:CHEMS-포집 CpG-DNA에 의한 hPBMC 및 마우스에서의 사이토카인 생산을 나타낸다. 인간 PBMC는 헤파린으로 응고가 억제된 혈액에서 얻었다. hPBMC 및 BALB/c 마우스로부터 얻은 비장세포를 MB-ODN 4531 또는 DOPE:CHEMS(1:1)-포집 MB-ODN 4531(lipoplex라고 표시)로 24시간 처리한 후 배양 상등액을 수집하였다. IL-6, IL-12 및 IFN-g의 발현량을 ELISA를 이용하여 분석하였다.

도 4는 포스포다이에스터 결합 형태로 합성한 MB-ODN 4531(O)가 리포좀(DOPE:CHEMS(1:1)과 HEL(hen egg lysozyme) 복합체에 의해 복강 면역화된 Balb/c 마우스의 체액반응을 보여주는 그림으로 DOPE:CHEMS-포집 된 MB-ODN 4531(O)-유도 Th1-결합 HEL 항원-특이적 IgG2a 반응을 보여준다. 도 4a는 3마리의 BALB/c 마우스를 50 μg의 유리 HEL, MB-ODN 4531이 첨가된 50 μg의 HEL, DOPE:CHEMS, DOPE:CHEMS(1:1)-포집 MB-ODN 4531(lipoplex(O)+HEL라고 표시) 또는 DOPE:CHEMS (1:1)-포집 MB-ODN 4531GC(O) (lipoplexGC(O)+HEL로 표시)를 각각 10일 간격으로 복강 내에 주입하였다. 도 4b는 3마리의 BALB/c 마우스에 HEL-IFA, 50 μg 의 HEL과 50 μg 의 DOPE:CHEMS, DOPE:CHEMS (1:1)-포집MB-ODN 4531(O)(lipoplex(O)로 표시), DOTAP-포집 MB-ODN 4531(O)(DOTAP+HEL+4531(O)로 표시) 또는 리포펙타민-포집 MB-ODN 4531(O)(Lipofectamine+HEL+4531(O)로 표시)를 각각 10일 간격으로 복강 내에 주입한 결과를 나타낸 그림이다. 도 4c는 3마리의 BALB/c 마우스에 HEL과 50 μg 의 리포좀(DSPC:Chol, DSPC:CHEMS:PEG-PE, Chol:DOPE:PEG-PE, Dc-Chol:DOPE:PEG-PE, DOPE:CHEMS)-포집 MB-ODN 4531(O)를 각각 10일 간격으로 복강 내에 주입한 결과를 나타낸 그림이다. 혈청을 수집하여 항체 아이소타입을 ELISA로 분석하였다(도 4a, 4b 및 4c). 도 4a, 4b 및 4c의 상부 패널은 항-HEL 총 IgG 반응을 나타낸다. 도 4a, 4b 및 4c의 중간 패널은 Th2-주도 반응과 연관된 아이소타입인 항-HEL IgG1의 반응을 나타낸다. 도 4a, 4b 및 4c의 하부 패널은 Th1-주도 반응과 연관된 아이소타입인 항-HEL IgG2a의 반응을 나타낸다.

도 5는 DOPE:CHEMS 복합체에 포집된 CpG-DNA를 포함한 자외선-불활성 재조합 H5N1 바이러스(PR8/H5Lo)를 복강내 주사한 후, BALB/c 마우스의 체액성 반응을 나타낸 것이다. DOPE:CHEMS 복합체에 포집된 MB-ODN 4531(O)에 의해 유도된 Th2 반응-관련 재조합 H5N1 바이러스-특이적 IgG2a 반응을 보여준다. 세 마리의 BALB/c 마우스에 불활성 재조합 H5N1 바이러스, 불활성 재조합 H5N1 바이러스 포집 DOPE:CHEMS 복합체 또는 불활성 재조합 H5N1 바이러스와 MB-ODN 4531(O) (50 μg/마리)의 동시포집(coencapsulated) DOEP:CHEMS 복합체를 각각 10일 간격으로 3회 복강내 주사하였다. 복강내 주입 10일 후, 하트 펀칭(heart punching)방법으로 혈액을 수득하였다. 상기 혈액으로부터 혈청을 수집하였고, 항-재조합 H5N1 바이러스 항체를 이용하여 ELISA를 실시하였다.

도 6은 DOPE:CHEMS 포집 Cy5-표지-MB-ODN 4531(O)를 복강내 주사하여 얻은 인 비보에서의 생체 분포 이미지 및 림프절에서의 면역세포 분포를 나타낸 그림이다. 유리된(free) 50 μg 의 Cy5-표지-MB-ODN 4531(O) 또는 DOPE:CHEMS(1:1)에 포집된 50 μg 의 MB-ODN 4531(O)(lipoplex(O)라고 표시)를 BALB/c 마우스 복강내에 주사한 후 4시간 후 액와 림프절, 천경 림프절, 서혜부 림프절, 장간막 림프절 및 비장으로부터 단일 세포 현탄액을 얻었다. 세포들을 CD45R/B220에 대한 FITC-접합 항체로 염색한 후 DOPE:CHEMS 포집 Cy5-표지-MB-ODN 4531(O)의 유입과 CD45R/B220-양성 세포의 숫자를 FACSAria II 유세포 분석기로 측정하였다. FITC-접합 래트 IgG2a k을

아이소타입 대조군으로 사용하였다. MB-ODN 4531(O)-리포좀(DOPE:CHEMS(1:1) 복합체를 투여하였을 때 각 림프절 및 비장에 MB-ODN 4531(O)이 가장 많이 유입되었음을 확인하였다.

도 7은 Mycobacterium bovis의 크로모좀 DNA에 존재하는 염기서열 중 20 bp 상에 세 개의 CG를 가진 염기서열을 선정하여 포스포로티오에이트 골격의 올리고뉴크레오타이드를 합성하여 PS-DNA(CpG-DNA(S))-리포좀(DOPE:CHEMS(1:1)복합체를 제조하여 RPMI 8226 세포의 IL-8 프로모터 활성화 정도를 비교하여 본 결과를 나타내는 그림이다. 본 발명에서 이용한 PS-DNA(8종)이 리포좀(DOPE:CHEMS(1:1)복합체를 제조하였을 때 IL-8 프로모터 활성을 크게 증가시킴을 확인하였다(도 7a). 도 7b는 상기 도 7a의 PS-DNA 8종을 13염기의 두 개의 CG를 가진 염기서열을 절단하여포스포로티오에이트 골격의 올리고뉴크레오타이드를 합성하여 PS-DNA(CpG-DNA(S))-리포좀(DOPE:CHEMS(1:1)복합체를 제조하여 RPMI 8226 세포의 IL-8 프로모터 활성화 정도를 비교하여 본 결과를 나타내는 그림이다. 두 개의 CG를 가진 염기서열을 가진 13 염기의 포스포로티오에이트 골격의 올리고뉴크레오타이드들도 IL-8 프로모터를 활성화 시킬 수 있으며, 리포좀 (DOPE:CHEMS(1:1)) 복합체를 형성하였을 때 IL-8 프로모터를 크게 활성화시킴을 확인하였다.

도 8a는 S형의 MB-ODN4531의 CG 염기서열을 CT, CA, CC로 각각 치환한 4531(S)CT, 4531(S)CA, 4531(S)CC 올리고뉴클레오타이드가 인간 B세포(RPMI 8226) 및 대식세포(RAW 264.7)의 IL-8 프로모터 활성화 정도를 비교하여 본 결과를 나타내는 그림이다. 도 8b는 MB-ODN 4531(S)CT 가 농도-의존적 및 처리 시간에 따라 IL-8 프로모터를 활성화시키는 것을 보여주는 그림이다. 도 8c는 MB-ODN 4531(S)CT에 의해 IL-8의 발현이 증가함을 RT-PCR을 통하여 확인한 그림이다.

도 9a는 *S. aureus* 의 크로모좀 DNA 에 존재하는 염기서열 중 20 bp 상에 세 개의 CT를 가진 염기서열을 선정하여(SACT, 표 2) 포스포다이에스터 골격의 올리고뉴클레오타이드를 합성하여 RPMI 8226 세포의 의 IL-8 프로모터 활성화 정도를 비교하여 본 결과를 나타내는 그림이다. 도 9b는 세 개의 CT를 가진 염기서열을 선정하여 포스포다이에스터의 올리고뉴클레오타이드를 합성하여 리포좀들과 복합체를 형성하여(DOPE:CHEMS, DOTAP, 리포펙타민, 리포펙틴) RPMI 8226 세포의 의 IL-8 프로모터 활성화 정도를 비교하여 본 결과를 나타내는 그림이다. 도 9c와 도 9d는 SACT4501가 리포좀(DOPE:CHEMS(1:1)(lipoplex)과 복합체를 이루었을 때 농도-의존적(도 9c) 및 처리 시간(도 9d)에 따라 IL-8 프로모터를 활성화 시킴을 보여준 그림이다.

도 10은 세 개의 CT를 가진 염기서열을 함유하는 MB-ODN4531(S 또는 O)CT 및 SACT4501(O)가 리포좀(DOPE:CHEMS(1:1)(lipoplex)과 복합체를 이루었을 때 마우스의 비장세포(도 10a)와 hPBMC(도 10b)에 작용하여 사이토카인의 발현을 증가 시키는 것을 보여주는 그림이다.

도 11은 Balb/c 마우스에 포스포다이에스터-결합된 SACT4501(O)(또는 MB-ODN 4531(O)CT)과 HEL 동시포집 DOPE:CHEMS 복합체를 복강내 투여한 후의 체액성 면역반응을 나타낸다. DOPE:CHEMS 복합체에 포집된 SACT4501(O)에 의해 유도된 Th2 반응-관련 HEL 항원-특이적 IgG1 반응을 보여준다. Balb/c 마우스에 HEL-IFA, 50 μg HEL과 50 μg SACT4501(O) 혼합물, 50 μg HEL과 50 μg MB-ODN 4531(O)CT 혼합물, 50 μg HEL과 SACT4501(O) 포집(DOPE:CHEMS)(1:1) 복합체(Lipoplex(O)SACT+HEL로 표시함) 또는 50 μg HEL과 MB-ODN4531(O)CT 포집 (DOPE:CHEMS)(1:1)복합체(Lipoplex(O)CT+HEL로 표시함)을 각각 10일 간격으로 3회 복강내 투여하였다. 10일 경과 후, 하트 펀칭(heart punching)방법으로 혈액을 채취하고 원심분리하여 혈구를 침전시키고 혈청을 획득하였다. 획득한 혈청으로부터 항-HEL 항체 (total IgG, Ig G1, Ig G2a)의 역가(도 11a) 및 항체의 양(도 11b)을 확인하기 위해 ELISA를 수행하였다.

도 12는 동물모델에 SACT4501(O) 또는 MB-ODN 4531(O)CT를 국부적으로 적용하였을 때 아토피 피부염의 치료효과를 나타낸 것이다. NC/Nga 마우스의 피부에 DNFB를 도포하여 아토피 피부염을 유도하였다. NC/Nga 마우스를 각각 5마리씩 SACT4501(O)-처치, MB-ODN 4531(O)CT-처치 및 비-처치의 세 그룹으로 나누었다. SACT4510(O) 또는 MB-ODN 4531(O)CT를 마우스 등의 아토피 부위에 2일 간격으로 2주 동안 7번 도포하였다. 마우스의 등 피부를 H&E 염색하여 아토피 피부염의 치료 효과를 분석하였다. 또한 톨루이딘 블루 염색으로 비만세포(mast cell)의 분포를 측정하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0071] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0072] **실시예**

[0073] **실시예 1: 리포좀-단백질-CpG-DNA 복합체의 제작**

[0074] 본 발명에서 사용된 리포좀은 다음과 같다: CHEMS, Chol, DOPE 및 DSPC(Sigma), DC-Chol 및 PEG-PE(Avanti-Polar Lipids (Alabaster, AL, USA)), CpG-DNA 및 단백질과 DOTAP의 복합체(Roche, Indianapolis, IN, USA), 리포펙타민(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 또는 리포펙틴(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)이 생산자의 설명서대로 제조되었다. DOPE/CHEMS, DSPC/Chol, DSPC/CHEMS/PEG-PE, Chol/DOPE/PEG-PE, Dc-Chol/DOPE/PEG-PE 또는 DOPE/CHEMS로 포집된 CpG-DNA 및 단백질로 이루어진 리포좀 복합체 및 그 변형들을 공지된 방법으로 제조하였다(Simoes et al. 2004. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 56: 947-965(2004); Gursel et al. *J. Immunol.* 167: 3324-3328(2001)). 요약하자면, DOPE 및 CHEMS를 1:1 몰비율로 혼합하거나 각각의 실시예에서 서술한대로 혼합한 후, 혼합물을 질소가스와 함께 증발시켜 무용매(solvent-free) 지방 필름을 만들었다. 그 후, 에탄올(최종농도 10%)에서 혼합하여, 동일한 부피의 수용성 CpG-DNA 및 단백질 혼합물에 섞어 30분간 상온에서 강하게 휘저었다. pH를 7.0으로 조절한 후, 리포플렉스 용액을 초음파분해기로 30초간 초음파 분해를 하였다. 이후, 0.22㎛ 필터로 여과하고 액체질소에서 냉동-해동을 3번 반복하였다.

[0075] **실시예 2: 면역세포 면역활성 효과를 갖는 CpG-DNA-리포좀 복합체의 탐색**

[0076] **<2-1> 제조한 리포좀-CpG-DNA 복합체들의 면역반응조사**

[0077] 상기 실시예 <1>에서 제조된 MB-ODN 및 MB-ODN과 다양한 리포좀 복합체들이 대식세포 및 B 세포에서 IL-8의 프로모터를 활성화시키는지 조사하였다.

[0078] a) 마우스 대식세포 및 인간 B 세포의 배양

[0079] Raw 264.7 세포(ATCC, Manassas, VA)는 10% FBS(Gibco BRL)를 DMEM 배지에서 배양하였다. RPMI 8226 세포(ATCC, Manassas, VA)는 10% FBS(Gibco BRL)를 RPMI 배지에서 배양하였다. 세포 배양은 37℃, 5% CO_2 배양기(Forma)에서 수행하였다.

[0080] b) IL-8 프로모터-*Luc* 리포터 플라스미드의 제작

[0081] IL-8 프로모터 영역(-135 bp에서 +46 bp 까지)을 증폭하기 위하여, 인간 게놈 DNA를 주형으로 하고 프라이머 셋트(5' 프라이머: 5'- GTGAGATCTGAAGTGTGATGACTCAGG-3', 3' 프라이머: 5'- GTGAAGCTTGAAGCTTGTGTGCTCTGC-3')를 이용하여 PCR을 수행하였다.

[0082] 상기 증폭된 IL-8 프로모터 영역 단편을 *Bgl*Ⅱ 및 *Hin*dⅢ로 절단된 pGL3-Basic 플라스미드(Promega)에 삽입하였다. 이렇게 하여 IL-8 프로모터-*Luc* 리포터 플라스미드를 제조하였다(Wu G. D. et al. *J. Biol. Chem.* 272:2396-2403(1997)).

[0083]

[0084] c) 프로모터 활성화 분석: 루시퍼라제 활성 분석

[0085] RAW 264.7 세포 및 RPMI 8226 세포 (ATCC, Rockviller, MID)를 $5X10^4$ cells/well의 농도로 12-웰 플레이트에 분주하여 37℃, 5% CO_2 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 상기 세포를 상기 b)에서 제조한 IL-8 프로모터-*Luc* 리포터 플라스미드 와 pRL-null 플라스미드(Promega)로 공동-형질전환(co-transfection)시켰다. 이후, 37℃, 5% CO2 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 상기 <실시예 1>에서 제조한 리포좀-CpG-DNA 복합체(5 ㎍/well)를 각 웰에 처리하고, 37℃, 5% CO_2 배양기에서 12시간 동안 배양하였다. 이 때 대조군에는 PBS를 처리하였다. 이후, 듀얼-루시퍼라제 리포터 어세이 시스템(Dual-luciferase reporter assay system, Promega)의 PLB(passive lysis buffer)을 100 ㎕/well의 농도로 각 웰에 첨가하여 세포를 파쇄하였다. 세포 파쇄액을 원심분리하고 얻은 상층액(15 ㎕)을 이용하여 루시퍼라제 분석을 수행하였다. 루시퍼라제 활성은 TD-20/20(Turner designs) 루미노미터(luminometer)를 사용하여 측정하였다. 리포좀-CpG-DNA 복합체의 처리에 따른 각 프로모터의 활성은 대조군에 대한 상대적인 활성으로 나타내었다. 즉, 대조군의 활성을 '1'로 하여 이에 대한 활성화 배수(fold activation)로 나타내었다.

[0086] 그 결과, 도 1에서 보는 바와 같이, 리포좀-PO-ODN 복합체가 인간의 B 세포주인 RPMI 8226세포에서 IL-8 프로모터를 활성화 시키는 것으로 확인하였다. 이러한 결과는 CpG 모티프를 함유하는 DOPE/CHEMS 복합체-포집 PO-ODN가 CG 서열 의존적으로 IL-8 프로모터 활성을 증가시킨다는 것을 보여준다. 그러나, DOPE/CHEMS 복합체-포집 PS-ODN는 CG 서열과 무관하게 골격의 변형에 의존적으로 IL-8 프로모터 활성을 증가시킨다.

[0087] **실시예 3: CpG-DNA-리포좀 복합체의 세포내 유입, TLR9 결합 및 앤도좀 이동의 증가 확인**

[0088] **<3-1> CpG-DNA의 유입**

[0089] CpG-DNA의 세포내 유입을 이미 보고된 공지의 방법에 의해 실시하였다(Roberts et al. *J. Immunol*. 175:3569-3576(2005)). 요약하면, FITC-표지 CpG-DNA를 합성하여 제조자의 설명서에 따라 리포좀으로 포집시켰다. RPMI 8226 세포 및 RAW 264.7 세포를 24-웰 플레이트에 24시간동안 도말하고 FITC-표지 CpG-DNA 또는 리포좀으로 포집된 FITC-표지 CpG-DNA로 10분간 처리하였다. 세포들을 12.5 mg/ml 덱스트란 설퍼와 함께 얼음위에서 배양함으로써 세포 표면에 결합한 모든 ODN를 제거하였다. 세포들은 0.1% BSA를 함유하는 PBS로 세척한 후에 유세포 분석기(FACScan flow cytometer)(BD Biosciences, San Diego, CA, USA)를 이용한 FACS분석을 하였다(Robert, T. L. et al. *J. Immunol*. 175:3569-3576(2005))

[0090] **<3-2> CpG-DNA의 엔도좀-전좌(tranlocation)**

[0091] RPMI 8226 세포를 IL-8 프로모터 루시퍼라아제 컨스트럭트로 24시간 동안 일시적 형질전환하였다. 세포들을 미리 클로로퀸(10 μM)으로 1시간동안 처리한 후 MB-ODN 4531(O) (4531(O)로 표시), MBODN 4531(S) (4531(S)로 표시), DOPE:CHEMS(1:1), DOPE:CHEMS(1:1)-포집 MB-ODN 4531(lipoplex(O) 또는 Lipoplex(S)으로 표시) 또는 LPS (100 ng/ml)로 12시간동안 촉진시켰다. 상기 배양물을 수집한 후 루시퍼라제 활성을 분석하였다.

[0092] **<3-3> CpG-DNA의 NF-κB 활성**

[0093] RPMI 8226 세포를 IL-8 프로모터 루시퍼라아제 컨스트럭트, 대조군 벡터, IκBαSR, 또는 MyD88의 도미넌트 네거티브 뮤턴트(ΔMyD88) 로 24시간 동안 일시적 형질전환하였다. 루시퍼라제 활성을 측정하기 전 세포들을 MB-ODN 4531(4531(O) 및 4531(S)라 표시) 또는 DOPE:CHEMS(1:1)-포집 MB-ODN 4531(Lipoplex(O) 및 Lipoplex(S)로 표시)로 12시간동안 처리하였다. 상기 배양물을 수집한 후 루시퍼라제 활성을 분석하였다.

[0094] RPMI 8226 세포를 IL-8 프로모터 루시퍼라아제 컨스트럭트로 일시적 형질전환시켰다. 세포들을 미리 PDTC (200 μM) 또는 BMS-345541 (50 μM)로 1시간동안 처리한 후, MB-ODN 4531(O) (4531(O)로 표시), MBODN 4531(S) (4531(S)로 표시), DOPE:CHEMS(1:1), DOPE:CHEMS(1:1)-포집 MB-ODN 4531(lipoplex(O) 또는 Lipoplex(S)으로 표시)로 12시간동안 촉진시켰다. 상기 배양물을 수집한 후 루시퍼라제 활성을 분석하였다.

[0095] 그 결과, DOPE:CHEMS-포집 CpG-DNA는 세포내 PS-DNA와 PO-DNA 유입을 증가시켰다. 본 발명자들은 또한 CpG-DNA가 리포좀 내 포집되었을 때, RPMI 8226 세포에서의 세포내 PS-DNA 및 PO-DNA 유입이 RAW 264.7 세포보다 더 강하게 나타나는 것을 확인하였다. 이러한 결과들은 DOPE:CHEMS 복합체-포집된 PS-DNA 또는 PO-DNA가 CpG-DNA의 세포내 유입 및 엔도좀-전좌, 그리고 NF-κB의 활성을 증가시킴을 보여준다.

[0096] **실시예 4: CpG-DNA-리포좀 복합체의 사이토카인 생산 유도**

[0097] **<4-1> hPBMC (인간 말초혈액 단핵세포)의 분리 및 CpG-DNA-리포좀 복합체 처리**

[0098] a) hPBMC의 분리 및 CpG-DNA-리포좀 복합체 처리

[0099] 말초혈액은 IRB(institutional review board) 승인 하에 건강한 지원자로부터 얻었다. 본 발명자들은 말초혈액 단핵세포(PBMC)를 Ficoll-Paque(Amersham Biosciences)를 이용한 밀도구배 원심분리를 통해서 분리하였다. PBMC 세포를 37 ℃에서 5% CO_2를 함유한 배양기에서 배양하였다. 본 발명에 따른 CpG-DNA-리포좀 복합체를 5

㎍/㎖ 처리하였다.

[0100] b) hPBMC 세포에서의 사이토카인 발현분석

[0101] 사이토카인의 측정을 위해서 CpG-DNA 또는 리포좀 포집 CpG-DNA(5 ㎍/ml)를 hPBMC에 첨가하고 37℃에서 5% CO_2와 함께 24시간동안 배양하였다. 배양상등액 내의 사이토카인 발현량은 상업적으로 구입 가능한 ELISA 키트(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 제조자의 설명서에 따라 측정하였다.

[0102] **<4-2> 마우스 비장 면역세포의 분리 및 CpG-DNA-리포좀 복합체의 처리**

[0103] 마우스의 비장에서 면역 세포를 수집하고, 이를 5 x 10^5 cells/well의 농도로 각 웰에 분주하였다. 이후, CpG-DNA-리포좀 복합체(0 또는 5 ㎍/㎖)를 각 웰에 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 배양이 완료된 후, 세포 배양액을 분리하였다. 이후, 세포 배양액 내 사이토카인의 수준을 조사하기 위하여, 상용화된 항-IL-6, 항-IL-12 p40 및 IFN-γ 항체(R&D systems, Minneapolis, Minn.)를 이용하여 샌드위치 ELISA 분석을 각각 수행하였다.

[0104] Phosphodiester bond의 CpG-DNA(PO-DNA)는 인간 PBMC(말초혈액)의 면역세포를 활성화 시키지 못하여 싸이토카인의 발현을 증가시키지 못하지만 리포좀 복합체(DOPE:CHEMS(1;1))를 제조하였을 때 IL-6, IL-12, IFN-γ의 발현을 증가시킴을 확인할 수 있었다.

[0105] **실시예 5: CpG-DNA-리포좀 복합체의 체액성 면역반응 유도**

[0106] **<5-1> 마우스**

[0107] 마우스는 특정 병원균이 없는 상황에서 보존하였다. 4주령의 수컷 BALB/c ($H-2^b$) 마우스를 Central Lab. Animal Inc.(Seoul, Korea)에서 구입하였다. 본 발명자들의 동물실험은 한림대학교 동물실험위원회의 승인을 받았다.

[0108] **<5-2> 면역화**

[0109] 4주령의 Balb/c 마우스에 HEL(hen egg lysozyme, 50 ㎍/마리), HEL과 IFA 혼합물, HEL과 MB-ODN4531(50 ㎍/마리)혼합물 또는 HEL-MB-ODN4531(O)-리포좀(DOPE:CHEMS, DOTAP, Lipofectamine, DSPC:Chol, DSPC:CHEMS:PEG-PE, Chol:DOPE:PEG-PE or Dc-Chol:DOPE:PEG-PE) 을 각각 10일 간격으로 3회 복강내 투여하였다. 10일 경과 후, 하트 펀칭(heart punching)방법으로 혈액을 채취하고 원심분리하여 혈구를 침전시키고 혈청을 획득하였다. 획득한 혈청으로부터 항-HEL 항체 (total IgG, Ig G1, Ig G2a)의 역가를 확인하기 위해 ELISA를 수행하였다.

[0110] **<5-3> 항원 특이적 Ig ELISA**

[0111] 주입 후 10일 뒤에 마우스로부터 혈청을 수집하여 -70℃에서 저장하였다. IgG, IgG1 및 IgG2a의 총량을 측정하기 위해 96-웰 면역플레이트(Nalgen Nunc International, Rochester, NY, USA)를 각각의 단백질 10 ㎍/ml로 코팅하고 1% BSA를 함유한 PBST(0.05% Tween-20 in PBS)로 블로킹시켰다. 혈청은 PBS로 1:400 비율로 희석하였고, 각각의 플레이트의 웰들에 첨가되었다. IgG, IgG1 및 IgG2a의 총량을 측정하기 위해 고트 항-마우스 IgG 항체, 고트 항-마우스 IgG1 항체 또는 고트 항-마우스 IgG2a 항체(Jackson ImmunoResearch Laborities, Inc.,WestGrove,PA,USA)를 1:5,000으로 희석하여 사용하였다. IgG, IgG1 및 IgG2a 타이터를 측정하기 위해, 96-웰 면역플레이트(Nalgen Nunc International)를 10 ㎍/ml의 각각의 단백질로 코팅하고 1%의 BSA를 포함하는 PBST로 블로킹시켰다. 혈청을 각각의 플레이트의 맨 윗열에 첨가하고 PBST로 1:3의 비율로 순차적인 희석을 한 것을 다음 열에 첨가하였다. 플레이트를 4시간 동안 상온에서 배양한 다음 PBST로 세척하였다. 다음으로, 고트 항-염소 IgG 항체-, 항-마우스 IgG1 항체- 또는 항-마우스 IgG2a 항체-접합 HRP(horseradish peroxidase)를 첨가하고 플레이트를 2시간 동안 배양하였다. 측색 분석을 1-Step ABTS(Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL, USA)를 사용하여 개시하였고, 405nm에서의 흡광을 측정하기 위해 Labsystems Multiskan

마이크로플레이트 리더(GMI Inc., Ramsey, MI, USA)를 사용하였다.

[0112] HEL, MB-ODN4531 및 리포좀 복합체를 마우스 복강내에 주사하여 체액성 면역반응을 조사하였다. HEL만을 단독으로, 또는 HEL-MB-ODN4531 혼합물, HEL-리포좀 복합체 주사하는 것에 비하여 HEL-MB-ODN4531-리포좀 복합체를 주사하였을 때 HEL에 대한 항체의 양이 증가하여, MB-ODN4531-리포좀 복합체는 체액성 면역에서 면역 아쥬번트 효과가 있음을 확인하였다. Incomplete Freund's adjuvant는 60년 전부터 현재까지 사용되고 있는 대표적인 면역아쥬번트 중 하나이다. 그러나 이 면역아쥬번트의 문제점은 세포성 면역증강이 이루어지지 않고 인간에게 사용할 수 없다는 점이다. MB-ODN4531-리포좀 복합체는 체액성 면역을 증가시키는 면역아쥬번트로의 역할 뿐 아니라 면역세포를 자극하여 세포성 면역을 유도하기 때문에 새로운 면역아쥬번트로의 활용이 가능하다는 결과를 얻었다. 또한 MB-ODN4531-리포좀 복합체는 Th1 면역반응 특이적인 IgG2a의 항체 생산에 효과적임을 보여주고 있다.

[0113] **실시예 6: 인플루엔자 바이러스-CpG-DNA-리포좀 복합체에 의한 체액성 면역반응의 유도**

[0114] **<6-1> 재조합 조류 인플루엔자 바이러스의 불활성화**

[0115] 역유전학에 의한 바이러스 구제(rescue)를 위해 A/Vietnam/1203/2004 (H5N1)와 A/Puerto Rico/8/34 (PR8) (H1N1) 인플루엔자 바이러스의 유전자 조각(segment)을 플라스미드 내에 클로닝 하였다(33). 이러한 재조합된(reassortant) 바이러스들은 PR8/H5Lo를 포함하며, PR8/H5Lo는 조류-혈통 A/Vietnam/1203/2004의 HA 유전자 조각 및 PR8의 7개 유전자 조각을 포함한다. 재조합 H5N1 바이러스(PR8/H5Lo)의 자외선-유도 불활성을 위해 바이러스를 5 cm 거리에서 1,500 μM/s/cm^2 UV 로 5분간 조사하였다. 바이러스의 불활성을 확인하기 위하여 MDCK 세포에 불활성화된 바이러스(총 바이러스 단백질 5 μg)를 첨가한 후 1 μg/ml TPCK-트립신 존재 하에서 3일 동안 37℃에서 배양하였다. MDCK 세포에서 자외선-불활성 바이러스를 이용한 플라그 분석결과, 바이러스의 감염능이 완전히 상실되었음을 확인하였다.

[0116] **<6-2> 면역화**

[0117] 4주령의 Balb/c 마우스에 불활성화된 재조합 H5N1 바이러스, 불활성화된 재조합 H5N1 바이러스와 리포좀(DOPE:CHEMS) 복합체의 혼합물 또는 불활성화된 재조합 H5N1 바이러스-MB-ODN4531 (50 μg/마리)-리포좀(DOPE:CHEMS) 복합체를 각각 10일 간격으로 3회 투여하였다. 10일 경과 후, 하트 펀칭(heart punching)방법으로 혈액을 채취하고 원심분리하여 혈구를 침전시키고 혈청을 획득하였다. 획득한 혈청으로부터 항-HEL 항체(total IgG, Ig G1, Ig G2a)의 역가를 확인하기 위해 ELISA를 수행하였다.

[0118] HEL, MB-ODN4531 및 리포좀 복합체를 마우스 복강내에 주사하여 체액성 면역반응을 조사하였다. HEL만을 단독으로, 또는 HEL-MB-ODN4531 혼합물, HEL-리포좀 복합체 주사하는 것에 비하여 HEL-MB-ODN4531-리포좀 복합체를 주사하였을 때 HEL에 대한 항체의 양이 증가하여, MB-ODN4531-리포좀 복합체는 체액성 면역에서 면역 아쥬번트 효과가 있음을 확인하였다(도 4). Incomplete Freund's adjuvant는 60년 전부터 현재까지 사용되고 있는 대표적인 면역아쥬번트 중 하나이다. 그러나 이 면역아쥬번트의 문제점은 세포성 면역증강이 이루어지지 않고 인간에게 사용할 수 없다는 점이다. MB-ODN4531-리포좀 복합체는 체액성 면역을 증가시키는 면역아쥬번트로의 역할 뿐 아니라 면역세포를 자극하여 세포성 면역을 유도하기 때문에 새로운 면역아쥬번트로의 활용이 가능하다는 결과를 얻었다.

[0119] **실시예 7: CpG-DNA-리포좀을 이용한 면역화에 의한 CpG-DNA의 분포**

[0120] 림프절 세포, 지라세포, 복막세포에서의 Cy5-표지 MB-ODN 4531(O)의 분포를 결정하기 위해 조직을 방부처리하여 제거한 후 즉시 RPMI 1640 배지에 썰어넣고 메쉬에 통과시켜 단일세포 현탄액을 얻었다. PBS로 세포를 두 번 세척한 후, 20 mM Tris-HCl (pH 7.2) 및 140 mM 암모늄 클로라이드를 포함하는 적혈구 용해 완충액을 37℃에서 5분간 처리하여 적혈구를 제거하였다. Cy5-표지 MB-ODN 4531(O)의 분포를 FACS Aria II 유세포 분석기(BD Biosciences)를 이용하여 분석하였다. 세포들은 0.1% BSA를 포함하는 PBS로 두 번 세척한 후 Fc 수용체를 블로킹하기 위해 4℃에서 20분 간 항-FcγRⅡ/Ⅲ 항체(BD Pharmingen)와 함께 배양하였다. 블로킹 과정 후, 세포들을 FITC-접합 항-CD45R/B220 항체(BD Pharmingen)와 함께 4℃에서 1시간동안 배양하였다. 아이소타입

대조군에 대해서는 FITC-접합 래트 IgG2a k를 사용하였다. FACS 데이터는 WinMDI 2.8 FACS 소프트웨어를 이용하여 분석하였다.

[0121] MB-ODN 4531(O)-리포좀(DOPE:CHEMS(1:1)) 복합체에 의해 마우스의 복강 및 림프절에 MB-ODN 4531(O)가 오래동안 존재할 수 있음을 확인하였고, DOPE:CHEMS(1:1) 복합체 포집에 의해 림프절 및 비장의 면역세포에 MB-ODN 4531(O)의 유입이 증가함을 확인하였다.

[0122] **실시예 8: PS-CpG-DNA-리포좀 복합체에 의한 면역반응 증가 및 PS-DNA 크기에 따를 면역반응 증가 비교**

[0123] 본 발명자들은 PS-ODN-리포좀(DOPE:CHEMS) 복합체가 IL-8 프로모터를 활성화시키는지 조사하였다.

[0124] **<8-1> PS-ODN 합성**

[0125] *M. bovis*에서 CG 염기서열이 3개 존재하는 20 베이스의 염기서열을 분석하여 (도 7a), 포스포로티오에이트 골격의 올리고뉴클레오타이드(PS-ODN)를 합성하였다. 또한 확보한 PS-ODN에서 두 개의 CG 서열을 함유하는 13 베이스의 염기서열도 포스포로티오에이트 골격의 올리고뉴클레오타이드(PS-ODN)로 합성하였다(도 7b).

[0126] **<8-2> 제조한 리포좀-CpG-DNA 복합체들의 면역반응조사**

[0127] 상기 실시예 1에서와 같은 방법으로 PS-ODN-리포좀(DOPE:CHEMS(1:1) 복합체를 제조하여, 상기 실시예 2에서와 같은 방법으로 B세포(RPMI 8226)에서 IL-8의 프로모터를 활성화시키는지 조사하였다.

[0128] 그 결과, 도 7에서 보는 바와 같이, 면역반응을 활성화 시키는 7종의 *M. bovis* 유래 신규 PS-ODN를 확보하였으며, 리포좀(DOPE:CHEMS(1:1) 복합체에 의해 면역반응 활성화를 크게 증가시킴을 확인할 수 있었다. 또한 PS-ODN-리포좀 복합체에 의해 두 개의 CpG 모티프를 가지는 PS-ODN도 리포좀(DOPE:CHEMS(1:1) 복합체 형성에 의해 면역반응 활성화를 크게 증가시킴을 확인할 수 있었다. DOPE:CHEMS 리포좀을 이용하여 PS-ODN의 면역반응 활성화가 크게 증가하고 PS-ODN의 크기를 줄여도(두개의 CG 서열을 함유하는 13 베이스) 면역반응을 크게 증가시킴을 확인하였다.

[0129] **실시예 9: MB-ODN4531 올리고뉴클레오타이드의 염기서열 변형 및 면역 반응**

[0130] **<9-1> MB-ODN4531 올리고뉴클레오타이드의 염기서열변형**

[0131] S형(포스포로티오에이트 골격)의 MB-ODN4531 의 염기서열을 도 7a와 같이 변형하여 합성하였다. MB-ODN4531의 CG 서열들을 CT(4531(S)CT), CA(4531(S)CA), CC(4531(S)CC)서열로 각각 바꾸었다.

[0132] **<9-2> 염기서열 변형된 MB-ODN4531 올리고뉴클레오타이드의 면역반응 조사**

[0133] a) 인간면역세포에서 IL-8 프로모터 활성화 분석

[0134] 12 웰 프레이트에 RPMI 8226 세포를 $5x10^4$ 세포/웰로 도말하고 24 시간동안 37℃ 5% CO_2 배양기에서 배양하였다. IL-8 프로모터 리포터 플라스미드와 pRL-null 플라스미드를 공동형질전환 시킨 후 24 시간동안 37℃ 5% CO_2 배양기에서 배양하였다. 염기서열 변형된 MB-ODN4531 올리고뉴클레오타이드를 10 μg/웰 씩 처리하고 6 시간 동안 37℃ 5% CO_2 배양기에서 배양하였다. 이후, 상기 실시예 2와 동일한 방법에 따라 수행하여 IL-8 프로모터 활성을 측정하였다.

[0135] 어떤 변형된 염기서열을 가진 합성 올리고뉴클레오타이드가 대식세포의 IL-8 프로모터를 활성화시키는지 확인하기 위해 루시퍼라제 분석 방법으로 활성화를 측정한 결과, CG의 염기서열을 CT로 변형시킨 CT(4531(S)CT)의 염기서열을 가진 올리고뉴클레오타이드가 IL-8 프로모터를 활성화 시켰다(도 8a 및 도 8b).

[0136]

[0137] b) 인간면역세포에서의 IL-8 발현분석

[0138] 본 발명에 따른 S형의 MB-ODN4531(S)CT을 처리한 RPMI 8226 세포에서의 IL-8의 발현량을 조사하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. 먼저, RPMI 8226 세포에 MB-ODN4531(S)CT을 농도별 (0, 0.5, 1, 2, 5 및 10μg/ml), 시간

별(0, 1, 2, 4, 8, 12 시간)로 처리하였다. 대조군에는 S형 MB-ODN 4531(S)을 처리하였다. 이후, TRIzol(Invitrogen)을 이용하여 RPMI 8226 세포로부터 총 RNA를 분리하였다. 이후, 총 RNA(5 ㎍)에 M-MLV 역전사 효소(invitrogen)를 처리하여 cDNA를 제조하였다. 이렇게 제조한 cDNA를 주형으로 하고 IL-8에 특이적인 프라이머 셋트(정방향 프라이머: 5'-ATGACTTCCAAGCTGGCCGTGGCT-3', 역방향 프라이머: 5'-TCTCAGCCCTCTTCAAAAACTTCT-3')를 이용하여 PCR을 수행하였다.

[0139] PCR 증폭은 95℃ 에서 30초 동안 DNA 변성, 57℃에서 40초 동안 프라이머 어닐링 및 72℃에서 1분 동안 연장을 일 순환으로 하여 총 25회 반복 수행하였다. PCR 반응이 완료된 후, 1% 아가로스 젤에서 증폭된 PCR 산물을 확인하였다. 그 결과, 도 8c에서 보는 바와 같이, 본 발명에 따른 MB-ODN4531(S)CT에 의해서 IL-8의 발현이 유도됨을 확인할 수 있었다.

[0140]

[0141] **실시예 10: *Staphylococcus aureus* 의 크로모좀 DNA 염기서열의 분석**

[0142] **<10-1> *S. aureus*의 크로모좀 DNA에서 CpT 모티프 염기서열 분석**

[0143] 본 발명자들은 *S. aureus*의 크로모좀 DNA 염기서열을 컴퓨터 프로그램을 이용하여 분석하였다. *S. aureus* 크로모좀 DNA를 무작위로 20개의 염기서열씩 선택 하였을 때, 그 중 3개의 XXCTXX들을 포함하는 염기서열들을 선별하였다. 예)CATTTCTTTCTTTTCTTGTTC

[0144] C와 C 사이의 염기서열 간격을 4개씩 두고 분석한 결과(-CTXXCTXXXCT-, SA-CT-ODN 4/5, 표 1 (A))와 C 와 C 사이의 염기서열 간격을 각각 5개씩 두고 분석한 결과(-CTXXXCTXXXCT-, SA-CT-ODN 5/5, 표 1 (B))는 표 1과 같다.

표 1

[0145] 20nt SACT-ODN4/5 및 5/5 CpT 헥사머의 분석

A			B		
번호	서열	위치	번호	서열	위치
1	CATTTCTTTCTTTTCTTGTT	7967	1	ATTACTTTTCTTTTCTTTAA	9009
2	TTCATCTAACTTTTCTTTAT	7427	2	TTATCTTTTCTATTCTTTTT	7508
3	AGACACTTTCTTTTCTTCAT	6642	3	TATGCTTTGCTTTTCTTTGA	7233
4	TCAAACTTTCTAAACTTTCA	6612	4	TATGCTTTTCTAATCTTTTT	6728
5	AGTATCTTGCTTTTCTTTTG	6497	5	TTTTCTAAACTTTACTTTTG	6590
6	ATCGACTTTCTTTTCTTCCA	6240	6	ATTTCTTTACTTTTCTCATA	6302
7	TAATGCTTTCTTTGCTGCAG	6114	7	TTATCTTTGCTTTACTTATT	5831
8	TGGATCTACCTTTTCTTTCA	5586	8	AAATCTTTACTATGCTTTGC	5790
9	AAATACTTTCTAATCTATGT	5582	9	AATTCTTATCTAAACTTTGC	5423
10	TAGATCTTTCTTCACTTGTT	5535	10	CCAACTATGCTTTTCTAATC	5288
11	CATAACTTTCTTCACTTTTG	5494	11	TAACCTTTACTTTTCTTAAA	5056
12	TGGATCTTTCTTCACTAATT	5492	12	TGTTCTTGACTGTTCTTTTG	4883
13	AATTTCTTTCTATACTCAAG	5411	13	TATCCTCAACTTTACTTTCA	4810
14	ATAATCTATCTTTTCTATTT	5352	14	TATGCTGAGCTAATCTTTCA	4791
15	ACATACTTTCTAAACTGTAG	5299	15	ATGCCTGTTCTTTACTTGTG	4707
16	TTTTTCTTGCTTTTCTAAAA	5223	16	ATGTCTTTTCTTAACTTTTC	4704
17	CGATGCTAACTTTTCTATCA	5187	17	AATTCTTCACTCAACTTTTT	4661
18	ATTGTCTTTCTTATCTTTAG	5145	18	TTAACTTTTCTTAACTGAAC	4661
19	CATTTCTATCTTTCCTTTCG	5124	19	TTTACTATGCTTTGCTAAAT	4617
20	GTTAACTATCTTATCTTTAA	4845	20	GTGGCTTTTCTTTCCTGTTG	4433
.	.	.	.	.	.
.	.	.	.	.	.
193	TTTGCCTACCTCATCTCGTG	739	118	TTCCCTGATCTCGACTTCGT	794
194	TTTGACTAGCTAGCCTAGGT	614	119	TCGTCTGCGCTAGGCTGCCA	525

[0146] *S. aureus*의 크로모좀 DNA 에 존재하는 -CTXXCTXXXCT- 형태의 올리고뉴클레오타이드는 194개, -CTXXXCTXXXCT-

형태의 올리고뉴클레오타이드는 119개 존재함을 보여주고 있다. 후보 면역반응 조절용 올리고뉴클레오타이드 10개를 선정하여 O형의 올리고뉴클레오타이드를 합성하였고 후보물질 검색에 이용하였다(표 2).

표 2

[0147] 스크리닝에 사용된 CT-ODN의 서열

ODN	서열
SA-CTODN4501	CATTTCTTTCTTTTCTTGTT
SA-CTODN4502	TTCATCTAACTTTTCTTTAT
SA-CTODN4503	AGACACTTTCTTTTCTTCAT
SA-CTODN4504	ATTGTCTTTCTTATCTTTAG
SA-CTODN4505	ATAGACTTTCTTATCTTGAT
SA-CTODN4506	CATTTCTTGCTTGTCTTTTT
SA-CTODN4507	ACCAACTTGCTGGTCTTTCC
SA-CTODN5501	TATGCTTTGCTTTTCTTTGA
SA-CTODN5502	TGTTCTTGACTGTTCTTTTG
SA-CTODN5503	ATGTCTTTTCTTAACTTTTC

[0148] **<10-2> 합성한 후보 MB-ODN 들의 면역반응조사**

[0149] 상기 실시예 <10-1>에서 제조된 SACT-ODN들이 RPMI 8226 세포의 IL-8 프로모터를 활성화시키는지 SACT-ODN-리포좀 복합체를 이용하여 조사하였다. 그 결과, 포스포다이에스터 SACT4501와 MB-ODN 4531(O)CT의 염기서열은 ODNs이 DOPE:CHEMS(1:1) 복합체에 포집되었을 때, IL-8 프로모터를 활성화 시키는 것으로 확인되었다(도 9a). IL-8 프로모터 활성은 RPMI 8226 세포에 리포펙타민, DOTAP-포집-SACT 4501(O) 또는 MB-ODN 4531(O)CT를 처리한 경우보다, DOPE:CHEMS 복합체, 리포펙틴-포집 SACT4501(O) 또는 MB-ODN 4531(O)CT를 처리했을 때 크게 증가되었다(도 9b). SACT4501(O)-리포좀(DOPE:CHEMS) 복합체는 시간 및 농도-의존적으로 IL-8 프로모터 활성을 증가시켰다(도 9c 및 도 9d).

[0150] **<10-3> SACT4501에 의한 마우스에서 사이토카인 발현 분석**

[0151] 본 발명에 따른 SACT4501을 처리한 마우스에서 MIP-2, TNF-α, IFN-α, IL-6 및 IL-12p40의 발현량을 조사하기 위하여 마우스의 비장에서 면역 세포를 수집하고, 이를 5 x 10^5 cells/well의 농도로 각 웰에 분주하였다. 이후, SACT4501(O), MB-ODN 4531(O)CT-리포좀 복합체 또는 MB-ODN 4531(S)CT-리포좀 복합체 (0 또는 10 ㎍/㎖) 및 이들의 리포좀 복합체를 각 웰에 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 배양이 완료된 후, 세포 배양액을 분리하였다. 이후, 세포 배양액 내 사이토카인의 수준을 조사하기 위하여, 상용화된 항-MIP-2, TNF-α, IFN-α, IL-6 및 IL-12p40 항체(R&D systems, Minneapolis, Minn.)를 이용하여 상기 실시예 <5-3>과 같이 샌드위치 ELISA 분석을 각각 수행하였다. 그 결과, 도 10a에서 보는 바와 같이, 본 발명의 SACT4501(O)-리포좀 복합체는 MIP-2 및 IFN-α생산을 증가시켰다. 또한 MB-ODN 4531CT-리포좀 복합체는 MIP-2, TNF-α, IFN-α, IL-6 및 IL-12p40의 생산량을 증가시켰다.

[0152] **<10-4> SACT4501에 의한 hPBMC 세포에서의 사이토카인 발현분석**

[0153] hPBMC에서 IFN-γ 및 IL-6 의 발현량을 조사하기 위하여 혈액에서 면역 hPBMC를 수집하고, 이를 5 x 10^5 cells/well의 농도로 각 웰에 분주하였다. 이후, SACT4501(O), MB-ODN4531(O)CT-리포좀 복합체 또는 MB-ODN4531(S)CT-리포좀 복합체(0 또는 10 ㎍/㎖) 및 이들의 리포좀 복합체를 각 웰에 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 배양이 완료된 후, 세포 배양액을 분리하였다. 이후, 세포 배양액 내 사이토카인의 수준을 조사하기 위하여, 상용화된 IFN-γ 및 IL-6 항체(R&D systems, Minneapolis, Minn.)를 이용하여 상기 실시예 <5-3>과 같이 샌드위치 ELISA 분석을 각각 수행하였다. 그 결과, 도 10b에서 보는 바와 같이, 본 발명의 SACT4501(O)-리포좀 복합체는 IFN-γ 및 IL-6 생산을 증가시켰다. 또한 MB-ODN4531(O)CT-리포좀 복합체는 IL-6 의 생산량을 증가시켰다. 그러나 MB-ODN4531(O)CT는 IFN-γ의 발현에 영향을 미치지 못하였다. 상기의 결과로부터

CT-모티프를 함유하는 SACT4501-리포좀 복합체 및 MB-ODN4531CT-리포좀 복합체는 사이토카인의 발현을 조절하여 면역반응을 조절할 수 있음을 알 수 있었다.

[0154] **실시예 11: CpT 모티프-리포좀 복합체를 포함하는 포스포다이에스터 ODNs에 의한 체액성 면역반응의 유도**

[0155] **<11-1> 마우스**

[0156] 마우스는 특정 병원균이 없는 상황에서 보존하였다. 4주령의 수컷 BALB/c ($H\text{-}2^b$) 마우스를 Central Lab. Animal Inc.(Seoul, Korea)에서 구입하였다. 본 발명자들의 동물실험은 한림대학교 동물실험위원회의 승인을 받았다.

[0157] **<11-2> 면역화**

[0158] 4주령의 Balb/c 마우스에 HEL(hen egg lysozyme, 50 μg/마리)과 IFA 혼합물, HEL과 SACT4501(O) 혼합물, HEL과 MB-ODN 4531(O)CT 혼합물, HEL-SACT4501(O)-리포좀(DOPE:CHEMS) 복합체(Lipoplex(O)SACT+HEL로 표시함) 또는 HEL-MB-ODN4531(O)CT-리포좀(DOPE:CHEMS) 복합체(Lipoplex(O)CT+HEL로 표시함)을 각각 10일 간격으로 3회 복강내 투여하였다. 10일 경과 후, 하트 펀칭(heart punching)방법으로 혈액을 채취하고 원심분리하여 혈구를 침전시키고 혈청을 획득하였다. 획득한 혈청으로부터 항-HEL 항체 (total IgG, Ig G1, Ig G2a)의 역가를 확인하기 위해 ELISA를 수행하였다(도 11a 및 도 11b).

[0159] 그 결과, SACT4501(O)(또는 MB-ODN 4531(O)CT)-리포좀 복합체는 면역세포의 자극을 통해 세포성 면역반응뿐만 아니라 체액성 면역반응도 증가시키는 면역어쥬번트로서의 역할을 한다는 것이 입증되었다. 또한, SACT4501(O)-리포좀 복합체는 Th1 면역반응 특이적인 IgG2a의 항체 생산에 효과적임을 보여주고 있다.

[0160] **실시예 12: *인 비보*에서의 아토피 피부염의 치료 효과 분석**

[0161] 아토피 피부염의 동물모델로서 NC/Nga 마우스를 사용하였다. NC/Nga 마우스의 피부에 DNFB를 도포하여 아토피 피부염을 유도하였다. NC/Nga 마우스를 각각 5마리씩 SACT4501(O)-처치, MB-ODN 4531(O)CT-처치 및 비-처치의 세 그룹으로 나누었다. SACT4510(O) 또는 MB-ODN 4531(O)CT를 마우스 등의 아토피 부위에 2일 간격으로 7번 도포하였다. 비-처치 그룹은 본 발명의 ODNs 첨가 없이 같은 조건으로 도포하였다. 마우스의 등 피부를 적출한 후 H&E 염색으로 아토피 피부염의 치료 효과를 분석하였다. 또한 톨루이딘 블루 염색으로 비만세포(mast cell)의 분포를 측정하였다. SACT4501(O)와 MB-ODN 4531(O)CT를 도포한 마우스의 아토피 부위에서, 과각화증(hyperkeratosis) 및 극세포증(acanthosis)이 현저히 감소되었고, 진피(dermis) 내 림프구의 침윤의 감소되었으며, 따라서 아토피 피부염이 호전되는 것을 확인하였다(도 12).

[0162] **참고문헌**

[0163] 1. Janeway, C.A. Jr., et al., Semin. Immunol. 10:349-350(1998).

[0164] 2. Aderem, A., et al., Nature 406:782-787(2000).

[0165] 3. Hemmi, H., et al., Nature 408:740-745(2000).

[0166] 4. Tokunaga, T., et al., J. Natl. Cancer Inst. 72:955-962(1984).

[0167] 5. Messina, J.P., et al.,. J. Immunol. 147: 1759-1764(1991).

[0168] 6. Krieg, A.M., et al., Nature 374:546-549(1995).

[0169] 7. Ballas, Z.K., et al., J. Immunol. 157:1840-1845(1996).

[0170] 8. Cowdery, J.S., et al., J. Immunol. 156:4570-4575(1996).

[0171] 9. Stacey, K.J., et al., J. Immunol. 157:2116-2122(1996).

[0172] 10. Klinman, D.M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:2879-2883(1996).

[0173] 11. Hartmann, G., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:9305-9310(1999).

[0174] 12. Hartmann, G., et al., J. Immunol. 164:944-952(2000).

[0175] 13. Liang, H. Nishioka, et al., J. Clin. Invest. 98:1119-1129(1996).

[0176] 14. Zimmermann, S., et al., J. Immunol. 160:3627-3630(1998).

[0177] 15. Broide, D., et al., J. Immunol. 161:7054-7062(1998).

[0178] 16. Krieg, A.M., et al., Curr. Opin. Mol. Ther. 3:15-24(2001).

[0179] 17. Ballas, Z.K., et al., J. Immunol. 167:4878-4886(2001).

[0180] 18. Stein, C.A., et al., Nucleic Acids Res. 16:3209-3221(1998).

[0181] 19. Zhao, Q., et al., Antisense Res. Dev. 3:53-66(1993).

[0182] 20. Zhao, Q., et al., Blood 84:3660-3666(1994).

[0183] 21. Deng, G.M., et al., Nat. Med. 5:702-705(1999).

[0184] 22. Lipford, G.B., et al., J. Immunol. 165:1228-1235(2000).

[0185] 23. Tsunoda, I., et al., Brain Pathol. 9:481-493(1999).

[0186] 24. Heikenwalder, M., et al., Nat. Med. 10:187-192(2004).

[0187] 25. Lee, K. W., et al., Mol. Immunol. 43:2107-2118(2006).

[0188] 26. Krieg, A. M. et al., Annu. Rev. Immunol. 20:709-760(2002).

[0189] 27. Haas, T., et al., Immunity 28:315-323(2008).

[0190] 28. Yasuda, K., et al., J. Immunol. 174:6129-6136(2005).

[0191] 29. Egholm, M., et al., Nature 365:566-568(1993).

[0192] 30. Simoes, S., et al., Adv. Drug. Deliv. Rev. 56:947-965(2004).

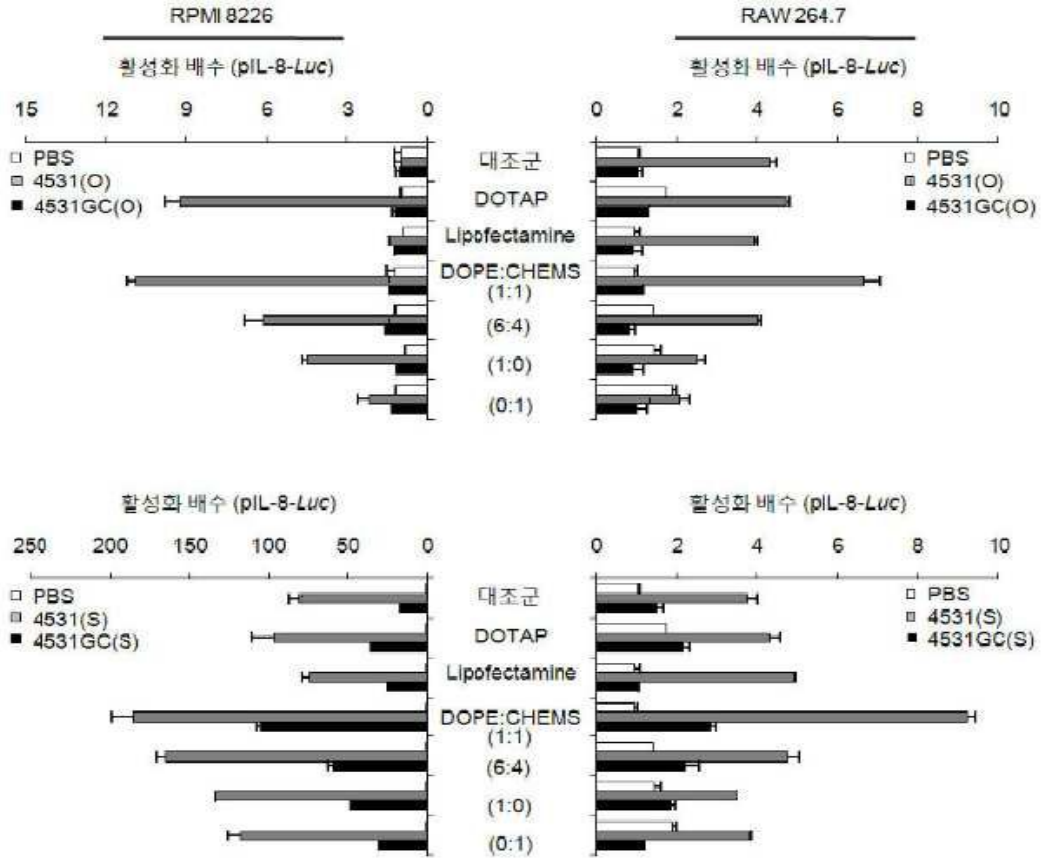
[0193] 31. Gursel, I., et al., J. Immunol. 167:3324-3328(2001).

[0194] 32. Roberts, T.L., et al., J. Immunol. 175:3569-3576(2005).

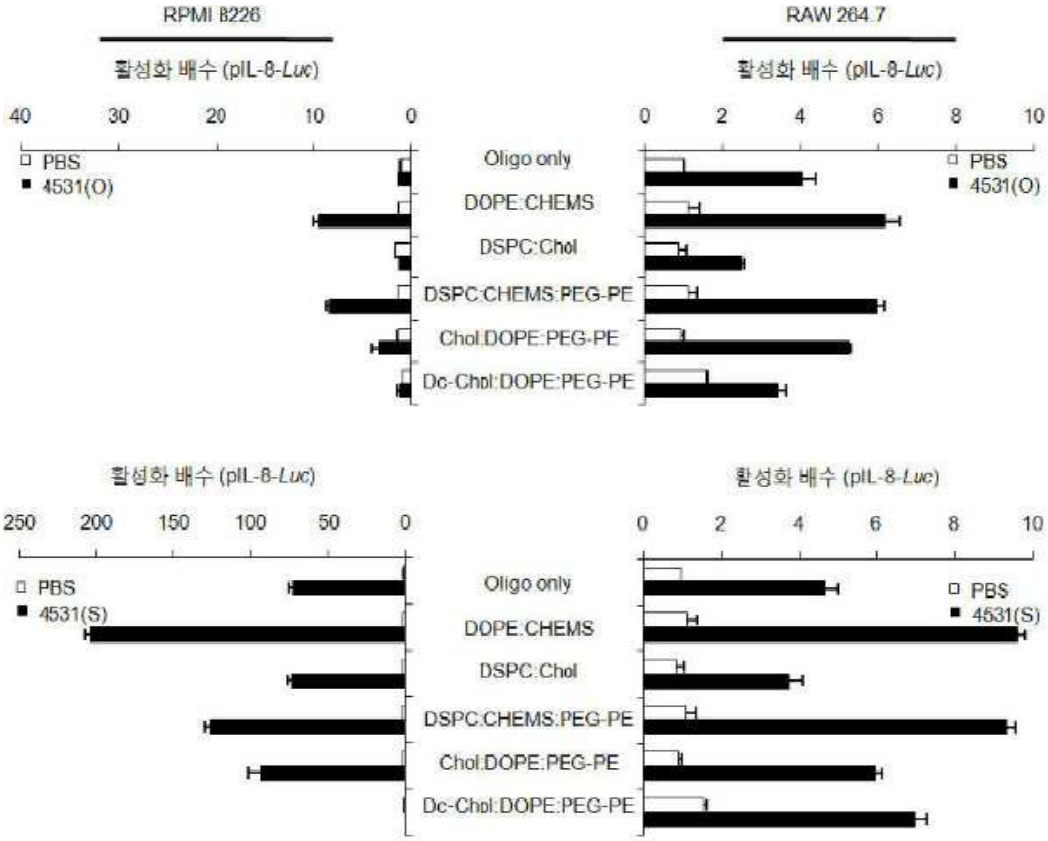
[0195] 33. Hoffmann, E., et al., Vaccine 20:3165-3170 (2002).

도면

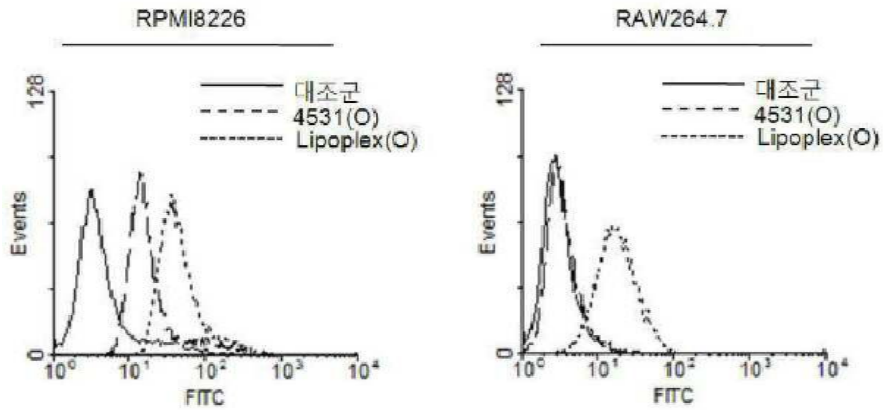
도면1a


RPMI 8226
RAW 264.7
활성화 배수 (pIL-8-Luc)
활성화 배수 (pIL-8-Luc)
15 12 9 6 3 0
0 2 4 6 8 10
PBS
4531(O)
4531GC(O)
대조군
DOTAP
Lipofectamine
DOPE:CHEMS
(1:1)
(6:4)
(1:0)
(0:1)
PBS
4531(O)
4531GC(O)
활성화 배수 (pIL-8-Luc)
활성화 배수 (pIL-8-Luc)
250 200 150 100 50 0
0 2 4 6 8 10
PBS
4531(S)
4531GC(S)
대조군
DOTAP
Lipofectamine
DOPE:CHEMS
(1:1)
(6:4)
(1:0)
(0:1)
PBS
4531(S)
4531GC(S)

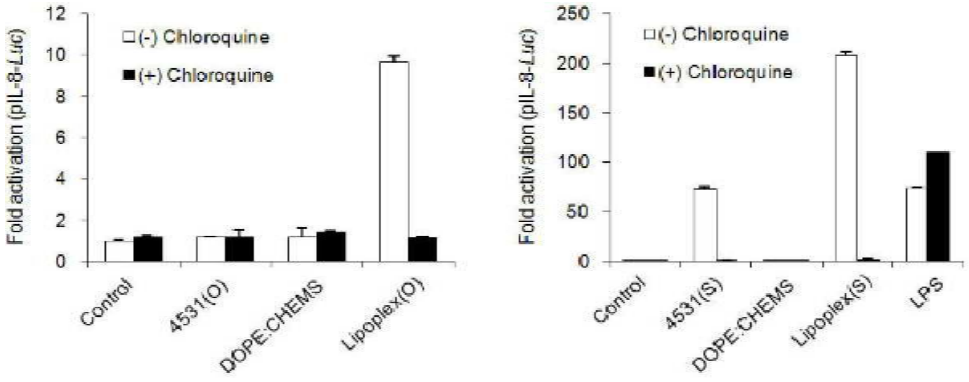
도면1b


RPMI 8226
RAW 264.7
활성화 배수 (pIL-8-Luc)
활성화 배수 (pIL-8-Luc)
40 30 20 10 0
0 2 4 6 8 10
PBS
4531(O)
Oligo only
DOPE:CHEMS
DSPC:Chol
DSPC:CHEMS:PEG-PE
Chol:DOPE:PEG-PE
Dc-Chol:DOPE:PEG-PE
PBS
4531(O)
활성화 배수 (pIL-8-Luc)
활성화 배수 (pIL-8-Luc)
250 200 150 100 50 0
0 2 4 6 8 10
PBS
4531(S)
Oligo only
DOPE:CHEMS
DSPC:Chol
DSPC:CHEMS:PEG-PE
Chol:DOPE:PEG-PE
Dc-Chol:DOPE:PEG-PE
PBS
4531(S)

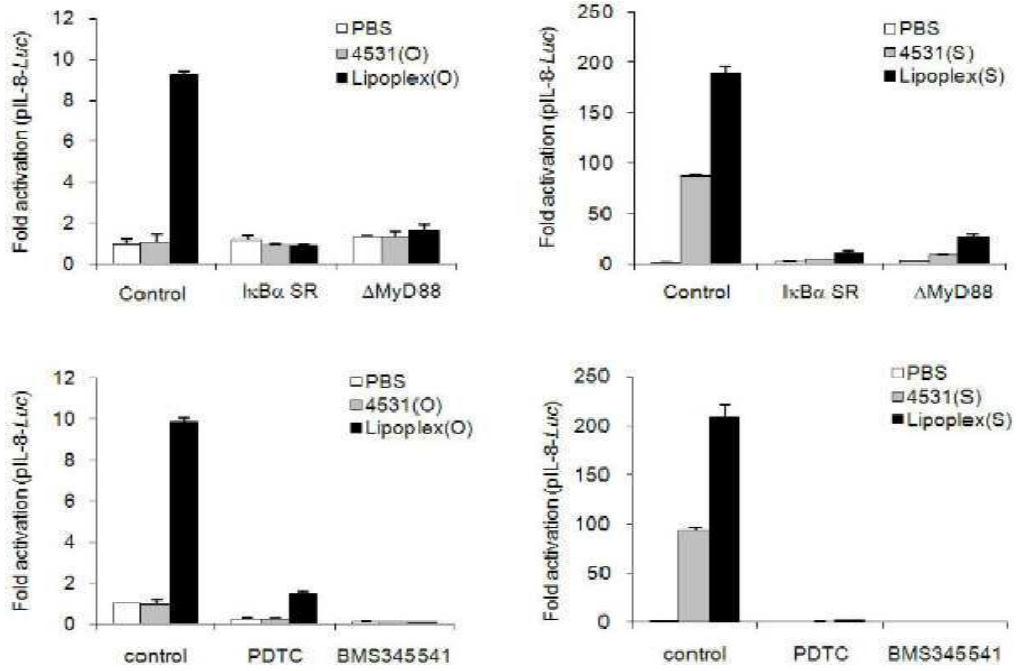
도면2a


RPMI8226
RAW264.7
대조군
4531(O)
Lipoplex(O)
Events
128
0
FITC
대조군
4531(O)
Lipoplex(O)
Events
128
0
FITC

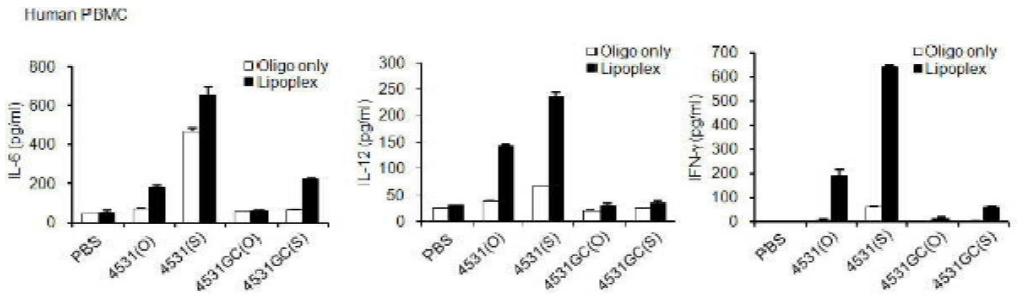
도면2b



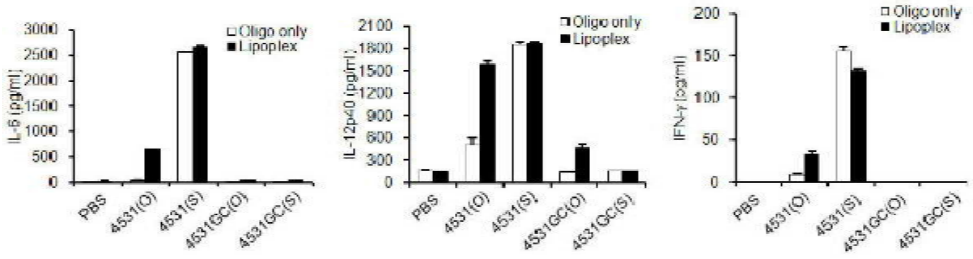
도면2c



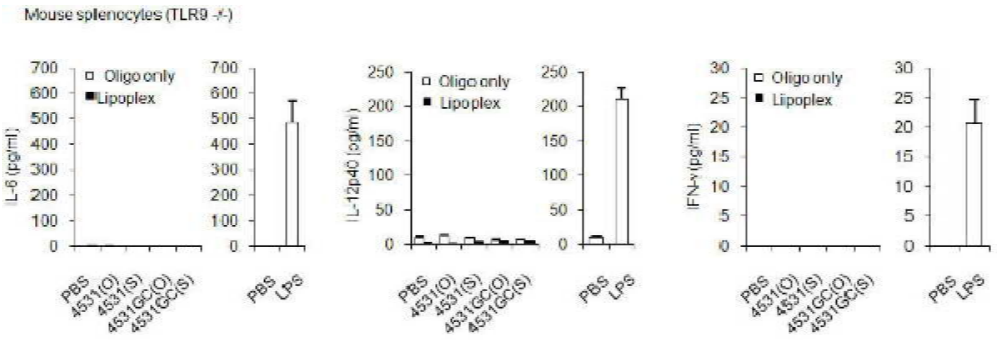
도면3a



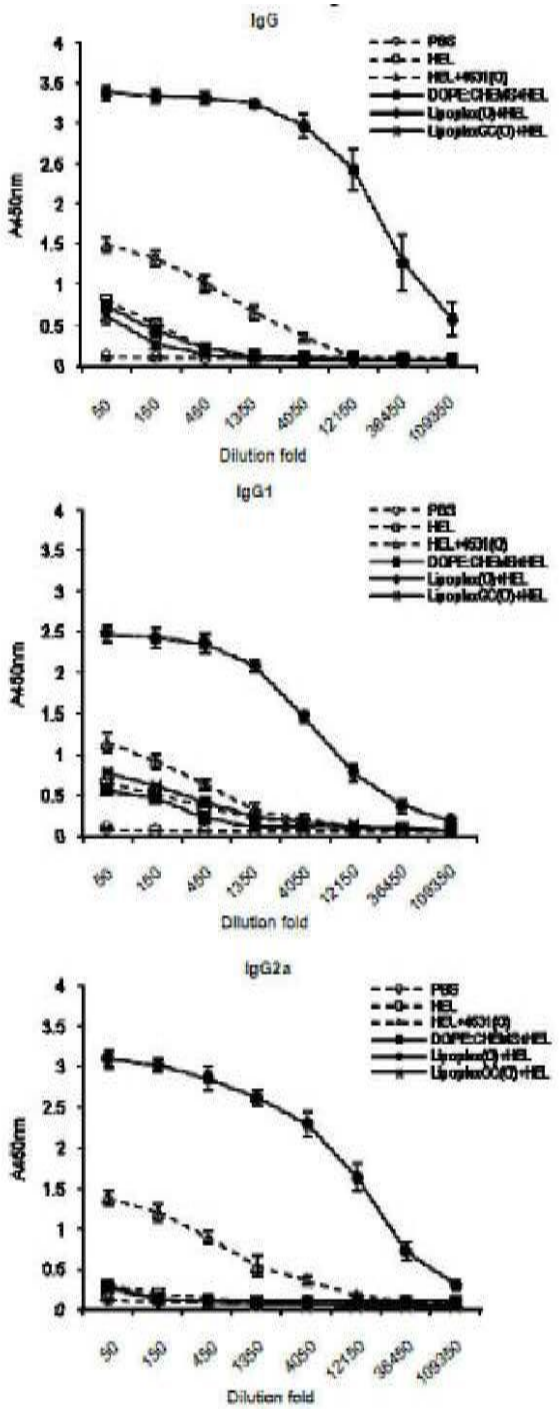
도면3b


IL-6 (pg/ml)
Oligo only
Lipoplex
PBS
4531(O)
4531(S)
4531GC(O)
4531GC(S)
IL-12p40 (pg/ml)
IFN-γ (pg/ml)

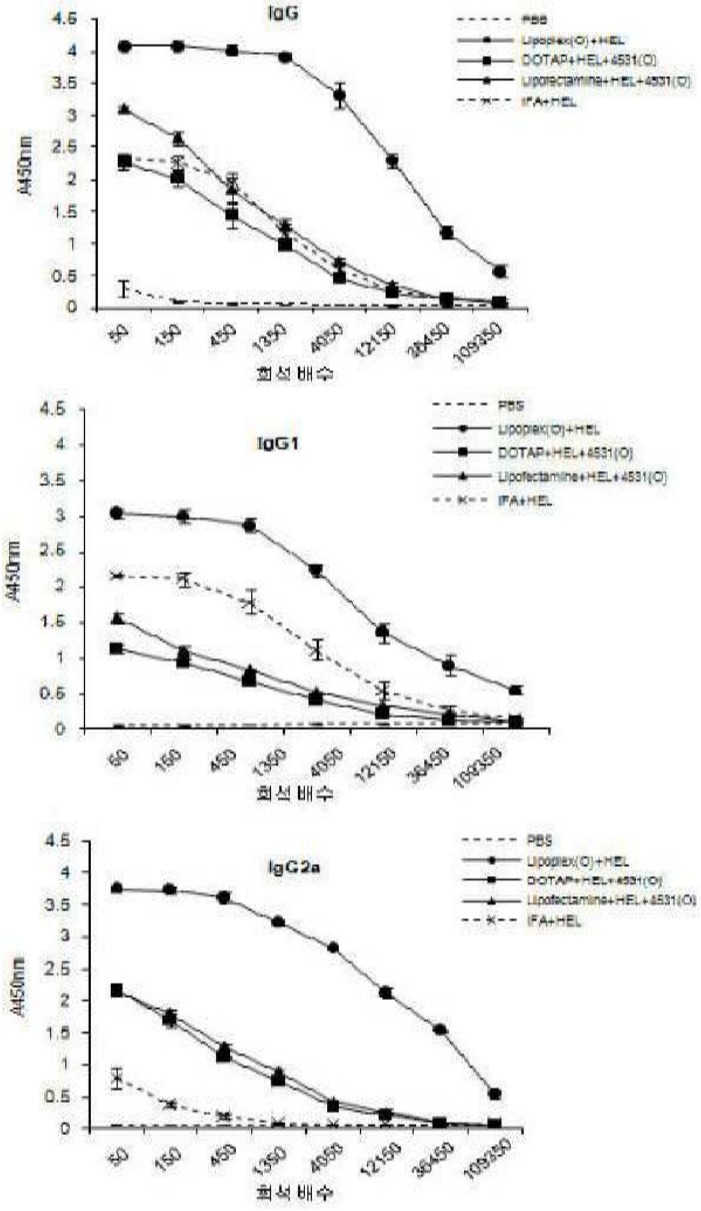
도면3c


Mouse splenocytes (TLR9 -/-)
L-6 (pg/ml)
Oligo only
Lipoplex
PBS
4531(O)
4531(S)
4531GC(O)
4531GC(S)
LPS
IL-12p40 (pg/m)
IFN-γ (pg/ml)

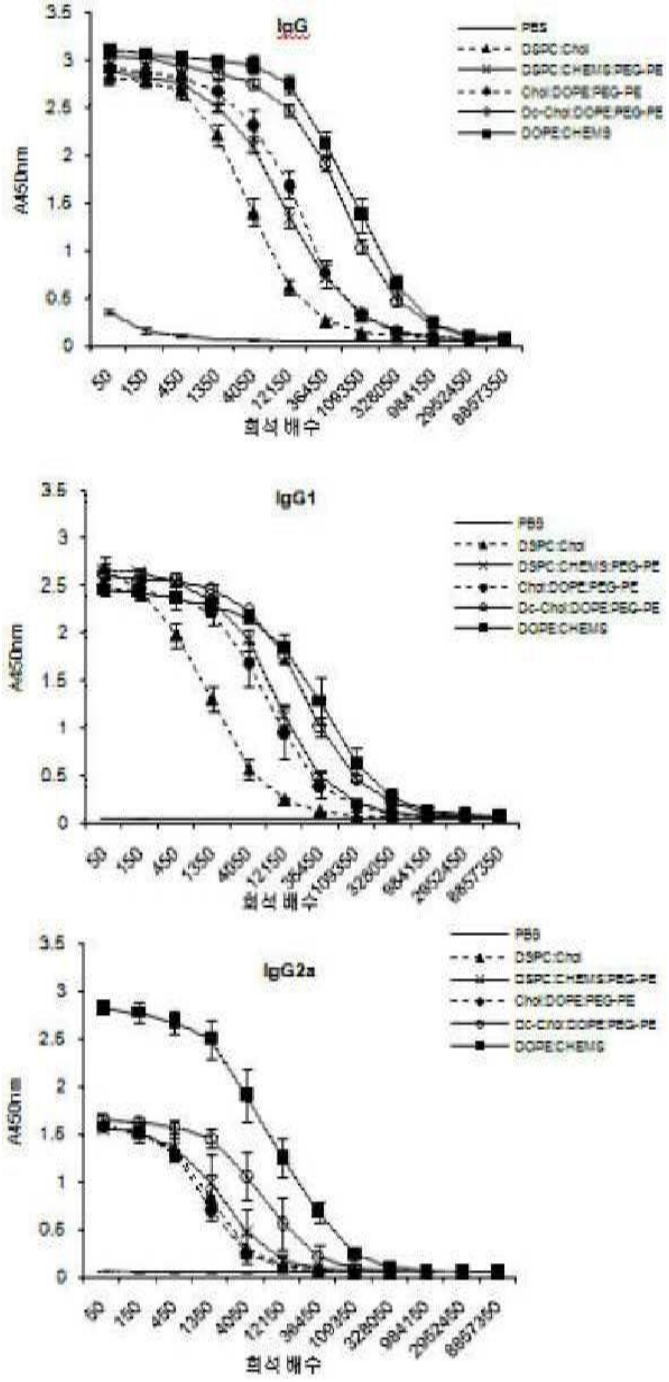
도면4a


IgG
PBS
HEL
HEL+4631(0)
DOPE:CHEMS4HEL
Lipoplex(0)+HEL
LipoplexGC(0)+HEL
A450nm
Dilution fold
IgG1
PBS
HEL
HEL+4631(0)
DOPE:CHEMS4HEL
Lipoplex(0)+HEL
LipoplexGC(0)+HEL
A450nm
Dilution fold
IgG2a
PBS
HEL
HEL+4631(0)
DOPE:CHEMS4HEL
Lipoplex(0)+HEL
LipoplexGC(0)+HEL
A450nm
Dilution fold

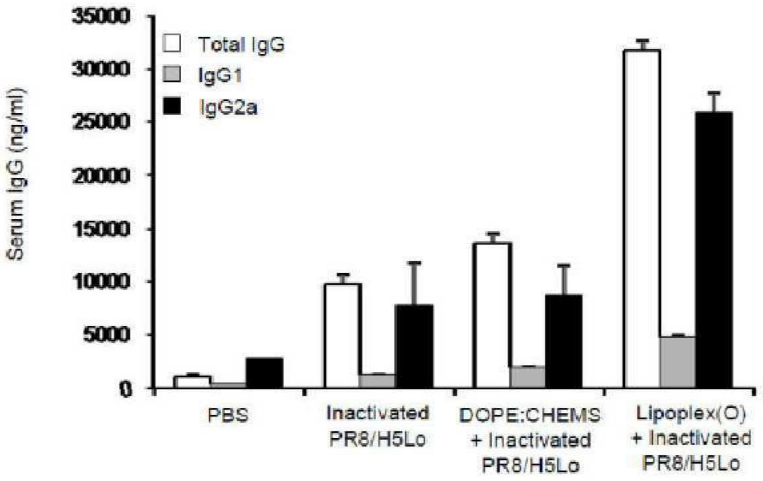
도면4b


IgG
PBS
Lipoplex(O)+HEL
DOTAP+HEL+4531(O)
Lipofectamine+HEL+4531(O)
IFA+HEL
A450nm
희석배수
IgG1
IgG2a

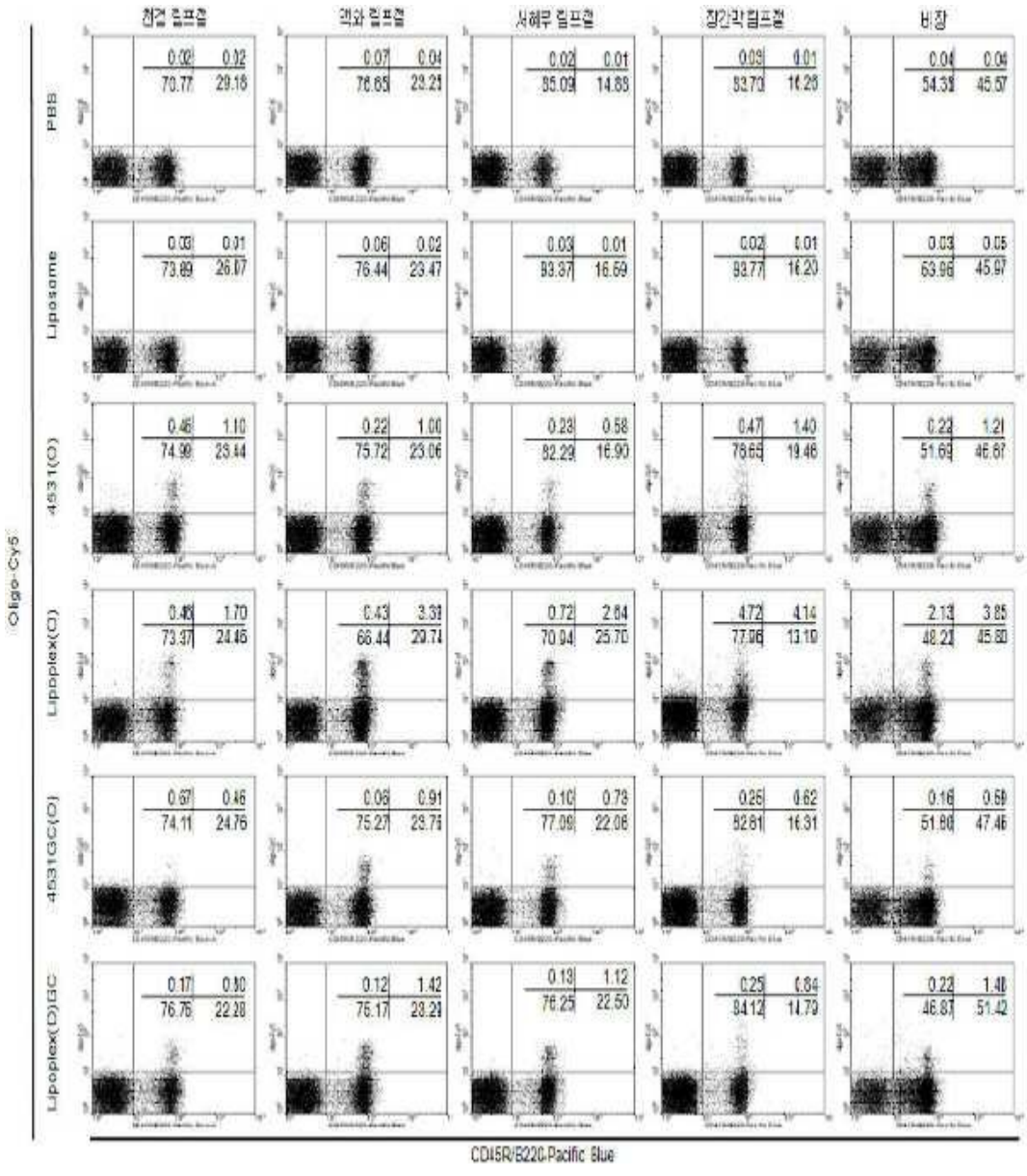
도면4c


IgG
IgG1
IgG2a
A450nm
희석배수
PBS
DSPC:Chol
DSPC:CHEMS:PEG-PE
Chol:DOPE:PEG-PE
Dc-Chol:DOPE:PEG-PE
DOPE:CHEMS

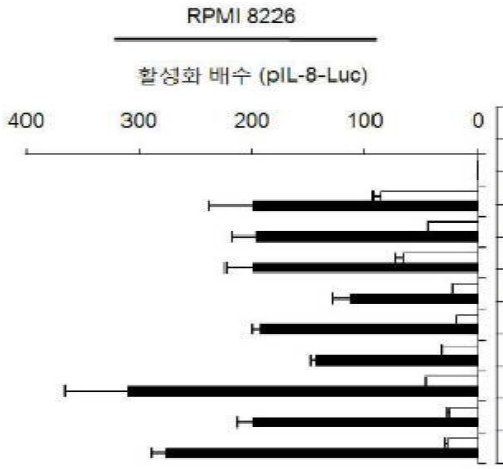
도면5


35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
Serum IgG (ng/ml)
Total IgG
IgG1
IgG2a
PBS
Inactivated PR8/H5Lo
DOPE:CHEMS + Inactivated PR8/H5Lo
Lipoplex(O) + Inactivated PR8/H5Lo

도면6

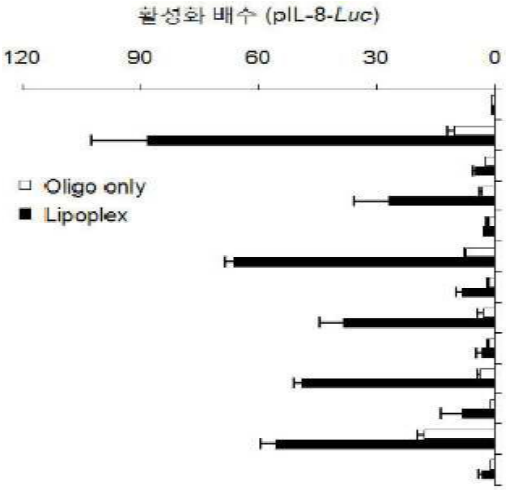

혈액 림프절
췌와 림프절
서혜부 림프절
장간막림프절
비장
PBS
Liposome
4531(O)
Lipoplex(O)
4531GC(O)
Lipoplex(O)GC
Oligo-Cy5
CD45R/B220-Pacific Blue

도면7a



ODN	서열
대조군	
4531(S)	AGC AGC GTT CGT GTC GGC CT
4505(S)	GGA GTC GAT CGT CAC GCT TG
4507(S)	TAT GTC GTT CGA GTC GTC TT
4508(S)	CAG TTC GTG CGG GTC GTG CC
4517(S)	GTA GTC GTA CGA CAC GAT CA
5511(S)	CAT TCG GTG CGT GTC GAG GC
5512(S)	TAT TCG GTT CGG TTC GCC AA
5513(S)	TTT GCG TTT CGG GTC GGT GT
5514(S)	ACA GCG TTT CGG GTC GGT CA

도면7b



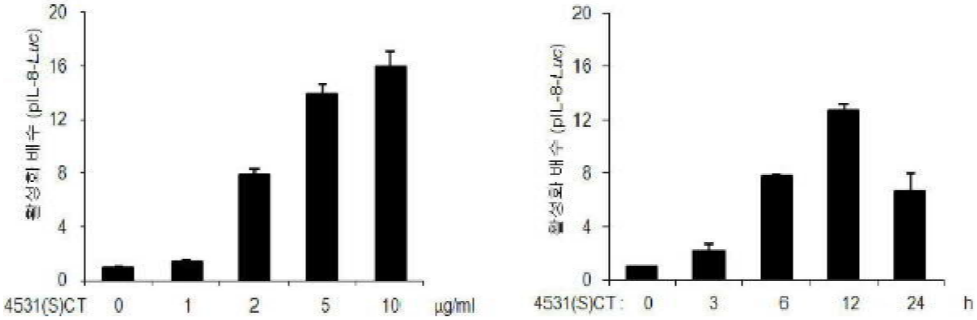
ODN	서열
대조군	
4531(S)T13	AGC AGC GTT CGT G
4531(S)T13_AA	AGC AGA ATT AAT G
4505(S)T13	GGA GTC GAT CGT C
4505(S)T13_AA	GGA GTA AAT AAT C
4507(S)T13	TAT GTC GTT CGA G
4507(S)T13_AA	TAT GTA ATT AAA G
4508(S)T13	CAG TTC GTG CGG G
4508(S)T13_AA	CAG TTA ATG AAG G
5511(S)T13	CAT TCG GTG CGT G
5511(S)T13_AA	CAT TAA GTG AAT G
5513(S)T13	TTT GCG TTT CGG G
5513(S)T13_AA	TTT GAA TTT AAG G

도면8a

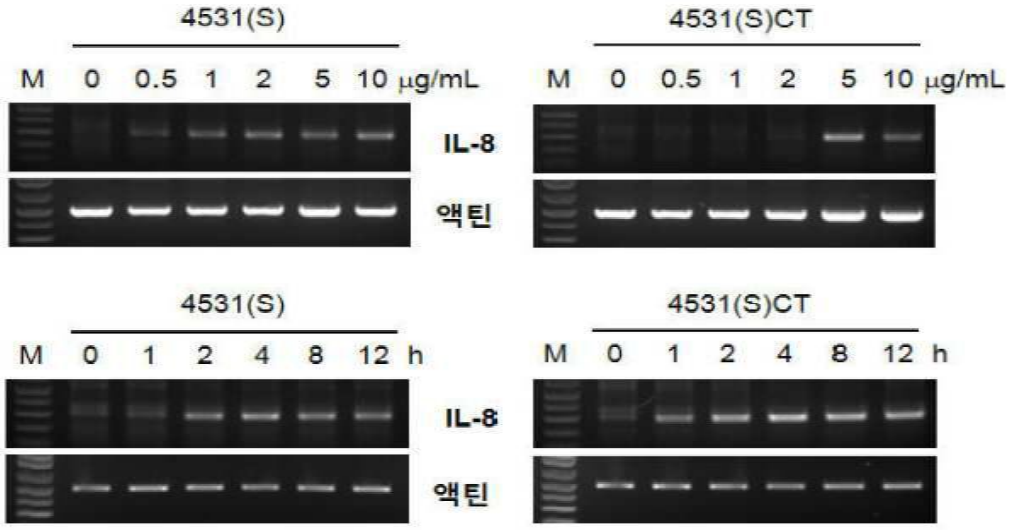


ODN	서열
대조군	
4531(S)CG	AGC AGC GTT CGT GTC GGC CT
4531(S)CT	AGC AGC TTT CTT GTC TGC CT
4531(S)CA	AGC AGC ATT CAT GTC AGC CT
4531(S)CC	AGC AGC CTT CCT GTC CGC CT

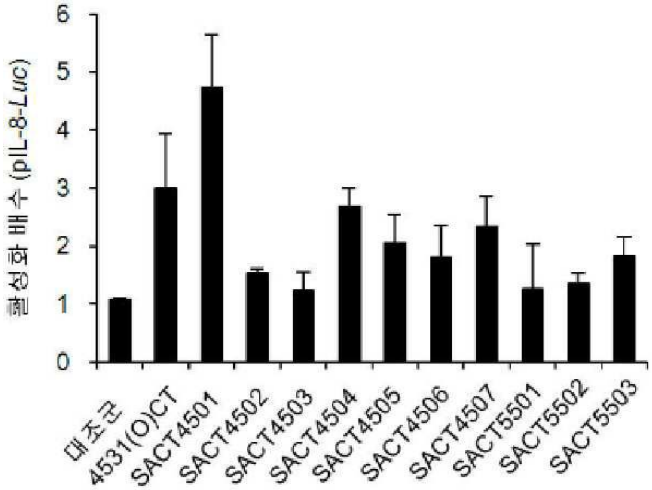
도면8b



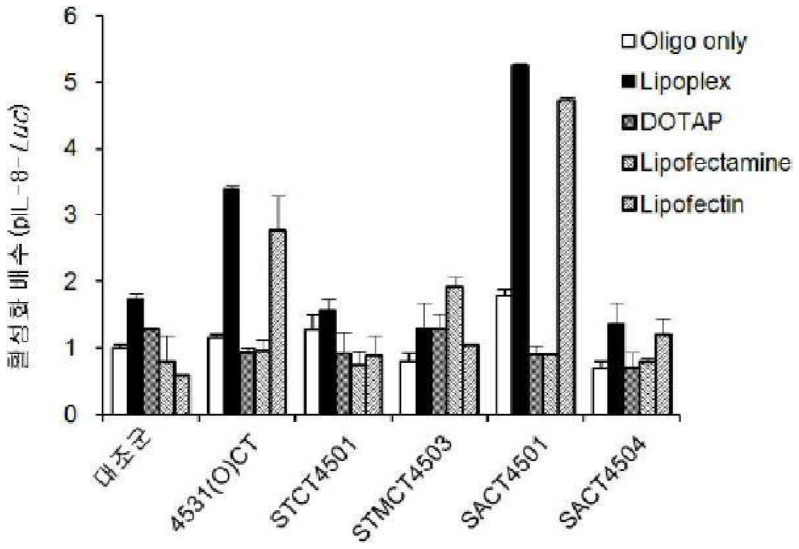
도면8c



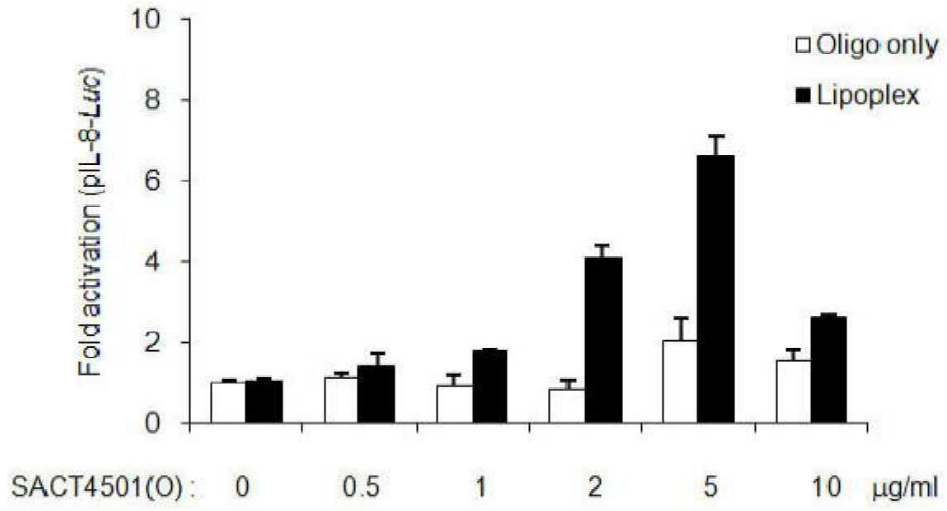
도면9a



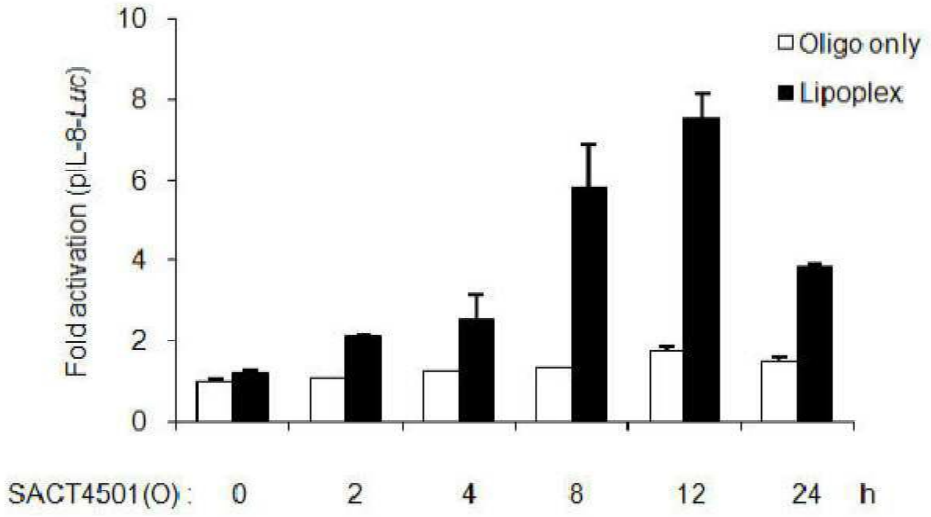
도면9b


활성화 배수 (pIL-8-Luc)
0
1
2
3
4
5
6
Oligo only
Lipoplex
DOTAP
Lipofectamine
Lipofectin
대조군
4531(O)CT
STCT4501
STMCT4503
SACT4501
SACT4504

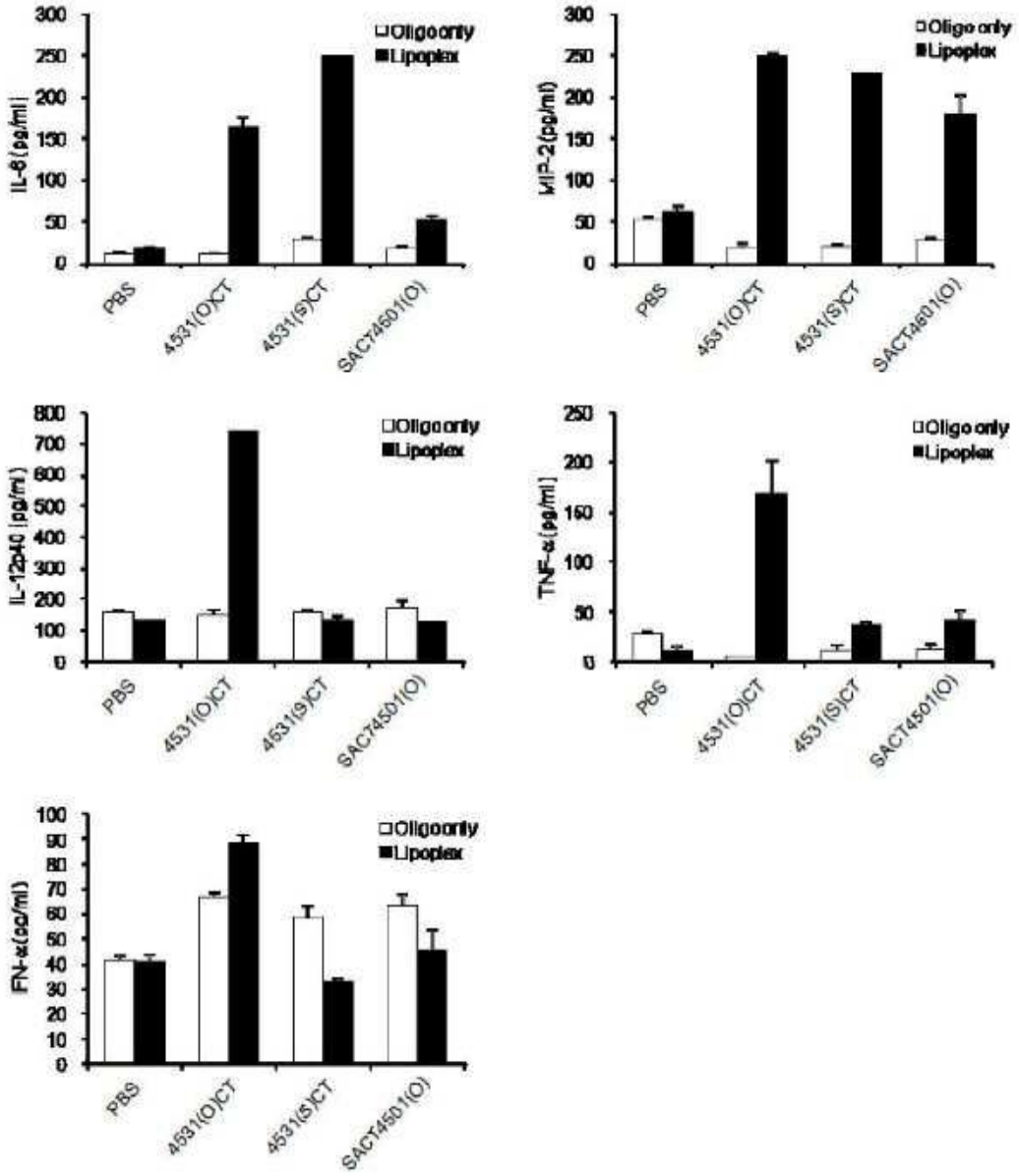
도면9c


Fold activation (pIL-8-Luc)
0
2
4
6
8
10
Oligo only
Lipoplex
SACT4501(O) : 0 0.5 1 2 5 10 μg/ml

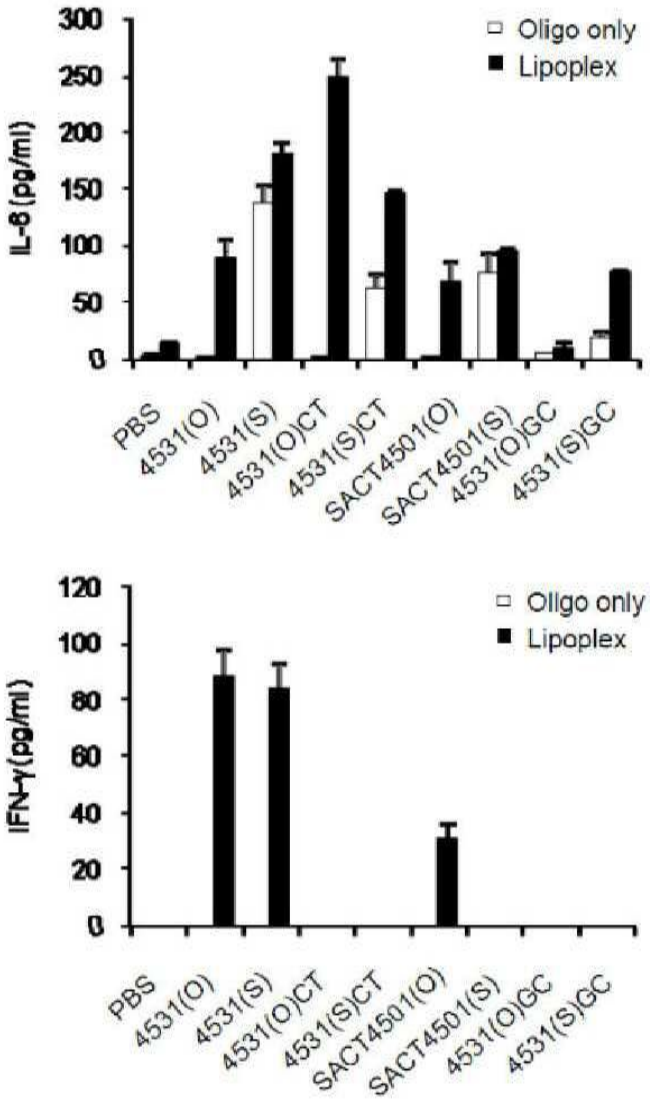
도면9d


Fold activation (pIL-8-Luc)
10
8
6
4
2
0
Oligo only
Lipoplex
SACT4501(O) :
0
2
4
8
12
24
h

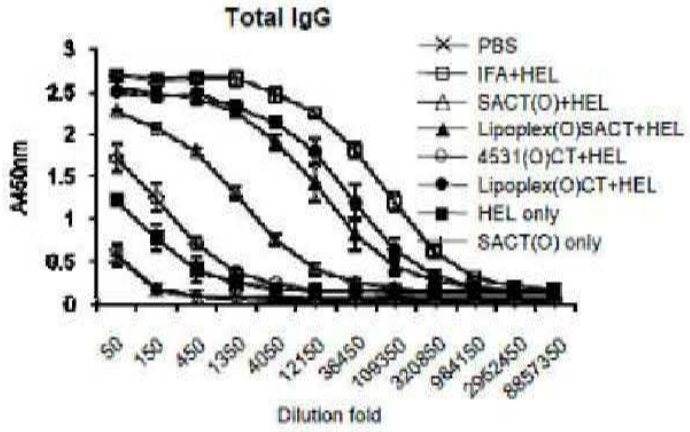
도면10a

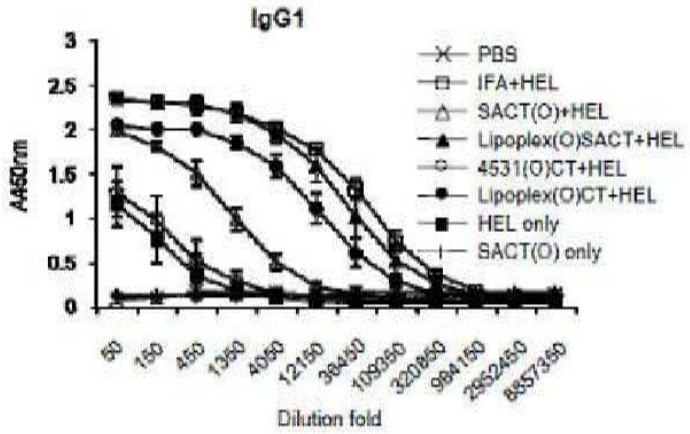

IL-6 (pg/ml)
IL-12p40 (pg/ml)
IFN-α(pg/ml)
Oligo only
Lipoplex
PBS
4531(O)CT
4531(S)CT
SACT4501(O)

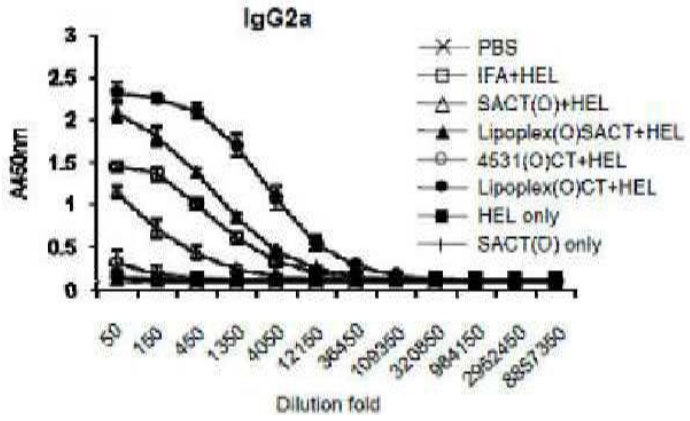
도면10b


Oligo only
Lipoplex
IL-6 (pg/ml)
300
250
200
150
100
50
0
PBS
4531(O)
4531(S)
4531(O)CT
4531(S)CT
SACT4501(O)
SACT4501(S)
4531(O)GC
4531(S)GC
Oligo only
Lipoplex
IFN-γ (pg/ml)
120
100
80
60
40
20
0
PBS
4531(O)
4531(S)
4531(O)CT
4531(S)CT
SACT4501(O)
SACT4501(S)
4531(O)GC
4531(S)GC

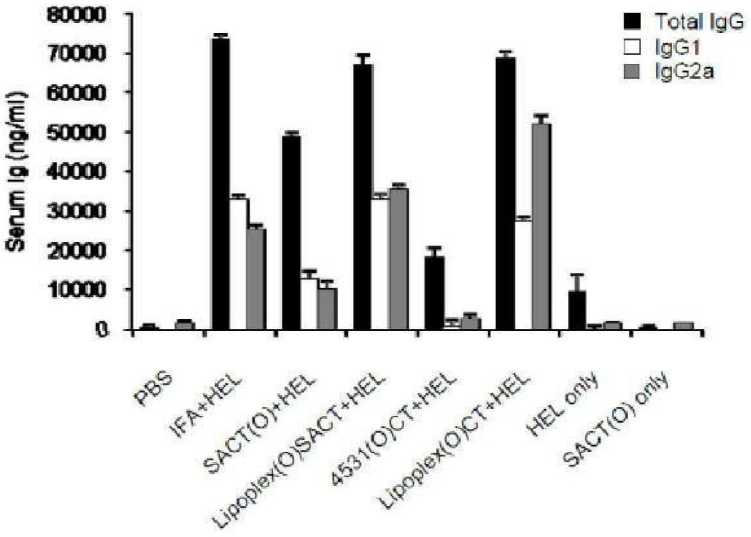
도면11a


Total IgG
A450nm
Dilution fold
PBS
IFA+HEL
SACT(O)+HEL
Lipoplex(O)SACT+HEL
4531(O)CT+HEL
Lipoplex(O)CT+HEL
HEL only
SACT(O) only

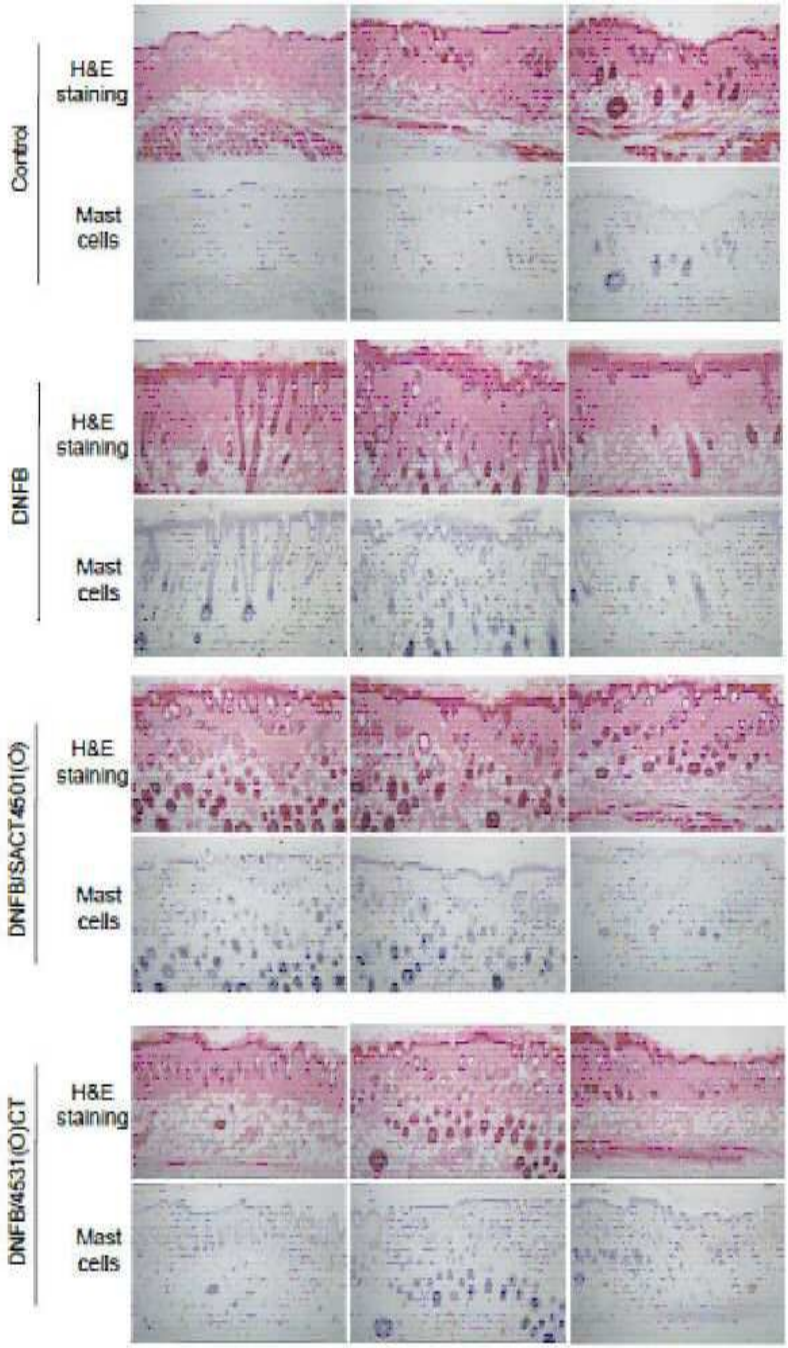

IgG1
A450nm
Dilution fold
PBS
IFA+HEL
SACT(O)+HEL
Lipoplex(O)SACT+HEL
4531(O)CT+HEL
Lipoplex(O)CT+HEL
HEL only
SACT(O) only


IgG2a
A450nm
Dilution fold
PBS
IFA+HEL
SACT(O)+HEL
Lipoplex(O)SACT+HEL
4531(O)CT+HEL
Lipoplex(O)CT+HEL
HEL only
SACT(O) only

도면11b


Total IgG
IgG1
IgG2a
Serum Ig (ng/ml)
80000
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
PBS
IFA+HEL
SACT(O)+HEL
Lipoplex(O)SACT+HEL
4531(O)CT+HEL
Lipoplex(O)CT+HEL
HEL only
SACT(O) only

도면12



서 열 목 록

<110> Industry Academic Cooperation Foundation Hallym University

<120> Immunostimulatory Compositions Comprising Liposome-encapsulated Oligonucleotide as Active Ingredients

<160> 49

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Mycobacterium bovis

<400> 1

agcagcgttc gtgtcggcct 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CT-ODN

<400> 2

catttctttc ttttcttgtt 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CT-ODN

<400> 3

ttcatctaac ttttctttat 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CT-ODN

<400> 4

agacactttc ttttcttcat 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CT-ODN

<400> 5

tcaaactttc taaactttca 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CT-ODN

<400> 6

agtatcttgc ttttcttttg 20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CT-ODN

<400> 7

atcgactttc ttttcttcca 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CT-ODN

<400> 8

taatgctttc tttgctgcag 20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CT-ODN

<400> 9

tggatctacc ttttctttca 20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CT-ODN

<400> 10

aaatactttc taatctatgt 20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CT-ODN

<400> 11

tagatctttc ttcacttgtt 20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CT-ODN

<400> 12

cataactttc ttcacttttg 20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CT-ODN

<400> 13

tggatctttc ttcactaatt 20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CT-ODN

<400> 14

aatttctttc tatactcaag 20

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CT-ODN

<400> 15

ataatctatc ttttctattt 20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CT-ODN

<400> 16

acatactttc taaactgtag 20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CT-ODN

<400> 17

tttttcttgc ttttctaaaa 20

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CT-ODN

<400> 18

cgatgctaac ttttctatca 20

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CT-ODN

<400> 19

attgtctttc ttatctttag 20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CT-ODN

<400> 20

catttctatc tttcctttcg 20

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CT-ODN

<400> 21

gttaactatc ttatctttaa 20

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CT-ODN

<400> 22

tttgcctacc tcatctcgtg 20

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CT-ODN

<400> 23

tttgactagc tagcctaggt 20

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CT-ODN

<400> 24

attacttttc ttttctttaa 20

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CT-ODN

<400> 25

ttatcttttc tattcttttt 20

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CT-ODN

<400> 26

tatgctttgc ttttctttga 20

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CT-ODN

<400> 27

tatgcttttc taatcttttt 20

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CT-ODN

<400> 28

ttttctaaac tttacttttg 20

<210> 29

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CT-ODN

<400> 29

atttctttac ttttctcata 20

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CT-ODN

<400> 30

ttatctttgc tttacttatt 20

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CT-ODN

<400> 31

aaatctttac tatgctttgc 20

<210> 32

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CT-ODN

<400> 32

aattcttatc taaactttgc 20

<210> 33

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CT-ODN

<400> 33

ccaactatgc ttttctaatc 20

<210> 34

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CT-ODN

<400> 34

taacctttac ttttcttaaa 20

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CT-ODN

<400> 35

tgttcttgac tgttcttttg 20

<210> 36

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CT-ODN

<400> 36

tatcctcaac tttactttca 20

<210> 37

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CT-ODN

<400> 37

tatgctgagc taatctttca 20

<210> 38

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CT-ODN

<400> 38

atgcctgttc tttacttgtg 20

<210> 39

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CT-ODN

<400> 39

atgtcttttc ttaacttttc 20

<210> 40

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CT-ODN

<400> 40

aattcttcac tcaacttttt 20

<210> 41

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CT-ODN

<400> 41

ttaacttttc ttaactgaac 20

<210> 42

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CT-ODN

<400> 42

tttactatgc tttgctaaat 20

<210> 43

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CT-ODN

<400> 43

gtggcttttc tttcctgttg 20

<210> 44

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CT-ODN

<400> 44

ttccctgatc tcgacttcgt 20

<210> 45

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CT-ODN

<400> 45

tcgtctgcgc taggctgcca 20

<210> 46

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CT-ODN

<400> 46

atagactttc ttatcttgat 20

<210> 47

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CT-ODN

<400> 47

catttcttgc ttgtcttttt 20

<210> 48

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CT-ODN

<400> 48

accaacttgc tggtctttcc 20

<210> 49

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CT-ODN

<400> 49

agcagctttc ttgtctgcct 20