(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl.[7]
A61K 31/7088
C12N 15/11
A61K 48/00

(11) 공개번호 10-2005-0009697
(43) 공개일자 2005년01월25일

(21) 출원번호 10-2004-7016862
(22) 출원일자 2004년10월20일
번역문 제출일자 2004년10월20일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2003/001488
(87) 국제공개번호 WO 2003/089642
(86) 국제출원출원일자 2003년04월22일
(87) 국제공개일자 2003년10월30일

(30) 우선권주장 60/374,540 2002년04월22일 미국(US)

(71) 출원인 바이오니취 라이프 사이언시즈 인코포레이티드
캐나다 온타리오 케이8엔 5제이2 벨빌시 이스트 둔다스 스트리트 231

(72) 발명자 필립스니겔씨.
캐나다 퀘벡 에이치9알 1제이6 쁘왕뜨-끌레르 세뇨리 애버뉴 101

필리온마리오씨.
캐나다 퀘벡 에이치7이 3와이6 라벌 장-드 브레보프 스트리트 1145

(74) 대리인 차윤근

심사청구 : 없음

(54) 올리고뉴클레오티드 조성물 및 면역 반응 조절시 이의 용도

요약

본 발명은 개체내 면역 반응을 활성화하는, 보다 바람직하게는 개체내 항원 제시 세포를 활성화하는 3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드 서열 조성물 및 방법에 관한 것이다. 일 구체예에서, 항원 제시 세포는 수지상 세포이다. 본 발명은 또한 시험관내 수지상 세포를 활성화하는 조성물 및 방법을 포함한다. 그 다음 이들 수지상 세포는 개체에 투여될 수 있다. 바람직한 3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드 서열은 6개의 염기를 포함하며, 여기서 염기의 적어도 50%는 구아닌이고 5' 염기도 구아닌이다. 조성물은 포스포디에스테르 또는 포스포로티오에이트 주쇄를 포함할 수 있다.

색인어

3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드 서열, 면역 반응, 자극, 수지상 세포, 항원

명세서

기술분야

본 발명은 3'-OH, 5'-OH 포스포로티오에이트 및 포스포디에스테르 폴리뉴클레오티드를 포함하는 조성물과 면역 반응 조절시 이의 용도에 관한 것이다.

배경기술

수지상 세포(dendritic cells; DC)는 1차 면역 반응의 개시와 관련된 항원 제시 세포(antigen-presenting cells; APC)이다. 이들의 기능은 성숙 단계에 따라 변화한다. 미성숙 DC는 천연 단백질 항원을 처리하는 데는 매우 효과적이지만, 항원을 제시하기에 충분한 세포 표면 MHC 클래스 II 및 보조 자극 분자는 부족하다. 성숙 DC는 제시를 위한 새로운 단백질을 포획하는 능력은 덜하지만, 휴지기의 CD4 및 CD8 T 림프구 자극에 있어서는 보다 효율적이다. 형태적으로는, 성숙 DC의 세포 크기 및 입도가 더 크다. 성숙 DC에서는 세포 표면 분자인 MHC II, CD40, CD83과 보조 자극 분자인 CD80, CD86의 양이 증가된다. 성숙 DC가 활성화되면, 선천적 및 후천적 면역성을 향상시키는 IL-12가 많은 양으로 합성된다.

합성 올리고뉴클레오티드는 다가음이온성 서열이다. 합성 올리고뉴클레오티드는 핵산, 특이적 세포 단백질, 특이적 핵 단백질, 또는 특이적 세포 표면 수용체에 선택적으로 결합하는 것으로 보고된 바 있다. 비메틸화된 CpG 디뉴클레오티드를 1개 이상 함유한, 8 내지 100개 염기의 합성 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오티드는 면역 시스템을 자극하는 것으로 알려져 있다(미국 특허 번호 6,239,116). 특히, CpG 모티프(5'퓨린-퓨린-시토신-구아닌-피리미딘-피리미딘3')를 함유한 합성 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오티드는 IL-6, IL-12, IFN-감마, TNF-알파, 및 GM-CSF와 같은 시토킨의 합성, 자연 살해 세포(natural killer cells)의 세포 용해 활성, 및 B-림프구의 증식을 자극하는 것으로 밝혀졌다(Krieg, Annu. Rev. Immunol. 2002, 20:709-760). 염기수가 14개 이상인, CpG 모티프를 함유한 합성 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오티드는 수지상 세포의 성숙과 활성(즉, 세포 크기와 입도의 증가; IL-12의 합성; 엔도시토시스의 증가; 및 세포 표면 분자인 MHC II, CD40, CD80, CD83과 CD86의 상승조절)을 유발시키는 것으로 보고된 바 있다(Sparwasser et al. Eur. J. Immunol. 1998, 28:2045-205; Hartman et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999, 96:9305-9310; Askew et al. J. Immunol. 2000, 165:6889-6895). 염기수가 30개인, CpG 모티프를 함유한 합성 포스포디에스테르 올리고뉴클레오티드는 IFN의 합성을 자극하고 DC 전구체 상 CD80과 CD86의 발현을 상승조절하는 것으로 보고된 바 있다(Kadowaski et al. J. Immunol. 2001, 166:2291-2295).

$(G_xT_y)_n$, $(T_yG_x)_n$, a$(G_xT_y)_n$, a$(T_yG_x)_n$, $(G_xT_y)_n$b, $(T_yG_x)_n$b, a$(G_xT_y)_n$b, 및 a$(T_yG_x)_n$b[여기서, x 및 y는 1 내지 7 사이의 정수이고, n은 1 내지 12 사이의 정수이며, a 및 b는 1종 이상의 A, C, G 또는 T이다]로 구성된 그룹에서 선택된, 2 내 지 20개 염기의 3'-OH, 5'-OH 합성 올리고뉴클레오티드를 포함하는 조성물을 앞서 기술했다. 이들 조성물은 세포 주기 정지의 유도, 증식의 억제, 카스파제 활성의 유도, 세포사멸의 유도, 및 단구와 말초혈 단핵 세포에 의한 시토킨 합성의 자극으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 반응을 유도한다(PCT 공개 번호 WO 01/44465 참조).

신규 올리고뉴클레오티드 조성물, 및 수지상 세포를 포함하는 면역 세포의 기능을 조절하는 이들 조성물의 사용 방법이 요구된다.

발명의 개요

본 발명은 6개 염기의 3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드를 포함하는 올리고뉴클레오티드 조성물을 제공함으로써 이러한 요구를 충족시킨다. 일 구체예에서, 폴리뉴클레오티드의 인산염 주쇄는 포스포디에스테르 주쇄이다. 또 다른 구체예에서, 폴리뉴클레오티드의 인산염 주쇄는 포스포로티오에이트 주쇄이다. 바람직하게는 3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드는 합성되고, 보다 바람직하게는 3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드는 5'GTGTGT3'(서열번호 1), 5'GGTGGG3'(서열번호 2), 5'GGGTGG3'(서열번호 3), 5'GGGCGG3'(서열번호 4), 5'GGGAGG3'(서열번호 5), 5'GGGGGG3'(서열번호 6), 및 5'GGCCGG3'(서열번호 7)로 구성된 그룹에서 선택된다. 3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드는 사람 또는 동물에 투여되었을 때 면역 반응을 자극한다. 면역 반응은 전신적이거나 국소적일 수 있다. 일 구체예에서, 3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드는 사람 또는 동물에 투여되었을 때 그 안의 APC를 자극했다. 3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드는 또한 APC 자극을 위해서 시험관내 APC에 직접 투여될 수도 있다. 그 다음 자극된 APC를 사람 또는 동물에서의 면역 반응 활성화를 위해 사람 또는 동물에 투여할 수 있다.

본 발명의 3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드는 DC에 투여되었을 때, IL-1 베타, IL-12 또는 IFN-감마 생성의 증가, 세포 크기와 입도의 증가, 엔도시토시스의 증가, 세포 표면 상 CD80, CD83, CD86 또는 MHC II 발현의 증가, 및 세포 표면 상 OX-2 발현의 감소로 구성된 그룹에서 선택된 반응을 유도하는 것에 의해 DC를 자극한다.

본 발명은 추가로, 3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드 및 약학적 허용성 담체를 포함하는 조성물을, 동물 또는 사람에서 면역 반응의 자극을 유도하고, 보다 바람직하게는 동물 또는 사람에서 1종 이상의 APC 자극을 유도하기에 효과적인 양으로 동물 또는 사람에게 투여하는 방법을 제공한다. 바람직한 APC는 DC이다. 또 다른 구체예에서, 3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드 조성물에 더하여 항원을 동물 또는 사람에게 투여하면, 동물 또는 사람에서 항원 특이적 면역 반응을 일으킨다. 바람직한 항원은 종양 항원 및 간염 표면 항원이다. 일부 구체예에서, 1종 이상의 APC의 자극은 동물 또는 사람에서 전신성 면역 반응을 일으킨다. 다른 구체예에서, 면역 반응은 국소적이다. 본 발명은 또한 3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드와 면역조절제 또는 면역조절 양식을 포함하는 조성물을 동물 또는 사람에서 면역 반응의 자

극을 유도하기에 효과적인 양으로 동물 또는 사람에게 투여하는 방법을 포함한다.

본 발명은 또한 3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드 및 약학적 허용성 담체를 포함하는 조성물의, 종양 항원과 같은 항원을 함유한 APC, 및 보다 바람직하게는 DC 에 대한 시험관내 투여를 포함하는 방법을 제공하는데, 이러한 투여는 APC를 자극한다. 상기 방법은 추가로, 동물 또는 사람에서의 면역 반응 자극을 위해, 자극된 APC를 동물 또는 사람에게 도입하는 것을 포함할 수 있다. 6개 염기의 짧은 3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드가 APC(예컨대 DC)를 자극하는 능력은 예기치 못한 놀라운 것으로서 동물 및 사람에게 중대한 혜택을 제공하는 것이다.

본 명세서에 기술된 방법은 암과 같은 질환의 처치, 알레르기의 처치, 각종 병원체에 대한 동물 또는 사람의 예방접종, 자가면역성 질환의 처치, 및 이식수술 거부반응의 예방에 사용할 수 있다. 일부 구체예에서, 본 발명은 IL-12 합성을 증가시킴으로써, 자가면역성 질환의 처치 및 이식수술 거부반응의 예방을 달성한다. IL-12의 합성은 자가면역성 질환, 이식수술 거부반응, 이식편대숙주 질환(graft-versus-host disease; GVHD), 및 알레르기를 억제할 수 있다[예를 들면, Bagenstose et al., J. Immunol. 1998, 160:1612(IL-12에 의한, 자가면역에서의 자가항체 생성 하강조절); Vogel et al., Eur. J. Immunol., 1996, 26:219(IL-12에 의한, 자가면역성 발달과 관련된 B1 림프구, B 림프구 서브셋의 억제); Dey et al., Blood, 1998, 91:3315(IL-12에 의한 이식편대숙주 질환(GVHD)의 억제); Smits et al., Int. Arch Allergy Immunol., 2001, 126-102(알레르기 처치에 있어서, IL-12에 의한 병원성 Th2 면역 프로파일의 Th1 프로파일로의 변형) 참조]. 다른 구체예에서, 본 발명은 예방접종을 통해 자가면역성 질환의 처치 및 이식수술 거부반응의 예방을 달성한다[예를 들면, Zhang et al., J. Mol. Med. 1996, 74:653(자가반응성 질환의 원인이 되는 자가반응성 B 또는 T 림프구에 대한 예방접종); Vignes et al., Eur. J. Immunol., 2000, 30:2460(이식편 거부반응의 원인이 되는 타가반응성 T 림프구에 대한 예방접종); Liu et al., J. Exp. Med., 2002, 196:1013(사멸 세포를 동일계내에서 활성화시킨 DC 세포로 전달하는 것에 의한 면역 내성의 유도) 참조].

따라서, 본 발명의 제1 목적은 사람을 포함하는 동물의 질환을 처치하기에 효과적인 조성물 및 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 제2 목적은 동물 또는 사람에게 예방접종하기에 효과적인 조성물 및 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 제3 목적은 동물 또는 사람의 암을 처치하기에 효과적인 조성물 및 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 제4 목적은 동물 또는 사람에서 면역 반응을 자극하기에 효과적인 조성물 및 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 제5 목적은 동물 또는 사람에서 APC, 및 바람직하게는 DC의 성숙 및/또는 활성화를 유도하기에 효과적인 조성물 및 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 제6 목적은 항원을 함유한 APC의 시험관내 자극을 유도한 다음, 이 자극된 APC를 동물 또는 사람에게 투여하기에 효과적인 조성물 및 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 제7 목적은 DC에 의한 IL-1 베타, IL-12 및/또는 IFN 감마의 생성을 증가시키기에 효과적인 조성물 및 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 제8 목적은 DC의 세포 크기 및/또는 입도를 증가시키기에 효과적 인 조성물 및 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 제9 목적은 DC에 의한 엔도시토시스를 증가시키기에 효과적인 조성물 및 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 제10 목적은 DC의 세포 표면 상 CD40, CD80, CD86, 및/또는 MHC II 양을 증가시키기에 효과적인 조성물 및 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 제11 목적은 DC의 세포 표면 상 OX-2 양을 감소시키기에 효과적인 조성물 및 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 제12 목적은 기타 다른 치료제 또는 면역조절제의 효과를 강화하는 조성물 및 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 제13 목적은 APC, 및 바람직하게는 DC 상에서 1종 이상의 시토킨의 효과를 강화하는 조성물 및 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 제14 목적은 DC 상에서 GM-CSF의 효과를 강화하는 조성물 및 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 이들 및 기타 다른 목적, 특성, 및 이점은 하기 개시된 구체예의 상세한 설명과 첨부된 청구의 범위를 검토한다면 명확해질 것임이 자명하다.

발명의 상세한 설명

본 발명은 6개의 염기를 함유한 분리된 3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 조성물을 제공하는데, 여기서 염기의 적어도 50%는 구아닌이고, 5' 염기도 구아닌이며, 이 조성물은 동물 또는 사람에게 투여되었을 때 그 안에서 면역 반응을 자극한다. 본 발명은 또한, 3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드 및 약학적 허용 성 담체를 포함하는 조성물을, 동물 또는 사람에서 1종 이상의 항원 제시 세포(APC), 또는 바람직하게는 1종 이상의 DC를 자극하기에 효과적인 양으로 동물 또는 사람에게 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 동물 또는 사람에서의 1종 이상의 APC 자극은 전신성 면역 반응이나 국소성 면역 반응을 일으킬 수 있다. 본 발명은 또한, 3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드를 포함하는 조성물을 APC를 자극하기에 효과적인 양으로, 항원을 함유한 APC에 시험관내 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 그 다음, 이들 APC는 면역 반응의 자극을 위해서 약학적 허용성 담체와 함께 동물 또는 사람에게 투여될 수 있다. 동물 또는 사람에게 투여하는 이들 임의의 조성물에는 면역조절제, 부형제, 희석제, 및/또는 담체를 첨가할 수 있다. 본 발명은 또한, 동물 또는 사람에서의 면역 반응 자극 및 시험관내 항원 제시 세포의 자극에 유용한 약물 제조시 3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드의 용도를 포함한다. 6개 염기의 3'-OH, 5'-OH 합성 포스포디에스테르 및 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오티드의 APC(예컨대 DC)의 자극을 유도하는 능력은 예기치 못한 놀라운 것으로서 동물 및 사람에게 중대한 혜택을 제공하는 것이다.

본 명세서에서 사용된 '3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드'라는 용어는 3' 및 5' 양 말단에 히드록시기가 있는 폴리뉴클레오티드를 의미한다. 보다 구체적으로, 본 발명의 3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드는 폴리뉴클레오티드의 3' 말단에 존재하는 당의 3' 탄소에 히드록시기가 결합되어 있고, 폴리뉴클레오티드의 5' 말단에 존재하는 당의 5' 탄소에도 히드록시기가 결합되어 있다. 본 발명의 일 구체예에서, 3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드는 6개의 뉴클레오티드 염기로 이루어져 있다. 바람 직하게는, 3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드는 6개의 뉴클레오티드 염기를 포함하는데, 여기서 이들 뉴클레오티드 염기의 적어도 50%는 구아닌(G)이고, 5' 뉴클레오티드 염기도 G이다. 보다 바람직한 구체예에서, 3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드는 5'GGNNGG3'(서열번호 8) 서열 또는 5'GGGNGG3'(서열번호 9) 서열을 포함하거나 이것으로 구성되는데, 여기서 N은 G, C, A, 또는 T이다. 3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드는 구체적으로는 5'GTGTGT3'(서열번호 1), 5'GGTGGG3'(서열번호 2), 5'GGGTGG3'(서열번호 3), 5'GGCCGG3'(서열번호 4), 5'GGGGGG3'(서열번호 5), 5'GGGAGG3'(서열번호 6), 및 5'GGCCGG3'(서열번호 7)로 구성된 그룹에서 선택된 서열을 포함하거나 이것으로 구성될 수 있다. 일 구체예에서, 3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드는 벡터를 통해서 APC, DC, 사람, 또는 동물에 투여된다.

이들 3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드는 포스포디에스테르 주쇄 또는 변형된 인산염 주쇄, 예컨대 포스포로티오에이트 주쇄를 함유할 수 있다. 전술한 서열번호에 해당하는, 포스포디에스테르 주쇄를 함유한 3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드는 이하에서 하기와 같이 지칭된다: 5'GTGTGT3'(서열번호 1)(N1A), 5'GGTGGG3'(서열번호 2)(N2A), 5'GGGTGG3'(서열번호 3)(N3A), 5'GGCCGG3'(서열번호 4)(N4A), 5'GGGGGG3'(서열번호 5)(N5A), 5'GGGAGG3'(서열번호 6)(N6A), 및 5'GGCCGG3'(서열번호 7)(N7A). 이들 구체예에서, 폴리뉴클레오티드 사슬내 각 뉴클레오티드는 포스포디에스테르 뉴클레오티드이다. 전술한 서열번호에 해당하는, 포스포로티오에이트 주쇄를 함유한 3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드는 이하에서 하기와 같이 지칭된다: 5'GTGTGT3'(서열번호 1)(N1B), 5'GGTGGG3'(서열번호 2)(N2B), 5'GGGTGG3'(서열번호 3)(N3B), 5'GGCCGG3'(서열번호 4)(N4B), 5'GGGGGG3'(서열번호 5)(N5B), 5'GGGAGG3'(서열번호 6)(N6B), 및 5'GGCCGG3'(서열번호 7)(N7B). 이들 구체예에서, 폴리뉴클레오티드 사슬내 각 뉴클레오티드는 포스포로티오에이트 뉴클레오티드이다. 본 발명은 또한 1종 이상의 포스포디에스테르 뉴클레오티드 및 1종 이상의 포스포로티오에이트 뉴클레오티드를 포함하는 3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드를 포괄한다. 바람직하게는, 3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드는 N1A, N2B, N3B, 또는 N5B, 및 보다 바람직하게는 N3B 또는 N5B이다.

본 명세서에서 사용된 '자극하다'라는 용어는 사용된 문맥에 따라, DC 또는 기타 다른 APC의 활성화나 성숙, 또는 면역 반응의 활성화나 증가를 의미한다. DC의 자극은 세포 크기 및/또는 입도의 증가; IL-1 베타, IL-12 및/또는 IFN-감마 생성의 증가; 엔도시토시스의 증가; CD80, CD83, CD86, MHC II, 또는 이들의 임의 조합의 세포 표면 발현 증가; OX-2의 세포 표면 발현 감소; 또는 이들의 임의 조합에 의해 증명될 수 있다. 따라서, '수지상 세포 반응'은 세포 크기 및/또는 입도의 증가; IL-1 베타, IL-12 또는 IFN-감마 생성의 증가; 엔도시토시스의 증가; CD80, CD83, CD86, 또는 MHC II의 세포 표면 발현 증가; OX-2의 세포 표면 발현 감소; 또는 이들의 임의 조합을 포함하지만 이에 국한되는 것은 아니다. '수지상 세포' 및 'DC'란 용어는 간질성(interstitial) DC, 랭거란즈 세포(Langheran's cell) 유도성 DC, 형질구성(plasmacytoid) DC, 및 전술한 세포들의 임의의 전구세포를 포함하지만 이에 국한되는 것은 아니다. 본 명세서에서 사용된 '생성'이란 용어는 분자의 합성 및/또는 분비를 의미한다. 바람직한 구체예에서, 수지상 세포는 간질성 DC이 다.

본 명세서에 기술된 3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드는 DC를 자극할 수 있을 뿐 아니라, 예컨대 단구, 대식세포, 랭거란즈 세포, B 림프구, T 림프구, 쿠퍼 세포(Kuppfer cell), 소신경교세포, 슈완 세포(Schwann cell), 및 내피세포이지만 이에 국한되는 것은 아닌 전문적 APC; 및 예컨대 상피세포, 섬유아세포, 멜라닌세포, 신경세포, 평활근세포, 근세포, 간세포, 성상세포, 및 각질형성세포이지만 이에 국한되는 것은 아닌 비전문적 APC를 포함하는 기타 다른 APC도 자극할 수 있다. 따라서, 본 발명은 APC의 활성화를 위한 조성물 및 방법을 포함한다.

면역 반응을 언급할 때, '자극하다'라는 용어는 별도의 지시가 없는 한, 항원 비특이적 방식에서의 일반적인 면역 시스템의 활성화 또는 면역 시스템 성분의 활성화를 의미한다. 개체에서의 면역 반응 자극은 세포 증식, 무성생식적 팽창, 새로운 단백질의 합성, 작용 세포로의 분화, 기억 세포로의 분화, 일 유형 항체의 수준이나 양의 증가, 항체 클래스의 전환, 항체 생성 B 림프구의 체세포성 과다 돌연변이, 일 유형 면역 세포의 수준이나 양의 증가, 특정 위치로의 면역 세포 모집(운동 및 이동), 개체내 시토킨의 수준이나 양의 증가, 개체내 케모킨의 수준이나 양의 증가, 항체 제시의 증가, 엔도시토시스의 증가, 보조 자극 분자(부속 분자)의 증가나 획득, 부착 분자의 증가나 획득, 시토킨 수용체의 증가나 획득, 케모킨 수용체의 증가나 획득, 세포 매개 세포독성의 증가, 형태적 변화, 면역 세포 기억의 확립, 반응성 산소 중간산물의 수준이나 양의 증가, 산화질소의 수준이나 양의 증가, 신경내분비성 분자(예를 들면, 호르몬, 신경전달물질 등)의 수준이나 양의 증 가, 및 면역 내성이나 면역 억제의 중단에 증명될 수 있지만 이에 국한되는 것은 아니다. 면역 세포에는 림프구, 예컨대 B 세포, T 세포(CD4 $^{+}$ 및 CD8 $^{+}$ 세포 포함), 및 NK 세포; 단핵 식세포; 과립구, 예컨대 뉴트로필, 에오시노필, 및 바소필; 본 명세서에서 기술한 바와 같은 수지상 세포; 및 전술한 세포들의 임의의 전구 세포가 포함되지만 이에 국한되는 것은 아니다. 항체 유형에는 IgG, IgA, IgM, IgD, IgE, 및 IgY가 포함된다.

일 구체예에서, 면역 반응은 전신성 면역 반응이다. 본 명세서에서 '전신성 면역 반응'이란 용어는 신체의 특정 영역에만 국한되지 않는 면역 반응을 의미한다. 전신성 면역 반응의 예는 개체에 항원 및 면역자극성 분자를 투여한 후 개체내 순환계나 림프계를 순환하는 항체의 양이 증가하는 것이다. 또 다른 예는 개체에 면역자극성 분자를 투여한 후 개체내 순환계나 림프계에서 시토킨 및/또는 케모킨의 양이 증가하는 것이다. 또 다른 예는 혈행이나 림프행, 또는 면역계 장기, 예컨대 비장, 림프절, 또는 간에서 항원을 감지하여 그 공격에 반응할 수 있는 T 세포, B 세포, 또는 형질 세포와 같은 감각성 면역 작용 세포의 존재이다. 다른 구체예에서, 면역 반응은 국소성 면역 반응이다. '국소성 면역 반응'이란 용어는 반드시 전적으로 그런 것은 아니지만, 주로 신체의 특정 영역에만 국한되는 면역 반응을 의미한다. 국소성 면역 반응은 국소적인 부어오름과 붉어짐 및/또는 신체의 특정 영역으로의 면역 세포 모집(운동 및 이동)에 의해 증명될 수 있다. 예를 들면, 항원 및/또는 면역자극성 분자, 예컨대 본 명세서에 기술된 3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드의 점막 투여 후에 점막성 면역 반응이 일어날 수 있다. 점막성 반응은 일 유 형 항체의 수준이나 양의 증가, IgA 항체의 수준이나 양의 증가, 감마/델타 양성 T 림프구의 활성화, 국소성 면역 내성의 유도, 및 전신성 면역 내성의 유도를 포함할 수 있지만 이에 국한되는 것은 아니다.

본 발명의 몇몇 구체예에서, 3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드는 질환의 처치 또는 예방을 위해 개체(즉, 동물 또는 사람)에 투여된다. 본 명세서에서 사용된 '질환'이란 용어는 신체 건강이 손상된 상태를 의미하며, 암; 바이러스, 박테리아, 또는 기생충을 포함하는 병원균에 의한 감염; 알레르기; 자가면역성 질환; 및 이식된 장기에 대한 자가면역성 반응을 포함하지만 이에 국한되는 것은 아니다. 일부 구체예에서, 이러한 질환은 세자리 증후군(Sezary syndrome; 환자가 DC 순환에 심각한 결함을 가짐)[Wysocka et al., Blood 2002, 100:3287]; 다운 증후군(환자가 수지상 세포 위축을 나타냄)[Takashima et al., J. Intellect. Disabil. Res. 1994, 38:265]; DC의 부적절한 활성화(예를 들면, DC에 의한 자체 항원 제시의 연장)를 동반하는 자가면역성 질환[Erikson et al., J. Exp. Med. 2003, 197:323 및 Ludewig et al., Curr. Opin. Immunol. 2001, 13:657]; 척수 손상(환자가 수지상 세포 위축을 나타냄)[Iversen et al., Blood 2000, 96:2081]; 및 그레이브즈병(Grave's disease; 갑상선 수지상 세포와 관련된 질환)[Quadbeck et al., Scand. J. Immunol. 2002, 55:612]을 포함하지만 이에 국한되는 것은 아닌 DC 기능부전과 관련이 있다. '처치'라는 용어는 질환의 증후를 경감시키는 것을 의미하며, 질환의 치료를 요하는 것은 아니다. 또한 본 명세서에서 사용된 '유효량'이란 용어는 면역 반응을 유도하기에 효과적인 3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드의 양을 의미한다. 3'- OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드의 치료 효과는 염기, 당, 또는 인산염 주쇄를 화학적으로 변형시키는 방법, 적당한 서열을 함유한 박테리아 플라스미드를 사용하여 서열을 화학적으로 보강하거나 생물공학적으로 증폭시키는 방법, 서열을 생물학적 또는 화학적 담체와 복합체화시키는 방법, 또는 서열을 세포 유형별 지향성 리간드나 항체와 커플링시키는 방법을 포함하지만 이에 국한되는 것은 아닌 방법을 통해서 증가시킬 수 있다.

본 발명의 3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드는 약학적 허용성 담체와 배합하여 조성물로서 시험관내 또는 생체내 세포, 바람직하게는 APC, 및 보다 바람직하게는 DC에 투여할 수 있다. 본 발명의 일 구체예에서는, 3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드 함유 조성물을 DC를 자극하기에 효과적인 양으로 시험관내 DC에 투여한다. 그 다음 동물 또는 사람에서 면역 반응을 자극하기 위해, DC를 약학적 허용성 담체와 함께 동물 또는 사람에게 투여한다. 바람직한 구체예에서, 수지상 세포는 하기 내용을 포함하지만 이에 국한되는 것은 아닌 특징을 갖는 미성숙 DC이다: 세포 표면에서의, 많은 세포내 양의 MHC II; 높은 엔도시토시스 활성; 많은 양의 특이적 케모킨 수용체 CCR1, CCR2, CCR3, CCR5, CCR6, 및 CXRC1; 적은 양의 CCR7; 많은 양의 CD36, CD68, CD47, 및 CD91 분자; 적은 양의 보조 자극제 CD40, CD54, CD58, CD80, 및 CD83 분자; DC-LAMP(LAMP: 리소좀 결합 막단백질)의 부재; DCIR(DC 면역수용체), CLEC-1(C-렉틴 수용체), DC-ASGPR(DC-아시알로당단백질), MN(만노즈 수용체), TLR-2와 TLR-3(톨-라이크 수용체), FCγR, FcεR, 인테그린 αvβ5 및 αvβ3의 존재. 미성숙 DC는 말초혈에서 발견할 수 있다. 추가의 바람직한 구체예에서, DC에 3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드를 투여하기 전에, 미성숙 DC는 항원을 함유하거나 항원에 노출되어 있다. 항원을 함유한 DC를 수득하는 비제한적 방법에는 항원을 첨가하는 방법 및 1종 이상의 항원을 발현하도록 유전학적으로 변형시킨 DC를 사용하는 방법이 있다.

1종 이상의 3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드를 단독으로 또는 항원(예컨대 종양 항원)을 함유한 DC에 영향을 주는 다른 면역조절제와 배합해서, 면역 반응의 자극을 위해 동물 또는 사람에게 재주입할 수 있도록 고안된 DC의 자극을

유도하기에 효과적인 양으로 시험관내 DC에 투여할 수 있음은 자명하다. 면역조절제에는 하기와 같은 것들이 포함되지만 이에 국한되는 것은 아니다: 수산화 알루미늄; 인산 알루미늄; 인산 칼슘; 중합체; 블록 공중합체를 포함하는 공중합체, 예컨대 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 공중합체; 중합체 P1005; 프로인드 완전 보조제[Freund's complete adjuvant(동물용)]; 프로인드 불완전 보조제; 모노올레산 소르비탄; 스쿠알렌; CRL-8300 보조제; QS21; 사포닌; ISCOM; 무라밀 디펩티드; 글루코사미닐무라밀 디펩티드; 트레할로즈; 박테리아 추출물(예컨대 미코박테리아 추출물); 박테리아 전체 세포(예컨대 미코박테리아 전체 세포); 독성이 제거된 내독소; 막지질; 원핵세포성 유기체로부터 분리한 DNA; CpG 합성 올리고뉴클레오티드; 비-CpG 합성 올리고뉴클레오티드; 아파타머; 플라스미드 면역자극성 분자; 폴리(I:C) 분자; 시토킨; 케모킨; 키토산과 그 유도체; 히알루론산과 그 유도체; 콜레라 독소; 백일해 독소; 및 키홀 림핏 헤모시아닌(keyhole limpet hemocyanin); 또는 이들의 배합물. 3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드 또는 면역조절제가 더해진 3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클 레오티드는 단일 처치 또는 다중 처치 방식을 사용하여, 선택적으로는 상이한 농도로, DC를 자극하기에 적절한 기간 동안 DC에 첨가할 수 있다. 3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드는 면역조절제의 투여 전에, 투여와 동시에, 또는 투여 후에 첨가할 수 있다. 또한, 3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드는 항원의 투여 전에, 투여와 동시에, 또는 투여 후에 첨가할 수 있다.

본 발명은 또한 3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드, 및 DC에 함유되지 않은 항원을 동물 또는 사람에게 투여하는 방법을 포함하는데, 이러한 투여는 동물 또는 사람에서 면역 반응, 및 보다 바람직하게는 항원 특이적 면역 반응을 일으킨다. 항원은 3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드의 투여 전에, 투여와 동시에, 또는 투여 후에 동물 또는 사람에게 투여할 수 있다. 바람직한 구체예에서, 항원은 3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드와 동시에 투여한다.

본 명세서에 기술된 항원은 임의의 특정 항원이나 항원의 유형에 국한되지 않는다. 일 구체예에서, 항원은 종양 항원인데, 예컨대 종양 세포 용해물에서 유래한 종양 항원과 같은 것이다. 또 다른 구체예에서, 항원은 병원체에서 유래한 항원, 및 보다 바람직하게는 병원체의 표면 상에서 발현되는 항원이다. 병원체 유래의 표면 항원 중 일례는 간염 표면 항원이다. DC에 함유되지 않은 항원을 동물 또는 사람에게 투여할 때는 단백질, 펩티드, 또는 폴리펩티드로서 투여할 수도 있고, 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 투여할 수도 있다. 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 동물 또는 사람에서 항원 폴리펩티드가 발현되도록 하는 다른 성분을 포함하고 있는 벡터에 함유시킬 수 있다. 일 구체예에서는, 항원 및 3'-OH, 5'- OH 폴리뉴클레오티드를 상이한 벡터에 함유시킬 수 있다.

항원을 함유한, 3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드으로 자극시킨 DC, 또는 3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드와 항원을 동물 또는 사람에게 투여하면 동물 또는 사람에서 면역 반응의 자극이 유도된다. 바람직한 구체예에서, 이러한 투여는 동물 또는 사람에서 항원 특이적 면역 반응과 관련된 면역계의 자극을 유도한다. '항원 특이적 면역 반응'이란 용어는 현저하게 항원을 향해 나타나는 면역 반응을 의미한다. 항원 특이적 면역 반응은 항원이 투여된 사람 또는 동물에서의 항체 양(항체 적정량)의 증가, 항체 클래스의 전환, 항체 생성 B 림프구의 체세포성 과다 돌연변이, 면역 세포 기억의 확립, 항원에 대한 특이적 B 세포 수용체나 T 세포 수용체를 지닌 세포 양의 증가를 포함하거나 이들로 구성된다. 항체-항원 복합체를 생성하기에 충분한 친화력 및 요망으로 항체가 항원에 결합할 때, 항체는 특정 항원'에 대해 특이적'이다.

투여의 형태에는 주사, 용액, 크림, 겔, 삽입체, 펌프, 연고, 에멀션, 현탁액, 마이크로스피어, 입자, 마이크로입자, 나노입자, 리포좀, 페이스트, 패치, 정제, 경피성 전달 장치, 스프레이, 에어로졸, 또는 당업자에게 친숙한 기타 다른 수단이 포함되지만 이에 국한되는 것은 아니다. 본 발명의 약학적 제형은 익히 공지된 입수용이한 성분을 사용하여 당업계에 공지된 절차에 따라 제조할 수 있다. 예를 들면, 화합물은 일반적인 부형제, 희석제, 또는 담체와 배합하여 정제, 캡슐, 현탁액, 분말 등으로 제조할 수 있다. 이러한 제형에 적절한 부형제, 희석제, 또는 담체의 예로는 하기와 같은 것들이 있다: 충진제 및 증량제(예를 들면, 전분, 당, 만니톨, 및 규산 유도체); 결합제(예를 들면, 카르복시메틸 셀룰로오스와 기타 다른 셀룰로오스 유도체, 알긴산염, 젤라틴, 및 폴리비닐 피롤리돈); 보습제(예를 들면, 글리세롤); 붕해제(예를 들면, 탄산 칼슘 및 중탄산 나트륨); 용해 지연제(예를 들면, 파라핀); 재흡수 촉진제(예를 들면, 4차 암모늄 화합물); 계면활성제(예를 들면, 세틸 알콜, 모노스테아르산 글리세롤); 흡착성 담체(예를 들면, 카올린 및 벤토나이트); 유화제; 보존제; 감미제; 안정화제; 착색제; 방향제; 착향제; 윤활제(예를 들면, 활석, 스테아르산 칼슘 및 스테아르산 마그네슘); 고체 폴리에틸 글리콜; 및 이들의 혼합물.

상기 제형은 활성 성분을 단지 또는 바람직하게는 특정 위치에만, 가능하게는 일정 기간 동안 방출하도록 구성될 수 있다(즉, 지속적 방출형 제형). 이러한 조합은 또한 방출 동역학을 조절하는 추가 기구를 제공한다. 예를 들면 중합체 물질이나 왁스로부터 코팅, 엔벨로프, 및 보호 매트릭스를 제조할 수 있다.

1종 이상의 3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드 및 약학적 허용성 담체를 함유한 조성물은 3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드와 약학적 허용성 담체를 균일하게 충분히 혼합하여 제조한다. 약학적 허용성 담체는 액체 담체, 고체 담체, 또는 이 양자를 포함한다. 액체 담체는 수성 담체, 비수성 담체, 또는 이 양자를 의미하는 것으로서, 수성 현탁액, 유상 에멀션, 유중수 에멀션, 수중유중수 에멀션, 부위 특이적 에멀션, 장기 체류성 에멀션, 점착성 에멀션, 마이크로에멀션 및 나노에멀션을 포함하지만 이에 국한되는 것은 아니다. 고체 담체는 생물학적 담체, 화학적 담체, 또는 이 양자를 의미하는 것으로서, 올리고뉴클레오티드 조성물을 지속적으로 방출 할 수 있는 바이러스성 벡터 시스템, 입자, 마이크로입자, 나노입자, 마이크로스피어, 나노스피어, 미니펌프, 박테리아 세포벽 추출물, 및 생물분해성 또는 비생물분해

성 천연 또는 합성 중합체를 포함하지만 이에 국한되는 것은 아니다. 에멀션, 미니펌프, 및 중합체는 전달해야 하는 장소 부근에 삽입할 수 있다(Brem et al., J. Neurosurg. 74:441, 1991). 3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드를 고체 담체와 복합체화시키는 방법은 고체 담체 표면에 대한 직접적인 흡착, 고체 담체 표면에 대한 직접적 또는 연결 기를 통한 공유 커플링, 및 고체 담체 제조에 사용된 중합체와의 공유 커플링을 포함하지만 이에 국한되는 것은 아니다. 선택적으로는, 폴리옥시에틸렌소르비탄 모노올레산염(TWEENs)이나 히알루론산과 같은 비이온성 또는 이온성 중합체를 첨가함으로써 서열을 안정화시킬 수 있다.

바람직한 수성 담체에는 물, 식염수, 및 약학적 허용성 완충액이 포함되지만 이에 국한되는 것은 아니다. 바람직한 비수성 담체에는 디글리세리드, 트리글리세리드, 인지질, 지질, 오일 및 이들의 혼합물을 포함하지만 이에 국한되는 것은 아닌 광유 또는 중성유가 포함되지만 이에 국한되는 것은 아니며, 여기서 오일은 폴리불포화 지방산과 포화 지방산을 적절하게 혼합하여 함유한다. 이들의 예로는 대두유, 카놀라유, 팜유, 올리브유, 및 미글리올이 포함되지만 이에 국한되는 것은 아니며, 여기서 지방산은 포화성 또는 불포화성일 수 있다. 선택적으로는, 3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드를 세포에 도입하는 데 사용하는 약학적 허용성 담체에 관계없이 부형제가 포함될 수 있다. 이들 부형제에는 항산화제, 완충제, 및 박테리아 발육저지제가 포함되지만 이에 국한되는 것은 아니며, 현탁제 및 증점제도 포함될 수 있다.

1종 이상의 3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드는 단독으로, 또는 하기와 같은 것들을 포함하지만 이에 국한되는 것은 아닌 기타 다른 면역조절 양식과 조합하여 사람 또는 동물에 투여할 수 있다: 수산화 알루미늄; 인산 알루미늄; 인산 칼슘; 중합체; 블록 공중합체를 포함하는 공중합체, 예컨대 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 공중합체; 중합체 P1005; 프로인드 완전 보조제(동물용); 프로인드 불완전 보조제; 모노올레산 소르비탄; 스쿠알렌; CRL-8300 보조제; QS21; 사포닌; ISCOM; 무라밀 디펩티드; 글루코사미닐무라밀 디펩티드; 트레할로즈; 박테리아 추출물, 예컨대 미코박테리아 추출물; 박테리아 전체 세포, 예컨대 미코박테리아 전체 세포; 독성이 제거된 내독소; 막지질; 원핵세포성 유기체로부터 분리한 DNA; CpG 합성 올리고뉴클레오티드; 비-CpG 합성 올리고뉴클레오티드; 아파타머; 면역자극성 분자를 암호화하는 플라스미드; 폴리(I:C) 분자; 시토킨; 케모킨; 키토산과 그 유도체; 히알루론산과 그 유도체; 콜레라 독소; 백일해 독소; 및 키홀 림핏 헤모시아닌; 또는 이들의 배합물.

또한, 1종 이상의 3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드는 단독으로, 또는 화학치료제, 항미생물제, 또는 항바이러스제를 포함하지만 이에 국한되는 것은 아닌 기타 다른 치료 양식과 조합하여 투여할 수 있다. 화학치료제에는 항대사제, DNA 손상제, 미세관 불안정화제, 미세관 안정화제, 액틴 해중합제, 성장 억제제, 토포이소머라제 억제제, HMG-CoA 억제제, 퓨린 합성 억제제, 피리미딘 합성 억제제, 메탈로프로테이나제 억제제, CDK 억제제, 혈관형성 억제제, 및 분화 향상제가 포함되지만 이에 국한되는 것은 아니다. 이들 기타 다른 치료 양식의 투여량 및 투여방법은 당업자라면 알고 있는 것들이다.

본 발명의 3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드, 3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드를 함유한 APC 또는 DC 세포, 또는 3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드와 기타 다른 물질, 예컨대 하기 투여 유형을 포함하지만 이에 국한되는 것은 아닌 각종 투여 형태에 특히 적절한 본 발명의 담체를 포함하는 조성물을 투여하는 방법에는 경구(예를 들면, 협측 또는 설하), 항문, 직장(좌약으로서), 국소, 비경구, 비측, 에어로졸, 흡입, 척추강내, 복강내, 정맥내, 동맥내, 경피, 진피내, 진피하, 피하, 근육내, 조직내(예를 들면, 조직 또는 선), 자궁내, 질내, 체강내, 종양이나 체내 상처 부위에 외과적 투여, 종양에 직접적으로, 기관의 내강이나 실질 중으로, 골수 중으로, 및 위장, 생식계, 비뇨기계 및 요생식계의 임의 점막 표면 중으로 투여가 있다. 바람직한 구체예에서, 본 발명의 3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드는 소낭내(방광내), 안구, 경구, 비측, 직장, 및 질 표면으로 구성된 그룹에서 선택된 점막 표면에 투여한다. 전술한 각종 투여 형태에 유용한 기법에는 국소 투여, 섭취, 외과적 투여, 주사, 스프레이, 경피 전달 장치, 삼투압 펌프, 목적 부위에 직접적인 전기침착, 또는 당업자에게 친숙한 기타 다른 기법이 포함되지만 이에 국한되는 것은 아니다. 투여 부위는 표피 상과 같은 체외 부위이거나, 예를 들면 위궤양, 수술 부위 등과 같은 체내 부위일 수 있다.

본 발명의 조성물은 크림, 겔, 용액, 현탁액, 리포좀, 입자, 또는 조성물의 제형 및 전달 분야의 당업자에게 공지된 기타 다른 수단의 형태로 투여할 수 있다. 치료제의 흡입 전달에는 초미세 입자 크기를 사용할 수 있다. 피하 투여에 적당한 제형의 몇몇 예에는 삽입체, 축적체, 침상체, 캡슐 및 삼투압 펌프가 포함되지만 이에 국한되는 것은 아니다. 질 투여에 적당한 제형의 몇몇 예에는 크림 및 링이 포함되지만 이에 국한되는 것은 아니다. 경구 투여에 적당한 제형의 몇몇 예에는 환제, 액체, 시럽, 및 현탁액이 포함되지만 이에 국한되는 것은 아니다. 경피 투여에 적당한 제형의 몇몇 예에는 겔, 크림, 페이스트, 패치, 스프레이, 및 겔이 포함되지만 이에 국한되는 것은 아니다. 피하 투여에 적당한 전달 기구의 몇몇 예에는 삽입체, 축적체, 침상체, 캡슐, 및 삼투압 펌프가 포함되지만 이에 국한되는 것은 아니다. 비경구 투여에 적당한 제형에는 항산화제, 완충제, 박테리아 발육저지제, 및 해당 환자의 혈액과 등장성인 제형으로 만들기 위한 용질을 함유할 수 있는 수성 및 비수성 멸균 주사액, 및 현탁제와 증점제를 함유할 수 있는 수성 및 비수성 멸균 현탁액이 포함되지만 이에 국한되는 것은 아니다. 당업자가 통상적으로 사용하는 멸균 분말, 과립 및 정제로부터 즉석식 주사액과 현탁액을 제조할 수도 있다.

구체예에서, 예를 들면 1종 이상의 약학적 허용성 담체 또는 부형제와 배합한 본 발명의 조성물은 편리하게 단위 투여량 형태로 제공할 수 있는데, 이것은 통상의 약제 기법에 따라 제조할 수 있다. 이 기법은 활성 성분과 약학적 담체

또는 부형제를 함유하는 조성물을 혼합하는 단계를 포함한다. 일반적으로, 제형은 활성성분과 액체 담체를 균일하게 충분히 혼합하여 제조한다. 바람직한 단위 투여량의 제형은 투여 성분의 1회 용량 또는 1 유닛을 함유한 것이거나 또는 이의 적당한 분획인 것이다. 상기 구체적으로 기술한 성분 외에도 본 발명의 조성물을 함유하는 제형은 당업자가 일반적으로 사용하는 기타 다른 제제를 함유할 수 있다.

투여 부피는 투여 경로에 따라 달라질 것이다. 이러한 부피는 동물 또는 사람에게 조성물을 투여하는 기술 분야의 당업자라면 잘 알고 있는 것이다. 투여 경로에 따라, 1회 용량당 부피는 바람직하게는 1회 용량당 약 0.001 내지 100 ml, 보다 바람직하게는 1회 용량당 약 0.01 내지 50 ml, 및 가장 바람직하게는 1회 용량당 약 0.1 내지 30 ml이 좋다. 예를 들면, 근육내 주사액은 약 0.1 내지 1.0 ml 범위의 부피일 수 있다. 단독으로, 또는 기타 다른 치료제와 배합하여 투여되는 올리고뉴클레오티드 조성물은 단일 용량 치료 형식, 복수 용량 치료 형식으로 투여하거나, 또는 치료받는 질환, 환자의 상태 및 투여 경로에 적당한 시간 동안 시간표대로 연속 주입하여 투여할 수 있다. 또한, 상기 기타 다른 치료제는 올리고뉴클레오티드 조성물의 투여 전에, 또는 투여와 동시에, 또는 투여 후에 투여할 수 있다.

1회 용량당 투여되는 3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드의 함량은 바람직하게는 약 0.0001 내지 100 mg/체중kg, 보다 바람직하게는 약 0.001 내지 10 mg/체중kg, 및 가장 바람직하게는 약 0.01 내지 5 mg/체중kg이다. 투여되는 특정 3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드와 특정 치료제, 1회 용량당 함량, 1회 용량 시간표 및 투여 경로는 당업자에게 공지된 방법에 따라 실시자가 결정해야 하며, 이것은 질환의 종류, 질환의 정도, 질환의 위치 및 기타 환자의 체격, 체중 및 신체 상태와 같은 임상적 요인에 따라 달라지는 것이다. 또한, 시험관내 분석을 선택적으로 이용하여 서열 및 서열과 치료제 투여의 최적 범위를 결정할 수 있다.

다음 실시예는 본 발명을 추가적으로 설명하기 위한 것이지, 이들로 본 발명 을 임의 제한하기 위한 것은 아니다. 이에 반해, 본 발명의 취지 및 범위를 벗어나지 않으면서 본 명세서를 통해 당업자에게 제안될 수 있는 다양한 다른 구체예, 변형예 및 이의 동등물에도 본 발명의 권한이 있다는 것은 자명한 것이다.

실시예

실시예 1

3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드의 제조

3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드 서열은 시그마-제노시스(Sigma-Genosys, 텍사스주 우드랜즈 소재)에서 아바커스 분절화 합성 기법(Abacus Segmented Synthesis Technology)을 사용하여 제조한 것이다. 별도의 언급이 없다면, 상기 서열은 사용 직전에 오토클레이브 처리한 탈이온수나 약학적 허용성 완충액, 예컨대 식염수(이에 국한되는 것은 아님)에 분산시켰다. 사용된 서열은 하기와 같다: N1A, N1B, N2A, N2B, N3A, N3B, N4A, N4B, N5A, N5B, N6A, N6B, N7A, 및 N7B.

실시예 2

수지상 세포

사람 수지상 세포는 클로네틱스(Clonetics, 미국 캘리포니아주 샌디에고 소재)에서 입수하여 클로네틱스가 추천하는 배지에서 배양하였다. DC는 3인의 상이한 피검자로부터 입수했다(표 1). 이들 각각의 피검자에 대해 주요 조직적합성 유형검사를 실시하여 몇몇 HLA(사람 백혈구 항원) 유형을 나타냈다.

표 1

DC 특징

피검자	성별	연령	HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-DRB1
A	F	32	0201 30	41 62	03 17	04 08
B	M	22	0201 23	37 51	06 15	04 13
C	F	31	0201 11	08 35	04 07	03 13

실시예 3

3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드와 함께 배양한 DC의 세포 크기 및 입도 증가

1.0 X 10 ^{5} 세포/ml의 DC 1.0 ml을 6개 염기의 N1A, N1B, N2A, N2B, N3A, N3B, N4A, N4B, N5A, N5B, N6A, N6B, N7A, 또는 N7B 폴리뉴클레오티드 100 μg과 함께 6웰 평판 조직 배양 플레이트에서 48시간 동안 배양했다. 세포 크기(FCS: 전방 측면 산란도) 및 입도(SSC: 측광 산란도)는 FACSCalibur를 사용한 유동 세포측정기로 측정한 다음, CELLQuest Pro 소프트웨어를 사용하여 분석했다[모두 벡튼 디킨슨(Becton-Dickinson, 미국 캘리포니아주 샌디에고 소재)으로부터 입수]. 3인의 상이한 피검자로부터 분리한 DC에 3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드를 처리한 후 FCS > 500 유닛 및 SSC > 400 유닛을 나타내는 DC의 %를 측정했다.

표 2

3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드 처리 후 FCS > 500 유닛 및 SSC > 400 유닛을 나타내는 DC의 %(이 %는 FACS로 측정한 각 DC 그룹의 총 개수를 기준으로 함).

서열	피검자로부터 분리한 DC		
	A	B	C
자극시키지 않음	7	10	20
N1A	6	9	18
N1B	5	17	25
N2A	6	14	21
N2B	42	38	50
N3A	8	15	31
N3B	28	25	28
N4A	4	n.d.	19
N4B	4	n.d.	32
N5A	10	19	36
N5B	53	16	23
N6A	9	22	21
N6B	4	17	36
N7A	8	n.d.	30
N7B	16	n.d.	31

표 2에 제시된 바와 같이, 다수의 서열은 세포 크기(FCS) 및 입도(SSC)의 증가로부터 알 수 있듯이 DC의 자극/성숙을 유도했다.

실시예 4

IL-1베타 생성의 유도

1.0 X 10 ^{5} 세포/ml의 DC 1.0 ml을 6개 염기의 N1A, N1B, N2A, N2B, N3A, N3B, N4A, N4B, N5A, N5B, N6A, N6B, N7A, 또는 N7B 폴리뉴클레오티드 100 μg과 함 께 6웰 평판 조직 배양 플레이트에서 48시간 동안 배양했다. IL-1베타의 생성은 배양 48시간 후, 시판용 ELISA[바이오소스(BioSource, 미국 캘리포니아주 카마릴로 소재)]를 사용하여 배양 상등액 100 μℓ로부터 측정했다. 결과는 대조군 세포에 비해 처리한 DC에서의 IL-1베타 생성 '~배(X)'증가로서 표시했다.

표 3

DC에 의한 IL-1베타 생성(미처리 DC에 비해 증가한 배수)

서열	피검자로부터 분리한 DC		
	A	B	C
N1A	1.0	1.2	1.0
N1B	1.0	1.0	1.0
N2A	1.0	1.0	1.0
N2B	1.2	1.4	1.0
N3A	1.1	1.1	1.0
N3B	1.7	4.4	2.1
N4A	0.9	n.d.	1.0
N4B	1.0	n.d.	1.0
N5A	1.1	1.1	1.0
N5B	5.0	7.5	3.7
N6A	1.0	1.1	0.9
N6B	1.0	1.1	1.0
N7A	1.1	n.d.	1.0
N7B	1.1	n.d.	0.9

표 3에 제시된 바와 같이, 폴리뉴클레오티드 N3B 및 폴리뉴클레오티드 N5B는 시험된 3인의 상이한 피검자 세포에서 IL-1베타의 생성을 유도했다.

실시예 5

IL-12 생성의 유도

1.0 X 10 ^{5} 세포/ml의 DC 1.0 ml을 6개 염기의 N1A, N1B, N2A, N2B, N3A, N3B, N4A, N4B, N5A, N5B, N6A, N6B, N7A, 또는 N7B 폴리뉴클레오티드 100 μg과 함 께 6웰 평판 조직 배양 플레이트에서 48시간 동안 배양했다. IL-12의 생성은 배양 48시간 후, 시판용 ELISA(바이오소스)를 사용하여 배양 상등액 100 μℓ로부터 측정했다. 결과는 대조군 세포에 비해 처리한 DC에서의 IL-12 생성 '~배(X)'증가로서 표시했다.

표 4

DC에 의한 IL-12 생성(미처리 DC에 비해 증가한 배수)

서열	피검자로부터 분리한 DC		
	A	B	C
N1A	15.9	17.8	2.1
N1B	1.5	1.3	1.1
N2A	7.9	6.8	1.6
N2B	1.3	6.0	2.5
N3A	1.0	1.0	1.0
N3B	5.2	17.3	14.4
N4A	1.2	n.d.	1.0
N4B	1.3	n.d.	2.6
N5A	0.9	1.1	1.0
N5B	7.5	17.8	15.0
N6A	1.0	1.0	1.0
N6B	1.3	1.4	4.1
N7A	1.0	n.d.	0.9
N7B	1.8	n.d.	1.0

표 4에 제시된 바와 같이, 다수의 서열은 IL-12의 생성을 유도했다.

실시예 6

IFN-감마 생성의 유도

1.0 X 10 ^{5} 세포/ml의 DC 1.0 ml을 6개 염기의 N1A, N1B, N2A, N2B, N3A, N3B, N4A, N4B, N5A, N5B, N6A, N6B, N7A, 또는 N7B 폴리뉴클레오티드 100 μg과 함께 6웰 평판 조직 배양 플레이트에서 48시간 동안 배양했다. IFN-감마의 생성은 배양 48시간 후, 시판용 ELISA(바이오소스)를 사용하여 배양 상등액 100 μℓ로부터 측정했다. 결과는 대조군 세포에 비해 처리한 DC에서의 IFN-감마 생성 '~배(X)'증가로서 표시했다.

표 5

DC에 의한 IFN-감마 생성(미처리 DC에 비해 증가한 배수)

서열	피검자로부터 분리한 DC		
	A	B	C
N1A	0.8	1.0	1.0
N1B	0.9	1.0	1.0
N2A	1.0	1.1	1.0
N2B	1.2	1.2	1.0
N3A	1.0	1.0	1.0
N3B	2.0	4.5	1.3
N4A	1.0	n.d.	1.0
N4B	1.0	n.d.	1.0
N5A	1.1	1.1	1.0
N5B	3.5	5.0	1.5
N6A	1.0	1.0	1.0
N6B	1.1	1.0	1.1
N7A	1.0	n.d.	1.0
N7B	1.1	n.d.	1.1

표 5에 제시된 바와 같이, 폴리뉴클레오티드 N3B 및 폴리뉴클레오티드 N5B는 시험된 3인의 상이한 피검자 세포에서 IFN-감마의 생성을 유도했다.

실시예 7

GM-CSF를 더한 서열에 의한 IL-12의 유도

1.0 X 10 ^{5} 세포/ml인 피검자 B의 DC 1.0 ml을 사람 재조합 GM-CSF(클로네틱스) 500 유닛 및 6개 염기의 폴리뉴클레오티드 N1A 또는 폴리뉴클레오티드 N7A 100 μg과 함께 6웰 평판 조직 배양 플레이트에서 48시간 동안 배양했다. IL-12의 생성 은 배양 48시간 후, 시판용 ELISA(바이오소스)를 사용하여 배양 상등액 100 μℓ로부터 측정했다. 결과는 재조합 GM-CSF의 부재 또는 존재하에, 대조군 세포에 비해 처리한 DC에서의 IL-12 생성 '~배(X)'증가로서 표시했다.

표 6

재조합 GM-CSF 존재하에, 피검자 B의 DC에 의한 IL-12의 생성(미처리 DC에 비해 증가한 배수)

서열	IL-12	
	w/o	+ GM-CSF
처리하지 않음	1.0	1.0
N1A	14.7	15.3
N7A	9.6	11.7

표 6에 제시된 바와 같이, DC에 의한 IL-12 생성에 있어서 GM-CSF와 폴리뉴클레오티드 N1A 또는 폴리뉴클레오티드 N7A 사이에 공동상승효과가 관찰되었다.

실시예 8

DC 세포 표면 상 CD40 양의 증가

1.0 X 10 ^{5} 세포/ml인 피검자 B 및 C의 DC 1.0 ml을 6개 염기의 N1A, N1B, N2A, N2B, N3A, N3B, N4A, N4B, N5A, N5B, N6A, N6B, N7A, 또는 N7B 폴리뉴클레오티드 100 μg과 함께 6웰 평판 조직 배양 플레이트에서 48시간 동안 배양했다. 세포 표면 상 CD40의 양은 배양 48시간 후, CD40으로 향하는 FITC-접합 모노클로날 항체를 사용하여 유동 세포측정기(FACSCalibur 시스템)로 측정한 다음, CELLQuest Pro 로 분석했다(모두 벡튼 디킨슨으로부터 입수). 결과는 처리 후 CD40 ^{hi} DC의 %로서 표시했다. 'CD40 ^{hi} '라는 용어는 CD40의 발현이 기준선보다 높은 세포의 개수를 유동 세포측정기로 계수한 것을 의미한다.

표 7

처리 후 CD40 ^{hi} DC의 %

서열	피검자로부터의 DC	
	B	C
처리하지 않음	8	8
N1A	21	24**
N1B	31**	18
N2A	27**	17
N2B	22	37**
N3A	36**	20
N3B	33**	14
N4A	n.d.	16
N4B	n.d.	16
N5A	40**	30**
N5B	21	15
N6A	35**	15
N6B	28**	15
N7A	n.d.	23
N7B	n.d.	18

** $p < 0.001$ Kolmogorov-Smirnov($D > 0.20$).

표 7에 제시된 바와 같이, 다수의 서열은 DC의 세포 표면 상 CD40의 발현을 유의적으로 상승조절하는 능력을 가진다.

실시예 9

DC 세포 표면 상 CD80 양의 증가

1.0 X 10 ^{5} 세포/ml인 피검자 B 및 C의 DC 1.0 ml을 6개 염기의 N1A, N1B, N2A, N2B, N3A, N3B, N4A, N4B, N5A, N5B, N6A, N6B, N7A, 또는 N7B 폴리뉴클레오티드 100 μg과 함께 6웰 평판 조직 배양 플레이트에서 48시간 동안 배양했다. 세포 표면 상 CD80의 양은 배양 48시간 후, CD80으로 향하는 FITC-접합 모노클로날 항체[세로텍(Serotec, 영국 옥스퍼드 소재)]를 사용하여 유동 세포측정기로 측정한 다음, CELLQuest로 분석했다. 결과는 처리 후 CD80 ^{hi} DC의 %로서 표시했다.

표 8

처리 후 CD80 ^{hi} DC의 %

서열	피검자로부터의 DC	
	B	C
처리하지 않음	7	7
N1A	45**	41**
N1B	11	13
N2A	25**	18
N2B	7	8
N3A	12	18
N3B	5	3
N4A	11	21**
N4B	9	13
N5A	18	14
N5B	3	10
N6A	15	17
N6B	4	4
N7A	23**	22**
N7B	5	5

** $p < 0.001$ Kolmogorov-Smirnov($D > 0.20$).

표 8에 제시된 바와 같이, 다수의 서열은 DC의 세포 표면 상 CD80의 발현을 유의적으로 상승조절했다.

실시예 10

DC 세포 표면 상 CD86 양의 증가

1.0 X 10 ^{5} 세포/ml인 피검자 B 및 C의 DC 1.0 ml을 6개 염기의 N1A, N1B, N2A, N2B, N3A, N3B, N4A, N4B, N5A, N5B, N6A, N6B, N7A, 또는 N7B 폴리뉴클레오티드 100 μg과 함께 6웰 평판 조직 배양 플레이트에서 48시간 동안 배양했다. 세포 표면 상 CD86의 양은 배양 48시간 후, CD86으로 향하는 PE-접합 모노클로날 항체(세로텍)를 사용하여 유동 세포측정기로 측정한 다음, CELLQuest Pro로 분석했다. 결과는 처리 후 CD86 ^{hi} DC의 %로서 표시했다.

표 9

처리 후 CD86 ^{hi} DC의 %

서열	피검자로부터의 DC	
	B	C
처리하지 않음	14	16
N1A	10	14
N1B	19	27
N2A	16	26
N2B	31**	53**
N3A	16	37**
N3B	30**	39**
N4A	n.d.	23
N4B	n.d.	32
N5A	20	16
N5B	26**	31**
N6A	24**	18
N6B	15	33
N7A	n.d.	34
N7B	n.d.	34

** $p < 0.001$ Kolmogorov-Smirnov($D > 0.20$).

표 9에 제시된 바와 같이, 다수의 서열은 DC의 세포 표면 상 CD86의 발현을 유의적으로 상승조절했다.

실시예 11

DC 세포 표면 상 MHC-II 양의 증가

1.0 X 10^5 세포/ml인 피검자 B의 DC 1.0 ml을 6개 염기의 N1A, N1B, N2A, N2B, N3A, N3B, N5A, N5B, N6A, N6B, N7A, 또는 N7B 폴리뉴클레오티드 100 μg과 함께 6웰 평판 조직 배양 플레이트에서 48시간 동안 배양했다. 세포 표면 상 MHC-II의 양은 배양 48시간 후, MHC-II로 향하는 FITC-접합 모노클로날 항체(세로텍)를 사용하여 유동 세포측정기로 측정한 다음, CELLQuest Pro로 분석했다. 결과는 처리 후 MHC-II ^{hi} DC의 %로서 표시했다.

표 10

처리 후 MHC-II ^{hi} DC의 %

서열	피검자 B로부터의 DC
처리하지 않음	22
N1A	32**
N1B	7
N2A	42**
N2B	30
N3A	23
N3B	25
N5A	19
N5B	18
N6A	25
N6B	27
N7A	21
N7B	31**

** $p < 0.001$ Kolmogorov-Smirnov($D > 0.20$).

표 10에 제시된 바와 같이, 폴리뉴클레오티드 N1A, N2A 및 N7B는 DC의 세포 표면 상 MHC-II의 발현을 유의적으로 상승조절했다.

실시예 12

DC 세포 표면 상 OX-2 양의 감소

1.0 X 10^5 세포/ml인 피검자 A의 DC 1.0 ml을 6개 염기의 N3A 또는 N6A 폴리뉴클레오티드 1, 10, 또는 100 μg과 함께 6웰 평판 조직 배양 플레이트에서 48시간 동안 배양했다. 세포 표면 상 OX-2의 양은 배양 48시간 후, OX-2로 향하는 FITC-접 합 모노클로날 항체[바이오스파크(BioSPARK, 미국 커네티컷주 그린위치 소재)]를 사용하여 유동 세포측정기로 측정한 다음, CELLQuest Pro로 분석했다. DC 표면 항원인 OX-2는 Th1 시토킨 생성의 자극을 억제하고, 면역 세포에 내성 신호(tolarizing signal)를 제공하는 것으로 밝혀져 있다(Gorczynski et al., J. Immunol. 1999 162:774-781). 결과는 처리 후 OX-2 ^{hi} DC의 %로서 표시했다.

표 11

처리 후 OX-2 ^{hi} DC의 %

서열	OX-2%
처리하지 않음	66
N3A 1.0 μg	61
N3A 10.0 μg	51**
N3A 100.0 μg	51**
N6A 1.0 μg	64
N6A 10.0 μg	62
N6A 100.0 μg	64

** $p < 0.001$ Kolmogorov-Smirnov($D > 0.20$).

표 11에 제시된 바와 같이, 폴리뉴클레오티드 N3A는 DC의 세포 표면 상 OX-2의 발현을 유의적으로 하강조절했다.

실시예 13

DC에 의한 엔도시토시스의 증가

6개 염기의 N2A, N2B, N3A, N3B, N5A, N5B, 및 N6B 폴리뉴클레오티드 100 μg 의 부재 또는 존재하에, 1.0 X 10^5 세포/ml인 피검자 B의 DC 1.0 ml을 FITC-덱스트란(20 kDa; 시그마-알드리치) 1 mg/ml과 함께 6웰 평판 조직 배양 플레이트에서 4℃(FITC-덱스트란의 세포 표면 결합 대조군) 및 37℃(엔도시토시스 평가용)로 24시간 동안 배양했다. 세포를 냉각 인산염 완충 식염수로 3회 세척한 다음, CELLQuest Pro를 사용하여 유동 세포측정기로 분석했다. 결과는 엔도시토시스 상대속도[Δ평균 형광도(ΔMFV)로 표준화]로서 표시했다. ΔMFV = 37℃에서 FITC-덱스트란에 노출된 DC의 MFV - 4℃에서 FITC-덱스트란에 노출된 DC의 MFV. ΔMFV = (서열의 ΔMFV / 대조군의 ΔMFV) X 100.

표 12

처리 후 DC의 엔도시토시스 상대속도

서열	엔도시토시스 상대속도 (ΔMFV로 표준화)
	피검자 B로부터의 DC
처리하지 않음 (대조군)	100
N2A	334
N2B	148
N3A	156
N3B	211
N5A	209
N5B	151
N6B	23

표 12에 제시된 바와 같이, N2A, N2B, N3A, N5A, 및 N5B는 DC의 엔도시토시스 속도를 증가시켰다.

실시예 14

항원 첨가 DC에 의한 암 예방접종

C57BL/6 마우스에서 분리한 DC를 흑색종 B-16 세포로부터의 종양 세포 용해물과 함께 시험관내 로딩했다. 항원 첨가 동안에 N1A, N1B, N2A, N2B, N3A, N3B, N4A, N4B, N5A, N5B, N6A, N6B, N7A, 또는 N7B 폴리뉴클레오티드를 포함시켰다. 75마리의 C57BL/6 마우스에 B-16 흑색종 세포 약 2 X 10^6 을 피하주사했다.

종양 접종 후 7일 째에, 마우스를 5마리씩 15그룹으로 나누었다. 그룹 1 마우스는 B-16 종양 세포 용해물 첨가 DC 2 X 10^4 으로 예방접종했고; 그룹 2 마우스는 B-16 종양 세포 용해물 첨가 DC 2 X 10^4 + N1A 폴리뉴클레오티드 100μg로 예방접종했으며; 그룹 3 마우스는 B-16 종양 세포 용해물 첨가 DC 2 X 10^4 + N1B 폴리뉴클레오티드 100μg로 예방접종했고; 그룹 4 마우스는 B-16 종양 세포 용해물 첨가 DC 2 X 10^4 + N2A 폴리뉴클레오티드 100μg로 예방접종했으며; 그룹 5 마우스는 B-16 종양 세포 용해물 첨가 DC 2 X 10^4 + N1B 폴리뉴클레오티드 100μg로 예방접종했고; 그룹 6 마우스는 B-16 종양 세포 용해물 첨가 DC 2 X 10^4 + N3A 폴리뉴클레오티드 100μg로 예방접종했으며; 그룹 7 마우스는 B-16 종양 세포 용해물 첨가 DC 2 X 10^4 + N3B 폴리뉴클레오티드 100μg로 예방접종했고; 그룹 8 마우스는 B-16 종양 세포 용해물 첨가 DC 2 X 10^4 + N4A 폴리뉴클레오티드 100μg로 예방접종했으며; 그룹 9 마우스는 B-16 종양 세포 용해물 첨가 DC 2 X 10^4 + N4B 폴리뉴클레오티드 100μg로 예방접종했고; 그룹 10 마우스는 B-16 종양 세포 용해물 첨가 DC 2 X 10^4 + N5A 폴리뉴클레오티드 100μg로 예방접종했으며; 그룹 11 마우스는 B-16 종양 세포 용해물 첨가 DC 2 X 10^4 + N5B 폴리뉴클레오티드 100μg로 예방접종했고; 그룹 12 마우스는 B-16 종양 세포 용해물 첨가 DC 2 X 10^4 + N6A 폴리뉴클레오티드 100μg로 예방접종했으며; 그룹 13 마우스는 B-16 종양 세포 용해물 첨가 DC 2 X 10^4 + N6B 폴리뉴클레오티드 100μg로 예방접종했고; 그룹 14 마우스는 B-16 종양 세포 용해물 첨가 DC 2 X 10^4 + N7A 폴리뉴클레오티드 100μg로 예방접종했으며; 그룹 15 마우스는 B-16 종양 세포 용해물 첨가 DC 2 X 10^4 + N7B 폴리뉴클레오티드 100μg로 예방접종했다.

상기 예방접종을 1주 후에 반복했다. 2주 후, 종양의 부피 및 중량을 분석했다. 그룹 2 내지 15의 마우스는 그룹 1의 마우스보다 종양 질량이 작았다. B-16 항원으로 향하는 특이적 세포독성 T 림프구(CTL)는 종양 세포 용해물 첨가 DC의 주사 전 및 주사 후에, 마우스로부터 유래한 말초혈 단핵 세포를 사용하여 IFN-감마 ELISPOT로 분석했다. B-1

6로 향하는 CTL의 빈도는 그룹 1의 마우스보다 그룹 2 내지 15의 마우스에서 더 높았다.

실시예 15

보르다텔라 페르투시스(Bordatella pertussis) 첨가 DC에 의한 예방접종

C57BL/6 마우스에서 분리한 DC를 열처리 사멸시킨 보르다텔라 페르투시스 10^7과 함께 시험관내 로딩했다. 항원 첨가 동안에 N1A, N1B, N2A, N2B, N3A, N3B, N4A, N4B, N5A, N5B, N6A, N6B, N7A, 또는 N7B 폴리뉴클레오티드를 포함시켰다. 70마리의 C57BL/6 마우스를 5마리씩 15그룹으로 나누었다. 그룹 1 마우스는 열처리 사멸시킨 보르다텔라 페르투시스 10^7으로 예방접종했고; 그룹 2 마우스는 열처리 사멸시킨 보르다텔라 페르투시스 10^7 + N1A 폴리뉴클레오티드 100μg로 예방접종했으며; 그룹 3 마우스는 열처리 사멸시킨 보르다텔라 페르투시스 10^7 + N1B 폴리뉴클레오티드 100μg로 예방접종했고; 그룹 4 마우스는 열처리 사멸시킨 보르다텔라 페르투시스 10^7 + N2A 폴리뉴클레오티드 100μg로 예방접종했으며; 그룹 5 마우스는 열처리 사멸시킨 보르다텔라 페르투시스 10^7 + N2B 폴리뉴클레오티드 100μg로 예방접종했고; 그룹 6 마우스는 열처리 사멸시킨 보르다텔라 페르투시스 10^7 + N3A 폴리뉴클레오티드 100μg로 예방접종했으며; 그룹 7 마우스는 열처리 사멸시킨 보르다텔라 페르투시스 10^7 + N3B 폴리뉴클레오티드 100μg로 예방접종했고; 그룹 8 마우스는 열처리 사멸시킨 보르다텔라 페르투시스 10^7 + N4A 폴리뉴클레오티드 100μg로 예방접 종했으며; 그룹 9 마우스는 열처리 사멸시킨 보르다텔라 페르투시스 10^7 + N4B 폴리뉴클레오티드 100μg로 예방접종했고; 그룹 10 마우스는 열처리 사멸시킨 보르다텔라 페르투시스 10^7 + N5A 폴리뉴클레오티드 100μg로 예방접종했으며; 그룹 11 마우스는 열처리 사멸시킨 보르다텔라 페르투시스 10^7 + N5B 폴리뉴클레오티드 100μg로 예방접종했고; 그룹 12 마우스는 열처리 사멸시킨 보르다텔라 페르투시스 10^7 + N6A 폴리뉴클레오티드 100μg로 예방접종했으며; 그룹 13 마우스는 열처리 사멸시킨 보르다텔라 페르투시스 10^7 + N6B 폴리뉴클레오티드 100μg로 예방접종했고; 그룹 14 마우스는 열처리 사멸시킨 보르다텔라 페르투시스 10^7 + N7A 폴리뉴클레오티드 100μg로 예방접종했으며; 그룹 15 마우스는 열처리 사멸시킨 보르다텔라 페르투시스 10^7 + N7B 폴리뉴클레오티드 100μg로 예방접종했다.

상기 예방접종을 1주일 간격으로 2회 반복했다. DC의 최종 투여 후 2주째에, 마우스를 보르다텔라 페르투시스 5×10^6으로 공격했다(비측내 투여). 공격 후에 상기 동물들을 죽여서, 혈청내 보르다텔라 페르투시스 특이적 IgG 양, 폐 속의 박테리아 양, 및 폐 속의 보르다텔라 페르투시스 특이적 항체 분비 세포를 분석했다. 그룹 2 내지 15의 마우스는 그룹 1의 마우스보다 많은 양의 보르다텔라 페르투시스 특이적 IgG를 나타냈다. 또한, 그룹 2 내지 15의 마우스는 그룹 1의 마우스보다 폐 속의 보르다텔라 페르투시스가 적었다. 끝으로, 그룹 2 내지 15의 마우스는 페 속 에 많은 양의 보르다텔라 페르투시스 특이적 항체 분비 세포가 나타났다.

실시예 16

간염 표면 항원에 의한 예방접종

수산화 알루미늄[Alum; 슈퍼포스 바이오섹터(SuperFos Biosector, 덴마크 베드백 소재)] 및/또는 N3A, N6A 또는 N6B 폴리뉴클레오티드와 배합한 재조합 B형 간염 표면 항원[HbsAg; 코르텍스 바이오케미컬(Cortex Biochemical, 미국 캘리포니아주 샌린드로 소재)]에 의한 면역화를 6 내지 8주된 암컷 BALB/C 마우스[찰스 리버(Charles River, 캐나다 퀘벡주 세인트-콘스탄트 소재)]에서 수행했다. 각각의 마우스(그룹당 5마리)에 식염수(그룹 1), HbsAg 1 μg(그룹 2), HbsAg 1 μg + Alum 10 μg(그룹 3), HbsAg 1 μg + Alum 10 μg + N3A 10 μg(그룹 4), HbsAg 1 μg + Alum 10 μg + N3A 100 μg(그룹 5), HbsAg 1 μg + Alum 10 μg + N3B 10 μg(그룹 6), HbsAg 1 μg + Alum 10 μg + N3B 100 μg(그룹 7), HbsAg 1 μg + Alum 10 μg + N6A 10 μg(그룹 8), HbsAg 1 μg + Alum 10 μg + N6A 100 μg(그룹 9), HbsAg 1 μg + Alum 10 μg + N6B 10 μg(그룹 10), 및 HbsAg 1 μg + Alum 10 μg + N6B 100 μg(그룹 11)을 함유한 총 부피 50 μℓ의 용액을 0일째 및 21일째에 1회씩 경골근육내 주사했다. 31일째에 혈장을 회수했다.

HbsAg에 특이적인 항체를 검출하여 종말점 희석 분석 ELISA로 정량했다. 간단하게는, HbsAg 단백질의 고체상(웰당 0.1 μg, 4℃에서 철야)을 사용하여 혈장내 항-HbsAg를 포획한 다음(37℃에서 1시간), 이것을 제조업자의 지시에 따라 양고추냉이 퍼옥시다제 접합 염소 항-마우스 IgG(전체), IgG1, 및 IgG2a로 검출했다 [Clonetyping system; 서던 바이오테크놀러지 인코포레이티드(Southern Biotechnology Inc., 미국 앨라배마주 버밍햄 소재)]. 종말점 적정량은 대조군(그룹 1)의 흡수값(OD 450)보다 2배 큰 값을 나타내는 최대 혈장 희석량으로 정의했다. 데이터는 표 13에 그룹당 5마리의 평균 ±SD로서 표시했다.

표 13

HbsAg로 면역화시킨 마우스에 대한 종말점 적정량

그룹	종말점 적정량		
	IgG 전체 평균 ± SD (범위)	IgG1 평균 ± SD (범위)	IgG2a 평균 ± SD (범위)
1	50 ± 10 (38-65)	728 ± 99 (625-840)	67 ± 39 (0-95)
2	214 ± 134 (80-375)	1516 ± 537 (880-2300)	211 ± 127 (93-420)
3	800 ± 248 (550-1200)	4400 ± 1042 (3500-5800)	259 ± 187 (120-580)
4	849 ± 386 (520-1500)	9300 ± 3365 (4500-13500)	272 ± 255 (90-715)
5	1985 ± 1748 (800-4800)	13320 ± 12993 (4800-35000)	860 ± 719 (150-1850)
6	287 ± 142 (150-520)	3460 ± 1680 (1550-4700)	120 ± 26 (90-155)
7	437 ± 305 (100-750)	4460 ± 1884 (1400-6200)	204 ± 129 (82-420)
8	439 ± 705 (95-1700)	2010 ± 2187 (750-5900)	250 ± 257 (90-700)
9	1185 ± 607 (525-1900)	6420 ± 2528 (4000-9800)	291 ± 154 (90-440)
10	551 ± 309 (250-1000)	2880 ± 1126 (1900-4700)	187 ± 46 (135-260)
11	660 ± 364 (520-1500)	3560 ± 1210 (1700-5000)	205 ± 76 (140-320)

표 13에 제시된 바와 같이, N3A(그룹 4: HbsAg 1 μg + Alum 10 μg + N3A 10 μg 및 그룹 5: HbsAg 1 μg + Alum 10 μg + N3A 100 μg) 및 N6A(그룹 9: HbsAg 1 μg + Alum 10 μg + N6A 100 μg)는 HbsAg에 대한 IgG, IgG1, 및 IgG2a 적정량의 증가로부터 알 수 있듯이 HbsAg에 대한 면역 반응을 유의적으로 자극하는 능력을 가진다.

실시예 17

간염 표면 항원에 의한 경구 예방접종

N6A 또는 N6B 폴리뉴클레오티드와 배합한 재조합 B형 간염 표면 항원에 의한 면역화를 6 내지 8주된 암컷 BALB/C 마우스[찰스 리버(캐나다 퀘벡주 세인트-콘스탄트 소재)]에서 수행했다. 각각의 마우스(그룹당 5마리)에 식염수(그룹 1), HbsAg 10 μg(그룹 2), HbsAg 10 μg + N6A 1 μg(그룹 3), HbsAg 10 μg + N6A 10 μg(그룹 4), HbsAg 10 μg + N6A 100 μg(그룹 5), HbsAg 10 μg + N6B 1 μg(그룹 6), HbsAg 10 μg + N6B 10 μg(그룹 7), 및 HbsAg 10 μg + N6B 100 μg(그룹 8)을 함유한 총 부피 50 μℓ의 용액을 0, 7, 및 14일째에 경구 투여했다. 21일째에 혈장 및 장 세척물을 회수했다. 장 세척물(IgA 정량용)은 PBS 함유 프로테이나제 억제제(펩스타틴 10 μg, 루펩틴 10 μg, 안티파인 10 μg 및 벤자미딘 50 μg) 0.2 ml을 부드럽게 피페팅함으로써 수득했다.

HbsAg에 특이적인 항체를 검출하여 ELISA로 정량했다. 간단하게는, HbsAg 단백질의 고체상(웰당 0.1 μg, 4°C에서 철야)을 사용하여 혈장내 또는 장 세척물내 항-HbsAg를 포획한 다음(37°C에서 1시간), 이것을 제조업자의 지시에 따라 양고추냉이 퍼옥시다제 접합 염소 항-마우스 IgA(장 세척물에서) 및 염소 항-마우스 전체 IgG(혈장에서)로 검출했다(Clonetyping system, 서던 바이오테크놀러지 인코포레이티드). 데이터는 표 14에 OD(450 nm) 단위로 그룹당 5마리의 평균 ±SD로서 표시했다. IgA에 대한 OD는 장 세척물을 1:2로 희석해서 수득했고, 전체 IgG는 혈청을 1:16으로 희석해서 수득했다.

표 14

HbsAg로 경구 면역화시킨 마우스에 대한 OD(450 nm)

그룹	OD (450nm에서의 광학 밀도)	
	1:2 희석물에서의 IgA 전체 평균 ± SD (범위)	1:32 희석물에서의 전체 IgG 평균 ± SD (범위)
1	0.256 ± 0.123 (0.118-0.453)	0.124 ± 0.042 (0.060-0.185)
2	0.452 ± 0.119 (0.290-0.558)	0.124 ± 0.055 (0.060-0.191)
3	0.662 ± 0.166 (0.459-0.790)	0.138 ± 0.055 (0.080-0.254)
4	0.853 ± 0.543 (0399-1.906)	0.141 ± 0.044 (0.090-0.213)
5	0.650 ± 0.276 (0.440-1.170)	0.121 ± 0.055 (0.064-0.215)
6	0.549 ± 0.242 (0.323-0.865)	0.104 ± 0.030 (0.072-0.161)
7	0.333 ± 0.156 (0.171-0.628)	0.225 ± 0.135 (0.103-0.414)
8	0.492 ± 0.074 (0.387-0.601)	0.120 ± 0.057 (0.063-0.229)

표 14에 제시된 바와 같이, N6A(그룹 3: HbsAg 10 μg + N6A 1 μg; 그룹 4: HbsAg 10 μg + N6A 10 μg; 및 그룹 5: HbsAg 10 μg + N6A 100 μg) 및 N6B(그룹 8: HbsAg 10 μg + N6B 100 μg)는 경구 투여 후 HbsAg에 대한 면역 반응을 유의적으로 자극했다.

본 명세서에 기술된 모든 특허, 공개 공보 및 발췌문들은 그 전체내용이 본원에 참고인용된 것이다. 상기 기술된 모든 내용은 본 발명의 바람직한 구체예만을 예시한 것으로서, 이의 다양한 변형이나 수정이 하기 청구의 범위에 정의된 본 발명의 취지 및 범위를 벗어나지 않는 한도내에서 이루어질 수 있음은 자명한 것이다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.
6개의 염기를 함유한 분리된 3'-OH, 5'-OH 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 조성물로서,

a) 상기 염기의 적어도 50%는 구아닌이고;

b) 5'염기도 구아닌이며;

c) 조성물을 동물 또는 사람에게 투여했을 때 그 안에서 면역 반응을 자극하거나, 조성물을 시험관내 항원 제시 세포에 투여했을 때 그것을 자극하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 2.
제1항에 있어서, 폴리뉴클레오티드 서열이 5'GGNNGG3'을 포함하되, 여기서 N은 G, C, A, 또는 T인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3.
제1항에 있어서, 폴리뉴클레오티드 서열이 5'GGGNGG3'을 포함하되, 여기서 N은 G, C, A, 또는 T인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4.
제1항에 있어서, 폴리뉴클레오티드 서열이 5'GTGTGT3', 5'GGTGGG3', 5'GGGTGG3', 5'GGGCGG3', 5'GGGAGG3', 또는 5'GGGGGG3'인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5.
제1항에 있어서, 폴리뉴클레오티드 서열이 5'GGGTGG3', 또는 5'GGGAGG3'인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6.
제1항에 있어서, 폴리뉴클레오티드 서열이 포스포디에스테르 주쇄를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7.
제1항에 있어서, 폴리뉴클레오티드 서열이 포스포로티오에이트 주쇄를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8.
제1항에 있어서, 동물 또는 사람에서 1종 이상의 항원 제시 세포를 자극하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9.
제1항 또는 제8항에 있어서, 항원 제시 세포가 수지상 세포인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 10.
제1항에 있어서, 면역 반응의 자극이 세포 크기 및/또는 입도의 증가, IL-1 베타, IL-12 또는 IFN-감마 생성의 증가, CD40, CD80, CD86 또는 MHC II 세포 표면 발현의 증가, 및 OX-2 세포 표면 발현의 감소, 및 엔도시토시스의 증가로 구성된 그룹에서 선택된 1종 이상의 수지상 세포 반응을 포함하는 것을 특징으로 하는 조 성물.

청구항 11.
제1항에 있어서, 면역 반응이 전신성 면역 반응 또는 점막성 면역 반응인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 12.
제1항에 있어서, 항원 폴리펩티드를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 13.
제1항에 있어서, 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 14.
제1항에 있어서, 면역조절제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 15.
제1항에 있어서, 조성물을 항원 제시 세포에 투여하여 이것을 자극한 다음, 이 자극된 항원 제시 세포를 동물 또는 사람에게 투여하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 16.
동물 또는 사람에서 면역 반응을 자극하는 데 유용한 약제 제조시 사용되는 제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 기재된 조성물의 용도.

청구항 17.
시험관내 항원 제시 세포의 자극에 사용되는 제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 기재된 조성물의 용도.