 <b>(19) 대한민국특허청(KR)</b> <b>(12) 공개특허공보(A)</b>	<b>(11) 공개번호</b> 10-2016-0042917 <b>(43) 공개일자</b> 2016년04월20일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <b>C12N 15/117</b> (2010.01) <b>A61K 39/00</b> (2006.01) <b>A61K 48/00</b> (2006.01) <b>B82Y 5/00</b> (2011.01) (52) CPC특허분류 <b>C12N 15/117</b> (2013.01) <b>A61K 39/0008</b> (2013.01) (21) 출원번호 <b>10-2016-7004849</b> (22) 출원일자(국제) <b>2014년07월25일</b> 심사청구일자 <b>없음</b> (85) 번역문제출일자 <b>2016년02월24일</b> (86) 국제출원번호 <b>PCT/US2014/048291</b> (87) 국제공개번호 <b>WO 2015/013673</b> 국제공개일자 <b>2015년01월29일</b> (30) 우선권주장 61/858,558 2013년07월25일 미국(US)	(71) 출원인 <b>엑시큐어, 인크.</b> 미국 60077-5318 일리노이주 스코키 스위트 410 라몬 애비뉴 8045 (72) 발명자 <b>라도비크-모레노, 알렉산다르, 필리프</b> 미국 16801 펜실베이니아주 스테이트 칼리지 크랩 애플 드라이브 1055 <b>메이더, 크리스토퍼, 씨.</b> 미국 60077-5318 일리노이주 스코키 스위트 410 라몬 애비뉴 8045 (뒷면에 계속) (74) 대리인 <b>양영준, 김영</b>

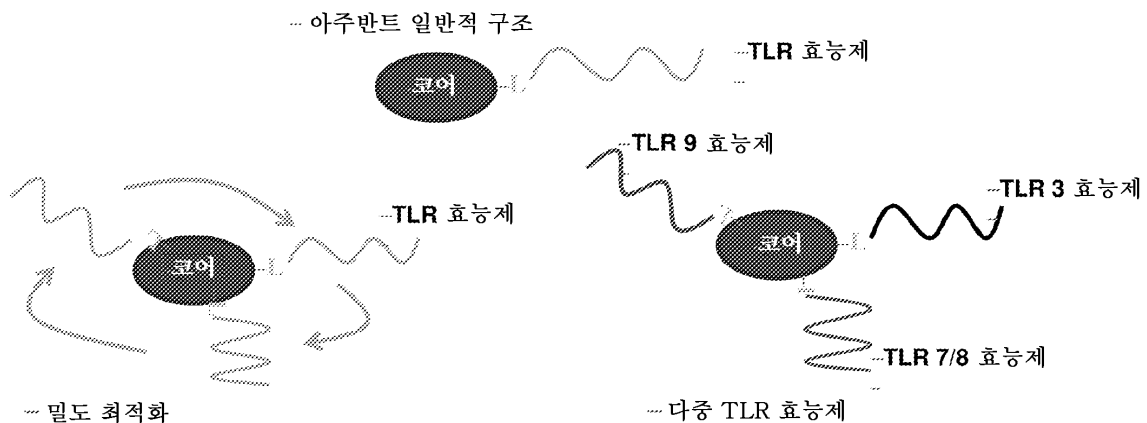
전체 청구항 수 : 총 33 항

(54) 발명의 명칭 **예방 및 치료 용도를 위한 면역자극제로서의 구형 핵산-기재 구축물**

### (57) 요약

본 발명의 측면은 구형 핵산-기재 구축물 및 관련 방법 및 그의 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 핵산 상호작용 복합체, 예컨대 TLR의 효능제를 활성화하고, 면역 반응을 자극하고, 질환 예컨대 감염성 질환, 암, 알레르기, 알레르기성 질환 및 자가면역 질환을 치료하는데 유용하다.

### 대표도



도 1 -A

(52) CPC특허분류

**A61K 39/0011** (2013.01)

**A61K 48/00** (2013.01)

**B82Y 5/00** (2013.01)

**C12N 2310/17** (2013.01)

**C12N 2320/32** (2013.01)

(72) 발명자

**날라가틀라, 수바라오**

미국 60077-5318 일리노이주 스코키 스위트 410 라  
몬 애비뉴 8045

**하산, 와레프타**

미국 60077-5318 일리노이주 스코키 스위트 410 라  
몬 애비뉴 8045

**러브, 아론**

미국 60077-5318 일리노이주 스코키 스위트 410 라  
몬 애비뉴 8045

**그라즈노프, 세르게이**

미국 60077-5318 일리노이주 스코키 스위트 410 라  
몬 애비뉴 8045

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

핵산-상호작용 복합체의 효능제의 코로나를 포함하며, 여기서 핵산-상호작용 복합체의 효능제의 표면 밀도는 적어도  $0.3 \text{ pmol/cm}^2$ 인

나노규모 구축물.

#### 청구항 2

핵산-상호작용 복합체의 효능제의 코로나 및 코로나 내로 혼입된 항원을 포함하며, 여기서 항원의 표면 밀도는 적어도  $0.3 \text{ pmol/cm}^2$ 인

나노규모 구축물.

#### 청구항 3

제2항에 있어서, 항원이 적어도 2종의 상이한 유형의 항원을 포함하는 것인 나노규모 구축물.

#### 청구항 4

핵산-상호작용 복합체의 적어도 2종의 효능제가 혼입된 코로나를 포함하며, 여기서 효능제는 TLR 3, 7/8 및/또는 9 효능제로 이루어진 군으로부터 선택된 것인

나노규모 구축물.

#### 청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산-상호작용 복합체의 효능제가 스페이서를 함유하는 것인 나노규모 구축물.

#### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산-상호작용 복합체의 효능제가 RNA 또는 DNA인 나노규모 구축물.

#### 청구항 7

제6항에 있어서, 핵산-상호작용 복합체의 효능제가 이중 가닥 RNA인 나노규모 구축물.

#### 청구항 8

제7항에 있어서, 이중 가닥 RNA가 폴리(I:C)인 나노규모 구축물.

#### 청구항 9

제6항에 있어서, 핵산-상호작용 복합체의 효능제가 단일 가닥 RNA인 나노규모 구축물.

#### 청구항 10

제9항에 있어서, 단일 가닥 RNA가 UUG-모티프를 함유하는 것인 나노규모 구축물.

#### 청구항 11

제6항에 있어서, 핵산-상호작용 복합체의 효능제가 비메틸화 데옥시리보핵산인 나노규모 구축물.

#### 청구항 12

제11항에 있어서, 비메틸화 데옥시리보핵산이 CpG 올리고뉴클레오타이드인 나노규모 구축물.

### 청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 코로나의 중심에 금속성인 나노입자 코어를 함유하는 나노규모 구축물.

### 청구항 14

제13항에 있어서, 금속성 코어가 금, 은, 백금, 알루미늄, 팔라듐, 구리, 코발트, 인듐, 니켈 및 그의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 나노규모 구축물.

### 청구항 15

제13항에 있어서, 나노입자 코어가 금을 포함하는 것인 나노규모 구축물.

### 청구항 16

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 분해성인 나노규모 구축물.

### 청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 나노규모의 직경이 1 nm 내지 약 250 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 240 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 230 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 220 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 210 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 200 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 190 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 180 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 170 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 160 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 150 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 140 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 130 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 120 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 110 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 100 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 90 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 80 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 70 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 60 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 50 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 40 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 30 nm 평균 직경, 또는 약 1 nm 내지 약 20 nm 평균 직경, 또는 약 1 nm 내지 약 10 nm 평균 직경인 나노규모 구축물.

### 청구항 18

핵산-상호작용 복합체의 효능제의 코로나를 포함하며, 여기서 효능제는 적어도 1개의 포스포디에스테르 뉴클레오타이드간 연결을 갖는 핵산인

나노규모 구축물.

### 청구항 19

제18항에 있어서, 효능제가 CpG 올리고뉴클레오타이드인 나노규모 구축물.

### 청구항 20

제18항 또는 제19항에 있어서, 핵산의 각각의 뉴클레오타이드간 연결이 포스포디에스테르 연결인 나노규모 구축물.

### 청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 코로나가 구형 코로나인 나노규모 구축물.

### 청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항의 나노규모 구축물 및 담체를 포함하는 백신.

### 청구항 23

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항의 나노규모 구축물을 세포로 전달하는 것을 포함하는, 치료제를 세포로 전달하는 방법.

#### 청구항 24

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항의 나노규모 구축물을 세포로 전달하는 것을 포함하는, 표적 분자의 발현을 조절하는 방법.

#### 청구항 25

제24항에 있어서, 표적 분자가 TLR3, 7, 8 및 9로 이루어진 군으로부터 선택된 TLR인 방법.

#### 청구항 26

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항의 나노규모 구축물을 세포로 전달하는 것을 포함하는, TLR을 활성화시키는 방법.

#### 청구항 27

대상체에게 제1항 내지 제21항 중 어느 한 항의 나노규모 구축물을 면역 반응을 자극하기 위한 유효량으로 투여하는 것을 포함하는,

대상체를 치료하는 방법.

#### 청구항 28

제27항에 있어서, 대상체가 감염성 질환을 갖는 것인 방법.

#### 청구항 29

제27항에 있어서, 대상체가 암을 갖는 것인 방법.

#### 청구항 30

제27항에 있어서, 대상체가 자가면역 질환을 갖는 것인 방법.

#### 청구항 31

제27항에 있어서, 대상체가 알레르기를 갖는 것인 방법.

#### 청구항 32

제27항에 있어서, 대상체가 알레르기성 질환을 갖는 것인 방법.

#### 청구항 33

대상체에게 제18항 내지 제21항 중 어느 한 항의 나노규모 구축물을 면역 반응을 자극하기 위한 유효량으로 투여하는 것을 포함하는,

대상체에서 면역 반응을 유도하는 방법.

### 발명의 설명

### 기술 분야

[0001]

관련 출원

[0002]

본원은 35 U.S.C. § 119(e) 하에 발명의 명칭 "예방 및 치료 용도를 위한 면역자극제로서의 구형 핵산-기재 구축물"로 2013년 7월 25일에 출원된 미국 가출원 일련 번호 61/858,558을 우선권 주장하며, 이는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0003]

발명의 분야

[0004]

본 발명은 핵산-상호작용 복합체의 효능제 예컨대 TLR의 효능제의 나노규모 구축물, 뿐만 아니라 그의 방법 및 조성물에 관한 것이다.

## 배경 기술

[0005] 면역계는 병원체 및 노화 또는 악성 숙주 세포를 비롯하여 외래의 유해하고 불필요한 물질을 제거하기 위한 고도로 진화된, 정교하게 정교한 내인성 메카니즘이다. 치료 또는 예방 목적을 위해 면역계를 조정하는 것이 특정 면역 세포의 활성을 조정하는 화합물을 도입함으로써 가능한 것으로 공지되어 있다. 주된 예는 병원체 뿐만 아니라 암성 세포에 대한 보호를 유도하는 능력을 보여주는 백신이다. 최초의 현대 백신 제제는 살아있는/감쇠된 또는 불활성화된 병원체를 포함하였으나, 이들은 다수의 경우에 너무 독성인 것으로 여겨졌거나, 또는 보호 면역을 제공하지 않았다. 정제된 단백질 유도체 및 다른 항원 서브유닛 백신 전략이 추구되었으나, 이들은 전형적으로 가벼운 보호 반응 또는 비효율적 반응을 유도하였다. 효과적인 면역이 대부분의 경우에 면역자극 화합물의 사용을 필요로 하는 것으로 공지되어 있으며 특히 이것이 세포-매개 면역 및 면역 기억을 비롯하여 보다 강건하고 특이적이며 장기-지속되는 반응을 유도하기 위해 필요한 신호를 제공한다는 것이 이제는 인지되어 있다. 이들 반응의 특성은 도입된 면역자극 화합물(들)의 유형에 의해 조정될 수 있다. 사실상, 적절한 항원 자극의 존재 하에 함께 투여된 면역자극 화합물이 감염성 질환 및 암을 비롯한 다양한 질병을 치료 또는 예방하기 위한 잠재력을 가지면서 매우 다양한 면역 반응을 도출하는데 사용될 수 있는 것으로 가정되어 왔다. 이들은 또한 잠재적으로 면역손상 집단, 예컨대 소아 및 노인에 대한 백신접종을 위해 사용될 수 있다.<sup>1</sup>

[0006] 기존 백신은 AIDS, 말라리아, 클라미디아, 다양한 악성종양 및 알레르기 또는 알레르기성 질환, 예컨대 천식을 비롯하여 중대한 세계적 영향을 갖는 다양한 질환에서 효과적인 면역 반응을 유도하는데 실패하였다. 개발 중인 면역자극 화합물 중에서, 톨-유사 수용체 (TLR)의 효능제가 뛰어난 잠재력을 나타낸 바 있다. TLR4의 효능제, 예컨대 모노포스포릴 지질 A (MPL)는 일부 경우에 다양한 국가에서 임상 시험 및 승인의 후기 단계에 도달해 있다.<sup>2</sup> 이들 유망한 결과에도 불구하고, 세포내 병원체 및 암을 제거할 수 있는 반응을 안전하고 효과적으로 유도할 수 있는 화합물, 예컨대 세포-매개 면역의 유도제에 대한 명백하고 유의한 필요성이 여전히 존재한다. TLR 3, TLR 7/8 및 TLR 9의 효능제는 Th1 세포-매개 면역 반응을 유도하는 그의 강력한 능력으로 인해 탁월한 잠재력을 갖는다. 합성 TLR 7/8 효능제인 이미퀴모드는 표재성 암종 및 생식기 혹을 비롯한 다양한 피부 질환의 치료에 대해 승인되었으며, 다양한 다른 적응증에 대해 개발되고 있다. 유사하게, TLR 9의 효능제는 거대한 미충족 의료 필요를 갖는 다양한 질환의 치료를 위한 임상 개발의 다양한 단계에 있다. 그러나, 효능의 부족, 오프-타겟 포스포로티오에이트 효과 및 독성으로 인한 우려는 TLR 7/8 및 9 효능제의 효과적인 임상 해석을 더디게 하고 있다.

## 발명의 내용

[0007] 나노규모 구축물을 사용하여 면역 반응을 증진시키고 핵산 상호작용 복합체 예컨대 TLR을 활성화시키기 위한 신규 방법 및 조성물이 본원에 기재된다. 본 발명의 측면은, 핵산-상호작용 복합체의 효능제의 코로나를 가지며, 여기서 핵산-상호작용 복합체의 효능제의 표면 밀도는 적어도  $0.3 \text{ pmol/cm}^2$ 인 나노규모 구축물에 관한 것이다.

[0008] 다른 측면에서, 본 발명은 핵산-상호작용 복합체의 효능제의 코로나 및 코로나 내로 혼입된 항원을 갖는 나노규모 구축물이다. 일부 실시양태에서, 항원의 표면 밀도는 적어도  $0.3 \text{ pmol/cm}^2$ 이다. 다른 실시양태에서, 항원은 적어도 2종의 상이한 유형의 항원을 포함한다.

[0009] 또 다른 측면에서, 본 발명은, 핵산-상호작용 복합체의 적어도 2종의 효능제가 혼입된 코로나를 가지며, 여기서 효능제는 TLR 3, 7/8 및/또는 9 효능제로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 나노규모 구축물이다.

[0010] 일부 실시양태에서, 핵산-상호작용 복합체의 효능제는 스페이서를 함유한다.

[0011] 다른 실시양태에서, 핵산-상호작용 복합체의 효능제는 RNA 또는 DNA이다. 핵산-상호작용 복합체의 효능제는 예를 들어 이중 가닥 RNA, 예컨대 폴리(I:C)일 수 있다. 대안적으로, 핵산-상호작용 복합체의 효능제는 단일 가닥 RNA, 예컨대 UUG-모티프를 함유하는 RNA일 수 있다. 일부 실시양태에서, 핵산-상호작용 복합체의 효능제는 비메틸화 데옥시리보핵산, 예컨대 CpG 올리고뉴클레오타이드이다.

[0012] 일부 실시양태에서, 나노규모 구축물은 코로나의 중심에, 임의로 금속성인 나노입자 코어를 함유한다. 금속성 코어는 금, 은, 백금, 알루미늄, 팔라듐, 구리, 코발트, 인듐, 니켈 및 그의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 일부 실시양태에서, 나노입자 코어는 금을 포함한다. 다른 실시양태에서, 나노규모 구축물은 분해성이다.

- [0013] 특정 실시양태에서, 나노규모 구축물의 직경은 1 nm 내지 약 250 nm 직경, 약 1 nm 내지 약 240 nm 직경, 약 1 nm 내지 약 230 nm 직경, 약 1 nm 내지 약 220 nm 직경, 약 1 nm 내지 약 210 nm 직경, 약 1 nm 내지 약 200 nm 직경, 약 1 nm 내지 약 190 nm 직경, 약 1 nm 내지 약 180 nm 직경, 약 1 nm 내지 약 170 nm 직경, 약 1 nm 내지 약 160 nm 직경, 약 1 nm 내지 약 150 nm 직경, 약 1 nm 내지 약 140 nm 직경, 약 1 nm 내지 약 130 nm 직경, 약 1 nm 내지 약 120 nm 직경, 약 1 nm 내지 약 110 nm 직경, 약 1 nm 내지 약 100 nm 직경, 약 1 nm 내지 약 90 nm 직경, 약 1 nm 내지 약 80 nm 직경, 약 1 nm 내지 약 70 nm 직경, 약 1 nm 내지 약 60 nm 직경, 약 1 nm 내지 약 50 nm 직경, 약 1 nm 내지 약 40 nm 직경, 약 1 nm 내지 약 30 nm 직경, 또는 약 1 nm 내지 약 20 nm 직경, 또는 약 1 nm 내지 약 10 nm 직경이다.
- [0014] 다른 측면에서, 본 발명은 핵산-상호작용 복합체의 효능제의 코로나의 나노규모 구축물이며, 여기서 효능제는 적어도 1개의 포스포디에스테르 뉴클레오타이드간 연결을 갖는 핵산이다. 일부 실시양태에서, 효능제는 CpG 올리고뉴클레오타이드이다. 다른 실시양태에서, 핵산의 각각 뉴클레오타이드간 연결은 포스포디에스테르 연결이다.
- [0015] 본 발명의 실시양태에서, 코로나는 구형 코로나이다.
- [0016] 본원에 기재된 나노규모 구축물 및 담체로 구성된 백신이 본 발명의 다른 측면에 따라 제공된다.
- [0017] 본 발명의 나노규모 구축물을 세포로 전달함으로써 치료제를 세포로 전달하는 방법이 다른 측면에서 제공된다.
- [0018] 표적 분자의 발현을 조절하는 방법이 본 발명의 다른 측면에서 제공된다. 상기 방법은 본 발명의 나노규모 구축물을 세포로 전달하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적 분자는 TLR3, 7, 8 및 9로 이루어진 군으로부터 선택된 TLR이다.
- [0019] 본원에 기재된 바와 같은 나노규모 구축물을 세포로 전달함으로써 TLR을 활성화시키는 방법이 본 발명의 다른 측면에서 제공된다.
- [0020] 다른 측면에 따르면, 본 발명은 대상체에게 본원에 기재된 바와 같은 나노규모 구축물을 면역 반응을 자극하기 위한 유효량으로 투여하는 것을 포함하는, 대상체를 치료하는 방법이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 감염성 질환, 암, 자가면역 질환, 알레르기 또는 알레르기성 질환 예컨대 천식을 갖는다.
- [0021] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 대상체에게 핵산-상호작용 복합체의 효능제 (여기서 효능제는 적어도 1종의 포스포디에스테르 뉴클레오타이드간 연결을 갖는 핵산임)의 코로나의 나노규모 구축물을 면역 반응을 자극하기 위한 유효량으로 투여함으로써, 대상체에서 면역 반응을 유도하는 방법이다.
- [0022] 특정 실시양태에서, 방법은 치료 또는 검출 모달리티를 세포로 전달하는 것을 포함한다.
- [0023] 본 발명의 추가 측면은 나노입자 코어를 임의로 포함하며; 핵산-상호작용 복합체의 효능제를 갖는 나노규모 구축물, 및 핵산-상호작용 복합체-코로나의 효능제의 어셈블리에 대한 지침서를 포함하는 키트에 관한 것이다. 특정 실시양태에서, 키트는 사용 지침서를 추가로 포함한다.
- [0024] 본 발명의 각각의 제한사항은 본 발명의 다양한 실시양태를 포괄할 수 있다. 따라서, 어느 한 요소 또는 요소의 조합을 포함하는 본 발명의 각각의 제한사항은 본 발명의 각각의 측면에 포함될 수 있는 것으로 예상된다. 본 발명은 그의 적용에서 하기 설명에 기재되거나 도면에 예시된 구성요소의 구성 및 배열의 세부사항에 제한되지 않는다. 본 발명은 다른 실시양태가 가능하고, 다양한 방식으로 실시되거나 수행될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [0025] 첨부 도면은 실제에 비례하여 도시되도록 의도되지 않는다. 도면에서, 다양한 도면에 도시되어 있는 동일하거나 거의 동일한 각각의 성분은 유사 번호로 표시된다. 명확성을 위해, 모든 구성요소가 모든 도면에 표시되어 있지 않을 수 있다. 도면에서:
- 도 1A-1B는 본 발명의 나노규모 구축물의 개략적인 비제한적 예를 제시한다. A. 코어 및 그에 결합된 핵산 상호작용 복합체의 1종 이상의 효능제, 예컨대 TLR 효능제를 갖는 아주반트 나노규모 구축물의 일반 구조를 제시한다. B. 코어 및 1종 이상의 TLR 효능제 및 그에 결합된 1종 이상의 항원을 갖는 아주반트 나노규모 구축물의 일반 구조를 제시한다.
- 도 2는 용액 중 핵산-상호작용 복합체 (CpG 올리고뉴클레오타이드)의 효능제에 비해 대식세포에서 본 발명의 나노규모 구축물의 현저하게 증진된 효력을 도시하는 일련의 그래프이다.
- 도 3은 밤새 인큐베이션한 후에 용액 중 핵산-상호작용 복합체 (CpG 올리고뉴클레오타이드)의 효능제에 비해 대식

세포에서 본 발명의 나노규모 구축물의 현저하게 증진된 효력을 도시하는 일련의 그래프이다.

도 4는 용액 중 핵산-상호작용 복합체 (CpG 올리고뉴클레오타이드)의 효능제에 비해 본 발명의 나노규모 구축물의 사용시에 시토카인 분비의 증진된 수준을 도시하는 일련의 그래프이다. 시토카인 유도에 대한 효과를 나노규모 구축물 및 TLR 효능제 군 둘 다에서 포스포디에스테르 및 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결을 갖는 올리고뉴클레오타이드 둘 다에 대해 검사하였다.

도 5는 용액 중 포스포디에스테르 및 포스포로티오에이트 CpG 올리고뉴클레오타이드와 비교하여 포스포디에스테르 CpG 올리고뉴클레오타이드를 갖는 본 발명의 나노규모 구축물로의 자극에 반응한 TLR9 활성화를 도시하는 선 및 막대 그래프이다.

도 6은 상이한 여러 CpG 올리고뉴클레오타이드 서열에 비해 본 발명의 나노규모 구축물의 효력에서의 다중 배수 증가를 도시하는 일련의 그래프이다. CpG 1826은 서열 1이고, 그 아래의 rp1V는 서열 2이다. CpG 1668은 서열 3이고, 그 아래의 rp1V는 서열 4이다.

도 7은 나노규모 구축물 코어 크기 조정의 효과를 도시하는 일련의 그래프이며, 효능제 활성의 증진에 대해 시사한다.

도 8은 CpG 올리고뉴클레오타이드보다 더 신속하며 지속된 활성화를 도시하는 그래프를 제시한다.

도 9는 서열-의존성 방식으로 효능제 활성을 조정하는 포스포로티오에이트 변형의 능력을 도시하는 일련의 그래프이다. CpG 1668의 경우: P0는 서열 5이고, C\*G는 서열 6이고, 5PS2/C\*G는 서열 7이고, PS는 서열 8이다. CpG 1826의 경우: P0는 서열 9이고, C\*G는 서열 10이고, 5PS2/C\*G는 서열 11이고, PS는 서열 12이다.

도 10은 효능제 활성에 영향을 미치는 올리고뉴클레오타이드 로딩 밀도의 능력을 도시하는 일련의 그래프이다.

도 11은 CpG P0/P0 나노규모 구축물의 활성화의 시간 경과를 도시하는 그래프를 제시한다. 시험된 구축물은 인큐베이션 >4시간까지 활성화되지 않았다.

도 12는 5'Chol CpG P0 나노규모 구축물이 낮은 nM 범위의 활성화를 보여주며 5'C18이 활성을 폐지시켰다는 것을 나타내는 그래프를 제시한다.

도 13은 사전-플레이팅된 대식세포가 후속 활성화를 위해 보다 적합하다는 것을 나타내는 일련의 그래프이다.

도 14는 대식세포에 의한 낮은 수준의 IFN-감마 분비를 나타내는 일련의 그래프이다.

도 15는 면역요법제 SNA (AST-008)의 표현을 제시한다. 도 6은 SNA가 단일 나노입자 상에 치료 백신 항원 및 아주반트를 공동-제시할 수 있으며 다중 면역자극 수용체 (예를 들어 TLR 3, 4, 7/8, 9)를 동시에 표적화할 수 있다는 것을 제시한다.

도 16은 AST-008이 유발된 세포내이입을 통해 엔도솜에 어떻게 진입할 수 있는지를 나타내는 개략도이며, 여기서 이것은 이어서 다목적 면역계 자극에 사용될 수 있다. 엔도솜 내에서, AST-008은 SNA 요법을 위한 분자 표적인 TLR 9 수용체를 통해 면역계 신호전달을 자극하여 선천성 및 적응성 면역 반응 둘 다를 유도한다. AST-008은 또한 TLR 3, 4, 7/8을 표적화하여 선천성 및 적응성 면역 반응을 일으킬 수 있다.

도 17A 및 17B는 AST-008이 시험관내에서 상응하는 CpG 올리고데옥시뉴클레오타이드 (올리고)보다 더 높은 염증유발 반응을 유도한다는 것을 제시하는 일련의 그래프이다. 도 17A는 CTL 올리고, CTL SNA, CpG 1826 및 AST-008에 의해 유도된 TNF, IL-12 및 IL-6의 발현 수준을 제시한다. 도 17B는 나타난 작용제로부터 유도된 NF-κB 활성화를 나타낸다.

도 18은 AST-008이 단일 피하 용량의 투여 후에 배액 림프절을 표적화한다는 것을 나타낸다. AST-008을 은-염색하여 금 코어의 광 산란을 증진시키고, 이어서 에오신으로 대조염색하였다. 4X 명시야 배율을 사용하였다.

도 19는 AST-008의 생체내 활성을 예시하는 그래프이다. 마우스에게 5.1 nmol 용액의 50 μL 볼루스 꼬리 정맥 (정맥내) 주사 (AST-008-po, AST-008-ps, CpG 1826-po, CpG 1826-ps, GpC-po SNA, GpC-ps SNA, GpC-po, 또는 GpC-ps)를 제공하고, 이어서 주사 1, 3 및 6시간 후에 IL-12 발현에 대해 분석하였다 (군당 24마리 마우스, 각 시점당 3마리). IL-12 수준은 PBS에 대한 배수로서 표현된다. AST-008 아키텍처는 유리 올리고데옥시뉴클레오타이드에 비해 대략 20배 만큼 IL-12의 유도를 증진시켰고, 효과는 초기 투여 후 6시간 초과 동안 지속되었다.

도 20A-20C는 AST-008이 명반 또는 CpG 올리고뉴클레오타이드보다 균형을 이룬 Th1/Th2 반응 (도 20A) 및 보다 높은 IgG2a 항체 (도 20B) 반응을 둘 다 유도한다는 것을 나타내는 한 쌍의 그래프 및 차트로 이루어진다. 결과



는 도 20C에 표로 제시된다.  $**p < 0.01$ .

도 21A-21B는 AST-008이 명반 또는 CpG 올리고뉴클레오타이드보다 더 효과적으로 세포성 반응을 유도한다는 것을 제시한다. 도 21A는 프로토콜을 개략적으로 나타낸다: 비장세포를 28일 동안 성장시키고, 제0일 및 제21일에 챌린지하고, 이어서 SIINFEKL로 재자극하고, 제28일에 ELISPOT를 사용하여 INF- $\gamma$ 에 대해 프로빙하였다. 도 21B는 결과를 도시하는 그래프이다.  $****p < 0.0001$ .

도 22A-22B는 AST-008이 생체내 림프종 모델에서 완전한 종양-제거 면역 반응을 유도한다는 것을 나타낸다. 도 22A는 프로토콜을 예시한다: C57BL/6 마우스의 우측 측복부에  $1 \times 10^6$ 개의 E.G7-OVA 림프종을 주사하였다 (군당 11마리). 이어서, 마우스에게 100  $\mu$ g OVA s.c., 1.8  $\mu$ g OVA<sub>257-264</sub> s.c. 및 AST-008 중 0.92 nmol 올리고를 3회 챌린지하고, 2000 mm<sup>3</sup>에서 안락사시켰다. 도 22B는 결과의 그래프이다. 2원 ANOVA를 사용하여  $* p < 0.05$ .

도 23A-23B는 AST-008이 CpG 올리고데옥시뉴클레오타이드보다 우월한 항종양 활성 및 보다 긴 생존을 나타낸다는 것을 제시한다. 그래프는 C57BL/6 마우스에게  $1 \times 10^6$ 개의 E.G7-OVA 림프종을 그의 우측 측복부에 주사한 다음 (군당 11마리) PBS, PBS 및 OVA, CpG 1826 및 OVA, 또는 AST-008 및 OVA를 3회 챌린지한 후의 종양 부피 (도 23A) 및 퍼센트 생존 (도 23B)을 제시한다.  $* p < 0.05$ .

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 본 발명은 그의 적용에서 하기 설명에 기재되거나 도면에 예시된 구성요소의 구성 및 배열의 세부 사항으로 제한되지 않는다. 본 발명은 다른 실시양태가 가능하고, 다양한 방식으로 실시되거나 수행될 수 있다. 또한, 본원에 사용된 어구 및 용어는 설명을 위한 것으로, 제한사항으로 여겨져서는 안 된다. 본원에서 "비롯한", "포함하는", 또는 "갖는", "함유하는", "수반하는", 및 그의 변형의 사용은 그 다음에 나열되는 항목 및 그의 등가물 뿐만 아니라 추가의 항목을 포괄하는 것으로 의도된다.

[0027] 일부 측면에서, 본 발명은 특히 더 빠른 활성화를 달성하고, 다가 구조를 만들고, 세포 분포를 변화시키고, 다양한 아주반트 및 항원-함유 구조물의 간단하고 확장가능한 합성을 용이하게 함으로써 종래 TLR 3, TLR 7/8 및 TLR 9 효능제에 의해 경험하였던 여러 주요 장애물을 극복한다. 본 발명의 구축물은 특히 예를 들어 AIDS, 말라리아, 클라미디아, 캄필로박터, 시토크로바이러스, 뎅기, 엡스타인-바르 단핵구증, 구제역, 광견병, 헬리코박터 필로리 위 궤양, 간염 A, B, C, 단순 포진, 인플루엔자, 리슈마니아증, 콜레라, 디프테리아, 헤모필루스 인플루엔자, 수막구균 수막염, 흑사병, 폐렴구균성 폐렴, 파상풍, 장티푸스열, 호흡기 세포융합 바이러스, 리노바이러스, 주혈흡충증, 시겔라, 스트렙토코쿠스 그룹 A 및 B, 결핵, 비브리오 콜레라, 살모넬라, 아스페르길루스, 블라스토크스, 히스토플라스마, 칸디다, 크립토코쿠스, 뉴모시스티스 및 요로 감염; 다양한 식품 알레르기 예컨대 땅콩, 과일, 마늘, 귀리, 고기, 우유, 어류, 패류, 대두, 나무 견과류, 밀, 글루텐, 계란, 술과이트; 예컨대 테트라시클린, 딜란틴, 카르바마제핀, 페니실린, 세팔로스포린, 숄폰아미드, NSAID, 정맥내 조영 염료, 국부 마취제에 대한 다양한 약물 알레르기; 자가면역 질환 예컨대 다발성 경화증, 루푸스, 염증성 장 질환, 크론병, 췌장성 결장염, 천식 및 COPD; 및 암 예컨대 흑색종, 유방암, 전립선암, 방광암, NSCLC, 다형성 교모세포종을 비롯한 넓은 다양한 질환/감염을 치료함에 있어 예방 또는 치료 용도를 위한 더 효과적인 백신을 제공한다.

[0028] 본 발명의 한 세트의 예시적인 나노규모 구축물이 도 1의 개략도에 제시되어 있다. 본원에 기재된 플랫폼은 핵산-상호작용 복합체의 1종 또는 다수 효능제 (A) 또는 핵산-상호작용 복합체 및 항원의 1종 또는 다수 효능제 (B)를 로딩하는 데 유용하다. (1) 핵산 상호작용 복합체, 예컨대 표적화된 TLR (TLR 3, 7/8 및/또는 9), (2) 핵산-상호작용 복합체의 효능제의 밀도, (3) 항원 밀도, (4) 다중 항원 제시, (5) 코어 조성, 크기 및 전하, 및 (6) 코어 링커 화학체 "L", 및 (7) 효능제 화학 구조의 최적화는 백신 개발에 있어 새로운 패러다임을 제공할 것으로 기대된다. 특히, 핵산-상호작용 복합체의 효능제는 이중 가닥 RNA (예컨대 폴리(I:C), TLR 3), 단일 가닥 RNA (예컨대, UUG-모티프 함유 가닥, TLR 7/8), 및 비메틸화 데옥시리보핵산 및 유도체 (예컨대, CpG 모티프 함유 가닥)를 포함한다.

[0029] 본 발명의 측면은 나노규모 구축물에 관한 것이다. 나노규모 구축물은 하나 이상의 핵산을 기하학적 위치에서 유지되게 하는 나노미터 크기 구축물을 지칭한다. 나노규모 구축물은 전형적으로 한 세트의 핵산의 코로나로 지칭된다. 본원에 사용된 코로나는, 핵산 분자로 구성된 외부 셸을 지칭한다. 코로나는 핵산 또는 다른 물질, 예컨대 금속으로 구성되는 나노입자 코어를 가질 수 있다. 대안적으로, 코로나는 간단하게 중공 코어를 갖는 기하학적 형상으로 배열된 한 세트의 핵산, 즉 핵산의 3-차원 형상 층일 수 있다. 전형적으로, 그러나 항상은

아니지만, 코로나는 구형 형상을 갖는다.

[0030] 예컨대, 코로나가 나노입자 코어를 포함하는 경우에 핵산은 코어에 직접 연결될 수 있다. 핵산의 일부 또는 모두는 공유 또는 비-공유 연결을 통하여 직접적으로 또는 간접적으로 다른 핵산에 연결될 수 있다. 하나 핵산의 또 다른 핵산에의 연결은 그 핵산의 코어에의 연결에 대해 추가적이거나 또는 대안적으로 그에 대한 것일 수 있다. 핵산 중 하나 이상은 또한 다른 분자, 예컨대 항원에 연결될 수 있다.

[0031] 코로나가 나노입자 코어를 포함하지 않는 경우에, 핵산은 공유 또는 비-공유 연결을 통하여 직접적으로 또는 간접적으로 서로 연결될 수 있다. 일부 실시양태에서 나노입자 코어를 포함하지 않은 코로나는 격자 또는 다른 용해가능 구조물 상에 핵산을 증형성하고 이어서 격자 또는 다른 구조물을 용해시켜 비어있는 중심을 제조함으로써 형성할 수 있다.

[0032] 본원에 사용된 나노규모 구조물은 나노미터 정도 (즉, 약 1 nm 내지 약 1 마이크로미터)의 평균 직경을 갖는 구조물이다. 예를 들면, 일부 경우에, 나노입자의 직경은 약 1 nm 내지 약 250 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 240 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 230 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 220 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 210 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 200 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 190 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 180 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 170 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 160 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 150 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 140 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 130 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 120 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 110 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 100 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 90 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 80 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 70 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 60 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 50 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 40 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 30 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 20 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 10 nm 평균 직경, 약 5 nm 내지 약 150 nm 평균 직경, 약 5 nm 내지 약 50 nm 평균 직경, 약 10 nm 내지 약 30 nm 평균 직경, 약 10 nm 내지 150 nm 평균 직경, 약 10 nm 내지 약 100 nm 평균 직경, 약 10 nm 내지 약 50 nm 평균 직경, 약 30 nm 내지 약 100 nm 평균 직경, 또는 약 40 nm 내지 약 80 nm 평균 직경이다.

[0033] 일부 경우에 코로나는 핵산-상호작용 복합체의 하나 이상의 효능제 및/또는 항원에 부착되는 나노입자 코어를 포함한다. 본원에 사용된 나노입자 코어는 임의의 부착된 모달리티가 없는, 나노입자 구조물의 나노입자 성분을 지칭한다. 일부 경우에, 나노입자 코어는 금속성이다. 나노입자 코어가 임의의 금속을 포함할 수 있다는 것을 인지해야 한다. 금속의 여러 비제한적 예는 금, 은, 백금, 알루미늄, 팔라듐, 구리, 코발트, 인듐, 니켈 및 그의 혼합물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 나노입자 코어는 금을 포함한다. 예를 들면, 나노입자 코어는 분해성 금을 포함하는 격자 구조물일 수 있다. 나노입자는 또한 반도체 및 자성 물질을 포함할 수 있다.

[0034] 본 발명의 측면과 상용성인 나노입자의 비제한적 예는 하기에 기재되어 있으며 이는 참조로 포함된다: 미국 특허 번호 7,238,472, 미국 특허 공개 번호 2003/0147966, 미국 특허 공개 번호 2008/0306016, 미국 특허 공개 번호 2009/0209629, 미국 특허 공개 번호 2010/0136682, 미국 특허 공개 번호 2010/0184844, 미국 특허 공개 번호 2010/0294952, 미국 특허 공개 번호 2010/0129808, 미국 특허 공개 번호 2010/0233270, 미국 특허 공개 번호 2011/0111974, PCT 공개 번호 WO 2002/096262, PCT 공개 번호 WO 2003/08539, PCT 공개 번호 WO 2006/138145, PCT 공개 번호 WO 2008/127789, PCT 공개 번호 WO 2008/098248, PCT 공개 번호 WO 2011/079290, PCT 공개 번호 WO 2011/053940, PCT 공개 번호 WO 2011/017690 및 PCT 공개 번호 WO 2011/017456. 본 발명과 관련된 나노입자는 관련 기술분야에 공지된 임의의 수단에 따라 합성될 수 있거나, 상업적으로 입수될 수 있다. 예를 들면, 나노입자의 상업적 공급업체의 여러 비제한적 예는 다음을 포함한다: 테드 펠라, 인크(Ted Pella, Inc., 캘리포니아 레드), 나노프로브즈, 인크.(Nanoprobe, Inc., 뉴욕 애플백), 배컴 메탈루지컬 캄파니, 리미티드(Vacuum Metallurgical Co., Ltd., 일본 지바) 및 벡터 래보러토리즈, 인크.(Vector Laboratories, Inc., 캘리포니아 벨링턴).

[0035] 핵산-상호작용 복합체의 효능제

[0036] 본원에 사용된 핵산-상호작용 복합체는, 핵산 분자와 상호작용하고, 그 상호작용에 반응하여 면역 반응을 생성 시키도록 자극되는 분자 또는 분자의 복합체를 지칭한다. 예컨대, 분자 또는 분자의 복합체는 수용체일 수 있다. 일부 실시양태에서 핵산-상호작용 복합체는 패턴 인식 수용체 (PRR) 복합체이다. PRR은 미생물 병원체 또는 세포 스트레스와 관련된 병원체-연관 분자 패턴 (PAMP), 및 세포 손상 동안 방출된 세포 성분과 관련된 손상-연관 분자 패턴 (DAMP)을 확인하기 위해 선천성 면역계의 세포에 의해 발현된 단백질로 구성된 면역계의 원시 부분이다. PRR은 막-결합 PRR, 예컨대 수용체 키나제, 톨-유사 수용체 (TLR) 및 C-유형 렉틴 수용체 (CLR) (만노스 수용체 및 아시알로당단백질 수용체); 세포질 PRR, 예컨대 RIG-I-유사 수용체 (RLR), RNA 헬리카제, 식물

PRR 및 NonRD 키나제; 및 분비된 PRR을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

- [0037] 핵산-상호작용 복합체는 TLR, RIG-I, 전사 인자, 세포 번역 기구, 세포 전사 기구, 핵산 작용 효소 및 핵산 연관 자가항원을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 핵산-상호작용 복합체의 효능제인 핵산 분자는 TLR 효능제, 및 RIG-I, 전사 인자, 세포 번역 기구, 세포 전사 기구, 핵산 작용 효소 및 핵산 연관 자가항원의 효능제를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0038] 일부 실시양태에서 핵산-상호작용 복합체의 효능제는 TLR 효능제이다. 본원에 사용된 TLR 효능제는 상호작용하여 TLR의 활성을 자극하는 핵산 분자이다.
- [0039] 툴-유사 수용체 (TLR)는 포유동물의 선천성 면역에서 결정적인 역할을 하는 고도로 보존된 폴리펩티드의 패밀리아이다. TLR1 - TLR10으로 지정된 적어도 10종의 패밀리 구성원이 확인된 바 있다. 다양한 TLR의 세포질 도메인은 툴-인터류킨 1 (IL-1) 수용체 (TIR) 도메인을 특징으로 한다. Medzhitov R et al. (1998) *Mol Cell* 2:253-8. TLR에 의한 미생물 침습의 인식은 진화론적으로 드로소필라(*Drosophila*) 및 포유동물에서 보존된 신호전달 캐스케이드의 활성화를 촉발한다. TIR 도메인-함유 어댑터 단백질 MyD88은 TLR와 연관되어 IL-1 수용체-연관 키나제 (IRAK) 및 중앙 괴사 인자 (TNF) 수용체-연관 인자 6 (TRAF6)를 TLR로 동원하는 것으로 보고된 바 있다. MyD88-의존성 신호전달 경로는 NF- $\kappa$ B 전사 인자 및 c-Jun NH<sub>2</sub> 말단 키나제 (Jnk) 미토젠-활성화 단백질 키나제 (MAPK)의 활성화, 즉 면역 활성화 및 염증성 시토카인의 생산에서의 결정적 단계를 유도하는 것으로 여겨진다. 검토를 위해, 문헌 [Aderem A et al. (2000) *Nature* 406:782-87] 참조.
- [0040] TLR은 다양한 조직에서 및 다양한 유형의 면역 세포에 대해 차별적으로 발현되는 것으로 여겨진다. 예를 들면, 인간 TLR7은 태반, 폐, 비장, 림프절, 편도에서 및 형질세포양 전구체 수지상 세포 (pDC) 상에서 발현된다고 보고된 바 있다. 문헌 [Chuang T-H et al. (2000) *Eur Cytokine Netw* 11:372-8]; Kadowaki N et al. (2001) *J Exp Med* 194:863-9]. 인간 TLR8은 폐, 말초 혈액 백혈구 (PBL), 태반, 비장, 림프절에서, 및 단핵구 상에서 발현된다고 보고된 바 있다. 문헌 [Kadowaki N et al. (2001) *J Exp Med* 194:863-9; Chuang T-H et al. (2000) *Eur Cytokine Netw* 11:372-8]. 인간 TLR9는 비장, 림프절, 골수, PBL에서 및 pDC 및 B 세포 상에서 발현된다고 보고되었다. 문헌 [Kadowaki N et al. (2001) *J Exp Med* 194:863-9; Bauer S et al. (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* 98:9237-42; Chuang T-H et al. (2000) *Eur Cytokine Netw* 11:372-8].
- [0041] 인간 및 뮤린 TLR7의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열은 공지되어 있다. 참조, 예를 들어, 진뱅크 수탁 번호 AF240467, AF245702, NM\_016562, AF334942, NM\_133211; 및 AAF60188, AAF78035, NP\_057646, AAL73191 및 AAL73192, 전체 내용이 본원에 참조로 포함된다. 인간 TLR7은 1049개 아미노산 길이인 것으로 보고되어 있다. 뮤린 TLR7은 1050개 아미노산 길이인 것으로 보고되어 있다. TLR7 폴리펩티드는 류신-풍부 반복 영역을 갖는 세포외 도메인, 막횡단 도메인, 및 TIR 도메인을 포함하는 세포내 도메인을 포함한다.
- [0042] 인간 및 뮤린 TLR8의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열은 공지되어 있다. 예를 들어, 진뱅크 수탁 번호 AF246971, AF245703, NM\_016610, XM\_045706, AY035890, NM\_133212; 및 AAF64061, AAF78036, NP\_057694, XP\_045706, AAK62677, 및 NP\_573475를 참조하며, 이들 모두의 내용이 본원에 참조로 포함된다. 인간 TLR8은 적어도 2종의 이소형으로, 1041개 아미노산 길이인 1종 및 1059개 아미노산 길이인 다른 종이 존재한다고 보고되어 있다. 뮤린 TLR8는 1032개 아미노산 길이이다. TLR8 폴리펩티드는 류신-풍부 반복 영역을 갖는 세포외 도메인, 막횡단 도메인, 및 TIR 도메인을 포함하는 세포내 도메인을 포함한다.
- [0043] 인간 및 뮤린 TLR9의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열은 공지되어 있다. 예를 들어, 진뱅크 수탁 번호 NM\_017442, AF259262, AB045180, AF245704, AB045181, AF348140, AF314224, NM\_031178; 및 NP\_059138, AAF72189, BAB19259, AAF78037, BAB19260, AAK29625, AAK28488, 및 NP\_112455를 참조하며, 이들 모두의 내용이 본원에 참조로 포함된다. 인간 TLR9는 적어도 2종의 이소형으로, 1032개 아미노산 길이인 1종 및 1055개 아미노산인 다른 종이 존재한다고 보고되어 있다. 뮤린 TLR9는 1032개 아미노산 길이이다. TLR9 폴리펩티드는 류신-풍부 반복 영역을 갖는 세포외 도메인, 막횡단 도메인, 및 TIR 도메인을 포함하는 세포내 도메인을 포함한다.
- [0044] 본원에 사용된 용어 "TLR 신호전달"은 TLR을 통한 신호전달과 관련된 세포내 신호전달의 어떤 측면을 지칭한다. 본원에 사용된 용어 "TLR-매개 면역 반응"은 TLR 신호전달과 관련된 면역 반응을 지칭한다.
- [0045] TLR7-매개 면역 반응은 TLR7 신호전달과 관련된 반응이다. TLR7-매개 면역 반응은 일반적으로 IFN- $\alpha$  및 IFN- $\gamma$  유도성 시토카인, 예컨대 IP-10 및 I-TAC의 유도를 특징으로 한다. TLR7-매개 면역 반응에서 유도된 시토카인

IL-1  $\alpha/\beta$ , IL-6, IL-8, MIP-1  $\alpha/\beta$  및 MIP-3  $\alpha/\beta$ 의 수준은 TLR8-매개 면역 반응에서 유도된 수준보다 낮다.

- [0046] TLR8-매개 면역 반응은 TLR8 신호전달과 관련된 반응이다. 이 반응은 추가로 염증유발 시토카인, 예컨대 IFN- $\gamma$ , IL-12p40/70, TNF- $\alpha$ , IL-1  $\alpha/\beta$ , IL-6, IL-8, MIP-1  $\alpha/\beta$  및 MIP-3  $\alpha/\beta$ 의 유도를 특징으로 한다.
- [0047] TLR9-매개 면역 반응은 TLR9 신호전달과 관련된 반응이다. TLR8-매개 면역 반응을 통해 달성되는 것보다는 낮은 수준이긴 하지만, 이 반응도 또한 적어도 IFN- $\gamma$  및 IL-12의 생산/분비를 특징으로 한다.
- [0048] 본원에 사용된 "TLR7/8 효능제"는 집합적으로 TLR7 및/또는 TLR8 신호전달을 증가시킬 수 있는 임의의 핵산 (즉, TLR7 및/또는 TLR8의 효능제)를 지칭한다. 일부 TLR7/8 리간드는 TLR7 신호전달만을 유도하고 (예를 들면, TLR7 특이적 효능제), 일부는 TLR8 신호전달만을 유도하고 (예를 들면, TLR8 특이적 효능제), 기타는 TLR7 및 TLR8 신호전달 모두를 유도한다.
- [0049] TLR7 또는 TLR8 신호전달의 수준은 신호전달의 이미 존재하는 수준을 초과하여 증대될 수 있거나 또는 신호전달의 배경 수준을 초과하여 유도될 수 있다. TLR7 리간드는, 비제한적으로, 구아노신 유사체 예컨대 C8-치환된 구아노신, 본질적으로 G 및 U로 이루어지는 리보뉴클레오시드, 구아노신 리보뉴클레오타이드 및 RNA 또는 RNA-유사 분자의 혼합물 (PCT/US03/10406) 및 아데노신-기반 화합물 (예를 들면, 6-아미노-9-벤질-2-(3-히드록시-프로폭시)-9H-퓨린-8-올 및 스미토모(Sumitomo)에 의해 제조된 유사 화합물 (예를 들면, CL-029))을 포함한다.
- [0050] 본원에 사용된 용어 "구아노신 유사체"는 구아닌 염기, 구아노신 뉴클레오시드 당, 또는 구아닌 염기 및 구아노신 뉴클레오시드 당 모두를 수반하는 화학적 변형을 갖는 구아노신-유사 뉴클레오타이드 (구아노신은 제외)를 지칭한다. 구체적으로, 구아노신 유사체는 비제한적으로 7-데아자-구아노신을 포함한다.
- [0051] 구아노신 유사체는 또한 C8-치환된 구아노신 예컨대 7-티아-8-옥소구아노신 (임퓨노신), 8-메르캅토구아노신, 8-브로모구아노신, 8-메틸구아노신, 8-옥소-7,8-디히드로구아노신, C8-아릴아미노-2'-데옥시구아노신, C8-프로피닐-구아노신, C8- 및 N7-치환된 구아닌 리보뉴클레오시드, 예컨대 7-알릴-8-옥소구아노신 (록소리빈) 및 7-메틸-8-옥소구아노신, 8-아미노구아노신, 8-히드록시-2'-데옥시구아노신, 8-히드록시구아노신 및 7-데아자 8-치환된 구아노신을 포함한다.
- [0052] TLR8 리간드는 본질적으로 G 및 U로 이루어지는 리보뉴클레오시드, 구아노신 리보뉴클레오타이드 및 RNA 또는 RNA-유사 분자의 혼합물 (PCT/US03/10406)을 포함한다. 추가의 TLR8 리간드는 또한 문헌[Gorden et al. J. Immunol. 2005, 174:1259-1268]]에 개시되어 있다.
- [0053] 본원에서 사용되는 용어 "TLR9 효능제"는 TLR9 신호전달을 증가시킬 수 있는 임의의 작용제 (즉, TLR9의 효능제)를 지칭한다. 구체적으로, TLR9 효능제는 제한없이 면역자극 핵산, 특히 CpG 면역자극 핵산을 포함한다.
- [0054] 본원에 사용된 용어 "면역자극 CpG 핵산" 또는 "면역자극 CpG 올리고뉴클레오타이드"는 면역 세포를 활성화할 수 있는 임의의 CpG-함유 핵산을 지칭한다. 적어도 CpG 디뉴클레오타이드의 C는 전형적으로 (반드시는 아니지만) 비메틸화된다. 면역자극 CpG 핵산은 다수의 허여된 특허 및 공개 특허 출원 (미국 특허 번호 6,194,388; 6,207,646; 6,218,371; 6,239,116; 6,339,068; 6,406,705; 및 6,429,199 포함)에 기재되어 있다.
- [0055] 일부 실시양태에서 핵산-상호작용 복합체의 효능제는 면역자극 올리고뉴클레오타이드이다. 본원에 사용된 "면역자극 올리고뉴클레오타이드"는 면역 반응을 유도할 수 있는 면역자극 모티프 또는 백본을 함유하는 임의의 핵산 (DNA 또는 RNA)이다. 면역 반응의 유도는 면역 세포의 개수 또는 활성의 임의의 증가, 또는 면역 인자, 예컨대 시토카인의 발현 또는 절대 수준의 증가를 지칭한다. 면역 세포는 NK 세포, CD4+ T 림프구, CD8+ T 림프구, B 세포, 수지상 세포, 대식세포 및 기타 항원-제시 세포를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 시토카인은 인터류킨, TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ ,  $\beta$  및  $\gamma$ , Flt-리간드, 및 공동-자극 분자를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 면역자극 모티프는 CpG 모티프 및 T-펍부 모티프를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0056] 면역자극 올리고뉴클레오타이드의 비-제한적 세트는 다음을 포함한다:
- [0057] dsRNA (TLR 3): 폴리(A:C) 및 폴리(I:C)
- [0058] ssRNA (TLR7/8):
- [0059] CCGUCUGUUGUGUGACUC (서열 13)
- [0060] GCCACCGAGCCGAAGGCACC (서열 14)



- [0061] UAUUAUAUAUAUAUAUAUA (서열 15)
- [0062] UUAUAUAUAUAUAUAUAUA (서열 16)
- [0063] UUUUAUUUAUUUAUUUA (서열 17)
- [0064] UGUGUGUGUGUGUGUGUGUG (서열 18)
- [0065] UUGUUGUUGUUGUUGUUGU (서열 19)
- [0066] UUUUUUUUUUUUUUUUUUG (서열 20)
- [0067] UUAUUUAUUUAUUUAUUUAU (서열 21)
- [0068] UUGUUUGUUUGUUUGUUUGU (서열 22)
- [0069] GCCCGUCUGUUGUGACUC (서열 23)
- [0070] GUCCUUAAGUCCUCAA (서열 24)
- [0071] DNA (TLR9):
- [0072] GGTGCATCGATGCAGGGGG (서열 25)
- [0073] TCCATGGACGTTCTGAGCGTT (서열 26)
- [0074] TCGTCGTTTGAACGACGTTGAT (서열 27)
- [0075] TCGTCGACGATCCGCGCGCG (서열 28)
- [0076] GGGGTCAACGTTGAGGGGG (서열 29)
- [0077] TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT (서열 30)
- [0078] TCGTCGTTGTCGTTTTGTCGTT (서열 31)
- [0079] GGGGACGATCGTCGGGGG (서열 32)
- [0080] GGGGACGACGTCGTGGGGGG (서열 33)
- [0081] TCGTCGTTTTCGGCGCGCCG (서열 34)
- [0082] TCGTCGTCGTTGAACGACGTTGAT (서열 35)
- [0083] 번역자극 올리고뉴클레오티드는 코어에 또는 서로 또는 다른 분자, 예컨대 항원에 연결될 수 있다. 예를 들어, 올리고뉴클레오티드는 5' 말단 또는 3' 말단을 통해 링커에 접합될 수 있다. 예를 들어, [서열, 5'-3']-링커 또는 링커-[서열, 5'-3'].
- [0084] 용어 "올리고뉴클레오티드" 및 "핵산"은 교환가능하게 사용되며, 다중 뉴클레오티드 (즉 포스페이트 기와, 치환된 피리미딘 (예를 들어, 시토신 (C), 티미딘 (T) 또는 우라실 (U)) 또는 치환된 퓨린 (예를 들어, 아데닌 (A) 또는 구아닌 (G))인 교환가능한 유기 염기에 연결된 당 (예를 들어, 리보스 또는 데옥시리보스)을 포함하는 분자)를 의미한다. 따라서, 이 용어는 DNA 및 RNA 올리고뉴클레오티드 둘 다를 포괄한다. 이 용어는 또한 폴리뉴클레오티드 (즉, 포스페이트를 제외한 폴리뉴클레오티드) 및 임의의 다른 유기 염기 함유 중합체를 포함할 것이다. 올리고뉴클레오티드는 기존의 핵산 공급원 (예를 들어, 게놈 또는 cDNA)으로부터 수득될 수 있으나, 바람직하게는 합성된 것 (예를 들어, 핵산 합성에 의해 생성된 것)이다. 나노규모 구축물의, 임의적으로는 나노입자 코어에 부착된, 폴리뉴클레오티드는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다. 이중 가닥 폴리뉴클레오티드는 또한 본원에서 듀플렉스로 지칭된다. 본 발명의 이중-가닥 올리고뉴클레오티드는 2개의 개별 상보적 핵산 가닥을 포함할 수 있다.
- [0085] 본원에 사용된 "듀플렉스"는 상보적 서열이 서로에 대해 수소 결합된 이중-가닥 핵산 분자(들)를 포함한다. 상보적 서열은 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함할 수 있다. 안티센스 뉴클레오티드 서열은 유효한 표적 유전자 역제를 매개하도록 표적 유전자와 동일하거나 또는 충분히 동일할 수 있다 (예를 들어, 표적 유전자 서열에 대해 적어도 약 98% 동일하거나, 96% 동일하거나, 94% 동일하거나, 90% 동일하거나, 85% 동일하거나, 또는 80% 동일함).

- [0086] 이중-가닥 폴리뉴클레오티드는 그의 전체 길이에 걸쳐 이중-가닥일 수 있으며, 이는 상기 폴리뉴클레오티드가 오버행잉 단일-가닥 서열을 갖지 않고, 이에 따라 평활-말단을 갖는다는 것을 의미한다. 다른 실시양태에서는, 이중-가닥 폴리뉴클레오티드의 2개의 가닥이 상이한 길이를 가져 1개 이상의 단일-가닥 오버행을 생성할 수 있다. 본 발명의 이중-가닥 폴리뉴클레오티드는 미스매치 및/또는 루프 또는 돌출부를 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 이는 올리고뉴클레오티드의 길이의 적어도 약 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%에 걸쳐 이중-가닥이다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 이중-가닥 폴리뉴클레오티드는 적어도 또는 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개의 미스매치를 함유한다.
- [0087] 본 발명과 연관된 폴리뉴클레오티드는 예컨대 당 모이어티, 포스포디에스테르 연결부, 및/또는 염기에서 변형될 수 있다. 본원에 사용된 "당 모이어티"는 천연, 비변형된 당 (펜토스, 리보스 및 데옥시리보스 포함), 변형된 당 및 당 유사체를 포함한다. 당 모이어티의 변형은 히드록실 기를 할로젠, 헤테로원자 또는 지방족 기로 대체하는 것을 포함할 수 있고, 히드록실 기를 예를 들어 에테르, 아민 또는 티올로서 관능화하는 것을 포함할 수 있다.
- [0088] 당 모이어티의 변형은 2'-O-메틸 뉴클레오티드 ("메틸화된 것"으로 지칭됨)를 포함할 수 있다. 일부 경우에, 본 발명과 연관된 폴리뉴클레오티드는 변형된 당 모이어티만을 또는 비변형된 당 모이어티만을 함유할 수 있고, 한편 다른 경우에는, 폴리뉴클레오티드는 일부는 변형되고 일부는 변형되지 않은 당 모이어티를 함유한다.
- [0089] 일부 경우에, 변형된 뉴클레오토머는 당- 또는 백본-변형된 리보뉴클레오티드를 포함한다. 변형된 리보뉴클레오티드는 비-자연 발생 염기, 예컨대 5'-위치에서 변형된 우리딘 또는 시티딘, 예를 들어 5'-(2-아미노)프로필 우리딘 및 5'-브로모 우리딘; 8-위치에서 변형된 아데노신 및 구아노신, 예를 들어 8-브로모 구아노신; 데아자 뉴클레오티드, 예를 들어 7-데아자-아데노신; 및 N-알킬화 뉴클레오티드, 예를 들어 N6-메틸 아데노신을 함유할 수 있다. 또한, 당-변형된 리보뉴클레오티드는 2'-OH 기가 H, 알콕시 (또는 OR), R 또는 알킬, 할로젠, SH, SR, 아미노 (예컨대 NH<sub>2</sub>, NHR, NR<sub>2</sub>), 또는 CN 기 (여기서, R은 저급 알킬, 알케닐 또는 알킬닐임)로 대체된 것일 수 있다. 일부 실시양태에서, 변형된 리보뉴클레오티드는 인접한 리보뉴클레오티드에 연결되는 포스포디에스테르 기가 변형된 기, 예컨대 포스포로티오에이트 기로 대체된 것일 수 있다.
- [0090] 일부 측면에서, 2'-O-메틸 변형은 바람직하지 않은 세포 스트레스 반응, 예컨대 이중-가닥 핵산에 대한 인터페론 반응의 감소에 유리할 수 있다. 변형된 당은 D-리보스, 2'-O-알킬 (2'-O-메틸 및 2'-O-에틸 포함), 즉, 2'-알콕시, 2'-아미노, 2'-S-알킬, 2'-할로 (2'-플루오로 포함), 2'-메톡시에톡시, 2'-알릴옥시 (-OCH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 2'-프로파르길, 2'-프로필, 에티닐, 에테닐, 프로페닐, 및 시아노 등을 포함할 수 있다. 당 모이어티는 또한 핵소실일 수 있다.
- [0091] 용어 "알킬"은 직쇄 알킬 기 (예를 들어, 메틸, 에틸, 프로필, 부틸, 펜틸, 헥실, 헵틸, 옥틸, 노닐, 데실 등), 분지쇄 알킬 기 (이소프로필, tert-부틸, 이소부틸 등), 시클로알킬 (지환족) 기 (시클로프로필, 시클로헵틸, 시클로헥실, 시클로헵틸, 시클로옥틸), 알킬 치환된 시클로알킬 기, 및 시클로알킬 치환된 알킬 기를 비롯한 포화 지방족 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 직쇄 또는 분지쇄 알킬은 그의 백본에 6개 이하의 탄소 원자 (예를 들어, 직쇄의 경우 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, 분지쇄의 경우 C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>), 보다 바람직하게는 4개 이하의 탄소 원자를 갖는다. 마찬가지로, 바람직한 시클로알킬은 그의 고리 구조에 3-8개의 탄소 원자, 보다 바람직하게는 고리 구조에 5 또는 6개의 탄소를 갖는다. 용어 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>은 1 내지 6개 탄소 원자를 함유하는 알킬 기를 포함한다.
- [0092] 달리 명시되지 않는 한, 용어 알킬은 "비치환된 알킬" 및 "치환된 알킬" 둘 다를 포함하고, 여기서 후자는 탄화수소 백본의 1개 이상의 탄소 상의 수소를 대체한 독립적으로 선택된 치환기를 갖는 알킬 모이어티를 지칭한다. 이러한 치환기는 예를 들어 알케닐, 알키닐, 할로젠, 히드록실, 알킬카르보닐옥시, 아릴카르보닐옥시, 알콕시카르보닐옥시, 아릴옥시카르보닐옥시, 카르복실레이트, 알킬카르보닐, 아릴카르보닐, 알콕시카르보닐, 아미노카르보닐, 알킬아미노카르보닐, 디알킬아미노카르보닐, 알킬티오카르보닐, 알콕실, 포스페이트, 포스포네이트, 포스피네이트, 시아노, 아미노 (알킬 아미노, 디알킬아미노, 아릴아미노, 디아릴아미노 및 알킬아릴아미노 포함), 아실아미노 (알킬카르보닐아미노, 아릴카르보닐아미노, 카르바모일 및 우레이드 포함), 아미디노, 이미노, 술폰히드릴, 알킬티오, 아릴티오, 티오카르복실레이트, 술폰이트, 알킬술폰, 술폰에이트, 술폰아미도, 니트로, 트리플루오로메틸, 시아노, 아지도, 헤테로시클릴, 알킬아릴, 또는 방향족 또는 헤테로방향족 모이어티를 포함할 수 있다. 시클로알킬은, 예를 들어 상기 기재된 치환기로 추가로 치환될 수 있다. "알킬아릴" 또는 "아릴알킬" 모이어티는 아릴로 치환된 알킬 (예를 들어, 페닐메틸 (벤질))이다. 용어 "알킬"은 또한 천연 및 비천연 아미노산의 측쇄를 포함한다. 용어 "n-알킬"은 직쇄 (즉, 비분지형) 비치환된 알킬 기를 의미한다.

- [0093] 용어 "알케닐"은 상기에 기재된 알킬과 길이 및 가능한 치환이 유사하지만 적어도 1개의 이중 결합을 함유하는 불포화 지방족 기를 포함한다. 예를 들어, 용어 "알케닐"은 직쇄 알케닐 기 (예를 들어, 에틸레닐, 프로페닐, 부테닐, 펜테닐, 헥세닐, 헵테닐, 옥테닐, 노네닐, 데세닐 등), 분지쇄 알케닐 기, 시클로알케닐 (치환족) 기 (시클로프로페닐, 시클로펜테닐, 시클로헥세닐, 시클로헵테닐, 시클로옥테닐), 알킬 또는 알케닐 치환된 시클로알케닐 기, 및 시클로알킬 또는 시클로알케닐 치환된 알케닐 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 직쇄 또는 분지쇄 알케닐 기는 그의 백본에 6개 이하의 탄소 원자를 갖는다 (예를 들어, 직쇄의 경우  $C_2-C_6$ , 분지쇄의 경우  $C_3-C_6$ ). 마찬가지로, 시클로알케닐 기는 그의 고리 구조에 3-8개의 탄소 원자를 가질 수 있으며, 더욱 바람직하게는 고리 구조에 5 또는 6개의 탄소를 갖는다. 용어  $C_2-C_6$ 은 2 내지 6개의 탄소 원자를 함유하는 알케닐 기를 포함한다.
- [0094] 달리 명시되지 않는 한, 용어 알케닐은 "비치환된 알케닐" 및 "치환된 알케닐" 둘 다를 포함하고, 여기서 후자는 탄화수소 백본의 1개 이상의 탄소 상의 수소를 대체하는 독립적으로 선택된 치환기를 갖는 알케닐 모이어티를 지칭한다. 이러한 치환기는 예를 들어 알킬 기, 알킬닐 기, 할로젠, 히드록실, 알킬카르보닐옥시, 아릴카르보닐옥시, 알콕시카르보닐옥시, 아릴옥시카르보닐옥시, 카르복실레이트, 알킬카르보닐, 아릴카르보닐, 알콕시카르보닐, 아미노카르보닐, 알킬아미노카르보닐, 디알킬아미노카르보닐, 알킬티오카르보닐, 알콕실, 포스페이트, 포스포네이트, 포스포네이트, 시아노, 아미노 (알킬 아미노, 디알킬아미노, 아릴아미노, 디아릴아미노 및 알킬아릴아미노 포함), 아실아미노 (알킬카르보닐아미노, 아릴카르보닐아미노, 카르바모일 및 우레이도 포함), 아미디노, 이미노, 술프히드릴, 알킬티오, 아릴티오, 티오카르복실레이트, 술페이트, 알킬술피닐, 술포네이트, 술포모일, 술포아미도, 니트로, 트리플루오로메틸, 시아노, 아지도, 헤테로시클릴, 알킬아릴, 또는 방향족 또는 헤테로방향족 모이어티를 포함할 수 있다.
- [0095] 용어 "소수성 변형"은 전체 소수성이 증가하고 염기가 여전히 정규에 가까운 왓슨-크릭(Watson -Crick) 상호작용을 형성할 수 있도록 하는 염기의 변형을 지칭한다. 염기 변형의 비제한적 예는 페닐, 4-피리딜, 2-피리딜, 인돌릴 및 이소부틸, 페닐 ( $C_6H_5OH$ ); 트립토판 ( $C_8H_6N$ ) $CH_2CH(NH_2)CO$ ), 이소부틸, 부틸, 아미노벤질; 페닐; 나프틸과 같은 5-위치 우리딘 및 시티딘 변형을 포함한다.
- [0096] 용어 "헤테로원자"는 탄소 또는 수소 이외의 임의의 원소의 원자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 바람직한 헤테로원자는 질소, 산소, 황 및 인이다. 용어 "히드록시" 또는 "히드록실"은  $-OH$  또는  $-O^-$  (적절한 반대이온을 가짐)를 갖는 기를 포함한다. 용어 "할로젠"은 플루오린, 브로민, 염소, 아이오딘 등을 포함한다. 용어 "퍼할로젠화"는 일반적으로 모든 수소가 할로젠 원자에 의해 대체된 모이어티를 지칭한다.
- [0097] 용어 "치환된"은 모이어티 상에 위치할 수 있고 분자가 그의 의도된 기능을 수행하도록 하는 독립적으로 선택된 치환기를 포함한다. 치환기의 예는 알킬, 알케닐, 알킬닐, 아릴,  $(CR'R'')_{0-3}NR'R''$ ,  $(CR'R'')_{0-3}CN$ ,  $NO_2$ , 할로젠,  $(CR'R'')_{0-3}C$ (할로젠) $_3$ ,  $(CR'R'')_{0-3}CH$ (할로젠) $_2$ ,  $(CR'R'')_{0-3}CH_2$ (할로젠),  $(CR'R'')_{0-3}CONR'R''$ ,  $(CR'R'')_{0-3}S(O)_{1-2}NR'R''$ ,  $(CR'R'')_{0-3}CHO$ ,  $(CR'R'')_{0-3}O(CR'R'')_{0-3}H$ ,  $(CR'R'')_{0-3}S(O)_{0-2}R'$ ,  $(CR'R'')_{0-3}O(CR'R'')_{0-3}H$ ,  $(CR'R'')_{0-3}COR'$ ,  $(CR'R'')_{0-3}CO_2R'$ , 또는  $(CR'R'')_{0-3}OR'$  기를 포함하고; 여기서 각  $R'$  및  $R''$ 는 각각 독립적으로 수소,  $C_1-C_5$  알킬,  $C_2-C_5$  알케닐,  $C_2-C_5$  알킬닐, 또는 아릴 기이거나, 또는  $R'$  및  $R''$ 는 함께 벤질리덴 기 또는  $-(CH_2)_2O(CH_2)_2-$  기이다.
- [0098] 용어 "아민" 또는 "아미노"는 질소 원자가 적어도 1개의 탄소 또는 헤테로원자에 공유 결합된 화합물 또는 모이어티를 포함한다. 용어 "알킬아미노"는 질소가 적어도 1개의 추가의 알킬 기에 결합된 기 및 화합물을 포함한다. 용어 "디알킬 아미노"는 질소 원자가 적어도 2개의 추가의 알킬 기에 결합된 기를 포함한다.
- [0099] 용어 "에테르"는 2개의 상이한 탄소 원자 또는 헤테로원자에 결합된 산소를 함유하는 화합물 또는 모이어티를 포함한다. 예를 들어, 이 용어는 또 다른 알킬 기에 공유 결합된 산소 원자에 공유 결합된 알킬, 알케닐 또는 알킬닐 기를 지칭하는 "알콕시알킬"을 포함한다.
- [0100] 용어 "염기"는 기지의 퓨린 및 피리미딘 헤테로시클릭 염기, 데아자퓨린, 및 그의 유사체 (헤테로시클릭 치환된 유사체, 예를 들어 아미노에톡시 페녹사진 포함), 유도체 (예를 들어, 1-알킬-, 1-알케닐-, 헤테로방향족- 및 1-알킬닐 유도체) 및 호변이성질체를 포함한다. 퓨린의 예는 아데닌, 구아닌, 이노신, 디아미노퓨린 및 크산틴, 및 그의 유사체 (예를 들어, 8-옥소- $N^6$ -메틸아데닌 또는 7-디아자크산틴) 및 유도체를 포함한다. 피리미딘은 예를 들어 티민, 우라실 및 시토신, 및 그의 유사체 (예를 들어, 5-메틸시토신, 5-메틸우라실, 5-(1-프로피닐)우라실, 5-(1-프로피닐)시토신 및 4,4-에타노시토신)를 포함한다. 적합한 염기의 다른 예는 비-퓨리닐

및 비-피리미디닐 염기, 예컨대 2-아미노피리딘 및 트리아진을 포함한다.

- [0101] 일부 측면에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드의 뉴클레오토머는 RNA 뉴클레오타이드 (변형된 RNA 뉴클레오타이드 포함)이다.
- [0102] 용어 "뉴클레오시드"는 당 모이어티, 바람직하게는 리보스 또는 데옥시리보스에 공유 부착된 염기를 포함한다. 바람직한 뉴클레오시드의 예는 리보뉴클레오시드 및 데옥시리보뉴클레오시드를 포함한다. 뉴클레오시드는 또한 유리 카르복실 기, 유리 아미노 기 또는 보호기를 포함할 수 있는 아미노산 또는 아미노산 유사체에 연결된 염기를 포함한다. 적합한 보호기는 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다 (문헌 [P. G. M. Wuts and T. W. Greene, "Protective Groups in Organic Synthesis", 2<sup>nd</sup> Ed., Wiley-Interscience, New York, 1999] 참조).
- [0103] 용어 "뉴클레오타이드"는 포스페이트 기 또는 포스페이트 유사체를 추가로 포함하는 뉴클레오시드를 포함한다.
- [0104] 본원에 사용된 용어 "연결부"는 뉴클레오토머에 인접하여 공유 커플링된, 자연 발생 비변형된 포스포디에스테르 모이어티 ( $-O-(PO_3^{2-})-O-$ )를 포함한다. 본원에 사용된 용어 "치환기 연결부"는 뉴클레오토머에 인접하여 공유 커플링된 천연 포스포디에스테르 기의 임의의 유사체 또는 유도체를 포함한다. 치환기 연결부는 포스포디에스테르 유사체, 예를 들어 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 및 P-에티옥시포스포디에스테르, P-에톡시포스포디에스테르, P-알킬옥시포스포트리에스테르, 메틸포스포네이트, 및 인 무함유 연결부, 예를 들어 아세탈 및 아마이드를 포함한다. 이러한 치환기 연결부는 관련 기술분야에 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Bjergarde et al. 1991. Nucleic Acids Res. 19:5843; Caruthers et al. 1991. Nucleosides Nucleotides. 10:47]). 특정 실시양태에서, 비-가수분해성 연결부, 예컨대 포스포로티오에이트 연결부가 바람직하다.
- [0105] 일부 측면에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 3' 및 5' 말단을 포함한다 (원형 올리고뉴클레오타이드는 제외). 폴리뉴클레오타이드의 3' 및 5' 말단은, 예를 들어 3' 또는 5' 연결부를 변형시킴으로써, 뉴클레아제로부터 실질적으로 보호될 수 있다 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,849,902 및 WO 98/13526). 올리고뉴클레오타이드는 "차단 기"의 포함에 의해 저항성이 될 수 있다. 본원에 사용된 용어 "차단 기"는 올리고뉴클레오타이드 또는 뉴클레오토머에 합성을 위한 보호 기 또는 커플링 기로서 부착될 수 있는 (예를 들어, OH 기 이외의) 치환기를 지칭한다 (예를 들어, FITC, 프로필 ( $CH_2-CH_2-CH_3$ ), 글리콜 ( $-O-CH_2-CH_2-O-$ ), 포스페이트 ( $PO_3^{2-}$ ), 수소 포스포네이트 또는 포스포르아미다이트). "차단 기"는 또한 변형된 뉴클레오타이드 및 비-뉴클레오타이드 엑소뉴클레아제 저항성 구조물을 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 5' 및 3' 말단을 보호하는 "말단 차단 기" 또는 "엑소뉴클레아제 차단 기"를 포함한다.
- [0106] 예시적인 말단-차단 기는 캡 구조물 (예를 들어, 7-메틸구아노신 캡), 역전된 뉴클레오토머 (예를 들어, 3'-3' 또는 5'-5' 말단 역전됨) (예를 들어, 문헌 [Ortiagao et al. 1992. Antisense Res. Dev. 2:129] 참조), 메틸포스포네이트, 포스포르아미다이트, 비-뉴클레오타이드 기 (예를 들어, 비-뉴클레오타이드 링커, 아미노 링커, 접합체) 등을 포함한다. 3' 말단 뉴클레오토머는 변형된 당 모이어티를 포함할 수 있다. 3' 말단 뉴클레오토머는 올리고뉴클레오타이드의 3'-엑소뉴클레아제 분해를 방지하는 차단 기에 의해 임의로 치환될 수 있는 3'-O를 포함한다. 예를 들어, 3'-히드록실은 3'→3' 뉴클레오타이드간 연결부를 통해 뉴클레오타이드로 에스테르화될 수 있다. 예를 들어, 알킬옥시 라디칼은 메톡시, 에톡시, 또는 이소프로폭시, 바람직하게는 에톡시일 수 있다. 임의적으로, 3' 말단에서 3'→3' 연결된 뉴클레오타이드는 치환기 연결부에 의해 연결될 수 있다. 뉴클레아제 분해를 감소시키기 위해, 5' 가장 말단의 3'→5' 연결부는 변형된 연결부, 예를 들어 포스포로티오에이트 또는 P-알킬옥시포스포트리에스테르 연결부일 수 있다. 바람직하게는, 5' 가장 말단의 2개의 3'→5' 연결부는 변형된 연결부이다. 임의적으로, 5' 말단 히드록시 모이어티는 인 함유 모이어티, 예를 들어 포스페이트, 포스포로티오에이트, 또는 P-에톡시포스페이트로 에스테르화될 수 있다.
- [0107] 일부 측면에서, 폴리뉴클레오타이드는 DNA 및 RNA 둘 다를 포함할 수 있다.
- [0108] 일부 측면에서, 인접 폴리뉴클레오타이드의 적어도 일부는 치환기 연결, 예를 들어 포스포로티오에이트 연결에 의해 연결된다. 치환기 연결의 존재는 혈청 단백질에 대한 그의 보다 높은 친화도로 인해 약동학을 개선시킬 수 있다.
- [0109] CpG 서열은 인간 DNA에서 비교적 드물지만 박테리아와 같은 감염성 유기체의 DNA에서 통상적으로 발견된다. 인간 면역계는 감염의 조기 경고 신호로서 CpG 서열을 인식하고, 다른 면역 자극제에 의해 빈번하게 보여지는 유해 반응을 야기하지 않으면서 침입 병원체에 대해 즉각적이고 강력한 면역 반응을 개시하도록 분명히 진화하였다. 따라서 CpG 함유 핵산은 이 선천성 면역 방어 메커니즘에 의존하면서 면역 요법을 위한 고유한 천연 경로



를 이용할 수 있다. 면역 조절에 대한 CpG 핵산의 효과는 미국 특허 번호 6,194,388 및 공개된 특허 출원, 예컨대 PCT US95/01570, PCT/US97/19791, PCT/US98/03678; PCT/US98/10408; PCT/US98/04703; PCT/US99/07335; 및 PCT/US99/09863에 광범위하게 기재되었다.

- [0110] "CpG 올리고뉴클레오타이드"는 적어도 1개의 비메틸화 CpG 디뉴클레오타이드를 포함하는 핵산이다. 일부 실시양태에서, 핵산은 3개 이상의 비메틸화 CpG 디뉴클레오타이드를 포함한다. 적어도 1개의 "비메틸화 CpG 디뉴클레오타이드"를 함유하는 핵산은 시토신-구아닌 디뉴클레오타이드 서열 (즉, "CpG DNA" 또는 5' 시토신에 이어서 3' 구아노신을 함유하고 포스페이트 결합에 의해 연결된 DNA)에 비메틸화 시토신을 함유하고 면역계를 활성화하는 핵산 분자이다.
- [0111] 나노규모 구조물의 면역자극 올리고뉴클레오타이드는 바람직하게는 6 내지 100개 염기의 범위의 길이이다. 그러나, 6개 뉴클레오타이드 초과인 임의의 크기 (훨씬 많은 kb 길이)의 핵산은 충분한 면역자극 모티프가 존재하는 경우에 본 발명에 따른 면역 반응을 유도할 수 있다. 바람직하게는 면역자극 핵산은 8 내지 100개 뉴클레오타이드의 범위이고, 일부 실시양태에서 8 내지 50개 또는 8 내지 30개 뉴클레오타이드의 크기이다.
- [0112] 일부 실시양태에서 면역자극 올리고뉴클레오타이드는 변형된 백본, 예컨대 포스포로티오에이트 (PS) 백본을 갖는다. 다른 실시양태에서 면역자극 올리고뉴클레오타이드는 포스포디에스테르 (PO) 백본을 갖는다. 또 다른 실시양태에서 면역자극 올리고뉴클레오타이드는 혼합된 PO 및 PS 백본을 갖는다.
- [0113] 나노입자 코어에의 모달리티의 부착
- [0114] 핵산-상호작용 복합체의 효능제 및 항원을 비롯한, 본 발명과 연관된 모달리티는 관련 기술분야에 공지된 임의의 수단에 의해 나노입자 코어에 부착될 수 있다. 나노입자에 올리고뉴클레오타이드를 부착시키는 방법은 미국 특허 공개 번호 2010/0129808에 상세하게 기재되어 있으며 그로부터 참조로 포함된다.
- [0115] 나노입자는 폴리뉴클레오타이드를 부착시키기 위해 관능화될 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 폴리뉴클레오타이드가 관능화될 수 있다. 관능화를 위한 한 메카니즘은 알칸티올 방법이며, 이에 의해 올리고뉴클레오타이드는 금 나노입자 또는 다른 금속, 반도체 또는 자성 물질을 포함하는 나노입자에 대한 부착 전에 그의 3' 또는 5' 말단에서 알칸티올로 관능화된다. 이러한 방법은, 예를 들어 문헌 [Whitesides, Proceedings of the Robert A. Welch Foundation 39th Conference On Chemical Research Nanophase Chemistry, Houston, Tex., pages 109-121 (1995), 및 Mucic et al. Chem. Commun. 555-557 (1996)]에 기재되어 있다. 올리고뉴클레오타이드는 또한 미국 특허 번호 5,472,881에 기재되어 있으며 그로부터 참조로 포함된 바와 같이 다른 관능기, 예컨대 포스포로티오에이트 기를 사용하거나, 또는 문헌 [Burwell, Chemical Technology, 4, 370-377 (1974) 및 Matteucci and Caruthers, J. Am. Chem. Soc., 103, 3185-3191 (1981)]에 기재되어 있으며 그로부터 참조로 포함된 바와 같이 치환된 알킬실록산을 사용하여 나노입자에 부착될 수 있다. 일부 경우에서, 폴리뉴클레오타이드는 5' 또는 3' 티오뉴클레오타이드로 폴리뉴클레오타이드를 중결시킴으로써 나노입자에 부착된다. 다른 경우에서, 미국 특허 번호 6,361,944, 6,506,569, 6,767,702 및 6,750,016, 및 PCT 공개 번호 WO 1998/004740, WO 2001/000876, WO 2001/051665 및 WO 2001/073123에 기재되어 있으며 그로부터 참조로 포함된 바와 같이 나노입자에 폴리뉴클레오타이드를 부착시키는데 노화 과정이 사용된다.
- [0116] 일부 경우에서, 핵산 및/또는 항원은 금-티올 연결을 통해서와 같이 나노입자 코어에 공유적으로 부착될 수 있다. 스페이서 서열은 부착 부위와 흡수 제어 모이어티 및/또는 결합 모이어티 사이에 포함될 수 있다. 일부 실시양태에서, 스페이서 서열은 올리고뉴클레오타이드, 펩티드, 중합체 또는 올리고에틸렌을 포함하거나 또는 그로 이루어진다.
- [0117] 나노규모 구조물은 다중 화학으로 설계될 수 있다. 예를 들어, DTPA (디티올 포스포르아미다이트) 연결이 사용될 수 있다. DTPA는 티올에 의해 플레어의 세포내 방출에 저항하고, 신호 대 잡음 비를 증가시키는 역할을 할 수 있다.
- [0118] 본원에 기재된 방법에 의해 생산된 접합체는 다른 방법에 의해 생산된 것들보다 상당히 더 안정하다. 이 증가된 안정성은 나노입자 코어의 표면 상의 올리고뉴클레오타이드의 증가된 밀도 또는 코로나의 표면의 형성으로 인한 것이다. 계면활성제, 예를 들어 대략 0.01% 소듐 도데실설페이트 (SDS), 트윈 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)의 존재 하에 염 부가를 수행함으로써, 염 노화 과정이 약 1시간 내에 수행될 수 있다.
- [0119] 표면 밀도는 나노입자의 크기 및 유형, 및 올리고뉴클레오타이드의 길이, 서열 및 농도에 좌우될 수 있다. 나노입자를 안정하게 만드는데 적절한 표면 밀도 및 나노입자와 올리고뉴클레오타이드의 목적하는 조합을 수득하는데

필요한 조건은 실험적으로 결정될 수 있다. 일반적으로, 적어도 10 피코몰/cm<sup>2</sup>의 표면 밀도가 안정한 나노입자-올리고뉴클레오티드 접합체를 제공하는데 적절할 것이다. 바람직하게는, 표면 밀도는 적어도 15 피코몰/cm<sup>2</sup>이다. 접합체의 올리고뉴클레오티드가 표적과 혼성화하는 능력은 표면 밀도가 너무 큰 경우에 감소할 수 있기 때문에, 표면 밀도는 임의로 약 35-40 피코몰/cm<sup>2</sup> 이하이다. 올리고뉴클레오티드가 적어도 10 pmol/cm<sup>2</sup>, 적어도 15 pmol/cm<sup>2</sup>, 적어도 20 pmol/cm<sup>2</sup>, 적어도 25 pmol/cm<sup>2</sup>, 적어도 30 pmol/cm<sup>2</sup>, 적어도 35 pmol/cm<sup>2</sup>, 적어도 40 pmol/cm<sup>2</sup>, 적어도 45 pmol/cm<sup>2</sup>, 적어도 50 pmol/cm<sup>2</sup>, 또는 50 pmol/cm<sup>2</sup> 이상의 표면 밀도에서 나노입자에 결합하는 방법이 또한 제공된다.

[0120] 치료제

[0121] 본 발명의 측면은 치료 및/또는 진단 용도를 위한 나노규모 구축물의 대상체로의 전달에 관한 것이다. 입자는 생체내 투여를 위해 단독으로 또는 임의의 적절한 제약 담체, 예컨대 액체, 예를 들어 염수, 또는 분말로 투여될 수 있다. 이들은 또한 큰 담체 입자와 함께 또는 투여 장치 내에서 공-전달될 수 있다. 입자는 제제화될 수 있다. 본 발명의 제제는 제약상 허용되는 농도의 염, 완충제, 보존제, 상용성 담체, 아주반트 및 임의로 다른 치료 성분을 상용적으로 함유할 수 있는 제약상 허용되는 용액으로 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명과 연관된 나노규모 구축물은 물질, 예컨대 로션 (예를 들어, 아쿠아포어)와 혼합되고, 대상체의 피부에 투여되며, 이에 의해 나노규모 구축물이 대상체의 피부를 통해 전달된다. 관련 기술분야에 공지된 임의의 나노입자 전달 방법이 본 발명의 측면과 상용성일 수 있는 것으로 인지되어야 한다.

[0122] 요법에 사용하기 위해, 유효량의 입자는 입자를 목적하는 세포로 전달하는 임의의 방식에 의해 대상체에게 투여될 수 있다. 제약 조성물의 투여는 통상의 기술자에게 공지된 임의의 수단에 의해 달성될 수 있다. 투여 경로는 경구, 비경구, 근육내, 정맥내, 피하, 점막, 비강내, 설하, 기관내, 흡입, 안구, 질, 피부, 직장 및 직접 주사를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0123] 따라서, 본 발명은 한 측면에서 핵산-상호작용 복합체의 효능제가 면역 자극 효과를 매개하는데 고도로 효과적이라는 발견을 수반한다. 이들 핵산-상호작용 복합체의 효능제는 암, 감염성 질환, 알레르기, 천식, 자가면역 질환 및 다른 장애를 치료하기 위해 및 암 화학요법 후에 기회 감염에 대해 보호하는 것을 돕기 위해 면역계를 자극하는데 치료적으로 및 예방적으로 유용하다. 예를 들어, TLR 효능제 자극으로부터 유발되는 강하지만 균형 잡힌 세포성 및 체액성 면역 반응은 침입 병원체 및 암성 세포에 대한 신체 자신의 자연 방어 시스템을 반영한다.

[0124] 따라서 본 발명의 일부 측면에 유용한 핵산-상호작용 복합체의 효능제는 알레르기 또는 천식, 감염성 유기체에 의한 감염 또는 특정한 암 항원이 확인된 바 있는 암을 발달시킬 위험이 있는 대상체 또는 그를 갖는 대상체의 치료를 위한 백신이다. 핵산-상호작용 복합체의 효능제는 또한 감염, 알레르기 또는 암에 대한 보호를 위한 항원 또는 알레르겐 없이 주어질 수 있고, 이 경우에 반복 용량은 보다 긴 기간 보호를 가능하게 할 수 있다. 본원에 사용된 위험이 있는 대상체는 감염 야기 병원체 또는 암 또는 알레르겐에 대한 임의의 노출 위험 또는 암을 발달시킬 위험을 갖는 대상체이다. 예를 들어, 위험이 있는 대상체는 특정한 유형의 감염원이 발견된 영역으로 여행할 계획이 있는 대상체일 수 있거나, 또는 생활방식 또는 의료 절차를 통해 감염성 유기체를 함유할 수 있는 체액에 또는 직접 상기 유기체에 노출되는 대상체일 수 있거나, 또는 심지어 감염성 유기체 또는 알레르겐이 확인된 영역에 살고있는 임의의 대상체일 수 있다. 감염을 발달시킬 위험이 있는 대상체는 또한 의료 기관이 특정한 감염성 유기체 항원을 사용한 백신접종을 권장하는 일반적 집단을 포함한다. 항원이 알레르겐이고, 대상체가 그러한 특정한 항원에 대한 알레르기성 반응을 발달시키며, 대상체가 즉 화분 계절 동안 항원에 노출될 수 있는 경우에, 그러한 대상체는 항원에 대한 노출 위험이 있다.

[0125] 감염을 갖는 대상체는 감염성 병원체에 노출된 바 있고 체내에 급성 또는 만성 검출가능한 수준의 병원체를 갖는 대상체이다. CpG 면역자극 올리고뉴클레오티드는 감염성 병원체의 수준을 감소시키거나 또는 감염성 병원체를 근절시킬 수 있는 항원 특이적 전신 또는 점막 면역 반응을 설정하기 위한 항원의 존재 또는 부재 하에 사용될 수 있다. 본원에 사용된 감염성 질환은 체내에 외래 미생물의 존재로부터 발생하는 질환이다. 병원체 진입의 주요 부위인 신체 점막 표면을 보호하기 위한 효과적인 백신 전략 및 치료를 개발하는 것이 특히 중요하다.

[0126] 알레르기를 갖는 대상체는 알레르겐에 반응하여 알레르기성 반응을 갖거나 또는 이러한 반응을 발달시킬 위험이 있는 대상체이다. 알레르기는 물질 (알레르겐)에 대한 후천성 과민증을 지칭한다. 알레르기성 상태는 습진, 알레르기성 비염 또는 코감기, 고초열, 결막염, 기관지 천식, 두드러기 (심마진) 및 식품 알레르기, 및 다른 아

토피성 상태를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

- [0127] 암을 갖는 대상체는 검출가능한 암성 세포를 갖는 대상체이다. 암은 악성 또는 비-악성 암일 수 있다. 암 또는 종양은 담도암; 뇌암; 유방암; 자궁경부암; 용모막암종; 결장암; 자궁내막암; 식도암; 위암; 상피내 신생물; 림프종; 간암; 폐암 (예를 들어 소세포 및 비-소세포); 흑색종; 신경모세포종; 구강암; 난소암; 췌장암; 전립선 암; 직장암; 육종; 피부암; 고환암; 갑상선암; 및 신암, 뿐만 아니라 다른 암종 및 육종을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 한 실시양태에서 암은 모발상 세포 백혈병, 만성 골수 백혈병, 피부 T-세포 백혈병, 다발성 골수종, 여포성 림프종, 악성 흑색종, 편평 세포 암종, 신세포 암종, 전립선 암종, 방광 세포 암종 또는 결장 암종이다.
- [0128] 대상체는 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 양, 염소, 칠면조, 닭, 영장류, 예를 들어 원숭이, 및 어류 (양식 종), 예를 들어 연어를 포함하나 이에 제한되지는 않는 인간 또는 척추동물을 의미할 것이다. 따라서, 본 발명은 또한 비-인간 대상체에서 암 및 종양, 감염, 및 알레르기/천식을 치료하는데 사용될 수 있다.
- [0129] 본원에 사용된, 감염성 질환, 암, 알레르기 또는 천식과 같은 장애에 관하여 사용된 경우의 용어 치료하다, 치료된 또는 치료하는은 대상체의 질환의 발달 (예를 들어 병원체에 의한 감염)에 대한 저항성을 증가시키거나 또는 달리 말하면 대상체가 질환을 발달시킬 (예를 들어 병원체에 의해 감염될) 가능성을 감소시키는 예방적 치료, 뿐만 아니라 대상체가 질환을 발달시킨 후에 질환에 대항하기 위한 (예를 들어 감염을 감소시키거나 또는 제거하기 위한) 또는 질환이 악화되는 것을 방지하기 위한 치료를 지칭한다.
- [0130] 본원에 사용된 항원은 면역 반응을 유발할 수 있는 분자이다. 항원은 세포, 세포 추출물, 단백질, 폴리펩티드, 펩티드, 폴리사카라이드, 폴리사카라이드 접합체, 폴리사카라이드 및 다른 분자의 펩티드 및 비-펩티드 모방체, 소분자, 지질, 당지질, 탄수화물, 바이러스 및 바이러스 추출물, 및 다세포 유기체, 예컨대 기생충, 및 알레르겐을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 용어 항원은 넓게는 숙주 면역계에 의해 외래의 것으로 인식되는 임의의 유형의 분자를 포함한다. 항원은 암 항원, 미생물 항원 및 알레르겐을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0131] 본원에 사용된 용어 "암 항원" 및 "종양 항원"은 암 세포에 의해 차등 발현되며 이로써 암 세포를 표적화하기 위해 이용될 수 있는 항원을 지칭하는 것으로 상호교환적으로 사용된다. 암 항원은 잠재적으로 종양-특이적 면역 반응을 분명히 자극할 수 있는 항원이다. 이들 항원 중 일부는 정상 세포에 의해 코딩되며, 정상 세포에 의해 반드시 발현되지는 않는다. 이들 항원은 정상 세포에서는 통상적으로 침묵 (즉, 발현되지 않음)인 항원, 특정 분화 단계에서만 발현되는 항원, 및 배아 및 태아 항원과 같이 일시적으로 발현되는 항원인 것을 특징으로 할 수 있다. 다른 암 항원은 종양유전자 (예를 들어, 활성화된 ras 종양유전자), 억제 유전자 (예를 들어, 돌연변이체 p53), 내부 결실 또는 염색체 전위로부터 생성되는 융합 단백질과 같은 돌연변이체 세포 유전자에 의해 코딩된다. 또 다른 암 항원은 RNA 및 DNA 종양 바이러스에 보유된 것과 같은 바이러스 유전자에 의해 코딩될 수 있다. 암 항원은, 종양 또는 암 세포 표면과 연관되며 MHC 분자와 관련하여 항원 제시 세포의 표면 상에 발현되는 경우에 면역 반응을 유발할 수 있는 화합물, 예컨대 펩티드 또는 단백질이다. 암 항원은, 예를 들어 문헌 [Cohen, et al., 1994, Cancer Research, 54:1055]에 기재된 바와 같이 암 세포의 조 추출물을 제조하거나, 항원을 부분적으로 정제하거나, 재조합 기술에 의해, 또는 공지된 항원의 신생 합성에 의해 암 세포로부터 제조될 수 있다.
- [0132] 본원에 사용된 미생물 항원은 미생물의 항원이고, 바이러스, 박테리아, 기생충 및 진균을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 이러한 항원은 무손상 미생물뿐만 아니라 천연 단리물 및 그의 단편 또는 유도체 및 또한 천연 미생물 항원과 동일 또는 유사하고 그러한 미생물에 특이적인 면역 반응을 유도하는 합성 화합물을 포함한다. 화합물이 천연 미생물 항원에 대해 면역 반응 (체액성 및/또는 세포성)을 유도할 경우에 그것은 천연 미생물 항원과 유사하다. 이러한 항원은 관련 기술분야에서 상용적으로 사용되고, 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있다.
- [0133] 인간에서 발견된 바이러스의 예는 다음을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다: 레트로비리다에(Retroviridae) (예를 들어 인간 면역결핍 바이러스, 예컨대 HIV-1 (또한 HDTV-III, LAV 또는 HTLV-III/LAV로 지칭됨), 또는 HIV-III; 다른 단리물, 예컨대 HIV-LP); 피코르나비리다에(Picornaviridae) (예를 들어 소아마비 바이러스, A형 간염 바이러스; 엔테로바이러스, 인간 콕사키 바이러스, 리노바이러스, 에코바이러스); 칼시비리다에(Calciviridae) (예를 들어 위장염을 야기하는 균주); 토가비리다에(Togaviridae) (예를 들어 말 뇌염 바이러스, 풍진 바이러스); 플라비리다에(Flaviridae) (예를 들어 땡기 바이러스, 뇌염 바이러스, 황열 바이러스); 코로노비리다에(Coronaviridae) (예를 들어 코로나바이러스); 람도비리다에(Rhabdoviridae) (예를 들어 수

포성 구내염 바이러스, 광견병 바이러스); 필로비리다에(*Filoviridae*) (예를 들어 에볼라 바이러스); 파라믹소비리다에(*Paramyxoviridae*) (예를 들어 파라인플루엔자 바이러스, 메프스 바이러스, 홍역 바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스); 오르토믹소비리다에(*Orthomyxoviridae*) (예를 들어 인플루엔자 바이러스); 분야비리다에(*Bunyaviridae*) (예를 들어 한탄 바이러스, 병가 바이러스, 플레보바이러스 및 나이로 바이러스); 아레나비리다에(*Arena viridae*) (출혈열 바이러스); 레오비리다에(*Reoviridae*) (예를 들어 레오바이러스, 오르비바이러스 및 로타바이러스); 비르나비리다에(*Birnaviridae*); 헤파드나비리다에(*Hepadnaviridae*) (B형 간염 바이러스); 파르보비리다에(*Parvoviridae*) (파르보바이러스); 파포바비리다에(*Papovaviridae*) (유두종 바이러스, 폴리오마 바이러스); 아데노비리다에(*Adenoviridae*) (대부분의 아데노바이러스); 헤르페스비리다에(*Herpesviridae*) (단순 포진 바이러스 (HSV) 1 및 2, 수두 대상포진 바이러스, 시토메갈로바이러스 (CMV), 포진 바이러스; 폭스비리다에(*Poxviridae*) (두창 바이러스, 백시니아 바이러스, 폭스 바이러스); 및 이리도비리다에(*Iridoviridae*) (예를 들어 아프리카 돼지열 바이러스); 및 미분류 바이러스 (예를 들어 델타 간염의 작용제 (B형 간염 바이러스의 결함성 위성인 것으로 생각됨), 비-A형, 비-B형 간염의 작용제 (부류 1 = 내부 전달; 부류 2 = 비경구 전달 (즉, C형 간염)); 노워크 및 관련 바이러스, 및 아스트로바이러스).

[0134] 그람 음성 및 그람 양성 박테리아 둘 다는 척추동물에서 항원으로서의 역할을 한다. 이러한 그람 양성 박테리아는 파스테우렐라(*Pasteurella*) 중, 스태필로코쿠스(*Staphylococci*) 중 및 스트렙토코쿠스(*Streptococcus*) 중을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 그람 음성 박테리아는 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*), 슈도모나스(*Pseudomonas*) 중 및 살모넬라(*Salmonella*) 중을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 감염성 박테리아의 구체적 예는 헬리코박터 필로리(*Helicobacter pyloris*), 보렐리아 부르그도르페리(*Borrelia burgdorferi*), 레지오넬라 뉴모필리아(*Legionella pneumophila*), 미코박테리움(*Mycobacteria*) 중 (예를 들어 엠. 투베르쿨로시스(*M. tuberculosis*), 엠. 아비움(*M. avium*), 엠. 인트라셀룰라레(*M. intracellulare*), 엠. 칸사시이(*M. kansasii*), 엠. 고르도나에(*M. gordonae*)), 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 네이세리아 고노레아에(*Neisseria gonorrhoeae*), 네이세리아 메닝기티디스(*Neisseria meningitidis*), 리스테리아 모노시토게네스(*Listeria monocytogenes*), 스트렙토코쿠스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*) (A군 스트렙토코쿠스), 스트렙토코쿠스 아갈락티아에(*Streptococcus agalactiae*) (B군 스트렙토코쿠스), 스트렙토코쿠스 (비리단스군), 스트렙토코쿠스 파에칼리스(*Streptococcus faecalis*), 스트렙토코쿠스 보비스(*Streptococcus bovis*), 스트렙토코쿠스 (협기성 중), 스트렙토코쿠스 뉴모니아에(*Streptococcus pneumoniae*), 병원성 캄필로박터(*Campylobacter*) 중, 엔테로코쿠스(*Enterococcus*) 중, 헤모필루스 인플루엔자에(*Haemophilus influenzae*), 바실루스 안트라시스(*Bacillus anthracis*), 코리네박테리움 디프테리아에(*Corynebacterium diphtheriae*), 코리네박테리움 중, 에리시펠로트릭스 루시오파티아에(*Erysipelothrix rhusiopathiae*), 클로스트리디움 페르프린게스(*Clostridium perfringers*), 클로스트리디움 테타니(*Clostridium tetani*), 엔테로박터 아에로게네스(*Enterobacter aerogenes*), 클레브시엘라 뉴모니아에(*Klebsiella pneumoniae*), 파스테우렐라 물토시다(*Pasteurella multocida*), 박테로이데스(*Bacteroides*) 중, 푸소박테리움 누클레아툼(*Fusobacterium nucleatum*), 스트렙토마실루스 모닐리포르미스(*Streptobacillus moniliformis*), 트레포네마 팔리둠(*Treponema pallidum*), 트레포네마 페르테누에(*Treponema pertenuae*), 랩토스피라(*Leptospira*), 리케치아(*Rickettsia*) 및 악티노미세스 이스라엘리(*Actinomyces israelii*)를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0135] 진균의 예는 크립토코쿠스 네오포르만스(*Cryptococcus neoformans*), 히스토플라스마 캡슐라툼(*Histoplasma capsulatum*), 콕시디오이데스 임미티스(*Coccidioides immitis*), 블라스토미세스 더마티티디스(*Blastomyces dermatitidis*), 클라미디아 트라코마티스(*Chlamydia trachomatis*), 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)를 포함한다.

[0136] 다른 감염성 유기체 (즉, 원생생물)는 플라스모디움(*Plasmodium*) 중, 예컨대 플라스모디움 팔시파룸(*Plasmodium falciparum*), 플라스모디움 말라리아에(*Plasmodium malariae*), 플라스모디움 오발레(*Plasmodium ovale*) 및 플라스모디움 비박스(*Plasmodium vivax*), 및 독소플라스마 곤디이(*Toxoplasma gondii*)를 포함한다. 혈액-매개 및/또는 조직 기생충은 플라스모디움 중, 바베시아 마이크로티(*Babesia microti*), 바베시아 디베르겐스(*Babesia divergens*), 리슈마니아 트로피카(*Leishmania tropica*), 리슈마니아 중, 리슈마니아 브라질리엔시스(*Leishmania braziliensis*), 리슈마니아 도노바니(*Leishmania donovani*), 트리파노소마 감비엔세(*Trypanosoma gambiense*) 및 트리파노소마 로데시엔세(*Trypanosoma rhodesiense*) (아프리카 수면병), 트리파노소마 크루지(*Trypanosoma cruzi*) (샤가스병), 및 독소플라스마 곤디이(*Toxoplasma gondii*)를 포함한다.

[0137] 다른 의학상 관련된 미생물은 문헌에 광범위하게 기재되어 있으며, 예를 들어 그의 전체 내용이 본원에 참조로 포함된 문헌 [C.G.A Thomas, Medical Microbiology, Bailliere Tindall, Great Britain 1983]을 참조한다.



[0138] 알레르겐은 감수성 대상체에서 알레르기성 또는 천식 반응을 유도할 수 있는 물질 (항원)을 지칭한다. 알레르겐의 목록은 방대하고, 화분, 곤충 독, 동물 비듬 가루, 진균 포자 및 약물 (예를 들어 페니실린)을 포함할 수 있다. 천연, 동물 및 식물 알레르겐의 예는 하기 속에 특이적인 단백질을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다: 카닌(*Canine*) (카니스 파밀리아리스(*Canis familiaris*)); 더마토파고이데스(*Dermatophagoides*) (예를 들어 더마토파고이데스 파리나에(*Dermatophagoides farinae*)); 펠리스(*Felis*) (펠리스 도메스티쿠스(*Felis domesticus*)); 암브로시아(*Ambrosia*) (암브로시아 아르테미시폴리아(*Ambrosia artemisiifolia*)); 콜리움(*Lolium*) (예를 들어 콜리움 페렌네(*Lolium perenne*) 또는 콜리움 멀티플로룸(*Lolium multiflorum*)); 크립토메리아(*Cryptomeria*) (크립토메리아 자포니카(*Cryptomeria japonica*)); 알테르나리아(*Alternaria*) (알테르나리아 알테르나타(*Alternaria alternata*)); 알더(*Alder*); 알누스(*Alnus*) (알누스 글루티노아사(*Alnus glutinosa*)); 베틀라(*Betula*) (베틀라 베루코사(*Betula verrucosa*)); 퀘르쿠스(*Quercus*) (퀘르쿠스 알바(*Quercus alba*)); 올레아(*Olea*) (올레아 유로파(*Olea europaea*)); 아르테미시아(*Artemisia*) (아르테미시아 불가리스(*Artemisia vulgaris*)); 플란타고(*Plantago*) (예를 들어 플란타고 란세올라타(*Plantago lanceolata*)); 파리에타리아(*Parietaria*) (예를 들어 파리에타리아 오피시날리스(*Parietaria officinalis*) 또는 파리에타리아 주다이카(*Parietaria judaica*)); 블라텔라(*Blattella*) (예를 들어 블라텔라 게르마니카(*Blattella germanica*)); 아피스(*Apis*) (예를 들어 아피스 멀티플로룸(*Apis multiflorum*)); 쿠프레수스(*Cupressus*) (예를 들어 쿠프레수스 쉘페르비렌스(*Cupressus sempervirens*), 쿠프레수스 아리조니카(*Cupressus arizonica*) 및 쿠프레수스 마크로카르파(*Cupressus macrocarpa*)); 주니페루스(*Juniperus*) (예를 들어 주니페루스 사비노이데스(*Juniperus sabinoides*), 주니페루스 비르기니아나(*Juniperus virginiana*), 주니페루스 코뮤니스(*Juniperus communis*) 및 주니페루스 아스헤이(*Juniperus ashei*)); 투야(*Thuja*) (예를 들어 투야 오리엔탈리스(*Thuja orientalis*)); 카마에시파리스(*Chamaecyparis*) (예를 들어 카마에시파리스 오브투사(*Chamaecyparis obtusa*)); 페리플라네타(*Periplaneta*) (예를 들어 페리플라네타 아메리카나(*Periplaneta americana*)); 아그로피론(*Agropyron*) (예를 들어 아그로피론 레펜스(*Agropyron repens*)); 세칼레(*Secale*) (예를 들어 세칼레 세레알레(*Secale cereale*)); 트리티쿰(*Triticum*) (예를 들어 트리티쿰 아에스티쿰(*Triticum aestivum*)); 닥틸리스(*Dactylis*) (예를 들어 닥틸리스 글로메라타(*Dactylis glomerata*)); 페스투카(*Festuca*) (예를 들어 페스투카 엘라티오르(*Festuca elatior*)); 포아(*Poa*) (예를 들어 포아 프라텐시스(*Poa pratensis*) 또는 포아 콤프레사(*Poa compressa*)); 아베나(*Avena*) (예를 들어 아베나 사티바(*Avena sativa*)); 홀쿠스(*Holcus*) (예를 들어 홀쿠스 라나투스(*Holcus lanatus*)); 안톡산툼(*Anthoxanthum*) (예를 들어 안톡사툼 오도라툼(*Anthoxanthum odoratum*)); 아레나테룸(*Arrhenatherum*) (예를 들어 아레나테룸 엘라티우스(*Arrhenatherum elatius*)); 아그로스티스(*Agrostis*) (예를 들어 아그로스티스 알바(*Agrostis alba*)); 플레움(*Phleum*) (예를 들어 플레움 프라텐세(*Phleum pratense*)); 팔라리스(*Phalaris*) (예를 들어 팔라리스 아룬디나세아(*Phalaris arundinacea*)); 파스팔룸(*Paspalum*) (예를 들어 파스팔룸 노나툼(*Paspalum notatum*)); 소르굼(*Sorghum*) (예를 들어 소르굼 할레펜시스(*Sorghum halepensis*)); 및 브로무스(*Bromus*) (예를 들어 브로무스 이네르미스(*Bromus inermis*)).

[0139] 본 발명의 나노규모 구축물은 또한 항미생물제로 코팅되거나 또는 항미생물제와 함께 투여될 수 있다. 본원에 사용된 항미생물제는 감염성 미생물을 사멸시키거나 억제할 수 있는 자연 발생 또는 합성 화합물을 지칭한다. 본 발명에 따른 유용한 항미생물제의 유형은 대상체를 감염시키거나 감염시킬 위험이 있는 미생물의 유형에 좌우될 것이다. 항미생물제는 항박테리아제, 항바이러스제, 항진균제 및 항기생충제를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. "항감염제", "항박테리아제", "항바이러스제", "항진균제", "항기생충제" 및 "살기생충제"와 같은 어구는 통상의 기술자에게 널리 확립된 의미를 가지며, 표준 의학 교재에 정의되어 있다. 간단히 설명하면, 항박테리아제는 박테리아를 사멸시키거나 억제하고, 항생제뿐만 아니라 유사한 기능을 갖는 다른 합성 또는 천연 화합물을 포함한다. 항생제는 세포, 예컨대 미생물에 의해 2차 대사물질로서 생산되는 저분자량 분자이다. 일반적으로, 항생제는 미생물에 특이적이며 숙주 세포에 존재하지 않는 하나 이상의 박테리아 기능 또는 구조를 방해한다. 항바이러스제는 천연 공급원으로부터 단리되거나 합성될 수 있고, 바이러스를 사멸시키거나 억제하는데 유용하다. 항진균제는 표제 진균 감염뿐만 아니라 기회 및 원발성 전신 진균 감염을 치료하는데 사용된다. 항기생충제는 기생충을 사멸시키거나 억제한다.

[0140] 항박테리아제는 박테리아의 성장 또는 기능을 사멸시키거나 억제한다. 항박테리아제의 큰 부류는 항생제이다. 폭넓은 범위의 박테리아를 사멸시키거나 억제하는데 효과적인 항생제는 광역 항생제로 지칭된다. 다른 유형의 항생제는 우세하게 부류 그람-양성 또는 그람-음성 박테리아에 대해 효과적이다. 이들 유형의 항생제는 협역 항생제로 지칭된다. 단일 유기체 또는 질환에 대해서는 효과적이지만 다른 유형의 박테리아에 대해서는 효과적이지 않은 다른 항생제는 제한역 항생제로 지칭된다. 항박테리아제는 때때로 그의 주요 작용 방식을 기준으로 분류된다. 일반적으로, 항박테리아제는 세포벽 합성 억제제, 세포막 억제제, 단백질 합성 억제제, 핵산 합성

또는 기능 억제제 및 경쟁적 억제제이다.

- [0141] 항바이러스제는 바이러스에 의한 세포의 감염 또는 세포 내의 바이러스의 복제를 방지하는 화합물이다. 바이러스 복제 과정은 숙주 세포 내의 DNA 복제와 밀접하게 관련되고 비-특이적 항바이러스제는 종종 숙주에 대해 독성이기 때문에, 항박테리아 약물보다 항바이러스 약물의 수가 훨씬 더 적다. 바이러스 감염 과정 내에는 항바이러스제에 의해 차단되거나 억제될 수 있는 여러 단계가 존재한다. 이들 단계는 숙주 세포에 대한 바이러스의 부착 (이뮤노글로불린 또는 결합 펩티드), 바이러스의 비코팅 (예를 들어 아만타딘), 바이러스 mRNA의 합성 또는 번역 (예를 들어 인터페론), 바이러스 RNA 또는 DNA의 복제 (예를 들어 뉴클레오타이드 유사체), 새로운 바이러스 단백질의 성숙 (예를 들어 프로테아제 억제제) 및 바이러스의 출아 및 방출을 포함한다.
- [0142] 본 발명의 구축물은 또한 치료 또는 진단 항체와 함께 투여될 수 있다. 한 실시양태에서, 항체는 리부탁신(Ributaxin), 헤르셉틴(Herceptin), 콰드라메트(Quadramet), 파노렉스(Panorex), IDEC-Y2B8, BEC2, C225, 온콜림(Oncolym), SMART M195, ATRAGEN, 오바렉스(Ovarex), 벅사르(Bexxar), LDP-03, ior t6, MDX-210, MDX-11, MDX-22, OV103, 3622W94, 항-VEGF, 제나팍스(Zenapax), MDX-220, MDX-447, MELIMMUNE-2, MELIMMUNE-1, CEACIDE, 프리타겟(Pretarget), 노보MAB(NovoMAB)-G2, TNT, 글리오맵(Gliomab)-H, GNI-250, EMD-72000, 림포사이드(LymphoCide), CMA 676, 모노팜(Monopharm)-C, 4B5, ior egf.r3, ior c5, BABS, 항-FLK-2, MDX-260, ANA Ab, SMART 1D10 Ab, SMART ABL 364 Ab, 리톡산, 베바시주맙 및 이뮤RAIT(ImmuRAIT)-CEA로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0143] 핵산-상호작용 복합체의 효능제는 또한 자가면역 질환을 치료 및 예방하는데 유용하다. 자가면역 질환은 대상체 자신의 항체가 숙주 조직과 반응하거나 또는 면역 이펙터 T 세포가 내인성 자기-펩티드에 대해 자가반응성이어서 조직의 파괴를 야기하는 질환의 부류이다. 따라서 자기-항원으로 지칭되는 대상체 자신의 항원에 대해 면역 반응이 설정된다. 자가면역 질환은 류마티스 관절염, 크론병, 다발성 경화증, 전신 홍반성 루푸스 (SLE), 자가면역 뇌척수염, 중증 근무력증 (MG), 하시모토 갑상선염, 굿패스처 증후군, 천포창 (예를 들어, 심상성 천포창), 그레이브스병, 자가면역 용혈성 빈혈, 자가면역 혈소판감소성 자반증, 항-콜라겐 항체를 동반한 경피증, 혼합 결합 조직 질환, 다발근염, 악성 빈혈, 특발성 에디슨병, 자가면역-연관 불임, 사구체신염 (예를 들어, 초승달 사구체신염, 증식성 사구체신염), 수포성 유천포창, 쇼그렌 증후군, 인슐린 저항성 및 자가면역 당뇨병을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0144] 본원에 사용된 "자기-항원"은 정상 숙주 조직의 항원을 지칭한다. 정상 숙주 조직은 암 세포를 포함하지 않는다. 따라서 자가면역 질환과 관련하여 자기-항원에 대해 설정된 면역 반응은 바람직하지 않은 면역 반응이고 정상 조직의 파괴와 손상에 기여하는 반면에, 암 항원에 대해 설정된 면역 반응은 바람직한 면역 반응이고 종양 또는 암의 파괴에 기여한다. 따라서, 자가면역 장애를 치료하는 것을 목표로 하는 본 발명의 일부 측면에서, CpG 면역자극 핵산이 자기-항원, 특히 자가면역 장애의 표적인 자기-항원과 함께 투여되지 않는 것이 권장된다.
- [0145] 다른 경우에서, CpG 면역자극 핵산은 저용량의 자기-항원과 함께 전달될 수 있다. 수많은 동물 연구는 저용량의 항원의 점막 투여가 면역 저반응성 또는 "관용"의 상태를 유발할 수 있다는 것을 입증하였다. 활성 메커니즘은 Th1로부터 Th2 및 Th3 우세 (즉, TGF- $\beta$  우세형) 반응을 향한 시토카인-매개된 면역 편향인 것처럼 보인다. 저용량 항원 전달에 의한 활성 억제는 또한 자가면역 질환, 예를 들어 류마티스 관절염 및 SLE의 요법에 대해 상당히 관심있는 비관련 면역 반응을 억제할 수 있다 (방관자 억제). 방관자 억제는 염증유발 및 Th1 시토카인이 항원-특이적 또는 항원-비특이적 방식으로 방출되는 국부 환경에서 Th1-반대-조절, 억제자 시토카인의 분비를 수반한다. 본원에 사용된 "관용"은 이 현상을 지칭하는데 사용된다. 사실상, 경구 관용은 실험적 자가면역 뇌척수염 (EAE), 실험적 자가면역 중증 근무력증, 콜라겐-유도된 관절염 (CIA) 및 인슐린-의존성 당뇨병을 비롯한 동물에서의 수많은 자가면역 질환의 치료에 효과적인 바 있다. 이들 모델에서, 자가면역 질환의 예방 및 억제는 항원-특이적 체액성 및 세포성 반응의 Th1로부터 Th2/Th3 반응으로의 전환과 연관된다.
- [0146] 또 다른 측면에서, 본 발명은 이전에 논의된 조성물 중 하나 이상을 포함하는 키트에 관한 것이다. 본원에 사용된 "키트"는 전형적으로 본 발명의 조성물 중 하나 이상 및/또는 본 발명과 연관된 다른 조성물, 예를 들어 이전에 기재된 것들을 포함하는 패키지 또는 조립체를 정의한다. 키트의 각각의 조성물은, 존재하는 경우에, 액체 형태로 (예를 들어, 용액으로), 또는 고체 형태로 (예를 들어, 건조된 분말로) 제공될 수 있다. 특정 경우에서, 조성물 중 일부는, 예를 들어 키트와 함께 제공될 수 있거나 또는 제공될 수 없는 적합한 용매 또는 다른 종의 첨가에 의해 (예를 들어, 활성 형태로) 구성될 수 있거나 또는 다르게는 가공될 수 있다. 본 발명과 연관될 수 있는 다른 조성물의 예는, 예를 들어 샘플 및/또는 대상체에 대한 특정한 용도를 위해 조성물 또는 성분을 사용, 투여, 변형, 조립, 보관, 포장, 제조, 혼합, 희석 및/또는 보존하기 위한 용매, 계면활성제, 희석

제, 염, 완충제, 유화제, 킬레이트화제, 충전제, 항산화제, 결합제, 벌킹제, 보존제, 건조제, 향미생물제, 바늘, 시린지, 포장 재료, 튜브, 병, 플라스크, 비커, 디쉬, 프릿, 필터, 링, 클램프, 램, 패치, 용기, 테이프, 접착제 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0147] 일부 실시양태에서, 본 발명과 연관된 키트는 하나 이상의 나노입자 코어, 예컨대 금을 포함하는 나노입자 코어를 포함한다. 키트는 또한 핵산-상호작용 복합체의 하나 이상의 효능제를 포함할 수 있다. 키트는 또한 하나 이상의 항원을 포함할 수 있다.

[0148] 본 발명의 키트는, 일부 경우에서, 본 발명의 조성물과 함께 제공되는 임의의 형태의 지침서를 그 지침서가 본 발명의 조성물과 연관된 것임을 통상의 기술자가 인식하는 방식으로 포함할 수 있다. 예를 들어, 지침서는 본 조성물 및/또는 키트와 연관된 다른 조성물의 사용, 변형, 혼합, 희석, 보존, 투여, 조립, 보관, 포장 및/또는 제조에 대한 지침서를 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 지침서는 또한 예를 들어 샘플에 대한, 예를 들어 특정한 용도를 위한, 조성물의 사용에 대한 지침서를 포함할 수 있다. 지침서는, 이러한 지침서를 함유하는 적합한 매체, 예를 들어 임의의 방식으로 제공되는 서면 또는 출판, 구두, 가정 (예를 들어, 전화), 디지털, 광학, 시각 (예를 들어, 비디오테이프, DVD 등) 또는 전자 통신 (인터넷 또는 웹-기반 통신 포함)으로서 통상의 기술자에 의해 인식가능한 임의의 형태로 제공될 수 있다.

[0149] 일부 실시양태에서, 본 발명은 본원에 논의된 바와 같은 본 발명의 하나 이상의 실시양태를 판촉하는 방법에 관한 것이다. 본원에 사용된 "판촉하는"은 본원에 논의된 바와 같은 본 발명의 시스템, 장치, 기기, 물품, 방법, 조성물, 키트 등과 연관된 판매, 광고, 배정, 라이선싱, 계약, 지시, 교육, 연구, 수입, 수출, 협상, 재무, 대부, 무역, 매각, 전매, 분배, 수리, 교체, 보험, 소송, 특허 등의 방법을 포함하나 이에 제한되지는 않는 모든 사업 방법을 포함한다. 판촉 방법은 개인 집단, 기업 (공적 또는 사적), 합자회사, 주식회사, 기업합동, 계약상 또는 하위-계약상 대리인, 교육 기관, 예컨대 단과대학 및 종합대학, 연구 기관, 병원 또는 다른 임상 기관, 정부 기관 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는 임의의 집단에 의해 수행될 수 있다. 판촉 활동은 본 발명과 분명히 연관된 임의의 형태의 통신 (예를 들어, 서면, 구두 및/또는 전자 통신, 예컨대 이들에 제한되지는 않지만, 이메일, 전화, 인터넷, 웹-기반 통신 등)을 포함할 수 있다.

[0150] 한 세트의 실시양태에서, 판촉 방법은 하나 이상의 지침서를 수반할 수 있다. 본원에 사용된 "지침서"는 교육용 유틸리티의 구성요소 (예를 들어, 사용법, 안내서, 경고문, 표지, 알람, FAQ 또는 "자주 하는 질문" 등)를 정의할 수 있으며, 전형적으로 본 발명 및/또는 본 발명의 포장에 관한 또는 이와 연관된 서면 지침서를 수반한다. 지침서는 또한, 이러한 지침서가, 예를 들어 본원에 논의된 바와 같은 본 발명과 연관된 것임을 사용자가 분명히 인식할 임의의 방식으로 제공되는 임의의 형태 (예를 들어, 구두, 전자, 가정, 디지털, 광학, 시각 등)의 교육용 통신을 포함할 수 있다.

[0151] 본 발명은 하기 실시예에 의해 추가로 예시되지만, 어떠한 방식으로든지 이로 인해 추가로 제한되는 것으로 간주되지 않아야 한다. 본원 전체에 걸쳐 인용되는 모든 참고문헌 (문헌상의 참고문헌, 공고된 특허, 공개된 특허 출원, 및 공동-계류중인 특허 출원 포함)의 전체 내용은 본원에 명백하게 참조로 포함된다.

[0152] 실시예

[0153] 실시예 1:

[0154] 물질 및 방법

[0155] 면역자극 SNA의 합성

[0156] 면역자극 SNA (isSNA)의 합성은 하기 본질적 변형과 함께, 다른 문헌<sup>7-12</sup>에 기재된 바와 같이 달성된다. 간략하게, 20 mL 13 nm 금 콜로이드를 적절한 농도, 예컨대 5  $\mu$ M의 10% 트윈(Tween) 20 및 술프히드릴-변형된 핵산의 TLR 효능제 서열 (TLR 3, 7/8, 9)과 혼합하고, 밤새 반응하게 하였다. 항원의 첨가는 다른 문헌에 기재된 방법과 유사하게 달성될 수 있다.<sup>10</sup> SNA의 정제는 75,000xg에서 30분 동안의 반복적 초원심분리에 의해 달성할 수 있다.

[0157] 세포주

[0158] RAW 264.7 세포주를 ATCC로부터 수득하였다. RAW-블루 대식세포를 인비보젠(InVivoGen)으로부터 수득하였다. 라모스-블루(Ramos-Blue) 및 THP1-X블루 세포를 인비보젠으로부터 수득하였다. 모두를 분배기 권장사항에 따라 배양하였다.

- [0159] 결과 및 논의
- [0160] 본 발명의 나노규모 구축물은 용액 중 핵산-상호작용 복합체 (CpG 올리고뉴클레오티드)의 비제제화된 효능제에 비해 대식세포에서 효력을 현저하게 증진시키는 것으로 발견되었다 (도 2). RAW-블루 대식세포를 웰당 65k 세포로 플레이팅하고, 밤새 부착되게 하였다. 실험일에, 세포를 AST-008-ps 또는 CpG 1826-ps로 표시된 올리고 농도로 30분 (상부 패널), 4시간 (중앙 패널), 또는 밤새 (하부 패널) 처리하였다. 30분 및 4시간 시점의 경우에, 전체 상청액을 흡인해내고, 세포를 세척하고, 시험 작용제의 부재 하의 완전 성장 배지를 투여하였다. 밤새 시점에서는, 세포의 활성화 상태를 콰нти블루(Quant iBlue) 검정 키트를 사용하여 결정하였다. 결과는 특히 짧은 시점에서, AST-008-ps가 17800 nM과 비교하여 188 nM의 CpG 1826-ps보다 유의하게 더 낮은 EC50을 나타냄을 제시한다 (9-1000-배수 감소 평균으로부터 1 표준 편차). 4시간 쯤에, AST-008-ps는 CpG 1826-ps보다 낮은 EC50 (32 nM vs 57 nm) 및 큰 활성화 상태를 나타내었다. 이러한 차이는 밤샘 인큐베이션 후에 더 좁아지고, 그 시점에서 EC50은 서로 통계적으로 상이하지 않다. 이는 작용제와 표적 세포의 체류 시간이 특히 30분 이하로 제한된 조건 하에서, AST-008-ps 제제는 보다 신속하고 강건한 면역 활성화를 생성할 수 있음을 시사한다.
- [0161] 또한, 본 발명의 나노규모 구축물은 밤새 인큐베이션한 후에 용액 중 핵산-상호작용 복합체 (CpG 올리고뉴클레오티드)의 비제제화된 효능제에 비해 대식세포에서 효력을 현저하게 증진시키는 것으로 나타났다 (도 3). RAW-블루 대식세포를 웰당 65k 세포로 플레이팅하고, 밤새 부착되게 하였다. 실험일에, AST-007-po, AST-007-ps, AST-008-po, AST-008-ps, CpG 1826-po, CpG 1826-ps를 세포와 밤새 인큐베이션시켰다. 이어서 콰нти블루 검정 키트를 사용하여 활성화의 정도를 결정하였다. 결과는 오직 포스포디에스테르 (-po) 연결을 함유하는 화합물의 경우에 (상부 패널), AST-007-po 및 AST-008-po가 그의 EC50 값에 의한 결정 시 CpG 1826-po보다 ~50-150배 더 강력함을 제시한다 (16032 nM과 비교하여 각각 191 nM 및 194 nM). 포스포로티오에이트-변형된 화합물에 의하면 (-ps, 하부 패널), AST-007-ps 및 AST-008-ps는 CpG 1826-ps와 대략 동등하였고, EC50이 각각 29 nM, 27 nM, 및 20 nM이었다.
- [0162] 본 발명의 나노규모 구축물 대 용액 중 핵산-상호작용 복합체 (CpG 올리고뉴클레오티드)의 비제제화된 효능제에 노출된 후 시토카인 분비의 수준을 조사하였다. 나노입자 및 TRL 효능제 군 둘 다에서 포스포디에스테르 및 포스포로티오에이트 뉴클레오티드간 연결을 갖는 양쪽 올리고뉴클레오티드에 대해 시토카인 유도 효과를 조사하였다 (도 4). RAW-블루 대식세포를 웰당 65k 세포로 플레이팅하고, 밤새 부착되게 하였다. 실험일에, 표시된 화합물을 세포와 밤새 인큐베이션시켰다. 상청액을 수집하고, ELISA에 의해 표시된 시토카인의 농도를 측정함으로써 시토카인 분비의 정도를 결정하였다 (TNF-알파- 상부 패널, IL-12- 하부 우측 패널, IL-6- 하부 좌측 패널). 결과는 CpG 1826-ps, CpG 1826-po, 및 표시된 대조군보다 AST-008-ps 및 AST-008-po를 사용하면 보다 낮은 용량에서 유의하게 더 높은 시토카인 분비가 가능함을 제시한다. 예를 들어 2000 pg/mL 초과 TNF-알파를 달성하기 위해서는, 100 nM 미만의 AST-008-ps가 필요하고, 1000 nM 미만의 AST-007-po가 필요하지만, 1000 nM 초과 CpG 1826-ps가 요구되었다.
- [0163] 다음으로, 용액 중 포스포디에스테르 및 포스포로티오에이트 CpG 올리고뉴클레오티드와 비교하여 포스포디에스테르 CpG 올리고뉴클레오티드를 갖는 본 발명의 나노규모에 의한 자극에 대한 반응으로 TLR9 활성화를 조사하였다 (도 5). 라모스-블루 또는 THP1-X블루 세포를 시딩하고, 표시된 화합물 및 대조군을 사용하여 제조업체의 권장 프로토콜에 따라 활성화시켰다. 놀랍게도, AST-007-po, AST-008-po, 및 AST-009-po는 공지되고 최적화된 TLR 9 효능제인 CpG 7909-ps보다 유사한 용량에서 비슷한 활성화를 나타내었다. 또한, TLR 9 효능제 비감수성 THP1-X블루 세포가 어떠한 활성화도 나타내지 않았기 때문에, 활성화는 TLR 9에 의존적인 것으로 보였다.
- [0164] 본 발명의 나노규모 구축물은 여러 다양한 CpG 올리고 서열에 비해 효력면에서 다중 배수 증가를 갖는 것으로 결정되었다 (도 6). 라모스-블루 세포를 시딩하고, 표시된 화합물 및 대조군을 사용하여 제조업체의 권장 프로토콜에 따라 활성화시켰다. 올리고 1826 (상부 패널) 및 1668 (하부 패널)을 시험하였다. 특히, SNA 화합물이 대조군과 비교하여 화학에 관계없이 유리 올리고보다 유의하게 더 낮은 EC50 값을 나타내었다. 이는 이들 서열의 경우에, 올리고의 SNA 제제가 여러 배수로 더 강력함을 시사한다.
- [0165] 나노입자 코어 크기의 조정 효과를 조사하였다 (도 7). Raw 블루 세포를 플레이팅하고, 표시된 올리고를 사용하여 3.5 nm 내지 13 nm 범위의 상이한 금 코어 크기를 갖는 표시된 효능제로 처리하였다. 결과는 보다 작은 금 코어 크기가 시험관내에서 효능제 활성을 증진시키는데 잠재력을 나타내는 것으로 보임을 제시한다.
- [0166] 본 발명의 나노규모 구축물은 CpG 올리고보다 더 신속하고 지속적인 활성화를 갖는 것으로 관찰되었다 (도 8). 세포를 기재된 바와 같이 플레이팅하고, 콰нти블루를 사용하여 활성화를 측정하였다. 결과는 6 nM 올리고에서,



PS SNA가 유리 1668 PS 올리고보다 유의하게 더 큰 활성화를 나타냄을 제시한다.

- [0167] 포스포로티오에이트 변형이 서열-의존적 방식으로 효능제 활성을 조정하는 능력을 조사하였다 (도 9). Raw 블루 세포를 플레이팅하고, 표시된 효능제로 처리하였다. 올리고 1826 (상부 패널) 및 1668 (하부 패널)을 시험하였다. 결과는 내부 포스포로티오에이트 변형 (C\*G) 및 2개의 5' 포스포로티오에이트 연결 (5'PS2)이 면역자극 SNA의 활성화에 영향을 미치며, 이는 서열 의존적인 것으로 보임을 제시한다.
- [0168] 올리고뉴클레오타이드 로딩 밀도가 효능제 활성화에 영향을 미치는 능력을 평가하였다 (도 10). V2는 금 코어에의 올리고 첨가 전에 구축물이 완전히 금 코팅되었음을 나타낸다. 포스포디에스테르 올리고뉴클레오타이드 (상부 패널) 및 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드 (하부 패널)를 시험하였다. 데이터는 금 표면 상의 올리고뉴클레오타이드의 밀도가 면역자극 구축물의 활성을 조정할 것임을 제시한다.
- [0169] CpG PO/PO 나노규모 구축물의 활성화의 시간 경과를 연구하였다 (도 11). 시험 구축물은 인큐베이션 >4시간까지 활성화되지 않았다. Raw 블루 세포를 플레이팅하고, 표시된 효능제로 처리하였다. 결과는 PO 및 PO SNA가 인큐베이션 4시간 초과까지 부착 RAW 블루 세포를 강건하게 활성화시키지 않음을 제시한다.
- [0170] 5'Chol CpG PO 나노규모 구축물은 낮은 nM 범위에서 활성화를 나타낸 반면에, 5'C18은 활성을 제거하였다 (도 12). 5' 콜레스테롤 변형 (5'Chol)은, 특히 낮은 농도에서 올리고-용량-비의존적 방식으로 효능제의 효력을 증가시킬 수 있다. C18 분자에 의한 5' 말단의 변형 (5'C18)은 활성을 완전히 제거하는 것으로 보인다.
- [0171] 사전-플레이팅한 대식세포를 후속 활성화를 위해 더욱 프라이밍하였다 (도 13). 효능제 화합물의 첨가 전에 밤새 플레이팅한 RAW 블루 대식세포는 (상부) 일반적으로, 세포를 효능제 화합물을 첨가하는 것과 동시에 플레이팅한 경우 (하부)보다 더 큰 활성화를 나타내었다.
- [0172] 대식세포에 의한 낮은 수준의 IFN-감마 분비가 나타났다 (도 14). RAW-블루 대식세포를 웰당 65k 세포로 플레이팅하고, 밤새 부착되게 하였다. 실험일에, 표시된 화합물을 세포와 밤새 인큐베이션시켰다. 상청액을 수집하고, ELISA에 의해 표시된 시토카인의 농도를 측정함으로써 시토카인 분비의 정도를 결정하였다 (처리 후 24시간 -좌측 패널 또는 48시간 -우측 패널). 결과는 IFN-감마가 이들 화합물에 의해 자극된 RAW 블루 대식세포에 의해 인지가 가능한 정도로 생산되지 않음을 제시한다.
- [0173] 실시예 2: 면역-종양학 및 면역요법
- [0174] 면역요법제 SNA (즉, AST-008)는 신규하고 다목적 기술 플랫폼을 제공한다. 그의 다가 면역조정제 전달은 반응을 최적화하고, 림프종 모델에서 완전한 종양 감소가 관찰되었다. 추가로, 이는 유리 올리고뉴클레오타이드 또는 명반의 그것보다 더 큰, 강력하고 균형잡힌 생체내 T 세포 반응을 유발한다. SNA는 단일 나노입자 상에 치료 백신 항원 및 아주반트를 공동-제시할 수 있고, 유리 면역자극 CpG 올리고데옥시뉴클레오타이드보다 증진된 활성 및 더 빠른 동역학을 갖는다. 게다가, SNA는 다중 면역자극 수용체 (예를 들어, TLR 3, 4, 7/8, 9)를 동시에 표적화하는 잠재력을 갖는다. 이는 예를 들어, 암 면역요법 및 백신에 사용될 수 있다 (예방적 또는 치료적).
- [0175] 면역요법제 SNA (AST-008)의 개략도를 도 15에 제시한다. SNA는 단일 나노입자 상에 치료 백신 항원 및 아주반트를 공동-제시할 수 있고, 다중 면역자극 수용체 (예를 들어, TLR 3, 4, 7/8, 9)를 동시에 표적화할 수 있다.
- [0176] AST-008이 유발된 세포내이입을 통해 어떻게 엔도솜에 진입할 수 있는지를 나타내는 개략도를 도 16에 제시한다. AST-008은 일단 엔도솜 내에서 다목적 면역계 자극을 위해 사용될 수 있다. 엔도솜 내에서, AST-008은 SNA 요법을 위한 분자 표적인 TLR 9 수용체를 통해 면역계 신호전달을 자극하고, 이는 선천성 및 적응성 면역 반응 둘 다로 이어진다. AST-008은 또한 TLR 3, 4, 7/8을 표적으로 하여 선천성 및 적응성 면역 반응을 생성할 수 있다.
- [0177] AST-008은 시험관내에서 상응하는 CpG 올리고데옥시뉴클레오타이드 (올리고)보다 더 높은 염증유발 반응을 유도한다. 이러한 발견을 나타내는 검정을 수행하였다. 데이터는 도 17A 및 17B에서 일련의 그래프로서 제시된다. 도 17A는 CTL 올리고, CTL SNA, CpG 1826, 및 AST-008에 의해 유도된 TNF, IL-12, 및 IL-6의 발현 수준을 제시한다. 도 17B는 표시된 작용제로부터 기인한 NF- $\kappa$ B 활성화를 나타낸다.
- [0178] AST-008은 또한 단일 피하 용량의 투여 후에 배액 림프절을 표적으로 한다. 금 코어의 광 산란을 증진시키기 위해 AST-008을 은-염색한 다음, 예오신으로 대조염색하였다. 4X 명시야 배율을 사용하였다. 데이터를 도 18에 제시한다.
- [0179] 본 발명의 구조는 생체내에서 강건한 면역 반응을 자극하는데 유용하다. 예를 들어, 도 19는 AST-008의 생체내

활성을 예시하는 그래프이다. 마우스에게 5.1 nmol 용액 (AST-008-po, AST-008-ps, CpG 1826-po, CpG 1826-ps, GpC-po SNA, GpC-ps SNA, GpC-po, 또는 GpC-ps)의 50  $\mu$ L 볼루스 꼬리 정맥 (정맥내) 주사를 제공한 다음, 주사 1, 3, 및 6시간 후에 IL-12 발현을 분석하였다 (군당 24마리의 마우스, 각각의 시점당 3). IL-12 수준을 PBS에 비해 배수로서 표현한다. AST-008 아키텍처는 IL-12의 유도를 유리 올리고데옥시뉴클레오티드에 비해 대략 20배 증진시켰고, 효과는 초기 투여 후 6시간 초과 동안 지속되었다. 도 20A-20C는 AST-008이 명반 또는 CpG 올리고뉴클레오티드보다 균형잡힌 Th1/Th2 반응 (도 20A) 및 더 높은 IgG2a 항체 (도 20B) 반응 둘 다를 유도함을 나타내는 한 쌍의 그래프 및 차트로 이루어진다. 결과를 도 20C에 표로 나타낸다. \*\*  $p < 0.01$ . 도 21A-21B는 AST-008이 명반 또는 CpG 올리고뉴클레오티드보다 세포성 반응을 더 효과적으로 유도함을 제시한다. 도 21A는 프로토콜을 개략적으로 나타낸다: 비장세포를 28일 동안 성장시키고, 제0일 및 제21일에 챌린지한 다음, SIINFEKL로 재자극하고, 제28일에 ELISPOT으로 INF- $\gamma$ 에 대해 프로빙하였다. 도 21B는 결과를 도시한 그래프이다. \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

[0180] 구조는 또한 생체내에서 극적인 항종양 반응을 생성하는 것으로 나타났다. 도 22A-22B는 AST-008이 생체내 림프종 모델에서 완전한 종양-제거 면역 반응을 유도함을 나타낸다. 도 22A는 프로토콜을 예시한다: C57BL/6 마우스의 우측 측복부에  $1 \times 10^6$ 개의 E.G7-OVA 림프종을 주사하였다 (군당 11마리). 이어서 마우스를 100  $\mu$ g OVA s.c., 1.8  $\mu$ g OVA<sub>257-264</sub> s.c., 및 AST-008 중 0.92 nmol 올리고로 3회 챌린지하고, 2000 mm<sup>3</sup>일 때 안락사시켰다. 도 22B는 결과 그래프이다. \*  $p < 0.05$  이원 ANOVA 사용. 도 23A-23B는 AST-008이 CpG 올리고데옥시뉴클레오티드보다 뛰어난 항종양 활성 및 더 긴 생존을 나타냄을 제시한다. 그래프는 C57BL/6 마우스에게 그의 우측 측복부로  $1 \times 10^6$ 개의 E.G7-OVA 림프종을 주사한 다음 (군당 11마리) PBS, PBS 및 OVA, CpG 1826 및 OVA, 또는 AST-008 및 OVA로 3회 챌린지한 후의 종양 부피 (도 23A) 및 퍼센트 생존 (도 23B)을 제시한다. \* $p < 0.05$ .

[0181] <표 1> 기호에 대한 해설

명칭	올리고 서열 (5'-3')	제제	서열 번호
AST-007-po, CpG 1668 PO SNA	TCCATGACGTTTCCTGATGCT/iSp18//iSp18//iSp18//3 티오 MC3-D/	티오-금 결합을 통해 13 nm 금 코어에 접합됨	36
AST-008-po, CpG 1826 PO SNA	TCCATGACGTTTCCTGACGTT/iSp18//iSp18//3 티오 MC3-D/	티오-금 결합을 통해 13 nm 금 코어에 접합됨	37
AST-009-po, CpG 7909 PO SNA	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT/iSp18//iSp18//3 티오 MC3-D/	티오-금 결합을 통해 13 nm 금 코어에 접합됨	38
AST-007-ps, CpG 1668 PS SNA	tccatgacgttctgacgtt/iSp18//iSp18//iSp18//3 티오 MC3-D/	티오-금 결합을 통해 13 nm 금 코어에 접합됨, 테트라에틸렌 글리콜로 재충전됨	39
AST-008-ps, CpG 1826 PS SNA	tccatgacgttctgacgtt/iSp18//iSp18//iSp18//3 티오 MC3-D/	티오-금 결합을 통해 13 nm 금 코어에 접합됨, 테트라에틸렌 글리콜로 재충전됨	40
AST-009-ps, CpG 7909 PS SNA	tcgtcgttttgcgttttgcgtt/iSp18//iSp18//3 티오 MC3-D/	티오-금 결합을 통해 13 nm 금 코어에 접합됨, 테트라에틸렌 글리콜로 재충전됨	41
CpG 1826-po	TCCATGACGTTTCCTGACGTT	유리	42

[0182]

CpG 1826-ps	Tccatgacgttcctgacgtt	유리	43
CpG 1668-po	TCCATGACGTTTCCTGATGCT	유리	44
CpG 1668-ps	Tccatgacgttcctgatgct	유리	45
CpG 7909-po	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT	유리	46
CpG 7909-ps	Tcgtcgttttgcgttttgcgtt	유리	47
rplV-po	GCTTTCTTGTTGGTGTAGGTC	유리	48
rplV-ps	Gctttcttggtgttaggtc	유리	49
Ctrl-SNA-po, rplV SNA PO	어떠한 CpG 모티프도 함유하지 않는 서열, 모두 포스포디에스테르 연결	티오-금 결합을 통해 13 nm 금 코어에 접합됨	
Ctrl-SNA-ps, rplV SNA PS	어떠한 CpG 모티프도 함유하지 않는 서열, 모두 포스포로티오에이트 연결	티오-금 결합을 통해 13 nm 금 코어에 접합됨	

소문자는 포스포로티오에이트 연결을 나타냄

대문자는 포스포디에스테르 연결을 나타냄

접두어 "Ctrl"은 CpG 모티프의 부재 하에 사용된 올리고를 나타냄

/iSp18/ 내부 스페이서-18

/3 티오 MC3-D/ 말단 술폰히드릴 기

[0183]

[0184]

참고문헌

1. Koff WC et al. Science 340:1232910-1 (2013)
2. Cluff CW. Monophosphoryl Lipid A (MPL) as an Adjuvant for Anti-Cancer Vaccines: Clinical Results. Lipid A in Cancer Therapy, Jeannin J Ed. Landes Bioscience (2000)
3. Krieg AM. Proc Am Thorac Soc 4:289 (2007)
4. Schmidt C. Nat Biotechnol 25:825 (2007)
5. Ellis RD et al. PLOS One 10:e46094 (2012)
6. Garcon N et al. Expert Rev. Vaccines 6:723 (2007)
7. Rosi NL et al. Science 312:1027 (2006)
8. Lytton-Jean AK et al. JACS 127:12754 (2005)
9. Hurst SJ et al. Anal. Chem. 78:8313 (2006)
10. Patel PC et al. PNAS 105:17222 (2008)
11. Seferos DS et al. Nano Lett 9:308 (2009)
12. Giljohann et al. Angew. Chem. Int. Ed. 49:3280 (2010)

[0185]

[0186]

등가물

[0187]

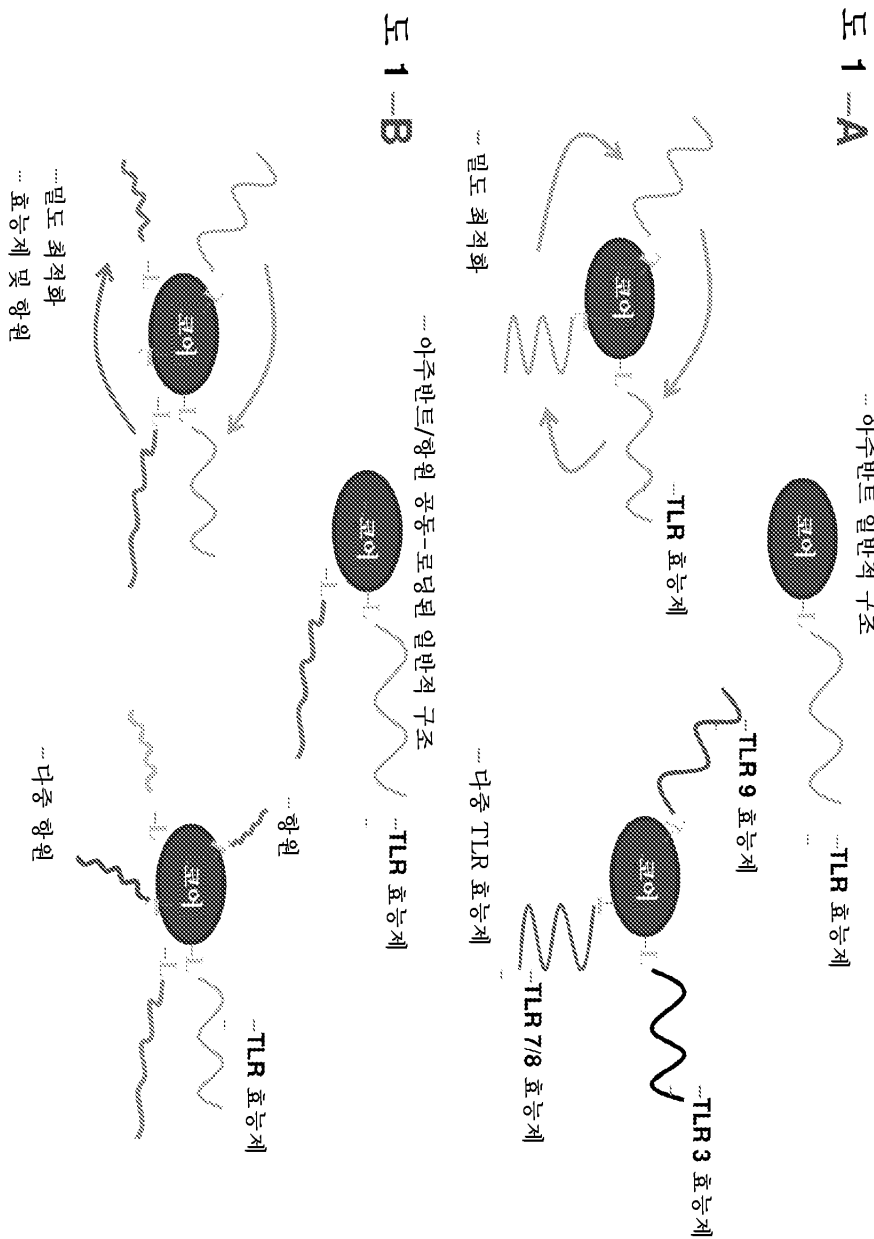
통상의 기술자는 상용의 범위를 넘지 않는 실험을 사용하여, 본원에 기재된 본 발명의 구체적 실시양태에 대한 다수의 등가물을 인식하거나 또는 확인할 수 있을 것이다. 이러한 등가물은 하기 청구범위에 포괄되는 것으로 의도된다.

[0188]

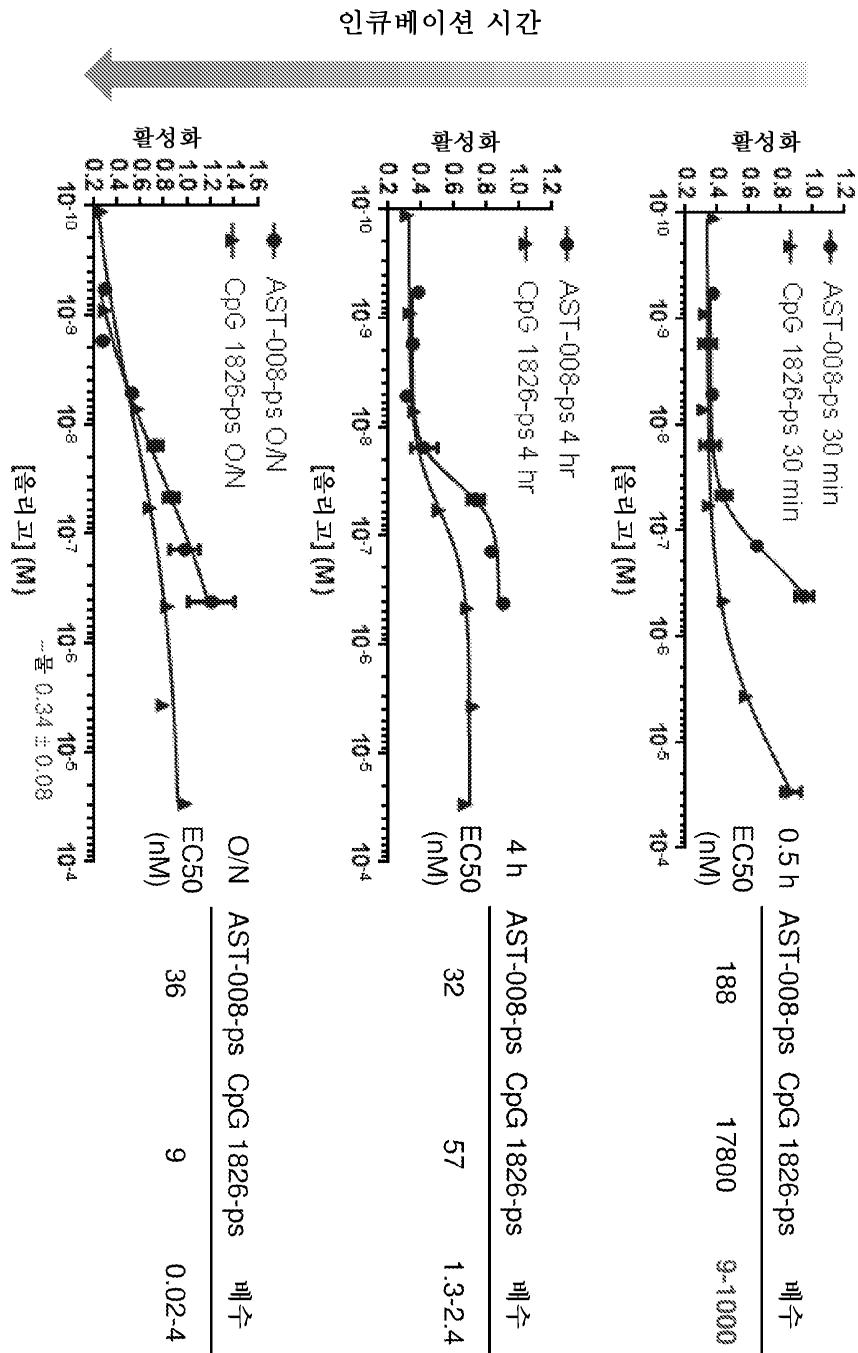
특허 문헌을 비롯한 본원에 개시된 모든 참고문헌은 그 전문이 참조로 포함된다.

도면

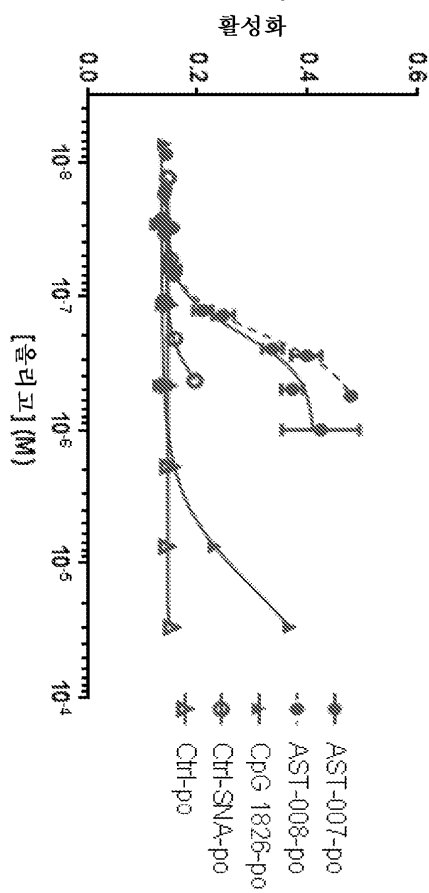
도면1



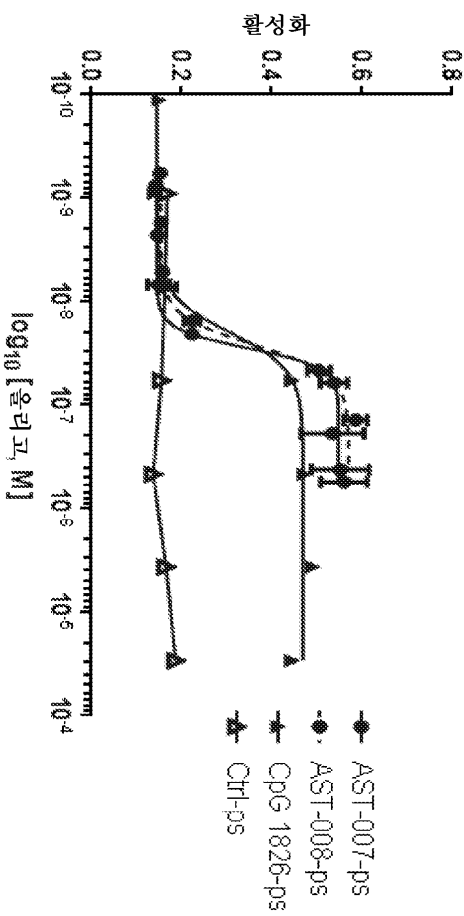
도면2



<u>포스포디에스테르 단독 (PO)</u>		
	<u>EC<sub>50</sub> (nM)</u>	<u>배수</u>
AST-007-po	191	49-145
AST-008-po	194	51-133
CpG 1826-po	16032	-

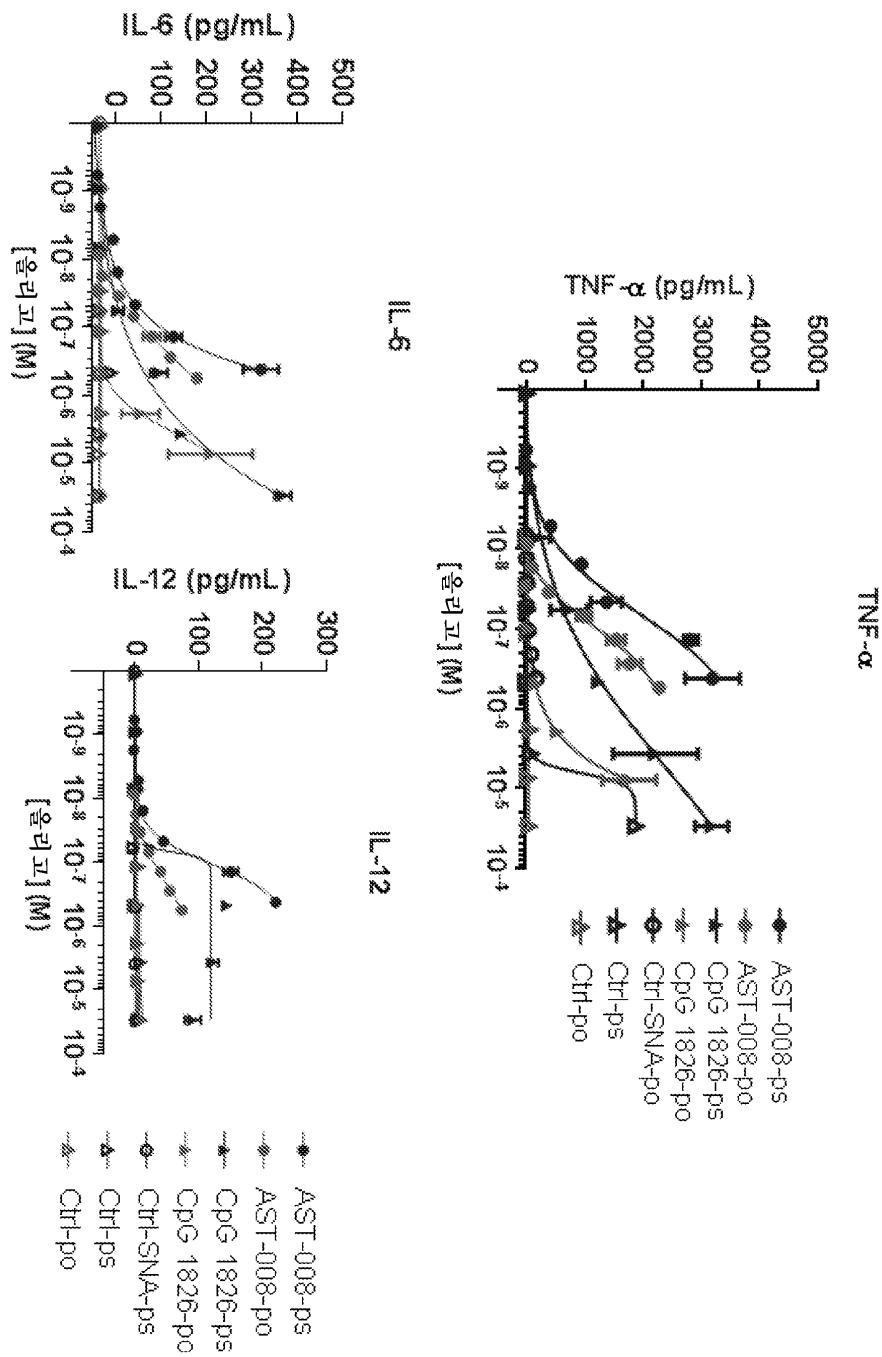


<u>포스포로티오에이트 변형질 (PS)</u>		
	<u>EC<sub>50</sub> (nM)</u>	<u>배수</u>
AST-007-ps	29	0.5-1
AST-008-ps	27	0.6-1
CpG 1826-ps	20	-



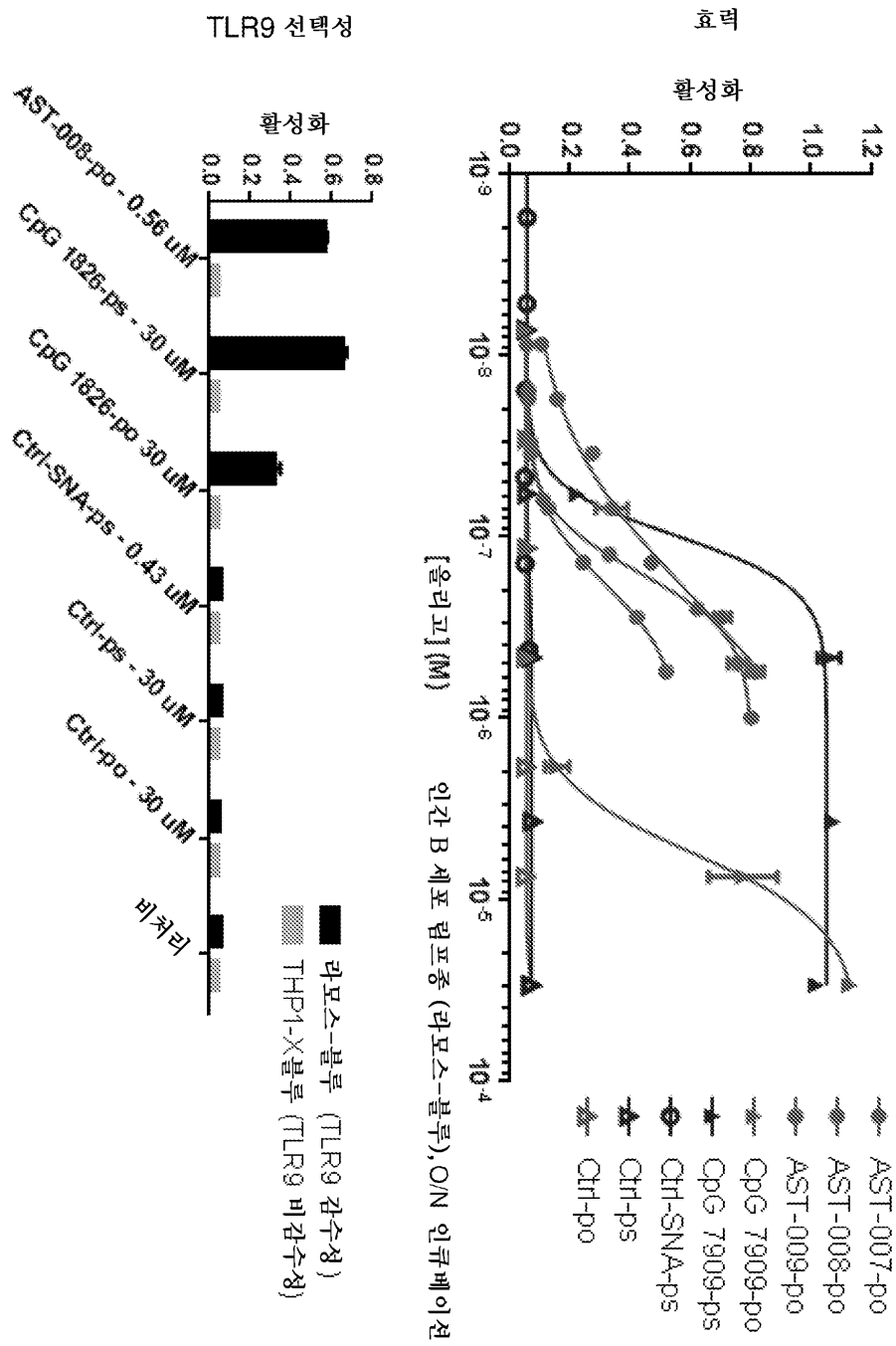
도면3

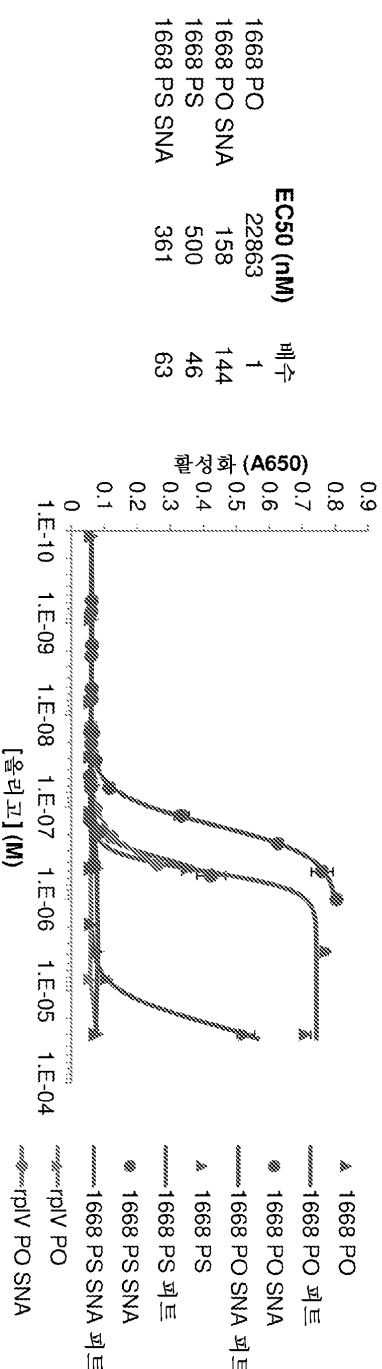
도면4





도면5

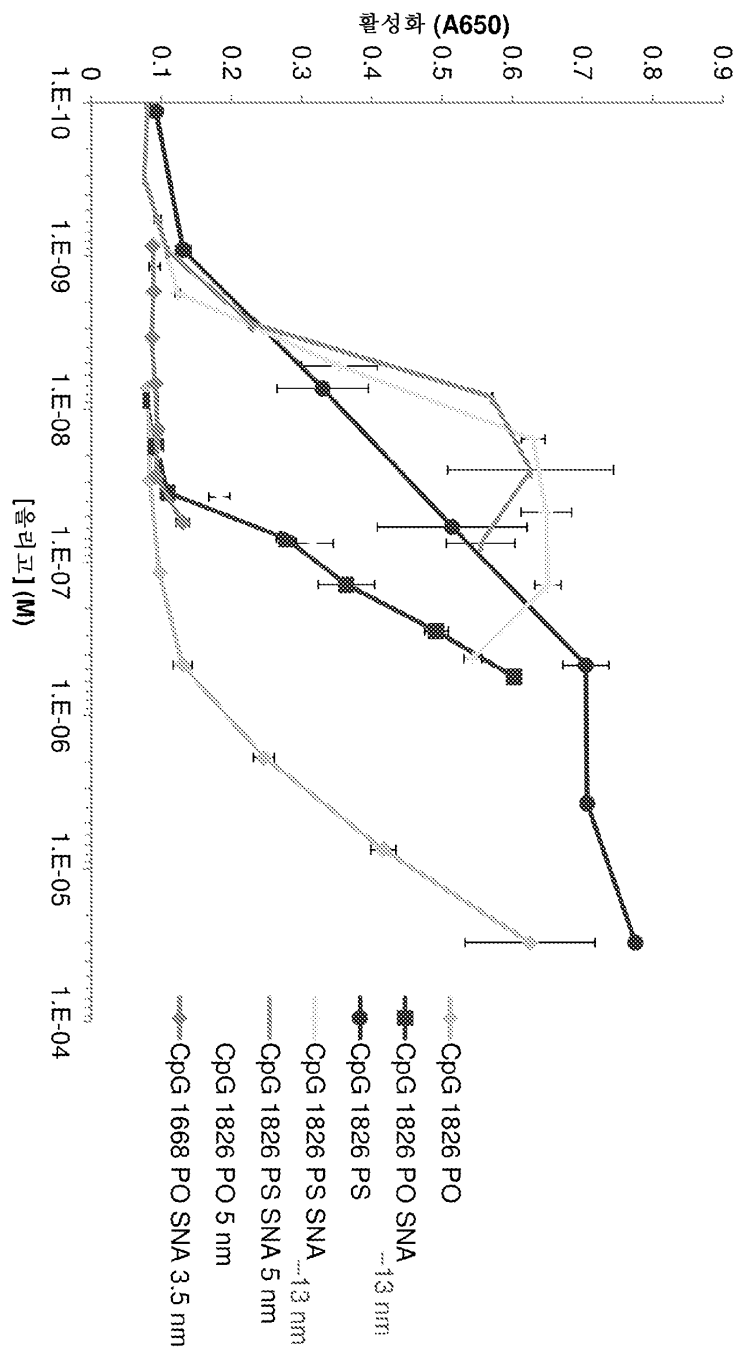




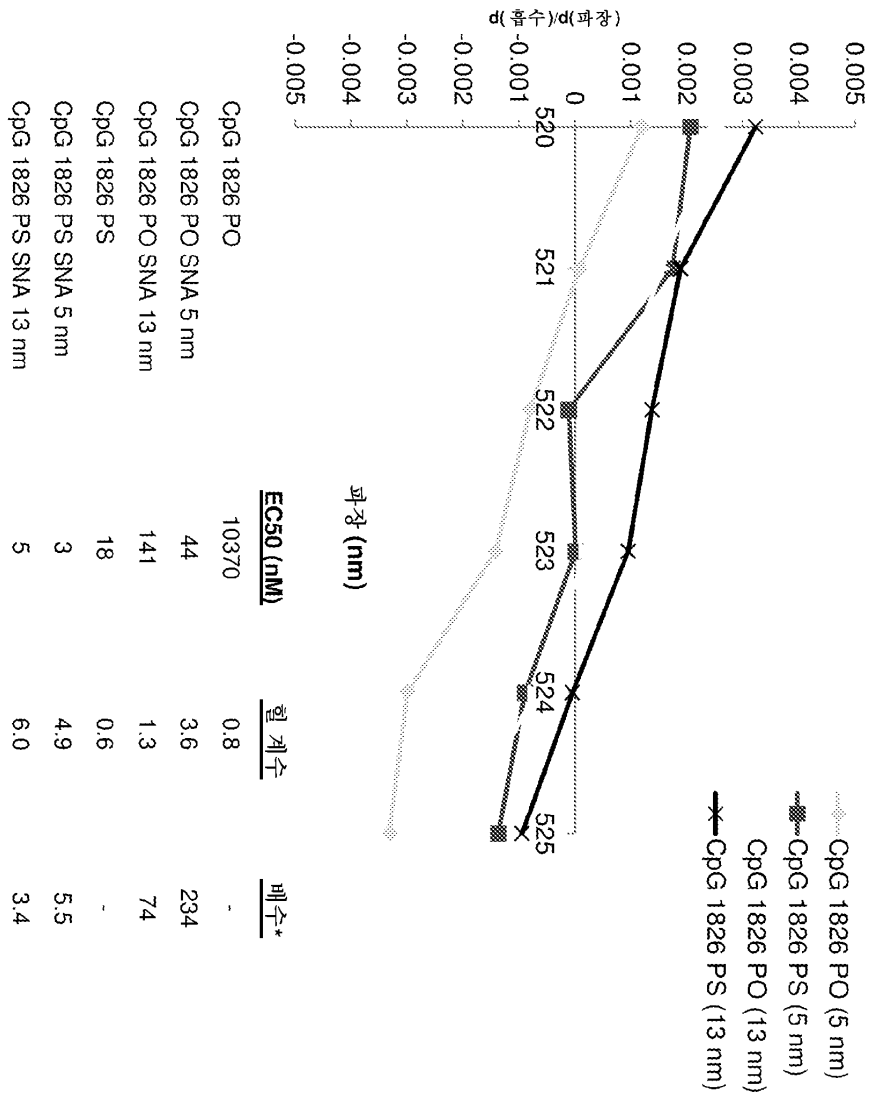
도면6

CpG 1826    TCCATGACGTTCCCTGACGTT    CpG 1668    TCCATGACGTTCCCTGATGCT  
rplV    GCCTTCTGTGTTGATGAGGTC    rplV    GCCTTCTGTGTTGATGAGGTC

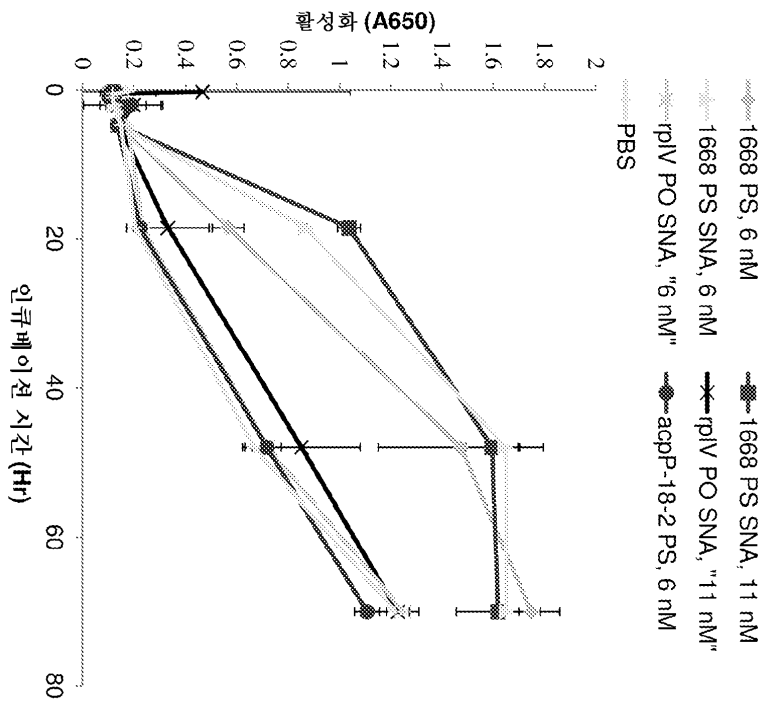
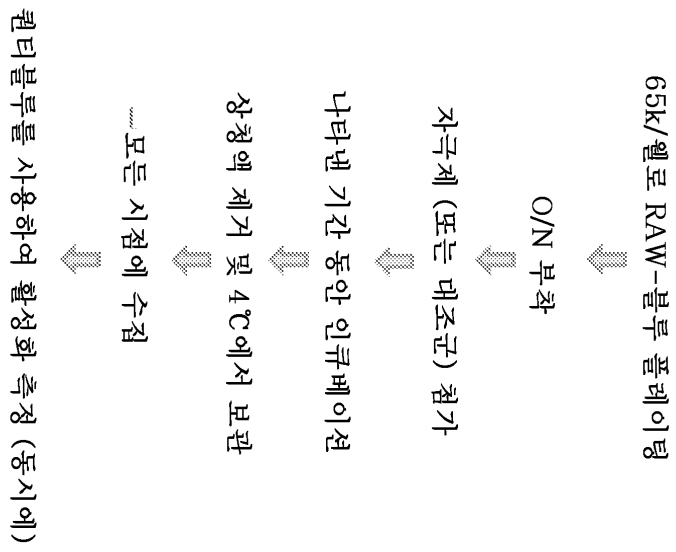
도면7a



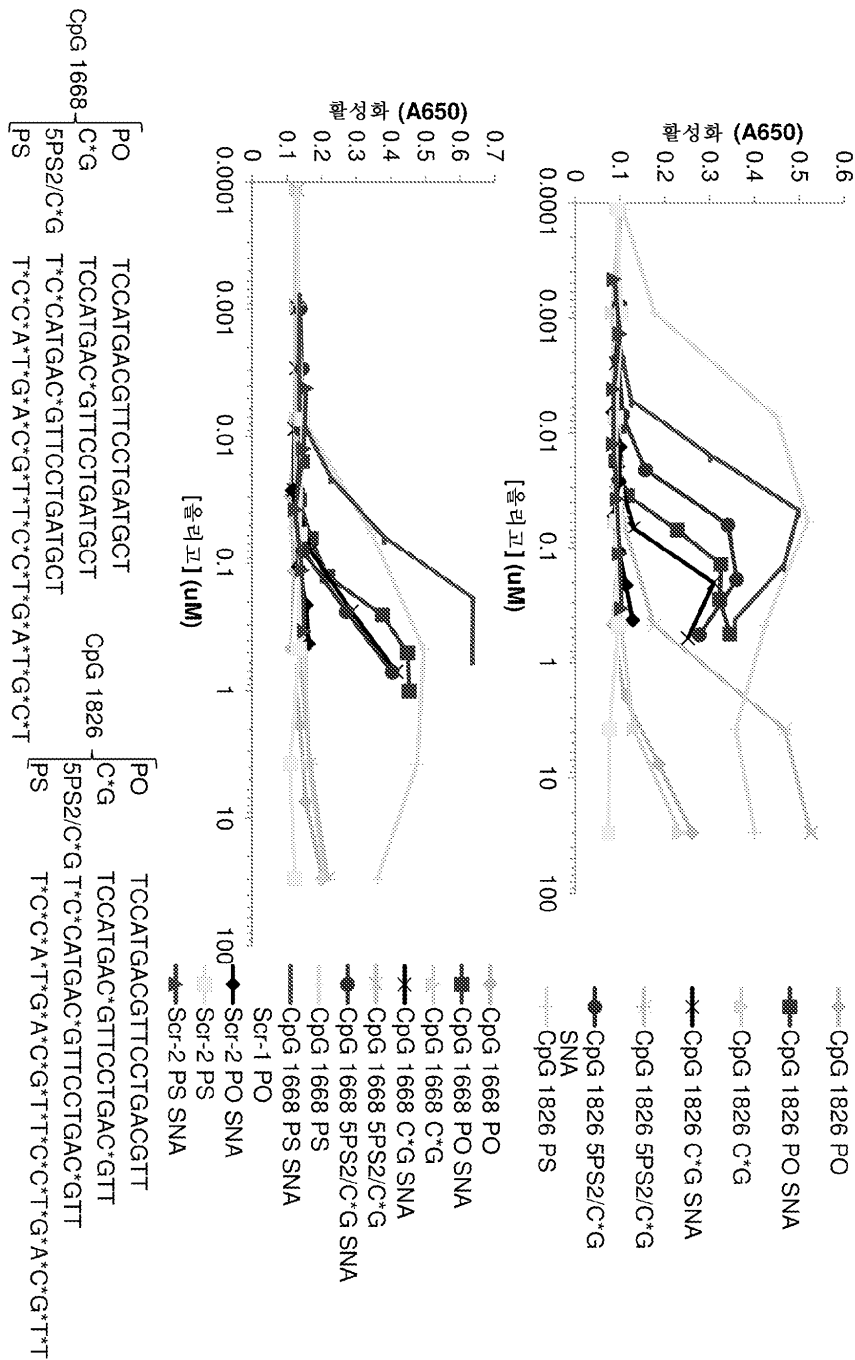
도면7b



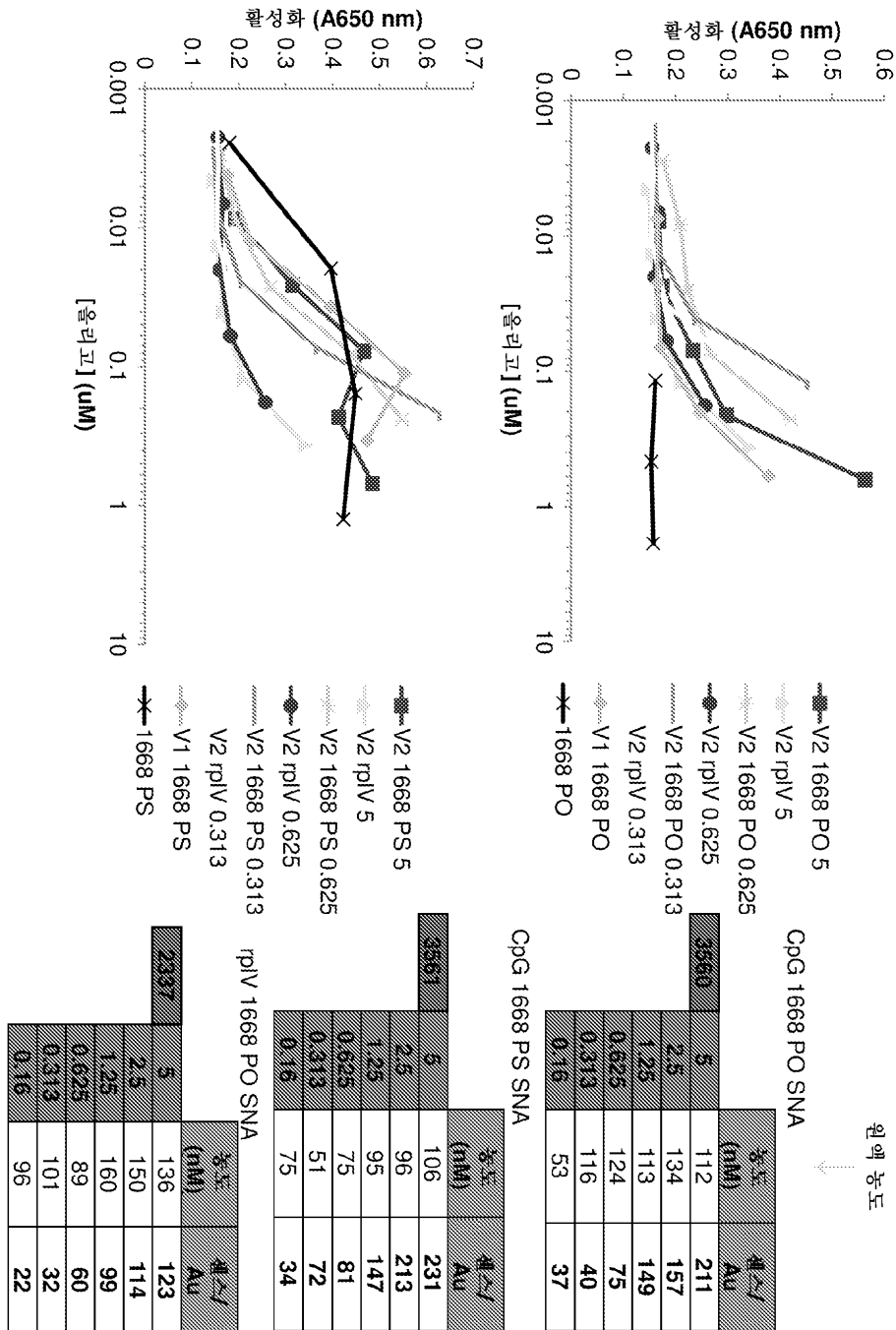
도면8



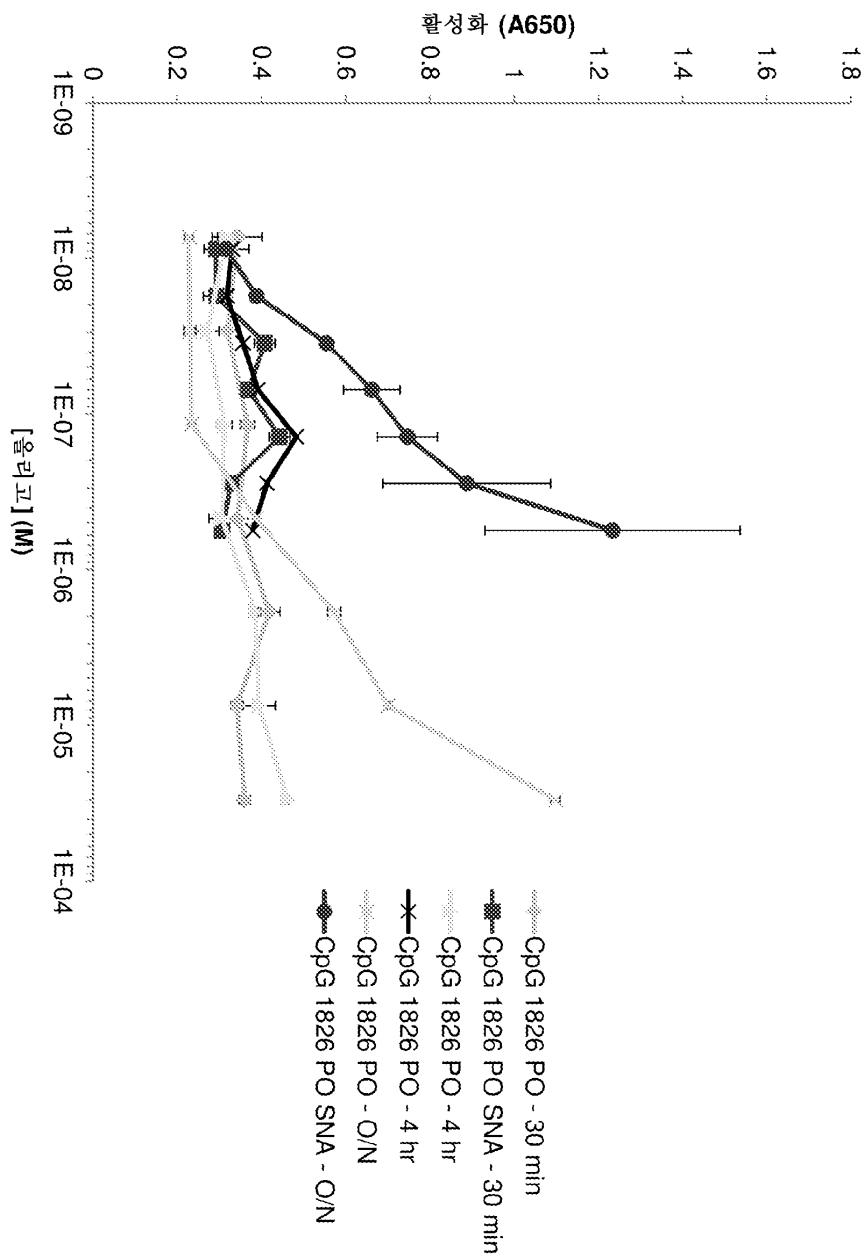
도면9



도면10

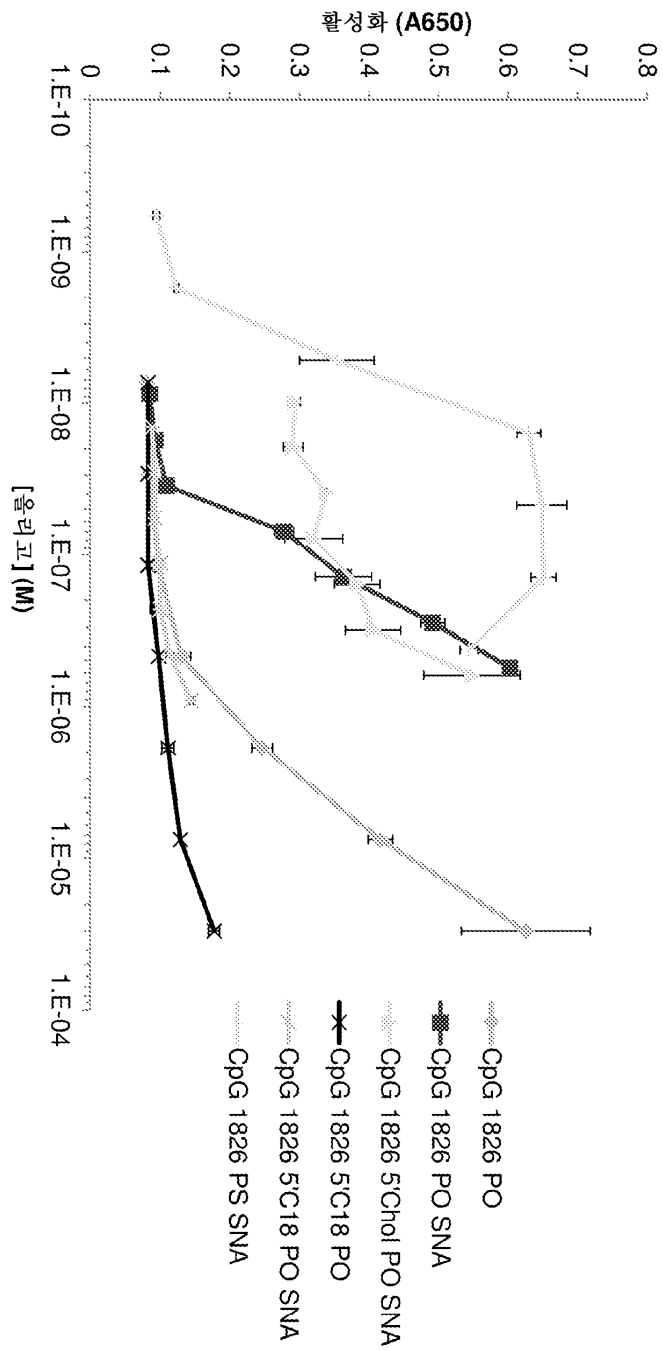


도면11

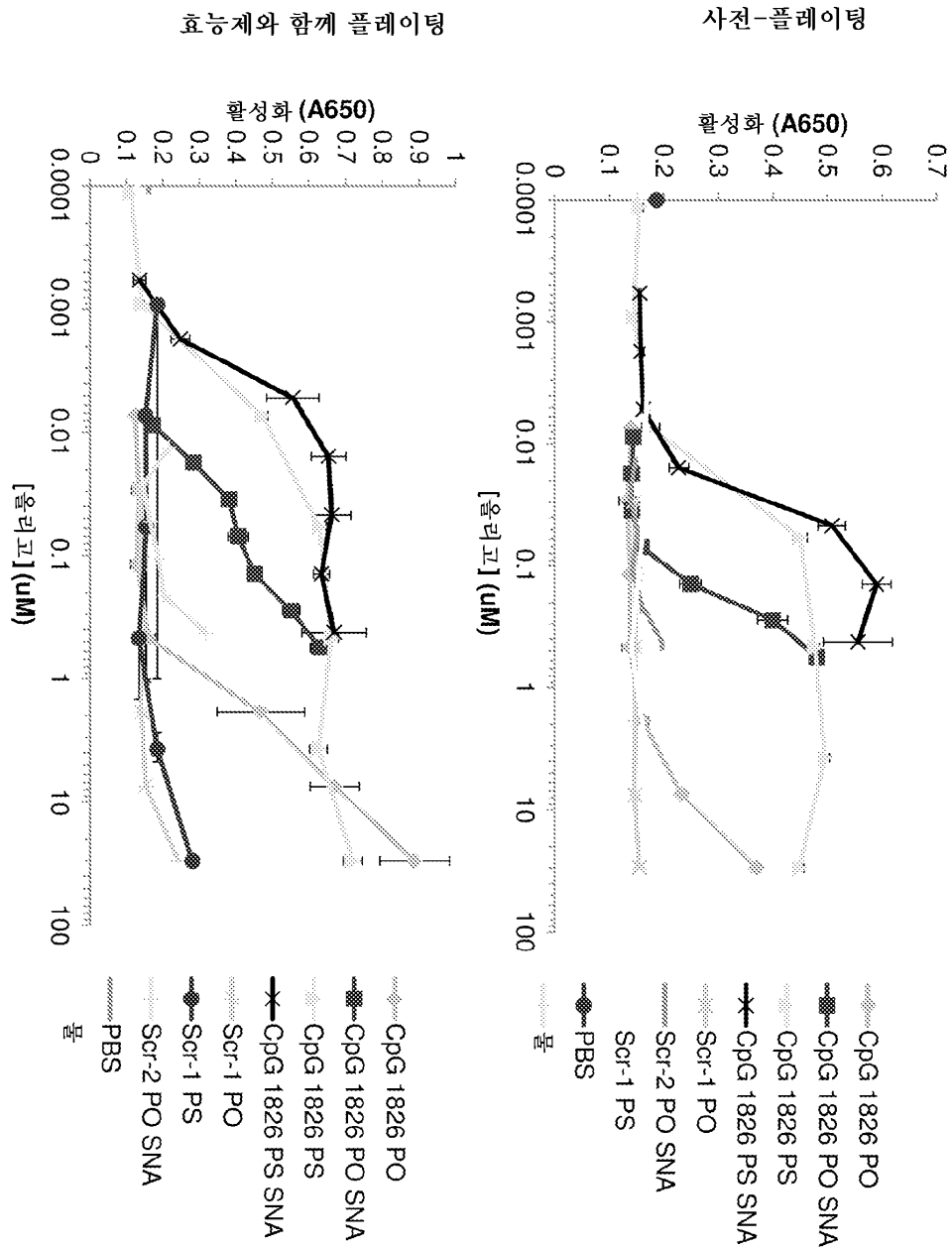




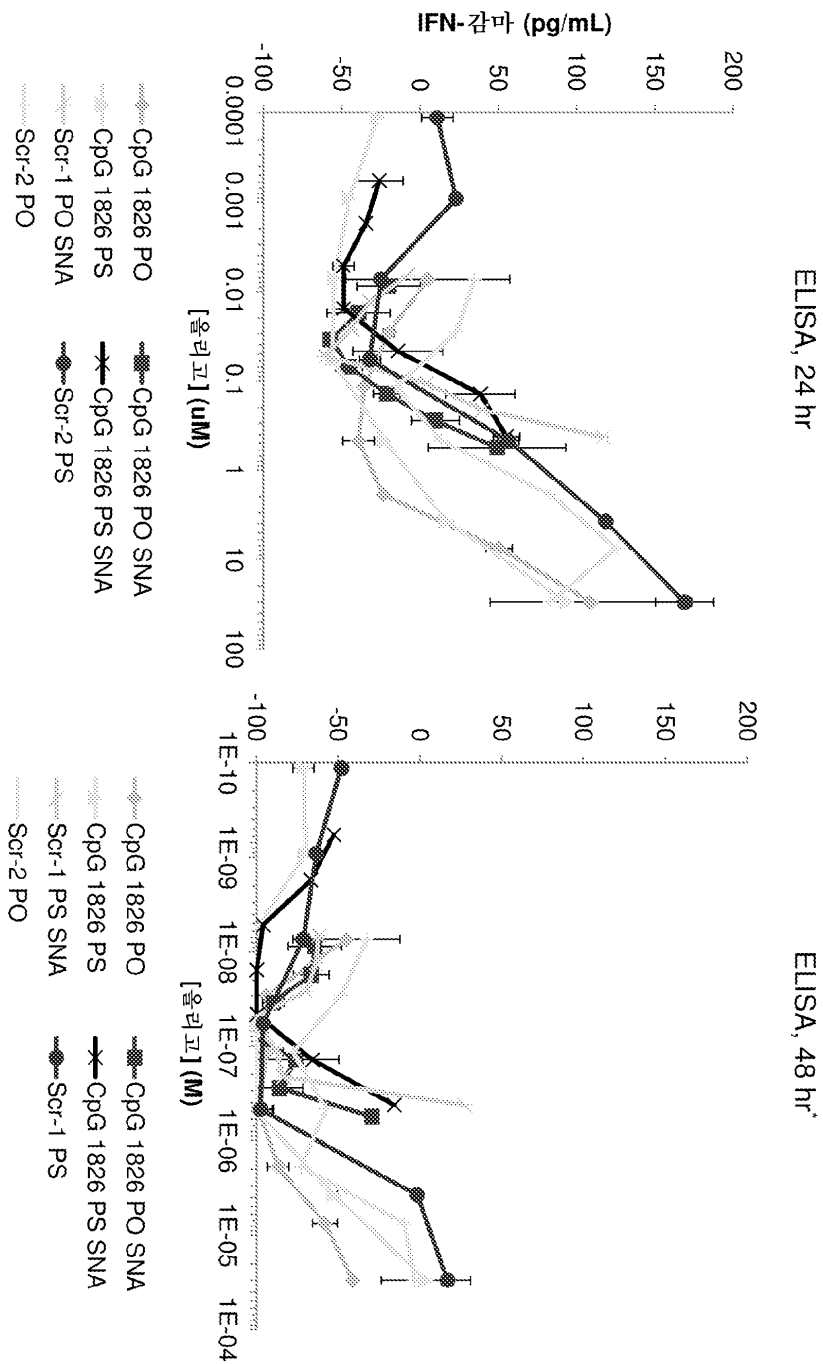
도면12



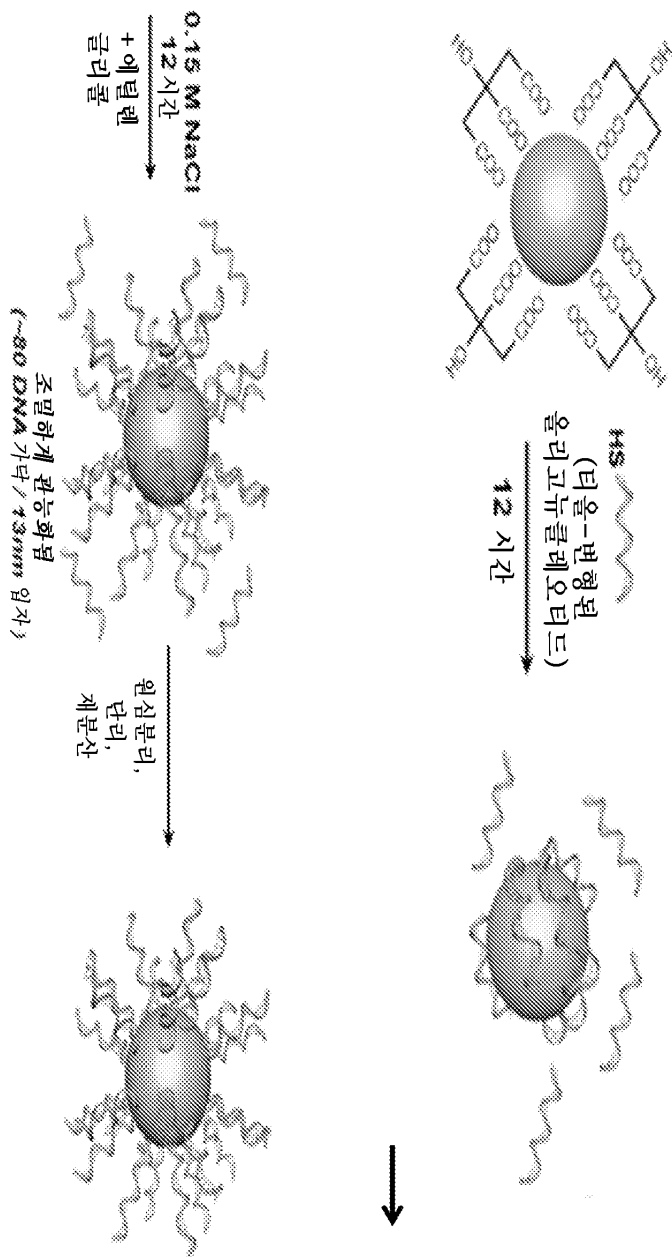
도면13



도면14

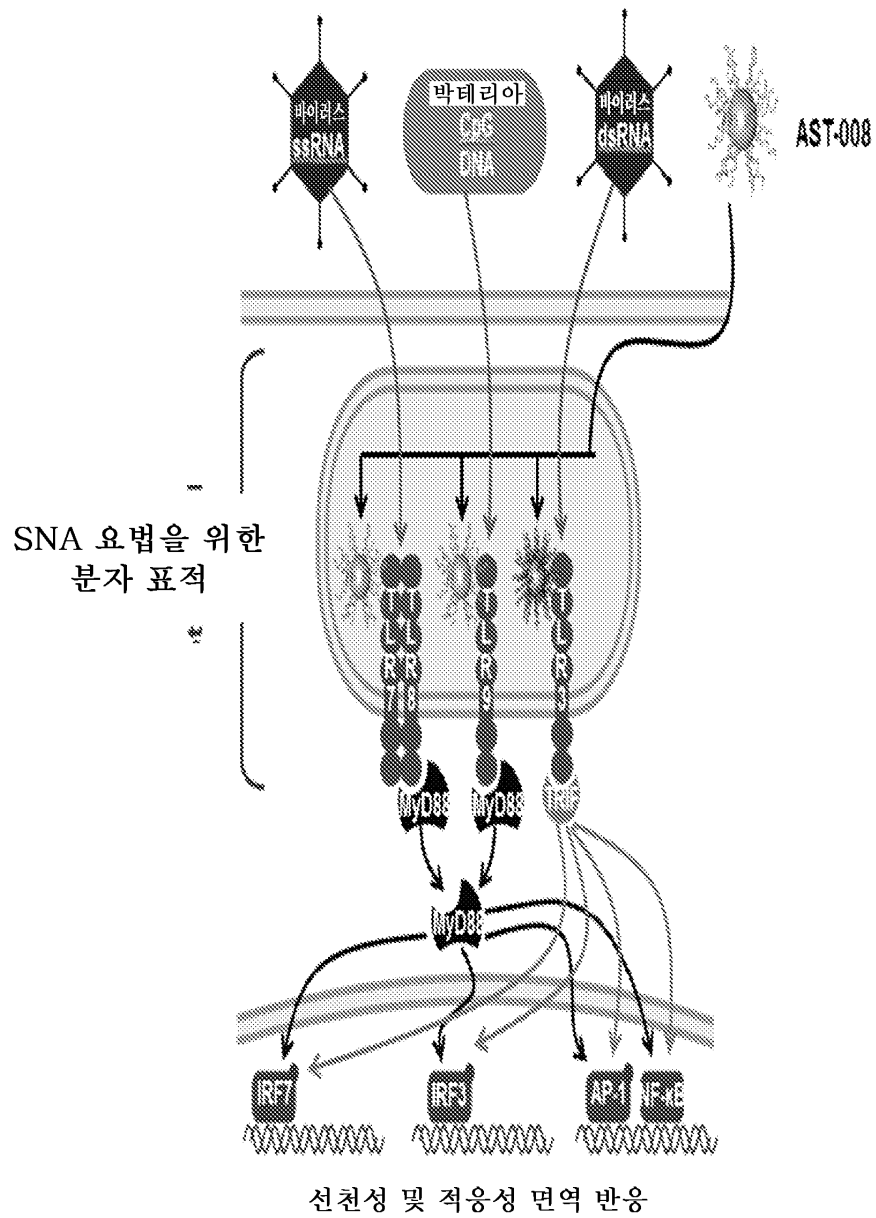


도면15

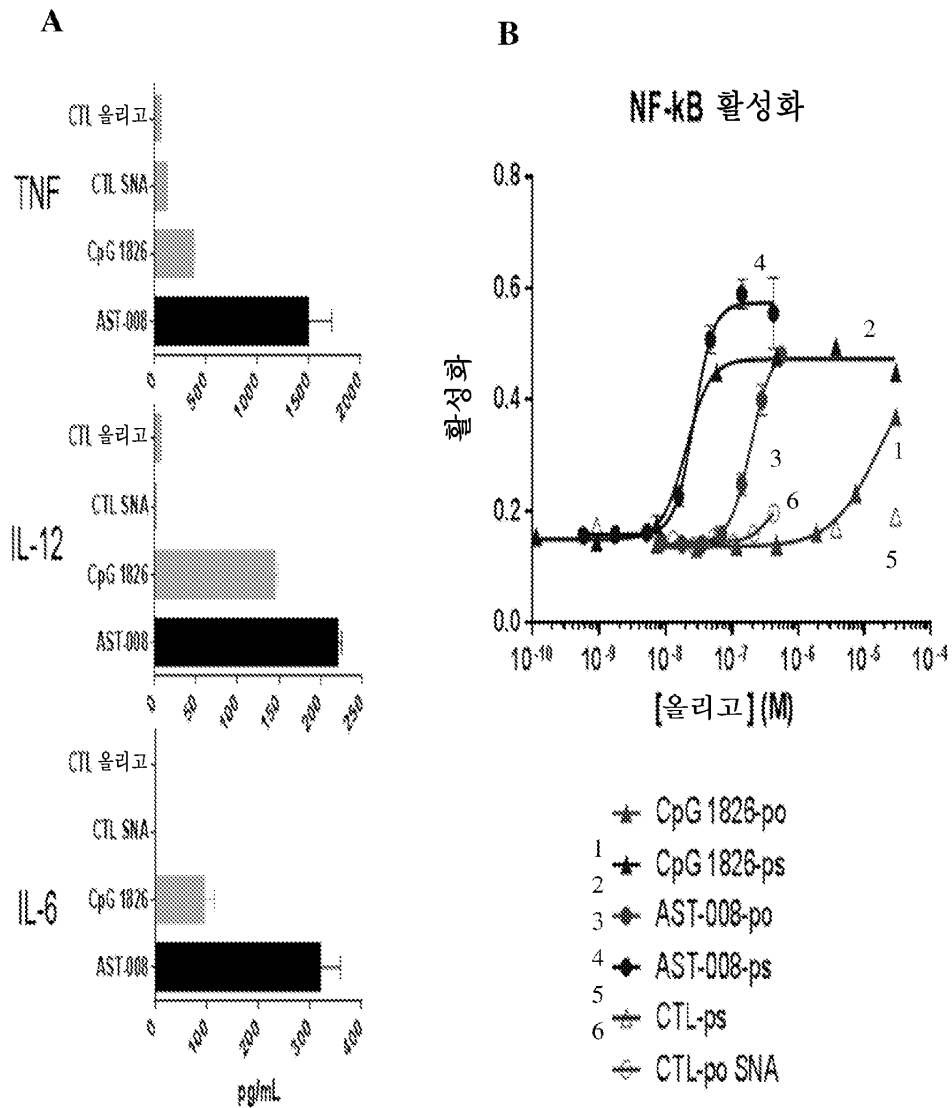


도식 1

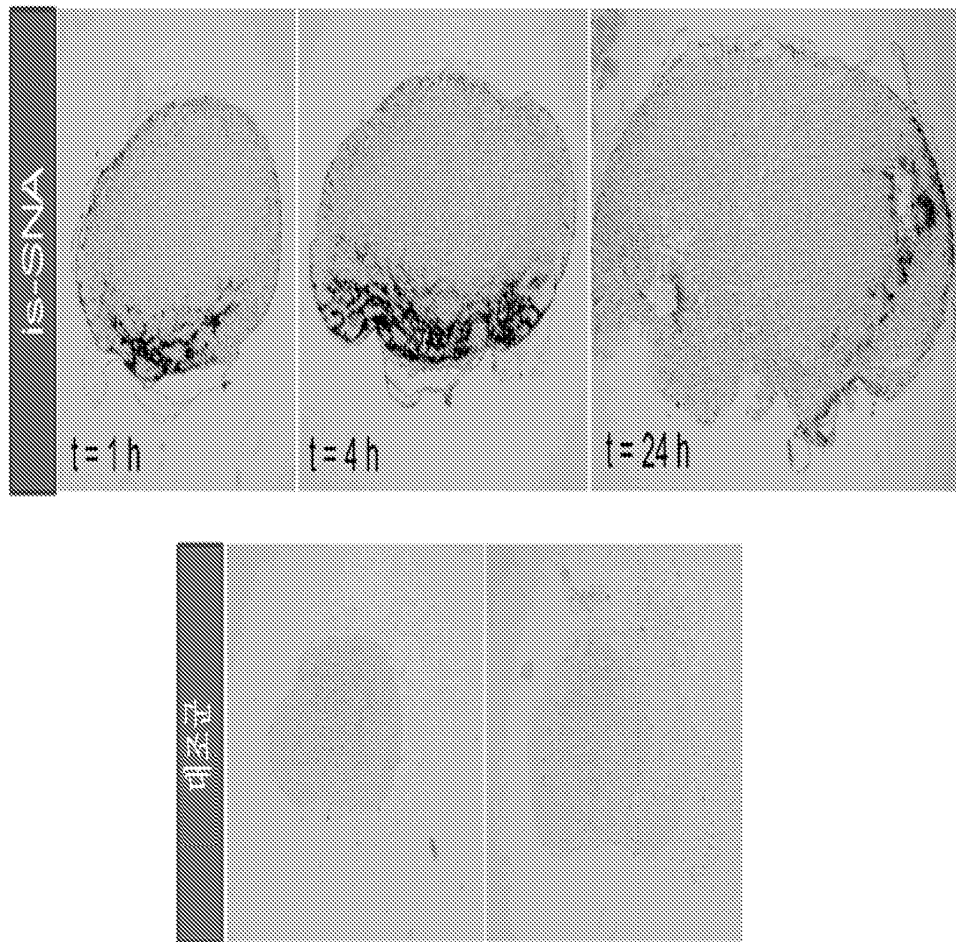
도면16



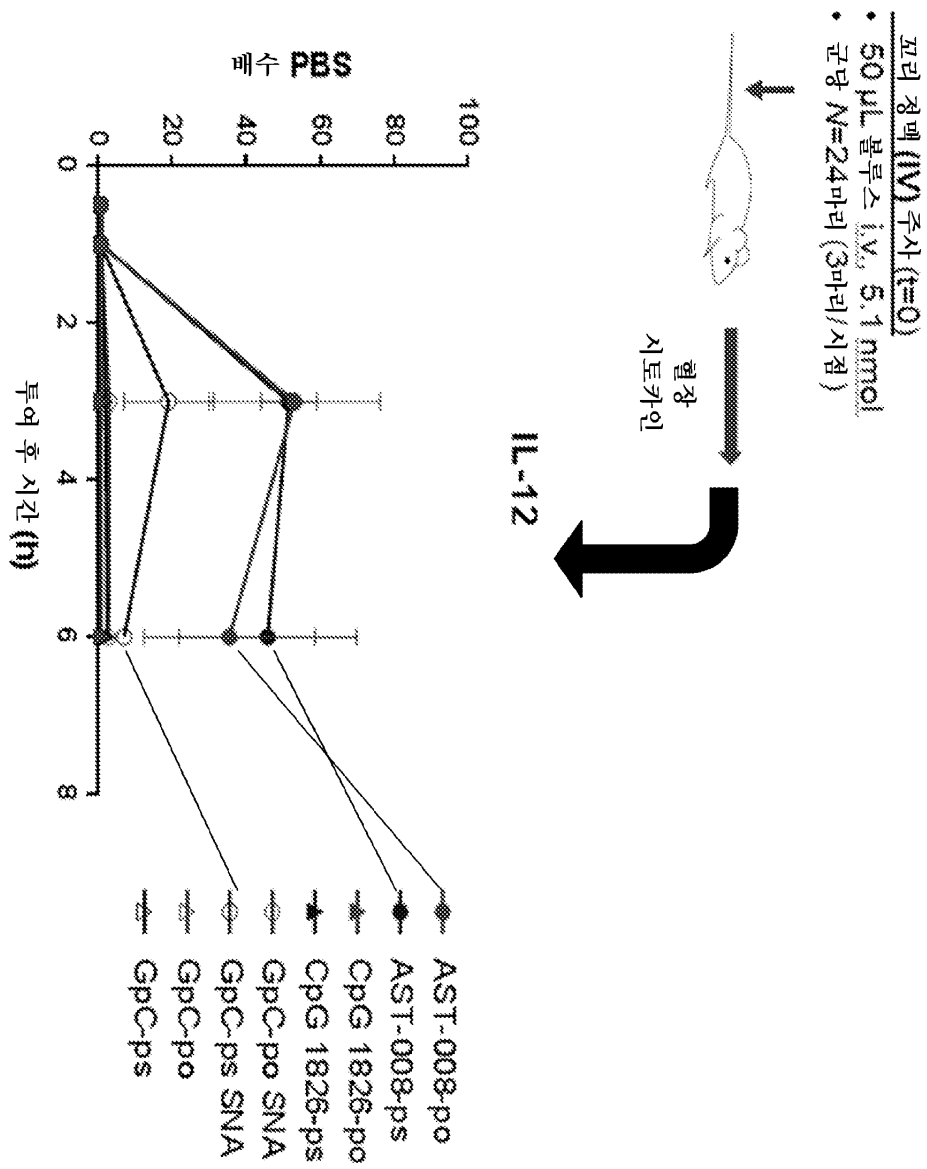
도면17



도면18

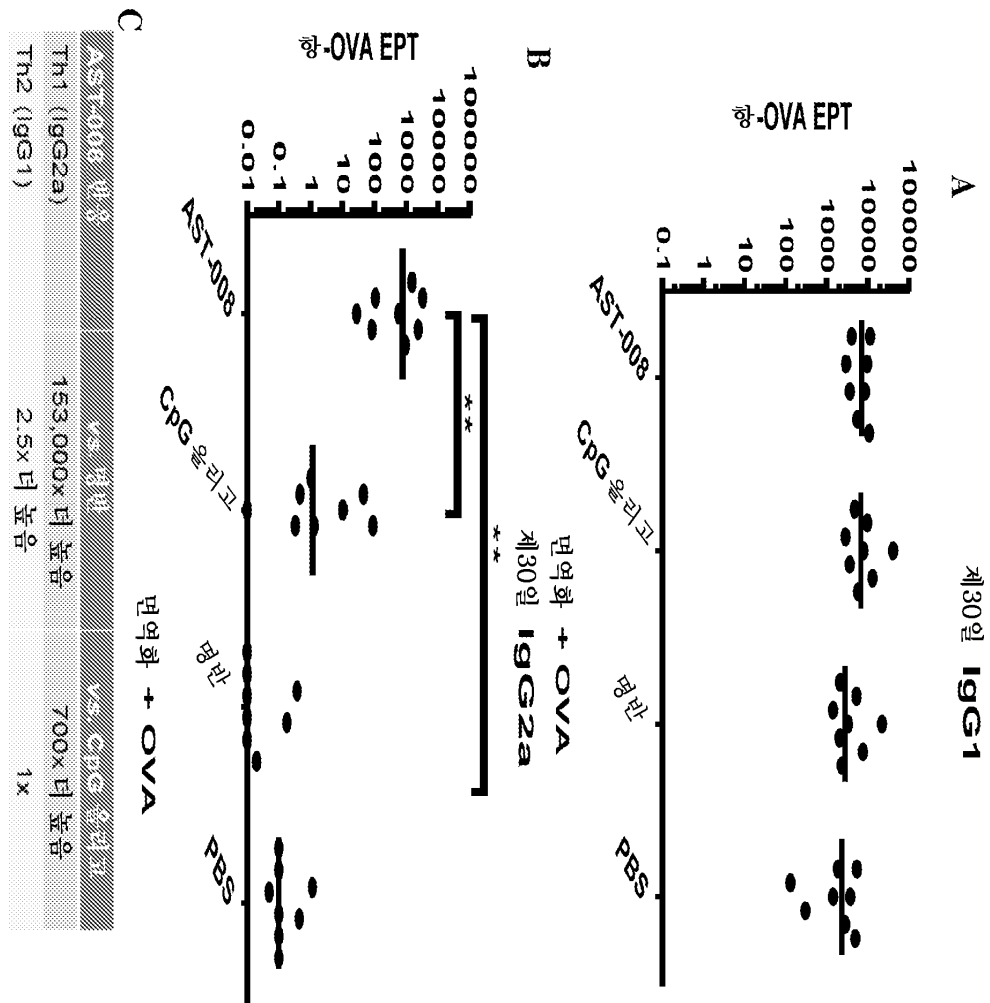


도면19

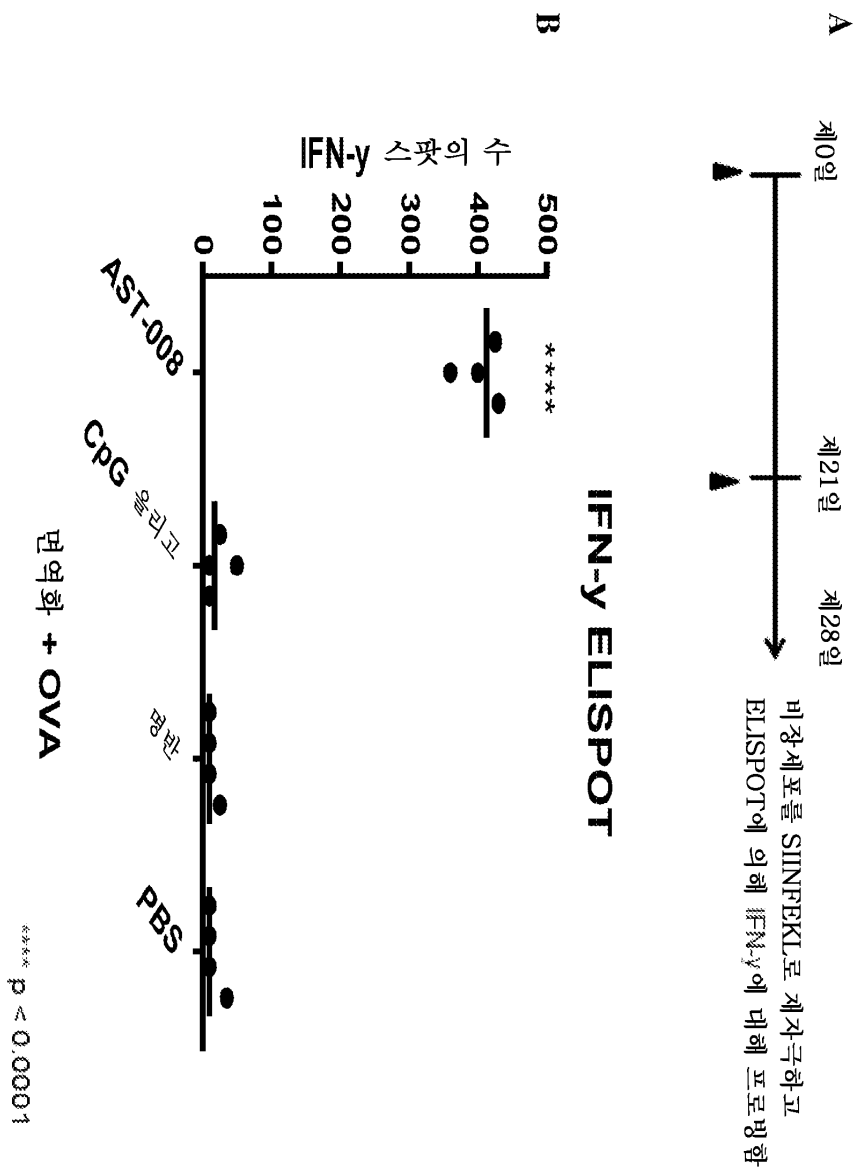




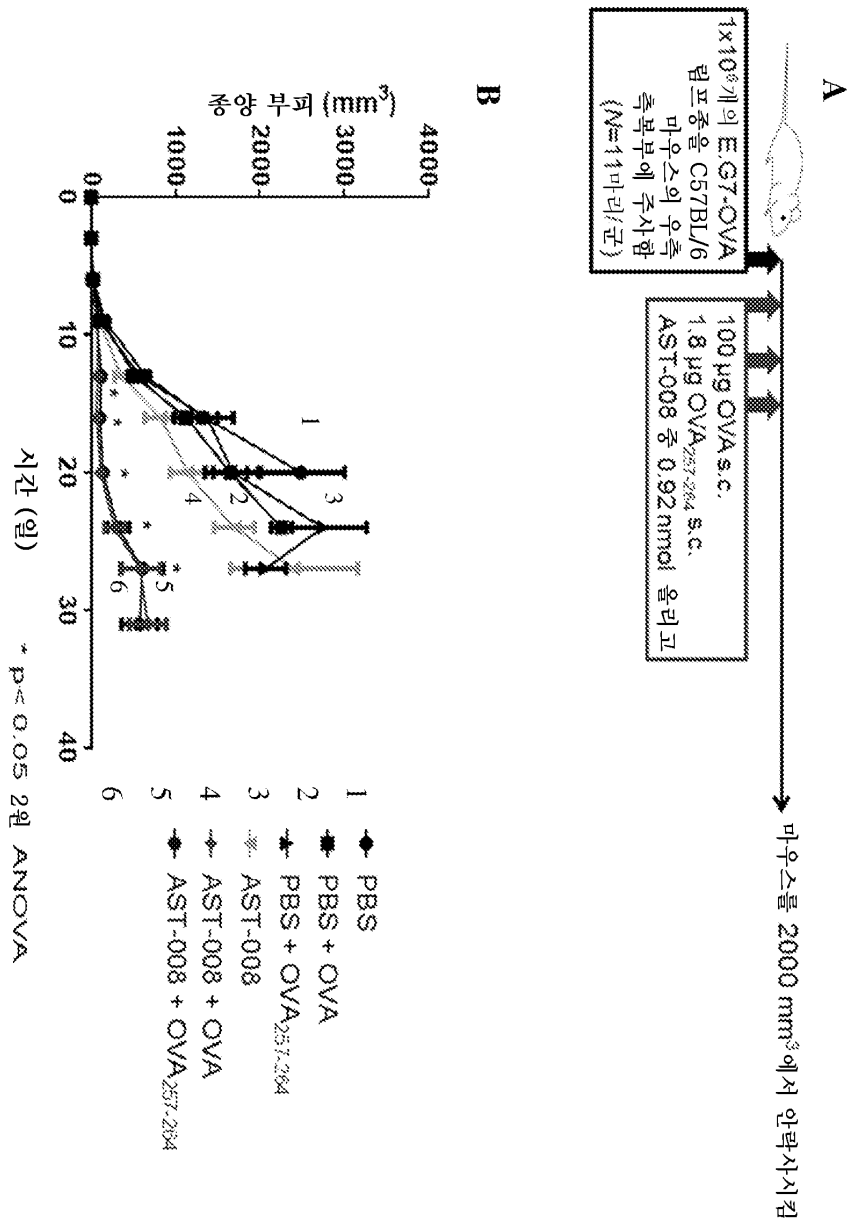
도면20



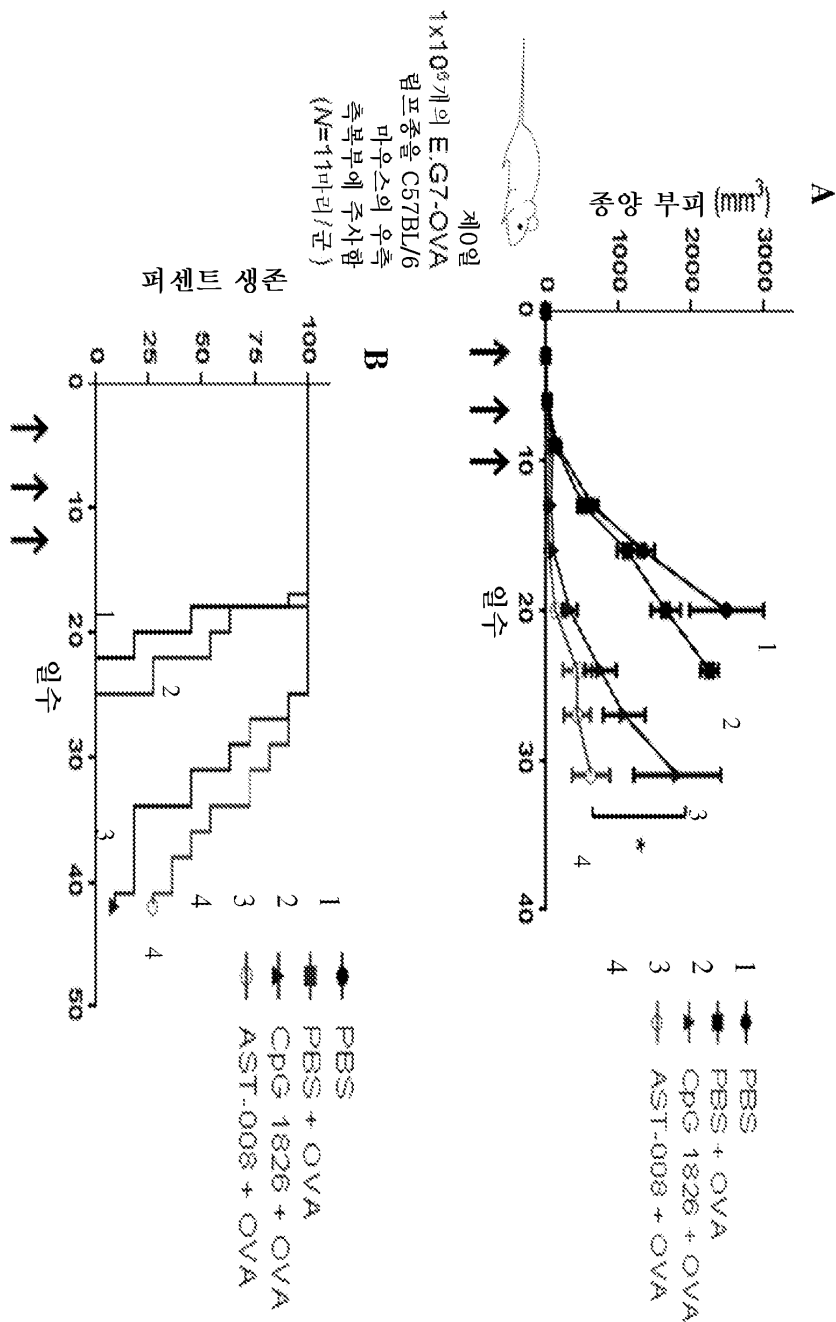
도면21



도면22



도면23



## 서열 목록

### SEQUENCE LISTING

<110> AuraSense, LLC

<120> SPHERICAL NUCLEIC ACID-BASED CONSTRUCTS AS IMMUNOSTIMULATORY  
AGENTS FOR PROPHYLACTIC AND THERAPEUTIC USE

<130> A1005.70002W000

<140> Not Yet Assigned

<141> 2014-07-25  
 <150> US 61/858,558  
 <151> 2013-07-25  
 <160> 49  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 1  
 tccatgacgt tctgacgtt 20  
  
 <210> 2  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 2  
 gctttcttgt tggtaggt c 21  
  
 <210> 3  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 3  
 tccatgacgt tctgatgct 20  
  
 <210> 4  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 4  
 gctttcttgt tggtaggt c 21

<210> 5  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 5  
 tccatgacgt tcctgatgct 20  
 <210> 6  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 6  
 tccatgacgt tcctgatgct 20  
 <210> 7  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 7  
 tccatgacgt tcctgatgct 20  
  
 <210> 8  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 8  
 tccatgacgt tcctgatgct 20  
 <210> 9  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 9



tccatgacgt tcctgacgtt	20
<210> 10	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 10	
tccatgacgt tcctgacgtt	20
<210> 11	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 11	
tccatgacgt tcctgacgtt	20
<210> 12	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 12	
tccatgacgt tcctgacgtt	20
<210> 13	
<211> 18	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 13	
ccgucuguug ugugacuc	18
<210> 14	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 14

gccaccgagc cgaaggcacc

20

<210> 15

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 15

uauauauaua uauauauaua

20

<210> 16

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 16

uuauuuuuau uuauuuuuuu

20

<210> 17

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 17

uuuuuuuuua uuuuuuuuuu

20

<210> 18

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 18

ugugugugug ugugugugug

20

<210> 19

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 19	
uuguuguugu uguuguuguu	20
<210> 20	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 20	
uuuguuuugu uguuguuuug	20
<210> 21	
<211> 24	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 21	
uuuuuuuuuu auuuuuuuau uuau	24
<210> 22	
<211> 24	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 22	
uuguuuuuuu guuuguuuugu uugu	24
<210> 23	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 23	
gcccgucugu ugugugacuc	20
<210> 24	

<211> 18	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 24	
guccuucuaag uccuucuaa	18
<210> 25	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 25	
ggtgcatcga tgcagggggg	20
<210> 26	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 26	
tccatggacg ttctgagcg tt	22
<210> 27	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 27	
tcgtcggttcg aacgacgttg at	22
<210> 28	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 28	

tcgtcgacga tccgcgcgcg cg	22
<210> 29	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 29	
gggggtcaacg ttgagggggg	20
<210> 30	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 30	
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt	24
<210> 31	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 31	
tcgtcgttgt cgttttgtcg tt	22
<210> 32	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 32	
gggggacgat cgtcgggggg	20
<210> 33	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 33

ggggacgacg tcgtggggg g

21

<210> 34

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 34

tcgtcgtttt cggcgcgcgc cg

22

<210> 35

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 35

tcgtcgtcgt tcgaacgacg ttgat

25

<210> 36

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 36

tccatgacgt tcctgatgct

20

<210> 37

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 37

tccatgacgt tcctgacgtt

20

<210> 38

<211> 24



<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 38  
 tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt 24  
 <210> 39  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 39  
 tccatgacgt tcctgatgct 20  
 <210> 40  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 40  
 tccatgacgt tcctgacgtt 20  
  
 <210> 41  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 41  
 tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt 24  
 <210> 42  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 42  
 tccatgacgt tcctgacgtt 20  
 <210> 43

<211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 43  
 tccatgacgt tctgacgtt 20

<210> 44  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 44  
 tccatgacgt tctgatgct 20

<210> 45  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 45  
 tccatgacgt tctgatgct 20

<210> 46  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 46  
 tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt 24

<210> 47  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 47

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt	24
<210> 48	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 48	
gctttcttgt tggtaggt c	21
<210> 49	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 49	
gctttcttgt tggtaggt c	21