



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0096560
(43) 공개일자 2009년09월10일

(51) Int. Cl.
A61K 48/00 (2006.01) C07H 21/00 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-7017958(분할)
(22) 출원일자 2005년01월28일
심사청구일자 2009년08월28일
(62) 원출원 특허 10-2007-7008849
원출원일자 2007년04월18일
심사청구일자 2007년04월18일
(85) 번역문제출일자 2009년08월28일
(86) 국제출원번호 PCT/KR2005/000266
(87) 국제공개번호 WO 2006/080596
국제공개일자 2006년08월03일

(71) 출원인
권형주
충북 청주시 상당구 용암동 2095 현대1차아파트 103-506
김태윤
서울 송파구 잠실7동 아시아선수촌아파트 8동 702호
(72) 발명자
권형주
충북 청주시 상당구 용암동 2095 현대1차아파트 103-506
김태윤
서울 송파구 잠실7동 아시아선수촌아파트 8동 702호
김두식
서울특별시 서대문구 연희동 84-3
(74) 대리인
남호현, 김슬기

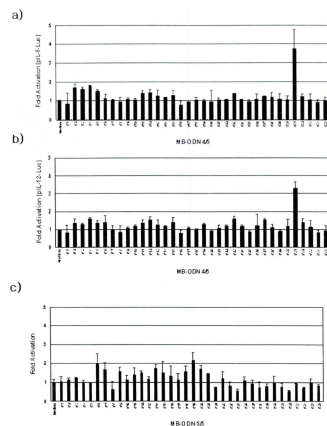
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 마이크로박테리아 유래 면역기능 증진, 면역질환 치료, 아토피성 피부질환 및/또는 면역세포 생존용 올리고뉴클레오타이드

(57) 요약

면역반응 조절용 올리고뉴클레오타이드가 개시된다. 이 올리고뉴클레오타이드는 면역기능 증진제, 다양한 면역질환 치료 및 아토피성 피부질환 치료 또는 정상의 면역세포를 생존시키는데 사용할 수 있는 효과가 있다.

대표도 - 도4



특허청구의 범위

청구항 1

다음 서열: 5'-AGCAGCGTTCGTGTGCGCCT-3' (서열번호 4), 5'-GTATTCGTTCGTGTGCGCCT-3' (서열번호 7) 또는 5'-TGACTCGTTCGTGTGCGCATG-3' (서열번호 8)로 표시되는 면역반응 증강제(adjuvant) 또는 면역질환 치료용 올리고데옥시뉴클레오타이드.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기의 올리고데옥시뉴클레오타이드는 방사선 치료시 정상 면역세포를 생존 시키는 것을 특징으로 하는 올리고데옥시뉴클레오타이드.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기의 올리고데옥시뉴클레오타이드는 피부질환을 치료 또는 예방하는 것을 특징으로 하는 올리고데옥시뉴클레오타이드.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기의 올리고데옥시뉴클레오타이드는 다양한 Th1/Th2 면역반응의 균형을 유지하는 것을 특징으로 하는 올리고데옥시뉴클레오타이드.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기의 올리고데옥시뉴클레오타이드는 상기의 뉴클레오타이드 간의 결합이 포스포다이에스터 결합 또는 포스포로싸이오에이트 결합인 것을 특징으로 하는 올리고데옥시뉴클레오타이드.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

<1> 본 발명은 면역반응 증진용 및 면역반응의 균형 유지에 사용할 수 있고, 치료학적 용도에 관한 것으로 아토피성 피부질환 (Atopic dermatitis) 등 다양한 면역질환에 효과가 있는, *Mycobacterium* 유래 면역반응 조절용 올리고뉴클레오타이드에 대한 발명으로, 더욱 상세하게는 면역반응 증강에 관여하는 세 개의 CpG 모티프(motif)를 갖는 올리고뉴클레오타이드, 염기서열 변형에 따른 효과 및 phosphodiester 형태의 oligo에 의한 면역증강(adjuvant), Th1/Th2 면역반응 균형유지를 통한 다양한 면역질환 치료 및 아토피성 피부질환 (Atopic dermatitis)에 사용할 수 있는 효과 및 방사선 조사에 대한 세포의 생존을 증가시키는 효과에 대한 발명이다.

배경기술

<2> 선천성 면역체계를 통해 시작되는 면역 시스템은 균형을 이루며 정교하게 조절되어야 한다. 즉, immunity 와 tolerance, T helper type 1 (Th1) 과 T helper type 2 (Th2) 면역성의 균형, inflammation 과 unresponsiveness 등의 정교한 조절이 필수적이다. 그러나, 불행하게도 지금까지 개발된 많은 면역질환 치료제들은 면역체계의 조절이 제대로 이루어지지 않아 자가면역질환, 알러지성 질환, 만성염증 등의 문제점을 나타내게 되었다. 그러나 선천성 면역체계는 병원균 침입시 외부물질의 구조적인 차이점(Pathogen-Associated Molecular Pattern, PAMP)을 면역세포가 인식하여 활성화되고 신호가 전달되어 병원체의 침입에 저항할 수 있는 기작을 가지고 있다. 따라서 선천성 면역체계를 이용한 Good & Evil 메커니즘을 정확하게 이해하여 Evil 메커니즘을 최소화하는 면역질환 치료제의 개발전략이 요구되고 있다.

<3> 1890년대 William B. Coley는 병원성 미생물의 감염이 암환자의 항암효과를 유도할 수 있다는 특이한 현상을 관찰하였고, 이를 응용한 bacterial therapy 를 약 900명의 암환자에 적용하여 약 40% 의 효능을 확인할 수 있었다. 1980년대 일본의 연구자들은 새로운 시각에서 Coley's toxin의 유용성을 인식하고 Bacillus Calmette-Guerin (BCG) 의 활성화 분획을 통한 항암 효과를 입증하였고, BCG의 항암 활성화는 그 DNA 의 특성에서 유래한 것이라는 결론을 도출하였다. 1995년 Kreig 등의 연구자들은 B 세포 유전자 억제를 위한 antisense

oligonucleotide 를 연구하는 과정에서 메틸화되지 않은 cytosine과 guanine으로 구성된 특정 염기 서열의 합성 oligodeoxynucleotide(ODN) 들이 면역세포의 활성화를 유도한다는 사실을 입증하였다. Kreig의 관점에서 기존의 일본 연구자들에 의한 BCG의 항암 효과는 methylation 되지 않은 BCG DNA 의 특성에서 기인한 것이며, 이러한 박테리아 DNA 에 의한 면역활성화는 척추동물의 면역 시스템이 자기(self)의 DNA 와 비자기(non-self)의 DNA 를 구분할 수 있다는 새로운 패러다임을 제시하였다.

- <4> 박테리아의 면역활성화 및 조절에 관한 초기 연구들은 항체 생성을 유발하는 Coley's toxin 과 같은 단백질 항원에 집중되었다. 그러나 여러 발표를 통해 미생물 구성물질 중 보다 강력한 면역활성화 유도체가 존재한다는 사실이 보고 되었고, 박테리아의 DNA는 강력한 면역활성화 뿐만 아니라 각각의 항원에 따른 특정 면역 반응성으로 치우치게 할 수 있다는 사실이 입증되었다 (6, 7). 면역활성화 및 조절에 기인하는 핵심은 cytosine과 guanine 2개의 핵산 염기서열로 구성된 CpG dinucleotide 로서 최근 연구를 통해 박테리아 DNA도 척추동물에 의해 자기의 DNA 와 구별되어 면역세포를 활성화시키는데 역할을 하는 것으로 알려졌다. 이와 같은 CpG 모티프들(CpG motifs)은 박테리아에서 매우 흔하나, 포유동물에서는 그렇지 않다. CpG 모티프를 포함하는 올리고데옥시뉴클레오티드(CpG-oligodeoxynucleotide, CpG-ODN)는 선천적(innate) 면역 반응에서 획득된 면역 반응(acquired immune responses)에 이르는 숙주의 방어 기작을 활성화시킨다(Akdis, CA. *Curr Opin Immunol.*, 12:641-646, 2000).
- <5> 최근에는 CpG ODN 의 유용성을 높이기 위하여 골격(backbone)을 변형시킨 CpG ODN이 개발되었다. DNA 의 기본 골격인 포스포디에스터(phosphodiester) 골격의 CpG ODN 은 뉴클레아제에 대하여 민감한 편이어서 체내에서 빠르게 분해된다. 따라서 생체 내에서 독성을 유발할 위험이 적다. 그러나, 다른 골격의 CpG ODN에 비해 그 활성이 낮은 것으로 알려져 있다 (Kwon, HJ. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 311:129-138, 2003). 이에 반해, 포스포로티오에이트 골격(phosphorothioate backbone)의 CpG ODN 은 체내에서 뉴클레아제에 의해 분해되지 않도록 구조를 변경하여 인위적으로 만들어진 것이다. 포스포로티오에이트 골격의 CpG ODN은 포스포디에스터 골격의 CpG ODN 에 비해 체내에서 안정하고 B 세포를 유도하는 능력이 더욱 뛰어나다. 따라서 현재 포스포로티오에이트 골격으로 변형시킨 CpG ODN 이 가장 널리 사용되고 있다. 그러나, 이러한 포스포로티오에이트 골격의 CpG ODN은 수 많은 단백질에 비특이적인 ODN의 결합을 증가시키며, 체 내에서 쉽게 분해되지 않기 때문에 독성을 유발한다. 또한 포스포로티오에이트 골격의 CpG ODN가 관절염(arthritis)의 유발 및 증상을 악화시키고(Deng GM *et al.*, *Arthritis & Rheumatism*, 43(2):356-364, 2000), SLE(systemic lupus erythematosus)와 같은 자가면역 질환을 일으킬 수 있다고 보고된 바 있다(Tanaka, T. *et al.*, *J Exp. Med.* 175:597-607, 1992).
- <6> 금세기 이래 여러 가지 물질들을 면역보조제(adjuvant)로 백신에 첨가하였으며 이러한 제제들은 백신의 효과를 보다 극대화하기 위한 방향으로 고안되어져 왔다. 그러나 현재 사람의 면역보조제 뿐만 아니라 가축의 백신에 서조차 Aluminium salt (alum, Al₂O₃) 만이 투여가 공인된 유일한 면역보조제이다. 최근 연구에서 재조합 hepatitis surface antigen을 알룸과 CpG-ODN을 혼합하여 마우스에 주사하였을 때, 알룸만을 면역보조제로 사용했을 때 보다 훨씬 높은 백신효과를 볼 수 있었다(Davis H L. *et al.*, *J. Immunol.* 160: 870-876, 1998). 알룸은 Th2 면역반응을 유도하여 세포매개면역성 (Cell mediated immunity) 이 약하게 유도된다. 반면에 CpG ODN은 Th1 사이토카인들의 발현을 유도하여 체액성 및 세포매개면역반응을 강하게 유도함을 보여주었다. 그러나 이때 사용한 CpG-ODN은 phosphorothioate 형태의 골격을 이용하여 부작용이 유발될 가능성 존재한다.
- <7> 한편 피부질환은 사람을 포함하는 동물의 피부에서 나타나는 모든 이상소견을 말한다. 그 중에서도 아토피 피부염은 만성/염증성 피부질환으로서 심한 소양증, 건조한 피부 및 습진성 피부병변이 특징적인 주 증상이다(Rudikoff, D. *et al.*, *Lancet.* 351:1715-1721, 1998). 아토피 피부염은 일반적으로 유전적 경향이 있으며 개개인에 따라 알레르기 천식, 알레르기 비염, 알레르기 결막염 및 담마진(urticaria)을 동반하기도 한다. 아토피 피부염 환자에서 보고된 일련의 면역학적 이상 소견으로는 IgE 생성의 증가, CD8+ 억제/세포독성 T 림프구(suppressor/cytotoxic T lymphocytes) 수적 감소 및 기능 저하, IFN-gamma를 분비하는 Th1(T-cell Helper type 1) 림프구의 수적 감소 등이 있다. 또한 아토피 피부염은 조직학적으로 CD4+ 표현형을 갖는 T 림프구, 단핵구/대식 세포의 침윤, 비만 세포 및 호산구가 피부 병변에 증가되어 있으며, 수지상 세포(dendritic cell; DC)와 표피의 랑게르한스 세포도 아토피 피부염의 피부 병변에서 증가되어 있다(Imokawa, G., *et al.*, *J. Invest. Dermatol.*, 96:523-526, 1991).

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <8> 많은 연구자들은 X-ray를 이용하여 암세포를 사멸시켜 암을 치료하는 방법들을 개선 시켜왔다. 그러나 방사선에 의한 항암 치료시 암 조직에 주위에 있는 면역세포들에도 조사되므로 필연적으로 면역세포에 손상을 미쳐 면역기능의 저하를 초래하게 된다. 방사선 조사에 의해 B 세포(Ashwell JD *et al.*, *J. Immunol.* 136:3649-3656, 1986), T 세포 (Prosser JS *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* 30:459-465, 1976), 대식세포 (Yoshihisa K *et al.*, *J. Radiat Res.* 45:205-211, 2004)등의 면역세포들이 사멸한다는(apoptosis) 보고들이 있다. 따라서 암등의 질환을 치료하기 위한 방사선 치료법에서 암세포 이외의 정상적인 면역세포를 생존시켜 면역반응이 정상을 유지 시키는 방법이 필요하다.
- <9> 본 발명은 면역반응 증진용 (adjuvant) 및 면역반응의 균형 유지를 통한 다양한 면역질환 치료에 사용할 수 있고 또한 아토피성 피부질환(Atopic dermatitis)에 효과가 있고 방사선 조사에 대한 세포의 생존을 증가시키는 효과가 있는, *Mycobacterium bovis* BCG 유래 면역반응 조절용 올리고뉴클레오타이드에 대한 발명이다.

과제 해결수단

- <10> 따라서, 본 발명은 하기의 일반식으로 표시되고 적어도 2개 이상의 비메틸화된 CpG 모티프를 가지는 염기서열로 이루어진 *Mycobacterium bovis* BCG에서 분리된 CpG 올리고데옥시뉴클레오타이드를 면역반응증강제(면역보조제), 다양한 면역질환 치료를 위한 Th1/Th2 면역반응의 균형유지, 암등의 난치성 질환 방사선 치료시 정상 면역세포를 생존 시키는데 사용할 수 있는 효과, 피부질환의 치료 또는 예방 방법을 제공한다.
- <11> [일반식]: HKCGTTCRTGTCSGM(서열번호 1)
- <12> 여기에서, R은 A 또는 G이고 S는 C 또는 G이고, H는 A, T 또는 C이고, K는 G 또는 T이고, M은 C 또는 A이다.
- <13> 본 발명에서 상기 올리고뉴클레오타이드는 하기의 일반식으로 표시된 5개의 뉴클레오타이드를 5'쪽과 3'쪽에 더욱 포함하는 것이 바람직하다.
- <14> [일반식]: DKMHKCGTTCRTGTCSGMYK(서열번호 2)
- <15> 여기에서, R은 A 또는 G이고 S는 C 또는 G이고, H는 A, T 또는 C이고, K는 G 또는 T이고, D는 A, G 또는 T이고, M은 C 또는 A이고, Y는 C 또는 T이다.
- <16> 본 발명에서, 'CpG 모티프(motif)'라 함은 포스포디에스터 결합(phosphate bond)으로 연결된 비메틸화된 시토신-구아닌 디뉴클레오타이드(unmethylated cytosine-guanine dinucleotide)('unmethylated cytosine-phosphate-guanine dinucleotide'라고도 함)를 함유하며 면역반응을 활성화시키는 염기서열을 말한다. 또한 'CpG 올리고데옥시뉴클레오타이드(oligodeoxynucleotide, 이하 'CpG ODN'이라 함)'은 상기 CpG 모티프를 적어도 2개 이상 포함하는 올리고데옥시뉴클레오타이드를 말한다.
- <17> 또한 본 발명에 있어서, '개체(subject)'란 포유동물, 특히 인간을 포함하는 동물을 의미한다. 상기 개체는 치료가 필요한 환자(patient)일 수 있다.
- <18> 본 발명에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 5'-AGCAGCGTTCGTGTCGGCCT-3' (서열번호 3), 5'-AGCAGCGTTCGTGTCGGCCT-3' (서열번호 4), 5'-AGCAGCGTTCATGTCGGCCT-3' (서열번호 5), 5'-AGCAGCGTTCGTGTCGGCCT-3' (서열번호 6), 5'-GTATTCGTTCGTGTCGCCT-3' (서열번호 7), 5'-TGACTCGTTCGTGTCGCATG-3'(서열번호 8) 인 것이 가장 바람직하다.
- <19> 본 발명의 MB-ODN은 천연 공급원(예: *M. bovis* BCG 의 염색체 DNA)으로부터 유래될 수도 있으며, 화학적으로 합성되거나 재조합적으로 제조될 수 있다. 본 발명의 MB-ODN은 당업계에서 공지된 다양한 핵산 합성기술 및 기계를 이용하여 합성될 수 있다(Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Chs 2. and 4(Wiley Interscience, 1989; Maniatis, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*(Cold Spring Harbor Lab., New York, 1982); 및 미국 특허 제4,458,066호).
- <20> 본 발명의 MB-ODN은 포스포디에스터 골격을 갖는 것이 바람직하다. DNA의 기본 골격인 포스포디에스터 골격은 생체 내 뉴클레아제에 의해 쉽게 분해되기 때문에 독성을 유발할 위험이 적다. 본 발명의 MB-ODN은 포스포디에스터 골격이라 할지라도 종래 다른 CpG ODN과는 달리 시험관 내뿐 아니라 생체 내에서 뛰어난 면역활성을 나타낸다는 특징이 있다. 또한 본 발명의 MB-ODN은 변형된 골격(modified backbone)을 가질 수 있다. 올리고뉴클레오타이드 골격의 변형은 생체 내에 투여될 때 CpG ODN의 활성 및/또는 안정성을 강화시킬 수 있음이 알려져

왔다. 본 발명의 MB-ODN에 있어서 바람직한 골격의 변형으로는 분해에 내성을 갖게 하는 포스포로티오에이트 변형을 포함한다. 포스포로티오에이트 변형은 말단에서 일어날 수 있으며, 예컨대 마지막 2개 또는 3개의 5' 또는 3' 뉴클레오티드가 포스포로티오에이트 결합에 의해 연결될 수 있다. 또한 본 발명의 MB-ODN은 분해에 내성을 갖도록 하는 2차 구조(예: 스템 루프 구조)를 포함하도록 변형될 수 있다. 바람직하게는 하나 이상의 부분적 포스포로티오에이트 변형된 골격을 가지도록 변형될 수 있다. 포스포로티오에이트는 포스포르아미데이트 또는 H-포스포네이트 화학을 이용하여 자동화된 기술에 의해 합성될 수 있다(S. E. Beaucage *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 22:1859, 1981; Froehler *et al.*, *Nucl. Acid. Res.*, 14:5399-5407). 또 다른 변형인 아릴- 및 알킬- 포스포네이트는 예컨대 미국 특허 제4,469,863호에 기술된 바와 같이 제조될 수 있으며, 알킬 포스포트리에스테르(하전된 산소 잔기가 미국 특허 제5,023,243호 및 유럽 특허 제092,574호에 기술된 바와 같이 알킬화됨)가 시판 시약을 이용하여 자동화된 고체상 합성에 의해 제조될 수 있다. 또 분해에 덜 민감하도록 하는 또 다른 변형은 아데닌, 시토신, 구아닌, 티민 및 우라실의 아세틸-, 티오- 및 이와 유사한 변형뿐만 아니라 이노신 및 케신과 같은 비전형 염기를 포함하는 것이다. 테트라에틸글리콜 또는 헥사에틸글리콜과 같은 디올을 말단으로 포함하는 CpG ODN도 분해에 보다 내성적이다. 이외에도 포스포디에스테르와 포스포로티오에이트의 조합, 포스포트리에스테르, 포스포라미네이트, 메틸포스포네이트, 메틸포스포로티오네이트, 포스포로디티오에이트 및 이들의 조합이 포함된다(Khorana *et al.*, *J. Molec. Biol.*, 72:209, 1972; Goodchild, J. *Bioconjugate Chem.*, 4:165, 1990). 이와 같이 골격이 변형된 CpG ODN은 강화된 뉴클레아제 저항성(enhanced nuclease resistance), 증가된 세포 흡수(increased cellular uptake), 증가된 단백질 결합(increased protein uptake) 및/또는 변경된 세포 내 위치화(altered intracellular localization) 등을 통해 더 강력한 면역효과를 보일 수 있다.

- <21> 본 발명의 MB-ODN의 바람직한 골격은 포스포디에스테르(이하, 'O형'이라 함) 또는 포스포로티오에이트(이하, 'S형'이라 함) 골격이며, 가장 바람직한 골격은 생체 내에서 쉽게 분해 되어 부작용을 유발하지 않는 O형 골격이다.
- <22> 본 발명에 따른 MB-ODN 은 Th1 사이토카인들의 발현을 유도하여 체액성 면역반응을 강하게 유도함을 보여주고 있으며 백신의 효과를 높일 수 있는 면역보조제 활성을 갖는다. 구체적인 생리적 활성은 다음과 같다.
- <23> 1) 마우스 및 마우스 비장의 면역세포에서 IL-12의 생산을 증가시킨다.
- <24> 2) 수지상 세포를 활성화시켜 IL-12의 발현을 유도시킨다.
- <25> 3) HEL을 항원으로 이용하고 MB-ODN 을 면역 보조제로 이용했을 때, 항체의 생산이 크게 증가하였다. 이때 Th1 면역반응의 결과로 IgG2a의 생산이 CFA를 이용했을 때보다 높게 나타났다.
- <26> 상기와 같은 활성을 통해 본 발명에 따른 MB-ODN은 백신의 효능을 증진 시키는 효과를 나타낸다. 종래 알려진 CpG ODN과는 달리 본 발명의 MB-ODN은 골격의 형태에 관계 없이 거의 동일한 활성을 나타낸다는 점에 특징이 있다. 본 발명에서는 O형 골격으로 변형시킨 본 발명의 CpG ODN이 S형 골격으로 변형시킨 경우와 거의 동등하게 활성을 나타냄을 규명하였다. 또한 Th1 사이토카인들의 발현을 유도하여 체액성 면역반응을 강하게 유도함을 규명하여 백신의 면역보조제 (adjuvant)로 효과적으로 사용될 수 있다.
- <27> 본 발명에 따른 MB-ODN은 Th2 사이토카인(예: IL-4)을 억제하거나 또는/및 Th1 사이토카인(예: IL-12)을 유도함으로써 Th1/Th2 면역반응의 평형(balance)을 조절하는 생리적 활성을 가진다. 구체적인 생리적 활성은 다음과 같다. 1) 대식세포를 활성화시켜 IL-12의 프로모터를 활성화 시킨다; 2) 수지상 세포를 활성화시켜 IL-12의 발현을 유도시킨다; 3) 마우스에서 IL-12의 생산을 증가시킨다; 4) 마우스 비장의 면역세포에서 IL-12의 생산을 증가 시킨다; 5) Th2-림프구에 의해 매개되는 사이토카인(IL-4 및 IL-10)의 발현을 억제시킨다; 6) 아토피 피부염 병변 부위에서 CD4+ 및 CD8+ 림프구의 세포수를 감소시킨다; 7) 혈청 내 IgE 수준(level)을 감소시킨다.
- <28> 상기와 같은 활성을 통해 본 발명에 따른 MB-ODN은 피부질환의 치료 또는 증상 개선의 효과를 나타낸다. 종래 알려진 CpG ODN과는 달리 본 발명의 CpG ODN은 골격의 형태에 관계없이 거의 동일한 활성을 나타낸다는 점에 특징이 있다. 본 발명에서는 O형 골격으로 변형시킨 본 발명의 CpG ODN이 S형 골격으로 변형시킨 경우와 동등하거나 보다 우수한 활성을 나타냄을 규명하였다. 그러므로 본 발명의 MB-ODN은 모두 피부질환의 치료 또는 예방에 효과적으로 사용될 수 있다. 또한 Th1 사이토카인들의 발현을 유도하여 Th1/Th2 면역반응의 균형을 유지 시키므로, Th1/Th2 면역반응의 불균형에 의해 발생하는 면역질환 (예; 천식) 치료제로 효과적으로 적용할 수 있다.

<29> 본 발명에 따른 MB-ODN 은 면역세포의 생존을 증가시키는 기능을 갖는다. MB-ODN 은 대식세포를 자극하여 Bcl-xs/L 의 발현을 증가 시켜 방사선 조사에 의한 세포의 사멸을 저해하는 효과를 나타낸다. 또한 MB-ODN은 B 세포의 방사선 조사에 의한 세포의 사멸을 저해하는 효과를 나타낸다. 따라서 MB-ODN은 방사선 조사에 의한 암 등의 난치성 질환 치료시, 정상외 면역세포생존율을 높여 면역기능을 정상화 시키는데 효과적으로 적용할 수 있다. MB-ODN의 구체적인 생리적 활성은 다음과 같다: 1) 대식세포의 Bcl-xs/L 의 발현을 증가 시킨다; 2) 방사선 조사에 의한 대식세포의 생존율을 증가시킨다; 3) 방사선 조사에 의한 B 세포의 생존율을 증가 시킨다.

효 과

<30> 상기와 같은 구성을 갖는 본 발명을 통하여 *Mycobacterium bovis* BCG 유래 올리고뉴클레오타이드 조각들은 HEL 항체 형성에 있어서 면역보조제(adjuvant)로서의 역할을 수행하여 혈액성 면역에 관여하고, 대식세포의 IL-8 및 IL-12 프로모터 활성화 발명에서 IL-8 프로모터가 활성화됨을 통해 선천성 면역세포의 활성화에 관여함을 알았다. 또한 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 혈액성 면역을 증가시키는 면역보조제로의 역할 뿐 아니라 면역세포를 자극하여 세포성 면역을 유도하기 때문에 새로운 면역보조제로 사용할 수 있는 효과가 있고, 본 발명의 MB-ODN이 아토피 피부염 동물모델인 NC/Nga 마우스에서 Th1-림프구에 의해 매개되는 사이토카인의 발현을 증가시키는 반면, Th2-림프구에 의해 매개되는 사이토카인의 발현은 억제시킴으로써 혈청 내 IgE 수준을 감소시킴을 통해 아토피 피부염의 치료에 매우 우수한 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다.

<31> 본 발명의 MB-ODN4/5#31 이 방사선 조사에 의한 암등의 난치성 질환 치료시, 정상외 면역세포생존율을 높여 면역기능을 정상화 시키는데 매우 우수한 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<32> 이하 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

<33> 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것으로, 본 발명의 내용이 이에 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1>

E. coli 와 M. bovis BCG 의 chromosomal DNA 염기서열 분석

<34> <1-1> E. coli 와 M. bovis BCG 의 chromosomal DNA에서 CpG motif 염기서열 분석

<35> 본 발명자들은 E. coli 와 M. bovis BCG 의 chromosomal DNA 염기서열을 컴퓨터 프로그램을 이용하여 분석하였다. E. coli 와 M. bovis BCG 의 chromosomal DNA 내에 존재하는 6 nucleotides 로 구성된 염기서열들의 빈도를 컴퓨터 프로그램을 이용하여 계산하였다. XXCGXX 의 염기서열이 나타날 확률은 이론적으로 1/4⁶ 이나, 실제로 E. coli 와 M. bovis BCG 의 chromosomal DNA에서 XXCGXX의 확률은 훨씬 높게 나타났다. 또한 M. bovis BCG 의 chromosomal DNA에서 E. coli 보다 더 높은 빈도로 XXCGXX 가 나타남을 확인하였다 (도 1).

<1-2> M. bovis BCG 의 chromosomal DNA에서 CpG ODN 염기서열 분석

<36> M. bovis BCG chromosomal DNA 를 무작위로 20 개의 염기서열씩 선택하였을 때, 그중 3개의 XXCGXX 들이 포함하는 염기서열들을 선별하였다. 예)GACGTTGAGTCGTTAACGAG

<37> C 와 C 사이의 염기서열 간격을 4개 와 5개 씩 두고 분석한 결과(-CGXXCGXXXCG-, MB-ODN 4/5, 도 2a) 와 C 와 C 사이의 염기서열 간격을 각각 5개 씩 두고 분석한 결과 (-CGXXXCGXXXCG-, MB-ODN 5/5, 도 2b) 도 2와 같다. M. bovis BCG 의 chromosomal DNA 에 존재하는-CGXXCGXXXCG- 형태의 올리고뉴클레오타이드는 395개, -CGXXXCGXXXCG- 형태의 올리고뉴클레오타이드는 354개 존재함을 보여주고 있다. 도 1에서 빈도가 높은 XXCGXX 들이 많이 포함될수록 높은 점수를 주어 우선순위로 20개의 염기서열들을 배열하였다. 20개의 염기서열에 5'- 또는 3'- 말단에 CG가 존재하는 염기서열들 배제하였고, 후보 면역반응 조절용 올리고뉴클레오타이드 71개를 선정하여 합성하였고 후보물질 검색에 이용하였다.

<실시예 2>

면역활성 효과를 갖는 MB-ODN 의 탐색

<2-1> 합성한 후보 MB-ODN 들의 면역반응조사

<38> 상기 실시예 <1-2>에서 제조된 MB-ODN 및 이의 다양한 치환변이체들이 대식세포의 IL-8 및 IL-12의 프로모터

를 활성화시키는지 조사하였다.

<45>

a) 마우스 대식세포의 배양

<46>

Raw 264.7 세포(ATCC, Manassas, VA)는 10% FBS(Gibco BRL)를 DMEM 배지에서 배양하였다. 세포 배양은 37 °C, 5% CO₂ 배양기(Forma)에서 수행하였다.

<47>

b) IL-8 및 IL-12 프로모터-Luc 리포터 플라스미드의 제작

<48>

IL-8 프로모터 영역 (-135 bp에서 +46 bp 까지)을 증폭하기 위하여, 인간 게놈 DNA를 주형으로 하고 다음과 같은 프라이머 셋트를 이용하여 PCR을 수행하였다.

5' primer (서열정보 9)	5'- GTGAGATCTGAAGTGTGATGACTCAGG-3'
3' primer (서열정보 10)	5'- GTGAAGCTTGAAGCTTGTGTGCTCTGC-3'

<49>

<50>

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

<51>

한편, IL-12 프로모터 영역 (-373 bp에서 +52 bp 까지)을 증폭하기 위하여, 인간 게놈 DNA를 주형으로 하고 다음과 같은 프라이머셋트를 이용하여 PCR을 수행하였다.

5' primer (서열정보 11)	5'- CATGAGCTCAGCCTCCCGTCTGACC-3'
3' primer (서열정보 12)	5'- CTGGGCTCGAGGGAGAGTCCAATGG-3'

<52>

<53>

증폭된 IL-12 프로모터 영역 단편을 *Sac* I 및 *Xho* I으로 절단된 pGL3-Basic 플라스미드(Promega)에 삽입하였다. 이렇게 하여 IL-12 프로모터-Luc 리포터 플라스미드를 제조하였다(Wu G. D. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 272:2396-2403, 1997).

<54>

c) 프로모터 활성화 분석: 루시페라제 활성 어세이

<55>

RAW 264.7 세포(ATCC, Rockviller, MID)를 5X10⁴ cells/well의 농도로 12-웰 플레이트에 분주하여 37 °C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 상기 세포를 상기 b)에서 제조한 IL-8 프로모터-Luc 리포터 플라스미드 또는 IL-12 프로모터-Luc 리포터 플라스미드와 pRL-null 플라스미드 (Promega)로 공동-형질감염(co-transfection)시켰다. 이후, 37 °C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 상기 도 3에 기재된 MB-ODNs(10µg/well)을 각 웰에 처리하고, 37 °C, 5% CO₂ 배양기에서 6시간 또는 12시간 동안 배양하였다. 이 때 대조군에는 PBS를 처리하였다. 이후, 듀얼-루시페라제 리포터 어세이 시스템(Dual-luciferase reporter assay system, Promega)의 PLB(passive lysis buffer)을 100 µl/well의 농도로 각 웰에 첨가하여 세포를 파쇄하였다. 세포 파쇄액을 원심분리하고 얻은 상층액(15 µl)을 이용하여 루시페라제 어세이를 수행하였다. 루시페라제 활성은 TD-20/20(Turner designs) 루미노미터(luminometer)를 사용하여 측정하였다. MB-ODN의 처리에 따른 각 프로모터의 활성은 대조군에 대한 상대적인 활성으로 나타내었다. 즉, 대조군의 활성을 '1'로 하여 이에 대한 활성화 배수(fold activation)로 나타내었다.

<56>

그 결과, 도 4에서 보는 바와 같이, MB-ODN4/5#31의 염기서열이 IL-8 프로모터를 활성화 시키는 것으로 확인되었다.

<57>

<2-2> MB-ODN4/5#31 유사 염기서열들의 IL-8 프로모터에 대한 활성화 분석

<58>

상기 실시예 <2-1>에서 IL-8 프로모터 활성화에 효과가 있는 MB-ODN4/5#31의 염기서열 중 CGTTCGTGTCG 서열은 같고 그 외의 염기서열이 다른 MB-ODN4/5#31과 유사한 *M. bovis* BCG chromosomal DNA에 존재하는 20개의 염기서열들을 분석하였다. 그 결과 도 5a에 나타난바와 같이 17개의 MB-ODN4/5#31 유사염기서열이 존재함을 알 수 있었다. 이후, 상기 실시예 <2-1>과 동일한 방법에 따라 수행하여 IL-8 프로모터 활성을 측정하였다.

<59>

그 결과, 도 5b에서 보는 바와 같이, 염기서열에 따라 IL-8 프로모터를 활성화시키는 활성이 다름을 볼 수 있

었다. 본 발명에 따른 MB-ODN4/5#31 이외에 MB-ODN4/5#31.14 염기서열도 높은 활성을 나타내었다.

<60> <실시예 3>

<61> **MB-ODN4/5#31 올리고뉴클레오타이드의 염기서열 변형 및 면역 반응**

<62> <3-1>MB-ODN4/5#31 올리고뉴클레오타이드의 염기서열 변형

<63> MB-ODN4/5#31 의 염기서열을 도 6a과 같이 변형하여 합성하였다. MB-ODN4/5#31 의 CG 서열들을 GC 서열로 각각 바꾸었다 (#31-CG-1, #31-CG-2, #31-CG-3). 또한 첫 번째 CG와 두 번째 CG를 GC 염기로 (#31-CG-4) 바꾸었고, 두 번째 CG와 세 번째 CG를 GC 염기로 (#31-CG-5) 바꾸었으며, 첫 번째 CG 와 세 번째 CG를 GC로 (#31-CG-5) 바꾸었다. CG 서열의 G를 A, T, C 로 도 6a와 같이 각각 바꾸었다. 또한 첫 번째와 두 번째 CG를 CA로, 두 번째와 세 번째의 CG를 CA로, 그리고 첫 번째와 세 번째와 CG를 CA로 바꾸었다.

<64> <3-2> 염기서열 변형된 MB-ODN4/5#31 올리고뉴클레오타이드의 면역반응 조사

<65> 12 웰 플레이트에 RAW 264.7 세포를 5×10^4 세포/웰 깔고 24 시간동안 37°C 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. IL-8 프로모터 리포터 프라즈미드와 pRL-null 프라즈미드를 co-transfection시킨 후 24 시간동안 37°C 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 합성 올리고뉴클레오타이드를 10 ug/웰 씩 처리하고 6 시간 동안 37°C 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 이후, 상기 실시 예 <2-1>과 동일한 방법에 따라 수행하여 IL-8 프로모터 활성을 측정하였다.

<66> 어떤 변형된 염기서열을 가진 합성 올리고뉴클레오타이드가 대식세포의 IL-8 프로모터를 활성화시키는지 루시퍼레이즈 분석 방법으로 활성화를 측정한 결과, 5'-AGCAGCGTTCGTGTGCGCCT-3', 5'-AGCAGCGTTCATGTCGGCCT-3', 5'-AGCAGCGTTCGTGTCCGCCT -3'의 염기서열을 가진 올리고뉴클레오타이드가 높게 IL-8 프로모터를 활성화시켰다 (도 6b). 다른 합성 올리고뉴클레오타이드의 경우 대조군보다 낮게 IL-8 프로모터 활성화를 보였다. IL-8 프로모터를 활성화시킨 올리고뉴클레오타이드에서 CpG 모티프가 아닌 두 번째 TTCGTG 의 변형체인 TTCATG에 의해서도 IL-8 프로모터의 활성화가 측정 되었다. 세 번째 CpG 모티프인 GTCGGC 변형했을 때, 다시 CpG 모티프가 나타나는 GTGCGC 및 GTCCGC 염기서열에 의해 IL-8 프로모터 활성화를 증가시킬 수 있음을 보였다(도 6).

<67> <실시예 4>

<68> *MB-ODN4/5#31 및 MB-ODN4/5#31.14 올리고뉴클레오타이드의 골격 변형에 따른 면역반응 조사

<69> <4-1> MB-ODN4/5#31 및 MB-ODN4/5#31.14 의 골격 변형에 따른 RAW 264.7 세포의 활성화

<70> RAW 264.7 세포에 상기 실시 예 <2-1>의 b)에서 제작한 IL-8-Luc 프로모터 리포터 벡터 또는 IL-12-Luc 프로모터 리포터 벡터 와 pRL-null 플라스미드(Promega)로 공동-형질감염 시켰다. 상기 형질감염된 세포에 O형(포스포디에스터 골격) 및 S형(포스포로티오에이트 골격) MB-ODN4/5#31과MB-ODN4/5#31.14 (0 또는 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 각각 처리하고 8시간 동안 배양하였다. 이후, 상기 실시 예 <2-1>과 동일한 방법에 따라 수행하여 IL-8 프로모터 및 IL-12 프로모터 활성을 측정하였다. 그 결과, 도 7에서 보는 바와 같이, 본 발명에 따른 MB-ODN4/5#31 과 MB-ODN4/5#31.14 는 골격의 형태에 관계없이(O형 및 S형 모두) 가장 높은 활성을 나타내었다.

<71> <4-2> MB-ODN4/5#31 및 MB-ODN4/5#31.14 의 골격 변형에 따른 NF- κ B 활성화

<72> 24 웰 플레이트에 cover glass를 넣고 RAW 264.7 세포를 5×10^5 세포/ml씩 넣어 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24 시간 배양하였다.

<73> MB-ODN4/5#31 및 MB-ODN4/5#31.14 을 각각 5 ug/웰 씩 처리하였다. 30 분 경과 후 3.7% formaldehyde로 세포를 고정시킨 후 0.2% Triton-X 100을 포함한 PBS로 permeabilize 하였다. 0.2% Tween-20을 포함한 PBS(PBS T)에 1% donkey serum을 넣은 용액으로 30 분간 blocking한 후, PBST에 mouse anti-p65 (titer 1: 500) 항체를 0.5 ul/웰 넣어 2 시간 동안 상온에 방치하였다. PBST로 세척 후, Donkey-anti-mouse-IgG-FITC (titer 1:250) 항체로 2 시간동안 처리하였다. Confocal microscopy를 이용하여 NF- κ B의 핵으로 이동을 관찰하였다 (Lee, Y., et.al., (2002) *Blood*99, 4307-4317).

<74> 도 8a는 NF- κ B를 면역 염색법으로 염색하여 confocal microscopy를 사용하여 NF- κ B가 핵으로 이동하는 현상을 관찰한 그림이다. 아무것도 처리하지 않은 대조군이나 CpG 모티프가 없는 대조군 (non-CpG-ODN 2041)에서는 NF- κ B가 세포질에 위치하였다. 대식세포에 MB-ODN4/5#31 및 MB-ODN4/5#31.14를 처리한 경우에 NF- κ B가 핵으로 이동

하였다. 본 발명에 따른 MB-ODN4/5#31 과 MB-ODN4/5#31.14 는 골격의 형태에 관계없이(O형 및 S형 모두) NF- κ B 가 핵으로 이동하였다.

<75> 도 8b은 또한 MB-ODN4/5#31 및 MB-ODN4/5#31.14를 처리한 RAW 264.7 세포주에서 NF- κ B가 활성화됨을 Electrophoretic mobility shift assay(EMSA)로 확인한 실험이다. 6 웰 플레이트에 RAW 264.7 세포를 5×10^5 세포/ml씩 넣어 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24 시간 배양하였다. MB-ODN4/5#31 및 MB-ODN4/5#31.14 을 각각 5 ug/웰 씩 처리하였다. 30 분 경과 후 세포를 nuclear extraction buffer에 반응 시킨 후 원심분리하여 핵단백질을 얻어 EMSA를 수행하였다. EMSA를 위하여 NF- κ B 결합위치를 가지는 probe(5'-AGTTGAGGGGACTTCCAGGC-3')(서열 정보 13)에 ³²P 로 표식 하였다. ³²P로 표식된 probe 와 20 ug 의 핵단백질을 완충용액(10 mM HEPES, pH 7.9, 65 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol, 0.2 mM EDTA, 0.02% NP-40, 50 mg/ml poly(dIdC):poly(dIdC) and 8% glycerol)에서 혼합한 후 상온에서 30분 동안 반응시켰다. 반응액을 0.5X TBE (1X TBE is 89 mMTris borate and 1 mM EDTA, pH 8.0) 와 2.5% glycerol을 함유하는 4% polyacrylamide gels에서 전개시켰다. NF- κ B competitor로는 5'-AGTTGAGGGGACTTCCAGGC-3'(서열 정보 13)(Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA)를 이용하였으며, 50 배 높게 전처리하여 EMSA를 수행 하였다. NF- κ B antibody supershift assays 는 40C에서 30분동안 1ug의 NF- κ B 항체와 반응시킨 후 EMSA를 수행하였다. 도 8은 MB-ODN4/5#31 및 MB-ODN4/5#31.14 에 의해 RAW 264.7 세포에서 NF- κ B가 활성화 됨을 EMSA로 확인할 수 있었다. 본 발명에 따른 MB-ODN4/5#31 과 MB-ODN4/5#31.14 는 골격의 형태에 관계없이(O형 및 S형 모두) NF- κ B가 활성화됨을 EMSA 로 확인할 수 있었다.

<76> <실시예 5>

<77> MB-ODN4/5#31 의 혈액성 면역반응 유도

<78> <5-1> Immunization

<79> 4주령의 Balb/c mouse에 hen egg lysozyme (HEL, 50 mg/마리)과 MB-ODN4/5#31 (100 ug/마리) 혼합물을 복강내 투여하였다. 1 주일 경과 후 동량의 HEL과 MB-ODN4/5#31 혼합물을 두 번째 투여하였다. 1 주일 경과 후, heart punching방법으로 혈액을 채취하고 원심분리하여 혈구를 침전시키고 혈청을 획득하였다. 획득한 혈청으로부터 anti-HEL 항체 (total IgG, Ig G1, Ig G2a)의 역가를 확인하기 위해 ELISA를 수행하였다.

<80> <5-2> ELISA

<81> 획득한 혈청에 PBS/0.2% sodium azide를 사용하여 1:10으로 dilution하여 -20°C에 보관하였다. 96 웰 이무노 플레이트 (Nunc)에 HEL (10 ug/ml sodium bicarbonate 버퍼 pH 9.6)을 넣어 4°C에서 16 시간 동안 방치하여 플레이트 바닥에 HEL을 붙였다. PBST (PBS/0.05% Tween 20)를 사용하여 플레이트를 씻고, blocking하기 위해 1 % 소serum albumin (BSA)을 넣고 실온에서 1 시간 방치하였다. 혈청을 PBS 를 사용하여 1:3으로 연속 희석하여 플레이트에 순서대로 넣고 4°C에서 16 시간 동안 방치한 후 PBST로 씻었다. Alkaline phosphatase-conjugated detecting 항체를 PBST에 섞어 플레이트에 넣고 실온에서 2 시간 방치하였다. Total Ig 검출을 위해 1:2,000 goat anti-mouse Ig(H+L) (Southern Biotechnology Associates) 항체를 사용하였다. 발색을 위해 1-StepTM ABTS (PIERCE)를 넣고, ELISA 리더(Labsystems)를 사용하여 405 nm에서 흡광을 측정하였다(Chu, R. S., et.al., (1997)J. Exp. Med. 186, 1623-1631).

<82> MB-ODN4/5#31 을 마우스 복강내에 hen egg lysozyme (HEL)과 함께 주사하여 혈액성 면역반응을 조사하였다. HEL 만을 단독으로 주사하는 것에 비하여 MB-ODN4/5#31 과 함께 주사한 HEL에 대한 항체의 양이 증가하므로 MB-ODN4/5#31 조각이 혈액성 면역에서 면역 보조제 효과가 있음을 확인하였다 (도 9). Mycobacteria의 추출물을 파 라핀 oil과 혼합한 약제인 Freund's adjuvant는 60년 전부터 현재까지 사용되고 있는 대표적인 면역보조제 중 하나이다. 그러나 이 면역보조제의 문제점은 세포성 면역증강이 이루어 지지 않고 인간에게 사용할 수 없다는 점이다. MB-ODN4/5#31는 혈액성 면역을 증가시키는 면역보조제로의 역할 뿐 아니라 면역세포를 자극하여 세포성 면역을 유도하기 때문에 새로운 면역보조제로의 활용이 가능하다는 결과를 얻었다. 또한 MB-ODN4/5#31 은 Th1 면역반응 특이적인 IgG2a 의 항체 생산에 효과적임을 보여주고 있다.

<83> <실시예 6>

<84> MB-ODN4/5#31 의 싸이토카인 생산 유도

<85> <6-1> 수지상 세포에서의 사이토카인 발현 분석

<86> a) 수지상 세포의 분리 및 MB-ODN4/5#31 처리

<87> 4주령의 Balb/c 마우스의 대퇴부의 골수로부터 전구 세포를 분리하였다. 분리된 전구 세포에 RBC 용해 용액(150 mM NH₄Cl, 10 mM potassium carbonate, 0.1 mM EDTA pH 7.4) 반응시킨 후 세포를 회수하였다. 상기 세포를 6-웰 플레이트(Nunc)에 2 X 10⁶ cells/well의 농도로 분주하였다. 골수의 전구 세포를 수지상 세포로 분화시키기 위하여 IL-4와 GM-CSF(biosource)를 각각 10 ng/ml의 농도로 첨가한 10% FBS 함유 RPMI 배지를 각 웰에 가하였다(Ghosh, M., *J Immunol.* 170: 5625-5629, 2003). 세포를 37 °C에서 5% CO₂를 함유한 배양기에서 배양하였다. 세포는 2일마다 배지를 교체하면서 6일간 배양하였다. 이후, 본 발명에 따른 0형 MB-ODN4/5#31, CpG-ODN 1826, 및 non-CpG-ODN 2041 을 10 µg/ml 처리하였다.

<88> b) 수지상 세포에서의 IL-12 발현분석

<89> 본 발명에 따른 0형 MB-ODN4/5#31을 처리한 수지상 세포에서의 IL-12의 발현량을 조사하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다.

<90> 먼저, 상기 실시예 <6-1a>에서 Balb/c 마우스로부터 분리된 수지상 세포에 0형 MB-ODN4/5#31을 시간 별(0, 0.5, 1, 2, 4 및 8 시간)로 처리하였다. 대조군에는 0형 1826 CpG ODN과 2041 non-CpG ODN을 각각 처리하였다.

<91> 이후, TRIzol (Invitrogen)을 이용하여 수지상 세포로부터 총 RNA를 분리하였다. 이후, 총 RNA(5 µg)에 M-MLV 역전사 효소(invitrogen)를 처리하여 cDNA를 제조하였다. 이렇게 제조한 cDNA를 주형으로 하고 IL-12에 다음과 같은 특이적인 프라이머 셋트를 이용하여 PCR을 수행하였다.

정방향 프라이머(서열정보 14)	5'-CTGGTGCAAAGAAACATGG-3'
역방향 프라이머(서열정보 15)	5'-TGGTTTGTATGATGTCCCTGA-3'

<92>

<93> PCR 증폭은 95 °C 에서 30초 동안 DNA 변성 57 °C에서 40초 동안 프라이머 어닐링 및 72 °C에서 1분 동안 연장을 한 사이클로 하여 총 25회 반복 수행하였다. PCR 반응이 완료된 후, 1% 아가로스 겔에서 증폭된 PCR 산물을 확인하였다. 그 결과, 도 10에서 보는 바와 같이, 본 발명에 따른 0형 MB-ODN4/5#31 에 의해서만 IL-12의 발현이 유도됨을 확인할 수 있었다. 한편, S형의 1826 CpG ODN이 IL-12의 발현을 높은 수준으로 유도한다고 보고된 것과는 달리(Lee, KW.*et al.*, *Mol. Immunol.* 41:955-964, 2004), 0형의 1826 CpG ODN에 의해서는 IL-12의 발현이 유도되지 않았다.

<94> <6-2> MB-ODN4/5#31에 의한 마우스에서 IL-12 발현 분석

<95> 본 발명에 따른 MB-ODN4/5#31을 처리한 마우스에서 IL-12p40의 발현량을 조사하기 위하여 immunization 후 ELISA를 수행하였다.

<96> a) Immunization

<97> 4주령의 Balb/c mouse에 0형과 S형의 MB-ODN4/5#31, non-CpG-ODN 2041 (100 µg/마리) 각각을 복강내 투여하였다. 24시간 경과 후, heart punching방법으로 혈액을 채취하고 원심분리하여 혈구를 침전시키고 혈청을 획득하였다.

<98> b) ELISA

<99> *먼저 상기 실시예 <5-2>에서와 같이 MB-ODN4/5#31를 immunization한 Balb/c 마우스로부터 분리된 혈청에서 anti-IL-12p40 및 anti-IL-4 항체의 역가를 확인하기 위해 ELISA를 수행하였다.

<100> MB-ODN4/5#31 을 마우스 복강내에 주사하여 IL-12p40 와 IL-4 의 생산을 비교하였다. 그 결과, 도 11a에서 보는 바와 같이, 본 발명의 MB-ODN4/5#31 은 IL-12p40의 생산을 유도하였으며, IL-4는 변화가 없었다. S형의 MB-ODN4/5#31이 IL-12 p40의 생산을 더 높은 수준으로 증가시켰다. 본 발명은 MB-ODN4/5#31 이 IL-12p40 의 생산을 증가 시켜 Th1 면역반응성을 증가 시키는 효과가 있음을 보여주고 있다.

<101> <6-3> MB-ODN4/5#31에 의한 마우스 비장 면역세포에서 IL-12 발현 분석

<102> 마우스의 비장에서 면역 세포를 수집하고, 이를 5 x 10⁵ cells/well의 농도로 각 웰에 분주하였다. 이후, 0형 또는 S형의 MB-ODN4/5#31, non-CpG-ODN 2041 (0 또는 10 µg/ml)를 각 웰에 처리하고 24시간 동안 배양하였다.

배양이 완료된 후, 세포 배양액을 분리하였다. 이후, 세포 배양액 내 사이토카인의 수준을 조사하기 위하여, 상용화된 anti-IL-12 p40 및 IL-4 항체 (R&D systems, Minneapolis, Minn.)를 이용하여 상기 실시예 <5-2>와 같이 샌드위치 ELISA 분석을 각각 수행하였다.

<103> 그 결과, 도 11b에서 보는 바와 같이, 본 발명의 MB-ODN4/5#31 은 골격 형태에 관계없이 비장 면역세포에서 IL-12 p40의 생산을 높은 수준으로 증가시켰다. 그러나 IL-4의 생산에는 영향을 미치지 않았다. 특히, Th1/Th2 면역반응의 균형에서 Th1 면역반응을 유도하는 대표적인 사이토카인인 IL-12은 본 발명의 MB-ODN4/5#31에 의해서 유도되었으며, 이로부터 본 발명의 MB-ODN4/5#31 이 Th1 면역반응을 유도할 수 있음을 확인할 수 있었다.

<104> <실시예 7>

<105> 아토피 피부염 치료 효과를 조사하기 위한 생체 내 분석

<106> <7-1> 본 발명의 MB-ODN4/5#31-함유 연고제의 도포

<107> NC/Nga 마우스 6 마리를 MB-ODN4/5#31 처리군 및 무처리군으로 나누었다. 처리군의 마우스에는 제조한 0형 MB-ODN4/5#31을 함유하는 연고제(0.2 mg/head)를 마우스의 등에 있는 아토피 피부염 병변 부위에 5일에 한 번씩 2 주 동안 총 4회 도포하였다. 무처리군의 마우스에는 본 발명의 CpG ODN이 첨가되지 않은 페트로라툼을 동일한 조건으로 도포하였다.

<108> <7-2> 병변의 관찰

<109> 본 발명의 MB-ODN4/5#31 함유 연고제를 도포한 후 5일째 및 7일째에 아토피 피부염의 병변 부위를 육안으로 관찰하였다. 그 결과, 도 12a에서 보는 바와 같이, 무처리군의 마우스와 비교할 때에 본 발명의 0형MB-ODN4/5#31을 도포한 마우스의 등에서 피부 병변의 소실이 관찰되었다. 또한, 마우스의 등 피부를 적출하여H&E 염색법에 의해 아토피 피부염의 치료 효과를 조사하였다. 그 결과, 도 12b에서 보는 바와 같이, 본 발명의 0형 MB-ODN4/5#31을 도포한 마우스의 병변에서는 과각화증(hyperkeratosis)과 양성각화변화(acanthosis)가 현저히 감소하고, 진피 내 림프구의 침윤도 감소하여 아토피 피부염이 치료됨을 확인하였다.

<110> <7-3> 조직학적 분석

<111> a) 사이토카인의 발현 분석

<112> 본 발명의 0형 MB-ODN4/5#31 을 함유하는 연고제를 도포한 지 5일째, 7일째 및 14일째에 1.51.5 cm² 면적의 피부를 적출하였다. 이후, 4% 포르말린 용액에서 하루 이상 고정시켰다. 고정된 피부 조직에 파라핀을 처리하여 5 μm의 두께로 잘라내었다. 파라핀을 제거한 후, LSAB+kit (DAKO, Denmark)의 매뉴얼에 따라 실험을 수행하였다. 3% H₂O₂를 10분간 처리하였다. 이후, 0.1% BSA를 함유하는 TBS(Tris-buffered saline, pH7.4)으로 희석한 10% 정상 염소 혈청을 첨가하여 블로킹하였다. 이후, 1차 항체-goat anti-mouse IL-10, goat anti-mouse IL-4(Santa Cruz, USA), rat anti-mouse IFN-(Pierce, USA)-를 처리하고 4 °C에서 12시간 이상 반응시켰다. 이후, 바이오틴으로 표지된 2차 항체를 상온에서 30분 동안 반응시킨 후, 퍼옥시다제(oxidase)으로 표지된 스트렙타비딘(streptavidin)을 첨가하여 상온에서 약 30분 동안 반응시켰다. DAB Substrate chromogen system(DAKO, Denmark)을 이용하여 염색한 후 현미경을 통해 관찰하였다.

<113> 그 결과, 도 13에서보는 바와 같이, 본 발명의 0형 MB-ODN4/5#31을 도포한 지 5일 되는 마우스의 표피에서는 IL-4의 발현이 감소된 반면, IFN-gamma 의 발현은 증가된 것을 확인할 수 있었다. 이는 본 발명의 0형 MB-ODN4/5#31이 아토피 피부염에서 특이적으로 높은 Th2 표현형 T 림프구에 의해 매개되는 사이토카인인 IL-4 의 생성을 낮추는 반면, Th1 표현형 T 림프구에 의해 매개되는 사이토카인인 IFN-gamma 의 생성을 증가시킴으로써 아토피 피부염의 증상을 호전시키고 치료함을 나타내는 것이다.

<114> b) CD4+ 및 CD8+ 림프구의 세포수 측정

<115> 본 발명의 0형 MB-ODN4/5#31을 함유하는 연고제를 도포한 지 5일째, 7일째 및 14일째에 1.51.5 cm² 면적의 피부를 적출하였다. 적출된 피부 조직을 액체 질소로 냉동시켰다. 이후, 티슈-텍 OCT 화합물(Tissue-Tek OCT compound, Sakura Finetek USA, INC.)로 삽입하고, 크라이오스탯(cryostat)를 이용하여 5 μm의 두께로 잘랐다. 절단된 조직에 1차 항체-rat anti-mouse CD4 mAb (BD phamingen, USA) 또는 rat anti-CD8 mAb (Serotec, UK)-를 4 °C에서 12시간 동안 반응시켰다. 이후, 바이오틴으로 표지된 2차 항체를 상온에서 30분 동안 반응시켰다. 그리고 나서, 퍼옥시다제(oxidase)로 표지된 스트렙타비딘(streptavidin)을 첨가하여 상온에서 약 30분 동안 반응시켰다. DAB Substrate chromogen system(DAKO, Denmark)을 이용하여 염색한 후 현미경을 통해

관찰하였다. 사진은 모두 200배로 찍었다.

<116> 그 결과, 도 14에서 보는 바와 같이, 본 발명의 0형 MB-ODN4/5#31을 도포한 마우스의 피부에서 CD4+ 및 CD8+ 림프구 세포가 감소했음을 확인할 수 있었다. 아토피 피부염의 병변에서 CD4+ 및 CD8+ 림프구 세포가 감소하는 것은 아토피 피부염의 치료에 매우 효과적인 현상이다(Christian V., et al. *J Clin Invest.* 104:1097-1105, 1999).

<117> <7-4> 혈청 내 IgE 수준 분석

<118> 각 군의 마우스에서 혈장을 수득하고, 사용하기 전까지 -20 °C 에서 보관하였다. 총 IgE 수준은 마우스 IgE BD OptEIA Kit(BD phamingen, USA)를 사용하여 측정하였다. 이후, 혈장내 IgE 항체(BD pharmingen, USA) 수준을 조사하기 위하여, 상용화된 바이오틴으로 표지된 IgE 항체(BD pharmingen, USA)를 이용하여 상기 실시예 <5-2>와 같이 샌드위치 ELISA 분석을 각각 수행하였다.

<119> 그 결과, 도 15에서 보는 바와 같이, 본 발명의 0형 MB-ODN4/5#31을 함유하는 연고제를 도포한 마우스에서는 혈청 내 IgE 수준이 현저히 감소하였다.

<120> 상기 결과들로부터 본 발명의 0형 MB-ODN4/5#31 이 Th1-림프구에 의해 매개되는 사이토카인의 발현을 증가시키는 반면, Th2-림프구에 의해 매개되는 사이토카인의 발현은 억제시킴으로써 혈청 내 IgE 수준을 감소시킴을 통해 아토피 피부염의 치료에 매우 우수한 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다.

<121> <실시예 8>

<122> 방사선조사시 면역세포의 생존율에 미치는 MB-ODN4/5#31의 효과 분석

<123> <8-1> MB-ODN4/5#31 처리에 의한 Bcl-xs/L 의 발현

<124> 6 웰 플레이트에 RAW 264.7 세포를 1×10^5 세포/웰 같고 24 시간동안 37°C 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 합성 올리고뉴클레오타이드를 10 ug/웰 씩 처리하고 6 시간 동안 37°C 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 세포에 lysis 버퍼를 100 ul/웰씩 넣고 RAW 264.7 세포를 파쇄하였다. 세포 파쇄액을 원심분리하여 얻은 상층액 (15 ul)을 사용하여 Western blotting을 수행하였다. 항체-goat anti-mouse Bcl-xs/L를 처리하고, 퍼옥시다제(oxidase)로 표지된 2차 항체를 반응시킨 후 enhanced chemiluminescence reagent (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)을 이용하여 Bcl-xs/L을 관찰하였다.

<125> 그 결과, 도 16에서 보는 바와 같이, 본 발명에 따른 MB-ODN4/5#31은 RAW264.7 세포에 작용하여 Bcl-xs/L 발현을 증가시켜 세포의 생존율을 증가 시키는 효과가 있음을 알 수 있다.

<126> <8-2> MB-ODN4/5#31 처리에 의한 대식세포의 생존율 증가 관찰

<127> 4 웰 챔버 슬라이드 (Lab-TEK Chamber slide, Nalge Nunc International, Inc)에 RAW 264.7 세포를 3×10^4 세포/웰 같고 24 시간동안 37°C 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 합성 올리고뉴클레오타이드를 10 ug/웰 씩 6시간동안 처리하고, γ -irradiator로 10Gy 방사선 조사 후, 48 시간 동안 37°C 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배양한 RAW 264.7 세포에 5x3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)solution(2ug/mL)을 0.4ug/mL이 되도록 배지에 직접 첨가하여 37°C 5% CO₂ 배양기에서 4시간동안 반응시켰다. 각 웰의 배지를 깨끗이 제거한 후 DMSO 0.5ml를 첨가한 후 37°C에서 10분간 반응하여 생성된 formazan 결정을 녹였다. 반응액만을 100ul 취하여 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

<128> 그 결과, 도 17에서 보는 바와 같이, 본 발명에 따른 MB-ODN4/5#31의 처리에 의해 RAW 264.7 세포가 방사선 조사에 의해 사멸을 되는 것을 저해하는 효과가 있음을 나타낸다. 골격의 형태에 있어 0형 이 더 높은 활성을 나타내었다.

<129> <8-2> MB-ODN4/5#31 처리에 의한 B 세포의 생존율 증가 관찰

<130> 6 웰 플레이트에 RPMI 8226 세포를 1×10^5 세포/웰 같고 합성 올리고뉴클레오타이드를 10 ug/웰 씩 6시간동안 처리하고, γ -irradiator로 10Gy 방사선 조사 후, 48 시간 동안 37°C 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배양한 세포에 Propidium Iodide(PI)를 50ug/mL 농도로 첨가하여 10분 동안 얼음에서 반응시킨 후 Flow Cytometry로 PI

의 염색된 정도를 확인하였다.

- <131> 또한, 배양한 세포를 차가운 PBS로 2회 세척한 후 Annexin V-PE 5ul를 첨가한 후 15분 동안 상온에서 반응시켰다. 여기에 Annexin V binding buffer 0.4mL을 더 가한 후 Flow Cytometry로 Annexin V가 결합한 정도를 확인하였다.
- <132> 그 결과, 도 18과 19 에서 보는 바와 같이, 본 발명에 따른 MB-ODN4/5#31 의 처리에 의해 RPMI 8226 세포가 방사선 조사에 의해 사멸을 되는 것을 저해하는 효과가 있음을 나타낸다.
- <133> 상기 결과들로부터 본 발명의 MB-ODN4/5#31 이 방사선 조사에 의한 암등의 난치성 질환 치료시, 정상의 면역세포생존율을 높여 면역기능을 정상화 시키는데 매우 우수한 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다.

도면의 간단한 설명

- <134> 도 1은 *E. coli* 와 *M. bovis* BCG 의 chromosomal DNA 염기서열을 컴퓨터 프로그램을 이용하여 분석하였음. CG dinucleotide 를 사이에 두고 양쪽에 두개씩의 염기가 오는 모든 염기서열 (CpG motif) 을 분석한 결과 도 1에 서와 같이 *M. bovis* BCG 의 chromosomal DNA 에 훨씬 많은 CpG motif가 존재함을 확인하였음.
- <135> 도 2는 *M. bovis* BCG 의 chromosomal DNA 에 존재하는 염기서열 중 20 base pair 상에 CpG motif 가 3개씩 존재하는 염기서열들을 분석한 결과임. C 와 C 사이의 염기서열 간격을 4개 와 5개 씩 두고 분석한 결과(-CGXXCGXXXCG-, MB-ODN 4/5) 와 C 와 C 사이의 염기서열 간격을 각각 5개 씩 두고 분석한 결과 (-CGXXXCGXXXCG-, MB-ODN 5/5) 임. *M. bovis* BCG 의 chromosomal DNA 에 존재하는-CGXXCGXXXCG- 형태의 올리고뉴클레오타이드는 395개, -CGXXXCGXXXCG- 형태의 올리고뉴클레오타이드는 354개 존재함을 보여줌.
- <136> 도 3은 후보 면역반응 조절용 올리고뉴클레오타이드 71개를 선정하여 합성하였고 후보물질 검색에 이용하였음.
- <137> 도 4는 Phosphodiester 결합형태로 도 3에서 합성한 면역반응 조절용 올리고뉴클레오타이드 71개를 처리한 RAW 264.7 세포에서 IL-8 및 IL-12 프로모터 활성화를 보여 주는 그림. 도 4a는 MB-ODN 4/5 형태의 합성한 35개의 올리고뉴클레오타이드가 대식세포의 IL-8 프로모터 활성화 정도를 비교하여 본 결과를 나타내는 그림이고, 도 4b는 MB-ODN 4/5 형태의 합성한 35개의 올리고뉴클레오타이드가 대식세포의 IL-12 프로모터 활성화 정도를 비교하여 본 결과를 나타내는 그림이고, 도 4c는 MB-ODN 5/5 형태의 합성한 35개의 올리고뉴클레오타이드가 대식세포의 IL-8 프로모터 활성화 정도를 비교하여 본 결과를 나타내는 그림임.
- <138> 도 5는 *M. bovis* BCG 의 chromosomal DNA 에 존재하는 염기서열 중 20 base pair 상에 MB-ODN 4/5#31의 CGTTCGTGTCG 코어의 5' 쪽 5개 염기서열과 3'쪽 염기서열이 다른 17개의 염기서열을 선정하여(도 5a), phosphodiester backbone의 올리고뉴클레오타이드를 합성하여 대식세포의 IL-8 프로모터 활성화 정도를 비교하여 본 결과를 나타내는 그림임(도 5b).
- <139> 도 6은 MB-ODN 4/5#31의 염기서열을 15개로 줄인 MB-ODN 4/5#31(M), CG 서열을 GC서열로 치환한 #31-CG 및 CG 의 G를 A, T, 또는 C 로 각각 치환한 #31-A, B, C, D 올리고뉴클레오타이드가 (도 6a) 대식세포의 IL-8 프로모터 활성화 정도를 비교하여 본 결과를 나타내는 그림임 (도 6b).
- <140> 도 7은 MB-ODN 4/5#31 및 #31.14 의 backbone 을 phosphodiester 및 phosphorothioate 형태로 합성하여 IL-8 및 IL-12 프로모터 활성화에 미치는 영향을 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포에서 비교한 그림임. 도 7a 와 7b는 MB-ODN 4/5#31 의 backbone 을 phosphodiester 및 phosphorothioate 형태로 합성하여 농도 의존적으로 IL-8 프로모터를 활성화 시킴을 보여준 그림임. 도 7c 및 7d는 MB-ODN 4/5#31 및 #31.14 의 backbone 을 phosphodiester 및 phosphorothioate 형태로 합성하여 IL-8 및 IL-12 프로모터 활성화에 미치는 영향을 보여준 그림임.
- <141> 도 8은 MB-ODN 4/5#31 의 phosphodiester 및 phosphorothioate backbone 형태를 RAW 264.7 세포주에 자극하였을 때 NF-κB 를 활성화 시키는 것을 보여주는 그림. 그림 a)는 RAW 264.7 세포를 MB-ODN 4/5#31 (10 μg/ml) 로 30분간 처리 후 세포를 고정한 다음 NF-κB p65-specific antisera로 간접면역형광법을 수행하여 NF-κB 의 위치를 확인한 그림. 그림 b)는RAW 264.7 세포를 MB-ODN 4/5#31 (10 μg/ml)로 30 분간 처리 후 핵단백질을 분리하여 NF-κB consensus binding site에 결합하는 NF-κB를 확인하는 Electrophoretic Mobility Shift Assay(EMSA) 그림임.
- <142> 도 9는 MB-ODN 4/5#31 의 backbone 을 phosphodiester 및 phosphorothioate 형태로 합성하여 hen egg lysozyme (HEL) 에 의해 복강면역화된 Balb/c mice의 체액반응을 보여주는 그림.

- <143> 도 10은 수지상 세포에서의 IL-12의 발현에 있어서, 본 발명의 MB-ODN 4/5#31의 효과를 종래의 1826 CpG ODN과 비-CpG ODN(2041)과 비교 조사한 결과임.
- <144> 도 11은 IL-12 p40의 생산에 있어서, 본 발명에 따른 MB-ODN 4/5#31의 골격 변형에 따른 효과를 종래 1826 CpG ODN 및 비-CpG ODN(2041)과 비교 조사한 결과임. 그림 a)는 MB-ODN 4/5#31를 Balb/c mice에 복강면역화한 후 혈청에서 IL-12 p40의 생산을 확인한 그림. 그림 b)는 Balb/c mice의 비장 면역세포를 분리하여 MB-ODN 4/5#31을 처리하였을 때 IL-12 p40의 생산을 확인한 그림.
- <145> 도 12는 본 발명에 따른 0형 MB-ODN 4/5#31의 투여에 의해 아토피 피부염이 치료되는 것을 동물 모델을 이용하여 확인한 결과이다.
- <146> a: 본 발명의 0형 MB-ODN 4/5#31을 NC/Nga 마우스의 등에 있는 아토피 피부염 병변에 도포한 후 5일 및 7일에 육안으로 관찰한 사진; b: 아토피 피부염이 발생한 NC/Nga 마우스의 등 피부에 0형 MB-ODN 4/5#31을 도포한 후 피부를 적출하여 H&E 염색하여 관찰한 사진. 그림에서 "↔"는 극세포증(acanthosis), "→"는 과각화증(hyperkeratosis)을 나타냄.
- <147> 도 13은 본 발명의 0형 MB-ODN 4/5#31을 투여한 NC/Nga 마우스의 등 피부에서 사이토카인(IL-4 및 IFN-gamma)의 발현을 관찰한 조직 화학적 분석 결과로서, 화살표는 사이토카인의 발현을 나타낸다.
- <148> 도 14는 본 발명의 0형 MB-ODN 4/5#31을 투여한 NC/Nga 마우스의 등 피부에서 CD4+ 및 CD8+ 림프구의 세포수를 관찰한 조직 화학적 분석 결과이다.
- <149> 도 15는 본 발명의 0형 MB-ODN 4/5#31을 투여한 NC/Nga 마우스의 혈청 내 IgE 수준을 조사한 결과이다. 도에서 AD: 무처리군을 나타냄.
- <150> 도 16은 0형 MB-ODN 4/5#31을 대식세포주인 RAW264.7 세포주에 처리하였을 때 Bcl-xs/L의 발현이 증가됨을 나타낸 그림.
- <151> 도 17은 MB-ODN 4/5#31을 RAW264.7 세포에 전 처리한 후 방사선 조사하였을 때, RAW264.7 세포의 생존율이 증가하였음을 MTT assay로 확인한 그림.
- <152> 도 18은 MB-ODN 4/5#31을 B 세포주인 RPMI 8226 세포에 전 처리한 후 방사선 조사하였을 때, RPMI 8226 세포의 생존율이 증가하였음을 PI 염색 후 Flow cytometry로 확인한 그림.
- <153> 도 19는 MB-ODN 4/5#31을 B 세포주인 RPMI 8226 세포에 전 처리한 후 방사선 조사하였을 때, RPMI 8226 세포의 생존율이 증가하였음을 Annexin V 염색 후 Flow cytometry로 확인한 그림.

도면

도면1

Sequence	MB DNA (%)	EC DNA (%)	fold (MB/EC)
GGCGCC=	0.1462	0.0020	73.12
GCCGGC=	0.2317	0.0062	37.19
GTCGAC=	0.0890	0.0116	8.56
CTCGAG=	0.0299	0.0038	7.96
CCCGGG=	0.0645	0.0091	7.13
CACGTG=	0.0205	0.0030	6.74
CCCGAG=	0.0451	0.0069	6.58
CTCGGG=	0.0392	0.0068	5.75
GCCGAC=	0.1435	0.0297	4.83
GTCGGC=	0.1400	0.0295	4.74
CTCGGC=	0.1021	0.0217	4.71
GCCGAG=	0.1000	0.0218	4.58
GACGAG=	0.0493	0.0120	4.10
GCCCGC=	0.1781	0.0435	4.09
GACGTC=	0.0619	0.0151	4.09
GTCGAG=	0.0577	0.0166	4.08
GTCGTC=	0.0755	0.0192	3.93
CTCGAC=	0.0643	0.0165	3.90
CCCGAC=	0.0676	0.0175	3.86
CTCGTC=	0.0601	0.0130	3.86
CGCGGC=	0.1751	0.0455	3.85
GTCGGG=	0.0627	0.0165	3.79
TCCGAG=	0.0203	0.0054	3.78
GACGAC=	0.0747	0.0199	3.76
CTCGGA=	0.0202	0.0054	3.73
GCCGCC=	0.2336	0.0654	3.58
GCCGTC=	0.1008	0.0296	3.41
GGCGGC=	0.2237	0.0662	3.38
GCCGGT=	0.1302	0.0402	3.24
CCCGGC=	0.1183	0.0365	3.24
GACGGC=	0.1033	0.0327	3.16
CCCGC=	0.0624	0.0263	3.13
GCCGGG=	0.1165	0.0373	3.13
CGCGGG=	0.0849	0.0273	3.11
ACCGGC=	0.1242	0.0405	3.07
GGCGGG=	0.0882	0.0323	3.04
CCCGCC=	0.0895	0.0329	3.02
CGCGGT=	0.1117	0.0372	3.00
ACCGC=	0.1090	0.0368	2.97
ACCGAG=	0.0511	0.0175	2.92
GTCGGA=	0.0331	0.0118	2.80
GGCGAC=	0.1005	0.0360	2.80
CTCGGT=	0.0494	0.0178	2.78
GTCGCC=	0.1056	0.0383	2.76
GTCGC=	0.0884	0.0323	2.74
CACGTC=	0.0430	0.0158	2.73
TCCGAC=	0.0326	0.0121	2.70
CGCGAC=	0.0852	0.0320	2.66
<hr/>			
Average	0.0498	0.0288	
Sum	12.7440	7.3665	

도면2

a)

MB-ODN 4/5 (-CGXXCGXXXCG-)

No.	Sequence	Score
1	CTCCAcqGGcGCAcGCCA	11811
2	TGTCUcGqGGcGCAcGTTG	11773
3	CAAGGcGqGTCqGCTcGATGG	11538
4	AACTGcGqGAcqTGGcGqGCAg	10931
5	GTCAGcGqGAcqTGGcGqGCTC	10829
6	AAAGGcGqTGGcGGTcGqGCCC	10697
7	CTCAGcGqGGcGCAcTGCA	10670
8	CACRAcGqGGcGCTcGqGCTT	10319
9	ATGAAcGqGGcGCTcGqAGCC	10240
10	GATGGcGqATcGqGCAcGCCA	10199
11	CAGCAcGqTGGcTGGcGCAT	9962
12	GCTGGcGqGGcGqAGGcGqATTG	9855
13	TGTTGcGqCTcGqGCTcGqGCAg	9839
14	GGTGGcGqGTCqAGGcGqCTCT	9728
15	GGTGGcGqCAcGqCCcTcGqGCCC	9259
16	GGGGGcGqGTCqCCcTcGqCTAA	9250
17	GACATcGqGTCqGGcGqTCAG	9098
18	CCAGTcGqGGcGqGGGcGqCTGG	9022
19	TCTGGcGqGTCqAGGcGqGCCC	8953
20	CAAC TcGqATcGqGGGcGqCCCA	8878
21	TTTGGcGqGTCqGTGGcGqCAGC	8869
22	CCAGGcGqGTCqGTGGcGqCAGG	8869
23	CTCC TcGqGTCqAGGcGqGTGG	8844
24	ACCA TcGqGGcGqCCAcTCTC	8780
25	CAACAcGqATcGqTGGcGCTG	8615
<hr/>		
333	GTGTTcGqAAcGCTAcqAACC	1681
334	AAATAcGqAAcGATGcGqAGAA	1637
335	ACTAGcGqTAcqCAGcGqAATC	1539

b)

MB-ODN 5/5 (-CGXXXCGXXXCG-)

No.	Sequence	Score
1	TGCTcGqTGGcGqGCTcGqGCAG	12868
2	GAGGcGqGCTcGqGTGGcGqGGTC	12599
3	TTGGcGqGCAcGqCAcGqCCTC	11345
4	GAAGcGqTTGGcGGGcGqGCCC	11280
5	AAAGGcGqTGGcGqGCTcGqTGGGA	11258
6	CAGGcGqATGGcGCTcGqGCTC	10614
7	GTTGcGqGGcGqAGTcGqGCAT	10297
8	GGGGcGqGGTcGqAGTcGqACCA	10243
9	TGGTcGqGGGcGqGGTcGqACTC	10153
10	ATCAcGqCTAcqGGGcGqGCCA	10063
11	GTGGcGqCCAcqAGTcGqACAT	10059
12	AAAGGcGqGCTcGqCA TcGqATGG	10036
13	GAGGcGqGGGcGqGGTcGqATCT	9743
14	AAATcGqTGGcGqGCTcGqTGGGA	9712
15	CAGGcGqGTGGcGqGTGGcGqGCAT	9657
16	TAGGcGqCTTcGqAGTcGqGCAC	9655
17	GTGAcqTCAcqGGTcGqGCAG	9390
18	GCTTcGqGGTcGqGCAcGqCCAG	9269
19	GTGTcGqGGGcGqAGGcGqACCA	9164
20	TTGGcGqTTGGcGqTGGcGqGCTT	9034
21	TCATcGqATGGcGGGcGqCCAC	8959
22	GAGGcGqGGGcGqGGGcGqGAGA	8873
23	TAGGcGqATGGcGqCAGcGqCCTG	8845
24	CAGGcGqGTGGcGqGCAcGqCAGT	8703
25	CTGAcGqCCcTcGqGCTcGqAGCT	8642
<hr/>		
332	ATTAcqCTGcGqAAAcGqCAGT	1807
333	TAA TcGqAAcGqTAAcGqATCC	1713
334	CATGcGqTAAcGqTAAcGqAAA	1219

도면3

a)

MB-ODN 4/5 (-CGXXCGXXXCG-)

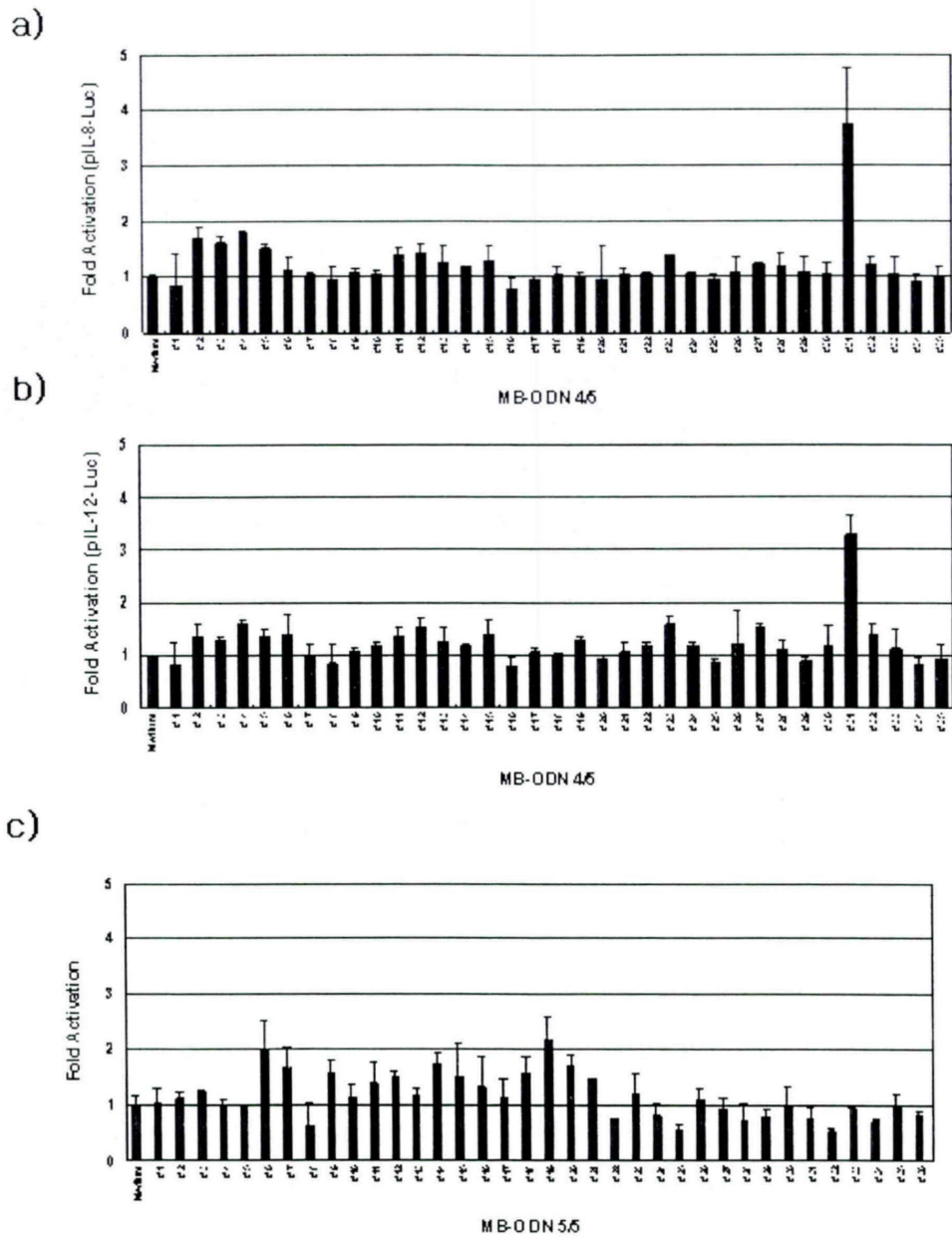
ODN	Sequence
MB-ODN4/5-1	CCAGTCGGGGCGGGCGGCTGC
MB-ODN4/5-2	GCTGGCGGGCGAGCGGATTC
MB-ODN4/5-3	ACCAGCGGGCGAGTCGCGCTG
MB-ODN4/5-4	GCTGGCGGGCGTTCGCGCATC
MB-ODN4/5-5	GGCAGCGGGCGCAGTCGCGCAG
MB-ODN4/5-6	CTTGGCGGGCGCTGCCAGCAG
MB-ODN4/5-7	AACTGGCGCAGCTGCCGCGCAG
MB-ODN4/5-8	GCTCAGCGCTCGGATCGGATTC
MB-ODN4/5-9	TTTGGCGGCTCGTTCGCGCAGC
MB-ODN4/5-10	GCTGGCGGCTCGAGCGGCTCTT
MB-ODN4/5-11	GCTGGCGGCTCGAGCGGCTCTT
MB-ODN4/5-12	TTTGTGGCTCGCAGCCGAAA
MB-ODN4/5-13	CACTCGCAGCGGATCGGCGCAG
MB-ODN4/5-14	TTGCTCGCAGCGGATCGGCGCAG
MB-ODN4/5-15	TTGCTCGCAGCGGATCGGCGCAG
MB-ODN4/5-16	AGCAGTCGAGCGCAGCGGCTGCT
MB-ODN4/5-17	GGCAGCGGCGCAGCCGAGCAGC
MB-ODN4/5-18	CTCAGTCGAGCGCAGCCGAGCAG
MB-ODN4/5-19	ATGCTCGAGCGGCTCGGCGCC
MB-ODN4/5-20	GGCTTCGAGCCGCTCGAGCGG
MB-ODN4/5-21	CACTGGCGAGCGGATCGGCTCT
MB-ODN4/5-22	CTTGTGGAGCGGCTCGGCGCAG
MB-ODN4/5-23	CACTCGGAGCGGATCGGCGCAG
MB-ODN4/5-24	CACTTCGATCGGAGCGGCGCC
MB-ODN4/5-25	CTAGCGGATCGGATCGGCGCAG
MB-ODN4/5-26	CAACAGGATCGGATCGGCGCTG
MB-ODN4/5-27	CTAGCGGATCGGAGCGGAGCT
MB-ODN4/5-28	CCACAGGATCGGAGCGGCTCG
MB-ODN4/5-29	GGCAGCGGCTCGGAGCGGCTCT
MB-ODN4/5-30	TAAAGCGGTCGCGGATCGGATCT
MB-ODN4/5-31	AGCAGCGGCTCGGATCGGCGCT
MB-ODN4/5-32	TGTTGGCGCAGGCTCGGCTCG
MB-ODN4/5-33	CTGGCGGCGCGGCGGCTCGG
MB-ODN4/5-34	GGCAGCGGCGCGGAGCGGCGCAG
MB-ODN4/5-35	CCAGCGGCTCGGATCGGCGCC

b)

MB-ODN 5/5 (-CGXXXCGXXXCG-)

ODN	Sequence
MB-ODN5/5-1	CACTCGCAGTCGCTCGGCTGC
MB-ODN5/5-2	CAGCGGCTCGCAGCCGCGCTG
MB-ODN5/5-3	CACTCGGCTCGCAGCCGCGCAG
MB-ODN5/5-4	CAGCGGCTCGCAGCCGCTGCT
MB-ODN5/5-5	CGAGCGGCTCGCAGCCGCGCAG
MB-ODN5/5-6	TGCTCGCAGCGCTTCGCGGCGC
MB-ODN5/5-7	ACAGCGCAGTCGCTCGGCGCAG
MB-ODN5/5-8	TAGCGCAGCCGAGTCGCGGCGC
MB-ODN5/5-9	TCAAGCAGCCGCTCGGCGCAG
MB-ODN5/5-10	ATCTCGCAGCCGCTCGGCGGCG
MB-ODN5/5-11	GCTCGCAGCTCGCTCGGCGCTC
MB-ODN5/5-12	TAGCGCAGTCGCGCAGCGGCTG
MB-ODN5/5-13	ATGCGCAGTCGCGTCCGCGCTG
MB-ODN5/5-14	GCTCGCAGCAGCTCGGATTCG
MB-ODN5/5-15	TGCTCGCTCGCGGCTCGGCGCAG
MB-ODN5/5-16	CCAGCTCGCGCAGTCGCGGCGCAG
MB-ODN5/5-17	CGATCTCGCGCAGCGGCTCG
MB-ODN5/5-18	TGCGAGCTCTCGGAGCGGCGCAG
MB-ODN5/5-19	CTCGCGCTAGCGGCTCGGCGCT
MB-ODN5/5-20	TTCGCGCTCGGCTCGGCGCT
MB-ODN5/5-21	AAAATCGCTCGGCGCAGCGGCT
MB-ODN5/5-22	ATCAGCTTCGCGCAGCGGCTG
MB-ODN5/5-23	AAAATCGCTCTCGAGCGGCTTC
MB-ODN5/5-24	CTCGCGCAGCGCTCGGCGCTCG
MB-ODN5/5-25	TGGCGCAGCGGCGCAGCGCTAG
MB-ODN5/5-26	TCTCGCGCAGCGGCTCGGCTGAG
MB-ODN5/5-27	TGGCGCAGCGGCTCGGAGCT
MB-ODN5/5-28	GCTTCGCGCAGCGCAGCGGCTG
MB-ODN5/5-29	TTCGCGCAGCGGCTCGGCGCAG
MB-ODN5/5-30	CGAGCGCAGCGGCTCGGCGCAG
MB-ODN5/5-31	ACAGCGCAGTCGCGGCTCGGCGCAG
MB-ODN5/5-32	AGCAGCGCTCGGCGGCTCGGCGCAG
MB-ODN5/5-33	CTCTCGGCTCGGCGCAGCGGCT
MB-ODN5/5-34	CTCTCGGCTCGGCGCAGCGGCT
MB-ODN5/5-35	CGGAGCGCTCGGCTCGGCGGCT
MB-ODN5/5-36	CTGAGCGCTCGGCTCGGAGCT

도면4

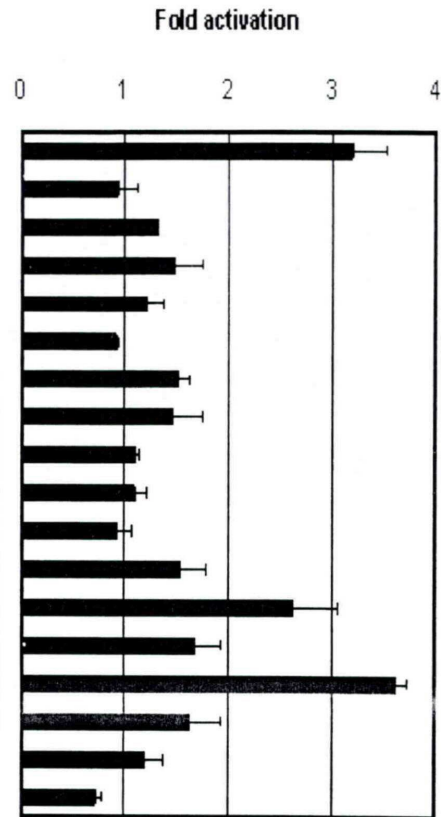


도면5

a)

ODN	Sequence
MB 4/5 #31	AGCAGCGTTCGTGTCGGCCT
#31.1	CAGCTCGTTCGTGTCGTGCT
#31.2	TGTGGCGTTCGTGTCGGTCT
#31.3	TGCACCGTTCGTGTCGCCAC
#31.4	GGCCACGTTCGTGTCGGTAG
#31.5	GACACCGTTCGTGTCGGAC
#31.6	CAGCACGTTCGTGTCGGACA
#31.7	TATGTCGTTCGTGTCGTCTT
#31.8	AGGGCGTTCGTGTCGCTTG
#31.9	ATTGCGTTCGTGTCGATTC
#31.10	GGTGGCGTTCGTGTCGTCRT
#31.11	ATGGCGTTCGTGTCGATCC
#31.12	GTATCGTTCGTGTCGTCCT
#31.13	GGGACCGTTCGTGTCGGTGC
#31.14	TGACTCGTTCGTGTCGCATG
#31.15	GTCATCGTTCGTGTCGAGAC
#31.16	TTGCACGTTCGTGTCGATGA
#31.17	CAGCACGTTCGTGTCGGTCA

b)

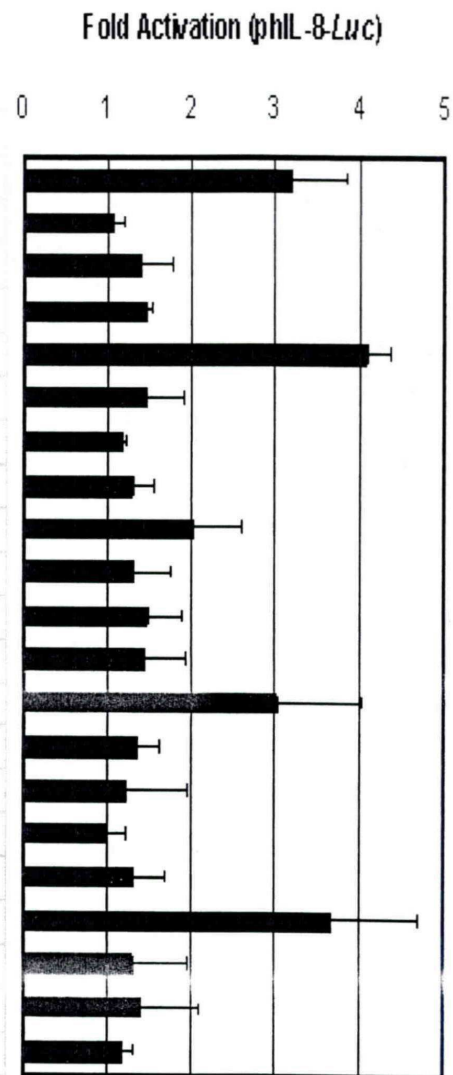


도면6

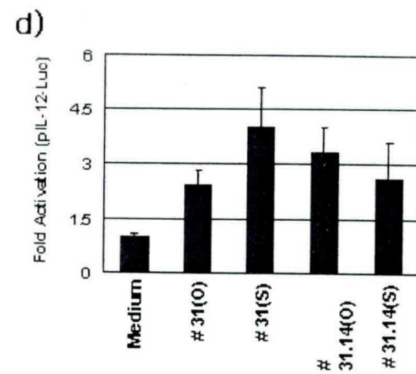
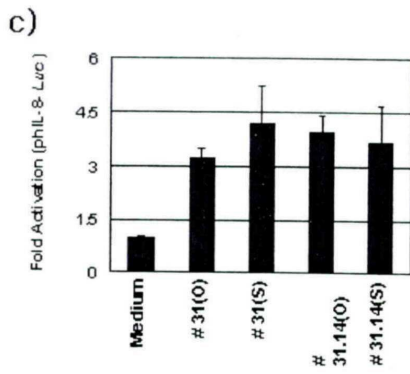
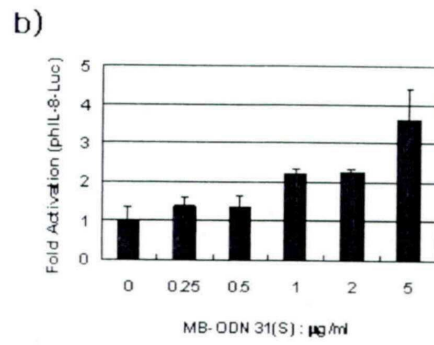
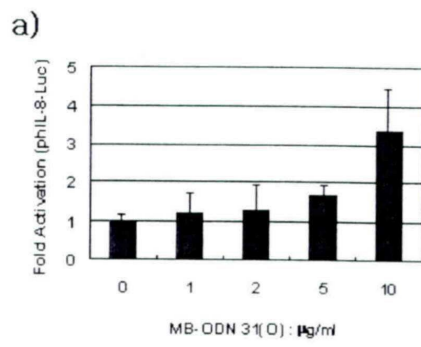
a)

ODN	Sequence
MB-ODN 31(D)	AGCAGCGTTTCGTGTCGGCCT
MB-ODN 31(M)	AGCGTTTCGTGTCGGC
#31-CG-1	AGCAGCGTTTCGTGTCGGCCT
#31-CG-2	AGCAGCGTTTCGTGTCGGCCT
#31-CG-3	AGCAGCGTTTCGTGTCGGCCT
#31-CG-4	AGCAGCGTTTCGTGTCGGCCT
#31-CG-5	AGCAGCGTTTCGTGTCGGCCT
#31-CG-6	AGCAGCGTTTCGTGTCGGCCT
#31-CG-7	AGCAGCGTTTCGTGTCGGCCT
#31-A-1	AGCAGCGTTTCGTGTCGGCCT
#31-A-2	AGCAGCGTTTCGTGTCGGCCT
#31-A-3	AGCAGCGTTTCGTGTCGGCCT
#31-B-1	AGCAGCGTTTCGTGTCGGCCT
#31-B-2	AGCAGCGTTTCGTGTCGGCCT
#31-B-3	AGCAGCGTTTCGTGTCGGCCT
#31-C-1	AGCAGCGTTTCGTGTCGGCCT
#31-C-2	AGCAGCGTTTCGTGTCGGCCT
#31-C-3	AGCAGCGTTTCGTGTCGGCCT
#31-D-1	AGCAGCGTTTCGTGTCGGCCT
#31-D-2	AGCAGCGTTTCGTGTCGGCCT
#31-D-3	AGCAGCGTTTCGTGTCGGCCT

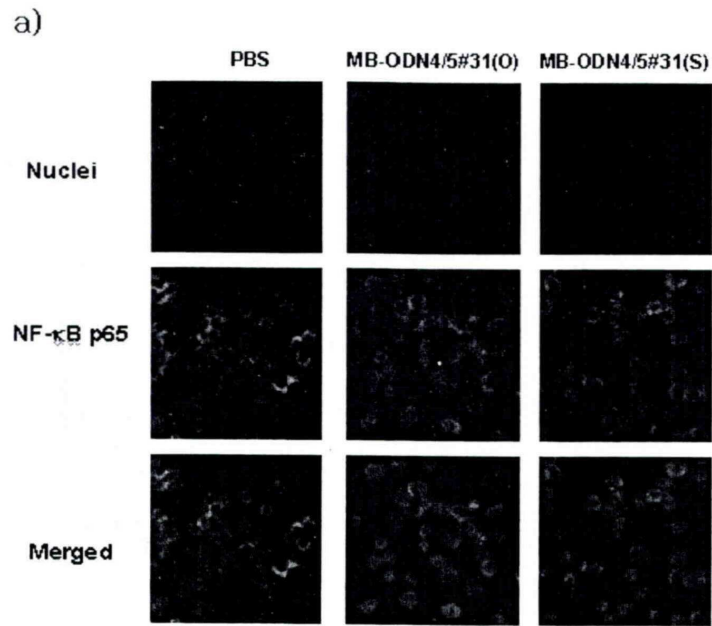
b)



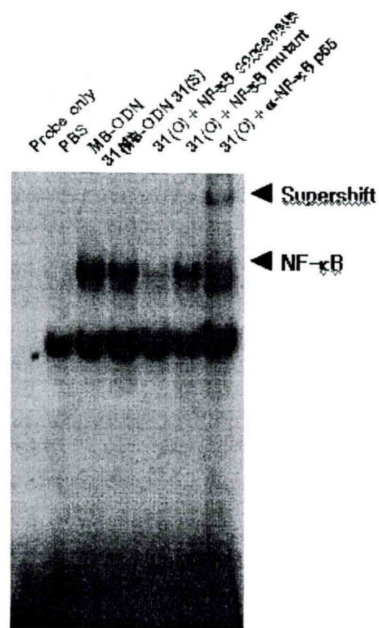
도면7



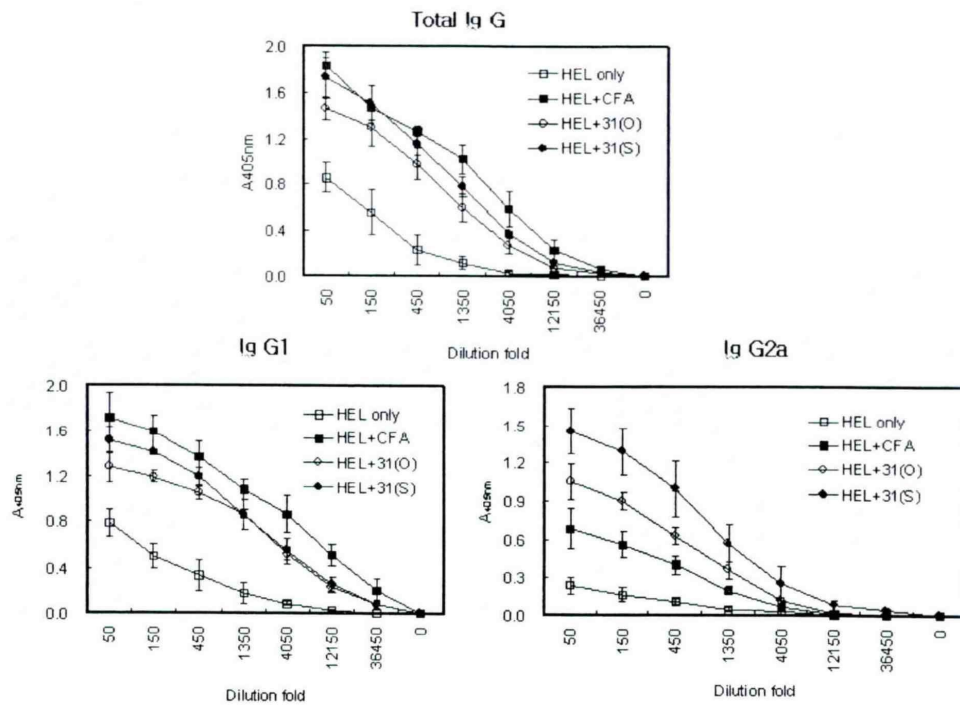
도면8



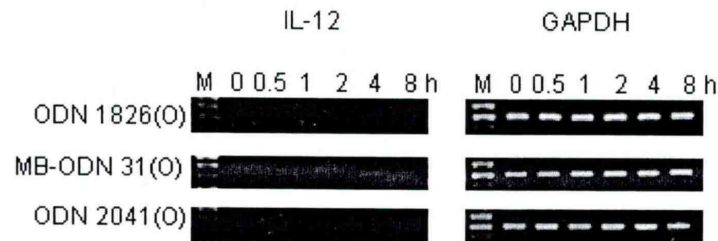
b)



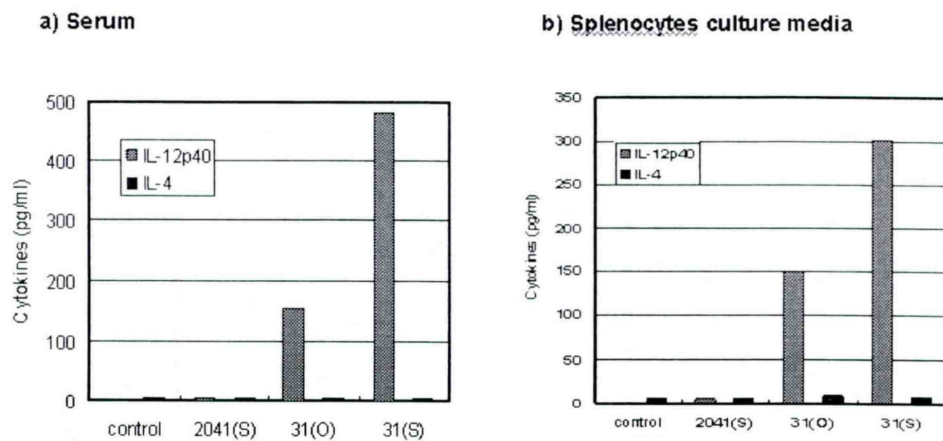
도면9



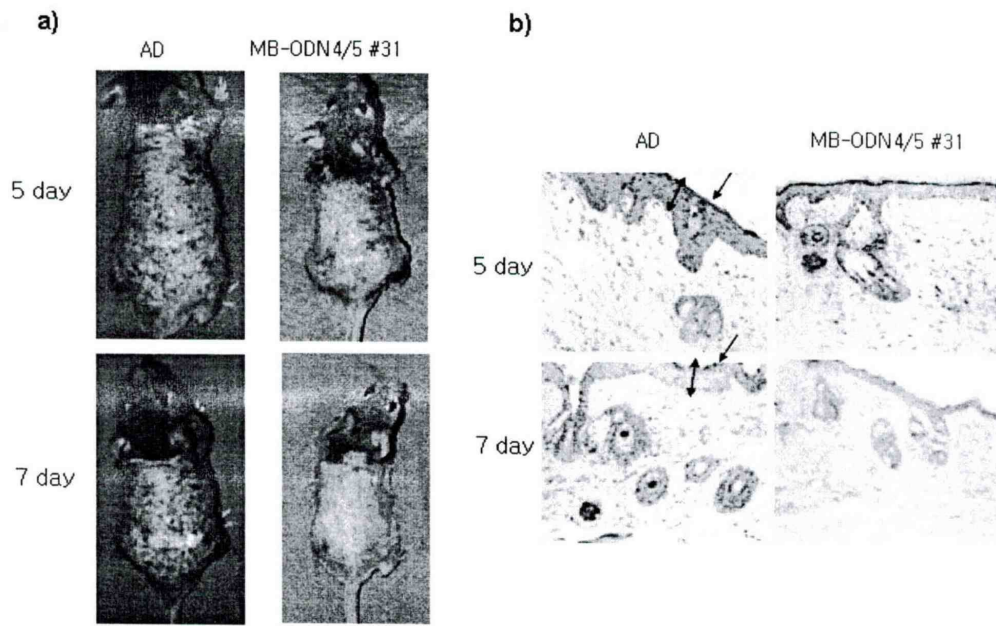
도면10



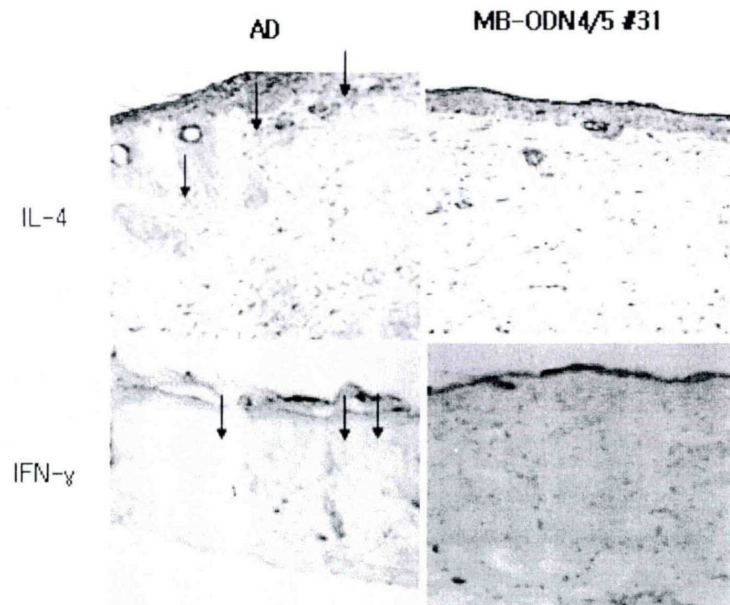
도면11



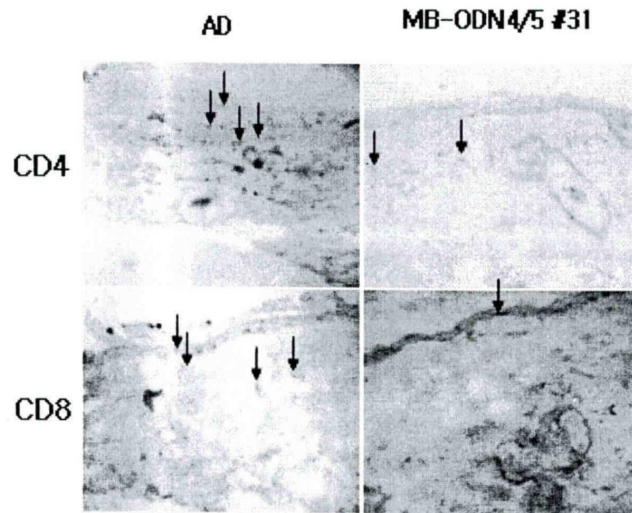
도면12



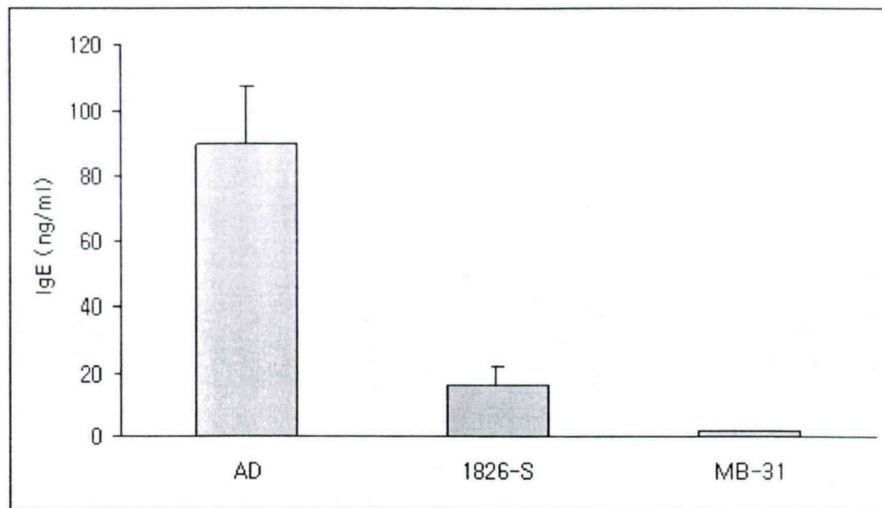
도면13



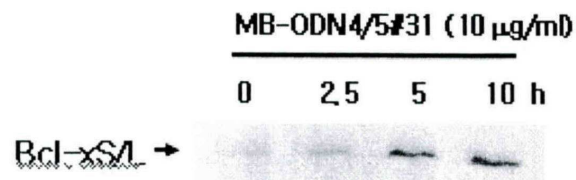
도면14



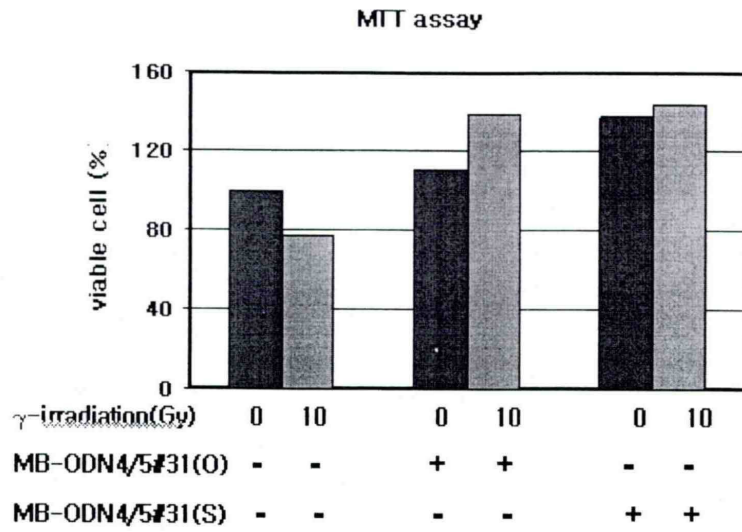
도면15



도면16



도면17



도면18

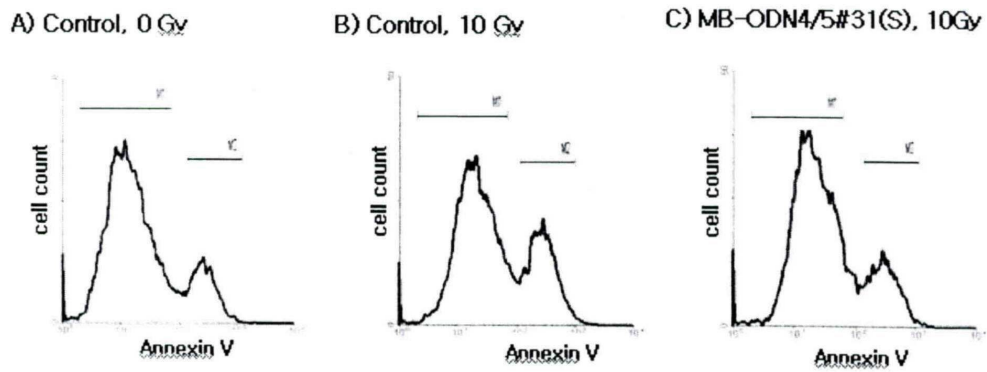


Fig.	γ -irradiation	MB-ODN 4/5 #31(S)	Marker	%Total
A	0 Gy	(-)	M1	73.54
			M2	16.709
B	10 Gy	(-)	M1	58.82
			M2	27.24
C	10 Gy	(+))	M1	65.25
			M2	18.71

도면19

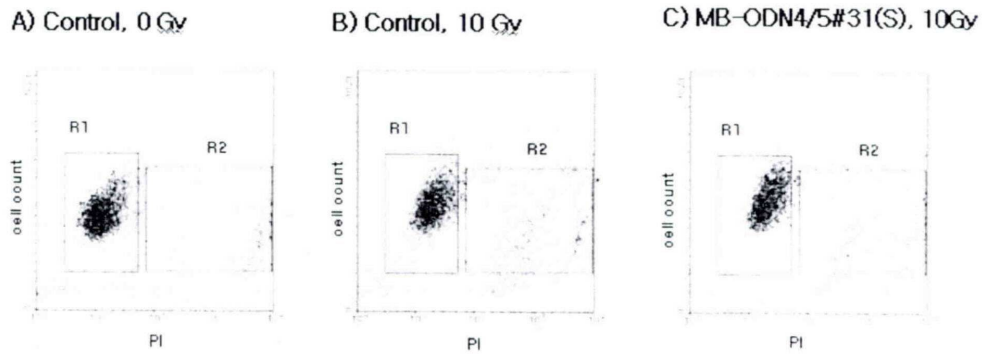


Fig.	γ - irradiation	MB-ODN 4/5 #31(s)	Region	%Total
A	0 Gy	(-)	R1 R2	73,30 16,32
B	10 Gy	(-)	R1 R2	58,93 25,33
C	10 Gy	(+)	R1 R2	62,82 20,92

서열 목록

<110> KWON, Hyung-Joo
KIM, Tae-Yoon

<120> OLIGONUCLEOTIDES DERIVED FROM MYCOBACTERIUM FOR STIMULATING IMMUNE FUNCTION, TREATING IMMUNE-RELATED DISEASES, ATOPIC DERMATITIS AND/OR PROTECTING NORMAL IMMUNE CELL

<160> 15

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> General formula of oligonucleotide

<400> 1

hkcgttcttg tcsqm

15

<210> 2
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> General sequence of oligonucleotide

<400> 2
 dknhkcggtc rtgtcsgmyk 20

<210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide

<400> 3
 agcagcggtc gtgtcggcct 20

<210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide

<400> 4
 agcagcggtc gtgtcggcct 20

<210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide

<400> 5
agcagcggtc atgtcggcct 20

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide

<400> 6
agcagcggtc gtgtcgcct 20

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide

<400> 7
gtattcgttc gtgtcgtcct 20

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide

<400> 8
tgactcgttc gtgtcgcctg 20

<210> 9
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> 5' Primer for IL-8

<400> 9
 gtgagatctg aagtgtgatg actcagg 27

<210> 10
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> 3' Primer for IL-8

<400> 10
 gtgaagcttg aagcttgtgt gctctgc 27

<210> 11
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> 5' Primer for IL-12

<400> 11
 catgagctca gcctcccgtc tgacc 25

<210> 12
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> 3' Primer for IL-12

<400> 12
ctgggctcga gggagagtcc aatgg 25

<210> 13
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> NF-kB competitor

<400> 13
agttgagggg actttcccag gc 22

<210> 14
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer for IL-12

<400> 14
ctggtgcaaa gaaacatgg 19

<210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse primer for IL-12

<400> 15
tggtttgatg atgtccctga 20