(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0048594
(43) 공개일자 2025년04월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/117 (2010.01) *A61K 39/39* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/117 (2013.01)
A61K 39/39 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2025-7009617(분할)
(22) 출원일자(국제) 2018년12월07일
심사청구일자 2025년03월24일
(62) 원출원 특허 10-2020-7020349
원출원일자(국제) 2018년12월07일
심사청구일자 2021년12월06일
(85) 번역문제출일자 2025년03월24일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2018/084019
(87) 국제공개번호 WO 2019/115402
국제공개일자 2019년06월20일
(30) 우선권주장
17207740.6 2017년12월15일
유럽특허청(EPO)(EP)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
엘랑코 애니멀 헬스 게엄베하
독일 40789 몬하임 암 라인 알프레드-노벨-슈트라쎄 50
(72) 발명자
일크, 토마스
독일 40789 몬하임 플뢰첸시어 슈트라쎄 16
(74) 대리인
장덕순, 이윤기

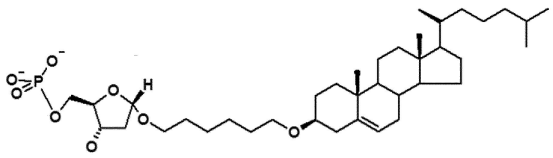
전체 청구항 수 : 총 31 항

(54) 발명의 명칭 **면역자극성 올리고뉴클레오티드**

(57) 요 약

톨-유사 수용체 9 (TLR9)를 자극하기 위한 조성물 및 방법이 제공된다. 보다 특히, 면역자극성 올리고뉴클레오티드, 올리고뉴클레오티드의 면역자극 특성을 증강시키는 방법, 및 면역 반응을 유발하는 방법이 본원에 개시된다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61P 37/04 (2018.01)
C07H 21/00 (2013.01)
A61K 2039/55555 (2013.01)
A61K 2039/55561 (2013.01)
A61K 2039/60 (2013.01)
C12N 2310/17 (2013.01)
C12N 2310/315 (2013.01)
C12N 2310/3341 (2013.01)
C12N 2310/3515 (2013.01)

(30) 우선권주장
17207746.3 2017년12월15일
유럽특허청(EPO)(EP)
17207750.5 2017년12월15일
유럽특허청(EPO)(EP)

명 세 서

청구범위

청구항 1

적어도 하나의 CpG 모티프 및 3' 콜레스테릴 모이어티를 포함하는 면역자극성 올리고뉴클레오티드로서,

여기서 면역자극성 올리고뉴클레오티드는 복수개의 티민 뉴클레오티드를 포함하는 3' 말단 서열을 추가로 포함하는 면역자극성 올리고뉴클레오티드.

청구항 2

제1항에 있어서, 올리고뉴클레오티드가 면역자극성 올리고뉴클레오티드의 뉴클레오티드 사이에 포스포디에스테르 연결 또는 포스포로티오에이트 연결을 포함하는 것인, 면역자극성 올리고뉴클레오티드.

청구항 3

제1항에 있어서, 콜레스테릴 모이어티가 링커를 통해 면역자극성 올리고뉴클레오티드의 3'-말단 뉴클레오티드에 공유 부착되는 것인, 면역자극성 올리고뉴클레오티드.

청구항 4

제1항에 있어서, 복수개의 티민 뉴클레오티드가 연속적 티민 뉴클레오티드를 포함하는 것인, 면역자극성 올리고뉴클레오티드.

청구항 5

제1항에 있어서, 복수개의 티민 뉴클레오티드가 4 내지 6개의 연속적 티민 뉴클레오티드를 포함하는 것인, 면역자극성 올리고뉴클레오티드.

청구항 6

제1항에 있어서, 3' 말단 서열이 서열식별번호: 9를 포함하는 것인, 면역자극성 올리고뉴클레오티드.

청구항 7

제1항에 있어서, 서열식별번호: 2, 3, 4, 5, 6 또는 8의 핵산 서열을 포함하는, 면역자극성 올리고뉴클레오티드.

청구항 8

제1항에 있어서, 3' 말단 서열이 TTTT인, 면역자극성 올리고뉴클레오티드.

청구항 9

제1항에 있어서, 면역자극성 올리고뉴클레오티드의 3' 말단 서열이 복수개의 구아닌 뉴클레오티드를 포함하는 것인, 면역자극성 올리고뉴클레오티드.

청구항 10

제9항에 있어서, 복수개의 구아닌 뉴클레오티드가 연속적 구아닌 뉴클레오티드를 포함하는 것인, 면역자극성 올리고뉴클레오티드.

청구항 11

제9항에 있어서, 3' 말단 서열이 GGGGG인, 면역자극성 올리고뉴클레오티드.

청구항 12

제9항에 있어서, 서열식별번호: 7의 핵산 서열을 포함하는, 면역자극성 올리고뉴클레오티드.

청구항 13

제1항에 있어서, $(TCG)_n$을 포함하고, 여기서 n은 3 내지 10인, 면역자극성 올리고뉴클레오티드.

청구항 14

제3항에 있어서, 링커가 탄소 쇄를 포함하는 것인, 면역자극성 올리고뉴클레오티드.

청구항 15

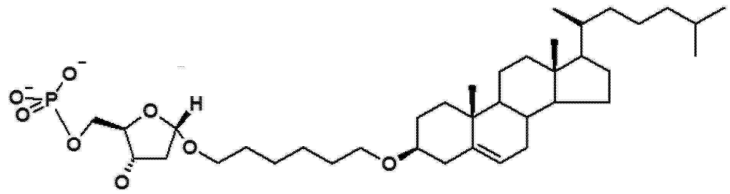
제14항에 있어서, 탄소 쇄가 3 내지 12개의 탄소 원자를 포함하는 것인, 면역자극성 올리고뉴클레오티드.

청구항 16

제15항에 있어서, 링커가 헥산디올을 포함하는 것인, 면역자극성 올리고뉴클레오티드.

청구항 17

제1항에 있어서, 하기 구조를 갖는 콜레스테릴-링커 모이어티를 포함하는, 면역자극성 올리고뉴클레오티드:



.

청구항 18

제3항에 있어서, 링커가 반복 화학 단위를 포함하는 것인, 면역자극성 올리고뉴클레오티드.

청구항 19

제18항에 있어서, 반복 화학 단위가 2회 내지 12회 반복되는 것인, 면역자극성 올리고뉴클레오티드.

청구항 20

제18항에 있어서, 반복 화학 단위가 에틸렌 글리콜인, 면역자극성 올리고뉴클레오티드.

청구항 21

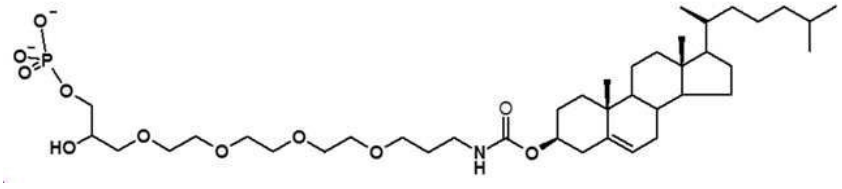
제18항에 있어서, 링커가 헥사에틸렌 글리콜을 포함하는 것인, 면역자극성 올리고뉴클레오티드.

청구항 22

제1항에 있어서, 콜레스테릴 모이어티가 링커에 공유 결합되어 콜레스테릴-링커 모이어티를 형성하는 것인, 면역자극성 올리고뉴클레오티드.

청구항 23

제22항에 있어서, 하기 구조를 갖는 콜레스테릴-링커 모이어티를 포함하는, 면역자극성 올리고뉴클레오티드:



.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항의 면역자극성 올리고뉴클레오티드 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 면역자극성 조성물.

청구항 25

제24항에 있어서, 벡터를 추가로 포함하는, 면역자극성 조성물.

청구항 26

제25항에 있어서, 벡터가 바이러스 벡터인, 면역자극성 조성물.

청구항 27

제26항에 있어서, 올리고뉴클레오티드가 바이러스 벡터 내부에 패키징되는 것인, 면역자극성 조성물.

청구항 28

제24항에 있어서, 제약상 허용되는 담체가 희석제, 아주반트, 부형제 또는 비히클인, 면역자극성 조성물.

청구항 29

제24항에 있어서, 올리고뉴클레오티드 및 제약상 허용되는 담체가 공유 커플링된 것인, 면역자극성 조성물.

청구항 30

제24항에 있어서, 합텐을 추가로 포함하는, 면역자극성 조성물.

청구항 31

제30항에 있어서, 올리고뉴클레오티드 및 합텐이 공유 커플링된 것인, 면역자극성 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원에 대한 참조

[0002] 본 출원은 각각 2017년 12월 15일에 출원된 유럽 특허 출원 번호 EP17207740.6, EP17207746.3, 및 EP17207750.5를 우선권 주장하며, 이들 출원의 개시내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 서열 목록

[0004] 본 출원은 ASCII 포맷으로 전자적으로 제출되었고 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 서열 목록을 함유한다. 2018년 11월 27일에 창출된, 상기 ASCII 카피는 103976.000119 SEQ LISTING_ST25.txt로 명명되고 그 크기가 2,233 바이트이다.

[0005] 발명의 분야

[0006] 톨-유사 수용체 9 (TLR9)를 자극하기 위한 조성물 및 방법이 제공된다. 보다 특히, 면역자극성 올리고뉴클레오티드, 올리고뉴클레오티드의 면역자극 특성을 증강시키는 방법, 및 면역 반응을 유발하는 방법이 본원에 개시되어 있다.

배 경 기 술

[0007] 항생제 내성은 수많은 산업에 부정적인 영향을 미치는 세계적인 문제이다. 메티실린 내성 스타필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) (MRSA) 및 다른 "슈퍼 버그"는 병원과 의사 사무실에서 큰 혼란을 야기하여, 의료 센터를 방문하는 것이 잠재적으로 치명적인 것으로 만든다. 농업 산업에서도 유사한 문제가 있다. 제한된 공간과 비-멸균 환경으로 인해 전체 무리가 병원성 감염에 걸릴 위험이 있다. 예를 들어, 한 무리의 아픈 젖소는 무리와 가까운 거리에서 이환율과 사망률을 기하 급수적으로 증가시킬 수 있다. 감염의 위험에도 불구하고, 항생제 치료는 비용 증가와 항생제에 노출되지 않은 육류 및 유제품을 요구하는 소비자들로 인해 더욱 불리해지

고 있다. 그리고, 항생제 요법을 사용하는 생산자들은 광범위한 스펙트럼의 항생제조차도 무리와 접촉할 수 있는 모든 병원체에 대항하여 완전히 효과적이지는 않다는 것을 이해하고 있다.

[0008] 따라서, 동물에서의 감염을 치료 또는 예방하기 위한 비-항생제 기반 요법이 필요하다. 개시된 조성물 및 방법은 이들 및 다른 중요한 요구에 관한 것이다.

발명의 내용

[0009] 적어도 하나의 CpG 모티프 및 3' 콜레스테릴 모이어티를 포함하는 면역자극성 올리고뉴클레오티드가 본원에 개시된다.

[0010] 면역자극성 올리고뉴클레오티드를 포함하는 면역자극성 조성물이 또한 본원에 제공된다.

[0011] 또한 TLR9 리간드의 면역원성을 증강시키는 방법으로서, 링커를 통해 콜레스테릴 모이어티를 TLR9 리간드의 3' 말단에 부착시키는 것을 포함하며, 여기서 TLR9 리간드는 적어도 하나의 CpG 모티프를 갖는 올리고뉴클레오티드인 방법이 개시된다.

[0012] 대상체에서 TLR9 매개된 면역 반응을 유발하는 방법으로서, 대상체에게 본원에 기재된 면역자극성 올리고뉴클레오티드 또는 면역자극성 조성물 중 어느 하나를 투여하는 것을 포함하는 방법이 또한 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0013] 하기의 상세한 설명 뿐만 아니라 발명의 내용은 첨부 도면과 연계해서 판독할 때 추가로 이해된다. 개시된 조성물 및 방법을 예시하기 위해, 조성물 및 방법의 예시적인 실시양태가 본 도면에 도시되어 있으며; 그러나, 조성물 및 방법은 개시된 구체적 실시양태로 제한되지는 않는다. 본 도면에서:

도 1은 헥산디올 링커에 부착된 콜레스테릴 모이어티의 화학 구조를 도시한다.

도 2a 및 2b는 HEK블루-hTLR9 세포에서 올리고뉴클레오티드 PTO-2006, 3' TTTTGGGGGTTTT (서열식별번호(SEQ ID NO): 9) 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드 PDE-2006 ("2006-3dT4G5T4"), 및 도 1에 제시된 헥산디올 링커를 통해 부착된 3' 콜레스테릴 모이어티를 갖는 올리고뉴클레오티드 2006-3dT4G5T4 ("2006-3dT4G5T43C")의 TLR9 자극 활성을 비교한 것이다.

도 3은 HEK블루-hTLR9 세포에서 3' TTTT 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드 PDE-2006 ("2006-T4-PDE"), 및 도 1의 헥산디올 링커를 통해 올리고뉴클레오티드의 3' 말단에 부착된 콜레스테릴 모이어티를 갖는 올리고뉴클레오티드 2006-T4-PDE ("3Chol-2006-T4-PDE")의 TLR9 매개된 면역 반응을 유발할 수 있는 능력을 도시한다.

도 4a 및 4b는 올리고뉴클레오티드 2006-3dT4G5T4 및 올리고뉴클레오티드 2006-3dT4G5T4C의 TLR9 자극성 특징을 비교한 것이다.

도 5는 올리고뉴클레오티드 2006-3dT4G5T4 및 올리고뉴클레오티드 2006-3dT4G5T4C의 TLR9 자극성 특징을 비교한 것이다.

도 6은 헥사에틸렌 글리콜 링커에 부착된 콜레스테릴 모이어티의 화학 구조를 도시한다.

도 7은 올리고뉴클레오티드 2006-T4G5T4, 및 3' 말단에 부착된 도 6의 콜레스테릴-링커 모이어티를 갖는 올리고뉴클레오티드 2006-T4G5T4 ("2006-T4G5T4-3Chol" 또는 "2006-T4G5T4-3C")의 TLR9 자극 능력을 비교한 것이다.

도 8a 및 8b는 3' 콜레스테릴 변형을 수반한 경우 및 수반하지 않은 경우의 올리고뉴클레오티드의 면역원성을 비교한 것이다. **도 8a**는 HEK블루-hTLR9 세포에서 TLR9 매개된 면역 반응을 유발할 수 있는 올리고뉴클레오티드 2007-PDE-T4 올리고뉴클레오티드의 능력을, 도 1의 헥산디올 링커를 통해 부착된 콜레스테릴 모이어티를 갖는 올리고뉴클레오티드 2007-PDE-T4 올리고뉴클레오티드 ("2007-PDE-T4-3Ch")의 능력과 비교한 것이고, **도 8b**는 HEK블루-hTLR9 세포에서, 3' GGGGGTTTT 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드 2007-PDE-T4 ("2007-T4G5T4")와, 도 1에 제시된 헥산디올 링커를 통해 부착된 콜레스테릴 모이어티를 갖는 올리고뉴클레오티드 2007-T4G5T4 ("2007-T4G5T4-3Ch")의 능력을 비교한 것이다.

도 9a 및 9b는 3' 콜레스테릴 변형을 수반한 경우 및 수반하지 않은 경우의 올리고뉴클레오티드의 면역원성을 비교한 것이다. 보다 구체적으로, **도 9a**는 라모스-블루(Ramos-Blue) 세포에서 TLR9 매개된 면역 반응을 통한 2006-PTO, 2006-3dT4G5T4, 및 2006-3dT4G5T4C 올리고뉴클레오티드의 면역원성을 예시하고, **도 9b**는 보다 좁은 농도 범위에 걸쳐 **도 9a**에 도시된 결과를 예시한다.

도 10a 및 10b는 라모스-블루 세포에서 TLR9 매개된 면역 반응을 유발할 수 있는, 헥산디올 링커를 통해 부착된 3' 콜레스테릴 모이어티를 갖거나 또는 갖지 않는 올리고뉴클레오티드의 능력을 비교한 것이다. 보다 구체적으로, **도 10a**는 TLR9 매개된 면역 반응을 유발할 수 있는 올리고뉴클레오티드 2006-3dT4G5T4 및 2006-3dT4G5T4C의 상대적 능력을 예시한다. **도 10b**는 보다 좁은 농도 범위에 걸쳐 **도 10a**의 결과를 예시한다.

도 11은 라모스-블루에서 올리고뉴클레오티드 2006-T4-PDE, 및 도 1에 제시된 헥산디올 링커를 통해 부착된 3' 콜레스테릴 모이어티를 갖는 올리고뉴클레오티드 2006-T4-PDE ("3Chol-2006-T4-PD")의 면역원성을 비교한 것이다.

도 12는 올리고뉴클레오티드 2006-3dT4G5T4와 올리고뉴클레오티드 2006-3dT4G5T4-3Chol의 라모스-블루 세포에서의 TLR9 매개된 면역 반응을 유발할 수 있는 능력을 비교한 것이다.

도 13a, 13b, 및 13c는 라모스-블루 세포에서 TLR9를 자극할 수 있는, 올리고뉴클레오티드의 3' 말단에 부착된 콜레스테릴 모이어티를 갖거나 또는 갖지 않는, 2007-PDE-T4, 2007-T4G5T4, 및 TCG8-T4 올리고뉴클레오티드의 능력을 비교한 것이다. **도 13a**는 올리고뉴클레오티드 2007-PDE-T4 및 2007-PDE-T4-Ch3의 상이한 면역원성을 예시한다. **도 13b**는 올리고뉴클레오티드 2007-T4G5T4 및 2007-T4G5T4-3Ch의 상이한 면역원성을 예시한다. **도 13c**는 올리고뉴클레오티드 TCG8-T4 및 TCG8-T4-Ch3의 상이한 면역원성을 예시한다.

도 14a, 14b, 14c, 및 14d는 HEK블루-mTLR9 세포에서 마우스 TLR9 ("mTLR9")에 대한 몇 가지 올리고뉴클레오티드 및 콜레스테릴 변형된 올리고뉴클레오티드의 자극 활성을 비교한 것이다. **도 14a**는 비변형된 2007-PDE-T4 올리고뉴클레오티드 및 올리고뉴클레오티드 2007-PDE-T4-3Ch의 HEK블루-mTLR9 세포에서의 TLR9 매개된 반응을 유발할 수 있는 능력을 비교한 것이다. **도 14b**는 HEK블루-mTLR9 세포에서 TLR9 매개된 반응을 유발할 수 있는 비변형된 2007-T4G5T4 올리고뉴클레오티드 및 올리고뉴클레오티드 2007-T4G5T4-3Ch의 능력을 비교한 것이다. **도 14c**는 HEK블루-mTLR9 세포에서 TLR9 매개된 반응을 유발할 수 있는 올리고뉴클레오티드 TCG8-T4 및 올리고뉴클레오티드 TCG8-T4-3Ch의 능력을 비교한 것이고; **도 14d**는 HEK블루-mTLR9 세포에서 TLR9 매개된 반응을 유발할 수 있는, TCG8-T4G5T4 올리고뉴클레오티드 및 도 1에 제시된 헥산디올 링커를 통해 부착된 3' 콜레스테릴 모이어티를 갖는 올리고뉴클레오티드 TCG8-T4G5T4 ("TCG8-T4G5T4-3Ch")의 능력을 비교한 것이다.

도 15는 헥사에틸렌 글리콜 링커에 부착된 콜레스테릴 모이어티의 화학 구조를 도시한다.

도 16a, 16b, 16c, 및 16d는 TLR9 매개된 면역 반응을 유발할 수 있는 올리고뉴클레오티드의 능력에 대한, 콜레스테릴 모이어티를 갖는 올리고뉴클레오티드의 3' 또는 5' 말단를 변형시킨 것의 효과를 도시한다. **도 16a**는 HEK블루-hTLR9 세포에서 올리고뉴클레오티드 2006-PDE-T4, 2006-PDE-T4-Chol, 및 도 15에 제시된 헥사에틸렌 글리콜 링커를 통해 부착된 5' 콜레스테릴 모이어티를 갖는 올리고뉴클레오티드 2006-PDE-T4 ("2006-PDE-T4-5Chol")의 TLR9를 자극할 수 있는 능력을 그래프로 도시한다. **도 16b**는 HEK블루-hTLR9 세포에서 올리고뉴클레오티드 2006-PTO, GGGGG 3' 말단 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드 2006-PDE ("2006-G5"), 도 6에 제시된 헥사에틸렌 글리콜 링커를 통해 부착된 3' 콜레스테릴 모이어티를 갖는 올리고뉴클레오티드 2006-G5 ("2006-G5-3Chol"), 및 도 15에 제시된 헥사에틸렌 글리콜 링커를 통해 부착된 5' 콜레스테릴 모이어티를 갖는 올리고뉴클레오티드 2006-G5 ("2006-G5-5Chol")의 TLR9를 자극할 수 있는 능력을 그래프로 도시한다. **도 16c**는 HEK블루-hTLR9 세포에서 올리고뉴클레오티드 2006-PTO, 2006-T4G5T4, 2006-T4G5T4-3Chol, 및 도 15에 제시된 헥사에틸렌 글리콜 링커를 통해 부착된 5' 콜레스테릴 모이어티를 갖는 올리고뉴클레오티드 2006-T4G5T4 ("2006-T4G5T4-5Chol")의 TLR9 매개된 면역 반응을 자극할 수 있는 능력을 그래프로 도시한다. **도 16d**는 HEK블루-hTLR9 세포에서 올리고뉴클레오티드 TCG8-T4G5T4, 도 6에 제시된 헥사에틸렌 글리콜 링커를 통해 부착된 3' 콜레스테릴 모이어티를 갖는 올리고뉴클레오티드 TCG8-T4G5T4 ("TCG8-T4G5T4-3Chol"), 및 도 15에 제시된 헥사에틸렌 글리콜 링커를 통해 부착된 5' 콜레스테릴 모이어티를 갖는 올리고뉴클레오티드 TCG8-T4G5T4 ("TCG8-T4G5T4-5Chol")의 TLR9 매개된 면역 반응을 자극할 수 있는 능력을 그래프로 도시한다.

도 17a, 17b, 17c, 및 17d는 콜레스테릴 모이어티로 올리고뉴클레오티드의 3' 또는 5' 말단를 변형시킨 것의 효과를 도시한다. **도 17a**는 라모스-블루 세포에서 올리고뉴클레오티드 2006-PDE-T4, 2006-PDE-T4-Chol, 및 2006-PDE-T4-5Chol의 TLR9를 자극할 수 있는 능력을 그래프로 도시한다. **도 17b**는 라모스-블루 세포에서 올리고뉴클레오티드 2006-PTO, 2006-G5, 2006-G5-3Chol, 및 2006-G5-5Chol의 TLR9를 자극할 수 있는 능력을 그래프로 도시한다. **도 17c**는 라모스-블루 세포에서 올리고뉴클레오티드 2006-PTO, 2006-T4G5T4, 2006-T4G5T4-3Chol, 및 올리고뉴클레오티드 2006-T4G5T4-5Chol의 TLR9 매개된 면역 반응을 자극할 수 있는 능력을 그래프로 도시한다. **도 17d**는 라모스-블루 세포에서 올리고뉴클레오티드 TCG8-T4G5T4, TCG8-T4G5T4-3Chol, 및 TCG8-

T4G5T4-5Chol의 TLR9 매개된 면역 반응을 자극할 수 있는 능력을 그래프로 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 개시된 조성물 및 방법은 본 개시내용의 일부를 형성하는 첨부 도면과 연계해서 취해진 하기 상세한 설명을 참조함으로써 보다 쉽게 이해될 수 있다. 개시된 조성물 및 방법은 본원에 기재되고/거나 제시된 구체적 조성물 및 방법으로 제한되지는 않으며, 본원에 사용된 용어는 특별한 실시양태를 단지 예로서 설명하기 위한 것이며 청구된 조성물 및 방법을 제한하는 것으로 의도된 것이 아님을 이해해야 한다.

[0015] 달리 구체적으로 언급되지 않는 한, 가능한 작용 메카니즘 또는 모드 또는 개선 이유에 대한 임의의 설명은 단지 예시적인 것으로 의도되며, 개시된 조성물 및 방법은 이러한 임의의 제안된 작용 메카니즘 또는 모드 또는 개선 이유의 정확성 또는 부정확성에 의해 제한되지는 않아야 한다.

[0016] 본 명세서 전체에 걸쳐, 설명은 조성물 및 이러한 조성물을 사용하는 방법을 지칭한다. 본 개시내용이 조성물과 연관된 특색 또는 실시양태를 기재하거나 청구하는 경우, 그러한 특색 또는 실시양태는 상기 조성물을 사용하는 방법에도 동일하게 적용가능하다. 마찬가지로, 본 개시내용이 조성물을 사용하는 방법과 연관된 특색 또는 실시양태를 기재하거나 청구하는 경우, 그러한 특색 또는 실시양태는 조성물에도 동일하게 적용가능하다.

[0017] 값의 범위가 표현될 때, 또 다른 실시양태는 하나의 특별한 값 및/또는 다른 특별한 값을 포함한다. 추가로, 범위에 언급된 값에 대한 언급은 그 범위 내의 각각의 모든 값을 포함한다. 모든 범위는 포괄적이며 조합가능하다. 값이 선행 "약"을 사용하여 근사치로서 표현될 때, 특별한 값은 또 다른 실시양태를 형성하는 것으로 이해될 것이다. 문맥상 명백하게 달리 지시되지 않는 한, 특별한 수치에 대한 언급은 적어도 그러한 특별한 값을 포함한다.

[0018] 명확성을 위해, 별도의 실시양태의 맥락에서 본원에 기재되는 개시된 조성물 및 방법의 특정 특색이 또한 단일 실시양태에서 조합하여 제공될 수 있음을 인지해야 한다. 반대로, 간결하게 하기 위해, 단일 실시양태의 맥락에서 기재되는 개시된 조성물 및 방법의 다양한 특색이 또한 별도로 또는 임의의 하위 조합으로 제공될 수 있다.

[0019] 본원에 사용된 바와 같은, 단수 형태는 복수 형태를 포함한다.

[0020] 본원에 사용된 바와 같은, "CpG 모티프"는 시토신-구아닌 디뉴클레오티드 서열을 지칭한다. 본원에 기재된 면역자극성 핵산은 비메틸화된 경우에 톨-유사 수용체 단백질 (TLR)과 상호작용하고 면역 반응을 유발할 수 있는 하나 이상의 CpG 모티프를 함유한다.

[0021] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "대상체"는 임의의 동물, 특히 포유동물, 및 임의의 유형의 조류, 포유동물, 또는 수생 종을 개시된 방법을 사용하여 치료할 수 있다는 것을 의미하고자 한다.

[0022] 설명의 측면과 관련한 다양한 용어가 본 명세서 및 청구범위 전체에 걸쳐 사용된다. 이러한 용어는 달리 표시되지 않는 한 관련 기술분야에서 통상적인 의미를 부여받는다. 다른 구체적으로 정의된 용어는 본원에 제공된 정의와 일치하는 방식으로 해석되어야 한다.

[0023] 적어도 하나의 CpG 모티프 및 3'-말단 콜레스테릴 모이어티를 포함하는 면역자극성 올리고뉴클레오티드가 본원에 개시된다. 올리고데옥시뉴클레오티드 (ODN) 내의 CpG 모티프는 포유동물에서 면역 반응을 유발할 수 있는 것으로 이미 밝혀졌다. 일부 경우에, CpG 모티프는 톨-유사 수용체 (TLR)에 의해 인식된다. CpG 인식 TLR의 예는 TLR9의 포유동물 상동체를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 따라서, 본 개시내용의 일부 측면에서, CpG 인식 TLR은 마우스, 인간, 소, 돼지, 말, 또는 양 TLR9 상동체이다. ODN의 면역원성은 감수성 집단 또는 감염된 개체에서 감염을 피할 수 있는 면역 반응을 유발하기에 충분하지 않을 수 있다. 본원에 입증된 바와 같이, ODN의 면역자극 특성은, 특히 ODN의 3' 말단에서 티민 런(run), 구아닌 런 및/또는 콜레스테릴 모이어티를 부가하여 올리고뉴클레오티드를 변형시킴으로써 증강될 수 있다.

[0024] 본 개시내용의 면역자극성 올리고뉴클레오티드는 적어도 하나의 CpG 모티프를 포함한다. 일부 실시양태에서, 면역자극성 올리고뉴클레오티드는 1개 내지 10개의 CpG 모티프를 포함한다. 다른 실시양태에서 면역자극성 올리고뉴클레오티드는 심지어 20개의 CpG 모티프를 포함할 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 면역자극성 올리고뉴클레오티드는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 또는 10개의 CpG 모티프를 포함한다. 다른 실시양태에서, 면역자극성 올리고뉴클레오티드는 11개 내지 15개의 CpG 모티프 또는 심지어 15개 내지 20개의 CpG 모티프를 포함한다.

[0025] 뉴클레오티드 사이에 포스포디에스테르 및/또는 포스포로티오에이트 연결을 포함하는 올리고뉴클레오티드가 본 원에 고려된다. 일부 측면에서, 본 개시내용의 올리고뉴클레오티드는 이러한 올리고뉴클레오티드의 뉴클레오티드 사이에 포스포디에스테르 연결을 포함한다. 다른 측면에서, 올리고뉴클레오티드는 이러한 올리고뉴클레오티드의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 연결을 포함한다. 다른 연결이 또한 본원에 고려된다. 예를 들어, 본 개시내용의 올리고뉴클레오티드는 포스포아세테이트, 메틸포스포네이트, 및 포스포노카르복실레이트 연결을 포함하나 이에 제한되지는 않는 다른 연결을 포함할 수 있다. 이러한 연결 중 일부는 다른 연결에 비해 바람직한 이점, 예컨대 생산 비용, 생산 용이성 및/또는 생산 품질, 및 증강된 면역자극 영향을 제공할 수 있다.

[0026] 본 개시내용의 일부 측면에서, CpG 모티프로 인한 올리고뉴클레오티드의 면역원성은 비-CpG 서열에 의해 추가로 증강될 수 있다. 본 실시예에 제시된 바와 같이, 올리고뉴클레오티드의 3' 말단에 티민 런을 부가하면, TLR9 매개된 면역 반응을 유발할 수 있는 올리고뉴클레오티드의 능력이 개선될 수 있다. 이러한 이유로, 본 개시내용의 일부 실시양태에서, 면역자극성 올리고뉴클레오티드의 3' 말단 서열은 3' 말단 서열로서 복수개의 티민 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 측면에서, 이러한 복수개의 티민 뉴클레오티드는 연속적 티민 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 측면에서, 복수개의 티민 뉴클레오티드는 4개 내지 6개의 연속적 티민 뉴클레오티드를 포함한다. 예를 들어, 본 개시내용의 일부 실시양태에서, 3' 말단 서열은 서열식별번호: 9를 포함한다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 서열식별번호: 2, 3, 4, 5, 6, 또는 8을 포함한다. 그리고 일부 측면에서, 올리고뉴클레오티드 서열의 3' 말단 서열은 TTTT이다.

[0027] 면역자극성 올리고뉴클레오티드의 3' 말단에 대한 다른 서열 변형은 또한 증강된 면역원성에 기여할 수 있다. 예를 들어, 본 개시내용의 일부 실시양태에서, 면역자극성 올리고뉴클레오티드는 3' 말단 서열에 또는 그 근처에 복수개의 구아닌 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 측면에서, 면역자극성 올리고뉴클레오티드의 3' 말단 서열은 복수개의 구아닌 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 측면에서, 복수개의 구아닌 뉴클레오티드는 연속적 구아닌 뉴클레오티드를 포함하며, 예컨대 GGGGG의 3' 말단 서열을 갖는 본 개시내용에 따른 올리고뉴클레오티드이다. 일부 측면에서, 올리고뉴클레오티드는 서열식별번호: 7을 포함한다.

[0028] 면역자극성 올리고뉴클레오티드의 면역원성을 증가시키는 것은 올리고뉴클레오티드의 3' 말단의 변형으로 제한되지는 않는다. 내부 서열은 또한, 예를 들어, CpG 모티프의 수를 증가시키기 위해 변형될 수 있다. 일부 측면에서, 올리고뉴클레오티드는 올리고뉴클레오티드의 5' 말단과 3' 말단 사이에 부가의 CpG 모티프를 포함하여 합성될 수 있다. 일부 측면에서, 면역자극성 올리고뉴클레오티드는 서열 $(TCG)_n$을 포함하며, 여기서 n은 3 내지 10이다. 따라서, 본 개시내용의 일부 측면에서, 올리고뉴클레오티드는 서열 $(TCG)_n$을 포함하며, 여기서 n은 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10이다.

[0029] 본 개시내용의 일부 실시양태에서, 면역자극성 올리고뉴클레오티드는 3' 말단에 지질 모이어티를 포함하여 올리고뉴클레오티드의 면역원성 특성을 증강시킬 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 콜레스테릴 모이어티는 링커를 통해 면역자극성 올리고뉴클레오티드의 3'-말단 뉴클레오티드에 공유적으로 부착된다. 콜레스테릴 모이어티는 아마도, 분해를 방지하거나, 용해도를 증가시키거나, 고차 구조 (예를 들어, 미셀)를 형성함으로써 리간드 다가를 발생시키거나, 제약 조성물 중의 올리고뉴클레오티드의 안정성을 증가시키거나, 또는 그의 임의의 조합에 의해 올리고뉴클레오티드의 면역원성을 증가시킨다. 공유 결합을 형성할 수 있는 적어도 2개의 모이어티를 갖는 링커는 콜레스테릴 모이어티 및 올리고뉴클레오티드와 결합할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 링커는 콜레스테릴 모이어티의 히드록실 기와 상호작용하여 공유 결합을 형성하고, 올리고뉴클레오티드의 3' 말단 뉴클레오티드와 상호작용한다. 일부 측면에서, 콜레스테릴 모이어티는 링커에 공유 결합되어 콜레스테릴-링커 모이어티를 형성한다. 일부 측면에서, 링커가 먼저, 콜레스테릴 모이어티에 부착된 다음, 이로써 생성되는 콜레스테릴-링커가 올리고뉴클레오티드에 부착된다. 다른 측면에서, 링커가 먼저, 올리고뉴클레오티드에 부착된 다음, 콜레스테릴 모이어티에 부착된다. 일부 측면에서, 콜레스테릴-링커는 상업적으로 이용가능하다.

[0030] 올리고뉴클레오티드 및 콜레스테릴 모이어티와 결합할 수 있는 모이어티를 갖는 것에 더하여, 링커의 일부 실시양태는 탄소 쇄를 포함하고, 일부 측면에서 탄소 쇄는 3개 내지 12개의 탄소 원자를 포함한다. 말단 히드록실 기가 올리고뉴클레오티드 및 콜레스테릴 모이어티의 히드록실 기와 공유 결합할 수 있기 때문에, 예를 들어, 디올이 콜레스테릴 모이어티와 올리고뉴클레오티드 사이의 링커로서 사용될 수 있다. 일부 측면에서, 링커는 헥산디올을 포함한다. 일부 측면에서, 콜레스테릴-링커 모이어티는 도 1에 도시된 화학 구조를 갖는다. 다른 실시양태는 반복 화학 단위를 포함하는 링커를 제공한다. 화학 단위는 일부 측면에서, 2회 내지 12회 반복된다. 일부 측면에서 반복 화학 단위는 에틸렌 글리콜을 포함하며, 에틸렌 글리콜 화학 단위가 6회 반복될 때, 링커는

헥사에틸렌 글리콜을 포함한다. 헥사에틸렌 글리콜을 포함하는 링커는 도 6에 도시된 화학 구조를 가질 수 있다.

[0031] 일부 상황에서, 본원에 기재된 바와 같은 올리고뉴클레오티드를, 이를 필요로하는 대상체에게 전달하는 것이 바람직할 것이다. 올리고뉴클레오티드는 면역자극성 조성물로서 전달될 수 있다. 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드 중 임의의 것을 포함하는 면역자극성 조성물이 제공된다. 이들 면역자극성 조성물은 일부 측면에서, 올리고뉴클레오티드 뿐만 아니라 조성물의 면역원성, 유효성 및 효율에 영향을 미치는 다른 성분을 포함한다. 본 개시내용의 일부 실시양태에서 면역자극성 조성물은 면역자극성 올리고뉴클레오티드 외에도, 감염성 질환을 예방 또는 치료하기 위한 백신, 올리고뉴클레오티드를 대상체에게 전달하기 위한 벡터, 제약 담체, 또는 그의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 예를 들어, 일부 측면에서 올리고뉴클레오티드는 이러한 올리고뉴클레오티드의 표적화된 전달을 허용하는 바이러스 벡터에 패키징된다. 올리고뉴클레오티드는 일부 측면에서, 양이온성 리포솜 전달 비히클에 부가되어, TLR9를 함유하는 세포 소기관의 막 및/또는 지질 세포 막을 횡단할 수 있는 올리고뉴클레오티드의 능력을 증강시킬 수 있다.

[0032] 본원에 기재된 면역자극성 올리고뉴클레오티드 또는 면역자극성 조성물의 투여에 의해 치료 또는 예방될 수 있는 감염성 질환은 바이러스성, 박테리아성, 진균성, 기생충, 또는 다른 기생충 감염을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 본 개시내용의 면역자극성 올리고뉴클레오티드 또는 조성물을 투여하면, 침입 병원체에 대해 적대적인 환경을 창출하는 면역 반응이 초래되는 것으로 고려된다. 따라서, 침입 병원체는 숙주 유기체에서의 건강 상태를 부정적으로 변경시키기에 충분한 감염을 확립시킬 수 없다. 면역자극성 올리고뉴클레오티드 및/또는 조성물의 투여는 침입 병원체에 대항한 항원 특이적 면역 반응을 증대시키거나 또는 이와 병행하여 작용하는 비-항원 특이적 면역 반응을 제공할 수 있다.

[0033] 일부 측면에서, 상기 올리고뉴클레오티드를 포함하는 면역자극성 조성물은 감염성 질환을 예방 또는 치료하기 위한 백신을 추가로 포함할 수 있다. 올리고뉴클레오티드와 백신을 조합하는 것이 효율 이유로 인해 수행될 수 있는데, 이는 다수의 제약을 별도로 전달하는 것이 치료 비용을 증가시키기 때문이다. 올리고뉴클레오티드 및 백신은 또한 임의의 현재 감염에 대항하여 비-항원 특이적 면역 반응을 유발할 뿐만 아니라 항원 특이적 면역 반응의 발생을 개시하기 위해 단일 면역자극성 조성물로서 전달될 수 있다.

[0034] 본원에 기재된 바와 같은 올리고뉴클레오티드 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 면역자극성 조성물이 또한 본원에서 고려된다. 일부 측면에서, 제약상 허용되는 담체는 임의의 제약상 허용되는 담체이다. 제약상 허용되는 담체는 정맥내, 근육내, 유방내로, 피내, 복강내, 피하, 스프레이에 의해, 에어로졸에 의해, 난내로, 점막, 경피, 침지에 의해, 경구, 안내, 기관내, 비강내, 폐, 직장, 또는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 다른 수단으로부터 선택된 경로에 의한 투여를 위해 조성물을 적합화시킨다. 제약상 허용되는 담체(들)는 면역자극성 조성물과 함께 투여되는 희석제, 아주반트, 부형제, 또는 비히클일 수 있다. 이러한 비히클은 액상물, 예컨대 물, 및 페트로리움, 동물성, 식물성, 또는 합성 기원의 것을 포함한 오일, 예컨대 땅콩 오일, 대두 오일, 미네랄 오일, 참깨 오일 등일 수 있다. 예를 들어, 0.4% 식염수 및 0.3% 글리신이 사용될 수 있다. 이들 용액은 멸균되어 있으며 일반적으로 입자상 물질이 없다. 이들은 널리 공지된 통상적인 멸균 기술 (예를 들어, 여과)에 의해 멸균될 수 있다. 상기 조성물은 생리학적 조건에 비슷하게 하는데 필요한 바와 같은 제약상 허용되는 보조 물질, 예컨대 pH 조정제 및 완충제, 안정화제, 증점제, 윤활제 및 착색제 등을 함유할 수 있다. 이러한 제약 제형에서 본 발명의 분자의 농도는 광범위하게, 즉 약 0.5 중량% 미만, 통상적으로 적어도 약 1 중량% 내지 15 또는 20 중량%만큼 다양할 수 있으며, 선택된 특별한 투여 방식에 따라 요구되는 용량, 유체 용적, 점도 등에 기반하여 주로 선택될 것이다. 다른 인간 단백질, 예를 들어, 인간 혈청 알부민을 포함하여 적합한 비히클 및 제형이, 예를 들어, 문헌 [Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, Troy, D.B. ed., Lipincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA 2006, Part 5, Pharmaceutical Manufacturing pp 691-1092]에 기재되어 있다 (특히 pp. 958-989 참조).

[0035] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드 및 담체가 커플링되는데, 예를 들어, 화학적으로 커플링된다. 올리고뉴클레오티드 및 담체 사이의 관계를 설명하기 위해 사용된 바와 같은 "커플링된"은 올리고뉴클레오티드 및 담체의 물리적 회합을 지칭한다. 올리고뉴클레오티드 및 담체가 서로 결합하거나, 서로 상호작용하거나, 조합되거나, 또는 달리 연결될 때, 이들은 커플링된 것으로 간주될 수 있다.

[0036] 본원에 기재된 면역자극성 조성물은 일부 실시양태에서 합텐을 추가로 포함한다. 일부 측면에서, 면역자극성 올리고뉴클레오티드는 합텐에 연결된다. 합텐은 특이적 미생물, 예컨대 이. 콜라이(*E. coli*) 또는 살모넬라(*Salmonella*)에 대항하여 면역 반응을 유발할 수 있지만, 면역자극성 올리고뉴클레오티드는 올리고뉴클레오티드

와의 TLR9 상호작용에 의해 매개된 비-특이적 면역 반응을 유발한다. 이들 및 다른 감염성 미생물은 대규모 농업 생산자, 예컨대 소, 양 및 돼지 생산자에게 특히 중요하다.

[0037] TLR9 리간드의 면역원성을 증강시키는 방법으로서, 콜레스테릴 모이어티를 상기 리간드에 부착시키는 것을 포함하며, 여기서 리간드는 적어도 하나의 CpG 모티프를 갖는 면역자극성 올리고뉴클레오티드이고, 콜레스테릴 모이어티는 링커를 통해 올리고뉴클레오티드의 3' 말단 뉴클레오티드에 부착되는 것인 방법이 또한 제공된다.

[0038] 본원에 개시된 다른 방법은 TLR9 매개된 면역 반응의 유발을 필요로 하는 대상체에게 복수개의 CpG 모티프 및 올리고뉴클레오티드의 3' 말단 뉴클레오티드에 부착된 콜레스테릴-링커 모이어티를 갖는 올리고뉴클레오티드를 투여하는 것을 포함하여, 대상체에서 TLR9 매개된 면역 반응을 유발하는 것을 제공한다. TLR9 매개된 면역 반응을 유발하는 방법의 일부 측면에서, 올리고뉴클레오티드는 면역자극성 조성물로서 투여된다.

[0039] 면역자극성 올리고뉴클레오티드 또는 면역자극성 조성물이 투여되는 대상체는 본 개시내용의 일부 실시양태에서 동물이다. 일부 측면에서, 동물은 병원체, 특히 CpG-기반 병원체 관련 분자 패턴 (PAMP)을 갖는 병원체에 의한 감염 위험이 높아진다. 면역자극성 올리고뉴클레오티드 및/또는 면역자극성 조성물이 이러한 동물에게 투여될 때, TLR9 매개된 면역 반응은 병원체에 의한 감염을 예방하거나 또는 병원체에 의해 야기되는 증상의 완화를 도울 것이다. 본 발명의 면역자극성 올리고뉴클레오티드는 특별한 병원체에 대해 특이적일 필요는 없고, 오히려 비-항원 특이적 면역 반응을 자극한다는 것이 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 이해될 것이다. 올리고뉴클레오티드는 또한 특별한 동물에 대해 특이적일 필요는 없다. 따라서, 본 개시내용의 일부 측면에서, 대상체는 포유동물이다. 일부 측면에서, 대상체는 무리 또는 농장 동물, 예컨대 돼지, 소, 말 또는 양이다. 무리 동물에게 투여하는 것이, 집단 상황, 예컨대 우리 및/또는 공통의 사료 또는 물 공급원을 공유하는 상황에서 대규모 집단의 동물에게 감염이 확산되는 것을 방지하는데 도움을 줄 수 있다. 본 개시내용의 올리고뉴클레오티드는 항생제의 사용이, 특히 항생제 요법에 대한 박테리아 내성의 출현으로 인해, 더욱 선호되지 않고 있다는 점에서 감염의 전통적 형태의 예방적 처치에 비해 뚜렷한 이점을 제공한다.

[0040] 일부 실시양태에서, 대상체는 인간일 수 있다. 무리 동물과 같이, 인간이 소비하는 항생제에 대한 내성은 박테리아에서 흔해지고 있으며, 내성 감염에 대한 치료 옵션은 제한적이다. 본 개시내용의 올리고뉴클레오티드 및 방법은 소위 "슈퍼 버그", 예컨대 메티실린 내성 스타필로코쿠스 아우레우스에 대한 매우 필요한 해결책을 제공한다.

[0041] 본원에서 면역자극성 올리고뉴클레오티드 또는 조성물이 투여되는 대상체는 마우스, 래트, 햄스터, 저빌, 또는 다른 설치류일 수 있는 것으로 또한 고려된다. 대상체는 또한 비-포유동물일 수 있다. 예를 들어, 일부 측면에서, 대상체는 수생 종이다.

[0042] **실시예**

[0043] 하기 실시예는 본원에 개시된 실시양태 중 일부를 추가로 설명하기 위해 제공된다. 본 실시예는 개시된 실시양태를 예시하는 것이지, 제한하는 것이 아니다.

[0044] **실시예 1: ODN의 3'-콜레스테릴 변형은 TLR9 자극 활성을 강력하게 증가시킨다**

[0045] **인간 TLR9, HEK블루에서의 재조합 과다발현**

[0046] **PDE-ODN의 3'-콜레스테릴 변형 (I)**

[0047] 3'-콜레스테릴 변형 (콜레스테릴-링커 모이어티의 화학 구조에 대하여 도 1 참조)을, 인간 TLR9에 대해 활발한 활성을 갖는 PDE-ODN (표 1, 2006-3dT4G5T4)에 적용하였다. 변형된 및 비변형된 형태를, 인간 TLR9를 발현하는 세포주인 HEK블루-hTLR9 세포 (인비보젠(Invivogen))에서 시험관내 시험하였다.

[0048] **표 1:** ODN 서열 (소문자: PTO 결합)

ODN	SEQ ID NO	서열
2006-PTO	SEQ ID NO:1	tcgtcgttttgtcgttttgtcgtt
2006-3dT4G5T4	SEQ ID NO:2	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTTTTTTGGGGGTTTT
2006-3dT4G5T43C	SEQ ID NO:2	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTTTTTTGGGGGTTTTX
X = 3'-콜레스테릴		

[0049]

[0050] **표 2:** 절반 최대 유효 농도 (EC_{50}) 및 최대 시그널 속도 (V_{max})

ODN	EC50 나노몰 (nM)	Vmax 밀리OD 405nm/min (mOD405/min)
2006-PTO	26.0	56
2006-3dT4G5T4	404	120
2006-3dT4G5T43C	13.6	103

[0051]

[0052] 그 결과는 2006-3dT4G5T4의 TLR9-자극 활성이, 2006-3dT4G5T43C에 대한 EC_{50}이 거의 30배 더 낮다는 것과 관련하여, 3'-콜레스테릴 변형 시 상당히 개선된다는 것을 시사한다 (표 2, 도 2a, 2b).

[0053] **PDE-ODN의 3'-콜레스테릴 변형 (II)**

[0054] 콜레스테릴 모이어티 (콜레스테릴-링커 모이어티의 화학 구조에 대하여 도 1 참조)를, 인간 TLR9의 불량한 활성화 리간드인 것으로 공지되어 있는 2006-T4-PDE (서열식별번호: 3, 표 3)의 3' 말단 뉴클레오티드에 부착시켰다. 변형된 및 비변형된 2006-T4-PDE 올리고뉴클레오티드를 HEK블루-hTLR9 세포에 시험관내 투여하여 3'-콜레스테릴 변형의 면역자극 영향을 결정하였다.

[0055] **표 3:** ODN 서열

ODN	SEQ ID NO:	서열
3Chol-2006-T4-PDE	SEQ ID NO:3	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTTTTTTX
2006-T4-PDE	SEQ ID NO:3	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTTTTTT
X = 3'-콜레스테릴		

[0056]

[0057] 그 결과는 2006-T4-PDE의 인간 TLR9-자극 활성이 3'-콜레스테릴 변형 시 상당히 개선된다는 것을 시사한다 (표 2, 도 3).

[0058] **PDE-ODN의 3'-콜레스테릴 변형 (III)**

[0059] 3'-콜레스테릴 변형 (콜레스테릴-링커 모이어티의 화학 구조에 대하여 도 1 참조)을, 인간 TLR9에 대한 활발한 활성을 갖는 PDE-ODN인 2006-3dT4G5T4에 적용하였다 (표 4). 변형된 및 비변형된 형태를 HEK블루-hTLR9 세포에서 시험관내 시험하였다.

[0060] **표 4:** ODN 서열

ODN	SEQ ID NO	서열
2006-3dT4G5T4	SEQ ID NO:2	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTTTTTTGGGGGTTTT
2006-3dT4G5T43C	SEQ ID NO:2	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTTTTTTGGGGGTTTTX
X = 3'-콜레스테릴		

[0061]

[0062] **표 5:** 절반 최대 유효 농도 (EC_{50}) 및 최대 시그널 속도 (V_{max})

ODN	EC_{50} 나노몰 (nM)	Vmax 밀리OD 405nm/min (mOD405/min)
2006-3dT4G5T4	81.1	55
2006-3dT4G5T43C	24.3	58

[0063]

[0064] 그 결과는 2006-3dT4G5T4의 TLR9-자극 활성이, 2006-3dT4G5T43C에 대한 EC_{50}이 3배 초과하여 더 낮다는 것과 관련하여, 3'-콜레스테릴 변형 시 상당히 개선된다는 것을 시사한다 (표 5, 도 4a, 4b).

[0065] **PDE-ODN의 3'-콜레스테릴 변형 (IV)**

[0066] 3'-콜레스테릴 변형 (콜레스테릴-링커 모이어티의 화학 구조에 대하여 도 1 참조)을, 인간 TLR9에 대한 활발한 활성을 갖는 PDE-ODN인 2006-3dT4G5T4에 적용하였다 (표 8). 변형된 및 비변형된 형태를 HEK블루-hTLR9 세포에서 시험관내 시험하였다.

[0067] **표 8:** ODN 서열

ODN	SEQ ID NO	서열
2006-3dT4G5T4	SEQ ID NO:2	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTTTTTTGGGGGTTTT
2006-3dT4G5T43C	SEQ ID NO:2	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTTTTTTGGGGGTTTTX
X = 3'-콜레스테릴		

[0068]

[0069] **표 9:** 절반 최대 유효 농도 (EC_{50}) 및 최대 시그널 속도 (V_{max})

ODN	EC_{50} 나노몰 (nM)	Vmax 밀리OD 405nm/min (mOD405/min)
2006-3dT4G5T4	1175	175
2006-3dT4G5T43C	32.0	56

[0070]

[0071] 그 결과는 2006-3dT4G5T4의 TLR9-자극 활성이, 2006-3dT4G5T43C에 대한 EC_{50}이 36배 초과하여 더 낮다는 것과 관련하여, 3'-콜레스테릴 변형 시 상당히 개선된다는 것을 시사한다 (표 9, 도 5).

[0072] **PDE-ODN의 3'-콜레스테릴 변형 (V)**

[0073] 3'-콜레스테릴 변형 (콜레스테릴-링커 모이어티의 화학 구조에 대하여 도 6 참조)을, 인간 TLR9에 대한 매우 불량한 활성을 갖는 PDE-ODN인 2006-3dT4G5T4에 적용하였다 (표 10). 변형된 및 비변형된 형태를 HEK블루-hTLR9 세포에서 시험관내 시험하였다.

[0074] **표 10:** ODN 서열 (소문자: PTO 결합)

ODN	SEQ ID NO:	서열
2006-3dT4G5T4	SEQ ID NO:2	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTTTTTTGGGGGTTTT
2006-3dT4G5T4-3Chol	SEQ ID NO:2	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTTTTTTGGGGGTTTTX
X = 3'-콜레스테릴		

[0075]

[0076] **표 11:** 절반 최대 유효 농도 (EC_{50}) 및 최대 시그널 속도 (V_{max})

ODN	EC_{50} 나노몰 (nM)	Vmax 밀리OD 405nm/min (mOD405/min)
2006-3dT4G5T4	불량하게 활성	-
2006-3dT4G5T4-3Chol	68.0	21

[0077]

[0078] 그 결과는 2006-3dT4G5T4의 TLR9-자극 활성이 3'-콜레스테릴 변형 시, 거의 0에서 68 nM의 EC_{50}으로 엄청나게 개선된다는 것을 시사한다 (표 11, 도 7).

[0079] **PDE-ODN의 3'-콜레스테릴 변형 (VI)**

[0080] 3'-콜레스테릴 변형 (콜레스테릴-링커 모이어티의 화학 구조에 대하여 도 1 참조)을, 인간 TLR9에 대한 매우 불량한 활성을 갖거나 활성을 갖지 않는 PDE-ODN인 2007-PDE-T4 또는 2007-PDE-T4G5T4에 적용하였다 (표 12). 변형된 및 비변형된 형태를 HEK블루-hTLR9 세포에서 시험관내 시험하였다.

[0081] **표 12:** ODN 서열

ODN	SEQ ID NO	서열
2007-PDE-T4	SEQ ID NO:4	TCGTCGTTGTCGTTTTGTCGTTTTTT
2007-PDE-T4-3Ch	SEQ ID NO:4	TCGTCGTTGTCGTTTTGTCGTTTTTTX
2007-T4G5T4	SEQ ID NO:5	TCGTCGTTGTCGTTTTGTCGTTTTTTGGGGGTTTT
2007-T4G5T4-3Ch	SEQ ID NO:5	TCGTCGTTGTCGTTTTGTCGTTTTTTGGGGGTTTTX
X = 3'-콜레스테릴		

[0082]

[0083] **표 13:** 유효 농도 50% (EC_{50}-) 및 최대 시그널 속도 (V_{max})의 계산:

ODN	EC_{50} 나노몰 (nM)	Vmax 밀리OD 405nm/min (mOD405/min)
2007-PDE-T4	불활성	-
2007-PDE-T4-3Ch	활성	-
2007-T4G5T4	약하게 활성	-
2007-T4G5T4-3Ch	24.9	30

[0084]

[0085] 그 결과는 2007-PDE-T4 및 2007-PDE-T4G5T4 둘 다의 TLR9-자극 활성이 3'-콜레스테릴 변형 시 엄청나게 개선된다는 것을 시사하며 (도 8a 및 8b), 2007-T4G5T4-3Ch의 경우에는 24.9 nM의 EC_{50}으로 되었다 (표 13).

[0086] **실시예 2: 인간 TLR9, 라모스-블루 세포에서의 자연 발현**

[0087] **3'-콜레스테릴 변형 (I)**

[0088] 3'-콜레스테릴 변형 (콜레스테릴-링커 모이어티의 화학 구조에 대하여 도 1 참조)을, 인간 TLR9에 대해 활발한 활성을 갖는 PDE-ODN인 2006-3dT4G5T4에 적용하였다 (표 14). 변형된 및 비변형된 형태를 라모스-블루 세포에서 시험관내 시험하였다. 라모스-블루 B 림프구 세포주 (인비보젠; 미국 캘리포니아주 샌디에이고)는 TLR9 시그널링의 검출을 허용하는 NF-κB/AP-1-유도성 리포터 유전자를 안정적으로 발현한다.

[0089] **표 14:** ODN 서열 (소문자: PTO 결합)

ODN	SEQ ID NO	서열
2006-3dT4G5T4	SEQ ID NO:2	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTTTTTTGGGGGTTTT
2006-3dT4G5T43C	SEQ ID NO:2	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTTTTTTGGGGGTTTTX
2006-PTO	SEQ ID NO:1	tcgtcgttttgtcgttttgtcgtt
X = 3'-콜레스테릴		

[0090]

[0091] **표 15:** 절반 최대 유효 농도 (EC_{50}) 및 최대 시그널 속도 (V_{max})

ODN	EC_{50} 나노몰 (nM)	Vmax 밀리OD 405nm/min (mOD405/min)
2006-3dT4G5T4	862	5.8
2006-3dT4G5T43C	107	3.7
2006-PTO	462	4.4

[0092]

[0093] 그 결과는 2006-3dT4G5T4의 TLR9-자극 활성이, 2006-3dT4G5T43C에 대한 EC_{50}이 8배 초과하여 더 낮다는 것과 관련하여, 3'-콜레스테릴 변형 시 상당히 개선된다는 것을 시사한다 (표 15, 도 9a, 9b). 또한, 변형된 ODN 2006-3dT4G5T43C는 "산업 표준" ODN 2006-PTO의 활성을 능가한다.

[0094] **3'-콜레스테릴 변형 (II)**

[0095] 3'-콜레스테릴 변형 (콜레스테릴-링커 기의 화학 구조에 대하여 도 1 참조)을, 인간 TLR9에 대해 활발한 활성을 갖는 PDE-ODN인 2006-3dT4G5T4에 적용하였다 (표 16). 변형된 및 비변형된 형태를 라모스-블루 세포에서 시험관내 시험하였다.

[0096] **표 16:** ODN 서열

ODN	SEQ ID NO	서열
2006-3dT4G5T4	SEQ ID NO:2	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTTTTTTGGGGGTTTT
2006-3dT4G5T43C	SEQ ID NO:2	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTTTTTTGGGGGTTTTX
X = 3'-콜레스테릴		

[0097]

[0098] **표 17:** 절반 최대 유효 농도 (EC_{50}) 및 최대 시그널 속도 (V_{max})

ODN	EC_{50} 나노몰 (nM)	Vmax 밀리OD 405nm/min (mOD405/min)
2006-3dT4G5T4	44.3	6.7
2006-3dT4G5T43C	331	10.7

[0099]

[0100] 그 결과는 2006-3dT4G5T4의 TLR9-자극 활성이, 2006-3dT4G5T43C에 대한 EC_{50}이 7배 초과하여 더 낮다는 것과 관련하여, 3'-콜레스테릴 변형 시 상당히 개선된다는 것을 시사한다 (표 17, 도 10a, 10b).

[0101] **PDE-ODN의 3'-콜레스테릴 변형 (III)**

[0102] 3'-콜레스테릴 변형 (콜레스테릴-링커 모이어티의 화학 구조에 대하여 도 1 참조)을, 인간 TLR9에 대해 단지 불량한 활성인 PDE-ODN인 2006-T4-PDE에 적용하였다 (표 18). 변형된 및 비변형된 형태를 라모스-블루 세포에서 시험관내 시험하였다.

[0103] **표 18:** ODN 서열

ODN	SEQ ID NO	서열
3Chol-2006-T4-PDE	SEQ ID NO:3	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTTTTTTX
2006-T4-PDE	SEQ ID NO:3	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTTTTTT
X = 3'-콜레스테릴		

[0104]

[0105] 그 결과는 2006-T4-PDE의 인간 TLR9-자극 활성이 3'-콜레스테릴 변형 시 상당히 개선된다는 것을 시사한다 (표 18, 도 11).

[0106] **PDE-ODN의 3'-콜레스테릴 변형 (IV)**

[0107] 3'-콜레스테릴 변형 (콜레스테릴-링커 모이어티의 화학 구조에 대하여 도 6 참조)를, 인간 TLR9에 대한 매우 불량한 활성을 갖는 PDE-ODN인 2006-3dT4G5T4에 적용하였다 (표 19). 변형된 및 비변형된 형태를 라모스-블루 세포에서 시험관내 시험하였다.

[0108] **표 19:** ODN 서열 (소문자: PTO 결합)

ODN	SEQ ID NO	서열
2006-3dT4G5T4	SEQ ID NO:2	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTTTTTTGGGGGTTTT
2006-3dT4G5T4-3Chol	SEQ ID NO:2	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTTTTTTGGGGGTTTTX
X = 3'-콜레스테릴		

[0109]

[0110] **표 20:** 절반 최대 유효 농도 (EC_{50}) 및 최대 시그널 속도 (V_{max})

ODN	EC_{50} 나노몰 (nM)	Vmax 밀리OD 405nm/min (mOD405/min)
2006-3dT4G5T4	610	17.2
2006-3dT4G5T4-3Chol	46.3	11.9

[0111]

[0112] 그 결과는 라모스-블루 세포 상에서 2006-3dT4G5T4의 인간 TLR9-자극 활성이 3'-콜레스테릴 변형 시, EC_{50}과 관련하여 13배만큼 상당히 개선된다는 것을 시사한다 (표 20, 도 12).

[0113] **PDE-ODN의 3'-콜레스테릴 변형 (V)**

[0114] 3'-콜레스테릴 변형 (콜레스테릴-링커 모이어티의 화학 구조에 대하여 도 1 참조)을, 인간 TLR9에 대한 매우 불량한 활성을 갖거나 활성을 갖지 않는 PDE-ODN인 2007-PDE-T4 또는 2007-PDE-T4G5T4에 적용하였다 (표 21). 변형된 및 비변형된 형태를 라모스-블루 세포에서 시험관내 시험하였다.

[0115] **표 21:** ODN 서열

ODN	SEQ ID NO	서열
2007-PDE-T4	SEQ ID NO:4	TCGTCGTTGTCGTTTTGTCGTTTTTT
2007-PDE-T4-3Ch	SEQ ID NO:4	TCGTCGTTGTCGTTTTGTCGTTTTTTX
2007-T4G5T4	SEQ ID NO:5	TCGTCGTTGTCGTTTTGTCGTTTTTTGGGGGTTTT
2007-T4G5T4-3Ch	SEQ ID NO:5	TCGTCGTTGTCGTTTTGTCGTTTTTTGGGGGTTTTX
TCG8-T4	SEQ ID NO:6	TCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTTTT
TCG8-T4-3Ch	SEQ ID NO:6	TCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTTTTX
X = 3'-콜레스테릴		

[0116]

[0117] **표 22:** 절반 최대 유효 농도 (EC_{50}) 및 최대 시그널 속도 (V_{max})

ODN	EC_{50} 나노몰 (nM)	Vmax 밀리OD 405nm/min (mOD405/min)
2007-PDE-T4	-	-
2007-PDE-T4-3Ch	1219	17.2
2007-T4G5T4	401	22.5
2007-T4G5T4-3Ch	28.7	14.1
TCG8-T4	-	-
TCG8-T4-3Ch	362	9.7

[0118]

[0119] 그 결과는 라모스-블루 세포에서 2006-3dT4G5T4의 인간 TLR9-자극 활성이 본 실험에서 고려된 모든 ODN (2007-PDE-T4, 2007-T4G5T4, TCG8-T4, 표 22, 도 13a, 13b 및 13c)의 3'-콜레스테릴 변형 시 상당히 개선된다는 것을 시사한다. 2007-T4G5T4-Ch의 경우에, 그의 비변형된 동류물과 비교해서, EC_{50}과 관련하여 거의 14배만큼의 활성 개선이 주목되었다.

[0120] **실시예 3: 마우스 TLR9, HEK블루에서의 재조합 과다발현**

[0121] **PDE-ODN의 3'-콜레스테릴 변형**

[0122] 3'-콜레스테릴 변형 (콜레스테릴-링커 모이어티의 화학 구조에 대하여 도 1 참조)을, 인간 TLR9에 대한 매우 불량한 활성을 갖거나 활성을 갖지 않는 2007-PDE-T4, 2007-PDE-T4G5T4, 및 TCG8-T4에 적용하였다 (표 23). 변형된 및 비변형된 형태를 HEK블루-mTLR9 세포 (인비보젠)에서 시험관내 시험하였다.

[0123] **표 23:** ODN 서열

ODN	SEQ ID NO	서열
2007-PDE-T4	SEQ ID NO:4	TCGTCGTTGTCGTTTTGTCGTTTTTT
2007-PDE-T4-3Ch	SEQ ID NO:4	TCGTCGTTGTCGTTTTGTCGTTTTTTX
2007-T4G5T4	SEQ ID NO:5	TCGTCGTTGTCGTTTTGTCGTTTTTTGGGGGTTTT
2007-T4G5T4-3Ch	SEQ ID NO:5	TCGTCGTTGTCGTTTTGTCGTTTTTTGGGGGTTTTX
TCG8-T4	SEQ ID NO:6	TCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTTTT
TCG8-T4-3Ch	SEQ ID NO:6	TCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTTTTX
TCG8-T4G5T4	SEQ ID NO:8	TCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTTTTGGGGGTTTT
TCG8-T4G5T4-3Chol	SEQ ID NO:8	TCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTTTTGGGGGTTTTX
X = 3'-콜레스테릴		

[0124]

[0125] 그 결과는 HEK블루-mTLR9에서 본 실험에 고려된 모든 ODN (2007-PDE-T4, 2007-T4G5T4, TCG8-T4, 표 23)의 마우스 TLR9-자극 활성이, 3가지 경우에 3'-콜레스테릴 변형 시 상당히 개선되고 (도 14a, 14b, 및 14c), 제4 예에서는 저 농도에서 아주 조금 개선된다는 것을 시사한다 (도 14d).

[0126] **실시예 4: HEK블루-hTLR9 및 라모스-블루 세포에서 비변형된, 3'-콜레스테릴 변형된 및 5'-콜레스테릴 변형된 ODN에 대한 체계적인 연구: 구조-활성 관계 (SAR)**

[0127] **HEK블루-hTLR9**

[0128] 3'-콜레스테릴 또는 5'-콜레스테릴 변형 (콜레스테릴-링커 모이어티의 화학 구조에 대하여 각각 도 6 및 15 참조)을, 4가지 상이한 ODN에 적용하였다 (표 24). 변형된 및 비변형된 형태를 HEK블루-hTLR9 세포에서 시험관내 시험하였다.

[0129] **표 24:** ODN 서열 (소문자는 PTO 결합을 표시함)

ODN	SEQ ID NO	서열
2006-PTO	SEQ ID NO:1	tcgtcgttttgtcgttttgtcgtt
2006-PDE-T4	SEQ ID NO:3	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTTTTTT
2006-PDE-T4-3Chol	SEQ ID NO:3	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTTTTTTX
2006-PDE-T4-5Chol	SEQ ID NO:3	YTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTTTTTT
2006-G5	SEQ ID NO:7	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTTGGGGG
2006-G5-3Chol	SEQ ID NO:7	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTTGGGGGX
2006-G5-5Chol	SEQ ID NO:7	YTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTTGGGGG
2006-T4G5T4	SEQ ID NO:2	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTTTTTTGGGGGTTTT
2006-T4G5T4-3Chol	SEQ ID NO:2	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTTTTTTGGGGGTTTTX
2006-T4G5T4-5Chol	SEQ ID NO:2	YTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTTTTTTGGGGGTTTT
TCG8-T4G5T4	SEQ ID NO:8	TCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTTTTGGGGGTTTT
TCG8-T4G5T4-3Chol	SEQ ID NO:8	TCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTTTTGGGGGTTTTX
TCG8-T4G5T4-5Chol	SEQ ID NO:8	YTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTTTTGGGGGTTTT
X = 3'-콜레스테릴 Y = 5'-콜레스테릴		

[0130]

[0131] **표 25:** 절반 최대 유효 농도 (EC_{50}) 및 최대 시그널 속도 (V_{max})

ODN	EC_{50} 나노몰 (nM)	Vmax 밀리OD 405nm/min (mOD405/min)
2006-PTO	586	55
2006-PDE-T4	매우 약함	-
2006-PDE-T4-3Chol	활성 (선형)	-
2006-PDE-T4-5Chol	불활성	-
2006-G5	362	30
2006-G5-3Chol	144	30
2006-G5-5Chol	매우 약함	-
2006-T4G5T4	1133	69
2006-T4G5T4-3Chol	23.3	26
2006-T4G5T4-5Chol	매우 약함	-
TCG8-T4G5T4	약함	-
TCG8-T4G5T4-3Chol	약함	-
TCG8-T4G5T4-5Chol	약함	-

[0132]

[0133] 본 실험에서는, 비교적 높은 배경 판독 값으로 인해 EC50 및 Vmax 계산을 위해 모든 데이터 포인트로부터 제로 ODN 값을 차감하였다.

[0134] 본 실험에서 조사된 모든 ODN에 대해, 3'-콜레스테릴 변형은 HEK블루 세포에서 발현된 인간 TLR9에 대한 활성에 가장 유익하였다 (표 24, 도 16a, 16b, 16c, 16d). EC_{50}/V_{max} 계산이 가능한 경우 (2006-G5, 2006-T4G5T4, 표 25), 비변형된 ODN의 EC_{50}은 더 낮았지만 (각각 2.5배 및 48배), 5'-콜레스테릴 변형은 활성 손실을 초래한 것으로 밝혀졌다. 2006-G5-3Chol 및 2006-T4G5T4-3Chol의 EC_{50}은 "산업 표준" 2006-PTO의 EC_{50}보다 더 낮아, 이들은 면역조정성 중재를 위한 후보가 되었다.

[0135] **라모스-블루**

[0136] 3'-콜레스테릴 또는 5'-콜레스테릴 변형 (콜레스테릴-링커 모이어티의 화학 구조에 대하여 각각 도 6 및 15 참조)을, 4가지 상이한 ODN에 적용하였다 (표 26). 변형된 및 비변형된 형태를 라모스-블루 세포에서 시험관내 시험하였다.

[0137] **표 26:** ODN 서열 (소문자: PTO 결합)

ODN	SEQ ID NO	서열
2006-PTO	SEQ ID NO:1	tcgtcgttttgtcgttttgtcgtt
2006-PDE-T4	SEQ ID NO:3	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTTTTTT
2006-PDE-T4-3Chol	SEQ ID NO:3	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTTTTTTX
2006-PDE-T4-5Chol	SEQ ID NO:3	YTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTTTTTT
2006-G5	SEQ ID NO:7	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTTGGGGG
2006-G5-3Chol	SEQ ID NO:7	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTTGGGGGX
2006-G5-5Chol	SEQ ID NO:7	YTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTTGGGGG
2006-T4G5T4	SEQ ID NO:2	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTTTTTTGGGGGTTTT
2006-T4G5T4-3Chol	SEQ ID NO:2	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTTTTTTGGGGGTTTTX
2006-T4G5T4-5Chol	SEQ ID NO:2	YTCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTTTTTTGGGGGTTTT
TCG8-T4G5T4	SEQ ID NO:8	TCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTTTTGGGGGTTTT
TCG8-T4G5T4-3Chol	SEQ ID NO:8	TCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTTTTGGGGGTTTTX
TCG8-T4G5T4-5Chol	SEQ ID NO:8	YTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTTTTGGGGGTTTT
X = 3'-콜레스테릴 Y = 5'-콜레스테릴		

[0138]

[0139] **표 27:** 절반 최대 유효 농도 (EC_{50}) 및 최대 시그널 속도 (V_{max})

ODN	EC_{50} 나노몰 (nM)	Vmax 밀리OD 405nm/min (mOD405/min)
2006-PTO	287	20
2006-PDE-T4	약함	-
2006-PDE-T4-3Chol	활성 (선형)	-
2006-PDE-T4-5Chol	활성 (선형)	-
2006-G5	771	22
2006-G5-3Chol	247	14
2006-G5-5Chol	약함	-
2006-T4G5T4	439	22
2006-T4G5T4-3Chol	42.8	14
2006-T4G5T4-5Chol	약함	-
TCG8-T4G5T4	약함	-
TCG8-T4G5T4-3Chol	339	9
TCG8-T4G5T4-5Chol	1438	14

[0140]

[0141] 본 실험에서는, 표 25와의 일관성을 위해, EC50 및 Vmax 계산을 위해 모든 데이터 포인트로부터 제로 ODN 값을 차감하였다.

[0142] 본 실험에서 조사된 모든 ODN에 대해, 3'-콜레스테릴 변형은 라모스-블루 세포에 내생적으로 존재하는 인간 TLR9에 대한 활성에 가장 유익하였다 (표 26, 도 17a - 17d). EC_{50}/V_{max} 계산이 가능한 경우 (2006-G5, 2006-T4G5T4, 표 25), 비변형된 ODN의 EC_{50}은 더 낮았지만 (각각 3배 및 10배), 5'-콜레스테릴 변형은 활성 손실을 초래한 것으로 밝혀졌는데, 단 양쪽 유도체화가 개선된 활성을 야기시켰지만, 5'-콜레스테릴에 대한 것보다는

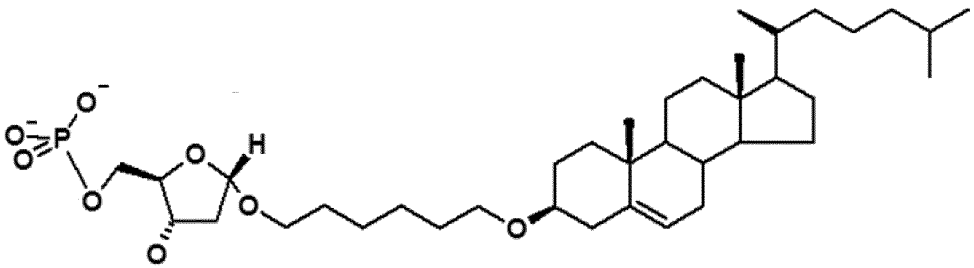
3'-콜레스테릴에 대해서 더 많은 TCG8-T4G5T4는 제외되었다 (도 17d, 표 26). 2006-G5-3Chol 및 2006-T4G5T4-3Chol의 EC_{50}은 "산업 표준" 2006-PTO의 EC_{50}보다 더 낮아, 이들은 면역조정성 중재를 위한 후보가 되었다.

[0143] 관련 기술분야의 통상의 기술자는 본 발명의 바람직한 실시양태에 대해 많은 변화 및 변형이 이루어질 수 있으며, 이러한 변화 및 변형은 본 발명의 요지를 벗어나지 않고 이루어질 수 있음을 이해할 것이다. 따라서, 첨부된 청구범위는 본 발명의 진정한 요지 및 범위 내에 있는 바와 같은 모든 등가의 변형을 포함하는 것으로 의도된다.

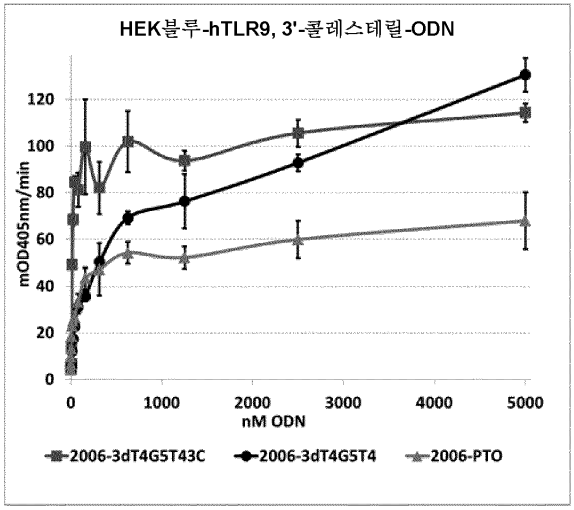
[0144] 본 명세서에 인용되거나 기재된 각각의 특허, 특허 출원 및 공보의 개시내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

도면

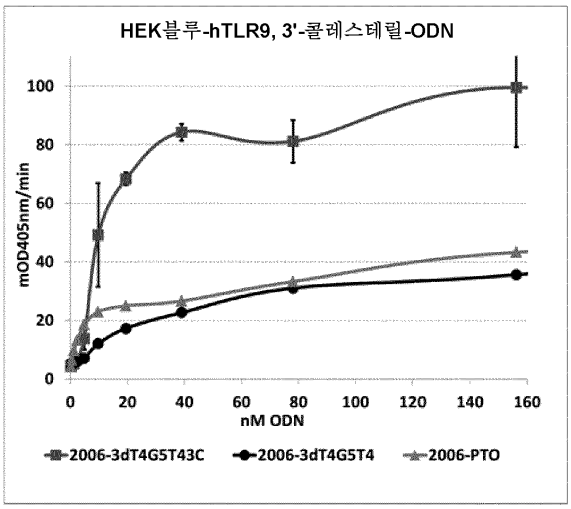
도면1



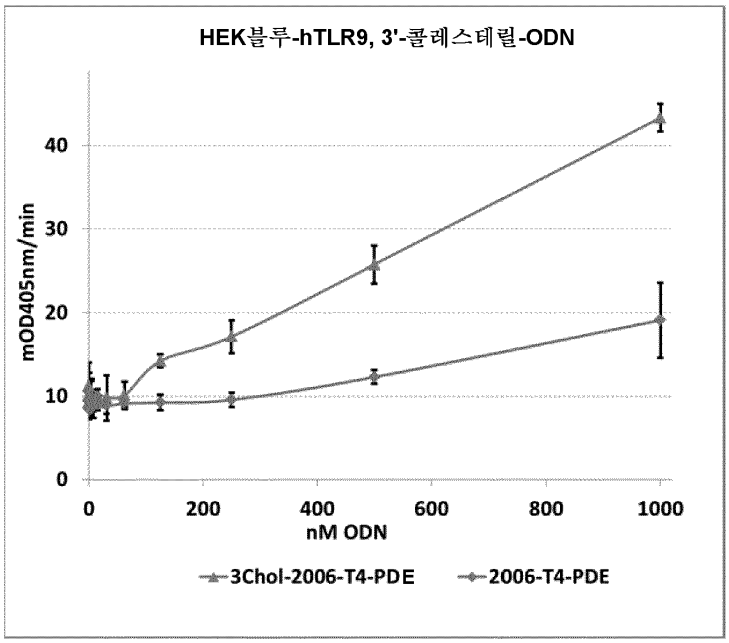
도면2a



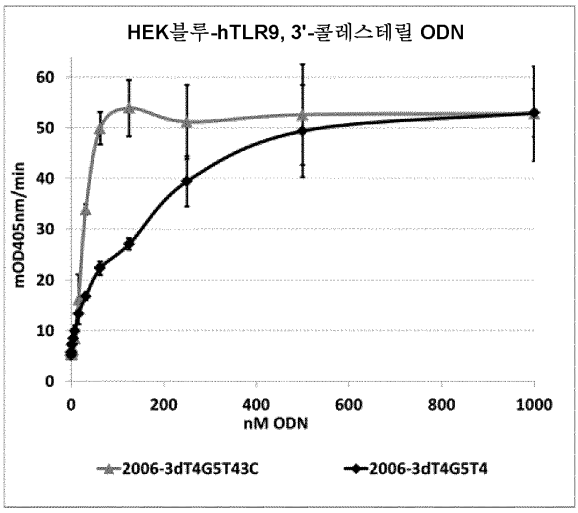
도면2b


HEK블루-hTLR9, 3'-콜레스테릴-ODN
mOD405nm/min
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
80
100
120
140
160
nM ODN
2006-3dT4G5T43C
2006-3dT4G5T4
2006-PTO

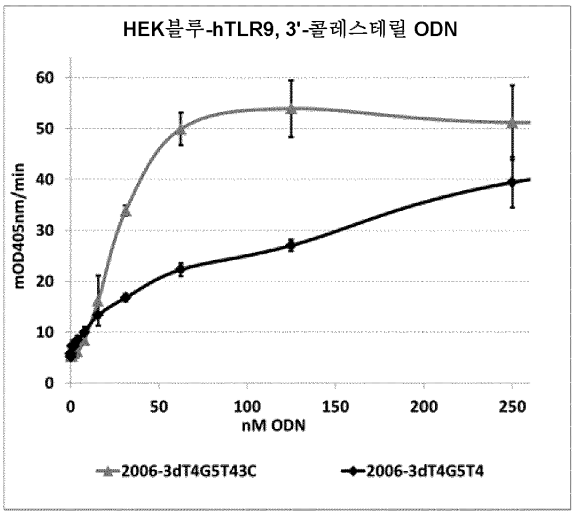
도면3


HEK블루-hTLR9, 3'-콜레스테릴-ODN
mOD405nm/min
40
30
20
10
0
0
200
400
600
800
1000
nM ODN
3Chol-2006-T4-PDE
2006-T4-PDE

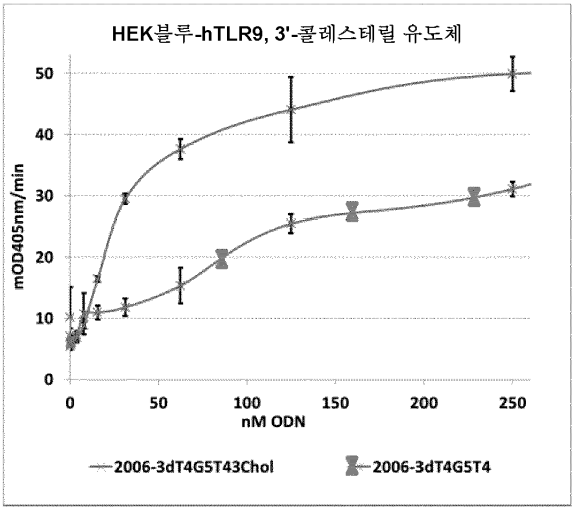
도면4a



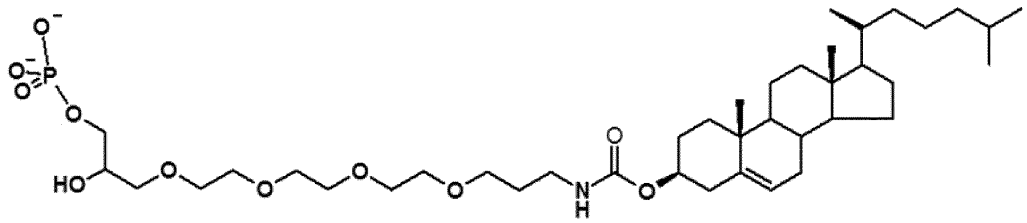
도면4b



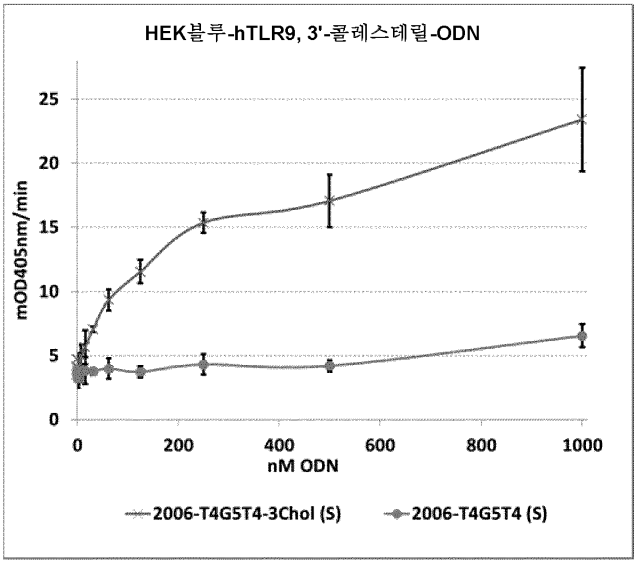
도면5



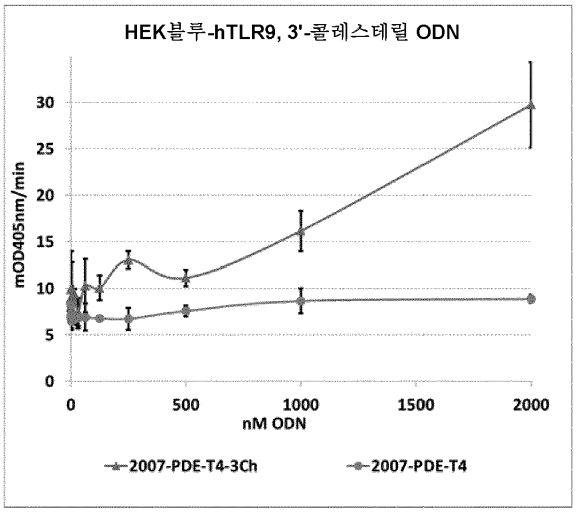
도면6



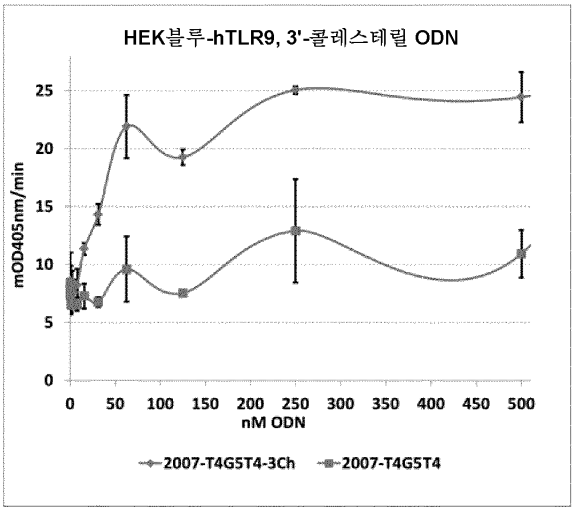
도면7


HEK블루-hTLR9, 3'-콜레스테릴-ODN
mOD405nm/min
25
20
15
10
5
0
0
200
400
600
800
1000
nM ODN
2006-T4G5T4-3Chol (S)
2006-T4G5T4 (S)

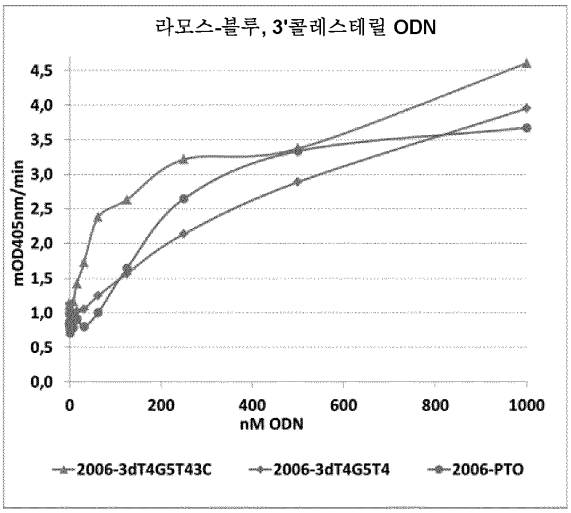
도면8a


HEK블루-hTLR9, 3'-콜레스테릴 ODN
mOD405nm/min
30
25
20
15
10
5
0
0
500
1000
1500
2000
nM ODN
2007-PDE-T4-3Ch
2007-PDE-T4

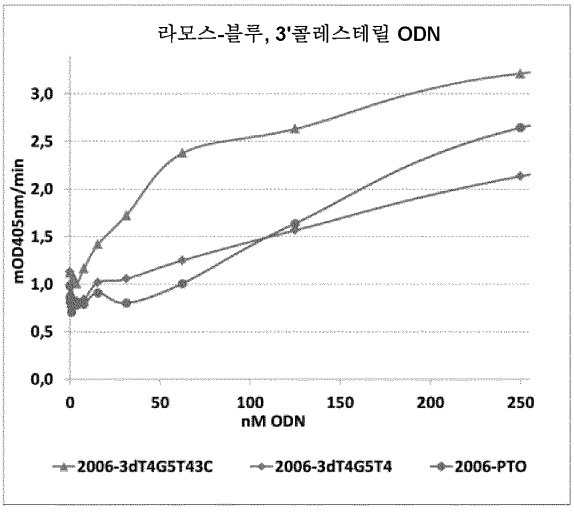
도면8b



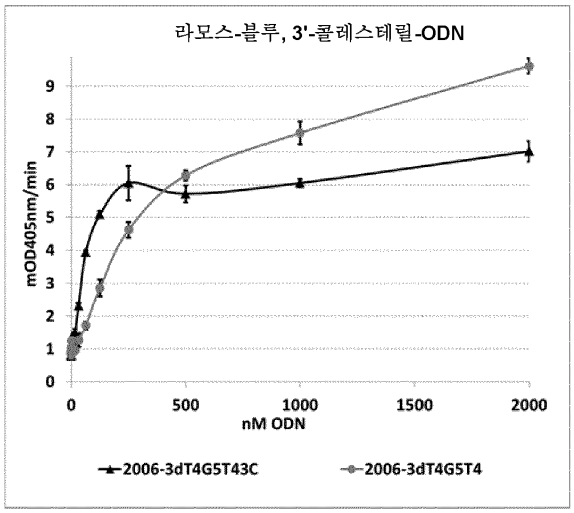
도면9a



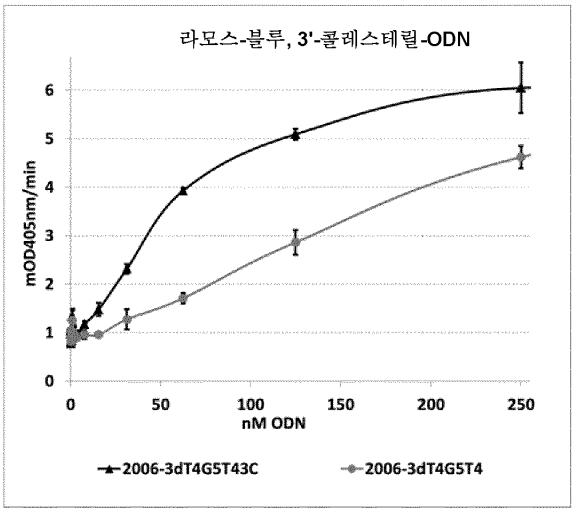
도면9b



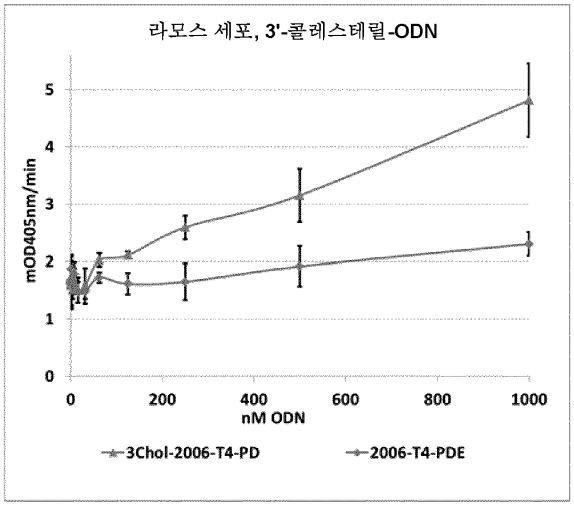
도면10a


라모스-블루, 3'-콜레스테릴-ODN
mOD405nm/min
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
0
500
1000
1500
2000
nM ODN
2006-3dT4G5T43C
2006-3dT4G5T4

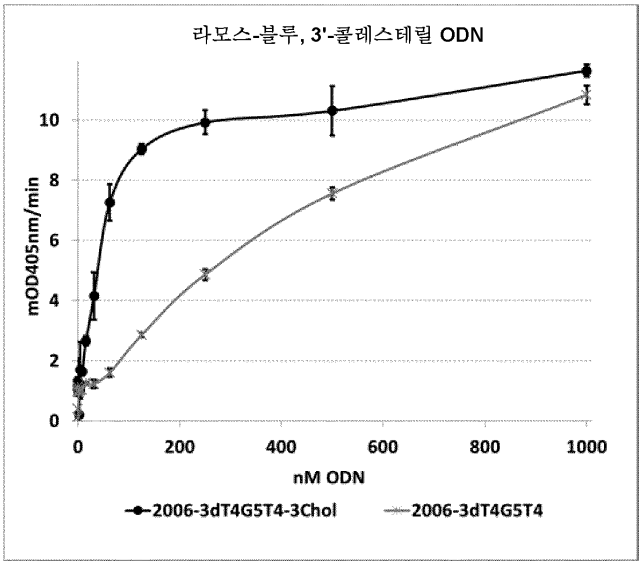
도면10b


라모스-블루, 3'-콜레스테릴-ODN
mOD405nm/min
0
1
2
3
4
5
6
0
50
100
150
200
250
nM ODN
2006-3dT4G5T43C
2006-3dT4G5T4

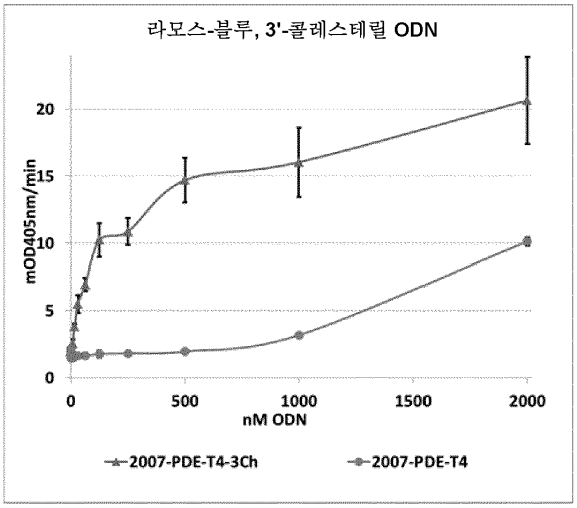
도면11


라모스 세포, 3'-콜레스테릴-ODN
mOD405nm/min
0
1
2
3
4
5
0
200
400
600
800
1000
nM ODN
3Chol-2006-T4-PD
2006-T4-PDE

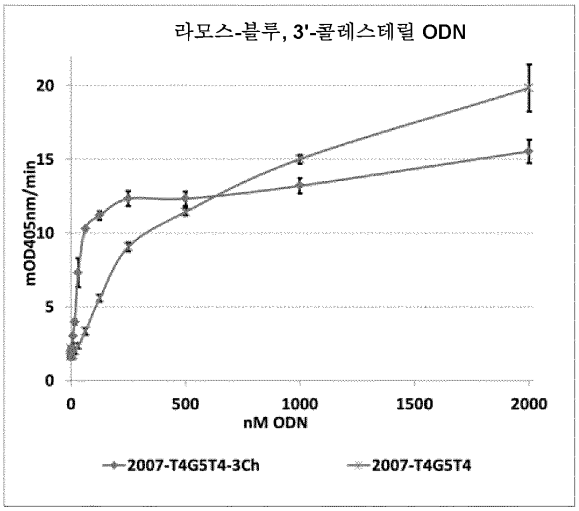
도면12


라모스-블루, 3'-콜레스테릴 ODN
mOD405nm/min
0
2
4
6
8
10
0
200
400
600
800
1000
nM ODN
2006-3dT4G5T4-3Chol
2006-3dT4G5T4

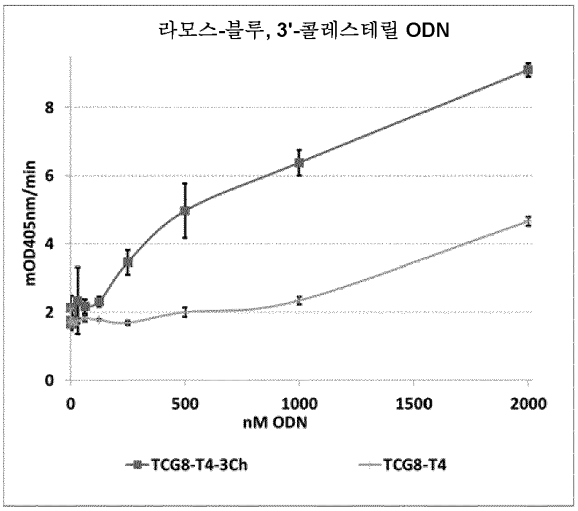
도면13a



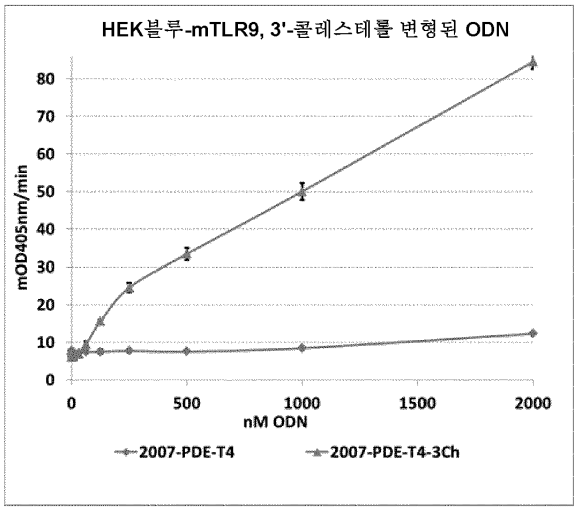
도면13b



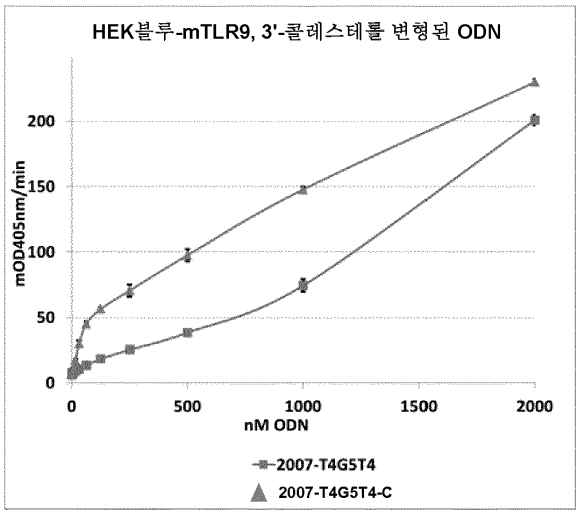
도면13c



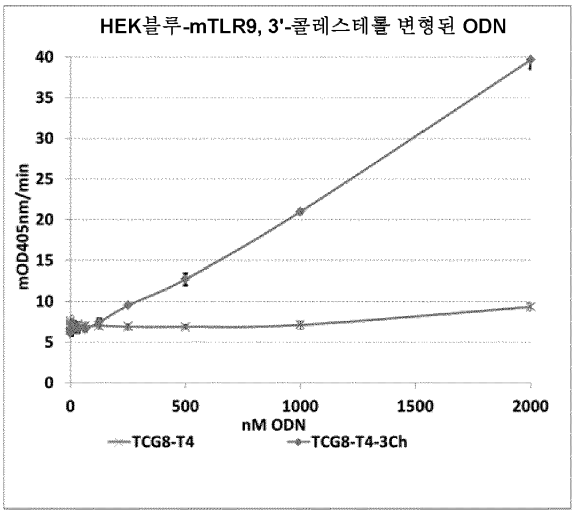
도면14a



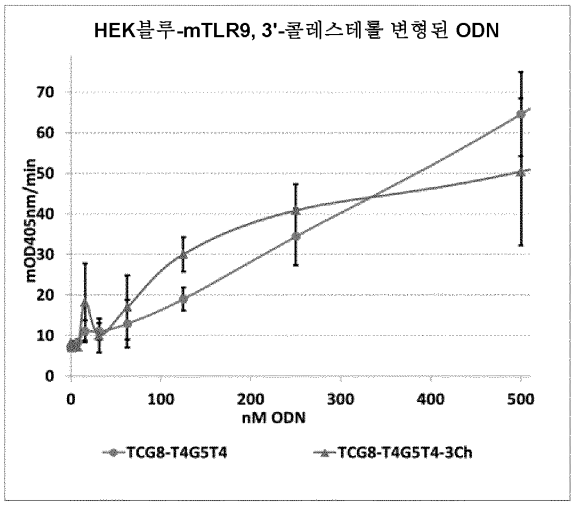
도면14b



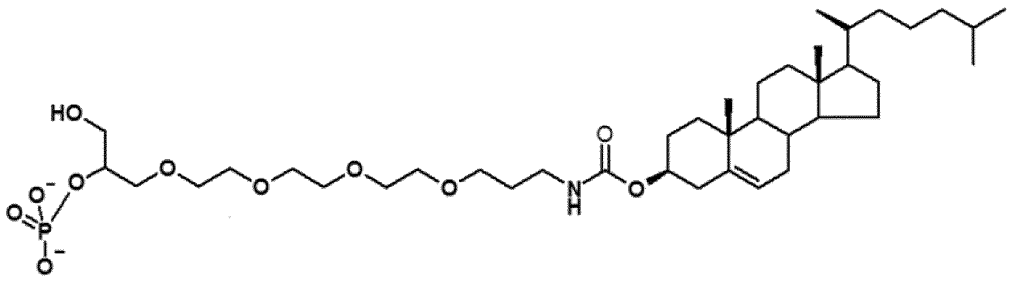
도면14c



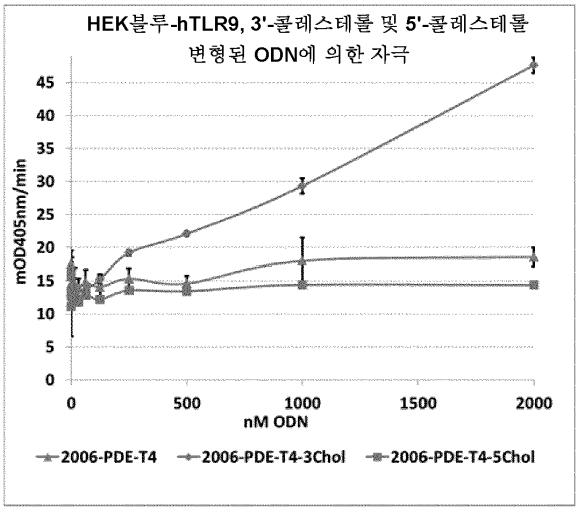
도면14d



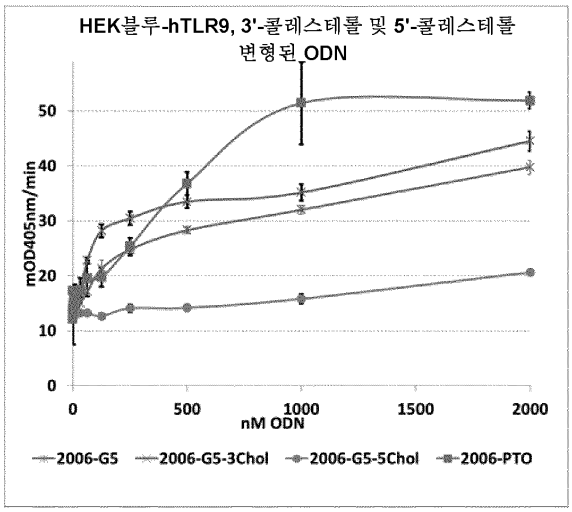
도면15



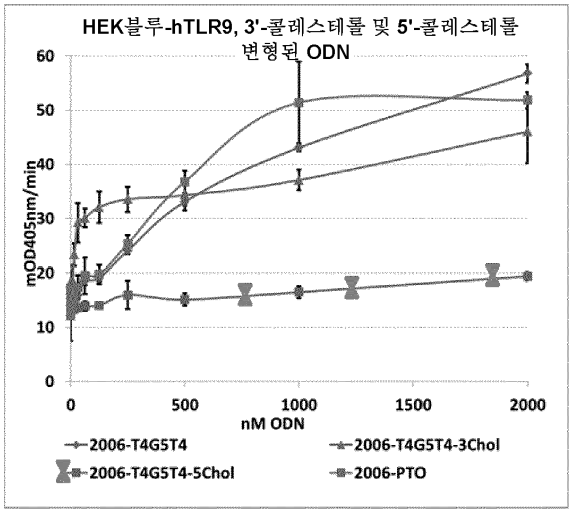
도면16a



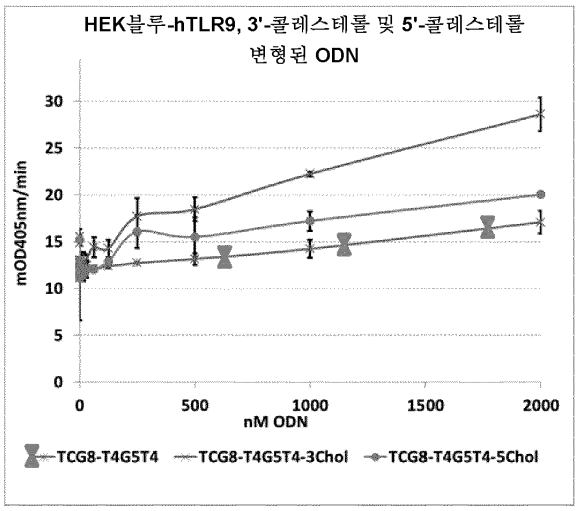
도면16b


HEK블루-hTLR9, 3'-콜레스테롤 및 5'-콜레스테롤 변형된 ODN
mOD405nm/min
0
10
20
30
40
50
0
500
1000
1500
2000
nM ODN
2006-G5
2006-G5-3Chol
2006-G5-5Chol
2006-PTO

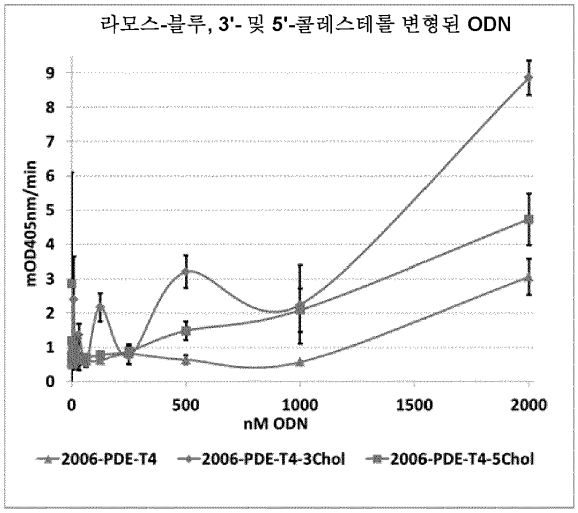
도면16c


HEK블루-hTLR9, 3'-콜레스테롤 및 5'-콜레스테롤 변형된 ODN
mOD405nm/min
0
10
20
30
40
50
60
0
500
1000
1500
2000
nM ODN
2006-T4G5T4
2006-T4G5T4-3Chol
2006-T4G5T4-5Chol
2006-PTO

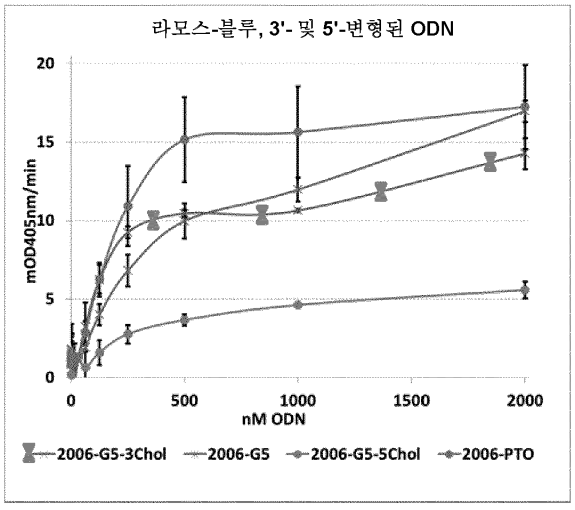
도면16d



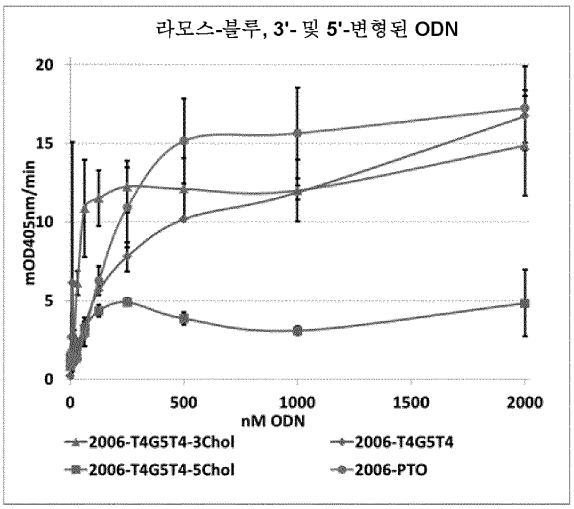
도면17a



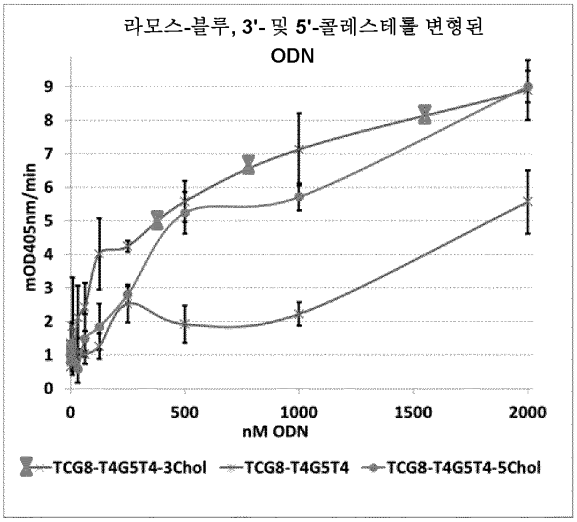
도면17b



도면17c



도면17d



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Bayer Animal Health GmbH

<120> IMMUNOSTIMULATORY OLIGONUCLEOTIDES

<130> BHC168026-FC

<150> EP17207740.6

<151> 2017-12-15

<150> EP17207746.3

<151> 2017-12-15

<150> EP17207750.5

<151> 2017-12-15

<160> 9

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> Phosphorothioate (PTO) linkages

<223> Synthetic Oligonucleotide 2006-PTO

<400> 1

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 2

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Oligonucleotide 2006-3dT4G5T4

<400> 2

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgttttttgg gggtttt 37

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Oligonucleotide 2006-T4-PDE

<400> 3

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtttttt 28

<210> 4

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Oligonucleotide 2007-PDE-T4

<400> 4

tcgtcgttgt cgttttgtcg tttttt 26

<210> 5

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Oligonucleotide 2007-T4G5T4

<400> 5

tcgtcgttgt cgttttgtcg ttttttgggg gtttt 35

<210> 6

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Oligonucleotide TCG8-T4

<400> 6

tcgtcgtcgt cgtcgtcgtc gtcgtttt 28

<210> 7

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Oligonucleotide 2006-G5

<400> 7

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgttggggg 29

<210> 8

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Oligonucleotide TCG8-T4G5T4

<400> 8

tcgtcgtcgt cgtcgtcgtc gtcgttttgg gggtttt 37

<210> 9

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Oligonucleotide PDE-2006

<400> 9

ttttgggggt ttt 13