



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년05월10일
(11) 등록번호 10-1856462
(24) 등록일자 2018년05월03일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/7125 (2006.01) A61K 38/08 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01) A61K 9/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 31/7125 (2013.01)
A61K 38/08 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7010287(분할)
(22) 출원일자(국제) 2010년03월25일
심사청구일자 2017년05월15일
(85) 번역문제출일자 2017년04월14일
(65) 공개번호 10-2017-0045371
(43) 공개일자 2017년04월26일
(62) 원출원 특허 10-2011-7025110
원출원일자(국제) 2010년03월25일
심사청구일자 2015년01월30일
(86) 국제출원번호 PCT/US2010/028658
(87) 국제공개번호 WO 2010/111485
국제공개일자 2010년09월30일
(30) 우선권주장
61/163,137 2009년03월25일 미국(US)
61/179,246 2009년05월18일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
Journal of Immunology. Vol. 177, No. 6, pp. 3515-3519 (2006)
Journal of Leukocyte Biology. Vol. 83, No. 5, pp. 1118-1127 (2008)
Experimental and Molecular Medicine. Vol. 39, No. 4, pp. 421-438 (2007)
- (73) 특허권자
보드 오브 리전츠, 더 유니버시티 오브 텍사스 시스템
미국 텍사스주 78701 오스틴 웨스트 7번 스트리트 210
(72) 발명자
디키 버튼
미국 텍사스주 77005 휴스턴 머서 스트리트 6514
투빔 마이클
미국 텍사스주 77079 휴스턴 트랄 할로우 12961
에반스 스콧
미국 텍사스주 77401 벨레어 홀리 스트리트 4502
(74) 대리인
장훈

전체 청구항 수 : 총 18 항

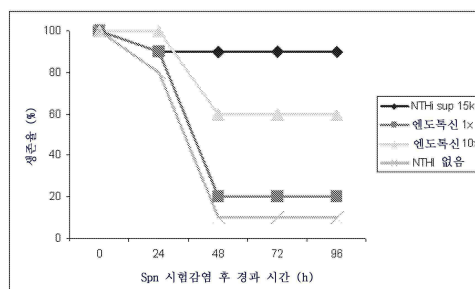
심사관 : 김은영

(54) 발명의 명칭 병원체에 대한 포유동물의 선천성 면역 저항성의 자극을 위한 조성물

(57) 요약

본 발명의 양태는 미생물에 감염되었거나 그러한 감염 발생 위험이 있는 개체에게 유효량의 TLR9 효능제 및 TLR 2/6 효능제를 투여하는 단계를 포함하여 상기 개체에서 미생물 감염을 치료, 억제 또는 약독화하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 39/39 (2013.01)

A61K 9/0078 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

바이러스에 감염되었거나 바이러스 감염의 발증 또는 획득 위험이 있는 개체에게서 바이러스 감염을 치료, 억제 또는 약화(attenuate)시키기 위한, TLR9를 활성화시키는 올리고데옥시뉴클레오타이드(ODN)인 TLR9 효능제를 포함하는 약제학적으로 허용가능한 조성물로서,

상기 약제학적으로 허용가능한 조성물이 PAM2CSK4와 병용하여 사용되는, 약제학적으로 허용가능한 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 약제학적으로 허용가능한 조성물이 TLR9 효능제 및 PAM2CSK4를 둘 다 포함하는, 약제학적으로 허용가능한 조성물.

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항 또는 제3항에 있어서, 상기 TLR9 효능제가 C형 또는 B형 올리고데옥시뉴클레오타이드(ODN)인, 약제학적으로 허용가능한 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 C형 ODN이 ODN2395, ODNM362 또는 ODN10101인, 약제학적으로 허용가능한 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 B형 ODN이 2006-G5인, 약제학적으로 허용가능한 조성물.

청구항 8

제1항 또는 제3항에 있어서, 상기 개체가 병원성 바이러스에 노출된 적이 있는, 약제학적으로 허용가능한 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 바이러스가 아데노바이러스과(Adenoviridae), 코로나바이러스과(Coronaviridae), 필로바이러스과(Filoviridae), 플라비바이러스과(Flaviviridae), 헤파드나바이러스과(Hepadnaviridae), 헤르페스바이러스과(Herpesviridae), 오르토믹소바이러스과(Orthomyxoviridae), 파라믹소바이러스과(Paramyxoviridae), 뉴모바이러스과(Pneumoviridae), 피코르나바이러스과(Picornaviridae), 폭스바이러스과(Poxviridae), 레트로바이러스과(Retroviridae), 토가바이러스과(Togaviridae), 파라인플루엔자(Parainfluenza), 인플루엔자(Influenza), H5N1, 마르부르그(Marburg), 에볼라(Ebola), 중증급성호흡기증후군 코로나바이러스(Severe acute respiratory syndrome coronavirus), 황열 바이러스(Yellow fever virus), 사람호흡기세포융합바이러스(Human respiratory syncytial virus), 한타바이러스(Hantavirus) 또는 백신니아 바이러스(Vaccinia virus)인, 약제학적으로 허용가능한 조성물.

청구항 10

제1항 또는 제3항에 있어서, 상기 ODN 및 PAM2CSK4가 분무 또는 에어로졸 제형으로 투여되는, 약제학적으로 허

용가능한 조성물.

청구항 11

제1항 또는 제3항에 있어서, 상기 ODN 및 PAM2CSK4의 유효량이 상기 개체의 폐에 침착(deposit)되는, 약제학적으로 허용가능한 조성물.

청구항 12

제1항 또는 제3항에 있어서, 상기 ODN 및 PAM2CSK4가 상기 개체의 체중 기준으로 0.1 mg/kg 내지 100 mg/kg의 양으로 투여되는, 약제학적으로 허용가능한 조성물.

청구항 13

제1항 또는 제3항에 있어서, 상기 ODN 및 PAM2CSK4 둘다의 투여가 상기 바이러스 감염을 약화시키는 것인, 약제학적으로 허용가능한 조성물.

청구항 14

제1항 또는 제3항에 있어서, 상기 ODN 및 PAM2CSK4가 병원성 미생물을 함유하지 않는 것인, 약제학적으로 허용가능한 조성물.

청구항 15

제1항 또는 제3항에 있어서, 상기 조성물이 소염제 및 하나 이상의 약제학적 부형제를 추가로 포함하고, 상기 조성물이 무균성이고 병원성 미생물이 없는 것인, 약제학적으로 허용가능한 조성물.

청구항 16

제1항 또는 제3항에 기재된 약제학적으로 허용가능한 조성물을 포함하는 흡입 장치.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 장치가 비강 흡입에 의해 상기 약제학적 조성물을 전달하기 위한 것인, 흡입 장치.

청구항 18

제16항에 있어서, 상기 흡입 장치가 분무기(nebulizer), 정량 흡입기 (metered-dose inhaler: MDI), 연무기(sprayer) 및 건조 분말 흡입 장치로부터 선택되는, 흡입 장치.

청구항 19

제1항 또는 제3항에 기재된 약제학적 조성물을 포함하는 비강 스프레이.

청구항 20

제1항 또는 제3항에 있어서, 상기 조성물이 글리세롤을 추가로 포함하는, 약제학적으로 허용가능한 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 2009년 3월 25일에 출원된 미국 임시특허출원 제61/163,137호 및 2009년 5월 18일에 출원된 미국 임시특허출원 제61/179,246호에 대해 우선권을 주장하고, 각 출원은 전문이 본원에 참조로서 인용된다.

[0002] 본 발명은 일반적으로 미생물학, 면역학 및 항미생물 약물요법 분야에 관한 것이다. 보다 자세하게는, 본 발명의 조성물 및 방법은 소(small) 분자 조성물을 이용하여 미생물 감염 또는 침습을 치료하거나 약독화하기 위하여 개체의 폐에서 선천성 면역성을 조절하는 것에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 감염에 대한 폐의 민감성은 가스 교환의 조직적 요건으로부터 발생한다. 호흡을 유지하기 위해 사람은 지속적

으로 100 m² 폐표면을 외부 환경에 노출한다. 폐는 공기뿐만 아니라 공기속에 분무 상태로 존재하는 입자, 액적 및 병원체에 노출된다. 불투과성 피부에 에워싸인 표피 면이나 두터운 점액 흡수막이 있는 위장관과는 달리, 폐는 최소의 방어막으로 커다란 환경과 접하고 있다. 보다 실질적인 보호막은 방해받지 않는 기체 확산의 필요성으로 인해 불가능하다.

[0004] 구조적 취약성에도 불구하고 폐는 일반적으로 다양한 기계적, 체액적 및 세포적 메커니즘을 통해 감염에 대하여 성공적으로 자체 방어를 한다 (Knowles *et al.*, 2002; Martin and Frevert, 2005; Rogan, *et al.*, 2006; Travis, *et al.*, 2001); (Mizgerd, 2008; Bals and Hiemstra, 2004; Bartlett *et al.*, 2008; Hiemstra, 2007; Hippenstiel *et al.*, 2006; Schutte and McCray, 2002). 흡입된 대부분의 미생물 병원체는 기도벽에 부딪쳐 점액에 포획된 다음 점액섬모 자동조절 시스템을 경유하여 방출됨으로써 폐포에 침투하지 못한다 (Knowles *et al.*, 2002). 이러한 운명을 벗어난 병원체의 경우 기도액에 구성적으로 존재하는 항균 펩타이드로 인해 성장에 제약을 받는다 (Rogan, *et al.*, 2006; Travis, *et al.*, 2001). 말단공간에 내재해 있는 폐포대식세포는 이들 유기체를 소화할 수 있으며, 그럼으로써 폐를 잠재적 감염으로부터 보호한다.

[0005] 흔히 수동 가스 교환 장벽으로 간주되는 기도 및 폐포상피는 병원성 자극을 받을 때 뚜렷한 국소적 구조 및 기능 변화를 일으킴으로써 기본적인 폐 방어를 보조한다. 바이러스, 진균 또는 알러지 염증에 반응하여 기도 분비 세포는 급속히 자신의 신장을 증대시키고 상피 세포질을 분비파립으로 채우고, 이 과정은 염증화생이라 한다 (Evans *et al.*, 2004; Williams *et al.*, 2006). 병원체의 존재하에 폐포상피는 세포막계와 분비기전을 활성화하며, 그럼으로써 백혈구가 폐 보호에 참여케한다 (Evans *et al.*, 2005). 아마도 가장 중요한 것은 미생물과 호흡 상피 패턴 인지 수용체가 상호작용함으로써, 디펜신, 카텔리시딘, 리소자임 및 반응성 산소 종을 포함한 많은 살균성 산물이 기도액내로 발현된다는 것이다 (Rogan *et al.*, 2006; Forteza *et al.*, 2005; Akinbi *et al.*, 2000; Bals and Hiemstra, 2004; Bals and Hiemstra, 2006). 주목되는 것은 폐렴(세균성 또는 바이러스성)이 세계적으로 감염에 의한 사망의 주된 원인이라는 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 미생물 감염을 억제하고/하거나 치료하는 추가적 방법 및 조성물이 요구된다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명은 선천성 저항성 (자극된 선천성 저항성, StIR)을 자극하는 조성물 및 이러한 조성물을 StIR을 자극하는데 사용하는 방법을 제공한다. 특정 양태에서 StIR은 폐 StIR이다. 본 발명의 한 가지 관점은 보다 높은 치료/독성 비율 또는 지수를 제공하는데 있다. 본 발명의 양태는 포유동물 (예: 사람) 개체의 생물학적 방어능 (예: 개체의 감염에 대한 면역성)을 감염으로부터 증강시켜 주는 조성물, 제제 및 방법을 포함한다. 특정 관점으로서, 본 발명의 조성물은 개체의 폐에 유효량으로 침적된다. 본 발명의 관점은 미생물 감염에 대항한 생물학적 방어력의 신속하고 일시적인 증강 또는 강화를 제공한다. 개체의 면역성의 증강은 미생물 감염을 약독화한다. 약독화는 감염이나 미생물 성장 또는 생존을 억제, 처치 또는 제어함으로써 달성될 수 있다. 본 발명의 관점은 개체의 폐 및 기도의 방어능을 강화하는 것이다.

[0008] 특정 관점으로서, 미생물에 감염되었거나 감염 위험이 있는 개체의 미생물 감염을 치료, 억제 또는 약독화하는 방법이 제공되며, 이 방법은 하나 이상의 선천 수용체에 대한 하나 이상의 리간드를 포함한 StIR 조성물의 유효량을 투여함을 포함한다. 많은 선천 수용체가 확인되었으며, 이들로 한정하는 것은 아니지만 톨-유사 수용체 (Toll-like receptor, TLR), C-형 렉틴 수용체 (CLR) 및 뉴클레오타이드-결합 올리고머화 도메인-유사 수용체 (Nod-유사 수용체 또는 NLR)가 포함된다. TLR은 선천면역계에서 중추적 역할을 담당하는 단백질 부류이다. 이들은 미생물로부터 파생된 구조적으로 보존된 분자를 인지하는 단일 막-횡단 비-촉매적 수용체이다. 일단 이들 미생물이 피부 또는 장관, 폐 및 비뇨생식기 점막위 또는 안에 존재하면, 이들은 TLR에 의해 인지되고, TLR은 면역세포 반응을 활성화한다. 흥미로운 것은 이들 TLR 효능제중 많은 것들이 단독으로 투여되었을 때 중요한 StIR을 유도하지 않는다는 것이다. 전형적으로, 본원에 기술된 방법을 이용하여 치료받고 있는 개체 또는 피검체는 병원성 미생물에 노출되어 왔거나 그러한 노출 위험이 있다.

[0009] 특정 양태는 1, 2, 3, 4 또는 그 이상의 TLR 효능제(agonist)를 포함함을 특징으로 하여 기도에 투여할 수 있는 조성물 및 이러한 조성물을 이용한 방법에 관한 것이다. TLR 효능제는 TLR2/1, TLR2/6, TLR3, TLR4, TLR5, TLR9 또는 TLR7 효능제중에서 선택된다. 특정 관점으로서, TLR 효능제는 TLR9 및 TLR2/6 효능제중에서

선택된다. 추가의 관점으로서, TLR 효능제는 TLR5 효능제중에서 선택된다. 다른 추가의 관점으로서, TLR5 효능제는 TLR2/6, TLR4, TLR9 또는 TLR7 효능제와 배합하여 사용될 수 있다. 특정 관점으로서 TLR9 효능제는 TLR2/6, TLR4, TLR5 또는 TLR7 효능제와 배합하여 사용될 수 있다. 다른 관점에서 TLR2/6 효능제는 TLR4, TLR5, TLR9 또는 TLR7 효능제와 배합하여 사용될 수 있다. 특정 관점에서, TLR4 효능제는 TLR2/6, TLR5, TLR9 또는 TLR7 효능제와 배합하여 사용될 수 있다. 추가의 관점에서, TLR7 효능제는 TLR2/6, TLR4, TLR5 또는 TLR9 효능제와 배합하여 사용될 수 있다. 또 다른 추가의 관점에서, 이들 이중 배합물은 모두 TLR2/6, TLR4, TLR5, TLR9 또는 TLR7 효능제중에서 선택된 제3, 제4 또는 제5 TLR 효능제를 포함할 수 있다.

[0010] 특정 양태는 TLR9 효능제와 TLR2/6 효능제의 유효량을 미생물에 감염되었거나 감염의 발생 또는 획득 위험이 있는 개체에 투여하는 것을 포함함을 특징으로 하는 미생물 감염을 치료, 억제 또는 약독화하는 방법에 관한 것이다. 특정 관점으로서, TLR2/6 효능제는 PAM2CSK4이다. 추가의 관점으로서, TLR9 효능제는 C형 올리고데옥시뉴클레오타이드(ODN)이다. C형 ODN은 이들로 한정되는 것은 아니지만 ODN2395 또는 ODNM362 또는 ODN10101 또는 다른 C형 ODN 또는 이들의 유사체를 포함할 수 있다. 특정 관점에서, 대상 개체는 병원성 미생물에 노출되었거나 노출 위험이 있다. 미생물은 바이러스, 세균 또는 진균일 수 있다.

[0011] 다른 관점으로서, TLR9 효능제 및 TLR2/6 효능제는 분무 제형으로 투여된다. TLR9 효능제 및/또는 TLR2/6 효능제는 개체의 체중 kg당 약 0.1, 1, 5, 10, 50 μ g 또는 mg 내지 약 5, 10, 50, 100 μ g 또는 mg의 양으로 (이들 사이의 모든 값 및 범위를 포함함) 투여될 수 있다.

[0012] 특정 양태는 TLR9 효능제 및 TLR2/6 효능제, 소염제 및 하나 이상의 약제학적 부형제를 포함하고, 무균상태로서 병원성 미생물이 실질적으로 없는 약제학적으로 허용가능한 조성물에 관한 것이다. 특정 관점에서 TLR2/6 효능제는 PAM2CSK4이다. 추가의 관점에서 TLR9 효능제는 C형 올리고데옥시뉴클레오타이드(ODN)이다. C형 ODN은 이들로 한정되는 것은 아니지만 ODN2395 또는 ODNM362 또는 ODN10101을 포함할 수 있다.

[0013] 특정 관점에서 St IR 조성물은 TLR5 효능제로 알려진 펩타이드 QRLSTGSRINSKDDAAGLQIA (서열번호 2)의 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 또는 22개 연속 아미노산을 포함한 플라젤린 폴리펩타이드 또는 이의 단편 또는 유도체를 포함한다. 본 발명의 폴리펩타이드는 또한 서열번호 2와 70, 80 또는 90% 이상 (이들 사이의 모든 값과 범위를 포함함) 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 다른 관점으로서, 플라젤린은 합성 및/또는 정제 또는 분리된 플라젤린 폴리펩타이드 또는 펩타이드이다. 용어 "정제" 또는 "분리"는 성분이 다른 단백질 또는 합성 시약 또는 부산물로부터 이미 분리되었거나 정제된 상태이고 그 성분이 조성물에 제형화되기 전에 약 95% 이상의 순도임을 의미한다. 특정 양태로서, 정제 또는 분리된 성분은 약 80, 95, 96, 97, 98, 99, 99.1, 99.2, 99.3, 99.4, 99.5% 또는 그 이상의 순도 또는 이들 사이의 범위에 속하는 순도이다. 그런 다음 이러한 정제된 성분은 본원에 기술된 바와 같이 다른 성분과 혼합하여 조성물을 형성할 수 있다.

[0014] 재조합 플라젤린 단백질 또는 이의 절편 또는 단편은 서열번호 2 또는 다른 플라젤린 폴리펩타이드의 5, 10, 15, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250, 300, 350 또는 400개 연속 아미노산 (이들 사이의 모든 값 및 범위를 포함함)을 포함한다. 이들 절편 또는 단편은 서열번호 2 또는 다른 플라젤린 폴리펩타이드와 적어도, 최대, 또는 약 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% 동일하다. 특정 관점에서, 플라젤린 폴리펩타이드 또는 단편은 서열번호 2의 서열과 75% 이상 동일하다. 다른 관점에서, 플라젤린 폴리펩타이드 또는 단편은 서열번호 2의 서열과 80% 이상 동일하다. 다른 관점에서, 플라젤린 폴리펩타이드 또는 단편은 서열번호 2의 서열과 85% 이상 동일하다. 다른 관점에서, 플라젤린 폴리펩타이드 또는 단편은 서열번호 2의 서열과 90% 이상 동일하다. 다른 관점에서, 플라젤린 폴리펩타이드 또는 단편은 서열번호 2의 서열과 95% 이상 동일하다. 플라젤린 또는 이의 단편의 유도체 또는 변이체는 서열번호 2의 삽입, 결실 및 점돌연변이를 포함한다. 특정 삽입 변이는 플라젤린에 외인성인 아미노산 서열을 카르복시 또는 아미노 말단에 포함한 융합 단백질이다. 많은 플라젤린 단백질이 당 업계에 알려져 있으며 이들로 한정되는 것은 아니지만 등록번호 BAB58984 (gi|14278896); YP_001330159 (gi|150402865); YP_001323483 (gi|150399716); CAA28975 (gi|1333716); CAA02137 (gi|1567895); CAA67105 (gi|1580779); AAR10473 (gi|38049688); CAR58992 (gi|197093531); YP_001217666 (gi|147675484); CAL12564 (gi|122089712); BAD14977 (gi|46093563); 또는 CAD05707 (gi|16503200)의 플라젤린이 포함되고, 위 플라젤린에 대한 각각의 전체 내용은 본원의 우선일을 기준으로 본원에 참고로 인용된다.

[0015] 본 발명의 양태는 기도를 통해 투여될 수 있다. 본 발명의 방법은 흡입에 의한 조성물의 투여 또는 상 및/또는 하 기도로의 다른 투여 방법을 포함한다. 특정 관점에서 투여는 흡입에 의한 투여이다. 특정 관점으로서, St IR 조성물은 분무 또는 에어로졸 제형으로 투여된다. 추가의 관점으로서, 조성물은 에어로졸 또는 분무제이

거나 피검체에 흡입되거나 점적될 수 있는 형태이다. 조성물은 흡입 또는 흡인에 의해 투여될 수 있다. 개별적으로 또는 응집물로서 TLR 효능제를 포함한 StIR 조성물은 개체의 체중 kg당 약 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 μg 또는 mg 내지 약 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 200 μg 또는 mg의 양으로 투여될 수 있다. 다른 관점에서, 피검체는 약 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 200 μg 또는 mg의 StIR 또는 TLR 효능제를 개별적으로 투여받거나 모든 TLR 효능제를 합쳐서 투여받을 수 있다. 피검체는 흡입된 바이러스, 세균 또는 진균에 노출되었거나 노출 위험이 있을 수 있다. 또 다른 추가의 양태는 유기체에 노출되기 또는 노출의심 또는 고도의 노출위험이 있기 전, 후, 중; 전후; 전중; 중후; 전후중에 조성물을 투여하는 방법을 포함한다. 피검체는 생물학적무기 또는 기회병원체에 노출될 수 있다. 특정 관점으로서, 피검체는 예를 들면 암환자 또는 AIDS 환자로서 면역약화될 수 있다.

[0016] 또 다른 양태에서 본 발명은 하나 이상의 TLR 효능제, 소염제, 항균제 및/또는 하나 이상의 약제학적 부형제를 포함한 약제학적으로 허용가능한 조성물에 관한 것이다. 전형적으로 이러한 조성물은 무균성으로 병원성 미생물이 실질적으로 없는 상태이다.

[0017] 특정 관점으로서, 처치 또는 방어 대상의 병원성 또는 잠재적 병원성 미생물은 바이러스, 세균 및/또는 진균이다. 특정 관점에서, 미생물은 바이러스이다. 바이러스는 아데노바이러스과(Adenoviridae), 코로나바이러스과(Coronaviridae), 필로바이러스과(Filoviridae), 플라비바이러스과(Flaviviridae), 헤파드나바이러스과(Hepadnaviridae), 헤르페스바이러스과(Herpesviridae), 오르토믹소바이러스과(Orthomyxoviridae), 파라믹소바이러스과(Paramyxovirinae), 뉴모바이러스과(Pneumovirinae), 피코르나바이러스과(Picornaviridae), 폭스바이러스과(Poxviridae), 레트로바이러스과(Retroviridae) 또는 토가바이러스과(Togaviridae) 및/또는 파라인플루엔자(Parainfluenza), 인플루엔자(Influenza), H5N1, 마르부르그(Marburg), 에볼라(Ebola), 중증급성호흡기증후군 코로나바이러스(Severe acute respiratory syndrome coronavirus), 황열 바이러스(Yellow fever virus), 사람호흡기세포융합바이러스(Human respiratory syncytial virus), 한타바이러스(Hantavirus) 또는 백신니아 바이러스(Vaccinia virus)일 수 있다.

[0018] 다른 추가의 관점에서, 처치 또는 방어 대상의 병원성 또는 잠재적 병원성 미생물은 세균이다. 세균은 세포내, 그람 양성 또는 그람 음성 세균일 수 있다. 추가의 관점에서, 세균은 이로써 한정하는 것은 아니나 스태필로코커스속(*Staphylococcus*), 바실러스속(*Bacillus*), 프란시셀라속(*Francisella*) 또는 예르시니아속(*Yersinia*) 세균을 포함한다. 또 다른 추가적 관점에서, 세균은 바실러스 안트라시스(*Bacillus anthracis*), 예르시니아 페스티스(*Yersinia pestis*), 프란시셀라 툴라렌시스(*Francisella tularensis*), 슈도모나스 아에루제노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 또는 스태필로코커스 아우레아스(*Staphylococcus aureus*)이다. 특정 양태로서, 세균은 바실러스 안트라시스(*Bacillus anthracis*) 및/또는 스태필로코커스 아우레아스(*Staphylococcus aureus*)이다. 또 다른 추가의 관점에서, 세균은 약물 내성 세균, 예를 들면 다약제 내성 스태필로코커스 아우레아스(MRSA)이다. 대표적인 의학 관련 그람 음성 바실러스는 헤모필루스 인플루엔자(*Hemophilus influenzae*), 크렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*), 레지오넬라 뉴모필라(*Legionella pneumophila*), 슈도모나스 아에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*), 엔테로박터 클로아케(*Enterobacter cloacae*), 세라티아 마르세스센스(*Serratia marcescens*), 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*), 살모넬라 엔테리티디스(*Salmonella enteritidis*) 및 살모넬라 타이피(*Salmonella typhi*)를 포함한다. 대표적인 그람 양성 세균은 이로써 한정하는 것은 아니나 세포벽이 없고 그람 염색될 수 없는 바실러스(*Bacillus*), 리스테리아(*Listeria*), 스태필로코커스(*Staphylococcus*), 스트렙토코커스(*Streptococcus*), 엔테로코커스(*Enterococcus*), 액티노박테리아(*Actinobacteria*) 및 클로스트리듐 마이코플라스마(*Clostridium Mycoplasma*)뿐만 아니라 이들 형태로부터 파생된 세균을 포함한다.

[0019] 또 다른 추가의 관점에서, 처치 또는 방어 대상의 병원성 또는 잠재적 병원성 미생물은 예를 들면 아스퍼질러스(*Aspergillus*), 캔디다(*Candida*), 크립토코커스(*Cryptococcus*), 히스토플라스마(*Histoplasma*), 코시디오이드(*Coccidioides*), 블라스토마이세스(*Blastomyces*), 뉴모사이스티스(*Pneumocystis*) 또는 자이코마이세스(*Zygomycetes*) 과에 속하는 진균이다. 또 다른 추가의 양태로서, 진균은 이로써 한정하는 것은 아니지만 아스퍼질러스 푸미가투스(*Aspergillus fumigatus*), 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*), 크립토코커스 네오포르만스(*Cryptococcus neoformans*), 히스토플라스마 캡슐라툼(*Histoplasma capsulatum*), 코시디오이데스 임미티스(*Coccidioides immitis*) 또는 뉴모사이스티스 카리니(*Pneumocystis carinii*)를 포함한다. 자이코마이세테스과는 바시디오볼라레스(*Basidiobolales*) (바시디오볼라세과(*Basidiobolaceae*)), 디마르가리탈레스(*Dimargaritales*) (디마르가리타세과(*Dimargaritaceae*)), 엔도고날레스(*Endogonales*) (엔도고나세과

(Endogonaceae)), 엔토모프토탈레스(Entomophthorales) (안사일리스타세과(Ancylistaceae), 콤플레토리아세과(Completoiriaceae), 엔토모프토탈라세과(Entomophthoraceae), 메리스타크라세과(Meristacraceae), 네오자이지타세과(Neozygitaceae)), 킥셀랄레스(Kickxellales) (킥셀랄라세과(Kickxellaceae)), 모르티에렐랄레스(Mortierellales) (모르티에렐라세과(Mortierellaceae)), 뮤코랄레스(Mucorales) 및 주파갈레스(Zoopagales)를 포함한다. 아스퍼질러스과는 이들로 한정하는 것은 아니나 아스퍼질러스 카에시엘루스(*Aspergillus caesiellus*), 에이. 캔디두스(*A. candidus*), 에이. 카르누스(*A. carneus*), 에이. 클라바투스(*A. clavatus*), 에이. 데플렉투스(*A. deflectus*), 에이. 플라부스(*A. flavus*), 에이. 퍼미카투스(*A. fumigatus*), 에이. 글라우커스(*A. glaucus*), 에이. 니둘란스(*A. nidulans*), 에이. 나이거(*A. niger*), 에이. 오크라세우스(*A. ochraceus*), 에이. 오리자에(*A. oryzae*), 에이. 파라시티쿠스(*A. parasiticus*), 에이. 페니실로이데스(*A. penicilloides*), 에이. 레스트릭투스(*A. restrictus*), 에이. 소자에(*A. sojae*), 에이. 시도우이(*A. sydowi*), 에이. 타마리(*A. tamari*), 에이. 테레우스(*A. terreus*), 에이. 우스투스(*A. ustus*), 에이. 베르시콜로르(*A. versicolor*) 등을 포함한다. 캔디다 과는 이로써 한정하는 것은 아니지만 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*), 씨. 두브리니엔시스(*C. dubliniensis*), 씨. 글라브라타(*C. glabrata*), 씨. 킬리에르몽디(*C. guilliermondii*), 씨. 케피르(*C. kefir*), 씨. 크루세이(*C. krusei*), 씨. 루시타니아에(*C. lusitaniae*), 씨. 밀레리(*C. milleri*), 씨. 올레�필라(*C. oleophila*), 씨. 파랍실로시스(*C. parapsilosis*), 씨. 트로피칼리스(*C. tropicalis*), 씨. 우틸리스(*C. utilis*) 등을 포함한다.

- [0020] 특정 관점에서, 병원성 세균은 세포내, 그람 양성 또는 그람 음성 세균이다. 특정 양태에서 세균은 스트렙토코커스(*Streptococcus*), 스태필로코커스(*Staphylococcus*), 바실러스(*Bacillus*), 프란시셀라(*Francisella*) 또는 예르시니아(*Yersinia*)이다. 또 다른 추가의 관점에서, 세균은 바실러스 안트라시스(*Bacillus anthracis*), 예르시니아 페스티스(*Yersinia pestis*), 프란시셀라 툴라렌시스(*Francisella tularensis*), 스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumoniae*), 스태필로코커스 아우레아스(*Staphylococcus aureus*), 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 및/또는 부르크홀데리아 셉파시아(*Burkholderia cepacia*)이다.
- [0021] 용어 "약독화", "억제", "감소" 또는 "예방" 또는 이들 용어의 모든 변형은 특허청구범위 및/또는 명세서에서 사용될 때 목적하는 결과를 달성하는데 모든 측정가능한 감소 또는 완전한 억제를 포함하며, 예로써 노출후 미생물 개수 또는 성장의 감소를 들 수 있다.
- [0022] 특허청구범위 및/또는 명세서에서 용어 "포함하는"과 사용되는 단어 "하나"는 한 개를 의미할 수 있으나 "한 개 이상", "적어도 한 개" 및 "한 개 또는 그 이상"의 의미에 상응할 수 있다.
- [0023] 본원에 논의된 모든 양태는 본 발명의 어떠한 방법 또는 조성물에 관하여도 개시될 수 있음을 고려해야 한다. 추가로, 본 발명의 조성물 및 키트는 본 발명의 방법을 달성하기 위해 사용될 수 있다.
- [0024] 본 명세서에서 용어 "약"은 값을 결정하는데 사용되는 장치 또는 방법에서 오류의 표준편차가 포함된다는 것을 가리키기 위해 사용된 것이다.
- [0025] 특허청구범위에서 사용된 용어 "또는"은 비록 단지 양자택일과 "및/또는"을 암시하는 정의를 지지할지라도 단지 양자택일만을 지칭하기 위해 명확히 표기되지 않거나 양자택일이 상호 배제하지 않는 한 "및/또는"을 의미한다. 및/또는을 포함한 특정 목록에서 수록된 요소중 하나 또는 그 이상은 그 목록으로부터 특정적으로 배제될 수 있다.
- [0026] 본 명세서 및 특허청구범위에 사용된 용어 "포함하는", "갖는", "함유하는"는 제한적이지 않고 모두를 포괄함을 의미하며 추가적이며 비인용된 요소 또는 방법 단계를 배제하지 않는다.
- [0027] 본 발명의 다른 목적, 특징 및 이점은 아래 상세한 설명으로부터 명확하게 드러날 것이다. 그러나, 본 발명의 취지와 범위내에서 여러 가지 변화와 변형이 아래 상세한 설명으로부터 당업자에게 명백히 드러날 것이기 때문에, 상세한 설명과 특정 실시예는 본 발명의 특정 양태를 가리키기 위한 것으로 단지 설명의 수단으로 제시되는 것임을 이해하여야 한다.

도면의 간단한 설명

- [0028] 아래 도면은 본 명세서의 일부를 구성하며 본 발명의 특정 관점을 추가로 입증하기 위해 포함된다. 본 발명은 본원에 제시된 특정 양태의 상세한 설명과 병행하여 이들 도면중 하나 이상을 참조로 하면 보다 잘 이해될 수 있다.

도 1. 천연 엔도톡신 (TLR4 효능제)은 몇몇 StIR을 유도한다. 야생형 스위스-웹스터 마우스 (10/그룹)를 NTHI

용해물 ("NTHi sup"), NTHi 용해물과 대등한 것으로 추정되는 LPS 농도("엔도톡신 1x") 또는 용해물에 10배인 것으로 추정되는 LPS("엔도톡신 10x")로 처리하거나, 또는 무처리 후 24시간 경과하여 에스. 뉴모니에 (5×10^{10} CFU/ml)로 시험감염시켰다.

도 2. 합성된 핵사아실화 지질 A (TLR4 효능제)은 StIR을 유도하지 않는다. 야생형 스위스-웹스터 마우스 (8/그룹)를 피. 아에루기노사로 시험감염시키기 24시간 전에 합성된 지질 A 현탁액 또는 PBS로 처리하였다.

도 3. 스위스-웹스터 마우스 (8/그룹)를 피. 아에루기노사로 감염시키기 24시간 전에 고 또는 저 용량의 이미퀴모드 (TLR7 효능제) 또는 PBS로 처리한 실험의 예를 보여준다.

도 4. TLR9 자극만으로 최소의 보호를 유도한다. 야생형 스위스-웹스터 마우스(8/그룹)를 피. 아에루기노사로 흡입 감염시키기 24시간 전에 PBS 또는 ODN2395로 처리하였다.

도 5. TLR2/6 효능제로의 고용량 처리는 StIR을 유도한다. 야생형 스위스-웹스터 마우스를 피. 아에루기노사로 감염시키기 24시간 전에 고 또는 저 용량 Pam2CSK4 또는 PBS로 처리하였다.

도 6. TLR 효능제의 배합은 단독으로 처리한 경우보다 더욱 큰 StIR을 유도한다. 야생형 스위스-웹스터 마우스를 ODN2395 (20 μ g/ml, 8 마리), Pam2CSK4 (20 μ g/ml, 8 마리), 두 가지 효능제 (10 마리) 또는 PBS (10 마리)로 처리하였다.

도 7. 플라젤린 (TLR5 효능제)의 합성 절편은 StIR을 유도한다. 플라젤린의 22개 아미노산 고도로 보존된 단편 또는 PBS 단독을 피. 아에루기노사로 감염시키기 24시간 전에 야생형 스위스-웹스터에 에어로졸로 처리하였다.

도 8. 인플루엔자 A/HK 폐 풀(pool) 11-29-05 에어로졸 감염이 체중에 미치는 영향 (1회 30분 에어로졸 처리; 인플루엔자 바이러스 용량: 약 100 TCID₅₀/마우스). 감염이 진행됨에 따라 처음에 체중이 감소하는데, 이것은 질환의 증상을 나타낸다. 그런 다음 회복하면서 체중이 늘어난다.

도 9. 인플루엔자 A/HK 폐 풀 11-29-05 에어로졸 감염이 생존에 미치는 영향 (1회 30분 에어로졸 처리; 인플루엔자 바이러스 용량: 약 100 TCID₅₀/마우스).

도 10. ODN/PAM2/PolyIC로 1회 30분 에어로졸 전처리가 인플루엔자 A/HK 에어로졸 (바이러스 용량 약 130 TCID₅₀/마우스)로 감염된 마우스의 생존에 미치는 영향을 보여준다.

도 11. 인플루엔자 A/HK 폐 풀 11-29-05 에어로졸 감염이 체중에 미치는 영향 (1회 30분 에어로졸 처리; 인플루엔자 바이러스 용량: 약 100 TCID₅₀/마우스). 감염이 진행됨에 따라 처음에 체중이 감소하는데, 이것은 질환의 증상을 나타낸다. 그런 다음 회복하면서 체중이 늘어난다.

도 12A 및 12B. 세균 용해물-유도된 폐렴 저항성을 위해 MyD88 신호는 요구되나 TRIF는 그렇지 않다. 도 12A. *Myd88*^{-/-} 및 야생형 마우스를 비피막형 에이치. 인플루엔자 (NTHi)의 에어로졸화 용해물로 24시간 전에 처리한 후 또는 전처리하지 않고 피. 아에루기노사로 흡입 시험감염시켰다. 좌측, 생존 (N=10 마리/그룹, *p<0.0001). 우측, 감염 직후 세균 폐 부담 (우측, N=3 마리/그룹, **p<0.004, †p=0.39 대 야생형 대조군). 도 12B. 세균 용해물로 전처리하거나 하지 않고서 *Trif*^{-/-} 마우스의 피. 아에루기노사 시험감염. 좌측, 생존 (N=10 마리/그룹, *p<0.0001). 우측, 감염 직후 세균 폐 부담 (우측, N=3 마리/그룹, *p<0.0001).

도 13. 유도된 병원체 살균은 인터루킨-1 수용체 결핍 마우스에서 손상되지 않는다. *Il1r*^{-/-} 및 야생형 마우스는 피. 아에루기노사로 시험감염시키기 24시간 전에 에어로졸화 PBS 또는 비피막형 헤모필루스 인플루엔자 (NTHi) 용해물로 처리되었다. 감염 직후 폐 균질화물의 세균 부담을 보여준다 (N=3 마리/그룹, *p=0.001 대 야생형 + PBS, **p=0.01 대 *Il1r*^{-/-}, †p=0.66 대 야생형 + PBS, ‡p=0.89 대 야생형 + NTHi).

도 14. 단일 합성 TLR 리간드로 처리한 후 기관지폐포세척액(BAL)중의 백혈구 계수. PBS 또는 다음의 TLR 리간드 중 하나로 처리한 후 24시간 경과하여 마우스를 BAL 시행했다: Pam3CSK4 (TLR2/1 효능제, 1 μ g/ml, 3 μ g/ml, 10 μ g/ml), Pam2CSK4 (TLR2/6 효능제, 1 μ g/ml, 3 μ g/ml, 10 μ g/ml), Poly(I:C) (TLR3 효능제, 1 μ g/ml, 10 μ g/ml, 100 μ g/ml), 합성 지질 A (MPLA, TLR4 효능제, 1 μ g/ml, 10 μ g/ml, 100 μ g/ml), Flg22 (플라젤린의 합성 22량체, TLR5 효능제, 10 μ g/ml, 100 μ g/ml, 1000 μ g/ml), 이미퀴모드 (TLR7 및 TLR8, 100 μ g/ml, 300 μ g/ml, 1000 μ g/ml) 또는 ODN2395 (TLR9 효능제, 2 μ g/ml, 20 μ g/ml). BAL 액중의 호중구 (검정 막대) 및 대식구 (회

색 막대) 계수를 보여준다.

도 15A-15G. 개별적인 합성 TLR 리간드 용량으로 에어로졸 처리는 고수준의 폐렴 저항성을 유도하지 않는다. 야생형 마우스를 24시간 전에 PBS 또는 다음의 합성 TLR 리간드로 처리(20분에 걸쳐 8 ml 분무)한 후 피. 아에루기노사로 시험감염시켰다 (도 15A. TLR2/1 효능제 Pam3CSK4 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 도 15B. TLR2/6 효능제 Pam2CSK4 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 도 15C. TLR3 효능제 poly (I:C) 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 도 15D. TLR4 효능제 MPLA 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 도 15E. TLR5 효능제 Flg22 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 도 15F. TLR7 및 TLR8 효능제 이미퀴모드 1 mg/ml 또는 도 15G. TLR9 효능제 ODN 2395 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$). 생존 곡선은 처리된 마우스 및 비처리된 마우스에 대해 실시된 3회 이상의 별도 실험의 대표적인 예이다 (N=8 마리/그룹, *p=0.5, **p=1.0, †p=0.47, ‡p=0.2).

도 16A-16C. TLR2/6과 TLR9 효능제는 상호작용하여 세균성 폐렴에 대한 저항성을 유도한다. 도 16A. 좌측, PBS, Pam2CSK4 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ODN 2395 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 이들의 배합 또는 2배 용량의 배합으로 처리한 후 24시간 경과하여 피. 아에루기노사로 시험감염된 마우스의 생존 (N=6 마리/그룹, ‡p=0.008 대 PBS). 우측, 피. 아에루기노사로 감염 직후 폐 균질물의 세균 부담 (N=3 마리/그룹, #p=0.045 대 PBS, ##p=0.030 대 PBS). 도 16B. 좌측, PBS, Pam2CSK4 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ODN 2395 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 이들의 배합 또는 2배 용량의 배합으로 처리한 후 24시간 경과하여 에스. 뉴모니애로 시험감염된 마우스의 생존 (N=10 마리/그룹, ‡p=0.0001 대 PBS). 우측, 에스. 뉴모니애 감염 2×10^{10} 직후 폐 균질물의 세균 부담 (N=3 마리/그룹, †p<0.001, ‡p<0.0001). 도 16C. PBS, Pam2CSK4 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ODN 2395 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 또는 Pam2CSK4와 ODN2395의 배합으로 처리한 후 4시간 또는 24시간 경과하여 마우스로부터 BAL 세포 계수 (N=3 마리/그룹, *p=0.016 대 PBS, **p<0.0001 대 PBS, †p=0.041 대 Pam2 단독).

도 17A-17F. 모든 TLR 효능제 배합물이 유의적인 폐렴 보호를 제공하지는 않는다. 야생형 마우스를 24시간 전에 PBS 또는 다음의 TLR 효능제 배합물로 처리한 후 피. 아에루기노사로 시험감염시켰다: 도 17A. Pam2CSK4와 poly (I:C), 도 17B. Pam2CSK4와 Flg22, 도 17C. Pam2CSK4와 이미퀴모드, 도 17D ODN2395와 poly (I:C), 도 17E. ODN2395와 Flg22, 도 17F. ODN2395와 Pam3CSK4. 생존 곡선은 3회 이상의 별도 실험의 대표적인 예이다 (N=8 마리/그룹, *p=0.20, **p=0.08, †p=1.0, ‡p=0.5).

도 18A-18B. TLR2는 Pam2CSK4와 ODN2395의 방어진 상승작용을 촉진하기에 충분하지만 유도된 저항성을 위해 필요하지 않다. 도 18A. 좌측, ODN2395와 Pam2CSK4로 24시간 전에 처리하거나 전처리하지 않고 피. 아에루기노사로 시험감염된 *Tlr2*^{-/-}와 야생형 마우스의 생존(N=8 마리/그룹, *p<0.0002). 우측, 피. 아에루기노사로 감염 직후 폐 균질물의 세균 부담 (N=4 마리/그룹, **p<0.0001 대 야생형 + PBS, †p=0.59 대 *Tlr2*^{-/-} + PBS). 도 18B. 좌측, 비피막형 에이치. 인플루엔자 (NTHi)의 에어로졸 용해물로 24시간 전에 처리하거나 전처리하지 않고서 피. 아에루기노사로 시험감염된 TLR2^{-/-} 및 야생형 마우스의 생존 (N=10 마리/그룹, *p<0.0002). 우측, 피. 아에루기노사로 감염 직후 폐 균질물의 세균 부담 (N=3마리/그룹, ‡p=0.03 대 야생형 + PBS, #p=0.002 대 *Tlr2*^{-/-} + PBS).

도 19A-19B. TLR9-결합 C형 CpG ODN은 세균성 폐렴 저항성을 유도하는데 Pam2CSK4와 상승적으로 상호작용하지만, A형 또는 B형의 CpG ODN은 그렇지 않다. 도 19A. 피. 아에루기노사 시험감염 24시간 전에 Pam2CSK4와 ODN2395 또는 Pam2CSK4와 스크램블드 대조군 ODN으로 처리된 야생형 마우스의 생존 (N=10 마리/그룹, *p<0.0001). 도 19B. A형 CpG ODN (ODN1585 또는 ODN2216), B형 CpG ODN (ODN 2006-G5) 또는 C형 CpG ODN (M362 또는 ODN2395)와 배합된 Pam2CSK4 또는 PBS로 처리한 후 24시간 경과하여 피. 아에루기노사로 시험감염된 야생형 마우스의 생존 (N=10 마리/그룹, *p=0.01 대 PBS, **p=0.0001 대 PBS; †p=0.3 대 Pam2 + ODN2395).

도 20A-20D. TLR2/6과 TLR9 효능제는 시험관내에서 쥐와 사람 호흡기 상피세포에 의한 세균 사멸을 유도하는데 상호작용한다. 도 20A. MLE-15 세포를 비. 안트라시스 (1000개 포자)로 감염시키기 전에 4시간 동안 Pam2CSK4 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 및/또는 ODN2395 (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)으로 처리하였다. 감염 4시간 후 세균 CFU를 보여준다 (*p=0.05 대 PBS, **p=0.016 대 PBS, #p>0.05 대 둘중의 단일 효능제). 도 20B. MLE 배양 배지 (세포 없음)를 ODN2395와 Pam2CSK4로 처리하고, 비. 안트라시스 (1000개 포자)로 감염시킨 후 4시간 후에 배양하였다 (†p=1.0). 도 20C. A549 세포를 피. 아에루기노사 (2700 CFU)로 감염시키기 전에 4시간 동안 ODN2395와 Pam2CSK4로 처리하였다. 감염 4시간 후 세균 CFU를 보여준다 (*p=0.01 대 PBS, **p=0.003 대 PBS, ***p=0.001 대 PBS, #p=>0.05 대 둘중의 단일 효능제). 도 20D. MLE 배양 배지 (세포 없음)를 ODN2395와 Pam2CSK4로 처리하고, 피. 아에루기노사 (4000 CFU)로 감염시킨 후 4시간 경과하여 배양하였다 (‡p=0.58).

도 21. 여러 가지 합성 TLR 효능제로 면역화되고 5 LD50의 바실러스 안트라시스 에임즈 포자 (MD-10-013)로 비강 내 시험감염된 스위스-웹스터 마우스의 생존. 마우스를 안트라스로 시험감염시키기 24시간 전에 표시된 바와 같이 TLR 효능제 에어로졸로 전처리하였다. ALIIS=NTHi 세균 용해물, 2395=ODN2395, 10101=ODN10101, M362=ODN-M362. 1x=40 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$ 의 ODN과 20 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$ 의 Pam2.

도 22. ODN/Pam2 또는 NTHi 용해물의 에어로졸 전처리가 인플루엔자 A/HK-감염된 마우스의 생존에 미치는 영향. 1회 30분 에어로졸 처리; 인플루엔자 바이러스 용량: 약 100 TCID₅₀/마우스.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0029] 면역계는 외부의 생물학적 영향으로부터 유기체를 보호하는 특화 세포 및 기관의 체계이다. 면역계가 적절하게 기능할때, 이는 미생물 감염에 대항하여 신체를 보호하며 암세포와 외래 물질을 파괴한다. 면역계가 허약하면, 또한 면역계의 신체 방어능력이 약해지고, 병원체가 체내에서 자라게 된다.
- [0030] 면역계는 흔히 다음과 같이 분류된다: (a) 병원체를 지속적으로 막아내는 최전선 방어능을 제공하는 성분으로 구성된 선천성 면역과 (b) 항체의 제조 및 특정 병원체를 표적으로 하여 특이적으로 설계된 T-세포의 생성 또는 자극을 포함한 적응 (후천) 면역. 적응 면역을 이용하여 신체는 특정 병원체에 대한 특이적 면역을 시간이 경과하면서 발전시킬 수 있다. 이러한 반응은 발전하기까지 수일이 걸리며, 그럼으로써 초기 침입을 방어하는데 효과적이지 않지만 정상적으로는 어떠한 후속적 감염도 방어할 수 있으며 또한 좀더 장기간 지속되는 감염을 제거하는데 도움을 준다.
- [0031] 특정 염증 자극에 반응하여, 마우스 및 사람의 기도 상피의 분비 세포는 염증 화생이라고 하는 뚜렷한 구조 변화를 급속히 겪는다. 구조 변화의 대부분은 분비된 젤-형성 뮤신의 증가된 생성에 기인할 수 있는 한편, 뮤신 분비, 미생물 살해 또는 염증 신호전달에 있어 기능을 갖는 추가적인 거대분자가 또한 상향조절된다. 이 반응의 생리적 기능은 미생물 병원체에 대한 국소적 방어의 증가인 것으로 여겨지지만, 이러한 가설은 단지 한정된 형식적인 시험을 수용한 것이다. 역설적으로, 젤-형성 뮤신의 과도한 생성 및 분비는 천식, 낭포성 섬유증 및 만성 장애 폐 질환 (COPD)과 같은 기도의 흔한 염증 질병에서 기류 폐색의 주된 원인이다. 뮤신의 생성없이 선천면역의 자극은 피검체를 예방 및/또는 치료함으로써 기도의 감염을 약독하는 추가의 방법을 제공한다.
- [0032] 본 발명의 양태는 1, 2, 3, 4 또는 그 이상의 TLR 효능제 (이의 절편, 유도체 또는 유사체를 포함함)를 포함한 조성물로 피검체의 기도를 자극하는 것을 포함한다. 본 발명의 조성물을 투여받은 피검체는 잠재적 감염 유기체에 대한 치료, 예방 또는 치료와 예방 반응을 제공받은 것이다. 특정 관점에서, 조성물은 에어로졸 형태이며 기도를 통해 투여된다. 조성물은 예를 들면 폐의 선천면역을 활성화하거나 증강시킴으로써 방어효과를 유도하거나 발현하기 위해 사용된다.
- [0033] 본 발명의 특정 관점은 여러 가지 미생물로부터 유도된 또는 사람에 의해 합성된 소 분자 및/또는 TLR 효능제를 포함한다. 전형적으로, 소 분자 및/또는 TLR 효능제는 분비된 뮤신의 증가된 생성을 일으키지 않는다. 본 발명의 양태는 예를 들어 생물무기, 신생-맹독성 미생물 또는 기회성 미생물에 대한 방어 및 예방 치료제로 사용할 수 있다.
- [0034] I. StIR 조성물
- [0035] A. 이중 화합물 및 잔기
- [0036] 많은 비-숙주 또는 이중 분자는 면역 반응의 생성을 자극, 증강 또는 기여할 수 있다. 이들 잔기는 선천 수용체 및/또는 미생물 성분의 여러 가지 효능제를 포함한다.
- [0037] 1. 선천 수용체 리간드
- [0038] 패턴 인지 수용체 또는 PRR (선천 수용체)는 미생물 병원체 또는 세포 스트레스와 연관이 있는 병원체-연관된 분자 패턴 또는 PAMP를 식별하는 선천성 면역계의 세포에 의해 발현된 단백질이다. PAMP는 이들로 한정되는 것은 아니지만 세균 탄수화물 (예: 리포폴리사카라이드 또는 LPS, 만노즈), 핵산 (예: 세균 또는 바이러스 DNA 또는 RNA), 펩티도글리칸 및 지질타이코산 (그람 양성 세균 유래), N-포르밀메티오닌, 지단백질, 진균 글루칸 등을 포함한다.
- [0039] PRR은 전형적으로 이들의 리간드 특이성, 기능, 위치 및/또는 진화 관계에 따라 분류된다. 기능을 기초로 하여, PRR은 식균작용 PRR 또는 신호전달 PRR로 나뉠 수 있다. 신호전달 PRR은 막-결합된 Toll-유사 수용체 및 세포질 NOD-유사 수용체의 대규모 과를 포함한다. 식균작용 PRR은 세포내 신호를 전달하지 않고서 식세포에 의

한 미생물의 부착, 흡입 및 파괴를 촉진한다. 이들 PRR은 탄수화물을 인지하며 대식세포의 만노스 수용체, 모든 식세포에 존재하는 글루칸 수용체 및 하전된 리간드를 인지하고 모든 식세포에서 발견되며 아포토시스 세포의 제거를 매개하는 청소세포 수용체를 포함한다.

[0040] 많은 선천 수용체가 확인되어 있으며, 이들로 한정하는 것은 아니지만 Toll-유사 수용체 (TLR), C형 렉틴 수용체 (CLR) 및 뉴클레오타이드-결합 올리고머화 도메인-유사 수용체 (Nod-유사 수용체 또는 NLR)을 포함한다. TLR은 선천성 면역계에서 핵심 역할을 하는 단백질 부류이다. 이들은 미생물로부터 유래된 구조적으로 보존된 분자를 인지하는 단일 막-횡단 비촉매 수용체이다. 일단 이들 미생물이 피부 또는 장관 점막 상에 또는 안에 존재하면, 이들은 면역 세포 반응을 활성화하는 TLR에 의해 인지된다. 흥미롭게도, 이들 TLR 효능제중 많은 것이 단독으로 투여된 경우 중요한 StIR을 유도하지 않는다. 전형적으로, 본원에 기술된 방법을 사용하여 치료받는 개체 또는 피검체는 병원성 미생물에 노출되었거나 그러한 노출 위험이 있다.

[0041] a. Toll-유사 수용체 (TLR) 효능제

[0042] Toll-유사 수용체 (TLR)은 PRR중에서 가장 잘 성상이 밝혀진 것이다 (Ishii et al., 2008). 이들은 고도로 보존된 횡막 단백질로서, 패턴 인식을 위한 다수의 류신-풍부한 반복체를 갖는 엑토도메인, 막-횡단 α-나선 및 세포내 신호전달을 위한 Toll/인터루킨-1 수용체 (TIR) 도메인으로 구성된다. 적어도 13가지의 포유동물 TLR이 확인되었으며, 각각은 특이적으로 원형질막 또는 엔도솜 막에 편재해 있으며, 각각은 PAMP의 특이적 보체를 검출한다 (Akira et al., 2006; Shi et al., 2006). PAMP 인지시, 신호 전달이 세포질 TIR 어댑터 단백질 배합물의 TLR-특이적 소집을 통해 일어난다. 4 가지 다른 어댑터중 하나 이상과 협력하는 TIR 어댑터 단백질 MyD88는 대부분의 TLR로부터 신호 전달을 위해 필요하다. TLR3 및 TLR4로부터 관찰된 MyD88-독립 신호전달 이벤트는 TRAM의 참여와 함께 또는 참여없이 TIR 어댑터 TRIF (또한, TICAM-1로 알려져 있음)를 필요로 한다 (Yamamoto et al., 2003). TLR-특이적 TIR 어댑터 신호전달 과정은 수용체-특이적 전사 인자 (예: NF-κB, 활성화 단백질-1 및 인터페론 조절 인자 (IRF))를 활성화시키고 염증 및 항미생물 유전자의 발현을 선도한다 (Akira et al., 2006; O'Neill, L.A., and Bowie, 2007; Takeda, K., and Akira, 2004).

[0043] TLR 효능제는 TLR을 활성화하는 작용을 하는, 예를 들어 TLR 신호 전달 경로에 의해 매개된 신호전달 이벤트를 유도하는 작용을 하는 모든 화합물 또는 물질이다. 적합한 TLR 효능제는 TLR1 효능제, TLR2 효능제, TLR3 효능제, TLR4 효능제, TLR5 효능제, TLR6 효능제, TLR7 효능제, TLR8 효능제 및 TLR9 효능제를 포함한다.

[0044] 방어 면역의 발생은 항원에의 노출뿐만 아니라 항원이 직면한 상황에 의존하는 것이 오늘날 널리 인식되어 있다. 염증 과정에서 숙주내로 새로운 항원이 유입하는 것은 장기 면역보다 면역학적 저항성을 발생시키는 반면 소염제 (보조제)의 존재하에 항원에 대한 노출은 면역성을 유도하는 많은 사례가 있다 (Mondino et al., 1996; Pulendran et al., 1998; Jenkins et al., 1994; 및 Keamey et al.). 이것은 저항성과 면역성사이의 차이를 의미할 수 있기때문에, 항원 제시의 적절한 면역원성 과정을 발생함에 연루되어 있는 분자 경로를 자극하는 감염 물질내에 존재하는 "보조제"를 개발하려는 많은 노력이 있었다. 다량의 보조제 활성이 면역 세포에서 발현된 Toll-유사 수용체 (TLR)의 상이한 일원과 미생물 및 바이러스 산물의 상호작용에 기인함은 오늘날 공지된 사실이다 (Beutler et al., 2004; Kaisho, 2002; Akira et al., 2003; 및 Takeda and Akira, 2004). TLR은 Toll이라고 하는 초파리의 한 분자 (초파리의 발생에서 작용하고 항미생물 면역에 연루되어 있음)와 상동성이 있어 명명된 것이다 (Lernaitre et al., 1996; 및 Hashimoto et al., 1988).

[0045] 초기 연구는 Toll과의 포유동물 동족체 및 Toll 경로 분자들이 미생물 시험감염 및 미생물 부산물에 반응하는 선천성 면역계의 세포의 능력에 중요한 것임을 보여주었다 (Medzhitov et al., 1997; Medzhitov et al., 1998; Medzhitov et al., 2000; 및 Janeway et al., 2002). LPS의 TLR4 효능제로의 확인(Poltorak et al., 1998)이래로, 많은 다른 TLR 효능제가 밝혀졌으며 예로써 트리-아실 다형 HPV 폴리펩타이드 (TLR1), 펩티도글리칸, 지 타이콘산 및 Pam₃Cys (TLR2), dsRNA (TLM), 플라젤린(TLR5), 디아실 다형 HPV 폴리펩타이드 (예: Malp-2 (TLR6)), 이미다조퀴놀린 및 일본쇄 RNA (TLR7,8), 세균성 DNA, 비메틸화된 CpG DNA 서열 및 사람 게놈 DNA 항체 복합체 (TLR9)를 들 수 있다 (Takeuchi et al., 2001; Edwards et al., 2002; Hayashi et al., 2003; Nagase et al., 2003).

[0046] 본원에 사용된 용어 "효능제"는 수용체 (예: TLR)와 결합하여 세포 활성을 생성하는 화합물을 가리킨다. 효능제는 수용체와 직접적으로 결합하는 리간드일 수 있다. 다른 것으로서 효능제는 수용체와 간접적으로 결합할 수 있는데, 예를 들어 (a) 수용체와 직접 결합하는 다른 분자와 복합체를 형성함으로써 또는 (b) 다른 화합물을 변형시켜 그 변형물이 수용체와 직접적으로 결합하도록 하는 경우가 포함된다. 효능제는 특정 TLR의 효능제 (예: TLR7 효능제) 또는 TLR의 특정 배합물 (예: TLR 7/8 효능제-TLR7과 TLR8 모두의 효능제)로 언급될 수

있다.

- [0047] 본원에서 상호교환적으로 사용되는 용어 "CpG-ODN", "CpG 핵산", "CpG 폴리뉴클레오타이드" 및 "CpG 올리고뉴클레오타이드"는 한 개 이상의 5'-CG-3' 잔기를 포함하고, 많은 양태로서 비메틸화된 5'-CG-3' 잔기를 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 가리킨다. 일반적으로, CpG 핵산은 변형된 뉴클레오타이드 또는 변형된 뉴클레오사이드의 서열을 포함하거나 구성될 수 있는 적어도 6개 뉴클레오타이드 염기를 갖는 일본체 또는 이본체 DNA 또는 RNA이다. 일부 양태에서, CpG 핵산의 5'-CG-3' 잔기는 회문식 뉴클레오타이드 서열의 일부이다. 일부 양태에서, CpG 핵산의 5'-CG-3' 잔기는 비-회문식 뉴클레오타이드 서열의 일부이다.
- [0048] 적합한 TLR 효능제는 분리된 천연 TLR 효능제 및 합성 TLR 효능제를 포함한다. TLR 효능제의 천연원으로부터 분리된 TLR 효능제는 일반적으로 정제되며, 예를 들어 정제된 TLR 효능제는 순도가 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 또는 99% 이상이다. 합성 TLR 효능제는 표준 방법으로 제조하고, 일반적으로 순도가 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 또는 99% 이상이다.
- [0049] 적합한 TLR 효능제는 어떠한 다른 화합물에도 결합되지 않은 TLR 효능제를 포함한다. 적합한 TLR 효능제는 제2 화합물에 공유적으로 또는 비공유적으로 결합된 TLR 효능제를 포함한다. 일부 양태에서, TLR 효능제는 다른 화합물에 직접적으로 결합된다. 다른 양태로서, TLR 효능제는 링커를 통해 다른 화합물에 결합된다. TLR 효능제가 결합된 화합물은 담체, 스캐폴드, 불용성 지지체, 미세입자, 미세구 등을 포함한다. 담체는 치료용 폴리펩타이드; 증가된 용해성을 제공하는 폴리펩타이드; 생리학적 매질 (예: 혈청 또는 다른 체액)중에서 TLR 효능제의 반감기를 증가시키는 폴리펩타이드 등을 포함한다. 일부 양태에서, TLR 효능제는 제2 TLR 효능제에 직접 결합되거나 링커를 통해 결합된다.
- [0050] 일부 양태에서, TLR 효능제는 TLR 효능제의 프로드럭 버전이다. 프로드럭은 프로드럭 부분이 활성 치료제에 공유적으로 연결되어 구성된다. 프로드럭은 이들 구조의 화학적 또는 효소적 변형에 의해 생체내에서 약물 (활성 치료제)로 전환할 수 있다. 프로드럭 부분의 예는 본 분야에 잘 알려져 있으며 다음의 참조 문헌에서 찾아 볼 수 있다: Biological Approaches to the Controlled Delivery of Drugs, R. L. Juliano, New York Academy of Sciences, (1988); Hydrolysis in Drug and Prodrug Metabolism: Chemistry, Biochemistry, and Enzymology, Bernard Testa, Vch Verlagsgesellschaft Mbh, (2003); 및 Prodrugs: Topical and Ocular Drug Delivery, Kenneth Sloan, Marcel Dekker; (1992). 프로드럭 부분의 예로는 펩타이드 (예: TLR 리간드를 작용 부위로 유도하는 펩타이드 및 2 개 이상의 유리된 및 비결합된 카르복실산을 아미노 말단에 갖고 있는 펩타이드)를 들 수 있다. 다른 분해성 프로드럭 부분은 에스테르 그룹, 에테르 그룹, 아실 그룹, 알킬 그룹, 포스페이트 그룹, 설포네이트 그룹, N-옥사이드 및 3급-부톡시 카르보닐 그룹을 포함한다.
- [0051] 일부 양태에서, TLR 효능제는 단량체 TLR 효능제이다. 다른 양태에서, TLR 효능제는 다량체이며, 예를 들면 TLR 효능제는 중합체이다. 일부 양태에서, 다량체화된 TLR 효능제는 단독작용성이며, 예를 들면 한 가지 유형의 TLR 효능제로 구성된다. 다른 양태로서, 다량체화된 TLR 효능제는 헤테로작용성 TLR 효능제이다.
- [0052] 일부 양태에서, TLR 리간드는 키메릭 TLR 리간드 (또한 본원에서 "헤테로작용성" TLR 리간드로 언급됨)이다. 일부 양태에서, 키메릭 TLR 효능제는 TLR9 효능제 잔기 및 TLR2 효능제 잔기를 포함한다. 다음은 헤테로작용성 TLR 효능제의 비제한적인 예이다.
- [0053] 일부 양태에서, 키메릭 TLR 리간드는 다음의 식을 갖는다: $(X)_n-(Y)_m$ (여기서, X는 TLR1 효능제, TLR2 효능제, TLR3 효능제, TLR4 효능제, TLR5 효능제, TLR6 효능제, TLR7 효능제, TLR8 효능제 및 TLR9 효능제이고, Y는 TLR2 효능제, TLR3 효능제, TLR4 효능제, TLR5 효능제, TLR6 효능제, TLR7 효능제, TLR8 효능제 및 TLR9 효능제이며, m 및 n은 독립적으로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 이상의 정수 (이들 사이의 모든 수치와 범위를 포함함)이다). 특정 양태에서, X 또는 Y는 TLR9이고 X 또는 Y는 TLR2/6이다.
- [0054] TLR2 효능제. TLR2 효능제는 분리된 천연 TLR2 효능제 및 합성 TLR2 효능제를 포함한다. TLR2 효능제의 천연 원으로부터 분리된 TLR2 효능제는 일반적으로 정제되며, 예를 들어 정제된 TLR2 효능제는 순도가 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 또는 99% 이상이다. 합성 TLR2 효능제는 표준 수단에 의해 제조되고, 일반적으로 순도가 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 또는 99% 이상이다.
- [0055] 적합한 TLR2 효능제는 어떠한 다른 화합물에도 결합되지 않은 TLR2 효능제를 포함한다. 적합한 TLR2 효능제는 제2 화합물에 공유적으로 또는 비공유적으로 결합된 TLR2 효능제를 포함한다. 일부 양태에서, TLR2 효능제는

다른 화합물에 직접적으로 결합된다. 다른 양태로서, TLR2 효능제는 링커를 통해 다른 화합물에 결합된다.

- [0056] TLR2 효능제는 합성 트리아실화 및 디아실화된 리포펩타이드를 포함한다. TLR2 리간드의 비제한적 예로는 FSL-1 (마이코플라스마 살리바리움 1로부터 유래된 합성 리포단백질), Pam₃Cys (트리팔미토일-S-글리세릴 시스테인) 또는 S-[2,3-비스(팔미토일옥시)-(2RS)-프로필]-N-팔미토일-(R)-시스테인 (여기서, "Pam₃"은 "트리팔미토일-S-글리세릴"이다)(Aliprantis et al., 1999)를 들 수 있다. Pam₃Cys의 유도체가 또한 적합한 TLR2 효능제이며, 이러한 유도체로는 이들로 한정하는 것은 아니지만 S-[2,3-비스(팔미토일옥시)-(2-R,S)-프로필]-N-팔미토일-(R)-시스-(S)-Ser-(Lys)₄-하이드록시트리하이드로콜로라이드; Pam₃Cys-Ser-Ser-Asn-Ala; Pam₃Cys-Ser(Lys)₄; Pam₃Cys-Ala-Gly; Pam₃Cys-Ser-Gly; Pam₃Cys-Ser; Pam₃Cys-OMe; Pam₃Cys-OH; PamCAG, 팔미토일-Cys((RS)-2,3-디(팔미토일옥시)-프로필)-Ala-Gly-OH 등이 포함된다. 적합한 TLR2 효능제의 다른 비제한적 예로는 Pam₂CSK₄ Pam₂CSK₄ (디팔미토일-S-글리세릴 시스테인-세린-(라이신)₄이거나 Pam₂Cys-Ser-(Lys)₄)는 합성 트리아실화 리포펩타이드이다. 합성 TLR 효능제는 문헌에 기술되어 있다 (예: Kellner et al. (1992); Seifer et al. (1990); Lee et al (2003)).
- [0057] TLR3 효능제. TLR3 효능제는 분리된 천연 TLR3 효능제 및 합성 TLR3 효능제를 포함한다. TLR3 효능제의 천연 원으로부터 분리된 TLR3 효능제는 일반적으로 정제된 것으로, 예를 들면 정제된 TLR3 효능제는 적어도 약 80%의 순도, 적어도 약 90%의 순도, 적어도 약 95%의 순도, 적어도 약 98%의 순도, 적어도 약 99%의 순도 또는 99% 이상의 순도를 갖는다. 합성 TLR3 효능제는 표준 방법에 의해 제조되고, 일반적으로 적어도 약 80%의 순도, 적어도 약 90%의 순도, 적어도 약 95%의 순도, 적어도 약 98%의 순도, 적어도 약 99%의 순도 또는 99% 이상의 순도를 갖는다.
- [0058] TLR3 효능제는 어떠한 다른 화합물에 결합되지 않은 TLR3 효능제를 포함한다. TLR3 효능제는 제2 화합물에 공유적으로 또는 비공유적으로 결합된 TLR3 효능제를 포함한다. 일부 양태로서, TLR3 효능제는 다른 화합물에 직접 결합된다. 다른 양태로서, TLR3 효능제는 링커를 통해 다른 화합물에 결합된다.
- [0059] TLR3 효능제는 천연 이분쇄 RNA (dsRNA), 합성 dsRNA 및 합성 dsRNA 유사체 등을 포함한다 (Alexopoulou et al., 2001). 합성 dsRNA 유사체의 비제한적 예로는 poly(I:C)를 들 수 있다.
- [0060] TLR4 효능제. 적합한 TLR4 효능제는 분리된 천연 TLR4 효능제 및 합성 TLR4 효능제를 포함한다. TLR4 효능제의 천연원으로부터 분리된 TLR4 효능제는 일반적으로 정제된 것으로, 예를 들면 정제된 TLR4 효능제는 적어도 약 80%의 순도, 적어도 약 90%의 순도, 적어도 약 95%의 순도, 적어도 약 98%의 순도, 적어도 약 99%의 순도 또는 99% 이상의 순도를 갖는다. 합성 TLR4 효능제는 표준 방법에 의해 제조되며, 일반적으로 적어도 약 80%의 순도, 적어도 약 90%의 순도, 적어도 약 95%의 순도, 적어도 약 98%의 순도, 적어도 약 99%의 순도 또는 99% 이상의 순도를 갖는다.
- [0061] TLR4 효능제는 어떠한 다른 화합물에 결합되지 않은 TLR4 효능제를 포함한다. 적합한 TLR4 효능제는 제2 화합물에 공유적으로 또는 비공유적으로 결합된 TLR4 효능제를 포함한다. 일부 양태로서, TLR4 효능제는 다른 화합물에 직접 결합된다. 다른 양태로서, TLR4 효능제는 링커를 통해 다른 화합물에 결합된다. TLR4 효능제가 결합되는 적합한 화합물로는 담체, 스캐폴드 등이 포함된다.
- [0062] TLR4 효능제는 천연 리포폴리사카라이드(LPS) (예: 다양한 그람 음성 세균 유래의 LPS); 천연 LPS의 유도체; 합성 LPS; 세균 열쇼크 단백질-60 (Hsp60); 맨누론산 중합체; 플라보리핀; 테이쿠론산; 에스. 뉴모니에 뉴모라이신; 세균 섬모; 호흡기 세포융합 바이러스 피복 단백질 등을 포함한다. TLR4 효능제는 또한 모노포스포릴 지질 A-합성 (MPLAs, Invivogen) 및 인산화된 헥사아실 디사카라이드 (PHAD, Avanti Polar Lipids) 뿐만 아니라 다른 합성 TLR4 효능제를 포함한다.
- [0063] TLR5 효능제. 적합한 TLR5 효능제는 분리된 천연 TLR5 효능제 및 합성 TLR5 효능제를 포함한다. TLR5 효능제의 천연원으로부터 분리된 TLR5 효능제는 일반적으로 정제된 것으로, 예를 들면 정제된 TLR5 효능제는 적어도 약 80%의 순도, 적어도 약 90%의 순도, 적어도 약 95%의 순도, 적어도 약 98%의 순도, 적어도 약 99%의 순도 또는 99% 이상의 순도를 갖는다. 합성 TLR5 효능제는 표준 방법에 의해 제조되며, 일반적으로 적어도 약 80%의 순도, 적어도 약 90%의 순도, 적어도 약 95%의 순도, 적어도 약 98%의 순도, 적어도 약 99%의 순도 또는 99% 이상의 순도를 갖는다.
- [0064] TLR5 효능제는 어떠한 다른 화합물에 결합되지 않은 TLR5 효능제를 포함한다. 적합한 TLR5 효능제는 제2 화합

물에 공유적으로 또는 비공유적으로 결합된 TLR5 효능제를 포함한다. 일부 양태로서, TLR5 효능제는 다른 화합물에 직접 결합된다. 다른 양태로서, TLR5 효능제는 링커를 통해 다른 화합물에 결합된다. TLR5 효능제가 결합되는 적합한 화합물로는 담체, 스캐폴드 등이 포함된다.

[0065] TLR5 효능제는 플라젤린의 고도로 보존된 22개 아미노산 단편뿐만 아니라 전체 길이의 플라젤린 및 이의 다른 단편을 포함한다.

[0066] TLR7 효능제. 적합한 TLR7 효능제는 분리된 천연 TLR7 효능제 및 합성 TLR7 효능제를 포함한다. TLR7 효능제의 천연원으로부터 분리된 TLR7 효능제는 일반적으로 정제된 것으로, 예를 들면 정제된 TLR7 효능제는 적어도 약 80%의 순도, 적어도 약 90%의 순도, 적어도 약 95%의 순도, 적어도 약 98%의 순도, 적어도 약 99%의 순도 또는 99% 이상의 순도를 갖는다. 합성 TLR7 효능제는 표준 방법에 의해 제조되며, 일반적으로 적어도 약 80%의 순도, 적어도 약 90%의 순도, 적어도 약 95%의 순도, 적어도 약 98%의 순도, 적어도 약 99%의 순도 또는 99% 이상의 순도를 갖는다.

[0067] TLR7 효능제는 어떠한 다른 화합물에 결합되지 않은 TLR7 효능제를 포함한다. 적합한 TLR7 효능제는 제2 화합물에 공유적으로 또는 비공유적으로 결합된 TLR7 효능제를 포함한다. 일부 양태로서, TLR7 효능제는 다른 화합물에 직접 결합된다. 다른 양태로서, TLR7 효능제는 링커를 통해 다른 화합물에 결합된다.

[0068] TLR7 리간드는 이미다조퀴놀린 화합물; 구아노신 유사체; 피리미딘 화합물 (예: 브로피리민 및 브로피리민 유사체) 등을 포함한다. TLR7 리간드로 작용하는 이미다조퀴놀린 화합물은 이들로 한정되는 아니지만 이미퀴모드 (알다라, R-837, S-26308로도 알려짐) 및 R-848 (레시퀴모드, S-28463으로도 알려져 있으며 4-아미노-2-에톡시메틸- α , α -디메틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-네-1-에탄올의 화학 구조를 가짐)를 포함한다. 적합한 이미다조퀴놀린 제제는 이미다조퀴놀린 아민, 이미다조피리딘 아민, 6,7-융합된 사이클로알킬이미다조피리딘 아민 및 1,2-브릿지된 이미다조퀴놀린 아민을 포함한다. 이들 화합물은 미국특허 제4,689,338호, 제4,929,624호, 제5,238,944호, 제5,266,575호, 제5,268,376호, 제5,346,905호, 제5,352,784호, 제5,389,640호, 제5,395,937호, 제5,494,916호, 제5,482,936호, 제5,525,612호, 제6,039,969호 및 제6,110,929호에 기술되어 있다. 본 발명의 방법에 사용하기에 적합한 이미다조퀴놀린 제제의 특정 종류로는 R-848(S-28463); 4-아미노-2-에톡시메틸- α , α -디메틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-s-i-에탄올; 및 1-(2-메틸프로필)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민 (R-837 또는 이미퀴모드)가 포함된다. 또한 적합한 화합물은 4-아미노-2-(에톡시메틸)- α , α -디메틸-6,7,8,9-테트라하이드로-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-에탄올 수화물 (예: Gorden et al. (2005)에서 BM-003)이다.

[0069] 적합한 화합물로는 5원 질소-함유 헤테로사이클릭 환에 융합된 2-아미노피리딘을 갖는 화합물이 포함된다. 이러한 화합물은 예를 들면 이미다조퀴놀린 아민 (아미드 치환된 이미다조퀴놀린 아민, 설펜아미드 치환된 이미다조퀴놀린 아민, 우레아 치환된 이미다조퀴놀린 아민, 아릴 에테르 치환된 이미다조퀴놀린 아민, 헤테로사이클릭 에테르 치환된 이미다조퀴놀린 아민, 아미도 에테르 치환된 이미다조퀴놀린 아민, 설펜아미도 에테르 치환된 이미다조퀴놀린 아민, 우레아 치환된 이미다조퀴놀린 에테르, 티오에테르 치환된 이미다조퀴놀린 아민 및 6-, 7-, 8-, 또는 9-아릴 또는 헤테로아릴 치환된 이미다조퀴놀린 아민과 같은 치환된 이미다조퀴놀린 아민을 포함하지만 이들로 한정되는 것은 아님); 테트라하이드로이미다조퀴놀린 아민 (아미드 치환된 테트라하이드로이미다조퀴놀린 아민, 설펜아미드 치환된 테트라하이드로이미다조퀴놀린 아민, 우레아 치환된 테트라하이드로이미다조퀴놀린 아민, 아릴 에테르 치환된 테트라하이드로이미다조퀴놀린 아민, 헤테로사이클릭 에테르 치환된 테트라하이드로이미다조퀴놀린 아민, 아미도 에테르 치환된 테트라하이드로이미다조퀴놀린 아민, 설펜아미도 에테르 치환된 테트라하이드로이미다조퀴놀린 아민, 우레아 치환된 테트라하이드로이미다조퀴놀린 에테르 및 티오에테르 치환된 테트라하이드로이미다조퀴놀린 아민을 포함하지만 이들로 한정되는 것은 아님); 이미다조피리딘 아민 (아미드 치환된 이미다조피리딘 아민, 설펜아미도 치환된 이미다조피리딘 아민, 우레아 치환된 이미다조피리딘 아민, 아릴 에테르 치환된 이미다조피리딘 아민, 헤테로사이클릭 에테르 치환된 이미다조피리딘 아민, 아미도 에테르 치환된 이미다조피리딘 아민, 설펜아미도 에테르 치환된 이미다조피리딘 아민, 우레아 치환된 이미다조피리딘 에테르 및 티오에테르 치환된 이미다조피리딘 아민을 포함하지만 이들로 한정되는 것은 아님); 1,2-브릿지된 이미다조퀴놀린 아민; 6,7-융합된 사이클로알킬이미다조피리딘 아민; 이미다조나프티리딘 아민; 테트라하이드로이미다조나프티리딘 아민; 옥사졸로퀴놀린 아민; 티아졸로퀴놀린 아민; 옥사졸로피리딘 아민; 티아졸로피리딘 아민; 옥사졸로나프티리딘 아민; 티아졸로나프티리딘 아민; 및 피리딘 아민, 퀴놀린 아민, 테트라하이드로퀴놀린 아민, 나프티리딘 아민 및 테트라하이드로나프티리딘 아민에 융합된 1H-이미다조 이량체를 포함한다.

[0070] 화합물은 치환된 이미다조퀴놀린 아민, 테트라하이드로이미다조퀴놀린 아민, 이미다조피리딘 아민, 1,2-브릿지된 이미다조퀴놀린 아민, 6,7-융합된 사이클로알킬이미다조피리딘 아민, 이미다조나프티리딘 아민, 테트라하이드

드로이미다조나프티리딘 아민, 옥사졸로퀴놀린 아민, 티아졸로퀴놀린 아민, 옥사졸로피리딘 아민, 티아졸로피리딘 아민, 옥사졸로나프티리딘 아민 및 티아졸로나프티리딘 아민을 포함한다.

[0071] 본원에 사용된 용어 치환된 이미다조퀴놀린 아민은 아마이드 치환된 이미다조퀴놀린 아민, 설펜아미드 치환된 이미다조퀴놀린 아민, 우레아 치환된 이미다조퀴놀린 아민, 아릴 에테르 치환된 이미다조퀴놀린 아민, 헤테로사이클릭 에테르 치환된 이미다조퀴놀린 아민, 아마이드 에테르 치환된 이미다조퀴놀린 아민, 설펜아미드 에테르 치환된 이미다조퀴놀린 아민, 우레아 치환된 이미다조퀴놀린 에테르, 티오에테르 치환된 이미다조퀴놀린 아민 또는 6-, 7-, 8- 또는 9- 아릴 또는 헤테로아릴 치환된 이미다조퀴놀린 아민을 가리킨다.

[0072] TLR7 리간드로서 작용하는 구아노신 유사체는 특정 C8-치환된 및 N7,C8-이치환된 구아닌 리보뉴클레오타이드 및 데옥시리보뉴클레오타이드 (복소리바인 (7-알릴-8-옥소구아노신), 7-티아-8-옥소-구아노신 (TOG), 7-테아자구아노신 및 7-테아자데옥시구아노신을 포함하지만 이들로 한정되는 것은 아님)를 포함한다 (Lee et al., 2003). 브로피리민 (PNU-54461), 5-할로-6-페닐-피리미딘 및 브로피리민 유사체가 문헌에 기술되어있고 또한 사용에 적합하다 (예: Vroegop et al., 1999). 적합한 C8-치환된 구아노신의 추가적인 예로는 8-메르캅토구아노신, 8-브로모구아노신, 8-메틸구아노신, 8-옥소-7,8-디하이드로구아노신, C8-아릴아미노-2'-데옥시구아노신, C8-프로필-구아노신, C8- 및 N7-치환된 구아닌 리보뉴클레오타이드 (예: 7-알릴-8-옥소구아노신 (복소리바인) 및 7-메틸-8-옥소구아노신), 8-아미노구아노신, 8-하이드록시-2'-데옥시구아노신 및 8-하이드록시구아노신을 들 수 있지만 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0073] 일부 양태로서 치환된 구아닌 TLR7 리간드는 단량체이다. 다른 양태로서는 치환된 구아닌 TLR7 리간드가 다량체이다. 그러므로, 일부 양태에서, TLR7 리간드는 (B)_q의 식을 갖는데, 여기서 B는 치환된 구아닌 TLR7 리간드이고 q는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이다. 다량체 TLR7 리간드에서 개개의 TLR7 리간드 단량체는 서로에 직접적으로 또는 링커를 통해 공유 또는 비공유적으로 결합된다. 적합한 TLR7 효능제는 미국특허공개 2004/0162309에 기술된 바와 같은 TLR7 리간드를 포함한다.

[0074] 일부 양태에서, TLR7 효능제는 선택적 TLR7 효능제인데, 예컨대, 이 효능제는 TLR7을 통해 세포 활성을 조절하지만 TLR8을 통해서서는 세포 활성을 조절하지 않는다. TLR7-선택적 효능제는 미국특허공개 2004/0171086에 기재된 것을 포함한다. 이와 같은 TLR7 선택적 효능제 화합물은 N¹-{4-[4-아미노-2-(2-메톡시에틸)-6,7,8,9-테트라하이드로-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일]부틸}-4-플루오로-1-벤젠설펜아미드, N¹-{4-[4-아미노-2-(2-메톡시에틸)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일]부틸}-4-플루오로-1-벤젠설펜아미드, N-[4-(4-아미노-2-프로필-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸]메탄설펜아미드, N-{3-[4-아미노-2-(2-메톡시에틸)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일]2,2-디메틸프로필}벤즈아미드, N-(2-{2-[4-아미노-2-(2-메톡시에틸)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일]에톡시에틸}-N-메틸메탄설펜아미드, N-(2-{2-[4-아미노-2-(2-메톡시에틸)-6,7,8,9-테트라하이드로-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일]에톡시에틸}벤즈아미드, N-[4-(4-아미노-2-메틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸]사이클로헥탄카르복사미드, 1-[4-(1,1-디옥시도이소티아졸리딘-2-일)부틸]-2-(2-메톡시에틸)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민, 2-메틸-1-[5-메틸설포닐]펜틸-6,7,8,9-테트라하이드로-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민, N-{2-[4-아미노-2-(에톡시메틸)-6,7-디메틸-1H-이미다조[4,5-c]피리딘-1-일]-1,1-디메틸에틸}-N-사이클로헥실우레아, N-[2-(4-아미노-2-에틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)-1,1-디메틸에틸]벤즈아미드, N-[3-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)-2,2-디메틸프로필]메탄설펜아미드, 1-[6-(메탄설포닐)헥실]-6,7-디메틸-2-프로필-1H-이미다조[4,5-c]피리딘-4-아민, 6-(6-아미노-2-프로필-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)-N-메톡시-N-메틸헥사아미드, 1-[2,2-디메틸-3-(메틸설포닐)프로필]-2-(에톡시메틸)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민, N-[4-(4-아미노-2-메틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸]-N-메틸-N-페닐우레아, 1-{3-[4-아미노-1-(2-메틸프로필)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-8-일]페닐}에탄온, 7-(4-아미노-2-프로필-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)-2-메틸헥탄-2-올, N-메틸-4-(4-아미노-2-에틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부탄-1-설펜아미드, N-(4-메톡시벤질)-4-(4-아미노-2-에틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부탄-1-설펜아미드, N-{2-[4-아미노-3-(에톡시메틸)-6,7-디메틸-1H-이미다조[4,5-c]피리딘-1-일]-1,1-디메틸에틸}메탄설펜아미드, 2-에톡시메틸-1-(3-메톡시프로필)-7-(5-하이드록시메틸피리딘-3-일)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민, 1-[(2,2-디메틸-1,3-디옥솔란-4-일)메틸]-2-(에톡시메틸)-7-(피리딘-3-일)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민, 4-[3-(4-아미노-6,7-디메틸-2-프로필-1H-이미다조[4,5-c]피리딘-1-일)프로판-1-설포닐]-벤조산 에틸 에스테르, 2-부틸-1-{2-[2-(메틸설포닐)에톡시]에틸}-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민, N-(2-{4-아미노-2-에톡시메틸-7-[6-(메탄설포닐아미노)헥실옥시]-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일]-1,1-디메틸에틸}메탄설펜아미드, N-(6-{[4-아미노-2-에톡시메틸-1-(2-메탄설포닐아미노-2-메틸프로필)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-7-일]옥시}헥실)아세트아미드, 1-[4-(1,1-디옥시도이소티아

졸리딘-2-일)부틸]-2-에톡시메틸-7-(피리딘-3-일)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민, 1-[4-(1,1-디옥시도이소티아졸리딘-2-일)부틸]-2-에톡시메틸-7-(피리딘-4-일)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민, 1-[4-(1,1-디옥시도이소티아졸리딘-2-일)부틸]-2-에톡시메틸-7-페닐-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민, 2-(에톡시메틸)-1-[[1-(메틸설포닐)피페리딘-4-일]메틸]-7-(피리딘-3-일)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민, 2-(에톡시메틸)-1-[[1-(1-이소부틸피페리딘-4-일)메틸]-7-(피리딘-3-일)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민, 2-(에톡시메틸)-1-[[1-(모르폴릭-4-일 카르보닐)피페리딘-4-일]메틸]-7-(피리딘-3-일)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민, 사이클로프로판카르복실산 [3-(4-아미노-2-프로필-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)프로폭시]아מיד, 이소프로필카르바산 4-아미노-2-(2-메톡시메틸)-1-프로필-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-7-일 에스테르, 에틸 4-(4-아미노-2-프로필-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부티레이트, 1-[4-아미노-2-에틸-7-(피리딘-3-일)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일]-2-메틸프로판-2-올, 1-(4-아미노-2-에틸-7-[5-(하이드록시메틸)피리딘-3-일]-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)-2-메틸프로판-2-올, 1-(3-[4-아미노-2-(2-메톡시메틸)-8-(피리딘-3-일)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일]프로필)피롤리딘-2-온, N-(2-(4-아미노-2-에톡시메틸-7-(6-(메탄설포닐아미노)헥실옥시)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)-1,1-디메틸 에틸)아세트아מיד, 1-{3-[4-아미노-7-(3-하이드록시메틸페닐)-2-(2-메톡시메틸)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일]프로필}피롤리딘-2-온, N-{4-[4-아미노-2-에톡시메틸-7-(피리딘-3-일)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일]부틸}-N'-프로필우레아, N-{4-[4-아미노-2-에톡시메틸-7-(피리딘-3-일)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일]부틸}부티르아מיד, 5-(4-아미노-2-프로필-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)-4,4-디메틸헨탄-2-온, 1-사이클로헥실메틸-2-에톡시메틸-7-(5-하이드록시메틸피리딘-3-일)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민, N,N-디메틸-5-(4-아미노-2-에톡시메틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)헨탄-1-설포아מיד, N-{3-[(4-아미노-2-에톡시메틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)아미노]프로필}메탄설포아מיד 및/또는 N,N-디메틸-4-(4-아미노-2-에톡시메틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부탄-1-설포아미드를 포함하지만 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0075] 추가로 적합한 TLR7 선택적 효능제는 이들로 한정되는 것은 아니지만 2-(에톡시메틸)-1-(2-메틸프로필)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민 (미국특허 제5,389,640호), 2-메틸-1-[2-(3-피리딘-3-일프로폭시)에틸]-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민 (WO 02/46193), N-(2-(2-[4-아미노-2-(2-메톡시메틸)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일]에톡시)에틸)-N-메틸사이클로헥산카르복시아מיד (미국특허공개 2004/0171086), 1-[2-(벤질옥시)에틸]-2-메틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일]옥틸)-N-페닐우레아 (미국특허공개 2004/0171086 (IRM5)), 2-부틸-1-[5-(메틸설포닐)헨틸]-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민 (WO 02/46192), N-{3-[4-아미노-2-(2-메톡시메틸)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일]프로필}-4-메틸벤젠설포아מיד (미국특허 제6,331,539호) 및 N-[4-(4-아미노-2-에틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸]사이클로헥산카르복시아מיד (미국특허공개 2004/0171086 (IRM8))를 포함한다. 또한 적합하게 사용되는 TLR7-선택적 효능제는 N-[4-(4-아미노-2-에틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸]메탄설포아מיד (Gorden et al., 2005)이다.

[0076] TLR8 효능제. 적합한 TLR8 효능제는 분리된 천연 TLR8 효능제 및 합성 TLR8 효능제를 포함한다. TLR8 효능제의 천연원으로부터 분리된 TLR8 효능제는 일반적으로 정제된 것으로, 예를 들면 정제된 TLR8 효능제는 적어도 약 80%의 순도, 적어도 약 90%의 순도, 적어도 약 95%의 순도, 적어도 약 98%의 순도, 적어도 약 99%의 순도 또는 99% 이상의 순도를 갖는다. 합성 TLR7 효능제는 표준 방법에 의해 제조되며, 일반적으로 적어도 약 80%의 순도, 적어도 약 90%의 순도, 적어도 약 95%의 순도, 적어도 약 98%의 순도, 적어도 약 99%의 순도 또는 99% 이상의 순도를 갖는다.

[0077] TLR8 효능제는 어떠한 다른 화합물에 결합되지 않은 TLR8 효능제를 포함한다. 적합한 TLR8 효능제는 제2 화합물에 공유적으로 또는 비공유적으로 결합된 TLR8 효능제를 포함한다. 일부 양태로서, TLR8 효능제는 다른 화합물에 직접 결합된다. 다른 양태로서, TLR8 효능제는 링커를 통해 다른 화합물에 결합된다.

[0078] TLR8 효능제는 이들로 한정되는 것은 아니지만 R-848과 같은 화합물 및 이의 유도체 및 유사체를 포함한다. 적합한 TLR8 효능제를 5원 질소-함유 헤테로사이클릭 환에 융합된 2-아미노피리딘을 갖는 화합물을 포함한다. 이러한 화합물은 예를 들면 이미다조퀴놀린 아민 (아מיד 치환된 이미다조퀴놀린 아민, 설포아מיד 치환된 이미다조퀴놀린 아민, 우레아 치환된 이미다조퀴놀린 아민, 아릴 에테르 치환된 이미다조퀴놀린 아민, 헤테로사이클릭 에테르 치환된 이미다조퀴놀린 아민, 아미도 에테르 치환된 이미다조퀴놀린 아민, 설포아미도 에테르 치환된 이미다조퀴놀린 아민, 우레아 치환된 이미다조퀴놀린 에테르, 티오에테르 치환된 이미다조퀴놀린 아민 및 6-, 7-, 8-, 또는 9-아릴 또는 헤테로아릴 치환된 이미다조퀴놀린 아민과 같은 치환된 이미다조퀴놀린 아민을 포함하지만 이들로 한정되는 것은 아님); 테트라하이드로이미다조퀴놀린 아민 (아מיד 치환된 테트라하이드로이미다조퀴놀린 아민, 설포아מיד 치환된 테트라하이드로이미다조퀴놀린 아민, 우레아 치환된 테트라하이드로이미다조퀴놀린 아민, 아릴 에테르 치환된 테트라하이드로이미다조퀴놀린 아민, 헤테로사이클릭 에테르 치환된 테트라하이드

로이미다조퀴놀린 아민, 아미도 에테르 치환된 테트라하이드로이미다조퀴놀린 아민, 설펜아미도 에테르 치환된 테트라하이드로이미다조퀴놀린 아민, 우레아 치환된 테트라하이드로이미다조퀴놀린 에테르 및 티오에테르 치환된 테트라하이드로이미다조퀴놀린 아민을 포함하지만 이들로 한정되는 것은 아님); 이미다조피리딘 아민 (아미드 치환된 이미다조피리딘 아민, 설펜아미도 치환된 이미다조피리딘 아민, 우레아 치환된 이미다조피리딘 아민, 아릴 에테르 치환된 이미다조피리딘 아민, 헤테로사이클릭 에테르 치환된 이미다조피리딘 아민, 아미도 에테르 치환된 이미다조피리딘 아민, 설펜아미도 에테르 치환된 이미다조피리딘 아민, 우레아 치환된 이미다조피리딘 에테르 및 티오에테르 치환된 이미다조피리딘 아민을 포함하지만 이들로 한정되는 것은 아님); 1,2-브릿지된 이미다조퀴놀린 아민; 6,7-융합된 사이클로알킬이미다조피리딘 아민; 이미다조나프티리딘 아민; 테트라하이드로이미다조나프티리딘 아민; 옥사졸로퀴놀린 아민; 티아졸로퀴놀린 아민; 옥사졸로피리딘 아민; 티아졸로피리딘 아민; 옥사졸로나프티리딘 아민; 티아졸로나프티리딘 아민; 및 피리딘 아민, 퀴놀린 아민, 테트라하이드로퀴놀린 아민, 나프티리딘 아민 및 테트라하이드로나프티리딘 아민에 융합된 1H-이미다조 이량체를 포함한다.

[0079] 한 가지 특정 양태로서, TLR8 효능제는 아미드 치환된 이미다조퀴놀린 아민이다. 다른 양태에서 TLR8 효능제는 설펜아미드 치환된 이미다조퀴놀린 아민이다. 또 다른 양태에서, TLR8 효능제는 우레아 치환된 이미다조퀴놀린 아민이다. 또 다른 양태에서, TLR8 효능제는 아릴 에테르 치환된 이미다조퀴놀린 아민이다. 또 다른 양태에서 TLR8 효능제는 헤테로사이클릭 에테르 치환된 이미다조퀴놀린 아민이다. 또 다른 양태에서, TLR8 효능제는 아미도 에테르 치환된 이미다조퀴놀린 아민이다. 또 다른 양태에서, TLR8 효능제는 설펜아미도 에테르 치환된 이미다조퀴놀린 아민이다. 또 다른 양태에서, TLR8 효능제는 우레아 치환된 이미다조퀴놀린 에테르이다. 또 다른 양태에서, TLR8 효능제는 티오에테르 치환된 이미다조퀴놀린 아민이다. 또 다른 양태에서, TLR8 효능제는 6-, 7-, 8-, 또는 9-아릴 또는 헤테로아릴 치환된 이미다조퀴놀린 아민이다.

[0080] 또 다른 양태로서, TLR8 효능제는 아미드 치환된 테트라하이드로이미다조퀴놀린 아민이다. 또 다른 양태에서, TLR8 효능제는 설펜아미드 치환된 테트라하이드로이미다조퀴놀린 아민이다. 또 다른 양태에서 TLR8 효능제는 우레아 치환된 테트라하이드로이미다조퀴놀린 아민이다.

[0081] 또 다른 양태로서, TLR8 효능제는 아릴 에테르 치환된 테트라하이드로이미다조퀴놀린 아민이다. 또 다른 양태에서, TLR8 효능제는 헤테로사이클릭 에테르 치환된 테트라하이드로이미다조퀴놀린 아민이다. 또 다른 양태에서, TLR8 효능제는 아미도 에테르 치환된 테트라하이드로이미다조퀴놀린 아민이다. 또 다른 양태에서, TLR8 효능제는 설펜아미도 에테르 치환된 테트라하이드로이미다조퀴놀린 아민이다. 또 다른 양태로서, TLR8 효능제는 우레아 치환된 테트라하이드로이미다조퀴놀린 에테르이다. 또 다른 양태로서, TLR8 효능제는 티오에테르 치환된 테트라하이드로이미다조퀴놀린 아민이다.

[0082] 또 다른 양태로서, TLR8 효능제는 아미드 치환된 이미다조피리딘 아민이다. 또 다른 양태로서, TLR8 효능제는 설펜아미드 치환된 이미다조피리딘 아민이다. 또 다른 양태로서, TLR8 효능제는 우레아 치환된 이미다조피리딘 아민이다. 또 다른 양태로서, TLR8 효능제는 아릴 에테르 치환된 이미다조피리딘 아민이다. 또 다른 양태로서, TLR8 효능제는 헤테로사이클릭 에테르 치환된 이미다조피리딘 아민이다. 또 다른 양태로서, TLR8 효능제는 아미도 에테르 치환된 이미다조피리딘 아민이다. 또 다른 양태로서, TLR8 효능제는 설펜아미도 에테르 치환된 이미다조피리딘 아민이다. 또 다른 양태로서, TLR8 효능제는 우레아 치환된 이미다조피리딘 에테르이다. 또 다른 양태로서, TLR8 효능제는 티오에테르 치환된 이미다조피리딘 아민이다.

[0083] 또 다른 양태로서, TLR8 효능제는 1,2-브릿지된 이미다조퀴놀린 아민이다. 또 다른 양태로서 TLR8 효능제는 6,7-융합된 사이클로알킬이미다조피리딘 아민이다.

[0084] 또 다른 양태로서, TLR8 효능제는 이미다조나프티리딘 아민이다. 또 다른 양태로서, TLR8 효능제는 테트라하이드로이미다조나프티리딘 아민이다. 또 다른 양태로서, TLR8 효능제는 옥사졸로퀴놀린 아민이다. 또 다른 양태로서, TLR8 효능제는 티아졸로퀴놀린 아민이다. 또 다른 양태로서, TLR8 효능제는 옥사졸로피리딘 아민이다. 또 다른 양태로서, TLR8 효능제는 티아졸로피리딘 아민이다. 또 다른 양태로서, TLR8 효능제는 옥사졸로나프티리딘 아민이다. 또 다른 양태로서, TLR8 효능제는 티아졸로나프티리딘 아민이다.

[0085] 또 다른 양태로서, TLR8 효능제는 피리딘 아민, 퀴놀린 아민, 테트라하이드로퀴놀린 아민, 나프티리딘 아민 또는 테트라하이드로나프티리딘 아민에 융합된 1H-이미다조 이량체이다.

[0086] 일부 양태에서, TLR8 효능제는 선택적 TLR8 효능제인데, 예컨대, 이 효능제는 TLR8을 통해 세포 활성을 조절하지만 TLR7을 통해서서는 세포 활성을 조절하지 않는다. TLR8-선택적 효능제는 미국특허공개 2004/0171086에 기재된 것을 포함한다. 이와 같은 TLR8 선택적 효능제 화합물은 N-{4-[4-아미노-2-(2-메톡시에틸)-1H-이미다조

[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸}퀴놀린-3-카르복스아미드, N-{4-[4-아미노-2-(2-메톡시에틸)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸}퀴놀린-2-카르복스아미드 및 N-[4-(4-아미노-2-프로필-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸]모르폴린-4-카르복스아미드를 포함하는 미국특허공개 2004/0171086에 기재된 화합물을 포함하지만 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0087] 다른 적합한 TLR8-선택적 효능제는 이들로 한정되는 것은 아니지만 2-프로필티아졸로[4,5-c]퀴놀린-4-아민 (미국특허 제6,110,929호), N¹-[2-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c][1,5]나프티리딘-1-일)에틸]-2-아미노-4-메틸펜탄아미드 (미국특허 제6,194,425호), N¹-[4-(4-아미노-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸]-2-페녹시-벤즈아미드 (미국특허 제6,451,810), N¹-[2-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)에틸]-1-프로판설폰아미드 (미국특허 제6,331,539호), N-{2-[2-(4-아미노-2-에틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)에톡시]에틸}-N'-페닐우레아 (미국특허공개 2004/0171086), 1-{4-[3,5-디클로로페닐]티오}부틸}-2-에틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민 (미국특허공개 2004/0171086), N-{2-[4-아미노-2-(에톡시메틸)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일]에틸}-N'-(3-시아노페닐)우레아 (WO 00/76518 및 미국특허공개 2004/0171086) 및 4-아미노- α , α -디메틸-2-메톡시에틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-에탄올 (미국특허 제5,389,640호)을 포함한다. TLR8-선택적 효능제로 사용하는 화합물은 미국특허공개 2004/0171086에 기재된 화합물을 포함한다. 또한 사용하기에 적합한 화합물은 2-프로필티아졸로-4,5-c]퀴놀린-4-아민이다 (상기 Gorden et al., 2005).

[0088] TLR9 효능제. 적합한 TLR9 효능제는 분리된 천연 TLR9 효능제 및 합성 TLR9 효능제를 포함한다. TLR9 효능제의 천연원으로부터 분리된 TLR9 효능제는 일반적으로 정제된 것으로, 예를 들면 정제된 TLR9 효능제는 적어도 약 80%의 순도, 적어도 약 90%의 순도, 적어도 약 95%의 순도, 적어도 약 98%의 순도, 적어도 약 99%의 순도 또는 99% 이상의 순도를 갖는다. 합성 TLR9 효능제는 표준 방법에 의해 제조되며, 일반적으로 적어도 약 80%의 순도, 적어도 약 90%의 순도, 적어도 약 95%의 순도, 적어도 약 98%의 순도, 적어도 약 99%의 순도 또는 99% 이상의 순도를 갖는다.

[0089] TLR9 효능제는 어떠한 다른 화합물에 결합되지 않은 TLR9 효능제를 포함한다. 적합한 TLR9 효능제는 제2 화합물에 공유적으로 또는 비공유적으로 결합된 TLR9 효능제를 포함한다. 일부 양태로서, TLR9 효능제는 다른 화합물에 직접 결합된다. 다른 양태로서, TLR9 효능제는 링커를 통해 다른 화합물에 결합된다.

[0090] TLR9 효능제 (또한 "TLR9 리간드"로도 언급됨)의 예로는 서열 5'-CG-3' ("CpG 핵산")을 포함한 핵산을 들 수 있으며, 특정 관점에서 C는 비메틸화된다. TLR9 리간드 분자와 관련하여 상호교환적으로 사용되는 용어 "폴리핵산"과 "핵산"은 모든 길이의 폴리뉴클레오타이드를 지칭하며 특히 일본쇄 및 이본쇄의 올리고뉴클레오타이드 (데옥시리보뉴클레오타이드, 리보뉴클레오타이드 또는 둘다를 포함함), 변형된 올리고뉴클레오타이드 및 올리고뉴클레오타이드를 단독으로 또는 보다 큰 핵산 구조물의 일부로서 또는 폴리펩타이드와 같은 비핵산 분자와의 결합체의 일부로서 포함한다. 따라서, TLR9 리간드는 예를 들면 일본쇄 DNA (ssDNA), 이본쇄 DNA (dsDNA), 일본쇄 RNA (ssRNA) 또는 이본쇄 RNA (dsRNA)일 수 있다. TLR9 리간드는 또한 정제되지 않고 무독성화된 세균성 (예: 마이코박테리아) RNA 또는 DNA 뿐만 아니라 TLR9 리간드를 위해 증식된 플라스미드를 포함한다. 일부 양태에서, "TLR9 리간드-증식된 플라스미드"는 포유동물 DNA에서 정상적으로 발견되는 것보다 훨씬 많은 수의 CpG 모티프를 포함하거나 포함하도록 유전자 조작된 직선형 또는 원형 플라스미드를 지칭한다.

[0091] 비제한적인 TLR9 리간드-증식된 플라스미드의 예는 Roman et al., 1997에 기술되어 있다. 올리고뉴클레오타이드의 변형은 이들로 한정되는 것은 아니지만 3'OH 또는 5'OH 그룹의 변형, 뉴클레오타이드 염기의 변형, 당 성분의 변형 및 포스페이트 그룹의 변형을 포함한다.

[0092] TLR9 리간드는 L-당을 포함한 적어도 한개의 뉴클레오타이드를 포함한다. L-당은 데옥시리보스, 리보스, 펜토스, 데옥시펜토스, 핵소스, 데옥시핵소스, 글루코즈, 갈락토즈, 아라비노즈, 자일로즈, 라익소스 또는 당 "유사체" 사이클로펜틸 그룹일 수 있다. L-당은 피라노실 또는 푸라노실 형태일 수 있다.

[0093] TLR9 리간드는 일반적으로 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화된 어떠한 아미노산 서열의 발현에도 참여하지 않으며 이들이 그러한 발현에 참여하는 어떠한 요건도 없다. 이에 따라 TLR9 리간드의 서열은 비코딩일 수 있고 일반적으로 비코딩이다. TLR9 리간드는 직선형 이본쇄 또는 일본쇄 분자, 환형 분자를 포함하거나 직선형과 환형 단편 둘다를 포함할 수 있다. TLR9 리간드는 일본쇄일 수 있거나 완전히 또는 부분적으로 이본쇄일 수 있다.

[0094] 일부 양태에서, 본 발명의 방법에 사용하기 위한 TLR9 리간드는 올리고뉴클레오타이드이며, 예를 들면 약 5개

뉴클레오타이드 내지 약 200개 뉴클레오타이드의 서열, 약 10개 뉴클레오타이드 내지 약 100개 뉴클레오타이드의 서열, 약 12개 뉴클레오타이드 내지 약 50개 뉴클레오타이드의 서열, 약 15개 뉴클레오타이드 내지 약 25개 뉴클레오타이드의 서열, 약 20개 뉴클레오타이드 내지 약 30개 뉴클레오타이드의 서열, 약 5개 뉴클레오타이드 내지 약 15개 뉴클레오타이드의 서열, 약 5개 뉴클레오타이드 내지 약 15개 뉴클레오타이드의 서열, 약 5개 뉴클레오타이드 내지 약 10개 뉴클레오타이드의 서열 또는 약 5개 뉴클레오타이드 내지 약 7개 뉴클레오타이드의 서열이다. 일부 양태에서, 약 15개 미만의 뉴클레오타이드, 약 12개 미만의 뉴클레오타이드, 약 10개 미만의 뉴클레오타이드 또는 약 8개 미만의 뉴클레오타이드인 TLR9 리간드는 좀더 큰 분자와 결합된다.

[0095] 일부 양태에서, TLR9 리간드는 진핵세포에서 펩타이드 또는 폴리펩타이드의 발현에 참여하지 않는다. 예를 들면, 진핵세포내로 TLR9 리간드의 도입은, TLR9 리간드가 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 암호화한 mRNA의 전사를 제공하지 않기 때문에 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 생성하지 않는다. 이들 양태에서, TLR9 리간드는 진핵세포에 전사에 필요한 프로모터 영역 및 다른 조절 요소가 결합되어 있다.

[0096] TLR9 리간드는 세균으로부터 분리될 수 있거나 (예를 들면, 세균으로부터 분리됨), 합성방법에 의해 생성되거나 (예를 들면, 폴리뉴클레오타이드의 화학적 합성을 위한 표준 방법에 의해 생성됨), 표준 재조합 방법에 의해 생성된 다음 세균으로부터 분리되거나, 위 방법의 조합에 의해 얻을 수 있다. 많은 양태에서, TLR9 리간드는 정제되며, 예를 들면 순도가 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 또는 그 이상 (예: 99.5% 또는 99.9%)이다. 많은 양태에서, TLR9 리간드는 화학적으로 합성된 다음 정제된다.

[0097] 다른 양태에서, TLR9 리간드는 좀 더 큰 뉴클레오타이드 작제물 (예: 플라스미드 벡터, 바이러스 벡터 또는 다른 그러한 작제물)의 일부이다. 아주 다양한 플라스미드 및 바이러스 벡터가 본 분야에 알려져 있으며 여기서 상세히 다룰 필요는 없다. 이와 같은 벡터의 상당수가 예를 들면 Current Protocols in Molecular Biology (1987 및 개정판)를 포함한 여러 문헌에 기술되어 있다.

[0098] 일반적으로, 본 발명의 조성물에 사용된 TLR9 리간드는 하나 이상의 비메틸화된 CpG 모티프를 포함한다. 특정 포유동물 중 (예: 설치류)에서 폴리뉴클레오타이드내 어떠한 CpG 서열의 해당 위치는 5'-CG-3' (즉, C는 5'에 위치하고 G는 3'에 위치한다)이다.

[0099] 일부 양태에서, TLR9 리간드는 한 개 이상의 CpG 서열을 포함한 중앙 회문식 코어 서열을 포함하며, 여기서 중앙 회문식 코어 서열은 포스포디에스테르 백본(backbone)을 함유하고 중앙 회문식 코어 서열은 한쪽 또는 양쪽에 포스포로티오에이트 백본-함유 폴리구아노신 서열이 삽입되어 있다.

[0100] 다른 양태로서, TLR9 리간드는 핵산의 5' 말단에 또는 근처에 한 개 이상의 TCG 서열; 및 2개 이상의 추가적인 CG 디뉴클레오타이드를 포함한다. 이들 양태의 일부에서, 2개 이상의 추가적인 CG 디뉴클레오타이드는 3개 뉴클레오타이드, 2개 뉴클레오타이드 또는 한 개 뉴클레오타이드로 떨어져 있다. 이들 양태의 일부에서, 적어도 2개의 추가적인 CG 디뉴클레오타이드는 서로 인접해 있다. 이들 양태의 일부에서, TLR9 리간드는 핵산의 5' 말단에 (TCG)_n (여기서, n=1 내지 3이다)을 포함한다. 다른 양태에서, TLR9 리간드는 (TCG)_n (여기서, n=1 내지 3이다)을 포함하며, (TCG)_n 서열은 1개 뉴클레오타이드, 2개 뉴클레오타이드, 3개 뉴클레오타이드, 4개 뉴클레오타이드 또는 5개 뉴클레오타이드가 (TCG)_n 서열의 5' 말단에 삽입된다.

[0101] 본 발명에 유용한 TLR9 리간드의 컨센서스 CpG 모티프는 이들로 한정되는 것은 아니며 예를 들면 5'-퓨린-퓨린-(C)-(G)-피리미딘-피리미딘-3' (여기서, TLR9 리간드는 2개 이상의 퓨린 뉴클레오타이드 (예: GG, GA, AG, AA, II 등) 및 2개 이상의 피리미딘 뉴클레오타이드 (CC, TT, CT, TC, UU 등)이 삽입된 CpG 모티프를 포함한다); 5'-퓨린-TCG-피리미딘-피리미딘-3'; 5'-TCG-N-N-3' (여기서, N은 모든 염기이다); 5'-N_x(CG)_nN_y (여기서, N은 모든 염기이고, x 및 y는 독립적으로 0 내지 200의 모든 정수, 예를 들면 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11-15, 16-20, 21-25, 25-30, 30-50, 50-75, 75-100, 100-150 또는 150-200이고, n은 1 또는 그 이상의 정수, 예를 들면 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 이 보다 큰 수이다); 5'-N_x(TCG)_nN_y (여기서, N은 모든 염기이고, x 및 y는 독립적으로 0 내지 200의 모든 정수, 예를 들면, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11-15, 16-20, 21-25, 25-30, 30-50, 50-75, 75-100, 100-150 또는 150-200이고, n은 1 또는 그 이상의 정수, 예를 들면 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 이 보다 큰 수이다); 5'-(TCG)_n-3' (여기서, n은 1 또는 그 이상의 모든 정수이며, 예를 들면 TCG-기본 TLR9 리간드 (예: 여기서 n=3 이고, 폴리뉴클레오타이드는 서열 5'-TCGNNTCGNNTCG-3'; 서열번호 3을 포함한다)를 제공한다); 5'-N_m-(TCG)_n-N_p-3' (여기서, N은 모든 뉴클레오타이드이고, m은 0, 1, 2 또는 3이며, n은 1 이상의 모든 정수이고, p는 1, 2, 3 또는 4이다); 5'-N_m-(TCG)_n-N_p-3' (여기서, N은 모든 뉴클레오타이드이고, m은 0 내지 5이며, n은 1 이상의 모든 정수이고, p는 4 이상이고, 서열 N-N-N은 서로 인접해 있거나 1개 뉴클레오타이드, 2개 뉴클레오타이드 또는 3개 뉴클레오타이드에 의해 떨어져

져 있는 2개 이상의 디뉴클레오타이드를 포함한다); 및 5'-퓨린-퓨린-CG-피리미딘-TCG-3'를 포함한다.

[0102] 핵산 TLR9 리간드가 식 5'-Nm-(TCG)n-Np-3'(여기서, N은 모든 뉴클레오타이드이고, m은 0 내지 5이며, n은 1 이상의 모든 정수이고, p는 4 이상이며, 서열 N-N-N-N은 서로 인접해 있거나 1개 뉴클레오타이드, 2개 뉴클레오타이드 또는 3개 뉴클레오타이드에 의해 떨어져 있는 2개 이상의 디뉴클레오타이드를 포함한다)의 서열을 포함하는 경우, 본 발명에 유용한 TLR9 리간드의 예로는 이들로 한정하는 것은 아니지만 (1) n=2이고 Np는 NNCGNNCG인 식의 서열; (2) n=2이고 Np는 AACGTTCG인 식의 서열; (3) n=2이고 Np는 TTCGAACG인 식의 서열; (4) n=2이고 Np는 TACGTACG인 식의 서열; (5) n=2이고 Np는 ATCGATCG인 식의 서열; (6) n=2이고 Np는 CGCGCGCG인 식의 서열; (7) n=2이고 Np는 GCCGGCCG인 식의 서열; (8) n=2이고 Np는 CCCGGGCG인 식의 서열; (9) n=2이고 Np는 GGCGCCCG인 식의 서열; (10) n=2이고 Np는 CCCGTTTCG인 식의 서열; (11) n=2이고 Np는 GGCGTTTCG인 식의 서열; (12) n=2이고 Np는 TTCGCCCCG인 식의 서열; (13) n=2이고 Np는 TTCGCCCCG인 식의 서열; (14) n=2이고 Np는 AACGCCCCG인 식의 서열; (15) n=2이고 Np는 AACGGGCG인 식의 서열; (16) n=2이고 Np는 CCCGAACG인 식의 서열; (17) n=2이고 Np는 GGCGAACG인 식의 서열이고, 상기 (1)-(17)에서 m=0, 1, 2 또는 3인 것을 포함한다.

[0103] 핵산 TLR9 리간드가 N은 모든 뉴클레오타이드이고 m은 0, 1, 2 또는 3이며 n은 1 또는 그 이상의 정수이고 p는 1, 2, 3 또는 4인 식 5'-Nm-(TCG)n-Np-3'의 서열을 포함하는 경우, 본 발명에 유용한 TLR9 리간드의 예로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 (1) m=0, n=1이고 Np는 T-T-T인 식의 서열, (2) m=0, n=1이고 Np는 T-T-T-T인 식의 서열, (3) m=0, n=1이고 Np는 C-C-C-C인 식의 서열, (4) m=0, n=1이고 Np는 A-A-A-A인 식의 서열, (5) m=0, n=1이고 Np는 A-G-A-T인 식의 서열, (6) Nm은 T이고 n=1이며 Np는 T-T-T인 식의 서열, (7) Nm은 A이고 n=1이며 Np는 T-T-T인 식의 서열, (8) Nm은 C이고, n=1이며 Np는 T-T-T인 식의 서열, (9) Nm은 G이고, n=1이며 Np는 T-T-T인 식의 서열, (10) Nm은 T이고, n=1이며 Np는 A-T-T인 식의 서열, (11) Nm은 A이고, n=1이며, Np는 A-T-T인 식의 서열 및 (12) Nm은 C이고, n=1이며 Np는 A-T-T인 식의 서열을 포함한다.

[0104] 본 발명에 유용한 TLR9 리간드의 코어 구조는 어떠한 수 또는 조성의 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오사이드도 상류 및/또는 하류로 삽입될 수 있다. 일부 양태에서, TLR9 리간드의 코어 서열은 길이가 6개 이상의 염기 또는 8개 염기이고, 완전한 TLR9 리간드 (코어 서열 + 삽입 서열 5', 3' 또는 양쪽 모두)는 길이가 보통 6개 염기 또는 8개 염기 내지 최대 약 200개 염기이다.

[0105] 본 발명에 유용한 DNA-기본 TLR9 리간드는 이들로 한정되는 것은 아니지만 아래 뉴클레오타이드 서열중 하나 이상을 포함한 폴리뉴클레오타이드를 포함한다:

[0106] AGCGCT, AGCGCC, AGCGTT, AGCGTC, AACGCT, AACGCC, AACGTT, AACGTC, GGCGCT, GGCGCC, GGCGTT, GGCGTC, GACGCT, GACGCC, GACGTT, GACGTC, GTCGTC, GTCGCT, GTCGTT, GTCGCC, ATCGTC, ATCGCT, ATCGTT, ATCGCC, TCGTCG 및 TCGTCGTCG.

[0107] 본 발명에 유용한 추가의 TLR9 리간드는 이들로 한정되는 것은 아니지만 아래 뉴클레오타이드 서열중 하나 이상을 포함한 폴리뉴클레오타이드를 포함한다:

[0108] TCGXXX, TCGAXX, XTCGXXX, XTCGAXX, TCGTCGA, TCGACGT, TCGAACG, TCGAGAT, TCGACTC, TCGAGCG, TCGATTT, TCGCTTT, TCGGTTT, TCGTTTT, TCGTCGT, ATCGATT, TTCGTTT, TTCGATT, ACGTTCG, AACGTTT, TGACGTT, TGTCGTT, TCGXXX, TCGAXX, TCGTCG, AACGTT, ATCGAT, GTCGTT, GACGTT, TCGXX, TCGAX, TCGAT, TCGTT, TCGTC, TCGA, TCGT, TCGX 및 TCG (여기서, "X"는 어떠한 뉴클레오타이드도 가능하다).

[0109] 본 발명에 유용한 DNA-기본 TLR9 리간드는 이들로 한정되는 것은 아니지만 아래 8량체 뉴클레오타이드 서열을 포함한 폴리뉴클레오타이드를 포함한다:

[0110] AGCGCTCG, AGCGCCCG, AGCGTTCG, AGCGTCCG, AACGCTCG, AACGCCCCG, AACGTTCG, AACGTCCG, GGCGCTCG, GGCGCCCG, GGCGTTCG, GGCGTCCG, GACGCTCG, GACGCCCG, GACGTTCG 및 GACGTCCG.

[0111] 본 발명의 방법을 수행하는데 유용한 TLR9 리간드는 상기 CpG 모티프중 하나 이상을 포함할 수 있다. 예를 들면, 본 발명에 유용한 TLR9 리간드는 동일한 CpG 모티프의 한 가지 예 또는 다수의 예 (예: 2, 3, 4, 5 또는 그 이상)를 포함할 수 있다. 다르게는, TLR9 리간드는 다수의 CpG 모티프중 2개 이상이 다른 컨센서스 서열을 갖거나 TLR9 리간드내 모든 CpG 모티프가 다른 컨센서스 서열을 갖는 다수의 CpG 모티프 (예: 2, 3, 4, 5 또는 그 이상)를 포함할 수 있다.

[0112] 본 발명에 유용한 TLR9 리간드는 회문식 영역을 포함할 수 있거나 포함하지 않을 수 있다. 존재하는 경우, 회문식은 코어 6량체 또는 8량체 서열내의 CpG 모티프로만 연장할 수 있거나 6량체 또는 8량체 이상의 서열뿐만

아니라 삽입하는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다.

- [0113] 다량체 TLR9 리간드. 일부 양태에서, TLR9 리간드는 다량체이다. 다량체 TLR9 리간드는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 이상의 상기된 개별 (단량체) 핵산 TLR9 리간드가 비공유 결합을 통해 연결되거나, 공유 결합을 통해 연결되거나, 서로 직접 연결되거나, 하나 이상의 스페이서를 통해 연결될 수 있다. 적합한 스페이서는 이들이 생물학적 적합성이 있는 한 핵산 및 비핵산 분자를 포함한다. 일부 양태에서 다량체 TLR9 리간드는 단량체 TLR9 리간드의 직선 배열을 포함한다. 다른 양태에서, 다량체 TLR9 리간드는 단량체 TLR9 리간드의 측쇄 또는 덴드리머 배열이다.
- [0114] 일부 양태에서, 다량체 TLR9 리간드는 $(X1)_n(X2)_n$ 의 일반 구조를 가지고, 여기서 X는 상기된 핵산 TLR9 리간드이고, 약 6개 뉴클레오타이드 내지 약 200개 뉴클레오타이드의 길이, 예를 들면 약 6개 뉴클레오타이드 내지 약 8개 뉴클레오타이드, 약 8개 뉴클레오타이드 내지 약 10개 뉴클레오타이드, 약 10개 뉴클레오타이드 내지 약 12개 뉴클레오타이드, 약 12개 뉴클레오타이드 내지 약 15개 뉴클레오타이드, 약 15개 뉴클레오타이드 내지 약 20개 뉴클레오타이드, 약 20개 뉴클레오타이드 내지 약 25개 뉴클레오타이드, 약 25개 뉴클레오타이드 내지 약 30개 뉴클레오타이드, 약 30개 뉴클레오타이드 내지 약 40개 뉴클레오타이드, 약 40개 뉴클레오타이드 내지 약 50개 뉴클레오타이드, 약 50개 뉴클레오타이드 내지 약 60개 뉴클레오타이드, 약 60개 뉴클레오타이드 내지 약 70개 뉴클레오타이드, 약 70개 뉴클레오타이드 내지 약 80개 뉴클레오타이드, 약 80개 뉴클레오타이드 내지 약 90개 뉴클레오타이드, 약 90개 뉴클레오타이드 내지 약 100개 뉴클레오타이드, 약 100개 뉴클레오타이드 내지 약 125개 뉴클레오타이드, 약 125개 뉴클레오타이드 내지 약 150개 뉴클레오타이드, 약 150개 뉴클레오타이드 내지 약 175개 뉴클레오타이드, 또는 약 175개 뉴클레오타이드 내지 약 200개 뉴클레오타이드의 길이이며, n은 1 내지 약 100의 모든 수, 예를 들면 n=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10 내지 약 15, 15 내지 약 20, 20 내지 약 25, 25 내지 약 30, 30 내지 약 40, 40 내지 약 50, 50 내지 약 60, 60 내지 약 70, 70 내지 약 80, 80 내지 약 90 또는 90 내지 약 100이다. 이들 양태에서, X와 X2는 서로 적어도 한개의 뉴클레오타이드에 의해 뉴클레오타이드 서열에서 다르며, 서로 뉴클레오타이드 서열에서 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 이상의 염기에 의해 상이할 수 있다.
- [0115] 위에서 주지된 바와 같이 일부 양태에서 다량체 TLR9 리간드는 스페이서에 의해 인접한 TLR9 리간드로부터 분리된 TLR9 리간드를 포함한다. 일부 양태에서 스페이서는 비-TLR9 리간드 핵산이다. 다른 양태에서, 스페이서는 비핵산 잔기이다. 적합한 스페이서는 미국특허공개 2003/0225016에 기술된 것을 포함한다. TLR9 리간드는 공지 방법을 이용하여 다량체화한다.
- [0116] TLR9 리간드 변형. 본 발명의 조성물에 유용한 TLR9 리간드는 여러 방법으로 변형될 수 있다. 예를 들면, TLR9 리간드는 백본 포스페이트 그룹 변형 (예: 메틸포스포네이트, 포스포로티오에이트, 포스포로아미테이트 및 포스포로디티오에이트 뉴클레오타이드간 연결)을 포함할 수 있으며, 여기서 변형은 예를 들어 리간드의 생체내 안정성을 강화하여 특히 치료용으로 유용하게 만들 수 있다. 특히 유용한 포스페이트 그룹 변형은 핵산 TLR9 리간드의 포스포로티오에이트 또는 포스포로디티오에이트 형태로의 변환이다. 포스포로티오에이트 및 포스포로디티오에이트는 이들의 비변형된 올리고뉴클레오타이드 형태보다 생체내에서의 분해 내성이 더 강하며, 이에 따라 TLR9 리간드의 반감기를 증가시키고 치료 받는 개체에서 보다 더 이용성이 있도록 한다.
- [0117] 본 발명에 속하는 다른 변형된 TLR9 리간드는 5' 말단, 3' 말단 또는 5'과 3' 말단 양쪽에 변형이 이루어진 TLR9 리간드를 포함한다. 예를 들면, 5' 및/또는 3' 말단은 분자 (핵산, 비핵산 또는 양쪽 모두)와 공유 또는 비공유 결합되어 예를 들어 TLR9 리간드의 생체이용성을 높이고, 필요한 경우 흡수효율을 증가시키며, 해당 세포로의 전달을 촉진해 줄 수 있는 등의 역할을 할 수 있다. TLR9 리간드에 결합하는 분자는 이들로 한정되는 것은 아니지만 콜레스테롤, 인지질, 지방산, 스테롤, 올리고사카라이드류, 폴리펩타이드 (예: 면역글로불린), 펩타이드, 항원 (예: 펩타이드, 소분자 등), 직선형 또는 원형 핵산 분자 (예: 플라스미드), 불용성 지지체, 치료용 폴리펩타이드 등을 포함한다. TLR9 효능제에 결합시키기에 적합한 치료용 폴리펩타이드는 이들로 한정되는 것은 아니지만 수지상 세포 성장 인자 (예: GM-CSF), 사이토카인, 인터페론 (예: IFN- α , IFN- β 등), TNF- α 길항제 등을 포함한다.
- [0118] TLR9 리간드는 일부 양태에서 불용성 지지체와 결합된다 (예: 접합, 공유결합, 비공유결합 또는 흡착). 불용성 지지체의 비제한적 예로는 양이온성 폴리(D,L-락타이드-코-글리콜라이드)를 들 수 있다.
- [0119] 추가의 TLR9 리간드 접합체 및 이들의 제조 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들면 WO 98/16427 및 WO 98/55495에 기술되어 있다. 따라서, 용어 "TLR9 리간드"는 핵산 TLR9 리간드를 포함한 접합체를 포함한다.

- [0120] 폴리펩타이드 (예: 치료용 폴리펩타이드)는 TLR9 리간드에 직접 또는 간접으로 (예: 링커 분자를 통해) 접합될 수 있다. 다양한 링커 분자들이 당업계에 알려져 있으며 접합체에 사용될 수 있다. 펩타이드로부터 올리고뉴클레오타이드로의 연결은 펩타이드 반응성 측쇄 또는 펩타이드의 N- 또는 C-말단을 통해 이루어질 수 있다. 올리고뉴클레오타이드로부터 펩타이드로의 연결은 3' 또는 5' 말단 또는 중간에서 이루어질 수 있다. 링커는 유기, 무기 또는 반유기 분자일 수 있으며 유기분자, 무기분자의 중합체 또는 무기와 유기 분자 둘 다를 포함한 공중합체일 수 있다.
- [0121] 존재하는 경우, 링커 분자는 일반적으로 올리고뉴클레오타이드 및/또는 폴리뉴클레오타이드와 결합된 폴리펩타이드가 올리고뉴클레오타이드와 폴리펩타이드사이에 약간의 유연한 움직임을 허용할 수 있을 만큼의 충분한 길이여야 한다. 링커 분자는 일반적으로 길이가 약 6-50개 원자이다. 링커 분자는 또한 예를 들어 아릴 아세틸렌, 2-10개 단량체 단위를 함유한 에틸렌 글리콜 올리고머, 디아민, 디엑시드, 아미노산 또는 이들의 조합일 수 있다. 이러한 내용을 고려하여 올리고뉴클레오타이드와 결합할 수 있는 다른 링커 분자가 사용될 수 있다.
- [0122] b. NOD-유사 수용체 (NLR) 효능제
- [0123] NOD-유사 수용체 (NLR)는 염증 및 아폽토시스 반응의 조절에 다양한 기능을 가질 수 있는 세포질 단백질이다. 이들 단백질중 약 20개가 포유동물 게놈에서 발견되었고 NOD 및 NALP라고 하는 두 가지 주요 아부류, MHC 부류 II 트랜스활성화제 (CIITA) 및 일부 다른 분자 (예: IPAF 및 BIRC1)를 포함한다. 현재 이해되고 있는 바로는 이들 단백질중 일부가 내인성 또는 미생물 분자를 인식하거나 반응을 억제하고 IL-1과 같은 중요한 염증 사이토카인의 절단 및 활성화를 유도하는 염증 카스파제 (예: 카스파제 1)를 활성화하고/하거나 NF- κ B 신호 경로를 활성화하여 염증 분자의 생성을 유도하는 올리고머를 형성한다. NLR 부류는 CATERPILLER (또는 CLR) 또는 NOD-LRR 부류를 포함하여 몇 가지 다른 명칭으로 알려져 있다.
- [0124] NOD1 및 NOD2에 대한 리간드가 현재 알려져 있다. NOD1은 그람 음성 세균만의 펩티도글리칸 성분인 메조-DAP라는 분자를 인식한다. NOD2 단백질은 그람 양성 및 그람 음성 세균 모두의 펩티도글리칸 성분인 세포내 MDP (뮤라밀 디펩타이드)를 인식한다. NODS는 NF- κ B 및 MAP 키나제의 경로에서 RIP2라고 불리는 세린-트레오닌 키나제를 통해 신호를 변환한다. NOD 단백질은 지칭되는 바와 같이 뉴클레오타이드-결합 올리고머화 도메인을 함유하며 그 도메인은 뉴클레오타이드 트리포스페이트와 결합한다. NOD는 N-말단 CARD 도메인을 통해 신호를 보내 하류 유전자 유도 이벤트를 활성화하고 C-말단 류신-풍부한 반복 (LRR) 영역에 의해 미생물 분자와 상호작용한다.
- [0125] NOD처럼 NALP 단백질은 C-말단 LRR을 함유하며, 이들은 조절 도메인으로서 작용하는 것으로 보이고 미생물 병원체의 인식에 연루될 수 있다. 또한 NOD처럼 이들 단백질은 또한 뉴클레오타이드 트리포스페이트를 위한 뉴클레오타이드 결합 부위 (NBS)를 함유한다. 다른 단백질 (예: 어댑터 분자 ASC)과의 상호작용은 N-말단 파이린 (PYD) 도메인을 통해 매개된다. 사람의 경우 이러한 아부류의 14개 종류가 있으며 NALP1 내지 NALP14라고 부른다. NALP3에서의 돌연변이는 자가염증 질환인 가족성 한랭 자가염증 증후군, Muckle-Wells 증후군 및 신생아발병다발염증질환을 일으킨다. NALP3의 활성화제는 뮤라밀 디펩타이드, 세균성 DNA, ATP, 독소, 이분쇄 RNA, 파라믹소바이러스 및 요산 결정을 포함한다.
- [0126] IPAF 및 NAIP25/Bircle와 같은 다른 NLR이 또한 살모넬라 및 레지오넬라에 반응하여 카스파제-1을 활성화하는 것으로 제시되었다.
- [0127] NLR 효능제는 이들로 한정되는 것은 아니지만 GM-트리펩타이드 (슈젤라 플렉스네리), 메조-란티오닌 (헬리코박터 파일로리), 메조-DAP, γ -D-Glu-DAP (iEDAP) (장침투성 에스케리키아 콜라이), D-락틸-L-ala- γ -Glu-메조-DAP-Gly (FK156) (슈도모나스), 헵타놀릴- γ -Glu-메조-DAP-D-ala (FK565) (클라미디아, 리스테리아 모노사이토게네스), MDP (리스테리아 모노사이토게네스), MurNAc-L-Ala- γ -D-Glu-L-Lys (M-TRILys) (스트렙토코커스 뉴모니아, 살모넬라 타이피뮤리움, 살모넬라 플렉스네리), 플라젤린, 세균성 RNA, ATP, 나이제리신, 마이토톡신, 요산 결정, 에어로라이신 및 탄저균 치사 독소를 포함한다.
- [0128] c. RIG-유사 수용체 (RLR) 효능제
- [0129] 체내 여러 세포는 감염성 바이러스를 감지하고 총체적으로 항바이러스 선천 반응으로 알려진 반응들을 개시할 수 있다. 이들 반응은 I형 인터페론 (IFN)과 같은 항바이러스 사이토카인의 생성 및 후속되는 항바이러스 효소의 합성을 포함하며, 이러한 반응은 바이러스 복제에 손상을 주고 후천성 면역반응을 촉진한다. RIG (레틴산 유도성 유전자)-유사 수용체는 선천면역계의 성분을 유도하는 바이러스 RNA 분자를 감지한다. RLR에 대한 리간드는 이들로 한정되는 것은 아니지만 ssRNA, dsRNA, 폴리이노신-폴리시티딜신 ("poly(I:R)", 이분쇄 RNA

(dsRNA)의 합성 유사체 및 다른 바이러스성 핵산 (RNA 바이러스 게놈 (예: 일본 뇌염 바이러스 (JEV), 수포성 구내염 바이러스 (VSV), 인플루엔자 바이러스, 뎡기열 바이러스, 웨스트 나일 바이러스, 레오바이러스 및 뇌심근염 바이러스 (EMCV))의 일부 및 이의 유사체를 포함)을 포함한다. RNA 단편 또는 유사체는 적어도 20, 25, 30, 35, 40 또는 그 이상의 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 쌍 또는 동등물일 수 있다. 특정 관점에서 RNA는 5' 트리포스페이트 RNA이다.

[0130] d. 백혈구 면역글로불린-유사 수용체 (LIR) 효능제

[0131] LIR-1과 63-84% 아미노산 동일성을 갖는 8개 LIR-1-관련 분자(Fanger et al., 1999 및 본원의 참조문헌)의 클로닝은 면역수용체 (LIR)의 새로운 부류를 설정하였다. LIR은 이들의 구조에 따라 그룹으로 나눌 수 있다. LIR중 5개 (1, 2, 3, 5 및 8)는 2, 3 또는 4개 면역수용체 티로신-기본 억제 모티프(ITIM)-유사 서열을 함유한 세포질 도메인을 갖는다. 비록 티로신-기본 모티프중 2개 (모티프 2번 및 3번; I/VxYxxL/V)는 최초 ITIM 컨센서스 서열과 부합하며, 이들 LIR중 일부는 아스파라긴 잔기 (모티프 1번; NxYxxL/V) 또는 세린 잔기 (모티프 4번; SxYxxL/V)가 티로신의 상류로 2개 아미노산이 위치해 있는 티로신-기본 모티프를 함유한다. ITIM-함유 LIR과 대조적으로, LIR중 3개 (6a, 6b 및 7)는 짧은 세포질 영역과 횡막 도메인내에 양전하 아르기닌 잔기를 함유한다.

[0132] LIR 부류의 일원은 MHC I 부류 분자와 결합한다. LIR-1 및 LIR-2는 HLA-A (A0101, A0301), HLA-B (B0702, B0802, B1501, B2702) 및 HLA-C (C0304) 대립인자 및 비고전적 I 부류 분자 HLA-G1을 인식한다. 따라서, LIR-1 및 LIR-2의 결합 특이성은 MHC I 부류 대립인자 뿐만 아니라 CD94/NDG2A의 상대적으로 제한된 하위부류를 인식하는 KIR의 결합 특이성과 구분된다. 후자 분자는 결합 주머니가 특이적 MHC I 부류 항원의 신호 서열로부터 파생된 펩타이드에 의해 점유되는 HLA-E를 인식한다.

[0133] 2. 미생물 성분

[0134] a. EF2505

[0135] 특정 관점에서, 미생물에 감염되었거나 이러한 감염에 걸릴 위험이 있는 개체에게 그러한 미생물 감염을 치료, 억제 또는 약독화하는 방법이 제공되며, 이 방법은 유효량의 StIR 펩타이드 (예: 엔테로코커스 파에칼리스 단백질 EF2505 (서열번호 1) 또는 이의 유도체의 절편을 상기 개체에 투여함을 포함한다. 전형적으로 개체 또는 피검체는 병원성 미생물에 노출되었거나 그러한 노출 위험이 있다. 특정 관점에서, StIR 펩타이드는 정제된 또는 분리된 폴리펩타이드 또는 펩타이드이다. 용어 "정제된" 또는 "분리된"은 성분이 다른 단백질로부터 사전에 분리되었거나 정제되었으며 조성물에 제형화되기 전에 그 성분의 순도가 적어도 약 70, 75, 80, 90, 95, 97 또는 99%임을 의미한다. 특정 양태에서 정제된 또는 분리된 성분은 적어도 약 95, 96, 97, 98, 99, 99.1, 99.2, 99.3, 99.4, 99.5%의 순도를 갖거나 그 안에서 유도해 낼 수 있는 어떠한 범위의 순도일 수 있다. 그런 다음 그렇게 정제된 성분은 본원에 기술된 바와 같이 다른 성분과 혼합하여 조성물을 형성할 수 있다.

[0136] 제조함 StIR 단백질 (예: EF2505) 또는 이의 절편 또는 단편 또는 유사체는 서열번호 1중 적어도 또는 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80-, 85, 90, 95, 100, 150 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, . 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1500, 1600 또는 1651개 연속 아미노산 (모든 숫자와 이들 숫자 사이의 범위를 포함함)을 포함한다. 특정 관점에서, 그의 절편 또는 유사체는 서열번호 1의 아미노산 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120 내지 아미노산 100, 150, 200, 250, 300, 350, 355, 360, 365, 370, 375, 380, 390, 395, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450의 아미노산 서열 (모든 숫자와 이들 숫자 사이의 범위를 포함함)을 최소한 또는 대부분 또는 대략 포함한다. 추가의 관점에서, 그의 폴리펩타이드 절편 또는 유사체는 이들로 한정되는 것은 아니지만 서열번호 1의 최소한, 대부분 또는 약 아미노산 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 내지 아미노산 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450을 포함한 아미노산 서열을 포함한다. 특정 관점에서, 그의 폴리펩타이드 절편 또는 유사체는 이들로 한정되는 것은 아니지만 서열번호 1의 아미노산 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 200, 250 내지 아미노산 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450 (모든 숫자와 이들 숫자 사이의 범위를 포함함)을 최소한 또는 대부분 또는 대략 포함한다. 다른 추가의 관점에서, 그의 폴리펩타이드 단편 또는 유사체는 서열번호 1의 아미노산 28 내지 449, 28 내지

442, 111 내지 449, 111 내지 442, 223 내지 449 또는 223 내지 442 (모든 숫자와 이들 숫자 사이의 범위를 포함함)와 적어도 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% 상등인 아미노산 서열을 포함한 아미노산 서열을 포함한다. StIR 단백질 또는 이의 단편의 유도체 또는 변이체는 삽입, 결실 및 점 돌연변이를 포함한다. 특정 삽입 돌연변이는 카르복시 또는 아미노 말단에 EF2505 단백질에 외래성인 아미노산 서열을 포함한 융합 단백질이다.

[0137] 특정 관점에서, StIR 단백질 또는 이의 절편 또는 단편 또는 유도체는 분무제 또는 에어로졸로 투여된다. 조성물은 흡입 또는 흡인에 의해 투여될 수 있다. StIR 또는 이의 절편 또는 유도체는 약 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 μg 또는 mg/개체의 체중 kg 내지 약 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 200 μg 또는 mg/개체의 체중 kg의 양으로 투여될 수 있다. 다른 관점에서, 피검체에게 약 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 200 μg 또는 mg의 StIR 폴리펩타이드 또는 펩타이드 또는 이의 변이체, 유도체 또는 유사체를 투여할 수 있다. 아래 내용을 기초로 하여, 본 분야에 통상의 기술을 가진 사람은 StIR 폴리펩타이드 (예: 엔테로코커스 파에칼리스 단백질 EF2505)의 유용한 단편, 절편 또는 유도체를 용이하게 결정할 수 있다. 한 가지 바람직한 관점에서, 절편, 단편 또는 유도체는 서열번호 1의 서열과 75% 이상의 동일성을 갖는다. 다른 관점에서, 절편, 단편 또는 유도체는 서열번호 1의 서열과 80% 이상의 동일성을 갖는다. 또 다른 관점에서, 절편, 단편 또는 유도체는 서열번호 1의 서열과 85% 이상의 동일성을 갖는다. 또 다른 관점에서, 절편, 단편 또는 유도체는 서열번호 1의 서열과 90% 이상의 동일성을 갖는다. 또 다른 관점에서, 절편, 단편 또는 유도체는 서열번호 1의 서열과 95% 이상의 동일성을 갖는다.

[0138] 또 다른 양태로서 본 발명은 하나 이상의 StIR 폴리펩타이드 (예: 엔테로코커스 파에칼리스 단백질 EF2505) 또는 이의 절편, 단편, 유도체 또는 유사체; 소염제; 항균제; 및/또는 하나 이상의 약제학적 부형제를 포함한 약제학적으로 허용가능한 조성물에 관한 것이다. 전형적으로 그러한 조성물은 무균 상태로 병원성 미생물이 실질적으로 없다.

[0139] b. 플라젤린

[0140] 특정 관점에서 StIR 조성물은 TLR5 효능제로 알려진 펩타이드 QRLSTGSRINSKDDAAGLQIA (서열번호 2)의 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 또는 22개 연속 아미노산을 포함한 플라젤린 폴리펩타이드 또는 이의 단편 또는 유도체를 포함한다. 본 발명의 폴리펩타이드는 또한 서열번호 2와 70, 80 또는 90% 이상 (모든 수치와 그 사이의 범위를 포함함) 동일성인 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 다른 관점에서, 플라젤린은 합성된 및/또는 정제된 또는 분리된 플라젤린 폴리펩타이드 또는 펩타이드이다. 용어 "정제된" 또는 "분리된"은 성분이 다른 단백질 또는 합성 시약 또는 부산물로부터 사전에 분리되었거나 정제되었으며 조성물에 체형화되기 전에 그 성분의 순도가 적어도 약 95%임을 의미한다. 특정 양태에서 정제된 또는 분리된 성분은 적어도 약 80, 95, 96, 97, 98, 99, 99.1, 99.2, 99.3, 99.4, 99.5%의 순도를 갖거나 그 안에서 유도해 낼 수 있는 어떠한 범위의 순도일 수 있다. 그런 다음 그렇게 정제된 성분은 본원에 기술된 바와 같이 다른 성분과 혼합하여 조성물을 형성할 수 있다.

[0141] 제조합 플라젤린 단백질 또는 이의 절편 또는 단편은 서열번호 2 또는 다른 플라젤린 폴리펩타이드의 5, 10, 15, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250, 300, 350 또는 400개 연속 아미노산 (모든 수치 및 그 사이의 범위를 포함함)를 포함한다. 이들 절편 또는 단편은 서열번호 2 또는 다른 플라젤린 폴리펩타이드와 적어도, 대부분 또는 대략 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% 동일성을 갖는다. 특정 관점에서, 플라젤린 폴리펩타이드 또는 단편은 서열번호 2의 서열과 75% 이상의 동일성을 갖는다. 다른 관점에서, 플라젤린 폴리펩타이드 또는 단편은 서열번호 2의 서열과 80% 이상의 동일성을 갖는다. 또 다른 관점에서, 플라젤린 폴리펩타이드 또는 단편은 서열번호 2의 서열과 85% 이상의 동일성을 갖는다. 또 다른 관점에서, 플라젤린 폴리펩타이드 또는 단편은 서열번호 2의 서열과 90% 이상의 동일성을 갖는다. 또 다른 관점에서, 플라젤린 폴리펩타이드 또는 단편은 서열번호 2의 서열과 95% 이상의 동일성을 갖는다. 플라젤린 또는 이의 단편의 유도체 또는 변이체는 서열번호 2의 삽입, 결실 및 점 돌연변이를 포함한다. 특정 삽입 돌연변이는 카르복시 또는 아미노 말단에 플라젤린에 대해 외래성인 아미노산 서열을 포함하는 융합 단백질이다. 많은 플라젤린 단백질이 알려져 있으며 이들로 한정되는 것은 아니지만 등록번호 BAB58984 (gi|14278896); YP_001330159 (gi|150402865); YP_001323483 (gi|150399716); CAA28975 (gi|1333716); CAA02137 (gi|1567895); CAA67105 (gi|1580779); AAR10473 (gi|38049688); CAR58992 (gi|197093531); YP_001217666 (gi|147675484); CAL12564 (gi|122089712); BAD14977 (gi|46093563); 또는 CAD05707 (gi|16503200)를 갖는 플라젤린을 포함한다. 이들 각각에 대한 전체적인 내용은 본원의 우선일자로

본 명세서에 참조로 인용된다.

[0142] c. 미생물 용해물

[0143] 본 발명의 양태는 필수적으로 병원성인 미생물의 용해물, 소염제 및 하나 이상의 약제학적 부형제를 포함하고 무균 상태로 병원성 미생물이 실질적으로 없는 약제학적으로 허용가능한 조성물을 포함한다. 미생물 용해물은 전형적으로 음파처리되거나; 균질화되거나; 방사능 조사되거나; 기압, 공압, 세정제 또는 효소적 방법 및 이들의 조합에 의해 용해된다. 미생물 용해물은 이들로 한정되는 것은 아니지만 세균, 진균 또는 바이러스 용해물을 포함할 수 있다. 특정 양태로서 미생물 용해물은 세균 용해물이다. 용해물의 제조원이 되는 미생물은 맹독성 미생물이 필요 없으며 전형적으로는 맹독성 미생물이어서는 안될 것이다. 본 발명의 관점은 치료 피검체의 건강에 한정된 영향을 미치는 세균으로부터 유래된 용해물을 포함한다. 한정된 영향은 피검체의 조직, 기관 또는 계의 기능에 최소의 역반응 및 비실질적인 장애를 적어도, 대체로 또는 대략 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10일의 기간에 걸쳐 유발함을 가리킨다.

[0144] 본 발명의 조성물은 보호 또는 치료의 원인이 되는 병원성 유기체로부터 직접적으로 유래될 필요는 없다. 세균은 해모필루스 속일 수 있으나 이들로 한정되는 것은 아니다. 피검체에게 최소한의 부작용 위험을 제공하는 세균은 확인할 수 있다. 특정 관점에서 그러한 세균은 해모필루스 인플루엔자, 특히 비피막형 해모필루스 인플루엔자 (NTHi)이다 (Clement et al., 2008; Clement et al., 2009; Evans et al., 2010; Tuvim et al., 2009).

[0145] 미생물 용해물은 적어도, 거의, 약 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5 또는 10 mg/ml (모든 수치와 그 사이의 범위를 포함함)의 단백질 농도를 가질 수 있다. 특정 관점에서 미생물 용해물은 적어도, 거의, 약 10 mg/ml를 가질 수 있다.

[0146] 본 발명의 양태는 기도를 통해 투여될 수 있는 미생물 용해물을 포함한다. 특정 관점에서 투여는 흡입에 의한 것이다. 추가의 관점에서, 조성물은 에어로졸이거나 피검체가 흡입할 수 있는 형태이다. 특정 양태에서, 용해물 조성물은 스테로이드성 및 비스테로이드성 소염제 (NSAID)를 포함한 소염제를 포함한다. 보다 자세한 내용은 Dickey 등의 미국특허원 11/830,622 (폐 선천면역의 자극을 위한 조성물 및 방법)을 참조할 수 있고 이의 전체 내용은 본 명세서에 참조로 인용된다.

[0147] B. 숙주 또는 자가 성분

[0148] 피검체 또는 숙주의 세포 및 조직으로부터 유래된 많은 분자는 면역반응 유발을 자극, 강화 또는 기여할 수 있다. 이들 잔기를 숙주 또는 자가 잔기 또는 성분이라고 하며 손상된, 스트레스 받은 또는 사멸된 세포로부터 방출된 소 분자; 미생물 치사 또는 중화에 연루된 성분; 및 세포 또는 조직으로부터 방출된 거대분자를 포함한다.

[0149] 1. 소분자 숙주 성분

[0150] 손상된, 강인된 또는 사멸된 세포와 연관된 또는 방출된 소분자의 예로는 아데노신 5'-트리포스페이트 (ATP), 요산 (우레이트) 및 아데노신을 들 수 있다. 이들 분자중 많은 것에 대한 수용체 및 이들 이 염증을 조절하는 경로는 잘 정의되어 있다. 염증은 감염 또는 자극에 대한 면역계의 첫 번째 반응중 하나이다. 염증은 손상된 세포에 의해 방출된 화학 인자에 의해 자극되며 감염의 전파를 막는 물리적 장벽을 설정하고 병원체의 청소 후 모든 손상된 조직의 치유를 촉진하는 역할을 한다. 염증반응시 생성된 화학인자 (히스타민, 브라디키닌, 세로토닌, 류코트리엔, 프로스타글란딘)은 통증 수용체를 감작시키고, 해당 부위에서 혈관의 팽창을 유발하며, 대식세포, 특히 호중구를 유인한다. 그런 다음 호중구는 다른 백혈구 및 림프구를 소집하는 인자를 방출함으로써 면역계의 다른 부분이 진행되도록 한다.

[0151] 본 발명의 StIR 조성물에 포함될 수 있는 소분자 숙주 성분은 ATP, 아데노신, 히스타민, 브라디키닌, 세로토닌, 류코트리엔, 프로스타글란딘을 포함한다.

[0152] 2. 세포외 숙주 잔기

[0153] 세포외 숙주 단백질은 보체, 펩타신, 디펜신 및 카텔리시딘과 같이 직접적인 미생물 살해 및/또는 신호를 보내는 역할을 한다. 이들 분자는 흔히 구성적으로 존재하지만 이들이 미생물 산물과 결합하거나 단백질분해적으로 절단됨으로써 또는 몇몇 다른 활성화 기전에 의해 활성화되기까지 신호를 보내지 않는다. 또한, 이들 분자의 생성이 증가될 수 있다. 특정 관점에서 이들 단백질은 시험관내 활성화 또는 프로세싱에 의해 또는 단백질의 공학적 조작에 의해 활성화 형태를 취한다.

- [0154] 보체계는 유기체로부터 병원체의 청소를 보조하는 생화학적 일련과정이다. 이는 개인의 수명 내내 적응하지 않고 변하지 않는 거대 면역계의 일부이다. 예컨대, 보체계는 선천면역계에 속한다. 그러나, 보체계는 후천면역계에 의해 소집되고 활동이 이루어진다.
- [0155] 보체계는 혈액내에서 발견되고, 정상적으로는 불활성 자이모겐으로서 순환하는 많은 소 단백질로 구성된다. 서너 가지 유발원중 하나에 의해 자극받은 경우 계내의 프로테아제는 특이적 단백질을 절단하여 사이토카인을 방출하고 추가 절단의 일련 과정을 증폭시킨다. 이와 같은 활성화 일련 과정의 최종 결과는 세포-살해 막 공격 복합체의 반응 및 활성화의 거대한 증폭이다. 20가지 이상의 단백질 및 단백질 절편이 보체계를 구성하며, 혈청 단백질, 장막 단백질 및 세포막 수용체가 포함된다. 이들 단백질은 주로 간에서 합성되며 혈청의 글로불린 분획중 약 5%를 차지한다.
- [0156] StIR 조성물에 함유될 수 있는 보체계의 성분은 이들로 한정되는 것은 아니지만 C1-복합체, (C1q, C1r, C1s 및 C1qr2s2), C1r2s2, C4, C2, C4a, C4b, C2a, C2b C3-컨버타제 (C4b2a 복합체), C3a, C3b; C5 컨버타제 (C4bC2aC3b 복합체), 소멸가속인자 (DAF), 인자 B, C3bB, 인자 D, Ba, Bb, C3bBb, C3bBbC3b, C5, C5a, C5b, C6, C7, C8, C9 및 막 공격 복합체 (MAC) (C5b6789)를 포함한다
- [0157] 펜트락신은 전형적으로 칼슘 의존성 리간드 결합과 콩 렉틴의 것과 유사한 독특하게 편평한 β -젤리롤 구조를 갖는 단백질 부류이다. "짧은" 펜트락신은 혈청 아밀로이드 P 성분 (SAP) 및 C 반응성 단백질 (CRP)를 포함한다. "긴" 펜트락신은 PTX3 (사이토카인 조절된 분자) 및 수 가지 신경 펜트락신을 포함한다.
- [0158] 디펜신은 척추동물 및 무척추동물 모두에서 발견되는 작은 시스테인-풍부한 양이온성 단백질이다. 이들은 세균, 진균 및 많은 외피 및 비외피 바이러스에 대해 활성을 나타낸다. 디펜신은 6개 (척추동물에서) 내지 8개 보존된 시스테인 잔기를 포함한 18-45개 아미노산으로 구성된다. 면역계의 세포는 예를 들면 과립구 및 거의 모든 상피 세포에서 식세포화된 세균을 살해하는 것을 보조하는 디펜신 펩타이드를 함유한다. 대부분의 디펜신은 미생물 세포막에 결합하고, 일단 함입되면, 기공-유사한 막 결합을 형성하여 필수적인 이온과 영양분이 유출되도록 하는 작용을 한다.
- [0159] 본 발명의 StIR 조성물에 함유될 수 있는 디펜센은 이들로 한정되는 것은 아니지만 α -디펜신 (DEFA1, DEFA1A3, DEFA3 및/또는 DEFA4), β -디펜신 (DEFB1, DEFB4, DEFB103A/DEFB103B 내지 DEFB107A/DEFB107B, DEFB110 내지 DEFB133) 및/또는 θ -디펜신 (DEFT1P)을 포함한다.
- [0160] 카텔리시딘 항미생물 펩타이드는 다형핵 백혈구 (PMN)의 리소솜에서 발견되는 폴리펩타이드 부류이다. 항미생물 폴리펩타이드의 카텔리시딘 부류의 일원은 고도로 보존된 영역 (카텔린 도메인) 및 고도로 가변적인 카텔리시딘 펩타이드 도메인에 의해 특징지어진다. 카텔리시딘 펩타이드는 포유동물의 많은 다른 종으로부터 분리되어 있다. 카텔리시딘은 호중구에서 최초로 발견되었으나 그 이후로 세균, 바이러스, 진균 또는 호르몬 1,25-D에 의해 활성화된 상피 세포 및 대식세포를 포함한 많은 다른 세포에서 발견되었다. 카텔리시딘 부류는, 비록 시스테인 프로테아제 억제제에서 중요한 것으로 간주되는 아미노산 잔기가 보통 결여되어 있으나, 시스테인 프로테아제 억제제의 카텅신 부류와 일차 서열 상동성을 공유한다.
- [0161] 3. 사이토카인
- [0162] 사이토카인은 세포 교신에서 광범위하게 이용되는 신호전달 분자의 카테고리이다. 이들은 단백질, 펩타이드 또는 당단백질이다. 용어 사이토카인은 다양한 발생학적 기원의 세포에 의해 몸체 전반적으로 생성되는 폴리펩타이드 조절제의 다양하고 대규모 부류를 포괄한다. 사이토카인의 작용은 자가분비, 측분비 및 내분비일 수 있다. 사이토카인은 비록 면역계로만 한정되는 것은 아니지만 선천 및 후천 면역 반응 모두의 발생 및 작용에 중요하다. 이들은 흔히 병원체에 직면한 면역세포에 의해 분비되며, 그럼으로써 추가의 면역 세포를 활성화하고 소집하여 병원체에 대한 계의 반응을 증가시킨다.
- [0163] 선천성 면역세포, 특히 상피세포의 항미생물 방어를 자극하는 사이토카인의 예로는 IL-17, IL-22, IFN- γ 를 들 수 있다. 몇몇 경우에 이것은, IL-17이 Th 17 세포에 의해 생성될 때와 같이 적응한 선천면역계에 의해 선천염증의 증폭을 나타낸다. 다른 경우로서, 사이토카인은 후천적 면역계의 일부가 아닌 세포, 예를 들면 상피세포, 간엽 세포 또는 수지상 세포에 의해 방출된다.
- [0164] 본 발명의 StIR 조성물에 포함될 수 있는 사이토카인은 IL-1 상위부류 1 ((IL-1Ra), IL-18, IL-33); IL-6 유사/gp130 이용 부류 (IL-6, IL-11, IL-27, IL-30, IL-31, 온코스타틴 M, 백혈병 억제 인자, 섬모영양 인자, 카디오프로틴 1); IL-10 부류 (IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26); 인터페론 III형 (IL-28, IL-29); 공통

γ -쇄 부류 (IL-2/15, IL-3, IL-4, IL-7, IL-9, IL-13, IL-21); IL-12 부류 (IL-12, IL-23, IL-27, IL-35), IL-5; IL-8; IL-14; IL-16; IL-17/25; IL-32; CCL 케모카인 (CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL6, CCL7, CCL8, CCL9, CCL10, CCL11, CCL12, CCL13, CCL14, CCL15, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL21, CCL22, CCL23, CCL24, CCL25, CCL26, CCL27, CCL28); CXCL 케모카인 (CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL15, CXCL16, CXCL17); CX3CL-1; XCL1; XCL 2; TNF(리간드) 상위부류 (4-1BB 리간드, B-세포 활성화 인자, FAS 리간드, 림포톡신, OX40L, RANKL, TRAIL); 분화 사이토카인의 클러스터 (CD70, CD153, CD154); 인터페론 (IFN-I 알파 (페길화된 2a, 페길화된 2b), IFN-I 베타 (1a, 1b)), IFN-II γ 및 IFN-III을 포함한다.

[0165] 4. 거대분자 숙주 잔기

[0166] 세포외 매트릭스, 세포 표면 또는 세포 내부로부터 방출될 수 있는 거대분자 또는 이의 절편은 텍틴, 베르시칸, HMGB-I, DNA 및 RNA와 같은 선천성 면역 신호전달을 활성화한다. 전형적으로, 이들 거대분자는 세포 내부에 존재하거나 분자내 또는 분자간 상호작용에 의해 마스킹되어 표적 수용체로부터 은폐되는 것이 보통이다. 이들은 세포 붕괴 후 또는 매트릭스의 세포 표면이 단백질 분해되어 신호전달 잔기가 드러나거나 일부 유사한 기전에 의해 방출되어 표적 수용체와 상호작용한다.

[0167] II. 폴리펩타이드 및 펩타이드 조성물

[0168] 특정 양태에서, 본 발명은 하나 이상의 폴리펩타이드 또는 펩타이드 (예: 폴리펩타이드 단편) 또는 이의 유도체 또는 변이체에 관한 것이다. 본원에 사용된 "단백질", "폴리펩타이드", "펩타이드", "폴리펩타이드 또는 펩타이드 조성물" 또는 "폴리펩타이드 또는 펩타이드 화합물"은 이들로 한정되는 것은 아니지만 일반적으로 5개 이상의 아미노산 또는 아미노산 유사체 (총괄적으로 아미노 분자, 아래 참조)의 단백질 또는 폴리펩타이드를 가리킨다. 상기된 용어 "폴리펩타이드 또는 펩타이드"는 본 명세서에서 상호 교환적으로 사용될 수 있다.

[0169] 특정 양태에서 하나 이상의 폴리펩타이드 또는 펩타이드 분자의 크기는 이들로 한정되는 것은 아니지만 적어도, 거의 또는 약 5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 50, 100, 500, 1000개 내지 약 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 50, 100, 500개 또는 그 이상의 아미노 분자 잔기 및 모든 숫자 또는 이로부터 파생되는 범위의 아미노 분자를 갖는 분자를 포함할 수 있다. 본 발명은 본원에 논의된 임의의 서열의 상기 길이의 연속 아미노산 또는 이의 유사체를 포함한다.

[0170] 폴리펩타이드 또는 펩타이드의 단편 또는 절편은 본원에 기술되었거나 인용된 서열의 아미노산 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 300, 350, 400, 450개 내지 아미노산 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600개 아미노산 (모든 숫자 및 그 사이의 범위를 포함함)을 포함한다.

[0171] 본원에 사용된 "아미노 분자"는 본 분야에 통상의 지식을 갖춘 자에게 알려진 바와 같은 모든 아미노산, 아미노산 유도체 또는 아미노산 모방체를 가리킨다. 특정 양태에서 폴리펩타이드 또는 펩타이드 분자의 잔기는 아미노 분자 잔기의 서열을 차단하는 어떠한 비아미노 분자도 없이 서열로 되어 있다. 다른 양태에서, 서열은 하나 이상의 비아미노 분자 잔기를 포함할 수 있다. 특정 양태에서, 폴리펩타이드 또는 펩타이드 분자의 잔기의 서열은 하나 이상의 비아미노 분자 잔기에 의해 차단될 수 있다.

[0172] 따라서, 용어 "폴리펩타이드 또는 펩타이드 조성물"은 천연적으로 합성된 단백질내의 20개의 공통된 아미노산중 한 개 이상 또는 변형된 또는 비정상적인 아미노산 한 개 이상을 포함한 아미노 분자 서열을 포함한다.

[0173] 특정 양태로서, 폴리펩타이드 또는 펩타이드 조성물은 하나 이상의 단백질, 폴리펩타이드 또는 펩타이드를 포함한다. TLR 효능제 조성물이 연루된 방법에서 폴리펩타이드 또는 펩타이드는 서열번호 2와 같은 플라젤린 폴리펩타이드 또는 상동성 폴리펩타이드의 아미노산 서열의 전부 또는 일부를 가질 수 있다. 특정 양태에서, 조성물에 함유된 단백질, 폴리펩타이드 또는 펩타이드는 일반적으로 독소, 병원체 및 유해한 면역원이 실질적으로 없는 단백질 또는 펩타이드 또는 합성 단백질 또는 펩타이드이다. 특정한 관점에서 폴리펩타이드는 재조합 또는 합성 아미노산 서열이다.

[0174] 폴리펩타이드 또는 펩타이드 조성물은 표준 분자 생물 기술에 의한 단백질, 폴리펩타이드 또는 펩타이드의 발현, 천연원으로부터 폴리펩타이드 또는 펩타이드의 분리 또는 폴리펩타이드 또는 펩타이드 물질의 화학적 합성을 포함하여 본 분야의 숙련가에게 알려진 어떠한 기술에 의해서도 제조될 수 있다. 이들 폴리펩타이드 또는 펩타이드의 암호화 영역은 본원에 기술된 기술을 사용하거나 본 분야에 통상의 기술을 가진 자에게 알려진 바와

같이 증폭하고/하거나 발현할 수 있다. 다른 방안으로서, 단백질, 폴리펩타이드 및 펩타이드의 여러 가지 상업적 제조 방법이 숙련가에게 알려져 있다.

[0175] 특정 양태로서, 폴리펩타이드 또는 펩타이드 화합물은 정제될 수 있다. 일반적으로, "정제된"은 분획화하여 여러 다른 단백질, 폴리펩타이드, 펩타이드 및 다른 분자 및 화합물이 제거된 특이적 단백질, 폴리펩타이드 또는 펩타이드 조성물을 가리키는데, 여기서 조성물은 특이적 또는 원하는 단백질, 폴리펩타이드 또는 펩타이드에 대해 본 분야에 통상의 기술을 가진 자에게 알려진 바와 같이 예를 들면 단백질 검정예의해 측정될 수 있는 바와 같이 활성을 실질적으로 유지한다.

[0176] 실질적으로 어떠한 단백질, 폴리펩타이드 또는 펩타이드를 함유한 성분도 본원에 기술된 조성물 및 방법에 사용될 수 있음을 이해하여야 한다. 특정 양태에서 에어로졸 또는 분무된 또는 에어로졸성 또는 분무성 조성물의 제형은 조성물이 흡입, 흡인 등에 의해 호흡계에 보다 정확하게 또는 간편이 투여되도록 할 수 있음이 명백하다.

[0177] A. 폴리펩타이드 또는 펩타이드 변이체 및 유도체

[0178] 본 발명에 따른 단백질, 폴리펩타이드 및 펩타이드의 아미노산 서열 변이체 또는 유도체는 치환, 삽입 또는 결실 변이체 뿐만 아니라 아미노산 유사체 또는 유도체의 삽입일 수 있다. 결실 변이체는 기능 또는 면역원 활성화에 필수적이지 않은 천연 단백질에서 한 개 이상의 잔기가 결핍된 것이다. 결실 변이체의 다른 공통된 유형은 하나의 결여된 분비성 신호 서열 또는 세포 또는 막 통과 영역의 특정 부분 또는 탐지된 생체내 활성을 위해 필요치 않은 다른 작용성 서열에 단백질이 결합하도록 유도하는 신호서열이다. 삽입 돌연변이체는 전형적으로 폴리펩타이드에서 비-말단 포인트에 물질이 삽입된 것이다. 이것은 면역반응성 에피토프 또는 단순히 단일 잔기의 삽입을 포함할 수 있다. 융합 단백질이라고 하는 말단 부가가 아래에 기술된다.

[0179] 치환 변이체는 전형적으로 폴리펩타이드 또는 펩타이드내의 한 개 이상의 부위에서 한 개 아미노산이 다른 아미노산으로 교환된 것을 포함하며, 다른 기능 또는 성질이 상실되지 않으면서 단백질 절단에 대한 안정성과 같이 하나 이상의 특성을 조절하기 위해 디자인될 수 있다. 이러한 종류의 치환은 바람직하게는 보존성으로, 즉 한 개의 아미노산이 유사한 모양 및 전하의 아미노산으로 교체된다. 보존성 치환은 본 분야에 잘 알려져 있으며, 예를 들면 알라닌이 세린으로, 아르기닌이 라이신으로, 아스파라긴이 글루타민 또는 히스티딘으로, 아스파테이트가 글루타메이트로, 시스테인이 세린으로, 글루타민이 아스파라긴으로, 글루타메이트가 아스파테이트로, 글라이신이 프롤린으로, 히스티딘이 아스파라긴 또는 글루타민으로, 이소류신이 류신 또는 발린으로, 류신이 발린 또는 이소류신으로, 라이신이 아르기닌으로, 메티오닌이 류신 또는 이소류신으로, 페닐알라닌이 티로신, 류신 또는 메티오닌으로, 세린이 트레오닌으로, 트레오닌이 세린으로, 트립토판이 티로신으로, 티로신이 트립토판 또는 페닐알라닌으로 및 발린이 이소류신 또는 류신으로의 변이를 포함한다.

[0180] 용어 "생물학적 작용성 동등물"은 본 분야에 잘 이해되고 있으며 본원에 좀 더 상세히 정의되어 있다. 따라서, 생물학적 작용성 동등물은 폴리펩타이드 또는 펩타이드 또는 이의 변이체 또는 유사체 또는 유도체의 아미노산과 동일하거나 기능상 동일하고 플라젤린 또는 다른 TLR 효능제와 유사한 생물학적 활성/반응을 제공하는 아미노산의 약 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99%의 서열을 갖는다.

[0181] 아래 논의된 것은 폴리펩타이드 또는 펩타이드의 아미노산을 변이시켜 동등물 또는 개량된 2세대 분자를 생성하는 것을 기초로 한 것이다. 예를 들면, 폴리펩타이드 또는 펩타이드에서 면역반응의 증강과 같이 특정 활성의 평가가능한 손실없이 다른 아미노산으로 치환될 수 있다. 전형적으로 단백질의 작용 활성을 정의하는 것은 폴리펩타이드 또는 펩타이드의 상호작용성 및 성질이기 때문에, 특정 아미노산 치환은 폴리펩타이드 또는 펩타이드 서열에서 및 상응하는 DNA 암호화 서열에서 이루어질 수 있으며, 그럼에도 불구하고 유사한 성질을 갖는 단백질을 생성할 수 있다. 따라서, 본 발명자들은 아래 기술된 바와 같이 생물학적 이용성 또는 활성을 평가될 만큼 손실하지 않으면서 본 발명의 폴리펩타이드 또는 펩타이드를 암호화한 DNA 서열에서 여러 변이를 이룰 수 있음을 고려한다.

[0182] 그러한 변이를 생성함에 있어, 아미노산의 친수성 지수를 고려할 수 있다. 단백질에 상호작용성 생물학적 기능을 부여함에 있어서 친수성 아미노산 지수의 중요성은 일반적으로 본 분야에서 이해되고 있다 (Kyte & Doolittle, 1982). 아미노산의 상대적 친수성 특성이 생성된 단백질의 이차 구조에 기여하며, 차례로 그 단백질과 다른 분자, 세포, 조직 등 (예: 효소, 기질, 수용체, DNA, 항체, 항원, 면역세포 및 면역계 등)의 상호작용을 규정하는 것으로 이해되고 있다.

[0183] 또한, 유사 아미노산의 치환은 친수성을 기초로 효과적으로 제조할 수 있음은 본 분야에서 이해되고 있다. 본

원에 참조로 인용된 미국특허 제4,554,101호는 인접한 아미노산의 친수성에 의해 통제받는 단백질의 가장 큰 국소 평균 친수성이 단백질의 생물학적 특성과 상호관련이 있음을 기재하고 있다. 미국특허 제4,554,101에 상세히 기술된 바와 같이, 아미노산 잔기에 다음의 친수성 값이 부여되어 있다: 아르기닌 (+3.0); 라이신 (+3.0); 아스파테이트 (+3.0±1); 글루타메이트(+3.0±1); 세린(+0.3); 아스파라긴(+0.2); 글루타민(+0.2); 글라이신 (0); 트레오닌(-0.4); 프롤린(-0.5±1); 알라닌(-0.5); 히스티딘(-0.5); 시스테인(-1.0); 메티오닌(-1.3); 발린(-1.5); 류신(-1.8); 이소류신(-1.8); 티로신(-2.3); 페닐알라닌(-2.5); 트립토판(-3.4).

[0184] 또한, 아미노산은 유사한 친화성 값을 갖는 다른 아미노산으로 치환되고 생물학적으로 동등하고 면역학적으로 동등한 단백질을 생성할 수 있는 것으로 이해되고 있다. 이러한 변이에서, 친수성 값이 ±2 이내인 아미노산의 치환이 바람직하고, ±1 이내인 것이 특히 바람직하며, ±0.5 이내인 것이 훨씬 더 특히 바람직하다.

[0185] 앞서 요약된 바와 같이, 아미노산 치환은 일반적으로 아미노산 측쇄 치환체의 상대적 유사성, 예를 들면 소수성, 친수성, 전하, 크기 등을 기초로 한다. 여러 가지 상기 특징을 고려한 치환의 예는 본 분야의 숙련가에게 잘 알려져 있으며 아르기닌과 라이신; 글루타메이트와 아스파테이트; 세린과 트레오닌; 글루타민과 아스파라긴; 및 발린, 류신 및 이소류신을 포함한다.

[0186] 당업자는 또한 본 발명에 따른 폴리펩타이드 또는 펩타이드 화합물의 내부 아미노산 및/또는 아미노 및/또는 카르복시 말단을 변형시켜 본 발명의 다른 화합물, 즉 폴리펩타이드 또는 펩타이드 유도체를 제조할 수 있다. 아미노 말단 변형은 메틸화 (예: -NHCH₃ 또는 -N(CH₃)₂), 아세틸화 (예: 아세트산 또는 이의 할로겐화 유도체 (예: α-클로로아세트산, α-브로모아세트산 또는 α-요오도아세트산)로), 벤질옥시카르보닐 (Cbz) 그룹의 부가 또는 아미노 말단을 RCOO-로 표시되는 카르복실레이트 작용기 또는 R-SO₂- (여기서, R은 알킬, 아릴, 헤테로아릴, 알킬 아릴 등으로부터 선택됨)로 표시되는 설포닐 작용기를 갖는 차단 그룹 및 유사한 그룹으로의 차단을 포함한다. 또한, 당업자는 테스아미노산을 N-말단에 부가하여 (그럼으로써 N-말단 아미노 그룹이 없다) 프로테아제에 대한 민감성을 감소시키거나 폴리펩타이드 또는 펩타이드 화합물의 형태를 제한할 수 있다.

[0187] 카르복시 말단 변형은 유리 산을 카르복스아미드 그룹으로 치환시키거나 카르복시 말단에서 사이클릭 락탐을 형성하여 구조적 제약을 도입하는 것을 포함한다. 당업자는 또한 본 발명의 펩타이드를 폐환시키거나 펩타이드의 말단에 테스아미노 또는 테스카르복시 잔기를 도입함으로써 말단 아미노 또는 카르복실 그룹이 없게 되고 프로테아제에 대한 민감성을 감소시키거나 펩타이드의 형태를 제약할 수 있다. 본 발명에 따른 화합물의 C-말단 작용 그룹은 아미드, 아미드 저급 알킬, 아미드 디(저급 알킬), 저급 알콕시, 하이드록시 및 카르복시, 및 이의 저급 에스테르 유도체 및 그의 약제학적으로 허용되는 염을 포함한다.

[0188] 당업자는 20개의 유전적으로 암호화된 아미노산 (또는 입체이성체 D 아미노산)의 천연 측쇄를 다른 측쇄, 예를 들면 알킬, 저급 알킬, 사이클릭 4-, 5-, 6- 내지 7-원 알킬, 아미드, 아미드 저급 알킬, 아미드 디(저급 알킬), 저급 알콕시, 하이드록시, 카르복시 및 이의 저급 에스테르 유도체 및 4-, 5-, 6- 내지 7-원 헤테로사이클릭과 같은 그룹으로 치환시킬 수 있다. 특히, 프롤린 잔기의 환 크기가 5원으로부터 4, 6 또는 7원으로 변이된 프롤린 유사체가 사용될 수 있다. 사이클릭 그룹은 포화 또는 비포화될 수 있으며, 비포화된 경우 방향족 또는 비방향족일 수 있다. 헤테로사이클릭 그룹은 바람직하게는 한 개 이상의 질소, 산소 및/또는 황 헤테로원자를 함유한다. 이러한 그룹의 예는 퓨라자닐, 퓨릴, 이미다졸리디닐, 이미다졸릴, 이미다졸리닐, 이소티아졸릴, 이속사졸릴, 모르폴리닐 (예: 포르폴리노), 옥사졸릴, 피페라지닐 (예: 1-피페라지닐), 피페리딜 (예: 1-피페리딜, 피페리디노), 피라닐, 피라지닐, 피라졸리디닐, 피라졸리닐, 피라졸릴, 피리다지닐, 피리딜, 피리미디닐, 피롤리디닐 (예: 1-피롤리디닐), 피롤리닐, 피롤릴, 티아디아졸릴, 티아졸릴, 티에닐, 티오모르폴리닐 (예: 티오모르폴리노) 및 트리아졸릴을 포함한다. 이들 헤테로사이클릭 그룹은 치환되거나 비치환될 수 있다. 그룹이 치환된 경우, 치환체는 알킬, 알콕시, 할로젠, 산소 또는 치환되거나 비치환된 페닐일 수 있다.

[0189] 당업자는 또한 인화 및 다른 방법에 의해 폴리펩타이드 또는 펩타이드를 용이하게 변형시킬 수 있다 (예: Hruby et al., 1990에 기술됨).

[0190] 본 발명의 펩타이드 화합물은 또한 유사한 생물학적 활성을 갖는 비-펩타이드 화합물에 대한 구조적 모델로 역할을 한다. 본 분야 숙련가는 동일하거나 유사한 목적하는 생물학적 활성을 갖는 화합물을 선도 펩타이드 화합물로서 그러나 용해성, 안정성 및 가수분해 및 단백질분해에 대한 민감성 측면에서 선도 화합물보다 더욱 양호한 활성을 갖는 화합물로 작제하기 위해 여러 기술이 이용가능함을 인지하고 있다 (참조: Morgan and Gainor, 1989). 이들 기술은 펩타이드 골격을 포스포네이트, 아미데이트, 카르바메이트, 설폰아미드, 이차 아민 및 N-메틸아미노산으로 구성된 골격으로 치환하는 것을 포함한다.

- [0191] 또한, 본 발명의 화합물은 한 개 이상의 분자내 디설파이드 결합을 함유할 수 있다. 한 가지 양태로서, 펩타이드 단량체 또는 이량체가 한 개 이상의 분자내 디설파이드 결합을 포함한다. 바람직한 양태로서, 펩타이드 이량체는 두 개의 분자내 디설파이드 결합을 포함한다. 이러한 디설파이드 결합은 펩타이드 코어 서열의 시스템인 잔기의 산화에 의해 형성될 수 있다. 한 가지 양태로서, 시스템 결합 형성의 조절은 목적하는 이성체의 형성을 최적화하기에 효과적인 유형 및 농도의 산화제를 선택함으로써 달성된다. 예를 들면, 펩타이드 이량체를 산화시켜 두 개의 분자내 디설파이드 결합 (각 펩타이드 쇠에 한 개)을 형성하는 것은 산화제가 DMSO일때 우선적으로 (분자간 디설파이드 결합의 형성에 비해) 달성된다. 특정 양태로서, 시스템 결합의 형성은 펩타이드 합성시 티올-보호 그룹의 선택적 사용에 의해 조절된다.
- [0192] 본 발명의 다른 양태는 황 중 한 개가 CH₂ 그룹 또는 황의 다른 이소테레(isotere)로 치환된 디설파이드 유도체의 유사체를 제공한다. 이들 유사체는 본 분야에 공지된 방법 (참조예: Barker et al., 1992 및 Or et al., 1991)을 사용하여 분자내 또는 분자간 치환을 통해 각 코어 서열이 한 개 이상의 Cys(C)를 함유하거나 두 번째 C 잔기 대신에 호모시스테인 잔기 및 α-아미노-γ-부틸산을 함유한 본 발명의 화합물로부터 제조할 수 있다. 본 분야의 숙련가는 이러한 치환을 α-아미노-γ-부틸산의 다른 동족체 및 호모시스테인을 사용하여 달성할 수 있음을 용이하게 이해한다.
- [0193] 상기된 폐환 방법 이외에, 다른 비-디설파이드 펩타이드 폐환 방법을 사용할 수 있다. 그러한 다른 폐환 방법은 예를 들면 아미드-폐환 방법뿐만 아니라 티오-에테르 결합의 형성에 연루된 방법을 포함한다. 따라서, 본 발명의 화합물은 분자내 아미드 결합 또는 분자내 티오-에테르 결합을 갖는 폐환 형태로 존재할 수 있다. 예를 들면, 코어 서열의 한 개 시스템이 라이신으로 치환되고 두 번째 시스템이 글루탐산으로 치환된 펩타이드가 합성될 수 있다. 그런 후 이들 두 잔기의 측쇄 사이에 아미드 결합을 통해 사이클릭 단량체를 형성할 수 있다. 다른 방법으로서, 코어 서열의 한 개 시스템이 라이신으로 치환된 펩타이드를 합성할 수 있다. 그런 다음, 라이신 잔기와 코어 서열의 두 번째 시스템 잔기의 측쇄사이에 티오-에테르 결합을 통해 사이클릭 단량체를 형성할 수 있다. 그런 경우로서, 디설파이드 폐환 방법 외에 아미드-폐환 방법 및 티오-에테르 폐환 방법 둘 다를 용이하게 사용하여 본 발명의 화합물을 폐환시킬 수 있다. 대안으로서, 펩타이드의 아미노-말단은 α-치환체가 α-할로아세트산 (예: α-클로로아세트산, α-브로모아세트산 또는 α-요오도아세트산)과 같은 이탈기인 α-치환된 아세트산으로 캡핑할 수 있다.
- [0194] 아래 설명과 함께 포함되는 미국특허원 제10/844,933호 (2004년 5월 12일 출원)은 전체 내용이 본원 명세서에 참조로 인용된다. 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 같은 수용성 중합체를 치료 목적상 폴리펩타이드 또는 펩타이드의 공유 변형을 위해 사용할 수 있다. 이러한 중합체의 결합은 생물학적 활성을 높여주고, 수용해성을 증가시켜 주며, 프로테아제 분해에 대해 내성을 강화시켜 준다. 예를 들면, 인터루킨 (Knauf, et al., 1988; 15064; Tsutsumi et al., 1995), 인터페론 (Kita et al., 1990), 카탈라제 (Abuchowski et al., 1997), 과산화물 디스 뮤타제 (Beauchamp et al., 1983) 및 아데노신 데아미나제 (Chen et al., 1981)와 같은 치료용 폴리펩타이드에 PEG의 공유 결합은 생체내 반감기를 늘려주고/주거나 면역원성 및 항원성을 감소시켜주는 것으로 보고되어 있다.
- [0195] 본 발명의 화합물은 또한 한 개 이상의 수용성 중합체 잔기를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 이들 중합체는 본 발명 화합물에 공유 결합된다. 수용성 중합체는 예를 들면 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜의 공중합체, 카르복시메틸셀룰로즈, 텍스트란, 폴리비닐 알코올, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리-1,3-디옥솔란, 폴리-1,3,6-트리옥산, 에틸렌/말레산 무수물 공중합체, 폴리아미노산 (단독중합체 또는 랜덤 공중합체), 폴리(n-비닐 피롤리돈)폴리에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜 단독중합체, 폴리프로필렌 옥사이드/에틸렌 옥사이드 공중합체 및 폴리옥시에틸화된 폴리올일 수 있다.
- [0196] 본 발명의 화합물은 분자 (예: 펩타이드+스페이서)의 수용체-결합 부분에 수용성 중합체(들)를 연결하는 여러 화학 방법중 어느 것을 이용하여도 수용성 중합체 (예: PEG)에 결합시킬 수 있다. 전형적인 양태는 수용체-결합 부위에 수용성 중합체의 공유 결합을 위해 단일 연결점을 사용한다. 그러나, 다른 양태로서 복수의 연결점을 사용할 수 있으며 다른 종류의 수용성 중합체가 스페이서 및/또는 한쪽 또는 양쪽 펩타이드 쇠에 공유 연결점을 포함할 수 있는 뚜렷한 연결점에서 수용체-결합 부위에 연결되는 추가의 변이를 포함한다.
- [0197] PEG 시약은 이들로 한정되는 것은 아니지만 mPEG2-NHS, mPEG2-ALD, 멀티-암 PEG, mPEG(MAL)₂, mPEG2(MAL), mPEG-NH₂, mPEG-SPA, mPEG-SBA, mPEG-티오에스테르, mPEG-이중 에스테르, mPEG-BTC, mPEG-ButyrALD, mPEG-ACET, 헤테로작용성 PEG (NH₂-PEG-COOH, Boc-PEG-NHS, Fmoc-PEG-NHS, NHS-PEG-VS, NHS-PEG-MAL), PEG 아크릴레

이트 (ACRL-PEG-NHS), PEG-인지질 (*e.g.*, mPEG-DSPE), SUNBRITE 시리즈의 멀티 암 PEG (본 분야 숙련가에 의해 선택된 화학방법에 의해 활성화된 글리세린-기본 PEG의 GL 시리즈를 포함), SUNBRITE 활성화된 PEG (이들로 한정되는 것은 아니지만 카르복실-PEG, p-NP-PEG, 트리셀-PEG, 알데하이드 PEG, 아세탈-PEG, 아미노-PEG, 티올-PEG, 말레이미도-PEG, 하이드록실-PEG-아민, 아미노-PEG-COOH, 하이드록실-PEG-알데하이드, 카르복실릭 무수물 형-PEG, 작용기화된 PEG-인지질 및 다른 유사한 및/또는 적합한 반응성 PEG를 포함)포함하며 본 분야의 숙련가는 특정 응용 및 용도에 맞춰 선택할 수 있다.

[0198] 결합되는 중합체 분자의 수는 다양할 수 있으며, 예를 들면 1개, 2개, 3개 또는 그 이상의 중합체가 본 발명의 폴리펩타이드 또는 펩타이드에 결합될 수 있다. 복수의 결합된 중합체는 동일하거나 상이한 화학적 잔기 (예: 다른 분자량의 PEG)일 수 있다. 일부 경우에서, 중합체 결합의 정도 (펩타이드에 결합된 중합체 잔기의 수 및/또는 중합체가 결합된 펩타이드의 총 수)는 결합 반응에서 중합체 분자 대 펩타이드 분자의 비율에 의해서 뿐만 아니라 반응 혼합물중 각각의 총 농도에 의해 영향을 받을 수 있다. 일반적으로, 최적 중합체 대 펩타이드 비율 (과량의 미반응된 펩타이드 및/또는 중합체 잔기를 유발하지 않는 반응 효율의 측면에서)은 목적하는 중합체 결합 정도 (예: 모노, 디-, 트리- 등), 선택된 중합체의 분자량, 중합체의 측쇄 또는 비측쇄 여부 및 특정 결합 방법을 위한 반응 조건과 같은 요인에 의해 결정된다.

[0199] 다른 관점에서, 본 발명의 화합물은 불용성 중합체의 부가에 의해 유도체화할 수 있다. 대표적인 불용성 중합체는 이들로 한정되는 것은 아니지만 폴리포스파진, 폴리(비닐 알코올), 폴리아미드, 폴리카르보네이트, 폴리알킬렌, 폴리아크릴아미드, 폴리알킬렌 글리콜, 폴리알킬렌 옥사이드, 폴리알킬렌 테레프탈레이트, 폴리비닐 에테르, 폴리비닐 에스테르, 폴리비닐 할라이드, 폴리비닐피롤리돈, 폴리글리콜라이드, 폴리실록산, 폴리우레탄, 폴리(메틸 메타크릴레이트), 폴리(에틸 메타크릴레이트), 폴리(부틸 메타크릴레이트), 폴리(이소부틸 메타크릴레이트), 폴리(헥실 메타크릴레이트), 폴리(이소데실 메타크릴레이트), 폴리(라우릴 메타크릴레이트), 폴리(페닐 메타크릴레이트), 폴리(메틸 아크릴레이트), 폴리(이소프로필 아크릴레이트), 폴리(이소부틸 아크릴레이트), 폴리(옥타데실 아크릴레이트)폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리(에틸렌 글리콜), 폴리(에틸렌 옥사이드), 폴리(에틸렌 테레프탈레이트), 폴리(비닐 아세테이트), 폴리비닐 클로라이드, 폴리스티렌, 폴리비닐 피롤리돈, 플루로닉스 및 폴리비닐페놀 및 이의 공중합체를 포함한다.

[0200] 본 발명의 유도체에 사용되는 합성적으로 변형된 천연 중합체는 이들로 한정되는 것은 아니지만 알킬 셀룰로즈, 하이드록시알킬 셀룰로즈, 셀룰로즈 에테르, 셀룰로즈 에스테르 및 니트로셀룰로즈를 포함한다. 합성적으로 변형된 천연 중합체의 폭 넓은 부류의 일원은 이들로 한정되는 것은 아니지만 메틸 셀룰로즈, 에틸 셀룰로즈, 하이드록시프로필 셀룰로즈, 하이드록시프로필 메틸 셀룰로즈, 하이드록시부틸 메틸 셀룰로즈, 셀룰로즈 아세테이트, 셀룰로즈 프로피오네이트, 셀룰로즈 아세테이트 부티레이트, 셀룰로즈 아세테이트 프탈레이트, 카르복시메틸 셀룰로즈, 셀룰로즈 트리아세테이트, 셀룰로즈 설페이트 나트륨 염 및 아크릴과 메타크릴 에스테르와 알긴산의 중합체를 포함한다.

[0201] 특정 관점에서 본 발명의 폴리펩타이드 또는 펩타이드는 사카라이드 그룹 또는 변형된 당의 첨가에 의해 변형되거나 유도체화될 수 있다. 본 발명은 변형된 당, 변형된 당 뉴클레오타이드 및 변형된 당의 결합체를 함유한 폴리펩타이드 및 펩타이드 유도체를 제공한다. 본 발명의 변형된 당 화합물에서 당 잔기는 바람직하게는 사카라이드, 데옥시-사카라이드, 아미노-사카라이드 또는 N-아실 사카라이드이다. 용어 "사카라이드" 및 이의 동등물, "사카릴", "당" 및 "글라이코실"은 단량체, 이량체, 올리고머 및 중합체를 가리킨다. 당 잔기는 또한 변형 그룹으로 작용기화할 수 있다. 변형 그룹은 전형적으로 당 상의 아민, 설프하이드릴 또는 하이드록실 (예: 일차 하이드록실) 잔기와의 결합을 통해 당 잔기에 결합된다. 한 가지 양태로서, 변형 그룹은 당 상의 아민 잔기 (예: 아미드, 우레탄 또는 우레아)를 통해 결합되는데 아민은 변형 그룹의 반응성 유도체와 반응한다.

[0202] 어떠한 당도 본 발명의 결합체를 위한 당으로 이용할 수 있다. 이러한 당은 이들로 한정되는 것은 아니지만 글루코즈, 갈락토즈, 만노즈, 퓨코즈 및 시알산을 포함한다. 다른 유용한 당은 글루코사민, 갈락토사민, 만노사민, 시알산의 5-아민 유사체 등과 같은 아미노 당을 포함한다. 당은 천연에서 발견되는 구조일 수 있거나 추가의 변형 그룹을 결합시키기 위한 부위를 제공하도록 변형될 수 있다.

[0203] 본 분야의 숙련가는 설명된 구조 및 조성물이 사카라이드 그룹, 변형된 사카라이드 그룹, 활성화된 변형된 사카라이드 그룹 및 변형된 사카라이드 그룹의 결합체의 속에 대하여 일반적으로 적용가능함을 인정할 것이다.

[0204] III. 폐 방어의 자극

[0205] 본 발명자들은 폐의 미생물 감염을 위한 모델로 마우스를 사용하였다. 특정 연구에서, 비처리된 마우스는 100%

의 치사율을 나타내지만 처리된 마우스는 상당히 보호된다. 어떠한 특정 기전 또는 이론에 바탕을 두는 것은 아니지만, 보호는 국소 반응 또는 선천면역의 활성화에 기인한다는 것은 확실하다. 본 발명의 조성물에 피검체의 일회 및 반복적 노출의 효과를 결정하였으며 조기 사망, 체중 감소 또는 행동 변화와 같은 뚜렷한 육안 병리가 관찰되지 않았다.

[0206] 본 발명의 비제한적인 한 가지 이점은 조성물을 빠르고 쉽게 전달하고 효과를 볼 수 있다는 것이다. 또한, 본 발명의 조성물은 경제적으로 대량 생산할 수 있고 간편하게 저장할 수 있을 뿐만 아니라 병원 체계를 벗어나 있는 사람에 의해 용이하게 수송될 수 있다. 전형적으로, 본 발명 조성물의 투여 및 본 발명의 방법은 세포 유입 이전조차도 침투하는 병원체중 적어도 일부를 사멸 또는 억제하는 결과를 제공한다. 세포의 살해를 회피함으로써 또는 병원체 노출 전 (예방차원으로) 대신 병원체 노출 후 (전점차원으로) 조성물이 투여되기 때문에 폐내의 세포에 일부 병원체가 유입한 경우, 본 발명의 조성물 및 관련 방법은 폐내의 강화된 또는 증강된 국소 반응에 기인하는 세포내 살해를 촉진하는 것으로 이해된다. 본 발명의 조성물 및 관련 방법은 여러 가지 호흡계 병원체에 대해 예방 또는 치료 반응을 나타내거나 유도하는 것으로 간주된다.

[0207] StIR 조성물에 의해 피검체에게 제공된 예방 또는 치료는 기도에 대한 항미생물 기전의 폭 넓은 활성화때문에 그람 음성 세균, 세포내 세균, 진균 및 바이러스를 포함한 미생물 병원체의 추가 부류에까지 확장될 수 있다. 본 명세서에 기술된 바와 같은 제제는 저장 및 전개를 간편하게 해준다. 또한, 본 발명의 조성물 및 방법은 생물학적 무기의 공격 또는 다른 노출 또는 잠재적 노출 사건이 발생시 특정 병원체를 신속히 확인함에 있어서의 어려움을 해소할 수 있다.

[0208] 또한, 다수의 민간인 및 생체방어 세팅에서 응용성을 갖는 제제를 생산하고 판매하는 경제적 이점은 중요하다. 국소 상피 기전을 증가시키는 것은 흔히 백혈구 감소증 또는 손상된 후천면역 기능을 갖는 피검체 (예: 면역 약화된 피검체)에게 특히 매력적이다. 본 발명 방법은 전형적으로 전신적으로 보다는 국소적으로 작용하며 복수의 병원체에 대해 광범위한 효과를 제공한다. 효과는 생체방어, 의학 및 방역 세팅에서 매력적이다.

[0209] 정상 숙주에서 폐의 선천 방어능의 증가는 후천성 면역 백신이 이용되지 않는 인플루엔자 또는 급성 호흡기 바이러스 전염시 가치가 있다. 급성 또는 약물-내성 유기체와의 세균성 창궐이 또한 선천 폐 방어의 집중이 유익한 상황일 수 있다. 유사하게, 전염병 창궐시 간호사의 보호는 질병 확산을 방지하는 한편 병자의 회복을 촉진할 것이다.

[0210] 공동 사회에서 많은 사람들은, 예를 들면 당뇨 환자 및 자가면역 질환으로 또는 이식 거부를 예방하기 위해 면역억제 약물을 복용한 환자는 감염에 대해 만성적으로 약화된 방어로 살아 간다. 이러한 사람들은 전염병 창궐시 또는 미생물에 대한 노출 잠재성이 증가된 시기에 폐 방어의 증가로부터 특히 유리할 수 있다. 더욱 놀라운 것은 일시적이지만 심각하게 약화된 면역 방어를 가진 화학요법을 받은 암환자는 일시적 보호로부터 유리할 수 있다. 폐렴은 이들 환자에서 공통된 발병이며 감염성 사망의 주 원인이다. 알킬화제 및 뉴클레오사이드 유사체와 같은 많은 화학요법 약물은 심각한 일시적 백혈구 감소증을 일으킨다. 처음에 백혈구 감소증 환자는 정상 숙주에서 발견되는 유기체뿐만 아니라 저 병독성의 세균 (예: 스테노트로포모나스 말토필리아)에 의한 세균성 폐렴에 민감하다. 장기간의 백혈구 감소증을 앓는 환자는 또한 저 병독성의 진균, 특히 아스페질러스 종에 감염되기 쉽다.

[0211] 폐의 방어는 백혈구 감소증의 지속된 기간 동안 자극을 받아 일시적 보호를 제공할 수 있다. 플루다라빈 또는 항림프구 항체를 투여받은 환자 또는 조혈 줄기 세포 이식 후 칼시뉴린 억제제 및 스테로이드를 투여받은 환자와 같은 다른 암 환자는 후천면역이 손상되어 있다. 이들 환자는 또한 기도에서 군락화하는 진균 및 세균에 의한 침입에 대하여 보호하는 또는 전염성 바이러스에 대하여 보호하는 폐 면역의 발작적 자극으로부터 유익을 얻을 수 있다. 파라인플루엔자 및 RSV와 같은 계절별 호흡기 "감기" 바이러스의 창궐은 이들 약화된 환자에서 치명적인 폐렴을 유발할 수 있으며, 이들 바이러스중 많은 것에 의한 감염은 비강 세척물로부터 신속히 확인될 수 있다.

[0212] 감염시 미생물의 확인은 주로 패턴 인식 수용체 (PRR) (Medzhitov and Janeway, 1997)로 일컫는 선천성 면역 세포 상의 생식세포-암호화된 분자의 세트에 의해 주로 매개된다. 이들 패턴 인식 수용체는 병원체-결합된 분자 패턴 (PAMP) (Janeway and Medzhitov, 2002)으로 불리우는 고정 분자 구조를 인식하는 막-결합된 또는 가용성 단백질로서 발현된다. 병원체-결합된 분자 패턴은 숙주 분자와 구조적으로 상이한 특징적이고 보존적이며 필수적인 미생물 성분 (예: LPS)이다 (Medzhitov and Janeway, 1997; Janeway and Medzhitov, 2002).

[0213] 대부분의 다세포 유기체는 유기체의 수명 동안에 변하지 않는 "선천성 면역계"를 보유한다. 대조적으로, 후천

면역은 개체의 수명 동안에 변하고 발생하는 병원체에 대한 반응이다. 후천 면역을 갖는 유기체는 또한 선천성 면역을 가지며, 계사이의 기전중 많은 것이 공통적이면서 작동에 있어서 뚜렷한 차이에도 불구하고 각각에 연루된 개별 성분들 사이에 엄격하고 신속한 경계를 그리는 것이 항상 가능하지 않다. 고등 척추동물 및 모든 포유동물은 선천 및 후천 면역계 모두를 갖는다.

[0214] A. 선천성 면역계

[0215] 후천 면역계는 효과가 나타나는데 최초 감염 후 수일 또는 수주 걸릴 수 있다. 그러나, 대부분의 유기체는 보다 빠르게 작용하는 선천성 면역계에 의해 계속 체크되어야 하는 병원체로부터 항상 공격을 받고 있는 상태에 있다. 선천성 면역은 보존된 병원성 성분의 광범위한 스펙트럼을 인식하는 "선천적" 기전의 협동하에 신속한 반응에 의해 병원체를 방어한다. 선천성 면역에 대한 대부분의 연구는 호중구, 대식세포 및 천연 살해 세포와 같은 백혈구에 집중되어 왔다. 그러나, 상피 세포가 미생물 유입에 기계적 장벽을 제공하고, 백혈구에 신호를 보내며, 병원체를 직접적으로 살해하는 것을 포함한 선천 방어에 핵심 역할을 한다. 중요하게는, 모든 이들 방어는 미생물 및 숙주 산물의 감지에 반응하는 고도로 유도성이다. 건강한 폐에서 선천성 면역 상피 기능의 수준은 기준에서 낮은 편이다. 이것은 자발적인 미생물 살해 및 사이토카인 방출의 낮은 수준으로 나타나며, 점액섬모 청소 기전이 효과적으로 기능하고 있는 경우 거의 무균의 하부 기도에서 저 지속 자극을 반영한다. 이것은 세균이 계속적으로 존재하고 상피 세포가 지속적으로 활성화되는 결장과 대조된다. 비록 폐의 표면적이 미생물 침입에 대한 거대한 표적을 제공할지라도, 침적된 병원체에 나란히 밀착되어 있는 활성화된 폐 상피 세포는 미생물 살해를 위해 이상적으로 자리잡고 있다 (참조: Evans et al., 2010). 식물과 많은 하등 동물은 후천 면역계를 소유하고 있지 않으며 대신 선천성 면역에 의지한다. 미생물과 비미생물 모두로부터 유래된 물질은 선천성 면역 반응을 자극할 수 있다.

[0216] 선천성 면역계는 활성화된 경우 효과 세포들의 다양한 배열과 기전을 제시한다. 침입한 병원체를 섭취하고 파괴하는 수 가지 다른 유형의 식세포들이 있다. 가장 흔한 식세포는 호중구, 대식세포 및 수지상 세포이다. 다른 세포 유형인 천연 살해 세포는 바이러스에 감염된 세포를 파괴하는데 특히 능숙하다. 선천성 면역계의 다른 성분은 보체계로 알려져 있다. 보체 단백질은 보통 혈액의 비활성 성분이다. 그러나, 병원체 또는 항체의 인식에 의해 활성화된 경우 여러 단백질이 활성화되어 염증 세포를 모집하고, 병원체를 코팅하여 이들이 보다 더 쉽게 식세포화되도록 하며, 병원체의 표면에 구멍을 내 파괴한다.

[0217] "일선" 방어는 숙주와 병원체 사이의 상호작용을 물리적으로 차단하는 감염에 대한 물리적 및 화학적 장벽 (예: 피부 및 소화관 및 기도의 점액 피복)을 포함한다. 이들 장벽을 통과한 병원체는 감염을 제어하는 것으로 지속적으로 발현된 항미생물 분자 (예: 라이소자임)에 직면한다. "이선" 방어는 외래 물질을 삼킬 수 있는 (식세포 작용) 식세포 (대식세포 및 호중구)를 포함한다.

[0218] 식세포작용은 화학주성 화학물질 (예: 미생물 산물, 보체, 손상된 세포 및 백혈구 절편)의 수단에 의해 미생물로 식세포가 이끌리는 화학주성과 연루되어 있다. 화학주성에 뒤이어 흡착이 이루어지는데 식세포가 미생물에 부착한다. 흡착은 식균작용증진에 의해 강화되며 옥소닌과 같은 단백질이 세균의 표면에 코팅된다. 이 과정에 이어서 섭취가 진행되며, 식세포는 돌기는 확장하고 외래 유기체를 삼키는 위축을 형성한다. 마지막으로, 병원체는 반응성 산소 종 및 프로테아제를 포함한 라이소좀내의 효소들에 의해 분해된다.

[0219] 또한, 병원체가 물리적 장벽을 통과한 경우 항미생물 단백질들이 활성화될 수 있다. 항미생물 단백질의 몇 가지 부류가 있으며, 예로는 급성병기 단백질 (예: 에스. 뉴모니아의 C-단백질과 결합한 경우 식세포작용을 강화하고 보체를 활성화하는 C-반응성 단백질), 라이소자임 및 보체계가 있다.

[0220] 보체계는 캐스케이드 방식으로 활성화되는 혈청 단백질들의 아주 복잡한 그룹이다. 보체 활성화에는 3 가지 다른 경로가 연루되어 있다: (a) 항원-항체 복합체를 인식하는 고전적 경로, (b) 병원성 세포 표면과 접촉한 경우 자발적으로 활성화하는 대안 경로, (c) 병원성 세포 표면에만 보이는 성향이 있는 만노스 당을 인지하는 만노스-결합 렉틴 경로. 단백질 활성화의 캐스케이드는 보체 활성화에 뒤이어 진행된다. 이와 같은 캐스케이드는 병원체의 옥소닌작용, 막 공격 복합체의 형성 및 활성화에 의한 병원체의 파괴 및 염증을 포함한 다양한 효과를 제공할 수 있다.

[0221] 인터페론 또한 항미생물 단백질이다. 이들 분자는 바이러스-감염된 세포에 의해 분비되는 단백질이다. 그런 다음 이들 단백질은 이웃 세포로 신속히 확산하고, 세포가 바이러스 감염의 확대를 억제하도록 유도한다. 필수적으로, 이들 항미생물 단백질은 바이러스의 세포 대 세포 증식을 억제하는 작용을 한다.

[0222] B. 후천 면역계

[0223] "획득 면역계"라고도 불리는 후천 면역계는 병원체의 초기 감염에서 살아 남는 대부분의 포유동물에게 동일한 병원체에 의해 유발된 추가의 질병에 대해 면역성을 보장한다. 후천 면역계는 골수에서 줄기 세포에 의해 생성되어 흉선 및/또는 림프절에서 성숙하는 백혈구라고 하는 헌신적인 면역 세포에 기반을 두고 있다. 포유동물을 포함한 많은 종에서, 후천 면역계는 (a) 면역글로불린이라고 하는 단백질 (또한, 항체로 알려져 있음)의 수단에 의해 체액 (예: 혈액)중의 세균 및 바이러스에 대하여 작용하는 체액성 면역계, 및 (b) T 세포 (또한 "T 림프구"로 지칭되며, T는 이들이 흉선에서 발생함을 의미한다)로 바이러스-감염된 세포를 파괴하는 (다른 의무 가운데) 세포성 면역계로 분류될 수 있다. 후천 면역계는 전형적으로 특정 병원체를 대상으로 한다 (예: 백신접종).

[0224] IV. 미생물 유기체

[0225] 본 발명의 양태는 여러 가지 병원체 또는 잠재적 병원체 (예: NIAID 카테고리 A, B 및 C 우선 병원체)에 대한 폭 넓은 방어를 위한 조성물 및 관련 방법을 포함한다. 예를 들면, 정상 숙주에서 세균성 폐렴은 대부분 성인 및 청소년에게서 1/100 명/년의 비율로 발생하며 여러 유기체에 의해 일어날 수 있다. 가장 흔하게는 스트렙토코커스 뉴모니아에 의해 발생되며, 다음의 빈도로는 캡슐화된 헤모필루스 인플루엔자이다. 장내 그람 음성, 혐기성 및 스태필로코커스 아우레우스와 같은 다른 세균도 건강관리 시설과 같은 특정 장소에서 폐렴의 주원인이 된다. 마이코박테리움 투버쿨로시스는 고 전염성이며, 역사적으로 전세계 사망률의 중요한 원인이었다. 비록 복수 약물 내성 균이 계속 문제를 일으키고 카테고리 C 생물무기 제제로 분류되어 있기는 하지만 개도국에서는 대체로 항생물질로 조절되어 왔다. 레지오넬라 뉴모필라가 1978년 필라델피아에서의 발병시 최초로 확인되었다. 오늘날 이 균은 환경 원과 관련된 저 풍토 비율로 광범위하게 발생하는 것으로 인식되고 있다. 또한, 폐의 진균 감염이 정상 숙주에게 전신 질병을 유발할 수 있다. 히스토플라스마 캡슐라툼, 코시디오테스 임미티스, 블라스토마이세스 더마티티디스 및 크립토코커스 네오포르만스 모두는 고 환경 농도에 대한 국부적 노출과 관련된 폐렴을 일으킨다. 이들 병원성 진균에 기인한 폐렴은 보통 정상 숙주에서 자체 제어된다. 일부 추가적인 "이형" 미생물 (예: 마이코플라스마)이 정상 숙주에 추가의 폐렴을 실질적인 비율로 원인 제공한다. 본 발명의 조성물은 예를 들어 폐렴 또는 다른 질병 상태를 유발할 수 있는 균의 스펙트럼에 대해 신속하고 일시적인 보호를 제공할 수 있다. 특정 관점에서, 본 발명은 예방접종 일정과 병용하여 한 가지 이상의 병원성 또는 잠재적 병원성 유기체에 노출될 수 있거나 노출된 피검체에게 추가의 보호를 제공할 수 있다.

[0226] 본 발명의 특정 관점에서 본 발명의 조성물 및 방법은 생물학적 무기/기회성 미생물에 대한 감염 또는 노출 또는 흡입된 감염균에 대한 피검체의 노출을 예방, 감소 또는 치료하는데 사용할 수 있다. 현대에 테러 무기로 사용된 유일한 미생물 병원체는 바실러스 안트라시스이며, 이 균은 적절한 항생제의 사용에도 불구하고 호흡 경로에 의해 감염이 발생한 경우 75%의 치사율을 나타낸다. 프란시셀라 툴라렌시스는 통성 세포내 병원체인 혐기성, 그람 음성 코코바실러스이다. 이 미생물은 비록 사람간 전파가 약하긴 하지만 고 전염성, 고 병원성이며 조악한 환경 조건하에서 생존하여 심각한 바이오테러 위협이 된다 (Dennis, 2001). 백신이 이용가능하나 단지 부분적으로만 보호가능하다. 세계 보건 기구는 5백만 거주민 대도시 지역에 50 kg의 맹독성 프란시셀라 툴라렌시스를 에어로졸로 살포하면 19,000명의 사망자를 포함하여 250,000명의 불구자를 초래하는 것으로 추산하였다. 질병 통제 센터(CDC)는 그러한 공격의 경제적 비용으로 노출된 100,000명당 54억 달러로 추산하였다 (Dennis, 2001).

[0227] 에어로졸에 의해 전파될 수 있는 다른 부류 A 바이오테러 균은 예시니아 페스티스, 천연두 바이러스 및 출혈열 바이러스이다. 또한, 복수의 부류 B 및 C 균이 호흡 경로에 의해 효과적으로 전달될 수 있다. 더불어, 이들 유기체는 그람 양성, 그람 음성, 세포내 및 세포외 세균뿐만 아니라 여러 바이러스 부류를 포함한다. 특정 바이오테러 균을 처음 확인하는데 따른 잠재적 곤란성, 특정 균에 대한 후천 면역백신 및 항생물의 국소적 저장의 복잡성 및 적절한 치료에도 불구하고 바실러스 안트라시스와 같은 유기체의 상당한 맹독성 때문에, 호흡 경로에 의해 전달된 바이오테러 균에 의한 감염을 억제 또는 예방하거나 약독화할 수 있는 폐의 선천 방어능의 자극에 의한 효과는 공중 보건에 상당한 가치를 부여할 수 있다.

[0228] A. 병원성 또는 잠재적 병원성 미생물

[0229] 특정 조건하에서 병원성이거나 잠재적 병원성인 것으로 고려되는 미생물 (즉, 기회적 병원균/미생물)은 많이 있다. 특정 관점에서, 병원성은 폐를 경유한 감염과 관련하여 결정된다. 세균성 미생물은 이들로 한정되는 것은 아니지만 바실러스 속, 예르시니아 속, 프란시셀라 속, 스트렙토코커스 속, 스태필로코커스 속, 슈도모나스 속, 마이코박테리움 속, 버크홀데리아 속의 여러 종을 포함한다. 피검체를 보호해야 하는 세균의 특정 종은 이들로 한정되는 것은 아니지만 바실러스 안트라시스, 예르시니아 페스티스, 프란시셀라 툴라렌시스, 스트렙토코커스

뉴모니아, 스타필로코커스 아우레아스, 슈도모나스 아에루기노사, 부르크홀데리아 세파시아, 코리네박테리움 디프테리아, 클로스트리디아 종, 쉬젤라 종, 마이코박테리움 아비움, 마이코박테리움 인트라셀룰라레, 마이코박테리움 칸사시, 마이코박테리움 파라투버쿨로시스, 마이코박테리움 스크로폴라세움, 마이코박테리움 시미애, 마이코박테리움 하바나, 마이코박테리움 인터젝툼, 마이코박테리움 제노피, 마이코박테리움 핵케소르넨세, 마이코박테리움 술가이, 마이코박테리움 포르투이툼, 마이코박테리움 임뮤노제눔, 마이코박테리움 첼로내, 마이코박테리움 마리눔, 마이코박테리움 게나벤스, 마이코박테리움 해도필룸, 마이코박테리움 셀라툼, 마이코박테리움 콘스피쿰, 마이코박테리움 말모엔스, 마이코박테리움 울세란스, 마이코박테리움 스메그마티스, 마이코박테리움 올린스카이, 마이코박테리움 구디, 마이코박테리움 써모레시스터블, 마이코박테리움 네오아우룸, 마이코박테리움 박카에, 마이코박테리움 팔루스트레, 마이코박테리움 엘레판티스, 마이코박테리움 보헤미감 및 마이코박테리움 셉티쿰을 포함한다.

[0230] B. 바이러스

[0231] 병원성이거나 특정 환경하에서 잠재적 병원성인 것으로 고려되는 많은 바이러스들이 있다. 바이러스는 다음의 7 가지 그룹중 하나에 속할 수 있다: 그룹 I: 이분쇄 DNA 바이러스, 그룹 II: 일본쇄 DNA 바이러스, 그룹 III: 이분쇄 RNA 바이러스, 그룹 IV: 양성-센스 일본쇄 RNA 바이러스, 그룹 V: 음성-센스 일본쇄 RNA 바이러스, 그룹 VI: 역전사 이배체 일본쇄 RNA 바이러스, 그룹 VII: 역전사 환형 이분쇄 DNA 바이러스. 바이러스는 아데노비리대 과, 아레나비리대 과, 칼리시비리대 과, 코로나비리대 과, 필로비리대 과, 플라비비리대 과, 헤파드나비리대 과, 헤르페스비리대 과 (알파헤르페스비리대, 베타헤르페스비리대, 감마헤르페스비리대), 니도비랄레스 과, 파필로마비리대 과, 파라믹소비리대 과 (파라믹소비리대, 뉴모비리대), 파르보비리대 과 (바르보비리대, 피코르나비리대), 톱소비리대 과 (코르도톱소비리대), 레오비리대 과, 레트로비리대 과 (오르토크레트로비리대) 및/또는 토가비리대 과를 포함한다. 이들 바이러스는 이로써 한정되는 것은 아니지만 조류 독감 (예: H5N1)과 같은 인플루엔자의 여러 균주를 포함한다. 피검체로부터 보호해야 하는 특정 바이러스는 이들로 한정되는 것은 아니지만 사이토메갈로바이러스, 호흡기세포융합바이러스 등을 포함한다.

[0232] 병원성 바이러스의 예는 이들로 한정되는 것은 아니지만 인플루엔자 A, H5N1, 마르부르그, 에볼라, 뎅기, 중증 급성 호흡 증후군 코로나바이러스, 황열 바이러스, 사람 호흡기 세포융합 바이러스, 백시니아 등을 포함한다.

[0233] C. 진균

[0234] 병원성이거나 특정 환경에서 잠재적으로 병원성인 것으로 간주되는 많은 진균 종들이 있다. 이들로 한정되는 것은 아니나 아스퍼질러스 푸미가투스, 캔디다 알비칸스, 크립토크커스 네오포르만스, 히스토플라스마 캡슐라툼, 코시디오이데스 임미티스 또는 뉴모시스티스 카르니 및/또는 블라스토마이세스 더마티티디스에 대한 보호를 제공할 수 있다.

[0235] V. 제형 및 투여

[0236] 본 명세서에 기술된 약제학적 조성물은 피검체의 호흡계를 통해 투여될 수 있다. 특정 관점에서 조성물은 본 분야에 공지된 방법 및 기구에 의해 폐에 침착된다. St IR 조성물은 하이드록시프로필셀룰로스와 같은 계면활성제와 적당히 혼합한 물로 제조할 수 있다. 또한, 글리세롤, 지질 폴리에틸렌 글리콜 및 이의 혼합물로 및 오일로 분산액을 제조할 수 있다. 저장 및 사용의 통상적 조건하에서, 이들 제제는 미생물의 성장을 억제하는 방부제를 함유한다. 흡입에 적합한 약제학적 형태는 무균의 수성 용액 또는 분산액 및 무균의 흡입성 용액 또는 분산액의 즉흥적 조제를 위한 무균의 분말을 포함한다. 모든 경우에 있어서 형태는 전형적으로 무균이며 직접적으로 또는 몇몇 중계 과정 또는 장치를 통해 흡입할 수 있다. 제제는 제조 및 저장의 조건하에서 안정해야 하며 세균 및 진균과 같은 미생물의 오염 활동에 대해 보존되어야 한다. 담체는 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올 (예: 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 지질 폴리에틸렌 글리콜 등), 이의 적합한 혼합물 및/또는 식물유를 함유한 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 미생물의 작용 방지는 여러 가지 항균제 및 항진균제, 예를 들면 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 솔빈산, 티메로살 등으로 달성할 수 있다.

[0237] 용량의 일부 조정은 치료 피검체의 상태 및 노출 또는 잠재적 노출과 관련된 특정 환경에 따라 반드시 필요하다. 투여 담당자는 어떠한 경우에서라도 개별 피검체에 적합한 용량을 결정한다. 게다가, 사람에게 투여하는 경우 제제는 FDA의 Office of Biologics 표준 또는 타 유사 기관에 의해 요구되는 바와 같은 무균성, 발열원성, 일반적 안전성 및 순도 표준을 충족해야 한다.

[0238] 무균 조성물은 필요 양의 활성 성분을 적당한 용매중에 상기 열거된 여러 다른 성분과 함께 요건에 맞춰 예를 들어 여과 멸균에 따라서 혼합하여 제조한다. 일반적으로 분산액은 여러 멸균된 활성 성분을 기본적인 분산 매

질과 상기 열거된 것중에서 필요한 다른 성분을 함유한 무균 비히클내에 혼입함으로써 제조한다. 무균 조성물의 제조를 위한 무균 분말의 경우에 몇몇 제조 방법은 진공 건조 및 동결 건조 기술이며, 이들 기술은 사전 멸균-여과된 용액으로부터 활성 성분 + 모든 추가적인 필요 성분의 분말을 제공한다.

[0239] 폐/호흡 약물 전달은 액체 분무기(nebulizer), 에어로졸-기본 정량 흡입기 (MDI), 연무기(sprayer), 건조 분말 분산 장치 등을 포함한 다른 방식으로 이루어질 수 있다. 이러한 방법 및 조성물은 미국 특허 제6,797,258호, 제6,794,357호, 제6,737,045호 및 제6,488,953호에 기재된 바와 같이 본 분야 숙련자에게 잘 알려져 있다. 위 특허의 내용은 본원에 참조로 인용된다. 본 발명에 따르면 한 가지 이상의 약제학적 조성물이 치료제의 흡입 투여에 대해 본 분야에 알려진 다양한 흡입 또는 비강 장치중 어떠한 것에 의해서도 전달될 수 있다. 폐 또는 비강 투여에 적합한 다른 기구가 또한 본 분야에 알려져 있다. 전형적으로, 폐 투여의 경우 한 가지 이상의 약제학적 조성물은 폐의 하부 기도 또는 부비강에 도달하는데 효과적인 입자 크기로 전달된다. 본 발명의 실시를 위해 적합한 시판 흡입 기구의 몇 가지 특정 예로는 터보할러™(Astra), 로타할러®(Glaxo), 디스쿠스®(Glaxo), 스피로스™ 흡입기(Dura), Inhale Therapeutics에 의해 마케팅되고 있는 기구, AERx™(Aradigm), 울트라넨트® 분무기(Mallinckrodt), 아콘 II® 분무기(Marquest Medical Products), 벤톨린® 정량 흡입기(Glaxo), 스프인할러® 분말 흡입 장치(Fisons) 등이다.

[0240] 모든 이러한 흡입 기구는 에어로졸의 약제학적 조성물을 투여하는데 사용할 수 있다. 이러한 에어로졸은 용액(수성 및 비수성 모두) 또는 고체 입자를 포함할 수 있다. 정량 흡입기는 전형적으로 분사제 가스를 사용하며 흡입하는 동안 제어 동작을 필요로 한다 (참조 예: WO 98/35888; WO 94/16970). 건조 분말 흡입 장치는 혼합 분말의 호흡 제어 동작을 이용한다 (참조 : 미국특허 제5,458,135호, 제4,668,218호, PCT 공개 WO 97/25086, WO 94/08552, WO 94/06498 및 유럽 특허원 EP 0237507). 위 특허의 전체 내용은 본원에 참조로 인용된다. 분무기는 용액으로부터 에어로졸을 생성하는 한편, 정량 흡입기, 건조 분말 흡입 장치 등은 소 입자 에어로졸을 발생한다. 투여에 적합한 제형은 이들로 한정되는 것은 아니지만 비강 스프레이 또는 비강 점적을 포함하며, StIR 조성물의 수성 또는 오일성 용액을 포함할 수 있다.

[0241] 본 발명에 따른 약제학적 조성물을 포함한 스프레이는 조성물의 현탁액 또는 용액이 압력에 의해 노즐을 강제 통과함으로써 생성된다. 노즐 크기 및 형태, 적용 압력 및 액체 공급 속도는 원하는 배출 및 입자 크기를 얻을 수 있도록 선택할 수 있다. 예를 들어 전장을 모세관 또는 노즐 피드에 연결시켜 전자스프레이를 제조할 수 있다.

[0242] 본 발명의 약제학적 조성물은 제트 분무기 또는 초음파 분무기와 같은 분무기로 투여할 수 있다. 전형적으로 제트 분무기의 경우 압축된 공기를 사용하여 구멍을 통해 고속 공기 제트를 형성한다. 가스가 노즐을 지나 팽창하면서 저압 영역이 형성되어 조성물이 액체 저장소에 연결된 모세관을 통과하게 된다. 모세관을 지나는 액체 스트림은 관을 빠져나가면서 불안정한 필라멘트 및 방울로 절단되고 에어로졸을 생성한다. 제트 분무기를 목적하는 성능 특징에 맞추기 위해 형태, 유속 및 배플 유형을 다양하게 설정할 수 있다. 초음파 분무기의 경우, 고주파 전기 에너지를 사용하여 진동 기계 에너지를 형성하는데, 전형적으로는 압전기 변환기를 이용한다. 이 에너지는 조성물에 전파되어 에어로졸을 생성한다.

[0243] 정량 흡입기(MDI)에서 분사제, 조성물 및 부형제 또는 다른 첨가제가 용기에 압축 가스와의 혼합물로 함유된다. 정량 값의 작동은 혼합물을 에어로졸로 방출한다.

[0244] 정량 흡입기와 사용되는 약제학적 조성물은 본 발명의 조성물을 수성 매질중의 현탁액으로서 함유한, 예를 들면 계면활성제의 보조로 분사제중에 현탁된 미세 분말을 포함한다. 분사제로는 이러한 목적을 위해 사용되는 어떠한 통상의 물질도 사용될 수 있으며, 예로는 클로로플루오로카본, 하이드로클로로플루오로카본, 하이드로플루오로카본 또는 하이드로카본 (트리클로로플루오로메탄, 디클로로디플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄올 및 1,1,1,2-테트라플루오로에탄, HFA-134a (하이드로플루로알칸-134a), HFA-227 (하이드로플루로알칸-227) 등이 있다.

[0245] 본 발명에 사용된 "담체"는 모든 용매, 분산 매질, 비히클, 피복제, 희석제, 향균 및 항진균제, 등장화제 및 흡수지연제, 완충제, 캐리어 용액, 현탁액, 콜로이드 등을 포함한다. 약제학적 활성 물질을 위한 그러한 매질 및 제제의 사용은 본 분야에 잘 알려져 있다. 통상적인 매질 또는 제제가 활성 성분과 혼화되지 않는 경우를 제외하고 치료 조성물에 그를 사용하는 것은 가능하다. 또한, 보조 활성 성분이 조성물에 혼입될 수 있다.

[0246] 용어 "약제학적으로 허용가능한"은 피검체에 투여되었을 때 알려지 또는 유사한 부작용을 유발하지 않는 분자 자체 및 조성물을 가리킨다. 활성 성분으로서 폴리펩타이드 또는 펩타이드를 함유한 수성 조성물의 제조는 본

분야에서 잘 이해되어 있다.

[0247] VI. 병용 치료

[0248] 본 발명의 조성물 및 방법은 많은 치료 또는 예방 용도의 맥락에서 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물로 치료 효능을 높이기 위해 또는 다른 요법 (이차 요법), 예를 들면 예방접종 또는 항미생물 요법의 보호를 증강하기 위해, 본 발명의 조성물 및 방법을 질병 및 병리 상태의 치료, 감염 위험 감소 또는 예방, 예를 들면 항균, 항 바이러스 및/또는 항진균 치료에 효과적인 다른 제제 및 방법과 조합하는 것이 바람직할 수 있다.

[0249] 여러 가지 조합이 이용될 수 있다. 예를 들면 StIR 조성물 "A"이고 이차 요법은 "B"이다:

[0250] A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B

[0251] B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A

[0252] B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

[0253] 본 발명의 조성물을 피검체에게 투여하는 것은 호흡계를 경유한 투여에 대한 일반적인 프로토콜에 따르며, 또한 특정 이차 요법의 투여에 대한 일반적인 프로토콜에 따른다. 어느 경우든 치료에 따른 독성을 고려해야 한다. 치료 주기는 필요한 경우 반복될 수 있다. 또한, 여러 표준 요법뿐만 아니라 예방접종이 기재된 요법과 병용하여 적용될 수 있다.

[0254] A. 항바이러스제

[0255] 본 발명의 특정 관점에서 StIR 조성물과 배합하여 항바이러스제를 사용할 수 있다. 항바이러스제는 바이러스 감염을 치료하기 위해 특정적으로 사용되는 약물의 부류이며 체외 바이러스 입자를 불활성화시키는 작용을 하는 살바이러스제와는 구별되어야 한다. 현재 이용되고 있는 대부분의 항바이러스제는 HIV, 헤르페스 바이러스, B형 및 C형 간염 바이러스 및 인플루엔자 A형 및 B형 바이러스의 처치를 보조하기 위해 고안된 것이다. 본 발명에 유용한 항바이러스제는 이들로 한정되는 것은 아니지만 면역글로불린, 아만타딘, 인터페론, 뉴클레오타이드 유사체 및 프로테아제 억제제를 포함한다.

[0256] 한 가지 항바이러스 전략은 바이러스가 표적 세포를 침투하는 능력을 방해하는 것이다. 바이러스 복제의 이러한 단계는 바이러스-연관된 단백질 (VAP)를 모사하고 세포 수용체와 결합하는 제제를 사용함으로써 억제할 수 있다. 또는 세포 수용체를 모사하고 VAP와 결합하는 제제를 사용함으로써 억제할 수 있다. 이것은 항-VAP 항체, 수용체 항-유전자형 항체, 외부 수용체 및 합성 수용체 모사체를 포함한다. 그러한 "유입-차단제" 두 가지 아만타딘 및 리만타딘이 인플루엔자를 퇴치하는데 도입되었다.

[0257] 항바이러스제 요법의 두 번째 전략은 바이러스가 세포를 침투한 후 바이러스 성분을 합성하는 과정을 표적으로 한다. 이것을 이행하는 한 가지 방법은 RNA 또는 DNA의 빌딩 블록처럼 보이지만 일단 혼입되면 RNA 또는 DNA를 합성하는 효소를 탈활성화하는 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오사이드 유사체를 개발하는 것이다. 뉴클레오타이드 유사체는 이들로 한정되는 것은 아니지만 리비비린, 비다라빈, 아실클로비르, 강사이클로비르, 지도부딘, 디다노신, 잘시타빈, 스타부딘 및 라미부딘을 포함한다.

[0258] 또 다른 항바이러스 기술은 선택된 부위에서 바이러스 RNA 또는 DNA를 절단 분리하는 효소인 리보자임을 기본으로 한 약물 세트이다. 천연 과정에서 리보자임은 바이러스 제조 순서의 일부로서 이용되지만 이들 합성 리보자임은 그들을 불능화하는 부위에 RNA와 DNA를 절단하도록 설계된다.

[0259] 일부 바이러스는 최종 형태로 집합할 수 있도록 바이러스 단백질 쉘을 절단 분리하는 프로테아제로서 알려진 효소를 포함한다. HIV는 프로테아제를 포함하며, 상당한 연구가 진행되어 생활사의 단계에 HIV를 공격하는 "프로테아제 억제제"가 발견되었다. 프로테아제 억제제는 비록 특이한 부작용 (예: 비정상적인 장소에서 증가하여 비만을 유발)이 발생할 수 있지만 1990년대에 이용되어 효과적인 것으로 입증되었다. 개량된 프로테아제 억제제가 현재 개발중에 있다.

[0260] 바이러스 생활사의 마지막 단계는 숙주 세포로부터 완성된 바이러스의 방출이며 이 단계가 또한 항바이러스제 개발자에 의해 표적이 되어 왔다. 인플루엔자를 치료하기 위해 도입된 두 가지 약물, 즉 자나미비르 (RELENZA™) 및 오셀타미비르 (TAMIFLU™)는 독감 바이러스의 표면에서 발견되고 광범위한 독감 군주에서 항상 존재하는 것으로 보이는 뉴라미니다제로 명명된 분자를 차단함으로써 바이러스 입자의 방출을 억제한다.

[0261] 항바이러스제는 이들로 한정되는 것은 아니지만 아바카비르; 아세만단; 아시클로비르; 아시클로비르 나트륨; 아

테포비르; 알로부딘; 알비르셉트 수도톡스; 아만타딘 하이드로클로라이드; 암프레나비르; 아라노딘; 아렐돈; 아테비르딘 메실레이트; 아브리딘; 시도포비르; 시팜파일린; 사이타라빈 하이드로클로라이드; 델라비르딘 메실레이트; 데스시클로비르; 디다노신; 디숙사틸; 에독수딘; 에파비렌즈; 엔비라텐; 엔비록심; 팜시클로비르; 팜모틴 하이드로클로라이드; 피아시타빈; 피아루리딘; 포사릴레이트; 트리나트륨 포스포노메이트; 포스포네트 나트륨; 간시클로비르; 간시클로비르 나트륨; 이독수리딘; 인디나비르; 케톡살; 라미부딘; 로부카비르; 메모틴 하이드로클로라이드; 메티사존; 넬피나비르; 펜시클로비르; 피로다비르; 리바비린; 리만타딘 하이드로클로라이드; 리토나비르; 사퀴나비르 메실레이트; 소만타딘 하이드로클로라이드; 소리부딘; 스타톨론; 스타부딘; 킬론 하이드로클로라이드; 트리플루리딘; 발라시클로비르 하이드로클로라이드; 비다라빈; 비다라빈 포스페이트; 비다라빈 나트륨 포스페이트; 비록심; 잘시타빈; 지도부딘; 진비록심, 인터페론, 사이클로비르, 알파-인터페론 및/또는 베타 글로불린을 포함한다.

[0262] 특정 양태로서 항바이러스제는 리비비린이며 고용량 리비비린이다. 리바비린은 많은 DNA 및 RNA 바이러스에 대해 활성을 나타내는 항바이러스제이다. 이것은 바이러스 유전물질의 복제를 차단하는 뉴클레오사이드 항진지대 사제의 한 종류이다. 비록 리바비린이 모든 바이러스에 대해 효과적이진 않지만 인플루엔자, 플라비바이러스 및 많은 바이러스 출혈열의 균에 대한 중요한 활성을 포함한 넓은 범위의 활성을 나타낸다.

[0263] 전형적으로, 리바비린의 경구 형태가 폐경화된 인터페론 약물과 배양하여 C형 간염의 치료에 사용된다. 과거에는 어린이의 호흡기 세포융합 바이러스-관련된 질병을 치료하는데 에어로졸 형태가 사용되었다. 그러나, 많은 연구에 의해 그의 효능에 의문이 제기되었고 대부분의 연구소는 더 이상을 리바비린을 사용하지 않는다.

[0264] B. 항균제

[0265] 항균제의 예로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 β-락탐 항생물질, 페니실린 (예: 천연 페니실린, 아미노페니실린, 페니실리나제-내성 페니실린, 카복시 페니실린, 우레이도 페니실린), 세팔로스포린 (제1 세대, 제2 세대 및 제3 세대 세팔로스포린), 및 기타 β-락탐 (예: 이미페넴, 모노박탐), β-락타마제 억제제, 반코마이신, 아미노글리코시드 및 스펙티노마이신, 테트라사이클린, 클로람페니콜, 에리트로마이신, 린코마이신, 클린다마이신, 리팜핀, 메트로니다졸, 폴리믹신, 설펜아미드 및 트리메토프림 및 퀴놀론을 포함한다. 항균제의 예로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 아세답손(Acedapsone), 아세트설펜 나트륨(Acetosulfone Sodium), 알라메신(Alamecin), 알렉시딘(Alexidine), 암디노실린(Amdinocillin), 암디노실린 피복실(Amdinocillin Pivoxil), 아미시클린(Amicycline), 아미플록사신(Amifloxacin), 아미플록사신 메실레이트(Amifloxacin Mesylate), 아미카신(Amikacin), 아미카신 설페이트(Amikacin Sulfate), 아미노살리실산(Aminosalicylic acid), 아미노살리실산 나트륨(Aminosalicylate sodium), 아목시실린(Amoxicillin), 암포마이신(Amphomycin), 암피실린(Ampicillin), 암피실린 나트륨(Ampicillin Sodium), 아팔실린 나트륨(Apalcillin Sodium), 아프라마이신(Apramycin), 아스파르토신(Aspartocin), 아스트로마이신 설페이트(Astromicin Sulfate), 아빌라마이신(Avilamycin), 아보파르신(Avoparcin), 아지트로마이신(Azithromycin), 아즐로실린(Azlocillin), 아즐로실린 나트륨(Azlocillin Sodium), 바캄피실린 하이드로클로라이드(Bacampicillin Hydrochloride), 바시트라신(Bacitracin), 바시트라신 메틸렌 디살리실레이트(Bacitracin Methylene Disalicylate), 바시트라신 아연(Bacitracin Zinc), 밤버마이신(Bambermycins), 벤조일파스 칼슘(Benzoylpas Calcium), 베리트로마이신(Berythromycin), 베타마이신 설페이트(Betamicin Sulfate), 비아페넴(Biapenem), 비니라마이신(Biniramycin), 비페나민 하이드로클로라이드(Biphenamine Hydrochloride), 비스피리티온 매그설펜(Magsulfex), 부티카신(Butikacin), 부티로신 설페이트(Butirosin Sulfate), 카프레오마이신 설페이트(Capreomycin Sulfate), 카르바독스(Carbadox), 카르베니실린 이나트륨(Carbenicillin Disodium), 카르베니실린 인다닐 나트륨(Carbenicillin Indanyl Sodium), 카르베니실린 페닐 나트륨(Carbenicillin Phenyl Sodium), 카르베니실린 칼륨(Carbenicillin Potassium), 카루모남 나트륨(Carumonam Sodium), 세파클로(Cefaclor), 세파드록실(Cefadroxil), 세파만돌(Cefamandole), 세파만돌 나페이트(Cefamandole Nafate), 세파만돌 나트륨(Cefamandole Sodium), 세파파롤(Cefaparole), 세파트리진(Cefatrizine), 세파자플루르 나트륨(Cefazafur Sodium), 세파졸린(Cefazolin), 세파졸린 나트륨(Cefazolin Sodium), 세프부페라존(Cefbuperazone), 세프디니르(Cefdinir), 세페핌(Cefepime), 세페핌 하이드로클로라이드(Cefepime Hydrochloride), 세페테콜(Cefetecol), 세픽심(Cefixime), 세피네녹심 하이드로클로라이드(Cefinenoxime Hydrochloride), 세피네타졸(Cefinetazole), 세피네타졸 나트륨(Cefinetazole Sodium), 세포니시드 일나트륨(Cefonicid Monosodium), 세포니시드 나트륨(Cefonicid Sodium), 세포페라존 나트륨(Cefoperazone Sodium), 세포라니드(Ceforanide), 세포탁심 나트륨(Cefotaxime Sodium), 세포테탄(Cefotetan), 세포테탄 이나트륨(Cefotetan Disodium), 세포티아 하이드로클로라이드(Cefotiam Hydrochloride), 세폭시틴(Cefoxitin), 세폭시틴 나트륨(Cefoxitin Sodium), 세프피미졸

(Cefpimizole), 세프피미졸 나트륨(Cefpimizole Sodium), 세프피라미드(Cefpiramide), 세프피라미드 나트륨(Cefpiramide Sodium), 세프피롬 설레이트(Cefpirome Sulfate), 세프포독심 프로세스틸(Cefpodoxime Proxetil), 세프프로질(Cefprozil), 세프록사딘(Cefroxadine), 세프술로딘 나트륨(Cefsulodin Sodium), 세프트지딤(Ceftazidime), 세프티부텐(Ceftibuten), 세프티죽심 나트륨(Ceftizoxime Sodium), 세프트리악손 나트륨(Ceftriaxone Sodium), 세푸록심(Cefuroxime), 세푸록심 악세틸(Cefuroxime Axetil), 세푸록심 피복세틸(Cefuroxime Pivoxetil), 세푸록심 나트륨(Cefuroxime Sodium), 세파세트릴 나트륨(Cephacetrile Sodium), 세팔렉신(Cephalexin), 세팔렉신 하이드로클로라이드(Cephalexin Hydrochloride), 세팔로글라이신(Cephaloglycini), 세팔로리딘(Cephaloridine), 세팔로틴 나트륨(Cephalothin Sodium), 세파피린 나트륨(Cephapirin Sodium), 세프라딘(Cephradine), 세토사이클린 하이드로클로라이드(Cetocycline Hydrochloride), 세토펜니콜(Cetophenicol), 클로람페니콜(Chloramphenicol), 클로로람페니콜 팔미테이트(Cliloramphenicol Palmitate), 클로람페니콜 판토텐네이트 복합체(Chloramphenicol Pantothenate Complex), 클로람페니콜 나트륨 석시네이트(Chloramphenicol Sodium Succinate), 클로르헥시딘 포스포닐레이트(Chlorhexidine Phosphanilate), 클로로자일레놀(Chloroxylenol), 클로르테트라사이클린 비설페이트(Chlortetracycline Bisulfate), 클로르테트라사이클린 하이드로클로라이드(Chlortetracycline Hydrochloride), 시녹사신(Cinoxacin), 시프로플록사신(Ciprofloxacin), 시프로플록사신 하이드로클로라이드(Ciprofloxacin Hydrochloride), 시롤레마이신(Cirolemycin), 클라리트로마이신(Clarithromycin), 클리나플록사신 하이드로클로라이드(Clinafloxacin Hydrochloride), 클리다마이신(Clildamycin), 클린다마이신 하이드로클로라이드(Clindamycin Hydrochloride), 클린다마이신 팔미테이트 하이드로클로라이드(Clindamycin Palmitate Hydrochloride), 클린다마이신 포스페이트(Clindamycin Phosphate), 클로파지민(Clofazimine), 클록사실린 벤자틴(Cloxacillin Benzathine), 클록사실린 나트륨(Cloxacillin Sodium), 클록시퀸(Cloxyquin), 콜리스티메테이트 나트륨(Colistimethate Sodium), 콜리스틴 설레이트(Colistin Sulfate), 쿨머마이신(Coumermycin), 쿨머마이신 나트륨(Coumermycin Sodium), 시클라실린(Cyclacillin), 사이클로세린(Cycloserine), 달포프리스틴(Dalfopristin), 답손(Dapsone), 답토마이신(Daptomycin), 데메클로사이클린(Demeclocycline), 데메클로사이클린 하이드로클로라이드(Demeclocycline Hydrochloride), 데메사이클린(Demecycline), 데노푼진(Denofungin), 디아베리딘(Diaveridine), 디클록사실린(Dicloxacillin), 디클록사실린 나트륨(Dicloxacillin Sodium), 디하이드로스트렙토마이신 설레이트(Dihydrostreptomycin Sulfate), 디피리티온(Dipyrrithione), 디리트로마이신(Dirithromycin), 독시사이클린(Doxycycline), 독시사이클린 칼슘(Doxycycline Calcium), 독시사이클린 포스포텍스(Doxycycline Fosfatex), 독시사이클린 하이클레이트(Doxycycline Hyclate), 드록사신 나트륨(Droxacin Sodium), 에녹사신(Enoxacin), 에피실린(Epicillin), 에피테트라사이클린 하이드로클로라이드(Epitetracycline Hydrochloride), 에리트로마이신(Erythromycin), 에리트로마이신 아시스트레이트(Erythromycin Acistrate), 에리트로마이신 에스테레이트(Erythromycin Estolate), 에리트로마이신 에틸석시네이트(Erythromycin Ethylsuccinate), 에리트로마이신 글루세이트(Erythromycin Gluceptate), 에리트로마이신 락토비오네이트(Erythromycin Lactobionate), 에리트로마이신 프로피오네이트(Erythromycin Propionate), 에리트로마이신 스테아레이트(Erythromycin Stearate), 에탐부톨 하이드로클로라이드(Ethambutol Hydrochloride), 에티온아מיד(Ethionamide), 플록사신(Fleroxacin), 플록사실린(Floxacillin), 플루달라닌(Fludalanine), 플루메퀸(Flumequine), 포스포마이신(Fosfomycin), 포스포마이신 트로메타민(Fosfomycin Tromethamine), 푸목시실린(Fumoxicillin), 푸라졸리움 클로라이드(Furazolum Chloride), 푸라졸리움 타르트레이트(Furazolum Tartrate), 푸시데이트 나트륨(Fusidate Sodium), 푸시딘산(Fusidic Acid), 겐타마이신 설레이트(Gentamicin Sulfate), 글록시모남(Gloximonam), 그라미시딘(Gramicidin), 할로프로진(Haloprogin), 헤타실린(Hetacillin), 헤타실린 칼륨(Hetacillin Potassium), 헥세딘(Hexedine), 이바플록사신(Ibafloxacin), 이미페넴(Imipenem), 이소코나졸(Isoconazole), 이세파마이신(Isepamicin), 이소니아지드(Isoniazid), 조사마이신(Josamycin), 카나마이신 설레이트(Kanamycin Sulfate), 키타사마이신(Kitasamycin), 레보푸랄타돈(Levofuraltadone), 레보프로필실린 칼륨(Levopropylcillin Potassium), 렉시트로마이신(Lexithromycin), 린코마이신(Lincomycin), 린코마이신 하이드로클로라이드(Lincomycin Hydrochloride), 로메플록사신(Lomefloxacin), 로메플록사신 하이드로클로라이드(Lomefloxacin Hydrochloride), 로메플록사신 메실레이트(Lomefloxacin Mesylate), 로라카베프(Loracarbef), 마페나이드(Mafenide), 메클로사이클린(Meclocycline), 메클로사이클린 설포살리실레이트(Meclocycline Sulfosalicylate), 메갈로마이신 칼륨 포스페이트(Megalomicin Potassium Phosphate), 메퀴독스(Mequidox), 메로페넴(Meropenem), 메타사이클린(Methacycline), 메타사이클린 하이드로클로라이드(Methacycline Hydrochloride), 메테나민(Methenamine), 메테나민 히푸레이트(Methenamine Hippurate), 메테나민 만델레이트(Methenamine Mandelate), 메티실린 나트륨(Methicillin Sodium), 메티오프림(Metioprim), 메트로니다졸 하이드로클로라이드(Metronidazole Hydrochloride), 메트로니다졸 포스페이트(Metronidazole Phosphate), 메즐로실

린(Mezlocillin), 메즐로실린 나트륨(Mezlocillin Sodium), 미노사이클린(Minocycline), 미노사이클린 하이드로클로라이드(Minocycline Hydrochloride), 미린카마이신 하이드로클로라이드(Mirincamycin Hydrochloride), 모넨신(Monensin), 모넨신 나트륨(Monensin Sodium), 나프실린 나트륨(Nafcillin Sodium), 날리딕세이트 나트륨(Nalidixate Sodium), 날리딕산(Nalidixic Acid), 나타마이신(Natamycin), 네브라마이신(Nebramycin), 네오마이신 팔미테이트(Neomycin Palmitate), 네오마이신 설페이트(Neomycin Sulfate), 네오마이신 운데실레네이트(Neomycin Undecylenate), 네틸마이신 설페이트(Netilmicin Sulfate), 뉴트라마이신(Neutramycin), 니푸라덴(Nifuradene), 니푸랄데존(Nifuraldezone), 니푸라텔(Nifuratel), 니푸라트론(Nifuratrone), 니푸르다질(Nifurdazil), 니푸리미드(Nifurimide), 니푸르피리놀(Nifurpirinol), 니푸르퀴나졸(Nifurquinazol), 니푸르티아졸(Nifurthiazole), 니트로사이클린(Nitrocycline), 니트로푸란토인(Nitrofurantoin), 니트로미드(Nitromide), 노르플록사신(Norfloxacin), 노보바이오신 나트륨(Novobiocin Sodium), 오픈록사신(Ofloxacin), 오르메토프림(Ormetoprim), 옥사실린 나트륨(Oxacillin Sodium), 옥시모남(Oximonam), 옥시모남 나트륨(Oximonam Sodium), 옥솔린산(Oxolinic Acid), 옥시테트라사이클린(Oxytetracycline), 옥시테트라사이클린 칼슘(Oxytetracycline Calcium), 옥시테트라사이클린 하이드로클로라이드(Oxytetracycline Hydrochloride), 팔디마이신(Palidimycin), 파라클로로페놀(Parachlorophenol), 파울로마이신(Paulomycin), 페플록사신(Pefloxacin), 페플록사신 메실레이트(Pefloxacin Mesylate), 페나메실린(Penamecillin), 페니실린 G 벤자틴(Penicillin G Benzathine), 페니실린 G 칼륨(Penicillin G Potassium), 페니실린 G 프로카인(Penicillin G Procaine), 페니실린 G 나트륨(Penicillin G Sodium), 페니실린 V(Penicillin V), 페니실린 V 벤자틴(Penicillin V Benzathine), 페니실린 V 하이드라바민(Penicillin V Hydrabamine), 페니실린 V 칼륨(Penicillin V Potassium), 펜티지돈 나트륨(Pentizidone Sodium), 페닐 아미노살리실레이트(Phenyl Aminosalicylate), 피페라실린 나트륨(Piperacillin Sodium), 피르베니실린 나트륨(Pirbenicillin Sodium), 피리디실린 나트륨(Piridicillin Sodium), 피를리마이신 하이드로클로라이드(Pirlimycin Hydrochloride), 피밤피실린 하이드로클로라이드(Pivampicillin Hydrochloride), 피밤피실린 파모에이트(Pivampicillin Pamoate), 피밤피실린 프로베네이트(Pivampicillin Probenate), 폴리믹신 B 설페이트(Polymyxin B Sulfate), 포르피로마이신(Porfiromycin), 프로피카신(Propikacin), 피라지나미드(Pyrazinamide), 피리티온 아연(Pyrrithione Zinc), 퀴데카민 아세테이트(Quindecamine Acetate), 퀴누프리스틴(Quinupristin), 라세페니콜(Racephenicol), 라모플라닌(Ramoplanin), 라니마이신(Ranimycin), 렐로마이신(Relomycin), 레프로마이신(Repromicin), 리파부틴(Rifabutin), 리파메탄(Rifametan), 리파멕실(Rifamexil), 리파미드(Rifamide), 리팜핀(Rifampin), 리파펜틴(Rifapentine), 리팍시민(Rifaximin), 롤리테트라사이클린(Rolitetracycline), 롤리테트라사이클린 니트레이트(Rolitetracycline Nitrate), 로사라마이신(Rosaramicin), 로사라마이신 부티레이트(Rosaramicin Butyrate), 로사라마이신 프로피오네이트(Rosaramicin Propionate), 로사라마이신 나트륨 포스페이트(Rosaramicin Sodium Phosphate), 로사라마이신 스테아레이트(Rosaramicin Stearate), 로속사신(Rosoxacin), 록사르손(Roxarsone), 록시트로마이신(Roxithromycin), 산사이클린(Sancycline), 산페트리넨 나트륨(Sanfetrinem Sodium), 사르목시실린(Sarmoxicillin), 사르피실린(Sarpicillin), 스코파콘진(Scopafungin), 시소마이신(Sisomicin), 시소마이신 설페이트(Sisomicin Sulfate), 스파르플록사신(Sparfloxacin), 스펙티노마이신 하이드로클로라이드(Spectinomycin Hydrochloride), 스피라마이신(Spiramycin), 스탈리마이신 하이드로클로라이드(Stallimycin Hydrochloride), 스테피마이신(Steffimycin), 스트렙토마이신 설페이트(Streptomycin Sulfate), 스트렙토니코지드(Streptonicozid), 설파벤즈(Sulfabenz), 설파벤자미드(Sulfabenzamide), 설파세타미드(Sulfacetamide), 설파세타미드 나트륨(Sulfacetamide Sodium), 설파사이틴(Sulfacytine), 설파디아진(Sulfadiazine), 설파디아진 나트륨(Sulfadiazine Sodium), 설파독신(Sulfadoxine), 설파렌(Sulfalene), 설파메라진(Sulfamerazine), 설파메터(Sulfameter), 설파메타진(Sulfamethazine), 설파메티졸(Sulfamethizole), 설파메톡사졸(Sulfamethoxazole), 설파모노메톡신(Sulfamonomethoxine), 설파목솔(Sulfamoxole), 설파닐레이트 아연(Sulfanilate Zinc), 설파니트란(Sulfanitran), 설파살라진(Sulfasalazine), 설파소미졸(Sulfasomizole), 설파티아졸(Sulfathiazole), 설파자메트(Sulfazamet), 설파속사졸(Sulfisoxazole), 설파속사졸 아세틸(Sulfisoxazole Acetyl), 설파속사졸 디올라민(Sulfisoxazole Diolamine), 설파믹신(Sulfomyxin), 설파로페넴(Sulopenem), 설파타미실린(Sultamicillin), 선실린 나트륨(Suncillin Sodium), 탈람피실린 하이드로클로라이드(Talampicillin Hydrochloride), 테이코플라닌(Teicoplanin), 테마플록사신 하이드로클로라이드(Temafloxacin Hydrochloride), 테모실린(Temocillin), 테트라사이클린(Tetracycline), 테트라사이클린 하이드로클로라이드(Tetracycline Hydrochloride), 테트라사이클린 포스페이트 복합체(Tetracycline Phosphate Complex), 테트로소프림(Tetroxoprim), 티암페니콜(Thiamphenicol), 티펜실린 칼륨(Thiphencillin Potassium), 티카르실린 크레실 나트륨(Ticarcillin Cresyl Sodium), 티카르실린 이나트륨(Ticarcillin Disodium), 티카르실린 일나트륨(Ticarcillin Monosodium), 티클라톤(Ticlatone), 티오도늄 클로라이드(Tiodonium Chloride), 토브라마이신

(Tobramycin), 토브라마이신 설페이트(Tobramycin Sulfate), 토수플록사신(Tosufloxacin), 트리메토프림(Trimethoprim), 트리메토프림 설페이트(Trimethoprim Sulfate), 트리설파피리미딘(Trisulfapyrimidines), 트롤레안도마이신(Troleandomycin), 트로스펙토마이신 설페이트(Trospectomycin Sulfate), 타이로트리신(Tyrothricin), 반코마이신(Vancomycin), 반코마이신 하이드로클로라이드(Vancomycin Hydrochloride), 버지니아마이신(Virginiamycin) 및/또는 조르바마이신(Zorbamycin)을 포함한다.

[0266] B. 항진균제

[0267] 항진균제는 이들로 한정되는 것은 아니지만 아졸, 이미다졸, 폴리엔, 포사코나졸, 플루코나졸, 이트라코나졸, 암포테리진 B, 5-플루오로사이토신, 미코나졸, 케토코나졸, 마이암부톨 (에탐부톨 하이드로클로라이드), 답손 (4,4'-디아미노디페닐설펜), 파세르 그레놀 (아미노살리실산 과립), 리파펜틴, 피라진아미드, 이소니아지드, 리파딘 IV, 리팜핀, 피라진아미드, 스트렙토마이신 설페이트 및 트레카토-SC (에티온아미드) 및/또는 보리코나졸 (Vfend™)을 포함한다.

[0268] C. 다른 제제

[0269] 본 발명의 특정 관점에서, 소염제가 StIR 조성물과 배합하여 사용될 수 있다.

[0270] 본 발명에서 사용하기 위한 스테로이드성 소염제는 이들로 한정되는 것은 아니지만 플루티카손, 베클로메타손, 이의 약제학적으로 허용가능한 모든 유도체 및 이들의 모든 조합물을 포함한다. 본원에 사용된 약제학적으로 허용되는 유도체는 그의 염, 에스테르, 엔올 에테르, 엔올 에스테르, 산, 염기, 용해물 또는 수화물을 포함한다. 이러한 유도체는 본 분야의 숙련가가 이와 같은 유도체화를 위해 공지된 방법을 이용하여 제조할 수 있다.

[0271] 플루티카손 - 플루티카손 프로피오네이트는 합성 코르티코스테로이드이며 실험식 $C_{25}H_{31}F_3O_5S$ 를 갖는다. 이의 화학명은 S-(플루로메틸) 6 α ,9-디플루오로-11 β -17-디하이드록시-16 α -메틸-3-옥소안드로스타-1,4-디엔-17 β -카르보티오에이트, 17-프로피오네이트이다. 플루티카손 프로피오네이트는 분자량이 500.6인 백색 내지 회색 분말이며 실질적으로 수불용성이며, 디메틸 설폭사이드 및 디메틸포름아미드에서 완전히 용해되고, 메탄올 및 95% 에탄올에서 약 용해성이다.

[0272] 한 가지 양태로 본 발명의 제형은 스테로이드성 소염제 (예: 플루티카손 프로피오네이트)를 포함할 수 있다.

[0273] 베클로메타손 - 특정 관점에서 스테로이드성 소염제는 베클로메타손 디프로피오네이트 또는 이의 일수화물일 수 있다. 베클로메타손 디프로피오네이트는 화학명이 9-클로로-11b,17,21-트리하이드록시-16b-메틸프레그나-1,4-디엔-3,20-도인17,21-디프로피오네이트이다. 이 화합물은 분자량이 521.25인 백색 분말일 수 있으며 아주 약하게 물에 용해되고(Physicians' Desk Reference), 클로로포름에 아주 잘 녹으며, 아세톤 및 알코올에서는 완전히 녹는다.

[0274] 본 발명에 따른 스테로이드성 소염제를 제공하는 것은 예를 들면 어떠한 원치않는 염증도 약독화시킴으로써 본 발명의 조성물 및 방법을 강화시킬 수 있다. 본 발명에 사용할 수 있는 다른 스테로이드성 소염제의 예로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 베타메타손, 트리암시놀론, 텍사메타손, 프레드니손, 모메타손, 플루니솔리드 및 부데소니드가 포함된다.

[0275] 본 발명의 또 다른 관점에 따라 비-스테로이드성 소염제는 아스피린, 나트륨 살리실레이트, 아세트아미노펜, 페나세틴, 이부프로펜, 케토프로펜, 인도메타신, 플루르비프로펜, 디클로페낙, 나프록센, 피록시캄, 테부펜론, 에토돌락, 나부메톤, 테니답, 알코페낙, 안티파이린, 아미모파이린, 디파이론, 아니모파이론, 페닐부타존, 클로페존, 옥시펜부타존, 프렉사존, 아파존, 벤지다민, 부콜롬, 신코펜, 클로닉신, 디트라졸, 에피리졸, 페노프로펜, 플록타페닐, 플루페남산, 글라페닌, 인도프로펜, 메클로페남산, 메페남산, 니플루민산, 살리디파미드 (salidifamides), 술린닥(sulindac), 수프로펜, 톨메틴, 나부메톤, 티아라미드, 프로쿠아존, 부펙사막, 플루미졸, 티노리딘, 티메가딘, 답손, 디플루니살, 베노릴레이트, 포스포살, 펜클로페낙, 에토돌락, 펜티아작, 티로미솔, 카르프로펜, 펜부펜, 옥사프로진, 티아프로펜산, 피르프로펜, 페프라존, 피록시캄, 수독시캄, 이속시캄, 셀레콕시브, Vioxx® 및/또는 테녹시캄을 포함할 수 있다.

[0276] VII. 키트

[0277] 본 발명에 기술된 어떠한 조성물도 키트에 포함될 수 있다. 비제한적인 예로서, StIR 조성물의 제조 및/또는 전달을 위한 시약이 키트에 포함된다. 특정 관점에서, 키트는 휴대용이며 천식 흡입기처럼 사람이 지니고 다닐

수 있다. 키트는 병원체 검출기를 추가로 포함할 수 있다. 키트는 또한 본 발명의 조성물을 위한 가스 또는 기계식 분사제를 함유할 수 있다.

[0278] 키트의 성분들은 수성, 분말 또는 동결건조 형태로 포장될 수 있다. 키트의 컨테이너 수단은 일반적으로 한 개 이상의 흡입기, 용기, 바이알, 시험 튜브, 플라스크, 병, 주사기 또는 성분을 넣을 수 있고 바람직하게는 적절히 분취할 수 있는 다른 컨테이너 수단을 포함한다. 키트에 한 개 이상의 성분 (제2 제제 등)이 있는 경우, 키트는 또한 일반적으로 추가의 성분을 별도로 넣을 수 있는 제2, 제3 또는 다른 추가의 컨테이너를 함유한다. 그러나, 성분의 다양한 조합이 바이알, 용기 또는 흡입기에 포함될 수 있다. 본 발명의 컨테이너는 벨트에 차거나 주머니, 배낭 또는 다른 저장 컨테이너에 간편히 넣을 수 있는 용기 또는 흡입기를 포함할 수 있다. 본 발명의 키트는 또한 전형적으로 기술된 조성물 또는 이의 변형물을 위한 컨테이너와 시판을 위한 다른 어떠한 시약 컨테이너도 포함한다. 이러한 컨테이너는 바이알을 담아두는 주사 또는 취입 성형된 플라스틱 컨테이너를 포함할 수 있다.

[0279] 키트의 성분이 하나 이상의 액상 용액으로 제공되는 경우, 예를 들어 액상 용액은 수용액이며, 특히 바람직한 것은 무균 수용액이나 반드시 요구되는 것은 아니다. 그러나, 키트의 성분은 건조 분말로 제공될 수 있다. 시약 및/또는 성분이 건조 분말로 제공되는 경우, 이 분말은 적합한 용매의 첨가에 의해 재구성되거나 분말 형태로 투여될 수 있다. 또한 용매는 다른 컨테이너 수단에서 제공될 수 있음은 자명하다.

[0280] 또한, 키트는 키트 성분의 사용 지침뿐만 아니라 키트에 포함되지 않은 다른 시약의 용법을 포함한다. 지침은 실행될 수 있는 변형을 포함할 수 있다.

[0281] 이러한 시약들은 본 발명에 따른 키트의 양태임을 이해하여야 한다. 그러나, 그러한 키트는 상기된 특정 품목에 한정되지 않으며 병원성 미생물의 검출 또는 본 발명에 따른 StIR 조성물의 투여에 직접 또는 간접적으로 사용되는 어떠한 시약도 포함할 수 있다.

[0282] VIII. 실시예

[0283] 하기 실시예는 본 발명의 다양한 양태를 설명하기 위한 목적으로 제공되고 있으며 본 발명을 어떠한 형태로든 제한하는 것이 아니다. 본 분야 숙련가는 본 발명의 목적을 실시하고 언급된 결과 및 이점뿐만 아니라 본 발명 고유의 목적, 결과 및 이점을 얻을 수 있도록 본 발명이 잘 적응됨을 쉽게 알 수 있을 것이다. 본원에 기술된 방법과 함께 본 실시예는 특정 양태를 대표하는 것이며 본 발명의 범위를 한정하는 의도가 아니다. 본원 특허 청구범위에 기술된 바와 같은 본 발명의 취지에 속하는 변화 및 기타 사용들이 본 분야의 숙련가에게 일어날 수 있을 것이다.

[0284] 실시예 1

[0285] 피. 아에루기노사 시험감염. 균주 PA103을 ATCC로부터 입수하고 LB-배지 (Bio 101 Systems)중의 20% 글리세롤에 동결 스탁 (1×10^8 CFU/ml)으로 저장하였다. 1 ml의 스탁을 5% CO₂하에 37°C에서 LB-배지 100 ml중에서 16시간 동안 배양한 다음, 1 L의 신선한 브로쓰(broth)에 희석하고 37°C에서 6-7시간 동안 0.3의 OD₆₀₀으로 성장시켜 약 3×10^{10} CFU를 수득하였다. 현탁액을 원심분리하고, 세척하며, 현탁하고, 에어로졸로 시험감염시킨 후, 연속 희석액을 트립틱 대두 한천 플레이트 (Becton Dickinson)상에 도말함으로써 세균 농도를 결정하였다. 에어로졸화하기 위해 10 ml의 현탁액을, 심층 통기를 촉진하기 위해 공기중 5% CO₂의 10 L/분으로 작동시킨 에어로미스트 CA-209 분무기 (CIS-US)에 넣었다. 30분 후 추가의 5 ml를 첨가하고, 총 10 ml의 현탁액을 전체 60분 동안 에어로졸화하였다.

[0286] TLR 리간드 처리. 감염 시험감염 이전에, 마우스를 TLR 리간드의 에어로졸로, 단독으로 또는 배합하여, 또는 PBS (음성 대조군)로 처리하였다. 모든 처리는 통기를 촉진하기 위해 5% CO₂를 보충하여 10 L/분으로 가동한 에어로미스트 CA-209 분무기를 사용하여 감염 시험감염 18시간 전에 실시하였다. 각 처리의 경우 10 ml의 TLR 리간드 현탁액 또는 PBS를 분무기에 넣고 20분에 걸쳐 투여하였다. TLR 리간드의 배합을 이용한 실험의 경우, 리간드 둘 다를 동일한 10 ml 현탁액에 현탁시키고 동시에 전달하였다. 각 리간드의 경우 초기 에어로졸 용량은, 처리 후 24시간 경과시점에 기관지 폐포 세척액중의 백혈구와 호중구 총 수에 의해 결정되는 것과 같이, 폐의 호중구 침투가 유도된 최소 현탁액 농도로 결정하였다.

[0287] TLR 4 리간드. 5, 6 및 7 아실 그룹 모두를 갖는 천연 지질 A와는 다르게, 모노포스포릴 지질 A-합성물 (MPLAs, Invivogen)은 6개의 지방 아실 그룹을 함유한 순수 합성물이다. MPLAs의 현탁액은 100 µg/ml로 전달하였다. 6

개의 아실 그룹을 갖는 다른 합성 지질 A인 인산화된 헥사아실 디사카라이드 (PHAD, Avanti Polar Lipids)가 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 전달되었다.

- [0288] TLR 2/6 리간드. Pam2CSK4 및 FSL-1 (모두 Invivogen 제품)은 TLR2와 TLR6의 이중이량체를 통해 신호 전달하는 것으로 알려진 합성 디아실화된 리포펩타이드이다. Pam2CSK4는 표기된 바와 같이 6 또는 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 전달되었고 FSL-1은 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 전달되었다.
- [0289] TLR 9 리간드. ODN 2395 (Invivogen)는 사람 및 쥐 TLR9에 대해 고 친화성을 갖는 C형 CpG 올리뉴클레오타이드이다. ODN 2395는 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 에어로졸로 전달되었다.
- [0290] TLR 7 리간드. 이미퀴모드 (R837, Invivogen)는 TLR7 및 가능하게는 TLR8을 자극하는 이미다조퀴놀린 아민 구아노신 유사체이다. 이미퀴모드는 표기된 바와 같이 1 또는 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 에어로졸로 전달되었다.
- [0291] TLR 5 리간드. TLR5의 공지 리간드인 플라젤린의 고도로 보존된 22개 아미노산 단편이 확인되었다. 이 아미노산 단편은 매사추세츠 보스턴 소재 Cell Essentials, Inc.에 합성 의뢰되었다. 이 펩타이드는 HPLC 및 Maldi-TOF 질량 스펙트럼을 기준으로 >95% 순도인 것으로 검증되었고, 그의 PBS중 용해성이 확인되었다. Flg22의 합성 절편은 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 전달되었다.
- [0292] 실시예 2
- [0293] 재료 및 방법
- [0294] 동물 및 시약. 모든 시약은 별도 표기된 것을 제외하고 시그마 (St Louis, MO)로부터 입수하였다. 모든 마우스는 텍사스 대학 M. D. 앤더슨 암 센터의 Institutional Animal Care and Use Committee의 정책에 따라 다루었다. 보호 및 세포 계수 실험을 위해 야생형 5 내지 8 주령 암컷 스위스-웹스터 마우스 (매사추세츠, 윌밍톤, 찰스 리버)를 사용하였다. 표기된 바와 같이, 시즈모 아키라 (1998)에 의해 제공된 5 내지 8 주령 암컷 MyD88^{-/-}, Trif^{-/-} 마우스 (매사추세츠 바 하버 소재 더 잭슨 래버라토리) 및 TLR2^{-/-} (Jackson)을 야생형 마우스 C57BL/6J (Jackson)과 비교하여 사용하였다.
- [0295] 에어로졸 처리. 기재된 바와 같이 (Clement et al., 2008; Evans et al., 2010; Moghaddam et al., 2008), 비피막형 해모필루스 인플루엔자 (NTHi)의 동결 스톱을 초콜릿 한천(Remel, Lenexa, KS)에서 성장시키고, 3.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ NAD가 보충된 뇌-심장 주입 브로쓰에서 증식한 후 EmulsiFlex C5 (독일 만하임 소재 Avestin)으로 분쇄시켰다. 단백질 농도는 비신코닌산 검정(일리노이 록포드 소재 Pierce)에 의해 염수중에 2.5 mg/ml로 조정하였으며, 용해물을 -80°C에서 10 ml 분획량으로 동결시켰다. 처리시, 해동 분획물을 에어로미스트 CA-209 분무기 (CIS-US)에 넣고 5% CO₂ (심층 통기를 촉진하기 위해)가 보충된 공기 10 L/분으로 20분 동안 가동하였다. 분무기는 폴리에틸렌 관 (30 cm x 22 mm)을 통해 10 리터 폴리에틸렌 노출 챔버로 연결되었으며, 저 내성 미생물 필터 (뉴욕 이스트 힐 소재 Pall 제품 BB50T)를 말단에 갖춘 동일한 배출관이 생체안전성 후드로 환기되었다.
- [0296] Pam3CSK4, Pam2CSK4, 폴리 (I:C), MPLA, 이미퀴모드 및 ODN 2395는 InvivoGen (캘리포니아 샌 디에고 소재)에서 구입하였다. 플라젤린의 가장 보존된 도메인인 Flg22의 22량체 (QRLSTGSRINSKDDAAGLQIA)는 Cell Essentials (매사추세츠 보스턴 소재)에 의해 합성되었다. 동물에 처리하기 위해, 합성 TLR 효능제는 엔도톡신-미함유 물에 재구성하고, 표기된 농도로 8 ml 무균 PBS에 현탁한 후, NTHi 용해물 처리시 사용된 것과 동일한 기술을 사용하여 20분 동안 동물에 에어로졸을 분무하였다.
- [0297] 생체내 감염 시험감염. 전기된 바와 같이 (Clement et al., 2008; Clement et al., 2009; Evans et al., 2010), 마우스를 LD₈₀-LD₁₀₀으로 맞춘 세균 접종물로 흡입 시험감염시켰다. 피. 아에루기노사 균주 PA103은 ATCC로부터 입수하고 LB-배지 (Bio 101 Systems)중 20% 글라이세롤에 동결 스톱 (1 x 10⁸ CFU/ml)으로 저장하였다. 1 ml의 스톱을 5% CO₂하에 37°C에서 100 ml LB-배지로 16시간 동안 배양한 다음, 1 L의 신선한 브로쓰로 희석하고, 37°C에서 6-7시간 동안 0.3의 OD₆₀₀로 성장시켜 1-4 x 10¹⁰ CFU/ml를 수득하였다. 에스. 뉴모니에 혈청형 4를 Todd-Hewett 브로쓰(Becton Dickinson)중의 20% 글리세롤로 동결 스톱(1 x 10⁹ CFU)으로서 저장하였다. 1 ml의 해동된 스톱을 5% CO₂하에 37°C에서 150 ml Todd-Hewett 브로쓰로 16시간 동안 배양한 다음, 1.5 L의 신선한 브로쓰로 희석하고 대수기에서 6-7시간 동안 0.3의 OD₆₀₀으로 성장시켜 2-6 x 10¹¹ CFU/ml를 수득하였다. 세

균 현탁액을 원심분리하고, 세척한 다음, 10 ml PBS에 재현탁시키고 처치시 사용된 것과 동일한 시스템을 사용하여 60분에 걸쳐 분부하였다. 트립틱 대두 한천 플레이트에 연속 희석액을 도말하여 세균 농도를 결정하였다.

[0298] 폐 병원체 부담의 정량. 전기된 바와 같이 (Clement et al., 2008; Clement et al., 2009; Evans et al., 2010), 세균성 병원체로 감염 직후 마우스를 마취하고 마우스의 폐를 수집한 다음 2 ml 조직 분쇄기 (뉴저지 바인랜드 소재 Kontes)를 이용하여 1 ml PBS중에 균질화하였다. 균질화물의 연속 희석액을 트립신 대두 한천 (TSA)에 도말하고, 37°C에서 16시간 동안 배양한 다음, 세균 콜로니를 계수하였다.

[0299] 기관지 폐포 세척액 분석. 전기된 바와 같이 (Clement et al., 2008, Clement et al., 2009; Evans et al., 2010), 표기된 시점에 노출 기관의 링을 통해 삽입된 루어 스테르 어댑터 캐놀라 (Becton Dickinson)을 통해 1ml의 각각의 PBS의 2개의 분취량을 주입 및 수집하여 기관지 폐포 (BAL) 세척액을 수득하였다. 총 백혈구 수를 혈구측정기(Hauser Scientific, Horsham, PA)로 측정하고, 300 μ l의 BAL액을 세포원심분리기로 2,000 rpm에서 5분 동안 분별 계수하고, Wright-Giemsa 염색을 하였다.

[0300] 시험관내 살해 검정. 전기된 바와 같이 (Clement et al., 2008, Clement et al., 2009; Evans et al., 2010), MLE-15 세포 및 A549 세포를 10% 열-불활성화된 FCS 및 1% 페니실린/스트렙토마이신 (Invitrogen)이 보충된 RPMI-1640으로 6-웰 플레이트 상에서 배양하였다. 약 80% 컨플루언스로 성장했을 때, 세포를 PBS로 세척하고, 10% 열-불활성화된 FCS와 함께 신선한 무항생제 배지를 보충한 다음, 10% 열-비활성화된 FCS가 함유된 RPMI-1640중의 20 μ l PBS 또는 20 μ l 용량의 ODN 2395 (20 μ g/ml), Pam2CSK4 (10 μ g/ml) 또는 둘다로 처리하였다. 4시간 후 바실러스 안트라시스 Sterne 균주 1000개 포자 또는 2000 CFU 피. 아에루기노사 균주 PA103을 모든 웰에 첨가하였다. 감염 후 4시간 경과해서, 각 웰로부터 상청액 20 μ l를 흡입하고, 연속 희석한 다음, TSA 한천 플레이트에 도말하고, 37°C에서 16시간 동안 배양한 후 CFU를 계수하였다.

[0301] 면역형광 현미경. 10% 열-불활성화된 FCS 및 1% 페니실린/스트렙토마이신 (Invitrogen)이 보충된 RPMI-1640으로 Lab-Tek II 챔버 슬라이드에서 A549 세포를 48시간 동안 배양한 후, 10% 열-불활성화된 FCS가 함유된 RPMI-1640중의 20 μ l 용량의 텍사스 레드-표지된 ODN 2395 (20 μ g/ml, Invivogen), 플루오레세인 이소티오시아네이트 (FITC)-표지된 Pam2CSK4 (10 μ g/ml, Invivogen) 또는 둘다로 처리하였다. 2시간 후 배지를 흡입하고, 챔버를 분리한 다음, 세포를 냉각된 PBS로 3회 세척하였다. 이어서, 세포를 4% 파라포름알데하이드로 고정하고, 글리세린으로 급랭시킨 다음, PBS로 3회 세척하고, 4',6-디아미디노-2-페닐인돌 (DAPI; 0.1 μ g/ml)로 핵 대비염색하고, 적절한 광학 (텍사스 레드: 여기 = 540 nm; 방출 = 620 nm; FITC: 여기 = 495 nm, 방출 = 520 nm; DAPI: 여기 = 360 nm; 방출 = 460 nm)을 사용하여 형광 현미경 (뉴욕 멜빌 소재 올림푸스의 BX-60 현미경)으로 검사하였다. 컴퓨터-조정된 스팟 RT 카메라 (스터링 헤이즈 소재 Diagnostic Instruments)로 이미지를 순차적으로 수집하고 포토샵 CS3 (캘리포니아 산 조세 소재 Adobe)로 어셈블링하였다. 중첩된 적색 및 초록색 형광은 노란색으로 보였다.

[0302] 통계 분석. SAS/STAT 소프트웨어 (버전 8.2, SAS Institute)를 사용하여 통계 분석을 실시하였다. 스튜던트 t-검정을 이용하여 그룹간의 폐 세균 또는 바이러스 역가를 비교하였다. 병원체 시험감염에서 생존한 마우스의 %를 Fisher의 정확도 검정을 사용하여 비교하고, 로그 등급 시험을 사용하여 Kaplan-Meier 방법에 의해 산정된 생존 분포를 비교하였다. 일원 ANOVA를 사용하여 처리 동물과 비처리 동물사이의 BAL 세척액 차등 계수를 비교하였다.

[0303] 결과

[0304] 에어로졸화된 세균 용해물에 의한 폐렴 저항성의 유도를 위해 MyD88이 필요하였으나, TRIF는 그렇지 않았다. NTHi의 에어로졸화된 용해물에 의한 폐 상피의 자극은 넓은 범위의 미생물 병원체 9종에 대해 고 수준의 저항성을 유도한다 (Clement et al., 2008; Clement et al., 2009; Evans et al., 2010; Tuvim et al., 2009). TLR 신호전달이 용해물-유도된 보호를 위해 필요한 것인지를 시험하기 위해, TIR 어댑터를 통한 TLR 신호전달이 결핍된 마우스를 피. 아에루기노사로 흡입 시험감염시켰다. 야생형 및 TRIF-결핍 (Trif^{-/-}) 마우스는 에어로졸화된 세균 용해물로의 전처리에 의해 맹독성 피. 아에루기노사 시험감염에 대해 완전히 보호된 반면, MyD88이 결핍된 마우스 (Myd88^{-/-}; 도 12A 및 12B, 좌측 패널)에서는 저항성이 유도될 수 없었다. 보호는 폐에서의 급속한 병원체 살해의 유도와 밀접한 상관관계가 있다 (도 12A 및 12B, 우측 패널). IL-1 수용체는 또한 MyD88을 통해 신호를 전달하지만 (Adachi et al., 1998; Medzhitov et al., 1998) 미생물 산물에 직접적으로 반응하기 보다는 숙주 사이토카인 신호 전달에 반응한다. 에어로졸화된 세균 용해물에 의해 자극된 IL-1 수용체 결핍 마우스 (Il1r^{-/-}; 도 13)에서 병원체 살해가 완전히 보존되었다. 이러한 발견은 MyD88을 통한 모든 수용체 신호 전달이

용해물-유도된 보호를 위해 필요하지 않음을 가리키며 TLR을 통한 직접적인 미생물 신호전달이 숙주 사이토카인을 통한 간접적 신호전달보다 유도성 상피 저항성을 위해 더욱 중요함을 제시한다.

[0305] 개별적인 TLR 효능제는 저 수준의 폐렴 저항성을 유도한다. MyD88 신호전달의 요건 측면에서, 본 발명자들은 어떤 개별적인 합성 TLR 효능제가 에어로졸 세균 용해물에 의해 제공된 것과 유사한 저항성을 유도할 수 있는지를 시험하였다. TLR1 및 TLR6이 TLR2와 이중이량체로 발현되고 TLR7 및 TLR8 둘 다 이미퀴모드를 인지함에 따라, 마우스 TLR 1 내지 9 모두는 다음의 7 가지 합성 리간드로 자극받을 수 있었다: Pam3CSK4 (TLR2/1 효능제), Pam2CSK4 (TLR2/6 효능제), 폴리(I:C) (TLR3 효능제), 합성 지질 A (MPLA, TLR4 효능제), Flg22 (플라젤린의 합성 22량체, TLR5 효능제), 이미퀴모드 (TLR7 및 TLR8) 또는 ODN2395 (TLR9 효능제).

[0306] 이들 효능제의 적당한 에어로졸 용량은 알려져 있지 않으며, 이에 따라 2종 (β) 오류를 피하기 위해 폐로 전달하기에 적당한 용량을 확인하는 계획을 설정하였다. 사용된 합성 TLR 효능제 각각은 최대 사이토카인 분비가 수치상 세포로부터 자극받는 농도가 보고되어 있다 ([DCmax])(Yamamoto et al., 2003; Aliprantis et al., 1999; Buwitt-Beckmann et al., 2005; Hayashi et al., 2001; Krug et al., 2001; Lee et al., 2003; Martin et al., 2003). 에어로졸 화합물의 효과적인 기도 전달의 계산치를 기초로 (Clement et al., 2009; Evans et al., 2004), 본 발명자들은 기도 상피 표면에서 [DCmax]를 달성하는데 필요한 분무액 농도를 결정하였다. 비록 에어로졸 용해물-유도된 저항성이 백혈구 유입에 의존하는 것은 아니지만, 보호 현상은 유도된 폐 호중구 감소증의 시점 및 중증과 밀접하게 관련이 있다 (Clement et al., 2008). 따라서, 시험에 충분한 TLR 효능제 용량을 확인하기 위해 본 발명자들은 각 리간드에 대해 보고된 [DCmax]에서 시작하였고, 백혈구 침윤이 달성될 때까지 분무 농도를 대수적으로 증가시켰다.

[0307] 도 14에서 보는 바와 같이, PBS 처리된 마우스에서 기관지폐포 세척액중의 호중구 수는 $0.1 \times 10^3 \pm 0.2$ 세포/ mL 이다. 비록 폴리(I:C) 및 Flg22를 제외한 모두가 DCmax보다 1 내지 2 로그 큰 농도에서 호중구 수준의 유의적 증가를 보여주었지만, Pam2CSK4만이 DCmax에서 호중구의 유의적인 증가를 입증해 주었다. 다른 한편, 폴리(I:C) 및 Flg22 둘 다는 처리 후 24시간 경과하여 BAL에 대식세포의 유의적인 유입을 유도하였다. Flg22 및 이미퀴모드 각각은 리간드 농도 그 이상에서 호중구 침윤의 감소가 있었다. Pam2CSK4는 Pam3CSK4보다 거의 5배 높은 수준의 호중구 증가를 유도하였고 기타 다른 리간드보다는 15배 높게 유도하였다.

[0308] 각 리간드를 위해 선택된 농도는 호중구/ mL 의 10배 증가를 유도하거나 대식세포의 두 배 증가를 유도하는데 가장 낮은 용량이었다(둘 다를 유도하는 것은 없었다). 리간드중 일부는 왕성한 세포 침윤을 유도한 한편, 합성 효능제는 어떠한 것도 맹독성 피. 아에루기노사 뉴모니아에 대한 왕성한 보호를 제공하지 않았다 (도 15). Pam2CSK4, Flg22 및 이미퀴모드가 개별 실험에서 또는 복수 실험의 평균에서 통계적 유의성에 도달하지 못했으나 보호 성향은 있었다. MPLA 처리된 마우스는 병원체 시험감염 후 치사율 증가에서 비-유의적 성향을 보여주었다.

[0309] **TLR2/6과 TLR9 효능제의 배합은 고 수준의 폐렴 저항성을 유도한다.** 비록 단일 합성 TLR 효능제가 단지 미미한 보호를 제공하였지만, 고 수준의 저항성을 유도하기 위해 다수 PRR의 동시 자극이 필요할 수 있음이 가능하다 (Clement et al., 2008; Evans et al., 2010). TLR 효능제의 배합이 저항성을 유도할 수 있는가를 결정하기 위해 본 발명자들은 7가지 합성 리간드의 쌍별 순열을 시험하였다.

[0310] 확실하게는, Pam2CSK4와 ODN2395 (ODN + Pam2)의 동시 처리는 그람-음성 피. 아에루기노사의 맹독성 시험감염으로부터 마우스의 100% 생존 결과를 제공하였고(도 16A, 좌측), 그람 양성 에스. 뉴모니아의 맹독성 시험감염으로부터 80% 생존 결과를 제공하였다(도 16B, 좌측). 에어로졸 처리시 두 리간드의 농도를 두 배로 증가시키면 에스. 뉴모니아의 시험감염으로부터 90% 생존 결과를 제공하였다 (도 16B). 맹독성 감염 시험감염으로부터 마우스의 보호는 폐내 병원체의 상승적 살해와 연관이 있었고 (도 16A 및 16B, 우측), 리간드의 농도를 2배 증가시키는 것은 보다 큰 병원체 살해 효과와 연관이 있었다. 또한, Pam2CSK4와 ODN2395 사이의 상승적 상호작용이 4 및 24시간째에 폐로의 백혈구 소집에서 관찰되었다 (도 16C). 이들 결과는 TLR2/6과 TLR9에 대한 리간드가 병원체 살해 및 백혈구 소집을 위한 것을 포함한 항미생물 면역반응의 상승적 활성화를 유도하고 결과적으로 폐렴에 대한 상승적 보호 수준을 제공함을 가리킨다. NTHi 용해물-유도된 저항성의 속도론과 유사하게, 보호는 치료 후 4시간까지 존재했다.

[0311] **모든 TLR 효능제 배합이 감염에 대해 강력한 보호를 제공하지는 않는다.** 본 발명자들은 TLR 효능제의 다음과 같은 배합을 시험하였다: Pam2 + 폴리(I:C), Pam2 + Flg22, Pam2 + 이미퀴모드, ODN + 폴리(I:C), ODN + Flg22 및 ODN + Pam3. 본 발명자들은 이들 조합이 Pam2-ODN 조합 (도 16)과 비교하여 피. 아에루기노사 시험감염에 대한 보호에 덜 효과적임을 발견하였다 (도 17A-F). 이들 결과는 모든 TLR 효능제 배합이 Pam2-ODN과 동일

한 면역 자극을 제공하지는 않음을 제시한다.

- [0312] **TLR2는 보호적 Pam2CSK4와 ODN2395 상승효과를 촉진하는데 충분하지만 유도된 저항성을 위해 필요하지 않다.** 잘 규명된 수용체 특이성을 갖는 TLR 리간드 Pam2CSK4 및 ODN2395의 상승 효과의 검출은 TLR2/6 및 TLR9의 참여에 대한 예상되는 증거를 제공한다. 본 발명자들은 녹아웃 마우스 및 추가의 리간드를 사용하여 추가의 증거를 찾았다.
- [0313] 본 발명자들은 피. 아에루기노사로 시험감염시키기 전에 Pam2-ODN 또는 PBS로 전처리된 야생형 및 TLR2-결핍 마우스의 생존을 비교하였다. 야생형 마우스는 Pam2-ODN에 의해 완전히 보호된 한편, 모의 처리된 야생형 그룹 또는 $Tlr2^{-/-}$ 그룹은 전혀 생존하지 않았다 (도 18A, 좌측 패널). 이것은 Pam2-ODN-유도된 보호에서 TLR2가 필요하다는 것을 증명한다. $Tlr2^{-/-}$ 마우스의 보호 상실은 Pam2-ODN-유도된 폐내 병원체 살해의 상실과 밀접한 관계가 있다 (도 18A, 우측 패널).
- [0314] Pam2CSK4 및 Pam3CSK4는 TLR2/6과 TLR2/1를 구별하고 Pam2CSK4는 ODN2395와 배합되었을 때 강력한 상승적 보호 효과를 제공하지만 Pam3CSK4는 그렇지 않기 때문에, 폐 상피 저항성을 유도하는데 TLR2/6 이중이량체가 필요할 수 있다. 또한, 본 발명자들은 NTHi 용해물로 처리한 후 $Tlr2^{-/-}$ 및 야생형 마우스를 시험감염시키고 보호 상실 (도 18B, 좌측 패널) 또는 용해물-유도된 세균 살해의 결핍 (도 18B, 우측 패널) 어느 것도 발견하지 못했다. 종합해 보면, 이들 결과는 TLR2/6이 TLR9와 상승적으로 상호작용하는데 충분하지만 모든 유도된 폐 상피 저항성을 위해 필요하지 않음을 제시한다.
- [0315] **C형 CpG ODN은 Pam2CSK4와 상승적으로 상호작용하여 세균성 폐렴에 대한 저항성을 유도하지만 A형 또는 B형 CpG ODN은 그렇지 않다.** 본 발명자들은 Pam2-ODN의 상승적 상호작용을 위해 TLR9가 필요한지를 평가하였다. $Tlr9^{-/-}$ 마우스는 입수할 수 없어서, 본 발명자들은 TLR9와 결합하지 않는 것으로 알려진 스크램블드 ODN을 사용하여 TLR9 연관성을 시험하였다. Pam2-ODN으로의 전처리는 피. 아에루기노사-시험감염된 마우스의 90% 생존 결과를 제공한 반면, Pam2CSK4와 대조 ODN으로 전처리한 경우는 전혀 생존되지 않았다 (도 19A). 이것은 ODN에 의한 TLR9 결합이 상승적 보호에 필요하다는 것을 가리킨다.
- [0316] Pam2-ODN 상호작용의 특이성을 좀더 탐구하기 위하여, 본 발명자들은 피. 아에루기노사로 시험감염시키기 전에 야생형 마우스를 Pam2CSK4 및 다른 유형의 CpG ODN으로 처리하였다. A형 ODN (ODN 1585 또는 ODN 2216) 또는 B형 ODN (ODN 2006-G5)와 Pam2CSK4의 배합은 보호를 전혀 제공하지 않은 반면 C형 ODN (ODN M362 또는 ODN 2395)와 Pam2CSK4의 배합은 맹독성 폐렴에 대해 유의적인 저항성을 촉진하였다 (도 19B). 이들 결과는 TLR2/6과 TLR9 리간드가 상승제로 작용할 뿐만 아니라 다른 것보다 더 유리하게 상호작용하는 특이적 리간드가 있음을 가리킨다.
- [0317] **Pam2CSK4 및 ODN2395는 시험관내에서 상피 세포에 의한 세균 살해를 유도한다.** NTHi 용해물로 자극한 경우 폐 상피 세포가 시험관내에서 세균을 살해하도록 유도된다 (Clement et al., 2009; Evans et al., 2010). Pam2-ODN은 생체내에서 세균 용해물의 면역자극 효과를 반복하기 때문에, 본 발명자들은 그 배합이 마찬가지로 시험관내에서도 분리된 폐 상피 세포에 의한 병원체 살해를 유도할 수 있는지를 시험하였다. Pam2-ODN으로 4시간 동안 쥐 MLE-15 호흡 상피 세포의 전처리는 비. 안트라시스로 접종 후 세포 배양 배지에서 세균 CFU를 유의적으로 감소시켰다 (도 20A). 유사하게, Pam2-ODN으로 사람 A549 세포의 처리는 감염 후 4시간 경과하여 피. 아에루기노사 CFU의 유의적 감소 결과를 제공하였다 (도 20C). 병원체 살해는 Pam2-ODN의 직접적인 항생 효과를 통해서라기보다는 상피 세포의 자극을 통해 발생한 것임을 증명하며, 세균은 Pam2-ODN 또는 PBS로 처리되었을 때 상피 세포가 함유되지 않은 웰에서 동일한 숫자로 성장하였다 (도 20B 및 20D).
- [0318] 따라서, 이러한 항미생물 효과는 쥐와 사람 모두의 상피 세포에서 유도되며 그람-양성 및 그람-음성 병원성 세균 모두를 살해하는 결과를 제공한다. 이들 데이터는 Pam2-ODN 처리에 따라 생체내에서 발견되는 세균 살해를 모사한다. 여기에 표기된 것보다 32배까지 높게 Pam2-ODN의 용량을 순차적으로 증가시켰을 때 병원체 살해가 유의적으로 증가하지 않았다.
- [0319] **Pam2CSK4와 ODN2395는 시험관내에서 세포내에 공동으로 편재한다.** Pam2CSK4와 ODN2395가 상호작용하여 상승효과를 유발하는 기전은 미해결 상태로 남아있다. TLR2/6은 원형질막에 편재해 있는 것으로 보고되어 있고 TLR9는 엔도솜에 편재해 있는 것으로 보고되어 있음에 따라 (Beutler, 2009; Dostert et al., 2008), 누구도 리간드의 물리적 상호작용을 예상할 수 없다. 그러나, TLR4는 신호전달을 위해 내재화를 필요로 할 수 있기 때문에 (Kagan et al., 2008), 본 발명자들은 두 개의 리간드가 상피 세포에 편재해 있는지를 연구하였다. A549 세포

를 세포 배양 슬라이드상에서 단일층으로 성장시킨 다음, 병원체 살해 실험에서 사용된 것과 동일한 농도에서 FITC-표지된 Pam2CSK4 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 및 텍사스 레드-표지된 ODN2395 (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 처리하였다. 2시간 후 세포를 세척하고 핵을 DAPI로 표지한 다음, 슬라이드를 형광 현미경으로 관찰하였다. Pam2CSK4와 ODN2395 둘 다 상피 세포에 편재해 있었다. 또한, Pam2CSK4와 ODN2395는 세포질 구획에, 아마도 엔도솜내에 함께 편재해 있다. 이들 결과는 Pam2CSK4와 ODN2395가 엔도솜내에 공동으로 편재해 있을 수 있음을 제시한다.

[0320] Pam2CSK4, TLR2/6 효능제 및 C형 ODN (2395, 10101 또는 M362), TLR9 효능제의 배합물로의 전처리는 바실러스 안트라시스 및 인플루엔자 바이러스에 의한 폐 감염에 대해 고 수준의 저항성을 유도한다. 마우스를 탄저균 포자로 비강 내 시험감염 또는 인플루엔자 바이러스로 에어로졸 시험감염 하루 전에 표기된 바와 같이 에어로졸 TLR 리간드로 전처리하였다. 마우스의 생존을 모니터링하였다.

[0321] 참고문헌

[0322] 아래 문헌은 본 명세서에 설명된 것에 보충적으로 예시적인 절차 또는 기타 세부 사항을 제공하는 정도로 본 명세서에 구체적으로 참고로 인용된다.

미국특허 4,554,101
 미국특허 4,668,218
 미국특허 4,689,338
 미국특허 4,929,624
 미국특허 5,238,944
 미국특허 5,266,575
 미국특허 5,268,376
 미국특허 5,346,905
 미국특허 5,352,784
 미국특허 5,389,640
 미국특허 5,389,640
 미국특허 5,389,640
 미국특허 5,395,937
 미국특허 5,458,135
 미국특허 5,482,936
 미국특허 5,494,916
 미국특허 5,525,612
 미국특허 6,039,969
 미국특허 6,110,929
 미국특허 6,110,929
 미국특허 6,194,425
 미국특허 6,331,539
 미국특허 6,331,539
 미국특허 6,451,810
 미국특허 6,488,953
 미국특허 6,737,045
 미국특허 6,794,357
 미국특허 6,797,258

[0323]

미국특허원 11/830,622
 미국특허공보 20030225016
 미국특허공보 2004/0162309
 미국특허공보 2004/0171086
 미국특허 제10/844,933호

- Abuchowski *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 252:582, 1977.
 Adachi *et al.*, *Immunity*, 9:143-150, 1998.
 Akinbi *et al.*, *J. Immunol.*, 165(10):5760-6, 2000.
 Akira *et al.*, *Biochem. Soc. Trans.*, 31(Pt 3):637-42, 2003.
 Akira *et al.*, *Cell*, 124:783-801, 2006.
 Alexopoulou *et al.*, *Nature*, 413:732-738, 2001.
 Aliprantis *et al.*, *Science*, 285:736-739, 1999.
 Aliprantis *et al.*, *Science*, 285:736-739, 1999.
 Bals and Hiemstra, *Curr. Drug Targets*, 7(6):743-50, 2006.
 Bals and Hiemstra, *Eur. Respir. J.*, 23(2):327-33. 20, 2004.
 Bals and Hiemstra, *Eur. Respir. J.*, 23:327-333, 2004.
 Barker *et al.*, *J. Med. Chem.*, 35:2040-2048, 1992.
 Bartlett *et al.*, *Microbiol.*, 15:147-163, 2008.
 Beauchamp *et al.*, *Anal. Biochem.*, 131:25, 1983.
 Beutler, *Blood*, 113:1399-1407, 2009.
 Biological Approaches to the Controlled Delivery of Drugs, R. L. Juliano, New York Academy of Sciences, 1988.
 Buwitt-Beckmann *et al.*, *FEBS J.*, 272:6354-6364, 2005.
 Chen *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 660:293, 1981.
 Clement *et al.*, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 177:1322-1330, 2008.
 Clement *et al.*, *Respir. Res.*, 10:70, 2009.
 Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel *et al.* (Eds.), 1987.
 Dennis *et al.*, *JAMA*, 285:2763-2773, 2001.
 Dostert *et al.*, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 60:830-840, 2008.
 Edwards *et al.*, *Cancer Res.*, 62:4671-4677, 2002.
 유럽 출원 EP 0237507
 Evans *et al.*, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 31(4):382-94, 2004.
 Evans *et al.*, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 32(6): 490-7, 2005.

[0324]

- Evans *et al.*, *Am. J. Respir. Cell Molec. Biol.*, 42:40-50, 2010.
- Evans *et al.*, *Annu. Rev. Physiol.*, (72)413-35, 2010.
- Fanger *et al.*, *J. Leukocyte Biology*, 66:231-236, 1999.
- Forteza *et al.*, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 32(5):462-9, 2005.
- Gorden *et al.*, *J. Immunol.*, 174:1259-1268, 2005.
- Hayashi *et al.*, *Nature*, 410:1099-1103, 2001.
- Hiemstra, *Exp. Lung Res.*, 33:537-542, 2007.
- Hippenstiel *et al.*, *Respir. Res.*, 7:97, 2006.
- Hruby *et al.*, *Biochem J.*, 268:249-262, 1990.
- Hydrolysis in Drug and Prodrug Metabolism: Chemistry, Biochemistry, and Enzymology,
Bernard Testa, Vch Verlagsgesellschaft MbH, 2003.
- Ishii *et al.*, *Cell Host Microbe.*, 3:352-363, 2008.
- Janeway, Jr. and Medzhitov, *Annu. Rev. Immunol.*, 20:197-216, 2002.
- Kagan *et al.*, *Nat. Immunol.*, 9:361-368, 2008.
- Kaisho *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1589(1):1-13, 2002.
- Keamey *et al.*, *Immunity*, 1:327, 1994.
- Kellner *et al.*, *Biol. Chem.* 373:1:51-5, 1992.
- Kita *et al.*, *Drug Des. Delivery*, 6:157, 1990.
- Knauf *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 263:15064, 1988.
- Knowles *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 109(5):571-7, 2002.
- Krug *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 31:2154-2163, 2001.
- Kyte and Doolittle, *J. Mol. Biol.*, 157(1):105-132, 1982.
- Lee *et al.*, *J. Lipid Res.*, 44:479-486, 2003.
- Lee *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:6646-6651, 2003.
- Martin and Frevert, *Proc. Am. Thorac. Soc.*, 2(5):403-11, 2005.
- Martin *et al.*, *Infect. Immun.*, 71:2498-2507, 2003.
- Medzhitov and Janeway, Jr., *Curr. Opin. Immunol.*, 9(1):4-9, 1997.
- Medzhitov and Janeway, Jr., *Trends Microbiol.*, 8(10):452-456, 2000.
- Medzhitov *et al.*, *Mol. Cell*, 2(2):253-8, 1998.
- Mizgerd, *N. Engl. J. Med.*, 358:716-727, 2008.
- Moghaddam *et al.*, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 38:629-638, 2008.
- Mondino *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(6):2245-52, 1996.
- Morgan and Gainor, *Ann. Rep. Med. Chem.*, 24:243-252, 1989.
- Nagase *et al.*, *J Immunol.*, 171(8):3977-82, 2003.

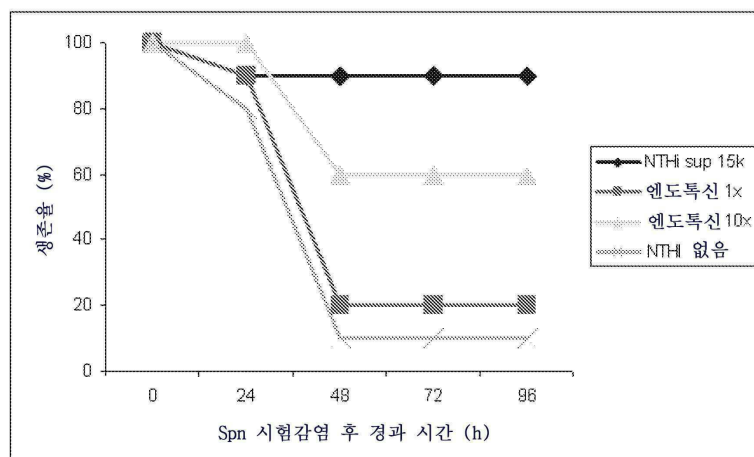
[0325]

O'Neill and Bowie, *Nat. Rev. Immunol.*, 7:353-364, 2007.
 Or *et al.*, *J. Org. Chem.*, 56:3146-3149, 1991.
 PCT 출원 WO 00/76518
 PCT 출원 WO 02/46189
 PCT 출원 WO 02/46192
 PCT 출원 WO 02/46193
 PCT 출원 WO 94/06498
 PCT 출원 WO 94/08552
 PCT 출원 WO 94/16970
 PCT 출원 WO 97/25086
 PCT 출원 WO 98/16427
 PCT 출원 WO 98/35888
 PCT 출원 WO 98/55495
 Poltorak *et al.*, *Science*, 282(5396):2085-8, 1998.
 Prodrugs: Topical and Ocular Drug Delivery, Kenneth Sloan, Marcel Dekker; 1992.
 Pulendran *et al.*, *J. Exp. Med.*, 188(11):2075-82, 1998.
 Rogan *et al.*, *Respir. Res.*, 7:29, 2006.
 Roman *et al.*, *Nat. Med.*, 3(8):849-54, 1997.
 Schutte and McCray, *Annu. Rev. Physiol.*, 64:709-748, 2002.
 Seifer *et al.*, *Biochem. J.*, 26:795-802, 1990.
 Shi *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 284:20540-20547, 2009.
 Takeda and Akira, *J. Dermatol. Sci.*, 34(2):73-82, 2004.
 Takeda and Akira, *Semin. Immunol.*, 16:3-9, 2004.
 Takeuchi *et al.*, *Int. Immunopharmacol.*, 1(4):625-35, 2001.
 Travis *et al.*, *Curr. Opin. Immunol.*, 13(1):89-95, 2001.
 Tsutsumi *et al.*, *J. Controlled Rel.*, 33:447, 1995.
 Tuvim *et al.*, *PLoS ONE*, 4:e4176, 2009.
 Vroegop *et al.*, *Intl. J. Immunopharmacol.*, 21:647-662, 1999.
 Williams *et al.*, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 34(5):527-36. 10, 2006.
 Yamamoto *et al.*, *Science*, 301:640-643, 2003.

[0326]

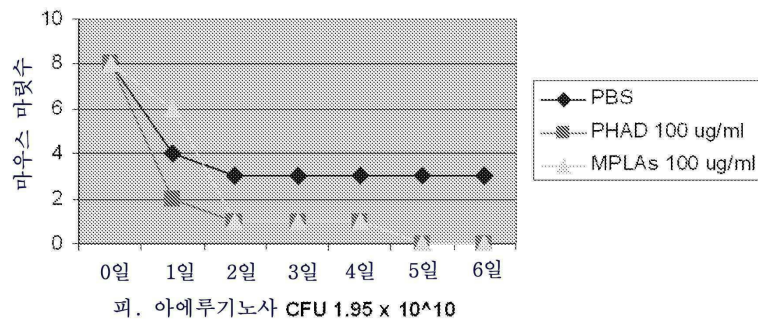
도면

도면1



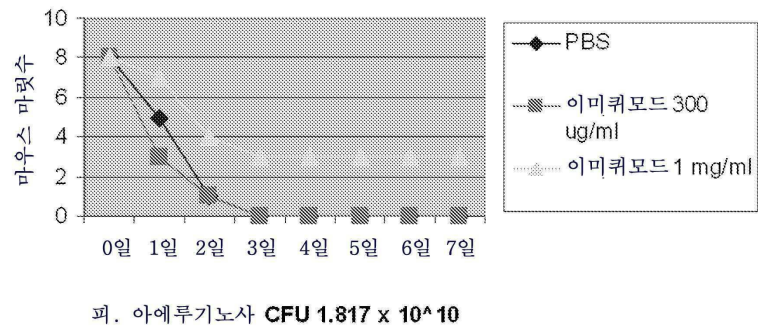
도면2

PHAD/MPLAs- 피. 아에루기노사 보호



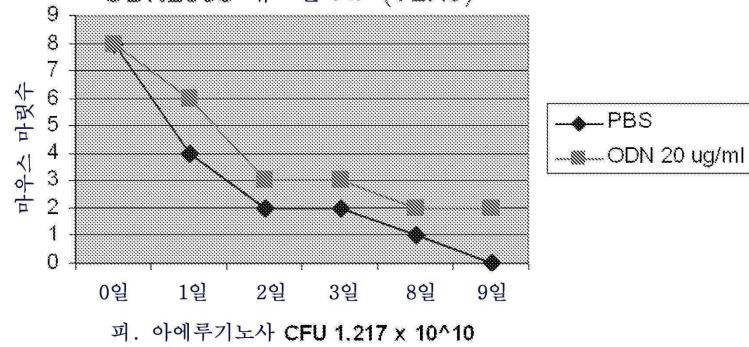
도면3

이미퀴모드-피. 아에루기노사 보호

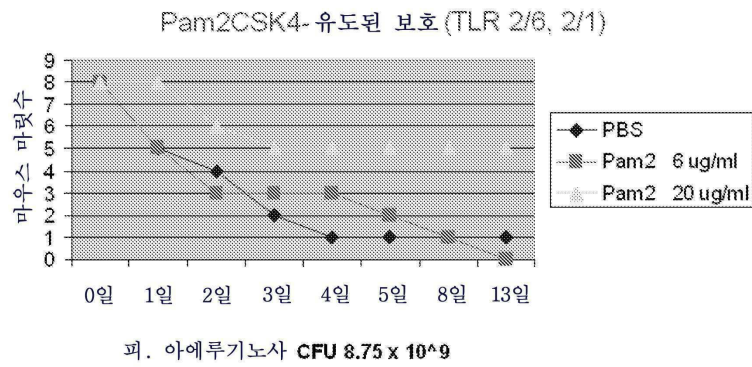


도면4

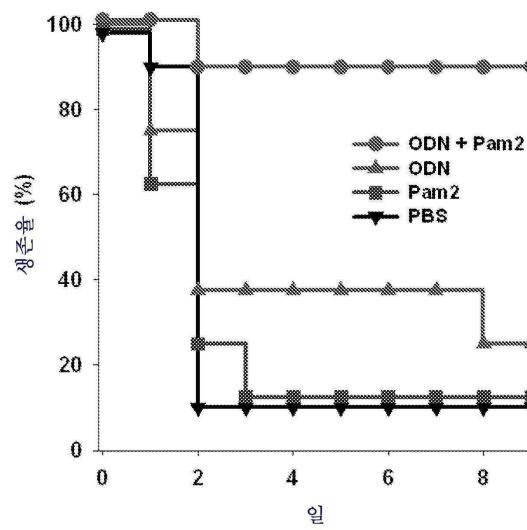
ODN2395- 유도된 보호 (TLR9)



도면5

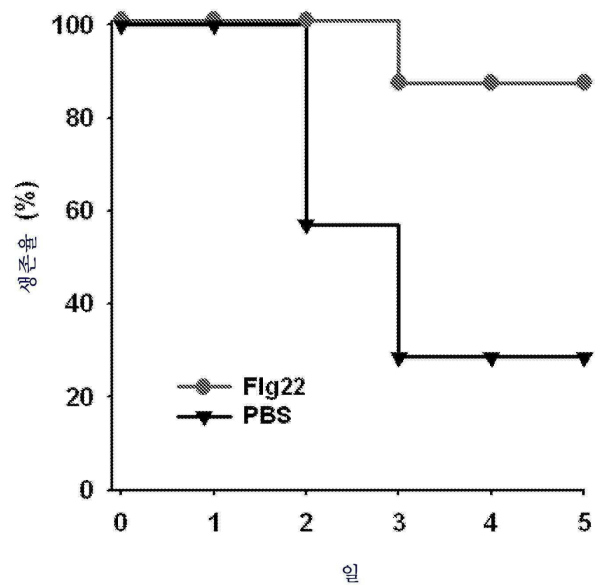


도면6



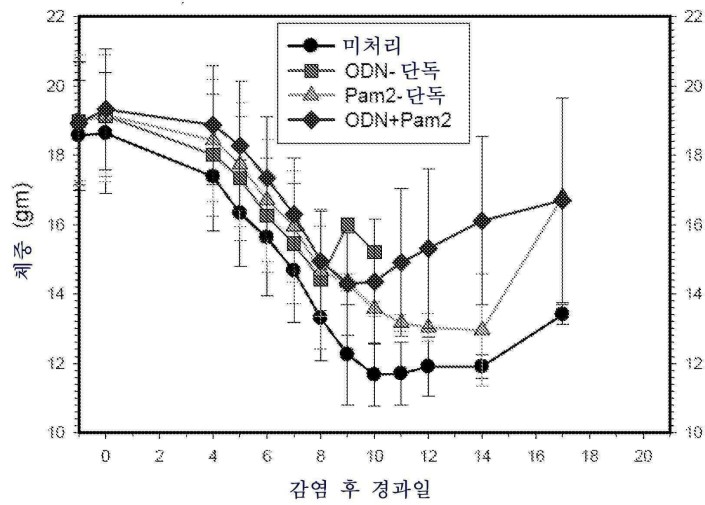
피. 아에루기노사 시험 감염을 받은 스위스-웹스터 마우스 (2×10^{10} CFU/ml)

도면7

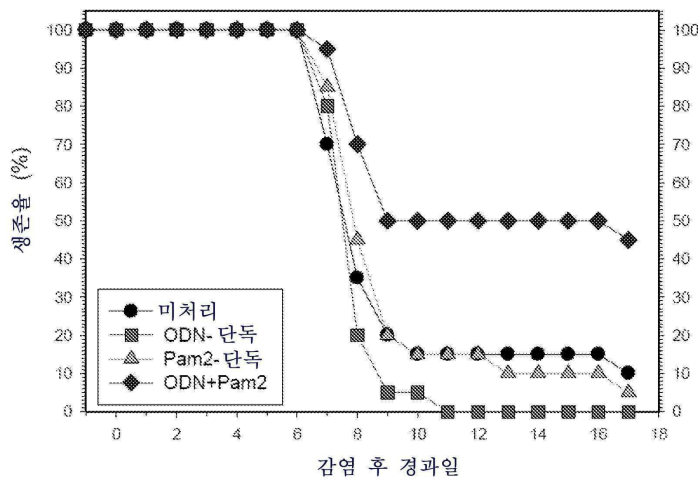


피. 아에루기노사 시험 감염 (2×10^{10} CFU/ml)

도면8

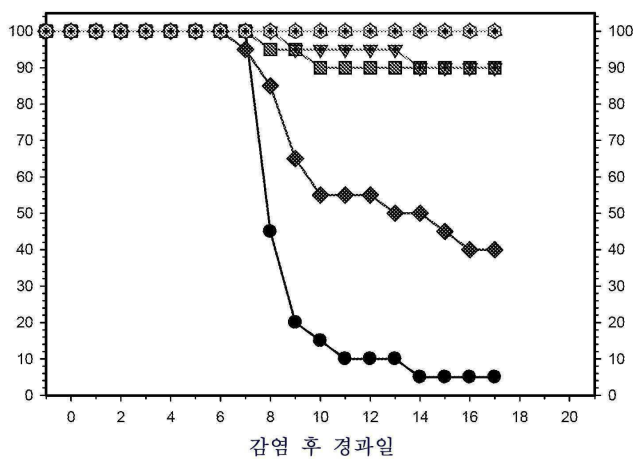


도면9



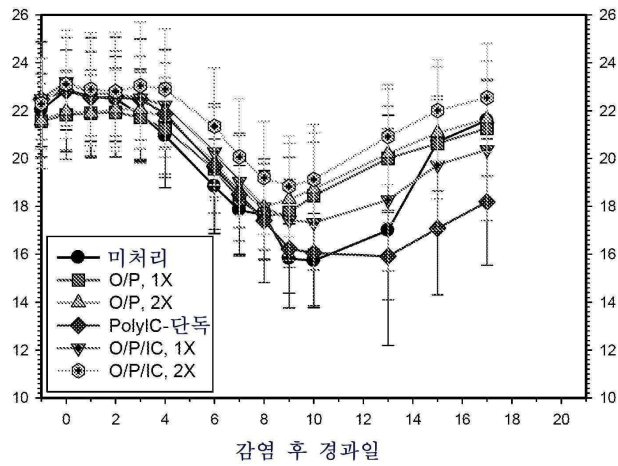
도면10

실험 3. 인플루엔자 A/HK 에어로졸로 감염된 마우스의 생존율에 미치는 ODN/Pam2/PolyIC 1회 30분 에어로졸 전처리(D-1)의 효과; 바이러스 용량: 약 130 TCID₅₀/마우스

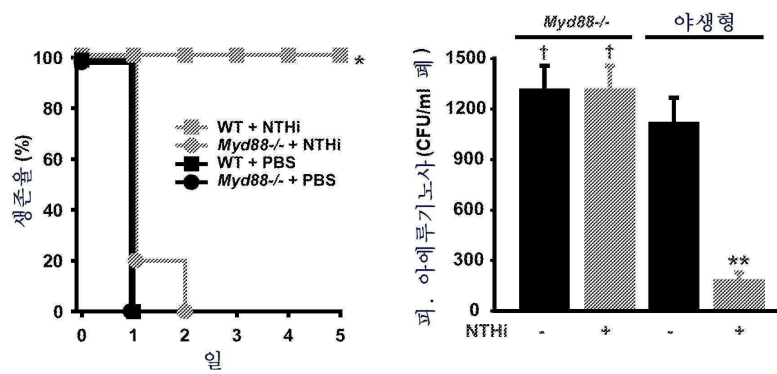


도면11

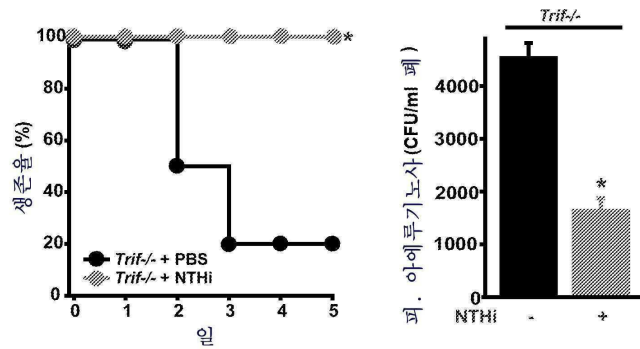
실험 3. 인플루엔자 A/HK 에어로졸로 감염된 마우스의 체중에 미치는 ODN/Pam2/PolyIC 1회 30분 에어로졸 전처리(D-1)의 효과; 바이러스 용량: 약 130 TCID₅₀/마우스



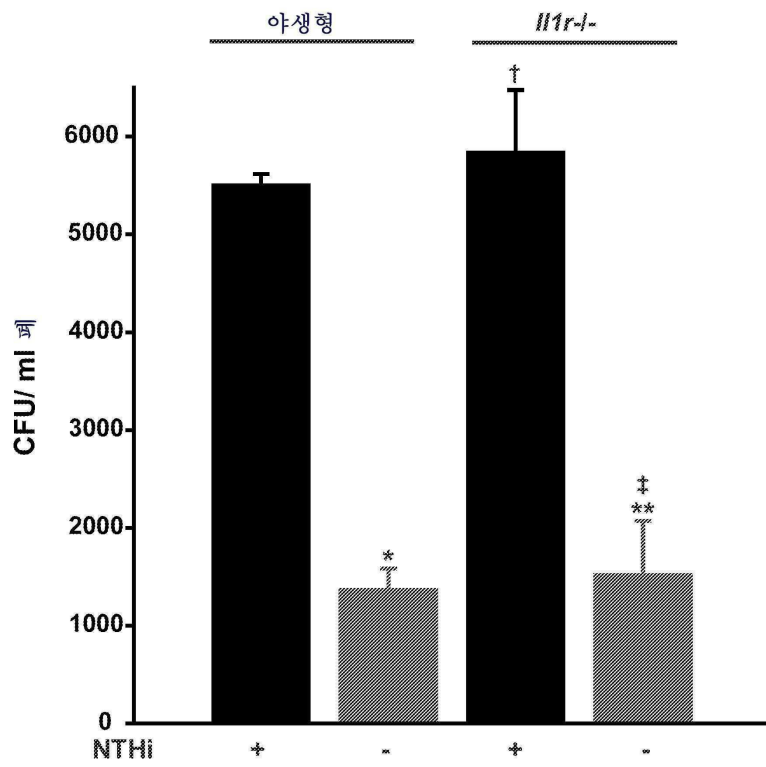
도면12a



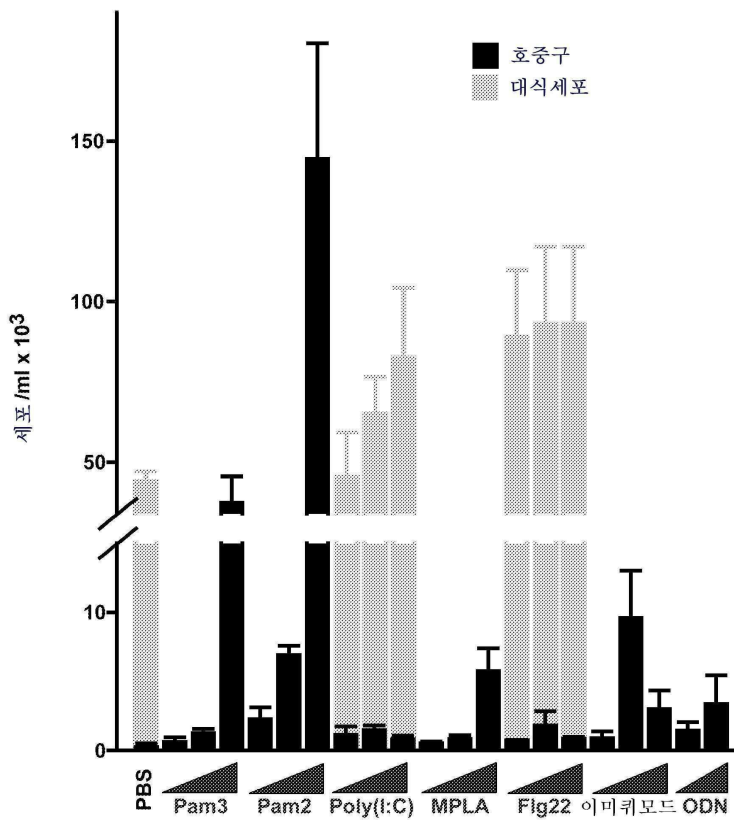
도면12b



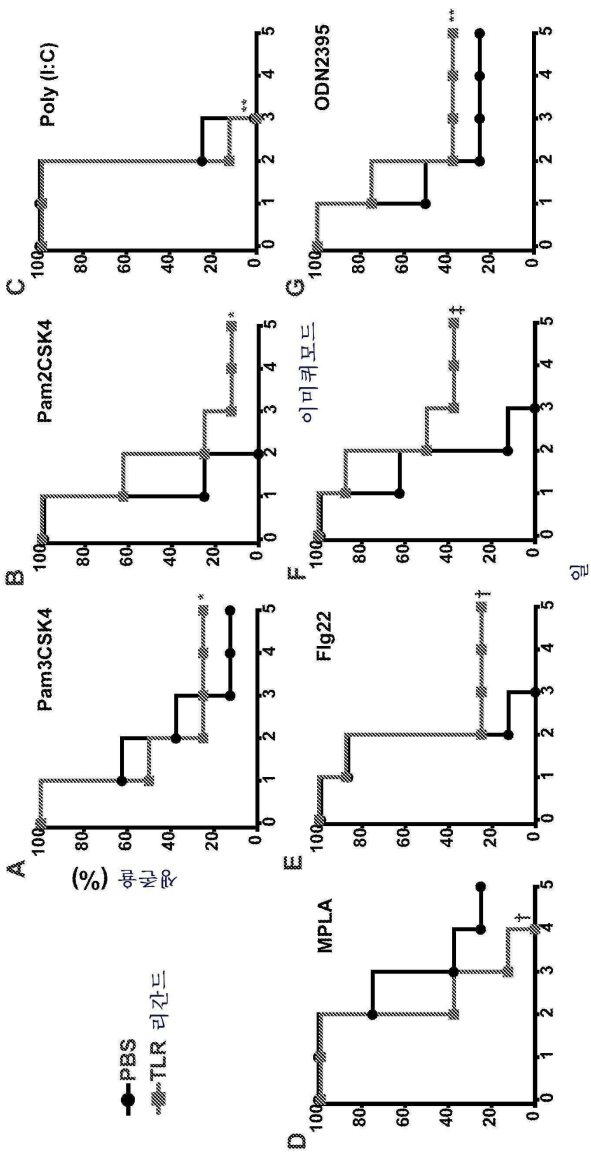
도면13



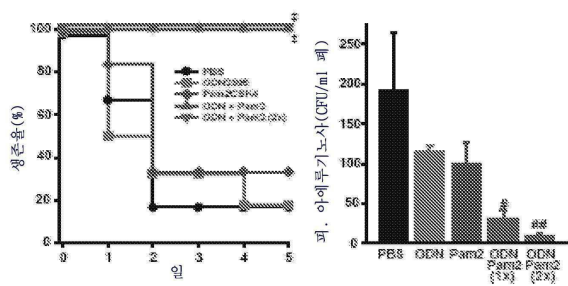
도면14



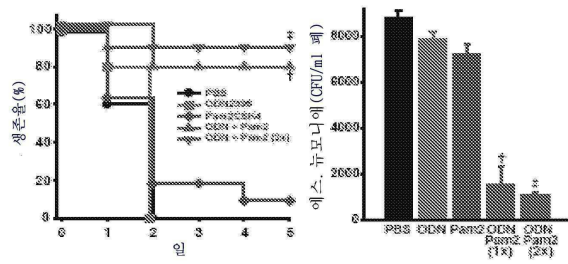
도면15



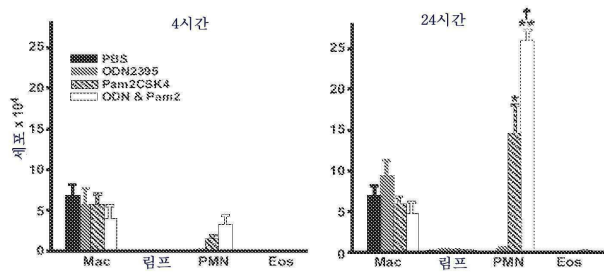
도면16a



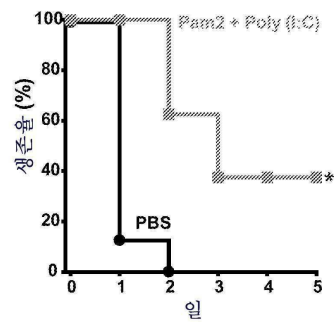
도면16b



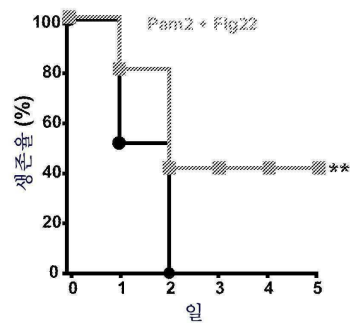
도면16c



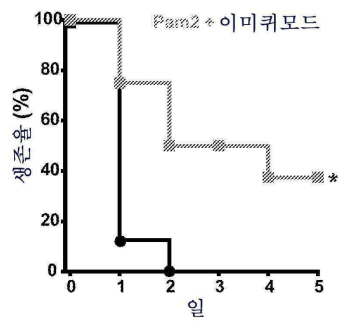
도면17a



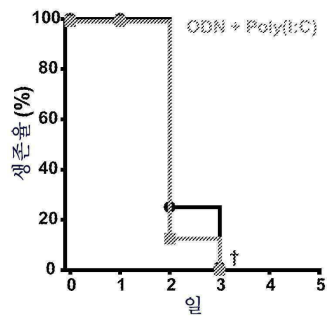
도면17b



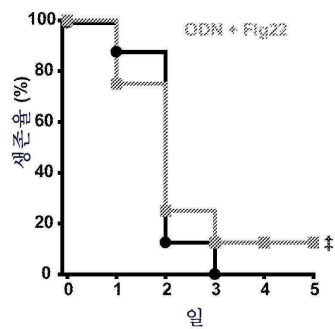
도면17c



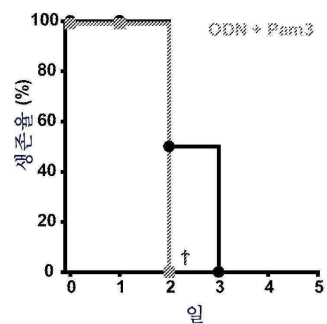
도면17d



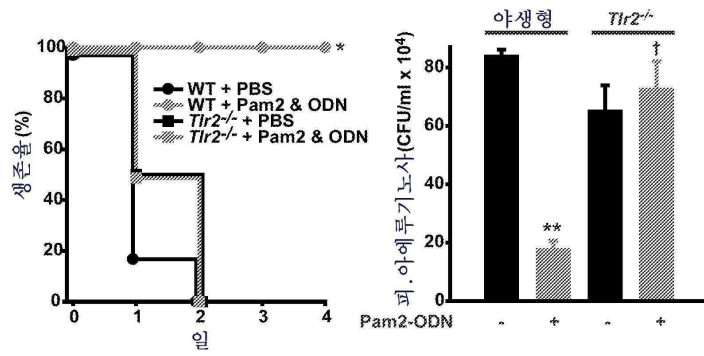
도면17e



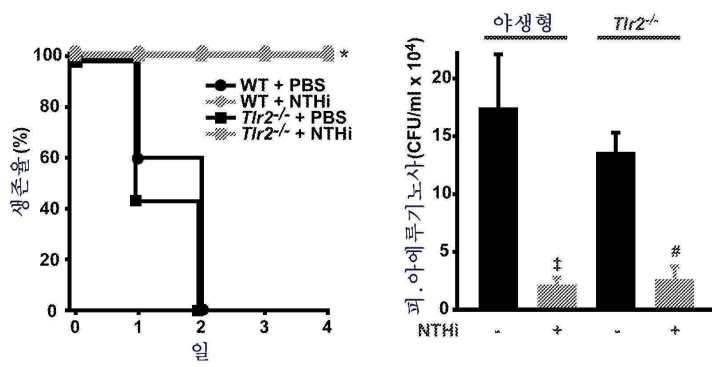
도면17f



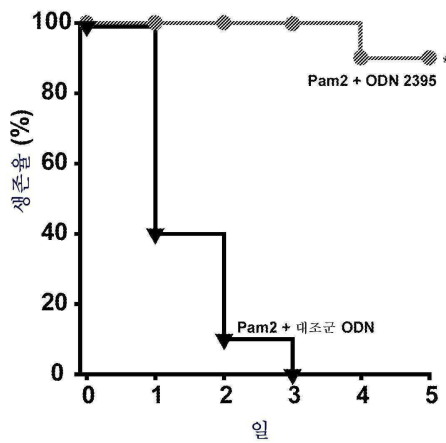
도면18a



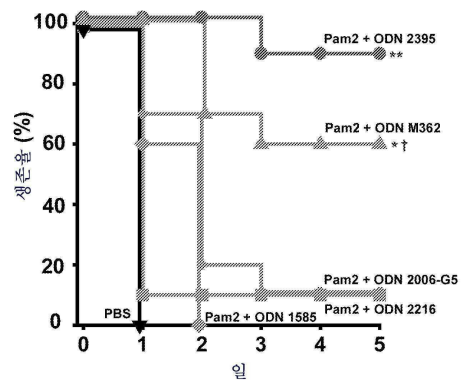
도면18b



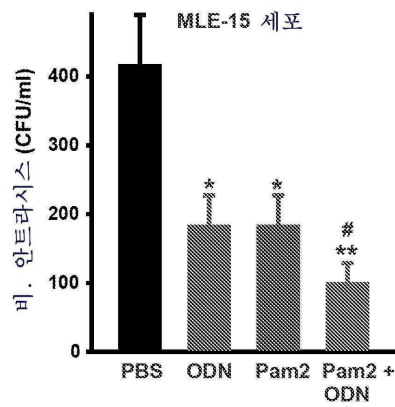
도면19a



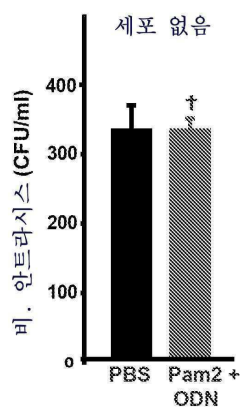
도면19b



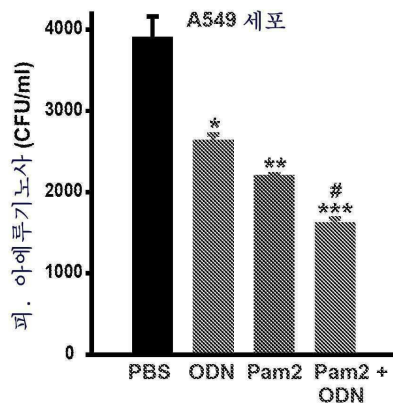
도면20a



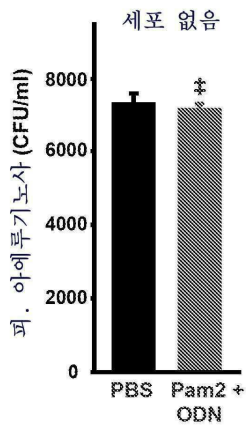
도면20b



도면20c

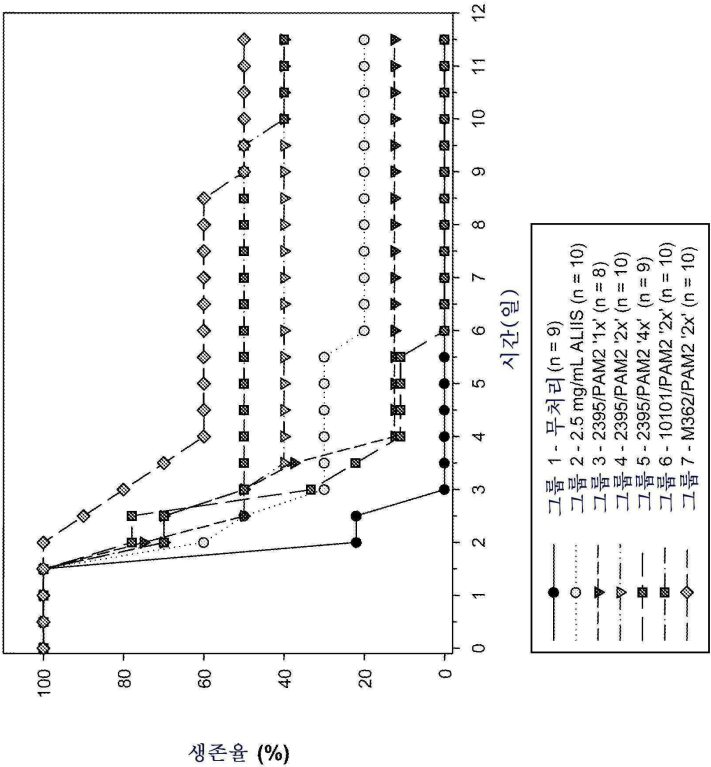


도면20d

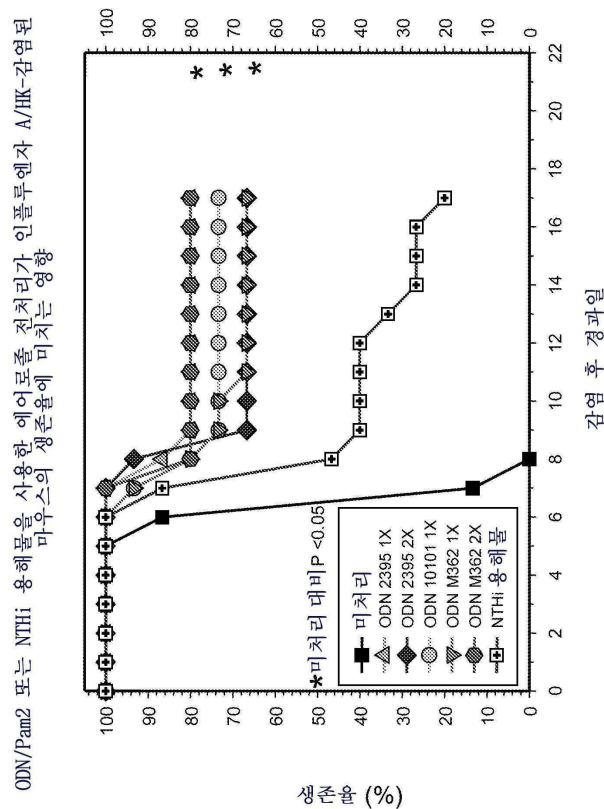


도면21

다양한 합성 TLR 효능제로 면역화되고 5 LD50의 바실라리스 안트라시스 에이즈 포자 (MD-10-013)로
비내 시험감염된 스위스-웹스터 마우스의 생존율



도면22



서열 목록

- <110> The Board of Regents of the University of Texas System
- <120> Compositions for stimulation of mammalian innate immune resistance to pathogens
- <130> TAMK:252WO
- <150> US 61/163,137
- <151> 2009-03-25
- <150> US 61/179,246
- <151> 2009-05-18
- <160> 3
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 1651
- <212> PRT
- <213> Enterococcus faecalis
- <400> 1

Met Lys Lys Lys Thr Phe Ser Phe Val Met Leu Ser Ile Leu Leu Ala

Gln Asn Phe Gly Phe Ala Val Asn Ala Tyr Ala Val Thr Thr Thr Glu

20 25 30

Ala Gln Thr Glu Thr Thr Asp Thr Ala Lys Lys Glu Ala Glu Leu Ser

35 40 45

Asn Ser Thr Pro Ser Leu Pro Leu Ala Thr Thr Thr Thr Ser Glu Met

50 55 60

Asn Gln Pro Thr Ala Thr Thr Glu Ser Gln Thr Thr Glu Ala Ser Thr

65 70 75 80

Thr Ala Ser Ser Asp Ala Ala Thr Pro Ser Glu Gln Gln Thr Thr Glu

85 90 95

Asp Lys Asp Thr Ser Leu Asn Glu Lys Ala Leu Pro Asp Val Gln Ala

100 105 110

Pro Ile Thr Asp Glu Leu Leu Asp Ser Met Ser Leu Ala Pro Ile Gly

115 120 125

Gly Thr Glu Tyr Ser Gln Thr Glu Val His Arg Glu Leu Asn Thr Thr

130 135 140

Pro Val Thr Ala Thr Phe Gln Phe Ala Val Gly Asn Thr Gly Tyr Ala

145 150 155 160

Pro Gly Ser Val Tyr Thr Val Gln Leu Pro Glu His Leu Gly Tyr Ser

165 170 175

Thr Val Ser Gly Glu Val Thr Gly Ile Gly Ala Thr Trp Ala Val Asp

180 185 190

Ala Ala Thr Lys Thr Leu Ser Ile Thr Phe Asn Gln Arg Val Ser Asp

195 200 205

Thr Ser Phe Lys Val Glu Leu Lys Ser Tyr Leu Thr Thr Glu Ala Glu

210 215 220

Pro Leu Ile Lys Ile Glu Thr Pro Gly Lys Asn Lys Lys Thr Tyr Ser

225 230 235 240

Phe Asp Leu Tyr Glu Gln Val Glu Pro Ile Gln Tyr Asn Glu Arg Thr

245 250 255

Arg Thr Thr Gly Leu Asp Gly Glu Ile Phe Tyr Asn Leu Asp Arg Thr

260 265 270
 Leu Thr Gly Asn Gln Thr Leu Glu Leu Leu Thr Thr Glu Thr Pro Gly

 275 280 285
 Ala Val Phe Gly Lys Gln Asp Asn Leu Glu Pro Gln Val Phe Ser Tyr
 290 295 300
 Asp Val Asp Ile Asn Gly Gln Ile Leu Pro Glu Thr Gln Thr Leu Leu
 305 310 315 320
 Thr Pro Gly Lys Asp Tyr Thr Leu Ser Asp Asn Ser Leu Gly Arg Ile
 325 330 335
 Ala Val Thr Val Pro Asn Met Asn Gln Gln Lys Ala Tyr Ser Leu Ser

 340 345 350
 Ile Asn Arg Thr Ile Tyr Leu Glu Ser Ala Ser Asp Tyr Asn Tyr Leu
 355 360 365
 Tyr Ser Gln Gln Tyr Pro Thr Thr Lys Ile Gly Ser Ile Ser Leu Lys
 370 375 380
 Ser Thr Thr Gly Thr Lys Gln Thr Thr Asp Phe Thr Ala Lys Thr Ser
 385 390 395 400
 Gln Thr Ser Lys Val Ile Ala Asp Arg Glu Met Arg Ser Met Ser Tyr

 405 410 415
 Ile Ser Phe Gln Ser Lys Gly Lys Tyr Tyr Val Thr Ile Tyr Gly Thr
 420 425 430
 Leu Thr Glu Thr Lys Val Gly Gln Gln Ile Val Leu Glu Ser Thr Asn
 435 440 445
 Gly Gln Glu Ile Lys Asn Pro Lys Phe Thr Ala Tyr Gly Pro Leu Tyr
 450 455 460
 Glu Asn Val Lys Leu Glu Asp Tyr Phe Asp Ile Lys Thr Glu Gly Gly

 465 470 475 480
 Lys Leu Thr Leu Thr Ala Thr Lys Asp Ser Tyr Leu Arg Ile Asn Ile
 485 490 495
 Ser Asp Leu Thr Met Asp Phe Asp Lys Lys Asp Ile Asn Leu Ser Leu
 500 505 510

Ser Thr Pro Val Ile Gly Pro Asn Lys Ala Ile Gln Leu Val Ser Asp
515 520 525
Gln Tyr Ile Glu Pro Ile Ser Val Val Asn Pro Leu Asn Ala Glu Thr
530 535 540
Ala Trp Gly Asn Tyr Asp Gln Asn Gly Ala Tyr Ser Ser Arg Thr Thr
545 550 555 560
Val Ser Val Met Gly Ser Lys Glu Lys Pro Ile Gln Asn Leu Glu Ile
565 570 575
Lys Val Lys His Pro Asn Tyr Leu Ser Leu Arg Ala Thr Lys Glu Ile
580 585 590
Tyr Phe Tyr Tyr Lys Leu Gly Thr Asp Tyr Thr Val Thr Pro Thr Ser
595 600 605
Asp Gly Ser Val Ile Lys Phe Thr Thr Pro Ile Thr Asn Glu Ile Gln
610 615 620
Ile Pro Ile Gly Phe Asn Tyr Val Pro Asp Ser Leu Pro Lys Asp Lys
625 630 635 640
Ser Ile Pro Val Asp Thr Ile Pro Ile Thr Met Ser Ala Glu Gly Leu
645 650 655
Thr Pro Val Asp Thr Thr Val Thr Thr Asn Ser Lys Arg Gly Ser Glu
660 665 670
Arg Thr Leu Gln Ser Ser Lys Asn Gln Phe Leu Val Asn Ala Arg Asn
675 680 685
Asp Ser Phe Asp Ser Leu Ser Val Arg Thr Lys Ile Pro Ala Gly Ala
690 695 700
Asp Val Leu Phe Asp Ile Tyr Asp Val Ser Asn Asp Gln Val Asp Ser
705 710 715 720
Ile Tyr Pro Gln Tyr Trp Asp Arg Gly Gln Tyr Phe Asp Lys Pro Met
725 730 735
Thr Pro Asn Ser Pro Gly Tyr Pro Thr Ile Thr Phe Asp Glu Asn Thr
740 745 750
Asn Ser Tyr Thr Phe Asp Phe Gly Lys Thr Asn Lys Arg Tyr Ile Ile

755 760 765
Glu Tyr Lys Asn Ala Asn Gly Trp Ile Asp Val Pro Thr Leu Tyr Ile

770 775 780
Thr Gly Thr Ala Lys Glu Pro Gln Ser Asn Asn Asn Glu Gly Ser Ala

785 790 795 800
Ser Val Ser Val Gln Asn Glu Ala Leu Asp Ile Leu Ser Ala Thr Gln

805 810 815
Ala Ala Asn Pro Thr Leu Lys Asn Val Thr Lys Thr Thr Val Thr Thr

820 825 830
Lys Asn Ile Asp Asn Lys Thr His Arg Val Lys Asn Pro Thr Ile Glu

835 840 845
Leu Thr Pro Lys Gly Thr Thr Asn Ala Gln Ile Asp Leu Asn Ser Ile

850 855 860
Thr Val Lys Gly Val Pro Glu Asp Ala Tyr Ser Leu Glu Lys Thr Thr

865 870 875 880
Asn Gly Ala Lys Val Ile Phe Lys Asp Tyr Thr Leu Thr Glu Asn Ile

885 890 895
Thr Ile Glu Tyr Asn Thr Val Ser Ala Asn Ala Gly Gln Ile Tyr Thr

900 905 910
Glu Thr Thr Ile Asp Ser Glu Thr Leu Asn Gln Met Ser Ala Ser Lys

915 920 925
Lys Lys Val Thr Thr Ala Pro Ile Thr Leu Lys Phe Ser Glu Gly Asp

930 935 940
Ala Glu Gly Ile Val Tyr Leu Ala Thr Ala Thr Phe Tyr Thr His Asn

945 950 955 960
Val Glu Asp Glu Asn Gln Ala Ile Ala Lys Val Ser Phe Glu Leu Ile

965 970 975
Asp Asn Val Thr His Thr Ala Thr Glu Phe Thr Thr Asp Glu Lys Gly

980 985 990
Gln Tyr Ser Phe Asp Ala Ile Met Thr Gly Asp Tyr Thr Leu Arg Val

995 1000 1005

Thr Asn Val Pro Gln Glu Tyr	Ser Val Asp Glu Glu Tyr Leu Thr
1010	1015 1020
Gly Lys Ala Ile Lys Leu Val	Lys Gly Asp Asn Gln Leu Lys Ile
1025	1030 1035
Pro Leu Thr Lys Thr Ile Asp	His Ser Arg Leu Gln Val Lys Asp
1040	1045 1050
Ser Thr Ile Tyr Val Gly Asp	Ser Trp Lys Pro Glu Glu Asn Phe
1055	1060 1065
Val Ser Ala Thr Asp Lys Thr	Gly Gln Asp Val Pro Phe Glu Lys
1070	1075 1080
Ile Thr Val Ser Gly Gln Val	Asp Asn Thr Lys Ala Gly Val Tyr
1085	1090 1095
Pro Ile Ile Tyr Ser Asp Glu	Gly Lys Glu Glu Thr Ala Tyr Val
1100	1105 1110
Thr Val Lys Pro Asp Gln Ser	Lys Leu Glu Val Lys Asp Thr Thr
1115	1120 1125
Ile Tyr Val Gly Asp Ser Trp	Lys Pro Glu Asp Asn Phe Val Ser
1130	1135 1140
Ala Thr Asp Lys Thr Gly Gln	Asp Val Pro Phe Glu Lys Ile Asp
1145	1150 1155
Val Gln Gly Thr Val Asn Val	Asp Lys Ile Gly Asp Tyr Glu Ile
1160	1165 1170
Val Tyr Lys Asn Gly Lys Lys	Glu Ala Lys Ala Ile Val His Val
1175	1180 1185
Arg Asp Asp Ser Gln Leu Glu	Val Lys Asp Thr Thr Ile Tyr Val
1190	1195 1200
Gly Asp Ser Trp Lys Pro Glu	Asp Asn Phe Val Ser Ala Thr Asp
1205	1210 1215
Lys Thr Gly Gln Asp Val Pro	Phe Glu Lys Ile Thr Val Ser Gly
1220	1225 1230
Gln Val Asp Thr Ser Lys Ala	Gly Val Tyr Pro Ile Val Tyr Ser

1235 1240 1245
Tyr Glu Gly Lys Glu Glu Thr Ala Asn Val Thr Val Lys Pro Asp

1250 1255 1260
Gln Ser Lys Leu Glu Val Lys Asp Thr Thr Ile Tyr Val Gly Asp

1265 1270 1275
Lys Trp Glu Pro Glu Asp Asn Phe Val Ser Ala Thr Asp Lys Thr

1280 1285 1290
Gly Gln Asp Val Pro Phe Glu Lys Ile Asp Val Gln Gly Thr Val

1295 1300 1305
Asn Val Asp Lys Ile Gly Asp Tyr Glu Ile Val Tyr Lys Asn Gly

1310 1315 1320
Thr Lys Glu Ala Lys Ala Ile Val His Val Arg Asp Asp Ser Gln

1325 1330 1335
Leu Glu Val Lys Asp Thr Thr Ile Tyr Val Gly Asp Lys Trp Glu

1340 1345 1350
Ala Glu Asp Asn Phe Val Ser Ala Thr Asp Lys Thr Gly Gln Asp

1355 1360 1365
Val Pro Phe Glu Lys Ile Asp Val Gln Gly Thr Val Asn Val Asp

1370 1375 1380
Lys Ile Gly Asp Tyr Glu Ile Val Tyr Lys Asn Gly Thr Lys Glu

1385 1390 1395
Ala Lys Ala Ile Val His Val Arg Asp Asp Ser Arg Leu Gln Val

1400 1405 1410
Lys Asp Thr Thr Ile Tyr Val Gly Asp Ser Trp Lys Pro Glu Glu

1415 1420 1425
Asn Phe Val Ser Ala Thr Asp Lys Thr Gly Gln Asp Val Pro Phe

1430 1435 1440
Glu Lys Ile Thr Val Ser Gly Gln Val Asp Thr Ser Lys Ala Gly

1445 1450 1455
Val Tyr Pro Ile Ile Tyr Ser Tyr Glu Gly Lys Glu Glu Thr Ala

1460 1465 1470

His Val Ala Val Lys Pro Asp Gln Ser Lys Leu Glu Val Lys Asp
1475 1480 1485

Thr Thr Ile Tyr Val Gly Asp Ser Trp Lys Pro Glu Asp Asn Phe
1490 1495 1500

Val Ser Ala Thr Asp Arg Asp Gly His Ala Ile Ser Phe Asp Lys
1505 1510 1515

Val Gln Val Lys Gly Glu Val Asp Thr Lys Lys Thr Gly Glu Tyr
1520 1525 1530

Gln Ile Ser Tyr Thr Thr Glu Pro Val Asn Glu Thr Lys Pro Ala
1535 1540 1545

Val Gln Ser Arg Leu Phe Ser Met Phe Ser Asn Glu Thr Pro Arg
1550 1555 1560

Gln Leu Thr Thr Val Ala Thr Val His Val Ile Asp Arg Asn Pro
1565 1570 1575

Thr Pro Leu Pro Asp Lys Asn Glu Asn Asn Gln Thr Ser Ser Ser
1580 1585 1590

Thr Asn Gln Thr Thr Ile Lys Ser Ser Gln Tyr Val Thr His Ile
1595 1600 1605

Val Lys Pro Asp Lys Gln Gly Arg Tyr Pro Lys Thr Gly Glu Gln
1610 1615 1620

Thr Asn Gly Leu Tyr Arg Val Leu Gly Leu Val Val Leu Leu Ile
1625 1630 1635

Val Ile Ile Ser Gly Ile Val Ile Lys Lys Lys Arg Lys
1640 1645 1650

<210> 2

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 2

Gln Arg Leu Ser Thr Gly Ser Arg Ile Asn Ser Ala Lys Asp Asp Ala
1 5 10 15

Ala Gly Leu Gln Ile Ala

20

<210> 3

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic primer

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(5)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(10)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 3

tcgnntcgnn tcg

13