



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2016-0045726  
 (43) 공개일자 2016년04월27일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
**A61K 47/48** (2006.01) **A61K 31/713** (2006.01)  
**A61K 48/00** (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
**A61K 47/48861** (2013.01)  
**A61K 31/713** (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-7004851
- (22) 출원일자(국제) 2014년07월25일  
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2016년02월24일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2014/048294
- (87) 국제공개번호 WO 2015/013675  
 국제공개일자 2015년01월29일
- (30) 우선권주장  
 61/858,584 2013년07월25일 미국(US)

- (71) 출원인  
**엑시큐어, 인크.**  
 미국 60077-5318 일리노이주 스코키 스위트 410  
 라몬 애비뉴 8045
- (72) 발명자  
**그라즈노프, 세르게이**  
 미국 60077-5318 일리노이주 스코키 스위트 410  
 라몬 애비뉴 8045  
**메이더, 크리스토퍼, 씨.**  
 미국 60077-5318 일리노이주 스코키 스위트 410  
 라몬 애비뉴 8045  
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
**양영준, 김영**

전체 청구항 수 : 총 37 항

(54) 발명의 명칭 **면역조절제로서의 구형 핵산-기재 구축물**

**(57) 요약**

본 발명의 측면은 나노규모 구축물 및 관련 방법 및 그의 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 면역 세포 활성화의 수준에 감수성인 장애, 예컨대 자가면역 질환 또는 다른 염증 기반 질환 또는 장애를 치료하는데 유용하다.

(52) CPC특허분류

**A61K 48/00** (2013.01)

(72) 발명자

**할로, 티파니, 엘.**

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

**라도비크-모레노, 알렉산다르, 필리프**

미국 16801 펜실베이니아주 스테이트 칼리지 크랩  
애플 드라이브 1055

**리세, 클레이턴**

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

**아난타트몰라, 사가르**

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

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

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

나노규모 구축물.

#### 청구항 2

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

나노규모 구축물.

#### 청구항 3

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

#### 청구항 4

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

나노규모 구축물.

#### 청구항 5

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

#### 청구항 6

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

#### 청구항 7

제6항에 있어서, 핵산-상호작용 복합체의 길항제가 이중 가닥 RNA 또는 이중 가닥 DNA인 나노규모 구축물.

#### 청구항 8

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

#### 청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산-상호작용 복합체의 길항제의 표면 밀도가 적어도  $15 \text{ pmol/cm}^2$ 인 나노규모 구축물.

#### 청구항 10

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산-상호작용 복합체의 길항제의 표면 밀도가 적어도  $45 \text{ pmol/cm}^2$ 인 나노규모 구축물.

#### 청구항 11

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

**청구항 12**

제11항에 있어서, 비메틸화 테옥시리보핵산이 최적화된 면역조절 서열을 함유하는 것인 나노규모 구축물.

**청구항 13**

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

**청구항 14**

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

**청구항 15**

제13항에 있어서, 나노입자 코어가 금을 포함하는 것인 나노규모 구축물.

**청구항 16**

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

**청구항 17**

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

**청구항 18**

핵산-상호작용 복합체의 길항제의 구형 코로나를 포함하며, 여기서 길항제는 적어도 1개의 포스포디에스테르 뉴클레오티드간 연결을 갖는 핵산인

나노규모 구축물.

**청구항 19**

제18항에 있어서, 길항제가 CpG 올리고뉴클레오티드인 나노규모 구축물.

**청구항 20**

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

**청구항 21**

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

**청구항 22**

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

**청구항 23**

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

하는 방법.

**청구항 24**

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

**청구항 25**

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

**청구항 26**

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

**청구항 27**

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

대상체를 치료하는 방법.

**청구항 28**

제27항에 있어서, 대상체가 감염성 질환을 갖는 것인 방법.

**청구항 29**

제27항에 있어서, 대상체가 염증 유발된 암을 갖는 것인 방법.

**청구항 30**

제27항에 있어서, 대상체가 자가면역 질환을 갖는 것인 방법.

**청구항 31**

제27항에 있어서, 대상체가 알레르기를 갖는 것인 방법.

**청구항 32**

제27항에 있어서, 대상체가 알레르기성 질환을 갖는 것인 방법.

**청구항 33**

제27항에 있어서, 대상체가 염증성 질환을 갖는 것인 방법.

**청구항 34**

제27항에 있어서, 대상체가 대사 질환을 갖는 것인 방법.

**청구항 35**

제27항에 있어서, 대상체가 심혈관 질환을 갖는 것인 방법.

**청구항 36**

제27항에 있어서, 대상체가 조직 또는 기관 이식을 위한 후보자이거나 또는 그의 수용자인 방법.

**청구항 37**

대상체에게 제18항 내지 제21항 중 어느 한 항의 나노규모 구축물을 면역 반응을 조정하기 위한 유효량으로 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 면역 반응을 조정하는 방법.

**발명의 설명**

**기술분야**

- [0001] 관련 출원
- [0002] 본원은 35 U.S.C. § 119(e) 하에 발명의 명칭 "예방 및 치료 용도를 위한 면역자극제로서의 구형 핵산-기체 구조물"로 2013년 7월 25일에 출원된 미국 가출원 일련 번호 61/858,584를 우선권 주장하며, 이는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.
- [0003] 발명의 분야
- [0004] 본 발명은 핵산-상호작용 복합체의 길항제를 전달하기 위한 나노규모 구조물, 뿐만 아니라 그의 방법 및 조성물에 관한 것이다.

**배경기술**

- [0005] 면역 세포, 특히 대식세포, 수지상 세포 및 B-세포는 이물질 예컨대 박테리아 성분 및 외래 DNA 또는 RNA에 대한 환경을 조사하기 위해 톨-유사 수용체 (TLR)를 사용한다<sup>4-10</sup>. 이들 수용체의 활성화시에, 많은 염증 반응이 특정 세포 신호전달 경로를 통해, 주로 전사 인자, NF $\kappa$ B를 통해 발생된다<sup>11</sup>. 이어서, NF $\kappa$ B 활성화는 염증 반응을 이웃 면역 세포로 진행시키는 TNF $\alpha$ 와 같은 여러 분비 신호전달 분자의 생산을 유도한다<sup>11</sup>. 이러한 면역학적 감각계는 선천성 면역 반응으로 지칭된다. 여러 자가면역 장애에서, 신체는 자기-성분 예컨대 DNA 및 RNA를 이물질로서 부정확하게 인식하고, 제어되지 않는 경우에 파괴성, 통증성 및 생명 위협성일 수 있는 대량 염증 반응을 개시할 것이다. 그의 가장 보편적인 예는, 관절을 주로 공격하며 주의깊게 조절되지 않는 경우에 연골 및 골을 파괴시킬 수 있는 류마티스 관절염, 뿐만 아니라 내부 기관 예컨대 심장, 신장 및 폐를 또한 공격하며 제어되지 않는 경우에 치명적일 수 있는 루푸스를 포함한다. 현행 요법은 유발된 시토카인 생산을 TNF $\alpha$ -결합 항체 (에타네르셉트 등)를 통해 면역 세포로부터 격리시키는 것, 뿐만 아니라 화학요법제 예컨대 메토트렉세이트를 사용한 일반적 면역억제, 및 적응 면역 반응을 지연시키기 위한 B-세포 집단의 제거에 주로 의존한다. 그러나, 이들 치료는 종종 내약성이 불량하고/거나 시간이 지남에 따라 내성 획득이 쉬워진다. 따라서, 이러한 신호전달 캐스케이드의 초기 시점에서의 TLR의 활성화에 대한 길항제의 개발은 자가면역 장애를 앓고 있는 환자에서 자기-DNA 및 RNA의 부적절한 인식을 차단하기 위한 강력한 요법이어야 한다.
- [0006] TLR 7, 8 및 9는 모두 면역 세포의 엔도솜으로 상주한다. TLR9는 박테리아 DNA에서는 공통적이지만 인간 DNA에서는 그렇지 않은 비메틸화 CpG 모티프를 인식한다<sup>5,10</sup>. TLR 7 및 8은 둘 다 바이러스 감염에 공통적인 짧은 단일 가닥 RNA의 특정 서열을 인식한다<sup>6-8</sup>. 중요하게는, 이들의 각각의 TLR을 길항하고 하루 신호전달을 차단할 수 있는 이들 공통 인식 모티프의 모방체가 공지되어 있다<sup>12-17</sup>. 그러나, 요법에서의 그의 용도는 생체내에서 분해되지 않으면서 병리상태의 부위로 전달되어야 하는 그의 능력으로 인해 제한된다.

**발명의 내용**

- [0007] 나노규모 구조물을 사용한 수용체 상호작용, 예컨대 TLR의 조정을 통해 면역 반응을 조절하기 위한 신규 방법 및 조성물이 본원에 기재된다. 본 발명의 측면은, 핵산-상호작용 복합체의 길항제의 코로나를 가지며, 여기서 핵산-상호작용 복합체의 길항제의 표면 밀도는 적어도 0.3 pmol/cm<sup>2</sup>인 나노규모 구조물에 관한 것이다.
- [0008] 다른 측면에서, 본 발명은 핵산-상호작용 복합체의 길항제의 코로나 및 코로나 내로 혼입된 항원을 갖는 나노규모 구조물이다. 일부 실시양태에서, 항원의 표면 밀도는 적어도 0.3 pmol/cm<sup>2</sup>이다. 다른 실시양태에서, 항원은 적어도 2종의 상이한 유형의 항원을 포함한다.
- [0009] 또 다른 측면에서, 본 발명은, 핵산-상호작용 복합체의 적어도 2종의 길항제가 혼입된 코로나를 가지며, 여기서 길항제는 TLR 3, 7/8 및/또는 9 길항제로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 나노규모 구조물이다.
- [0010] 일부 실시양태에서, 핵산-상호작용 복합체의 길항제는 스페이서를 함유한다.
- [0011] 다른 실시양태에서, 핵산-상호작용 복합체의 길항제는 RNA 또는 DNA이다. 핵산-상호작용 복합체의 길항제는 예를 들어 이중 가닥 RNA 또는 이중 가닥 DNA일 수 있다. 대안적으로, 핵산-상호작용 복합체의 길항제는 단일 가닥 RNA일 수 있다. 일부 실시양태에서, 핵산-상호작용 복합체의 길항제는 비메틸화 데옥시리보핵산, 예컨대 최

적화된 면역조절 서열이다.

- [0012] 특정 실시양태에서, 나노규모 구축물은 나노입자 코어를 포함하고, 임의로 나노입자 코어는 금속성이다. 특정 실시양태에서, 금속은 금, 은, 백금, 알루미늄, 팔라듐, 구리, 코발트, 인듐, 니켈 및 그의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 나노입자 코어는 금을 포함한다. 특정 실시양태에서, 나노입자 코어는 분해성 금을 포함하는 격자 구조이다. 일부 실시양태에서, 나노규모 구축물은 분해성이다.
- [0013] 특정 실시양태에서, 나노규모 구축물의 직경은 1 nm 내지 약 250 nm 직경, 약 1 nm 내지 약 240 nm 직경, 약 1 nm 내지 약 230 nm 직경, 약 1 nm 내지 약 220 nm 직경, 약 1 nm 내지 약 210 nm 직경, 약 1 nm 내지 약 200 nm 직경, 약 1 nm 내지 약 190 nm 직경, 약 1 nm 내지 약 180 nm 직경, 약 1 nm 내지 약 170 nm 직경, 약 1 nm 내지 약 160 nm 직경, 약 1 nm 내지 약 150 nm 직경, 약 1 nm 내지 약 140 nm 직경, 약 1 nm 내지 약 130 nm 직경, 약 1 nm 내지 약 120 nm 직경, 약 1 nm 내지 약 110 nm 직경, 약 1 nm 내지 약 100 nm 직경, 약 1 nm 내지 약 90 nm 직경, 약 1 nm 내지 약 80 nm 직경, 약 1 nm 내지 약 70 nm 직경, 약 1 nm 내지 약 60 nm 직경, 약 1 nm 내지 약 50 nm 직경, 약 1 nm 내지 약 40 nm 직경, 약 1 nm 내지 약 30 nm 직경, 또는 약 1 nm 내지 약 20 nm 직경, 또는 약 1 nm 내지 약 10 nm 직경이다.
- [0014] 다른 측면에서, 본 발명은, 핵산-상호작용 복합체의 길항제의 구형 코로나를 가지며, 여기서 길항제는 적어도 1 개의 포스포디에스테르 뉴클레오티드간 연결을 갖는 핵산인 나노규모 구축물이다. 일부 실시양태에서, 핵산의 각각의 뉴클레오티드간 연결은 포스포디에스테르 연결이다.
- [0015] 본 발명의 일부 실시양태에서, 코로나는 구형 코로나이다.
- [0016] 본원에 기재된 바와 같은 나노규모 구축물 및 담체로 구성된 백신이 본 발명의 다른 측면에서 제공된다.
- [0017] 본 발명의 나노규모 구축물을 세포로 전달함으로써 치료제를 세포로 전달하는 방법이 다른 측면에서 제공된다.
- [0018] 표적 분자의 발현을 조절하는 방법이 본 발명의 다른 측면에서 제공된다. 상기 방법은 본 발명의 나노규모 구축물을 세포로 전달하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적 분자는 TLR3, 7, 8 및 9로 이루어진 군으로부터 선택된 TLR이다.
- [0019] 본원에 기재된 바와 같은 나노규모 구축물을 세포로 전달함으로써 TLR을 길항하는 방법이 본 발명의 다른 측면에서 제공된다.
- [0020] 다른 측면에 따르면, 본 발명은 대상체에게 본원에 기재된 바와 같은 나노규모 구축물을 면역 반응을 감소시키기 위한 유효량으로 투여하는 것을 포함하는, 대상체를 치료하는 방법이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 감염성 질환, 암, 자가면역 질환, 천식 또는 알레르기성 질환, 염증성 질환, 대사 질환, 심혈관 질환을 갖거나, 또는 조직 또는 기관 이식을 위한 후보자이거나 또는 그의 수용자이다.
- [0021] 다른 측면에서, 본 발명은 대상체에게 핵산-상호작용 복합체의 길항제 (여기서 길항제는 적어도 1개의 포스포디에스테르 뉴클레오티드간 연결을 갖는 핵산임)의 코로나의 나노규모 구축물을 면역 반응을 조정하기 위한 유효량으로 투여함으로써, 대상체에서 면역 반응을 조정하는 방법이다.
- [0022] 특정 실시양태에서, 상기 방법은 치료 또는 검출 모달리티를 세포로 전달하는 것을 포함한다.
- [0023] 본 발명의 추가 측면은 나노입자 코어; 길항제 및 길항제-나노입자의 어셈블리를 위한 지침서를 포함하는 키트에 관한 것이다. 특정 실시양태에서, 키트는 사용 지침서를 추가로 포함한다.
- [0024] 본 발명의 각각의 제한사항은 본 발명의 다양한 실시양태를 포괄할 수 있다. 따라서, 어느 한 요소 또는 요소의 조합을 포함하는 본 발명의 각각의 제한사항은 본 발명의 각각의 측면에 포함될 수 있는 것으로 예상된다. 본 발명은 그의 적용에서 하기 설명에 기재되거나 도면에 예시된 구성요소의 구성 및 배열의 세부사항에 제한되지 않는다. 본 발명은 다른 실시양태가 가능하고, 다양한 방식으로 실시되거나 수행될 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0025] 첨부 도면은 실제에 비례하여 도시되도록 의도되지 않는다. 도면에서, 다양한 도면에 도시되어 있는 동일하거나 거의 동일한 각각의 성분은 유사 번호로 표시된다. 명확성을 위해, 모든 구성요소가 모든 도면에 표시되어 있지 않을 수 있다. 도면에서:

도 1a-1d는 본 발명의 구축물 (AST-015)이 대식세포-유사 RAW 블루(RAW Blue) 세포에서 CpG 유도된 TLR9 활성화를 억제할 수 있음을 나타내는 일련의 그래프이다. 도 1a는 AST-012를 제시하고, 도 1b는 AST-013을 제시하

고, 도 1c는 AST-014를 제시하고, 도 1d는 AST-015를 제시한다.

도 2a-2d는 본 발명의 구축물 (AST-015)로의 전처리가 대식세포-유사 RAW-블루 세포에서 CpG-유도된 TLR9 활성화를 억제할 수 있음을 나타내는 일련의 그래프이다. 세포를 TLR9 효능제로 자극하기 전에 면역조절 구축물과 함께 인큐베이션하였다. IC50 값은 나노몰 (nM)로 제시된다. "비처리" 선은 어떠한 자극제도 없었던 세포의 TLR 활성화 수준을 지칭한다.

도 3a-3d는 본 발명의 구축물 (AST-015) 및 CpG DNA로의 동시 처리가 대식세포-유사 RAW-블루 세포에서 CpG-유도된 TLR9 활성화를 억제할 수 있음을 나타내는 일련의 그래프이다. 유리 면역조절 DNA (도 3a 및 3b) 및 면역조절 SNA (도 3c 및 3d)의 효능을 RAW-블루 리포터 세포주에서 TLR 활성화에 대해 비교하였다. 이들 조건 하에, 세포를 TLR9 효능제로의 자극과 동시에 면역조절 구축물과 함께 인큐베이션하였다. IC50 값은 나노몰 (nM)로 제시된다. "비처리" 선은 어떠한 자극제도 없었던 세포의 TLR 활성화 수준을 지칭한다.

도 4는 본 발명의 구축물 (AST-015)이 만성적으로 자극된 대식세포-유사 RAW-블루 세포에서 CpG-유도된 TLR9 활성을 억제할 수 있음을 나타내는 그래프이다. 유리 면역조절 DNA의 효능을 RAW-블루 리포터 세포주에서 TLR 활성화에 대해 결정하였다. 이들 조건 하에, 세포를 먼저 TLR9 효능제 구축물로 만성 수준으로 예비-자극시키고, 이어서 TLR9 효능제로의 재자극과 동시에 면역조절 구축물과 함께 인큐베이션하였다. IC50 값은 나노몰 (nM)로 제시된다. "비처리" 선은 어떠한 자극제도 없었던 세포의 TLR 활성화 수준을 지칭한다. "o/n 비처리" 선은 밤새 자극제가 있었지만 다음 날에 제2 용량의 자극제를 제공받지 않은 세포를 지칭한다.

도 5a 및 5b는 AST 개발된 면역조절 서열 4084F7/8이 대식세포-유사 RAW-블루 세포에서 CpG-유도된 TLR9 활성화 및 ssRNA-유도된 TLR7/8 활성을 둘 다 억제할 수 있음을 나타내는 일련의 그래프이다. AST-015로 사용된 4084F 서열 및 AST에서 개발된 변형된 4084F7/8 서열을 TLR9 (도 5a) 및 TLR7/8 (도 5b) 효능제에 대한 효능에 대해, 디나박스(Dynavax)로부터의 임상예인 IRS869 및 IRS954와 비교하였다. IC50 값은 나노몰 (nM)로 제시된다. "비처리" 선은 어떠한 자극제도 없었던 세포의 TLR 활성화 수준을 지칭한다.

도 6은 면역조절 DNA (irDNA)를 함유하는 신규 구축물의 표현을 제시한다. 도 6은 부가 또는 티올화 irDNA 및 짧은 에틸렌 글리콜 중합체를 위한 주형으로서의 13 nm 직경 금 나노입자를 사용하여 irDNA를 합성할 수 있음을 제시한다.

도 7a-7d는 다양한 효능제를 차단하기 위한 본 발명의 구축물의 능력을 도시하는 그래프이다. 시험된 구축물 둘 다는 시험된 모든 3종의 효능제: 이미퀴모드 (TLR7, 도 7b), CpG 1826 (CpG, TLR9, 도 7d), 박테리아 리포폴리사카라이드 (LPS, TLR4, 도 7c) 또는 동시에 3종 모두 (도 7b)에 의한 자극을 차단할 수 있었다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

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

[0027] 일부 측면에서, 본 발명은 면역조절 DNA (irDNA)를 함유하는 신규 구축물 또는 입자에 관한 것이다. 면역조절 DNA는 예를 들어 TLR9, TLR7/8 및/또는 TLR7/8/9 길항작용 DNA 올리고뉴클레오티드일 수 있다. 입자는 입자에 부착되어 있는 올리고뉴클레오티드 구조물의 조밀 배치를 가지고 있으며, 이는 나노입자 구축물, 나노규모 구축물 또는 irDNA로서 본원에서 동등하게 지칭된다. 이들 구축물은, 수종의 자가면역 병리상태에 공통되는 비-메틸화 CpG-함유 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 및 단일 가닥 RNA 효능제에 반응하여 TLR-매개 신호전달을 길항시킬 수 있다. 일부 예시 데이터가 하기 실시예에 제공된다.

[0028] 이 데이터에서 irDNA가 13 nm 직경 금 나노입자를 부가 또는 티올화 irDNA 및 짧은 에틸렌 글리콜 중합체를 위한 주형으로 사용하여 합성될 수 있다는 것이 보여진다 (도식 1, 도 6b에 제시됨). 엔도솜 상주성 TLR에 대한 irDNA 함유 irDNA가, 자가면역 장애 등의 장애, 예컨대 류마티스 관절염에 공통되는 TLR-매개 신호전달 경로의 과다활성화를 차단하기 위해 irDNA를 면역 세포로 전달하는 효능있는 신규 접근법을 제공할 수 있다는 것이 발견되었다. 이들 구축물이 장애의 치료를 위해 irDNA를 전달하기 위한 기존 방법보다 현저하게 더 효과적이라는 발견은 완전히 예측가능하지 않았다. 출원인은 메카니즘에 구애됨이 없이 본 발명의 구축물에서 제시된 것처럼 irDNA의 밀도는 핵산 수용체 조정을 크게 증대시키는 것으로 여겨진다.

- [0029] 실시예에 제시된 데이터는 무린 대식세포-유사 세포 (RAW)에서 irRNA가 TLR9 및 TLR7/8-매개 NF $\kappa$ B 및 TNF $\alpha$  면역 활성화 신호전달의 강력한 억제제임을 증명한다. 한 예에서, irRNA에 혼입된 면역조절 올리고뉴클레오타이드 서열의 낮은 nM 용량은 활성화된 TLR9- 및 TLR7/8-매개 NF $\kappa$ B/TNF $\alpha$  신호전달을 차단할 수 있었다. 중요하게, 천연 포스포디에스테르 백본을 갖는 DNA는 irRNA 내로 혼입된 경우에 효과가 있었으나, 용액으로 유리 올리고뉴클레오타이드로서 투여된 경우에는 효과가 없었다. 포스포로티오에이트 (ps) 백본 함유 서열이 혼입된 irRNA는 유리 DNA 투여와 효과적으로 동등하게 TLR 활성화를 조정할 수 있었으나, 더 긴 방출 프로파일의 추가 장점을 갖는다. 대부분의 현행 DNA 기반 요법은 임의의 효능을 위한 포스포로티오에이트 백본 변형을 요구하지만, 포스포로티오에이트-매개 일반 독성 때문에 치료 범위에 제한이 있다. 본 발명의 구축물이 천연 및 변형된 백본 화학체 둘 다를 혼입시킬 수 있다는 사실은 이 플랫폼에 대한 개발된 요법의 잠재적 치료 범위를 크게 증대시킨다.
- [0030] NF $\kappa$ B 및 TNF $\alpha$  신호전달 경로는 자가면역 장애의 급성 병리상태, 특히 RA의 주요 기여요인이다<sup>18</sup>. 종래 요법은 과다활성화된 면역계의 작용을 하향 조절하기 위한 격리 전략에 주로 의존하고, 특성상 반작용성이다<sup>19-21</sup>. irRNA는 염증유발 세포성 반응의 활성화를 초래하는 신호전달의 캐스케이드를 주로 담당하는 수용체를 차단함으로써 면역 신호전달을 전향적으로 조절한다. 이 작용 메커니즘을 사용하는 것은 예를 들어 증대된 효력, 감소된 내성 기회 및 더 큰 치료 범위에 대한 잠재력을 결과하는 RA 환자를 비롯한 자가면역 환자를 치료하는 데 중요한 잠재적 개선을 제공한다. 많은 광범위-스펙트럼 처리와는 달리, irRNA는 단지 면역 세포에 주로 존재하는 이들 신호전달 경로의 활성화를 오로지 차단하기 때문에, irRNA의 투여에 의해 정상 조직 및 세포에 대한 부작용은 감소되거나 심지어 제거될 수 있다.
- [0031] 본 발명의 측면은 나노규모 구축물에 관한 것이다. 나노규모 구축물은 하나 이상의 핵산을 기하학적 위치에서 유지되게 하는 나노미터 크기 구축물을 지칭한다. 나노규모 구축물은 전형적으로 한 세트의 핵산의 코로나로 지칭된다. 본원에 사용된 코로나는, 핵산 분자로 구성된 외부 셸을 지칭한다. 코로나는 핵산 또는 다른 물질, 예컨대 금속으로 구성되는 나노입자 코어를 가질 수 있다. 대안적으로, 코로나는 간단하게 중공 코어를 갖는 기하학적 형상으로 배열된 한 세트의 핵산, 즉 핵산의 3-차원 형상 층일 수 있다. 전형적으로, 그러나 항상은 아니지만, 코로나는 구형 형상을 갖는다.
- [0032] 예컨대, 코로나가 나노입자 코어를 포함하는 경우에 핵산은 코어에 직접 연결될 수 있다. 핵산의 일부 또는 모두는 공유 또는 비-공유 연결을 통하여 직접적으로 또는 간접적으로 다른 핵산에 연결될 수 있다. 하나 핵산의 또 다른 핵산에의 연결은 그 핵산의 코어에의 연결에 대해 추가적이거나 또는 대안적으로 그에 대한 것일 수 있다. 핵산 중 하나 이상은 또한 다른 분자, 예컨대 항원에 연결될 수 있다.
- [0033] 코로나가 나노입자 코어를 포함하지 않는 경우에, 핵산은 공유 또는 비-공유 연결을 통하여 직접적으로 또는 간접적으로 서로 연결될 수 있다. 일부 실시양태에서 나노입자 코어를 포함하지 않은 코로나는 격자 또는 다른 용해가능 구조물 상에 핵산을 층형성하고 이어서 격자 또는 다른 구조물을 용해시켜 비어있는 중심을 제조함으로써 형성할 수 있다.
- [0034] 본원에 사용된 나노규모 구축물은 나노미터 정도 (즉, 약 1 nm 내지 약 1 마이크로미터)의 평균 직경을 갖는 구축물이다. 예를 들면, 일부 경우에, 나노입자의 직경은 약 1 nm 내지 약 250 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 240 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 230 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 220 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 210 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 200 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 190 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 180 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 170 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 160 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 150 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 140 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 130 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 120 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 110 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 100 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 90 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 80 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 70 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 60 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 50 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 40 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 30 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 20 nm 평균 직경, 약 1 nm 내지 약 10 nm 평균 직경, 약 5 nm 내지 약 150 nm 평균 직경, 약 5 nm 내지 약 50 nm 평균 직경, 약 10 nm 내지 약 30 nm 평균 직경, 약 10 nm 내지 150 nm 평균 직경, 약 10 nm 내지 약 100 nm 평균 직경, 약 10 nm 내지 약 50 nm 평균 직경, 약 30 nm 내지 약 100 nm 평균 직경, 또는 약 40 nm 내지 약 80 nm 평균 직경이다.
- [0035] 일부 경우에 코로나는 핵산-상호작용 복합체의 하나 이상의 길항제 및/또는 항원에 부착되는 나노입자 코어를 포함한다. 본원에 사용된 나노입자 코어는 임의의 부착된 모달리티가 없는, 나노입자 구축물의 나노입자 성분

을 지칭한다. 일부 경우에, 나노입자 코어는 금속성이다. 나노입자 코어가 임의의 금속을 포함할 수 있다는 것을 인지해야 한다. 금속의 여러 비제한적 예는 금, 은, 백금, 알루미늄, 팔라듐, 구리, 코발트, 인듐, 니켈 및 그의 혼합물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 나노입자 코어는 금을 포함한다. 예를 들면, 나노입자 코어는 분해성 금을 포함하는 격자 구조물일 수 있다. 나노입자는 또한 반도체 및 자성 물질을 포함할 수 있다.

[0036] 본 발명의 측면과 상용성인 나노입자의 비제한적 예는 하기에 기재되어 있으며 이는 참조로 포함된다: 미국 특허 번호 7,238,472, 미국 특허 공개 번호 2003/0147966, 미국 특허 공개 번호 2008/0306016, 미국 특허 공개 번호 2009/0209629, 미국 특허 공개 번호 2010/0136682, 미국 특허 공개 번호 2010/0184844, 미국 특허 공개 번호 2010/0294952, 미국 특허 공개 번호 2010/0129808, 미국 특허 공개 번호 2010/0233270, 미국 특허 공개 번호 2011/0111974, PCT 공개 번호 WO 2002/096262, PCT 공개 번호 WO 2003/08539, PCT 공개 번호 WO 2006/138145, PCT 공개 번호 WO 2008/127789, PCT 공개 번호 WO 2008/098248, PCT 공개 번호 WO 2011/079290, PCT 공개 번호 WO 2011/053940, PCT 공개 번호 WO 2011/017690 및 PCT 공개 번호 WO 2011/017456. 본 발명과 관련된 나노입자는 관련 기술분야에 공지된 임의의 수단에 따라 합성될 수 있거나, 상업적으로 입수될 수 있다. 예를 들면, 나노입자의 상업적 공급업체의 여러 비제한적 예는 다음을 포함한다: 테드 펠라, 인크(Ted Pella, Inc., 캘리포니아 레딩), 나노프로브즈, 인크.(Nanoprobe, Inc., 뉴욕 애플뱅크), 배큘 메탈루지칼 캄파니, 리미티드(Vacuum Metallurgical Co., Ltd., 일본 지바) 및 벡터 래보러토리즈, 인크.(Vector Laboratories, Inc., 캘리포니아 벨링톤).

[0037] 본원에 사용된 핵산-상호작용 복합체는, 핵산 분자와 상호작용하고, 그 상호작용에 반응하여 면역 반응을 생성 시키도록 자극되는 분자 또는 분자의 복합체를 지칭한다. 분자 또는 분자의 복합체는 수용체일 수 있다. 일부 실시양태에서 핵산-상호작용 복합체는 패턴 인식 수용체 (PRR) 복합체이다. PRR은 미생물 병원체 또는 세포 스트레스와 관련된 병원체-연관 분자 패턴 (PAMP), 및 세포 손상 동안 방출된 세포 성분과 관련된 손상-연관 분자 패턴 (DAMP)을 확인하기 위해 선천성 면역계의 세포에 의해 발현된 단백질로 구성된 면역계의 원시 부분이다. PRR은 막-결합 PRR, 예컨대 수용체 키나제, 톨-유사 수용체 (TLR) 및 C-유형 렉틴 수용체 (CLR) (만노스 수용체 및 아시알로당단백질 수용체); 세포질 PRR, 예컨대 RIG-I-유사 수용체 (RLR), RNA 헬리카제, 식물 PRR 및 NonRD 키나제; 및 분비된 PRR을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0038] 핵산-상호작용 복합체는 TLR, RIG-I, 전사 인자, 세포 번역 기구, 세포 전사 기구, 핵산 작용 효소 및 핵산 연관 자가항원을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 핵산-상호작용 복합체의 길항제인 핵산 분자는 TLR 길항제, 및 RIG-I, 전사 인자, 세포 번역 기구, 세포 전사 기구, 핵산 작용 효소 및 핵산 연관 자가항원의 길항제를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0039] 일부 실시양태에서 핵산-상호작용 복합체의 길항제는 TLR 길항제이다. 본원에 사용된 TLR 길항제는 상호작용하여 TLR의 활성을 조정하는, 즉 감소시키는 핵산 분자이다.

[0040] 톨-유사 수용체 (TLR)는 포유동물의 선천성 면역에서 결정적인 역할을 하는 고도로 보존된 폴리펩티드의 패밀리아이다. TLR1 - TLR10으로 지정된 적어도 10종의 패밀리아 구성원이 확인된 바 있다. 다양한 TLR의 세포질 도메인은 톨-인터류킨 1 (IL-1) 수용체 (TIR) 도메인을 특징으로 한다. Medzhitov R et al. (1998) *Mol Cell* 2:253-8. TLR에 의한 미생물 침습의 인식은 진화론적으로 *Drosophila* 및 포유동물에서 보존된 신호전달 캐스케이드의 활성화를 촉발한다. TIR 도메인-함유 어댑터 단백질 MyD88은 TLR와 연관되어 IL-1 수용체-연관 키나제 (IRAK) 및 중앙 피사 인자 (TNF) 수용체-연관 인자 6 (TRAF6)를 TLR로 동원하는 것으로 보고된 바 있다. MyD88-의존성 신호전달 경로는 NF- $\kappa$ B 전사 인자 및 c-Jun NH<sub>2</sub> 말단 키나제 (Jnk) 미토젠-활성화 단백질 키나제 (MAPK)의 활성화, 즉 면역 활성화 및 염증성 시토카인의 생산에서의 결정적 단계를 유도하는 것으로 여겨진다. 검토를 위해, 문헌 [Aderem A et al. (2000) *Nature* 406:782-87] 참조.

[0041] TLR은 다양한 조직에서 및 다양한 유형의 면역 세포에 대해 차별적으로 발현되는 것으로 여겨진다. 예를 들면, 인간 TLR7은 태반, 폐, 비장, 림프절, 편도에서 및 형질세포양 전구체 수지상 세포 (pDC) 상에서 발현된다고 보고된 바 있다. 문헌 [Chuang T-H et al. (2000) *Eur Cytokine Netw* 11:372-8]; Kadowaki N et al. (2001) *J Exp Med* 194:863-9]. 인간 TLR8은 폐, 말초 혈액 백혈구 (PBL), 태반, 비장, 림프절에서, 및 단핵구 상에서 발현된다고 보고된 바 있다. 문헌 [Kadowaki N et al. (2001) *J Exp Med* 194:863-9; Chuang T-H et al. (2000) *Eur Cytokine Netw* 11:372-8]. 인간 TLR9는 비장, 림프절, 골수, PBL에서 및 pDC 및 B 세포 상에서 발현된다고 보고되었다. 문헌 [Kadowaki N et al. (2001) *J Exp Med* 194:863-9; Bauer S et al. (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* 98:9237-42; Chuang T-H et al. (2000) *Eur Cytokine Netw* 11:372-8].

[0042] 인간 및 무린 TLR7의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열은 공지되어 있다. 참조, 예를 들어, 진뱅크 수탁 번호

AF240467, AF245702, NM\_016562, AF334942, NM\_133211; 및 AAF60188, AAF78035, NP\_057646, AAL73191 및 AAL73192, 전체 내용이 본원에 참조로 포함된다. 인간 TLR7은 1049개 아미노산 길이인 것으로 보고되어 있다. 무린 TLR7은 1050개 아미노산 길이인 것으로 보고되어 있다. TLR7 폴리펩티드는 류신-풍부 반복 영역을 갖는 세포외 도메인, 막횡단 도메인, 및 TIR 도메인을 포함하는 세포내 도메인을 포함한다.

[0043] 인간 및 무린 TLR8의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열은 공지되어 있다. 예를 들어, 진뱅크 수탁 번호 AF246971, AF245703, NM\_016610, XM\_045706, AY035890, NM\_133212; 및 AAF64061, AAF78036, NP\_057694, XP\_045706, AAK62677, 및 NP\_573475를 참조하며, 이들 모두의 내용이 본원에 참조로 포함된다. 인간 TLR8은 적어도 2종의 이소형으로, 1041개 아미노산 길이인 1종 및 1059개 아미노산 길이인 다른 종이 존재한다고 보고되어 있다. 무린 TLR8은 1032개 아미노산 길이이다. TLR8 폴리펩티드는 류신-풍부 반복 영역을 갖는 세포외 도메인, 막횡단 도메인, 및 TIR 도메인을 포함하는 세포내 도메인을 포함한다.

[0044] 인간 및 무린 TLR9의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열은 공지되어 있다. 예를 들어, 진뱅크 수탁 번호 NM\_017442, AF259262, AB045180, AF245704, AB045181, AF348140, AF314224, NM\_031178; 및 NP\_059138, AAF72189, BAB19259, AAF78037, BAB19260, AAK29625, AAK28488, 및 NP\_112455를 참조하며, 이들 모두의 내용이 본원에 참조로 포함된다. 인간 TLR9는 적어도 2종의 이소형으로, 1032개 아미노산 길이인 1종 및 1055개 아미노산인 다른 종이 존재한다고 보고되어 있다. 무린 TLR9는 1032개 아미노산 길이이다. TLR9 폴리펩티드는 류신-풍부 반복 영역을 갖는 세포외 도메인, 막횡단 도메인, 및 TIR 도메인을 포함하는 세포내 도메인을 포함한다.

[0045] 본원에 사용된 용어 "TLR 신호전달"은 TLR을 통한 신호전달과 관련된 세포내 신호전달의 어떤 측면을 지칭한다. 본원에 사용된 용어 "TLR-매개 면역 반응"은 TLR 신호전달과 관련된 면역 반응을 지칭한다. TLR 신호전달 또는 활성의 감소는 기준선에 비해 신호전달 또는 활성의 감소를 지칭한다. 기준선 수준은 면역자극 분자가 TLR의 자극을 일으키는 수준일 수 있다. 그 경우에 신호전달 또는 활성의 감소는 면역자극 분자에 의해 이루어진 신호전달 또는 활성의 수준에 대해 신호전달 또는 활성에서의 감소이다.

[0046] TLR7-매개 면역 반응은 TLR7 신호전달과 관련된 반응이다. TLR7-매개 면역 반응은 일반적으로 IFN- $\alpha$  및 IFN-유도성 시토카인, 예컨대 IP-10 및 I-TAC의 유도를 특징으로 한다. TLR7-매개 면역 반응에서 유도된 시토카인 IL-1  $\alpha/\beta$ , IL-6, IL-8, MIP-1  $\alpha/\beta$  및 MIP-3  $\alpha/\beta$ 의 수준은 TLR8-매개 면역 반응에서 유도된 수준보다 낮다.

[0047] TLR8-매개 면역 반응은 TLR8 신호전달과 관련된 반응이다. 이 반응은 추가로 염증유발 시토카인, 예컨대 IFN- $\gamma$ , IL-12p40/70, TNF- $\alpha$ , IL-1  $\alpha/\beta$ , IL-6, IL-8, MIP-1  $\alpha/\beta$  및 MIP-3  $\alpha/\beta$ 의 유도를 특징으로 한다.

[0048] TLR9-매개 면역 반응은 TLR9 신호전달과 관련된 반응이다. TLR8-매개 면역 반응을 통해 달성되는 것보다는 낮은 수준이긴 하지만, 이 반응도 또한 적어도 IFN- $\gamma$  및 IL-12의 생산/분비를 특징으로 한다.

[0049] 본원에 사용된 "TLR7/8 길항제"는 집합적으로 기준선 수준에 비해 TLR7 및/또는 TLR8 신호전달을 감소시킬 수 있는 임의의 핵산 (즉, TLR7 및/또는 TLR8의 길항제)를 지칭한다. 일부 TLR7/8 길항제는 TLR7 신호전달만을 감소시키고 (예를 들면, TLR7 특이적 길항제), 일부는 TLR8 신호전달만을 감소시키고 (예를 들면, TLR8 특이적 길항제), 기타는 TLR7 및 TLR8 신호전달 모두를 감소시킨다.

[0050] 본원에서 사용되는 용어 "TLR9 길항제"는 TLR9 신호전달을 감소시킬 수 있는 임의의 작용제 (즉, TLR9의 길항제)를 지칭한다.

[0051] 일부 실시양태에서 TLR 7, 8, 또는 9의 길항제는 면역조절 핵산을 포함한다. 면역조절 핵산은 하기 화학식: 5'R<sub>n</sub>JGCN<sub>z</sub>3' (여기서 각각의 R은 뉴클레오티드이고, n은 약 0 내지 10의 정수이고, J는 U 또는 T이고, 각각의 N은 뉴클레오티드이고, z는 약 1 내지 약 100의 정수임) 내에 속하는 핵산을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, n은 0이고, z는 약 1 내지 약 50이다. 일부 실시양태에서 N은 5'S<sub>1</sub>S<sub>2</sub>S<sub>3</sub>S<sub>4</sub>3'이고, 여기서 S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>, 및 S<sub>4</sub>는 독립적으로 G, I, 또는 7-테아자-dG이다. 일부 실시양태에서 TLR7, TLR8 및/또는 TLR9 길항제는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다:

[0052] TCCTGGAGGGGTTGT (서열 1)

[0053] TGCTCCTGGAGGGGTTGT (서열 2)

[0054] TGCTGGATGGGAA (서열 3)

- [0055] TGCCCTGGATGGGAA (서열 4)
- [0056] TGCTTGACACCTGGATGGGAA (서열 5)
- [0057] TGCTGGATGGGAA/iSp18//iSp18//3티오MC3-D/(13nm AuNP; 서열 6)
- [0058] TGCCCTGGATGGGAA/iSp18//iSp18//3티오MC3-D/(13nm AuNP; 서열 7)
- [0059] TGCTTGACACCTGGATGGGAA/iSp18//iSp18//3티오MC3-D/(13nm AuNP; 서열 8)
- [0060] TCCTGAGCTTGAAGT/iSp18//iSp18//3티오MC3-D/ (서열 9)
- [0061] TCCTGAGCTTGAAGT/iSp18//iSp18//3티오MC3-D/(13nm AuNP; 서열 10)
- [0062] TTCTGGCGGGGAAGT/iSp18//iSp18//3티오MC3-D/ (서열 11)
- [0063] CTCCTATTGGGGGTTTCCTAT/iSp18//iSp18//3티오MC3-D/ (서열 12)
- [0064] ACCCCCTCTACCCCTCTACCCCTCT/iSp18//iSp18//3티오MC3-D/ (서열 13)
- [0065] CCTGGATGGGAA/iSp18//iSp18//3티오MC3-D/ (서열 14)
- [0066] TTCTGGCGGGGAAGT/iSp18//iSp18//3티오MC3-D/(13nm AuNP; 서열 15)
- [0067] CTCCTATTGGGGGTTTCCTAT/iSp18//iSp18//3티오MC3-D/(13nm AuNP; 서열 16)
- [0068] ACCCCCTCTACCCCTCTACCCCTCT/iSp18//iSp18//3티오MC3-D/(13nm AuNP; 서열 17)
- [0069] CCTGGATGGGAA/iSp18//iSp18//3티오MC3-D/(13nm AuNP; 서열 18)
- [0070] C\*C\*T\*GGATGGGAA/iSp18//iSp18//3티오MC3-D/(13nm AuNP; 서열 19)
- [0071] CCTGGATG\*G\*G\*AA/iSp18//iSp18//3티오MC3-D/(13nm AuNP; 서열 20)
- [0072] C\*C\*T\*GGATG\*G\*G\*AA/iSp18//iSp18//3티오MC3-D/(13nm AuNP; 서열 21)
- [0073] /Chol/CCTGGATGGGAA/iSp18//iSp18//3티오MC3-D/(13nm AuNP; 서열 22)
- [0074] /Stryl/CCTGGATGGGAA/iSp18//iSp18//3티오MC3-D/(13nm AuNP; 서열 23)
- [0075] /Palm/CCTGGATGGGAA/iSp18//iSp18//3티오MC3-D/(13nm AuNP; 서열 24)
- [0076] T\*C\*C\*T\*G\*G\*A\*G\*G\*G\*T\*T\*G\*T (서열 25)
- [0077] T\*G\*C\*T\*C\*C\*T\*G\*G\*A\*G\*G\*G\*T\*T\*G\*T (서열 26)
- [0078] T\*G\*C\*T\*G\*G\*A\*T\*G\*G\*G\*A\*A (서열 27)
- [0079] T\*G\*C\*C\*C\*T\*G\*G\*A\*T\*G\*G\*G\*A\*A (서열 28)
- [0080] T\*G\*C\*T\*T\*G\*A\*C\*A\*C\*T\*G\*G\*A\*T\*G\*G\*G\*A\*A (서열 29)
- [0081] T\*G\*C\*T\*G\*G\*A\*T\*G\*G\*G\*A\*A\*/iSp18//iSp18//3티오MC3-D/(13nm AuNP; 서열 30)
- [0082] T\*G\*C\*C\*C\*T\*G\*G\*A\*T\*G\*G\*G\*A\*A\*/iSp18//iSp18//3티오MC3-D/(13nm AuNP; 서열 31)
- [0083] T\*G\*C\*T\*T\*G\*A\*C\*A\*C\*T\*G\*G\*A\*T\*G\*G\*G\*A\*A\*/iSp18//iSp18//3티오MC3-D/(13nm AuNP; 서열 32)
- [0084] T\*C\*C\*T\*G\*A\*G\*C\*T\*T\*G\*A\*A\*G\*T\*/iSp18//iSp18//3티오MC3-D/(13nm AuNP; 서열 33)
- [0085] T\*C\*C\*T\*G\*A\*G\*C\*T\*T\*G\*A\*A\*G\*T\*/iSp18//iSp18//3티오MC3-D/(13nm AuNP; 서열 34)
- [0086] T\*T\*C\*T\*G\*G\*C\*G\*G\*G\*G\*A\*A\*G\*T\*/iSp18//iSp18//3티오MC3-D/(13nm AuNP; 서열 35)
- [0087] C\*T\*C\*C\*T\*A\*T\*T\*G\*G\*G\*G\*T\*T\*T\*C\*C\*T\*A\*T\*/iSp18//iSp18//3티오MC3-D/(13nm AuNP; 서열 36)
- [0088] A\*C\*C\*C\*C\*T\*C\*T\*A\*C\*C\*C\*C\*T\*C\*T\*A\*C\*C\*C\*T\*C\*T\*/iSp18//iSp18//3티오MC3-D/(13nm AuNP; 서열 37)
- [0089] C\*C\*T\*G\*G\*A\*T\*G\*G\*G\*A\*A\*/iSp18//iSp18//3티오MC3-D/(13nm AuNP; 서열 38)
- [0090] T\*T\*C\*T\*G\*G\*C\*G\*G\*G\*G\*A\*A\*G\*T\*/iSp18//iSp18//3티오MC3-D/(13nm AuNP; 서열 39)

- [0091] C\*T\*C\*C\*T\*A\*T\*T\*G\*G\*G\*G\*T\*T\*T\*C\*T\*A\*T\*/iSp18//iSp18//3티오MC3-D/(13nm AuNP; 서열 40)
- [0092] A\*C\*C\*C\*C\*C\*T\*C\*T\*A\*C\*C\*C\*C\*T\*C\*T\*A\*C\*C\*C\*C\*T\*C\*T\*/iSp18//iSp18//3티오MC3-D/(13nm AuNP; 서열 41)
- [0093] C\*C\*T\*G\*G\*A\*T\*G\*G\*G\*A\*A\*/iSp18//iSp18//3티오MC3-D/(13nm AuNP; 서열 42)
- [0094] (13nm AuNP)/5티오MC3-D//iSp18//iSp18/\*T\*G\*C\*T\*G\*G\*A\*T\*G\*G\*G\*A\*A (13nm AuNP; 서열 43)
- [0095] /5티오MC3-D//iSp18//iSp18/\*T\*G\*C\*C\*C\*T\*G\*G\*A\*T\*G\*G\*G\*A\*A (서열 44)
- [0096] (13nm AuNP)/5티오MC3-D//iSp18//iSp18/\*T\*G\*C\*T\*T\*G\*A\*C\*A\*C\*T\*G\*G\*A\*T\*G\*G\*G\*A\*A (서열 45)
- [0097] (13nm AuNP)/5티오MC3-D//iSp18//iSp18/\*T\*C\*C\*T\*G\*A\*G\*C\*T\*T\*G\*A\*A\*G\*T (서열 46)
- [0098] (13nm AuNP)/5티오MC3-D//iSp18//iSp18/\*T\*C\*C\*T\*G\*A\*G\*C\*T\*T\*G\*A\*A\*G\*T (서열 47)
- [0099] (13nm AuNP)/5티오MC3-D//iSp18//iSp18/\*T\*T\*C\*T\*G\*C\*G\*G\*G\*A\*A\*G\*T (서열 48)
- [0100] (13nm AuNP)/5티오MC3-D//iSp18//iSp18/\*C\*T\*C\*C\*T\*A\*T\*T\*G\*G\*G\*G\*T\*T\*T\*C\*T\*A\*T (서열 49)
- [0101] (13nm AuNP)/5티오MC3-D//iSp18//iSp18/\*A\*C\*C\*C\*C\*T\*C\*T\*A\*C\*C\*C\*C\*T\*C\*T\*A\*C\*C\*C\*C\*T\*C\*T (서열 50)
- [0102] (13nm AuNP)/5티오MC3-D//iSp18//iSp18/\*C\*C\*T\*G\*G\*A\*T\*G\*G\*G\*A\*A (서열 51)
- [0103] (13nm AuNP)/5티오MC3-D//iSp18//iSp18/\*T\*T\*C\*T\*G\*G\*C\*G\*G\*G\*A\*A\*G\*T (서열 52)
- [0104] (13nm AuNP)/5티오MC3-D//iSp18//iSp18/\*C\*T\*C\*C\*T\*A\*T\*T\*G\*G\*G\*G\*T\*T\*T\*C\*T\*A\*T (서열 53)
- [0105] (13nm AuNP)/5티오MC3-D//iSp18//iSp18/\*A\*C\*C\*C\*C\*T\*C\*T\*A\*C\*C\*C\*C\*T\*C\*T\*A\*C\*C\*C\*C\*T\*C\*T (서열 54)
- [0106] (13nm AuNP)/5티오MC3-D//iSp18//iSp18/\*C\*C\*T\*G\*G\*A\*T\*G\*G\*G\*A\*A (서열 55)
- [0107] TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG (서열 56)
- [0108] T\*T\*A\*G\*G\*G\*T\*A\*G\*G\*G\*T\*T\*A\*G\*G\*G\*T\*A\*G\*G\*G (서열 57)
- [0109] TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG (서열 58)/iSp18//iSp18//3티오MC3-D/(13nm AuNP)
- [0110] T\*T\*A\*G\*G\*G\*T\*A\*G\*G\*G\*T\*T\*A\*G\*G\*G\*T\*A\*G\*G\*G\* (서열 59)/iSp18//iSp18//3티오MC3-D/(13nm AuNP)
- [0111] (13nm AuNP)/5티오MC3-D//iSp18//iSp18/TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG (서열 60)
- [0112] (13nm AuNP)/5티오MC3-D//iSp18//iSp18/\*T\*T\*A\*G\*G\*G\*T\*T\*A\*G\*G\*G\*T\*T\*A\*G\*G\*G\*T\*T\*A\*G\*G\*G (서열 61)
- [0113] CTATCTGUCGTTCTCTGU (서열 62)
- [0114] C\*T\*A\*T\*C\*T\*G\*U\*C\*G\*T\*T\*C\*T\*C\*T\*G\*U (서열 63)
- [0115] CTATCTGUCGTTCTCTGU (서열 64)/iSp18//iSp18//3티오MC3-D/(13nm AuNP)
- [0116] C\*T\*A\*T\*C\*T\*G\*U\*C\*G\*T\*T\*C\*T\*C\*T\*G\*U\*(서열 65)/iSp18//iSp18//3티오MC3-D/(13nm AuNP)
- [0117] (13nm AuNP)/5티오MC3-D//iSp18//iSp18/CTATCTGUCGTTCTCTGU (서열 66)
- [0118] (13nm AuNP)/5티오MC3-D//iSp18//iSp18/\*C\*T\*A\*T\*C\*T\*G\*U\*C\*G\*T\*T\*C\*T\*C\*T\*G\*U (서열 67)
- [0119] (13nm AuNP)/5티오MC3-D//iSp18//iSp18/TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG (서열 68)
- [0120] (13nm AuNP)/5티오MC3-D//iSp18//iSp18/T\*T\*A\*G\*G\*G\*T\*T\*A\*G\*G\*G\*T\*T\*A\*G\*G\*G\*T\*T\*A\*G\*G\*G\* (서열 69)
- [0121] (13nm AuNP)/5티오MC3-D//iSp18//iSp18/CTATCTGUCGTTCTCTGU (서열 70)
- [0122] (13nm AuNP)/5티오MC3-D//iSp18//iSp18/C\*T\*A\*T\*C\*T\*G\*U\*C\*G\*T\*T\*C\*T\*C\*T\*G\*U\* (서열 71)
- [0123] (13nm AuNP)/5티오MC3-D//iSp18//iSp18/TGCTGGATGGGAA (서열 72)
- [0124] (13nm AuNP)/5티오MC3-D//iSp18//iSp18/TGCCCTGGATGGGAA (서열 73)
- [0125] (13nm AuNP)/5티오MC3-D//iSp18//iSp18/TGCTTGACCTGGATGGGAA (서열 74)
- [0126] (13nm AuNP)/5티오MC3-D//iSp18//iSp18/TCCTGAGCTTGAAGT (서열 75)

- [0127] (13nm AuNP)/5티오MC3-D//iSp18//iSp18/TCCTGAGCTTGAAGT (서열 76)
- [0128] (13nm AuNP)/5티오MC3-D//iSp18//iSp18/TTCTGGCGGGGAAGT (서열 77)
- [0129] (13nm AuNP)/5티오MC3-D//iSp18//iSp18/CTCCTATTGGGGTTTCCTAT (서열 78)
- [0130] (13nm AuNP)/5티오MC3-D//iSp18//iSp18/ACCCCTCTACCCCTCTACCCCTCT (서열 79)
- [0131] (13nm AuNP)/5티오MC3-D//iSp18//iSp18/CCTGGATGGGAA (서열 80)
- [0132] (13nm AuNP)/5티오MC3-D//iSp18//iSp18/TTCTGGCGGGGAAGT (서열 81)
- [0133] (13nm AuNP)/5티오MC3-D//iSp18//iSp18/CTCCTATTGGGGTTTCCTAT (서열 82)
- [0134] (13nm AuNP)/5티오MC3-D//iSp18//iSp18/ACCCCTCTACCCCTCTACCCCTCT (서열 83)
- [0135] (13nm AuNP)/5티오MC3-D//iSp18//iSp18/CCTGGATGGGAA (서열 84)
- [0136] (13nm AuNP)/5티오MC3-D//iSp18//iSp18/C\*C\*T\*GGATGGGAA (서열 85)
- [0137] (13nm AuNP)/5티오MC3-D//iSp18//iSp18/CCTGGATG\*G\*G\*AA (서열 86)
- [0138] (13nm AuNP)/5티오MC3-D//iSp18//iSp18/C\*C\*T\*GGATG\*G\*G\*AA (서열 87)
- [0139] (13nm AuNP)/5티오MC3-D//iSp18//iSp18/CCTGGATGGGAA/Chol/ (서열 88)
- [0140] (13nm AuNP)/5티오MC3-D//iSp18//iSp18/CCTGGATGGGAA/Stryl/ (서열 89) 및
- [0141] (13nm AuNP)/5티오MC3-D//iSp18//iSp18/CCTGGATGGGAA/Palm/ (서열 90).
- [0142] 일부 실시양태에서 핵산-상호작용 복합체의 길항제는 각각 본원에 참조로 포함된 참고문헌 23 및 24에 기재된 것이다.
- [0143] 용어 "올리고뉴클레오티드" 및 "핵산"은 교환가능하게 사용되며, 다중 뉴클레오티드 (즉 포스페이트 기와, 치환된 피리미딘 (예를 들어, 시토신 (C), 티미딘 (T) 또는 우라실 (U)) 또는 치환된 퓨린 (예를 들어, 아데닌 (A) 또는 구아닌 (G))인 교환가능한 유기 염기에 연결된 당 (예를 들어, 리보스 또는 데옥시리보스)을 포함하는 분자)를 의미한다. 따라서, 이 용어는 DNA 및 RNA 올리고뉴클레오티드 둘 다를 포괄한다. 이 용어는 또한 폴리뉴클레오티드 (즉, 포스페이트를 제외한 폴리뉴클레오티드) 및 임의의 다른 유기 염기 함유 중합체를 포함할 것이다. 올리고뉴클레오티드는 기존의 핵산 공급원 (예를 들어, 게놈 또는 cDNA)으로부터 수득될 수 있으나, 바람직하게는 합성된 것 (예를 들어, 핵산 합성에 의해 생성된 것)이다. 나노규모 구축물의, 임의적으로는 나노 입자 코어에 부착된, 폴리뉴클레오티드는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다. 이중 가닥 폴리뉴클레오티드는 또한 본원에서 듀플렉스로 지칭된다. 본 발명의 이중-가닥 올리고뉴클레오티드는 2개의 개별 상보적 핵산 가닥을 포함할 수 있다.
- [0144] 본원에 사용된 "듀플렉스"는 상보적 서열이 서로에 대해 수소 결합된 이중-가닥 핵산 분자(들)를 포함한다. 상보적 서열은 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함할 수 있다. 안티센스 뉴클레오티드 서열은 유효한 표적 유전자 역제를 매개하도록 표적 유전자와 동일하거나 또는 충분히 동일할 수 있다 (예를 들어, 표적 유전자 서열에 대해 적어도 약 98% 동일하거나, 96% 동일하거나, 94% 동일하거나, 90% 동일하거나, 85% 동일하거나, 또는 80% 동일함).
- [0145] 이중-가닥 폴리뉴클레오티드는 그의 전체 길이에 걸쳐 이중-가닥일 수 있으며, 이는 상기 폴리뉴클레오티드가 오버행인 단일-가닥 서열을 갖지 않고, 이에 따라 평활-말단을 갖는다는 것을 의미한다. 다른 실시양태에서는, 이중-가닥 폴리뉴클레오티드의 2개의 가닥이 상이한 길이를 가져 1개 이상의 단일-가닥 오버행을 생성할 수 있다. 본 발명의 이중-가닥 폴리뉴클레오티드는 미스매치 및/또는 루프 또는 돌출부를 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 이는 올리고뉴클레오티드의 길이의 적어도 약 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%에 걸쳐 이중-가닥이다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 이중-가닥 폴리뉴클레오티드는 적어도 또는 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개의 미스매치를 함유한다.
- [0146] 본 발명과 연관된 폴리뉴클레오티드는 예컨대 당 모이어티, 포스포디에스테르 연결부, 및/또는 염기에서 변형될 수 있다. 본원에 사용된 "당 모이어티"는 천연, 비변형된 당 (펜토스, 리보스 및 데옥시리보스 포함), 변형된 당 및 당 유사체를 포함한다. 당 모이어티의 변형은 히드록실 기를 할로젠, 헤테로원자 또는 지방족 기로 대체하는 것을 포함할 수 있고, 히드록실 기를 예를 들어 에테르, 아민 또는 티올로서 관능화하는 것을 포함할 수

있다.

- [0147] 당 모이어티의 변형은 2'-O-메틸 뉴클레오타이드 ("메틸화된 것"으로 지칭됨)를 포함할 수 있다. 일부 경우에, 본 발명과 연관된 폴리뉴클레오타이드는 변형된 당 모이어티만을 또는 비변형된 당 모이어티만을 함유할 수 있고, 한편 다른 경우에는, 폴리뉴클레오타이드는 일부는 변형되고 일부는 변형되지 않은 당 모이어티를 함유한다.
- [0148] 일부 경우에, 변형된 뉴클레오타이드는 당- 또는 백본-변형된 리보뉴클레오타이드를 포함한다. 변형된 리보뉴클레오타이드는 비-자연 발생 염기, 예컨대 5'-위치에서 변형된 우리딘 또는 시티딘, 예를 들어 5'-(2-아미노)프로필 우리딘 및 5'-브로모 우리딘; 8-위치에서 변형된 아데노신 및 구아노신, 예를 들어 8-브로모 구아노신; 데아자 뉴클레오타이드, 예를 들어 7-데아자-아데노신; 및 N-알킬화 뉴클레오타이드, 예를 들어 N6-메틸 아데노신을 함유할 수 있다. 또한, 당-변형된 리보뉴클레오타이드는 2'-OH 기가 H, 알콕시 (또는 OR), R 또는 알킬, 할로젠, SH, SR, 아미노 (예컨대 NH<sub>2</sub>, NHR, NR<sub>2</sub>), 또는 CN 기 (여기서, R은 저급 알킬, 알케닐 또는 알킬닐임)로 대체된 것일 수 있다. 일부 실시양태에서, 변형된 리보뉴클레오타이드는 인접한 리보뉴클레오타이드에 연결되는 포스포디에스테르 기가 변형된 기, 예컨대 포스포로티오에이트 기로 대체된 것일 수 있다.
- [0149] 일부 측면에서, 2'-O-메틸 변형은 세포 스트레스 반응, 예컨대 이중-가닥 핵산에 대한 인터페론 반응의 감소에 유리할 수 있다. 변형된 당은 D-리보스, 2'-O-알킬 (2'-O-메틸 및 2'-O-에틸 포함), 즉, 2'-알콕시, 2'-아미노, 2'-S-알킬, 2'-할로 (2'-플루오로 포함), 2'-메톡시에톡시, 2'-알릴옥시 (-OCH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 2'-프로파르길, 2'-프로필, 에틸닐, 에테닐, 프로페닐, 및 시아노 등을 포함할 수 있다. 당 모이어티는 또한 핵소스일 수 있다.
- [0150] 용어 "알킬"은 직쇄 알킬 기 (예를 들어, 메틸, 에틸, 프로필, 부틸, 펜틸, 헥실, 헵틸, 옥틸, 노닐, 데실 등), 분지쇄 알킬 기 (이소프로필, tert-부틸, 이소부틸 등), 시클로알킬 (지환족) 기 (시클로프로필, 시클로헵틸, 시클로헥실, 시클로헵틸, 시클로옥틸), 알킬 치환된 시클로알킬 기, 및 시클로알킬 치환된 알킬 기를 비롯한 포화 지방족 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 직쇄 또는 분지쇄 알킬은 그의 백본에 6개 이하의 탄소 원자 (예를 들어, 직쇄의 경우 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, 분지쇄의 경우 C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>), 보다 바람직하게는 4개 이하의 탄소 원자를 갖는다. 마찬가지로, 바람직한 시클로알킬은 그의 고리 구조에 3-8개의 탄소 원자, 보다 바람직하게는 고리 구조에 5 또는 6개의 탄소를 갖는다. 용어 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>은 1 내지 6개 탄소 원자를 함유하는 알킬 기를 포함한다.
- [0151] 달리 명시되지 않는 한, 용어 알킬은 "비치환된 알킬" 및 "치환된 알킬" 둘 다를 포함하고, 여기서 후자는 탄화수소 백본의 1개 이상의 탄소 상의 수소를 대체한 독립적으로 선택된 치환기를 갖는 알킬 모이어티를 지칭한다. 이러한 치환기는 예를 들어 알케닐, 알킬닐, 할로젠, 히드록실, 알킬카르보닐옥시, 아릴카르보닐옥시, 알콕시카르보닐옥시, 아릴옥시카르보닐옥시, 카르복실레이트, 알킬카르보닐, 아릴카르보닐, 알콕시카르보닐, 아미노카르보닐, 알킬아미노카르보닐, 디알킬아미노카르보닐, 알킬티오카르보닐, 알콕실, 포스페이트, 포스포네이트, 포스포네이트, 시아노, 아미노 (알킬 아미노, 디알킬아미노, 아릴아미노, 디아릴아미노 및 알킬아릴아미노 포함), 아실아미노 (알킬카르보닐아미노, 아릴카르보닐아미노, 카르바모일 및 우레이도 포함), 아미디노, 이미노, 술폰히드릴, 알킬티오, 아릴티오, 티오카르복실레이트, 술폰이트, 알킬술폰닐, 술폰네이트, 술폰모일, 술폰아미도, 니트로, 트리플루오로메틸, 시아노, 아지도, 헤테로시클릴, 알킬아릴, 또는 방향족 또는 헤테로방향족 모이어티를 포함할 수 있다. 시클로알킬은, 예를 들어 상기 기재된 치환기로 추가로 치환될 수 있다. "알킬아릴" 또는 "아릴알킬" 모이어티는 아릴로 치환된 알킬 (예를 들어, 페닐메틸 (벤질))이다. 용어 "알킬"은 또한 천연 및 비천연 아미노산의 측쇄를 포함한다. 용어 "n-알킬"은 직쇄 (즉, 비분지형) 비치환된 알킬 기를 의미한다.
- [0152] 용어 "알케닐"은 상기에 기재된 알킬과 길이 및 가능한 치환이 유사하지만 적어도 1개의 이중 결합을 함유하는 불포화 지방족 기를 포함한다. 예를 들어, 용어 "알케닐"은 직쇄 알케닐 기 (예를 들어, 에틸레닐, 프로페닐, 부테닐, 펜테닐, 헥세닐, 헵테닐, 옥테닐, 노네닐, 데세닐 등), 분지쇄 알케닐 기, 시클로알케닐 (지환족) 기 (시클로프로페닐, 시클로헵테닐, 시클로헥세닐, 시클로헵테닐, 시클로옥테닐), 알킬 또는 알케닐 치환된 시클로알케닐 기, 및 시클로알킬 또는 시클로알케닐 치환된 알케닐 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 직쇄 또는 분지쇄 알케닐 기는 그의 백본에 6개 이하의 탄소 원자를 갖는다 (예를 들어, 직쇄의 경우 C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, 분지쇄의 경우 C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>). 마찬가지로, 시클로알케닐 기는 그의 고리 구조에 3-8개의 탄소 원자를 가질 수 있으며, 더욱 바람직하게는 고리 구조에 5 또는 6개의 탄소를 갖는다. 용어 C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>은 2 내지 6개의 탄소 원자를 함유하는 알케닐 기를 포함한다.
- [0153] 달리 명시되지 않는 한, 용어 알케닐은 "비치환된 알케닐" 및 "치환된 알케닐" 둘 다를 포함하고, 여기서 후자

는 탄화수소 백본의 1개 이상의 탄소 상의 수소를 대체하는 독립적으로 선택된 치환기를 갖는 알케닐 모이어티를 지칭한다. 이러한 치환기는 예를 들어 알킬 기, 알킬닐 기, 할로젠, 히드록실, 알킬카르보닐옥시, 아릴카르보닐옥시, 알콕시카르보닐옥시, 아릴옥시카르보닐옥시, 카르복실레이트, 알킬카르보닐, 아릴카르보닐, 알콕시카르보닐, 아미노카르보닐, 알킬아미노카르보닐, 디알킬아미노카르보닐, 알킬티오카르보닐, 알콕실, 포스페이트, 포스포네이트, 포스포네이트, 시아노, 아미노 (알킬 아미노, 디알킬아미노, 아릴아미노, 디아릴아미노 및 알킬아릴아미노 포함), 아실아미노 (알킬카르보닐아미노, 아릴카르보닐아미노, 카르바모일 및 우레이도 포함), 아미디노, 이미노, 술포히드릴, 알킬티오, 아릴티오, 티오카르복실레이트, 술페이트, 알킬술폰, 술폰네이트, 술폰모일, 술폰아미도, 니트로, 트리플루오로메틸, 시아노, 아지도, 헤테로시클릴, 알킬아릴, 또는 방향족 또는 헤테로방향족 모이어티를 포함할 수 있다.

[0154] 용어 "소수성 변형"은 전체 소수성이 증가하고 염기가 여전히 정규에 가까운 왓슨-크릭(Watson-Crick) 상호작용을 형성할 수 있도록 하는 염기의 변형을 지칭한다. 염기 변형의 비제한적 예는 페닐, 4-피리딜, 2-피리딜, 인돌릴 및 이소부틸, 페닐 (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>OH); 트립토판닐 (C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>N)CH<sub>2</sub>CH(NH<sub>2</sub>)CO), 이소부틸, 부틸, 아미노벤질; 페닐; 및 나프틸과 같은 5-위치 우리딘 및 시티딘 변형을 포함한다.

[0155] 용어 "헤테로원자"는 탄소 또는 수소 이외의 임의의 원소의 원자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 바람직한 헤테로원자는 질소, 산소, 황 및 인이다. 용어 "히드록시" 또는 "히드록실"은 -OH 또는 -O<sup>-</sup> (적절한 반대이온을 가짐)를 갖는 기를 포함한다. 용어 "할로젠"은 플루오린, 브로민, 염소, 아이오딘 등을 포함한다. 용어 "피할로젠화"는 일반적으로 모든 수소가 할로젠 원자에 의해 대체된 모이어티를 지칭한다.

[0156] 용어 "치환된"은 모이어티 상에 위치할 수 있고 분자가 그의 의도된 기능을 수행하도록 하는 독립적으로 선택된 치환기를 포함한다. 치환기의 예는 알킬, 알케닐, 알킬닐, 아릴, (CR'R')<sub>0-3</sub>NR'R", (CR'R')<sub>0-3</sub>CN, NO<sub>2</sub>, 할로젠, (CR'R')<sub>0-3</sub>C(할로젠)<sub>3</sub>, (CR'R')<sub>0-3</sub>CH(할로젠)<sub>2</sub>, (CR'R')<sub>0-3</sub>CH<sub>2</sub>(할로젠), (CR'R')<sub>0-3</sub>CONR'R", (CR'R')<sub>0-3</sub>S(O)<sub>1-2</sub>NR'R", (CR'R')<sub>0-3</sub>CHO, (CR'R')<sub>0-3</sub>O(CR'R')<sub>0-3</sub>H, (CR'R')<sub>0-3</sub>S(O)<sub>0-2</sub>R', (CR'R')<sub>0-3</sub>O(CR'R')<sub>0-3</sub>H, (CR'R')<sub>0-3</sub>COR', (CR'R')<sub>0-3</sub>CO<sub>2</sub>R', 또는 (CR'R')<sub>0-3</sub>OR' 기를 포함하고; 여기서 각 R' 및 R"는 각각 독립적으로 수소, C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 알킬, C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> 알케닐, C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> 알킬닐, 또는 아릴 기이거나, 또는 R' 및 R"는 함께 벤질리덴 기 또는 -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>- 기이다.

[0157] 용어 "아민" 또는 "아미노"는 질소 원자가 적어도 1개의 탄소 또는 헤테로원자에 공유 결합된 화합물 또는 모이어티를 포함한다. 용어 "알킬아미노"는 질소가 적어도 1개의 추가의 알킬 기에 결합된 기 및 화합물을 포함한다. 용어 "디알킬 아미노"는 질소 원자가 적어도 2개의 추가의 알킬 기에 결합된 기를 포함한다.

[0158] 용어 "에테르"는 2개의 상이한 탄소 원자 또는 헤테로원자에 결합된 산소를 함유하는 화합물 또는 모이어티를 포함한다. 예를 들어, 이 용어는 또 다른 알킬 기에 공유 결합된 산소 원자에 공유 결합된 알킬, 알케닐 또는 알킬닐 기를 지칭하는 "알콕시알킬"을 포함한다.

[0159] 용어 "염기"는 기지의 퓨린 및 피리미딘 헤테로시클릭 염기, 테아자퓨린, 및 그의 유사체 (헤테로시클릭 치환된 유사체, 예를 들어 아미노에톡시 페녹사진 포함), 유도체 (예를 들어, 1-알킬-, 1-알케닐-, 헤테로방향족- 및 1-알킬닐 유도체) 및 호변이성질체를 포함한다. 퓨린의 예는 아데닌, 구아닌, 이노신, 디아미노퓨린 및 크산틴, 및 그의 유사체 (예를 들어, 8-옥소-N<sup>6</sup>-메틸아데닌 또는 7-디아자크산틴) 및 유도체를 포함한다. 피리미딘은 예를 들어 티민, 우라실 및 시토신, 및 그의 유사체 (예를 들어, 5-메틸시토신, 5-메틸우라실, 5-(1-프로피닐)우라실, 5-(1-프로피닐)시토신 및 4,4-에타노시토신)를 포함한다. 적합한 염기의 다른 예는 비-퓨리닐 및 비-피리미디닐 염기, 예컨대 2-아미노피리딘 및 트리아진을 포함한다.

[0160] 일부 측면에서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드의 뉴클레오모노머는 RNA 뉴클레오티드 (변형된 RNA 뉴클레오티드 포함)이다.

[0161] 용어 "뉴클레오시드"는 당 모이어티, 바람직하게는 리보스 또는 데옥시리보스에 공유 부착된 염기를 포함한다. 바람직한 뉴클레오시드의 예는 리보뉴클레오시드 및 데옥시리보뉴클레오시드를 포함한다. 뉴클레오시드는 또한 유리 카르복실 기, 유리 아미노 기 또는 보호기를 포함할 수 있는 아미노산 또는 아미노산 유사체에 연결된 염기를 포함한다. 적합한 보호기는 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다 (문헌 [P. G. M. Wuts and T. W. Greene, "Protective Groups in Organic Synthesis", 2<sup>nd</sup> Ed., Wiley-Interscience, New York, 1999] 참조).

[0162] 용어 "뉴클레오티드"는 포스페이트 기 또는 포스페이트 유사체를 추가로 포함하는 뉴클레오시드를 포함한다.

- [0163] 본원에 사용된 용어 "연결부"는 뉴클레오모노머에 인접하여 공유 커플링된, 자연 발생 비변형된 포스포디에스테르 모이어티 (-O-(PO<sup>2-</sup>)-O-)를 포함한다. 본원에 사용된 용어 "치환기 연결부"는 뉴클레오모노머에 인접하여 공유 커플링된 천연 포스포디에스테르 기의 임의의 유사체 또는 유도체를 포함한다. 치환기 연결부는 포스포디에스테르 유사체, 예를 들어 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 및 P-에티옥시포스포디에스테르, P-에톡시포스포디에스테르, P-알킬옥시포스포트리에스테르, 메틸포스포네이트, 및 인 무함유 연결부, 예를 들어 아세탈 및 아미드를 포함한다. 이러한 치환기 연결부는 관련 기술분야에 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Bjergarde et al. 1991. Nucleic Acids Res. 19:5843; Caruthers et al. 1991. Nucleosides Nucleotides. 10:47]). 특정 실시양태에서, 비-가수분해성 연결부, 예컨대 포스포로티오에이트 연결부가 바람직하다.
- [0164] 일부 측면에서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 3' 및 5' 말단을 포함한다 (원형 올리고뉴클레오티드는 제외). 폴리뉴클레오티드의 3' 및 5' 말단은, 예를 들어 3' 또는 5' 연결부를 변형시킴으로써, 뉴클레아제로부터 실질적으로 보호될 수 있다 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,849,902 및 WO 98/13526). 올리고뉴클레오티드는 "차단기"의 포함에 의해 저항성이 될 수 있다. 본원에 사용된 용어 "차단기"는 올리고뉴클레오티드 또는 뉴클레오모노머에 합성을 위한 보호기 또는 커플링기로서 부착될 수 있는 (예를 들어, OH 기 이외의) 치환기를 지칭한다 (예를 들어, FITC, 프로필 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 글리콜 (-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-), 포스페이트 (PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>), 수소 포스포네이트 또는 포스포아미다이트). "차단기"는 또한 변형된 뉴클레오티드 및 비-뉴클레오티드 엑소뉴클레아제 저항성 구조물을 포함하는 올리고뉴클레오티드의 5' 및 3' 말단을 보호하는 "말단 차단기" 또는 "엑소뉴클레아제 차단기"를 포함한다.
- [0165] 예시적인 말단-차단기는 캡 구조물 (예를 들어, 7-메틸구아노신 캡), 역전된 뉴클레오모노머 (예를 들어, 3'-3' 또는 5'-5' 말단 역전됨) (예를 들어, 문헌 [Ortiagao et al. 1992. Antisense Res. Dev. 2:129] 참조), 메틸포스포네이트, 포스포아미다이트, 비-뉴클레오티드 기 (예를 들어, 비-뉴클레오티드 링커, 아미노 링커, 접합체) 등을 포함한다. 3' 말단 뉴클레오모노머는 변형된 당 모이어티를 포함할 수 있다. 3' 말단 뉴클레오모노머는 올리고뉴클레오티드의 3'-엑소뉴클레아제 분해를 방지하는 차단기에 의해 임의로 치환될 수 있는 3'-O를 포함한다. 예를 들어, 3'-히드록실은 3'→3' 뉴클레오티드간 연결부를 통해 뉴클레오티드로 에스테르화될 수 있다. 예를 들어, 알킬옥시 라디칼은 메톡시, 에톡시, 또는 이소프로폭시, 바람직하게는 에톡시일 수 있다. 임의적으로, 3' 말단에서 3'→3' 연결된 뉴클레오티드는 치환기 연결부에 의해 연결될 수 있다. 뉴클레아제 분해를 감소시키기 위해, 5' 가장 말단의 3'→5' 연결부는 변형된 연결부, 예를 들어 포스포로티오에이트 또는 P-알킬옥시포스포트리에스테르 연결부일 수 있다. 바람직하게는, 5' 가장 말단의 2개의 3'→5' 연결부는 변형된 연결부이다. 임의적으로, 5' 말단 히드록시 모이어티는 인 함유 모이어티, 예를 들어 포스페이트, 포스포로티오에이트, 또는 P-에톡시포스페이트로 에스테르화될 수 있다.
- [0166] 일부 측면에서, 폴리뉴클레오티드는 DNA 및 RNA 둘 다를 포함할 수 있다.
- [0167] 일부 측면에서, 인접 폴리뉴클레오티드의 적어도 일부분은 치환기 연결, 예를 들어 포스포로티오에이트 연결에 의해 연결된다. 치환기 연결의 존재는 혈청 단백질에 대한 그의 보다 높은 친화도로 인해 약동학을 개선시킬 수 있다.
- [0168] 나노규모 구조물의 올리고뉴클레오티드는 바람직하게는 6 내지 100개 염기의 범위의 길이이다. 그러나, 6개 뉴클레오티드 초과 임의의 크기 (훨씬 많은 kb 길이)의 핵산은 충분한 면역조절 모티프가 존재하는 경우에 본 발명에 따른 면역 반응을 유도할 수 있다. 바람직하게는 핵산은 8 내지 100개 뉴클레오티드의 범위이고, 일부 실시양태에서 8 내지 50개 또는 8 내지 30개 뉴클레오티드의 크기이다.
- [0169] 일부 실시양태에서 면역조절 올리고뉴클레오티드는 변형된 백본, 예컨대 포스포로티오에이트 (PS) 백본을 갖는다. 다른 실시양태에서 면역조절 올리고뉴클레오티드는 포스포디에스테르 (PO) 백본을 갖는다. 또 다른 실시양태에서 면역조절 올리고뉴클레오티드는 혼합된 PO 및 PS 백본을 갖는다.
- [0170] 핵산-상호작용 복합체의 길항제 및 항원을 비롯한, 본 발명과 연관된 모달리티는 관련 기술분야에 공지된 임의의 수단에 의해 나노입자 코어에 부착될 수 있다. 나노입자에 올리고뉴클레오티드를 부착시키는 방법은 미국 특허 공개 번호 2010/0129808에 상세하게 기재되어 있으며 그로부터 참조로 포함된다.
- [0171] 나노입자는 폴리뉴클레오티드를 부착시키기 위해 관능화될 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 폴리뉴클레오티드가 관능화될 수 있다. 관능화를 위한 한 메카니즘은 알칸티올 방법이며, 이에 의해 올리고뉴클레오티드는 금 나노입자 또는 다른 금속, 반도체 또는 자성 물질을 포함하는 나노입자에 대한 부착 전에 그의 3' 또는 5' 말단

에서 알칸티올로 관능화된다. 이러한 방법은, 예를 들어 문헌 [Whitesides, Proceedings of the Robert A. Welch Foundation 39th Conference On Chemical Research Nanophase Chemistry, Houston, Tex., pages 109-121 (1995), 및 Mucic et al. Chem. Commun. 555-557 (1996)]에 기재되어 있다. 올리고뉴클레오티드는 또한 미국 특허 번호 5,472,881에 기재되어 있으며 그로부터 참조로 포함된 바와 같이 다른 관능기, 예컨대 포스포로티오에이트 기를 사용하거나, 또는 문헌 [Burwell, Chemical Technology, 4, 370-377 (1974) 및 Matteucci and Caruthers, J. Am. Chem. Soc., 103, 3185-3191 (1981)]에 기재되어 있으며 그로부터 참조로 포함된 바와 같이 치환된 알킬실록산을 사용하여 나노입자에 부착될 수 있다. 일부 경우에서, 폴리뉴클레오티드는 5' 또는 3' 티오뉴클레오티드로 폴리뉴클레오티드를 종결시킴으로써 나노입자에 부착된다. 다른 경우에서, 미국 특허 번호 6,361,944, 6,506,569, 6,767,702 및 6,750,016, 및 PCT 공개 번호 WO 1998/004740, WO 2001/000876, WO 2001/051665 및 WO 2001/073123에 기재되어 있으며 그로부터 참조로 포함된 바와 같이 나노입자에 폴리뉴클레오티드를 부착시키는데 노화 과정이 사용된다.

[0172] 일부 경우에서, 핵산 및/또는 항원은 금-티올 연결을 통해서와 같이 나노입자 코어에 공유적으로 부착될 수 있다. 스페이서 서열은 부착 부위와 흡수 제어 모이어티 및/또는 결합 모이어티 사이에 포함될 수 있다. 일부 실시양태에서, 스페이서 서열은 올리고뉴클레오티드, 펩티드, 중합체 또는 올리고에틸렌을 포함하거나 또는 그로 이루어진다.

[0173] 나노규모 구축물은 다중 화학으로 설계될 수 있다. 예를 들어, DTPA (디티올 포스포르아미다이트) 연결이 사용될 수 있다. DTPA는 티올에 의해 플레어의 세포내 방출에 저항하고, 신호 대 잡음 비를 증가시키는 역할을 할 수 있다.

[0174] 본원에 기재된 방법에 의해 생산된 접합체는 다른 방법에 의해 생산된 것들보다 상당히 더 안정하다. 이 증가된 안정성은 나노입자 코어의 표면 상의 올리고뉴클레오티드의 증가된 밀도 또는 코로나의 표면의 형성으로 인한 것이다. 계면활성제, 예를 들어 대략 0.01% 소듐 도데실설페이트 (SDS), 트윈 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)의 존재 하에 염 부가를 수행함으로써, 염 노화 과정이 약 1시간 내에 수행될 수 있다.

[0175] 표면 밀도는 나노입자의 크기 및 유형, 및 올리고뉴클레오티드의 길이, 서열 및 농도에 좌우될 수 있다. 나노입자를 안정하게 만드는데 적절한 표면 밀도 및 나노입자와 올리고뉴클레오티드의 목적하는 조합을 수득하는데 필요한 조건은 실험적으로 결정될 수 있다. 일반적으로, 적어도 10 피코몰/cm<sup>2</sup>의 표면 밀도가 안정한 나노입자-올리고뉴클레오티드 접합체를 제공하는데 적절할 것이다. 바람직하게는, 표면 밀도는 적어도 15 피코몰/cm<sup>2</sup>이다. 접합체의 올리고뉴클레오티드가 표적과 혼성화하는 능력은 표면 밀도가 너무 큰 경우에 감소할 수 있기 때문에, 표면 밀도는 임의로 약 35-40 피코몰/cm<sup>2</sup> 이하이다. 올리고뉴클레오티드가 적어도 10 pmol/cm<sup>2</sup>, 적어도 15 pmol/cm<sup>2</sup>, 적어도 20 pmol/cm<sup>2</sup>, 적어도 25 pmol/cm<sup>2</sup>, 적어도 30 pmol/cm<sup>2</sup>, 적어도 35 pmol/cm<sup>2</sup>, 적어도 40 pmol/cm<sup>2</sup>, 적어도 45 pmol/cm<sup>2</sup>, 적어도 50 pmol/cm<sup>2</sup>, 또는 50 pmol/cm<sup>2</sup> 이상의 표면 밀도에서 나노입자에 결합하는 방법이 또한 제공된다.

[0176] 본 발명의 측면은 치료 및/또는 진단 용도를 위한 나노규모 구축물의 대상체로의 전달에 관한 것이다. 입자는 생체내 투여를 위해 단독으로 또는 임의의 적절한 제약 담체, 예컨대 액체, 예를 들어 염수, 또는 분말로 투여될 수 있다. 이들은 또한 큰 담체 입자와 함께 또는 투여 장치 내에서 공-전달될 수 있다. 입자는 제제화될 수 있다. 본 발명의 제제는 제약상 허용되는 농도의 염, 완충제, 보존제, 상용성 담체, 아주반트 및 임의로 다른 치료 성분을 상용적으로 함유할 수 있는 제약상 허용되는 용액으로 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명과 연관된 나노규모 구축물은 물질, 예컨대 로션 (예를 들어, 아쿠아포어)와 혼합되고, 대상체의 피부에 투여되며, 이에 의해 나노규모 구축물이 대상체의 피부를 통해 전달된다. 관련 기술분야에 공지된 임의의 나노입자 전달 방법이 본 발명의 측면과 상용성일 수 있는 것으로 인지되어야 한다.

[0177] 요법에 사용하기 위해, 유효량의 입자는 입자를 목적하는 세포로 전달하는 임의의 방식에 의해 대상체에게 투여될 수 있다. 제약 조성물의 투여는 통상의 기술자에게 공지된 임의의 수단에 의해 달성될 수 있다. 투여 경로는 경구, 비경구, 근육내, 정맥내, 피하, 점막, 비강내, 설하, 기관내, 흡입, 안구, 질, 피부, 직장 및 직접 주사를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0178] 따라서, 본 발명은 한 측면에서 핵산-상호작용 복합체의 길항제가 면역 조정 효과를 매개하는데 고도로 효과적이라는 발견을 수반한다. 이들 핵산-상호작용 복합체의 길항제는 암, 감염성 질환, 알레르기, 천식, 자가면역 질환 및 다른 염증성 기반 질환을 치료하기 위해 면역계를 조정하는데 치료적으로 및 예방적으로 유용하다.

- [0179] 다른 측면에 따르면 본 발명은 대상체에게 본원에 기재된 바와 같은 나노규모 구축물을 면역 반응을 감소시키기 위한 유효량으로 투여하는 것을 수반하는, 대상체를 치료하는 방법이다. 일부 실시양태에서 대상체는 감염성 질환, 암, 자가면역 질환, 천식 또는 알레르기성 질환, 염증성 질환, 대사 질환, 심혈관 질환을 가지거나, 또는 조직 또는 기관 이식의 수용자에 대한 후보 또는 상기 수용자이다.
- [0180] 대사 질환의 예는 제I형 당뇨병; 탄수화물 대사, 아미노산 대사, 유기산 대사, 지방산 산화 및 미토콘드리아 대사, 프로피린 대사, 퓨린 또는 피리미딘 대사, 스테로이드 대사, 리소솜 미토콘드리아 기능, 피옥시솜 기능, 리소솜 저장의 장애; 우레아 사이클 장애 (예를 들어, N-아세틸 글루타메이트 신테타제 결핍, 카르바밀포스페이트 신타제 결핍, 오르니틴 카르바밀 트랜스퍼라제 결핍, 아르기니노숙신산뇨, 시트룰린혈증, 아르기나제 결핍), 아미노산 장애 (예를 들어, 비-케톤성 고글리신혈증, 티로신 혈증 (제I형), 메이플 시럽노 질환), 유기산혈증 (예를 들어, 이소발레르산혈증, 메틸말론산혈증, 프로피온산혈증, 제I형 글루타르산뇨, 제I형 및 제II형 글루타르산혈증), 미토콘드리아 장애 (예를 들어, 카르복실라제 결핍, 미토콘드리아 근병증, 락트산 산증 (피루베이트 데히드로게나제 복합체 결핍), 선천성 락트산 산증, 미토콘드리아 호흡 사슬 결핍, 시스틴축적증, 고셔병, 파브리병, 폼페병, 뮤코폴리사카라이드증 I, 뮤코폴리사카라이드증 II, 뮤코폴리사카라이드증 VI)를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0181] 심혈관 질환은 심장 및 혈관계의 수많은 장애를 지칭한다. 전형적으로, 심혈관 질환은 심장 비대; 심근경색; 졸중; 동맥경화증; 및 심부전을 포함하는 군으로부터 선택된다. 일부 경우에서 심혈관 질환은 염증, 예컨대 아테롬성동맥경화증과 연관된 염증과 연관된다.
- [0182] 본 발명의 일부 측면에 유용한 핵산-상호작용 복합체의 길항제는 알레르기 또는 천식, 감염성 유기체에 의한 감염 또는 특정한 암 항원이 확인된 바 있는 암을 발달시킬 위험이 있는 대상체 또는 그를 갖는 대상체의 치료를 위한 백신이다. 이 경우에, 백신은 관용원성 백신일 수 있다. 이들은 면역억제제와 함께 투여될 수 있다. 특히, 알레르기, 알레르기성 질환 및 자가면역 질환의 치료에 특히 유용하다. 핵산-상호작용 복합체의 길항제는 또한 감염, 알레르기 또는 암에 대한 보호를 위한 항원 또는 알레르겐 없이 주어질 수 있고, 이 경우에 반복 용량은 보다 긴 기간 보호를 가능하게 할 수 있다. 본원에 사용된 위험이 있는 대상체는 감염 야기 병원체 또는 암 또는 알레르겐에 대한 임의의 노출 위험 또는 암을 발달시킬 위험을 갖는 대상체이다.
- [0183] 감염을 갖는 대상체는 감염성 병원체에 노출된 바 있고 체내에 급성 또는 만성 검출가능한 수준의 병원체를 갖는 대상체이다. 면역조절 올리고뉴클레오티드는 감염과 연관된 면역 반응을 감소시키는데 사용될 수 있다. 대상체가 패혈증을 발달시킬 위험이 있는 경우에 특히 바람직하다. 본 발명의 구축물은 감염, 예컨대 패혈증과 연관된 이상 반응을 예방하는데 유용하다.
- [0184] 알레르기를 갖는 대상체는 알레르겐에 반응하여 알레르기성 반응을 갖거나 또는 이러한 반응을 발달시킬 위험이 있는 대상체이다. 알레르기는 물질 (알레르겐)에 대한 후천성 과민증을 지칭한다. 알레르기성 상태는 습진, 알레르기성 비염 또는 코감기, 고초열, 결막염, 기관지 천식, 두드러기 (심마진) 및 식품 알레르기, 및 다른 아토피성 상태를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0185] 암을 갖는 대상체는 검출가능한 암성 세포를 갖는 대상체이다. 특히 암은 만성 염증과 연관된 암이다. 예를 들어, 감염에 의해 야기된 염증과 연관된 암 또는 만성 염증성 장 질환과 같은 상태는 상당수의 암과 연관된다. 암 위험 또는 진행을 증가시키는 만성 염증의 일부 유발인자는 감염 (예를 들어 위암 및 점막 림프종에 대해 헬리코박터 필로리(*Helicobacter pylori*); 자궁경부 및 간 암종에 대해 각각 유두종 바이러스 및 간염 바이러스), 자가면역 질환 (예를 들어 결장암에 대해 염증성 장 질환) 및 불확실한 기원의 염증성 상태 (예를 들어 전립선 암에 대해 전립선염)를 포함한다. 본 발명의 구축물은 만성 염증을 제어하거나, 암을 야기 또는 악화시키는 유발인자를 감소시키는데 보조한다.
- [0186] 대상체는 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 양, 염소, 칠면조, 닭, 영양류, 예를 들어 원숭이, 및 어류 (양식 종), 예를 들어 연어를 포함하나 이에 제한되지는 않는 인간 또는 척추동물물 의미를 지닌 것이다. 따라서, 본 발명은 또한 비-인간 대상체에서 암 및 종양, 감염, 및 알레르기/천식을 치료하는데 사용될 수 있다.
- [0187] 본원에 사용된, 감염성 질환, 암, 알레르기 또는 천식과 같은 장애에 관하여 사용된 경우의 용어 치료하다, 치료된 또는 치료하는은 대상체의 질환의 발달 (예를 들어 병원체에 의한 감염)에 대한 저항성을 증가시키거나 또는 달리 말하면 대상체가 질환을 발달시킬 (예를 들어 병원체에 의해 감염될) 가능성을 감소시키는 예방적 치료, 뿐만 아니라 대상체가 질환을 발달시킨 후에 질환에 대항하기 위한 (예를 들어 감염을 감소시키거나 또는 제거하기 위한) 또는 질환이 악화되는 것을 방지하기 위한 치료를 지칭한다.

- [0188] 본원에 사용된 항원은 면역 반응을 유발할 수 있는 분자이다. 항원은 세포, 세포 추출물, 단백질, 폴리펩티드, 펩티드, 폴리사카라이드, 폴리사카라이드 접합체, 폴리사카라이드 및 다른 분자의 펩티드 및 비-펩티드 모방체, 소분자, 지질, 당지질, 탄수화물, 바이러스 및 바이러스 추출물, 및 다세포 유기체, 예컨대 기생충, 및 알레르겐을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 용어 항원은 넓게는 숙주 면역계에 의해 외래의 것으로 인식되는 임의의 유형의 분자를 포함한다. 항원은 암 항원, 미생물 항원 및 알레르겐을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0189] 본원에 사용된 암 항원은, 종양 또는 암 세포 표면과 연관되며 MHC 분자와 관련하여 항원 제시 세포의 표면에 발현되는 경우에 면역 반응을 유발할 수 있는 화합물, 예컨대 펩티드 또는 단백질이다. 암 항원은, 예를 들어 문헌 [Cohen, et al., 1994, Cancer Research, 54:1055]에 기재된 바와 같이 암 세포의 조 추출물을 제조하거나, 항원을 부분적으로 정제하거나, 재조합 기술에 의해, 또는 공지된 항원의 신생 합성에 의해 암 세포로부터 제조될 수 있다. 암 항원은 재조합적으로 발현되는 항원, 그의 면역원성 부분, 또는 전체 종양 또는 암을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 이러한 항원은 재조합적으로 또는 관련 기술분야에 공지된 임의의 다른 수단에 의해 단리 또는 제조될 수 있다.
- [0190] 본원에 사용된 미생물 항원은 미생물의 항원이고, 바이러스, 박테리아, 기생충 및 진균을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 이러한 항원은 무손상 미생물뿐만 아니라 천연 단리물 및 그의 단편 또는 유도체 및 또한 천연 미생물 항원과 동일 또는 유사하고 그러한 미생물에 특이적인 면역 반응을 유도하는 합성 화합물을 포함한다. 화합물이 천연 미생물 항원에 대해 면역 반응 (체액성 및/또는 세포성)을 유도할 경우에 그것은 천연 미생물 항원과 유사하다. 이러한 항원은 관련 기술분야에서 상용적으로 사용되고, 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있다.
- [0191] 알레르겐은 감수성 대상체에서 알레르기성 또는 천식 반응을 유도할 수 있는 물질 (항원)을 지칭한다. 알레르겐의 목록은 방대하고, 화분, 곤충 독, 동물 비듬 가루, 진균 포자 및 약물 (예를 들어 페니실린)을 포함할 수 있다. 천연, 동물 및 식물 알레르겐의 예는 하기 속에 특이적인 단백질을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다: 카닌(*Canine*) (카니스 파밀리아리스(*Canis familiaris*)); 더마토파고이데스(*Dermatophagoides*) (예를 들어 더마토파고이데스 파리나에(*Dermatophagoides farinae*)); 펠리스(*Felis*) (펠리스 도메스티쿠스(*Felis domesticus*)); 암브로시아(*Ambrosia*) (암브로시아 아르테미스폴리아(*Ambrosia artemisiifolia*)); 롤리움(*Lolium*) (예를 들어 롤리움 페렌네(*Lolium perenne*) 또는 롤리움 멀티플로룸(*Lolium multiflorum*)); 크립토펠리아(*Cryptomeria*) (크립토펠리아 자포니카(*Cryptomeria japonica*)); 알테르나리아(*Alternaria*) (알테르나리아 알테르나타(*Alternaria alternata*)); 알더(*Alder*); 알누스(*Alnus*) (알누스 글루티노아사(*Alnus glutinosa*)); 베틀라(*Betula*) (베틀라 베루코사(*Betula verrucosa*)); 퀘르쿠스(*Quercus*) (퀘르쿠스 알바(*Quercus alba*)); 올레아(*Olea*) (올레아 유로파(*Olea europaea*)); 아르테미시아(*Artemisia*) (아르테미시아 불가리스(*Artemisia vulgaris*)); 플란타고(*Plantago*) (예를 들어 플란타고 란세올라타(*Plantago lanceolata*)); 파리에타리아(*Parietaria*) (예를 들어 파리에타리아 오피시날리스(*Parietaria officinalis*) 또는 파리에타리아 주다이카(*Parietaria judaica*)); 블라텔라(*Blattella*) (예를 들어 블라텔라 게르마니카(*Blattella germanica*)); 아피스(*Apis*) (예를 들어 아피스 멀티플로룸(*Apis multiflorum*)); 쿠프레수스(*Cupressus*) (예를 들어 쿠프레수스 셴페르비렌스(*Cupressus sempervirens*), 쿠프레수스 아리조니카(*Cupressus arizonica*) 및 쿠프레수스 매크로카르파(*Cupressus macrocarpa*)); 주니페루스(*Juniperus*) (예를 들어 주니페루스 사비노이데스(*Juniperus sabinoides*), 주니페루스 비르기니아나(*Juniperus virginiana*), 주니페루스 코뮤니스(*Juniperus communis*) 및 주니페루스 아스헤이(*Juniperus ashei*)); 투야(*Thuja*) (예를 들어 투야 오리엔탈리스(*Thuja orientalis*)); 카마에시파리스(*Chamaecyparis*) (예를 들어 카마에시파리스 오브투사(*Chamaecyparis obtusa*)); 페리플라네타(*Periplaneta*) (예를 들어 페리플라네타 아메리카나(*Periplaneta americana*)); 아그로피론(*Agropyron*) (예를 들어 아그로피론 레펜스(*Agropyron repens*)); 세칼레(*Secale*) (예를 들어 세칼레 세레알레(*Secale cereale*)); 트리티쿰(*Triticum*) (예를 들어 트리티쿰 아에스티BUM(*Triticum aestivum*)); 닥틸리스(*Dactylis*) (예를 들어 닥틸리스 글로메라타(*Dactylis glomerata*)); 페스투카(*Festuca*) (예를 들어 페스투카 엘라티오르(*Festuca elatior*)); 포아(*Poa*) (예를 들어 포아 프라텐시스(*Poa pratensis*) 또는 포아 콤프레사(*Poa compressa*)); 아베나(*Avena*) (예를 들어 아베나 사티바(*Avena sativa*)); 홀쿠스(*Holcus*) (예를 들어 홀쿠스 라나투스(*Holcus lanatus*)); 안톡산툼(*Anthoxanthum*) (예를 들어 안톡산툼 오도라툼(*Anthoxanthum odoratum*)); 아레나테룸(*Arrhenatherum*) (예를 들어 아레나테룸 엘라티우스(*Arrhenatherum elatius*)); 아그로스티스(*Agrostis*) (예를 들어 아그로스티스 알바(*Agrostis alba*)); 플레움(*Phleum*) (예를 들어 플레움 프라텐세(*Phleum pratense*)); 팔라리스(*Phalaris*) (예를 들어 팔라리스 아룬디나세아(*Phalaris arundinacea*)); 파스팔룸(*Paspalum*) (예를 들어

파스팔룸 노나툼(*Paspalum notatum*); 소르굼(*Sorghum*) (예를 들어 소르굼 할레펜시스(*Sorghum halepensis*)); 및 브로무스(*Bromus*) (예를 들어 브로무스 이네르미스(*Bromus inermis*)).

- [0192] 본 발명의 나노규모 구축물은 또한 항미생물제로 코팅되거나 또는 항미생물제와 함께 투여될 수 있다. 본원에 사용된 항미생물제는 감염성 미생물을 사멸시키거나 억제할 수 있는 자연 발생 또는 합성 화합물을 지칭한다. 본 발명에 따른 유용한 항미생물제의 유형은 대상체를 감염시키거나 감염시킬 위험이 있는 미생물의 유형에 좌우될 것이다. 항미생물제는 항박테리아제, 항바이러스제, 항진균제 및 항기생충제를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. "항감염제", "항박테리아제", "항바이러스제", "항진균제", "항기생충제" 및 "살기생충제"와 같은 어구는 통상의 기술자에게 널리 확립된 의미를 가지며, 표준 의학 교재에 정의되어 있다. 간단히 설명하면, 항박테리아제는 박테리아를 사멸시키거나 억제하고, 항생제뿐만 아니라 유사한 기능을 갖는 다른 합성 또는 천연 화합물을 포함한다. 항생제는 세포, 예컨대 미생물에 의해 2차 대사물로서 생산되는 저분자량 분자이다. 일반적으로, 항생제는 미생물에 특이적이며 숙주 세포에 존재하지 않는 하나 이상의 박테리아 기능 또는 구조를 방해한다. 항바이러스제는 천연 공급원으로부터 단리되거나 합성될 수 있고, 바이러스를 사멸시키거나 억제하는데 유용하다. 항진균제는 표제 진균 감염뿐만 아니라 기회 및 원발성 진신 진균 감염을 치료하는데 사용된다. 항기생충제는 기생충을 사멸시키거나 억제한다.
- [0193] 항박테리아제는 박테리아의 성장 또는 기능을 사멸시키거나 억제한다. 항박테리아제의 큰 부류는 항생제이다. 폭넓은 범위의 박테리아를 사멸시키거나 억제하는데 효과적인 항생제는 광역 항생제로 지칭된다. 다른 유형의 항생제는 우세하게 부류 그람-양성 또는 그람-음성 박테리아에 대해 효과적이다. 이들 유형의 항생제는 협역 항생제로 지칭된다. 단일 유기체 또는 질환에 대해서는 효과적이지만 다른 유형의 박테리아에 대해서는 효과적이지 않은 다른 항생제는 제한역 항생제로 지칭된다. 항박테리아제는 때때로 그의 주요 작용 방식을 기준으로 분류된다. 일반적으로, 항박테리아제는 세포벽 합성 억제제, 세포막 억제제, 단백질 합성 억제제, 핵산 합성 또는 기능 억제제 및 경쟁적 억제제이다.
- [0194] 항바이러스제는 바이러스에 의한 세포의 감염 또는 세포 내의 바이러스의 복제를 방지하는 화합물이다. 바이러스 복제 과정은 숙주 세포 내의 DNA 복제와 밀접하게 관련되고 비-특이적 항바이러스제는 종종 숙주에 대해 독성이기 때문에, 항박테리아 약물보다 항바이러스 약물의 수가 훨씬 더 적다. 바이러스 감염 과정 내에는 항바이러스제에 의해 차단되거나 억제될 수 있는 여러 단계가 존재한다. 이들 단계는 숙주 세포에 대한 바이러스의 부착 (이뮤노글로불린 또는 결합 펩티드), 바이러스의 비코팅 (예를 들어 아만타딘), 바이러스 mRNA의 합성 또는 번역 (예를 들어 인터페론), 바이러스 RNA 또는 DNA의 복제 (예를 들어 뉴클레오티드 유사체), 새로운 바이러스 단백질의 성숙 (예를 들어 프로테아제 억제제) 및 바이러스의 출아 및 방출을 포함한다.
- [0195] 본원에 사용된 용어 "암 항원" 및 "종양 항원"은 암 세포에 의해 차등 발현되며 이로써 암 세포를 표적화하기 위해 이용될 수 있는 항원을 지칭하는 것으로 상호교환적으로 사용된다. 암 항원은 잠재적으로 종양-특이적 면역 반응을 분명히 자극할 수 있는 항원이다. 이들 항원 중 일부는 정상 세포에 의해 코딩되며, 정상 세포에 의해 반드시 발현되지는 않는다. 이들 항원은 정상 세포에서는 통상적으로 침묵 (즉, 발현되지 않음)인 항원, 특정 분화 단계에서만 발현되는 항원, 및 배아 및 태아 항원과 같이 일시적으로 발현되는 항원인 것을 특징으로 할 수 있다. 다른 암 항원은 종양유전자 (예를 들어, 활성화된 ras 종양유전자), 억제 유전자 (예를 들어, 돌연변이체 p53), 내부 결실 또는 염색체 전위로부터 생성되는 융합 단백질과 같은 돌연변이체 세포 유전자에 의해 코딩된다. 또 다른 암 항원은 RNA 및 DNA 종양 바이러스에 보유된 것과 같은 바이러스 유전자에 의해 코딩될 수 있다.
- [0196] 핵산-상호작용 복합체의 길항제는 또한 자가면역 질환을 치료 및 예방하는데 유용하다. 자가면역 질환은 대상체 자신의 항체가 숙주 조직과 반응하거나 또는 면역 이펙터 T 세포가 내인성 자기-펩티드에 대해 자가반응성이어서 조직의 파괴를 야기하는 질환의 부류이다. 따라서 자기-항원으로 지칭되는 대상체 자신의 항원에 대해 면역 반응이 설정된다. 자가면역 질환은 류마티스 관절염, 크론병, 다발성 경화증, 진신 홍반성 루푸스 (SLE), 자가면역 뇌척수염, 중증 근무력증 (MG), 하시모토 갑상선염, 굿패스처 증후군, 천포창 (예를 들어, 심상성 천포창), 그레이브스병, 자가면역 용혈성 빈혈, 자가면역 혈소판감소성 자반증, 항-콜라겐 항체를 동반한 경피증, 혼합 결합 조직 질환, 다발근염, 악성 빈혈, 특발성 애디슨병, 자가면역-연관 불임, 사구체신염 (예를 들어, 초승달 사구체신염, 증식성 사구체신염), 수포성 유천포창, 쇼그렌 증후군, 인슐린 저항성 및 자가면역 당뇨병을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0197] 본원에 사용된 "자기-항원"은 정상 숙주 조직의 항원을 지칭한다. 정상 숙주 조직은 암 세포를 포함하지 않는다. 따라서 자가면역 질환과 관련하여 자기-항원에 대해 설정된 면역 반응은 바람직하지 않은 면역 반응이고

정상 조직의 파괴와 손상에 기여하는 반면에, 암 항원에 대해 설정된 면역 반응은 바람직한 면역 반응이고 종양 또는 암의 파괴에 기여한다. 따라서, 자가면역 장애를 치료하는 것을 목표로 하는 본 발명의 일부 측면에서, 면역조절 핵산이 자기-항원, 특히 자가면역 장애의 표적인 자기-항원과 함께 투여되지 않는 것이 권장된다.

[0198] 다른 경우에서, 면역조절 핵산은 저용량의 자기-항원과 함께 전달될 수 있다. 수많은 동물 연구는 저용량의 항원의 점막 투여가 면역 저반응성 또는 "관용"의 상태를 유발할 수 있다는 것을 입증하였다. 활성 메카니즘은 Th1로부터 Th2 및 Th3 우세 (즉, TGF-β 우세형) 반응을 향한 시토카인-매개된 면역 편향인 것처럼 보인다. 저용량 항원 전달에 의한 활성 억제는 또한 자가면역 질환, 예를 들어 류마티스 관절염 및 SLE의 요법에 대해 상당히 관심있는 비관련 면역 반응을 억제할 수 있다 (방관자 억제). 방관자 억제는 염증유발 및 Th1 시토카인이 항원-특이적 또는 항원-비특이적 방식으로 방출되는 국부 환경에서 Th1-반대-조절, 억제자 시토카인의 분비를 수반한다. 본원에 사용된 "관용"은 이 현상을 지칭하는데 사용된다. 사실상, 경구 관용은 실험적 자가면역 뇌척수염 (EAE), 실험적 자가면역 중증 근무력증, 콜라겐-유도된 관절염 (CIA) 및 인슐린-의존성 당뇨병을 비롯한 동물에서의 수많은 자가면역 질환의 치료에 효과적인 바 있다. 이들 모델에서, 자가면역 질환의 예방 및 억제는 항원-특이적 체액성 및 세포성 반응의 Th1로부터 Th2/Th3 반응으로의 전환과 연관된다.

[0199] 또 다른 측면에서, 본 발명은 이전에 논의된 조성물 중 하나 이상을 포함하는 키트에 관한 것이다. 본원에 사용된 "키트"는 전형적으로 본 발명의 조성물 중 하나 이상 및/또는 본 발명과 연관된 다른 조성물, 예를 들어 이전에 기재된 것들을 포함하는 패키지 또는 조립체를 정의한다. 키트의 각각의 조성물은, 존재하는 경우에, 액체 형태로 (예를 들어, 용액으로), 또는 고체 형태로 (예를 들어, 건조된 분말로) 제공될 수 있다. 특정 경우에서, 조성물 중 일부는, 예를 들어 키트와 함께 제공될 수 있거나 또는 제공될 수 없는 적합한 용매 또는 다른 종의 첨가에 의해 (예를 들어, 활성 형태로) 구성될 수 있거나 또는 다르게는 가공될 수 있다. 본 발명과 연관될 수 있는 다른 조성물의 예는, 예를 들어 샘플 및/또는 대상체에 대한 특정한 용도를 위해 조성물 또는 성분을 사용, 투여, 변형, 조립, 보관, 포장, 제조, 혼합, 희석 및/또는 보존하기 위한 용매, 계면활성제, 희석제, 염, 완충제, 유화제, 킬레이트화제, 충전제, 향산화제, 결합제, 벌크제, 보존제, 건조제, 항미생물제, 바늘, 시린지, 포장 재료, 튜브, 병, 플라스크, 비커, 디쉬, 프릿, 필터, 링, 클램프, 랩, 패치, 용기, 테이프, 접착제 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0200] 일부 실시양태에서, 본 발명과 연관된 키트는 하나 이상의 나노입자 코어, 예컨대 금을 포함하는 나노입자 코어를 포함한다. 키트는 또한 핵산-상호작용 복합체의 하나 이상의 길항제를 포함할 수 있다. 키트는 또한 하나 이상의 항원을 포함할 수 있다.

[0201] 본 발명의 키트는, 일부 경우에서, 본 발명의 조성물과 함께 제공되는 임의의 형태의 지침서를 그 지침서가 본 발명의 조성물과 연관된 것임을 통상의 기술자가 인식하는 방식으로 포함할 수 있다. 예를 들어, 지침서는 본 조성물 및/또는 키트와 연관된 다른 조성물의 사용, 변형, 혼합, 희석, 보존, 투여, 조립, 보관, 포장 및/또는 제조에 대한 지침서를 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 지침서는 또한 예를 들어 샘플에 대한, 예를 들어 특정한 용도를 위한, 조성물의 사용에 대한 지침서를 포함할 수 있다. 지침서는, 이러한 지침서를 함유하는 적합한 매체, 예를 들어 임의의 방식으로 제공되는 서면 또는 출판, 구두, 가청 (예를 들어, 전화), 디지털, 광학, 시각 (예를 들어, 비디오테이프, DVD 등) 또는 전자 통신 (인터넷 또는 웹-기반 통신 포함)으로서 통상의 기술자에 의해 인식가능한 임의의 형태로 제공될 수 있다.

[0202] 일부 실시양태에서, 본 발명은 본원에 논의된 바와 같은 본 발명의 하나 이상의 실시양태를 관측하는 방법에 관한 것이다. 본원에 사용된 "관측하는"은 본원에 논의된 바와 같은 본 발명의 시스템, 장치, 기기, 물품, 방법, 조성물, 키트 등과 연관된 판매, 광고, 배정, 라이선싱, 계약, 지시, 교육, 연구, 수입, 수출, 협상, 재무, 대부, 무역, 매각, 전매, 분배, 수리, 교체, 보험, 소송, 특허 등의 방법을 포함하나 이에 제한되지는 않는 모든 사업 방법을 포함한다. 관측 방법은 개인 집단, 기업 (공적 또는 사적), 합자회사, 주식회사, 기업합동, 계약상 또는 하위-계약상 대리인, 교육 기관, 예컨대 단과대학 및 종합대학, 연구 기관, 병원 또는 다른 임상 기관, 정부 기관 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는 임의의 집단에 의해 수행될 수 있다. 관측 활동은 본 발명과 분명히 연관된 임의의 형태의 통신 (예를 들어, 서면, 구두 및/또는 전자 통신, 예컨대 이들에 제한되지는 않지만, 이메일, 전화, 인터넷, 웹-기반 통신 등)을 포함할 수 있다.

[0203] 한 세트의 실시양태에서, 관측 방법은 하나 이상의 지침서를 수반할 수 있다. 본원에 사용된 "지침서"는 교육용 유틸리티의 구성요소 (예를 들어, 사용법, 안내서, 경고문, 표지, 알림, FAQ 또는 "자주 하는 질문" 등)를 정의할 수 있으며, 전형적으로 본 발명 및/또는 본 발명의 포장에 관한 또는 이와 연관된 서면 지침서를 수반한다. 지침서는 또한, 이러한 지침서가, 예를 들어 본원에 논의된 바와 같은 본 발명과 연관된 것임을 사용자가

분명히 인식할 임의의 방식으로 제공되는 임의의 형태 (예를 들어, 구두, 전자, 가청, 디지털, 광학, 시각 등) 의 교육용 통신을 포함할 수 있다.

[0204] 본 발명은 하기 실시예에 의해 추가로 예시되지만, 어떠한 방식으로든지 이로 인해 추가로 제한되는 것으로 간주되지 않아야 한다. 본원 전체에 걸쳐 인용되는 모든 참고문헌 (문헌상의 참고문헌, 공고된 특허, 공개된 특허 출원, 및 공동-계류중인 특허 출원 포함)의 전체 내용은 본원에 명백하게 참조로 포함된다.

[0205] 실시예

[0206] 실시예 1:

[0207] TLR9를 억제하는 4종의 주요 강력한 서열, ODN2088<sup>14,15</sup>, ODN G<sup>12,17</sup>, ODN MT01<sup>22</sup>, 및 ODN 4084F<sup>13,16</sup>가 확인된 바 있다. 이들을 표 1에 제시한다. 본 발명자들은 이들 서열을 사용하여 구축물을 개발하였다. 이들 구축물은 본원 곳곳에서 irSNA로 지칭된다. irSNA는 다양한 자극 조건 하에서 TLR9 활성화를 억제하는데 효과적인 것으로 본원에서 입증되었다. 이러한 과제를 달성하기 위해, 본 발명자들은 RAW-블루 뮤린 대식세포 리포터 라인 시스템 (인비보젠(Invivogen))을 사용하였다. 간략하게, RAW-블루 시스템은 TLR 활성화의 NFκB 신호전달 하류에 반응성인 리포터 플라스미드를 안정적으로 발현하는 뮤린 대식세포로 이루어진다. 이러한 NFκB-제어 플라스미드는 세포에 의해 분비되는 알칼리성 포스포타제를 발현하고, 이는 살아있는 세포에서 TLR 활성화를 모니터링하기 위해 수집되어 비색 검출 작용제를 사용하여 정량화될 수 있다. 본 발명자들은 RAW-블루 세포를 증가하는 농도의 각각의 유형의 천연 포스포디에스테르 (po) 또는 포스포로티오에이트 (ps) 백본을 갖는 유리 irDNA 올리고뉴클레오티드 또는 각각 각각의 면역조절 올리고뉴클레오티드로 로딩된 irSNA (표 1 참조)와 2시간 동안 인큐베이션시켰다. 이러한 인큐베이션 후에, 둘 다 TLR9<sup>1,10</sup>를 자극하는 것으로 공지되어 있는 포스포로티오에이트 백본을 갖는 0.5 μM CpG-함유 DNA 또는 포스포디에스테르 백본을 갖는 10 μM CpG-함유 DNA로 세포를 자극하고, 세포를 밤새 인큐베이션시켰다. 이어서 리포터 검정을 사용하여 TLR9 활성화를 측정하고, 상대적 활성화 수준을 면역조절 DNA 또는 SNA 구축물의 농도에 대해 플롯팅하고, 비-선형 최소 제곱 회귀 피트를 사용하여 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism) 소프트웨어를 사용하여 기울기를 1로 가정하여 IC<sub>50</sub> 값을 결정하였다.

[0208] 결과를 도 1에 제시한다. 2088 DNA는 553 nM의 IC<sub>50</sub>으로 높은 나노몰 효능을 나타낸 반면에, 상응하는 irSNA 구축물, AST-012의 IC<sub>50</sub> 값은 검정에서의 투약 한계로 인해 결정할 수 없었다 (도 1a). G DNA는 4.2nM의 낮은 나노몰 IC<sub>50</sub>을 나타내었지만, 높은 농도에서 SNA로의 안정한 혼입과 상용되지 않았다 (도 1b). MT01 DNA는 278.6 nM의 IC<sub>50</sub>을 가졌고, 각각의 irSNA, AST-014의 IC<sub>50</sub>은 검정에서의 투약 한계로 인해 결정할 수 없었다 (도 1c). 그러나, 4084F DNA는 1.6 nM의 IC<sub>50</sub>으로 가장 강력한 효능을 나타내었고, 각각의 AST-015 SNA 유사체는 1.3 nM의 IC<sub>50</sub>으로 동등 효능을 입증하였다. 이는 AST-015 구축물이 유리 올리고뉴클레오티드만큼 효과적이고, irDNA 서열이 SNA 아키텍처와 상용성임을 입증하였다. 따라서, 도 1에 제시된 바와 같이 AST-015는 대식세포-유사 RAW-블루 세포에서 CpG-유도된 TLR9 활성화를 억제할 수 있다.

[0209] 실시예 2

[0210] 면역조절 올리고뉴클레오티드를 사용하는 현행 요법은 생물학적 유체에서 올리고뉴클레오티드의 분해를 방지하기 위해 포스포로티오에이트 백본의 사용을 필요로 한다. 그러나, 포스포로티오에이트 백본은 원치않는 수준의 독성을 도입하고, 천연 포스포디에스테르 백본이 사용될 수 있는 경우가 특히 유리하다. 본 발명자들은 천연 포스포디에스테르 화학을 혼입시킨 SNA가 TLR 활성을 차단하는 능력을 시험하였다. 본 발명자들은 먼저 면역조절 구축물, po 또는 ps 화학의 유리 4084F DNA, 또는 po 또는 ps 화학의 AST-015와 사전-인큐베이션시킨 세포가 대식세포-유사 세포 (RAW-블루)를 TLR9 길항제 CpG DNA에 대해 불응성 있게 할 것인지 여부를 조사하였다. 간략하게, 면역조절 구축물을 세포에 증가하는 농도로 2시간 동안 첨가하여 엔도솜 구획 내로 흡수 및 혼입되게 하였다. 이러한 인큐베이션에 이어서, 0.5 μM CpG DNA 1668ps 또는 10 μM CpG DNA 1826po를 첨가하고, 세포를 밤새 인큐베이션한 다음, 상기 기재된 바와 같이 자극을 정량화하였다.

[0211] 비교를 위한 기준선으로서, 본 발명자들은 먼저 유리 4084F DNA의 효능을 조사하였다. 결과를 도 2에 제시한다. 포스포디에스테르 CpG 자극 DNA로 챌린지한 경우에, 4084F DNApo는 7.1 nM의 IC<sub>50</sub>을 가진 반면에 4084F DNAps는 IC<sub>50</sub>이 0.4 nM로 약 한 자릿수 더 효과적이었다. 이는 유리 4084F의 포스포디에스테르 및 포스포로티오에이트 버전 둘 다가 유리 포스포디에스테르 CpG-유도된 면역자극을 차단할 수 있음을 입증한다 (도

2a). 동일한 시스템에서, 보다 안정한 포스포로티오에이트 CpG DNA로 챌린지한 경우에, 유리 4084F DNApo는 자극을 차단할 수 없었지만, 4084F DNAs는 4 nM의 IC<sub>50</sub>으로 자극을 차단할 수 있었다 (도 2b). 비교를 위한 기준선으로서 이들 값을 사용하여, 본 발명자들은 다음으로 AST-015에 대한 효능 값을 결정하였다. 포스포디에스테르 CpG DNA로 챌린지한 경우에, AST-015po는 7.1 nM의 IC<sub>50</sub>을 가진 반면에 AST015ps는 1.4 nM의 IC<sub>50</sub>을 가졌고, 둘 다 유리 DNA의 값과 거의 동일하였다 (도 2c). 흥미롭게도, 보다 안정한 포스포로티오에이트 CpG DNA로 챌린지한 경우에, 앞서 그의 유리 DNA 유사체는 포스포로티오에이트 CpG DNA에 대해 효과적이지 않았지만, AST-015po는 IC<sub>50</sub>이 24.1 nM로 효과적이었다. AST-015ps 처리도 또한 IC<sub>50</sub>이 0.7 nM로 효과적이었다 (도 2d). 이들 데이터는 면역조절 DNA 서열의 SNA 아키텍처로의 혼입이 유리 DNA 단독에 비해 고유하고 신규한 이점을 부여함을 입증한다.

[0212] 실시예 3

[0213] 이전의 실시예는 CpG-함유 면역자극 DNA를 자극하기 전에 첨가한 경우에 AST-015의 TLR9-유도된 신호전달을 억제하는 능력을 조사하였다. 본 발명자들은 다음으로 동시에 첨가한 경우에 AST-015가 면역자극 DNA를 경쟁에서 이길 수 있을 것인지 결정하고자 하였다. 이를 달성하기 위해, RAW-블루 세포를 증가하는 농도의 po 및 ps 둘 다의 유리 4084F DNA 또는 po 및 ps 둘 다의 AST-015와 함께 0.5 μM CpG DNA 1668ps 또는 10 μM CpG DNA 1826po로 자극하였다. 결과를 도 3에 제시한다.

[0214] 포스포디에스테르 CpG 자극 DNA와 동시에 챌린지한 경우에, 4084F DNApo는 11.2 nM의 IC<sub>50</sub>을 가진 반면에 4084F DNAs는 IC<sub>50</sub>이 0.5 nM로 약 한 자릿수 더 효과적이었다 (도 3a). 동일한 시스템에서, 보다 안정한 포스포로티오에이트 CpG DNA로 챌린지한 경우에, 유리 4084F DNApo는 자극을 차단할 수 없었지만, 4084F DNAs는 17.6 nM의 IC<sub>50</sub>으로 자극을 차단할 수 있었다 (도 3b). 비교를 위한 기준선으로서 이들 값을 사용하여, 본 발명자들은 다음으로 AST-015에 대한 효능 값을 결정하였다. 포스포디에스테르 CpG DNA로 챌린지한 경우에, AST-015po는 9.9 nM의 IC<sub>50</sub>을 가진 반면에 AST015ps는 2.3 nM의 IC<sub>50</sub>을 가졌고, 둘 다 유리 DNA의 값과 거의 동일하였다 (도 3c). 앞서 기재된 irSNA로의 사전-처리와 유사하게, 보다 안정한 포스포로티오에이트 CpG DNA와 동시에 챌린지한 경우에, 앞서 그의 유리 DNA 유사체는 포스포로티오에이트 CpG DNA에 대해 효과적이지 않았지만, AST-015po는 IC<sub>50</sub>이 77.3 nM로 효과적이었다. AST-015ps 처리도 또한 IC<sub>50</sub>이 1.9 nM로 효과적이었다 (도 3d).

[0215] 실시예 4

[0216] 본 발명자들은 다음으로 환자가 이미 과다활성화된 면역계를 제시하는 임상 시나리오에 대한 모델로서 이미 만성 자극 상태에 있는 세포에서 유리 4084F DNA가 CpG-유도된 TLR9 활성화를 억제할 수 있는지 여부를 조사하였다. 이를 달성하기 위해, RAW-블루 세포를 0.5 μM CpG 1668ps로 18시간 동안 자극하여 대식세포를 활성화시키고, 배지를 증가하는 농도의 po 또는 ps 화학의 유리 4084F DNA와 함께 추가 용량의 0.5 μM CpG1668ps로 추가로 18시간 동안 대체한 다음, 비색 검출 검정을 사용하여 정량화하였다. 결과를 도 4에 제시한다.

[0217] 유리 4084F DNApo는 이들 만성 처리된 대식세포에서 IC<sub>50</sub>이 241 nM로 효과적이었다. 이는 0.9 nM의 IC<sub>50</sub>을 갖는 4084F DNAs의 효능보다 대략 두 자릿수 덜 강력한 것으로, 이는 그의 포스포디에스테르 형태의 유리 DNA는 TLR 활성화의 상대적으로 불량한 억제제임을 시사한다 (도 4).

[0218] 중요한 것으로, 이들 데이터는 면역조절 서열의 사전-처리가 구축물이 효과적이기 위해 필요하지 않음을 입증한다. 이는 상기 기술을 염증성 증상이 임상에서 제시되는 경우에 예방적으로서 및 급성 치료로서 둘 다 사용될 수 있게 하기 때문에 중요한 차이이다.

[0219] 흥미롭게도, AST-015는 po 형태에서 포스포로티오에이트 TLR9-활성화 CpG-함유 DNA에 대해 낮은 나노몰 효능을 나타내는 반면에, 그의 각각의 유리 DNA 등가물은 이러한 활성화를 차단하는데 비효과적이다. AST-015는 ps 형태에서 그의 유리 DNA 등가물과 효력이 동등하다. 이는 면역조절 DNA가 활성의 손실 없이 유리 DNA 등가물로부터 예기되는 것보다 상이한 효능을 가지고 SNA 구축물로 로딩될 수 있음을 입증한다. 이러한 데이터를 고려하여, 올리고뉴클레오타이드 구축물은 염기 서열의 선택적 변형의 존재 하에 설계될 수 있다. 예를 들어 특정 부위에서 포스포로티오에이트 백본의 선택적 혼입 및 막 회합을 촉진하기 위한 친지성 작용제, 예컨대 콜레스테롤, 스테아릴 기 및/또는 팔미토일 기의 혼입이 이루어질 수 있다 (표 2 참조). SNA 아키텍처의 유리한 특성, 예컨대 생물학적 유체에서의 증진된 분해 저항성, 증진된 생체분포, 및 구축물의 생체내 신속한 흡수의 사용은 현행 유리 DNA 처리 접근법과 비교하여 보다 유효한 요법을 개발가능하게 한다.

- [0220] 실시예 5: irSNA는 다중 TLR을 길항작용할 수 있다
- [0221] 맞춤형 조절 서열을 혼입시켜 보다 넓은 범위의 TLR에 대한 길항제로서 작용하도록 하기 위해 SNA 구축물을 조정하였다. 이들 구축물을 현행 길항제의 최신 전달 기술과 비교하였다. 이를 달성하기 위해, 신규 TLR7/8/9 길항제 서열을 설계하고, 디나박스(Dynavax)<sup>23,24</sup>에 의해 개발된 현행 임상 관련 서열과 대비하여 효능을 비교하였다 (표 3). 상기 기재된 것과 동일한 시스템을 사용하여, RAW-블루 세포를 모두 포스포로티오에이트 백본 화학을 갖는 증가하는 농도의 4084F, IRS869, IRS954, 또는 AST-개발 4084F7/8과 2시간 동안 인큐베이션하여 흡수 및 엔도솜 내재화되게 하였다. 이어서 세포를 포스포로티오에이트 백본을 갖는 0.5  $\mu$ M의 TLR9 활성화 CpG 1668 DNA, 또는 5  $\mu$ M의 TLR7/8 활성화 단일 가닥 RNA, ssRNA 06<sup>6-8</sup>으로 밤새 켈린지하고, 상기 기재된 비색 검정을 사용하여 TLR 활성화를 측정하였다. 결과를 도 5에 제시한다.
- [0222] 흥미롭게도, AST-015로 혼입된 4084F 서열은 TLR9에 대해 최신 기술 디나박스 서열, IRS869 및 IRS954와 동등하게 효과적이었고 ( $IC_{50}$ : 4084F = 2.8 nM; IRS869 = 3.0 nM; IRS954 = 9.4 nM), AST-개발 TLR7/8/9 길항제 4084F7/8은 보다 약하지만 196 nM의 여전히 효과적인  $IC_{50}$ 을 가졌다 (도 5a). 중요한 것으로, 4084F7/8은 그의 염기 서열 대응물 4084F에 비해 디나박스 서열과 동일한 효능으로 TLR7/8 활성화를 길항작용하는 능력을 획득하였다 ( $IC_{50}$ : 4084F > 10,000 nM; IRS869 = 4,775 nM; IRS954 = 3,134 nM; 4084F7/8 = 3,956 nM) (도 5b).
- [0223] 중요한 것으로, 본 실시예는 특정 서열이 염기 서열의 변형을 통해 다양한 엔도솜 TLR을 길항작용하도록 설계될 수 있음을 입증한다. 이들 데이터에 기초하여, 통상의 기술자는 그의 유리 DNA 대응물 또는 현행 최신 기술의 임상 시험 구축물과 동등하거나 더 우수하게 기능할 특이적 TLR 길항제 및 광범위한 TLR 길항제 둘 다를 SNA 형태로 개발할 수 있다.
- [0224] 실시예 6: 다양한 톨-유사 수용체 효능제 활성의 리포솜 구형 핵산 길항작용.
- [0225] 종래의 리포솜 압출 공정에 의해 형성된 DOPC (1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린)로 이루어진 지질 미셀 코어를 형성함으로써 리포솜 SNA를 제조하였다. DOPC 미셀 형성에 이어서, 서열 4084F (5'-C\*C\*T\*G\*G\*A\*T\*G\*G\*G\*A\*A-3' (서열 121), \*는 포스포로티오에이트를 나타냄) 또는 4084F-Ext (5'-T\*G\*C\*T\*T\*G\*A\*C\*A\*C\*T\*G\*G\*A\*T\*G\*G\*G\*A\*A-3')(서열 122)의 올리고뉴클레오티드를 3' 말단에서 지질 기, 예컨대 디스테아릴 또는 토크페롤에 부착시키고, 단순 혼합을 통해 미셀로 혼입시킨 다음, 접선 흐름 여과 (TFF)에 의해 정제하여 대략 ~100 올리고/SNA를 갖는 정제된 리포솜 SNA를 달성하였다. RAW-블루 대식세포 (인비보젠)를 표지된 TLR 효능제, 이미퀴모드 (TLR7, 도 7b), CpG 1826 (CpG, TLR9, 도 7d), 박테리아 리포폴리사카라이드 (LPS, TLR4, 도 7c)와, 또는 모든 3종과 동시에 (도 7a) 4시간 동안 인큐베이션시킨 다음, 표지된 리포솜 SNA 또는 PBS 및 비처리에 대한 참조와 밤새 인큐베이션시켰다. 데이터를 도 7에 제시한다. 구축물 둘 다는 모든 3종의 효능제에 의한 자극을 차단할 수 있음을 발견하였다.

면역조절 서열			
명칭	서열	참고 문헌	서열 번호
2088 DNA	TTCTGGCGGGGAAGT/iSp18//iSp18//3 티오 MC3-D/	14,25	91
G DNA	CTCCTATTGGGGGTTTCCTAT/iSp18//iSp18//3 티오 MC3-D/	12,17	92
MT01 DNA	ACCCCTCTACCCCTCTACCCCTCT/iSp18//iSp18//3 티오 MC3-D/	22	93
4084F DNA	CCTGGATGGGAA/iSp18//iSp18//3 티오 MC3-D/	13,16	94
AST-012	TTCTGGCGGGGAAGT/iSp18//iSp18//3 티오 MC3-D/(13nm AuNP)	AST	95
AST-013	CTCCTATTGGGGGTTTCCTAT/iSp18//iSp18//3 티오 MC3-D/(13nm AuNP)	AST	96
AST-014	ACCCCTCTACCCCTCTACCCCTCT/iSp18//iSp18//3 티오 MC3-D/(13nm AuNP)	AST	97
AST-015	CCTGGATGGGAA/iSp18//iSp18//3 티오 MC3-D/(13nm AuNP)	AST	98
Ctrl DNA	TCCTGAGCTTGAAGT/iSp18//iSp18//3 티오 MC3-D/	14,25	99
Ctrl SNA	TCCTGAGCTTGAAGT/iSp18//iSp18//3 티오 MC3-D/(13nm AuNP)	AST	100
면역자극 서열			
CpG 1826	TCCATGACGTTTCCTGACGTT	5,10	101
CpG 1668	TCCATGACGTTTCCTGATGCT	5,12	102
<p><b>표 1: 본 연구에 사용된 TLR9 길항제 및 자극 서열의 동일성.</b>                      모든 서열은 테옥시리보뉴클레오티드로 이루어진다. /iSp18/ = 내부 스페이서 18 링커; /3 티오 MC3-D/ = 3 개의 탄소 링커를 갖는 3' 말단 티올; 13nm AuNP = 13 나노미터 직경 금 나노입자; 문맥에서 "po"는 모든 포스포디에스테르 백본 화학을 지칭하고; 문맥에서 "ps"는 모든 포스포로티오에이트 백본 화학을 지칭한다.</p>			

[0226]

면역조절 서열			
명칭	서열	참고문헌	서열 번호
AST-015mod1	C*C*T*GGATGGGAA/iSp18//iSp18//3 티오 MC3-D/(13nm AuNP)	AST	103
AST-015mod2	CCTGGATG*G*G*AA/iSp18//iSp18//3 티오 MC3-D/(13nm AuNP)	AST	104
AST-015mod3	C*C*T*GGATG*G*G*AA/iSp18//iSp18//3 티오 MC3-D/(13nm AuNP)	AST	105
AST-015mod4	/Chol/CCTGGATGGGAA/iSp18//iSp18//3 티오 MC3-D/(13nm AuNP)	AST	106
AST-015mod5	/Stryl/CCTGGATGGGAA/iSp18//iSp18//3 티오 MC3-D/(13nm AuNP)	AST	107
AST-015mod6	/Palm/CCTGGATGGGAA/iSp18//iSp18//3 티오 MC3-D/(13nm AuNP)	AST	108
<p><b>표 2: 효능을 촉진시키기 위해 AST-015에 대해 고안된 변형</b>                      모든 서열은 테옥시리보뉴클레오티드로 이루어진다. /iSp18/ = 내부 스페이서 18 링커; /3 티오 MC3-D/ = 3 개의 탄소 링커를 갖는 3' 말단 티올; 13nm AuNP = 13 나노미터 직경 금 나노입자; *=포스포로티오에이트 연결; /Chol/ = 콜레스테롤; /Stryl/ = C16/C18 스테아릴 기; /Palm/ = 팔미토일 기.</p>			

[0227]

면역조절 서열			
명칭	서열	참고 문헌	서열 번호
IRS869	TCCTGGAGGGGTTGT	<sup>24</sup>	109
IRS954	TGCTCCTGGAGGGGTTGT	<sup>24</sup>	110
4084F7/8 DNA	TGCTGGATGGGAA	AST	111
4084F7/8Ext	TGCCCTGGATGGGAA	AST	112
4084D7/8 전장	TGCTTGACACCTGGATGGGAA	AST	113
AST-016	TGCTGGATGGGAA/iSp18//iSp18//3 티오 MC3-D/(13nm AuNP)	AST	114
AST-017	TGCCCTGGATGGGAA/iSp18//iSp18//3 티오 MC3-D/(13nm AuNP)	AST	115
AST-018	TGCTTGACACCTGGATGGGAA/iSp18//iSp18//3 티오 MC3-D/(13nm AuNP)	AST	116
Ctrl DNA	TCCTGAGCTTGAAGT/iSp18//iSp18//3 티오 MC3-D/	<sup>24</sup>	117
Ctrl SNA	TCCTGAGCTTGAAGT/iSp18//iSp18//3 티오 MC3-D/(13nm AuNP)	AST	118
면역자극 서열			
ssRNA06	TCCATGACGTTCTGACGTT	<sup>6-8</sup>	119
CpG 1668	TCCATGACGTTCTGATGCT	<sup>10</sup>	120
<p><b>표 3:</b> 본 연구에 사용된 TLR7/8/9 길항제 및 자극 서열의 동일성.                      리보뉴클레오티드로 이루어진 ssRNA06 을 제외하고, 모든 서열은 데옥시리보뉴클레오티드로 이루어진다. /iSp18/ = 내부 스페이서 18 링커; /3 티오 MC3-D/ = 3 개의 탄소 링커를 갖는 3' 말단 티올; 13nm AuNP = 13 나노미터 직경 금 나노입자; 문맥에서 "po"는 모든 포스포디에스테르 백본 화학을 지칭하고; 문맥에서 "ps"는 모든 포스포로티오에이트 백본 화학을 지칭한다.</p>			

[0228]

[0229] 참고문헌

- (1) Hornung, V.; Rothenfusser, S.; Britsch, S.; Krug, A.; Jahrsdorfer, B.; Giese, T.; Endres, S.; Hartmann, G. *J Immunol* **2002**, *168*, 4531.
- (2) Stacey, K. J.; Sweet, M. J.; Hume, D. A. *J Immunol* **1996**, *157*, 2116.
- (3) Zarembek, K. A.; Godowski, P. J. *J Immunol* **2002**, *168*, 554.
- (4) Bauer, M.; Redecke, V.; Ellwart, J. W.; Scherer, B.; Kremer, J. P.; Wagner, H.; Lipford, G. B. *J Immunol* **2001**, *166*, 5000.
- (5) Bauer, S.; Kirschning, C. J.; Hacker, H.; Redecke, V.; Hausmann, S.; Akira, S.; Wagner, H.; Lipford, G. B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2001**, *98*, 9237.
- (6) Diebold, S. S.; Massacrier, C.; Akira, S.; Paturel, C.; Morel, Y.; Reis e Sousa, C. *European journal of immunology* **2006**, *36*, 3256.
- (7) Forsbach, A.; Nemorin, J. G.; Montino, C.; Muller, C.; Samulowitz, U.; Vicari, A. P.; Jurk, M.; Mutwiri, G. K.; Krieg, A. M.; Lipford, G. B.; Vollmer, J. *J Immunol* **2008**, *180*, 3729.
- (8) Heil, F.; Hemmi, H.; Hochrein, H.; Ampenberger, F.; Kirschning, C.; Akira, S.; Lipford, G.; Wagner, H.; Bauer, S. *Science* **2004**, *303*, 1526.
- (9) Krieg, A. M. *Journal of clinical immunology* **1995**, *15*, 284.
- (10) Krieg, A. M.; Yi, A. K.; Matson, S.; Waldschmidt, T. J.; Bishop, G. A.; Teasdale, R.; Koretzky, G. A.; Klinman, D. M. *Nature* **1995**, *374*, 546.
- (11) West, A. P.; Koblansky, A. A.; Ghosh, S. *Annual review of cell and developmental biology* **2006**, *22*, 409.
- (12) Peter, M.; Bode, K.; Lipford, G. B.; Eberle, F.; Heeg, K.; Dalpke, A. H. *Immunology* **2008**, *123*, 118.
- (13) Lenert, P.; Yi, A. K.; Krieg, A. M.; Stunz, L. L.; Ashman, R. F. *Antisense & nucleic acid drug development* **2003**, *13*, 143.
- (14) Stunz, L. L.; Lenert, P.; Peckham, D.; Yi, A. K.; Haxhinasto, S.; Chang, M.; Krieg, A. M.; Ashman, R. F. *European journal of immunology* **2002**, *32*, 1212.
- (15) Krieg, J.; Hartmann, S.; Vicentini, A.; Glasner, W.; Hess, D.; Hofsteenge, J. *Molecular biology of the cell* **1998**, *9*, 301.
- (16) Lenert, P.; Rasmussen, W.; Ashman, R. F.; Ballas, Z. K. *DNA and cell biology* **2003**, *22*, 621.
- (17) Gursel, I.; Gursel, M.; Yamada, H.; Ishii, K. J.; Takeshita, F.; Klinman, D. M. *J Immunol* **2003**, *171*, 1393.
- (18) Goh, F. G.; Midwood, K. S. *Rheumatology (Oxford)* **2012**, *51*, 7.
- (19) Chabaud, M.; Durand, J. M.; Buchs, N.; Fossiez, F.; Page, G.; Frappart, L.; Miossec, P. *Arthritis and rheumatism* **1999**, *42*, 963.
- (20) van den Berg, W. B.; Miossec, P. *Nature reviews. Rheumatology* **2009**, *5*, 549.
- (21) Emery, P.; Fleischmann, R.; Filipowicz-Sosnowska, A.; Schechtman, J.; Szczepanski, L.; Kavanaugh, A.; Racewicz, A. J.; van Vollenhoven, R. F.; Li, N. F.; Agarwal, S.; Hessey, E. W.; Shaw, T. M. *Arthritis and rheumatism* **2006**, *54*, 1390.
- (22) Yang, G.; Wan, M.; Zhang, Y.; Sun, L.; Sun, R.; Hu, D.; Zhou, X.; Wang, L.; Wu, X.; Yu, Y. *Immunology* **2010**, *131*, 501.

[0230]

- (23) Kanzler, H.; Barrat, F. J.; Hessel, E. M.; Coffman, R. L. *Nature medicine* **2007**, *13*, 552.
- (24) Barrat, F. J.; Meeker, T.; Gregorio, J.; Chan, J. H.; Uematsu, S.; Akira, S.; Chang, B.; Duramad, O.; Coffman, R. L. *The Journal of experimental medicine* **2005**, *202*, 1131.
- (25) Krieg, A. M.; Wu, T.; Weeratna, R.; Efler, S. M.; Love-Homan, L.; Yang, L.; Yi, A. K.; Short, D.; Davis, H. L. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1998**, *95*, 12631.

[0231]

[0232] 등가물

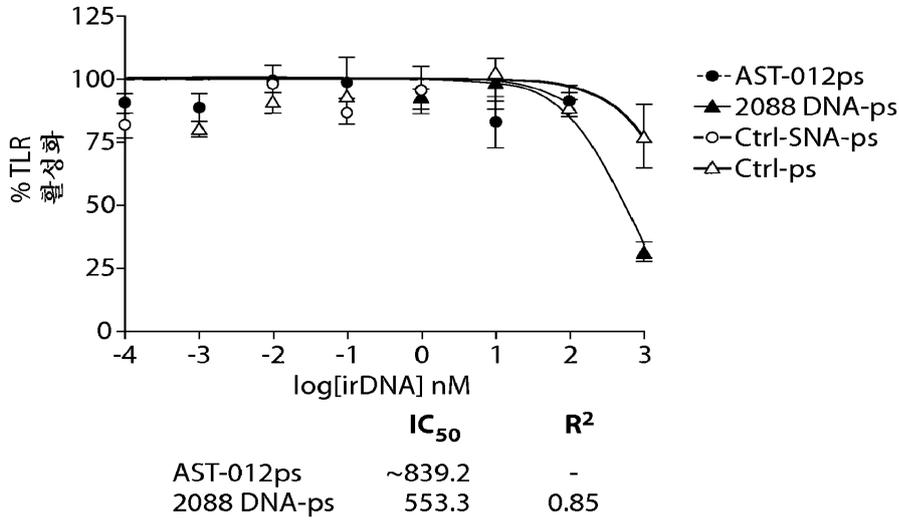
[0233] 통상의 기술자는 상용의 범위를 넘지 않는 실험을 사용하여, 본원에 기재된 본 발명의 구체적 실시양태에 대한 다수의 등가물을 인식하거나 또는 확인할 수 있을 것이다. 이러한 등가물은 하기 청구범위에 포괄되는 것으로 의도된다.

[0234] 특허 문헌을 비롯한 본원에 개시된 모든 참고문헌은 그 전문이 참조로 포함된다.

도면

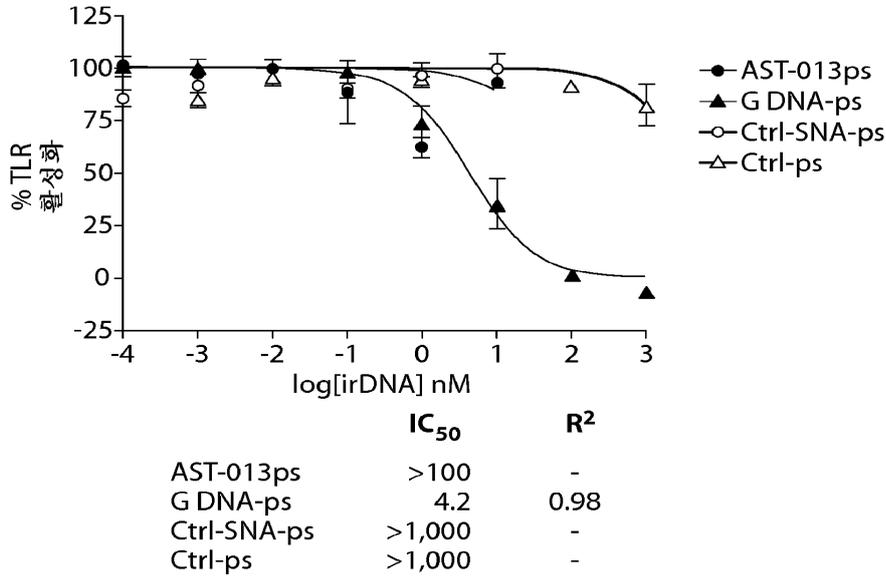
도면1a

CpG-유도된 TLR9 활성화의 억제 - AST-012

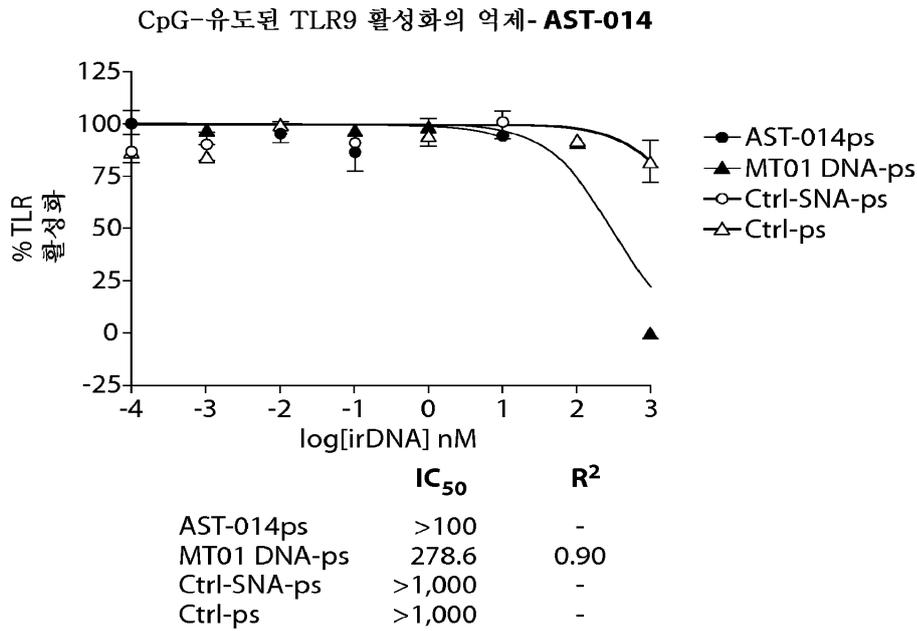


도면1b

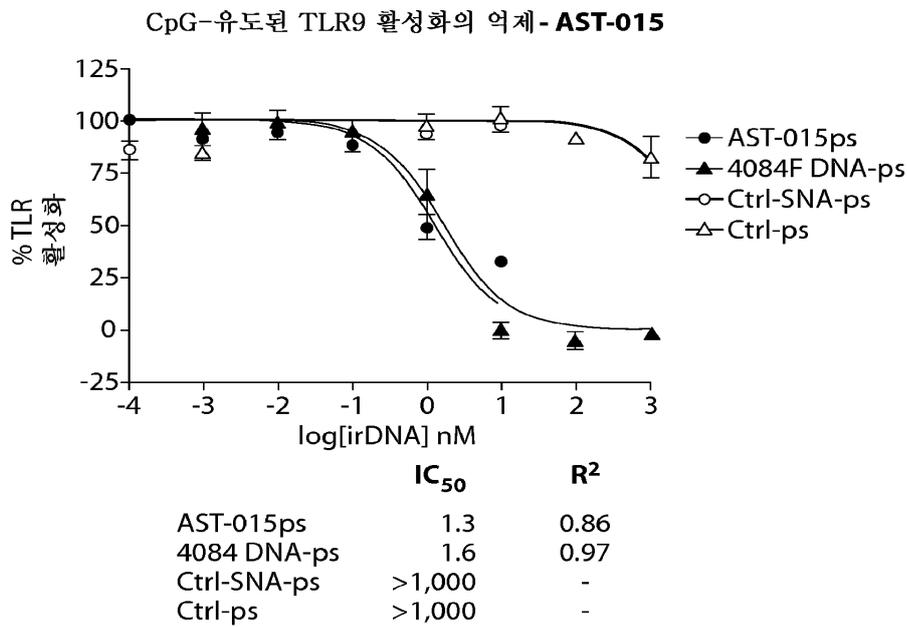
CpG-유도된 TLR9 활성화의 억제 - AST-013



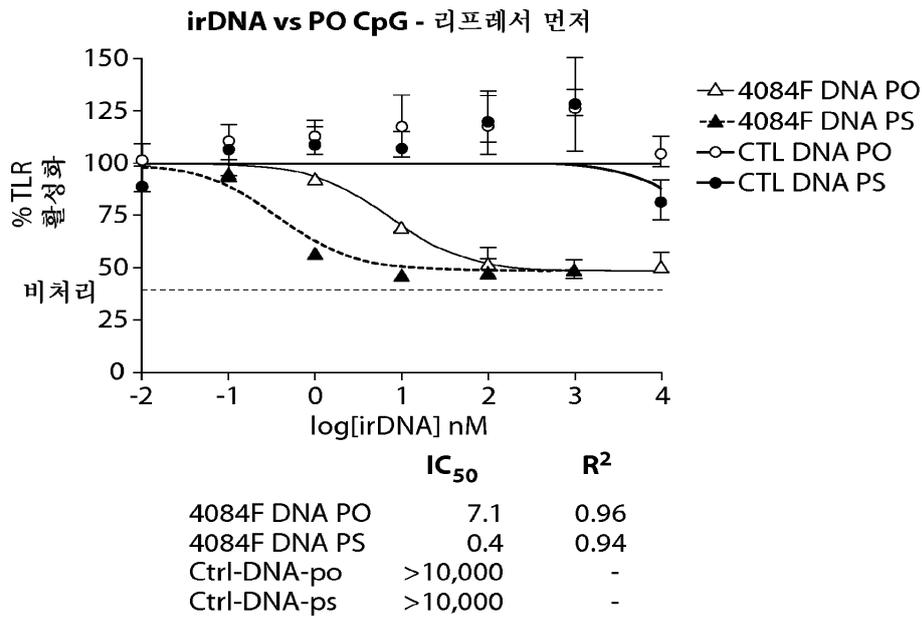
도면1c



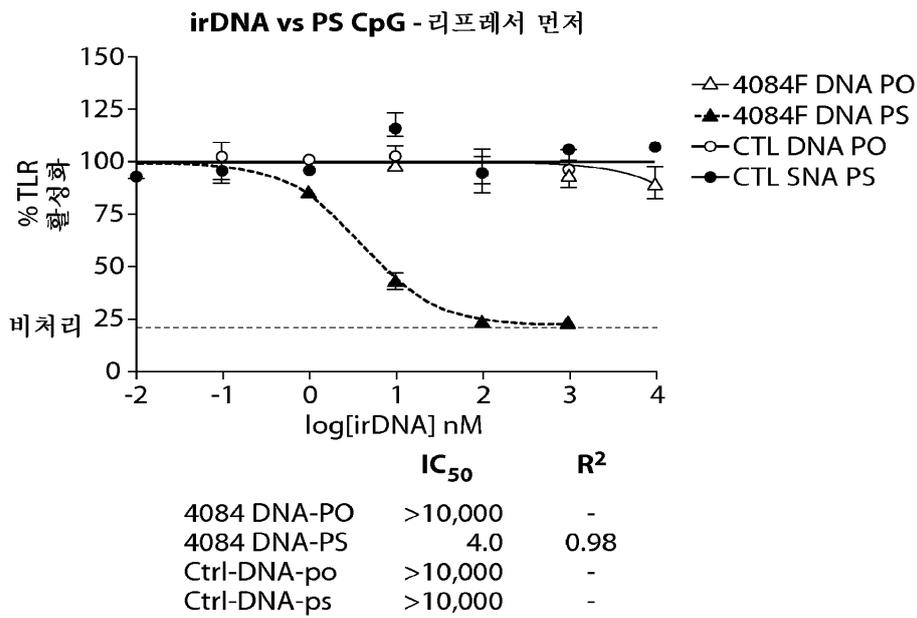
도면1d



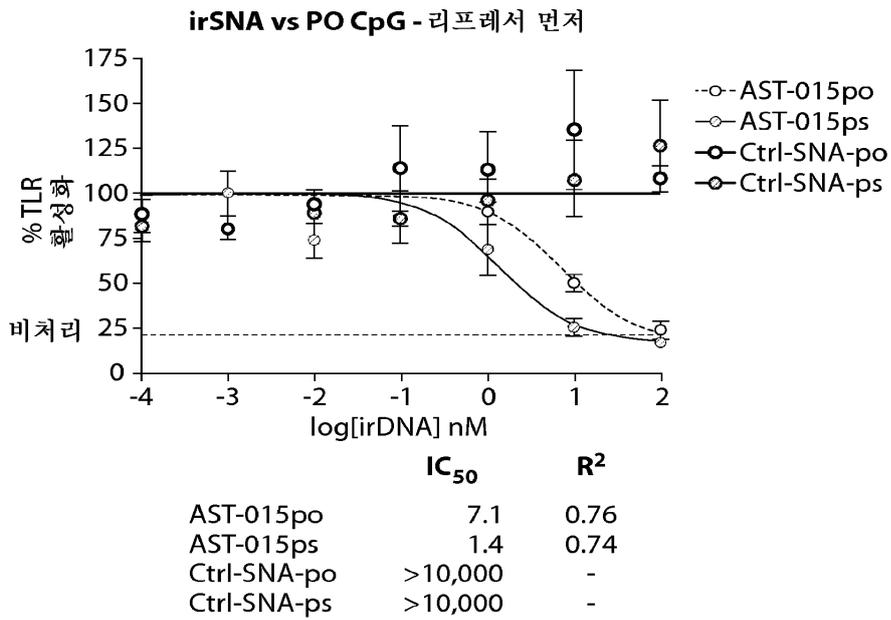
도면2a



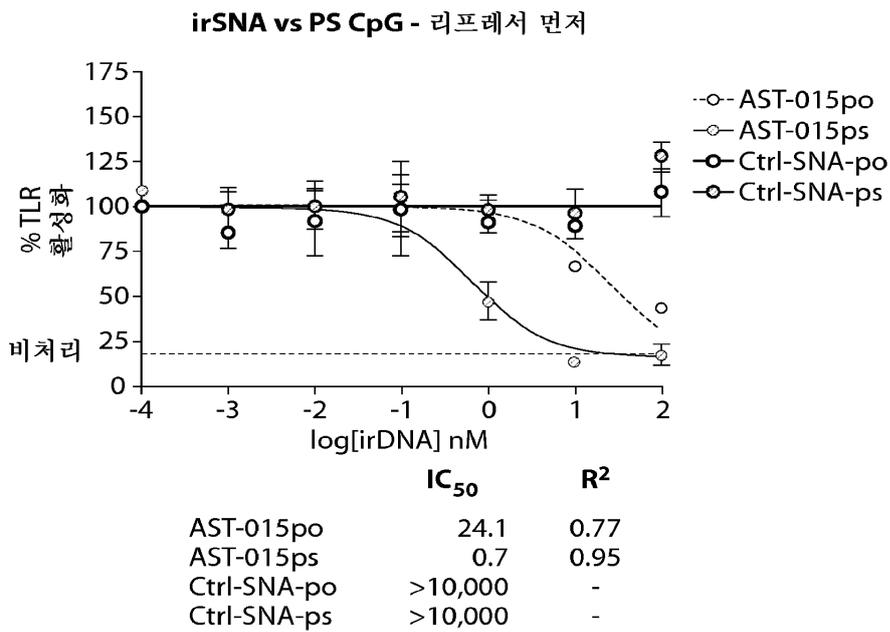
도면2b



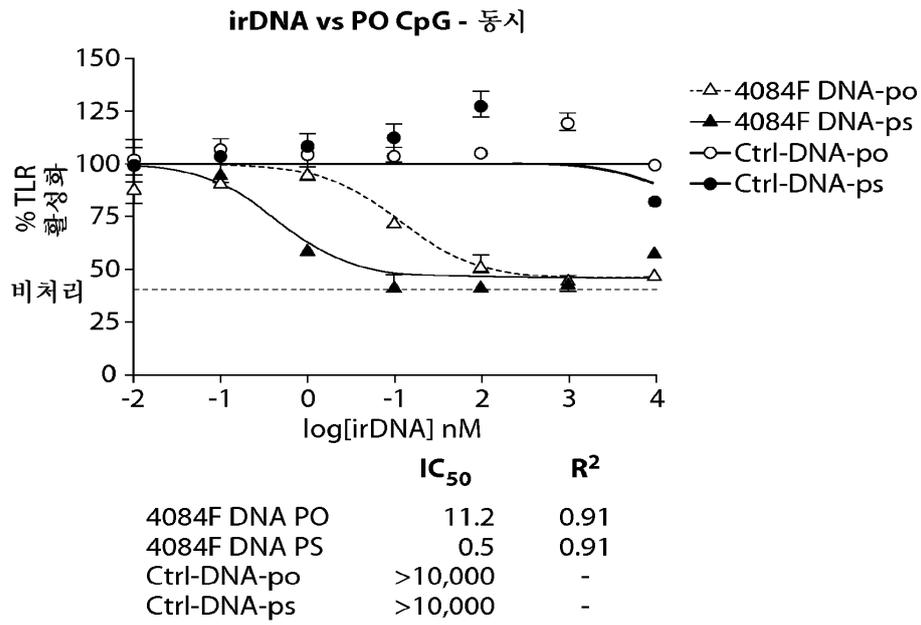
도면2c



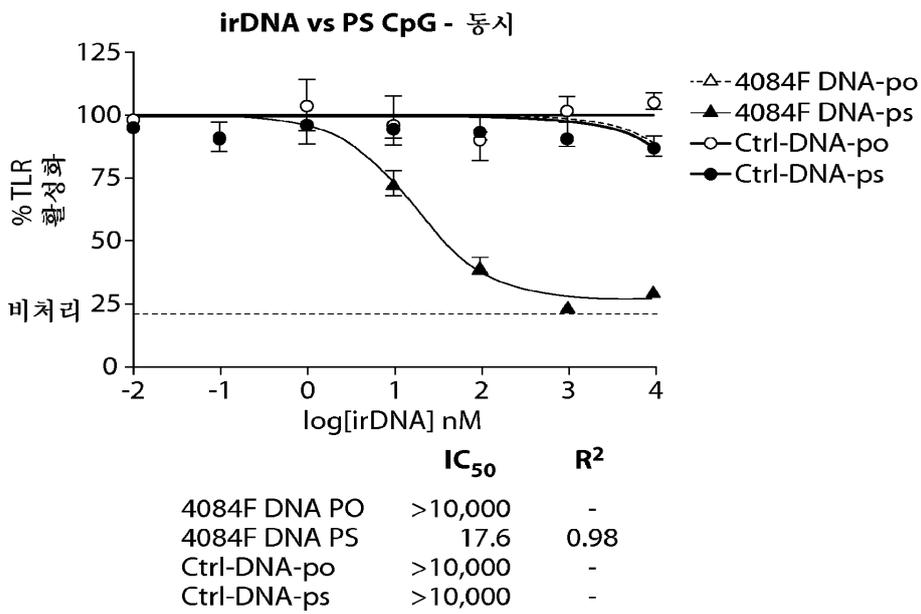
도면2d



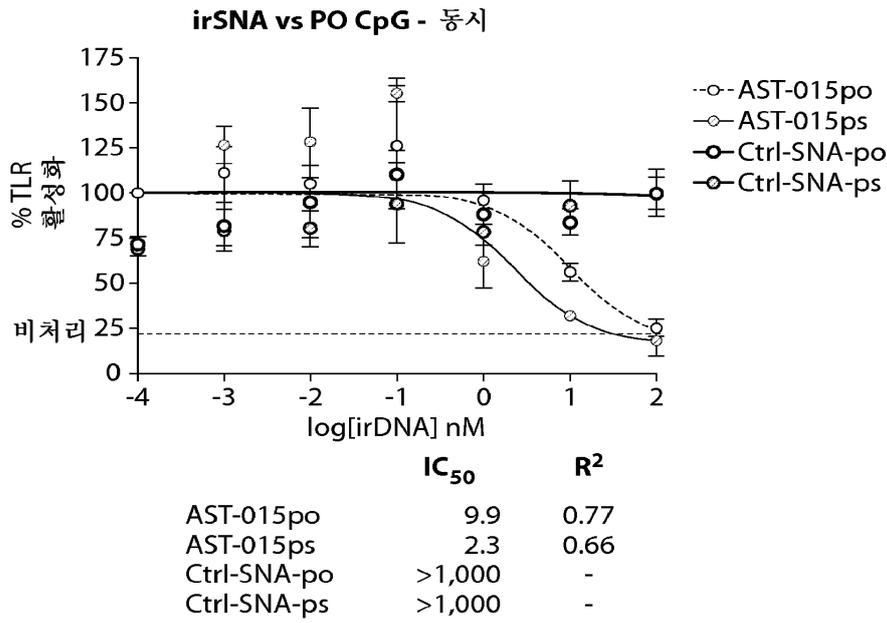
도면3a



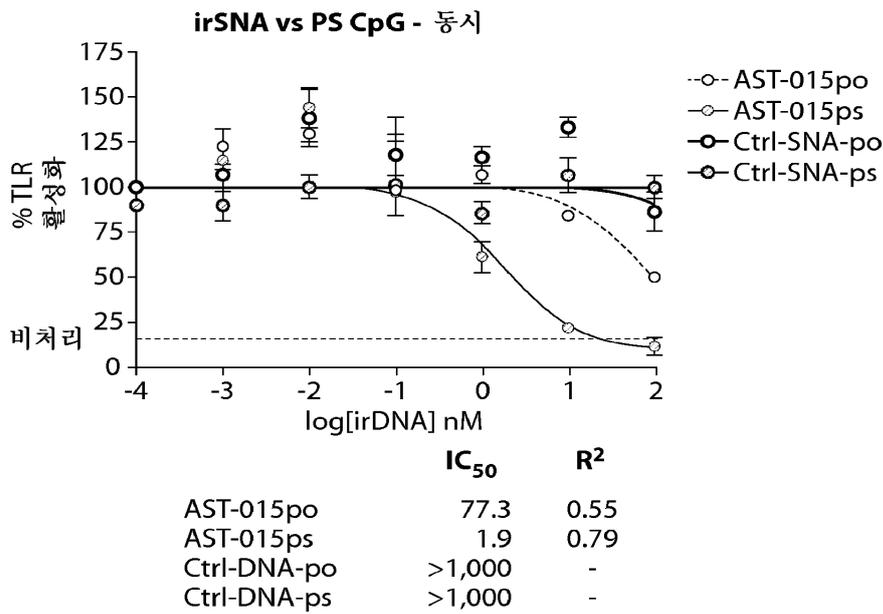
도면3b



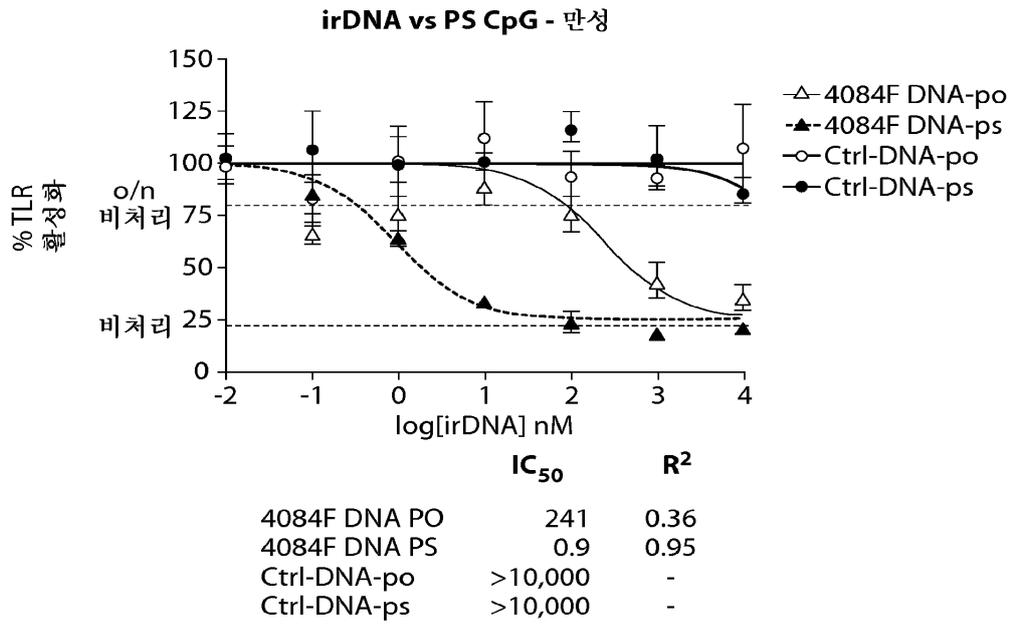
도면3c



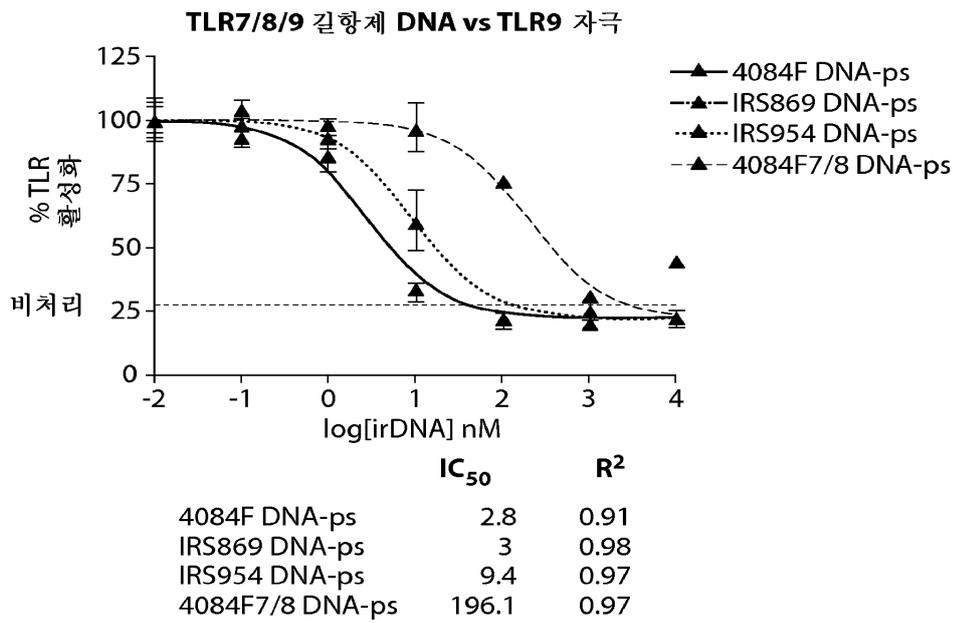
도면3d



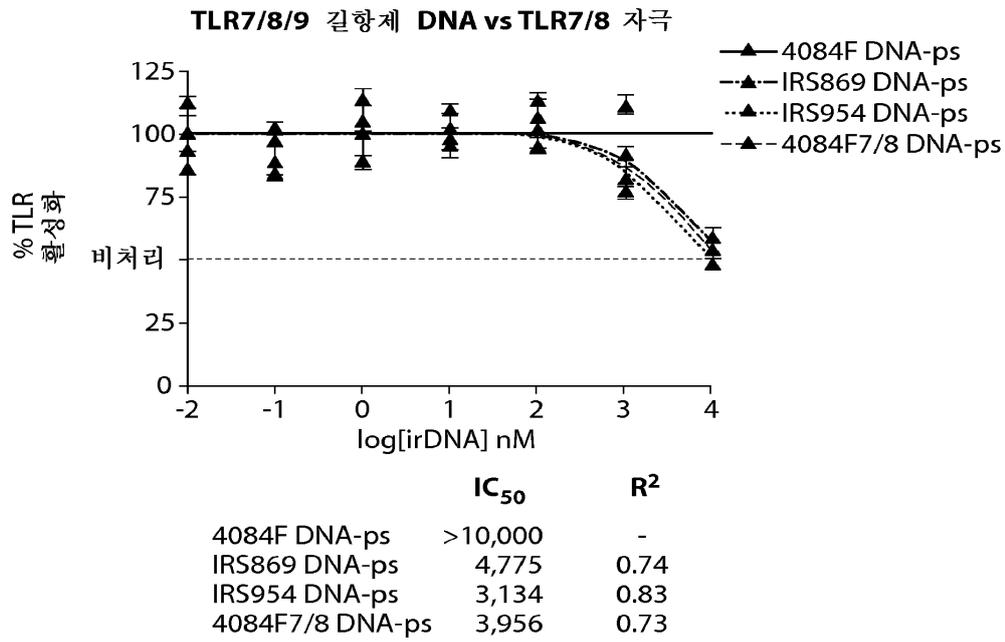
도면4



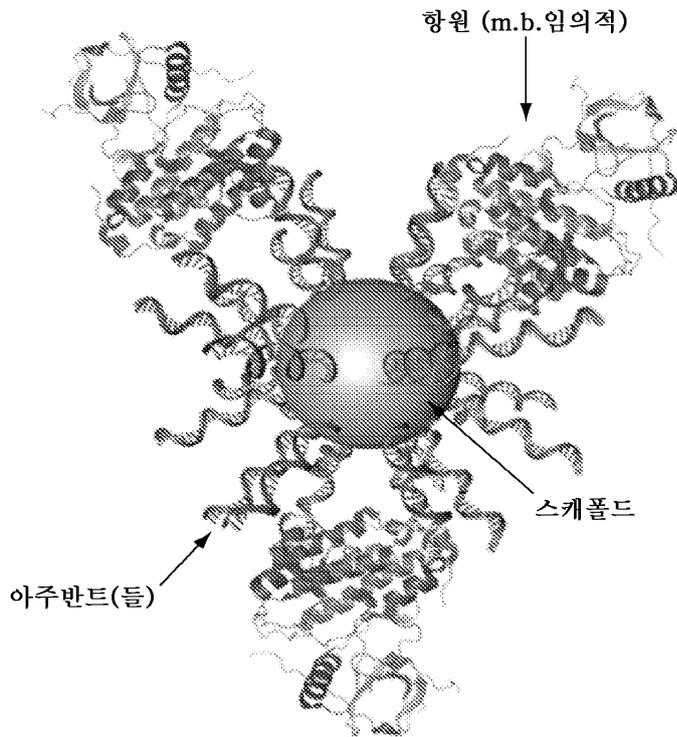
도면5a



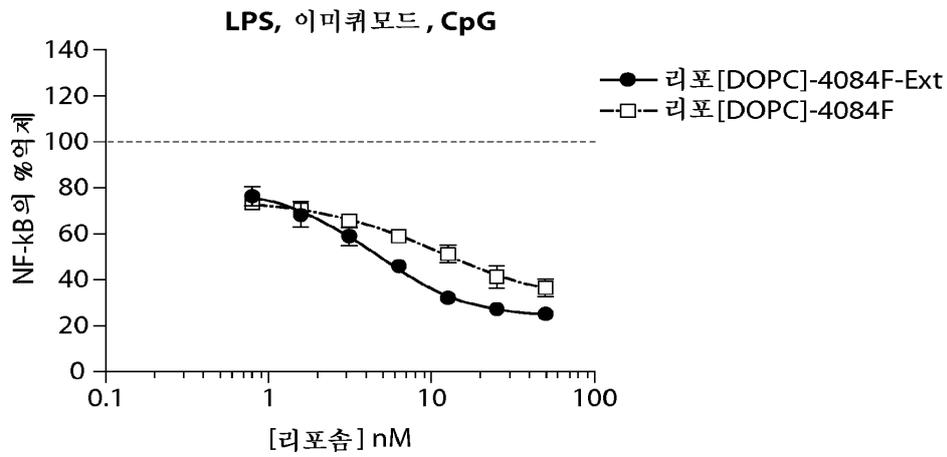
도면5b



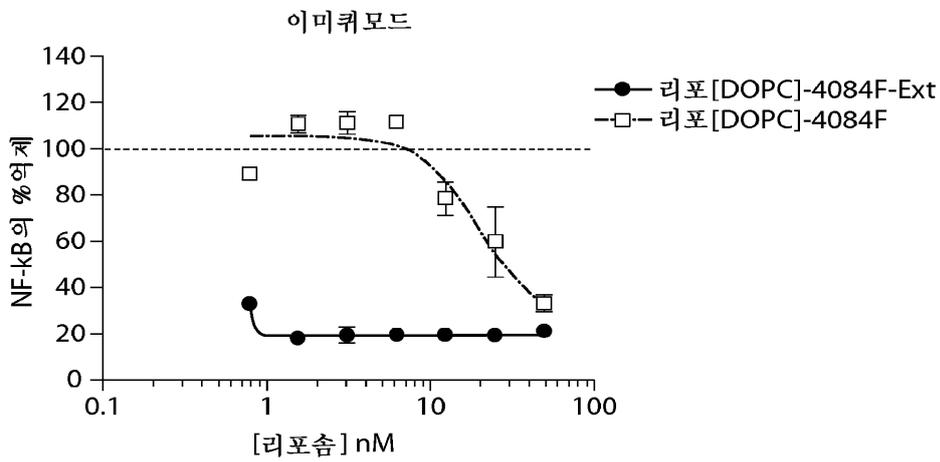
도면6



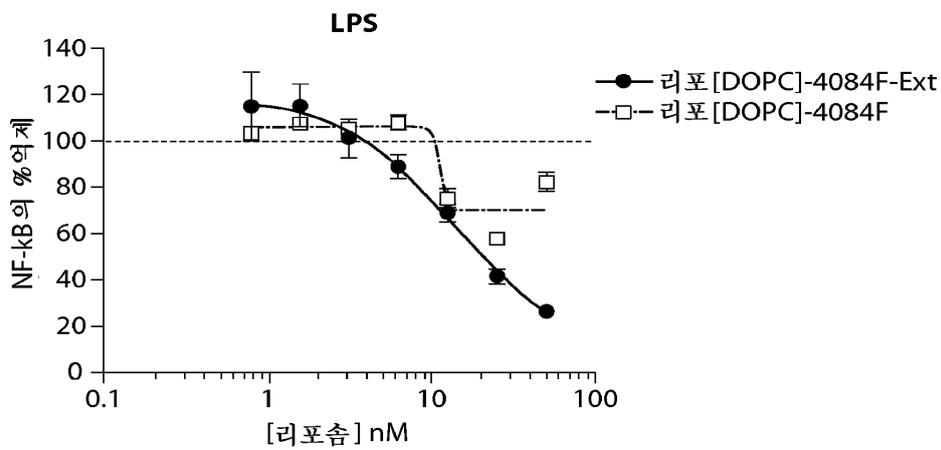
도면7a



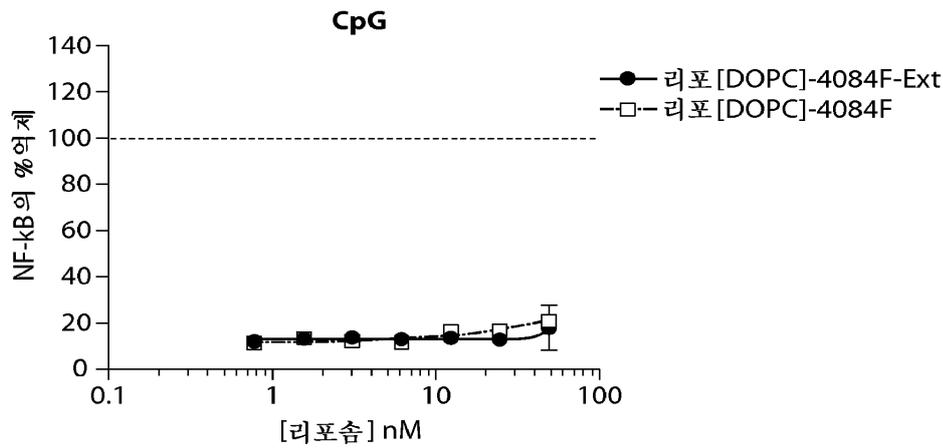
도면7b



도면7c



도면7d



서열목록

SEQUENCE LISTING

- <110> AuraSense, LLC  
Gryaznov, Sergei  
Mader, Christopher C.  
Halo, Tiffany L.  
Radovic-Moreno, Aleksandar F.
- <120> SPHERICAL NUCLEIC ACID-BASED CONSTRUCTS AS IMMUNOSTIMULATORY AGENTS FOR PROPHYLACTIC AND THERAPEUTIC USE
- <130> A1005.70003W000
- <140> Not Yet Assigned
- <141> 2014-07-25
- <150> US 61/858,584
- <151> 2013-07-25
- <160> 120
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 15
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Synthetic Polynucleotide
- <400> 1  
tcctggaggg gttgt

<210> 2  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 2  
 tgctcctgga ggggttgt 18  
 <210> 3  
 <211> 13  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 3  
 tgctggatgg gaa 13  
  
 <210> 4  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 4  
 tgccttgat gggaa 15  
 <210> 5  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 5  
 tgcttgacac ctggatggga a 21  
 <210> 6  
 <211> 13  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 6

tgctggatgg gaa	13
<210> 7	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 7	
tgccctggat gggaa	15
<210> 8	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 8	
tgcttgacac ctggatggga a	21
<210> 9	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 9	
tcctgagctt gaagt	15
<210> 10	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 10	
tcctgagctt gaagt	15
<210> 11	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 11	
ttctggcggg gaagt	15
<210> 12	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 12	
ctcctattgg gggtttccta t	21
<210> 13	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 13	
acccctcta cccctetac ccctet	26
<210> 14	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 14	
cctggatggg aa	12
<210> 15	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 15	
ttctggcggg gaagt	15
<210> 16	
<211> 21	

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 16  
 ctctattgg gggtttccta t 21  
 <210> 17  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 17  
 acccctcta cccctetac ccctet 26  
 <210> 18  
 <211> 12  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 18  
 cctggatggg aa 12  
  
 <210> 19  
 <211> 12  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 19  
 cctggatggg aa 12  
 <210> 20  
 <211> 12  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 20  
 cctggatggg aa 12  
 <210> 21

<211> 12  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 21  
 cctggatggg aa 12

<210> 22  
 <211> 12  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 22  
 cctggatggg aa 12

<210> 23  
 <211> 12  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 23  
 cctggatggg aa 12

<210> 24  
 <211> 12  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 24  
 cctggatggg aa 12

<210> 25  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 25

tcctggaggg gttgt	15
<210> 26	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 26	
tgctcctgga ggggttgt	18
<210> 27	
<211> 13	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 27	
tgctggatgg gaa	13
<210> 28	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 28	
tgccctggat gggaa	15
<210> 29	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 29	
tgcttgacac ctggatggga a	21
<210> 30	
<211> 13	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	

<400> 30	
tgctggatgg gaa	13
<210> 31	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 31	
tgccctggat gggaa	15
<210> 32	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 32	
tgcttgacac ctggatggga a	21
<210> 33	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 33	
tcctgagctt gaagt	15
<210> 34	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 34	
tcctgagctt gaagt	15
<210> 35	
<211> 15	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 35	
ttctggcggg gaagt	15
<210> 36	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 36	
ctcctattgg gggtttccta t	21
<210> 37	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 37	
acccctcta cccctctac ccctct	26
<210> 38	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 38	
cctggatggg aa	12
<210> 39	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 39	
ttctggcggg gaagt	15
<210> 40	

<211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 40  
 ctctattgg gggtttccta t 21  
 <210> 41  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 41  
 accccctcta cccctctac ccctct 26  
 <210> 42  
 <211> 12  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 42  
 cctggatggg aa 12  
  
 <210> 43  
 <211> 13  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 43  
 tgctggatgg gaa 13  
 <210> 44  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 44  
 tgccctggat gggaa 15

<210> 45  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 45  
 tgcttgacac ctggatggga a 21

<210> 46  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 46  
 tcctgagctt gaagt 15

<210> 47  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 47  
 tcctgagctt gaagt 15

<210> 48  
 <211> 14  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 48  
 tctggcgggg aagt 14

<210> 49  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 49	
ctcctattgg gggtttccta t	21
<210> 50	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 50	
acccctcta cccctctac ccctct	26
<210> 51	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 51	
cctggatggg aa	12
<210> 52	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 52	
ttctggcggg gaagt	15
<210> 53	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 53	
ctcctattgg gggtttccta t	21
<210> 54	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 54  
 accccctcta cccctctac ccctct 26

<210> 55  
 <211> 12  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 55  
 cctggatggg aa 12

<210> 56  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 56  
 ttagggttag ggtagggtt aggg 24

<210> 57  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 57  
 ttagggttag ggtagggtt aggg 24

<210> 58  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 58  
 ttagggttag ggtagggtt aggg 24

<210> 59  
 <211> 24

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 59  
 ttagggttag ggtagggtt aggg 24  
 <210> 60  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 60  
 ttagggttag ggtagggtt aggg 24  
  
 <210> 61  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 61  
 ttagggttag ggtagggtt aggg 24  
 <210> 62  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 62  
 ctatctgcgt tctctg 16  
 <210> 63  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 63  
 ctatctgcgt tctctg 16

<210> 64  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 64  
 ctatctgcgt tctctg 16  
 <210> 65  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 65  
 ctatctgcgt tctctg 16  
 <210> 66  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 66  
 ctatctgcgt tctctg 16  
 <210> 67  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 67  
 ctatctgcgt tctctg 16  
 <210> 68  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 68

ttagggttag ggtagggtt aggg	24
<210> 69	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 69	
ttagggttag ggtagggtt aggg	24
<210> 70	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 70	
ctatctgcgt tctctg	16
<210> 71	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 71	
ctatctgcgt tctctg	16
<210> 72	
<211> 13	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 72	
tgctggatgg gaa	13
<210> 73	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 73  
 tgccttgat gggaa 15  
 <210> 74  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 74  
 tgcttgacac ctggatggga a 21  
 <210> 75  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 75  
 tcctgagctt gaagt 15  
 <210> 76  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 76  
 tcctgagctt gaagt 15  
 <210> 77  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 77  
 ttctggcggg gaagt 15  
 <210> 78  
 <211> 21  
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 78  
 ctctattgg gggtttcta t 21

<210> 79  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 79  
 acccctcta cccctctac ccctc 26

<210> 80  
 <211> 12  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 80  
 cctggatggg aa 12

<210> 81  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 81  
 ttctggcggg gaagt 15

<210> 82  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 82  
 ctctattgg gggtttcta t 21

<210> 83

<211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 83  
 accccctcta cccctctac ccctct 26  
 <210> 84  
 <211> 12  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 84  
 cctggatggg aa 12  
  
 <210> 85  
 <211> 12  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 85  
 cctggatggg aa 12  
 <210> 86  
 <211> 12  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 86  
 cctggatggg aa 12  
 <210> 87  
 <211> 12  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 87

cctggatggg aa	12
<210> 88	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 88	
cctggatggg aa	12
<210> 89	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 89	
cctggatggg aa	12
<210> 90	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 90	
cctggatggg aa	12
<210> 91	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 91	
ttctggcggg gaagt	15
<210> 92	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 92	
ctcctattgg gggtttccta t	21
<210> 93	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 93	
accccctcta cccctctac ccctct	26
<210> 94	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 94	
cctggatggg aa	12
<210> 95	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 95	
ttctggcggg gaagt	15
<210> 96	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 96	
ctcctattgg gggtttccta t	21
<210> 97	
<211> 26	

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 97  
 accccctcta cccctctac ccctct 26  
 <210> 98  
 <211> 12  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 98  
 cctggatggg aa 12  
 <210> 99  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 99  
 tcctgagctt gaagt 15  
  
 <210> 100  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 100  
 tcctgagctt gaagt 15  
 <210> 101  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 101  
 tccatgacgt tcctgacgtt 20  
 <210> 102

<211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 102  
 tccatgacgt tctgatgct 20

<210> 103  
 <211> 12  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 103  
 cctggatggg aa 12

<210> 104  
 <211> 12  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 104  
 cctggatggg aa 12

<210> 105  
 <211> 12  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 105  
 cctggatggg aa 12

<210> 106  
 <211> 12  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 106

cctggatggg aa	12
<210> 107	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 107	
cctggatggg aa	12
<210> 108	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 108	
cctggatggg aa	12
<210> 109	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 109	
tcttgagggtt	15
<210> 110	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 110	
tgctcctgga ggggtt	18
<210> 111	
<211> 13	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	

<400> 111	
tgctggatgg gaa	13
<210> 112	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 112	
tgccctggat gggaa	15
<210> 113	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 113	
tgcttgacac ctggatggga a	21
<210> 114	
<211> 13	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 114	
tgctggatgg gaa	13
<210> 115	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<400> 115	
tgccctggat gggaa	15
<210> 116	
<211> 21	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 116  
 tgcttgacac ctggatggga a 21  
 <210> 117  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 117  
 tcctgagctt gaagt 15  
  
 <210> 118  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 118  
 tcctgagctt gaagt 15  
 <210> 119  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 119  
 tccatgacgt tcctgacgtt 20  
 <210> 120  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic Polynucleotide  
 <400> 120  
 tccatgacgt tcctgatgct 20