



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0130019
(43) 공개일자 2009년12월17일

(51) Int. Cl.

A61K 48/00 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-7020751

(22) 출원일자 2008년03월05일
심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2009년10월05일

(86) 국제출원번호 PCT/US2008/002874

(87) 국제공개번호 WO 2008/109083
국제공개일자 2008년09월12일

(30) 우선권주장

60/904,792 2007년03월05일 미국(US)

(71) 출원인

유타 스테이트 유니버시티

미국, 유타 84341-2032 놀스 로간, 유엠씨 9730,
스위트 101, 리서치 파크 웨이 570

(72) 별명자

고웬, 브라이언, 비.

미국 유타 84326 밀빌 150 놀스 250 이스트

(74) 대리인

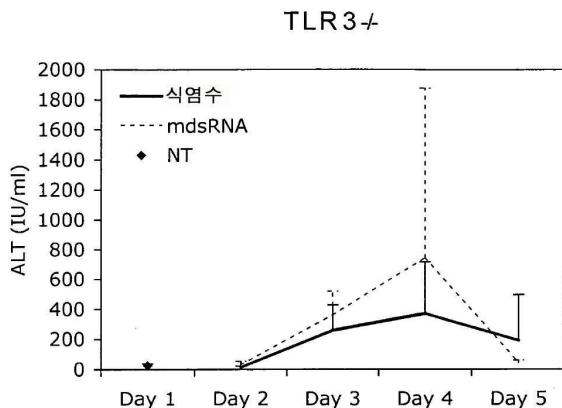
윤동열

전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 툴-유사 수용체 3(T L R 3)의 제한적인 작용제

(57) 요약

툴-유사 수용체 3(TLR3)용 작용제인 미스매치된 이중 가닥 리보핵산은 생체 내 또는 시험관 내에서 하나 이상의 항바이러스제, 항증식제 및 면역 자극제로서 사용된다. 의약 처리 방법 및 약제 제조용 방법이 제공된다.

대 표 도 - 도1A

특허청구의 범위

청구항 1

톨-유사 수용체 3(Toll-Like Receptor 3, TLR3)에 의해서만 매개되는 고유한 면역 반응의 개시 방법으로서, 적어도 다른 톨-유사 수용체 또는 RNA 나선의 활성화없이 TLR3를 활성화시키기에 충분한 양의 폴리(I:C₁₂U)를 대상체에 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 2

(i) 바이러스에 감염되거나 또는 (ii) 종양 또는 다른 변형된 세포를 갖는 대상체의 치료 방법으로서, 톨-유사 수용체 3(TLR3)에 결합하여 (i) 바이러스에 의한 대상체의 감염 또는 (ii) 대상체 내의 종양 또는 다른 변형된 세포의 증식을 각각 감소 또는 제거하기에 충분한 양의 폴리(I:C₁₂U)로 구성된 약제학적 조성물의 투여를 포함하는 방법.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 대상체가 바이러스에 감염된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 바이러스가 부냐바이러스(bunyavirus)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 바이러스가 플레보바이러스(phlebovirus)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

바이러스 또는 종양에 대비하여 대상체를 백신 접종하는 방법으로서,

(i) 바이러스 또는 종양에 대하여 면역 반응을 유발하는 백신; 및

(ii) 톨-유사 수용체 3(TLR3)에 결합하고 대상체 내에서 상기 백신의 바이러스 또는 종양 항원에 대하여 면역 반응을 자극하기에 충분한 양의 폴리(I:C₁₂U)으로 구성된 약제학적 조성물;

의 투여를 포함하는 방법.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 대상체가 바이러스에 대비하여 백신 접종된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 바이러스가 부냐바이러스(bunyavirus)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 8항에 있어서, 상기 바이러스가 플레보바이러스(phlebovirus)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체가 인간인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 2항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 바이러스 또는 종양이 TLR3 작용제로서 배타적으로 작용하는 폴리(I:C₁₂U)의 단독 작용에 민감한 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 2항 내지 제 9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 바이러스 또는 종양이 인-시츄(*in situ*) 표적으로서 폴리(1:C₁₂U)에 의해 자발적으로 선택된 항원을 발현시켜 상기 항원에 대한 면역 반응을 개시하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제 1항 내지 제 9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리(1:C₁₂U)가 정맥 내로 주입되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제 1항 내지 제 9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리(1:C₁₂U)가 피내, 피하 또는 근육내로 주입; 비강내 또는 기관내로 흡입; 또는 구인두(oropharyngeally)에 노출되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

바이러스에 의해 감염되거나, 종양을 보유하거나, 또는 바이러스 또는 종양에 대하여 백신 접종된 대상체의 면역 세포 상에 톨-유사 수용체 3(TLR3)를 결합시키는 약제를 제조하기 위한 일반식 $rI_n \cdot r(C_{11-14}U)_n$ (단, n은 4 내지 29의 정수임)의 부정합(mismatched) 이중-가닥 리보핵산의 용도.

청구항 16

무균 조건하에서 제조되고, 바이러스에 의해 감염되거나, 종양을 보유하거나, 또는 바이러스 또는 종양에 대하여 백신 접종된 대상체를 치료하기 위해 사용되는 일반식 $rI_n \cdot r(C_{11-14}U)_n$ (단, n은 4 내지 29의 정수임)의 부정합(mismatched) 이중-가닥 리보핵산.

명세서

기술 분야

<1> 관련 출원에의 상호 참조

본 출원은 2007년 3월 5일에 출원된 미국 가출원 제 60/904,792호의 우선권 이익을 청구한다.

<3> 연방 정부의 후원을 받은 연구 또는 개발

미국 정부는 보건복지부에 의해 수여받은 NIH-N01-AI-15435 협정에 의해 규정되는 바와 같이 본 발명에서 특정 권리를 갖는다.

<5> 발명의 기술분야

본 발명은 항바이러스제, 항증식제, 면역 자극제 또는 그들의 임의의 조합으로의 사용을 위한 톨-유사 수용체 3(TLR3)용 작용제의 제공에 관한 것이다. 의약 치료 방법 및 약제 제조 방법이 제공된다.

배경 기술

<7> 이중 가닥 RNA 유사 폴리(I:C)는 TLR3 작용제로 사용되고 있다. 그러나 이의 약제로서의 유용성은 이의 독성을 의해 제한된다. 그러므로 이 군에 속하는 다른 수용체들 대신에 TLR3를 특이적으로 표적화함으로써 항바이러스제, 항증식제 및/또는 면역 자극제로 사용될 수 있는 향상된 약제가 요구된다. 예를 들어, 바람직한 약제는 초기 또는 확정된 감염의 치료, 전암 또는 암 질병의 치료, 또는 TLR3에 의해 매개된 염증성 반응 유발을 위해 증가된 치료 지수(예를 들어, LD₅₀ 나누기 ED₅₀과 같이 독성 효과를 내는 투여량 나누기 치료 효과를 내는 투여량의 비율)를 가질 수 있다.

<8> 이중-가닥 리보핵산(dsRNA)는 2',5'-올리고아데닐레이트 신테타아제(2',5'-oligoadenylate synthetase)/RNase L 및 p68 단백질 키나아제 경로를 포함하는 dsRNA-의존 세포내 항바이러스성 방어 메커니즘을 통해 고유 면역(예를 들어, 인터페론 및 다른 시토카인의 생성)을 유발한다. 헤미스페르스® 바이오파마(HEMISPHERx® Biopharma)로부터의 앰플리겐(AMPLIGEN)® 폴리(I:C₁₂U)는 항바이러스성 및 면역자극성을 갖지만 감소된 독성을

나타내는 특정-구조 dsRNA이다. 앰플리겐® 폴리(I:C₁₂U)는 다면 발현성(pleiotropic) 활성을 통해 바이러스 및 암 세포 성장을 저해한다: 이는 다른 dsRNA 분자의 거동과 같이 2',5'-올리고아데닐레이트 신테타아제/RNase L 및 p68 단백질 키나아제 경로를 조절한다. 여기에서, 폴리(I:C₁₂U)는 TLR3의 특정 작용제로 작용함으로써 인체 내에서 이의 효능을 중재한다고 밝혀졌다.

<9> 그러므로, 본 발명의 목적은 항바이러스제, 항증식제 및/또는 면역자극제가 필요한 환자에게 치료를 제공하는 것이다. 그 때문에 선택적인 TLR3 작용제에 대한 오랜 필요가 있었다. 특히, 감염성 질환, 세포 증식 및/또는 백신 접종을 포함하는 대상체의 치료 방법 및 약제의 제조 방법을 제공한다. 더욱이, 본 발명의 목적 및 장점은 하기에 기재되거나 또는 이러한 기재로부터 당업계의 숙련인에게 명백하다.

발명의 상세한 설명

<10> 본 발명은 초기 또는 확정 바이러스의 감염, 비정상적인 세포 증식에 의해 표시되는 병리학적 이상(예를 들어, 신생물 또는 종양)이 있는 대상체(예를 들어, 인간 또는 동물)를 치료하거나 또는 면역 자극제(immunostimulant)로 사용되어 바이러스 감염에 대하여 대상체를 백신 접종할 수 있다. 부정합(mismatched) 이중-가닥 리보핵산(dsRNA)은 대상체의 면역 세포에서 톨-유사 수용체(TLR3)에 결합하기 충분한 양으로 사용되는 것이 바람직하다. 그로인해 고유 면역이 유발될 수 있다. 특히, TLR4와 같은 다른 톨-유사 수용체, 또는 RIG-1 또는 mda-5와 같은 RNA 나선의 활성화없이 TLR3을 활성화시키기 위해 특정-구조 dsRNA가 사용될 수 있다.

<11> 상기 대상체는 바이러스, 특히 부냐바이러스(bunyavirus), 보다 상세하게는 플레보바이러스(phlebovirus)에 감염될 수 있다. 특정-구조 dsRNA로 구성된 약제학적 조성물은 TLR3에 결합하기 충분한 양으로 대상체에 투여된다. 특정-구조 dsRNA로 치료되지 않은 대상체와 비교하여 감소된 회복 시간, 증가된 면역[예를 들어, 항체의 역가, 립프구의 증식, 감염된 세포의 살해, 또는 자연 살해(natural killer, NK) 세포 활성의 증가], 감소된 복제 바이러스수, 또는 이들의 조합에 의해 평가됨에 따라 대상체의 바이러스 감염이 감소 또는 제거된다.

<12> 상기 대상체는 비정상적인 세포 증식(예를 들어, 신생물 또는 종양, 다른 변형된 세포)에 의해 고통받을 수 있다. TLR3에 결합하기 충분한 양의 특정-구조 dsRNA로 구성된 약제학적 조성물이 대상체에 투여된다. 특정-구조 dsRNA로 처리되지 않은 대상체의 상태와 비교하여 세포 증식이 감소되고, 신생물 세포가 제거되고/되거나 대상체의 병적 상태(morbidity) 또는 사망률이 개선된다.

<13> 상기 대상체는 바이러스 또는 신생물에 대항하여 백신 접종될 수 있다. 백신 접종 직전, 동안 또는 직후, TLR3에 결합하기 충분한 양의 특정-구조 dsRNA로 구성된 약제학적 조성물이 대상체에 투여된다. 이로인해 백신에 대한 면역 반응이 자극된다. 백신은 사멸 또는 약화된 바이러스, 신생물 세포의 파편, 하나 이상의 유리된 바이러스 단백질, 또는 하나 이상의 유리된 종양 항원으로 구성될 수 있다. 인-시츄(in situ)의 백신은 그 자리에서 생성되는 항원 및 그에 관한 보조제로 작용하는 특정-구조 dsRNA로 구성될 수 있다. 상기 바이러스는 부냐바이러스, 보다 상세하게는 플레보바이러스일 수 있다.

<14> 항원 제공 세포(예를 들어, 수지상 세포, 대식 세포) 및 점막 조직(예를 들어, 위 또는 호흡기 상피)는 특정-구조 dsRNA를 위한 인체 내의 바람직한 표적이다. 바이러스 또는 종양이 제공될 수 있고, 항원은 TLR3 작용제로서 배타적으로 작용하는 특정-구조 dsRNA의 단독 작용에 민감할 수 있다. 특정-구조 dsRNA는 정맥내 주입; 피내, 피하 또는 근육내로 주사; 비강내 또는 기관내로 흡입; 또는 구인두(oropharyngeal) 노출에 의해 바람직하게 투여된다.

<15> 또한, 약제의 사용 및 제조를 위한 방법이 제공된다. 하지만 생성물에 대한 청구항은 방법의 특정한 단계가 생성물 청구항으로 다시 인용되는 경우를 제외하고는 이러한 방법을 제한하는데 필요하지 않다.

<16> 본 발명의 구체적인 해석은 상세한 설명과 청구항, 및 이의 보편화로부터 당업계의 숙련인에게 명백할 것이다.

본 발명의 특정 구현예들의 설명

<18> 본 발명은 볼티모어 분류 시스템(Baltimore classification system)의 III군, IV군 또는 V군에 속하는 RNA 바이러스에 의해 감염 처리될 수 있다. 이는 리보핵산(RNA)을 이의 유전 물질로 가지고, DNA 중간 생성물을 사용하여 복제되지 않는다. 상기 RNA는 일반적으로 단일 가닥(ssRNA)이지만 때때로 이중 가닥(dsRNA)일 수 있다. RNA 바이러스는 이들 RNA의 센스 또는 극성에 따라 음성-센스와 양성-센스 RNA 바이러스로 더 분류될 수 있다. 양성-센스 바이러스 RNA는 바이러스성 mRNA와 동일하고, 이에 따라 숙주 세포에 의해 즉시 변형될 수 있다. 음성-센스 바이러스 RNA는 mRNA에 상보적이며, 이에 따라 변형 전 RNA 폴리머라아제에 의해 양성-센스 RNA로 변환

되어야 한다. 이와 같이, 양성-센스 바이러스의 정제된 RNA는 전체 바이러스 입자보다 감염성이 약할지라도 직접적으로 감염을 유발할 수 있다. 음성-센스 바이러스의 정제된 RNA는 양성-센스 RNA로 전사되어야 하기 때문에 자체로는 감염성이 아니다.

<19> 인간과 동물을 감염시키는 RNA 바이러스는 *비르나비리대(Birnaviridae)* 및 *레오비리대(Reoviridae)* 족(III군 dsRNA 바이러스); *아르테리비리대(Arteriviridae)*, *아스트로비리대(Astroviridae)*, *칼리시비리대(Caliciviridae)*, *헤페비리대(Hepeviridae)* 및 *로니비리대(Roniviridae)* 족(IV군 양성-센스 ssRNA 바이러스); 및 *아레나비리대(Arenaviridae)*, *보르나비리대(Bornaviridae)*, *부나비리대(Bunyaviridae)*, *필로비리대(Filoviridae)*, *파라믹소비리대(Paramyxoviridae)* 및 *람도비리대(Rhabdoviridae)* 족(V군 음성-센스 ssRNA 바이러스)에 속하는 것들을 포함한다. 또한, 특정-구조, 이중 가닥 리보핵산(dsRNA)은 *플라비비리대(Flaviviridae)*, *헵파드나비리대(Hepadnaviridae)*, *오르토믹소비리대(Orthomyxoviridae)*, *피코르나비리대(Picornaviridae)*, *레트로비리대(Retroviridae)* 및 *토가비리대(Togaviridae)* 족으로부터의 RNA 바이러스에 의해 감염 처리되는 것이 알려져 있다. 이러한 족들의 바이러스들은 본 발명의 범위 내에 포함되거나 또는 포함되지 않을 수 있다.

<20> 비정상적인 증식 하에 있는 대상체의 세포는 신생물 또는 종양(예를 들어, 악성 종양, 육종, 백혈병, 림프종), 특히 종양 바이러스(예를 들어, 변형 유전자 또는 발암 유전자를 운반하는 DNA 또는 RNA 바이러스)에 의해 변형되거나 또는 그밖에 암과 연관된 바이러스에 의해 감염된 세포일 수 있다. 예를 들어, 엡스타인바 바이러스(Epstein-Barr virus)는 비인두(nasopharyngeal)암, 호지킨 림프종(Hodgkin's lymphoma), 버킷 림프종(Burkitt's lymphoma) 및 기타 B림프종과 연관되고; 인간 간염 B 및 C 바이러스(HBV 및 HCV)는 간암과 연관되고; 인간 포진 바이러스 8(human herpesvirus 8, HHV8)은 카포시 육종(Kaposi's sarcoma)과 연관되고; 인간 유두종 바이러스(예를 들어, HPV6, HPV11, HPV16, HPV18 또는 이들의 조합)는 경부암, 항문암 및 생식기 혹과 연관되고; 인간 T 림프 영양성 바이러스(human T-lymphotrophic virus, HTLV)는 T-세포 백혈병 및 림프종과 연관된다. 암은 위장(예를 들어, 식도, 결장, 장, 회장, 직장, 항문, 간, 췌장, 위), 비뇨 생식기(예를 들어, 방광, 신장, 전립선), 골격, 신경, 폐(예를 들어, 허파) 또는 생식기(예를 들어, 경부, 난소, 고환) 기관계로부터 유래한 것들을 포함한다.

<21> 폴리(리보이노시닉)은 폴리(리보시토시닉₁₂우라실릭)으로 부분적으로 혼성화되고, rI_n · r(C₁₂U)_n으로 나타낼 수 있다. 본 발명에 사용될 수 있는 다른 특정-구조 dsRNA는 폴리(C_nU) 및 폴리(C_nG)(단, n은 4 내지 29의 정수임)에서 선택된 코폴리뉴클레오티드(copolynucleotides)에 기초하거나 또는 폴리리보시티딜레이트(rCn) 가닥의 사이에 짹없는 염기(우라실 또는 구아닌)를 병입시키기 위한 rI_n · rC_n의 변형에 의해 형성된 폴리리보이노시닉산 및 폴리리보시티딜릭산 복합체의 부정합 유사체이다. 그 대신에 부정합 dsRNA는 폴리리보이노시닉산(rI_n)의 리보실 백본, 예를 들어 2'-0-메틸 리보실 잔기의 변형에 의해 r(I) · r(C) dsRNA로부터 유래될 수 있다. 부정합 dsRNA는 리신 셀룰로오즈와 같은 RNA-안정화 폴리머와 복합화될 수 있다. rI_n · rC_n의 부정합 유사체 중에서, 일반식 rI_n · r(C₁₁₋₁₄U)_n이 바람직하고, 본원발명에 참고로 통합된 미국 특허 제 4,024,222호 및 제 4,130,641호에 기재되었다. 상기에 기재된 dsRNA는 일반적으로 본 발명에 따른 용도에 적합하다. 또한, 미국 특허 제 5,258,369호를 참조한다.

<22> 특정-구조 dsRNA는 경장(enteral)(예를 들어, 경구, 공급관, 관장), 국부(예를 들어, 표피에서 작용하는 폐치, 직장 또는 질에서 작용하는 좌약) 및 비경구(예를 들어, 경피 폐치; 피하, 정맥내, 근육내, 피내 또는 복강내 주사; 불의, 설하 또는 경점막; 비강내 또는 기관내의 흡입 또는 주입)을 포함하는 임의의 적절한 국소 또는 온몸의 경로에 의해 투여될 수 있다. 핵산은 흡입용으로 미분화, 주사 또는 주입용으로 부형제(예를 들어, 멸균 완충 식염수 또는 물)에 용해, 또는 표적 운반용으로 리포좀 또는 기타 담체(carrier)에 캡슐화될 수 있다. 항원이 존재하는 세포 및 상피 상에서 TLR3 수용체에 핵산을 표적화하는 담체가 바람직하다. 약제는 무균 조건 하에서 제조되고(선택적으로 저장되며), 낮은 미생물 및 균체내 독소 오염이 검사된 특정-구조 dsRNA의 적어도 유효량을 함유하는 약제학적 조성물로 제형화될 수 있다. 상기 약제는 생리학적으로-수용가능한 부형제 또는 담체를 더 포함할 수 있다. 바람직한 경로는 대상체의 상태 및 연령, 감염성 또는 신생물 질병의 특성, 및 선택된 활성 성분에 따라 달라질 수 있다.

<23> 핵산의 권고되는 투여량은 대상체의 임상적 상태와 바이러스 감염 또는 종양 부하(tumor burden)를 치료하는 의사 또는 수의사의 경험에 의존할 것이다. 특정-구조 dsRNA는 70kg 대상체에게 정맥 내 주입에 의해 약 200mg 내지 약 400mg으로 주 2회 투여될 수 있으나, 투여량 및/또는 투여 빈도는 대상체의 상태에 따라 의사 또는 수의

사가 변경할 수 있다. TLR3을 발현하는 세포 또는 조직은 핵산을 운반하기에 바람직한 위치, 특히 항원 존재 세포(예를 들어, 수지상 세포 및 대식세포) 및 내피세포(예를 들어, 호흡기 및 위 시스템)이다. 특정-구조 dsRNA의 효력은 TLR3 유전자의 변형(예를 들어, 삭제), 이의 발현 하강 조절(예를 들어, siRNA), TLR3 리간드-결합 사이트용 경쟁자(예를 들어, 중화 항체) 또는 수용체 길항제와의 결합, 또는 TLR3 신호 경로의 하류 성분(예를 들어, MyD88 또는 TRIF)의 간섭에 의해 억제 또는 차단될 수 있다.

<24> 앰플리겐®폴리(I:C₁₂U)는 이전에 효력이 없었던 면역계에서 TLR3 활성화 효과를 나타내는 선택적인 제제를 제공한다. TLR 어댑터 MyD88 및 TRIF와 같은 기타 제제는 각각 모든 TLR 또는 TLR3/TLR4에 의해 신호를 매개한다. 그러므로, MyD88 또는 TRIF를 통한 신호의 활성화 또는 억제는 TLR3에 의해 매개된 것들에 생리적 효과를 저해하지 않는다. TLR3의 존재 및 이의 신호는 앰플리겐®폴리(I:C₁₂U)가 수용체 작용제로 작용하기 위해 필요하기 때문에 작용제의 투여 전 대상체의 세포 또는 조직에서 TLR3의 변형 없음, TLR3 단백질의 존재, 완전한 TLR3-매개 신호 또는 이들의 임의의 조합이 분석될 수 있다. 이러한 TLR3 활성화 확인은 작용제의 투여 전, 동안 또는 후에 실시될 수 있다. 상기 작용제는 다른 톤-유사 수용체 또는 RNA 나선의 활성화없이 TLR3의 활성화에 대한 면역 반응을 제한하기 위해 사용될 수 있다.

<25> 하기 실시예는 본 발명의 특정 구현예를 상세하게 설명하지만, 본 발명의 범위를 한정하지는 않는다.

실시예

<28> 푼타 토로 바이러스(Punta Toro virus, PTV)는 리프트 밸리열(Rift Valley fever) 및 샌드플라이열(Sandfly fever)을 유발하는 바이러스와 식물 발생학적으로 밀접하게 연관된다. 고도의 병원성 플레보바이러스와는 달리, PTV의 인간 감염은 일반적으로 약한 열병으로 한정된 질병을 유발한다. 작은 설치류에서의 감염 모델은 인간 및 가축 유제 동물(ungulates)의 리프트 밸리열 바이러스 감염에서 관측되는 것과 유사한 간장 관련 심각한 질병을 유발한다고 기재하고 있다. 일부 군들은 PTV 감염에 의해 유발된 심각한 질병에 감염성인 햄스터를 기재하였다. 상기 리프트 밸리열 바이러스는 고도로 제한되고 고-수준 오염 시설이 요구되기 때문에 이러한 설치류 모델의 유효성은 PTV를 항바이러스 연구를 위한 리프트 밸리열 바이러스 사용의 실용적인 대안으로 만들어 준다. 이를 위하여 기대되는 항바이러스의 다양한 평가가 심각한 플레보바이러스-유도 질병의 PTV 모델을 이용하여 실시되었다. 더욱이, 일부 많은 연구들은 면역 조절제의 평가를 포함하고 PTV가 IFN 유도제에 매우 민감함을 증명하였다. 타입 I IFN의 중요성은 마우스 PTV 감염 모델에서 생겨났다. IFN-α / β로의 중화 항체의 처리는 성숙한 마우스에서 보고된 감염에 대한 저항력을 완전히 무효화하였다. 폴리(I:C) 또는 폴리(I:C₁₂U)와 같이 효력이 있는 타입 I IFN-유도제는 치사성 PTV 공격으로부터 어린(weanling) 마우스를 보호하는 효과가 우수함이 끊임없이 증명되었다.

<29> dsRNA, RNA 바이러스의 복제 중간 생성물로의 노출로 발생하는 활성화 사건에는 두 개의 경로가 포함된다는 증거가 축적되어있다. TLR3 반응 경로와 함께, 캐스파제-보급 도메인(caspase-recruiting domains, CARDs)을 포함하는 RNA 나선 세포질 센서에 의해 매개된 TLR3-독립 경로는 최근까지 밝혀지지 않았다. 이러한 dsRNA 센서에 의한 신호는 다양한 키나아제 및 IFN-β의 생성을 제어하는 복사 인자, 항바이러스 면역 제어의 임계 인자(critical factor)들을 공유하기 위해 모이는 독특한 경로를 통해 발생한다. 이의 엔도좀 제한으로 인해, TLR3는 세포 식균 과정을 통해 내부화되는 dsRNA의 인식에 포함된다. RNA 나선 dsRNA 검출기, 레티노산-유도 단백질 I (RIG-I) 및 흑색종 분화 관련 유전자-5(mda-5)의 시토졸 위치는 세포 내의 바이러스 감염을 감지할 수 있다. 최근의 증거는 mda-5가 폴리(I:C)에 반응하는 타입 I IFN의 TLR3에서 지배적인 역할을 수행함을 제안한다. 폴리(I:C₁₂U)에 의한 보호 면역의 유발에서의 TLR3의 역할을 증명하는 데이터가 본 명세서에 제공된다.

동물 대상체

<31> TLR3^{-/-} 마우스는 예일 대학의 C57BL/6 백그라운드로 유도 및 역교배되었다(Alexopoulou et al., Nature 413:732-738, 2001). 이들은 유타주립대에서 특정 무-병원균 조건하에서 사육되었다. C57BL/6 마우스(야생형)는 책순 연구실로부터 얻었다(바하버, 메인주). 연령을 일치시킨 암컷 마우스가 모든 실험에 사용되었다. 본 연구에 사용된 모든 동물 과정은 미국 농무부 및 유타주립대 동물 보호 및 사용 위원회에 의해 정해진 지침에 따라 실시되었다.

면역 조절제

<33> 폴리(I:C₁₂U)는 헤미스페르스® 바이오파마(필라델피아, 펜실베니아주)에 의해 2.4mg/mL의 농도로 제공되었다.

이는 주입 직전 멸균 식염수를 이용하여 적절한 농도로 희석되었다. 양이온 리포좀-DNA 복합체(CLDC)를 생성하는 물질은 주바리스 바이오테라퓨틱스사(플레젠톤, 캘리포니아주)에 의해 제공되었다. 리포좀, DNA 및 주입용 CLDC의 제조가 고웬(Gowen) 등에 의해 이미 개시되어있다(Antiviral Res. 69:165-172, 2006). 재조합 에이메리아 원생 동물 항원(Recombinant Eimeria protozoan antigen, rEA)은 바로스 연구소(홀트, 미시간주)에 의해 제공되었고, 고웬 등에 의해 기재된 바와 같이 사용되었다(Antimicrobiol. Agents Chemother. 50:2023-2029, 2006). 리바비린(Ribavirin)은 ICN 제약사(코스타메사, 캘리포니아주)에 의해 제공되었다. 모든 물질은 복강내(i.p.) 경로에 의해 투여되었다.

<34> PTV로 감염된 TLR3^{-/-} 및 야생형 마우스에서의 폴리(I:C₁₂U)의 평가

<35> 아담스 종의 PTV는 미국 육군 전염병 의학 연구소(프레더릭, 메릴랜드주)의 도미니크 피팻 박사으로부터 얻었다. 바이러스 스톡은 LLC-MK₂ 세포를 통하여 본래의 바이러스 스톡의 네 가지 경로에 따라 제조되었다(American Type Culture Collection, 머내서스, 버지니아주). 어린 TLR3^{-/-} 및 C57BL/6 마우스(3~4주 연령)가 PTV의 2×10^4 50% 세포 배양 감염 투여량(CCID₅₀)으로 피하(s.c.) 주입에 의해 접종되었다.

<36> 첫번째 연구에서 폴리(I:C₁₂U) 10 μ g, CLDC 1 μ g의 단일 투여량 또는 식염수 위약이 감염 공격 후 24시에 복강내(i.p.) 투여되었다. 리바비린 처리군은 또한 바이러스 공격 전 초기 4시에 5일동안 일 2회 투여되는 치료에 포함되었다. 각 군의 마우스는 21일 전까지 죽음이 관찰되었다. 두번째 연구에서 1 μ g rEA-처리군은 CLDC 및 리바비린군으로 대체되었다. 또한, 추가 동물이 감염 3일에 간 질병의 분석용으로 포함되었다. 혈청은 감염 3일에 죽인 마우스로부터 수집되었고, 같은 간장 황달을 위해 0 내지 4의 척도로 수치화되었다: 0은 정상이고 4는 최대로 노랗게 변색. 혈청 알라닌 아미노기 전이 효소(alanine aminotransferase, ALT) 활성은 푸앵트 사이언티픽사(링컨 파크, 미시간주)로부터 구입한 ALT(SGPT) 시약 세트를 이용하여 측정되었다.

<37> 일시적인 연구가 폴리(I:C₁₂U)로 처리된 TLR3^{-/-} 및 야생형 마우스의 온몸 및 간 바이러스 부하, 간장 변색 및 ALT 수준을 비교하기 위해 실시되었다. 8주-연령 마우스의 군(n=5)은 폴리(I:C₁₂U) 또는 식염수로의 치료적 간섭에 이어 감염 2, 3, 4 또는 5일에 시료 수집을 위해 희생되었다. 또한, 1일 시료는 감염 과정 동안 초기의 기준선을 제공하기 위해 수집되었다. 보도에 의하면 나이든 마우스가 PTV 감염에 보다 저항적이기 때문에 감염 후 단계에서 분석이 용이하므로 본 연구에 사용되었다. 시드웰(Sidwell) 등에 의해 기재된 바와 같이 감염 세포 배양 분석을 사용하여 바이러스 역가가 분석되었다(Antimicrob. Agents. Chemother. 32:331-336, 1988). 요약하여, 일정 부피의 간 호모제네이트(homogenate) 또는 혈청은 연속적으로 희석되고 96-웰 마이크로플레이트의 LLC-MK₂ 세포 단일층의 3중 웰로 첨가되었다. 바이러스 세포 병리학적 효과(CPE)는 바이러스 노출 후 6일에 측정되고 50% 종점은 리드&뮌슈(Reed & Muench)에 의해 기재된 바와 같이 계산되었다(Am. J. Hyg. 27:493-497, 1938).

<38> 폴리(I:C₁₂U) 처리 후 TLR3^{-/-} 및 야생형 마우스에서의 IFN- β

<39> 8주-연령 TLR3^{-/-} 및 야생형 마우스의 군(군당 n=3)은 10 μ g 폴리(I:C₁₂U)으로 처리되었다. 혈청은 노출 후 0, 1.5, 3, 6 및 24시에 수집되었다. 온몸의 IFN- β 수준은 PBL(피스카타웨이, 뉴저지주)로부터의 ELISA 시약을 사용하여 제조업자에 의해 명시된 바에 따라 측정되었다.

<40> 통계 분석

<41> 로그-랭크 분석이 생존 데이터에서의 차이를 평가하기 위해 사용되었다. 피셔 정확 검증(Fisher's exact test) (2급)이 전체 생존자의 증가를 평가하기 위해 사용되었다. 맨-휘트니 검증(Mann-Whitney test) (2급)은 사망, 바이러스 역가 및 혈청 ALT 수준에서의 하루 평균의 차이를 분석하기 위해 실시되었다. 윌콕슨 순위 합계 분석(Wilcoxon ranked sum analysis)이 평균 간 수치 비교를 위해 사용되었다. 스튜던트 t-검증 (2급)은 폴리(I:C₁₂U) 처리된 TLR3^{-/-} 및 야생형 마우스 사이의 IFN- β 수준에서의 차이를 결정하기 위해 사용되었다.

<42> 폴리(I:C₁₂U) 처리 후 PTV 감염에 대해 보호 면역을 발달시키지 못한 TLR3-결핍 마우스

<43> 폴리(I:C₁₂U)는 치사성 PTV 공격에 대하여 어린 C57BL/6의 완전한 보호를 제공하고 바이러스 역가를 감소시키며

PTV 감염과 연관된 간의 기능 장애 및 질병을 제한하는 것으로 이미 보고된 약물이다(Sidwell et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 653:344-35, 1992). TLR3 활성이 폴리(I:C₁₂U)에 의하여 PTV에 대한 항바이러스성 방어 유발에 중요한 역할을 수행하는지 결정하기 위해서, 3~4주 연령 TLR3^{-/-} 및 야생형 마우스는 첫번째 연구에서 감염성 공격 후 24시에 처리되었다. 폴리(I:C₁₂U)로 처리된 마우스의 TLR3^{-/-}군에서는 생존자가 없었다(표 1). 대조적으로, 플라스미드 DNA 백본에 존재하는 CpG 모티프의 TLR9 인식을 통해 주로 작용하는 CLDC로 자극된 8마리의 마우스 중 5마리가 감염에서 생존하였다. 야생형 마우스에서 dsRNA 및 CLDC는 둘다 마우스의 100%를 보호하였고(표 1), 이로써 면역 조절제 약물 조제품이 매우 효과적임을 알 수 있었다. 또한, 리바비린 처리는 보편적으로 치사성 PTV 공격으로부터 야생형 마우스의 90% 이상을 보호하기 때문에 추가적인 양성 대조군으로 포함되었다. 특히, 리바비린은 야생형 동물에서 완전한 보호가 관측된 반면, TLR3^{-/-} 마우스의 75%(8마리의 마우스 중 6마리)만을 죽음으로부터 보호하였다(표 1). 이는 조금 큰 야생형 마우스(~3-4주 연령)와 비교하여 작은 TLR3^{-/-} 마우스(~3주 연령)가 사용되었기 때문일 수 있다. 그 대안으로 TLR3 삭제는 감염을 한정하고 질병에 저항하는 이러한 마우스의 능력을 감소시킬 수 있다. CLDC 및 리바비린은 모두 생존 결과를 유의하게 향상시켰다.

표 1

<44> TLR3 결핍 마우스에서의 PTV 감염에 대한 방어 면역을 이끌어낸 부정합 dsRNA가 아닌 CLDC, 폴리(I:C₁₂U)

종류	처리 ^a	생존마리수/ 전체수	치사일 ^b		로그-랭크 Prob>Chi Sq
			평균±SD	범위	
TLR3 ^{-/-}	폴리(I:C ₁₂ U), 10μg	0/9	4.1±0.3	4-5	0.6775
	CLDC, 1μg	5/8 ^{**}	3.7±0.6	3-4	0.0163
	리바비린, 75mg/kg/일	6/8 ^{**}	6.0±2.8	4-8	0.0003
	멸균 식염수	0/9	4.2±1.0	3-6	
야생형	폴리(I:C ₁₂ U), 10μg	10/10 ^{***}			<0.0001
	CLDC, 1μg	10/10 ^{***}			<0.0001
	리바비린, 75mg/kg/일	10/10 ^{***}			<0.0001
	멸균 식염수	1/11	4.5±0.7	4-6	

<45> ^a단일-투여 폴리(I:C₁₂U), CLDC 및 식염수 처리는 바이러스 공격 후 24시에 복강내 투여되었다. 리바비린은 바이러스 공격 전 4시에 시작하여 5일 동안 일 2회 복강내로 제공되었다.

<46> ^b21일 전에 죽은 마우스의 치사일 평균 및 범위

<47> 각각의 식염수-처리 대조군에 비교하여 *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001

<48> 두번째 연구는 처음의 연구 결과들을 증명하기 위하여 실시되었다. 더욱 근접하게 연령이 일치된 마우스(~4주 연령)를 사용했을 뿐만 아니라, PTV 감염의 결과로서 간 질병의 차이를 평가하기 위하여 감염 3일째 희생용으로 다섯 마리의 추가적인 마우스를 포함하였다. 표 2에 나타낸 바와 같이, 폴리(I:C₁₂U)는 바이러스의 높은 치사량으로부터 TLR3^{-/-} 마우스를 보호하지 못하였고, 혈청 ALT 및 간수치의 감소된 수준으로 나타내는 간 질병의 제한에 실패하였다. TLR11을 통해 작용하는 양성 대조군 면역 조절제, rEA는 마우스를 사망으로부터 보호하고 혈청 ALT 수준을 유의하게 감소시키는 효과가 높았다. 예상되는 바와 같이, 폴리(I:C₁₂U) 및 rEA의 야생형 마우스 처리는 고도의 치사성 공격 접종원에 대하여 100% 보호를 이끌어내었다(표 2). 흥미롭게도 타입 I IFN을 유도하는 것으로 알려진 폴리(I:C₁₂U) 치료는 극적으로 간장 황달을 방해하는 반면, 타입 I IFN을 유도하지 않는 rEA는 두 종류의 마우스에서 모두 평균 간수치를 감소시키지 않았다. TLR3^{-/-}과 야생형의 식염수-처리 위약 및 rEA 처리군을 비교할 때 유의한 차이점이 없었고, 이는 두 종류가 모두 PTV 감염이 쉽고 rEA와 유사하게 반응함을 의미한

다.

표 2

<49> 치사성 PTV 질병으로부터 TLR3-결핍 마우스를 보호하는 TLR11 작용체, 부정합 dsRNA가 아닌 rEA, 폴리(I:C₁₂U)

종류	처리 ^a	생존마리수/ 전체수	치사일 ^b		로그-랭크 Prob>Chi Sq	ALT ^{c,d} ± SD	간수치 ^{c,e} ± S D
			평균 ± SD	범위			
TLR3 ^{-/-}	폴리(I:C ₁₂ U), 10μg	0/10	4.1 ± 0.6	3~5	0.4861	2700 ± 1576	3.2 ± 0.4
	rEA, 1μg	10/10 ***			<0.0001	155 ± 77 **	3.3 ± 0.3
	멸균 식염수	1/10	4.1 ± 0.6	3~5		3837 ± 234	3.5 ± 0.0
야생형	폴리(I:C ₁₂ U), 10μg	10/10 ***			<0.0001	3 ± 6 **	0.6 ± 0.2 **
	rEA, 1μg	10/10 ***			<0.0001	93 ± 56 **	3.3 ± 0.3
	멸균 식염수	1/20	4.8 ± 1.1	3~7		3650 ± 823	3.2 ± 0.3

<50> ^a단일-투여 폴리(I:C₁₂U), rEA 및 식염수 처리는 바이러스 공격 후 24시간에 복강내 투여되었다.

<51> ^b21일 전에 죽은 마우스의 치사일 평균 및 범위

<52> ^c감염 3일에 측정; 군당 4~5 마리의 마우스

<53> ^dALT, 알라닌 아미노기 전이 효소(aminotransferase); 리터당 국제 단위로 측정

<54> ^e0(정상 간) 내지 4(최대 변색)의 득점

<55> 각각의 식염수-처리 대조군에 비교하여 *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001

<56> 폴리(I:C₁₂U)에 반응하여 질병의 중증도 및 바이러스 부하를 감소시키지 못하는 TLR3-결핍 마우스

<57> 어떤 C57BL/6 마우스에서 PTV가 고도로 치사성임에도 불구하고, 8주-연령 동물은 보도에 의하면 감염에 대한 저항력이 있다. 그러므로 폴리(I:C₁₂U) 면역 치료의 보호 효과에 대한 TLR3의 기여를 구체적으로 평가하기 위해서 나이든 마우스를 사용하여 전체 감염 및 질병 과정에 걸쳐 시간 코스 연구가 실시되었다. 도 1A에 나타낸 바와 같이, TLR3^{-/-} 및 야생형 마우스에서 감염 3일까지 ALT의 주목할 만한 수준이 나타나지 않았고, 내려가기 전 4일 정점에 도달하였다. 폴리(I:C₁₂U)-처리 및 식염수-처리된 TLR3^{-/-} 마우스 사이의 ALT 수준의 차이가 없지만,

dsRNA 처리를 받은 야생형 마우스에서는 기준선 가까이 남겨져있다(도 1A~1B). 흥미롭게 감염 3일과 4일에 큰 변화를 보임에도 불구하고, 식염수-처리된 야생형 마우스는 이들의 TLR3-결핍 동물보다 3배 이상 큰 평균 ALT 수준으로 존재하였다. 종체적인 시각 검사에 의해 평가된 간 손상의 경우, 변색에 의해 표시된 질병은 식염수-처리 마우스에서 2일에 처음 나타났고 4일에 정점에 도달하였다(도 1C~1D). ALT 데이터에 의해 알 수 있는 간 질병에 따라, 4 및 5일에서의 식염수 처리 대조군과 비교하여 폴리(I:C₁₂U)에 반응하는 야생형 마우스에서만 간장 황달의 유의한 감소가 나타났다. 또한, TLR3^{-/-} 마우스와 비교하여 야생형 마우스가 더 높은 4일 평균 간수치를 가짐에 따라 더 심각한 간질병의 중증도의 기미가 관측되었다(각각 3.7 ± 0.3 및 3.4 ± 0.4). 그리고 이전의 공격 연구에서 관측된 보호 결핍에 일치하여(표 1 및 2), 상기 데이터는 TLR3가 폴리(I:C₁₂U) 처리 후 PTV에 대한 보호 면역을 매개하는 데 중요한 역할을 수행함을 나타낸다.

<58> 또한, 폴리(I:C₁₂U) 또는 식염수 처리에 이은 감염 과정 동안의 간과 온몸 바이러스 부하의 대조군이 시험되었다. 예상외로 간 바이러스 부하의 명백한 차이가 발견되지 않았고, 야생형 마우스에서 높은 수준의 가변성이 관측되었다(도 1E~1F). 평균 역가는 폴리(I:C₁₂U)-처리 야생형 마우스에서 2일 및 3일에 더 높았지만, 일부 경우에 나타난 바와 같이 혈청 ALT 수준 및 간수치는 통계적으로 중요하지 않다. 특히, TLR3^{-/-} 마우스와 대조

적으로 바이러스는 일부 야생형 동물에서 1일 만큼 초기에 검출되었다(도 1E~1F). 감염 1일에는 검출 가능하지 않았으나, 3-로그 이상의 바이러스 감소에 의해 나타낸 바와 같이 검출 가능한 수준까지만 감염을 조절할 수 있는 dsRNA-처리 야생형 마우스를 제외하고 혈청 바이러스가 2일에 극적으로 내려갔다(도 1G~1H). 또다시, 야생형 동물에서 보여진 폴리(I:C₁₂U) 치료의 효과는 TLR-결핍 마우스에서 상실되었다. TLR3⁺ 및 야생형 마우스에서의 간 바이러스 부하를 비교함에 따라 식염수-처리군에서 피크 역가의 유의한 차이가 전체적으로 나타나지 않았다(도 1G~1H). 하지만, TLR3⁺ 마우스에서의 평균 바이러스 역가는 3일 후 3-로그보다 더 가파르게 떨어졌으나, 반면에 야생형에서는 점차적인 감소만이 관측되었다. 식염수-처리군의 마우스들 사이의 비교는 야생형 동물에서 보여지는 더욱 심각한 간 질병 프로파일을 입증한다. 야생형에서 간 바이러스는 초기에 검출 가능하고(1일), 온몸의 바이러스는 더 길게 생존하였다(도 1E~1H).

<59> 폴리(I:C₁₂U) 처리에 반응하여 IFN-β를 생성하지 않는 TLR3-결핍 마우스

<60> dsRNA는 숙주 항바이러스 방어가 확립된 임계 인자, IFN-β의 주 유도제이다. 기능성 TLR3의 결핍이 IFN-β 반응 프로파일을 바꾸는지 시험하기 위해서 야생형 및 TLR3⁺ 마우스군이 모든 실험에 사용된 폴리(I:C₁₂U) 10μg의 투여량으로 처리되었고, 온몸의 IFN-β 생성이 다양한 시간 지점에서 측정되었다. 1.5시간의 노출 시간 후, TLR3⁺ 마우스와 비교하여 야생형 마우스에서는 IFN-β 수준의 유의한 증가가 관측되었다(도 2). 3시에 IFN-β 수준이 TLR3⁺ 마우스에서 바닥 수준에 머무르는 반면, 야생형 마우스에서는 정점에 도달하였다. 6시에 야생형 마우스에서 IFN-β 수준이 다시 기준선으로 되돌아왔다(도 2). TLR3⁺ 마우스의 평가된 임의의 시간 지점에서 IFN-β 유도의 표시가 없었다. 1.5 및 3시의 시료 채취 시간에서 IFN-β 생성의 차이가 주목할 만하고, TLR3-결핍 동물에서 PTV 감염에 대한 보호 면역을 이끌어낼 수 없는 폴리(I:C₁₂U)의 요인일 수 있다.

<61> 검토

<62> 타입 I IFN 유도 및 항 바이러스 숙주 방어를 위한 중요한 경로인 dsRNA-의존 단백질 키나아제(PKR), dsRNA-표준 시토솔릭 센서에 대해 주장하는 몇몇 증거가 있다. 상기 결과들은 패턴 인식 수용체 TLR3가 마우스에서 폴리(I:C₁₂U)에 의해 이끌어내는 보호 면역에 필수적임을 보여준다. 기타 세포질 dsRNA 센서 및 숙주 항바이러스 면역에서 이들의 개선에 대한 최근 발견은 mda-5가 타입 I IFN 유도 및 항바이러스 상태의 초래를 위해 유력한 메커니즘임을 제안한다. 하지만, TLR3 결핍 동물은 폴리(I:C₁₂U) 단독 투여 치료에 이은 PTV 감염에 대한 보호 면역을 개발 및 이에 연관된 질병을 한정하지 못함이 발견되었다. 더욱이, 확인되지 않은 바이러스 복제 및 IFN-β의 부재를 초래하는 TLR3의 결핍은 폴리(I:C₁₂U)로 처리된 야생형 동물에서 매우 명백하다.

<63> TLR3 결핍과 같이 면역 결핍된 마우스에서의 항바이러스 연구와 연관된 주의는 효력 부족이 폴리(I:C₁₂U)에 관계 없이 PTV 감염에 대한 TLR3-매개 반응의 중단 때문일 수 있다. 그 목적을 위하여, TLR3 고갈은 마우스가 더욱 중증의 질병을 앓게 하고, 그로 인해 감염 치료를 더 어렵게 한다. 첫번째 연구로부터의 결과(표 1)는 각각 공격받은 쥐의 100% 및 80% 이상을 통상적으로 보호하는 양성 대조군 제제인 리바비린 및 CLDC가 효력이 더 적을 수 있음을 제안하였다. 하지만, 이러한 결과는 TLR3⁺ 마우스의 연령에 의해 영향을 받았을 수 있고, 즉 본 실험에서 TLR3⁺ 마우스가 야생형 마우스보다 눈에 띄게 작고 대략 며칠 어리다. 이러한 설명은 두번째 연구로부터의 결과에 의해 뒷받침될 수 있고, 여기서 마우스는 더욱 엄격하게 연령이 일치되도록 4주 연령에 모두 가깝다. 더욱이, 매우 유사한 보호가 rEA에 반응하는 두 마우스 종류 중에서 나타났으며, 유사한 치사율이 식염수 위약군에서 관찰되었다(표 2). 그러므로, PTV 감염과 싸우는 TLR3⁺ 마우스의 감소된 능력을 반박하는 추가적인 증거는 또한 더 나이든 마우스에서 나타났다. 폴리(I:C₁₂U)에 반응하는 TLR3⁺ 및 야생형 마우스의 능력 차이를 더 설명하기 위해서 실시된 시간 코스 연구에서, 위약-처리된 마우스와의 비교는 TLR3⁺ 마우스가 PTV 감염 및 질병에 대하여 보다 저항성일 수 있음을 제안한다. 야생형 마우스는 유사한 피크 혈청 역가를 가짐에도 불구하고 높은 수준의 ALT 및 간수치로 존재하고, TLR3⁺ 마우스에서 역가가 감염 3일 후 갑자기 떨어지는 반면에 바이러스는 점차적인 감소를 보이면서 오래 지속된다. 비처리 TLR3⁺ 및 야생형 마우스에서의 추가적인 공격 연구는 TLR3⁺ 마우스가 이들의 다른 야생형 상응물보다 PTV 감염이 더이상 쉽지 않다는 발견을 지지한다.

<64> 일반적으로 사용되는 dsRNA 모방물, 폴리(I:C)에 숙주 반응의 기초적인 메커니즘에 대한 최근 연구는 시토솔릭

dsRNA 센서, mda-5가 타입 I IFN 생산의 주된 반응 경로라는 강력한 증거를 제공한다. 상기 결과들은 TLR3가 지배적인 dsRNA 반응 매커니즘임을 제안한다. 이는 항바이러스 활성 및 IFN- β 의 유도를 위해 필수적이다. 이러한 발견들을 기트린 및 동료의 것과 비교할 때, 몇몇 생점들이 나타났다. 그들의 연구에서는 100 μ g의 폴리(I:C)가 정맥 내(i.v.) 주입을 통해 투여된 반면, 본 연구에서의 치료는 복강 내 경로에 의해 투여된 폴리(I:C₁₂U)를 10 μ g으로 한정되었다. 10 μ g의 양은 PTV 감염 모델에서 최대 항바이러스 활성을 위해 가장 바람직한 투여량을 결정하기 위하여 고안된 실험에 기초하였다. 추측컨대, dsRNA의 조성물, 이의 투여 경로 및 접종량은 타입 I IFN 반응에서 관찰된 불일치에 상당히 기여하였다. TLR3가 폴리(I:C₁₂U)에 더 큰 친화력을 갖는 반면에 mda-5는 dsRNA의 폴리(I:C) 형태에 더 큰 특이성을 가질 수 있다. 또한, 운반 경로는 dsRNA의 인지에서의 세포-타입 특이성 차이가 나타나는 데 중요하다. dsRNA를 정맥 내로 운반함에 따라, 상기 물질은 TLR3의 유의한 수준을 발현하지 않는 수지상 세포(CDs)가 차지하는 비장의 가장자리 지역으로 초기에 들어가고, 이에 따라 mda-5 매개 타입 I IFN 유도를 현저하게 초래한다. 대조적으로, 복강내 투여는 TLR3-매개 활성화가 주된 사용 경로로 나타나는 염증성 복막 대식세포군을 침투하여 초기 만남을 초래한다. 이러한 발상은 배양액 내의 TLR3- 및 TRIF-결핍 복막 대식세포에 의한 dsRNA 반응을 조사한 여러 생체 밖 연구들에 의해 뒷받침된다. 그러므로, 복막 공동(cavity) 내 dsRNA로의 대식세포의 직접 노출은 mda-5 매개 타입 I IFN 유도에 적합한 CD8-음성 DCs를 표적화하는 직접 옴의 운반을 통해 노출이 일어날 때 관측될 수 있는 것과는 다른 반응 프로파일을 만든다.

<65> 본 연구와 기트린 및 동료들 사이에서 관측된 차이점을 제공하는 상기 잠재적 자료들과 함께, dsRNA의 사용량은 유의하게 달랐다. 본 연구에서는 복강내 운반과 결합되어 온 몸의 IFN- β 를 상대적으로 낮은 수준으로 만들 수 있는 10배 적은 dsRNA가 사용되었다. 정맥 내 경로에 의한 자체 dsRNA의 100 μ g 투여는 본 연구에서 관측된 것보다 10배 이상 초과된 IFN- β 를 더 생성하였다(cf. Gitlin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:8459-8464, 2006). 그럼에도 불구하고, 적은 투여량에 의해 유도된 IFN- β 의 양은 PTV 감염 모델에서 보호 면역을 유발하기에 충분한 양보다 많았다. 1 μ g 또는 미만의 폴리(I:C₁₂U) 물질은 여전히 치사성 PTV 공격에 대하여 적절한 보호를 제공하며, 이는 바이러스 감염 및 폴리(I:C₁₂U)의 잠재적인 면역 치료의 맥락에서 생리학적으로 보다 중요하다. 후자는 폴리(I:C)의 공지된 독성을 고려하여 특히 중요하다. 아마도 복강내-투여된 폴리(I:C₁₂U)에 노출된 후 타입 IFN- β 를 생성할 수 없음은 TLR3^{-/-} 마우스와의 공격 연구의 결과에 중대하게 해롭다.

<66> 본 발명에서 언급된 특허, 특히 출원, 책 및 기타 문헌들은 전체가 참고 문헌으로 통합되었다.

<67> 언급된 다양한 범위에서, 범위 내의 모든 수치들이 또한 기재된 것으로 이해되어야 한다(예를 들어, 1 내지 10은 2 내지 10, 1 내지 5, 및 3 내지 8과 같은 모든 중간 범위뿐만 아니라 1과 10 사이의 모든 정수를 포함). 용어 "약(about)"은 본 발명 또는 이의 특허성의 작용에 영향을 미치지 않는 것으로 당업계의 숙련인에게 이해되는 수치량의 측정 또는 가변성과 연관된 통계적 불확실성을 의미한다.

<68> 청구항의 의미 및 이들의 법적 동등물 범위 내에서 도출될 수 있는 모든 변형과 대체가 그들의 범주 내에 포함된다. "포함하는(comprising)"을 언급하는 청구항은 청구항의 범주 내에 있을 수 있는 다른 성분들의 포함을 허용하고; 또한, 본 발명은 상기 용어 "포함하는(comprising)" 대신에 전환구 "필수적으로 구성된(consisting essentially of)"(즉, 본 발명의 작용에 실질적으로 영향을 미치지 않는다면 본 청구항의 범위 내에 있을 수 있는 다른 성분들의 포함을 허용하는) 또는 "구성된(consisting of)"(즉, 본 발명에 일반적으로 연관된 불순물 또는 중요하지 않는 활성물 이외에 청구항에 기재된 성분들만을 허용하는)을 언급하는 청구항에 의해 기재될 수 있다. 이러한 세 개의 전환구 중 임의의 것이 본 발명의 청구항에 사용될 수 있다.

<69> 본 명세서에 기재된 성분은 청구항에 명확하게 언급되지 않더라도 청구된 발명의 한정으로 여겨지지 않는다고 이해되어야만 한다. 그러므로 인정된 청구항은 청구항을 설명하는 명세서로부터의 한정이 아니라 법적 보호의 범위를 결정하기 위한 기초이다. 대조적으로, 상기 선행 기술은 청구된 발명이 예측 가능하거나 또는 진보성을 파괴할 수 있는 특정 구현예이면 본원발명으로부터 명백하게 배제된다.

<70> 더욱이, 청구항의 한계들 사이 또는 중의 관계는 청구항에 명확하게 기재되는 경우를 제외하고는 특정한 관계가 없다(즉, 생성물 청구항에서의 성분 배합 또는 방법 청구항에서의 단계들의 순서는 명백하게 언급되지 않는다면 청구항의 한계가 아니다). 본원에 기재된 각각의 성분들의 모든 가능한 조합 및 변경이 본 발명으로 간주될 수 있다. 유사하게, 본 발명의 기재의 보편화가 본 발명의 일부로 여겨질 수 있다.

<71> 상기로부터, 본 발명은 이의 정신 또는 근본적인 특징에서 벗어남 없이 다른 특정한 형태로 구체화할 수 있는 당업계의 숙련인에게 명백할 수 있다. 본 발명에 제공된 법적 보호의 범위가 본 명세서에 의한 것보다 부가된

청구항에 의해 나타나기 때문에 기재된 구현예는 실례일 뿐, 이에 제한되지 않는다.

도면의 간단한 설명

<26>

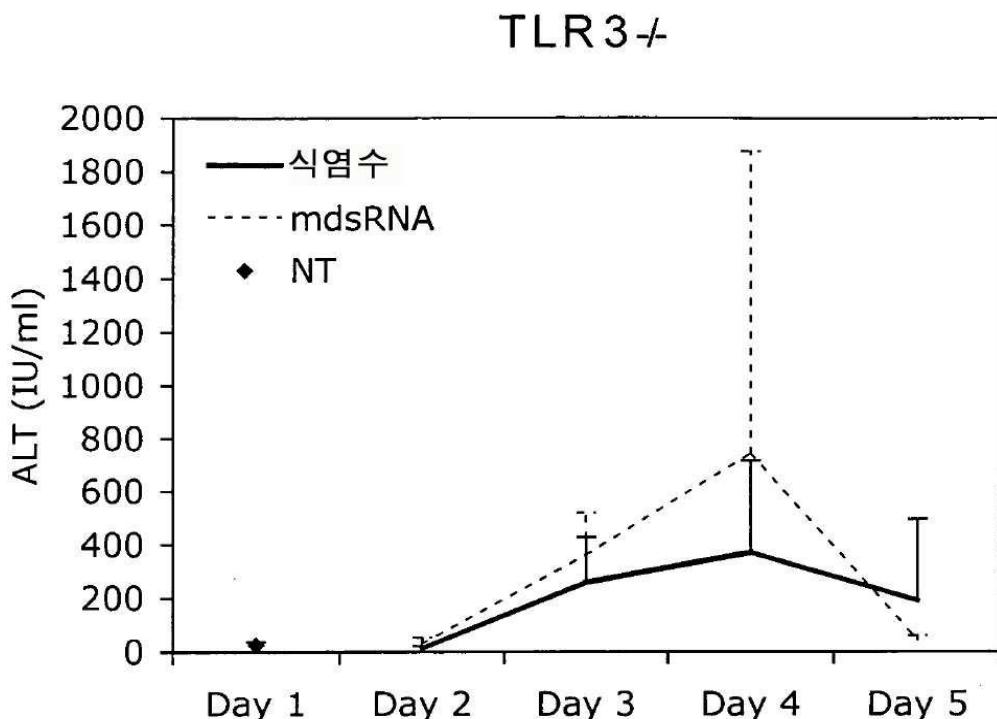
도 1은 폴리(I:C₁₂U) 처리는 야생형에서 간 질병 및 온몸의 바이러스 부하(virus burden)를 제한하지만 TLR3⁺ 마우스에서는 제한하지 못함을 보여준다. 8주 연령 TLR3⁺(도 1A, 1C, 1E 및 1G) 및 야생형(도 1B, 1D, 1F 및 1H) 마우스 군들은 PTV로 바이러스 공격을 받고(0일), 감염 후 24시에 폴리(I:C₁₂U) 10μg 또는 식염수 위약(placebo)으로 처리되었다. 감염 후 표시된 날에 수집된 시료에서의 평균 혈청 ALT 수준(도 1A~1B), 간 수치(도 1C~1D), 간 바이러스 역가(도 1E~1F) 및 혈청 바이러스 역가(도 1G~1H)를 나타내었다. 데이터는 군당 다섯 동물의 평균 및 표준 편차를 의미한다. 폴리(I:C₁₂U), mdsRNA; IU, 국제 단위(international units); 식염수 처리 대조군과 비교하여 *P<0.05; **P<0.01.

<27>

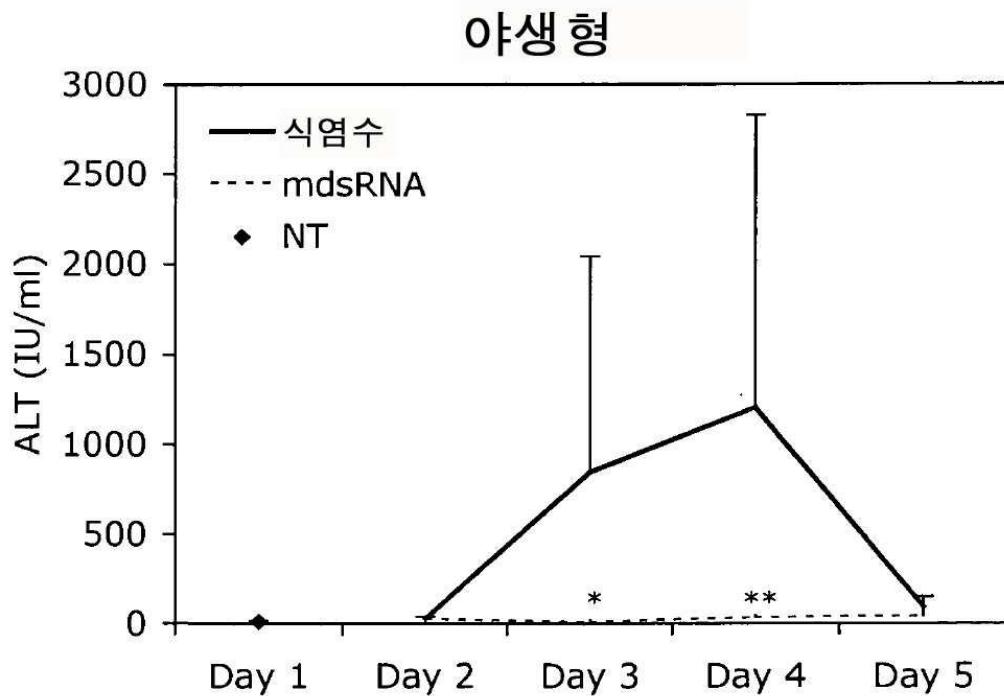
도 2는 폴리(I:C₁₂U) 노출에 이은 감염되지 않은 TLR3⁺ 및 야생형 마우스에서의 IFN-β의 유도를 보여준다. 8주 연령 마우스 군에 폴리(I:C₁₂U) 10μg을 복강내 주입하고, 노출 후 표시된 날에 수집된 혈청 시료에서 온몸의 IFN-β 수준을 측정하였다. 데이터는 군당 세 동물의 평균 및 표준 편차를 의미한다.

도면

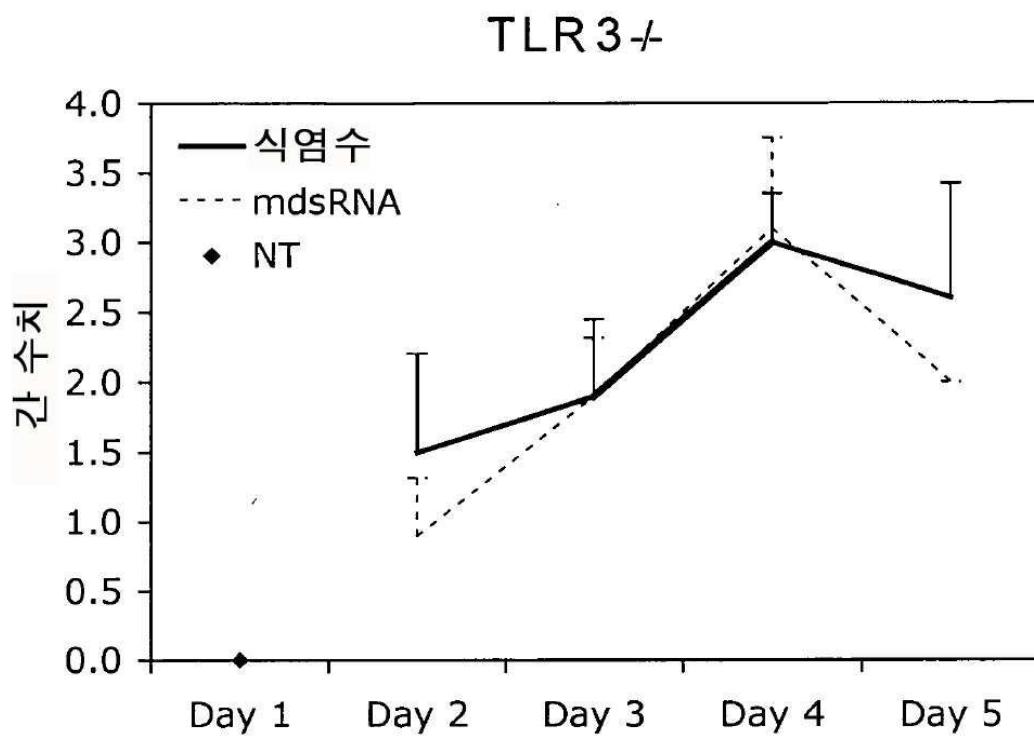
도면1A



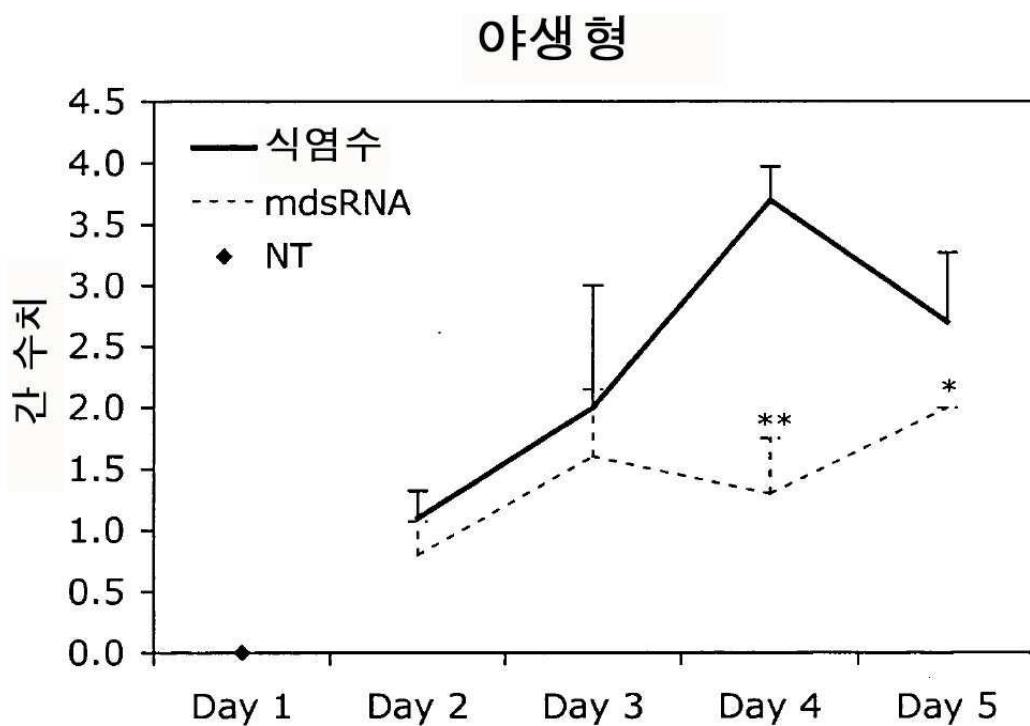
도면1B



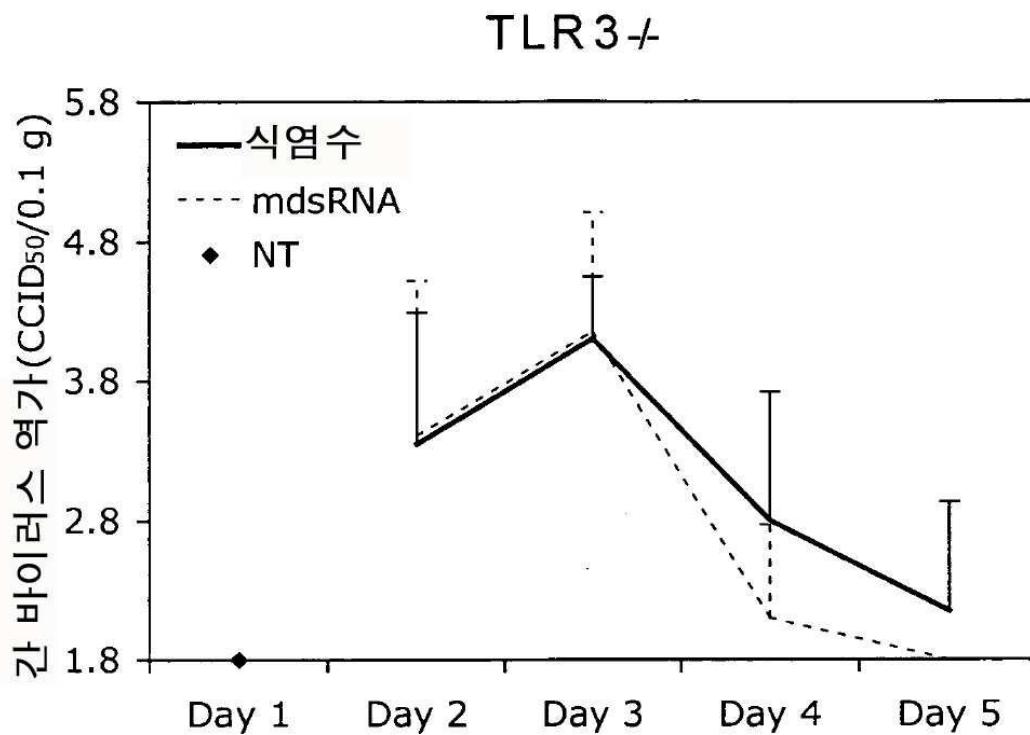
도면1C



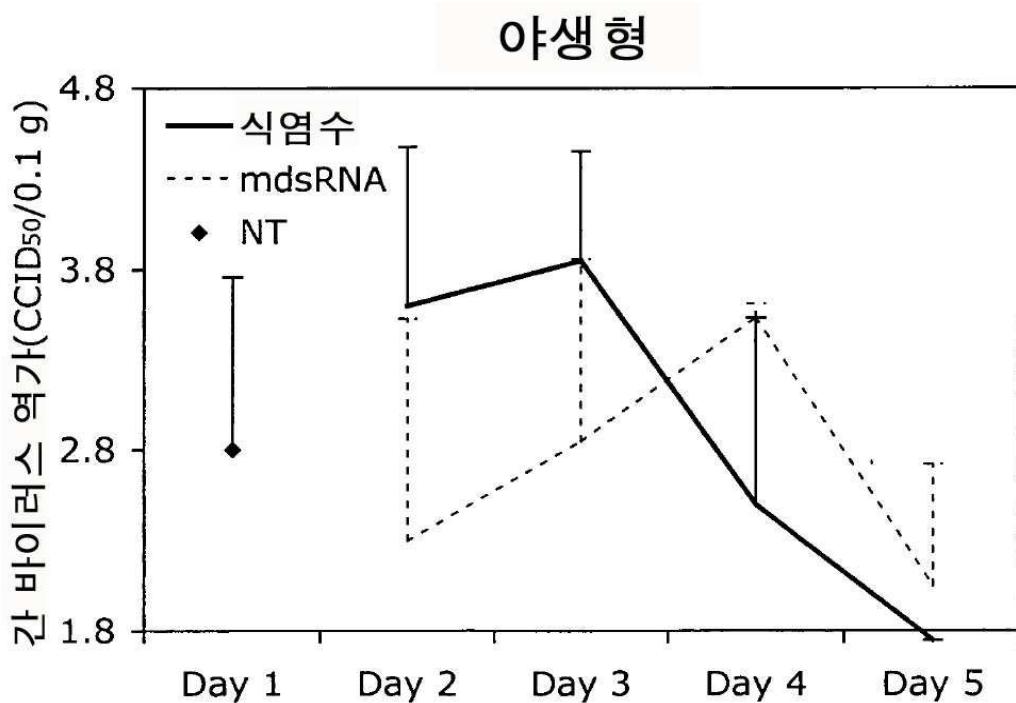
도면1D



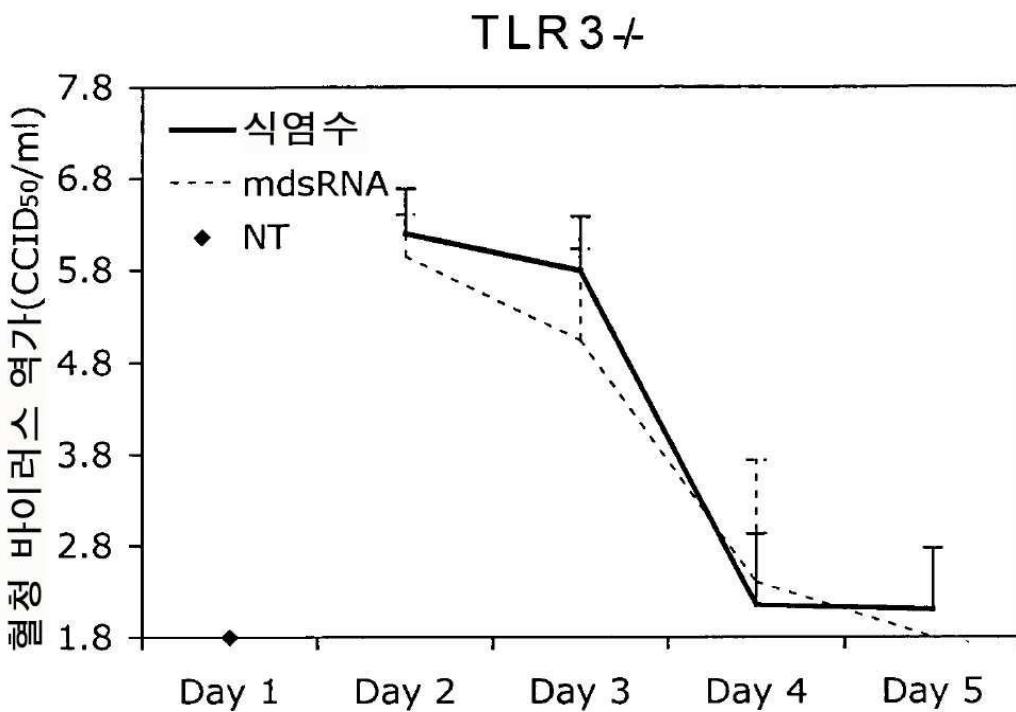
도면1E



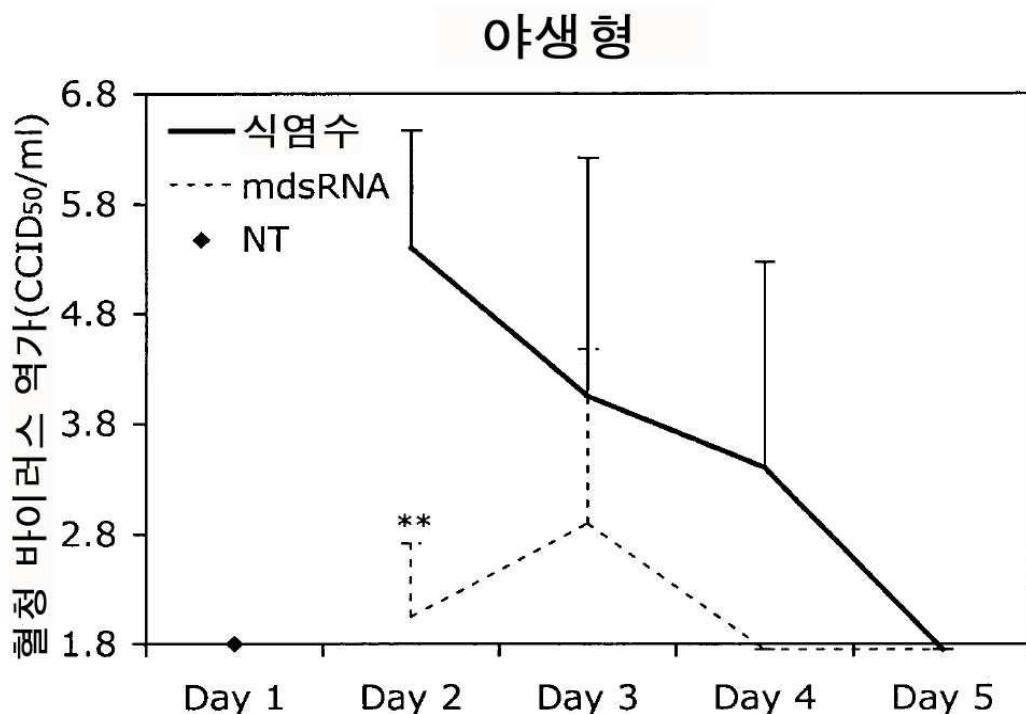
도면1F



도면1G



도면1H



도면2

