



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년09월12일
(11) 등록번호 10-1898177
(24) 등록일자 2018년09월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/117 (2010.01) A61K 31/7115 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) A61K 39/39 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/117 (2013.01)
A61K 31/7115 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-7021207
(22) 출원일자(국제) 2014년01월08일
심사청구일자 2016년11월01일
(85) 번역문제출일자 2015년08월05일
(65) 공개번호 10-2015-0103739
(43) 공개일자 2015년09월11일
(86) 국제출원번호 PCT/US2014/010599
(87) 국제공개번호 WO 2014/110081
국제공개일자 2014년07월17일
(30) 우선권주장
61/750,014 2013년01월08일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
WO2012068470 A2*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
이데라 파마슈티칼즈, 인코포레이티드
미국 매사추세츠 캄브리지 시드니 스트리트 167
(우: 02139)
(72) 발명자
칸디말라, 에캄바르, 알.
미국 01748 매사추세츠 홉킨턴 오버룩 로드 3
왕, 다영
미국 01730 매사추세츠 베드포드 셀프리지 로드 7
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 남앤드남

전체 청구항 수 : 총 36 항

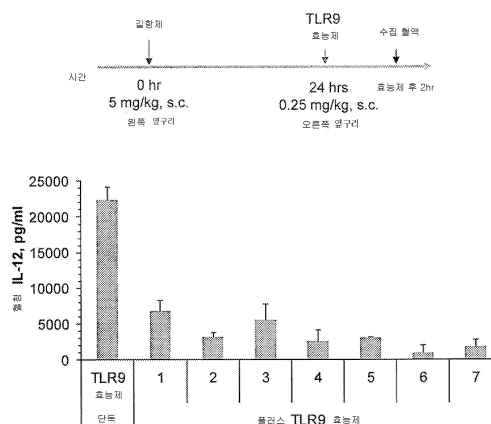
심사관 : 김정태

(54) 발명의 명칭 톨-유사 수용체 기반 면역 반응을 조절하기 위한 면역 조절 올리고뉴클레오타이드 (IRO) 화합물

(57) 요약

본 발명은 TLR의 길항제로서 면역 조절 올리고뉴클레오타이드 (IRO) 및 이의 사용 방법을 제공한다. 이러한 IRO는 TLR 리간드 또는 TLR 효능제에 대한 반응에서 TLR-매개된 시그널링을 억제하는 독특한 서열을 갖는다. 본 방법은 암, 자가면역성 질환, 기도 염증, 염증 질환, 감염성 질환, 피부 장애, 알레르기, 천식 또는 병원체에 의해 초래되는 질병의 예방 및 치료에서의 용도를 가질 수 있다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 39/39 (2013.01)

A61K 45/06 (2013.01)

A61K 2039/55561 (2013.01)

C12N 2310/17 (2013.01)

C12N 2310/3341 (2013.01)

C12N 2310/336 (2013.01)

C12N 2710/24043 (2013.01)

(72) 발명자

유, 동

미국 01581 매사추세츠 웨스트버러 인디언 폰드 로드 25

노와크, 이레누즈

미국 02134 매사추세츠 올스톤 캠브리지 스트리트 #22 592

아그라왈, 수디르

미국 01545 매사추세츠 슈루즈베리 램프라이터 드라이브 61

명세서

청구범위

청구항 1

서열 5'-C*TATC*TGUC*G1TTC*TC*TGU-3'의 면역 조절 올리고뉴클레오타이드 (IRO) 화합물로서, G1 = 7-테아자-dG; C* = 5-Me-dC; G = 2'-O-Me-G; U = 2'-O-Me-U; 및 G2 = AraG인 IRO 화합물.

청구항 2

제1항에 따른 IRO 화합물 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 TLR9-, TLR7- 및 TLR8-매개된 면역 반응으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 면역 반응을 억제함으로써 자가면역성 질환, 암 및 염증 질환으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 질병 또는 장애를 치료 또는 예방하기 위한 약제 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 하나 이상의 백신, 항원, 항체, 세포독성 제제, 알레르겐, 항생제, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, TLR 길항제, 펩티드, 단백질, 유전자 요법 벡터, DNA 백신 또는 애주번트를 추가로 포함하는, 약제 조성물.

청구항 4

제1항에 따른 IRO 화합물 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 TLR9, TLR7 및 TLR8 효능제로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 효능제의 활성을 억제함으로써 자가면역성 질환, 암 및 염증 질환으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 질병 또는 장애를 치료 또는 예방하기 위한 약제 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, IRO 화합물이 TLR9, TLR7 및 TLR8 효능제로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 효능제와 동시에 또는 그 전에 투여되는, 약제 조성물.

청구항 6

제1항에 따른 IRO 화합물 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는, 환자에서 자가면역성 질환, 암 및 염증 질환으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 질병 또는 장애를 치료학적으로 치료하기 위한 약제 조성물.

청구항 7

제1항에 따른 IRO 화합물 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는, 환자의 질병 또는 장애를 예방하기 위한 약제 조성물로서, 상기 질병 또는 장애는 자가면역성 질환, 암 및 염증 질환으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 질병인, 약제 조성물.

청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서, 상기 질병 또는 장애는 자가면역성 질환인, 약제 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 자가면역성 질환이 건선, 류마티스 관절염, 범발성 탈모증, 급성 파종 뇌척수염, 애디슨 병, 강직성 척추염, 항인지질 항체 증후군, 자가면역성 용혈성 빈혈, 자가면역성 간염, 수포성 유천포창, 샤가스 병, 만성 폐쇄성 폐질환, 복강 질환, 피부근염, 자궁내막증, 굿파스처 증후군, 그레이브스병, 길랑-바레 증후군, 하시모토병, 화농성 땀샘염, 특발성 혈소판 감소성 자반증, 간질성 방광염, 피부경화증, 중증 근무력증, 기면증, 신경근 긴장증, 천포창, 악성 빈혈, 다발성 근염, 원발성 담즙성 간경변증, 정신분열증, 쇼그렌 증후군, 측두 동맥염, 맥관염, 백반증, 외음부 통증, 베게너 육아종증, 홍반 루푸스, 다발성 경화증, 타입 I 당뇨병, 과민성 대장 증후군, 크론병 및 폐혈 쇼크로 구성된 군으로부터 선택되는, 약제 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 자가면역성 질환이 과민성 대장 증후군인, 약제 조성물.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 자가면역성 질환이 크론병인, 약제 조성물.

청구항 12

제6항 또는 제7항에 있어서, 상기 질병 또는 장애는 암인, 약제 조성물.

청구항 13

제6항 또는 제7항에 있어서, 상기 질병 또는 장애는 염증 질환인, 약제 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 염증 질환은 기도 염증, 천식, 자가면역성 질환, 만성 염증, 만성 전립샘염, 사구체신염, 베체트병, 과민증, 염증성 장 질환, 재관류 손상, 류마티스 관절염, 이식 거부, 궤양성 대장염, 포도막염, 결막염 및 혈관염으로 구성된 군으로부터 선택되는, 약제 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 염증 질환이 염증성 장 질환인, 약제 조성물.

청구항 16

제14항에 있어서, 상기 염증 질환이 궤양성 대장염인, 약제 조성물.

청구항 17

제4항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 백신, 항원, 항체, 세포독성 제제, 알레르겐, 항생제, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, TLR 길항제, 펩티드, 단백질, 유전자 요법 벡터, DNA 백신 또는 애주번트를 추가로 포함하는, 약제 조성물.

청구항 18

제4항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, IRO 화합물의 투여 경로가 비경구, 점막 전달, 경구, 설하, 경피, 국소, 흡입, 비내, 에어로졸, 안내, 기관내, 직장내, 질내, 유전자총, 피부 패치 또는 점안약 또는 구강세척제 형태인, 약제 조성물.

청구항 19

제1항에 있어서, 상기 화합물의 뉴클레오시드간 결합은 포스포로티오에이트 결합인, IRO 화합물.

청구항 20

제2항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IRO 화합물의 뉴클레오시드간 결합은 포스포로티오에이트 결합인, 약제 조성물.

청구항 21

제8항에 있어서, 상기 IRO 화합물의 뉴클레오시드간 결합은 포스포로티오에이트 결합인, 약제 조성물.

청구항 22

제10항에 있어서, 상기 IRO 화합물의 뉴클레오시드간 결합은 포스포로티오에이트 결합인, 약제 조성물.

청구항 23

제11항에 있어서, 상기 IRO 화합물의 뉴클레오시드간 결합은 포스포로티오에이트 결합인, 약제 조성물.

청구항 24

제12항에 있어서, 상기 IRO 화합물의 뉴클레오시드간 결합은 포스포로티오에이트 결합인, 약제 조성물.

청구항 25

제13항에 있어서, 상기 IRO 화합물의 뉴클레오시드간 결합은 포스포로티오에이트 결합인, 약제 조성물.

청구항 26

제15항에 있어서, 상기 IRO 화합물의 뉴클레오시드간 결합은 포스포로티오에이트 결합인, 약제 조성물.

청구항 27

제16항에 있어서, 상기 IRO 화합물의 뉴클레오시드간 결합은 포스포로티오에이트 결합인, 약제 조성물.

청구항 28

제1항 또는 제19항에 있어서, 상기 화합물이 소듐염 형태인, IRO 화합물.

청구항 29

제20항에 있어서, 상기 화합물이 소듐염 형태인, 약제 조성물.

청구항 30

제21항에 있어서, 상기 화합물이 소듐염 형태인, 약제 조성물.

청구항 31

제22항에 있어서, 상기 화합물이 소듐염 형태인, 약제 조성물.

청구항 32

제23항에 있어서, 상기 화합물이 소듐염 형태인, 약제 조성물.

청구항 33

제24항에 있어서, 상기 화합물이 소듐염 형태인, 약제 조성물.

청구항 34

제25항에 있어서, 상기 화합물이 소듐염 형태인, 약제 조성물.

청구항 35

제26항에 있어서, 상기 화합물이 소듐염 형태인, 약제 조성물.

청구항 36

제27항에 있어서, 상기 화합물이 소듐염 형태인, 약제 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 2013년 1월 8일 출원된 미국 특허 가출원 일련 번호 61/750,014의 이익을 청구하며, 이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로서 통합된다.

[0003] 기술 분야

[0004] 본 발명은 일반적으로 면역학 및 면역 치료 분야, 및 더욱 구체적으로 면역 조절 올리고뉴클레오티드 (IRO) 조성물 및 톨-유사 수용체-매개된 면역 반응의 억제 및/또는 저지를 위한 이들의 용도에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 톨-유사 수용체 9 (TLR9), TLR7 및/또는 TLR8 자극을 통해 일반적으로 생성된 사이토킨을 유일하게 억제

하는 TLR9, TLR7 및/또는 TLR8의 길항제에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 관련 기술의 요약

[0006] 톨-유사 수용체(TLR)는 면역계의 많은 세포 상에 존재하고, 선천성 면역 반응과 관련있는 것으로 나타내었다 (Hornung, V. et al., (2002) J. Immunol. 168:4531-4537). 척추동물 또는 포유동물에서, 이러한 패밀리는 TLR1 내지 TLR10으로 불리는 10개의 단백질로 구성되며, 이는 박테리아, 진균류, 기생충 및 바이러스로부터의 병원체 관련 분자 패턴 (pathogen associated molecular pattern)을 인식하는 것으로 알려져 있다 (Poltorak, a. et al. (1998) Science 282:2085-2088; Underhill, D.M., et al. (1999) Nature 401:811-815; Hayashi, F. et. al (2001) Nature 410:1099-1103; Zhang, D. et al. (2004) Science 303:1522-1526; Meier, A. et al. (2003) Cell. Microbiol. 5:561-570; Campos, M.A. et al. (2001) J. Immunol. 167: 416-423; Hoebe, K. et al. (2003) Nature 424: 743-748; Lund, J. (2003) J. Exp. Med. 198:513-520; Heil, F. et al. (2004) Science 303:1526-1529; Diebold, S.S., et al. (2004) Science 303:1529-1531; Hornung, V. et al. (2004) J. Immunol. 173:5935-5943). TLR은, 포유동물이 외래 분자를 인지하고 이에 대한 면역 반응을 구축하는 주요 수단이고, 또한 선천성 및 적응성 면역 반응들을 연결하는 수단을 제공한다 (Akira, S. et al. (2001) Nature Immunol. 2:675-680; Medzhitov, R. (2001) Nature Rev. Immunol. 1:135-145). TLR은 또한, 자가면역, 감염성 질환, 및 염증을 포함하는 많은 질병의 발병기전 (Cook, D.N. et al. (2004) Nature Immunol. 5:975-979)에서 역할을 수행하는 것으로 나타내었으며, 적절한 제제를 이용한 TLR-매개된 활성화의 조절은 질병 중재를 위한 수단을 제공할 수 있다.

[0007] 일부 TLR은 세포외 병원체를 탐지하고 이에 대한 반응을 개시하기 위해 세포 표면 상에 위치하고 있으며, 다른 TLR은 세포내 병원체를 탐지하고 이에 대한 반응을 개시하기 위해 세포 내부에 위치하고 있다. 표 1은 TLR의 대표, 이들의 세포 위치 및 이에 대한 알려진 효능제를 제공한 것이다 (Diebold, S. S. et al. (2004) Science 303:1529-1531; Liew, F. et al. (2005) Nature 5:446-458; Hemmi H et al. (2002) Nat Immunol 3:196-200; Jurk M et al, (2002) Nat Immunol 3:499; Lee J et al. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:6646-6651); (Alexopoulou, L. (2001) Nature 413:732-738).

[0008] 표 1

TLR 분자	효능제
세포 표면 TLR:	
TLR2	박테리아 리포펩티드
TLR4	그람 네거티브 박테리아
TLR5	운동성 박테리아
TLR6	그람 파지티브 박테리아
엔도솜 TLR:	
TLR3	이중 가닥 RNA 바이러스
TLR7	단일 가닥 RNA 바이러스
TLR8	단일 가닥 RNA 바이러스
TLR9	비메틸화된 DNA

[0009] 박테리아 및 합성 DNA에 존재하는 특정 비메틸화된 CpG 모티프는 면역계를 활성화시키고 항종양 활성을 유도하는 것으로 나타내었다 (Tokunaga T et al., J. Natl. Cancer Inst. (1984) 72:955-962; Shimada S, et al., Jpn. H cancer Res, 1986, 77, 808-816; Yamamoto S, et al., Jpn. J. Cancer Res., 1986, 79, 866-73). CpG 디뉴클레오티드를 함유하는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 사용한 그 밖의 연구에 의해 면역 반응을 자극하는 것으로 나타내었다 (Zhao Q, et al. (1996) Biochem.Pharmacol. 26:173-182). 후속 연구는 TLR9가 박테리아 및 합성 DNA에 존재하는 비메틸화된 CpG 모티프를 인지함을 입증하였다 (Hemmi, H. et al. (2000) Nature 408:740-745). CpG-함유 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오티드의 그 밖의 변형은 또한, TLR9를 통한 면역 반응의 조절제로서 작용하는 이들의 능력에 영향을 끼칠 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Zhao et al., Biochem. Pharmacol. (1996) 51:173-182; Zhao et al. (1996) Biochem Pharmacol. 52:1537-1544; Zhao et al. (1997) Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 7:495-502; Zhao et al (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:3453-3458; Zhao et al. (2000) Bioorg. Med. Chem. Lett. 10:1051-1054; Yu, D. et al. (2000) Bioorg. Med. Chem. Lett. 10:2585-2588; Yu, D. et al. (2001) Bioorg. Med. Chem. Lett. 11:2263-2267; and Kandimalla, E. et al. (2001) Bioorg. Med. Chem. 9:807-813] 참조). 또한, 구조 활성 관계 연구는 비메틸화된 CpG 디뉴클레오티드로부터 유도된 것들과 구별되는 특이적 면역 반응 프로파일을 유도하는 합성 모티프 및 신규한 DNA-기반

화합물의 확인을 가능하게 한다 (Kandimalla, E. et al. (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 102:6925-6930. Kandimalla, E. et al. (2003) Proc. Nat. Acad. Sci. U S A 100:14303-14308; Cong, Y. et al. (2003) Biochem Biophys Res. Commun.310:1133-1139; Kandimalla, E. et al. (2003) Biochem. Biophys. Res. Commun. 306:948-953; Kandimalla, E. et al. (2003) Nucleic Acids Res. 31:2393-2400; Yu, D. et al. (2003) Bioorg. Med. Chem.11:459-464; Bhagat, L. et al. (2003) Biochem. Biophys. Res. Commun.300:853-861; Yu, D. et al. (2002) Nucleic Acids Res.30:4460-4469; Yu, D. et al. (2002) J. Med. Chem.45:4540-4548. Yu, D. et al. (2002) Biochem. Biophys. Res. Commun.297:83-90; Kandimalla, E. et al. (2002) Bioconjug. Chem.13:966-974; Yu, D. et al. (2002) Nucleic Acids Res. 30:1613-1619; Yu, D. et al. (2001) Bioorg. Med. Chem. 9:2803-2808; Yu, D. et al. (2001) Bioorg. Med. Chem. Lett. 11:2263-2267; Kandimalla, E. et al. (2001) Bioorg. Med. Chem. 9:807-813; Yu, D. et al. (2000) Bioorg. Med. Chem. Lett. 10:2585-2588; Putta, M. et al. (2006) Nucleic Acids Res. 34:3231-3238).

[0011] TLR의 선택적 국소화 및 이로부터 발생된 시그널링은 면역 반응에서의 이들의 역할에 있어 몇 가지 통찰을 제공한다. 면역 반응은 반응에서 수반되는 세포의 서브세트를 기초로 하여 선천성 및 적응성 반응 둘 모두를 포함한다. 예를 들어, 전통적인 세포-매개 기능, 예를 들어, 세포독성 T 림프구(CTL)의 지연형 과민반응 및 활성화에서 수반되는 T 헬퍼(helper)(Th) 세포는 Th1 세포이다. 이러한 반응은 항원(예를 들어, 바이러스 감염, 세포 내 병원체, 및 종양 세포)에 대한 신체의 선천성 반응으로서, IFN-감마의 분비 및 CTL의 부수적 활성화를 초래한다. 대안적으로, B-세포 활성화에 대한 헬퍼 세포로서 포함된 Th 세포는 Th2 세포이다. Th2 세포는 박테리아 및 기생충에 대한 반응에서 활성화되는 것으로 나타내었으며, IL-4 및 IL-5의 분비를 통한 신체의 적응성 면역 반응 (예를 들어, IgE 생성 및 호산구증가증 활성화)을 매개할 수 있다. 면역 반응의 유형은 항원 노출에 대한 반응에서 생성된 사이토킨에 의해 영향을 받으며, Th1 및 Th2 세포에 의해 분비된 사이토킨에서의 차이는 이러한 2 서브세트의 상이한 생물학적 기능의 결과일 수 있다.

[0012] TLR의 활성화는 면역 반응을 구축하는데 관련된 반면, TLR을 통한 면역계의 비체화된 자극은 면역이 발휘되지 않는 대상체에서 특정 질병을 악화시킬 수 있다. 최근에, 여러 그룹들은 염증 사이토킨의 억제제로서 합성 올리고데옥시올리고뉴클레오타이드 (ODN)의 용도를 입증하였다 (Lenert, P. et al. (2003) DNA Cell Biol. 22(10):621-631).

[0013] 특정 합성 ODN을 사용하여, 레널트 (Lenert) 등은 억제성 ODN을 생성하는 능력을 보고하였다 (Lenert, P. et al. (2003) DNA Cell Biol. 22(10):621-631). 이들 억제성 ODN에는 2개의 트리플렛 서열 즉, 근위 "CCT" 트리플렛 및 원위 "GGG" 트리플렛이 필요하다. 이러한 트리플렛-함유 억제성 ODN 이외에, 여러 그룹들이 CpG-함유 ODN에 의한 TLR-9-매개된 활성화를 억제시킬 수 있는 그 밖의 특이적 DNA 서열을 보고하였다. 이들 "억제성" 또는 "저지성" 모티프는 폴리 "G" (예를 들어, "GGGG") 또는 "GC" 서열이 풍부하며, 메틸화되는 경향이 있으며, 포유동물 및 특정 바이러스의 DNA에 존재하며 (예를 들어, 문헌 [Chen, Y., et al., Gene Ther. 8: 1024-1032 (2001); Stunz, L.L., Eur. J. Immunol. 32: 1212-1222 (2002)] 참조). 문헌 [Duramad, O., et al., J. Immunol., 174: 5193-5200 (2005) and Jurk et. al (US 2005/0239733)]에는 서열 내에 GGGG 모티프를 함유하는 억제성 DNA 올리고뉴클레오타이드에 대한 구조가 기술되어 있다. 파톨 (Patole) 등은 GGGG 함유 ODN이 전신 루푸스를 저지할 것임을 입증한다 (Patole, P. et al. (2005) J. Am. Soc. Nephrol. 16:3273-3280). 추가적으로, 문헌 [Gursel, I., et al., J. Immunol., 171: 1393-1400 (2003)]은 포유동물 텔로머에 고도의 빈도로 존재하는 반복적인 TTAGGG 엘리먼트가 CpG-유도된 면역 활성화를 하향-조절함을 기술하고 있다. 문헌 [Shirota, H., et al., J. Immunol., 173: 5002-5007 (2004)]은 TTAGGG 엘리먼트를 함유하는 합성 올리고뉴클레오타이드가 이러한 활성을 모방하고, 특정 Th1-의존성 자가면역성 질환의 예방/치료에서 효과적일 수 있음을 입증한다.

[0014] 이에 반해, 일부 연구는 폴리 G 함유 ODN이 TLR의 길항제로서 작용한다는 관점에 의문을 제기하였다. 예를 들어, US 6,426,334 (Agrawal et al.)은 GGGG 스트링을 함유하는 CpG 올리고뉴클레오타이드 투여는 강력한 항바이러스 및 항암 활성을 가지며, 이들 화합물의 투여는 혈청 IL-12 농도 증가를 초래할 것임이 입증한다. 추가로, 폴리G 서열을 함유하는 CpG 올리고는 TLR9 활성화를 통한 면역 반응을 유도하며 (Verthelyi D et al, J Immunol. 166, 2372, 2001; Gursel M et al, J Leukoc Biol, 71, 813, 2001, Krug A et al, Eur J Immunol, 31, 2154, 2001), 항종양 및 항바이러스 활성을 보여주는 것으로 공지되어 있다 (Ballas GK et al, J Immunol, 167, 4878, 2001; Verthelyi D et al, J Immunol, 170, 4717, 2003). 또한, 폴리G 올리고뉴클레오타이드는 HIV 및 Rel A를 억제하는 것으로 공지되어 있으며 (McShan WM, et al, J Biol Chem., 267(8):5712-21, 1992; Rando, RF et al., J Biol Chem, 270(4):1754-60, 1995; Benimetskaya L, et al., Nucleic Acids Res., 25(13):2648-56, 1997); 면역 자극 CpG 모티프 및 4 연속적 G 뉴클레오타이드를 함유하는 ODN (클래스 A ODN으로

서 공지됨)은 면역 반응에서 인터페론- γ 생성 및 Th1 이동을 유도한다. 게다가, 임상전 질병 모델에서, Class A ODN은 TLR-매개된 면역 반응을 유도하는 것으로 입증되었다.

[0015] 추가적인 제한으로서, 구아노신 스트링을 함유하는 올리고뉴클레오타이드는 테트라플렉스 구조를 형성하고, 압타머로서 작용하고 트롬빈 활성을 억제하는 것으로 입증되었다 (Bock LC et al., Nature, 355:564-6, 1992; Padmanabhan, K et al., J Biol Chem., 268(24):17651-4, 1993). 따라서, 단일-가닥 또는 다중-가닥 구조가 TLR9 활성 억제에 효과적인지의 여부를 분명하지 않다.

[0016] 문헌 [Kandimalla et al. (11/549,048)]은 폴리G 서열이 필요하지 않은 신규한 부류의 TLR 길항제가 기술되어 있다. 칸디말라 등은 또한, 다양한 질병 및 장애를 치료하고 예방하기 위한 이러한 신규한 조성물의 적용을 기술하고 있다 (11/549,048; 11/743,876; 12/140,334; 12/140,338; 12/244,199). 그러나, 폴리G 서열이 요구되지 않고 이차 구조를 형성하는데 문제점이 존재하지 않는 추가적인 TLR 길항제를 개발해야할 도전이 남아있다. 또한, 질병의 변동성 및 질병 치료 및 환자의 복잡성에 의해 제기된 도전이 존재한다. 이러한 도전은 환자의 특정 요구에 맞춰질 수 있는 TLR 9, 7 및/또는 8의 독특한 억제제로서 작용할 수 있는 신규한 올리고뉴클레오타이드-기반 화합물 및 조성물의 설계를 통해 해결될 수 있다. 이러한 신규한 맞춤형 화합물 및 조성물은 면역 자극 성분으로 질병 및 장애를 치료하고 예방하는 것을 포함한 많은 임상적 관련 적용분야에서 용도를 찾아볼 수 있을 것이다.

발명의 내용

[0017] 발명의 개요

[0018] 본 발명은 TLR9, TLR7 및/또는 TLR8 자극을 통해 일반적으로 발생된 시험관내 및 생체내 사이토킨 및 케모킨 프로파일을 명백하게 길항작용하는 TLR7 및/또는 TLR9의 길항제를 제공한다. TLR9, TLR7 및/또는 TLR8 효능제에 대한 사이토킨 및 케모킨 반응을 독특하게 길항작용하는 능력은 질병-특이적 및 심지어 환자-특이적 방식으로 다양한 질병 상태를 예방하고/거나 치료하는 능력을 제공한다.

[0019] 따라서, 본 발명은 하기 기술된 바와 같은 화합물 번호 1 내지 화합물 번호 15로부터 선택된 면역 조절 올리고뉴클레오타이드 (IRO) 화합물을 제공한다. 본 발명에 따른 IRO 화합물 및 조성물은 다양한 세포 유형 및 다양한 시험관내 및 생체내 실험 모델에서 TLR9-, TLR7- 및/또는 TLR8-매개된 면역 반응을 우선적으로 억제하며, 각각의 화합물 또는 조성물은 구별되는 면역 억제 프로파일을 제공한다.

[0020] 본 발명은 본 발명에 따른 IRO 화합물 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제 조성물을 추가로 제공한다.

[0021] 본 발명은 척추동물, 또는 포유동물에서 TLR9, TLR7 및/또는 TLR8-매개된 면역 반응을 억제하는 방법으로서, 본 발명에 따른 IRO 화합물 또는 조성물을 포유동물에 투여하는 것을 포함하는 방법을 추가로 제공한다.

[0022] 본 발명은 본 발명에 따른 IRO 화합물을 투여하는 것을 포함하여 TLR9, TLR7 및/또는 TLR8 효능제의 활성을 억제하는 방법으로서, IRO 화합물이 TLR 효능제와 동시에, 전에 또는 후에 투여되는 방법을 추가로 제공한다.

[0023] 본 발명은 TLR9, TLR7 및/또는 TLR8의 억제가 유익할 질병 또는 장애를 갖는 척추동물 또는 포유동물을 치료학적으로 치료하는 방법을 추가로 제공하며, 이러한 방법은 본 발명에 따른 IRO 화합물을 상기 포유동물에 투여하는 것을 포함한다.

[0024] 본 발명은 TLR9, TLR7, 및/또는 TLR8의 억제가 유익할 척추동물 또는 포유동물에서 질병 또는 장애를 예방하는 방법을 추가로 제공하며, 이러한 방법은 본 발명에 따른 IRO 화합물을 상기 척추 동물 또는 포유동물에 투여하는 것을 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 실시예 3에 따라 처리된 마우스의 생체 내에서 TLR9-유도된 사이토킨을 억제하는 본 발명에 따른 TLR7/9 길항제의 능력을 묘사한다. 데이터는 생체 내에서 TLR9-유도된 사이토킨을 억제하는 본 발명에 따른 TLR 길항제의 능력을 더욱 일반적으로 입증한다.

도 2는 실시예 3에 따라 처리된 마우스의 생체 내에서 TLR7-유도된 사이토킨을 억제하는 본 발명에 따른 TLR7/9 길항제의 능력을 묘사한다. 데이터는 생체 내에서 TLR7-유도된 사이토킨을 억제하는 본 발명에 따른 TLR 길항제의 능력을 더욱 일반적으로 입증한다.

도 3은 실시예 4에 기술된 세포 배양 검정에서 본 발명에 따른 TLR9, TLR7, TLR8 길항제의 50% 억제 농도 (IC₅₀) 값을 묘사한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0026] 본 발명은 면역요법 적용을 위한 면역 조절제로서 올리고뉴클레오타이드-기반 화합물의 치료학적 용도에 관한 것이다. 본 발명은 TLR9, TLR7 및/또는 TLR8과 올리고뉴클레오타이드-기반 화합물의 상호작용을 통한 구별되는 면역 억제 프로파일을 제공하는 올리고뉴클레오타이드-기반 화합물을 제공한다. 특히, 본 발명은 TLR9-, TLR7- 및/또는 TLR8-매개된 면역 반응을 억제하고/거나 저지하는 톨-유사 수용체 9, 7 및/또는 8 (TLR9, TLR7, 및/또는 TLR8)의 길항제로서 면역 조절 올리고뉴클레오타이드 (IRO) 화합물을 제공한다. 이들 IRO는 화학적 변형 및/또는 뉴클레오타이드간 결합을 가지며, 이는 내인성 및/또는 외인성 TLR 리간드 또는 효능제에 대한 반응에서 TLR9-, TLR7- 및/또는 TLR8-매개된 시그널링의 이들의 억제 또는 저지를 제공한다. 본원에 언급된 참고문헌은 본 분야에서 지식 수준을 반영하며, 이들 전체는 본원에 참조로서 통합된다. 인용된 참고문헌과 본 명세서의 교시 내용간의 어떠한 상충되는 사항은 본 명세서의 지지하에 해결되어야 한다.
- [0027] 본 발명은 TLR9, TLR7 및/또는 TLR8에 의해 초래된 면역 반응을 억제하는 방법을 추가로 제공하며, 이는 비제한적으로, 성인 및 소아 및 가축 적용에서 암, 자가면역 질환, 천식, 호흡기 알레르기, 음식 알레르기, 피부 알레르기, 전신 홍반성 루푸스 (SLE), 관절염, 홍막염, 만성 감염, 염증 질환, 염증성 장 증후군, 패혈증, 및 박테리아, 기생충 및 바이러스 감염의 치료와 같은 면역 요법 적용에 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 면역요법에 대한 최적 수준의 면역 조절 효과를 갖는 IRO 화합물 및 이러한 화합물을 제조하고 사용하는 방법을 제공한다. 또한, 질병의 예방 및 치료를 위한 예를 들어, 백신, 항원, 항체, 알레르겐, 화학요법제 (화학요법 및 표적화 요법 둘 모두) 및/또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드와 조합되는 본 발명의 IRO 화합물이 유용하다.
- [0028] 정의
- [0029] 용어 "올리고뉴클레오타이드"는 복수의 결합된 뉴클레오시드 단위를 포함하는 폴리뉴클레오시드를 일반적으로 지칭한다. 이러한 올리고뉴클레오타이드는 게놈 또는 cDNA를 포함하는 존재하는 핵산 공급원으로부터 획득될 수 있지만, 바람직하게 합성 방법에 의해 생산된다. 바람직한 구체예에서, 각 뉴클레오시드 단위는 야생형 올리고뉴클레오타이드와 비교하여 다양한 화학적 변형 및 치환을 포함할 수 있으며, 이는 비제한적으로 변형된 뉴클레오시드 염기 및/또는 변형된 당 단위를 포함한다. 화학적 변형의 예는 당업자에게 공지되어 있으며, 예를 들어, 문헌 [Uhlmann, E. et al. (1990) Chem. Rev. 90:543; "Protocols for 올리고뉴클레오타이드 and Analogs" Synthesis and Properties & Synthesis and Analytical Techniques, S. Agrawal, Ed, Humana Press, Totowa, USA 1993; and Hunziker, J. et al. (1995) Mod. Syn. Methods 7:331-417; and Crooke, S. et al. (1996) Ann.Rev. Pharm. Tox. 36:107-129]에 기술되어 있다. 뉴클레오시드 잔기는 임의의 여러 공지된 뉴클레오시드간 결합에 의해 서로 커플링될 수 있다. 이러한 뉴클레오시드간 결합은 비제한적으로, 포스포디에스테르, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 알킬포스포네이트, 알킬포스포노티오에이트, 포스포트리에스테르, 포스포르아미데이트, 실록산, 카보네이트, 카보알콕시, 아세트아미데이트, 카바메이트, 모르폴리노, 보라노, 티오에테르, 브릿징된 포스포르아미데이트, 브릿징된 메틸렌 포스포네이트, 브릿징된 포스포로티오에이트, 및 설폰 뉴클레오시드간 결합을 포함한다. 용어 "올리고뉴클레오타이드"는 또한 하나 이상의 입체특이적 뉴클레오시드간 결합 (예를 들어, R_p - 또는 S_p -포스포로티오에이트, 알킬포스포네이트, 또는 포스포트리에스테르 결합)을 갖는 폴리뉴클레오시드를 포함한다. 본원에서 사용되는 용어 "올리고뉴클레오타이드" 및 "디뉴클레오타이드"는 결합이 포스페이트기를 포함하거나 포함하지 않든지 간에 임의의 이러한 뉴클레오시드간 결합을 갖는 폴리뉴클레오시드 및 디뉴클레오시드를 포함하는 것으로 의도된다. 특정의 바람직한 구체예에서, 이러한 뉴클레오시드간 결합은 포스포디에스테르, 포스포로티오에이트 또는 포스포로디티오에이트 결합, 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [0030] 용어 "2'-치환된 리보뉴클레오시드" 또는 "2'-치환된 아라비노시드"는 2'-치환되거나 2'-O-치환된 리보뉴클레오시드가 생성되도록 펜토스 모이어티의 2' 위치에 하이드록실기가 치환된 리보뉴클레오시드 또는 아라비노뉴클레오시드를 일반적으로 포함한다. 특정 구체예에서, 그러한 치환은 1-6개의 포화 또는 불포화 탄소 원자를 함유하는 저급 하이드로카르빌기로, 할로젠 원자로, 또는 6-10개의 탄소 원자를 지니는 아릴기로 이루어지며, 여기서 상기 하이드로카르빌, 또는 아릴기는 비치환될 수 있거나, 예를 들어, 할로, 하이드록시, 트리플루오로메틸, 시아노, 니트로, 아실, 아실옥시, 알콕시, 카르복실, 카르보알콕시, 또는 아미노기로 치환될 수 있다. 2'-O-치환된 리보뉴클레오시드 또는 2'-O-치환된-아라비노시드의 예로는, 이로만 제한되는 것은 아니지만, 2'-아미노, 2'-플루오로, 2'-알릴, 2'-O-알킬 및 2'-프로파르길 리보뉴클레오시드 또는 아라비노시드, 2'-O-메틸리

보뉴클레오시드 또는 2'-0-메틸아라비노시드 및 2'-0-메톡시에톡시리보뉴클레오시드 또는 2'-0-메톡시에톡시아라비노시드를 포함한다.

- [0031] 방향적으로 사용될 때, 용어 "3'"은, 일반적으로 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드내 또 다른 영역 또는 위치로부터 동일한 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 3'측 (다운스트림)에 있는 영역 또는 위치를 지칭한다.
- [0032] 방향적으로 사용될 때, 용어 "5'"은, 일반적으로 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드내 또 다른 영역 또는 위치로부터 동일한 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 5'측 (업스트림)에 있는 영역 또는 위치를 지칭한다.
- [0033] 용어 "약"은 일반적으로 정확한 수가 중요하지 않다는 것을 의미한다. 따라서, 해당 올리고뉴클레오티드내의 뉴클레오시드 잔기의 수는 중요하지 않으며, 1개 또는 2개 미만의 뉴클레오시드 잔기들을 지니거나, 1개 내지 수 개의 추가 뉴클레오시드 잔기들을 지니는 올리고뉴클레오티드가 상기 기술된 구체예들 각각의 균등물로서 간주된다.
- [0034] 용어 "효능제"는 일반적으로 세포의 수용체에 결합하여 반응을 유도하는 물질을 지칭한다. 효능제는 종종 자연 발생 물질, 예를 들어, 리간드의 작용을 모방한다.
- [0035] 용어 "길항제"는 일반적으로 효능제 또는 리간드의 효과를 약화시키거나 억제하는 물질을 지칭한다.
- [0036] 용어 "애주버트"는 면역원성 제제 예컨대, 백신 또는 항원에 첨가되는 경우, 혼합물로의 노출시 수령체 숙주에서 제제에 대한 면역 반응을 향상시키거나 강화시키는 물질을 일반적으로 지칭한다.
- [0037] 용어 "기도 염증"은 비제한적으로 천식을 일반적으로 포함한다.
- [0038] 용어 "알레르겐"은 일반적으로 대상체로의 노출시 알레르기 반응을 유발시키는, 항원 또는 분자의 항원성 부분, 일반적으로 단백질을 지칭한다. 전형적으로, 대상체는 예를 들어, 부스럼(wheal) 및 플레어(flare) 시험 또는 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해, 지시한 것과 같이 알레르겐에 대해 알레르기가 있다. 대상체들의 단지적은 서브세트만이 분자에 노출될 때 알레르기 면역 반응을 나타내는 경우라 하더라도 상기 분자는 알레르겐인 것으로 여겨진다.
- [0039] 용어 "알레르기"는 염증을 특징으로 하는 부적절한 면역 반응을 일반적으로 지칭하며, 비제한적으로, 음식 알레르기 및 호흡기 알레르기를 포함한다.
- [0040] 용어 "항원"은 일반적으로 항체 또는 T 세포 항원 수용체에 의해 인지되고 이에 선택적으로 결합되어 면역 반응의 유도를 생성시키는 물질을 지칭한다. 항원은 비제한적으로, 펩티드, 단백질, 뉴클레오시드, 뉴클레오티드 및 이의 조합물을 포함할 수 있다. 항원은 천연 또는 합성 항원일 수 있으며 일반적으로 그러한 항원에 특이적인 면역 반응을 유도할 수 있다.
- [0041] 용어 "자가면역성 질환" 및 "자가면역성 장애"는 "자가" 구성요소가 면역계에 의해 공격을 받는 질환 또는 장애를 일반적으로 지칭한다.
- [0042] 용어 "TLR-매개된 질환" 또는 "TLR-매개된 장애"는 일반적으로 하나 이상의 TLR의 활성화가 기여 인자인 임의의 병리학적 상태를 의미한다. 이러한 상태는 비제한적으로, 암, 자가면역성 질환 또는 장애, 기도 염증, 염증 질환 또는 장애, 감염성 질환, 피부 장애, 알레르기, 천식 또는 병원체에 의해 초래된 질환을 포함한다.
- [0043] 용어 "생리학적으로 허용되는"은 일반적으로 본 발명에 따른 IRO 화합물 또는 조성물의 유효성을 저해하지 않으며, 생리학적 시스템 예컨대, 세포, 세포 배양물, 조직 또는 유기체와 양립가능한 물질을 지칭한다. 바람직하게는, 생물학적 시스템은 살아있는 유기체 예컨대, 척추동물 또는 포유동물이다.
- [0044] 용어 "담체"는 일반적으로 임의의 부형제, 희석제, 충전제, 염, 완충액, 안정화제, 가용화제, 오일, 지질, 지질 함유 소포, 마이크로스피어, 리포솜 캡슐화, 또는 약제학적 제형에 사용하기 위해 당업계에 널리 공지된 기타 물질을 포함한다. 담체, 부형제, 또는 희석제의 특성은 특별한 적용을 위한 투여 경로에 좌우될 것임이 이해될 것이다. 이러한 물질을 함유하는 약제학적으로 허용되는 제형의 제조는 예를 들어, 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, ed. A. Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990]에 기재되어 있다.
- [0045] 용어 "공동-투여(co-administration)"는 일반적으로 면역 반응을 조절, 저지 또는 억제하기 위해 적어도 2개의

상이한 물질이 충분히 가까운 시간 내에 투여되는 것을 지칭한다. 공동-투여는 단일 용량 또는 개별 용량으로 임의의 순서로 적어도 2개의 상이한 물질의 동시 투여는 물론, 수일 이하의 시간 간격을 둔 순차적 투여를 지칭한다.

- [0046] 용어 "상보적"은 핵산에 하이브리다이징하는 능력을 가짐을 일반적으로 의미한다. 이러한 하이브리드화는 바람직하게는, 왁슨-크릭 또는 호크스틴 염기 쌍을 형성하기 위한 보통 상보적 가닥 사이의 수소 결합의 결과이며, 다른 방식의 수소 결합은 물론 염기 스택킹 (stacking) 또한 하이브리드화로 이어질 수 있다.
- [0047] 용어 "유효량" 또는 "충분량"은 일반적으로 유익한 결과와 같은 요망되는 생물학적 효과에 영향을 끼치는데 충분한 양을 지칭한다. 따라서, "유효량" 또는 "충분량"은 투여되는 상황에 의존적일 것이다. 공동-투여된 항원에 대한 면역 반응을 조절하는 화합물 또는 조성물의 투여 맥락에서, 유효량의 본 발명에 따른 IRO 화합물 또는 조성물 및 항원은 항원이 단독으로 투여되는 경우 수득된 면역 반응과 비교하여 요망되는 조절, 억제 또는 저지를 달성하는데 충분한 양이다. 유효량은 1회 이상의 투여로 투여될 수 있다.
- [0048] 용어 "조합되는"은 일반적으로, 환자의 질병 또는 장애의 치료 과정 중에, 본 발명에 따른 IRO 화합물 또는 조성물, 및 본 발명에 따른 IRO 화합물 또는 조성물의 면역 억제 효과를 약화시키지 않으면서, 질병 또는 장애를 치료하는데 유용한 또 다른 제제를 투여하는 것을 의미한다. 이러한 조합 치료는 또한, 본 발명에 따른 IRO 화합물 또는 조성물 및/또는 독립적으로 제제의 1회 초과 투여를 포함할 수 있다. 본 발명에 따른 IRO 화합물 또는 조성물 및/또는 제제의 투여는 동일하거나 상이한 경로로 수행될 수 있다.
- [0049] 용어 "개체" 또는 "대상체" 또는 "척추동물"은 일반적으로 포유동물을 지칭한다. 포유동물은 일반적으로, 비제한적으로, 인간, 인간의 영장류, 래트, 마우스, 고양이, 개, 말, 소, 젖소, 돼지, 양 및 토끼를 포함한다.
- [0050] 용어 "키나제 억제제"는 일반적으로 세포에서 인산화-의존성 세포 시그널링 및/또는 성장 경로를 길항작용하거나 억제하는 분자를 지칭한다. 키나제 억제제는 천연적으로 발생되거나 합성될 수 있으며 경구 치료제로서 투여될 수 있는 잠재력을 지니는 작은 분자들을 포함한다. 키나제 억제제는 표적 키나제 분자의 활성화를 급속하고 특이적으로 억제시키는 능력을 지닌다. 단백질 키나제는 매력적인 약물 표적인데, 이는 부분적으로 이들이 폭넓게 다양한 시그널링 및 성장 경로를 조절시키고 다수의 상이한 단백질을 포함하기 때문이다. 따라서, 이들은 암, 심혈관 질환, 염증 질환, 당뇨, 황반 변성 및 신경학적 장애(neurological disorders)를 포함하는 키나제 시그널링이 관여하는 질환의 치료에 탁월한 잠재력을 지닌다. 키나제 억제제의 예로는 소라페닙 (Nexavar[®]), Sutent[®], 다사티닙, Dasatinib[™], Zactima[™], Tykerb[™] 및 STI571을 포함한다.
- [0051] 용어 "뉴클레오시드"는 일반적으로 당, 일반적으로 리보스 또는 데옥시리보스, 및 퓨린 또는 피리미딘 염기로 구성된 화합물을 지칭한다.
- [0052] 용어 "뉴클레오타이드"는 일반적으로 당에 부착된 포스페이트 기를 포함하는 뉴클레오시드를 지칭한다.
- [0053] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "피리미딘 뉴클레오시드"는 뉴클레오시드의 염기 성분이 피리미딘 염기 (예를 들어, 시토신 (C) 또는 티민 (T) 또는 우라실 (U))인 뉴클레오시드를 지칭한다. 유사하게는, 용어 "퓨린 뉴클레오시드"는 뉴클레오시드의 염기 성분이 퓨린 염기 (예를 들어, 아데닌 (A) 또는 구아닌 (G))인 뉴클레오시드를 지칭한다.
- [0054] 용어 "유사체" 또는 "유도체"는 변형된 염기 및/또는 당을 갖는 임의의 퓨린 및/또는 피리미딘 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오시드를 일반적으로 지칭하도록 상호교환적으로 사용될 수 있다. 변형된 염기는 구아닌, 시토신, 아데닌, 티민 또는 우라실이 아닌 염기이다. 변형된 당은 리보스 또는 2' 데옥시리보스가 아닌 임의의 당이며, 올리고뉴클레오타이드의 백본에 사용될 수 있다.
- [0055] 용어 "억제하는"은 일반적으로 반응의 감소 또는 방지 또는 반응의 질적 차이를 지칭하며, 이는 그렇지 않으면 반응의 유발 및/또는 자극을 발생시킬 수 있다.
- [0056] 용어 "비-뉴클레오타이드 링커"는 일반적으로 인-함유 결합 이외의 결합을 통해 올리고뉴클레오타이드에 연결될 수 있거나 연결할 수 있는 임의의 결합 또는 모이어티를 지칭한다. 바람직하게는, 이러한 링커는 약 2 오스트롬 내지 약 200 오스트롬 길이이다.
- [0057] 용어 "뉴클레오타이드 결합"은 인-함유 결합을 통해 2개의 뉴클레오시드의 3' 및 5' 하이드록실 기를 직접적으로 연결시키는 직접 3'-5' 결합을 지칭한다.
- [0058] 용어 "치료"는 일반적으로 질병 또는 장애의 증상을 완화시키고/거나 질병 또는 장애의 진행을 지연시키고/거나

개선시키는 것을 포함할 수 있는 유익하거나 요망되는 결과를 수득하도록 의도된 처리 방법을 지칭한다.

[0059] 제 1 양태에서, 본 발명은 표 2에 도시된 면역 조절 올리고뉴클레오타이드 (IRO) 화합물을 제공한다. 용어 "IRO"는 TLR9, TLR7 및/또는 TLR8에 대한 길항제인 면역 조절 올리고뉴클레오타이드-기반 화합물을 지칭한다. 표 2에서, 달리 지적하지 않는 한, IRO 화합물은 모두 포스포로티오에이트 (PS) 결합을 지니며, 모든 뉴클레오타이드는 데옥시뉴클레오타이드이다.

[0060] 표 2

IRO 화합물 #	서열 / 구조 / SEQ ID NO
1	5'-CTATCTGUC*G1TTCACTGU-3' (SEQ ID NO 1)
2	5'-CCATCTGUC*G1TTCACTGU-3' (SEQ ID NO 2)
3	5'-CAATCTGUC*G1TTCACTGU-3' (SEQ ID NO 3)
4	5'-CTATCTGUC*G1TTCTCUGU-3' (SEQ ID NO 4)
5	5'-CTATCUGUC*G1TTCTCTGU-3' (SEQ ID NO 5)
6	5'-C*TATC*TGUC*G1TTC*TC* <u>T</u> GU-3' (SEQ ID NO 6)
7	5'-CdUAdUCdUGUC*G1TTCdUCdUGU-3' (SEQ ID NO 7)
8	5'-CTATCTGUCG1TTCTCTGU-3' (SEQ ID NO 8)
9	5'-CTATCTGUCG1TTCTCTGU-3' (SEQ ID NO 9)
10	5'-CTATCTGUC*G1TTCTCTGU-3' (SEQ ID NO 10)
11	5'-CTATCTGUC*G1TTCTCTGU-3' (SEQ ID NO 11)
12	5'-CTATCTGUC*G2TTCTCTGU-3' (SEQ ID NO 12)
13	5'-CTATCTGUC*G1TTCTCTGU-3' (SEQ ID NO 13)
14	5'-C6TATCTGUC*G1TTCTCTGU-3' (SEQ ID NO 14)
15	5'-C7TATCTGUC*G1TTCTCTGU-3' (SEQ ID NO 15)
16	5'-CTATCTGUC*G1TTCTCTGU-3' (SEQ ID NO 16)

[0061]

[0062] G1 = 7-데아자-dG; C* = 5-Me-dC; G = 2'-O-Me-G; U = 2'-O-Me-U; dU = 데옥시-U; G2 = AraG; C = 2'-O-Me-C; C* = 2'-OMe-5-Me-C; C6=2'-MOE-C; C7=2'-O-프로파르길-C.

[0063] 바람직한 구체예에서, IRO 화합물은 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 아니다.

[0064] 일부 구체예에서, IRO 화합물의 올리고뉴클레오타이드는 약 6개 내지 약 35개 뉴클레오타이드 잔기, 바람직하게는, 약 9개 내지 약 30개 뉴클레오타이드 잔기, 더욱 바람직하게는, 약 11개 내지 약 23개 뉴클레오타이드 잔기를 가질 수 있다. 일부 구체예에서, 올리고뉴클레오타이드는 약 6개 내지 약 18개 뉴클레오타이드 잔기를 갖는다. 일부 구체예에서, IRO 화합물은 18개 뉴클레오타이드 잔기 길이이다.

[0065] 일부 구체예에서, IRO 화합물은 하나 이상의 백신, 항원, 항체, 세포독성 제제, 알레르겐, 항생제, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, TLR 길항제, 펩티드, 단백질, 유전자 요법 벡터, DNA 백신, 애주번트 또는 키나제 억제제와 조합될 수 있다.

[0066] 제 2 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 IRO 화합물 및 생리학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제 조성물

을 제공한다.

[0067] 본 발명의 이러한 양태의 구체예에서, 조성물은 하나 이상의 백신, 항원, 항체, 세포독성 제제, 알레르겐, 항생제, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, TLR 길항제, 펩티드, 단백질, 유전자 요법 벡터, DNA 백신, 애주번트 또는 키나제 억제제를 추가로 포함할 수 있다.

[0068] 제 3 양태에서, 본 발명은 포유동물에서 면역 반응의 TLR9, TLR7- 및/또는 TLR8-매개된 유도를 억제하거나 저지하는 방법을 제공하며, 이러한 방법은 본 발명에 따른 IRO 화합물을 포유동물에 투여하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 포유동물은 인간이다. 바람직한 구체예에서, IRO 화합물은 면역 저지가 필요한 포유동물에 투여된다.

[0069] 본 발명의 이러한 양태에 따르면, IRO 화합물은 추가의 TLR 리간드 또는 TLR 효능제에 대한 TLR9, TLR7- 및/또는 TLR8-기반 면역 반응을 저지할 수 있다. 하기 실시예에서 추가로 논의된 바와 같이, TLR 효능제 또는 TLR 리간드 (예를 들어, 면역 자극성 올리고뉴클레오타이드)에 의한 TLR9, TLR7- 및/또는 TLR8-기반 면역 반응의 활성화는 IRO 화합물의 동시, 사전- 또는 사후-투여에 의해 길항작용되거나 억제되거나 저지되거나 방지될 수 있으며, 이러한 길항작용, 억제, 저지 또는 방지는 투여 후 연장된 기간 (예를 들어, 수일) 동안 유지될 수 있다. 본 발명의 이러한 유익한 특성은 질병 또는 장애의 예방 및/또는 치료에 대한 독특한 이점을 갖는다. 예를 들어, 질병 치료 과정에서 특정 TLR-효능제의 적용은 원하지 않는 면역 자극을 초래할 수 있으며, IRO 화합물이 이를 길항작용하거나, 저지하거나, 억제하거나 방지할 수 있다. TLR-효능제와 동시, 사전 및/또는 사후 투여되는 IRO의 투여는 TLR-효능제로부터 치료학적 이점을 허용할 수 있으면서, 원하지 않는 부작용(들)을 길항작용하거나, 저지하거나, 억제하거나 방지한다. 추가적으로, 본 발명에 따른 IRO 화합물의 사전-투여는 TLR-효능제, 바람직하게는, TLR9, TLR7 및/또는 TLR8 효능제에 의한 후속 또는 후기 자극에 대한 면역 반응 (예를 들어, 알레르기 반응)을 길항작용하거나, 저지하거나, 억제하거나 방지할 수 있다.

[0070] 본 발명의 이러한 양태에 따른 방법에서, 본 발명에 따른 IRO 화합물의 투여는 비제한적으로, 비경구, 점막 전달, 경구, 설하, 경피, 국소, 흡입, 위내, 비내, 에어로졸, 안내, 기관내, 직장내, 질내, 유전자총(gene gun), 피부 패치 또는 점안약 또는 구강세척제 형태를 포함하는 임의의 적합한 경로에 의해 이루어질 수 있다. IRO 화합물의 치료학적 조성물의 투여는 질병의 증상 또는 대리 표지자를 감소시키기에 효과적인 기간 및 투여량으로 공지의 절차를 이용하여 수행될 수 있다. 전신 투여되는 경우, 치료학적 조성물은 바람직하게는, 약 0.0001 마이크로몰 내지 약 100 마이크로몰의 IRO 화합물의 혈중 농도를 달성하기에 충분한 투여량으로 투여된다. 더욱 바람직하게는, 전신 투여는 약 0.001 마이크로몰 내지 약 10 마이크로몰의 IRO 화합물의 혈중 농도를 달성하기에 충분한 투여량으로 이루어질 것이다. 국소화된 투여에 있어서, 이보다 훨씬 더 낮은 농도가 효과적일 수 있으며, 훨씬 더 높은 농도도 용인될 수 있다. 바람직하게는, IRO 화합물의 전체 투여량은 1일당 환자당 약 0.001 mg 내지 1일당 체중 kg 당 약 200 mg의 범위이다. 본 발명에 따른 IRO 화합물을 매일, 격일마다, 매 3일마다, 매 4일마다, 매 5일마다, 매 6일 또는 매주 투여하는 것이 바람직할 수 있다. 본 발명의 IRO 함유 치료학적 조성물 중 하나 이상을 치료학적 유효량으로 개체에 1회 치료 에피소드로서 동시에 또는 순차적으로 투여하는 것이 바람직할 수 있다.

[0071] IRO 화합물은 선택적으로, 하나 이상의 알레르겐 및/또는 항원 (자가 또는 이종성), 면역원성 단백질 예컨대, 키홀 림프 헤모시아닌 (KLH), 콜레라 독소 B 서브유닛 또는 임의의 기타 면역원성 담체 단백질에 연결될 수 있거나 이와 조합될 수 있다. IRO는 또한, 비제한적으로, TLR 효능제 (예를 들어, TLR2 효능제, TLR4 효능제 및 TLR9 효능제), 프레운드 (Freund) 불완전 애주번트, KLH, 모노포스포릴 리피드 A (MPL), 명반 (alum), 머크 (Merk) 알루미늄 애주번트 (MAA), 및 QS-21 및 이미퀴모드를 포함하는 사포닌, 또는 이들의 조합물을 포함하는 다른 화합물 (예를 들어, 애주번트)과 조합되어 사용될 수 있다.

[0072] 본 발명의 이러한 양태에 따른 방법은 면역계의 모델 연구에 유용하다. 본 방법은 또한 인간 또는 동물 질병의 예방학적 또는 치료학적 치료에 유용하다. 예를 들어, 본 방법은 소아, 성인 및 가축 백신 적용에 유용하다.

[0073] 제 4 양태에서, 본 발명은 TLR9, TLR7 및/또는 TLR8의 억제제가 유익할 질병 또는 장애를 갖는 환자를 치료학적으로 치료하는 방법을 제공하며, 이러한 방법은 본 발명에 따른 IRO 화합물을 환자에 투여하는 것을 포함한다. 다양한 구체예에서, 치료될 질병 또는 장애는 암, 자가면역성 질환, 기도 염증, 염증 질환, 감염성 질환, 말라리아, 라임병, 안구 감염, 결막염, 피부 질환, 건선, 공피증, 심혈관 질환, 죽상경화증, 만성 피로 증후군, 사르코이드시스, 이식 거부, 알레르기, 천식 또는 병원체에 의해 초래된 질병이다. 바람직한 자가면역성 질환은 비제한적으로, 홍반 루푸스, 다발성 경화증, 타입 I 당뇨병, 과민성 대장 증후군, 크론병, 류마티스 관절염, 패혈 쇼크, 범발성 탈모증, 급성 파종 뇌척수염, 애디슨 병, 강직성 척추염, 항인지질 항체 증후군, 자가면역성

용혈성 빈혈, 자가면역성 간염, 수포성 유천포창, 샤가스 병, 만성 폐쇄성 폐질환, 복강 질환, 피부근염, 자궁 내막증, 굿파스처 증후군, 그레이브스병, 길랑-바레 증후군, 하시모토병, 화농성 땀샘염, 특발성 혈소판 감소성 자반증, 간질성 방광염, 피부경화증, 중증 근무력증, 기면증, 신경근 긴장증, 천포창, 악성 빈혈, 다발성 근염, 원발성 담즙성 간경변증, 정신분열증, 쇼그렌 증후군, 측두 동맥염 ("거대 세포 동맥염"), 맥관염, 백반증, 외음부 통증 및 베게너 육아종증을 포함한다. 바람직한 염증 질환은 비제한적으로, 기도 염증, 천식, 자가면역성 질환, 만성 염증, 만성 전립샘염, 사구체신염, 베체트병, 과민증, 염증성 장 질환, 재관류 손상, 류마티스 관절염, 이식 거부, 췌양성 대장염, 포도막염, 결막염 및 혈관염을 포함한다. 병원체는 박테리아, 기생충, 진균류, 바이러스, 비로이드 및 프리온을 포함한다. 투여는 본 발명의 제 3 양태에 대해 기술된 바와 같이 수행된다.

[0074] 제 5 양태에서, 본 발명은 TLR9, TLR7, 및/또는 TLR8의 억제제 유익할 질병 또는 장애를 예방하는 방법을 제공하며, 이러한 방법은 본 발명에 따른 IRO 화합물을 환자에 투여하는 것을 포함한다. 다양한 구체예에서, 예방될 질병 또는 장애는 암, 자가면역성 질환, 기도 염증, 염증 질환, 감염성 질환, 말라리아, 라임병, 안구 감염, 결막염, 피부 질환, 건선, 공피증, 심혈관 질환, 죽상경화증, 만성 피로 증후군, 사르코이도시스, 이식 거부, 알레르기, 천식 또는 병원체에 의해 초래된 질병이다. 바람직한 자가면역성 질환은 비제한적으로, 홍반 루푸스, 다발성 경화증, 타입 I 당뇨병, 과민성 대장 증후군, 크론병, 류마티스 관절염, 패혈 쇼크, 범발성 탈모증, 급성 파종 뇌척수염, 애디슨 병, 강직성 척추염, 항인지질 항체 증후군, 자가면역성 용혈성 빈혈, 자가면역성 간염, 수포성 유천포창, 샤가스 병, 만성 폐쇄성 폐질환, 복강 질환, 피부근염, 자궁내막증, 굿파스처 증후군, 그레이브스병, 길랑-바레 증후군, 하시모토병, 화농성 땀샘염, 특발성 혈소판 감소성 자반증, 간질성 방광염, 피부경화증, 중증 근무력증, 기면증, 신경근 긴장증, 천포창, 악성 빈혈, 다발성 근염, 원발성 담즙성 간경변증, 정신분열증, 쇼그렌 증후군, 측두 동맥염 ("거대 세포 동맥염"), 맥관염, 백반증, 외음부 통증 및 베게너 육아종증을 포함한다. 바람직한 염증 질환은 비제한적으로, 기도 염증, 천식, 자가면역성 질환, 만성 염증, 만성 전립샘염, 사구체신염, 베체트병, 과민증, 염증성 장 질환, 재관류 손상, 류마티스 관절염, 이식 거부, 췌양성 대장염, 포도막염, 결막염 및 혈관염을 포함한다. 병원체는 박테리아, 기생충, 진균류, 바이러스, 비로이드 및 프리온을 포함한다. 투여는 본 발명의 제 3 양태에 대해 기술된 바와 같이 수행된다.

[0075] 본 발명의 제 3, 제 4 또는 제 5 양태에 따른 방법 중 임의의 방법에서, IRO 화합물은 IRO 화합물의 면역 길항, 억제, 저지 또는 방지 효과 또는 활성을 파괴하기 않으며 질병 또는 병태를 치료하거나 예방하는데 유용한 임의의 다른 제제와 조합되어 투여될 수 있다. 본 발명에 따른 임의의 방법에서, 질병 또는 병태를 치료하거나 예방하는데 유용한 제제는 비제한적으로, 하나 이상의 백신, 항원, 항체, 세포독성 제제, 알레르겐, 항생제, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, TLR 길항제, 펩티드, 단백질, 유전자 요법 벡터, DNA 백신, 애주번트 또는 키나제 억제제를 포함한다. 예를 들어, 암 치료에서, IRO 화합물은 하나 이상의 화학요법 화합물, 표적화된 치료제 및/또는 모노클로날 항체와 조합되어 투여될 수 있음이 고려되며; 질병 예방에서, IRO 화합물은 하나 이상의 백신과 조합되어 투여될 수 있음이 고려된다. 대안적으로, 제제는 항원 또는 알레르겐에 대해 엔코딩하는 DNA 벡터를 포함할 수 있다. 이들 구체예에서, 본 발명의 IRO 화합물은 애주번트로서 다양하게 작용하고/거나 직접 면역 조절 효과를 생성시킬 수 있다.

[0076] 하기 실시예는 본 발명의 특정한 예시적 구체예를 추가로 설명하기 위한 것이며, 본 발명의 범위를 제한하고자 하는 것은 아니다. 예를 들어, 대표적인 TLR-리간드는 하기 실시예에 기재되어 있으나, 본 발명의 IRO가 길항제로서 작용하는 리간드의 범위를 제한하지 않는다.

[0077] 실시예 1

[0078] 면역 조절 모이어티를 함유하는 올리고뉴클레오타이드의 합성

[0079] 본 발명의 모든 IRO 화합물은 표준 절차에 따라 합성하였다 (예를 들어, 미국 특허 공개 번호 20040097719 참조).

[0080] 표준 선형 합성 또는 병렬 합성 절차 (예를 들어, 미국 특허 공개 번호 20040097719의 도 5 및 6 참조)에 따라, 자동화된 DNA 합성기 (Expedite 8909; PerSeptive Biosystems, Framingham, Mass)를 사용하여 1 μ M 규모로 올리고뉴클레오타이드를 합성하였다.

[0081] 테옥시리보뉴클레오시드 포스포르아미다이트를 (Aldrich-Sigma, St Louis, Mo)로부터 획득하였다. 1',2'-디테옥시리보스 포스포르아미다이트, 프로필-1-포스포르아미다이트, 2-테옥시우리딘 포스포르아미다이트, 1,3-비스-[5-(4,4'-디메톡시트리틸)펜틸아미드]-2-프로판올 포스포르아미다이트 및 메틸 포스포르아미다이트를 Glen Research (Sterling, Va.)로부터 획득하였다. .베타.-L-2'-테옥시리보뉴클레오시드 포스포르아미다이트,

.알파.-2'-데옥시리보뉴클레오시드 포스포르아미다이트, 모노-DMT-글리세롤 포스포르아미다이트 및 디-DMT-글리세롤 포스포르아미다이트를 ChemGenes (Willmington, Mass.)로부터 획득하였다. (4-아미노부틸)-1,3-프로판디올 포스포르아미다이트를 Clontech (Palo Alto, Calif.)로부터 획득하였다. 아라비노구아노신을 Reliable Pharmaceutical (St. Louis, Mo.)로부터 획득하였다. 아라비노구아노신 포스포르아미다이트는 Idera Pharmaceuticals, Inc. (Cambridge, Mass.)에서 합성되었다 (Noronha et al. (2000) Biochem., 39:7050-7062).

[0082] 모든 뉴클레오시드 포스포르아미다이트는 ^{31}P 및 ^1H NMR 스펙트럼에 의해 특성결정하였다. 변형된 뉴클레오시드를 정상적인 커플링 사이클을 사용하여 특이적 부위에 결합시켰다. 합성 후, 올리고뉴클레오티드를 진한 수산화암모늄을 사용하여 탈보호하고 역상 HPLC에 의해 정제한 후, 투석하였다. 소듐 염 형태로서의 정제된 올리고뉴클레오티드를 사용 전에 동결건조하였다. 순도를 CGE 및 MALDI-TOF MS에 의해 평가하였다.

[0083] 실시예 2

[0084] TLR7 및 TLR9 자극의 생체내 억제

[0085] C57BL/6 마우스를 0 시간에 5 mg/kg의 IRO 화합물 및 24 시간에 0.25 mg/kg TLR9 효능제 또는 10 mg/kg TLR9 효능제를 왼쪽 팔 아래에 s.c. 주입하였다. 혈청 샘플을 TLR9 또는 TLR7 효능제의 주입 후 2 시간째에 취하고 IL-12 농도를 ELISA에 의해 측정하였다. 결과는 표 3에 나타내었다. 이들 결과는 본 발명에 따른 IRO 화합물이 생체 내에서 TLR7 및/또는 TLR9 활성을 억제할 수 있으며, 더욱 일반적으로, 본 발명에 따른 IRO 화합물이 TLR 활성화를 억제시킬 수 있음을 입증하였다.

[0086] 표 3. 마우스 생체 내에서 길항제 활성

올리고 번호.	서열 및 변형	TLR9 효능제 유 도된 IL-12의 억제율 %	TLR7 효능제 유 도된 IL-12의 억제율 %
1	5'-CTATCTGUC*G1TTCACTGU-3'	69.3	80.4
2	5'-CCATCTGUC*G1TTCACTGU-3'	85.4	80.9
3	5'-CAATCTGUC*G1TTCACTGU-3'	75.2	91.1
4	5'-CTATCTGUC*G1TTCTCUGU-3'	88.7	86.9
5	5'-CTATCUGUC*G1TTCTCTGU-3'	86.3	76.8
6	5'-C*TATC*TGUC*G1TTC*TC*TGU-3'	95.5	94.1
7	5'-CdUAUCdUGUC*G1TTCdUCdUGU-3'	91.9	79.1
9	5'-CTATCTGUCG1TTCTCTGU-3'	70.5	84.4
10	5'-CTATCTGUC*G1TTCTCTGU-3'	79.4	84.3
12	5'-CTATCTGUC*G2TTCTCTGU-3'	69.3	78.0
13	5'-CTATCTGUC*G1TTCTCTGU-3'	69.8	29.9
14	5'-C6TATCTGUC*G1TTCTCTGU-3'	66.1	33.7
15	5'-C7TATCTGUC*G1TTCTCTGU-3'	67.8	42.6

[0087]

[0088] 실시예 3

[0089] TLR7/TLR9 생체내 길항제 연구

[0090] 암컷 C57BL/6 마우스 (2/군)의 왼쪽 옆구리에 0 hr에 5 mg/kg 길항제 화합물을 s.c. 주입하였다. 그 후, 24

hr에 마우스의 왼쪽 옆구리에 TLR9 (0.25mg/kg) 또는 TLR7 (10 mg/kg) 효능제를 주입하였다. 효능제 투여 후 2 hr에 안와 출혈에 의해 혈액을 수집하였다. 이어서, Luminex xMAP 시스템을 이용한 멀티플렉스 검정에 의해 혈청 샘플에서 사이토킨/케모킨 반응을 평가하였다. 결과는 도 1 및 2에 도시되어 있다.

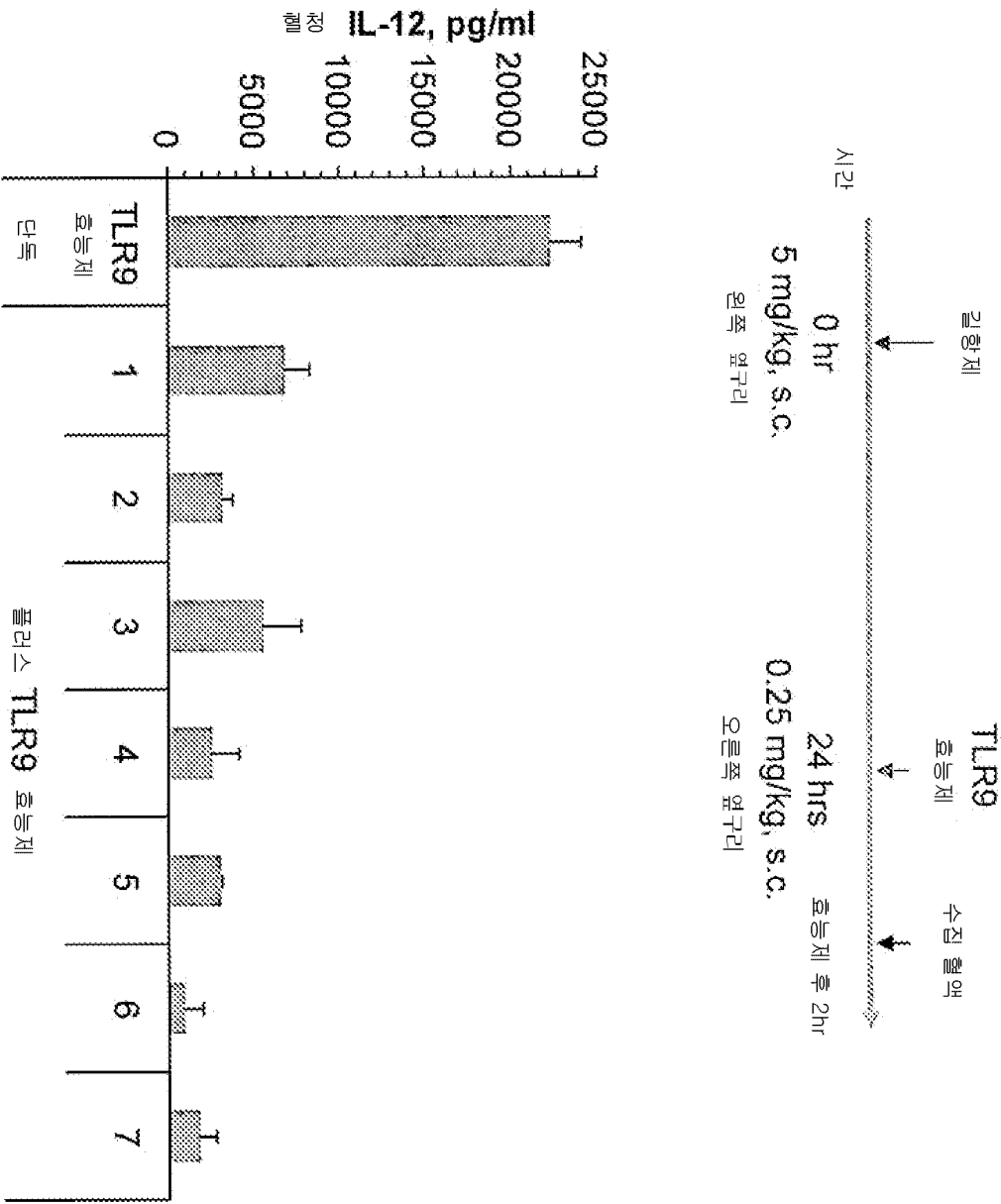
[0091] 실시예 4

[0092] TLR4, 7, 8 및 9를 발현하는 HEK293 세포의 세포 배양물 검정

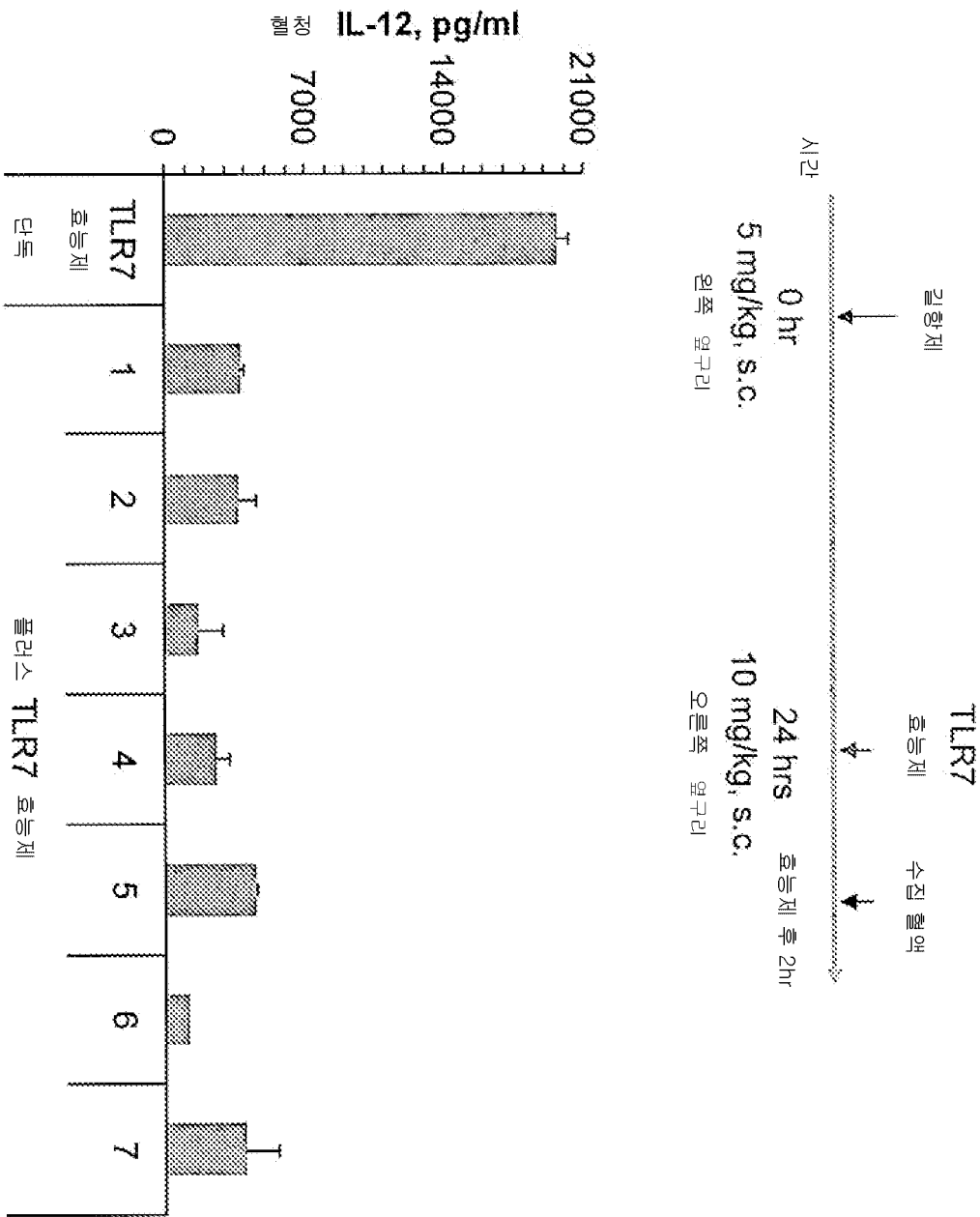
[0093] 인간 TLR4/CD14/MD-2 또는 mTLR9를 안정하게 발현하는 인간 배아 신장 (HEK)293 세포 및 인간 TLR7 또는 TLR8 을 안정하게 발현하는 HEK293XL 세포를 Invivogen (San Diego, CA)으로부터 획득하였다. HEK 세포를 6 h 동안 리포터 유전자 (SEAP, Invivogen)로 일시적으로 형질감염시켰다. 적절한 TLR 효능제를 다양한 농도의 길항제의 존재 또는 부재하에 배양물에 첨가하고, 18 시간 동안 연속해서 배양시켰다. 처리 말기에, 20 ml의 배양 상청액을 각 처리로부터 취하고, 제조업자의 프로토콜 (Invivogen)에 따라 150 ml의 Quanti-Blue 기질을 사용하여 SEAP 활성에 대해 평가하였다. 결과는 PBS-처리된 세포 대비 NF- κ B 활성화에서의 배수 변화로서 계산하였으며 50% 억제 농도 (IC₅₀) 값을 측정하였다. 결과는 도 3에 도시하였다.

도면

도면1



도면2



도면3

실험제	#	IC ₅₀ μg/ml			
		TLR7	TLR8	TLR9	TLR4
2		0.005	0.016	0.246	4.674
6		0.005	0.010	0.173	13.68
7		0.005	0.010	0.253	2.55
12		0.005	0.005	0.229	5.116
13		0.086	0.025	0.131	7.323
16		0.010	0.021	0.368	1.407

서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110>

Kandimalla, Ekambar R.
Wang, Daqing
Yu, Dong
Nowak, Ireneusz
Agrawal, Sudhir
- <120>

IMMUNE REGULATORY OLIGONUCLEOTIDE (IRO) COMPOUNDS TO MODULATE
TOLL-LIKE RECEPTOR BASED IMMUNE RESPONSE
- <130>

IDE10639P00391PC
- <140>

PCT/US 14/10599
- <141>

2014-01-08
- <150>

US 61/750,014
- <151>

2013-01-08

<160> 16
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic oligonucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (7)..(8)
 <223> 2'-O-Me
 <220><221> modified_base
 <222> (9)..(9)
 <223> 5-methyl-dC
 <220><221> modified_base
 <222> (10)..(10)
 <223> 7-deaza-dG
 <220><221> modified_base
 <222> (17)..(18)
 <223> 2'-O-Me
 <400> 1

ctatctgucg ttactgu

18

<210> 2
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic oligonucleotide
 <220><221> modified_base

<222> (7)..(8)
 <223> 2'-O-Me
 <220><221> modified_base
 <222> (9)..(9)
 <223> 5-methyl-dC
 <220><221> modified_base

<222> (10)..(10)

<223> 7-deaza-dG

<220><221> modified_base

<222> (17)..(18)

<223> 2'-O-Me

<400> 2

ccatctgucg ttactgu

18

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (7)..(8)

<223> 2'-O-Me

<220><221> modified_base

<222> (9)..(9)

<223> 5-methyl-dC

<220><221> modified_base

<222> (10)..(10)

<223> 7-deaza-dG

<220><221> modified_base

<222> (17)..(18)

<223> 2'-O-Me

<400> 3

caatctgucg ttactgu

18

<210> 4

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (7)..(8)

<223> 2'-O-Me

<220><221> modified_base

<222> (9)..(9)

<223> 5-methyl-dC

<220><221> modified_base

<222> (10)..(10)

<223> 7-deaza-dG

<220><221> modified_base

<222> (16)..(18)

<223> 2'-O-Me

<400> 4

ctatctgucg ttctcugu

18

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (6)..(8)

<223> 2'-O-Me

<220><221> modified_base

<222> (9)..(9)

<223> 5-methyl-dC

<220><221> modified_base

<222> (10)..(10)

<223> 7-deaza-dG

<220><221> modified_base

<222> (17)..(18)

<223> 2'-O-Me

<400> 5

ctatcugucg ttctctgu

18

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic oligonucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 5-methyl-dC
 <220><221> modified_base
 <222> (5)..(5)
 <223> 5-methyl-dC
 <220><221> modified_base
 <222> (7)..(8)
 <223> 2'-O-Me
 <220><221> modified_base
 <222> (9)..(9)
 <223> 5-methyl-dC
 <220><221> modified_base

 <222> (10)..(10)
 <223> 7-deaza-dG
 <220><221> modified_base
 <222> (13)..(13)
 <223> 5-methyl-dC
 <220><221> modified_base
 <222> (15)..(15)
 <223> 5-methyl-dC
 <220><221> modified_base
 <222> (17)..(18)
 <223> 2'-O-Me
 <400> 6
 ctatctgucg ttctctgu
 <210> 7
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic oligonucleotide
 <220><221> modified_base

18

<222> (2)..(2)

<223> deoxy-U

<220><221> modified_base

<222> (4)..(4)

<223> deoxy-U

<220><221> modified_base

<222> (6)..(6)

<223> deoxy-U

<220><221> modified_base

<222> (7)..(8)

<223> 2'-O-Me

<220><221> modified_base

<222> (9)..(9)

<223> 5-methyl-dC

<220><221> modified_base

<222> (10)..(10)

<223> 7-deaza-dG

<220><221> modified_base

<222> (14)..(14)

<223> deoxy-U

<220><221> modified_base

<222> (16)..(16)

<223> deoxy-U

<220><221> modified_base

<222> (17)..(18)

<223> 2'-O-Me

<400> 7

cuaucugucg ttcucugu

18

<210> 8

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (7)..(9)

<223> 2'-O-Me

<220><221> modified_base

<222> (10)..(10)

<223> 7-deaza-dG

<220><221> modified_base

<222> (17)..(18)

<223> 2'-O-Me

<400> 8

ctatctgucg ttctctgu

18

<210> 9

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (8)..(9)

<223> 2'-O-Me

<220><221> modified_base

<222> (10)..(10)

<223> 7-deaza-dG

<220><221> modified_base

<222> (17)..(18)

<223> 2'-O-Me

<400> 9

ctatctgucg ttctctgu

18

<210> 10

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (7)..(8)

<223> 2'-O-Me

<220><221> modified_base

<222> (9)..(9)

<223> 2'-O-Me-5-Me-C

<220><221> modified_base

<222> (10)..(10)

<223> 7-deaza-dG

<220><221> modified_base

<222> (17)..(18)

<223> 2'-O-Me

<400> 10

ctatctgucg ttctctgu

18

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (8)..(8)

<223> 2'-O-Me

<220><221> modified_base

<222> (9)..(9)

<223> 2'-O-Me-5-Me-C

<220><221> modified_base

<222> (10)..(10)

<223> 7-deaza-dG

<220><221> modified_base

<222> (17)..(18)

<223> 2'-O-Me

<400> 11

ctatctgucg ttctctgu

18

<210> 12

<211> 18

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic oligonucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (7)..(8)
 <223> 2'-O-Me
 <220><221> modified_base
 <222> (9)..(9)
 <223> 5-methyl-dC
 <220><221> modified_base
 <222> (10)..(10)
 <223> arabinoguanosine
 <220><221> modified_base
 <222> (17)..(18)
 <223> 2'-O-Me
 <400> 12

ctatctgucg ttctctgu

18

<210> 13
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic oligonucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> 2'-O-Me
 <220><221> modified_base
 <222> (7)..(8)
 <223> 2'-O-Me
 <220><221> modified_base
 <222> (9)..(9)
 <223> 5-methyl-dC
 <220><221> modified_base
 <222> (10)..(10)
 <223> 7-deaza-dG

<220><221> modified_base

<222> (17)..(18)

<223> 2'-O-Me

<400

> 13

ctatctgucg ttctctgu

18

<210> 14

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> 2'-MOE

<220><221> modified_base

<222> (7)..(8)

<223> 2'-O-Me

<220><221> modified_base

<222> (9)..(9)

<223> 5-methyl-dC

<220><221> modified_base

<222> (10)..(10)

<223> 7-deaza-dG

<220><221> modified_base

<222> (17)..(18)

<223> 2'-O-Me

<400> 14

ctatctgucg ttctctgu

18

<210> 15

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)
 <223> 2'-O-propargyl
 <220><221> modified_base
 <222> (7)..(8)
 <223> 2'-O-Me
 <220><221> modified_base
 <222> (9)..(9)
 <223> 5-methyl=dC
 <220><221> modified_base
 <222> (10)..(10)
 <223> 7-deaza-dG
 <220><221> modified_base
 <222> (17)..(18)
 <223>
 > 2'-O-Me
 <400> 15
 ctatctgucg ttctctgu
 <210> 16
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic oligonucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (7)..(8)
 <223> 2'-O-Me
 <220><221> modified_base
 <222> (9)..(9)
 <223> 5-methyl-dC
 <220><221> modified_base
 <222> (10)..(10)
 <223> 7-deaza-dG
 <220><221> modified_base
 <222> (17)..(18)
 <223> 2'-O-Me
 <400> 16

18

ctatctgucg ttctctgu

18