



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2010년07월13일  
(11) 등록번호 10-0969727  
(24) 등록일자 2010년07월05일

- (51) Int. Cl.  
C12Q 1/68 (2006.01) C12N 15/11 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2005-7002841  
(22) 출원일자(국제출원일자) 2003년08월19일  
심사청구일자 2006년11월06일  
(85) 번역문제출일자 2005년02월18일  
(65) 공개번호 10-2005-0034738  
(43) 공개일자 2005년04월14일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2003/025935  
(87) 국제공개번호 WO 2004/016805  
국제공개일자 2004년02월26일
- (30) 우선권주장  
60/404,479 2002년08월19일 미국(US)  
(뒷면에 계속)
- (56) 선행기술조사문헌  
US05663153 A1\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자  
콜레이 파마시티컬 그룹, 인코포레이티드  
미국 뉴욕주 10017 뉴욕 이스트 42번 스트리트 235  
콜리 파마슈티칼 게엠베하  
독일 40225 뒤셀도르프 메로빙거플라츠 1아
- (72) 발명자  
크리그, 아서, 엠.  
미국 02481 메사추세츠주 웰즐리 윈딩 리버 로드 173  
자플로비츠, 올리케  
독일 테-40764 랑겐펠트 잔트스트라쎄 16아  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
김영, 장수길

전체 청구항 수 : 총 76 항

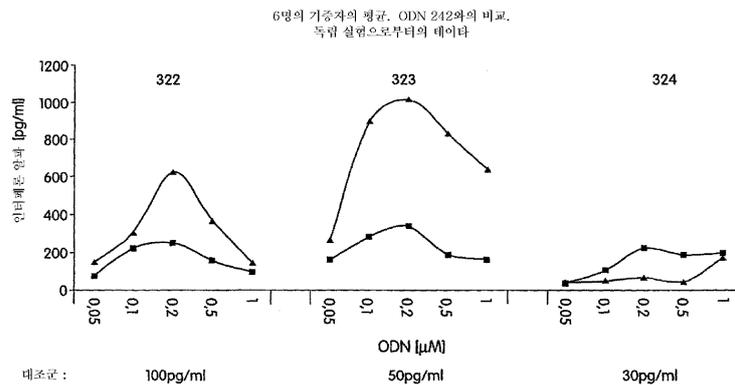
심사관 : 이동원

**(54) 번역자극 핵산**

**(57) 요약**

본 발명은 면역 반응의 자극에 유용한 연결 또는 반-연결 CpG 번역자극 올리고뉴클레오타이드의 분류에 관한 것이다.

**대표도**



(72) 발명자

**폴머, 요에르그**

독일 데-40591 뒤셀도르프 콜라우슈백 24

**울만, 오이겐**

독일 데-61479 글라쉬에텐 춤 탈블리크 31

**위르크, 마리온**

독일 데-41540 도르나겔 클로스터스트라쎄 4

**리프포트, 그라이존**

독일 데-40597 뒤셀도르프 벤로더 스트라쎄 86

**란킨, 로베르트**

네덜란드 엔엘-6672 엠데 험멘 빌트스트라트 75

(30) 우선권주장

60/404,820 2002년08월19일 미국(US)

60/429,701 2002년11월27일 미국(US)

60/447,377 2003년02월14일 미국(US)

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

하나 이상의 내부 피리미딘-퓨린 (YZ) 디뉴클레오티드 및 하나의 키메라 백본을 가지며, 여기서 상기 하나 이상의 내부 YZ 디뉴클레오티드가 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기를 가지고, 임의로 각각의 추가 내부 YZ 디뉴클레오티드가 포스포디에스테르, 포스포디에스테르-유사 또는 안정화된 인터뉴클레오티드 연결기를 가지고, 모든 다른 인터뉴클레오티드 연결기가 안정화된, 올리고뉴클레오티드.

**청구항 2**

제1항에 있어서, 올리고뉴클레오티드가 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기를 갖는 다수의 내부 YG 디뉴클레오티드를 포함하는 것인 올리고뉴클레오티드.

**청구항 3**

제2항에 있어서, 모든 내부 YG 디뉴클레오티드가 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기를 갖는 것인 올리고뉴클레오티드.

**청구항 4**

제1항에 있어서, 올리고뉴클레오티드가 서열 1 내지 54, 서열 55 내지 99 및 서열 241 (여기서, 본원 명세서 중의 서열에서 나타낸 \*는 포스포로티오에이트를 나타내고, \_은 포스포디에스테르를 나타내고, U는 2'-테옥시우라실을 나타내고, 7은 7-테아자구아닌을 나타냄) 중 어느 하나인 올리고뉴클레오티드.

**청구항 5**

제1항에 있어서, 올리고뉴클레오티드가

T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\*T\*T( 서열: 100),  
 T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\_G\*T\*C\_G\*T\*T( 서열: 101),  
 T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\_C\_G\*T\*C\_G\*T\*T( 서열: 102),  
 T\*G\*T\*C\_G\*T\*T\*G\*T\*C\_G\*T\*T\_G\*T\*C\_G\*T\*T\_G\*T\*C\_G\*T\*T( 서열:  
 103), 및 T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\*C\*G\*G\*C\*G\*G\*C\*G\*G\*C\*G( 서열:  
 104)

(여기서, \*는 포스포로티오에이트를 나타내고, \_은 포스포디에스테르를 나타냄)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 올리고뉴클레오티드.

**청구항 6**

키메라 백본 및 하나 이상의 서열 N<sub>1</sub>YGN<sub>2</sub>를 포함하며, 여기서 서열 N<sub>1</sub>YGN<sub>2</sub> 각각에 대하여 독립적으로 YG는 내부 피리미딘-구아노신 (YG) 디뉴클레오티드이고, N<sub>1</sub> 및 N<sub>2</sub>가 각각 서로 독립적으로 임의의 뉴클레오티드이고, 하나 이상의 서열 N<sub>1</sub>YGN<sub>2</sub> 및 임의로 각각의 추가 서열 N<sub>1</sub>YGN<sub>2</sub>의 경우에, YG 디뉴클레오티드가 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기를 가지고, (a) N<sub>1</sub>이 내부 뉴클레오티드인 경우에, N<sub>1</sub> 및 Y가 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기에 의해 연결되거나,

(b) N<sub>2</sub>가 내부 뉴클레오티드인 경우에, G 및 N<sub>2</sub>가 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기에 의해 연결되거나, 또는

(c) N<sub>1</sub>이 내부 뉴클레오티드인 경우에, N<sub>1</sub> 및 Y가 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기에 의해 연결되고, N<sub>2</sub>가 내부 뉴클레오티드인 경우에, G 및 N<sub>2</sub>가 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기에 의해 연결되며, 여기서 모든 다른 인터뉴클레오티드 연결기가 안정화된,

면역자극 핵산 분자를 포함하는 올리고뉴클레오티드.

**청구항 7**

제6항에 있어서,

면역자극 핵산 분자가

다수의 서열 N<sub>1</sub>YGN<sub>2</sub>를 포함하며, 여기서

서열 N<sub>1</sub>YGN<sub>2</sub> 각각의 경우에,

YG 디뉴클레오티드가 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기를 가지고,

(a) N<sub>1</sub>이 내부 뉴클레오티드인 경우에, N<sub>1</sub> 및 Y가 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기에 의해 연결되거나,

(b) N<sub>2</sub>가 내부 뉴클레오티드인 경우에, G 및 N<sub>2</sub>가 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기에 의해 연결되거나, 또는

(c) N<sub>1</sub>이 내부 뉴클레오티드인 경우에, N<sub>1</sub> 및 Y가 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기에 의해 연결되고, N<sub>2</sub>가 내부 뉴클레오티드인 경우에, G 및 N<sub>2</sub>가 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기에 의해 연결된 것인 올리고뉴클레오티드.

**청구항 8**

제6항에 있어서, 면역자극 핵산 분자가 서열 105 내지 231 (여기서, 본원 명세서 중의 서열에서 나타낸 \*는 포스포로티오에이트를 나타내고, \_은 포스포디에스테르를 나타냄) 중 어느 하나인 올리고뉴클레오티드.

**청구항 9**

제6항에 있어서, 면역자극 핵산 분자가

T\*C\_G\_T\*C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T( 서열 :  
232),  
T\*C\_G\*T\_C\_G\*T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\*T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\*T\*T( 서열 :  
233), 및  
T\*C\_G\_T\_C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 :  
234)

(여기서, \*는 포스포로티오에이트를 나타내고, \_은 포스포디에스테르를 나타냄)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 올리고뉴클레오티드.

**청구항 10**

제6항에 있어서, 번역자극 핵산 분자가

T\*C\*G\*T\*C\*G\*T\*T\*\_T\_G\*T\*C\*G\*T\*T\*\_T\_G\*T\*C\*G\*T\*T( 서열 :  
235),  
T\*C\*G\*T\*C\*G\*T\*T\*\_T\_G\*\_T\*C\*G\*T\*T\*\_T\_G\*\_T\*C\*G\*T\*T( 서열 :  
236), 및  
T\*C\*G\*T\*C\*G\*T\*T\*\_T\_G\*\_T\*C\*G\*T\*T\*\_T\_G\*\_T\*C\*G\*T\*T( 서열 :  
237)

(여기서, \*는 포스포로티오에이트를 나타내고, \_은 포스포디에스테르를 나타냄)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 올리고뉴클레오티드.

**청구항 11**

제6항에 있어서, 번역자극 핵산 분자가

T\*C\*\_G\*\_T\*\_C\*\_G\*\_T\*\_T\*\_T\_G\*\_T\*\_C\*\_G\*\_T\*\_T\*\_T\_G\*\_T\*\_C\*\_G\*\_T\*\_T( 서열 :  
NO:238),  
T\*C\*\_G\*\_T\*\_C\*\_G\*\_T\*\_T\*\_T\_G\*\_T\*\_C\*\_G\*\_T\*\_T\*\_T\_G\*\_T\*\_C\*\_G\*\_T\*\_T( 서열 :  
NO:239), 및  
T\*C\*\_G\*\_T\*\_C\*\_G\*\_T\*\_T\*\_T\_G\*\_T\*\_C\*\_G\*\_T\*\_T\*\_T\_G\*\_T\*\_C\*\_G\*\_T\*\_T( 서열 :  
NO:240)

(여기서, \*는 포스포로티오에이트를 나타내고, \_은 포스포디에스테르를 나타냄)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 올리고뉴클레오티드.

**청구항 12**

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기를 갖는 하나 이상의 내부 YG 디뉴클레오티드가 CG인 올리고뉴클레오티드.

**청구항 13**

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기를 갖는 하나 이상의 내부 YG 디뉴클레오티드가 TG인 올리고뉴클레오티드.

**청구항 14**

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고뉴클레오티드가 B-클래스 번역자극 핵산 분자를 포함하는 것인 올리고뉴클레오티드.

**청구항 15**

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고뉴클레오티드가 C-클래스 번역자극 핵산 분자를 포함하는 것인 올리고뉴클레오티드.

**청구항 16**

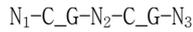
제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고뉴클레오티드가 길이 4 내지 100개의 뉴클레오티드인 번역자극 핵산 분자를 포함하는 것인 올리고뉴클레오티드.

**청구항 17**

삭제

**청구항 18**

하기 식의 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드.



식 중,

$N_1$  및  $N_3$ 은 각각 독립적으로 길이 1 내지 20개의 뉴클레오티드 핵산 서열이고,

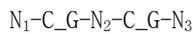
\_은 내부 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기를 나타내고,

$N_2$ 는 독립적으로 길이 0 내지 20개의 뉴클레오티드 핵산 서열이고,

$G-N_2-C$ 는 1 또는 2 개의 안정화된 연결기를 포함한다.

#### 청구항 19

하기 식의 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드.



식 중,

$N_1$  및  $N_3$ 은 각각 독립적으로 길이 1 내지 20개의 뉴클레오티드 핵산 서열이고,

\_은 내부 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기를 나타내고,

$N_2$ 는 독립적으로 길이 4 내지 20개의 뉴클레오티드 핵산 서열이고,

$G-N_2-C$ 는 5 이상의 안정화된 연결기를 포함한다.

#### 청구항 20

삭제

#### 청구항 21

삭제

#### 청구항 22

제1항 내지 제7항, 제18항, 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산이 데옥시리보스 또는 리보스를 포함하는 백본을 갖는 것인 올리고뉴클레오티드.

#### 청구항 23

제1항 내지 제7항, 제18항, 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 아주반트 또는 사이토카인, 또는 항원을 추가로 포함하는 올리고뉴클레오티드.

#### 청구항 24

제1항 내지 제7항, 제18항, 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기가 포스포디에스테르인 올리고뉴클레오티드.

#### 청구항 25

제1항 내지 제7항, 제18항, 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 포스포디에스테르-유사 연결기가 보라노포스포네이트 또는 부분입체이성질체적으로 순수한 Rp 포스포로티오에이트인 올리고뉴클레오티드.

#### 청구항 26

제1항 내지 제7항, 제18항, 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 안정화된 인터뉴클레오티드 연결기가 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 메틸포스포네이트, 메틸포스포로티오에이트 및 이들의 임의의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 올리고뉴클레오티드.

**청구항 27**

제1항 내지 제7항, 제18항, 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 안정화된 인터뉴클레오티드 연결기가 포스포로티오에이트인 올리고뉴클레오티드.

**청구항 28**

삭제

**청구항 29**

삭제

**청구항 30**

삭제

**청구항 31**

하기 식의 서열을 포함하고, 2 이상의 포스포디에스테르 인터뉴클레오티드 연결기를 포함하고, 임의로 길이 16 내지 24개의 뉴클레오티드이며, 포스포디에스테르 인터뉴클레오티드 연결기를 갖는 1개 이상의 C<sub>2</sub>G 모티프를 포함하는 올리고뉴클레오티드.

5'T\*C\*G\*T\*CGTTTTGAN<sub>1</sub>CGN<sub>2</sub>\*T\*T3' (서열 296)

식 중,

N<sub>1</sub>은 0 내지 6개의 뉴클레오티드, 임의로 0 내지 2개의 뉴클레오티드이고,

N<sub>2</sub>는 0 내지 7개의 뉴클레오티드이고,

\*는 안정화된 인터뉴클레오티드 연결기의 존재를 나타낸다.

**청구항 32**

삭제

**청구항 33**

삭제

**청구항 34**

삭제

**청구항 35**

하기 식의 서열을 포함하고, 3 이상의 포스포디에스테르 인터뉴클레오티드 연결기를 포함하고, 임의로 길이 16 내지 24개의 뉴클레오티드이며, 포스포디에스테르 인터뉴클레오티드 연결기를 갖는 1개 이상의 C<sub>2</sub>G 모티프를 포함하는 올리고뉴클레오티드.

5'T\*C\*G\*(T\*/A\*)TN<sub>3</sub>CGTTTTN<sub>4</sub>CGN<sub>5</sub>\*T\*T3' (서열 301)

식 중,

N<sub>3</sub>은 0 내지 4개의 뉴클레오티드이고,

N<sub>4</sub>는 1 내지 5개의 뉴클레오티드, 임의로 1 내지 2개의 뉴클레오티드이고,

N<sub>5</sub>는 0 내지 7개의 뉴클레오티드이고,

\*는 안정화된 인터뉴클레오티드 연결기의 존재를 나타낸다.

**청구항 36**

삭제

**청구항 37**

삭제

**청구항 38**

하기 식의 구조 중 하나를 갖고, 3 이상의 포스포디에스테르 인터뉴클레오티드 연결기, 임의로 5개의 포스포디에스테르 인터뉴클레오티드 연결기를 포함하고, 임의로 길이 16 내지 24개의 뉴클레오티드인 올리고뉴클레오티드.



식 중,

N은 임의의 뉴클레오티드이고,

\*는 안정화된 인터뉴클레오티드 연결기의 존재를 나타낸다.

**청구항 39**

하기 식의 서열을 포함하고, 길이 15 내지 40개의 뉴클레오티드인 올리고뉴클레오티드.



식 중,

N<sub>8</sub>은 길이 4 내지 10개의 뉴클레오티드이고, 1개 이상의 C\_G 모티프, 임의로 2개 또는 3개 이상의 CG 모티프를 포함하고,

N<sub>9</sub>는 길이 0 내지 3개의 뉴클레오티드이고,

\*는 안정화된 인터뉴클레오티드 연결기의 존재를 나타내고,

\_은 포스포디에스테르 인터뉴클레오티드 연결기의 존재를 나타낸다.

**청구항 40**

제39항에 있어서, N<sub>8</sub>이 PuCGPyPyCG, PuCGPyPyCGCG 또는 ACGTTCG인 올리고뉴클레오티드.

**청구항 41**

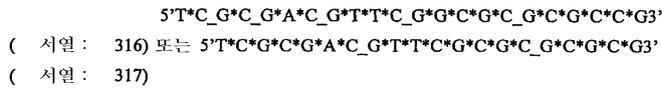
제39항에 있어서, N<sub>9</sub>가 1개 이상의 CG 모티프를 포함하는 것인 올리고뉴클레오티드.

**청구항 42**

제39항에 있어서, N<sub>9</sub>가 CCG인 올리고뉴클레오티드.

**청구항 43**

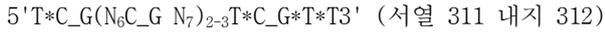
제39항에 있어서,



구조를 갖는 올리고뉴클레오티드.

**청구항 44**

하기 식의 서열을 포함하고, 길이 16 내지 40개의 뉴클레오티드인 올리고뉴클레오티드.



식 중,

$N_6$  및  $N_7$ 은 독립적으로 길이 1 내지 5개의 뉴클레오티드이고,

임의로  $N_6$ 은 1개의 뉴클레오티드이고,

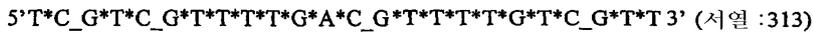
임의로  $N_7$ 은 5개의 뉴클레오티드이고,

\*는 안정화된 인터뉴클레오티드 연결기의 존재를 나타내고,

\_은 포스포디에스테르 인터뉴클레오티드 연결기의 존재를 나타낸다.

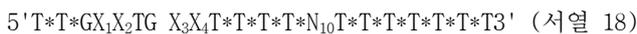
**청구항 45**

하기 식의 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드.



**청구항 46**

하기 식의 서열을 포함하고, 길이 24 내지 40개의 뉴클레오티드인 올리고뉴클레오티드.



식 중,

$N_{10}$ 은 길이 4 내지 8개의 뉴클레오티드이고, 1개 이상의 C\_G 모티프, 임의로 2개 또는 3개 이상의 CG 모티프를 포함하고,

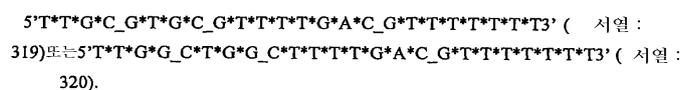
$X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$  및  $X_4$ 는 독립적으로 C 또는 G이고,

\*는 안정화된 인터뉴클레오티드 연결기의 존재를 나타내고,

\_은 포스포디에스테르 인터뉴클레오티드 연결기의 존재를 나타낸다.

**청구항 47**

제46항에 있어서,



구조를 갖는 올리고뉴클레오티드.

**청구항 48**

하기 식의 서열을 포함하고, 임의로 길이 21 내지 40개의 뉴클레오티드인 올리고뉴클레오티드.

5'T\*C\*G\*C\_G\*A\*C\*G\*T\*T\*C\_G\*G\*C\*G\*C\_G\*C\*G\*C\*C\*G3' (서열 321)

식 중,

\*는 안정화된 인터뉴클레오티드 연결기의 존재를 나타내고,

\_은 포스포디에스테르 인터뉴클레오티드 연결기의 존재를 나타낸다.

**청구항 49**

제44항에 있어서, N<sub>6</sub>이 T 또는 A인 올리고뉴클레오티드.

**청구항 50**

제44항에 있어서, N<sub>7</sub>이 5개의 피리미딘 또는 TTTTG인 올리고뉴클레오티드.

**청구항 51**

삭제

**청구항 52**

삭제

**청구항 53**

삭제

**청구항 54**

삭제

**청구항 55**

삭제

**청구항 56**

삭제

**청구항 57**

삭제

**청구항 58**

삭제

**청구항 59**

삭제

**청구항 60**

삭제

**청구항 61**

삭제

**청구항 62**

삭제

**청구항 63**

삭제

**청구항 64**

삭제

**청구항 65**

삭제

**청구항 66**

삭제

**청구항 67**

삭제

**청구항 68**

삭제

**청구항 69**

삭제

**청구항 70**

제1항 내지 제7항, 제18항, 제19항, 제39항, 제44항, 제46항, 제48항 내지 제50항 중 어느 한 항의 올리고뉴클레오타이드를 면역 반응 조정 유효량으로 포함하는, 면역 반응 조정용 제약 조성물.

**청구항 71**

제70항에 있어서, 천식을 치료하기 위한 제약 조성물.

**청구항 72**

제70항에 있어서, 알레르기를 치료하기 위한 제약 조성물.

**청구항 73**

제70항에 있어서, 암을 치료하기 위한 제약 조성물.

**청구항 74**

제70항에 있어서, 감염성 질환을 치료하기 위한 제약 조성물.

**청구항 75**

제70항에 있어서, 자가면역 질환을 치료하기 위한 제약 조성물.

**청구항 76**

제70항에 있어서, 기도 개형을 치료하기 위한 제약 조성물.

**청구항 77**

제70항에 있어서, 항원과 함께 또는 없이 투여하는 것을 추가로 포함하는 제약 조성물.

**청구항 78**

제70항에 있어서, 치료 프로토콜을 수행하는 것을 추가로 포함하는 제약 조성물.

**청구항 79**

제78항에 있어서, 치료 프로토콜이 수술인 제약 조성물.

**청구항 80**

제78항에 있어서, 치료 프로토콜이 방사선인 제약 조성물.

**청구항 81**

제78항에 있어서, 치료 프로토콜이 의약인 제약 조성물.

**청구항 82**

제70항에 있어서, 올리고뉴클레오티드가 제제화된 것인 제약 조성물.

**청구항 83**

제82항에 있어서, 올리고뉴클레오티드가 표적 분자와 결합되어 있는 것인 제약 조성물.

**청구항 84**

제70항에 있어서, 올리고뉴클레오티드가 경구, 비강, 설하, 정맥내, 피하, 점막, 호흡기, 직접 주사, 및 피부로 이루어진 군으로부터 선택되는 경로에 의해 전달되는 것인 제약 조성물.

**청구항 85**

제70항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드를 사이토카인 발현 유도 유효량으로 포함하는 제약 조성물.

**청구항 86**

제85항에 있어서, 사이토카인이 IL-6, TNF  $\alpha$ , IFN  $\alpha$ , IFN  $\gamma$  및 IP-10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 제약 조성물.

**청구항 87**

제70항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드를 Th2 편향 반응으로부터 Th1 편향 반응으로의 면역 반응 이동 유효량으로 포함하는 제약 조성물.

**청구항 88**

삭제

**청구항 89**

삭제

**청구항 90**

삭제

**청구항 91**

삭제

**청구항 92**

삭제

**청구항 93**

삭제

**청구항 94**

삭제

**청구항 95**

면역 반응을 자극하기 위한 제1항 내지 제7항, 제18항, 제19항, 제39항, 제44항, 제46항, 제48항 내지 제50항 중 어느 한 항의 올리고뉴클레오티드의 의약의 제조 방법.

**청구항 96**

제45항의 올리고뉴클레오티드를 면역 반응 조정 유효량으로 포함하는, 면역 반응 조정용 제약 조성물.

**청구항 97**

제96항에 있어서, 천식을 치료하기 위한 제약 조성물.

**청구항 98**

제96항에 있어서, 알레르기를 치료하기 위한 제약 조성물.

**청구항 99**

제96항에 있어서, 암을 치료하기 위한 제약 조성물.

**청구항 100**

제96항에 있어서, 감염성 질환을 치료하기 위한 제약 조성물.

**청구항 101**

제96항에 있어서, 자가면역 질환을 치료하기 위한 제약 조성물.

**청구항 102**

제96항에 있어서, 기도 개형을 치료하기 위한 제약 조성물.

**청구항 103**

제96항에 있어서, 항원과 함께 또는 없이 투여하는 것을 추가로 포함하는 제약 조성물.

**청구항 104**

제96항에 있어서, 치료 프로토콜을 수행하는 것을 추가로 포함하는 제약 조성물.

**청구항 105**

제104항에 있어서, 치료 프로토콜이 수술인 제약 조성물.

**청구항 106**

제104항에 있어서, 치료 프로토콜이 방사선인 제약 조성물.

**청구항 107**

제104항에 있어서, 치료 프로토콜이 의약인 제약 조성물.

**청구항 108**

제96항에 있어서, 올리고뉴클레오티드가 제제화된 것인 제약 조성물.

**청구항 109**

제108항에 있어서, 올리고뉴클레오티드가 표적 분자와 결합되어 있는 것인 제약 조성물.

**청구항 110**

제96항에 있어서, 올리고뉴클레오티드가 경구, 비강, 설하, 정맥내, 피하, 점막, 호흡기, 직접 주사, 및 피부로 이루어진 군으로부터 선택되는 경로에 의해 전달되는 것인 제약 조성물.

**청구항 111**

제96항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드를 사이토카인 발현 유도 유효량으로 포함하는 제약 조성물.

**청구항 112**

제111항에 있어서, 사이토카인이 IL-6, TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$  및 IP-10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 제약 조성물.

**청구항 113**

제96항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드를 Th2 편향 반응으로부터 Th1 편향 반응으로의 면역 반응 이동 유효량으로 포함하는 제약 조성물.

**청구항 114**

삭제

**청구항 115**

삭제

**청구항 116**

삭제

**청구항 117**

삭제

**청구항 118**

삭제

**청구항 119**

삭제

**청구항 120**

삭제

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 일반적으로 감소된 신장 염증성 영향을 갖는 면역자극 핵산, 뿐만 아니라 면역자극 올리고뉴클레오티드, 그의 조성물 및 면역자극 핵산을 사용하는 방법에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 박테리아 DNA는 B 세포 및 천연 킬러 세포를 활성화하는 면역자극 효과를 갖지만, 척추동물의 DNA는 그렇지 못하다 ([Tokunaga, T., et al., Jpn. J. Cancer Res. 79: 682-686]; [Tokunaga, T., et al., 1984, JNCI 72: 955-962; Messina, J.P., et al., 1991, J. Immunol. 147: 1759-1764]; 및 리뷰용 [Krieg, 1998, In: Applied Oligonucleotide Technology, C.A. Stein and A.M. Krieg, (Eds.), John Wiley and Sons, Inc., New York, NY, pp. 431-448]). 현재, 박테리아 DNA의 이러한 면역자극 효과는 박테리아 DNA에 일반적이지만 척추동물의 DNA에서는 메틸화되어 드러나 있지 않은 특정한 염기 콘텍스트 (context) (CpG 모티프)에 메틸화되지 않은 CpG

디뉴클레오티드가 존재하기 때문에 나타난다고 이해되고 있다 [Krieg et al., 1995 Nature 374: 546-549; Krieg, 1999 Biochim. Biophys. Acta 93321: 1-10]. 이들 CpG 모티프를 함유하는 합성 올리고데옥시뉴클레오티드 (ODN)는 박테리아 DNA의 면역자극 효과를 나타낼 수 있다. 이러한 CpG ODN은 B 세포 증식; 사이토카인 및 이뮤노글로불린 분비; 천연 킬러 (NK) 세포 용해 활성 및 IFN- $\gamma$  분비; 및 공동자극 분자를 발현하고 사이토카인, 특히 Th1-유사 T 세포 반응의 발달을 촉진하는 데 중요한 Th1-유사 사이토카인을 분비하는 수상 세포 (DC) 및 기타 항원 제시 세포의 활성화를 유도하는, 인간 및 무린 백혈구에 대한 고도의 자극 효과를 가진다. 천연 포스포디에스테르 백본 CpG ODN의 이러한 면역자극 효과는 CpG 모티프가 메틸화되거나 GpC로 바뀌거나, 그렇지 않으면 제거되거나 변경되는 경우 상기 효과가 극적으로 감소된다는 점에서 CpG에 매우 특이적이다 [Krieg et al., 1995 Nature 374: 546-549; Hartmann et al., 1999 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 9305-10].

[0003] 초기 연구에서, 면역자극성 CpG 모티프의 식은 퓨린-퓨린-CpG-피리미딘-피리미딘인 것으로 여겨졌다 [Krieg et al., 1995 Nature 374: 546-549; Pisetsky, 1996 J. Immunol. 156: 421-423; Hacker et al., 1998 EMBO J. 17: 6230-6240; Lipford et al., 1998 Trends in Microbiol. 6: 496-500]. 그러나, 현재, 마우스 림프구가 이 "식"을 따르지 않는 포스포디에스테르 CpG 모티프에 매우 잘 반응하고 [Yi et al., 1998 J. Immunol. 160: 5898-5906], 인간 B 세포 및 수상 세포도 상기 "식"을 따르지 않는 포스포디에스테르 CpG 모티프에 매우 잘 반응한다 [Hartmann et al., 1999 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 9305-10; Liang, 1996 J. Clin. Invest. 98: 1119-1129]는 것이 명백해졌다.

[0004] CpG 핵산의 몇몇의 상이한 분류는 최근에 설명되고 있다. 하나의 분류는 B 세포의 활성화에 효능이 있지만, IFN- $\alpha$  및 NK 세포 활성화의 유도에 상대적으로 약한데; 이 분류는 B 클래스라고 칭해져 있다. B 클래스 CpG 핵산은 전형적으로 완전히 안정화되고, 특정 바람직한 염기 콘텍스트 내의 메틸화되지 않은 CpG 디뉴클레오티드를 포함한다 (예컨대, 미국 특허 제6,194,388호; 동 제6,207,646호; 동 제6,214,806호; 동 제6,218,371호; 동 제6,239,116호; 및 동 제6,339,068호 참조). CpG 핵산의 또다른 분류는 B 세포 및 NK 세포를 활성화시키고, IFN- $\alpha$ 를 유도하는데; 이 분류는 C-클래스라 칭해져 있다. 최초로 특성화된 C-클래스 CpG 핵산은 전형적으로 완전히 안정화되어 있고, B 클래스-유형 서열 및 GC-부유 회문구조 또는 거의-회문구조를 포함한다. 이 분류는 동시 계류중인 2001년 8월 17일자로 제출한 미국 가출원 제60/313,273호 및 2002년 8월 19일자로 제출한 미국 제10/224,523호 및 국제 공개 WO 03/015711로 공개된 관련 PCT 특허 출원 PCT/US02/26468에 설명되어 있다.

[0005] <발명의 요약>

[0006] 본 발명에 이르러서야, B-클래스 및 C-클래스 CpG 핵산 및 다른 안정화된 면역자극 핵산의 면역자극 특성이 특정 뉴클레오티드 간의 하나 이상의 비-안정화된 연결기의 선택적 포함에 의해 유지될 수 있거나 심지어 개선될 수 있다는 것을 놀랍게도 발견하였다. 비-안정화된 연결기는 바람직하게는 천연 연결기, 즉 포스포디에스테르 연결기 또는 포스포디에스테르-유사 연결기이다. 비-안정화된 연결기는 반드시 아니지만, 전형적으로 뉴클레아제 절단에 상대적으로 민감할 것이다. 본 발명의 면역자극 핵산은 5' 피리미딘 (Y) 및 인접한 3' 퓨린 (Z), 바람직하게는 구아닌 (G) 사이에 위치한 하나 이상의 비-안정화된 연결기를 포함하며, 여기서 5'Y 및 3'Z는 모두 내부 뉴클레오티드이다.

[0007] 완전히 안정화된 면역자극 핵산과 같이, 본 발명의 면역자극 핵산은 Th1-유사 면역 반응의 유도에 유용하다. 따라서, 본 발명의 면역자극 핵산은 백신접종에 아주반트로서 유용하고, 이들은 암, 감염성 질환, 알레르기 및 천식을 포함하는 질환의 치료에 유용하다. 이들은 임의의 목적을 위한 면역자극 핵산의 연장되거나 또는 반복되는 투여에 요구되는 임의의 상태에 특정 용도로 여겨진다.

[0008] 완전히 안정화된 면역자극 핵산이 용도를 갖는 임의의 목적에 대한 유용성 이외에, 본 발명의 면역자극 핵산은 일부 실시양태에서 완전히 안정화된 면역자극 핵산보다 나은 이점, 예컨대 증가된 효능 및 감소된 독성을 가질 수 있다.

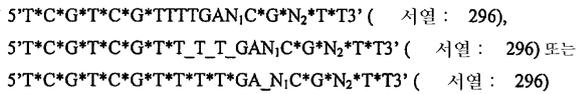
[0009] 본 발명은 부분적으로 올리고뉴클레오티드를 함유한 면역자극 CpG에 관한 것이다. 본 발명의 일 측면은 하기 식을 갖는 올리고뉴클레오티드이다:

[0010] 5'T\*C\*G\*T\*CGTTTGAN<sub>1</sub>CGN<sub>2</sub>\*T\*T3' (서열 296)

[0011] 상기 올리고뉴클레오티드에서, N<sub>1</sub>은 0 내지 6개의 뉴클레오티드이고, N<sub>2</sub>는 0 내지 7개의 뉴클레오티드이다. 기호 \*는 안정화된 인터뉴클레오티드 연결기의 존재를 나타낸다. \*로 표시하지 않은 인터뉴클레오티드 연결기는 올리고뉴클레오티드가 2 이상의 포스포디에스테르 인터뉴클레오티드 연결기를 포함하는 하는 이상 안정화되지

않거나 또는 안정화될 수 있다. 안정화된 인터뉴클레오티드 연결기는 포스포로티오에이트 연결기일 수 있다. 일부 실시양태에서,  $N_1$ 은 0 내지 2개의 뉴클레오티드이다. 바람직하게는, 올리고뉴클레오티드 길이는 16 내지 24개의 뉴클레오티드이다.

[0012] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는



[0013]

[0014] 구조 중 하나를 가진다. 기호 \_은 포스포디에스테르 인터뉴클레오티드 연결기의 존재를 나타낸다.

[0015] 바람직하게는, 올리고뉴클레오티드는

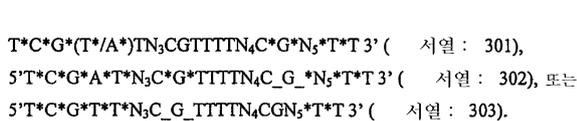


[0016]

[0017] 이다.

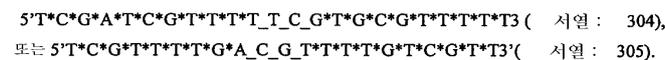
[0018] 본 발명의 다른 측면은 5'T\*C\*G\*(T\*/A\*)TN<sub>3</sub>CGTTTTN<sub>4</sub>CGN<sub>5</sub>\*T\*T3' (서열 301)을 포함하는 올리고뉴클레오티드에 관한 것이다.  $N_3$ 은 0 내지 4개의 뉴클레오티드이다.  $N_4$ 는 1 내지 5개의 뉴클레오티드이다.  $N_5$ 는 0 내지 7개의 뉴클레오티드이다. 기호 \*는 안정화된 인터뉴클레오티드 연결기의 존재를 나타낸다. \*로 표시하지 않은 인터뉴클레오티드 연결기는 올리고뉴클레오티드가 2 이상의 포스포디에스테르 인터뉴클레오티드 연결기를 포함하는 만큼 안정화되지 않거나 또는 안정화될 수 있다. 안정화된 인터뉴클레오티드 연결기는 포스포로티오에이트 연결기일 수 있다. 일부 실시양태에서,  $N_4$ 는 1 내지 2개의 뉴클레오티드이다. 바람직하게는, 올리고뉴클레오티드 길이는 16 내지 24개의 뉴클레오티드이다.

[0019] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 하기 구조 중 하나를 가진다.



[0020]

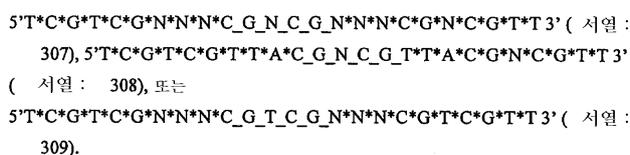
[0021] 바람직하게는, 올리고뉴클레오티드는 하기 서열이다.



[0022]

[0023] 다른 측면에 따라, 5'T\*C\*G\*T\*C\*GNNCGNCGNNC\*G\*N\*C\*G\*T\*T3' (서열 306)을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 제공한다. N은 임의의 뉴클레오티드이다. 기호 \*는 안정화된 인터뉴클레오티드 연결기의 존재를 나타낸다. \*로 표시하지 않은 인터뉴클레오티드 연결기는 올리고뉴클레오티드가 3 이상의 포스포디에스테르 인터뉴클레오티드 연결기를 포함하는 만큼 안정화되지 않거나 또는 안정화될 수 있다. 안정화된 인터뉴클레오티드 연결기는 포스포로티오에이트 연결기일 수 있다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 5개의 포스포디에스테르 인터뉴클레오티드 연결기를 포함한다. 바람직하게는, 올리고뉴클레오티드 길이는 16 내지 24개의 뉴클레오티드이다.

[0024] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 하기 구조 중 하나를 가진다.



[0025]

- [0026] 일 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 하기의 서열이다.
- 5'T\*C\*G\*T\*C\*G\*T\*T\*A\*C\_G\_T\_C\_G\_T\*T\*A\*C\*G\*T\*C\*G\*T\*T 3' (서열 : 310).
- [0027]
- [0028] 기호 \_은 포스포디에스테르 인티뉴클레오티드 연결기의 존재를 나타낸다.
- [0029] 다른 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 포스포디에스테르 인티뉴클레오티드 연결기를 갖는 1개 이상의 C\_G 모티프를 포함한다. 다른 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 포스포디에스테르 인티뉴클레오티드 연결기를 갖는 임의의 C\_G 모티프를 포함하지 않는다.
- [0030] 다른 측면에서, 구조 5'T\*C\_G(N<sub>6</sub>C\_G N<sub>7</sub>)<sub>2-3</sub>T\*C\_G\*T\*T3'(서열 311 내지 312)을 갖는 올리고뉴클레오티드를 제공한다. N<sub>6</sub> 및 N<sub>7</sub> 길이는 독립적으로 1 내지 5개의 뉴클레오티드이고, 올리고뉴클레오티드 길이는 16 내지 40개의 뉴클레오티드이다.
- [0031] 일부 실시양태에서, N<sub>6</sub>은 1개의 뉴클레오티드이고, 예를 들면 N<sub>6</sub>은 T 또는 A일 수 있다. 일부 실시양태에서, N<sub>7</sub>은 5개의 뉴클레오티드이고, 예를 들면, N<sub>7</sub>은 5개의 피리미딘 또는 TTTTG일 수 있다.
- [0032] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 하기 구조를 가질 수 있다:
- 5' T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*G\*A\*C\_G\*T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\*T\*T 3' (서열 : 313) 또는  
5' T\*C\_G\*A\*C\_G\*T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\*T\*T 3' (서열 : 314).
- [0033]
- [0034] 본 발명의 다른 측면에 따라, 구조 5'T\*CGCGN<sub>8</sub>CGCGC\*GN<sub>9</sub>3' (서열 315)을 갖는 올리고뉴클레오티드를 제공한다. N<sub>8</sub> 길이는 4 내지 10개의 뉴클레오티드이고, N<sub>8</sub>은 1개 이상의 C\_G 모티프를 포함한다. N<sub>9</sub> 길이는 0 내지 3개의 뉴클레오티드이다. 올리고뉴클레오티드 길이는 15 내지 40개의 뉴클레오티드이다.
- [0035] 일부 실시양태에서, N<sub>8</sub>은 2개 또는 3개 이상의 CG 모티프를 포함한다. 다른 실시양태에서, N<sub>8</sub>은 PuCGPyPyCG 또는 PuCGPyPyCGCG이다. 임의로 N<sub>8</sub>은 ACGTTCG이다. N<sub>9</sub>는 1개 이상의 CG 모티프, 예컨대 CCG를 포함할 수 있다.
- [0036] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드 하기 구조를 가진다:
- 5' T\*C\_G\*C\_G\*A\*A\*C\_G\*T\*T\*C\_G\*G\*C\*G\*C\_G\*C\*G\*C\*G 3' (서열 : 316)  
또는  
5' T\*C\*G\*C\*G\*A\*A\*C\_G\*T\*T\*C\*G\*C\*G\*C\_G\*C\*G\*C\*G 3' (서열 : 317).
- [0037]
- [0038] 또다른 측면에서, 화학식 5'T\*T\*GX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>TGX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>T\*T\*T\*N<sub>10</sub>T\*T\*T\*T\*T3' (서열 318)을 갖는 올리고뉴클레오티드를 제공한다. N<sub>10</sub> 길이는 4 내지 8개의 뉴클레오티드이고, N<sub>10</sub>은 1개 이상의 C\_G 모티프를 포함한다. X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub> 및 X<sub>4</sub>는 독립적으로 C 또는 G이다. 올리고뉴클레오티드 길이는 24 내지 40개의 뉴클레오티드이다.
- [0039] 일부 실시양태에서, N<sub>10</sub>은 2개 또는 3개 이상의 CG 모티프를 포함한다. 다른 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는
- 5' T\*T\*G\*C\_G\*T\*G\*C\_G\*T\*T\*T\*G\*A\*C\_G\*T\*T\*T\*T\*T 3' (서열 : 319) 또는  
5' T\*T\*G\*G\_C\*T\*G\*G\_C\*T\*T\*T\*G\*A\*C\_G\*T\*T\*T\*T\*T 3' (서열 : 320).
- [0040]
- [0041] 구조 중 하나를 가진다.
- [0042] 다른 실시양태에서, , 올리고뉴클레오티드는 하기 구조를 가진다:
- [0043] 5' T\*C\*G\*C\_G\*A\*C\*G\*T\*T\*C\_G\*G\*C\*G\*C\_G\*C\*G\*C\*G 3' (서열 : 321).

[0044] 일부 측면에서, ODN은 하기 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드이다.

CGTCGTTTTGACGTTTTGTCGTT ( 서열 : 333),  
 GTCGTTTTGACGTTTTGTCGTT ( 서열 : 334),  
 TCGTTTTGACGTTTTGTCGTT ( 서열 : 335), CGTTTTGACGTTTTGTCGTT  
 ( 서열 : 336), GTTTGACGTTTTGTCGTT ( 서열 : 337),  
 TTTTGACGTTTTGTCGTT ( 서열 : 338), TTTGACGTTTTGTCGTT ( 서열 :  
 339), TTGACGTTTTGTCGTT ( 서열 : 340), TGACGTTTTGTCGTT ( 서열 :  
 341), GACGTTTTGTCGTT ( 서열 : 342), ACGTTTTGTCGTT ( 서열 :  
 343), GTTTTGTCGTT ( 서열 : 344), GTTTTGTCGTT ( 서열 : 345),  
 TTTTGTCGTT ( 서열 : 346), TTTGTCGTT, TTGTCGTT,  
 TCGTCGTTTTGACGTTTTGTCGTT ( 서열 : 347),  
 TCGTCGTTTTGACGTTTTGTCG ( 서열 : 348),  
 TCGTCGTTTTGACGTTTTGTC ( 서열 : 349), TCGTCGTTTTGACGTTTTGTT  
 ( 서열 : 350), TCGTCGTTTTGACGTTTTG ( 서열 : 351),  
 TCGTCGTTTTGACGTTTTT ( 서열 : 352), TCGTCGTTTTGACGTTTT ( 서열 :  
 353), TCGTCGTTTTGACGTT ( 서열 : 354), TCGTCGTTTTGACGTT ( 서열 :  
 355), TCGTCGTTTTGACG ( 서열 : 356), TCGTCGTTTTGAC ( 서열 :  
 357), TCGTCGTTTTGA ( 서열 : 358), TCGTCGTTTTG ( 서열 : 359),  
 TCGTCGTTTT ( 서열 : 360), TCGTCGTTT, TCGTCGTT,  
 CGTCGTTTTGACGTTTTGTCGTT ( 서열 : 361),  
 GTCGTTTTGACGTTTTGTCG ( 서열 : 362), TCGTTTTGACGTTTTGTC ( 서열 :  
 363), CGTTTTGACGTTTTGT ( 서열 : 364), GTTTTTGACGTTTTG  
 ( 서열 : 365), TTTTGACGTTTT ( 서열 : 366), TTTGACGTTT ( 서열 :  
 367), 및 TTGACGTT.

[0045]

[0046] 또다른 측면에서, 본 발명은 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기, 및 4개의 T 뉴클레오티드를 갖는 하나 이상의 YZ 디뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 Y가 피리미딘 또는 변형된 피리미딘 이고, Z가 구아노신 또는 변형된 구아노신이고, 올리고뉴클레오티드가 하나 이상의 안정화된 인터뉴클레오티드 연결기를 포함하는, 8머 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드이다.

[0047] Y는 메틸화되지 않은 C일 수 있다. Z는 구아노신일 수 있다. 일부 실시양태에서, Y는 5-메틸 시토신, 5-메틸-이소시토신, 5-히드록시-시토신, 5-할로게노 시토신, 우라실, N4-에틸-시토신, 5-플루오로-우라실 및 수소로 이루어진 군으로부터 선택되는 시토신 또는 변형된 시토신 염기이다. 다른 실시양태에서, Z는 7-테아자구아닌, 7-테아자-7-치환된 구아닌 (예컨대, 7-테아자-7-(C2-C6) 알킬닐구아닌), 7-테아자-8-치환된 구아닌, 히포크산틴, 2,6-디아미노퓨린, 2-아미노퓨린, 퓨린, 8-치환된 구아닌, 예컨대 8-히드록시구아닌, 및 6-티오구아닌, 2-아미노퓨린, 및 수소로 이루어진 군으로부터 선택되는 구아닌 또는 변형된 구아닌 염기이다.

[0048] 일부 실시양태에서, 8머 서열은 TTTT 모티프를 포함한다. 다른 실시양태에서, 8머 서열은 2개의 YZ 디뉴클레오티드를 포함한다. 임의로 YZ 디뉴클레오티드는 모두 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기를 가진다.

[0049] 일부 실시양태에서, 8머 서열은

T\*C-G\*T\*C-G\*T\*T, C-G\*T\*C-G\*T\*T\*T, G\*T\*C-G\*T\*T\*T\*T, T\*C-G\*T\*T\*T\*T\*G, C-G\*T\*T\*T\*T\*G\*A, T\*T\*T\*T\*G\*A\*C-G, T\*T\*T\*G\*A\*C-G\*T, T\*T\*G\*A\*C-G\*T\*T, T\*G\*A\*C-G\*T\*T\*T, G\*A\*C-G\*T\*T\*T\*T, A\*C-G\*T\*T\*T\*G, C-G\*T\*T\*T\*T\*G\*T, T\*T\*T\*T\*G\*T\*C-G, T\*T\*T\*G\*T\*C-G\*T, G\*T\*T\*T\*G\*T\*C, 및 T\*T\*G\*T\*C-G\*T\*T,

[0050]

[0051] (여기서, \*는 안정화된 인터뉴클레오티드 연결기의 존재를 나타내고, \_은 포스포디에스테르 인터뉴클레오티드 연결기의 존재를 나타냄)로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0052] 다른 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드 길이는 8 내지 40개의 뉴클레오티드이다.

[0053] 포스포디에스테르-유사 연결기는 보라노스포네이트 또는 부분입체이성질체적으로 순수한 Rp 포스포로티오에이트일 수 있다. 임의로 안정화된 인터뉴클레오티드 연결기는 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 메틸포스포네이트, 메틸포스포로티오에이트 또는 이들의 임의의 조합물일 수 있다.

- [0054] 올리고뉴클레오티드는 1 또는 2개의 접근가능 5'말단을 갖는 3'-3'연결기를 가질 수 있다. 일부 바람직한 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 2개의 접근가능 5'말단을 가지며, 이들 각각이 5'TCG이다.
- [0055] 본 발명의 또다른 측면에서, 5'TCGTCGTTTTGACGTTTTGTCGTT3' (서열 368)을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 제공한다. 1개 이상의 CG 디뉴클레오티드는 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기를 가지고, 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 안정화된 인터뉴클레오티드 연결기를 포함한다.
- [0056] 다른 측면에서, 본 발명은 하기 식의 서열을 포함하고, 하나 이상의 안정화된 인터뉴클레오티드 연결기를 포함하는 올리고뉴클레오티드이다.
- [0057] 5'GNC 3'
- [0058] 식 중,
- [0059] N 길이는 4 내지 10개의 뉴클레오티드의 핵산 서열이고,
- [0060] N은 50% 이상이 T이고, CG 디뉴클레오티드를 포함하지 않는다.
- [0061] 일 실시양태에서, N은 TTTT 모티프를 포함한다. 다른 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 G\*T\*T\*T\*T\*G\*T\*C 및 G\*T\*T\*T\*T\*G\*A\*C (여기서, \*는 안정화된 인터뉴클레오티드 연결기의 존재를 나타냄)로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0062] 또다른 측면에서, 본 발명은 하나 이상의 내부 피리미딘-퓨린 (YZ) 디뉴클레오티드 및 임의로 피리미딘-구아노신 (YG) 디뉴클레오티드 및 키메라 백본을 가지며, 여기서 상기 하나 이상의 내부 YZ 디뉴클레오티드가 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기를 가지고, 임의로 각각의 추가 내부 YZ 디뉴클레오티드가 포스포디에스테르, 포스포디에스테르-유사 또는 안정화된 인터뉴클레오티드 연결기를 가지고, 모든 다른 인터뉴클레오티드 연결기가 안정화된, 면역자극 핵산 분자를 제공한다. 일 실시양태에서, 면역자극 핵산은 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기를 각각 갖는 다수의 내부 YZ 디뉴클레오티드를 포함한다. 일 실시양태에서, 모든 내부 YZ 디뉴클레오티드는 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기를 가진다.
- [0063] 일 실시양태에서, 면역자극 핵산 분자는

\*A\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T( 서열 :

- 1), G\*C\_G\*T\*C\_G\*A\*A\*C\_G\*T\*C\_G\*A\*A\_C\_G\*C( 서열 : 2),
- G\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\*C\_G\*T\*C\_G\*C( 서열 : 3),
- T\*C\*C\*A\*T\_G\*A\*A\_C\_G\*T\*T\*C\*C\*T\_G\*A\*T\*G\*C( 서열 : 4),
- T\*C\*G\*T\*C\*G\*T\*T\*T\*T\*C\*G\*T\*C\_G\*T\*T( 서열 : 5),
- T\*C\*G\*T\*C\*G\*T\*T\*T\*T\*C\_G\*G\*C\_G\*G\*C\_C\_G\*C\*C\*G( 서열 : 6),
- T\*C\*G\*T\*C\*G\*T\*T\*T\*T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T( 서열 : 7),
- T\*C\*G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T( 서열 : 8),
- T\*C\*G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\*C\*G\*T\*C\*G\*T\*T( 서열 : 9),
- T\*C\*G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\*C\*G\*T\*C\_G\*T\*T( 서열 : 10),
- T\*C\*G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\*C\_G\*T\*C\*G\*T\*T( 서열 : 11),

[0064]

T\*C\_7\*T\*C\_7\*T\*T\*T\*T\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\_G\*T\*C\_G\*T\*T( 서열 : 12),  
T\*C\_7\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\*T\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\_G\*T\*C\_7\*T\*T( 서열 : 13),  
T\*C\_G\*C\*C\_G\*T\*T\*T\*T\*T\_C\_G\*G\*C\_G\*G\*C\*C\_G\*C\*C\*G( 서열 : 14),  
T\*C\_G\*T\*C\*G\*T\*T\*T\*T\*A\*C\*G\*A\*C\*G\*T\*C\*G\*C\*G( 서열 : 15),  
T\*C\_G\*T\*C\*G\*T\*T\*T\*T\*A\*C\*G\*A\*C\*G\*T\*C\*G\*T\*G( 서열 : 16),  
T\*C\_G\*T\*C\*G\*T\*T\*T\*T\*A\*C\*G\*G\*C\*G\*C\*G\*C\*G\*C\*G( 서열 : 17),  
T\*C\_G\*T\*C\*G\*T\*T\*T\*T\*C\*G\*G\*C\*G\*C\*G\*C\*G\*C\*G( 서열 : 21),  
T\*C\_G\*T\*C\*G\*T\*T\*T\*T\*C\*G\*T\*C\*G\*T\*T( 서열 : 22),  
T\*C\_G\*T\*C\*G\*T\*T\*T\*T\*C\*G\*T\*C\_G\*T\*T( 서열 : 23),  
T\*C\_G\*T\*C\*G\*T\*T\*T\*T\_C\_G\*T\*C\*G\*T\*T( 서열 : 24),  
T\*C\_G\*T\*C\*G\*T\*T\*T\*T\*G\*C\*G\*A\*C\*G\*T\*C\*G\*C\*G( 서열 : 25),  
T\*C\_G\*T\*C\*G\*T\*T\*T\*T\*T\*C\*G\*A\*C\*G\*T\*C\*G\*A\*G( 서열 : 26),  
T\*C\_G\*T\*C\*G\*T\*T\*T\*T\*T\*C\*G\*A\*C\*G\*T\*C\*G\*C\*G( 서열 : 27),  
T\*C\_G\*T\*C\_7\*T\*T\*T\*T\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\_7\*T\*C\_G\*T\*T( 서열 : 28),  
T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*C\_G\*A\*C\*G\*T\*T( 서열 : 29),  
T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*C\_G\*A\*C\_G\*T\*T\*T\*T\*G\*T\*T\_C\_G\*T\*T( 서열 : 30),  
T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*C\_G\*T\*C\_G\*A\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*C\_G\*T\*C\*G(SEQ  
ID NO:31), T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*C\_G\*T\*C\_G\*A\*T( 서열 : 32),  
T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*C\_G\*T\*C\_G\*A\*T\*T( 서열 : 33),  
T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*C\_G\*T\*C\_G\*T( 서열 : 34),  
T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T( 서열 : 35),  
T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T( 서열 : 36),  
T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\*T\*T( 서열 : 37),  
T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*G\*T\*C\*G\*T\*C\*G\*G\*C\*G\*G\*C\*G\*C\*G( 서열 :  
38), T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\*C\*G\*G\*C\*G\*G\*C\*G\*C\*G( 서열 :  
39), T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\*C\*G\*G\*C\*G\*G\*C\*G\*C\*G( 서열 :  
40), T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\*C\*G\*T\*C\*G\*T\*T( 서열 : 41),  
T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\*C\_G\*G\*C\_G\*C\_G\*C\*G( 서열 : 42),  
T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\*C\_G\*G\*C\_G\*G\*C\*G\*C\*G( 서열 : 43),  
T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\*C\_G\*T\*C\_G\*T( 서열 : 44),  
T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T( 서열 : 45),  
T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\*C\_G\*T\*T\_G\*T\*T( 서열 : 46),

[0065]

T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T( 서열 : 47),  
 T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\*T\*T\*T\*T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T( 서열 : 48),  
 T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\*T\_G\*T\*C\_G\*T\*T( 서열 : 49),  
 T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\*T\_G\*T\*T\_G\*T\*T( 서열 : 50),  
 T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\_7\*T\*C\_7\*T\*T\*T\*T\_G\*T\*C\_G\*T\*T( 서열 : 51),  
 T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\_G\*A\*C\_G\*T\*T( 서열 : 52),  
 T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\_T\_G\*A\*C\_G\*T\*T\*T( 서열 : 53),  
 T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\_T\_G\*A\*C\_G\*T\*T\*T\*T\*G\*T\*C\*G\*T\*T( 서열 : 54),  
 T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\_T\_G\*A\*C\_G\*T\*T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\*T\*T( 서열 : 55),  
 T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\_T\_G\*T\*C\_G\*T\*T( 서열 : 56),  
 T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\_T\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\*T\*T( 서열 : 241),  
 T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\_T\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\_T\_7\*T\*C\_7\*T\*T( 서열 : 58),  
 T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\_T\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\_T\_G\*T\*C\_G\*T\*T( 서열 : 59),  
 T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\_U\_G\*T\*C\_G\*T\*T( 서열 : 60),  
 T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\_U\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\_T\_G\*T\*C\_G\*T\*T( 서열 : 61),  
 T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\_T\_G\*C\_G\*T\*C\_G\*T( 서열 : 62),  
 T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\_T\_G\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T( 서열 : 63),  
 T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\_T\_G\*T\*C\_G\*T( 서열 : 64),  
 T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\_T\_G\*T\*C\_G\*T\*T( 서열 : 65),  
 T\*C\_G\*T\*C\_G\*U\*U\*U\*C\_G\*T\*C\_G\*U\*U\*U\_G\*T\*C\_G\*T\*T( 서열 : 66),  
 T\*C\_G\*T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\*T\*T\*T( 서열 : 67),  
 T\*C\_G\*T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\*T\*T( 서열 : 68),  
 T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\*T\*T\*T\*T\*C\_G\*T\*T\*T( 서열 : 69),  
 T\*C\_G\*T\*T\_G\*T\*T\*T\*T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T( 서열 : 70),  
 T\*C\_G\*T\*T\_G\*T\*T\*T\*T\*C\_G\*T\*T\_G\*T\*T( 서열 : 71),  
 T\*C\_G\*T\*T\_G\*T\*T\*T\*T\_T\_G\*T\*C\_G\*T\*T( 서열 : 72),  
 T\*C\_G\*T\*T\_G\*T\*T\*T\*T\_T\_G\*T\*T\_G\*T\*T( 서열 : 73),  
 T\*C\_G\*U\*C\_G\*T\*T\*T\_T\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\_U\_G\*U\*C\_G\*T\*T( 서열 : 74),  
 T\*G\*T\*C\_G\*T\*T\*G\*T\*C\_G\*T\*T\*G\*T\*C\_G\*T\*T\*G\*T\*C\_G\*T\*T( 서열 : 75),  
 T\*G\*T\*C\_G\*T\*T\*G\*T\*C\_G\*T\*T\_G\*T\*C\_G\*T\*T\_G\*T\*C\_G\*T\*T( 서열 : 76),  
 T\*G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T( 서열 : 77),  
 T\*G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\*T\*T( 서열 : 78),

[0066]

T\*T\*A\*G\*T\*T\*C\_G\*T\*A\*G\*T\*T\*C\*T\*T\*C\_G\*T\*T( 서열 : 79),  
 T\*T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T( 서열 : 80),  
 T\*T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T( 서열 : 81),  
 T\*T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\_T\_G\*T\*C\_G\*T\*T( 서열 : 82),  
 T\*T\*C\_G\*T\*T\*C\*T\*A\*G\*T\*T\*C\_G\*T\*A\*G\*T\*T( 서열 : 83),  
 T\*T\*T\*C\_G\*A\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T( 서열 : 84),  
 T\*T\*T\*T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\*T\*C\_G\*T( 서열 : 85),  
 T\*T\*T\*T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T( 서열 : 86),  
 T\*T\*T\*T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\*T\*T\*T\*T\*C\_G\*T\*C\_G\*T( 서열 : 87),  
 T\*T\*T\*T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\*T\*T\*T\*T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T( 서열 :  
 88), T\*T\*T\*T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\_T\_G\*T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T( 서열 :  
 89), T\*T\*T\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\*T( 서열 : 90),  
 T\*T\*T\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\*T\*T\*T( 서열 : 91),  
 T\*T\*T\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\*T\*T\*T\*T\*C\_G\*T( 서열 : 92),  
 T\*T\*T\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\*T\*T\*T\*T\*C\_G\*T\*T\*T( 서열 : 93),  
 T\*T\*T\*T\*C\_G\_T\*T\*T\_T\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T( 서열 : 94),  
 T\*T\*T\*T\*T\*T\*T\*T\*T\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\*T( 서열 : 95),  
 T\*T\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T( 서열 : 96),  
 T\*T\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\*C\_G\*T\*T\_G\*T\*T( 서열 : 97),  
 T\*T\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\_G\*T\*C\_G\*T\*T( 서열 : 98), 및  
 T\*T\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\_G\*T\*T\_G\*T\*T( 서열 : 99),

[0067]

[0068]

(여기서, \*는 포스포리티오에이트를 나타내고, \_은 포스포디에스테르를 나타내고, U는 2'-데옥시우라실을 나타내고, 7은 7-테아자구아닌을 나타냄)로 이루어진 군으로부터 선택된다.

- [0069] 일 실시양태에서, 면역자극 핵산 분자는
- T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*G\*T\*C\_G\*T\*T( 서열: 100),  
 T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\_G\*T\*C\_G\*T\*T( 서열: 101),  
 T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\_G\*T\*C\_G\*T\*T( 서열: 102),  
 T\*G\*T\*C\_G\*T\*T\*G\*T\*C\_G\*T\*T\_G\*T\*C\_G\*T\*T\_G\*T\*C\_G\*T\*T( 서열:  
 103), 및 T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\*C\*G\*G\*C\*G\*G\*C\*G\*G\*C\*G( 서열:  
 104),
- [0070]
- [0071] (여기서, \*는 포스포로티오에이트를 나타내고, \_은 포스포디에스테르를 나타냄)로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0072] 또다른 측면에서, 본 발명은 키메라 백본 및 하나 이상의 서열 N<sub>1</sub>YGN<sub>2</sub>를 포함하며, 여기서
- [0073] 서열 N<sub>1</sub>YGN<sub>2</sub> 각각에 대하여 독립적으로 YG는 내부 피리미딘-구아노신 (YG) 디뉴클레오티드이고, N<sub>1</sub> 및 N<sub>2</sub>는 각각 서로 독립적으로 임의의 뉴클레오티드이고,
- [0074] 하나 이상의 서열 N<sub>1</sub>YGN<sub>2</sub> 및 임의로 각각의 추가 서열 N<sub>1</sub>YGN<sub>2</sub>의 경우에,
- [0075] YG 디뉴클레오티드가 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기를 가지고,
- [0076] N<sub>1</sub>이 내부 뉴클레오티드인 경우에, N<sub>1</sub> 및 Y가 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기에 의해 연결되거나,
- [0077] N<sub>2</sub>가 내부 뉴클레오티드인 경우에, G 및 N<sub>2</sub>가 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기에 의해 연결되거나, 또는
- [0078] N<sub>1</sub>이 내부 뉴클레오티드인 경우에, N<sub>1</sub> 및 Y가 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기에 의해 연결되고, N<sub>2</sub>가 내부 뉴클레오티드인 경우에, G 및 N<sub>2</sub>가 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기에 의해 연결되며, 여기서 모든 다른 인터뉴클레오티드 연결기가 안정화된, 면역자극 핵산 분자를 제공한다.
- [0079] 일 실시양태에서, 면역자극 핵산은
- [0080] 다수의 서열 N<sub>1</sub>YGN<sub>2</sub>를 포함하며, 여기서
- [0081] 서열 N<sub>1</sub>YGN<sub>2</sub> 각각의 경우에,
- [0082] YG 디뉴클레오티드가 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기를 가지고,
- [0083] N<sub>1</sub>이 내부 뉴클레오티드인 경우에, N<sub>1</sub> 및 Y가 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기에 의해 연결되거나,
- [0084] N<sub>2</sub>가 내부 뉴클레오티드인 경우에, G 및 N<sub>2</sub>가 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기에 의해 연결되거나, 또는
- [0085] N<sub>1</sub>이 내부 뉴클레오티드인 경우에, N<sub>1</sub> 및 Y가 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기에 의해 연결되고, N<sub>2</sub>가 내부 뉴클레오티드인 경우에, G 및 N<sub>2</sub>가 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기에 의해 연결된다.

[0086] 일 실시양태에서, 면역자극 핵산 분자는

- T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T ( 서열 : 105),
- T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\*T\*T ( 서열 : 106),
- T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T ( 서열 : 107),
- T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\*T\*T ( 서열 : 108),
- T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T ( 서열 : 109),
- T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\*T\*T ( 서열 : 110),
- T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T ( 서열 : 111),
- T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\*T\*T ( 서열 : 112),

[0087]

- T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\*T\*T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T ( 서열 : 113),
- T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\*T\*T ( 서열 : 114),
- T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T ( 서열 : 115),
- T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\*T\*T ( 서열 : 116),
- T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T ( 서열 : 117),
- T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\*T\*T ( 서열 : 118),
- T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T ( 서열 : 119),
- T\*C\_G\*T\*C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\*T\*T ( 서열 : 120),
- T\*C\_G\*T\*C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T ( 서열 : 121),
- T\*C\_G\*T\*C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T ( 서열 : 122),
- T\*C\_G\*T\*C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T ( 서열 : 123),
- T\*C\_G\*T\*C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T ( 서열 : 124),
- T\*C\_G\*T\*C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T ( 서열 : 125),
- T\*C\_G\*T\*C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T ( 서열 : 126),
- T\*C\_G\*T\*C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T ( 서열 : 127),
- T\*C\_G\*T\*C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T ( 서열 : 128),
- T\*C\_G\*T\*C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T ( 서열 : 129),
- T\*C\_G\*T\*C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T ( 서열 : 130),
- T\*C\_G\*T\*C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T ( 서열 : 131),
- T\*C\_G\*T\*C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T ( 서열 : 132),
- T\*C\_G\*T\*C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T ( 서열 : 133),
- T\*C\_G\*T\*C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T ( 서열 : 134),
- T\*C\_G\*T\*C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T ( 서열 : 135),
- T\*C\_G\*T\_C\_G\*T\*T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T ( 서열 : 136),
- T\*C\_G\*T\_C\_G\*T\*T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T ( 서열 : 137),
- T\*C\_G\*T\_C\_G\*T\*T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T ( 서열 : 138),
- T\*C\_G\*T\_C\_G\*T\*T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T ( 서열 : 139),
- T\*C\_G\*T\_C\_G\*T\*T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T ( 서열 : 140),
- T\*C\_G\*T\_C\_G\*T\*T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T ( 서열 : 141),
- T\*C\_G\*T\_C\_G\*T\*T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T ( 서열 : 142),
- T\*C\_G\*T\_C\_G\*T\*T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T ( 서열 : 143),
- T\*C\_G\*T\_C\_G\*T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T ( 서열 : 144),
- T\*C\_G\*T\_C\_G\*T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T ( 서열 : 145),
- T\*C\_G\*T\_C\_G\*T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T ( 서열 : 146),
- T\*C\_G\*T\_C\_G\*T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T ( 서열 : 147),

[0088]

T\*C\_G\*T\_C\_G\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\*T\*T( 서열 : 148),  
 T\*C\_G\*T\_C\_G\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T( 서열 : 149),  
 T\*C\_G\*T\_C\_G\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\*T\*T( 서열 : 150),  
 T\*C\_G\*T\_C\_G\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 151),  
 T\*C\_G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\*T\*T( 서열 : 152),  
 T\*C\_G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T( 서열 : 153),  
 T\*C\_G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 154),  
 T\*C\_G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 155),  
 T\*C\_G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T( 서열 : 156),  
 T\*C\_G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T( 서열 : 157),  
 T\*C\_G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 158),  
 T\*C\_G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 159),  
 T\*C\_G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T( 서열 : 160),  
 T\*C\_G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T( 서열 : 161),  
 T\*C\_G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 162),  
 T\*C\_G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 163),  
 T\*C\_G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T( 서열 : 164),  
 T\*C\_G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T( 서열 : 165),  
 T\*C\_G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 166),  
 T\*C\_G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 167),  
 T\*C\_G\_T\*C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T( 서열 : 168),  
 T\*C\_G\_T\*C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T( 서열 : 169),  
 T\*C\_G\_T\*C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 170),  
 T\*C\_G\_T\*C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 171),  
 T\*C\_G\_T\*C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T( 서열 : 172),  
 T\*C\_G\_T\*C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T( 서열 : 173),  
 T\*C\_G\_T\*C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 174),  
 T\*C\_G\_T\*C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 175),  
 T\*C\_G\_T\*C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T( 서열 : 176),  
 T\*C\_G\_T\*C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T( 서열 : 177),  
 T\*C\_G\_T\*C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 178),  
 T\*C\_G\_T\*C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 179),  
 T\*C\_G\_T\*C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T( 서열 : 180),  
 T\*C\_G\_T\*C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\_T\*T( 서열 : 181),  
 T\*C\_G\_T\*C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 182),

[0089]

T\*C\_G\_T\*C\_G\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 183),  
 T\*C\_G\_T\*C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 184),  
 T\*C\_G\_T\*C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 185),  
 T\*C\_G\_T\*C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 186),  
 T\*C\_G\_T\*C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 187),  
 T\*C\_G\_T\*C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 188),  
 T\*C\_G\_T\*C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 189),  
 T\*C\_G\_T\*C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 190),  
 T\*C\_G\_T\*C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 191),  
 T\*C\_G\_T\*C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 192),  
 T\*C\_G\_T\*C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 193),  
 T\*C\_G\_T\*C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 194),  
 T\*C\_G\_T\*C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 195),  
 T\*C\_G\_T\*C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 196),  
 T\*C\_G\_T\*C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 197),  
 T\*C\_G\_T\*C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 198),  
 T\*C\_G\_T\*C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 199),  
 T\*C\_G\_T\_C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 200),  
 T\*C\_G\_T\_C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 201),  
 T\*C\_G\_T\_C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 202),  
 T\*C\_G\_T\_C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 203),  
 T\*C\_G\_T\_C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 204),  
 T\*C\_G\_T\_C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 205),  
 T\*C\_G\_T\_C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 206),  
 T\*C\_G\_T\_C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 207),  
 T\*C\_G\_T\_C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 208),  
 T\*C\_G\_T\_C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 209),  
 T\*C\_G\_T\_C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 210),  
 T\*C\_G\_T\_C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 211),  
 T\*C\_G\_T\_C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 212),  
 T\*C\_G\_T\_C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 213),  
 T\*C\_G\_T\_C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 214),  
 T\*C\_G\_T\_C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 215),  
 T\*C\_G\_T\_C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 216),  
 T\*C\_G\_T\_C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 217),

[0090]

T\*C\_G\_T\_C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 218),  
 T\*C\_G\_T\_C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 219),  
 T\*C\_G\_T\_C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 220),  
 T\*C\_G\_T\_C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 221),  
 T\*C\_G\_T\_C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 222),  
 T\*C\_G\_T\_C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 223),  
 T\*C\_G\_T\_C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 224),  
 T\*C\_G\_T\_C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 225),  
 T\*C\_G\_T\_C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 226),  
 T\*C\_G\_T\_C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 227),  
 T\*C\_G\_T\_C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 228),  
 T\*C\_G\_T\_C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 229),  
 T\*C\_G\_T\_C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 230), 및  
 T\*C\_G\_T\_C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 231),

[0091]

[0092]

(여기서, \*는 포스포로티오에이트를 나타내고, \_은 포스포디에스테르를 나타냄)로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0093]

일 실시양태에서, 면역자극 핵산 분자는

T\*C\_G\_T\*C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 232),  
 T\*C\_G\_T\_C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 : 233),  
 및 T\*C\_G\_T\_C\_G\_T\*T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\_C\_G\_T\*T( 서열 :  
 234),

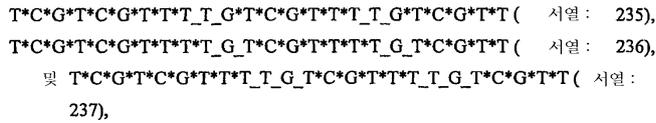
[0094]

[0095]

(여기서, \*는 포스포로티오에이트를 나타내고, \_은 포스포디에스테르를 나타냄)로 이루어진 군으로부터 선택된

다.

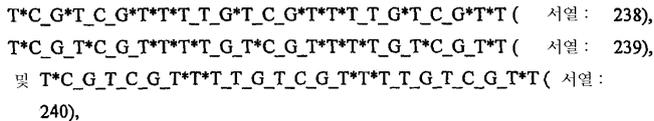
[0096] 일 실시양태에서, 면역자극 핵산 분자는



[0097]

[0098] (여기서, \*는 포스포로티오에이트를 나타내고, \_은 포스포디에스테르를 나타냄)로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0099] 일 실시양태에서, 면역자극 핵산 분자는



[0100]

[0101] (여기서, \*는 포스포로티오에이트를 나타내고, \_은 포스포디에스테르를 나타냄)로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0102] 일 실시양태에서, 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기를 갖는 하나 이상의 내부 YG 디뉴클레오티드는 CG이다. 일 실시양태에서, 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기를 갖는 하나 이상의 내부 YG 디뉴클레오티드는 TG이다.

[0103] 일 실시양태에서, 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기는 포스포디에스테르이다. 일 실시양태에서, 포스포디에스테르-유사 연결기는 보라노스포네이트 또는 부분입체이성질체적으로 순수한 Rp 포스포로티오에이트이다.

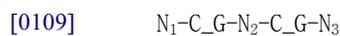
[0104] 일 실시양태에서, 안정화된 인터뉴클레오티드 연결기는 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 메틸포스포네이트, 메틸포스포로티오에이트 및 이들의 임의의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일 실시양태에서, 안정화된 인터뉴클레오티드 연결기는 포스포로티오에이트이다.

[0105] 일 실시양태에서, 면역자극 핵산 분자는 B-클래스 면역자극 핵산 분자이다. 일 실시양태에서, 면역자극 핵산 분자는 C-클래스 면역자극 핵산 분자이다.

[0106] 일 실시양태에서, 면역자극 핵산 분자 길이는 4 내지 100개의 뉴클레오티드이다. 일 실시양태에서, 면역자극 핵산 분자 길이는 6 내지 40개의 뉴클레오티드이다. 일 실시양태에서, 면역자극 핵산 분자 길이는 6 내지 19개의 뉴클레오티드이다.

[0107] 일 실시양태에서, 면역자극 핵산 분자는 안티센스 올리고뉴클레오티드, 삼중-나선-형성 올리고뉴클레오티드 또는 리보자임이 아니다.

[0108] 또다른 측면에서, 본 발명은 하기 식의 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 제공한다.



[0110] 식 중,

[0111]  $N_1$  및  $N_3$  길이는 각각 독립적으로 1 내지 20개의 뉴클레오티드의 핵산 서열이고,

[0112] \_은 내부 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기를 나타내고,

[0113]  $N_2$  길이는 독립적으로 0 내지 20개의 뉴클레오티드의 핵산 서열이고,

[0114]  $G\text{-N}_2\text{-C}$ 는 1 또는 2 개의 안정화된 연결기를 포함한다.

[0115] 또다른 측면에서, 본 발명은 하기 식의 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 제공한다.



- [0117] 식 중,
- [0118]  $N_1$  및  $N_3$  길이는 각각 독립적으로 1 내지 20개의 뉴클레오타이드의 핵산 서열이고,
- [0119] \_은 내부 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오타이드 연결기를 나타내고,
- [0120]  $N_2$  길이는 독립적으로 핵산 서열 4 내지 20개의 뉴클레오타이드이고,
- [0121]  $G-N_2-C$ 는 5 이상의 안정화된 연결기를 포함한다.
- [0122] 또다른 측면에서, 본 발명은 하기 식의 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 제공한다.
- [0123]  $N_1-C-G-N_2-C-G-N_3$
- [0124] 식 중,
- [0125]  $N_1$ ,  $N_2$  및  $N_3$  길이는 각각 독립적으로 0 내지 20개의 뉴클레오타이드의 핵산 서열이고,
- [0126] \_은 내부 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오타이드 연결기를 나타내고,
- [0127] 올리고뉴클레오타이드는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 삼중-나선-형성 올리고뉴클레오타이드 또는 리보자임이 아니다.
- [0128] 또다른 측면에서, 본 발명은 하기 식의 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 제공한다.
- [0129]  $X_1-N_1-(GTCGTT)_n-N_2-X_2$  (서열 18 내지 20 및 57)
- [0130] 식 중,
- [0131]  $N_1$  및  $N_2$  길이는 각각 독립적으로 0 내지 20개의 뉴클레오타이드의 핵산 서열이고,
- [0132]  $n$ 은 2 또는 4 내지 6이고,
- [0133]  $X_1$  및  $X_2$ 는 각각 독립적으로 3 내지 10개의 뉴클레오타이드의 포스포로티오에이트 인터뉴클레오타이드 연결기를 갖는 핵산 서열이고,
- [0134]  $N_1-(GTCGTT)_n-N_2$ 는 하나 이상의 포스포디에스테르 인터뉴클레오타이드 연결기를 포함하고,
- [0135] 올리고뉴클레오타이드의 3' 및 5' 뉴클레오타이드는 폴리-G, 폴리-A, 폴리-T, 또는 폴리-C 서열을 포함하지 않는다.
- [0136] 일 실시양태에서, 핵산은 데옥시리보스 또는 리보스를 포함하는 백분을 가진다.
- [0137] 일 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 데옥시리보스 또는 리보스를 포함하는 백분을 가진다.
- [0138] 일 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 제약상 허용되는 담체를 임의로 포함하는 제약 조성물 중에 있다.
- [0139] 일 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 아주반트 또는 사이토카인을 추가로 포함한다.
- [0140] 일 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 항원을 포함하며, 여기서 올리고뉴클레오타이드는 백신 아주반트이다.
- [0141] 일 실시양태에서, 항원은 바이러스 항원, 박테리아 항원, 진균 항원, 기생충 항원, 및 종양 항원으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일 실시양태에서, 항원은 핵산 벡터에 의해 코딩된다. 일 실시양태에서, 항원은 펩티드 항원이다. 일 실시양태에서, 항원은 올리고뉴클레오타이드 또는 면역자극 핵산 분자에 공유결합으로 연결되어 있다. 또다른 실시양태에서, 항원은 올리고뉴클레오타이드 또는 면역자극 핵산 분자에 공유결합으로 연결되어 있지 않다.
- [0142] 또다른 측면에서, 본 발명은 시험 면역자극 핵산 분자의 상대적 효능 또는 독성을 확인하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 참조 서열, 안정화된 백본 및 참조 면역자극 효능 또는 독성을 갖는 참조 면역자극 핵산을 선별하는 것; 참조 서열 중에 하나 이상의 내부 YN 디뉴클레오타이드 (여기서, Y는 피리미딘이고, N은 임의의 뉴클레오타이드임)의 Y와 N 사이에 안정화된 연결기 대신에 참조 서열인 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 연결기를 가지고, 시험 면역자극 효능 또는 독성을 갖는 시험 면역자극 핵산을 선별하는 것; 및 시험 면역자극 핵산 분자의 상대적 효능 또는 독성을 확인하기 위해 시험 면역자극 효능 또는 독성 대 참조 면역자극 효능 또는

독성을 비교하는 것을 포함한다.

- [0143] 일 실시양태에서, 시험 면역자극 핵산은 참조 면역자극 핵산보다 TLR9 신호전달 활성의 더 효능있는 유도자이다.
- [0144] 일 실시양태에서, 시험 면역자극 핵산은 참조 면역자극 핵산보다 인터페론 1형의 더 효능있는 유도자이다.
- [0145] 일 실시양태에서, 시험 면역자극 핵산은 참조 면역자극 핵산보다 IP-10의 더 효능있는 유도자이다.
- [0146] 일 실시양태에서, YN은 YG이다. 일 실시양태에서, 하나 이상의 내부 YG 디뉴클레오티드는 CG이다. 일 실시양태에서, 하나 이상의 내부 YG 디뉴클레오티드는 TG이다.
- [0147] 일 실시양태에서, 시험 면역자극 핵산은 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기를 각각 갖는 다수의 내부 YG 디뉴클레오티드를 포함한다. 일 실시양태에서, 하나 이상의 내부 YG 디뉴클레오티드는 모든 내부 YG 디뉴클레오티드이다.
- [0148] 일 실시양태에서, 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 연결기는 포스포디에스테르이다. 일 실시양태에서, 포스포디에스테르-유사 연결기는 보라노포스포네이트 또는 부분입체이성질체적으로 순수한 Rp 포스포로티오에이트이다.
- [0149] 일 실시양태에서, 안정화된 백본은 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 메틸포스포네이트, 메틸포스포로티오에이트 및 이들의 임의의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 다수의 인터뉴클레오티드 연결기를 포함한다. 일 실시양태에서, 안정화된 백본은 다수의 포스포로티오에이트 인터뉴클레오티드 연결기를 포함한다.
- [0150] 일 실시양태에서, 참조 면역자극 핵산 분자는 B-클래스 면역자극 핵산 분자이다. 일 실시양태에서, 참조 면역자극 핵산 분자는 C-클래스 면역자극 핵산 분자이다.
- [0151] 일 실시양태에서, 참조 면역자극 핵산 분자 길이는 4 내지 100개의 뉴클레오티드이다. 일 실시양태에서, 참조 면역자극 핵산 분자 길이는 6 내지 40개의 뉴클레오티드이다. 일 실시양태에서, 참조 면역자극 핵산 분자 길이는 6 내지 19개의 뉴클레오티드이다.
- [0152] 또다른 측면에서, 본 발명은 길이가 20개의 뉴클레오티드보다 작은 안정화된 면역자극 핵산 분자를 디자인하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 길이가 6 내지 19개의 뉴클레오티드인 서열을 선별하는 것 (여기서, 상기 서열은 하나 이상의 내부 CG 디뉴클레오티드를 포함함); 하나 이상의 내부 CG 디뉴클레오티드의 C와 G 사이의 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 연결기를 선별하는 것; 각각의 추가 내부 CG 디뉴클레오티드의 C와 G 사이의 포스포디에스테르, 포스포디에스테르-유사 또는 안정화된 연결기를 독립적으로 선별하는 것; 및 모든 다른 인터뉴클레오티드 연결기에 대한 안정화된 연결기를 선별하는 것을 포함한다.
- [0153] 또다른 측면에서, 본 발명은 알레르기 또는 천식의 치료 또는 예방 방법이다. 상기 방법은 본원에 기재된 면역자극 CpG 올리고뉴클레오티드를 알레르기 또는 천식의 치료 또는 예방 유효량으로 대상체에게 투여함으로써 수행된다. 일 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 점막 표면에 투여된다. 다른 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 에어로졸 제형으로 투여된다. 임의로 올리고뉴클레오티드는 비내로 투여된다.
- [0154] 사이토카인 생성의 유도 방법은 본 발명의 또다른 측면에 따라 제공된다. 상기 방법은 본원에 기재된 면역자극 CpG 올리고뉴클레오티드를 IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, TNF, IFN- $\alpha$ , 케모킨 및 IFN- $\gamma$ 로 이루어진 군으로부터 선택되는 사이토카인의 유도 유효량으로 대상체에게 투여함으로써 수행된다.
- [0155] 또다른 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 CpG 면역자극 올리고뉴클레오티드를 항원 또는 기타 치료 화합물, 예컨대 항균제를 함께 포함하는 조성물이다. 항균제는 예를 들어, 항바이러스제, 항기생충제, 항박테리아제 또는 항진균제일 수 있다.
- [0156] 본원에 기재된 CpG 면역자극 올리고뉴클레오티드를 포함하는 서방형 디바이스 (device)의 조성물을 본 발명의 또다른 측면에 따라 제공한다.
- [0157] 조성물은 임의로 제약상 담체를 포함할 수 있고(거나) 전달 디바이스로 제제화될 수 있다. 일부 실시양태에서, 전달 디바이스는 양이온성 지질, 세포 투과 단백질 및 서방형 디바이스로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일 실시양태에서, 서방형 디바이스는 생분해성 중합체 또는 미세입자이다.
- [0158] 본 발명의 또다른 측면에 따라, 면역 반응의 자극 방법을 제공한다. 상기 방법은 CpG 면역자극 올리고뉴클레오티드를 대상체에서의 면역 반응의 유도 유효량으로 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 바람직하게는, CpG 면

역자극 올리고뉴클레오타이드는 경구, 국소, 서방형 디바이스로, 점막, 전신, 비경구 또는 근육내로 투여된다. CpG 면역자극 올리고뉴클레오타이드가 점막 표면으로 투여되는 경우에, 상기 올리고뉴클레오타이드는 점막 면역 반응 또는 전신 면역 반응의 유도 유효량으로 전달될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 점막 표면은 구강 표면, 비강 표면, 직장 표면, 질 표면 및 안구 표면으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0159] 일부 실시양태에서, 상기 방법은 상기 대상체를 항원에 노출시키는 것을 포함하며, 여기서 면역 반응은 항원-특이적 면역 반응이다. 일부 실시양태에서, 상기 항원은 종양 항원, 바이러스 항원, 박테리아 항원, 기생충 항원 및 펩티드 항원으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0160] CpG 면역자극 올리고뉴클레오타이드는 광범위한 면역 반응을 일으킬 수 있다. 예를 들어, 이들 CpG 면역자극 올리고뉴클레오타이드는 Th2 면역 반응을 Th1 면역 반응으로 바꾸는 데 사용할 수 있다. CpG 면역자극 올리고뉴클레오타이드는 면역 세포, 예컨대 림프구 (예컨대, B 및 T 세포), 수상 세포 및 NK 세포를 활성화시키는 데 사용할 수도 있다. 상기 활성화는 면역 세포를 대상체로부터 단리하고 CpG 면역자극 올리고뉴클레오타이드의 면역 세포를 활성화시키기 위해 유효한 양을 면역 세포와 접촉시키고 활성화된 면역 세포를 대상체에게 다시 투여함으로써 생체내, 시험관내 또는 생체외에서 수행할 수 있다. 일부 실시양태에서, 수상 세포는 암 항원을 발현한다. 상기 수상 세포는 생체외에서 암 항원에 노출시킬 수 있다.

[0161] CpG 면역자극 올리고뉴클레오타이드에 의해 일어나는 면역 반응은 사이토카인 생성, 예를 들어, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, TNF, IFN- $\alpha$ , 케모킨 및 IFN- $\gamma$ 의 생성을 유도할 수도 있다.

[0162] 또다른 실시양태에서, CpG 면역자극 올리고뉴클레오타이드는 암을 치료하는 데 유용하다. 또한, 본 발명의 다른 측면에 따라, CpG 면역자극 올리고뉴클레오타이드는 암이 발병될 위험이 있는 대상체에서 암을 예방하는 데 (예를 들어, 암이 발병될 위험을 감소시키는 데) 유용하다. 암은 담도암, 유방암, 자궁암, 용모암종, 결장암, 자궁내막암, 위암, 상피내 육종, 림프종, 간암, 폐암 (예컨대, 소세포 및 비소세포) 흑색종, 신경아종, 구강암, 난소암, 췌장암, 전립선암, 직장암, 육종, 갑상선암 및 신장암 뿐만 아니라 기타 암종 및 육종으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 몇몇 중요한 실시양태에서, 암은 골암, 뇌 및 중추신경계 (CNS) 암, 결합 조직 암, 식도암, 안구암, 호지킨 림프종, 후두암, 구강암, 피부암 및 정소암으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0163] CpG 면역자극 올리고뉴클레오타이드는 임의로 이들 CpG 면역자극 올리고뉴클레오타이드가 항암요법제와 함께 투여되는 경우에 암 치료법 (예를 들어, 항암요법)에 대한 암세포의 반응성을 증가시키는 데 사용할 수도 있다. 항암요법은 화학요법, 백신 (예를 들어, 시험관내에서 프라이밍된 수상 세포 백신 또는 암 항원 백신) 또는 항체 기재 요법일 수 있다. 상기 항체 기재 요법은 예를 들어, 암 세포의 세포 표면 항원에 대해 특이적인 항체를 투여하는 것을 포함할 수도 있으며, 여기서 면역 반응은 항원 의존성 세포독성 (ADCC)을 일으킨다. 일 실시양태에서, 항체는 리부탁신 (Ributaxin), 헤르셉틴 (Herceptin), 쿠아드라메트 (Quadramet), 파노렉스 (Panorex), IDEC-Y2B8, BEC2, C225, 온콜림 (Oncolym), SMART M195, ATRAGEN, 오바렉스 (Ovarex), 벅사르 (Bexxar), LDP-03, ior t6, MDX-210, MDX-11, MDX-22, OV103, 3622W94, 항-VEGF, 제나팩스 (Zenapax), MDX-220, MDX-447, MELIMMUNE-2, MELIMMUNE-1, CEACIDE, 프리타겟 (Pretarget), 노보Mab-G2, TNT, 글리오마브-H (Gliomab-H), GNI-250, EMD-72000, 림포사이드 (LymphoCide), CMA 676, 모노팜-C (Monopharm-C), 4B5, ior egf.r3, ior c5, BABS, 항-FLK-2, MDX-260, ANA Ab, SMART ID10 Ab, SMART ABL 364 Ab 및 ImmuRAIT-CEA로 이루어진 군으로부터 선택할 수 있다.

[0164] 따라서, 본 발명의 일부 측면에 따라, 암을 앓는 대상체 또는 암을 앓을 위험이 있는 대상체는 CpG 면역자극 올리고뉴클레오타이드 및 항암요법제를 투여받는다. 일부 실시양태에서, 항암요법제는 화학요법제, 면역요법제 및 암 백신으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0165] 암을 예방하거나 치료하기 위한 방법의 또다른 실시양태에서, 대상체에게 인터페론- $\alpha$ 를 추가로 투여할 수 있다.

[0166] 본 발명은, 한 측면에서, 대상체의 질환을 예방하기 위한 방법에 관한 것이다. 본 발명의 방법은 CpG 면역자극 올리고뉴클레오타이드를 정기적으로 대상체에게 투여하여 대상체의 질환을 예방하기 위한 면역계 반응을 촉진시키는 것을 포함한다. 본 발명의 예방 방법을 이용하여 예방하고자 하는 질환 또는 상태의 예에는 미생물 감염 (예를 들어, 성적으로 전달되는 질환), 및 식품 알레르기인 인한 과민성 쇼크가 포함된다.

[0167] 다른 측면에서, 본 발명은 선천성 면역 반응을 활성화시키기 위해 유효한 양의 CpG 면역자극 올리고뉴클레오타이드를 대상체에게 투여하여 선천성 면역 반응을 유도하는 방법이다.

[0168] 본 발명의 또 다른 측면에 따라, 바이러스 또는 레트로바이러스 감염을 치료하거나 예방하는 방법이 제공된다.

이 방법은 바이러스 또는 레트로바이러스 감염을 치료하거나 예방하기에 유효한 양의 본 발명의 조성물 중 임의의 조성물을 바이러스 또는 레트로바이러스에 감염되거나 감염될 위험이 있는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 감염은 간염 바이러스, 에컨대 간염 바이러스 B, 간염 바이러스 C, HIV, 헤르페스 바이러스 또는 파필로마바이러스에 의해 야기된다.

[0169] 본 발명의 또 다른 측면에 따라 박테리아 감염을 치료하거나 예방하는 방법이 제공된다. 이 방법은 박테리아 감염을 치료하거나 예방하기에 유효한 양의 본 발명의 조성물 중 임의의 조성물을 박테리아에 감염되거나 감염될 위험이 있는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 일 실시양태에서, 박테리아 감염은 세포내 박테리아에 기인한다.

[0170] 또 다른 측면에서, 본 발명은 기생충 감염을 치료하거나 예방하기에 유효한 양의 본 발명의 조성물 중 임의의 조성물을 기생충에 감염되었거나 감염될 위험이 있는 대상체에게 투여하여 기생충 감염을 치료하거나 예방하는 방법에 관한 것이다. 일 실시양태에서, 기생충 감염은 세포내 기생충에 기인한다. 또다른 실시양태에서, 기생충 감염은 비구충성 기생충에 기인한다.

[0171] 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이고, 다른 실시양태에서, 대상체는 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 칠면조, 염소, 어류, 원숭이, 닭, 래트, 마우스 및 양으로 이루어진 군으로부터 선택되는 비-인간 척추동물이다.

[0172] 일 측면에서, 본 발명은 TH1 면역 반응을 일으키기에 유효한 양의 본 발명의 임의의 조성물을 대상체에게 투여함으로써 TH1 면역 반응을 유도하는 방법에 관한 것이다.

[0173] 또다른 측면에서, 본 발명은 면역 반응 유도가 필요한 대상체에게 5'T\*C\*G\*T\*X<sub>1</sub>\*T\*3' (여기서, X<sub>1</sub>은 3 내지 30 개의 뉴클레오티드이고, \*는 안정화된 인터뉴클레오티드 연결기의 존재를 나타내고, 상기 올리고뉴클레오티드는 2 이상의 포스포디에스테르 인터뉴클레오티드 연결기를 포함함)의 유효량의 면역자극 올리고뉴클레오티드를 투여함으로써 면역 반응을 유도하는 방법에 관한 것이다.

[0174] 또다른 측면에서, 본 발명은 자가면역 질환을 앓고 있거나 또는 그의 위험이 있는 대상체에게 임의의 자가면역 질환을 치료하기에 유효한 양의 본 발명의 조성물을 투여함으로써 자가면역 질환을 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0175] 다른 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 대상체에게 사이토카인 발현 유도 유효량으로 전달된다. 임의로 사이토카인은 IL-6, TNF α, IFN α, IFN γ 및 IP-10으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 다른 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 Th2 편향 반응으로부터 Th1 편향 반응으로의 면역 반응 이동 유효량으로 대상체에게 전달된다.

[0176] 본 발명의 일부 측면은 CG 디뉴클레오티드를 포함하는 올리고뉴클레오티드를 대상체에서의 기도 개형 치료 유효량으로 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 기도 개형의 치료 방법이다. 일 실시양태에서, 대상체는 천식, 만성폐쇄성 폐질환을 앓고 있거나 또는 흡연자이다. 다른 실시양태에서, 대상체는 천식의 증후가 없다.

[0177] 또한, 면역 반응을 자극하기 위한 본 발명의 올리고뉴클레오티드의 용도가 본 발명의 일 측면으로서 제공된다.

[0178] 또한, 면역 반응을 자극하기 위한 본 발명의 올리고뉴클레오티드의 의약의 제조 방법을 제공한다.

[0179] 또다른 측면에서, 본 발명은

[0180] 길이가 5개 이상의 뉴클레오티드인 올리고뉴클레오티드 (여기서, 올리고뉴클레오티드가 1개 이상의 면역자극 디뉴클레오티드 모티프를 포함하고, 디뉴클레오티드의 뉴클레오티드들 사이의 인터뉴클레오티드 연결기가 R 키랄성을 가지고, 올리고뉴클레오티드 중 70% 이상의 다른 인터뉴클레오티드 연결기가 S 키랄성을 가짐)를 면역 반응 자극 유효량으로 대상체에게 투여함으로써 면역 반응을 자극하는 방법에 관한 것이다.

[0181] 본 발명의 각 제한은 본 발명의 다양한 실시양태를 포함할 수 있다. 따라서, 임의의 한 요소 또는 요소의 조합을 포함하는 본 발명의 각 제한은 본 발명의 각 측면에 포함될 수 있음이 예측된다.

**발명의 상세한 설명**

[0225] 본 발명에 따라 연결 및 반-연결 면역자극 핵산을 제공한다. 본원에 기재된 본 발명의 면역자극 올리고뉴클레오티드는 일부 실시양태에서 유사하거나 또는 증강된 효능을 포함하는 개선된 특성을 가지고, 신장, 간 및 비장에 대한 전신 노출을 감소시키고, 주사 부위에서의 감소된 부반응을 가질 수 있다. 본 출원인은 메카니즘에 의해 구속되지 않지만, 이들 개선된 특성이 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 "인터뉴클레오티드 연

결기"의 번역자극 올리고뉴클레오티드 내의 전략상 배치와 관련되는 것으로 여겨진다. 본원에 사용되는 용어 "인터뉴클레오티드 연결기"는 핵산 분자 중의 2개의 인접한 뉴클레오티드를 연결하는 공유결합 백본 연결기를 나타낸다. 공유결합 백본 연결기는 전형적으로 변형되거나 또는 변형되지 않은 포스포이트 연결기일 것이지만, 다른 변형도 가능하다. 따라서, 길이가 n개의 뉴클레오티드인 선형 올리고뉴클레오티드는 총 n-1개의 인터뉴클레오티드 연결기를 가진다. 이들 공유결합 백본 연결기는 본 발명의 교시에 따라 번역자극 올리고뉴클레오티드에서 변형되거나 또는 변형되지 않을 수 있다.

[0226] 특히, 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기는 "내부 디뉴클레오티드"를 포함한다. 내부 디뉴클레오티드는 일반적으로 인터뉴클레오티드 연결기에 의해 연결된 인접한 뉴클레오티드의 임의의 쌍을 의미할 것이며, 여기서 뉴클레오티드의 쌍 중 하나의 뉴클레오티드는 말단 뉴클레오티드가 아닌데, 즉 뉴클레오티드의 쌍 중 하나의 뉴클레오티드는 올리고뉴클레오티드의 5' 또는 3' 말단을 정의하는 뉴클레오티드가 아니다. 따라서, 길이가 n개의 뉴클레오티드인 선형 올리고뉴클레오티드는 총 n-1개의 디뉴클레오티드 및 단지 n-3개의 내부 디뉴클레오티드를 가진다. 내부 디뉴클레오티드 중 각각의 인터뉴클레오티드 연결기는 내부 인터뉴클레오티드 연결기이다. 따라서, 길이가 n개의 뉴클레오티드인 선형 올리고뉴클레오티드는 총 n-1개의 인터뉴클레오티드 및 단지 n-3개의 내부 인터뉴클레오티드를 가진다. 따라서, 전략적으로 배치된 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기는 핵산 서열 중 뉴클레오티드의 임의의 쌍 사이에 위치한 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기를 나타낸다. 일부 실시양태에서, 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기는 5' 또는 3' 말단에 가장 가까운 뉴클레오티드의 쌍 중 하나 사이에 위치하지 않는다.

[0227] 본 발명의 적어도 일부 측면은 본원에 기재된 연결 및 반-연결 핵산이 적어도 동일하거나 또는 다수의 경우에 다수의 예에서 동일한 뉴클레오티드 서열을 갖는 상응하는 완전히 안정화된 번역자극 올리고뉴클레오티드보다 더 큰 번역자극 활성을 가진다는 놀라운 발견에 기초한다. 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오티드가 안정화되지 않은 올리고뉴클레오티드보다 일반적으로 더 큰 번역자극을 가지는 것으로 널리 여겨지고 있기 때문에 이는 예기치 않은 것이었다. "연질화" 결합이 중요한 번역자극 모티프, 즉 CG 사이에 배치되는 경우에, 핵산이 생체 내에 단편을 함유한 비-CG로 용이하게 파괴되기 때문에 핵산이 감소된 활성을 가질 것으로 예상되었으므로 이 결과는 놀라운 것이다. 예상과는 반대로, 다수의 이들 핵산은 실제로 시험관내 및 생체내에서 등량 또는 더 양호한 활성을 가지고 있었다. 연결 및 반-연결 올리고뉴클레오티드는 그의 완전히 안정화된 상대물보다 더 효능이 있지 않은 경우에 연결 및 반-연결 올리고뉴클레오티드의 알짜 번역자극 효과가 활성과 안정성 간의 균형을 나타내는 만큼 적어도 효능이 있는 것으로 보여진다. 고 농도에서, 균형은 활성, 즉 효능 우세를 선호하는 것으로 나타난다. 저 농도에서, 이 균형은 안정성, 즉, 뉴클레아제 민감성 우세와 관련된 상대적 불안정성을 선호하는 것으로 나타난다.

[0228] 일 측면에서 본 발명은 연결 올리고뉴클레오티드에 관한 것이다. 연결 올리고뉴클레오티드는 부분적으로 안정화된 백본을 갖는 번역자극 올리고뉴클레오티드이며, 여기서 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기는 단지 하나 이상의 내부 피리미딘-퓨린 디뉴클레오티드 (YZ) 내에 있고, 그에 바로 인접하고 있다. 바람직하게는, YZ는 YG인 피리미딘-구아노신 (YG) 디뉴클레오티드이다. 하나 이상의 내부 YZ 디뉴클레오티드 자체는 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기를 가지고 있었다. 하나 이상의 내부 YZ 디뉴클레오티드에 바로 인접한 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기는 하나 이상의 내부 YZ 디뉴클레오티드에 대한 5', 3', 또는 5' 및 3' 모두일 수 있다. 바람직하게는, 하나 이상의 내부 YZ 디뉴클레오티드에 바로 인접한 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기는 그 자체로 내부 인터뉴클레오티드 연결기이다. 따라서, 서열 N<sub>1</sub> YZ N<sub>2</sub> (여기서, N<sub>1</sub> 및 N<sub>2</sub>는 각각 서로 독립적으로 임의의 단일 뉴클레오티드임)의 경우에, YZ 디뉴클레오티드는 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기를 가지고, 또한

[0229] (a) N<sub>1</sub>이 내부 뉴클레오티드인 경우에, N<sub>1</sub> 및 Y가 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기에 의해 연결되거나,

[0230] (b) N<sub>2</sub>가 내부 뉴클레오티드인 경우에, Z 및 N<sub>2</sub>가 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기에 의해 연결되거나, 또는

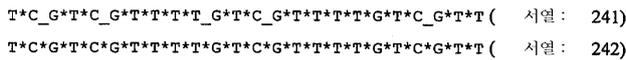
[0231] (c) N<sub>1</sub>이 내부 뉴클레오티드인 경우에, N<sub>1</sub> 및 Y가 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기에 의해 연결되고, N<sub>2</sub>가 내부 뉴클레오티드인 경우에, Z 및 N<sub>2</sub>가 포스포디에스테르 또는 포스포디에

스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기에 의해 연결된다.

[0232] 연결 올리고뉴클레오티드의 비제한 예에는 서열 105 내지 231, 서열 232 내지 234, 서열 235 내지 237, 및 서열 238 내지 240에 의해 기재된 것을 포함한다.

[0233] 본 발명에 따른 연결 올리고뉴클레오티드는 완전히 안정화된 올리고뉴클레오티드에 비해 뉴클레아제 절단에 상대적으로 민감한 것으로 여겨진다. 특정 이론 또는 메카니즘에 구속되는 것을 의미하지 않은 채, 본 발명의 연결 올리고뉴클레오티드가 전장 연결 올리고뉴클레오티드에 상대적으로 감소된 면역자극 활성을 가지거나 또는 없는 단편에 절단가능한 것으로 여겨진다. 특히 올리고뉴클레오티드의 중간 근처에 하나 이상의 뉴클레아제-민감성 인터뉴클레오티드 연결기의 삽입은 올리고뉴클레오티드의 약동학을 변경시켜 올리고뉴클레오티드의 최고 면역자극 활성의 지속을 감소시키는 "오프 스위치 (off switch)"를 제공하는 것으로 여겨진다. 이는 만성 국소 염증 또는 면역자극, 예컨대 신장에 관련된 손상을 피하는 데 바람직한 임상 적용 및 조직에서 특정 값일 수 있다.

[0234] 또다른 측면에서, 본 발명은 반-연질 올리고뉴클레오티드에 관한 것이다. 반-연질 올리고뉴클레오티드는 부분적으로 안정화된 백본을 갖는 면역자극 올리고뉴클레오티드이며, 여기서 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기는 단지 하나 이상의 내부 피리미딘-퓨린 (YZ) 디뉴클레오티드 내에 있다. 반-연질 올리고뉴클레오티드는 상응하는 완전히 안정화된 면역자극 올리고뉴클레오티드에 상대적으로 증가된 면역자극 효능을 일반적으로 가진다. 예를 들면, 반-연질 서열 241의 면역자극 효능은 모든 포스포로티오에이트 서열 242의 것의 2 내지 5배이며, 여기서 2개의 올리고뉴클레오티드는 동일한 뉴클레오티드 서열을 공유하지만, 하기와 같은 내부 YZ 인터뉴클레오티드 연결기에만 상이하며, 여기서, \*는 포스포로티오에이트를 나타내고, \_은 포스포디에스테르를 나타낸다:

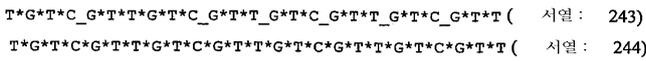


[0235]

[0236] 서열 241은 CG 및 TG (모든 YZ) 디뉴클레오티드 모두를 포함하는 내부 포스포디에스테르 인터뉴클레오티드 연결기를 삽입한다. 반-연질 올리고뉴클레오티드의 더 큰 효능 때문에, 반-연질 올리고뉴클레오티드는 유효한 농도에서 사용될 수 있고, 목적하는 생물학적 효과를 달성하기 위해 통상적인 완전히 안정화된 면역자극 올리고뉴클레오티드보다 더 낮은 유효 투여량을 가진다.

[0237] 완전히 안정화된 면역자극 올리고뉴클레오티드는 투여량-반응 최대를 나타낼 수 있는 반면, 본 발명의 반-연질 올리고뉴클레오티드는 상응하는 완전히 안정화된 면역자극 올리고뉴클레오티드에 대한 최적 농도 초과와 더 높은 농도로 연장되는 단조적으로 증가한 투여량-반응 곡선 (TLR9 자극에 의해 분석함)을 가지는 것으로 나타난다. 따라서, 본 발명의 반-연질 올리고뉴클레오티드가 완전히 안정화된 면역자극 올리고뉴클레오티드보다 더 큰 면역자극을 유도할 수 있는 것으로 여겨진다.

[0238] 약한 면역자극 완전 안정화된 올리고뉴클레오티드의 면역자극 활성이 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기와 하나 이상의 내부 YZ 디뉴클레오티드의 삽입에 의해 증가될 수 있음을 본 발명에 따라 발견하였다. 따라서, 완전히 안정화된 백본을 갖는 약한 면역자극 올리고뉴클레오티드로 시작하고, 하나 이상의 내부 YG 디뉴클레오티드의 안정화된 인터뉴클레오티드 연결기에 대한 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기의 치환에 의해 그의 면역자극 활성을 개선시킬 수 있다. 예를 들면, 하기 서열 243은 그의 완전히 안정화된 상대물인 하기 서열 244보다 더 큰 면역자극 활성을 가지는 것으로 발견되었으며, 여기서 서열 244는 서열 242에 비해 상대적으로 약한 면역자극 올리고뉴클레오티드이다:



[0239]

[0240] 길이가 20개의 뉴클레오티드보다 작은 완전히 안정화된 면역자극 핵산이 더 큰 (예컨대, 길이가 24개의 뉴클레오티드임) 완전 안정화된 올리고뉴클레오티드에 비해 별로 크지 않은 면역자극 활성을 가질 수 있는 반면, 길이가 16개의 뉴클레오티드인 만큼 짧은 반-연질 올리고뉴클레오티드는 길이 20개의 뉴클레오티드보다 완전히 안정화된 올리고뉴클레오티드의 면역자극 활성에 대해 적어도 동일한 면역자극 활성을 가진다는 것을 발견하였다. 예를 들면, 서열 245 및 5602 (16-머 모두가 서열 242와 유사한 부분 서열을 가짐)는 서열 242 (24-머)에 필적하는 면역자극 활성을 나타낸다.

T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T ( 서열 : 245)

5602 T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\_G\*T\*C\_G\*T\*T ( 서열 : 56)

T\*C\*G\*T\*C\*G\*T\*T\*T\*T\*G\*T\*C\*G\*T\*T\*T\*T\*G\*T\*C\*G\*T\*T ( 서열 : 242)

[0241]

[0242]

6-머 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오티드가 번역자극 활성의 결실을 나타낸 일부 예에서, 포스포로티오에이트 연결기에 대한 심지어 하나의 포스포디에스테르 내부 YZ 인터뉴클레오티드 연결기의 치환은 번역자극 활성을 갖는 상응하는 6-머를 수득하는 것을 발견하였다.

[0243]

또한, 반-연결 올리고뉴클레오티드의 상기 특성이 내부 YZ 디뉴클레오티드를 포함하는 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기의 증가하는 "투여량"으로 증가되는 것으로 일반적으로 여겨진다. 따라서, 예를 들면, 일반적으로 5개의 내부 YZ 디뉴클레오티드를 갖는 주어진 올리고뉴클레오티드 서열의 경우에, 5개의 내부 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 YZ 인터뉴클레오티드 연결기를 갖는 올리고뉴클레오티드가 4개의 내부 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 YG 인터뉴클레오티드 연결기를 갖는 올리고뉴클레오티드보다 더 번역자극이 있고, 또한 3개의 내부 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 YG 인터뉴클레오티드 연결기를 갖는 올리고뉴클레오티드보다 더 번역자극이 있고, 또한 2개의 내부 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 YG 인터뉴클레오티드 연결기를 갖는 올리고뉴클레오티드보다 더 번역자극이 있고, 또한 1개의 내부 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 YG 인터뉴클레오티드 연결기를 갖는 올리고뉴클레오티드보다 더 번역자극이 있는 것으로 여겨진다. 중요하게는, 심지어 1개의 내부 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 YZ 인터뉴클레오티드 연결기를 포함하는 것은 내부 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 YZ 인터뉴클레오티드 연결기가 없는 것보다 유리할 것으로 여겨진다. 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기의 수 이외에, 핵산의 길이에 따른 위치도 효능에 영향을 미칠 수 있다.

[0244]

반-연결 올리고뉴클레오티드의 비제한 예는 서열 1 내지 99 및 241 및 서열 100 내지 104에 의해 기재된 것을 포함한다.

[0245]

본 발명의 번역자극 올리고뉴클레오티드는 일반적으로 혈청에서의 빠른 분해로부터 보호된다. 본 발명의 번역자극 올리고뉴클레오티드는 또한 일반적으로 번역자극 올리고뉴클레오티드를 분해할 수 있는 특성의 또는 과량의 뉴클레아제 활성을 갖는 특정 조직을 제외하고는 대부분의 조직에서의 빠른 분해로부터 보호된다. 이는 이들 특정 조직 중에서 번역자극 올리고뉴클레오티드를 감소시키며, 그렇지 않다면 그의 축적은 분해-내성 올리고뉴클레오티드를 사용하는 장기 요법으로부터 바람직하지 않은 결과를 유도할 수 있다. 또한, 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 일반적으로 분해에 내성인 바람직한 내부 위치, 5' 및 3' 말단에서의 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기를 포함할 것이다. 이러한 분해-내성 말단은 상응하는 변형되지 않은 말단보다 엑소뉴클레아제 절단에 대한 내성을 증가시키는 임의의 적합한 변형을 포함할 수 있다. 예를 들면, 5' 및 3' 말단은 백본의 하나 이상의 포스페이트 변형을 포함함으로써 안정화될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 각각의 말단에서의 백본의 하나 이상의 포스페이트 변형은 독립적으로 포스포로티오에이트, 포스포로티오에이트, 메틸포스포네이트, 또는 메틸포스포로티오에이트 인터뉴클레오티드 연결기이다. 또다른 실시양태에서, 분해-내성 말단은 3' 말단에서의 펩티드 또는 아미드 연결기에 의해 연결된 하나 이상의 뉴클레오티드 단위를 포함한다. 추가로 하기에 기재하는 것을 포함하지만 이에 제한되지 않는 다른 안정화된 말단은 본 발명에 의해 포함되는 것으로 의미된다.

[0246]

상기한 바와 같이, 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 내부 YG 디뉴클레오티드 중에 있고, 임의로 내부 YG 디뉴클레오티드에 인접한 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 연결기를 포함한다. 이러한 YG 디뉴클레오티드는 종종 번역자극 모티프의 부분이다. 반드시 는 아니지만, 올리고뉴클레오티드는 모든 번역자극 모티프 중의 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 연결기를 포함한다. 예로서, 4개의 CpG 디뉴클레오티드를 갖는 올리고뉴클레오티드, 예컨대 T\*C\*G\*T\*C\*G\*T\*T\*T\*G\*T\*C\*G\*T\*T\*T\*G\*T\*C\*G\*T\*T (서열 242)는 제2, 제3, 또는 제4 CpG 디뉴클레오티드의 C와 G 사이의 포스포디에스테르 연결기, 및 이들의 임의의 조합물을 가질 수 있다. 추가의 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 연결기는 이들 다른 "안정화된 올리고뉴클레오티드"의 더욱더 빠른 신장 소화에 대해 유지될 수도 있다. 예를 들면, 서열 242는 추가로 2개의 내부 TG 디뉴클레오티드를 포함하며, 이들 중 하나 또는 모두는 단독으로 또는 내부 CG 디뉴클레오티드의 임의의 하나 또는 조합과 함께 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기를 가질 수 있다.

[0247]

포스포디에스테르 인터뉴클레오티드 연결기는 자연에서 발견되는 핵산의 연결기 특징의 유형이다. 도 20에 나타낸 바와 같이, 포스포디에스테르 인터뉴클레오티드 연결기는 2개의 가교 산소 원소의 측면에 위치하고, 또한

2개의 추가 산소 원자 (하나는 하전되어 있고, 다른 하나는 하전이 안되어 있음)에 의해 결합된 인 원자를 포함한다. 포스포디에스테르 인터뉴클레오티드 연결기는 올리고뉴클레오티드의 조직 반감기를 감소시키는 데 중요한 경우에 특히 바람직하다.

[0248] 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기는 포스포디에스테르에 화학적으로 및(또는) 부분입체이성질체적으로 유사한 인-함유 가교기이다. 포스포디에스테르의 유사도의 크기는 뉴클레아제 절단에 대한 민감성 및 RNase H에 대한 활성화능을 포함한다. 따라서, 예를 들면 포스포디에스테르 (포스포로티오에이트는 아님) 올리고뉴클레오티드는 뉴클레아제 절단에 민감하지만, 포스포디에스테르 및 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오티드 모두는 RNase H를 활성화시킨다. 바람직한 실시양태에서, 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기는 보라노포스포네이트 (또는 동등하게는 보라노포스포네이트) 연결기이다 (미국 특허 제5,177,198호; 동 제 5,859,231호; 동 제6,160,109호; 동 제6,207,819호; 문헌 [Sergueev et al., (1998) J Am Chem Soc 120: 9417-27]). 또다른 바람직한 실시양태에서, 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기는 부분입체이성질체적으로 순수한 Rp 포스포로티오에이트이다. 부분입체이성질체적으로 순수한 Rp 포스포로티오에이트가 뉴클레아제 절단에 더 민감하고, 혼합되거나 또는 부분입체이성질체적으로 순수한 Sp 포스포로티오에이트보다 RNase H의 활성화에 더 양호한 것으로 여겨진다. CpG 올리고뉴클레오티드의 입체이성질체는 동시 계류중인 1999년 7월 27일자로 제출한 미국 출원 제09/361,575호 및 공개된 PCT 출원 PCT/US99/17100 (WO 00/06588)의 주제이다. 본 발명의 목적을 위해, 용어 "포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기"는 특별히 포스포로티오에이트 및 메틸포스포네이트 인터뉴클레오티드 연결기를 제외하는 데 주목되어야 한다.

[0249] 본 발명의 번역자극 핵산 분자는 키메라 백본을 가진다. 본 발명의 목적을 위해, 키메라 백본은 부분적으로 안정화된 백본을 나타내며, 여기서 하나 이상의 인터뉴클레오티드 연결기는 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사이고, 하나 이상의 다른 인터뉴클레오티드 연결기는 안정화된 인터뉴클레오티드 연결기이고, 하나 이상의 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 연결기와 하나 이상의 안정화된 연결기는 상이하다. 백본의 키메라 특성을 위해, 보라노포스포네이트 연결기가 포스포디에스테르 연결기에 대해 상대적으로 안정화되는 것으로 보고되어 있기 때문에, 보라노포스포네이트 연결기는 콘텍스트에 따라 포스포디에스테르-유사 또는 안정화된 것으로 분류될 수 있다. 예를 들면, 본 발명에 따른 키메라 백본은 일 실시양태에서 하나 이상의 포스포디에스테르 (포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사) 연결기 및 하나 이상의 보라노포스포네이트 (안정화된) 연결기를 포함할 수 있다. 또다른 실시양태에서, 본 발명에 따른 키메라 백본은 보라노포스포네이트 (포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사) 및 포스포로티오에이트 (안정화된) 연결기를 포함할 수 있다. "안정화된 인터뉴클레오티드 연결기"는 포스포디에스테르 인터뉴클레오티드 연결기와 비교하여 (예컨대, 엑소- 또는 엔도-뉴클레아제를 통한) 생체내 분해에 상대적으로 균질인 인터뉴클레오티드 연결기를 의미할 것이다. 바람직한 안정화된 인터뉴클레오티드 연결기는 제한 없이 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 메틸포스포네이트, 및 메틸포스포로티오에이트를 포함한다. 다른 안정화된 인터뉴클레오티드 연결기는 제한 없이 펩티드, 알킬, 테포스포, 및 상기된 기타를 포함한다.

[0250] 포스포로티오에이트와 같은 변형 백본은 포스포라미데이트 또는 H-포스포네이트 화학물질을 사용하는 자동화 기술을 이용하여 합성할 수 있다. 아릴- 및 알킬- 포스포네이트는 예를 들어, 미국 특허 제4,469,863호에 기재된 바와 같이 제조할 수 있고; 알킬포스포트리에스테르 (하전된 산소 잔기가 미국 특허 제5,023,243호 및 유럽 특허 제092,574호에 기재된 바와 같이 알킬화되어 있음)는 상업적으로 입수가능한 시약을 사용하여 자동화 고상 합성에 의해 제조할 수 있다. 다른 DNA 백본 변형체 및 치환체를 제조하는 방법은 문헌 [Uhlmann E et al. (1990) Chem Rev 90: 544; Goodchild J (1990) Bioconjugate Chem 1: 165]에 기재되어 있다. 키메라 올리고뉴클레오티드의 제조 방법도 공지되어 있다. 예를 들면, 울만 (Uhlmann) 등에 의해 허여된 특허에는 이러한 기술이 기재되어 있다.

[0251] 혼합된 백본 변형 ODN은 상업적으로 입수가능한 DNA 합성기 및 표준 포스포라미다이트 화학을 사용하여 합성할 수 있다 [F. E. Eckstein, "Oligonucleotides and Analogues-A Practical Approach " IRL Press, Oxford, UK, 1991, and M. D. Matteucci and M. H. Caruthers, Tetrahedron Lett. 21,719 (1980)]. 커플링 후에, PS 연결기는 보우케이지 (Beaucage) 시약 [R. P. Iyer, W. Egan, J. B. Regan and S. L. Beaucage, J. Am. Chem. Soc. 112, 1253 (1990)] (아세트니트릴 중의 0.075 M) 또는 페닐 아세틸 디술피드 (PADS)를 사용하여 황화시킨 후에, 아세트산 무수물, 2,6-루티딘 (테트라히드로푸란 중에서, 1:1:8; v:v:v) 및 N-메틸이미다졸 (테트라히드로푸란 중의 16%)로 캡핑함으로써 도입된다. 이 캡핑 단계는 포스포로티오에이트 연결기가 위치하여야 할 위치에서 바람직하지 않은 포스포디에스테르 (PO) 연결기의 형성을 최소화하기 위해 황화 반응 후에 수행한다. 포스포디에스테르 연결기를 도입하는 경우에, 예컨대 CpG 디뉴클레오티드에서, 중간체 아인-III은 물/피리딘 중

의 요오드의 용액으로 처리함으로써 산화된다. 고체 지지로부터 절단하고 진한 암모니아로 처리하여 (50 °C에서 15 시간) 최종 탈보호한 후에, ODN은 NaCl-구배 (예컨대, 완충액 A: 아세트니트릴/물 (1:4/v:v) 중의 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6.8; 완충액 B: 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 아세트니트릴/물 (1:4/v:v) 중의 1.5 M NaCl; 30 분 동안 1 ml/분에서 5 내지 60% B)를 사용하는 겔-팩 팩스(Gen-Pak Fax) 칼럼 (밀리포어 (Millipore)-물) 상의 HPLC 또는 모세관 겔 전기영동으로 분석한다. ODN은 소스 고성능 칼럼 (아머삼 파마시아 (Amersham Pharmacia) 상의 HPLC 또는 FPLC로 정제될 수 있다. HPLC-동질 분획을 합하고, C18 칼럼을 통해 또는 한외여과에 의해 탈염한다. ODN은 MALDI-TOF 질량 분광측정법에 의해 분석하여 계산된 질량을 확인하였다.

[0252] 본 발명의 핵산은 다른 변형체를 포함할 수도 있다. 이들은 비이온성 DNA 유사체, 예컨대 알킬- 및 아릴-포스페이트 (여기서, 하전된 포스포네이트 산소는 알킬 또는 아릴 기에 의해 치환됨), 포스포디에스테르 및 알킬포스포트리에스테르 (하전된 산소 잔기는 알킬화됨)를 포함한다. 두 말단 중 하나 또는 모두에서 디올, 예컨대 테트라에틸렌글리콜 또는 헥사에틸렌글리콜을 함유하는 핵산은 또한 뉴클레아제 분해에 실질적으로 내성인 것으로 나타났다.

[0253] 번역자극 올리고뉴클레오티드의 크기 (즉, 핵산의 길이에 따른 뉴클레오티드 잔기의 수)는 올리고뉴클레오티드의 자극 활성화에 기여할 수도 있다. 세포 번역자극 올리고뉴클레오티드 내로의 흡입을 촉진하기 위해, 바람직한 체계는 최소 길이가 6개의 뉴클레오티드 잔기이다. 충분한 번역자극 모티프가 존재하는 경우에, 6개의 뉴클레오티드보다 큰 임의의 크기 (심지어 길이가 수 kb임)의 핵산은 본 발명에 따른 번역 반응을 유도할 수 있는데, 이는 더 큰 핵산이 세포의 내부에서 분해되기 때문이다. 본 발명자들은 4개의 뉴클레오티드 만큼 짧은 반-연질 올리고뉴클레오티드가 세포 내부로 전달될 수 있는 경우에 번역자극될 수도 있다고 여긴다. 본 발명에 따른 특히 바람직한 실시양태에서, 번역자극 올리고뉴클레오티드 길이는 4 내지 100개의 뉴클레오티드이다. 전형적인 실시양태에서, 번역자극 올리고뉴클레오티드 길이는 6 내지 40개의 뉴클레오티드이다. 본 발명에 따른 특히 바람직한 실시양태에서, 번역자극 올리고뉴클레오티드 길이는 6 내지 19개의 뉴클레오티드이다.

[0254] 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 번역 반응을 유도하는 것으로 알려진 특이적 서열을 함유한 핵산이다. 번역 반응을 유도하는 이들 특이적 서열은 "번역자극 모티프"로 칭하고, 번역자극 모티프를 함유한 올리고뉴클레오티드는 "번역자극 핵산 분자"로 칭하고, 동등하게는, "번역자극 핵산" 또는 "번역자극 올리고뉴클레오티드"라 칭한다. 따라서, 본 발명의 번역자극 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 번역자극 모티프를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 번역자극 모티프는 "내부 번역자극 모티프"이다. 용어 "내부 번역자극 모티프"는 더 큰 핵산 서열 내의 모티프 서열의 위치를 나타내며, 여기서 더 큰 핵산 서열은 번역자극 모티프 서열의 5' 및 3' 말단 모두에 연결된 하나 이상의 뉴클레오티드에 의한 모티프 서열보다 길이가 길다.

[0255] 본 발명의 일부 실시양태에서, 번역자극 올리고뉴클레오티드는 "CpG 디뉴클레오티드"인 번역자극 모티프를 포함한다. CpG 디뉴클레오티드는 메틸화되거나 또는 메틸화되지 않을 수 있다. 하나 이상의 메틸화되지 않은 CpG 디뉴클레오티드를 포함하는 번역자극 핵산은 메틸화되지 않은 시토신-구아닌 디뉴클레오티드 서열 (즉, 메틸화되지 않은 5' 시티딘, 이어서 3' 구아노신이고, 포스페이트 결합에 의해 연결됨)을 함유하고, 번역계를 활성화시키는 핵산 분자이며; 이러한 번역자극 핵산은 CpG 핵산이다. CpG 핵산은 미국 특허 제6,194,388호; 동 제6,207,646호; 동 제6,214,806호; 동 제6,218,371호; 동 제6,239,116호; 및 동 제6,339,068호를 포함하는 다수의 허여된 특허, 공개된 특허 출원, 및 다른 발행물에 기재되어 있다. 하나 이상의 메틸화된 CpG 디뉴클레오티드를 포함하는 번역자극 핵산은 메틸화된 시토신-구아닌 디뉴클레오티드 서열 (즉, 메틸화된 5' 시티딘, 이어서 3' 구아노신이고, 포스페이트 결합에 의해 연결됨)을 함유하고, 번역계를 활성화시키는 핵산이다. 다른 실시양태에서, 번역자극 올리고뉴클레오티드는 CpG 디뉴클레오티드를 함유하고 있지 않다. CpG 디뉴클레오티드를 함유하지 않는 이들 올리고뉴클레오티드는 비-CpG 올리고뉴클레오티드로 칭하고, 이들은 비-CpG 번역자극 모티프를 가진다. 따라서, 본 발명은 또한 메틸화되거나 또는 메틸화되지 않을 수 있는 다른 유형의 번역자극 모티프를 갖는 핵산을 포함한다. 본 발명의 번역자극 올리고뉴클레오티드는 또한 메틸화되거나 메틸화되지 않은 CpG 및 비-CpG 번역자극 모티프의 임의의 조합물을 포함할 수 있다.

[0256] CpG 핵산에 관해서는, 상이한 분류의 CpG 핵산이 있다고 최근에 보고되고 있다. 하나의 분류는 B 세포의 활성화에 유능하지만 IFN- $\alpha$  및 NK 세포 활성화의 유도에 상대적으로 약한데; 이 분류를 B 클래스라 칭하고 있다. B 클래스 CpG 핵산은 전형적으로 완전히 안정화되고, 특정 바람직한 염기 콘텍스트 내에 메틸화되지 않은 CpG 디뉴클레오티드를 포함한다. 예컨대, 미국 특허 제6,194,388호; 동 제6,207,646호; 동 제6,214,806호; 동 제6,218,371호; 동 제6,239,116호; 및 동 제6,339,068호를 참조한다. 또다른 분류는 IFN- $\alpha$  및 NK 세포 활성화의 유도에 유능하지만 B 세포 자극에 상대적으로 약한데; 이 분류를 A 클래스라 칭하고 있다. A 클래스 CpG 핵

산은 전형적으로 5' 및 3' 말단에서 안정화된 폴리-G 서열 및 6개 이상의 뉴클레오티드의 회문구조 포스포디에스테르 CpG 디뉴클레오티드-함유 서열을 가진다. 예를 들면, 공개된 특허 출원 PCT/US00/26527 (WO 01/22990)를 참조한다. 또다른 분류의 CpG 핵산은 B 세포 및 NK 세포를 활성화시키고, IFN- $\alpha$ 를 유도하는데; 이 분류를 C-클래스라 칭하고 있다. 최초로 특성화된 C-클래스 CpG 핵산은 전형적으로 완전히 안정화되어 있고, B 클래스-유형 서열 및 GC-부유 회문구조 또는 거의-회문구조를 포함한다. 이 분류는 당시 계류중인 2001년 8월 17일자로 제출한 미국 가출원 제60/313,273호 및 2002년 8월 19일자로 제출한 미국 제10/224,523호에 설명되어 있으며, 이들의 내용 전체는 본원에 참고로 인용된다. C-클래스 핵산의 일부 비제한 예는 하기 서열을 포함한다:

서열	서열
275	T* <u>C</u> _G* <u>C</u> _G*T* <u>C</u> _G*T* <u>T</u> *C_G* <u>G</u> *C* <u>G</u> *C_G* <u>C</u> *G* <u>C</u> *C* <u>G</u>
369	T* <u>C</u> _G*T* <u>C</u> _G*A* <u>C</u> _G*T* <u>T</u> *C_G* <u>G</u> *C* <u>G</u> *C_G* <u>C</u> *G* <u>C</u> *C* <u>G</u>
370	T* <u>C</u> _G* <u>G</u> *A* <u>C</u> _G*T* <u>T</u> *C_G* <u>G</u> *C* <u>G</u> *C_G* <u>C</u> *G* <u>C</u> *C* <u>G</u>
371	T* <u>C</u> _G* <u>G</u> *A* <u>C</u> _G*T* <u>T</u> *C_G* <u>G</u> *C* <u>G</u> *C* <u>G</u> *C* <u>C</u> * <u>G</u>
372	T* <u>C</u> _G* <u>C</u> _G*T* <u>C</u> _G*T* <u>T</u> *C_G* <u>G</u> *C* <u>G</u> *C* <u>G</u> *C* <u>C</u> * <u>G</u>
373	T* <u>C</u> _G*A* <u>C</u> _G*T* <u>T</u> *C_G* <u>G</u> *C* <u>G</u> *C_G* <u>C</u> *G* <u>C</u> *C* <u>G</u>
374	T* <u>C</u> _G*A* <u>C</u> _G*T* <u>T</u> *C_G* <u>G</u> *C* <u>G</u> *C* <u>G</u> *C* <u>C</u> * <u>G</u>
375	T* <u>C</u> _G* <u>C</u> _G*T* <u>C</u> _G*T* <u>T</u> *C_G* <u>G</u> *C* <u>G</u> *C* <u>C</u> * <u>G</u>
316	T* <u>C</u> _G* <u>C</u> _G*A* <u>C</u> _G*T* <u>T</u> *C_G* <u>G</u> *C* <u>G</u> *C_G* <u>C</u> *G* <u>C</u> *C* <u>G</u>

[0257]

[0258]

따라서, 일 측면에서 본 발명은 키메라 백본을 갖는 CpG 면역자극 올리고뉴클레오티드의 특정 서브-클래스가 면역자극 효과의 매개에 고도로 효과적이라는 발견을 포함한다. 이들 CpG 핵산은 암, 감염성 질환, 알레르기, 천식, 자가면역 질환, 및 기타 질병을 치료하고 기회 감염 후의 암 화학요법에 대한 보호를 돕기 위해 면역계의 자극에 치료상 및 예방상 유용하다. CpG 자극으로 인해 강하게 이미 균형잡힌 세포 및 체액 면역 반응은 병원체 및 암 세포의 침해에 대한 신체 자신의 자연 방어 시스템을 반영한다.

[0259]

일 측면에서 본 발명은 CpG 면역자극 올리고뉴클레오티드의 서브세트가 면역자극 특성을 개선하고, 신장 염증성 영향을 감소시키는 발견을 포함한다. 일부 예에서, 신장 염증은 완전 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오티드를 투여한 대상체에서 관찰되었다. 본원에 기재된 키메라 핵산이 완전 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오티드보다 덜 신장 염증을 발생시키는 것으로 여겨진다. 추가로 이들 올리고뉴클레오티드는 면역 반응의 자극에 고도로 효과적이다. 따라서, 분자의 포스포디에스테르 영역은 효과를 감소시키지 않았다.

[0260]

바람직한 CpG 면역자극 올리고뉴클레오티드는 하기 6개의 식 중 하나에 속한다:

- 5' T\*C\*G\*T\*CGTTTTGAN<sub>1</sub>CGN<sub>2</sub>\*T\*T 3' ( 서열: 296),
- 5' T\*C\*G\*(T\*/A\*)TN<sub>3</sub>CGTTTTN<sub>4</sub>CGN<sub>5</sub>\*T\*T 3' ( 서열: 301),
- 5' T\*C\*G\*T\*C\*G\*NNNCGNCGNNNC\*G\*N\*C\*G\*T\*T 3' ( 서열: 307),
- 5' T\*C\_G(N<sub>6</sub>C\_G N<sub>7</sub>)<sub>2</sub>T\*C\_G\*T\*T 3' ( 서열: 311-312),
- 5' T\*T\*GX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>TGX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>T\*T\*T\*N<sub>10</sub>T\*T\*T\*T\*T\*T\*T 3' ( 서열: 331) 및
- 5' T\*CCGCGN<sub>8</sub>CGCGC\*GN<sub>9</sub> 3' ( 서열: 332).

[0261]

[0262]

이들 식 중에서, N은 임의의 뉴클레오티드이고, N<sub>1</sub>은 0 내지 6개의 뉴클레오티드이고, N<sub>2</sub>는 0 내지 7개의 뉴클레오티드이고, N<sub>3</sub>은 0 내지 4개의 뉴클레오티드이고, N<sub>4</sub>는 1 내지 5개의 뉴클레오티드이고, N<sub>5</sub>는 0 내지 7개의 뉴클레오티드이고, N<sub>6</sub> 및 N<sub>7</sub> 길이는 독립적으로 1 내지 5개의 뉴클레오티드이고, N<sub>8</sub> 길이는 4 내지 10개의 뉴클레오티드이고, N<sub>9</sub> 길이는 0 내지 3개의 뉴클레오티드이고, N<sub>10</sub> 길이는 4 내지 8개의 뉴클레오티드이다. X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub> 및 X<sub>4</sub>는 독립적으로 C 또는 G이다. 상기 식은 탁월한 면역자극 특성을 나타내고, 올리고뉴클레오티드를 함유한 완전 포스포로티오에이트보다 체내에서 분해에 더 민감한 CpG 올리고뉴클레오티드 분류의 서브세트를 정의한다. 상기 식에서, 5'은 올리고뉴클레오티드의 유리 5' 말단을 나타내고, 3'은 올리고뉴클레오티드의 유리 3' 말단을 나타낸다.

[0263]

상기 식에 사용된 기호 \*는 안정화된 인터뉴클레오티드 연결기의 존재를 나타낸다. \*로 표시하지 않은 인터뉴클레오티드 연결기는 올리고뉴클레오티드가 2 내지 3 이상의 포스포디에스테르 인터뉴클레오티드 연결기를 포함하는 만큼 안정화되거나 또는 안정화되지 않는다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드가 3 내지 6개의 포

스포디에스테르 연결기를 포함하는 것이 바람직하다. 일부 경우에, CG 모티프 사이의 연결기는 포스포디에스테르이고, 다른 경우에는 포스포로티오에이트 또는 다른 안정화된 연결기이다.

[0264] 다른 식은 5'TCGTCGTTTTGACGTTTTGTCGTT3' (서열 368) (여기서, 1개 이상의 CG 디뉴클레오티드는 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기를 가지고, 상기 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 안정화된 인터뉴클레오티드 연결기를 포함함) 및 5'GNC3' (여기서, N은 길이가 4 내지 10개의 뉴클레오티드인 핵산 서열이고, 50% 이상이 T이고, CG 디뉴클레오티드를 포함하지 않고, 상기 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 안정화된 인터뉴클레오티드 연결기를 포함함)을 포함한다.

[0265] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 하기 구조 중 하나를 가진다.

- 5' T\*C\*G\*T\*C\*G\*TTTTGAN<sub>1</sub>C\*G\*N<sub>2</sub>\*T\*T 3' ( 서열: 96),
- 5' T\*C\*G\*T\*C\*G\*T\*T<sub>1</sub>T<sub>2</sub>GAN<sub>1</sub>C\*G\*N<sub>2</sub>\*T\*T 3' ( 서열: 96),
- 5' T\*C\*G\*T\*C\*G\*T\*T\*G\*GA<sub>1</sub>N<sub>2</sub>C\*G\*N<sub>2</sub>\*T\*T 3' ( 서열: 296),
- 5' T\*C\*G\*(T\*/A\*)TN<sub>3</sub>CGTTTTN<sub>4</sub>C\*G\*N<sub>5</sub>\*T\*T 3' ( 서열: 301),
- 5' T\*C\*G\*A\*T\*N<sub>3</sub>C\*G\*TTTTN<sub>4</sub>C<sub>1</sub>G<sub>2</sub>\*N<sub>5</sub>\*T\*T 3' ( 서열: 302),
- 5' T\*C\*G\*T\*N<sub>3</sub>C<sub>1</sub>G<sub>2</sub>TTTTN<sub>4</sub>CGN<sub>5</sub>\*T\*T 3' ( 서열: 303),
- 5' T\*C\*G\*T\*C\*G\*N\*N\*N\*C<sub>1</sub>G<sub>2</sub>N<sub>3</sub>N\*N\*N\*C\*G\*N\*N\*N\*C\*G\*T\*T 3' ( 서열: 307),
- 5' T\*C\*G\*T\*C\*G\*T\*A\*A\*C<sub>1</sub>G<sub>2</sub>N<sub>3</sub>C<sub>4</sub>T\*T\*A\*A\*C\*G\*N\*N\*N\*C\*G\*T\*T 3' ( 서열: 308), 또는
- 5' T\*C\*G\*T\*C\*G\*N\*N\*N\*C<sub>1</sub>G<sub>2</sub>T<sub>3</sub>C<sub>4</sub>N\*N\*N\*N\*C\*G\*T\*C\*G\*T\*T 3' ( 서열: 309).

[0266]

이들 구조 중의 기호 \_은 포스포디에스테르 인터뉴클레오티드 연결기의 존재를 나타낸다.

[0268] 구조의 일부 바람직한 예에는 하기의 서열이 포함된다:

- 5' T\*C\*G\*T\*C\*G\*T\*T\*T\*G\*A\_C\_C\_G\_G\_T\*T\*C\*G\*T\*G\*T\*T 3' ( 서열: 327),
- 5' T\*C\*G\*T\*C\*G\*T\*T\*T\*G\_A\_C\*G\*T\*T\*T\*G\*T\*C\*G\*T\*T 3' ( 서열: 328),
- 5' T\*C\*G\*T\*C\*G\*T\*T\_T\_T\_G\*A\*A\*C\*G\*T\*T\*T 3' ( 서열: 324), 5' T\*C\*G\*T\*C\*G\*T\*T\_T\_T\_G\*A\*A\*C\*G\*T\*T 3' ( 서열: 325),
- 5' T\*C\*G\*A\*T\*C\*G\*T\*T\*T\_T\_C\_G\*T\*G\*C\*G\*T\*T\*T 3' ( 서열: 323),
- 5' T\*C\*G\*T\*T\*T\*G\*A\_C\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\*C\*G\*T\*T 3' ( 서열: 326),
- 5' T\*C\*G\*T\*C\*G\*T\*T\*A\*A\_C\_G\_T\_C\_G\_T\*T\*A\*A\*C\*G\*T\*C\*G\*T\*T 3' ( 서열: 322),
- 5' T\*C\_G\_T\*T\_C\_G\*T\*T\*T\*G\*A\*A\_C\_G\*T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\*T\*T 3' ( 서열: 313),
- 5' T\*C\_G\*A\*A\_C\_G\*T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\*T\*T 3' ( 서열: 314),
- 5' T\*T\*G\*C\_G\*T\*G\*C\_G\*T\*T\*T\*G\*A\*A\_C\_G\*T\*T\*T\*T\*T 3' ( 서열: 319),
- 5' T\*C\_G\_C\_G\*A\*A\_C\_G\*T\*T\*C\_G\*G\*C\*G\*C\_G\*C\*G\*C\*G 3' ( 서열: 316),
- 5' T\*C\*G\*C\*G\*A\*A\_C\_G\*T\*T\*C\*G\*C\*G\*C\_G\*C\*G\*C\*G 3' ( 서열: 317),
- 5' T\*T\*G\*G\_C\*T\*G\*G\_C\*T\*T\*T\*G\*A\*A\_C\_G\*T\*T\*T\*T\*T 3' ( 서열: 320),
- 5' T\*C\*G\*C\_G\*A\*A\_C\*G\*T\*T\*C\_G\*G\*C\*G\*C\_G\*C\*G\*C\*G 3' ( 서열: 321), T\*C-G\*T\*C-G\*T\*T, C-G\*T\*C-G\*T\*T, G\*T\*C-G\*T\*T, T\*C-G\*T\*T\*T\*G, C-G\*T\*T\*T\*G\*A, T\*T\*T\*T\*G\*A\*C-G, T\*T\*T\*G\*A\*A-C-G, T\*T\*G\*A\*A-C-G\*T, T\*G\*A\*A-C-G\*T, G\*A\*A-C-G\*T, A\*A-C-G\*T\*T\*G, C-G\*T\*T\*T\*G\*T, T\*T\*T\*G\*T\*C-G, T\*T\*G\*T\*C-G, G\*T\*T\*T\*G\*T, or T\*T\*G\*T\*C-G\*T.

[0269]

[0270] 번역자극 올리고뉴클레오티드 길이는 일반적으로 4 내지 100개, 일부 실시양태에서는 10 내지 40개의 범위이다. 길이는 16 내지 24개의 뉴클레오티드의 범위일 수 있다.

[0271] 용어 "핵산" 및 "올리고뉴클레오티드"는 또한 예컨대 염기 및(또는) 당에서 치환 또는 변형을 갖는 핵산 또는 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 예를 들어, 이들은 백본 당이 공유결합을 통해 3' 위치의 히드록실기 및 5' 위치의 포스페이트 기 또는 히드록시기 이외의 저분자량 유기 기에 부착되어 있는 핵산을 포함한다. 따라서, 변형된 핵산은 2'-O-알킬화 리보스 기를 포함할 수 있다. 또한, 변형된 핵산은 리보스 대신에 아라비노스 또는 2'-플루오로아라비노스와 같은 당을 포함할 수 있다. 따라서, 핵산은 백본 조성에서 불균질할 수 있으므로, 중합체 유닛이 서로 연결되어 있는 임의의 가능한 조합물, 예컨대, 펩티드-핵산 (핵산 염기가 있는 아미노산 백본을 갖고 있음)을 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 핵산은 백본 조성에서 균일하다.

[0272] 핵산은 치환된 퓨린 및 피리미딘, 예컨대 C-5 프로핀 피리미딘 및 7-테아자-7-치환된 퓨린 변형 염기도 포함한다 [Wagner RW et al. (1996) Nat Biotechnol 14: 840-4]. 퓨린 및 피리미딘은 아데닌, 시토신, 구아닌, 티민, 5-메틸시토신, 5-히드록시시토신, 5-플루오로시토신, 2-아미노퓨린, 2-아미노-6-클로로퓨린, 2,6-디아미노퓨린, 히포크산틴, 및 기타 자연 및 비-자연 발생 뉴클레오티드 염기, 치환 및 비치환된 방향족 잔기를 포함하지만

이에 제한되지 않는다. 기타 이러한 변형체는 당업자에게 잘 공지되어 있다.

- [0273] 본 발명의 번역자극성 올리고뉴클레오티드는 천연 RNA 및 DNA에 대비하여, 포스포디에스테르 인터뉴클레오티드 가교,  $\beta$ -D-리보스 단위 및(또는) 천연 뉴클레오티드 염기 (아데닌, 구아닌, 시토신, 티민, 우라실)가 관련된 다양한 화학적 변형 및 치환을 포함할 수 있다. 화학적 변형의 예는 당업자들에게 알려져 있으며, 예컨대 문헌 [Uhlmann E et al. (1990) Chem Rev 90:543; "Protocols for Oligonucleotides and Analogs" Synthesis and Properties & Synthesis and Analytical Techniques, S. Agrawal, Ed, Humana Press, Totowa, USA 1993; Crooke ST et al.(1996) Annu Rev Pharmacol Toxicol 36: 107-129; and Hunziker J et al. (1995) Mod Synth Methods 7: 331-417]에 기재되어 있다. 본 발명에 따른 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 변형을 가질 수 있으며, 각 변형은 천연 DNA 또는 RNA로 이루어진 동일한 서열의 올리고뉴클레오티드에 대비하여 특정한 포스포디에스테르 인터뉴클레오티드 가교 및(또는) 특정한  $\beta$ -D-리보스 단위 및(또는) 특정한 천연 뉴클레오티드 염기 위치에 자리한다.
- [0274] 예를 들면, 본 발명은 하나 이상의 변형을 포함하면서 각 변형이
- [0275] a) 변형된 인터뉴클레오티드 가교에 의한 뉴클레오티드의 3' 및(또는) 5' 말단에 위치한 포스포디에스테르 인터뉴클레오티드 가교의 치환,
- [0276] b) 데포스포 가교에 의한 뉴클레오티드의 3' 및(또는) 5' 말단에 위치한 포스포디에스테르 가교의 치환,
- [0277] c) 당 포스페이트 백본에서 당 포스페이트 단위의 다른 단위에 의한 치환,
- [0278] d) 변형된 당 단위에 의한  $\beta$ -D-리보스 단위의 치환, 및
- [0279] e) 변형된 뉴클레오티드 염기에 의한 천연 뉴클레오티드 염기의 치환
- [0280] 으로부터 독립적으로 선택되는 올리고뉴클레오티드에 관련된 것이다.
- [0281] 올리고뉴클레오티드의 화학적 변형에 대한 더 자세한 예는 다음과 같다.
- [0282] 뉴클레오티드의 3' 및(또는) 5' 말단에 위치한 포스포디에스테르 인터뉴클레오티드 가교는 변형된 인터뉴클레오티드 가교에 의해 치환될 수 있으며, 여기서 변형된 인터뉴클레오티드 가교는 예를 들면 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>-포스포라미데이트, 보라노포스페이트,  $\alpha$ -히드록시벤질 포스포네이트, 포스페이트-(C<sub>1</sub>-C<sub>21</sub>)-O-알킬 에스테르, 포스페이트-[(C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>)아릴-(C<sub>1</sub>-C<sub>21</sub>)-O-알킬]에스테르, (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)알킬포스포네이트 및(또는) (C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>)아릴포스포네이트 가교, (C<sub>7</sub>-C<sub>12</sub>)- $\alpha$ -히드록시메틸-아릴 (예컨대, WO 95/01363에 개시되어 있음)로부터 선택되며, 여기서 (C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>)아릴, (C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>)아릴 및 (C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>) 아릴은 할로젠, 알킬, 알콕시, 니트로, 시아노에 의해 임의로 치환되고, R<sup>1</sup> 및 R<sup>2</sup>는 서로 독립적으로 수소, (C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>)-알킬, (C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>)-아릴, (C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>)-아릴-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)-알킬, 바람직하게는 수소, (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)-알킬, 바람직하게는 (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-알킬 및(또는) 메톡시에틸이거나, 또는 R<sup>1</sup> 및 R<sup>2</sup>는 그들을 갖는 질소 원자와 함께 O, S 및 N 기로부터의 추가 헤테로원자를 추가로 함유할 수 있는 5 내지 6원 헤테로시클릭 고리를 형성한다.
- [0283] 뉴클레오티드의 3' 및(또는) 5' 말단에 위치한 포스포디에스테르 가교는 데포스포 가교에 의해 치환되며 (데포스포 가교는 예를 들면 문헌 [Uhlmann E and Peyman A in "Method in Molecular Biology", Vol. 20, "Protocols for Oligonucleotides and Analogs", S. Agrawal, Ed., Humana Press, Totowa 1993, Chapter 16, pp. 355 ff]에 기재되어 있음), 여기서 데포스포 가교는 예를 들면 데포스포 가교 포름아세탈, 3'-티오포름아세탈, 메틸히드록시아민, 옥심, 메틸렌디메틸-히드라조, 디메틸렌술폰 및(또는) 실릴 기로부터 선택된다.
- [0284] 당 포스페이트 백본 (즉, 당 포스페이트 백본은 당 포스페이트 단위들로 구성됨)으로부터의 당 포스페이트 단위 (즉, 당 포스페이트 단위를 함께 형성하는  $\beta$ -D-리보스와 포스포디에스테르 인터뉴클레오티드 가교)는 "모르폴리노-유도체" 올리고머 (예컨대, 문헌 [Stirchak EP et al. (1989) Nucleic Acids Res 17: 6129-41]에 기재됨)를 형성하는 데 적합한 다른 단위에 의해 치환, 즉, 모르폴리노-유도체 단위에 의해 치환되거나; 또는 폴리아미드 핵산 ("PNA"; 예컨대 문헌 [Nielsen PE et al. (1994) Bioconjug Chem 5: 3-7]에 기재된 것)을 형성하기에 적합한 다른 단위에 의해 치환, 즉 PNA 백본 단위, 예컨대 2-아미노에틸글리신 등에 의해 치환될 수 있다.
- [0285]  $\beta$ -리보스 단위 또는  $\beta$ -D-2'-데옥시리보스 단위는 변형된 당 단위에 의해 치환될 수 있는데, 상기 변형된 당 단위는 예를 들면  $\beta$ -D-리보스,  $\alpha$ -D-2'-데옥시리보스, L-2'-데옥시리보스, 2'-F-2'-데옥시리보스, 2'-F-아라비

노스, 2'-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)알킬-리보스 (바람직하게는 2'-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)알킬-리보스는 2'-O-메틸리보스임), 2'-O-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)알케닐-리보스, 2'-[O-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)알킬-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)알킬]-리보스, 2'-NH<sub>2</sub>-2'-데옥시리보스, β-D-크실로-푸라노스, α-아라비노푸라노스, 2,4-디데옥시-β-D-에리트르-핵소-피라노스, 및 카르보시클릭 (예컨대, 문헌 [Froehler J (1992) Am Chem Soc 114: 8320]에 기재됨) 및(또는) 개방쇄 당 유사체 (예컨대, 문헌 [Vandendriessche et al. (1993) Tetrahedron 49: 7223]에 기재됨) 및(또는) 비시클로당 유사체 (예컨대, 문헌 [Tarkov M et al. (1993) Helv Chim Acta 76: 481]에 기재됨)로부터 선택된다.

[0286] 일부 바람직한 실시양태에서, 당은 특히 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 인터뉴클레오티드 연결기에 의해 연결된 뉴클레오티드 중 하나 또는 모두의 경우에 2'-O-메틸리보스이다.

[0287] 핵산은 또한 치환된 퓨린 및 피리미딘 예컨대 C-5 프로핀 피리미딘 및 7-데아자-7-치환된 퓨린 변형 염기를 포함한다 [Wagner RW et al. (1996) Nat Biotechnol 14: 840-4]. 퓨린 및 피리미딘은 아데닌, 시토신, 구아닌, 및 티민, 및 다른 자연 및 비-자연 발생 뉴클레오염기, 치환 및 비치환된 방향족 잔기를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0288] 변형된 염기는 DNA 및 RNA에서 전형적으로 발견되는 자연 발생 염기, 예컨대 T, C, G, A, 및 U와 화학적으로 구별되는 임의의 염기이지만, 이들 자연 발생 염기가 갖는 염기성 화학 구조를 가진다. 상기 변형된 뉴클레오티드 염기는 예를 들면 히포크산틴, 우라실, 디히드로우라실, 슈도우라실, 2-티오우라실, 4-티오우라실, 5-아미노우라실, 5-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-알킬우라실, 5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-알케닐우라실, 5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-알키닐우라실, 5-(히드록시메틸)우라실, 5-클로로우라실, 5-플루오로우라실, 5-브로모우라실, 5-히드록시시토신, 5-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-알킬시토신, 5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-알케닐시토신, 5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-알키닐시토신, 5-클로로시토신, 5-플루오로시토신, 5-브로모시토신, N<sup>2</sup>-디메틸구아노신, 2,4-디아미노-퓨린, 8-아자퓨린, 치환된 7-데아자퓨린, 바람직하게는 7-데아자-7-치환 및(또는) 7-데아자-8-치환된 퓨린, 5-히드록시메틸시토신, N4-알킬시토신, 예컨대 N4-에틸시토신, 5-히드록시데옥시시티딘, 5-히드록시메틸데옥시시티딘, N4-알킬데옥시시티딘, 예컨대, N4-에틸데옥시시티딘, 6-티오데옥시구아노신, 및 니트로피롤의 데옥시리보뉴클레오티드, C5-프로피닐피리미딘, 및 디아미노퓨린, 예컨대 2,6-디아미노퓨린, 이노신, 5-메틸시토신, 2-아미노퓨린, 2-아미노-6-클로로퓨린, 히포크산틴 또는 천연 뉴클레오티드 염기의 다른 변형체로부터 선택될 수 있다. 이 목록은 실례를 의미하고, 제한하는 것으로 이해되지 않아야 한다.

[0289] 본원에 기재된 특정 식에서 변형된 염기의 세트가 정의된다. 예를 들면, 문자 Y는 시토신 또는 변형된 시토신을 함유한 뉴클레오티드를 칭하는 데 사용된다. 본원에 사용된 변형된 시토신은 올리고뉴클레오티드의 면역자극 활성의 손상 없이 이 염기를 치환할 수 있는 시토신의 자연 발생 또는 비-자연 발생 피리미딘 염기 유사체이다. 변형된 시토신은 5-치환된 시토신 (예컨대, 5-메틸-시토신, 5-플루오로-시토신, 5-클로로-시토신, 5-브로모-시토신, 5-요오도-시토신, 5-히드록시-시토신, 5-히드록시메틸-시토신, 5-디플루오로메틸-시토신, 및 비치환된 또는 치환된 5-알키닐-시토신), 6-치환된 시토신, N4-치환된 시토신 (예컨대, N4-에틸-시토신), 5-아자-시토신, 2-메르캅토-시토신, 이소시토신, 슈도-이소시토신, 시토신 유사체 (축합된 고리계를 가짐) (예컨대, N, N'-프로필렌 시토신 또는 페녹사진), 및 우라실 및 그의 유도체 (예컨대, 5-플루오로-우라실, 5-브로모-우라실, 5-브로모비닐-우라실, 4-티오-우라실, 5-히드록시-우라실, 5-프로피닐-우라실)을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 바람직한 시토신의 일부는 5-메틸-시토신, 5-플루오로-시토신, 5-히드록시-시토신, 5-히드록시메틸-시토신, 및 N4-에틸-시토신을 포함한다. 본 발명의 또다른 실시양태에서, 시토신 염기는 보편적인 염기 (예컨대, 3-니트로피롤, P-염기), 방향족 고리계 (예컨대, 플루오로벤젠 또는 디플루오로벤젠) 또는 수소 원자 (dSpacer)에 의해 치환된다.

[0290] 문자 Z는 구아닌 또는 변형된 구아닌 염기를 칭하는 데 사용된다. 본원에 사용된 변형된 구아닌은 올리고뉴클레오티드의 면역자극 활성의 손상 없이 이 염기를 치환할 수 있는 구아닌의 자연 발생 또는 비-자연 발생 퓨린 염기 유사체이다. 변형된 구아닌은 7-데아자구아닌, 7-데아자-7-치환된 구아닌 (예컨대, 7-데아자-7-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)알키닐구아닌), 7-데아자-8-치환된 구아닌, 히포크산틴, N2-치환된 구아닌 (예컨대, N2-메틸-구아닌), 5-아미노-3-메틸-3H,6H-티아졸로[4,5-d]피리미딘-2,7-디온, 2,6-디아미노퓨린, 2-아미노퓨린, 퓨린, 인돌, 아데닌, 치환된 아데닌 (예컨대, N6-메틸-아데닌, 8-옥소-아데닌) 8-치환된 구아닌 (예컨대, 8-히드록시구아닌 및 8-브로모구아닌), 및 6-티오구아닌을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 또다른 실시양태에서, 구아닌 염기는 보편적인 염기 (예컨대, 4-메틸-인돌, 5-니트로-인돌, 및 K-염기), 방향족 고리계 (예컨대, 벤즈이미다졸 또는 디클로로-벤즈이미다졸, 1-메틸-1H-[1,2,4]트리아졸-3-카르복실산 아미드) 또는 수소 원자 (dSpacer)에 의해

치환된다.

- [0291] 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 접근가능 5' 말단을 가질 수 있다. 2개의 이러한 5' 말단을 갖는 변형된 올리고뉴클레오티드를 생성할 수 있다. 이는 예를 들면 3'-3'연결기를 통해 2개의 올리고뉴클레오티드를 부착하여 1 또는 2개의 접근가능 5' 말단을 갖는 올리고뉴클레오티드를 생성함으로써 달성될 수 있다. 3'3'-연결기는 포스포디에스테르, 포스포로티오에이트 또는 임의의 다른 변형된 인터뉴클레오티드 가교일 수 있다. 이러한 연결을 달성하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들면, 이러한 연결기는 문헌 [Seliger, H.; et al., Oligonucleotide analogs with terminal 3'-3'-and 5'-5'-internucleotides linkages as antisense inhibitors of viral gene expression, *Nucleotides & Nucleotides* (1991), 10 (1-3), 469-77 and Jiang, et al., Pseudo-cyclic oligonucleotides: in vitro and in vivo properties, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (1999), 7 (12), 2727-2735]에 기재되어 있다.
- [0292] 또한, 3'-말단 뉴클레오티드 사이의 연결기가 포스포디에스테르, 포스포로티오에이트 또는 다른 변형된 가교가 아닌 3'3'-연결된 핵산은 추가 스페이스, 예컨대 트리- 또는 테트라-에틸렌글리콜 포스페이트 잔기 ([Durand, M. et al, Triple-helix formation by an oligonucleotide containing one (dA) 12 and two (dT) 12 sequences bridged by two hexaethylene glycol chains, *Biochemistry* (1992), 31 (38), 9197-204], 미국 특허 제5658738호, 및 동 제5668265호)를 사용하여 제조할 수 있다. 변형으로는, 비-뉴클레오티드 링커는 표준 포스포라미다이트 화학을 사용하여 에탄디올, 프로판디올, 또는 탈-염기성 (abasic) 데옥시리보스 (dSpacer) 단위로 부터 유도될 수 있다 [Fontanel, Marie Laurence et al., Sterical recognition by T4 polynucleotide kinase of non-nucleosidic moieties 5'-attached to oligonucleotides; *Nucleic Acids Research* (1994), 22 (11), 2022-7]. 비-뉴클레오티드 링커는 1회 또는 수회, 또는 연결될 2개의 ODN의 3'-말단 사이의 임의의 바람직한 거리에 허용되는 각각의 다른 것과 조합하여 삽입될 수 있다.
- [0293] 최근에, CpG 올리고뉴클레오티드가 Toll-유사 수용체 9 (TLR9)와의 상호작용을 통한 그의 면역자극 효과를 발휘하는 것으로 보고되고 있다 [Hemmi H et al. (2000) *Nature* 408: 740-5]. 따라서, TLR9 신호전달 활성화는 NF-κB, NF-κB-관련 신호, 및 적합한 현상 및 NF-κB의 상류 중간체를 측정함으로써 CpG 올리고뉴클레오티드 또는 다른 면역자극 핵산에 대한 반응으로 측정될 수 있다.
- [0294] 본 발명에 사용하기 위해, 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 당업계에 잘 공지된 다수의 임의의 방법을 사용하여 새롭게 합성할 수 있다. 예컨대 b-시아노에틸 포스포라미다이트법 [Beaucage, S. L., and Caruthers, M. H., *Tet. Let.* 22: 1859, 1981]; 및 뉴클레오티드 H-포스포네이트법 [Garegg et al., *Tet. Let.* 27: 4051-4054, 1986; Froehler et al., *Nucl. Acid. Res.* 14: 5399-5407, 1986,; Garegg et al., *Tet. Let.* 27: 4055-4058, 1986, Gaffney et al., *Tet. Let.* 29: 2619-2622, 1988]이 있다. 이들 화학반응은 시판되는 다양한 자동화된 핵산 합성기로 수행할 수 있다. 이들 올리고뉴클레오티드를 합성 올리고뉴클레오티드라 칭한다. 단리된 올리고뉴클레오티드는 일반적으로 자연 상태에서라면 보통 결합되어 있을 성분들로부터 분리되어 있는 핵산을 말한다. 예로서, 단리된 올리고뉴클레오티드는 세포, 핵, 미토콘드리아 또는 염색질로부터 분리되어 있는 것일 수 있다.
- [0295] 올리고뉴클레오티드는 분해 (예컨대, 안정화됨)에 부분적으로 내성이다. A "안정화된 올리고뉴클레오티드 분자"는 생체내 분해 (예, 엑소뉴클레아제 또는 엔도뉴클레아제를 통해)에 대해 비교적 저항성인 올리고뉴클레오티드를 의미한다. 핵산 안정화는 백본 변형을 통해 이루어질 수 있다. 포스포로티오에이트 연결기를 갖는 올리고뉴클레오티드는 최대 활성을 제공하고, 세포내 엑소뉴클레아제 및 엔도뉴클레아제에 의한 분해로부터 올리고뉴클레오티드를 보호한다. 다른 변형된 올리고뉴클레오티드는 포스포디에스테르 변형 핵산, 포스포디에스테르 및 포스포로티오에이트 핵산의 조합물, 메틸포스포네이트, 메틸포스포로티오에이트, 포스포로티오에이트, p-에톡시, 및 이들의 조합물을 포함한다.
- [0296] 포스포로티오에이트와 같은 변형 백본은 포스포라미다이트 또는 H-포스포네이트 화학물질을 사용하는 자동화 기술을 이용하여 합성할 수 있다. 아릴- 및 알킬-포스포네이트는 예를 들어, 미국 특허 제4,469,863호에 기재된 바와 같이 제조할 수 있고; 알킬포스포트리에스테르 (하전된 산소 잔기가 미국 특허 제5,023,243호 및 유럽 특허 제092,574호에 기재된 바와 같이 알킬화되어 있음)는 상업적으로 입수가능한 시약을 사용하여 자동화 고상 합성에 의해 제조할 수 있다. 다른 DNA 백본 변형체 및 치환체를 제조하는 방법은 문헌 (예컨대, 문헌 [Uhlmann, E. and Peyman, A., *Chem. Rev.* 90: 544, 1990; Goodchild, J., *Bioconjugate Chem* 1: 165, 1990]에 기재되어 있다.
- [0297] 다른 안정화된 올리고뉴클레오티드는 비이온성 DNA 유사체, 예컨대 알킬- 및 아릴-포스페이트 (여기서, 하전된

포스포네이트 산소는 알킬 또는 아릴 기에 의해 치환됨), 포스포디에스테르 및 알킬포스포트리에스테르 (하전된 산소 잔기는 알킬화됨)를 포함한다. 두 말단 중 하나 또는 모두에서 디올, 예컨대 테트라에틸렌글리콜 또는 헥사에틸렌글리콜을 함유하는 핵산은 또한 뉴클레아제 분해에 실질적으로 내성인 것으로 나타났다.

[0298] 마우스에서의 CpG 효과는 잘 특성화되어 있는 반면, 인간 시스템에 관한 정보는 제한되어 있다. 마우스 시스템에서 강한 자극 활성을 갖는 CpG 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오티드는 인간 및 다른 비-설치류 면역 세포에서 더 낮은 활성을 보인다. 예로서, 유능한 인간 CpG 모티프의 발생 및 인간 PBMC, 예컨대, B-세포, 및 NK-세포에 대한 그의 효과 및 작용 메카니즘의 특성화가 설명된다. 이들 CpG 모티프 및 부분적으로 변형된 백본을 함유한 DNA는 인간 말초 혈액 세포를 강하게 자극하여 IL-6, IL-10, IP-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , 및 IFN- $\gamma$ 를 생성한다. IFN- $\gamma$ 는 대조군 수준보다 증가되었다. NK 세포 및 T 세포는 또한 유도되어 증가된 수준의 CD69를 발현한다.

[0299] 본 발명에 따라, CpG 면역자극 올리고뉴클레오티드는 인간 세포, 예컨대 NK 세포에 대한 강력한 면역자극 효과를 갖는 것을 발견하였으며. 이는 CpG 면역자극 올리고뉴클레오티드가 인간 백신접종, 암 면역요법, 천식 면역요법, 면역 기능의 일반적 강화, 방사선요법 또는 방사선 또는 화학요법 후 조혈 회수의 강화, 자가면역 질환 및 기타 면역 조절 용도에 효과적인 치료제임을 제시한다는 것이 입증되었다.

[0300] 따라서, CpG 면역자극 올리고뉴클레오티드는 감염성 유기체로의 감염, 특정한 암 항원이 확인되어 있는 암, 또는 알레르기나 또는 천식이 발병될 위험이 있는 대상체의 치료를 위한 예방 백신으로서 본 발명의 몇몇 측면에서 유용하다. CpG 면역자극 올리고뉴클레오티드는 감염, 알레르기 또는 암에 대한 항원 또는 알레르기 없이 투여할 수도 있고, 이 경우 반복된 투여가 보다 긴 기간 동안 허용될 수 있다. 본원에 이용된 바와 같이 상기 위험이 있는 대상체는 감염을 유발하는 병원체, 암, 알레르기에 노출될 위험, 또는 암이 발병될 위험이 있는 대상체이다. 예를 들어, 상기와 같은 위험에 있는 대상체는 특정한 유형의 감염원이 발견된 지역으로 여행할 계획이 있는 대상체이거나, 생활습관 또는 의학적 처리를 통해 감염성 유기체를 함유할 수 있는 체액에 노출되거나 상기 감염성 유기체에 직접 노출된 대상체, 또는 심지어 감염성 유기체나 알레르겐이 확인된 지역에 사는 임의의 대상체일 수 있다. 감염될 위험이 있는 대상체에는 의료 기관으로부터 특정한 감염성 유기체 항원로서의 백신접종을 권유받은 일반적 집단도 포함된다. 항원이 알레르겐이고 대상체가 특정한 항원에 대한 알레르기 반응을 일으키고 대상체가 즉, 수분 계절 동안 항원에 노출될 수 있는 경우, 상기 대상체는 항원에 노출될 위험에 있다. 알레르기 또는 천식이 발병될 위험이 있는 대상체에는 알레르기 또는 천식을 갖지만 CpG 면역자극 올리고뉴클레오티드 치료 동안 활성 질환을 갖지 않는 것으로 확인된 대상체 뿐만 아니라, 유전적 또는 환경적 인자로 인해 이들 질환이 발병될 위험이 있는 것으로 생각되는 대상체가 포함된다.

[0301] 암이 발병될 위험이 있는 대상체는 암이 발병될 가능성이 높은 대상체이다. 이들 대상체에는 예를 들어, 높은 암 발병 가능성의 상호 관계가 있는 것으로 입증된 유전적 결함이 있는 대상체; 및 담배, 석면 또는 기타 화학독소와 같은 암 유발제에 노출된 대상체, 또는 이전에 암 치료를 받아 명백한 차도가 있는 대상체가 포함된다. 암이 발병될 위험이 있는 대상체가 이 대상체에서 발병될 위험이 있는 유형의 암에 대해 특이적인 항원 및 면역자극성 핵산으로 치료받는 경우, 대상체는 발병하는 암 세포를 사멸시킬 수 있다. 종양이 대상체에서 형성되기 시작하면, 대상체는 종양 항원에 대한 특이적 면역 반응을 일으킬 것이다.

[0302] 예방학적 치료를 위한 CpG 면역자극 올리고뉴클레오티드의 사용 이외에, 본 발명은 감염, 알레르기, 천식 또는 암을 앓는 대상체의 치료를 위한 CpG 면역자극 올리고뉴클레오티드의 용도도 포함한다.

[0303] 감염을 앓는 대상체는 감염성 병원체에 노출되고 검출가능한 수준의 급성 또는 만성 병원체가 체내에 존재하는 대상체이다. CpG 면역자극 올리고뉴클레오티드는 항체와 함께 사용되어 감염성 병원체를 감소시킬 수 있는 또는 박멸시킬 수 있는 수준의 항원 특이적 전신 또는 점막 면역 반응을 일으킬 수 있다. 본원에 사용된 감염 질환은 외부 미생물이 체내에 존재함으로써 발생하는 질환이다. 특히, 병원체가 침투하는 일차 부위인 신체 점막 표면을 보호하기에 효과적인 백신화 방법 및 치료 방법을 개발하는 것이 중요하다.

[0304] 알레르기를 앓는 대상체는 알레르기에 반응하여 알레르기 반응을 일으키거나 일으킬 위험이 있는 대상체이다. 알레르기는 물질 (알레르겐)에 대한 후천성 과민증을 말한다. 알레르기 상태에는 습진, 알레르기성 류마티스 또는 코감기, 고초열, 결막염, 기관지 천식, 담마진 (두드러기) 및 음식 알레르기, 및 기타 아토피성 증상이 포함되나, 이에 제한되지 않는다.

[0305] 알레르기는 일반적으로 유해하지 않은 알레르기에 대한 IgE 항체 생성에 의해 야기된다. CpG 면역자극 올리고뉴클레오티드의 전신 또는 점막 투여에 의해 유도되는 사이토카인은 주로 Th1 (예로는 IL-12, IP-10, IFN- $\alpha$  및

IFN- $\gamma$ 가 있음)으로 불리는 클래스이고, 이들은 체액성 및 세포성 면역 반응 둘다를 유도한다. IL-4 및 IL-5 사이토카인의 생성과 관련된 면역 반응의 다른 주요 형태는 Th2 면역 반응으로 불린다. 일반적으로, 알레르기 질환은 Th2 타입 면역 반응에 의해 매개되는 것으로 나타난다. 대상체에서 우세한 Th2 반응 (IgE 항체 및 알레르기의 생성과 관련되어 있음)에서 균형된 Th2/Th1 반응 (알레르기 반응에 대한 보호효과를 갖고 있음)으로 면역 반응을 전환시키는 CpG 면역자극 올리고뉴클레오티드의 능력을 기초로 하여, 천식 및 알레르기를 치료하거나 예방할 대상체에게 면역자극성 핵산의 면역 반응을 유도하기에 효과적인 투여량을 투여할 수 있다.

[0306] 따라서, CpG 면역자극 올리고뉴클레오티드는 알레르기성 증상, 및 천식과 같은 비-알레르기성 증상의 치료에 상당히 유용하다. Th2 사이토카인, 특히 IL-4 및 IL-5는 천식 대상체의 기도에서 상승되어 있다. 이들 사이토카인은 IgE 이소토프 스위칭, 호산구 화학주성 및 활성화, 및 비만 세포 (mast cell)의 성장을 포함하는, 천식 염증 반응의 중요한 측면을 촉진한다. Th1 사이토카인, 특히 IFN- $\gamma$  및 IL-12는 Th2 클론의 형성 및 Th2 사이토카인의 생성을 억제할 수 있다. 천식은 염증, 기도의 협소화, 및 흡입된 물질에 대한 기도의 증가된 반응성을 특징으로 하는 호흡 시스템 장애를 말한다. 천식은 전적으로 아토피성 또는 알레르기성 증상과 관련되어 있지는 않지만 흔한 질환이다.

[0307] 암을 앓는 대상체는 검출가능한 암 세포를 갖는 대상체이다. 암은 악성 또는 비-악성 암일 수 있다. 암 또는 종양에는 담도암; 뇌암; 유방암; 자궁암; 용모암; 결장암; 자궁내막암; 식도암; 위암; 상피내육종; 림프종; 간암; 폐암 (예를 들어, 소세포 및 비-소세포); 흑색종; 신경아종; 구강암; 난소암; 췌장암; 전립선암; 직장암; 육종; 피부암; 정소암; 갑상선암; 및 신장암, 뿐만 아니라, 다른 암종 및 육종이 포함되나, 이에 제한되지 않는다. 일 실시양태에서, 암은 모발상 세포 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 피부 T-세포 백혈병, 다발성 골수종, 여포 림프종, 악성 흑색종, 편평세포암종, 신장세포암종, 전립선암종, 방광세포암종 또는 결장암종이다.

[0308] 대상체는 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 양, 염소, 칠면조, 닭, 영장류, 예를 들어, 원숭이, 및 어류 (수중배양종), 예를 들어, 연어를 포함하나, 이에 제한되지 않는 인간 또는 척추동물을 의미한다. 따라서, 본 발명은 비-인간 대상체에서 암 및 종양, 감염 및 알레르기/천식을 치료하는 데 사용할 수도 있다. 암은 애완 동물 (즉, 고양이 및 개)이 사망하는 주된 원인 중 하나이다.

[0309] 질병, 예컨대, 감염성 질환, 암, 알레르기, 또는 천식에 관해 사용되는 경우에 본원에 사용된 용어 "치료하다", "치료된" 또는 "치료하는"은 질환의 발병에 대한 (예컨대, 병원체 감염에 대한) 대상체의 내성을 증가시키거나 또는, 달리, 대상체가 질환 (예컨대, 병원체로 감염되는) 질환이 발병할 징후를 감소시키는 예방적 처리 뿐만 아니라 질환과 싸우거나 (예컨대, 감염의 저하 또는 제거) 또는 악화로부터 질환을 저지하기 위한 대상체에서의 질환 발병 후의 치료를 나타낸다.

[0310] 예로서, CpG 올리고뉴클레오티드를 항원과 투여하는 경우에, 대상체는 항원에 노출될 수 있다. 본원에 사용된 용어 "노출된"은 대상체를 항원과 접촉시키는 능동 단계, 또는 생체내에서 대상체를 항원에 수동적으로 노출시키는 단계를 말한다. 대상체를 항원에 능동적으로 노출시키는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 일반적으로, 항원은 정맥내, 근육내, 경구, 경피, 점막, 비강내, 기관내 또는 피하 투여와 같은 임의의 방법으로 대상체에 직접 투여한다. 항원은 전신 또는 국소 투여할 수 있다. 항원 및 CpG 면역자극 올리고뉴클레오티드를 투여하는 방법은 아래에 보다 더 자세히 기재되어 있다. 대상체는 항원이 체내에서 면역 세포에 노출될 수 있게 되면 항원에 수동적으로 노출된다. 대상체는 예를 들어, 외부 병원체를 체내로 도입시키거나 표면에 외부 항원을 발현하는 종양 세포를 발생시킴으로써 항원에 수동적으로 노출시킬 수 있다.

[0311] 대상체를 항원에 수동적으로 노출시키는 방법은 특히, CpG 면역자극 올리고뉴클레오티드의 투여 시기에 달려 있을 수 있다. 예를 들어, 암, 감염 질환, 알레르기 반응 또는 천식 반응이 일어날 위험이 있는 대상체에 있어서, CpG 면역자극 올리고뉴클레오티드는 상기 위험이 가장 높을 때 즉, 알레르기 기간 동안 또는 대상체를 암유발제에 노출시킨 후 정기적으로 대상체에게 투여할 수 있다. 또한, CpG 면역자극 올리고뉴클레오티드는 여행자들이 감염성 물질에 노출될 위험이 있는 외부 지역으로 여행하기 전에 여행자에게 투여할 수 있다. 마찬가지로, CpG 면역자극 올리고뉴클레오티드는 세균전에 노출될 위험에 있는 군인 또는 시민에게 투여하여 군인 또는 시민이 세균전에 노출될 때 항원에 대한 전신성 또는 점막성 면역 반응을 유도할 수 있다.

[0312] 본원에 사용된 항원은 면역 반응을 일으킬 수 있는 분자이다. 항원에는 세포, 세포 추출물, 단백질, 폴리펩티드, 펩티드, 폴리사카라이드, 폴리사카라이드 컨쥬게이트, 펩티드, 폴리사카라이드와 다른 분자의 비-펩티드 유사체, 소분자, 지질, 당지질, 탄수화물, 바이러스, 바이러스 추출물, 및 기생충과 알레르기와 같은 다세포 유기체가 포함되나, 이에 제한되지 않는다. 용어 항원에는 넓게, 숙주 면역 시스템에 의해 외부 물질로 인식되는 임의의 유형의 분자가 포함된다. 항원에는 암 항원, 미생물 항원 및 알레르기이 포함되나, 이에 제한되지 않는다

다.

- [0313] 본원에 사용된 암 항원은 종양 또는 암 세포 표면에 결합되어 있고 MHC 분자의 컨텍스트로 항원 제시 세포의 표면 상에 발현될 때 면역 반응을 일으킬 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 추출물의 준비, 항원의 부분 정제, 재조합 기술 또는 공지된 항원의 드 노보 합성에 의해 암세포로부터 제조할 수 있다. 암 항원에는 재조합 기술에 의해 발현되는 항원, 항원의 면역원성 부위, 또는 종양이나 암 전체가 포함되나, 이에 제한되지 않는다. 이러한 항원은 재조합 방법 또는 당업계에 공지된 임의의 다른 방법에 의해 단리할 수 있거나 제조할 수 있다.
- [0314] 본원에 사용된 미생물 항원은 미생물의 항원이고 바이러스, 박테리아, 기생충 및 진균을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 이러한 항원에는 온전한 미생물 뿐만 아니라, 그의 천연 단리물 및 단편이나 유도체가 포함되고 천연 미생물 항원과 동일하거나 유사하며 그 미생물에 특이적인 면역 반응을 유도하는 합성 화합물도 포함된다. 화합물이 천연 미생물 항원에 대한 면역 반응 (체액성 및(또는) 세포성)을 유도하면 상기 화합물은 천연 미생물 항원과 유사하다. 이러한 항원은 당업계에서 통상적으로 사용되고 있고 당업계에서 통상의 기술을 가진 자에게 잘 공지되어 있다.
- [0315] 인간에서 발견되는 바이러스의 예에는 레트로비리대 (*Retroviridae*) (예컨대, HIV-1 (HTLV-III, LAV, HTLV-III/LAV, 또는 HIV-III로도 불림)와 같은 인간 면역결핍증 바이러스; 및 HIV-LP와 같은 다른 단리체); 피코르나비리대 (*Picornaviridae*) (예를 들어, 폴리오 바이러스, 간염 A 바이러스; 장내바이러스, 인간 콕사키 바이러스, 리노바이러스 (*rhinovirus*), 에코바이러스 (*echovirus*)); 칼시비리대 (*Calciviridae*) (예를 들어, 위장염을 일으키는 균주); 토가비리대 (*Togaviridae*) (예를 들어, 뇌염 바이러스, 풍진 바이러스); 플라비리대 (*Flaviridae*) (예를 들어, 탱그 바이러스, 뇌염 바이러스, 황열 바이러스); 코로노비리대 (*Coronaviridae*) (예를 들어, 코로나바이러스); 라브도비리대 (*Rhabdoviridae*) (예를 들어, 수포성 구내염 바이러스, 광견병 바이러스); 필로비리대 (*Filoviridae*) (예를 들어, 에볼라 바이러스); 파라믹소비리대 (*Paramyxoviridae*) (예를 들어, 파라인플루엔자 바이러스, 유행성 이하선염 바이러스, 홍역 바이러스, 호흡기 합포체 바이러스); 오르토믹소비리대 (*Orthomyxoviridae*) (예를 들어, 인플루엔자 바이러스); 병가비리대 (*Bungaviridae*) (예를 들어, 한탄 바이러스, 병가 바이러스, 플레보바이러스 (*phlebovirus*) 및 나이로 바이러스); 아레나비리대 (*Arenaviridae*) (출혈성 열 바이러스); 레오비리대 (*Reoviridae*) (예를 들어, 레오바이러스, 오르비바이러스 및 로타 바이러스); 비르나비리대 (*Birnaviridae*); 헤파드나비리대 (*Hepadnaviridae*) (간염 B 바이러스); 파르보비리대 (*Parvoviridae*) (파르보바이러스); 파포바비리대 (*Papovaviridae*) (파필로마 바이러스, 폴리오마 바이러스); 아데노비리대 (*Adenoviridae*) (대부분의 아데노바이러스); 헤르페스비리대 (*Herpesviridae*) (헤르페스 심플렉스 바이러스 (HSV) 1 및 2, 수두대상포진 바이러스, 사이토메갈로바이러스 (CMV), 헤르페스 바이러스); 포क्स비리대 (*Poxviridae*) (천연두 바이러스, 백시니아 바이러스, 포크스 바이러스); 및 이리도비리대 (*Iridoviridae*) (예를 들어, 아프리카 돼지 열 바이러스); 및 분류되지 않은 바이러스 [예를 들어, 해면상 뇌병증의 병인체, 델타 간염의 병인체 (간염 B 바이러스의 결핍 새틀라이트 (satellite)인 것으로 생각됨), 비-A, 비-B 간염의 병인체 (클래스 1 = 내부 전달됨; 클래스 2 = 비경구 전달됨 (즉, 간염 C); 노르워크 (Norwalk) 및 관련 바이러스, 및 아스트로바이러스]가 포함되나, 이에 제한되지 않는다.
- [0316] 그람 음성 및 그람 양성 박테리아 둘다 척추동물에서 항원으로 작용한다. 이러한 그람 양성 박테리아에는 파스테렐라 종 (*Pasteurella species*), 스타필로코키 종 (*Staphylococci species*), 및 스트렙토코쿠스 종 (*Streptococcus species*)이 포함되지만 이에 제한되지 않는다. 그람 음성 박테리아에는 대장균 (*Escherichia coli*), 슈도모나스 종 (*Pseudomonas species*) 및 살모넬라 종 (*Salmonella species*)이 포함되나, 이에 제한되지 않는다. 감염성 박테리아의 구체적 예에는 헬리코박터 파이로리스 (*Helicobacter pyloris*), 보렐리아 부르그도르페리 (*Borelia burgdorferi*), 레지오넬라 뉴모필리아 (*Legionella pneumophilia*), 마이코박테리아 (*Mycobacteria*) 종 (예를 들어, 마이코박테리아 튜버쿨로시스 (*M. tuberculosis*), 마이코박테리아 아비움 (*M. avium*), 마이코박테리아 인트라셀룰라 (*M. intracellulare*), 마이코박테리아 칸사이 (*M. kansasii*), 마이코박테리아 고르도나 (*M. gordonae*), 스타필로코쿠스 아우레우스 (*Staphylococcus aureus*), 네이세리아 고노르호에아 (*Neisseria gonorrhoeae*), 네이세리아 메닝기티디스 (*Neisseria meningitidis*), 리스테리아 모노사이토게네스 (*Listeria monocytogenes*), 스트렙토코쿠스 피오게네스 (*Streptococcus pyogenes*) (군 A 스트렙토코쿠스), 스트렙토코쿠스 아갈락티아 (*Streptococcus agalactiae*) (군 B 스트렙토코쿠스), 스트렙토코쿠스 (비리단스 군), 스트렙토코쿠스 패칼리스 (*Streptococcus faecalis*), 스트렙토코쿠스 보비스 (*Streptococcus bovis*), 스트렙토코쿠스 (협기성 종), 스트렙토코쿠스 뉴모니아 (*Streptococcus pneumoniae*), 병원성 캄필로박터 종

(*Campylobacter* sp.), 엔테로코쿠스 종 (*Enterococcus* sp.), 헤모필루스 인플루엔자 (*Haemophilus influenzae*), 바실러스 안트라시스 (*Bacillus anthracis*), 코리네박테리움 디프테리아 (*Corynebacterium diphtheriae*), 코리네박테리움 종 (*Corynebacterium* sp.), 이리시펠로트릭스 루시오패씨아 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*), 클로스트리디움 퍼프링게르스 (*Clostridium perfringens*), 클로스트리디움 테타니 (*Clostridium tetani*), 엔테로박터 애로게네스 (*Enterobacter aerogenes*), 클렙시엘라 뉴모니아 (*Klebsiella pneumoniae*), 파스투렐라 툴토시다 (*Pasturella multocida*), 박테로이데스 종 (*Bacteroides* sp.), 퓨조박테리움 뉴클레아툼 (*Fusobacterium nucleatum*), 스트렙토바실러스 모닐포르미스 (*Streptobacillus moniliformis*), 트레포네마 팔리디움 (*Treponema pallidum*), 트레포네마 퍼테뉴 (*Treponema pertenuis*), 렘토스피라 (*Leptospira*), 리케차 (*Rickettsia*) 및 악티노마이세스 이스라엘리 (*Actinomyces israelii*)가 포함되나, 이에 제한되지 않는다.

[0317] 진균의 예에는 크립토코쿠스 네오포르만스 (*Cryptococcus neoformans*), 히스토플라스마 캡슐라툼 (*Histoplasma capsulatum*), 코시디오이데스 이미티스 (*Coccidioides immitis*), 블라스토마이세스 데르마티티디스 (*Blastomyces dermatitidis*), 클라미디아 트라코마티스 (*Chlamydia trachomatis*), 캔디다 알비칸스 (*Candida albicans*)가 포함된다.

[0318] 다른 감염성 유기체 (즉, 원생생물)에는 플라스모디움 팔시파룸 (*Plasmodium falciparum*), 플라스모디움 말라리아 (*Plasmodium malariae*), 플라스모디움 오발 (*Plasmodium ovale*) 및 플라스모디움 비박스 (*Plasmodium vivax*)와 같은 플라스모디움 (*Plasmodium*) 종, 및 독소플라스마 곤디이 (*Toxoplasma gondii*)가 포함된다. 혈액-유래 및(또는) 조직 기생충에는 플라스모디움 종, 바베시아 마이크로티 (*Babesia microti*), 바베시아 디버겐스 (*Babesia divergens*), 레이쉬마니아 트로피카 (*Leishmania tropica*), 레이쉬마니아 종, 레이쉬마니아 브라질리엔시스 (*Leishmania braziliensis*), 레이쉬마니아 도노바니 (*Leishmania donovani*), 트리파노소마 감비엔스 (*Trypanosoma gambiense*) 및 트리파노소마 로데시엔스 (*Trypanosoma rhodesiense* (아프리카 수면병)), 트리파노소마 크루지 (*Trypanosoma cruzi* (샤가스병 (Chagas' disease))) 및 독소플라스마 곤디이가 포함된다.

[0319] 다른 의학 관련 미생물은 문헌 (예컨대, 문헌 [C.G.A Thomas, Medical Microbiology, Bailliere Tindall, Great Britain 1983 참조]에 광범위하게 기재되어 있고, 이 문헌의 전 내용은 본원에 포함되는 것으로 한다.

[0320] 알레르겐 (allergen)이란 감염되기 쉬운 대상에서 알러지 반응 또는 천식 반응을 유도할 수 있는 물질 (항원)을 의미한다. 알레르겐의 종류는 매우 많으며, 화분, 곤충 독, 동물의 비듬 가루, 진균 포자 및 약물 (예를 들어, 페니실린)이 포함될 수 있다. 천연의 동물 및 식물 알레르겐의 예로는 다음 속에 특이적인 단백질이 포함되지만 이에 한정되지 않는다: 캐닌 (Canine) (*Canis familiaris*); 더마토파고이데스 (*Dermatophagoides*) (예를 들어, *Dermatophagoides farinae*); 펠리스 (Felis) (*Felis domesticus*); 암브로시아 (*Ambrosia*) (*Ambrosia artemisiifolia*); 롤리움 (*Lolium*) (예를 들어, *Lolium perenne* 또는 *Lolium multiflorum*); 크립토메리아 (*Cryptomeria*) (*Cryptomeria japonica*); 알터나리아 (*Alternaria*) (*Alternaria alternata*); 알더 (Alder); 알누스 (*Alnus*) (*Alnus gultinoasa*); 베틀라 (*Betula*) (*Betula verrucosa*); 쿠에르쿠스 (*Quercus*) (*Quercus alba*); 올레아 (*Olea*) (*Olea europa*); 아르테미시아 (*Artemisia*) (*Artemisia vulgaris*); 플란타고 (*Plantago*) (예를 들어, *Plantago lanceolata*); 파리에타리아 (*Parietaria*) (예를 들어, *Parietaria officinalis* 또는 *Parietaria judaica*); 블라텔라 (*Blattella*) (예를 들어, *Blattella germanica*); 아피스 (*Apis*) (예를 들어, *Apis multiflorum*); 쿠프레수스 (*Cupressus*) (예를 들어, *Cupressus sempervirens*, *Cupressus arizonica* 및 *Cupressus macrocarpa*); 유니페루스 (*Juniperus*) (예를 들어, *Juniperus sabinoides*, *Juniperus virginiana*, *Juniperus communis* 및 *Juniperus ashei*); 추야 (*Thuya*) (예를 들어, *Thuya orientalis*); 카메시파리스 (*Chamaecyparis*) (예를 들어, *Chamaecyparis obtusa*); 페리플라네타 (*Periplaneta*) (예를 들어, *Periplaneta americana*); 아그로피론 (*Agropyron*) (예를 들어, *Agropyron repens*); 세칼레 (*Secale*) (예를 들어, *Secale cereale*); 트리티쿰 (*Triticum*) (예를 들어, *Triticum aestivum*); 닥틸리스 (*Dactylis*) (예를 들어, *Dactylis glomerata*); 페스투카 (*Festuca*) (예를 들어, *Festuca elatior*); 포아 (*Poa*) (예를 들어, *Poa pratensis* 또는 *Poa compressa*); 아베나 (*Avena*) (예를 들어, *Avena sativa*); 홀쿠스 (*Holcus*) (예를 들어, *Holcus lanatus*); 안톡산툼 (*Anthoxanthum*) (예를 들어, *Anthoxanthum odoratum*); 아레나테룸 (*Arrhenatherum*) (예를 들어, *Arrhenatherum elatius*); 아그로스티스 (*Agrostis*) (예를 들어, *Agrostis alba*); 플레움 (*Phleum*) (예를 들어, *Phleum pratense*); 팔라리스 (*Phalaris*) (예를 들어, *Phalaris arundinacea*); 파스팔룸 (*Paspalum*) (예를 들어, *Paspalum notatum*); 소르굼 (*Sorghum*) (예를 들어, *Sorghum halepensis*); 및 브로무스 (*Bromus*) (예를 들어, *Bromus inermis*).

[0321] 본원에 사용된 바와 같이 실질적으로 "정제된"이라는 용어는 자연적으로 결합된 다른 단백질, 지질, 탄수화물

또는 다른 물질이 실질적으로 없는 폴리펩티드를 의미한다. 당업자라면 단백질 정제에 대한 표준 기술을 사용하여 바이러스 또는 박테리아 폴리펩티드를 정제할 수 있다. 실질적으로 순수한 폴리펩티드는 흔히 비-환원성 겔상에 단일한 주요 밴드를 형성할 것이다. 부분적으로 글리코실화된 폴리펩티드 또는 여러 개시 코돈을 갖는 폴리펩티드의 경우, 비-환원성 폴리아크릴아미드 겔상에 여러 밴드가 있을 수 있지만, 이들은 이 폴리펩티드에 대하여 구별되는 패턴을 형성할 것이다. 바이러스 또는 박테리아 폴리펩티드의 순도는 또한 아미노-말단 아미노산 서열분석에 의해 결정할 수 있다. 핵산 벡터에 의해 코딩되지 않는 다른 유형의 항원, 예를 들어 폴리사카라이드, 소분자, 모방체 등은 상기 기재되어 있으며, 본 발명에 포함된다.

[0322] 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 항미생물제와 함께 대상에게 투여될 수 있다. 본 명세서에서, 항미생물제는 감염성 미생물을 죽이거나 억제할 수 있는 천연, 합성 또는 반합성 화합물을 말한다. 본 발명에 따른 유용한 항미생물제의 종류는 대상이 감염되었거나 감염될 위험이 있는 미생물의 종류에 따라 달라질 것이다. 항미생물제는 항균제, 항바이러스제, 항진균제 및 구충제를 포함하나, 여기에 한정되지는 않는다. "항감염제", "항균제", "항바이러스제", "항진균제", "구충제" 및 "살충제"와 같은 용어는 당업자에게 잘 확립된 의미를 가지며, 보통의 의학적 맥락에서 정의된다. 요컨대, 항균제는 세균을 죽이거나 억제하며, 항생제뿐 아니라 비슷한 기능을 갖는 다른 합성 또는 천연 화합물을 포함한다. 항생제는 미생물과 같은 세포에 의해 부수적인 대사 물질로 생산되는 저분자량 분자들이다. 일반적으로, 항생제는 해당 미생물에 특이적이면서 숙주 세포에는 존재하지 않는 한 가지 이상의 세균 기능 또는 구조를 방해한다. 항바이러스제는 천연 원료에서 단리하거나 합성할 수 있으며, 바이러스를 죽이거나 억제하는 데 유용하다. 항진균제는 표면적인 진균 감염뿐 아니라 기회성 및 원발성 전신 진균 감염을 치료하는 데 사용한다. 구충제는 기생충을 죽이거나 억제한다.

[0323] 또한, 인간에 대한 투여에 유용한 살기생충제라고도 하는 항-기생충제의 예로는 아벤다졸, 암포테리신 B, 벤즈니다졸, 비티오놀, 클로로퀸 HCl, 클로로퀸 포스페이트, 클린다마이신, 데히드로에메틴, 디에틸카르바마진, 딜록사니드 푸로에이트, 에플로니틴, 푸라졸리다온, 글루코코르티코이드, 할로판트린, 요오도퀴놀, 이베르멕틴, 메벤다졸, 메플로퀸, 메글루민 안티모니에이트, 멜라르소프롤, 메트리포네이트, 메트리니다졸, 니클로사미드, 니푸르티독스, 옥삼니퀸, 파로모마이신, 펜타미딘, 이세티오네이트, 피페라진, 프라지퀸텔, 프리마린 포스페이트, 프로구아닐, 피란텔 파모에이트, 피리메탄민-솔폰아미드, 피리메탄민-솔파독신, 퀴나크린 HCl, 퀴닌 술페이트, 퀴니딘 글루코네이트, 스피라마이신, 스티보글루코네이트 소듐 (소듐 안티몬 글루코네이트), 수라민, 테트라사이클린, 독시사이클린, 티아벤다졸, 티니다졸, 트리메트로프림-솔파메톡사졸, 및 트리파라사미드가 포함되나 이에 한정되지 않으며, 이들 중 어떤 것은 단독으로 또는 다른 것들과 함께 사용된다.

[0324] 항세균제는 박테리아의 성장 또는 기능을 사멸 또는 억제시킨다. 항세균제의 큰 군은 항생제이다. 다양한 박테리아를 사멸시키거나 억제하는데 효과적인 항생제는 넓은 스펙트럼을 갖는 항생제라고 한다. 다른 유형의 항생제는 그람 양성 또는 그람 음성 클래스의 박테리아에 대하여 주로 효과적이다. 이러한 유형의 항생제는 좁은 스펙트럼을 갖는 항생제라고 한다. 단일 생물 또는 질환에 대해서는 효과적이지만 다른 유형의 박테리아에 대해서는 그렇지 못한 다른 항생제는 제한된 스펙트럼을 갖는 항생제라고 한다. 항세균제는 흔히 이들의 주요 작용 방식을 기초로 분류된다. 일반적으로, 항세균제는 세포벽 합성 억제자, 세포막 억제자, 단백질 합성 억제자, 핵산 합성 또는 기능성 억제자, 및 경쟁적 저해자이다.

[0325] 항바이러스제는 바이러스에 의한 세포 감염 또는 세포내에서 바이러스의 복제를 방지하는 화합물이다. 바이러스의 복제 과정은 숙주 세포내의 DNA 복제와 밀접한 관련이 있기 때문에 항바이러스성 약물은 항세균성 약물보다는 수가 훨씬 적으며, 비-특이적 항바이러스제는 종종 숙주에 대해 독성을 나타낸다. 항바이러스제에 의해 차단 또는 억제될 수 있는 바이러스의 감염 과정에는 여러 단계가 있다. 이러한 단계들에는 숙주 세포에 대한 바이러스의 부착 단계 (이류노글로불린 또는 결합 펩티드), 바이러스의 코팅제거 단계 (예를 들어, 아만타딘), 바이러스 mRNA의 합성 또는 번역 단계 (예를 들어, 인터페론), 바이러스 RNA 또는 DNA의 복제 단계 (예를 들어, 뉴클레오시드 유사체), 새로운 바이러스 단백질의 성숙 단계 (예를 들어, 프로테아제 저해제), 및 새로운 바이러스의 버딩 및 방출 단계가 포함된다.

[0326] 뉴클레오티드 유사체는 뉴클레오티드와 유사하지만, 비정상적인 데옥시리보스 또는 리보스기의 불완전성을 보유하는 합성 화합물이다. 뉴클레오티드 유사체가 세포내에 존재한다면, 이들은 인산화되며, 바이러스 DNA 또는 RNA로의 혼입에 대하여 정상적인 뉴클레오티드와 경쟁하는 트리포스페이트를 생산한다. 뉴클레오티드 유사체의 트리포스페이트 형태가 연장 중인 핵산 사슬로 혼입되는 경우, 이 유사체는 바이러스 폴리머라제와 비가역적으로 결합하여 사슬 연장을 종결시킨다. 뉴클레오티드 유사체로는 아시클로비어 (acyclovir) (헤르페스 심플렉스 바이러스 및 바리셀라-조스터 바이러스의 치료에 사용됨), 강시클로비어 (gancyclovir) (사이토메갈로바이러스의 치료에 유용함), 이독수리딘 (idoxuridine), 리바비린 (ribavirin) (호흡기 세포융합 바이러스의 치료에 유

용함), 디데옥시이노신, 디데옥시시타딘, 지도부딘 (아지도티미딘), 이미퀴모드, 및 레시미퀴모드가 포함되지만 이에 한정되지 않는다.

[0327] 인터페론은 바이러스에 감염된 세포 및 면역 세포에 의해 분비되는 사이토카인이다. 인터페론은 감염된 세포에 인접한 세포상의 특정 수용체에 결합하여 작용하며, 세포에서 바이러스에 의한 감염으로부터 세포를 보호하는 변화를 유발한다.  $\alpha$ - 및  $\beta$ -인터페론은 또한 숙주 면역 세포의 인식을 위해 감염된 세포의 표면에서 클래스 I 및 클래스 II MHC 분자의 발현을 유도하여 항원 제시를 증가시킨다.  $\alpha$ - 및  $\beta$ -인터페론은 재조합 형태로 이용가능하며, 만성 B형 및 C형 간염 감염증의 치료에 유용하다. 항-바이러스 요법에 효과적인 투여량에서, 인터페론은 발열, 불쾌감 및 체중 감소와 같은 심각한 부작용을 나타낸다.

[0328] 본 발명에 유용한 항바이러스제는 이뮤노글로블린, 아만타딘, 인터페론, 뉴클레오시드 유사체 및 프로테아제 저해제가 포함되지만 이에 한정되지 않는다. 항바이러스제의 구체적인 예로는 아세마난, 아시클로비어; 아시클로비어 소듐; 아테포비어; 알로부딘; 알비르셉트 수도톡스; 아만타딘 하이드로클로라이드; 아라노딘; 아릴돈; 아테비르딘 메실레이트; 아비리딘; 시도포비어; 시팜필린; 시타라빈 하이드로클로라이드; 텔라비르딘 메실레이트; 테스시클로비어; 디다노신; 디속사릴; 에독수딘; 엔비라텐; 엔비록심; 팜시클로비어; 파모딘; 하이드로클로라이드; 피아시타빈; 피알루리딘; 포사릴레이트; 포스카르네트 소듐; 포스포네트 소듐; 강시클로비어; 강시클로비어 소듐; 이독수리딘; 케톡살; 라미부딘; 로부카비어; 메모틴 하이드로클로라이드; 메티사존; 네비라핀; 펜시클로비어; 피로다비어; 리바비린; 리만타딘 하이드로클로라이드; 사퀴나비어 메실레이트; 소만타딘 하이드로클로라이드; 소리부딘; 스타플론; 스타부딘; 티로론 하이드로클로라이드; 트리플루리딘; 발라시클로비어 하이드로클로라이드; 비다라빈; 비다라빈 포스페이트; 비다라빈 소듐 포스페이트; 비록심; 잘시타빈; 지도부딘 및 진비록심이 포함되지만 이에 한정되지 않는다.

[0329] 항진균제는 감염성 진균의 치료 및 예방에 유용하다. 항진균제는 때때로 이들의 작용 기작에 의해 분류된다. 어떤 항진균제는 글루코스 신타제를 저해함으로써 세포벽 저해제로 작용한다. 이들로는 바시운진 (basiungin)/ECB가 포함되지만 이에 한정되지 않는다. 다른 항진균제는 막 일체성을 불안정화하는 작용을 한다. 이들로는 이미다졸, 예를 들어 클로트리마졸, 세르타코졸, 플루코나졸, 이트라코나졸, 케토코나졸, 미코나졸 및 보리코나콜뿐만 아니라 FK 463, 암포테리신 B, BAY 38-9502, MK 991, 프라디미신, UK 292, 부테나파인, 및 테르비나파인이 포함되지만 이에 한정되지 않는다. 다른 항진균제는 키틴 (예를 들어, 키티나제) 또는 면역억제제 (501 크립)을 분해하는 작용을 한다.

[0330] CpG 면역자극 올리고뉴클레오티드는 면역 반응을 증가시키기 위하여 다른 치료제, 예를 들어 보조제와 병용될 수 있다. CpG 면역자극 올리고뉴클레오티드 및 다른 치료제는 동시에 또는 연속적으로 투여될 수 있다. 다른 치료제가 동시에 투여되는 경우, 이들은 동일한 제제 또는 별도의 제제로 투여될 수 있지만, 동시에 투여된다. 다른 치료제 및 CpG 면역자극 올리고뉴클레오티드의 투여가 일시적으로 분리되는 경우, 다른 치료제는 CpG 면역자극 올리고뉴클레오티드와 함께 서로 연속적으로 투여된다. 이들 화합물의 투여 사이의 시간 차이는 몇분이거나 또는 그보다 길 수 있다. 다른 치료제로는 보조제, 사이토카인, 항체, 항원 등이 포함되지만 이에 한정되지 않는다.

[0331] 본 발명의 조성물은 또한 비-핵산 보조제와 함께 투여될 수도 있다. 비-핵산 보조제는 체액성 및(또는) 세포성 면역 반응을 자극할 수 있는, 본원에 기재된 CpG 면역자극 올리고뉴클레오티드를 제외한 임의 분자 또는 화합물이다. 비-핵산 보조제로는 예를 들어 데포 (depo) 효과를 발생하는 보조제, 면역자극 보조제, 및 데포 효과를 발생하고 면역계를 자극하는 보조제가 포함된다.

[0332] CpG 면역자극 올리고뉴클레오티드는 또한 점막 아주반트로서 유용하다. 전신 및 점막 면역성 모두가 CpG 핵산의 점막 전달에 의해 유도된다는 것이 이미 발견되었다. 따라서, 올리고뉴클레오티드는 다른 점막 아주반트와 함께 투여될 수 있다.

[0333] 면역 반응은 또한 사이토카인 [Bueler & Mulligan, 1996; Chow et al, 1997; Geissler et al., 1997; Iwasaki et al, 1997; Kim et al, 1997] 또는 B-7 공동자극성 분자 [Owasaki et al, 1997; Tsuji et al, 1997]를 CpG 면역자극 올리고뉴클레오티드와의 공동 투여 또는 동시 선상의 발현에 의해 유도되거나 또는 증가될 수도 있다. 사이토카인이라는 용어는 나노 내지 피코몰 농도에서 체액성 조절자로 작용하며, 정상 또는 병원성 조건하에서는 각 세포 또는 조직의 기능 활성을 조절하는 다양한 가용성 단백질 및 펩티드 군에 대한 일반적인 이름으로 사용된다. 이러한 단백질은 또한 세포들 사이의 상호작용을 직접 매개하며, 세포의 환경에서 일어나는 반응을 조절한다. 사이토카인의 예로는 IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, 과립세포-대식세포 콜로니 자극 인자 (GM-CSF), 과립세포 콜로니 자극 인자 (G-CSF), 인터페론- $\gamma$  ( $\gamma$ -IFN), IFN- $\alpha$ , 중

양 괴사 인자 (TNF), TGF-β, FLT-3 리간드, 및 CD40 리간드가 포함되나 이에 한정되지 않는다.

- [0334] 올리고뉴클레오티드는 또한 Th2 면역 반응으로부터 Th1 면역 반응으로 면역 반응을 재지시하는데 유용하다. 이는 비교적 균형된 Th1/Th2 환경의 생성을 유발한다. Th2로부터 Th1 면역 반응으로의 면역반응의 재지시는 핵산에 대해 반응하여 생산되는 사이토카인의 수준을 측정하여 평가할 수 있다 (예를 들어, 단핵구 세포 및 다른 세포가 Th1 사이토카인 (IL-12, IFN-γ 및 GM-CSF 포함)을 생산하도록 유도하여). Th2로부터 Th1 반응으로의 면역 반응의 재지시 또는 재평형화는 천식의 치료 또는 예방에 있어 특히 유용하다. 예를 들어, 천식 치료에 유효한 양이란 천식과 관련이 있는 Th2 타입 면역 반응을 Th1 유형의 반응 또는 균형된 Th1/Th2 환경으로 재지시하는데 유용한 양이다. Th2 사이토카인, 특히 IL-4 및 IL-5는 천식 환자의 기도에서 증가된다. 본 발명의 CpG 면역자극 올리고뉴클레오티드는 면역계의 재평형화를 돕는 Th1 사이토카인의 증가를 유발하며, 주로 Th2 면역 반응과 관련된 역효과를 방지 또는 감소시킨다.
- [0335] 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 기도 개형의 치료에도 유용할 수 있다. 기도 개형은 평활근 세포 증식 및(또는) 기도 중의 점막질 비대로 일어나고, 결국 제한된 기류로 유도하는 기도 협착을 유발한다. 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 추가 개형을 예방하고, 가능하게는 심지어 개형 프로세스로부터 생성되는 조직 구조 증대를 감소시킬 수 있다.
- [0336] 올리고뉴클레오티드는 수상 세포의 생존, 분화, 활성화 및 성숙의 개선에도 유용하다. CpG 면역자극 올리고뉴클레오티드는 수상 세포의 세포 생존, 분화, 활성화 및 성숙의 특이한 촉진능을 가진다.
- [0337] CpG 면역자극 올리고뉴클레오티드는 또한 자연 사멸 세포의 용해 활성화 및 항체 의존적 세포의 세포독성 (ADCC)을 증가시킨다. CpG 면역자극 올리고뉴클레오티드를 세포 표적, 예를 들어 암세포에 대해 특이적인 항체와 함께 사용하여 ADCC를 수행할 수 있다. CpG 면역자극 올리고뉴클레오티드가 항체와 함께 대상에게 투여되는 경우, 투여 대상의 면역계는 종양 세포를 사멸시키도록 유도된다. ADCC 방법에 유용한 항체로는 체내에서 세포와 상호작용하는 항체가 포함된다. 세포 표적에 대해 특이적인 이러한 많은 항체는 당업계에 알려져 있으며, 많은 것들이 시판된다.
- [0338] CpG 면역자극 올리고뉴클레오티드는 항암치료제와 함께 투여될 수도 있다. 항암 요법으로는 암 치료약물, 방사선 및 수술 방법이 포함된다. 본원에 사용된 바와 같이, "암 치료약물"이란 암 치료를 위해 대상에게 투여되는 물질을 의미한다. 본원에 사용된 바와 같이, "암을 치료하는" 것에는 암 발생을 예방하는 것, 암 증상을 저감시키는 것 및(또는) 형성된 암의 성장을 억제하는 것이 포함된다. 다른 측면으로, 암 치료약물은 암 발생의 위험을 줄일 목적으로 암에 걸릴 위험이 있는 대상에게 투여된다. 암 치료를 위한 다양한 유형의 약물이 본원에 기재되어 있다. 본 명세서의 목적을 위해, 암 치료약물은 화학치료제, 면역치료제, 암 백신, 호르몬 치료제, 및 생물학적 반응 변경제로 분류된다.
- [0339] 또한, 본 발명의 방법은 하나 이상의 암 치료약물을 CpG 면역자극 올리고뉴클레오티드와 함께 사용하는 것을 포함한다. 예로서, 경우에 따라, CpG 면역자극 올리고뉴클레오티드를 화학치료제 및 면역치료제 둘 다와 함께 투여할 수 있다. 또는, 암 치료약물은 면역치료제 및 암 백신, 또는 화학치료제 및 암 백신, 또는 화학치료제, 면역치료제 및 암 백신 모두를 포함할 수 있으며, 암에 걸렸거나 암 발생 위험이 있는 대상을 치료하기 위해 대상에게 투여된다.
- [0340] 화학요법제는 메토트렉세이트 (methotrexate), 빈크리스틴 (vincristine), 아드리아마이신 (adriamycin), 시스플라틴 (cisplatin), 클로로에틸니트로소우레아를 함유하는 비-당 (non-sugar containing chloroethylnitrosoureas), 5-플루오로우라실 (5-fluorouracil), 미토마이신 (mitomycin) C, 블레오마이신 (bleomycin), 독소루비신 (doxorubicin), 다카르바진 (dacarbazine), 탁솔 (taxol), 프라길린 (fragyline), 메글라민 (Meglamine) GLA, 발루비신 (valrubicin), 카르무스타인 (carmustaine) 및 폴리페르포산 (poliferposan), MMI270, BAY 12-9566, RAS 파메실 트랜스퍼라제 억제제 (famesyl transferase inhibitor), 파메실 트랜스퍼라제 억제제, MMP, MTA/LY231514, LY264618/로메텍솔 (Lometexol), 글라모렉 (Glamolec), CI-994, TNP-470, 히캄틴 (Hycamtin) / 토폠테칸 (Topotecan), PKC412, 발스포다르 (Valspodar) / PSC833, 노반트론 (Novantrone) / 미트록산트론(Mitroxantrone), 메타레트(Metaret) / 수라민 (Suramin), 바티마스타트 (Batimastat), E7070, BCH-4556, CS-682, 9-AC, AG3340, AG3433, 인셀 (Incel) / VX-710, VX-853, ZD0101, ISI641, ODN 698, TA 2516 / 마르미스타트 (Marmistat), BB2516 / 마르미스타트 (Marmistat), CDP 845, D2163, PD183805, DX8951f, 레모날 (Lemonal) DP 2202, FK 317, 피시바닐 (Picibanil) / OK-432, AD 32 / 발루비신 (Valrubicin), 메타스트론 (Metastron) / 스트론튬 (strontium) 유도체, 테모달 (Temodal) / 테모졸로마이드 (Temozolomide), 에바세트 (Evacet) / 리포솜 독소루비신 (liposomal doxorubicin), 예우탁산 (Yewtaxan) / 플

라클리탁셀 (Paclitaxel), 탁솔 (Taxol) / 팩클리탁셀 (Paclitaxel), 셀로아드 (Xeload) / 카페시타빈 (Capecitabine), 푸르톨론 (Furtulon) / 독시플루리딘 (Doxifluridine), 시클로팍스 (Cyclopax) / 경구 팩클리탁셀 (oral paclitaxel), 경구용 탁소이드 (Oral Taxoid), SPU-077 / 시스플라틴 (Cisplatin), HMR 1275 / 플라보피리돌 (Flavopiridol), CP-358 (774) / EGFR, CP-609 (754) / RAS 온코진 억제제, BMS-182751 / 경구용 백금, UFT (Tegafur/uracil), 에르가미솔 (Ergamisol) / 레바미솔 (Levamisole), 에닐우라실 (Eniluracil) / 776C85 / 5FU 강화제, 캠프토 (Campto) / 레바미솔 (Levamisole), 캠프토사르 (Camptosar) / 이리노테칸 (Irinotecan), 투모덱스 (Tumodex) / 랄리트렉세드 (Ralitrexed), 류스타틴 (Leustatin) / 클라드리빈 (Cladribine), 팩섹스 (Paxex)/ 팩클리탁셀 (Paclitaxel), 독실 (Doxil) / 리포좀 독소루비신, 캐릭스 (Caelyx) / 리포좀 독소루비신, 플루다라 (Fludara) / 플루다라빈 (Fludarabine), 파마루비신 (Pharmarubicin) / 에피루비신 (Epirubicin), DepoCyt, ZD1839, LU 79553 / 비스-나프탈이미드 (Naphtalimide), LU 103793 / 돌라스타인 (Dolastain), 캐티스 (Caetyx) / 리포좀 독소루비신, 겐자르 (Gemzar) / 겐시타빈 (Gemcitabine), ZD 0473 /아노르네드 (Anorined), YM 116, 요오드 시드 (seed), CDK4 및 CDK2 억제제, PARP 억제제, D4809 / 텍시포사미드 (Dexifosamide), 이페스 (Ifes) / 메스넥스 (Mesnex) / 이포사미드 (Ifosamide), 부몬 (Vumon) / 테니포사이드 (Teniposide), 파라플라틴 (Paraplatin) / 카보플라틴 (Carboplatin), 플라티놀 (Platinol) / 시스플라틴 (cisplatin), 베페사이드 (Vepeside) / 에토포사이드 (Etoposide), ZD 9331, 탁소테르 (Taxotere) / 독세탁셀 (Docetaxel), 구아닌 아라비노사이드의 전구약물, 탁산 동족체, 니트로소우레아, 멜펠란 및 시클로로스프아미드와 같은 알킬화제, 아미노글루테쓰이미드 (Aminoglutethimide), 아스파라기나제, 불숴판 (Busulfan), 카르보플라틴, 클로롬부실 (Chlorombucil), 시타라빈 (Cytarabine) HCl, 닥티노마이신, 다우노루비신 HCl, 에스트라무스틴 포스페이트 소듐 (Estramustine Phosphate sodium), 에토포사이드 (VP16-213), 플록스우리딘 (Floxuridine), 플루오로우라실 (5-FU), 플루트아미드 (Flutamide), 히드록시우레아 (히드록시카르바미드), 이포스파미드 (Ifosfamide), 인터페론 알파-2a, 알파-2b, 류프롤라이드 아세테이트 (Leuprolide acetate) (LHRH-방출 인자 동족체), 로무스틴 (CCNU), 메클로르에타민 (Meclorethamine) HCl (질소 머스타드), 머캡토포린, 메스나 (Mesna), 미토탄 (Mitotane) (o.p'-DDD), 미톡산트론 (Mitoxantrone) HCl, 옥트레오타이드 (Octreotide), 플리카마이신 (Plicamycin), 프로카르바진 HCl 스트렙토조신, 타목시펜 시트레이트, 티오구아닌, 티오테파 (Thiotepa), 빈블라스틴 술페이트, 암사크린 (Amsacrine) (m-AMSA), 아자시티딘 (Azacitidine), 에리트르포이 에틴, 헥사메틸멜라민 (Hexamethylmelamine) (HMM), 인터루킨 2, 미토구아존 (Mitoguzone) (메틸-GAG; 메틸 글리옥살 비스-구아닐히드라존; MGBG), 펜토스타틴 (Pentostatin) (2' 데옥시코포르마이신 (deoxycoformycin)), 세무스틴 (메틸-CCNU), 테니포사이드 (VM-26) 및 빈데신 술페이트로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

[0341] 면역요법제는 리부탁신, 헤르셉틴, 쿠아드라메트, 파노렉스, IDEC-Y2B8, BEC2, C225, 온콜림 (Oncolym), SMART M195, ATRAGEN, 오바렉스, 백사르, LDP-03, ior t6, MDX-210, MDX-11, MDX-22, OV103, 3622W94, 항-VEGF, 제나팩스, MDX-220, MDX-447, MELIMMUNE-2, MELIMMUNE-1, CEACIDE, 프리타겟, 노보Mab-G2, TNT, 그리오마브-H, GNI-250, EMD-72000, 림포사이드, CMA 676, 모노팜-C, 4B5, ior egf.r3, ior c5, BABS, 항-FLK-2, MDX-260, ANA Ab, SMART 1D10 Ab, SNMART ABL 364 Ab 및 ImmuRAIT-CEA로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

[0342] 암 백신은 EGF, 항-이디오타입 암 백신, Gp75 항원, GMK 흑색종 백신, MGv 강글리오사이드 컨쥬게이트 백신, Her2/neu, 오바렉스, M-Vax, O-Vax, L-Vax, STn-KHL 테라토프, BLP25 (MUC-1), 리포좀형 이디오타입 백신, 멜라신 (Melacine), 펩티드 항원 백신, 독소/항원 백신, MVA-기재 백신, PACIS, BCG 백신, TA-HPV, TA-CIN, DISC-바이러스 및 이뮤시스트/테라시스 (ImmuCyst/TheraCys)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0343] CpG 면역자극 올리고뉴클레오타이드를 면역치료제, 예를 들어 모노클로날 항체와 함께 사용하여 ADCC (상기 기재된 바와 같음)의 상당한 증가, 자연 킬러 (NK) 세포의 활성화 및 IFN α 수준의 증가를 비롯한 많은 메카니즘을 통해 장기간의 생존력을 증가시킬 수 있다. 모노클로날 항체와 함께 사용되는 경우, 핵산은 생물학적 결과를 달성하는데 요구되는 항체의 투여량을 감소시키는 작용을 한다.

[0344] 본원에 사용된 바와 같이, "암 항원" 및 "종양 항원"이라는 용어는 서로 바꾸어 쓸 수 있는 말이며, 암세포에 의해 차별적으로 발현됨에 따라 암세포를 표적화하기 위해 이용될 수 있는 항원을 의미한다. 암 항원은 잠재적으로, 종양-특이적 면역 반응을 분명하게 자극할 수 있는 항원이다. 이러한 항원 중 일부는 반드시 발현되는 것은 아니지만 정상 세포에 의해 코딩된다. 이러한 항원은 정상 세포에서는 보통 나타나지 않는 (예를 들어, 발현되지 않음) 것, 특정 분화 단계에서만 발현되는 것, 및 배 및 태아 항원과 같이 일시적으로 발현되는 것을

특징으로 할 수 있다. 다른 암 항원은 변이체 세포 유전자, 예를 들어 종양유전자 (예를 들어, 활성화된 라스 종양유전자), 억제 유전자 (예를 들어, 변이체 p53), 내부 결실 또는 염색체 전위로부터 발생하는 융합 단백질 유전자에 의해 코딩된다. 또다른 암 항원은 RNA 및 DNA 종양 바이러스상에 운반되는 것들과 같은 바이러스 유전자에 의해 코딩될 수 있다.

[0345] CpG 면역자극 올리고뉴클레오티드는 자가면역 질환의 치료 및 예방에도 유용하다. 자가면역 질환은 대상체 자신의 항체가 숙주 조직과 반응하거나 또는 면역 효과기 T 세포가 내인성 자가 펩티드에 자가반응이고 조직의 파괴를 유발하는 질환의 분류이다. 따라서, 면역 반응은 자가 항원이라 칭하는 대상체 자신의 항원에 대해 개시된다. 자가면역 질환은 류마티스 관절염, 크론병, 다발성 경화증, 전신 홍반성 루푸스 (SLE), 자가면역 뇌척수염, 중증 근육무력증 (MG), 하시모토 갑상선염, 구드패스슈어 증후군, 천포창 (예컨대, 보통천포창), 그레이브스병, 자가면역 용혈 빈혈, 자가면역 혈소판감소성 자반증, 항-콜라겐 항체에 의한 피부경화증, 혼합된 결합 조직 질환, 다발근육염, 악성 빈혈, 특발성 에디슨병, 자가면역-회합된 불임증, 사구체신염 (예컨대, 반월상 사구체신염, 증식성 사구체신염), 수포성 유천포창, 쇼그렌 증후군, 인슐린 내성, 및 자가면역 당뇨병을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0346] 본원에 사용된 "자가-항원"은 정상 숙주 조직의 항원을 나타낸다. 정상 숙주 조직은 암 세포를 포함하지 않는다. 따라서, 자가면역 질환의 환경에서 자가-항원에 대해 개시된 면역 반응은 바람직하지 않은 면역 반응이고, 정상 조직의 파괴 및 손상에 기여하는 반면, 항원에 대해 개시된 면역 반응은 바람직한 면역 반응이고, 종양 또는 암의 파괴에 기여한다. 따라서, 자가면역 질병 치료 목적의 복 발명의 일부 측면에서, CpG 면역자극 핵산이 자가 항원, 특히 자가면역 질병의 표적인 것과 투여하는 것이 권유되지 않는다.

[0347] 다른 예로서, CpG 면역자극 핵산은 자가-항원의 저 투여량으로 전달될 수 있다. 다수의 동물 연구는 저 투여량의 항원의 점막 투여가 면역 저-반응성 또는 "내성"의 상태를 유발할 수 있다는 것을 입증하였다. 활성화 메카니즘은 사이토카인-매개된 면역이 Th1로부터 우세한 Th2 및 Th3 (즉, TGF-β 우위) 반응을 향해 편향됨을 보인다. 저 투여량 항원 전달의 활성화 저해는 또한 자가면역 질환, 예를 들면 류마티스 관절염 및 SLE의 치료법으로 고려될 수 있는 관련되지 않은 면역 반응 (방관자 저해)을 저해할 수 있다. 방관자 저해는 전염증성 및 Th1 사이토카인이 항원-특이적 또는 항원-비특이적 방식으로 유리되는 국소 환경 중의 Th1-카운터-조절, 저해자 사이토카인의 분비를 포함한다. 본원에 사용된 "내성"은 이 현상을 칭하는 데 사용된다. 실제로, 경구 내성은 실험 자가면역 뇌척수염 (EAE), 실험 자가면역 중증 근육무력증, 콜라겐-유도된 관절염 (CIA), 및 인슐린-의존 당뇨병을 포함하는 동물의 다수의 자가면역 질환의 치료에 유효하였다. 이들 모델에서, 자가면역 질환의 예방 및 저해는 항원-특이적 체액 및 세포 반응에서 Th1로부터 Th2/Th3 반응으로의 이동과 관련된다.

[0348] 본 발명은 또한 CpG 면역자극 올리고뉴클레오티드를 사용하여 감염성 항원에 대한 비-특이적인 선천성 면역 활성화 및 광범위한 내성을 유도하는 방법을 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이 항원 비-특이적 선천성 면역 활성화라는 용어는 B 세포 이외의 다른 면역 세포의 활성화를 의미하며, 예를 들어 항원 독립적인 방식으로 반응할 수 있는 NK 세포, T 세포 또는 기타 면역 세포, 또는 이러한 세포들의 몇몇 조합의 활성화를 의미한다. 면역 세포가 활성화 형태이고 개시되어 임의 침투성 화합물 또는 미생물에 반응하기 때문에, 감염성 집중에 대한 넓은 범위의 내성이 유도된다. 세포가 특정 항원에 대하여 특이적으로 개시될 필요는 없다. 이는 생물전, 및 여행자와 같은 상기 기술된 다른 환경에서 특히 유용하다.

[0349] 본 발명은 또한 키랄 인터뉴클레오티드 연결기를 갖는 올리고뉴클레오티드에 관한 것이다. 상기한 바와 같이, 본 발명의 연결 및 반-연결 올리고뉴클레오티드는 C와 G 사이의 포스포디에스테르 유사 연결기를 가질 수 있다. 포스포디에스테르-유사 연결기의 하나의 예는 Rp 형태의 포스포로티오에이트 연결기이다.

[0350] 하나 이상의 연구는 비장 세포 증식의 그의 유도능에 대해 입체-부유 (입체-순수가 아님) 포스포로티오에이트 (PS)-올리고뉴클레오티드와 비교하여 CpG 올리고뉴클레오티드의 면역자극 효과에 대한 p-키랄성의 효과를 조사하였다 [Yu et al., 2000]. 이 연구에서, 단일 CpG 모티프를 함유한 19머 서열은 올리고뉴클레오티드가 랜덤 p-키랄성으로 합성되거나 또는 Sp 인터뉴클레오티드 연결기에 대해 부유화되는 경우에, 마우스 비장 세포 증식의 높은 수준을 유도하지만, 올리고뉴클레오티드가 Rp 인터뉴클레오티드 연결기에 대해 부유화되는 경우에, 증식은 현저하게 감소되는 것으로 밝혀졌다 [Yu et al., 2000]. 그러나, 이 연구는 CpG 디뉴클레오티드에서의 p-키랄성의 특정 역할을 조사하거나, 또는 Rp CpG 올리고뉴클레오티드가 단기 자극 분석에서 활성을 가지는지에 대하여 조사하지 않았다.

[0351] 본 발명에 따라, 올리고뉴클레오티드 p-키랄성이 활성이 측정되는 시간대에 따라 CpG 올리고뉴클레오티드의 면역 활성화에 대해 명백히 역효과를 가질 수 있음을 발견하였다. 40 분의 초기 시간대에서, 포스포로티오에이트

CpG 올리고뉴클레오타이드의 Rp (Sp이 아님) 입체이성질체는 마우스 비장 세포 (실시예에서 논의함)에서 JNK 인산화를 유도한다. 대조적으로, 44 시간의 후기 시간대에 분석한 경우에, Sp (Rp가 아님) 입체이성질체는 비장 세포 증식의 자극에 활성이다. 본 발명자들은 Rp 및 Sp 입체이성질체의 역학 및 생활성에서의 이 차이가 세포 흡수에서의 임의의 차이로부터 일어나지 않고, 차라리 가장 가능성이 있기는 p-키랄성의 2개의 반대적 생물학적 역할 때문인 것임을 입증하였다. 먼저, 초기 시간대에서의 면역 세포를 자극하기 위한, Sp와 비교한 Rp 입체이성질체의 증강된 활성은 Rp가 CpG 수용체, TLR9와의 상호작용, 또는 하류 신호전달 경로의 유도에서 더 효과적일 수 있음을 나타낸다. 다른 한편으로는, Sp와 비교한 Rp PS-올리고뉴클레오타이드의 더 빠른 분해는 신호전달의 매우 더 짧은 지속을 유발하여 후기 시간대에 시험하는 경우에 Sp PS-올리고뉴클레오타이드가 더 생물학적 활성인 것으로 나타난다.

[0352] 본 발명은 일부 측면에서 이미 보고된 Rp PS-올리고에 의한 면역자극의 상대적 결실이 단지 CpG 수용체 및 하류 경로를 자극하는 그의 뉴클레아제 무능 (선천적 무능이 아님) 때문이라는 새로운 발견에 기초한다. 이 미토겐 활성화 단백질 키나제 경로의 활성화를 나타내는 JNK 인산화의 그의 자극능에 대해 시험하는 경우에, Rp 올리고뉴클레오타이드는 가장 활성화된 후에, 입체-랜덤 올리고에 의해 활성화되지만, Sp 올리고뉴클레오타이드의 탐지 가능한 활성이 없는 것으로 보인다. 그러나, 억제 단백질 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 분해에 의해 측정하여 이들 올리고뉴클레오타이드를 NF- $\kappa$ B 경로의 그의 활성화능에 대해 비교하는 경우에, CpG 올리고뉴클레오타이드는 모두 활성이지만, 비-CpG 대조군은 I $\kappa$ B- $\alpha$  분해의 유도에 실패하였다. 따라서, Sp 올리고뉴클레오타이드는 여전히 생물학적으로 활성화이다. JNK 경로의 유도에 대한 그의 실패는 JNK 및 NF- $\kappa$ B 경로의 활성화의 역학에서의 차이와 관련될 수 있지만, 시험을 위해 입수가 가능한 입체-특이적 올리고뉴클레오타이드의 제한된 양 때문에 본 발명자들은 이 가설을 확인할 수 없었다.

[0353] 실시예에 기재되는 실험은 CpG 디뉴클레오타이드 자체에서의 p-키랄성의 놀라운 강한 효과를 보였다. 입체-랜덤 CpG 올리고뉴클레오타이드에 비해, 단일 CpG 디뉴클레오타이드가 Rp에서 연결된 동류물은 약간 더 활성인 반면에, Sp 연결기를 포함하는 동류물은 비장 세포 증식의 유도에 거의 불활성이다. Sp 동류물의 활성 손실은 TLR9 수용체가 키랄성 상호작용하는 DNA에서 CpG 디뉴클레오타이드의 키랄성에 중요할 수 있지만, 실제로 Rp 입체이성질체에 의해 더 양호하게 자극될 수 있다는 본 발명자들의 가설을 지지한다. 따라서, 입체-랜덤 올리고의 자극 효과는 분해를 저지하는 50% Sp 연결기의 존재 뿐만 아니라 올리고 분자의 절반이 CpG 디뉴클레오타이드에서 Rp 키랄성을 가질 것이라는 사실 때문일 것이며, 이는 면역자극 효과를 증강시키는 것으로 보인다.

[0354] Rp PS 연결기의 뉴클레아제 민감성은 인간 또는 동물에서 PS-올리고의 약동학 (PK) 및 대사작용 연구의 해석에 대한 중요한 암시를 가진다. 우세한 혈청 뉴클레아제 활성은 3' 엑소뉴클레아제인 것으로 공지되어 있다. 전형적인 입체-랜덤 PS-올리고 용액에서, 마지막 3' 인터뉴클레오타이드 연결기는 분자의 절반에서 Rp 키랄성일 것으로 기대될 것이다. 따라서, PS-올리고 분자의 이들 50%에서, 말단 3' 염기는 IV 주입 후에 상당히 빠르게 절단될 것이다. 말단 3' 인터뉴클레오타이드 연결기로부터의 2 번째 것은 이들 분자 절반에서 Rp 키랄성이고, 따라서, 출발 PS-올리고 분자의 25%에서 3' 말단은 상대적으로 빠르게 2개의 염기에 의해 짧아질 것으로 기대될 수 있다. 3'Rp 인터뉴클레오타이드 연결기를 수반하는 이 생체내 염기-클리핑 프로세스는 3' 인터뉴클레오타이드 연결기가 Sp 배위가 될 때까지 지속될 것으로 기대될 수 있다. 따라서, PS-올리고가 합성되어 Sp 3' 말단 연결기를 가지는 경우에, 이들은 입체-랜덤 PS-올리고에 비해 매우 더 짧은 분해 및 상이한 PK 프로파일을 가져야 한다. 이는 생체내 적용을 위해 다소 더 짧은 올리고뉴클레오타이드를 사용가능하게 하여야 한다. 안티센스 적용을 위해 최적화된 올리고의 디자인에서, Rp 입체이성질체의 증강된 RNA 결합은 가능한 한 Rp 배위 중에 올리고뉴클레오타이드 내부 코어를 더 많이 가지는 것이 바람직함을 지적한다. 다른 한편으로는, 면역자극 적용을 위한 최적화된 CpG 올리고뉴클레오타이드는 CpG를 제외한 인터뉴클레오타이드 연결기가 모두 Sp 키랄성인 것일 수 있다.

[0355] CpG 면역자극 올리고뉴클레오타이드는 대상에게 직접 투여되거나 또는 핵산 전달 복합체와 함께 투여될 수 있다. 핵산 전달 복합체는 표적화 수단 (예를 들어, 표적 세포 (예를 들어, B 세포 표면) 및(또는) 표적 세포에 의한 세포 수용의 증가)에 고 친화성으로 결합하는 분자)에 (예를 들어, 이온 결합 또는 공유 결합에 의하거나 또는 내부적으로 보호되어) 결합되는 핵산 분자를 의미한다. 핵산 전달 복합체의 예로는 스테롤 (예를 들어, 콜레스테롤), 지질 (예를 들어, 양이온성 지질, 비로솜 또는 리포솜), 또는 표적 세포 특이적 결합체 (예를 들어, 표적 세포 특이적 수용체에 의해 인식되는 리간드)와 결합되는 핵산이 포함된다. 바람직한 복합체는 생체내에서 충분히 안정성이 있어서 표적 세포에 의한 내부화에 앞서 상당한 언커플링을 방지할 수 있다. 그러나, 복합체는 핵산이 기능성 형태로 방출되도록 세포내의 적절한 조건하에 절단될 수 있다.

[0356] 항원 및 올리고뉴클레오타이드를 표면에 절단하는 전달 수단 또는 전달 도구를 설명한다. CpG 면역자극 올리고뉴클레오타이드, 항원 및(또는) 다른 치료제를 단독으로 (예를 들어, 염수 또는 완충액 중에서) 또는 당업계의 임의

전달 수단을 이용하여 투여할 수 있다. 예를 들어, 다음과 같은 전달 수단이 있다: 코클레이트 (Cochleate) [Gould-Fogerite et al., 1994, 1996]; 에멀젼 (Emulsomes) [Vancott et al., 1998, Lowell et al., 1997]; ISCOM [Mowat et al., 1993, Carlsson et al., 1991, Hu et al., 1998, Morein et al., 1999]; 리포솜 [Childers et al., 1999, Michalek et al., 1989, 1992, de Haan 1995a, 1995b]; 생균 벡터 (예를 들어, 살모넬라, 에세리키아 콜라이, 바실러스 칼마테-구에린, 쉬겔라, 락토바실러스) [Hone et al., 1996, Pouwels et al., 1998, Chatfield et al., 1993, Stover et al., 1991, Nugent et al., 1998]; 생 바이러스 벡터 (예를 들어, 백시니아, 아데노바이러스, 헤르페스 심플렉스) [Gallichan et al., 1993, 1995, Moss et al., 1996, Nugent et al., 1998, Flexner et al., 1988, Morrow et al., 1999]; 마이크로소피어 [Gupta et al., 1998, Jones et al., 1996, Maloy et al., 1994, Moore et al., 1995, O'Hagan et al., 1994, Eldridge et al., 1989]; 핵산 백신 [Fynan et al., 1993, Kuklin et al., 1997, Sasaki et al., 1998, Okada et al., 1997, Ishii et al., 1997]; 중합체 (예를 들어, 카르복시메틸셀룰로스, 키토산) [Hamajima et al., 1998, Jabbal-Gill et al., 1998]; 중합체 고리 (Wyatt et al., 1998); 프로테오솜 [Vancott et al., 1998, Lowell et al., 1988, 1996, 1997]; 소듐 플루오라이드 [Hashi et al., 1998]; 형질전이 식물 [Tacket et al., 1998, Mason et al., 1998, Haq et al., 1995]; 비로솜 [Gluck et al., 1992, Mengiardi et al., 1995, Cryz et al., 1998]; 바이러스-유사 입자 [Jiang et al., 1999, Leibl et al., 1998]. 다른 전달 수단은 당업자에게 공지되어 있으며, 벡터의 논의에 대한 몇가지 추가의 실시예가 하기 제공되어 있다.

[0357] CpG 면역자극 올리고뉴클레오티드의 유효량이라는 용어는 목적하는 생물학적 효과를 실현하는데 필요하거나 그에 충분한 양을 의미한다. 예를 들어, 점막의 면역을 유도하기 위한 항원과 함께 투여되는 CpG 면역자극 올리고뉴클레오티드의 유효량이란 항원에 노출시 항원에 대한 반응에서 IgA를 발생시키는데 필요한 양을 말하지만, 전신성 면역을 유도하는데 필요한 양이란 항원에 노출시 항원에 대해 반응하여 IgG를 발생시키는데 필요한 양을 의미한다. 본원에 제공된 교시 내용을 종합하여, 다양한 활성 화합물 중에서 선택하고, 효능, 상대적인 생체이용성, 환자의 체중, 불리한 부작용 정도 및 바람직한 투여 방식을 고려하여, 실질적인 독성을 유발하지 않으면서 특정 대상의 치료에 전체적으로 효과가 있는 효과적인 예방 또는 치료 처치법을 설계할 수 있다. 어떤 특정한 경우에 대한 유효량은 치료될 질병 또는 증상, 투여되는 특정 CpG 면역자극 올리고뉴클레오티드, 항원, 대상의 크기, 또는 질병 또는 증상의 심도와 같은 요소에 따라 다를 수 있다. 당업자라면 과도한 실험 없이도 특정 CpG 면역자극 올리고뉴클레오티드 및(또는) 다른 치료제에 대한 항원의 유효량을 실험적으로 결정할 수 있을 것이다.

[0358] 점막 또는 국소 전달에 대해 본원에 기재된 화합물의 대상 투여량은 통상적으로 투여 당 약 0.1 µg 내지 10 mg의 범위이며, 투여는 경우에 따라 매일, 매주, 또는 매월, 및 이들 사이의 임의 다른 시간 동안 제공될 수 있다. 보다 통상적으로, 점막 또는 국소 투여량은 투여 당 약 10 µg 내지 5 mg, 가장 통상적으로는 약 100 µg 내지 5 mg, 가장 통상적으로는 약 100 µg 내지 1 mg이며, 일 또는 주 간격으로 나누어 2 내지 4회 투여할 수 있다. 보다 통상적으로, 면역 자극제의 투여량은 일 또는 주 단위 투여로 투여 당 1 µg 내지 10 mg, 가장 통상적으로는 10 µg 내지 1 mg이다. 항원-특이적 면역 반응을 유도하기 위해 비경구 전달되는 본원에 기재된 화합물 (항원과 함께 전달되나 다른 치료제와는 그렇지 않음)의 대상 투여량은 백신 보조제 또는 면역 자극제의 점막 투여 유효량 보다 통상적으로 5 내지 10,000배, 보다 통상적으로 10 내지 1,000배, 가장 통상적으로는 20 내지 100배 더 높다. 선천성 면역 반응을 유도하거나, ADCC를 증가시키거나 또는 항원 특이적 면역 반응을 유도하기 위해 비경구로 전달되는 본원에 기재된 화합물의 투여량은, CpG 면역자극 올리고뉴클레오티드를 다른 치료제와 함께 또는 특수화된 전달 수단에 넣어 투여하는 경우, 통상적으로는 투여 당 약 0.1 µg 내지 10 mg이며, 투여는 경우에 따라 매일, 매주 또는 매월, 및 이들 사이의 임의 다른 시간으로 제공될 수 있다. 보다 통상적으로, 이러한 목적을 위한 비경구 투여량은 투여 당 약 10 µg 내지 5 mg, 가장 통상적으로는 약 100 µg 내지 1 mg이며, 일 또는 주 단위로 나누어 2 내지 4회 투여된다. 그러나, 어떤 실시양태에서는 이러한 목적을 위한 비경구 투여량이 상기 기술된 통상적인 투여량의 5 내지 10,000배 더 높은 범위에서 사용될 수 있다.

[0359] 본원에 기재된 임의 화합물의 경우, 치료 유효량은 먼저 동물 모델로부터 결정할 수 있다. 치료 유효량은 또한 인간에서 시험된 (인간에 대한 임상 실험이 시작됨) CpG 올리고뉴클레오티드, 및 유사한 제약 활성을 나타내는 것으로 알려진 화합물, 예를 들어 다른 보조제, 예를 들어 LT 및 백신접종을 위한 다른 항원에 대한 인간 데이터로부터 결정할 수 있다. 비경구 투여를 위해서는 투여량이 많아야 한다. 사용되는 투여량은 상대적인 생체이용성 및 투여되는 화합물의 효능을 기초로 조절될 수 있다. 상기 기재된 방법 및 당업계에 잘 알려진 다른 방법을 기준으로 하여 최대 효과를 달성하기 위해 투여량을 조절하는 것은 당업자에게는 용이한 일이다.

[0360] 본 발명의 제제는 제약상 허용되는 용액으로 투여되며, 이 용액은 통상적으로, 제약상 허용되는 농도의 염, 완

층제, 보존제, 적합한 담체, 보조제, 및 임의로 다른 치료 성분을 함유할 수 있다.

- [0361] 치료법에 사용되는 경우, 유효량의 CpG 면역자극 올리고뉴클레오티드는 핵산을 목적하는 표면, 예를 들어 점막, 전신으로 전달하는 임의 방식에 의해 대상에게 투여될 수 있다. 본 발명의 제약 조성물의 투여는 당업자에게 알려진 임의 방법에 의해 달성될 수 있다. 바람직한 투여 경로에는 경구, 비경구, 근육내, 비강내, 초내, 흡입, 안내, 질내 및 직장내 투여가 포함되지만 이에 한정되지 않는다.
- [0362] 경구 투여의 경우, 화합물 (즉, CpG 면역자극 올리고뉴클레오티드, 항원 및 다른 치료제)은 활성 화합물을 당업계에 공지된 제약상 허용되는 담체와 함께 배합하여 쉽게 제제화할 수 있다. 처치된 대상에 의한 경구 사용을 위해, 이러한 담체는 본 발명의 화합물이 정제, 환제, 당의정제, 캡셀제, 액제, 겔제, 시럽, 슬러리 및 현탁액제 등으로 제제화되도록 할 수 있다. 경구 사용을 위한 제약 제제는, 임의로 생성 혼합물을 분쇄하고, 원한다면 적절한 보조제를 첨가한 후 과립 혼합물을 가공하여 정제 또는 당의정 코어를 얻음으로써 고상 부형제로서 얻을 수 있다. 적합한 부형제로는 특히, 수크로스, 만니톨, 소르비톨을 비롯한 당; 예를 들어 옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분, 감자 전분, 젤라틴, 트래거캔스 검, 메틸 셀룰로스, 히드록시프로필메틸셀룰로스, 소듐 카르복시메틸셀룰로스, 및(또는) 폴리비닐피롤리돈 (PVP)과 같은 셀룰로스 제제 등의 충전제가 있다. 원한다면, 가교 연결된 폴리비닐 피롤리돈, 아가, 또는 알긴산 또는 이들의 염, 예를 들어 알긴산나트륨과 같은 붕해제를 첨가할 수 있다. 임의로, 경구 제제는 내부의 산성 상태를 중화하는 염수 또는 완충액, 즉 EDTA 중에 배합되거나 임의 담체 없이 투여될 수도 있다.
- [0363] 상기 성분 또는 성분들의 경구 투여정도 특별히 고려된다. 성분 또는 성분들은 유도체의 경구 전달이 효과있도록 화학적으로 개질될 수 있다. 일반적으로, 고려되는 화학 변형은 성분 분자 자신에 하나 이상의 잔기의 부착이며, 여기서 상기 잔기는 (a) 단백질가수분해의 억제제; 및 (b) 위 또는 장으로부터 혈액 스트림으로의 흡수를 허용한다. 또한, 성분 또는 성분들의 전체 안정성의 증가 및 체내의 순환 시간 증가가 바람직하다. 이러한 잔기의 예에는 폴리에틸렌 글리콜, 에틸렌 글리콜 및 프로필렌 글리콜의 공중합체, 카르복시메틸 셀룰로오스, 텍스트란, 폴리비닐 알콜, 폴리비닐 피롤리돈 및 폴리프롤린이 포함된다 [Abuchowski and Davis, 1981, "Soluble Polymer-Enzyme Adducts" In: Enzymes as Drugs, Hocenberg and Roberts, eds., Wiley-Interscience, New York, NY, pp. 367-383; Newmark, et al., 1982, J. Appl. Biochem. 4: 185-189]. 사용될 수 있는 기타 중합체에는 폴리-1,3-디옥솔란 및 폴리-1,3,6-티옥소안이 있다. 상기한 바와 같이, 폴리에틸렌 글리콜 잔기가 제약상 용법에 바람직하다.
- [0364] 성분 (또는 유도체)의 경우에, 유리 위치는 위, 소장 (십이지장, 공장, 또는 회장), 또는 대장일 수 있다. 당업자는 위에서 용해되지 않고, 물질을 십이지장에서 또는 다른 경우에 장에 유리할 입수가 가능한 제법을 가지고 있다. 바람직하게는, 유리는 올리고뉴클레오티드 (또는 유도체)를 보호하거나 또는 위 환경을 지나서, 예컨대 장에서 생물학적으로 활성인 물질을 유리함으로써 위 환경의 유해한 효과를 막을 것이다.
- [0365] 완전한 위산 내성을 보장하기 위해, pH 5.0 이상에 대해 불침투성인 코팅이 필수적이다. 장관 코팅으로서 사용되는 더 통상적인 불활성 성분의 예에는 셀룰로오스 아세테이트 트리멜리테이트 (CAT), 히드록시프로필메틸셀룰로오스 프탈레이트 (HPMCP), HPMCP 50, HPMCP 55, 폴리비닐 아세테이트 프탈레이트 (PVAP), 에우드라기트 (Eudragit) L30D, 아쿠아테릭 (Aquateric), 셀룰로오스 아세테이트 프탈레이트 (CAP), 에우드라기트 L, 에우드라기트 S, 및 셸락 (Shellac)이 있다. 이들 코팅은 혼합된 필름으로서 사용될 수 있다.
- [0366] 코팅 또는 코팅의 혼합물은 또한 정제 상에 사용될 수도 있으며, 이는 위에 대한 보호를 의도하지 않는다. 여기에는 당 코팅, 또는 정제를 용이하게 삼키게 하는 코팅이 포함될 수 있다. 캡슐은 경질 셸 (예컨대, 젤라틴), 건조 치료물의 전달의 경우에는, 즉 산제로 이루어질 수 있는데; 액형의 경우에는 연질 젤라틴 셸이 사용될 수 있다. 카세제의 셸 물질은 굵은 전분 또는 다른 식용 종이일 수 있다. 환제, 로젠지제, 성형 정제 또는 정제 가루의 경우에, 습식 덩어리화 기술이 사용될 수 있다.
- [0367] 치료물은 입경이 약 1 mm인 과립형 또는 펠렛형으로 미세 다중-미립자로서 제제에 포함될 수 있다. 캡슐 투여용 물질의 제제는 또한 산제로서 가볍게 압축된 플러그 또는 심지어 정제일 수 있다. 치료물은 압축에 의해 제조될 수 있다.
- [0368] 착색제 및 향미제는 모두 포함될 수 있다. 예를 들면, 올리고뉴클레오티드 (또는 유도체)는 (예컨대, 리포솜 또는 미세구 캡슐화에 의해) 제제화될 수 있고, 이어서 추가로 식용 생성물, 예컨대 착색제 및 향미제를 함유한 냉장 음료 내에 함유된다.
- [0369] 불활성 물질로 치료물을 희석하거나 그의 용적을 증가시킬 수 있다. 이들 희석제에는 탄수화물, 특히 만니톨,

$\alpha$ -락토스, 무수 락토스, 셀룰로오스, 수크로스, 개질된 텍스트란 및 전분이 포함될 수 있다. 특정 무기 염은 삼인산칼슘, 탄산마그네슘 및 염화나트륨을 포함하는 충전제로서 사용될 수도 있다. 일부 상업적으로 입수가 가능한 희석제에는 Fast-Flo, 엠덱스 (Emdex), STA-Rx 1500, 엠컴프레스 (Emcompress) 및 아비셀 (Avicell)이 있다.

[0370] 봉해제는 고흥물 투여형으로의 치료물의 제제에 포함될 수 있다. 봉해물로서 사용되는 물질은 시판되는 전분 기재 봉해제, 엑플로타브 (Explotab)를 포함하는 전분을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 나트륨 전분 글리콜레이트, 암버라이트 (Amberlite), 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스, 울트라밀로펙틴, 나트륨 알기네이트, 젤라틴, 오렌지 껍질, 산 카르복시메틸 셀룰로오스, 천연 스펀지 및 벤토나이트도 모든 사용될 수 있다. 봉해제의 또다른 형태는 불용성 양이온성 교환 수지이다. 분말된 검은 봉해제 및 결합제로서 사용될 수 있고, 이들은 분말된 검, 예컨대 한천, 카라야 (Karaya) 또는 트래거캔스를 포함할 수 있다. 알긴산 및 그의 나트륨 염은 또한 봉해제로서 유용하다.

[0371] 결합제는 치료제와 함께 경질 정제를 형성하는 데 사용될 수 있고, 천연 생성물, 예컨대 아카시아, 트래거캔스, 전분 및 젤라틴으로부터의 물질을 포함할 수 있다. 기타에는 메틸 셀룰로오스 (MC), 에틸 셀룰로오스 (EC) 및 카르복시메틸 셀룰로오스 (CMC)가 포함된다. 폴리비닐 피롤리돈 (PVP) 및 히드록시프로필메틸 셀룰로오스 (HPMC)는 알콜성 용액에서 사용하여 치료물을 과립화할 수 있다.

[0372] 항-마찰제는 제제화 프로세스 동안 접촉을 막기 위해 치료물의 제제에 포함될 수 있다. 윤활제는 치료물과 다이 벽 사이의 층으로서 사용될 수 있고, 이들은 스테아르산 (그의 마그네슘 및 칼슘 염 포함), 폴리테트라플루오로에틸렌 (PTFE), 액체 파라핀, 식물성 오일 및 왁스를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 가용성 윤활제는 예컨대 라우릴황산나트륨, 라우릴황산마그네슘, 각종 분자량의 폴리에틸렌 글리콜, 카르보왁스 (Carbowax) 4000 및 6000을 사용할 수도 있다.

[0373] 제제화 동안 약물의 유동 특성을 개선할 수 있고, 압축 동안 재배열을 돕기 위해 활택제를 첨가할 수 있다. 활택제는 전분, 활석, 발열성 실리카 및 수화된 실리코알루미네이트를 포함할 수 있다.

[0374] 수성 환경 내로 치료물의 용해를 돕기 위해, 계면활성제는 습윤제로서 첨가될 수 있다. 계면활성제는 음이온성 세제, 예컨대 라우릴황산나트륨, 디옥틸 나트륨 술포숙시네이트 및 디옥틸 나트륨 술포네이트를 포함할 수 있다. 양이온성 세제가 사용될 수 있고, 상기 세제에는 벤잘코늄 클로라이드 또는 벤제토늄 클로라이드가 포함될 수 있다. 계면활성제로서 제제화에 포함될 수 있는 잠재적 비-이온성 세제의 목록에는 라우로마크로콜 400, 폴리옥실 40 스테아레이트, 폴리옥시에틸렌 수산화 피마자유 10, 50 및 60, 글리세롤 모노스테아레이트, 폴리소르베이트 40, 60, 65 및 80, 수크로스 지방산 에스테르, 메틸 셀룰로오스 및 카르복시메틸 셀룰로오스가 있다. 이들 계면활성제는 단독으로 또는 상이한 비율로의 혼합물로서 올리고뉴클레오티드 또는 유도체의 제제에 존재할 수 있다.

[0375] 경구적으로 사용될 수 있는 제약 제제로는 젤라틴 소재의 푸쉬-핏 (push-fit) 캡셀제뿐만 아니라 젤라틴 및 가소제, 예를 들어 글리세롤 또는 소르비톨 소재의 연질의 밀봉 캡셀제가 포함된다. 푸쉬-핏 캡셀제는 활성 성분을 충전제, 예를 들어 락토스, 결합제, 예를 들어 전분, 및(또는) 윤활제, 예를 들어 탈크 또는 스테아르산마그네슘 및, 임의로 안정화제와 혼합하여 함유할 수 있다. 연질 캡셀에서, 활성 화합물은 적절한 액체, 예를 들어 지방 오일, 액상 파라핀, 또는 액상 폴리에틸렌 글리콜 중에 용해시키거나 또는 현탁시킬 수 있다. 또한, 안정화제를 첨가할 수 있다. 경구 투여용으로 제제화된 마이크로스피어를 사용할 수도 있다. 이러한 마이크로스피어는 당업계에 잘 정의되어 있다. 경구 투여용의 모든 제제는 이러한 투여에 적합한 투여량이어야 한다.

[0376] 경구 투여의 경우, 조성물은 통상의 방식으로 제제화된 정제 또는 로젠지 형태일 수 있다.

[0377] 흡입에 의한 투여의 경우, 본 발명에 따라 사용되는 화합물은, 적합한 추진제, 예를 들어 디클로로디플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄, 이산화탄소 또는 다른 적합한 기체를 사용하여, 가압된 팩으로부터 에어로졸 분무 제공 형태 또는 분무기 형태로 편리하게 전달될 수 있다. 가압된 에어로졸의 경우, 투여 단위는 계량된 양을 전달하는 밸브를 제공하여 결정할 수 있다. 흡입기 또는 취입기에 사용하는, 예를 들어 젤라틴의 캡셀 및 카트리지가 화합물 및 적합한 분말 베이스, 예를 들어 락토스 또는 전분의 분말 혼합물을 함유하도록 제제화할 수 있다.

[0378] 본원에는 올리고뉴클레오티드 (또는 그의 유도체)의 폐 전달도 고려된다. 올리고뉴클레오티드 (또는 유도체)는 흡입 동안 포유동물의 폐로 전달되고 혈액 스트림으로 폐 상피를 가로질러 간다. 흡입되는 분자의 다른 보고에는 문헌 [Adjei et al., 1990, Pharmaceutical Research, 7: 565-569; Adjei et al., 1990, International

Journal of Pharmaceutics, 63: 135-144 (leuprolide acetate); Braquet et al., 1989, Journal of Cardiovascular Pharmacology, 13 (suppl. 5): 143-146 (endotlielin-1); Hubbard et al., 1989, Annals of Internal Medicine, Vol. III, pp. 206-212 (a1-antitrypsin); Smith et al., 1989, J. Clin. Invest. 84: 1145-1146 (a-1-proteinase); Oswein et al., 1990, "Aerosolization of Proteins", Proceedings of Symposium on Respiratory Drug Delivery II, Keystone, Colorado, March, (recombinant human growth hormone); Debs et al., 1988, J. Immunol. 140: 3482-3488 (interferon-g and tumor necrosis factor alpha)] 및 플라츠 (Platz) 등의 미국 특허 제5,284,656호 (과립구 집락 자극 인자)가 포함된다. 전신 효과용 약물의 폐 전달을 위한 방법 및 조성물은 왕 (Wong) 등에 의한 1995년 9월 19일자로 허여된 미국 특허 제5,451,569호에 기재되어 있다.

[0379] 본 발명의 수행에서 사용하기 위해 치료 생성물의 폐 전달용으로 디자인된 광범위한 기계적 장치가 고려되며, 여기에는 연무기, 계량 투여 흡입기, 및 분말 흡입기가 포함되며 이에 제한되지 않고, 상기 모두는 당업자에 통상적인 것이다.

[0380] 본 발명의 수행에 적합한 상업적으로 입수가 가능한 장치의 일부 특정 예에는 미국 미주리주 세인트루이스 소재의 말린클크로드트 인크. (Mallinckrodt, Inc.)제의 울트라벤트 (Ultravent) 연무기; 미국 콜로라도주 앵글우드 소재의 마르퀘스트 메디칼 프로덕츠 (Marquest Medical Products)제의 아코른 (Acorn) II 연무기; 미국 노쓰캐롤라이나주 리서치 트라이앵글 파크 소재의 글락소 인크. (Glaxo Inc.)제의 벤톨린 (Ventolin) 계량 투여 흡입기; 및 미국 매사추세츠주 베드포드 소재의 피슨스 코르프. (Fisons Corp.)제의 스피날러 (Spinhaler) 분말 흡입기가 있다.

[0381] 이러한 장치 모두는 올리고뉴클레오티드 (또는 유도체)의 분배에 적합한 제제화의 이용이 요구된다. 전형적으로, 각각의 제제화는 사용되는 장치의 유형에 특이적이고, 치료법에 유용한 통상의 희석제, 아주반트 및(또는) 담체 이외에 적절한 추진제 물질의 사용을 포함할 수 있다. 또한, 리포솜, 미세캡슐 또는 미세구의 사용, 내포 복합체, 또는 담체의 기타 유형이 고려된다. 화학적으로 개질된 올리고뉴클레오티드는 화학 변형의 유형 또는 사용되는 장치의 유형에 따른 상이한 제제화로 제조될 수도 있다.

[0382] 연무기와 함께 제트 또는 초음파의 사용에 적합한 제제는 용액의 1 mL 당 생물학적으로 활성 올리고뉴클레오티드 약 0.1 내지 25 mg의 농도로 물에 용해된 올리고뉴클레오티드 (또는 유도체)를 전형적으로 포함할 것이다. 제제는 완충액 및 단순 당 (예컨대, 올리고뉴클레오티드 안정화 및 삼투압의 조절)을 포함할 수도 있다. 에어로졸의 형성에서 용액의 애터마이저화에 의해 기인된 올리고뉴클레오티드의 표면 유도 응집을 감소시키거나 또는 방지하기 위해 연무기 제제는 계면활성제를 포함할 수도 있다.

[0383] 계량 투여 흡입기 장치용 제제는 계면활성제의 도움으로 추진제에 현탁된 올리고뉴클레오티드 (또는 유도체)의 미분된 산제를 일반적으로 포함할 것이다. 추진제는 이 목적을 위해 사용되는 임의의 통상적인 물질, 예컨대 클로로플루오로카본, 히드로클로로플루오로카본, 히드رو플루오로카본, 또는 히드로카본 (트리클로로플루오로메탄, 디클로로디플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄올, 및 1,1,1,2-테트라플루오로에탄올을 포함함), 또는 이들의 조합물일 수 있다. 적합한 계면활성제는 소르비탄 트리올레이트 및 소야 레시틴을 포함한다. 올레산은 계면활성제로서 유용할 수도 있다.

[0384] 분말 흡입기 장치로부터의 분배용 제제는 올리고뉴클레오티드 (또는 유도체)를 함유하는 미분된 건조 산제를 포함할 것이고, 장치로부터 산제의 분산을 촉진하는 양, 예컨대, 제제의 50 내지 90중량%로 팽화제, 예컨대 락토스, 소르비톨, 수크로스, 또는 만니톨을 포함할 수도 있다. 올리고뉴클레오티드 (또는 유도체)는 말단 페로 가장 효과적인 전달을 위해 평균 입경이 10 μm (또는 마이크로미터), 가장 바람직하게는 0.5 내지 5 μm 미만인 미립자형으로 가장 유리하게 제조되어야 한다.

[0385] 본 발명의 제약 조성물의 비강 전달도 고려된다. 비강 전달은 폐 중에 생성물의 퇴적 요구 없이 코로의 치료 생성물의 투여 직후에 혈액 스트림으로 본 발명의 제약 조성물의 통과를 허용한다. 비강 전달용 제제는 텍스트란 또는 시클로텍스트란을 갖는 것을 포함한다.

[0386] 비강 투여의 경우에, 유용한 장치는 계량 투여량 스프레이를 부착한 작은 경질 병이다. 일 실시양태에서, 계량 투여량은 본 발명의 제약 조성물 용액을 정해진 용적의 챔버 내로 빼냄으로써 전달되며, 여기서 상기 챔버는 에어로졸화를 위해 치수화된 구멍 및 챔버 내의 액체를 압축하는 경우에 스프레이를 형성하는 에어로졸 제제를 가진다. 챔버는 압축되어 본 발명의 제약 조성물을 투여한다. 특정 실시양태에서, 챔버는 피스톤 장치이다. 이러한 장치는 상업적으로 입수가 가능하다.

- [0387] 변법으로는, 압착시에 스프레이를 형성하는 에어로졸 제제를 에어로졸화하기 위해 치수화된 구멍 또는 개방부를 가지는 플라스틱 압착 병을 사용한다. 개방부는 병의 상부에 보통 있고, 상부는 에어로졸 제제의 유효한 투여를 위한 콧구멍에 부분적으로 장착되게 일반적으로 점감식이다. 바람직하게는, 비강 흡입기는 결정된 투여량의 약물의 투여를 위해 에어로졸 제제의 계량된 양을 제공할 것이다.
- [0388] 전신으로 전달할 필요가 있는 화합물은 주사, 예를 들어 환약 주사 또는 지속적 주입에 의한 비경구 투여를 위해 제제화될 수 있다. 주사용 제제는 단위 투여 형태, 예를 들어 앰플, 또는 다중-투여용 컨테이너로, 첨가된 보존제와 함께 제공될 수 있다. 조성물은 오일 또는 수성 비히클 중 현탁액, 용액 또는 에멀전과 같은 형태를 취할 수 있으며, 현탁제, 안정화제 및(또는) 분산제와 같은 제제화 물질을 함유할 수 있다.
- [0389] 비경구 투여를 위한 제약 제제로는 수용성 형태의 활성 화합물 수용액이 포함된다. 또한, 활성 화합물의 현탁액은 적합한 오일 주사 현탁액으로서 제조될 수 있다. 적합한 지질친화성 용매 또는 비히클로는 지방 오일, 예를 들어 참기름, 또는 합성 지방산 에스테르, 예를 들어 에틸 올레에이트 또는 트리글리세라이드, 또는 리포솜이 포함된다. 수성 주사 현탁액은 현탁액의 점도를 증가시키는 물질, 예를 들어 소듐 카르복시메틸 셀룰로스, 소르비톨 또는 텍스트란을 함유할 수 있다. 임의로, 현탁액은 화합물의 용해도를 증가시켜 고도로 농축된 용액의 제조를 가능케 하는 적합한 안정화제 또는 물질을 함유할 수도 있다.
- [0390] 또는, 활성 화합물은 사용시에 적합한 비히클, 예를 들어 멸균 발열물질 무함유 물로 녹여 사용하는 분말 형태일 수 있다.
- [0391] 화합물은 직장 또는 질 조성물, 예를 들어 좌제, 또는 예를 들어 코코아 버터 또는 기타 글리세라이드와 같은 통상의 좌약 베이스를 함유하는 보유 관장제로 제제화할 수 있다.
- [0392] 상기 기술된 제제 이외에, 화합물은 축적물 제제로 제제화할 수도 있다. 이러한 장기 작용성 제제는 적합한 고분자 또는 소수성 물질 (예를 들어, 허용가능한 오일 중 에멀전으로서) 또는 이온교환수지와 함께, 또는 예를 들어 가용성이 적은 염과 같이 가용성이 적은 유도체로서 제제화될 수 있다.
- [0393] 제약 조성물은 또한 적합한 고체 또는 겔 상 담체 또는 부형제를 포함할 수도 있다. 이러한 담체 또는 부형제의 예로는 탄산칼슘, 인산칼슘, 각종 당, 전분, 셀룰로스 유도체, 젤라틴, 및 폴리에틸렌 글리콜과 같은 중합체가 포함되지만 이에 한정되지 않는다.
- [0394] 적합한 액상 또는 고상 제약 제제 형태로는, 예를 들어 흡입용 수용액 또는 염수 용액 형태, 미세캡셀화 형태, 코클레에이트화 형태, 미세한 금 입자상에 코팅된 형태, 리포솜내에 함유된 형태, 분무 에어로졸 형태, 피부에 이식되는 펠릿 형태, 또는 피부로 스크래치되는 날카로운 물건상에 건조된 형태가 있다. 제약 조성물은 또한 활성 화합물을 연장 방출시키는 과립, 분말, 정제, 코팅 정제, (미세)캡셀, 좌제, 시럽, 에멀전, 현탁액, 크림, 적제 또는 제제를 포함하며, 제제 중에 부형제 및 첨가제 및(또는) 보조제, 예를 들어 붕해제, 결합제, 코팅제, 증가제, 율활제, 향미제, 감미제 또는 가용화제를 상기 설명된 바와 같이 통상적으로 사용한다. 제약 조성물은 다양한 약물 전달 시스템에 사용하기에 적합하다. 약물 전달 방법에 대한 개략적인 검토를 위해서는, 본원에 참고로 포함되는 문헌 (Langer, Science 249: 1527-1533, 1990)을 참조한다.
- [0395] CpG 면역자극 올리고뉴클레오티드, 임의로 다른 치료제, 및(또는) 항원은 그 자체로 (니트) 또는 제약상 허용되는 염 형태로 투여될 수 있다. 의료에서 사용되는 경우, 염은 제약상 허용되는 것이어야 하지만, 비-제약상 허용되는 염도 통상적으로 그의 제약상 허용되는 염을 제조하는데 사용될 수 있다. 이러한 염으로는 하기 산으로부터 제조되는 것들이 포함되지만 이에 한정되지 않는다: 염산, 브롬화수소산, 황산, 질산, 인산, 말산, 아세트산, 살리실산, p-톨루엔 술폰산, 타르타르산, 시트르산, 메탄술폰산, 포름산, 말론산, 숙신산, 나프탈렌-2-술폰산, 및 벤젠술폰산. 이러한 염은 알칼리금속염 또는 알칼리토금속염, 예를 들어 카르복실산기의 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염으로 제조할 수 있다.
- [0396] 적합한 완충제로는 다음의 것들이 포함된다: 아세트산 및 그의 염 (1 내지 27% w/v); 시트르산 및 그의 염 (1 내지 3% w/v); 붕산 및 그의 염 (0.5 내지 2.5% w/v); 및 인산 및 그의 염 (0.8 내지 2% w/v). 적합한 보존제로는 벤즈알코늄 클로라이드 (0.003 내지 0.03% w/v); 클로로부탄올 (0.3 내지 0.9% w/v); 파라벤 (0.01 내지 0.25% w/v) 및 티메로살 (0.004 내지 0.02% w/v)이 포함된다.
- [0397] 본 발명의 제약 조성물은 유효량의 CpG 면역자극 올리고뉴클레오티드, 및 임의로 항원, 및(또는) 임의로 제약상 허용되는 담체 중에 포함된 다른 치료제를 함유한다. 제약상 허용되는 담체라는 용어에는 인간 또는 다른 척추동물에 투여하기에 적합한 한가지 이상의 상용성 고상 또는 액상 충전제, 희석제 또는 캡셀화 물질을 의미한다.

담체라는 용어는 활성 성분이 배합되어 투여가 촉진되는 천연 또는 합성의 유기 또는 무기 성분을 의미한다. 제약 조성물의 성분은 또한 목적하는 약제 효능에 실질적으로 손상을 주는 상호작용이 없도록 하는 방식으로 본 발명의 화합물과 서로 혼합될 수 있다.

[0398] 본 발명은 하기 실시예에 의해 추가로 설명되지만, 이 실시예는 본 발명을 제한하기 위한 것은 아니다. 본원을 통해 인용된 참고문헌 (문헌의 참고문헌, 허여된 특허, 공개된 특허 출원 및 동시 계류중인 특허 출원 포함)의 전체 내용은 본원에 참고로 포함된다.

**실시예**

[0399] **재료 및 방법:**

[0400] **올리고데옥시뉴클레오티드 (ODN)**

[0401] 모든 ODN은 비오스프링 (biospring) (프랑크푸르트 (Frankfurt), 독일) 또는 시그마-아크 (Sigma-Ark) (다름스타트 (Darmstadt), 독일)로부터 구입하였고, 콜리 파마슈티칼 게압베하 (Coley Pharmaceutical GmbH) (랑겐펠트 (Langenfeld), 독일)에 의한 확인 및 정제에 의해 조정하였다. ODN을 포스페이트-완충 염수 (시그마, 독일)에 희석하고, -20 °C에서 저장하였다. 모든 희석을 발열원-무함유 시약을 사용하여 수행하였다.

[0402] **세포 정제**

[0403] 건강한 남성 및 여성 기증자로부터 말초 혈액 연층 제조물을 드셀도르프 (Dsseldorf) 대학교 (독일)의 블러드뱅크 (Blood Bank)로부터 얻고, PBMC를 피콜-히파퀘 (Ficoll-Hypaque) (시그마) 상에서 원심분리에 의해 정제하였다. 정제된 PBMC를 새롭게 (대부분의 분석의 경우) 사용하거나 또는 냉동 배지에 현탁하고, -70 °C에서 저장하였다. 필요한 경우에, 분취량의 이들 세포를 해동하고, 세척하고, 5% (v/v) 가열 불활성화 인간 AB 혈청 (비오브히타커 (BioWhittaker), 벨기에) 또는 10% (v/v) 가열 불활성화 FCS, 2mM L-글루타민 (비오브히타커), 100 U/ml 페니실린 및 스트렙토마이신 100µg/ml (인비트로젠 (Invitrogen) (카를스루헤 (Karlsruhe), 독일))를 보충한 RPMI 1640 배양 배지 (비오브히타커, 벨기에)에 재현탁하였다.

[0404] **사이토카인 탐지**

[0405] 해동되거나 또는 새로운 PBMC를 48 웰 평평한 바닥 플레이트 또는 96 웰 둥근 바닥 플레이트 상에 시딩하고, 37 °C의 항습화되는 인큐베이터에서 지시되는 농도로 ODN을 인큐베이션하였다. 배양 상청액을 수집하고, 즉시 사용하지 않는 경우에는 -20 °C에서 요구될 때까지 냉동하였다. 상업적으로 입수가 가능한 ELISA 키트 (디아클론 (Diaclone), 미국) 또는 상업적으로 입수가 가능한 항체 (벡톤 디킨슨 (Becton Dickinson)/파르밍겐 (Pharmingen) 또는 PBL 제)를 사용하여 개발된 실내 ELISA를 사용하여 상청액 중의 사이토카인의 양을 평가하였다.

[0406] **NK 세포 활성화의 유세포측정 분석을 위한 배양**

[0407] CD3 (T 세포 마커), CD56 (NK 세포 마커) 및 CD69 (NK 세포 및 T 세포 상의 초기 활성화 마커)에 대한 플루오로크롬 접합 모노클로날 항체를 벡톤 디킨슨으로부터 구입하였다. 96 웰 둥근 바닥 플레이트에 상이한 농도의 ODN의 첨가와 함께 또는 없이 24 시간 동안 PBMC를 인큐베이션하였다. NK 세포를 CD56-양성 및 CD3-음성 세포로서 유세포측정기에 의해 확인하였다. 유세포측정 데이터를 FACSCalibur (벡톤 디킨슨)에서 얻었다. 데이터를 컴퓨터 프로그램 CellQuest (벡톤 디킨슨)를 사용하여 분석하였다.

[0408] **세포 표면 활성화 마커의 유세포측정 분석**

[0409] B 세포 상의 활성화 마커로서공동-자극 분자 CD86의 발현을 측정하기 위해, PBMC를 48 시간 동안 ODN과 함께 지시된 농도로 인큐베이션하고, 세포를 CD19 및 CD86 (파르밍겐, 독일)에 대한 mAb로 염색하였다. CD19 양성 B 세포에 대한 CD86 발현을 유세포측정기로 측정하였다.

[0410] 단핵구 상의 활성화 마커로서공동-자극 분자 CD80의 발현을 측정하기 위해, PBMC를 48 시간 동안 ODN과 함께 지시된 농도로 인큐베이션하고, 세포를 CD14, CD19, 및 CD80 (파르밍겐, 독일)에 대한 mAb로 염색하였다. CD14 양성 CD19 음성 단핵구에 대한 CD80 발현을 유세포측정기로 측정하였다. 측정 모두의 결과를 평균 형광 강도 (MFI)로서 나타낸다.

[0411] 실시예 1:

[0412] 본원에 기재된 CpG 올리고뉴클레오티드에 인간 PBMC를 노출시킨 후에 인간 PBMC로부터 분비되는 인터페론-알파 (IFN-α), IFN-γ, IL-10, IL-6, 및 TNF-α의 수준을 첨부된 도 1 내지 5에 나타낸다. 조사한 시험 올리고뉴

클레오티드를 ▲로 도면에 나타냈다. 양성 대조군 올리고뉴클레오티드로서 제공된 올리고뉴클레오티드를 ■로 나타냈다. 도 1A, 2A, 3A, 4A, 및 5A에 나타낸 시험 올리고뉴클레오티드는 서열 322, 서열 323, 및 서열 324를 포함한다. 도 1B, 2B, 3B, 4B, 및 5B에 나타낸 시험 올리고뉴클레오티드는 서열 325, 서열 326, 서열 327, 및 서열 328을 포함한다. 특정 데이터 지점을 작성하기 위해 사용된 올리고뉴클레오티드의 농도는 X 축 ( $\mu\text{M}$ )에 따라 나타낸다. 그래프 하부에, 음성 (배지) 및 일부의 경우에는 LPS로 처리한 세포에 의해 분비된 사이토카인의 수준을 각각의 실험에 대해 열거한다.

[0413] 도 1 내지 5에서 입증한 바와 같이, 분석에서 시험된 올리고뉴클레오티드는 완전 포스포로티오에이트 백본을 갖는 양성 대조군 올리고뉴클레오티드보다 대략 등량 또는 더 양호한 수준으로 사이토카인을 분비할 수 있었다. 음성 대조군은 사이토카인을 유의하게 덜 생성하였다.

[0414] 실시예 2:

[0415] 시험 올리고뉴클레오티드 대 대조군 올리고뉴클레오티드를 사용하는 처리에 대한 반응에서 NK 세포 상의 CD69 발현 (MFI)의 수준을 시험하였다. CD69 발현은 T 세포 및 NK 세포 활성화의 지시자이다. 세포를 도 6에서 ▲로 나타낸 시험 올리고뉴클레오티드 대 ■로 나타낸 양성 대조군 올리고뉴클레오티드에 노출시켰다. 도 6A에 나타낸 시험 올리고뉴클레오티드는 서열 322, 서열 323, 및 서열 324를 포함한다. 도 6B에 나타낸 시험 올리고뉴클레오티드는 서열 325, 서열 326, 서열 327, 및 서열 328을 포함한다. 이들 연구에 사용한 양성 대조군 올리고뉴클레오티드는 서열 329이었다. 그래프 하부에, 음성 대조군 (배지) 및 LPS로 처리한 T 및 NK 세포 상의 CD69 발현의 수준을 각각의 실험에 대해 열거한다.

[0416] 도 6에서 입증한 바와 같이, 분석에서 시험된 올리고뉴클레오티드는 완전 포스포로티오에이트 백본을 갖는 양성 대조군 올리고뉴클레오티드보다 대략 등량 또는 더 양호한 수준으로 CD69 발현을 유도할 수 있었다. 음성 대조군은 CD69를 유의하게 덜 생성하였다.

[0417] 실시예 3:

[0418] 본원에 기재된 CpG 올리고뉴클레오티드에 인간 PBMC를 노출시킨 후에 이들 세포에 의해 생성된 인터페론-알파 ( $\text{IFN-}\alpha$ ) 및 IL-10의 수준을 첨부된 도 7 내지 12 및 17에 나타낸다. 조사한 시험 올리고뉴클레오티드를 ■로 도면에 나타냈다. 양성 대조군 올리고뉴클레오티드 서열 242로서 제공된 올리고뉴클레오티드를 ●로서 나타냈다. 음성 대조군 올리고뉴클레오티드 서열 330로서 제공된 올리고뉴클레오티드를 ◆로서 나타냈다. 도 7A 및 7B에 나타낸 시험 올리고뉴클레오티드는 서열 313을 포함한다. 도 8A 및 8B에 나타낸 시험 올리고뉴클레오티드는 서열 314를 포함한다. 도 9A 및 9B에 나타낸 시험 올리고뉴클레오티드는 서열 319를 포함한다. 도 10A 및 10B에 나타낸 시험 올리고뉴클레오티드는 서열 316을 포함한다. 도 11A 및 11B에 나타낸 시험 올리고뉴클레오티드는 서열 317을 포함한다. 도 12A 및 12B에 나타낸 시험 올리고뉴클레오티드는 서열 320을 포함한다. 도 17A 및 17B에 나타낸 시험 올리고뉴클레오티드는 서열 321을 포함한다. 특정 데이터 지점을 작성하기 위해 사용된 올리고뉴클레오티드의 농도는 X 축 ( $\mu\text{M}$ )에 따라 나타낸다.

[0419] 도 7 내지 12 및 17에서 입증한 바와 같이, 분석에서 시험된 올리고뉴클레오티드는 각각 사이토카인 분비의 상이한 수준 및 패턴을 생성할 수 있었다. 예를 들면, 대략 등량 또는 더 낮은 농도에서, 대부분의 시험된 ODN은 완전 포스포로티오에이트 백본을 갖는 양성 대조군 올리고뉴클레오티드보다 하나 이상의 사이토카인을 더 양호하게 유도하였다. 음성 대조군은 사이토카인을 유의하게 덜 생산하였다.

[0420] 서열 313과의 인큐베이션시에 PBMC는 서열 242와의 인큐베이션 후와 같이 유사한 수준의 인터페론-알파 ( $\text{IFN}\alpha$ ) 및 인터루킨-10 (IL-10)을 분비하였다. 서열 314는 서열 242와 같이 인간 PBMC로부터 분비된 IL-10의 양에 대해 유사한 효과를 가지는 반면,  $\text{IFN}\alpha$ 의 분비는 강하게 증가되었다. 서열 242와 대조적으로, 서열 319는 인간 PBMC로부터 단지 낮은 수준의  $\text{IFN}\alpha$  분비를 유도하는 반면, 분비된 IL-10의 양은 2개의 올리고뉴클레오티드 간에 유사하였다. 서열 316은 서열 242보다 인간 PBMC로부터 수배 더 높은 수준의  $\text{IFN}\alpha$ 를 유도할 수 있었다. 총량의 분비된 IL-10의 총량의 증가도 관찰되었다. 서열 317은 서열 242에 비해 인간 PBMC로부터의 강하게 증가된  $\text{IFN}\alpha$  분비를 갖는, 서열 316와 유사한 특성을 나타냈다. IL-10 분비의 수준은 약하게 높아졌다. 서열 320이 인간 PBMC로부터  $\text{IFN}\alpha$  및 IL-10을 유도하지만, 그 유도는 서열 242보다 덜 하였다. 서열 321은 서열 242 (도 17A)보다 인간 PBMC로부터 10 배 이상 더 높은 수준의  $\text{IFN}\alpha$ 를 유도할 수 있었다. 서열 242에 비해, 서열 321에 의해 유도되는 인간 PBMC로부터의 IL-10 분비는 더 높은 농도의 이 올리고뉴클레오티드에서 약하게 증가되었다 (도 17B).

[0421] 실시예 4:

- [0422] 본원에 기재된 CpG 올리고뉴클레오티드에 B 세포 및 단핵구를 노출시킨 후에 B 세포 및 단핵구 활성화의 수준을 첨부된 도 13 내지 15, 16 및 18 내지 20에 나타낸다. 조사한 시험 올리고뉴클레오티드를 ■로 도면에 나타냈다. 양성 대조군 올리고뉴클레오티드 서열 242로서 제공된 올리고뉴클레오티드를 ●로서 나타냈다. 음성 대조군 올리고뉴클레오티드 서열 330로서 제공된 올리고뉴클레오티드를 ◆로서 나타냈다. 도 13A 및 13B에 나타낸 시험 올리고뉴클레오티드는 서열 313을 포함한다. 도 14A 및 14B에 나타낸 시험 올리고뉴클레오티드는 서열 314를 포함한다. 도 15A 및 15B에 나타낸 시험 올리고뉴클레오티드는 서열 319를 포함한다. 도 16A 및 16B에 나타낸 시험 올리고뉴클레오티드는 서열 316을 포함한다. 도 18A 및 18B에 나타낸 시험 올리고뉴클레오티드는 서열 321을 포함한다. 도 19A 및 19B에 나타낸 시험 올리고뉴클레오티드는 서열 317을 포함한다. 도 20A 및 20B에 나타낸 시험 올리고뉴클레오티드는 서열 320을 포함한다. 특정 데이터 지점을 작성하기 위해 사용된 올리고뉴클레오티드의 농도는 X 축 ( $\mu\text{M}$ )에 따라 나타낸다.
- [0423] 도 13 내지 15, 16 및 18 내지 20에서 입증한 바와 같이, 분석에서 시험된 올리고뉴클레오티드는 각각 세포 표면 마커 발현의 상이한 수준 및 패턴을 생성할 수 있었다. 예를 들면, 대략 등량 또는 더 낮은 농도에서, 대부분의 시험된 ODN은 완전 포스포로티오에이트 백분을 갖는 양성 대조군 올리고뉴클레오티드보다 세포 표면 마커를 더 양호하게 유도하였다.
- [0424] 서열 313에 의해 유도된 B 세포 상의 CD86 발현 및 단핵구 상의 CD80 발현의 수준은 서열 242에 필적할만 하였다. 서열 242와 비교하여, 서열 313은 세포 서열 242에 비해 더 낮은 농도에서 세포를 자극하며, 이는 증가된 효능임을 제시한다. 수준의 B 세포 상의 CD86 발현 및 단핵구 상의 CD80 발현의 수준은 유사하였다. 서열 314의 효과를 서열 242에 비해 더 낮은 농도의 서열 314를 사용하여 관찰하였으며, 이는 서열 314의 증가된 효능을 나타낸다. B 세포 상에서, CD86의 표면 발현은 서열 242에 필적하는 신호 세기를 갖는 서열 319로 강하게 상류 조절되었다. 단핵구 상에서, 단지 약하게 상승되는 수준의 CD80 발현은 서열 319로 탐지가 가능하였다. B 세포 상에 CD86 상류 조절에 대한 서열 319의 유도능은 서열 242에 비해 약하게 감소되었다. 서열 242에 비해, 서열 316은 B 세포 상에서 활성화 마커 CD86(도 16A), 및 단핵구 상에서 활성화 마커 CD80(도 16B)의 더 높은 수준을 유도하였다. B 세포는 CD86 발현에 의해 나타나는 바와 같이 서열 321과의 인간 PBMC의 인큐베이션 시에 강하게 활성화되었다(도 18A). CD86의 수준이 서열 242에 의해 유도되는 것보다 더 높았다. 또한, 서열 321로 CD80 발현에 의해 나타나는 단핵구의 활성화는 서열 242보다 더 강하였다(도 18B). 서열 317은 B 세포 상의 CD86 발현을 서열 242에 필적할만한 수준으로 유도한 반면(도 19A), 단핵구 상의 활성화 마커 CD80의 발현은 서열 242에 비해 증가되었다(도 19B). 서열 320은 B 세포 상의 CD86 발현을 서열 242와 유사한 정도로 유도하였다(도 20A).
- [0425] 실시예 5. 반-연질 올리고뉴클레오티드는 시험관내에서 인간 PBMC에 대해 면역자극적이다.
- [0426] 이 실시예에서, 반-연질 올리고뉴클레오티드 시험관내에서 사이토카인 및 케모킨의 그의 유도능을 평가하였다. 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 3명의 건강한 인간 기증자로부터 얻고, 각종 농도(0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 및 5.0  $\mu\text{M}$ )의 완전히 안정화된 CpG 서열 242 또는 반-연질 서열 241의 존재하에 배양하였다. 6, 16, 또는 48 시간 후에, 배양 상청액을 수집하고, 상청액 중의 각종 사이토카인(IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IL-10) 및 케모킨 IP-10을 ELISA로 측정하였다. 올리고뉴클레오티드의 낮은 농도에서, 반-연질 및 완전히 안정화된 올리고뉴클레오티드는 IFN- $\alpha$ 를 배양에서 16 또는 48 시간 후에 유사한 정도로 유도하였다. 그러나, ODN 5476을 사용하는 IFN- $\alpha$ 의 최고 유도를 서열 242에 필요한 올리고뉴클레오티드 농도의 약 절반에서 조사하였다. 중간 농도에서, 서열 242는 서열 241보다 더 IFN- $\alpha$ 를 유도하고, 높은 농도에서, 서열 242 또는 서열 241은 IFN- $\alpha$ 를 유도하지 않았다. 케모킨 IP-10은 유사한 정도로, 반-연질 및 완전히 안정화된 올리고뉴클레오티드에 의한 유사한 농도 의존성을 가지고 자극되었다. 2 가지 경우 모두에, 약 700 pg/mL의 IP-10을 올리고뉴클레오티드의 더 낮은 농도에서 관찰되고, IP-10은 올리고뉴클레오티드 더 높은 농도에서 덜 유도되었다. 반-연질 올리고뉴클레오티드가 0.05  $\mu\text{M}$ 에서 유의한 양의 IL-10을 유도하는 것을 제외하고, IP-10과의 유사한 패턴이 사이토카인 IL-10에 대해 관찰되는 반면, 완전히 안정화된 올리고뉴클레오티드는 0.05  $\mu\text{M}$ 에서 IL-10을 거의 유도하지 않았다. 반-연질 및 완전히 안정화된 올리고뉴클레오티드는 TNF- $\alpha$ 의 그의 유도능과 유사한데, 즉 올리고뉴클레오티드 모두는 TNF- $\alpha$ 를 특히 높은 농도에서 강하게 유도하였다.

**표 1**

올리고뉴클레오티드 ( $\mu M$ )에 의해 유도된 사이토카인 및 케모킨 (pg/mL)<sup>1</sup>

	ODN	0.05	0.1	0.2	0.5	1.0	5.0
IFN- $\alpha$	서열 241	534.8 (3.5)	466.0 (7.5)	251.6 (22.9)	25.4 (21.4)	22.9 (26.3)	26.7 (22.1)
	242	444.0 (23.9)	573.6 (41.7)	892.4 (58.0)	583.6 (51.5)	115.6 (2.5)	51.5 (12.8)
IP-10	서열 241	5677.8 (18.9)	6221.5 (22.4)	4936.6 (11.8)	1493.6 (5.5)	121.9 (0.4)	0.0 (0.0)
	242	7287.4 (5.5)	6685.8 (12.8)	6967.4 (15.9)	4422.7 (11.0)	361.7 (2.6)	0.0 (0.0)
IL-10	서열 241	447.6 (3.7)	385.3 (4.9)	257.3 (3.1)	92.9 (1.6)	46.5 (0.2)	17.3 (1.5)
	242	73.4 (1.0)	399.8 (3.0)	367.7 (9.8)	237.8 (2.6)	52.3 (1.3)	10.5 (0.3)
TNF- $\alpha$	서열 241	179.0 (18.3)	186.4 (15.9)	229.9 (23.4)	178.8 (9.0)	368.2 (22.3)	886.3 (31.7)
	242	196.8 (25.9)	211.5 (8.7)	242.7 (5.5)	262.1 (6.3)	479.8 (33.5)	939.6 (69.7)

[0427]

[0428] <sup>1</sup> 값은 평균으로 보고함 (표준 편차).

[0429] 실시예 6. 반-연질 서열 241 대 완전히 안정화된 ODN에 의한 무린 대식세포의 시험관내 자극.

[0430] 무린 대식세포 세포주 (RAW264)는 반-연질 올리고뉴클레오티드 서열 241, 완전히 안정화된 올리고뉴클레오티드 서열 242, 완전히 안정화된 ODN 1826, 지질다당질 (LPS) 또는 PBS와 함께 16 시간 동안 인큐베이션하였다. 반-연질 및 완전히 안정화된 ODN을 0.02, 0.05, 및 0.1  $\mu M$ 의 농도에서 조사하였다. 상청액을 수집하고, IL-12의 p40 서브유닛 (IL-12p40, pg/mL)을 ELISA로 조사하였다. 결과를 하기 표 2에 나타낸다. 반-연질 올리고뉴클레오티드 서열 241은 완전히 안정화된 ODN보다 IL-12p40을 분비하는 대식세포의 유도에 유의하게 더 효능이 있었다.

**표 2**

반-연질 올리고뉴클레오티드 서열 241에 의해 자극된 무린 대식세포에 의한 IL-12p40 분비

ODN	ODN 농도 ( $\mu M$ )	IL-12 p40, pg/mL 평균 (S.D.)
서열 : 241	0.02	148.8 (37.5)
	0.05	149.8 (28.7)
	0.1	162.3 (8.4)
서열 : 242	0.02	41.4 (18.6)
	0.05	42.0 (26.2)
	0.1	23.0 (10.7)
서열 : 386	0.02	43.5 (23.0)
	0.05	38.3 (19.2)
	0.1	54.4 (4.1)
LPS	--	346.5 (20.5)
PBS	--	32.0 (12.1)

[0431]

[0432] 실시예 7. 인간 면역 세포의 자극에 최적화된 서열을 갖는 반-연질 B 클래스 올리고뉴클레오티드는 무린 면역 세포의 유능한 면역자극인자이다.

[0433] 인간 및 무린 면역 세포가 상이한 CpG ODN에 반응하는 것으로 보고되고 있다. 완전히 안정화된 CpG 서열 242는 인간 면역 세포의 자극에 "최적"으로 간주되었지만, 무린 면역 세포의 자극에는 "최적"으로 간주되지 않았다. 역으로, 완전히 안정화된 CpG ODN 5890 (5'T\*C\*A\*A\*C\*G\*T\*3')은 무린 면역 세포의 자극에 "최적"으로 간주되었지만, 인간 면역 세포의 자극에는 "최적"으로 간주되지 않았다. 인간 및 무린 B 세포는 모두 TLR9를 발현하는 것으로 보고되고 있다. TLR9-발현 HEK293 무린 비장세포를 각종 농도의 완전히 안정화된 CpG 서열 242, 완

전히 안정화된 CpG ODN 5890, 또는 반-연질 서열 241의 존재하에 배양하고, TLR9 활성화를 하기와 같이 측정하였다. 이 분석에 사용하는 세포는 무린 TLR9를 발현하고, 리포터 유전자 작제물을 함유하였다. 세포를 ODN 16 시간 동안 37 °C에서 항습화된 인큐베이터 내에서 인큐베이션하였다. 각각의 데이터 지점을 3회로 수행하였다. 세포를 용해하고, 리포터 유전자 활성화에 대해 분석하였다. ODN의 추가 없이 배지의 리포터 유전자 활성을 참조로 하여 자극 지수를 계산하였다. 반-연질 올리고뉴클레오티드 서열 241 및 완전히 안정화된 올리고뉴클레오티드 서열 242는 동일한 염기 서열을 가졌다. 결과를 하기 표 3에 나타낸다. 가장 낮은 농도에서, 서열 241 및 서열 242는 최저 면역자극 효과를 가졌다. 그러나, 14 nM 이상으로 증가된 농도와 같이, 서열 241은 서열 242 보다 명확하게 더 면역자극이 있다. 이 실험에서 연구한 가장 높은 농도에서, 서열 241은 무린-최적 완전히 안정화된 올리고뉴클레오티드 ODN 5890 만큼 적어도 자극이 있다.

**표 3**

인간 세포에 대해 최적화된 서열을 갖는 반-연질 ODN에 의한 무린 TLR9 발현 HEK293 세포의 자극 지수

농도	ODN		
	5890	서열 : 241	서열 : 242
0.9 nM	1.4	0.7	0.9
3.5 nM	2.4	1.1	1.2
14 nM	12.5	1.9	1.1
58 nM	21.4	4.3	2.0
0.23 μM	25.2	12.0	6.2
0.94 μM	28.6	18.3	8.0
3.75 μM	29.3	32.1	10.3

[0434]

[0435]

[0436]

실시에 8 내지 9. 반-연질 올리고뉴클레오티드는 NK 세포 활성화를 유도한다.

반-연질 및 완전히 안정화된 올리고뉴클레오티드를 NK 세포 활성화의 그의 자극능에 대해 비교하였다. 표준 크롬 유리 분석을 사용하며, 반-연질 서열 241 또는 완전히 안정화된 서열 242의 1, 3 또는 10 μg/mL의 최종 농도로 첨가된 각각의 ODN과 함께 또는 없이 10% FBS (30 분 동안 65 °C로의 가열 불활성화), 50 μM 2-메르캅토에탄올, 100 U/mL 페니실린, 스트렙토마이신 100 μg/mL, 및 2 mM L-글루타메이트를 보충한 RPMI 2 mL에서 10 x 10<sup>6</sup> BALB/c 비장 세포를 48 시간 동안 배양하였다. 세포를 세척하고, 이어서 2종의 NK-민감성 표적 세포주인 YAC-1 및 2C11 [Ballas ZK et al. (1993) J Immunol 150: 17-30]와 함께 효과기 세포로서 단기 Cr 유리 분석에서 사용하였다. 효과기 세포를 0.2 mL 중 V-바닥 미세역가 플레이트 내의 10<sup>4</sup> <sup>51</sup>Cr-표지된 표적 세포에 각종 농도로 첨가하고, 5% CO<sub>2</sub>에서 4 시간 동안 37 °C에서 인큐베이션하였다. 연구한 효과기 세포:표적 세포 (E:T) 비율은 6.25:1, 25:1, 50:1, 및 100:1이었다. 플레이트를 이어서 원심분리하고, 상청액의 분취량을 방사능에 대해 계산하였다. 2% 아세트산에서의 세포 용해 후에 유리된 총수 (용해율 (%))에서 세포를 단독으로 배양한 경우에 유리된 <sup>51</sup>Cr cpm에 대한 효과기 세포의 존재하에 유리된 <sup>51</sup>Cr의 비율에 표적 세포를 단독으로 배양한 경우에 유리된 <sup>51</sup>Cr을 뺀 비율을 계산함으로써 특이적 용해율 (%)을 측정하였다. 결과를 하기 표 5에 나타낸다. 요약하면, 반-연질 올리고뉴클레오티드 서열 241 및 완전히 안정화된 서열 242는 시험한 모든 ODN 농도 및 E:T 비율에 걸쳐 필적할만한 수준의 NK 세포 활성화를 실질적으로 유도하였다.

표 5

NK 세포-매개된 특이적 용해

ODN	µg/mL	E:T 비율			
		6.25:1	25:1	50:1	100:1
서열 : 241	1	8	17	17.5	27.5
	3	2.5	5	8	15
	10	4	12.5	20	28
서열 : 242	1	7	8	12.5	22
	3	3.5	4	11	18
	10	5	12.5	23	32.5

[0437]

[0438]

실시에 10. 반-연질 올리고뉴클레오티드는 동일하거나 또는 유사한 서열의 모든 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오티드보다 일반적으로 더 면역자극적이다.

[0439]

모든 시험된 반-연질 변형체는 상응하는 균등한 포스포로티오에이트 분자보다 인간 TLR9 분석에서 더 활성이다 (표 6). 평균 자극 지수를 4개의 농도 (0.1 µM, 0.5 µM, 2 µM, 및 8 µM)의 데이터 지점으로부터 계산하였다. 하기 표에서, U는 2'-데옥시우라실을 나타낸다.

표 6

반-연질 올리고뉴클레오티드의 상대적 평균 자극 지수 대 동일하거나 또는 유사한 서열의 모든 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오티드

서열	상대적 평균 자극 지수
T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*G*C*G*C*G*C*G ( 서열 : 247)	1.00
T*C*G*C*C*G*T*T*T*T*C_G*G*C_G*G*C*C_G*C*C*G ( 서열 : 248)	0.74
T*C*G*C*C*G*T*T*T*T*C_G*G*C_G*G*C*C_G*C*C*G ( 서열 : 249)	0.72

[0440]



T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T*T*G*T*C*G*T*T ( 서열 : 242)	1.00
T*C_G*T*T*T*T_G*T*T*T*T_G*T*T*T*T_G*T*T ( 서열 : 276)	1.95
T*C*G*U*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T*T*U*G*U*C*G*T*T ( 서열 : 277)	1.00
T*C_G*U*C_G*T*T*T*T_G*T*T*T*U_G*U*C_G*T*T ( 서열 : 278)	1.39
T*C*G*T*C*G*U*U*U*G*T*C*G*U*U*U*G*T*C*G*T*T ( 서열 : 279)	1.00
T*C_G*T*C_G*U*U*U*C_G*T*T*C_G*U*U*U_G*T*C_G*T*T ( 서열 : 280)	2.05
A*A*C*G*T*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T ( 서열 : 281)	1.00
A*A*C_G*T*T*T*T*T*C_G*T*T ( 서열 : 282)	1.58

[0442]

[0443]

[0444]

실시예 11. 약한 면역자극 완전 안정화된 올리고뉴클레오타이드의 반-연질 변형체의 개선된 시험관내 효능

서열 (T\*G\*T\*C\*G\*T\*T\*G\*T\*C\*G\*T\*T\*G\*T\*C\*G\*T\*T\*G\*T\*C\*G\*T\*T, 서열 244)은 서열 242에 비해 낮은 면역자극 효능을 갖는 완전히 안정화된, 모든 포스포로티오에이트 CpG 올리고뉴클레오타이드이다. 관련된 반-연질 올리고뉴클레오타이드

[0445]

(T\*G\*T\*C\_G\*T\*T\*G\*T\*C\_G\*T\*T\*G\*T\*C\_G\*T\*T\*G\*T\*C\_G\*T\*T, 서열 : 258) 및 (T\*G\*T\*C\_G\*T\*T\*G\*T\*C\_G\*T\*T\_G\*T\*T\_G\*T\*T\_G\*T\*T\_G\*T\*T\_G\*T\*T, 서열 : 243)

는 서열 244보다 수배 더 효능이

있고, 서열 242보다 더욱더 효능이 있다.

[0446]

T\*G\*T\*C\_G\*T\*T\*G\*T\*C\_G\*T\*T\*G\*T\*C\_G\*T\*T\*G\*T\*C\_G\*T\*T ( 서열 : 258)  
 T\*G\*T\*C\_G\*T\*T\*G\*T\*C\_G\*T\*T\_G\*T\*T\_G\*T\*T\_G\*T\*T\_G\*T\*T ( 서열 : 243)  
 T\*G\*T\*C\*G\*T\*T\*G\*T\*T\*G\*T\*C\*G\*T\*T\*G\*T\*C\*G\*T\*T\*G\*T\*T\*G\*T\*T\*G\*T\*T\*G\*T\*T ( 서열 : 244)

**표 7**

완전히 안정화이지만 약한 면역자극 올리고뉴클레오타이드의 반-연질 변형체에 의한 개선된 면역자극

ODN	ODN 농도 $\mu\text{M}$			
	0.1	0.5	2	8
서열 : 244	16.0	47.5	71.4	68.5
서열 : 243	19.3	40.5	78.2	77.9
서열 : 241	2.6	9.5	12.9	14.0
서열 : 242	10.6	34.2	38.3	40.8

[0447]

[0448]

[0449]

실시예 12. 감소된 길이의 반-연질 올리고뉴클레오타이드는 시험관내에서 면역자극이 있다.

반-연질 16-머 서열 283, 16-머 서열 245, 17-머 서열 284 및 24-머 서열 24을 TLR9 신호전달의 그의 자극능에서 완전히 안정화된 ODN 24-머 서열 242 및 18-머 서열 285와 비교하였다. 각각의 올리고뉴클레오타이드는 1, 6, 12, 또는 24  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도의 인간 TLR9 및 리포터 유전자 작제물로 형질감염된 HEK293 세포에 첨가하고, TLR9 활성화를 상기와 같이 측정하였다.

- (16-머) T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*C\_G\*T\*C\_G\*T (서열: 283)
- (16-머) T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T (서열: 245)
- (17-머) T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T (서열: 284)
- (18-머) A\*A\*C\*G\*T\*C\*G\*T\*T\*T\*T\*C\*G\*T\*C\*G\*T\*T (서열: 285)
- (24-머) T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*T\*G\*T\*C\_G\*T\*T (서열: 241)
- (24-머) T\*C\*G\*T\*C\*G\*T\*T\*T\*G\*T\*C\*G\*T\*T\*G\*T\*C\*G\*T\*T (서열: 242)

[0450]

[0451]

18-머 완전 안정화된 올리고뉴클레오티드 ODN 서열 285는 시험된 모든 농도에서 24-머 완전히 안정화된 올리고뉴클레오티드 서열 242보다 덜 면역자극적이인 반면에, 16-머 및 17-머 반-연질 올리고뉴클레오티드는 6 µg/mL 이상의 농도에서 24-머 서열 242 만큼 적어도 자극적이었다. 또한, 16-머 및 17-머 반-연질 올리고뉴클레오티드는 거의 24-머 반-연질 올리고뉴클레오티드 서열 241 만큼 면역자극적이었다.

**표 8**

짧거나 긴 완전 안정화된 및 반-연질 올리고뉴클레오티드들과 비교한 짧은 반-연질 올리고뉴클레오티드의 면역자극 활성

ODN	ODN 농도 µg/mL			
	1	6	12	24
서열: 283	1.2	17.1	29.0	39.5
서열: 245	1.1	8.4	31.3	48.9
서열: 284	3.4	23.9	35.9	45.6
서열: 285	4.6	12.9	15.9	18.0
서열: 241	6.4	33.0	50.8	58.6
서열: 242	11.0	24.6	26.2	21.9

[0452]

[0453]

실시예 13. 반-연질 올리고뉴클레오티드는 생체내에서 면역자극적이다.

[0454]

BALB/c 마우스를 군으로 나누고, 피하로 400 µg의 반-연질 올리고뉴클레오티드 서열 241, 완전히 안정화된 면역자극 올리고뉴클레오티드 서열 242, 완전히 안정화된 음성 대조군 올리고뉴클레오티드 (TGCTGCTTTTGCTTTTGCTT, 서열 286), 또는 등용적의 포스페이트-완충된 염수 (PBS)를 투여하였다. 동물에서 주사 3 시간 후에 채혈하고, IP-10, IFN-γ, 및 TNF-α의 혈청 수준을 적절한 사이토카인-특이적 ELISA를 사용하여 측정하였다. 혈청 IP-10은 반-연질 서열 241 (8,000 내지 12,000 pg/mL)이 투여된 동물에서 완전히 안정화된 면역자극 올리고뉴클레오티드 서열 242 (3,500-8,000 pg/mL)보다 약 2배 더 높았다. 대조군 서열 286이 투여된 동물에서의 혈청 IP-10은 PBS를 투여한 동물만큼 동일한 낮은 수준의 IP-10을 가졌다. 반-연질 올리고뉴클레오티드 서열 241 및 완전히 안정화된 면역자극 올리고뉴클레오티드 서열 242는 유사한 양의 IFN-γ (약 150 pg/mL)를 유도하였다. 반-연질 올리고뉴클레오티드 서열 241은 완전히 안정화된 면역자극 올리고뉴클레오티드 서열 242 (하나의 실험에서 약 1,550 pg/mL 대 약 1,175 pg/mL 및 또다른 실험에서 약 710 pg/mL 대 490 pg/mL)보다 30 내지 45% 더 TNF-α를 유도하였다.

[0455]

생체내 실험의 또다른 세트에서, 반-연질 및 완전히 안정화된 올리고뉴클레오티드를 BALB/c 마우스에서 종양의 그의 치료능에 대해 조사하였다. 확립된 종양 모델을 사용하여 3 군의 BALB/c 마우스에 자연 기원 (Renca) 세포의 무린 신장 선암종을 i.p. 주사하였다 [Salup RR et al. (1985) J Immunopharmacol 7: 417-36]. 각 군의 마우스에 또한 100 mg의 반-연질 올리고뉴클레오티드 서열 241, 100 mg의 완전히 안정화된 면역자극 올리고뉴클레오티드 서열 242, 또는 등용적의 PBS를 투여하였다. 이어서, 마우스의 생존 및 사망시에 종양 크기를 주사하였다. PBS로 위약 처리를 받은 마우스의 중간 생존일은 44 일이고, 50 일째에 생존율이 20%이었다. 대조적으로, 반-연질 올리고뉴클레오티드 서열 241을 투여한 마우스의 생존율은 50 일째에 80%이고, 완전히 안정화된 면역자극 올리고뉴클레오티드 서열 242를 투여한 마우스의 생존율은 50 일째에 70%이었다.

종양 크기 (cubic millimeters)에 관해, 52 일 후에 PBS를 투여한 마우스는 1200 mm<sup>3</sup>의 종양 용적을 가진 반면에, 반-연질 올리고뉴클레오티드 서열 241 또는 완전히 안정화된 면역자극 올리고뉴클레오티드 서열 242를 투여한 마우스는 약 250 mm<sup>3</sup> 및 180 mm<sup>3</sup>의 종양을 각각 가졌다. 따라서, 반-연질 올리고뉴클레오티드 및 완전히 안정화된 올리고뉴클레오티드는 모두 이 모델 실험에서 종양 존재량의 감소 및 생존의 연장에 고도로 유효하였다.

[0456] 실시예 14. 연질 또는 반-연질 올리고뉴클레오티드 감소된 신독성을 가진다.

[0457] 원숭이에 대한 완전히 안정화된 면역자극 올리고뉴클레오티드의 투여가 사구체신염, 즉, 신장 염증의 발생과 관련될 수 있음을 관찰하였다. 사구체신염을 진단할 수 있고, 적혈구 및 소변 중의 단백질의 존재에 의해 모니터링될 수 있으며, 종종 감소된 사구체 여과 속도 (질소혈증을 사용함), 물 및 염 체류, 고혈압, 및 부종에 의해 달성된다. 일반적으로 소변은 혈액 세포 및 혈장 단백질을 실질적으로 함유하지 않는다. 신장 조직 조직학 조사에 의해 진단할 수도 있다. 신장 조직은 뉴클레아제 부유로 보고, 이는 완전히 안정화된 면역자극 올리고뉴클레오티드보다 연질 올리고뉴클레오티드에 대해 더 활성일 것으로 추측되었다.

[0458] 원숭이를 2개의 군으로 나누고, 한 군에 연질 올리고뉴클레오티드를 투여하고, 다른 군에 완전히 안정화된 면역자극 올리고뉴클레오티드를 투여하였다. 연질 올리고뉴클레오티드 및 완전히 안정화된 면역자극 올리고뉴클레오티드는 서열이 동일하고, 그의 인터뉴클레오티드 연결기만 상이하였다. 원숭이의 두 군 모두에 동일 투여량의 면역자극 올리고뉴클레오티드를 투여하였다. 예비처리 (기준선) 및 정기적-처리 측정은 예를 들면, 단백질뇨 및(또는) 혈뇨의 존재에 대한 계량 요검사, 적혈구 및(또는) 적혈구 소량의 존재에 대한 현미경 소변 분석, 소변 단백질 농도, 혈액 요소 질소 (BUN), 혈청 크레아티닌, 혈액 압력, 체중, 및 신장 생검사 (광 및(또는) 전자 현미경 조직 분석을 사용함)를 포함하는 사구체신염의 존재에 대한 평가에 유용한 하나 이상의 파라미터를 제공한다. 임상적 발견은 원숭이 각각에 투여한 면역자극 올리고뉴클레오티드의 유형과 상호관련되고, 그 결과를 통계상 유의함에 대해 군들 간에 비교하였다.

[0459] 임의로, 상기한 바와 같이 연질 또는 반-연질 올리고뉴클레오티드 또는 완전히 안정화된 면역자극 올리고뉴클레오티드를 투여하지만, 더 높거나 또는 더 낮은 올리고뉴클레오티드 투여량(들)을 사용하는 원숭이의 추가 쌍의 군은 결과를 추가로 올리고뉴클레오티드 투여의 기능으로서 평가하는 것을 포함하였다.

[0460] 연질 올리고뉴클레오티드를 투여한 원숭이는 완전히 안정화된 면역자극 올리고뉴클레오티드를 투여한 원숭이보다 사구체신염의 발병하는 경향이 덜 유의하게 있었다.

[0461] 실시예 15. 연질 올리고뉴클레오티드는 증가된 면역자극 효능을 높은 농도에서 가진다.

[0462] 연질 올리고뉴클레오티드는 TLR9 활성의 그의 유도능에 대해 서열 242와 비교하였다. 연질 ODN 및 대조군 서열 242를 각각 4개의 농도인 1 µg/ml, 6 µg/ml, 12 µg/ml, 및 24 µg/ml에서 비교하였다. 서열 242에 의한 활성화에 대한 각각의 연질 올리고뉴클레오티드에 의한 활성화의 각각의 농도의 비율은 하기 표 9에 나타났다. 이들 결과는 연질 올리고뉴클레오티드가 서열 242보다 시험한 더 높은 농도에서 더 면역자극적이었다.

T*G*T*C_G_T*T*G*T*C_G_T*T*G*T*C_G_T*T	서열: 287
T*C_G_T*T*T*T*T*T*T*C_G_T*T*T*T*T*T*T*C_G_T*T*T	서열: 288
T*C_G*T*C_G*T*T*T*T*T*T*C_G_G*T*C_G_T*T*T*T	서열: 289
T*C_G_T*C_G_T*T*T*T*T*T*C_G_T*G*C_G_T*T*T*T*T	서열: 290
T*C_G_T*C_G_T*T*T*T*T*C_G_T*T*T*T*T*T*T*T*C_G*T*T*T	서열: 291
T*C_G_T*T*T*T*G*T*C_G_T*T*T*T*T*T*T*T*C_G*A	서열: 292
T*C_G_T*C_G_T*T*T*T_T_G_T*C_G_T*T*T*T_G_T_C_G*T*T	서열: 293

[0463]

표 9

서열 242에 대한 각각의 농도에서의 연결  
올리고뉴클레오타이드의 상대적 효능

ID	ODN 농도 µg/mL			
	1	6	12	24
서열 : 287	0.11	0.12	1.00	1.68
서열 : 288	0.30	0.62	1.67	1.81
서열 : 289	0.13	0.52	1.67	1.97
서열 : 290	0.18	0.41	1.69	2.27
서열 : 291	0.16	0.35	1.56	1.81
서열 : 292	0.25	0.48	1.38	1.84
서열 : 293	0.10	0.11	1.20	2.05

[0464]

[0465]

실시에 16. 혈청 및 조직 중의 올리고뉴클레오타이드 안정성.

[0466]

마우스에 25 mg/kg의 반-연결 올리고뉴클레오타이드 서열 241, 연결 올리고뉴클레오타이드 (T\*C\*G\*T\*C\*G\*T\*T\*T\*\_G\_T\_C\_G\_T\*T\*T\*G\*T\*C\*G\*T\*T 서열 29) 또는 완전히 안정화된 올리고뉴클레오타이드 서열 242으로 피하 주사하였다. 조직 및 혈청 샘플을 선택된 시간 수 후에 얻고, 무손상 올리고뉴클레오타이드 및 그 단편에 대해 분석하였다.

[0467]

조직 또는 혈청 샘플을 공지된 양의 내부 표준 ODN (1.25 µg 폴리T)으로 희석하고, ODN을 하기 고상 추출 (SPE) 방법에 의해 조직 및 혈장 샘플로부터 분리하였다. 분석물, 대사산물, 및 내부 표준을 함유한 생성된 용액을 또한 하기에 기재한 모세관 겔 전기영동 (CGE) 및 MALDI-TOF 방법으로 분석하였다. CGE로 분석한 신장, 간, 비장, 및 혈청 샘플로부터의 회수한 ODN (즉, 분석물 및 대사산물)의 총량을 정하였다. 표준 편차를 계산하였다. 총 피크 면적의 상대적 양 (%)을 각각의 대사산물에 대입하였다.

[0468]

SPE. 혈청으로부터의 ODN의 분리를 위해, 100 µg의 샘플을 내부 표준 ODN 1.25 µg으로 희석하고, 혼합하고, SAX-완충액 5 ml로 용해하였다. 이 용액을 음이온 교환 칼럼 (SAX, 아길런트 (Agilent))에 가하고, 칼럼을 세척하고, ODN을 증가된 이온 강도의 완충액으로 용리하였다. 역상 (RP) 칼럼 (글렌 리서치 (Glen Research)) 또는 유사한 칼럼 (HLB, 물)을 사용하여 생성된 용리액을 탈염하였다. 단지 물 및 아세트오니트릴을 함유한 RP 칼럼으로부터의 용리액을 건조시키고, 탈이온수 60 µl 중의 동일한 튜브 내에서 가용화시켰다. 샘플을 추가 탈염 하기 위해, 막 투석을 수행하였다. 샘플을 모세관 겔 전기영동으로 직접 분석하였다. MALDI-TOF MS의 경우에, 희석하지 않거나 또는 농축한 샘플을 사용하는데, 즉 ODN 샘플 50 µl를 진공에서 건조시키고, 탈이온수에 용해 하고, 하기와 같이 분석하였다.

[0469]

조직으로부터 ODN을 유사한 SPE 프로토콜에 따라 분리하였다. FastPrep 장치를 사용하여 조직 100 mg을 균질 화하였다. 프로테아제 K를 첨가하고, 단백질을 2 시간 동안 가수분해하였다. 상기 SPE 방법에서의 수용성 분획을 진행하기 전에 페놀 추출을 수행하였다.

[0470]

CGE. 분석물, 그의 대사산물, 및 정량의 내부 표준 ODN을 함유한 탈염된 샘플을 겔-충진 모세관 (중성, 30 cm, eCAP DNA 모세관, 베크만 (Beckman) # 477477) 내로 샘플 측면에서 주사 전에 물과 함께 동전기적으로 주사하였다. 300 V/cm의 전압을 가하는 동시에 260 nm에서 탐지를 모니터하였다. 분리를 25 °C에서 트리스/붕산/EDTA 완충액 (7M 우레아를 함유함)에서 수행하였다. 유사하게 제조하고, 동시에 분석하는 표준의 것과 비교하여그의 상대적 이동 시간 ( $MT_{\text{올리고}}/MT_{\text{내부표준}} (IntStd.)$ )에 의해 분석물을 확인하였다. 3 x 시그널:노이즈 (S:N) 비율 초과인 임의의 전기영동 피크의 상대적 이동 시간 및 상대적 면적이 기록되었다. 3 x과 10 x 시그널:노이즈 사이의 피크 높이가 정량되지 않을 정도로 기록되었다.

[0471]

올리고 (%) = (피크 면적/총 피크 면적 > 3 x S:N) x 100%

[0472] MALDI-TOF. 지연된 추출 공급원, 337 nm 파장에서 질소 레이저, 및 1.2 미터 비행 튜브를 사용하는 어플라이드 바이오시스템즈 (Applied Biosystems) MALDI-TOF 질량 분석기 상에서 분석물 및 그의 대사산물을 포함한 탈염된 샘플을 분석하였다. 기기 셋팅은 하기와 같았다: 전압 25 kV; 그리드 전압 95.4%; 유도선 0.1%; 지연 시간 1200 nsec. 디암모늄 시트레이트를 함유한 매트릭스 3-히드록시피콜린산을 사용하였다. 공지된 분자량의 표준 ODN의 세트를 사용하여 동일한 조건하에 동일한 플레이트 상에서 외부적으로 ODN 샘플의 스펙트럼을 보정하였다.

[0473] 48 시간에서 얻은 결과를 하기 도 20에 나타낸다. 도 20은 모든 포스포로티오에이트 서열 242에 비해 신장 반-연질 서열 241 및 연질 ODN 서열 294에서 (각각, 93% 및 87%까지) 극적으로 감소됨을 나타낸다.

[0474] 실시예 17. C 올리고뉴클레오티드는 시험관내에서 면역자극적이다.

[0475] 반-연질 C-클래스 올리고뉴클레오티드를 5' 비-회문구조 부분 (ODN 서열 255), 3' 회문구조 부분 (ODN 서열 251) 내, 및 5' 비-회문구조 부분 및 3' 회문구조 부분 (ODN 서열 295) 모두 내의 포스포디에스테르 연결기로 제조하였다. 또한, 3' 회문구조 부분 (하기에 밑줄로 나타냄)을 구성하는 뉴클레오티드에서 2'-O-Me 리보스 당 외에 연결기 유사 ODN 서열 295로 ODN 서열 252를 제조하였다. 이들 올리고뉴클레오티드를 이어서 상기 TLR9 분석을 사용하여 평가하였다.



[0476]

[0477] 완전히 안정화된 백분을 갖는 C-클래스 올리고뉴클레오티드는 일반적으로 상대적으로 낮은 TLR9 활성을 나타냈다. 하기 표 10에 나타난 바와 같이, 단지 5' 비-회문구조 부분 중의 반-연질 서열의 삽입 (ODN 서열 255)은 단지 3' 회문구조 부분 중의 반-연질 서열의 삽입 (ODN 서열 251)에 비해 TLR9 활성을 유의하게 증강시켰다. 5' 비-회문구조 부분 및 3' 회문구조 부분 모두 중의 반-연질 서열의 삽입 (ODN 서열 295)은 단지 3' 회문구조 부분 중의 반-연질 서열의 삽입 (ODN 서열 251)에 비해 TLR9 활성을 증강시켰다.

**표 10**

반-연질 C-클래스 올리고뉴클레오티드에 의한 TLR9 자극

ODN	ODN 농도 µg/mL			
	0.1	0.5	2.0	8.0
서열 : 255	2.3	16.9	36.4	35.7
서열 : 251	1.2	2.5	8.4	16.8
서열 : D 295	2.0	11.6	29.8	37.3
서열 : 252	1.1	3.9	22.1	47.0

[0478]

[0479] 반-연질 C-클래스 올리고뉴클레오티드는 인간 PBMC에 의한 IFN-α의 그의 유도능을 보유할 뿐만 아니라, 낮은 농도에서 유의하게 더 효능이 있다. 증강된 효능은 5' 비-회문구조 부분 (ODN 서열 255 및 ODN 서열 295) 중의 반-연질 서열을 포함하는 이들 C-클래스 올리고뉴클레오티드에서 가장 두드러졌다. ODN 서열 255, 서열 251, 및 서열 295를 ELISA로 평가하고, 서열 242와 비교하며, 여기서 이들은 이들 3개의 반-연질 올리고뉴클레오티드 및 IFN-α의 유능한 C-클래스 올리고뉴클레오티드 유도자의 완전히 안정화된 형태이다. 결과를 하기 표 11에 나타낸다.

표 11

C-클래스 올리고뉴클레오타이드의 반-연질 변형체에 의한 IFN-α 유도 (pg/mL)

ODN	ODN 농도 μM				
	0.1	0.2	0.5	1.0	2.0
서열 : 255	3202	7429	937	64	3
서열 : 251		688	3033	3083	
서열 : 295	2560	3363	3246	930	41
	50	504	3247	2114	1789

[0480]

[0481]

실시에 18: 서열 313의 물리화학 특징

[0482]

방법: 서열 313의 분말 X선 회절분석 패턴은 비결정상의 특징인 할로를 나타냈다. 수증기 흡착 분석은 서열 313이 고도로 흡수성인 것으로 나타났다. 습기 교환하는 약물의 경향은 환경의 습도에 따라 각종 양의 습기를 유발할 수 있다. 화합물은 높은 수용성 (> 100 mg/mL)을 나타내고, 따라서 사용가능 pH 범위 전체에 걸쳐 충분한 가용성을 가진다. 승온에서의 약물의 수용액의 분석은 중간 산성 내지 산성 환경에서 빠르게 분해되지만, pH 6 초과로 완충된 용액이 충분한 용액 안정성을 가짐을 나타낸다.

[0483]

결과:

[0484]

서열 313은 자연에서 비결정성이고, 고도로 흡수성인 것으로 밝혀졌다. 화합물은 높은 수용성 (> 100 mg/mL)을 나타내고, 따라서 사용가능 pH 범위 전체에 걸쳐 충분한 가용성을 가진다. ODN은 중간 산성 내지 산성 환경에서 빠르게 분해되었다. pH 6 초과로 완충된 용액은 충분한 용액 안정성을 가지는 것으로 나타났다.

[0485]

실시에 19: 시험관내 TLR9-형질감염 세포의 자극

[0486]

방법:

[0487]

인간 TLR9로 형질감염된 HEK 293 세포를 서열 313 또는 서열 329와 16 시간 동안 인큐베이션하였다. 신호를 루시퍼라제 판독에 의해 측정하였다.

[0488]

결과

[0489]

서열 329에 비해, 서열 313은 표적 수용체 TLR9의 더 유능한 자극인자이었다.

[0490]

실시에 20: 인간 면역 세포의 시험관내 자극

[0491]

방법:

[0492]

6명의 기증자로부터의 인간 말초 혈액 단핵 세포를 서열 313 또는 서열 329와 24 또는 48 시간 동안 인큐베이션하였다. 사이토카인의 분비를 측정하였다.

[0493]

결과

[0494]

결과를 도 23에 나타낸다. 서열 329에 비해, 서열 313은 TLR9-회합된 사이토카인 IL-6, IL-10, IFNα 및 IP-10의 유도자로서 증가되거나 또는 적어도 유사한 효과 및(또는) 효능을 나타냈다.

[0495]

실시에 21: 무린 비장세포의 시험관내 자극

[0496]

방법:

[0497]

무린 (BALB/c) 비장세포를 서열 313 또는 서열 329와 48 시간 동안 인큐베이션하였다. 사이토카인 및 IP-10의 분비를 측정하였다.

[0498]

결과

[0499]

서열 329에 비해, 서열 313은 사이토카인 IL-6, IL-10, IL-12p40, IFNα, TNFα 및 IP-10의 유도자로서 증가되거나 또는 적어도 유사한 효과 및(또는) 효능을 나타냈다. 데이타를 도 24에 나타낸다. 이 데이타는 무린 면역 세포 상의 서열 313의 활성이 인간 세포 (상부) 상의 것과 유사하고, TLR9를 통한 활성화와 유사하게 일치한

다는 것을 나타낸다.

[0500]

실시예 22: 마우스 생체내의 사이토카인 유전자 유도

[0501]

방법:

[0502]

이 연구를 서열 313을 기도 내로 투여한 후에 마우스 폐 중의 사이토카인의 발현을 평가하였다. 신장 노출을 조사하기 위해, 이 기관에서의 동일한 사이토카인 (실시예 10 및 21에 기재한 바와 같음)의 유도를 또한 평가하였다. 마우스 (수컷, BALB/c)에게 서열 313 또는 서열 329 (각각, 1 mg/kg)를 비내 점적 또는 볼루스 정맥내 주사에 의해 투여하였다. 폐 및 신장을 투여 8 또는 15 시간 후에 제거하였다. RNA를 추출하고, cDNA로 역전사하였다. cDNA의 표적 단편을 증폭하고, 실시간 PCR (SYBR 그린 (Green) 탐지 방법을 사용하는 로체 라이트시클러 (Roche LightCycler))로 탐지하였다. GAPDH, IFN 감마, IL-6, IP-10, 및 TNF-알파에 대한 프라이머를 로체로부터의 LC PROBE DESIGN 소프트웨어 (버전 1.0 로체 카탈로그 제3 139 174호)을 사용하여 디자인하였다. IFN알파에 대한 프라이머를 프라이머 (PRIMER) 3 소프트웨어를 사용하여 디자인하였다. 생산 수율을 대조군 유전자 (GAPDH) 발현의 비율로서 표준화하였다.

[0503]

결과

[0504]

기도로 투여하는 경우에, 서열 313은 폐에서 TLR9-관련 유전자 (IL-6, TNF  $\alpha$ , IFN  $\alpha$ , IFN  $\gamma$  및 IP-10)의 발현을 유도하였다. 결과를 도 25에 나타낸다. 그러나, IP-10을 제외하고는, 이들 유전자는 이 경로로 투여된 마우스의 신장에서 발현되지 않았다. IP-10이 전형적으로 인터페론에 의해 유도되기 때문에, 이 케모킨의 발현은 폐로부터 전신 순환 내로 분비된 인터페론의 결과로서 간접적으로 일어날 수 있었다. 서열 313이 정맥내로 투여되는 경우에, IFN  $\gamma$ 를 제외한 각각의 이들 유전자는 신장에서 유도되었다. 따라서, 기도 내로의 투여 후에 서열 313의 신장 영향의 결핍은 마찬가지로 낮은 전신 노출 때문이다.

[0505]

CpG ODN은 다수의 메카니즘을 통한 신장 효과를 유발할 수 있다. TLR9-의존 메카니즘에 의해 발생하는 급성 신장 육아종 염증은 일부 CpG ODN에 대한 전신 노출 후에 관찰되었다. 본 발명자들의 결과는 기도에 투여된 서열 313에 대한 전신 노출이 신장에서 TLR9-회합된 유전자를 직접적으로 유도하기에 충분하지 않다는 것을 제시한다.

[0506]

실시예 23: 마우스 생체내에서 항원-유도된 림프절 발생의 영향

[0507]

방법:

[0508]

이 연구는 마우스의 배출 림프절에서 Th2-유형 반응으로부터 면역 왜곡을 유도하는 서열 313의 능력을 조사하였다. 완전 프로인트 아주반트 중의 항원 (난 알부민, 100  $\mu$ g)으로 오른쪽 뒷 발바닥 내로 주사하여 마우스 (수컷, BALB/c)를 민감화시켰다. 마우스에 서열 313 또는 서열 329 (1.5 mg/kg) 또는 비히클 (염수)로 동일한 발바닥 내로 동시에 주사하였다. 발바닥 주사 6 일 후에, 배출 오금 림프절을 제거하였다. T 세포 (CD3<sup>+</sup>) 및 B 세포 (B220<sup>+</sup>)를 유세포측정기로 계측하였다. 생체의 항원 회상 분석을 하기와 같이 수행하였다. (배출 오금 림프절로부터의)  $1 \times 10^6$  세포를 220  $\mu$ l의 배지 RPMI 1640 + 10% 소 태아 혈청 (난 알부민 (100  $\mu$ g/ml) 또는 회석제를 함유함)에서 인큐베이션하였다. 36 시간 후에 배양 배지를 제거하고, IL-1베타, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, GM-CSF, IFN 감마, 및 TNF 알파의 농도를 미국 63304 세인트 칼레스 리서치 파크 드라이브 14 소재의 LINCO 리서치, 인크. (LINCO research, Inc.)로부터의 키트를 사용하여 조사하고, 루미넥스 멀티플렉스 시스템 (Luminex multiplex system) (미국 78727-6115 텍사스 오우스틴 테크놀로지 불러버드 12212 소재의 루미넥스 코퍼레이션 (Luminex Corporation)) 상에서 분석하였다.

[0509]

결과

[0510]

오금 림프절 중의 세포수

[0511]

민감화는 배출 오금 림프절 중의 T 세포 및 B 세포의 축적을 유발하였다. 이들 항원-유도된 축적은 또한 CpG ODN을 투여한 마우스에서 유의하게 추가로 증가되지 않았다. 그러나, 민감화되지 않은 마우스에 단독으로 주사한 각각의 CpG ODN은 T 세포 및 B 세포 축적 모두를 유발하였다. 데이터를 도 26에 나타냈다.

[0512]

항원 회상 분석

[0513]

항원으로 생체의 체자극되는 경우에 배출 림프절 세포를 항원-민감화 마우스 분비된 IL-4, IL-5, IL-10 및 IFN  $\gamma$ 로부터 획득하였다. 또한 CpG ODN을 투여한, 민감화된 마우스에서 Th2-유형 사이토카인 IL-4, IL-5 및 IL-10

의 분비는 감소된 반면, Th1-유형 사이토카인 IFN $\gamma$ 의 분비는 증가되었다. 도 27에 나타난 본 발명자들의 데이터는 서열 329와 같이 서열 313이 항원 민감화에 대한 Th2 반응을 저해한다는 가설을 지지한다. 결과는 평균  $\pm$  s.e.m. (n = 9 내지 10)이다. 민감화되고, 비히클-처리된 군 (크루스칼-왈리스 (Kruskal-Wallis) 다중 비교 시험)과의 비교는 \* P < 0.05이었다.

[0514] 실시예 24: 마우스 생체내에서 항원-유도된 IgE 생성의 효과

[0515] 방법:

[0516] 마우스 (수컷 BALB/c)를 연구 0 및 7 일째에 항원 (난 알부민, 100  $\mu$ g, i.p.)으로 수산화알루미늄 아주반트와 함께 민감화하였다. 마우스에 서열 313 (0.15 또는 1.5 mg/kg, i.p.) 또는 서열 17 (1.5 mg/kg, i.p.)을 각각의 민감화 2 일 전 및 각각의 민감화 개시일에 투여하였다. 혈청을 18 일째에 수집하였다. 항원 (난 알부민)-특이적 IgE 및 IgG2a의 역할을 ELISA로 조사하였다. 프로토콜의 요약은 하기 표 12에 나타낸다.

표 12

연구 프로토콜의 요약						
	민감화		민감화			
	ODN	ODN	ODN	ODN		
일	-2	0	5	7		18
						↓
						중점

[0517]

[0518] 결과

[0519] 서열 313 또는 서열 329로 처리한 마우스에서, 항원-특이적 IgE의 생성이 완전히 저지되었다. 대조적으로, IgG2a의 생성은 증가되었다. IgE 및 IgG2a 생성은 각각 Th2-유형 및 Th1-유형 반응의 특징이기 때문에, 이 결과는 서열 313이 항원 민감화에 대한 Th2-유형 반응을 저해할 수 있는 추가 증거이다. 달리, CpG ODN은 T-베타 발현 및 B 세포에서 IgE로부터의 클래스 스위칭을 직접적으로 유도할 수 있다. 데이터를 도 28에 나타낸다. 결과는 평균  $\pm$  s.e.m. (n = 10 내지 12, 서열 329 군에 대해 5는 제외함)이다. 민감화되고, 비히클-처리된 군 (크루스칼-왈리스 다중 비교 시험)과의 비교는 \* P < 0.05이었다.

[0520] 실시예 25: 마우스 생체내에서 항원-유도된 기도 염증에 대한 효과

[0521] 방법:

[0522] 마우스 (수컷 BALB/c)를 연구 0 및 7 일째에 항원 (난 알부민, 100  $\mu$ g, i.p.)으로 수산화알루미늄 아주반트와 함께 민감화하였다. 마우스에게 흡입된 난 알부민 에어로졸에 연속되는 2 주 동안 각 주에 2 회 노출시킴으로써 항원 접종하였다. 제1 접종은 연구 21 일째이었다. 서열 313 (0.1 내지 1000  $\mu$ g/kg), 서열 329 (1 내지 1000  $\mu$ g/kg) 또는 비히클 (염수, 20  $\mu$ l)을 기도 내로 각 주의 제1 항원 접종 2 전에 1 회 비내 점적함으로써 투여하였다. 중점을 최종 항원 접종 48 시간 후에 평가하였다. 기도 중의 세포를 기관지 폐포 세척으로 회수하고, 상이한 세포 수를 계수하였다. 폐 조직 중의 호산구 수 (호산구 용적 밀도) 및 점액 분비 (PAS 염색)를 조직병리학적 평가로 측정하였다. 프로토콜을 표 13에서 요약하였다.

표 13

연구 프로토콜의 요약									
	민감화			민감화			민감화		
	↓	↓		↓	↓		↓	↓	
			ODN			ODN			
			↓			↓			
일:	0	7	19	21	24	26	28	31	33
									↓
									종점

[0523]

[0524]

결과

[0525]

항원 접종은 기도 관내강 중의 백혈구, 주로 호산구의 총수의 증가를 유발하였다. 데이터를 도 29에 나타낸다. 호산구증가증을 서열 313 또는 서열 329로 투여-관련 방식으로 유의하게 저해하였다. 호산구증가증에 대한 EDSO 값은 서열 313: 23  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; 서열 329: 47  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이었다. 접종은 또한 서열 313에 의해 유의하게 저해된  $\text{CD4}^+$  T 세포 ( $\text{CD3}^+\text{CD4}^+$  세포)의 축적을 유발하였다. 서열 313은 또한 폐 조직 및 상피 점액 분비에서 항원-유도된 호산구 축적을 유의하게 저해하였다. 도 29의 결과는 평균  $\pm$  s.e.m. ( $n = 15$ )이다. 항원 접종되고, 비히클-처리된 군 (크루스칼-왈리스 다중 비교 시험)과의 비교는 \*  $P < 0.05$ 이었다. 도 30의 결과는 평균  $\pm$  s.e.m. ( $n = 6$ )이다. 항원 접종되고, 비히클-처리된 군 (ANOVA, 두넷 (Dunnett) 다중 비교 시험)과의 비교는 \*  $P < 0.05$ 이었다.

[0526]

실시예 26: 마우스 생체내에서 항원-유도된 기도 과다반응에 대한 효과

[0527]

방법:

[0528]

마우스 (수컷 BALB/c)를 연구 0 및 7 일째에 항원 (난 알부민, 100  $\mu\text{g}$ , i.p.)으로 수산화알루미늄 아주반트와 함께 민감화하였다. 마우스에게 흡입된 난 알부민 에어로졸에 연속되는 2 주 동안 각 주에 2 회 노출시킴으로써 항원 접종하였다. 제1 접종은 연구 19 일째이었다. 서열 313 (10 내지 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) 또는 비히클 (염수, 20  $\mu\text{l}$ )을 각 주의 제1 항원 접종 2 전에 1 회 비강내 투여함으로써 투여하였다. 정맥내 메타콜린에 대한 기관지 수축 (기도 저항의 증가)을 측정함으로써 최종 항원 접종 24 시간 후에 기도 과다반응을 평가하였다. 각각의 동물에 대해, 메타콜린에 대한 투여량-반응 곡선을 얻고, 기도 반응성을 곡선 하부 면적으로서 정량하였다. 프로토콜을 하기 표 14에 나타낸다.

표 14



[0529]

[0530] 결과

[0531]

항원 접종은 기도 과다반응을 유발하였다. 서열 313은 투여-관련 방식으로 항원-유도된 기도 과다반응의 발생의 저해하였다. 데이터를 서열 313 (1000 µg/kg)의 효과를 나타내는 메타콜린에 대한 샘플 투여량-반응 곡선으로 도 31 및 32에 나타낸다. 메타콜린에 대한 투여량-반응 곡선을 곡선 하부 면적으로서 정량하였다. 결과는 평균 ± s.e.m. (n = 6 내지 8)이다. 항원 접종되고, 비히클-처리된 군 (크루스칼-왈리스 다중 비교 시험)과의 비교는 \* P < 0.05이었다.

[0532]

항원 접종되고 비히클-처리된 마우스 및 항원 접종되고 서열 313으로 처리된 개별 마우스 각각 사이의 완전 투여량-반응 (RL) 곡선의 분석을 반복된 측정 MANOVA를 사용하여 수행하였다. 100 및 1000 µg/kg 서열 313 처리군의 투여량-반응 곡선 간의 유의한 차이 (P < 0.05)가 있는 반면에, 항원 접종되고 비히클-처리된 마우스 및 유사하게 처리하고 서열 313 10 µg/kg을 투여한 동물 간의 유의한 차이는 없었다.

[0533] 실시예 27: 래트에서의 생체내 약동학 (PK) 연구

[0534]

서열 313인 '반-연질' ODN이 혈장 및 조직, 특히 신장으로부터 염기 서열이 서열 313과 동일한 서열 329인 완전 포스포티오에이트 ODN보다 더 빠른 속도로 제거되는지를 결정하기 위해 래트에서 PK 연구를 수행하였다.

[0535] 방법

[0536]

56 마리의 래트에 서열 313 및 서열 329 5 mg/kg (IV 및 IT 모두의 경우에)을 정맥내 (IV) 및 관내 (IT) 경로로 투여하였다. 원형질, 폐, 신장을 수집하였다. 연구를 투여 1 군당 14 시간 지점을 갖는 5 일 동안 지속하였다. IV 군 (총 = 42 마리의 래트)의 경우 3 래트/시간 지점을 사용하고, IT 군의 경우 4 마리의 래트/시간 지점을 사용하였다.

[0537] 결과

[0538]

도 33은 5 mg/kg의 IV 및 IT 투여 후에 래트 혈장 중의 ODN 농도를 나타낸다. 혈장 데이터는 서열 313이 IV 및 IT 투여 모두 후에 서열 329에 비해 혈장으로부터 더 신속하게 제거된다는 것을 나타낸다.

[0539]

도 34는 5 mg/kg의 IV 및 IT 투여 후에 래트 폐 중의 ODN 농도를 나타낸다. 동일 투여량 수준에서의 IV 투여 후에, 서열 313의 폐 농도는 서열 329 농도보다 낮았다. IT 투여 후에 차이가 덜 현저하다. 서열 329에 대한 폐 데이터는 투여 후 48 시간까지 동안만 입수가 가능하다.

[0540]

도 35는 5 mg/kg의 IV 및 IT 투여 후에 래트 신장 중의 ODN 농도를 나타낸다. 신장 데이터는 신장에서의 서열 313의 절대 수준이 IV 및 IT 모두 투여 후에 상응하는 서열 329 농도보다 낮다는 것을 나타낸다. IT 투여 후에 서열 313에 대한 신장 노출은 특히 동일 투여량 수준에서의 서열 329에 대한 노출에 비해 현저하게 감소되었다. 이는 도 36 및 37에서 더 명확하게 볼 수 있다.

[0541]

도 36은 5 mg/kg의 IV 투여 후에 래트 신장 중의 ODN 농도를 나타낸다. 도 37은 5 mg/kg의 IT 투여 후에 래트 신장 중의 ODN 농도를 나타낸다. IT 투여 후에 서열 313 및 서열 329 모두는 투여 1 시간 후까지 신장에서 정

량의 더 낮은 한도의 미만이었다 (0.4 내지 0.6  $\mu\text{g/g}$ ). 1 시간 후에, 서열 329는 연구 기간 (48 시간) 동안 수집한 모든 신장 샘플에서 탐지될 수 있었다. 다른 한편으로는, 서열 313은 투여 7 시간 후까지 동안만 측정가능한 수준으로 존재하였다.

**표 15**

랫트에 5 mg/kg의 투여량 수준으로 IV 및 IT 투여한 후의 서열 313 및 서열 329에 대한 평균 PK 파라미터의 요약

투여군	조직	ODN	Cmax (ug/ml)	Tmax (시간)	T <sub>1/2</sub> (시간)	AUC <sub>0-∞F</sub> (시간.ug/ml)	AUC <sub>0-48h*</sub> (시간.ug/ml)
IV (5 mg/kg)	혈장	10	na	na	0.20	9.5	9.3
		17	na	na	0.62	62.8	62.2
	간	10	1.4	0.25	0.17	0.47	0.35
		17	14.4	0.083	2.5	23.7	20.8
	신장	10	6.6	0.083	24.9	184	123
		17	11.4	0.083	nc	nc	346
IT (5 mg/kg)	혈장	10	1.9	0.75	1.20	2.68	2.35
		17	2.1	2	2.3	9.01	7.46
	간	10	632	0.25	28.1	5540	5350
		17	692	1	(31)**	(7908)**	6505
	신장	10	0.49	2	7.8	5.81	2.34
		17	3.8	7	nc	nc	134

[0542]

[0543] na-적용 불가

[0544] nc-계산 불가. 연구 기간 동안 도달되지 않는 말단 단계 또는 말단 제거 단계에서의 불충분한 데이터 지점 때문에 정확한 측정이 불가능함.

[0545] \*- 48 시간 전 최종 측정가능한 농도에서의 AUC<sub>0</sub> 내지 48 시간 또는 AUC<sub>0-최종</sub>

[0546] \*\*-매우 대략적인 예측 (말단 단계에서만 2 데이터 지점에 기초함).

[0547] 10-서열 313

[0548] 17-서열 329

**표 16a**

랫트에 5 mg/kg의 투여량 수준으로 IV 및 IT 투여한 후의 서열 313 및 서열 329에 대한 전신 및 조직 노출

혈장 데이터

ODN	투여 경로	AUC <sub>0-48시간</sub> (시간.ug/ml)	서열 : 313 : 서열 : 329 비율
서열 : 313	IT	2.35	0.32 (IT) 0.15 (IV)
	IV	9.30	
서열 : 329	IT : IV 비율	0.25	
	IT	7.46	
	IV	62.2	
	IT : IV 비율	0.12	

[0549]

표 16b

폐 데이터			
ODN	투여 경로	AUC <sub>0-48시간</sub> (시간· $\mu\text{g/ml}$ )	서열 : 313 : 서열 : 329 비율
서열 : 313	IT	5350	0.82 (IT) 0.017 (IV)
	IV	0.35	
IT:IV 비율		15286	
서열 : 329	IT	6505	
	IV	21	
IT:IV 비율		313	

[0550]

표 16c

신장 데이터			
ODN	투여 경로	AUC <sub>0-48시간</sub> (시간· $\mu\text{g/ml}$ )	서열 : 313 : 서열 : 329 비율
서열 : 313	IT	2.34	0.017 (IT) 0.36 (IV)
	IV	123	
IT:IV 비율		0.019	
서열 : 329	IT	134	
	IV	346	
IT:IV 비율		0.39	

[0551]

[0552]

서열 313의 전신 및 신장 노출은 정맥내 (IV) 또는 관내 (IT) 경로에 의한 2개의 ODN 투여 후에 서열 329에 대한 노출보다 현저하게 더 낮은 것으로 밝혀졌다.

[0553]

5 mg/kg에서의 IT 투여 후에 서열 313에 대한 혈장 AUC는 2.7 시간· $\mu\text{g/ml}$ 이었다. 서열 329에 대한 상응하는 값은 9.0 시간· $\mu\text{g/ml}$ 이었다. 따라서, 서열 313에 대한 전신 노출은 서열 329으로 나타난 것보다 3 배였다.

[0554]

5 mg/kg에서의 IT 투여 후에 서열 313에 대한 신장 AUC는 2.35 시간· $\mu\text{g/ml}$ 이었다. 서열 329에 대한 상응하는 값은 134 시간· $\mu\text{g/ml}$ 이었다. 따라서, 동일 투여량 수준에 대해, 서열 313에 대한 신장 노출은 서열 329으로 나타난 것의 단지 약 2%이었다.

[0555]

혈장 및 신장의 경우와는 달리, IT 투여 후에 서열 313에 대한 폐 노출은 서열 329에 대한 노출과 비교할 경우에 상기의 큰 정도로 감소되지는 않았다. 서열 313에 대한 폐 AUC는 동일 투여량 수준에서 서열 329에 대한 폐 AUC의 대략 70 내지 80%이었다. 폐가 표적 조직이기 때문에, 폐로부터의 ODN의 제거가 혈장 및 신장으로부터의 동일한 정도로 증가되지 않는 이점이 있다.

[0556]

도 38은 5 mg/kg에서 서열 313의 IV 투여 후에 래트 신장 중의 서열 313 및 그의 8-머 대사산물(들)의 농도를 나타낸다.

[0557]

도 39는 5 mg/kg에서 서열 313의 IT 투여 후에 래트 신장 중의 서열 313 및 그의 8-머 대사산물(들)의 농도를 나타낸다. 방법적인 문제점 때문에 혈장 및 조직 중의 서열 313의 8-머 대사산물에 대한 데이터는 불완전하였다. 그러나, 8-머 데이터는 일부 IV 및 모든 IT 신장 샘플에 대해 입수가가능하였다. 이 데이터는 8-머 농도가 성공적으로 측정된 대부분의 이들 신장 샘플에서 대사산물의 수준이 수준의 서열 313의 초과한다는 것을 나타내며, 이는 엔도뉴클레아제 활성이 서열 313에 대한 대사작용의 중요한 경로임을 나타낸다.

[0558]

완전 포스포티오에이트 백본 (서열 329) 내로의 다수의 포스포디에스테르 연결기 (서열 313)의 도입은 ODN의 분해 속도를 증가시켜, 특히 신장으로부터 더 빠른 제거를 일으킨다는 것을 나타낸다.

[0559]

실시예 28: 완전한 포스포티오에이트 ODN과 비교하여 반-연결 ODN을 사용하는 TLR9의 활성화

[0560]

방법

[0561]

인간 TLR9를 발현하는 안정하게 형질감염된 HEK293 세포는 선행 문헌 [Bauer et al.; PNAS ; 2001]에 기재되어 있다. 간단하게는, 인간 TLR9 및 6xNF $\kappa$ B-루시퍼라제 리포터 플라스미드를 발현하는 벡터로 전기천공하여 HEK293 세포를 형질감염시켰다. 안정한 형질감염물 (3 x 10<sup>4</sup> 세포/웰)을 ODN과 함께 16 시간 동안 37 °C의 항습화된 인큐베이터 내에서 인큐베이션하였다. 각각의 데이터 지점을 3회 수행하였다. 세포를 용해하고, 루시퍼라제 유전자 활성 (독일 우에베를린겐 소재의 퍼킨-엘머 (Perkin-Elmer)제의 브라이틀리테 (Brightlite) 키트를 사용함)에 대해 분석하였다. 자극 지수를 ODN의 추가 없이 배지의 리포터 유전자 활성을 참조하여 계산하

였다.

[0562] 결과

[0563] TLR9는 용이하게 최적 면역자극 CpG 서열을 함유한 ODN에 의해 활성화되었다. 본 발명자들은 인간 TLR9를 안정하게 발현하는 세포주 반-연질 ODN의 패널, 및 반-연질 ODN과 동일한 ODN 서열을 갖는 완전한 포스포로티오에이트 ODN의 패널과 인큐베이션하였다. 결과를 도 40에 나타낸다.

[0564] 결과는 하기 표에 나타낸 각각의 반-연질 ODN인 서열 376, 378, 380, 382, 384, 241이 완전 포스포로티오에이트 백본인 서열 377, 379, 381, 383, 385, 및 242를 각각 갖는 동일한 서열 ODN보다 TLR9를 더 높은 수준으로 활성화시킨다는 것을 입증한다.

서열 <b>376</b>	T*G*T*C G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T
서열 <b>377</b>	T*G*T*C*G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T
서열 <b>378</b>	U*G*T*C G*T*T*U*U*U*U*U*U*U*U*U*U*U*U
서열 <b>379</b>	U*G*T*C*G*T*T*U*U*U*U*U*U*U*U*U*U*U*U
서열 <b>380</b>	D*G*T*C G*T*T*D*D*D*D*D*D*D*D*D*D*D*T
서열 <b>381</b>	D*G*T*C*G*T*T*D*D*D*D*D*D*D*D*D*D*D*T
서열 <b>382</b>	U*G*T*C G*T*T*U*U*U*U G G G A G G*G*G
서열 <b>383</b>	U*G*T*C*G*T*T*U*U*U*U*G*G*G*A*G*G*G*G
서열 <b>384</b>	U*G*T*C G*T*T*C*U*U*U G G G A G G*G*G
서열 <b>385</b>	U*G*T*C*G*T*T*C*U*U*U*G*G*G*A*G*G*G*G
서열 <b>241</b>	T*C_G*T*C_G*T*T*T*T_G*T*C_G*T*T*T*T*G*T*C_G*T*T
서열 <b>242</b>	T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T

[0565] 실시예 29: 반-연질 올리고뉴클레오티드 중의 포스포디에스테르 유사 연결기로서의 Rp 인터뉴클레오티드 연결기

[0567] 방법

[0568] 세포 배양 조건 및 시약

[0569] B 세포 증식 분석을 위해, BALB/c 마우스 (4 내지 18 주령)로부터의 비장 세포를 96-웰 미세역가 플레이트 내에서 2 내지 5 x 10<sup>5</sup> 내지 10<sup>6</sup> 세포/ml로 RPMI 중에서 44 시간 동안 배양하고, 이어서 1 µCi의 3H 티미딘을 4 내지 6 시간 동안 첨가하고, 수확하고, cpm을 선행 문헌 [Krieg et al., 1995]에 기재된 바와 같이 섬광 계수로 측정하였다. 웨스턴 블롯의 경우, WEHI-231 세포 (미국 메릴랜드주 록빌 소재의 아메리칸 타입 컬렉션 (American Type Culture Collection))를 37 °C의 5% CO<sub>2</sub> 항습화 인큐베이터 내에서 배양하고, 10% 가열-불활성화 FCS (미국 메릴랜드주 가이테르스버그 소재의 라이프 테크놀로지스), 1.5 mM L-글루타민, 50 µM 2-ME, 페니실린 100 U/ml, 및 스트렙토마이신 100 pg/ml를 보충한 RPMI 1640 (미국 메릴랜드주 가이테르스버그 소재의 라이프 테크놀로지스 (Life Technologies))에서 유지하였다.

[0570] 올리고뉴클레오티드.

[0571] 올리고데옥시뉴클레오티드 (PO-올리고) 및 입체-랜덤 올리고 (테옥시뉴클레오티드 포스포로티오에이트) [Mix-PS]-올리고를 오페론 테크놀로지스 (Operon Technologies)(미국 캘리포니아주 알라메다 소재)로부터 구입하거나 또는 표준 포스포라미다이트 방법 [Caruthers, 1985] [Stec et al., 1984]에 의해 제조하였다. 이미 마우스 세포에 대해 강한 면역자극 효과를 가지는 것으로 밝혀졌기 때문에 [Yi et al., 1996] 올리고뉴클레오티드 [Mix-PS]-d(TCCATGACGTTCTGACGTT) ([Mix-PS]-서열 386)를 양성 대조군으로서 사용하였다. 최저 자극 모티프

를 갖는 CpG PS-올리고의 경우, 서열 PS-d(TCAACGTT)-2066을 연구를 위해 CpG DNA의 넓은 패밀리 내의 대표적인 넓은 변역자극 효과를 갖는 전형적인 CpG 모티프로서 선택하였다. 이 서열을 입체-랜덤 백본으로 제작하는 경우에 [Mix-PS]-2066로 칭하였다. 이 8머 서열을 완전 또는 부분 입체-한정 백본으로 제작할 때에, 전체 백본을 입체-한정하는 경우에 PS-올리고를 [A11-Rp-PS]-2066 또는 [A11-Sp-PS]-2066라 칭하고, 단지 CpG 디뉴클레오티드를 입체-한정하는 경우에는 [CG-Rp-PS]-2066 또는 [CG-Sp-PS]-2066라 칭하였다. 사용하는 다른 PS-올리고는 CpG PS-d(TCAACGTTGA) ([Mix-PS]-서열 387) 및 그의 A11-Rp- 및 A11-Sp-입체-한정 상대물, 및 대조군 비-CpG PS-d(TCAAGCTTGA) [Mix-PS]-서열 388을 포함하였다.

[0572] 입체-한정 포스포로티오에이트 올리고데옥시뉴클레오티드는 문헌 [Stec et al., 1995] [Stec et al., 1998]에 기재한 옥사티아포스폴란 방법으로 제조하였다. 합성을 메뉴얼로 수행하였다. 3'-말단으로부터의 제1 뉴클레오티드 단위를 DBU-내성 사르코시닐 링커 [Brown et al., 1989]에 의해 고체 지지체에 부착시켰다. 3'-O-(2-티오-"스피로"-4,4-펜타메틸렌-1,3,2-옥사티아포스폴란) 잔기를 갖는 적절하게 보호된 데옥시뉴클레오티드 단량체를 합성하고, 순수한 P-부분입체이성질체로 크로마토그래피 분리하였다. [CG-Rp-PS]-2066 및 [CG-Sp-PS]-2066의 합성의 경우, (Rp:Sp (비율 약 1:1) 중의) P-부분입체이성질체 모두 [Stec et al., 1998]의 채용해되지 않은 혼합물을 P 원자의 랜덤 배위의 인터뉴클레오티드 연결기의 어셈블리에 사용하였다. 모든 합성된 올리고머를 2 단계 RP- HPLC:DMT-온 (체류 시간 범위 23 내지 24 분) 및 DMT-오프 (체류 시간 14 내지 16 분) {크로마토그래피 시스템: ODS 하이퍼실 (Hypersil) 칼럼, 5  $\mu$ M, 240 x 4.6mm, 0.1 M 트리에틸암모늄 비카르보네이트 중의 0 내지 40% CH<sub>3</sub>CN, pH 7.5, 구배 1%/분}로 정제하였다. 그의 순도를 폴리아크릴아미드 겔 전기영동으로 평가하였다.

[0573] PS-올리고 흡수의 연구의 경우, 형광물질 접합 스트레오레귤러 (stereoregular) PS-올리고를 메뉴얼 합성 입체-한정 PS-올리고머의 고상 연장으로 제조하였다. 탈트리틸화 (detritylation) 단계 후에, 형광물질 포스포라미다이트 (미국 매사추세츠주 아쉬랜드 소재의 켐진스 코퍼레이션 (ChemGenes Corporation); 작업 농도 125 mg/mL) 및 1-H-테트라졸을 일상적으로 (커플링 시간 120 초) 첨가하고, 이어서 S-테트라 시약 [Stec et al., 1993]으로 황화시켰다. 지지체로부터 절단하고, 탈보호를 진한 수산화암모늄으로 1 시간 동안 실온에서 및 4 시간 동안 55 °C에서 각각 수행하였다. 생성된 올리고머를 1 단계 RP-HPLC (상기 참조)로 정제하였다.

[0574] 형광물질 잔기의 두드러진 소수성 때문에, Rp- 및 Sp-올리고머를, 즉 끊어진 서열의 말단에서 체류 시간 14.5, 14.8 및 14.7, 15.0 분에서 각각 용리하였다. 두 가지 모든 경우에, 2 종의 P-부분입체이성질체는 형광물질 단량체를 사용하는 연장의 포스포라미다이트/황화 방법의 비-입체특이성 때문에 용리되었다.

[0575] 웨스턴 블롯 분석

[0576] 세포를 수확하고, 새로운 배지 중에  $2 \times 10^6$  세포/mL의 농도에서 재현탁하였다. 세포를 40 분 자극 전 4 시간 동안 휴식시켰다. 세포를 수확하고, 냉각 PBS로 3회 세척하였다. 세포를 0.05M 트리스 (pH 7.4), 0.14M NaCl, 1% NP-40, 0.001M Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 0.01M NaF, B-글리세로포스페이트 4.3 mg/ml, 0.002M DTT, PMSF 50  $\mu$ g/ml, 안티파인 12.5  $\mu$ g/ml, 아프로티닌 12.5  $\mu$ g/ml, 류펩틴 12.5  $\mu$ g/ml, 펩스타틴 1.25  $\mu$ g/ml, 베스트틴 19  $\mu$ g/ml, 포스포라미돈 10  $\mu$ g/ml, 트립신 억제제 12.5  $\mu$ g/ml 중에 용해하고, 냉동하고, 해동한 후에 빙상에서 30 분 인큐베이션 하였다. 샘플을 이어서 10,000 x g에서 10 분 동안 4 °C에서 원심분리하였다. 추가 분석을 위해 상청액을 전체 세포 용해질로서 제공하였다. 등량의 전체 세포 용해질 (20  $\mu$ g)을 SDS 샘플 완충액 중에 5 분 동안 끓이고, 11% 변성 폴리아크릴아미드 겔 상에서 전기영동하였다. 전기영동 후에, 반-건조 블로터 (미국 캘리포니아주 헤르쿨레스 소재의 바이오 래버러터리즈 (Bio-Rad Laboratories))를 사용하여 단백질을 니트로셀룰로오스 막에 전달하였다. 블롯을 5% 비-탈지유로 블로킹하고, 포스포-SAPK/JNK (미국 매사추세츠주 베버럴 소재의 셀 시그널링 테크놀로지 (Cell Signaling Technology)), I $\kappa$ B- $\alpha$  및 JNK1 (미국 캘리포니아주 산타 크루즈 소재의 산타 크루즈 바이오테크놀로지, 인크. (Santa Cruz Biotechnology, Inc.))로 혼성화하였다. 제조자 프로토콜에 따라 블롯을 증강된 화학발광 시약 (ECL, 아마샤 인터내셔널 (Amersham International))을 사용하여 시각화하였다.

[0577] 결과

[0578] CpG PS-올리고의 Sp 입체이성질체에 의한 비장 세포 <sup>3</sup>H 티미딘 삽입의 유도.

[0579] CpG DNA의 변역자극 효과의 입체-특이성을 결정하기 위해, BALB/c 비장 세포를 입체-한정 옥타뉴클레오티드 PS-d (TCAACGTT)-2066와 배양하며, 여기서 모든 인터뉴클레오티드 연결기는 하기 표 17에 나타낸 농도에서 Rp 또는

Sp 배위이었다. 세포를 48 시간 동안 배양하고, 충분한 시간 동안 B 세포를 유도하여 CpG 모티프를 증폭하였다 [Krieg et al., 1995]. CpG 모티프를 갖는 입체-랜덤 [Mix-PS]-2066은 강한 투여량-의존 비장 세포 증식을 유도하였다 (표 17). Sp 이성질체는 또한 증식을 유도하고, [Mix-PS]-2066보다 최적으로 더 효능이 있음을 보였다. 대조적으로, Rp 입체이성질체는 임의의 탐지가능한 증식을 유도하지 않았으며, 이는 유 (Yu) 등의 발견 [Yu et al., 2000]과 일치하였다.

표 17

CpG 8머의 Sp 입체이성질체에 의한 비장 세포 증식의 유도

올리고	농도	cpm	SI
없음 ( 매질 )		2170	1
2066 ( 스트레오 랜덤 CpG)	0.4 μM	3154	1.5
“	2.4 μM	16,525	7.6
“	4.8 μM	30,811	14.2
Rp (2066)	0.4 μM	1207	0.6
“	2.4 μM	985	0.5
“	4.8 μM	640	0.3
Sp (2066)	0.4 μM	9567	4.4
“	2.4 μM	35,372	16.3
“	4.8 μM	43,591	20.1
Rp (2066) + 2066 <sup>1</sup>	0.4 μM	1,597	0.7
“	2.4 μM	10,255	4.7
“	4.8 μM	15,841	7.3

[0580]

[0581] SI = 배지 대조군에 대한 자극 지수

[0582] <sup>1</sup> 2 종의 PS-올리고 각각을 배양 개시 때에 지시된 농도로 첨가하였다.

[0583] 본 발명자들의 선행 연구는 10머 CpG PS-올리고가 제1 실험에서 사용한 8머에 비해 개선된 면역자극 효과를 가지는 것으로 나타났다. 따라서, 이들 실험은 입체-랜덤 [Mix-PS]-서열 387로서, 또는 A11-Rp- 또는 A11-Sp-형태로 합성한 작제물 PS-서열 387을 사용하여 반복하였다. 다시, [Mix-PS]-서열 387 및 [A11-Sp-PS]-서열 387 모두는 투여량 의존성 방식으로 강한 <sup>3</sup>H 티미딘 삽입을 유도하였다. 그러나, 이 경우에, [A11-Rp-PS]-서열 387은 또한 최고 농도에서 세포 증식의 실질적인 증가를 유도할 수도 있으며, 이는 적어도 부분 자극 활성을 유지한다는 것을 나타낸다.

[0584] 8머 PS-올리고 중의 CpG 디뉴클레오티드에서의 Rp 키랄성에 대한 바람직함.

[0585] 초기 실험 중의 Sp 입체이성질체에 대한 명백한 바람직함은 CG 디뉴클레오티드 자체 내의 효과로 인한 것인지

또는 이 효과가 CG 이외의 것으로 그런 것일지는 여전히 불분명하다. 이를 입증하기 위해, 2 종의 8머 PS-2066 을 합성하며, 여기서 백본은 중앙 CG 사이의 연결기를 제외한 입체-랜덤이고, 이를 Sp 또는 Rp로 칭하였다. 놀랍게도, 이 실험은 전체 백본이 스트레오레귤러인 PS-올리고를 사용하는 것으로부터 유발된 것의 반대적 영향을 나타냈으며, 이는 [CG-Rp-PS]-2066에서 대조군 입체랜덤 PS-올리고 만큼 비장 세포 <sup>3</sup>H 티미딘 삽입이 강하게 유발되기 때문이다. 대조적으로, PS-올리고 [CG-Sp-PS]-2066은 실질적으로 불활성이었다.

- [0586] CpG PS-올리고의 R 입체이성질체에 의한 비장 세포 3H 티미딘 삽입의 억제.
- [0587] Rp 입체이성질체로 처리한 웰 중에서 <sup>3</sup>H 티미딘 삽입의 수준은 대조군 웰보다 더 낮으며, 이는 가능한 억제 활성을 제시하지만 세포독성이 세포의 현미경 조사에 나타나지 않았다. 대신에, 세포를 [Mix-PS]-2066 및 All-Rp 입체이성질체의 등물의 혼합물과 함께 배양하는 경우에, 단지 [Mix-PS]-2066 와 배양한 세포에 비해 <sup>3</sup>H 티미딘 삽입의 수준에서 대략 50% 감소가 있었다 (표 17).
- [0588] 초기 시점에서 [Rp-PS]-올리고에 의한 바람직한 면역 자극.
- [0589] 선행 실험에서 수행한 <sup>3</sup>H 티미딘 삽입 분석은 표지된 물질 (그의 삽입을 인위적으로 저해함)과 경쟁하는 냉각 티미딘의 유틸리티와 함께 PS-올리고 분해로부터 생성된 인공물에 취약하다 [Matson et al., 1992]. 상기 연구는 [Rp-PS]-올리고가 Sp 상대물보다 뉴클레아제 분해에 훨씬 더 민감함을 입증하였다. 따라서, 본 발명자들의 <sup>3</sup>H 티미딘 삽입 분석에서 [Rp-PS]-올리고의 자극 효과의 명백한 결실은 [Rp-PS]-올리고의 참된 효과를 반영하지 않은 유인 인공물일 수 있음이 가능하다. PS-올리고를 분해할 수 있기 전의 초기 시간대에 [Rp-PS]-올리고의 자극 효과를 탐지하기 위해, CpG-유도된 자극에 대한 독립적 생물학적 분석으로서, 본 발명자들은 정규 조절 미토겐 활성화 단백질 키나제인 JNK의 빠른 인산화를 유도하는 이들 PS-올리고의 능력을 시험하였다. 놀랍게도, 본 발명자들은 CpG 서열 PS-서열 386 및 PS-서열 387의 처리 시에, 40 분 내에 JNK 인산화가 [Sp-PS]-이성질체에 의해 강하게 유도되지 않지만 입체랜덤 [Mix-PS]- 및 [Rp-PS]-이성질체에 의해서만 강하게 유도됨을 밝혀냈다. 대조군 비-CpG [Mix-PS]-서열 388은 탐지가능한 JNK 인산화를 유도하지 않았다. 모든 샘플은 필적할만한 양의 총 JNK 단백질을 함유하였다.
- [0590] CpG [Sp-PS]-올리고의 효과가 JNK 인산화 분석에서 탐지될 수 없지만, 올리고는 이 실험에서 생물학적으로 활성이었는데, 이는 억제 단백질 IκB-α가 입체이성질체와 관계 없이 모든 CpG PS-올리고에 의해 감소되기 때문이지만, 대조군 비-CpG PS-서열 388에 의해서는 그렇지 않다.
- [0591] PS-올리고 세포 표면 결합 및 흡수의 입체-독립.
- [0592] PS-올리고 입체이성질체의 생활성에서의 관찰되는 차이에 대해 도움이 될 수 있는 하나의 잠재적 설명은 PS-올리고의 세포 결합 또는 흡수가 입체-의존성일 수 있다는 것이다. 이 가능성을 시험하기 위해, P-입체-한정 PS-올리고를 형광 태그와 함께 합성하고, 세포와 함께 인큐베이션하였다. 선행 연구의 결과와 일치되게, PS-올리고는 세포 흡수의 농도-의존 및 온도-의존 패턴을 나타냈다. 현저하게, Rp 또는 Sp PS-올리고의 결합 또는 흡수에서의 탐지가능한 차이가 없었다.
- [0593] 실시예 30: 반-연질 C 클래스 올리고뉴클레오타이드 ODN 316 및 반-연질 B 클래스 올리고뉴클레오타이드 ODN 313은 항원-유도된 기도 염증을 생체내에서 감소시킨다.
- [0594] 이 연구는 항원-유도 기도 염증의 무린 모델에서 ODN 316의 생체내 효과를 평가하였다. B 클래스 ODN 313을 비교용 연구에 포함하였다.
- [0595] 방법. 마우스 (수컷 BALB/c)를 연구 0 및 7 일째에 항원 (난 알부민, 10 μg, i.p.)으로 수산화알루미늄 아주반트 (피어스 알루미늄 (Pierce Alum))와 함께 민감화하였다.
- [0596] 마우스를 흡입된 난 알부민 에어로졸에 연속되는 2 주 동안 각 주에 2 회 노출시킴으로써 항원 접종하였다. 제 1 접종은 연구 21 일째이었다. 데빌비스 울트라네브 (DeVilbiss Ultraneb) 연무기를 사용하여 PBS 중의 난 알부민의 1% 용액으로부터 1 시간 동안 에어로졸을 생성시켰다. 접종하지 않은 대조군으로 활동하는 마우스를 분리하였다.
- [0597] ODN 316 또는 ODN 313 (1 내지 100 μg/kg) 또는 비히클 (염수, 20 μl)을 각 주의 제1 항원 접종 2일 전 1회 비내로 투여하였다.
- [0598] 종점을 연구 33 일째 (즉, 최종 항원 접종 48 시간 후)에 평가하였다. 기도의 세포를 기관지 폐포 세척으로 회

수하였다. 윌리트-기엠사 (Wright-Giemsa) 염색으로 염색한 세포원심분리 제조물 상에서 세포를 시각적으로 계수함으로써 확인된 램덤 샘플과 함께 아드비아 (Advia) 자동화 세포 계수기로 상이한 세포 계수하였다.  $CD4^+$  T 세포 ( $CD3^+CD4^+$  세포)의 수를 유세포측정기로 계수하였다. 결과를 각 군에 대해 평균  $\pm$  SEM으로 나타냈다. 크루스칼-왈리스 다중 비교 시험으로 유의함을 측정하였다.

[0599] 결과. 항원 접종은 기도 관내강에서 백혈구의 총수를 증가시켰다. 이 증가는 호산구 (예컨대, 항원-접종되고, 비히클-처리된 마우스 중의  $3 \times 10^5$  호산구/ml 대 접종되지 않은 마우스 중의  $1 \times 10^4$  호산구/ml 미만)의 축적 때문에 우세하였다. 호산구증가증은 ODN 316 또는 ODN 313 (예컨대, ODN 중 하나의  $100 \mu\text{g/ml}$ 으로 처리한 항원-접종된 마우스 중의 약  $5 \times 10^4$  호산구/ml ( $P < 0.05$ ))에 의해 유의하게 저해되었다.

[0600] 또한, 항원 접종은 ODN 중 하나 (예컨대, ODN 중 하나의  $100 \mu\text{g/ml}$ 로 처리한 항원-접종된 마우스 중의 약  $2 \times 10^4$   $CD4^+$  T 세포/ml 대 항원-접종되고, 비히클-처리된 마우스 중의 약  $1.3 \times 10^5$   $CD4^+$  T 세포/ml ( $P < 0.05$ ))에 의해 유의하게 저해된  $CD4^+$  T 세포를 축적시켰다.

[0601] 결론. 반-연질 C 클래스 ODN 316 및 반-연질 B 클래스 올리고뉴클레오티드 ODN 313 각각은 항원-유도된 기도 호산구증가증 및  $CD4^+$  T 세포의 생체내 축적을 저해하였다.

[0602] 실시예 31: 반-연질 B, C, 및 T 클래스 ODN의 비교: 뮤린 비장세포로부터의 사이토카인 분비의 시험관내 유도

[0603] 이 연구는 뮤린 비장세포로부터의 사이토카인 분비의 시험관내 유도에 대한 반-연질 B, C, 및 T 클래스 ODN의 능력을 조사하였다.

[0604] 방법. BALB/c 마우스로부터 비장세포를 수확하고, 모았다. 48-웰 배야 플레이트 내에서 ODN 각각 (0, 0.001, 0.01, 0.1, 1 또는  $10 \mu\text{g/ml}$ )을 함유한 RPMI 1640 + 10% 소 태아 혈청 중의  $1 \times 10^7$  세포/1 ml에서 비장세포를 인큐베이션하였다. 시험된 ODN은 반-연질 B 클래스 ODN 20674, 반-연질 C 클래스 ODN 316 및 ODN 317, 및 반-연질 T 클래스 ODN 319 및 ODN 320을 포함하였다.

[0605] 48 시간 인큐베이션 ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) 후에, 배양 배지를 제거하고, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, GM-CSF, IFN- $\gamma$  및 TNF- $\alpha$ 의 농도를 루미넥스 (Luminex) 사이토카인 멀티플렉스 시스템을 사용하여 측정하였다. IL-12p40, IFN- $\alpha$  및 IP-10 농도를 ELISA로 측정하였다. 정확한 탐지성의 낮은 한도는 3.2 내지  $10 \text{ pg/ml}$ 이었다. 유세포측정기에 의한  $CD3^+$  및  $B220^+$  세포 상에서 CD40, CD69 및 CD86 발현을 측정하여 세포의 활성화 상태를 평가하였다.

[0606] 결과. ODN 각각은 B 세포 ( $B220^+$  세포)의 활성화 (CD40, CD69 및 CD86의 증가된 발현으로 측정함) 및 T 세포 ( $CD3^+$  세포)의 활성화 (CD69의 증가된 발현으로 측정함)를 유도하였다.

[0607] ODN은 IL-6, IL-10, IL-12p40, IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$  및 IP-10의 분비를 유도하였다. 측정된 다른 사이토카인의 역가는 증가하지 않았다. 예를 들면,  $1 \mu\text{g/ml}$ 의 ODN 농도에서 사이토카인 분비 수준은 하기와 같은 것으로 밝혀졌다 (모두를  $\text{pg/ml}$ 로 나타냄):

**표 18**

반-연질 B, C, 및 T 클래스 ODN에 대한 반응 중의 시험관내 사이토카인 분비

ODN	IL-6	IL-10	IL-12p40	IFN- $\alpha$	TNF- $\alpha$	IP-10
313	4000	410	300	12	150	400
316	3600	820	820	90	400	780
317	2200	410	790	140	340	760
319	1200	200	300	nd	50	30
320	150	nd	160	nd	15	25

[0608]

[0609] nd- 탐지 불가

- [0610] 반-연질 B 클래스 ODN 313과 비교하여, 2개의 반-연질 C 클래스 ODN은 더 높은 역가의 IL-10, IL-12p40, IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$  및 IP-10을 포함하지만, 더 두드러진 B 세포 활성화를 유발하지 않았다. 2개의 반-연질 T 클래스 ODN은 사이토카인 유도자로서 반-연질 B 및 C 분류 ODN보다 덜 유효한 것으로 보였다.
- [0611] 결론. 각각의 B 클래스 및 C 분류 ODN 각각은 TLR9의 활성화로 이루어진 사이토카인 유도의 프로파일 유도하고, 각각은 B 세포를 활성화시켰다. T 클래스 ODN은 더 유효한 사이토카인 유도자이었다.
- [0612] 반-연질 B 클래스 ODN 313에 비해, 반-연질 C 클래스 ODN 316 및 317 각각은 더 높은 농도의 면역-개질 사이토카인을 유도하지만, B 세포 활성화를 더 유도하지는 않았다. 이 데이터는 C 클래스 ODN의 치료 이점을 제시한다.
- [0613] 실시예 32: CpG ODN에 대한 반응 중의 생체내 사이토카인, 항체, 및 CTL 유도
- [0614] 사이토카인 측정: BALB/c 마우스에 ODN (서열 294 (연질), 241 (반-연질), 242, 및 286) 400 mg을 SC 주사로 투여하였다. 동물에서 주사 3 시간 후에 채혈하고, 혈장 중의 IP-10, IFN-감마 및 TNF-알파 수준을 ELISA로 측정하였다. 결과를 도 41 A 및 B (IP-10), C (IFN), 및 D 및 E (TNF)에 나타낸다.
- [0615] 항체 반응: BALB/c 마우스를 HBsAg 1 mg 단독으로 또는 CpG ODN와 함께 IM 주사에 의해 면역화시켰다. 동물에게 제1 면역화 4 주 후에 추가접종하였다. 항체 역가를 말단 지점 ELISA로 측정하였다. IgG 동형 역가를 추가접종 2 주 후에 말단 지점 ELISA로 측정하였다. 결과를 도 42 A 및 B에 나타낸다.
- [0616] 세포독성 T 림프구 반응: BALB/c 마우스를 HBsAg 1 mg 단독으로 또는 CpG ODN와 함께 IM 주사에 의해 면역화시켰다. 동물에게 제1 면역화 4 주 후에 추가접종하였다. CTL 활성을 추가접종 2 주 후에 51Cr 유리 분석으로 측정하였다. 결과를 도 42 C에 나타낸다.
- [0617] 따라서, 연질 및 반-연질 ODN은 시험관내 및 생체내 연구 모두에서 나타난 바와 같이 무린 면역계의 활성화가 유사하거나 또는 더 양호하고, 항원 특이적 면역 반응을 증대할 수 있다.
- [0618] 실시예 33: 생체내 항암요법제 중의 CpG ODN의 용도
- [0619] 본 발명의 ODN을 단일-치료로서 3개의 암 모델에서 효능에 대해 시험하였다. 초기에, ODN을 신장 세포 암종을 갖는 마우스 (렌카(renca))에 투여하였다. 상기 방법을 하기와 같이 수행하였다:  $2 \times 10^5$  렌카 세포 SC를 마우스의 왼쪽 옆구리에 0 일째에 주사함으로써 종양을 유도하였다. 처리 후에 종양 세포 주사 10 일 후에 시작하여 5 주 동안 매주 PBS, CpG ODN 241 또는 242를 SC 주사하였다. 결과를 도 43 A 및 B에 나타낸다.
- [0620] 시험한 제2 모델은 무린 비-소세포 폐암 (루이스 (Lewis) 폐 암종)이었다.  $2 \times 10^6$  루이스 폐 암종 세포 SC를 마우스의 왼쪽 옆구리에 0 일째에 주사함으로써 종양을 유도하였다. 처리 후에 2 개월 동안 매주 1, 3, 7 일째에 PBS, 100 mg의 CpG ODN 241 또는 242를 SC 주사하였다. 결과를 도 43 E 및 F에 나타낸다.
- [0621] 시험한 제3 모델은 무린 신경아종이었다.  $1 \times 10^6$  Neuro2a 세포를 왼쪽 옆구리에 0 일째에 주사하였다. 10 내지 15 일 동안 매일 PBS, 100 mg의 CpG ODN 241 또는 242를 SC 주사하였다. 결과를 도 43 C 및 D에 나타낸다.
- [0622] 따라서, 반-연질 ODN은 암 (무린 렌카, LLC, 신경아종)의 성장을 제어하고, 이들 암을 앓고 있는 마우스의 생존을 향상시켰다.
- [0623] 실시예 34: TLR-9 녹아웃 마우스 중 BALB/c 마우스에서 연질, 반-연질 및 경질 ODN의 투여로부터 생성된 신주위 염증
- [0624] 신주위 염증을 TLR-9 녹아웃 마우스 중 BALB/c 마우스에서 평가하였다. 결과를 각각 하기 표 19 및 20에 나타낸다. 반-연질 ODN (241)은 주사 부위에서 염증을 덜 유도하고, 투여량 100 mg에서는 신주위 염증을 유도하지 않거나 또는 투여량 250 mg에서는 신주위 염증을 거의 유도하지 않았고, ODN의 다중 투여 후에 더 양호하게 관대하였다.

표 19

군	신장 실질 염증	신장 피막 육아종 염증	지방 조직 육아종 염증
PBS	정상 5/5	정상 5/5	정상 5/5
242 100 mg	경증 2/5	경증 내지 중간 증상 5/5	경증 내지 중간 증상 4/5
242 250 mg	경증 1/4	경증 내지 중간 증상 4/4	뚜드러진 증상 4/4
241 100 mg	정상 5/5	정상 5/5	정상 5/5
241 250 mg	경증 2/5	경증 2/5	경증 내지 중간 증상 3/5

[0625]

표 20

군	신장 실질 염증	신장 피막 육아종 염증	지방 조직 육아종 염증
PBS	정상 5/5	정상 5/5	정상 5/5
242 100 mg	정상 5/5	정상 5/5	정상 5/5
242 250 mg	정상 5/5	정상 5/5	정상 5/5
241 100	정상 5/5	정상 5/5	정상 5/5
241 250 mg	정상 5/5	정상 5/5	정상 5/5

[0626]

[0627]

상기 명세서는 당업자가 본 발명을 실시할 수 있게 하기에 충분하다고 여겨진다. 실시예는 본 발명의 일 측면의 단일 예시로 의도된 것이며 다른 기능상 균등한 실시태양들이 본 발명의 범위 내에 있으므로 제공된 실시예에 의해 본 발명의 범위가 제한되어서는 안 된다. 본 명세서에 예시되고 설명된 것들 외에도 본 발명의 다양한 변형이 상기한 설명으로부터 당업자에게 명백해질 것이며, 그 역시 뒤에 오는 청구의 범위에 속한다. 본 발명의 이점 및 목적은 본 발명의 각 실시태양에 반드시 반영되는 것은 아니다.

**도면의 간단한 설명**

[0182]

도 1은 그래프의 상부 X 축을 따른 수에 의해 열거하고 ▲로 나타낸 올리고뉴클레오티드에 인간 PBMC를 노출시킨 후에 이들 세포로부터 분비된 인터페론-알파 (pg/ml)의 수준 대 ■로 나타낸 양성 대조군 올리고뉴클레오티드에 대한 수준을 나타낸 그래프의 세트이다. 도 1A에 나타낸 시험 올리고뉴클레오티드는 서열 322, 서열 323 및 서열 324를 포함하고, 양성 대조군 올리고뉴클레오티드는 서열 242이다. 도 1B에 나타낸 시험 올리고뉴클레오티드는 서열 325, 서열 326, 서열 327, 및 서열 328을 포함하고, 양성 대조군 올리고뉴클레오티드는 5'TCG TCG TTT TGA CGT TTT GTC GTT 3' (서열 329)이다. 특정 데이터 지점을 생성하기 위해 사용된 올리고뉴클레오티드의 농도를 X 축 (µM)에 따라 나타낸다. 도시한 데이터는 6명의 기증자의 평균을 나타낸다. 그래프 하부에, 음성 대조군 (배지)으로 처리한 세포에 의해 분비된 인터페론-알파 (pg/ml)의 수준을 각각의 실험에 대해 열거한다.

[0183]

도 2는 그래프의 상부 X 축을 따른 수에 의해 열거하고 ▲로 나타낸 올리고뉴클레오티드에 인간 PBMC를 노출시킨 후에 이들 세포로부터 분비된 IL-10 (pg/ml)의 수준 대 ■로 나타낸 양성 대조군 올리고뉴클레오티드에 대한 수준을 나타낸 그래프의 세트이다. 도 2A에 나타낸 시험 올리고뉴클레오티드는 (서열 322), 서열 323, 및 서열

324를 포함하고, 양성 대조군 올리고뉴클레오티드는 서열 242이다. 도 2B에 나타난 시험 올리고뉴클레오티드는 서열 325, 서열 326, 서열 327, 및 서열 328을 포함하고, 양성 대조군 올리고뉴클레오티드는 서열 329이다. 특정 데이터 지점을 생성하기 위해 사용된 올리고뉴클레오티드의 농도를 X 축 ( $\mu\text{M}$ )에 따라 나타낸다. 도시한 데이터는 6명의 기증자의 평균을 나타낸다. 그래프 하부에, 음성 대조군 (배지)으로 처리한 세포에 의해 분비된 IL-10 (pg/ml)의 수준을 각각의 실험에 대해 열거한다.

[0184] 도 3은 그래프의 상부 X 축을 따른 수에 의해 열거하고 ▲로 나타난 올리고뉴클레오티드에 인간 PBMC를 노출시킨 후에 이들 세포로부터 분비된 TNF-알파 (pg/ml)의 수준 대 ■로 나타난 양성 대조군 올리고뉴클레오티드에 대한 수준을 나타낸 그래프의 세트이다. 도 3A에 나타난 시험 올리고뉴클레오티드는 서열 322, 서열 323, 및 서열 324를 포함하고, 양성 대조군 올리고뉴클레오티드는 서열 329이다. 도 3B에 나타난 시험 올리고뉴클레오티드는 서열 325, 서열 326, 서열 327, 및 서열 328을 포함하고, 양성 대조군 올리고뉴클레오티드는 서열 329이다. 특정 데이터 지점을 생성하기 위해 사용된 올리고뉴클레오티드의 농도를 X 축 ( $\mu\text{M}$ )에 따라 나타낸다. 도시한 데이터는 3명의 기증자의 평균을 나타낸다. 그래프 하부에, 음성 대조군 (배지) 및 LPS로 처리한 세포에 의해 분비된 TNF-알파 (pg/ml)의 수준을 각각의 실험에 대해 열거한다.

[0185] 도 4는 그래프의 상부 X 축을 따른 수에 의해 열거하고 ▲로 나타난 올리고뉴클레오티드에 인간 PBMC를 노출시킨 후에 이들 세포로부터 분비된 IL-6 (pg/ml)의 수준 대 ■로 나타난 양성 대조군 올리고뉴클레오티드에 대한 수준을 나타낸 그래프의 세트이다. 도 4A에 나타난 시험 올리고뉴클레오티드는 서열 322, 서열 323, 및 서열 324를 포함하고, 양성 대조군 올리고뉴클레오티드는 서열 329 (완전 포스포로티오에이트 변형 백본을 가지고 있음)이다. 도 4B에 나타난 시험 올리고뉴클레오티드는 서열 325, 서열 326, 서열 327, 및 서열 328을 포함하고, 양성 대조군 올리고뉴클레오티드는 서열 329이다. 특정 데이터 지점을 생성하기 위해 사용된 올리고뉴클레오티드의 농도를 X 축 ( $\mu\text{M}$ )에 따라 나타낸다. 도시한 데이터는 3명의 기증자의 평균을 나타낸다. 그래프 하부에, 음성 대조군 (배지) 및 LPS로 처리한 세포에 의해 분비된 IL-6 (pg/ml)의 수준을 각각의 실험에 대해 열거한다.

[0186] 도 5는 그래프의 상부 X 축을 따른 수에 의해 열거하고 ▲로 나타난 올리고뉴클레오티드에 인간 PBMC를 노출시킨 후에 이들 세포로부터 분비된 인터페론-감마 (pg/ml)의 수준 대 ■로 나타난 양성 대조군 올리고뉴클레오티드에 대한 수준을 나타낸 그래프의 세트이다. 도 5A에 나타난 시험 올리고뉴클레오티드는 서열 322, 서열 323, 및 서열 324를 포함하고, 양성 대조군 올리고뉴클레오티드는 서열 329이다. 도 5B에 나타난 시험 올리고뉴클레오티드는 서열 325, 서열 326, 서열 327, 및 서열 328을 포함하고, 양성 대조군 올리고뉴클레오티드는 서열 329이다. 특정 데이터 지점을 생성하기 위해 사용된 올리고뉴클레오티드의 농도를 X 축 ( $\mu\text{M}$ )에 따라 나타낸다. 도시한 데이터는 3명의 기증자의 평균을 나타낸다. 그래프 하부에, 음성 대조군 (배지) 및 LPS로 처리한 세포에 의해 분비된 인터페론-감마 (pg/ml)의 수준을 각각의 실험에 대해 열거한다.

[0187] 도 6은 그래프의 상부 X 축을 따른 수에 의해 열거하고 ▲로 나타난 올리고뉴클레오티드에 NK 세포를 노출시킨 후에 NK 세포 활성화의 지시자로서 NK 세포 상에서의 CD69 발현 (MFI)의 수준 대 ■로 나타난 양성 대조군 올리고뉴클레오티드에 대한 수준을 나타낸 그래프의 세트이다. 도 6A에 나타난 시험 올리고뉴클레오티드는 서열 322, 서열 323, 및 서열 324를 포함하고, 양성 대조군 올리고뉴클레오티드는 서열 329이다. 도 6B에 나타난 시험 올리고뉴클레오티드는 서열 325, 서열 326, 서열 327, 및 서열 328을 포함하고, 양성 대조군 올리고뉴클레오티드는 서열 329이다. 특정 데이터 지점을 생성하기 위해 사용된 올리고뉴클레오티드의 농도를 X 축 ( $\mu\text{M}$ )에 따라 나타낸다. 도시한 데이터는 3명의 기증자의 평균을 나타낸다. 그래프 하부에, 음성 대조군 (배지) 및 LPS로 처리한 세포에 의해 분비된 NK 세포 상에서의 CD69 발현의 수준을 각각의 실험에 대해 열거한다.

[0188] 도 7은 ■로 나타난 올리고뉴클레오티드 서열 313에 인간 PBMC를 노출시킨 후에 이들 세포에 의해 생성된 인터페론-알파 (IFN- $\alpha$ ) (7A) 및 IL-10 (7B)의 수준 대 ●로 나타난 양성 대조군 올리고뉴클레오티드 서열 242에 대한 수준을 나타낸 그래프의 세트이다. 특정 데이터 지점을 생성하기 위해 사용된 올리고뉴클레오티드의 농도를 X 축 ( $\mu\text{M}$ )에 따라 나타낸다.

[0189] 도 8은 ■로 나타난 올리고뉴클레오티드 서열 314에 인간 PBMC를 노출시킨 후에 이들 세포에 의해 생성된 인터페론-알파 (IFN- $\alpha$ ) (8A) 및 IL-10 (8B)의 수준 대 ●로 나타난 양성 대조군 올리고뉴클레오티드 서열 242에 대한 수준을 나타낸 그래프의 세트이다. 음성 대조군 ODN은 서열 330: tccaggacttctctcaggtt이다. 특정 데이터 지점을 생성하기 위해 사용된 올리고뉴클레오티드의 농도를 X 축 ( $\mu\text{M}$ )에 따라 나타낸다.

[0190] 도 9는 ■로 나타난 올리고뉴클레오티드 서열 319에 인간 PBMC를 노출시킨 후에 이들 세포에 의해 생성된 인터페론-알파 (IFN- $\alpha$ ) (9A) 및 IL-10 (9B)의 수준 대 ●로 나타난 양성 대조군 올리고뉴클레오티드 서열 242에 대한 수준을 나타낸 그래프의 세트이다. 특정 데이터 지점을 생성하기 위해 사용된 올리고뉴클레오티드의 농도를

X 축 ( $\mu\text{M}$ )에 따라 나타낸다.

- [0191] 도 10은 ■로 나타낸 올리고뉴클레오타이드 서열 316에 인간 PBMC를 노출시킨 후에 이들 세포에 의해 생성된 인터페론-알파 ( $\text{IFN-}\alpha$ ) (10A) 및 IL-10 (10B)의 수준 대 ●로 나타낸 양성 대조군 올리고뉴클레오타이드 서열 242에 대한 수준을 나타낸 그래프의 세트이다. 특정 데이터 지점을 생성하기 위해 사용된 올리고뉴클레오타이드의 농도를 X 축 ( $\mu\text{M}$ )에 따라 나타낸다.
- [0192] 도 11은 ■로 나타낸 올리고뉴클레오타이드 서열 317에 인간 PBMC를 노출시킨 후에 이들 세포에 의해 생성된 인터페론-알파 ( $\text{IFN-}\alpha$ ) (11A) 및 IL-10 (11B)의 수준 대 ●로 나타낸 양성 대조군 올리고뉴클레오타이드 서열 242에 대한 수준을 나타낸 그래프의 세트이다. 특정 데이터 지점을 생성하기 위해 사용된 올리고뉴클레오타이드의 농도를 X 축 ( $\mu\text{M}$ )에 따라 나타낸다.
- [0193] 도 12는 ■로 나타낸 올리고뉴클레오타이드 서열 320에 인간 PBMC를 노출시킨 후에 이들 세포에 의해 생성된 인터페론-알파 ( $\text{IFN-}\alpha$ ) (12A) 및 IL-10 (12B)의 수준 대 ●로 나타낸 양성 대조군 올리고뉴클레오타이드 서열 242에 대한 수준을 나타낸 그래프의 세트이다. 특정 데이터 지점을 생성하기 위해 사용된 올리고뉴클레오타이드의 농도를 X 축 ( $\mu\text{M}$ )에 따라 나타낸다.
- [0194] 도 13은 ■로 나타낸 올리고뉴클레오타이드 서열 313에 B 세포 및 단핵구를 노출시킨 후에 B 세포 상의 CD86 발현 (13A) 및 단핵구 상의 CD80 발현 (13B)의 수준 대 ●로 나타낸 양성 대조군 올리고뉴클레오타이드 서열 242에 대한 수준을 나타낸 그래프의 세트이다. 특정 데이터 지점을 생성하기 위해 사용된 올리고뉴클레오타이드의 농도를 X 축 ( $\mu\text{M}$ )에 따라 나타낸다.
- [0195] 도 14는 ■로 나타낸 올리고뉴클레오타이드 서열 314에 B 세포 및 단핵구를 노출시킨 후에 B 세포 상의 CD86 발현 (14A) 및 단핵구 상의 CD80 발현 (14B)의 수준 대 ●로 나타낸 양성 대조군 올리고뉴클레오타이드 서열 242에 대한 수준을 나타낸 그래프의 세트이다. 특정 데이터 지점을 생성하기 위해 사용된 올리고뉴클레오타이드의 농도를 X 축 ( $\mu\text{M}$ )에 따라 나타낸다.
- [0196] 도 15는 ■로 나타낸 올리고뉴클레오타이드 서열 319에 B 세포 및 단핵구를 노출시킨 후에 B 세포 상의 CD86 발현 (15A) 및 단핵구 상의 CD80 발현 (15B)의 수준 대 ●로 나타낸 양성 대조군 올리고뉴클레오타이드 서열 242에 대한 수준을 나타낸 그래프의 세트이다. 특정 데이터 지점을 생성하기 위해 사용된 올리고뉴클레오타이드의 농도를 X 축 ( $\mu\text{M}$ )에 따라 나타낸다.
- [0197] 도 16은 올리고뉴클레오타이드 서열 319에 B 세포 및 단핵구를 노출시킨 후에 B 세포 상의 CD86 발현 (16A) 및 단핵구 상의 CD80 발현 (16B)을 나타내고, 양성 대조군 올리고뉴클레오타이드 서열 242, 및 올리고뉴클레오타이드 5'TCC AGG ACT TCT CTC AGG TT3' 서열 330과 비교한 그래프의 세트이다. 특정 데이터 지점을 생성하기 위해 사용된 올리고뉴클레오타이드의 농도를 X 축 ( $\mu\text{M}$ )에 따라 나타낸다.
- [0198] 도 17은 대조군 올리고뉴클레오타이드 서열 242 및 올리고뉴클레오타이드 서열 330과 비교한 경우에, 올리고뉴클레오타이드 서열 321에 인간 PBMC를 노출시킨 후에 이들 세포에 의해 생성된 인터페론-알파 ( $\text{IFN-}\alpha$ ) (17A) 및 IL-10 (17B)의 수준을 나타낸 그래프의 세트이다. 특정 데이터 지점을 생성하기 위해 사용된 올리고뉴클레오타이드의 농도를 X 축 ( $\mu\text{M}$ )에 따라 나타낸다.
- [0199] 도 18은 올리고뉴클레오타이드 서열 321에 B 세포 및 단핵구를 노출시킨 후에 B 세포 상의 CD86 발현 (18A) 및 단핵구 상의 CD80 발현 (18B)을 나타내고, 양성 대조군 올리고뉴클레오타이드 서열 242, 및 올리고뉴클레오타이드 서열 330과 비교한 그래프의 세트이다. 특정 데이터 지점을 생성하기 위해 사용된 올리고뉴클레오타이드의 농도를 X 축 ( $\mu\text{M}$ )에 따라 나타낸다.
- [0200] 도 19는 올리고뉴클레오타이드 서열 317에 B 세포 및 단핵구를 노출시킨 후에 B 세포 상의 CD86 발현 (19A) 및 단핵구 상의 CD80 발현 (19B)을 나타내고, 양성 대조군 올리고뉴클레오타이드 서열 242, 및 올리고뉴클레오타이드 서열 330과 비교한 그래프의 세트이다. 특정 데이터 지점을 생성하기 위해 사용된 올리고뉴클레오타이드의 농도를 X 축 ( $\mu\text{M}$ )에 따라 나타낸다.
- [0201] 도 20은 올리고뉴클레오타이드 서열 320에 B 세포 및 단핵구를 노출시킨 후에 B 세포 상의 CD86 발현 (20A) 및 단핵구 상의 CD80 발현 (20B)을 나타내고, 양성 대조군 올리고뉴클레오타이드 서열 242, 및 올리고뉴클레오타이드 서열 330과 비교한 그래프의 세트이다. 특정 데이터 지점을 생성하기 위해 사용된 올리고뉴클레오타이드의 농도를 X 축 ( $\mu\text{M}$ )에 따라 나타낸다.
- [0202] 도 21은 염기 (B), 당, 및 5'시티딘과 3'구아노신 사이에 포스포디에스테르 연결기 (원으로 나타냄) 및 인접한

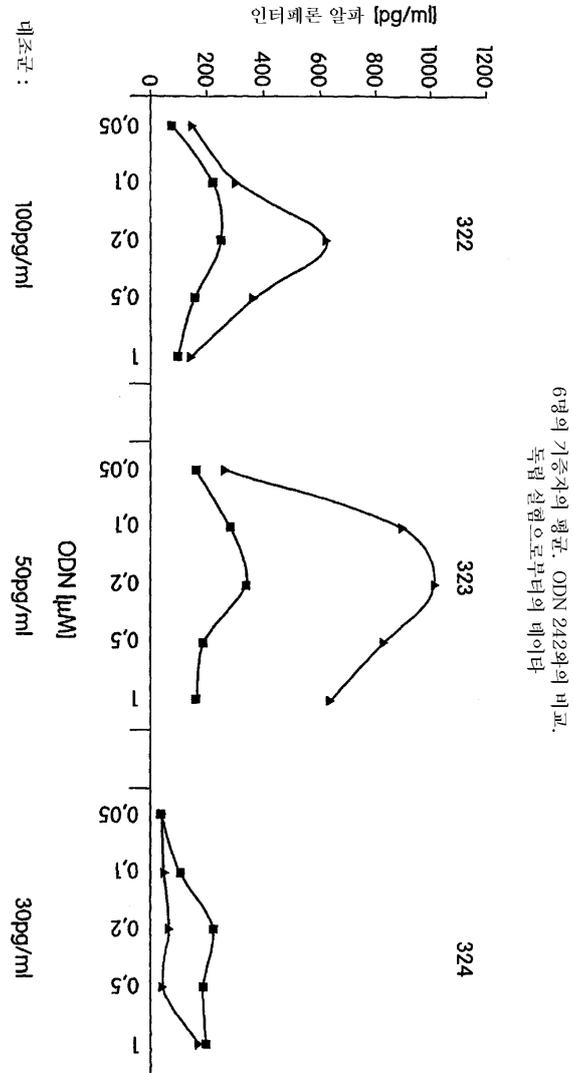
포스포로티오에이트 연결기를 갖는 백본을 포함하는 구조적 특징을 나타낸 핵산 분자의 부분의 그래프이다.

- [0203] 도 22는 마우스 내로의 피하 주사 48 시간 후에 신장, 비장, 및 간에서의 포스포로티오에이트 (서열 242), 연질 (서열 294), 및 반-연질 (서열 241) 올리고뉴클레오티드의 상대적 조직 양을 나타낸 막대 그래프이다. 올리고뉴클레오티드 서열 242 및 서열 241은 동일한 염기 서열을 가지고, 그들의 백본 조성이 상이하다.
- [0204] 도 23은 IL-6, IL-10, IFN  $\alpha$  및 IP-10의 유도에 의한 시험관내 인간 면역 세포의 자극을 나타낸다.
- [0205] 도 24는 IL-1, IL-2, IL-4, IL-5 또는 GM-CSF의 탐지가능한 분비 없이 TLR9-회합된 사이토카인 IL-6, IL-10, IL-12p40, IFN  $\alpha$ , TNF  $\alpha$  및 IP-10의 유도자로서의 증가된 효과 및 효능에 의한 무린 비장세포의 자극을 나타낸다.
- [0206] 도 25는 본 발명의 ODN (서열 313)에 의한 폐에서의 TLR9-회합된 유전자 (IL-6, TNF  $\alpha$ , IFN  $\alpha$ , IFN  $\gamma$  및 IP-10)의 유도된 발현을 나타낸다.
- [0207] 도 26은 마우스 생체내에서 항원-유도된 림프절 발생에 대한 CpG ODN의 효과를 나타낸다.
- [0208] 도 27은 CpG ODN이 항원 민감화에 대한 Th2 반응을 저해한다는 것을 나타낸다.
- [0209] 도 28은 마우스 생체내에서 항원-유도된 IgE 생성에 대한 효과를 나타낸다.
- [0210] 도 29는 항원 접종이 기도 관내강에서 백혈구, 주로 호산구의 총수를 증가시켰다는 것을 나타낸다.
- [0211] 도 30 및 32는 항원 접종이 기도 관내강에서 백혈구, 주로 호산구의 총수를 증가시키고, 이것이 투여-관련 방식으로 본 발명의 ODN (서열 313)에 의해 저해되었다는 것을 나타낸다.
- [0212] 도 31 및 32는 항원 접종이 기도 과다반응을 유발하고, 이것이 투여-관련 방식으로 본 발명의 ODN (서열 313)에 의해 저해되었다는 것을 나타낸다.
- [0213] 도 33은 5 mg/kg에서의 IV & IT 투여 후에 래트 혈장에서의 ODN 농도를 나타낸다. 혈장 데이터는 IV & IT 투여 모두 후에 서열 329에 비해 서열 313이 혈장으로부터 신속하게 제거된다는 것을 나타낸다.
- [0214] 도 34는 5 mg/kg에서의 IV & IT 투여 후에 래트 폐에서의 ODN 농도를 나타낸다. 동일 투여량 수준에서의 IV 투여 후에, 서열 313의 폐 농도는 서열 329 농도보다 작다. IT 투여 후에는, 차이가 덜 현저하다. 서열 329에 대한 폐 데이터는 투여 후 48 시간까지 동안만 입수가 가능하다.
- [0215] 도 35는 5 mg/kg에서의 IV & IT 투여 후에 래트 신장에서의 ODN 농도를 나타낸다. 신장 데이터는 IV 및 IT 투여 모두 후에 신장에서의 서열 313의 절대 수준이 상응하는 서열 329 농도보다 낮음을 나타낸다.
- [0216] IT 투여 후에 서열 313에 대한 신장 노출은 특히 동일 투여량 수준에서의 서열 329에 대한 노출에 비해 현저하게 감소된다.
- [0217] 도 36은 5 mg/kg에서의 IV 투여 후에 래트 신장에서의 ODN 농도를 나타낸다.
- [0218] 도 37은 5 mg/kg에서의 IT 투여 후에 래트 신장에서의 ODN 농도를 나타낸다.
- [0219] 도 38은 5 mg/1 g에서의 서열 313의 IV 투여 후에 래트 신장 중의 서열 313 및 그의 8-머 대사산물(들)의 농도를 나타낸다.
- [0220] 도 39는 5 mg/1 g에서의 서열 313의 IT 투여 후에 래트 신장 중의 서열 313 및 그의 8-머 대사산물(들)의 농도를 나타낸다.
- [0221] 도 40은 반-연질 ODN의 세트를, 동일한 서열을 갖는 완전한 포스포로티오에이트 ODN과 비교한 자극 지수를 나타낸 그래프이다.
- [0222] 도 41은 연질 (서열 294), 반-연질 (서열 241), 및 완전한 포스포로티오에이트 ODN (서열 242)의 투여에 대한 반응에서의 사이토카인 유도 A & B (IP-10), C (IFN), 및 D & E (TNF)를 나타낸 막대 그래프의 세트이다.
- [0223] 도 42는 연질 (서열 294), 반-연질 (서열 241), 및 완전한 포스포로티오에이트 ODN (서열 242)의 투여에 대한 반응에서의 항체 및 세포독성 T 림프구 활성을 나타낸 그래프의 세트이다.
- [0224] 도 43은 반-연질 (서열 241) 또는 완전한 포스포로티오에이트 ODN (서열 242)을 사용하는 마우스에스의 항종양 요법을 나타낸 그래프의 세트이다. 도 43 A 및 B는 신장 세포 암종 모델에서의 결과를 나타낸다. 도 43 C 및 D는 무린 신경아종 모델에서의 결과를 나타낸다. 도 43 E 및 F는 무린 비-소세포 폐암 모델에서의 결과를 나타

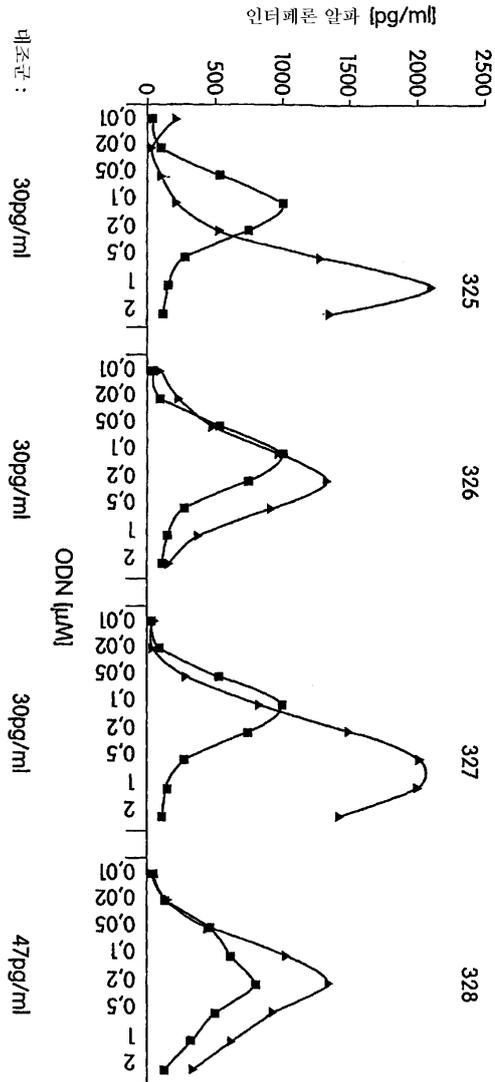
낸다.

도면

도면1A

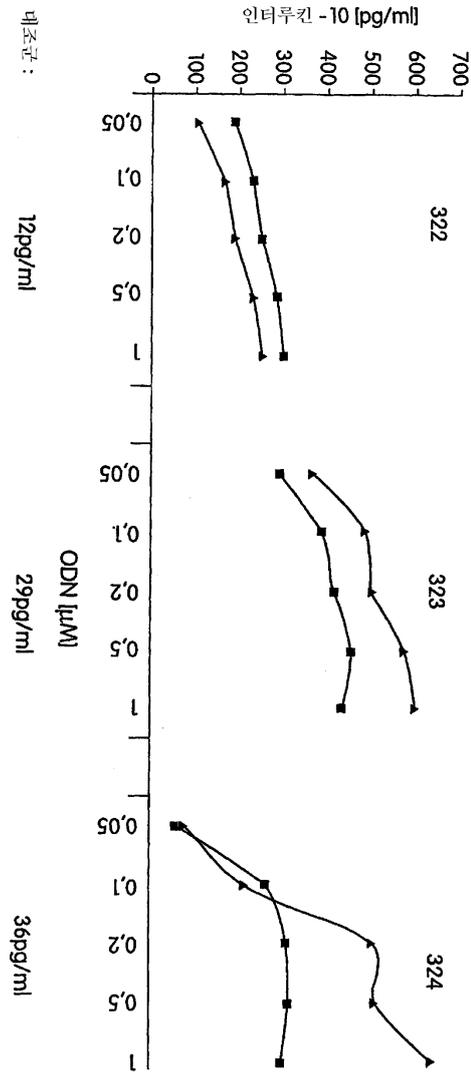


도면1B



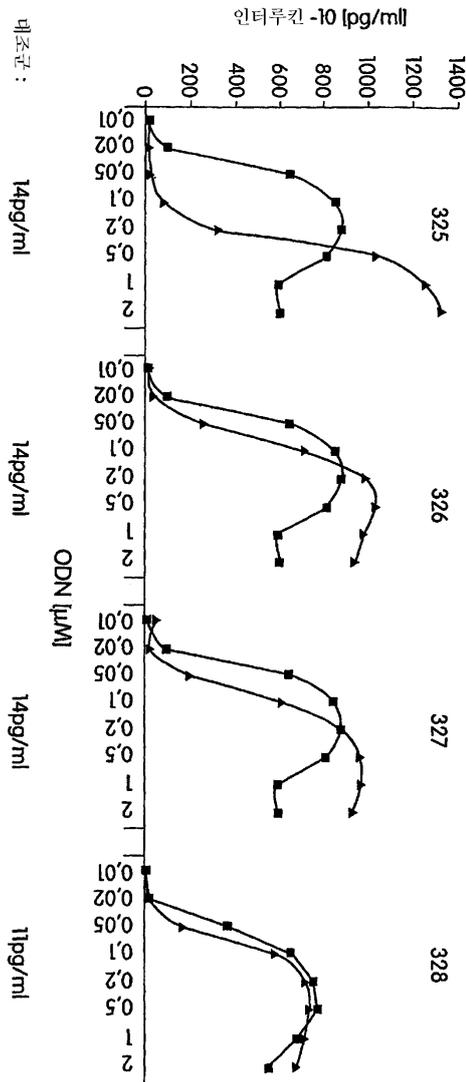
6명의 기증자의 평균. ODN 329와의 비교.  
 독립 실험으로부터의 데이터

도면2A



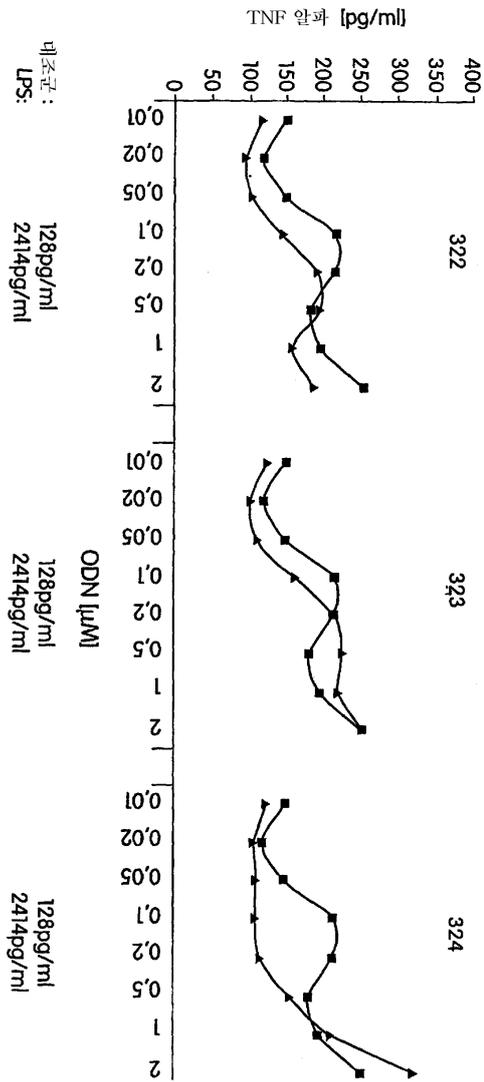
5명의 기증자의 평균. ODN 2412와의 비교. 독립 실험으로부터의 데이터

도면2B

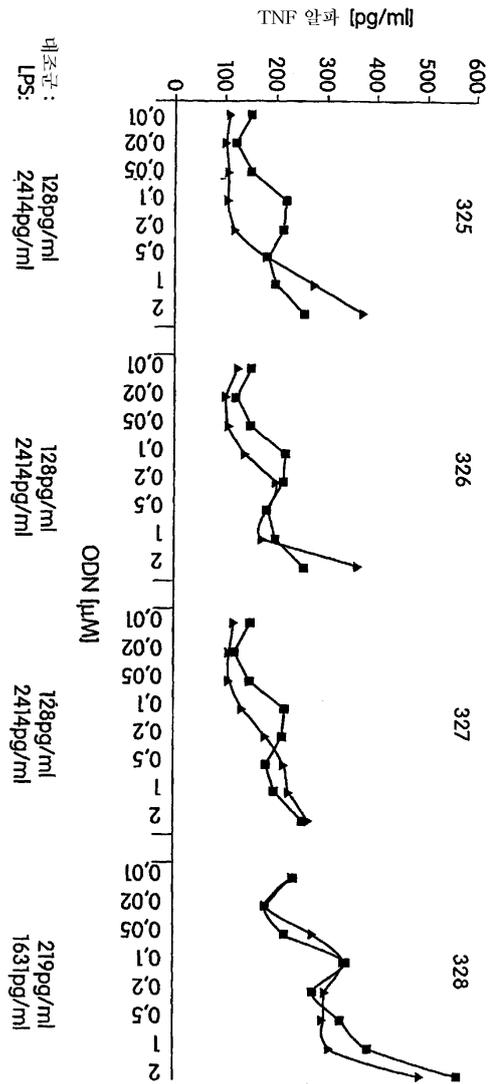


6명의 기증자의 평균. ODN 323와의 비교. 독립 실험으로부터의 데이터

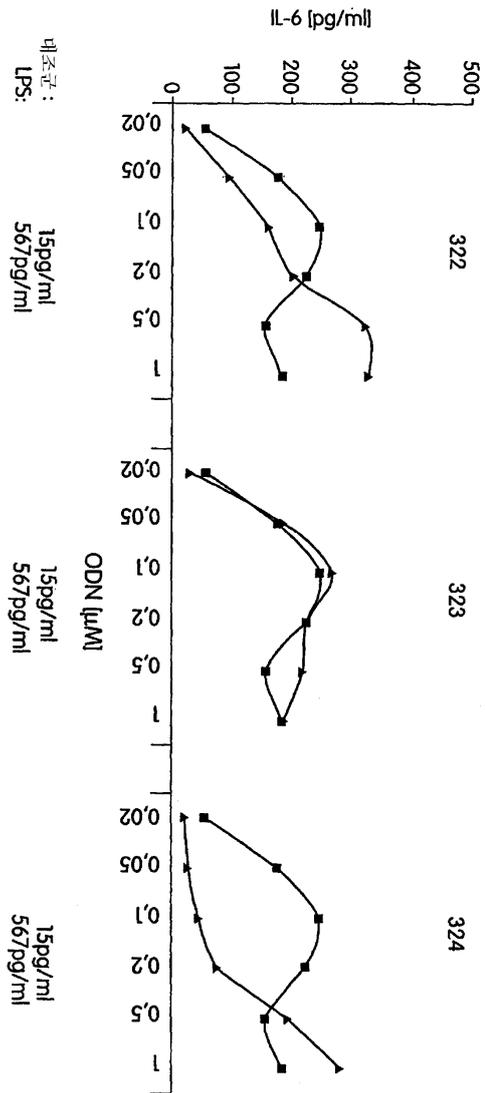
도면3A



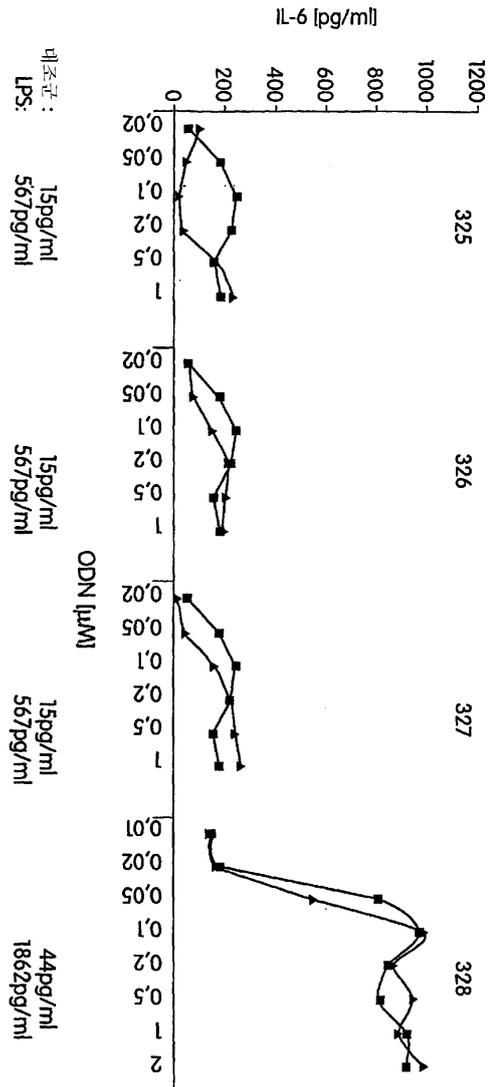
도면3B



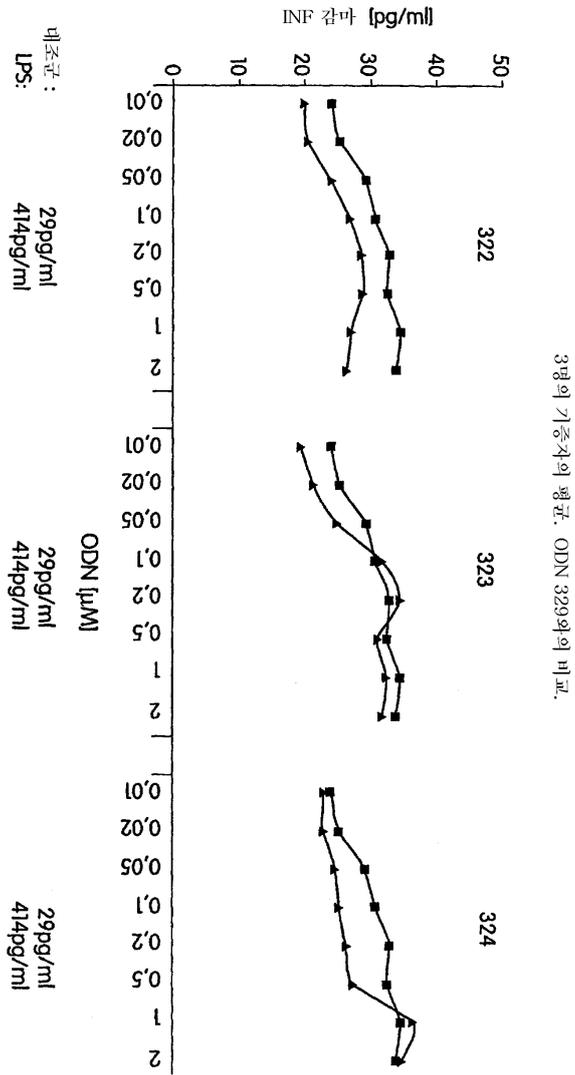
도면4A



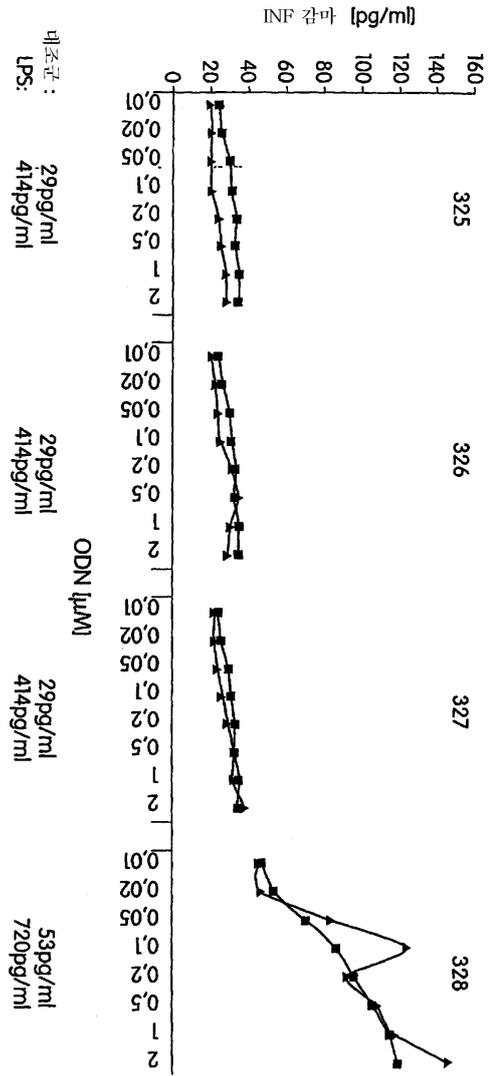
도면4B



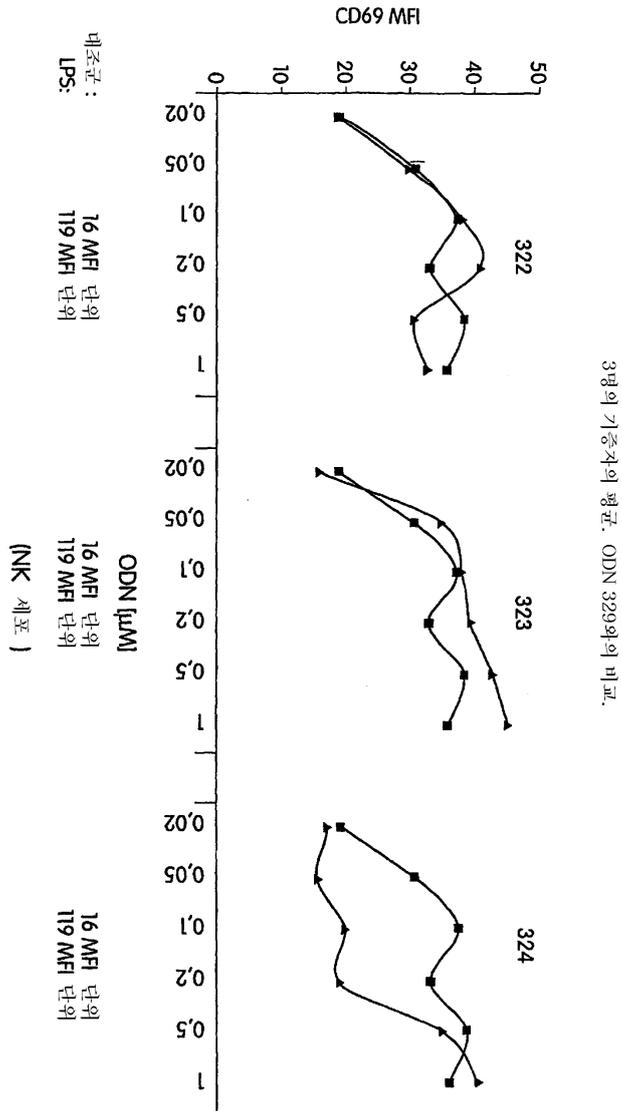
도면5A



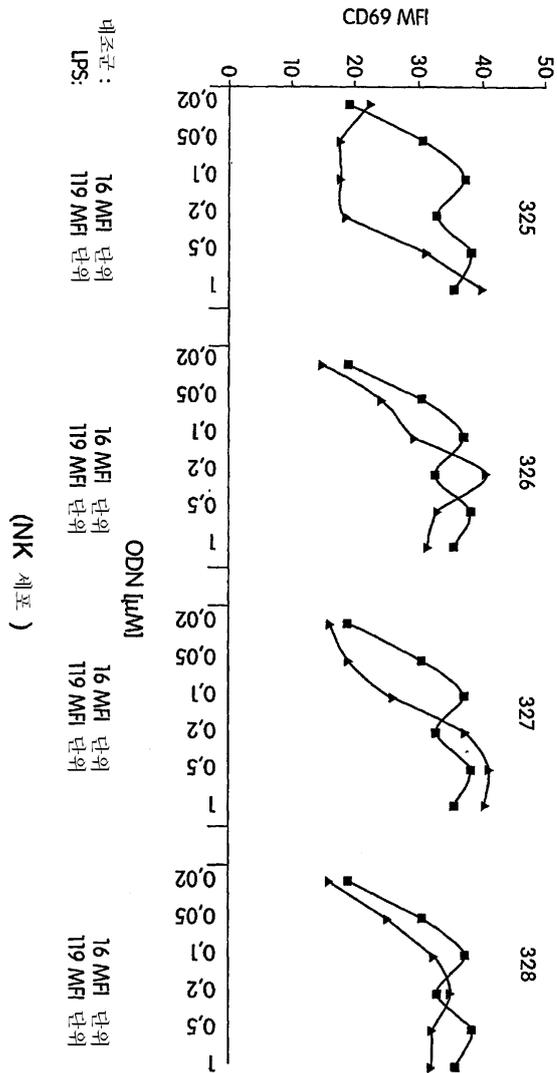
도면5B



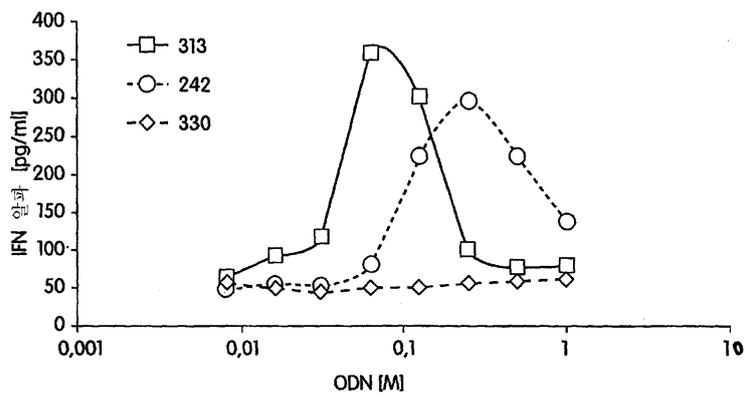
도면6A



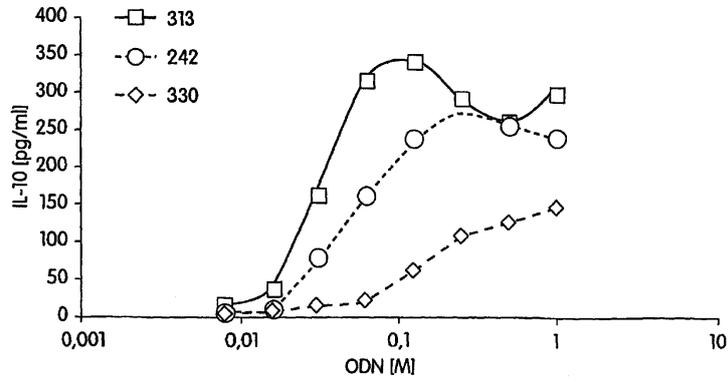
도면6B



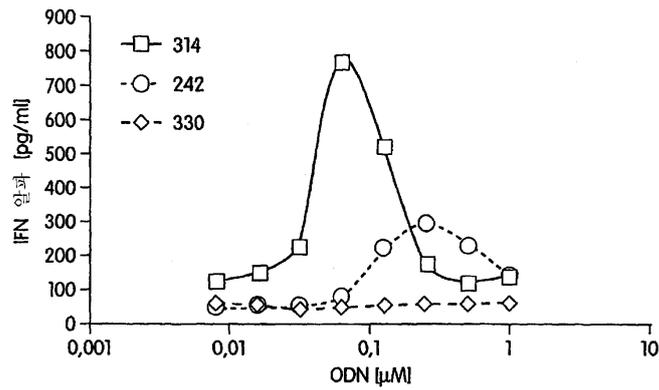
도면7A



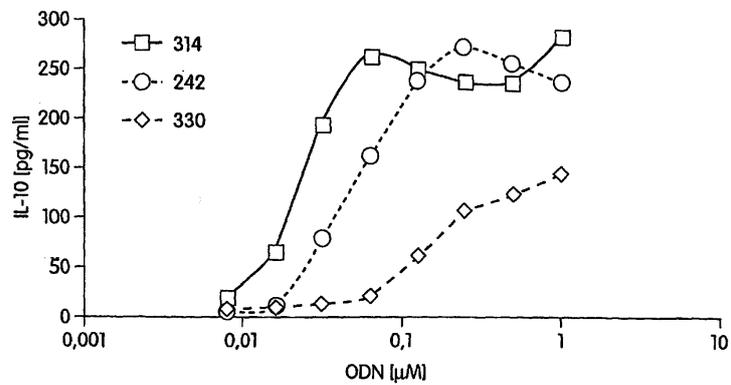
도면7B



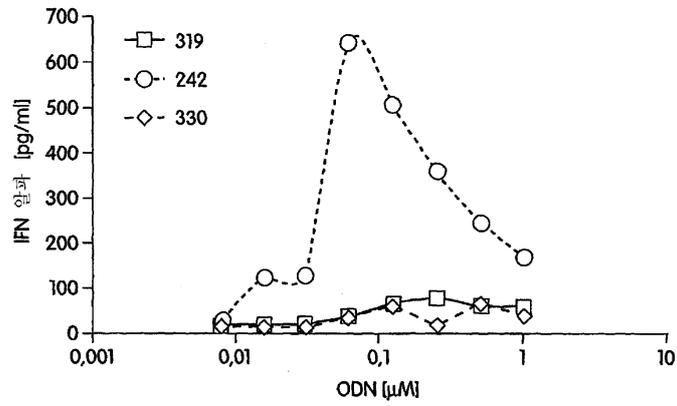
도면8A



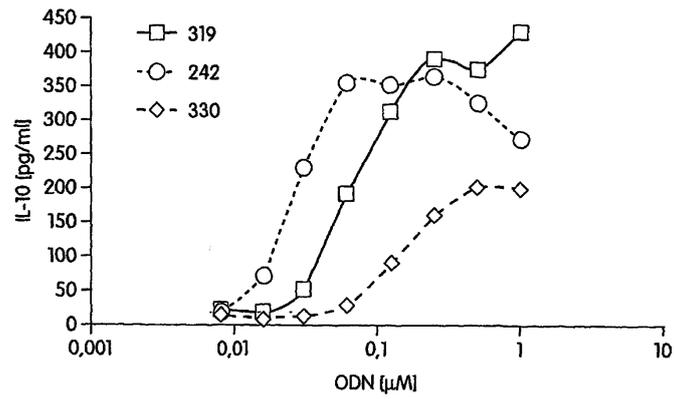
도면8B



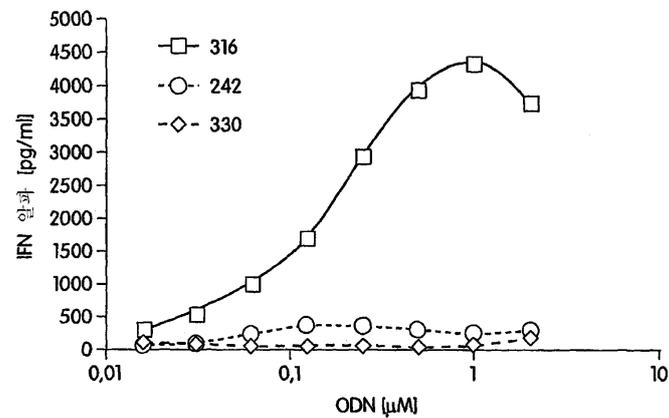
도면9A



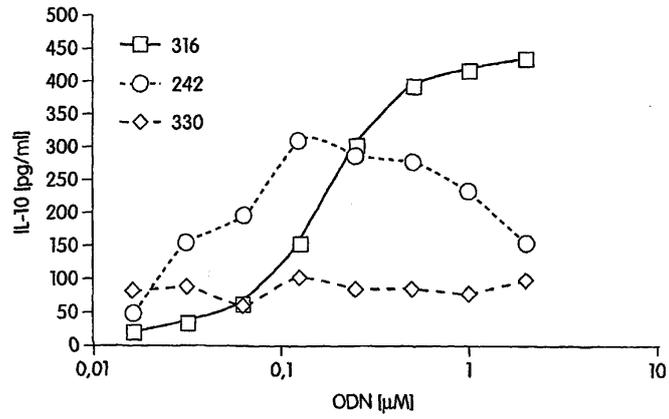
도면9B



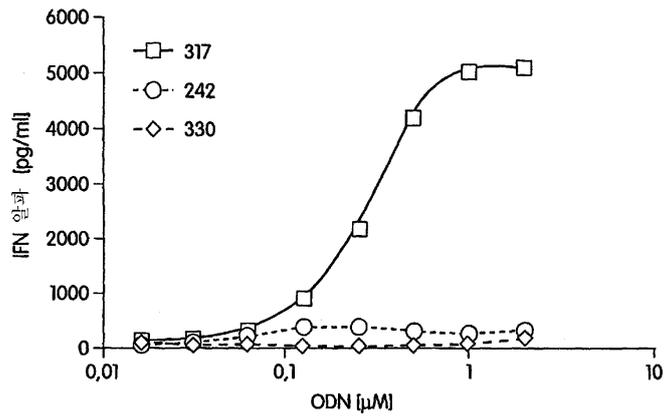
도면10A



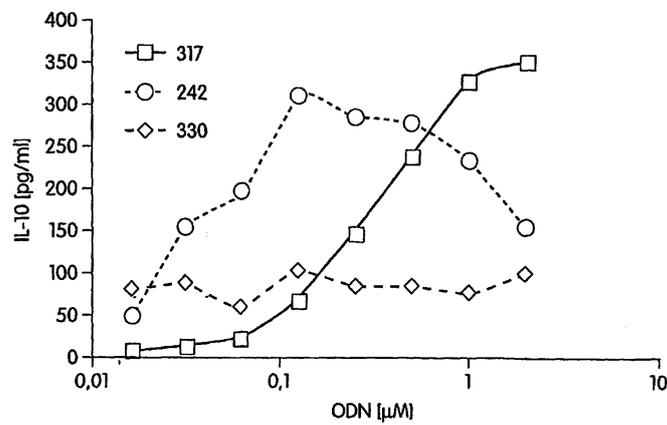
도면10B



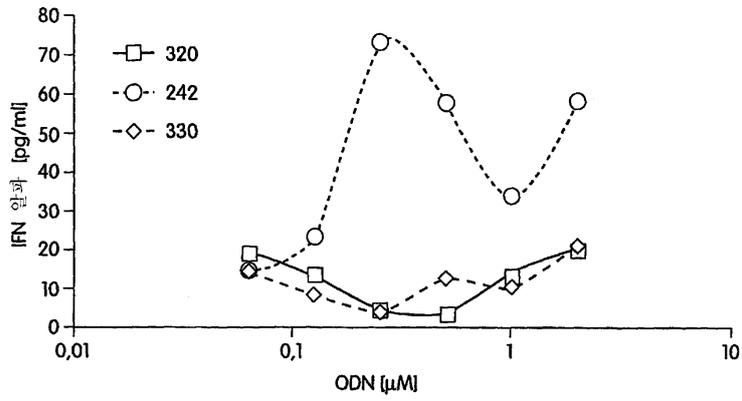
도면11A



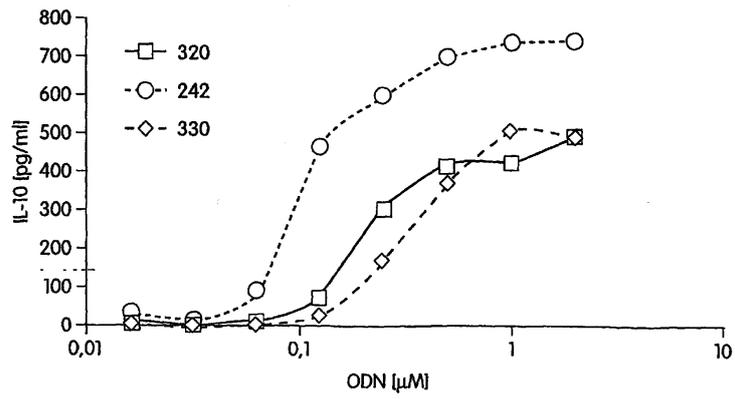
도면11B



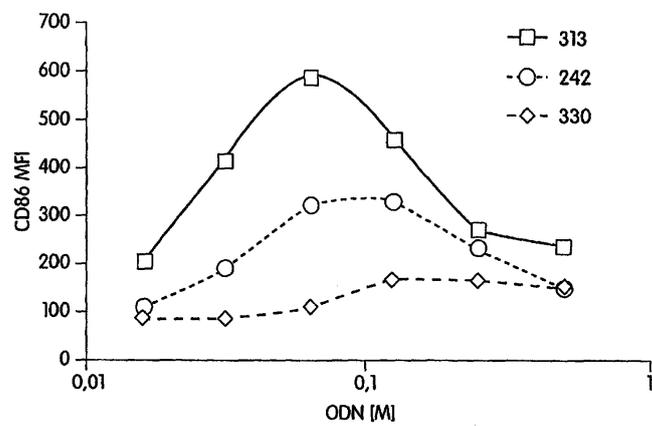
도면12A



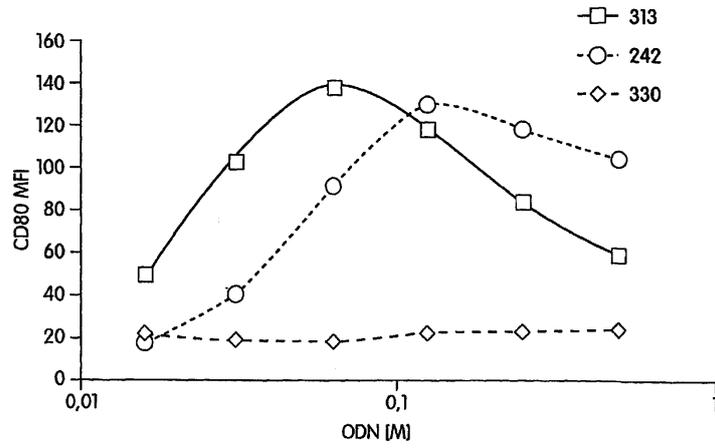
도면12B



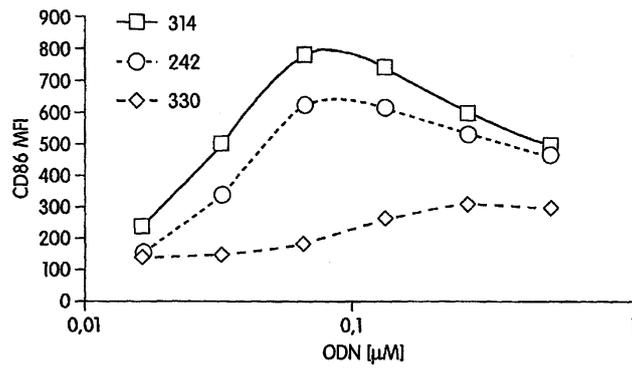
도면13A



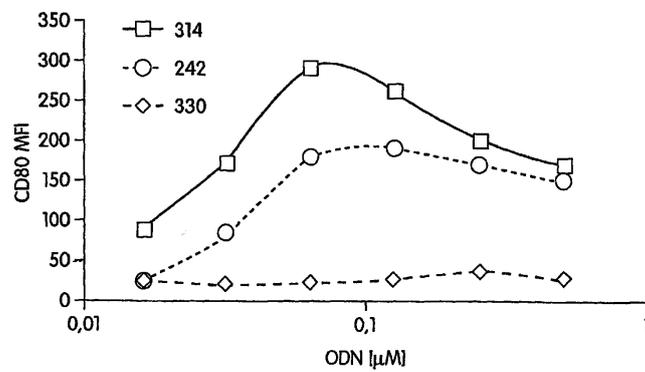
도면13B



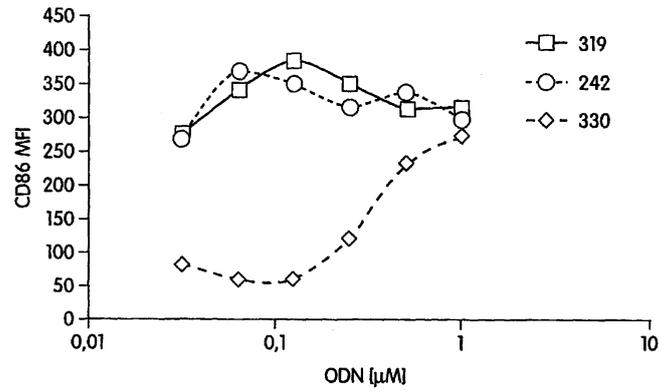
도면14A



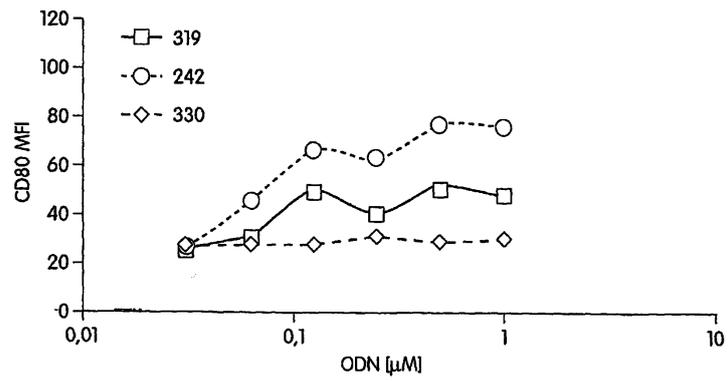
도면14B



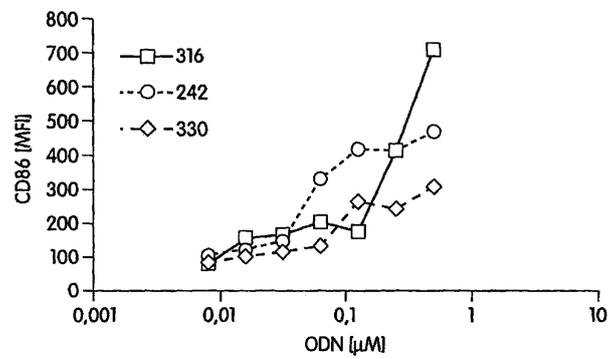
도면15A



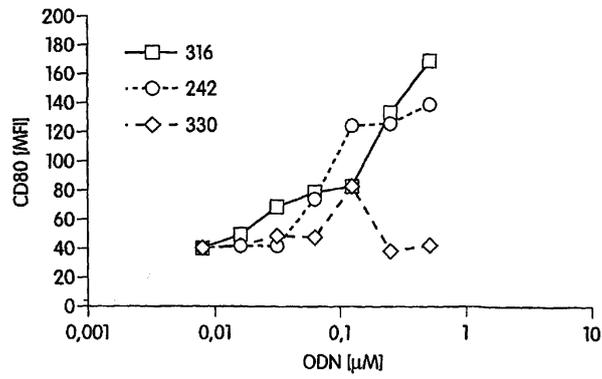
도면15B



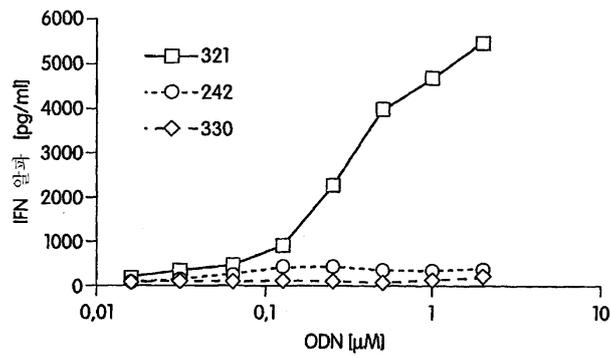
도면16A



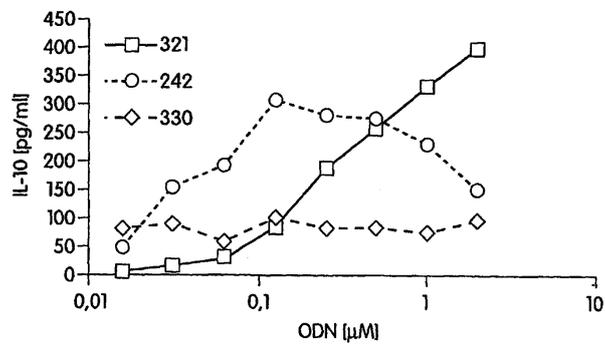
도면16B



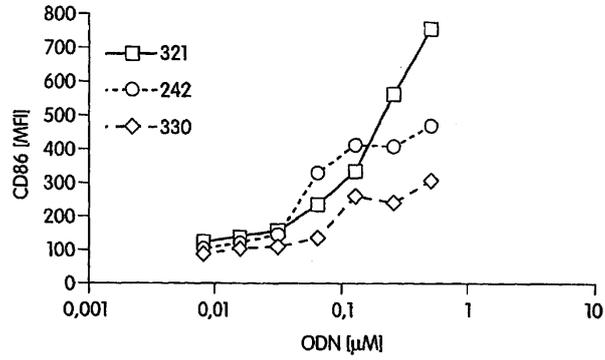
도면17A



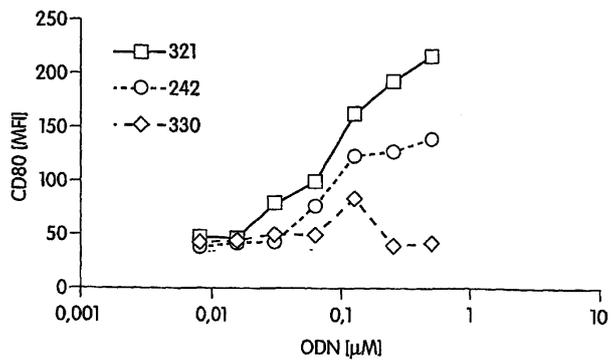
도면17B



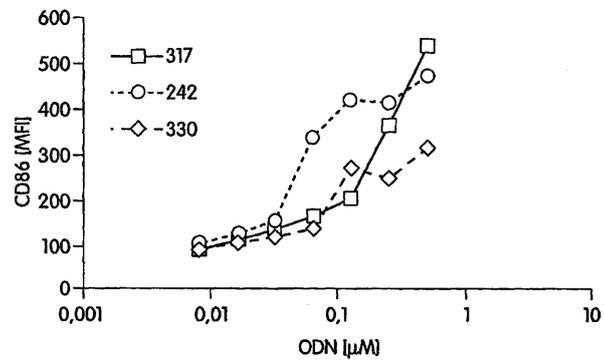
도면18A



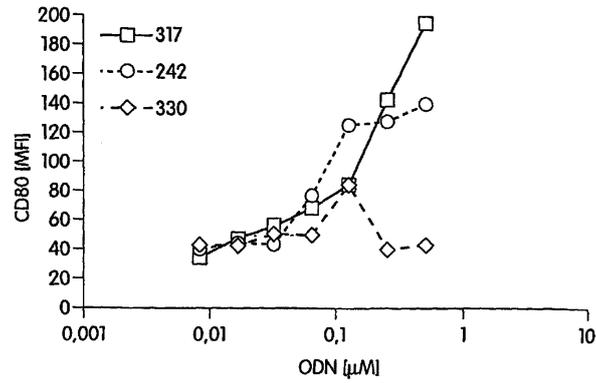
도면18B



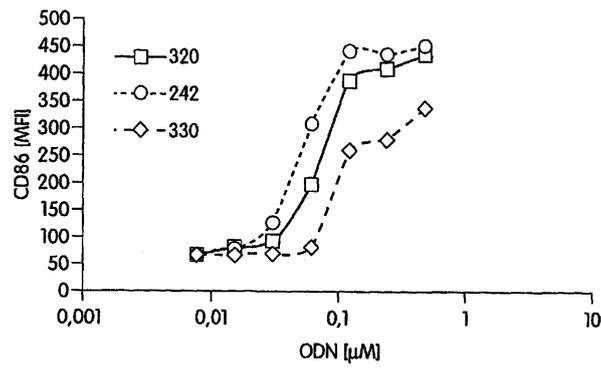
도면19A



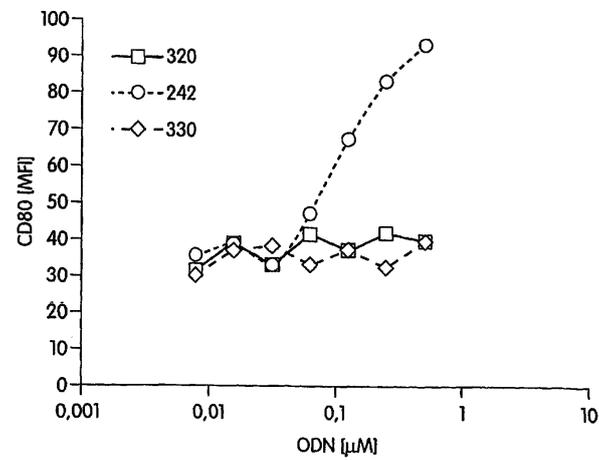
도면19B



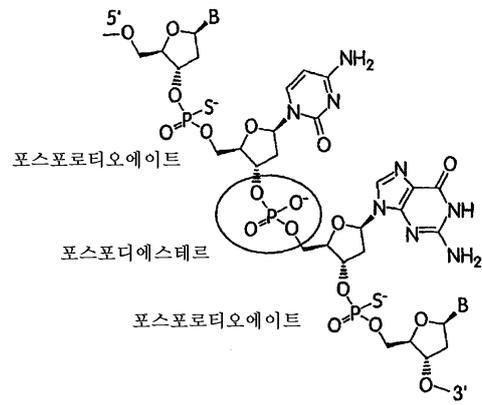
도면20A



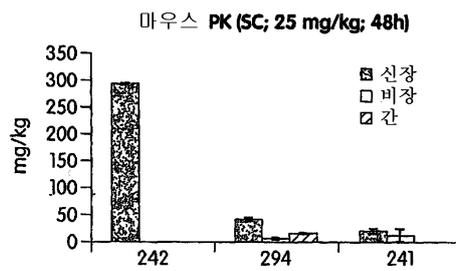
도면20B



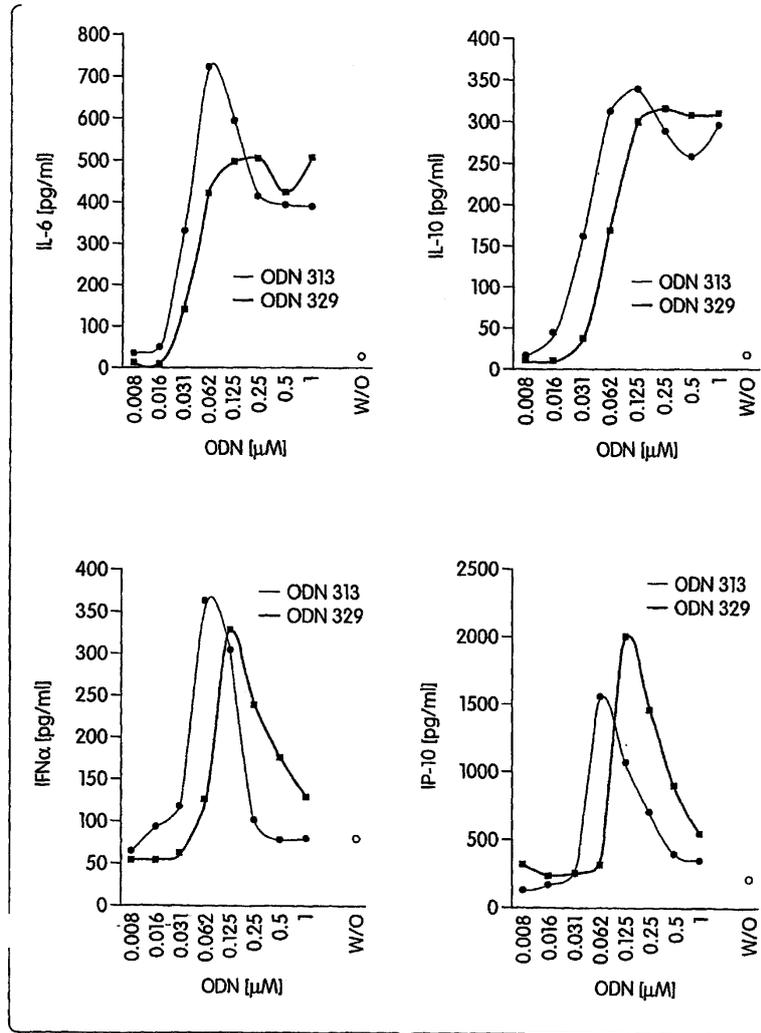
도면21



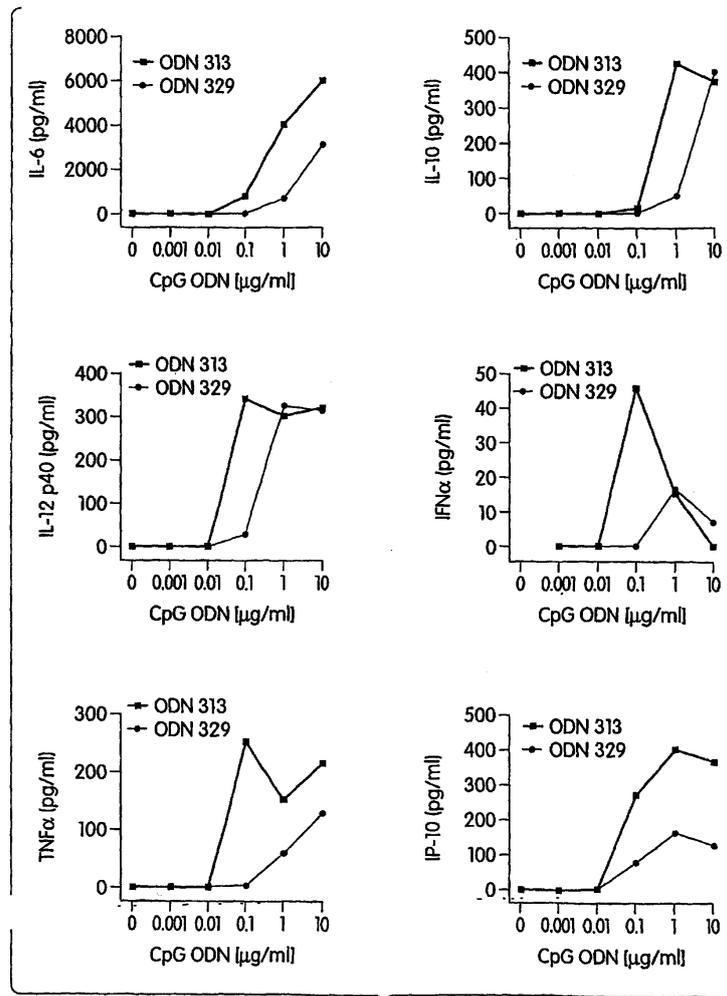
도면22



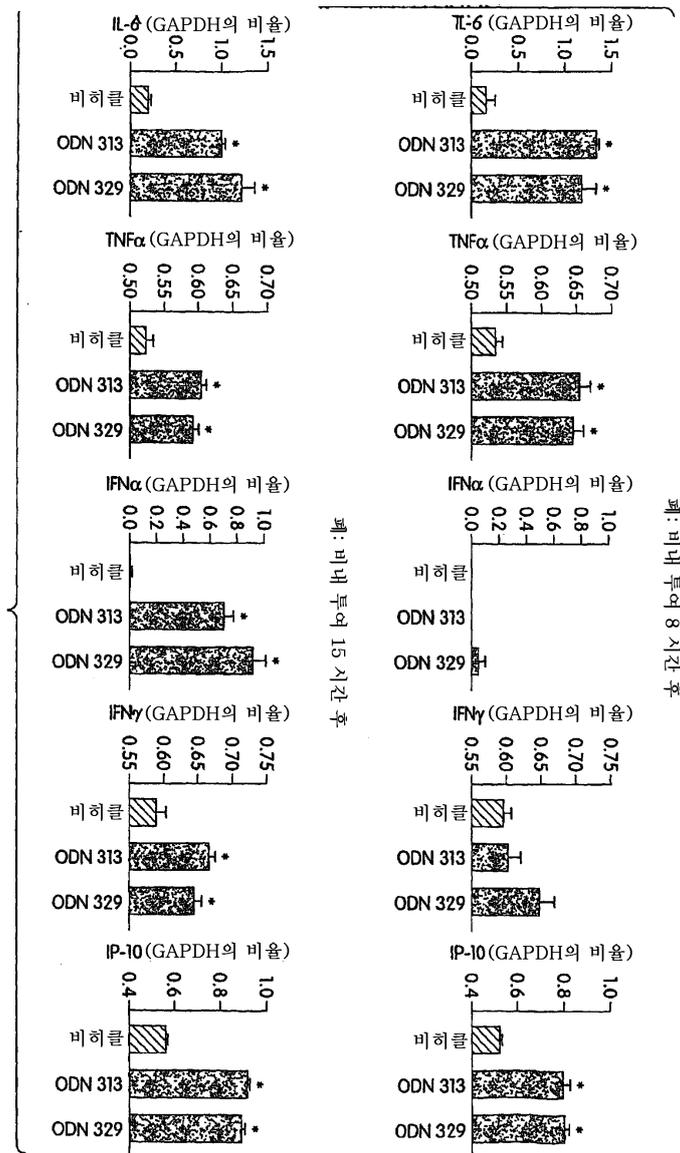
도면23



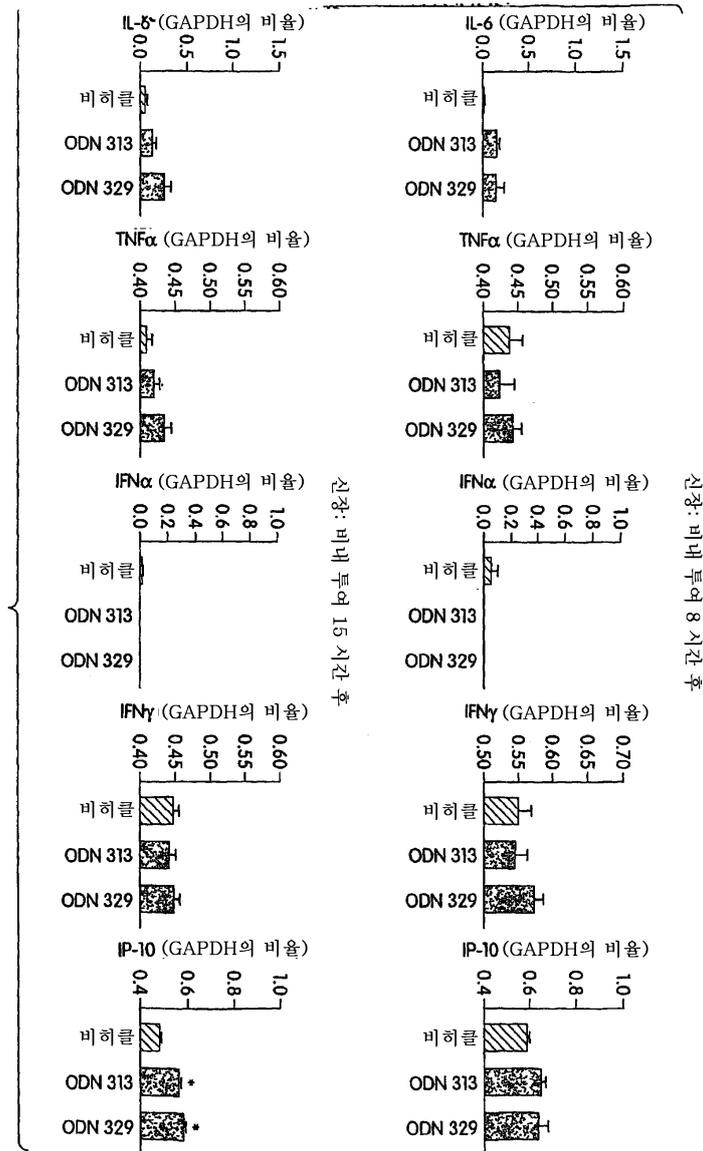
도면24



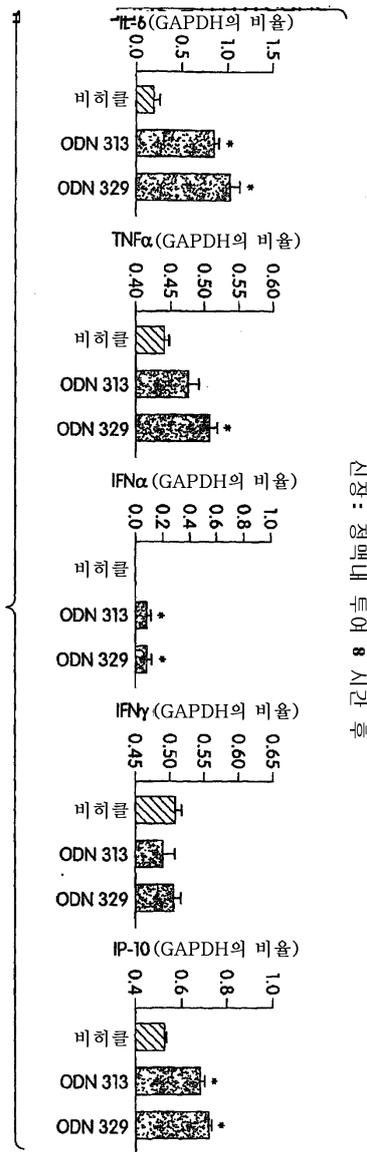
도면25A



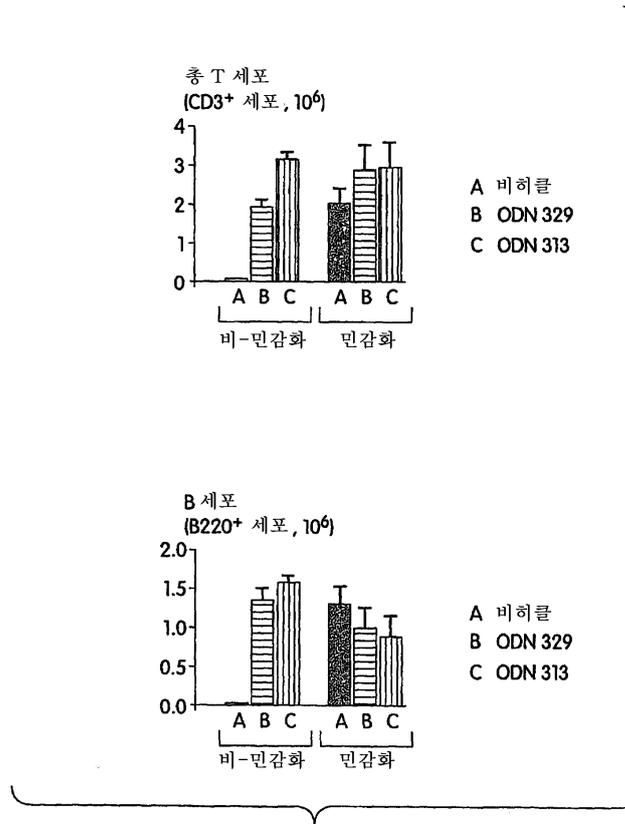
도면25B1



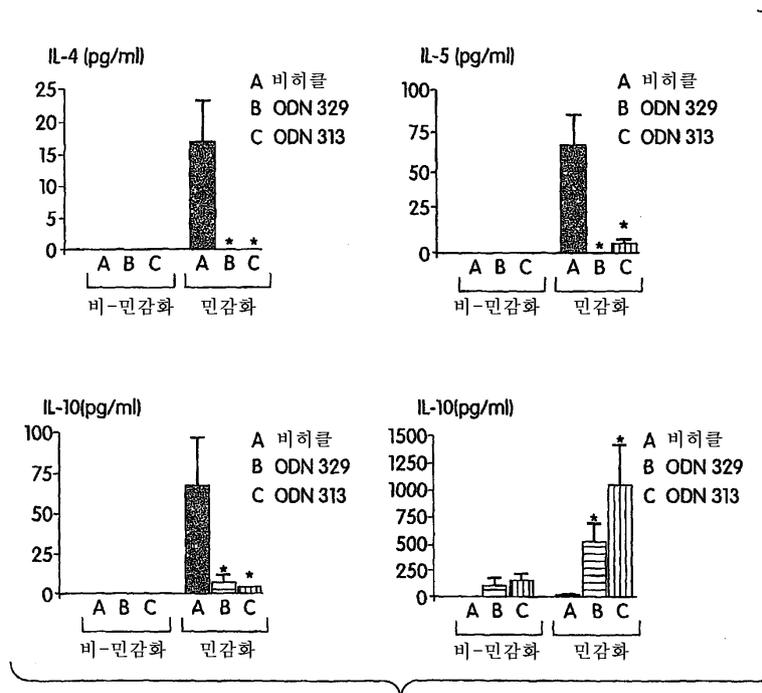
도면25B2



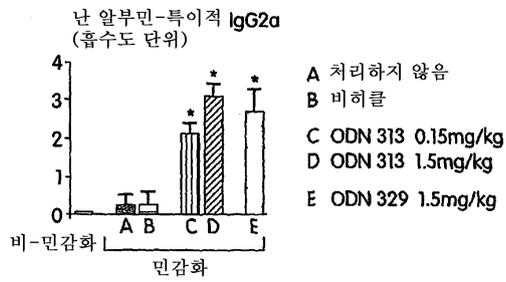
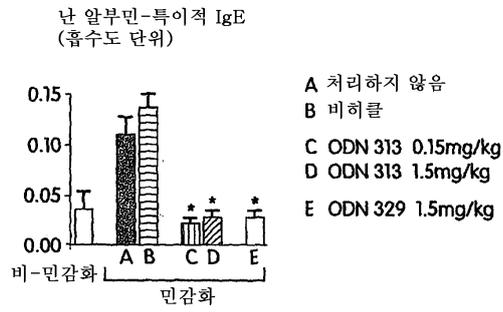
도면26



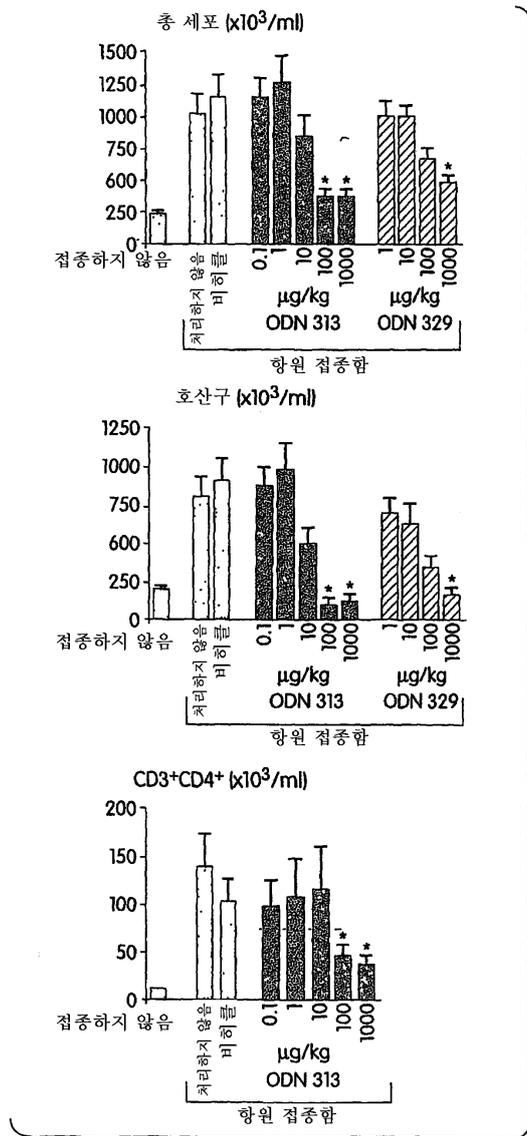
도면27



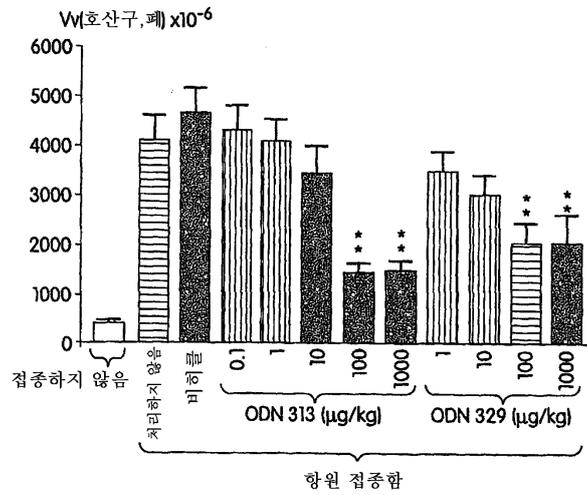
도면28



도면29

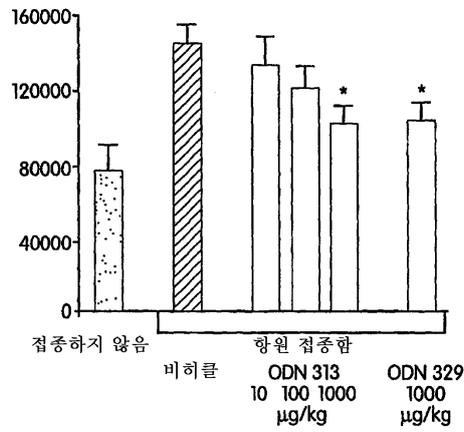


도면30

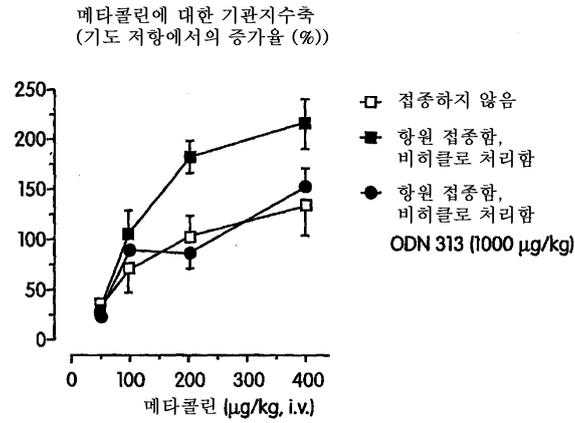


도면31

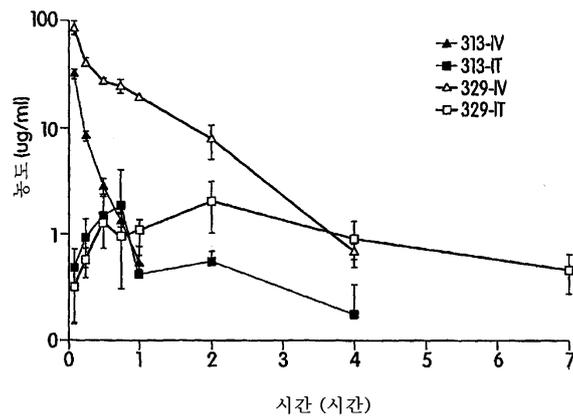
메타콜린에 대한 기관지수축  
(기도 저항 곡선 하부 면적)



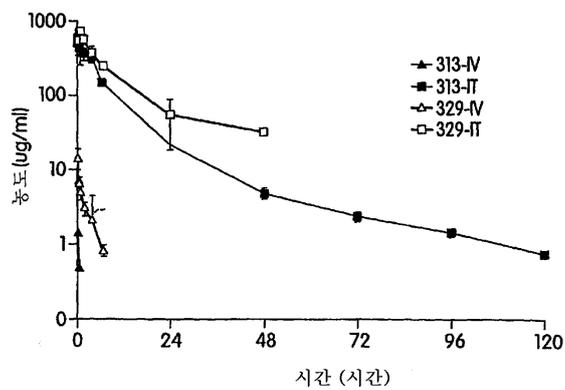
도면32



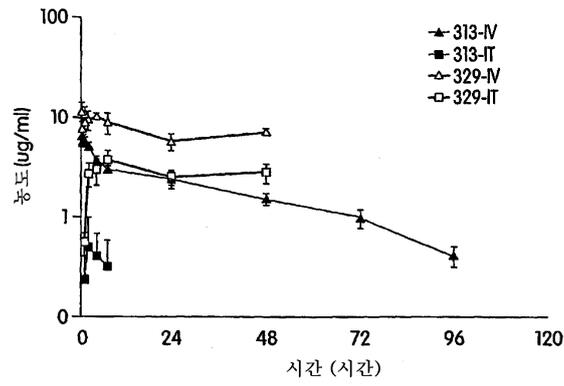
도면33



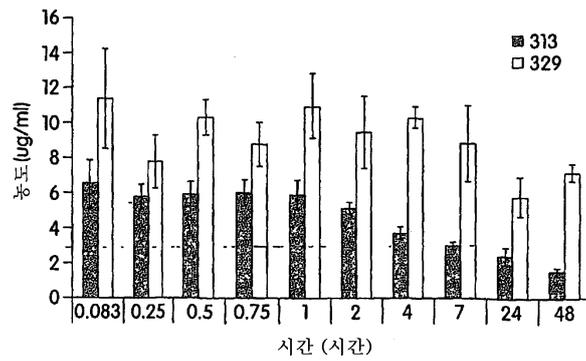
도면34



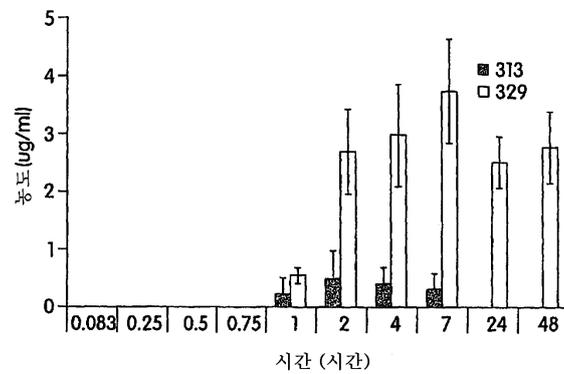
도면35



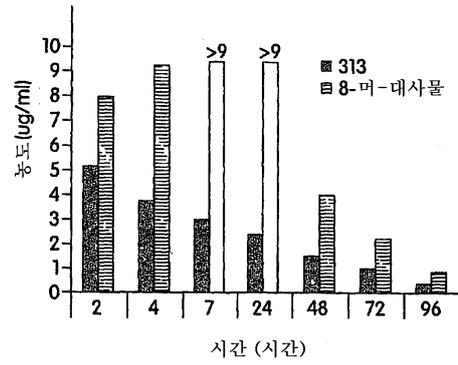
도면36



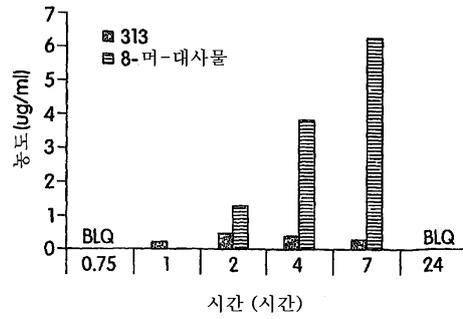
도면37



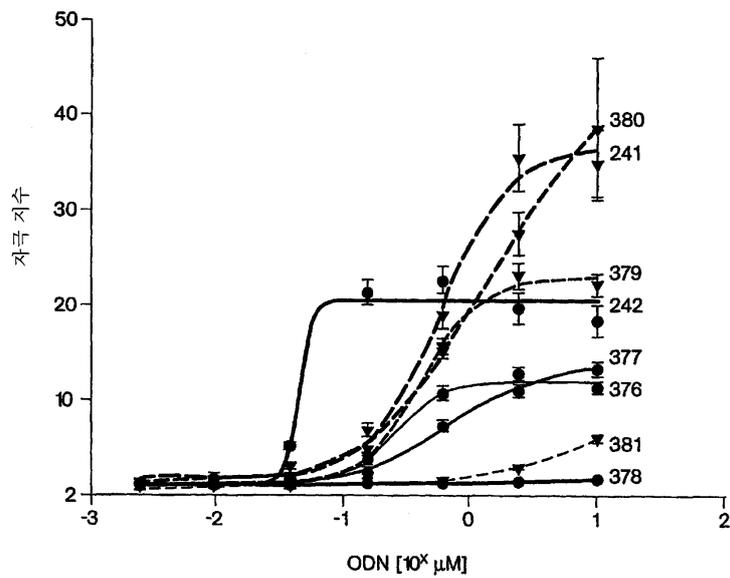
도면38



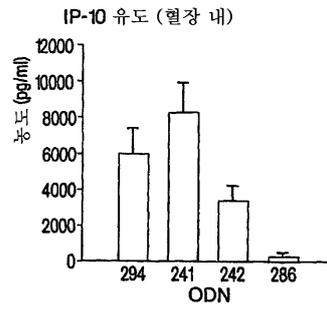
도면39



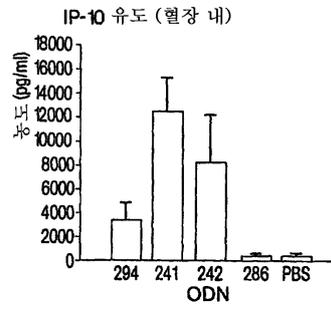
도면40



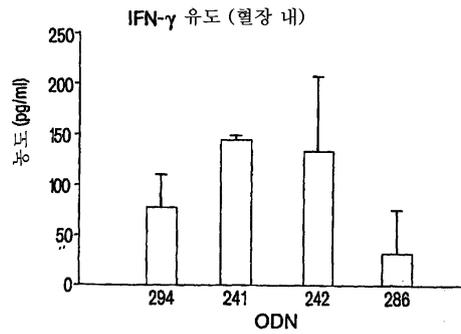
도면41A



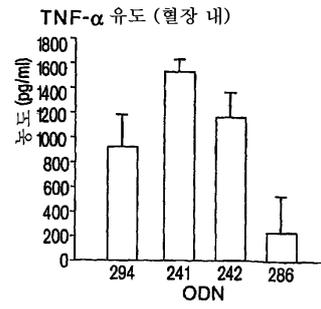
도면41B



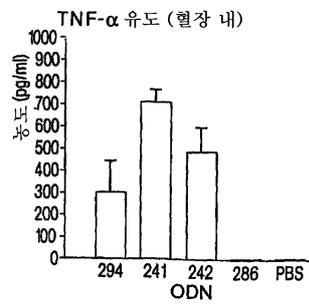
도면41C



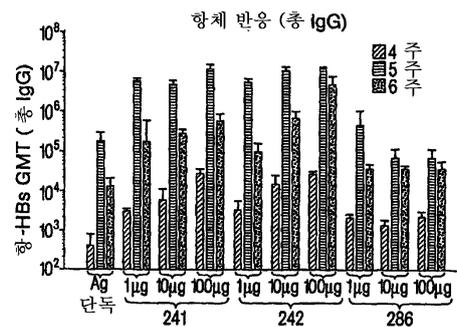
도면41D



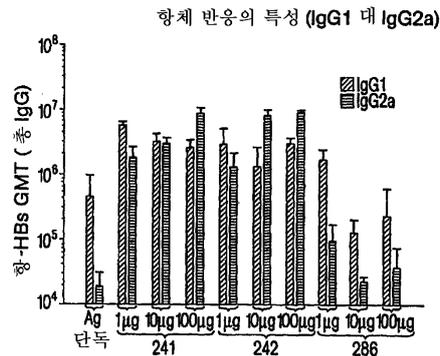
도면41F



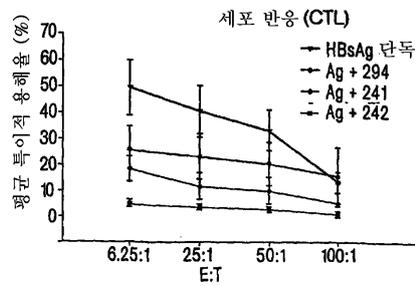
도면42A



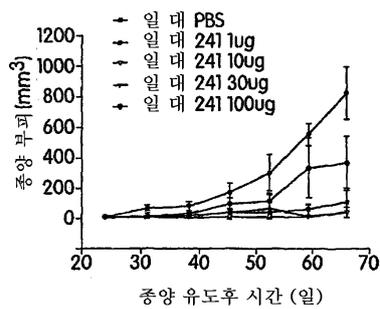
도면42B



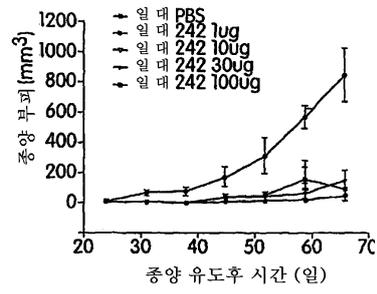
도면42C



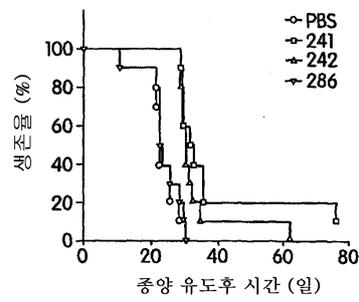
도면43A



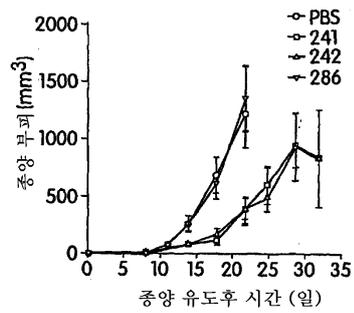
도면43B



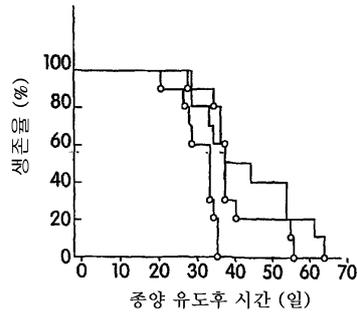
도면43C



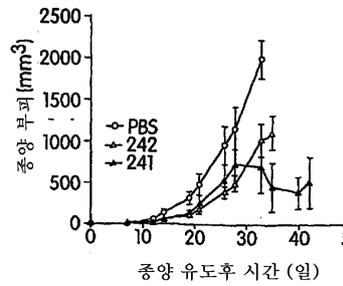
도면43D



도면43E



도면43F



서열목록

<110> COLEY PHARMACEUTICAL GROUP, INC.

COLEY PHARMACEUTICAL GmbH

<120> IMMUNOSTIMULATORY NUCLEIC ACIDS

<130> C01037.70048.US

<140> US 60/404,820

<141> 2003-08-06

<150> US 60/404,479

<151> 2002-08-19

<150> US 60/447,377

<151> 2003-02-14

<150> US 60/404,820

<151> 2002-08-19

<160> 388

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 1

acgtcgtttt cgtcgtt

17

<210> 2

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 2

gcgtcgacgt cgacgc

16

<210> 3

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 3

gcgtcgtttt cgtcgc

16

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 4

tccatgacgt tctgatgc

19

<210> 5

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 5

tcgtcgtttt cgtcgtt

17

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 6

tcgtcgtttt cggcggccgc cg

22

<210> 7

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 7

tcgtcgtttt cgtcgtt 17

<210> 8  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 8  
 tcgtcgtttc gtcgtt 16

<210> 9  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 9  
 tcgtcgtttt cgtcgtt 17

<210> 10  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 10  
 tcgtcgtttt cgtcgtt 17

<210> 11  
 <211> 17  
 <212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 11

tcgtcgtttt cgtcggt

17

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<220>

<221> misc\_feature

<222> (3)..(3)

<223> dezaguanine

<220>

<221> misc\_feature

<222> (6)..(6)

<223> dezaguanine

<400> 12

tcntcntttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<220>

<221> misc\_feature

<222> (3)..(3)

<223> dezaguanine

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (22)..(22)  
 <223> dezaguanine

<400> 13  
 tcntcgtttt gtcgttttgt cntt 24

<210> 14  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Oligodeoxynucleotide

<400> 14  
 tcgccgtttt cggcggccgc cg 22

<210> 15  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Oligodeoxynucleotide

<400> 15  
 tcgtcgtttt acgacgtcgc g 21

<210> 16  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Oligodeoxynucleotide  
 <400> 16  
 tcgtcgtttt acgacgtcgt g 21

<210> 17  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 17  
 tcgtcgtttt acggcgccgc gccg 24

<210> 18  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1)  
 <223> N is a, c, g, or t with a phosphorothioate link, 3-10 nucleotides

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (2)..(2)  
 <223> N is a, c, g, or t, 0-20 nucleotides

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (15)..(15)  
 <223> N is a, c, g, or t, 0-20 nucleotides

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (16)..(16)  
 <223> N is a, c, g, or t with a phosphorothioate link, 3-10 nucleotides

<400> 18  
 nngtcgttgt cgttnn 16

<210> 19  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<220>

<221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1)  
 <223> N is a, c, g, or t, with a phosphorothioate link, 3-10 nucleotides

<220>

<221> misc\_feature  
 <222> (2)..(2)  
 <223> N is a, c, g, or t, 0-20 nucleotides

<220>

<221> misc\_feature  
 <222> (27)..(27)  
 <223> N is a, c, g, or t, 0-20 nucleotides

<220>

<221> misc\_feature  
 <222> (28)..(28)  
 <223> N is a, c, g, or t, with a phosphorothioate link, 3-10 nucleotides

<400> 19

nngtcgttgt cgttgctggt gtcgttnn

28

<210> 20  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<220>

<221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1)  
 <223> N is a, c, g, or t, with a phosphorothioate link, 3-10 nucleotides

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (2)..(2)  
 <223> N is a, c, g, or t, 0-20 nucleotides

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (33)..(33)  
 <223> N is a, c, g, or t, 0-20 nucleotides

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (34)..(34)  
 <223> N is a, c, g, or t, with a phosphorothioate link, 3-10 nucleotides

<400> 20  
 nngtcgttgt cgttgcgtt gtcgtgtcg tttn 34

<210> 21  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
 <220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 21  
 tcgtcgtttt cggcgcgcgc cg 22

<210> 22  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Oligodeoxynucleotide

<400> 22

tcgtcgtttt cgtcgtt 17

<210> 23  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 23  
 tcgtcgtttt cgtcgtt 17

<210> 24  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 24  
 tcgtcgtttt cgtcgtt 17

<210> 25  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 25  
 tcgtcgtttt ggcacgtcgc g 21

<210> 26  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 26

tcgtcgtttt tcgacgtcga g

21

<210> 27

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 27

tcgtcgtttt tcgacgtcgc g

21

<210> 28

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<220>

<221> misc\_feature

<222> (6)..(6)

<223> dezaguanine

<220>

<221> misc\_feature

<222> (19)..(19)

<223> dezaguanine

<400> 28

tcgtcntttt gtcgtttnt cgtt

24

<210> 29

<211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 29  
 tcgtcgtttc gacgtt 16

<210> 30  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 30  
 tcgtcgtttc gacgttttgt cggt 24

<210> 31  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 31  
 tcgtcgtttc gtcgacgtcg tttcgtcg 28

<210> 32  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 32  
tcgtcgtttc gtcgat 16

<210> 33  
<211> 17  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 33  
tcgtcgtttc gtcgatt 17

<210> 34  
<211> 15  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 34  
tcgtcgtttc gtcgt 15

<210> 35  
<211> 16  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 35  
tcgtcgtttc gtcgatt 16

<210> 36  
<211> 24  
<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 36

tcgtcgtttc gtcgtttcgt cggt

24

<210> 37

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 37

tcgtcgtttc gtcgttttgt cggt

24

<210> 38

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 38

tcgtcgtttg tcgtcggcgg ccgccg

26

<210> 39

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 39  
tcgtcgtttt cggcgcgcgc cg 22

<210> 40  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 40  
tcgtcgtttt cggcggccgc cg 22

<210> 41  
<211> 17  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 41  
tcgtcgtttt cgtcgtt 17

<210> 42  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 42  
tcgtcgtttt cggcgcgcgc cg 22

<210> 43  
<211> 22  
<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 43

tcgtcgtttt cggcggccgc cg

22

<210> 44

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 44

tcgtcgtttt cgtcgt

16

<210> 45

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 45

tcgtcgtttt cgtcgtt

17

<210> 46

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 46

tcgtcgtttt cgttggt 17

<210> 47  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 47  
 tcgtcgtttt gtcgtcgtt t 21

<210> 48  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 48  
 tcgtcgtttt ttttcgtcgt ttt 23

<210> 49  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
 <220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 49  
 tcgtcgtttt tgcgtt 17

<210> 50  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 50

tcgtcgtttt tgttggt

17

<210> 51

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<220>

<221> misc\_feature

<222> (11)..(11)

<223> dezaguanine

<220>

<221> misc\_feature

<222> (14)..(14)

<223> dezaguanine

<400> 51

tcgtcgtttt ntcnttttgt cggt

24

<210> 52

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 52

tcgtcgtttt gacggt

16

<210> 53

<211> 18

<212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
 <220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 53  
 tcgtcgtttt gacgtttt 18

<210> 54  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 54  
 tcgtcgtttt gacgttttgt cgtt 24

<210> 55  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 55  
 tcgtcgtttt gacgttttgt cgtt 24

<210> 56  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 56

tcgtcgtttt gtcggt

16

<210> 57  
 <211> 40  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<220>

<221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1)  
 <223> N is a, c, g, or t, with a phosphorothioate link, 3-10 nucleotides

<220>

<221> misc\_feature  
 <222> (2)..(2)  
 <223> N is a, c, g, or t, 0-20 nucleotides

<220>

<221> misc\_feature  
 <222> (39)..(39)  
 <223> N is a, c, g, or t, 0-20 nucleotides

<220>

<221> misc\_feature  
 <222> (40)..(40)  
 <223> N is a, c, g, or t, with a phosphorothioate link, 3-10 nucleotides

<400> 57

nngtcgttgt cgttgcggtt gtcggtgctg ttgctgttnn

40

<210> 58  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (19)..(19)  
 <223> dezaguanine

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (22)..(22)  
 <223> dezaguanine

<400> 58  
 tcgtcgtttt gtcgtttnt cntt 24

<210> 59  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Oligodeoxynucleotide

<400> 59  
 tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 60  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Oligodeoxynucleotide

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (10)..(10)  
 <223> 2'-deoxyuracil

<400> 60  
 tcgtcgtttn gtcgttt 17

<210> 61  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (10)..(10)  
 <223> 2'-deoxyuracil

<400> 61  
 tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt 24

<210> 62  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 62  
 tcgtcgtttg cgtcgt 16

<210> 63  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 63  
 tcgtcgtttg cgtcgtt 17

<210> 64  
 <211> 14

<212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
 <220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 64  
 tcgtcgtttg tcgt 14

<210> 65  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 65  
 tcgtcgtttg tcggt 15

<210> 66  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (7)..(9)  
 <223> 2'-deoxyuracil

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (15)..(18)  
 <223> 2'-deoxyuracil

<400> 66  
 tcgtcgnnnc gtcgnnnngt cggt 24

<210> 67  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 67  
 tcgttttgtc gtttt 15

<210> 68  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
 <220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 68  
 tcgttttgtc gttttttt 19

<210> 69  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 69  
 tcgttttttt tcgtttt 17

<210> 70  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 70

tcgttgtttt cgtcgtt

17

<210> 71

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 71

tcgttgtttt cgttggt

17

<210> 72

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 72

tcgttgtttt tgcgtt

17

<210> 73

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 73

tcgttgtttt tgttggt

17

<210> 74

<211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<220>

<221> misc\_feature  
 <222> (4)..(4)  
 <223> 2'-deoxyuracil

<220>

<221> misc\_feature  
 <222> (18)..(18)  
 <223> 2'-deoxyuracil

<220>

<221> misc\_feature  
 <222> (20)..(20)  
 <223> 2'-deoxyuracil

<400> 74

tcgncgtttt gtcgtttngn cgtt 24

<210> 75

<211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 75

tgtcgttgtc gttgctgtg tcggt 25

<210> 76

<211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 76

tgtcgttgtc gttgctgtg tcggt

25

<210> 77

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 77

tgtcgtttcg tcggt

15

<210> 78

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 78

tgtcgttttg tcggt

15

<210> 79

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 79

ttagttcgta gttcttcggt

20

<210> 80  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 80  
 ttcgtcgttt cgtcggtt 17

<210> 81  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 81  
 ttcgtcgttt cgtcggtt 18

<210> 82  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 82  
 ttcgtcgttt tgcggtt 17

<210> 83  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 83  
 ttcggttctta gttcgtagtt 20

<210> 84  
 <211> 14  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 84  
 tttcgacgtc gttt 14

<210> 85  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 85  
 ttttcgtcgt tttgctcgcg t 21

<210> 86  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
 <220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 86  
 ttttcgtcgt tttgctcgcg tttt 24

<210> 87  
 <211> 23  
 <212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 87

ttttcgtcgt ttttttcgt cgt

23

<210> 88

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 88

ttttcgtcgt ttttttcgt cgtttt

26

<210> 89

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 89

ttttcgtcgt ttgtcgtcg tttt

24

<210> 90

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 90

ttttcgtttt gtcgt 15

<210> 91  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 91  
 ttttcgtttt gtcgtttt 18

<210> 92  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 92  
 ttttcgtttt ttttcgt 17

<210> 93  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 93  
 ttttcgtttt ttttcgtttt 20

<210> 94  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 94

ttttcgtttt gtcgtttt

18

<210> 95

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 95

ttttttttcg tttgtcgt

19

<210> 96

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 96

ttgtcgtttt cgtcgtt

17

<210> 97

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 97

ttgtcgtttt cgttggt

17

<210> 98  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 98  
 ttgtcgtttt tgcggt 17

<210> 99  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 99  
 ttgtcgtttt tgttgt 17

<210> 100  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 100  
 tcgtcgtttt gtcgtttgtc gtt 23

<210> 101  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 101

tcgtcgtttt gtcgtt

16

<210> 102

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 102

tcgtcgtttc gtcgtt

16

<210> 103

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 103

tgtcgttgtc gttgctgtg tcgtt

25

<210> 104

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 104

tcgtcgtttt cggcggccgc cg 22

<210> 105  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Oligodeoxynucleotide

<400> 105  
 tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 106  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Oligodeoxynucleotide

<400> 106  
 tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 107  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Oligodeoxynucleotide

<400> 107  
 tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 108  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 108

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 109

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 109

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 110

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 110

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 111

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 111

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 112  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 112  
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 113  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 113  
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 114  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 114  
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 115  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 115

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 116

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 116

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 117

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 117

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 118

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 118

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 119

<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 119  
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 120  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 120  
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 121  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 121  
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 122  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 122  
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 123  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 123  
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 124  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 124  
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 125  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 125  
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 126  
<211> 24  
<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 126

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 127

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 127

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 128

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 128

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 129

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 129

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 130  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 130  
 tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 131  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 131  
 tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 132  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 132  
 tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 133  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 133

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 134

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 134

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 135

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 135

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 136

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 136

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 137  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 137  
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 138  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 138  
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 139  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 139  
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 140  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 140

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 141

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 141

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 142

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 142

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 143

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 143

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 144  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 144  
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 145  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 145  
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 146  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 146  
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 147  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 147

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 148

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 148

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 149

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 149

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 150

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 150

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 151  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 151  
tcgctgtttt gtcgttttgt cggt 24

<210> 152  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 152  
tcgctgtttt gtcgttttgt cggt 24

<210> 153  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 153  
tcgctgtttt gtcgttttgt cggt 24

<210> 154  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 154  
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 155  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 155  
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 156  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 156  
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 157  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 157  
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 158  
<211> 24

<212> DNA  
<213> Artificial sequence  
<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 158  
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 159  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 159  
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 160  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 160  
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 161  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 161

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 162  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 162  
 tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 163  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 163  
 tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 164  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 164  
 tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 165  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 165

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 166

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 166

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 167

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 167

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 168

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 168

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 169  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 169  
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 170  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 170  
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 171  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 171  
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 172  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 172

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 173

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 173

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 174

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 174

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 175

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 175

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 176  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 176  
 tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 177  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 177  
 tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 178  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 178  
 tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 179  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 179

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 180

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 180

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 181

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 181

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 182

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 182

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 183  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 183  
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 184  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 184  
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 185  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 185  
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 186  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 186

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 187

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 187

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 188

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 188

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 189

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 189

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 190

<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 190  
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 191  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 191  
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 192  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 192  
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 193  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 193  
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 194  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 194  
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 195  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 195  
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 196  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 196  
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 197  
<211> 24  
<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 197

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 198

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 198

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 199

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 199

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 200

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 200

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 201  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Oligodeoxynucleotide

<400> 201  
 tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 202  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Oligodeoxynucleotide

<400> 202  
 tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 203  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Oligodeoxynucleotide

<400> 203  
 tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 204  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 204

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 205

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 205

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 206

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 206

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 207

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 207

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 208  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 208  
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 209  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 209  
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 210  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 210  
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 211  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 211

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 212

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 212

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 213

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 213

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 214

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 214

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 215

<211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 215  
 tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 216  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 216  
 tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 217  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 217  
 tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 218  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 218  
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 219  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 219  
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 220  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 220  
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 221  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 221  
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 222  
<211> 24  
<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 222

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 223

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 223

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 224

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 224

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 225

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 225

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 226  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 226  
 tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 227  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 227  
 tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 228  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 228  
 tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 229  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 229

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 230

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 230

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 231

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 231

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 232

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 232

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 233  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 233  
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 234  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 234  
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 235  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 235  
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 236  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 236

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 237

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 237

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 238

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 238

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 239

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 239

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 240  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 240  
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 241  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 241  
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 242  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 242  
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgt 23

<210> 243  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 243

tgtcgttgtc gttgctgttg tcgtt

25

<210> 244

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 244

tgtcgttgtc gttgctgttg tcgtt

25

<210> 245

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 245

tcgtcgtttc gtcgtt

16

<210> 246

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 246

tcgtcgtttt gtcgtt

16

<210> 247  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 247  
tcgtcgtttt cggcggccgc cg 22

<210> 248  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 248  
tcgccgtttt cggcggccgc cg 22

<210> 249  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 249  
tcgccgtttt cggcggccgc cg 22

<210> 250  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 250  
tcgtcgtttt cggcggccgc cg 22

<210> 251  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 251  
tcgtcgtttt cggcggccgc cg 22

<210> 252  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 252  
tcgccgtttt cggcggccgc cg 22

<210> 253  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 253  
tcgccgtttt cggcggccgc cg 22

<210> 254  
<211> 22

<212> DNA  
<213> Artificial sequence  
<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 254  
tcgtcgtttt cggcggccgc cg 22

<210> 255  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 255  
tcgtcgtttt cggcggccgc cg 22

<210> 256  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 256  
tcgtcgtttt cggcggccgc cg 22

<210> 257  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 257

tcgtcgtttt cggcggccgc cg 22

<210> 258  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 258  
 tgtcgttgc gttgcttg tcgtt 25

<210> 259  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 259  
 tcgtcgtttc gtcgtttgt cgtt 24

<210> 260  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 260  
 tcgtcgtttc gtcgtttgt cgtt 24

<210> 261  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 261

tcgtcgtttt gacgttttgt cgtt

24

<210> 262

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 262

tcgtcgtttc gacgttttgt cgtt

24

<210> 263

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 263

tcgtcgtttt gacgttttgt cgtt

24

<210> 264

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 264

tcgtcgtttt gacgttttgt cgtt

24

<210> 265  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 265  
tcgtcgtttt gacgtttt 18

<210> 266  
<211> 16  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 266  
tcgtcgtttt gacgtt 16

<210> 267  
<211> 16  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 267  
tcgtcgtttc gacgtt 16

<210> 268  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 268

gttctcgctg gtgagtttca

20

<210> 269

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 269

gttctcgctg gtgagtttca

20

<210> 270

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 270

tcgtcgtttc gtcgtttcgt cgtt

24

<210> 271

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 271

tcgtcgtttc gtcgtttcgt cgtt

24

<210> 272  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<220>

<221> misc\_feature  
 <222> (10)..(10)  
 <223> 2'-deoxyuracil

<400> 272  
 tcgtcgtttn gtcgttttgt cgtt

24

<210> 273  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<220>

<221> misc\_feature  
 <222> (10)..(10)  
 <223> 2'-deoxyuracil

<400> 273  
 tcgtcgtttn gtcgttttgt cgtt

24

<210> 274  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<220>

<221> misc\_feature

<222> (10)..(10)

<223> 2'-deoxyuracil

<400> 274

tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt

24

<210> 275

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 275

tcgcgtcgtt cggcgcgcgc cg

22

<210> 276

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 276

tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt

24

<210> 277

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<220>

<221> misc\_feature

<222> (4)..(4)  
 <223> 2'-deoxyuracil

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (18)..(18)  
 <223> 2'-deoxyuracil

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (20)..(20)  
 <223> 2'-deoxyuracil

<400> 277  
 tcgncgtttt gtcgtttngn cgtt

24

<210> 278  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Oligodeoxynucleotide

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (4)..(4)  
 <223> 2'-deoxyuracil

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (18)..(18)  
 <223> 2'-deoxyuracil

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (20)..(20)  
 <223> 2'-deoxyuracil

<400> 278  
 tcgncgtttt gtcgtttngn cgtt

24

<210> 279  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<220>

<221> misc\_feature  
 <222> (7)..(9)  
 <223> 2'-deoxyuracil

<220>

<221> misc\_feature  
 <222> (15)..(18)  
 <223> 2'-deoxyuracil

<400> 279

tcgtcgnmnt gtcgnnnngt cgtt

24

<210> 280

<211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<220>

<221> misc\_feature  
 <222> (7)..(9)  
 <223> 2'-deoxyuracil

<220>

<221> misc\_feature  
 <222> (15)..(18)  
 <223> 2'-deoxyuracil

<400> 280

tcgtcgnnnc gtcgnnnngt cgtt

24

<210> 281

<211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 281  
 aacgtcgttt tcgtcgtt 18

<210> 282  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide  
 <400> 282  
 aacgtcgttt tcgtcgtt 18

<210> 283  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 283  
 tcgtcgtttt cgtcgt 16

<210> 284  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 284

tcgtcgtttt cgtcgtt 17

<210> 285  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 285  
 aacgtcgttt tcgtcgtt 18

<210> 286  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 286  
 tgctgctttt gtgcttttgt gctt 24

<210> 287  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 287  
 tgtcgttgtc gttgctgtg tcgtt 25

<210> 288  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 288

tcgtttttt cgtttttttc gttt

24

<210> 289

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 289

tcgtcgtttt tcggtcgttt t

21

<210> 290

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 290

tcgtcgtttt tcgtgcgttt tt

22

<210> 291

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 291

tcgtcgtttt cgtttttttc gttt

24

<210> 292  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence  
<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 292  
tcgttttgc gttttttcg a 21

<210> 293  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 293  
tcgtcgtttt gtcgttttgc cgtt 24

<210> 294  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 294  
tcgtcgtttt gtcgttttgc cgtt 24

<210> 295  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 295

tcgtcgtttt cggcggccgc cg

22

<210> 296

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<220>

<221> misc\_feature

<222> (13)..(13)

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

<220>

<221> misc\_feature

<222> (16)..(16)

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

<400> 296

tcgtcgtttt gancgntt

18

<210> 297

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 297

tcgtcgtttt gaccggttcg tggt

24

<210> 298

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 298

tcgtcgtttt gacgttttgt cgtt

24

<210> 299

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 299

tcgtcgtttt gacgtttt

18

<210> 300

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 300

tcgtcgtttt gacgtt

16

<210> 301

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (7)..(7)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (14)..(14)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (17)..(17)  
 <223> n is a, c, g, or t

<400> 301  
 tcgtatncgt ttncgntt

19

<210> 302  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Oligodeoxynucleotide

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (6)..(6)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (13)..(13)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (16)..(16)  
 <223> n is a, c, g, or t

<400> 302  
 tcgatncggt ttncgntt

18

<210> 303  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Oligodeoxynucleotide

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (6)..(6)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (13)..(13)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (16)..(16)  
 <223> n is a, c, g, or t

<400> 303  
 tcgttncggtt ttncgntt 18

<210> 304  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Oligodeoxynucleotide

<400> 304  
 tcgatcgttt ttcgtgcggtt ttt 23

<210> 305  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 305

tcgttttgac gttttgtcgt t

21

<210> 306

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<220>

<221> misc\_feature

<222> (7)..(9)

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

<220>

<221> misc\_feature

<222> (12)..(12)

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

<220>

<221> misc\_feature

<222> (15)..(17)

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

<220>

<221> misc\_feature

<222> (20)..(20)

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

<400> 306

tcgtcgnnc gncgnncgn cgtt

24

<210> 307

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<220>

<221> misc\_feature

<222> (7)..(9)

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

<220>

<221> misc\_feature

<222> (12)..(12)

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

<220>

<221> misc\_feature

<222> (15)..(17)

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

<220>

<221> misc\_feature

<222> (20)..(20)

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

<400> 307

tcgtcgnnc gncgnncgn cggt

24

<210> 308

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<220>

<221> misc\_feature

<222> (12)..(12)

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

<220>

<221> misc\_feature

<222> (20)..(20)

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

<400> 308

tcgtcgttac gncgttacgn cggt

24

<210> 309

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<220>

<221> misc\_feature

<222> (7)..(9)

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

<220>

<221> misc\_feature

<222> (15)..(17)

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

<400> 309

tcgtcgnnc gtcgnncgt cggt

24

<210> 310

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 310

tcgtcgttac gtcgttacgt cggt

24

<210> 311

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<220>

<221> misc\_feature

<222> (4)..(4)

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

<220>

<221> misc\_feature

<222> (7)..(8)

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

<220>

<221> misc\_feature

<222> (11)..(11)

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

<400> 311

tcgncgncg ntcggtt

16

<210> 312

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<220>

<221> misc\_feature

<222> (4)..(4)

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

<220>

<221> misc\_feature

<222> (7)..(8)

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

<220>

<221> misc\_feature

<222> (11)..(12)

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

<220>

<221> misc\_feature

<222> (15)..(15)

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

<400> 312

tcgncgnncg nncgntcggt

20

<210> 313

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 313

tcgtcgtttt gacgttttgt cggt

24

<210> 314

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 314

tcgacgtttt gtcgttttgt cggt

24

<210> 315

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (6)..(6)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (13)..(13)  
 <223> n is a, c, g, or t

<400> 315  
 tcgcnccgcn cgn 13

<210> 316  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Oligodeoxynucleotide

<400> 316  
 tcgcnccgcn cggcgcgc cg 22

<210> 317  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Oligodeoxynucleotide

<400> 317  
 tcgcnccgcn cgcgcgcg 20

<210> 318  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<220>

<221> misc\_feature

<222> (4)..(5)

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

<220>

<221> misc\_feature

<222> (8)..(9)

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

<220>

<221> misc\_feature

<222> (14)..(14)

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

<400> 318

ttgnntgmnt tttntttttt t

21

<210> 319

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 319

ttgcgtgcgt tttgacgttt tttt

24

<210> 320

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 320

ttggctggct tttgacgttt tttt

24

<210> 321  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide  
<400> 321  
tcgcgacgtt cggcgcgcgc cg

22

<210> 322  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 322  
tcgtcgttac gtcgttacgt cggt

24

<210> 323  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 323  
tcgatcgttt ttcgtgcgtt ttt

23

<210> 324  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 324

tcgtcgtttt gacgtttt

18

<210> 325

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 325

tcgtcgtttt gacgtt

16

<210> 326

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 326

tcgttttgac gtttgcgt t

21

<210> 327

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 327

tcgtcgtttt gaccggttcg tggt

24

<210> 328

<211> 24

<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 328  
tcgtcgtttt gacgttttgt cgtt 24

<210> 329  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 329  
tcgtcgtttt gacgttttgt cgtt 24

<210> 330  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 330  
tccaggactt ctctcaggtt 20

<210> 331  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence  
<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<220>

<221> misc\_feature  
 <222> (4)..(5)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (8)..(9)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (14)..(14)  
 <223> n is a, c, g, or t

<400> 331  
 ttgnmtgmnt ttntttttt t 21

<210> 332  
 <211> 13  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Oligodeoxynucleotide

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (6)..(6)  
 <223> n is a, c, g, or t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (13)..(13)  
 <223> n is a, c, g, or t

<400> 332  
 tcgcgncgcg cgn 13

<210> 333  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 333

cgtcgttttg acgttttgc gtt

23

<210> 334

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 334

gtcgttttga cgttttgtcg tt

22

<210> 335

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 335

tcgttttgac gttttgcgt t

21

<210> 336

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 336

cgttttgacg ttttgcgtt

20

<210> 337  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 337  
gttttgacgt tttgctgtt 19

<210> 338  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 338  
ttttgacggt ttgctgtt 18

<210> 339  
<211> 17  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 339  
tttgacgttt tgtcgtt 17

<210> 340  
<211> 16  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 340

ttgacgtttt gtcgtt

16

<210> 341

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 341

tgacgttttg tcggt

15

<210> 342

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 342

gacgttttgc cgtt

14

<210> 343

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 343

acgttttgc gtt

13

<210> 344

<211> 11

<212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 344  
 gttttgtcgt t 11

<210> 345  
 <211> 11  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 345  
 gttttgtcgt t 11

<210> 346  
 <211> 10  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 346  
 ttttgcggt 10

<210> 347  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 347  
tcgtcgtttt gacgttttgt cgt 23

<210> 348  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 348  
tcgtcgtttt gacgttttgt cg 22

<210> 349  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 349  
tcgtcgtttt gacgttttgt c 21

<210> 350  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 350  
tcgtcgtttt gacgttttgt 20

<210> 351  
<211> 19  
<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 351

tcgtcgtttt gacgttttg

19

<210> 352

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 352

tcgtcgtttt gacgtttt

18

<210> 353

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 353

tcgtcgtttt gacgttt

17

<210> 354

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 354

tcgtcgtttt gacgtt 16

<210> 355  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 355  
 tcgtcgtttt gacgt 15

<210> 356  
 <211> 14  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 356  
 tcgtcgtttt gacg 14

<210> 357  
 <211> 13  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 357  
 tcgtcgtttt gac 13

<210> 358  
 <211> 12  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 358

tcgtcgtttt ga

12

<210> 359

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 359

tcgtcgtttt g

11

<210> 360

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 360

tcgtcgtttt

10

<210> 361

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 361

cgtcgttttg acgttttgtc gt

22

<210> 362  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 362  
 gtcgttttga cgttttgcg 20

<210> 363  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 363  
 tcgttttgac gttttgc 18

<210> 364  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 364  
 cgttttgacg ttttgc 16

<210> 365  
 <211> 14  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 365

gttttgacgt ttg

14

<210> 366

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 366

ttttgacgtt tt

12

<210> 367

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 367

tttgacgttt

10

<210> 368

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 368

tcgtcgtttt gacgttttgt cggt

24

<210> 369

<211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 369  
 tcgtcgacgt tcggcgcgcg ccg 23

<210> 370  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 370  
 tcggacgttc ggcgcgcgcc g 21

<210> 371  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 371  
 tcggacgttc ggcgcgccg 19

<210> 372  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 372  
 tcgctcggtt cggcgcgccg 20  
 <210> 373  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 373  
 tcgacgttcg gcgcgcgccg 20

<210> 374  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 374  
 tcgacgttcg gcgcgccg 18

<210> 375  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 375  
 tcgctcggtt cggcgcgccg 18

<210> 376  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 376

tgtcgttttt tttttttttt

20

<210> 377

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 377

tgtcgttttt tttttttttt

20

<210> 378

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(1)

<223> N = uracil

<220>

<221> misc\_feature

<222> (8)..(20)

<223> N = uracil

<400> 378

ngtcgttnnn nnnnnnnnnn

20

<210> 379  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<220>

<221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1)  
 <223> N = uracil

<220>

<221> misc\_feature  
 <222> (8)..(20)  
 <223> N = uracil

<400> 379

ngtcgttnnn nnnnnnnnnn

20

<210> 380

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<220>

<221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1)  
 <223> N is 2'-deoxyuracil

<220>

<221> misc\_feature  
 <222> (8)..(20)  
 <223> N is 2'-deoxyuracil

<400> 380

ngtcgttnnn nnnnnnnnnt

20

<210> 381

<211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(1)

<223> N is 2'-deoxyuracil

<220>

<221> misc\_feature

<222> (8)..(19)

<223> N is 2'-deoxyuracil

<400> 381

ngtcgttnnn nnnnnnnnt

20

<210> 382

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(1)

<223> N is uracil

<220>

<221> misc\_feature

<222> (8)..(12)

<223> N is uracil

<400> 382

ngtcgttnnn nngggagggg

20

<210> 383

<211> 20

<212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1)  
 <223> N is uracil

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (8)..(12)  
 <223> N is uracil

<400> 383  
 ngtcgttnnn nngggagggg 20

<210> 384  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1)  
 <223> N is uracil

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (10)..(12)  
 <223> N is uracil

<400> 384  
 ngtcgttccn nngggagggg 20

<210> 385  
 <211> 20  
 <212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(1)

<223> N is uracil

<220>

<221> misc\_feature

<222> (10)..(12)

<223> N is uracil

<400> 385

ngtcgttccn mngggagggg

20

<210> 386

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 386

tccatgacgt tcctgacgtt

20

<210> 387

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 387

tcaacgttga

10

<210> 388

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligodeoxynucleotide

<400> 388  
tcaagcttga

10