



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0066512
(43) 공개일자 2010년06월17일

- (51) Int. Cl.
C07H 21/00 (2006.01) C12N 15/11 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2010-7005694
(22) 출원일자(국제출원일자) 2008년08월15일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2010년03월15일
(86) 국제출원번호 PCT/US2008/073280
(87) 국제공개번호 WO 2009/023819
국제공개일자 2009년02월19일
(30) 우선권주장
60/955,895 2007년08월15일 미국(US)
- (71) 출원인
이데라 파마슈티칼즈, 인코포레이티드
미국 매사추세츠 캄브리지 시드니 스트리트 167
(우: 02139)
- (72) 발명자
칸디말라, 예캄바, 알.
미국 01172 매사추세츠 사우쓰보로 캔들우드 레인 6
바게트, 라크쉬미
미국 01702 매사추세츠 프라밍햄 유니트 605 워세스터 스트리트 1550
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
남상선

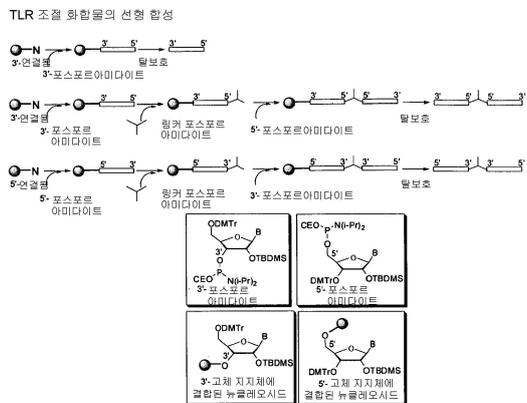
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 톨 유사 수용체 조절자

(57) 요약

본 발명은 TLR9 길항제 화합물 및 이들의 치료학적 또는 예방학적 용도와 관련이 있다. 본 발명은 TLR의 길항제로서 신규한 면역 조절 올리고뉴클레오티드와 이류노머 및 이들의 사용 방법을 제공한다. 이러한 면역 조절성 올리고뉴클레오티드는 TLR 리간드 또는 TLR 신호전달 효능제에 반응하여 TLR-매개 신호전달을, 완전하게 제거함이 없이, 억제시키는 특유의 서열을 지닌다. 본 발명의 방법은 자가면역력, 염증, 염증성장질환, 루프스, 알레르기, 천식, 감염, 패혈증, 암 및 면역결핍의 예방 및 치료에 있어서 용도를 지닐 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

푸타, 말리카르주나

미국 01803 매사추세츠 벨링턴 아르보레툼 웨이
824

왕, 다킵

미국 01730 매사추세츠 베드포드 셸프리지 로드 7

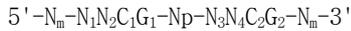
아그라월, 서드히

미국 01545 매사추세츠 쉬류스버리 램플라이어 드
라이브 61

특허청구의 범위

청구항 1

하기 구조를 갖는 올리고뉴클레오티드-기반 화합물을 포함하는 TLR9 길항제 화합물:



상기 구조에서

C_1 및 C_2 는 독립적으로 시토신 또는 시토신 유도체이고, G_1 및 G_2 는 독립적으로 구아노신 또는 구아노신 유도체이고, 여기서 C_1 및 G_1 중 하나 이상이 변형된 뉴클레오시드이고;

N_1 및 N_2 는, 각각의 출현시, 독립적으로 뉴클레오티드, 2'-치환된(예를 들어, 2'-O-메틸) 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유도체 또는 $C_1 G_1$ 의 TLR 자극 활성을 억제시키는 기타 차단 모이어티(blocking moiety)이고(단, N_1 및 N_2 중 하나 이상이 $C_1 G_1$ 의 TLR 자극 활성을 억제시키는 차단 모이어티인 것을 조건으로 함);

N_3 및 N_4 는, 각각의 출현시, 독립적으로 $C_2 G_2$ 의 TLR 자극 활성을 억제시키지 않는 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유도체이고;

N_m 은, 각각의 출현시, 독립적으로 뉴클레오티드, 뉴클레오티드 유도체 또는 비-뉴클레오티드 연결이고;

N_p 는, 각각의 출현시, 독립적으로 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유도체이고(단, 상기 화합물이 3개 이하의 연속된 구아노신 뉴클레오티드를 함유하는 것을 조건으로 함),

여기서, m 은 0부터 약 20까지의 수이고,

여기서, p 는 0부터 약 20까지의 수이며;

여기서, 상기 올리고뉴클레오티드는, 상기 2'-O-치환된 뉴클레오티드, 뉴클레오티드 유도체 또는 $C_1 G_1$ 의 TLR 자극 활성을 억제시키는 기타 변형(modification)이 없는 경우, 면역 자극성이다.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 화합물이 2', 3' 또는 5' 부착(attachments), 또는 기능화된 뉴클레오염기 부착, 또는 이의 조합을 통해 연결된 2개 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는, TLR9 길항제 화합물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드가 이들의 2' 말단, 3' 말단 또는 5' 말단, 또는 기능화된 뉴클레오염기에서 각자 서로에게 직접적으로 연결되는, TLR9 길항제 화합물.

청구항 4

제 2항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드의 2' 말단, 3' 말단 또는 5' 말단, 또는 기능화된 뉴클레오염기가 비-뉴클레오티드성 링커에 연결되는, TLR9 길항제 화합물.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 비-뉴클레오티드성 링커가 알킬 링커 또는 아미노 링커이고, 여기서 상기 알킬 또는 아미노 링커는 임의로 분지 또는 비분지되고, 고리 또는 비고리이고, 치환 또는 비치환되고, 포화 또는 불포화된, 키랄, 비키랄 또는 라세믹 혼합물일 수 있는, TLR9 길항제 화합물.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 알킬 링커가 약 2 내지 약 18개 탄소 원자를 지니는, TLR9 길항제 화합물.

청구항 7

제 5항에 있어서, 상기 알킬 링커가 약 3 내지 약 9개의 탄소 원자를 지니는, TLR9 길항제 화합물.

청구항 8

제 5항에 있어서, 상기 알킬 링커가 1,2,3-프로판트리올, 1,2,4-부탄트리올, 2-히드록시메틸-1,3-프로판디올, 1,1,1-트리스(히드록시메틸)에탄, 2-아미노-2-(히드록시메틸) 1,3-프로판디올, 트리스(히드록시메틸)니트로메탄, 1,1,1-트리(히드록시메틸)프로판, 1,2,6-헥산트리올, 1,3,5-헥산트리올, 1,3,5-펜탄트리올, 3-메틸-1,3,5-펜탄트리올, 1,2,3-헵탄트리올, 2-(히드록시메틸)1,4-부탄디올, 1,3-디(히드록시메틸)페놀, 1,3,5-트리(히드록시메틸)벤젠, 1,3-디(히드록시에톡시)-2-히드록시-프로판, 1,3-디(히드록시프로폭시)-2-히드록시-프로판, D-갈락탈, 1,3,5-트리스(2-히드록시에틸)시아누르산, 1,3,5-트리스(4-히드록시페닐)벤젠, 1,3-프로판디올, 1,2-프로판디올, 1,4-부탄디올, 1,3-부탄디올, 2,3-부탄디올, 1,4-부탄디올, 1,5-펜탄디올, 2,4-펜탄디올, 1,6-헥산디올, 1,2-헥산디올, 1,5-헥산디올, 2,5-헥산디올, 1,7-헵탄디올, 1,8-옥탄디올, 1,2-옥탄디올, 1,9-노난디올, 1,12-도데칸디올 또는 2-(1-아미노프로필)-1,3-프로판디올 중에서 선택된, TLR9 길항제 화합물.

청구항 9

제 1항 내지 제 8항 중 어느 한 항에 따른 TLR9 길항제 화합물 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제 조성물.

청구항 10

척추동물에서 TLR9-매개 면역 반응을 감소시키는 방법으로서, 상기 척추동물에게 상기 TLR9-매개 면역 반응을 감소시키지만, 상기 반응을 폐기시키지 않는 양으로 제 9항에 따른 약제 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 11

TLR9-매개 면역 반응을 감소시키는 것이 이로운, 질환 또는 장애를 지니는 척추동물을 치료학적으로 치료하는 방법으로서, 상기 질환 또는 장애를 지니는 상기 척추동물에게 약제학적 유효량으로 제 9항에 따른 약제 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 12

제 11항에 있어서, 상기 질환 또는 장애가 암, 자가면역질환, 기도 염증, 염증성 질환, 감염성 질환, 말라리아, 라임병, 안구 감염증(ocular infections), 피부 질환, 건선, 경피증, 심혈관질환, 죽상동맥경화증, 만성 피로 증후군, 유육종증, 알레르기, 천식 또는 병원균에 의해 초래된 질환 중에서 선택된, 방법.

청구항 13

제 12항에 있어서, 상기 자가면역질환이 홍반성 낭창, 다발성 경화증, 타입 I 당뇨병(type I diabetes mellitus), 과민성 대장 증후군, 크론병, 류마티스 관절염, 폐혈성 쇼크, 전신 탈모증(alopecia universalis), 급성 산재성 뇌척수염(acute disseminated encephalomyelitis), 애디슨병, 강직성 척수염, 항인지질 항체 증후군, 자가면역성 용혈성 빈혈, 자가면역성 간염, 수포성유친포창, 샤가스병, 만성 폐쇄성 폐질환, 복강병(coeliac disease), 피부근염, 자궁내막증, 굿패스츄어 증후군, 그레이브병, 길랑-바레(Guillain-Barre) 증후군, 하시모토병, 화농성 한선염(hidradenitis suppurativa), 특발성 혈소판 감소성 자반증(idiopathic thrombocytopenic purpura), 간질성 방광염(interstitial cystitis), 반상 경피증(morphea), 중증 근무력증, 기면 발작, 신경근육긴장증(neuromyotonia), 수포창, 악성 빈혈(pernicious anaemia), 다발성근염, 원발성 담즙성 간경변증(primary biliary cirrhosis), 정신분열증, 쇼그렌 증후군, 측두 동맥염(temporal arteritis)("거대세포동맥염"), 맥관염, 백반증, 성기통(vulvodynia) 및 베게너 육아종증(Wegener's granulomatosis) 중에서 선택된, 방법.

청구항 14

제 12항에 있어서, 상기 염증성 질환이 기도 염증, 천식, 자가면역질환, 만성 염증, 만성 전립선염(chronic

prostatitis), 사구체신염(glomerulonephritis), 베체트병, 과민증, 염증성 장 질환, 재관류 손상, 류마티스 관절염, 이식 거부반응(transplant rejection), 궤양성 대장염, 포도막염, 결막염 및 맥관염 중에서 선택된, 방법.

청구항 15

TLR9-매개 면역 반응을 감소시키는 것이 이로운 척추동물에서 질환 또는 장애를 예방하기 위한 방법으로서, 상기 질환 또는 장애에 민감한 척추동물에게 제 9항에 따른 약제 조성물을 치료학적으로 유효량으로 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 16

제 15항에 있어서, 상기 질환 또는 장애가 암, 자가면역질환, 기도 염증, 염증성 질환, 감염성 질환, 말라리아, 라임병, 안구 감염증, 결막염, 피부 질환, 건선, 경피증, 심혈관질환, 죽상동맥경화증, 만성 피로 증후군, 유육종증, 이식 거부반응, 알레르기, 천식 또는 병원균에 의해 초래된 질환 중에서 선택된, 방법.

청구항 17

제 16항에 있어서, 상기 자가면역질환이 홍반성 낭창, 다발성 경화증, 타입 I 당뇨병, 과민성 대장 증후군, 크론병, 류마티스 관절염, 패혈성 쇼크, 전신 탈모증, 급성 산재성 뇌척수염, 애디슨병, 강직성 척수염, 항인지질 항체 증후군, 자가면역성 용혈성 빈혈, 자가면역성 간염, 수포성유천포창, 샤가스병, 만성 폐쇄성 폐질환, 복강병, 피부근염, 자궁내막증, 굿패스츄어 증후군, 그레이브병, 길랑-바레 증후군, 하시모토병, 화농성 환선염, 특발성 혈소판 감소성 자반증, 간질성 방광염, 반상 경피증, 중증 근무력증, 기면 발작, 신경근육긴장증, 수포창, 악성 빈혈, 다발성근염, 원발성 담즙성 간경변증, 정신분열증, 쇼그렌 증후군, 측두 동맥염("거대세포동맥염"), 맥관염, 백반증, 성기통 및 베게너 육아종증 중에서 선택된, 방법.

청구항 18

제 16항에 있어서, 상기 염증성 질환이 기도 염증, 천식, 자가면역질환, 만성 염증, 만성 전립선염, 사구체신염, 베체트병, 과민증, 염증성 장 질환, 재관류 손상, 류마티스 관절염, 이식 거부반응, 궤양성 대장염, 포도막염, 결막염 및 맥관염 중에서 선택된, 방법.

청구항 19

제 10항 내지 제 18항중 어느 한 항에 있어서, 상기 투여 경로가 비경구 경로, 점막 전달(mucosal delivery) 경로, 경구 경로, 설하 경로, 경피 경로, 국소 경로, 흡입 경로, 비내 경로, 에어로졸 경로, 안구내 경로, 기도내(intratracheal) 경로, 직장내 경로, 질내 경로, 유전자 총에 의한 경로, 피부 패치 경로 또는 점안액 또는 구강 세척액 형태로의 경로인, 방법.

청구항 20

제 10항 내지 제 19항중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 백신, 항원, 항체, 세포독성제, 알레르겐, 항생제, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, TLR 효능제, TLR 길항제, siRNA, miRNA, 단백질, 유전자 치료 벡터, DNA 백신, 애주번트, 동시-자극분자(co-stimulatory molecules) 또는 이들의 조합물을 추가로 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

명세서

기술분야

[0001] **발명의 배경**

[0002] **관련 출원**

[0003] 본원은 2007년 8월 15일에 출원된, 미국 가특허 출원 제 60/955,895호에 대한 우선권을 주장하며, 상기 특허출원의 내용은 이의 전체로 참고문헌으로 본 명세서에 통합된다.

[0004] **발명의 분야**

[0005] 본 발명은 일반적으로 면역 조절제로서 올리고뉴클레오티드-기반 화합물을 사용하는 면역학 및 면역치료 적용 분야와 관련되어 있다. 더 특별하게는, 본 발명은 TLR을 통해 면역 억제(regulation)를 조절하는 화학적으로-변형된 올리고뉴클레오티드-기반 화합물 및 이들의 사용 방법과 관련이 있다.

배경 기술

[0006] 관련 기술의 요약

[0007] 면역 반응은 선천적 및 후천적 반응에 관여하는 세포의 서브세트에 기초하여 상기 선천성 및 후천성 반응 둘 모두에 관여한다. 예를 들어, 지연된-유형의 과민반응 및 세포독성 T 림프구("CTL"s)의 활성화와 같은 고전적(classical) 세포-매개 기능에 관여하는 세포는 Th1 세포이고, 반면, B-세포 활성화를 위한 헬퍼 세포로서 관여하는 Th 세포는 Th2 세포이다. 면역 반응의 유형은 항원 노출에 대한 반응으로 생산된 사이토카인 및 케모카인에 의해 영향받는다. 사이토카인은 T 헬퍼 1(Th1) 및 T 헬퍼 2(Th2) 세포의 균형에 영향을 미침으로써 면역 반응을 조절하는 수단을 제공하는데, 상기 균형은 일어나는 면역 반응의 유형에 직접적으로 영향을 미친다. 균형이 더 많은 수의 Th1 세포를 지향하면, 세포독성 T 세포(예를 들어, CTLs)의 활성화를 포함하는, 세포-매개 면역 반응이 일어난다. 상기 균형이 더 많은 수의 Th2 세포를 지향하면, 체액성 또는 항체 면역 반응이 일어난다. 이러한 면역 반응 각각은 Th1 및 Th2 세포로부터 분비된 상이한 세트의 사이토카인을 초래한다. Th1과 Th2 세포에 의해 분비된 사이토카인에서의 차이는 이러한 2개의 T 세포 서브세트의 상이한 생물학적 기능의 결과일 수 있다.

[0008] Th1 세포는 항원(예를 들어, 바이러스 감염, 세포내 병원균, 및 종양 세포)에 대한 신체의 선천적 반응에 관여한다. 항원에 대한 초기 반응은 항원 제시 세포(예를 들어, 활성화된 대식세포 및 수지상 세포)의 분비와 Th1 세포의 동시수반적(concomitant) 활성화일 수 있다. 활성화된 Th1 세포의 결과는 특정 사이토카인(예를 들어, IL-2, IFN-감마 및 다른 사이토카인)의 분비와 항원-특이적 CTL의 동시수반적 활성화이다. Th2 세포는 세균, 기생충, 항원 및 알레르겐에 반응하여 활성화되는 것으로 알려져 있고 특정 사이토카인(예를 들어, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 및 다른 사이토카인)과 케모카인의 분비를 통한 신체의 후천적 면역 반응(예를 들어, IgM과 IgG 생산 및 호산구 활성화)을 매개할 수 있다. 이러한 사이토카인 중 특정 사이토카인의 분비는 B-세포 증식 및 항체 생산에서의 증가를 초래할 수 있다. 또한, 이러한 사이토카인들 중 특정 사이토카인은 다른 사이토카인의 방출을 자극하거나 억제할 수 있다(예를 들어, IL-10은 Th1 세포로부터의 IFN- γ 분비 및 수지상 세포로부터의 IL-12의 분비를 억제시킨다). Th1과 Th2 세포 및 분비된 자극체(stimulus)에 반응하여 방출된 사이토카인과 케모카인 사이의 균형은 신체의 면역 시스템이 질환에 대해 어떻게 반응할 것인지에 있어 중요한 역할을 할 수 있다. 예를 들어, IFN- α 는 C형 간염을 억제시킬 수 있고, MIP-1 α 및 MIP-1 β (각각, CCL3 및 CCL4로도 공지되어 있음)는 HIV-1 감염을 억제시킬 수 있다. Th1/Th2 면역 반응의 최적 균형조절은 면역 시스템을 사용하여 다양한 질환을 치료 및 예방하는 기회를 제공한다.

[0009] Th1 면역 반응은, 예를 들어, 비메틸화된 CpG 디뉴클레오티드를 함유하는 세균 또는 합성 DNA의 도입에 의해 포유동물에서 유도될 수 있는데, 면역 반응은 패턴 인식 수용체(pattern recognition receptors, "PRR"s)로 공지된 특정 면역 세포 상의 수용체에 대한 특정 올리고뉴클레오티드 서열(예를 들어, 비메틸화된 CpG)의 제시의 결과이다. 이러한 PRR들 중 특정 PRR이 툴-유사 수용체(TLRs)이다.

[0010] 툴-유사 수용체(TLRs)는 미생물 감염에 반응하여 선천적 면역 반응을 유도하는데 긴밀하게 관여한다. 척추동물에서, 툴-유사 수용체로 불리우는 10개의 단백질의 패밀리를(TLR1 내지 TLR10)는 병원균과 연관된 분자 패턴을 인지하는 것으로 공지되어 있다. 상기 단백질 10개 중에, TLR3, 7, 8, 및 9는 세포 내부의 엔도솜에 위치하며 핵산(DNA와 RNA)과 작은 분자, 예컨대, 뉴클레오티드 및 핵산 대사산물을 인지하는 것으로 공지되어 있다. TLR3와 TLR9은, 각각, 핵산, 예컨대, 바이러스와 세균내에 존재하는 dsRNA와 비메틸화된 CpG 디뉴클레오티드 및 합성 DNA를 인지하는 것으로 공지되어 있다. 세균 DNA는 면역 시스템과 항종양 활성을 활성화시키는 것으로 드러났다(Tokunaga T et al., J Natl Cancer Inst (1984) 72:955-962; Shimada S, et al., Jpn H Cancer Res, 1986, 77, 808-816; Yamamoto S, et al., Jpn. J Cancer Res, 1986, 79, 866-73; Messina, J, et al., J Immunol (1991) 147:1759-1764). CpG 디뉴클레오티드를 함유하는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 이용한 다른 연구는 면역 반응의 자극을 보여주었다(Zhao Q, et al., Biochem Pharmacol 1996, 26, 173-82). 연이은 연구는 TLR9이 세균내에 존재하는 비메틸화된 CpG 모티프 및 합성 DNA를 인지하는 것을 밝혀냈다(Hemmi H, et al., Nature (2000) 408:740-5). 또한 CpG-함유 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오티드의 기타 변형은 TLR9을 통한 면역 반응의 조절자로서 역할하는 이들의 능력에 영향을 미칠 수 있다(예를 들어, 하기 문헌 참조: Zhao et al., Biochem Pharmacol (1996) 51:173-182; Zhao et al., Biochem Pharmacol (1996) 52:1537-1544; Zhao et al.,

Antisense Nucleic Acid Drug Dev (1997) 7:495-502; Zhao et al., Bioorg Med Chem Lett (1999) 9:3453-3458; Zhao et al., Bioorg Med Chem Lett (2000) 10:1051-1054; Yu et al., Bioorg Med Chem Lett (2000) 10:2585-2588; Yu et al., Bioorg Med Chem Lett (2001) 11:2263-2267; 및 Kandimalla et al., Bioorg. Med. Chem. (2001) 9:807-813). 또한, 구조 활성 관계 연구는 비메틸화된 CpG 디뉴클레오티드에서 야기되는 프로파일과 구별되는 특정 면역 반응 프로파일을 유도하는 합성 모티프 및 신규한 DNA-기반 구조의 확인을 가능케 하였다. (Kandimalla ER, et al., Proc Natl Acad Sci U S A. (2005) 102:6925-30. Kandimalla ER, et al., Proc Natl Acad Sci U S A. (2003) 100:14303-8. Cong YP, et al., Biochem Biophys Res Commun (2003) 310:1133-9. Kandimalla ER, et al., Biochem Biophys Res Commun (2003) 306:948-53. Kandimalla ER, et al., Nucleic Acids Res. (2003) 31:2393-400. Yu D, et al., Bioorg Med Chem (2003) 11 :459-64. Bhagat L, et al., Biochem Biophys Res Commun (2003) 300:853-61. Yu D, et al., Nucleic Acids Res. (2002) 30:4460-9. Yu D, et al., J Med Chem (2002) 45:4540-8. Yu D, et al., Biochem Biophys Res Commun (2002) 297:83-90. Kandimalla ER, et al., Bioconjug Chem (2002) 13:966-74. Yu D, K et al., Nucleic Acids Res. (2002) 30:1613-9. Yu D, et al., Bioorg Med Chem (2001) 9:2803-8. Yu D, et al., Bioorg Med Chem Lett. (2001) 11:2263-7. Kandimalla ER, et al., Bioorg Med Chem.(2001) 9:807-13. Yu D, et al., Bioorg Med Chem Lett (2000) 10:2585-8, Putta MR, et al., Nucleic Acids Res (2006) 34:3231-8).

[0011] 리보오스 또는 데옥시리보오스 당을 함유하는 올리고뉴클레오티드 및 올리고데옥시뉴클레오티드는, 이로만 국한되는 것은 아니지만, 진단 탐침, PCR 프라이밍, 유전자 발현의 안티센스 억제, siRNA, microRNA, 앵타머 (aptamers), 리보자임, 및 톨-유사 수용체(TLRs)에 기초한 면역치료제를 포함하는 폭넓게 다양한 분야에서 사용되어 왔다. 더 최근에, 다수의 간행물이 올리고데옥시뉴클레오티드의 면역 조절제로서의 용도 및 다수의 질환, 예컨대, 알레르기, 천식, 자가면역, 염증성 질환, 암, 및 감염성 질환에 관한 면역치료 적용에 있어서 이들의 단독 사용 또는 애주번트로서 이들의 용도(Marshak-Rothstein A, Nat Rev Immunol (2006) 6:823-35)에 대해 입증하였다.

[0012] 염증 반응 조절에 있어서 이들의 관여의 결과로서, TLR은 자가면역, 감염성 질환 및 염증을 포함하는, 다수의 질환의 발병에 소정 역할을 하는 것으로 드러났다(Papadimitraki et al. (2007) J. Autoimmun 29: 310-318; Sun et al. (2007) Inflamm Allergy Drug Targets 6:223-235; Diebold (2008) Adv Drug Deliv Rev 60:813-823; Cook, D.N. et al. (2004) Nature Immunol 5:975-979; Tse and Homer (2008) Semin Immunopathol 30:53-62; Tobias & Curtiss (2008) Semin Immunopathol 30:23-27; Ropert et al. (2008) Semin Immunopathol 30:41-51; Lee et al. (2008) Semin Immunopathol 30:3-9; Gao et al. (2008) Semin Immunopathol 30:29-40; Vijay-Kumar et al. (2008) Semin Immunopathol 30:11-21). TLR의 활성화가 면역 반응을 증가시키는데 관여하는 반면, TLR을 통한 면역 시스템의 비조절된 자극은 면역 저하된 피검체에서 특정 질환을 악화시킬 수 있다. 최근 몇년동안, 몇몇 그룹이 염증성 사이토카인의 억제자로서 합성 올리고데옥시올리고뉴클레오티드 ("ODNs")의 용도를 밝혀내었다(Lenert, P. et al. (2003) DNA Cell Biol. 22(10):621-631).

[0013] 또한, 몇몇 그룹은 2개의 트리플렛 서열, 근위(proximal) "CCT" 트릿플렛 및 원위(distal) "GGG" 트리플렛, 폴리 "G"(예를 들어, "GGGG" 또는 "GGG") 또는 TLR 단백질과 상호작용하여 이의 활성화와 항-염증성(pro-inflammatory) 사이토카인의 동시수반적 생산 및 방출을 억제시키는 "GC" 서열을 지니는 합성 올리고데옥시뉴클레오티드를 사용하였다(예를 들어, 하기 문헌 참조: Lenert, P. et al. (2003) DNA Cell Biol. 22(10):621-631; Patole, P. et al. (2005) J. Am. Soc. Nephrol. 16:3273-3280), Gursel, L, et al. (J. Immunol, 171:1393-1400 (2003), Shirota, H., et al., J. Immunol, 173: 5002-5007 (2004), Chen, Y., et al., Gene Ther 8: 1024-1032 (2001); Stunz, L.L., Eur. J. Immunol 32: 1212-1222 (2002; Kandimalla et al. WO2007/7047396). 그러나, 구아노신 연쇄물(strings)을 함유하는 올리고뉴클레오티드는 테트라플렉스 구조를 형성하고, 앵타머로서 작동하며 트롬빈 활성을 억제하는 것으로 드러났다(Bock LC et al., Nature, 355:564-6, 1992; Padmanabhan, K et al., J Biol Chem., 268(24): 17651-4, 1993). 따라서, 이러한 억제성 올리고데옥시뉴클레오티드 분자의 유용성은 환자에서 달성불가능할 수 있다.

[0014] 더욱이, 최근 연구는 폴리 G 함유 ODN이 TLR의 길항제로서 작용한다는 개념에 대해 의문을 제기하였다. 예를 들어, 미국 특허 제6,426,334호(Agrawal et al)는 "GGGG" 연쇄물을 함유하는 CpG 올리고뉴클레오티드의 투여가 혈청 IL-12 농도의 증가를 초래할 것임을 입증하며, 상기 혈청 IL-12 농도의 증가는 TLR 억제와는 반대로 TLR 활성화를 증명한다. 더 나아가, polyG 서열을 함유하는 CpG 올리고(oligos)는 TLR9의 활성화를 통해 면역 반응을 유도하며(Verthelyi D et al, J Immunol 166, 2372, 2001; Gursel M et al, J Leukoc Biol, 71, 813, 2001, Krieg A et al, Eur J Immunol, 31, 2154, 2001) 항종양 및 항바이러스 활성을 나타내는 것으로 공지되어 있다

(Ballas GK et al, J Immunol, 167, 4878, 2001; Verthelyi D et al, J Immunol, 170, 4717, 2003). 또한, 면역 자극성 CpG 모티프와 4개의 연속된 G 뉴클레오티드를 함유하는 ODN(클래스 A ODNs)은 인터페론- γ 생산과 면역 반응에서의 Th1 편이(shift)를 유도한다

[0015] 최근, 아그라발 등(Agrawal et al., W02007047396)은 이전에 확인된 TLR 길항제의 제약을 지니지 않는 신규한 클래스의 TLR 길항제를 개발하였다. 그러한 신규한 클래스의 화합물은 TLR의 활성을 효과적으로 억제하고 다양한 TLR 효능제 활성을 차단한다. 그러나, 몇몇 질환 상태에서, TLR 활성을 단지 부분적으로 길항시키는 것이 요망될 수 있다. 따라서, 용량-의존적인, 덜 완전한 방식으로 TLR 활성을 길항시킬 수 있는 화합물에 대한 요구가 있다.

발명의 내용

[0016] 발명의 간추린 요약

[0017] 제 1 양상에서, 본 발명은 조절된 방식으로, TLR9-매개 면역 반응을 감소시키지만, 상기 TLR9-매개 면역 반응을 폐기시키지 않는 신규한 부류의 면역 조절성 올리고뉴클레오티드 화합물을 제공한다. 그러한 화합물은 2개 이상의 TLR9-유도 모이어티 및 상기 TLR9-유도 모이어티 및/또는 5'에 가장 가까운(most 5') TLR9-유도 모이어티에 플랭킹되어 있는 서열내의 1개 이상의 화학적 변형을 지니는데, 여기서 상기 변형은 상기 5'에 가장 가까운 TLR9-유도 모이어티의 활성을 억제시키며, 상기 변형은 차단된 TLR9-유도 모이어티가 되도록 한다.

[0018] 본 발명의 이 양상의 일 구체예에서, 화합물은 구조 5'-N_m-N₁N₂C₁G₁-N_p-N₃N₄C₂G₂-N_m-3'을 지니며, 여기서 C₁은 시토신이고, G₁은 구아노신이고, C₂는 시토신 또는 시토신 유도체이고, G₂는 구아노신 또는 구아노신 유도체이며; N₁ 및 N₂는, 각각의 출현시, 독립적으로 뉴클레오티드, 2'-치환된(예를 들어, 2'-O-메틸) 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유도체 또는 C₁G₁의 TLR 자극 활성을 억제시키는 다른 차단 모이어티이고(단, 하나 이상의 N₁ 또는 N₂는 C₁G₁의 TLR 자극 활성을 억제시키는 차단 모이어티인 것을 조건으로 함); N₃ 및 N₄는, 각각의 출현시, 독립적으로 C₂G₂의 TLR 자극 활성을 억제시키지 않는 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유도체이며; N_m은, 각각의 출현시, 독립적으로 뉴클레오티드, 뉴클레오티드 유도체 또는 비-뉴클레오티드 연결이고; N_p는, 각각의 출현시, 독립적으로 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유도체이고(단, 상기 화합물은 3개 이하의 연속된 구아노신 뉴클레오티드를 함유하는 것을 조건으로 함); 여기서 m은 0부터 약 20까지의 수이고; 여기서 p는 0부터 약 20까지의 수이고; 여기서 상기 올리고뉴클레오티드는 상기 2'-O-치환된 뉴클레오티드, 뉴클레오티드 유도체 또는 C₁G₁의 TLR 자극 활성을 억제시키는 다른 변형이 없는 경우 면역 자극성이다.

[0019] 본 발명의 이 양상의 또 다른 구체예에서, 화합물은 구조 5'-N_m-N₁N₂C₁G₁-N_p-N₃N₄C₂G₂-N_m-3'을 지니며, 여기서 C₁ 및 C₂는 독립적으로 시토신 또는 시토신 유도체이고, G₁ 및 G₂는 독립적으로 구아노신 또는 구아노신 유도체이고, 여기서 C₁ 및 G₁ 중 하나 이상은 변형된 뉴클레오티드이고; N₁ 및 N₂는, 각각의 출현시, 독립적으로 뉴클레오티드, 2'-치환된(예를 들어, 2'-O-메틸) 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유도체 또는 C₁G₁의 TLR 자극 활성을 억제시키는 다른 차단 모이어티이고(단, 하나 이상의 N₁ 또는 N₂가 C₁G₁의 TLR 자극 활성을 억제시키는 차단 모이어티인 것을 조건으로 함); N₃ 및 N₄는, 각각의 출현시, 독립적으로 C₂G₂의 TLR 자극 활성을 억제시키지 않는 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유도체이고; N_m은, 각각의 출현시, 독립적으로 뉴클레오티드, 뉴클레오티드 유도체 또는 비-뉴클레오티드 연결이고; N_p는, 각각의 출현시, 독립적으로 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유도체이고(단, 상기 화합물은 3개 이하의 연속된 구아노신 뉴클레오티드를 함유하는 것을 조건으로 함); 여기서 m은 0부터 약 20까지의 수이고; 여기서 p는 0부터 약 20까지의 수이고; 여기서 상기 올리고뉴클레오티드는 상기 2'-O-치환된 뉴클레오티드, 뉴클레오티드 유도체 또는 C₁G₁의 TLR 자극 활성을 억제시키는 다른 변형이 없는 경우 면역 자극성이다.

[0020] 본 발명의 이 양상의 추가 구체예에서, 화합물은 구조 5'-N_m-N₁N₂C₁G₁-N_p-N₃N₄C₂G₂-N_r-X-N_r-G₂C₂N₄N₃-N_p-G₁C₁N₂N₁-N_m-5'를 지니며, 여기서 C₁은 시토신이고, G₁은 구아노신이고, C₂는 시토신 또는 시토신 유도체이고, G₂는 구아노신 또는 구아노신 유도체이고; N₁ 및 N₂는, 각각의 출현시, 독립적으로 뉴클레오티드, 2'-치환된(예를 들어, 2'-O-메틸) 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유도체 또는 C₁G₁의 TLR 자극 활성을 억제시키는 다른 차단 모이어티

고(단, 하나 이상의 N_1 또는 N_2 가 C_1G_1 의 TLR 자극 활성을 억제시키는 차단 모이어티인 것을 조건으로 함); N_3 및 N_4 는, 각각의 출현시, 독립적으로 C_2G_2 의 TLR 자극 활성을 억제시키지 않는 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유도체이고; N_m 은, 각각의 출현시, 독립적으로 뉴클레오티드, 뉴클레오티드 유도체 또는 비-뉴클레오티드 연결이고; N_p 는, 각각의 출현시, 독립적으로 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유도체이고; N_r 은, 각각의 출현시, 독립적으로 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유도체이고(단, 상기 화합물은 3개 이하의 연속된 구아노신 뉴클레오티드를 함유하는 것을 조건으로 함); 여기서 m 은 0부터 약 20까지의 수이고; 여기서 m 은 0부터 약 20까지의 수이고; 여기서 p 는 0부터 약 20까지의 수이고; 여기서 x 는 비-뉴클레오티드성 링커이고; 여기서 상기 올리고뉴클레오티드는 상기 2'-O-치환된 뉴클레오티드, 뉴클레오티드 유도체 또는 C_1G_1 의 TLR 자극 활성을 억제시키는 다른 변형이 없는 경우 면역 자극성이다;

[0021] 본 발명의 이 양상의 추가 구체예에서, 화합물은 구조 5'- $N_m-N_1N_2C_1G_1-N_p-N_3N_4C_2G_2-N_r-X-N_r-G_2C_2N_4N_3-N_p-G_1C_1N_2N_1-N_m-5'$ 를 가지며, 여기서 C_1 및 C_2 는 독립적으로 시토신 또는 시토신 유도체이고, G_1 및 G_2 는 독립적으로 구아노신 또는 구아노신 유도체이고, 여기서 C_1 및 G_1 중 하나 이상은 변형된 뉴클레오시드이고; N_1 및 N_2 는, 각각의 출현시, 독립적으로 뉴클레오티드, 2'-치환된(예를 들어, 2'-O-메틸) 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유도체 또는 C_1G_1 의 TLR 자극 활성을 억제시키는 다른 차단 모이어티이고(단, 하나 이상의 N_1 또는 N_2 가 C_1G_1 의 TLR 자극 활성을 억제시키는 차단 모이어티인 것을 조건으로 함); N_3 및 N_4 는, 각각의 출현시, 독립적으로 C_2G_2 의 TLR 자극 활성을 억제시키지 않는 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유도체이고; N_m 은, 각각의 출현시, 독립적으로 뉴클레오티드, 뉴클레오티드 유도체 또는 비-뉴클레오티드 연결이고; N_p 는, 각각의 출현시, 독립적으로 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유도체이고; N_r 은, 각각의 출현시, 독립적으로 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유도체이고(단, 상기 화합물은 3개 이하의 연속된 구아노신 뉴클레오티드를 함유하는 것을 조건으로 함); 여기서 m 은 0부터 약 20까지의 수이고; 여기서 m 은 0부터 약 20까지의 수이고; 여기서 p 는 0부터 약 20까지의 수이고; 여기서 x 는 비-뉴클레오티드성 링커이고; 여기서 상기 올리고뉴클레오티드는 상기 2'-O-치환된 뉴클레오티드, 뉴클레오티드 유도체 또는 C_1G_1 의 TLR 자극 활성을 억제시키는 다른 변형이 없는 경우 면역 자극성이다;

[0022] 제 2 양상에서, 본 발명은 억제 조성물을 제공한다. 이러한 조성물은 본 발명의 제 1 양상에 개시된 화합물들 중 임의의 화합물과 억제학적으로 허용되는 담체를 포함한다.

[0023] 제 3 양상에서, 본 발명은 포유동물에서 TLR9-매개 면역 반응을 감소시키는 방법을 제공하는데, 당해 방법은 억제학적 유효량으로 본 발명에 따른 화합물 또는 조성물을 상기 포유동물에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0024] 제 4 양상에서, 본 발명은 TLR9-매개 면역 반응을 감소시키는 것이 유익할 수 있는 질환 또는 장애를 지니는 포유동물을 치료학적으로 치료하는 방법을 제공한다. 이 양상에 따른 방법은 본 발명에 따른 화합물 또는 조성물을 포유동물에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0025] 제 5 양상에서, 본 발명은 TLR9-매개 면역 반응을 감소시키는 것이 유익할 수 있는 포유동물내 질환 또는 장애, 또는 조절된 TLR-길항작용(antagonism)이 바람직할 수 있는 질환 및 장애를 예방하기 위한 방법을 제공한다. 이 양상에 따른 방법은 본 발명에 따른 화합물 또는 조성물을 포유동물에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0026] **도면의 간단한 설명**

[0027] 도 1은 본 발명의 화합물의 선형 합성을 위한 합성 도식이다. DMTr = 4,4'-디메톡시트리틸; CE = 시아노에틸.

[0028] 도 2는 본 발명의 화합물의 병렬 합성을 위한 합성 도식이다. DMTr = 4,4'-디메톡시트리틸; CE = 시아노에틸.

[0029] 도 3은 신규한 면역 조절성 올리고뉴클레오티드에 의해 매개된 TLR9 활성을 도시한다. 도 3은 신규한 억제성 올리고뉴클레오티드가, 이들의 억제 활성을 효과적으로 조절하는, 더 낮은 농도에서 길항제로서 기능하고 더 높은 농도에서 효능제로 기능할 것임을 더 일반적으로 입증한다.

[0030] 도 4는 더 낮은 용량으로 신규한 면역 조절성 올리고뉴클레오티드에 의해 매개된 TLR9 활성을 도시한다. 도 4는 신규한 억제성 올리고뉴클레오티드가 더 낮은 농도에서 길항제로서 기능하고 더 높은 농도에서 효능제로 기능할 것임을 더 일반적으로 입증한다.

[0031] 도 5는 증가된 용량에서 신규한 면역 조절성 올리고뉴클레오티드의 TLR9 활성을 도시한다. 도 5는 신규한 억제

성 올리고뉴클레오타이드가, 이들의 억제 활성을 효과적으로 조절하는, 더 낮은 농도에서 길항제로서 기능하고 더 높은 농도에서 효능제로 기능할 것임을 더 일반적으로 입증한다.

[0032] 도 6은 신규한 면역 조절성 올리고뉴클레오타이드의 TLR9 활성을 도시한다. 도 6은 신규한 억제성 올리고뉴클레오타이드가, 이들의 억제 활성을 효과적으로 조절하는, 더 낮은 농도에서 길항제로서 기능하고 더 높은 농도에서 효능제로 기능할 것임을 더 일반적으로 입증한다.

[0033] 도 7은 증가된 용량에서 신규한 면역 조절성 올리고뉴클레오타이드의 TLR9 활성을 도시한다. 도 7은 신규한 억제성 올리고뉴클레오타이드가, 이들의 억제 활성을 효과적으로 조절하는, 더 낮은 농도에서 길항제로서 기능하고 더 높은 농도에서 효능제로 기능할 것임을 더 일반적으로 입증한다.

[0034] **바람직한 구체예의 상세한 설명**

[0035] 본 발명은 면역치료 적용을 위한 면역 조절제로서 올리고뉴클레오타이드의 치료학적 용도와 관련이 있다. 구체적으로, 본 발명은 TLR9을 통하여 면역 반응을 조절하는 올리고뉴클레오타이드-기반 화합물을 제공한다. TLR9-매개 면역 반응을 폐기시키지 않지만, 상기 반응을 감소시킴으로써, 본 발명은 TLR9의 투여량 조절된 길항제의 투여가 유의할 수 있는 자가면역 구성요소를 지니는 것들을 포함하는, 다양한 질환 또는 장애를 치료 또는 예방하는데 유용할 수 있는 화합물과 방법을 제공한다. 등록된 특허, 특허 출원, 및 본원에서 인용된 참고문헌은 각각이 참고문헌으로 통합되도록 구체적으로 개별적으로 기재된 것과 같이 동일한 정도로 참고문헌으로써 본 명세서에 통합된다. 이들 참고문헌의 교시와 본 명세서의 교시 간에 불일치되는 경우, 본 명세서의 교시가 본 발명의 목적을 위해 우선되어야 한다.

[0036] 본 발명의 앞의 목적 및 기타 목적, 이의 다양한 특색을 비롯한 본 발명 그 자체는, 첨부된 도면과 함께 관독할 때, 하기 상세한 설명으로부터 더 완전히 이해될 수 있다:

[0037] 용어 "2'-치환된 뉴클레오시드" 또는 "2'-치환된 아라비노시드"는 2'-치환되거나 2'-O-치환된 리보뉴클레오시드가 생성되도록 펜토스 또는 아라비노스 모이어티의 2' 위치에 히드록실기가 치환된 뉴클레오시드 또는 아라비노뉴클레오시드를 일반적으로 포함한다. 특정 구체예에서, 그러한 치환은 1-6개의 포화 또는 불포화 탄소 원자를 함유하는 저급 히드록카빌(hydrocarbyl)기로, 수소 원자로, 또는 6-10개의 탄소 원자를 지니는 아릴기로 이루어지며, 여기서 상기 히드록카빌, 또는 아릴기는 비치환되거나, 예를 들어, 할로, 히드록시, 트리플루오로메틸, 시아노, 니트로, 아실, 아실옥시, 알콕시, 카르복실, 카르보알콕시, 또는 아미노기로 치환될 수 있다. 2'-O-치환된 리보뉴클레오시드 또는 2'-O-치환된-아라비노시드의 일예는, 이로만 국한되는 것은 아니지만, 2'-아미노, 2'-플루오로, 2'-알킬, 2'-O-알킬 및 2'-프로파길 리보뉴클레오시드 또는 아라비노시드, 2'-O-메틸리보뉴클레오시드 또는 2'-O-메틸아라비노시드 및 2'-O-메톡시에톡시리보뉴클레오시드 또는 2'-O-메톡시에톡시아라비노시드를 포함한다.

[0038] 방향적으로 사용될 때, 용어 "3'"은, 일반적으로 동일한 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드내 또 다른 영역 또는 위치로부터 (올리고뉴클레오타이드의 3' 위치 쪽으로) 3'쪽의 폴리펩티드 또는 올리고뉴클레오타이드내 영역 또는 위치를 지칭한다.

[0039] 방향적으로 사용될 때, 용어 "5'"은, 일반적으로 동일한 폴리뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드내 또 다른 영역 또는 위치로부터 (올리고뉴클레오타이드의 5' 위치 쪽으로) 5'쪽의 폴리펩티드 또는 올리고뉴클레오타이드내 영역 또는 위치를 지칭한다.

[0040] 용어 "약"은 일반적으로 정확한 수가 중요하지 않다는 것을 의미한다. 따라서, 해당 올리고뉴클레오타이드내의 뉴클레오시드 잔기의 수는 중요하지 않으며, 1개 또는 2개 미만의 뉴클레오시드 잔기들을 지니거나, 1개 내지 수개의 추가 뉴클레오시드 잔기들을 지니는 올리고뉴클레오타이드가 상기한 구체예들 각각의 균등물로서 간주되는 것을 의미한다.

[0041] 용어 "기도 염증"은, 이로만 국한되는 것은 아니지만, 일반적으로 천식을 포함하는, 알레르겐에 의해 초래되는 호흡기내 염증을 포함한다.

[0042] 용어 "알레르겐"은 일반적으로 피검체에 대한 노출시 알레르기 반응을 유발시키는, 항원 또는 분자의 항원성 부분, 일반적으로 단백질을 지칭한다. 전형적으로, 피검체는, 예를 들어, 부스럼(wheel) 및 플레이(flare) 시험 또는 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해, 지정한 것과 같이 알레르겐에 대해 알레르기가 있다. 피검체들의 적은 서브세트만이 분자에 노출시 알레르기(예를 들어, IgE) 면역 반응을 나타내는 경우라 하더라도 상기 분자는 알레르겐인 것으로 여겨진다.

- [0043] 용어 "알레르기"는 이로만 국한되는 것은 아니지만, 일반적으로 식품 알레르기, 호흡 알레르기 및 피부 알레르기를 포함한다.
- [0044] 용어 "항원"은 일반적으로 항체 또는 T 세포 항원 수용체에 의해 인지되고 선택적으로 결합되는 물질을 지칭한다. 항원은 펩티드, 단백질, 뉴클레오시드, 뉴클레오티드 및 이의 조합물을 포함할 수 있으나, 이로만 국한되는 것은 아니다. 항원은 천연 또는 합성 항원일 수 있으며 일반적으로 그러한 항원에 특이적인 면역 반응을 유도할 수 있다.
- [0045] 용어 "자가면역질환(autoimmune disorder)"은 일반적으로 "자가 항원"이 면역 시스템에 의해 공격을 받게 되는 질환을 의미한다.
- [0046] 용어 "담체"는 일반적으로 임의의 부형제, 희석제, 충전제(filler), 염, 완충액, 안정화제, 가용화제(solubilizer), 오일, 액체, 지질 함유 비히클, 마이크로스피어, 리포솜 캡슐화(liposomal encapsulation), 또는 약제 제형에서 사용을 위한 당업계에 널리 공지된 기타 물질을 포함한다. 담체, 부형제, 또는 희석제의 특성은 특별한 적용을 위한 투여 경로에 좌우될 것임이 이해될 것이다. 이러한 물질을 함유하는 약제학적으로 허용되는 제형의 제조는 예를 들어, 문헌[Remington 's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, ed. A. Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990]에 기재되어 있다.
- [0047] 용어 "동시투여(co-administration)" 또는 "동시투여된(co-administered)"은 일반적으로 면역 반응을 조절하기 위해 적어도 2개의 상이한 물질이 충분히 가까운 시간으로 투여되는 것을 의미한다. 바람직하게는, 동시투여는 2개 이상의 상이한 물질의 동시적 투여를 의미한다.
- [0048] 용어 "약제학적 유효량"은 일반적으로 원하는 생물학적 효과, 예컨대, 질환 또는 장애의 징후 또는 증상의 예방, 억제, 축소, 완화 또는 제거를 초포함하는, 이로인한 결과에 영향을 미치는데 충분한 양을 의미한다. 따라서, "약제학적 유효량"은 투여되는 정황에 좌우될 것이다. 약제학적 유효량은 하나 이상의 예방적 또는 치료적 투여로 투여될 수 있다.
- [0049] 용어 "예방학적 유효량"은 일반적으로 원치않는 생물학적 효과의 발달을 예방, 감소 또는 억제시키는데 충분한 양을 의미한다.
- [0050] 용어 "~와 조합하여(in combination with)"는 일반적으로 본 발명에 따른 화합물과 환자의 치료 경과에서 상기 화합물의 TLR9 길항 효과를 폐기시키지 않는 질환 또는 병태를 치료하는데 유용한 또 다른 물질을 투여하는 것을 의미한다. 그러한 투여는 동시 투여를 포함하는, 임의의 순서로 진행될 수 있을 뿐만 아니라, 수초 내지 최대 수일 이격된 시간적으로 간격을 둔 순서로 진행될 수 있다. 그러한 조합 처리는 또한 본 발명에 따른 화합물 및/또는 독립하여 다른 물질의 1회 이상의 투여를 포함할 수 있다. 본 발명에 따른 화합물 및 다른 물질의 투여는 동일 경로 또는 상이한 경로로 수행될 수 있다.
- [0051] 용어 "개체(individual)" 또는 "피검체(subject)"는 일반적으로 포유동물, 예컨대, 인간을 의미한다. 포유동물은, 이로만 국한되는 것은 아니지만, 일반적으로, 인간, 비인간 영장류, 래트, 마우스, 고양이, 개, 말, 소, 젓소, 돼지, 양 및 래빗을 포함한다.
- [0052] 용어 "선형 합성(linear synthesis)"은 일반적으로 올리고뉴클레오티드의 한쪽 말단에서 시작하여 다른쪽 말단으로 직선으로 진행하는 합성을 의미한다. 선형 합성은 동일하거나 비동일한(길이, 염기 조성 및/또는 통합된 화학적 변형의 측면에서) 단량체 단위의 올리고뉴클레오티드내로의 통합을 가능케 한다.
- [0053] 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드와 관련하여 사용될 때, 용어 "변형된" 또는 "유도체"는 일반적으로 변형된 헤테로시클릭 염기, 변형된 당 모이어티, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 뉴클레오시드이다. 몇몇 구체예에서, 변형된 뉴클레오시드는 본원에 기재된 것과 같은, 비천연 피리미딘 또는 퓨린 뉴클레오시드이다. 본 발명의 목적을 위해, 변형된 뉴클레오시드, 피리미딘 또는 퓨린 유사체 또는 자연적으로 생겨나지 않는 피리미딘 또는 퓨린은 상호교환적으로 사용될 수 있고 자연적으로 생겨나지 않는 염기 및/또는 자연적으로 생겨나지 않는 당 모이어티를 포함하는 뉴클레오시드를 의미한다. 본 발명의 목적을 위해, 염기가 구아닌, 시토신, 아데닌, 티민 또는 우라실이면, 염기는 비자연적인 것으로 간주된다.
- [0054] 용어 "조절(modulation)" 또는 "조절성(modulatory)"은 일반적으로 반응에서의 감소 또는 TLR9-매개 반응에서의 정량적 차이와 같은, 변화를 의미한다.
- [0055] 용어 "링커"는 일반적으로 당, 염기, 또는 백본을 통해 공유결합 또는 비공유 결합 방식으로 올리고뉴클레오티드에 부착될 수 있는 임의의 모이어티를 의미한다. 링커는 2개 이상의 뉴클레오시드를 부착시키는데 사용될 수

있거나 올리고뉴클레오티드내의 5' 및/또는 3' 말단 뉴클레오티드를 부착시키는데 사용될 수 있다. 그러한 링 커는 비-뉴클레오티드성(non-nucleotidic) 링커 또는 뉴클레오티드성 링커일 수 있다.

[0056] 용어 "비-뉴클레오티드성 링커"는 일반적으로 공유결합 또는 비공유결합 방식으로 올리고뉴클레오티드에 부착될 수 있는 뉴클레오티드성 결합 이외의 화학적 모이어티를 의미한다. 바람직하게는, 그러한 비뉴클레오티드성 링 커는 약 2 Å 내지 약 200 Å 길이이고,시스 또는 트랜스 배향으로 존재할 수 있다.

[0057] 용어 "뉴클레오티드성 연결(nucleotidic linkage)"은 이들의 당을 통해 인접 뉴클레오시드 사이의 인 원자 및 하전된 기, 또는 중성 기(예를 들어, 포스포디에스테르, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 알킬포스포네이트 또는 포스포르아미데이트)로 구성된 이들의 당(예를 들어, 3'-3', 2'-3', 2'-5', 3'-5')을 통해 2개의 뉴클레오시드를 연결시키는 화학적 연결을 의미한다.

[0058] 용어 "올리고뉴클레오티드-기반 화합물"은 다수의 연결된 뉴클레오시드 유닛으로부터 형성된 폴리뉴클레오시드를 의미한다. 그러한 올리고뉴클레오티드는 또한 게놈 또는 cDNA를 포함하는, 기존 핵산 공급원으로부터 획득될 수 있으나, 합성 방법에 의해 생산되는 것이 바람직하다. 바람직한 구체예에서, 각각의 뉴클레오시드 유닛은 헤테로시클릭 염기 및 펜토푸라노실, 트레할로스, 아라비노스, 2'-데옥시-2'-치환된 뉴클레오시드, 2'-데옥시-2'-치환된 아라비노스, 2'-O-치환된 아라비노스 또는 핵소오스 당 기를 포함한다. 뉴클레오시드 잔기는 수많은 공지된 뉴클레오시드간 연결 중 임의의 연결에 의해 각자 서로에 커플링될 수 있다. 그러한 뉴클레오시드간 연결은, 이로만 국한되는 것은 아니지만, 포스포디에스테르, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 알킬포스포네이트, 알킬포스포노티오에이트, 포스포트리에스테르, 포스포르아미데이트, 실록산, 카보네이트, 카르보알콕시, 아세트아미데이트, 카바메이트, 몰포리노, 보라노, 티오에테르, 브릿지된 포스포르아미데이트, 브릿지된 메틸렌 포스포네이트, 브릿지된 포스포로티오에이트, 및 실폰 뉴클레오시드간 연결을 포함한다. 용어 "올리고뉴클레오티드-기반 화합물"은 또한 하나 이상의 입체특이적 뉴클레오시드간 연결(예를 들어, R_p - 또는 S_p -포스포로티오에이트, 알킬포스포네이트, 또는 포스포트리에스테르 연결)을 지니는 폴리뉴클레오시드를 포함한다. 본원에 사용된, 용어 "올리고뉴클레오티드" 및 "디뉴클레오티드"는 연결이 포스페이트 기를 포함하던지 불포함하던지 간에 상기한 임의의 뉴클레오시드간 연결을 지니는 폴리뉴클레오시드 및 디뉴클레오시드를 포함하기 위해 의도적으로 사용된다. 특정 바람직한 구체예에서, 이러한 뉴클레오시드간 연결은 포스포디에스테르, 포스포로티오에이트, 또는 포스포로디티오에이트 연결, 또는 이의 조합일 수 있다.

[0059] 용어 "펩티드"는 일반적으로 펩티드가 헵텐인지 여부에 관계없이 생물학적 반응, 예를 들어, 항체 생성 또는 사이토카인 활성화에 영향을 미치는데 충분한 길이 및 조성을 갖는 폴리펩티드를 의미한다. 용어 "펩티드"는 변형된 아미노산(자연적으로 생성되던지 비자연적으로 생성되던지 간에)을 포함할 수 있는데, 상기 변형은, 이로만 국한되는 것은 아니지만, 인산화, 당화, 폐길화, 지질화 및 메틸화를 포함한다.

[0060] 용어 "생리학적으로 허용되는"은 일반적으로 본 발명에 따른 화합물의 유효성을 저해하지 않고, 세포, 세포 배양물, 조직, 또는 개체와 같은 생물학적 시스템과 양립가능한 물질을 의미한다. 바람직하게는, 상기 생물학적 시스템은 살아있는 개체, 예컨대, 척추동물이다.

[0061] 용어 "TLR9 길항제"는 TLR9에 의해 매개되는 면역 자극을 예방 또는 감소시킬 수 있는 올리고뉴클레오티드-기반 화합물을 의미한다.

[0062] 용어 "TLR9-유도 모이어티"는, 올리고뉴클레오티드-기반 화합물과 관련하여, TLR9 매개 면역 반응을 유도하는 디뉴클레오티드 모이어티를 의미한다. 바람직한 구체예에서, 디뉴클레오티드는 구조 Y-Z를 갖는데, 여기서 Y는 시티딘, 2'-데옥시시티딘, 아라비노시티딘, 2'-데옥시-2'-치환된 아라비노시티딘, 2'-O-치환된 아라비노시티딘, 2'-데옥시-5-히드록시시티딘, 2'-데옥시-N4-알킬-시티딘, 2'-데옥시-4-티오우리딘 또는 기타 비천연 피리미딘 뉴클레오시드이고; Z는 구아노신, 2'-데옥시구아노신, 2'-데옥시-7-테아자구아노신, 2'-데옥시-6-티오구아노신, 아라비노구아노신, 2'-데옥시-2' 치환된-아라비노구아노신, 2'-O-치환된-아라비노구아노신, 2'-데옥시이노신, 또는 기타 비천연 퓨린 뉴클레오시드이다.

[0063] 용어 "차단된 TLR9-유도 모이어티"는 이것이 TLR9-유도 모이어티 그 자체의 변형(들)을 통해서 및/또는 올리고뉴클레오티드 기반 화합물 내부의 하나 이상의 화학적 변형에 의해 TLR9 매개 면역 반응을 유도하는 것을 기능적으로 차단 또는 억제시킨다는 사실을 제외하면 TLR9 효능제 활성을 지닐 수 있는 TLR9-유도 모이어티를 의미한다. TLR9-유도 모이어티의 활성을 억제시키는 차단 모이어티는, 이로만 국한되는 것은 아니지만, 2'-OMe-리보뉴클레오시드, 3'-OMe-리보뉴클레오시드, 3-니트로피롤, 5-니트로인돌, dU, β -L-데옥시뉴클레오시드, α -데옥시뉴클레오시드, 무염기(abasic) 뉴클레오시드, 프로판디올 링커, 아미노 링커, 이소프로폭실, 글리세롤

링커, 2'-5'-DNA, 2'-5' RNA, 및 P-Me DNA를 포함한다.

[0064] 용어 "치료(treatment)"는 일반적으로 증상의 완화, 또는 질환 발달의 지연 또는 경감을 포함할 수 있는, 유익하거나 요망되는 결과를 획득하기 위해 의도된 접근법(approach)을 의미한다.

[0065] 제 1 양상에서, 본 발명은 조절된 방식으로 TLR9-매개 면역 반응을 감소시키지만, 상기 반응을 폐기시키지 않는 신규한 부류의 면역 조절성 올리고뉴클레오타이드 화합물을 제공한다. 그러한 화합물은 2개 이상의 TLR9-유도 모이어티와 상기 TLR9-유도 모이어티 및/또는 모스트 5' TLR9-유도 모이어티에 플랭킹된 서열내에 하나 이상의 화학적 변형을 지니는데, 여기서 그러한 변형은 상기 모스트 5' TLR9-유도 모이어티의 활성을 억제시키며, 상기 변형은 차단된 TLR9-유도 모이어티가 되게 한다.

[0066] 본 발명의 이 양상의 일 구체예에서, 화합물은 구조 5'-N_m-N₁N₂C₁G₁-N_p-N₃N₄C₂G₂-N_m-3'을 갖는데, 여기서 C₁은 시토신이고, G₁은 구아노신이고, C₂는 시토신 또는 시토신 유도체이고, G₂는 구아노신 또는 구아노신 유도체이며; N₁ 및 N₂는, 각각의 출현시, 독립적으로 뉴클레오타이드, 2'-치환된(예를 들어, 2'-O-메틸) 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 유도체 또는 C₁G₁의 TLR 자극 활성을 억제시키는 다른 차단 모이어티이고(단, 하나 이상의 N₁ 또는 N₂는 C₁G₁의 TLR 자극 활성을 억제시키는 차단 모이어티인 것을 조건으로 함); N₃ 및 N₄는, 각각의 출현시, 독립적으로 C₂G₂의 TLR 자극 활성을 억제시키지 않는 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 유도체이며; N_m은, 각각의 출현시, 독립적으로 뉴클레오타이드, 뉴클레오타이드 유도체 또는 비-뉴클레오타이드 연결이고; N_p는, 각각의 출현시, 독립적으로 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 유도체이고(단, 상기 화합물은 3개 이하의 연속된 구아노신 뉴클레오타이드를 함유하는 것을 조건으로 함); 여기서 m은 0부터 약 20까지의 수이고; 여기서 p는 0부터 약 20까지의 수이고; 여기서 상기 올리고뉴클레오타이드는 상기 2'-O-치환된 뉴클레오타이드, 뉴클레오타이드 유도체 또는 C₁G₁의 TLR 자극 활성을 억제시키는 다른 변형이 없는 경우 면역 자극성이다. 이 구체예에서, 제 1 TLR9-유도 모이어티는 제 2 TLR9-유도 모이어티에 대해 5'인데, 상기 제 1 TLR9-유도 모이어티는, TLR9 길항제로서 역할하는, 차단된 TLR9-유도 모이어티이고, 상기 제 2 TLR9-유도 모이어티는 차단되지 않는다.

[0067] 본 발명의 이 양상의 또 다른 구체예에서, 화합물은 구조 5'-N_m-N₁N₂C₁G₁-N_p-N₃N₄C₂G₂-N_m-3'을 지니며, 여기서 C₁ 및 C₂는 독립적으로 시토신 또는 시토신 유도체이고, G₁ 및 G₂는 독립적으로 구아노신 또는 구아노신 유도체이고, 여기서 C₁ 및 G₁ 중 하나 이상은 변형된 뉴클레오타이드이고; N₁ 및 N₂는, 각각의 출현시, 독립적으로 뉴클레오타이드, 2'-치환된(예를 들어, 2'-O-메틸) 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 유도체 또는 C₁G₁의 TLR 자극 활성을 억제시키는 다른 차단 모이어티이고(단, 하나 이상의 N₁ 또는 N₂가 C₁G₁의 TLR 자극 활성을 억제시키는 차단 모이어티인 것을 조건으로 함); N₃ 및 N₄는, 각각의 출현시, 독립적으로 C₂G₂의 TLR 자극 활성을 억제시키지 않는 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 유도체이고; N_m은, 각각의 출현시, 독립적으로 뉴클레오타이드, 뉴클레오타이드 유도체 또는 비-뉴클레오타이드 연결이고; N_p는, 각각의 출현시, 독립적으로 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 유도체이고(단, 상기 화합물은 3개 이하의 연속된 구아노신 뉴클레오타이드를 함유하는 것을 조건으로 함); 여기서 m은 0부터 약 20까지의 수이고; 여기서 p는 0부터 약 20까지의 수이고; 여기서 상기 올리고뉴클레오타이드는 상기 2'-O-치환된 뉴클레오타이드, 뉴클레오타이드 유도체 또는 C₁G₁의 TLR 자극 활성을 억제시키는 다른 변형이 없는 경우 면역 자극성이다. 이 구체예에서, 제 1 TLR9-유도 모이어티는 제 2 TLR9-유도 모이어티에 대해 5'인데, 상기 제 1 TLR9-유도 모이어티는, TLR9 길항제로서 역할하는, 차단된 TLR9-유도 모이어티이고, 상기 제 2 TLR9-유도 모이어티는 차단되지 않는다.

[0068] 본 발명의 이 양상의 추가 구체예에서, 본 발명은 올리고뉴클레오타이드들의 3' 말단에서 연결되거나, 뉴클레오타이드간 연결 또는 기능화된 뉴클레오타이드 또는 당을 통해 비-뉴클레오타이드성 링커에 연결된 2개 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 면역 조절성 올리고뉴클레오타이드를 제공한다. 예를 들어, 이 구체예의 화합물은 구조 5'-N_m-N₁N₂C₁G₁-N_p-N₃N₄C₂G₂-N_r-X-N_r-G₂C₂N₄N₃-N_p-G₁C₁N₂N₁-N_m-5'를 가지며, 여기서 C₁은 시토신이고, G₁은 구아노신이고, C₂는 시토신 또는 시토신 유도체이고, G₂는 구아노신 또는 구아노신 유도체이고; N₁ 및 N₂는, 각각의 출현시, 독립적으로 뉴클레오타이드, 2'-치환된(예를 들어, 2'-O-메틸) 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 유도체 또는 C₁G₁의 TLR 자극 활성을 억제시키는 다른 차단 모이어티이고(단, 하나 이상의 N₁ 또는 N₂가 C₁G₁의 TLR 자극 활성을 억제시키는 차단 모이어티인 것을 조건으로 함); N₃ 및 N₄는, 각각의 출현시, 독립적으로 C₂G₂의 TLR 자

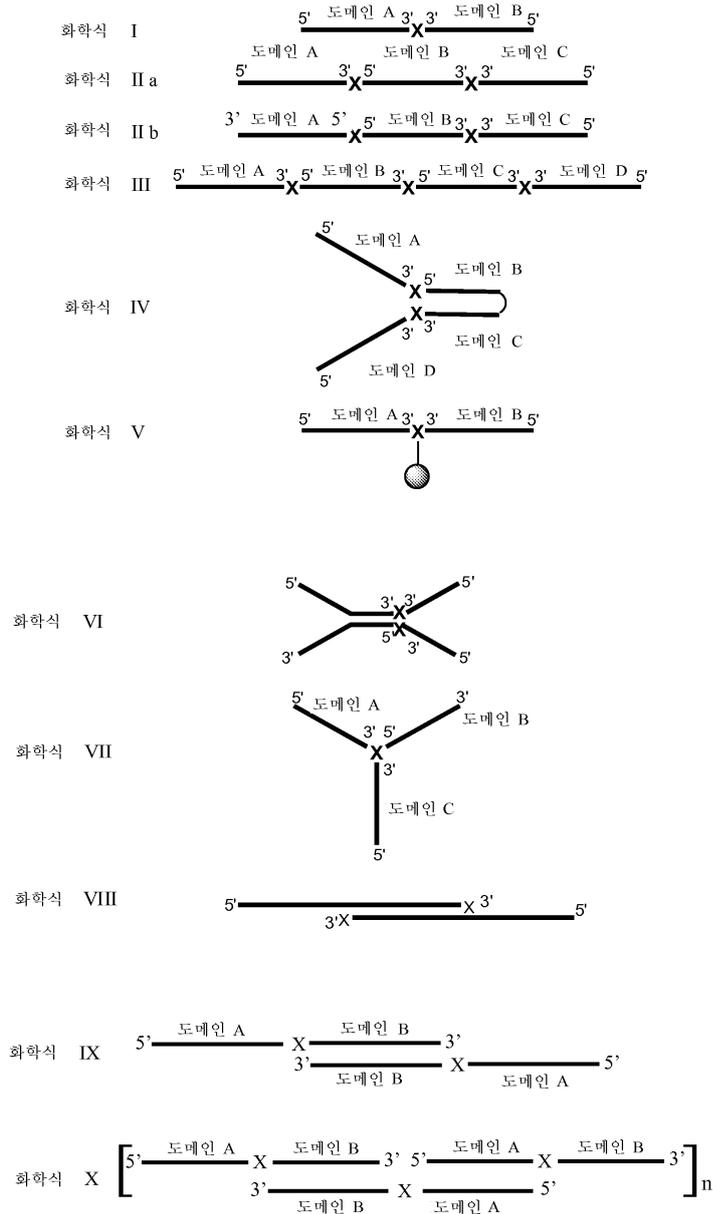
극 활성을 억제시키지 않는 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유도체이고; N_m 은, 각각의 출현시, 독립적으로 뉴클레오티드, 뉴클레오티드 유도체 또는 비-뉴클레오티드 연결이고; N_p 는, 각각의 출현시, 독립적으로 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유도체이고; N_r 은, 각각의 출현시, 독립적으로 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유도체이고 (단, 상기 화합물은 3개 이하의 연속된 구아노신 뉴클레오티드를 함유하는 것을 조건으로 함); 여기서 m 은 0부터 약 20까지의 수이고; 여기서 r 은 0부터 약 20까지의 수이고; 여기서 p 는 0부터 약 20까지의 수이고; 여기서 x 는 비-뉴클레오티드성 링커이고; 여기서 상기 올리고뉴클레오티드는 상기 2'-O-치환된 뉴클레오티드, 뉴클레오티드 유도체 또는 C_1G_1 의 TLR 자극 활성을 억제시키는 다른 변형이 없는 경우 면역 자극성이다;.

[0069] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 올리고뉴클레오티드들의 3' 말단에서 연결되거나, 뉴클레오시드간 연결 또는 기능화된 뉴클레오염기 또는 당을 통해 비-뉴클레오티드성 링커에 연결된 2개 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 면역 조절성 올리고뉴클레오티드를 제공한다. 예를 들어, 이 구체예의 화합물은 구조 5'- $N_m-N_1N_2C_1G_1-N_p-N_3N_4C_2G_2-N_r-X-N_r-G_2C_2N_4N_3-N_p-G_1C_1N_2N_1-N_m-5'$ 을 가지며, 여기서 C_1 및 C_2 는 독립적으로 시토신 또는 시토신 유도체이고, G_1 및 G_2 는 독립적으로 구아노신 또는 구아노신 유도체이고, 여기서 C_1 및 G_1 중 하나 이상은 변형된 뉴클레오시드이고; N_1 및 N_2 는, 각각의 출현시, 독립적으로 뉴클레오티드, 2'-치환된(예를 들어, 2'-O-메틸) 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유도체 또는 C_1G_1 의 TLR 자극 활성을 억제시키는 다른 차단 모이어티이고(단, 하나 이상의 N_1 또는 N_2 가 C_1G_1 의 TLR 자극 활성을 억제시키는 차단 모이어티인 것을 조건으로 함); N_3 및 N_4 는, 각각의 출현시, 독립적으로 C_2G_2 의 TLR 자극 활성을 억제시키지 않는 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유도체이고; N_m 은, 각각의 출현시, 독립적으로 뉴클레오티드, 뉴클레오티드 유도체 또는 비-뉴클레오티드 연결이고; N_p 는, 각각의 출현시, 독립적으로 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유도체이고; N_r 은, 각각의 출현시, 독립적으로 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유도체이고(단, 상기 화합물은 3개 이하의 연속된 구아노신 뉴클레오티드를 함유하는 것을 조건으로 함); 여기서 m 은 0부터 약 20까지의 수이고; 여기서 r 은 0부터 약 20까지의 수이고; 여기서 p 는 0부터 약 20까지의 수이고; 여기서 x 는 비-뉴클레오티드성 링커이고; 여기서 상기 올리고뉴클레오티드는 상기 2'-O-치환된 뉴클레오티드, 뉴클레오티드 유도체 또는 C_1G_1 의 TLR 자극 활성을 억제시키는 다른 변형이 없는 경우 면역 자극성이다;.

[0070] 본 발명의 이러한 구체예들은 하나 이상의 접근가능한(accessible) 5' 말단을 지닐 수 있다. 이 구조가 상기 면역 조절성 올리고뉴클레오티드 화합물에 추가로 안정성(예를 들어, 엑소뉴클레아제 활성의 억제)을 제공한다는 것이 결정되었다. 면역 조절성 올리고뉴클레오티드의 5'-말단은 당해 면역 조절성 올리고뉴클레오티드 화합물이 TLR9를 통해 면역 반응을 조절하는 것을 막도록 그러한 식으로 변형되지 아니한다.

[0071] 본 발명의 이 양상의 또 다른 구체예에서, 2개 이상의 올리고리보뉴클레오티드를 포함하는데, 여기서 도메인 A, B, C, 및 D 중 하나 이상은 하나 이상의 TLR9-유도 모이어티 및 상기 TLR9-유도 모이어티에 대해 5'에 차단된 TLR9-유도 모이어티와 함께 TLR9 길항제를 포함하며, 상기 면역 조절성 화합물은, 이로만 국한되는 것은 아니지만, 표 1의 화학식 I-X로 상세히 기술된 구조를 포함하는, 구조를 갖는다.

표 1: 올리고뉴클레오타이드 화학식 I - X



[0072]

[0073]

[0074]

[0075]

[0076]

[0077]

도메인 A, B, C, 및 D는 독립적으로 약 8 내지 약 30개 뉴클레오타이드, 더 바람직하게는 약 10 내지 약 21개 뉴클레오타이드일 수 있다. 도메인 A, B, C, 및/또는 D는 동일하거나 동일하지 아니할 수 있다. 도메인 A, B, C, 및 D는 자가-상보(self-complementary) 도메인, 동중 또는 이중 리보뉴클레오타이드 서열, 또는 링커를 지니거나 지니지 않는 5'-3' 또는 2'-5' RNA일 수 있다. "n"은 1부터 비제한된 수일 수 있다.

"X"는 3' 또는 5' 연결을 거칠 수 있는 도메인 A, B, C, 및/또는 D를 연결시키거나 캡핑(capping)시키는 링커, 포스페이트 기, 비-RNA 뉴클레오타이드, 또는 알리파틱, 아로마틱, 아릴, 시클릭, 키랄, 비키랄, 펩티드, 카보하이드레이트, 지질, 지방산, 모노-, 트리- 또는 헥사플리에틸렌 글리콜, 또는 헤테로시클릭 모이어티, 또는 이들의 조합일 수 있는 비-뉴클레오타이드성 링커이다.

추가 구체예에서, 본 발명은 비-뉴클레오타이드 링커에 의해 연결된 2개 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 면역 조절성 올리고뉴클레오타이드를 제공하는데, 여기서 상기 면역 조절성 올리고뉴클레오타이드의 서열은 적어도 부분적으로 자기-상보성일 수 있다. 당업계의 통상의 기술자에 의해 인지될 것이지만, 올리고뉴클레오타이드의 상보 서열은 분자내 수소 결합을 가능케 하여, 그로 인해 상기 올리고뉴클레오타이드 2차 구조가 부여된다. 추가 올리고뉴클레오타이드는 함께 결합할 수 있고, 그로 인해, 본 발명에 따른 올리고뉴클레오타이드의,쇄, 또는 다합체(multimers)가 형성될 수 있다.

이 양상에 따른 화합물은 제 1 투여량에서 TLR9의 길항제로서 작용하고 제 2이, 더 높은 투여량에서 TLR9의 부

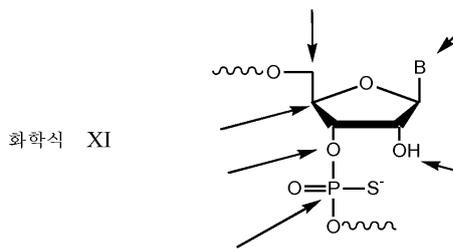
분적인 효능제로서 작용한다. 이론에 의해 제한되는 것을 원치 않지만, 본 출원인은, 더 낮은 농도에서, 이 양상에 따른 화합물이 주로 제 1(5'에 가장 가까운) TLR9-유도 모이어티를 통해 TLR9에 결합한다고 믿는다. 이것은 TLR9이 이들의 5' 말단(들)에서 처음에 올리고뉴클레오티드-기반 화합물과 상호작용하는 것으로 여겨지기 때문이다. 제 1 TLR9-유도 모이어티의 활성이 차단되기 때문에, 상기 화합물은 TLR9이 제 1(5'에 가장 가까운) TLR9-유도 모이어티에서 주로 상기 화합물과 상호작용하는 투여량에서 TLR9 길항제로서 작용한다. 그러나, 더 높은 농도에서, 상기 제 1(5'에 가장 가까운) TLR9-유도 모이어티는 포화되고, TLR9은 제 2(3'에 가장 가까운 (more 3')) TLR9-유도 모이어티에서 상기 화합물과 상호작용하기 시작하는 것으로 믿어진다. 상기 제 2(3'에 가장 가까운) TLR9-유도 모이어티는 차단되지 않기 때문에, 이후 상기 화합물은 TLR9 효능제로서 작용하기 시작한다.

[0078] 이 양상에 따른 화합물의 이점은 TLR9 매개 면역 반응이 상기 화합물의 더 낮은 투여량에서 감소되지만, 상기 지점에서 상기 화합물이 TLR9 효능제로 역할하기 시작하기 때문에 더 높은 투여량에서 폐기되지 않는다는 것이다. 따라서, 이 양상에 따른 화합물은 TLR9의 길항 정도에 있어서 자가-조절성(self-regulating)이다.

[0079] 본 발명의 이 양상에 따른 일부 구체예들에서, 화합물은 미국 특허 제 7,276,489호에 기재된 것과 같은, 이뮤노머 구조를 갖는다.

[0080] 일부 구체예들에서, 선형 올리고뉴클레오티드 또는 하나 이상의 분지된 올리고뉴클레오티드 각각은 독립적으로 약 8 내지 약 30개 뉴클레오티드 잔기를 갖는다. 따라서, 특정 구체예들에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 독립적으로 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30개 뉴클레오티드 길이일 수 있다. 바람직하게는, 올리고뉴클레오티드는 약 11 내지 약 25개 뉴클레오티드 잔기, 더 바람직하게는 약 16 내지 약 21개 뉴클레오티드 잔기이다. 몇몇 구체예들에서, 면역 조절성 올리고뉴클레오티드는 21개 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 특정 바람직한 구체예들은 42개 뉴클레오티드를 포함한다. 바람직하게는, TLR9 길항제 화합물은 하나 이상의 포스포디에스테르, 포스포로티오에이트, 또는 포스포로디티오에이트 뉴클레오티드간 연결을 포함한다.

[0081] 바람직한 구체예들에서, 각각의 뉴클레오티드 유닛은 헤테로시클릭 염기 및 펜토푸라노실, 2'-O-치환된 펜토푸라노실, 트레할로오스, 아라비노스, 2'-데옥시-2'-치환된 아라비노스, 2'-O-치환된 리보오스 또는 아라비노스 또는 핵소오스 당 기를 포함한다. 뉴클레오티드 잔기는 다수의 공지된 뉴클레오티드간 연결 중 임의의 연결에 의해 각자 서로에게 커플링될 수 있다. 그러한 뉴클레오티드간 연결은, 이로만 국한되는 것은 아니지만, 포스포디에스테르, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 알킬포스포네이트, 알킬포스포노티오에이트, 포스포트리에스테르, 포스포르아미데이트, 실록산, 카보네이트, 카르보알콕시, 아세트아미데이트, 카바메이트, 몰포리노, 보라노, 티오에테르, 브릿지된 포스포르아미데이트, 브릿지된 메틸렌 포스포네이트, 브릿지된 포스포로티오에이트, 및 설피온 뉴클레오티드간 연결을 포함한다. 뉴클레오티드를 위한 견주게이션의 가능 부위들은 하기 화학식 XI에 표시되어 있으며, 여기서 B는 헤테로시클릭 염기를 나타낸다.



[0082] 본 발명의 TLR9 길항제 화합물은 자연적으로 생성되는 리보뉴클레오티드, 변형된 리보뉴클레오티드 또는 이의 혼합물을 추가로 포함할 수 있다.

[0084] 헤테로시클릭 염기에 대한 일부 화학적 변형은, 이로만 국한되는 것은 아니지만, 구아닌 유사체, 예컨대, 7-테아자-G, 아라-G, 6-티오-G, 이노신, 이소-G, 록소리빈(loxoribine), TOG(7-티오-8-옥소)-G, 8-브로모-G, 8-히드록시-G, 5-아미노포미신 B, 옥소포미신, 7-메틸-G, 9-p-클로로페닐-8-아자-G, 9-페닐-G, 9-헥실-구아닌, 7-테아자-9-벤질-G, 6-클로로-7-테아자구아닌, 6-메톡시-7-테아자구아닌, 8-아자-7-테아자-G(PPG), 2-(디메틸아미노) 구아노신, 7-메틸-6-티오구아노신, 8-벤질옥시구아노신, 9-테아자구아노신, 및 1-(B-D-푸라노실)-2-옥소-7-테아자-8-메틸-퓨린을 포함한다. 또한 화학적 변형은, 이로만 국한되는 것은 아니지만, 아데닌

유사체, 예컨대, 9-벤질-8-히드록시-2-(2-메톡시에톡시)아데닌, 2-아미노-N2-0-, 메틸아데노신, 8-아자-7-테아자-A, 7-테아자-A, 비다라빈(Vidarabine), 2-아미노아데노신, N1-메틸아데노신, 8-아자아데노신, 5-아이오도티부버시딘을 포함한다. 또한, 화학적 변형은, 이로만 국한되는 것은 아니지만, 시토신 유사체, 예컨대, 2'-데옥시-5-히드록시시티딘 및 2'-데옥시-N4-알킬-시티딘을 포함한다. 또한, 화학적 변형은 이로만 국한되는 것은 아니지만, 우라실 유사체, 예컨대, 4-티오-U를 포함한다.

[0085] 본 발명에 따른 TLR9 길항제 화합물은 이들의 3'- 또는 2'- 말단에서 공유적으로 또는 비공유적으로 연결된 2개 이상의 올리고뉴클레오타이드 또는 비뉴클레오타이드성 또는 뉴클레오타이드성 링커를 통해 기능화된 리보오스 또는 데옥시리보오스(치환된 형태 포함) 또는 기능화된 기능화된 뉴클레오타이드를 포함하는 화합물을 포함한다. 링커의 몇몇 일례는 표 2에 제시되어 있다. 비-공유 연결은, 이로만 국한되는 것은 아니지만, 정전기 상호작용, 수소 결합 상호작용, π -쌓임(π -stacking) 상호작용 및 수소 결합을 포함한다.

[0086] 아직 다른 구체예들에서, 비-뉴클레오타이드성 링커는 올리고뉴클레오타이드에 대한 부착을 가능케하는 작용기를 지니는 유기 모이어티이다. 그러한 부착은 바람직하게는 안정한 공유결합성 연결에 의해 이루어진다. 비제한적인 일례로서, 링커는 뉴클레오타이드 상의 임의의 적합한 위치에 부착될 수 있다. 일부 바람직한 구체예들에서, 상기 링커는 3'-히드록실에 부착된다. 그러한 구체예들에서, 링커는 바람직하게는 히드록실 작용기를 포함하며, 상기 링커는 바람직하게는 포스포디에스테르, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 메틸포스포네이트와 같은 포스페이트-기반 연결, 또는 비-포스페이트-기반 연결을 사용하여 3'-히드록실에 부착된다.

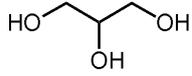
[0087] 일부 구체예들에서, 비-뉴클레오타이드성 링커는 폴리펩티드, 항체, 지질, 항원, 알레르겐, 및 올리고사카라이드를 포함하는, 작은 분자, 거대분자 또는 생체분자이나, 이로만 국한되는 것은 아니다. 일부 다른 구체예들에서, 비-뉴클레오타이드성 링커는 작은 분자이다. 본 발명의 목적을 위해, 작은 분자는 1,000 Da 미만의 분자량을 갖는 유기 모이어티이다. 일부 구체예들에서, 작은 분자는 750 Da 미만의 분자량을 갖는다.

[0088] 일부 구체예들에서, 작은 분자는 알리파틱 또는 아로마틱 탄화수소인데, 상기 알리파틱 또는 아로마틱 탄화수소 중 어느 하나는, 올리고뉴클레오타이드를 연결하는 직선 쇠내에 또는 상기 분자에 첨부된 직선 쇠내에, 히드록시, 아미노, 티올, 티오에테르, 에테르, 아미드, 티오아미드, 에스테르, 우레아 또는 티오우레아를 포함하나, 이로만 국한되는 것은 아닌, 하나 이상의 작용기를 포함하거나 불포함할 수 있다. 작은 분자는 고리 또는 비고리일 수 있다. 작은 분자 링커의 일례는, 이로만 국한되는 것은 아니지만, 아미노산, 탄수화물, 시클로텍스트린, 아다만탄, 콜레스테롤, 합텐, 및 항생제를 포함한다. 그러나, 비-뉴클레오타이드성 링커를 기술하기 위한, 용어 "작은 분자"는 뉴클레오타이드를 포함하려는 의도는 아니다.

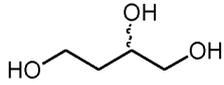
[0089] 몇몇 구체예들에서, 비-뉴클레오타이드성 링커는 알킬 링커 또는 아미노 링커이다. 알킬 링커는 분지 또는 비분지, 고리 또는 비고리, 치환된 또는 비치환된, 포화 또는 불포화, 키랄, 비키랄 또는 라세믹 혼합물일 수 있다. 알킬 링커는 약 2 내지 약 18개 탄소 원자를 지닐 수 있다. 일부 구체예들에서, 그러한 알킬 링커는 약 3 내지 약 9개 탄소 원자를 지닐 수 있다. 일부 알킬 링커는, 이로만 국한되는 것은 아니지만, 히드록시, 아미노, 티올, 티오에테르, 에테르, 아미드, 티오아미드, 에스테르, 우레아, 및 티오에테르를 포함하는, 하나 이상의 작용기를 포함한다. 그러한 알킬 링커는, 이로만 국한되는 것은 아니지만, 1-프로판올, 1,2 프로판디올, 1,3 프로판디올, 1,2,3, 프로판트리올, 트리에틸렌 글리콜, 헥사에틸렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 링커(예를 들어, [-O-CH₂-CH₂-]_n(n = 1-9)), 메틸 링커, 에틸 링커, 프로필 링커, 부틸 링커, 또는 헥실 링커를 포함할 수 있다. 일부 구체예들에서, 그러한 알킬 링커는 펩티드 또는 아미노산을 포함할 수 있다.

[0090] 일부 구체예들에서, 비-뉴클레오타이드성 링커는, 이로만 국한되는 것은 아니지만, 표 2에 나열된 링커들을 포함할 수 있다.

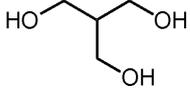
표 2: 대표적인 비-뉴클레오타이드성 링커



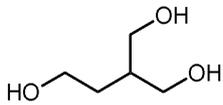
글리세롤 (1,2,3-프로판트리올)



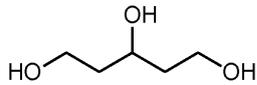
1,2,4-부탄트리올



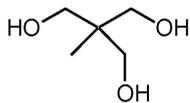
2-(히드록시메틸)-1,3-프로판디올



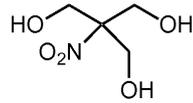
2-(히드록시메틸) 1,4-부탄디올



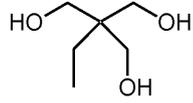
1,3,5-펜탄트리올



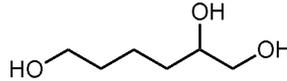
1,1,1-트리스(히드록시메틸)에탄



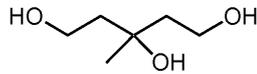
1,1,1-트리스(히드록시메틸)니트로메탄



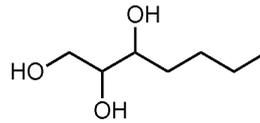
1,1,1-트리스(히드록시메틸)프로판



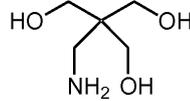
1,2,6-헥산트리올



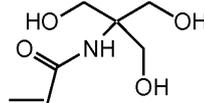
3-메틸-1,3,5-펜탄트리올



1,2,3-헵탄트리올



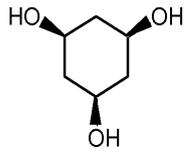
2-아미노-2-(히드록시메틸)-1,3-프로판디올



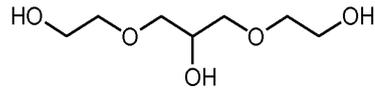
N-[트리스(히드록시메틸)메틸]아크릴아미드

[0091]

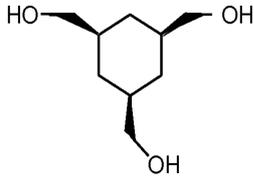
표 2: 계속



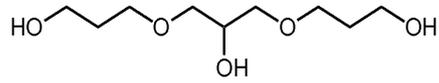
시스-1,3,5-시클로헥산트리올



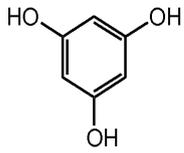
1,3-디(히드록시에톡시)-2-히드록실-프로판



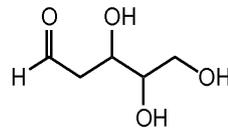
시스-1,3,5-트리(히드록시메틸)시클로헥산



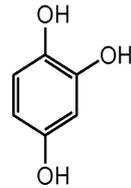
1,3-디(히드록시프로폭시)-2-히드록실-프로판



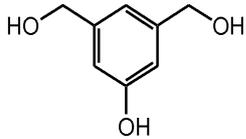
1,3,5-트리히드록실-벤젠



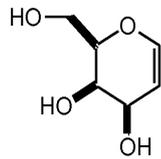
2-데옥시-D-리보오스



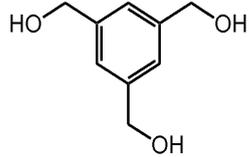
1,2,4-트리히드록실-벤젠



3,5-디(히드록시메틸)페놀



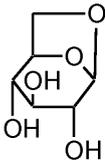
D-갈락토알



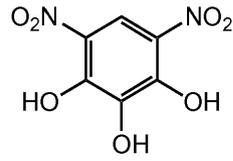
1,3,5-트리(히드록시메틸)벤젠

[0092]

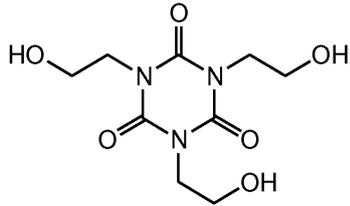
표 2: 계속



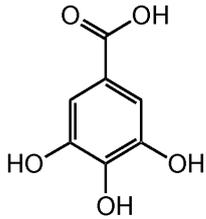
1,6-안히드로-β-D-글루코스



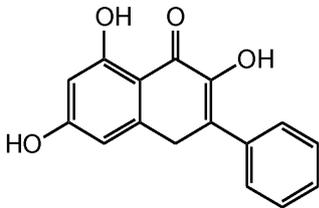
4,6-니트로피로갈올



1,3,5-트리스(2-히드록시에틸)-시아뉴르산



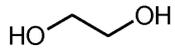
갈릭산



3,5,7-트리히드록시플라본

[0093]

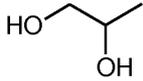
표 2: 계속



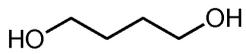
에틸렌 글리콜



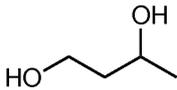
1,3-프로판디올



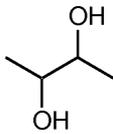
1,2-프로판디올



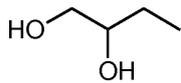
1,4-부탄디올



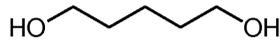
1,3-부탄디올



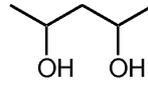
2,3-부탄디올



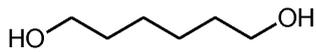
1,4-부탄디올



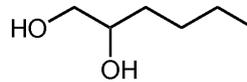
1,5-펜탄디올



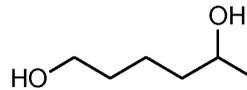
2,4-펜탄디올



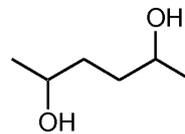
1,6-헥산디올



1,2-헥산디올



1,5-헥산디올



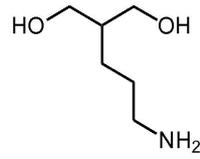
2,5-헥산디올

[0094]

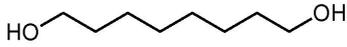
표 2: 계속



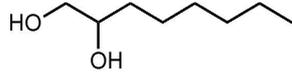
1,7-헵탄디올



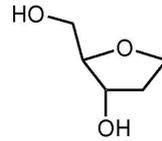
2-(1-아미노프로필)-1,3-프로판디올



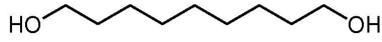
1,8-옥탄디올



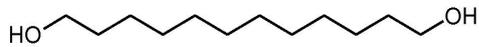
1,2-옥탄디올



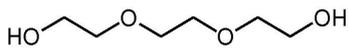
1,2-디데옥시리보오스



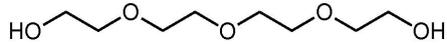
1,9-노난디올



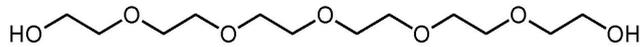
1,12-도데칸디올



트리에틸렌 글리콜



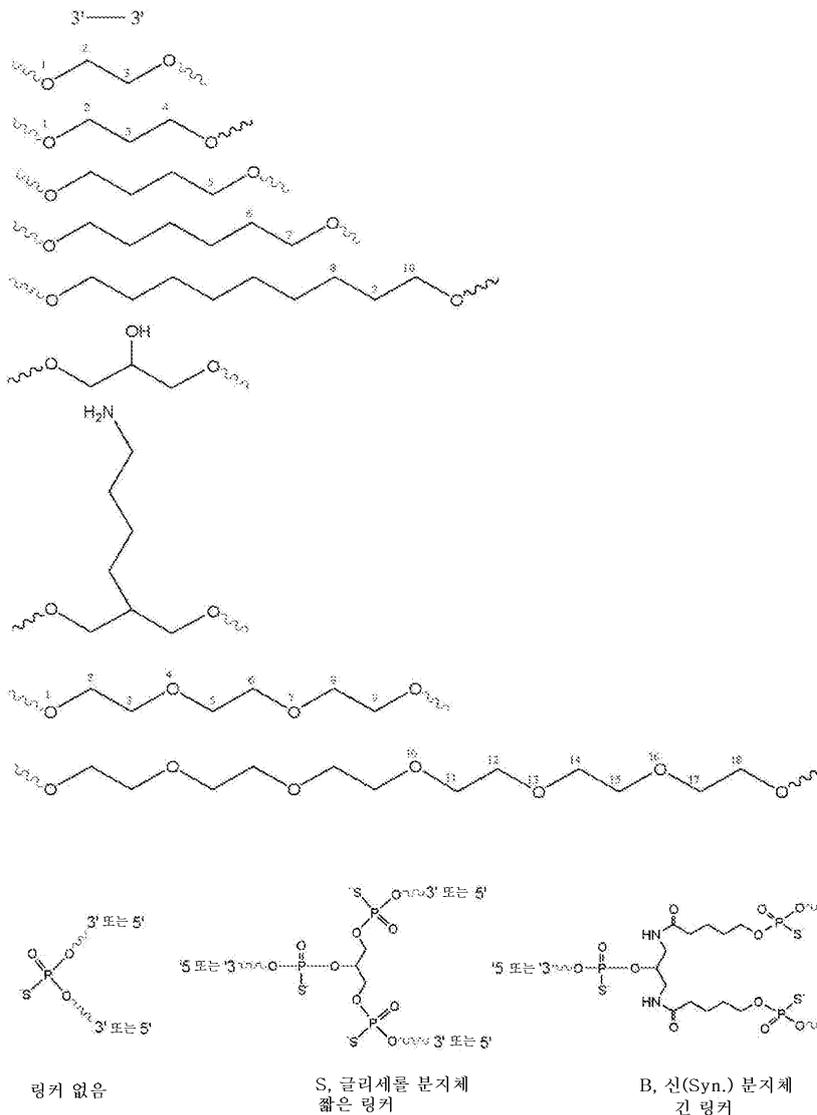
테트라에틸렌 글리콜



헥사에틸렌 글리콜

[0095]

표 2: 계속



[0096]

[0097]

일부 구체예들에서, 작은 분자 링커는 글리세롤 또는 화학식 $\text{HO}-(\text{CH}_2)_o-\text{CH}(\text{OH})-(\text{CH}_2)_p-\text{OH}$ 의 글리세롤 상동체 (homolog)인데, 여기서 o 및/또는 p 는 독립적으로 1 내지 약 6, 1 내지 약 4, 또는 1 내지 약 3의 정수이다. 일부 다른 구체예들에서, 작은 분자 링커는 1,3-디아미노-2-히드록시프로판의 유도체이다. 일부 그러한 유도체는 화학식 $\text{HO}-(\text{CH}_2)_m-\text{C}(\text{O})\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{NHC}(\text{O})-(\text{CH}_2)_n-\text{OH}$ 를 갖는데, 여기서 m 은 0 내지 약 10, 0 내지 약 6, 2 내지 약 6, 또는 2 내지 약 4의 정수이다.

[0098]

본 발명에 따른 일부 비-뉴클레오티드 링커는 표 1에 도시된 바와 같이, 2개 이상의 올리고뉴클레오티드의 부착을 가능케한다. 예를 들어, 작은 분자 링커 글리세롤은 올리고뉴클레오티드가 공유적으로 부착될 수 있는 3개의 히드록실기를 갖는다. 따라서, 본 발명에 따른 일부 면역 조절성 올리고뉴클레오티드는 비-뉴클레오티드 링커를 통해 연결된 2개 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함한다.

[0099]

본 발명의 이 양상의 추가 구체예에서, TLR9 길항제 화합물은, 표 1에 도시된 것과 같이, 이들의 3' 또는 5' 말단에서, 또는 뉴클레오티드간 연결 또는 기능화된 뉴클레오티드 또는 당을 통해 2개 이상의 링커에 연결된 3개 이상의 올리고뉴클레오티드를 함유할 수 있다. 본 발명의 이 양상의 올리고뉴클레오티드는 동일 또는 상이한 서열을 지닐 수 있다. 본 발명의 이 양상의 링커는 동일 또는 상이할 수 있다.

[0100]

본 발명에 의해 포함되는 화합물의 특성을 입증하기 위해 사용하였던 특정 면역 조절성 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오티드 화합물의 서열은 표 3에 제시된 서열을 포함한다.

표 3

면역 조절성 올리고뉴클레오타이드 / 서열번호 :	서열
1	5'-TCTGACGTTTTTTGACGTTCT-3'
2	5'-TCTGACGTTTTTTGACGTTCT-3'
3	5'-TCTGACGTTTTTTGACGTTCT-3'
4	5'-TCTGACGTTTTTTGACGTTCT-3'
5	5'-TCTGACG ₁ TTTTTTGACG ₁ TTCT-3'
6	5'-TCTGACG ₁ TTTTTTGACG ₁ TTCT-3'
7	5'-TCTGACG ₁ TTTTTTGACG ₁ TTCT-3'
8	5'-TCTGACG ₁ TTTTTTGACG ₁ TTCT-3'
9 (대조 TLR9 효능제)	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
10 (대조 TLR9 효능제)	5'-TCTGACG ₁ TTCT-X-TCTTG ₁ CAGTCT-5'
11 (대조 비-면역 조절성 올리고뉴클레오타이드)	5'-ACACACCAACT-X-TCAACCACACA-5'
12	5'-TCTGACGTTTTTTGACGTTCT-X- TCTTGACGTTTTTTGACGTTCT-5'
13	5'-TCTGACGTTTTTTGACGTTCT-X- TCTTGACGTTTTTTGACGTTCT-5'
14	5'-TCTGACG ₁ TTTTTTGACG ₁ TTCT-X- TCTTG ₁ CAGTTTTTTG ₁ CAGTCT-5'
15	5'-TCTGACG ₁ TTTTTTGACG ₁ TTCT-X- TCTTG ₁ CAGTTTTTTG ₁ CAGTCT-5'

밑줄 친 뉴클레오타이드는 2'-O-메틸리보뉴클레오타이드를 나타낸다 ; G1 = 2'-데옥시-7-

테아자구아노신 ; X = 비-뉴클레오타이드성 링커, 예를 들어, 글리세롤.

[0101]

본 발명의 TLR9 길항제 화합물은 도 1 및 2에 도시적으로 도시된 것과 같이, 또한 실시예에 추가로 기재된 대로 자동화된 합성기 및 포스포르아미다이트 접근법을 사용하여 간편하게 합성될 수 있다. 일부 구체예들에서, 면역 조절성 올리고뉴클레오타이드는 선형 합성 방법에 의해 합성된다(도 1).

[0103]

대안적인 합성 방식은 "병렬 합성"인데, 이 합성은 중심 링커 모이어티로부터 바깥쪽으로 진행한다(도 2 참조). 고체 지지체에 부착된 링커가, 미국 특허 제 5,912,332호에 기재된 것과 같이, 병렬 합성을 위해 사용될 수 있다. 대안적으로, 범용 고체 지지체(예컨대, 포스페이트가 부착된 조절된 세공 유리) 지지체가 사용될 수 있다.

[0104]

본 발명에 따른 화합물의 병렬 합성은 선형 합성을 능가하는 몇가지 이점을 지닌다: (1) 병렬 합성은 동일한 단량체 유닛의 통합을 가능케 한다; (2) 선형 합성과 달리, 두 (또는 모든) 단량체 유닛이 동시에 합성되고, 그로 인해 합성에 필요한 합성 단계의 수와 시간은 단량체 유닛의 그것과 동일하다; (3) 합성 단계의 감소는 최종 면역 조절성 올리고뉴클레오타이드 생성물의 순도 및 수율을 개선시킨다.

[0105]

선형 합성 또는 병렬 합성 프로토콜 중 어느 하나에 의한 합성의 말기에, 면역 조절성 올리고뉴클레오타이드는, 변형된 뉴클레오타이드가 통합되는 경우, 포스포르아미다이트 공급업자에 의해 권장된 대로 또는 농축 암노니아 용액으로 간편하게 탈보호될 수 있다. 생성물 면역 조절성 올리고뉴클레오타이드는 역상 HPLC에 의해 정제되고, 탈트리틸화(detritylation)되고, 제염되고 투석되는 것이 바람직할 수 있다.

[0106]

제 2 양상에서, 본 발명은 본 발명에 따른 TLR9 길항제 화합물 및 생리학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제 제형을 제공한다.

[0107]

제 3 양상에서, 본 발명은 포유동물에서 TLR9-매개 면역 반응을 감소시키는 방법을 제공하는데, 당해 방법은 상기 TLR9-매개 면역 반응을 감소시키는 양으로 본 발명에 따른 화합물 또는 약제 제형을 상기 포유동물에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0108]

제 4 양상에서, 본 발명은 TLR9-매개 면역 반응을 감소시키는 것이 이로울 질환 또는 장애, 예를 들어, 자가면역 질환, 기도 염증, 염증성 질환, 알레르기, 천식, 천식, 관절염, 관절염, 말라리아, 알레르기, 이식 거부반응, 감염성 질환, 및 자가면역 성분을 지니는 기타 질환 및 장애를 지니는 포유동물을 치료학적으로 치료하는 방법

을 제공한다. 본 발명의 이 양상에 따른 방법은 약제학적 유효량으로 본 발명에 따른 화합물 또는 약제 제형을 그러한 장애 또는 질환을 지니는 상기 포유동물에게 투여하는 단계를 포함한다.

- [0109] 제 5 양상에서, 본 발명은 TLR9-매개 면역 반응을 감소시키는 것이 이로울 수 있는 질환 또는 장애, 예를 들어, 자가면역질환, 암, 기도 염증, 염증성 질환, 감염성 질환, 말라리아, 라임병, 안구 감염증, 피부 질환, 건선, 경피증, 심혈관질환, 죽상동맥경화증, 만성 피로 증후군, 유훈증, 알레르기, 천식 또는 병원균에 의해 초래된 질환을 예방하기 위한 방법을 제공한다. 본 발명의 이 양상에 따른 방법은 약제학적 유효량으로 본 발명에 따른 화합물 또는 약제 제형을 그러한 장애 또는 질환에 걸리기 쉬운 포유동물에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0110] 일부 구체예들에서, 자가면역질환은 홍반성 낭창, 다발성 경화증, 타입 I 당뇨병, 과민성 대장 증후군, 크론병, 류마티스 관절염, 폐혈성 쇼크, 전신 탈모증, 급성 산재성 뇌척수염, 에디슨병, 강직성 척수염, 항인지질 항체 증후군, 자가면역성 용혈성 빈혈, 자가면역성 간염, 수포성유친포창, 샤가스병, 만성 폐쇄성 폐질환, 복강병, 피부근염, 자궁내막증, 굿패스츄어 증후군, 그레이브병, 길랑-바레 증후군, 하시모토병, 화농성 한선염, 특발성 혈소판 감소성 자반증, 간질성 방광염, 반상 경피증(morphea), 중증 근무력증, 기면 발작, 신경근육긴장증, 수포창, 악성 빈혈, 다발성근염, 원발성 담즙성 간경변증, 정신분열증, 쇼그렌 증후군, 측두 동맥염 ("거대세포동맥염"), 맥관염, 백반증, 성기통 및 베게너 육아종증 중에서 선택된다.
- [0111] 일부 구체예들에서, 상기 염증성 질환은 기도 염증, 천식, 자가면역질환, 만성 염증, 만성 전립선염, 사구체신염, 베체트병, 과민증, 염증성 장 질환, 재관류 손상, 류마티스 관절염, 이식 거부반응, 췌양성 대장염, 포도막염, 결막염 및 맥관염 중에서 선택된다.
- [0112] 본 발명에 따른 방법들 중 임의의 방법에서, TLR9 길항제 화합물은 단독으로 및/또는 화합물의 TLR9 길항제 효과를 약화시키지 않는 질환 또는 병태를 치료 또는 예방하는데 유용한 임의의 다른 물질과 조합하여 직접적인 TLR9 길항제 효과를 생산함으로써 다양하게 작용할 수 있다. 본 발명에 따른 방법들 중 임의의 방법에서, 상기 질환 또는 병태를 치료 또는 예방하는데 유용한 물질(들)은, 이로만 국한되는 것은 아니지만, 백신, 항원, 항체, 바람직하게는 모노클로날 항체, 세포독성제, 알레르겐, 항생제, siRNA, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 기타 TLR 효능제 또는 길항제(예를 들어, TLR7, TLR8 및/또는 TLR3의 효능제 또는 길항제), 화학치료제(재래식 화학치료제 및 근대식 표적화된 치료제 둘 모두), 표적화된 치료제, 활성화된, 펩티드, 단백질, 유전자 치료 벡터, 펩티드 백신, 단백질 백신, DNA 백신, 애주번트, 및 동시자극분자(예를 들어, 사이토카인, 케모카인, 단백질 리간드, 트랜스-활성화 인자, 펩티드 또는 변형된 아미노산을 포함하는 펩티드), 또는 이들의 조합물을 포함한다. 대안적으로, 상기 물질은 항원 또는 알레르겐을 엔코딩하는 DNA 벡터를 포함할 수 있다. 대안적으로, 화합물은 화합물에 대한 면역 반응의 특이성 또는 규모를 증강시키기 위해 다른 애주번트와 조합하여 투여될 수 있다.
- [0113] 본 발명에 따른 방법들 중 임의의 방법에서, 단독으로 또는 임의의 다른 물질과 조합하여, TLR9 길항제 화합물을 투여하는 것은, 이로만 제한되는 것은 아니지만, 비경구, 점막 전달, 경구, 설하, 경피, 국소, 흡입, 비내, 에어로졸, 안구내, 기도내, 직장내, 질내를 포함하는 임의의 적합한 경로에 의해, 유전자 총에 의해, 피부 패치, 또는 점안액으로 또는 구강세척액 형태로 이루어질 수 있다. TLR9 길항제 화합물의 치료 조성물의 투여는 질환의 증상 또는 대리 지표(surrogate markers)를 감소시키는데 유용한 시간 동안 유효량을 사용하는 공지된 절차를 사용하여 실행될 수 있다. 예를 들어, 질환 및/또는 장애를 치료하기 위한 TLR9 길항제 화합물의 유효량은 증상을 완화 또는 감소시키거나, 자가면역 반응을 지연 또는 경감시키는데 필요한 그러한 양일 수 있다. 임의의 특별한 적용을 위한 유효량은 치료되는 질환 또는 병태, 투여되는 특정 올리고뉴클레오티드, 피검체의 크기, 질환 또는 병태의 극심도와 같은 인자에 따라 달라질 수 있다. 당업계의 통상이 기술자는 과도한 실험 없이 특정 올리고뉴클레오티드의 유효량을 실험적으로 결정할 수 있다.
- [0114] 전신적으로 투여될 때, 치료학적 조성물은 약 0.0001 마이크로몰(micromolar) 내지 약 10 마이크로몰의 TLR9 길항제 화합물의 혈중 수준을 달성시키기 위해 충분한 투여량으로 투여되는 것이 바람직할 수 있다. 국소 투여의 경우, 이 보다 훨씬 더 낮은 농도가 효과적일 수 있고, 훨씬 더 높은 농도는 내성일 수 있다. 바람직하게는, TLR9 길항제 화합물이 총 투여량은 일(日)당 환자당 약 0.001 mg 내지 일(日)당 체중 kg 당 약 200 mg 범위 이내이다. 단일 치료 에피소드로서 치료학적으로 유효량의 하나 이상의 본 발명의 치료학적 조성물을 동시에, 또는 순차적으로 투여하는 것이 바람직할 수 있다.
- [0115] TLR9 길항제 화합물은 하나 이상의 알레르겐 및/또는 항원(자가 또는 외래), 면역원성 단백질, 예컨대, 키홀 림펫 헤모시아닌(keyhole limpet hemocyanin, KLH), 콜레라 독소 B 서브유닛, 또는 임의의 기타 면역원성 단백질에 연결되거나 연결되지 않을 수 있다. TLR9 길항제 화합물은 또한 프레온드 불완전 애주번트, KLH, 모

노포스포릴 지질 A(MPL), 명반(alum), 및 사포닌(QS-21과 이미퀴모드를 포함하는 사포닌, 또는 이들의 조합물을 포함하나, 이로만 국한되지 아니하는, 기타 화합물(예를 들어, 에주번트)과 조합되어 사용될 수 있다.

[0116] 본 발명의 이 양상에 따른 방법들은 면역 시스템의 모델 연구에 유용하다. 또한 본 발명의 방법들은 인간 또는 동물 질환의 예방학적 또는 치료학적 치료에 유용하다. 예를 들어, 본 발명의 방법들은 소아 및 수의 백신 적용에 유용하다.

[0117] 하기 실시예들은 본 발명의 특별한 바람직한 구체예들을 더 상세히 설명하기 위한 의도로 기술된 것이며, 본 발명의 보호범위를 제한하기 위한 의도로 기술된 것은 아니다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0118] **실시예**

[0119] **실시예 1**

[0120] TLR9 길항제 화합물 합성

[0121] 면역 조절성 올리고뉴클레오티드를 자동화된 DNA/RNA 합성기에서 포스포아미다이트 화학을 사용하여 화학적으로 합성하였다. TAC 보호된(U 제외) 2'-O-TBDMS RNA 단량체, A, G, C 및 U를 시그마-알드리히(Sigma-Aldrich)로부터 구입하였다. 7-테아자-G, 이노신 및 독소리빈 단량체를 켐진스 코퍼레이션(ChemGenes Corporation)으로부터 구입하였다. 0.25M 5-에틸티오-1H-테트라졸, PAC-안하이드라이드 캡(Cap) A 및 캡 B를 글렌 리서치(Glen Research)로부터 구입하였다. 디클로로메탄(DCM) 중의 3% 트리클로로아세트산(TCA) 및 5% 3H-1,2-벤조디티올-3-온-1,1-디옥사이드(뷰케이지(Beaucage) 시약)를 자체적으로 제조하였다.

[0122] TLR9 길항제 화합물을 표준 DNA 합성 프로토콜을 사용하여 1-2 μM 규모로 합성하였다.

[0123] 절단 및 염기 탈보호

[0124] TLR9 길항제 화합물을 고체 지지체로부터 잘라 내었고 용액을 엑소시클릭-아민의 보호기 제거를 위해 65°C에서 추가로 가열하였다. 그 결과 얻어진 용액을 스피드백(SpeedVac)에서 완전히 건조시켰다.

[0125] 이온 교환 HPLC 정제

[0126] TLR9 길항제 화합물을 이온 교환 HPLC로 정제하였다.

[0127] 컬럼: Dionex DNAPac 100 컬럼(22X250)

[0128] 컬럼 히터: ChromTech TL-105 HPLC 컬럼 히터, 온도는 80°C로 설정.

[0129] 완충액 A: 20 mM 트리스-HCl, pH 7.0, 20% 아세토니트릴

[0130] 완충액 B: 3.0 M NaCl, 20 mM 트리스-HCl, pH 7.0, 20% 아세토니트릴

[0131] 유속: 10ml/분

[0132] 구배:

[0133] 0-2 분: 0% B

[0134] 2-11 분: 0% B 내지 35% B

[0135] 11-41 분: 35% B 내지 90% B

[0136] 41-45 분: 100% B

[0137] 미정제 TLR9 길항제 화합물 용액을 HPLC내로 주입하였다. 상기 구배를 실행하고 분획을 수집하였다. 90% 이상 원하는 생성물을 함유하는 모든 분획을 혼합하고, 이후 요액을 농축시켜 로토랩(RotoVap)으로 거의 완전히 건조시켰다. 증류된 탈이온수를 첨가하여 최종 부피 10 ml를 제조하였다.

[0138] C-18 역상 제염

[0139] 워터스(Waters)에서 구입한 tC-18 Sep-Pak 카트리지를 제일 처음 10 ml의 아세토니트릴로 처리하고 후속하여 10 ml의 0.5 M 소듐 아세테이트로 처리하였다. 10 ml의 면역 조절성 올리고뉴클레오티드 용액을 로딩시켰다. 이후 15 ml의 물을 사용하여 염을 세척하였다. 면역 조절성 올리고뉴클레오티드를 최종적으로 물 중의 1 ml의

50% 아세토니트릴로 용리시켰다.

- [0140] 용액을 30분 동안 스피드백(SpeedVac)에 위치시켰다. 잔여 용액을 0.2 마이크로 필터를 통해 여과시키고 이후 건조를 위해 동결건조시켰다. 이후 고체를 물에 재용해시켜 원하는 농도로 만들었다.
- [0141] 최종 용액을 0℃ 미만에서 저장하였다.
- [0142] 모세관 전기영동
- [0143] 합성 및 정제후, TLR9 길항제 화합물을 모세관 전기영동으로 분석하였다.
- [0144] 장치: Beckman 5010
- [0145] 모세관: 62cm ssDNA 모세관
- [0146] 샘플 제조물: 0.2 OD의 TLR9 길항제 화합물을 200 μ l의 증류된 탈이온수에 용해시켰다.
- [0147] 주입: 5초 동안 5KV로 동전기적(electro-kinetic) 주입.
- [0148] 실행 조건: 30℃에서 50분 동안 14KV.
- [0149] 이온 교환 HPLC 분석
- [0150] 합성 및 정제후, TLR9 길항제 화합물을 이온 교환 HPLC로 분석하였다.
- [0151] 컬럼: Dionex DNAPac 가드 컬럼 (22X250)
- [0152] 컬럼 히터: ChromTech TL- 105 HPLC 컬럼 히터, 온도를 80 ℃로 설정함.
- [0153] 완충액 A: 100 mM 트리스-HCl, pH 8.0, 20% 아세토니트릴(acetonitrile)
- [0154] 완충액 B: 2.0 M LiCl, 100 mM 트리스-HCl, pH 8.0, 20% 아세토니트릴
- [0155] 유속: 2ml/min
- [0156] 구매:
- [0157] 0-2 min: 0% B
- [0158] 2-10 min: 0% B 내지 100% B
- [0159] 10-15 min: 100% B
- [0160] PAGE 분석
- [0161] 0.3 OD의 면역 조절성 올리고뉴클레오타이드를 20% 폴리아크릴아미드 겔에 로딩시키고 대략 5시간 동안 4 와트의 정전류로 전기영동시켰다. 겔을 짧은 파장의 UV 광선 아래서 관찰하였다.
- [0162] **실시예 2**
- [0163] 인간 세포 배양 프로토콜
- [0164] HEK293/인간 TLR7 또는 HEK293/인간 TLR8 세포(Invivogen, San Diego, CA)를 5% CO₂ 인큐베이터에서 10% 열-불활성화된 FBS가 보충된 250 μ l/웰 DMEM 중의 48-웰 플레이트에서 배양하였다.
- [0165] 리포터 유전자 형질전환
- [0166] 마우스 TLR993을 안정적으로 발현하는 HEK293 세포(Invivogen, San Diego, CA)를 5% CO₂ 인큐베이터에서 10% 열-불활성화된 FBS가 보충된 250 μ l/웰 DMEM 중의 48-웰 플레이트에서 배양하였다. 80% 컨플루언스(confluence)시, 배양물에 배양 배지 중의 4 μ l/ml의 리포펙타민(Invitrogen, Carlsbad, CA) 존재하에 400 ng/ml의 SEAP(인간 배아 알카라인 포스파타제의 분비형) 리포터 플라스미드(pNifty2-Seap)(Invivogen)를 순간적으로 트랜스펙션시켰다. 플라스미드 DNA와 리포펙타민을 무혈청 배지에서 따로 따로 희석시키고 5분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 인큐베이션후, 희석된 DNA와 리포펙타민을 혼합하고 혼합물을 20분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 100 ng의 플라스미드 DNA 및 1 μ l의 리포펙타민을 함유하는 25 μ l의 DNA/리포펙타민 혼합물의 분취액을 세포 배양 플레이트의 각각의 웰에 첨가하고, 배양을 4시간 동안 지속하였다.

[0167] TLR9 길항제 처리

[0168] 트랜스펙션후, 배지를 신선한 배양 배지로 대체하고, TLR9 길항제 화합물을 배양 배지에 첨가하고, 배양을 18시간 동안 지속하였다. 처리 말기에, 30 μ l의 배양 상청액을 각각의 처리로부터 획득하고 제조업자(Invivogen)의 프로토콜에 따라 SEAP 검정에 사용하였다.

[0169] SEAP 검정

[0170] 요약하면, 배양 상청액을 p-니트로페닐(nitrophenyl) 포스페이트 기질과 함께 인큐베이션하고 생성된 노란색 컬러를 405 nm에서 플레이트 판독기로 측정하였다. 데이터는 PBS 대조군에 비해 NF- κ B 활성화에서의 증가 배수로 제시된다. (Putta MR et al, Nucleic Acids Res, 2006, 34:3231-8). 결과는 도 3에 제시되어 있다.

[0171] **실시예 3**

[0172] 투여량 조절된 TLR9 길항제 화합물로 처리된 마우스 모델에서 생체내 IL-12 분비

[0173] 6-8주령의 C57BL/6 마우스 및 BALB/c 마우스를 타코닉 팜스(Taconic Farms, Germantown, NY)로부터 입수하고, 이데라 파마슈티칼(Idera Pharmaceutical)의 IACUC 승인된 동물 프로토콜에 따라 유지하였다. 마우스(n=3)에게 1, 10, 또는 20 mg/kg(단일 용량)으로 표 3의 개별 면역 조절성 올리고뉴클레오티드를 피하로(s.c) 주입하였다. 혈청을 면역 조절성 올리고뉴클레오티드 투여 2시간 경과후 수집하고 사이토카인과 케모카인 농도를 샌드위치 ELISA 또는 루미넥스(Luminex) 멀티플렉스 검정으로 측정하였다. 결과는 도. 4, 5, 및 7에 도시되어 있고 면역 조절성 올리고뉴클레오티드를 함유한 신규한 화학 조성물의 생체내 투여는 특유의 사이토카인 프로파일을 생성 시킴을 입증한다. 사이토카인과 케모카인 항체 및 표준물질(standards)을 포함하는, 모든 시약을 파밍젠(PharMingen)(San Diego, CA)에서 구입하였다.

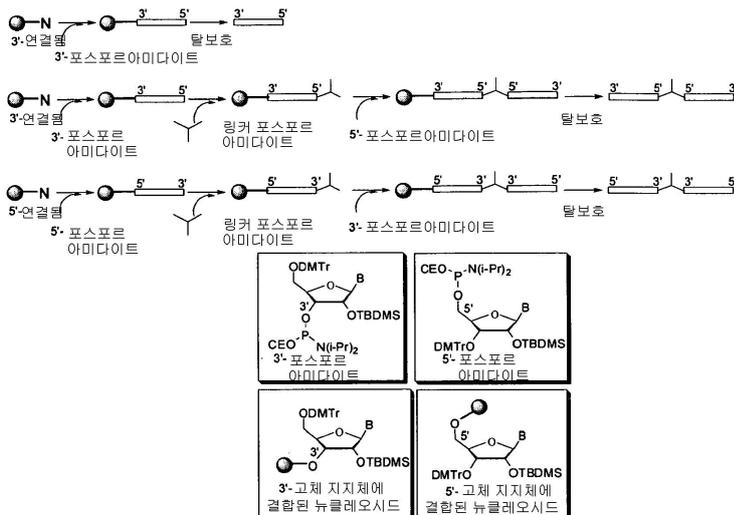
[0174] **균등물(EQUIVALENTS)**

[0175] 앞서 기술한 발명이 명확함과 이해를 목적으로 다소 상세하게 기재되었으나, 형태와 세부사항에서의 다양한 변형이 본 발명의 진실한 권리범위 및 첨부된 특허청구범위에서 벗어남이 없이 이루어질 수 있다는 것을 당해 기술분야의 당업자에 의해 이해될 것이다.

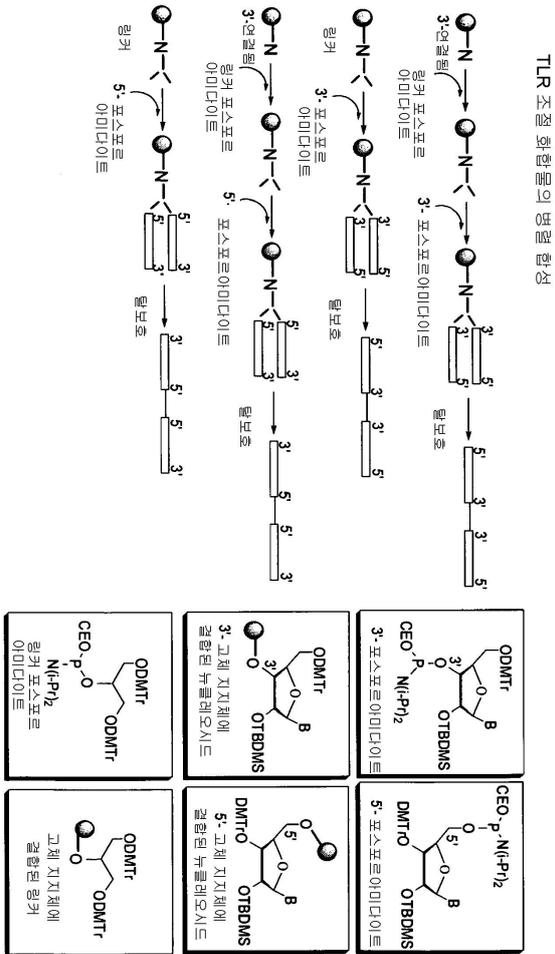
도면

도면1

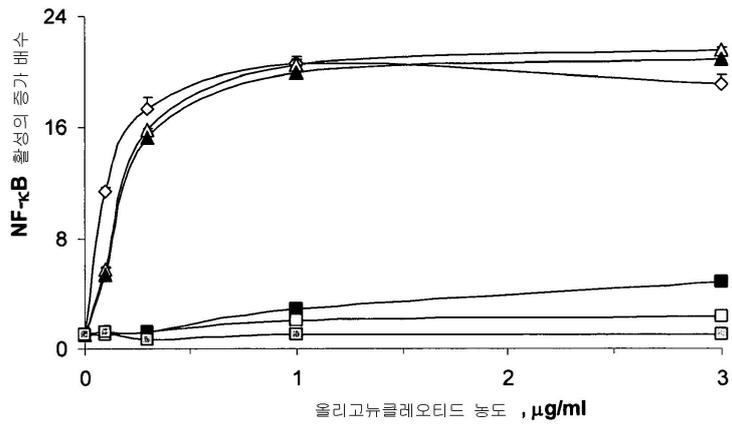
TLR 조절 화합물의 선형 합성



도면2

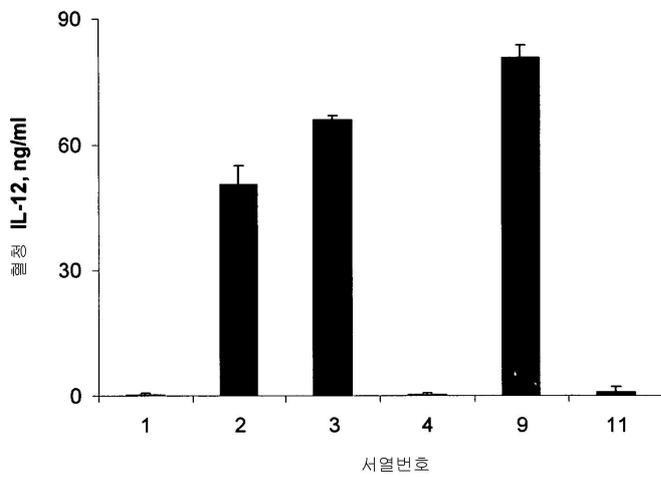


도면3

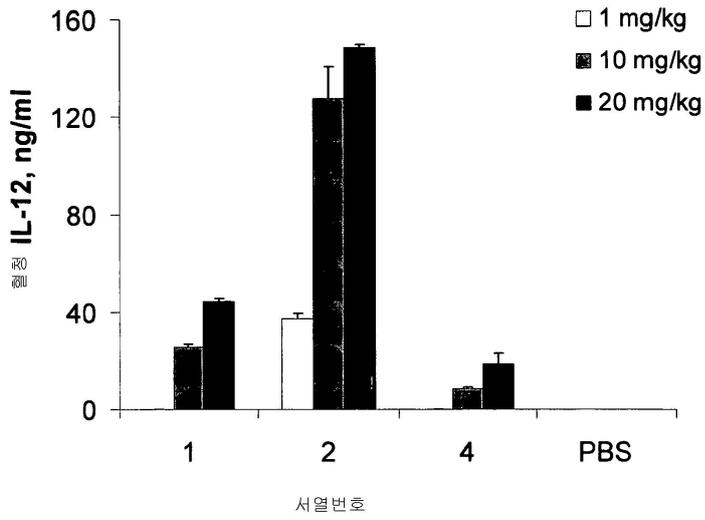


- 서열번호 1
- △ 서열번호 2
- ▲ 서열번호 3
- 서열번호 4
- ◇ 서열번호 9
- ▣ 서열번호 11

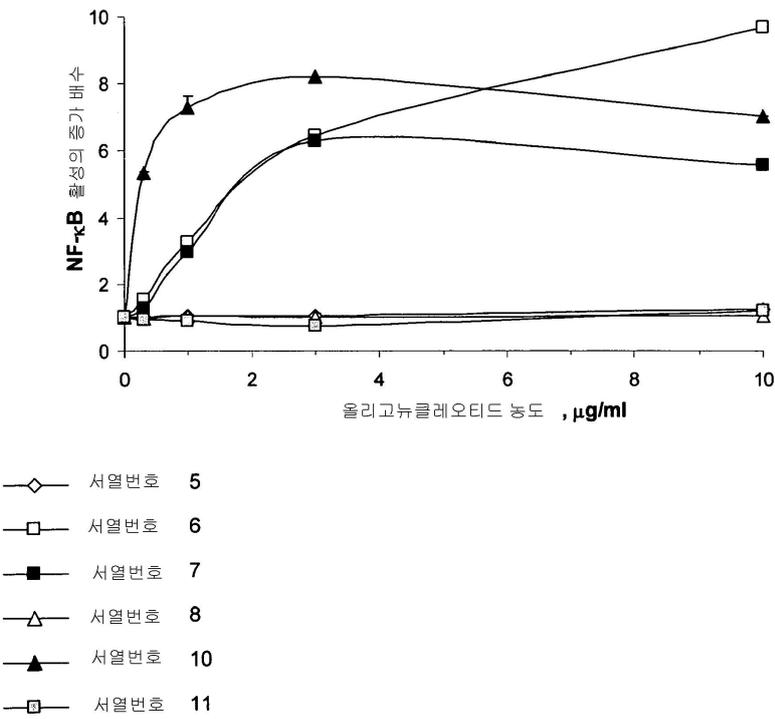
도면4



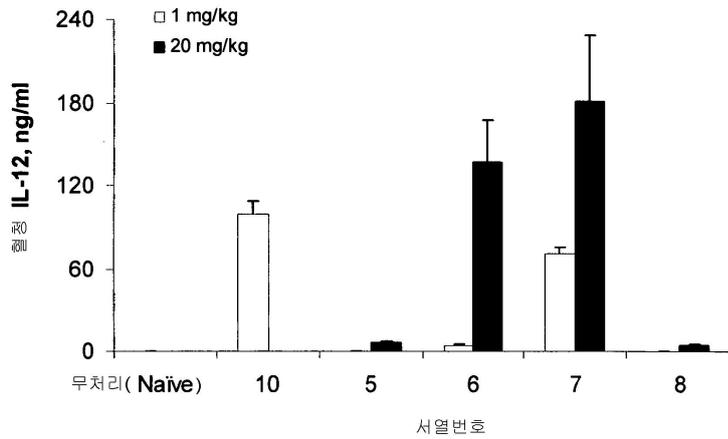
도면5



도면6



도면7



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> IDERA PHARMACEUTICALS, INC.

<120> TOLL LIKE RECEPTOR MODULATORS

<130> IDR-045PCT

<140> PCT/US2008/073280

<141> 2008-08-15

<150> 60/955,895

<151> 2007-08-15

<160> 15

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (4)..(5)

<223> 2'-O-methylribonucleoside

<400> 1

tctgacgttt tttgacgttc t

21

<210> 2

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (14)..(15)
 <223> 2'-O-methylribonucleoside
 <400> 2
 tctgacgttt tttgacgttc t 21
 <210> 3
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 3
 tctgacgttt tttgacgttc t 21

 <210> 4
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (4)..(5)
 <223> 2'-O-methylribonucleoside
 <220><221> modified_base
 <222> (14)..(15)
 <223> 2'-O-methylribonucleoside
 <400> 4
 tctgacgttt tttgacgttc t 21
 <210> 5
 <211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (4)..(5)

<223> 2'-O-methylribonucleoside

<220><221> modified_base

<222> (7)..(7)

<223> 2'-deoxy-7-deazaguanosine

<220><221> modified_base

<222> (17)..(17)

<223> 2'-deoxy-7-deazaguanosine

<400> 5

tctgacgttt tttgacgttc t

21

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (7)..(7)

<223>

> 2'-deoxy-7-deazaguanosine

<220><221> modified_base

<222> (14)..(15)

<223> 2'-O-methylribonucleoside

<220><221> modified_base

<222> (17)..(17)

<223> 2'-deoxy-7-deazaguanosine

<400> 6

tctgacgttt tttgacgttc t

21

<210> 7

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'-deoxy-7-deazaguanosine
 <220><221> modified_base

<222> (17)..(17)
 <223> 2'-deoxy-7-deazaguanosine
 <400> 7

tctgacgttt tttgacgttc t

21

<210> 8
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (4)..(5)
 <223> 2'-O-methylribonucleoside
 <220><221> modified_base
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'-deoxy-7-deazaguanosine
 <220><221> modified_base
 <222> (14)..(15)
 <223> 2'-O-methylribonucleoside

<220><221> modified_base
 <222> (17)..(17)
 <223> 2'-deoxy-7-deazaguanosine
 <400> 8

tctgacgttt tttgacgttc t

21

<210> 9
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 9
 ctatctgacg ttctctgt 18
 <210> 10
 <211> 11
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'-deoxy-7-deazaguanosine
 <400> 10
 tctgacgttc t 11
 <210> 11
 <211> 11
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 11
 acacaccaac t 11
 <210> 12
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide

<220><221> modified_base
 <222> (4)..(5)
 <223> 2'-O-methylribonucleoside
 <400> 12
 tctgacgttt tttgacgttc t 21
 <210> 13
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (4)..(5)
 <223> 2'-O-methylribonucleoside
 <220><221> modified_base
 <222> (14)..(15)
 <223> 2'-O-methylribonucleoside
 <400> 13
 tctgacgttt tttgacgttc t 21

 <210> 14
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><221> modified_base
 <222> (4)..(5)
 <223> 2'-O-methylribonucleoside
 <220><221> modified_base
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'-deoxy-7-deazaguanosine
 <220><221> modified_base
 <222> (17)..(17)
 <223> 2'-deoxy-7-deazaguanosine

<400> 14

tctgacgttt tttgacgttc t

21

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (4)..(5)

<223> 2'-O-methylribonucleoside

<220><221> modified_base

<222> (7)..(7)

<223> 2'-deoxy-7-deazaguanosine

<220><221> modified_base

<222> (14)..(15)

<223> 2'-O-methylribonucleoside

<220><221> modified_base

<222> (17)..(17)

<223> 2'-deoxy-7-deazaguanosine

<400> 15

tctgacgttt tttgacgttc t

21