



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년03월28일
 (11) 등록번호 10-1123489
 (24) 등록일자 2012년02월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/11 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2005-7013207
 (22) 출원일자(국제) 2004년01월14일
 심사청구일자 2009년01월14일
 (85) 번역문제출일자 2005년07월15일
 (65) 공개번호 10-2005-0100375
 (43) 공개일자 2005년10월18일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2004/000828
 (87) 국제공개번호 WO 2004/064782
 국제공개일자 2004년08월05일
 (30) 우선권주장
 60/440,587 2003년01월16일 미국(US)
 (56) 선행기술조사문헌
 Nucleic Acids Research 30(20): 4460-4469
 (2002)*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
이데라 파마슈티칼즈, 인코포레이티드
 미국 매사추세츠 캠브리지 시드니 스트리트 167
 (우: 02139)
 (72) 발명자
아그라월, 서드허
 미국 01545 매사추세츠 쉬류즈버리 램플라이터 드
 라이브 61
바게트, 락쉬미
 미국 02446 매사추세츠 브룩라인 페어뱅크스 스트
 리트 17에이아파트먼트 3
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
남상선

전체 청구항 수 : 총 23 항

심사관 : 최승희

(54) 발명의 명칭 **개질된 면역자극성 디뉴클레오티드를 이용한 올리고뉴클레오티드-기재 화합물의 면역자극 특성의 조절**

(57) 요약

본 발명은 면역치료법에서 면역자극제로서의 올리고뉴클레오티드의 치료적 용도에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 면역자극이 필요한 환자를 치료하거나 면역 반응을 유발하기 위한 방법에 사용하기 위한 면역자극성 올리고뉴클레오티드 및 이뮤노머를 제공한다. 본 발명의 이뮤노머 및 면역자극성 올리고뉴클레오티드는 바람직하게는 신규한 퓨린을 포함한다.

(72) 발명자

유, 동

미국 01581 매사추세츠 웨스트보로 인디안 폰드 로
드 25

칸디말라, 에캄바

미국 01772 매사추세츠 사우쓰보로 캔들우드 레인
6

특허청구의 범위

청구항 1

2개 이상의 올리고뉴클레오티드들을 포함하는 이뮤노머(immunomer)로서,

상기 올리고뉴클레오티드들의 3' 말단, 뉴클레오시드간 링키지(internucleoside linkages) 또는 작용기화된 핵염기(functionalized nucleobase) 또는 당에서 비-뉴클레오티드 링커에 연결되어 있고,

상기 올리고뉴클레오티드들 중 적어도 하나가 접근가능한 5' 말단을 가지고,

RpG 구조를 갖는 면역자극성 디뉴클레오티드를 포함하며, 여기서, R은 염기로서 2-옥소-7-데아자-8-메틸-퓨린을 지니는 뉴클레오티드이고, G는 구아닌, 2-아미노-6-옥소-7-데아자퓨린, 2-아미노-6-티오피린, 6-옥소-퓨린 또는 기타 비천연 퓨린으로 구성된 군에서 선택된 염기를 지니는 면역자극성 뉴클레오티드인,

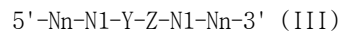
이뮤노머.

청구항 2

삭제

청구항 3

제 1항에 있어서, 하기 구조를 가짐을 특징으로 하는 이뮤노머:



상기 식에서,

Y가 1-(2'-데옥시-β-D-리보푸라노실)-2-옥소-7-데아자-8-메틸퓨린이고;

Z가 구아노신, 2'-데옥시구아노신, 2'-데옥시-7-데아자구아노신, 2'-데옥시-6-티오구아노신, 아라비노구아노신, 2'-데옥시-2'-치환된-아라비노구아노신, 2'-0-치환된-아라비노구아노신 또는 기타 비천연 퓨린 뉴클레오티드이고, 여기서 상기 치환은 1 내지 6개의 포화 또는 불포화된 탄소 원자들을 함유하는 저급 알킬기 또는 6 내지 10개의 탄소 원자들을 갖는 아릴기로서의 치환이고, 여기서 상기 알킬기 또는 아릴기는 비치환되거나 할로, 히드록시, 트리플루오로메틸, 시아노, 니트로, 아실, 아실옥시, 알콕시, 카르복실, 카르보알콕시, 또는 아미노 기로 치환될 수 있으며;

N1 및 Nn은, 각각의 존재 위치에서, 천연 발생 또는 합성 뉴클레오시드, 또는 탈염기(abasic) 뉴클레오시드, 아라비노뉴클레오시드, 2'-데옥시우리딘, α-데옥시리보뉴클레오시드, β-L-데옥시리보뉴클레오시드, 및 3' 쪽(side) 상의 인접 뉴클레오시드에 변형된 뉴클레오시드간 링키지에 의해 연결된 뉴클레오시드로 구성된 군으로부터 선택된 면역자극성 모이어티(immunostimulatory moiety)이고,

상기 변형된 뉴클레오티드간 링키지가 C2-C18 알킬 링커, 폴리(에틸렌 글리콜) 링키지, 2-아미노부틸-1,3-프로판디올 링커, 2'-5' 뉴클레오시드간 링키지, 메틸포스포네이트 뉴클레오시드간 링키지; 메틸포스포노티오에이트, 포스포트리에스테르, 포스포티오트리에스테르, 포스포티오에이트, 포스포디티오에이트, 트리에스테르, 설펜, 설펜아미드, 설펜메이트, 포름아세탈, N-메틸히드록시아민, 카보네이트, 카바메이트, 몰포리노, 보라노포스포네이트, 일차 아미노-포스포르아미데이트를 포함하는 포스포르아미데이트, N3 포스포르아미데이트 및 N5 포스포르아미데이트, 및 입체특이적 링키지, 당 변형(sugar modifications)을 지니는 뉴클레오시드; 2'-0-메틸리보오스, 2'-0-메톡시에틸리보오스, 2'-0-프로파길리보오스, 및 2'-데옥시-2'-플루오로리보오스를 포함하는 2'-치환된 펜토오스 당; 3'-0-메틸리보오스를 포함하는 3'-치환된 펜토오스 당; 1',2'-디데옥시리보오스; 아라비노오스; 치환된 아라비노오스 당, 핵소오스 당, 및 알파-아노머(alpha-anomers), 펩티드 핵산(peptide nucleic acids, PNA), 포스페이트 기를 지니는 펩티드 핵산(peptide nucleic acids with phosphate groups, PHONA), 잠금 핵산(locked nucleic acids, LNA), 몰포리노핵산, 및 2 옹스트롱 내지 200 옹스트롱의 길이를 갖는 백분 링커 부분을 지니는 올리고뉴클레오티드, 알킬 링커 또는 아미노 링커, DNA 이소형, β-L-데옥시리보뉴클레오시드, α-데옥시리보뉴클레오시드, 비천연 뉴클레오시드간 링키지 지점들을 갖는 뉴클레오시드, 및 변형된 헤테로사이클릭 염기를 지니는 뉴클레오시드로 구성된 군에서 선택된 것이다.

청구항 4

삭제

청구항 5

제 3항에 있어서, 상기 번역자극성 모이어티가 탈염기 뉴클레오시드, 아라비노뉴클레오시드, 2'-데옥시우리딘, α-데옥시리보뉴클레오시드, β-L-데옥시리보뉴클레오시드, 및 3' 쪽(side) 상의 인접 뉴클레오시드에 변형된 뉴클레오시드간 링크지에 의해 연결된 뉴클레오시드로 구성된 군으로부터 선택되고,

상기 변형된 뉴클레오티드간 링크지가 2 옹스트롱 내지 200 옹스트롱 길이를 갖는 링커, C2-C18 알킬 링커, 폴리(에틸렌 글리콜) 링커, 2-아미노부틸-1,3-프로판디올 링커, 글리세릴 링커, 2'-5'-뉴클레오시드간 링크지, 및 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 또는 메틸포스포네이트 뉴클레오시드간 링크지 중에서 선택되고,

여기서 상기 올리고뉴클레오티드가 또 다른 올리고뉴클레오티드에 직접 또는 간접적으로 연결되어 있는, 이뮤노머.

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

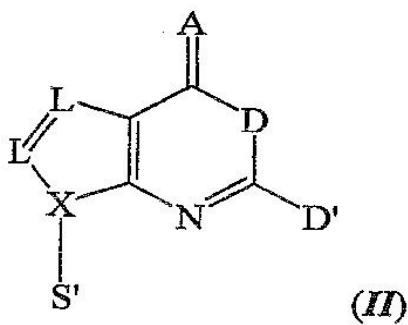
삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

제 1항에 있어서, 번역자극성 디뉴클레오티드의 하나의 퓨린 뉴클레오시드가 하기 구조(II)를 가짐을 특징으로 하는 이뮤노머:



상기 식에서,

D는 수소 결합 공여체이고;

D'는 수소, 수소 결합 공여체, 및 친수성 기로 구성된 군으로부터 선택되고;

A는 수소 결합 수용체 또는 친수성 기이고;

X는 탄소 또는 질소이고;

각 L은 독립적으로 C, O, N 및 S로 구성된 군으로부터 선택된 원자이고;

S'는 펜토오스 또는 헥소오스 당 고리 또는 비천연 당이다.

청구항 11

제 10항에 있어서, 당 고리가 포스페이트 잔기, 개질된 포스페이트 잔기 또는 퓨린 뉴클레오시드를 다른 뉴클레오시드 또는 뉴클레오시드 유사체에 연결하기에 적합한 다른 링커 잔기로 유도체화됨을 특징으로 하는 이뮤노머.

청구항 12

제 10항에 있어서, 수소 결합 공여체가 -NH-, -NH₂-, -SH, 및 -OH로 구성된 군으로부터 선택됨을 특징으로 하는 이뮤노머.

청구항 13

제 10항에 있어서, 수소 결합 수용체가 C=O, C=S, -N= 및 방향족 헤테로사이클의 고리 질소 원자로 구성된 군으로부터 선택됨을 특징으로 하는 이뮤노머.

청구항 14

제 10항에 있어서, 비천연 퓨린이 2-아미노-6-티오피린, 6-옥소퓨린 또는 2-아미노-6-옥소-7-테아자퓨린임을 특징으로 하는 이뮤노머.

청구항 15

제 1항에 있어서, 비뉴클레오티드 링커가 2 옹스트롱 내지 200 옹스트롱의 길이를 가지는 링커, 금속, 용해성 또는 불용성의 생분해성 중합체 비드, 올리고뉴클레오티드의 3'-말단 뉴클레오시드에 부착되도록 하는 작용기를 가지는 유기 잔기, 생분자, 사이클릭 또는 비사이클릭(acyclic) 소분자, 지방족 또는 방향족 탄화수소(이들 중 어느 하나는 선택적으로 올리고뉴클레오티드를 연결하거나 이에 부착된 선행 사슬에 하이드록시, 아미노, 티올, 티오에테르, 에테르, 아마이드, 티오아미드, 에스테르, 우레아 및 티오우레아로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 작용기를 포함할 수 있다), 아미노산, 탄수화물, 시클로텍스트린, 아다만탄, 콜레스테롤, 합텐 항생제, 화학식 HO-(CH₂)_o-CH(OH)-(CH₂)_p-OH의 글리세롤 또는 글리세롤 동족체(o 및 p는 독립적으로 1 내지 약 6의 정수이다), 및 1,3-디아미노-2-하이드록시프로판의 유도체로 구성된 군으로부터 선택됨을 특징으로 하는 이뮤노머.

청구항 16

삭제

청구항 17

제 1항에 따른 이뮤노머 및 접근가능한 5' 말단 이외의 위치에서 이뮤노머에 컨주게이션된 항원을 포함하는 이뮤노머 컨주게이트.

청구항 18

제 1항에 있어서, G가 아라비노구아노신 또는 2'-데옥시-2'-치환된 아라비노구아노신, 2'-데옥시-7-테아자구아노신 또는 2'-데옥시-6-티오구아노신 또는 2'-데옥시이노신임을 특징으로 하는 이뮤노머.

청구항 19

제 1항에 있어서, 5'-CTGTC₁GTTCTC-X-CTCTGC₁TGTC-5'(5'-SEQ ID NO: 177-X-SEQ ID NO: 177-5') 구조를 가지며, 여기서 X가 글리세롤 링커이고, C₁이 1-(2'-데옥시-β-D-리보푸라노실)-2-옥소-7-테아자-8-메틸퓨린인, 이뮤노머.

청구항 20

제 1항에 있어서, 5'-TC₁GTC₁GTTCTG-X-CTCTGC₁TGC₁T-5'(5'-SEQ ID NO: 181-X-SEQ ID NO: 181-5') 구조를 가지며, 여기서 X가 글리세롤 링커이고, C₁이 1-(2'-데옥시-β-D-리보푸라노실)-2-옥소-7-테아자-8-메틸퓨린인, 이뮤노머.

청구항 21

제 1항에 있어서, 5'-TCTGTC₁GTTCT-X-TCTTGC₁TGTCT-5' 구조를 가지며, 여기서 X가 글리세롤 링커이고, C₁이 1-(2'-데옥시-β-D-리보푸라노실)-2-옥소-7-데아자-8-메틸퓨린인, 이뮤노머.

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

제 1항, 제 3항, 제 5항, 제 10항 내지 제 15항, 또는 제 17항 내지 21항 중 어느 한 항에 따른 이뮤노머를 포함하는 면역 반응을 유발시키는 약제 조성물.

청구항 33

제 1항, 제 3항, 제 5항, 제 10항 내지 제 15항, 또는 제 17항 내지 21항 중 어느 한 항에 따른 이뮤노머를 인간을 제외한 척추동물에 투여하는 것을 포함하는, 인간을 제외한 척추동물에서 면역 반응을 유발하는 방법.

청구항 34

제 1항, 제 3항, 제 5항, 제 10항 내지 제 15항, 또는 제 17항 내지 21항 중 어느 한 항에 따른 이뮤노머를 포함하는, 암, 자가면역질환, 기도 염증, 염증성 질환, 피부 질환, 알레르기, 천식, 박테리아 감염, 기생충 감염 또는 바이러스 감염을 치료하기 위한, 약제 조성물.

청구항 35

삭제

청구항 36

제 1항, 제 3항, 제 5항, 제 10항 내지 제 15항, 또는 제 17항 내지 21항 중 어느 한 항에 따른 이뮤노머를 비인간 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 암, 자가면역질환, 기도 염증, 염증성 질환, 피부 질환, 알레르기, 천식, 박테리아 감염, 기생충 감염 또는 바이러스 감염을 지니는 비인간 환자를 치료하기 위한 방법.

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

제 32항 또는 제 34항에 있어서, 백신을 추가로 포함하는, 약제 조성물.

청구항 41

제 40항에 있어서, 상기 이뮤노머, 백신 또는 상기 이뮤노머 및 백신 둘 모두가 면역원성 단백질에 연결되어 있는, 약제 조성물.

청구항 42

제 40항에 있어서, 애주번트를 추가로 포함하는, 약제 조성물.

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

제 32항 또는 제 34항에 있어서, 다른 치료제를 추가로 포함하는, 약제 조성물.

청구항 55

제 54항에 있어서, 상기 다른 치료제가 백신, 항체, 알레르겐, 항생제 및 화학치료제(chemotherapeutic agent)로 구성된 군으로부터 선택된 것인, 약제 조성물.

청구항 56

삭제

명세서

발명의 상세한 설명

[0001]

발명의 배경

[0002]

발명의 기술분야

[0003]

본 발명은 번역자극제로서 올리고뉴클레오티드를 사용하는 번역학 및 번역요법 적용에 관한 것이다.

[0004]

관련 기술의 요약

[0005]

올리고뉴클레오티드는 진단 프로빙 방법에서 PCR, 유전자 발현의 안티센스 억제 및 번역치료 용법에 이르기까지 매우 다양한 범위의 기술로 사용되어 현대 분자 생물학에 필수불가결한 수단이 되었다. 올리고뉴클레오티드의 이러한 광범한 용도로 인하여 올리고뉴클레오티드를 합성하기 위한 빠르고 값싸며 효율적인 방법에 대한 필요성이 증가하였다.

[0006]

안티센스 및 진단 용법을 위한 올리고뉴클레오티드의 합성은 현재 일상적으로 수행될 수 있다. 예를 들어, 문헌[*Methods in Molecular Biology, Vol. 20: Protocols for Oligonucleotides and Analogs* pp. 165-189 (S.Agrawal, ed., Humana Press, 1993); *Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach*, pp. 87-108 (F.Eckstein, ed., 1991); and Uhlmann and Peyman, *supra*; Agrawal and Iyer, *Curr. Op. in Biotech.* 6:12(1995); and *Antisense Research and Applications* (Crooke and Lebleu, eds., CRC Press, Boca Raton, 1993)을 참조할 수 있다. 초기의 합성 방법은 포스포디에스테르 및 포스포트리에스테르 화학법을 포함하였다. 예를 들어, 문헌[Khorana et al., *J. Molec. Biol.* 72: 209 (1972)]에 올리고뉴클레오티드 합성을 위한 포스포디에스테르 화학법이 개시되어 있다. 문헌[Reese, *Tetrahedron Lett.* 34: 3143-3179 (1978)]에 올리고뉴클레오티드 및 폴리뉴클레오티드의 합성을 위한 포스포트리에스테르 화학법이 개시되어 있다. 이러한 초기 방법들은 대부분 보다 효율적인 포스포르아미디트 및 H-포스포네이트 합성법에 자리를 내주었다. 예를 들어, 문헌[Beaucage and Caruthers, *Tetrahedron Lett.* 22:2859-1862 (1981)]은 폴리뉴클레오티드 합성에서의 데옥시리보뉴클레오시드 포스포르아미디트의 용도를 개시한다. 미국 특허 제 5,149,798호(Agrawal and Zamecnik, 1992)는 H-포스포네이트 접근법에 의한 올리고뉴클레오티드의 최적화된 합성법을 개시한다. 이러한 현대 접근법 둘 모두가 다양한 개질된 뉴클레오티드간 링키지(linkage)을 가지는 올리고뉴클레오티드를 합성하는 데 사용되었다. 문헌[Agrawal and Goodchild, *Tetrahedron Lett.* 28: 3539-3542, (1987)]은 포스포르아미디트 화학법을 사용한 올리고뉴클레오티드 메틸포스포네이트의 합성법을 개시한다. 문헌[Connolly et al., *Biochem.* 23: 3443 (1984)]은 포스포르아미디트 화학법을 사용하는 올리고뉴클레오티드 포스포르아미데이트의 합성법을 개시

한다. 문헌[Jager et al., Biochem. 27: 7237 (1998)]은 포스포르아미디트 화합법을 사용하는 올리고뉴클레오티드 포스포르아미데이트의 합성법을 개시하고 있다. 문헌[Agrawal et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85: 7079-7083 (1988)]은 H-포스포네이트 화학법을 사용하는 올리고뉴클레오티드 포스포르아미데이트 및 포스포로티오에이트의 합성법을 사용한다.

[0007] 보다 최근에, 여러 연구자가 면역치료법에서 올리고뉴클레오티드의 면역자극제로서의 용도를 증명하였다. 포스포디에스테르 및 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오티드가 면역 자극을 유발할 수 있다는 관찰이 치료 수단으로 이러한 부작용을 발생시킬 수 있다는 데에 관심을 유발하였다. 이러한 노력은 디뉴클레오티드 천연 CpG를 함유하는 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오티드에 초점이 맞추어졌다. 문헌[Kuramoto et al., Jpn. J. Cancer Res. 83:1128-1131 (1992)]은, CpG 디뉴클레오티드를 포함하는 회문(palindrome)을 함유하는 포스포디에스테르 올리고뉴클레오티드가 인터페론-알파 및 감마 합성을 유발하고 천연 살생세포(natural Killer) 활성을 증강시킬 수 있다는 것을 교시한다. 문헌[Krieg et al., Nature 371: 546-549 (1995)]는 포스포로티오에이트 CpG-함유 올리고뉴클레오티드가 면역자극성이라는 것을 교시한다. 문헌[Liang et al., J. Clin. Invest. 98: 1119-1129(1996)]은 이러한 올리고뉴클레오티드가 인간 B 세포를 활성화한다는 것을 개시한다. 문헌[Moldoveanu et al., Vaccine 16: 1216-124(1998)]은 CpG-함유 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오티드가 인플루엔자 바이러스에 대한 면역 반응을 증강시킨다는 것을 교시한다. 문헌[McCluskie and Davis, J. Immunol. 161: 4463-4466(1998)]은 CpG-함유 올리고뉴클레오티드가 B형 간염 표면 항원에 대한 면역 반응을 증강시키는 유력한 애주버트로서 작용한다는 것을 교시한다. 문헌[Hartman et al., J. Immunol 164: 1617-1624 (2000)]은 면역자극성 서열이 종-특이적이고 마우스와 영장류 간에 상이하다는 것을 교시한다.

[0008] CpG-함유 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오티드의 다른 개질은 또한 이들의 면역 반응의 모듈레이터로서 작용할 수 있는 능력에 영향을 줄 수 있다. 예를 들어 하기 문헌들을 참조할 수 있다:

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; and Kandimalla et al., *Bioorg. Med. Chem.* (2001) **9**:807-813.

[0009] 이러한 보고는 면역자극성 올리고뉴클레오티드에 의해 유발되는 면역 반응을 조절하고 면역자극성 서열의 종 특이성을 극복해야 할 필요가 있다는 것을 명확히 하고 있다.

[0010] 발명의 간단한 요약

[0011] 본 발명은 올리고뉴클레오티드 화합물에 의해 유발되는 면역 반응을 조절(modulation)하기 위한 방법을 제공한다. 본 발명에 따른 방법은 면역치료법을 위한 면역자극성 올리고뉴클레오티드에 의해 생성되는 사이토카인 프로파일을 변형하는 것을 가능하게 한다. 본 발명자들은 놀랍게도 면역자극성 디뉴클레오티드의 개질이 생성되는 면역 반응의 특성에 있어 융통성을 가능하게 하고 특정 개질은 면역자극성 서열의 시대에 관찰되는 종-특이성을 극복한다는 것을 발견하였다. 특정 바람직한 구체예에서, 개질된 디뉴클레오티드는 하기 기술하는 바와 같이 "이뮤노머(immunomer)"의 콘텍스트(context)에 있다.

[0012] 첫 번째 측면에서, 따라서, 본 발명은 하나 이상의 개질된 퓨린 또는 피리미딘을 포함하는 하나 이상의 면역자극성 디뉴클레오티드를 포함하는 면역자극성 올리고뉴클레오티드 또는 이뮤노머를 제공한다.

[0013] 하나의 구체예에서, 면역조절성 올리고뉴클레오티드 또는 이뮤노머는 식 5'-Pyr-Pur-3'(여기서, Pyr은 천연 또는 비천연의 피리미딘 뉴클레오시드이고, Pur은 천연 또는 비천연의 퓨린 뉴클레오시드이다)의 면역자극성 디뉴클레오티드를 포함한다. 다른 바람직한 구체예에서, 면역조절성 올리고뉴클레오티드 또는 이뮤노머는 식 5'-Pur^{*}-Pur-3'(여기서, Pur^{*}은 비천연 퓨린 뉴클레오시드이고 Pur은 천연 또는 비천연 퓨린 뉴클레오시드이다)의 면역조절성 디뉴클레오티드를 포함한다. 특히 바람직한 합성 퓨린은 2-옥소-7-테아자-8-메틸-퓨린이다. 이러한 합성 퓨린이 디뉴클레오티드의 Pur^{*} 위치에 있는 경우에 면역자극성 효과의 종-특이성(서열 의존성)은 극복되고 사이토카인 프로파일이 향상된다.

- [0014] 다른 구체예에서, 면역조절성 올리고뉴클레오타이드 또는 이뮤노머는 CpG, C^{*}pG, CpG^{*}, 및 C^{*}pG^{*}로 구성된 군으로부터 선택된 면역자극성 디뉴클레오타이드를 포함하며, 여기서, C의 염기는 시토신이고, C^{*}의 염기는 티민, 5-하이드록시시토신, N4-알킬-시토신, 4-티오우라실, 또는 비천연 피리미딘 뉴클레오시드 또는 2-옥소-7-데아자-8-메틸-퓨린이며, 염기가 2-옥소-데아자-8-메틸-퓨린인 경우에 이는 바람직하게는 염기의 1 위치를 통하여 펜토오스의 1'-위치에 공유 결합되며; G의 염기는 구아닌이고, G^{*}의 염기는 2-아미노-6-옥소-7-데아자퓨린, 2-아미노-6-티오피린, 6-옥소퓨린, 또는 다른 비천연 퓨린 뉴클레오시드이고; p는 포스포디에스테르, 포스포로티오에이트, 및 포스포로디티오에이트로 구성된 뉴클레오시드간 링키지이다. 특정 바람직한 구체예에서, 면역자극성 디뉴클레오타이드는 CpG가 아니다.
- [0015] 또 다른 구체예에서, 면역조절성 올리고뉴클레오타이드는 화학식(III)의 면역자극성 도메인을 포함한다:
- [0016] 5'-Nn-N1-Y-Z-N1-Nn-3' (III)
- [0017] 상기 식에서,
- [0018] Y의 염기는 시토신, 티민, 5-하이드록시시토신, N4-알킬-시토신, 4-티오우라실, 또는 2-옥소-7-데아자-8-메틸-퓨린이고, 여기서 염기가 2-옥소-7-데아자-8-메틸-퓨린인 경우에 이것은 바람직하게는 염기의 1 위치를 통하여 펜토오스의 1'-위치에 공유결합된다.
- [0019] Z의 염기는 구아닌, 2-아미노-6-옥소-7-데아자퓨린, 2-아미노-6-티오피린, 또는 6-옥소퓨린이다.
- [0020] N1 및 Nn은 각 위치에서 독립적으로 바람직하게는 천연 또는 합성 뉴클레오시드, 또는 염기결여 뉴클레오시드, 아라비노뉴클레오시드, 2'-데옥시우리딘, α-데옥시리보뉴클레오시드, β-L-데옥시리보뉴클레오시드 및 3'쪽에 인접한 뉴클레오시드에 포스포디에스테르 또는 개질된 뉴클레오시드간 링키지에 의해 연결된 뉴클레오시드로 구성된 군으로부터 선택된 면역자극성 모이어티이며, 개질된 뉴클레오타이드간 링키지가 제한 없이 약 2 옹스트롱 내지 약 200 옹스트롱의 길이를 가지는 링커, C2-C18 알킬 링커, 폴리(에틸렌 글리콜) 링커, 2-아미노부틸-1,3-프로판디올 링커, 글리세릴 링커, 2'-5' 뉴클레오시드간 링키지, 및 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 또는 메틸포스포네이트 뉴클레오시드간 링키지로부터 선택되며;
- [0021] 이 경우에 하나 이상의 N1 또는 Nn은 선택적으로 면역자극성 모이어티이고;
- [0022] 여기서 n은 0 내지 30의 수이고;
- [0023] 3' 말단, 뉴클레오타이드간 링키지, 또는 작용기화된 핵염기 또는 당은 직접 또는 비뉴클레오타이드(non-nucleotide) 링커를 통하여 면역자극성이거나 아닐 수 있는 다른 올리고뉴클레오타이드에 연결되거나 연결되지 않을 수 있다. 면역조절성 올리고뉴클레오타이드가 다른 올리고뉴클레오타이드에 연결되는 경우에, "이뮤노머"로서 언급된다.
- [0024] 두 번째 측면에서, 본 발명은 상기 기술된 바와 같은 이뮤노머를 포함하는 이뮤노머 컨주게이트, 및 접근가능한 5' 말단이 아닌 위치에서 이뮤노머에 컨주게이션된 항원을 제공한다. 유사하게, 올리고뉴클레오타이드가 다른 올리고뉴클레오타이드에 연결되지 않고, 접근가능한 5' 말단이 아닌 임의의 위치에서 항원에 연결된다면 이는 "면역조절성 올리고뉴클레오타이드 컨주게이트"로서 언급될 수 있다.
- [0025] 세 번째 측면에서, 본 발명은 본 발명에 따른 면역자극성 올리고뉴클레오타이드, 면역조절성 올리고뉴클레오타이드 컨주게이트, 이뮤노머 또는 이뮤노머 컨주게이트 또는 이들의 둘 이상의 조합물 및 생리학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 제형을 제공한다.
- [0026] 네 번째 측면에서, 본 발명은 척추동물에서 면역 반응을 발생시키는 방법을 제공하고, 이 방법은 척추동물에 본 발명에 따른 면역자극성 올리고뉴클레오타이드, 면역조절성 올리고뉴클레오타이드 컨주게이트, 이뮤노머 또는 이뮤노머 컨주게이트 또는 이들의 둘 이상의 조합물을 투여하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 척추동물은 포유동물이다.
- [0027] 다섯 번째 측면에서, 본 발명은 질병 또는 질환을 가지는 환자를 치료학적으로 치료하는 방법을 제공하며, 이러한 방법은 환자에게 본 발명에 따른 면역 자극성 올리고뉴클레오타이드, 면역조절성 올리고뉴클레오타이드 컨주게이트, 이뮤노머 또는 이뮤노머 컨주게이트, 또는 이들이 둘 이상의 조합물을 투여하는 것을 포함한다. 다양한 구체예에서, 치료되는 질병 또는 질환은 암, 자가면역질환, 기도 염증, 천식, 알레르기, 또는 병원체에 의해 유발되는 질병이다.

[0028] **도면의 간단한 설명**

- [0029] 도 1은 본 발명의 대표적인 이뮤노머의 개략도이다.
- [0030] 도 2는 본 발명의 수개의 대표적인 이뮤노머를 도시한다.
- [0031] 도 3은 본 발명의 이뮤노머의 선형 합성을 위해 적합한 대표적인 소분자 링커 군을 도시한다.
- [0032] 도 4는 본 발명의 이뮤노머의 평행적 합성에 적합한 대표적인 소분자 링커 군을 도시한다.
- [0033] 도 5는 본 발명의 이뮤노머의 선형 합성을 위한 합성 도식이다. DMTr=4,4'-디메톡시트리틸; CE=시아노에틸.
- [0034] 도 6은 본 발명의 이뮤노머의 평행적 합성을 위한 합성 도식이다. DMTr=4,4'-디메톡시트리틸; CE=시아노에틸.
- [0035] 도 7A는 BALB/c 마우스 비장 세포 배양물에서 이뮤노머 1-3에 의한 IL-12의 유도에 대한 그래프이다. 이들 데이터는 접근가능한 5'-말단을 가지는 이뮤노머 2가 모노머인 올리고(Oligo) 1 보다 더 강한 IL-12의 인듀서이고, 접근가능한 5'-말단을 가지지 않는 이뮤노머 3가 올리고 1과 비교하여 동일하거나 보다 약한 면역 자극을 생성하는 능력을 가진다는 것을 제시한다.
- [0036] 도 7B는 BALB/c 마우스 비장 세포 배양물의 이뮤노머 1-3에 의한 IL-6의 유도(각각 위에서 아래로)에 대한 그래프이다. 이들 데이터는 접근가능한 5'-말단을 가지는 이뮤노머 2가 모노머인 올리고 1보다 더 강한 IL-6의 인듀서이고, 접근가능한 5'-말단을 가지지 않는 이뮤노머 3이 올리고 1과 비교하여 면역 자극을 유도하는 능력이 같거나 더 약하다는 것을 제시한다.
- [0037] 도 7C는 BALB/c 마우스 비장 세포 배양물에서 이뮤노머 1-3에 의한 IL-10의 유도(각각 위에서 아래로)에 관한 그래프이다.
- [0038] 도 8A는 각각 접근가능하지 않은 5'-말단 및 접근가능한 5'-말단을 가지는 이뮤노머 5 및 6의 상이한 농도에 의해 세포 배양물에서 BALB/c 마우스 비장 세포 증식의 유도에 관한 그래프이다.
- [0039] 도 8B는 CpG 모티프의 5'-플래킹 서열에서 면역원성 화학적 개질을 가지는 이뮤노머 4-6에 의한 BALB/c 마우스 비장 확장에 관한 그래프이다. 또한 접근가능한 5'-말단을 가지는 이뮤노머(6)는 접근가능한 5'-말단을 가지지 않는 이뮤노머 5, 및 모노머 올리고 4와 비교하여 비장 확장을 증가시키는 보다 큰 능력을 가진다.
- [0040] 도 9A는 BALB/c 마우스 비장 세포 배양물에서의 올리고 4 및 이뮤노머 7 및 8의 상이한 농도에 의한 IL-12의 유도에 관한 그래프이다.
- [0041] 도 9B는 BALB/c 마우스 비장 세포 배양물에서의 올리고 4 및 이뮤노머 7 및 8의 상이한 농도에 의한 IL-6의 유도에 관한 그래프이다.
- [0042] 도 9C는 BALB/c 마우스 비장 세포 배양물에서의 올리고 4 및 이뮤노머 7 및 8의 상이한 농도에 의한 IL-10의 유도에 관한 그래프이다.
- [0043] 도 10A는 BALB/c 마우스 비장 세포 배양물에서의 이뮤노머 14, 15, 및 16에 의한 세포 증식의 유도에 관한 그래프이다.
- [0044] 도 10B는 BALB/c 마우스 비장 세포 배양물에서의 이뮤노머 14 및 16의 상이한 농도에 의한 IL-12에 의한 세포 증식의 유도에 관한 그래프이다.
- [0045] 도 10C는 BALB/c 마우스 비장 세포 배양물에서의 이뮤노머 14 및 16의 상이한 농도에 의한 IL-6에 의한 세포 증식의 유도에 관한 그래프이다.
- [0046] 도 11A는 BALB/c 마우스 비장 세포 배양물에서의 올리고 4 및 17 및 이뮤노머 19 및 20에 의한 세포 증식의 유도에 관한 그래프이다.
- [0047] 도 11B는 BALB/c 마우스 비장 세포 배양물에서의 올리고 4 및 17 및 이뮤노머 19 및 20의 상이한 농도에 의한 IL-12 생성의 유도에 관한 그래프이다.
- [0048] 도 11C는 BALB/c 마우스 비장 세포 배양물에서의 올리고 4 및 17 및 이뮤노머 19 및 20의 상이한 농도에 의한 IL-6 생성의 유도에 관한 그래프이다.
- [0049] 도 12는 올리고뉴클레오티드 4 및 이뮤노머 14, 23, 및 24를 사용하는 BALB/c 마우스 비장 세포 확장에 대한 그래프이다.

- [0050] 도 13은 비뉴클레오티드 연결이 뉴클레오시드, 3' 위치, 또는 2' 위치에서 뉴클레오시드에 부착될 수 있다는 것을 보이는 올리고뉴클레오티드의 3'-말단 뉴클레오시드의 개략도이다.
- [0051] 도 14는 실시예 13에서 사용되는 화학적 치환을 도시한다.
- [0052] 도 15는 실시예 13의 개질된 올리고뉴클레오티드를 사용하여 수득된 사이토카인 프로파일을 도시한다.
- [0053] 도 16은 아미노 링커와 비교하여 글리세롤 링커에 대한 상대적인 사이토카인 유도를 도시한다.
- [0054] 도 17은 다양한 링커 및 링커 조합물에 대한 상대적인 사이토카인 유도를 도시한다.
- [0055] 도 18 A-E는 다양한 PS 및 PO 이뮤노머 및 올리고뉴클레오티드에 대한 상대적인 뉴클리아제 내성을 도시한다.
- [0056] 도 19는 BALB/c 마우스 비장 세포 배양물에서의 PS 이뮤노머와 비교하여 PO 이뮤노머에 대한 상대적인 사이토카인 유도를 도시한다.
- [0057] 도 20은 C3H/HeJ 마우스 비장 세포 배양물에서의 PS 이뮤노머와 비교하여 PO 이뮤노머에 대한 상대적인 사이토카인 유도를 도시한다.
- [0058] 도 21은 이뮤노머의 높은 농도에서 C3H/HeJ 마우스 비장 세포 배양물에서의 PS 이뮤노머와 비교된 PO 이뮤노머에 대한 상대적인 사이토카인 유도를 도시한다.
- [0059] 도 22는 일부 피리미딘 및 퓨린 구조를 도시한다.
- [0060] 도 23은 본 연구에서 사용된 일부 면역자극성 올리고뉴클레오티드 또는 이뮤노머를 도시한다.
- [0061] 도 24는 합성 퓨린-pG 디뉴클레오티드를 가지는 면역자극성 모티프 및 천연 CpG 모티프의 비교를 도시한다.
- [0062] 도 25는 본 연구에서 사용되는 다양한 면역자극성 올리고뉴클레오티드의 IL-12 및 IL-6 프로파일을 도시한다.
- [0063] 도 26은 본 연구에서 사용되는 추가의 면역자극성 올리고뉴클레오티드의 IL-12 및 IL-6 프로파일을 도시한다.
- [0064] 도 27은 본 연구에서 사용되는 면역자극성 올리고뉴클레오티드 및 이뮤노머의 IL-12 및 IL-6 프로파일을 도시한다.
- [0065] 도 28은 면역자극성 올리고뉴클레오티드 및 이뮤노머에서 마우스 및 인간 모티프에 의해 제공된 IL-12 및 IL-6 프로파일을 비교한다.
- [0066] 도 29는 다양한 면역자극성 올리고뉴클레오티드 및 이뮤노머로 처리된 J774 세포에서 NF- κ B의 활성화 및 I κ B α 의 분해를 도시한다.
- [0067] 도 30은 인간 PMBC 배양에서 이뮤노머의 면역자극성 활성을 도시한다.
- [0068] **바람직한 구체예의 상세한 설명**
- [0069] 본 발명은 면역치료법을 위한 면역자극제로서의 올리고뉴클레오티드의 치료적 용도에 관한 것이다. 본원에 인용된 등록된 특허, 특허 출원, 및 참조문헌은 각각이 구체적으로 개별적으로 기재되어 참조로 통합되는 것과 같은 정도로 본원에 참조로 통합된다. 본원에 인용된 임의의 참조문헌과 본 명세서의 임의의 교시내용 간에 불일치가 있는 경우에는 후자가 본 발명을 위해 우세하다.
- [0070] 본 발명은 비제한적으로 성인 및 소아 및 수의학적 적용에 있어 암, 자가면역 질환, 천식, 호흡기 알레르기, 음식 알레르기, 및 박테리아, 기생충, 및 바이러스 감염의 치료와 같은 면역치료 적용을 위해 사용되는 면역자극성 화합물에 의해 유발되는 면역 반응을 증강시키기 위한 방법을 제공한다. 따라서, 본 발명은 추가로 이러한 화합물을 제조하고 사용하는 방법 및 면역치료를 위한 면역자극성 효과의 최적 수준을 가지는 화합물을 제공한다. 또한, 본 발명의 화합물은 DNA 백신, 항체 및 알레르겐; 및 화학요법 제제 및/또는 안티센스 올리고뉴클레오티드와 조합하여 애주버트로서 유용하다.
- [0071] 본 발명자들은 놀랍게도 면역자극성 올리고뉴클레오티드를 이의 5' 말단을 최적으로 제공하도록 개질하는 것이 이의 면역자극능에 극적으로 영향을 준다는 것을 발견하였다. 또한, 본 발명자들은 면역 반응의 사이토카인 프로파일 및 종 특이성이 면역조절성 올리고뉴클레오티드 또는 이뮤노머의 일부로서 신규한 퓨린 또는 피리미딘 구조를 사용함에 의해 조절될 수 있다는 것을 발견하였다.
- [0072] 제 1 측면에서, 본 발명은 면역자극성 올리고뉴클레오티드 또는 "이뮤노머"를 제공하며, 후자는 비뉴클레오티드

링커에 작용기화된 핵염기 또는 당, 또는 뉴클레오티드가 링키지, 또는 3' 말단에서 연결되는 둘 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, 하나 이상의 올리고뉴클레오티드는 면역조절성 올리고뉴클레오티드이고 접근가능한 5' 말단을 가진다. 본원에서 사용된 용어 "접근가능한 5' 말단"은 올리고뉴클레오티드의 5' 말단이 이뮤노머를 인지하여 이에 결합하고 면역계를 자극하는 인자가 이에 접근할 수 있도록 충분히 이용가능한 것을 의미한다. 접근가능한 5' 말단을 가지는 올리고뉴클레오티드에서, 말단 당의 5' OH 위치가 2개 이상의 뉴클레오시드 잔기 또는 5' 말단과 상호작용을 방해하는 임의의 다른 잔기에 공유결합에 의해 연결되어 있지 않다. 임의로, 5' OH는 포스페이트, 포스포로디티오에이트, 또는 포스포티오에이트 잔기, 방향족 또는 지방족 링커, 콜레스테롤, 또는 접근가능성을 방해하지 않는 다른 것에 연결될 수 있다. 본 발명에 따른 면역자극성 올리고뉴클레오티드 또는 이뮤노머는 바람직하게는 신규한 퓨린 또는 피리미딘을 포함하는 면역자극성 디뉴클레오티드를 추가로 포함한다.

[0073] 일부 구체예에서, 본 발명에 따른 면역자극성 올리고뉴클레오티드는 도 14에 도시된 바와 같은, 링커에 의해 5'에서 3' 방향으로 연결된 올리고뉴클레오티드 서열을 가질 수 있다.

[0074] 일부 구체예에서, 이뮤노머는 동일 또는 상이할 수 있는 둘 이상의 면역자극성 올리고뉴클레오티드(이뮤노머의 콘텍스트 내의)를 포함한다. 바람직하게는, 각각의 이러한 면역자극성 올리고뉴클레오티드는 적어도 하나의 접근가능한 5' 말단을 가진다.

[0075] 특정 구체예에서, 면역자극성 올리고뉴클레오티드(들)에 더해, 이뮤노머는 또한 유전자 또는 이의 RNA 생성물에 상보적인 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 본원에서 사용된 용어 "~에 상보적인"은 올리고뉴클레오티드가 유전자의 영역에 생리학적 조건하에서 하이브리드화하는 것을 의미한다. 일부 구체예에서, 올리고뉴클레오티드는 유전자의 발현을 하향조절한다. 이러한 하향조절성 올리고뉴클레오티드는 바람직하게는 안티센스 올리고뉴클레오티드, 리보자임 올리고뉴클레오티드, 작은 억제성 RNA 및 미끼 (decoy) 올리고뉴클레오티드로 구성된 군으로부터 선택된다. 본원에서 사용된 "유전자를 하향조절하다"는 유전자의 전사 또는 유전자 생성물의 번역을 억제하는 것을 의미한다. 따라서, 이러한 발명의 구체예에 따른 이뮤노머는 하나 이상의 특이적 질병 표적을 표적화하는 데 사용되며 또한 면역계를 자극한다.

[0076] 특정 구체예에서, 이뮤노머는 리보자임 또는 미끼 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 본원에서 사용된 용어 "리보자임"은 촉매 활성을 가지는 올리고뉴클레오티드를 의미한다. 바람직하게는, 리보자임은 특이적 핵산 표적에 결합하고 표적을 절단한다. 본원에 사용된 용어 "미끼 올리고뉴클레오티드는 서열 특이적 방식으로 전사 인자에 결합하고 전사 활성을 멈추게 하는 올리고뉴클레오티드를 의미한다. 바람직하게는, 리보자임 또는 미끼 올리고뉴클레오티드는 제한 없이 스템-루프 또는 헤어핀 구조를 포함하는 2차 구조를 보인다. 특정 구체예에서, 하나 이상의 올리고뉴클레오티드는 폴리(I)-폴리(C)를 포함한다. 특정 구체예에서, 하나 이상의 Nn 세트는 3 내지 10개 dG 및/또는 G 또는 2'-치환된 리보 또는 아라비노 G의 스트링을 포함한다.

[0077] 본 발명을 위하여, 용어 "올리고뉴클레오티드"는 다수의 연결된 뉴클레오시드 유닛으로부터 형성된 폴리뉴클레오시드를 의미한다. 이러한 올리고뉴클레오티드는 게놈 DNA 또는 cDNA를 포함하여 존재하는 핵산 공급원으로부터 얻을 수 있으나, 바람직하게는 합성 방법에 의해 생성된다. 바람직한 구체예에서, 각 뉴클레오시드 유닛은 헤테로사이클릭 염기 및 펜토포라노실, 트레할로스, 아라비노스, 2'-데옥시-2'-치환된 아리비노스, 2'-0-치환된 아라비노스 또는 핵소스 당 기를 포함한다. 뉴클레오시드 잔기는 임의의 많은 공지된 뉴클레오시드간 연결 중 하나에 의해 서로 커플링될 수 있다. 이러한 뉴클레오시드간 링키지는 제한 없이 포스포디에스테르, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 알킬포스포네이트, 알킬포스포노티오에이트, 포스포트리에스테르, 포스포아미데이트, 실록산, 카르보네이트, 카르보알콕시, 아세트아미데이트, 카르바메이트, 포르폴리노, 보라노, 티오에테르, 가교된 포스포아미데이트, 가교된 메틸렌 포스포네이트, 가교된 포스포로티오에이트, 및 설폰 뉴클레오시드간 링키지를 포함한다. 용어 "올리고뉴클레오티드"는 또한 하나 이상의 위치특이성 뉴클레오시드간 링키지를 가지는 폴리뉴클레오시드(예를 들어, (Rp)- 또는 (Sp)-포스포로티오에이트, 알킬포스포네이트 또는 포스포트리에스테르 연결)를 포함한다. 본원에서 사용되는 용어 "올리고뉴클레오티드" 및 "디뉴클레오티드"는, 임의의 이러한 뉴클레오시드간 연결이 포스페이트 기를 포함하건 아니건 이들을 가지는 폴리뉴클레오시드 및 디뉴클레오시드를 포함하는 것으로 명확하게 의도된다. 특정 바람직한 구체예에서, 이러한 뉴클레오시드간 링키지는 포스포디에스테르, 포스포로티오에이트 또는 포스포로디티오에이트 연결 또는 이들의 조합일 수 있다.

[0078] 일부 구체예에서, 올리고뉴클레오티드는 각각 약 3 내지 약 35개 뉴클레오시드 잔기, 바람직하게는 약 4 내지 약 30개 뉴클레오시드 잔기, 보다 바람직하게는 약 4 내지 약 20개 뉴클레오시드 잔기를 가진다. 일부 구체예에서, 이뮤노머는 약 5개 내지 약 18개 또는 약 5개 내지 약 14개 뉴클레오시드 잔기를 가지는 올리고뉴클레오

티드를 포함한다. 본원에서 사용된 용어 "약"은 정확한 수는 중요하지 않다는 것을 의미한다. 따라서, 올리고뉴클레오티드에서 뉴클레오타이드 잔기의 수는 중요하지 않고, 하나 또는 두개의 적은 뉴클레오타이드 또는 한 내지 수개의 추가의 뉴클레오타이드 잔기를 가지는 올리고뉴클레오티드는 상기 기술된 구체예의 각각의 균등물로서 생각된다. 일부 구체예에서, 하나 이상의 올리고뉴클레오티드는 11개 뉴클레오타이드를 가진다. 면역자극성 올리고뉴클레오티드의 콘텍스트에서, 바람직한 구체예는 약 13 내지 약 35개 뉴클레오타이드, 보다 바람직하게는 약 13 내지 약 26개 뉴클레오타이드를 가진다.

[0079] 용어 "올리고뉴클레오티드"는 또한 제한없이 단백질 기, 친지성 기, 삽입성 체제, 디아민, 폴산, 콜레스테롤 및 아다만탄을 포함하는 추가의 치환기를 가지는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 용어 "올리고뉴클레오티드" 또한 제한 없이 펩티드 핵산(PNA), 포스페이트기를 가지는 펩티드 핵산(PHONA), 록킹된(locked) 핵산(LNA), 모르폴리노-백본 올리고뉴클레오티드, 및 알킬 링커 또는 아미노 링커와 함께 백본 부분을 가지는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 중합체를 함유하는 임의의 다른 핵염기를 포함한다.

[0080] 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 천연 뉴클레오타이드, 개질된 뉴클레오타이드, 또는 이들의 혼합물을 포함할 수 있다. 본원에 사용된 용어 "개질된 뉴클레오타이드"는 개질된 헤테로사이클릭 염기, 개질된 당 잔기, 또는 이들의 조합물을 포함하는 뉴클레오타이드이다. 일부 구체예에서, 개질된 뉴클레오타이드는 본원에 기술된 바와 같이 비천연 피리미딘 또는 퓨린 뉴클레오타이드이다. 특정 구체예에서, 개질된 뉴클레오타이드는 2'-치환된 리보뉴클레오타이드 아라비노뉴클레오타이드 또는 2'-데옥시-2'-치환된 아라비노시드이다.

[0081] 본 발명을 위하여, 용어 "2'-치환된 리보뉴클레오타이드" 또는 "2'-치환된 아라비노시드"는 펜토오스 잔기의 2' 위치의 하이드록실 기가 치환되어 2'-치환되거나 2'-O-치환된 리보뉴클레오타이드를 생성하는 리보뉴클레오타이드 또는 아라비노뉴클레오타이드를 포함한다. 바람직하게는, 이러한 치환은 1-6개 포화 또는 불포화 탄소 원자를 함유하는 저급 알킬기, 또는 6-10개 탄소 원자를 가지는 아릴 기로 이루어지며, 여기서, 이러한 알킬 또는 아릴기는 비치환될 수 있거나 예를 들어 할로, 하이드록시, 트리플루오로메틸, 시아노, 니트로, 아실, 아킬옥시, 알콕시, 카르복실, 카르보알콕시, 또는 아미노기로 치환될 수 있다. 2'-O-치환된 리보뉴클레오타이드 또는 2'-O-치환된 아라비노시드는 제한 없이 2'-O-메틸리보뉴클레오타이드 또는 2'-O-메틸아라비노시드 및 2'-O-메톡시에틸리보뉴클레오타이드 또는 2'-O-메톡시에틸아라비노시드를 포함한다.

[0082] 용어 "2'-치환된 리보뉴클레오타이드" 또는 "2'-치환된 아라비노시드"는 또한, 2'-하이드록실 기가 1-6개 포화되거나 불포화된 탄소 원자를 함유하는 저급 알킬기 또는 아미노 또는 할로기로 치환된 리보뉴클레오타이드 또는 아라비노뉴클레오타이드를 포함한다. 이러한 2'-치환된 리보뉴클레오타이드 또는 2'-치환된 아라비노시드의 예는 제한 없이 2'-아미노, 2'-플루오로, 2'-알릴, 및 2'-프로파르길 리보뉴클레오타이드 또는 아라비노시드를 포함한다.

[0083] 용어 "올리고뉴클레오티드"는 하이브리드 및 키메라 올리고뉴클레오티드를 포함한다. "키메라 올리고뉴클레오티드"는 뉴클레오타이드 링키지의 하나 이상의 타입을 가지는 올리고뉴클레오티드이다. 이러한 키메라 올리고뉴클레오티드의 하나의 바람직한 예는 포스포로티오에이트, 포스포디에스테르 또는 포스포로디티오에이트 영역 및 알킬포스포네이트 또는 알킬포스포노티오에이트 연결과 같은 비이온성 링키지를 포함하는 키메라 올리고뉴클레오티드이다(문헌[Pederson et al., US Patent Nos. 5,635,377 and 5,366,878] 참조).

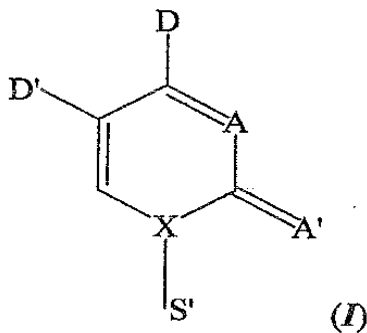
[0084] "하이브리드 올리고뉴클레오티드"는 하나 이상의 타입의 뉴클레오타이드를 가지는 올리고뉴클레오티드이다. 이러한 하이브리드 올리고뉴클레오티드의 하나의 바람직한 예는 리보뉴클레오티드 또는 2'-치환된 리보뉴클레오티드 영역 및 데옥시리보뉴클레오티드 영역을 포함한다(예를 들어 문헌[Metelev and Agrawal, U.S. patent No. 5,652,355, 6,346,614, and 6,143,881]).

[0085] 본 발명을 위하여, 용어 "면역자극성 올리고뉴클레오티드"는 어류, 가금류, 또는 포유류와 같은 척추동물에 투여되는 경우에 면역 반응을 유도하는 상기 기술된 바와 같은 올리고뉴클레오티드에 관한 것이다. 본원에서 사용된 용어 "포유류"는 제한 없이 래트, 마우스, 고양이, 개, 말, 축우, 젖소, 돼지, 토끼, 비인간 영장류, 및 인간을 포함한다. 유용한 면역자극성 올리고뉴클레오티드는 문헌[Agrawal et al., WO 98/49288, 1998년 11월 5일 공개; WO 01/12804, 2001년 2월 22일 공개; WO 01/55370, 2001년 8월 2일 공개; PCT/US01/13682, 2001년 4월 30일 출원; 및 PCT/US01/30137, 2001년 9월 26일에 출원]에 기재되어 있음을 알 수 있다. 바람직하게는, 면역조절성 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 포스포디에스테르, 포스포로티오에이트 또는 포스포로디티오에이트 뉴클레오타이드간 링키지를 포함한다.

[0086] 일부 구체예에서, 면역자극성 올리고뉴클레오티드는 화학식 5'-Pyr-Pur-3'의 면역자극성 디뉴클레오티드를 포함

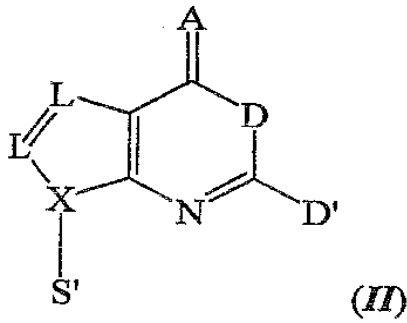
하고, 여기서 Pyr은 천연 또는 합성 피리미딘 뉴클레오시드이고 Pur은 천연 또는 합성 퓨린 뉴클레오시드이다. 일부 바람직한 구체예에서, 번역조절성 올리고뉴클레오티드는 화학식 5'-Pur^{*}-Pur-3'의 번역자극성 디뉴클레오티드를 포함하고, 여기서 Pur^{*}은 합성 퓨린 뉴클레오시드이고 Pur은 천연 또는 합성 퓨린 뉴클레오시드이다. 다양한 장소에서, 디뉴클레오티드는 RpG, C^{*}pG, 또는 YZ로서 표현되고, 각각의 경우에 R, C^{*}, 또는 Y는 합성 퓨린이다. 특히 바람직한 합성 퓨린은 2-옥소-7-테아자-8-메틸-퓨린이다. 이러한 합성 퓨린이 디뉴클레오티드의 Pur^{*} 위치에 있는 경우에, 번역자극성 효과의 종-특이성(서열 의존성)은 극복되고 사이토카인 프로파일이 개선된다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "피리미딘 뉴클레오시드"는, 뉴클레오시드의 염기 성분이 모노사이클릭 핵염기인 뉴클레오시드에 관한 것이다. 유사하게는, 용어 "퓨린 뉴클레오시드"는 뉴클레오시드의 염기 성분이 바이사이클릭 핵염기인 뉴클레오시드에 관한 것이다. 본 발명을 위하여, "합성" 피리미딘 또는 퓨린 뉴클레오시드는 비천연 피리미딘 또는 퓨린 염기, 비천연 당 잔기 또는 이들의 조합물을 포함한다.

[0087] 본 발명에 따른 바람직한 피리미딘 뉴클레오시드는 하기 구조(I)를 가진다:



- [0088]
- [0089] 상기 식에서:
- [0090] D는 수소 결합 공여체이고;
- [0091] D'는 수소, 수소 결합 공여체, 수소 결합 수용체, 친수성 기, 소수성 기, 전자 끄는 기 및 전자 공여 기로 구성된 군으로부터 선택되고;
- [0092] A는 수소 결합 수용체 또는 친수성 기이고;
- [0093] A'는 수소 결합 수용체, 친수성 기, 소수성 기, 전자 끄는 기 및 전자 공여 기로 구성된 군으로부터 선택되고;
- [0094] X는 탄소 또는 질소이고;
- [0095] S'는 펜토오스 또는 헥소오스 당 고리 또는 비천연 당이다.
- [0096] 바람직하게는, 당 고리는 포스페이트 잔기, 개질된 포스페이트 잔기 또는 피리미딘 뉴클레오시드를 다른 뉴클레오시드 또는 뉴클레오시드 유사체에 연결하는 데에 적합한 다른 링커 잔기로 유도체화된다.
- [0097] 바람직한 수소 결합 공여체는 제한 없이 -NH-, -NH₂-, -SH 및 -OH를 포함한다. 바람직한 수소 결합 수용체는 제한 없이 C=O, C=S, 및 방향족 헤테로사이클의 고리 질소 원자 예를 들어 시토신의 N3를 포함한다.
- [0098] 일부 구체예에서, (I)의 염기 잔기는 비천연 피리미딘 염기이다. 바람직한 비천연 피리미딘 염기의 예는 제한 없이 5-하이드록시시토신, 5-하이드록시메틸시토신, N4-알킬시토신, 바람직하게는 N4-에틸시토신 및 4-티오우라실을 포함한다. 그러나, 일부 구체예에서 5-브로모시토신은 특이적으로 배제된다.
- [0099] 일부 구체예에서, (I)의 당 잔기 S'는 비천연 당 잔기이다. 본 발명을 위하여, "천연 당 잔기"는 핵산의 부분으로 천연 당 잔기, 예를 들어 리보오스 및 2'-데옥시리보오스, 및 "비천연 당 잔기"는 핵산의 부분으로 비천연이지만 올리고뉴클레오티드를 위한 백본에 사용될 수 있는 임의의 당, 예를 들어 헥소오스이다. 아라비노스 및 아라비노스 유도체는 바람직한 당 잔기의 예이다.

[0100] 본 발명에 따른 바람직한 퓨린 뉴클레오시드는 구조(II)를 가진다:



- [0101]
- [0102] 상기 식에서:
- [0103] D는 수소 결합 공여체이고;
- [0104] D'는 수소, 수소 결합 공여체, 및 친수성 기로 구성된 군으로부터 선택되고;
- [0105] A는 수소 결합 수용체 또는 친수성 기이고;
- [0106] X는 탄소 또는 질소이고;
- [0107] 각 L은 독립적으로 C, O, N, 및 S으로 구성된 군으로부터 선택된 원자이고;
- [0108] S'는 펜토오스 또는 핵소오스 당 고리, 또는 비천연 당이다.
- [0109] 바람직하게는, 당 고리는 포스페이트 잔기, 개질된 포스페이트 잔기, 또는 피리미딘 뉴클레오시드를 다른 뉴클레오시드 또는 뉴클레오시드 유사체에 연결하기에 적합한 다른 링커 잔기로 유도체화된다.
- [0110] 바람직한 수소 결합 공여체는 제한 없이 -NH-, -NH₂-, -SH, 및 -OH를 포함한다. 바람직한 수소 결합 수용체는 제한 없이 C=O, C=S, -NO₂ 및 방향족 헤테로사이클의 고리 질소 원자, 예를 들어 구아닌의 N1을 포함한다.
- [0111] 일부 구체예에서, (II)의 염기 잔기는 비천연 퓨린 염기이다. 바람직한, 비천연 퓨린 염기는 제한 없이 2-아미노-6-티오피린 및 2-아미노-6-옥소-7-테아자퓨린을 포함한다. 일부 구체예에서, (II)의 당 잔기 S'는 구조 (I)에 대해 상기 기술된 바와 같은 천연 당 잔기이다.
- [0112] 바람직한 구체예에서, 번역자극성 디뉴클레오티드는 CpG, C^{*}pG, CpG^{*}, 및 C^{*}pG^{*}로 구성된 군으로부터 선택되고, 염기 C는 시토신이고, 염기 C^{*}는 2'-티민, 5-하이드록시시토신, N4-알킬-시토신, 4-티오우라실 또는 다른 비천연 피리미딘, 또는 2-옥소-7-테아자-8-메틸퓨린이며, 염기가 2-옥소-7-테아자-8-메틸-퓨린인 경우에 바람직하게는 염기의 1 위치를 통하여 펜토오스의 1'-위치에 공유결합되고; G의 염기는 구아노신이고, G^{*}의 염기는 2-아미노-6-옥소-7-테아자퓨린, 2-옥소-7-테아자-8-메틸퓨린, 6-티오구아닌, 6-옥소퓨린 또는 다른 비천연 퓨린 뉴클레오시드이고, p는 포스포디에스테르, 포스포로티오에이트, 및 포스포로디티오에이트로 구성된 군으로부터 선택된 뉴클레오시드간 연결이다. 특정 바람직한 구체예에서, 번역자극성 디뉴클레오티드는 CpG가 아니다.
- [0113] 번역자극성 올리고뉴클레오티드는 번역자극성 디뉴클레오티드의 한쪽 또는 양쪽에서 번역자극성 모이어티를 포함할 수 있다. 따라서, 일부 구체예에서, 번역자극성 올리고뉴클레오티드는 구조(III)의 번역자극성 도메인을 포함한다:
- [0114] 5'-Nn-N1-Y-Z-N1-Nn-3' (III)
- [0115] 상기 식에서:
- [0116] 염기 Y는 시토신, 티민, 5-하이드록시시토신, N4-알킬-시토신, 4-티오우라실 또는 다른 비천연 피리미딘 뉴클레오시드, 또는 2-옥소-7-테아자-8-메틸 퓨린이고, 염기가 2-옥소-7-테아자-8-메틸-퓨린인 경우에, 바람직하게는 염기의 1 위치를 통해 펜토오스의 1'-위치에 공유 결합되며; Z의 염기는 구아닌, 2-아미노-6-옥소-7-테아자퓨린, 2-옥소-7-테아자-8-메틸퓨린, 2-아미노-6-티오-퓨린, 6-옥소퓨린 또는 다른 비천연 퓨린 뉴클레오시드이며;

- [0117] N1 및 Nn은 각각의 위치에서 독립적으로 바람직하게는 천연 또는 합성 뉴클레오시드 또는 탈염기 (abasic) 뉴클레오시드, 아라비노뉴클레오시드, 2'-데옥시우리딘, α-데옥시리보뉴클레오시드, β-L-데옥시리보뉴클레오시드 및 포스포디에스테르 또는 3' 쪽에서 인접 뉴클레오시드에 포스포디에스테르 또는 개질된 뉴클레오시드간 링키지에 의해 연결된 뉴클레오시드로 구성된 군으로부터 선택된 번역자극성 모이어티이고, 개질된 뉴클레오시드간 링키지는 제한 없이 약 2 옹스트롱 내지 약 200 옹스트롱의 길이를 가지는 링커, C2-C18 알킬 링커, 폴리(에틸렌 글리콜) 링커, 2-아미노부틸-1,3-프로판디올 링커, 글리세릴 링커, 2'-5' 뉴클레오시드간 연결, 및 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 또는 메틸포스포네이트 뉴클레오시드간 연결로부터 선택되고;
- [0118] 다만, 하나 이상의 N1 또는 Nn이 임의로 번역자극성 모이어티이며,
- [0119] 여기서 n은 0 내지 30의 수이고,
- [0120] 3' 말단, 뉴클레오시드간 링커, 또는 유도체화된 핵염기 또는 당이 번역자극성일 수 있거나 아닐 수 있는 다른 올리고뉴클레오티드에 비뉴클레오티드 링커를 통하거나 직접 연결된다.
- [0121] 일부 바람직한 구체예에서, YZ은 아라비노사이티딘 또는 2'-데옥시-2'-치환된 아라비노사이티딘 및 아라비노구아노신 또는 2'-데옥시-2'-치환된 아라비노구아노신이다. 바람직한 번역자극성 모이어티는 천연 포스포디에스테르 백본 및, 제한 없이 메틸포스포네이트, 메틸 포스포노티오에이트, 포스포트리에스테르, 포스포티오트리에스테르, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 트리에스테르 프로드러그, 설펜, 설펜아미드, 설펜메이트, 포름아세탈, N-메틸하이드록실아민, 카르보네이트, 카르바메이트, 모르폴리노, 보라노포스포네이트, 포스포르아미데이트, 특히 1차 아미노-포스포르아미데이트, N3 포스포르아미데이트 및 N5 포스포르아미데이트, 및 입체특이적 링키지(예를 들어, (R_p)- 또는 (S_p)-포스포로티오에이트, 알킬포스포네이트 또는 포스포트리에스테르 링키지)을 포함하여 포스포네이트 백본 개질체를 포함한다.
- [0122] 본 발명에 따른 바람직한 번역자극성 모이어티는 추가로 뉴클레오시드를 포함하고, 이는 제한 없이 2'-치환된 펜토오스 당(제한 없이 2'-O-메틸리보오스, 2'-O-메톡시에틸-리보오스, 2'-O-프로파르길리보오스, 및 2'-데옥시-2'-플루오로리보오스를 포함); 3'-치환된 펜토오스 당(제한 없이 3'-O-메틸리보오스를 포함); 1',2'-디데옥시리보오스; 아라비노오스; 치환된 아라비노오스 당(제한 없이 1'-메틸아라비노오스, 3'-하이드록시메틸아라비노오스, 4'-하이드록시메틸아라비노오스, 3'-하이드록시아라비노오스 및 2'-치환된 아라비노오스 당을 포함); 핵소오스 당(제한 없이 1,5-언하이드로핵시톨); 및 알파-아노머를 포함하는 개질된 당을 가진다. 개질된 당이 3'-데옥시리보뉴클레오시드 또는 3'-O-치환된 리보뉴클레오시드인 구체예에서, 번역자극성 모이어티는 2'-5' 뉴클레오시드간 링키지에 의해 인접 뉴클레오시드에 부착된다.
- [0123] 본 발명에 따른 바람직한 번역자극성 모이어티는 추가로 다른 탄수화물 백본 개질 및 대체를 가지는 올리고뉴클레오티드를 포함하고, 이 올리고뉴클레오티드는 펩티드 핵산(PNA), 포스페이트기를 가지는 펩티드 핵산(PHONA), 록킹된 핵산(LNA), 모르폴리노 백본 올리고뉴클레오티드 및 약 2 옹스트롱 내지 약 200 옹스트롱의 길이를 가지는 백본 링커 부분(제한 없이, 알킬 링커 또는 아미노 링커)을 가지는 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 알킬 링커는 분지되거나 분지되지 않은, 치환되거나 치환되지 않은 순수 키랄 또는 라세미 혼합물일 수 있다. 가장 바람직하게는, 이러한 알킬 링커는 약 2 내지 약 18개 탄소 원자를 가진다. 일부 바람직한 구체예에서, 이러한 알킬 링커는 약 3 내지 9개 탄소 원자를 가진다. 일부 알킬 링커는, 하이드록시, 아미노, 티올, 티오에테르, 에테르, 아미드, 티오아미드, 에스테르, 우레아, 및 티오에테르로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 작용기를 포함한다. 일부 이러한 작용기화된 알킬 링커는 화학식 -O-(CH₂-CH₂-O)_n의 폴리(에틸렌 글리콜) 링커 (n=1-9)이다. 일부 다른 작용기화된 알킬 링커는 펩티드 또는 아미노산이다.
- [0124] 본 발명에 따른 바람직한 번역자극성 모이어티는, 제한 없이 β-L-데옥시리보뉴클레오시드 및 α-데옥시리보뉴클레오시드를 포함하는 DNA 이소폼을 추가로 포함한다. 본 발명에 따른 바람직한 번역자극성 모이어티는 3' 개질을 혼입하고, 추가로 제한 없이 2'-5', 2'-2', 3'-3', 및 5'-5' 링키지를 포함하여 비천연의 뉴클레오시드간 링키지 위치를 가지는 뉴클레오시드를 포함한다.
- [0125] 본 발명에 따른 바람직한 번역자극성 모이어티는 제한 없이 5-하이드록시시토신, 5-하이드록시메틸시토신, N4-알킬시토신, 바람직하게는 N4-에틸시토신, 4-티오우라실, 6-티오구아닌, 7-데아자구아닌, 이노신, 니트로피롤, C5-프로피닐피리미딘 및 디아미노퓨린(제한 없이 2,6-디아미노퓨린을 포함)을 포함하는 개질된 헤테로사이클릭 염기를 가지는 뉴클레오시드를 추가로 포함한다.
- [0126] 구체적 예에 의해 제한 없이 예를 들어 구조(III)의 번역자극성 도메인에서, 위치 N1 또는 Nn에서 메틸포스포네

이트 뉴클레오시드간 링커지는 번역자극성 모이어티, 약 2 옹스트롱 내지 약 200 옹스트롱의 길이를 가지는 링커이고, 위치 X1에서의 C2-C18 알킬 링커는 번역자극성 모이어티이고, 위치 X1에서의 β-L-데옥시리보뉴클레오시드는 번역자극성 모이어티이다. 대표적인 위치 및 번역자극성 모이어티의 구조에 대한 하기 표 1을 참조할 수 있다. 지정된 위치에서의 번역자극성 모이어티로서 링커에 대한 언급은 그 위치에서 뉴클레오시드 잔기에서의 3'-하이드록실 잔기에서 지정된 링커로 치환되고, 이에 의해 3' 쪽에서 뉴클레오시드 잔기 및 인접 뉴클레오시드 간의 개질된 뉴클레오시드 링커지를 생성한다는 것을 의미한다. 유사하게, 지정된 위치에서 번역자극성 모이어티로서의 개질된 뉴클레오시드간 링커지에 대한 언급은 그 위치에서 뉴클레오시드 잔기가 인용된 링커지에 의해 3' 쪽에서 인접 뉴클레오시드에 연결된다는 것을 의미한다.

표 1

[0127]

위치	통상적인 번역자극성 모이어티
N1	천연 뉴클레오시드, 탈염기 뉴클레오시드, 아라비노뉴클레오시드, 2'-데옥시우리딘, β-L-데옥시리보뉴클레오시드 C2-C18 알킬 링커, 폴리(에틸렌 글리콜)링커지, 2-아미노부틸-1,3-프로판디올 링커(아미노 링커), 2'-5' 뉴클레오시드간 링커지, 메틸포스포네이트 뉴클레오시드간 링커지
Nn	천연 뉴클레오시드, 탈염기 뉴클레오시드, 아라비노뉴클레오시드, 2'-데옥시우리딘, 2'-O-치환된 리보뉴클레오시드, 2'-5' 뉴클레오시드간 링커지, 메틸포스포네이트 뉴클레오시드간 링커지, 단 N1 및 N2는 둘 모두 탈염기 링커지일 수 없다.

[0128]

표 2는 업스트림 강화(potential) 도메인을 가지는 번역자극성 올리고뉴클레오티드 내의 번역자극성 모이어티의 대표적인 위치 및 구조를 도시한다. 본원에 사용된 용어 "스페이스 9"는 화학식 $-O-(CH_2CH_2-O)_n-$ (n은 3)의 폴리(에틸렌 글리콜) 링커에 관한 것이다. 용어 "스페이스 18"은 화학식 $-O-(CH_2CH_2-O)_n-$ 의 폴리(에틸렌 글리콜)(n은 6)을 의미한다. 본원에 사용된 용어 "C2-C18 알킬 링커"는 화학식 $-O-(CH_2)_q-O-$ 의 링커(q는 2 내지 18의 정수)를 의미한다. 따라서, 용어 "C3-링커" 및 "C3-알킬 링커"는 화학식 $-O-(CH_2)_3-O-$ 의 링커를 의미한다. 스페이스 9, 스페이스 18, 및 C2-C18 알킬 링커의 각각에 대해, 링커는 포스포다이에스테르, 포스포포티오에이트, 또는 포스포로디티오에이트 링커지에 의해 인접 뉴클레오시드에 연결된다.

표 2

[0129]

위치	통상적인 번역자극성 모이어티
5' N2	천연 뉴클레오시드, 2-아미노부틸-1,3-프로판디올 링커
5' N1	천연 뉴클레오시드, β-L-데옥시리보뉴클레오시드, C2-C18 알킬 링커, 폴리(에틸렌 글리콜), 탈염기 링커, 2-아미노부틸-1,3-프로판디올 링커
3' N1	천연 뉴클레오시드, 1',2'-디데옥시리보오스, 2'-O-메틸-리보뉴클레오시드, C2-C18 알킬 링커, 스페이스 9, 스페이스 18
3' N2	천연 뉴클레오시드, 1',2'-디데옥시리보오스, 3'-데옥시리보뉴클레오시드, β-L-데옥시리보뉴클레오시드, 2'-O-프로파르길-리보뉴클레오시드, C2-C18 알킬 링커, 스페이스 9, 스페이스 18, 메틸포스포네이트 뉴클레오시드간 링커지

3' N3	천연 뉴클레오시드, 1',2'-디데옥시리보오스, C2-C18 알킬 링커, 스페이서 9, 스페이서 18, 메틸 포스포네이트 뉴클레오시드간 링키지, 2'-5' 뉴클레오시드간 링키지, d(G)n, 폴리I-폴리C
3'N2+3'N3	1',2'-디데옥시리보오스, β-L-데옥시리보뉴클레오시드, C2-C18 알킬 링커, d(G)n, 폴리I-폴리C
3'N3+3'N4	2'-O-메톡시에틸-리보뉴클레오시드, 메틸포스포네이트 뉴클레오시드간 링키지, d(G)n, 폴리I-폴리C
3'N5+3'N6	1',2'-디데옥시리보오스, C2-C18 알킬 링커, d(G)n, 폴리I-폴리C
5'N1+3'N3	1',2'-디데옥시리보오스, d(G)n, 폴리I-폴리C

[0130] 표 3은 다운스트림 강화 도메인을 가지는 번역자극성 올리고뉴클레오티드 내의 번역자극성 모이어티의 대표적인 위치 및 구조를 도시한다.

표 3

[0131]

위치	통상적인 번역자극성 모이어티
5'N2	메틸포스포네이트 뉴클레오시드간 링키지
5'N1	메틸포스포네이트 뉴클레오시드간 링키지
3'N1	1',2'-디데옥시리보오스, 메틸포스포네이트 뉴클레오시드간 링키지, 2'-O-메틸
3'N2	1',2'-디데옥시리보오스, β-L-데옥시리보뉴클레오시드, C2-C18 알킬 링커, 스페이서 9, 스페이서 18, 2-아미노부틸-1,3-프로판디올 링커, 메틸포스포네이트 뉴클레오시드간 링키지, 2'-O-메틸
3'N3	3'-데옥시리보뉴클레오시드, 3'-O-치환된 리보뉴클레오시드, 2'-O-프로파르길-리보뉴클레오시드
3'N2+3'N3	1',2'-디데옥시리보오스, β-L-데옥시리보뉴클레오시드

[0132]

본 발명에 따른 이뉴노머는 비뉴클레오티드 링커를 통하여 작용기화된 핵염기 또는 당 또는 뉴클레오시드간 연결 또는 3' 말단에서 연결된 둘 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 본 발명을 위하여, "비뉴클레오티드 링키지"은 공유 또는 비공유 링키지에 의해 올리고뉴클레오티드에 연결될 수 있는 임의의 잔기이다. 바람직하게는, 이러한 링커는 약 2 옹스트롱 내지 약 200 옹스트롱의 길이를 갖는다. 바람직한 링커의 수개의 예가 하기에 도시된다. 비-공유결합 링키지는 제한없이 정전기적 상호작용, 소수성 상호작용, π-스택킹(stackings) 상

호작용, 및 수소 결합을 포함한다. 용어 "비뉴클레오티드 링커"는 상기 기술된 바와 같은 뉴클레오시드간 링커지, 예를 들어 두개의 뉴클레오시드의 3'-하이드록실기를 직접 연결하는, 포스포디에스테르, 포스포티오에이트, 또는 포스포로디티오에이트 작용기를 언급하는 것을 의미하지 않는다. 본 발명을 위하여, 이러한 직접적인 3'-3' 연결(링커가 관여하지 않음)은 "뉴클레오티드 링커지"인 것으로 간주된다.

- [0133] 일부 구체예에서, 비-뉴클레오티드 링커는 제한 없이 금 입자를 포함하는 금속이다. 일부 다른 구체예에서, 비-뉴클레오티드 링커는 가용성 또는 비가용성 생분해성 중합체 비드이다.
- [0134] 다른 구체예에서, 비뉴클레오티드 링커는 올리고뉴클레오티드에 부착을 허용하는 작용기를 가지는 유기 잔기이다. 이러한 부착은 바람직하게는 임의의 안정한 공유 링커지이다. 비제한적 예로서, 링커는 도 13에 도시된 바와 같이 뉴클레오시드 상에 임의의 적합한 위치에 부착될 수 있다. 이러한 구체예에서, 링커는 바람직하게는 포스포디에스테르, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 또는 비포스페이트 기재 링커지에 의해 3'-하이드록실에 부착되는 하이드록실 작용기를 포함한다.
- [0135] 일부 구체예에서, 비뉴클레오티드 링커는 제한없이 폴리펩티드, 항체, 지질, 항원, 알레르겐, 및 올리고사카라이드를 포함하는 생분자이다. 일부 다른 구체예에서, 비뉴클레오티드 링커는 소분자이다. 본 발명을 위하여, 소분자는 1,000Da 미만의 분자량을 가지는 유기 잔기이다. 일부 구체예에서, 소분자는 750Da 미만의 분자량을 가진다.
- [0136] 일부 구체예에서, 소분자는 지방족 또는 방향족 탄화수소이고, 이들 중 어느 하나는 임의로 올리고뉴클레오티드를 연결하거나 이에 부착된 선형 사슬에, 하이드록시, 아미노, 티올, 티오에테르, 에테르, 아마이드, 티오아מיד, 에스테르, 우레아, 및 티오우레아로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 작용기를 포함할 수 있다. 소분자는 사이클릭 또는 비사이클릭(acyclic)이다. 소분자 링커의 예에는 제한 없이 아미노산, 탄수화물, 시클로헥스 트린, 아다만탄, 콜레스테롤, 합텐, 및 항생제가 포함된다. 그러나, 비뉴클레오티드 링커를 기술하기 위하여, 용어 "소분자"는 뉴클레오시드를 포함하지 않는 것으로 의도된다.
- [0137] 일부 구체예에서, 소분자 링커는 화학식 $\text{HO}-(\text{CH}_2)_o-\text{CH}(\text{OH})-(\text{CH}_2)_p-\text{OH}$ (o 및 p 는 독립적으로 1 내지 약 6, 1 내지 약 4, 또는 1 내지 약 3의 정수이다)의 글리세롤 또는 글리세롤 유사체이다. 일부 다른 구체예에서, 소분자 링커는 1,3-디아미노-2-하이드록시프로판의 유도체이다. 일부 이러한 유사체는 화학식 $\text{HO}-(\text{CH}_2)_m-\text{C}(\text{O})\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{NHC}(\text{O})-(\text{CH}_2)_n-\text{OH}$ (m 은 0 내지 약 10, 0 내지 약 6, 2 내지 약 6, 또는 2 내지 약 4의 정수이다)를 가진다.
- [0138] 본 발명에 따른 일부 비뉴클레오티드 링커는 도 1에 개략적으로 도시되어 있는 2개 이상의 올리고뉴클레오티드의 부착을 허용한다. 예를 들어 소분자 링커 글리세롤은 올리고뉴클레오티드가 공유결합으로 부착될 수 있는 3개의 하이드록실기를 가진다. 따라서, 본 발명에 따른 일부 이뮤노머는 3' 말단에서 비뉴클레오티드 링커에 연결되어 있는 2개 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일부 이러한 이뮤노머는 둘 이상의 면역자극성 올리고뉴클레오티드를 포함하고, 각각은 접근가능한 5' 말단을 가진다.
- [0139] 본 발명의 이뮤노머는 도 5 및 6에 개략적으로 도시되어 있고 실시예에 추가로 기술되어 있는 바와 같이 자동 합성기 및 포스포르아미디트 접근법을 사용하여 공유결합에 의해 합성될 수 있다. 일부 구체예에서, 이뮤노머는 선형 합성 접근법에 의해 합성된다(도 5 참조). 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "선형 합성"은 이뮤노머의 한쪽 끝에서 출발하여 다른 끝에 선형으로 진행되는 합성을 의미한다. 선형 합성은 동일하거나 동일하지 않은(길이, 염기 조성, 및/또는 화학적 개질 혼입의 관점에서) 단량체 단위를 이뮤노머에 혼입하는 것을 허용한다.
- [0140] 합성의 대안적인 형태는 "평행적 합성"이고, 이러한 합성에서는 합성이 중앙 링커 잔기로부터 바깥쪽으로 진행된다(도 6 참조). 고휘 지지체 부착된 링커는 미국 특허 제 5,912,332호에 기술된 바와 같이 평행 합성을 위해 사용될 수 있다. 대안적으로, 보편적인 고체 지지체(예를 들어 포스페이트 부착된 조절 포어 글라스)가 사용될 수 있다.
- [0141] 이뮤노머의 평행 합성은 선형 합성에 비해 여러 이점을 가진다: (1) 평행 합성은 동일한 단량체 단위의 혼입을 가능하게 하고; (2) 선형 합성과 달리, 둘 모두 (또는 모든) 단량체 단위는 동시에 합성되어 합성 단계의 수 및 합성에 필요한 시간이 단량체 단위와 동일하며; (3) 합성 단계의 축소는 최종 이뮤노머 생성물의 순도 및 수율을 개선한다.
- [0142] 선형 합성 및 평행 합성 프로토콜 중 어느 하나에 의한 합성이 끝나면, 개질된 뉴클레오시드가 혼입되는

경우에, 이뮤노머는 용이하게 농축된 암모니아 용액으로 보호되거나 포스포르아미디트 공급체에 의해 제안된 바와 같이 보호될 수 있다. 생성물 이뮤노머는 바람직하게는 역상 HPLC에 의해 정제되고, 데트리틸레이션되고 (detritylation), 탈염되고 투석된다.

[0143] 표 4A 및 표 4B는 본 발명에 따라 대표적인 이뮤노머를 도시한다. 추가의 이뮤노머는 실시예에 기술되어 있다.

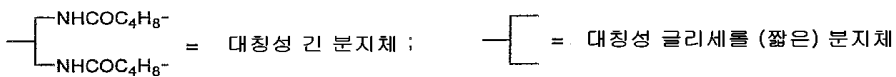
[0144] [표 4A] 이뮤노머 서열의 예

올리고 또는 이뮤노머 번호	서열 및 개질 (5'-3')
1	5'-GAGAACGCTCGACCTT-3'
2	5'-GAGAACGCTCGACCTT-3'-3'-TTCCAGCTCGCAAGAG-5'
3	3'-TTCCAGCTCGCAAGAG-5'-5'-GAGAACGCTCGACCTT-3'
4	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
5	5'-T-3' $\left\{ \begin{array}{l} \text{HNCO-C}_4\text{H}_8\text{-5'-CTATLTGACGTTCTCTGT-3'} \\ \text{HNCO-C}_4\text{H}_8\text{-5'-CTATLTGACGTTCTCTGT-3'} \end{array} \right.$
6	$\left. \begin{array}{l} \text{5'-CTATLTGACGTTCTCTGT-3'-C}_4\text{H}_8\text{-CONH} \\ \text{5'-CTATLTGACGTTCTCTGT-3'-C}_4\text{H}_8\text{-CONH} \end{array} \right\} \text{3'-C-5'}$
7	$\left. \begin{array}{l} \text{5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'-C}_4\text{H}_8\text{-CONH} \\ \text{5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'-C}_4\text{H}_8\text{-CONH} \end{array} \right\} \text{3'-C-5'}$

[0145]

8	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' 5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'	3'-C-5'
9	5'-CTATCTGAYGTTCTCTGT-3' 5'-CTATCTGAYGTTCTCTGT-3'	3'-C-5'
10	5'-CTATCTGACRTTCTCTGT-3' 5'-CTATCTGACRTTCTCTGT-3'	3'-C-5'
11	5'-CTALCTGAYGTTCTCTGT-3' 5'-CTALCTGAYGTTCTCTGT-3'	3'-C-5'
12	5'-CTALCTGACRTTCTCTGT-3' 5'-CTALCTGACRTTCTCTGT-3'	3'-C-5'
13	5'-CTGACGTTCTCTGT-3'	
14	5'-CTGACGTTCTCTGT-3' 5'-CTGACGTTCTCTGT-3'	3'-C-5'
15	5'-CTGAYGTTCTCTGT-3' 5'-CTGAYGTTCTCTGT-3'	3'-C-5'
16	5'-CTGACRTTCTCTGT-3' 5'-CTGACRTTCTCTGT-3'	3'-C-5'
17	5'-XXTGACGTTCTCTGT-3'	
18	5'-XXXTGACGTTCTCTGT-3' 5'-XXXTGACGTTCTCTGT-3'	3'-C-5'
19	5'-XXXTGAYGTTCTCTGT-3' 5'-XXXTGAYGTTCTCTGT-3'	3'-C-5'
20	5'-XXXTGACRTTCTCTGT-3' 5'-XXXTGACRTTCTCTGT-3'	3'-C-5'
21	5'-TCTGACGTTCT-3'	
22	5'-XXXTCTGACGTTCT-3' 5'-XXXTCTGACGTTCT-3'	3'-C-5'
23	5'-XXXTCTGAYGTTCT-3' 5'-XXXTCTGAYGTTCT-3'	3'-C-5'
24	5'-XXXTCTGACRTTCT-3' 5'-XXXTCTGACRTTCT-3'	3'-C-5'

[0146]



[0147]

L = C3-알킬 링커; X = 1',2'-디에옥시리보사이드 ; Y = ^{50H}dC; R = 7-테아자-dG

[0148] [표 4B] 이뮤노머 서열의 예

올리고 또는 이뮤노머 번호	서열 (5'-3')	개질
170	5'-TCTGTQGTCT-X-TCTTGQTGTCT-5'	Q=1-(2'-데옥시-β-D-리보푸라노실)-2-옥소-7-테아자-8-메틸-푸린; X=글리세롤 링커
171	5'-CTGTCTTCTC-X-CTCTTCTGTCT-5'	P=아라비노스; X=글리세롤 링커
172	5'-TCZTCZTTCTG-X-GTCITZCTZCT-5'	Z=2'-데옥시-7-테아자구아노신; X=글리세롤 링커
173	5'-TCTGTCGTTCT-X-TCTTGCTGTCT-5'	G=2'-데옥시-7-테아자구아노신; X=글리세롤 링커
174	5'-TCTGTCGTTCT-X-TCTTGCTGTCT-5'	G=아라비노스; X=글리세롤 링커
175	5'-TCTGTCGTTCT-X-TCTTGCTGTCT-5'	C=1-(2'-데옥시-β-D-리보푸라노실)-2-옥소-7-테아자-8-메틸-푸린; X=글리세롤 링커
176	5'-TCTGTCGTTCT-X-TCTTGCTGTCT-5'	C=아라비노사이드; X=글리세롤 링커
177	5'-TCTGTCGTTCT-X-TCTTGCTGTCT-5'	C=2'-데옥시-5-하이드록시사이드; X=글리세롤 링커
178	5'-CTGTCTTCTC-X-CTCTTCTGTCT-5'	G=2'-데옥시-7-테아자구아노신; X=글리세롤 링커
179	5'-CTGTCTTCTC-X-CTCTTCTGTCT-5'	G=아라비노스; X=글리세롤 링커
180	5'-CTGTCTTCTC-X-CTCTTCTGTCT-5'	C=1-(2'-데옥시-β-D-리보푸라노실)-2-옥소-7-테아자-8-메틸-푸린; X=글리세롤 링커
181	5'-CTGTCTTCTC-X-CTCTTCTGTCT-5'	C=아라비노사이드; X=글리세롤 링커
182	5'-CTGTCTTCTC-X-CTCTTCTGTCT-5'	C=2'-데옥시-5-하이드록시사이드; X=글리세롤 링커
183	5'-TCGTCGTTCTG-X-GTCTTGCTGCT-5'	G=2'-데옥시-7-테아자구아노신; X=글리세롤 링커
184	5'-TCGTCGTTCTG-X-GTCTTGCTGCT-5'	G=아라비노스; X=글리세롤 링커
185	5'-TCGTCGTTCTG-X-GTCTTGCTGCT-5'	C=1-(2'-데옥시-β-D-리보푸라노실)-2-옥소-7-테아자-8-메틸-푸린; X=글리세롤 링커
186	5'-TCGTCGTTCTG-X-GTCTTGCTGCT-5'	C=아라비노사이드; X=글리세롤 링커
187	5'-TCGTCGTTCTG-X-GTCTTGCTGCT-5'	C=2'-데옥시-5-하이드록시사이드; X=글리세롤 링커
188	5'-TC ₁ G ₁ TC ₂ G ₂ TTCTG-X-GTCTTG ₃ TC ₄ T-5'	C ₁ , C ₂ , C ₃ , 및 C ₄ 은 독립적으로 2'-데옥시사이드, 1-(2'-데옥시-β-D-리보푸라노실)-2-옥소-7-테아자-8-메틸-푸린, 아라비노사이드, 또는 2'-데옥시-5-하이드록시사이드이다. G ₁ , G ₂ , G ₃ , 및 G ₄ 은 독립적으로 2'-데옥시구아노신, 2'-데옥시-7-테아자구아노신, 또는 아라비노스이다.

[0149]

[0150]

[표 4C]

올리고 또는 이뮤노머 번호	서열 (5'-3')
189	5'-TCTGTCG ₁ TTCT-X-TCTTG ₂ CTGTCT-5'
190	5'-TCTGTCG ₂ TTCT-X-TCTTG ₁ CTGTCT-5'
191	5'-TCTGTC ₁ GTTCT-X-TCTTG ₂ TGTCT-5'
192	5'-TCTGTC ₂ GTTCT-X-TCTTG ₁ TGTCT-5'
193	5'-TCTGTC ₃ GTTCT-X-TCTTG ₂ TGTCT-5'
194	5'-CTGTCTG ₁ TTCTC-X-CTCTTG ₂ CTGTCT-5'
195	5'-CTGTCTG ₂ TTCTC-X-CTCTTG ₁ CTGTCT-5'
196	5'-CTGTCTG ₃ TTCTC-X-CTCTTG ₂ CTGTCT-5'
197	5'-CTGTCTG ₄ TTCTC-X-CTCTTG ₃ CTGTCT-5'
198	5'-CTGTCTG ₅ TTCTC-X-CTCTTG ₄ CTGTCT-5'
199	5'-TCG ₁ TCG ₂ TTCTG-X-GTCTTG ₃ CTG ₄ CT-5'
200	5'-TCG ₂ TCG ₁ TTCTG-X-GTCTTG ₄ CTG ₃ CT-5'
201	5'-TC ₁ GTC ₂ GTTCTG-X-GTCTTG ₃ TGC ₄ T-5'
202	5'-TC ₂ GTC ₁ GTTCTG-X-GTCTTG ₄ TGC ₃ T-5'
203	5'-TC ₃ GTC ₂ GTTCTG-X-GTCTTG ₅ TGC ₄ T-5'

[0151]

[0152]

*G₁ = 2'-데옥시-7-테아자구아노신; G₂=아라비노스

[0153]

C₁ = 2'-데옥시사이드, 1-(2'-데옥시-β-D-리보푸라노실)-2-옥소-7-테아자-8-메틸푸린;

[0154] C₂ = 아라비노시티딘; C₃ = 2'-데옥시-5-하이드록시시티딘.

[0155] X = 글리세롤 링커, 또한 C2-C18 알킬 링커, 에틸렌 글리콜 링커, 폴리에틸렌 글리콜 링커, 분지된 알킬 링커일 수 있다.

표 4D

올리고 또는 이뮤노머 번호	서열(5'-3')	개질
204	5'-TC ¹ G ² TC ³ G ⁴ TTCG-X-GTCTG ³ C ² TG ¹ C ⁴ T-5'	C1, C2, C3, 및 C4은 독립적으로 2'-데옥시사이티딘, 1-(2'-데옥시-β-D-리보푸라노실)-2-옥소-7-테아자-8-메틸 푸린, 아라비노사이티딘; 또는 2'-데옥시-5-하이드록시사이티딘이다. G1, G2, G3, 및 G4은 독립적으로 2'-데옥시-7-테아자구아노신, 또는 아라비노구아노신이다.

[0156]

[0157] 두번째 측면에서, 본 발명은 상기 기술된 바와 같은 면역조절성 올리고뉴클레오티드 또는 이뮤노머, 및 접근가능한 5' 말단 이외의 위치에서 이뮤노머에 컨주게이션된 항원을 포함하는 면역조절성 올리고뉴클레오티드 컨주게이트 및 이뮤노머 컨주게이트를 제공한다. 일부 구체예에서, 비뉴클레오티드 링커는 항원을 포함하고 이는 올리고뉴클레오티드에 컨주게이션된다. 일부 다른 구체예에서, 항원은 3' 말단 이외의 위치에서 올리고뉴클레오티드에 컨주게이션된다. 일부 구체예에서, 항원은 백신 효과를 가진다.

[0158] 항원은 바람직하게는 병원체와 관련된 항원, 암과 관련된 항원, 자가면역질환과 관련된 항원, 및 제한 없이 수의학적 질환 또는 소아과 질환과 같은 다른 질병과 관련된 항원으로 구성된 군으로부터 선택된다. 본 발명을 위하여, 용어 "-과 관련된"은 병원체, 암, 자가면역질환, 음식 알레르기, 호흡기 알레르기, 천식, 또는 다른 질병이 존재하는 경우에 항원이 존재하지만, 병원체, 암, 자가면역 질환, 음식 알레르기, 호흡기 알레르기 또는 질병이 존재하지 않는 경우에 항원이 존재하지 않거나 감소된 양으로 존재하는 것을 의미한다.

[0159] 면역자극성 올리고뉴클레오티드 또는 이뮤노머는 항원에 공유결합에 의해 연결되거나, 그렇지 않으면 항원에 작동적으로 관련된다. 본원에서 사용된 용어 "작동적으로 관련된"은 이뮤노머 및 항원 둘 모두의 활성을 유지하는 임의의 관련성을 의미한다. 이러한 작동성 관련성의 비제한적인 예는 동일한 리포솜 또는 다른 이러한 전달 비히클 또는 시약의 일부인 것을 포함한다. 이뮤노머가 항원에 공유결합에 의해 연결되어 있는 구체예에서, 이러한 공유 결합은 바람직하게는 면역자극성 올리고뉴클레오티드의 접근가능한 5' 말단 이외의 이뮤노머 상의 임의의 위치에 있다. 예를 들어, 항원은 뉴클레오시드간 링키지에 부착될 수 있거나 비뉴클레오티드 링커에 부착될 수 있다. 대안적으로, 항원 그 자체는 비뉴클레오티드 링커일 수 있다.

[0160] 세번째 측면에서, 본 발명은 본 발명에 따른 면역조절성 올리고뉴클레오티드, 면역조절성 올리고뉴클레오티드 컨주게이트, 이뮤노머 또는 이뮤노머 컨주게이트 및 생리학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 제형을 제공한다. 본원에 사용된 용어 "생리학적으로 허용되는"은 이뮤노머의 유효성을 방해하지 않고, 세포, 세포 배양, 조직, 또는 유기체와 같은 생물계와 양립가능한 물질을 의미한다. 바람직하게는 생물계는 척추동물과 같은 살아 있는 유기체이다.

[0161] 본원에 사용된 용어 "담체"는 임의의 부형제, 희석제, 충전제, 염, 완충제, 안정화제, 가용화제, 지질 및 약제 제형에 사용되는 것으로 당 기술분야에 널리 공지된 다른 물질을 포함한다. 담체, 부형제 또는 희석제의 특성은 특정 적용을 위한 투여 경로에 따라 다를 것으로 이해된다. 이러한 물질을 함유하는 약제학적으로 허용되는 제형의 제조는 예를 들어 문헌[Remington's Pharmaceutical Science, 18th Edition, ed. A. Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990]에 기술되어 있다.

[0162] 네 번째 측면에서, 본 발명은 척추동물에서 면역반응을 발생시키는 방법을 제공하고, 이러한 방법은 척추동물에 본 발명에 따른 면역조절성 올리고뉴클레오티드, 면역조절성 올리고뉴클레오티드 컨주게이트, 이뮤노머 또는 이뮤노머 컨주게이트를 투여하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 척추동물은 포유동물이다. 본 발명을 위하여, 용어 "포유동물"은 명시적으로 인간을 포함하는 것으로 의도된다. 바람직한 구체예에서, 이뮤노머 또는 이뮤노머 컨주게이트는 면역자극을 위해 척추동물에 투여된다.

[0163] 본 발명의 이러한 측면에 따른 방법에서, 면역조절성 올리고뉴클레오티드, 면역조절성 올리고뉴클레오티드 컨주게이트, 이뮤노머 또는 이뮤노머 컨주게이트의 투여는 제한 없이 비경구, 경구, 설하, 경피, 국소적, 비강내, 에어로졸, 안내, 기관내, 직장내, 질내, 유전자 건에 의해, 피부 패치 또는 점안액, 또는 구강세정제 형태를 포

합하는 임의의 적합한 경로에 의할 수 있다. 이뮤노머의 치료 조성물의 투여는 질병의 증상 또는 대용 마커를 감소시키는 데 유효한 시간 및 투여량으로 공지된 방법을 사용하여 수행될 수 있다. 전신적으로 투여되는 경우에, 치료 조성물은 바람직하게는 약 0.0001 마이크로몰랄 내지 약 10 마이크로몰랄의 이뮤노머의 혈중 농도를 유지하기에 충분한 투여량으로 투여된다. 국소적 투여를 위하여, 이보다 훨씬 적은 농도가 유효할 수 있고 보다 높은 농도가 내성을 가질 수 있다. 바람직하게는 이뮤노머의 총 투여량은 1일 환자 당 약 0.001 mg 내지 1 일 체중 kg 당 약 200mg이다. 1회 치료 에피소드로서 개체에 본 발명의 치료 조성물 중 하나 이상의 치료적 유효량을 동시에 또는 순차적으로 투여하는 것이 바람직할 수 있다.

[0164] 특정 바람직한 구체예에서, 본 발명에 따른 면역조절성 올리고뉴클레오티드, 면역조절성 올리고뉴클레오티드 컨주게이트, 이뮤노머 또는 이뮤노머 컨주게이트는 백신, 항체, 세포독성 제제, 알레르겐, 항체, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 펩티드, 단백질, 유전자 치료 벡터, DNA 백신 및/또는 애주번트와 조합되어 투여되어 면역 반응의 특이성 및 크기를 증강시킨다. 이러한 구체예에서, 본 발명의 이뮤노머는 애주번트로서 다양하게 작용하고/거나 직접적인 면역자극성 효과를 생성한다.

[0165] 면역조절성 올리고뉴클레오티드, 면역조절성 올리고뉴클레오티드 컨주게이트, 이뮤노머, 이뮤노머 컨주게이트 또는 백신 중 어느 하나 또는 모두는 면역원성 단백질 예를 들어 키홀 림펫 헤모시아닌(Keyhole limpet hemocyanin, KLH), 콜레라 독신 B 서브유닛, 또는 다른 임의의 면역원성 담체 단백질에 임의로 연결될 수 있다. 임의의 애주번트의 다혈증(plethora)은 프로인드 완전 애주번트, KLH, 모노포스포릴 지질 A(MPL), 백반, 및 QS-21을 포함하는 사포닌, 이미퀴모드(imiquimod), R848, 또는 이들의 조합물을 포함하여 사용될 수 있다.

[0166] 본 발명의 이러한 측면을 위하여, 용어 "와 조합하여"는 동일한 환자의 동일한 질병을 치료하는 과정에서를 의미하고, 동시 투여 뿐만 아니라 수일까지 시간적 간격을 둔 순서로 투여되는 것을 포함하여 임의의 순서로 이뮤노머 및/또는 백신 및/또는 애주번트를 투여하는 것을 포함한다. 이러한 조합 치료는 또한 이뮤노머, 및/또는 독립적으로 백신, 및/또는 독립적으로 애주번트의 1회 이상의 투여를 포함한다. 이뮤노머 및/또는 백신 및/또는 애주번트의 투여는 동일하거나 상이한 경로에 의할 수 있다.

[0167] 본 발명의 이러한 측면에 따른 방법은 면역계의 모델 연구에 유용하다. 이 방법은 또한 인간 또는 동물 질병의 예방 또는 치료를 위해 유용하다. 예를 들어 방법은 소아과 및 수의과 백신 적용에 유용하다.

[0168] 다섯번째 측면에서, 본 발명은 질병 또는 질환을 가지는 환자를 치료적으로 처리하는 방법을 제공하고, 이러한 방법은 환자에게 본 발명에 따른 면역조절성 올리고뉴클레오티드, 면역조절성 올리고뉴클레오티드 컨주게이트, 이뮤노머 또는 이뮤노머 컨주게이트를 투여하는 것을 포함한다. 다양한 구체예에서, 치료되어야 할 이뮤노머 또는 이뮤노머 컨주게이트는 암, 자가면역 질환, 기도 염증, 염증성 질환, 알레르기, 천식 또는 병원체에 의해 유발되는 질병이다. 병원체는 박테리아, 기생체, 진균류, 바이러스, 비로이드, 및 프리온이다. 병원체는 박테리아, 기생체, 진균류, 바이러스, 비로이드, 및 프리온을 포함한다. 투여는 본 발명의 네번째 측면을 위해 기술된 바와 같이 수행된다.

[0169] 본 발명을 위하여, 용어 "알레르기"는 제한 없이 음식 알레르기 및 호흡기 알레르기를 포함한다. 용어 "기도 염증"은 제한 없이 천식을 포함한다. 본원에 사용된 용어 "자가면역 질환"은 "자기" 단백질이 면역계에 의해 공격을 받는 질환을 의미한다. 이러한 용어는 자가면역 천식을 포함한다.

[0170] 본 발명의 이러한 측면에 따른 방법 중 하나에 있어, 면역조절성 올리고뉴클레오티드, 면역조절성 올리고뉴클레오티드 컨주게이트, 이뮤노머 또는 이뮤노머 컨주게이트는 이뮤노머의 면역조절성 효과를 감소시키지 않는 질병 또는 질환을 치료하는 데 유용한 임의의 다른 제제와 조합하여 투여될 수 있다. 예를 들어, 암의 치료에 있어, 면역조절성 올리고뉴클레오티드, 면역조절성 올리고뉴클레오티드 컨주게이트, 이뮤노머 또는 이뮤노머 컨주게이트는 화학치료용 화합물과 조합하여 투여될 수 있다.

[0171] 하기 예들은 본 발명의 특정 바람직한 구체예를 추가로 설명하고자 하는 것이고 발명의 범위를 제한하고자 하는 것이 아니다.

[0172] **실시예**

[0173] **실시예 1: 면역조절성 잔기를 함유하는 올리고뉴클레오티드의 합성**

[0174] 올리고뉴클레오티드는 도 5 및 6에 도시된 선형 합성 또는 평형 합성 방법 후에 자동 DNA 합성기(Expedite 8909; PerSeptive Biosystems, Framingham, MA)를 사용하여 1 μmol 크기로 합성하였다.

[0175] 테옥시리보뉴클레오시드 포스포르아미디트는 어플라이드 바이오시스템즈(Foster city, CA)로부터 획득되었다.

1',2'-디데옥시리보오스 포스포라미디트, 프로펠-1-포스포라미디트, 2-데옥시우리딘 포스포라미디트, 1,3-비스-[5-(4,4'-디메톡시트리틸)펜틸아미딜]-2-프로판올 포스포라미디트 및 메틸 포스포라미디트는 글렌 리서치(Sterling, VA)로부터 취득된다. β -L-2'-데옥시리보뉴클레오시드 포스포라미디트, α -2'-데옥시-리보뉴클레오시드 포스포라미디트, 모노-DMT-글리세롤 포스포라미디트 및 디-DMT-글리세롤 포스포라미디트는 켈진(Ashland, MA)으로부터 취득되었다. (4-아미노부틸)-1,3-프로판디올 포스포라미디트는 칼론테크(Palo Alto, CA)로부터 취득된다. 아라비노시티딘 포스포라미디트, 아라비노구아노신, 아라비노티미딘 및 아라비노우리딘을 릴라이어블 파마슈티컬(Reliable Pharamaceuticla, St. Louis, MO)로부터 취득되었다. 아라비노구아노신 포스포라미디트, 아라비노티미딘 포스포라미디트 및 아라비노우리딘 포스포라미디트는 하이브리든, 인크(캠브리지, MA)에서 합성되었다(참조: Noronha et al., (2000) Biochem., 39: 7050-7062).

[0176] 모든 뉴클레오시드 포스포라미디트는 ^{31}P 및 ^1H NMR 스펙트럼에 의해 특징화되었다. 개질된 뉴클레오시드를 통상적인 커플링 사이클을 사용하여 특정 위치에서 혼입하였다. 합성 후에, 올리고뉴클레오티드를 농축된 수산화암모늄을 사용하여 탈보호하고 역상 HPLC에 의해 정제하고 투석하였다. 나트륨 염과 같은 정제된 올리고뉴클레오티드는 사용 전에 동결건조하였다. 순도는 CGE 및 MALDI-TOF MS에 의해 시험하였다.

[0177] **실시예 2: 비장 세포 증식의 분석**

[0178] 비장세포 증식의 시험관내 분석은 종래 기술된 바와 같이 표준 방법을 사용하여 수행되었다(참조: Zhao et al., Biochem Pharma 51: 173-182 (1996)). 그 결과가 도 8A에 도시되어 있다. 이러한 결과는 보다 높은 농도에서 2개의 접근가능한 5' 말단을 가지는 이뮤노머 6는 접근가능한 5' 말단을 가지지 않은 이뮤노머 5나 하나의 접근가능한 5' 말단을 가지는 올리고뉴클레오티드 4 보다 우수한 비장 세포 증식을 유발하였다. 이뮤노머 6는 또한 LPS 양성 대조군 보다 우수한 비장세포 증식을 유발하였다.

[0179] **실시예 3: 생체내 비종대(Splenomegaly) 검정**

[0180] 시험관내 결과를 생체내 모델에 적용하는 것을 시험하기 위해, 선택된 올리고뉴클레오티드는 마우스에 투여되고 비종대의 정도는 면역자극성 활성의 수준의 인디케이터로서 측정된다. 5mg/kg의 1회 투여량을 BALB/c 마우스(암컷, 4-6주령, Harlan Sprague Dawley Inc, Baltic, CT)에 복강내로 투여하였다. 이 마우스를 올리고뉴클레오티드 투여 72 시간 후에 살생하고 비장을 수집하여 무게를 측정하였다. 그 결과를 도 8B에 도시하였다. 이러한 결과는 두개의 접근가능한 5' 말단을 가지는 이뮤노머 6이 올리고뉴클레오티드 4 또는 이뮤노머 5 보다 훨씬 큰 면역자극성 효과를 가진다는 것을 증명한다.

[0181] **실시예 4: 사이토카인 분석**

[0182] 척추동물 세포, 바람직하게는 BALB/c 마우스 비장 세포 또는 인간 PBMC에서의 IL-12 및 IL-6의 분비를 샌드위치 ELISA로 측정하였다. 사이토카인 항체 및 사이토카인 표준물질을 포함하는 필요한 시약은 파르민젠(PharMingen, San Diego, CA)으로부터 구입하였다. ELISA 플레이트(Coastar)를 4°C에서 밤새 PBSN 완충액(PBS/0.05% 소듐 아지드, pH 9.6) 중에 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 적절한 항체와 인큐베이션하고, 다음에 30분 동안 37°C에서 PBS/1% BSA로 블로킹하였다. 세포 배양 상청액 및 사이토카인 표준물질을 PBS/10% FBS로 적절하게 희석하고 트리플리케이트(triplicate)로 플레이트에 첨가하고, 2 시간 동안 25°C에서 인큐베이션하였다. 플레이트를 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 적절한 바이오티닐화된 항체로 덮었고, 1.5 시간 동안 25°C로 인큐베이션하였다. 다음에, 플레이트를 PBS-T 완충액(PBS/0.05% Tween 20)으로 광범위하게 세척하고, 스트렙타비딘 컨주게이션된 페록시다아제(시그마, St. Louis, MO)를 첨가한 후에 1.5 시간 동안 25°C에서 추가로 인큐베이션하였다. 플레이트를 수어 블루(Sure Blue)TM(Kirkegaard and Perry) 발색시약으로 발색시키고 반응을 스탑 솔루션(stop solution, Kirkegaard and Perry)을 첨가함에 의해 종결하였다. 색 변화를 세레스(Ceres) 900 HDI 분광 광도계(Bio-Tek Instruments)으로 측정하였다. 그 결과를 하기 표 5A에 도시하였다.

[0183] 인간 말초 혈액 단핵구(PBMC)를 피콜-파크(Ficoll-Paque) 밀도 구배 원심분리(Histopaque-1077, 시그마, St. Louis, MO)에 의해 건강한 지원자의 말초 혈액으로부터 분리하였다. 간단하게, 해파린처리된 혈액을 원뿔형 원심분리기의 히스토파크(Histopaque-1077)(동일 부피) 상에 적층하고 실온에서 30분 동안 400 $\times\text{g}$ 로 원심분리하였다. 단핵구를 함유하는 담황갈색 코트를 조심스럽게 제거하고 10분 동안 250 $\times\text{g}$ 로 원심분리함에 의해 등장 포스페이트 완충 식염수(PBS)로 2회 세척하였다. 다음에, 생성된 세포 펠릿을 L-글루타메이트와 10% 열 불활성화된 FCS 및 페니실린-스트렙토마이신(100U/ml)의 보충물을 함유하는 RPMI 1640 배지 중에 재현탁하였다. 세포를 올리고뉴클레오티드의 존재 또는 부재 하에 1×10^6 세포/ml/웰로 상이한 기간 동안 24개 웰 플레이트 중에 배양

하였다. 배양 기간이 끝나면, 상청액을 수집하고, 샌드위치 ELISA에 의해 IL-6(BD Pharmingen, San Diego, CA), IL-10(BD Pharmingen), IL-12(BioSource International, Camarillo, CA), IFN- α (BioSource International) 및 γ (BD Pharmingen) 및 TNF- α (BD Pharmingen)을 포함하는 다양한 사이토카인에 대해 검정 될 때까지 -70°C에서 동결 저장하였다. 그 결과를 하기 표 5에 도시하였다.

[0184] 모든 경우에 있어서, 세포 배양 상청액 중의 IL-12 및 IL-6의 수준을 IL-12 및 IL-6 각각에 대한 동일한 실험 조건 하에 제작된 표준 곡선으로부터 계산하였다. 세포 배양 상청액 중의 IL-10, IFN- γ , 및 TNF- α 의 수준을 IL-10, IFN- γ , 및 TNF- α 각각에 대한 동일한 실험 조건 하에 제작된 표준 곡선으로부터 계산하였다.

[0185] [표 5]

[0186] 인간 PBMC 배양물 중의 이뮤노머 구조 및 면역자극성 활성

올리고 번호	서열 및 개질 (5'-3')	올리고 길이/ 또는 각 사슬	IL-12 (pg/mL)		IL-6 (pg/mL)	
			D1	D2	D1	D2
25	5'-CTATCTGTCGTTCTCTGT-3'	18머 (PS)	184	332	3077	5369
26	5'-TCTGTCR ₁ TTCT-3' 5'-TCTGTCR ₁ TTCT-3' \times_1	11머 (PS)	237	352	3724	4892

올리고 번호	서열 및 개질 (5'-3')	올리고 길이/ 또는 각 사슬	IL-10 (pg/mL)		IFN- γ (pg/mL)	
			D1	D2	D1	D2
25	5'-CTATCTGTCGTTCTCTGT-3'	18머 (PS)	37	88	125	84
26	5'-TCTGTCR ₁ TTCT-3' 5'-TCTGTCR ₁ TTCT-3' \times_1	11머 (PS)	48	139	251	40

[0187]

올리고 번호	서열 및 개질 (5'-3')	올리고 길이/ 또는 각 사슬	TNF- α (pg/mL)	
			D1	D2
25	5'-CTATCTGTCGTTCTCTGT-3'	18머 (PS)	537	nt
26	5'-TCTGTCR ₁ TTCT-3' 5'-TCTGTCR ₁ TTCT-3' \times_1	11머 (PS)	681	nt

[0188]

[0189] D1 및 D2는 공여체 1 및 2이다.

[0190] [표 5A]

[0191] BALB/c 마우스 비장 세포 배양물에서의 이뮤노머 구조 및 면역자극성 활성

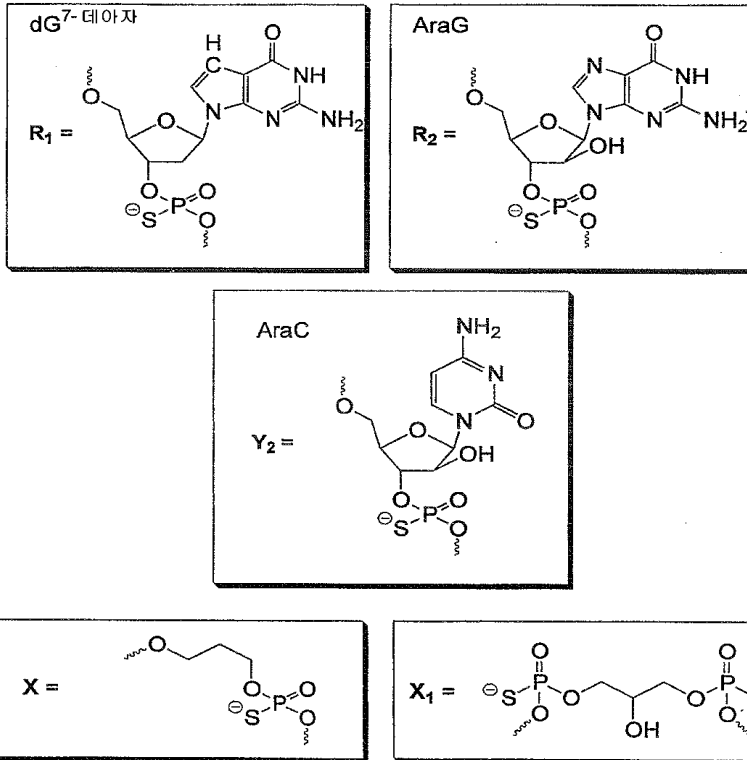
올리고 번호	서열 및 개질 ¹ (5'-3')	올리고 길이/ 또는 각 사슬	IL-12 (pg/mL) IL-6 (pg/mL)	
			3 µg/mL	10 µg/mL
26	5'-TCTGTCR ₁ TTCT-3' 5'-TCTGTCR ₁ TTCT-3' X ₁	11머 (PS)	870	10670
27	5'-TCTGTCR ₂ TTCT-3' 5'-TCTGTCR ₂ TTCT-3' X ₁	11머 (PS)	1441	7664
28	5'-TCTGTY ₂ R ₂ TTCT-3' 5'-TCTGTY ₂ R ₂ TTCT-3' X ₁	11머 (PS)	1208	1021
29	5'-XXTCTGTCR ₁ TTCT-3' 5'-XXTCTGTCR ₁ TTCT-3' X ₁	11머 (PS)	162	1013
30	5'-CTGTCR ₂ TTCTCTGT-3' 5'-CTGTCR ₂ TTCTCTGT-3' X ₁	14머 (PO)	264	251
31	5'-CTGTY ₂ R ₂ TTCTCTGT-3' 5'-CTGTY ₂ R ₂ TTCTCTGT-3' X ₁	14머 (PO)	149	119
32	5'-TCTGACR ₁ TTCT-3' 5'-TCTGACR ₁ TTCT-3' X ₁	11머 (PS)	2520	9699
33	5'-XXTCTGACR ₁ TTCT-3' 5'-XXTCTGACR ₁ TTCT-3' X ₁	11머 (PS)	2214	16881
34	5'-TCTGACR ₂ TTCT-3' 5'-TCTGACR ₂ TTCT-3' X ₁	11머 (PS)	3945	10766
35	5'-TCTGAY ₂ R ₂ TTCT-3' 5'-TCTGAY ₂ R ₂ TTCT-3' X ₁	11머 (PS)	2573	19411
36	5'-CTGAY ₂ GTTCTCTGT-3' 5'-CTGAY ₂ GTTCTCTGT-3' X ₁	14머 (PO)	2699	408

[0192]

37	5'-CTGACR ₂ TTCTCTGT-3' 5'-CTGACR ₂ TTCTCTGT-3' X ₁	14머 (PO)	839	85
38	5'-CTGAY ₂ R ₂ TTCTCTGT-3' 5'-CTGAY ₂ R ₂ TTCTCTGT-3' X ₁	14머 (PO)	143	160

[0193]

[0194] 정상적인 상은 포스포로티오에이트 링키지를 나타내고 이태릭체 상은 포스포디에스테르 링키지를 나타낸다.



[0195]

[0196] 추가로, 도 7A 내지 C에 도시된 결과는 두개의 접근가능한 5'말단을 가지는 올리고뉴클레오타이드 2가 각각 하나의 접근가능한 5' 말단을 가지거나 가지지 않는 올리고뉴클레오타이드 1 또는 3보다 더 낮은 농도에서 IL-12 및 IL-6를 상승시키지만, IL-10은 상승시키지 않았다는 것을 증명한다.

[0197] 실시예 5: 이뮤노머의 면역자극성 활성화에 대한 사슬 길이의 효과

[0198] 올리고뉴클레오타이드 사슬의 길이의 효과를 연구하기 위하여, 각 사슬에 18, 14, 11, 및 8개 뉴클레오타이드를 함유하는 이뮤노머를 합성하고, BALB/c 마우스 비장 세포 배양물에서 사이토카인 IL-12 및 IL-6의 분비를 유도하는 이들을 능력을 측정하여 면역자극성 활성화에 대해 시험하였다(표 6 내지 8). 이러한 실시예 및 모든 후속하는 실시예에서, 사이토카인 검정을 실시예 4에 기술된 바와 같이 BALB/c 비장 세포 배양물에서 수행하였다.

[0199] [표 6]

[0200] 이뮤노머 구조 및 면역자극성 활성화

번호	서열 및 개질 (5'-3')	올리고 길이/ 또는 각 사슬	IL-12 (pg/mL)		IL-6 (pg/mL)	
			@ 0.3 µg/mL	@ 0.3 µg/mL	@ 0.3 µg/mL	@ 0.3 µg/mL
4	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'	18머	1802	176		
39	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' 5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' } 3'-T-5'	18머	1221	148		
40	5'-CTGACGTTCTCTGT-3' 5'-CTGACGTTCTCTGT-3' } 3'-T-5'	14머	2107	548		
41	5'-TCTGACGTTCT-3' 5'-TCTGACGTTCT-3' } 3'-T-5'	11머	3838	1191		
42	5'-GACGTTCT-3' 5'-GACGTTCT-3' } 3'-T-5'	8머	567	52		

[0201]

[0202] [표 7]

[0203] 이뮤노머 구조 및 면역자극성 활성화

번호	서열 및 개질 (5'-3')	올리고 길이/ 또는 각 사슬	IL-12 (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)
			1 µg/mL	1 µg/mL
25	5'-CTATCTGTCGTTCTCTGT-3'	18머	291	65
43	5'-CTATCTGTCGTTCTCTGT-3' 5'-CTATCTGTCGTTCTCTGT-3' } 3'-T-5'	18머	430	39
44	5'-CTGTCGTTCTCTGT-3' 5'-CTGTCGTTCTCTGT-3' } 3'-T-5'	14머	813	59
45	5'-CTGTCGTTCTCT-3' 5'-CTGTCGTTCTCT-3' } 3'-T-5'	12머	1533	123
46	5'-TCTGTCGTTCT-3' 5'-TCTGTCGTTCT-3' } 3'-T-5'	11머	2933	505
47	5'-GTCGTTCT-3' 5'-GTCGTTCT-3' } 3'-T-5'	8머	1086	26
48	5'-GTCGTTCT-3' 5'-GTCGTTCT-3' } 3'-T-5'	7머	585	34
49	5'-GTCGTT-3' 5'-GTCGTT-3' } 3'-T-5'	6머	764	76
50	5'-TCGTT-3' 5'-TCGTT-3' } 3'-T-5'	5머	28	29

[0204]

[0205] [표 8]

[0206] 이뮤노머 구조 및 면역자극성 활성화

번호	서열 및 개질 (5'-3')	올리고 길이/ 또는 각 사슬	IL-12 (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)
			1 µg/mL	1 µg/mL
51	5'-CTCACATTTCGTTCTCTGT-3'	18머	91	73
52	5'-CTCACATTTCGTTCTCTGT-3' 5'-CTCACATTTCGTTCTCTGT-3' } 3'-T-5'	18머	502	99
53	5'-CTTTTCGTTCTCTGT-3' 5'-CTTTTCGTTCTCTGT-3' } 3'-T-5'	14머	683	119
54	5'-CTTTTCGTTCTCT-3' 5'-CTTTTCGTTCTCT-3' } 3'-T-5'	12머	633	102
55	5'-TTCGTTCT-3' 5'-TTCGTTCT-3' } 3'-T-5'	8머	687	243
56	5'-TCGTTCT-3' 5'-TCGTTCT-3' } 3'-T-5'	7머	592	1252

[0207]

[0208] 상기 결과는 올리고뉴클레오타이드 사슬의 길이가 18머에서 7머로 감소함에 따라 이뮤노머의 면역자극 활성이 증가한다는 것을 제시한다. 6머 또는 5머와 같이 짧은 길이의 올리고뉴클레오타이드 사슬 길이를 가지는 이뮤노머는 하나의 5' 말단을 가지는 18머 올리고뉴클레오타이드와 비교할만한 면역자극성 활성을 보인다. 그러한, 6머 또는 5머와 같은 짧은 올리고뉴클레오타이드 사슬 길이를 가지는 이뮤노머는 링커가 약 2 용스트롱 내지 약 200 용스트롱의 길이인 경우에 증가된 면역자극 활성을 가진다.

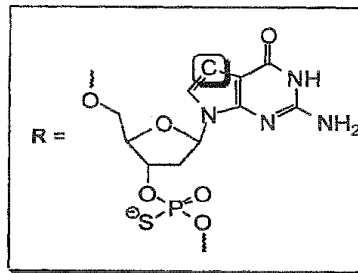
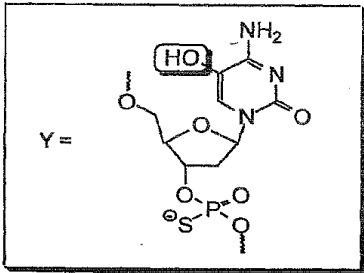
[0209] 실시예 6: 비천연 피리미딘 또는 비천연 퓨린 뉴클레오시드를 함유하는 이뮤노머의 면역자극성 활성화

[0210] 표 9 내지 11에 도시된 바와 같이, 면역자극성 활성화는 면역자극성 디뉴클레오타이드 모티프에 비천연 피리미딘 뉴클레오시드 또는 비천연 퓨린 뉴클레오시드를 가지는 다양한 길이의 이뮤노머에 대해 유지되었다.

[0211] [표 9]

[0212] 이뮤노머 구조 및 면역자극 활성

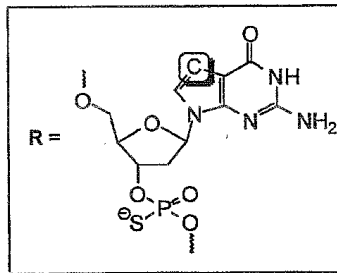
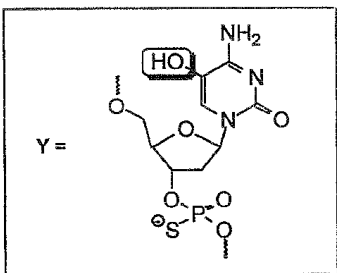
번호	서열 및 개질 (5'-3')	올리고 길이/ 또는 각 사슬	IL-12 (pg/mL) / IL-6 (pg/mL)	
			@ 3 µg/mL	@ 3 µg/mL
51	5'-CTCACTTCGTTCTCTGT-3'	18 머	404	348
57	5'-TCTTTYGTTCT-3' 5'-TCTTTYGTTCT-3' } 3'-T-5'	11 머	591	365
58	5'-TCTTTCRTTCT-3' 5'-TCTTTCRTTCT-3' } 3'-T-5'	11 머	303	283
59	5'-TTYGTTC-3' 5'-TTYGTTC-3' } 3'-T-5'	8 머	55	66
60	5'-TTCRTTCT-3' 5'-TTCRTTCT-3' } 3'-T-5'	8 머	242	143



[0213]

표 10

번호	서열 및 개질 (5'-3')	올리고 길이/ 또는 각 사슬	IL-12 (pg/mL) / IL-6 (pg/mL)	
			3 µg/mL	3 µg/mL
25	5'-CTATCTGTCGTTCTCTGT-3'	18 머	379	339
61	5'-TCTGYGTTCT-3' 5'-TCTGYGTTCT-3' } 3'-T-5'	11 머	1127	470
62	5'-TCTGTCRTTCT-3' 5'-TCTGTCRTTCT-3' } 3'-T-5'	11 머	787	296
63	5'-GTYGTTCT-3' 5'-GTYGTTCT-3' } 3'-T-5'	8 머	64	126
64	5'-GTCRTTCT-3' 5'-GTCRTTCT-3' } 3'-T-5'	8 머	246	113



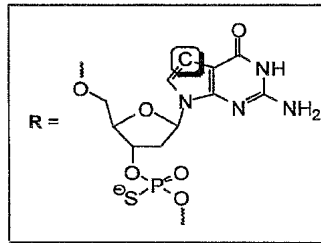
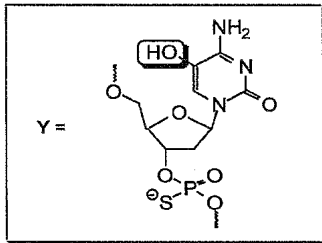
[0214]

[0215]

[표 11]

[0216] 이뮤노머 구조 및 면역자극성 활성

번호	서열 및 개질 (5'-3')	올리고 길이/ 또는 각 사슬	IL-12 (pg/mL)	
			3 µg/mL	3 µg/mL
4	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'	18 머	1176	1892
65	5'-CTATCTGAYGTTCTCTGT-3' 5'-CTATCTGAYGTTCTCTGT-3' } 3'-T-5'	18 머	443	192
66	5'-CTATCTGACRTTCTCTGT-3' 5'-CTATCTGACRTTCTCTGT-3' } 3'-T-5'	18 머	627	464
67	5'-CTGAYGTTCTCTGT-3' 5'-CTGAYGTTCTCTGT-3' } 3'-T-5'	14 머	548	152
68	5'-CTGACRTTCTCTGT-3' 5'-CTGACRTTCTCTGT-3' } 3'-T-5'	14 머	1052	1020
69	5'-TCTGAYGTTCT-3' 5'-TCTGAYGTTCT-3' } 3'-T-5'	11 머	2050	2724
70	5'-TCTGACRTTCT-3' 5'-TCTGACRTTCT-3' } 3'-T-5'	11 머	1780	1741
71	5'-GAYGTTCT-3' 5'-GAYGTTCT-3' } 3'-T-5'	8 머	189	55
72	5'-GACRTTCT-3' 5'-GACRTTCT-3' } 3'-T-5'	8 머	397	212



5

[0217]

[0218] 실시예 7: 면역자극 활성에 대한 링커의 효과

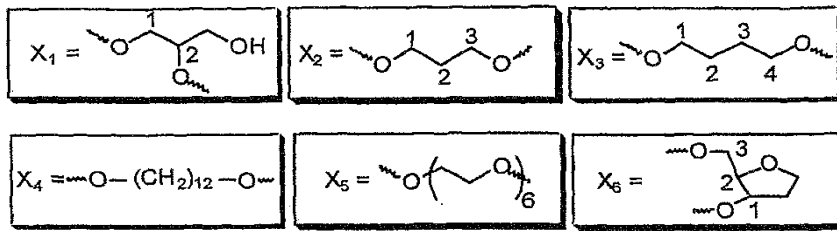
[0219] 두개 올리고뉴클레오타이드를 연결하는 링커의 길이의 효과를 검사하기 위하여, 동일한 올리고뉴클레오타이드를 함유하고 상이한 링커를 함유하는 이뮤노머를 합성하고 면역자극 활성에 대해 시험하였다. 표 12에 도시된 결과는 링커가 이뮤노머의 면역자극 활성에 역활한다는 것을 제시한다. 최고의 면역자극 활성은 산재되어 있는 포스페이트 전하를 가지는 탈염기 링커 또는 C3- 내지 C6-알킬 링커로 달성된다.

[0220] [표 12]

[0221] 이뮤노머 구조 및 면역자극성 활성화

번호	서열 및 개질 (5'-3')	올리고 길이/ 또는 각 사슬	IL-12 (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)
			0.3 µg/mL	1 µg/mL
4	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'	18 머	257	635
73	5'-CTGACGTTCT-3' 5'-CTGACGTTCT-3' >X ₁	10 머	697	1454
74	5'-CTGACGTTCT-3' 5'-CTGACGTTCT-3' >X ₂	10 머	1162	669
75	5'-CTGACGTTCT-3' 5'-CTGACGTTCT-3' >X ₃	10 머	1074	1375
76	5'-CTGACGTTCT-3' 5'-CTGACGTTCT-3' >X ₄	10 머	563	705
77	5'-CTGACGTTCT-3' 5'-CTGACGTTCT-3' >X ₅	10 머	264	543
78	5'-CTGACGTTCT-3' 5'-CTGACGTTCT-3' >X ₆	10 머	1750	2258
79	5'-CTGACGTTCT-3' 5'-CTGACGTTCT-3' >(X ₃ psX ₃)	10머	2255	2034
80	5'-CTGACGTTCT-3' 5'-CTGACGTTCT-3' >(X ₃ psX ₃ psX ₃)	10머	1493	1197
81	5'-CTGACGTTCT-3' 5'-CTGACGTTCT-3' >(X ₆ psX ₆)	10 머	3625	2642
82	5'-CTGACGTTCT-3' 5'-CTGACGTTCT-3' >(X ₆ psX ₆ psX ₆)	10 머	4248	2988
83	5'-CTGACGTTCT-3' 5'-CTGACGTTCT-3' >PO ₃ S	10 머	1241	1964

[0222]



[0223]

[0224] 실시예 8: 면역자극성 활성화에 대한 올리고뉴클레오티드 백본의 효과

[0225] 일반적으로, 천연 포스포티에스테르 백본을 함유하는 면역자극성 올리고뉴클레오티드는 포스포로티오에이트 백본과 동일한 길이의 올리고뉴클레오티드 보다 덜 면역자극적이다. 이러한 낮은 정도의 면역자극성 활성화는 부분적으로 실험 조건 하에 포스포디에스테르 올리고뉴클레오티드의 빠른 분해로 인한 것일 수 있다. 올리고뉴클레오티드의 분해는 주로 3' 말단으로부터 올리고뉴클레오티드를 소화하는 3'-엑소뉴클리아제의 결과이다. 본 실시예의 이뮤노머는 유리 3' 말단을 함유하지 않는다. 따라서, 포스포디에스테르 백본을 가지는 이뮤노머는 상응하는 단량체 올리고뉴클레오티드 보다 실험 조건 하에서 더 긴 수명을 가져야 하고, 따라서, 개선된 면역자극성 활성을 보여야 한다. 표 13에 도시된 결과는 BALB/c 마우스 비장 세포 배양물에 사이토카인 유도에 의해 결정된 면역자극성 활성을 보이는 이뮤노머 84 및 85로 이러한 효과를 증명한다.

[0226] [표 13]

[0227] 이뮤노머 구조 및 면역자극성 활성화

번호	서열 및 개질 (5'-3')	올리고 길이/ 또는 각 사슬	IL-12 (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)
			0.3 µg/mL	1 µg/mL
4	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'	18 머	225	1462
84	5'-CTGACGTTCTCTGT-3' 5'-CTGACGTTCTCTGT-3' } 3'-T-5' (PO)	14 머	1551	159
85	5'-LLCTGACGTTCTCTGT-3' 5'-LLCTGACGTTCTCTGT-3' } 3'-T-5' (PO)	14 머	466	467

L = C3- 링커

[0228]

[0229] 실시예 9: 이뮤노머 73-92의 합성

[0230] 올리고뉴클레오티드를 자동 DNA 합성기(엑스퍼다이트 8909 펠셉티브 바이오시스템즈: Expedite 8909 Perceptive Biosystems)를 사용하여 1 μmol 스케일로 합성하였다. 테옥시뉴클레오티드 포스포라미디트를 어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems, Forster City, CA)로부터 취득하였다. 7-테아자-2'-테옥시구아노신 포스포라미디트를 글렌 리서치(Glen Research, Sterling Virginia)로부터 취득하였다. 1,3-비스-DMT-글리세롤-CPG를 켐진(ChemGenes, Ashland, MA)로부터 취득하였다. 개질된 뉴클레오티드 통상의 커플링 사이클을 사용하여 특정 위치에서 올리고뉴클레오티드에 혼입하였다. 합성 후에, 올리고뉴클레오티드를 농축 수산화암모늄을 사용하여 탈보호하고 역상 HPLC를 사용하여 정제하고 투석하였다. 나트륨 염 형태로 정제된 올리고뉴클레오티드를 사용 전에 동결건조시켰다. 올리고뉴클레오티드의 순도를 CGE 및 MALDI-TOF MS에 의해 체크하였다(Bruker Proflex III MALDI-TOF 질량 분광계).

[0231] 실시예 11: 이뮤노머 안정성

[0232] 올리고뉴클레오티드를 4, 24, 또는 48 시간 동안 37°C에서 10% 우혈청을 함유하는 PBS에서 인큐베이션하였다. 완전한 올리고뉴클레오티드를 모세관 겔 전기영동에 의해 측정하였다. 그 결과를 표 14에 도시하였다.

[0233] [표 14]

[0234] 10% 우혈청 PBS 용액 중에서 올리고뉴클레오티드의 소화

번호	서열 및 개질 (5'-3')	올리고의 CE 분석 (소화 후에 남은 완전한 올리고 %)		
		4h 후	24h 후	48h 후
4	5-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'/PS	90.9	71.8	54.7
26	(5'-TCTGTCGTTCT) ₂ S/PS (G=dG ^{테아자})	97.1	91.0	88.1
86	(5'-CTGTCGTTCTCTGT) ₂ S/PO		37.8	22.5
87	(5'-XXCTGTCGTTCTCTGT) ₂ S/PO	73.1	56.8	36.8
88	(5'-UCTGTCGTTCTCTGT) ₂ S/PO		48.4	36.7

X = C3-링커, U, C = 2'-OMe- 리보뉴클레오티드

[0235]

[0236] 실시예 12: 면역자극성 활성화에 대한 접근가능한 5' 말단의 효과

[0237] BALB/c 마우스(4-8주령) 비장 세포를 RPMI 완전 배지 중에서 배양하였다. 쥐과 마크로파지 유사 세포, J774(아메리칸 타입 컬처 콜렉션, Rockville, MD)를 10%(v/v) FCS 및 항생제(100IU/ml의 페니실린 G/스트렙토마이신)으로 보충된 듀벨코 수정 이글 배지 중에서 배양하였다. 모든 다른 배양 시약은 메디아테크(Mediatech, Gaithersburg, MD)로부터 구입하였다.

[0238] IL-12 및 IL-6을 위한 ELISA. BALB/c 마우스 비장 또는 J774 세포를 각각 5×10⁶ 또는 1×10⁶ 세포/ml의 밀도로 24개 웰 디쉬에서 플레이트하였다. TE 완충액(10mM 트리스-HCl, pH 7.5, 1mM EDTA) 중에 용해된 CpG DNA를 0.03, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 또는 10.0 μg/ml의 최종 농도가 되도록 마우스 비장 세포 배양물에 첨가하고, 1.0, 3.0, 또는 10.0 μg/ml의 최종 농도가 되도록 J774 세포 배양물에 첨가하였다. 다음에, 세포를 24 시간 동안 37°C에서 인큐베이션하고 상청액을 ELISA 검정을 위하여 수집하였다. 실험을 각 농도에 대하여 트리플리케이트로 각 CpG DNA에 대해 2 또는 3회 수행하였다.

[0239] IL-12 및 IL-6의 분비를 샌드위치 ELISA에 의해 측정하였다. 사이토카인 항체 및 표준물질을 포함하는 필요한 시약을 파르민젠(PharMingen)으로부터 구입하였다. ELISA 플레이트(Coaster)를 4°C에서 밤새 PBSN 완충액(PBS/0.05% 소듐 아지드, pH 9.6) 중에 5μg/ml로 적절한 항체로 인큐베이션하고, 다음에, 30분 동안 37°C에서 PBS/1% BSA로 블로킹하였다. 세포 배양 상청액 및 사이토카인 표준물질을 적절하게 PBS/1% BSA로 희석하고, 트리플리케이트로 플레이트에 첨가하고 2 시간 동안 25°C에서 인큐베이션하였다. 플레이트를 세척하고, 적절한 바이오티닐화된 항체 1μg/ml로 인큐베이션하고 1.5 시간 동안 25°C에서 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBS/0.05% 트윈 20으로 광범하게 세척하고 그 후에 스트렙타비딘-퀴주게이션된 페록시다아제(시그마)를 첨가하

고 1.5 시간 동안 25°C에서 추가로 인큐베이션하였다. 플레이트를 수어 블루™(Kirkegaard and Perry) 발색 시약으로 발색시키고 반응을 스타프 솔루션(Kirkegaard and Perry)를 첨가하여 종결시켰다. 색 변화를 세레스 900 분광 광도계(Bio-Tek Instruments)상에서 450nm로 측정하였다. 세포 배양 상청액 중의 IL-12 및 IL-6의 수준을 각각 IL-12 및 IL-6을 위한 동일한 실험 조건 하에서 제작된 표준 곡선으로부터 계산하였다.

[0240] 결과를 표 15에 도시하였다.

[0241] [표 15]

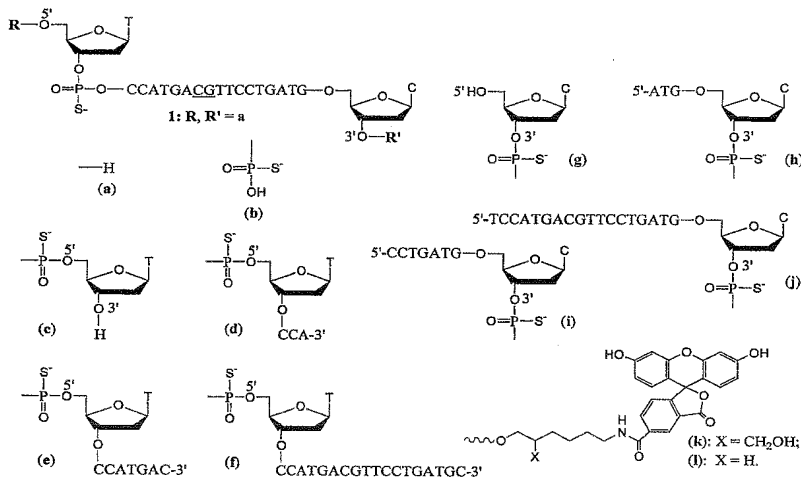
[0242] 연구^a에 사용된 포스포로티오에이트 CpG DNA 서열 및 개질

CpG DNA #	서열	길이	5'-말단	3'-말단
89	5'-TCCATGACGTTTCCTGATGC-3'	19-머	1	1
90	5'-TCCATGACGTTTCCTGATGC-3'-b	19-머	1	블록킹됨
91	5'-TCCATGACGTTTCCTGATGC-3'-3'-g-5'	20-머	2	블록킹됨
92	5'-TCCATGACGTTTCCTGATGC-3'-3'-h-5'	23-머	2	블록킹됨
93	5'-TCCATGACGTTTCCTGATGC-3'-3'-i-5'	27-머	2	블록킹됨
94	5'-TCCATGACGTTTCCTGATGC-3'-3'-j-5'	38-머	2	블록킹됨
95	b-5'-TCCATGACGTTTCCTGATGC-3'	19-머	블록킹됨	1
96	3'-c-5'-5'-TCCATGACGTTTCCTGATGC-3'	20-머	블록킹됨	2
97	3'-d-5'-5'-TCCATGACGTTTCCTGATGC-3'	23-머	블록킹됨	2
98	3'-e-5'-5'-TCCATGACGTTTCCTGATGC-3'	27-머	블록킹됨	2
99	3'-f-5'-5'-TCCATGACGTTTCCTGATGC-3'	38-머	블록킹됨	2
100	5'-TCCATGACGTTTCCTGATGC-3'-k	19-머	1	
101	l-5'-TCCATGACGTTTCCTGATGC-3'	19-머	블록킹됨	1

[0243]

[0244] ^a: 화학구조 b-1을 위한 차트 1을 참조; 5'-CG-3' 디뉴클레오티드는 밑줄로 표시하였다.

[0245] [차트 1]



[0246]

[0247] [표 16]

[0248] BALB/c 마우스 비장 세포 배양물 중의 CpG DNA-컨주게이트에 의한 IL-12 및 IL-6 분비의 유도

CpG DNA #	IL-12 (pg/mL)±SD					IL-6 (pg/mL)±SD				
	0.1µg/mL	0.3µg/mL	1.0µg/mL	3.0µg/mL	10.0µg/mL	0.1µg/mL	0.3µg/mL	1.0µg/mL	3.0µg/mL	10.0µg/mL
89	991±121	1820±224	2391±175	3507±127	2615±279	652±48	2858±180	13320±960	18625±1504	17229±1750
90	526±32	2100±175	1499±191	3019±35	3489±162	1387±152	1426±124	5420±370	19096±484	19381±2313
91	1030±11	1348±102	2060±130	3330±130	3582±259	923±22	2542±81	9054±120	14114±179	13693±264
92	1119±159	1726±207	2434±100	2966±204	3215±464	870±146	1905±56	7841±350	17146±1246	15713±693
93	1175±68	2246±124	1812±75	2388±320	2545±202	1152±238	3499±116	7142±467	14064±167	13566±477
94	1087±121	1705±163	1797±141	2572±195	3054±103	1039±105	2043±157	4848±288	15527±224	21021±1427
95	1173±107	2170±155	2132±58	2812±203	3689±94	807±0.5	927±0.5	3344±0.5	10233±0.5	9213±0.5
96	866±51	1564±63	1525±63	2666±97	4030±165	750±63	1643±30	5559±415	11549±251	11060±651
97	227±3	495±96	1007±68	897±15	1355±97	302±18	374±22	1000±68	9106±271	13077±381
98	139±18	211±12	452±22	458±29	1178±237	220±23	235±18	383±35	1706±33	11530±254
99	181±85	282±105	846±165	2082±185	3185±63	467±122	437±85	1697±283	9781±13	11213±294
배지	86±6					60±12				

3. 시험에 대해서 표 1 참조

[0249]

[0250] 현재의 결과들을 함께 고려하면, 이들은 CpG DNA의 접근가능한 5'-말단이 최적의 면역자극성 활성을 위해 필요하고, 포스포로티오에이트, 모노뉴클레오티드, 또는 디뉴클레오티드와 같은 더 작은 기질이 면역자극성 경로에 관여하는 수용체 또는 인자들에 CpG DNA의 5'-말단의 접근가능성을 효과적으로 차단하지 못한다는 것을 제안한다. 그러나, 플루오레세인과 같이 큰 분자 또는 더 큰 분자의 CpG DNA의 5'-말단에서의 컨주게이션은 면역자극성 활성을 없앨 수 있었다. 이러한 결과는 CpG DNA-항원/백신/단클론 항체(mAb) 컨주게이트의 면역자극성 활성의 연구에 대한 직접적인 영향을 가진다. CpG DNA의 5'-말단에서 백신 또는 mAb의 차선의 면역조절성 활성으로 이끌 수 있다. CpG DNA의 3'-말단에서 작용성 리간드의 컨주게이션은 뉴클리아제 안정성의 증가에 기여할 뿐만 아니라 또한 생체내 CpG DNA의 면역자극성 효능의 증가에 기여한다.

[0251] 실시예 13: 사이토카인 분비에 대한 링커의 효과

[0252] 하기 올리고뉴클레오티드를 본 연구를 위하여 합성하였다. 이러한 개질된 올리고뉴클레오티드의 각각을 이뮤노머에 혼입할 수 있다.

[0253] [표 17]

[0254] 치환 위치를 보이는 CpG DNA의 서열

CpG DNA 번호	서열 (5'---->3') ^a
102	CCTACTAGCGTTCTCATC
103	CCTACTAGC2TTCTCATC
104	CCTACT2GCGTTCTCATC
105	CCTA2TAGCGTTCTCATC
106	CCT22TAGCGTTCTCATC
107	22TACTAGCGTTCTCATC
108	CCTACTAGCGT2CTCATC
109	CCTACTAGCGTTC2CATC
110	CCTACTAGCGTTC22ATC
111	CCT6CTAGCGTTCTCATC
112	CCTACTAGCGTTC6CATC

[0255]

113	CCT7CTAGCGTTCTCATC
114	CCTACTAGCGTTC7CATC
4	CTATCTGACGTTCTCTGT
115	CTAT1TGACGTTCTCTGT
116	CTA1CTGACGTTCTCTGT
117	CTATCTG2CGTTCTCTGT
118	CTATC2GACGTTCTCTGT
119	CTA2CTGACGTTCTCTGT
120	2222TGACGTTCTCTGT
121	222TGACGTTCTCTGT
122	22TGACGTTCTCTGT
123	2TGACGTTCTCTGT
124	2TGACGTTCTCTGT
125	CTAT3TGACGTTCTCTGT
126	CTA3CTGACGTTCTCTGT
127	CTA33TGACGTTCTCTGT
128	33TGACGTTCTCTGT
129	CTAT4TGACGTTCTCTGT
130	CTA4CTGACGTTCTCTGT
131	CTA44TGACGTTCTCTGT
132	44TGACGTTCTCTGT
133	CTAT5TGACGTTCTCTGT
134	CTA5CTGACGTTCTCTGT
135	CTA55TGACGTTCTCTGT
136	55TGACGTTCTCTGT
137	CTA6CTGACGTTCTCTGT
138	CTATCTGACGTTTC6CTGT
139	CTA7CTGACGTTCTCTGT
140	CTATCTGACGTTTC7CTGT
141	CTATCTG8CGTTCTCTGT
142	CTATCT8ACGTTCTCTGT
143	CTATC8GACGTTCTCTGT
144	CTAT8TGACGTTCTCTGT
145	CTA8CTGACGTTCTCTGT
146	CTATCTGACG8TCTCTGT
147	CTATCTGACGT8CTCTGT
148	CTATCTGACGTT8TCTGT
149	CTATCTGACGTTTC8CTGT
150	CTATCTG9CGTTCTCTGT
151	CTATCT9ACGTTCTCTGT
152	CTA9CTGACGTTCTCTGT

[0256]

153 CTATCTGACGT9CTCTGT
154 CTATCTGACGTTTC9CTGT

^a: 치환제 1-9의 화학구조에 대해서 도 14를 참조
 모든 CpG DNA는 포스포로티오에이트 백본 개질되었다.

[0257]

면역자극성 활성의 강화를 위한 최적의 링커 크기를 평가하기 위하여, 본 발명자들은 BALB/c 마우스 비장 세포 배양물 중의 개질된 CpG DNA에 의해 유발된 IL-12 및 IL-6 분비를 측정하였다. 모든 CpG DNA는 농도 의존성 IL-12 및 IL-6 분비를 유도하였다. 도 15는, 모(parent) CpG DNA와 비교하여 CpG 디뉴클레오티드로의 5'-플랭킹 서열에서의 다섯번째 노클레오티드 위치에서 링커를 가지는, 선택된 CpG DNA, 116, 119, 126, 130, 및 134의 1 μ g/ml의 농도로 수득된 데이터를 도시한다. C2- (1), C3- (2), 및 C4-링커 (3)을 함유하는 CpG DNA는 모 CpG DNA와 유사한 IL-12 생성을 유도하였다. 5'-플랭킹 서열에서 CpG 디뉴클레오티드로부터 다섯번째 위치에서 C6 및 C9-링커(4 및 5)를 함유하는 CpG DNA는 모 CpG 보다 더 적은 수준의 IL-12 분비를 유도하였으며, 이는 C4-링커 보다 더 긴 링커의 치환이 더 적은 수준의 IL-12의 유도를 유발한다는 것을 제안한다. 링커를 가지는 모든 5개의 CpG DNA는 모 CpG DNA 보다 3배 높은 IL-6 분비를 유도한다. 이러한 CpG DNA에 링커의 존재는 링커를 가지지 않은 CpG DNA와 비교하여 IL-6의 유도에 상당한 영향을 보였다. 그러나, 본 발명자들은 IL-6 분비에 대한 길이-의존성 링커 효과를 관찰하지 못했다.

[0259]

에틸렌글리콜-링커를 함유하는 CpG DNA의 면역자극성 활성에 대한 효과를 검토하기 위하여, 본 발명자들은 CpG DNA 137 및 138을 합성하였고, 이들에는 트리에틸렌글리콜-링커(6)가 각각 CpG 디뉴클레오티드로의 3'-플랭킹 서열에서 네번째 뉴클레오티드 위치에서 5'-말단에 다섯번째 위치에서 혼입되었다. 유사하게, CpG DNA 139 및 140은 각각 CpG 디뉴클레오티드로의 5'- 또는 3'-플랭킹된 서열에 헥사에틸렌글리콜-링커(7)를 함유하였다. 모든 4개의 개질된 CpG DNA(137-140)을 모 CpG DNA 4와 비교하여 사이토카인 유도(IL-12, IL-6, 및 IL-10)에 대해 BALB/c 마우스 비장 세포 배양물 중에 시험하였다. 모든 CpG DNA를 시험된 농도 범위(0.03-10.0 μ g/ml)에 걸쳐 농도-의존성 사이토카인 생성을 유도하였다(데이터는 도시되지 않음). CpG DNA 137-140의 0.3 μ g/ml 농도에서 유도된 사이토카인의 수준을 표 18에 도시하였다. 5'-플랭킹 서열에서 에틸렌글리콜-링커를 가지는 CpG DNA 137 및 139는 모 CpG DNA 4 보다 더 높은 수준의 IL-12(2106 \pm 143 및 2066 \pm 153 pg/ml) 및 IL-6(2362 \pm 166 및 2507 \pm 66 pg/ml)를 유도하였다(표 18). 동일한 농도에서, 137 및 139는 모 CpG DNA 보다 다소 낮은 수준의 IL-10 분비를 유도하였다(표 18). 3'-플랭킹 서열에 보다 짧은 에틸렌글리콜-링커(6)를 가지는 CpG DNA 138은 모 CpG DNA와 유사하게 IL-12 분비를 유도하였으나, IL-6 및 IL-10은 상당히 낮은 수준으로 유도하였다(표 18). 더 긴 에틸렌글리콜-링커(7)를 가지는 CpG DNA 140은 모 CpG DNA와 비교하여 시험된 모든 세개의 사이토카인을 상당히 낮은 수준으로 유도하였다(표 18).

[0260]

트리에틸렌글리콜-링커(6)는 C9-링커(5)와 유사한 사슬 길이를 가지는 데도 불구하고, 트리에틸렌글리콜-링커를 함유하는 CpG DNA는 비장 세포 배양물에서 사이토카인 분비의 유도에 의해 측정되는 C9-링커 함유 CpG DNA 보다 더 우수한 면역자극성 활성을 가졌다. 이러한 결과는 보다 긴 알킬-링커(4 및 5)를 함유하는 CpG DNA로 관찰되는 낮은 면역자극성 활성이 이들의 증가된 길이와 관계된 것이 아니고 이들의 소수성 특성에 관계된 것일 수 있다는 것을 제시한다. 이러한 관찰은 본 발명자들로 하여금 면역자극성 활성에 대한 소수성 작용기를 함유하는 분지된 알킬-링커의 치환을 검토하도록 하였다.

[0261]

[표 18]

[0262] BALB/c 마우스 비장 세포 배양물 중의 에틸렌글리콜-링커를 함유하는 CpG DNA에 유발되는 사이토카인 분비

CpG DNA 번호	사이토카인, pg/mL		
	IL-12	IL-6	IL-10
4	1887±233	2130±221	86±14
137	2106±143	2362±166	78±21
138	1888±259	1082±25	47±14
139	2066±153	2507±66	73±17
140	1318±162	476±13	25±5
배지	84±13	33±6	2±1

[0263]

[0264] 분지된 알킬-링커를 함유하는 CpG DNA의 면역자극성 활성화에 대한 효과를 시험하기 위하여, 히드록실(8) 또는 아민(9) 작용기를 함유하는 두개의 분지된 알킬-링커를 모 CpG DNA 4에 혼입시키고, 생성된 개질된 CpG DNA(150-154- 표 19)의 면역자극성 활성화에 대한 효과를 검사하였다. BALB/c 마우스 비장 세포 배양물(증식) 또는 생체 내(비종대)에서 상이한 뉴클레오티드 위치에서 아미노-링커 9를 함유하는 CpG DNA 150-154로 취득된 데이터를 표 19에 도시하였다.

[0265] [표 19]

[0266] BALB/c 마우스 비장 세포 배양물 및 BALB/c 마우스 중의 비종대 중의 아미노부티릴 프로판디올-링커를 함유하는 CpG DNA에 의해 유도되는 비장 세포 증식

CpG DNA 번호 ^a	비장 세포 증식 (PI) ^b	비장 중량 (mg) ^c
4	3.7±0.8	121±16
150	2.5±0.6	107±11
151	9.2±0.7	169±16
152	8.8±0.4	220±8
153	7.6±0.7	127±24
154	7.8±0.04	177±12
M/V	1.2±0.3	102±8
LPS	2.8±0.5	ND

[0267]

[0268] 모 CpG DNA 4는 0.1µg/ml의 농도에서 3.7±0.8의 증식 지수를 도시하였다. 동일한 농도에서, 상이한 위치에서 아미노-링커 9를 함유하는 개질된 CpG DNA 151-154는 모 CpG DNA 보다 더 높은 비장 세포 증식을 유발하였다(표 19). 다른 링커로 관찰된 바와 같이, 치환이 CpG 디뉴클레오티드(150)에 인접하게 위치한 경우에, 더 낮은 증식 지수를 모 CpG DNA와 비교하여 언급하였고(표 19), 추가로 CpG 디뉴클레오티드에 인접한 링커 치환의 배치는 면역자극성 활성화에 대한 해로운 효과를 가진다. 일반적으로 5'-플랭킹 서열에서의 2'-데옥시리보뉴클레오티드로의 아미노-링커의 치환(152 및 153)은 3'-플랭킹 서열에서의 치환(153 및 154)에서 발견되는 것보다 더 높은 비장 세포 증식을 유도하였다. 유사한 결과를 비종대 검정에서 관찰하였고(표 19), 이는 비장 세포 배양에서 관찰된 결과를 확인하였다. 글리세롤-링커(8)를 함유하는 개질된 CpG DNA는 아미노-링커 9를 함유하는 개질된 CpG DNA로 관찰된 것과 유사하거나 다소 높은 면역자극성 활성을 보였다(데이터는 도시되지 않음).

[0269] 링커 8 및 9를 함유하는 CpG DNA의 면역자극성 효과를 비교하기 위하여, 본 발명자들은 5'-플랭킹 서열에서 치환을 가지는 CpG DNA 145 및 152를 선택하여 BALB/c 마우스 비장 세포 배양물 중에서 사이토카인 IL-12 및 IL-6

분비를 유도하는 이들의 능력을 검정하였다. CpG DNA 145 및 152 둘 모두는 농도-의존성 사이토카인 분비를 유도하였다. 도 4는 모 CpG DNA 4와 비교하여 0.3 µg/ml 농도에서 마우스 비장 세포 배양물의 145 및 152에 의해 유도되는 IL-12 및 IL-6의 수준을 무시한다. CpG DNA 둘 모두는 모 CpG DNA 4 보다 높은 수준의 IL-12 및 IL-6을 유도하였다. 글리세롤-링커(8)을 함유하는 CpG DNA는 아미노-링커(9)를 함유하는 CpG DNA 보다 다소 높은 수준의 사이토카인(특히 IL-12)을 유도하였다(도 16). 이러한 결과는 또한 친수성 기를 함유하는 링커가 CpG DNA의 면역자극성 활성화에 대해 보다 우호적이라는 것을 확인하였다.

[0270] 본 발명자들은 CpG DNA에서 다수의 링커 치환의 두가지 상이한 측면을 검토하였다. 한 세트의 실험에서, 본 발명자들은 뉴클레오타이드 서열의 길이를 13머로 유지하였고 5'-말단에서 1 내지 5개의 C3-링커(2) 치환체를 혼입하였다(120-124). 이러한 개질된 CpG DNA는 본 발명자들로 하여금 용해도 문제를 유바함 없이 링커의 길이의 증가의 효과를 연구하도록 하였다. 두번째 세트의 실험에서, 본 발명자들은 2개의 동일한 링커 치환체(3, 4, 또는 5)를 CpG 디뉴클레오타이드로의 5'-플랭킹 서열의 인접한 위치에 혼입하여 면역자극성 활성화에 대한 임의의 부가 효과가 있는지를 연구하였다.

[0271] 개질된 CpG DNA를 모 CpG DNA 4와 비교하여 BALB/c 마우스 비장 세포 배양물에 사이토카인 생성을 유도하는 능력에 대해 연구하였다. 모든 CpG DNA는 농도-의존성 사이토카인 생성을 유도하였다. 1.0µg/ml 농도의 CpG DNA에서 수득된 데이터가 표 20에 도시되어 있다. 이러한 검정에서, 모 CpG DNA 4는 1 µg/ml의 농도에서 967±28pg/ml의 IL-12, 1593±94pg/ml의 IL-6, 및 14±6pg/ml의 IL-10 분지를 유도하였다. 표 20에 제시된 데이터는 링커 치환의 수가 감소함에 따라 IL-12 유도가 감소함을 제안하였다. 그러나, CpG DNA 123 및 124에 의한 낮은 수준의 IL-12 분비의 유도는 보다 짧은 길이의 CpG DNA의 결과일 수 있다. 15-뉴클레오타이드 보다 짧은 개질되지 않은 CpG DNA를 이용한 연구는 무의미한 면역자극성 활성을 보였다(데이터는 도시되지 않음). 링커 치환체의 길이와 개수는 모두 IL-6 분비에 대한 보다 작은 효과를 보이지 않았다. IL-10 분비가 링커 치환으로 증가하더라도, 이러한 CpG DNA의 전체적인 IL-10 분비는 최소였다.

[0272] CpG 디뉴클레오타이드로의 5' 플랭킹 서열에서 네번째 및 다섯번째 위치에서 3개의 링커 치환을 함유하는 CpG DNA(링커 3-127; 링커 4-131; 링커 5-135), 및 상응하는 5-트렁케이션된 버전 128, 132, 및 136을 각각 BALB/c 마우스 비장 세포 배양물에서 사이토카인 분비를 유도하는 능력에 대해 시험하였다. 1.0µg/ml 농도에서 분비된 IL-12 및 IL-6의 수준은 도 17에 도시되었다. 도 17에 제시된 결과는 면역자극성 활성이 혼입된 링커의 특성에 따라 다르다는 것을 제시한다. 네번째 및 다섯번째 뉴클레오타이드의 C4-링커 3와의 치환(CpG DNA 127)은 모 CpG DNA 4와 비교하여 사이토카인 분비에 대한 의미없는 효과를 가졌고, 이는 이러한 위치에서 핵염기 및 당 고리가 수용체 인지 및/또는 결합을 위해 필요하지 않았다는 것을 제시한다. 링커 치환 이후의 뉴클레오타이드의 결실은 CpG DNA 4 및 127을 이용한 경우 보다 높은 IL-12 및 IL-6 분지를 유발하였다. 예상한 바와 같이, 2개의 C6-링커(4)의 치환은 모 CpG DNA 4에 의해 유발되는 경우보다 적게 IL-12를 분비하게 하거나 이와 유사하게 IL-6를 분비하게 하였다. 5'-트렁케이션된 CpG DNA 132는 CpG DNA 131 보다 높은 사이토카인 분비를 유발하였다. 두개의 C9 링커(5)를 가지는 CpG DNA 135 및 136은 의미없는 사이토카인 분비를 유도하였고, 이는 상기 기술한 바와 동일한 링커를 함유하는 모노-치환된 CpG DNA로 수득된 결과를 확인한다.

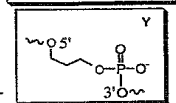
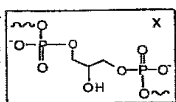
[0273] **실시예 14: 사이토카인 유도에 대한 포스포디에스테르 링커지의 효과**

[0274] 이뮤노머-유도된 사이토카인 유도에 대한 포스포디에스테르 링커지의 효과를 시험하기 위하여, 하기 분자를 합성하였다.

[0275] [표 21]

[0276] PO-이뮤노머 서열 및 분석 데이터

CpG DNA	서열 ^a	백분 ^b	분자량 ^c	
			실측치	이론치
4	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'	PS	5702	5704
155	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'	PO	5432	5428
156	5'-CTGACGTTCTCTGT-X-IGTCTCTTGCAGTC-5'	PO	8656	8649
157	5'-YYCTGACGTTCTCTGT-X-TGTCTCTTGCAGTCYY-5'	PO	9208	9214



^a 화살표는 각 DNA 분자에서 CpG 디뉴클레오타이드의 5'-3' 방향성을 나타내고 X 및 Y의 구조는 박스에 도시된다.
^b PS 및 PO는 각각 포스포리보오메이트 및 포스포디에스테르 백분을 나타낸다.
^c MALDI-TOF 질량 분광계에 의해 측정됨.

[0277] [0278] PS-CpG DNA 4(표 21)을 대조군인 PO-CpG DNA 155와 함께 마우스에서 면역반응을 유도하는 것으로 밝혀졌다(데이

터는 도시되지 않음). PO-이뮤노머 156 및 157 각각은 글리세릴 링커 X를 통해 3'-말단을 통해 결합된 모 CpG DNA 155의 두개의 동일한 트렁케이션된 복사체를 함유한다(표 21). 156 및 157 각각은 14개 염기의 동일한 올리고뉴클레오타이드 세그먼트를 함유하고, 157의 5'-말단은 두개의 C3-링커, Y의 첨가에 의해 개질되었다(표 21). 모든 올리고뉴클레오타이드 4, 155-157은 마우스 면역계를 활성화하는 것으로 공지된 'GACGTT' 핵사머 모티프를 함유한다.

[0279] 뉴클리아제에 대한 PO-이뮤노머의 안정성을 4, 24, 및 48 시간 동안 37°C에서 10% 우태아혈청(FBS)을 함유하는 세포 배양 배지 중에서 CpG DNA 4, 155-157을 인큐베이션함에 의해 평가하였다. 반응 혼합물 중에 남아 있는 완전한 CpG DNA는 다음에 CGE로 측정하였다. 도 18 A-D는 24시간 동안 10% FBS에서 인큐베이션되는 CpG DNA 4, 155-157의 뉴클리아제 소화 프로파일을 도시한다. 각 시점에서 남아 있는 전장 CpG DNA의 양이 도 18E에 도시되어 있다. 기대한 바와 같이, 모 CpG DNA 4는 혈청 뉴클리아제에 가장 내성을 가졌다. 약 55%의 18머 4는 48 시간 인큐베이션 후에 분해된 채 남아있었다. 대조적으로, 약 5%의 전장 PO-이뮤노머 155만이 동일한 실험 조건 하에서 4 시간 후에 남아 있었고, 이는 포스포디에스테르 링키지를 함유하는 DNA가 빠른 분해를 거친다는 것을 확인한다. 기대한 바와 같이, PO-이뮤노머 156 및 157은 혈청 뉴클리아제에 대해 155 보다 더 내성을 가졌다. 4 시간 후에, 각각 약 62% 및 73%의 156 및 157은 약 5%의 155와 비교하여 완전하였다(도 18E). 48시간 후에 조차, 각각 약 23% 및 37%의 156 및 157은 분해되지 않은 채로 남았다. 3'-3'-연결된 PO-이뮤노머가 혈청 뉴클리아제에 대해 보다 더 안정하다는 것을 보이는 것뿐만 아니라, 이러한 연구는 5'-말단에서 화학적 개질이 뉴클리아제 안정성을 추가로 증가시킬 수 있다는 것을 의미한다.

[0280] CpG DNA의 면역자극성 활성은 분비된 사이토카인 IL-12 및 IL-6의 수준을 측정함에 의해 BALB/c 및 C3H/HeJ 마우스 비장 세포 배양물 중에 연구하였다. 모든 CpG DNA는 BALB/c 마우스 비장 세포 배양물 중에 농도-의존성 사이토카인 분비를 유도하였다(도 19). 3µg/ml에서, PS-CpG DNA 4는 각각 IL-12 및 IL-6의 2656±256 및 12234±1180pg/ml을 유도하였다. 모 PO-CpG DNA 155는 10µg/ml의 농도에서 제외하고 상기 배경 이상으로 사이토카인 수준을 상승시키지 않았다. 이러한 관찰은 뉴클리아제 안정성 검정 결과와 일치하였다. 대조적으로, PO-이뮤노머 156 및 157은 BALB/c 마우스 비장 세포 배양물에서 IL-12 및 IL-6 둘 모두를 유도하였다.

[0281] 도 19에 도시된 결과는 PS- 및 PO-CpG DNA의 사이토카인 유도 프로파일에 있어 명확한 차이를 보였다. PO-이뮤노머 156 및 157은 BALB/c 마우스 비장 세포 배양물에서 PS-CpG DNA 4 보다 더 높은 수준의 IL-12를 유도하였다(도 19A). 대조적으로, 3µg/ml 이하의 농도에서, 이들은 무시할 만한 양의 IL-6를 생성하였다(도 19B). 가장 높은 농도(10µg/ml)에서, PO-이뮤노머 156은 PS-CpG DNA 보다 상당히 적은 IL-6를 유도하였다. PO-이뮤노머 157의 5'-종결부에서 C3 링커의 존재는 156과 비교하여 다소 높은 수준의 IL-6를 분비하였다. 그러나, 중요하게는, PO-이뮤노머에 의해 생성된 IL-6의 수준은 PS CpG DNA 4에 의해 유도된 것보다 훨씬 작았다. 도 19A의 삽입도는 3µg/ml 농도에서 분비된 IL-12 대 IL-6의 비율을 도시한다. IL-12 분비를 증가시키는 것에 더해, PO-이뮤노머 156 및 157은 BALB/c 마우스 비장 세포 배양물의 PS-CpG DNA 4 보다 높은 수준의 IFN-λ를 유도하였다(데이터는 도시되지 않음).

[0282] BALB/c 마우스 비장 세포 배양물의 PO- 및 PS-CpG DNA에 의해 유도된 상이한 사이토카인 프로파일은 본 발명자들로 하여금 C3H/HeJ(LPS에 작게 반응하는 스트레인) 마우스 비장 세포 배양물 중에 CpG의 사이토카인 유도의 패턴을 연구하도록 하였다. 본 검정에서 시험된 모든 3개의 CpG DNA는 농도-의존성 사이토카인 분비를 유도하였다(도 20A 및 B). PO-CpG DNA 155는 BALB/c 마우스 비장 세포 배양물에서 사이토카인 분비를 유도할 수 없기 때문에, C3H/HeJ 비장 세포 배양물 중에서 추가로 검정되지 않았다. PO-이뮤노머 156 및 157 둘 모두는 PS-CpG DNA 4 보다 높은 IL-12 생성을 유도하였다(도 21A). 그러나, 3µg/ml 이하의 온도에서는 어느 것도 IL-6 생성을 유도하지 않았다. 시험된 가장 높은 농도(10µg/ml)에서, 둘 모두는 PS-CpG DNA 4 보다 상당히 적은 IL-6를 유도하였다(도 21B). 분비된 IL-12 대 IL-6의 비율을 PS 및 PO CpG DNA의 사이토카인 분비 프로파일을 구별하기 위하여 계산하였다(도 21A 삽입도). 또한, C3H/HeJ 비장 세포 배양물 결과는 CpG DNA로 관찰되는 반응이 LPS 오염으로 인한 것이 아니라는 것을 제시한다.

[0283] PS-CpG DNA는 생체내 잠재적인 항종양 활성을 유도하는 것으로 관찰되었다. PO-CpG DNA는 보다 큰 뉴클리아제 안정성으로 보이고 시험관내 검정에서 보다 높은 수준의 IL-12 및 IFN-γ 분비를 유도하기 때문에, 본 발명자들은 이러한 요망되는 PO-이뮤노머의 특성이 생체내에서 항종양 활성을 개선하는지를 알아보는데 관심을 가졌다. 본 발명자들은, 돌연변이된 p53을 발현하는 DU-145 전립선 암 세포 또는 야생형 p53을 발현하는 MCF-7 유방암 세포의 종양 이종이식편을 가지는 nude 마우스에, PO-이뮤노머를 이들에 한번 0.5 mg/kg의 투여량으로 경피내로 투여하였다. PO-이뮤노머 157은 식염수 대조군과 비교하여 15일에 MCF-7 종양의 57% 증식 억제하였다(도 22A). 이는 또한 34일째에 DU-145 종양의 52% 증식 억제를 생성하였다(도 22B). 이러한 항종양 연구는 제안된 디자인

의 PO-이뮤노머가 생체내에서 유력한 항종양 활성을 보인다는 것을 제시한다.

[0284] 실시예 15: 짧은 이뮤노머

[0285] 사이토카인 유도에 대한 짧은 이뮤노머의 효과를 시험하기 위하여, 하기 이뮤노머를 사용하였다. 이러한 결과는 세그먼트 당 5개 뉴클레오티드와 같이 짧은 이뮤노머가 사이토카인 생성을 유도하는 데 효과적이라는 것을 보여준다.

[0286] [표 22]

[0287] 이뮤노머 구조 및 BALB/C 마우스 비장 세포 배양물에서의 면역자극성 활성

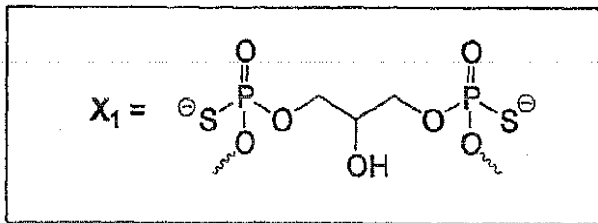
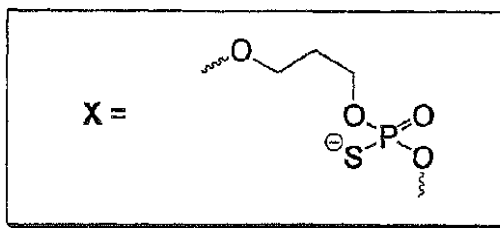
올리고 번호	서열 및 개질 (5'-3')	올리고 길이/ 또는 각 사슬	IL-12 (pg/mL) 10 µg/mL	IL-6 (pg/mL) 10 µg/mL
4	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'	18 머	2731	4547
25	5'-CTATCTGTCGTTCTCTGT-3'	18머	795	789
158	5'-TCTGACGTTCT-3' 5'-TCTGACGTTCT-3' X ₁	11머	3490	5319
159	5'-TCTGTCGTTCT-3' 5'-TCTGTCGTTCT-3' X ₁	11머	3265	4625
160	5'-TCGTTG-3' 5'-TCGTTG-3' X ₁	6머	2085	2961
161	5'-TCGTTG-3'XX 5'-TCGTTG-3'XX X ₁	6 머	3169	5194
162	5'-TCGTTG-3'X 5'-TCGTTG-3'X X ₁	6머	1015	705
163	5'-TCGTT-3'X 5'-TCGTT-3'X X ₁	5 머	2623	3619
164	5'-ACGTTG-3'X 5'-ACGTTG-3'X X ₁	6머	564	845
165	5'-GCGTTG-3'X 5'-GCGTTG-3'X X ₁	6 머	196	0
166	5'-CCGTTG-3'X 5'-CCGTTG-3'X X ₁	6 머	219	0

[0288]

167	5'-GTCGTT-3'X 5'-GTCGTT-3'X X ₁	6 머	1441	5056
168	5'-TGTCGT-3'X 5'-TGTCGT-3'X X ₁	6 머	198	0
169	5'-TCGTTG-3'X 5'-TCGTTG-3'X X ₁ -X ₃ -GTTGCT-5'	6머	2410	4857

[0289]

[0290] 정상적인 상은 포스포로티오에이트 링키지를 나타낸다.



[0291]

[0292] 실시예 16: 2-옥소-7-테아자-8-메틸-퓨린을 마우스 특이적 및 인간 특이적 면역자극성 모티프에 혼입한 효과

[0293] 마우스 비장세포 배양물을 제조하고 실시예 4에 기술한 바와 같이 처리하였다. 배양물을 배지 또는 올리고뉴클레오티드 170, 171, 또는 172로 처리하였다. (도 15 참조). 모든 올리고뉴클레오티드는 마우스-특이적 면역자극성 모티프 (GACGTT)를 함유하였으나, 올리고뉴클레오티드 171은 RpG 치환체를 함유하였고 올리고뉴클레오티드

172는 CpR 치환체를 함유하였으며, R은 2-옥소-7-테아자-8-메틸-퓨린이다. 결과를 도 17에 도시하였다. RpG 치환은 마우스 비장 배양물에 의해 인지되어 사이토카인이 생성된 반면에, CpR 치환은 아니었다. 인간-특이적 면역자극성 모티프 GTCGTT를 함유하는 올리고뉴클레오티드 173 또는 174 또는 RpG 치환체로 각각 배양물을 처리한 결과, 천연 인간 서열로 처리한 경우보다 RpG 치환체로가 보다 우수한 인지능을 보였다(도 18). 또 올리고뉴클레오티드 170 (마우스-특이적) 또는 173 (인간-특이적)으로 처리한 것이 이들의 각각의 이뮤노머 175 또는 176 (각각은 RpG 치환체 함유)와 비교하여 이뮤노머에 대해 보다 우수한 결과를 보였으며, 이는 이뮤노머로의 RpG 치환체의 삽입이 중-의존성 선택성을 극복할 수 있다는 것을 제안한다(도 19). 올리고뉴클레오티드 170 또는 173으로 인간 마크로파지 유사 세포 배양물을 처리한 것은 이뮤노머 175 또는 176으로 처리한 것과 비교하여 이뮤노머로의 RpG 치환체의 삽입이 중 선택적 활성을 극복한다는 것을 제시한다(도 20). 유사한 결과가 J774 세포에서의 NK- κ B의 활성화 및 I κ -B α 의 분해에 대해서 관찰된다(도 21). 이뮤노머 176은 또한 인간 말초혈 단핵구의 배양물에서 면역자극성 활성을 보였다(도 22).

[0294] 실시예 17: 인간 B 세포 및 플라즈마사이토이드(plasmacytoid) 수지상 세포(pDC)의 분리

[0295] 건강한 지원자 혈액으로부터 바로 채혈된 PBMC(CBR Laboratories, Boston, MA)를 피콜 밀도 구배 원심분리 방법 (히스토파크(Histopaque)-1077, 시그마)에 의해 분리하고 B 세포를 제조자의 지시에 따라 CD19 세포 분리 키트 (Miltenyi Biotec)을 사용하여 양성 선택에 의해 PBMC로부터 분리하였다.

[0296] 실시예 18: B 세포 검정

[0297] B-세포를 1×10^6 세포/ml, $200 \mu\text{l}$ /웰을 사용하여 96-웰 플레이트에 플레이팅하였다. 이뮤노머를 세포 배양액에 0.3, 1.0, 3.0 또는 $10.0 \mu\text{g/ml}$ 의 최종농도가 되도록 첨가하고 24시간 동안 37°C 에서 인큐베이션하였다. 다음에, 상청액을 수집하고 ELISA 키트(PBL에 의해 제공)를 사용하여 IL-6 및 IL-10에 대해 검정하였다. 표 23A 내지 23D는 최종 $10.0 \mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 이뮤노머로 공여체 1 내지 4에 대해 평균 \pm SD를 도시한다.

[0298] [표 23A]

[0299] 이뮤노머 구조 및 공여체 1에 대한 인간 B-세포 검정에서의 면역자극 활성 (48 시간).

올리고 번호	서열 및 개질 (5'-3')	IL-6 (pg/ml)	
		10 $\mu\text{g/ml}$ DN1	10 $\mu\text{g/ml}$ DN1
173	5'-TCTGTCG ₁ TTCT-X-TCTTG ₄ CTGTCT-5'	2718 \pm 35.5	132.7 \pm 5.5
174	5'-TCTGTCG ₂ TTCT-X-TCTTG ₂ CTGTCT-5'	2737 \pm 19	144 \pm 3.1
175	5'-TCTGTC ₁ GTTCT-X-TCTTG ₁ TGTCT-5'	2210 \pm 8.5	122.5 \pm 5.1
177	5'-TCTGTC ₃ GTTCT-X-TCTTG ₃ TGTCT-5'	2175 \pm 28.7	60.2 \pm 1.2
179	5'-CTGTCG ₂ TTCTC-X-CTCTTG ₂ CTGTC-5'	2714 \pm 2.7	132.1 \pm 1
181	5'-CTGTC ₂ GTTCTC-X-CTCTTG ₂ TGTC-5'	2166 \pm 29.6	30.9 \pm 0.2
183	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTCTG-X-GTCTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	2956 \pm 75	158.8 \pm 7.8
184	5'-TCG ₂ TCG ₂ TTCTG-X-GTCTTG ₂ CTG ₂ CT-5'	3057 \pm 37.2	132.7 \pm 2.7
185	5'-TC ₁ GTC ₁ GTTCTG-X-GTCTTG ₁ TGC ₁ T-5'	2171 \pm 18.6	50.9 \pm 1.6
186	5'-TC ₂ GTC ₂ GTTCTG-X-GTCTTG ₂ TGC ₂ T-5'	3067 \pm 21	53.6 \pm 0.2
187	5'-TC ₃ GTC ₃ GTTCTG-X-GTCTTG ₃ TGC ₃ T-5'	1760 \pm 2.4	37.7 \pm 1.3
205	5'-TG ₁ CTG ₁ CTTG-X-GITCG ₁ TCG ₁ T-5'	2138 \pm 41.3	25.7 \pm 0.2
배지		1674 \pm 22	2.8 \pm 0.1

[0300]

[0301] [표 23B]

[0302] 이뮤노머 구조 및 공여체 2에 대한 인간 B-세포 검정에서의 면역자극 활성 (48 시간).

올리고 번호	서열 및 개질 (5'-3')	IL-6 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)
		10 µg/ml DN2	10 µg/ml DN2
173	5'-TCTGTCG ₁ TTCT-X-TCTTG ₁ CTGTCT-5'	521±2.6	0±0
175	5'-TCTGTC ₁ GTTCT-X-TCTTG ₁ TGTCT-5'	1157±0.9	30.9±0
183	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTCTG-X-GTCTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	2198±2.6	158±9.7
184	5'-TCG ₂ TCG ₂ TTCTG-X-GTCTTG ₂ CTG ₂ CT-5'	2464±34.5	289±23.6

[0303]

185	5'-TC ₁ GTC ₁ GTTCTG-X-GTCTTG ₁ TGC ₁ T-5'	686±1.7	18.6±1
186	5'-TC ₂ GTC ₂ GTTCTG-X-GTCTTG ₂ TGC ₂ T-5'	867±17	31.3±1.5
187	5'-TC ₃ GTC ₃ GTTCTG-X-GTCTTG ₃ TGC ₃ T-5'	355±6.1	0±0
205	5'-TG ₁ CTG ₁ CTTG-X-GTTTCG ₁ TCG ₁ T-5'	132±0	0±0
배지		65.6±2.8	0±0

[0304]

[0305] [표 23C]

[0306] 이뮤노머 구조 및 공여체 3에 대한 인간 B-세포 검정에서의 면역자극 활성 (48 시간).

올리고 번호	서열 및 개질 (5'-3')	IL-6 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)
		10 µg/ml DN3	10 µg/ml DN3
173	5'-TCTGTCG ₁ TTCT-X-TCTTG ₁ CTGTCT-5'	495±2.9	14.8±0.3
175	5'-TCTGTC ₁ GTTCT-X-TCTTG ₁ TGTCT-5'	1043±0	28.4±1.4
183	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTCTG-X-GTCTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	1521±24.9	27.2±1.4
184	5'-TCG ₂ TCG ₂ TTCTG-X-GTCTTG ₂ CTG ₂ CT-5'	1018±13.4	33.5±0.7
185	5'-TC ₁ GTC ₁ GTTCTG-X-GTCTTG ₁ TGC ₁ T-5'	423±3.9	9.5±0.2
186	5'-TC ₂ GTC ₂ GTTCTG-X-GTCTTG ₂ TGC ₂ T-5'	524±36.2	9.0±0.1
187	5'-TC ₃ GTC ₃ GTTCTG-X-GTCTTG ₃ TGC ₃ T-5'	184±3.3	5.8±0.3
205	5'-TG ₁ CTG ₁ CTTG-X-GTTTCG ₁ TCG ₁ T-5'	139.4±0	7.1±0.3
배지		40.9±2.6	6.1±2.4

[0307]

[0308] [표 23D]

[0309] 이뮤노머 구조 및 공여체 4에 대한 인간 B-세포 검정에서의 면역자극 활성 (48 시간).

올리고 번호	서열 및 개질 (5'-3')	IL-6 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)
		10 µg/ml DN4	10 µg/ml DN4
173	5'-TCTGTCG ₁ TTCT-X-TCTTG ₁ CTGTCT-5'	1027±0	360±59.8
174	5'-TCTGTCG ₂ TTCT-X-TCTTG ₂ CTGTCT-5'	1470±46.9	559±0
175	5'-TCTGTC ₁ GTTCT-X-TCTTG ₁ TGTCT-5'	1272±23	470±1.1

[0310]

177	5'-TCTGTC ₃ GTTCT-X-TCTTGC ₃ TGTCT-5'	848±6.8	133±4.5
179	5'-CTGTCCG ₂ TTCTC-X-CTCTTG ₂ CTGTGC-5'	1424±22	634±2.7
181	5'-CTGTC ₂ GTTCTC-X-CTCTTG ₂ TGTGC-5'	407±3.1	61.8±0.1
183	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTCTG-X-GTCTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	2837±72.2	738±5.5
184	5'-TCG ₂ TCG ₂ TTCTG-X-GTCTTG ₂ CTG ₂ CT-5'	1986±34.8	765±7.9
185	5'-TC ₁ GTC ₁ GTTCTG-X-GTCTTG ₁ TGC ₁ T-5'	1126±23.1	165±1.6
186	5'-TC ₂ GTC ₂ GTTCTG-X-GTCTTG ₂ TGC ₂ T-5'	1372±14.3	150±0.9
187	5'-TC ₃ GTC ₃ GTTCTG-X-GTCTTG ₃ TGC ₃ T-5'	618±4.9	73±3.1
205	5'-TG ₁ CTG ₁ CTTG-X-GTTTCG ₁ TCG ₁ T-5'	891±13.6	37.8±0.5
배지		88.6±0	3.8±0.4

[0311]

[0312]

실시예 19: 인간 pDC 배양

[0313]

pDC를 제조자의 지시에 따라 BDCA-4 세포 분리 키트(Miltenyi Biotec)을 이용하여 인간 PBMC로부터 분리하였다. pDC를 1×10^6 세포/ml, 200 μ l/웰을 사용하여 96웰 플레이트에 플레이팅하였다. 이뮤노머를 세포 배양물에 0.3, 1.0, 3.0, 또는 10.0 μ g/ml의 최종 농도가 되도록 첨가하였고, 24 시간 동안 37 $^{\circ}$ C에서 인큐베이션하였다. 다음에, 상청액을 수집하고 ELISA 키트(PBL에 의해 제공)를 사용하여 IFN- α , IL-6, 및 TNF- α 에 대해 검정하였다. 표 24A 내지 표 24D는 10.0 μ g/ml의 농도에서 이뮤노머를 이용한 공여체 1-4에 대해 IFN- α , IL-6, 및 TNF- α 의 평균 \pm SD를 도시한다.

[0314]

[표 24A]

[0315]

이뮤노머 구조 및 공여체 1에 대한 인간 수지상 세포 검정에서의 면역자극성 활성화 (24시간)

올리고 번호	서열 및 개질 (5'-3')	IFN- α	IL-6 (pg/ml)	TNF- α
		(pg/ml) 10 μ g/ml DN1	10 μ g/ml DN1	10 μ g/ml DN1
173	5'-TCTGTCCG ₁ TTCT-X-TCTTG ₁ CTGTCT-5'	2524±99	6089±127	2643±22
174	5'-TCTGTCCG ₂ TTCT-X-TCTTG ₂ CTGTCT-5'	21219±1 253	4581±54	7939±0
175	5'-TCTGTGC ₁ GTTCT-X-TCTTG ₁ TGTCT-5'	6692±19 5	4787±105	6021±0
177	5'-TCTGTGC ₃ GTTCT-X-TCTTG ₃ TGTCT-5'	4503±51 5	2379±188	3842±0
179	5'-CTGTCCG ₂ TTCTC-X-CTCTTG ₂ CTGTGC-5'	21903±6 4	5632±190	6790±0
181	5'-CTGTC ₂ GTTCTC-X-CTCTTG ₂ TGTGC-5'	284±2	2271±22	2086±0
183	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTCTG-X-GTCTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	27183±8 8	6859±38	7543±39
184	5'-TCG ₂ TCG ₂ TTCTG-X-GTCTTG ₂ CTG ₂ CT-5'	774±32	4632±35	5335±27
185	5'-TC ₁ GTC ₁ GTTCTG-X-GTCTTG ₁ TGC ₁ T-5'	25260±2 311	3678±32	3010±60
186	5'-TC ₂ GTC ₂ GTTCTG-X-GTCTTG ₂ TGC ₂ T-5'	28228±2 202	3993±42	2793±15
187	5'-TC ₃ GTC ₃ GTTCTG-X-GTCTTG ₃ TGC ₃ T-5'	19735±4 23	3905±5	2510±3
205	5'-TG ₁ CTG ₁ CTTG-X-GTTTCG ₁ TCG ₁ T-5'	302±2	1394±123	1426±23
배지		321±2	891±0	1595±0

[0316]

[0317]

[표 24B]

[0318] 이뮤노머 구조 및 공여체 2에 대한 인간 수지상 세포 검정에서의 면역자극성 활성화 (24시간)

올리고 번호	서열 및 개질 (5'-3')	IFN- α	TNF- α	IL-6
		(pg/ml) 10 μ g/ml DN2	(pg/ml) 10 μ g/ml DN2	(pg/ml) 10 μ g/ml DN2
173	5'-TCTGTCG ₁ TTCT-X-TCTTG ₁ CTGTCT-5'	1372 \pm 126	1942 \pm 11	804 \pm 15
175	5'-TCTGTC ₁ GTTCT-X-TCTTGC ₁ TGTCT-5'	4097 \pm 292	2671 \pm 13	835 \pm 14

[0319]

183	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTCTG-X-GTCTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	10952 \pm 208	828 \pm 14	1094 \pm 18
184	5'-TCG ₂ TCG ₂ TTCTG-X-GTCTTG ₂ CTG ₂ CT-5'	5669 \pm 367	2868 \pm 133	4734 \pm 19
185	5'-TC ₁ GTC ₁ GTTCTG-X-GTCTTG ₁ TGC ₁ T-5'	3860 \pm 180	1760 \pm 14	845 \pm 12
186	5'-TC ₂ GTC ₂ GTTCTG-X-GTCTTG ₂ TGC ₂ T-5'	3093 \pm 127	2006 \pm 70	582 \pm 2
187	5'-TC ₃ GTC ₃ GTTCTG-X-GTCTTG ₃ TGC ₃ T-5'	0 \pm 0	1406 \pm 18	466 \pm 0
205	5'-TG ₁ CTG ₁ CTTG-X-GTTTCG ₁ TCC ₁ T-5'	0 \pm 0	803 \pm 17	436 \pm 3
배지		0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0

[0320]

[0321]

[표 24C]

[0322]

이뮤노머 구조 및 공여체 3에 대한 인간 수지상 세포 검정에서의 면역자극성 활성화 (24시간)

올리고 번호	서열 및 개질 (5'-3')	IFN- α	TNF- α	IL-6 (pg/ml)
		(pg/ml) 10 μ g/ml DN3	(pg/ml) 10 μ g/ml DN3	10 μ g/ml DN3
173	5'-TCTGTCG ₁ TTCT-X-TCTTG ₁ CTGTCT-5'	0 \pm 0	2101 \pm 26	804 \pm 15
175	5'-TCTGTC ₁ GTTCT-X-TCTTGC ₁ TGTCT-5'	2151 \pm 28	3810 \pm 5	835 \pm 14
183	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTCTG-X-GTCTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	4977 \pm 2	678 \pm 13	1094 \pm 18
184	5'-TCG ₂ TCG ₂ TTCTG-X-GTCTTG ₂ CTG ₂ CT-5'	2951 \pm 39	2085 \pm 60	4734 \pm 19
185	5'-TC ₁ GTC ₁ GTTCTG-X-GTCTTG ₁ TGC ₁ T-5'	5075 \pm 15 4	1787 \pm 14	845 \pm 12
186	5'-TC ₂ GTC ₂ GTTCTG-X-GTCTTG ₂ TGC ₂ T-5'	3203 \pm 5	2069 \pm 15	582 \pm 2
187	5'-TC ₃ GTC ₃ GTTCTG-X-GTCTTG ₃ TGC ₃ T-5'	0 \pm 0	1936 \pm 13	466 \pm 0
205	5'-TG ₁ CTG ₁ CTTG-X-GTTTCG ₁ TCC ₁ T-5'	0 \pm 0	846 \pm 12	605 \pm 8
배지		0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0

[0323]

[0324]

[표 24D]

[0325] 이뮤노머 구조 및 공여체 4에 대한 인간 수지상 세포 검증에서의 면역자극성 활성 (24시간)

올리고 번호	서열 및 개질 (5'-3')	IL-6 (pg/ml)	TNF-α (pg/ml)
		10 μg/ml DN4	10 μg/ml DN4
173	5'-TCTGTCG ₁ TTCT-X-TCTTG ₁ CTGTCT-5'	1144±182	411±93
174	5'-TCTGTCG ₂ TTCT-X-TCTTG ₂ CTGTCT-5'	3386±28	2936±5
175	5'-TCTGTC ₁ GTTCT-X-TCTTG ₁ TGTCT-5'	4267±18	1832±68
177	5'-TCTGTC ₃ GTTCT-X-TCTTG ₃ TGTCT-5'	2254±41	1173±23
179	5'-CTGTCG ₂ TTCTC-X-CTCTTG ₂ CTGTC-5'	5532±3	3494±142
181	5'-CTGTC ₂ GTTCTC-X-CTCTTG ₂ TGTC-5'	1430±17	1127±55
183	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTCTG-X-GTCTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	6564±77	2932±52
184	5'-TCG ₂ TCG ₂ TTCTG-X-GTCTTG ₂ CTG ₂ CT-5'	5360±147	1584±24
185	5'-TC ₁ GTC ₁ GTTCTG-X-GTCTTG ₁ TGC ₁ T-5'	3507±118	2326±60
186	5'-TC ₂ GTC ₂ GTTCTG-X-GTCTTG ₂ TGC ₂ T-5'	2273±92	1297±36
187	5'-TC ₃ GTC ₃ GTTCTG-X-GTCTTG ₃ TGC ₃ T-5'	2352±78	1237±28
205	5'-TG ₁ CTG ₁ CTTG-X-GTTCC ₁ TCG ₁ T-5'	1396±20	1000±0
배지		695±19	651±3

[0326]

[0327] 실시예 20

[0328] 인간 말초혈 단핵구(PBMC)를 건강한 지원자로부터의 말초혈로부터 분리하고 실시예 4에서 상기에 논의된 바와 같이 제조하였다. 표 25A-25D는 10.0μg/ml의 농도에서 이뮤노머를 이용한 공여체 1-4에 대한 IL-6 및 IL-10의 평균±SD를 도시한다.

[0329] [표 25A]

[0330] 이뮤노머 구조 및 공여체 1에 대한 인간 PBMC 검정에서의 면역자극성 활성(48 시간)

올리고 번호	서열 및 개질 (5'-3')	IL-6(pg/ml)	IL-10 (pg/ml)
		10 µg/ml DN1	10 µg/ml DN1
173	5'-TCTGTCG ₁ TTCT-X-TCTTG ₁ CTGTCT-5'	483±2.6	49.9±1.3
174	5'-TCTGTCG ₂ TTCT-X-TCTTG ₂ CTGTCT-5'	722±9.1	50.3±1.6
175	5'-TCTGTC ₁ GTTCT-X-TCTTGC ₁ TGTCT-5'	502±14.2	46.9±1.9
177	5'-TCTGTC ₃ GTTCT-X-TCTTGC ₃ TGTCT-5'	400±2.8	39.4±0.5
179	5'-CTGTCG ₂ TTCTC-X-CTCTTG ₂ CTGTC-5'	466±17.8	47.6±0.4
181	5'-CTGTC ₂ GTTCTC-X-CTCTTG ₂ TGTC-5'	194±3.5	13.6±0.1
183	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTCTG-X-GTCTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	994±12.2	57.5±0.1
184	5'-TCG ₂ TCG ₂ TTCTG-X-GTCTTG ₂ CTG ₂ CT-5'	652±5	57.1±7.9
185	5'-TC ₁ GTC ₁ GTTCTG-X-GTCTTGC ₁ TGC ₁ T-5'	370±1.9	37.6±6.1
186	5'-TC ₂ GTC ₂ GTTCTG-X-GTCTTGC ₂ TGC ₂ T-5'	416±2.7	28.9±0.7
187	5'-TC ₃ GTC ₃ GTTCTG-X-GTCTTGC ₃ TGC ₃ T-5'	323±5.9	29.7±0.3
205	5'-TG ₁ CTG ₁ CTTG-X-GTTTCG ₁ TCG ₁ T-5'	281±3.1	30.2±0.3
배지		345±7.9	8.7±0.3

[0331]

[0332] [표 25B]

[0333] 이뮤노머 구조 및 공여체 2에 대한 인간 PBMC 검정에서의 면역자극성 활성(48 시간)

올리고 번호	서열 및 개질 (5'-3')	IFN-γ (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)
		10 µg/ml DN2	10 µg/ml DN2	10 µg/ml DN2
173	5'-TCTGTCG ₁ TTCT-X-TCTTG ₁ CTGTCT-5'	7.8±0.6	742±0.8	175±3.7
175	5'-TCTGTC ₁ GTTCT-X-TCTTGC ₁ TGTCT-5'	26.6±1.1	939±34.1	147±5.8

[0334]

183	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTCTG-X-GTCTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	29.1±0.2	1508±12.3	179±5.3
184	5'-TCG ₂ TCG ₂ TTCTG-X-GTCTTG ₂ CTG ₂ CT-5'	22.3±0.3	1294±51.2	397±11
185	5'-TC ₁ GTC ₁ GTTCTG-X-GTCTTGC ₁ TGC ₁ T-5'	3.8±0.5	276±2.6	58±0.6
186	5'-TC ₂ GTC ₂ GTTCTG-X-GTCTTGC ₂ TGC ₂ T-5'	3.6±0.1	590±3.4	73±4.1
187	5'-TC ₃ GTC ₃ GTTCTG-X-GTCTTGC ₃ TGC ₃ T-5'	1.1±0.2	233±5.2	62.1±1.4
205	5'-TG ₁ CTG ₁ CTTG-X-GTTTCG ₁ TCG ₁ T-5'	3.6±0.5	203±12.3	34.8±2.7
배지		0±0	97.4±2.7	3.6±1.1

[0335]

[0336] [표 25C]

[0337] 이뮤노머 구조 및 공여체 3에 대한 인간 PBMC 검정에서의 면역자극성 활성화(48 시간)

올리고 번호	서열 및 개질 (5'-3')	IFN- γ (pg/ml)	iL-6 (pg/ml)	iL-10 (pg/ml)
		10 μ g/ml DN3	10 μ g/ml DN3	10 μ g/ml DN3
173	5'-TCTGTCG ₁ TTCT-X-TCTTG ₁ CTGTCT-5'	63.8±6.3	642±12.6	75.2±5.2
175	5'-TCTGTC ₁ GTTCT-X-TCTTGC ₁ TGTCT-5'	30.7±1.1	569±6.3	53.9±2.2
183	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTCTG-X-GTCTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	63.9±2.7	783±0.9	44.5±0.3
184	5'-TCG ₂ TCG ₂ TTCTG-X-GTCTTG ₂ CTG ₂ CT-5'	32.9±2.4	570±3.6	74±1.1
185	5'-TC ₁ GTC ₁ GTTCTG-X-GTCTTGC ₁ TGC ₁ T-5'	32.7±4.3	283±4.9	37.5±0.4
186	5'-TC ₂ GTC ₂ GTTCTG-X-GTCTTGC ₂ TGC ₂ T-5'	33.7±1.6	376±10.4	48.7±0.6
187	5'-TC ₃ GTC ₃ GTTCTG-X-GTCTTGC ₃ TGC ₃ T-5'	23±1.4	355±5.7	41.6±0.2
205	5'-TG ₁ CTG ₁ CTTG-X-GTTTCG ₁ TCG ₁ T-5'	12.3±1.2	57.3±1.2	39.4±1.3
배치		0±0	25.3±2.9	11.2±0.2

[0338]

[0339] [표 25D]

[0340] 이뮤노머 구조 및 공여체 4에 대한 인간 PBMC 검정에서의 면역자극성 활성화(48 시간)

올리고 번호	서열 및 개질 (5'-3')	IL-6 (pg/ml)		IL-10 (pg/ml)	
		10 μ g/ml DN4	10 μ g/ml DN4	10 μ g/ml DN4	10 μ g/ml DN4
173	5'-TCTGTCG ₁ TTCT-X-TCTTG ₁ CTGTCT-5'	316±20.4		175±0	
174	5'-TCTGTCG ₂ TTCT-X-TCTTG ₂ CTGTCT-5'	758±61.6		174±13.2	
177	5'-TCTGTC ₃ GTTCT-X-TCTTGC ₃ TGTCT-5'	228±21.2		95±3.4	
179	5'-CTGTGCG ₂ TTCTC-X-CTCTTG ₂ CTGTC-5'	498±5.9		197±3	
181	5'-CTGTC ₂ GTTCTC-X-CTCTTGC ₂ TGTC-5'	63±0		39±1.1	
183	5'-TCG ₁ TCG ₁ TTCTG-X-GTCTTG ₁ CTG ₁ CT-5'	1318±32.8		215±0.9	
184	5'-TCG ₂ TCG ₂ TTCTG-X-GTCTTG ₂ CTG ₂ CT-5'	976±24.9		251±9.3	
185	5'-TC ₁ GTC ₁ GTTCTG-X-GTCTTGC ₁ TGC ₁ T-5'	449±0.9		96±1.4	
186	5'-TC ₂ GTC ₂ GTTCTG-X-GTCTTGC ₂ TGC ₂ T-5'	210±4.2		62±6.3	
187	5'-TC ₃ GTC ₃ GTTCTG-X-GTCTTGC ₃ TGC ₃ T-5'	237±2.1		80±3.9	
205	5'-TG ₁ CTG ₁ CTTG-X-GTTTCG ₁ TCG ₁ T-5'	636±15.5		107±8.7	
배치		76.5±2.4		12.6±0.2	

[0341]

[0342] 표 23A-23D, 24A-24D, 및 25A-25D를 위해서만: 정상적인 상은 포스포로티오에이트 링키지를 나타낸다; G₁=2'-데옥시-7-테아자구아노신, G₂=아라비노구아노신, C₁=1-(2'-데옥시-β-D-리보푸라노실)-2-옥소-7-테아자-8-메틸퓨린, C₂=아라비노시티딘, C₃=2'-데옥시-5-하이드록시시티딘, X=글리세롤 링커.

[0343] **등가물**

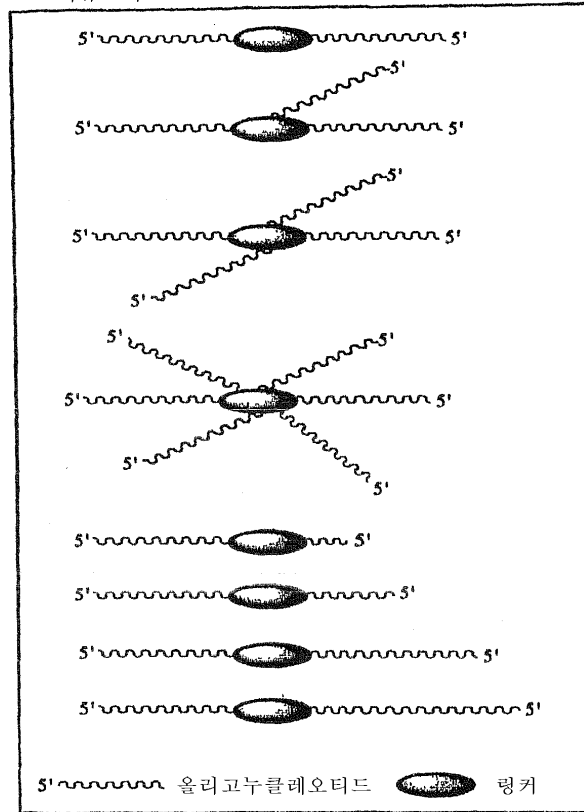
[0344] 상기 본 발명은 명료성과 이해를 위하여 다소 상세하게 기술된 것으로, 형태나 세부사항의 점에서 다양한 변화가 본 발명과 첨부된 청구범위의 진정한 범위로부터 벗어남 없이 있을 수 있다는 것을 상기 개시내용으로부터 당업자는 인지할 수 있을 것이다.

도면

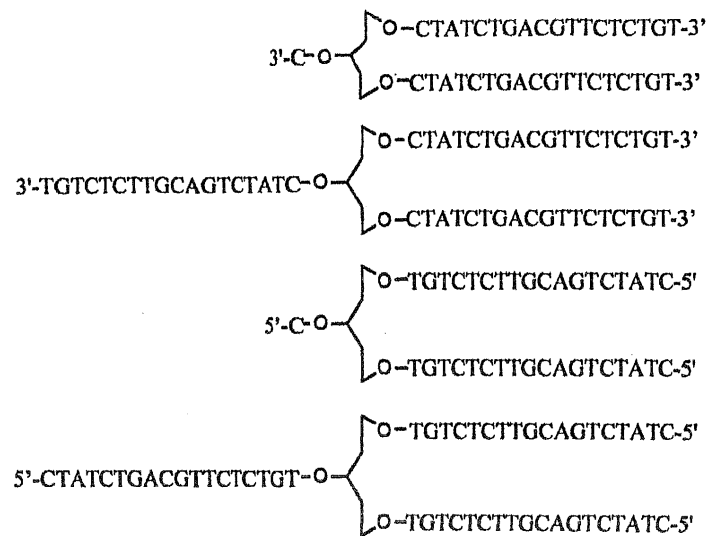
도면1

5'~~~~~3' 면역자극성 올리고뉴클레오티드

이류노머

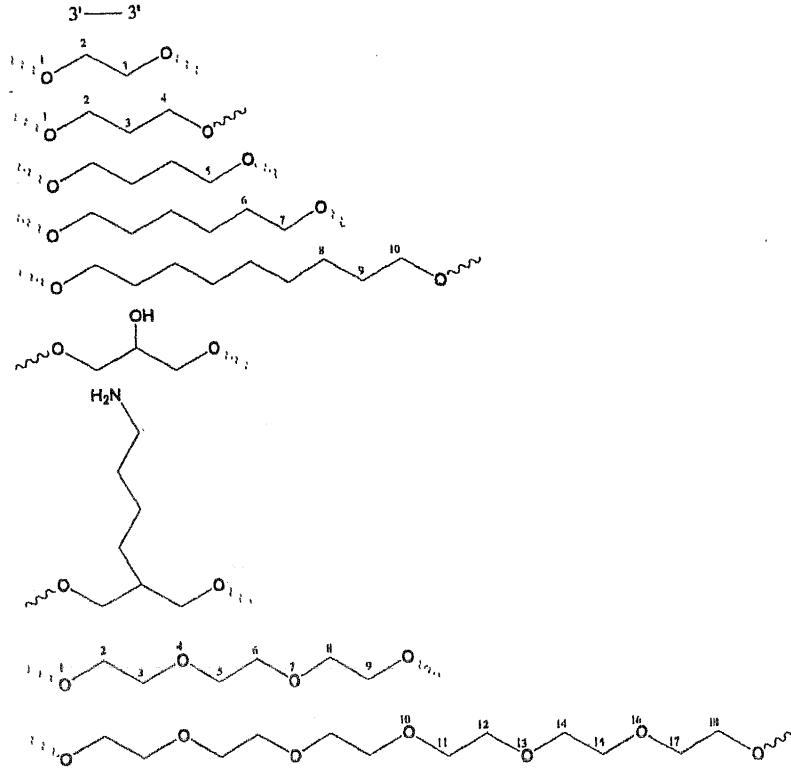


도면2

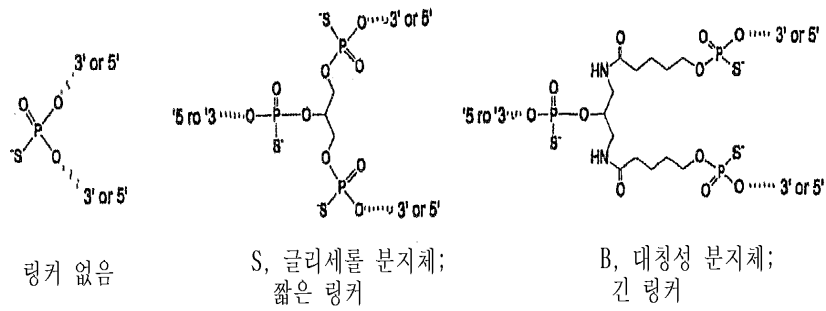


도면3

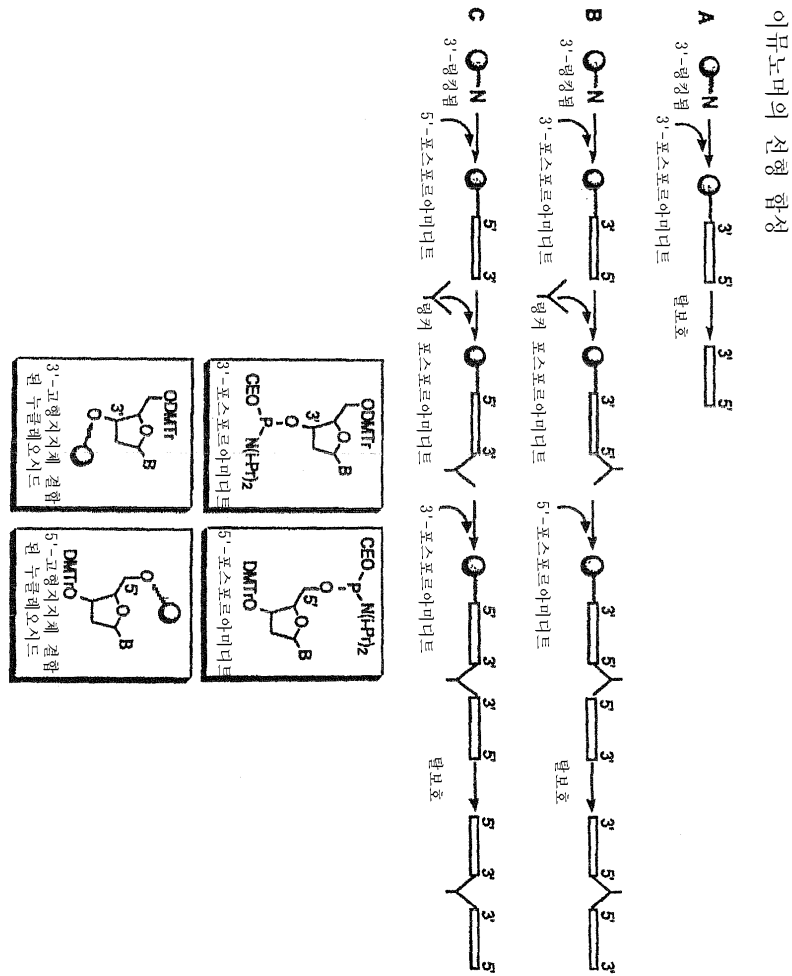
선형 합성을 위한 링커



도면4

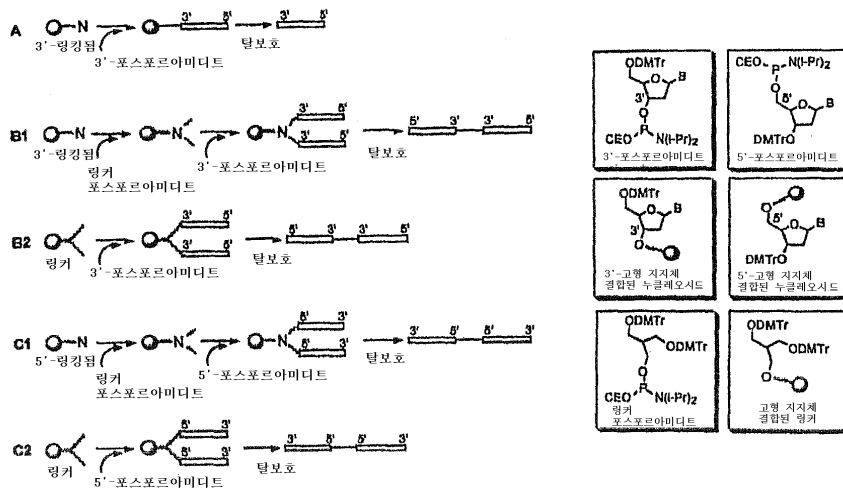


도면5

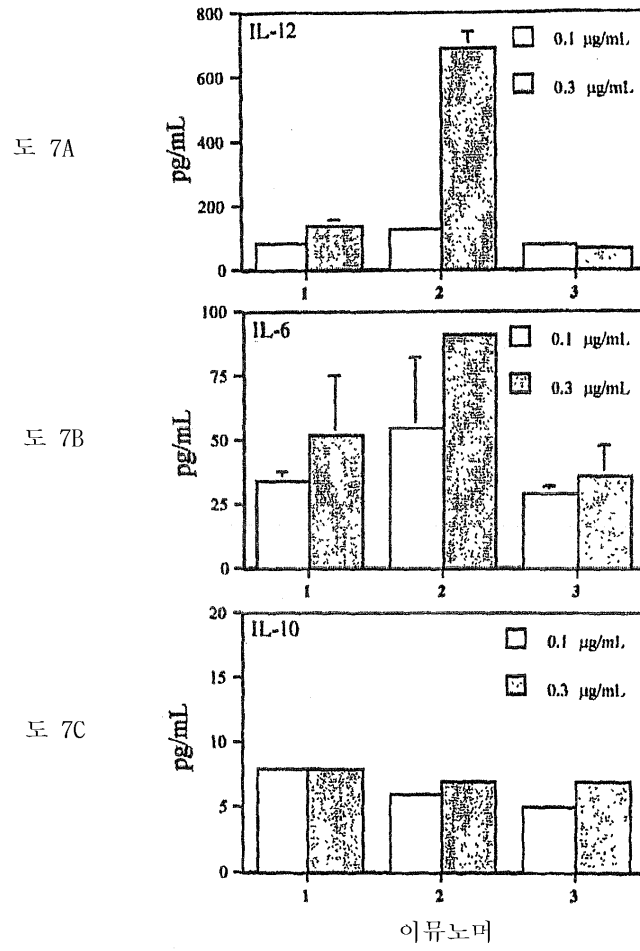


도면6

이뮤노머의 평형 합성

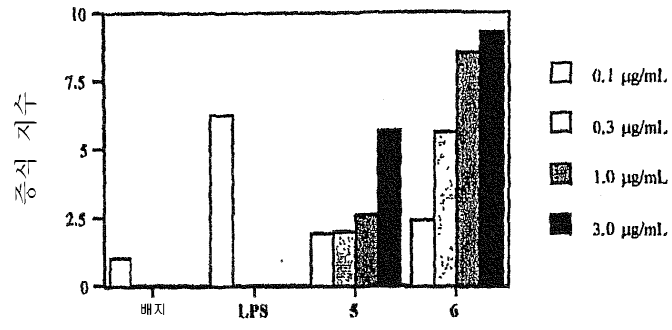


도면7

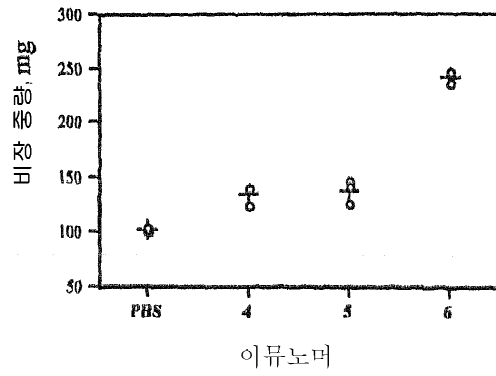


도면8

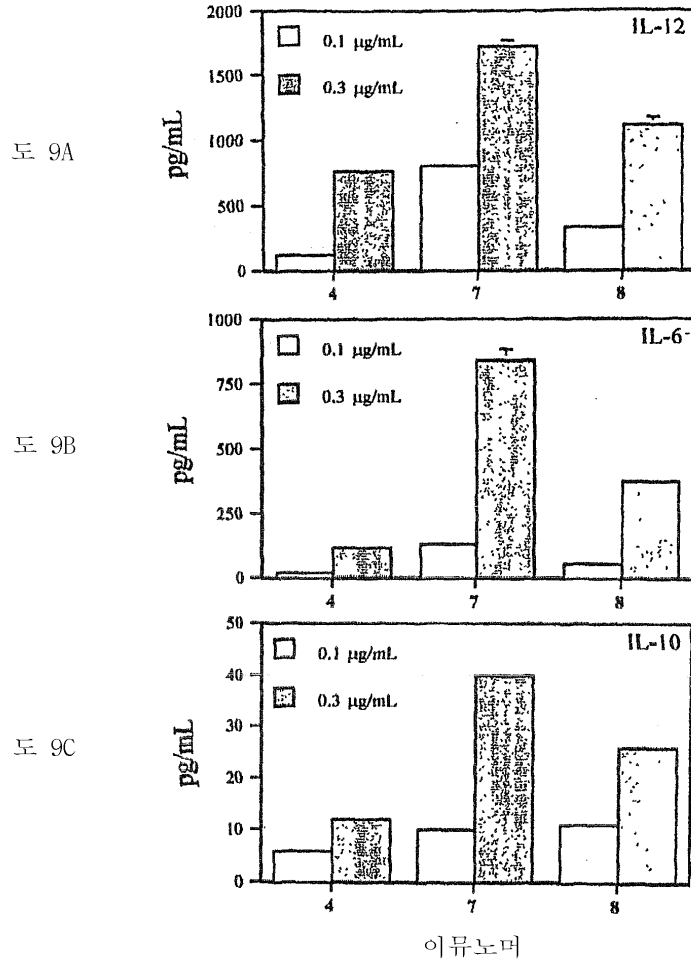
도 8A



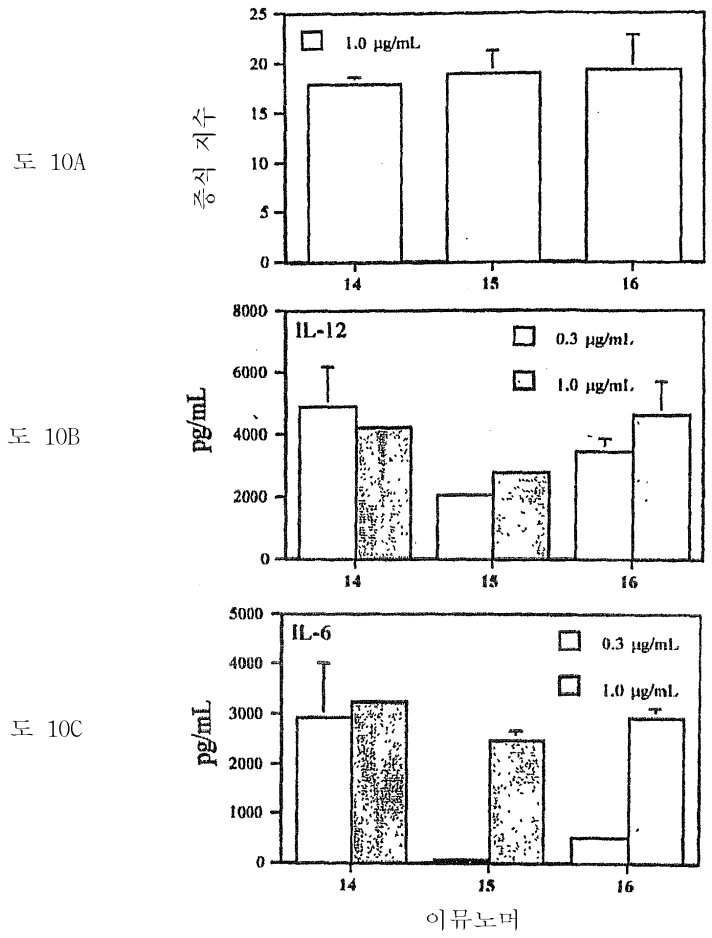
도 8B



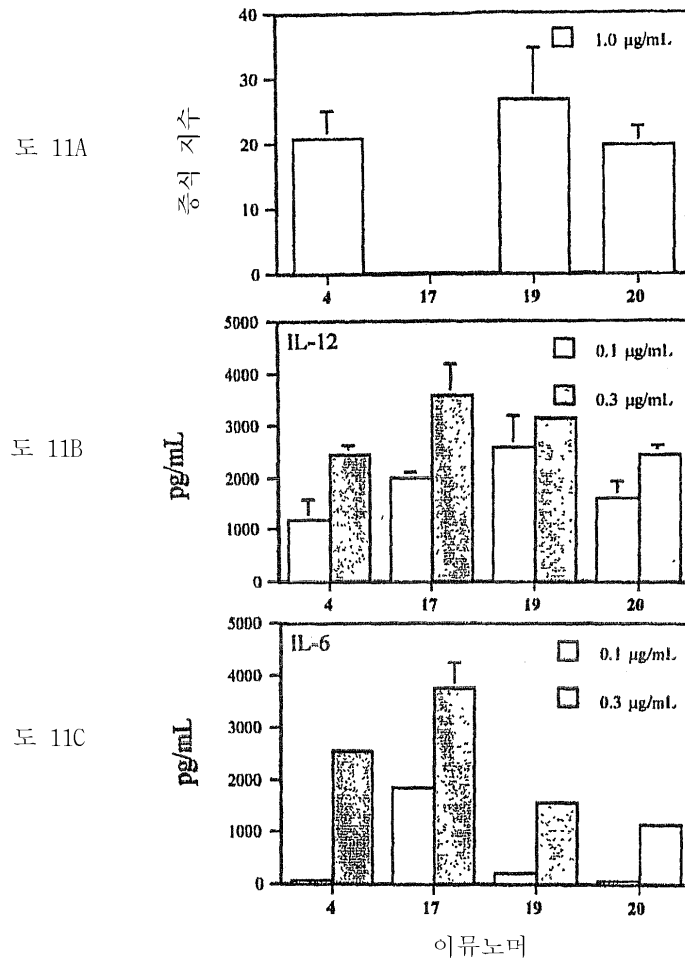
도면9



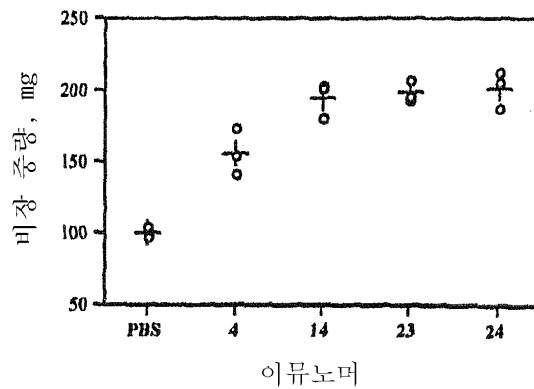
도면10



도면11

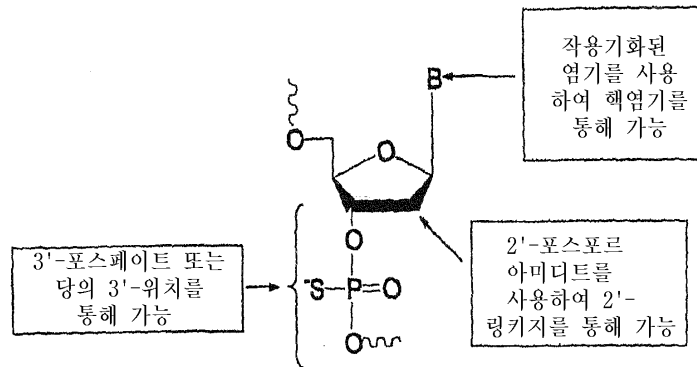


도면12

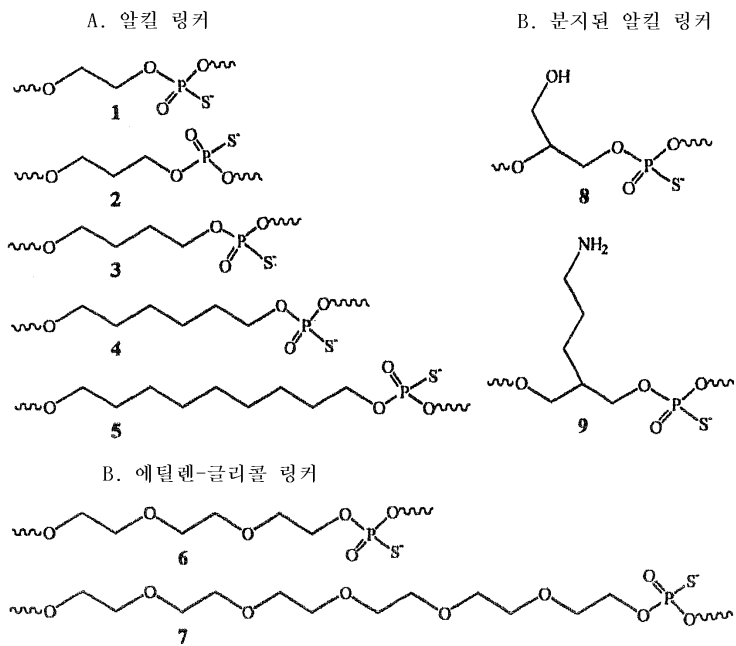


도면13

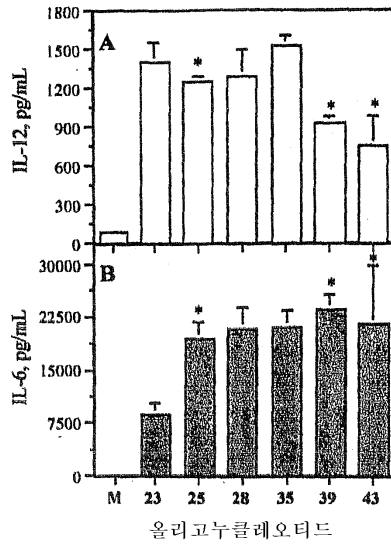
컨쥬게이션이 가능한 위치



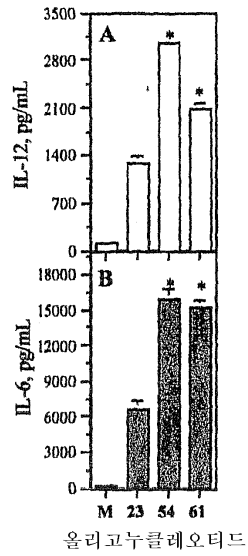
도면14



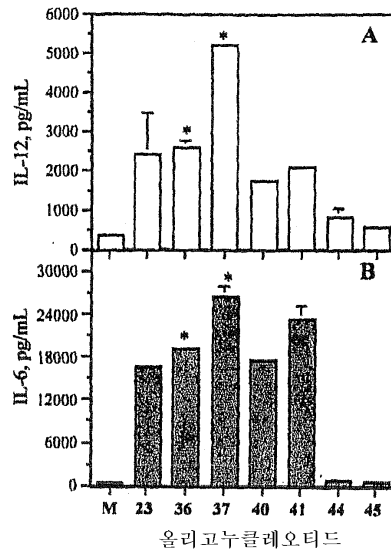
도면15



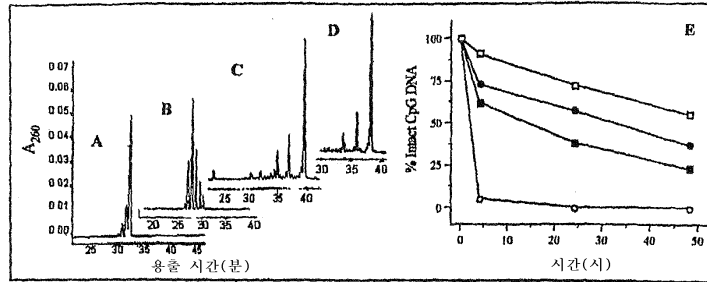
도면16



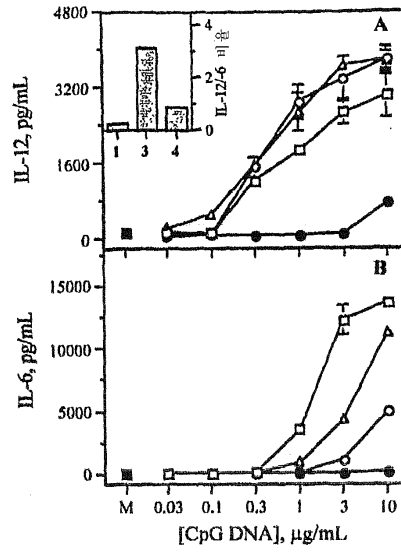
도면17



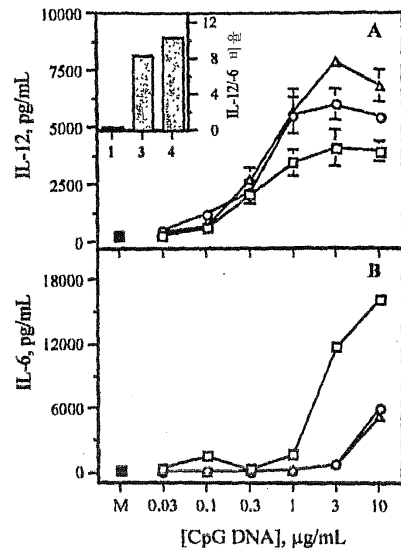
도면18



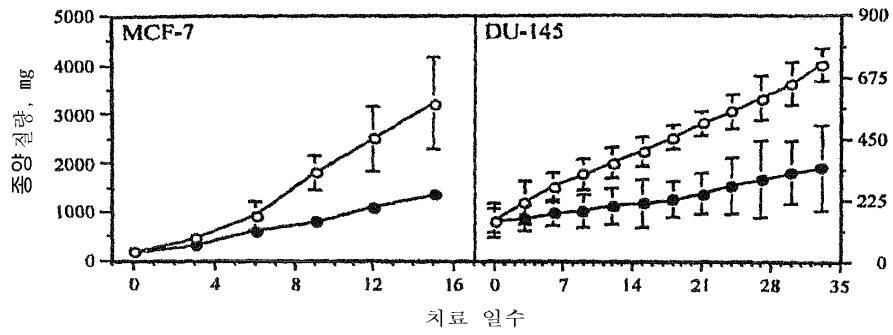
도면19



도면20

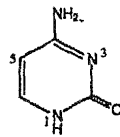


도면21

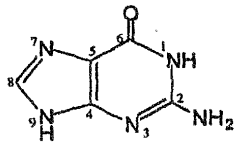


도면22

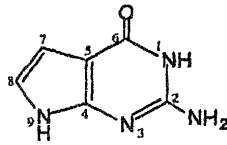
피리미딘 및 퓨린 구조



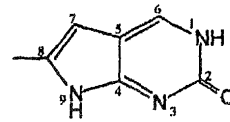
2-옥시-4-아미노 피리미딘
또는 사이토신



2-아미노-6-옥시-퓨린
또는 구아닌



2-아미노-6-옥시-7-테아자-
퓨린 또는 7-테아자-구아닌

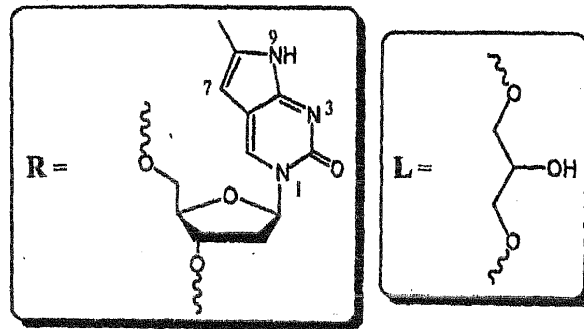


2-옥시-7-테아자-8-메틸 퓨린

도면23

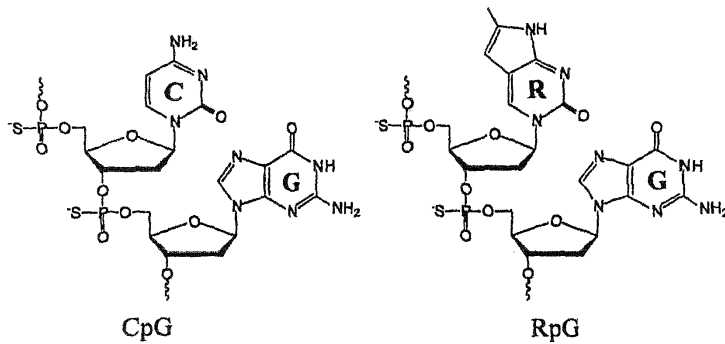
면역자극성 CpG DNA 및 합성 면역자극성 모티프를
 함유하는 면역자극성 이뮤노머 모티프의 서열

- 1 d(5'-CTATCTGACCGTTCTCTGT-3')
- 2 d(5'-CTATCTGARRGTTCTCTGT-3')
- 3 d(5'-CTATCTGACCRTTCTCTGT-3')
- 4 d(5'-CTATCTGTCGTTCTCTGT-3')
- 5 d(5'-CTATCTGTRGTTCTCTGT-3')
- 6 d(5'-TCTGARRGTTCT-L-TCTTGRAGTCT-5')
- 7 d(5'-TCTGTRGTTCT-L-TCTTGRTGTCT-5')



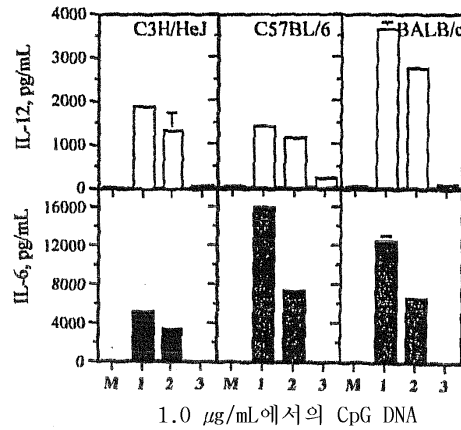
도면24

천연 피리미딘-푸린 면역자극성 모티프와 합성-푸린-구아닌
 면역자극성 모티프(RpG)의 비교



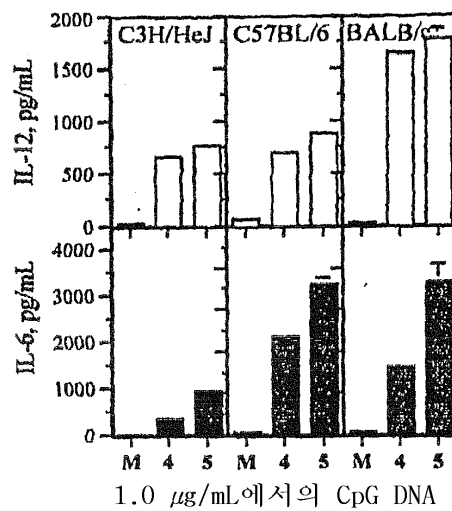
도면25

마우스 비장 세포 배양 검정에서의 CpG 디뉴클레오티드 모티프를 함유하는 모 올리고뉴클레오티드1, RpG 디뉴클레오티드 모티프를 함유하는 올리고뉴클레오티드2, 및 GpR 디뉴클레오티드 모티프를 함유하는 대조 올리고뉴클레오티드3의 면역 자극 활성. 모든 서열은 마우스-특이적 면역자극성 모티프(GACGTT)를 함유한다



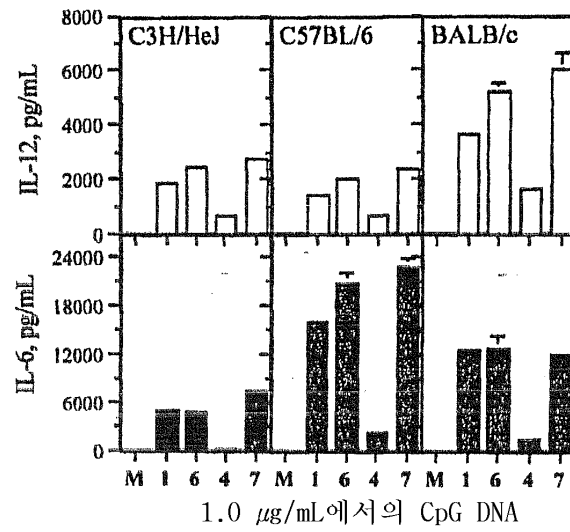
도면26

마우스 비장 세포 배양 검정에서의 CpG 디뉴클레오티드 모티프를 함유하는 모 올리고뉴클레오티드4 및 RpG 디뉴클레오티드 모티프를 함유하는 올리고뉴클레오티드5의 면역 자극 활성. 모든 서열은 인간-특이적 면역자극성 모티프(GTCGTT)를 함유한다



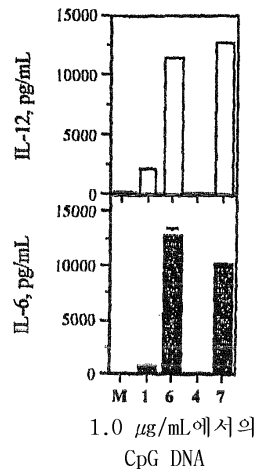
도면27

마우스 비장 세포 배양 검정에서의 CpG 디뉴클레오타이드 모티프를 함유하는 모 올리고뉴클레오타이드 1 및 4, 및 RpG 디뉴클레오타이드 모티프를 함유하는 이류노머 6 및 7의 면역 자극 활성. 서열 1 및 6은 마우스-특이적 면역자극성 모티프(GACGTT)를 함유하고 서열 4 및 7은 인간-특이적 면역자극성 모티프(GTCGTT)를 함유한다.



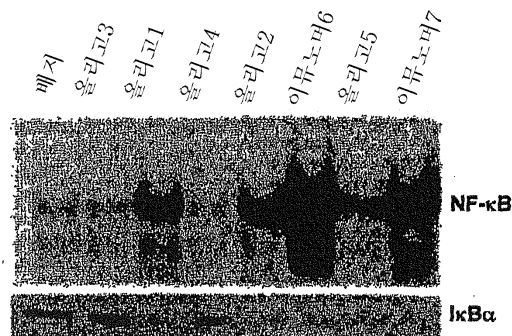
도면28

J774, 마크로파지-유사 세포 배양 검증에서의 CpG 디뉴클레오티드 모티프를 함유하는 모 올리고뉴클레오티드 1 및 4, 및 RpG 디뉴클레오티드 모티프를 함유하는 이뮤노머 6 및 7의 면역자극 활성. 서열 1 및 6은 마우스-특이적 면역자극 모티프(GACGTT)를 함유하고, 서열 4 및 7은 인간-특이적 면역자극 모티프(GTCGTT)를 함유한다



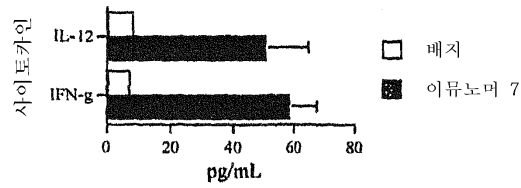
도면29

모 올리고뉴클레오티드 1-7의 면역자극 활성의 척도로서의 J774 세포에서의 IκBα의 분해 및 NF-κB의 활성



도면30

10 μ g/mL 농도에서의 이뮤노머 7 인간 PBMC 배양물(제공자)의 면역자극 활성



서열목록

SEQUENCE LISTING

- <110> AGRAWAL, SUDHIR
BHAGAT, LAKSHMI
WESTBORO, DONG YU
KANDIMALLA, EKAMBAR R.

- <120> MODULATION OF IMMUNOSTIMULATORY PROPERTIES OF
OLIGONUCLEOTIDE-BASED COMPOUNDS BY UTILIZING MODIFIED
IMMUNOSTIMULATORY DINUCLEOTIDES

- <130> HYB-018US1

- <140> 10/757,345
- <141> 2004-01-05

- <150> 60/440,587
- <151> 2003-01-16

- <160> 192

- <170> PatentIn Ver. 3.2

- <210> 1
- <211> 16
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

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

<400> 1
gagaacgctc gacctt 16

<210> 2
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 2
gagaacgctc gacctt 16

<210> 3
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 3
gagaacgctc gacctt 16

<210> 4
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 4
ctatctgacg ttctctgt 18

<210> 5

<211> 13
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

<400> 5
 tgacgttctc tgt 13

<210> 6
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

<400> 6
 tgacgttctc tgt 13

<210> 7
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

<400> 7
 ctatctgacg ttctctgt 18

<210> 8
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 8
ctatctgacg ttctctgt 18

<210> 9
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<220>
<221> modified_base
<222> (9)
<223> 50HdC

<400> 9
ctatctgang ttctctgt 18

<210> 10
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<220>
<221> modified_base
<222> (10)
<223> 7-deaza-dG

<400> 10
ctatctgaen ttctctgt 18

<210> 11
<211> 14
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<220>

<221> modified_base

<222> (5)

<223> 5HdC

<400> 11

ctgangttct ctgt

14

<210> 12

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<220>

<221> modified_base

<222> (6)

<223> 7-deaza-dG

<400> 12

ctgacnttct ctgt

14

<210> 13

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 13

ctgacgttct ctgt

14

<210> 14
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

<400> 14
 ctgacgttct ctgt 14

<210> 15
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

<220>
 <221> modified_base
 <222> (5)
 <223> 50HdC

<400> 15
 ctgangttct ctgt 14

<210> 16
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

<220>
 <221> modified_base
 <222> (6)
 <223> 7-deaza-dG

<400> 16
ctgacnttct ctgt 14

<210> 17
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(2)
<223> 1',2'-dideoxyriboside

<400> 17
nntgacgttc tctgt 15

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

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

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(3)
<223> 1',2'-dideoxyriboside

<400> 18
nnntgacgtt ctctgt 16

<210> 19
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(3)
 <223> 1',2'-dideoxyriboside

<220>
 <221> modified_base
 <222> (7)
 <223> 5HdC

<400> 19
 nnntgangtt ctctgt 16

<210> 20
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(3)
 <223> 1',2'-dideoxyriboside

<220>
 <221> modified_base
 <222> (8)
 <223> 7-deaza-dG

<400> 20
 nnntgacntt ctctgt 16

<210> 21
 <211> 11
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 21

tctgacgttc t

11

<210> 22

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<220>

<221> modified_base

<222> (1)..(3)

<223> 1',2'-dideoxyriboside

<400> 22

nnntctgacg ttct

14

<210> 23

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<220>

<221> modified_base

<222> (1)..(3)

<223> 1',2'-dideoxyriboside

<220>

<221> modified_base

<222> (9)

<223> 50HdC

<400> 23

nnntctgang ttct

14

<210> 24

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<220>

<221> modified_base

<222> (1)..(3)

<223> 1',2'-dideoxyriboside

<220>

<221> modified_base

<222> (10)

<223> 7-deaza-dG

<400> 24

nnntctgacn ttct

14

<210> 25

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 25

ctatctgtcg ttctctgt

18

<210> 26

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<220>

<221> modified_base

<222> (7)

<223> 7-deaza-dG

<400> 26

tctgtcgttc t

11

<210> 27

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<220>

<221> modified_base

<222> (7)

<223> AraG

<400> 27

tctgtcnttc t

11

<210> 28

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<220>

<221> modified_base

<222> (6)

<223> AraC

<220>

<221> modified_base

<222> (7)

<223> AraG

<400> 28

tctgtmnttc t

11

<210> 29

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<220>

<221> modified_base

<222> (1)..(2)

<223> 1',2'-dideoxyriboside

<220>

<221> modified_base

<222> (9)

<223> 7-deaza-dG

<400> 29

nntctgtcnt tct

13

<210> 30

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<220>

<221> modified_base

<222> (6)

<223> AraG

<400> 30

ctgtcnttct ctgt

14

<210> 31

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<220>

<221> modified_base

<222> (5)

<223> AraC

<220>

<221> modified_base

<222> (6)

<223> AraG

<400> 31

ctgtnttct ctgt

14

<210> 32

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<220>

<221> modified_base

<222> (7)

<223> 7-deaza-dG

<400> 32

tctgacnttc t

11

<210> 33
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(2)
 <223> 1',2'-dideoxyriboside

<220>
 <221> modified_base
 <222> (9)
 <223> 7-deaza-dG

<400> 33
 nntctgacnt tct 13

<210> 34
 <211> 11
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

<220>
 <221> modified_base
 <222> (7)
 <223> AraG

<400> 34
 tctgacnttc t 11

<210> 35
 <211> 11
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<220>

<221> modified_base

<222> (6)

<223> AraC

<220>

<221> modified_base

<222> (7)

<223> AraG

<400> 35

tctgannttc t

11

<210> 36

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<220>

<221> modified_base

<222> (5)

<223> AraC

<400> 36

ctgangttct ctgt

14

<210> 37

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220>

<221> modified_base

<222> (6)

<223> AraG

<400> 37

ctgacnttct ctgt

14

<210> 38

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<220>

<221> modified_base

<222> (5)

<223> AraC

<220>

<221> modified_base

<222> (6)

<223> AraG

<400> 38

ctgannttct ctgt

14

<210> 39

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 39

ctatctgacg ttctctgt

18

<210> 40
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

<400> 40
 ctgacgttct ctgt 14

<210> 41
 <211> 11
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

<400> 41
 tctgacgttc t 11

<210> 42
 <211> 8
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

<400> 42
 gacgttct 8

<210> 43
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 43

ctatctgtcg ttctctgt

18

<210> 44

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 44

ctgtcgttct ctgt

14

<210> 45

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 45

ctgtcgttct ct

12

<210> 46

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 46

tctgtcgttc t 11

<210> 47
 <211> 8
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

<400> 47
 gtcgttct 8

<210> 48
 <211> 7
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

<400> 48
 gtcgttc 7

<210> 49
 <211> 6
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

<400> 49
 gtcgtt 6

<210> 50
 <211> 5
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 50

tcgtt

5

<210> 51

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 51

ctcactttcg ttctctgt

18

<210> 52

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 52

ctcactttcg ttctctgt

18

<210> 53

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 53
ctttcgttct ctgt 14

<210> 54
<211> 12
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 54
ctttcgttct ct 12

<210> 55
<211> 8
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 55
ttcgttct 8

<210> 56
<211> 7
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 56
tcgttct 7

<210> 57
<211> 11
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<220>

<221> modified_base

<222> (6)

<223> 50HdC

<400> 57

tctttngttc t

11

<210> 58

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<220>

<221> modified_base

<222> (7)

<223> 7-deaza-dG

<400> 58

tctttcnttc t

11

<210> 59

<211> 8

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<220>

<221> modified_base

<222> (3)

<223> 50HdC

<400> 59

ttngttct

8

<210> 60

<211> 8

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<220>

<221> modified_base

<222> (4)

<223> 7-deaza-dG

<400> 60

ttcnttct

8

<210> 61

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<220>

<221> modified_base

<222> (6)

<223> 50HdC

<400> 61

tctgtngttc t

11

<210> 62

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<220>

<221> modified_base

<222> (7)

<223> 7-deaza-dG

<400> 62

tctgtcnttc t

11

<210> 63

<211> 8

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<220>

<221> modified_base

<222> (3)

<223> 5OHdC

<400> 63

gtngttct

8

<210> 64

<211> 8

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<220>

<221> modified_base

<222> (4)

<223> 7-deaza-dG

<400> 64
gtcnttct

8

<210> 65
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<220>
<221> modified_base
<222> (9)
<223> 50HdC

<400> 65
ctatctgang ttctctgt

18

<210> 66
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<220>
<221> modified_base
<222> (10)
<223> 7-deaza-dG

<400> 66
ctatctgaen ttctctgt

18

<210> 67
<211> 14
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<220>

<221> modified_base

<222> (5)

<223> 50HdC

<400> 67

ctgangttct ctgt

14

<210> 68

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<220>

<221> modified_base

<222> (6)

<223> 7-deaza-dG

<400> 68

ctgacnttct ctgt

14

<210> 69

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<220>

<221> modified_base

<222> (6)

<223> 50HdC

<400> 69

tctgangttc t

11

<210> 70

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<220>

<221> modified_base

<222> (7)

<223> 7-deaza-dG

<400> 70

tctgacnttc t

11

<210> 71

<211> 8

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<220>

<221> modified_base

<222> (3)

<223> 50HdC

<400> 71

gangttct

8

<210> 72

<211> 8

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<220>

<221> modified_base

<222> (4)

<223> 7-deaza-dG

<400> 72

gacnttct

8

<210> 73

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 73

ctgacgttct

10

<210> 74

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 74

ctgacgttct

10

<210> 75

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 75
 ctgacgttct 10

<210> 76
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

<400> 76
 ctgacgttct 10

<210> 77
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

<400> 77
 ctgacgttct 10

<210> 78
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

<400> 78

ctgacgttct 10

<210> 79
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

<400> 79
 ctgacgttct 10

<210> 80
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

<400> 80
 ctgacgttct 10

<210> 81
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

<400> 81
 ctgacgttct 10

<210> 82
 <211> 10
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 82

ctgacgttct

10

<210> 83

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 83

ctgacgttct

10

<210> 84

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 84

ctgacgttct ctgt

14

<210> 85

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 85
ctgacgttct ctgt 14

<210> 86
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 86
ctgtcgttct ctgtctgtcg ttctctgt 28

<210> 87
<211> 14
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 87
ctgtcgttct ctgt 14

<210> 88
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(2)
<223> 2,-OMe-ribonucleoside

<220>
<221> modified_base

<222> (16)..(17)

<223> 2,-OMe-ribonucleoside

<400> 88

nntgtcgttc tctgtmntgt cgttctctgt

30

<210> 89

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 89

tccatgacgt tcctgatgc

19

<210> 90

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 90

tccatgacgt tcctgatgc

19

<210> 91

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 91

tccatgacgt tcctgatgc

19

<210> 92
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 92
tccatgacgt tcctgatgc 19

<210> 93
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 93
tccatgacgt tcctgatgc 19

<210> 94
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 94
tccatgacgt tcctgatgc 19

<210> 95
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 95
 tccatgacgt tcctgatgc 19

<210> 96
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

<400> 96
 tccatgacgt tcctgatgc 19

<210> 97
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

<400> 97
 tccatgacgt tcctgatgc 19

<210> 98
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

<400> 98
 tccatgacgt tcctgatgc 19

<210> 99
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 99
tccatgacgt tcctgatgc 19

<210> 100
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 100
tccatgacgt tcctgatgc 19

<210> 101
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 101
tccatgacgt tcctgatgc 19

<210> 102
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 102

cctactagcg ttctcatc

18

<210> 103

<400> 103

000

<210> 104

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 104

gcgttctcat c

11

<210> 105

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 105

tagcgttctc atc

13

<210> 106

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 106

tagcgttctc atc

13

<210> 107

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 107

tactagcgtt ctcac

16

<210> 108

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 108

cctactagcg t

11

<210> 109

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 109
 cctactagcg ttc 13

<210> 110
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

<400> 110
 cctactagcg ttc 13

<210> 111
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

<400> 111
 ctagcgttct catc 14

<210> 112
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

<400> 112
 cctactagcg ttc 13

<210> 113
 <211> 14
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 113

ctagcgttct catc

14

<210> 114

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 114

cctactagcg ttc

13

<210> 115

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 115

tgacgttctc tgt

13

<210> 116

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 116
ctgacgttct ctgt 14

<210> 117
<211> 10
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 117
cgttctctgt 10

<210> 118
<211> 12
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 118
gacgttctct gt 12

<210> 119
<211> 14
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 119
ctgacgttct ctgt 14

<210> 120
<211> 13
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
oligonucleotide

<400> 118

gacgttctct gt

12

<210> 119

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 119

ctgacgttct ctgt

14

<210> 120

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 120

tgacgttctc tgt

13

<210> 121

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 121
 tgacgttctc tgt 13

<210> 122
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

<400> 122
 tgacgttctc tgt 13

<210> 123
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

<400> 123
 tgacgttctc tgt 13

<210> 124
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

<400> 124
 tgacgttctc tgt 13

<210> 125
 <211> 13
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 125

tgacgttctc tgt

13

<210> 126

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 126

ctgacgttct ctgt

14

<210> 127

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 127

tgacgttctc tgt

13

<210> 128

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 128
 tgacgttctc tgt 13

<210> 129
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

<400> 129
 tgacgttctc tgt 13

<210> 130
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

<400> 130
 ctgacgttct ctgt 14

<210> 131
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

<400> 131
 tgacgttctc tgt 13

<210> 132
 <211> 13
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 132

tgacgttctc tgt

13

<210> 133

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 133

tgacgttctc tgt

13

<210> 134

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 134

ctgacgttct ctgt

14

<210> 135

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 135
 tgacgttctc tgt 13

<210> 136
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

<400> 136
 tgacgttctc tgt 13

<210> 137
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

<400> 137
 ctgacgttct ctgt 14

<210> 138
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

<400> 138
 ctatctgacg ttc 13

<210> 139
 <211> 14
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 139

ctgacgttct ctgt

14

<210> 140

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 140

ctatctgacg ttc

13

<210> 141

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 141

cgttctctgt

10

<210> 142

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 142
acgttctctg t 11

<210> 143
<211> 12
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 143
gacgttctct gt 12

<210> 144
<211> 13
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 144
tgacgttctc tgt 13

<210> 145
<211> 14
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 145
ctgacgttct ctgt 14

<210> 146
<211> 10
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 146
ctatctgacg

10

<210> 147

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 147
ctatctgacg t

11

<210> 148

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 148
ctatctgacg tt

12

<210> 149

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 149
ctatctgacg ttc 13

<210> 150
<211> 10
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 150
cgttctctgt 10

<210> 151
<211> 11
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 151
acgttctctg t 11

<210> 152
<211> 14
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 152
ctgacgttct ctgt 14

<210> 153
<211> 11
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 153

ctatctgacg t

11

<210> 154

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 154

ctatctgacg ttc

13

<210> 155

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 155

ctatctgacg ttctctgt

18

<210> 156

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 156
ctgacgttct ctgt 14

<210> 157
<211> 14
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 157
ctgacgttct ctgt 14

<210> 158
<211> 11
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 158
tctgacgttc t 11

<210> 159
<211> 11
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 159
tctgtcgttc t 11

<210> 160
<211> 6
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 160

tcgttg

6

<210> 161

<211> 6

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 161

tcgttg

6

<210> 162

<211> 6

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 162

tcgttg

6

<210> 163

<211> 5

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 163
tcggtt 5

<210> 164
<211> 6
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 164
acgttg 6

<210> 165
<211> 6
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 165
gcgttg 6

<210> 166
<211> 6
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<400> 166
ccgttg 6

<210> 167
<211> 6
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 167

gtcgtt

6

<210> 168

<211> 6

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 168

tgtcgt

6

<210> 169

<211> 6

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 169

tcgttg

6

<210> 170

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<220>
 <221> modified_base
 <222> (6)
 <223> 1-(2'-deoxy-beta-D-ribofuranosyl)-2-oxo-7-deaza-8-methylpurine

<400> 170
 tctgtngttc t 11

<210> 171
 <211> 11
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

<220>
 <221> modified_base
 <222> (6)
 <223> AraG

<400> 171
 ctgtcnttct c 11

<210> 172
 <211> 11
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

<220>
 <221> modified_base
 <222> (3)
 <223> 7-deaza-dG

<220>
 <221> modified_base
 <222> (6)
 <223> 7-deaza-dG

<400> 172
tcntcttct g 11

<210> 173
<211> 11
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<220>
<221> modified_base
<222> (7)
<223> AraG

<400> 173
tctgtcttc t 11

<210> 174
<211> 11
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<220>
<221> modified_base
<222> (6)
<223> AraC

<400> 174
tctgtngttc t 11

<210> 175
<211> 11
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<220>
 <221> modified_base
 <222> (6)
 <223> 2'-deoxy-5-hydroxycytidine

<400> 175
 tctgtngttc t 11

<210> 176
 <211> 11
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

<220>
 <221> modified_base
 <222> (6)
 <223> 7-deaza-dG

<400> 176
 ctgtcnttct c 11

<210> 177
 <211> 11
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

<220>
 <221> modified_base
 <222> (5)
 <223> 1-(2'-deoxy-beta-D-ribofuranosyl)-2-oxo-7-deaza-8-

methylpurine

<400> 177
ctgtngttct c 11

<210> 178
<211> 11
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<220>
<221> modified_base
<222> (5)
<223> AraC

<400> 178
ctgtngttct c 11

<210> 179
<211> 11
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

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

<220>
<221> modified_base
<222> (5)
<223> 2'-deoxy-5-hydroxycytidine

<400> 179
ctgtngttct c 11

<210> 180
<211> 11
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<220>

<221> modified_base

<222> (3)

<223> AraG

<220>

<221> modified_base

<222> (6)

<223> AraG

<400> 180

tcntcnttct g

11

<210> 181

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<220>

<221> modified_base

<222> (2)

<223> 1-(2'-deoxy-beta-D-ribofuranosyl)-2-oxo-7-deaza-8-methylpurine

<220>

<221> modified_base

<222> (5)

<223> 1-(2'-deoxy-beta-D-ribofuranosyl)-2-oxo-7-deaza-8-methylpurine

<400> 181

tngtngttct g

11

<210> 182

<211> 11
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

<220>
 <221> modified_base
 <222> (2)
 <223> AraC

<220>
 <221> modified_base
 <222> (5)
 <223> AraC

<400> 182
 tngtngttct g 11

<210> 183
 <211> 11
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

<220>
 <221> modified_base
 <222> (2)
 <223> 2'-deoxy-5-hydroxycytidine

<220>
 <221> modified_base
 <222> (5)
 <223> 2'-deoxy-5-hydroxycytidine

<400> 183
 tngtngttct g 11

<210> 184

<211> 11
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

<220>
 <221> modified_base
 <222> (2)
 <223> May be 2'-deoxycytidine, 1-(2'-deoxy-beta-D-ribofuranosyl)-2-oxo-7-deaza-8-methylpurine, AraC, or 2'-deoxy-5-hydroxycytidine

<220>
 <221> modified_base
 <222> (3)
 <223> May be 2'-deoxyguanosine, 7-deaza-dG or AraG

<220>
 <221> modified_base
 <222> (5)
 <223> May be 2'-deoxycytidine, 1-(2'-deoxy-beta-D-ribofuranosyl)-2-oxo-7-deaza-8-methylpurine, AraC, or 2'-deoxy-5-hydroxycytidine

<220>
 <221> modified_base
 <222> (6)
 <223> May be 2'-deoxyguanosine, 7-deaza-dG or AraG

<400> 184
 tntntttct g

11

<210> 185
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

<220>
 <221> modified_base

<222> (2)
 <223> 7-deaza-dG

<220>
 <221> modified_base
 <222> (5)
 <223> 7-deaza-dG

<400> 185
 tinctcttg

9

<210> 186
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

<400> 186
 ccatgacgtt cctgatg

17

<210> 187
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

<400> 187
 tccatgacgt tcctgatg

18

<210> 188
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 188
 ccatgacggtt cctgatgc 18

<210> 189
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

<220>
 <221> modified_base
 <222> (9)
 <223> 7-deaza-dG

<400> 189
 ctatctgang ttctctgt 18

<210> 190
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

<220>
 <221> modified_base
 <222> (9)
 <223> 7-deaza-dG

<400> 190
 ctatctgtng ttctctgt 18

<210> 191
 <211> 11
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<220>

<221> modified_base

<222> (6)

<223> 7-deaza-dG

<400> 191

tctgangttc t

11

<210> 192

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<220>

<221> modified_base

<222> (6)

<223> 7-deaza-dG

<400> 192

tctgtngttc t

11