

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁸

A61K 31/7125 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2006-0012005

(43) 공개일자 2006년02월06일

(21) 출원번호 10-2005-7021797

(22) 출원일자 2005년11월15일

번역문 제출일자 2005년11월15일

(86) 국제출원번호 PCT/JP2004/006793

(87) 국제공개번호 WO 2004/100965

국제출원일자 2004년05월13일

국제공개일자 2004년11월25일

(30) 우선권주장 JP-P-2003-00136876 2003년05월15일 일본(JP)

(71) 출원인 도꾸리쓰교세이호정 가가꾸 기쥬쓰 신키 기꼬
일본 사이따마켄 가와구찌시 혼쵸 4쵸메 1방 8고
미즈이 세이토 가부시키키가이샤
일본 도쿄도 주오쿠 니혼바시혼쵸 2쵸메 8반 2고

(72) 발명자 신카이 세이지
일본국 후쿠오카켄 후쿠오카시 히가시구 미토마 2-13-17
미즈 마사미
일본국 오사카후 사카이시 나카차야 74-10
사쿠라이 가즈오
일본국 효고켄 히메지시 니시신마치 117-7
고우모토 가즈야
일본국 후쿠오카켄 기타큐슈시 야와타니시구 로우가오카8-11
누마타 무네노리
일본국 후쿠오카켄 후쿠오카시 히가시구 마즈자키 3-13-7
마쓰모토 다카히로
일본국 후쿠오카켄 후쿠오카시 히가시구 하코마쓰3-13-17-101

(74) 대리인 유미특허법인

심사청구 : 없음

(54) 면역자극제

요약

본 발명은 면역자극성 올리고뉴클레오티드와 안정성이 높으며, 전달이입의 효율이 높은 전달체의 복합체인, 신규한 유형의 면역자극제에 관한 것이다. 면역자극성 올리고뉴클레오티드 및 면β-1,3-결합을 갖는 폴리사카리드(바람직하게는 β-1,3-글루칸 예컨대 시조피란)을 포함하는 복합체를 형성하여, 이를 면역자극제로서 투여한다. 면역자극성 올리고뉴클레오티드의 바람직한 예는 비메틸화 CpG 모티브를 포함한다. 폴리사카리드는 핵산-결합성 및/또는 세포친화성 관능기로 변형되는 것이 바람직하다.

대표도

도 1

색인어

면역자극제, 면역자극성 올리고뉴클레오티드, 비메틸화 CpG 모티브

명세서

기술분야

본 발명은, 면역자극제(Immunostimulant : 면역부활제(賦活劑) 또는 면역촉진제 등으로도 불림) 기술 분야에 속하여, 특히, 면역자극성 올리고뉴클레오티드를, 신규 전달이입(transfection)제와 복합체화하여 수득되는 안전하고 효능이 뛰어난 면역자극제의 제공에 관한 것이다.

배경기술

면역반응 자극 활성을 가지는 올리고뉴클레오티드(이하, 면역자극성 올리고뉴클레오티드, 면역자극성 핵산 또는 면역자극성 DNA라고 기술하는 경우가 있다)는, 1984년에 Tokunaga등에 의해 BCG의 항종양 성분을 검색하는 과정에서 발견되었다. 그리고, 상기 활성 작용이 사이토신-구아닌 디뉴클레오티드(5'-CpG-3' : 소위 CpG 서열)를 포함하는 특정한 염기서열에 기인한다는 것이 밝혀졌다(Tokunaga, T., et al., J. Natl. Cancer Inst., 72, 955(1984)(비특허 문헌 1) ; Tokunaga, T., et al., J. Natl. Cancer Res., 79, 682(1988)(비특허 문헌 2).

척추동물 또는 식물 이외의, CpG 서열을 가지는 게놈 DNA에서도 마찬가지로의 활성이 인정되고 있다. 면역자극 활성에는 CpG 코어의 전후 서열도 중요한 것으로 생각되며, 특히, 메틸화되지 않은 CpG와, 그 전후에 위치한 치환된 퓨린(Pu)과 치환된 피리미딘(Py) 서열을 갖는 5'-PuPuCpGPyPy-3'가, 대표적인 비-메틸화 CpG 모티브로서 중요한 것으로 의견이 일치되고 있다(Krieg, A., et al., Nature, 374, 576(1995)(비특허 문헌 3). 여기에서, 비-메틸화 CpG 모티브란, 잘 알려져 있는 바와 같이, 적어도 1개의 사이토신(C)-구아닌(G) 서열을 포함하는 짧은 뉴클레오티드 서열(일반적으로는 4~10개의 뉴클레오티드로 이루어지는 서열)로서, 상기 사이토신-구아닌 서열에 있어서의 사이토신의 C-5위치가 메틸화되어 있지 않은 것을 지칭한다. 그리고, 이하의 설명에 있어서, CpG란, 특히 언급하지 않으면, 비메틸화 CpG를 의미하는 것이다.

유용한 CpG 모티브(핵사머)의 예를 이하에 기재한다(단, A : 아데닌, G : 구아닌, C : 사이토신, T : 티민, U : 우라실).

AACGTT, AGCGTT, GACGTT, GGCGTT, AACGTC, AGCGTC, GACGTC, GGCGTC, AACGCC, AGCGCC, GACGCC, GGCGCC, AACGCT, AGCGCT, GACGCT, 및 GGCGCT

이들 서열을 포함하는 8~100개 정도로 구성되는 올리고뉴클레오티드가 면역자극 활성을 갖는다(일본국 특표 2001-503254(특허 문헌 1).

이하의 서열은, NK세포의 활성화에 효과가 있는 것으로 보고된 CpG 모티브를 포함하는 면역자극성 올리고뉴클레오티드의 예이다 (밑줄친 부분이 CpG 모티브를 나타내고, 또, 대문자는 티올화 DNA를 나타낸다)(이호 스미코, 야마모토 사부로, Annual Review immunology 2001,137-146(2002)(비특허 문헌 4).

accgataaccggtgccggtgacggcaccacg

accgatagcgctgccggtgacggcaccacg

accgatgacgtcgccggtgacggcaccacg

accgattcgcgagccggtgacggcaccacg

ggggggggggggcgatcggggggggggggg

gggggggggggacgatcgtcgggggggggg

ggggggggggggaacgttgggggggggggg

GAGAACGCTCGACCTTCGAT

TCCATGACGTTTCCTGATGCT

TCTCCCAGCGTGCGCCAT

GGggtcaacgttgaGGGGGg

CpG 모티브 이외에도, 면역자극성 핵산으로서 알려져 있는 몇 개의 서열이 있다. 예를 들면, 5'TTTT 3'와 같이 티미딘이 풍부한 T-리치 핵산, 5'GGGG 3'와 같이 구아니딘이 풍부한 G 리치 핵산, 티미딘과 구아니딘이 모두 풍부한 TG-리치 핵산, 시티딘이 풍부한 C-리치 핵산 등이 비-CpG 면역자극성 핵산으로서 최근 주목받고 있다(일본국 특표 평 08-500738(특허 문헌 2) ; 일본국 특표 2002-512599(특허 문헌 3) ; 일본국 특표 2003-510282(특허 문헌 4) ; 일본국 특표 2003-510290(특허 문헌 5).

이들 면역자극성 핵산의 면역계 세포에 대한 효과의 큰 특징은, 항원 제시 세포를 활성화하는 것이다. 마우스나 사람의 단핵구, 대식세포, 수지상 세포 등에 직접 작용하여, 면역력 증강 작용을 가지는 IL-6, TNF- α , IL-12, IFN α / β , IL-18, 일산화 질소 등의 사이토카인을 생성하게 한다

면역질환에 대한 치료용 핵산 및 DNA 백신 조성물에 관한 특허 출원이, 최근, 증가하고 있다. 예를 들면, 더 유니버시티 오브 아이오와 리서치 파운데이션의 출원은, 바이러스, 세균, 진균류 또는 기생충의 감염에 의한 면역계 부전이나, 암에 걸려 있는 사람 또는 동물의 치료, 리포다당류나 엔도톡신의 방출로 인하여 극도로 약해진 대상체를 위한 치료를 위한 용도 또는 아췌반트 용으로서의 다수의 CpG 모티브계 서열을 제안하고 있다(일본국 특표 평 10-506265(특허 문헌 6) ; 일본국 특표 2001-503267(특허 문헌 7) ; 일본국 특표 2001-513776(특허 문헌 8).

CpG 모티브를 DNA 백신에 사용하는 특허 출원에는 어패류에 관한 것도 있다(일본국 특개평 9-285291(특허 문헌 9).

마찬가지로, 동물의 파르보바이러스의 감염 예방을 목적으로 하는 것도 있다(일본국 특표 2000-509976(특허 문헌 10).

또, 특허 문헌 1, 11 및 12등에는 면역자극 활성을 갖는 유사한 서열이 다수 기재되어 있다(일본국 특표 2002-517156(특허 문헌 11) ; 일본국 특표 2002-526425(특허 문헌 12).

안티센스 DNA를 사용하는 유전자 치료의 경우와 마찬가지로, 면역자극성 올리고뉴클레오티드의 인산 골격은, 뉴클레아제 내성화를 위해, 포스포디에스테르결합 부분이 포스포로티오에이트 결합으로 변형되어 있는 예가 많다. 또, 면역자극성 올리고뉴클레오티드의 세포와의 친화성을 높이는 목적으로 리포솜, 양이온 지방질, 콜레스테롤 등의 전달이입제를 병용하는 예도 많이 볼 수 있다.

유전자 치료의 경우, 안티센스 DNA의 전달이입제로서는, 초기에는 RNA 종양 바이러스 또는 아데노바이러스가 시험관내 실험에서는 우수한 결과를 나타냈지만, 이들 천연 유래 바이러스의 염증성, 면역원성 성질, 및 돌연변이 유발 및 세포 계능으로의 삽입의 위험성으로 인하여, 이들의 생체내 사용이 제한되었다(Mulligan, Science, 260, 926-932(1993)(비특허 문헌 5) ; Miller, Nature, 357, 455-460(1992)(비특허 문헌 6) ; Crystal, Science, 270, 404-410(1995)(비특허 문헌 7).

천연 유래 유전자를 위한 전달이입제의 대체물로서 바이러스류보다 취급이 용이하며, 고효율로 세포에 DNA를 확실하게 전달하는 것이 가능한 인공 재료의 비바이러스계 전달물질을 사용하는 것이 제시되었다(Tomlinson and Rolland, J. Contr. Rel., 39, 357-372(1996)(비특허 문헌 8).

현재, 비바이러스성 인공 전달물질로서 검토되고 있는 것은 폴리에틸렌이민(PEI)이다. 다수의 상이한 부착 세포 및 부유 세포에서 3차원성 분자구조의 양이온 폴리머인 PEI는, 어느 경우에는 평균 이상의 전달이입 효율을 가져왔다(Boussif et al., Gene Therapy, 3, 1074-1080(1996)(비특허 문헌 9).

또, PEI와 마찬가지로, 질소를 포함하는 치환기로 치환된, 각종 양이온성 폴리머, 양이온성 지질 등이 유전자 전달체, 전달이입제, 약물 담체 등의 명칭으로, 최근 다수의 특허가 출원되었다.

그러나, 현재 PEI와 같은 양이온성 폴리머의 안전성에 대하여는 거의 대부분이 확인되지 않은 상태이다. 양이온성을 부여하기 위해서는, 통상, 아미노기의 존재가 불가결하지만, 아미노기를 가지는 물질은 생리 활성이 높고, 체내 독성 등의 위험이 있을 수 있다. 사실, 지금까지 검토된 어떠한 양이온성 폴리머도 아직 실용화되지 못하였으며, 의약품 첨가물 사전(의약품 첨가물 사전(비특허 문헌 10); 일본 의약품 첨가제 협회 편집, 약사 일보사(비특허 문헌 11) 등에 기재되어 있지 않다.

한편, 근육내 주사 제제로 하여 임상약으로 실제로 사용되고 있는 다당류에는, β -1,3-글루칸이 있다. 상기 다당류는 예로부터 알려진 것으로 천연에서는 삼중 나선 구조를 취한다(Theresa M. McIntire and David A. Brant, J. Am. Chem. Soc., 120, 6909(1998)(비특허 문헌 12).

또한, 상기 다당류는, 이미 생체 내에서의 안전성이 확인되었으며, 여성암에 대한 면역증강을 위해 근육내 주사약으로서 20년 이상 사용되어 왔다(시미즈, 친, 짐 보고, 증언, Biotherapy, 4, 1390(1990) (비특허 문헌 13); 하세가와, Oncology and Chemotherapy, 8, 225(1992)(비특허 문헌 14).

이와 같은 β -1,3-글루칸을 DNA 등의 생체 재료와 콘주게이트하고, 유전자 전달체로서 사용할 수 있다는 것이 알려져 있다. 이 선행 기술에는, 천연 β -1,3-글루칸, 즉, 삼중 나선 구조를 가지는 β -1,3-글루칸을 그대로 사용하고, 이것과 생화학 활성 재료를 공유결합을 통하여 β -1,3-글루칸/생체 재료에 콘주게이트하는 방법이 기술되어 있다(PCT/US95/14800)(특허 문헌 13).

또, 최근, 본 발명자들에 의하여, β -1,3-결합을 주사술로 하는 다당류를 인공적으로 처리하여, 각종 핵산과 새로운 유형의 복합체를 형성하는 것이 발견되었다(PCT/JP00/07875(특허 문헌 14); PCT/JP02/02228(특허 문헌 14); 사쿠라이, 신카이, J. Am. Chem. Soc., 122, 4520(2000)(비특허 문헌 15); 키무라, 고모토, 사쿠라이, 신카이, Chem. Lett., 1242(2000)(비특허 문헌 16).

본 발명의 목적은, 면역자극성 올리고뉴클레오티드를, 안전하며 전달이입의 효과의 높은 전달체와 복합체를 형성하여 수득한 새로운 유형의 면역자극제를 제공하는 것이다.

발명의 상세한 설명

본 발명자는, β -1,3-결합을 보유하는 다당류를 전달체(전달이입제)로 사용함으로써 면역자극성 올리고뉴클레오티드의 작용을 높여, 면역력 증강이 뛰어난 안전한 면역자극제를 얻을 수 있다는 것을 발견하였다.

따라서, 본 발명은, 면역자극성 올리고뉴클레오티드와 β -1,3-결합을 가지는 다당류와의 복합체로 이루어지는 면역자극제를 제공한다.

본 발명에서는, 면역자극성 올리고뉴클레오티드를 주된 약제로 사용한다. 여기에서, 본 발명에서 사용되는 면역자극성 올리고뉴클레오티드란, 면역 반응을 자극해 면역력 증강 활성을 가지는 올리고뉴클레오티드를 일컫는 것이며, 상기 문헌에 기재되어 있는 것과 같은 각종 올리고뉴클레오티드를 예로 들 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 대상이 되는 면역자극성 올리고뉴클레오티드로서는, 상기 문헌에 기재되어 있는 것과 같은, 각종 비-메틸화 CpG 모티브를 포함하는 것이 바람직하며 이러한 것이 사용된다. 또한, 마찬가지로 예시한, 비-CpG 면역자극성 올리고뉴클레오티드(비-메틸화 CpG 모티브 이외의 면역자극성 올리고뉴클레오티드)도 사용할 수 있다. 비-CpG 면역자극성 올리고뉴클레오티드는, 단독 또는 CpG 모티브와 조합하여 사용된다. 투여되는 이들 올리고뉴클레오티드는 대식세포 등의 면역세포에 작용하여, 사이토카인의 방출 등을 통하여 면역력을 높이는 효과가 있다.

본 발명에서 사용하는 올리고뉴클레오티드의 인산 골격은, 뉴클레아제에 대한 내성을 위해, 통상, 주사술의 포스포디에스테르 결합 부분을 포스포로티오에이트 또는 포스포로디티오에이트로 변형하여 사용하지만, 포스포디에스테르 결합의 일부 또는 전부가 변형되지 않더라도 본 발명에 지장을 주지 않는다.

본 발명의 면역자극제는, 전술한 바와 같은 면역자극성 올리고뉴클레오티드와 β -1,3-결합을 가지는 다당류와의 복합체로부터 형성되고, 여기에서 상기 다당류가 전달이입제로 작용한다. 여기에서, 본 발명에서 사용되는 β -1,3-결합을 가지는

다당류로서 바람직한 것은, β -1,3-글루칸 또는 β -1,3-크실란이다. 그 중에서도, 시조피란, 레티난(lentinan), 스크레로글루칸, 커드란(curdran), 파키만, 그리프론(grifron), 또는 라미나란(laminaran)으로부터 선택되는 β -1,3-글루칸이 매우 적합하고, 특히, 시조피란, 레티난 또는 스크레로글리칸과 같이, 1,6-글루코피라노시드 분지를 많이 함유하는 (분지율 33~40%) β -1,3-글루칸이 바람직하다.

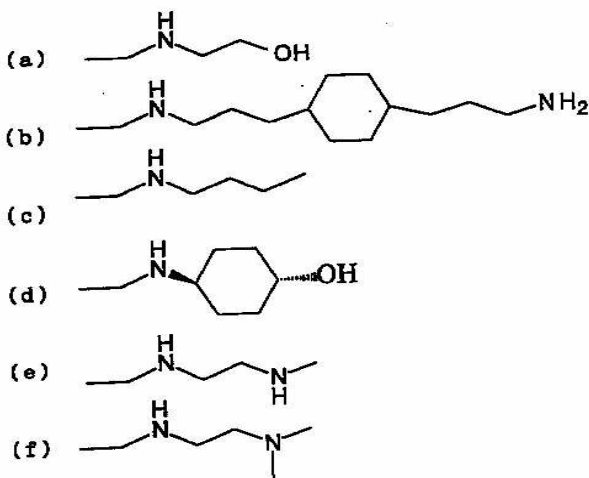
본 발명에서 사용되는 상기와 같은 다당류는, 천연 그 자체로도 사용 가능하지만, 핵산결합성 및/또는 세포친화성 관능기로 변형된 것이 전달이입 능력의 관점에서 적당하다. 여기에서, 핵산결합성이란, 핵산과 상호작용하여 다당류와 핵산과의 결합을 향상시키는 성질을 지칭한다. 또한, 세포친화성이란, 세포막 단백질이나 세포막 지방질(인 지방질)과 친화성이 있는 것을 지칭한다. 본 발명의 목적을 위해, 이와 같은 핵산 결합성 및 세포친화성 중 어느 한쪽 또는 양쪽의 성질을 갖도록 하기 위해, 관능기로 변형한 다당류를 사용하는 것이 바람직하다. 본 발명의 사용에 특히 바람직한 핵산결합성 및/또는 세포친화성 관능기의 예로서, 양이온성 관능기, 스테로이드성 관능기, 알칼리성 아미노산 관능기 및 펩티드성 관능기를 들 수 있다.

양이온성 관능기는 양전하를 갖는 관능기이며 (구체적인 예에 대하여는 후술하는 실시예 2 참조), 다당류에 양이온성 관능기를 부여함으로써, DNA나 RNA와 같은 핵산이 갖는 음전하와 전기적 상호작용에 의해 다당류와 핵산과의 결합을 높인다. 스테로이드성 관능기(구체적인 예에 대하여는 실시예 4 참조)는, 스테로이드 골격에 스페이서를 통하여 결합되어 있는 아미노기의 양전하로 인한 핵산 결합성 및 스테로이드 골격으로 인한 세포친화성 효과가 기대된다. 알칼리성 아미노산 관능기(구체 예에 대하여는 실시예 3 참조)는, 아미노산의 아미노기의 양전하로 인한 핵산결합성과 알칼리성 아미노산 잔기로 인한 세포친화성의 효과가 기대된다. 펩티드성 관능기란, 예를 들면, 후술하는 실시예 5~7에 나타낸 R8나 RGD와 같이, 주로 세포친화성에 의한 효과로 핵산의 전달이입 능력을 촉진하는 아미노산 서열을 포함하는 펩티드사슬이다. 다당류를 변형하여, 이상과 같은 핵산결합성 및/또는 세포친화성 관능기를 부여하는 방법으로서, 통상의 유기화학 방법을 사용하면 되지만, 일반적으로는, 다당류의 1,6-글루코피라노시드 분지를 과요오드산으로 산화한 후, 환원적 아미노화를 수행하여 해당하는 관능기를 결합시킨다 (도 1 참조). 상기 사항에 대하여는, 본 발명자들에 의한 PCT/JP02/02228(특허 문헌 15)에도 상세히 설명되어 있지만, 이하로 그 요지를 기재한다.

상술한 바와 같이, 본 발명의 면역자극제를 구성하는 변형된 다당류를 얻기 위해, 핵산결합성 관능기 및/또는 세포친화성 관능기를 다당류에 부여하기 위해, 일반적으로, 다당류의 1,6-글루코피라노시드 분지를 과요오드산으로 산화한 후, 환원적 아미노화를 행한다.

따라서, 본 발명에서 사용되는 변형된 다당류를 형성하는 핵산 결합성 관능기 및 세포친화성 관능기는, 환원적 아미노화가 적용되는 1급 아민, 2급 아민 또는 히드라진을 가지는 화합물 유래의 것이다.

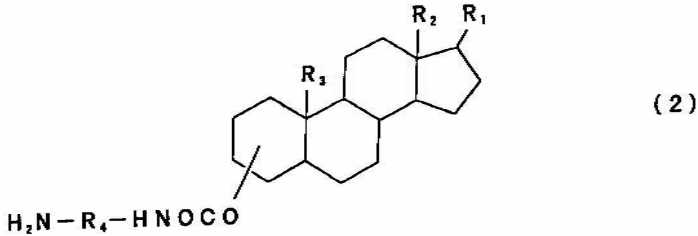
예를 들면, 본 발명의 사용에 바람직한 양이온성 관능기로는, 하기 나타낸 것과 같은 1급 또는 2급의 아미노기를 적어도 1개 이상 포함하는 직쇄형 또는 환형화합물 유래의 것이지만, 물론 이들로 한정되는 것은 아니다. 이들은, 시판중인 아미노기를 가지는 화합물보다 용이하게 합성할 수 있다.



도 1은, 핵산결합성 관능기로서, 양이온성 관능기(상기(a)로 나타낸 것)를 도입하는 경우를 예로 들어 본 발명에서 사용하는 양이온성으로 변형된 다당류를 얻는 방법을 나타낸다. 도면 중 (i)은 과요오드산에 의한 산화를 나타내고, (ii)는 시프염

기(Schiff base)의 형성을 나타내며, (iii)은 시프염기의 수소화붕소나트륨에 의한 환원을 나타낸다. 반응하지 않은 위치 3의 수산기를 포함하는 측쇄를 갖는 β-1,3-글루칸의 경우는, 2.X, 3.X, 4.X로 표시되는 반응물을 얻을 수 있다. 5에서 6은, 측쇄의 일부에 일어나는 상기 반응을 나타낸다.

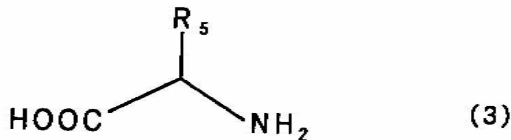
또한, 본 발명에 따라, 과요오드산에 의한 산화 및 뒤이은 환원적 아미노화에 의해 본 발명의 다당류의 분지에 부가되는 스테로이드성 관능기로서 바람직한 것은, 하기의 식(2)으로 표시되는 화합물과 같이, 스테로이드 골격을 가지며, 상기 스테로이드 골격에 스페이서를 통하여 아미노기가 결합되어 있는 구조로부터 유래하는 것이다.



여기에서, R₁, R₂, R₃는 수소, 또는 탄소, 산소, 질소 또는 수소를 포함하는 치환기이다. 또, R₄는 스페이서이며, 수소, 또는 탄소, 산소, 질소 또는 수소를 포함하는 환형 또는 직쇄형 화합물 유래이다. R₄가 스테로이드 골격에 결합하는 위치는 중요하지 않으며, 또, 그 외, 상기 일반식과 맞지 않는 스테로이드 골격을 가지는 것이라도 사용할 수 있다. 예를 들면, 코티코스테론, 코티솔의 유도체 등이다.

이와 같은 스테로이드성 관능기는, 스테로이드 고리에 부가된 수산기에 디아민을 결합시킨 후, 전술한 방법에 따라, 환원적 아미노화법으로, β-1,3-글루칸의 분지에 스테로이드성 관능기를 도입한다.

본 발명에서 사용되는 변형된 다당류를 얻기 위하여, 과요오드산으로의 산화와 환원적 아미노화에 의하여, 다당류의 분지에 도입되는 알칼리성 아미노산 관능기는 하기 일반식(3)으로 표현되는 아미노산 유래이다.



여기에서, R₅는 아미노산 측쇄이다. 상기 알칼리성 아미노산은, 카르복실기 및 측쇄를 보호한 후에, 다당류의 분지에 도입한다.

본 발명에 따라, 면역성 자극 올리고뉴클레오티드와 다당류의 복합체를 제조하기 위해서는, 본 발명자들에 의한 PCT/JP02/02228(특허 문헌 15)에 상세하게 기술되어 있는 방법에 따르는 것이 특히 바람직하다. 즉, 본래는, 천연 또는 수중에서 삼중 나선으로서 존재하는 β-1,3-글루칸 등의 다당류를, 극성 용매(예를 들면, 디메틸설폭시드)에 용해하여 1가닥의 사슬로 풀 후, 1가닥의 사슬에 핵산을 더하여, 용매를 다시 물로 교환하는 재생 과정에 의하여, 핵산 1가닥과 다당류 2가닥으로 이루어지는, 삼중 나선형 복합체를 형성하여 사용한다(후술하는 실시예 1 참조). 상기 복합체는, 1가닥의 뉴클레오티드 사슬과 2가닥의 다당류 사슬이 수소결합과 소수성 상호작용을 통하여 삼중 나선형으로 콘주게이트된, 비공유결합성의 복합체이다. 복합체는, 통상, 수용액으로서 얻어지므로, 한외여과법 등의 비교적 간단한 방법으로 필요한 순도로 정제된 후, 치료용으로 사용된다.

도면의 간단한 설명

도 1은, 양이온성 관능기를 도입하는 경우를 예로 하여, 본 발명에서 사용되는 변형된 다당류의 합성 방법의 예를 나타낸다.

도 2는, 본 발명에서 사용되는 펩티드 R8 및 RGD의 아미노산 서열을 나타낸다.

도 3은, 본 발명에서 사용되는 펩티드로 변형된 시조피란(R8-SPG 및 RGD-SPG) 합성 방법의 예를 나타낸다.

도 4는, 본 발명에 따른 면역자극제인 시조피란, 아미노기로 변형된 시조피란, 아르기닌으로 변형된 시조피란, 콜레스테롤로 변형된 시조피란, R8로 변형된 시조피란, 및 RGD로 변형된 시조피란 각각과 CpG DNA와의 복합체 형성을 나타낸 아가로스 겔 전기 영동 패턴을 나타낸다.

도 5는, 본 발명에 따른 면역자극제인, 시조피란 및 화학적으로 변형된 시조피란 각각과 복합체를 형성한 CpG DNA의 자극에 의한 마우스 유래 복강 내 대식세포로부터의 사이토카인 IL-12 합성량 증가 효과를 나타낸다.

도 6은, 본 발명에 따른 면역자극제인, 시조피란 및 화학적으로 변형된 시조피란 각각과 복합체를 형성한 비-CpG DNA(CpG 모티브를 포함하지 않는 올리고뉴클레오티드)에 의한 마우스 유래 복강 내 대식세포로부터의 사이토카인 IL-12 합성량 증가 효과를 나타낸다.

도 7은 본 발명에 따른 면역자극제인, 시조피란 및 화학적으로 변형된 시조피란 각각과 복합체를 형성한 CpG DNA의 자극에 의한 마우스 유래 복강 내 대식세포 유사세포인 J774.A1로부터의 사이토카인 IL-12 합성량 증가 효과를 나타낸다.

도 8은, 본 발명에 따른 면역자극제인, 시조피란 및 화학적으로 변형된 시조피란 각각과 복합체를 형성한 CpG DNA의 자극에 의한 마우스 유래 비장 세포로부터의 사이토카인 IL-6 합성량 증가 효과를 나타낸다.

도 9는, 본 발명에 따른 면역자극제인, 시조피란 및 화학적으로 변형된 시조피란 각각과 복합체를 형성한 CpG DNA의 자극에 의한 마우스 유래 비장 세포로부터의 사이토카인 IL-12 합성량 증가 효과를 나타낸다.

도 10은, 본 발명에 따른 면역자극제인, 시조피란 및 화학적으로 변형된 시조피란 각각과 복합체를 형성한 비-CpG DNA에 의한 마우스 유래 비장 세포로부터의 사이토카인 IL-6 합성량 증가 효과를 나타낸다.

도 11은, 본 발명에 따른 면역자극제인, 시조피란 및 화학적으로 변형된 시조피란 각각과 복합체를 형성한 비-CpG DNA에 의한 마우스 유래 비장 세포로부터의 사이토카인 IL-12 합성량 증가 효과를 나타낸다.

도 12는, 본 발명에 따른 면역자극제인, 시조피란 및 화학적으로 변형된 시조피란 각각과 복합체를 형성한 CpG DNA(PO)(포스포디에스테르 결합을 가지는 CpG DNA)의 자극에 의한 마우스 유래 비장 세포로부터의 사이토카인 IL-6 합성량 증가 효과를 나타낸다.

도 13은, 본 발명에 따른 면역자극제인, 시조피란 및 화학적으로 변형된 시조피란 각각과 복합체를 형성한 CpG DNA(PO)의 자극에 의한 마우스 유래 비장 세포로부터의 사이토카인 IL-12 합성량 증가 효과를 나타낸다.

도 14는, 본 발명에 따른 면역자극제인, 시조피란 및 화학적으로 변형된 시조피란 각각과 복합체를 형성한 비-CpG DNA(PO)(포스포디에스테르 결합을 가지나, CpG 모티브를 포함하지 않는 올리고뉴클레오티드)에 의한 마우스 유래 비장 세포로부터의 사이토카인 IL-6 합성량 증가 효과를 나타낸다.

도 15는, 본 발명에 따른 면역자극제인, 시조피란 및 화학적으로 변형된 시조피란 각각과 복합체를 형성한 비-CpG DNA(PO)에 의한 마우스 유래 비장 세포로부터의 사이토카인 IL-12 합성량 증가 효과를 나타낸다.

도 16은, 본 발명에 따른 면역자극제인, 시조피란 및 화학적으로 변형된 시조피란 각각과 복합체를 형성한 CpG DNA에 의한 마우스 유래 비장 세포로부터의 사이토카인 IL-4 합성량 증가 효과를 나타낸다.

도 17은, 본 발명에 따른 면역자극제인, 시조피란 및 화학적으로 변형된 시조피란 각각과 복합체를 형성한 CpG DNA(PO)에 의한 마우스 유래 비장 세포로부터의 사이토카인 IL-4 합성량 증가 효과를 나타낸다.

도 18은, 본 발명에 따르는 면역자극제의 시조피란 및 화학 변형된 시조피란과 복합체를 형성시킨 비-CpG DNA에 의한 마우스 유래 비장 세포로부터의 사이토카인 IL-4 합성량 증가 효과를 나타낸다.

도 19는, 본 발명에 따른 면역자극제인, 시조피란 및 화학적으로 변형된 시조피란 각각과 복합체를 형성한 비-CpG DNA(PO)에 의한 마우스 유래 비장 세포로부터의 사이토카인 IL-4 합성량 증가 효과를 나타낸다.

실시예

이하, 구체적인 면역자극제의 제조방법, 수득한 면역자극제의 특성분석 및 시험관내 테스트를 통한 투여 방법 및 측정과 관련하여, 본 발명의 특징을 상세하게 설명하지만, 본 발명의 범위가 이들 실시예로 제한되는 것은 아니다.

실시예 1

β-1,3-글루칸(시조피란) 및 비-메틸화 CpG 모티브를 포함하는 올리고뉴클레오티드(CpG DNA)의 복합체 형성에 의한 면역자극제의 제조.

삼중 나선 구조의 시조피란을 문헌에 기재된 정법에 따라 제조하였다. 즉, ATCC(American Type Culture Collection)로부터 입수한 Schizophyllum commune. Fries(ATCC 44200)를, 최소 배양배지를 사용하여 7일간 정치 배양한 후, 세포 성분 및 불용 찌꺼기를 원심분리하여 얻어진 상층액을 초음파 처리하여 분자량 45만의 삼중 나선 시조피란을 수득하였다. 이 시조피란을 디메틸설폭시드(이하, DMSO와 표기)에 용해하여 1가닥의 사슬로 만든 후, 30 mg/ml로 농도를 조정하고, 이 용액 1μl에, 3μl의 순수한 물, 1μl의 10 mM 트리스 완충액(pH7.8) 및 5μl의 3 mg/ml CpG DNA 용액을 혼합하였다. 얻어진 용액은 모두 투명하며, 균일하였다 (Gregory G. Martin, et al., Am. Chem. Soc. Polymer Prepr. 38(1), 253-254(1997); K. Tabata, et al., Carbohydr. Res., 89, 121-135(1981).

본 실시예에서 사용한 CpG 모티브를 포함하는 올리고뉴클레오티드(고상 합성)는, 염기서열 내에 한 위치에, 사이토신·구아닌 디뉴클레오티드(CpG) 서열을 포함하고, 포스포로티오에이트 결합을 갖고, 서열 TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT의 3' 말단에 40개의 dA이 결합된 서열번호 1의 서열로서 CpG DNA로 나타낸다 (Y. Aramaki, et al. Biol. Pharm. Bull., 25(3) 351-355(2002).

실시예 2

양이온성 유도체의 합성(아미노기 변형된 시조피란) 및 특성 규명

도 1의 절차에 따라, 양이온성 유도체(양이온성 관능기로 변형된 다당류)를 합성하였다. 아미노기의 도입률은 과요오드산에 의한 산화에 사용하는 과요오드산 나트륨의 당량수로 조절할 수 있다. 따라서, 모든 도입률에 있어서 합성법에 따른 차이는 생기지 않는다. 여기에서는, 시조피란에 4.6, 17, 20 및 36%의 아미노기를 도입한 양이온성으로 변형된 시조피란의 합성 예를 나타낸다. 또, 도입하는 아미노기로서 2-아미노 에탄올 및 스퍼민(spermin)을 사용하였다. 아미노기의 도입률은 측쇄 글루코오스에 대한 과요오드산 나트륨의 당량수에 의해 조절하는 것이 가능하며, 실험 결과는 실시예 3에 나타낸다. 실시예 1의 방법을 사용하여, 분자량 45만의 시조피란을 수득하였다. 이 시조피란 100 mg을 물 100 ml에 용해하였다. 여기에 과요오드산 나트륨 수용액 (시조피란 측쇄 글루코오스에 대하여 각각 10%, 40%, 및 80%의 당량수 또는, 과량인 500%)을 천천히 더하여, 4℃에서 2일간 교반하였다. 반응 용액을 투석막(배제 한계 12000)으로 투석 후, 동결건조 하였다. 얻어진 백색물질을 디메틸설폭시드 20 ml에 용해하여, 2-아미노 에탄올 및 스퍼민, 2 ml(과량, 10000 당량 이상)를 더하여, 실온에서 2일간 계속 교반하였다. 과량의 수소화붕소나트륨을 초산으로 소광한 후, 반응 용액을 투석막(배제 한계 12000)으로 투석(산성 수용액, 알칼리성 수용액, 증류수)하고, 동결건조하여, 양이온성 유도체를 제조하였다.

아미노기의 도입률 측정은 원소분석에 의한 미량 질소 분석(검출 하한 0.05%)에 의해 수행하였다. 미량 질소분석 실험은 모두 3회의 측정을 하였으며, 그 결과를 표 1에 나타낸다. 또한 분자량은 겔침투크로마토그래피(GPC) 및 점도 측정으로 시험하여, 원료와 일치하는 분자량을 나타내는 것을 확인하였다.

표 1

과요오드산 당량수(%)	10	40	80	500
아미노기 도입율 (%)	4.6-4.7	16.3-17.8	19.3-20.8	35.2-37.4

실시예 3

아미노산 유도체의 합성(아르기닌으로 변형된 시조피란) 및 특성규명

도 1의 절차에 따라, 아미노산 유도체(아미노산 관능기로 변형된 다당류)를 합성하였다. 아미노산 도입률은 실시예 2와 마찬가지로의 방법으로 조절하였다. 여기에서는, 시조피란에 4.6, 17, 20, 및 36%의 아르기닌을 도입한 아르기닌으로 변형된 시조피란 합성 예를 나타낸다.

실시에 1에 기재된 방법을 사용하여 분자량 45만의 시조피란을 수득하였다. 이 시조피란 100 mg을 물 100 ml에 용해하였다. 여기에 과요오드산 나트륨 수용액(시조피란 측쇄 글루코오스에 대하여 10, 40 및 70%의 당량수)을 천천히 가한 후, 4℃에서 2일간 교반하였다. 반응 용액을 투석막(배제 한계 12000)으로 투석 후, 동결건조 하였다. 얻어진 백색 물질을 DMSO 20 ml에 용해하여, 아르기닌메틸에스테르 2 ml(과잉, 10000 당량 이상)을 더하여, 실온에서 2일간 계속 교반하였다. 과량의 수소화붕소나트륨을 초산으로 소광한 후, 반응 용액을 투석막(배제 한계 12000)으로 투석(산성 수용액, 알칼리성 수용액, 증류수)하고, 동결건조하여 아르기닌으로 변형된 시조피란을 제조하였다.

아르기닌의 도입률 측정은, 원소 분석에 의한 미량 질소분석(검출 하한 0.05%)에 의해 수행하였다. 측정을 모두 3회 하여, 그 결과를 표 2에 나타낸다 (M. Numata, et al., Bioorg. Chem., 31, 163-171(2003)).

표 2

과요오드산 당량수	아르기닌도입율
10 %	3.6 %
40 %	9.3 %
70 %	13.5 %

실시예 4

콜레스테롤 유도체(콜레스테롤로 변형된 시조피란)의 합성 및 특성규명

도 1의 절차에 따라, 콜레스테롤 유도체(스테로이드성 관능기로 변형된 다당류)를 합성하였다. 콜레스테롤의 도입률은 실시예 2로 마찬가지로의 방법으로 조절하였다. 여기에서는, 측쇄를 4.5%의 콜레스테롤로 변형한, 콜레스테롤로 변형된 시조피란의 합성방법을 나타낸다. 즉, 실시예 1에서 제조한 시조피란 100 mg을 물 100 ml에 용해하여, 과요오드산 나트륨 1.65 mg(측쇄 글루코오스에 대하여 5 mol%)을 첨가한 후, 빛을 차단하고, 4℃에서 2일간 교반하였다. 반응 용액을 투석막(배제 한계 12000)으로 투석하고, 동결건조 하였다.

수득한 백색 고체를 DMSO에 현탁하고, 아미노기 말단을 가지는 스테로이드 유도체(여기에서는, Ishii 등의 문헌에 따라 합성한 3β-콜레스트-5-엔-3-일 N-(2-아미노 에틸) 카르바메이트)를 더하여, 실온에서 2일간 계속 교반하였다. 반응 용액에 수소화붕소나트륨 100 mg을 4시간 간격으로 2회 가하고, 그 후, 실온에서 1일 교반하였다. 과잉의 수소화붕소나트륨을 초산으로 소광한 후, 반응 용액을 투석막(배제 한계 12000)으로 투석하고, 동결건조하여, 콜레스테롤로 변형된 시조피란을 수득하였다(Tsutomu Ishii, Ritsuko Iguchi, Erwin Snip, Masato Ikeda and Seiji Shinkai, Langmuir, 17, 5825-5833 (2001)).

콜레스테롤의 도입률 측정은, 원소 분석에 의한 질소의 미량 분석(검출 하한 0.05%)에 의해 수행하였다. 측정은 모두 3회 씩 수행하였으며, 결과를 표 3에 나타낸다.

표 3

과요오드산 산화율	질소함유율	콜레스테롤 도입율
5.0 %	0.358~0.383	4.5 %

실시예 5

결합성 관능기를 포함하는 펩티드의 합성

펩티드 사슬(펩티드성 관능기)에 의한 시조피란의 화학적 변형에 있어서, 펩티드 사슬이 시조피란에 결합할 수 있는 관능기를 가져야 한다. 이러한 결합성 관능기 및 스페이서에는 특별한 제한은 없지만, 예로서 마이클 부가 반응에 의해 말레이미드기에 공유결합으로 고정화할 수 있는 티올을 갖는 시스테인을 포함하는 펩티드 사슬의 합성을 이하에 나타낸다.

펩티드의 서열로서는, 세포막에 대한 친화성이 높은 것으로 알려져 있는 아르기닌올리고머(여기에서는 8mer를 합성하고, 그 펩티드 사슬을 R8라고 표기함 : 서열번호 2), 및 세포부착인자가 인식하는 것으로 공지된, 아르기닌 글리신 아스파르트산의 서열(RGD라고 표기함: 서열번호 3)을 포함하고, N-말단에 시스테인을 도입한 펩티드(도 2 참조)를 각각 합성하였다. 펩티드 사슬은 Fmoc법에 따라 합성하였으며, 정제는 HPLC(고속 액체 크로마토그래피)(정제 조건 : 히타치 L-7100, ODS 컬럼(YMC 사제)를 사용하였으며, 용출액으로 5/95의 아세트니트릴/증류수(모두 0.1 vol%의 신선한 플루오르초산을 포함)를 사용하여, 40분 걸쳐 20/80의 농도구배로 용출하였다. 동정은 MALDI-TOF MS(매트릭스 지원 이온화-비행 시간 형 질량 분석기)에서 행하고, 동정결과는 표 4에 나타낸다(매트릭스 : CHCA)(Fmoc법 ; 「고상 합성 핸드북」, 머크 주식회사).

표 4

펩티드	이론치	실측치
R8	1371.65	1371.20
RGD	450.48	450.40

실시예 6

펩티드로 변형된 시조피란의 합성

실시예 5에서 합성한, 펩티드 사슬을 시조피란에 도입하기 위해 도 3에 나타난 합성 방법에 따라 합성하였다. 반응은, 과요오드산에 의한 산화, 환원적 아미노화, 스페이서의 도입, 펩티드 도입의 4단계 반응으로 이루어진다. 펩티드의 도입물은 과요오드산 산화 반응에 의해 조절할 수 있다. 2, 4단계에서는 반응의 진행을 원소 분석에 의해 평가하였다. 결과는 실시예 7에 나타낸다.

실시예 1에 따라 제조한 시조피란 300 mg을 물 300 ml에 용해하고, 과요오드산 나트륨 수용액(9.87 mg : 시조피란의 측쇄에 대하여 0.1 당량(10%))을 첨가한 후, 빛을 차단하고 4℃에서 2일간 교반하였다. 반응 용액을 투석막(배제 한계 12000)으로 투석 후, 동결건조하고, 백색 고체 1을 수득하였다.

수득한 100 mg의 백색 고체 1을 극성 유기용매 DMSO 10 ml, 28% 암모니아 수용액 10 ml에 용해하고, 시아노수소화붕소나트륨 200 mg(과잉)을 첨가한 후, 실온에서 4일간 교반하였다. 반응 용액을 투석막(배제 한계 12000)으로 투석 후, 동결건조하고, 백색 고체 2를 수득하였다.

얻어진 백색 고체 2를 DMSO 10 ml에 용해하여, 3-말레이미드프로피온산-N-히드록시숙신이미드에스테르 100 mg(과잉)를 더하여, 질소 기류하에서, 실온에서 24시간 교반하였다. 반응 용액을 투석막(배제 한계 12000)으로 투석 후, 동결건조하고, 백색 고체 3을 수득하였다.

얻어진 백색 고체 3을 DMSO 5 ml에 용해하였다. 또, 실시예 1에서 얻어진 시스테인을 포함하는 펩티드 사슬(약 50 mg)을 증류수에 용해하여, 앞의 DMSO 용액과 혼합하고, 그 용액을 실온에서 2일간 교반하였다. 반응 용액을 투석막(배제 한계 12000)으로 투석 후, 동결건조하고, 펩티드로 변형된 시조피란을 수득하였다.

실시예 7

펩티드로 변형 시조피란의 특성규명

실시에 6에서 얻어진, 펩티드 변형된 시조피란의 특성을 규명(각 반응 후의 도입물의 질소 원소 분석에 의한 평가, 분자량) 하였다. 표 5는 실시예 6의 각 단계의 반응에 있어서의 질소 원소 분석에 기본을 둔 관능기 도입률 (펩티드 변형율)의 변화를 나타내고 있다. 또한, 분자량은 겔침투크로마토그래피(GPC)에 의해 측정하였으며, 펩티드로의 변형 전후에 있어서 분자량의 큰 변화는 일어나지 않는다는 것을 확인하였다(T. Matsumoto, et al., Biochim. Biophys. Acta, 1670, 91-104(2004).

표 5

	R8 변형된 시조피란		RGD 변형된 시조피란	
	5 %	10 %	5 %	10 %
측쇄산화율				
백색고체 2	3.7±0.1 %	9.4±0.1 %	3.7±0.1 %	9.4±0.1 %
백색고체 3	3.7±0.3 %	2.3±0.3 %	3.7±0.3 %	2.3±0.3 %
펩티드 변형된 시조피란	0.3±0.1 %	0.5±0.1 %	1.0±0.1 %	1.3±0.3 %

실시예 8

양이온화 시조피란 및 아미노산으로 변형된 시조피란, 콜레스테롤로 변형된 시조피란 및 펩티드로 변형된 시조피란과 CpG DNA와의 복합체 형성에 의한 면역자극제의 제조

17, 20 및 36 %의 아미노기로 변형된 시조피란(이하, N-SPG로 표기), 4.6 %의 스퍼민으로 변형된 시조피란(이하, SP-SPG로 표기), 3.6, 9.3 및 13.5%의 아르기닌으로 변형된 시조피란(이하, Arg-SPG로 표기), 4.5%의 콜레스테롤로 변형된 시조피란(이하, Chol-SPG로 표기), 0.3 및 0.5%의 R8로 변형된 시조피란(이하, R8-SPG로 표기), 및 1.0 및 1.3 %의 RGD로 변형된 시조피란(이하, RGD-SPG로 표기)을 각각 DMSO에 용해하여 1가닥의 사슬로 만든 후, 30 mg/ml의 농도로 맞추고, 각각 용액 1µl에, 순수한 물 3µl, 10 mM의 트리스 완충액(pH7.8) 1µl 및 실시예 1에 기재된 CpG DNA 용액(3 mg/ml) 5µl를 혼합하였다. 수득한 용액은 모두 투명하여, 균일하였다.

이후, 실시예 2, 3, 4, 및 6에서 합성한 시조피란류를 총칭해 화학적으로 변형된 시조피란으로 표기하고, 각각의 화학적으로 변형된 시조피란은 R8(0.3)-SPG과 같이, 각각의 표기내에 그 도입율을 병기한다.

실시예 9

겔 전기 영동법을 이용한 CpG DNA와 시조피란류와의 복합체 형성 확인

CpG DNA는 음전하를 갖는 인산기가 양전하 방향으로 전기영동한다. 또한 겔 매트릭스의 공간을 통과하기 때문에, CpG DNA가 시조피란과 복합체를 형성하여 분자량이 증가하는 만큼 이동 정도가 감소한다. 그래서, CpG DNA에 시조피란 및 화학적으로 변형된 시조피란을 첨가해 실시예 1 및 8에 기재된 방법으로 복합체를 형성시킨 후, MOPS 완충액(20 mM MOPS (pH 7.0), 5 mM 초산나트륨, 1 mM EDTA, 3% 디메틸설폭사이드) 중의 2% 아가로스겔 사용하여 2 V/cm로 1시간 전기 영동한 후, Gel Star Nucleic Acids Stain(BMA)로 염색 후, 트랜스일루미네이터에서 그 이동 정도를 평가하였다.

도 4에 나타낸 아가로스겔 전기 영동 결과에 의하면, 시조피란 및 화학적으로 변형된 시조피란의 첨가에 따라, CpG DNA의 이동 정도가 감소하였으며, 이로부터 복합체의 형성을 확인할 수 있었다.

실시예 10

시조피란 및 화학적으로 변형된 시조피란과 복합체를 형성한 CpG DNA로의 자극에 의한 마우스 유래 복강 대식세포로부터의 사이토카인 IL-12 합성량 증가 효과

마우스 유래 복강 대식세포는 문헌에 기재된 방법으로 분리하였다. 즉 8주령의 암컷 Balb/c마우스의 경동맥을 절단해 탈혈사시킨 후, 복부를 70% 에탄올로 소독 후에 복부에 칼집을 넣어 외피 사이를 벌려 외피를 벗기고 복막을 노출하였다. 냉 PBS(인산 완충 생리식염수) 5 ml을 복부에 주입하고, 잘 마사지 한 후 액을 회수하였다. 폴리프로필렌으로 만들어진 원심분리용 관에 넣어, 1,000 rpm, 10분간, 4℃에서 원심분리하였다. 상층액을 버리고, 펠렛을 10% 소태아 혈청을 포함하는 RPMI1640 배지에 현탁하였다(일본 생화학회편, 신생 화학 실험 강좌 12 분자 면역학 I 면역 세포·사이토카인, 도쿄화학동인 (1989)).

96 웰 플레이트에 100µl의 10% 소태아 혈청을 포함하는 RPMI1640 배지에 현탁 시킨 2×10^5 개의 마우스 유래 복강 대식세포를 파종해 37℃, 5% CO₂에서 2시간 배양하여 세포가 플레이트에 정착하도록 한 후, 여기에, CpG DNA 및 실시예 1 내지 실시예 8에서 제조한 CpG DNA와 시조피란 및 화학적으로 변형된 시조피란과의 복합체를 한외여과막(배제 한계 3000)으로 여과하여 DMSO를 제거한 후, 농도를 재조정하여 첨가하고, 37℃, 5% CO₂하에서 24시간 배양 후에 배양 상층액을 회수하였다.

배양 상층액 중에 포함된 마우스의 총 IL-12량은 Mouse Interleukin-12 Total ELISA(ENDOGEN 사제)를 이용하여, 제조자의 프로토콜에 따라 측정하였다. 그 측정 결과를 도 5에 나타낸다. 도 5에 나타낸 바와 같이, 배양 상층액에 포함된 총 IL-12는, CpG DNA 단독 투여보다 본 발명의, CpG DNA와 시조피란 및 화학적으로 변형된 시조피란의 복합체를 투여한 경우에 더 많이 포함되어 있었다. 상기 결과로부터, 본 발명의 면역자극제 투여에 의하여 대식세포의 사이토카인(IL-12) 합성량이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

비교 예 1

시조피란 및 화학 변형 시조피란과 복합체를 형성한 비-CpG DNA(CpG 모티브를 포함하지 않는 올리고뉴클레오티드)가 마우스 유래 복강 대식세포의 사이토카인 IL-12의 생산에 미치는 효과

실시예 10에서 사용한 CpG DNA 대신에 염기서열 내에, 사이토신·구아닌 디뉴클레오티드(CpG)의 서열을 포함하지 않는(면역자극 효과를 나타내지 않음) 포스포로티오에이트 결합을 가지며, TCC ATG AGC TTC CTG ATG CT의 3'말단에 40개의 dA이 결합된 올리고뉴클레오티드(이하, 비-CpG DNA로 표기 : 서열번호 4)를 사용하여, 실시예 10과 동일한 방법으로 마우스 유래 복강 대식세포로부터의 사이토카인 IL-12 합성량을 평가하였다. 결과를 도 6에 나타내었다(Y. Aramaki, et al. Biol. Pharm. Bull., 25(3) 351-355(2002).

도 6에 나타낸 바와 같이, 비-CpG DNA 단독 투여 및 시조피란 또는 화학적으로 변형된 시조피란과 복합체를 형성한 복합체 투여에 있어서, 배양 상층액 중의 마우스의 총 IL-12량은 증가하지 않았으며, 배지만을 사용한 경우와 대략 같은 정도의 IL-12 합성량을 나타냈다. 상기 결과는 면역자극 효과가 없는 올리고뉴클레오티드(이 예에서는, 비-CpG DNA)와의 복합체 형성물은 면역자극 효과가 없음을 나타낸다(사이토카인 IL-12가 생합성 되지 않음).

실시예 11

시조피란 및 화학적으로 변형된 시조피란과 복합체를 형성한 CpG DNA의 자극에 의한 마우스 유래 대식세포 유사세포 J774.A1로부터의 사이토카인 IL-12 합성량의 증가 효과

실시예 10에서 사용한 마우스 유래 복강 대식세포 대신에, 면역자극 물질에 의해 IL-12 합성이 증가되는 것으로 보고된 마우스 유래의 대식세포 유사세포 J774.A1(ATCC로부터 입수)를 사용하여, 실시예 10과 동일한 방법으로 마우스 유래 복강 대식세포로부터의 사이토카인 IL-12 합성량을 평가하였다. 결과를 도 8에 나타내었다(E. R. Kandimalla, et al., Bioconjugate Chem., 13(5), 966-974(2002).

도 8에 나타낸 바와 같이, 배양 상층액에 포함된 총 IL-12는, CpG DNA를 단독으로 투여한 경우보다 본 발명의, CpG DNA와 시조피란 및 화학적으로 변형된 시조피란 복합체를 투여한 경우에 더 많이 포함되어 있었다. 즉, 본 발명의 면역자

극제를 투여한 경우에 IL-12가 더 많이 포함되어 있었다. 상기 결과로부터 실시예 10에 예시한 마우스 유래 복강 대식세포와 마찬가지로, 본 발명의 면역자극제의 투여에 의하여, 마우스 유래 대식세포 유사 세포 J774.A1로부터의 사이토카인(IL-12) 합성량이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

실시예 12

시조피란 및 화학적으로 변형된 시조피란과 복합체를 형성한 CpG DNA의 자극에 의한 마우스 비장 세포로부터의 사이토카인 IL-6 및 IL-12 합성량 증가 효과

실시예 10에서 사용한 마우스 유래 복강 대식세포 대신에, 면역자극 물질에 의해 IL-6 및 IL-12 합성이 증가되는 것으로 보고된 마우스 유래 비장 세포(비장 임파구)를 사용하여, 마우스 유래 비장 세포로부터의 사이토카인 IL-6 및 IL-12 합성량을 측정하였다. 마우스 유래 비장 세포는 문헌에 기재된 방법대로 수행하였다. 즉 8주령의 암컷의 Balb/c마우스를 경추 탈구하여, 도살하고, 복부를 70% 에탄올로 소독 후, 복부에 칼집을 넣어 외피 사이를 벌려 외피를 벗겨 복막을 노출시키고, 복막을 열어 비장을 회수하였다. 비장을 PBS 중에서 망(200 메쉬)에 넣어 편셋으로 해체한 후, 세포덩어리를 망으로 걸러내었다. 세포 부유액을 폴리프로필렌으로 만들어진 원심분리관에 넣고 1,000 rpm, 10분간, 4℃에서 원심분리하였다. 상층액을 버리고 펠렛을 10% 소태아 혈청을 포함하는 RPMI1640 배지에 현탁 하였다(일본 생화학회편, 신생 화학 실험 강좌 12 분자 면역학 I 면역 세포·사이토카인, 도쿄화학동인(1989)).

96 웰 플레이트에 100μl의 10% 소태아 혈청을 포함하는 RPMI1640 배지에 현탁한 2.5×10⁵개의 마우스 유래 비장 세포를 파종하고, 여기에, CpG DNA 및 실시예 1 내지 실시예 8에서 제조한 CpG DNA와 시조피란 및 화학적으로 변형된 시조피란과의 복합체를 한외여과막(배제 한계 3000)으로 여과하여 DMSO를 제거한 후, 농도를 재조정하여 첨가하고, 37℃, 5% CO₂하에서 24시간 배양 후에 배양 상층액을 회수하였다.

배양 상층액 중에 포함된 마우스의 IL-6 및 총 IL-12 양은, Mouse Interleukin-6 ELISA 및 Mouse Interleukin-12 Total ELISA(ENDOGEN 사제)를 이용하여 제조자의 프로토콜에 따라 측정하였다. 그 측정 결과를 도 8 및 도 9에 나타내었다. 도 8 및 도 9에 나타낸 바와 같이, 배양 상층액에 포함된 IL-6 및 총 IL-12는, CpG DNA를 단독으로 투여한 경우보다 본 발명의, CpG DNA와 시조피란 및 화학적으로 변형된 시조피란의 복합체를 투여한 경우에 더 많이 포함되어 있었다. 상기 결과로부터 본 발명의 면역자극제 투여에 의하여, 비장 세포(임파구)에서 생산되는 사이토카인(IL-6으로 IL-12)량이 증가하는 것을 확인할 수 있었다(E. R. Kandimalla, et al., Bioconjugate Chem., 13(5), 966-974(2002)).

비교 예 2

시조피란 및 화학적으로 변형된 시조피란과 복합체를 형성한 비-CpG DNA가 마우스 유래 비장 세포의 사이토카인 IL-6 및 IL-12 생산에 미치는 효과

실시예 12에서 사용한 CpG DNA 대신에 비-CpG DNA를 사용하여, 실시예 12와 동일한 방법으로 마우스 유래 비장 세포로부터의 사이토카인 IL-6 및 IL-12 합성량을 평가하였다. 이 결과를 도 10 및 도 11에 나타내었다.

도 10 및 도 11에 나타낸 바와 같이, 비-CpG DNA 단독 투여 및 시조피란 또는 화학적으로 변형된 시조피란과의 복합체 투여에 있어서, 배양 상층액 중의 마우스의 IL-6 및 총 IL-12 양은 증가하지 않았으며, 배지만을 사용한 경우와 대략 같은 정도의 IL-6 및 IL-12 합성량을 나타냈다. 상기 결과는 면역자극 효과가 없는 올리고뉴클레오티드(이 예에서는, 비-CpG DNA)와의 복합체 형성물은 면역자극 효과가 없다는 것을 나타낸다.

실시예 13

β-1, 3-글루칸(시조피란) 및 화학적으로 변형된 시조피란과 포스포디에스테르형 CpG DNA(CpG DNA(PO))와의 복합체에 형성에 의한 면역자극제의 제조

시조피란 및 화학적으로 변형된 시조피란을 각각 DMSO에 용해하여 1가닥의 사슬로 만든 후, 30 mg/ml로 농도를 조정하고, 이 용액 1μl, 순수한 물 3μl, 10 mM의 트리스 완충액(pH7.8) 1μl 및 실시예 1에 기재된 CpG DNA 용액에 대신하여, CpG DNA(PO) 용액(3 mg/ml) 5μl를 혼합하였다. 수득한 용액은 모두 투명하였으며 균일하였다.

본 실시예에 사용된 CpG 모티브를 포함하는 올리고뉴클레오티드(고상 합성)는 염기서열 내에 한 위치에, 사이토신·구아닌 디뉴클레오티드(CpG)의 서열을 포함하고 포스포디에스테르 결합을 갖고, TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT의 3'말단에 40개의 dA이 결합된 서열번호 5의 서열로서 이를 CpG DNA(PO)으로 나타낸다.

실시예 14

시조피란 및 화학적으로 변형된 시조피란과 복합체를 형성한 CpG DNA(PO)의 자극에 의한 마우스 비장 세포로부터의 사이토카인 IL-6 및 IL-12 합성량의 증가 효과

실시예 12에서 사용한 CpG DNA에 대신에 실시예 13에 기재된 CpG DNA(PO)를 사용하여, 실시예 12과 동일한 방법으로 마우스 유래 비장 세포로부터의 사이토카인 IL-6 및 IL-12 합성량을 측정하였다. 이 결과를 도 12 및 도 13에 나타내었다.

도 12 및 도 13에 나타낸 바와 같이, 배양 상층액에 포함된 IL-6 및 IL-12는, CpG DNA(PO)를 단독으로 투여한 경우보다 CpG DNA(PO)와 시조피란 및 화학적으로 변형된 시조피란의 복합체를 투여한 경우에 더 많이 포함되어 있었다. 상기 결과로부터, 본 발명의 면역자극제인 CpG DNA(PO)/시조피란 및 CpG DNA(PO)/화학적으로 변형된 시조피란 투여에 의하여, 마우스 유래 비장 세포로부터 사이토카인(IL-6 및 IL-12) 합성량이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

비교예 3

시조피란 및 화학적으로 변형된 시조피란과 복합체를 형성한 비-CpG DNA(PO)가 마우스 유래 비장 세포의 사이토카인 IL-6 및 IL-12 생산에 미치는 효과

실시예 14에서 사용한 CpG DNA(PO) 대신에, 염기서열 내에 사이토신·구아닌 디뉴클레오티드(CpG) 서열을 포함하지 않는(면역자극 효과를 나타내지 않음) 포스포디에스테르 결합을 가지며 TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT의 3'말단에 40개의 dA이 결합된 올리고뉴클레오티드(이하, 비-CpG DNA(PO)와 표기 : 서열번호 6)를 사용하여, 실시예 14와 동일한 방법으로 마우스 유래 비장 세포로부터의 사이토카인 IL-6 및 IL-12 합성량을 측정하였다. 이 결과를 도 14 및 도 15에 나타내었다.

도 14 및 도 15에 나타낸 바와 같이, 비-CpG DNA(PO) 단독 투여 및 시조피란 또는 화학적으로 변형된 시조피란과의 복합체 투여에 있어서, 배양 상층액 중의 마우스의 IL-6 및 총 IL-12 양은 증가하지 않았으며, 배지만을 사용한 경우와 대략 같은 합성량을 나타냈다. 상기 결과는 면역자극 효과가 없는 올리고뉴클레오티드, 비-CpG DNA(PO)와의 복합체 형성물은, 면역자극 효과가 없음을 나타낸다(사이토카인 IL-6 및 IL-12가 생성성 되지 않는다).

비교예 4

시조피란 및 화학적으로 변형된 시조피란과 복합체를 형성한 CpG DNA, CpG DNA(PO), 비-CpG DNA, 또는 비-CpG DNA(PO)로의 자극이 마우스 비장 세포의 사이토카인 IL-4 생산에 미치는 효과

실시예 12 및 실시예 14와 동일한 방법으로 마우스 유래 비장 세포로부터의 사이토카인 IL-4 합성량을 평가하였다. 이 결과를 도 16 내지 도 19에 나타내었다.

도 16 내지 도 19에 나타낸 바와 같이, CpG DNA, CpG DNA(PO), 비-CpG DNA, 또는 비-CpG DNA(PO) 단독 투여 및 시조피란 또는 화학적으로 변형된 시조피란과의 복합체 투여에 있어서, 배양 상층액 중의 마우스의 IL-4량은 증가하지 않았으며, 배지만을 사용한 경우와 대략 같은 합성량을 나타냈다. 면역자극 효과가 있는 CpG 모티브는, IL-2, IL-12, TNF- α , 및 IFN- γ 등의 세포성 면역(I형 면역)계 사이토카인만의 생산을 유도하고, IL-4, IL-5, IL-10, 및 IL-13 등의 체액성 면역(II형 면역)계의 사이토카인의 생산은 억제하는 것을 볼 수 있었다. 상기 결과는 본 발명의 면역자극제 투여에 의하여, CpG 모티브에 의한 면역자극 효과에 의해 면역을 증강시킬 수 있음을 나타내는 것이다(Dennis M. Klinman, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 2879-2883(1996)).

산업상 이용 가능성

본 발명의 면역자극제는 안전성이 확인된 β -1,3-글루칸 등의 다당류를 전달체(전달이입제)로서 사용하는 안전하고, 우수한 면역증강 작용을 갖는 것으로 면역 치료 및 유전자 치료 등의 분야에서 이용될 수 있는 새로운 유형의 면역자극제이다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

면역자극성 올리고뉴클레오티드와 β -1,3-결합을 가지는 다당류의 복합체로 이루어지는 면역자극제.

청구항 2.

제 1 항에 있어서, 면역자극성 올리고뉴클레오티드는, 비-메틸화 CpG 모티브를 포함하는 것을 특징으로 하는 면역자극제.

청구항 3.

제 1 항에 있어서, 올리고뉴클레오티드의 인산 골격이, 포스포로티오에이트 또는 포스포로디티오에이트로 변형되어 있는 것을 특징으로 하는 면역자극제.

청구항 4.

제 1 항에 있어서, β -1,3-결합을 가지는 다당류는 β -1,3-글루칸 또는 β -1,3-크실란인 것을 특징으로 하는 면역자극제.

청구항 5.

제 4 항에 있어서, β -1,3-글루칸은 시조피란, 커드란(curdran), 레티난(lentinan), 파키만, 그리프론(grifron), 라미나란(laminaran) 또는 스크레로글루칸으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 면역자극제.

청구항 6.

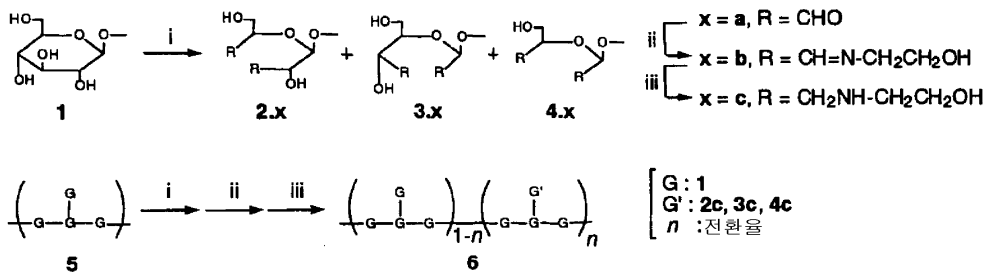
제 1 항에 있어서, 다당류가, 핵산결합성 및/또는 세포친화성 관능기로 변형되어 있는 것을 특징으로 하는 면역자극제.

청구항 7.

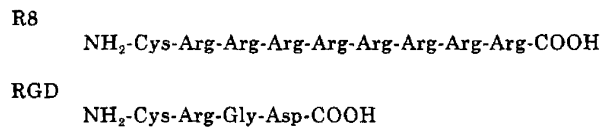
제 1 항에 있어서, 올리고뉴클레오티드와 다당류와의 복합체는, 수소결합 및 소수성 상호작용을 통하여 형성되는 삼중 나선 구조인 것을 특징으로 하는 면역자극제.

도면

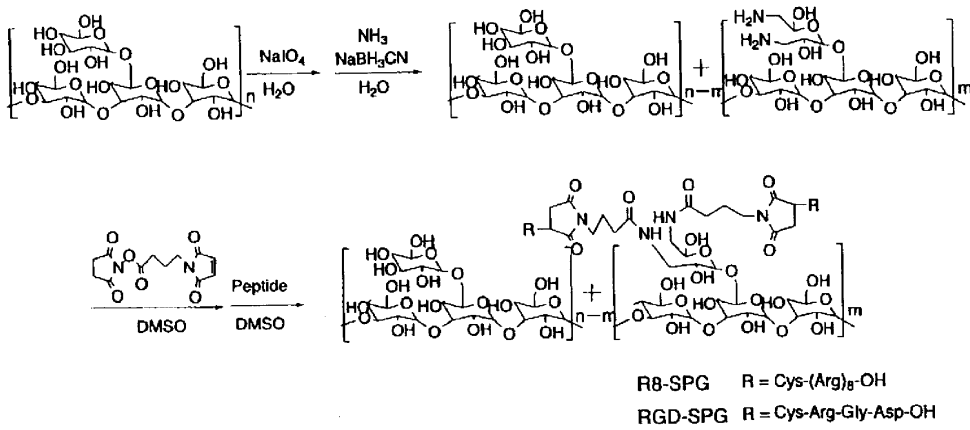
도면1



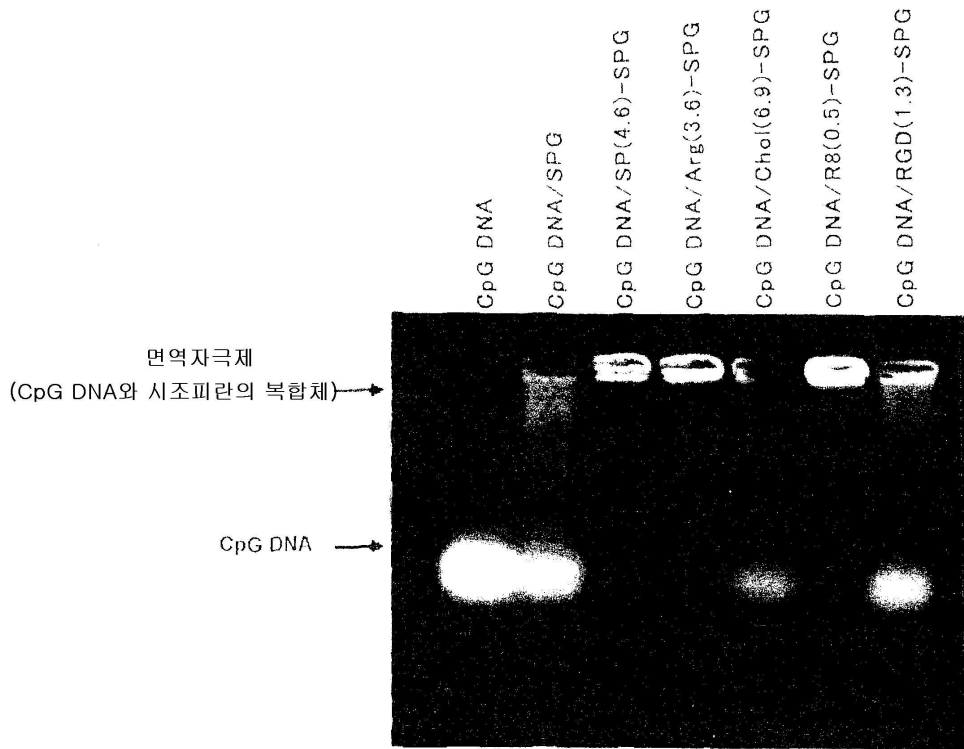
도면2



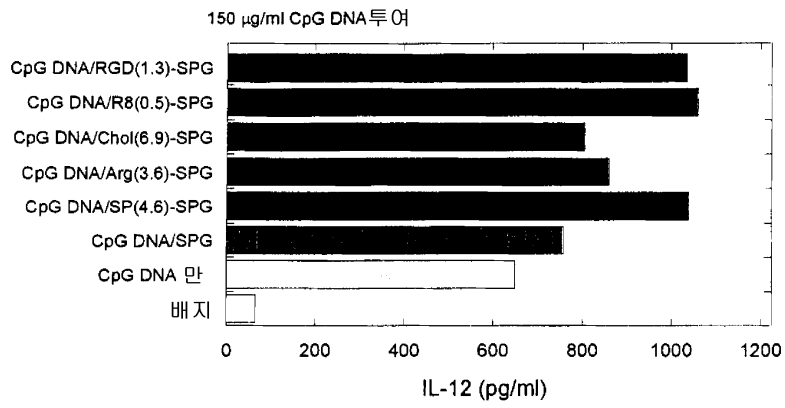
도면3



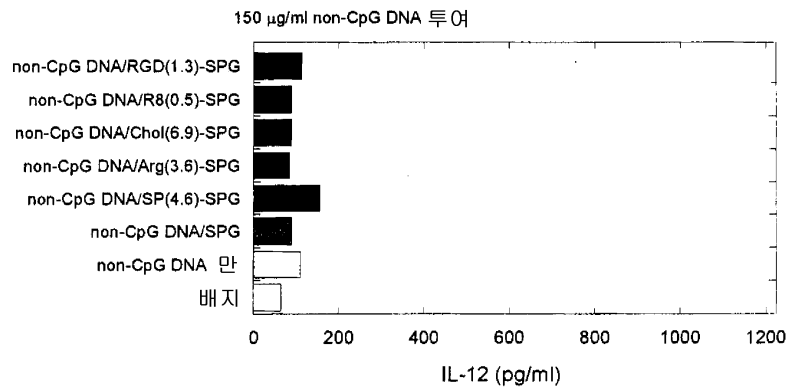
도면4



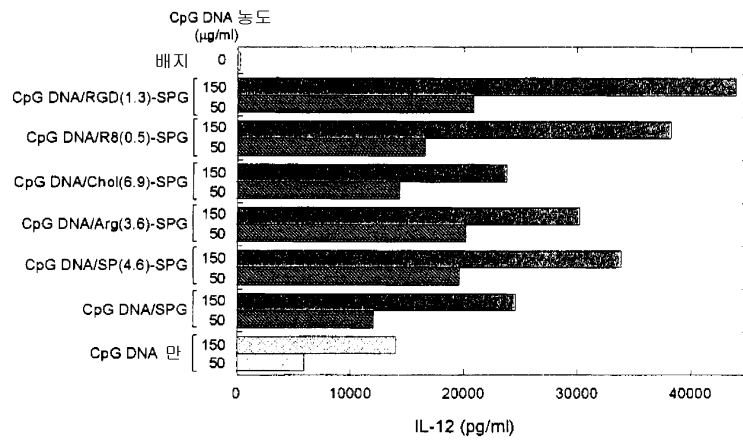
도면5



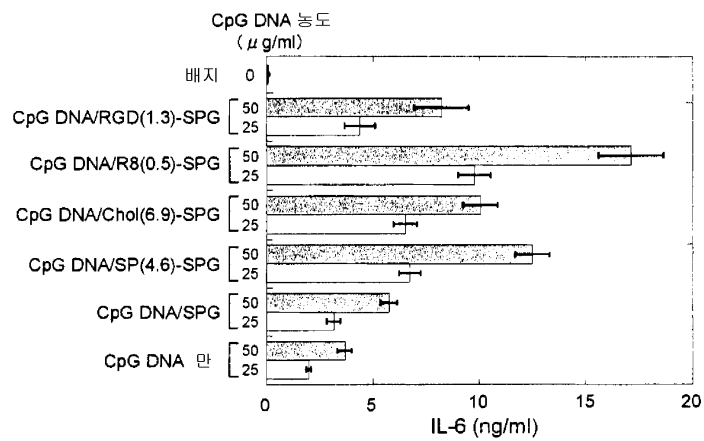
도면6



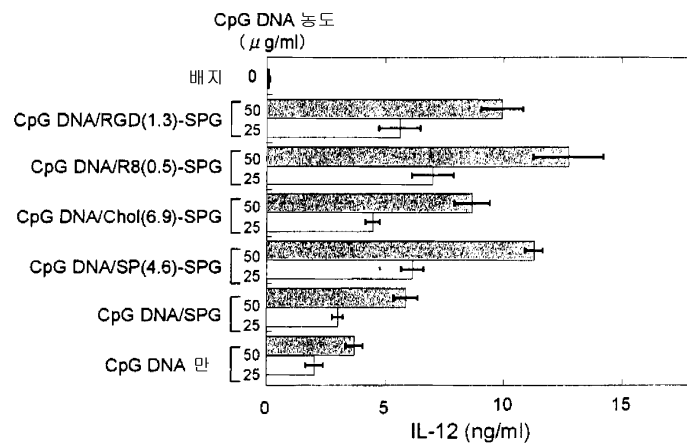
도면7



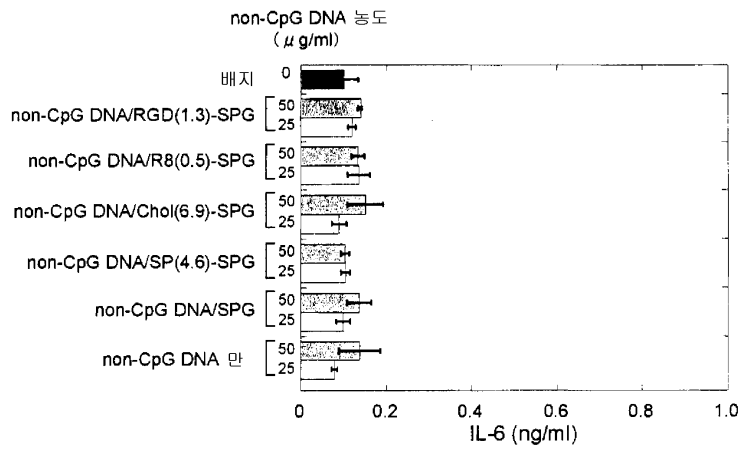
도면8



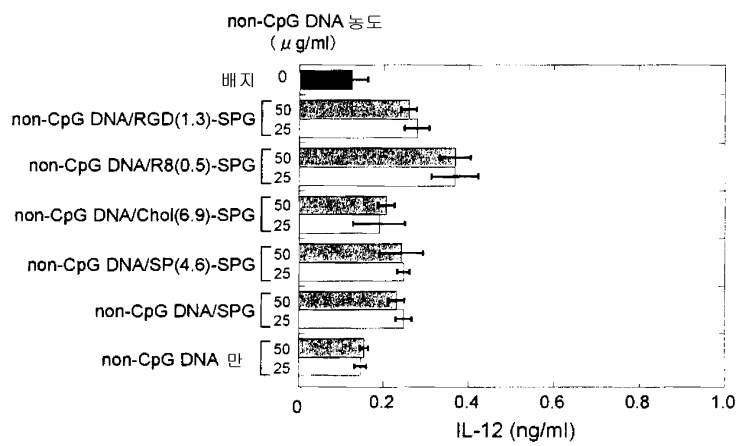
도면9



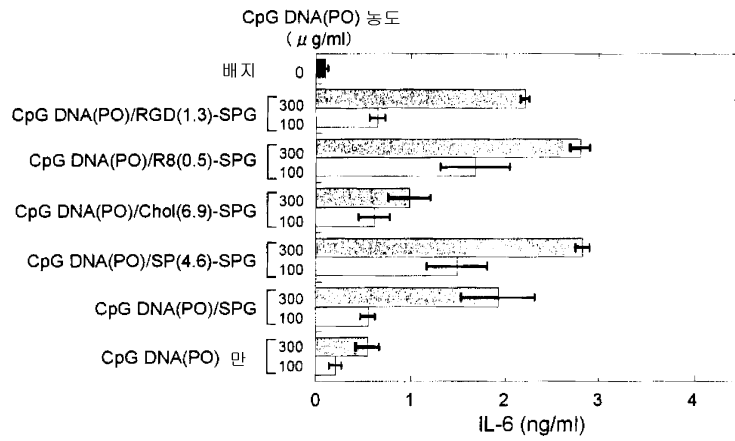
도면10



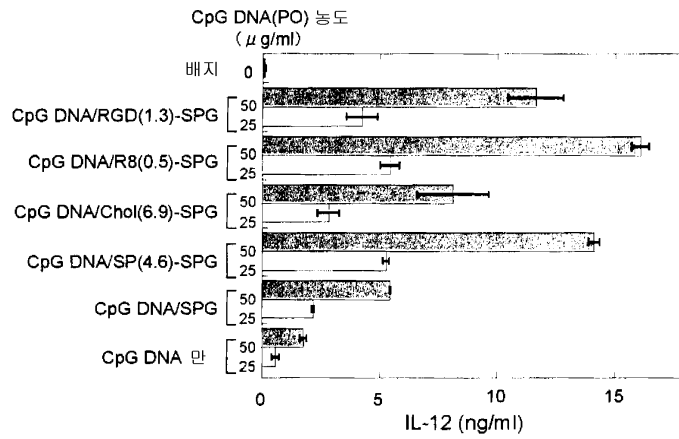
도면11



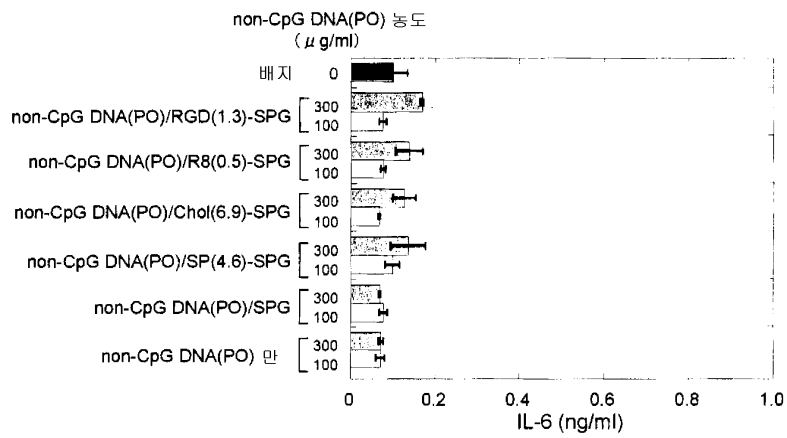
도면12



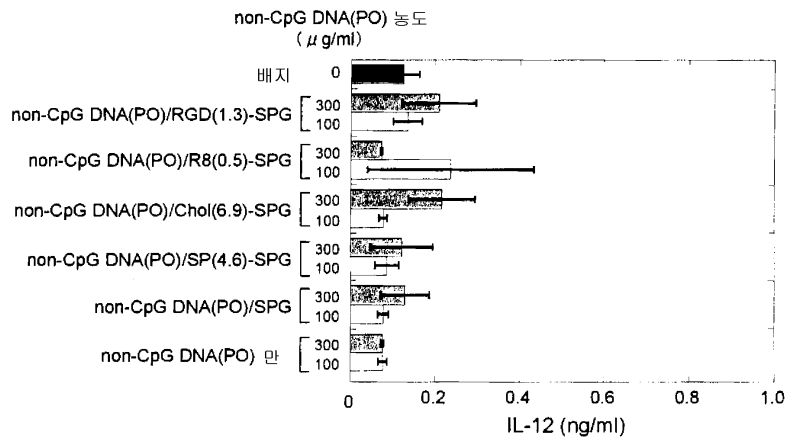
도면13



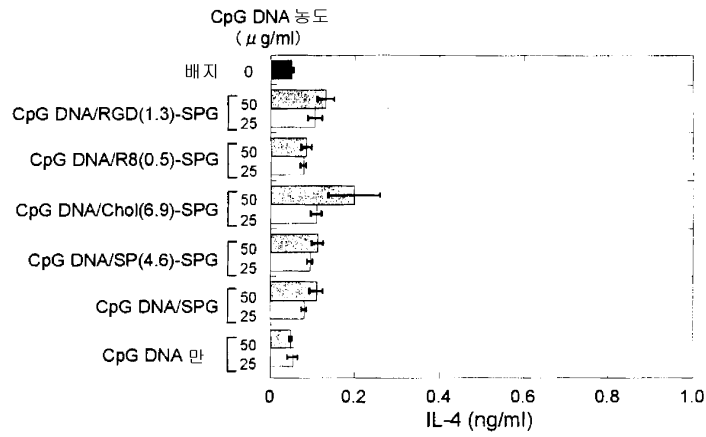
도면14



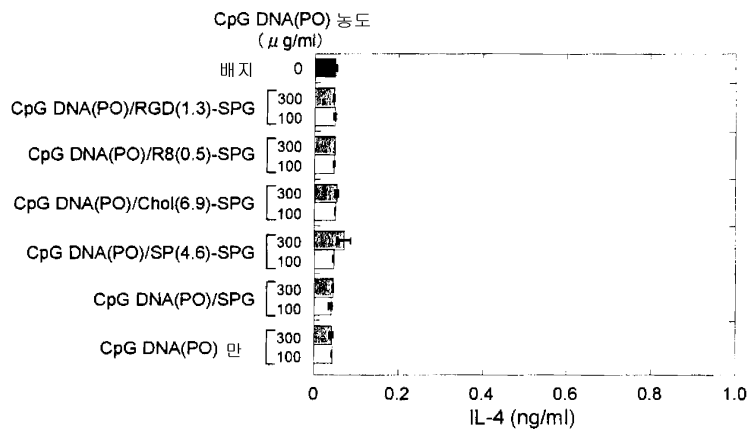
도면15



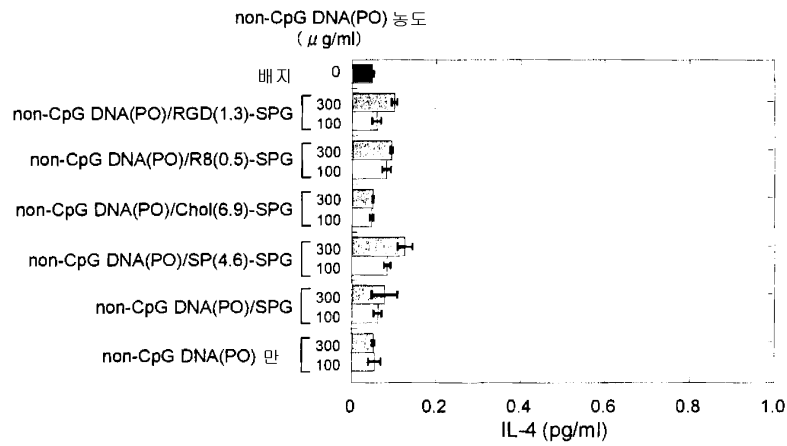
도면16



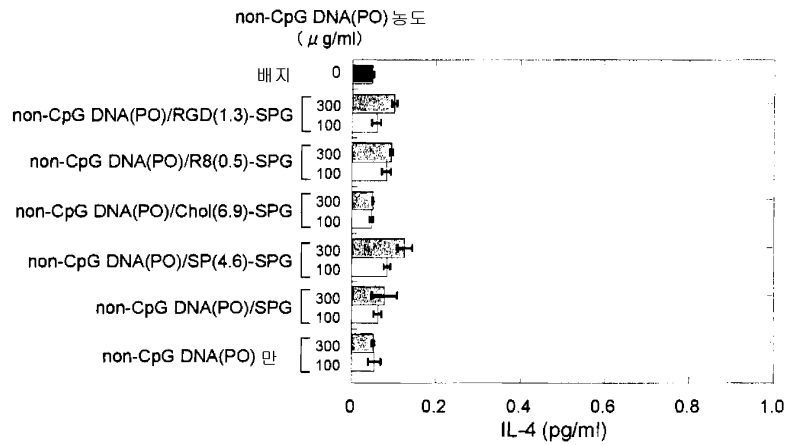
도면17



도면18



도면19



서열목록

- <110> Japan Science and Technology Agency
MIZU Masami
- <120> Immunostimulant
- <160> 6
- <170> KopatentIn version 1.71
- <210> 1
- <211> 60
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220>
- <223> Artificial S-oligo nucleotide

<400> 1
 tccatgacgt tcctgatgct aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 60
 60

<210> 2
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Solid phase synthesized peptide

<400> 2
 Arg Gly Asp
 1

<210> 3
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Solid phase synthesized peptide

<400> 3
 Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
 1 5

<210> 4
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial S-oligo nucleotide

<400> 4
 tccatgagct tcctgatgct aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 60
 60

<210> 5
 <211> 60
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificial nucleotide

<400> 5

tccatgacgt tcctgatgct aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 60

60

<210> 6

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificial nucleotide

<400> 6

tccatgagct tcctgatgct aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 60

60