

즉, 미코박테리아 제외)가 고려되어 왔다. 그러나, 동물이나 인체중에 있어서 상기 보강제의 임상적 사용은 저해되는데, 그 이유는 상기 보강제가 주입 부위에서의 육아종; 열병 및 다른 독성 효과; 및 튜버클린 과민증을 발생시키기 때문이다. 또한, 광유 및 수산화 알루미늄과 같은 기타 물질이 보강제로서 사용되어 왔으나, 역시 단점을 갖고 있다. 예컨대, 광유는 조직 자극을 산출시키고 강력한 종양원성인 것으로 공지되어 있다. 미국에서 유일하게 승인된 보강제인 수산화 알루미늄도 또한 접종 부위에서 육아종을 유발시키고, 더우기, 세포 매개 면역을 효과적으로 유도하지 못한다. 또한, 현재 사용되는 많은 보강제들은 인체중에서 대사가능치 않은 성분을 포함하기 때문에 이용성이 제한된다. 부가적으로, 대부분의 보강제들은 그 제조 절차가 시간 소모적이고, 어떤 경우에는 백신과 보강제 시스템을 배합하기 위해 정교하고 값비싼 장비를 사용할 필요가 있기 때문에 제조하기가 어렵다.

각종 면역학적 보강제들을 철저히 토의하려면 문헌[“면역학적 보강제의 현상태”(“Current status of Immunological Adjuvants”), Ann. Rev. Immunol., 1986, 4, pp. 369-388]을 참조하라. 또한, 특허 문헌에 제시된 각종 백신 보강제의 상세한 설명은 미합중국 특허 제 4,806,352호 제 5,026,543호; 및 제 5,026,546호를 참조하라.

최근, 통상적인 보강제의 단점과 결점을 극복할 수 있는 백신의 신규한 보강제를 찾아내기 위해 진행되고 있는 시도는 각종 물질에 대해 가능한 보강제가 면역 조절 능력, 즉, 임의의 방식으로 면역 시스템에 영향을 미치는 능력에 직접적으로 연관될 수 있다고 간주하는 약학 협회내의 당업자에 의해 이루어져 왔다. 예컨대, 특정 물질에 의해 증가된 시토킨(예, TNF, IL-2, IL-6, IL-8, 알파-인터페론 등)생산은 그 물질이 백신의 보강제로서 사용되는 경우 유리한 효과를 제공할 수 있는 지표인 것으로 해석될 수 있다. 그러나, 이러한 효과는 전혀 사실로 관찰된 바없다.

포도상구균 장독소 B는 예컨대, 세포매개 면역 응답(예, 세포독성 T-세포 임파구) 또는 체액 면역 응답(즉, 특이적인 항체 생산)에 대해 면역 증강 작용을 하는 것으로 밝혀진 바 없으나, 상기 장독소는 IL-2, TNF, 감마-인터페론 등과 같은 다양한 시토킨의 생성량을 증가시키는 것으로 나타났다(예, J. Immunol., 1975, 115, 575(Smith 등) 및 Infection and Immunity, 1978, 22, 62(Lansford 등) 참조). 이와 동일한 양태가 독성 쇼크 증후군 독소-1 및 기타 여러 물질에 대해서도 나타나는 것으로 밝혀졌다(예, J. Infectious Diseases, 1986, 153, 722(Poindexter 등), Immunology, 1986, 58, 203(Meusen 등), 및 J. Clin. Invest., 1984, 73, 1312(Ikejima 등)참조).

전술한 점에서 쉽게 볼 수 있는 바와 같이, 각종 물질들의 일반적인 면역조절 효과는 반드시 그 물질들의 면역 증강력의 정확한 지표가 되는 것은 아니다. 따라서, 이 사실은 각종 백신에 대해 효과적인 보강제일 수 있는 물질들에 대한 연구 계획을 헛되게 하였고, 결과적으로 약학 협회에서 그런 물질들에 대한 요구가 높아져 끊임없이 탐색되고 있다. 명백한 것은, 인간 및 가축 동물내의 광범위한 항원에 대한 강력한 세포 매개 면역 응답 및 체액 면역 응답을 유도하나, 프로인트 완전 보강제와 같은 통상적인 보강제의 부효과는 결여된 보강제 조성물이 크게 요구된다는 것이다. 이러한 배경하에 본 출원인들은 효과적인 백신 보강제에 대한 연구를 시작했다.

[발명의 개요]

본 발명은 면역 응답을 자극하기에 효과적인 양의 면역원과 백신 보강제로서 면역원에 대한 면역 응답을 증가시키기에 효과적인 양의 1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민을 함유하는 면역원/백신 보강제 조성물을 제공한다.

본 발명은 또한 (i) 면역 응답을 자극하기에 효과적인 양의 면역원과 (ii) 백신 보강제로서 면역 응답을 증가시키기에 효과적인 양의 1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민을 투여하는 단계를 포함하는 면역원에 대한 면역 응답을 증가시키는 방법을 제공한다.

임의의 1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민은 항비루스제로서 개시된 바 있다(예, 미합중국 특허 제 4,689,338호(Gerster) 및 제 4,929,624호(Gerster 등), 유럽 특허 출원 번호 제 90.301776.3(Gerster) 및 공동 양도된 공계류중인 미합중국 특허 출원 07/838,475(Gerster 등), 07/754,610(Gerster 등), 및 07/788,565(Gerster 등) 참조). 이들 화합물들중 몇몇은 또한 인터페론, 인터류킨, 및 인체와 마우스내의 중앙 과사 인자와 같이 시토킨의 생합성을 유도하는 것으로 공지되어 있다. 그러나, 본 발명에서 1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민은 백신 보강제로서 작용한다(즉, 면역원에 대한 체액 및/또는 세포 매개 면역 응답을 강화시키는 면역 자극 물질임). 이 화합물들은 바람직하지 않은 효과를 일으킬 수 있는 오염물이 거의 없고 특성이 잘 규명된 비교적 작은 합성 유기 분자이다. 이 화합물들은 통상, 적합하게는, 비독성이고 주사 부위에서 지나친 자극을 유발하지 않는다. 따라서, 본 발명은 종래기술의 약간의 백신 보강제들에 나타나는 단점을 극복할 수 있다.

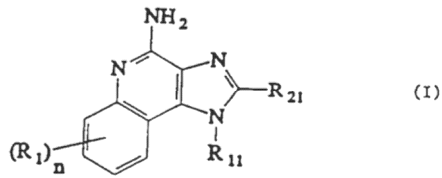
[발명의 상세한 설명]

본원에 사용된 바와 같이, “면역원/백신 보강제 조성물”이란 용어는 면역원과 1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민의 복합을 의미하며, 그 복합은 약학적 허용성 담체내의 상기 2 성분의 혼합물 형태이거나 별개의 형태, 예컨대, 한 성분으로서 면역원을 함유하고 다른 한 성분으로서 1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민을 함유하는 키트의 형태로 제공될 수 있다.

본 발명의 조성물중의 백신 보강제 성분은 1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민이다. 이런 부류의 화합물은 인체 및 쥐의 세포중에서 다양한 시토킨의 생합성을 유도한다고 밝혀진 바 있다. 시토킨 유도의 특이적인 프로파일은 상기 부류에 속하는 화합물 마다 어느 정도는 다를지라도, 상기 부류의 화합물에 공통적인 시토킨 유도의 일반적인 프로파일이 그 화합물들의 백신 보강제 활성화에 주요 역할을 하는 것이라고 생각된다. 또한, 이 부류의 약간의 화합물들은 β-임파구의 강력한 자극제인 것으로 보여지며, 따라서 체액 면역 반응을 증가시킬 수 있다.

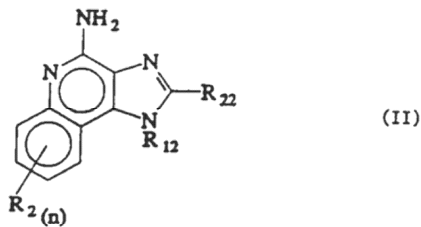
바람직하게는, 1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민은 하기 일반식(I) 내지 (V) 중의 하나로 정의되는 화합

물 또는 이들의 약학적 허용성 염이다:



상기 식중에서 R₁₁은 알킬, 히드록시알킬, 아실옥시알킬, 벤질, (페닐)에틸 및 페닐로 구성된 군에서 선택되며, 상기 벤질, (페닐)에틸 또는 페닐 치환체는 그 벤젠 고리상에 C₁ 내지 약 C₄의 알킬, C₁ 내지 약 C₄의 알콕시, 및 할로겐으로 구성된 군중에서 각각 선택된 1개 또는 2개부가 임의 치환되어 있고, 단, 상기 벤젠 고리가 2개의 상기 부들로 치환된다면, 이 부들은 함께 6개이하의 탄소원자를 포함해야 한다;

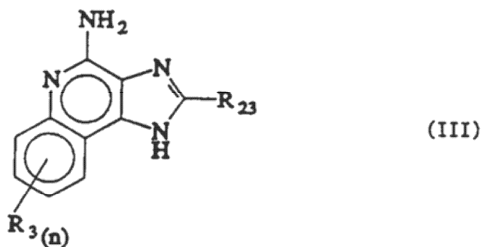
R₂₁은 수소, C₁ 내지 약 C₈의 알킬, 벤질, (페닐)에틸 및 페닐로 구성된 군중에서 선택되고, 상기 벤질, (페닐)에틸 또는 페닐 치환체는 그 벤젠 고리상에 C₁ 내지 약 C₄의 알킬, C₁ 내지 약 C₄의 알콕시, 및 할로겐으로 구성된 군중에서 각각 선택된 1개 또는 2개부가 임의 치환되어 있고, 단, 상기 벤젠 고리가 2개의 상기 부들로 치환된다면, 이 부들은 함께 6개 이하의 탄소원자를 포함해야 한다; 그리고 각 R₁이 C₁ 내지 약 C₄의 알콕시, 할로겐 및 C₁ 내지 약 C₄의 알킬로 구성된 군중에서 각각 선택되고, n은 0 내지 2의 정수이며, 단 n이 2이면, 상기 R₁기들은 함께 6개 이하의 탄소원자를 함유해야 한다;



상기 식중에서, R₁₂은 C₂ 내지 C₁₀의 직쇄 또는 분지쇄 알케닐 및 C₂ 내지 C₁₀의 치환된 직쇄 또는 분지쇄 알케닐로 구성된 군중에서 선택되고, 이때 상기 치환체는 C₁ 내지 C₄의 직쇄 또는 분지쇄 알킬 및 C₃ 내지 C₆의 시클로알킬; 및 C₁ 내지 C₄의 직쇄 또는 분지쇄 알킬로 치환된 C₃ 내지 약 C₆의 시클로알킬로 구성된 군중에서 선택된다;

R₂₂은 수소, C₁ 내지 약 C₈의 직쇄 또는 분지쇄 알킬, 벤질, (페닐)에틸 및 페닐로 구성된 군중에서 선택되고, 상기 벤질, (페닐)에틸 또는 페닐 치환체는 그 벤젠 고리상에 C₁ 내지 약 C₄의 직쇄 또는 분지쇄 알킬, C₁ 내지 약 C₄의 직쇄 또는 분지쇄 알콕시, 및 할로겐으로 구성된 군중에서 각각 선택된 1개 또는 2개부가 임의 치환되어 있고, 단, 상기 벤젠 고리가 2개의 상기 부들로 치환된다면, 상기 부는 함께 6개 이하의 탄소원자를 포함해야 한다; 그리고

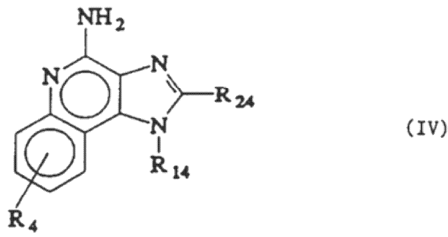
각 R₂가 C₁ 내지 약 C₄의 직쇄 또는 분지쇄 알콕시, 할로겐 및 C₁ 내지 약 C₄의 직쇄 또는 분지쇄 알킬로 구성된 군중에서 각각 선택되고, n은 0 내지 2의 정수이며, 단 n이 2이면, 상기 R₂기들은 함께 6개 이하의 탄소원자를 함유해야 한다;



상기 식중에서, R₂₃은 수소, C₁ 내지 약 C₈의 직쇄 또는 분지쇄 알킬, 벤질, (페닐)에틸 및 페닐로 구성된 군중에서 선택되고, 상기 벤질, (페닐)에틸 또는 페닐 치환체는 그 벤젠 고리상에 C₁ 내지 약 C₄의 직쇄 또는 분지쇄 알킬, C₁ 내지 약 C₄의 직쇄 또는 분지쇄 알콕시, 및 할로겐으로 구성된 군중에서 각각 선택된 1개 또는 2개부가 임의 치환되어 있고, 단, 상기 벤젠 고리가 2개의 상기 부들로 치환된다면, 이 부들은 함께 6개 이하의 탄소원자를 포함해야 한다; 그리고

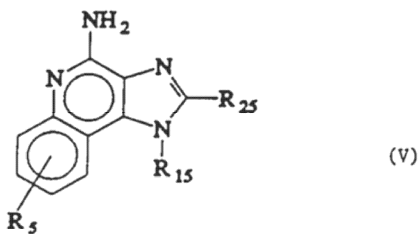
각 R₃은 C₁ 내지 약 C₄의 직쇄 또는 분지쇄 알콕시, 할로겐 및 C₁ 내지 약 C₄의 직쇄 또는 분지쇄 알킬로 구성된 군중에서 각각 선택되고, n은 0 내지 2의 정수이며, 단 n이 2이면 상기 R₃기들은 함께 6개 이하의

탄소원자를 함유해야 한다;




상기 식중에서, R₁₄는 -CHR_AR_B이고, 이때, R_B는 수소 또는 탄소-탄소 결합으로서, 단 R_B가 수소인 경우에는, R_A는 C₁ 내지 약 C₄의 알콕시, C₁ 내지 약 C₄의 히드록시알콕시, C₂ 내지 약 C₁₀의 1-알킬닐, 테트라히드로피라닐, 알콕시알킬(여기에서, 알콕시부는 1 내지 약 4개의 탄소원자를 함유하며, 알킬부는 1 내지 약 4개의 탄소 원자를 함유함), 2-, 3-, 또는 4-피리딜이며, 단 R_B가 탄소-탄소 결합인 경우에는, R_B 및 R_A는 함께 히드록시 및 C₁ 내지 약 C₄의 히드록시알킬로 구성된 군중에서 각각 선택된 하나 또는 그 이상의 치환체들로 임의 치환된 테트라히드로피라닐기를 형성한다;

R₂₄는 수소, C₁ 내지 약 C₄의 알킬, 페닐 및 치환된 페닐로 구성된 군중에서 선택되고, 이때, 치환체는 C₁ 내지 약 C₄의 알킬, C₁ 내지 약 C₄의 알콕시, 및 할로겐으로 구성된 군중에서 선택된다; 그리고 R₄는 수소, C₁ 내지 약 C₄의 직쇄 또는 분지쇄 알콕시, 할로겐, 및 C₁ 내지 약 C₄의 직쇄 또는 분지쇄 알킬로 구성된 군중에서 선택된다;



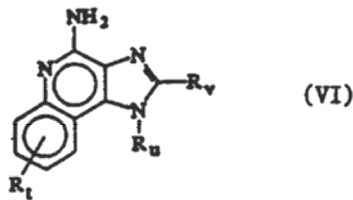
상기 식중에서, R₁₅는 수소; C₁ 내지 약 C₁₀의 직쇄 또는 분지쇄 알킬, 및 C₁ 내지 약 C₁₀의 치환된 직쇄 또는 분지쇄 알킬, 이때 상기 치환체는 C₃ 내지 약 C₆의 시클로알킬 및 C₁ 내지 약 C₄의 직쇄 또는 분지쇄 알킬로 치환된 C₃ 내지 약 C₆의 시클로알킬로 구성된 군중에서 선택되며; C₂ 내지 약 C₁₀의 직쇄 또는 분지쇄 알케닐 및 C₂ 내지 약 C₁₀의 치환된 직쇄 또는 분지쇄 알케닐, 이때 상기 치환체는 C₃ 내지 약 C₆의 시클로알킬 및 C₁ 내지 약 C₄의 직쇄 또는 분지쇄 알킬로 치환된 C₃ 내지 약 C₆의 시클로알킬로 구성된 군중에서 선택되고; C₁ 내지 약 C₄의 히드록시알킬; 알콕시알킬, 이때, 알콕시부는 1 내지 약 4개의 탄소 원자를 함유하고 알킬부는 1 내지 약 6개의 탄소 원자를 함유하며; 아실옥시알킬, 이때 아실옥시부는 C₂ 내지 약 C₄의 알카노일옥시 또는 벤조일옥시이고, 알킬부는 1 내지 약 6개의 탄소 원자를 함유하며; 벤질; (페닐)에틸; 및 페닐로 구성된 군중에서 선택되고; 상기 벤질, (페닐)에틸 또는 페닐 치환체는 그 벤젠 고리상에 C₁ 내지 약 C₄의 알킬, C₁ 내지 약 C₄의 알콕시, 및 할로겐으로 구성된 군중에서 각각 선택된 1개 또는 2개부가 임의 치환되어 있고, 단, 상기 벤젠 고리가 2개의 상기 부들로 치환된다면, 이 부



들은 함께 6개 이하의 탄소 원자를 함유해야 한다; R₂₅는  으로서, 이때, R_x 및 R_y는 수소, C₁ 내지 약 C₄의 알킬, 페닐, 및 치환된 페닐로 구성된 군중에서 각각 선택되고, 여기에서 치환체는 C₁ 내지 약 C₄의 알킬, C₁ 내지 약 C₄의 알콕시, 및 할로겐으로 구성된 군중에서 선택된다;

X는 C₁ 내지 약 C₄의 알콕시, 알콕시알킬(이때, 알콕시부는 1 내지 약 4개의 탄소 원자를 함유하고 알킬부는 1 내지 약 4개의 탄소 원자를 함유함), C₁ 내지 약 C₄의 할로알킬, 알킬아미도(이때, 알킬기는 1 내지 약 4개의 탄소 원자를 함유함), 아미노, 치환된 아미노(이때, 치환체는 C₁ 내지 약 C₄의 알킬 또는 히드록시알킬임), 아지도, C₁ 내지 약 C₄의 알킬티오로 구성된 군중에서 선택된다; 그리고 R₅는 수소, C₁ 내지 약 C₄의 직쇄 또는 분지쇄 알콕시, 할로겐, 및 C₁ 내지 약 C₄의 직쇄 또는 분지쇄 알킬로 구성된 군중

에서 선택된다; 또는



상기 식중에서, R₁는 수소, C₁ 내지 약 C₄의 직쇄 또는 분지쇄 알콕시, 할로겐, 및 C₁ 내지 약 C₄의 직쇄 또는 분지쇄 알킬로 구성된 군중에서 선택되고; R₂는 2-메틸프로필 또는 2-히드록시-2-메틸프로필이며; 그리고 R₃는 수소, C₁ 내지 약 C₆의 알킬(예, 메틸), 또는 알콕시알킬(이때, 알콕시부는 1 내지 약 4개의 탄소 원자를 함유하고 알킬부는 1 내지 약 4개의 탄소 원자(예, 에톡시메틸)을 함유함)이다.

상기 화합물들은 본 발명의 개요부에서 지적인 여러 특허 및 출원들에 개시되고 청구된 바 있다.

n이 0, 1 또는 2일 수 있는 경우에, n은 0 또는 1인 것이 바람직하다.

상기 R₁-R₅ 치환체들은 본원에서 일반적으로 “벤조 치환체들”을 나타낸다. 바람직한 벤조 치환체는 수소이다.

상기 R₁₁-R₁₅ 치환체는 본원에서 일반적으로 “1-치환체”를 나타낸다. 바람직한 1-치환체는 2-메틸프로필 또는 2-히드록시-2-메틸프로필이다.

상기 R₂₁-R₂₅ 치환체는 본원에서 일반적으로 “2-치환체”를 나타낸다. 바람직한 2-치환체는 수소, C₁ 내지 약 C₆의 알킬, 알콕시알킬(이때, 알콕시부는 1 내지 약 4개의 탄소 원자를 함유하고 알킬부는 1 내지 약 4개의 탄소 원자를 함유함)이다. 가장 바람직한 2-치환체는 수소, 메틸, 또는 에톡시메틸이다.

바람직한 1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민 화합물은 다음과 같다:

- 1-(2-메틸프로필)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민;
- 1-(2-히드록시-2-메틸프로필)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민;
- 1-(2-히드록시-2-메틸프로필)-2-메틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민; 및
- 1-(2-히드록시-2-메틸프로필)-2-에톡시메틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민.

1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민은 특정한 면역원에 대한 면역 응답을 증가시키기에 효과적인 양으로 제공된다(또는, 적절하다면 면역원/백신 보강제 조성물의 형태로 투여된다). 예컨대, 상기 화합물이 면역원과 무관하게 투여되는 경우, 즉, 별도의 주사로 투여되는 경우, 그 화합물은 일반적으로 약 0.003 내지 약 5mg/kg의 양으로 투여한다. 그러나, 유효량을 함유하는 특정량은 투여되는 특정한 1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민, 특정한 면역원 및 그 양, 증강되어야만 하는 면역 응답(체액 또는 세포 매개 면역 응답), 면역 시스템의 상태(예, 억제, 타협, 자극), 화합물 및 면역원의 투여 방법 및 순서, 피검체, 및 목적하는 치료 효과를 비롯한 임의의 요인들에 어느 정도 의존적이다. 따라서, 1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민의 유효량을 함유하는 양을 일반적으로 기술하는 것을 실용적이지 않다. 그러나, 당업자라면 상기 요인들의 고려하에 적절한 양을 쉽게 결정할 수 있을 것이다.

하기 실시예에 제시되는 바와 같이, 1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민은 체액 및 세포 매개 면역 응답을 모두 증강시키는 효과를 가지고 있다. 따라서, 면역원은 체액 또는 세포 매개 면역 응답, 또는 그 둘다를 향상시키는 임의의 물질일 수 있다. 적합한 면역원으로는 생바이러스계 및 세균계 면역원, 및 불활성화된 바이러스계, 종양 유래계, 원생 생물계, 유기체 유래계, 진균계, 및 세균계 면역원, 유독소류, 독소류, 다당류, 단백질, 당단백질, 펩티드 등을 포함한다. BCG(생 세균), 콜레라, 플라크, 및 장티푸스(사 세균), B형 간염, 인플루엔자, 불활성화된 폴리오, 및 광견병(불활성화된 바이러스), 마진, 유행성 이하선염, 풍진, 구강 폴리오, 및 황열(생 바이러스), 파상풍 및 디프테리아(유독소), 인플루엔자 호혈균 b, 수막염균 및 폐렴구균(세균 다당류)과 관련하여 사용된 백신 제제와 같은 통상적인 백신 제제가 면역원으로서 사용될 수 있다.

더우기, 현재 실험중인 임의의 면역원, 특히 재조합 단백질, 당단백질 및 강한 면역 응답을 일으키지 않는 펩티드와 같은 물질이 또한 1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민과 함께 사용될 수 있다고 생각된다. 실험중인 서브 유닛 면역원들의 일례로는 아데노바이러스, AIDS, 수두, 시토메갈로바이러스, 뎅그열, 고양이 백혈병, 가금 폐스트, A형 간염, B형 간염, HSV-1, HSV-2, 돈 콜레라, A형 인플루엔자, B형 인플루엔자, 일본 뇌염, 마진, 파라인플루엔자, 광견병, RS(respiratory syncytial) 바이러스, 로타바이러스, 우체 및 황열과 같은 바이러스 질환과 관련된 것을 포함한다.

본 발명에 사용하기 위한 바람직한 면역원에는 바이러스 병원균 및 종양 유래의 면역원과 같은 T-의존적인 면역원이 포함된다.

본 발명에 사용하기에 특히 바람직한 면역원은 문헌 [J. Infect. Dis. 1987, 155,914(Stanberry 등)]에 기술된 바와 같이 제조된 단순 헤르페스 II(HSV-2) 당단백질 서브유닛 제제이다.

본 발명의 방법에서, 면역원은 면역 응답을 자극하기에 효과적인 양으로 투여된다. 유효량을 함유하는 특정량은 투여되는 특정한 면역원, 특정한 보강제 및 그 양, 증강되어야만 하는 면역응답(체액 또는 세포 매개 면역 응답), 면역 시스템의 상태(예, 억제, 타협, 자극), 화합물 및 면역원의 투여 방법 및 순서, 및 목적하는 치료 효과를 비롯한 임의의 요인들에 어느 정도 의존적이다. 따라서, 유효량의 면역원

을 함유하는 양을 일반적으로 기술하는 것은 실용적이지 않다. 그러나 당업자라면 상기 요인들의 고려하에 적절한 양을 쉽게 결정할 수 있을 것이다.

본 발명의 면역원/백신 보강제 조성물은 추가로 당업자에게 공지된 약학적 허용성 성분, 부형제, 담체 등을 함유할 수 있다.

본 발명의 면역원/백신 보강제 조성물은 당업자에게 공지된 통상적인 방법(예, 경구, 피하, 비측, 국소)에 따라 동물, 예컨대, 포유류(인간 및 비인간), 가금 등에게 투여될 수 있다. 1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민은 면역원과 동시에 투여하거나(혼합물로 또는 별도로, 예컨대 경구 또는 별도 주사 투여함), 또는 면역원으로 공격하기 전에 투여하는 것이 바람직하다. 하기 실시예에서 밝혀지는 바와 같이(당 기술분야에 일반적인 바와 같이) 면역원으로 공격하기 전에 백신 보강제의 투여는 자극 효과보다는 면역 억제 효과를 산출시킬 수 있다.

하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위해 제공한다.

본 실시예에서, “화합물 A”는 1-(2-메틸프로필)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민을 나타낸다. “화합물 B”는 1-(2-히드록시-2-메틸프로필)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민을 나타낸다. “화합물 C”는 1-(2-히드록시-2-메틸프로필)-2-메틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민을 나타낸다. “화합물 D”는 1-(2-히드록시-2-메틸프로필)-2-에톡시메틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민을 나타낸다.

[인체 말초 혈액 단핵 세포 배양물에 있어서의 ³H-티미딘 흡수의 자극]

하기 기술되는 시험 방법은 인체 세포내에서 ³H-티미딘의 흡수를 자극하는 화합물의 능력을 증명한 것이다. ³H-티미딘의 흡수력의 증가는 그 세포가 활성적으로 분열한다는 것을 나타낸다.

[배양용 혈액 세포 조성물]

정맥 천자로 전체 혈액을 헤파린 바큐테이너(vacutainer) 튜브로 수집했다. 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)는 피콜-파크[®](Ficoll-Paque[®])용액(Pharmacia LKB Biotechnology Inc.사 시판품, 뉴저지, 피스카타웨이 소재)을 사용하여 분리했다. PBMC를 항크스액으로 세정한 다음, 2.0mM L-글루타민, 10% 태내 송아지 혈청 및 1% 페니실린/스트렙토마이신을 함유하는 PRMI 1640배지로 희석하여 2 × 10⁶ 세포/mL 농도가 되도록 했다.

[화합물 제조]

화합물을 물에 용해시킨 다음 상기에서 사용된 배지로 희석하여 목적하는 농도로 만들었다.

[항온배양]

화합물 용액 0.1mL부를 96웰 둥근 바닥 조직 배양판의 웰(각 처리군당 3웰)에 첨가했다. 대조용 웰에는 배지 0.1mL부를 첨가했다. 세포 현탁액 0.1mL부(1 × 10⁵ 세포)를 각 웰에 첨가하고 그 배양판들은 5% 이산화탄소의 존재하에 37°C에서 48시간 동안 항온 배양했다. 배양 마지막 4시간 내지 6시간째 ³H-티미딘 1 μCi(6.7 Ci/mole)의 비활성을 지닌; New England Nuclear사 제품)를 각 웰에 첨가했다.

[³H-티미딘 흡수 측정/분석]

배양물을 수거하여 유리 섬유 필터 스트립상에 모아두었다. 각 스트립을 신틸레이션 바이얼 용기에 넣는다. 아쿠아솔[®]-2 유니버설 LSC 콕테일(Aquasol[®]-2 Universal LSC Cocktail; Dupont사 시판품) 1 내지 2mL 부를 각 웰에 첨가한다. 15분 후, 방사능을 신틸레이션 계수기내에서 1분동안 계수한다. 처리 웰에서 측정되는 1분당 계수치(“CPM”)를 대조용 웰에서 측정되는 1분당 계수치로 나눔으로써 자극 지수(SI)를 계산했다.

결과를 하기 표에 제시한다. 농도는 세포 현탁액을 첨가한 후 웰에서 측정되는 최종 농도이다. CPM 값은 각 처리 군당 3웰의 평균 CPM이다. 식물성 혈구 응집소(PHA) 및 리포다당체(LPS)는 참조 제제로서 포함된다.

인체 말초 혈액 단핵 세포 배양물에 있어서의 ³ H-티미딘 흡수의 자극		
처리	CPM ± SEM	SI
배지	4,859 ± 392	1.0
PHA (5 μg/mL)	59,818 ± 2,867	12.3
LPS (2 μg/mL)	3,228 ± 433	0.7
화합물 C (4 μg/mL)	30,119 ± 636	6.2
화합물 C (1 μg/mL)	29,596 ± 3,221	6.1
화합물 C (0.25 μg/mL)	43,055 ± 9,383	8.9
화합물 C (0.06 μg/mL)	24,336 ± 2756	5.0

[쥐 비장 세포에 의한 ³H-티미딘 흡수의 자극]

하기 기술된 시험 방법은 쥐의 비장 세포에 의한 ³H-티미딘의 흡수를 자극하는 화합물의 능력을 증명한

것이다. ³H-티미딘의 흡수력의 증가는 그 세포가 활성적으로 분열한다는 것을 나타낸다.

[배양용 비장 세포 제조]

4 내지 8주령된 수컷 CFW 마우스로 부터 비장을 무균적으로 분리시킨 후, 항스액(HBSS) 10mL내에 넣어두었다. 캡슐로 부터 세포를 분리시키기 위해 메스를 사용했다. 단세포 현탁액은 19계이지 바늘이 장착된 5.0mL 주사기를 사용하여 그 현탁액을 수회 피펫팅하므로써 제조했다. 현탁액은 15mL 원심 분리관에 옮겨 4분동안 얼음상에 방치시켰다. 상청액을 10mL 피펫으로 제거한 뒤 깨끗한 15mL 원심분리관에 옮겨 1200rpm에서 5 내지 10분동안 원심분리시켰다. 상청액을 제거했다. 적혈구 세포를 제거하기 위해, 펠릿을 0.15M 염화 암모늄 5mL에 재현탁시킨 뒤, 실온에서 5분동안 방치시킨 다음 1200rpm에서 5 내지 10분동안 원심분리시켰다. 상청액을 제거했다. 펠릿을 2회 10mL HBSS에 재현탁시킨 다음 1200rpm에서 5 내지 10분동안 원심분리시켰다. 상청액을 제거했다. 펠릿을 2.0mM L-글루타민, 10% 태내 송아지 혈청, 1% 페니실린/스트렙토마이신 및 5×10^{-5} M 2-머캅토 에탄올을 함유하는 RPMI 1640 배지에 재현탁시켰다. 이 세포를 배지로 희석하여 2×10^6 세포/mL 농도가 되도록 했다.

[화합물 제조]

화합물을 물에 용해한 다음 배지로 희석하여 목적하는 농도로 만들었다.

[항온배양]

PBMC내에서 흡수시키기 위해 전술한 절차와 조건을 동일하게 사용했다.

[³H-티미딘 흡수 측정/분석]

PBMC 내에서 흡수시키기 위해 전술한 절차와 방법을 동일하게 사용했다.

결과를 하기 표에 제시한다. 농도는 세포 현탁액을 첨가한 후 웰에서 측정되는 최종 농도이다. CPM값은 각 처리군당 3웰의 평균 CPM이다. 콘카나발린 A(ConA), 리포다당체(LPS), 포도상구균 장독소 B(SEB) 및 폴리리보 이노신산-폴리리보시티딜산(Poly IC)은 참조 제제로서 포함된다.

쥐 비장 세포에 의한 ³ H-티미딘 흡수의 자극		
처리	CPM	SI
백거	19,728	1.0
ConA (5 μg/mL)	488,180	35.6
LPS (5 μg/mL)	114,023	8.3
SEB (1 μg/mL)	303,213	24.2
폴리 IC (5 μg/mL)	36,102	2.6
화합물		
C (1 μg/mL)	161,573	11.8
C (0.1 μg/mL)	147,356	10.7
C (0.01 μg/mL)	67,960	5.0
C (0.001 μg/mL)	20,004	1.4
C (0.0001 μg/mL)	17,759	1.3
A (1 μg/mL)	149,940	10.9
A (0.1 μg/mL)	87,753	6.4
A (0.01 μg/mL)	21,188	1.5
A (0.001 μg/mL)	21,270	1.5
B (1 μg/mL)	146,980	10.7
B (0.1 μg/mL)	51,880	3.8
B (0.01 μg/mL)	19,525	1.4
B (0.001 μg/mL)	20,596	1.5
B (0.0001 μg/mL)	22,076	1.6
D (1 μg/mL)	174,203	12.7
D (0.1 μg/mL)	165,630	12.1
D (0.01 μg/mL)	180,606	13.2
D (0.001 μg/mL)	116,380	8.5
D (0.0001 μg/mL)	25,689	1.9

[쥐 비장 세포내에 있어서의 항체 생성의 자극]

하기 기술된 시험 방법은 쥐 비장 세포내에 있어서의 항체 생성을 자극하는 화합물의 능력을 증명한 것이다.

[배양용 비장 세포 제조]

비장 세포를 전술한 바와 같이 제조하고, 단, 6월 조직 배양판내에서 희석시켜 최종 농도가 1×10^7 세포/mL가 되도록 했다.

[화합물 제조]

화합물을 물에 용해시킨 다음, 배지로 희석하여 목적하는 농도로 만들었다.

[항온배양]

화합물 용액 0.1mL부를 각 웰에 첨가했다(각 처리군당 2웰). 대조용 웰에는 배지를 첨가했다. 웰중의 최종 용량을 배지로 1mL로 조정했다. 평판을 5% 이산화 탄소의 존재하에 37°C에서 72시간 동안 항온 배양했다.

[항체 생산 측정/분석]

항체 생산은 변형된 저언 플라크 검정법(Jerne Plaque Assay)을 이용함으로써 측정했다. 간략히 요약하면 이 방법은 다음과 같다: 플라스틱 배양 접시에 2mL의 폴리-L-리신(50µg/mL)을 도포했다. 15분후, 평판을 인산염 완충 식염수(PBS)로 세정하고, PBS로 1:20으로 희석한 세정된 양 적혈구 세포(SRBC) 2mL를 첨가했다. 15분후 평판을 교반한 후, 다시 15분간 방치시킨 다음 완충 식염수로 세정했다. 마지막으로, 인산염 완충 식염수(pH 7.2) 1.5mL를 2.5×10^5 비장 세포와 함께 각 평판에 첨가했다. 이 평판을 그 다음 기니아 피구 보체의 존재하에 37°C에서 1시간 동안 항온 배양한 후, 플라크 형성 세포(PFC)를 약간 확대시켜 계수했다. 결과를 평균 PFC/배양물 ± SEM(표준 평균 오차)으로서 제시했다. 자극 지수(SI)는 처리 웰에서 측정되는 PFC를 대조용(평균) 웰에서 측정되는 PFC로 나눔으로써 계산했다.

결과를 하기 표에 제시한다. 농도는 세포 현탁액과 화합물 용액을 첨가한 후 웰에서 측정되는 최종 농도이다. PFC값은 각 처리군당 2웰의 평균 PFC이다. 리포다당체(LPS) 및 폴리리보이노신산-폴리리보시티딜산(PIC)은 참조 제제로서 포함된다.

쥐 비장 세포내에 있어서의 항체 생성의 자극			
처리	PFC/배양물	SI	PFC/10 ⁶ 세포
배지	167±18	1.0	30
LPS (10 µg/mL)	1,555±208	9.3	179
LPS (3 µg/mL)	1,300±391	7.8	118
LPS (1 µg/mL)	1,150±232	6.9	153
PIC (10 µg/mL)	604±227	3.6	106
PIC (3 µg/mL)	365±142	2.2	49
PIC (1 µg/mL)	273±15	1.6	29
화합물			
C (10 µg/mL)	1,419±219	8.5	121
C (3 µg/mL)	1,271±67	7.6	190
C (1 µg/mL)	1,465±311	8.8	274

[쥐 비장 세포내에 있어서의 B 세포의 자극]

하기 기술된 시험 방법은 쥐 비장 세포내에 있어서의 B세포를 자극하는 화합물의 능력을 증명한 것이다.

[배양용 비장 세포 제조]

비장 세포를 ³H-티미딘 흡수와 관련하여 전술한 바와 같이 제조했다.

[화합물 제조]

화합물을 물에 용해시킨 다음, 배지로 희석하여 목적하는 농도로 만들었다.

[항온배양]

세포 현탁액 0.9mL부를 12웰 조직 배양판의 각 웰에 첨가했다. 화합물 용액 0.1mL부를 각 웰에 첨가했다(각 처리군당 2웰). 대조용 웰에는 배지 0.1mL부를 첨가했다. 평판을 5% 이산화 탄소의 존재하에 37°C에서 72시간 동안 항온 배양했다.

[B 세포 및 T 세포의 정량]

세포 배양물을 웰로 부터 분리해낸 뒤, 제 2웰의 배양물과 혼합한 다음, 항스액으로 2회 세척했다. 세포를 1% 태내 송아지 혈청(FCS)이 보강된 인산염 완충 식염수(PBS)로 희석하여 1×10^6 세포/100µL의 농도로 만들었다. 이 세포를 항체로 4°C에서 30분동안 염색했다. 플루오레세인 이소티오시아네이트 표지된 염소 항-마우스 면역글로불린 항체(FITC_αI₀)는 B세포 표지인자로서 작용한다. 플루오레세인 이소티오시아네이트 표지된 항 마우스 Thy 1.2 항체는 T세포 표지 인자로서 작용한다. 세포를 그다음 1% FCS 보강된 PBS로 2회 세척한 다음 벡톤 디킨슨(Becton Dickinson) FACSCAN을 사용하여 형광성을 분석했다. 그 결과를 표지인자에 대해 양성인 총 세포, 즉, 전체(분리되지 않은) 세포 및 아세포-유사 세포의 백분율로서 기록했다.

결과를 하기 표에 제시한다. 농도는 세포 현탁액과 화합물 용액을 첨가한 후 웰에서 측정되는 최종 농도

이다. 리포 다당체는 참조 제제로서 포함된다.

쥐 비장 세포 배양물내에 있어서의 B 세포 및 T 세포의 정량				
처리	FITC α I _g		FITC 항 Thy 1.2	
	전체	아세포	전체	아세포
배지	56.5	-	34.7	-
LPS (5 μ g/mL)	73.1	93.6	15.5	9.4
화합물				
C (4 μ g/mL)	72.3	97.1	14.1	10.7
C (1 μ g/mL)	75.0	97.0	14.1	7.3
C(0.25 μ g/mL)	74.0	96.0	12.8	9.9

[마우스내에 있어서의 항체 형성의 증진]

하기 기술된 시험 방법은 양의 적혈구 세포(T-의존적 항원)에 대한 마우스내의 항체 형성을 증강시키는 화합물의 능력을 증명한 것이다.

0일째, 4주 내지 8주령의 수컷 CFW 마우스에게 양의 적혈구 세포(인산염 완충 식염수 중에 1×10^7 개)를 복강내로 주입했다. 또한, 0일째 시험 화합물을 멸균수에 용해한 뒤 복강내로 주입했다(각 처리군당 마우스 3마리). 4일째 마우스를 죽여 비장을 분리해냈다. 인산염 완충 식염수중에 단세포 현탁액을 제조하여 최종 농도가 5×10^5 세포/mL가 되도록 하여 변형된 저언 플라크 검정법에 사용했다. 이 검정은 비장 세포 배양물내에 있어서의 항체 형성과 관련하여 전술한 바와 같이 수행했다. 그 결과를 비장세포 10^6 세포당 플라크 형성 세포(PFC)로서 기록했다. 자극 지수(SI)는 처리군에서 측정되는 PFC값을 대조군(화합물이 첨가되지 않은 SRBC)에서 측정되는 PFC값으로 나눈값이다.

결과를 하기 표에 제시한다. 그 값은 플라크 형성 세포(PFC) \pm SEM의 평균값이다. 각 데이터 값은 3마리 마우스의 평균 값이다. 리포다당체(LPS) 및 폴리리보이노신산-폴리리보시티딜산(폴리 IC)은 참조제제로서 포함된다.

마우스내에 있어서의 항체 생성의 증강			
처리	PFC/ 10^6 세포	PFC/비장	SI
식염수	1	11	
SRBC	7 \pm 1	473	1.0
LPS(1mg/kg) + SRBC	246 \pm 24	12,054	35.1
폴리 IC(100 μ g/kg)+SRBC	74 \pm 11	5,180	10.5
화합물 C(10mg/kg)+SRBC	21 \pm 2	1,372	3.0
화합물 C(3mg/kg)+SRBC	82 \pm 7	6,123	11.7
화합물 C(1mg/kg)+SRBC	58 \pm 7	3,789	8.3

[마우스내에 있어서의 항체 형성의 억제]

이 시험 방법은 항체 형성의 증강에 대해 상술한 것과 같으며, 단, 화합물이 1일전에 투여되고 1×10^8 SRBC가 0일째 투여된다. 억제율(%)는 다음과 같이 계산한다:

$$\frac{(\text{SRBC만의 PFC값} - \text{처리시의 PFC값})}{\text{SRBC만의 PFC값}} \times 100$$

그 결과를 하기 표에 예시한다.

마우스내에 있어서의 항체 형성의 억제			
처리	PFC/10 ⁶ 세포	PFC/비장	억제율 (%)
식염수	1 ± 1	38	-
SRBC	594 ± 41	34,000	-
화합물 C(1mg/kg)+SRBC	129 ± 16	9,500	78.3
화합물 C(3mg/kg)+SRBC	87 ± 8	6,700	85.4
화합물 C(1mg/kg)+ 0일째 식염수	3 ± 1	220	-

하기 기술된 실험은 단순 헤르페스 2(HSV-2) 당단백질 서브유닛 백신과 함께 사용된 1-(2-메틸프로필)-1H-이미다조[4,5,-c]퀴놀린-4-아민의 기니아피그내에 있어서의 보강제 효과를 예시한 것이다.

[HSV-2 당단백질 제조]

HSV-2(균주 MS)로 감염된 배로세포를 가용화시키고 렌틸-렉틴 세파로즈 크로마토그래피하여 당단백질을 정제했다. 최종 제조물은 모두 3가지 HSV-2 당단백질, gB, gD, 및 gG를 함유했고, 이를 평가했다. 이 당단백질 제조물을 총 당단백질 함량이 35µg/0.1mL이 되도록 희석했다. 당단백질의 투여는 하기 실험 디자인과 함께 기술된다.

[처리군]

1-(2-메틸프로필)-1H-이미다조[4,5,-c]퀴놀린-4-아민(물(76.5%), 이소스테린산(10%), 스테아릴 알콜(3.1%), 폴리소르베이트 60(2.55%), 세틸 알콜(2.2%), 벤질 알콜(2%), 글리세린(2%), 소르비탄 모노스테아레이트(0.45%), 메틸파라벤(0.2%), 및 프로필파라벤(0.02%)을 함유하는 크림중의 1중량%)을 하기 기술되는 바와 같이 기니아 피그에게 당단백질 투여와 동시에(“S군”), 또는 당단백질을 투여한지 48시간 후에(“D군”) 투여하기 시작하여 5일 동안 5mg/kg/일의 농도로 초막내로 투여했다. 그 염산염은 수용액상태로 당단백질 투여와 동시에 투여(“서브Q S군”)하기 시작하여 5일 동안 3mg/kg/일의 투여량으로 피하투여했다. 프론티드 완전 보강제(“CFA”, Sigma)는 보강제와 당단백질(“CFA군”) 1:1 혼합물로서 투여했다. 면역화되지 않고 감염된 대조용 군도 사용했다. 또한, 1군에는 당단백질만을 제공했다.(“당단백질군”).

[실험 디자인]

200 내지 300g 중량의 하틀리 암컷 기니아 피그(찰스 리버 브리딩 레보레이토리, 매사추세츠 월링톤 소재)는 HSV-2 당단백질 35µg을 1차로 HSV-2의 초막내 접종 35일전과 2차로 접종 14일전에 뒷다리부에 투여하여 면역화시켰다.

이 동물에게 HSV-2 333균주(제 1 실험) 또는 HSV-2 MS 균주(ATCC VR-540)(제 2 실험) 10^{5.7} pfu를 초막내로 접종했다. 그 다음 초막 분비용 샘플을 다음 10일동안 채취하고 배로 세포상의 비루스 농도에 대한 검정 전에 -70°C에서 동결 보존시켰다. 급성 감염 기간 동안(1 내지 14일), 그 동물을 생식기의 피부 질환에 대해 매일 평가하고 문헌[J. Infect. Dis., 1982, 146, 397(Stanberry 등)]에 기술된 바와 같이 0 내지 4의 등급으로 나타냈다. 총상해 지수는 1일에서 14일 동안의 상해 지수들의 총합이다. 급성 감염에서 회복된 후에도 15일 내지 60일 동안 매일 재발되는 헤르페스성 질환에 대해 검사했다. 혈청은 초막내 접종하기 바로 전과 14일, 44일 또는 60일 후에 면역화된 동물로부터 채혈했다.

[HSV-2 항체에 대한 효소-결합된 면역흡착제 검정법]

HSV-2 항체의 정량은 ELISA 검정법으로 수행했다. 고상으로서 렉틴 정제된 HSV-2 당단백질을 사용했고, 기니아 피그 항체의 검출을 위해 퍼옥시다제-결합된 래빗 항-기니아 피그 면역글로블린(Accurate Chemical, 뉴욕, 웨스트베리 소재)을 사용했다. 흡광도를 10,000 ELISA 유닛 값으로 임의 설정된 표준화된 대조용 혈청과 비교했다.

[통계]

급성 질환에 대한 상해 정도의 지수, 비루스 외피, 및 재발성 상해 발생일의비교는 다수군들을 조정하기 위한 본페로니(Bonferroni) 보정된 2-말단 ANOVA로 수행했다. 데이터는 평균치 ± S.E.로 나타냈다.

[급성 질환]

1-(2-메틸프로필)-1H-이미다조[4,5,-c]퀴놀린-4-아민이 HSV-2 당단백질 백신의 효과를 증가시키는 지를 결정하기 위해 11마리의 기니아 피그로 이루어진 5개의 처리군을 다음과 같이 사용했다:

- 1) 면역화되지 않은 대조군;
- 2) 당단백질군;
- 3) D군;
- 4) S군; 및
- 5) CFA 군.

HSV-2 당단백질 만으로 면역화시킨 경우, 면역화되지 않은 대조군에 있어서의 19.1 ± 3.2의 총 상해 지

수를 $3.9 \pm 0.9 (P < .001)$ 로 현저하게 감소시켰다. 당단백질 군에서 질환이 악화되었기 때문에, 다른 군들에 대한 추가되는 현저한 감소성을 증명할 수 없었으나, 백신 보강제로 처리된 군들 각각의 총 상해 지수는 훨씬 적었다(D군, 2.8 ± 0.7 ; S군, 2.2 ± 0.6 ; CFA군, 1.2 ± 0.5).

당단백질 만으로의 면역화와 또한 여러 보강제 제제들로의 면역화는 면역화되지 않은 감염된 대조군에 비해 초막의 비루스 외피를 감소시켰다.

[재발성 질환]

면역화되지 않은 대조군과 당단백질군에 대한 재발 패턴은 유사했다(재발성 상해 발생일이 각각 4.9 ± 0.9 대 4.3 ± 0.9 였음). 그러나, 보강제로서 1-(2-메틸프로필)-1H-이미다조[4,5,-c]퀴놀린-4-아민을 사용한 경우에는 재발성 상해 발생일을 S군 및 D군에 대해, 각각 0.8 ± 0.3 및 0.1 ± 0.1 로 크기 감소시켰다(당단백질군과 비교해 볼때 각각에 대해 $P < .01$ 임). S군에 있어서 10마리 동물중의 1마리만이 재발된 반면, 당단백질만을 투여받은 수용체 9마리중 8마리($P < .002$)가 재발되었다. CFA군에서는 10마리 동물중의 3마리가 재발성 상해를 나타냈다.

[항체 응답]

접종일에 항체 역가는 당단백질군과 비교해 볼때, S군에서는 최저한으로 증가되었으나($P < .05$), CFA군에서는 10배 이상으로 증가되었다($P < .001$). 면역화되지 않은 감염된 대조군에 있어서의 최고 항체 역가(44일째)는 당단백질군에서 유도된 수종까지 접근했다. CFA군의 역가는 면역화되지 않은 대조군 및 백신 보강제로서 1-(2-메틸프로필)-1H-이미다조[4,5,-c]퀴놀린-4-아민을 투여받은 군보다 훨씬 높았다.

전술한 실험을 2가지 처리군을 추가하여 반복하므로써 당단백질과 함께 피하 투여된 1-(2-메틸프로필)-1H-이미다조[4,5,-c]퀴놀린-4-아민("서브Q S군")의 효과, 및 1-(2-메틸프로필)-1H-이미다조[4,5,-c]퀴놀린-4-아민 단독("화합물군")의 효과를 조사했다.

재발성 질환에 대한 효과를 보다 잘 관찰하고자 급성 질환을 약하게 산출하지만 재발을 빈번하게 일으키는 HSV-2 MS 균주의 보관주를 사용했다.

[급성 질환]

급성 상해를 진행시키는 유일한 군은 면역화되지 않은 군(화합물군, 9마리중 9마리; 면역화되지 않은 대조군, 11마리중의 11마리)과 당단백질군(11마리중 6마리)이었다. 또한, 당단백질 만으로의 면역화가 상당한 효과를 나타내기 때문에, 급성 질환의 중한 정도에 대한 1-(2-메틸프로필)-1H-이미다조[4,5,-c]퀴놀린-4-아민의 작은 보강제 효과만이 증명될 수 있었다(총 당단백질 단독 사용시와 비교해 볼때 각각의 총 상해 지수($P < .05$)의 차이).

초막의 비루스 외피는 또한 당단백질 만으로 면역화했을때 감소했다. 그러나, 보강제로서 1-(2-메틸프로필)-1H-이미다조[4,5,-c]퀴놀린-4-아민을 사용했을때도 비루스 외피를 더욱 감소시켰다. 당단백질 단독 투여시와 비교했을때, 비루스 외피는 1일째 D군에서 10배, S군에서 10배($P < .05$), 및 서브Q S군에서 10배($P < .001$) 감소했다. 따라서, 서브Q S군에서는 당단백질군에 비해 >99.9% 감소와 면역화되지 않은 대조군에 비해 >99.9% 감소를 나타냈다. CFA군에서는 어떤 비루스도 검출되지 않았다. 1-(2-메틸프로필)-1H-이미다조[4,5,-c]퀴놀린-4-아민만으로 처리한 경우, 초막의 비루스 외피에 대한 효과를 거의 얻지 못했다.

[재발성 질환]

결과를 하기 표에 나타낸다:

생식기의 재발성 HSV-2 질환의 패턴에 대한 보강제의 효과		
군	재발성 상해를 지닌 동물	헤르페스성 상해를 지닌 일수 ^a
면역화되지 않은 대조군	11/11	5.7 ± 0.8
당단백질	9/11	2.5 ± 0.9^c
D군	4/11	0.4 ± 0.2^b
S군	3/11 ^b	0.3 ± 0.1^b
서브Q S군	0/11 ^c	0 ^d
CFA군	0/11 ^c	0 ^d
화합물군	8/11	1.8 ± 0.5

^a 재발된 헤르페스성 상해를 지닌 일수의 평균치 \pm SE/동물
^b 당단백질 군과 비교했을때 $P < .05$
^c 당단백질 군과 비교했을때 $P < .001$
^d 당단백질 군과 비교했을때 $P < .01$
^e 면역화되지 않은 대조군과 비교했을때 $P < .001$

당단백질만으로의 면역화는 면역화되지 않은 대조군과 비교했을때 재발성 상해 일수를 크게 감소시켰으나, 재발이 일어난 동물의 수는 감소시키지 못했다. 그러나, 당단백질 단독 투여시와 비교했을때, 보강제로서 1-(2-메틸프로필)-1H-이미다조[4,5,-c]퀴놀린-4-아민의 사용은 재발성 상해 일수를 크게 감소시켰고, 재발이 일어난 동물의 수도 감소시켰다. 서브Q S군의 동물은 재발을 전혀 나타내지 않았다(당단백질 단독 투여시와 비교했을때 $P < .001$). 화합물군은 또한 면역화되지 않은 대조군보다 재발을 훨씬 감소시켰다($P < .001$).

[항체 응답]

CFA 군에 있어서의 항체 역가는 또한 당단백질(P < .001) 및 D군, S군, 서브Q S군(P < .01)보다 10배 이상이었다. 그러나, 보강제로서 1-(2-메틸프로필)-1H-이미다조[4,5,-c]퀴놀린-4-아민을 투여한 군은 당단백질 군에서 보다 HSV-2 항체의 보다 높은 역가를 나타냈다. 화합물군은 면역화되지 않은 군보다 높은 항체 역가를 나타냈다(P < .05).

상기 결과는 1-(2-메틸프로필)-1H-이미다조[4,5,-c]퀴놀린-4-아민이 HSV-2 당단백질 백신의 능력을 증가시켜 점막 부위에서 바이러스 복제를 감소시키고, 임상 질환을 예방하며, 감염후 진행되는 재발의 빈도를 줄인다는 것을 나타낸다.

가장 효과적인 치료법은 면역화 실험에서 투여하기 시작하여 5일동안 피하 투여하는 것이다. 그 결과는 보강제로서 CFA를 사용했을때에 필적하였다. 초막내 투여된 동물은 바이러스 역가를 감소시켰고 재발성 상해 일수도 감소되었다.

당단백질 면역화에 대한 1-(2-메틸프로필)-1H-이미다조[4,5,-c]퀴놀린-4-아민의 첨가는 항체 역가에 영향을 미치지 못했으나, 당단백질 제제에 의해 제공된, 특히 재발성 질환에 대한 예방 효과는 크게 증가시켰다.

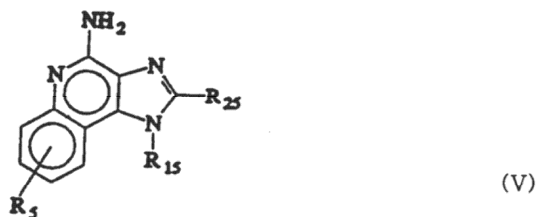
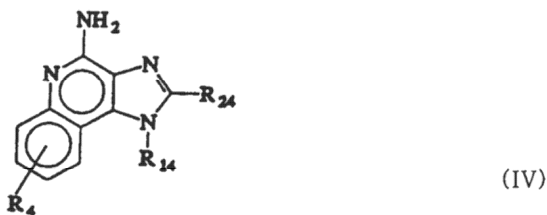
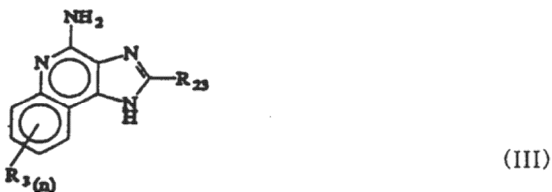
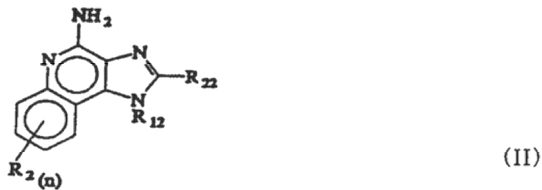
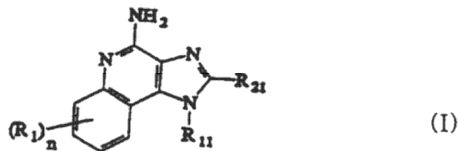
(57) 청구의 범위

청구항 1

면역 응답을 자극하기에 효과적인 양의 면역원과 백신 보강제로서 면역원에 대한 면역 응답을 증가시키기에 효과적인 양의 1H-이미다조[4,5,-c]퀴놀린-4-아민을 함유하는 면역원/백신 보강제 조성물.

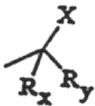
청구항 2

제1항에 있어서, 1H-이미다조[4,5,-c]퀴놀린-4-아민이 하기 일반식(I) 내지 (V)중의 하나로 표기되는 화합물 또는 이들의 약학적 허용성 염인 면역원/백신 보강제 조성물:



상기 식(I)중에서, R₁₁은 알킬, 히드록시알킬, 아실옥시알킬, 벤질, (페닐)에틸 및 페닐로 구성된 군에서 선택되고, 상기 벤질, (페닐)에틸 또는 페닐 치환체는 그 벤젠 고리상에 C₁ 내지 약 C₄의 알킬, C₁ 내지

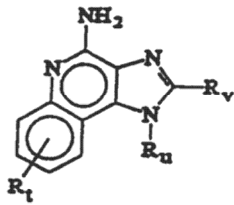
약 C₄의 알콕시 및 할로겐으로 구성된 군중에서 각각 선택된 1개 또는 2개부가 선택적으로 치환될 수 있으며, 단, 상기 벤젠 고리가 2개의 상기 부들로 치환되는 경우에는, 이 부들은 함께 6개이하의 탄소원자를 포함해야 하고; R₂₁은 수소, C₁ 내지 약 C₈의 알킬, 벤질, (페닐)에틸 및 페닐로 구성된 군중에서 선택되고, 상기 벤질, (페닐)에틸 또는 페닐 치환체는 그 벤젠 고리상에 C₁ 내지 약 C₄의 알킬, C₁ 내지 약 C₄의 알콕시 및 할로겐으로 구성된 군중에서 각각 선택된 1개 또는 2개부가 선택적으로 치환될 수 있으며, 단, 상기 벤젠 고리가 2개의 상기 부들로 치환되는 경우에는, 이 부들은 함께 6개 이하의 탄소원자를 포함해야 하고; 그리고 각 R₁이 C₁ 내지 약 C₄의 알콕시, 할로겐 및 C₁ 내지 약 C₄의 알킬로 구성된 군중에서 각각 선택되고, n은 0 내지 2의 정수이며, 단 n이 2인 경우에는, 상기 R₁기들은 함께 6개 이하의 탄소원자를 함유해야 하며; 상기 식(II)중에서, R₁₂는 C₂ 내지 C₁₀의 직쇄 또는 분지쇄 알케닐 및 C₂ 내지 C₁₀의 치환된 직쇄 또는 분지쇄 알케닐로 구성된 군중에서 선택되고, 이때 치환체는 C₁ 내지 약 C₄의 직쇄 또는 분지쇄 알킬 및 C₃ 내지 C₆의 시클로알킬; 및 C₁ 내지 C₄의 직쇄 또는 분지쇄 알킬로 치환된 C₃ 내지 약 C₆의 시클로알킬로 구성된 군중에서 선택되고; R₂₂는 수소, C₁ 내지 약 C₈의 직쇄 또는 분지쇄 알킬, 벤질, (페닐)에틸 및 페닐로 구성된 군중에서 선택되고, 상기 벤질, (페닐)에틸 또는 페닐 치환체는 그 벤젠 고리상에 C₁ 내지 약 C₄의 직쇄 또는 분지쇄 알킬, C₁ 내지 약 C₄의 직쇄 또는 분지쇄 알콕시 및 할로겐으로 구성된 군중에서 각각 선택된 1개 또는 2개부가 선택적으로 치환될 수 있으며, 단, 상기 벤젠 고리가 2개의 상기 부들로 치환되는 경우에는, 이 부들은 함께 6개 이하의 탄소원자를 포함해야 하며; 그리고 각 R₂는 C₁ 내지 약 C₄의 직쇄 또는 분지쇄 알콕시, 할로겐 및 C₁ 내지 약 C₄의 직쇄 또는 분지쇄 알킬로 구성된 군중에서 각각 선택되고, n은 0 내지 2의 정수이며, 단 n이 2인 경우에는, 상기 R₂기들은 함께 6개 이하의 탄소원자를 함유해야 하고; 상기 식(III)중에서, R₂₃은 수소, C₁ 내지 약 C₈의 직쇄 또는 분지쇄 알킬, 벤질, (페닐)에틸 및 페닐로 구성된 군중에서 선택되고, 상기 벤질, (페닐)에틸 또는 페닐 치환체는 그 벤젠 고리상에 C₁ 내지 약 C₄의 직쇄 또는 분지쇄 알킬, C₁ 내지 약 C₄의 직쇄 또는 분지쇄 알콕시 및 할로겐으로 구성된 군중에서 각각 선택된 1개 또는 2개 부가 선택적으로 치환될 수 있으며, 단, 상기 벤젠 고리가 2개의 상기 부들로 치환되는 경우에는, 이 부들은 함께 6개 이하의 탄소원자를 포함해야 하고; 그리고 각 R₃은 C₁ 내지 약 C₄의 직쇄 또는 분지쇄 알콕시, 할로겐 및 C₁ 내지 약 C₄의 직쇄 또는 분지쇄 알킬로 구성된 군중에서 각각 선택되고, n은 0 내지 2의 정수이며, 단 n이 2인 경우에는, 상기 R₃기들은 함께 6개 이하의 탄소원자를 함유해야 하며; 상기 식(IV)중에서, R₁₄는 -CHR_AR_B이고, 이때, R_B는 수소 또는 탄소-탄소 결합으로서, 단 R_B가 수소인 경우에는, R_A는 C₁ 내지 약 C₄의 알콕시, C₁ 내지 약 C₄의 히드록시알콕시, C₂ 내지 약 C₁₀의 1-알킬닐, 테트라히드로피라닐, 알콕시알킬(여기에서, 알콕시부는 1 내지 약 4개의 탄소원자를 함유하며, 알킬부는 1 내지 약 4개의 탄소 원자를 함유함), 2-피리딜, 3-피리딜, 또는 4-피리딜이며, 단 R_B가 탄소-탄소 결합인 경우에는, R_B 및 R_A는 함께 히드록시 및 C₁ 내지 약 C₄의 히드록시알킬로 구성된 군중에서 각각 선택된 하나 또는 그이상의 치환체들로 임의 치환된 테트라히드로푸라닐 기를 형성하며; R₂₄는 수소, C₁ 내지 약 C₄의 알킬, 페닐 및 치환된 페닐로 구성된 군중에서 선택되고, 이때, 치환체는 C₁ 내지 약 C₄의 알킬, C₁ 내지 약 C₄의 알콕시 및 할로겐으로 구성된 군중에서 선택되며; 그리고 R₄는 수소, C₁ 내지 약 C₄의 직쇄 또는 분지쇄 알콕시, 할로겐, 및 C₁ 내지 약 C₄의 직쇄 또는 분지쇄 알킬로 구성된 군중에서 선택되고; 상기 식(V)중에서, R₁₅는 수소; C₁ 내지 약 C₁₀의 직쇄 또는 분지쇄 알킬 및 C₁ 내지 약 C₁₀의 치환된 직쇄 또는 분지쇄 알킬, 이때, 이 치환체는 C₃ 내지 약 C₆의 시클로알킬 및 C₁ 내지 약 C₄의 직쇄 또는 분지쇄 알킬로 치환된 C₃ 내지 약 C₆의 시클로알킬로 구성된 군중에서 선택되며; C₂ 내지 약 C₁₀의 직쇄 또는 분지쇄 알케닐 및 C₂ 내지 약 C₁₀의 치환된 직쇄 또는 분지쇄 알케닐, 이때 치환체는 C₃ 내지 약 C₆의 시클로알킬 및 C₁ 내지 약 C₄의 직쇄 또는 분지쇄 알킬로 치환된 C₃ 내지 약 C₆의 시클로알킬로 구성된 군중에서 선택되고; C₁ 내지 약 C₆의 히드록시알킬; 알콕시알킬, 이때, 알콕시부는 1 내지 약 4개의 탄소 원자를 함유하고 알킬부는 1 내지 약 6개의 탄소 원자를 함유하며; 아실옥시알킬, 이때 아실옥시부는 C₂ 내지 약 C₄의 알카노일옥시 또는 벤조일옥시이고, 알킬부는 1 내지 약 6개의 탄소 원자를 함유하며; 벤질; (페닐)에틸; 및 페닐로 구성된 군중에서 선택되고; 전술한 벤질, (페닐)에틸 또는 페닐 치환체는 그 벤젠 고리상에 C₁ 내지 약 C₄의 알킬, C₁ 내지 약 C₄의 알콕시 및 할로겐으로 구성된 군중에서 각각 선택된 1개 또는 2개부가 임의 치환되어 있고, 단, 상기 벤젠 고리가 2개의 상기 부들로 치환되는 경우에는, 이 부들은 함께 6개 이하의 탄소 원자를 함유해야



하며; R₂₅는 으로서, 이때, R_X 및 R_Y는 수소, C₁ 내지 약 C₄의 알킬, 페닐, 및 치환된 페닐로 구성된 군중에서 각각 선택되고, 여기에서 치환체는 C₁ 내지 약 C₄의 알킬, C₁ 내지 약 C₄의 알콕시, 및 할로겐으로 구성된 군중에서 선택되고; X는 C₁ 내지 약 C₄의 알콕시, 알콕시알킬(이때, 알콕시부는 1 내지 약 4개의 탄소 원자를 함유하고 알킬부도 1 내지 약 4개의 탄소 원자를 함유함), C₁ 내지 약 C₄의 할로알킬, 알킬아미도(이때, 알킬기는 1 내지 약 4개의 탄소 원자를 함유함), 아미노, 치환된 아미노(이때, 치환체는 C₁ 내지 약 C₄의 알킬 또는 히드록시알킬임), 아지도, C₁ 내지 약 C₄의 알킬티오로 구성된 군중에서 선택되며; 그리고 R₅는 수소, C₁ 내지 약 C₄의 직쇄 또는 분지쇄 알콕시, 할로겐 및 C₁ 내지 약 C₄의 직쇄 또는 분지쇄 알킬로 구성된 군중에서 선택된다.

청구항 3

제1항에 있어서, 1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민이 하기 일반식(VI)의 화합물인 조성물:



(VI)

상기 식중에서, Rt는 수소, C1 내지 약 C4의 직쇄 또는 분지쇄 알콕시, 할로겐 및 C1 내지 약 C4의 직쇄 또는 분지쇄 알킬로 구성된 군중에서 선택되고; Ru는 2-메틸프로필 또는 2-히드록시-2-메틸프로필이며; 그리고 Rv는 수소, C1 내지 약 C6의 알킬 또는 알콕시알킬(이때, 알콕시부는 1 내지 약 4개의 탄소원자를 함유하고 알킬부도 1 내지 약 4개의 탄소 원자를 함유함)이다.

청구항 4

제3항에 있어서, Rt가 수소이고, Ru가 2-메틸프로필 또는 2-히드록시-2-메틸프로필이며, Rv가 수소, 메틸, 또는 에톡시메틸인 일반식(VI)의 화합물인 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민이 1-(2-메틸프로필)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민; 1-(2-히드록시-2-메틸프로필)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민; 1-(2-히드록시-2-메틸프로필)-2-메틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민; 및 1-(2-히드록시-2-메틸프로필)-2-에톡시메틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민으로 구성된 군중에서 선택된 것인 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 면역원이 생바이러스계 면역원, 생세균계 면역원, 불활성화된 비루스계 면역원, 불활성화된 종양 유래계 면역원, 불활성화된 원생생물계 면역원, 불활성화된 유기체 유래계 면역원, 불활성화된 진균계 면역원, 불활성화된 세균계 면역원, 유독소류, 독소류, 다당류, 단백질, 당단백질 및 펩티드로 구성된 군중에서 선택된 것인 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 면역원이 통상적인 백신 제제인 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 면역원이 재조합 서브유닛 백신인 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 면역원이 T-의존적인 면역원인 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 면역원이 단순 헤르페스 2 당단백질 서브유닛 제제인 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서, 약학적 허용성 담체중에 면역원과 1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민의 혼합물을 함유하는 조성물.