

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁶
A61K 39/106

(11) 공개번호 10-2001-0020418

(43) 공개일자 2001년03월 15일

(21) 출원번호	10-1999-7010042		
(22) 출원일자	1999년 10월 29일		
번역문제출일자	1999년 10월 29일		
(86) 국제출원번호	PCT/FR 98/00875	(87) 국제공개번호	WO 98/48836
(86) 국제출원출원일자	1998년 04월 30일	(87) 국제공개일자	1998년 11월 05일
(81) 지정국	AP ARIPO특허 : 케냐 레소토 말라위 수단 스와질랜드 우간다 가나 감비아 짐바브웨 EA 유라시아특허 : 아르메니아 아제르바이잔 벨라루스 키르기즈 카자흐 스탄 몰도바 러시아 타지키스탄 투르크메니스탄 EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 독일 덴마크 스페인 프랑스 영국 그리스 아일랜드 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투 갈 스웨덴 핀란드 사이프러스 OA OAPI특허 : 부르키나파소 베냉 중앙아프리카 콩고 코트디부아르 카 메룬 가봉 기네 말리 모리타니 니제르 세네갈 차드 토고 국내특허 : 알바니아 아르메니아 오스트리아 오스트레일리아 아제르바이 잔 보스니아-헤르체고비나 바베이도스 불가리아 브라질 벨라루스 캐나 다 스위스 중국 쿠바 체코 독일 덴마크 에스토니아 스페인 핀란드 영국 그루지야 헝가리 이스라엘 아이슬란드 일본 케냐 키르기즈 북 한 대한민국 카자흐스탄 세인트루시아 스리랑카 라이베리아 레소토 리투아니아 룩셈부르크 라트비아 몰도바 마다가스카르 마케도니아 몽 고 말라위 멕시코 노르웨이 뉴질랜드 슬로베니아 슬로바키아 타지키 스탄 투르크메니스탄 터어키 트리니다드토바고 우크라이나 우간다 우 즈베키스탄 베트남 폴란드 포르투갈 루마니아 러시아 수단 스웨덴 싱가포르 미국		
(30) 우선권주장	97/05,608 1997년04월30일 프랑스(FR)		
	97/15,732 1997년12월08일 프랑스(FR)		
(71) 출원인	마리외 오하박스 마리에 폴린 에이로레		
(72) 발명자	프랑스, 리옹 F-69007, 아베뉴 레끄레흐, 58 귀, 부르노 프랑스, 리옹 F-69005, 루데노이에르, 15B 헨슬레, 장 프랑스, 생쥐느레오리에흐 F-69290, 루피칸데 17, 레블란디에흐바티앙비		
(74) 대리인	허상훈		

심사청구 : 없음

(54) Th1-형 면역 보강제를 포함하는 헬리코박터 백신 조성물

요약

본 발명은 헬리코박터(Helicobacter)로부터 유래되고 QS-21, DC-choi 또는 베이(Bay) R1005와 같은 보조제와 관계있는 것으로, 포유동물에 있어서 T 헬퍼(helper) 1 형(Th1)의 면역반응을 유도하는 억제학적 조성물을 제조하고 헬리코박터 감염을 예방 또는 치료하는 데 사용하는 면역 물질의 용도에 관한 것이다.

색인어

헬리코박터, 면역 물질

명세서

기술분야

본 발명은 포유동물의 점막에 감염되는 병원체, 특히 헬리코박터(Helicobacter) 박테리아에 대해 예방적

인 면역 반응을 유도하는 백신 제조물의 특이적인 사용에 관한 것이다.

배경기술

헬리코박터(Helicobacter)는 그람 음성의 나선형 박테리아를 특징으로 하는 박테리아 속이다. 여러 종(species)이 포유동물의 위장관에 군집을 이룬다. 상세하게는 헬리코박터 필로리(H. pylori), 헬리코박터 헤일만니(H. heilmanii), 헬리코박터 펠리스(H. felis) 및 헬리코박터 무스텔라(H. mustelae)가 있다. 헬리코박터 필로리(H. pylori)는 사람 감염과 관계있는 가장 일반적인 종이고, 드문 경우에, 사람에게 있어서 헬리코박터 헤일만니(H. heilmanii), 헬리코박터 펠리스(H. felis)를 분리하는 것이 가능하다. 또한 헬리코박터형 및 가스트로스피릴룸 호미니스(Gastrospirillum hominis)의 박테리아도 사람에게서 발견된다.

선진국에 있어서 성인 집단의 50% 이상은 헬리코박터에 감염되고 개발도상국에 있어서는 성인 집단의 거의 100%가 감염됨으로써, 세계적으로 주된 감염 물질 중의 하나가 되었다.

헬리코박터 필로리(H. pylori)는 지금까지는 사람의 위 점막의 표면에서만 발견되고, 더욱 상세하게는 위 궤양 및 십이지장궤양의 구멍 손상(crater lesion) 주위에서 발견된다. 상기 박테리아는 현재 전정위염의 원인이 되는 물질로서 알려져 있고 궤양의 발달에 필요한 조요소 중의 하나이다. 더구나, 위암의 발달이 헬리코박터 필로리(H. pylori)과 관계 있는 것으로 여겨진다.

따라서, 헬리코박터 감염을 예방 또는 치료하는 백신이 개발될 많은 필요성이 있다.

지금까지, 여러 개의 헬리코박터 단백질은 이미 백신 항원으로서 제안되었고 일반적으로 추천되는 백신 방법은 위점막의 수준으로 즉, 면역 반응이 일어나야 되는 위치로 항원을 전달하는 것으로 구성된다. 따라서 이러한 것을 하기 위해, 구강 투여가 선택되었다.

예를 들면, 코 또는 직장 점막과 같은 위점막 외의 위치로 항원을 전달하는 것이 제안되었다[국제특허공개 제96/31235호]. 소위 유도제인 점액 지역에 있는 항원에 의해 자극된 림프구는 면역 반응을 유도 하기 위해 선택적으로 소위 효과제인 다른 점액 지역으로 이동하고 순환한다.

이러한 방법의 변형은 코를 통해 항원을 투여하기 전에 조직 경로(systemic route)를 통해 첫 번째 면역 조치를 수행하는 것으로 구성된다.

점액 경로(route)를 통한 투여에 있어서, 박테리아 용균물 또는 정제된 단백질이 대부분인 항원은 대장균의 콜레라독소(CT) 또는 열-가변성 독소(LT)와 같은 적당한 면역 보강제와 혼합된다.

점액 경로(route)를 통한 투여가 사용될 때, 관찰되는 체액 반응은 IgA 형이 우세하다. 이것은 부분적인(local) 면역 반응이 일어난다는 것을 나타낸다.

어떤 사람들은 매우 초기에 IgA 형의 강한 반응과 예방효과 사이의 긴밀한 관련이 있다는 것을 생각했다 [Czinn 등, Vaccine (1993) 11: 637]. 다른 사람들은 더 제한된 의견을 가졌다[Bogstedt 등, Clin. Exp. Immunol. (1996) 105: 202]. 지금까지 이 과제에 대하여 어떤 확실성이 없을지라도, 그럼에도 불구하고 특히 IgA 형의 항체의 유도는 대부분의 사람들이 바라는 것이다.

일반적으로, IgA의 출현은 타입 2 T 헬퍼(helper) 림프구에 대해 반응(Th2 반응)을 한다는 것을 나타낸다.

특정한 항원에 의한 T 헬퍼(helper) 림프구의 자극은 다양한 사이토카인(cytokine)을 합성하는 T 헬퍼(helper) 세포의 다양한 부분 집단을 얻는 것이 가능하다.

특히 Th1 세포는 선택적으로 인터루킨-2(IL-2) 및 인터루킨- γ (IFN- γ)를 생산하는 반면에, Th2 세포는 바람직하게는 IL-4, -5 및 -10을 분비한다. 사이토카인의 분화된 생산으로 인해, T 헬퍼(helper) 세포의 상기 두 가지 타입은 구별되는 역할을 가진다: Th1 세포는 세포-중개된 면역 즉, 감염형 반응을 증진시키는 반면에 Th2 세포는 IgA, IgE 및 특정한 IgG 부분집합(subclass)형의 체액 반응을 자극한다. 또한, 마우스 Th1 세포에 의해 생산된 사이토카인은 항체 반응을 자극할 수 있고 특히 INF- γ 는 IgG2a 반응을 유도할 수 있다는 것은 알려져 있다.

따라서, 종래 기술의 다양한 연구로부터, IgA이 출현하는 것을 특징으로 하는 Th2 반응의 유도는 충분하지는 않지만 예방 효과를 얻기 위해 필수적이라는 관점이 있다.

놀랍게도, 만일 Th2 반응이 위험하지는 않을지라도, 이것이 또한 높은 Th1 반응을 유도하기에 필수적이라는 것을 발견했다. 실험 결과는 예방 효과가 Th2 반응보다도 Th1 반응에 더 쉽게 관련이 있다는 것을 증명한다.

초기에 발견된 것과는 반대로[D'Elis 등, J. Immunol., (1997) 158: 962], 본 발명은 면역조치시 예방 효과가 나타나는 감염형 Th1 반응 유도의 중요성을 발견했다.

예를 들면, 면역 보강제(adjuvant) 형 같은 많은 요인들을 적용함으로써 헬리코박터에 대한 Th1 반응을 유도하는 것이 가능하다. 특정한 면역 보강제(adjuvant)를 사용함으로써, 점액 경로(route) 및 박테리아 독소와 같은 면역 보강제(adjuvant)가 사용될 때 관찰되는 것과 비슷하거나 더 큰 예방 수준을 얻을 수 있다는 것이 증명되었다.

발명의 상세한 설명

결과적으로, 본 발명의 목적은:

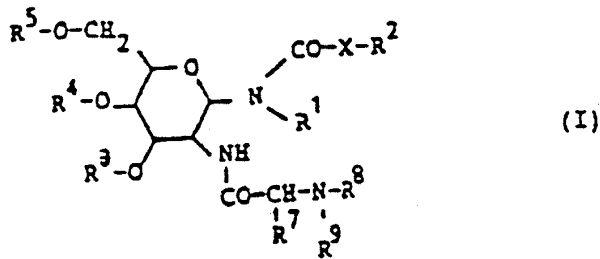
(a) 헬리코박터 감염을 예방 또는 치료하기 위해 조직 경로를 통해 투여되는 경향이 있는 약제의 제조에 있어서, 헬리코박터로부터 유래된 면역 물질 및 헬리코박터에 대해 T 헬퍼(helper) 1(Th 1) 형 면역 반응의 유도를 증진시킬 수 있는 화합물의 동시사용.

(b) 헬리코박터로부터 유래된 면역 물질 및 다음으로부터 적어도 하나의 화합물(헬리코박터에 대한 T 헬퍼(helper) 1(Th1) 형 면역 반응의 유도를 증진시킬 수 있는)을 포함하는 약제학적 조성물:

(i) 퀴라자 사포나리아(Quillaja saponaria)의 추출물로부터 분리된 사포닌(saponins);

(ii) 양이온 지질 또는 다음의 염(a salt of the latter); 이때 상기 조성물은 사포닌 또는 다음 구조식 (I)로 표시되는 당지질펩타이드를 포함하지 않고, 지질이 리포솜의 형태로 제공되지 않은 조건에서, 상기 지질은 단백질 카이네스 C의 약한 억제제이며, 콜레스테롤로부터 유래된 지질친화성기, 카르복시아마이드 및 카바모일로부터 선택된 결합기, C₁~C₂₀의 측쇄 또는 측쇄가 포함되지 않은 선형 알킬 사슬을 포함하는 스페이서 암(spacer arm), 그리고 1차, 2차, 3차 및 4차 아민으로부터 선택된 양이온 아민기를 포함하며; 및

(iii) 다음 구조식(I)로 표시되는 당지질펩타이드:



이때:

R¹은 포화되거나 또는 하나 또는 그 이상의 불포화된 C₁~C₅₀, 바람직하게는 C₁~C₂₀의 알킬기를 나타내고,

X는 -CH₂-, -O- 또는 -NH-를 나타내고,

R²는 수소원자, 포화되거나 또는 하나 또는 그 이상의 불포화된 C₁~C₅₀의 알킬기를 나타내고,

R³, R⁴ 및 R⁵ 각각은 서로 독립적으로, 수소원자, 아실-CO-R⁶(이때 R⁶는 C₁~C₁₀의 알킬기)을 나타내고,

R⁷는 수소원자, C₁~C₇의 알킬기, 하이드록시메틸기, 1-하이드록시메틸기, 머캅토메틸기, 2-(메틸티오)에틸기, 3-아미노프로필기, 3-우레이도프로필기, 3-구아니딜프로필기, 4-아미노부틸기, 카르복시메틸기, 카바모일메틸기, 2-카르복시메틸기, 2-카바모일메틸기, 벤질기, 4-하이드록시벤질기, 3-인돌일메틸기 또는 4-이미다졸일메틸기를 나타내고,

R⁸은 수소원자 또는 메틸기를 나타내며, 그리고

R⁹은 수소원자, 아세틸기, 벤조일기, 트리클로로아세틸기, 트리플루오로아세틸기, 메톡시카르보닐기, t-부틸록시카르보닐기 또는 벤질록시카르보닐기, 및

상기 R⁷과 R⁸은 서로 결합하여 -CH₂-CH₂-CH₂-기로 나타낼 수도 있다.

(c) 헬리코박터에 대하여 T 헬퍼(helper) 1(Th1) 형 면역 반응을 유도할 수 있는 약제학적 조성물의 제조에 있어서, 헬리코박터로부터 유래한 면역 물질 및 상기에서 언급한 화합물 (i)~(iii)로부터 선택된 적어도 하나의 화합물의 사용; 그리고

(d) 상기의 미생물, 예를 들면 헬리코박터로부터 유래한 적어도 하나의 면역 물질 및 예를 들면 헬리코박터에 대한 T 헬퍼(helper) 1(Th1) 형 면역 반응의 유도를 증진시킬 수 있는 적어도 하나의 화합물을 포함하는 조성물이 조직 경로(route)를 통해 포유동물에게 투여됨으로써, 포유동물의 위십이지장 점막을 감염시킬 수 있는 미생물에 의한 증진된 감염, 예를 들면 헬리코박터 감염을 예방 또는 치료하는 방법.

(e) 상기의 미생물, 예를 들면 헬리코박터로부터 유래한 적어도 하나의 면역 물질 및 상기에서 언급한 화합물 (i)~(iii)로부터 선택된 적어도 하나의 화합물을 포함하는 조성물을 포유동물에 투여되고, 예를 들면 헬리코박터에 대한 Th1-형 면역 반응을 유도함으로써, 포유동물의 위십이지장 점막을 감염시킬 수 있는 미생물에 의해 증진된 감염, 예를 들면 헬리코박터 감염을 예방 또는 치료하는 방법.

유용한 Th1 반응의 유도는 Th1 및 Th2 반응의 각각을 표시하는 예를 들면, 헬리코박터에 대해 마우스에서 유도된 IgG2a 및 IgG1 수준을 비교하여 Th2 반응에 대한 Th1 반응의 상대적 수준을 측정함으로써 본 발명의 목적을 증명할 수 있다. 정말로, 발견되는 Th1 반응은 일반적으로 Th2 반응이 수반된다. 그러나, Th2 반응은 Th1 반응에 비해 크게 우세하지는 않다. 마우스에서 유도된 IgG2a 및 IgG1 수준은 만일 두 개의 부동위형(subisotype) 각각을 위해 사용된 테스트가 동등한 민감성을 갖고, 특히 항-IgG2a 및 항-IgG1 항체가 동등한 친화성을 갖는다면 ELISA 테스트를 사용하여 보편적으로 확인할 수 있다.

IgG2a 및 IgG1의 양은 특히 다음의 설명과 동일하거나 비슷한 ELISA 테스트를 사용하여 측정된다. 폴리카르보네이트 ELISA 플레이트의 웰은 카르보네이트 완충액 중의 약 10 µg/ml인 헬리코박터, 예를 들

면 헬리코박터 필로리(H. pylori)의 박테리아 추출물 100 μ l로 코팅되어 있다. ELISA 플레이트는 37°C에서 2시간 동안 인큐베이션한 다음 4°C에서 밤새도록 놔두었다. 플레이트는 0.05% 트윈 20을 포함하는 PBS(인산염 완충 식염수) 완충액(PBS/트윈 완충액)으로 세척되었다. 웰은 항체의 비특이적인 결합을 막기 위해 1% 소혈청알부민을 포함하는 PBS 250 μ l로 포화되었다. 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션한 후에, 플레이트는 PBS/트윈 완충액으로 세척되었다. 헬리코박터에 대한 Th1-형 면역 반응을 유도하는 경향이 있는 조성물을 받은 지 며칠 후에 마우스로부터 얻은 항혈청을 연속적으로 PBS/트윈 완충액으로 연속적으로 희석하였다. 희석액의 100 μ l를 웰에 첨가했다. 플레이트는 37°C에서 90분 동안 배양, 세척 및 표준 과정에 따라 측정되었다. 예를 들면, 퍼옥시다제 같은 효소가 결합된 마우스 IgG2a 또는 IgG1에 대한 염소 항체가 사용된다. 이러한 항체의 존재에서 배양은 37°C에서 90분 동안 계속되었다. 플레이트를 세척한 다음, 적당한 기질(예를 들면 사용된 효소가 퍼옥시다제일 때 0-페닐다이아민 다이하이드로클로라이드)로 반응시켰다. 반응은 색채계(colorimetry)에 의해 측정되었다(스펙트로메트리에 의해 흡광도를 측정함으로써). 항혈청에 대한 IgG2a 또는 IgG1 적정(titre)은 490 nm에서 흡광도 1.5인 희석액의 역수에 해당한다.

본 발명의 목적을 위한 유용한 Th1 반응의 유도는 마우스에서 ELISA IgG2a : IgG1 적정비가 1/100, 1/50 또는 1/20 이상, 유의하게는 1/10 이상, 바람직하게는 1/3 이상, 가장 바람직하게는 1/2, 5 또는 10 이상이어야 한다. 상기 비율이 약 1일 때, Th1/Th2 반응은 혼합되거나 균형이 잡힌다. 상기 비가 5 이상일 때, Th1 반응이 우세하다.

마우스에서 Th1(또는 Th2) 반응의 생성은 사람에게 있어서 Th1(또는 Th2)반응과 같다. 마우스에서 반응의 형태를 평가하기가 더 쉬울지라도, 사람에게 있어서 차례로 유도되는 Th1 반응에 대해, Th2 반응에 대해 특이적인 사이토카인의 수준을 측정함으로써 평가될 수 있다. Th1 및 Th2 반응은 사람에게 있어서 반응의 두 형태(상기에서 설명한)에 특이적인 사이토카인의 수준을 기초로, 예를 들면 IFN- γ /IL-4 비율을 기초로 서로에게 상대적인 값으로 직접 평가될 수 있다.

교대로, 만일 상기에서 언급한 분석 방법이 사용된다면, IgG2a의 양을 반영하는 ELISA 적정은 10,000 이상이어야 하고, 바람직하게는 100,000 이상이어야 하고, 보다 바람직하게는 1,000,000 이상이어야 함을 예견하는 것은 가능하다; 이것은 Th1 반응이 중요하다는 것을 의미한다.

의도되는 약제학적 조성물 또는 방법을 위한 포유동물은 영장류가 관찰고, 사람이 바람직하다.

본 발명의 목적을 위해 유용한 사포닌은 미국특허 제 5,057,540호에서 구조에 대해서가 아니라 실리카를 이용한 고-성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 및 저-압 크로마토그래피에 의해 퀴라자 사포나리아 몰리나(Quillaja saponaria Molina) 껍질의 액상 추출물을 분획화 한 후 존재하는 분획에 대해 설명되어 있다. 특히, 분획 QA-7, QA-17, QA-18 및 QS-21이라고도 부르는 QA-21이 언급되었다. 후자의 사용은 특히 바람직하다. QS-21은 주로 Th1-형 면역 반응의 유도를 증진시키는 면역 보강제로서 알려져 있다. 이러한 면역 보강제는 Th1 형으로 불려진다.

본 발명의 목적을 위한 유용한 양이온성 지질은 미국특허 제 5,283,185호에 상세히 기술되어 있다. 예를 들면, 콜레스테릴-3 β -카르복실아미도에틸렌트리메틸암모늄 아이오다이드, 1-다이메틸아미노-3-트리메틸아미노-DL-2-프로필콜레스테릴카르복실레이트 아이오다이드, 콜레스테릴-3 β -카르복시아미도에틸렌아민 아이오다이드, 콜레스테릴-3 β -옥시숙신아미도에틸렌트리메틸암모늄 아이오다이드, 1-다이메틸아미노-3-트리메틸암모니오-DL-2-프로필-콜레스테릴-3 β -옥시숙시네이트 아이오다이드, 2-[(2-트리메틸-암모니오)에틸메틸아미노]에틸콜레스테릴-3 β -옥시숙시네이트 아이오다이드, 3 β -[N-(폴리에틸렌이민)카바모일]-콜레스테롤 및 3 β -[N-(N',N'-다이메틸아미노에탄)-카바모일]콜레스테롤(DC-cho1) 또는 이의 염으로 언급될 수 있다. DC-cho1(또는 이의 염 형태)은 Th1/Th2 형의 혼합된 균형을 이룬 반응의 유도를 촉진하는 면역보강제(adjuvant)로 알려져 있다. 면역보강제는 Th1/Th2 또는 Th1+Th2 형으로 이루어진다.

이러한 양이온성 지질은 분산으로 사용될 수 있거나 또는 선택적으로 리포솜 형태로 제조될 수 있다. 리포솜은 미국특허 제5,283,185호에 개시된 바와 같이, 중성 인지질, 예를 들면 포스파티딜콜린 또는 포스파티딜에탄올아민을 사용하는 양이온성 지질에 결합함으로써 제조될 수 있다.

본 발명의 목적을 위한 유용한 당지질펩타이드는 미국특허 제4,855,283호 및 유럽특허 제206,037호에 상세히 공지되어 있다. 이들은 특히, 일반적인 구조식 (1)로 표시되는 당지질로서, 여기서 슈거(sugar)의 잔여물은 2-아미노-2-데옥시-D-글루코오스 또는 2-아미노-2-데옥시-D-갈락토오스 잔여물이다. 아미노 슈거(sugar)의 2-아미노기는 D 또는 L 형태의 α -아미노부티르산 또는 α -아미노발레리안산, α -아미노카프로산 또는 α -아미노헵타노산과 같은 아미노카르복실산과 함께 D 또는 L 형태의 글라이신, 사르코신, 히푸르산, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 세린, 트레오닌, 시스테인, 메티오닌, 오르니틴, 시트룰린, 아르기닌, 아스파르트산, 아스파라긴, 글루탐산, 글루타민, 페닐알라닌, 티로신, 프롤린, 트립토판 또는 히스티딘에 연결된다.

더욱 상세하게는, 다음의 당지질펩타이드를 말한다:

N-(2-글리신아미도-2-데옥시- β -D-데옥시- β -D-글루코피라노실)-N-도데실도데카노일아마이드,

N-(2-글리신아미도-2-데옥시- β -D-글루코피라노실)-N-도데실옥타데카노일아마이드,

N-(2-글리신아미도-2-데옥시- β -D-글루코피라노실)-N-테트라데실도데카노일아마이드,

N-(2-L-알라닌아미도-2-데옥시- β -D-글루코피라노실)-N-도데실도데카노일아마이드,

N-(2-D-알라닌아미도-2-데옥시- β -D-글루코피라노실)-N-도데실옥타데카노일아마이드,

N-(2-D-페닐알라닌아미도-2-데옥시- β -D-글루코피라노실)-N-도데실옥타데카노일아마이드,

N-(2-L-발린아미도-2-데옥시- β -D-글루코피라노실)-N-옥타데실도데카노일아마이드,

N-(2-L-발린아미도-2-데옥시-β-D-글루코피라노실)-N-옥타데실테트라데카노일아마이드,
 N-(2-L-류신아미도-2-데옥시-β-D-글리코피라노실)-N-도데실도데카노일아마이드,
 N-(2-L-류신아미도-2-데옥시-β-D-글루코피라노실)-N-옥타데실도데실아마이드(베이(Bay) R1005), 및
 N-(2-사르코신아미도-2-데옥시-β-D-글루코피라노실)-N-옥타데실도데카노일아마이드.

본 발명에 따른 조성물은 상기에서 언급된 화합물을 1종 또는 그 이상으로 포함하고 있다. 유익한 구현예에 의하면, 상기 조성물은 두 개의 화합물이 사용되는데; (a) 하나의 화합물은 퀴라자 사포나리아 (*Quillaja saponaria*)의 추출물로부터 정제된 사포닌 중에서 선택된 것이며, (b) 또 다른 화합물은 (i) 양이온성 지질 또는 이의 염 중에서 선택된 하나를 사용하는 것으로, 상기 지질은 단백질 카이나아제 C의 약한 억제제 및 콜레스테롤로부터 유도된 지질친화성기, 카르복시아마이드 및 카바모일 중에서 선택된 결합기, 1~20개 탄소 원자의 측쇄 또는 측쇄아닌 선형 알킬사슬로 이루어진 스페이서 암(spacer arm), 그리고 1차, 2차, 3차 및 4차 아민 중에서 선택된 양이온성 아민기를 포함하는 구조를 갖는 것을 의미하며, (ii) 또는 상기 구조식 (1)로 표시되는 당지질펩타이드로부터 선택된 화합물이다. 예를 들면, QS21+ DC-Chol 및 QS-21+베이(Bay) R1005의 혼합물을 언급할 수 있다.

Th1-형 면역 반응(Th1 또는 Th1/Th2 형태의 면역보강제를 말한다)을 촉진할 수 있는 다른 면역보강제로는 종래 당업자의 기술에서 이들이 필요로 하는 것과 가장 일치되는 하나를 선택할 수 있는 종래 당업자들로 부터의 기술적 수준이 존재한다. 지침과 같이, 박테리아, 예를 들면 대장균, 살모넬라 미네소타, 살모넬라 티피무림(*Salmonella typhimurium*) 또는 시겔라 플렉스네리(*Shigella flexneri*)의 벽(wall); 알간-글루칸; 감마-이눌린; 칼시트리올 및 톡소리빈(*Toxobifin*)으로부터 주요 리포다당류인 모노포스포릴-지질 A(MPLA)과 같은 여러 가지 다른 화합물은 물론, 이것은 특히 리포솜; ISCOMs; 마이크로스피어; 단백질 코크레이트(*chochleates*); 비이온성 계면활성제로 이루어진 소낭(*vesicles*); 물속의 양이온성의 양성친화성 분산; 오일/물 에멀전; 글루코실 무라미딜다이펩타이드(GMDP), 트레오닐-MDP, 유라메타이드 및 무라 팔미틴과 같은 무라미딜다이펩타이드(MDP) 및 이의 유도체를 언급하고 있다.

본 발명의 목적을 위한 유용한 리포솜은 상세하게는 콜레스테롤 헤미숙시네이트(CHEMS) 및 다이올레일 포 스파티딜 에탄올아민(DOPE); 3-β-(N-(N',N'-다이메틸아미노에탄)카바모일)콜레스테롤(DC-chol) 및 미국 특허 제5,283,185호 및 국제특허공개 제96/14831호에 공지된 바와 같은 다이메틸다이옥타데실암모늄 브로 마이드(DDAB), 유럽특허 제91645호 및 유럽특허 제206 037호에 공지된 베이(BAY) 화합물, 즉 베이(Bay) R1005 (N-(2-데옥시-2-L-류신아미도-β-D-글루코피라노실)-N-옥타데실도데카노일아마이드 아세테이트와 같은 이들의 용해(*fusigenic*) 성질에 대하여 인식된 양이온성 지질을 포함하는 리포솜; 및 MTP-PE를 포함하는 리포솜, MDP(무라미딜다이펩타이드)의 지질친화성 유도체의 혼합에 의해 형성되는 pH-민감성의 리 포솜으로부터 선택된다. 이러한 리포솜은 상기 언급된 모든 면역 물질의 면역보강제로서 첨가하기에 유용하다.

본 발명의 목적을 위한 유용한 ISCOMs은 특히 콜레스테롤과 결합하고 선택적으로 포스파티딜콜린과 같은 인지질과 결합하는 QuilA 또는 QS-21의 화합물로부터 선택될 수 있다. 이들은 지질-항유 항원의 제제를 위해 특히 유용된다.

본 발명의 목적을 위한 유용한 마이크로스피어는 특히 폴리락타이드-co-글리콜라이드(PLAGA), 알기네이트, 키토산, 폴리포스파젠 및 수많은 다른 고분자들과 같은 화합물로부터 형성될 수 있다.

본 발명의 목적을 위한 유용한 단백질 코킬레이트(*chochleates*)는 특히 콜레스테롤 및 선택적으로 포스파 티딜콜린과 같은 추가적인 인지질로부터 형성된 것 중에서 선택될 수 있다. 이들은 특히 지질-항유 항원의 제제를 위해 주로 이용된다.

본 발명의 목적을 위한 유용한 비이온성 계면활성제로 이루어진 유용한 소낭(*vesicles*)은 특히 1-모노팔 미토일 글리세롤, 콜레스테롤 및 다이세틸포스페이트의 혼합에 의해 형성될 수 있다. 이들은 통상적 인 리포솜에서 선택된 것이며, 상기 언급된 모든 면역 물질의 제제를 위해 사용될 수 있다.

본 발명의 목적을 위한 유용한 오일/물 에멀전은 특히 MF59(바이오신-키론), SAF1(신텍스) 및 몬타나이드 ISA51 및 ISA720(셉픽)으로부터 선택될 수 있다.

헬리코박터 유래의 면역 물질은 정제형태인 헬리코박터의 불활성화된 헬리코박터 박테리아, 헬리코박터 세포 용균물, 펩타이드 및 폴리펩타이드의 제조물로부터 선택되는 것이 유익하다.

본 발명의 목적을 위해서, 불활성화된 박테리아의 제조는 종래기술에 잘 알려진 보편적인 방법에 따라 얻 어진다. 박테리아 용균물과 같이, 예방적 또는 치료적 목적을 위해 적당한 불활성화된 박테리아 또는 세포 용균물의 용량은 종래 당업자에 의해 결정될 수 있고 백신에 의해 의도되는 여러 요인, 예를 들면 나이, 항원 그 자체, 투여의 경로 및 방법, 면역 보강제(*adjuvant*)의 존재/부존재 또는 형태에 의해 달라 진다. 일반적으로, 적당한 용량은 용균물 약 1 mg에 대하여 50 μg~1 mg이다.

헬리코박터로부터 유래한 펩타이드 또는 폴리펩타이드는 헬리코박터로부터 정제분리 또는 유전 공학 기술 또는 대안방안으로 화학합성에 의해 얻을 수 있다. 후자의 과정은 펩타이드의 경우에 유익하다. "펩타이드"는 크기가 약 50 아미노산 이하인 아미노산 사슬이다. 크기가 더 클 때 "단백질" 용어로도 사용할 수 있는 "폴리펩타이드" 용어가 사용될 수 있다. 본 발명의 목적을 위해 유용한 펩타이드 또는 폴리펩타이드는 자연 상태로 존재하는 것과 동일하거나 비슷하다. 같은 타입의 면역 반응을 유도 할 수 있는 점에서 비슷하나 예를 들면 돌연변이, 지질 성질의 잔여기 첨가 또는 대안적으로 폴리펩타이 드나 펩타이드 형태의 융합과 같은 구조적 다양성을 포함한다.

예방적 또는 치료적 목적을 위한 펩타이드 또는 폴리펩타이드의 적당한 용량은 종래 당업자에 의해 결정 될 수 있고 백신에 의해 의도되는 여러 요인, 예를 들면 나이, 항원 그 자체, 투여의 경로 및 방법, 면역 보강제(*adjuvant*)의 존재/부존재 또는 형태에 의해 달라진다. 일반적으로, 적당한 용량은 약 10 μg ~1 mg이고 바람직하게는 약 100 μg이다.

헬리코박터로부터 유래한 면역 물질은 헬리코박터, 예를 들면 헬리코박터 필로리(H. pylori)의 폴리펩타이드이다. 이것은 특히 세포질에 존재하는 폴리펩타이드, 내외막의 폴리펩타이드 또는 외부 배지로 분비되는 폴리펩타이드로 존재한다. 헬리코박터의 수많은 폴리펩타이드는 이미 문헌에 기술되어 있거나 클론된 또는 확인된 대응하는 유전자의 서열로부터 추론된 아미노산 서열에 대해, 또는 자연환경으로부터 선택된 형태로 얻을 수 있는 정제 과정에 대해 참조에 설명되어 있다. 지침으로서, 다음 문서들을 특별히 언급되어 있다: 국제특허공개 제94/26901호 및 국제특허공개 제96/34624호(HspA), 국제특허공개 제94/09023호(CagA), 국제특허공개 제96/38475호(HpaA), 국제특허공개 제93/181150호(사이토톡신), 국제특허공개 제95/27506호 및 Hazell 등, J. Gen. Microbiol. (1991) 137: 57(카탈라제), 프랑스특허 제2724 936호(사람 락토페린에 대한 막수용체), 국제특허공개 제96/41880호(AlpA), 유럽특허 제752 473호(FibA) 및 O'Toole 등, J. Bact. (1991) 173: 505(TsaA). 다른 폴리펩타이드도 국제특허공개 제96/40893호, 국제특허공개 제96/33274호, 국제특허공개 제96/25430호 및 국제특허공개 제96/33220호에 기술되어 있다. 본 발명의 목적을 위해 유용한 폴리펩타이드는 헬리코박터에 대한 면역 반응을 증진시킬 수 있는 것에 대한 참조에 인용된 것 중 하나와 동일하거나 비슷하다. 이러한 마지막 조건을 만족시키기 위해, 면역 물질은 또한 참조에 인용된 폴리펩타이드로부터 유래한 펩타이드이다.

유익하게는, 헬리코박터 우레아제(urease)의 UreA 및 UreB 부단위로부터 선택된 폴리펩타이드가 사용된다 [국제특허공개 제90/4030호]. 바람직하게는, 우레아제 애포효소(apoenzyme) 형태 또는 대안적으로 멀티머 형태로 혼합된 양쪽이 사용된다.

본 발명의 목적을 위한 유용한 약제학적 조성물은 하나의 면역 물질 또는 여러개의 면역물질을 포함한다. 예를 들면, 유익한 조성물은 UreA 및 UreB, 예를 들면 특히 상기 언급한 것으로부터 선택된 하나 이상의 다른 폴리펩타이드 뿐만 아니라 애포효소(apoenzyme) 형태를 포함한다.

그 외에, 본 발명의 목적을 위한 유용한 약제학적 조성물은 면역 물질 그 자체 및 Th1 또는 Th1/Th2 형 면역 보강제(adjuvant)와의 화합물, 이러한 화합물의 성질은 면역 물질, 불활성화된 박테리아, 세포 용균물, 펩타이드 또는 폴리펩타이드의 특성에 따라 어느 정도 달라진다. 예를 들면, 조성물은 또한, Th2-형 면역 반응의 유도를 증진할 수 있는 면역 보강제(adjuvant), 예를 들면, 알루미늄 하이드록사이드, 알루미늄 포스페이트 또는 알루미늄 하이드록시포스페이트와 같은 알루미늄 화합물을 포함한다. 이것은 본 발명의 목적을 위한 유용한 면역 보강제(adjuvant)는 QS-21과 같은 Th1-형 면역 보강제가 유리하다.

본 발명에 따른 방법이나 사용의 치료적 또는 예방적 효능은 표준 방법, 예를 들면 Lee 등, Eur. J. Gastroenterology & Hepatology (1995) 7: 303 또는 Lee 등, J. Infect. Dis. (1995) 172: 161에 기술되어 있는 마우스/헬리코박터 펠리스 모델 및 과정을 사용하여 면역 반응의 유도 또는 치료적 또는 예방적 면역성의 유도를 측정된다. 종래기술의 당업자는 헬리코박터 펠리스가 마우스 모델에서 또 다른 헬리코박터 종으로 대체될 수 있다는 것을 깨달았다. 예를 들면, 헬리코박터 필로리 유래의 면역 물질의 효능은 바람직하게는 마우스에 적합한 헬리코박터 필로리를 사용하는 마우스 모델에서 평가된다. 효능은 위조직에서의 감염 수준(우레아제 활성, 박테리아 로드(load) 또는 위염의 조건을 측정함으로써)을 대조군과 비교함으로써 결정된다. 감염이 대조군에 비해 감소될 때 치료적 효과 또는 예방 효과가 존재하는 것이다.

본 발명의 목적을 위한 유용한 약제학적 조성물은 보편적인 방법으로 제조된다. 특히, 이것은 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석액, 예를 들면 물 또는 식염수로 제제된다. 일반적으로, 희석액 또는 담체는 투여의 방법 및 경로에 따라 및 표준 약제학적 실험에 따라 선택된다. 약제학적 조성물의 제조를 위해 필수적인 것 뿐만 아니라 적당한 담체 또는 희석액은 이 분야에서 표준 참조 서적인 Remington's Pharmaceutical sciences에 기술되어 있다.

이러한 목적을 위해 유용한 조성물 뿐만 아니라 본 발명에 따른 방법은 즉, 헬리코박터 감염 및 결과적인 이러한 감염과 관계있는 급성, 만성 또는 위축성 위염, 소화궤양, 예를 들면 위 또는 십이지장 궤양을 포함하는 위십이지장질환을 치료 또는 예방하는 데 사용된다.

본 발명에 따른 약제학적 조성물은 보편적으로, 특히 점액 경로를 통해, 예를 들면, 눈, 구강으로, 예를 들면 입, 폐, 장, 직장, 질(vaginal) 또는 비노기 경로 또는 조직을 통해 투여되고, 비경구적으로는 예를 들면 정맥내, 근육내, 피내(intradermal), 상피내 및 피하 경로를 통해 투여된다. 바람직하게는, 비경구 경로가 사용된다. 비경구 경로가 사용될 때, 횡경막 아래가 투여의 바람직한 위치로 선택된다. 등요추(dorsolumbar) 부분이 투여의 적당한 위치인 특히 상피내, 근육내, 피내(intradermal) 및 피하 경로를 구성하고, 이러한 후자 경로는 정맥내 경로로 바람직하게 선택된다.

예방적 또는 치료적 효과를 얻기 위해, 본 발명의 목적을 위한 유용한 약제학적 조성물을 투여하는 것으로 구성되는 실시는 한번 또는 여러 번, 바람직하게는 적어도 두 번 반복되는데, 각 투여 사이의 시간 간격을 두고, 이러한 간격은 한 주 또는 한 달의 순서이다. 이것의 정확한 결정은 종래 당업자의 능력이고 면역 물질의 특성 및 실험대상의 나이와 같은 여러 요소에 따라 다양하다.

특정한 방법에 따라, 백신과정은 첫 번째 면역예방주사 및 두 번째 예방주사(boosters)를 실시하는 동안 투여의 같은 경로를 사용하여 수행되었다. 이러한 특정한 경우에, 투여는 예를 들면 엄격한 조직 형태로 될 수 있다.

"면역 물질의 투여 방법은 엄격한 조직 경로를 통해 수행된다"는 조직 경로외의 투여 경로를 사용하지 않는 방법으로서 정의된다. 예를 들면, 면역 물질이 조직 경로 또는 점액 경로에 의해 투여되는 방법은 상기 정의에 해당하지 않다. 즉, "면역 물질의 투여 방법은 엄격한 조직 경로를 통해 수행된다"는 다른 경로, 특히 점액 경로를 배제하는 조직 경로를 통해 면역 물질이 투여되는 방법을 의미하는 것으로 이해되어야 한다.

한정없는 예에 의하면, QS-21, DC-choi 또는 이들의 동등제의 하나와 혼합된 우레아제 애포효소(apoenzyme)를 등요추(dorsolumbar) 부분의 피하 경로를 통해 2~4 주 간격으로 3번 투여하는 것으로 구

성되는 백신 계획이 있다.

본 발명에 따른 약제학적 조성물의 투여는 더 정교한 백신 과정의 부분을 형성하는 하나의 단계라는 것을 예견하는 것이 또한 가능하다. 예를 들면, 본 발명에 따른 약제학적 조성물이 우선하거나 상기에서 언급한 것과는 독립적으로 선택된 헬리코박터로부터 유래된 면역 물질 또는 백신 벡터 또는 DNA 분자와 같은 다른 면역 물질을 포함하고 QS-21, DC-choi 또는 이들과 동등한 것을 포함하지 않는 약제학적 조성물을 후에 투여하며, 이때 후자를 완전하게 다른 면역 보강제로 대체하는 것이 가능하고, 두 가지 조성물을 동일한 또는 다른 경로를 통해 투여하는 것이 가능하다.

한정없는 예에 의하면, 다음 과정이 언급된다:

- QS-21 존재에서 우레아제 애포효소(apoenzyme)의 조직 경로를 통한 첫 번째 면역주사, 다음으로 점액 경로를 통한 QS-21 또는 LT가 첨가된 우레아제 애포효소의 두 번째 면역 주사(boosters); 및
- UreA 및 UreB를 암호화하는 폭스바이러스의 조직 경로를 통한 첫 번째 면역 주사, 다음으로 조직 또는 점액 경로를 통한 QS-21가 첨가된 우레아제 애포효소의 두 번째 면역 주사.

본 발명의 목적을 위해 유용한 약제 또는 본 발명에 따른 조성물을 사용하는 투여 단계를 포함하는 다단계 백신 과정에서 사용될 수 있고, 상기에서 설명한 것 외의 면역 물질은 폴리뉴클레오타이드 분자, 상세하게는 포유동물 세포의 발현에 필요한 요소의 조절아래에 있는 헬리코박터의 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 암호화하는 서열을 포함하는 DNA 분자; 또는 대안적으로 포유동물 세포(만일 바이러스 벡터라면) 또는 원핵생물(만일 박테리아 벡터라면)의 발현에 필요한 요소의 조절아래에 있는 헬리코박터의 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 암호화하는 서열을 포함하는 백신 벡터로부터 선택된다.

DNA 분자는 복제 및 실질적으로 포유류의 게놈에 통합될 수 없는 플라스미드가 유리하다. 상기에서 언급된 암호 서열은 포유동물 세포에서 발현되는 프로모터의 조절하에 있다. 이러한 프로모터는 조직에 대해 보편적이거나 특이적이다. 보편적인 프로모터는 사이토메갈로바이러스(cytomegalovirus) 초기 프로모터[미국특허 제4,168,062호] 및 로우스(Rous) 육종 바이러스 프로모터[Norton & Coffin, Molec. Cell. Biol. (1985) 5: 281]이 있다. 선택적인 프로모터인 데스민(desmin) 프로모터[Li 등, Gene (1989) 78: 244443; Li & Paulin, J. Biol. Chem. (1993) 268: 10403]는 근육 세포 및 피부 세포에서 발현하게 한다. 근육세포에 특이적인 프로모터는 예를 들면 미오신 또는 디스토로핀(dystrophin) 유전자의 프로모터이다. 본 발명의 목적을 위해 사용될 수 있는 플라스미드 벡터는 국제특허공개 제 94/21797호 및 Hartikka 등, Human Gene Therapy (1996) 7: 1205에 기술되어 있다.

본 발명의 목적을 위한 유용한 약제학적 조성물에 있어서, 뉴클레오타이드 분자, 예를 들면 DNA 분자는 제제화되어 있다. 제제의 선택은 크게 다양하다. DNA는 담체가 있거나 없는 약제학적으로 허용가능한 용액에 간단히 희석된다. 담체가 없을 때, 이것은 등장액 또는 약간 고장액이고 낮은 이온력을 가진다. 예를 들면, 이러한 조건은 수크로스 용액 20%로 채운 상태이다.

대안적으로, 폴리뉴클레오타이드는 세포안으로 들어가도록 증진시키는 물질과 혼합된다. 이것은 (i) 부피바카인(bupivacaine)과 같이 세포 투과성을 조절하는 화학 물질 또는 (ii) 폴리뉴클레오타이드와 혼합되고 폴리뉴클레오타이드의 수송을 촉진하는 매개체(vehicle)로 작용하는 물질이다. 후자는 양이온성 폴리머, 예를 들면 폴리라이신 또는 폴리리민, 예를 들면 스페르민(spermine)의 유도체이다[국제특허공개 제93/18759호]. 또한 이것은 융합(fusogenic) 펩타이드, 예를 들면 GALA나 그람미사이드인(Gramicidin) S[국제특허공개 93/19768] 또는 대안적으로 바이러스 융합 단백질로부터 유래한 펩타이드이다.

또한 이것은 음이온성 또는 양이온성 지질이다. 음이온성 또는 중성 지질은 긴 시간동안 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 많은 화학물체에 대해 수송 물질, 예를 들면 리포솜 형태로 작용할 수 있는 것으로 알려져 있다. 상기 리포솜, 이것들의 구성성분 및 제조 과정에 대한 자세한 서술은 Liposome에 의해 제공된다: A Practical Approach, RPC New Ed., IRL 출판(1990).

양이온성 지질은 또한 알려져 있고 통상적으로 폴리뉴클레오타이드를 위한 수송 물질로 사용된다. DOTMA(N-[1-(2,3-다이오레이록시) 프로필]-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드), DOTAP(1,2-비스(올레이록시)-3-(트리메틸 암모니오)프로판), DDAB(다이메틸다이옥타데실암모늄 브롬), DOGS(다이옥타데실아미도글리실 스페르민) 및 DC-choi(3-베타-(N-(N',N'-다이메틸아미노에탄)카바모일)톨레스테롤)과 같은 콜레스테롤 유도체로 알려진 리포펙틴™이 언급되었다. 상기 지질의 설명은 유럽특허 제187,702호, 국제특허공개 제95/26356호 및 미국특허 제5,527,928호에 의해 제공된다. 양이온성 지질은 바람직하게는 예를 들면 국제특허공개 제90/11092호에 설명된 DOPE(다이오레일포스파티딜에타놀아민)과 같은 중성 지질로 사용된다.

금 또는 텅스텐 미세입자는 또한 국제특허공개 제91/359호, 국제특허공개 제93/17706호 및 Tang 등, Nature (1992) 356: 152에 설명되어 있는 수송 물질로 사용된다. 상기의 특별한 경우에, 폴리뉴클레오타이드는 염화칼슘 및 스페르미딘(spermidine)의 첨가로 미세입자 형태로 침전된 다음 전체가 고속 제트에 의해 미국특허 제4,945,050호와 제5,015,580호 및 국제특허공개 제94/24243호에 기술되어 있는 것과 같은 바늘이 없는 기기를 사용하여 상피 또는 표피로 투여된다.

실험물을 백신화하기 위해 사용되는 DNA 양은 예를 들면 항원 발현에 사용되는 프로모터의 힘, 발현되는 생산물의 면역성, 투여되는 포유동물의 조건(예를 들면, 중량, 나이 및 일반적인 건강 상태), 투여 방법 및 제제형과 같은 여러 요소에 따라 달라진다. 일반적으로, 성인에게 있어서 예방적 또는 치료적 사용에 적당한 용량은 1 µg ~ 5 mg이고, 바람직하게는 10 µg ~ 1 mg, 가장 바람직하게는 25 µg ~ 500 µg이다.

백신 벡터는 상기에서 언급한 면역 물질이다. 특히 아데노바이러스 및 폭스바이러스는 바이러스 기원의 벡터이다. 본 발명의 목적을 위해 유용한 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA 분자를 발현할 수 있는 벡터를 제조하는 방법 뿐만 아니라 아데노바이러스로부터 유래된 벡터의 예는 미국특허 제4,920,209호에 서술되어 있다. 이와 같이 사용된 폭스바이러스는 예를 들면 백신시아(vaccinia) 및

카나리폭스(canarypox) 바이러스이다. 이것들은 각각 미국특허 제4,722,848호 및 제5,364,773호에 설명되어 있다[Tartaglia 등, Virology (1992) 188: 217 및 Taylor 등, Vaccine (1995) 13: 539]. 본 발명의 목적을 위해 유용한 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 발현할 수 있는 폭스바이러스는 Kiemy 등, Nature (1984) 312: 163에 기술되어 있는 것처럼 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA 조각이 포유류 세포에서 발현에 적당한 조건하에 놓이는 상동 재조합(homologous recombination)에 의해 얻어진다. 담즙 칼메테-구에린 간상균(Calmette-Guerin bacillus)과 같은 박테리아 벡터도 생각할 수 있다.

일반적으로, 예방적 또는 치료적 목적을 위해 의도되는 바이러스 벡터의 용량은 kg당 플라크 형성 단위는 약 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^{11}$ 이고, 유리하게는 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{10}$, 바람직하게는 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^9$ 이다.

박테리아 벡터 중에서, 시겔라, 살모넬라, 비브리오 콜레라(Vibrio cholerae), 락토바실러스(Lactobacillus) 및 스트렙토코커스(Streptococcus)가 언급된다. 살아있는 백신으로서 비브리오 콜레라의 무독성 돌연변이 균주는 Mekalanos 등, Nature (1983) 306: 551 및 미국특허 제4,882,278호(두개의 대립유전자 ctxA의 각각을 암호화하는 실질적 부분이 삭제되어 어떤 기능적 독이 생산되지 않는 균주); 국제특허공개 제92/11354호(돌연변이에 의해 irgA 좌위(locus)가 불활성된 균주; 이러한 돌연변이는 ctxA 돌연변이를 가진 같은 균주에 혼합된다.); 및 국제특허공개 제94/1533호(삭제에 의해 기능적인 ctxA 및 attRS1 서열이 없는 돌연변이)에 기술되어 있다. 이러한 균주는 국제특허공개 제 94/19482호에 기술되어 있는 이종성(heterologous) 항원을 발현하기 위해 유전학적으로 조작되었다.

백신으로서의 사용 뿐만 아니라 이종성(heterologous) 항원을 발현하기 위해 유전학적으로 조작되거나 다른 방법이 사용된 살모넬라 티피무리움(Salmonella typhimurium)의 독성약화된 균주는 Nakayama 등, Biotechnology (1988) 6: 693 및 국제특허공개 제92/11361호에 기술되어 있다.

백신 벡터로 유용한 다른 박테리아는 High 등, EMB0 (1992) 11: 1991 및 Sizemore 등, Science (1995) 270: 299(시겔라 플렉스네리(Shigella flexneri)); Medaglini 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1995) 92: 6868(스트렙토코커스 고르도니(Streptococcus gordonii)); 및 Flynn J. L., Cell. Mol. Biol. (1994) 40(suppl. 1); 국제특허공개 제88/6626호, 국제특허공개 제90/0594호, 국제특허공개 제91/13157호, 국제특허공개 제92/1796호 및 국제특허공개 제 2/21376호(칼메테-구에린 간상균(Calmette-Guerin bacillus))에 기술되어 있다.

박테리아 벡터에 있어서, 헬리코박터의 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA 서열은 플라스미드에 의해 운반되어 박테리아 계능에 삽입되거나 대안적으로 유리 상태로 남아 있게 된다.

DNA 분자 또는 백신 벡터는 상기에서 설명한 폴리펩타이드 및 펩타이드를 암호화하는 서열을 포함한다.

또한, DNA 분자, 바람직하게는 바이러스 백신 벡터는 포유류 세포에서의 발현을 위해 적당한 요소의 조절 아래서, 사이토카인, 예를 들면 인터루킨-2 또는 -12와 같은 림포카인을 암호화하는 서열을 포함한다. 또한 이러한 선택에 대한 대안은 DNA 분자 또는 벡터, 사이토카인을 암호화하는 또 다른 분자 또는 바이러스 벡터를 포함하는 본 발명의 목적을 위해 유용한 약제학적 조성물을 추가하는 것으로 구성된다.

일반적으로, 본 발명의 목적은 또한 연속적인 투여를 위해 다음을 포함하는 헬리코박터 감염을 치료 또는 예방하는 약제학적 조성물이다: (i) (a) 정제된 형태인 헬리코박터의 불활성화된 헬리코박터 박테리아, 헬리코박터 세포 용균물, 펩타이드 및 폴리펩타이드의 제조물로부터 독립적으로 선택된 헬리코박터 유래의 면역 물질, 및 (b) Th1-형 면역 반응의 유도를 증진시킬 수 있는 화합물을 포함하는 첫 번째 생산물 그리고 (ii) 정제된 형태인 헬리코박터의 불활성화된 헬리코박터 박테리아, 헬리코박터 세포 용균물, 펩타이드 및 폴리펩타이드의 제조물로부터 독립적으로 선택된 헬리코박터 유래의 면역 물질, 발현에 필요한 요소의 조절하에 있는 헬리코박터의 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 암호화하는 서열을 포함하는 DNA 분자 및 발현에 필요한 요소의 조절하에 있는 헬리코박터의 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 암호화하는 서열을 포함하는 백신 벡터를 포함하는 두 번째 생산물이고, 바람직하게는 첫 번째 생산물은 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 포함하고 두 번째 생산물은 DNA 분자 또는 백신 벡터를 포함할 때, 상기의 DNA 분자 또는 백신 벡터의 암호 서열은 첫 번째 생산물에 포함된 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 암호화함을 제공한다.

상기 설명에서, 헬리코박터 감염 및 헬리코박터 감염과 싸우는 수단인 예방과 치료에 대해서 필수적인 참조가 있다. 그러나, 상기에서 설명한 원칙과 방법은 유단디스(mutatis mutandis)를 위, 심이지장 또는 장 감염의 원인인 미생물에 의해 유도된 감염에 적용될 수 있다.

그외에, 본 발명에서 인용되고 출판된 모든 문서는 참조에 나타났다.

도면의 간단한 설명

도 1은 실시예 1에 대한 것이고 D0, D28 및 D56에서 3번 받은 마우스를 죽인지 4시간 후에 우레아제 활성을 측정하는 것을 나타낸 것이다: (a) 등요추(dorsolumbar) 근육을 통한 약 80%가 DC-choi 리포솜으로 캡슐된 우레아제의 제조; 또는 (b) 장내 경로를 통한 콜레라 독성 면역 보강제(adjuvant)가 사용된 우레아제의 제조. 실험(c)와 (d)는 각각 양성 및 음성 대조군에 해당된다.

도 2는 실시예 1에 대한 것이고 D0, D28 및 D56에서 3번 받은 마우스를 죽인지 4시간 후에 우레아제 활성을 측정하는 것을 나타낸 것이다: (a) 장내 경로를 통한 콜레라 독성 면역 보강제(adjuvant)가 사용된 우레아제의 제조 또는 (b) 왼쪽 후면 요추 하부부의 피하 경로를 통한 PCPP 면역 보강제(adjuvant)가 사용된 우레아제의 제조; 또는 (c) 아래 뒤쪽의 피하 경로를 통한 QS-21 면역 보강제(adjuvant)가 사용된 우레아제의 제조. 실험(c)와 (d)는 각각 양성 및 음성 대조군에 해당된다.

도 3은 실시예 2에 설명되어 있는 면역조치 과정을 받은 원숭이에게 유도되고 ELISA 적정으로 표현된 혈청 면역글로불린의 양을 나타낸 것이다. 4마리 원숭이를 포함하는 대조군 및 3개의 시험군을 준비하고, 시험군 각각은 8마리 원숭이를 포함하고; 각 시험군은 4마리의 원숭이를 가지는 2개의 부그룹으로 나뉘는데, 하나는 불활성화된 헬리코박터 필로리(H.pylori)(1, 2, 및 3)만을 받고 다른 하나는 불활성화된

헬리코박터 필로리(H.pylori) 및 재조합 우레아제(1u, 2u 및 3u)를 받았다. 그룹 1 및 1u는 투여과정 [코+장내, 4번]에 해당하고; 그룹 2 및 2u는 투여과정 [근육내, 4번]에 해당하고; 그룹 1 및 1u는 투여과정 [코+장내, 근육내, 코+장내, 근육내]에 해당한다. ELISA 적정은 3번 측정된다: D0에서 첫 번째(하얀 밴드), D42에서 두 번째(그늘진 밴드), D78에서 세 번째(검은 밴드).

도 4는 실시예 3에서 설명된 면역 조치 과정을 받은 마우스에서 유도되고 ELISA 적정으로 표현된 혈청 면역글로블린의 양을 나타낸다. ○는 ELISA IgG2a 적정을 나타내고 ◆는 ELISA IgG1 적정을 나타낸다. 참조군 뿐만 아니라 2개의 대조군(양성과 음성 대조군), 4개의 시험군(A1~A4)이 형성되고, 각 그룹 각각은 10마리의 마우스를 포함한다. 혈청 면역글로블린 양의 측정은 10마리 중 5마리로만 수행되었다. A1~A4 군의 마우스는 왼쪽 후면 요추(sublumber) 부분으로 피하경로를 통해 QS-21(A1), 베이(Bay) R1005(A2), DC-choI(A3) 또는 PCPP(A4)이 첨가된 우레아제 10 µg을 투여하였다. 대조군의 마우스는 구강 경로를 통해 대장균 열-가변성 단백질이 첨가된 우레아제 40 µg을 투여하였다.

도 5는 실시예 3에 설명되어 있는 면역 조치 과정을 받은 마우스를 죽인 4시간 후 OD₅₅₀에서 위점막의 수준에서 측정된 우레아제 활성 수준을 나타낸다. 그룹은 도 4에 설명되어 있는 것과 같다.

도 6은 실시예 3에 설명되어 있는 면역 조치 과정을 받은 마우스를 죽인 24시간 후 OD₅₅₀에서 위점막의 수준에서 측정된 우레아제 활성 수준을 나타낸다. 그룹은 도 4에 설명되어 있는 것과 같다.

도 7은 실시예 3에 설명되어 있는 면역 조치 과정을 받은 마우스를 죽인 후 위점막의 수준에서 측정된 박테리아 로드(load)를 나타낸다. 그룹은 도 4에 설명되어 있는 것과 같다.

도 8A 및 8B는 헬리코박터 필로리(H. pylori)로 감염되고 A~H까지 다양한 처리를 받은 마우스에서 자트록스(Jatrox) 시험(Procter & Gamble) 및 박테리아 로드(load)를 한(도 6B) 4시간 후에 측정된 우레아제 활성을 나타낸다(도 6A)[A: 구강 경로를 통한 LT+우레아제; B: 목의 비경구 경로를 통한 QS21+우레아제; C: 요추(lumber) 부분의 비경구 경로를 통한 QS 21+우레아제; 요추(lumber) 부분의 피하 경로를 통한 QS 21 단독; E: 목의 비경구 경로를 통한 베이(Bay) R1005+우레아제; F: 요추(lumber) 부분의 비경구 경로를 통한 베이(Bay) R1005+우레아제; G: 요추(lumber) 부분의 피하 경로를 통한 베이(Bay) R1005 단독(대조군); H: 요추(lumber) 부분의 피하 경로를 통한 식염수(양성 대조군)] 는 음성 대조군을 나타낸다.

실시예

실시예 1 : 마우스의 면역 조치 연구

1A- 재료 및 방법

마우스

6/8 주된 암컷인 스위스(Swiss) 마우스는 잔비에어(Janvier, 프랑스)로부터 구입하였다. 전체 실험 중에 살균된 물질을 사용하였고; 케이지(cages)는 "아이소캡(isocaps)"에 의해 보호되었으며; 마우스에게는 여과된 물 및 방사선 조사(照射)된 먹이를 공급하였다.

투여 과정

각 실험 중에, 마우스에게 동일 생성물의 3회 분량을 투여하였고, 각각은 28일 간격(0, 28 및 56일)으로 투여되었다. 생성물 투여는 코 경로(깨어있는 마우스에 50 µl 까지), 경구 경로(위의 위관을 통한 0.2 M NaHCO₃ 중의 300 µl), 또는 피하 경로(목의 피부안에 또는 요추 왼쪽 부위피부하에 300 µl)를 통하여 수행되었다. 어떤 경우는 근육내 접종은 마취된 마우스의 등요추(dorsolumbar) 근육내에서(50 µl) 수행하였다. 우레아제 10 µg을 코, 피하 또는 근육내 경로를 통하여 투여하였고, 40 µg은 경구 경로를 통하여 투여하였다. 비활성된 박테리아 제조물에 관해선, 세포 400 µg을 피하 경로 또는 경구 경로를 통하여 투여하였다.

항원 및 면역 보강제

헬리코박터 필로리(H. pylori) 우레아제 애포효소(apoenzyme)를 대장균에서 발현시켰으며, 국제특허공개 제96/31235호의 실시예에서 개시된 바와 같이 정제하였다. 본문의 나머지에서 우레아제의 단순한 용어는 이러한 아포효소로 표시된다.

우레아제를 포함하는 DC-choI 리포솜은 다음과 같이 제조하였다; 우선, DC-choI(R-유전자 치료제) 100 mg 및 DOPC(다올레일포스파티딜콜린)(아반티(Avanti) 극성 지질) 100 mg을 포함하는 건조 지질 필름을 얻기 위하여, 이러한 생성물을 클로로포름 약 5 ml에 가루형태로 혼합시켰다. 용액을 로터리 증발기를 이용하는 진공하에서 증발시켰다. 용기 벽에 얻어진 필름을 적어도 4h 동안 고진공하에서 건조시켰다. 동시에, 우레아제 동결건조제 20 mg 및 슈크로스 100 mg을 pH 7.2 완충용액인 20 mM HEPES 13.33 ml에 희석시켰다. 상기 제조(우레아제 1.5 mg 및 슈크로스 0.75%를 포함하는)된 용액 10 ml를 0.220 µm 밀렉스(Millex) 필터로 여과한 다음, 지질 필름을 재수화에 사용하였다. 현탁액을 4h 동안 교반한 다음, 압출(0.2 µm 폴리카르보네이트 분리막 상을 10으로 통과시킴)시키거나 또는 초유체화(초유체 Co Y10 초유체화기에서 500 kPa의 압력으로 10으로 통과시킴)시켰다. 상기에서 얻은 리포솜 현탁액에서, 캡슐화된(encapsulated) 우레아제는 10 ~ 60%가 되었다. 현탁액의 슈크로스 농도를 5%(10 ml당 슈크로스 425 mg을 첨가하였다)로 맞춘 후에 동결건조하였다. 사용하기 전에, 동결건조제를 적당한 부피의 물 또는 완충용액에 녹이고, 현탁액을 캡슐화된 우레아제의 함량이 전체 우레아제의 함량과 비교하여 약 70%

보다 높게 제조하기 위하여 불연속적인 슈크로스 농도(0, 30 및 60% 단계)상에서 정제하였다.

콜레라 독소는 우레아제 또는 박테리아 제조물의 1회 용량당 10 µg 함량의 점막 면역보강제로서 사용되었다.

QS-21(켄브리지 바이오사이언스)은 우레아제의 1회 용량당 15 µg 함량의 면역보강제로서 사용되었다.

폴리포스파젠(PCPP)(바이러스 연구소)는 우레아제의 1회 용량당 100 µg 함량의 면역보강제로서 사용되었다.

실험(Challenge)

두 번째 면역주사 2주일 후, 균주 ORV2002(PBS 200 µl 중의 1×10^7 개의 살아있는 박테리아; 약 0.5의 OD₅₅₀)를 마우스에게 적당한 헬리코박터 피로리(H. pylori) 균주의 현탁액 300 µl와 함께 마우스의 위관(gavage)을 통해 투여되었다. 항원이 투여되지 않은 하나의 대조군은 상기와 같이 실험되었다.

실험(Challenge)의 분석

실험 4주 후에, 마우스의 목척추에 충격을 가해서 죽였다. 우레아제 활성을 측정하고 조직학적 분석을 하기 위해 위를 제거되었다. 우레아제 활성은 4시간 및 24 시간 후에 자트로스(Jatrox) 시험으로 측정되고(OD550 nm)[Procter & Gamble] 24시간 후에도 여전히 음성인(OD값이 0.1 이하) 마우스가 여러 마리가 관찰되었다.

ELISPOT에 의한 부분적 항체 반응의 측정(침샘 및 위).

ELISPOTs은 Mega 등, J. Immunol. (1992) 148: 2030에 따라 수행된다. 플레이트는 50 µg/ml 농도의 헬리코박터 필로리(H. pylori) 단백질의 추출액으로 코팅되어 있다.

위(stomach) 수준에서 항체 반응을 시험하기 위해, 변형된 다음 방법을 사용하였다: 위의 반을 인간 조직을 자르는 자동 기기를 사용하여 1 mm² 크기로 자르고[McIlwain Laboratorious, Gilford, UK] 변형된 조클릴(Joklil) 용액 2 ml 중의 디스파제(Dispase)(2 mg/ml, Boeringer Mannheim)의 소화에 10% 말(horse) 혈청(Gibco), 글루타민 및 항생제가 첨가되었다. 4시간 반의 소화는 37°C에서 부드럽게 혼합하면서 수행되었다. 그리고 나서 소화된 세포는 각 단계마다 70 µm 여과지(Falcon)를 사용하여 여과된 후 5% 소 태아혈청(FCS)가 첨가된 RPMI 1640(Gibco) 용액으로 3번 세척하고 나이트로셀룰로오스(Millipore)(100 µl/웰, 4 웰)로 덮여있는 플레이트에 적어도 4시간 동안 같은 용액에서 인큐베이트하였다. 위(stomach) 반당 1 ~ 3×10^5 개의 세포가 얻어진다(크기가 큰 세포 및 대식세포는 세지 않았다).

바이오틴이 결합된(biotinylated) IgA 및 스트렙타비딘(streptavidin)-바이오틴이 결합된 퍼옥시다제 복합체는 아머샴(Amersham)으로부터 구입하였다. AEC 기질(시그마)의 활성하에서 스팟(spot)이 발견되고 플레이트가 건조되자마자 현미경하에서 세었다(배율 $\times 16$ 또는 $\times 40$). 4개의 웰에 있는 IgGA 스팟(spot)의 수에 해당하는 평균값이 계산되고 10^6 세포당 스팟(spot)의 수로 나타내었다.

ELISA에 의한 반응 분석

ELISA 분석은 표준 과정에 따라 수행되었다(바이오틴이 결합된 접합체(conjugate) 및 스트렙타비딘-퍼옥시다제는 아머샴(Amersham)으로부터 구입하였고 OPD(0-페닐-다이아민 다이하이드로클로라이드 기질은 시그마로부터 구입하였다). 플레이트는 카르보네이트 완충액중의 헬리코박터 필로리(H. pylori) 추출물로 코팅되었다. 헬리코박터 필로리(H. pylori) 추출물에 대한 마우스의 대조군 혈청은 각 실험에 도입되었다. 적정은 OD490 nm의 1.5에 해당하는 희석액의 역수에 해당한다.

1B- 결과

결과는 상기에서 설명한 도 1과 도 2에 나타내고 하기에 설명하겠다:

도 1과 2의 목적에 대해 어떤 비평을 하기 전에, 상기 도는 콜레라독성 면역 보강제(adjuvant)가 사용되고 장내 경로를 통해 투여된 항원으로 얻은 결과를 나타낸 것임을 주의하여야 한다. 이러한 실험은 종래 기술 CT/IG 혼합이 지금까지의 가장 좋은 결과를 주기 때문에 표준 참조 실험이라 부른다.

도 1은 DC-choi 리포솜에 캡슐된 우레아제 제조물은 표준 참조 실험에서 얻은 것과 같은 좋은 결과를 나타냄을 보인다.

더구나, 마우스가 죽은 4시간 후 우레아제 활성의 견해에서 실험 (a)~(d)의 결과는 도 1에 나타내고 이것은 죽은 지 24시간 후 까지 우레아제 활성에 대해 여전히 음성반응을 보이는 마우스의 수는 각각 (a) 5/10, (b) 4/10, (c) 0/10 및 (d) 10/10임을 가리킨다. 이것은 이전에 결론지은 것과 다음의 면에서 동일하다; 즉, 실험(a)는 표준 참조 실험으로 얻은 것과 비슷한 결과를 이끈다.

도 2는 QS-21 면역 보강제(adjuvant)가 사용된 우레아제 제조물은 표준 참조 실험에서 얻은 것만큼 좋은 결과를 얻었다. 게다가, 상기 도는 면역 보강제(adjuvant)로서 PCPP를 사용하여 얻은 결과는 QS-21를 사용하여 얻은 것보다 많이 덜 만족스럽다는 것을 보여준다. 이것은 하기 표에서 증명된 것처럼 PCPP는 바람직하게는 우레아제가 사용된 PCPP는 Th2-형 반응을 유도하는 반면에 우레아제가 사용된 QS-21은

Th1/Th2 균형있는 반응을 유도한다고 설명될 수 있다.

더구나, 마우스가 죽은 4시간 후 우레아제 활성의 견해에서 실험 (a)~(e)의 결과는 도 2에 기록되어 있고 이것은 죽은 지 24시간 후 까지 우레아제 활성에 대해 여전히 음성반응을 보이는 마우스의 수는 각각 (a) 1/8, (b) 0/8, (c) 5/8, (d) 0/8 및 (e) 10/10임을 가리킨다. 이것은 이전에 결론지은 것과 다음의 면에서 동일하다; 즉, 실험(c)는 표준 참조 실험으로 얻은 것과 비슷한 결과를 이끈다.

죽은지 4 및 24시간 후 OD 값이 0.1 이하인 것으로 특징을 갖는 마우스의 수 뿐만 아니라 도 1 및 2에 표시되어 있는 우레아제 활성에 대한 실험 결과 동안 유도된 혈청 IgA, IgG1 및 IgG2a의 양을 다음 표에 나타내었다. IgA, IgG1 및 IgG2a의 양은 ELISA 적정으로 나타낸다.

	우레아제 CT IG	우레아제 DC-CHO1 SC	우레아제 PCPP SC	우레아제 QS-21 SC
IgA	45	0	58	1
IgG1	65700	620000	2930520	2970399
IgG2a	20200	321000	26200	1136095
OD<0.14 h	5/10	5/10	0/8	6/8
OD<0.124 h	4/10	5/10	0/8	5/8

상기 표에 나타낸 결과는 장내 경로(및 이러한 경로에 적당한 면역 보강제)를 사용한 후의 경우가 아니라 피하 경로가 사용될 때(이러한 경로에 적당한 면역 보강제 뿐만 아니라), 혈청 항체 수준이 높다. 더구나, 이러한 결과는 DC-choi 또는 QS-21이 사용될 때, IGG1 수준에 비하여 높은 IgG2a 수준이 얼어짐을 보인다. 이것은 이러한 면역 보강제는 Th2 반응뿐만 아니라 Th1 반응을 유도하는 능력을 가짐을 나타낸다. 반면에, PCPP가 사용될 때, 얻은 IgG2a 수준은 실질적으로 IgG1 수준보다 더 낮다. 후자의 면역 보강제는 필수적으로 Th2 반응을 유도함으로써 본 발명의 목적을 위한 유용한 면역 보강제가 될 수 없다고 결론지을 수 있다.

실시에 2: 원숭이에 있어서 면역 조치 연구

2A- 재료 및 방법

원숭이

마우리티우스(Mauritius)로부터 구입한 28마리의 2년생 원숭이(Macaca fascicularis)가 본 연구에서 사용되었다. 하기에서 설명되는 다양한 면역 조치 과정을 원숭이에게 처리하기 전에, 생체검사를 통해 이들의 대부분은 만성적으로 가스트로spi릴룸 호미니스(Gastrospirillum homonis)(GHL0) 또는 헬리코박터 헤일만니(H. heilmanii)와 비슷한 유기체로 감염되었음을 보여준다.

투여 과정

거의 모든 원숭이가 GHL0s로 감염됐기 때문에, 치료에 있어서 다양한 과정의 효능을 시험하기로 결정했다. 3가지 과정이 사용됐고, 하기 표에 요약되었다:

그룹	D0	D21	D42	D63
1 및 1u	IN+IG	IN+IG	IN+IG	IN+IG
2 및 2u	IM	IM	IM	IM
3 및 3u	IM	IN+IG	IM	IN+IG

근육내 경로를 통한 투여는 등요추(dorsolumbar) 근육에서 수행되는 것으로 특정화된다.

항원 및 면역 보강제

GPL0s 및 헬리코박터 필로리(H. pylori) 사이의 교차반응이 있기 때문에, 실시에 1A에 설명된 것처럼 불활성화된 헬리코박터 필로리(H. pylori)를 단독 또는 실시에 1A에 참조된 방법에 따라 제조된 제조할 우레아제와 혼합하여 사용하는 것으로 선택되었다.

대장균 열-가변성 독소(LT)(시그마) 또는 콜레라독의 B 부단위체(CTB)(Pasteur Merieux serums &

vaccine)가 점액 면역 보강제로 사용되는 반면에 DC-choi은 비경구 면역 보강제로 사용된다. DC-choi 분말은 항원 제조물을 사용하여 간단히 재수화된다.

사용된 용량은 다음과 같다:

경로(route)	미생물	우레아제	DC-choi	LT	CTB
IG	400 μ g	2.5 mg	-	25 μ g	-
IN	400 μ g	400 μ g	-	25 μ g	25 μ g
IM	400 μ g	100 μ g	400 μ g	-	-

생체검사, 우레아제 시험 및 박테리아학적/조직학적 연구

생체검사가 면역조치 전후의 원숭이 각각에 대해 수행되었다(3번째 면역조사후 한 달). 생체검사를 이용하여, 우레아제 테스트 및 조직학 연구가 수행되었다.

우레아제 활성이 자트록스 기기(Jatrox kit)(Procter & Gamble)를 사용하여 측정되었다. 이러한 활성의 수준은 다음과 같이 감소하는 방식으로 평가되었다: 레벨 3, 첫 10분 동안 나타나는 분홍색; 레벨 2, 시약 첨가후 10분과 30분사이에 나타나는 분홍색; 레벨 1, 30분과 4시간 사이에 나타나는 분홍색 및 레벨 0, 4시간 후 색깔이 약하거나 무색.

조직학 연구는 포르말린에 고정된 생체검사를 사용하여 수행되었고 박테리아 로드(load)는 다음과 같이 정량되었다: 박테리아의 부재(0); 헬리코박터 형의 약간의 박테리아(0.5); 그런대로 많은 박테리아(1); 수 많은 박테리아(2); 꽤 많은 박테리아(3). 하나의 레벨의 차이는(예를 들면 1~2) 박테리아의 수가 5배 더 큰것에 해당한다.

ELISA 시험에 의한 반응 분석

ELISA 시험은 실시예 1A에 설명되어 있는 것에 따라 수행되었다.

1B- 결과

다음 표는 면역 전후에 두 가지 테스트를 사용하여 확인된 박테리아 로드(load)에 관한 것이다: (i) 우레아제 활성을 측정함으로써 그리고 (ii) 조직학적 연구를 수행함으로써. 이것에 관한 결과는 컬럼 3~6에 나타내었다. 마지막 3개 컬럼은 각 그룹을 가리킨다(대조군, 1, 2 또는 3). 두 가지 테스트를 통해 면역조치 후 박테리아 로드(load)가 변하지 않은 채 남아있는(\rightarrow) 원숭이 수; 또는 두 가지 테스트 중의 어느 하나가 더 낮거나(\searrow) 증가되고(\nearrow) 나머지 하나의 테스트는 변하지 않는 박테리아 로드(load)를 가리킨다.

두 가지 테스트의 결과가 비슷한 다양성을 보일 때, 위쪽 또는 아래쪽 화살을 이중으로 표시하였다.

원숭이	그룹	우레아제 활성		조직학		변화					
		면역 조치 전	면역 조치 후	면역 조치 전	면역 조치 후	↘	→	↗			
H 282	C	2-2	3-2	2	3-2	1/4	1/4	2/4 (2/4↗ ↗)			
J 005	C	2-2	2-1	2	1-0						
J 852	C	0-0	2-0	0	1-1						
J 476	C	0-0	2-0	0	1-1						
H 799	1	2-2	2-2	2	2-2	1/8	5/8	2/8 (1/8 ↗↗)			
J 845	1	2-2	3-2	2	2-1						
J 205	1	1-1	2-2	0	1						
J 328	1	2-2	1-2	3	3-2						
J 197	1u	2-2	3-2	2	3						
H 025	1u	2-2	2-2	1	1-1						
G 460	1u	2-2	3-2	3	2-3						
J 607	1u	2-2	2-2	2	2						
H 549	2	3-3	2-2	3	2-3				6/8	1/8	1/8
H 622	2	3-3	1-1	2	2-3						
H 504	2	3-3	1-1	2	2-1						
H 798	2	1-1	0-1	1	1-1						
J 367	2u	2-2	2-1	3	2-3						
G 486	2u	2-2	2-2	1	2-2						
J 522	2u	2-2	0-0	2	2-2						
G 722	2u	3-3	2-0	2	2-3						
H 820	3	3-3	2-2	3	2-2	5/8 (3/8↘ ↘)	0	3/8			
J 557	3	2-2	1-0	2	1-2*						
H 588	3	2-2	2-0	3	1-2						
J 153	3	3-3	3-3	2	3-3						
H 480	3u	2-2	2-2	2	3-3						
J 344	3u	3-3	2-0	3	2-2						
H 710	3u	2-2	2-2	2	3-3						
J 262	3u	3-3	2-2	3	3-2						

따라서, 상기 표는 엄격한 점액 경로를 통한 면역 조치과정을 받은 그룹에 있어서, 결과는 실질적으로 음성 대조군에서 얻어진 것과 동일하다. 반면에, 혼합된 점액 및 근육내 경로 또는 엄격한 근육내 경로를 통해 면역조치를 받은 그룹에 있어서, 박테리아 로드(load)의 현저한 감소가 관찰된다. 이로써 면역 조치 조건, 특히 사용된 면역 보강제의 중요성을 확인했다; 결과적으로, 예방 효과를 얻기 위해서 균형있는 Th1 및 Th2 반응을 증진시킬 수 있는 DC-cho1과 같은 면역 보강제의 사용이 추천된다.

이러한 결과는 도 3에 나타난 혈청 항체 수준에 관한 다른 결과와 같이 하고 있다. 도 3은 엄격한 점액 경로(1 및 1u)를 통한 면역조치 계획은 음성 대조군 그룹의 결과와 매우 비슷한 결과를 이끈다는 것을 보인다. 반면에, 점액 및 장내의 혼합 경로(2 및 2u) 및 엄격한 근육내 경로를 통한 면역조치 계획은 대조군보다 더 실질적으로 항체수준이 유도되는 것이 가능하다.

따라서, 높은 혈청 반응은 예방효과와 관련 있는 반면에 낮은 반응은 예방효과의 부재와 연결되어 있다. 원하는 효과(고혈청반응 및 예방효과)를 얻기에 가능한 면역조치 조건은 황경막하를 표적으로 하는 비경구 경로 또는 Th1 면역 보강제의 사용이 필요하다.

실시예 3: 마우스에 있어서 다른 면역조치 연구

3A- 재료 및 방법

마우스

6/8-주된 암컷 스위스(Swiss) 마우스는 잔비어(Janvier)(프랑스)에서 제공되었다. 전체 실험에서, 멸균된 재료들이 사용되었고; 케이지(cage)는 "아이소캡스(isocaps)"에 의해 보호되었다; 마우스에게는 여과된 물 및 방사선을 조사한 음식을 먹였다.

투여과정

각 실험에서, 마우스에게 동일 생산물의 3회 분량; 각각은 21일 간격으로(0, 21 및 42일) 투여되었다. 생산물의 투여는 구강 경로(위관(gavage)를 통한 0.2 M NaHCO₃ 중의 300 μ l), 또는 피하 경로(요추(lumber) 부분의 왼쪽 피부아래로 300 μ l)를 통해 수행되었다. 우레아제 10 μ g이 피하로 투여되고 40 μ g이 구강경로를 통해 투여되었다.

항원 및 면역 보강제

헬리코박터 필로리(H. pylori) 우레아제 애포효소(apoenzyme)는 대장균에서 발견되고 국제특허공개 제 96/31235호의 실시예 5에 설명되어 있는 것과 같이 분리정제되었다. 본 발명의 나머지에서, 우레아제의 간단한 용어는 상기 애포효소(apoenzyme)를 가리키는 것이다.

대장균 열-가변 독소(시그마)는 점액 면역 보강제로서 우레아제 1회 분량당 1 μ g 함량으로 사용된다.

QS-21(캠브리지 바이오사이언스)은 점액 면역 보강제로서 우레아제 1회 분량당 15 μ g 함량으로 사용된다.

베이(Bay) R1005(베이어(Bayer))는 점액 면역 보강제로서 우레아제 1회 분량당 400 μ g 함량으로 사용된다.

DC-choi(R-진 테라퓨틱스(Gene Therapeutics))는 점액 면역 보강제로서 우레아제 1회 분량당 65 μ g 함량으로 사용된다.

포리포스파젠(polyphosphazene)(PCPP)(바이러스 리서치 인스티튜트(Virus Research Institute))는 점액 면역 보강제로서 우레아제 1회 분량당 100 μ g 함량으로 사용된다.

실험(challenge)

두 번째 면역주사한지 4주 후, 마우스에게 위관(gavage)을 통해 마우스에게 적응되고 스트렙토마이신(Streptomycin), 균주 0RV2001에 저항성을 갖는 헬리코박터 필로리(H. pylori) 균주의 현탁액 300 μ l(3×10^6 살아있는 박테리아)을 투여하였다. 항원을 받지 않고 대조군도 같은 방식으로 실험하였다.

상기 현탁액은 다음과 같이 제조되었다: 헬리코박터 필로리(H. pylori)를 시그마로부터 구입한 다음의 항생제를 포함하는 5% 양(sheep) 혈액이 첨가된 뮐러-힌톤(Muller-Hinton) 배지(바이오메리어스

(bioMerieux))(MHA 배지)에서 배양하였다: 트라이메토프림(Trimethoprim) 5 μ g/ml, 반코마이신(Vancomycin) 10 μ g/ml, 폴리믹신 B 1.3 μ g/ml, 암포테리신(Amphoterin) 5 μ g/ml 및 스트렙토마이신(Streptomycin) 50 μ g/ml. 배양 디시(dish)는 미호기성(microaerophilic) 조건(amaerocult C, Merck)하의 37°C에서 3일 동안 배양되었다. 이러한 배양은 5% 소태아혈청 및 상기 언급한 항생제가 첨가된 브루셀라(Brucella) 육즙(broth) 50 ml을 포함하는 구멍이 있는 75 cm² 플라스크에 접종하기 위해 회수되었다. 플라스크는 24시간 동안 부드럽게 섞이면서 미호기성 조건하에서 배양되었다. 그런 다음 현탁액은 OD 550 nm에서 0.1 이 되도록 브루셀라(Brucella) 육즙(broth)으로 희석되었다.

실험(challenge) 분석

실험한 지 4주 후에, 마우스의 목척추에 충격을 가함으로써 죽였다. 위(stomach)는 우레아제 활성 및 양적인 배양을 통한 박테리아 로드(load)를 측정하기 위해 제거되었다. 위의 세로로 1/4(공동(antrum)+중심체(corpus))은 각 시험에 사용되었다. 우레아제 활성은 4시간 및 24 시간 후에 자트록스(Jatrox) 시험으로 측정되고(OD550 nm)[Procter & Gamble] 24시간 후에도 여전히 음성인(OD값이 0.1 이하) 마우스가 여러 마리 관찰되었다.

헬리코박터 필로리(H. pylori)의 양적 배양을 통한 감염 측정

마우스가 죽었을 때, 각 마우스의 위 1/4의 정맥은 바이오메리어스(bioMerieux)로부터 구입한 포타겜(Portagem) 배지에 넣고 2시간 안에 배양 챔버(chamber)로 옮겼다. 샘플은 브루셀라(Brucella) 배지(브루셀라 육즙) 1 ml을 포함하는 도운스(Dounce) 균질기(Weaton, Millville USA)를 사용하여 균질화되고 10⁻³까지 연속적으로 희석되었다. 각 희석액 100 μ l(10⁰, 10⁻¹, 10⁻² 및 10⁻³)를 상기 언급한 항생제가 첨가된 MHA 배지를 포함하는 페트리디시에 뿌리고 4 또는 5일 동안 미호기성 조건하의 37°C에서 배양되었다. 그리고 나서, 살아있는 박테리아의 수를 세었다. 헬리코박터 필로리(H. pylori)는 그람 염색

법을 이용하여 형태가 확인되고, 우레아제, 카탈라제 및 옥시다제 시험에 대해 양성 반응을 보였다.

ELISA에 의한 반응분석

ELISA 분석은 표준 과정에 따라 수행되었다(바이오틴이 결합된 접합체(conjugate) 및 스트렙타비딘-퍼옥시다제는 아머삼(Amersham)으로부터 구입하였고 OPD 기질은 시그마로부터 구입하였다). 플레이트는 카르보네이트 완충액 중의 헬리코박터 필로리(H. pylori) 추출물로 코팅되었다. 헬리코박터 필로리(H. pylori) 추출물에 대한 마우스의 대조군 혈청은 각 실험에 도입되었다. 적정은 OD490 nm의 1.5에 해당하는 희석액의 역수에 해당한다.

3B- 결과

도 4~도 7의 과제에 대해 어떤 비평을 하기 전에, 상기 도는 LT 면역 보강제가 사용되고 장내 경로를 통해 투여된 항원으로 얻은 결과를 나타낸 것임을 주의하여야 한다. 이러한 실험은 종래 기술 LT/IG 혼합이 지금까지의 가장 좋은 결과를 주기 때문에 표준 참조 실험이라 부른다.

혈청반응

도 4에 나타냈듯이, 3번의 면역조치를 한 후에, 피하 경로를 통해 면역된 마우스는 고혈청 IgG 반응을 보인다. IgG1:IgG2a 비율을 기초로, PCPP는 Th2 형(높은 IgG1 수준, 낮은 IgG2a 수준)의 우세한 반응을 유도한다는 것을 알 수 있다. 베이 R1005 및 DC-cho1은 Th1/Th2의 더 균형 있는 반응을 유도한다. 마지막으로, QS-21은 Th1 형의 우세한 반응을 유도한다. 사실, 마우스 A1~A4의 네 그룹 사이의 주요한 차이는 IgG2a 적정에 있고, IgG1 적정은 모두 비슷하다.

실험 후 예방

도 5~도 7은 그룹 A1 및 A2의 예방 수준은 참조군(LT)에서 관찰된 것과 비슷하거나 더 낮다. 이러한 그룹에 각각 QS-21이 첨가된 중의 우레아제 및 베이 R1005를 투여하였다. 그룹 A3(DC-cho1)은 약간 낮은 예방 수준을 보였다. 반면에, 그룹 A4(PCPP)에 있어서, 높은 예방 효과를 증명하는 것이 가능하지 않다. 도 5~도 7에서 나타낸 결과는 서로 일치한다는 것을 알았다.

도 4에서 나타낸 결과와 도 5~도 7에 나타낸 결과를 비교할 때, Th1 또는 Th1/Th2 반응(QS-21, 베이 R1005 또는 DC-cho1)을 유도할 수 있는 면역 보강제의 사용은 Th2-형 면역 보강제(PCPP)의 사용과 반대로 예방 효과를 증진시킨다는 결론을 내릴 수 있다.

실시에 4: 마우스에 있어서 헬리코박터 필로리(H. pylori) 감염의 치료

본 발명은 마우스 모델에서 헬리코박터 필로리(H. pylori) 감염을 치료하기 위한 피하 경로(SC)와 점액 경로를 통한 면역조치의 효능을 비교하였다.

OF1 마우스는 헬리코박터 필로리(H. pylori) 0RV2001 균주의 10^6 플라크 형성 콜로니(cfu)로 감염되었다. 한 달 후, 감염이 정말 되었는지 무작위적으로 10/100 마우스를 죽이고 전체 위(stomach) 1/4에 대해 우레아제 활성을 시험함으로써 정검하였다. 모든 결과는 양성반응을 보였고, 마우스(그룹마다 10마리)에게 면역 보강제로서 QS21 15 μ g 또는 베이 R1005 면역 보강제(베이어(Bayer))가 첨가된 재조합 우레아제 10 μ g를 사용하여 피하 경로를 통해 또는 LT 1 μ g으로 혼합된 우레아제 40 μ g를 구강 경로를 통해 3주간격으로 3번 면역 조치하였다. 비경구 경로를 통해 투여된 2개의 면역 보강제 각각에 대해, 면역 조치는 상체의 림프점에 도달하기 위해 목으로, 또는 복부 림프점에 도달하기 위해 요추부분으로 수행된다. 10마리 마우스(음성 대조군)는 감염되지 않고 면역조치되지 않은채로 남기는 반면, 양성 대조군의 마우스는 피하 경로(요추 부분)를 통해 식염수, QS21 또는 베이 면역 보강제를 받았다.

세 번째 면역조치 한달 후, 모든 마우스를 죽이고 우레아제 활성을 측정하고(각 그룹에서 10/10 마우스가 분석되었다) 양적인 배양(5/10 마우스가 분석되었다)을 수행함으로써 집단(colonization)의 정도를 측정하기 위해 위를 제거했다. 도 6A(우레아제에 대해 시험) 및 도 6B(배양)는 요추 부분의 피하 경로를 통해 면역 보강제로서 QS21이 첨가된 우레아제로 면역된 마우스에 있어서, 감염은 실질적으로 사라졌다(4/5 마우스는 양적 배양에서 음성을 나타냈다). QS21의 존재에서 목의 피하경로를 통해 우레아제로 면역된 마우스 및 구강 경로를 통해 우레아제와 LT를 받은 마우스는 감염되지 않은 마우스에 비해 10~100의 감염 감소를 보였다. 베이 면역 보강제는 동일한 감소를 유도하였고 이것은 요추 부분으로 면역된 마우스에서 더 분명하게 나타났다.

본 발명의 이전 예방연구(실시에 1)에서 관찰한 것처럼, 예방된 마우스는 두 개의 동위형 IgG1 및 IgG2에 대한 고혈청 수준을 보였고, 균형있는 Th2/Th1 반응을 대표한다. 더구나, 요추 부분의 피하경로를 통해 면역된 마우스는 가장 높은 혈청 IgA 수준을 보였고, 이것은 점액 반응을 증명한다.

이러한 결과는 목표로 하는 조직 면역조치는 마우스에서 얻은 헬리코박터 필로리(H. pylori) 감염을 치료할 수 있고, Th1/Th2-형 균형있는 점액 반응을 유도하는 면역 보강제의 사용은 이러한 목적을 얻기 위해 바람직하다는 것을 지시한다.

산업상 이용가능성

본 발명은 헬리코박터 감염을 예방 또는 치료할 수 있는 화합물 및 이를 사용하는 용도를 제공하는 데 그 목적이 있다

(57) 청구의 범위

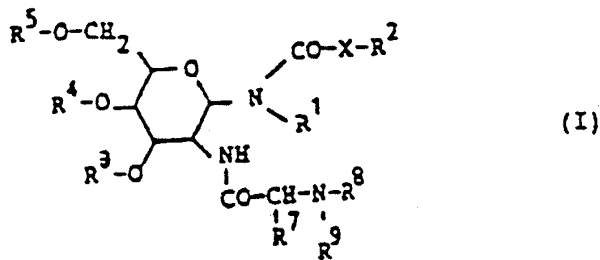
청구항 1

헬리코박터 유래의 면역 물질 및 다음으로부터 선택된 것 중 적어도 하나의 화합물을 포함하는 것임을 특징으로 하는 억제학적 조성물:

(i) 퀴라자 사포나리아(*Quillaja saponaria*)의 추출물로부터 정제분리된 사포닌(saponins);

(ii) 양이온 지질 또는 다음의 염(a salt of the latter); 이때 상기 조성물은 사포닌 또는 다음 구조식 (I)로 표시되는 당지질펩타이드를 포함하지 않고, 지질이 리포솜의 형태로 제공되지 않은 조건에서, 상기 지질은 단백질 카이네즈 C의 약한 억제제이며, 콜레스테롤로부터 유래된 지질친화성기, 카르복시아마이드 및 카바모일로부터 선택된 결합기, C₁~C₂₀의 측쇄 또는 측쇄가 포함되지 않은 선형 알킬 사슬을 포함하는 스페이서 암(spacer arm), 그리고 1차, 2차, 3차 및 4차 아민으로부터 선택된 양이온 아민기를 포함하며; 및

(iii) 다음 구조식(I)로 표시되는 당지질펩타이드:



이때:

R¹은 포화되거나 또는 하나 또는 그 이상의 불포화된 C₁~C₅₀, 바람직하게는 C₁~C₂₀의 알킬기를 나타내고, X는 -CH₂-, -O- 또는 -NH-를 나타내고,

R²는 수소원자, 포화되거나 또는 하나 또는 그 이상의 불포화된 C₁~C₅₀의 알킬기를 나타내고,

R³, R⁴ 및 R⁵ 각각은 서로 독립적으로, 수소원자, 아실-CO-R⁶(이때 R⁶는 C₁~C₁₀의 알킬기)을 나타내고,

R⁷는 수소원자, C₁~C₇의 알킬기, 하이드록시메틸기, 1-하이드록시메틸기, 머캄토메틸기, 2-(메틸티오)메틸기, 3-아미노프로필기, 3-우레이도프로필기, 3-구아니딜프로필기, 4-아미노부틸기, 카르복시메틸기, 카바모일메틸기, 2-카르복시메틸기, 2-카바모일메틸기, 벤질기, 4-하이드록시벤질기, 3-인돌일메틸기 또는 4-이미다졸일메틸기를 나타내고,

R⁸은 수소원자 또는 메틸기를 나타내며, 그리고

R⁹는 수소원자, 아세틸기, 벤조일기, 트리클로로아세틸기, 트리플루오로아세틸기, 메톡시카르보닐기, t-부틸록시카르보닐기 또는 벤질록시카르보닐기, 및

상기 R⁷과 R⁸은 서로 결합하여 -CH₂-CH₂-CH₂-기로 나타낼 수도 있다.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 적어도 두 종류의 화합물을 포함하며, 이때, 첫 번째 화합물로는 퀴라자 사포나리아(*Quillaja saponaria*)의 추출물로부터 정제된 사포닌 중에서 선택되고, 두 번째 화합물로는 양이온성 지질 또는 다음의 염 중에서 선택된 것으로; 상기 지질은 단백질 카이네즈 C의 약한 억제제이며, 콜레스테롤로부터 유래된 지질친화성기, 카르복시아마이드 및 카바모일로부터 선택된 결합기, C₁~C₂₀의 측쇄 또는 측쇄가 포함되지 않은 선형 알킬 사슬을 포함하는 스페이서 암(spacer arm), 그리고 1차, 2차, 3차 및 4차 아민으로부터 선택된 양이온 아민기를 포함하는 구조를 갖는 것임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 화합물은 사포닌으로서 퀴라자 사포나리아(*Quillaja saponaria*) 추출물로부터 정제된 QS-21 부활임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 화합물은 분산형태로 제조된 양이온성 지질인 것임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 1, 2 또는 4 항에 있어서, 상기 화합물은 3-β-[N-(N',N'-다이메틸아미노에탄)카바모일]콜레스테롤 (DC-choI) 또는 후자의 염(a salt of the latter)인 양이온성 지질인 것임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 화합물은 당지질펩타이드로서 N-(2-L-류신-아미도-2-데옥시-β-D-글리코피라노실)N-옥타데실-도데카노일아마이드 (베이(Bay) R1005)인 것임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제 1 항 내지 제 6 항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 헬리코박터(Helicobacter) 유래의 면역 물질은 비활성화된 헬리코박터 박테리아, 헬리코박터 세포 용균물, 정제된 형태의 헬리코박터로부터 제조된 펩타이드 및 폴리펩타이드 중에서 선택된 것임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 상기 헬리코박터(Helicobacter) 유래의 면역 물질은 헬리코박터 우레아제의 UreB 또는 UreA 부단위(subunit)인 것임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

제 1 항 내지 제 8 항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 면역 물질은 헬리코박터 피롤리(Helicobacter pylori)로부터 유래된 것임을 특징으로 하는 조성물.

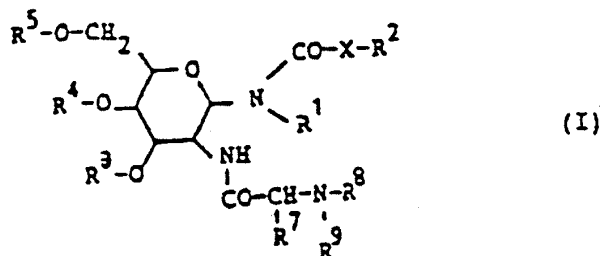
청구항 10

헬리코박터 유래의 면역 물질 및 다음 화합물 중에서 적어도 1종 이상이 선택된 것으로, 헬리코박터에 대한 T 헬퍼(helper) 1(Th1) 형 면역 반응을 유도할 수 있는 약제학적 조성물의 제조에 사용되는 것임을 특징으로 하는 용도.

(i) 퀴라자 사포나리아(Quillaja saponaria)의 추출물로부터 정제분리된 사포닌(saponins);

(ii) 양이온 지질 또는 다음의 염(a salt of the latter): 이때 상기 조성물은 사포닌 또는 다음 구조식 (I)로 표시되는 당지질펩타이드를 포함하지 않고, 지질이 리포종의 형태로 제공되지 않은 조건에서, 상기 지질은 단백질 카이네즈 C의 약한 억제제이며, 콜레스테롤로부터 유래된 지질친화성기, 카르복시아마이드 및 카바모일로부터 선택된 결합기, C₁~C₂₀의 측쇄 또는 측쇄가 포함되지 않은 선형 알킬 사슬을 포함하는 스페이서 암(spacer arm), 그리고 1차, 2차, 3차 및 4차 아민으로부터 선택된 양이온 아민기를 포함하며; 및

(iii) 다음 구조식(I)로 표시되는 당지질펩타이드:



이때:

R¹은 포화되거나 또는 하나 또는 그 이상의 불포화된 C₁~C₅₀, 바람직하게는 C₁~C₂₀의 알킬기를 나타내고,

X는 -CH₂-, -O- 또는 -NH-를 나타내고,

R^2 는 수소원자, 포화되거나 또는 하나 또 그 이상의 불포화된 $C_1 \sim C_{50}$ 의 알킬기를 나타내고,

R^3 , R^4 및 R^5 각각은 서로 독립적으로, 수소원자, 아실-CO- R^6 (이때 R^6 는 $C_1 \sim C_{10}$ 의 알킬기)을 나타내고,

R^7 는 수소원자, $C_1 \sim C_7$ 의 알킬기, 하이드록시메틸기, 1-하이드록시메틸기, 머캄토메틸기, 2-(메틸티오)메틸기, 3-아미노프로필기, 3-우레이도프로필기, 3-구아니딜프로필기, 4-아미노부틸기, 카르복시메틸기, 카바모일메틸기, 2-카르복시메틸기, 2-카바모일메틸기, 벤질기, 4-하이드록시벤질기, 3-인돌일메틸기 또는 4-이미다졸일메틸기를 나타내고,

R^8 은 수소원자 또는 메틸기를 나타내며, 그리고

R^9 는 수소원자, 아세틸기, 벤조일기, 트리클로로아세틸기, 트리플루오로아세틸기, 메톡시카르보닐기, t-부틸록시카르보닐기 또는 벤질록시카르보닐기, 및

상기 R^7 과 R^8 은 서로 결합하여 $-CH_2-CH_2-CH_2-$ 기로 나타낼 수도 있다.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 상기 헬리코박터로부터 유도된 면역 물질 및 적어도 2종 이상의 화합물로서, 첫 번째 화합물로는 퀴라자 사포나리아(*Quillaja saponaria*)의 추출물로부터 정제된 사포닌 중에서 선택되고, 두 번째 화합물로는 양이온성 지질 또는 다음의 염 중에서 선택된 적어도 2종 화합물이 포함되는 것으로; 상기 지질은 단백질 카이나아제 C의 약한 억제제이고 콜레스테롤로부터 유도된 지방친화성기, 카르복시아마이드 및 카바모일 중에서 선택된 결합기, $C_1 \sim C_{20}$ 의 측쇄 또는 측쇄가 포함되지 않은 선형 알킬 사슬을 포함하는 스페이서 암(spacer arm), 그리고 1차, 2차, 3차 및 4차 아민으로부터 선택된 양이온 아민기가 포함된 구조를 갖는 것임을 특징으로 하는 용도.

청구항 12

제 10 항 또는 제 11 항에 있어서, 상기 화합물은 퀴라자 사포나리아(*Quillaja saponaria*)의 추출물로부터 정제된 QS-21 부분인 사포닌인 것임을 특징으로 하는 용도.

청구항 13

제 10 항 또는 제 11 항에 있어서, 상기 화합물은 분산형태로 제조된 양이온성 지질인 것임을 특징으로 하는 용도.

청구항 14

제 10, 11 또는 13 항에 있어서, 상기 화합물은 3-베타-[N-(N',N'-다이메틸아미노에탄)카바모일]콜레스테롤(DC-cho1) 또는 후자의 염인 양이온성 지질인 것임을 특징으로 하는 용도.

청구항 15

제 10 항에 있어서, 상기 화합물은 N-(2-L-류신-아미도-2-데옥시-β-D-글리코피라노실)N-옥타데실-도데카노일아마이드(베이(Bay) R1005)인 당지질펩타이드인 것임을 특징으로 하는 용도.

청구항 16

제 10 항 내지 제 15 항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 Th1 형 면역 반응은 마우스에서 측정되고, (i) ELISA IgG2a : IgG1의 적정 비율이 1 : 100 이상이거나 (ii) ELISA IgG2a : IgG의 적정 비율이 1 : 100 이상인 것임을 특징으로 하는 용도.

청구항 17

제 16 항에 있어서, 상기 Th1 형 면역 반응은 마우스에서 측정되고, (i)ELISA IgG2a : IgG1의 적정 비율이 1 : 10 이상이거나 (ii) ELISA IgG2a : IgG의 적정 비율이 1 : 10 이상인 것임을 특징으로 하는 용도.

청구항 18

제 17 항에 있어서, 상기 Th1 형 면역 반응은 마우스에서 측정되고, (i) ELISA IgG2a : IgG1의 적정 비율이 1 : 2 이상이거나 (ii) ELISA IgG2a : IgG의 적정 비율이 1 : 2 이상인 것임을 특징으로 하는 용도.

청구항 19

제 10 항 내지 제 18 항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 헬리코박터 유래의 면역 물질은 비활성화된 헬리코박터 박테리아, 헬리코박터 세포 용균물, 정제된 형태의 헬리코박터로부터 제조된 펩타이드 및 폴리펩타이드 중에서 선택된 것임을 특징으로 하는 용도.

청구항 20

제 19 항에 있어서, 상기 헬리코박터(Helicobacter) 유래의 면역 물질은 헬리코박터 우레아제의 UreB 또는 UreA 부단위(subunit)인 것임을 특징으로 하는 용도.

청구항 21

제 10 항 내지 제 20 항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 면역 물질은 헬리코박터 피롤리(Helicobacter pylori)로부터 유래된 것임을 특징으로 하는 용도.

청구항 22

제 10 항 내지 제 21 항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 억제학적 조성물은 조직 경로를 통하여 투여되는 것임을 특징으로 하는 용도.

청구항 23

제 22 항에 있어서, 상기 억제학적 조성물은 엄격한 조직 경로를 통하여 투여되는 것임을 특징으로 하는 용도.

청구항 24

제 22 항 또는 제 23 항에 있어서, 상기 억제학적 조성물은 포유동물, 특히 영장류의 횡격막하의 조직 경로를 통하여 투여되는 것임을 특징으로 하는 용도.

청구항 25

제 22 항 내지 제 24 항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 억제학적 조성물은 포유동물, 특히 영장류의 등요추(dorsolumbar) 부분의 조직 경로를 통하여 투여되는 것임을 특징으로 하는 용도.

청구항 26

제 22 항 내지 제 25 항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 억제학적 조성물은 피하 경로, 근육내 경로 및 피부내 경로를 통하여 투여되는 것임을 특징으로 하는 용도.

청구항 27

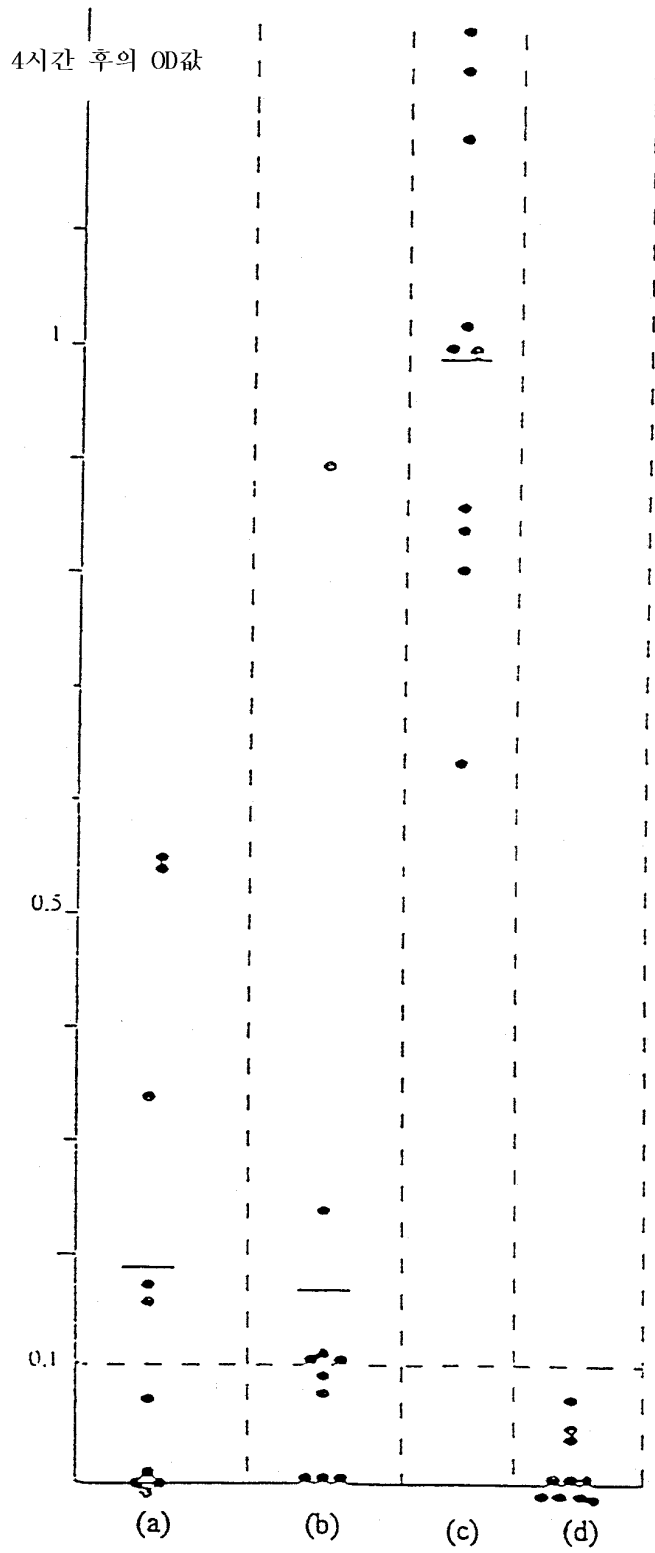
제 10 항 내지 제 26 항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 억제학적 조성물은 헬리코박터 감염을 예방 또는 치료하기 위하여 동일한 처리를 하는 중에 조직 경로를 통하여 두 배 또는 세 배로 투여되는 것임을 특징으로 하는 용도.

청구항 28

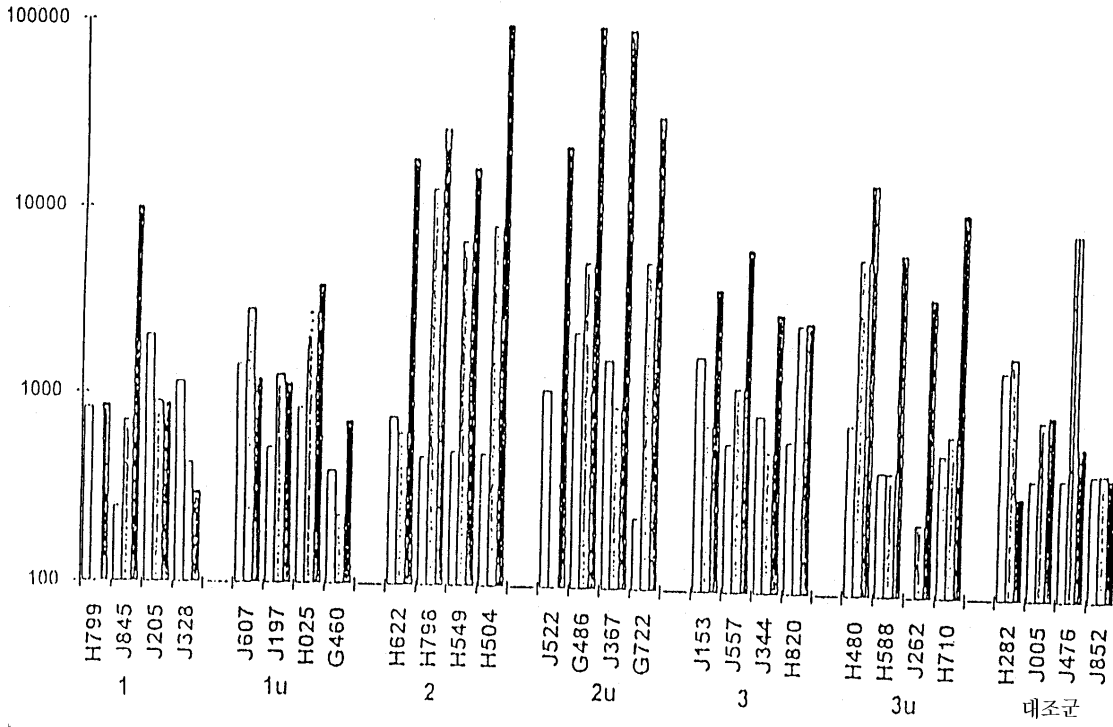
헬리코박터 감염을 예방 또는 치료하기 위한 조직 경로를 통하여 투여되는 억제학적 조성물의 제조에 있어서, 헬리코박터 유래의 면역 물질 및 헬리코박터에 대한 T 헬퍼(helper) 1(Th1) 형 면역 반응의 유도를 증진시킬 수 있는 화합물의 공동용도.

도면

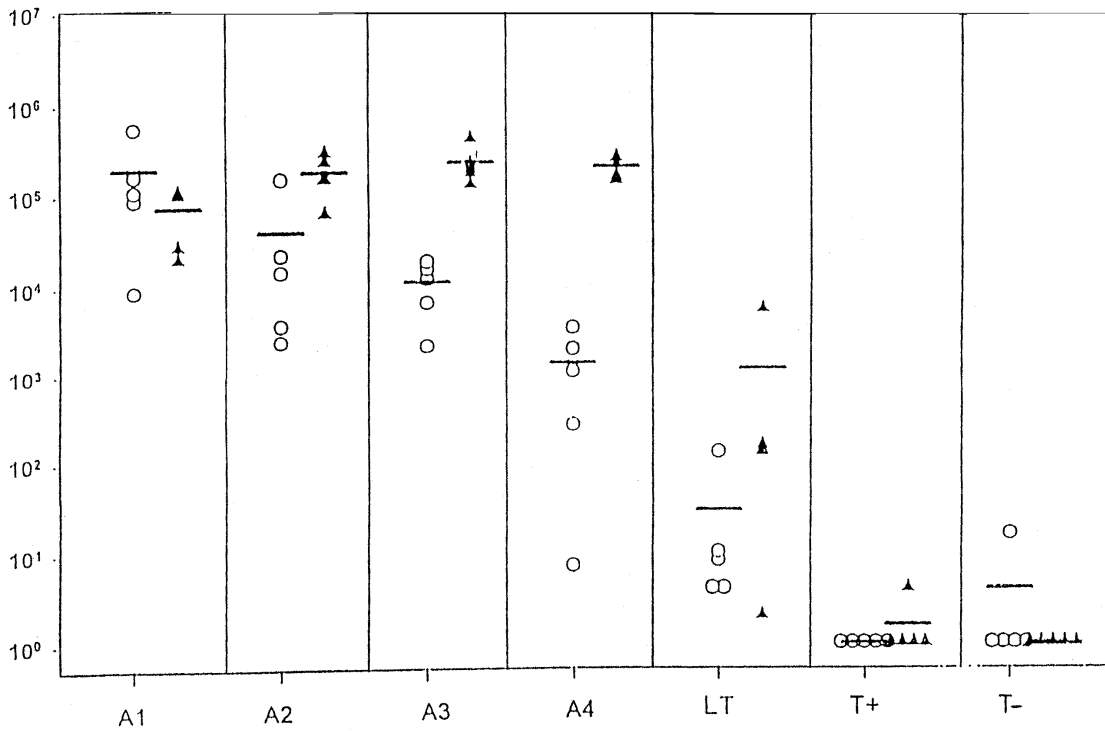
도면1



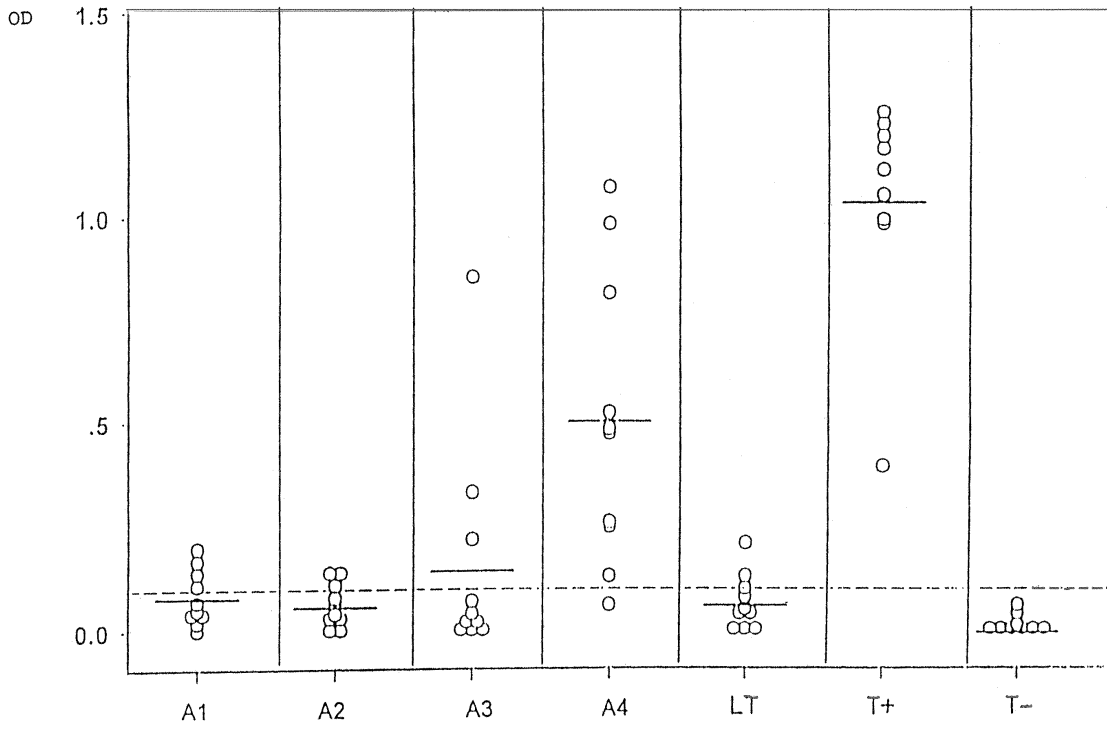
도면3



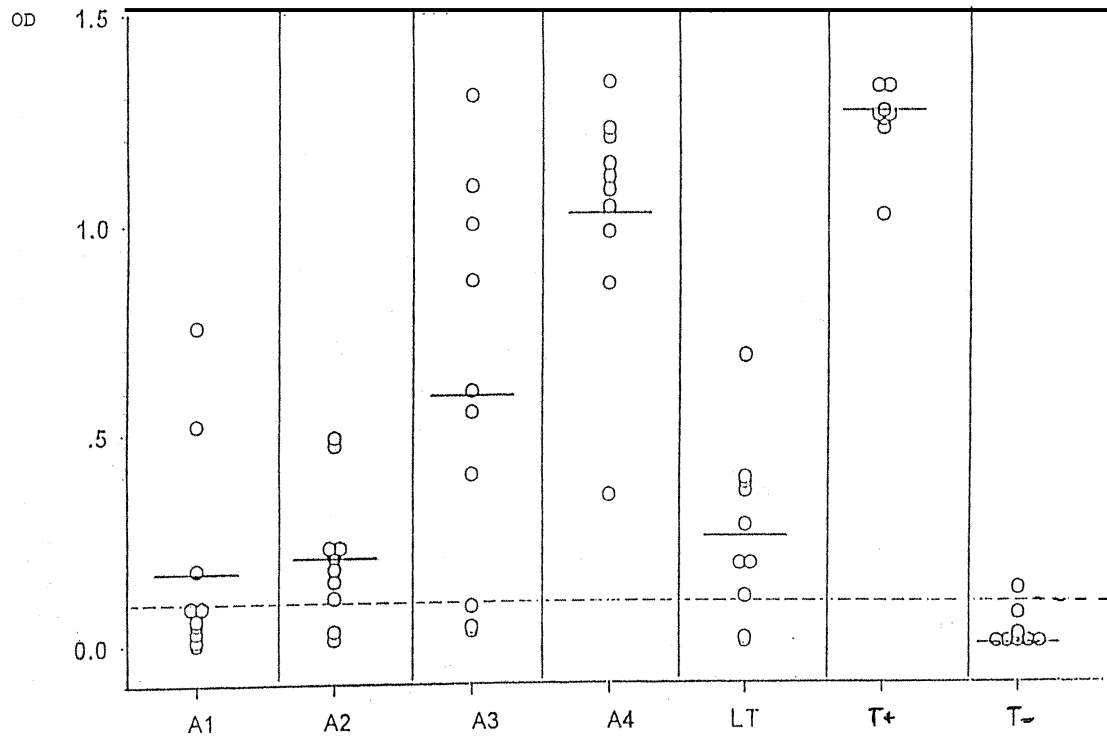
도면4



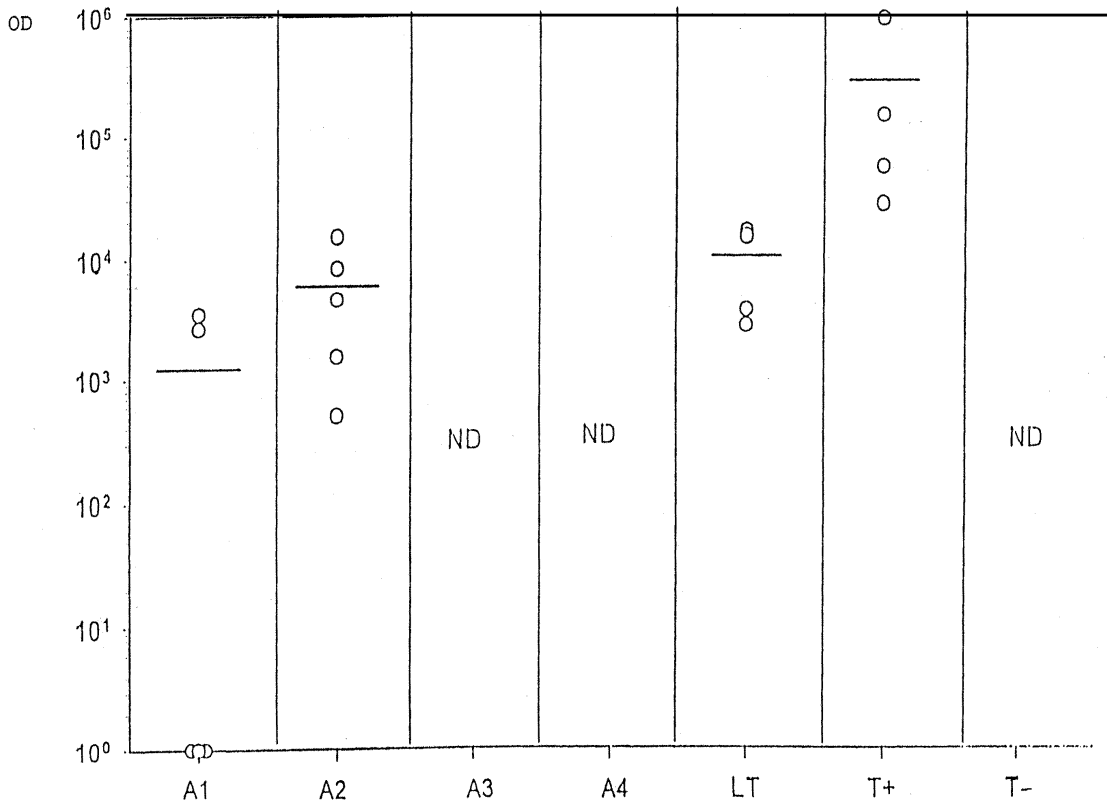
도면5



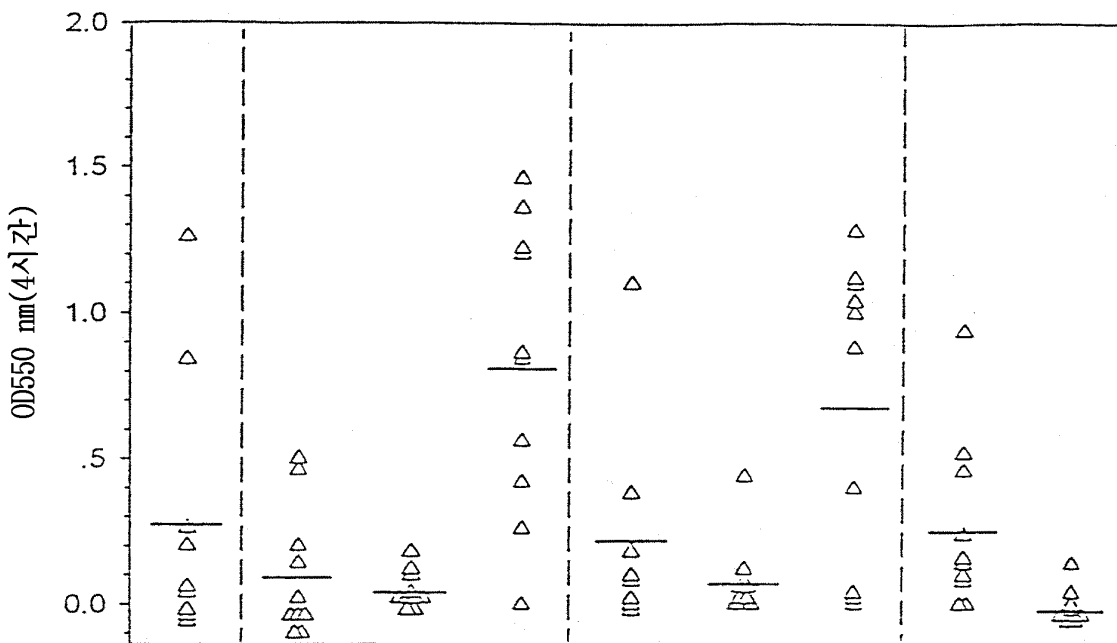
도면6



도면7



도면8a



도면 8b

