



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0068647  
(43) 공개일자 2012년06월27일

<p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  <i>A61K 39/29</i> (2006.01) <i>A61K 39/145</i> (2006.01)  <i>A61K 39/12</i> (2006.01) <i>A61P 1/16</i> (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2010-0130357</p> <p>(22) 출원일자 2010년12월18일                  심사청구일자 없음</p>	<p>(71) 출원인  <b>아이진 주식회사</b>                  서울특별시 마포구 상암동 1580 디엠씨 첨단산업센터 414호</p> <p>(72) 발명자  <b>조양제</b>                  서울특별시 용산구 이촌로75길 6, 로얄맨션아파트 401호 (이촌동)  <b>이나경</b>                  서울특별시 광진구 광장동 현대파크빌아파트 1002-404                  (뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인  <b>양부현</b></p>
---	---

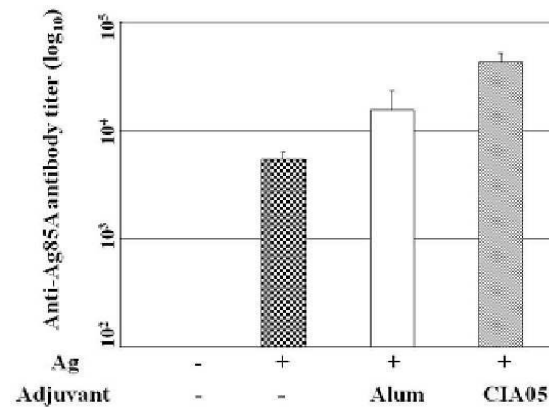
전체 청구항 수 : 총 34 항

(54) 발명의 명칭 **개선된 면역반응을 유도하는 백신**

(57) 요약

본 발명은 (a) 결핵균 항원, 탄저균 항원, HAV(Hepatitis A virus)의 항원, HBV(Hepatitis B virus)의 항원, HCV(Hepatitis C virus)의 항원, HIV(human immunodeficiency virus)의 항원, 인플루엔자 바이러스의 항원, HSV(Herpes simplex virus)의 항원, Hib(*Haemophilus influenzae* type b)의 항원, 나이세리아 메닝기티디스(*Neisseria meningitidis*)의 항원, 코니니박테리움 디프테리아(*Corynebacterium diphtheria*)의 항원, 보르데텔라 퍼투시스(*Bordetella pertussis*)의 항원, 클로스트리듐 테타니(*Clostridium tetani*)의 항원 및 바리셀라 바이러스(*Varicella virus*)의 항원으로 구성된 균으로부터 선택되는 병원체 유래 항원; (b) 탈아실화 비독성 LOS(Lipooligosaccharide); 및 (c) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 백신 약제학적 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도2a



(72) 발명자

**장진욱**

서울특별시 마포구 월드컵북로47길 46, 상암월드  
컵파크 203동 404호 (상암동)

**김광성**

경기도 하남시 하남대로802번길 111, 306동 2103  
호 (신장동, 에코타운)

**유원일**

서울특별시 강남구 선릉로 221, - 205동 704호 (도곡동, 도곡렉슬아파트)

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

(a) 결핵균 항원, 탄저균 항원, HAV(Hepatitis A virus)의 항원, HBV(Hepatitis B virus)의 항원, HCV(Hepatitis C virus)의 항원, HIV(human immunodeficiency virus)의 항원, 인플루엔자 바이러스의 항원, HSV(Herpes simplex virus)의 항원, Hib(*Haemophilus influenzae* type b)의 항원, 나이세리아 메닝기티디스(*Neisseria meningitidis*)의 항원, 코니너박테리움 디프테리아(*Corynebacterium diphtheria*)의 항원, 보르데텔라 퍼투시스(*Bordetella pertussis*)의 항원, 클로스트리듐 테타니(*Clostridium tetani*)의 항원 및 바리셀라 바이러스(Varicella virus)의 항원으로 구성된 군으로부터 선택되는 병원체 유래 항원;

(b) 탈아실화 비독성 LOS(Lipooligosaccharide); 및

(c) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 백신 약제학적 조성물.

### 청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 결핵균 항원은 65 kD 열충격 단백질(HSP65), 항원 85A(Ag85A), 항원 85B, 항원 85C, ESAT-6, Des 단백질, MPT32, MPT51, MPT63, MPT64, HspX 및 포스페이트 결합 단백질 1(Phosphate binding protein 1)로 구성된 군으로부터 선택되는 최소 1종의 항원인 것을 특징으로 하는 조성물.

### 청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 결핵균 항원은 항원 85A(Ag85A), ESAT-6, HspX 및 포스페이트 결합 단백질 1(Phosphate binding protein 1)로 구성된 군으로부터 선택되는 최소 1종의 항원인 것을 특징으로 하는 조성물.

### 청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 탄저균 항원은 PA(protective antigen), LF(lethal antigen) 또는 EA(edema antigen)인 것을 특징으로 하는 조성물.

### 청구항 5

제 3 항에 있어서, 상기 탄저균 항원은 PA(protective antigen)인 것을 특징으로 하는 조성물.

### 청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 HAV(Hepatitis A virus)의 항원은 생 약독화 HAV, 불활 약독화 HAV, VP1, VP2, VP3, VP4, 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C 및 3D 단백질로 구성된 군으로부터 선택되는 항원인 것을 특징으로 하는 조성물.

### 청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 HAV(Hepatitis A virus)의 항원은 불활 약독화 HAV인 것을 특징으로 하는 조성물.

### 청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 HBV(Hepatitis B virus)의 항원은 HBcAg(core antigen of HBV) 또는 HBsAg(surface antigen of HBV)인 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 9**

제 1 항에 있어서, 상기 HCV(Hepatitis C virus)의 항원은 E1, E2 또는 NS3/4a 항원인 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 10**

제 1 항에 있어서, 상기 HIV의 항원은 Gag(p55gag), Pol, Vif, Vpr, Tat, Rev, Vpu, Env 또는 Nef 항원인 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 11**

제 10 항에 있어서, 상기 HIV의 항원은 Env 항원인 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 12**

제 1 항에 있어서, 상기 인플루엔자 바이러스의 항원은 엔벨로프 당단백질 HA 또는 NA인 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 13**

제 12 항에 있어서, 상기 인플루엔자 바이러스의 항원은 엔벨로프 당단백질 HA인 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 14**

제 1 항에 있어서, 상기 HSV(Herpes simplex virus)의 항원은 HSV의 당단백질 gB, gD 또는 gH인 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 15**

제 14 항에 있어서, 상기 HSV(Herpes simplex virus)의 항원은 HSV의 당단백질 gB 또는 gD인 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 16**

제 1 항에 있어서, 상기 Hib(*Haemophilus influenzae* type b)의 항원은 PRP[*Haemophilus* type b capsular polysaccharide(polyribosyl-ribitol-phosphate)] 또는 그의 컨쥬게이트.

**청구항 17**

제 16 항에 있어서, 상기 Hib(*Haemophilus influenzae* type b)의 항원은 PRP와 테타너스(tetanus) 독소의 컨쥬게이트인 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 18**

제 1 항에 있어서, 상기 나이세리아 메닝기티디스(*Neisseria meningitidis*)의 항원은 PI, PII, PIII, 필린(pilin), 지질다당(lipopolysaccharide), 철결합 단백질 또는 프로테오솜인 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 19**

제 18 항에 있어서, 상기 나이세리아 메닝기티디스(*Neisseria meningitidis*)의 항원은 프로테오솜인 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 20**

제 1 항에 있어서, 상기 코니너박테리움 디프테리아(*Corynebacterium diphtheria*)의 항원은 디프테리아 독소인 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 21**

제 1 항에 있어서, 상기 보르데텔라 퍼투시스(*Bordetella pertussis*)의 항원은 퍼투시스 독소(Pertussis toxin)인 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 22**

제 1 항에 있어서, 상기 클로스트리듐 테타니(*Clostridium tetani*)의 항원은 테타너스 독소(Tetanus toxin)인 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 23**

제 1 항에 있어서, 상기 바리셀라 바이러스(Varicella virus)의 항원은 생 약독화 바리셀라 바이러스, 불활 약독화 바리셀라 바이러스, gpI 또는 gpII인 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 24**

제 23 항에 있어서, 상기 바리셀라 바이러스(Varicella virus)의 항원은 생 약독화 바리셀라 바이러스인 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 25**

제 1 항에 있어서, 상기 비독성 LOS는 LPS에 알카리 처리하여 지질 A의 탈아실화 되어 비독성화 된 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 26**

제 1 항에 있어서, 상기 비독성 LOS는 1,500-10,000 Da의 분자량을 가지는 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 27**

제 26 항에 있어서, 상기 비독성 LOS는 2,000-4,000 Da의 분자량을 가지는 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 28**

제 1 항에 있어서, 상기 비독성 LOS는 *E. coli* 유래된 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 29**

제 1 항에 있어서, 상기 억제학적 조성물은 면역보조제를 추가적으로 포함하며 상기 면역보조제는 Mg, Ca, Sr, Ba 및 Ra으로 구성된 군으로부터 선택되는 제2족 원소, Ti, Zr, Hf 및 Rf로 구성된 군으로부터 선택되는 제4족 원소 또는 알루미늄의 염 또는 그의 수화물인 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 30**

탈아실화 비독성 LOS(Lipooligosaccharide)를 포함하는 수지상 세포의 성숙화 유도용 조성물.

**청구항 31**

제 30 항에 있어서, 상기 비독성 LOS는 LPS에 알카리 처리하여 지질 A의 탈아실화 되어 비독성화 된 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 32**

제 30 항에 있어서, 상기 비독성 LOS는 1,500-10,000 Da의 분자량을 가지는 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 33**

제 32 항에 있어서, 상기 비독성 LOS는 2,000-4,000 Da의 분자량을 가지는 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 34**

제 30 항에 있어서, 상기 비독성 LOS는 *E. coli* 유래된 것을 특징으로 하는 조성물.

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 개선된 면역반응을 유도하는 백신 조성물에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 최근 면역보조제가 새롭게 주목 받고 있으며 차궁경부암 백신과 더불어 독감백신 등 다양하게 사용되고 있다. 이러한 면역보조제중 박테리아 DNA는 1960년대부터 항암제로서 주목 받았으며, 현재까지 계속 연구가 되고 있으나 효능이 미흡하여 단독으로 항암제로 사용되지는 못하고 있다(Glick, J. L. The specificity of inhibition of tumor cell viability by DNA. *CancerRes.*27:2338,1967). 그러나 박테리아 DNA는 큰 부작용 없이 다양한 면역세포를 활성화 시키는 것으로 알려져 있으며, 특히 어쥬번트로 많은 장점이 있음이 확인 되었다(McCluskie MJ, *etal.*. CpG DNA is a potent enhancer of systemic and mucosal immune responses against hepatitis B surface antigen with intranasal administration to mice. *JImmunol.*Nov1;161(9):4463-6.1998).

- [0003] 박테리아 DNA의 이러한 효과에 대해서 일본의 Yamamoto 등은 CG를 포함한 서열이 중요한 역할을 한다고 주장하였고, 미국의 Krieg 등의 연구에 의해 널리 알려졌다(Yamamoto S. et al. Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are required to induce IFN and augment IFN-mediated natural killer activity. *J. Immunol.*148:4072,1992 ; Krieg AM, Antitumor applications of stimulating toll-like receptor 9 with CpG oligodeoxynucleotides. *Curr. Oncol. Rep.* Mar; 6(2):88-95.2004). 특히 1990년대 중반 이후에는 CPG 사 관련 연구의 결과로 DNA 항암제의 관심이 unmethylated CG를 포함한 합성 DNA(CpG-ODN)의 가능성이 확인되었으며, 특히 짧은 합성 DNA의 분해를 억제하기 위한 다이에스테르 결합에서의 S 치환 등이 연구되었다. 이러한 노력을 통해 CpG-ODN 관련 제품은 어췌버트뿐 아니라 항암제로서도 임상시험 될 수 있게 하였다.(<http://www.colevpharma.com>).
- [0004] 그러나 CpG-ODN의 다이에스테르 결합의 S 치환에 대한 면역원성 문제 및 여전히 미흡한 항암효과 등은 해결해야 할 문제로 남아 있다. 현재 임상에 사용중인 CPG 7909는 anti-DNA Ab를 유발하는 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드이며(*Clin Immunol.* 2001 Aug;100(2):157-63), 이는 SLE(systemic lupus erythematosus) 등 자가면역질환과 밀접한 관계가 있다(*J Clin Immunol.* 1986 July;6(4):292-8). 또한 포스포로티오에이트 구조는 TI Ag로 작용하여 감염에 대한 면역방어기능에 혼란을 주는 것으로 알려져 있다(*Mol Immunol.* 1998 Dec;35(18):1161-70).
- [0005] 1950년대부터 항암효과가 알려진 LPS의 경우, ng 수준의 오염으로도 폐혈증에 의한 사망을 초래할 수 있는 독성으로 인해 사용이 어려웠다. 특히 LPS와 DNA의 결합은 심각한 독성을 나타낸다는 것이 일반적인 의견이었고, DNA 관련 의약품에서 LPS의 제거는 매우 중요한 과정으로 이해되었다(Gao JJ. et. al, Bacterial DNA and lipopolysaccharide induce synergistic production of TNF-alpha through a post-transcriptional mechanism. *J Immunol*166(11):6855-60,2001). 효능 면에서 LPS에 의한 면역증가는 DNA에 의한 것 보다 훨씬 강력하지만 항암에 중요한 Th1 타입이 아니라 Th2 타입이므로 항암제로 적합하지 못하다고 생각되었다(Lebman DA et al Interleukin 4 causes isotype switching to IgE in T cell-stimulated clonal B cell cultures. *J Exp Med.* Sep 1;168(3):853-62. 1988). 특히 Th2 타입 면역 활성화는 Th1 타입 면역 활성을 억제하기 때문에 LPS의 이러한 특성은 LPS를 항암제로 이용하기에 더욱 힘들게 하였다(Rengarajan J et al. Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. *Immunol Today.* Oct;21(10):479-83. 2000).
- [0006] LPS에 대한 약독화 시도는 꾸준히 연구되었으며 특히 폴리사카라이드 체인의 제거 또는 리피드 A의 탈아실기화를 통하여 독성을 감소시키는데 성공할 수 있었다 (Katz SS et al Deacylation of lipopolysaccharide in whole Escherichia coli during destruction by cellular and extracellular components of a rabbit peritoneal inflammatory exudate. *J Biol Chem.* Dec 17;274(51):36579-84 1999). 특히 LPS의 폴리사카라이드 체인을 제거하여 얻은 리피드 A의 인산화를 통하여 얻은 모노포스포릴 리피드 A(MPL)의 경우 LPS의 독성을 제거한 면역항암제로 개발되었으나 그 효과가 미미한 것으로 알려져 있다(<http://www.corixa.com>).
- [0007] 이에 본 출원인은 상기의 면역보조제들의 단점을 보완한 신규한 면역보조제를 이미 개발 한 바 있다(대한민국 특허등록 제0740237호 (2007.07.10)).
- [0008] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0009] 본 발명자들은 종래의 백신의 문제점, 특히 백신의 효능을 증강시킬 수 있는 신규한 백신 조성물을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 여러 병원체의 항원을 이용하는 면역화 과정에서 면역보조제로서 탈아실화 비독성 LOS(Lipooligosaccharide)를 면역보조제로 이용하는 경우에는 종래의 백신보다 크게 개선된 면역반응을 유도하여 다양한 질환의 예방을 위한 우수한 백신이 될 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0010] 따라서, 본 발명의 목적은 백신 약제학적 조성물을 제공하는 데 있다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 수지상 세포의 성숙화 유도용 조성물을 제공하는 데 있다.

[0012] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

**과제의 해결 수단**

[0013] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음을 포함하는 백신 약제학적 조성물을 제공한다:

[0014] (a) 결핵균 항원, 탄저균 항원, HAV(Hepatitis A virus)의 항원, HBV(Hepatitis B virus)의 항원, HCV(Hepatitis C virus)의 항원, HIV(human immunodeficiency virus)의 항원, 인플루엔자 바이러스의 항원, HSV(Herpes simplex virus)의 항원, Hib(*Haemophilus influenzae* type b)의 항원, 나이세리아 메닝기티디스(*Neisseria meningitidis*)의 항원, 코니너박테리움 디프테리아(*Corynebacterium diphtheria*)의 항원, 보르데텔라 퍼투시스(*Bordetella pertussis*)의 항원, 클로스트리듐 테타니(*Clostridium tetani*)의 항원 및 바리셀라 바이러스(Varicella virus)의 항원으로 구성된 군으로부터 선택되는 병원체 유래 항원;

[0015] (b) 탈아실화 비독성 LOS(Lipooligosaccharide); 및

[0016] (c) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 백신 약제학적 조성물.

[0017] 본 발명자들은 종래의 백신의 문제점, 특히 백신의 효능을 증강시킬 수 있는 신규한 백신 조성물을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 여러 병원체의 항원을 이용하는 면역화 과정에서 면역보조제로서 탈아실화 비독성 LOS(Lipooligosaccharide)를 면역보조제로 이용하는 경우에는 종래의 백신보다 크게 개선된 면역반응을 유도하여 다양한 질환의 예방을 위한 우수한 백신이 될 수 있음을 확인하였다.

[0018] 본 발명은 결핵을 유발하는 결핵균의 백신에 유용하다.

[0019] 본 발명의 결핵 백신에서 이용되는 결핵균 항원은 종래 공지된 다양한 결핵균-유래 항원을 포함하며, 바람직하게는 본 발명에 적합한 결핵균 항원은 65 kD 열충격 단백질(HSP65), 항원 85A(Ag85A), 항원 85B, 항원 85C, ESAT-6, Des 단백질, MPT32, MPT51, MPT63, MPT64, HspX 및 포스페이트 결합 단백질(Phosphate binding protein 1)로 구성된 군으로부터 선택되는 최소 1종의 항원이다.

[0020] 보다 바람직하게는, 본 발명의 결핵 백신에서 이용되는 결핵균 항원은 항원 85A(Ag85A), ESAT-6, HspX 및 포스페이트 결합 단백질(Phosphate binding protein 1)로 구성된 군으로부터 선택되는 최소 1종의 항원이다.

[0021] 또한, 본 발명은 탄저병을 유발하는 탄저 백신에 유용하다.

[0022] 본 발명의 탄저 백신에서 이용되는 탄저균 항원은 종래 공지된 다양한 탄저균-유래 항원을 포함하며, 바람직하게는 본 발명에 적합한 탄저균 항원은 PA(protective antigen), LF(lethal antigen) 또는 EA(edema antigen)이고, 보다 바람직하게는 PA(protective antigen)이다.

[0023] 또한, 본 발명은 A형 간염을 유발하는 HAV(Hepatitis A virus) 백신에 유용하다. 본 발명의 HAV 백신에서 이용되는 HAV 항원은 종래 공지된 다양한 HAV-유래 항원을 포함하며, 바람직하게는 본 발명에 적합한 HAV 항원은 생 약독화 HAV, 불활 약독화 HAV, VP1, VP2, VP3, VP4, 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C 및 3D 단백질로 구성된 군으로부터 선택되는 항원이고, 보다 바람직하게는 불활 약독화 HAV이다.

[0024] 본 발명은 B형 간염을 유발하는 HBV(Hepatitis B virus) 백신에 유용하다. 본 발명의 HBV 백신에서 이용되는 HBV 항원은 종래 공지된 다양한 HBV-유래 항원을 포함하며, 바람직하게는 본 발명에 적합한 HBV 항원은 HBcAg(core antigen of HBV) 또는 HBsAg(surface antigen of HBV)이고, 보다 바람직하게는 HBsAg이다.

[0025] 본 발명은 C형 간염을 유발하는 HCV(Hepatitis C virus) 백신에 유용하다. 본 발명의 HCV 백신에서 이용되는 HCV 항원은 종래 공지된 다양한 HCV-유래 항원을 포함하며, 바람직하게는 본 발명에 적합한 HCV 항원은 E1, E2, NS3 또는 NS3/4a 항원이고, 보다 바람직하게는 NS3이다.

[0026] 본 발명은 AIDS를 유발하는 HIV 백신에 유용하다. 본 발명의 HIV 백신에서 이용되는 HIV 항원은 종래 공지



된 다양한 HIV-유래 항원을 포함하며, 바람직하게는 본 발명에 적합한 HIV 항원은 Gag(p55gag), Pol, Vif, Vpr, Tat, Rev, Vpu, Env 또는 Nef 항원이고, 보다 바람직하게는 Env 항원이다.

- [0027] 본 발명은 독감 등을 유발하는 인플루엔자 백신에 유용하다. 본 발명의 인플루엔자 백신에서 이용되는 인플루엔자 바이러스의 항원은 종래 공지된 다양한 인플루엔자 바이러스-유래 항원을 포함하며, 바람직하게는 본 발명에 적합한 인플루엔자 바이러스 항원은 엔벨로프 당단백질 HA 또는 NA이고, 보다 바람직하게는 HA이다.
- [0028] 본 발명은 단순포진 등을 유발하는 HSV(Herpes simplex virus) 백신에 유용하다. 본 발명의 HSV 백신에서 이용되는 HSV의 항원은 종래 공지된 다양한 HSV-유래 항원을 포함하며, 바람직하게는 본 발명에 적합한 HSV 항원은 당단백질 gB, gD 또는 gH이고, 보다 바람직하게는 gB 또는 gD이다.
- [0029] 본 발명은 수막염 등을 유발하는 Hib(*Haemophilus influenzae* type b) 백신에 유용하다. 본 발명의 Hib 백신에서 이용되는 Hib의 항원은 종래 공지된 다양한 Hib-유래 항원을 포함하며, 바람직하게는 본 발명에 적합한 Hib 항원은 PRP[*Haemophilus* type b capsular polysaccharide(polyribosyl-ribitol-phosphate)] 또는 그의 컨주게이트이고, 보다 바람직하게는 PRP와 테타너스(tetanus) 독소의 컨주게이트이다.
- [0030] 본 발명은 뇌수막염 등을 유발하는 나이세리아 메닝기티디스(*Neisseria meningitidis*) 백신에 유용하다. 본 발명의 백신에서 이용되는 나이세리아 메닝기티디스의 항원은 종래 공지된 다양한 나이세리아 메닝기티디스-유래 항원을 포함하며, 바람직하게는 본 발명에 적합한 나이세리아 메닝기티디스 항원은 PI, PII, PIII, 필린(pilin), 지질다당(lipopolysaccharide), 절결합 단백질 또는 프로테오솜이고, 보다 바람직하게는 프로테오솜이다.
- [0031] 본 발명은 디프테리아 등을 유발하는 코니너박테리움 디프테리아(*Corynebacterium diphtheria*) 백신에 유용하다. 본 발명의 백신에서 이용되는 코니너박테리움 디프테리아의 항원은 종래 공지된 다양한 코니너박테리움 디프테리아-유래 항원을 포함하며, 바람직하게는 본 발명에 적합한 코니너박테리움 디프테리아 항원은 디프테리아 독소이다.
- [0032] 본 발명은 백일해 등을 유발하는 보르데텔라 퍼투시스(*Bordetella pertussis*) 백신에 유용하다. 본 발명의 백신에서 이용되는 보르데텔라 퍼투시스의 항원은 종래 공지된 다양한 보르데텔라 퍼투시스-유래 항원을 포함하며, 바람직하게는 본 발명에 적합한 보르데텔라 퍼투시스 항원은 퍼투시스 독소이다.
- [0033] 본 발명은 파상풍 등을 유발하는 클로스트리듐 테타니(*Clostridium tetani*) 백신에 유용하다. 본 발명의 백신에서 이용되는 클로스트리듐 테타니의 항원은 종래 공지된 다양한 클로스트리듐 테타니-유래 항원을 포함하며, 바람직하게는 본 발명에 적합한 클로스트리듐 테타니 항원은 테타너스 독소이다.
- [0034] 본 발명은 수두 등을 유발하는 바리셀라 바이러스(*Varicella virus*) 백신에 유용하다. 본 발명의 백신에서 이용되는 바리셀라 바이러스의 항원은 종래 공지된 다양한 바리셀라 바이러스-유래 항원을 포함하며, 바람직하게는 본 발명에 적합한 바리셀라 바이러스 항원은 생 약독화 바리셀라 바이러스, 불활 약독화 바리셀라 바이러스, gpI 또는 gpII이고, 보다 바람직하게는 생 약독화 바리셀라 바이러스이다.
- [0035] 본 발명의 백신 조성물에서 가장 큰 특징은 면역보조제로서 탈아실화 비독성 LOS(Lipooligosaccharide)를 이용하는 것이다. 본 명세서에서 처음으로 채택되는 용어 “LOS(Lipooligosaccharide)”는 LPS(lipopolysaccharide)의 변형체로서 천연(natural occurring) LPS보다 짧은 당쇄를 가지고 있어 분자량이 작은 것을 의미한다. 탈아실화 전 LOS는 바람직하게는 분자량이 5,000-10,000 Da이다. 용어 “탈아실화 LOS”는 이러한 LOS에서 지질 A의 글루코사민에 -C(O)O- 결합으로 결합된 지방산이 제거되어 LPO와 비교하여 독성이 크게 감소된 것을 의미한다. 지질 A의 글루코사민에 지방산은 -C(O)O- 결합 및 -C(O)NH- 결합을 통하여 결합되어 있다. 본 발명의 탈아실화 LOS는 지질 A의 탈아실화에 의해 -C(O)O- 결합으로 결합된 지방산이 제거된 것을 나타낸다.
- [0036] 탈아실화 비독성 LOS는 다양한 방법을 통하여 제조될 수 있으나, 본 발명자들의 선행특허인 대한민국 특허등록 제0456681호; WO 2004/039413; 대한민국 특허등록 제0740237호; 및 WO 2006/121232에 개시된 방법에 따라 제조될 수 있다. 예를 들어, LPS에 강염기(예컨대, 2 N NaOH)을 처리하여 탈아실화 하여 지질 A로부터 일부 지방산을 제거하여 탈독소화 한다.
- [0037] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에서 면역보조제로 이용되는 탈아실화 비독성 LOS는 LPS에 알카리 처리하여 탈아실화 하여 비독성화 된 것이다. 상기 알카리의 바람직한 예는 NaOH, KOH, Ba(OH)<sub>2</sub>, CsOH, Sr(OH)<sub>2</sub>, Ca(OH)<sub>2</sub>, LiOH, RbOH 를 Mg(OH)<sub>2</sub>를 포함하며, 보다 바람직하게는 NaOH, KOH, Ba(OH)<sub>2</sub>, Ca(OH)<sub>2</sub>, LiOH

및 Mg(OH)<sub>2</sub>이고, 보다 더 바람직하게는 NaOH, KOH 및 Mg(OH)<sub>2</sub>이며, 가장 바람직하게는 NaOH이다.

- [0038] LPS의 독성 정도는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통하여 분석할 수 있다. 예를 들어, LPS가 처리된 THP-1(Acute monocytic leukemia)에 분비되는 TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ )의 양을 측정하여 독성을 분석할 수 있다. 본 발명의 탈아실화 비독성 LOS는 종래의 LPS와 비교하여 상대적으로 적은 양의 TNF- $\alpha$  분비를 유도한다.
- [0039] 본 발명에서 이용되는 면역보조제인 탈아실화 비독성 LOS의 또 다른 특징은 분자량이 일반적으로 종래에 이용되는 LPS와 비교하여 작다는 것이다. 바람직하게는, 본 발명에서 이용되는 탈아실화 비독성 LOS는 1,500-10,000 Da, 보다 바람직하게는 2,000-5,000 Da, 보다 더 바람직하게는 2,000-4,000 Da, 보다 더욱 더 바람직하게는 3,000-4,000 Da, 가장 바람직하게는 3,200-3,7000 Da의 의 분자량을 갖는 것이다. 이러한 분자량은 당업계의 통상적인 방법 예를 들어 MALDI-MASS를 이용하여 측정할 수 있다.
- [0040] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 면역보조제 탈아실화 비독성 LOS는 대장균(*E. coli*)로부터 유래된 것이며, 가장 바람직하게는 본 발명자들의 독자적인 균인 *E. coli* EG0021(KCCM 10374)으로부터 유래된 것이다.
- [0041] 본 발명에서 이용되는 탈아실화 비독성 LOS는 면역촉진(immunostimulatory) 효능이 종래의 면역보조제와 비교하여 우수할 뿐만 아니라 독성도 훨씬 감소되어 있어, 본 발명의 백신 조성물에 매우 적합하다. 하기의 실시예에서 입증한 바와 같이, LPS의 독성을 제거하기 위하여 LPS의 폴리사카라이드 체인을 제거하여 얻은 리피드 A의 인산화를 통하여 얻은 모노포스포릴 리피드 A(MPL) 보다 본 발명의 탈아실화 비독성 LOS는 독성이 훨씬 적다.
- [0042] 또한, 하기 실시예에 나타난 바와 같이, 본 발명의 탈아실화 비독성 LOS를 여러 병원체의 항원과 함께 투여한 경우 면역반응이 크게 증가함을 알 수 있다.
- [0043] 본 발명의 백신 조성물은 그의 기본적인 조성, 병원체의 항원과 탈아실화 비독성 LOS만으로도 충분한 면역반응을 유도하여 특정 질환에 대한 예방 효능을 발휘할 수 있다. 선택적으로, 본 발명의 백신 조성물은 다른 면역보조제를 추가적으로 포함할 수 있으며, 예를 들어 Mg, Ca, Sr, Ba 및 Ra으로 구성된 군으로부터 선택되는 제2족 원소, Ti, Zr, Hf 및 Rf로 구성된 군으로부터 선택되는 제4족 원소 또는 알루미늄의 염 또는 그의 수화물을 포함할 수 있다. 상기 염은 바람직하게는 옥사이드, 피옥사이드, 하이드록사이드, 카보네이트, 포스페이트, 파이로포스페이트, 하이드로겐포스페이트, 다이하이드로겐포스페이트, 설페이트 또는 실리케이트와 함께 형성된다. 예를 들어, 본 발명의 백신 조성물에서 추가적으로 이용될 수 있는 면역보조제는 마그네슘 하이드록사이드, 마그네슘 카보네이트 하이드록사이드 펜타하이드레이트, 티타늄 다이옥사이드, 칼슘 카보네이트, 바륨 옥사이드, 바륨 하이드록사이드, 바륨 피옥사이드, 바륨 설페이트, 칼슘 설페이트, 칼슘 파이로포스페이트, 마그네슘 카보네이트, 마그네슘 옥사이드, 알루미늄 하이드록사이드, 알루미늄 포스페이트 및 수화된 알루미늄 포타슘 설페이트(Alum)를 포함한다. 가장 바람직하게는, 본 발명의 백신 조성물에서 추가적으로 이용될 수 있는 면역보조제는 알루미늄 하이드록사이드이다.
- [0044] 본 발명의 백신 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 *Remington's Pharmaceutical Sciences* (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [0045] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 바람직하게는 비경구 투여이고, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다.
- [0046] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 한편, 본 발명의 약제학적 조성물의 경구 투여량은 바람직하게는 1일 당 0.0001-1000 mg/kg(체중)이다.
- [0047] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액,

현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

- [0048] 본 발명의 백신 조성물은 병원체에 대한 면역반응을 크게 유도하여 특정 질환의 예방 효능이 우수할 뿐만 아니라 면역보조제로 이용되는 탈아실화 비독성 LOS의 독성이 거의 없어 안전성 측면에서도 매우 우수하다.
- [0049] 본 발명에서 이용되는 탈아실화 비독성 LOS는 다양한 병원체 항원 중에서, 결핵균항원, 탄저균 항원, HAV 항원, HBV 항원, HCV 항원, HIV 항원, 인플루엔자 바이러스의 항원, HSV 항원, Hib(*Haemophilus influenzae* type b)의 항원, 나이세리아 메닝기티디스 항원, 코니너박테리움 디프테리아 항원, 보르데텔라 퍼투시스 항원, 클로스트리듐 테타니 항원 및 바리셀라 바이러스 항원에 대하여 특히 우수한 면역반응을 촉진하는 작용을 한다. 탈아실화 비독성 LOS의 이러한 우수한 면역반응 촉진 효과는 하기 실시예에 입증되어 있다.
- [0050] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 탈아실화 비독성 LOS(Lipooligosaccharide)를 포함하는 수지상 세포의 성숙화 유도용 조성물을 제공한다.
- [0051] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 탈아실화 비독성 LOS(Lipooligosaccharide)를 미성숙 수지세포에 처리하는 포함하는 성숙화 수지상 세포의 제조방법을 제공한다.
- [0052] 수지상 세포 백신을 제조함에 있어서, 생체에서 분리한 수지상 세포를 성숙화 시켜야 한다. 이러한 과정에 서 탈아실화 비독성 LOS(Lipooligosaccharide)은 매우 유용하게 이용될 수 있다.
- [0053] 수지상 세포 백신의 제조방법에 따르면, 미성숙 수지상 세포는 단핵구 또는 조혈 모세포로부터 유래된 것이고, 보다 바람직하게는 단핵구로부터 유래된 것이다. 단핵구로부터 수지상 세포를 유도하는 방법이 보다 바람직한 이유는 다기능성 조혈 모세포 (pluripotent hematopoietic stem/progenitor cells)를 사용하는 방법보다 비교적 짧은 시간에 균일한 성질의 수지상 세포를 얻을 수 있기 때문이다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 단핵구는 말초 혈액으로부터 수득한 것이다. 말초 혈액 내의 선조 세포 (progenitor cell, 예: 단핵구 또는 조혈 모세포)로부터 미성숙 수지상 세포를 얻는 방법은 말초 혈액 내 기타 다른 세포들로부터 상기 선조 세포를 분리하여 수지상 세포로 분화 유도시키는 과정으로 실시될 수 있고, 또한 말초 혈액 내 다른 세포들로부터 분리되지 않은 형태로서 상기 선조 세포를 수지상 세포로 분화 유도 시키는 과정으로 실시될 수도 있다.
- [0054] 이어, 말초 혈액으로부터 얻은 단핵구를 수지상 세포로 분화 유도한다. 수지상 세포로 분화시키기 위하여 적합한 사이토카인이 포함되어 있는 배양기에서 단핵구를 배양한다. 이용되는 사이토카인은 GM-CSF (Granulocyte macrophage colony stimulating factor), IL-4 (interleukin-4), IL-13 또는 이의 조합이다. 첨가되는 사이토카인의 적합한 양은 수지상 세포로의 분화를 하는 데 충분한 양으로서 각 연구자의 실험실에서 경험적으로 선택하여 선호되고 있는 양이다.
- [0055] 단핵구로부터 수지상 세포의 분화를 목적으로 하는 제 1 차 배양 시간은 사이토카인을 사용하여 진행할 경우 통상적으로 5일 이상이고, 바람직하게는 6-7일간이다.
- [0056] 상술한 분화 과정에서 수득한 미성숙 수지상 세포를 이용하여 최종적으로 성숙화 과정을 실시한다. 즉, 본 발명의 탈아실화 비독성 LOS를 포함하는 배지가 있는 배양기에서 배양하여 수지상 세포를 성숙화시킨다. 제 2 차 배양의 시간은 통상적으로 10시간 이상, 바람직하게는 20시간 이상이며, 예컨대 1-3일이다.
- [0057] 본 발명은 효율적으로 성숙화된 수지상 세포 특히 인간 성숙화된 수지상 세포 백신을 제조할 수 있도록 한다.

**발명의 효과**

- [0058] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0059] (a) 본 발명의 백신 조성물은 병원체-유래 항원과 면역보조제로서 탈아실화 비독성 LOS를 이용한다.
- [0060] (b) 면역보조제인 탈아실화 비독성 LOS는 특정 병원체에 대한 면역반응에서 매우 우수한 면역촉진효능을 발휘할 뿐만 아니라 독성이 거의 없어 안전성이 매우 우수하다.

[0061] (c) 또한, 탈아실화 비독성 LOS는 효율적으로 성숙화된 수지상 세포 특히 인간 성숙화된 수지상 세포 백신을 제조할 수 있도록 한다.

**도면의 간단한 설명**

[0062] 도 1은 신규 면역보조제(CIA05)가 MPL 보다 세포독성(TNF- $\alpha$  분비)이 낮음을 보여주는 그래프이다.  
 도 2a-2d는 본 발명의 결핵 백신의 효능 분석을 한 실험 결과이다. 도 2a-도 2d는 각각 결핵균에 대한 항원으로서 Ag85A, HspX, Phosphate binding protein 1 및 ESAT-6를 사용하였다.  
 도 3은 본 발명의 탄저 백신의 효능 분석을 한 실험 결과이다.  
 도 4는 본 발명의 A형 간염 백신의 효능 분석을 한 실험 결과이다.  
 도 5a-5b는 본 발명의 B형 간염 백신의 효능 분석을 한 실험 결과이다. 도 5a 및 5b는 각각 면역대상으로서 Balb/c 마우스 및 C57BL/6 마우스를 이용하였다.  
 도 6은 본 발명의 C형 간염 백신의 효능 분석을 한 실험 결과이다.  
 도 7은 본 발명의 HIV 백신의 효능 분석을 한 실험 결과이다.  
 도 8은 본 발명의 인플루엔자 백신의 효능 분석을 한 실험 결과이다.  
 도 9a-9b는 본 발명의 HSV-2(Herpes simplex virus type 2) 백신의 효능 분석을 한 실험 결과이다. 도 9a 및 도 9b는 각각 항원으로서 gD 항원 및 gB 항원을 이용하였다.  
 도 10은 본 발명의 Hib(*Haemophilus influenzae* type b) 백신의 효능 분석을 한 실험결과이다.  
 도 11은 본 발명의 *Neisseria meningitidis* 백신의 효능 분석을 한 실험결과이다.  
 도 12a-12c는 본 발명의 DPT 백신의 효능 분석을 한 실험 결과이다. 도 12a-12c는 각각 항원으로서 Diphtheria toxin, Pertusis toxin 및 Tetanus toxin을 이용하였다.  
 도 13은 본 발명의 수두 백신의 효능 분석을 한 실험 결과이다.  
 도 14a는 마우스 BMDCs(Bone marrow-derived dendritic cells)에서 수지상 세포의 성숙화에 대한 CIA05(실시예 1에서 제조된 면역보조제)의 효능을 분석한 결과이다.  
 도 14b는 인간 MDCCs(Monocyte-derived dendritic cells)에서 수지상 세포의 성숙화에 대한 CIA05(실시예 1에서 제조된 면역보조제)의 효능을 분석한 결과이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0063] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0064] **실시예**

[0065] **실시예 1: 신규면역보조제로서의 매우 짧은 리포올리고사카라이드(LOS) CIA05의 생산**

[0066] 본 발명자들은 건강한 인간의 장에 사는 대장균으로부터 리포폴리사카라이드 당 사슬의 길이가 매우 짧은 LPS를 갖는 균주(*E. coli* EG0021)를 이미 발굴하였으며, 이 균주를 기탁기관 한국미생물보존센터에 2002년 5월 2일자로 기탁하고 기탁번호 KCCM 10374를 부여받았다(참조: 대한민국 특허등록 제0456681호; WO 2004/039413; 대한민국 특허등록 제0740237호; WO 2006/121232). 상기 균주로부터 LPS 정제는 대한민국 특허등록 제0456681호; WO 2004/039413; 대한민국 특허등록 제0740237호; 및 WO 2006/121232에 개시된 방법에 따라 실시하였다. 정제된 LPS의 분자량을 MALDI-MASS(Shimadzu사, Axima-LNR V 2.3.5(Mode Liner, Power: 106))로 측정하였으며, 측정 결과 약 3천 5백 Da의 분자량을 가짐을 확인하였다. 정제된 LPS를 대한민국 특허등록 제0456681호; WO 2004/039413; 대한민국 특허등록 제0740237호; 및 WO 2006/121232에 개시된 방법에 따라 개시된 프로토콜에 따라 탈독소화 하였다. 간단하게, 3 mg/ml의 상기 정제된 LPS에 2 N NaOH를 1:1 볼륨으로 섞

은 후 60°C에서 10분마다 한 번씩 흔들어주며 140분간 탈아실화시키고, 초기 0.2 N NaOH 볼륨의 약 1/5 정도의 1 N 아세트산을 넣어 pH 7.0으로 적정하였다. pH 적정 후 에탄올 침전하여 비독성 리포올리고사카라이드 (CIA05)를 수득하였다.

[0067] **실시예 2: 신규면역보조제인 CIA05와 종래 면역보조제 MPL과의 독성 비교 실험**

[0068] 본 발명의 백신에서 면역보조제로 이용되는 상기 실시예에서 제조한 CIA05와 기존의 자궁경부암 백신에 사용하고 있는 MPL(Monophosphoryl lipid A)의 독성을 비교 분석하였다. 건강한 인간의 혈액을 제공받아 PBMC(Peripheral Blood Mononuclear Cell)를 분리하고 이를 24-웰 배양 디쉬에  $5 \times 10^5$  cell/ml의 농도로 씨딩 하였다. 이때 배양액은 RPMI 1640(Gibco)에 10% FBS(Gibco)를 혼합한 것을 사용하며 한 웰 당 용량은 1 ml로 균등하게 하였다. 준비된 디쉬에 아래와 같은 조건으로 각각 처리하였다: 1) 음성대조군: BSS(Balanced salt solution) 100  $\mu$ l; 2) 탈아실화 비독성 LOS(CIA05) 10  $\mu$ g/100  $\mu$ l; 3) MPL(*E. coli* F583 MPL) 10  $\mu$ g/100  $\mu$ l.

[0069] 12시간 후 처리된 배양액을 모아서 원심분리하고 효소면역측정법(ELISA)을 이용하여 THP-1(Acute monocytic leukemia)에서 분비되는 염증성 단백질인 TNF- $\alpha$ 의 양을 ELISA kit(R&D system, DY210)을 사용하여 각각 측정하였다. 실험 결과, 도 1에서 보는 바와 같이, 기존의 백신 보조제로 사용하고 있는 MPL 보다 약 1/3 가량의 독성이 작음을 확인하였다.

[0070] **실시예 3: 본 발명의 결핵 백신의 효능 분석**

[0071] 결핵 백신 항원과 면역 보조제 CIA05의 면역

[0072] 결핵 백신에서 면역 보조제 CIA05의 효능을 확인하기 위해 결핵 균주(*Mycobacterium tuberculosis*)의 4가지 항원을 사용하였다. 그 5가지의 항원은 Ag85A(32-kDa), HspX(16-kDa), Phosphate binding protein 1(38-kDa) 및 ESAT-6(6-kDa)이다. 6주령 Balb/c 마우스(SLC, Japan)에 위의 4가지 항원을 각 2  $\mu$ g씩 혼합하여 1주 간격으로 3회 주사하였다. 이 때, 항원 단독 또는 Alum (알루미늄 하이드록사이드; Brenntag, Germany) 100  $\mu$ g이나 CIA05 0.5 $\mu$ g를 포함하여 최종 부피가 100  $\mu$ l를 만들어 주사 하였다.

[0073] 결핵 백신 항원 특이 혈청 항체 역가 측정

[0074] 면역 후 혈청 내 결핵 항원의 특이 항체 역가를 측정하기 위해 엔드-포인트 회색 ELSIA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 방법을 사용하였다. 100 $\mu$ l의 Ag85A(32-kDa), HspX (16-kDa), Phosphate binding protein 1 (38-kDa) 및 ESAT-6 (6-kDa)를 각각 1 $\mu$ g/ml의 농도로 96-웰 플레이트에 코팅(4°C, 하룻밤) 한 후, 1% BSA(Bovine Serum Albumin) 300 $\mu$ l로 블로킹을 하였다 (실온, 1시간). 블로킹 후 0.05% Tween-20이 포함된 PBS로 3회 세척하고, 면역 후 얻은 혈청 100 $\mu$ l를 반응 시켰다 (37°C, 2시간). 결핵 항원 특이 항체를 확인하기 위해 호스래디쉬 퍼옥시다아제-컨쥬게이트 항-마우스 IgG(Zymed)를 반응 시킨 후, TMB(tetramethylbenzidine, BD Bio science, 55555214)을 첨가하였고, 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 반응을 중지시켰다. 실험 결과는 450nm에서 흡광도를 측정하여 면역 후 회수한 혈청 내 결핵 항원 특이 항체의 양을 확인하였다.

[0075] 결핵 백신에서의 면역 보조제 CIA05의 효능 분석

[0076] 결핵 균주의 4가지 항원과 면역 보조제 CIA05의 효능을 분석한 결과, Ag85A(32-kDa) 항원의 경우 Alum을 포함한 시험군에서는 항원 단독으로 사용한 시험군에 비해 약 2.9배 결핵 항원 특이 항체를 증진시켰으며, CIA05와의 조합에서는 약 8배 증진시켰다 (도 2a). HspX (16-kDa) 항원에서는 Alum을 포함한 시험군이 항원을 단독으로 투여한 시험군에 비해 약 5배 특이 항체가 증진 되었으며, CIA05를 포함한 시험군에서는 약 11.6배 많은 특이 항체가 검출되었다 (도 2b). Phosphate binding protein 1 (38-kDa) 항원에 대해서는 항원 단독에 비해 Alum을 포함한 시험군에서 약 1.5배 증가된 특이 항체가 확인 되었으며, CIA05를 포함한 시험군에서는 약 8.8 배 많은 특이 항체가 확인되었다 (도 2c). ESAT-6 (6-kDa) 항원에 대해서는 항원 단독에 비해 Alum이 포함된 시험군에서 특이 항체가 거의 증가하지 않았으나 CIA05가 포함된 시험군에서는 약 3배 이상의 특이 항체가 검

출되었다 (도 2d).

[0077] 결론적으로, 면역보조제로서 CIA05를 포함하는 본 발명의 결핵 백신은 면역 효능 즉 백신 효능이 매우 우수하다.

[0078] **실시예 4: 본 발명의 탄저 백신의 효능 분석**

[0079] 탄저 백신 항원인 PA와 면역 보조제 CIA05의 면역

[0080] 탄저균(*Bacillus anthracis*)은 3가지 단백질로 2가지의 독소를 생성하는데, 여기서 3가지 단백질은 PA(protective antigen), LF(lethal antigen) 및 EA(edema antigen)로 구성된다. 이 중 PA가 탄저 백신에 사용되고 있으며 본 시험에서는 재조합 진장 PA 항원을 사용하였다. 탄저균의 PA 항원 10 µg을 6주령 웅성 Balb/c 마우스에 2주 간격으로 3회 복강 주사하였다. PA 항원은 10 µg 사용하였고, CIA05는 0.5 µg, 1 µg, Alum은 50 µg, 100 µg을 사용하여 총 부피가 100 µl 되도록 하였다. 음성 대조군은 PBS(Phosphate-Buffered Saline, pH 7.3)를 매회 100 µl씩 주사하였다. 마우스에 3회 주사 후 마우스로부터 전혈을 채취하여 원심분리를 통해 혈청을 얻었다. 면역 후 혈청 내 PA 특이 항체 역가를 측정하기 위해 실시예 3에서와 같이 엔드포인트 ELSIA 방법을 사용하였다. 면역화 후 혈청 내 PA 특이 항원을 분석한 결과, PA 항원을 단독으로 면역화 했을 때보다, 면역 보조제로 CIA05를 0.5 µg 투여했을 때 10배, 1 µg을 투여했을 때 21배 PA 특이 항원이 증가하였다(도 3). 이는 CIA05가 탄저 항원인 PA와 함께 탄저 백신에서 면역 보조제로서 역할을 함을 보여주고 있다. 또한, CIA05와 Alum(aluminum hydroxide)을 혼합하여 면역 보조제로 사용하였을 때, PA 특이 면역 반응을 증진시킬 수 있음을 확인할 수 있었다 (도 3).

[0081] 결론적으로, 면역보조제로서 CIA05를 포함하는 본 발명의 탄저 백신은 면역 효능 즉 백신 효능이 매우 우수하다.

[0082] **실시예 5: 본 발명의 A형 간염 (Hepatitis A virus; HAV) 백신의 효능 분석**

[0083] 항원으로는 MRC-5 세포주에서 배양된 불활화된 HAV를 사용하였다. 6주령 Balb/c 마우스에 불활화된 HAV를 1주 간격으로 3회 주사하였다. 이 때, HAV 단독 또는 CIA05를 포함하여 주사 하였다. 3회 주사 1주일 후 실시예 3에서와 같이 혈청을 분리하고 HAV 특이 항체를 엔드포인트 ELISA 방법으로 측정하였다. 불활화된 HAV를 단독으로 사용한 것에 비해 CIA05 조합에서는 약 6배 증가된 효능을 보였다. (도 4).

[0084] 결론적으로, 면역보조제로서 CIA05를 포함하는 본 발명의 HAV 백신은 면역 효능 즉 백신 효능이 매우 우수하다.

[0085] **실시예 6: 본 발명의 B형 간염 (Hepatitis B virus ; HBV) 백신의 효능 분석**

[0086] HBV 예방 백신에서 항원으로는 HBV의 표면 항원인 HBsAg (adr subtype)을 *Hansenula polymorpha*에서 재조합 HBsAg를 발현, 정제하여 사용하였다. Balb/c 마우스에 HBV 항원인 HBsAg 2 µg을 1주 간격으로 3회 주사하였다. 이 때, 항원 단독 또는 Alum이나 CIA05를 포함하여 주사 하였다. 3회 주사 1주일 후 실시예 3에서와 같이 혈청을 분리하고 HBsAg 특이 항체를 엔드포인트 ELISA 방법으로 측정하였다. 현재 HBV 백신으로 많이 사용하고 있는 HBsAg과 Alum의 조합은 항원 단독에 비해 2.5배 HBsAg 특이 항체를 증진시켰으나, CIA05와의 조합에서는 약 7.5배 증진시켰다(도 5a). 동일한 방법으로 C57BL/6 마우스에서 면역 보조제 CIA05의 효능을 확인한 결과 Balb/c와 비교하여 항원 단독으로 주사한 것에 비해 약 16배 HBsAg 특이 면역반응을 증진시키는 결과를 확인하였다(도 5b).

[0087] 결론적으로, 면역보조제로서 CIA05를 포함하는 본 발명의 HBV 백신은 면역 효능 즉 백신 효능이 매우 우수하다.

[0088] **실시예 7: 본 발명의 C형 간염 (Hepatitis C virus; HCV) 백신의 효능 분석**

[0089] HCV 백신에서 면역보조제 CIA05의 효능을 확인하기 위해 항원으로는 HCV의 재조합 NS3(Z00042, GenScript)를 구입하여 사용하였다.

[0090] 6주령 Balb/c 마우스에 NS3 항원 2  $\mu\text{g}$ 을 1주 간격으로 3회 주사하였고, 항원 단독 또는 Alum이나 CIA05를 포함하여 주사 하였다. 3회 주사 1주일 후 실시예 1에서와 같이 혈청을 분리하고 NS3 특이 항체를 엔드포인트 ELISA 방법으로 측정하였다. NS3 항원 단독으로 주사하였을 때와 비교하여 Alum의 조합은 3.2배 NS3 특이 항체를 증진시켰으나, CIA05와의 조합에서는 약 6.2배 증진시켰다 (도 6).

[0091] 결론적으로, 면역보조제로서 CIA05를 포함하는 본 발명의 HCV 백신은 면역 효능 즉 백신 효능이 매우 우수하다.

[0092] **실시예 8: 본 발명의 HIV 백신의 효능 분석**

[0093] HIV 백신에서 면역보조제 CIA05의 효능을 확인하기 위해 항원으로는 HIV-1 엔벨로브(Env) 항원(H9909, Sigma)를 구입하여 사용하였다. 6주령 Balb/c 마우스에 HIV-1 엔벨로브 항원 2  $\mu\text{g}$ 을 1주 간격으로 3회 주사하였고, 항원 단독 또는 Alum이나 CIA05를 포함하여 주사 하였다. 3회 주사 1주일 후 실시예 1에서와 같이 혈청을 분리하고 HIV-1 엔벨로브 항원 특이 항체를 엔드포인트 ELISA 방법으로 측정하였다. HIV-1 엔벨로브 항원 단독으로 주사하였을 때와 비교하여 Alum의 조합은 8배 HBcAg 특이 항체를 증진시켰으나, CIA05와의 조합에서는 약 14.5배 증진시켰다 (도 7).

[0094] 결론적으로, 면역보조제로서 CIA05를 포함하는 본 발명의 HIV 백신은 면역 효능 즉 백신 효능이 매우 우수하다.

[0095] **실시예 9: 본 발명의 인플루엔자 백신의 효능 분석**

[0096] 인플루엔자 백신에서 면역 보조제 CIA05의 효능을 확인하기 위해 3가지 종류의 인플루엔자 바이러스 스트레인에서 얻은 HA subunit(CJ Co., Incheon, Korea)을 사용하였다. 3가지 인플루엔자 바이러스 스트레인은 A/New Caledonia/20/99 (H1N1), A/Panama/2007/99 (H3N2), B/Shangdong/7/97 이다. 6주령 Balb/c 마우스에 앞서 언급한 3가지 인플루엔자 바이러스 스트레인에서 유래한 HA subunit 1.5  $\mu\text{g}$ 을 4주 간격으로 2회 주사하였다. 이 때, 항원 단독 또는 Alum 25  $\mu\text{g}$ 이나 CIA05 25  $\mu\text{g}$ 을 포함하여 주사 하였다. 2회 주사 4주일 후 실시예 1에서와 같이 주사한 마우스로부터 혈청을 분리하고 인플루엔자 HA subunit 특이 항체를 엔드포인트 ELISA 방법으로 측정하였다. 항원 단독으로 주사한 시험군에 비해 Alum을 포함한 시험군의 경우 인플루엔자 특이 항체를 증진시키지 못했음에도 불구하고 CIA05를 포함한 시험군에서 인플루엔자 특이 항체가 약 2.4배 이상 많이 유도되었다 (도 8).

[0097] **실시예 10: 본 발명의 HSV-2(Herpes simplex virus type 2) 백신의 효능 분석**

[0098] HSV-2 백신에서 면역 보조제 CIA05의 효능을 확인하기 위해 항원으로는 HSV-2의 당단백질 gD와 gB를 사용하였다. 2가지 항원은 당화가 중요하므로 정확한 당화를 위해 동물 세포인 CHO 세포주로부터 발현 및 정제하였다 (Boucher et al., Detection of antibodies to herpes simplex virus type 2 with a mammalian cell line expressing glycoprotein gG-2. *Clin. Diagn. Virol.* 1(1):29-38(1993)). CHO 세포주에서 발현, 정제한 2가지 항원을 6주령 Balb/c 마우스에 각 2  $\mu\text{g}$ 씩 1주 간격으로 3회 주사하였고, 시험군은 항원 단독 또는 Alum이나 CIA05를 포함하여 주사 하였다. 3회 주사 1주일 후 실시예 1에서와 같이 혈청을 분리하고 HSV-2 항원인 gD와 gB 특이 항체를 엔드포인트 ELISA 방법으로 측정하였다. gD 항원에 대해서는 항원 단독으로 사용한 것에 비해 Alum을 포함한 시험군에서 약 4배의 항체 생성을 확인하였고 CIA05를 포함한 시험군에서는 약 6.3배 이상의 특이 항체가 생성되는 것을 확인하였다 (도 9a). gB 항원에 대해서는 항원 단독으로 사용한 것에 비해 Alum을 포함한 시험군에서 약 2배의 항체 생성을 확인하였고 CIA05를 포함한 시험군에서는 약 5배 이상의 특이 항체가 생성되는 것을 확인하였다 (도 9b).

[0099] **실시예 11: 본 발명의 Hib(Haemophilus influenzae type b) 백신의 효능 분석**

[0100] Hib 항원으로는 ActHIB(Haemophilus b conjugate Vaccine(Tetanus Toxoid Conjugate, Sanofi Pasteur SA)를 구입하여 사용하였다. Balb/c 마우스에 ActHIB를 2주 간격으로 2회 주사하였다. 이 때, vaccine 단독 또는 Alum이나 CIA05를 포함하여 주사 하였다. 2회 주사 1주일 후 실시예 1에서와 같이 주사한 마우스로부터 혈청

을 분리하고 Hib 특이 항체를 엔드포인트 ELISA 방법으로 측정하였다. Hib 단독으로 투여한 시험군에 비해 Alum을 포함한 시험군에서 Hib 특이 항원이 약 4배 이상 증가하였으며, CIA05를 포함한 시험군에서는 약 6.8 배 증가한 결과를 보였다. (도 10).

[0101] **실시예 12: 본 발명의 *Neisseria meningitidis* 백신의 효능 분석**

[0102] *Neisseria meningitidis* 백신에서 면역 보조제 CIA05의 효능을 확인하기 위해 약독화된 *Neisseria meningitidis*로 부터 프로테오솜을 분리하여 항원으로 사용하였다(Lowell et al., Proteosome-lipo peptide vaccines: enhancement of immunogenicity for malaria CS peptides. *Science*, 240:800-802(1980)). 6주령 Balb/c 마우스에 항원을 2주 간격으로 2회 주사하였고 시험군은 백신 단독 또는 CIA05를 포함하는 2가지 시험군을 구성하였다. 2회 주사 1주일 후 실시예 1에서와 같이 혈청을 분리하고 항원으로 사용한 *Neisseria Meningitidis* proteosome 특이 항체를 엔드포인트 ELISA 방법으로 측정하였다. 항원을 단독으로 주사하였을 때와 비교하여 CIA05를 포함한 시험군에서는 약 10.3배의 특이 항원이 확인되었다 (도 11).

[0103] **실시예 13: 본 발명의 디프테리아, 파상풍, 백일해 (DPT) 백신의 효능 분석**

[0104] DPT는 diphtheria, pertussis, tetanus에 의해 유발되는 질병을 예방하는 백신이다. 이들 질병의 백신에 대해 CIA05의 면역 보조제 효능을 확인하기 위해 diphtheria는 *Corynebacterium diphtheria*에서 유래한 Diphtheria toxin (D0564, Sigma)를, pertussis는 *Bordetella pertussis*에서 유래한 Pertussis toxin (P7208, Sigma)를, tetanus는 *Clostridium tetani*에서 유래한 Tetanus toxin (T3194, Sigma)로부터 구입하여 사용하였다. 3가지 toxin을 6주령 Balb/c 마우스에 각 2 µg씩을 혼합하여 2주 간격으로 2회 주사하였다. 이 때, 항원 단독 또는 Alum이나 CIA05를 포함하여 주사 하였다. 2회 주사 1주일 후 실시예 1에서와 같이 혈청을 분리하고 3가지 toxin에 대한 특이 항체를 엔드포인트 ELISA 방법으로 측정하였다. Diphtheria toxin의 경우 항원 단독에 비해 Alum 조합에서 특이 항체가 9.4배 증진되었으며, CIA05와의 조합에서는 약 11.5배 증진되었다 (도 12a). Pertussis toxin에서는 항원 단독과 비교하여 Alum 조합에서 5.8배의 특이 항체가 검출되었으며, CIA05에서는 이보다 더 많은 7.2배의 특이 항체가 검출되었다 (도 12b). Tetanus toxin의 경우는 Alum 조합에서 항원 단독에 비해 3배의 증진된 항체 생성능을 보였으며, CIA05 조합에서는 8.1배의 특이 항체 생성 효능을 보였다 (도 12c).

[0105] **실시예 14: 본 발명의 수두 백신의 효능 분석**

[0106] 수두 백신에서 면역 보조제 CIA05의 효능을 확인하기 위해 항원으로 1VIA 수두박스 주 (1VIA Suduvax inj, 녹십자)를 사용하였다. 수두박스 주는 varicella가 live attenuated 형태의 수두 백신이다. 수두박스를 6주령된 Balb/c 마우스에 2주 간격으로 2회 주사하였다. 이 때, 백신 단독 또는 CIA05를 포함하여 주사 하였다. 2회 주사 1주일 후 실시예 1에서와 같이 혈청을 분리하고 수두 균주 특이 항체를 엔드포인트 ELISA 방법으로 측정 하였다. 수두 균주에 대한 특이 항원은 수두 백신 단독으로 주사하였을 때 보다 CIA05와의 조합에서 약 12배 이상 증진시킴을 확인 하였다 (도 13).

[0107] **실시예 15: 수지상 세포의 성숙화에 대한 CIA05의 효능 분석**

[0108] 인간 MDDCs(Monocyte-derived DC cells)와 마우스 BMDC (Bone marrow DCs)의 분리

[0109] 건강한 사람으로부터 약 80ml의 혈액을 채취한 후 Ficoll-Paque™ gradient 분리법으로 말초 혈액 단핵구 (PBMCs)를 분리하였다. 단핵구 (monocyte)는 말초혈액 단핵구(PBMCs)로부터 anti-CD14 microbeads (MACS system)를 이용하여 분리 하였으며, 24 웰 플레이트에 1x10<sup>8</sup> cells/well의 농도로 10% FBS, IL-4, GM-CSF가 포함된 RPMI1640 배지에 희석하여 배양하여 사람 MDDCs를 얻었다. BMDCs는 자성 BALB/c 마우스로부터 bone marrow cell를 IL-4, GM-CSF가 포함된 배지에서 6일간 배양하고, 7일째 anti-CD11c-coated magnetic beads를 이용하여 CD11c<sup>+</sup> cell을 분리하였다.



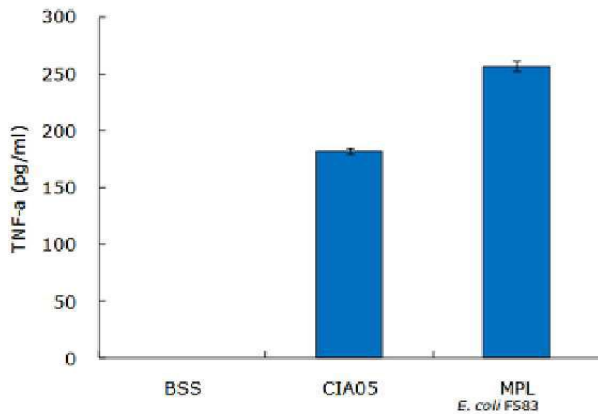
[0110] 면역 보조제 CIA05에 의한 DCs (Dendritic cells) 표면 marker 발현 증가 분석

[0111] 상술한 방법으로 사람 MDDCs와 마우스의 BMDCs를 분리한 후 LPS, MPL, CIA05를 각각 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하여 37°C에서 24시간 반응시켰다. 반응 후 마우스 BMDCs 표면에서는 CD40, CD80, CD86을 확인하였고, 사람 MDDCs에서는 HLA-DR, CD80, CD86을 각각 flow cytometry로 확인하였다. 마우스 BMDCs의 경우는 LPS, MPL, CIA05 모두 DCs 표면 marker인 CD40, CD80, CD86의 발현이 거의 유사하게 분포 되었음을 알 수 있다 (도 14a). 하지만 사람 MDDCs에서는 현재 백신 면역보조제로 많이 사용되고 있는 MPL과 비교하여 MDDCs의 표면 marker인 HLA-DR, CD80, CD86 모두가 CIA05에서 더 많이 발현되고 있음을 확인할 수 있었다 (도 14b). 이는 MPL이 마우스에서는 LPS 수준의 효능을 유지하지만 human에서는 그 효능이 제한적임을 보여주며 CIA05가 이러한 문제를 해결할 수 있음을 보여준다.

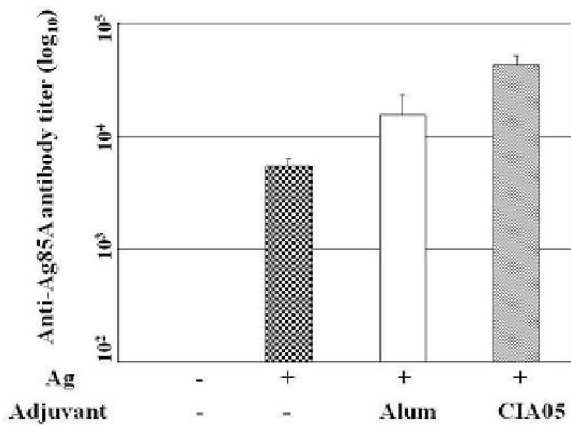
[0112] 결론적으로, 상기 실험결과, 면역보조제 CIA05는 여러 백신에서 면역 효능 즉 백신 효능을 크게 증가시키는 작용을 하며, 특히 인간 수지상세포의 성숙화에도 큰 효과를 나타낸다.

**도면**

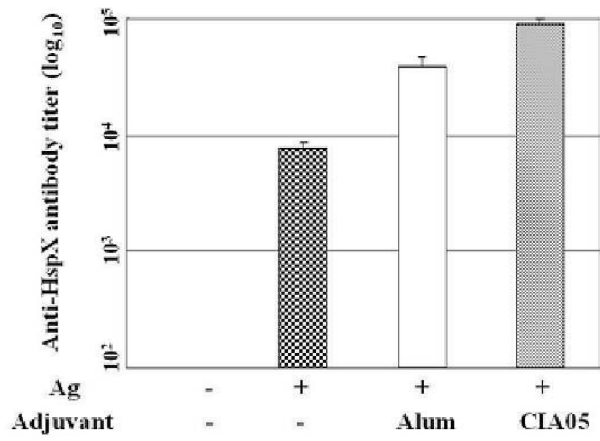
**도면1**



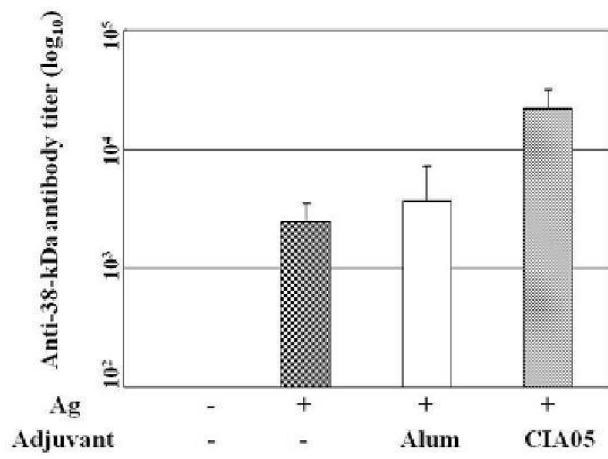
**도면2a**



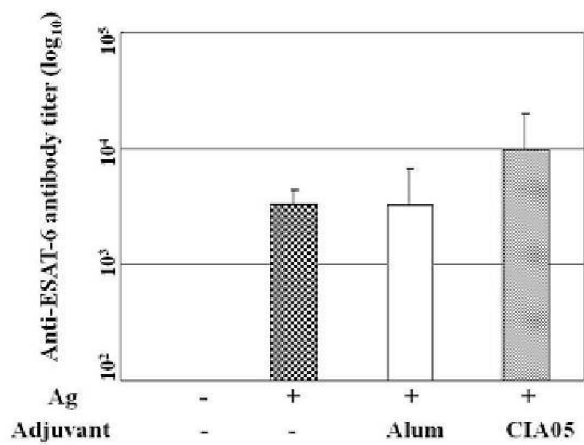
도면2b



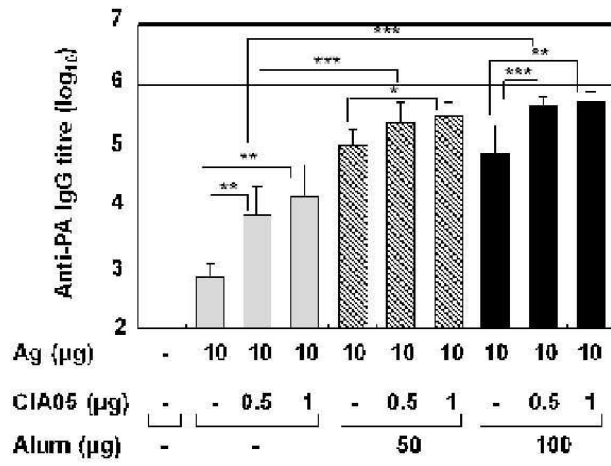
도면2c



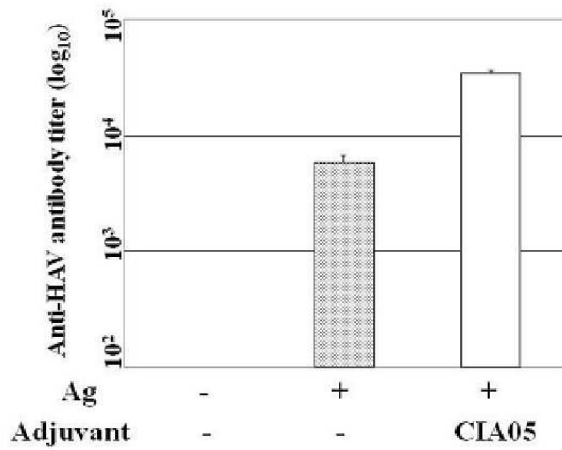
도면2d



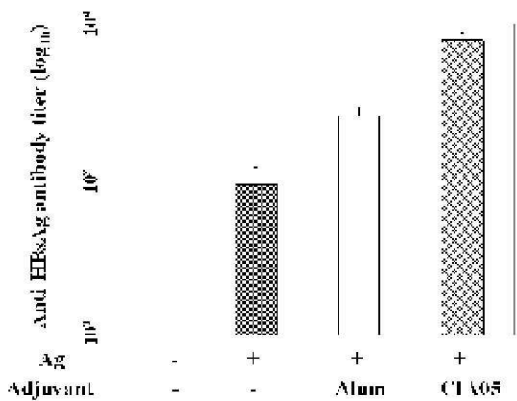
도면3



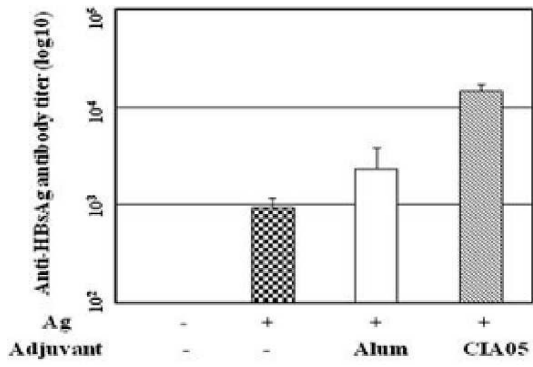
도면4



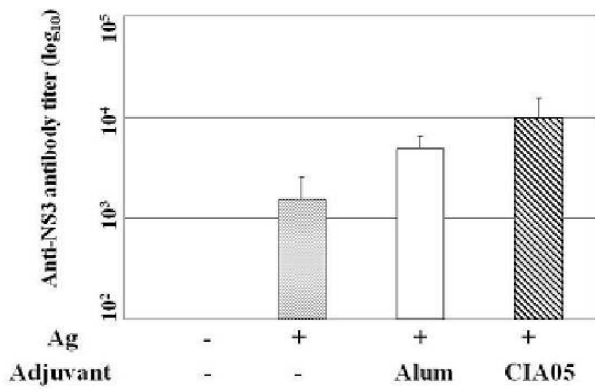
도면5a



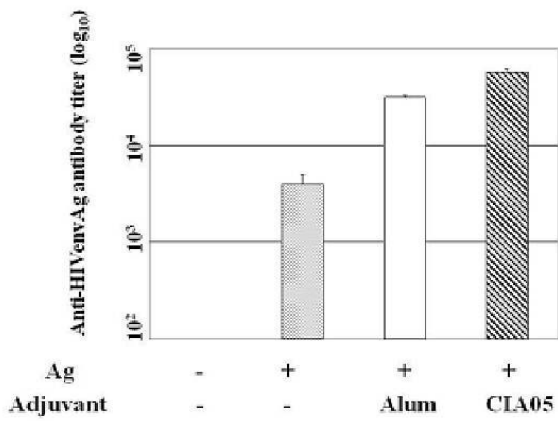
도면5b



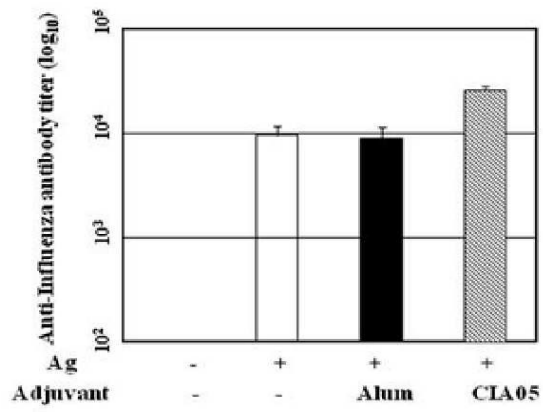
도면6



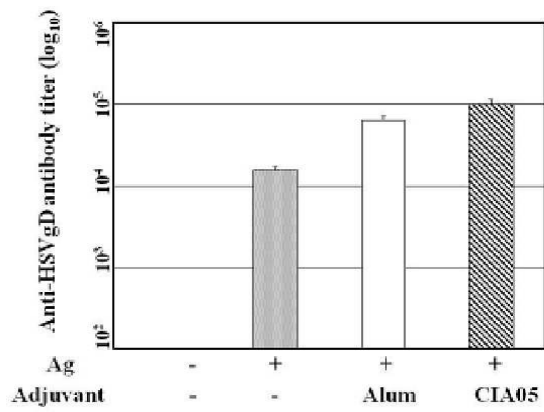
도면7



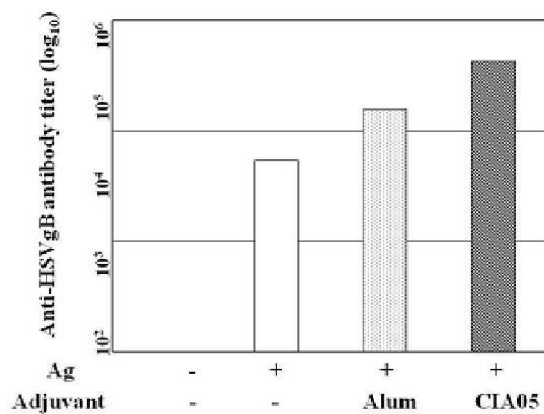
도면8



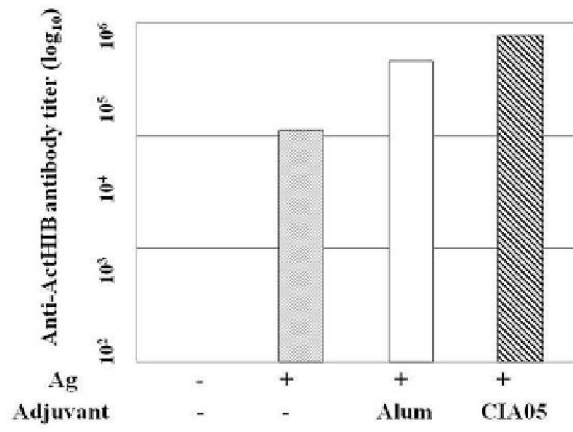
도면9a



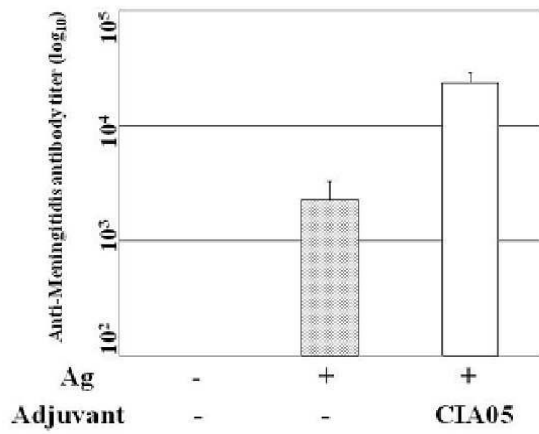
도면9b



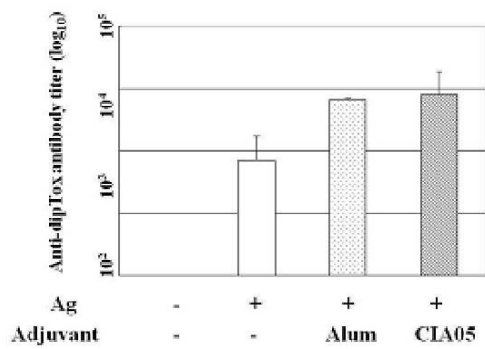
도면10



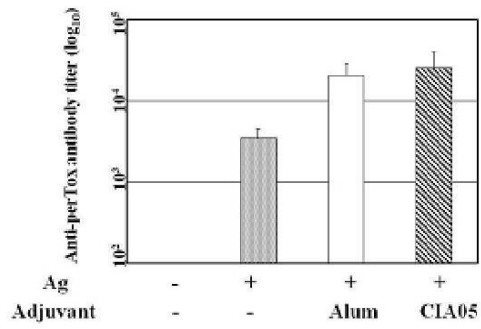
도면11



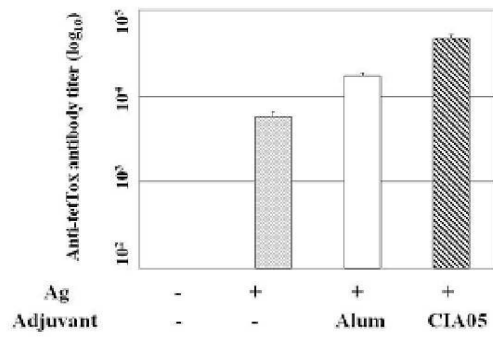
도면12a



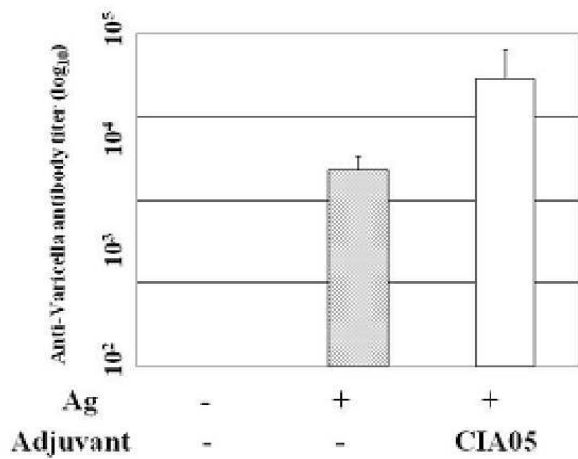
도면12b



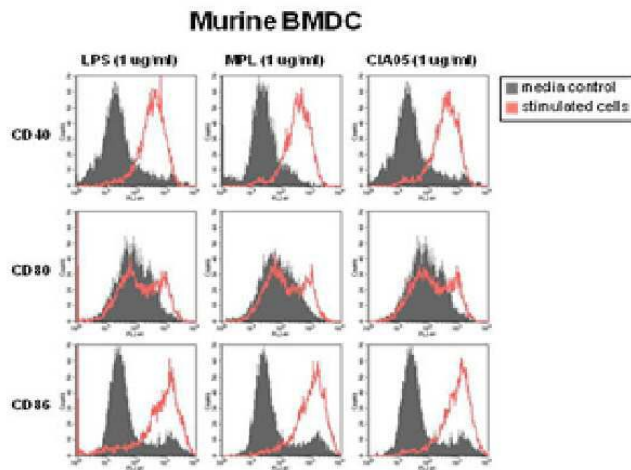
도면12c



도면13



도면14a



도면14b

