



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년08월03일

(11) 등록번호 10-2429564

(24) 등록일자 2022년08월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 39/39 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 39/39 (2013.01)

A61K 39/12 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-0014471(분할)

(22) 출원일자 2022년02월03일

심사청구일자 2022년02월03일

(65) 공개번호 10-2022-0027100

(43) 공개일자 2022년03월07일

(62) 원출원 특허 10-2019-0035847

원출원일자 2019년03월28일

심사청구일자 2019년03월28일

(56) 선행기술조사문헌

Journal of Entomology and Zoology Studies 제 5권, 1375-1380면 (2017)\*

Frontiers in Microbiology, 제8권, Article 2469 1-14 (2014)\*

이윤하, 연세대학교 박사학위 논문(2017.9.4. 공개, RISS)\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

성백린

서울특별시 서대문구 연세로 50, 연세대학교 제2공학관 518호(신촌동)

정유철

서울특별시 서대문구 연세로 50, 연세대학교 제2공학관 522호(신촌동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인이플리온

전체 청구항 수 : 총 4 항

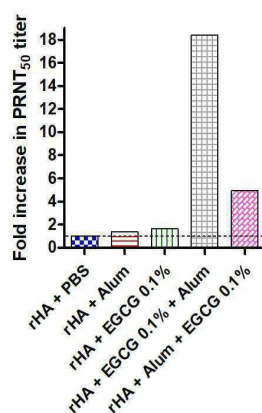
심사관 : 이수정

(54) 발명의 명칭 녹차 유래 성분을 함유하는 바이러스 백신용 면역증강제 조성물

## (57) 요약

본 발명은 에피갈로카테킨 갈레이트(epigallocatechin gallate; EGCG) 또는 녹차 추출물을 유효성분으로 함유하는 바이러스 백신용 면역증강제 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 면역증강제는 다양한 바이러스에 대한 면역반응에서 우수한 면역촉진 효능을 발휘할 뿐 아니라, 독성이 거의 없어 안전성이 매우 우수하다. 또한, 본 발명의 녹차 추출물 또는 EGCG로 이루어지는 면역증강제는 Alum과 병용사용하였을 때 백신의 면역반응을 더욱 강력하게 향상시킬 수 있다.

대표도 - 도6b



(52) CPC특허분류

A61K 2039/55505 (2013.01)

A61K 2039/55511 (2013.01)

(72) 발명자

**장요한**

서울특별시 서대문구 연세로 50, 연세대학교 제2공학관 522호(신촌동)

**이윤하**

서울특별시 서대문구 연세로 50, 연세대학교 제2공학관 522호(신촌동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465024524
과제번호	HI15C2934 (HI15C2934000017)
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	감염병위기대응기술개발사업
연구과제명	녹차 카테킨기반 개량형 불활화바이러스백신 개발(3/3)
기 여 율	1/2
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2017.12.01 ~ 2018.11.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465023836
과제번호	HI13C0826 (HI13C0826010017)
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	감염병위기대응기술개발사업
연구과제명	(1세부)면역백신기반기술개발센터-비주사형 백신전달 기술개발 (2단계(2/2))
기 여 율	1/2
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2017.06.24 ~ 2018.06.23

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

삭제

#### 청구항 2

삭제

#### 청구항 3

에피갈로카테킨 갈레이트(epigallocatechin gallate; EGCG); 및

덴기 바이러스의 E 단백질 중 도메인 3과 CTB 융합 항원(CTB-ED3)을 포함하는, 덴기 바이러스 단백질 백신 조성물.

#### 청구항 4

삭제

#### 청구항 5

바이러스 항원에 에피갈로카테킨 갈레이트(epigallocatechin gallate; EGCG)를 첨가하는 단계를 포함하고,

상기 바이러스 항원은 덴기 바이러스의 E 단백질 중 도메인 3과 CTB 융합 항원(CTB-ED3)인, 덴기 바이러스 백신 조성물의 제조 방법.

#### 청구항 6

제5 항에 있어서,

상기 에피갈로카테킨 갈레이트를 첨가하는 단계는, 에피갈로카테킨 갈레이트를 첨가한 후 알루미늄(Alum)을 첨가하는 단계를 포함하는, 덴기 바이러스 백신 조성물의 제조 방법.

#### 청구항 7

제3 항에 있어서,

상기 조성물은 알루미늄(Alum)을 포함하는 것인, 덴기 바이러스 단백질 백신 조성물.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 바이러스 백신용 면역증강제 조성물 및 이를 포함하는 바이러스 백신 조성물에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] "면역증강제(adjuvant)"란 백신 항원과 함께 사용되었을 때 그 백신 항원에 특이적인 면역반응을 형성 또는 향상시키는 임의의 화합물이다. 면역증강제의 여러 역할은 다양한 임상 시험에 의해 밝혀져 있다. 예를 들어 재조합 인플루엔자 단백질 항원을 면역증강제와 함께 사용하여 항원 양의 절약 효과를 얻어낸 결과가 보고되었으며

(Cox, M. Update on clinical trials evaluation of adjuvanted rHA(H5) vaccines. in *7th WHO Meeting on Evaluation of Pandemic Influenza Vaccines in Clinical Trials*. Geneva, Switzerland, 2011), B형 간염 바이러스의 항원을 면역증강제와 사용하여 접종 횟수를 감소시킨 사례도 있다(Levie, K., Gjorup, I., Skinhoj, P. & Stoffel, M. A 2-dose regimen of a recombinant hepatitis B vaccine with the immune stimulant AS04 compared with the standard 3-dose regimen of Engerix-B in healthy young adults. *Scand. J. Infect. Dis.* 34, 610-614. 2002). 또한, 인플루엔자와 인유두종 바이러스(HPV) 백신에서 면역증강제가 B 세포 다양성을 증가 시킴으로써 항체 반응 증대 효과(broadening effect)를 이끌어 내기도 하였다(Draper, E. et al. A randomized, observer-blinded immunogenicity trial of Cervarix and Gardasil human papillomavirus vaccines in 12-15 year old girls. *PLoS ONE* 8, e61825. 2013, Galli, G. et al. Fast rise of broadly cross-reactive antibodies after boosting long-lived human memory B cells primed by an MF59 adjuvanted prepandemic vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 7962-7967. 2009). 이 외에, 세포성 면역반응을 이끌어내는 것이 중요한 병원체에 대한 백신 개발에 있어서 면역증강제가 T 세포 반응을 유도하는 역할을 담당하기도 한다(Steven G Reed et al. Key roles of adjuvants in modern vaccines. *Nat. Med.* 19, 1597-1608. 2013).

[0003] 현재까지 사람을 대상으로 하는 백신에 사용되는 면역증강제는 널리 사용되고 있는 Alum, Novartis사의 MF59, GSK사의 AS03, AS04로, 4종에 불과하며, 이 중에 Alum을 제외하고는 일반 백신기업이 사용하기에 한계가 있다(New adjuvants for human vaccines. *Curr Opinion Immunol* 22:411-16, 2010). Alum은 알루미늄 난용성 염으로 단백질을 흡착하여 단백질 항원의 안정성을 증가시킬 뿐만 아니라 Alum에 흡착된 항원이 입자 형태가 되므로 면역세포의 탐식작용이 증가한다. 현재 접종되고 있는 대부분의 백신에 사용되고 있지만 백신의 동결건조나 동결을 불가능하게 하고, 모든 항원에 대해 효과적이지 못하며 세포성 면역반응이 필요한 백신에는 적합하지 않아 용도가 제한되어 있다는 큰 단점이 있다. 스쿠알렌(squalene) 기반 수중유적형 에멀전(oil in water emulsion) 형태인 MF59 면역증강제는 주로 인플루엔자백신에 사용되고 있으며, 이 역시 항원에 대한 항체면역반응 유도는 우수하지만 세포성 면역반응 유도활성은 낮은 편이다(Na Gyong Lee. 백신기반기술로서의 면역증강제. *KSMCB Webzine*. 05. 2015). 항체는 면역세포 중 B세포에서 만들어지는데, 유도되는 항체의 종류는 T세포의 도움에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어 Alum의 경우 도움 T세포 Th1으로부터 Th2세포로의 변화를 촉진하며 이는 IgG2a 항체로부터 IgG1 항체 아형(isotype)으로의 변화를 유도한다. 이러한 면역반응의 변화는 경우에 따라서 백신접종 이후 이상반응과도 연계되어 있다(Towards an understanding of the adjuvant action of aluminum. *Nat Rev Immunol*. 2009). 따라서 Alum과는 다르게 Th2 반응에서 Th1 반응으로 유도하여 세포성 면역을 유도하는 새로운 면역증강제 기술들이 시도, 개발되어 왔다. AS03 면역증강제는 스쿠알렌 기반 수중유적형 에멀전 형태에 면역자극 유도물질(immunostimulatory component)인  $\alpha$ -tocopherol을 추가하여 후천성 면역반응의 향상을 이끌어 내었으며(Sandra Morel et al. Adjuvant System AS03 containing  $\alpha$ -tocopherol modulates innate immune response and leads to improved adaptive immunity. *Vaccine* 29, 2461-2473. 2011), 모노포스포릴 리피드 A(monophosphoryl lipid A)를 이용하는 AS04 면역증강제와, 그 외 여러 면역증강제들은 Toll 유사수용체 작용물질(TLR agonist)을 이용하여 세포성 면역반응을 증강시키고 있다(Harper DM. Currently approved prophylactic HPV vaccines. *Expert Rev Vaccines* 2009;8:1663-79., Thoelen S, Van Damme P, Mathei C, Leroux-Roels G, Desombere I, Safary A, et al. Safety and immunogenicity of a hepatitis B vaccine formulated with a novel adjuvant system. *Vaccine* 1998;16:708-14.). TLR 기전은 최소 9가지의 기전(TLR1~TLR9)을 통해 유도되고 있으며 각각의 기전에 작용하는 물질(TLR agonist)들이 보고되어 있다(Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nat. Med.* 2007).

[0004] 한편, 식물에서 추출한 천연물질을 면역증강제의 성분으로 사용한 사례로는 인삼에 많이 들어있는 성분으로 알려진 사포닌이 있는데, 사포닌 QS-21 물질을 이용한 면역증강제 개발의 경우 QS-21의 높은 분자 조성 가변성과 낮은 안정성 등이 면역증강제로의 개발에 있어 걸림돌이 되고 있다(Michelle M. Adams et al. Design and Synthesis of Potent Quillaja Saponin Vaccine Adjuvants. *JACS* 132, 1939-1945. 2010). 아울러 혈액 용혈 작용, 통증 발생 등의 부작용이 있으며(Hemolytic activities of plant saponins and adjuvants. Effect of *Periandra mediterranea* saponin on the humoral response to the FML antigen of *Leishmania donovani*. *Vaccine*. 1997, Advances in saponin-based adjuvants. *Vaccine*. 2009), 이를 완화하기 위해 다른 물질을 혼합하여 사용하는 것으로 개발되고 있다. 이에는 GSK의 AS01 등이 포함되어 있는데, 이를 통해 효능이 높은 대상포진 백신 및 말라리아 백신이 개발되어 있다(Recent advances of vaccine adjuvants for infectious diseases. *Immune Netw*. 2015). 그럼에도 불구하고 QS-21이 지니는 부작용으로 인해, 대상포진 백신의 경우 접종 시 통증 유발 등이 개선점으로 지적되고 있다(Shingrix: The new adjuvanted recombinant herpes zoster vaccine. *Ann*

Pharmacother. 2018).

[0005] 녹차는 카멜리아 시넨시스(Camellia sinensis)라는 식물에서 생산되며, 흔히 음료로 음용되거나 다이어트 식품 또는 화장품에 응용되어 왔다 (Cabrera, C. 등, Beneficial effects of green tea review. Journal of the American College of Nutrition 25, 79-99). 녹차의 추출물은 여러 종류의 카테킨으로 구성되어있는데, 구체적으로 (-)-에피갈로카테킨(EGC: (-)-epigallocatechin), (-)-에피카테킨 갈레이트(EGC: (-)-epicatechin gallate), (-)-에피갈로카테킨 갈레이트(EGCG: (-)-epigallocatechin gallate) 및 (-)-에피카테킨(EC: (-)-epicatechin)으로 이루어져있다.

[0006] 한국등록특허 제10-1160743호는 녹차를 H9N2형 조류 인플루엔자에 대한 항바이러스제로 사용될 수 있음을 개시하고 있다. 아울러 한국등록특허 제10-1843564호에는 바이러스 불활화 기능을 활용한 불활화 백신 사용 용도에 대해서 기술되어 있다. 그러나 녹차 유래 성분을 면역증강제로 이용하여 다양한 유전자 재조합 항원이나 바이러스, 세균 유래 항원에 대한 백신의 개선 용도로서의 구체적인 결과는 개시한 바 없다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은 다양한 바이러스 백신에 적용할 수 있는 면역증강제를 개발하기 위하여 연구 노력하였다. 그 결과, 녹차추출물 또는 이로부터 유래된 순수정제 카테킨이 바이러스 감염성질환 예방에 중요한 백신항원에 대해 매우 강력한 면역증강 효과가 있음을 확인하였으며, 녹차 추출물 또는 카테킨과 Alum을 조합하여 면역증강제로 사용할 경우 백신의 면역반응을 크게 향상시킬 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0008] 따라서, 본 발명의 목적은 다양한 바이러스 백신에 적용할 수 있는 바이러스 백신용 면역증강제 조성물을 제공하는 데 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상용화된 백신의 면역반응을 크게 향상시킬 수 있는 바이러스 백신용 조성물을 제공하는 데 있다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 항체 아형 변화를 유도하여 안전성을 높이는 백신 조성물을 제공함에 있다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상용화된 백신의 면역반응을 크게 향상시킬 수 있는, 백신의 제조방법을 제공하는 데 있다.

[0012] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 기술한 과제로 제한되지 않으며, 기술되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0013] 본 발명은 상술한 문제점을 해결하기 위한 것으로, 에피갈로카테킨 갈레이트(epigallocatechin gallate; EGCG) 또는 녹차 추출물을 면역증강제 조성물의 유효성분으로 하며, i) 바이러스 백신에 녹차 추출물 또는 EGCG가 첨가될 경우, 첨가되지 않은 경우에 비해 4~8배 더 높은 중화항체가(HI antibody, NT antibody)를 유도하고, 바이러스 특이 항체의 경우에서도 2~4배 더 높은 항체가를 보였으며, ii) 놀랍게도 유전자재조합 항원에 녹차 추출물 또는 EGCG를 첨가한 경우, 첨가하지 않은 경우에 비해 녹차 농도에 따라서 최대 60여배까지 더 높은 중화항체가가 유도되고 방어 효능 또한 크게 증가되는 것을 검증하였고, iii) 예상치 못하게도 녹차 성분 농도에 따라 항체 아형의 급격한 변화(IgG1에서 IgG2a로의 isotype switching)를 야기하여 Th2 반응으로부터 Th1 반응으로 switch되는 결과를 검증함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0014] 이에 본 발명은 에피갈로카테킨 갈레이트(epigallocatechin gallate; EGCG) 또는 녹차 추출물을 유효성분으로 함유하는 바이러스 백신용 면역증강제 조성물을 제공한다.

[0015] 본 명세서의 용어, "녹차 추출물"은 다양한 추출 용매, 예를 들어 (a) 물, (b) 탄소수 1-4의 무수 또는 함수 저급 알코올 (메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올 등), (c) 상기 저급 알코올과 물과의 혼합용매, (d) 아세톤, (e) 에틸아세테이트, (f) 클로로포름, (g) 1,3-부틸렌글리콜, (h) 부틸 아세테이트를 추출 용매로 하여 얻을 수 있다. 본 발명의 일구현예에 따르면, 본 발명의 녹차 추출물은 물을 추출용매로 하여 얻어진 것이다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 녹차 추출물은 여러 종류의 카테킨을 포함하며, 구체적으로 (-)-에피갈로카테킨(EGC: (-)-epigallocatechin), (-)-에피카테킨 갈레이트(EGC: (-)-epicatechin gallate), (-)-에피갈로카테킨 갈레이트(EGCG: (-)-epigallocatechin gallate) 및 (-)-에피카테킨(EC: (-)-epicatechin)을 포함하며, 가장

구체적으로는 (-)-에피갈로카테킨 갈레이트(EGCG: (-)-epigallocatechin gallate)를 포함한다. 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면 본 발명의 녹차 추출물은 물이나 에탄올을 추출 용매로 하여 얻어질 수 있고, 본 발명의 특정 구현예에 따르면 70% 에탄올을 추출 용매로 하여 얻을 수 있다. 한편, 본 발명의 추출물은 상기 추출 용매 뿐만 아니라, 다른 추출 용매를 이용하여도 실질적으로 동일한 효과를 나타내는 추출물이 얻어질 수 있다는 것은 당업자에게 자명한 것이다.

[0016] 본 명세서의 용어 “추출물”은 상술한 바와 같이 당업계에서 조추출물(crude extract)로 통용되는 의미를 갖지만, 광의적으로는 추출물을 추가적으로 분획(fractionation)한 분획물도 포함한다. 즉 본 발명의 녹차 추출물은 상술한 추출용매를 이용하여 얻은 것뿐만 아니라, 여기에 정제과정을 추가적으로 적용하여 얻은 것도 포함한다. 예컨대, 상기 추출물을 일정한 분자량 컷-오프 값을 갖는 한외 여과막을 통과시켜 얻은 분획, 다양한 크로마토그래피(크기, 전하, 소수 성 또는 친화성에 따른 분리를 위해 제작된 것)에 의한 분리 등, 추가적으로 실시된 다양한 정제 방법을 통해 얻어진 분획도 본 발명의 추출물에 포함되는 것이다. 또한 본 발명의 추출물은 감압 증류 및 동결 건조 또는 분무 건조 등과 같은 추가적인 과정에 의해 분말 상태로 제조된 것을 포함한다.

[0017] 본 명세서의 용어, "면역증강제"는 일반적으로 항원에 대한 체액 또는 세포 면역 반응을 증가시키는 임의의 물질을 의미한다.

[0018] 본 발명의 바람직한 일 구현예에 따르면, 상기 바이러스는 인플루엔자 바이러스(influenza virus) 또는 뎅기바이러스(Dengue virus)일 수 있다.

[0020] 다른 측면에서, 본 발명은 에피갈로카테킨 갈레이트(epigallocatechin gallate; EGCG) 또는 녹차 추출물; 및 알룸(Alum)을 유효성분으로 포함하는 바이러스 백신용 면역증강제 조성물을 제공한다.

[0021] 본 발명의 바람직한 일 구현예에 있어서, 상기 알룸(Alum)은 양이온성 알루미늄염으로서, 수화 포타슘알루미늄실레이트, 황산알루미늄, 황산알루미늄칼륨, 수산화알루미늄, 인산알루미늄, 알루미늄히드록시포스페이트, 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.

[0022] 본 발명의 바람직한 일 구현예에 따르면, 본 발명의 면역증강제 조성물에서, 'Alum과 녹차 추출물' 또는 'Alum과 EGCG'에서  $Al^{3+}$ 과 EGCG의 농도비(wt/vol)는 40:1 ~ 20:1 일 수 있다. 상기 범위일 때 침전물이 생기지 않고 면역증강 효과를 높일 수 있다.

[0023] 본 발명의 바람직한 일 구현예에 따르면, 본 발명의 면역증강제 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있으며, 이에 대한 설명은 하기에 기재되어 있다.

[0024] 본 발명에서 사용되는 EGCG 및 Alum의 조합, 또는 녹차 추출물 및 Alum의 조합은 다양한 바이러스 항원에 대한 면역촉진 효능이 다른 면역보조제와 비교하여 우수할 뿐 아니라 독성도 훨씬 감소되어 바이러스 백신 조성물에 매우 효과적으로 사용될 수 있다. EGCG 및 Alum 조합, 또는 녹차 추출물 및 Alum 조합의 상승적 면역반응 촉진 효과는 하기 실시예에 입증되어 있다.

[0026] 또 다른 측면에서, 본 발명은 에피갈로카테킨 갈레이트(epigallocatechin gallate; EGCG), 알룸(Alum) 및 바이러스 항원을 유효성분으로 포함하는 백신 조성물을 제공한다.

[0027] 본 발명의 백신 조성물은 상술한 면역증강제 조성물을 유효성분으로 사용하기 때문에, 면역증강제 조성물에 대한 중복된 기재는 생략한다.

[0028] 본 명세서의 용어, "백신"은 대상(subject)의 면역 반응에 긍정적으로 영향을 주는 조성물을 의미하는 가장 광범위한 의미로 사용된다. 백신 조성물은 접종대상에게 체액성 면역 반응 (Humoral immune response), 예를 들어 항체에 의해 유발되는 향상된 전신적(systemic)/국소적(local) 면역반응뿐 아니라 세포성 면역 반응 (cell-mediated immune response), 예를 들어 CTL(Cytotoxic T Lymphocyte) 반응 등을 제공한다.

[0029] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 백신 조성물에 포함되는 바이러스 항원은 인플루엔자 바이러스 또는 뎅기 바이러스 자체 및 종래 공지된 다양한 인플루엔자 바이러스 유래 항원 또는 뎅기 바이러스 유래 항원을 포함한다.

[0030] 상기 항원은 바이러스 구성성분 중 면역반응을 일으킬 수 있는 항원을 의미하며, 바람직하게는 인플루엔자 바이러스의 헤마글루티닌 구형 도메인(HA<sub>g</sub>d) 및 인플루엔자 A/PuertoRico/8/34(H1N1) 바이러스의 HA 재조합 단백질(rHA), 뎅기 바이러스의 E 단백질 중 도메인 3과 CTB 융합 항원(CTB-ED3) 또는 이들의 단편일 수 있다.

[0031] 본 발명의 바람직한 일 구현예에 따르면, 본 발명의 백신은 약독화 된 생백신 또는 사백신, 서브유닛 백신, 합성



백신 또는 유전공학 백신일 수 있다.

- [0032] 하기 실시예에 나타난 바와 같이, 본 발명의 면역증강제를 포함하는 백신은 적은 용량의 항원으로도 우수한 면역반응을 유도할 수 있다.
- [0033] 본 발명의 백신 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, 메틸히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 백신 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 백신 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.
- [0035] 또 다른 측면에서, 본 발명은 녹차 유래 물질의 농도를 변화시킴으로써 IgG1에서 IgG2a로의 항체 isotype switching을 유도하는 방법을 제공한다.
- [0037] 또 다른 측면에서, 본 발명은 바이러스 항원에 에피갈로카테킨 갈레이트(epigallocatechin gallate; EGCG) 및 녹차 추출물로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 성분 및 기존에 사용되어온 면역증강제인 알루미늄(Alum)을 첨가하여 백신을 제조하는 방법을 제공한다.
- [0038] 본 발명의 일실시예에서는, 항원에 알루미늄을 첨가한 후 EGCG를 첨가한 백신(rHA + Alum + EGCG 0.1%)보다 항원에 EGCG를 먼저첨가하고 그 이후에 알루미늄을 첨가한 백신(rHA + EGCG 0.1% + Alum)의 면역증강효과가 더욱 상승하는 것을 확인하였다.
- [0039] 이에, 본 발명의 백신을 제조하는 방법은 알루미늄과 EGCG를 항원에 첨가하는 순서에 따라서 면역증강효과의 상승 정도가 달라질 수도 있고, 본 발명의 백신을 제조하는 방법에 있어서, 바이러스 항원에 EGCG 및 녹차 추출물로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 성분을 먼저 첨가한 후 알루미늄(Alum)을 첨가할 수 있다.
- [0040] 아울러 알루미늄 외에도 다양한 TLR agonist, 리포좀 등의 면역증강제와 혼합 사용하여 다양한 면역증강 기전 간 시너지를 도모하여 백신 효능을 증강시킬 수 있다.

### 발명의 효과

- [0041] 본 발명의 면역증강제는 안전성을 갖춘 천연 물질인 녹차 추출물 또는 EGCG를 함유하여 다양한 바이러스에 대한 면역반응에서 우수한 면역촉진 효능을 발휘할 뿐 아니라, 독성이 거의 없어 안전성이 매우 우수하다.
- [0042] 또한, 본 발명의 녹차 추출물 또는 EGCG로 이루어지는 면역증강제는 Alum과 병용사용 하였을 때 백신의 면역반응을 더욱 강력하게 향상시킬 수 있으며, EGCG 농도에 따라 세포성 면역반응을 매개하여 항체의 종류변환(isotype switch)에 기반하는 면역반응 활성을 기대할 수 있다.
- [0043] 이에, 본 발명의 면역증강제를 백신과 함께 사용하면, 상대적으로 안전성은 높지만 면역원성이 저조한 백신들의 면역원성을 높일 수 있고, 반대로 독성이 강한 백신들은 그 사용량을 줄임으로써 안전성이 우수한 백신 조성물을 제공할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [0044] 도 1은 녹차 추출물 또는 EGCG 를 첨가한 HA<sub>1</sub>g 단백질 백신의 면역원성 및 방어 효능을 확인한 결과이다:
- 도 1a는 HA<sub>1</sub>g 단백질 백신 관련 실험의 6주, 10주 차 마우스 혈청 항체의 인플루엔자 A/Puerto Rico/8/34(H1N1) 바이러스에 대한 항체가 분석 결과를 나타낸다.
- 도 1b는 HA<sub>1</sub>g 단백질 백신 관련 실험의 혈구응집능 억제시험(HI test) 결과를 나타낸다. 점선은 검출 한계를 나타내며, 검출 한계 값은 8(HI titer)이다.
- 도 1c는 HA<sub>1</sub>g 단백질 백신 관련 실험의 바이러스 중화시험(VNT) 결과를 나타낸다. 점선은 검출 한계를 나타내며, 검출 한계 값은 50(NT titer)이다.
- 도 1d는 HA<sub>1</sub>g 단백질 백신 관련 실험의 공격접종 후 체중 변화와 생존율 관찰 결과를 나타낸다. 점선은 마우스

의 윤리적 안락사 기준(체중 25% 감소 시 안락사)을 나타낸다.

도 2는 녹차 추출물 또는 EGCG를 첨가한 rHA 단백질 백신의 면역원성 및 방어 효능을 확인한 결과이다:

도 2a는 rHA 단백질 백신 관련 실험의 6주, 10주 차 마우스 혈청 항체의 인플루엔자 A/Puerto Rico/8/34(H1N1) 바이러스에 대한 항체가 분석 결과를 나타낸다.

도 2b는 rHA 단백질 백신 관련 실험의 혈구응집능 억제시험(HI test) 결과를 나타낸다. 점선은 검출 한계를 나타내며, 검출 한계 값은 8(HI titer)이다.

도 2c는 rHA 단백질 백신 관련 실험의 바이러스 중화시험(VNT) 결과를 나타낸다. 점선은 검출 한계를 나타내며, 검출 한계 값은 50(NT titer)이다.

도 2d는 rHA 단백질 백신 관련 실험의 공격접종 후 체중 변화와 생존율 관찰 결과를 나타낸다. 점선은 마우스의 윤리적 안락사 기준(체중 25% 감소 시 안락사)을 나타낸다.

도 2e는 rHA 단백질 백신 관련 실험의 결합활성(avidity) 분석 결과를 나타낸다.

도 3은 녹차 추출물 또는 EGCG를 첨가한 CTB\_ED3 단백질 백신의 면역원성 및 방어 효능을 확인하기 위한 바이러스 중화시험(VNT) 결과를 나타낸다. 점선은 검출 한계를 나타내며, 검출 한계 값은 10(NT titer)이다.

도 4는 EGCG의 농도에 따른 면역증강 효과 및 EGCG와 Alum의 상승적 면역증강효과를 IgG 항체가 분석을 통해 확인한 결과이다:

도 4a는 EGCG 농도에 따른 효과 확인 실험의 6주 차 마우스 혈청 항체의 인플루엔자 A/Puerto Rico/8/34(H1N1) 바이러스에 대한 항체가 분석 결과이다.

도 4b는 EGCG 및 Alum의 시너지 효과 확인 실험의 6주 차 마우스 혈청 항체의 인플루엔자 A/Puerto Rico/8/34(H1N1) 바이러스에 대한 항체가 분석 결과를 나타낸다. Endpoint dilution은 PBS 그룹 평균 흡광도 (O.D.)의 2배 값보다 큰 흡광도 값을 갖는 마지막 희석 값을 뜻하며, Fold increase는 면역증강제를 처리하지 않은 rHA + PBS 그룹을 기준으로, 각 면역증강제를 처리하였을 때 Endpoint dilution 값의 평균이 rHA + PBS 그룹의 평균값보다 몇 배 증가하였는지를 나타낸다. 점선은 rHA + PBS 그룹의 fold increase 값인 1을 나타낸다.

도 5는 EGCG의 농도에 따른 면역증강 효과 및 EGCG와 Alum의 상승적 면역증강효과를 혈구응집억제 분석을 통해 확인한 결과이다:

도 5a는 EGCG 농도에 따른 혈구응집억제 효과를 나타낸 것이고, 도 5b는 EGCG 및 Alum의 시너지 효과 확인 실험의 6주 차 마우스 혈청 항체의 혈구응집능 억제시험(HI test) 결과를 나타낸다. Fold increase는 각 면역증강제를 처리하였을 때 HI Ab titer값의 평균이 rHA + PBS 그룹의 평균값보다 몇 배 증가하였는지를 나타내며, 점선은 rHA + PBS 그룹의 fold increase 값인 1이다.

도 6은 EGCG의 농도에 따른 면역증강 효과 및 EGCG와 Alum의 상승적 면역증강효과를 바이러스 중화능 분석을 통해 나타낸 결과이다:

도 6a는 EGCG 농도에 따른 6주차 마우스 혈청 항체의 바이러스 중화시험(VNT) 결과를 나타낸 것이고, 도 6b는 EGCG 및 Alum의 시너지 효과 확인 실험의 6주 차 마우스 혈청 항체의 바이러스 중화시험(VNT) 결과를 나타낸다. Fold increase는 각 면역증강제를 처리하였을 때 PRNT<sub>50</sub> titer값의 평균이 rHA + PBS 그룹의 평균값보다 몇 배 증가하였는지를 나타내며, 점선은 rHA + PBS 그룹의 fold increase 값인 1이다.

도 7은 다양한 농도의 EGCG를 Alum과 혼합한 후 스핀다운(spin down)하여 침전물을 가라앉힌 뒤, 상층액을 1/100 희석하여 흡광도를 측정한 결과이다. (3회 반복 실험)

도 8은 EGCG의 세포성 면역반응 유도 가능성을 확인한 것으로, EGCG 농도에 따른 효과 확인 실험의 6주 차 마우스 혈청 항체 중 인플루엔자 A/Puerto Rico/8/34(H1N1) 바이러스에 결합하는 항체의 IgG subclass를 확인한 결과이다:

도 8a는 2<sup>nd</sup> 항체로 anti-mouse IgG1 항체를 이용함;

도 8b는 2<sup>nd</sup> 항체로 anti-mouse IgG2a 항체를 이용함.



도 9는 녹차 추출물을 첨가한 인플루엔자 불활화 백신(GT-V)의 면역원성을 혈구응집억제 분석 및 바이러스 중화 시험(VNT)을 통해 확인한 결과이다:

도 9a는 GT-V와 FA-V의 혈구응집능 억제시험(HI test) 결과를 나타낸다.

도 9b는 GT-V와 FA-V의 바이러스 중화시험(VNT) 결과를 나타낸다. 점선은 검출 한계를 나타내며 HI 분석의 검출 한계는 8 (HI titer), 중화능 분석의 검출 한계는 20 (NT titer)이다.

도 9c와 9d는 GT-V 관련 실험의 4주 차 마우스 혈청 항체의 결합활성(avidity) 분석 결과를 나타낸다.

도 9e와 9f는 6주 차 마우스 혈청 항체의 결합활성(avidity) 분석 결과를 나타낸다. 도면에 표현되어 있는 '4wk'는 4주 차, '6wk'는 6주 차를 나타낸다.

도 10은 녹차 추출물을 첨가한 돼지 불활화 백신(GT-D)의 면역원성을 IgG 항체가 분석을 통해 확인한 결과이다:

도 10a는 GT-D 관련 실험의 2주, 4주, 6주 차 마우스 혈청 항체의 돼지 바이러스 type1에 대한 항체가 분석 결과를 나타낸다. GT-D는 GT 0.1%-V  $5.00 \times 10^5$  PFU 농도, GT-D low는 GT 0.025%-V  $1.25 \times 10^5$  PFU, FA-D는 FA 0.1%-V  $5.00 \times 10^5$  PFU 농도를 나타낸다.

도 10b는 GT-D 관련 실험의 2주, 4주, 6주 차 마우스 혈청 항체의 돼지 type1 바이러스 E 단백질에 대한 항체가 분석 결과를 나타낸다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0045] 이하, 발명의 이해를 돕기 위해 다양한 실시예를 제시한다. 하기 실시예는 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐 발명의 보호범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0046] 본 명세서에서, %는 달리 언급이 없으면 %(wt/vol)으로 이해될 수 있다.

### 실시예 1

[0048] 실험재료의 준비

[0049] 세포주

[0050] MDCK(Madin-Darby Canine Kidney) 및 Vero 세포는 ATCC(American Type Culture Collection)로부터 구입하였고, 상기 세포는 10% FBS(fetal bovine serum, HyClone, 미국) MEM(minimal essential medium, HyClone, 미국) 또는 10% FBS DMEM(Dulbecco's Modified Eagles Medium, HyClone, 미국) 배지를 이용하여 5% CO<sub>2</sub>, 37℃ 조건 하에서 배양하였다.

[0052] 녹차 추출물 및 EGCG

[0053] 녹차 추출물은 고온·고압 멸균한 3차 증류수에 가루 녹차(녹차 100%, 아모레퍼시픽, 대한민국)를 녹여 사용하였다.

[0054] EGCG는 고온·고압 멸균한 3차 증류수에 분말 형태의 EGCG(98%, 중국의 Changsha Sunfull Biotech사에서 정제하여 판매)를 녹여 사용하였다.

[0056] 바이러스

[0057] 인플루엔자 A/Puerto Rico/8/34(H1N1) 바이러스는 11일 된 SPF(specific pathogen free) 계태아에 접종하여 37℃ 인큐베이터에서 2일 동안 키운 후, 요막액(allantoic fluid)을 채취하여 불순물을 제거하고 영하 80℃ 냉동시설에서 보관하였다.

[0058] 돼지 type 1 DenKor-07 바이러스는 vero 세포에 감염시킨 후, 1% FBS DMEM 배지를 넣고 5% CO<sub>2</sub>, 37℃ 조건 하에서 12일 동안 배양한 뒤 채취하여 영하 80℃ 냉동시설에서 보관하였다.

[0060] 단백질 항원

[0061] HAgd 항원은 인플루엔자 A/Puerto Rico/8/34(H1N1) 바이러스의 HA 단백질 중 구형 도메인(globular domain) 부분에 mRID(쥐의 LysRS 단백질 중 RNA와 상호작용하는 도메인) 단백질을 결합하여 대장균 BL21 계통에서 발현한

뒤, 니켈 친화성 크로마토그래피(Ni affinity chromatography)를 이용하여 정제하였다.

[0062] rHA 항원은 Sino Biological사에서 판매하는 인플루엔자 A/Puerto Rico/8/34(H1N1) 바이러스의 HA 재조합 단백질(11684-V08B)을 구매하여 사용하였다.

[0063] CTB\_ED3 항원은 Dengue type1 바이러스의 E 단백질 중 도메인 3 부분에 hRID(사람의 LysRS 단백질 중 RNA와 상호작용하는 도메인) 단백질을 콜레라 독소 B(CTB; Cholera toxin B) 단백질을 결합하여 대장균 Shuffle T7 Express 계통에서 발현한 뒤, 니켈 친화성 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다.

## 실시예 2

[0065] **녹차 추출물 또는 EGCG를 첨가한 HAgd 단백질 백신의 면역원성 및 방어 효능 확인**

[0066] 2-1. 단백질 항원과 면역증강제 접종 및 혈액 채취

[0067] 각 면역증강제를 섞은 단백질 백신의 면역원성을 확인하기 위해, 한 군 당 다섯 마리의 마우스에 각각 HAgd 단백질 10ug/50ul와 함께 면역증강제로서 군 별로 각각 PBS(통제집단), Alum, 0.5% GT(녹차 추출물) 또는 0.5% EGCG를 50ul씩 근육주사로 투여하였다. 2, 4주 후에 같은 농도로 추가접종 하였고, 첫 접종으로부터 2, 4, 6, 10주 후 혈액을 채취하여 원심분리를 통해 혈청만 수집하여 면역원성 분석을 위해 사용하였다.

[0068] 모든 실험 과정은 국제백신연구소(IVI) 동물실험윤리위원회 (Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC))의 가이드라인에 따라 수행하였다.

[0070] 2-2. IgG 항체가 분석

[0071] 마우스 실험에서 얻어낸 혈청의 ELISA 분석을 수행하였다. 96 웰 플레이트에 인플루엔자 PR8 바이러스를  $10^5$  PFU/100  $\mu$ l씩 분주하고 4°C 에서 하루 동안 코팅하였다. 바이러스가 코팅된 플레이트를 PBST로 3회 워싱한 후, 1% BSA로 상온에서 1시간 동안 블로킹 하였다. 동일한 방법으로 워싱한 후, 마우스 혈청을 1:800으로 희석한 후 2배씩 계대 희석하여 100  $\mu$ l/웰씩 96웰에 분주하고 상온에서 1시간동안 처리하였다. 동일한 방법으로 워싱한 후, HRP-conjugated anti-mouse IgG(Mab)를 1:10000으로 희석하여 100  $\mu$ l/웰씩 상온에서 1시간동안 처리하였다. 동일한 방법으로 워싱한 후, TMB 용액을 100  $\mu$ l/웰씩 상온에서 30분 동안 처리하였다. 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 처리하여 반응을 정지시키고 스펙트로포토미터로 450 nm에서 분석하였다.

[0072] 그 결과, [도 1a]에 나타난 바와 같이, 6주 차와 10주 차 모두 GT 또는 EGCG가 첨가된 백신에 의해 유도된 항체는 면역증강제가 첨가되지 않은 백신에 의해 유도된 항체보다 최소 2배에서 최대 8배 정도 높은 항체가를 나타내었다. 이로부터, GT 또는 EGCG의 강력한 면역증강 효과를 확인하였다.

[0074] 2-3. 혈구응집억제 분석

[0075] 헤마글루티네이션 저해 특성을 분석하기 위해, 혈구응집억제(HI: Hemagglutination inhibition) 분석을 수행하였다. 먼저 혈청에 수용체 파괴효소(receptor destroying enzyme)를 처리하고 56°C에서 1시간 동안 열을 가하여 비동화한 다음, 혈청을 25  $\mu$ l씩 96-웰 플레이트에서 PBS와 함께 2배씩 단계적으로 희석하였다. 희석한 혈청에 야생형의 A/Puerto Rico/8/34(H1N1) 바이러스 4 HAU/25  $\mu$ l를 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 후 1%의 닭적혈구(cRBC, chicken RBC)를 50  $\mu$ l 첨가하여 4°C에서 1시간 동안 반응시키고 혈구응집을 억제하는 가장 높은 희석률을 계산하였다.

[0076] 그 결과, [도 1b]에 나타난 바와 같이, GT가 첨가된 백신에 의해 유도된 항체의 경우 10주 차에서 면역증강제가 첨가되지 않은 백신에 의해 유도된 항체보다 4배 가량 더 높은 HI 항체가를 보였으며, EGCG가 첨가된 백신에 의해 유도된 항체는 6, 10주 차에서 4~5배 가량 더 높은 HI 항체가를 보였다. 특히 10주 차의 경우, GT 또는 EGCG가 이미 효능이 입증되어 널리 사용되고 있는 Alum과 비슷한 수준의 면역 증강 효과를 나타내었다.

[0078] 2-4. 바이러스 중화능 분석

[0079] 마우스 실험에서 얻어낸 혈청의 바이러스 중화능을 확인하기 위해, 바이러스 중화시험(VNT: Virus Neutralization Test) 분석을 수행하였다. 먼저 상기 실시예에서 수거한 마우스의 혈청을 MEM에 1/50 희석한 뒤 56°C에서 1시간 동안 열을 가하여 비동화한 후, 2배씩 단계적으로 희석하였다. 다음으로 희석한 혈청에 바이러스 100 PFU를 넣어 37°C에서 1.5시간 동안 중화반응을 시켰다. 그 후 중화반응을 시킨 바이러스와 혈청을 MDCK 세포가 배양된 12-웰 플레이트에 접종하여 플라크 분석을 실시하고 대조군과 비교하여 50% 플라크 감소를 나타

내는 회석률을 계산하였다.

[0080] 그 결과, [도 1c]에 나타난 바와 같이, GT 또는 EGCG가 첨가된 백신에 의해 유도된 항체는 면역증강제가 첨가되지 않은 백신에 의해 유도된 항체보다 높은 중화항체가를 보이는 것을 확인할 수 있었다.

## [0082] 2-5. 방어 효능 분석

[0083] 각 면역증강제가 첨가된 백신의 방어 효능을 확인하기 위해, 상기 실시예에서 항원 접종 및 혈액 채취가 모두 끝난 마우스에 야생형 인플루엔자 A/Puerto Rico/8/34(H1N1) 바이러스 2MLD<sub>50</sub>( $2 \times 10^3$  pfu)를 비강 접종한 뒤 2주 동안 체중변화 측정 및 생존율을 관찰하였다. 모든 실험 과정은 국제백신연구소(IVI) 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC))의 가이드라인에 따라 수행하였다.

[0084] 그 결과, [도 1d]에 나타난 바와 같이, GT 또는 EGCG가 첨가된 백신을 접종 받은 마우스들은 공격 접종 이후에 상대적으로 체중이 덜 감소하였다. 특히 생존율에서 확실한 차이를 보였는데, 면역증강제가 첨가되지 않은 백신을 접종 받은 마우스들은 공격 접종 후 5마리 중 3마리가 사망한 반면, EGCG 또는 Alum이 첨가된 백신을 접종 받은 마우스들은 공격 접종 후 5마리 중 2마리가 사망하였으며 GT가 첨가된 백신을 접종 받은 마우스들은 공격 접종 후에도 모두 생존하였다. 따라서 GT 또는 EGCG를 면역증강제로서 첨가할 경우 방어 효능에도 큰 영향이 있음을 확인하였다.

## 실시예 3

[0086] **녹차 추출물 또는 EGCG를 첨가한 rHA 단백질 백신의 면역원성 및 방어 효능 확인**

### [0087] 3-1. 단백질 항원과 면역증강제 접종 및 혈액 채취

[0088] 각 면역증강제를 섞은 단백질 백신의 면역원성을 확인하기 위해, 한 군 당 다섯 마리의 마우스에 각각 rHA 단백질 4 $\mu$ g/50 $\mu$ l와 함께 면역증강제로서 군 별로 각각 PBS(통제집단), Alum, 0.2% GT(녹차 추출물) 또는 0.2% EGCG를 50 $\mu$ l씩 근육주사로 투여하였다. 2, 4주 후에 같은 농도로 추가접종 하였고, 첫 접종으로부터 2, 4, 6, 10주 후 혈액을 채취하여 원심분리를 통해 혈청만 수집하여 면역원성 분석을 위해 사용하였다.

[0089] 모든 실험 과정은 국제백신연구소(IVI) 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC))의 가이드라인에 따라 수행하였다.

### [0091] 3-2. IgG 항체가 분석

[0092] 마우스 실험에서 얻어낸 혈청의 ELISA 분석을 수행하였다. 96 웰 플레이트에 인플루엔자 PR8 바이러스를  $10^5$  PFU/100  $\mu$ l씩 분주하고 4°C 에서 하루 동안 코팅하였다. 바이러스가 코팅된 플레이트를 PBST로 3회 워싱한 후, 1% BSA로 상온에서 1시간 동안 블로킹 하였다. 동일한 방법으로 워싱한 후, 마우스 혈청을 1:800으로 초기희석한 후 2배씩 계대 희석하여 100  $\mu$ l/웰씩 96웰에 분주하고 상온에서 1시간동안 처리하였다. 동일한 방법으로 워싱한 후, HRP-conjugated anti-mouse IgG(Mab)를 1:10000으로 희석하여 100  $\mu$ l/웰씩 상온에서 1시간동안 처리하였다. 동일한 방법으로 워싱한 후, TMB 용액을 100  $\mu$ l/웰씩 상온에서 30분 동안 처리하였다. 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 처리하여 반응을 정지시키고 스펙트로포토미터로 450 nm에서 분석하였다.

[0093] 그 결과, [도 2a]에 나타난 바와 같이, 6주 차와 10주 차 모두 GT 또는 EGCG가 첨가된 백신에 의해 유도된 항체는 면역증강제가 첨가되지 않은 백신에 의해 유도된 항체보다 최소 4배에서 최대 16배 정도 높은 항체가를 나타내었다. 따라서 GT 또는 EGCG의 강력한 면역증강 효과를 확인하였다.

### [0095] 3-3. 혈구응집억제 분석

[0096] 헤마글루티네이션 저해 특성을 분석하기 위해, 혈구응집억제(HI: Hemagglutination inhibition) 분석을 수행하였다. 먼저 혈청에 수용체 파괴효소(receptor destroying enzyme)를 처리하고 56°C에서 1시간 동안 열을 가하여 비동화한 다음, 혈청을 25  $\mu$ l씩 96-웰 플레이트에서 PBS와 함께 2배씩 단계적으로 희석하였다. 희석한 혈청에 야생형의 A/Puerto Rico/8/34(H1N1) 바이러스 4 HAU/25  $\mu$ l를 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 후 1%의 닭적혈구(cRBC, chicken RBC)를 50  $\mu$ l 첨가하여 4°C에서 1시간 동안 반응시키고 혈구응집능을 억제하는 가장 높은 회석률을 계산하였다.

[0097] 그 결과, [도 2b]에 나타난 바와 같이, GT 또는 EGCG가 첨가된 백신에 의해 유도된 항체의 경우 6, 10주 차에서 면역증강제가 첨가되지 않은 백신에 비해 4~5배 가량 더 높은 HI 항체가를 보였다.

- [0099] 3-4. 바이러스 중화능 분석
- [0100] 마우스 실험에서 얻어낸 혈청의 바이러스 중화능을 확인하기 위해, 바이러스 중화시험(VNT: Virus Neutralization Test) 분석을 수행하였다. 먼저 상기 실시예에서 수거한 마우스의 혈청을 MEM에 1/50 희석한 뒤 56℃에서 1시간 동안 열을 가하여 비동화한 후, 2배씩 단계적으로 희석하였다. 다음으로 희석한 혈청에 바이러스 100 PFU를 넣어 37℃에서 1.5시간 동안 중화반응을 시켰다. 그 후 중화반응을 시킨 바이러스와 혈청을 MDCK 세포가 배양된 12-웰 플레이트에 접종하여 플라크 분석을 실시하고 대조군과 비교하여 50% 플라크 감소를 나타내는 희석률을 계산하였다.
- [0101] 그 결과, [도 2c]에 나타난 바와 같이, 면역증강제가 첨가되지 않은 백신에 의해 유도된 항체는 중화항체가 거의 나타나지 않은 반면, GT 또는 EGCG가 첨가된 백신에 의해 유도된 항체는 높은 수준의 중화항체를 나타내었다.
- [0103] 3-5. 방어 효능 분석
- [0104] 각 면역증강제가 첨가된 백신의 방어 효능을 확인하기 위해, 상기 실시예에서 항원 접종 및 혈액 채취가 모두 끝난 마우스에 야생형 인플루엔자 A/Puerto Rico/8/34(H1N1) 바이러스 2MLD<sub>50</sub>( $2 \times 10^3$  pfu)를 비강 접종한 뒤 2주 동안 체중변화 측정 및 생존율을 관찰하였다. 모든 실험 과정은 국제백신연구소(IVI) 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)의 가이드라인에 따라 수행하였다.
- [0105] 그 결과, [도 2d]에 나타난 바와 같이, GT 또는 EGCG가 첨가된 백신을 접종 받은 마우스들은 공격 접종 이후에 상대적으로 체중이 덜 감소하였다. 특히 생존율에서 확실한 차이를 보였는데, 면역증강제가 첨가되지 않은 백신을 접종 받은 마우스들은 공격 접종 후 5마리 중 2마리가 사망한 반면, Alum, GT, 또는 EGCG를 면역증강제로서 접종 받은 마우스들은 공격 접종 후에도 모두 생존하였다. 따라서 GT 또는 EGCG를 면역증강제로서 첨가할 경우 방어 효능에도 큰 영향이 있음을 확인하였다.
- [0107] 3-6. 항체의 결합활성(avidity) 분석
- [0108] 마우스 실험에서 얻어낸 6주차 혈청의 결합활성 분석을 수행하였다. 96 웰 플레이트에 인플루엔자 A/Puerto Rico/8/34(H1N1) 바이러스를  $10^5$  PFU/100  $\mu$ l씩 분주하고 4℃에서 하루 동안 코팅하였다. 바이러스가 코팅된 플레이트를 PBST로 3회 워싱한 후, 1% BSA로 상온에서 1시간 동안 블로킹 하였다. 동일한 방법으로 워싱한 후, 마우스 혈청을 1:100으로 초기 희석한 후 2배씩 계대 희석하여 100  $\mu$ l/웰씩 96웰에 분주하고 상온에서 1시간 동안 처리하였다. 그 후, 3M, 5M, 7M의 요소(Urea)를 100 $\mu$ l씩 분주하고 상온에서 30분 동안 처리하였다. 동일한 방법으로 워싱한 후, HRP-conjugated anti-mouse IgG(Mab)를 1:10000으로 희석하여 100  $\mu$ l/웰씩 상온에서 1시간 동안 처리하였다. 동일한 방법으로 워싱한 후, TMB 용액을 100  $\mu$ l/웰씩 상온에서 30분 동안 처리하였다. 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 처리하여 반응을 정지시키고 스펙트로포토미터로 450 nm에서 분석하였다.
- [0109] 그 결과, [도 2e]에 나타난 바와 같이, Alum, GT, 또는 EGCG가 첨가된 백신에 의한 항체가 요소를 처리하여도 결합활성이 상대적으로 적게 떨어지는 것을 확인하였다. 따라서 GT 또는 EGCG를 면역증강제로 첨가할 경우 항체 성숙(Antibody maturation) 과정에 의해 항원에 더욱 특이적인 항체가 만들어짐을 확인하였다.

## 실시예 4

- [0111] **녹차 추출물 또는 EGCG를 첨가한 CTB\_ED3 단백질 백신의 면역원성 및 방어 효능 확인**
- [0112] 4-1. 단백질 항원과 면역증강제 접종 및 혈액 채취
- [0113] 각 면역증강제를 섞은 단백질 백신의 면역원성을 확인하기 위해, 한 군 당 다섯 마리의 마우스에 각각 CTB\_ED3 단백질 10 $\mu$ g/50 $\mu$ l와 함께 면역증강제로서 군 별로 각각 PBS(통제집단), Alum, 0.5% GT(녹차 추출물) 또는 0.5% EGCG를 50 $\mu$ l씩 근육주사로 투여하였다. 2, 4주 후에 같은 농도로 추가접종 하였고, 첫 접종으로부터 2, 4, 6, 10주 후 혈액을 채취하여 원심분리를 통해 혈청만 수집하여 면역원성 분석을 위해 사용하였다.
- [0114] 모든 실험 과정은 국제백신연구소(IVI) 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC))의 가이드라인에 따라 수행하였다.
- [0116] 4-2. 바이러스 중화능 분석
- [0117] 마우스 실험에서 얻어낸 혈청의 바이러스 중화능을 확인하기 위해, 바이러스 중화시험(VNT: Virus



Neutralization Test) 분석을 수행하였다. 먼저 상기 실시예에서 수거한 마우스의 혈청을 DMEM에 1/10 희석한 뒤 56℃에서 1시간 동안 열을 가하여 비동화한 후, 2배씩 단계적으로 희석하였다. 다음으로 희석한 혈청에 땡기 바이러스 100 PFU를 넣어 37℃에서 1.5시간 동안 중화반응을 시켰다. 그 후 중화반응을 시킨 바이러스와 혈청을 vero 세포가 배양된 12-웰 플레이트에 접종하여 플라크 분석을 실시하고 대조군과 비교하여 50% 플라크 감소를 나타내는 희석률을 계산하였다.

[0118] 그 결과, [도 3]에 나타난 바와 같이, 면역증강제가 첨가되지 않은 백신에 의해 유도된 항체는 중화항체가가 거의 나타나지 않은 반면, GT 또는 EGCG가 첨가된 백신에 의해 유도된 항체는 일정 수준의 중화항체가를 나타내었다.

## 실시예 5

[0120] EGCG의 농도에 따른 면역증강효과 및 EGCG와 Alum의 상승적 면역증강효과 확인

[0121] 5-1. 단백질 항원과 면역증강제 접종 및 혈액 채취

[0122] 각 면역증강제를 섞은 단백질 백신의 면역원성을 확인하기 위해, 한 군 당 다섯 마리의 마우스에 각각 rHA 단백질 7ug/50ul와 함께 면역증강제로서 군 별로 각각 PBS(통제집단), Alum, EGCG(0.1%, 0.5%, 1%), 그리고 Alum + EGCG 0.1%를 50ul씩 근육주사로 투여하였다. Alum과 EGCG 0.1%를 함께 넣어주는 군의 경우, 항원과 반응시키는 순서를 달리 하여 두 개의 군으로 구성하였다. 2, 4주 후에 같은 농도로 추가접종 하였고, 첫 접종으로부터 2, 4, 6주 후 혈액을 채취하여 원심분리를 통해 혈청만 수집하여 면역원성 분석을 위해 사용하였다.

[0123] 모든 실험 과정은 국제백신연구소(IVI) 동물실험윤리위원회 (Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC))의 가이드라인에 따라 수행하였다.

[0125] 5-2. IgG 항체가 분석

[0126] 마우스 실험에서 얻어낸 6주 차 혈청의 ELISA 분석을 수행하였다. 96 웰 플레이트에 인플루엔자 PR8 바이러스를  $10^5$  PFU/100  $\mu$ l씩 분주하고 4℃ 에서 하루 동안 코팅하였다. 바이러스가 코팅된 플레이트를 PBST로 3회 워싱한 후, 1% BSA로 상온에서 1시간 동안 블로킹 하였다. 동일한 방법으로 워싱한 후, 마우스 혈청을 1:400으로 초기 희석한 후 2배씩 계대희석하여 100  $\mu$ l/웰씩 96웰에 분주하고 상온에서 1시간동안 처리하였다. 동일한 방법으로 워싱한 후, HRP-conjugated anti-mouse IgG(Mab)를 1:10000으로 희석하여 100  $\mu$ l/웰씩 상온에서 1시간동안 처리하였다. 동일한 방법으로 워싱한 후, TMB 용액을 100  $\mu$ l/웰씩 상온에서 30분 동안 처리하였다. 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 처리하여 반응을 정지시키고 스펙트로포토미터로 450 nm에서 분석하였다.

[0127] 그 결과, [도 4a]에 나타난 바와 같이, EGCG가 첨가된 백신은 EGCG의 농도가 높아질수록 더 높은 항체가를 유도하였으며, 특히 면역증강제로 EGCG 1%를 첨가한 군의 경우 면역증강제를 첨가하지 않은 군에 비해 약 17배 더 높은 항체가를 나타내었다.

[0128] 또한, [도 4b]에 나타난 바와 같이, Alum 및 EGCG 0.1% 중 어느 하나만을 첨가한 군은 면역증강제를 첨가하지 않은 군과 비교하였을 때 1.6~1.8배의 면역증강 효과를 보여 면역증강 효과가 크게 증가하지 않은 반면, 면역증강제로 Alum 및 EGCG 0.1%를 함께 첨가한 군은 5~6배 정도의 면역증강 효과를 나타내었다.

[0129] 이로부터 Alum 및 EGCG는 면역증강 작용에 있어 시너지 효과를 지님을 확인할 수 있었다.

[0130] 한편, Alum 및 EGCG를 항원에 첨가하는 순서에 따라서도 면역증강 효과가 달라지는 것을 확인할 수 있었는데, EGCG가 단백질 항원의 특정 아미노산에 결합하여 작용하기 때문에 이미 Alum에 흡착된 단백질 항원에 EGCG를 첨가한 백신(rHA + Alum + EGCG 0.1%)보다 단백질 항원에 EGCG를 먼저 첨가하고 그 이후에 Alum에 흡착시킨 백신(rHA + EGCG 0.1% + Alum)이 더 뛰어난 효과를 보였다.

[0132] 5-3. 혈구응집억제 분석

[0133] 헤마글루티네이션 저해 특성을 분석하기 위해, 6주 차 혈청을 이용하여 혈구응집억제(HI: Hemagglutination inhibition) 분석을 수행하였다. 먼저 혈청에 수용체 파괴효소(receptor destroying enzyme)를 처리하고 56℃ 에서 1시간 동안 열을 가하여 비동화한 다음, 혈청을 25  $\mu$ l씩 96-웰 플레이트에서 PBS와 함께 2배씩 단계적으로 희석하였다. 희석한 혈청에 야생형의 A/Puerto Rico/8/34(H1N1) 바이러스 4 HAU/25  $\mu$ l를 첨가하여 37℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 후 1%의 닭적혈구(cRBC, chicken RBC)를 50  $\mu$ l 첨가하여 4℃에서 1시간 동안 반응시키고 혈구응집능을 억제하는 가장 높은 희석률을 계산하였다.

[0134] 그 결과, [도 5a]에 나타난 바와 같이, EGCG가 고농도로 첨가된 백신은 면역증강제를 넣지 않은 군에 비해 약 8~11배 더 높은 항체가를 나타내었다.

[0135] 또한, [도 5b]에 나타난 바와 같이, Alum 및 EGCG 0.1% 중 어느 하나만을 첨가한 군은 면역증강제를 첨가하지 않은 군에 비해 미미한(1.1~1.4배) 면역증강 효과만을 보인 반면, 면역증강제로 Alum 및 EGCG 0.1%를 함께 첨가한 군은 최대 9배 정도의 면역증강 효과를 나타내었다. 이러한 결과 역시 EGCG의 뛰어난 면역증강 효과, 그리고 Alum과의 시너지 효과를 보여준다.

#### [0137] 5-4. 바이러스 중화능 분석

[0138] 마우스 실험에서 얻어낸 혈청의 바이러스 중화능을 확인하기 위해, 바이러스 중화시험(VNT: Virus Neutralization Test) 분석을 수행하였다. 먼저 상기 실시예에서 수거한 마우스의 혈청을 MEM에 1/25 희석한 뒤 56℃에서 1시간 동안 열을 가하여 비동화한 후, 2배씩 단계적으로 희석하였다. 다음으로 희석한 혈청에 바이러스 100 PFU를 넣어 37℃에서 1.5시간 동안 중화반응을 시켰다. 그 후 중화반응을 시킨 바이러스와 혈청을 MDCK 세포가 배양된 12-웰 플레이트에 접종하여 플라크 분석을 실시하고 대조군과 비교하여 50% 플라크 감소를 나타내는 희석률을 계산하였다.

[0139] 그 결과, [도 6a]에 나타난 바와 같이, EGCG가 고농도로 첨가된 백신은 면역증강제를 넣지 않은 군에 비해 약 10~12배 더 높은 중화항체가를 나타내었다.

[0140] 또한, [도 6b]에 나타난 바와 같이, Alum 및 EGCG 0.1% 중 어느 하나만 첨가한 군은 면역증강제를 첨가하지 않은 군에 비해 미미한(1.3~1.6배)면역증강 효과를 보인 반면, 면역증강제로 Alum과 EGCG 0.1%를 함께 첨가한 군의 경우 최대 18배 정도의 면역증강 효과를 나타내었다. 이러한 결과 역시 EGCG의 뛰어난 면역증강 효과, 그리고 Alum과의 시너지 효과를 보여준다.

### 실시예 6

#### [0142] EGCG와 Alum의 최적 조성비 확인

[0143] EGCG와 Alum의 최적 조성비를 확인하기 위한 실험을 진행하였다. DW 혹은 다양한 농도의 EGCG(0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.5%, 1%) 500ul를 각각 알루미늄 하이드록사이드가 4% 농도(40mg/ml)로 포함된 Alum 500ul와 잘 섞어주었다. 다음으로 각각을 3초 동안 스핀다운(spin down)하여 침전물을 가라앉히고, 상층액만 따로 분리하였다. 분리한 상층액을 DW에 1/100 희석하여 스펙트로포토미터로 600nm에서의 흡광도를 측정하였으며, 3회 반복 실험한 결과를 도 7에 나타내었다.

[0144] 그 결과, [도 7]에 나타난 바와 같이, Alum에 DW 또는 저농도의 EGCG(0.05%~0.2%)를 섞어준 경우 Alum의 물성이 그대로 유지되어 스핀다운 이후에도 탁한 상태가 지속되었으며, DW에 1/100 희석하여 흡광도를 측정한 결과 0.44~0.5 사이의 측정값을 유지하였다. 하지만 EGCG를 0.5% 이상의 농도로 혼합할 경우 Alum이 엉겨 붙어 침전되는 현상이 발생하였다. 침전물은 주사기나 파이펫을 이용한 채취가 불가능하여 백신 용도로 사용하기에 적합하지 않으며, 상층액은 흡광도 측정 결과 Alum 성분이 거의 남아있지 않음이 확인되었다. 따라서 Alum과 혼합하는 EGCG의 농도는 0.2%를 초과하지 않는 것이 좋다고 판단된다.

[0145] 또한, 앞선 실험 결과에서 백신에 처리해준 EGCG의 농도가 높을수록 면역증강 효과가 뛰어났던 점을 함께 고려해볼 때, Alum과 EGCG는 40:1 ~ 20:1의 비율(wt/vol)로 첨가될 때 면역증강 효과가 높을 뿐 아니라 Alum이 침전되지 않고 물성을 그대로 유지할 수 있게 되는 것을 확인하였다.

### 실시예 7

#### [0147] 세포성 면역반응 유도 가능성 확인

[0148] 위의 실시예 5-2에서 실시한 분석법에서는 mouse IgG1과 IgG2a를 둘 다 인식할 수 있는 anti-mouse IgG 항체를 2<sup>nd</sup> 항체로 이용한 반면, 본 실시예 7에서는 mouse IgG1 또는 IgG2a 둘 중 하나만을 특이적으로 인식하는 anti-mouse IgG1 또는 anti-mouse IgG2a 항체를 2<sup>nd</sup> 항체로 이용하여 마우스 혈청 항체의 IgG subclass를 확인하였다. 96 웰 플레이트에 인플루엔자 PR8 바이러스를 10<sup>5</sup> PFU/100  $\mu$ l씩 분주하고 4℃에서 하루 동안 코팅하였다. 바이러스가 코팅된 플레이트를 PBST로 3회 워싱한 후, 1% BSA로 상온에서 1시간 동안 블로킹 하였다. 동일한 방법으로 워싱한 후, 마우스 혈청을 1:400으로 초기희석한 후 2배씩 계대희석하여 100  $\mu$ l/웰씩 96웰에



분주하고 상온에서 1시간동안 처리하였다. 동일한 방법으로 위상한 후, HRP-conjugated anti-mouse IgG1(Mab) 또는 HRP-conjugated anti-mouse IgG2a(Mab)를 1:10000으로 희석하여 100  $\mu$ l/웰씩 상온에서 1시간동안 처리하였다. 동일한 방법으로 위상한 후, TMB 용액을 100  $\mu$ l/웰씩 상온에서 30분 동안 처리하였다. 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 처리하여 반응을 정지시키고 스펙트로포토미터로 450 nm에서 분석하였다.

[0149] 그 결과, [도 8a]에 나타난 바와 같이, 2<sup>nd</sup> 항체로 anti-mouse IgG1 항체를 이용한 경우, anti-mouse IgG 항체를 이용하여 실험했던 실시예 5-2 결과값과 대체적으로 비슷한 양상의 결과를 보였다. 반면, [도 8b]에 나타난 바와 같이, 2<sup>nd</sup> 항체로 anti-mouse IgG2a 항체를 이용한 경우 EGCG를 고농도(1%)로 처리한 군에서만 높은 수준의 반응이 나타났다. 이는 면역증강제로 EGCG 1%를 처리한 군에서만 IgG1과 IgG2a 두 항체 모두를 높은 수준으로 만들어 내고, 다른 면역증강제를 처리하는 경우는 오직 IgG1 항체만 만들어낸다는 것을 의미한다.

[0150] 일반적으로 바이러스 자체가 아닌 단백질 항원을 백신으로 이용하는 경우 Naïve T 세포가 T helper 2 세포로 분화되며, T helper 2 세포는 B 세포가 IgG1 항체를 만들어내도록 하여 체액성 면역반응을 유도하는 것으로 알려져 있다. 반면 바이러스 약독화 생백신 또는 특정 면역증강제를 이용하는 경우 Naïve T 세포가 T helper 1 세포로 분화되며, T helper 1 세포는 B 세포가 IgG2a 항체를 만들어내도록 하여 세포성 면역반응을 유도한다 (Abul K. Abbas et al. Cellular and molecular immunology 7<sup>th</sup> edition. Elsevier). 체내 바이러스의 제거 및 바이러스로부터의 방어 효능에는 세포성 면역반응이 더욱 중요한 역할을 담당한다고 알려져 있어 (Victor C. Huber. Et al. Distinct contributions of vaccine-induced immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG2a antibodies to protective immunity against influenza. Clin Vaccine Immunol. 2006), 위의 배경기술 항목에서 언급된 바와 같이 세포성 면역반응을 증강시키는 면역증강제에 대한 연구가 꾸준히 진행되고 있다.

[0151] 본 실시예에서는 면역증강제로 EGCG 1%를 처리한 경우 IgG1과 IgG2a 두 항체 모두가 높은 수준으로 만들어진 것이 확인되었으며, 따라서 고농도의 EGCG는 체액성 면역반응을 증가시키는 동시에 세포성 면역반응도 유도해낼 수 있음이 확인되었다.

## 실시예 8

[0153] **녹차 추출물을 첨가한 인플루엔자 불활화 백신(GT-V)의 면역원성 확인**

[0154] 8-1. GT-V 접종 및 혈액 채취

[0155] GT-V의 면역원성을 확인하기 위해, 한 군 당 다섯 마리의 마우스에 각각 PBS, GT 0.1%, FA(Formalin) 0.1%, 두 가지 농도의 GT-V(GT 0.025%-V 6.25x10<sup>5</sup> PFU, GT 0.1%-V 2.50x10<sup>6</sup> PFU) 또는 두 가지 농도의 FA-V(FA 0.025%-V 6.25x10<sup>5</sup> PFU, FA 0.1%-V 2.50x10<sup>6</sup> PFU) 100  $\mu$ l와 함께 면역증강제인 alum 100  $\mu$ l를 근육주사(200  $\mu$ l/mice)로 투여하고, 2주 후 같은 농도로 추가접종 하였다. 첫 접종 2, 4 및 6주 후 혈액을 채취하여 원심분리를 통해 혈청만 수집하여 면역원성 분석을 위해 사용하였다.

[0156] 모든 실험 과정은 연세 실험동물 연구센터 동물실험윤리위원회 (Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC))의 가이드라인에 따라 수행하였다.

[0158] 8-2. 혈구응집억제 분석

[0159] GT-V의 헤마글루티네이션 저해 특성을 분석하기 위해, 혈구응집억제(HI: Hemagglutination inhibition) 분석을 수행하였다. 먼저 혈청에 수용체 파괴효소(receptor destroying enzyme)를 처리하고 56℃에서 1시간 동안 열을 가하여 비동화한 다음, 혈청을 25  $\mu$ l씩 96-웰 플레이트에서 PBS와 함께 2배씩 단계적으로 희석하였다. 희석한 혈청에 동일한 야생형의 A/Puerto Rico/8/34(H1N1) 바이러스 4 HAU/25  $\mu$ l를 첨가하여 37℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 후 1%의 닭적혈구(cRBC, chicken RBC)를 50  $\mu$ l 첨가하여 4℃에서 1시간 동안 반응시키고 혈구응집능을 억제하는 가장 높은 희석률을 계산하였다.

[0160] 그 결과, [도 9a]에 나타난 바와 같이, 불활화 바이러스가 주입된 마우스 혈청의 HI 항체가(HI titer)는 2주 차에는 나타나지 않았지만, 추가접종 후 항체가가 크게 증가하여 높게 유도되는 것을 확인할 수 있었다. 특히, 녹차 추출물이 첨가되지 않은 FA-V에 비해 녹차 추출물이 첨가된 GT-V를 접종한 마우스에서 얻어낸 혈청이 4배 가량 높은 HI 항체가를 보이는 것을 확인하였다.

[0162] 8-3. 바이러스 중화능 분석

[0163] 마우스 실험에서 얻어낸 혈청의 바이러스 중화능을 확인하기 위해, 바이러스 중화시험(VNT: Virus Neutralization Test) 분석을 수행하였다. 먼저 상기 실시예에서 수거한 마우스의 혈청을 56℃에서 1시간 동안 열을 가하여 비동화한 후, PBS와 함께 100  $\mu$ l를 2배씩 단계적으로 희석하였다. 다음으로 희석한 혈청에 바이러스 100 PFU/100  $\mu$ l를 넣어 37℃에서 1시간 동안 중화반응을 시켰다. 그 후 중화반응을 시킨 바이러스와 혈청을 MDCK 세포가 배양된 12-웰 플레이트에 접종하여 플라크 분석을 실시하고 대조군과 비교하여 50% 플라크 감소를 나타내는 희석률을 계산하였다.

[0164] 그 결과, [도 9b]에 나타난 바와 같이, 중화항체가(NT titer)는 최초 접종 후 2주차에는 거의 증가하지 않았으나 추가접종 후 크게 증가된 것을 확인하였다. 특히, 녹차 추출물이 첨가되지 않은 FA-V에 비해 녹차 추출물이 첨가된 GT-V를 접종한 마우스에서 얻어낸 혈청이 4배 가량 높은 중화항체가를 보이는 것을 확인할 수 있었다.

[0166] 8-4. 항체의 결합활성(avidity) 분석

[0167] 마우스 실험에서 얻어낸 4,6주차 혈청의 결합활성 분석을 수행하였다. 96 웰 플레이트에 Influenza A H1N1 (A/Puerto Rico/8/1934) (PR8) 바이러스를  $10^5$  PFU/100  $\mu$ l씩 분주하고 4℃에서 하루 동안 코팅하였다. 바이러스가 코팅된 플레이트를 PBST로 3회 워싱한 후, 1% BSA로 상온에서 1시간 동안 블로킹 하였다. 동일한 방법으로 워싱한 후, 마우스 혈청을 1:400으로 초기희석한 후 2배씩 계대 희석하여 100  $\mu$ l/웰씩 96웰에 분주하고 상온에서 1시간동안 처리하였다. 그 후, 7M, 8M, 9M의 요소(Urea)를 100 $\mu$ l씩 분주하고 상온에서 30분동안 처리하였다. 동일한 방법으로 워싱한 후, HRP-conjugated anti-mouse IgG(Mab)를 1:10000으로 희석하여 100  $\mu$ l/웰씩 상온에서 1시간동안 처리하였다. 동일한 방법으로 워싱한 후, TMB 용액을 100  $\mu$ l/웰씩 상온에서 30분 동안 처리하였다. 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 처리하여 반응을 정지시키고 스펙트로포토미터로 450 nm에서 분석하였다.

[0168] 그 결과, 4주 차 혈청(도 9c, 9d)과 6주 차 혈청(도 9e, 9f) 모두 녹차 추출물이 첨가된 백신에 의한 항체가 요소를 처리하여도 결합활성이 상대적으로 적게 떨어지는 것을 확인하였다. 특히 6주 차 혈청은 높은 농도(9M)의 요소를 처리하여도 90% 정도 결합을 유지하는 것을 확인하였다.

**실시예 9**

[0170] 녹차 추출물을 첨가한 뎅기 불활화 백신(GT-D)의 면역원성 확인

[0171] 9-1. GT-D 접종 및 혈액 채취

[0172] GT-D의 면역원성을 확인하기 위해, 한 군 당 다섯 마리의 마우스에 각각 PBS, 두 가지 농도의 GT-D(GT 0.025%-V  $1.25 \times 10^5$  PFU, GT 0.1%-V  $5.00 \times 10^5$  PFU) 또는 FA-D(FA 0.1%-V  $5.00 \times 10^5$  PFU) 60  $\mu$ l와 함께 면역증강제인 alum 40  $\mu$ l를 피하주사(100  $\mu$ l/mice)로 투여하고, 2, 4주 후 같은 농도로 추가접종 하였다. 첫 접종 2, 4 및 6주 후 혈액을 채취하여 원심분리를 통해 혈청만 수집하여 면역원성 분석을 위해 사용하였다.

[0173] 모든 실험 과정은 국제백신연구소(IVI) 동물실험윤리위원회 (Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC))의 가이드라인에 따라 수행하였다.

[0175] 9-2. IgG 항체가 분석

[0176] 마우스 실험에서 얻어낸 혈청의 ELISA 분석을 수행하였다. 96 웰 플레이트에 Dengue type1 DenKor-07 바이러스를  $10^4$  PFU/100  $\mu$ l씩 분주하고 4℃에서 하루 동안 코팅하였다. 바이러스가 코팅된 플레이트를 PBST로 3회 워싱한 후, 1% BSA로 상온에서 1시간 동안 블로킹 하였다. 동일한 방법으로 워싱한 후, 마우스 혈청을 1:250으로 초기희석한 후 2배씩 계대 희석하여 100  $\mu$ l/웰씩 96웰에 분주하고 상온에서 1시간동안 처리하였다. 동일한 방법으로 워싱한 후, HRP-conjugated anti-mouse IgG(Mab)를 1:10000으로 희석하여 100  $\mu$ l/웰씩 상온에서 1시간 동안 처리하였다. 동일한 방법으로 워싱한 후, TMB 용액을 100  $\mu$ l/웰씩 상온에서 30분 동안 처리하였다. 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 처리하여 반응을 정지시키고 스펙트로포토미터로 450 nm에서 분석하였다.

[0177] 그 결과, [도 10a]에 나타난 바와 같이, 2주 차에서 4주 차, 6주 차로 갈수록 항체가가 전반적으로 높아지는 것을 확인할 수 있었는데, 2주 차, 4주 차 및 6주 차 모두 녹차 추출물이 첨가된 경우 공히 낮은 백신도스 ( $1.25 \times 10^5$ ) (GT-D low) 에서 4배의 백신도스 ( $5 \times 10^5$ ) (FA-D) 와 유사한 항체가를 나타냈다. 이는 400%의 면역증가 효과에 해당된다. 따라서 녹차 추출물이 첨가된 백신에 의해 유도된 항체는 녹차 추출물이 첨가되지 않은 백신

에 의해 유도된 항체보다 더 높은 항체가를 나타냄으로써 녹차 추출물의 강력한 면역증강제로의 기능을 확인하였다.

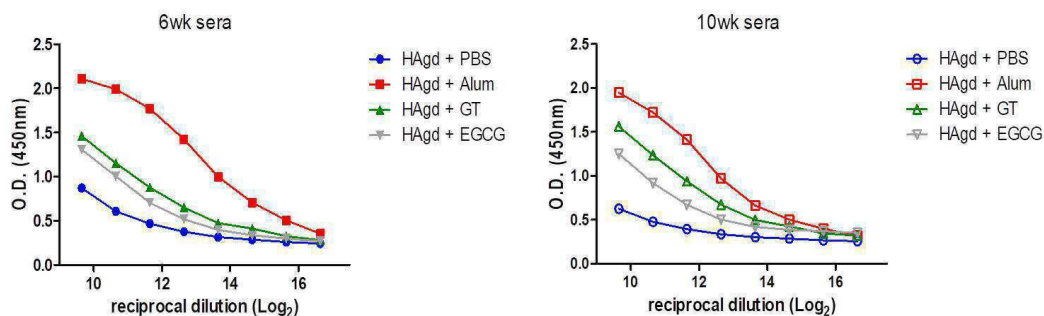
[0179] 9-3. E 단백질 결합 여부 분석

[0180] 마우스 실험에서 얻어낸 혈청으로 ELISA 분석을 수행하여 E 단백질 결합 여부를 분석하였다. 96 웰 플레이트에 Dengue type1의 E 단백질을 0.2 ug/100 u1씩 분주하고 4℃ 에서 하루 동안 코팅하였다. 단백질이 코팅된 플레이트를 PBST로 3회 워싱한 후, 1% BSA로 상온에서 1시간 동안 블로킹 하였다. 동일한 방법으로 워싱한 후, 마우스 혈청을 1:200으로 초기희석한 후 2배씩 계대 희석하여 100 μl/웰씩 96웰에 분주하고 상온에서 1시간동안 처리하였다. 동일한 방법으로 워싱한 후, HRP-conjugated anti-mouse IgG(Mab)를 1:10000으로 희석하여 100 μl/웰씩 상온에서 1시간동안 처리하였다. 동일한 방법으로 워싱한 후, TMB 용액을 100 μl/웰 씩 상온에서 30분 동안 처리하였다. 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 처리하여 반응을 정지시키고 스펙트로포토미터로 450 nm에서 분석하였다.

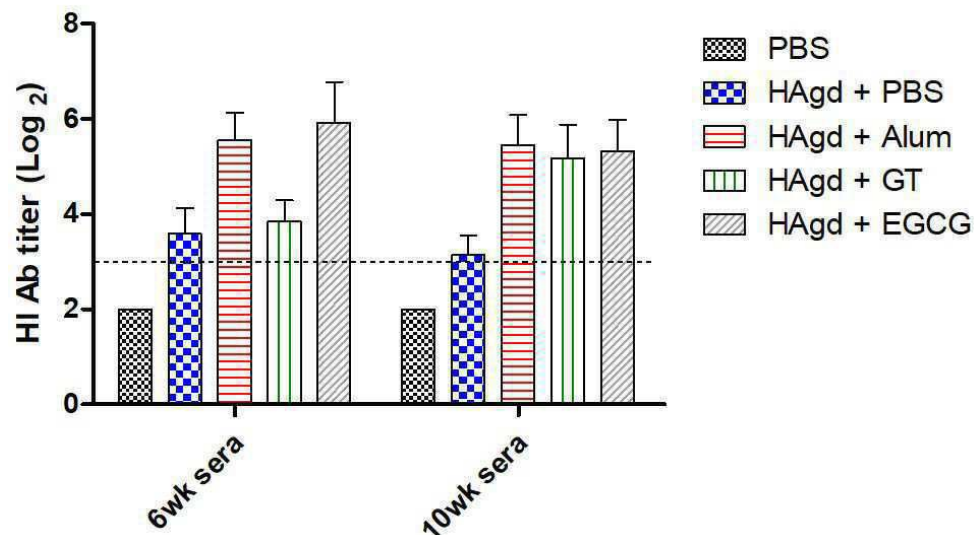
[0181] 그 결과, [도 10b]에 나타난 바와 같이, 2주 차 혈청의 경우 FA-D에 의해 유도된 항체는 E 단백질에 거의 결합력이 없음에도 불구하고 이에 비해 GT-D의 경우 강한 결합력을 나타냈다. 4주 차와 6주 차 혈청에서는 FA-D에 의해 유도된 항체도 E 단백질에 대한 결합력이 나타났지만, GT-D에 의해 유도된 항체의 E 단백질에 대한 결합력이 2배 가량 더 높았다. 뎡기 바이러스의 경우 다양한 바이러스 항원 (E, M, NS1, NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5 등)이 존재하는데, 이 중 표면 항원인 E 단백질에 대한 특이적 항체가 백신 효능에 가장 중요한 것으로 알려져 있다 (Yang Liu. et al. Vaccines and immunization strategies for dengue prevention. *Emerg Microbes Infect.* 2016 Jul; 5(7): e77.). 따라서 녹차 추출물이 기존 백신의 효능을 크게 증강하는 면역증강 효과가 있음이 확인된다.

도면

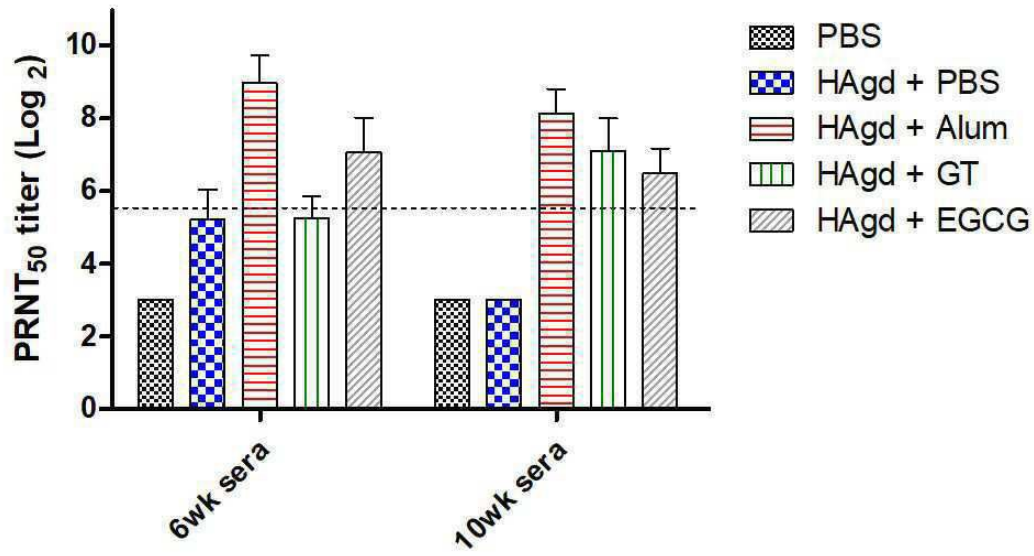
도면1



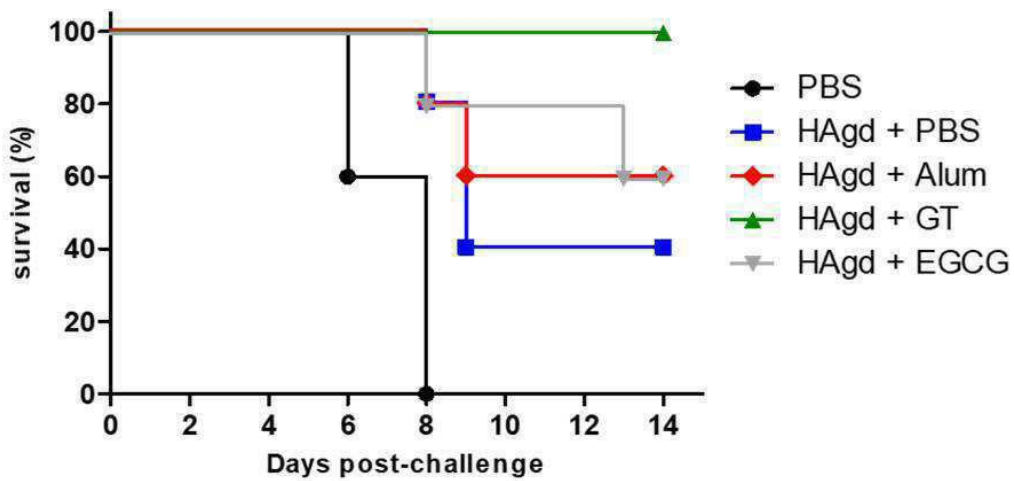
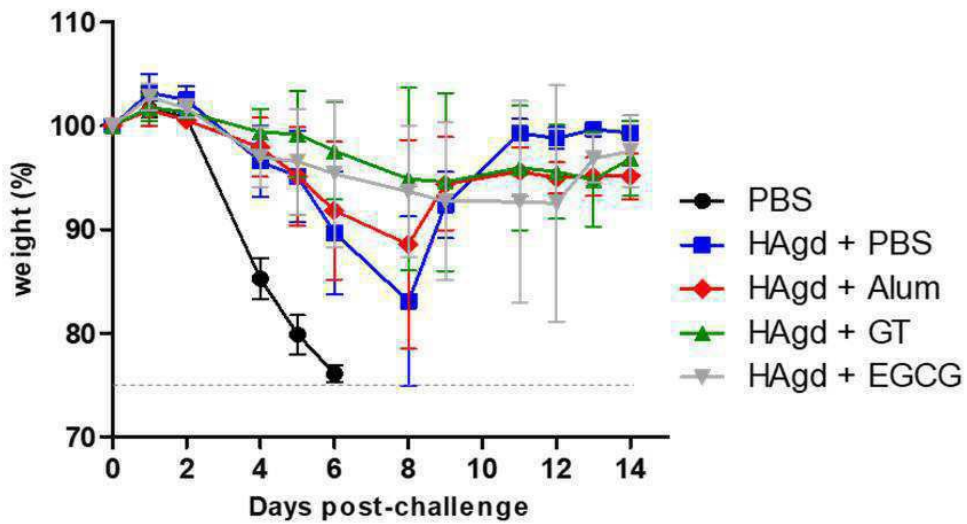
도면1b



도면1c

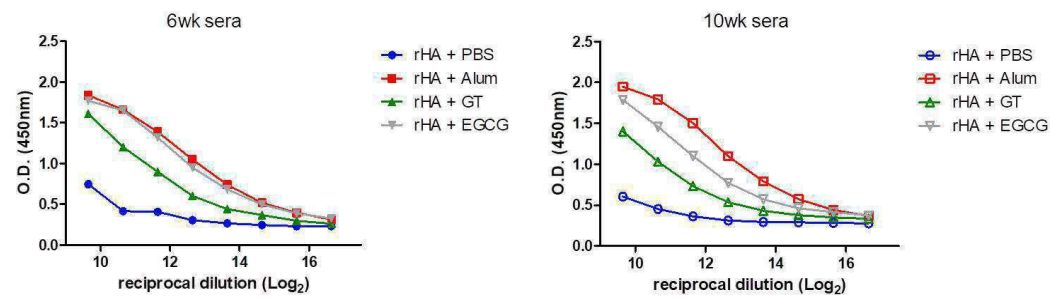


도면1d

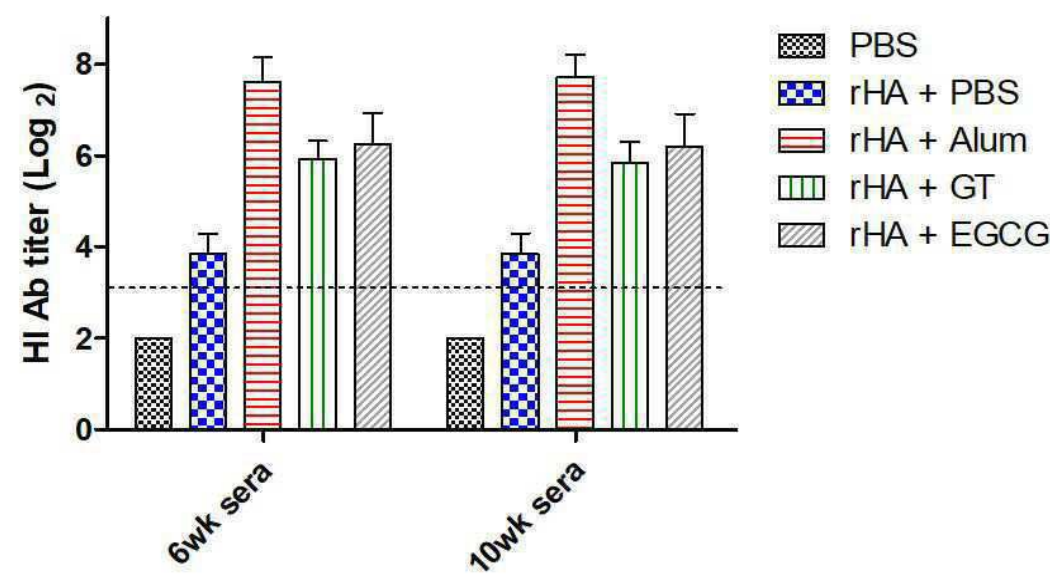




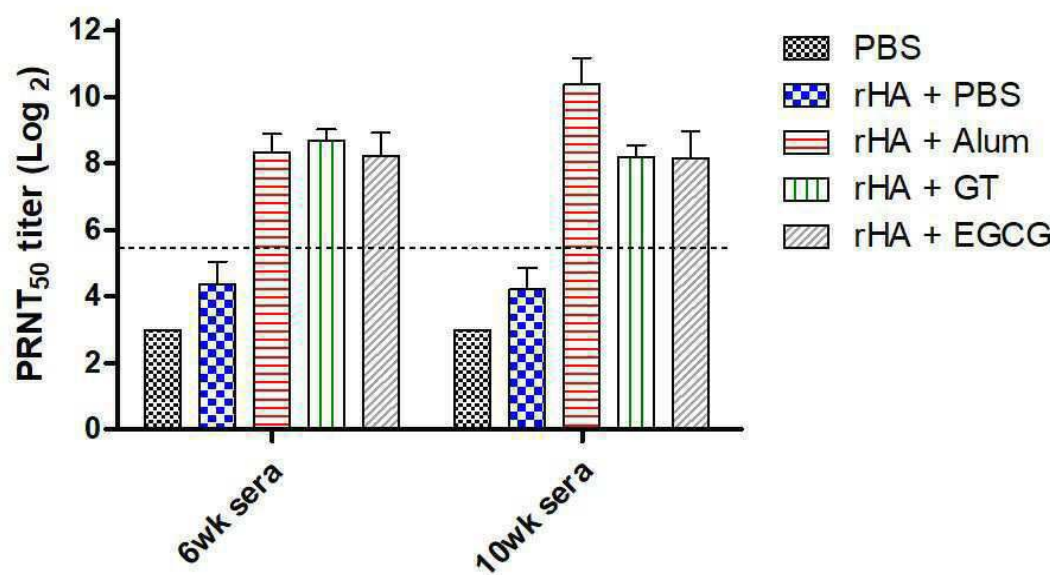
도면2a



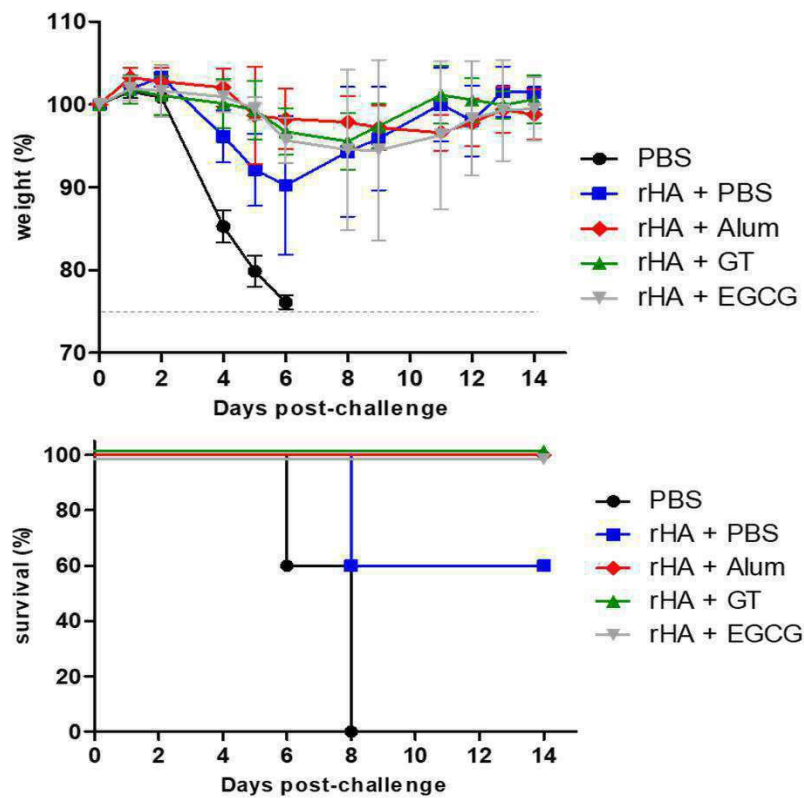
도면2b



도면2c

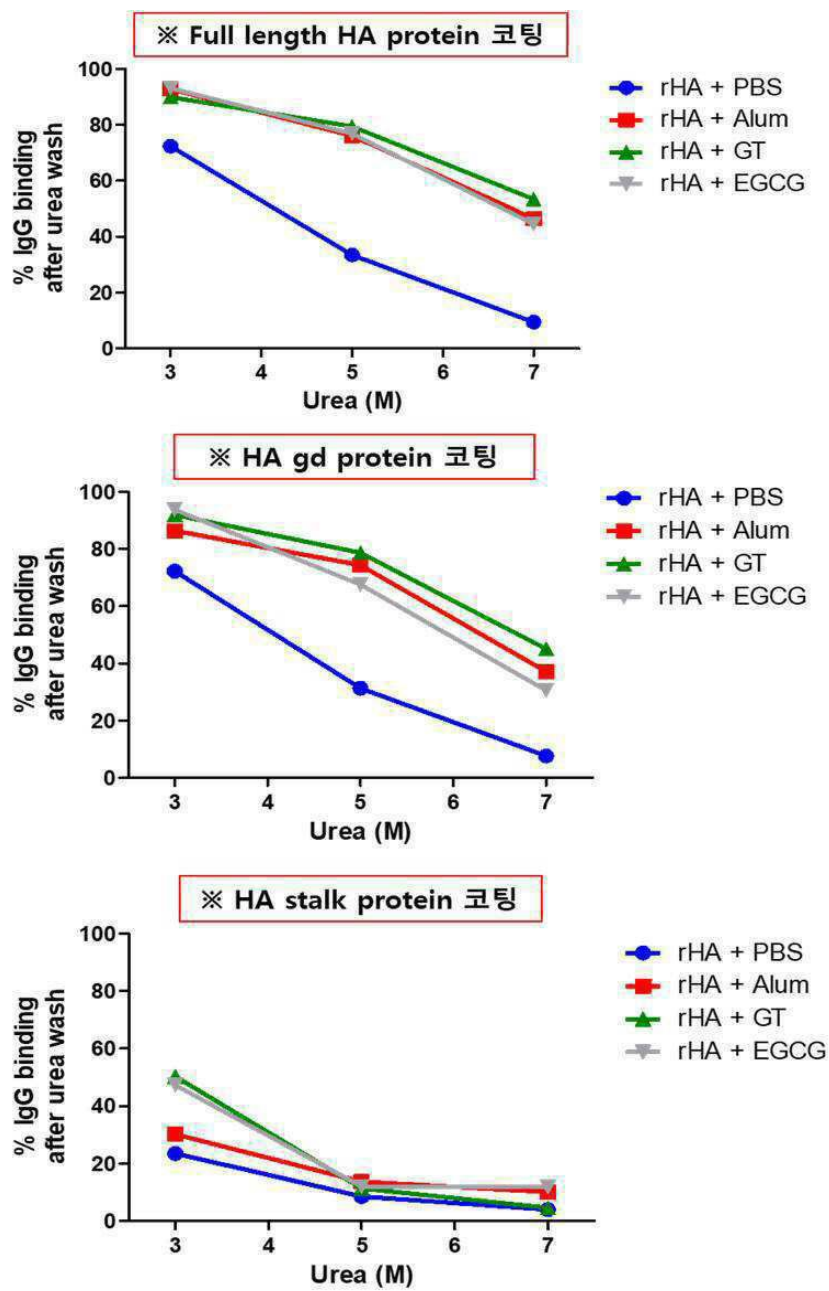


도면2d

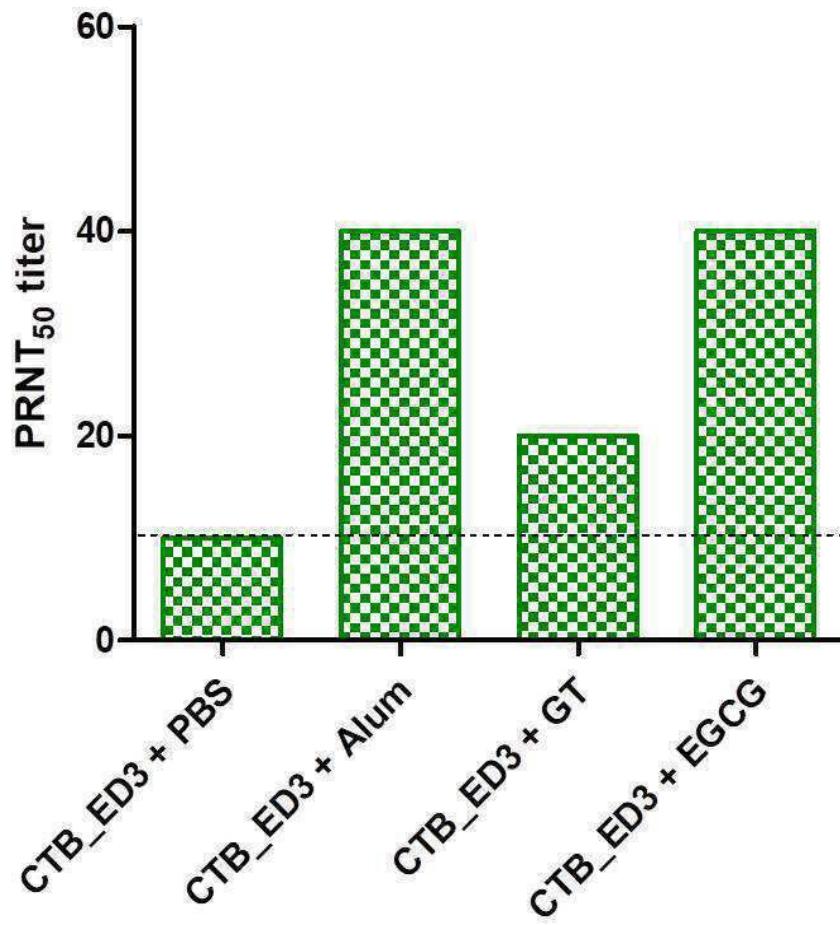




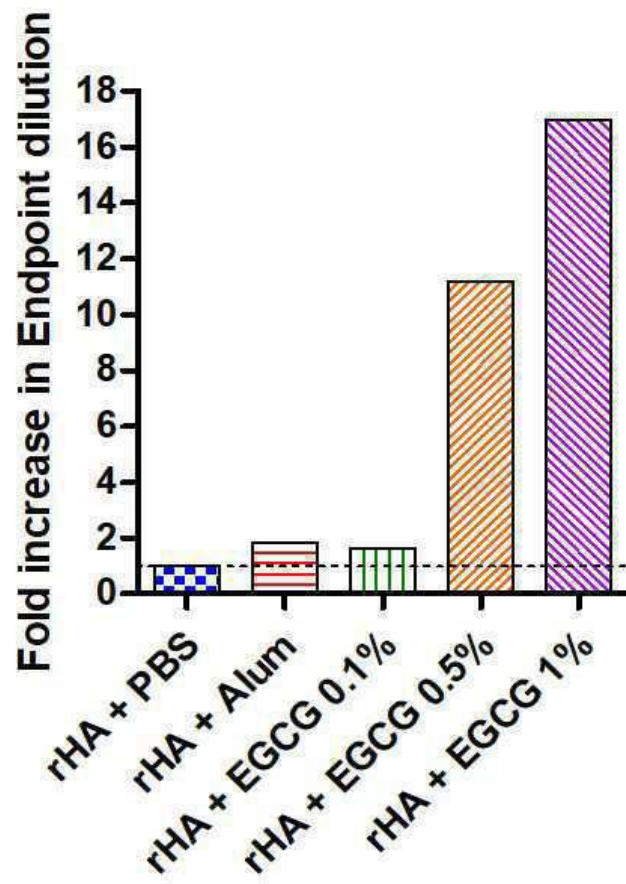
도면2e



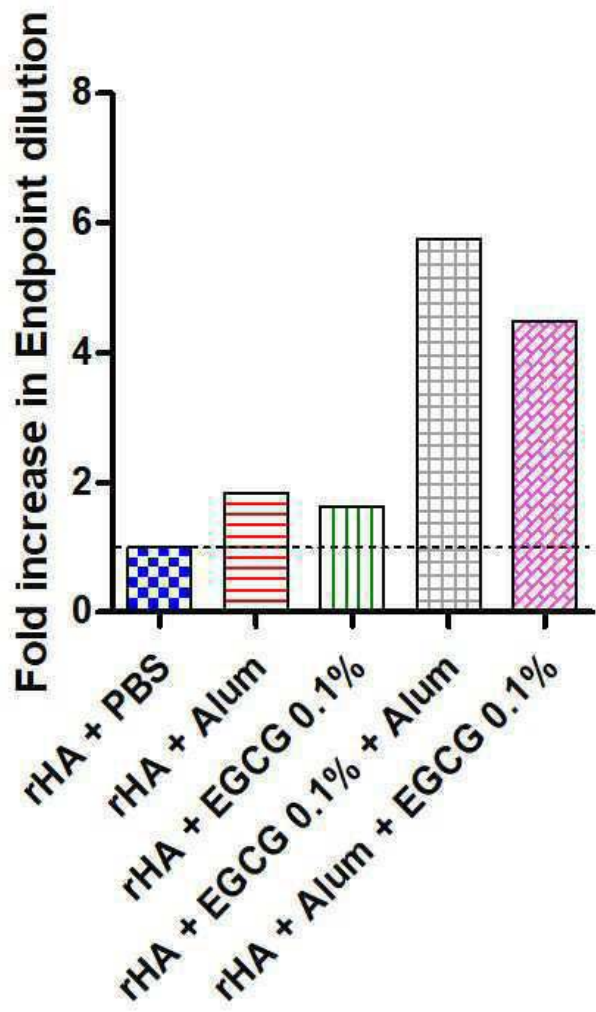
도면3



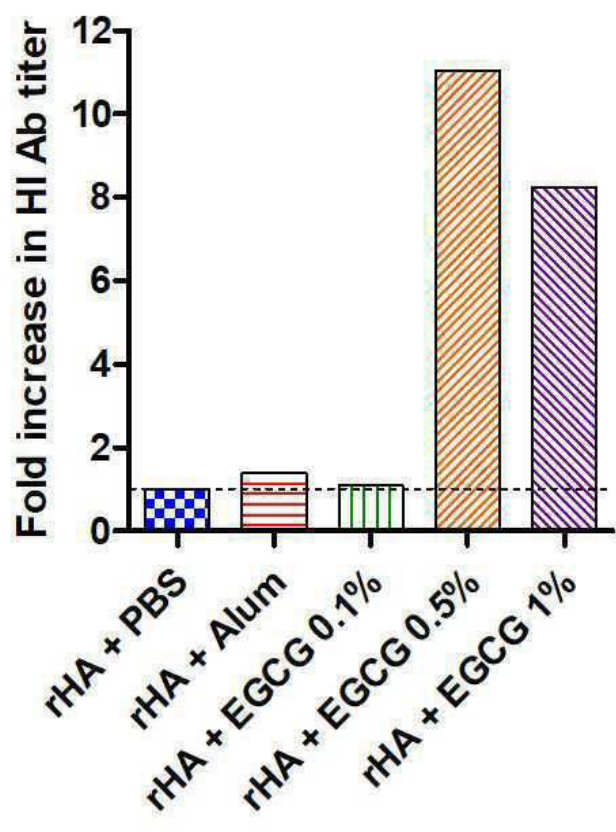
도면4a



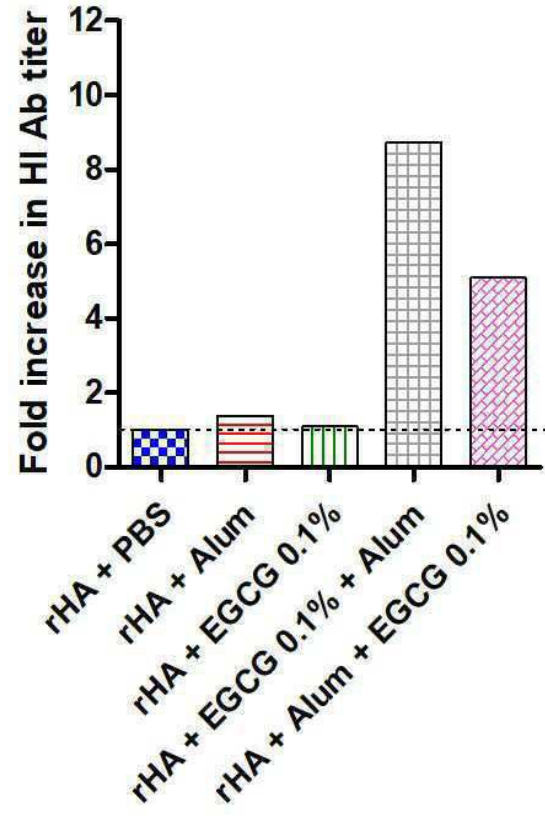
도면4b



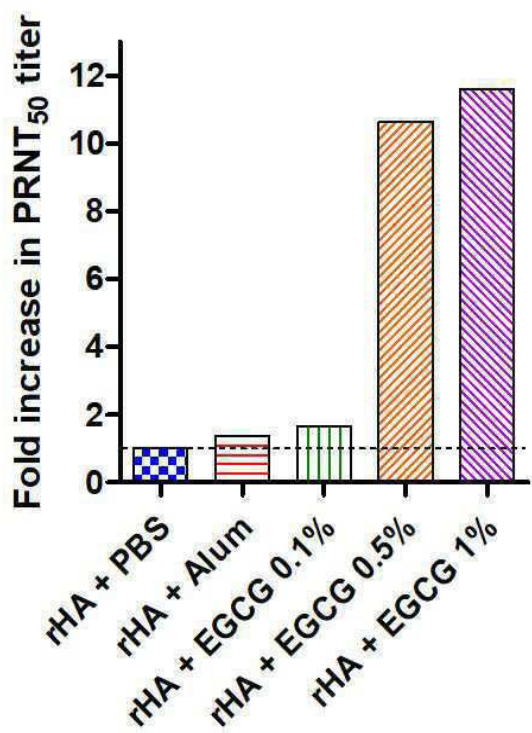
도면5a



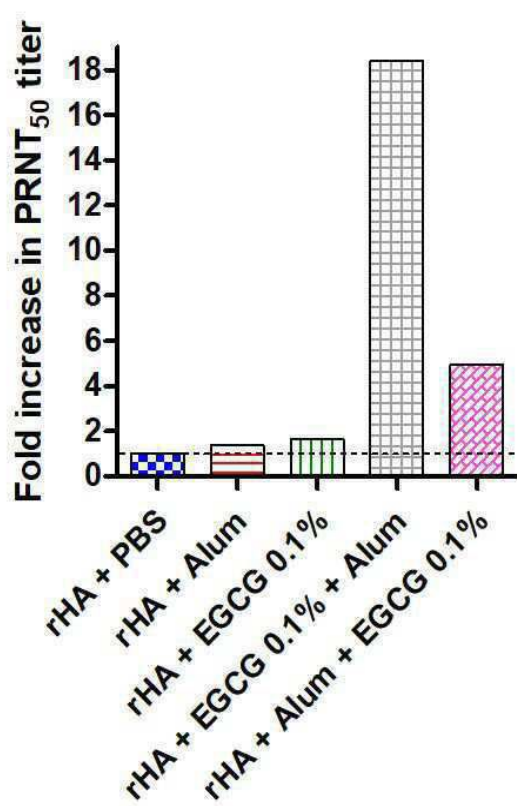
도면5b



도면6a

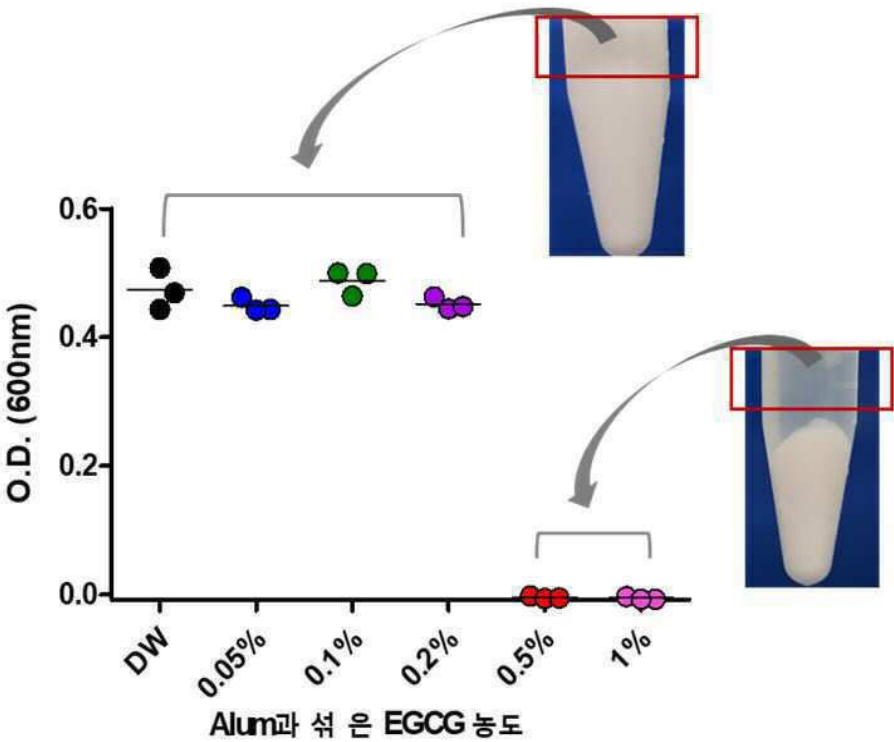


도면6b

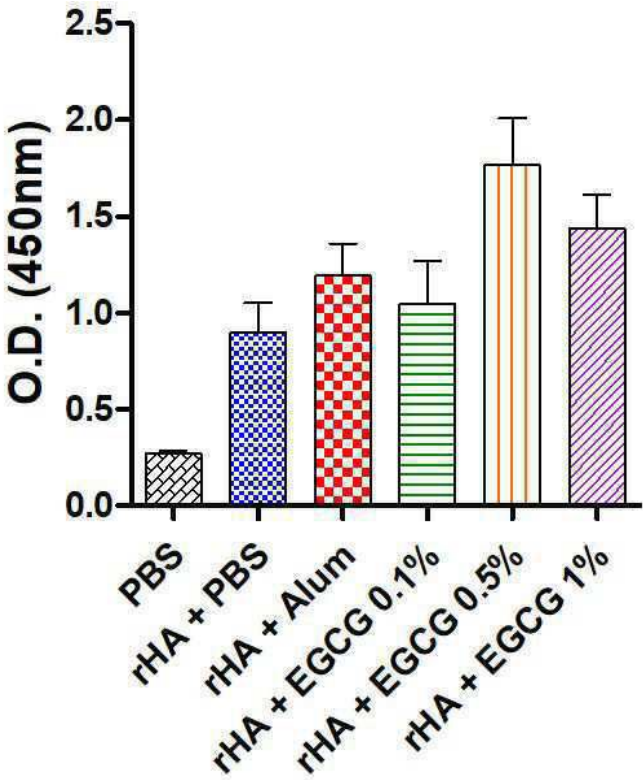




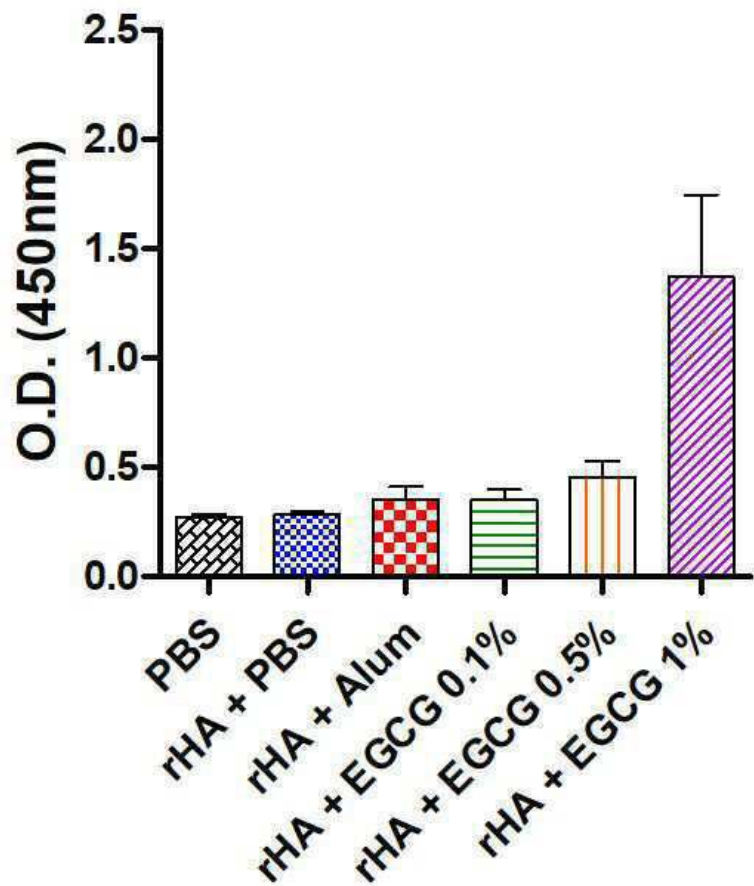
도면7



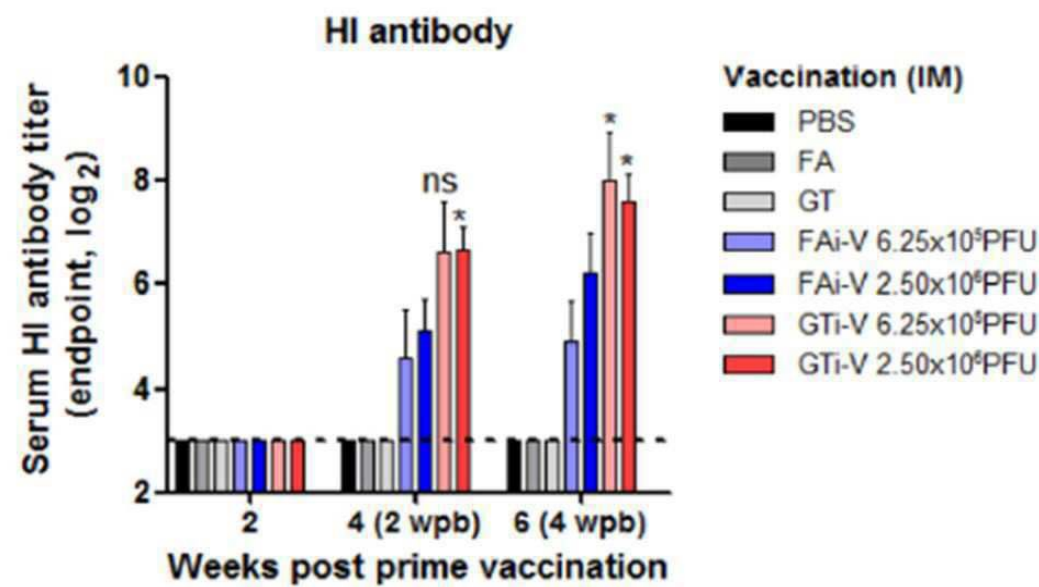
도면8a



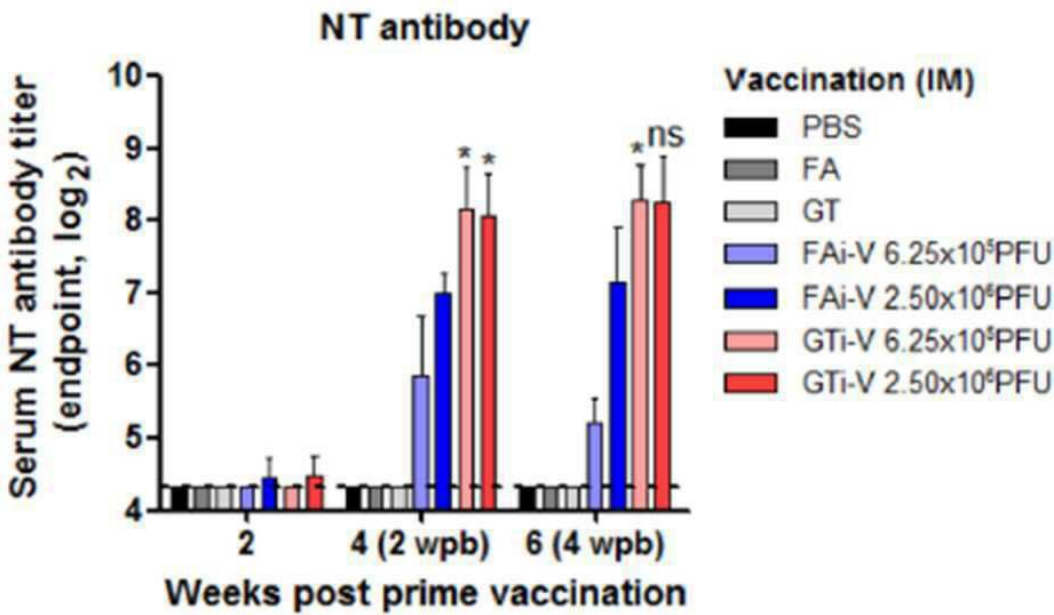
도면8b



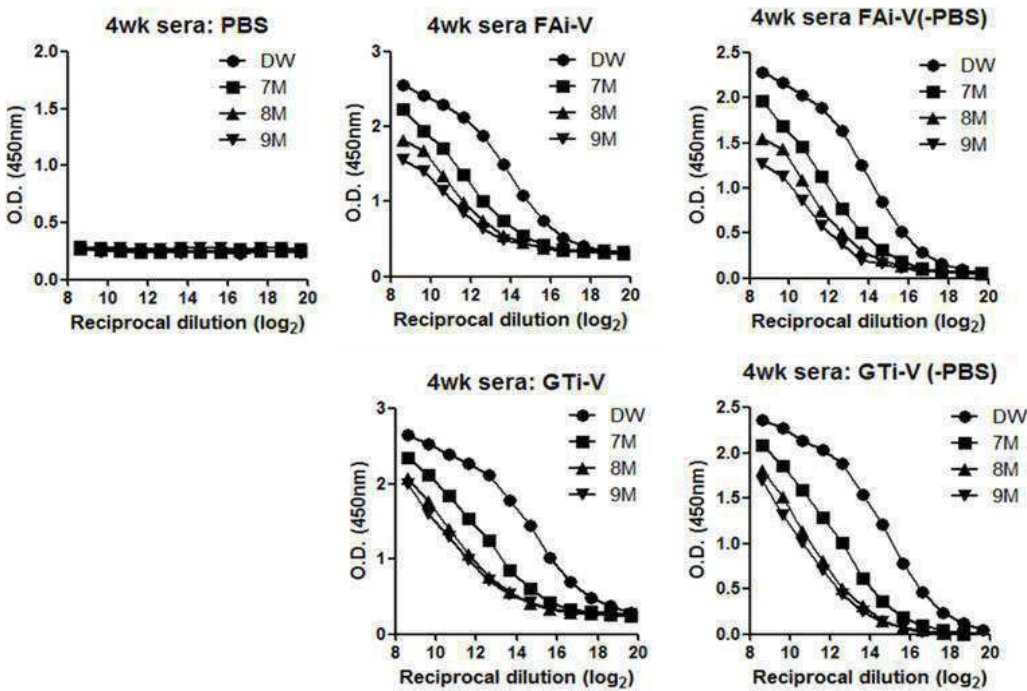
도면9a



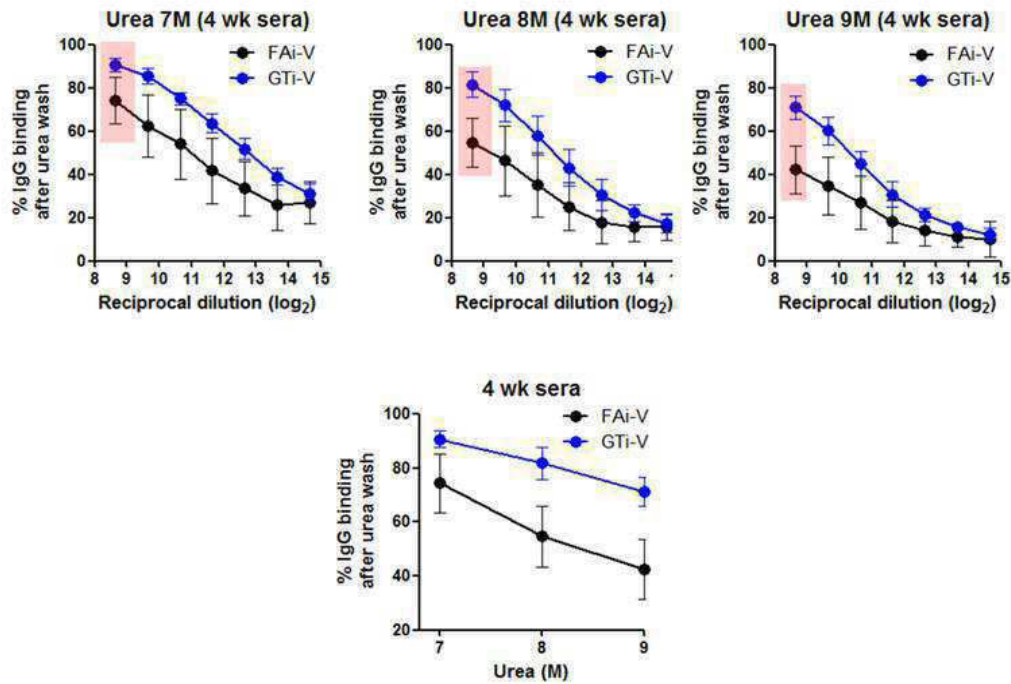
도면9b



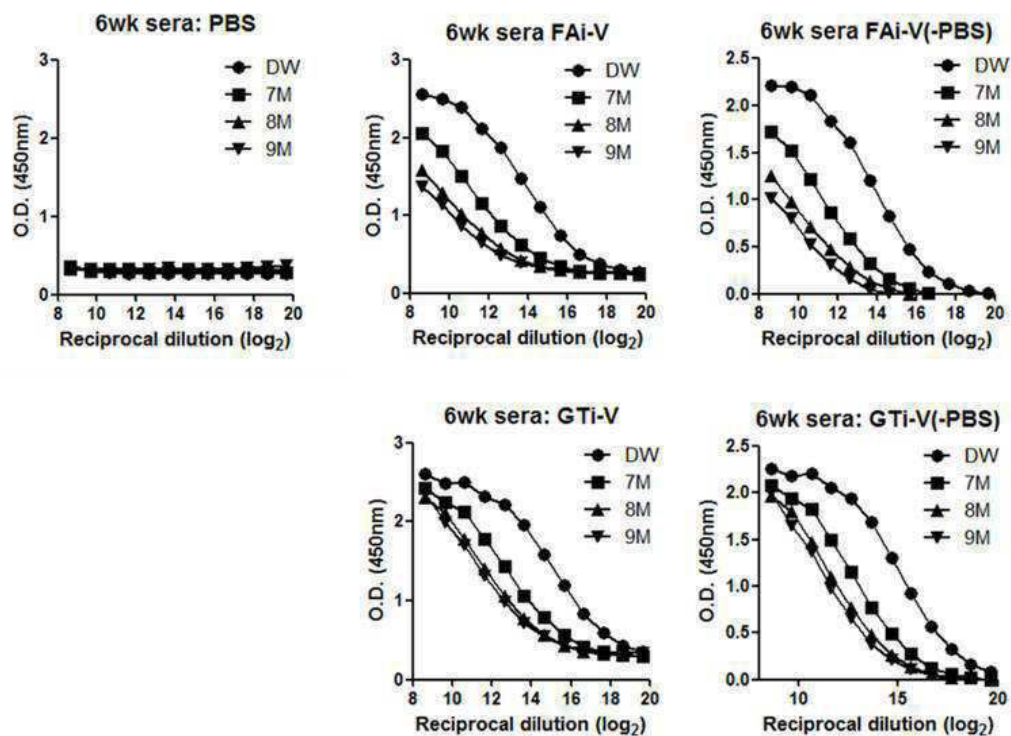
도면9c



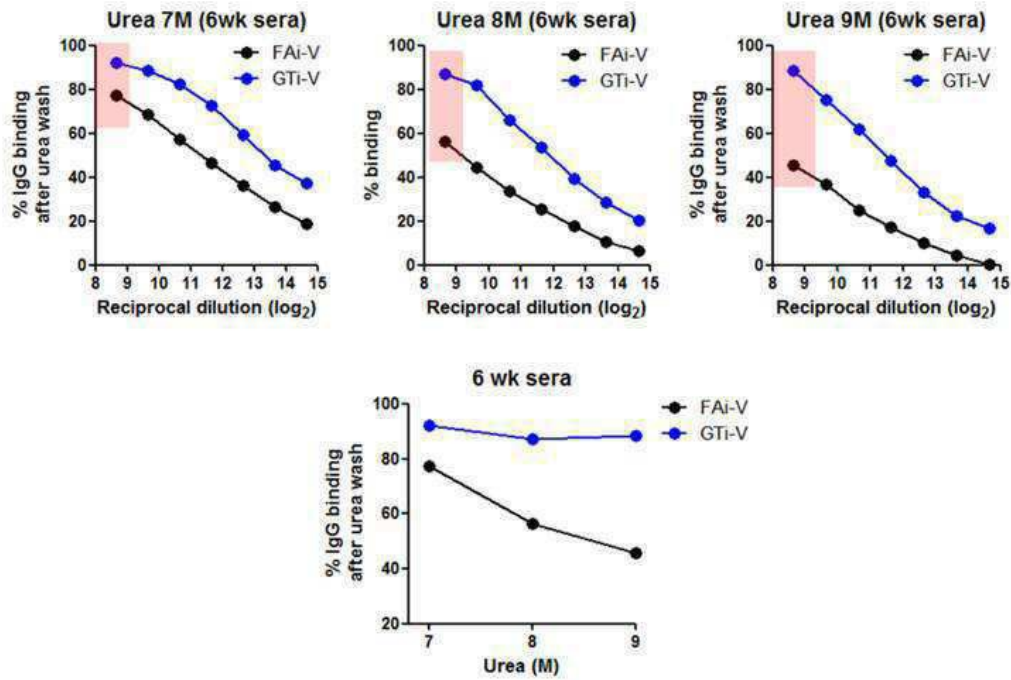
도면9d



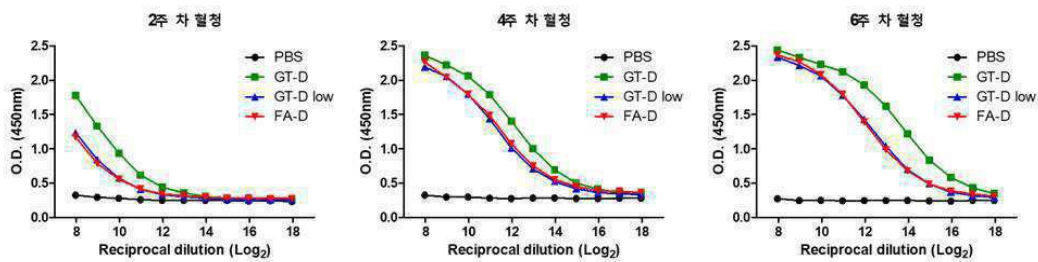
도면9e



도면9f



도면10a



도면10b

