



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0043201
(43) 공개일자 2011년04월27일

(51) Int. Cl.

A61K 39/112 (2006.01) *A61K 39/13* (2006.01)

A61K 39/145 (2006.01) *A61P 37/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0100219

(22) 출원일자 2009년10월21일

심사청구일자 2009년10월21일

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울 서대문구 신촌동 134 연세대학교

(72) 발명자

서경률

서울특별시 서초구 서초3동 엘로즈카운티 101-203

(74) 대리인

특허법인다나

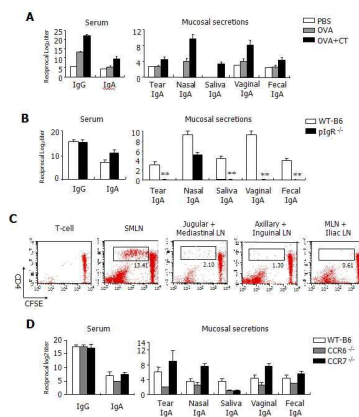
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 항원 약물을 포함하는 점안 점종용 백신

(57) 요약

본 발명은 항원 약물을 포함하는 점안 점종용 백신에 관한 것이며, 구체적으로 항원 특이적 분비형 IgA 항체의 우선적 및 선택적 산생, 국소면역 또는 점막 면역을 유도하는 기능을 발휘하는 항원약물을 유효성분으로 포함하는 점안 점종용 백신에 관한 것이다

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

항원 약물을 유효성분으로 포함하는 점안 접종용 백신.

청구항 2

제1항에 있어서

항원 약물은 전체 세균 (whole-cell bacteria) 항원, 독소이드 항원, 바이러스 항원 및 피막 다당질 항원으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는

점안 접종용 백신.

청구항 3

제2항에 있어서

전체 세균 항원은 콜레라, 백일해, 선 페스트(bubonic plague), 장티푸스 및 BCG 항원으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고,

독소이드 항원은 살모넬라, 예르시니아(*Yersinia*)속 균, 디프테리아, 파상풍 및 백일해 항원으로 이루어진 그룹으로부터 선택되며,

바이러스 항원은 홍역, 유행성 이하선염, 풍진, 생균 소아마비 및 사균 소아마비, A형 간염 바이러스, B형 간염 바이러스, 인유두종 바이러스(Human papilloma virus) 및 황열(yellow fever) 항원으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고,

피막 다당질 항원은 인플루엔자, 폐구균, 수막구균 및 헤모필루스 인플루엔자 타입 B 항원으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는

점안 접종용 백신.

청구항 4

제1항에 있어서

항원 약물은 살모넬라 항원, 예르시니아속 균 항원, 콜레라 항원 및 인플루엔자 바이러스 항원으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는

점안 접종용 백신.

청구항 5

제4항에 있어서

살모넬라 항원은 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*) 항원이고,

예르시니아속 균 항원은 예르시니아 수도투베르쿨로시스(*Yersinia pseudotuberculosis*), 예르시니아 페스티스(*Yersinia pestis*) 및 예르시니아 엔테로콜리티카(*Yersinia enterocolitica*) 항원으로 이루어진 그룹으로부터 선택되며,

인플루엔자 바이러스 항원은 H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8 및 H9 인플루엔자 A 바이러스 서브타입으로 이루어진 그룹에서 선택되는 것을 특징으로 하는

점안 점종용 백신.

청구항 6

제4항에 있어서

살모넬라 항원은 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*) 항원이고,

예르시니아속 균 항원은 예르시니아 수도투베르쿨로시스(*Yersinia pseudotuberculosis*)항원이며,

인플루엔자 바이러스 항원은 A/PR/8 인플루엔자 바이러스로부터의 하나 이상의 RNA 단편을 갖는 인플루엔자 바이러스로부터 제조되는 것을 특징으로 하는

점안 점종용 백신.

청구항 7

점안 점종용 백신은 점막 면역을 유도하는 것을 특징으로 하는 점안용 백신.

청구항 8

제7항에 있어서

점막 면역의 유도가 점막국소에 있어서의 IgA 항체의 산생 촉진에 의해 특징지어지는 것을 특징으로 하는 점안 점종용 백신.

청구항 9

제1항 내지 8항 중 어느 한 항의 점안 점종용 백신을 안구에 투여하는 것을 특징으로 하는 점막 면역의 유도방법.

청구항 10

제9항에 있어서

점막 면역의 유도가 점막국소에 있어서의 IgA 항체의 산생 촉진에 의해 특징지어지는 것을 특징으로 하는 점막 면역의 유도방법.

청구항 11

항원 약물 및 안구학적으로 허용되는 담체를 포함하는 점안 점종용 백신.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기술 분야

본 발명은 항원 약물을 포함하는 점안 점종용 백신에 관한 것이며, 특히 항원 특이적 분비형 IgA 항체의 우선적 및 선택적 산생, 국소면역 또는 점막 면역을 유도하는 기능을 발휘하는 항원약물을 유효성분으로 포함하는 점안 점종용 백신에 관한 것이다

[0001]

배경 기술

- [0002] 인간 및 동물은 외부로부터 침입해오는 박테리아나 바이러스와 같은 다양한 미생물과 밀접한 관계를 가지면서 생존해 오고 있다. 병원성 미생물에 대해 선천성 면역(innate immunity) 및 후천성 면역(acquired immunity) 시스템을 작동시켜 보호하며, 이러한 생명체의 방어 시스템을 면역체계(immune system)라 한다. 그 최전선에서 방어기능을 수행하고 있는 것이 점막 면역(mucosal immunity) 시스템이다. 최근 SARS, AIDS, 인플루엔자, 대장균, 콜레라, 결핵과 같은 질환을 일으키는 병원성 미생물은 호흡기, 소화기, 생식기 등을 덮고 있는 점막조직이다. 이러한 점막 면역 체계의 특징은 유도조직과 실행조직으로 구성되는 점막 면역 경로를 통해 지금까지의 주사제를 통한 면역유도로는 획득할 수 없었던 점막조직과 그 분비액 중에 항원-특이적 면역반응을 유도할 수 있다는 점이다. 최근 문제가 되고 있는 대개의 감염원이 호흡기, 소화기, 생식기 등의 점막을 통해서 침입하는 것을 고려할 때, 그 침입통로에 효과적인 면역방어를 구축하는 일은 매우 중요하다. 이와 같이 점막 면역체계를 이용한 감염예방대책의 개발이 최근 많은 주목을 받고 있다.
- [0003] 한편, 백신 피접종자에 있어서는 주로 면역 글로불린G (이하 「IgG」 또는 「IgG 항체」라고 약기함)가 혈중에 산생되어 체액성 면역이 유도된다. 그러나 점막면역을 담당하는 면역 글로불린A (이하 「IgA」 또는 「IgA 항체」라고 약기함)는 거의 산생되지 않아 점막면역의 성립은 기대할 수 없다.
- [0004] 또한, IgA 항체의 필요성과 유효성은 다음과 같다. IgA 항체는 공기에 의한 비강, 기관 등의 호흡기로의 감염, 또 경구에 의한 장관으로의 감염의 문호인 점막에서의 감염방어, 즉 점막면역을 담당하고 있어 임상면역상, 매우 중요한 역할을 나타내고 있다. 또, IgG 항체가 항원에 대한 특이성이 높고, 감염방어 스펙트럼이 좁으며, 항원 변이된 병원체의 감염방어에는 거의 무효인 것에 대하여, IgA 항체는 교차 면역성, 즉 교차 중화 활성이 있으므로 그만큼 감염방어 스펙트럼의 폭이 넓어 변이항원에 대한 감염도 방어한다.
- [0005] 또한, 초회 면역의 1회 접종만으로는 산생되는 IgG 항체가 낮아 확실한 효과를 기대할 수 없으므로, 그 후의 IgG 항체 보유상황에 기초하여 1회 이상의 추가접종, 소위 부스터 접종에 의해 혈중 IgG 항체가를 높일 필요가 있다. 그 때문에 경비나 노력을 반복하여 필요로 하고, 또 부스터 접종의 기회가 적은 2세 이하의 유아에게는 효과가 없는 경우가 생길 수 있다.
- [0006] 즉, 종래의 불활화된 백신이나 독소이드 등은 피접종자에게 있어서 주로 혈중 IgG 항체의 산생을 유도하고, 체액성 면역을 높이는 작용효과를 초래하여 그 유효성은 확인되고 있으나 IgA 항체 산생 내지는 점막 면역의 유도 능이 낮아 자연 감염을 방어하는데 충분한 기능과 효과에는 한계가 있다. 따라서, 종래 백신의 결점을 해소하기 위해 현재까지 다양한 측면에서 많은 시도가 이루어지고 있는데, 예컨대 백신 항원의 질적 또는 양적 개량, 불활화된 백신을 대신하는 생백신의 시험제조, 새로운 접종 루트나 점막 백신 등의 개발, 체액성 면역의 지속을 초래하는 어쥬번트의 스크리닝, 점막 면역 어쥬번트의 개발 등이다. 그러나 아직 안전 또한 유효한 점막 백신의 개발은 달성되어 있지 않으며, 비강 투여 백신 (항-계절성 인플루엔자 바이러스) 일 종만이 허가되었을 뿐인 실정이다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0007] 기존의 백신은 주로 주사를 통해 투여됨으로써 주사 투여를 위한 숙련자가 필요하다는 불편, 주사 부위가 괴사될 수 있다는 위험성 및 투여 후 전신 흡수되어 CNS 부작용을 일으킬 위험성이 크다는 단점을 가진다. 그 밖에도 주사시 상처가 나거나 통증이 유발될 수 있으며, 냉장 상태로 유통되어야 하고, 멸균하여 앰플 등에 용봉하는 제조공정을 거쳐야 하는 등 주사제는 제조 및 취급시 매우 주의를 요하는 제제 형태의 하나이다.
- [0008] 점막 백신투여 (mucosal vaccination)의 경우, 주로 분비형 IgA (SIgA) 항체를 통해 면역반응이 유도되는데, 백신투여 속도가 질병 진행속도를 따라가지 못한다면, 백신 투여를 통한 예방효과가 충분히 발현되지 못할 위험이 있다. 광역 유행성 질환이 대량의 가축에 전염되는 경우, 백신투여를 신속하게 하는 것이 필요하고, 이를 위해서는 특별한 기술이 없이도 용이하게 투여가 가능하고, 동시에 백신 투여의 효과가 충분히 발현될 수 있어야 한다. 그러나, 점막 투여루트 중의 하나인 비강 접종의 경우 항원이 중추신경계로 침투할 위험이 있어 바람직하지 못하다.

[0009] 현재 조류인플루엔자를 포함한 호흡기 감염 등 대규모 접촉이 가능한 신세대 백신의 개발이 필요한 실정이다.

과제 해결수단

[0010] 본 발명에서는 백신을 안구를 통해 투여함으로써, 효과적인 수준의 면역력이 발생한다는 점, 면역력 유도에 관련된 세포들을 증진시킴으로써 면역력을 증진시킨다는 점 및 백신을 비강 내에 투여한 경우와는 달리 항원이 CNS로 이행하지 않는다는 점을 밝힘으로써 본 발명인 점안백신을 완성하였다. 본 발명의 주사기를 사용하지 않는 점안 백신은 접종이 쉽다는 점 외에도 피하주사나 경구투여 등의 전통적 접종법에 비해 훨씬 다양한 체내 기관들에서 면역성을 유도할 수 있다는 점에서 매우 유리한 장점을 갖는다.

효 과

[0011] 안구 결막 점막을 통한 점안 투여로 유효한 점막 면역 반응 및 보호효과가 유도됨을 확인하였으며, 본 발명의 점안백신은 비숙련자도 손쉽게 투약할 수 있고, 투여 시 안구점막이 손상될 우려가 적으며, 침습적인 방법으로 투약하는 것이 아니기 때문에 등장조건만 만족하여 고통이 없고, 투여 후 항원이 CNS로 재이행할 확률이 낮아 전신부작용을 나타낼 가능성이 주사제나 비강내 접종 백신의 경우보다 훨씬 적다는 장점을 갖는다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0012] 본 발명은 항원 약물을 유효성분으로 포함하는 점안 점종용 백신에 관한 것으로서, 본 발명의 점안 점종용 백신 중에는 전체 세균 (whole-cell bacteria) 항원, 독소이드 항원, 바이러스 항원 및 피막 다당질 항원과 같은 항원 약물이 포함될 수 있다.

[0013] 본 발명의 백신 중에는 전체 세균 항원으로서 콜레라, 백일해, 선페스트, 장티푸스 및 BCG; 독소이드 항원으로서 살모넬라, 예르시니아(*Yersinia*)속 균, 디프테리아, 파상풍, 백일해; 바이러스 항원으로서 홍역, 유행성 이하선염, 풍진, 생균 소아마비 및 사균 소아마비, A형 간염 바이러스, B형 간염 바이러스, 인유두종 바이러스 (Human papilloma virus) 및 황열(yellow fever); 피막 다당질 항원으로서 인플루엔자, 폐구균, 수막구균, 헤모필루스 인플루엔자 타입 B가 포함될 수 있으나, 이로 한정되지 않는다.

[0014] 구체적으로는 살모넬라 항원, 예르시니아속 균 항원, 콜레라 항원 및 인플루엔자 바이러스 항원이 본 발명의 백신 중에 유효성분으로 포함될 수 있으며, 보다 구체적으로 살모넬라 항원은 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*) 항원일 수 있고, 예르시니아속 균 항원은 예르시니아 수도투베르쿨로시스(*Yersinia pseudotuberculosis*), 예르시니아 페스티스(*Yersinia pestis*), 예르시니아 엔테로콜리티카(*Yersinia enterocolitica*) 항원일 수 있으며, 인플루엔자 바이러스 항원은 H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8 및 H9 인플루엔자 A 바이러스 서브타입으로 이루어진 그룹에서 선택될 수 있다. 특히, 살모넬라 항원은 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*) 항원이고, 예르시니아속 균 항원은 예르시니아 수도투베르쿨로시스(*Yersinia pseudotuberculosis*) 항원이며, 인플루엔자 바이러스 항원은 A/PR/8 인플루엔자 바이러스로부터의 하나 이상의 RNA 단편을 갖는 인플루엔자 바이러스로부터 제조될 수 있다.

[0015] 본 발명은 또한 항원 특이적 분비형 IgA 항체의 우선적 및 선택적 산생, 국소면역 또는 점막 면역을 유도하는 기능을 발휘하는 항원약물을 유효성분으로 포함하는 점안 점종용 백신에 관한 것이다.

[0016] 본 발명의 점안 점종용 백신은 점막 면역을 유도할 수 있으며, 점막 면역의 유도는 점막국소에 있어서의 IgA 항체의 산생 촉진에 의해 특징지어질 수 있다.

- [0017] 본 발명은 본 발명의 점안 점종용 백신을 안구에 투여하여 점막 면역을 유도하는 방법을 제공한다. 본 발명의 점막 면역 유도 방법은 점막 면역의 유도가 점막국소에 있어서의 IgA 항체의 산생 촉진에 의해 특징지어질 수 있다.
- [0018] 본 발명은 또한 항원 약물 및 안구학적으로 허용되는 담체를 포함하는 점안 점종용 백신 조성물을 제공한다.
- [0019] 상기 "안과적으로 허용 가능한 담체" 라는 것은 광범위한 의미로 사용되는데, 여기에는 항원 약물을 함유하되, 이를 방출할 수 있는 임의의 물질 또는 조성물이 포함된다. 전형적으로 안과적으로 허용 가능한 담체로는 물 또는 수성 용액 또는 현탁액이 있지만, 또한 안구 삽입제로 사용된 것과 같은 연고 및 중합체 매트릭스를 제조하는데 사용된 오일류도 여기에 포함된다. 상기 점안 점종용 백신 조성물은, 계면활성제, 부가적인 의약을 포함하는 보조제, 완충액, 항산화제, 긴장성 조정제, 방부제, 증점제 또는 점도 개질제 등의 1종 이상을 함유할 수 있다. 제형 내의 첨가제로 바람직한 것은, 염화나트륨, EDTA, 벤잘코늄 클로라이드, 염화벤잘코늄, 질산페닐수은, 초산페닐수은, 치메로살, 소르빈산, 메틸 파라벤, 프로필 파라벤, 클로로헥시딘, 초산클로로헥시딘, 글리세린, 클로로부탄올, 페닐에칠알코올, 파라옥시안식향산 에스테르류 및 나트륨 퍼보레이트가 있으며, 특히 완충액으로는 Hind-Goyan완충액, Gifford 완충액, Palitzsch 완충액, Sorensen 인산염 완충액 등이 사용될 수 있다.
- [0020] 통상 항원 약물 성분은 조성물의 약 0.001% 내지 50중량%에서 좀 더 구체적으로는 조성물의 약 0.005% 내지 35중량% 사이에 존재하지만, 조성물과 함께 제공될 항원 약물의 양은 투여되는 요구되는 치료 복용량에 따라 좌우된다.
- [0021] 본 발명의 점안 점종용 백신은 수성점안제, 수성현탁점안제, 유성점안제, 유성현탁점안제 등의 형태로 제조될 수 있으며, 고압증기멸균법, 가열멸균법, 여과멸균법 또는 무균조작법 등의 방법으로 멸균되어 제조될 수 있다.
- [0022] 이하, 본 발명에 따르는 실시예 및 본 발명에 따르지 않는 비교예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.
- [0023] <실험방법>
- [0024] 1. 마우스 및 면역접종 프로토콜
- [0025] ① SPF BALB/c 마우스 (6-10주령): Charles River Lab. (한국)에서 구입
- [0026] ② C57BL/6 백그라운드 CCR7^{-/-} 마우스: Jackson Lab.(Bar Harbor, ME)에서 구입
- [0027] ③ pIgR^{-/-} 마우스 (Asahi et al., 2002; Shimada et al., 1999) : Dr. Masanobu Nanno (Yakult Central Institute for Microbiological Research, Japan) 제공
- [0028] ④ OVA 에피토프 (323-339)을 프리젠티하는 Balb/c 백그라운드 OVA-TCR 트랜스제닉 마우스 (D011.10): Dr. Kazuhiko Yamamoto (University of Tokyo, Tokyo, Japan) 제공
- [0029] ⑤ C57BL/6 백그라운드 CCR7^{-/-} 마우스: Dr. Martin Lipp (Max Delbruck Center for Molecular Medicine, Berlin, Germany) 제공
- [0030] 모든 마우스는 SPF(Specific pathogen free) 컨디션에서 사육되었으며, 멸균 먹이(Certified diet MF; Oriental Yeast Co., Osaka, Japan) 및 여과된 수돗물이 무제한 제공되었음.
- [0031] 실험에 앞서 케타민 (100 mg/kg of body weight, Yuhan Corporation, Korea) 및 자일라진 하이드로클로라이드 (xylazine hydrochloride, 10 mg/kg of body weight, Bayel, Korea)을 i.p.(Intraperitoneal: 복강내) 투여하

여 마우스를 마취하였음.

[0032] 결막내 면역접종시, 100 μ g의 OVA (Sigma, St. Louis, MO) 및 2 μ g의 CT (List and Biological Laboratories, Campbell, CA)를 5 μ l의 PBS에 현탁하여 결막낭에 3주 연속 매주 점안하였다.

[0033] 어떤 실험에서는, 마우스에 0.1LD₅₀ (500 pfu)의 라이브 A/PR/8 바이러스 [A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)] 또는 RASV2 스트레인 [Salmonella Typhimurium X9241]을 5 μ l 의 PBS에 현탁하여 면역접종하였다.

[0034] 2. M 세포 염색

[0035] 마우스 결막 세포의 검출에는 표준 렉틴 염색과정이 사용되었다. 전체 봉입 염색을 위해, 나이트 또는 OVA/CT 면역접종된 마우스의 소순막(small nictitating membrane)을 4℃에서 1시간 동안 4% 파라포름알데히드에 고정하고, 글루코즈 용액(10%, 20% 및 30%)에서 탈수시켰다. 검체를 OCT 화합물(Tissue-Tek, Elkhalt)에 함침시키고 -80℃에 보관하였다. 크리오스타트 섹션 (Cryostat sections, 5 μ m)을 냉(ice cold) 아세톤에 고정하고, PBS 중의 FcR2/III mAb (BD Pharmingen)로 블록시켰다.

[0036] 렉틴 염색을 위해, 조직을 20 μ g/ μ l 의 테트라메틸로다민 B 이소티오시아네이트(tetramethylrhodamine B isothiocyanate, TRITC) 컨쥬게이트드 *Ulex europaeus* 아글루티닌 (*Ulex europaeus* agglutinin, UEA-1) (UEA-1-TRITC, Vector Laboratories) 및 FITC 컨쥬게이트드 위트 점 아글루티닌(wheat germ agglutinin, WGA)로 염색하였다. 핵 염색에는 DAPI (Molecular Probes, Eugene, Oregon)을 사용하였다. 공초점 레이저 스캐닝 현미경 (confocal laser scanning microscope, Carl Zeiss, Germany)으로 섹션을 관찰하였다.

[0037] 3. 전자현미경 관찰 (Electron Microscopic Evaluations)

[0038] M 세포 특성화(characterization)를 위해 SEM 및 TEM 분석을 수행하였다.

[0039] SEM 분석의 경우, 결막 순막 조각에서 점액을 제거하고, 100 mM Hepes를 함유하는 PBS 중의 2% 글루타르알데히드 및 2% 파라포름알데히드로 실온에서 1시간 동안 고정하였다. PBS로 세척한 후, 검체를 실온에서 1시간 동안 1% 오스미움 테트록사이드(osmium tetroxide)처리하고, 그레이드된 에탄올 용액으로 탈수시켰다. 탈수 조직을 CO₂로 크리티컬 포인트 건조(critical point-dried) 시키고, 스퍼터-코팅한 후 JSM 5410LV 스캐닝 전자현미경 (JEOL, Japan)으로 관찰하였다.

[0040] TEM 분석의 경우, PBS 중의 4% 파라포름알데히드로 고정된 조직을 메탄올에 희석된 0.3% H₂O₂에 30분간 담가 내생 퍼옥시다아제를 블록시키고, 20 μ g/ml 의 PBS 중의 UEA-1-HRP에 1시간 동안 배양하였다. 그 후 3,3'-디아미노벤지딘 테트라하이드로클로라이드 (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB)로 염색하였다. 염색 후, 조직을 100 mM 소듐 포스페이트 완충액 (pH 7.3) 중의 2% 글루타르알데히드에 4℃에서 하룻밤 동안 고정하고, 이 조직을 TEM 분석(JEM 1010, JEOL, Japan)하였다.

[0041] 4. in Situ 항원 업테이크 (Antigen Uptake in Situ)

[0042] pKKGFP 플라스미드로 형질변환된 *S. typhimurium* PhoPc 스트레인은 F. Niederhang이 제공하였다. GFP-발현 *Yersinia pseudotuberculosis*는 'Jang, M.H., Kweon, M.N., Iwatani, K., Yamamoto, M., Terahara, K., Sasakawa, C., Suzuki, T., Nochi, T., Yokota, Y., Rennert, P.D., et al. 2004. Intestinal villous M cells: an antigen entry site in the mucosal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:6110-6115'에 기재된 방법에 따라 제조하였다. 마우스를 케타민/자일라진 하이드로클로라이드로 마취하였다 (i.p 주사). GFP-발현 박테리아(5x10⁸ CFU)를 5 μ l의 PBS에 현탁하고 결막낭에 접종하여 *in situ* 배양하였다. 10분 후 순막을 포함하는 전체 결막을 제거하고 콜드 PBS 및 젠타마이신(100 μ g/ μ l)을 포함하는 RPMI 미디어로 세척하였다. 결막조직을 4% 파라포름알데히드로 고정하고 글루코즈 용액(10%, 20% 및 30%)으로 탈수시켰다. 검체를 OCT 화합물 (Tissue-Tek, Elkhalt)에 함침시키고 크리오스타트 섹션을 UEA-1-TRITC로 레벨링 하였다. 전체-고정된 세그먼트

및 냉동된 섹션을 공초점 현미경으로 상기 기재한 바와 같이 관찰하였다.

[0043] 5. 점막 샘플 수집 (Mucosal sample collections)

[0044] 레트로-오비탈 블리딩(retro-orbital bleeding)으로 혈청을 수득하였다. 안구당 10 μ l의 PBS로 세척하여 누액-세척 샘플을 수득하였다. 필로카핀 (pilocarpine, 500mg/kg of body weight, Sigma, St. Louis, MO)을 마우스에 i.p. 주사 후 타액을 수득하였다. 칭량된 배설물을 0.1% 소듐 아자이드(sodium azide, 1 ml/100mg of feces)에 첨가함으로써 배설물을 수득하였다. 배설물은 볼텍스(vortex) 및 원심분리로 혼합하였고, 어세이를 위해 상등액을 모았다. 100 μ l의 PBS로 세척하여 질세척물을 모았다. 마우스를 희생시킨 후 비강 채취물 및 기관폐포 세척물(bronchoalveolar lavage, BAL) 유동액을 수득하였다. 비강 세척물은 피펫을 사용하여 비강의 전방(구강) 통로를 통해 100 μ l의 PBS를 플러싱(flushing)시켜 수득하였다. 기관을 절개한 후 22-게이지 폴리프로필렌 튜빙을 삽입하고, 600 μ l의 PBS를 넣어 폐가 천천히 부풀게 하여 BAL 유동액을 수득하였다. 주입된 PBS를 제거하고 총 3 사이클을 재주입하였다. OVA/CT-투여의 대조군으로는 PBS 단독투여 및 OVA 단독투여군을 사용하였다.

[0045] 6. ELISA 어세이 - Ag-특이적 항체 검출 (ELISA assay for detection of Ag-specific Abs)

[0046] ELISA 플레이트 (Falcon, Franklin Lakes, NJ)를 PBS 중의 OVA (1mg/ml) 또는 불활성화 A/PR/8 (5 μ g/ml) 또는 LPS(1 μ g/ml)로 코팅하여 4°C에서 하룻밤 동안 배양하였다. PBS 중의 1% BSA (Sigma)로 37°C 인큐베이터에서 1시간 반 동안 블락킹을 수행하였다. 두 배 순차적으로 희석된 샘플을 플레이트에 넣고 37°C에서 4시간 동안 배양하였다. 호스래디쉬 퍼옥시다아제(horseradish peroxidase, HRP)-컨쥬게이트드 고트(goat) 안티-마우스 IgG 또는 IgA 항체 (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL)를 각 웰에 첨가하고 4°C에서 하룻밤 동안 배양하였다. 색상 변화를 위해, TMB 용액 (TMB; Moss, Pasadena, MD)을 각 웰에 기제로 첨가하고, 실온에서 15분간 배양하였다. 스톱 용액(0.5 N HCl)을 첨가한 후, 플레이트를 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA)에 넣고 450 nm에서 측정하였다. OVA-특이적 항체의 엔드포인트 역가는 최종 희석의 대응 \log_2 역가로 표현되었으며, 백그라운드에 대해 > 0.1의 흡수도 레벨을 나타냈다.

[0047] 7. In vitro T 세포 증식 어세이 (In vitro T cell proliferation assay)

[0048] OVA 및 CT의 혼합물로 결막에 면역접종을 한 후, DC를 경부(cervical), 인후부(jugular), 종격동(mediastinal), 겨드랑이(axillary), 서혜부(inguinal) 및 장골 림프절에서 분리하였다. DO11.10 마우스로부터 분리된 CD4⁺KJ1.26⁺ T세포를 CFSE (Molecular Probes, Eugene, Oregon)로 37°C에서 15분간 레벨링하고 PBS로 수차례 세척하였다. 정제된 DC(3 x 10⁴ cells/well)를 항원이 존재하지 않는 상태에서 CD4⁺KJ1.26⁺ T 세포 (2 x 10⁵ cells/well)와 함께 37°C에서 2일간 공동-배양하였다. 세포를 채취하고, 각 조직에서의 CFSE 증식을 FACSCalibur (BD Biosciences)로 분석하였다.

[0049] 8. 점안된 Ag 추적 (Tracking of eye-dropped Ag)

[0050] 점안된 항원이 CNS로 재이행 되는지 여부를 살펴보기 위하여, OVA를 케모루미네센트 태그 아크리디니움(chemoluminescent tag acridinium)으로 레벨링하였다 (Duverger, A., Jackson, R. J., van Ginkel, F. W., Fischer, R., Tafaro, A., Leppla, S. H., Fujihashi, K., Kiyono, H., McGhee, J. R. & Boyaka, P. N. (2006) *J Immunol* 176, 1776-1783, Song, J. H., H. H. Nguyen, N. Cuburu, T. Horimoto, S. Y. Ko, S. H. Park, C. Czerkinsky, and M. N. Kweon. 2008. Sublingual vaccination with influenza virus protects mice against lethal viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:1644.). 마우스에게 40 μ g의 아크리디니움-레벨링된 OVA를 i.n.(intranasal) 또는 안구 루트를 통해 투여하고, 상기 논문에 기재된 바와 같이 면역접종 후 24시간째에 폐, OB 및 뇌를 제거하였다. 조직을 칭량하고 10 mg의 조직당(per 10 mg of wet weight tissue) 200 μ l의 셀라이틱 MT 라이시스 완충액(CellLytic MT lysis buffer, Sigma, St. Louis, MO)을 가하였다. 조직을 균질화하고 -20°C에서 냉동시켰다. 해동시킨 후 균질액(homogenate)을 10,000 x g로 10분간 원심분리하고,

상등액을 분리한 후 LMax II384 system (Molecular Devices, Sunnyvale, CA)을 사용하여 광활성을 테스트하였다.

[0051] 9. 인플루엔자 바이러스 A/PR/8/34에 대응한 보호 어세이 (Protection assay against influenza virus A/PR/8/34)

[0052] 0.1LD₅₀ (500 pfu)로 안구에 면역접종후 2주 후, 마우스를 마취하여 i.n. 루트를 통해 라이브 A/PR/8 바이러스 현탁액 (20 LD₅₀; 1x10⁵ pfu)을 20 μ l (콧구멍 당 10 μ l) 투여하였다. 마우스의 체중 감소분 및 생존률을 12일 동안 매일 모니터링하였다.

[0053] 10. 와일드-타입 악성 *Salmonella Trpfimurim* (UK-1) 스트레인에 대응한 보호 어세이 (Protection assay against the wild-type virulent *Salmonella Trpfimurim* (UK-1)strain)

[0054] RASV2 (1X10⁸ CFU)로 안구에 면역접종 후 4주 후, UK-1 스트레인 (1x10⁷ CFU)을 경구 투여하였다. 8일간 매일 체중 및 생존률을 모니터링하였다.

[0055] 11. 플레이크 어세이 (Plaque assay)

[0056] 폐 바이러스 역가 적정을 위한 MDCK (Madin-Darby canine kidney) 세포 플레이크 어세이가 상세히 기재되어 있다 (Lukacher, A.E., Braciale, V.L., and Braciale, T.J. 1984. In vivo effector function of influenza virus-specific cytotoxic T lymphocyte clones is highly specific. *J Exp Med* 160:814-826). 간략하게 보면, 감염 3일 후, 각 마우스로부터의 폐 세척물의 10-배 순차 희석액을 모았다. 각 희석액 (500 μ l)을 MDCK 단일층에 첨가하고 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 과량의 바이러스 용액을 흡인(aspiration) 한 후, 각 웰에 3mL의 아가 미디움을 깔았다. CO₂ 인큐베이터에서 2일간 배양한 후 플레이크를 세어 보았다. 결과는 이중 샘플의 각 희석액의 플레이크-형성 유니트의 평균 수로 나타났다.

[0057] <실험예 1> 점막 투여를 통한 Ag-특이적 면역반응 유도 실험

[0058] 결막내 투여를 통해서도 Ag-특이적 항체 반응이 유도되는지 여부를 테스트하였다. 100 μ g OVA 단독, 2 μ g의 CT-보조-OVA (CT-adjuvanted-OVA)를 결막을 통해 투여 받은 마우스 그룹의 경우, PBS를 투여 받은 대조군에 비하여 OVA-특이적 IgG 및 IgA 항체가 점막부위, 누액, 비 세척액(nasal wash), 타액, 질 세척액 및 배설물에서 높은 수준으로 검출되었다 (도 5A).

[0059] OVA 단독 투여의 경우, 감지될 정도의 혈청 항-OVA IgG 또는 IgA 항체가 유도되었으나, (OVA + CT) 혼합물 투여 그룹에서 항-OVA IgG 또는 IgA 항체 반응이 PBS 또는 OVA 단독 투여 그룹에 비하여 높은 것으로 나타났다. (OVA + CT)를 결막내 투여한 경우 점막 IgA 항체 역가가 증가하였다.

[0060] 결막에서 유도된 IgA가 분비형(secretory nature)인지 여부를 측정하기 위하여 2량체 IgA의 경피 수송을 막은 중합성 Ig 수용체 (pIgR)^{-/-} 마우스를 사용하여 실험하였다. 도 5B에 도시한 바와 같이, 와일드 타입 마우스에 결막 내 투여한 경우 동등한 정도로 혈청 IgG 및 IgA 항체가 생성되었으나, OVA-특이적 IgA 항체는 pIgR^{-/-} 마우스의 누액, 타액, 질 세척액 및 배설물에서 검출되지 않았다. 비록 IgA 항체가 pIgR^{-/-} 마우스의 비 세척액에서 일부 검출되기는 하였으나, 이는 비 세척액을 준비하는 과정 (비강 절단)에서의 혈액-오염 때문인 것으로 보인다.

[0061] 본 실험 결과, 결막내 Ag 투여로 인하여 유도되는 대부분의 Ag-특이적 IgA 항체는 SIgA인 것을 알 수 있다.

[0062] <실험예 2> 결막내 투여한 Ag의 아래턱밑 림프절로의 배출

[0063] 결막내 백신투여 후 Ag이 T 세포 상에 프리젠티되는 곳 - 림프절의 해부학적 위치 측정을 위하여, (OVA+CT) 단

일용량을 투여한 후 24시간 후 BALB/c 마우스의 림프절 세포를 배양하였고, 5-(및-6)-카복시플루오레신 디아세테이트 석시니미딜 에스테르(5-(and-6)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, CFSE)로 염색된 OVA-TCR 트랜스제닉 마우스 (DO 11.10)로부터 분리된 CD4+KJ1.26⁺ 세포와 함께 공동-배양하였다.

[0064] T 세포 단독 그룹에 비하여, 아래턱 림프절(SMLN)로부터 분리된 단핵 세포와 공동-배양한 CD4+KJ1.26⁺ 세포만이 현저한 증식(proliferation) 양상을 보였다. 기타 단핵 세포, 경부, 종격동, 겨드랑이, 사타구니, 상관막혈관, 장골 림프절을 포함하는 다른 림프절로부터의 단핵 세포와 공동-배양한 CD4+KJ1.26⁺ 세포의 경우, 현저한 증식양상을 나타내지 않았다 (도 5c).

[0065] <실험예 3> 점안 면역접종 후 면역반응 측정 (CCR6 not CCR7-dependent Ag-specific immune responses of eyedrop immunization)

[0066] OVA-특이적 항체 반응이 CCR6 또는 CCR7에 의존적인지 여부를 실험해 보았다. 최근 코, 구강 및 턱 림프 루트에서 (T 및 B 세포를 포함하는) 항원-특이적 전신 및 점막 면역 반응에 케모카인(chemokine)이 중요한 역할을 한다는 연구결과가 있기 때문이다 (Takamura K, Fukuyama S, Nagatake T, Kim DY, Kawamura A, Kawauchi H, Kiyono H. Regulatory role of lymphoid chemokines CCL19 and CCL21 in the control of allergic rhinitis. J Immunol. 2007 Nov 1;179(9):5897-906)(Cook DN, Prosser DM, Forster R, Zhang J, Kuklin NA, Abbondanzo SJ, Niu XD, Chen SC, Manfra DJ, Wiekowski MT, Sullivan LM, Smith SR, Greenberg HB, Narula SK, Lipp M, Lira SA. CCR6 mediate dendritic cell localization, lymphocyte homeostasis, and immune response in mucosal tissue. Immunity. 2000 May;12(5):495-503.)(Iwasaki A, Kelsall BL. Localization of distinct Peyer's patch dendritic cell subsets and their recruitment by chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-3alpha, MIP-3beta, and secondary lymphoid organ chemokine. J Exp Med. 2000 Apr 17;191(8):1381-94)(Salazar-Gonzalez RM, Niess JH, Zammit DJ, Ravindran R, Srinivasan A, Maxwell JR, Stoklasek T, Yadav R, Williams IR, Gu X, McCormick BA, Pazos MA, Vella AT, Lefrancois L, Reinecker HC, McSorley SJ. CCR6-mediated dendritic cell activation of pathogen-specific T cells in Peyer's patches. Immunity. 2006 May;24(5):623-32.)(Jang MH, Sougawa N, Tanaka T, Hirata T, Hiroi T, Tohya K, Guo Z, Umemoto E, Ebisuno Y, Yang BG, Seoh JY, Lipp M, Kiyono H, Miyasaka M. CCR7 is critically important for migration of dendritic cells in intestinal lamina propria to mesenteric lymph nodes. J Immunol. 2006 Jan 15;176(2):803-10.).

[0067] (OVA+CT)를 어쥬번트로 결막 점종 후 전신 (즉, 혈청) 및 점막 부위 (즉, 누액, 비강 세척액, 타액, 배설물 및 질 세척물)에서의 OVA-특이적 항체 역가를 구했다.

[0068] CCR6-/- 마우스의 경우, 점막 부위에서 OVA-특이적 IgA의 레벨이 현저하게 감소한 것으로 나타났으나 (도 5d), CCR7-/- 마우스의 경우 와일드 타입 마우스와 별다른 차이를 보이지 않았다. 이로써, 결막을 통해 유도되는 체액성 면역 반응이 CCR7 의존성이 아니고, CCR6 의존성 매너로 조절된다는 점을 알 수 있다.

[0069] <실험예 4> 점안 면역접종에 의한 결막 순막에서의 결막-연계성 림프 조직(CALT)의 유도 (Induction of conjunctiva-associated lymphoid tissue (CALT) in the nictitating membrane of conjunctiva by eyedrop immunization)

[0070] 결막내 항원 적용 그 자체로서 결막 조직에 변화를 일으킬 수 있는지 여부를 평가하기 위하여, 전체 안구 검체를 조직학적 염색법 및 전자현미경 방법을 사용하여 관찰했다. 결막 및 각막, 처치 안구의 점막 표면에는 결막 면역접종 후 특별한 감염이 보이지 않았다 (Fig.1A). 그러나, 순막 (제3의 눈꺼풀: 인간의 플리카 세미루나리스와 상동)에서는, 주 3회 보조-OVA 처치된 마우스 군의 경우 결막-연계성 림프 조직(CALT)가 관찰되었는데, 이는 나이브 상태의 마우스에서는 거의 관찰되지 않는 것이다. 최근 클라미디아 트라코마티스 세로바 C 또는 오프알부민 및 콜레라 독소 B 용액 (OVA/CT-B)을 외용 투여한 마우스의 70%에서 CALT가 유도되었다는 연구결과가 보고된 바 있다 (Steven P, Rupp J, Huttman G, Koop N, Lensing C, Laqua H, Gebert A. Experimental induction

and three-dimensional two-photon imaging of conjunctiva-associated lymphoid tissue. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2008 Apr;49(4):1512-7.)

- [0071] <실험예 5> 점안 면역접종에 의한 순막에서의 뮤신-생성 고블렛 세포 및 M-세포 유사 세포의 증가 (Increase of mucin-producing goblet cells and M-cell like cells on the nictitating membrane by eyedrop immunization)
- [0072] CT-보조 OVA를 결막에 노출시킨 후 주사전자현미경(Scanning electron microscopy, SEM)을 통해 산재하는 불규칙한 마이크로빌리를 갖는 디프레스된 세포(depressed cells with sparse and irregular microvilli)의 수 및 사이즈 증가를 관찰하였고 PBS-처리 결막과 비교하였다 (도 1B a,b Vs. d, e). SEM으로 상피세포로부터의 구분되는 피쳐드 세포(featured cell), 즉 불규칙한 마이크로빌리를 갖는 디프레스된 표면을 볼 수 있었다. 이러한 세포들은 두 가지 타입의 세포로 분류할 수 있는데, 하나는 라운드 탑 및 곧은 마이크로빌리를 갖는 클러스터를 쉽게 형성하는 것이고, 이들은 결막의 고블렛 세포에서만 관찰될 수 있다 (도 1B-c, f). 다른 하나는 클러스터를 만들지 않는 것인데, 클러스터를 형성하는 세포보다 깊이가 얇고 불규칙한 마이크로빌리를 더 많이 갖고 있다 (도 1B-g, h, i). 결막 M 세포의 마이크로빌리는 보통 결막 상피세포에서 보다 산재되어 있고 불규칙하며, 다른 동물들에서 특이적 특성이다 (Liu H, Meagher CK, Moore CP, Phillips TE. M cells in the follicle-associated epithelium of the rabbit conjunctiva preferentially bind and translocate latex beads. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2005 Nov;46(11):4217-23.)(Meagher CK, Liu H, Moore CP, Phillips TE. Conjunctival M cells selectively bind and translocate Maackia amurensis leucoagglutinin. Exp Eye Res. 2005 Apr;80(4):545-53.).
- [0073] HRP-컨쥬게이트드 UEA-1⁺ (DAB reacted)의 결합 후 투과전자현미경 (Transmission electron microscopy, TEM) 분석을 통해 결막의 순막에서 UEA-1⁺ 세포가 UEA-1⁻ 결막 상피 세포와는 구별되는 마이크로빌리 및 형상을 가진다는 점을 관찰하였다 (도 1C-a,b). UEA-1⁺ 세포 중 곧은 마이크로빌리를 갖는 클러스터화된 세포는 그 세포질에 고블렛 세포의 특이적 특성인 많은 소낭을 갖고 있다 (도 1C-c, d). 더 불규칙하고 조악한 UEA-1⁺ 마이크로빌리를 갖는 다른 세포들은 (도 1C-f) 세포막 바로 아래에 침윤성 단핵세포를 갖고 있었으며 (도 1C-e), 소장 M 세포의 바로 아래에 있는 포켓 림프세포의 특징과 유사하였다.
- [0074] <실험예 6> 마우스의 결막 상피세포층에서의 UEA-1+ 세포 (UEA-1+ cells in the conjunctival epithelium of mice)
- [0075] α(1,2) 푸코즈 (α(1,2) fucose)의 발현은 마우스 M 세포임을 증명하는 것이며, 그것에 의하여 α(1,2) 푸코즈에 대해 친화성을 갖는 렉틴 UEA-1가 마우스에서 M 세포를 검출하기 위하여 루틴하게 사용되어왔다. 비록 UEA-1이 고블렛 세포와 반응하지만, 위트 점 아글루티닌(wheat germ agglutinin, WGA)과 같은 상피세포 특이적 렉틴에 대해 강한 친화력을 갖고 있다. 유세포 분석기(Flow cytometry) 및 공초점 현미경 분석은 UEA-1 및 WGA 특이성에 기인하여 M 세포 및 고블렛 세포의 정성 및 정량적 분석에 유용한 것으로 여겨졌다. TRITC-컨쥬게이트드 UEA-1 (red) 및 FITC-레벨링된 WGA (green)으로 염색된 전체-마운트 마우스 결막에 대해 공초점 이미지 분석을 수행하여, 마우스 결막의 순막에서 M 세포-유사 세포를 나타내는 UEA-1⁺WGA⁻ 세포를 발견하였다 (도 1A, B-a, c, 및 도 2A-a, b; arrow).
- [0076] 냉동 섹션의 분석결과 결막의 순막에 UEA-1⁺WGA⁻ 세포가 존재하는 것으로 관찰되었다 (도 2A-c and d; arrow). 이러한 결막의 M 세포-유사 세포 (UEA-1⁺WGA⁻)는 분명히 고블렛 세포(UEA-1⁺WGA⁺ 세포)로부터 발견된 것이다 (도 2A; arrowhead).
- [0077] 유효한 점막 조절자(potent mucosal modulator)가 결막에서 M 세포-유사 세포를 유도하는지를 알아보기 위하여, 면역접종된 마우스 및 나이브 마우스 결막의 UEA-1⁺WGA⁻ 세포의 수를 비교해 보았다. 흥미롭게도, OVA 및 CT로 결

막 면역접종한 후 나이브 마우스에 비하여 결막 순막의 UEA-1⁺WGA⁻ 세포의 수가 현저하게 증가하는 것으로 나타났다 (전체 마운트 조직 - 도 2A-b, 횡단면 도 2A-d 참조, 도 2A-a 및 c 참조).

[0078] <실험예 7> UEA-1⁺ 세포에 의한 박테리아의 결합 및 내면화(Attachment and internalization of bacteria by UEA-1⁺ cells)

[0079] 병원성 미생물을 잡는 UEA-1⁺ 세포 능력을 측정하기 위한 실험을 수행하였다. 마우스에 녹색 형광(GFP)을 발현하는 r살모넬라 티피뮤리움(*rSalmonella typhimurium*) 및 예르시니아 수도투베르쿨로시스(*Yersinia pseudotuberculosis*)를 결막상에 접종하였다. in situ에서 각 박테리아를 접종하고 10분 후, 결막에 대해 순차적 면역조직화학적 분석을 수행한 결과, 나이브 마우스의 결막상피세포의 전체 마운트중의 UEA-1⁺ 세포내에 r*Salmonella*-GFP가 존재하는 것이 밝혀졌다 (도 3-a, b, c). 또한, *Yersinia*-GFP 또한 결막 상피세포층의 UEA-1⁺ 세포와 특이적으로 부착되어 있었다 (도 3-d, e). 박테리아를 내면화하는 UEA-1⁺ 세포 능력을 측정하기 위하여 r*Salmonella*-GFP를 사용하여 결막 감염 실험을 하였고, 냉동 섹션을 이용하여 분석하였다. 실험 결과 r*Salmonella*-GFP는 UEA-1⁺ 세포의 세포내에 위치하는 것으로 나타났다 (도 3-c). 이와 같은 점에 비추어, 결막 순막내의 UEA-1⁺ 세포는 루멘으로부터 박테리아를 잡아서 내면화하는 능력을 갖고 있음을 알 수 있다.

[0080] <실험예 8> A/PR/8 바이러스의 점안 투여를 통한 특이적 전신 및 분비성 항체 반응 유도(Eyedrop administration of A/PR/8 Virus induces Specific systemic and secretory Ab responses)

[0081] 호흡기 감염 인플루엔자 바이러스인 A/PR/8 바이러스로 결막내 면역 접종한 경우의 효능을 알아보기 위하여, 마우스 그룹에 0.1LD₅₀ (500 pfu) 용량의 라이브 A/PR/8 바이러스를 부스팅 없이 투여하였다.

[0082] i.n. 투여한 마우스와는 다르게, 점안 면역접종한 경우, 마우스에 대해 치명적이지 않은 것으로 나타났다 (도 6).

[0083] 0.1LD₅₀ 의 라이브 A/PR/8 바이러스의 면역원 및 보호능을 실험하였다. 안구 루트를 통해 라이브 A/PR/8 바이러스를 싱글 투여한 경우, 혈청 중의 A/PR/8 바이러스-특이적 IgG 항체 레벨 및 점막 분비액 (예컨대, 타액, 호흡기액, 질 세척액 및 각 안구로부터의 누액) 중의 IgA 레벨이 PBS 대조군에 비하여 현저하게 상승하는 것으로 나타났다 (도 6B). 라이브 A/PR/8 바이러스를 점안 면역접종 한 경우 BAL로부터 인플루엔자 바이러스가 효과적으로 제거되는 것으로 나타났으며 (도 6C), A/PR/8 바이러스를 i.n. 루트를 통해 치사량 (20LD₅₀; 1x10⁵ pfu) 투여한 경우에 있어서도 100%의 보호 효능을 나타냈다 (도 6C). 라이브 A/PR/8 바이러스를 i.n. 투여한 경우와는 달리, 점안 투여한 경우 치명적 효과는 나타나지 않았고, 면역 반응을 유도했다.

[0084] <실험예 9> RSV2 스트레인 살모넬라 티피뮤리움 점안 투여를 통한 특이적 전신 및 분비성 항체 반응 유도(Eyedrop administration of RSV2 strain Salmonella typhimurium induces Specific systemic and secretory Ab responses)

[0085] 결막내 면역접종의 다른 병원(pathogen) (장티푸스 및 설사를 야기하는 구강 감염성 살모넬라 종)에 대한 효능을 조사하기 위하여, 마우스에 약독화 RSV2 스트레인 살모넬라 티피뮤리움을 (1x10⁸ CPU) 점안 면역접종하였다. 면역접종 후 4주 후, 전신 및 점막 분비액 중의 LPS (살모넬라에 발현된 독신 분자) 레벨을 측정하였다. 혈청 IgG 및 점막 분비액 IgA가 크게 증가하였다 (도 7A).

[0086] RSV2로 면역접종이 와일드-타입 악성 살모넬라 티피뮤리움 (UK-1) 스트레인에 대한 보호효능을 나타낼 수 있는지를 실험하였다. 마우스군에 치사량 (1x10⁷ CFU) 의 UK-1 스트레인을 경구로 투여하였다. 8일 동안 사망률을 모니터링 한 결과, 결막 면역접종한 마우스의 경우 체중감소 없이 모두 살아남은 것으로 나타났다 (도 7B). 약독화 살모넬라 스트레인을 점안 루트로 면역접종한 경우 종전 호흡기 감염성 인플루엔자 바이러스에서와 같이 치사량의 장내세균(enteric bacteria), 살모넬라 와일드-타입 스트레인 (UK-1)에 대한 보호능이 증진될 수 있다는 점을 알 수 있다.

[0087] 이와 같은 점을 고려해 볼 때, 점안 백신 루트가 다양한 병원 (호흡기 또는 장내 감염성 병원균)에 대하여 효과적인 점막 백신 투여 루트임을 알 수 있다.

[0088] <실험예 10> 점안 투여된 항체의 CNS로의 재이행 여부 측정(Eyedrop administrated Ag does not redirect antigens to the CNS)

[0089] 백신 항원이 i.n. 투여 후 CNS로 이행하는 것은 안전상 문제를 야기한다. 이러한 이행은 i.n. 루트로의 임상 적용시 심각한 문제를 야기하게 되므로 점안 백신의 임상 적용시 항원이 CNS로 이행하여 유사한 한계점을 갖는지 여부를 살펴보기로 하였다.

[0090] 아크리디니움-레벨링된 OVA를 결막 또는 i.n. 루트를 통해 마우스 군에 투여하였다. 도 8A에 도시한 바와 같이 아크리디니움-레벨링된 OVA를 i.n. 투여한 경우 24시간 이내에 양쪽 후구 (olfactory bulbs, OB)로 항원이 축적되는 것을 관찰할 수 있었다. 반면, 아크리디니움-레벨링된 OVA를 결막 투여한 경우에는 OB 및 두뇌 조직에서 검출되지 않았다 (도 8A). 또한, i.n. 투여된 OVA는 결막 투여한 경우에 비하여 폐에서 더 높은 수준으로 용이하게 검출되었다.

[0091] 상기 결과를 통해 결막으로 투여한 경우 항원이 CNS로 재이행하지 않음을 알 수 있다. 따라서, 점안을 통한 백신 전달은 i.n. 전달에 비하여 안전하여 인간을 대상으로 한 임상실험도 가능할 것으로 여겨진다.

도면의 간단한 설명

[0092] 도 1은 점안투여를 통한 Ag-특이적 면역반응 유도실험 결과도이다.

[0093] 도 2-4는 점안 면역접종에 의한 순막에서의 뮤신-생성 고블렛 세포 및 M-세포 유사 세포의 증가 실험 및 마우스의 결막 상피세포층에서의 UEA-1+ 세포 관찰 결과도이다.

[0094] 도 5는 UEA-1+ 세포에 의한 박테리아의 결합 및 내면화 실험 결과를 도시한 것이다.

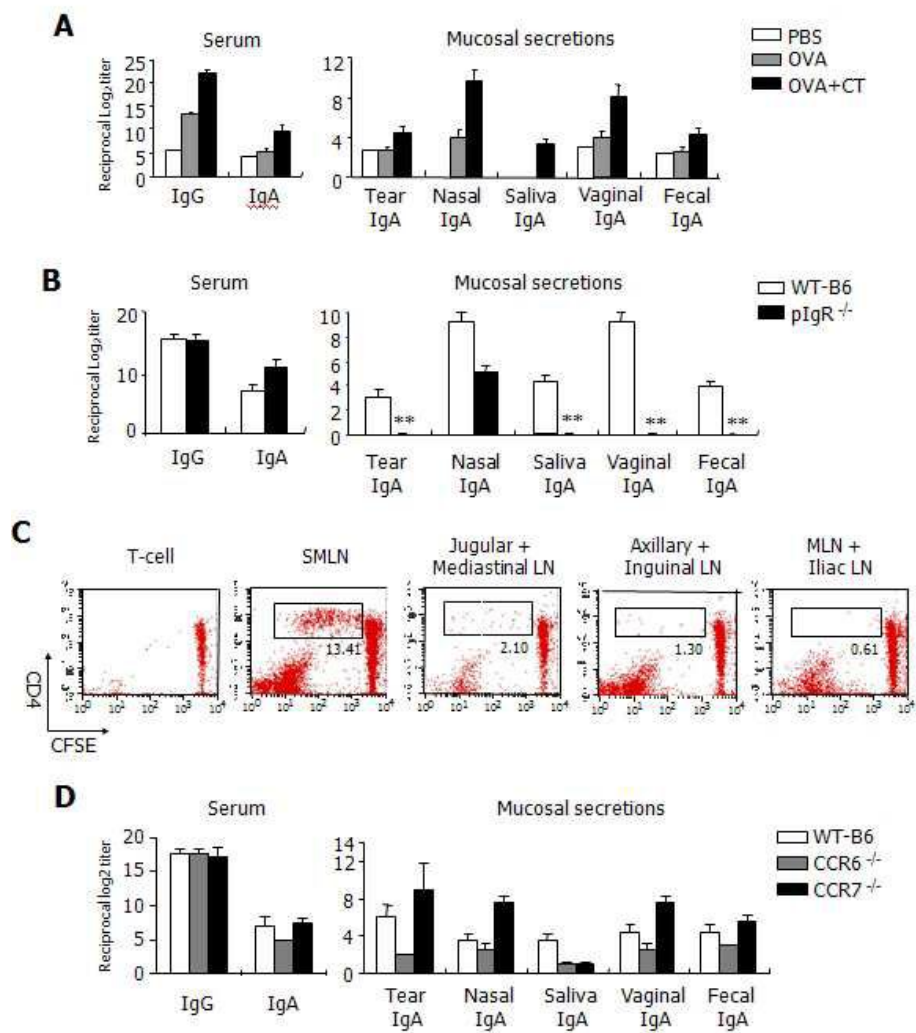
[0095] 도 6은 A/PR/8 바이러스의 점안 투여를 통한 특이적 전신 및 분비성 항체 반응 유도 실험 결과도이다.

[0096] 도 7은 RSAV2 스트레인 살모넬라 티피뮤리움 점안 투여를 통한 특이적 전신 및 분비성 항체 반응 유도 실험 결과도이다.

[0097] 도 8은 점안 투여된 항체의 CNS로의 재이행 여부 측정 결과도이다.

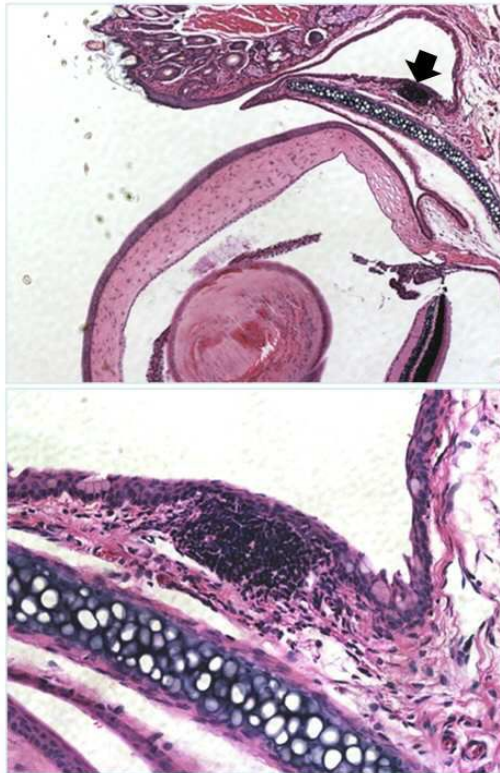
도면

도면1



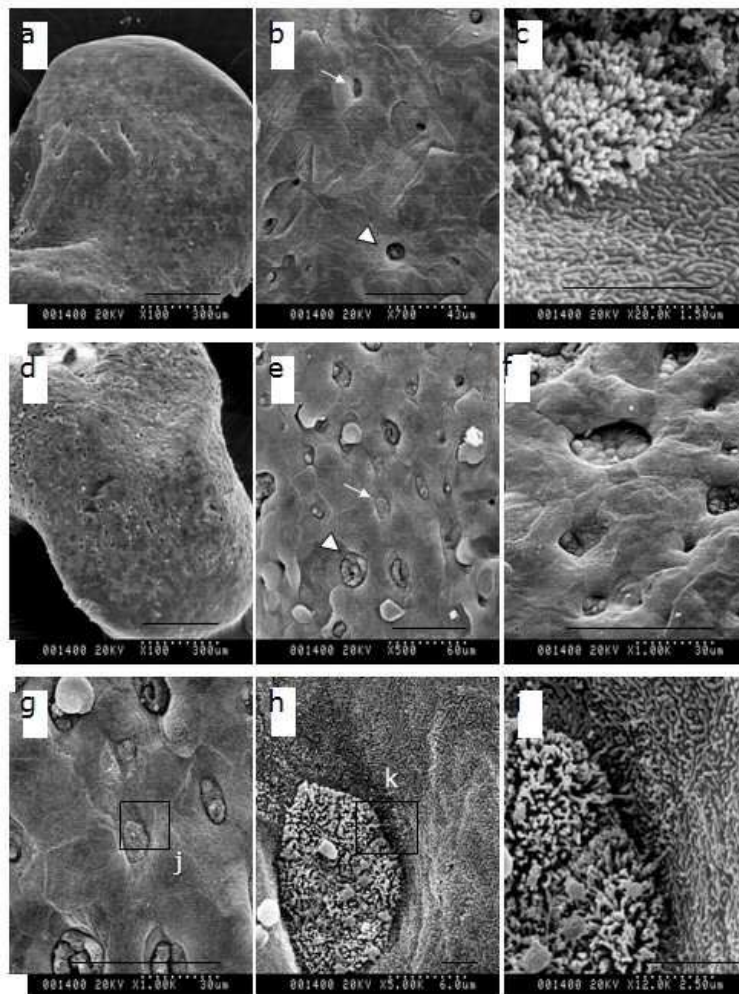
도면2

A

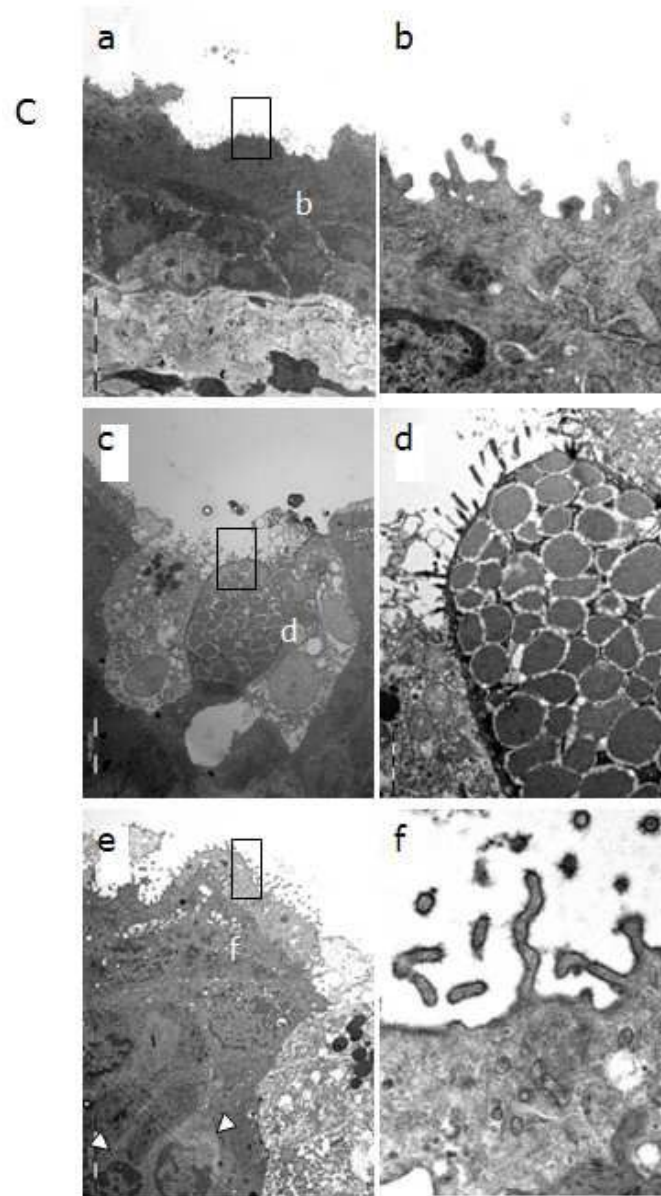


도면3

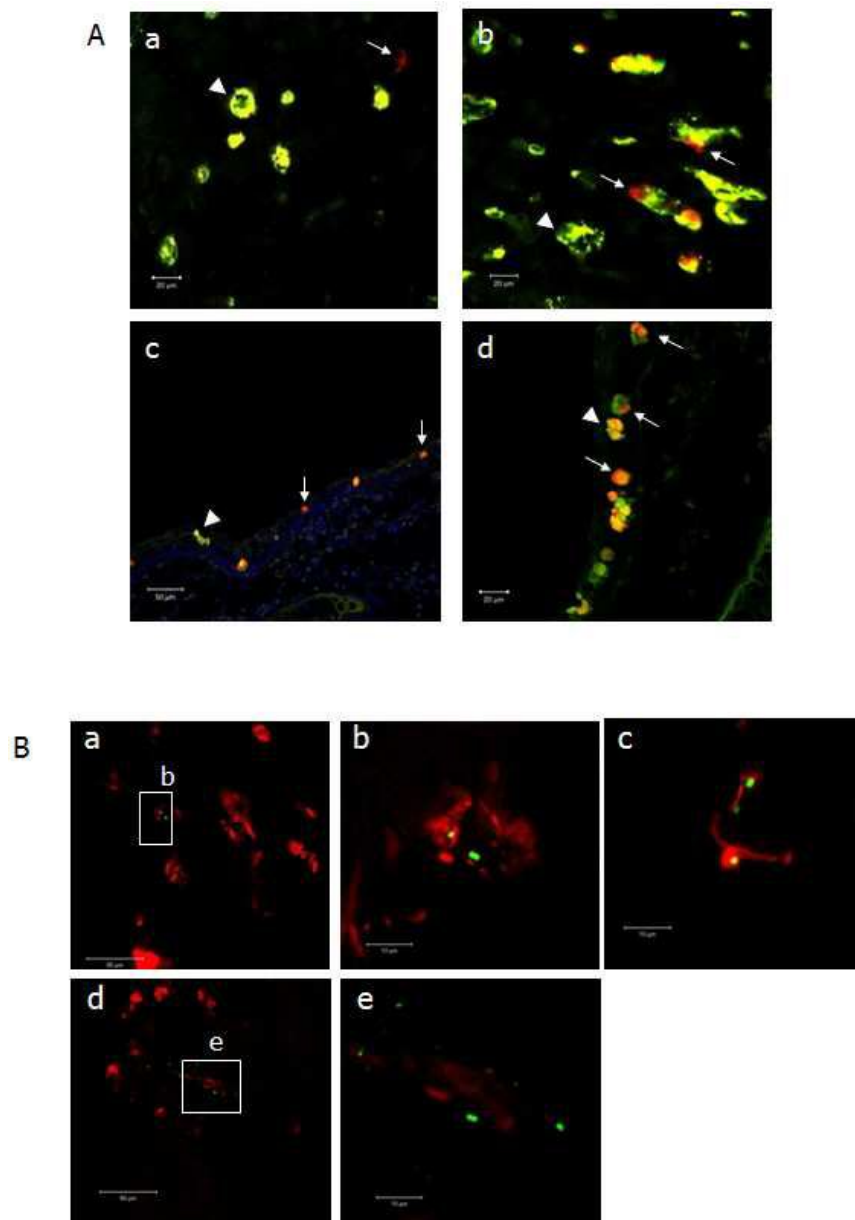
B



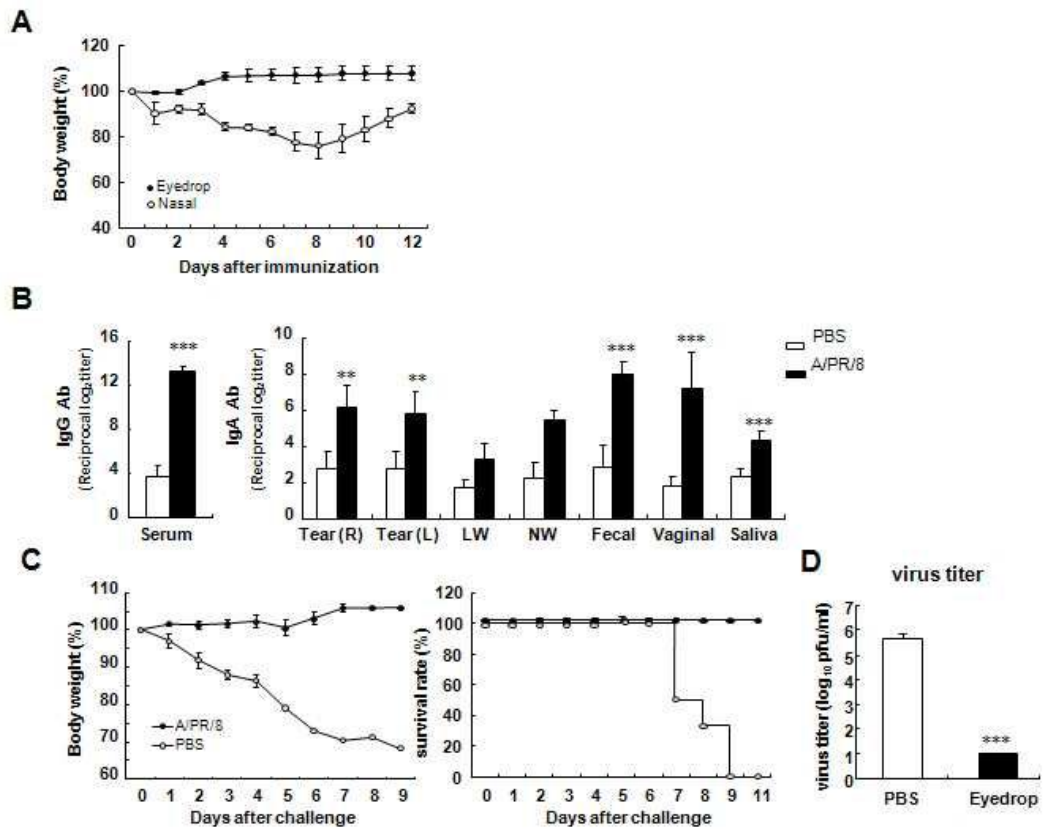
도면4



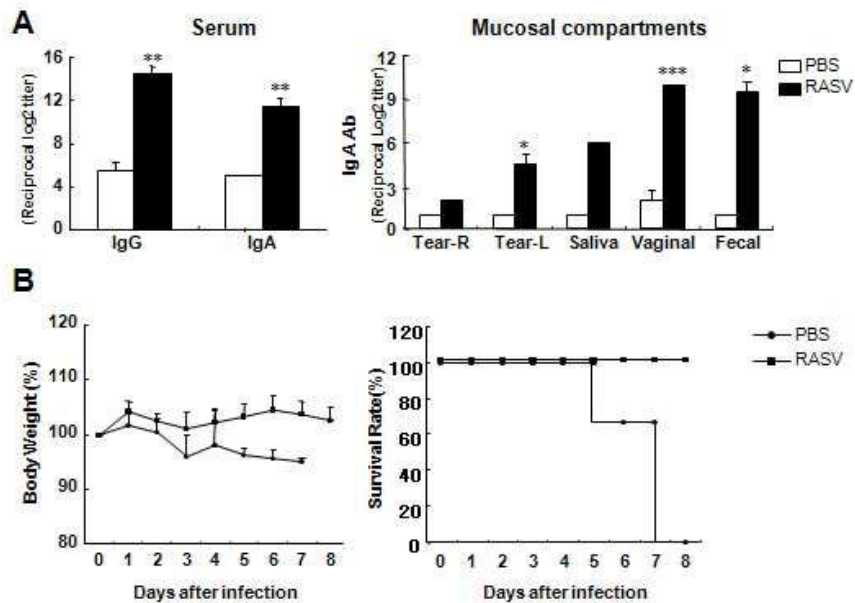
도면5



도면6



도면7



도면8

