



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0055310
(43) 공개일자 2021년05월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 39/39 (2006.01) A61K 31/519 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) A61K 39/135 (2006.01)
A61K 39/145 (2006.01) A61P 31/14 (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 39/39 (2013.01)
A61K 31/519 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0141604

(22) 출원일자 2019년11월07일

심사청구일자 2019년11월07일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

한국화학연구원

대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)

(72) 발명자

이중수

대전광역시 서구 둔산로 155, 109동 1203호(둔산동, 크로바아파트)

김미현

대전광역시 유성구 가정로 141(장동, 한국화학연구원)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

황이남

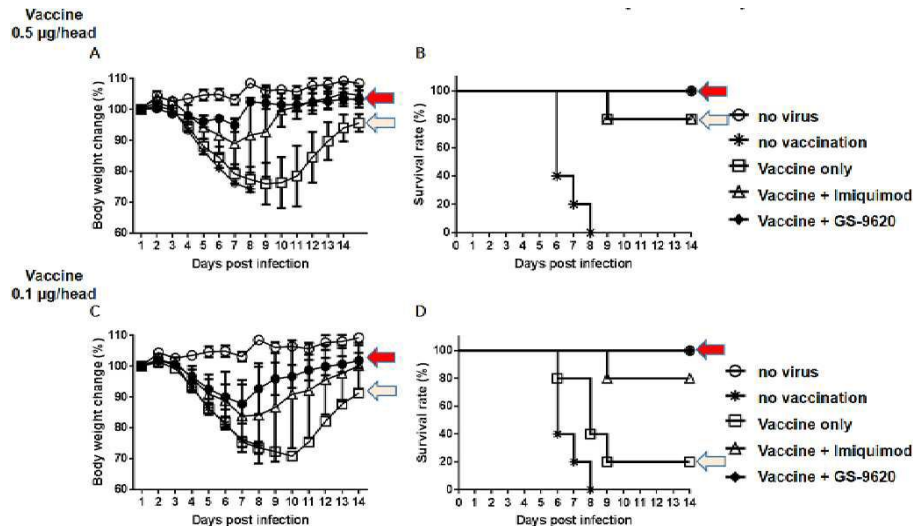
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 베사톨리모드를 함유하는 백신 보조제 조성물

(57) 요약

본 발명은 베사톨리모드를 유효 성분으로 포함하는 백신 보조제 조성물에 관한 것으로, 인플루엔자, 구제역 바이러스에 대한 특이적 체액성 및 세포-매개 면역 반응을 유도하고, 상기 바이러스에 대한 광범위한 방어 효능을 향상시킬 수 있다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

A61K 39/135 (2013.01)

A61K 39/145 (2013.01)

A61P 31/14 (2018.01)

A61P 31/16 (2018.01)

A61K 2039/55511 (2013.01)

A61K 2039/57 (2013.01)

(72) 발명자

장예진

대전광역시 유성구 가정로 141(장동, 한국화학연구원)

신진수

대전광역시 유성구 가정로 141(장동, 한국화학연구원)

한수봉

대전광역시 유성구 가정로 141(장동, 한국화학연구원)

정영식

대전광역시 유성구 가정로 141(장동, 한국화학연구원)

윤창수

대전광역시 유성구 가정로 141(장동, 한국화학연구원)

김혜진

대전광역시 유성구 가정로 141(장동, 한국화학연구원)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업	
과제고유번호	318039-3
부처명	농림축산식품부
과제관리(전문)기관명	농림수산식품기술기획평가원
연구사업명	가축질병대응기술개발사업
연구과제명	구제역 예방 재조합 백신 효능평가 및 대량생산시스템 구축
기 여 율	1/6
과제수행기관명	충남대학교
연구기간	2018.04.26 ~ 2020.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업	
과제고유번호	2018M3A9H4078703
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오의료기술개발사업
연구과제명	신규의 면역증강제 개발 및 면역증강 기작 규명
기 여 율	1/6
과제수행기관명	(주)중앙백신연구소
연구기간	2018.10.01 ~ 2022.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업	
과제고유번호	2019M3E5D5066834
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	혁신신약파이프라인발굴
연구과제명	신규 화합물 면역증강제 효능평가 및 기전연구
기 여 율	1/6
과제수행기관명	한국화학연구원
연구기간	2019.06.01 ~ 2020.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업	
과제고유번호	1711080641
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국화학연구원
연구사업명	한국화학연구원연구운영비지원(주요사업비)
연구과제명	사회문제 해결을 위한 바이러스 치료제 개발
기 여 율	1/6
과제수행기관명	한국화학연구원
연구기간	2018.01.01 ~ 2018.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업	
과제고유번호	1711094489
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	혁신신약파이프라인발굴(R&D)
연구과제명	아미노 피리미딘 유도체의 저분자 유기화합물 백신 어쥬번트 개발
기 여 율	1/6
과제수행기관명	한국화학연구원
연구기간	2019.06.01 ~ 2020.02.29
이 발명을 지원한 국가연구개발사업	
과제고유번호	1711096434
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국화학연구원
연구사업명	한국화학연구원연구운영비지원(R&D)(주요사업비)
연구과제명	감염증 치료제 후보물질 개발
기 여 율	1/6
과제수행기관명	한국화학연구원
연구기간	2019.01.01 ~ 2019.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

베사툴리모드를 유효성분으로 함유하는 백신 보조제 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 베사툴리모드는 1ug/kg 내지 100ug/kg의 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는 백신 보조제 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 백신은 인플루엔자 백신인 것을 특징으로 하는 백신 보조제 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 백신은 구제역 백신인 것을 특징으로 하는 백신 보조제 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 백신은 구제역 바이러스(FMDV), 리슈마니아(Leishmania), 인간 면역결핍 바이러스(Human Immunodeficiency virus, HIV), C형 간염 바이러스(Hepatitis C virus, HCV), E형 간염바이러스(Hepatitis E virus, HEV), A형 간염바이러스(Hepatitis A virus, HAV), B형 간염바이러스(Hepatitis B virus, HBV), 결핵(tuberculosis), 단순 헤르페스 바이러스(Herpes Simplex virus, HSV), 기생충을 일으키는 말라리아(malaria causing parasites), 인유두종 바이러스(Human Papilloma virus, HPV), 인플루엔자 바이러스(influenza virus), 홍역 바이러스(measles virus), 볼거리 바이러스(mumps virus), 에볼라 바이러스(Ebola virus), 호흡기 세포융합 바이러스(Respiratory Syntial virus, RSV), 웨스트 나일 바이러스(West Nile virus, WNV) 백신인 것을 특징으로 하는 백신 보조제 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 백신은 흉선종, 뇌척수종양, 담도암, 유방암, 대장암, 자궁경부암, 자궁내막암, 나팔림프종, 관암, 난소암, 위암, 뇌암, 두경부암, 직장암, 소장암, 식도암, 임파선암, 담낭암, 폐암, 피부암(또는 흑색종), 신장암, 방광암, 혈액암, 췌장암, 전립선암, 고환암, 생식세포종, 갑상선암, 내분비선암, 구강암, 간암, 림프종, 급성 백혈병, 만성 백혈병, 다발성 골수종, 육종 중 선택되는 어느 하나의 백신인 것을 특징으로 하는 백신 보조제 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 백신 보조제 조성물은 경구투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 동맥내 투여, 골수내 투여, 경막내 투여, 심장내 투여, 경피 투여, 피하 투여, 복강내 투여, 비강내 투여, 장관 투여, 국소 투여, 직장 투여, 국소 투여, 진피 투여, 점막 투여, 척추내 투여되는 것을 특징으로 하는 백신 보조제 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 백신 보조제 조성물은 체액성 면역, 세포성 면역, 또는 점막 면역을 증강시키는 것을 특징으로 하는 백신 보조제 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 면역은 바이러스, 곰팡이, 박테리아 및 기생충으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 병원체에 대한 감염 또는 암에 대한 면역인 것을 특징으로 하는 백신 보조제 조성물.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 백신 보조제 조성물에 관한 것으로, 구체적으로는 베사톨리모드를 유효성분으로 함유하는 백신 보조제 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 인플루엔자는 인플루엔자 A 및 B 바이러스 유형에 의해 발생하는 급성 호흡기 감염이다. 70 여년 동안 백신이 이용되고 있지만 인플루엔자는 전 세계적으로 인간과 동물 모두에서 발병률 및 사망률의 중요한 원인이다. 매년 3~5백만 건의 심각한 인플루엔자 사례가 발생하여 전 세계적으로 250,000~500,000명이 사망하는 것으로 추정된다. 인플루엔자 바이러스는 다른 인플루엔자 바이러스와의 돌연변이 또는 유전자 재 분류로 인한 높은 유전적 다양성으로 유명하다. 시간이 지남에 따라 바이러스의 진화는 항원변이(antigenic drift) 및 항원대변이(antigenic shift)을 일으켜 매년 백신 항원 성분이 업데이트 되어야 할 필요성을 요구한다. 매년 계절성 독감 백신에 대한 바이러스 균주의 선택은 순환하는 인플루엔자 바이러스의 전 세계 감시 및 전년도 백신 바이러스와 관련된 항원 변화에 근거한다. 균주 예측 및 백신 생산의 모든 단계는 긴 절차를 요구한다. 2009년 대유행에 의해 기존의 백신 개발 전략으로는 새로 출현한 바이러스에 대한 백신을 적시에 생산하고 배포하는데 어려움이 있음을 깨달았다. 바이러스 생산에 이용되는 발육란(embryonated eggs)의 지속적인 요구는 기존의 불활성화 및 생약독화 바이러스 백신 생산에 의해 발생하는 또 다른 일반적인 단점이며, 유행성 바이러스가 가금류에 병원성인 경우, 발육란은 공급이 부족할 수 있다.

[0003] 이러한 단점을 해결하기 위해 다양한 바이러스성 에피토프를 사용하는 인플루엔자 소단위 백신이 개발되고 있고, 이 백신의 형태는 빠르고 안정적이며 일관성 있게 효과적인 생산을 할 수 있어 지속적인 연구 개발이 이루어지고 있다. N 말단에 24개의 잔기를 함유하는 매트릭스 2(M2e) 단백질의 세포 도메인은 인플루엔자 A 바이러스 중에서 진화적으로 보존된 영역이며, 따라서 이 영역은 보편적 광범위 백신을 개발하기에 유망한 영역으로 간주된다. 또한, 유사하게, 헤마글루티닌의 HA2 서브 유닛의 융합 펩티드를 갖는 줄기(Stalk domain)는 HA2 특이적 항체를 유도하는 부위로 바이러스 서브타입 내- 또는 서브타입-간 서열 상동성 및 광범위한 교차 반응성에 대해 연구되어 있다. M2e와 HA2는 보편적인 백신 접근법의 주요 후보로 인식되었지만, 다른 소단위 백신처럼 면역원성이 낮은 경우가 많다. "Flublok(플루블록)"은 보조제를 포함하지 않는 유일하게 허가된 재조합 인플루엔자 백신이지만, 각 헤마글루티닌 (45 μ g)의 3배나 많은 계란-유래의 불활성화 바이러스 인플루엔자 백신인 "아그리팔(Agrippal)"(15 μ g)을 포함한다.

[0004] 백신보조제는 비교적 낮은 면역원성을 갖는 재조합 단백질 백신 등의 면역원성을 향상시키기 위한 주요 요소이다. 따라서 많은 연구에서 다양한 백신보조제를 사용하여 M2e 및 HA2 기반 범용 재조합 백신을 포함한 다양한 백신 항원의 면역원성을 높이는데 중점을 두고 있다.

[0005] 최근 면역학 연구의 진보로 인하여 선천면역의 이해가 확장되면서 선천면역의 유도가 적응성 면역 반응에 강력한 영향을 미친다는 것이 알려졌다. 이러한 학문적 진보로 패턴 인식 수용체의(PRR)에 대한 리간드(ligand)를 이용하여 백신보조제로서 사용하려는 실험 및 임상 접근법이 많이 알려지고 있다. 패턴 인식 수용체(PRR)들 중 톨 유사 수용체 (TLR)가 처음으로 밝혀졌다. 인간에서는 10개의 TLR (TLR1-TLR10)이 보고되었으며 각각 서로 다른 병원체 관련 분자 패턴을 인식하고 반응한다. 면역세포인 대식세포, 수지상 세포 및 B 세포를 포함하는 항원 제시세포 (APC)들의 TLR들은 TLR 작용제(agonist)들에 의해 활성화되어 선천면역을 유도하며 이러한 선천면역을 유도하는 TLR 작용제(agonist)들인 여러 합성물질들이나 미생물 유래의 성분들은 백신보조제로서 연구 및 이용되고 있다.

[0006] 베사톨리모드는 합성된 dihydropteridinone 유도체로 TLR7, TLR8 특이적 소분자 작용제로 확인되었고, 베사톨리모드(Vesatolimod)로 불리기도 한다. 베사톨리모드를 이용한 생체내 B형 간염 바이러스 치료 모델은 바이러스 감염 지역에서 플라스마사이토이드 수지상 세포(plasmacytoid dendritic cell; pDC)를 자극하여 이 세포들로부터 IFN- α , 사이토카인, 케모카인 및 인터페론-자극 유전자 (ISGs)등의 분비 및 발현을 유도하는 기본적인 기전을 갖고 있다. 베사톨리모드는 급성 HIV-1 감염에 대한 예방 효과를 나타내는데 이는 베사톨리모드가 pDC를 자극하여 pDC 유래의 용해성 인자들을 분비하고 이들로 인해 항바이러스 작용을 나타냄이 확인되었다. 2상 임상 시험에서 베사톨리모드 1, 2 및 4mg의 경구 투여가 만성 HBV 감염 바이러스 환자에게 안전하고 내성이 있는 것으로 나타났다.

[0007] 베사톨리모드에 대해 공개된 기술들은 효과적인 면역보조제 후보 물질로서의 기준을 충족하지만, 현재 이를 이용한 백신 면역보조제에 대한 기술은 개발되어 있지 않은 상태이므로, 베사톨리모드를 이용한 백신 면역보조제

의 개발 필요성이 대두되고 있다.

발명의 내용

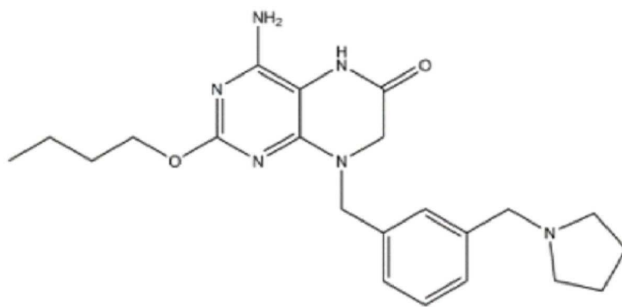
해결하려는 과제

- [0008] 상기와 같은 문제점을 해결하기 위해 본 발명은 베사톨리모드를 함유하는 새로운 백신보조제를 완성하였다.
- [0009] 따라서 본 발명은 베사톨리모드를 유효성분으로 함유하는 백신보조제를 제공하고자 한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 상기 백신보조제를 포함하는 백신 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해 본 발명은 베사톨리모드를 유효성분으로 포함하는 백신보조제를 제공한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 상기 백신보조제를 포함하는 백신 조성물을 제공한다.
- [0014] 본 발명에서 베사톨리모드(Vesatolimod)는 GS-9620이라고도 알려진 물질이며, 하기 화학식 1의 식을 갖는다.

[0016] <화학식 1>



[0017]

- [0019] 상기 보조제(Adjuvant)는 백신 또는 약학적으로 활성 있는 성분들에 첨가되어 면역 반응을 증가시키거나 및/또는 영향을 주는 물질 또는 조성물을 말하는 것이다. 대표적으로 면역원(immunogen)용 캐리어(carrier) 또는 보조 물질 및/또는 다른 약학적으로 활성 있는 물질 또는 조성물을 통상적으로 의미한다. 전형적으로, 용어 "보조제(adjuvant)"는 넓은 개념에서 해석되어야 하며, 상기 보조제(adjuvant)에 통합되거나 상기 애주번트(adjuvant)와 함께 투여된 항원의 면역원성(immunogenicity)을 증진시킬 수 있는 넓은 범위의 물질 또는 전략(stratagerm)을 의미한다. 또한, 보조제(adjuvant)는, 이에 제한되지 않고, 면역 강화제(immune potentiator), 항원 전달체 또는 이들의 조합으로 나뉘어질 수 있다.

- [0021] 백신(vaccine)이란, 생체에 면역을 주는 항원성 물질을 함유한 생물학적인 제제로서, 구제역 또는 구제역 바이러스의 예방을 위하여 생물체에 주입 또는 주사하여 생체에 면역이 생기게 하는 면역원을 말한다.

- [0022] 본 발명에서 상기 백신은 그 종류가 제한되는 것은 아니나, 바람직하게는 인플루엔자 백신일 수 있다. 또한, 상기 백신은 그 종류는 제한되는 것은 아니나, 바람직하게는 구제역 백신일 수 있다.

- [0024] 본 발명에 기재된 인플루엔자 백신(influenza vaccine)은 계절 또는 판데믹(pandemic) 인플루엔자를 예방하는 가장 좋은 방법으로, 크게 생백신과 비활성화백신으로 나누어진다. 생백신은 약독화 생백신(live attenuated vaccine)이 개발되어 사용되고 있다. 비활성화백신은 부화란 혹은 세포배양에서 배양한 바이러스를 정제하여 포르말린 등으로 비활성화시킨 바이러스 전체를 사용하는 전바이러스 백신(whole virus vaccine), 에테르 등으로 바이러스 외피를 분쇄시킨 분할 백신(split vaccine), HA와 NA 성분을 정제한 아단위 백신(subunit vaccine)

등이 있다.

- [0025] 본 발명에 기재된 구제역 백신 조성물은 구제역 바이러스 항원을 포함할 수 있으며, 상기 구제역 바이러스 항원은 구제역 바이러스 O 혈청형, 구제역 바이러스 A 혈청형, 구제역 바이러스 아시아1 혈청형, 구제역 바이러스 C 혈청형, 구제역 바이러스 SAT1 혈청형, 구제역 바이러스 SAT2 혈청형 및/또는 구제역 바이러스 SAT3 혈청형, 또는 이들의 재조합 항원 등을 포함할 수 있다.
- [0026] 또한, 본 발명의 구제역 백신 조성물은 구제역 바이러스 각 혈청형에 대한 방어능을 가진 백신일 수 있으며, 상기 혈청형은 A형, O형, C형, Asia1형, SAT1형, SAT2형, SAT3형을 포함할 수 있다.
- [0027] 본 발명에 기재된 면역학적 산물은 항원 및/또는 보조제 조성물의 투여에 의해 면역화된 숙주로부터 발생하는 방어 면역 매개 물질 또는 세포 등을 의미하며, 예를 들어, 활성화된 T세포, B세포 또는 항체 등을 의미할 수 있으나 이에 한정하는 것은 아니다.
- [0028] 본 발명에 따른 상기 백신 보조제 조성물은 당 업계에서 제제화하는데 통상적으로 사용될 수 있는 약제학적으로 허용 가능한 부형제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0029] 상기 약제학적으로 허용 가능한 부형제는 허용 가능한 또는 편리한 투약 형태를 제조하기 위한 약물, 제제 또는 결합 분자와 같은 활성 분자로 조합되는 불활성 물질을 의미한다. 약제학적으로 허용 가능한 부형제는 비독성이거나, 적어도 독성이 사용된 용량 및 농도에서 수용자에게 이의 의도된 용도를 위해 허용될 수 있는 부형제이고, 약물, 제제 또는 결합 분체를 포함하는 제형화의 다른 성분과 양립할 수 있다.
- [0030] 본 발명에 기재된 "유효한 양" 또는 "유효량" 등의 용어는 백신과 함께 투여 시에, 백신의 효과를 증대시키는 유효한 본 발명의 보조제의 양을 나타낸다.
- [0032] 본 발명에서 상기 백신 보조제 조성물의 투여 방식은 경구 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 동맥내 투여, 골수내 투여, 경막내 투여, 심장내 투여, 경피 투여, 피하 투여, 복강내 투여, 비강내 투여, 장관 투여, 구강 및 설하는 포함하는 국소 투여, 직장 투여, 국소 투여, 진피 투여, 점막 투여, 척추내 투여 등의 방법으로 투여될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0033] 또한, 상기 투여 시 각 투여 방식에 적절한 제형으로 제제화되어 투여될 수 있으며, 제제화는 당 업계에서 널리 알려져 있는 방법으로 제제화될 수 있다.
- [0035] 본 발명의 백신 보조제 조성물은 제한되지는 않지만 바람직하게는 0.1ug/kg 내지 100ug/kg의 농도로 투여될 수 있으며, 더욱 바람직하게는 0.1ug/kg 내지 50ug/kg의 농도로 투여될 수 있으며, 더욱 바람직하게는 10ug/kg내지 30ug/kg의 농도로 투여될 수 있다.
- [0036] 또한, 본 발명의 백신 보조제 조성물은 제한되지는 않지만 투여 후 48시간 내, 바람직하게는 12시간 내에 면역증강 효과가 나타난다.
- [0038] 본 발명의 백신 보조제 조성물 투여 후 나타나는 면역 증강 효과는 면역 매개 물질 또는 세포에 의한 것일 수 있으며, 구체적으로는 체액성 면역, 세포성 면역, 점막 면역 증강 효과를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0039] 상기 면역은 바이러스, 곰팡이, 박테리아 및 기생충 중 어느 하나의 병원체에 대한 감염 또는 암에 대한 면역을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0040] 상기 바이러스는 구제역 바이러스(FMDV), 리슈마니아(Leishmania), 인간 면역결핍 바이러스(Human Immunodeficiency virus, HIV), C형 간염 바이러스(Hepatitis C virus, HCV), E형 간염바이러스(Hepatitis E virus, HEV), A형 간염바이러스(Hepatitis A virus, HAV), B형 간염바이러스(Hepatitis B virus, HBV), 결핵(tuberculosis), 단순 헤르페스 바이러스(Herpes Simplex virus, HSV), 기생충을 일으키는 말라리아(malaria causing parasites), 인유두종 바이러스(Human Papilloma virus, HPV), 인플루엔자 바이러스(influenza virus), 홍역 바이러스(measles virus), 볼거리 바이러스(mumps virus), 에볼라 바이러스(Ebola virus), 호흡기 세포융합 바이러스(Respiratory Syntial virus, RSV), 웨스트 나일 바이러스(West Nile virus, WNV) 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0041] 상기 암은 흉선종, 뇌척수종양, 담도암, 유방암, 대장암, 자궁경부암, 자궁내막암, 나팔림프종, 관암, 난소암, 위암, 뇌암, 두경부암, 직장암, 소장암, 식도암, 임파선암, 담낭암, 폐암, 피부암(또는 흑색종), 신장암, 방광암, 혈액암, 췌장암, 전립선암, 고환암, 생식세포종, 갑상선암, 내분비선암, 구강암, 간암, 림프종, 급성 백혈병, 만성 백혈병, 다발성 골수종, 육종 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

발명의 효과

[0042] 본 발명에 따른 백신 보조제 조성물은 항원 특이적 체액성 및 세포-매개 면역 반응을 유도하고, 또한 무린(murine) 모델에서 다양한 인플루엔자 아형 바이러스들의 치명적인 감염에 대해 광범위한 방어 효능을 향상시킬 수 있다.

[0043] 또한, 백신 보조제로서 베사톨리모드의 사용은 불활화된 인플루엔자바이러스 항원의 비강 내 투여시 항원 특이적 체액성 및 세포-매개 면역 반응을 유도하고, 무린(murine) 모델에서 치사량의 인플루엔자 바이러스 감염에 대해 불활화 인플루엔자바이러스 항원 백신의 광범위한 방어 효능을 향상시킬 수 있다.

[0044] 또한, 백신 보조제로서 베사톨리모드의 사용은 구제역 재조합 항원인 OVM의 근육 내(i.m.) 투여시 항원 특이적 체액성 및 세포-매개 면역 반응을 유도하고, 또한 무린(murine) 모델에서 구제역 바이러스에 대한 치명적인 감염에 대해 구제역 재조합 항원인 OVM의 광범위한 방어 효능을 향상시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0045] 도 1은 베사톨리모드에 의한 TLR7 자극 효과를 나타낸 것이다. HEK-Blue null 세포 (A) 또는 mTLR7- (B) 및 hTLR7-발현 세포 (C)에서 농도별로 베사톨리모드를 처리한 후 루시퍼라제의 활성을 측정하여 NF- κ B 프로모터 활성을 나타낸 것이다. **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

도 2는 베사톨리모드 처리에 대한 무린 BMDM 및 BMDC의 면역학적 반응을 나타낸 것이다. (A 및 B) SPF 무린 Bone marrow 세포로부터 분화된 BMDM 및 BMDC를 지시된 용량의 베사톨리모드 또는 이미퀴모드(양성 대조군)로 처리하였다. 처리 후 12시간 및 24 시간(hpt)에 배양 상층액을 얻어 배양 상층액내 분비된 IL-6, TNF- α , IL-12 및 IFN- α 의 농도를 ELISA로 측정하였다. (C) 베사톨리모드로 처리 후 표시된 시간에 BMDM으로부터 총 RNA를 추출하였고, 선택한 사이토카인, IFN 및 ISG 유전자 발현 수준을 qPCR에 의해 분석하였다. 데이터는 평균 $\pm$ S.D이다.

도 3은 베사톨리모드 처리에 대해 면역세포주인 Raw 264.7 및 THP-1 세포에서의 면역학적 반응을 나타낸 것이다. (A 및 B) Raw264.7 세포 및 THP-1 세포에 지시된 용량의 베사톨리모드 또는 이미퀴모드를 처리하였다. 베사톨리모드 자극에 의해 세포의 상층액으로 분비되는 IL-6, TNF- α 및 IFN- α 수준을 ELISA로 측정하였다. (C) 베사톨리모드 처리 후 표시된 시간에 Raw264.7로부터 총 RNA를 추출하였고, 선택된 사이토카인, IFN 및 ISG 유전자 발현 수준을 qPCR에 의해 분석하였다. (D) Raw264.7 세포에 이미퀴모드 (20 μ M) 또는 베사톨리모드 (4 μ M)로 처리한 후 세포내 활성화된 신호전달 분자들을 확인하였다. 베사톨리모드 처리후 0, 2, 4 및 8 시간에 세포를 수거하여 면역 블롯 분석법으로 I κ B- α , p65, IRF3, STAT1 및 ERK의 활성화 형태인 인산화 형태를 확인하였다. 데이터는 평균 $\pm$ S.D이다.

도 4는 베사톨리모드와 함께 근육 내로 전달된 백신 항원인 sM2HA2에 대한 체액성 및 세포성 면역 반응을 증강시키는 것을 나타낸 것이다. (A) 마우스를 표 1에 나타낸 바와 같이 그룹화하고 모든 그룹에 격주로 2회 근육 내 투여하였다. 백신 접종 전 및 부스터 백신 접종 1주 후 혈청을 수집하고, 부스터 백신 접종 후 7일뒤에 한 세트의 각 그룹에서 3마리 마우스의 비장을 절제하였다. 부스터 백신 접종 1주 후, 모든 마우스에 비강 내 경로를 통해 치사량의 HPAI 바이러스로 공격하고 12일 동안 모니터링 하였다. 감염 후 5일에, 바이러스 역가를 확인하기 위해 각 그룹에서 3마리 마우스로부터 폐를 절제하였다. 감염 후 5일에, 한 세트로부터의 마우스를 폐 조직 병리학을 위해 희생시켰다. 코팅 샘플로서 sM2HA2 단백질 또는 sM2 펩티드 또는 HA2 펩티드를 사용하여 간접 ELISA에 의해 (B) sM2HA2 특이적 IgG, (C) sM2 특이적 IgG, 또는 (D) HA2 특이적 IgG에 대해 혈청 샘플을 평가하였다. 비장 세포를 항원으로 재자극하였고, 시험 관내 사이토카인 형성 세포 반응을 ELISPOT 분석에 의해 측정하였다. (E) sM2HA2 단백질, (F) sM2 펩타이드 및 (G) HA2 펩타이드는 TH1을 자극하여 IFN- γ 를 생성하는 TH1 및 5x10⁵ 비장 세포 당 세포를 형성하는 IL2 스팟을 생성하는 TH2를 측정하였다. 배지는 음성 대조군으로 사용된 비-자극된 세포 및 양성 대조군으로 사용된 미토겐으로 자극된 세포만을 함유한다. 데이터는 평균 $\pm$ S.D이다.

도 5는 다양한 인플루엔자 아형들에 대하여 베사톨리모드가 sM2HA2 항원의 교차 방어 효능을 강화하는 것을 보

여준다. PBS, sM2HA2 단독 또는 이미퀴모드 또는 베사톨리모드와 함께 마우스를 면역화시켰다. 마지막 부스트 백신 접종 후 2주에 마우스 적응 인플루엔자 바이러스 아형을 10 LD₅₀로 마우스를 감염시켰다. 폐 조직의 바이러스 역가는 5dpi에서 MDCK 세포주에서 TCID₅₀에 의해 결정되었다. 5dpi에서, 폐를 하나의 세트의 각각의 그룹으로부터 무작위로 수집하고, 고정하고 HE로 염색한 후 광학 현미경으로 검사하였다. (A) A/Aquatic bird/Korea/W81/2005 (H5N2) 감염 후 생존 (상단), 체중 변화 (하단), (B) A/Chicken/korea /116/2004 (H9N2) 감염 후 생존 (상단), 체중 변화 (하단), (C) A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) 감염 후 생존 (상부 패널), 체중 변화 (하부 패널), (D) A/Aquatic bird/Korea/W81/2005 (H5N2) 및 (E) A/Chicken/Korea/116/2004 (H9N2)로 치명적인 감염 후 폐 바이러스 역가를 나타낸 것이다. (F) sM2HA2/베사톨리모드로 백신 접종된 마우스의 폐는 염증성 세포 침윤이 없는 맑은 폐포를 나타내었고, 대조적으로, sM2HA2 단독 또는 PBS 그룹으로 백신 접종된 마우스의 폐는 심각한 폐렴의 특징을 나타냈다. 데이터는 평균 ± S.D이다.

도 6은 점막으로 투여된 인플루엔자 항원 백신에 대한 베사톨리모드의 백신보조제 효과를 나타낸 것이다. BALB/c 마우스를 비강 내, 단독으로 또는 베사톨리모드 또는 이미퀴모드 (각각 두 당 20 ug)와 함께 두 당 0.1 (A, B) 또는 0.5 ug (C, D)의 용량으로 불활성화 된 PR8 바이러스 백신으로 접종하였다. 3주 후, 마우스는 100 MLD₅₀의 maPR8로 투여되었다. 감염 후 14일 동안 매일 체중 변화 (A, B) 및 사망률 (C, D)을 측정하였다.

도 7은 점막으로 투여된 인플루엔자 항원 백신에 대한 베사톨리모드의 특이적 항체 유도능 향상을 나타낸 것이다. 혈청에서의 총 IgG (A), IgG1 (B) 및 IgG2a (C)는 면역화 후 2주에 ELISA에 의해 측정되었다. 동일한 혈청으로 HA 억제 분석 (D)을 수행하였다. 혈청 희석 배수는 상단에 표시되어 있다.

도 8은 근육으로 투여한 구제역 재조합 항원 백신에 대해 베사톨리모드의 백신보조제 효과를 나타낸 것이다. C57BL/6 마우스의 근육내로 재조합 구제역 항원인 OVM (두 당 20ug) 단독, 또는 베사톨리모드 (각각 두 당 10 ug)와 함께 2번 접종하였다. 2차 접종 후 7일된 혈청내 OVM 항원에 대한 항체가를 측정하였다 (B). 2차 접종 후 14일된 치사량의 구제역바이러스 진천주를 감염시킨 후 7일동안 매일 체중 변화 (C) 및 사망률 (D)을 측정하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0046] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

[0047] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

[0049] <예비실험예> 본 발명의 면역 증강 효과 확인

[0050] TLR7 자극 효과의 측정

[0051] 인간 및 마우스 TLR7-발현 HEK293 세포주, HEK-Blue hTLR7 및 mTLR7 및 그들의 모의 세포주 HEK-Blue Null1-k는 각각 InvivoGen에서 구입하여 10% FBS가 보충 된 DMEM에서 배양 제조업체의 지침에 따라 50 U/ml 페니실린, 50 ug/ml 스트렙토마이신 및 100ug/ml 노르모신(Normocin)과 함께 배양하였다. 웰당 4x10⁵ 세포의 농도로 12-웰 플레이트에 HEK-Blue 세포를 시딩(seeding)한 후 1 일째에, 이들은 1ug의 pNF-κB-Luc (Clontech) 및 5ng의 phRL-CMV (Promega)로 공동 형질주입되었다. 24시간 후, 형질전환된 세포를 추가의 24시간 동안 새로운 배양 배지에 증가하는 농도의 베사톨리모드로 처리하였다. NF-κB 프로모터 활성을 루시페라제 분석에 의해 측정하였다.

[0053] 세포 배양

[0054] 인간 급성 단핵구 백혈병 (THP-1) 세포주는 RPMI (PAN-Biotech)에서 배양되었다. 마우스 백혈병 단핵구 대식세포 (Raw264.7) 세포주 및 DMEM (PAN-Biotech, Germany)에서 배양하여 두 배지 모두 사용시까지 37℃, 5% CO₂에서 10% 소 태아 혈청 (FBS) (Gibco, USA) 및 1% 항생제/항균제 (A.A) (Gibco, USA)를 보충하였다. 무린 골수 유래 대식세포 (BMDM) 및 무린 골수 유래 수지상 세포 (BMDC)를 제조하였다. 간단하게, 대퇴골 및 경골을 무균 조건하에 6-8 주령 BALB/c 마우스로부터 수집하고 70% 알코올로 세척한 후 PBS 세척하였다. 각각의 골단(epiphysis)을 잘라내고 RPMI (Gibco, USA) 배지로 플러싱하여(flushed) 골수 (BM) 세포를 수집하였다. 세포

현탁액을 40 μ m 세포 스트레이너 (BD Falcon, USA)를 통해 여과하고 1200 rpm에서 3분 동안 원심 분리하여 세포 펠렛을 수집하였다. 이어서, 수집된 세포 펠렛을 200 μ l의 RBC 용해 완충액으로 재현탁시켜 RBC 유리 골수 세포를 수득하였다. 이어서 정제된 세포를 세포 배양 플라스크에 시딩하고 BMDM 분화를 위한 GM-CSF 및 BMDM 분화를 위한 IL-4를 갖는 GM-CSF를 함유하는 RPMI 배지로 6-7일 동안 자극시켰다.

[0056] **생체의(In-vitro) 베사톨리모드 처리 및 바이러스 감염**

[0057] RAW264.7 및 THP-1 세포를 12- 웰 조직 배양 플레이트 (5 x 10⁵ 세포/웰)에서 배양하였다. 실험 동안, 세포를 관련 용량의 이미퀴모드 또는 베사톨리모드로 처리하였다. 이어서, 세포를 PR8-GFP (MOI=1)로 감염시켰다. 바이러스 감염률은 감염후 12 및 24시간 후에 GFP 발현을 분석함으로써 평가하였다. PR8-GFP 바이러스 titer를 측정하기 위해 상청액 및 세포 펠렛을 12 및 24 hpi에서 각 그룹으로부터 수집하였다. 베로(Vero) 세포에 바이러스가 포함된 샘플을 연속으로 희석한 후 접종하였다. 36시간 인큐베이션 후, 세포를 GFP 발현에 대해 조사하였다.

[0059] **면역블롯(Immunoblot) 분석**

[0060] NF- κ B 및 IFN 관련 신호 전달 분자의 인산화를 면역 블롯 분석에 의해 평가하였다. Raw264.7 세포를 6개의 웰 플레이트 (1 x 10⁶ 세포/웰)에서 배양하고 20 μ M 이미 퀴모드 또는 4 μ M 베사톨리모드로 처리하였다. 처리 후 0, 2, 4 및 8시간에 세포를 수확하고 면역블롯 분석을 수행하였다. 세포 펠렛을 RIPA (radio immunoprecipitation assay) 용해 완충액에 의해 용해시키고, 용해물을 샘플 완충액 (Sigma)과 1 : 1 비율로 혼합하여 SDS-PAGE 겔에 의해 분리하였다. 이어서 단백질을 샘플을 면역 블롯 PVDF 웨스턴 블롯팅 막 (Bio-Rad)에 전기 블롯팅하였다. 막을 5% 소 혈청 알부민(BSA, Sigma)에서 1시간 동안 차단하고 4°C에서 밤새 진탕 플랫폼에서 특정 항체와 함께 배양하였다. 막 블롯을 조심스럽게 세척하고 0.05% 트윈-20 (TBST)을 함유하는 1X 트리스-완충 식염수로 행구고 실온에서 1시간 동안 거자무과산화효소(HRP)-접합된 2차 항체의 1 : 3000 희석물과 함께 배양하였다. 이어서 막을 세척하고 Las-4000 미니 루미너-이미지 분석기를 사용하는 제조사의 지시 사항(Bio-Rad)에 따라 발광 기관으로서 ECL(Enhanced Chemiluminescence Detection)을 사용하여 표적 단백질을 검출하였다. 면역 블롯팅에 사용된 항체는 항-포스포 IKB α (Cell Signaling, #2859S), 항-IKB α (Cell Signaling, #9242S), 항-포스포 p65 (Cell Signaling), 항-p65 (Cell Signaling, #), 항-포스포 IRF3 (Cell Signaling, #4947) 항-IRF3 (Abcam, #ab25950), 항-포스포 TBK1 (Cell Signaling, #5483S), 항-TBK1 (Cell Signaling, #3504S) 및 β -액틴 (Santa Cruz, SC47778)이다.

[0062] **qPCR**

[0063] Raw264.7 및 BMDM 세포는 이미퀴모드(20 μ M) 및 베사톨리모드(4 μ M)로 자극되었다. RNeasy Mini 키트 (Qiagen)의 프로토콜에 따라 자극된 세포의 총 RNA를 추출하고, ReverTra Ace 키트 (Toyobo)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 특정 cDNA에서 선택된 mRNA 전사체의 정량화는 GAPDH mRNA 발현으로 표준화한 후 Rotor-Gene Q(Qiagen)에서 QuantitTect SYBR 녹색 PCR 키트(Toyobo)의 유전자 특이적 프라이머 쌍을 사용하여 수행되었다. 이들 유전자의 상대 mRNA 발현 수준을 델타 CT 방법을 사용하여 계산하였다.

[0065] **세포 독성 분석**

[0066] Raw264.7 세포를 처리 12시간 전에 96- 웰 플레이트에서 배양하였다. 세포를 증가된 농도의 베사톨리모드로 처리하고 세포 독성 효과를 MTT 분석 (Roche, USA)에 의해 평가하였다. 처리 후 24시간에 10 μ l의 분석 용액을 각 웰에 첨가하고 5% CO₂ 인큐베이터와 함께 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션 하였다. 450nm에서의 광학 밀도는 마이크로 플레이트 흡광도 판독기로 측정했다.

[0068] **재조합 sM2HA2 융합 단백질의 제조**

[0069] 막 통과 도메인이 없는 세포 외 및 세포질 잔기의 공통 sM2 스패닝(spanning)은 데이터베이스에서 H5N1, H1N1

및 H9N2 서브 타입의 서열 분석으로부터 생성되었다. 이전의 연구는 특히 세포 외 도메인 (아미노산 1-13)이 인플루엔자 바이러스 서브타입에 잘 보존되어 있으며 인플루엔자 바이러스 감염을 방어할 수 있는 mAbs 유도를 위한 에피토프로 인식되고 있음을 보여준다. 보존된 에피토프(아미노산 1-13)의 역할을 고려하여, 본 발명에서 사용된 다른 서브 타입과 최적의 상동성을 보장하기 위해 H5N1의 위치 14 (E→G) 및 18 (R→K)에서 잔기를 변형시켰다. 터미널에서 제한 엔도뉴클레아제 부위 (SecI 및 EcoRI)를 포함하는 특정 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 공통 주형을 증폭시켰다. 이어서, 유전자를 TA 클로닝 방법 (Promega, Madison, WI)을 사용하여 pGEM-T Easy 벡터에 클로닝하였다. 유전자 단편을 절제하고 상응하는 부위를 사용하여 pRSET-A 벡터 (Invitrogen, Carlsbad, CA)의 멀티 클로닝 부위에 프레임 내에 삽입하여 플라스미드 pRSET-A-sM2를 형성하였다. 유사하게, A/EM/Korea/W149/06 (H5N1)의 HA2 유전자 (잔기 15-137)는 각각 59 및 39 개의 말단 부위에 EcoRI 및 HindIII 부위를 첨가하여 변형되었으며, 표적 단백질의 원핵 생물 발현을 위한 플라스미드 pRSET-A-sM2HA2 형성하기 위한 것이다. 플라스미드 작제물은 제한 효소 소화(restriction enzyme digestion)를 사용하여 확인하고 시퀀싱 (Solgent, Daejeon, South Korea)으로 확인하였다. 대장균 BL21 (DE3) 세포를 열 충격 방법을 사용하여 pRSETA-sM2HA2 플라스미드로 형질전환시켰다. 콜로니를 100 mg/ml 암피실린 (HPLC에 의해 96.9% 순도; Calbiochem, La Jolla, CA) 및 35 mg/ml 클로람페니콜 (HPLC에 의해 97% 순도; Calbiochem)이 보충된 5 ml 루리아-베르타니 브로스(Luria-Bertani broth)에 시딩하고 37℃에서 진탕시키면서 성장시켰다. 이어서, 세포를 밤새 200 rpm으로 진탕시키면서 37℃에서 대량의 Luria-Bertani 배지에서 배양 하였다. 배양물이 OD600의 0.6에 도달할 때, 2mM 이소프로필-b-D-티오갈락토피 라노사이드(isopropyl-b-D-thiogalactopyranoside) (99% 순도; Bio Basic, Markham, ON, Canada)를 첨가하고 30℃에서 추가로 12시간 동안 배양함으로써 표적 단백질의 발현이 유도되었다. 배양물을 4℃에서 20분 동안 6000 rpm 에서 원심 분리하여 수확 하였다. 세포 펠렛을 20mM 트리스-HCl, 0.5M NaCl, 10% 글리세롤 및 프로테아제 억제제 (1mM PMSF, Sigma-Aldrich, 서울, 한국)를 함유하는 20ml 콜드 버퍼에 재현 탁시켰다. 박테리아 용해는 25% 진폭에서 2초 펄스 간격 및 1초 간격으로 3분 동안 초음파 처리한 다음 4℃에서 원심 분리 (12,000xg, 20분)하여 수행하였다. 상층액을 제거하고 남은 펠렛을 봉입체로 유지 하였다. 봉입체를 변성 완충액 (20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 10% 글리세롤 및 6M 우레아)에 재현탁 시킨 후, 1분 동안 초음파 처리하고 전과 같이 원심 분리하였다. 잔류 상청액을 버리고, 나머지 펠렛을 변성 완충제 II (20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 8 M 우레아 [pH 8.0])에 재현탁시키고 4℃에서 밤새 진탕시켰다. 펠렛을 초음파 처리하고 전과 같이 원심 분리하였다. 상청액을 봉입체로부터 수득된 단백질로서 분리하고 His-태그 친화성 (His-tag affinity) 크로마토그래피(Qiagen, Valencia, CA)에 의해 정제하였다. 정제된 단백질을 4℃에서 PBS 중의 투과성 셀룰로스 막 (분자량 컷오프, 12-14 kDa; Spectrum Laboratories, Auckland, New Zealand)을 사용하여 투석하였다. 마우스 항-히스티딘 Ab (1 : 2000, 산타 크루즈)를 사용한 SDSPAGE 및 웨스턴 블롯 분석에 의해 표적 단백질을 확인 하였다 정제된 단백질을 백신 항원으로 사용하였다.

[0071] 동물 그룹화 및 백신 접종

[0072] 특정 병원체가 없는 BALB/c (5 주령) 마우스는 Orient bio(한국)에서 구입하였다. 마우스를 기관 동물 관리 및 사용위원회 (대전, 한국)의 승인에 따라 특정 병원체가 없는 환경에서 유지시켰다. 마우스를 각각 5개의 그룹을 포함하는 3개의 실험 세트로 나누었다. 3세트 중 2세트는 12마리였고 나머지 세트는 그룹당 5 마리의 마우스로 나뉘었다. 각각의 세트에서 3개의 마우스 그룹을 2주 간격으로 2개의 2주 간격으로 20 μ g의 이미퀴모드 또는 10 및 20 μ g의 베사톨리모드 보조제와 조합된 15 μ g의 sM2HA2로 근육 내 (즉,) 백신 접종하였다. 대조군으로서, 각 세트로부터 2개의 그룹을 PBS 또는 sM2HA2 단독으로 유사하게 처리하였다. 프라이밍(priming) 후 21일째에 혈액 샘플을 역 궤양 신경총(retro-orbital plexus)을 통해 수집하고 혈청을 원심 분리에 의해 분리하고 추가 분석을 위해 -20℃에 보관하였다. 비장을 35일에 무균 상태로 수집하여 그룹당 12 마리의 마우스를 함유하는 한 세트의 3마리의 마우스로부터 CTL 반응을 무작위로 분석하였다.

[0074] 바이러스 및 접종 테스트

[0075] PR8-GFP, A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), A/Aquatic bird/Korea/W81/2005 (H5N2) 및 A/Chicken/Korea/116/2004 (H9N2) 바이러스들은 충북 대학교 의과 대학(청주, 한국)에서 얻었다. 모든 바이러스는 10일된 닭 배아의 요실액(allantoic fluid)에서 증폭되었다. 마우스를 마취시키고 백신 접종 2주 후 30 μ l PBS에 희석시킨 마우스-적응 바이러스 10 LD₅₀를 마우스의 비강 내 (즉,) 비내로 감염시켰다. 체중 감소 및 생존을 측정하기 위해 고정된 시점에서 12 일 동안 마우스를 모니터링 하였다. 각 그룹에서 4마리의 마우스 및 H5N2 바이러스 감염된 그룹으

로부터 3마리의 마우스를 감염 후 5일 (dpi)에 희생시켜 폐의 바이러스 역가 및 폐 조직 화학 특성을 확인하였다. 생존 시험에 사용될 5 마리의 마우스가 각 그룹에 남았다. 생존율은 사망 또는 체중 감량 20% 감소에 의해 결정되었으며, 이때 동물은 안락사되었다. 고통을 최소화하기 위해 모든 노력을 기울였으며, 최종 모니터링 후 5분 동안 CO₂ 흡입을 사용하여 생존한 모든 마우스를 인도적으로 안락사시켰다.

[0077] ELISA

[0078] 이미퀴모드 및 베사톨리모드를 처리한 Raw264.7, THP-1, BMDM 및 BMDC 세포의 배양 상층액을 처리 후 12 시간 및 24 시간 후에 수집하고 IL-6, TNF- α , IL-12 및 IFN- α 분비를 상용화된 ELISA 키트(BD biosciences, USA)를 사용하여 측정하였다. 혈청 중의 항-sM2HA2 특이적 IgG, IgG1 및 IgG2a 항체의 수준은 간접 ELISA에 의해 검출되었다. 플레이트를 탄산염-코팅 완충제 (15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9.8) 중 500 ng/웰의 정제된 sM2HA2 재조합 단백질로 코팅하고 4°C에서 밤새 인큐베이션한 다음 10% 탈지유와 함께 1시간 동안 실온 인큐베이션 하였다. 면역화된 마우스로부터 회석된 혈청을 플레이트에 첨가하고 37°C 온도에서 3시간 동안 배양하였다. 3회 연속 세척 후, 겨자무과산화효소 (HRP) 접합된 염소 항-마우스 IgG, IgG1 및 IgG2a 항체 (1 : 3000)를 플레이트에 첨가하고 37°C 온도에서 2시간 동안 인큐베이션 하였다. 어두운 곳에서 100 μ l의 TMB 기질 (3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine)에 의해 10분 동안 반응을 진행시키고, 50 μ l의 2N H₂SO₄를 첨가하여 반응을 종결시켰다. 450nm에서의 광학 밀도는 마이크로 플레이트 흡광도 판독기로 측정했다.

[0080] 효소결합면역점(ELISPOT) 분석

[0081] 사이토카인 ELISPOT을 kit를 이용하여 sM2HA2 단백질에 대한 T-세포 반응을 검출하고 비교하였다. 간단히, BD ELISPOT 96- 웰 플레이트를 100 μ l PBS/웰로 항-마우스 인터페론 IFN- γ 또는 인터루킨 IL-4 포획 항체로 코팅하고 4°C에서 밤새 인큐베이션 하였다. 플레이트를 10% 소 태아 혈청 (PAN-Biotech, Germany)을 함유하는 완전한 RPMI 1640 배지로 차단하고 실온에서 2시간 동안 배양하였다. 새로 단리된 비장 세포를 sM2HA2 단백질 (1 μ g/well) 또는 M2 또는 HA2 펩티드 (1 μ g/well) 또는 유일한 배지 (음성 대조군) 또는 5 μ g/ml 피토헤마글루티닌(양성 대조군, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 함유하는 배지에서 5 X 10⁵ 세포/웰로 첨가하였다. 플레이트를 5% CO₂에서 37°C에서 48시간 동안 인큐베이션 하였다. 세포를 버린 후, 플레이트를 비오틴화(biotinylated)된 항-마우스 IFN- γ 및 IL-4 항체, 스트렙타비딘-HRP, 및 기질 용액으로 순차적으로 처리하였다. 마지막으로, 플레이트를 탈 이온수로 세척하고 어둠 속에서 2시간 이상 동안 건조시켰다. Immuno Scan Entry Analyzer (Cellular Technology Ltd., 미국 오하이오 주 Shaker Heights)를 사용하여 스팟을 자동으로 계수하였다.

[0083] 조직 병리학

[0084] 감염 후 3 일 및 5 일에 폐를 무균 상태로 수집하였다. 조직을 10% 포르말린 용액에 고정시키고, 파라핀에 포매(embedded)하고, 절단하고, 헤마톡실린 및 에오신(HE)으로 염색하였다. 병리학적 변화를 평가하기 위해 조직 단편을 광학 현미경으로 조사하였다.

[0086] 폐 바이러스 역가

[0087] 폐의 바이러스 역가를 결정하기 위해 50% 조직 배양 감염 용량 (TCID₅₀) 분석을 수행하였다. 간략하게, 폐 조직을 항생제 및 항진균제(Life Technologies, USA)를 함유하는 PBS에서 균질화하고 세포 파편을 제거하기 위해 12,000 3g에서 원심 분리하였다. 모든 샘플을 즉시 10배 연속 희석하고, 습한 대기에서 1시간 동안 37°C에서 융합성(confluent) 개 신장세포(Madin-Darby canine kidney cell)와 함께 배양하였다. L-1-토실아미드-2-페닐에틸 클로로메틸 케톤 트립신(Thermo Fisher Scientific, USA)을 함유하는 오버레이 배지를 감염된 세포에 첨가하고, 72시간 동안 배양하였다. 세포 역가 효과를 관찰한 후 HA 시험에 의해 바이러스 역가를 측정하고, log₁₀ TCID₅₀/폐 조직으로 표현된 리드 및 뮌치(Reed and Muench) 방법에 의해 계산하였다.

[0089] <실험예 1> 인플루엔자 A 바이러스에 대한 백신 보조제로써의 효과

[0090] 암컷 BALB/c 마우스(Orient bio)는 동물 연구 전 7주령까지 유지되었다. 그룹당 5마리의 마우스를 단독으로 두 당 0.1 또는 0.5 ug의 용량으로 또는 베사톨리모드의 20 μ g/두 당 또는 이미퀴모드와 함께 불활성화 된 A/Puerto Rico/8/34(PR8) 바이러스로 비강 내 면역화시켰다. 3주 후, 면역화 또는 면역화되지 않은 마우스에 100배-50% 마우스 치사 용량 (MLD₅₀)의 마우스-적응 PR8 (maPR8)을 비강 내로 투여하였다. 바이러스 감염으로부터 15일 동안 체중 변화를 모니터링 하였다. 체중의 30% 이상이 감소된 생쥐는 한국 화학연구원(KRICT)의 기관 동물 관리 및 사용위원회 (IACUC)가 승인한 윤리 지침에 따라 안락사되었다. Kaplan-Meier 생존 곡선은 GraphPad Prism 6 (GraphPad Software)을 사용하여 작성되었다.

[0092] ELISA 기반 면역 글로불린 G (IgG) 적정(titration)

[0093] 총 IgG, IgG1 및 IgG2a 역가는 96 웰 플레이트에서 ELISA로 측정되었다. 간단하게, 플레이트를 4℃에서 밤새 maPR8 (웰당 50 ng)로 코팅하고 1% BSA로 차단하였다. 마우스는 면역화 후 14 일째에 눈의 후안와 신경총 (retroorbital plexus)으로부터 채혈하였다. 그룹당 3마리 마우스(더 적은 용량의 백신으로)로부터의 혈액 샘플을 모아 혈청을 제조하였다. 이들은 1% BSA로 PBS에서 연속적으로 2배 희석된 후, 고정된 maPR8과 실온(RT)에서 1시간 동안 배양되었다. PBS/0.05% 트윈-20 (PBS-T)으로 세척한 후, HRP-접합된 염소 항-마우스 IgG, IgG1 또는 IgG2a 이차 항체를 추가로 1 시간 동안 1 : 10,000 희석(Sigma)에서 개별적으로 처리하였다. 플레이트를 PBS-T로 3회 다시 세척하고 TMB 용액 (Invitrogen)을 첨가하였다. 1M 인산을 첨가하여 10분 후 반응을 중지시키고, 450 nm에서 광학 밀도를 측정하였으며, 여기서 PBS 단독 대조군 샘플을 각 샘플의 판독치로부터 제외하였다.

[0095] 헤마글루티닌 억제(HAI) 분석

[0096] IgG 적정을 위해 제조된 혈액 샘플을 37℃에서 밤새 RDE로 처리하고 56℃에서 30분 동안 열-불활성화시켰다. 25 마이크로 리터의 혈청을 둥근 바닥 96- 웰 플레이트에 2회 연속 희석하고, 동일한 부피의 8 HA 단위의 maPR8 바이러스 (340 PFU에 상응)를 실온에서 30분 동안 혼합하였다. 닭 적혈구 (0.5%)를 각 웰에 첨가하고 플레이트 판독 전에 30분 동안 4℃에서 인큐베이션 하였다. 1:40 이상의 HAI 역가는 혈청 양성인 것으로 간주되었다. PBS만이 음성 대조군으로 사용되었다.

[0098] <실험예 2> 구제역 바이러스에 대한 백신 보조제로써의 효과

[0100] FMDV O 형 VP1 멀티 에피토프 (OVM) 유전자 구축

[0101] FMDV 서브 타입 01/Manisa/Turkey/69, 0/Andong/SKR/2010 및 0/ Jincheon/SKR/2014 바이러스들의 VP1염기서열은 NCBI 데이터베이스에서 수집되었다. 유전자 에피토프들은 GENETYX-WIN 버전 4.0 소프트웨어에 의해 E. coli에서 최적화된 코돈을 사용하였다. 인접한 에피토프 사이의 간섭을 최소화하기 위해, 각 에피토프를 Gly-Pro-Gly-Pro-Gly 링커 펩티드에 의해 분리하였다. 또한 EcoRI 및 XhoI 제한 효소 사이트가 각각 OVM의 5' 끝 및 3' 끝에 포함되었다. 디자인 DNA 서열은 상업적 유전자 합성 회사(Bioneer, 한국)에 의해 합성되었다. 서열 검증된 합성 삽입물을 T4 DNA 리가아제(TaKaRa korea biomedecal, 한국)에 의해 EcoRI 및 XhoI 제한 효소 부위를 사용하여 원핵 생물 pH1 평행 1 발현 벡터에 클로닝하였다.

[0103] 재조합 OVM 단백질의 발현 및 정제

[0104] 구축된 플라스미드를 42℃에서 열충격 변환을 사용하여 E-coli로 형질전환시키고 37℃에서 100 μ g/ml 암피실린 (CALBIOCHEM, 독일)을 함유하는 다량의 루리아 베르타니(LB) 브로쓰에서 배양하였다. 배양물이 600nm(OD600)에서 0.6까지의 광학 밀도에 도달하면, 재조합 단백질의 발현을 30℃에서 16시간 동안 1mM의 이소프로필 β -d-1-티오갈락토피라노시드(IPTG) (BIO BASIC, Canada)로 유도하였다. 단백질 정제는 Bioprogen(상업용 회사, 한국)에 의해 수행되었다. 간단하게, 플라스미드 형질 전환된 E-coli 세포를 3L의 LB 암피실린 브로쓰에서 배양하

였다. 유도 후, 세포를 수거하고 세척 완충제 (50 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0)로 2회 세척하였다. 최종 세포 펠릿을 200 ml의 50 mM Tris HCl, 0.2 M NaCl 함유 완충액에 재현탁시키고 초음파 처리 하였다. 용해성 분획을 고정화된 금속 친화성 크로마토 그래피 (IMAC) 컬럼 (Bio-Rad, USA)을 사용하여 고속 단백질 액체 크로마토 그래피 (FPLC)에 의해 정제하였다.

[0106] 쥐에서의 면역화 및 FMDV 투여

[0107] 오리엔트 컴퍼니 리미티드(한국)로부터 구매한 총 5마리의 암컷 5주령 C57BL/6 마우스를 이 실험에 사용하였다. 동물 실험 및 사용위원회의 승인을 받은 동물 및 식물 검역 기관의 BSL3 실험실 시설에서 동물 실험을 수행하였다. 마우스를 4개의 시험 그룹(그룹마다 N=5)으로 나누었다. 시험 그룹은 하기와 같다: 포스페이트 완충 식염수 (PBS), 상업용 백신, pOVM 및 베사톨리모드+ pOVM은 표 1에 도시된 것과 같다. 백신 접종 스케줄 (도 1A)에 기재된 바와 같이 마우스 면역화 및 혈청 수집을 수행하였다. 베사톨리모드에 의한 강화된 백신 효능을 관찰하기 위해, 백신 접종된 마우스는 면역 후 28일에 100LD₅₀의 O/Jincheon 구제역바이러스가 복강 내(IP)로 감염되었다. 모든 마우스에 대한 생존율 및 체중 경고는 투여 후 7일 동안 모니터링되었다. 동물의 고통을 최소화하기 위해 모든 노력을 기울였고, 모든 생존 마우스는 최종 모니터링 후 인도적으로 안락사되었다.

표 1

[0109] 백신 구성 및 예방 접종 그룹의 수

그룹	접종원			접종원 부피	루트	마우스 수
	OVM	베사톨리모드	PBS			
PBS	-	-	100 u μ l	100 u μ l	I.M	5
상업용 백신	-	-	-	100u μ l	I.M	5
OVM	20ug (33u μ l)	-	67 u μ l	100u μ l	I.M	5
OVM+베사톨리모드	20ug (33u μ l)	10ug (10u μ l)	57 u μ l	100u μ l	I.M	5

[0110] ELISA

[0111] 수집된 혈청 샘플에서 간접 효소-결합 면역 흡착 분석(ELISA)을 통해 항체 역가를 측정하였다. 구체적으로, 96 웰 면역 플레이트 (Nunc, 덴마크)를 4℃에서 밤새 500ng/웰의 OVM 단백질로 코팅하였다. 이어서, 플레이트를 PBST로 3회 세척하고 실온에서 2시간 동안 10% 탈지유로 차단하였다. 이어서, 플레이트를 PBST로 3 회 세척 한 후, 37℃에서 2시간 동안 2배 연속 희석된 혈청 샘플 (2% 탈지유에 희석된 1:25 내지 1 : 800) 100 μ l를 첨가하였다. 이어서, 플레이트를 PBST로 3회 세척한 후, 37℃에서 2시간 동안 100 μ l의 1 : 3000 희석된 염소 항-마우스 IgG HRP (GeneTex, USA)와 함께 인큐베이션 하였다. PBST로 5회 추가 세척을 수행한 후에, 플레이트를 실온에서 15분 동안 TMB 기질 시약 (BD Bioscience, USA)과 반응시켰다. 이어서, 정지 용액 (2N H₂SO₄)을 첨가하고 Apollo LB 913 ELISA 리더 (BERTHOLD Technologies, USA)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0113] <평가 결과>

[0114] 베사톨리모드는 이미퀴모드보다 TLR7을 더 강력하게 자극한다.

[0115] 베사톨리모드가 TLR7을 표적화하는지 여부를 조사하기 위해, TLR7-발현 세포에서 NF- κ B 프로모터 활성을 베사톨리모드의 농도 (0.1, 1.0 및 10 μ g/ml)를 증가시켜 가면서 측정하였고, 다른 작용제인 이미퀴모드를 양성 대조군으로 사용하였다. 베사톨리모드 및 이미퀴모드는 hTLR7뿐만 아니라 mTLR7의 발현에 따라 세포에서 NF- κ B 프로모터 활성을 자극함을 나타내었다(도 1). 그러나, 이러한 NF- κ B 프로모터 활성은 무처리된(null) 세포에서는 유도되지 않았다. 중요하게도, TLR7-매개 선천성 면역 반응은 이미퀴모드와 비교하여 베사톨리모드에 의해 더욱 유의하게 향상되었다.

[0117] 베사톨리모드는 류린 BMDM 및 BMDM에서 강력한 사이토카인 생성 및 면역 반응 유전자 전사를 유도한다

[0118] 이전의 연구에서는 TLR7 매개 선천성 면역 방어 신호 전달을 활성화시키는 TLR7 작용제로서 베사톨리모드를 입증하였다. 톨-유사-수용체 7은 주로 항 바이러스 단백질의 발현 증가와 같은 항 바이러스 이펙터 메커니즘을 유도하는 제1형 인터페론의 생산을 조절한다. 후속 바이러스 감염시 방관자 세포의 세포 자멸사에 대한 감작, 선천 면역과 적응 면역 사이의 상호작용(cross-talk)을 중재한다. 본 발명에서는 잘 알려진 TLR7 작용제인 이미퀴모드의 처리와 비교하여 뮤린 BMDM 및 BMDC에서 염증성 사이토카인 및 인터페론 생산을 자극하는 베사톨리모드의 효능을 평가하는 체외 실험 접근 방식을 채택했다. 베사톨리모드 처리는 자극 후 12시간 및 24시간에 용량 의존적으로 강력한 IL-6, TNF- α , IL-12 및 IFN- β 사이토카인 분비 유도를 나타내었고 (도 2A 및 1B), 이들 사이토카인 유도 수준은 이미퀴모드로 처리한 것보다 더 높았다. 베사톨리모드에 의해 매개된 면역 반응의 분자 시그니처를 결정하기 위해, 본 발명자들은 qPCR에 의해 BMDM에서 선택된 사이토카인 및 유형 I IFN 자극된 유전자 (ISG) 전사 수준을 평가하였다. 베사톨리모드 처리는 처리 후 8시간에 강하게 유도된 사이토카인 및 ISG 유전자 mRNA 수준을 나타내었고, 이 상승된 유전자 전사는 베사톨리모드 처리시 증가된 사이토카인 생성과 명백한 상관 관계를 보여준다. 이러한 사이토카인 및 ISG 유도는 다양한 APC의 활성을 증가시키고 항원 제시를 향상시킬 것이다. 이러한 결과는 베사톨리모드가 효과적인 백신 보조제의 주요 특징인 강력한 면역 자극 기능을 가지고 있음을 시사한다.

[0120] 베사톨리모드는 인간 및 마우스 면역 세포주를 자극하여 선천적 면역 반응을 유발한다.

[0121] 염증성 사이토카인 생성 증가에 대한 베사톨리모드의 효과를 추가로 확인하기 위해 Raw 264.7 세포를 이미퀴모드 또는 베사톨리모드로 처리하였다. 세포 상층액에서 이미퀴모드 또는 베사톨리모드 처리 12시간 및 24시간 후에 분비된 타입 I IFN 및 염증성 사이토카인을 분석하였다. 도 3a에 도시된 바와 같이, 베사톨리모드는 다량의 분비된 IL-6, TNF- α 를 유도할 수 있었고 IFN- β 는 의존적인 방식을 수행하였다. 또한, THP-1 세포에 대해서도 동일한 처리를 수행하였다. 유사하게, THP-1 세포에서 또한 베사톨리모드 처리시 용량 의존적으로 증가된 IL-6, TNF- α 및 IFN- β 분비를 나타냈다(도 3B). 또한, 사이토카인 및 ISG 유전자 발현 수준은 qPCR에 의한 베사톨리모드 자극으로 Raw 264.7 세포에서 분석되었다. 처리 8시간 후에 베사톨리모드 처리된 세포에서 상승된 사이토카인 및 ISG 유전자 mRNA 수준이 관찰되었다. 베사톨리모드는 TLR7 작용제로 알려져 있으며 치료시 사이토카인 유도가 증가하기 때문에 종래의 TLR7 신호 축, RLR 신호 축 및 JAK/STAT 신호 축을 포함하는 타입 I 및 타입 II IFN 신호 경로는 베사톨리모드 처리 후에 활성화될 수 있는 것으로 추측된다. 이를 연구하기 위해, 베사톨리모드로 Raw 264.7 세포를 처리한 후 특이적 면역 블롯 분석법으로 IB κ α , p65, ERK, p38 TBK1, IRF3 및 STAT1과 같은 신호 전달 어댑터 분자의 인산화에 의한 활성화를 관찰되었다. 실제로, Raw 264.7 세포에서의 베사톨리모드 처리는 I κ B α , p65, ERK, p38 TBK1, IRF3 및 STAT1 어댑터 단백질의 인산화를 명확하게 유발시켰다 (도 3d). 종합하면, 이들 데이터는 베사톨리모드가 전 염증성 사이토카인, 유형 I 인터페론 및 ISGs 유전자 전사 및 후속 사이토카인 및 항 바이러스 인자 분비를 매개하는 메커니즘을 정의한다.

[0123] 항원 특이적 항체 반응 유도를 위한 sM2HA2와 베사톨리모드의 조합

[0124] 새로운 백신의 개발과 현재의 예방 접종 접근법을 더욱 최적화하기 위해 절대적으로 중요한 것은 새로운 부류의 백신보조제 사용이다. 이러한 맥락에서, 소분자 TLR7/8 작용제는 백신 보조제로서 큰 잠재력을 보여주었다. 생체 내에서 효과적인 백신 보조제로서 베사톨리모드의 효능을 평가하기 위해, BALB/c 마우스 그룹을 PBS, sM2HA2 단독으로 또는 이미퀴모드 또는 베사톨리모드와 함께 면역화(i.m.)하였고, 면역화 및 혈청 수집을 실험스케줄에 의해 수행하였다(도 4A). 항원에 대한 면역원성은 IgG ELISA에 의해 sM2HA2 단백질(도 4B), sM2 펩티드(도 4C) 및 HA2 펩티드(도 4D)에 특이적인 혈청 IgG 반응에 대해 평가되었다. 베사톨리모드와 조합된 sM2HA2로 면역화된 마우스 그룹은 sM2HA2 단독으로 면역화된 것보다 유의하게 더 높은 혈청 IgG 반응을 유도하였고, 이 수준은 sM2HA2를 이미퀴모드와 함께 면역화된 것보다 훨씬 더 높았다. 또한, sM2HA2 특이적 IgG1 및 IgG2a가 또한 평가되었고, Th2 관련 IgG1 및 Th1 관련 IgG2a 둘 모두는 sM2HA2 단독 면역 마우스에 비해 베사톨리모드 접종 면역화된 마우스와 조합된 sM2HA2에서 유의하게 더 높은 수준으로 증가되었다(도 4E). 종합적으로, 이들 결과는 체액성 면역을 효과적으로 유도함으로써 항원 특이적 면역 반응을 유발하는 베사톨리모드의 효능을 명확하게 나타내었다.

[0126] 항원 특이적 T 세포 반응이 유발된 sM2HA2와 베사톨리모드의 조합

[0127] 효과적인 백신은 T 세포 기억을 유지하여 적응 면역의 세포 군을 나타내는 빠른 리콜(recall)반응을 가능하게 한다. 지속적인 T 세포 기억을 조사하기 위해, 비장에서 백신 접종에 의해 유도되는 항원 특이적 IFN- γ 및 IL-4 사이토카인 분비 세포를 ELISPOT 방법으로 평가하였다. 비장 세포를 부스팅 2주 후 분리하고 sM2HA2 단백질, sM2 펩티드 및 HA2 펩티드로 재자극시켰다. 베사툴리모드로 백신 접종된 마우스는 sM2HA2 단독 또는 대조군과 비교하여 상당히 높은 sM2HA2 단백질, sM2 펩티드 및 HA2 펩티드 특이적 IFN- γ 및 IL-4 스팟 형성 세포 (SPC)를 유도하였다(도 4F, 4G 및 4H). 그러나, 보조제가 없는 sM2HA2 재조합 단백질은 또한 sM2HA2, sM2 및 HA2로 자극 후 비장에서 IFN- γ 및 IL-4 SPC의 검출 가능한 수준을 유도할 수 있으며, 이는 융합 단백질 sM2HA2 자체가 세포 면역을 유도할 수 있고 베사툴리모드는 이 면역성을 크게 향상시킨다. 중요하게도, 이미퀴모드와 함께 sM2HA2로 백신 접종된 마우스는 베사툴리모드가 투여된 마우스에 비해 더 낮은 SPC를 나타낸다. 이 결과는 sM2HA2항원을 베사툴리모드와 함께 근육 내로 접종시 항원 특이적 세포 면역을 효과적으로 유도하였다.

[0129] **베사툴리모드와 결합된 sM2HA2는 다양한 인플루엔자 아형 치사 감염을 방어한다.**

[0130] 인플루엔자 A 감염의 치명적인 감염에 대해 베사툴리모드에 의한 백신의 방어 효능 향상을 검증하였다. 백신으로 접종된 마우스는 10 LD₅₀의 마우스에 적응된 고병원성 인플루엔자 (HPAI)인 A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), A/Aquatic bird/Korea/W81/2005 (H5N2) 및 A/Chicken/Korea/116/2004 (H9N2) 바이러스 등으로 감염되었다. 방어 효과는 생존율과 체중 변화에 따라 결정되었고, 12dpi까지 매일 관찰하였다. 베사툴리모드 복합 백신 군을 제외한 모든 백신 군에서 상당한 체중 손실 (20% 이상)이 관찰되었다(도 5A-5C, 하부 패널). sM2HA2 단독으로 면역화된 마우스는 모든 3가지 인플루엔자 아형에 의한 감염에 대해 완전한 치사성을 나타낸다. 유사하게, 이미퀴모드 백신 그룹을 갖는 sM2HA2는 3가지 인플루엔자 아형 모두에 대한 감염에 대한 방어를 이끌어 낼 수 없었으며, H5N2 및 H9N2 감염 모두에 대해 100% 치사율이고 H1N1 감염에 대해 20% 방어하였다. 중요하게는, 베사툴리모드 백신 그룹과 조합된 sM2HA2로 면역화된 마우스는 체중 감소의 빠른 회복과 함께 무시할만한 질병의 징후 및 약간의 체중 감소를 보여 주었고, 평균 시간 방어 효능은 H5N2 아형의 치명적 감염에 대해 100%, H9N2 및 H1N1 치사 감염에 대해 80%를 나타내었다(도 5A-5C 상부 패널). 종합하면, 이들 결과는 sM2HA2항원과 조합된 베사툴리모드에 의해 sM2HA2항원의 다양한 인플루엔자 아형에 대한 방어 효능을 상당히 개선시킨다는 것을 나타낸다.

[0132] **베사툴리모드와 결합된 sM2HA2는 폐 바이러스 로드(load) 감소 및 폐 기능 개선**

[0133] 베사툴리모드의 혼합에 의한 sM2HA2 항원의 향상된 면역 효과를 추가로 이해하기 위해, H5N2 및 H9N2 인플루엔자 아형 바이러스로 감염시킨 후 5일뒤에 마우스의 폐에서 각각의 바이러스 증식을 평가하였다(도 4A). 도 5D 및 5E에 도시된 바와 같이, 베사툴리모드 면역화와 조합된 sM2HA2는 H5N2 및 H9N2 바이러스의 제거에 효과적이었다. 이는 이미퀴모드, sM2HA2 단독 및 대조군 면역화 그룹과 조합된 sM2HA2와 비교하여 5dpi에서 바이러스 역가가 현저히 낮음을 나타낸다. 이 낮은 폐내 바이러스 역가는 다양한 인플루엔자 아형에 의한 감염으로 인한 사망률 감소와 명확한 상관 관계를 보여준다. 또한, 5dpi에서 H5N2 바이러스 감염 후 면역화 된 마우스의 폐 조직 병리를 검사 하였다. 폐 바이러스 역가 결과와 일관되게, 폐의 HE 염색된 섹션은 PBS 및 sM2HA2 단독으로 백신 접종된 마우스가 혈관, 세기관지 및 폐포 전반에 걸쳐 심각한 염증성 세포 침윤을 가졌으며, 이미퀴모드와 조합된 sM2HA2로 백신 접종된 마우스조차도 중증 폐포 염증 세포 침윤 및 세기관지 주위의 구조적 붕괴를 나타냈다. 중요하게도, 베사툴리모드와 조합된 sM2HA2로 백신 접종된 마우스는 중증 폐 염증의 징후가 더 낮았다(도 5F). 종합하면, 이들 결과는 sM2HA2항원과 베사툴리모드와의 결합이 sM2HA2항원에 대한 백신 효능을 증가시키고 이 유도된 백신 효능이 비강 내 인플루엔자 바이러스 감염에 대한 폐 염증 반응을 억제한다.

[0135] **베사툴리모드는 비강 내 투여된 인플루엔자 백신의 방어 효능을 향상시킨다.**

[0136] 백신 보조제로서의 베사툴리모드 효과를 인플루엔자 바이러스의 비강투여 모델을 사용하여 조사하였다. maPR8의 100 MLD₅₀의 감염은 6 내지 8 d.p.i만큼 빠른 체중 감소 및 100% 사망률을 유발하는 것으로 관찰되었다(도 6A, 6C). 대조적으로, 1 마리당 0.1 및 0.5 μ g의 용량에서 불활성화 PR8을 사용한 비강 내 백신 접종은 각각 공격받은 마우스의 20% (1/5) 또는 80% (4/5)를 방어하였다. 그러나, 이 두 그룹은 여전히 10일 d.p.i.까지 심각한 체중 감소를 나타냈다. 특히, 방어 효과는 베사툴리모드 및 이미퀴모드에 의해 향상되었다. 저용량 백신 접종 그

roup (두 당0.1ug)에서 바이러스 감염으로 인한 체중 감소가 감소하고 생존율이 100% 및 80%로 향상되었다(도 6A, 6B). 고용량 (두 당 0.5 ug)의 백신 접종 그룹에서 두 화합물 모두 백신 효능을 자극하여 100% 생존율을 나타냈다. 이 경우, 베사톨리모드가 이미퀴모드가 아닌 보조제로 사용될 때 평균 체중 감소가 더 완화되었다(도 6C, 6D). 인플루엔자 바이러스에 감염된 생쥐의 체중 감소와 사망률이 개선되면, 베사톨리모드가 이미퀴모드보다 더 강력하게 예방 비강 내 백신의 보조 효과를 가진다는 것을 알 수 있다.

[0138] 베사톨리모드는 마우스에서 바이러스 특이적 IgG를 향상시킨다

[0139] 베사톨리모드가 마우스에서 maPR8 바이러스에 대한 체액성 반응을 향상시킬 수 있는지를 조사하기 위해, 혈청 내 총 IgG, IgG1 및 IgG2a의 인플루엔자 바이러스-특이적 항체를 면역 후 2 주에 ELISA에 의해 결정하였다. 보조제가 없는 경우, 총 IgG, IgG1 및 IgG2a의 수준은 불활성화 백신에 의해 증가되었다(도 7A, 7B 및 7C). 흥미롭게도, 이 백신 전용 그룹과 비교할 때, 베사톨리모드의 첨가는 총 IgG 및 IgG2a의 양을 각각 1.5 및 1.3 배로 현저하게 향상 시켰지만, 혈청에서의 IgG1은 그렇지 않았다. 베사톨리모드에 의한 IgG2a의 증가에 기초하여, 점막 백신 보조제가 특정 Th1 매개 면역 반응을 촉진시키는 것으로 제안될 수 있다. HA 억제 분석에서, 백신 단독의 면역 후 이의 역가는 10이었다. 이 중화 역가는 백신에 보조제 화학 물질, 이미퀴모드 및 베사톨리모드를 각각 첨가하여 40 및 80으로 증가시켰다(도 7D). 종합하면, 베사톨리모드는 Th1- 매개 점막 면역 반응을 자극하고 바이러스-특이적 중화 항체를 풍부하게 유도하여 인플루엔자 A 바이러스에 대한 비강 내 백신의 방어 효과를 향상시킨다는 것을 제안한다.

[0141] 마우스에서 베사톨리모드는 구제역 재조합 항원 OVM의 면역원성을 향상시킨다.

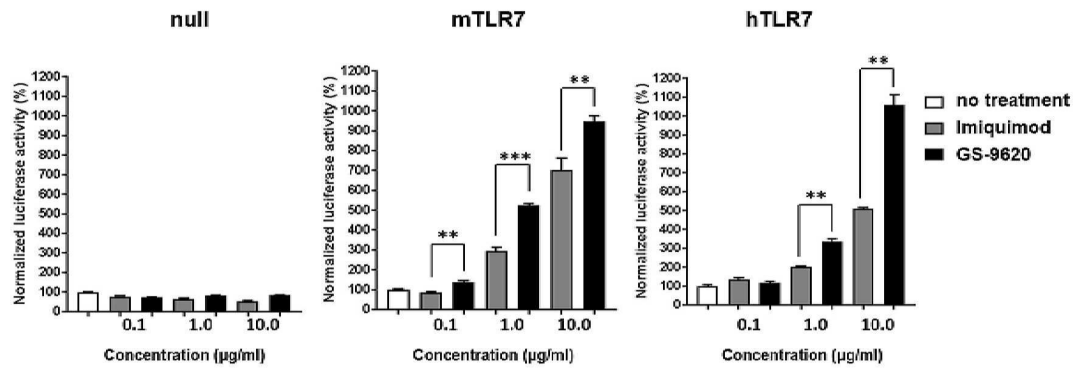
[0142] 재조합 OVM 단백질 항원을 베사톨리모드와 함께 접종된 마우스에서의 체액성 면역 향상을 검증 평가하기 위해, 본 발명자들은 상이한 백신 그룹에 대한 항-OVM 혈청 IgG 수준 반응을 측정하였고, 결과를 상업용 백신 및 OVM 전용 백신과 비교했다. 면역화 및 혈청 수집을 예정대로 수행하였다(도 8A). 혈청을 연속 희석하고 간접 ELISA를 수행하여 상이한 그룹에서 항-OVM 특이적 혈청 IgG 수준을 측정하였다. 도8B에 도시된 바와 같이, 베사톨리모드를 보조제로 구제역 재조합 항원과 함께 접종된 마우스는 OVM 단독 백신 접종 그룹과 비교하여 유의하게 더 높은 혈청 항 OVM IgG 항체역가를 나타내었다. 이러한 결과는 베사톨리모드가 구제역 항원에 특이적인 체액성 면역 반응을 향상 유도할 수 있는 백신보조제로서 기능한다는 것을 분명히 나타내었다.

[0144] 베사톨리모드와 함께 구제역 재조합 항원 OVM 사용시 치명적인 FMDV 감염으로부터 보호할 수 있다.

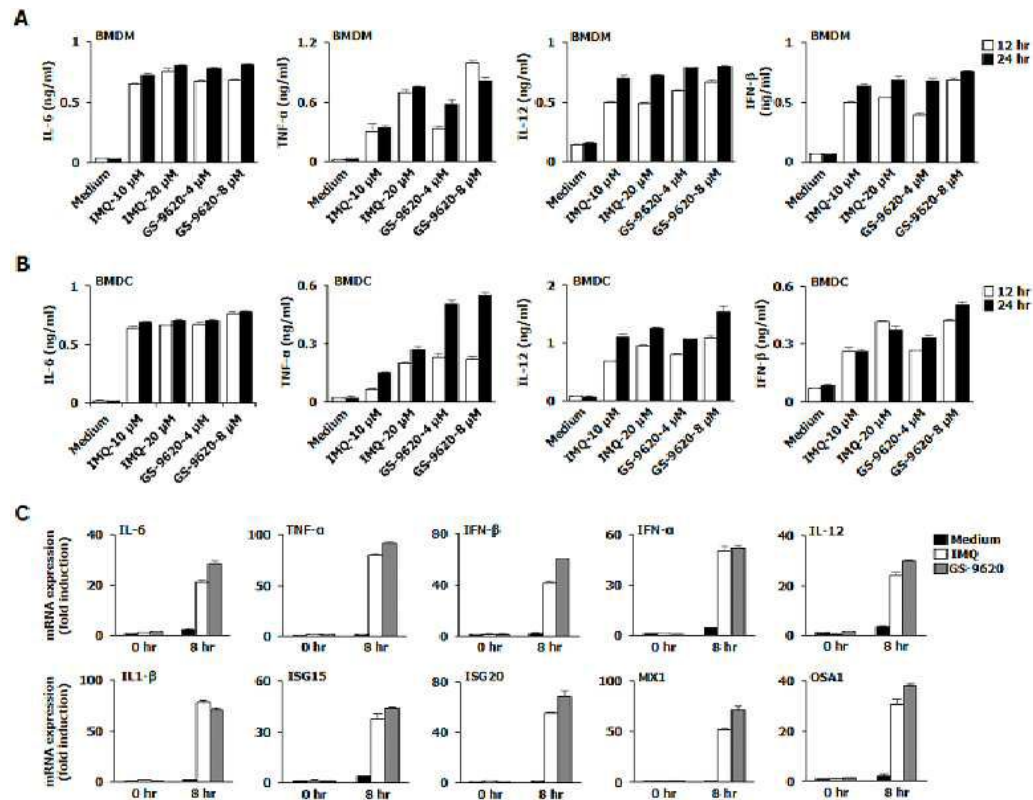
[0145] 베사톨리모드에 의해 향상된 구제역 재조합 항원의 구제역바이러스 방어 효과를 검증하기 위해, 백신 접종된 마우스를 100 LD₅₀의 0 진천 바이러스로 복강내(IP) 투여하여 공격접종하였다. 방어 효과는 생존율 및 체중 변화에 기초하여 결정되었으며, 이는 7dpi까지 매일 모니터링되었다. 도 8C 및 8D에 도시된 바와 같이, OVM+베사톨리모드 그룹은 100% 방어능을 가지며, 이는 상업적 백신 그룹의 효과와 유사하다. OVM+베사톨리모드 그룹의 마우스는 백신 접종 후 2일째까지 7% 체중 감소를 나타냈다. 그러나, OVM+베사톨리모드 백신 접종 그룹의 모든 동물은 OVM만으로 백신 접종된 동물과 비교하여 효과적인 체중 감량 회복을 나타냈다. 종합적으로, 이들 결과는 도 8B에 나타난 바와 같이 구제역 재조합 항원인 OVM과 함께 베사톨리모드로 백신 접종된 마우스의 항원 특이적 체액성 면역 반응의 상승과 일치하였다.

도면

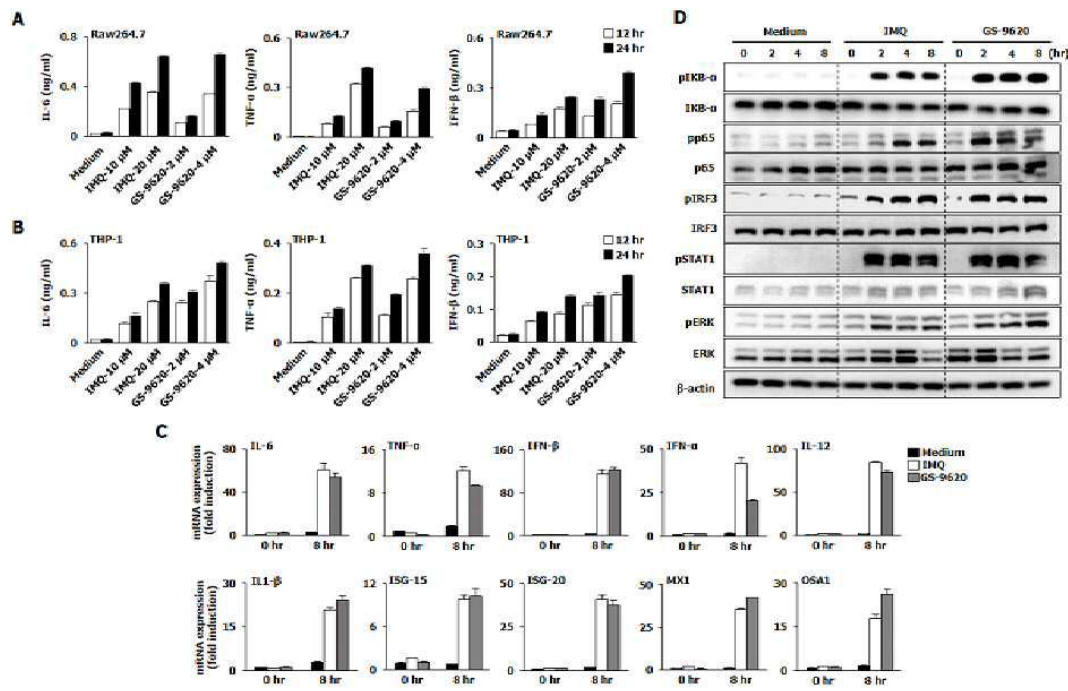
도면1



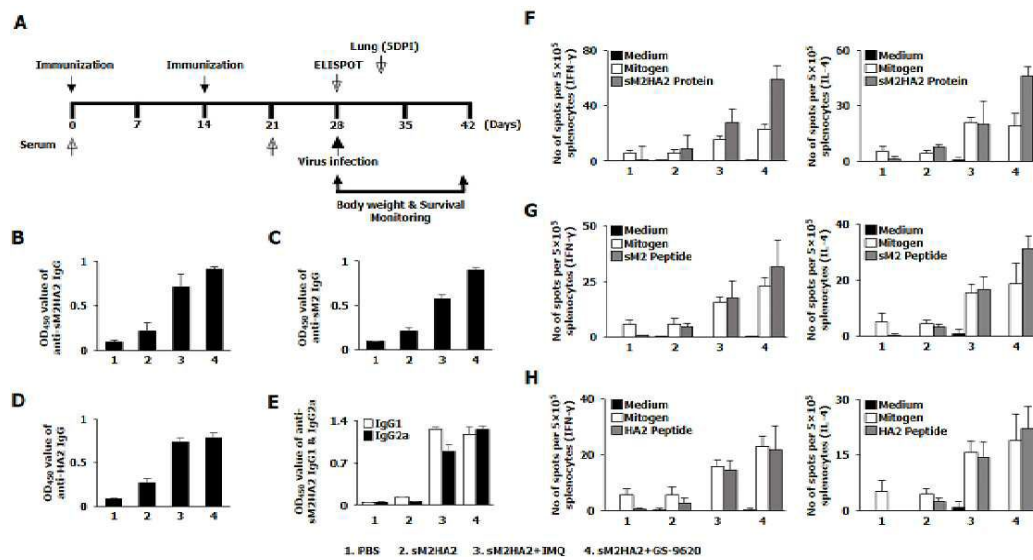
도면2



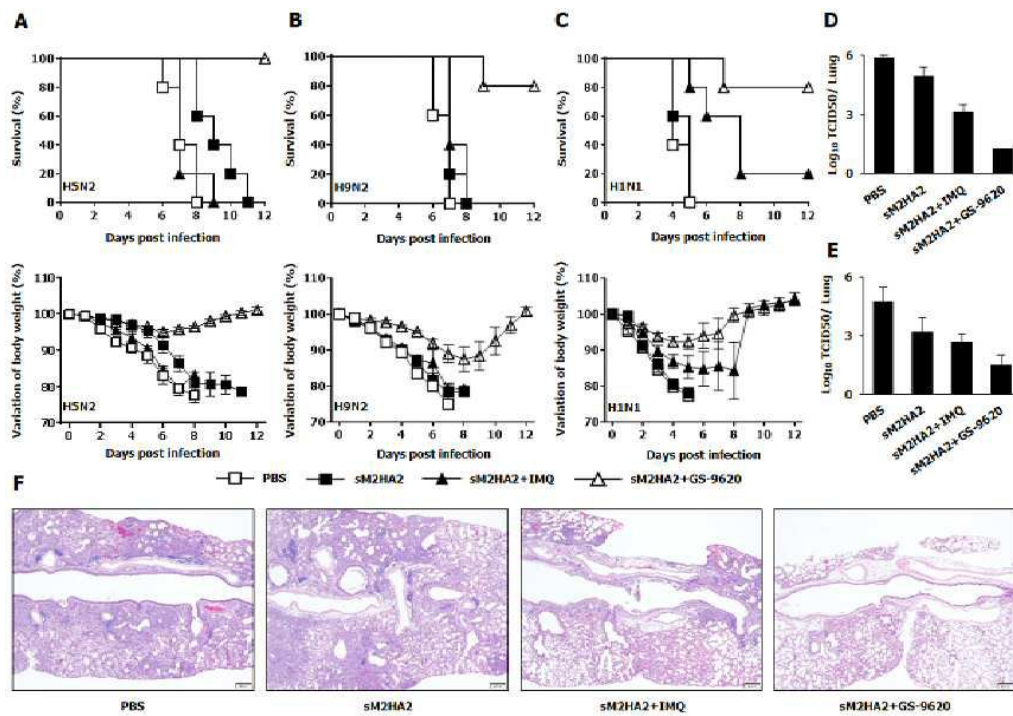
도면3



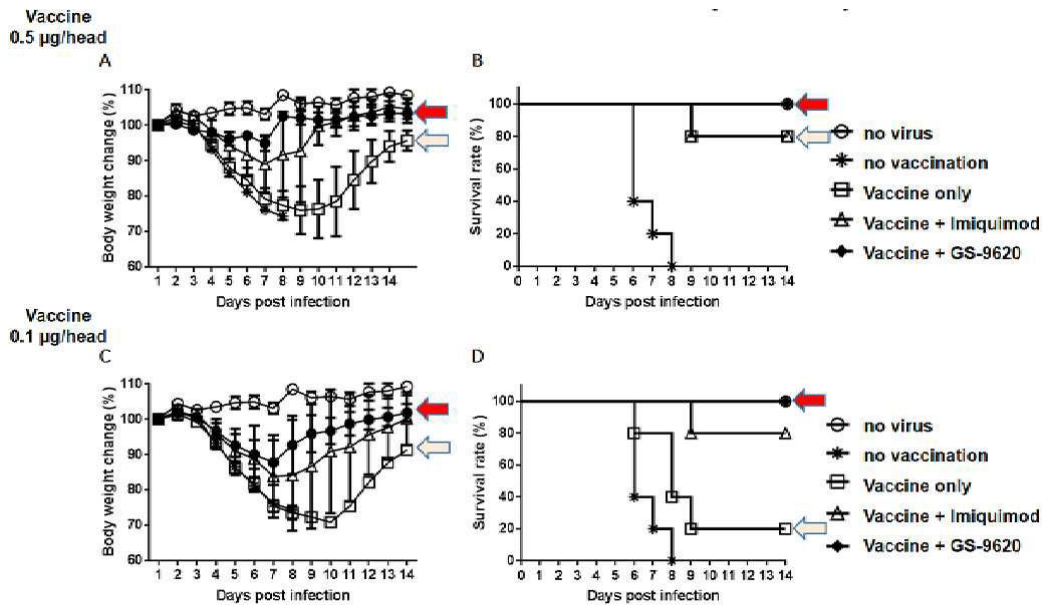
도면4



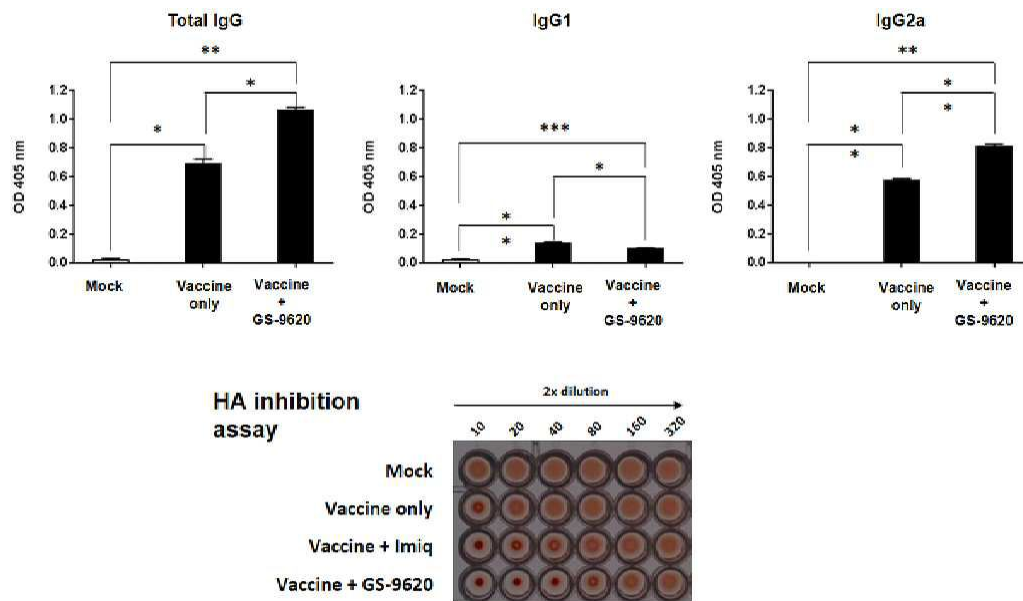
도면5



도면6



도면7



도면8

