



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0138850  
(43) 공개일자 2010년12월31일

(51) Int. Cl.

A61K 39/39 (2006.01) A61K 39/145 (2006.01)

A61P 31/16 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0060489

(22) 출원일자 2010년06월25일

심사청구일자 2010년06월25일

(30) 우선권주장

1020090056844 2009년06월25일 대한민국(KR)

(71) 출원인

주식회사 바이오리더스

대전광역시 유성구 용산동 559

충북대학교 산학협력단

충청북도 청주시 흥덕구 개신동 12

(뒷면에 계속)

(72) 발명자

성문희

대전광역시 유성구 장대동 283-4번지 갤럭시빌 2  
차 902호

부하령

대전광역시 유성구 신성동 대림두레아파트 103동  
1405호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이처영

전체 청구항 수 : 총 13 항

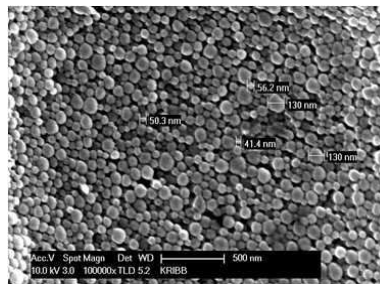
(54) 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자를 함유하는 면역보강제 조성물

(57) 요약

본 발명은 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자를 함유하는 면역보강제 조성물 및 상기 면역보강제를 함유하는 백신용 조성물에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 안전성이 확보된 폴리감마글루탐산과 키토산의 이온결합에 의한 나노입자를 함유하는 면역보강제 조성물 및 상기 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자와 항원을 함유하는 백신용 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따른 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자를 함유하는 면역보강제 조성물은 독성 및 부작용이 거의 없으며, 바이러스 및 세균성 감염증에 대한 백신과 암에 대한 인체용 또는 동물용 예방 및 치료용 백신에 첨가되어 항체생성율을 증가시키는 효과가 있다.

대표도 - 도1



(71) 출원인

**충남대학교산학협력단**

대전광역시 유성구 궁동 220번지 충남대학교

**국민대학교산학협력단**

서울특별시 성북구 정릉동 861-1 국민대학교내

**한국생명공학연구원**

대전 유성구 어은동 52번지

(72) 발명자

**김철중**

대전광역시 유성구 원촌동 257-18 싸이언스빌  
6-102

**최영기**

충북 청주시 흥덕구 산남동 현진에버빌 108동 706  
호

**임용택**

대전광역시 대덕구 송촌동 선비마을아파트 409동  
1502호

**정동진**

대전광역시 서구 정림동 640번지 우성아파트 121동  
1502호

**심상무**

대전광역시 서구 탄방동 산호아파트 102동 211호

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

폴리감마글루탐산-키토산 나노입자를 함유하는 면역보강제(adjuvant) 조성물.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자는 폴리감마글루탐산과 키토산이 이온결합으로 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 면역보강제 조성물.

### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자의 표면전하는 음전하인 것을 특징으로 하는 면역보강제 조성물.

### 청구항 4

제1항의 면역보강제 조성물을 인간을 제외한 동물에 항원과 함께 투여하여, 항원에 대한 항체 생성물을 증가시키는 방법.

### 청구항 5

제4항에 있어서, 투여는 피하주사, 근육내 주사, 피하내 주사, 복막내 주사, 비강투여, 구강투여, 경피투여 및 경구투여로 구성된 군에서 선택된 어느 하나의 방법으로 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 6

폴리감마글루탐산-키토산 나노입자와 항원을 포함하는 백신용 조성물.

### 청구항 7

제6항에 있어서, 상기 항원은 단백질, 펩타이드, 뉴클레오시드, 뉴클레오티드, 바이러스, 항바이러스제, 항종양제, 항생물질 및 항염증제로부터 선택된 것을 특징으로 하는 백신용 조성물.

### 청구항 8

제6항에 있어서, 조류 인플루엔자 바이러스, 돼지 인플루엔자 바이러스 및 신종 인플루엔자 바이러스로 선택된 군에서 어느 하나 이상의 바이러스에 의한 질병의 예방용 또는 치료용인 것을 특징으로 하는 백신용 조성물.

### 청구항 9

제6항에 있어서, 자궁경부암, 피부흑색종암, 전립선암, 결장암, 폐암, 유방암, 난소암, 두경부암, 외음부암, 방광암, 뇌암 및 신경교종으로 선택된 군에서 어느 하나 이상의 질병의 예방용 또는 치료용인 것을 특징으로 하는 백신용 조성물.

#### 청구항 10

다음 단계를 포함하는 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자와 표면전하가 음전하인 항원을 포함하는 백신의 제조 방법:

- (a) 표면전하가 음전하인 항원과 키토산을 이온결합시키는 단계; 및
- (b) 상기 키토산과 결합한 항원에 폴리감마글루탐산을 첨가하여, 키토산과 폴리감마글루탐산을 이온결합시켜, 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자와 항원이 결합되어 있는 백신을 제조하는 단계.

#### 청구항 11

다음 단계를 포함하는 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자와 표면전하가 양전하인 항원을 포함하는 백신의 제조 방법:

- (a) 표면전하가 양전하인 항원과 폴리감마글루탐산을 이온결합시키는 단계; 및
- (b) 상기 폴리감마글루탐산과 결합한 항원에 키토산을 첨가하여, 폴리감마글루탐산과 키토산을 이온결합시켜, 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자와 항원이 결합되어 있는 백신을 제조하는 단계.

#### 청구항 12

제6항의 백신용 조성물을 인간을 제외한 동물에 투여하여, 항원에 대한 항체 생성률을 증가시키는 방법.

#### 청구항 13

제12항에 있어서, 투여는 피하주사, 근육내 주사, 피하내 주사, 복막내 주사, 비강투여, 구강투여, 경피투여 및 경구투여로 구성된 군에서 선택된 어느 하나의 방법으로 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

### 명세서

#### 기술분야

[0001] 본 발명은 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자를 함유하는 면역보강제 조성물 및 상기 면역보강제를 함유하는 백신용 조성물에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 안전성이 확보된 폴리감마글루탐산과 키토산의 이온결합에 의한 나노입자를 함유하는 면역보강제 조성물 및 상기 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자와 항원을 함유하는 백신용 조성물에 관한 것이다.

#### 배경기술

[0002] 면역보강제(adjuvant)는 항원성을 높여 백신 개발에 이용되거나, 항원에 대한 비특이적 면역반응을 증강시켜 치료 및 예방 등에 이용될 수 있는 소재이다. 면역보강제는 항원량이 적을 때 항원에 대한 면역반응을 신속하고 강력하게, 그리고 장기간 유지시켜 주는 역할을 하기 때문에 백신을 제조할 때 사용되며, 또한 특별한 면역보강제를 사용하거나 항원의 양을 다르게 하여 면역반응을 조절하거나 항원에 대한 항체의 종류와 아형(subclass) 등을 조절할 수 있게 한다. 또한 면역보강제는 점막면역능 유도를 증진시키기 위한 목적으로 특히 면역적으로 미숙하거나 나이가 든 사람에게서 면역반응을 증강시키는데 사용될 수 있다.

[0003] 면역보강제 대부분은 수많은 천연물과 많은 시행착오 속에서 발견되었는데 최초의 연구보고는 1925년 프랑스의 Ramon이 식품에 사용되는 타피오카(topioca)라는 카사바(Casaba) 녹말을 디프테리아 및 과상풍 독소이드와 혼합하였을 때 항원특이성 항체생성이 효과적으로 증가된다고 발표하였다. 이후 알루미늄 복합체의 면역증강효과를 보고되었고, 면역조절제로서 마이코박테리아 사균을 포함하는 에멀전(emulsion)형태의 효과적인 아쥘반트가 개

발되었다. 이는 FCA(Freund's complete adjuvant)라 하여 매우 효과적인 면역조절제로서 알려져 있으나 반응성(reactogenic)이 매우 커서 인체에 사용하는 백신에 사용하기는 적합하지 않았다. 이에 마이코박테리아가 포함되지 않은 FIA (Freund's incomplete adjuvant)가 개발되어 영국에서 허가를 받았다. 그람음성균의 엔도톡신이 면역증강효과를 가지는 것이 보고되었고, 1974년 Ellouz 등은 muramyl dipeptide (MDP)의 효과를 확인하였다(Ellouz F. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 59:1317-25, 1974),. 이 후 레시틴, 사포닌 등도 면역성을 증강시키는 면역보조제로서의 가능성이 보고되었다.

[0004] 이상적인 면역보강제의 조건은 면역증진 효과 이외에도, 독성이 없어야 하고, 생체분해성이 좋고 안정해야 하며, 사용하기 편리하고, 쉽게 구입 할 수 있어야 하며, 가격이 저렴하여야 한다. 현재 많은 종류의 면역보강제가 보고되고 있으나 실제 임상적으로 이용 가능한 품목은 몇 가지 밖에 되지 않는다. 백신에 사용되는 면역보강제 개발에서 가장 중요한 것은 안전성으로 이에 대한 확실한 연구자료가 뒷받침되어야 하기 때문이다.

[0005] 백신은 치료효과 뿐만 아니라 예방효과가 있어 질병의 99 %까지 발병률을 줄일 수 있는 비용 대비 효과가 가장 큰 의약품이다. 특히 최근에는 백신의 용도가 감염성 질병에만 국한되는 것이 아니라, 암, 자가면역질환을 포함한 각종 난치성 질환으로 넓혀지고 있고, 치료 백신이 등장함에 따라 백신 개발이 매우 중요하게 인식되고 있다. 따라서 아쥘반트 개발은 백신관련 제품으로서 백신개발과 함께 가속화되고 있으며, 또한 면역관련 질환에 대한 범위가 넓어지면서 새로운 면역보강제로서의 개발이 매우 유망한 분야로 거론되고 있다.

[0006] 한편, 본 발명자들은 고분자량 폴리감마글루탐산 및 그 이용방법에 대한 물질특허(대한민국 특허등록 제399091), 고분자량의 폴리감마글루탐산을 생산하는 내염성 균주 바실러스 서브틸리스 청국장 균주를 사용하여 폴리감마글루탐산을 생산하는 방법에 관한 특허(대한민국 등록특허 제500796호)를 획득하였으며, 그 외에 폴리감마글루탐산을 함유하는 항암조성물, 면역보강제, 면역증강제 및 바이러스 감염 억제에 대한 특허(대한민국 등록특허 제496606호, 대한민국 등록특허 제517114호 및 대한민국 등록특허 제475406호, 대한민국 등록특허 제0873179호)를 획득한 바 있다. 또한, 폴리감마글루탐산을 함유하는 히알루로니다제 저해제(대한민국 등록특허 제582120호) 및 폴리감마글루탐산의 면역증강을 통한 항암기능을 밝힘으로써 [Poo, H.R. *et al.*, *Journal of Immunology*, 178:775, 2007, Poo, H.R. *et al.*, *Cancer Immunol Immunother* (published online: 18 March 2009)] 폴리감마글루탐산의 의약 용도에 대한 연구가 진행되는 등, 폴리감마글루탐산에 대한 지속적인 용도 개발을 수행하여 다양한 효능들을 밝혀내었다.

[0007] 한편, 폴리머 나노입자, 특히 poly-caprolactone과 같은 생분해성 폴리머로 제조된 나노입자의 경우 생체적합성이 우수하여 많은 관심을 끌고 있다. 그러나 이러한 나노입자는 소수성을 가지고 있어 친수성의 약물 또는 항원을 전달하기에는 적합하지 못한 단점을 가지고 있다.

[0008] 폴리감마글루탐산 나노입자를 생체내 단백질 전달이나, 체액성면역반응 증진용으로 사용한 예들이 보고되었으나 (Akagi, T. *et al.*, *J. controlled release*, 108:226, 2005; Uto, T. *et al.*, *the J. Immunol.*, 178:2979, 2007), 폴리감마글루탐산만을 단독으로 아쥘반트로 사용하였을 경우에는 아쥘반트로서의 항체생성능이 부족하여, 항원특이적 면역유도반응을 더욱 강화시킬 필요성이 제기되고 있다.

[0009] 키토산은 양이온의 폴리사카라이드로서 키틴을 탈아세틸화시킨 형태이며 독성이 없으며 생체적합성이 우수한 소재이다. 또한 키토산은 세포사이의 밀착 결합(tight junction)을 열 수 있는 특성으로 점막 약물 전달 시스템에 있어서 아주 효과적인 소재로 알려져 있다. 대부분의 키토산은 분자량이 50 ~ 2,000 kDa이며 acetic acid 용액(pH 4)에서 용해되는 특성을 가지고 있다. 그러나 의약소재로써 적용이 가능하기 위해서는 중성의 pH에서 수용액 상태여야 하는데 생리학적 pH에서 양이온의 수용액 상태를 유지하기 위해서는 셀룰라아제를 처리하여 분자량이 낮춰주는 방법이 필수적이다.

[0010] 폴리감마글루탐산과 키토산의 나노입자의 복합체는 폴리감마글루탐산과 키토산의 이온결합 복합체로 구강투여되는 인슐린의 캐리어로 사용되거나, DNA 운반용으로 사용되고 있으나, 면역유도반응에 사용된 예는 보고된 바 없다(Lin, Y. *et al.*, *Biomacromolecules*, 6:1104, 2005; Lin, Y. *et al.*, *Nanotechnology*, 16:105102, 2007)

[0011] 이에, 본 발명자들은 상기 종래기술의 문제점을 개선하고자 예의 노력한 결과, 폴리감마글루탐산과 키토산의 이온 결합으로 제조된 나노입자를 함유한 면역보강제를 여러 항원과 함께 마우스에 투여한 경우, 폴리감마글루탐산을 면역보강제로 사용한 경우보다, 항체의 생성이 현저히 증가하는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0012] 본 발명의 목적은 항원특이적 면역유도반응이 뛰어난 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자를 함유하는 면역보강제 (adjuvant) 조성물을 제공하는데 있다.
- [0013] 본 발명의 다른 목적은 상기 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자와 항원을 함유하는 백신용 조성물을 제공하는데 있다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자와 항원을 함유하는 백신의 제조방법을 제공하는데 있다.

### 과제의 해결 수단

- [0015] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자를 함유하는 면역보강제(adjuvant) 조성물을 제공한다.
- [0016] 본 발명은 또한, 상기 면역보강제 조성물을 인간을 제외한 동물에 항원과 함께 투여하여, 항원에 대한 항체 생성물을 증가시키는 방법을 제공한다.
- [0017] 본 발명은 또한, 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자와 항원을 포함하는 백신용 조성물을 제공한다.
- [0018] 본 발명은 또한, (a) 표면전하가 음전하인 항원과 키토산을 이온결합시키는 단계; 및 (b) 상기 키토산과 결합한 항원에 폴리감마글루탐산을 첨가하여, 키토산과 폴리감마글루탐산을 이온결합시켜, 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자와 항원을 포함하는 백신을 제조하는 단계를 포함하는 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자와 표면전하가 음전하인 항원이 결합되어 있는 백신의 제조방법을 제공한다.
- [0019] 본 발명은 또한, (a) 표면전하가 양전하인 항원과 폴리감마글루탐산을 이온결합시키는 단계; 및 (b) 상기 폴리감마글루탐산과 결합한 항원에 키토산을 첨가하여, 폴리감마글루탐산과 키토산을 이온결합시켜, 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자와 항원을 포함하는 백신을 제조하는 단계를 포함하는 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자와 표면전하가 양전하인 항원이 결합되어 있는 백신의 제조방법을 제공한다.
- [0020] 본 발명은 또한, 상기 백신용 조성물을 인간을 제외한 동물에 투여하여, 항원에 대한 항체 생성물을 증가시키는 방법을 제공한다.

### 발명의 효과

- [0021] 본 발명에 따른 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자를 함유하는 면역보강제는 안전성이 확보된 천연소재의 단순 이온 결합으로 제조되어 독성 및 부작용이 거의 없으며, 면역원성이 낮은 항원과 함께 사용하여 높은 항체가를 나타낼 수 있어 면역보강제 조성물 및 상기 면역보강제를 함유하는 백신용 조성물로 사용할 수 있다. 또한 도입되는 항원 및 바이러스의 표면전하에 따라 폴리감마글루탐산과 키토산의 혼합순서를 조정함으로써 항원과 나노입자의 결합율을 높여 보다 효과적인 항체가를 나타낼 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [0022] 도 1는 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자의 전자현미경 사진을 나타낸 것이다.
- 도 2는 항원 단백질의 혼합순서에 따른 단백질 도입률을 확인하기 위하여, FITC 표지된 OVA가 도입된 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자의 공초점 레이저 형광 현미경 사진이다.
- 도 3은 OVA 항원에 대한 체액성 면역반응에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, OVA와 PGA 분자량별로 제조된 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자를 혼합하여 마우스에 주사 후 OVA 특이 항체 생성 정도를 OVA-specific serum IgG를 측정하여 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 OVA와 전하에 따른 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자를 혼합하여 마우스에 주사 후 OVA 특이 항체 생성 정도를 확인하고 Freund adjuvant와의 비교를 위해 OVA-specific serum IgG 생성 정도를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자에 의한 마우스 비장 내 T세포의 OVA에 대한 세포성 면역반응을 조사하기 위하여, 분자량별 PGA를 이용하여 제조된 PGA-chitosan nanoparticle에 의한 IFN- $\gamma$ 를 분비하는 CD8+ T 세포의 활성화 정도를 FACS로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 6는 혼합순서에 따라 제조된 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자에 의한 수지상세포와 T 세포의 혼합비율에 따라 활성화된 T 세포를 확인하기 위하여 IFN- $\gamma$ 를 분비하는 CD8+ T 세포의 분포를 FACS로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 7는 AI 단백질과 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자를 혼합하여 마우스에 피하주사 또는 비강 투여 후 AI 단백질 특이 항체 생성 정도를 확인하기 위해 AI-specific serum IgG를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자의 중화항체 유도능을 확인하기 위해 HI (Haemagglutination Inhibition) 테스트법을 사용하여 마우스 혈청에서의 항체 역가를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자의 항체 생성능을 확인하기 위해 피하주사 또는 비강투여 후 바이러스를 감염시킨 마우스의 감염 경과일에 따른 사망 개체수 변화를 나타낸 그래프이다.

도 10은 인플루엔자 백신 항원과 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자를 혼합하여 마우스에 근육주사한 후 인플루엔자 백신 항원 특이 항체 생성 정도를 확인하기 위하여 vaccine antigen-specific serum IgG를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 11은 인플루엔자 백신 항원과 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자의 항체 생성능을 확인하기 위해 근육주사 후 바이러스를 감염시킨 마우스의 감염 경과일에 따른 몸무게 변화를 나타낸 그래프이다.

도 12는 인플루엔자 백신 항원과 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자의 항체 생성능을 확인하기 위해 근육주사 후 바이러스를 감염시킨 마우스의 감염 경과일에 따른 사망 개체수 변화를 나타낸 그래프이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0023] 일 관점에서, 본 발명은 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자를 함유하는 면역보강제(adjuvant) 조성물 및 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자와 항원을 함유하는 백신용 조성물에 관한 것이다.
- [0024] 본 발명에서, 상기 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자는 폴리감마글루탐산의 여분의 카르복실(carboxyl) 반응기의 음전하와 키토산의 아미노(amino) 반응기가 프로톤화 되면서 생긴 양전하 간의 정전기적 인력(electrostatic interaction)에 의해 형성되는 나노입자를 사용하였다.
- [0025] 본 발명에 따른 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자는 인체에 유해한 단백질 간의 가교물질 없이 단순한 정전기적 인력으로 제조되어, 나노입자 안정성 및 유효성이 매우 높아 면역보강제로 사용하기에 적합하다.
- [0026] 폴리감마글루탐산은 D-, L-glutamic acid가 감마 결합을 통하여 연결된 점액성의 아미노산 고분자이며 바실러스 속 균주로부터 만들어지는 천연 아미노산 고분자 소재로, 본 발명의 일 양태에서, 상기 폴리감마글루탐산은 바실러스 서브틸리스 청국장 균주(*Bacillus subtilis chungkookjang*, KCTC 0697BP)를 발효시켜 제조하였으며, 상기 바실러스 서브틸리스 청국장(*Bacillus subtilis chungkookjang*, KCTC 0697BP)에 의해 생산된 폴리감마글루탐산의 평균 분자량은 1 ~ 15,000 kDa이었다.
- [0027] 본 발명에 있어서, 상기 폴리감마글루탐산은 용도에 따라 필요한 경우, 생산된 폴리감마글루탐산을 적절한 방법으로 절단하여 일정한 분자량으로 제조하여 사용하거나, 적절한 방법으로 분리하여 일정한 분자량 별로 회수하여 사용할 수 있을 것이다.
- [0028] 본 발명에 따른 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자를 함유하는 면역보강제는 바실러스 서브틸리스 청국장이 발효생산하는 바이오폴리머인 폴리감마글루탐산 및 키토산을 이용하여 화학적 결합이 아닌 단순 이온 결합에 의해 제조되어 안정성 및 생체적합성, 항체생성물이 우수한 특징을 가지는 면역보강제 소재이다.
- [0029] 본 발명에 따른 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자 제조에 사용되는 상기 폴리감마글루탐산의 분자량은 바람직하게 50kDa~15,000kDa로, 폴리감마글루탐산의 분자량이 50kDa 미만인 경우, 면역증강 기능이 낮아지는 문제점이 발생되고, 폴리감마글루탐산의 분자량이 15,000kDa이상인 경우에는 효능에는 차이가 없으나 점도가 증가되어 문

제점이 발생될 수 있다.

- [0030] 본 발명에 있어서, 키토산의 분자량은 바람직하게 500Da~1,000kDa로, 키토산의 분자량이 500Da 미만인 경우, 나노입자 제조가 어려운 문제점이 발생되고, 키토산의 분자량이 1000kDa이상인 경우에는 중성 수용액 상태에서 용해도가 떨어지는 단점이 발생할 수 있다.
- [0031] 본 발명에 있어서, 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자의 제조에 있어 폴리감마글루탐산의 비율을 높여 제조되는 나노입자의 표면전하가 음전하를 가지는 나노입자를 제조할 수 있다.
- [0032] 본 발명에 있어서, 상기 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자의 표면전하는 음전하인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0033] 본 발명에 따른 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자는 화학적 방법이 아닌 단순 이온 반응에 의해 제조되는 나노입자로서 독성 및 안전성 또한 우수하다.
- [0034] 본 발명에 따른 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자를 함유하는 면역보강제 조성물에 있어서, 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자는 백신 조성물 건조중량 100중량부에 대하여, 건조중량 0.001~5 중량부로 함유하는 것을 특징으로 할 수 있고, 바람직하게는 건조중량 0.01~3 중량부로 함유할 수 있다. 만약, 백신 조성물 건조중량 100중량부에 대하여, 건조 중량 0.001중량부 미만으로 함유시킬 경우 항체생성 기능을 기대할 수 없고, 건조 중량 5 중량부를 초과 시에는 작용에는 차이가 없으며, 점성이 과도하게 증가할 수 있는 문제가 발생된다.
- [0035] 본 발명에 있어서, 백신용 조성물에 포함되는 항원은 단백질, 펩타이드, 뉴클레오시드, 뉴클레오티드, 바이러스, 항바이러스제, 항종양제, 항생물질 및 항염증제로부터 선택된 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0036] 본 발명에 있어서, 상기 백신용 조성물은 조류 인플루엔자 바이러스, 돼지 인플루엔자 바이러스 및 신종 인플루엔자 바이러스로 선택된 군에서 어느 하나 이상의 바이러스에 의한 질병의 예방용 또는 치료용인 것을 특징으로 할 수 있고, 자궁경부암, 피부흑색종암, 전립선암, 결장암, 폐암, 유방암, 난소암, 두경부암, 외음부암, 방광암, 뇌암 및 신경교종으로 선택된 군에서 어느 하나 이상의 질병의 예방용 또는 치료용인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0037] 다른 관점에서 본 발명은 (a) 표면전하가 음전하인 항원과 키토산을 이온결합시키는 단계; 및 (b) 상기 키토산과 결합한 항원에 폴리감마글루탐산을 첨가하여, 키토산과 폴리감마글루탐산을 이온결합시켜, 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자와 항원을 포함하는 백신을 제조하는 단계를 포함하는 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자와 표면전하가 음전하인 항원이 결합되어 있는 백신의 제조방법에 관한 것이다.
- [0038] 본 발명에 있어서, 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자의 제조에 있어 결합하고자 하는 항원 또는 바이러스 등이 양전하를 가질 경우 폴리감마글루탐산을 먼저 결합 후 키토산을 결합시키고, 항원 또는 바이러스 등이 음전하를 가질 경우 키토산과 먼저 결합 후 폴리감마글루탐산과 혼합하여 제조함으로써 보다 효과적인 면역보강제로써의 기능을 가질 수 있다.
- [0039] 또다른 관점에서, 본 발명은 (a) 표면전하가 양전하인 항원과 폴리감마글루탐산을 이온결합시키는 단계; 및 (b) 상기 폴리감마글루탐산과 결합한 항원에 키토산을 첨가하여, 폴리감마글루탐산과 키토산을 이온결합시켜, 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자와 항원을 포함하는 백신을 제조하는 단계를 포함하는 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자와 표면전하가 양전하인 항원이 결합되어 있는 백신의 제조방법에 관한 것이다.
- [0040] 또다른 관점에서, 본 발명은 인간을 제외한 동물에 상기 면역보강제 조성물을 항원과 함께 투여하거나, 상기 백신용 조성물을 투여하여 항원에 대한 항체 생성물을 증가시키는 방법에 관한 것이다.
- [0041] 본 발명에 있어서, 상기 투여는 피하주사, 근육내 주사, 피하내 주사, 복막내 주사, 비강투여, 구강투여, 경피투여 및 경구투여로 구성된 군에서 선택된 어느 하나의 방법으로 수행되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0042] 본 발명에 있어 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자를 포함하는 면역보강제 조성물 또는 백신용 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제, 희석제로는 락토즈, 덱스트로스, 슈크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 말티톨, 전분, 글리세린, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘포스페이트, 칼슘실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용되는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제할 수 있다. 비 경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조제제가 포함된다. 비수용성제제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능

한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

[0043] 본 발명의 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자 함유 면역보강제는 투여대상의 나이, 성별, 체중 등에 따라 투여량이 달라질 수 있고, 투여경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 나이 등에 따라서도 백신의 투여량이 증감될 수 있다.

[0044] 또한 본 발명의 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자는 암, 특히 피부흑색종암, 전립선암, 결장암, 폐암, 유방암, 난소암, 두경부암, 외음부암, 방광암, 뇌암 및 신경교종 등 뿐만 아니라 비전염성 만성 질병을 예방하고 치료하는 데에 사용되는 예방용 혹은 치료용 백신을 포함하는 의약 조성물에 첨가하여 사용될 수 있다.

[0045] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명이 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

#### [0046] 실시예 1: 초고분자량 폴리감마글루탐산의 제조

[0047] 폴리감마글루탐산 생산용 기본배지(3 %의 L-글루탐산이 첨가된 배지; Glucose 3 %,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1 %,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.27 %,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  0.17 %, NaCl 0.1 %, Sodium citrate 0.5 %, Soyptone 0.02 %,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.7 %, Vitamin solution 10 ml/L, pH 6.8)를 멸균, 준비하여 5 L Jar fermentor(working vol. 3 L)에 바실러스 서브틸리스 청국장 균주(*Bacillus subtilis* var chungkookjang, KCTC 0697BP)의 종균 배양액(LB medium)을 4 % 접종하여 발효시켰다. 교반속도는 500rpm, 공기주입속도는 1.0vvm으로 하여 37 °C에서 48 시간 동안 발효시킨 후, 소형 필터프레스(규조토 celite 1 %)를 이용하여 균체를 제거하여 폴리감마글루탐산 함유 시료액으로 사용하였다.

[0048] 폴리감마글루탐산 함유 시료액에 2 N 황산용액을 이용 pH 2.0으로 조정 후 10 °C이하에서 15 시간 동안 정치시켜 폴리감마글루탐산 침전물을 수득하였다. 이것을 충분한 양의 냉각 증류수(10 °C 이하)로 세척한 후(pH 3.5 이상), 누체여과기를 이용하여 폴리감마글루탐산 침전물을 수득 후 동결건조하여 초고분자량 폴리감마글루탐산을 제조하였다.

#### [0049] 실시예 2: 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자의 제조

[0050] 실시예 1에서 제조된 폴리감마글루탐산과 키토산(Amicogen Co., Korea)을 이용하여 면역보강제로 사용할 나노입자를 제조하였다.

[0051] 사용된 폴리감마글루탐산 및 키토산은 0.85 % NaCl 용액에 용해하여 사용하였다. 폴리감마글루탐산과 키토산의 혼합비를 1:1 ~ 8:1의 비율로 키토산 용액에 폴리감마글루탐산 용액을 혼합하여 표면전하가 음전하를 가지는 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자를 제조하였다. 제조된 나노입자는 DLS(Dynamyc Light Scattering)을 이용하여 입도 크기 및 표면 전하를 측정하였다. 그 결과 200~300 nm 크기의 나노입자가 제조됨을 확인하였으며, 제조한 방법에 따라 나노입자의 표면 전하가 -20.8 mV로 측정되었다. 또한 제조된 나노입자의 표면형태는 전자현미경을 사용하여 관찰하였다 (도 1).

### 표 1

[0052] 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자의 입도 크기 및 표면 전하

| 구분                        | 입도크기(nm) | 표면전하(mV) |
|---------------------------|----------|----------|
| 폴리감마글루탐산-키토산나노입자<br>(음전하) | 263      | -20.8    |

#### [0053] 실시예 3: 대상 단백질의 혼합 순서에 따른 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자의 제조

[0054] 실시예 2에서 확인된 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자에 단백질을 도입시켜 해당 단백질에 대한 항체생성을 증가시키기 위한 면역보강제로써의 검증을 위하여 해당 단백질의 pI 값을 검토하여 혼합순서에 따른 나노입자를 제조하였다. 우선 pI 값이 5.2인 OVA(SIGMA, USA) 단백질에 형광물질인 FITC를 결합시킨 OVA-FITC를 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자에 결합시켰다. 결합 방법으로 폴리감마글루탐산과 OVA-FITC를 우선 혼합한 후 키토산을 혼합시켜 제조한 시료와 키토산과 OVA-FITC를 우선 혼합한 후 폴리감마글루탐산을 혼합시켜 제조한 나노입자 두 종류를 제조하여 형광현미경을 통하여 OVA 결합정도를 확인하였다.

[0055] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이 키토산과 OVA-FITC를 우선 혼합한 후 폴리감마글루탐산을 혼합 한 시료에서 나노입자 표면 및 내부에 더 밝은 형광을 나타내었다. 이는 OVA가 중성 pH에서 음전하(negative charge)를 가지기 때문에 양전하(positive charge)를 가지는 키토산과 우선 결합한 후 폴리감마글루탐산을 결합시켜 제조한 시료에서 더 많은 OVA가 나노입자에 도입된 것임을 확인하였다.

#### [0056] 실시예 4: 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자의 OVA specific 항체생성 증진

[0057] 본 실시예에서는 본 발명의 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자가 OVA 항원에 대하여 특이적 면역 증진효과를 나타내는지 조사하기 위하여, 항체 특이적인 면역반응 중, 특히 항체 생산과 관련이 있는 B세포에 의한 체액성 면역반응(humoral immuneresponse)에 미치는 영향을 조사하였다.

[0058] 우선 대조군으로는 OVA(100 µg)를 분자량 5,000 kDa의 폴리감마글루탐산과 섞어서 C57/BL6 마우스 복강에 주사하였고, 실험군으로 분자량 50 kDa, 500 kDa, 2,000kDa, 5,000kDa, 7,000 kDa인 폴리감마글루탐산과 키토산을 혼합하여 제조한 나노입자에 OVA(100 µg)를 섞어 복강에 주사하였다.

[0059] 또한 대상 단백질의 혼합 순서에 따라서 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자를 제조한 것은 폴리감마글루탐산의 분자량을 7,000kDa를 사용하여 나노입자를 제조하였다. 나노입자의 혼합순서는 폴리감마글루탐산과 키토산을 먼저 혼합 후 OVA를 넣어준 것과, 키토산을 OVA와 혼합한 후 폴리감마글루탐산을 넣은 것을 사용하였다. 대조군으로 OVA를 폴리감마글루탐산이나 CFA와 주사하였다.

[0060] 1주에 한번씩 2회의 복강 주사 후 3주째에 마우스 혈청을 채취하여 혈청 중의 OVA에 대한 항체의 역가(titer)를 ELISA(Enzyme linked immunosorbent assay)법으로 측정하였다.

[0061] 상기 ELISA법은 OVA(0.5 µg/ml)가 코팅된 플레이트를 PBS/5% skim milk를 사용하여 블로킹한 후, 대조군과 실험군 혈청을 다양한 일련의 희석율로 37℃ 에서 배양하였다. 그 후, Horse raddish peroxidase가 부착된 마우스-IgG 항체(Fc에 대해 특이적임)를 첨가하였다. 상기 배양기에서 보관하는 시간은 블로킹과 마우스-IgG 항체를 넣는 과정은 1 시간, 혈청은 2 시간 동안 보관하였다. 언급된 각각의 단계 후에는 PBS/0.05 % Tween 20을 사용하여 3 회 세척하였다. 기질로는 TMB(테트라메틸벤지딘, BD Biosciences, USA) 100 µl를 첨가하여 반응을 전개시킨 후, 450nm에서의 흡광도를 ELISA 판독기로 측정하였다.

[0062] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 분자량별 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자를 OVA와 함께 주사한 마우스에서의 OVA에 대한 항체 역가는 OVA와 폴리감마글루탐산을 섞어서 주사한 마우스에서의 OVA 항원에 대한 항체 역가 보다 현저하게 높게 나타났다.

[0063] 또한 도 4에 나타난 바와 같이 대상 단백질의 혼합 순서에 따른 것은 키토산을 폴리감마글루탐산과 혼합하고 OVA를 넣은 나노입자와 키토산을 OVA와 먼저 혼합한 후 폴리감마글루탐산을 넣은 나노입자의 항체역가는 유사하게 측정되었다.

#### [0064] 실시예 5: 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자의 세포 매개성 면역반응 증진

[0065] 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자에 의한 마우스 비장 내 T 세포의 OVA에 대한 세포성 면역반응을 조사하였다. 실시예 4에서 처리한 마우스를 그룹 당 5마리씩을 선택하여 각각의 마우스에서 비장을 적출하여, 멸균된 페트리디쉬에 상기 비장 조직을 옮기고, cell strainer를 이용하여 상기 비장을 갈아 조직 피막으로부터 세포를 분리하였다. 상기 페트리디쉬 내의 모든 내용물을 15 ml 튜브에 옮기고 RPMI 배지로 가득 채운 후, 1,500 rpm에서 5분간 원심분리 한 후 상층액을 제거한 펠렛에 red blood cell lysing buffer(sigma aldrich, Germany)를 3 ml 넣고 37 °C 수조에서 10 분간 방치하여, 적혈구를 용혈시켰다. 튜브에 포함된 세포를 PBS로 세척한 후, RPMI 1640 배지에 부유시켜 비장세포(splenocyte)를 분리하였다. 분리된 비장세포를 1x10<sup>6</sup> cells/ml로

24 well plate에 깔고, golgi plug 2  $\mu$ l와 MHC class I-restricted OVA peptide를 1  $\mu$ g/ml의 농도로 12시간 동안 처리하였다. 그 후에 T 세포의 표면 분자인 CD8에 대한 특이적 항체 (PE-conjugated anti-mouse CD8)를 이용하여 4  $^{\circ}$ C에서 1시간동안 염색한 후, Cytofix/Cytoperm 키트(BD Biosciences, USA)로 세포에 구멍을 뚫고 IFN- $\gamma$ 에 특이적이 항체(FITC conjugated anti-mouse IFN- $\gamma$ )로 세포 내부의 IFN- $\gamma$ 를 염색하였다.

[0066] 그 결과 도 5에서 보는 바와 같이, 분자량별 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자가 대조군에 비해 IFN- $\gamma$ 를 분비하는 CD8+ T 세포의 활성화를 촉진하는 것을 확인하였다.

[0067] 또한, 대상단백질의 혼합 순서에 따라 나노입자를 제조한 것은 도 6에 나타난 바와 같이, 키토산을 OVA와 혼합한 후 폴리감마글루탐산을 넣은 나노입자가 폴리감마글루탐산에 키토산을 혼합한 후 OVA를 첨가한 나노입자보다 IFN- $\gamma$ 를 분비하는 T세포의 활성화 유도능이 더 큰 것을 확인하였다 (도 6).

# [0068] 실시예 6: 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자의 AI 단백질에 대한 세포 매개성 면역반응 증진

[0069] 본 실시예에서는 본 발명의 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자가 조류 인플루엔자 바이러스 (Avian influenza virus, AIV) 특이 항원단백질인 HA(hemagglutinin) 단백질에 대하여 특이적 면역 증진효과를 나타내는지 조사하기 위하여, 항체 특이적인 면역반응 중, 특히 항체 생산과 관련이 있는 B세포에 의한 체액성 면역반응에 미치는 영향을 조사하였다.

[0070] 실험에 사용한 HA 단백질은 조류 인플루엔자 바이러스[A/chicken/Korea/IS2/2006(H5N1)](Yong-Jeong Lee *et al. Emerging Infectious Diseases*. 2008. 14:487-490)의 neutralizing antibody에 대한 주요 epitope이 존재하는 것으로 알려진 HA(hemagglutinin) 단백질로 Genbank accession No. EU233683에 해당하는 염기서열을 가지는 유전자를 PCR로 합성하여 대장균 발현 벡터(pRSET)에 삽입시켜 재조합 항원단백질을 대장균에서 발현시켜 정제하여 사용하였다(Langzhou Song *et al. PLoS ONE*, 2008. e2257).

[0071] 대조군으로는 HA 단백질(7.128  $\mu$ g)을 단독으로 피하 주사 또는 비강 투여하였으며, 7,000 kDa인 폴리감마글루탐산과 키토산을 혼합하여 제조한 나노입자에 HA 단백질(7.128  $\mu$ g)을 섞어 피하주사 또는 비강 투여하였다.

[0072] 처음 피하주사 또는 비강주사 후에 각 1주별로 마우스 혈청을 채취하여 혈청 중의 HA 단백질에 대한 항체의 역가(titer)를 ELISA(Enzyme linked immunosorbent assay)법으로 측정하였다.

[0073] 상기 ELISA법은 HA 단백질이 코팅된 플레이트를 PBS/5% 우태아 혈청을 사용하여 블록킹한 후, 대조 실험군 혈청을 다양한 일련의 희석율에서 인큐베이션하였다. 그 후, Horse raddish peroxidase가 부착된 마우스-IgG 항체 (Fc에 대해 특이적임)를 첨가하였다. 상기 모든 인큐베이션은 37  $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 수행하였으며, 언급된 각각의 단계 후에는 PBS/0.05 % Tween 20을 사용하여 3회 세척하였다. 기질로는 ABTS(2,2-azinobis(3-ethylbenzthiazolinesulfonic acid)) 1 mg/ml를 첨가하여 반응을 전개시킨 후, 450 nm에서의 흡광도를 30분 후 ELISA 판독기로 측정하였다.

[0074] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자를 HA 단백질과 함께 피하주사 또는 비강 투여한 마우스에서의 HA 단백질에 대한 항체 역가는 HA 단백질만을 피하주사 또는 비강투여한 마우스에서의 항체 역가가 보다 높게 나타났다.

# [0075] 실시예 7: 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자의 중화항체 유도능

[0076] 각 그룹별 마우스 혈청에서의 항체 역가 측정은 하기의 HI (Haema- gglutination Inhibition) 테스트법으로 측정하였다.

[0077] 모든 혈청은 *Vibrio cholerae*에서 추출한 RDE(receptor-destroying enzyme) 을 혈청 샘플 부피 대비 1:3으로 처리한 뒤(예를 들면, 혈청 10  $\mu$ l에 RDE 30  $\mu$ l 첨가), 37  $^{\circ}$ C 배양기에서 18~20시간 배양하였다. 혈청 내 비특이적인 수용체들의 활성을 제거한 샘플을 96 well 둥근 바닥 플레이트에서 25  $\mu$ l씩 순차적 2진 희석하였다. 두 번째로 혈청 샘플에 동일 부피의 4 HAU 바이러스를 넣고, 37  $^{\circ}$ C 배양기에서 30분간 반응시키고, 마지막으로 0.5 % 닭 적혈구가 포함된 PBS를 50  $\mu$ l씩 넣어준 뒤 실온에서 40분간 반응시켰다. 역가는 희석된 50  $\mu$ l 안에서 계산된 값으로  $\log_{10}N = 10^N$ 에서 N값으로 표기하였다.

[0078] 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이, 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자와 AI 단백질을 피하주사 및 비강투여한

실험군에서 바이러스에 대한 항체 역가가 증가하였다.

**[0079] 실시예 8: 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자의 바이러스에 대한 면역증강 효과**

[0080] 본 실시예에서는 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자의 조류 인플루엔자 바이러스에 대한 면역증강 효과를 조사하기 위하여, 인플루엔자 바이러스를 감염시킨 실험동물의 폐사를 확인하였다.

[0081] (1) 바이러스의 준비

[0082] 병원체로 사용된 인플루엔자 바이러스는 충북대학교 의과대학 미생물학 실험실 최영기 교수로부터 분양받은, mouse에서 고병원성을 나타내는 H1N1 인플루엔자 바이러스주 (A/Puerto Rico/8/34(H1N1))를 Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell에서 증폭한 뒤 실험에 사용하였으며, 실험동물로는 6주령의 암컷 Balb/C 마우스를 사용하였다.

[0083] 분양된 바이러스의 순수 분리는 다음과 같이 실시하였다.

[0084] 일차적으로 분리된 바이러스를 항생제가 들어있는 PBS에 희석해서 10일령 된 백색 산란계의 유정란에 접종한 뒤 37 °C에서 48시간 정치 배양한 뒤 유정란의 요수를 취하여 증폭된 바이러스를 사용하였다.

[0085] 두 번째로 6 well 세포배양 플레이트에서 페니실린과 스트렙토마이신과 5% 우태아혈청(fetal bovine serum; FBS)이 포함된 alpha-MEM(minimum essential medium, Gibco, USA) 배지에서 자란 MDCK cell을 PBS로 3번 세척을 해주고 페니실린과 스트렙토마이신(이하 P/S)은 포함하고 FBS가 들어 있지 않은 배지로 희석해서 각 well에 바이러스를 희석한 후 감염시킨 후, 5 % 이산화탄소가 충전된 37 °C 세포 배양기에서 1시간 배양하였다. FBS가 들어 있지 않은 0.1 % TPCK(N-alpha-tosyl-L-phenylalanyl chloromethyl ketone) treated-trypsin EDTA와 P/S가 포함된 alpha-MEM 배지를 각 well에 넣어주고 세포 배양기에서 배양하였다. 배양 24시간 후, 세포 배양 플레이트를 PBS로 세척해주고 배지를 포함하고 있는 0.1 % noble agar를 사용하여 고정하였다.

[0086] 배양된 플라스크를 미리 준비된 MDCK cell이 배양된 24 well 플레이트에 각 well 당 1개의 플라스크를 접종하고 FBS가 들어 있지 않은 0.1 % TPCK treated-trypsin EDTA와 P/S가 포함된 alpha-MEM 배지를 각 well에 넣어주고 세포 배양기에서 배양하였다. 48시간 뒤 각 well의 배지를 취하여 원심분리해서 상층액을 상기와 동일한 방법으로 준비된 MDCK cell 플라스크에 감염시킨 후 48시간에서 36시간 배양해서 얻어진 배양액을 원심분리하여 상층액을 마이크로 튜브에 옮겨서 -80 °C 저온 냉동고에 동물 실험 전까지 보관하였다.

[0087] (2) 동물실험

[0088] 우선 대조군으로는 인플루엔자 바이러스를 단독으로 비강 투여 또는 피하주사한 마우스를 사용하였고, 실험군은 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자와 AI 항원 단백질을 혼합 피하주사 또는 비강투여한 후, 다음날 인플루엔자 바이러스를 투여하였다.

[0089] 바이러스의 감염은 실험동물에 디에틸에테르를 사용해서 30초간 마취한 후, 바이러스 30  $\mu$ l를 각 마우스에 비강을 통해  $1.25 \times 10^5$  EID<sub>50</sub> 투여하였다.

[0090] 그 결과, 도 9에 나타난 바와 같이, 대조군은 바이러스 투여 후 8일째 전량이 폐사하였으나 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자와 AI 단백질 혼합 투여군의 경우 11일 경과 후까지 모두 생존하였다. 이는 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자에 의해 AI 단백질에 대한 항체 생성을 유도하여 바이러스 감염을 억제함으로써 개체가 생존하게 된 것으로 판단된다.

**[0091] 실시예 9 : 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자의 인플루엔자 바이러스에 대한 면역증강 효과**

[0092] 본 실시예에서는 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자의 인플루엔자 바이러스에 대한 면역증강 효과를 조사하기 위하여 인플루엔자 백신에 대한 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자의 어쥬번트 효과를 확인하였다.

[0093] (1) 인플루엔자 백신

[0094] 항원으로 사용된 인플루엔자 백신은 H1N1 인플루엔자 바이러스주 (A/California/07/09 (H1N1)) 백신 항원을 사

용하였다.

(2) 동물실험

대조군으로는 PBS만을 근육주사한 마우스를 사용하였고, 실험군은 인플루엔자 백신(0.2  $\mu$ g)만을 근육주사한 마우스와 인플루엔자 백신(0.2  $\mu$ g)과 Alum 어쥬번트를 혼합하여 근육주사한 마우스, 그리고 인플루엔자 백신(0.2  $\mu$ g)과 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자(800  $\mu$ g)를 혼합하여 근육주사한 마우스를 사용하였다.

접종 방법은 2주 간격(0, 14일)으로 2회 마우스에 근육주사를 하였고, 각각 접종 후 14일째에 혈청을 채취하여 혈청중의 인플루엔자 백신 항원에 대한 역가(titer)를 ELISA (Enzyme linked immnosorbent assay)법으로 측정하였다.

ELISA법은 인플루엔자 백신 항원이 코팅된 플레이트를 PBS/1% BSA 를 사용하여 블록킹한 후, 모든 대조군, 실험군 혈청을 다양한 일련의 희석율에서 인큐베이션 하였다. 그 후, Horse raddish peroxidase가 부착된 마우스-IgG 항체, IgG2a 항체, 그리고 IgG1 항체를 각각 사용하였다. 상기 모든 인큐베이션은 37 °C에서 1시간 동안 수행하였으며, 각각의 단계 후에는 PBS/0.05% Tween20을 사용하여 3회씩 세척하였다. 기질로는 TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) A용액과 B용액의 1:1 혼합용액 100  $\mu$ l를 첨가하여 반응을 전개시킨 후 0.5N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액 50  $\mu$ l를 넣어 반응을 정지시킨 후 450 nm에서의 흡광도를 ELISA 판독기로 측정하였다.

그 결과, 도 10에 나타난 바와 같이, 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자를 인플루엔자 백신 항원과 함께 근육주사한 마우스에서 백신 항원에 대한 항체역가는 인플루엔자 백신만을 주사 또는 Alum 어쥬번트와 혼합하여 주사한 마우스에서의 항체역가보다 높게 나타났다.

**실시예 10: 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자의 인플루엔자 바이러스에 대한 중화항체 유도능**

각 그룹별 마우스 혈청에서의 항체 역가 측정은 하기의 HI (Hemagglutination Inhibition) 테스트법으로 측정하였다.

모든 혈청은 *Vibrio cholerae*에서 추출한 RDE (receptor-destroying enzyme)을 혈청 샘플 부피 대비 1:10으로 처리한 뒤, 37 °C 배양기에서 18시간 인큐베이션 하였다. 혈청 내 비 특이적인 수용체들의 활성을 제거한 샘플을 96well 등근 바닥 플레이트에서 25  $\mu$ l씩 순차적으로 2배 희석하였다. 두 번째로 혈청 샘플에 동일 부피의 4HAU 바이러스(A/California/04/09 (H1N1))를 넣고 실온에서 30분간 반응시키고, 마지막으로 0.5% 칠면조 적혈구가 포함된 PBS를 50  $\mu$ l씩 넣어준 뒤 실온에서 30분간 반응시켰다. 역가는 희석된 50  $\mu$ l안에서 계산된 값으로  $\log_{10}N=10^N$  에서 N값으로 표기하였다.

그 결과, 표 2에 나타난 바와 같이, 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자와 인플루엔자 백신 항원을 주사한 마우스에서 인플루엔자 백신만을 주사한 마우스와 Alum 어쥬번트를 혼합 주사한 마우스 보다 인플루엔자 바이러스에 대한 항체 역가가 각각 5~6배 정도 더 증가하였다.

**표 2**

| HI GMT <sup>a</sup>    |                      |                      |
|------------------------|----------------------|----------------------|
| Vaccine adjuvants      | 1 <sup>st</sup> dose | 2 <sup>nd</sup> dose |
| Vaccine only           | 43.62 (24/26)        | 755.84 (26/26)       |
| Vaccine + Nanoparticle | 99.02 (26/26)        | 4726.46 (26/26)      |
| Vaccine + Alum         | 58.1 (26/26)         | 980.46 (26/26)       |
| PBS                    | < 10 (0/26)          | < 10 (0/26)          |

<sup>a</sup> HI 항체 타이터는 CA/04(H1N1) 바이러스의 4HA unit 바이러스에 의한 응집이 저해되는 최고 희석 농도의 혈청과 비교하여 측정하였음. 양성 혈청의 기하평균( $\geq 10$ )을 나타내었음. 양성 혈청의 수는 괄호안에 나타냄(양성 혈청 수/총 혈청수).

[0106] **실시예 11: 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자의 인플루엔자 바이러스 감염에 대한 저항성**

[0107] 각 그룹별 마지막 백신주사 후 14일째에 인플루엔자 바이러스 (A/California/ 04/09 (H1N1))를 투여하였다.

[0108] 바이러스 감염은 실험동물에 마취한 후 각  $10^{7.25}$  EID<sub>50</sub>의 바이러스 30  $\mu$ l씩 비강을 통하여 투여하였다.

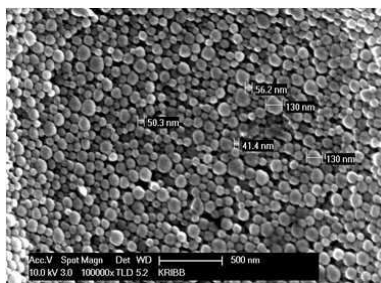
[0109] 그 결과, 도 11 및 도 12에 나타난 바와 같이, 백신만 근육주사 하거나 Alum 어쥬번트와 백신을 혼합주사한 군들은 바이러스 감염 후 2일째부터 체중이 감소하였으나 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자와 인플루엔자 백신 혼합 주사군의 경우 바이러스 감염에 따른 체중감소가 일어나지 않았다. 또한 대조군은 바이러스 투여 후 5일째 전량이 폐사하였으나, 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자와 인플루엔자 백신 혼합 주사군의 경우 14일째까지 모두 생존하였다. 그러나 백신만 투여한 그룹과 Alum 어쥬번트와 백신을 혼합 주사군들은 50%만 생존하였다.

[0110] 이는 폴리감마글루탐산-키토산 나노입자에 의해 인플루엔자 백신에 대한 항체 생성을 유도하여 바이러스 감염을 억제함으로써 개체가 생존하게 된 것으로 판단된다.

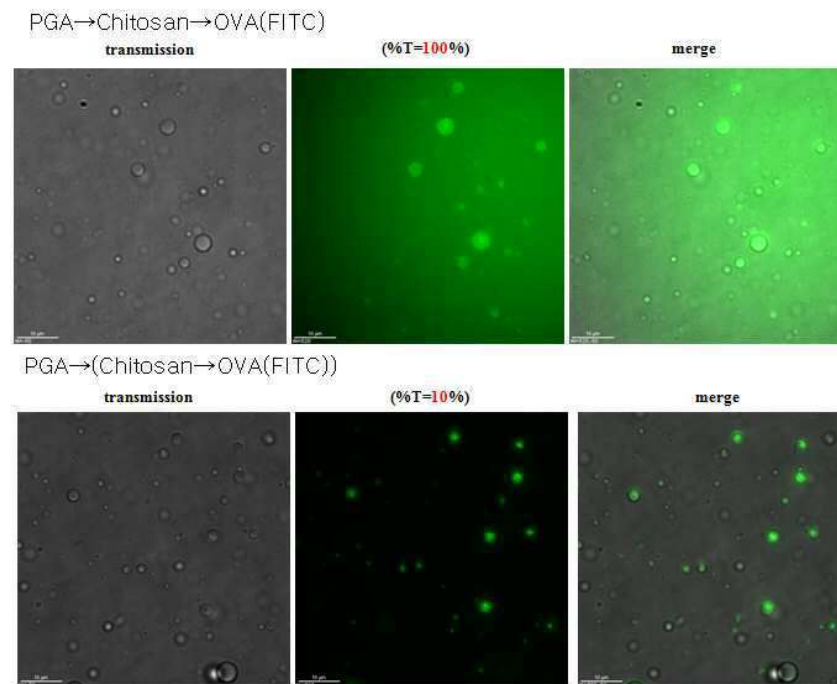
[0111] 이상으로, 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

## 도면

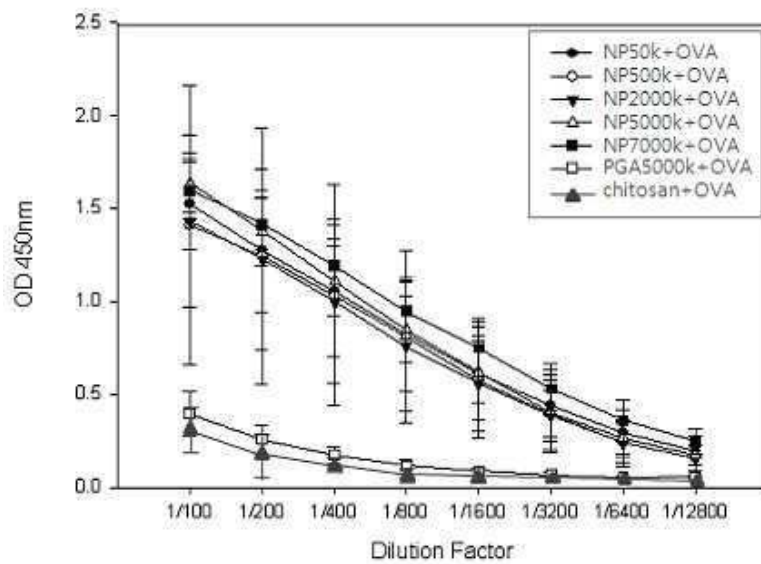
### 도면1



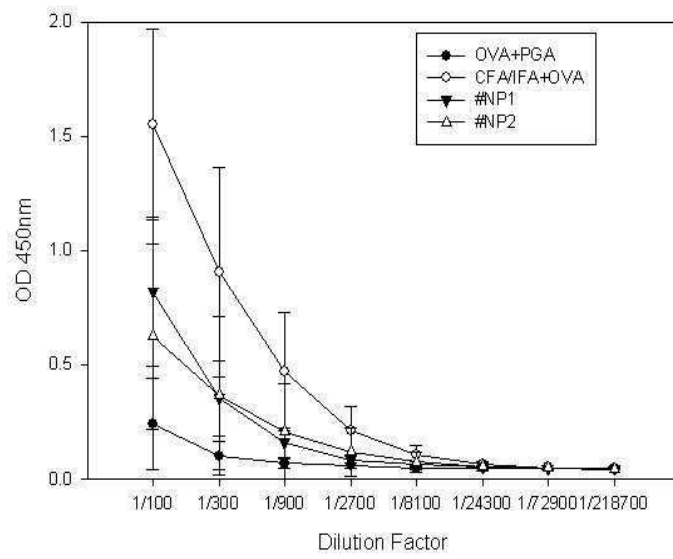
도면2



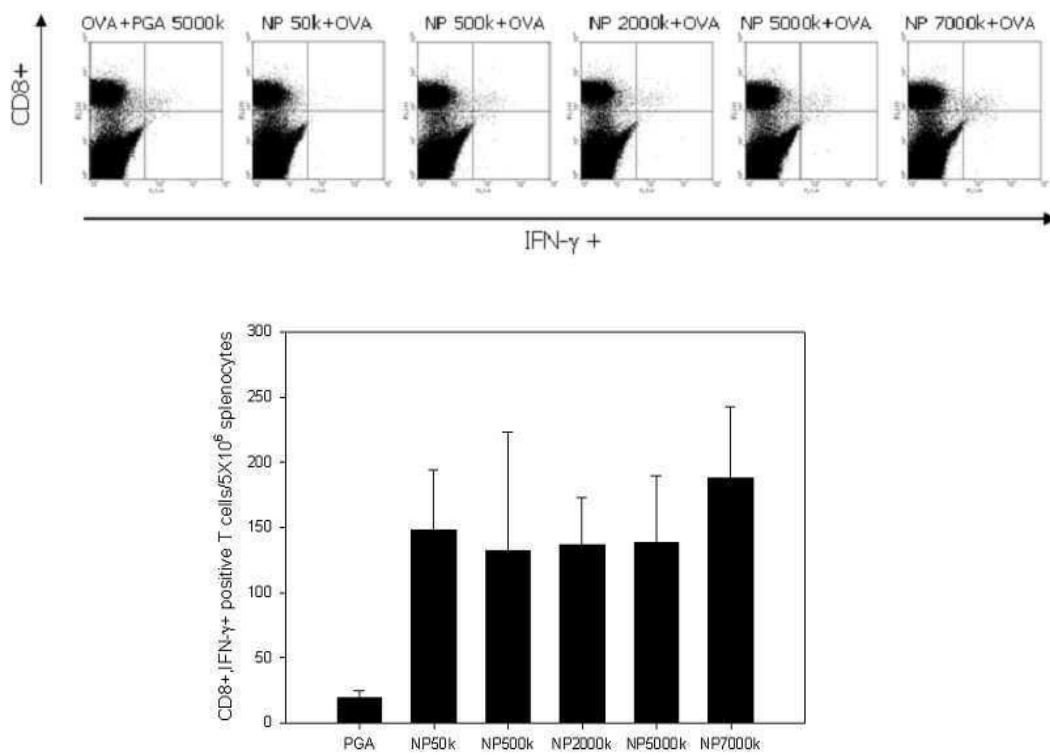
도면3



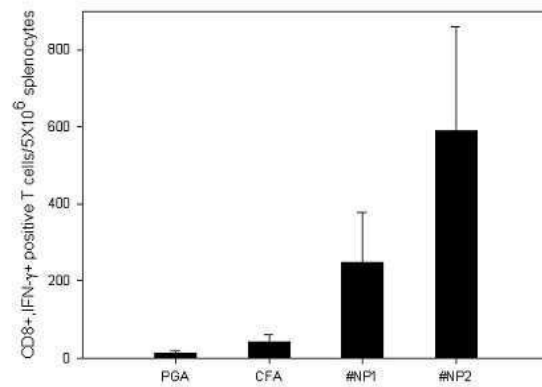
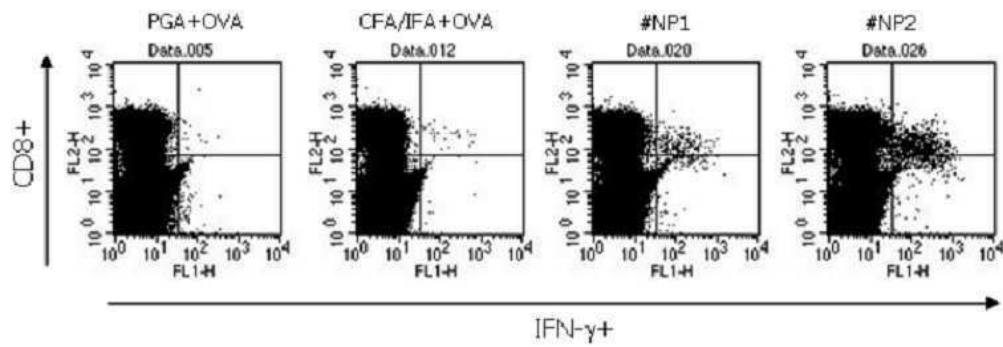
도면4



도면5

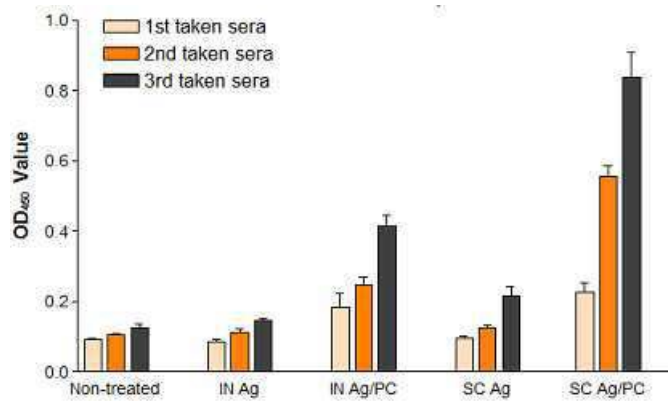


도면6

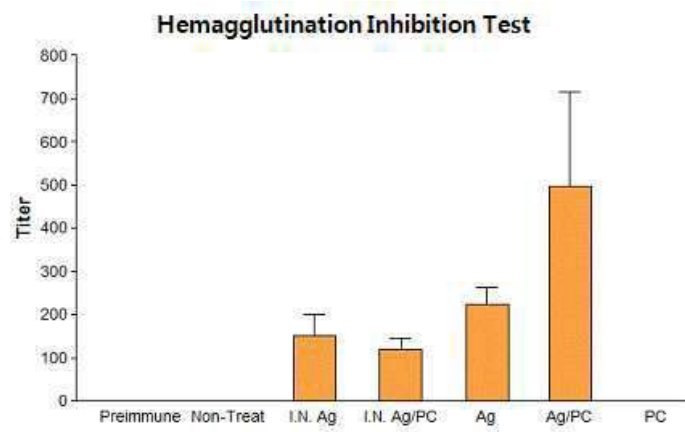


#NP1 : 폴리감마글루탐산+키토산+OVA  
#NP2 : 키토산+OVA+폴리감마글루탐산

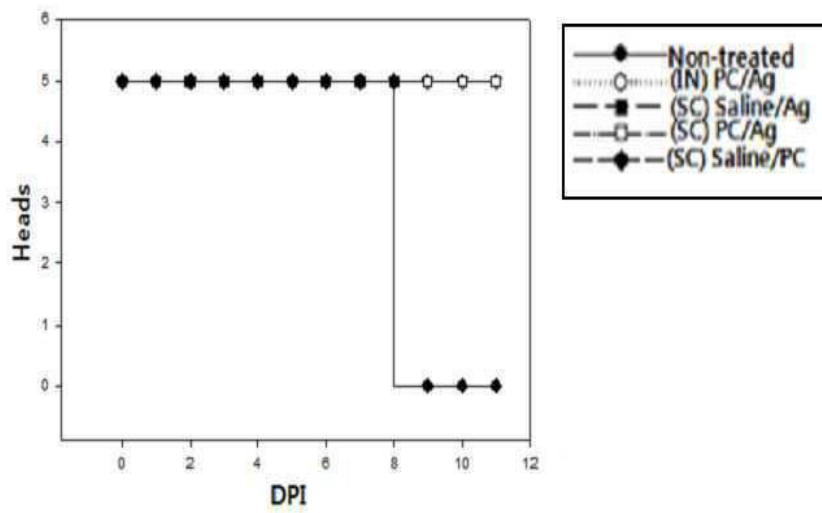
도면7



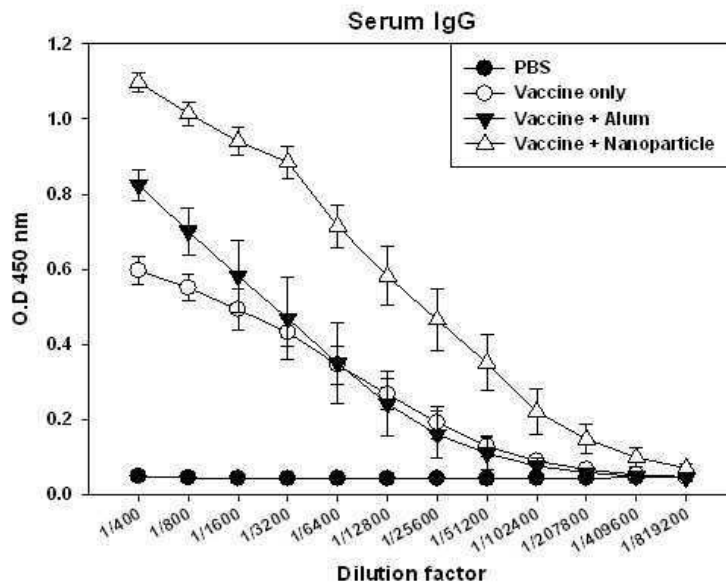
도면8



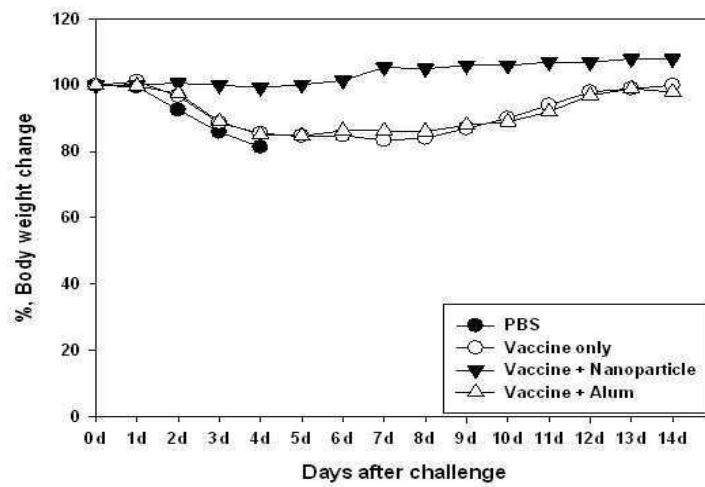
도면9



도면10



도면11



도면12

