

## Chlorogenic Acid의 면역보조제 효과

한 용 문<sup>#</sup>

동덕여자대학교 약학대학 면역·미생물학교실  
(Received October 29, 2010; Accepted November 18, 2010)

### Immunoadjuvant Activity of Chlorogenic Acid

Yongmoon Han<sup>#</sup>

Department of ImmunoMicrobiology, College of Pharmacy, Dongduk Women's University, Seoul 136-714, Korea

**Abstract** — We have been focussing on discovery of natural compounds that have immunoregulatory activities for many years. In the present study, we investigated if chlorogenic acid (CRA), a polyphenolic compound, has an immunoadjuvant activity. Prior to examining the immunoadjuvant activity, effect of CRA on proliferation of T- or B-lymphocyte was determined. Results showed that CRA enhanced the proliferation of those lymphocytes in dose-dependant manner ( $P < 0.05$ ), and the proliferation enhancement by CRA was appeared to be more effective to B-cells than to T-cells. Based on these observations, it was tested with bovine serum albumin (BSA) and *Candida albicans* cell wall (CACW) as antigenic sources if CRA has an immunoadjuvant activity. In experiments, BSA alone or a mixture of BSA plus CRA was injected intraperitoneally to mice (BALB/c strain). For a negative control, mice were given only diluent (DPBS) by the same route. In other experiment, CACW was tested by the same way as did with BSA. Three weeks after the first immunization these animals were boosted. Antisera collected from the mice one week after the booster were analyzed by ELISA. Results displayed that the induction of anti-BSA antibody was increased in mice that received the mixture of BSA and CRA as compared to anti-BSA induction in BSA only-given mice groups ( $P < 0.05$ ). In case of CACW, a similar observation as did with BSA was made, resulting in that there was app. 40% increased production of the anti-CACW antiserum from the combination (CACW plus CRA)-received mice as compared to antiserum induction from CACW alone-given animals. Taken all together, these data indicate that CRA has an ability of enhancing antibody production regardless of nature of antigenic sources. Presumably, activation of B-cell proliferation by CRA may plays an important role in the immunoadjuvant activity of the polyphenolic compound.

**Keywords** □ chlorogenic acid, immunoadjuvant, T-lymphocyte, B-lymphocyte, BSA, CACW

백신개발 시 주요점 중의 하나는 항체의 증진이라 할 수 있다. 이를 위해서 면역보조제를 사용하는데, 현재 인체에 사용이 허용된 면역보조제의 종류는 극히 제한되어 있다. 이는 면역보조제를 함유한 백신제형의 유효성 및 안전성(safety)이 중요하기 때문이다. 그러므로 면역보조제효능이 있으면서 안전성을 갖춘 성분의 발견 및 개발을 위한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 본 연구실에서도 수년 동안 면역보조제개발에 관한 연구를 진행하고 있다. 이 연구과정에서 특정 생약성분들이 면역조절효과가 있음을 연구 조사한 바가 있는데, 인삼배당체 성분인 Ginsenoside

Rg1과 daucosterol은 숙주의 면역력 증진시켜 실험동물의 생존율을 증진시킴으로서 항균효과를 나타내었다.<sup>1,2)</sup> 한편, 감초의 지표성분인 glycyrrhizin의 비당부(aglycone)인 18 $\beta$ -glycyrrhetic acid도 용량에 따라서 면역조절효과가 있어서 CD4+T-lymphocyte의 증식을 억제하는 농도에서는 감염성관절염 치료효과가 있으며,<sup>3)</sup> 반대로 T-lymphocyte의 증식을 보조하는 농도에서는 면역보조제효과가 있었다.<sup>4)</sup> 상기의 기 연구결과를 고찰해보면, 이들 성분들은 모두 terpenoid 계열성분인데, 이들은 T-lymphocyte(T-cell)를 통한 면역유도성을 통해서 B-cell의 항체생성에 영향을 주는 면역조절효과의 가능성이 있는 것으로 유추된다. 하지만 terpenoid 성분인 아닌 타 계열 성분의 면역조절효과에 대해서는 알려진 내용이 별로 없다.

지금까지 알려진 면역계의 활성은, 면역계에서 중추적인 역할

<sup>#</sup>본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 02-940-4521 (팩스) 02-940-4195  
(E-mail) ymhan@dongduk.ac.kr

을 담당하는 CD4+T-cell의 면역반응유도의 적절한 신호의 발생에 따른다. 즉, 이들은 MHC(Major Histocompatibility) molecules에 의한 항원제시를 받으면 증식과정을 거쳐서 Th1과 Th2 유효세포(effector cells)로 분화가 일어난다.<sup>1,2)</sup> 분화된 CD4+T-cell은 다양한 종류의 cytokine을 분비를 통해서 주변의 면역세포에 영향을 주고 이들 면역세포로 하여금 또 다른 종류의 cytokine을 분비토록 하므로, cytokine의 종류에 따라 유효기능을 예측해 볼 수 있는 cytokine profile의 개념이 설정되었다.<sup>5)</sup> 그러므로 면역발현의 초기단계인 염증반응 유도에 관여하는 기능에 따라 Th1 type과 Th2 type으로 분화되는 경향,<sup>6)</sup> 즉, 항원에 대한 숙주의 면역반응에 따라서 체액성면역이나 세포매개성면역의 관여여부에 대한 유추가 가능하다.<sup>7,8)</sup>

이런 점을 고려하여서, 본 연구에서는 식물계에 광범위하게 분포되어 있는 flavonoid 성분인 chlorogenic acid(Fig. 1)를 선정하여 이 성분의 면역보조효과를 조사하였다. Chlorogenic acid(CRA)는 항산화효과, 항암효과, 항염효과 및 항진균효과가 있으며,<sup>9,10)</sup> 최근에 감염성 관절염(septic arthritis)에도 효과가 있는 것으로 보고된 바 있다.<sup>11)</sup> 하지만, 면역보조제 효과에 관한 연구 보고는 전무하다. 천연성분의 면역보조제효과에 대한 대표적인 예를 보면, terpenoidal saponin 계열성분인 *Quillaja saponaria*에서 분리한 Quil A를 항원과 혼합하여 항체를 유도하였을 때 병용하지 않았을 때보다 항체생성의 증가가 있는 것으로 보고된 바 있다.<sup>12)</sup> Quil A와 항원으로 외독소(exotoxin)과 혼합하여 제조된 백신제형은 Cytotoxic T-cell 생산을 유도하여 침투성 병원균뿐만 아니라 암세포용 백신제조에 유효하다는 것이 보고된 바 있다.<sup>13,14)</sup> 그러나 이 성분의 독성 때문에 상업적인 백신개발에는 제한이 있다. 그러나 본 연구에서 선정한 CRA는 flavonoid 성분에 대한 연구 조사의 의미와 함께, 독성이 낮은 이점도 있어서 이 성분의 면역보조효과에 대한 연구조사는 중요한 의미가 있을 것으로 고려된다.

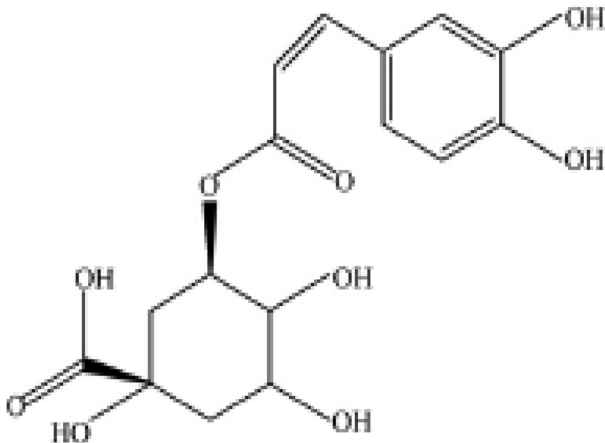


Fig. 1 - Chemical structure of chlorogenic acid (CRA).

## 실험재료 및 방법

### 실험동물

생쥐는 6~7 주령의 BALB/c 암컷 생쥐(Orient Inc.-Charles River Lab, Seoul)를 구입하여 동물실 환경에서 1주일간 적응시킨 후 실험에 사용하였으며, 멸균된 filter-top cage에서 멸균된 사료 및 물을 자유롭게 먹게 하였다. 동물실의 환경은 온도 20±2°C, 습도 50±10%로 유지하였고 조명은 12시간 간격으로 밤과 낮을 조절하였다. 동물관리는 동덕여자대학교 동물관리규정에 따라 취급하였다.

### C. albicans와 배양조건

*C. albicans* 균주는 기 연구에서 특성이 규명된 CA-1 strain<sup>3,15-17)</sup>을 사용하였다. 이 균주의 준비는, 실험직전에 37°C에서 GYEP (Glucose-Yeast Extract Peptone) 액체배지에서 24시간 간격으로 3회 배양한 후 효모 형태의 세포를 원심분리법으로 수집하여 멸균된 인산완충용액(DPBS; pH 7.4; 4°C)으로 3회 이상 세척하여 사용하였다. 생쥐를 감염시키기 위한 세포 수는 hemocytometer (Gibco, USA)를 사용하여 측정하였다.

### Chlorogenic acid

Chlorogenic acid(CRA)는 Sigma(C-3878)에서 구입하였으며, 실험에 사용하기 전에 endotoxin 오염여부를 상업용 endotoxin kit(Sigma)을 사용하여 endotoxin 혼재유무를 확인 한 다음에 본 실험에 사용하였다.

### 항원(Antigenic sources)

항원으로는 단백질로 조성된 Bovine Serum Albumin(BSA)과 탄수화물로 구성된 *C. albicans* 세포벽(CACW)을 선택하였다. BSA는 Sigma(A6793, Fraction V)에서 구입하여 본 실험에 사용하였으며, CACW는 본 연구실에서 보고된 방법을 사용하였다.<sup>3,16,18)</sup> 이 방법을 간략히 기술하면, GYEP 액체배지에 배양한 *C. albicans* 균을 원심분리법으로 수집하고 4°C DPBS로 세척한 다음에 disodium EDTA(0.1 M; pH 7.5)와 trisodium EDTA(0.1 M; pH 9.0)로 연속처리한 후에 0.3 M β-mercaptoethanol로 30분 동안 실온에서 처리하여 상등액을 분리하였다. 분리된 상등액을 투석막(membrane cut-off=12,000 Da)에 넣고 멸균된 탈이온수로 3일 동안 투석하였다. 투석이 완료된 후에 투석막 내부 물질을 영하 50°C에서 동결하여 동결건조기(Eyela FD-1000, Tokyo, Japan)로 건조하였다. 건조된 세포벽은 desiccator안에 저장보관하고 사용하였다.

### CRA의 T-lymphocyte와 B-lymphocyte 증식에 대한 효과

증식효과를 검색하기위해서 본 연구실의 기 연구에서 사용한

방법<sup>3,15)</sup>을 적용하였다. BALB/c 생쥐에서 splenocytes를 무균조작으로 채취하여 적혈구 용해 용액으로 적혈구를 제거한 다음에, RPMI 1640(Sigma) culture medium에 넣고 37°C-5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 배양 후 실험에 사용하였다. 이 splenocytes(5×10<sup>6</sup> cells/well)에 concanavalin A(Con A: 5 µg/ml; Sigma C2010)를 투여하고 다양한 농도의 CRA를 첨가한 후, 동일한 배양조건에서 72시간 배양한 다음에 CCK-8(Cell Count Kit-8; Dojindo Lab; Japan)용액을 사용하여 T-lymphocytes에 대한 증식효과를 검색하였다. B-lymphocyte 증식효과 검색에서는 상기 방법과 동일한 방법을 사용하되, Con A 대신에 LPS(lipopolysaccharide; 10 µg/ml)로 처리하고 CRA를 첨가하여 증식효과를 측정하였다. Con A는 T-cell mitogen이며, LPS는 B-cell mitogen으로 알려져 있다.<sup>12)</sup>

### CRA의 면역보조제 효과검색

CRA의 면역보조제 효과를 조사하기 위해서, BSA 또는 CACW를 항원으로 하는 백신제형을 제조하였다. 백신제형은 CRA(1 mg/ml)와 BSA(0.1 mg/ml)로 혼합하거나 또는 CRA(1 mg/ml)와 CACW(1 mg/ml)로 혼합한 후, oil로만 조성된 IFA(Incomplete Freund's Adjuvant)를 1대 1 비율로 첨가하고 sonication하여 유화제 형태의 백신제형을 제조하였다. 면역접종은 복강경로를 통해서 생쥐(BALB/c strain)에 1차 면역접종하고 21일 후에 2차 면역접종을 한다. 2차 접종 7일 후에 생쥐의 꼬리동맥에서 채혈하여 혈청만을 분리하였다. 수집한 혈청에 대한 anti-BSA 항체 또는 anti-CACW 항체의 생성여부는 ELISA(Enzyme-linked immunosorbant assay) 방법을 사용하여 검색하였다. 수집한 혈청에 대한 anti-CACW(*C. albicans*) 항체의 생성여부는 ELISA 방법으로 검색하였다. ELISA 방법은 본 연구실에서 사용하는 방법을 사용하였다.<sup>2,20)</sup> 이 ELISA 방법을 간략히 기술하면 다음과 같다. 96-well flat bottomed plate에 항원으로 BSA는 0.5 µg/well 농도로 코팅하고 CACW는 2 µg/well로 코팅한 후 4°C에서 대략 16시간 배양한다. 16시간 배양 후, 세척하고 수집된 혈청을 1:100으로 희석하여 코팅된 well에 첨가하고 일정시간 37°C 5%-CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양한다. 그 후에 희석용액(DPBS)으로 세척하고 poly Ig's 항체(secondary antibody)를 첨가하여 일정기간 상기처럼 동일한 배양조건에서 배양하였다. DPBS로 3회 세척한 다음에 OPD 용액을 첨가하여 30분 동안 처리하고 황산을 투여하여 반응을 정지시킨 다음에 microplate reader(Bio-Lab, USA)로 발색정도를 측정하여 항체생성 여부를 평가하였다.

### 통계 처리

실험결과는 평균±표준오차(Mean±S.E.)로 계산하였으며, 각 군 간의 유의성 검증은 Student's *t*-test를 사용하였고 값이 5% 미만일 때에 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

## 실험결과

### T-lymphocyte와 B-lymphocyte 증식에 대한 효과

BALB/c 생쥐로부터 splenocyte를 수집하여 Con A를 첨가하고 다양한 농도의 CRA(0, 1, 2, 4 µg/ml)로 처리하였을 때, 4 µg CRA/ml 농도로 처리된 T-cell의 증식의 경우는 CRA로 처리하지 않은 음성대조군그룹에 비해서 약 28% 정도의 증식이 관측되었다( $P<0.05$ )(Fig. 2). 그리고, T-cell의 증식은 전반적으로 현저하지는 않지만 농도의존적으로 증식하였다(Fig. 2). 한편, 생쥐의 splenocyte에 B-cell mitogen인 LPS를 첨가하고 CRA를 처리했을 경우에도 B-cell의 증식이 농도의존적으로 증식하였으며, 이때의 증식율은 T-cell 증식의 경우와 비교해서 매우 현저함을 알 수가 있었다(Fig. 3). 일례로, LPS로 처리된 splenocytes에 CRA(4 µg/ml)로 첨가하였을 때, 음성대조군과 비교해서 2배 이상의 B-cell 증식이 관측되어서 이 차이는 통계학적으로 유의성이 있다( $P<0.05$ )(Fig. 3).

### CRA의 BSA 단백질항원의 항체생성에 대한 면역보조효과

생쥐(BALB/c strain)를 4그룹으로 분류하여 희석액(DPBS: 음성대조군), CRA, BSA, BSA에 CRA를 혼합물에 각각 IFA를 첨가하여 emulsion형식으로 제형화시킨 백신제형을 각 생쥐그룹에 면역접종을 한 후 수집한 각 혈청에 대한 항 BSA항체(anti-BSA antibody)의 생성정도를 검색하였다. 검색 결과, BSA항원과 CRA로 혼합한 백신제형으로 면역접종을 받은 생쥐에서 수집한 혈청

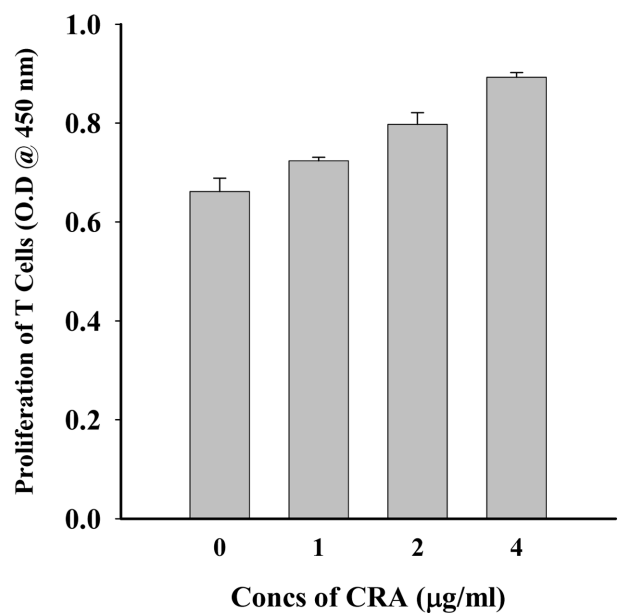


Fig. 2 – Effect of CRA on the proliferation of T-lymphocytes. The CRA treatment increased proliferation of T-lymphocytes that were stimulated by Con A (concanavaline A). This proliferation activity was dose-dependent. Error bar: SE.

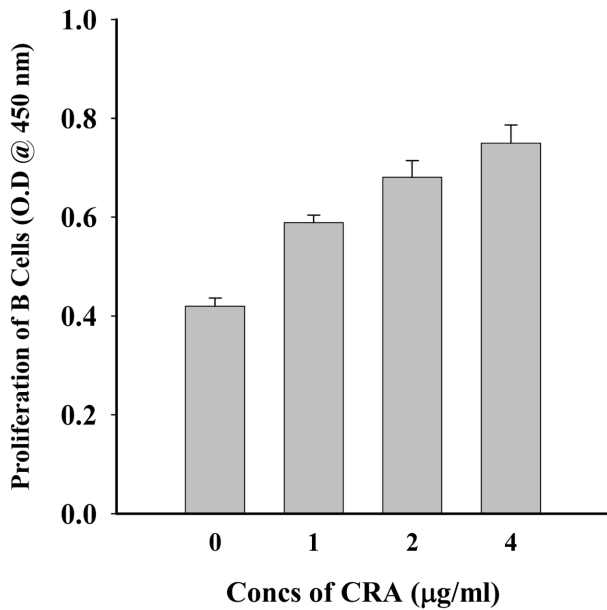


Fig. 3 – Effect of CRA on the proliferation of B-lymphocytes. The CRA also enhanced proliferation of LPS (lipopolysaccharide)-activated B-lymphocytes in dose dependant manner. The proliferation activity of CRA to B-cells appeared to be more effective than to T-cells as shown in Fig. 2. Error bar: SE.

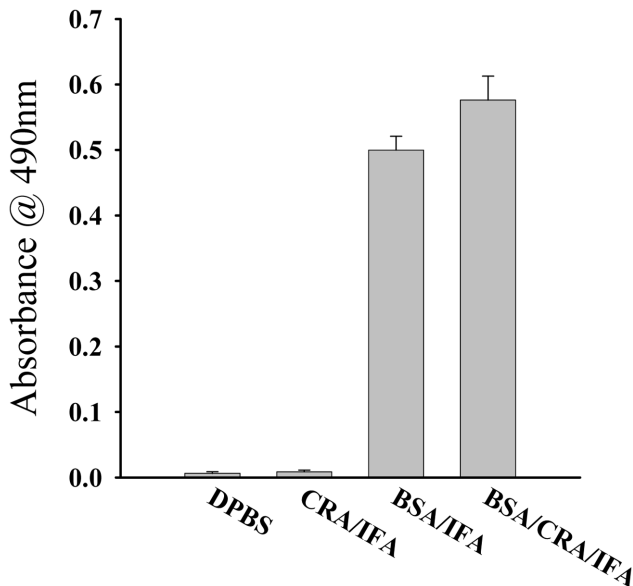


Fig. 4 – Addition of CRA to BSA antigen enhances induction of antibody specific for BSA in mice. The vaccine formulae of BSA plus CRA induced anti-BSA antiserum than did BSA alone. Mice groups that received CRA or DPBS (diluent) resulted in no induction of the antiserum, displaying values of the ELISA experimental backgrounds. This observation indicates that CRA may function as an immunoadjuvant. BSA and IFA stand for bovine serum albumin and incomplete Freund's adjuvant, respectively. Error bar: SE.

에서 항 BSA항체(anti-BSA antibody)의 생성정도를 ELISA방법으로 측정했을 때, BSA만으로 면역 접종한 경우보다 대략 18% 정도의 항체가 더 생성되었다( $P < 0.05$ )(Fig. 4). 한편, CRA만을 투여 받은 생쥐그룹에서 수집한 혈청의 측정결과를 음성대조군(DPBS만을 투여 받은 생쥐그룹)의 측정경우와 비교해 보면 anti-BSA antibody가 검색되지 않았다(Fig. 4). 음성대조군과 CRA만 투여 받은 생쥐그룹에서는 BSA 특이성 항체가 생성되지 않았다. 그러므로 이 결과는 CRA가 BSA 단백질항원의 항체유도성을 보조하는 면역보조제효과가 있음을 알 수 있었다. 이 결과를 바탕으로 하여 항체유도성(immunogenicity)이 단백질항원에 비해서 현저하게 떨어지는 탄수화물항원에 대한 CRA의 면역보조효과를 검색하였다.

#### CRA의 CACW의 항체유도성 면역보조효과평가

BSA의 경우와 유사하게 생쥐에 CACW 단독 또는 CACW에 CRA를 혼합한 백신제형을 접종한 후에 각 생쥐그룹에서 혈청을 수집하여 anti-CACW antibody 생성정도를 측정하였다. 이 실험 결과, CACW 단독의 경우에도 항체가 유도생성 되었지만, CACW에 CRA가 혼합되었을 때 이 항체의 유도성은 거의 40% 정도 증진되어서(Fig. 5), 단백질 항원인 BSA의 경우와 마찬가지로 CRA는 탄수화물 항원에 대해서도 면역보조제효과가 있음을 알 수가 있었다. 대조군으로 사용된 CRA만으로 접종된 생쥐그룹에

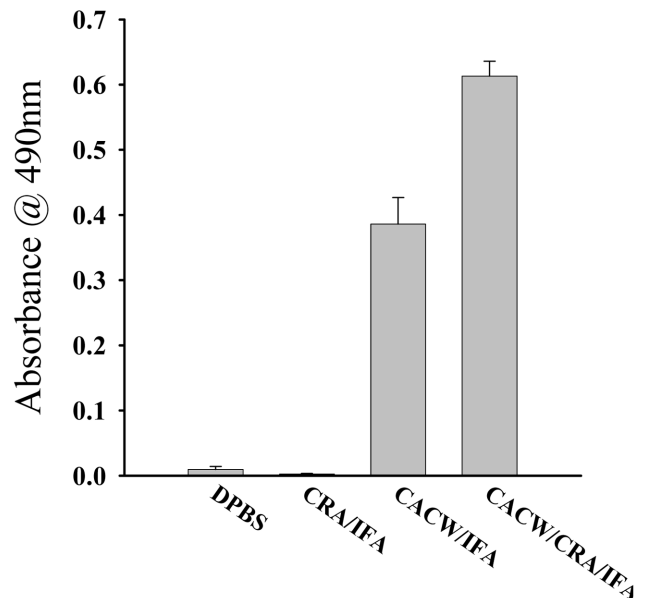


Fig. 5 – Immunoadjuvant activity of CRA confirms increased induction of antiserum in mice. As examined with BSA protein antigen, CRA also helped carbohydrate antigen, *C. albicans* cell wall (CACW), to induce enhancement of antibody specific for the antigen. These results confirm that CRA has immunoadjuvant activity. IFA stands for incomplete Freund's adjuvant. Error bar: SE.

서 수집한 혈청에서는 예상한 것처럼 anti-CACW antibody는 검출되지 않았다(Fig. 5).

### 고찰 및 결론

본 연구에서는 polyphenolic 성분인 CRA(Chlorogenic acid)의 면역보조제 효과를 조사하였다. 먼저 T-lymphocyte와 B-lymphocyte 증식에 대한 CRA의 효과를 조사하기 위해서, 생쥐의 spleen에서 수집한 splenocyte를 Con A로 처리하고 다양한 농도(1 µg/ml에서 4 µg/ml)의 CRA로 처리하였을 때, T-cells 증식은 농도의존적으로 증가하였으며 Con A 대신에 LPS로 처리된 경우에도 B-cells의 증식이 농도의존적으로 증가하였다. 이 증가율은 T-cell에 대한 효과보다 더 높았다. 이 결과를 고찰해보면, CRA는 체액면역성에 관여하는 B-cell의 증식에 더 친화성이 높은 것으로 추정된다. 이 실험결과를 토대로 하여 CRA의 면역보조제 효과의 가능성을 조사하였다.

CRA의 면역보조제 효과를 검색하기 위해서 단백질 항원과 탄수화물 항원을 사용하여 조사하였다. 이 실험에서 먼저 단백질 항원인 BSA를 사용하였는데, BSA만으로 접종된 생쥐에서 수집한 혈청에서 예상한바와 같이 anti-BSA항체가 검출되었다. 항원으로서 BSA는 면역성(immunogenicity)이 우수한 단백질이므로 당연히 이러한 결과이지만, 이 실험결과를 CRA와 혼합된 BSA항원으로 면역된 생쥐로부터 수집된 혈청에서 검출된 anti-BSA항체의 titer를 비교하면 후자의 경우가 더 높았다. 이 결과는 CRA성분이 면역보조제 효과가 있는 것을 입증한다. 이러한 CRA의 면역보조제 효과를 확실히 하기 위해서, 다른 실험에서는 단백질항원 대신에 면역성이 떨어지는 탄수화물 항원인 *C. albicans* 세포벽(CACW)을 사용하여 검색하였다. CACW를 사용한 결과를 분석해보면, BSA항원의 경우처럼 CACW항원 단독으로 사용했을 때보다는 CRA와 혼합되었을 때가 항체(anti-CACW antibody)의 생성이 증진됨을 알 수가 있었다. 이 실험결과는 CRA가 항원의 성상에 관계없이 항체유도를 증진하는 면역보조제 효과가 있는 것으로 사료된다. 사실, CACW의 항원성에 대한 특성은 기 연구에서 이미 규명된 바 있는데,<sup>18,21,22)</sup> CACW의 항체유도를 증진하기 위해서 Liposome 백신제형<sup>18)</sup>이나 conjugate vaccine<sup>22)</sup> 등으로 제형화하지만, 이러한 제형화 공정과정은 까다로워서 제조에 어려움이 있다. 그러나, CRA를 면역보조제로 사용하면 단순히 항원과 혼합하면 되므로 제조과정이 간편한 장점이 있다.

결론적으로, CRA는 T-cell과 B-cell의 증식을 보조하는 효과가 규명되었으며, 특히 항체생성에 관여하는 B-cell 증식에 더 효과적임을 알 수가 있다. 이러한 점을 고려해서 항체생성에 대한 CRA의 효과를 검색한 결과, CRA는 항원의 성상에 관계없이 항원에 특이성(specificity)이 있는 항체유도를 증진하여 항체생

성의 증가를 돕는 면역보조제효과가 있는 것으로 검색되었다. 이 결과를 응용한다면, 백신개발 시 까다로운 공정과 고가의 비용 대신에 손쉽게 CRA를 항원에 첨가하여 항체생성의 유도가 가능하여서 백신개발에 도움이 될 것으로 평가된다.

### 감사의 말씀

이 논문은 2010년도 동덕여자대학교 학술연구비 지원에 의하여 수행된 것으로 지원에 감사드립니다.

### 참고문헌

- 1) Lee, J. H. and Han, Y. : Ginsenoside Rg1 helps mice resist to disseminated candidiasis by Th1 type differentiation of CD4+ T cell. *Int. Immunopharm.* **6**, 1424 (2006).
- 2) Lee, J. H., Lee, J. Y., Park, J. H., Jung, H. S., Kim, J. S., Kang, S. S., Kim, Y. S. and Han, Y. : Immunoregulatory activity by daucosterol, a beta-sitosterol glycoside, induces protective Th1 immune response against disseminated Candidiasis in mice. *Vaccine.* **25**, 3834 (2007).
- 3) Han, Y. : Effect of 18β-glycyrrhetic acid on septic arthritis caused by *Candida albicans*. *Yakhak Hoeji* **51**, 325 (2007).
- 4) Han, Y. : 18β-glycyrrhetic acid induces protective anti-*Candida albicans* antibody by its immunoadjuvant activity. *Yakhak Hoeji* **52**, 494 (2008).
- 5) MacLeod, M. K., McKee, A., Crawford, F., White, J., Kappler, J. and Marrack, P. : CD4 memory T cells divide poorly in response to antigen because of their cytokine profile. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **23**, 14521 (2008).
- 6) Chen, G. H., McNamara, D. A., Hernandez, Y., Huffnagle, G. B., Toews, G. B. and Olszewski, M. A. : Inheritance of immune polarization patterns is linked to resistance versus susceptibility to *Cryptococcus neoformans* in a mouse model. *Infect. Immun.* **76**, 2379 (2008).
- 7) Weaver, C. T., Hatton, R. D., Mangan, P. R. and Harrington, L. E. : IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu. Rev. Immunol.* **25**, 821 (2007).
- 8) Corthay, A. : A three-cell model for activation of naïve T helper cells. *Scand J. Immunol.* **64**, 93 (2006).
- 9) Dos Santos, M. D., Almeida, M. C., Lopes, N. P. and De Souza, G. E. P. : Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid. *Biol. Pharm. Bull.* **29**, 2236 (2006).
- 10) Ma, C., Kully, M., Khan, J. K., Hattori, M. and Daneshmand, M. : Synthesis of chlorogenic acid derivatives with promising antifungal activity. *Bioorganic. Med. Chem.* **15**, 6830 (2007).
- 11) Lee, J. H., Park, J. H., Kim, Y. S. and Han, Y. : Chlorogenic acid, a polyphenolic compound, treats mice with septic arthritis

- caused by *Candida albicans*. *Int. Immunopharmacol.* **8**, 1681 (2008).
- 12) Kensil, C. R., Patel, U., Lennick, M. and Marciani, D. : Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from *Quillaja saponaria* Molina cortex. *J. Immunol.* **146**, 431 (1991).
- 13) Ghochikyan, A., Mkrtichyan, M., Loukinov, D., Mamikonyan, G., Pack, S. D., Movsesyan, N., Ichim, T. E., Cribbs, D. H., Lobanekov, V. V. and Agadjanyan, M. G. : Elicitation of T cell responses to histologically unrelated tumors by immunization with the novel cancer-testis antigen, brother of the regulator of imprinted sites. *J. Immunol.* **178**, 566 (2007).
- 14) White, K., Rades, T., Kearns, P., Toth, I. and Hook, S. : Immunogenicity of liposomes containing lipid core peptides and the adjuvant Quil A. *Pharm. Res.* **23**, 1473 (2006).
- 15) Lee, J. H., Park, J. H., Kim, Y. S. and Han, Y. : Chlorogenic acid, a polyphenolic compound, treats mice with septic arthritis caused by *Candida albicans*. *Int. Immunopharmacol.* **8**, 1681 (2008).
- 16) Han, Y., Morrison, R. P. and Cutler, J. E. : A vaccine and monoclonal antibodies that enhance mouse resistance to *Candida albicans* vaginal infection. *Infect. Immun.* **66**, 5771 (1998).
- 17) Han, Y., Kanbe, T. K., Cherniak, R. and Cutler, J. E. : Biochemical characterization of *Candida albicans* epitopes that can elicit protective and nonprotective antibodies. *Infect. Immun.* **65**, 4100 (1997).
- 18) Han, Y. and Cutler, J. E. : Antibody response that protects against disseminated candidiasis. *Infect. Immun.* **63**, 2714 (1995).
- 19) Han, Y., van Rooijen, N. and Cutler, J. E. : Binding of *Candida albicans* yeast cells to mouse popliteal lymph node is mediated by macrophages. *Infect. Immun.* **61**, 3244 (1993).
- 20) Han, Y., Ulrich, M. A. and Cutler, J. E. : *Candida albicans* mannan extract-protein conjugates induce a protective immune response against experimental candidiasis. *J. Infect. Dis.* **179**, 1477 (1999).
- 21) Han, Y., Riesselman, M. H. and Cutler, J. E. : Protection against candidiasis by an immunoglobulin G3 (IgG3) monoclonal antibody specific for the same mannose as an IgM protective antibody. *Infect. Immun.* **68**, 1649 (2000).
- 22) Han, Y., Kozel, T. R., Zhang, M. X., MacGill, R. S., Carroll, M. C. and Cutler, J. E. : Complement is essential for protection by an IgM and an IgG3 monoclonal antibody against experimental, hematogenously disseminated candidiasis. *J. Immunol.* **167**, 1550 (2001).