

DNA를 이용한 백신 및 치료

포항공대 분자생명과학부

송만기 · 성영철 · 이창우

배 경

1990년, plasmid DNA를 동물에 직접 주입했을 때 단백질이 만들어진다는 보고에 이어, 이렇게 생성된 소량의 단백질이 항원으로 작용해 면역 반응이 유도된다는 결과가 발표되면서 DNA 백신에 대한 연구가 시작되었다^{1, 2)}. 뒤이어 DNA vaccine이 안전하면서도 세포성 면역 반응을 유도 및 조절할 수 있다는 사실이 여러 disease model에서 발표되었고³⁻¹³⁾, 처음 소개된지 3년이라는 짧은 기간에 FDA에서 임상 실험을 허가하여, 현재 HIV를 비롯하여 천식, HBV, 말라리아, 독감, 암에 대한 임상 실험이 진행되고 있다.

DNA 백신은 eukaryotic expression vector를 직접 숙주에 주입하여 세포 내에서 발현되는 단백질에 대한 면역 반응을 유도하는 방법으로서 기존의 백신과는 달리 단백질이 아닌 유전 정보체인 DNA 자체를 사용한다는 특징을 가지고 있다¹⁴⁾. DNA 백신은 live attenuated 백신과 같이 항원이 세포 내에서 발현되는 특징을 가지고 있지만, 병원체 전체를 이용하는 것이 아닌 방어면역을 유발하는데 중요한 부분만을 포함하고 있기 때문에 감염에 대한 위험성이 없다. B형 간염백신으로 이용되고 있는 subunit 백신은 정제한 단백질을 백신으로 이용하는 것으로서 항원이 세포 외부에서 안으로 들어가는데 이 경우 주로 항체 반응을 유발하게 된다. 그렇지만, 항원이 세포내부에서 발현된다는 것은 면역학적으로 중요한 의미를 가지는데 이것은 cytotoxic T lymphocyte (CTL)을 활성화시킬 수 있기 때

문이다¹⁵⁾. 세포내에서 발현된 항원은 major histocompatibility antigens (MHC class I molecules)에 제시될 수 있기 때문에 CTL을 비롯한 세포성 면역 반응을 효율적으로 유도할 수 있는 것이다. 이러한 세포성 면역은 virus와 같은 intracellular pathogen을 제거하는데 필수적인 면역 반응으로서 HIV나 HCV 등 현재 치료하기 어려운 바이러스에 대해 이러한 면역 반응을 높이기 위한 연구가 많이 진행되고 있다³⁻⁵⁾. 항체반응은 주로 세포외부에서 병원균을 제거하는 역할을 주로 수행한다. 따라서 효과적으로 숙주 내에서 병원균을 제거하기 위해서는 세포성 면역반응과 함께 항체반응의 유발이 필요하다. 최근의 보고에 따르면 세포 내에서 발현된 단백질이 외부에서 유입된 단백질보다 효과적으로 MHC class II molecule에 제시된다고 한다. 그러므로, DNA를 동물에 주입했을 때 대부분의 DNA는 세포로 들어가지 못하고 극소수만이 세포내에서 발현됨에도 불구하고 높은 항체 반응을 유발할 수 있는 이유는 여기에 있다^{14, 15)}. 이러한 면역학적 특성과 안전성 때문에 DNA 백신이 여러 질병을 치료하고 예방하는데 큰 기대를 모으고 있다.

DNA 백신의 면역 활성화는 백신백터에 존재하는 박테리아 DNA sequence인 CpG-motif(Pu Pu CpG Py Py)에 의해 더욱 강화되는데 이 짧은 DNA sequence를 고등동물의 면역체계가 이 물질로 인식하여 면역 반응을 유발하게되는 것이다^{16, 17)}. 현재까지 알려진 바에 따르면, 중요한 항원제시세포 (antigen presenting cell)인 B

통신저자 : 포항공대 분자생명과학부 이창우
경북 포항시 남구 효자동 산 31 (☎ 790-784)
e-mail : cwlee@postech.ac.kr

cell과 macrophage, dendritic cell이 unmethylated CpG-motif에 의해 직접 활성화되며, 이러한 항원제시세포에서 분비하는 cytokine 이나 co-stimulatory molecule 등에 의해 방어면역 반응에 중요한 역할을 수행하는 natural killer (NK) cell이나 cytotoxic T lymphocyte (CTL) 등이 2차적으로 활성화된다고 보고되었다¹⁸⁻²⁰⁾. Unmethylated CpG-motif를 포함하는 DNA에 의한 면역활성의 중요한 특징은 T helper type 1 (Th1)의 면역반응을 유발하는 것인데, Th1 면역반응은 IL-12나 IFN- γ 등과 같은 cytokine을 분비하며 세포에 감염하는 바이러스나 암 등의 제거에 중요한 역할을 수행하는 CTL 반응을 일으킬 수 있다²¹⁾. DNA 백신은 세포내에서 항원을 발현하여 항원에 특이적인 면역 반응을 유발하고 또한 unmethylated CpG-motif에 의해서 유도되는 면역반응을 크게 강화할 수 있는 특징을 가지고 있다.

DNA 백신의 이용

1. 백신으로의 이용

현재, DNA를 이용한 연구에서 가장 활발하게 진행되고 있는 분야는 DNA를 백신으로 이용하고자 하는 것이다(Table 1). 생체 내에서 바이러스나 암을 제거하기 위해서는 CTL 등의 세포성 면역 반응이 중요하게 작용하는데, DNA

immunization 방법은 이러한 면역반응을 효과적으로 유도할 수 있어 세포에 감염하는 병원균 또는 암 등의 질병에 대해 방어면역을 유도할 수 있는 예방백신으로서 큰 가능성을 가지고 있어 기존에 이미 백신이 개발되어 있는 여러 바이러스에 대한 새로운 백신으로서의 이용뿐만 아니라 치료가 어렵거나 불가능하고 현재 백신이 없는 말라리아나 AIDS 바이러스에 대해서도 백신으로 이용하기 위하여 많은 연구가 진행되고 있다. 현재까지 이들 병원균에 대해 동물실험에서 성공적으로 방어면역을 유도하였고 이미 인체에서 임상실험이 진행되고 있다. DNA immunization 방법은 예방백신으로의 이용과 함께 치료용 백신(therapeutic vaccine)으로 이용하기 위해서도 많은 연구가 진행되고 있는데 치료가 어려운 결핵균에 대한 동물실험에서 성공적인 결과가 보고되었고 HBV, HIV 등에 대해서도 치료용 백신으로 이용하기 위한 연구가 진행되고 있다²²⁾.

한편, 많은 종류의 암에서 암 특이 항원(tumor-specific antigen)이 발견되었는데, DNA immunization 방법은 이러한 암 특이 항원을 DNA에 삽입한 후 생체에 바로 주입하여 암 특이 항원에 대한 면역 반응을 촉진시켜 암을 제거할 수 있을 것이다²²⁾. 이 방법은 암세포에 특이적으로 존재하는 항원에 대해서만 면역반응을 유도하기 때문에 정상적인 세포에는 작용하지 않고

Table 1. Successful uses of DNA vaccines in animal models

Use	Ex a m p l e s
Preventive /therapeutic vaccination	Viruses : influenza, HSV -1, HSV -2, HIV -1, CMV, measles, papilloma, rabies, Hepatitis, rotavirus, St Louis encephalitis and lymphocytic choriomeningitis Bacteria : Mycobacterium tuberculosis, Mycoplasma pulmonis and Leishmania Parasites : malaria
Allergies	Inhibition of specific IgE antibody formation for β -galactosidase, treatment of airway hyperresponsiveness to dust mite allergens
Cancer	Induction of immunity against a weak, otherwise unrecognized tumor antigen, by a DNA that encoded a fusion protein for the tumor antigen and GM-CSF

Seminars in Immunology 9: 271-83, 1997

암세포만 특이적으로 제거할 수 있는 장점이 있다. DNA를 이용한 이러한 면역 치료법은 기존의 수술, 화학 및 방사선 치료법으로 제거할 수 없는 암 세포까지도 생체 내의 면역 반응을 활성화시켜 퇴치할 수 있다는 점에서 획기적인 방법이라 할 수 있다. 최근 DNA를 이용하여 많은 동물 실험이 진행되고 있는데, 암에 대한 예방 백신으로서의 효과와 암을 치료하기 위한 therapeutic vaccine으로서의 효과를 검증하고자 하는 두 가지 방향의 실험들이 이루어지고 있다. 동물 실험 결과, B-cell lymphoma나 melanoma의 특이 항원을 DNA에 삽입한 후 생쥐에 바로 주입했을 때 암 특이 항원에 대한 면역 반응이 유도되어 암세포를 주입했을 때 이 세포만을 특이적으로 제거함을 증명하였고, 또한 함께 삽입한 cytokine에 의해 면역 반응이 크게 강화시킬 수 있음을 보였다²³⁻²⁵⁾. 뿐만아니라, 생쥐에 B-cell lymphoma를 먼저 형성시킨 후에 cytokine과 암 특이 항원을 가진 DNA로 면역했을 때 암세포가 제거됨을 보임으로써 DNA immunization 방법이 암의 치료에도 효과적임을 증명하였다. 이러한 동물실험을 바탕으로 최근에 DNA를 이용하여 melanoma와 blood cancer를 치료하기 위하여 인체에서의 임상 실험이 시작되었다. 이러한 인체실험을 통하여 DNA immunization 방법의 암에 대한 치료 효과가 증명된다면 향후 여러 종류의 암 치료에 큰 전기가 마련될 것이다.

2. 기타 면역치료제로의 이용

DNA는 여러 병원균 및 암에 대한 백신뿐만 아니라 autoimmune disease나 allergy를 치료하기 위한 면역치료제로의 연구들도 많이 진행되고 있다. Autoimmune disease인 multiple sclerosis를 치료하기 위한 동물실험이 진행되어 성공적인 결과를 얻었는데, autoimmune attack에 관여하는 세포들을 선택적으로 제거함으로써 autoimmune disease를 치료할 수 있

었다. Allergy는 외부 물질에 대한 인체의 면역 반응, 특히 IgE와 Th2 면역 반응에 의해 유발되는데 DNA로 allergen에 대해 IgE 반응 대신 Th1 반응과 IgG 반응을 유발시킴으로써 allergy 반응을 억제시킬 수 있다. 생쥐모델에서 주요 allergen인 house dust mite에 대한 실험결과 DNA immunization 방법으로 allergy 반응을 크게 억제시킬 수 있었고^{22, 26, 27)}, 다른 allergen에 대해서도 많은 실험이 진행되고 있다.

CpG-oligodeoxynucleotide (CpG-ODN)의 이용

CpG-ODN을 이용한 면역치료는 기본적으로 DNA를 이용하는 것과 같은 원리이지만 항원을 단백질 형태로 제공하고 CpG-ODN은 adjuvant로 이용하는 점에서 차이가 있다. CpG-ODN의 장점은 DNA 만으로 면역했을 때보다 더욱 높은 면역 반응을 유발하는 것인데 단백질 백신의 높은 humoral immune response와 DNA의 장점인 Th1 immune response를 동시에 유도할 수 있어 여러 질병의 치료에 이용하기 위해 많은 연구가 진행되고 있다²⁸⁻³¹⁾.

1. 백신으로의 이용

CpG-ODN 또한 DNA와 같이 여러 바이러스 및 암에 대해 예방 및 치료용 백신으로 이용하기 위하여 많은 연구가 진행되고 있다. 생쥐에서 HBV를 이용한 연구 결과에서는 CpG-ODN을 adjuvant로 이용했을 때 가장 높은 humoral 및 cellular immune response를 유도하였고 말라리아에 대해서는 100% 방어면역을 유도함이 증명되었다³²⁾. 현재 CpG-ODN을 HBV에 대해 예방 및 치료용 백신으로 이용하기 위해 임상실험이 진행중이다. 암에 대해서도 많은 연구가 진행되고 있는데 CpG-ODN이 antibody-based immunotherapy에 의한 항체의존성 세포 살상 효과(ADCC)를 크게 증가시키는 것이 증명되었고 B-cell lymphoma나 melanoma를 감소시키거나 제거할 수 있음이 밝혀졌다³³⁾.

2. 기타 면역치료제로의 이용

CpG-ODN은 알레르기나 천식을 치료하기 위한 연구에도 많이 이용되고 있는데 동물 모델에서 naked DNA와 같이 Th1 반응과 IgE 대신 IgG 반응을 유발시킴으로써 allergy 반응을 억제시킬 수 있음이 증명되었다^{26, 27, 33)}.

최근동향

최근에 DNA 백신을 이용한 인체에서의 임상 실험 결과들이 많이 발표되고 있다³⁴⁻³⁶⁾. HBV에 대한 임상 실험 결과 S 단백질에 대한 항체반응이 방어면역을 충분히 유발할 수 있을 정도로 유도되었고 Th1 type의 cytokine과 높은 CTL 반응을 유발하는 것이 밝혀졌다³⁴⁾. 현재 사용중인 HBV 예방백신의 가장 큰 문제점은 백신에 대한 항체 반응을 유도하지 못하는 비반응자(non-responder)의 비율이 10% 정도 되는 것인데 DNA 백신은 항체반응 외에 세포성 면역반응을 유발할 수 있기 때문에 이러한 문제를 해결할 수 있을 것이다. 또한, DNA 백신은 방어면역에 관여하는 유전자를 쉽게 클로닝하여 이용할 수 있기 때문에 단백질로는 이용하기 힘든 유전자를 사용할 수 있는 장점을 가지고 있다. 현재 HIV에 대한 임상 실험이 기존에 단백질 백신에서 주로 시도되었던 당단백질(gp120) 외에도 rev나 pol 등 세포성면역을 유도할 수 있는 유전자를 함께 사용하는 것도 이러한 이유이다³⁶⁾.

주로 cytokine이나 병원체의 유도 물질을 in vitro에서 대량 생산하여 인체에 투여하게 되는 기존의 면역 치료 및 백신 기술은 생산에 막대한 비용이 들 뿐 아니라, 몇 년에서 길게는 십 수년에 걸쳐 인체에 대한 안전성 실험을 해야 한다. 반면에 DNA 백신 기술은 기존의 백신 및 치료제에 비해 효율적으로 세포 면역을 유도 및 조절할 수 있을 뿐 아니라 안전하고 생산비용도 저렴하기 때문에, 신약 개발에 막대한 비용을 투자할 수 없는 우리 나라 현실에 매우 적합한 기술로 사료된다.

참 고 문 헌

- 1) Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Ascadi G, Jani A et al: Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 247: 1465-8, 1990
- 2) Tang D, deVit M, Levy R: Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 236: 1520-4, 1992
- 3) Boyer JD, Ugen KE, Wang B, Agadjanyan M, Gilbert L, Bagarazzi ML et al: Protection of chimpanzees from high-dose heterologous HIV-1 challenge by DNA vaccination. *Nat Med* 3: 526-32, 1997
- 4) Choo QL, G Kuo, R Ralston, A Weiner, D Chien, G Van Nest et al: Vaccination of chimpanzees against infection by the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 1294-8, 1994
- 5) Cooper S, Erickson AL, Adams EJ, Kansopon J, Weiner AJ, Chien DY et al: Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity* 10: 439-49, 1999
- 6) Davis HL, Brazolot Millan CL: DNA-based immunization against hepatitis B virus. *Springer Semin Immunopathol* 19: 195-209, 1997
- 7) Donnelly JJ, Friedman A, Martinez D, Montgomery DL, Shiver JW, Motzel SL et al: Preclinical efficacy of a prototype DNA vaccine: enhanced protection against antigenic drift in influenza virus. *Nat Med* 6: 583-7, 1993
- 8) Jondal M, Schirmbeck R, Reimann J: MHC class I-restricted CTL responses to exogenous antigens. *Immunity* 5: 295-302, 1996
- 9) Klinman DM, Verthelyi D, Takeshita F, Ishii KJ: Immune recognition of foreign DNA: a cure for bioterrorism? *Immunity* 11: 123-9, 1999

- 10) Lu S, Arthos J, Montefiori DC, Yasutomi Y, Manson K, Mustafa F et al: Simian immunodeficiency virus DNA vaccine trial in macaques. *J Virol* 70: 3978-91, 1996
- 11) Sedegah M, Hederstorm R, Hobert P, Hoffman SL: Protection against malaria by immunization with plasmid DNA encoding circumsporozoite protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 9866-70, 1994
- 12) Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, Rhodes GH, Felgner PL, Dwarki VJ et al: Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 259: 1745-9, 1993
- 13) Wang R, Doolan DL, Le TP, Hedstrom RC, Coonan KM, Charoenvit Y et al: Induction of antigen specific cytotoxic T lymphocytes in humans by a malaria DNA vaccine. *Science* 282: 476-80, 1998
- 14) Ulmer JB, Donnelly JJ, Liu MA: DNA vaccines promising: a new approach to inducing protective immunity. *ASM news* 62: 476-9, 1996
- 15) Ulmer JB, Sadoff JC, Liu MA: DNA vaccines. *Curr Opin Immunol* 8: 531-6, 1996
- 16) Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R et al: CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374: 546-9, 1995
- 17) Krieg AM: CpG DNA: a pathogenic factor in systemic lupus erythematosus? *J Clin Immunol* 15: 284-92, 1995
- 18) Klinman DM, Yi A, Beaucage SL, Connor J, Krieg AM: CpG motifs expressed by bacterial DNA rapidly induce lymphocytes to secrete IL-6, IL-12, and IFN. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 2879-83, 1996
- 19) Sato Y et al: Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. *Science* 273: 352-4, 1996
- 20) Wagner H: Bacterial CpG DNA activates immune cells to signal infectious danger. *Adv Immunol* 73: 329-68, 1999
- 21) Pissetsky DS: Immune activation by bacterial DNA: a new genetic code. *Immunity* 5: 303-10, 1996
- 22) Hasan UA, Abai AM, Harper DR, Wren BW, Morrow WJW: Nucleic acid immunization: concepts and techniques associated with third generation vaccines. *J Immunol Meth* 229: 1-22, 1999
- 23) Bueler H, Mulligan RC: Induction of antigen specific tumor immunity by genetic and cellular vaccines against MAGE: enhanced tumor protection by co-expression of granulocyte-macrophage colony stimulating factor and B7-1. *Mol Med* 5: 545, 1996
- 24) De Zoten EF, Carr-Brendel V, Cohen EP: Resistance to melanoma in mice immunized with semiallogeneic fibroblasts transfected with DNA from mouse melanoma cells. *J Immunol* 160: 2915, 1998
- 25) Hakim I, Levy S, Levy R: A nine-amino acid peptide from IL-1 beta augments antitumor immune responses induced by protein DNA vaccines. *J Immunol* 157: 5503, 1996
- 26) Hsu CH, Chua KY, Tao MH, Lai YL, Wu HD, Huang SK et al: Immunoprophylaxis of allergen-induced immunoglobulin E synthesis and airway hyperresponsiveness *in vivo* by genetic immunization. *Nat Med* 2: 540-4, 1996
- 27) Kline JN et al: Modulation of airway inflammation by CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of asthma. *J Immunol* 160: 2555-9, 1998
- 28) Chu RS, Targoni OS, Krieg AM, Lehmann PV, Harding CV: CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T

- helper (Th1) immunity. J Exp Med 186: 1623-31, 1997
- 29) Oxenius A, Martinic MM, Hengartner H, Klennerman P: CpG-containing oligonucleotides are efficient adjuvants for induction of protective antiviral immune responses with T-cell peptide vaccines. J Virol 73: 4120-6, 1999
- 30) Roman M, Martin-Orozco E, Goodman JS, Mguyen M, Sato Y, Ronaghy A et al: Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1 promoting adjuvants. Nat Med 3: 849-54, 1997
- 31) Stacey KJ, Blackwell JM: Immunostimulatory DNA as an adjuvant in vaccination against Leishmania major. Infect Immun 67: 3719-26, 1999
- 32) Davis HL et al: CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. J Immunol 160: 870-6, 1998
- 33) Krieg AM: The role of CpG motifs in innate immunity. Curr Opin Immunol 12: 35-43, 2000
- 34) Roy MJ et al: Induction of antigen-specific CD8⁺ T cells, T helper cells, and protective levels of antibody in humans by particle-mediated administration of a hepatitis B virus DNA vaccine. Vaccine 19: 764-78, 2001
- 35) Tacket CO et al: Phase 1 safety and immune response studies of a DNA vaccine encoding hepatitis B surface antigen delivered by a gene delivery device. Vaccine 17: 2826-9, 1999
- 36) Calarota S, Bratt G, Nordlund S, Hinkula J, Leandersson AC, Sandstrom E et al: Cellular cytotoxic response induced by DNA vaccination in HIV-1-infected patients. Lancet 351: 1320-5, 1998