

폐렴구균 DNA 백신의 면역병리학적 측면에서의 안전성 평가

이주희 · 한용문*

동덕여자대학교 약학대학 면역·미생물학 연구실
(Received December 16, 2005; Revised December 21, 2005)

Evaluation of Safety of *Streptococcus pneumoniae* DNA Vaccine in Immunopathological Aspect

Jue-Hee Lee and Yongmoon Han*

College of Pharmacy, Dongduk Women's University, 23-1 Wolgok-Dong, Seongbuk-Gu, Seoul 136-714, Korea

Abstract — We have previously reported the minimum criteria that can be applied to evaluate efficacy and safety of a DNA vaccine with use of *Streptococcus pneumoniae* DNA vaccine (SPDNA). The SPDNA was formulated by inserting the DNA sequences that are codons specific for the carbohydrate epitope in the capsule of *S. pneumoniae* by phage display peptide library. Administration of the SPDNA into mice induced both humoral and cell-mediated immunities. The induction was protective even in the absence of CD4+ T lymphocyte in mice. Profiles of cytokine and isotyping of antibody displayed tendency of the Th1. In continuation of these studies, we examined if the efficacy of the SPDNA was provoked by the peptide recognized by codons specific for the capsule. Results showed that the peptide vaccine formulae (SPP) induced protective antibody in mice as did the SPDNA. Involvement of the cell-mediated immunity was also determined. Possible side effects of autoimmune diseases such as myositis and C3a production and tumor-formation were undetectable in mice given 7 times of SPDNA vaccination during entire of 92 days. Even after the frequent immunization, immunogenicity of the SPDNA was observed as determined for antibody production, suggesting that there was no immunotolerance provoked. All together, these examining factors would be applied to measurement of a DNA vaccine safety regarding the immunopathological aspect.

Keywords □ DNA vaccine, *S. pneumoniae*, safety, autoimmune, tolerance, mice

최근 선진국에서 많은 연구가 진행되고 있는 DNA 백신개발은 주로 감염성질환(infectious diseases)에 대한 적용이며, 암치료법(gene therapy)에도 응용이 되고 있다.¹⁻³⁾ 후자의 경우 항암세포 항체(anti-tumor antibody)를 항암제에 결합하여 암세포만 인식할 수 있는 표적성 항암제형이 개발되고 있는데, 이 경우에도 암세포를 인식하는 DNA를 encoding하여 plasmid에 삽입하는 DNA 백신의 개념이 적용된다.^{4,5)} 이와 같은 DNA 백신의 알려진 작용기전은 항원제시세포에 직접 작용하여 CD4+ 및 CD8+ T lymphocytes를 활성화하여 specific memory를 갖춘 체액성면역(humoral immunity)을 유도하거나, 체세포(somatic cell)에 직

접 작용하여 CD8+ T-lymphocyte만을 활성화하여 세포매개성면역(cell-mediated immunity : CTL)을 작용시켜 양대 면역력에 작용하는 장점이 있다.⁶⁾ 이와 같은 장점을 갖춘 DNA 백신개발은 세계적인 추세로 유럽과 미국 등에서는 이미 10여 년 전부터 많은 연구가 진행 중에 있으며, DNA 백신의 효능과 유효성 및 안전성 검색에 대한 평가기술을 축적하고 있다.^{7,8)} 그러나 외부 유전자를 숙주내로 투여하는 점으로 인하여 안전성에 대한 문제가 제시되고 있다. 즉, 함께 투여되는 vector(또는 plasmid)를 인식하는 항체의 생성과 DNA 백신의 투여경로가 주로 근육주사인 점 때문에 antigen processing 과정에서 근육세포에 대한 항체가 생성되어 자가면역질환(autoimmune diseases)을 유발할 수 있는 부작용이 있다. 예로서, 감염이 없는 경우에도 보체계(the complement system)를 비특이적으로 활성화하여 C3a 또는 C5a가 생성되어 관절염과 같은 자가질환을 일으킬 수 있다.^{9,10)} 또

*본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-940-4521 (팩스) 02-940-4195
(E-mail) ymhan@dongduk.ac.kr

한, DNA 백신을 투여 받은 숙주 내에서 항원의 지속적인 processing으로 오히려 면역내성(immune tolerance)이 유발되기도 한다.^{11,12)} 이런 측면에서, 투여경로와 접종횟수에 대한 평가가 중요하게 고려되며, 외부유전자가 숙주 유전자에 통합되어 문제를 야기시킬 수도 있기 때문에 DNA 백신제형의 유효성 평가도 중요할뿐만 아니라 유효성과 관련된 안전성 평가도 중요하게 고려된다.

폐렴구균은 폐렴과 뇌막염, 중이염, 패혈증을 일으키는 그람양성세균으로 치료는 주로 항생제요법이 사용되지만 최근에는 항생제에 대한 내성증가로 인하여 발병률과 사망률이 세균성 급성 호흡기 질환 중에서 1위로 보고되고 있다.¹³⁻¹⁵⁾ 기존의 폐렴구균 백신인 23가 백신은 다당류성 협막을 항원으로 하여 제조된¹⁶⁾ 것으로 수십 년 동안 사용되고 있으나 2세 미만의 유아와 노약자에게는 면역력 미성숙과 약화로 인한 부작용이 많으며,¹⁶⁾ 면역유도성을 증진하기 위해 개발된 접합백신(conjugate vaccine)이 현재 임상에서 사용되고 있다.¹⁷⁾ 이 접합백신은 폐렴구균의 다당류성 협막에 단백질을 부착하여 제조되어 면역원성(immunogenicity)은 증진되지만 고가의 비용으로 개발도상국가나 후진국에서는 사용에 제한이 있다.^{16,17)} 이에 반해서 DNA 백신은 개발이 쉽고 비용이 저렴하나 상기 기술한 바와 같은 장·단점의 문제가 있다. 그러므로 백신의 유효성도 중요하나 안전성 평가도 기존의 백신제형보다 더 많은 측면에서 고려하여야 한다. DNA 백신에서 면역 유도성 및 효능의 측정에 관해서는 다양한 보고가 있으나 안전성에 관한 연구결과는 다소 부족한 실정으로, 주로 자가면역(autoimmunity)과 내성(tolerance) 같은 비정상적인 면역반응에 대한 평가가 많다. 이를 간략히 정리하면, 1) DNA 백신의 주요 접종경로인 근육으로 투여시 근육세포에 plasmid vector로 전달된 외부유전자가 발현되어 세포가 비정상화될 때 숙주의 T-lymphocytes의 표적이 되어 자가면역성 근육염(autoimmune myositis)을 일으키기도 하고, 2) 면역기능이 미성숙한 유아나 퇴화된 노인층에서 면역반응이 유도되지 않아서 cytokines 생성과 세포독성반응이 유도되지 않는 면역내성이 생길 수 있다.^{18,19)} 이런 사항을 고려하여 본 연구에서는 DNA 백신의 유효성 평가와 연계된 안전성 평가방법 확립을 위해 면역병리학적 측면에서의 검색을 위해 본 연구실에서 개발된 폐렴구균(*Streptococcus pneumoniae*) DNA 백신을 이용하여 안전성 평가 방법을 제시하고자 하였다.

이 DNA 백신은 병원성 폐렴구균의 협막을 Phage Display Peptide Library(PDPL) 방법에 의한 peptide mimicking으로 탄수화물을 펩타이드화한 항원을 사용하여 항체 유도성을 높이고, 면역학적 specific memory가 유도되도록 고안하여 그 유효성을 조사한 바 있다.^{20,21)} 연구결과는 최근 발표한 폐렴구균 DNA 백신의 안전성과 작용기전 평가²²⁾에 대한 계속적인 연구로, 폐렴구균 DNA 백신의 탄수화물 항원기를 단백질화한 펩타이드 자

체를 폐렴구균 DNA 백신의 효능과 비교하여 표적이 되는 항원기 자체에 의한 것인지를 확인하고 이 과정을 통해 안전성평가 방법을 제시하고자 하였다. 주요 평가검색은 면역유도성, 자가면역질환의 일종인 근염발생, C3 생성증가 유무, 특정장기에서의 종양형성을 Edmoson grade²³⁾에 따라 검색하고, 기초적인 면역내성 가능성을 조사하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양조건

S. pneumoniae serotype 4는 ATCC(American Tissues and Cell Cultures)에서 구입하여 혈액배지(Blood agar; Becton Dickinson Co., USA)와 BHI(Brain Heart Infusion; Difco, Becton Dickinson Co., USA) 액체배지를 이용하여 37°C에서 배양하였고, 면역된 생쥐의 감염은 BHI 액체배지에 배양한 폐렴구균세포를 멸균된 인산완충용액(DPBS : Dulbecco's phosphate saline solution, Sigma, St. Louis, MO, USA)으로 세척한 다음에 500 nm 흡광도에서 0.1로 하여 생쥐의 꼬리정맥으로 전신감염 시켰다.²⁰⁻²²⁾

동물

4주령과, 6주령, 12주령의 BALB/c 암컷생쥐와 5주령의 흰쥐(rat) [strain Crj:CD (SD)/GS]를 Charles River 연구소(USA)에서 구입하였으며, 동물들은 멸균된 물과 사료(Orient Co., Seoul, Korea)를 자유롭게 먹도록 하였다. 동물은 항원조와 공기여과장치 완비된 사육실에서 관리하였고, 사육실은 온도 22±2°C에서 상대습도를 50~60%로 유지하였으며 조명은 12시간마다 낮과 밤이 반복되도록 조절하였다. 면역내성 실험을 위한 생쥐는 12주령의 생쥐를 본 사육실에서 12주를 더 사육한 후 실험에 사용하였다.

Anti-peptide 항체생성과 능동면역 효과검색

폐렴구균 DNA 백신에 삽입된 염기서열을 Codon에 따라 합성된 peptide의 효능 검사는 peptide를 DPBS(Dulbecco's phosphate buffered saline solution; Sigma, St. Louis, MO, USA)에 10 µg/ml로 용해하고 CFA(complete Freund's adjuvant : GibcoBRL, NY, USA) 1 ml와 혼합하여 현탁한 제형을 생쥐에 200 µl씩 복강으로 투여하고 3주 후 두 번째 면역접종에서는 CFA 대신에 IFA(incomplete Freund's adjuvant : GibcoBRL)와 혼합된 동일량의 peptide를 투여하였다. 항체생성 여부는 2회 면역접종 1주일 후에 혈청을 수집하여 폐렴구균 협막다당물질(JY-Pol)^{20,21)}을 항원(2 µg/well)으로 코팅한 96 well plate(Falcon, Becton Dickinson Labware, NJ, USA)에 첨가하고 peroxidase conjugated anti-mouse Ig's polyvalent(Sigma)를 2차 항체로 사

용하여 ELISA 방법으로 조사하였다. 항체역가는 혈청을 DPBS로 10배씩 계대희석한 후 동일한 ELISA 방법으로 검색하였다.

능동면역효과는 peptide 백신제형(SPP)으로 상기 기술한 바와 같이 생쥐를 면역시킨 다음 폐렴구균을 꼬리정맥으로 감염시킨 후 생존시간을 측정하였다.

세포매개성 면역반응 검색

6주령 생쥐에 능동면역방법과 동일하게 폐렴구균 DNA vaccine (SPDNA)를 접종하고 발바닥에 폐렴구균 협막(JY-Pol)을 5 µg (volume=20 µl)씩 우측 발바닥(footpad)에 주사하고 좌측 발바닥에는 동일량의 희석액을 주입한 다음, 24시간과 48시간 후에 dial thickness gauger(Miyutoyo : Tokyo, Japan)로 부종을 측정하였다.^{20,21)} 각 그룹에 사용된 생쥐는 5마리였으며 3회 반복실험 하였다. JY-Pol은 본 연구실에서 분리한 폐렴구균 협막으로 협막의 glucuronic acid와 glucose 항원기를 인식한다.^{20,21)}

SPDNA로 인한 종양발생 검색

6주령의 생쥐 30마리를 SPDNA로 1, 22, 36, 50, 64, 78, 92 일에 각 1회씩 모두 7회 면역접종한 다음, 생쥐의 뇌, 신장, 비장을 적출하여 각 장기표면의 종양형성 여부를 검색하고 각 장기를 냉동절편(cryosection, Leica Microsystems, Nussloch, Germany)하여 Giemsa stain(Sigma)한 후 현미경(Olympus CX41RF, Japan) 하에서 장기내부의 병변상태를 검색하였다. 음성대조군 생쥐는 동일한 투여경로로 DPBS를 동일량 투여하였다. 평가는 Edmonson grade²³⁾를 적용하여 검색하였다.

SPDNA로 인한 자가면역질환 검색

DNA 백신 부작용으로 자가면역질환의 일종인 사구체염 발생 가능성을 조사하기위해, 상기 기술한 방법처럼 SPDNA로 6주령 생쥐를 7회 면역한 다음 30일 후에 생쥐(15마리)의 신장을 적출하여 homogenizer로 균질하게 분쇄한 다음 상등액을 원심분리로 수집하고 여과하여 동결건조기(Freeze dryer FD-1000, EYELA, Tokyo Rikakikai Co., Japan)로 농축하였다. 농축된 시료를 96-well plate에 20 µl/well로 첨가하고 hood 안에서 건조방법으로 코팅한 다음에 2차 항체로 anti-mouse C3 antibody (Pharmingen)로 반응시킨 후, DPBS로 세척하고 peroxidase conjugated anti-rat IgG로 처리하고 OPD(Sigma)로 반응시켰다. 30분간 반응 후, 황산을 첨가하여 반응을 종결시킨 다음 microplate reader(Bio-Tek Instruments, Inc. Winooski, USA)로 측정하였다.

근염발생 조사실험은 능동면역 방법처럼 SPDNA로 생쥐(15마리)를 7회 접종하고 30일 후부터 24시간 간격으로 3일간 생쥐의 운동성을 관찰하였다. 실험방법은 40°C로 유지된 hot plate위에 비커(200 ml)를 놓고 각 생쥐를 한 마리씩 넣은 다음, 생쥐

꼬리를 주사바늘로 자극하여 비커 안에서 한 방향으로 회전하도록 하여 3분 동안의 회전수를 측정하였다. 또한 동일 생쥐의 우측 뒷다리(hind leg)의 털을 제거하고 발적생성(systemic lupus erythematosus; SLE) 여부를 관찰하였다.

SPDNA에 의한 면역내성(immune tolerance) 검사

면역내성 가능성 여부를 검색하기 위해 항체생성 지속성 여부를 검색하였다. 실험방법은 15마리의 6주령 생쥐에 SPDNA를 정상적 투여회수인 2회 접종한 다음 7일 후에 혈청을 수집하고, 동일생쥐에 3회 접종하고 7일후 혈청을 수집하는 방법으로 4, 5, 6회 각 접종 후에도 혈청을 수집하여 항체생성유무를 ELISA 방법^{21,22)}으로 검색하였다. 판정은 항체가 생성되지 않으면 immunosuppression에 의한 면역내성이 유발된 것으로 간주하였다. 이 실험에 앞서, 2회 정상적 면역접종 schedule에 따라 4주령과 24주령 생쥐에 SPDNA 접종 후 혈청을 수집하여 항체생성 정도를 조사하였다. 각 그룹의 생쥐는 5마리였다.

Anti-mouse muscle cell 항체생성

Anti-mouse muscle cell 혈청분리를 위해, 50°C에서 10분간 열처리 한 생쥐근육세포(NOR-10, Korean Cell Line Bank)를 흰쥐(rat)의 복강으로 200 µl(2×10⁶ 근육세포/ml) 씩 주입하였다. 음성대조군 흰쥐에는 동일량의 희석액(DPBS)을 동일경로로 투여하였다. 접종 21일 후 꼬리동맥에서 채혈하고 혈청을 수집하여 anti-mouse muscle cell 항체생성을 ELISA 방법으로 확인하였다. 항원은 동일종의 근육세포를 사용하였다. 이 anti-mouse muscle cell 항체와 SPP로 면역된 생쥐에서 수집한 anti-peptide 항체의 항원-항체 반응은 ELISA²⁰⁻²²⁾ 방법으로 검색하였다.

통계

생존률의 통계적 유의성은 Kaplan-Meier Test 방법(Systat 7.0; New Statistics for Windows; SPSS, Chicago, IL, USA)으로 산출하였다. 대조군과의 비교하였을 때 P 값이 0.05 보다 적을 경우는 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

SPP 제형으로 확인된 SPDNA의 체액성 면역효과

SPP로 면역된 생쥐에서 Anti-capsule(JY-Pol) 항체생성 여부 조사결과, 폐렴구균 특이성 항체생성이 검색되었고 1/10,000 희석에서도 항체반응이 나타났다(Fig. 1). SPDNA의 보호효과^{21,22)}가 탄수화물에서 peptide로 전환된 항원기의 항체유도에 의한 것인지 규명하기 위해 동물실험을 한 결과, SPP도 SPDNA과 동일하게 폐렴구균으로 인한 전신성 감염에 대하여 예방효과가 있음을 알 수가 있었다(Table I). SPDNA로 면역된 생쥐의 생존시

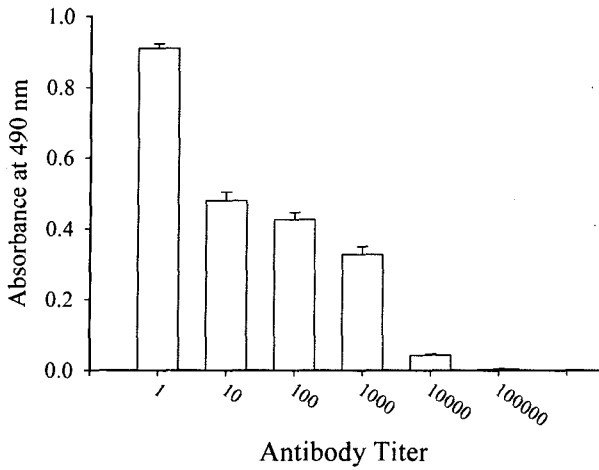


Fig. 1 – The SPP specific for the capsule in *S. pneumoniae* induced anti-capsule serum in mice and the antiserum was detected up to 1 : 10,000 diluted in DPBS. The serum was collected from five SPP-immunized mice. Error bars : S.E. These experiments were done in triplicate.

간을 음성대조군과 비교할 때, 생존시간이 거의 30일 이상 연장되었으며 이와 유사하게 SPP로 면역된 동물의 생존률도 높아졌다. 이 효과는 통계적으로 유의성이 있었다($P < 0.05$). 이 결과를

Table I – Active immunization by the peptide vaccine (SPP) enhanced resistance of mice against systemic pneumococcal disease as did *S. pneumoniae* DNA vaccine (SPDNA)

Type of immunogen	MST ¹ (days)
SPP	42.2±16.5
SPDNA	37.4±15.6
Diluent only (control)	10.1±0.89

Note : ¹MST stands for mean survival times (±S.E.). Each group contained 7 mice. The MSTs from SPP- or SPDNA-immunized mice were longer than the control mice groups ($P < 0.05$).

종합하면 SPDNA의 효과는 협막을 인식하는 DNA sequence에 의한 것으로 DNA 백신효능 확인 평가방법으로 사료된다.

SPP 제형으로 확인된 SPDNA의 세포매개성 면역효과

SPP로 면역된 생쥐도 SPDNA로 면역된 생쥐와 동일하게 JY-Pol로 감염된 후 음성대조군 생쥐의 족부종과 비교하면 24시간과 48시간 후에 거의 동일한 수준의 족부종이 형성되어 세포매개성 면역력이 유도됨이 확인되었다(Table II). 실험군과 음성대조군과의 차이는 대략 20%~25% 정도의 차이로 유효성이 있었다($P < 0.05$). 이 결과는 SPDNA에 사용된 plasmid(LAMP-1)가

Table II – The SSP that shares the same epitope of the SPDNA induced the cell-mediated immunity as did the SPDNA

		SSP		SPDNA		DPBS	
		DPBS	JY-Pol	DPBS	JY-Pol	DPBS	JY-Pol
Footpad-Thickness*	24 h	68.9±5.2	82.6±5.6	67.9±4.9	84.2±3.7	63.8±5.3	63.1±4.2
	48 h	66.7±4.3	76.2±3.9	66.8±2.7	79.5±3.7	63.3±3.5	64.8±3.9

Note: *Arbitrary unit means the measuring unit listed in the dial gauger. Each group contained 5 mice. Error bars; SE. Differences between in experimental and control groups in the SSP and SPDNA settings were all statistically significant ($P < 0.05$).

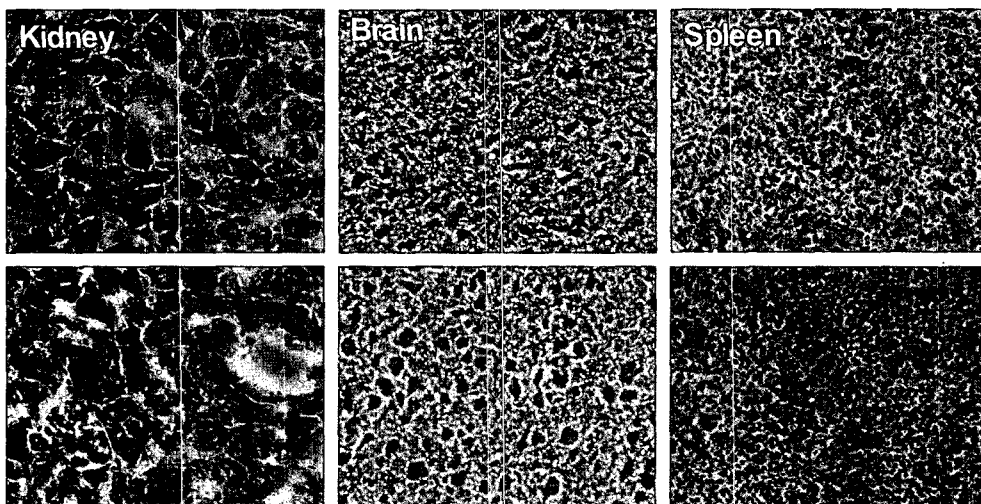


Fig. 2 – Examination of cryosectioned tissues of brain (A), kidneys (B), and spleen (C). Top panel: immunized mice; bottom panel : unimmunized normal (control) mice. Each tissue was stained with Giemsa and examined under a bright microscope.

영향이 미치지 않는 것으로 확인되었다.

SPDNA에 의한 Tumorigenicity 가능성 평가

모두 15마리 생쥐에 90일 동안 6회의 SPDNA 접종한 후 선정된 장기를 적출하여 장기표면 부위를 동일 연령의 정상생쥐의 장기와 비교하였을 때, 종양이 형성되지 않는 것으로 판정되었다(data not shown). 이 결과를 확인하기 위해, 장기를 냉동절편하여 뇌, 신장, 비장조직을 정상생쥐의 조직과 각각 비교하여 현미경 하에서 관찰한 결과 조직내부에서의 종양형성도 관찰되지 않았다(Fig. 2).

SPDNA에 의한 자가면역질환 유발성 평가

자가면역질환 가능성 평가실험결과에서, SPDNA 면역접종을 받은 생쥐와 받지 않은 대조군 생쥐의 C3a 생성정도에 약간의 차이가 있었으나 실험오차를 고려할 때 이 차이는 유의성이 없는 것으로 여겨진다(Fig. 3). 근염발생 검색의 일환으로 운동성을 관찰한 결과에서, 실험군 생쥐의 회전성과 대조군 생쥐군의 회전성은 각각 $5.6 \pm 1.9/\text{min}$ (평균±SE)과 $5.8 \pm 2.2/\text{min}$ (평균±SE)으로 운동성 저하는 관찰되지 않았으며, 면역접종을 받은 생쥐의 뒷다리 부종을 대조군 그룹과 비교 측정에서도 부종은 관찰되지 않았으며 동일부위의 발적생성(systemic lupus erythematosus; SLE)도 관찰되지 않았다(data not shown).

SPDNA의 면역내성 평가

24주령 생쥐와 4주령 생쥐의 항체생성 정도는 노령생쥐군의

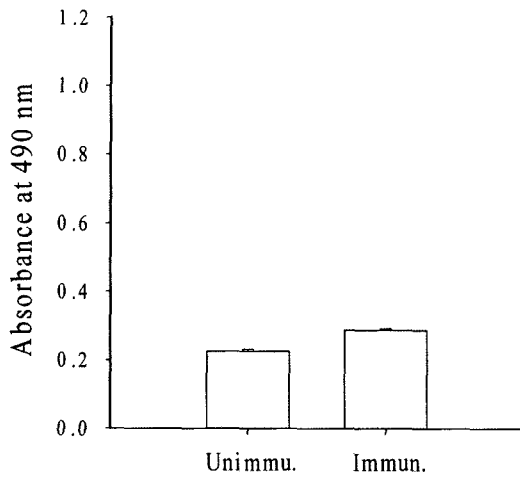


Fig. 3 – Supernatant of kidneys from the immunized mice resulted in increased amount of C3a. These results could be caused by continuous activation of the multiple injection by the vaccine, which, however, seems to be meaningless when the ELISA values are considered. The unimmu and immun stand for unimmunized and immunized, respectively. These experiments were done in triplicate. Error bar : S.E. Each group contained five mice.

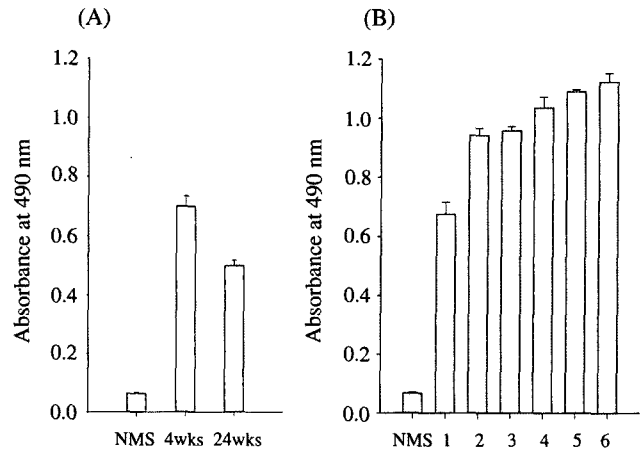


Fig. 4 – Frequent immunization caused no immunotolerance. Antibody was induced in mice of 24 weeks of age (A). As compared to their antibody titer, continuous immunization (B) of mice groups during an entire period of around 14 weeks still provoked antibody production, in which there was stepwise-increase of the antibody production. These experiments were done in triplicate. NMS stands for normal mouse serum. Error bar : S.E.

평균 항체생성 정도가 신생생쥐군에 비교하면 대략 35% 정도 감소되었다(Fig. 4A). 이 결과를 빈번한 면역접종을 받은 생쥐군의 항체생성 정도와 비교하면 3회 접종 이후 각 면역 횟수에서 항체생성은 지속적으로 유지되며 항체역가가 증가하였다(Fig. 4B). 양 실험결과를 고찰하면, SPDNA의 빈번한 접종으로 항체생성

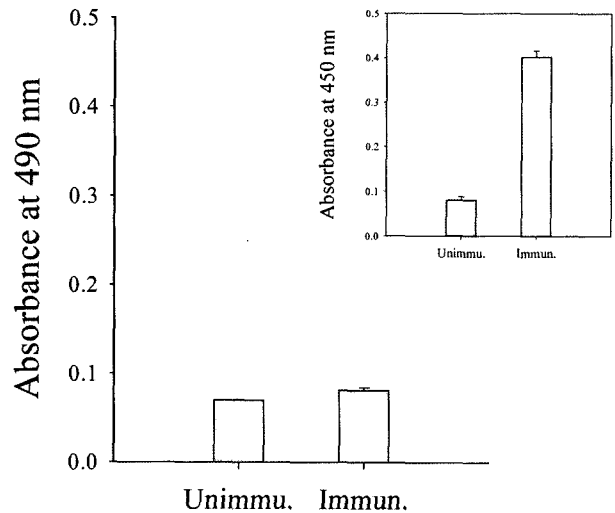


Fig. 5 – Anti-mouse muscle cell antibody had no interaction with antibody specific for *S. pneumoniae* capsule induced by SPDNA. ELISA analysis displays presence of the anti-mouse muscle cell (cell line NOR-10) antibody (inset). The unimmu and immun stand for unimmunized and immunized, respectively. These experiments were done in triplicate. Error bar : S.E.

은 오히려 증가가 되어 면역내성은 유발되지 않는 것으로 판정된다. 한편, 24주령의 생쥐의 항체생성 감소는 노령으로 인한 자연적 면역력 퇴화에서 기인된 것으로 추정되어 진다.

근육세포에 대한 SPDNA의 영향

이 실험도 자가면역질환의 평가방법으로 SPDNA가 생쥐의 근육세포를 변조시켜 근육세포에 대한 항체생성인한 면역복합체가 생성되는 부작용 가능성을 조사하기 위한 것으로 항원-항체의 반응이 있으면 부작용이 유발된 것으로 간주하였다. 먼저, 생쥐의 근육세포를 흰쥐에 접종한 후 수집된 혈청에서 anti-mouse muscle cell 항체생성을 확인하고(Fig. 5. inset), 이 anti-mouse muscle cell 항체와 anti-SPDNA 항체의 반응 결과 면역된 생쥐와 대조군 생쥐와 거의 비슷하게 검출되었으며 미세한 차이는 ELISA 수치를 고려할 때 실험오차로 예상된다(Fig. 5). 이 결과에서 SPDNA는 근육세포에는 영향을 주지 않음을 알 수 있다.

고 찰

숙주세포에 대상이 되는 감염균의 유전자를 삽입하여 양대 면역기전을 모두 유도하는 DNA 백신개발은 세계적 추세로, 이미 연구 선진국가에서는 DNA 백신에 대한 많은 연구가 진행 중에 있다. 한편, 외부유전자를 숙주내로 투입하기 때문에 안전성 평가에 대한 연구도 중요시되고 있다. 즉, 유효성도 중요하지만 다른 종류의 약물처럼 안전성이 중요하게 고려되고 있는 것이다. 주요 부작용은 자가면역질환 유발 가능성과 숙주에 항원이 항상 존재함으로 인하여 항체생성이 중단되는 면역내성이 유발될 수 있다. 이런 측면 이외에도 foreign gene이 숙주염색체에 통합(integration)되는 경우도 있기 때문에, 본 연구에서는 DNA 백신에 사용된 병원성 인자(virulence factor)를 인식하는 유전자에 대한 항체생성의 확인이 안전성 평가에 가장 중요하게 고려되었다. 그래서 삽입된 DNA 염기서열의 codon에 따라 생성된 peptide의 항체 유도성을 DNA 백신제형의 효과와 비교하였다. peptide vaccine 제형(SPP)은 DNA 백신(SPDNA)과 거의 동등한 수준의 체액성 면역력과 세포매개성 면역력이 확인되었고, 항체유도성도 유효하여 항체역가가 10,000 이상이었다. 이 평가방법은 DNA 백신의 효능을 확인 검증하는 평가방법으로 표적이 된 항원기의 확실성을 규명할 수 있는 방법으로 사료된다.

비록 위와 같이 확인이 되었다 하더라도 안전성을 간과할 수는 없을 것이다. 그러므로 본 연구에서는 DNA 백신의 대표적인 부작용인 종양형성과 자가면역질환 가능성을 검색하였다. 전자의 경우의 평가는, 동물에 장기간 수차례의 면역접종을 한 후에 뇌, 신장, 비장 등의 장기를 적출하여 장기표면과 조직 내의 종양형성을 검색하는 평가방법을 설정하였다. 실험결과에서 병리적 병변현상은 없었다. 신생쥐와 노령생쥐의 비교에서는, 절대적

인 비교는 될 수 없었으나, 출산력이 가장 활발한 시기인 6주령의 생쥐를 인간연령의 20대로 가정한다면 17~18 개월의 생쥐는 인간연령으로 70~80대의 고령에 가깝다고 할 수 있다. 이 연구에서 사용된 SPDNA는 2회 접종으로 항체가 유도 되는 백신제형인데,²²⁾ 오랜 기간 동안 면역된 생쥐의 운동성에도 이상이 없고, 부종과 발적현상은 관측되지 않았다. 또한, 6회 면역접종도 항체가 지속적인 생성되어 면역내성도 없는 것으로 추정되었다. 이 평가방법과 함께, 보체계의 중심 인자인 C3 활성화로 인한 C3a 생성의 증가여부 조사도 의미가 있다. 즉, 감염이 없는 상태에서 비정상적인 보체계 활성화로 C3a 생성증가는 자가면역질환의 일종인 관절염 유발의 원인으로 여겨지기 때문이다. 실험 결과는 면역된 생쥐에서 약간의 C3a 증가가 있지만, 이물질(백신제형)의 지속적 자극으로 인한 자동적 활성화로 인한 것일 수도 있다. 실제로 C3는 56°C에서 30분 동안의 조건에 파괴될 정도로 열에 약해서 이 정도의 차이는 의미가 없는 것으로 인식된다. 또 다른 추정으로는, 극한적인 조건인 6회의 접종과 생쥐의 자연노화도 고려해야 할 것이다. 피하내부의 근육세포에 대한 영향을 조사하기 위해 anti-muscle cell 항체를 이용하여 면역복합체의 부작용검사 평가는 기본적이면서도 중요한 DNA 백신의 안전성 검색은 혈청학적 방법을 적용한 점에 의미가 있다고 사료된다.

종합하면, 본 실험에서는 DNA 백신의 안전성 평가에 기본적인 필수적인 안전성 평가방법을 폐렴구균 DNA 백신을 이용하여 평가하였다. 사용된 평가방법들이 안전성에 평가에 대한 전 부라고 할 수는 없으나 평가방법에 최소한의 주요평가인자들로 적용될 것으로 기대된다.

감사의 말씀

본 연구는 2005년도 식품의약품안전청 독성연구원의 생물의약품평가기술개발사업(05092생의평380)의 연구지원으로 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) Klinman, D. M., Takeshita, F., Kamstrup, S., Takeshita, S., Ishii, K., Ichino, M. and Yamada, H. : DNA vaccines: capacity to induce auto-immunity and tolerance. *Dev. Biol. (Basel)* **104**, 45 (2000).
- 2) Donnelly, J. J., Ulmer, J. B. and Liu, M. A. : DNA vaccines. *Dev. Biol. Stand.* **95**, 43 (1998).
- 3) Donnelly, J. J., Ulmer, J. B., Shiver, J. W. and Liu, M. A. : DNA vaccines. *Ann. Rev. Immunol.* **15**, 617 (1997).
- 4) Wong, S. F. : Cetuximab: an epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for the treatment of colorectal cancer. *Clin. Ther.* **27**(6), 684 (2005).

- 5) Marsac, D., Puaux, A. L., Riviere, Y. and Michel, M. L. : *In vivo* induction of cellular and humoral immune responses by hybrid DNA vectors encoding simian/human immunodeficiency virus/hepatitis B surface antigen virus particles in BALB/c and HLA-A2-transgenic mice. *Immunobiology* **210**(5), 305 (2005).
- 6) Wolff, J. A. and Budker, V. : The mechanism of naked DNA uptake and expression. *Adv. Genet.* **54**, 13 (2005).
- 7) Ellenberg, S. S. and Chen, R. T. : The complicated task of monitoring vaccine safety. *Public Health Rep.* **112**, 10 (1997).
- 8) Cichutek, K. : DNA vaccines: development, standardization and regulation. *Intervirology* **43**, 331 (2000).
- 9) Quigg, R. J. : Complement and autoimmune glomerular diseases. *Curr. Dir. Autoimmun.* **7**, 165 (2004).
- 10) Karin, N. : Induction of protective therapy for autoimmune diseases by targeted DNA vaccines encoding pro-inflammatory cytokines and chemokines. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **6**(1), 27 (2004).
- 11) Rice, J., Buchan, S., Dewchand, H., Simpson, E. and Stevenson, F. K. : DNA fusion vaccines induce targeted epitope-specific CTLs against minor histocompatibility antigens from a normal or tolerized repertoire. *J. Immunol.* **173**(7), 4492 (2004).
- 12) von Herrath, M. G. and Bot, A. : Immune responsiveness, tolerance and dsRNA: implications for traditional paradigms. *Trends Immunol.* **24**(6), 89 (2003).
- 13) Bosarge, J. R., Watt, J. M., McDaniel, D. O., Swiatlo, E. and McDaniel, L. S. : Genetic immunization with the region encoding the alpha-helical domain of PspA elicits protective immunity against *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **69**(9), 5456 (2001).
- 14) Ogunniyi, A. D., Giammarinaro, P. and Paton, J. C. : The genes encoding virulence-associated proteins and the capsule of *Streptococcus pneumoniae* are upregulated and differentially expressed *in vivo*. *Microbiolog.* **148**, 2045 (2001).
- 15) Gregory, B., Lesinski, S., Smithson, L., Srivastava, N., Chen, D., Widera, G. and Westerink, J. : A DNA vaccine encoding a peptide mimic of *Streptococcus pneumoniae* serotype 4 capsular polysaccharide induces specific anti-carbohydrate antibodies in Balb/c mice. *Vaccine.* **19**, 1717 (2001).
- 16) Rose, M. A., Schubert, R., Strnad, N. and Zielen, S. : Priming of immunological memory by pneumococcal conjugate vaccine in children unresponsive to 23-valent polysaccharide pneumococcal vaccine. *Clin Diagn Lab. Immunol.* **12**, 1216 (2005).
- 17) Whitney, C. G. : Impact of conjugate pneumococcal vaccines. *Pediatr. Infect Dis. J.* **24**, 729 (2005).
- 18) Tidball, J. G. and Wehling-Henricks, M. : Damage and inflammation in muscular dystrophy: potential implications and relationships with autoimmune myositis. *Curr. Opin. Rheumatol.* **17**, 707 (2005).
- 19) Abraham, S., Begum, S. and Isenberg D. : Hepatic manifestations of autoimmune rheumatic diseases. *Ann. Rheum. Dis.* **63**, 123 (2004).
- 20) Han, Y. and Lee, J. : A pneumococcal conjugate vaccine formula induces protection in mice against disseminated disease due to *Streptococcus pneumoniae*. *Yakhak Hoeji* **48**, 345 (2004).
- 21) Lee, J. and Han, Y. : Antibody induced by the JY-Pol pneumococcal conjugate protects mice against systemic infection due to *Streptococcus pneumoniae*. *Yakhak Hoeji* **48**, 369 (2004).
- 22) Lee, J.-H. and Han, Y. : Evaluation of a *Streptococcus pneumoniae* DNA vaccine efficacy. *Yakhak Hoeji* **49**, 484 (2005).
- 23) Edmonson, H. A. and Steiner, P. E. : Primary carcinoma of the liver: a study of 100 cases among 48,900 necrosis. *Cancer.* **7**, 462 (1954).