



: DNA vaccine의 研究・開發 動向

(R & D trends of DNA vaccines)

I. 序言

미국의 대중과학잡지 ‘Scientific American’ 2010년 7월호 (Epub June 20)에 Morrow 및 Weiner* 두 박사에 의한 “DNA Drugs Come of Age” (DNA藥劑 成年을 맞다) 라는 제목으로 DNA vaccine 및 DNA치료에 관한 논문이 실렸다(1). 또한 Dr. Weiner 연구팀은, 같은 6월에 ‘Molecular Therapy’ journal에, 靈長類의 일종인 macaque원숭이들에게 再組合 Ad5 (adenovirus serotype 5) vector와 plasmid DNA(pDNA) vector로 각각 SIV (simian immunodeficiency virus; 원숭이 AIDS virus) 抗原(Ag)을 接種하여 惹起된 免疫應答(immune response)을 비교분석한 논문을 발표하였다(2). 결과적으로, DNA vaccine접종 group에서는 CD8+T세포의 더 큰 증식능력과 더불어 CD4+ 및 CD8+T세포 양쪽의 多機能性を 증가시켰으나, Ad5 vector vaccine접종 group은 첫 vaccine접종에 뒤이은 추가접종은 실패하였다는 것이다. 즉, 이들 最適化된(optimized) DNA vaccine은 기존의 Ad5 vaccine 보다 매우 상이한 immune phenotype(免疫表現型)을 發現함으로써 pDNA vaccine이 앞으로 vaccine의 연구 및 개발에 중요한 역할을 할 것으로 추정된다고 하였다. Scientific American지에 게재된 주요내용을 살펴보면, ‘plasmid라는 DNA ring을 함유하는 vaccine 및 療法(劑)은 질병을 처치하고 예방하기 위한 희망을 품어왔다. 그러나 그 plasmid들은 초기의 여러 test에서 그 作動이 허약함을 나타내었다. 그 후 plasmid에 대한 개선과 그것들을 生體에 전달하는 새로운 방법들이 그들의 효능을 극적으로 증진시켰다. 이제 DNA vaccine은 그것의 design, formulation 및 delivery process에 있어 중요한 향상의 변화를 겪고 있다. DNA vaccine 및 치료법은 동물 또는 인간에 대한 후기단계의 시험이 진행되고 있으며, plasmid는 그들의 潛在力에 도달하고 있다고 기술하고 있다. 사실 不實한 출발이었으나 다년간에 걸친 착실한 연구성과로, DNA vaccine의 ‘再誕生’의 새로운 세대를 맞고 있다고 한다. 즉, HIV(AIDS virus), influenza(‘flu’, 毒感) 및 기타 다루기 힘든 감염병들에 대한 신세대 vaccine 및 DNA의존 치료제들이 현재 후기단계의 임상시험을 거치고 있다는 것이다.

* Dr. David B. Weiner는 DNA vaccine분야의 세계적권위자로서 미국 Univ. Penn., 의대 병리학과 및 실험의학과 교수로, 동 대학의 遺傳子治療 및 vaccine program의 의장이며, 또한 미국 FDA 및 NIH, 그리고 여러 vaccine연구소 및 제조사의 자문의원이기도 함. 또한 Dr. Weiner는 Inovio Pharmaceuticals사의 과학자문위원회 의장이기도 함. Inovio사의 총괄책임자는 한국교포인 Dr. James Kim이며, 이 회사는 DNA vaccine연구 및 제조분야의 선두주자라고 볼 수 있으며, 그는 과거 Univ. Penn.에서 Dr. Weiner의 연구동료이기도 하였음.

사실 DNA vaccine의 개발은, 1990년대초 遺傳子治療實驗의 실패로부터 시작되었다고 볼 수 있으며, Tang 등(3)은, 인간의 발육hormone(HGH)을 발현할 plasmid DNA를 mouse에 접종하였던 바 발육촉진 대신 抗體(Ab)를 유도한 것이 plasmid가 야기한 면역응답의 첫 증거이었으며, 그들은 이 과정을 'genetic immunization' 이라고 불렀다. 그러나 초창기의 DNA vaccine이 안전성과 생산성의 측면에서는 훌륭하였지만, 기존 vaccine에 비해 그 효능이 낮아 많은 연구자들은 그 실용성에 대해 회의적이었다. 그럼에도 불구하고 지난 10여년간에 걸친 DNA기반의 여러 기술이 발전되고 또한 기술적 난제들이 해결됨으로써 이제 임상시험의 성공가능성이 높아지고 있다는 것이다.

Dr. Weiner는, DNA vaccine의 개선에 있어 특히, 1) DNA(특히 plasmid vector)의 세포내 取入率을 높여주는 electroporation(EP : 電氣穿孔法)과 같은 새로운 傳達技術(delivery technology), 2) DNA가 세포내로 注入되었을 때 Ag단백질 생산을 극대화시키는 최적화된 plasmid design의 개량기술 및, 3) 각종 adjuvant(免疫增強劑 : 賦形劑)를 통해 면역응답의 전반적 強度를 높이는 기술 등을 열거하고 있다(1).

또한 Dr. Henahan은 'DNA vaccine의 전망' 이라는 논설에서, DNA vaccine기술은 사람의 질병처치에 대한 희망적인 기대를 걸게하고 있다고 언급하였다(4). 1996년에 개최된, 미생물학 감염병학 및 면역학 분야의 국제전문가 25명의 colloquium에 근거한 'The Scientific Future of DNA for Immunization' (3)이라는 보고서의 공저자인 Dr. Robinson은 '동물model로 시험된 DNA vaccine에서 얻어진 최근의 결과는, 이 새로운 기술이 사람에 대한 vaccine접종법을 개혁할 것이다' 라고 말하고 있다. 그는 또한 '이미 우리들은 泄瀉를 일으키는 virus들, malaria원충 및 결핵균에 대응하는 면역응답을 발현시킬 수 있게 되었다' 고도 하였다(6).

또한 최근에는 allergy 등의 자가면역병(autoimmune diseases)의 예방 및 처치를 위한 DNA vaccine의 연구도 이루어지고 있다(7,8). 흔한 환경성 Ag에 대해 부적절한 면역응답으로 특성을 나타내는 allergy성 질환의 유형은, 그 이유가 불분명함에도 불구하고전세계적으로 증가되고 있는 추세이나, 현존의 처치법은 주로 대증요법적이라고 볼 수 있다. Chua 등(9,10)은, 생체내로의 단순한 plasmid DNA의 접종만으로도 당해 Ag에 대한 획득면역응답이 유발된 첫 관찰로, DNA vaccine접종에 의한 allergy성 면역응답의 잠재력은 이들 질환을 예방, 처치할 수 있으므로 광범위하게 탐구할 길을 열었다고 말하고 있다. 이와 같은 anti-allergy DNA vaccine의 접종은 allergy질환의 예방 및 치료에 대한 매력적인 방법이 될 것으로 기대되고 있으며, 많은 논문이 발표되고 있다.

DNA vaccine접종과 같은 새로운 활성적인 면역요법(immunotherapy)은, 기존의 vaccine 및 monoclonal Ab(mAb)를 발현하는 液性免疫應答(humoral immune response) 뿐만 아니라 癌化 또는 감염된 세포를 死滅시킬 수 있는 T세포를 산생시키는 T세포면역응답(細胞性免疫應答; cellular immune response)을 발현시키는 것이 목표이다. 이 T세포응답은 질병의 예방뿐만 아니라 치료도 행하는 새로운 vaccine을 성취시키는 것이 면역요법연구의 절대적인 목표인 것이다(11,12).

DNA vaccine기술은, 아직 동물 vaccine분야이기는 하지만 그 생산물이 최근에 시장에 出荷될 정도로 인상적인 行步를 이루고 있다. 이미 4종의 상이한 동물용 DNA vaccine(34)이 이용되고 있으며, flu, HPV 및 몇가지 癌에 대한 사람용 vaccine도 late-phase의 임상시험이 시행되고 있어 곧 승인될 것으로 보고 있다는 것이다(13~18).

외국의 경우, 정부 및 비정부 연구기관과 더불어 제약 및 생물공학회사들의 면역요법의 광범위한 과학적 우산밑에서 연구 및 개발산물에 대한 상당한 책무를 이행하고 있다고 한다. 사실, 과거 10여년에 걸친 다수의 특기할만한 기술적 및 상용적 성취가 면역요법분야의 진전에 劃을 그었으며, DNA vaccine의 성공적인 개발이 가능할 수 있었다고 볼 수 있다.

II. DNA vaccine의 研究背景 및 接種原理 (19~22)

사람이나 동물의 질병에 대한 더욱 강력하고 새로운 예방 및 치료에 대한 욕구가 어떻게 기존 vaccine기법의 한계를 넘어 신세대 vaccine의 작성과 개혁필요성의 기회를 창출하였는가를 살펴 볼 필요가 있다. 또한 DNA vaccine이 어떻게 면역요법연구의 경계를 확장하였는가도 올바르게 인식할 필요가 있다. 생물정보학(bioinformatics) 및 유전체공학(genomic engineering)의 이점과 더불어, 이 새로운 부류의 vaccine의 design 및 작성에 대한 능력은 개발기간, 비용 및 vaccine의 안전성, 발현되는 면역응답의 type 및 표적으로 하는 질병 등의 관점에서 의의로운 잠재적 이점을 얻을 수 있을 것이다.

A) 免疫系의 限界: 생체의 면역계(immune system)는 잠재적으로 많은 질병인자들을 처리할 수 있다. 그것은, virus 또는 bacteria의 표층상의 외래(foreign) Ag을 인식함으로써 이루어 진다. 감염병인자가 처음으로 생체내로 침입하면 면역계는 그 침입 병원체가 외래 이물임을 인식하게 되고, 면역계는 그들 병원체에 대응해서 Ab 응답을 야기시킬 것이다(液性.免疫). 만약 그 병원체들이 첫 면역응답에서 제거되지 못한다면, 세포내로 침입하여 그 세포들을 감염시킨다. 한번 virus나 bacteria가 세포에 침입하게 되면, Ab는 세포내로 들어가지 못하기 때문에 Ab 응답을

회피하게 된다. 이들 감염된 세포를 제거하기 위해서는 생체에서의 T세포응답을 야기시켜야 한다 (세포성면역). 암세포의 경우, 면역계가 암화세포를 유해한 것으로 인식하고 면역응답을 야기하기 위해서는 T세포들을 산생시켜야 한다.

불행하게도 면역계는 때로 병원체와 관련된 Ag 또는 감염된 세포나 암화세포를 인식하는 것이 불가능하거나, 너무 늦게 인식되어 면역응답을 야기하는 것이 불가능하게 될 수도 있다. 그 이유는, a) 일차 생체에 침입하여 신속히 발육 또는 복제되는 병원체에 대해 때로 너무 늦게 면역계의 Ab응답이 이루어지는 것이다. 그 병원체에 의한 병증상태는 면역계를 제압할 수 있다. 이것의 예는 숫된(naive) 숙주에서의 influenza (flu) virus의 감염이다. b) 어떤 virus나 bacteria는 면역계의 선택적 압력하에서 신속히 진화하거나 변이할 수 있다. 확고한 면역응답이 생체에 의해서 갖추어질 때까지는 그 감염병인자는 면역계가 특이적으로 찾아낼 수 없는 다른 형태로 변한다. HIV가 그 좋은 예이다. c) 암화세포 또는 이미 virus에 감염된 세포처럼, 생체내 세포에 의해서 만약 잠재적으로 Ag단백질이 산생된다면, 생체는 그들을 와래가 아닌 'self'(自己)성분임을 感知할 것이며, 따라서 그들을 공격하지 않을 것이다.

B) 既存 vaccine의 限界 : 특정 침입병원체에 대한 이전의 감수성과 면역학적 기억을 야기하는 것은, 생체가 그 침입자를 재차 만나게 되면 그것에 대해 더욱 신속하고 강력한 공격을 행하는데 도움을 줄 것이라는 점을 알게되었 때 예방적(preventive) vaccine접종의 idea가 생겨나게 되었다. 죽이거나 약독화된(attenuated) 병원체들 또는 세균의 유독소(toxoid) 등이 vaccine제조에 사용되게 되었다 (제1세대 vaccine). 뒤이어 Ag로 구성된 subunit 또는 recombinant protein 등이 vaccine으로 사용되었다 (제2세대 vaccine). 그와같은 vaccine이 생체내에 도입되면, 그병원체에 연관된 Ag를 제시한다. 면역계는 이 '공격자' (attacker)에 반응하게 되면, 이 Ag단백질에 대한 장기적인 기억을 발생한다. 만약 특정 병원체가 생체에 침입하게 되면, 면역계는 그 병원체와 연관된 특정 단백질(Ag)을 인식한 다음 더욱 신속하고 강력한 Ab응답을 야기한다. 이 접근방법이 수 많은 기존 vaccine의 성공적인 개발을 인도하였던 것이다.

그러나 불행하게도 기존 vaccine기술은 매우 만성적인 감염병이나 암에 대해 시도되었을 때 커다란 약점을 지니고 있다. 그 몇가지를 들면, a) 기존 vaccine은 특정 병원체 strain만을 공격하도록 design되어 있으므로 예컨대, 오랜 시간에 걸쳐 진화 또는 변이하는 flu virus strain, 혹은 한번 생체내에 침입하면 변이(진화)될 수 있는 HIV와 같은 것에 대해서 약간만 방어하거나, 또는 전연 방어하지 못한다. b) 첫 반응을 하는 Ab를 피할 수 있거나, 변이된 세포(병원체감염세포)를 죽일 수 있는 T세포응답을 제대로 유발하지 못한다. c) 약독화된 vaccine에 의해서 감염의 위험성이 발

생할 수 있다. 약독화된 변형 HIV의 사용가능성이 그 예이다. d) Vaccine을 design하기에 복잡하고 제조비용이 과다할 수 있다. e) 때로 제조하기가 곤란하거나 시간소모적일 수 있다. 유행에서 vaccine virus를 증식시켜야 하기 때문에 汎世界的流行(pandemic)의 flu의 빠른 확산을 막기 위한 vaccine의 신속한 증산을 뒷받침하지 못하는 어려움이 그 예이다.

C) DNA vaccine의 利點 : 과학자들을 上記와 같은 기존 vaccine의 약점을 극복하기 위해 제3세대의 면역요법을 개발하는데 주력하였으며, DNA에 기반한 vaccine의 작성연구를 정력적으로 추구하였다. DNA vaccine의 접종은 한마디로, 질병야기병원체의 특이적 성분을 encoding(暗號指畵)하는 DNA 배열(sequence)을 plasmid 등의 vector를 통해 생체에 주입한다는 점에서 기존 vaccine의 접종과 상이한 것이다. 이와 같이 DNA vaccine은 기존 vaccine에 비하여 많은 이점을 제공할 잠재력을 지니고 있다. 그 이점은 다음과 같다. a) 죽이거나 또는 약독화시킨 병원체를 vaccine으로 사용하는 대신, 병원체에 연관된 특정 Ag단백질을 산생케하는 DNA배열을 밝혀내는 것이다. 이 DNA배열은, 그 자체가 해를 입는 일 없이 생체세포속에 전달된다. 그리하여 세포내 machinery는 DNA배열에 의해서 encoding된 단백질을 산생하게 된다. 이 목적은 표적으로 하는 병원체를 공격하기 위한 면역계를 유발시켜 충분한 량의 Ag단백질을 산생토록 하는 것이다. b) DNA vaccine은 생체가 감염되기 전에 생체내에 도입되어 Ab응답을 야기시킴으로써 예방 vaccine으로 작용할 수 있다. c) DNA vaccine은 표적이 되는 암화세포 또는 병원체(virus 및 bacteria 등)에 감염된 세포들을 사멸시킬 수 있는 T세포응답의 산생에 효과적이다. 따라서 DNA vaccine은 이미 존재하는 병증을 처치하는데 치료적으로 사용할 수 있다 (therapeutic vaccine). 이와 같은 가능성은 AIDS나 C형 肝炎과 같은 만성감염병을 치료하는데 잠재력을 제공할 것이며, 따라서 치료용 암vaccine의 개발도 가능하게 할 것이다. d) DNA vaccine기술은 또한 변이(진화)되는 병원체의 strain(株)들의 reserved gene 및 Ag에 근거한 vaccine이나 복잡한 多種抗原(multi-Ag) vaccine을 design할 수 있는 기회도 제공한다. 즉, seasonal(계절성) flu virus strain과 동시에 鳥類 flu virus 또는 Mexican H1N1 flu virus strain과 같은 신생(novel) flu virus strain들 모두를 포함하는 multi-Ag vaccine을 design할 수 있다고 한다. e) DNA vaccine은 이미 잘 입증된 발효기술을 활용하여 용이하게 비용효과적(cost-effective)으로 제조할 수 있다. f) DNA vaccine은 대부분의 경우 냉장저장이나 냉장상태로의 배포를 필요로 하지 않는다. DNA vaccine의 큰 한계점의 한가지는, 어떤 미생물은 polysaccharide(多糖體)로 알려진 polymer성당으로 구성된 外殼(outer shell)을 지니고 있으므로, 그 일례로 DNA vaccine은 세균성폐염에 대한 폐염구균vaccine과 같은 다당체-의존 vaccine을 대체할 수 없다는 점이다.

D) DNA vaccine接種의 原理 : (23,24). DNA vaccine은 Ag을 직접 접종하는 것이 아니라 Ag를 encoding하는 DNA(주로 pDNA)를 접종하는 것이다. 1개 또는 그 이상의 단백Ag을 encoding하거나 또는 단순히 완전Ag의 epitope(抗原決定基)를 encoding하는 DNA배열을 環狀의 plasmid속에 cloning한다. 그 DNA가 생체세포내에서 효과적으로 전사되게끔 적절한 promoter를 DNA배열속에 삽입한다. 취입된 pDNA가 발현하는 Ag단백은 숙주의 protease에 의해서 작은 Ag peptide로 쪼개진다.

그 peptide들은 膜關聯transporter에 의해서 ER(endoplasmic rericulum)의 lumen(內腔)으로 들어간다. ER에서 peptide들은 MHC class I 분자들과 결합한다. 이들 peptide는 MHC class I의 context에서 세포표면에 제시된다. 그 후 CD8+CTL(cytotoxic T-lymphocyte)을 자극하여 그들은 cell-mediated immunity(세포성면역)을 촉발하며, CTL은 감염된 세포의 응해(사멸)와 cytokine산생과 같은 非細胞融解性 機轉의 양쪽을 통해서 virus를 저지한다(25). 그 단백질은 또한 CD4+helper T-cell(Th) 응답을 야기하는 APC(antigen presenting cells)에 의해서 MHC class II 경로에 제시된다. 이들 CD4+Th cell은, APC에 의해서 세포내로 흡수 또는 貪食化된 외래단백으로부터 형성된 peptide를 인식할 수 있으며, 뒤이어 peptide조각으로 분해되어 MHC class II분자상에 결합한다. 그 복합체에 결합하는 CD4+cell의 type에 의해서 B세포는 자극되어 Ab산생을 유발한다. 이것은 전통적 기존vaccine이 작동하는 것과 같은 방식이다.

a) 세포매개응답 : pDNA는 樹狀細胞(dendritic cells)와 같은 APC에 의해서 취입되는 것으로, 갖가지 성분을 encoding하여 gene을 전사하고 번역한 다음, 그 단백질산물을 peptide로 분해한다. 이들은, 세포매개면역의 생성을 위해 강력한 자극제로 작용하는 곳인 조직적합성분자 I(Class I histocompatibility molecules)에 자리잡고 있는 세포표면에 露出된다.

b) Ab매개응답 : 만약 pDNA가 근육세포와 같은 다른 세포에 취입되면, 합성된 단백질은 방출되어 B세포를 포함한 APC에 의해서 탐식될 수 있다. 이 경우 그 단백질은 Class II 경로에서 분해되며, Th세포(CD4)에 제시된다. Th세포는 B세포로 하여금 Ab를 산생하도록 조력하는 cytokine(lymphokine)을 분비한다. DNA vaccine의 작성 및 그 접종과정을 다시 간략하게 기술하면 다음과 같다. i) 병원체로부터 Ag protein을 encoding하는 gene을 분리한다. ii) 선정된 plasmid DNA(pDNA)속에 당해 gene을 cloning한다. iii) Cloning된 pDNA를 특정 bacteria내에 삽입하여 그 bacteria를 대량 증식시킨 후, 그 bacteria로부터 pDNA를 분리, 순화(정제)한다. iv) 이 순화된 vaccine pDNA를 목적하는 사람 또는 다른 동물에게 EP기술 등으로 접종(전달)하여 면역응답이 발현되도록 한다. 