

## Construction of Novel Plasmid Vector for DNA Immunization

박영섭<sup>1</sup>, 박재영<sup>1</sup>, 정동건<sup>2</sup>, 최차용<sup>1,2</sup>, 주현<sup>3</sup>

서울대학교 협동과정 생물화학공학전공<sup>1</sup>, 서울대학교 응용화학부<sup>2</sup>, 아주대학교 생명과학과<sup>3</sup>

전화 : (02)880-7079 FAX: (02)888-1604

### Abstract

DNA vaccines use eukaryote expression vectors to produce immunizing proteins in the vaccinated host and it represents a novel approach to vaccine and immuno-therapeutic development. We constructed a 2.9 kb compact plasmid vector (pVAC) which contains CMV promoter, polycloning site, BGH poly A terminator, ampicillin resistance gene and PBR322 origin. Enriched unmethylated CpG motifs have introduced into pVAC-ISS1 and pVAC-ISS2 which are derived from pVAC for enhancing Th1 responses. These plasmid DNAs rapidly induced interleukin 6 secretion in vivo. It is expected that these vectors will contribute to the DNA inoculation against infectious disease and various cancers without adjuvant.

### 1. 서론

DNA vaccination 은 항원 유전자를 코드화한 박테리아 유래의 플라스미드만으로 감염성 질병, 알레르기 및 암 등에 대한 강력하고 지속적인 세포성 및 체액성 면역 반응을 유도 할 수 있는 새로운 면역방법을 말한다.<sup>1</sup> DNA vaccine 은 기존의 whole cell killed vaccine, recombinant protein vaccine, peptide vaccine 등에 비해 많은 장점을 지니고 있다. 대량으로 분리정제가 가능하고 상온에서도 매우 안정적이며 다양한 항원에 대해 쉽게 신 시스템을 구축할 수 있고, 빠르고 강력한 면역 반응을 유발할 수 있다.<sup>1,2</sup>

몸이 외부 박테리아에 감염되었을 때 IL-6를 induce하는 매개체는 lipopolysaccharide (LPS) 로 알려져 있었다. 그러나 상당수의 박테리아나 바이러스는 이러한 LPS가 존재하지 않는다. 그럼에도 불구하고 외부 박테리아나 바이러스에 감염되었을 때 cytokine들이 분비되고, 면역반응을 시작하게 된다. 이러한 면역 반응의 개시에 관계하는 중요한 인자 중에 하나가 박테리아나 바이러스가 지니는 microbial DNA내에 존재하는 unmethylated CpG motif 임이 밝혀졌다.<sup>4</sup>

백신을 투여할 때 강력하고 빠른 면역반응의 유발을 위해 보조제(adjuvant)와 같이

사용하는 경우가 있다. 그러나 인체투여가 가능한 보조제는 매우 제한되어 있으며 그 효과도 그리 크지 않은 것으로 알려져 있다. 또한 단백질이나 펩타이드 백신의 경우 백신 자체의 생산에 비용이 많이 들고, 보조제 또한 생산단가가 매우 높기 때문에 사용이 더욱 제한되고 있는 실정이다. DNA vaccine은 박테리아에서 매우 높은 copy number로 복제되며 대량 분리정제가 용이하고 안정적이라는 장점과 아울러, 플라스미드 vector 내에 ISS 염기서열을 도입함으로써 보조제의 효과 또한 기대할 수 있다. 현재까지 CpG oligo-DNA를 기존의 단백질이나 펩타이드 백신과 같이 투여하여 면역반응의 조기 활성화에 효과를 나타내는 연구 결과가 보고되었고, DNA vaccine vector와도 같이 투여하여 효과를 증대시키는 연구가 진행되고 있다.<sup>5</sup>

지금까지 DNA vaccine에 대한 연구는 항원 유전자의 선택이나 기존 백신과의 공동 투여, 그리고 delivery에 대한 연구에 초점이 맞추어져 왔다.<sup>1,3</sup> 본 연구에서는 기존의 연구결과와 위의 실험결과를 토대로 보다 효율적이고 강력한 DNA vaccine vector 자체를 개량하는 실험을 수행하였다. 우선 기존의 동물세포발현용 벡터에서 DNA vaccine vector에 꼭 필요한 요소들만 남기고 나머지 부분을 없애버림으로써 dosage효과를 높였고, 초기 면역반응을 효과적으로 자극하는 ISS sequence를 증폭하여 cloning 함으로써 보조제 없는 백신으로서의 가능성을 타진하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 pVAC 의 제조

pVAC 은 CMV promoter, poly cloning site, BGH poly A terminator, ampicillin resistance, PBR322 origin 그리고 Igk heavy chain secretion signal로 구성되어 있으며 cloning 결과 2.9 kb의 size를 지닌 벡터를 만들 수 있었다.

먼저 promoter - secretion signal - poly cloning site - terminator 구간은 pSecTag B와 동일한 부분으로 제조하였다. PCR로 1201 base pair 가량을 증폭하였다. sense primer 와 antisense primer는 cloning 작업을 위해 sense쪽에는 Ssp I, BamH I restriction site를 만들어 넣었고, antisense 쪽에는 Bgl II, Tfi I을 넣었다. Ampicilline resistance 와 PBR322 origin 부분은 PUC19를 restriction enzyme digestion 시켜 사용하였다. DNA 양끝 restriction site는 Tfi I과 Ssp I이었으며 Tfi I은 sticky end, Ssp I 은 blunt end이다. 이 두가지 DNA 조각을 ligation 시켜 pVAC 벡터를 만들 수 있었다. (Fig 1.)

### 2.2 pVAC ISS1, pVAC ISS2 의 제조

40여개의 CpG motif를 넣어 만든100 base pair 정도 되는 DNA fragment를 제조하여 pVAC에 ligation 시켰다. Enriched CpG motif DNA 는 4개의 single strand

oligo nucleotide로 구성되어 있으며 각각의 DNA를 합성하여 hybridization 시켜서 제조하였다. CpG motif DNA는 양 말단이 Bgl II, BamHI 으로 구성되어 있으며 pVAC을 Bgl II single digestion 시킨 뒤 여기에 ligation 시켰다. Ligation의 확인은 Bgl II, Xho I double digestion 으로 하였다. 그 결과 single enriched CpG motif 가 들어간 pVAC ISS1 과 double enriched CpG motif 가 들어간 pVAC ISS2를 얻을 수 있었다. (Fig.2)

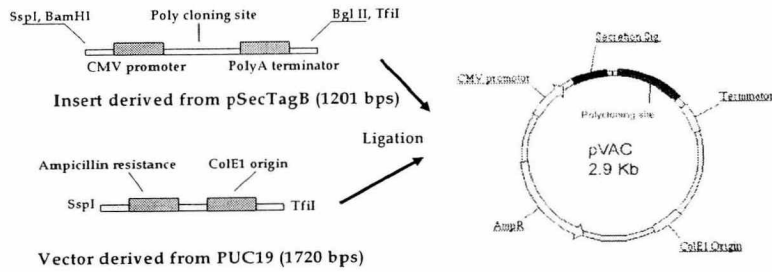


Fig 1. Construction of pVAC

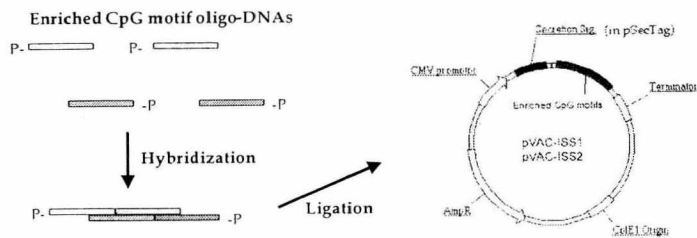


Fig.2 Construction of pVAC-ISS1, pVAC-ISS2

### 2.3 Interleukin-6 secretion assay *in vivo*

10주령된 balb/c mice에 pVAC-ISS2, pSecTagB를 정맥주사하여 2시간 뒤 혈액을 채취하였다. 투여한 plasmid DNA의 양은 50µg 이었으며 PBS에 녹여 100µl를 투여하였고, 대조군으로 PBS를 투여하였다. 혈액 샘플은 혈장만을 분리하여 PBS로 희석시켰으며 ELISA 로 혈액내의 Interleukin-6 양을 측정하였다. ELISA에 사용된 모든 시약은 Pharmigen 의 OptEIA Mouse IL-6 set을 이용하였다.

### 3. 결과 및 고찰

기존의 eukaryote expression vector는 백신으로 사용하기 위한 것이 아니기 때문에 동물세포내의 발현을 위한 gene들이 많아 5kb 이상의 큰 벡터이다. vaccine을 접종할 때 접종하고자 하는 종이 고등 생물일수록 충분한 면역반응을 일으키기 위해서는 접종량이 많아야한다. DNA vaccine 또한 예외는 아니라서 쥐의 경우 50 $\mu$ g ~ 100 $\mu$ g 가량, 원숭이의 경우 1mg 이상이 요구된다.<sup>3</sup> 따라서 dosage효과를 고려하여 DNA vaccine만을 위한 작은 벡터를 제조하였다. pVAC 은 CMV promoter, poly cloning site, BGH poly A terminator, ampicillin resistance, PBR322 origin 그리고 Igk heavy chain secretion signal로 구성되어 있으며 cloning 결과 2.9 kb의 size를 지닌 벡터를 만들 수 있었다.

또한, 바이러스성 질환은 바이러스의 감염속도가 매우 빠르기 때문에 예방용 혹은 치료용 백신을 만들 때 초기 면역반응을 강하게 유발시키는 것이 필요하다. 따라서 서론에서 소개한 Immunostimulatory Sequence를 벡터에 도입하였다. CpG motif는 메틸화 되지 않은 6개의 DNA sequence로 이루어져 있는데,

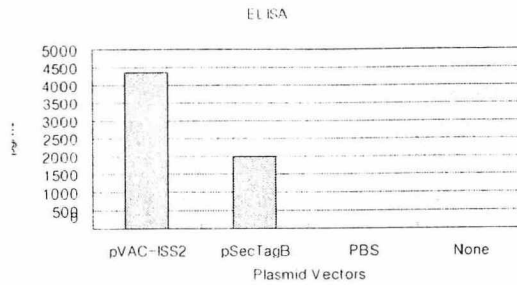
5'..purine-purine-C-G-pyrimidine-pyrimidine ..3'

위와 같은 구조를 지니고 있다. 본 연구에서는 이러한 CpG motif를 증폭하여 보다 강력한 초기 면역반응을 유발하고자 하였다. 40여개의 CpG motif를 넣어 만든 100 base pair 정도 되는 DNA fragment를 제조하여 pVAC에 ligation 시켰다.

이렇게 제조된 pVAC-ISS2를 쥐 임상 실험해 본 결과 대조군에 비해 월등히 높은 Interleukin-6가 발현됨을 알 수 있었다. Interleukin-6는 inflammatory response에 관여하는 cytokine으로, 초기 면역반응에 중요한 역할을 한다. 즉 pVAC-ISS2는 vector 자체에 감염성 질병에 대한 항원을 coding하여 DNA vaccine으로 쓸 수 있음과 동시에 강력한 초기면역반응을 유발하는 보조제로서도 우수한 효과를 보임을 알 수가 있었다. (Fig.3)

본 결과를 토대로 다양한 감염성 질병에 대한 DNA vaccine의 적용이 한층 더 효과적으로 사용될 수 있는 가능성이 있음을 알 수 있으며 현재 IFN- $\gamma$ 와 IL-12등의 cytokine에 대해서도 임상실험을 거쳐서 확실한 검증을 진행 중에 있다.

이렇게 개발된 pVAC-ISS2는 치료가 어려운 감염성 질병이나 현재 백신이 개발되어 있지 않은 불치병에 대해 보다 강력한 백신개발의 가능성을 보여주었다고 할 수 있다.



**Fig.3 Evaluate the ability of pVAC-ISS2 to induce IL-6 secretion *in vivo***

#### 참고문헌

1. Helen Tighe, Maripat Corr, Mark Romen, and Eyal Raz. "Gene Vaccination : plasmid DNA is more than just a blueprint" (1998) *Immunology Today* 19, No.2, pp 89-95
2. Harriet L. Robinson, and Celia A. T. Torres "DNA vaccines" (1997) *Seminars in Immunology*, 9, pp 271-283
3. Michael Chattergoon, Jean Boyer, and David B. Weiner (1997) *The FEBS Journal*, 11, pp 753-762
4. Ae-kyung Yi, Dennis M. Klinman, Thomas L. Martin, Sara Matson, and Arthur M. Krieg. "Rapid Immune Activation by CpG Motifs in Bacterial DNA" (1996) *Journal of Immunology*, 157, pp 5394-5402
5. Arthur M. Krieg, Ae-Kyung Yi, Sara Matson, Thomas J. Waldschmidt, Gail A. Bishop, Rebecca Teasdale, Gary A. Koretzky, and Dennis M. Klinman. "CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation" (1996) *Nature*, 374, pp 546-549
6. Dennis M. Klinman, Ae-Kyung Yi, Serge L. Beaucage, Jacqueline Conover, and Arthur M. Krieg. "CpG motifs present in bacterial DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12 and interferon  $\gamma$ " (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, pp 2879-2883
7. Heather L. Davis. "DNA-based vaccination against hepatitis B virus" (1996) *Advanced Drug Delivery Reviews*, 21, 33-47