

BCG를 이용한 재조합백신 개발

김상재/대한결핵협회 결핵연구원 세균부장

1. 머릿말

영생할 수 있는 생물은 없다. 그래서 생식을 통해 종을 보전해 갈 따름이다. 개체로서의 생물은 균형이 잘 이루어진 먹이사슬의 고리에 얽혀 일생을 다하지 만 그러한 균형이 영구불변한 것은 아니다. 긴 시간축을 따라 가보면 적자생존의 냉혹한 자연법칙에 의해 사라져간 종이 있는가 하면 새로이 생겨난 종도 있다. 생존을 위해 먹고 먹히는 관계에서 공생의 조화를 이룩하기도 하지만 한편으로는 기생관계에 빠져 처절한 공방전을 전개하기도 한다.

사람도 예외일 수 없기 때문에 수많은 기생생물의 침범을 받고 살아가고 있다. 그중에는 사람의 점막피부나 장관에서 해를 끼치지 않고 살아가는 것들도 있지만 조직을 침범해 치명적인 병을 일으키는 것들도 있다. 인명을 위협하는 기생(병원)체로는 바이러스와 세균류가 대부분을 차지하고 간혹 곰팡이도 그 대열에 낄다. 그러나 인체는 아무나 침범할 수 있는 허술한 조직체가 아니다. 거기에는 철통같은 방어수단이 있다. 다만 일부 병

원균들은 그러한 방어수단을 극복할 수 있는 수단을 갖추었거나, 아니면 숙주가 일시적 또는 상당한 기간 국소 또는 전신적 방어수단에 이상이 생겨 기생을 허용함으로써 질병이 발생하게 되는 것이다.

우리가 말하는 예방접종은 바로 이 조직을 침범해 들어오는 병원균을 특이하게 막아내는 방어수단을 미리 구축하는 과정인 것이다. 다시말해 감염균에 대한 그와 같은 특이면역반응을 발병력 잃은 생균이나 사균 또는 균으로부터 유래한 항원 등으로 접종하여 유도함으로써 차후 그러한 균에 자연감염 되었을 때 발병을 막아내는 것이다. 이를 처음 시도한 사람은 「에드워드 제너」로서 1796년에 우두를 천연두 예방백신으로 사용했던 것이 효시가 되었다. 그후 1977년에 세계보건기구가 천연두를 완전히 박멸했다고 선언하기까지 181년이 걸린 셈이다.

현재 결핵, 디프테리아, 파상풍, 간염, 공수병, 뇌염, 볼거리, 소아마비, 풍진, 홍역 등이 예방접종을 통해 관리되고 있는 질환이다. 여기에 사용되고 있는 백신은 성상이 다 다르고, 예방효과도 다양

하며, 접종시기 및 횟수 등도 다르다. 접종시 시행상의 잇점 때문에 일부 「백신」은 혼합해서 동시에 접종하는 경우도 있다. 그리고 유도하고자 하는 유효면역이 항체개재면역인 것도 있고 세포개재면역인 것도 있으며, 아니면 둘 다 유도되어야 효과적인 예방이 가능한 것도 있다.

모든 질병의 관리는 예방이 최선이다. 따라서 예방접종은 비용대 편익비율이 높다. 그러나 「백신」의 예방효과에 따라, 예방하고자 하는 질환의 발병률과 같은 역학적 상황에 따라서 편익비율이 크게 영향을 받기 때문에 (1) 예방효과가 높은 「백신」의 개발, (2) 적시 접종률 제고 및 (3) 「백신」 생산 및 접종비용 절감 등을 위한 꾸준한 노력이 있어야 한다.

2. 재조합 「백신」 개발의 배경

현행 예방접종에 따른 문제점들을 개선할 수 있는 방법들이 최근 유전자 재조합기법과 분자생물학의 발달로 (1) 유효한 「백신」제조에 결정적 중요성을 지닌 보호면역과 깊이 관련된 항원결정부의 동정과 정제 및 합성기법이 발전했고, (2) 유전자 조작기법의 보편화는 유효한 항원 유전자의 동정 및 양산 그리고 타생물에서 매우 정제된 항원을 양산하는 일도 가능해 졌으며, (3) 각종 「백신」의 주요 유전자를 동일 매체에 옮긴 재조합 유전자를 이용한 「백신」으로 여러질환에 대한 예방을 동시에 할 수 있게끔 연구 개발되고 있다.

이러한 재조합 「백신」 개발의 궁극 목적은 최소한의 면역접종으로 여러질환에 대해 강력하고 지속적 면역력을 유도하는 것이다. 그렇게 함으로써 (1) 예방접

종에 소요되는 비용을 크게 절감할 수 있고, (2) 적시 접종률을 제고할 수 있을 뿐 아니라 (3) 여러질환에 대한 예방효과를 극대화 할 수 있다.

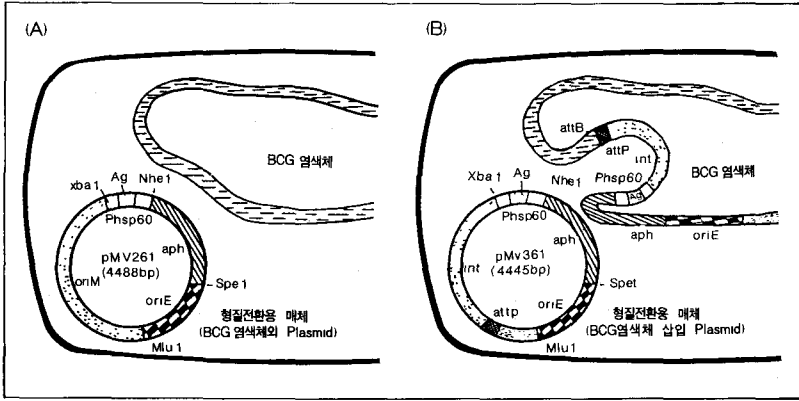
3. BCG를 이용한 재조합 「백신」 개발

재조합 「백신」의 잇점이 많은 만큼 개발경쟁도 선진국에서는 치열하다. 재조합 「백신」 개발이 가능하기 위해서는 먼저 특정 질환의 예방접종에 이용되고 있는 생균 「백신」 가운데서 외래유전자의 복제와 형질표현이 잘 되는 「백신」이 선택 또는 개발되어야 한다. 그러한 「백신」은 접종했을 때 무독해야 하고, 인체내에서 쉬이 죽어 없어지지 않고 오래 생존하면서 자체항원 뿐 아니라 외래유전자항원을 계속 생산해야 하며, 면역보강능력에 있어서 숙주가 강력한 면역력을 획득할 수 있게 해주어야 한다.

그러한 매체로서 가장 적합한 「백신」이 바로 BCG임이 밝혀졌다.

BCG는 (1) 지금까지 25억이상의 인구에 접종했으나 심각한 부작용이 매우 드문 안전한 「백신」이고 (치명적 부작용 발생률 0.19/10⁶), (2) 출생후 일찍 접종할 수 있는 「백신」이라 감염원에 노출되기 전에 예방접종이 가능하며, (3) 모성항체의 영향을 받지 않으며, (4) 1회 접종으로 감각상태(感作狀態)가 5~50년간 지속되고, (5) 강력한 면역보강제라 타항원에 대해서도 강력한 면역력을 유도할 수 있음으로써 추가접종이 필요치 않거나 횟수를 크게 줄일 수 있다. 그리고 (6) 경구 「백신」으로도 쓸 수 있고, (7) 열에 비교적 안정하며, (8) 생산비가 저렴하

그림 1. BCG 형질전환용「플라스미드」
BCG염색체에 삽입되지 않는 「플라스미드」(A)와 삽입되는 「플라스미드」(B)



XbaI, NheI, SpeI, MluI=제한효소 작용부위.
Phsp60=긴장유도단백 hsp60의 조절 유전자로 타항원(Ag) 유전자 삽입이 가능한 제한효소 작용부위 10개가 있음.
aph=전이인자 Tn903에서 유래한 유전자로 kanamycin내성.
oriE=대장균내 복제의 개시점, oriM=항산균내 복제의 개시점.
attP=숙주염색체 부착부위, int=삽입효소유전자.

다.

4. 재조합「백신」 유전자 운반매체 개발

다음은 타균의 유전자를 BCG내로 옮겨 넣을 운반매체가 필요한데 이 매체는 (1) BCG내에서 복제되어야 하고, (2) 삽입한 타유전자의 형질이 표현될 수 있어야 한다. 결국 그러한 매체개발이 재조합「백신」의 핵심이 된다.

제1세대 매체로 대장균↔항산균「샤틀백터」가 개발되어 BCG내로 형질전환시킬 수 있고 그속에서 잘 복제된다는 사실을 확인했다. 그후 실용적인 제2세대 매체가 개발되었는데 그 개략을 설명하면

다음과 같다.

즉 최근 Stover 등이 pAL5,000「플라스미드」로부터 BCG내에서 복제 가능하게 해주는 1.8kb 크기의 oriM설편을 찾아내어 중합반응에 의한 변이방법으로 바람직하지 못한 제한효소 작용부위를 제거해 개조함으로써 제2세대 매체개발의 기초를 확립했다. 여기에는 세가지 중합반응에 의해 개조된 세가지 DNA가 추가로 필요한데, (1) 대장균내에서 복제될 수 있게 하는 pUC19로부터 유래한 oriE, (2) 전이인자 Tn903으로부터 유래하고 선택적 분리배양에 필요한 kanamycin 내성을 나타내는 aph유전자 및 (3) 유전자 표현을 가능하게 하면서 타유전자를

삽입할 수 있는 부위가 여러개 있고 전사 정지신호(轉寫停止信號)를 가진 항산균 「프로모터」 등이다. (그림1 A 참조) 그렇게 해서 합성한 매체의 BCG 형질전환 빈도는 DNA 1 μ g당 10⁵⁻⁶으로 매우 높았다.

다음은 BCG내에서 매체를 안전하게 유지할 수 있도록 잠재성 항산균「파아지」의 특정부위압입계(site-specific integration system)를 찾아내어 이용했다. pMV261의 oriM 부위를 「파아지」 L5로부터 유래한 부착부위DNA(attP)와 삽입효소 유전자(int)로 교체한 삽입 가능 매체 pMV361을 합성하는데 성공했다. 이렇게 만든 「플라스미드」로 BCG염색체 attB부위에 삽입하여 형질전환 시켰더니 빈도가 앞서 말한 염색체의 「플라스미드」만큼 높았다.

「파아지」xis유전자가 없어서 항생제배지에 선택적 배양을 안해도 안전하게 유지되었다. (그림1 B 참조)

5. 재조합 BCG의 타유전자 표현

대식구(大食球)내에 있는 항산균의 유전자형질표현에 관해서는 잘 알려져 있지 않다. 그러나 항산균을 비롯한 여러 병원균에서 매우 잘 보존되어 있는 형질이고 대식구내에서도 많은 양이 생산되는 긴장유도단백(緊張誘導蛋白-stress-protenins) hsp60 및 hsp70이 있으며 이들은 언제나 생산되지만 특히 긴장상태에서 많이 생산된다. 그래서 타유전자의 표현에 이 긴장유도단백 유전자의 조절유전자 부위를 이용하고자 했던 것이다. 시발체연장분석기법(primer extension analysis)으로 두개의 긴장반응 유전자 전사 시발부위를 찾는데 성공하

였다. 거기다 대장균의 β -galactosidase 유전자를 연결한 매체로 형질전환 시킨 BCG에서 효소생산을 분석해 보았더니 BCG총단백의 10%이상 생산된다는 사실을 관찰했다. 그런데 BCG염색체에 「플라스미드」를 삽입한 재조합 BCG(rBCG)보다도 염색체의 「플라스미드」로 만든 rBCG가 더 많이 생산했다. 그러나 전자는 열, 산, 과산화물과 같은 충격으로 β -galactosidase 생산량이 증가하는 것이 관찰되었다.

17가지의 각종 병원성 「바이러스」, 세균 및 기생충 항원유전자를 앞서 언급한 매체에 삽입해 항원을 생산하는데 성공했다. 특히 다른 세균에서 표현시키기가 힘든 HIV-1 항원유전자가 rBCG에서 표현이 되었는데 HIV-1 pol 항원은 많이 얻을 수 있었지만 그의 유전자들의 표현은 β -galactosidase 생산량을 증가하지 못했다. 어떤 유전자는 염색체의 「플라스미드」에 의해 발현시키면 치명적이라 염색체 삽입 매체에 의해서만 표현이 가능한 것도 있었다.

6. 재조합BCG에 대한 면역반응

이제 재조합 BCG에 대한 면역반응을 살펴 보기로 하자. β -galactosidase 유전자를 삽입해 형질전환한 rBCG를 여러 경로로 접종한 결과 (1) 정맥내로 200개(생균으로), 피내로 10,000개 접종한 흰쥐에서 이 효소단백에 대한 높은 항체가 생산되었다. (2) 효소단백 항체량이 BCG 자체단백에 대한 항체량 보다 더 많이 생산되었고 그리고 오래동안 지속되었다. 이는 곧 많은 양의 효소단백이 오래동안 계속해서 생산되기 때문인 것

로 본다. HIV-1gp 120에 대한 항체는 많이 검출되지 않았는데 이는 아마도 항원 표현이 많지 않은 탓으로 추정된다. (3) 염색체의 「플라스미드」라는 숙주체내에서 안전하게 생존해 2~4주후에도 검출되었으며 비장에서는 추정했던 수치보다 30 배이상 검출되었다. 따라서 선택적 분리 배양을 위해 항생제를 첨가할 필요가 없다. 그리고 파상풍 C독소유전자를 넣은 rBCG를 접종한 흰쥐에서도 비록 C항원 생산이 β -galactosidase의 1/250에 불과할지라도 많은 양의 항체가 생산되어 12주까지 지속되었다.

재조합항원에 대한 IgG생산은 곧 보조「티립프」구의 유도를 뜻하므로 「림포카인」생산도 예견되어서 분석해 본 결과 (4) β -galactosidase생산 rBCG로 접종한 동물의 비장세포에서 효소단백 자극으로 「인터페론 감마」가 생산되는 것을 관찰할 수 있었다. 그리고 (5) 각종 「바이러스」감염에 대한 저항력에 있어서 결정적 중요성을 지닌 세포독성 「티립프」구 생산여부도 관찰한 결과 효소단백항원뿐 아니라 HIV-1 gp 120의 주된 항원결정부를 표면에 가진 세포에 대해 세포독성을 나타내는 「티립프」구가 비장세포에서 검출되었다. 이들은 주요조직 적합항원계 유전자에 의해 제한되고 대부분 CD8 「티립프」구 였다.

몇가지 개선 또는 고려되어야 할 사항은 (1) 각종 항원의 최적표현에 필요한 조건들을 찾아 충족시켜 주는 일이다. 예를 들면 rBCG로부터 재조합항원이 잘 생산분비될 수 있게 신호 DNA를 삽입하는 일이다.

그리고 (2) 유효한 면역력을 유도할 수

있는 경구접종처방이 개발되어야 하겠고, (3) 보호면역에 관련된 「바이러스」항원결정부는 대개 유전암호에 따라 합성된 단백질항원의 배당화(配糖化)(glycosylation)나 조립(assembly)과 같은 입체구조화나 수정이 요구되는데 원핵생물에서는 그런 능력이 없다. 그러나 「바이러스」내부항원으로 보조 「티립프」구의 면역기역을 만들어 놓을 수 있어서 자연감염시 증강된 항체반응(2차반응)을 일으킬 수 있다. 그리고 (4) 이미 BCG접종을 받은 개체에서는 rBCG가 오래동안 생존할 수 없어서 충분한 면역력을 얻을 수 없을 것이다.

7. 결론

이상의 연구개발 현황을 토대로 볼 때 BCG를 이용한 재조합 「백신」이 앞으로 사람에게 널리 이용될 것이 확실하며 이는 분명히 예방접종의 새로운 전기가 될 것임에 틀림없다. 결국 재조합 유전자를 BCG에 형질전환하여 잘 표현시킬 수 있는 매체의 개발이 각종 재조합 BCG 생산을 가능하게 했다.

rBCG는 생산비용이 저렴하고, 안전하며, 생후 일찍 접종할 수 있으며, 1회 접종으로 여러 질환에 대한 동시예방이 가능하여 접종률 제고에 따른 예방효과를 높일 수 있다. 뿐만 아니라 균이 오랫동안 생존하면서 많은 양의 항원을 지속적으로 면역계에 전달하면서 강력한 면역보강 효과를 발휘해 재조합항원에 대한 보다 강력하고 지속적인 항체 및 세포개재면역을 유도할 수 있는 잇점을 가지고 있다. †