

면역보조제의 작용 및 개발

¹한국과학기술정보연구원(KISTI) 정보분석부, ²삼척국립대학교 생약자원개발학과, ³성균관대학교 약학부

손은수¹ · 손은화² · 표석능³

A Current Research Insight into Function and Development of Adjuvants

Eun-Soo Sohn¹, Eunwha Son² and Suhkneung Pyo³

¹Department of Information Analysis, Korea Institute of Science and Technology Information (KISTI), Cheongryangri-dong, Dongdaemun-gu, Seoul, ²Department of Pharmacognosy Material Development, Samcheok National University, Samcheok, Kangwon-do, ³Division of Immunopharmacology, College of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Suwon, Kyunggi-do, Korea

ABSTRACT

In recent years, adjuvants have received much attention because of the development of purified subunit and synthetic vaccines which are poor immunogens and require adjuvants to evoke the immune response. Therefore, immunologic adjuvants have been developed and testing for most of this century. During the last years much progress has been made on development, isolation and chemical synthesis of alternative adjuvants such as derivatives of muramyl dipeptide, monophosphoryl lipid A, liposomes, QS-21, MF-59 and immunostimulating complexes (ISCOMS). Biodegradable polymer microspheres are being evaluated for targeting antigens on mucosal surfaces and for controlled release of vaccines with an aim to reduce the number of doses required for primary immunization. The most common adjuvants for human use today are aluminum hydroxide and aluminum phosphate. Calcium phosphate and oil emulsions have been also used in human vaccination. The biggest issue with the use of adjuvants for human vaccines is the toxicity and adverse side effects of most of the adjuvant formulations. Other problems with the development of adjuvants include restricted adjuvanticity of certain formulations to a few antigens, use of aluminum adjuvants as reference adjuvant preparations under suboptimal conditions, non-availability of reliable animal models, use of non-standard assays and biological differences between animal models and humans leading to the failure of promising formulations to show adjuvanticity in clinical trials. The availability of hundreds of different adjuvants has prompted a need for identifying rational standards for selection of adjuvant formulations based on safety and sound immunological principles for human vaccines. The aim of the present review is to put the recent findings into a broader perspective to facilitate the application of these adjuvants in general and experimental vaccinology. (**Immune Network 2004;4(3):131-142**)

Key Words: Adjuvant, animal model, human vaccines, oil emulsions, microspheres

서 론

Adjuvant (adjuvare는 help의 라틴어)는 항원성을 높여

책임저자 : 표석능, 성균관대학교 약학부
☎ 440-746, 수원시 장안구 천천동 300
Tel: 031-290-7713, Fax: 031-292-8800
E-mail: snpyo@skku.ac.kr

백신 개발에 이용되거나, 항원에 대한 비특이적 면역반응을 증강시켜 항암치료 등에 이용하는 면역보조제이다. Adjuvant는 항원량이 적을 때 항원에 대한 면역반응을 신속하고, 강력하게 그리고 장시간 유지시켜주는 역할을 하기 때문에 백신을 제조할 때 쓰이며, 또한 특별한 adjuvant를 사용하거나 또는 항원의 양을 다르게 하여 면역반응을 조절하거나 또는 항원에 대한 항체의 종류와

아형(subclass) 등을 조절할 수 있게 한다. 또한 adjuvant 는 점막면역능(mucosal immunity) 유도를 증진시키기 위한 목적으로 특히 면역적으로 미숙하거나 나이가 든 사람에게서 면역반응을 증강시키는데 사용할 수 있다.

Adjuvant 대부분은 수많은 천연물과 많은 시행착오 속에서 발견되었는데 최초의 연구보고는 1925년 프랑스의 Ramon이 식품에 사용되는 타피오카(topioca)라는 카사바(Casaba) 녹말을 디프테리아 및 파상풍 독소이드와 혼합하였을 때 항원특이성 항체생성이 효과적으로 증가된다고 발표하였다(1,2). 이후 1926년 Glenny는 알루미늄 복합체의 면역증강효과를 보고하였고(3), 1937년 Freund는 면역조절제로서 mycobacteria 사균을 포함한 에멀전(emulsion)형태의 효과적인 adjuvant를 개발하였다(4). 이는 FCA(Freund's complete adjuvant)라 하여 매우 효과적인 면역조절제로서 알려져 있으나 반응성(reactogenic)이 매우 커서 인체에 사용하는 백신에 사용하기는 적합하지 않았다. 이에 mycobacteria가 포함되지 않은 FIA (Freund's incomplete adjuvant)가 개발되어 영국에서 허가를 받았다. 1956년 Johnston은 그람음성균의 endotoxin에서 면역증강효과를 확인하였고(5), 1974년 Ellouz 등은 muramyl dipeptide (MDP)의 효과를 확인하였다(6). 이 후 lecithin(7), saponine(8) 등도 면역성을 증강시키는 면역보조제로서의 가능성이 보고되었다.

이와 같이 수많은 adjuvant가 발견되어 백신 제조에 시도되었으나(9) 여러 문제점들이 해결되지 못하여 실제 임상에는 사용되지 못하고 있다. 백신 제조에 사용되는 adjuvant의 가장 큰 문제점은 adjuvant 자체의 독성과 부작용이다(10). 특히 백신이 각종 감염성 질환을 예방하기 위해 영유아 등 소아의 예방약으로 주로 사용되기 때문에 안전성은 매우 민감하고 중요한 문제가 되었다. 또

한 그동안 실제 임상에서 매우 제한적인 처방의 adjuvant를 사용하였기 때문에 시험에 적합한 동물모델의 부족 및 백신 제조비용의 상승도 문제점으로 지적되고 있다(11,12).

백신은 치료효과 뿐만 아니라 예방효과가 있어 질병의 99%까지 발병률을 줄일 수 있는 비용 대비 효과가 가장 큰 의약품이다. 특히 최근에는 백신의 용도가 감염성 질병에만 국한되는 것이 아니라, 암, 자가면역질환을 포함한 각종 난치성 질환으로 넓혀지고 있고, 치료 백신이 등장함에 따라 백신 개발이 매우 중요하게 인식되고 있다. 따라서 adjuvant 개발은 백신관련 제품으로서 백신 개발과 함께 가속화되고 있으며, 또한 면역관련 질환에 대한 범위가 넓어지면서 새로운 면역조절제로서 adjuvant 개발이 매우 유망한 분야로 거론되고 있다.

Adjuvant의 면역조절작용

대부분의 단백질들은 단독 투여될 경우 매우 약한 면역원성을 갖고 있거나 혹은 거의 면역원성을 갖고 있지 않다. 단백질항원에 대한 강력한 면역반응을 유발하기 위해서 항원을 면역보조제와 함께 투여하는데, 면역보조제가 효과를 나타내는 방법은 크게 다음과 같이 구분할 수 있다(Table I).

첫째, 면역효과가 약한 수용성 항원을 입자로 만들어 대식세포와 같은 항원제시세포(APC; antigen presenting cell)에 쉽게 탐식(phagocytosis)될 수 있도록 돕는 방법으로 면역력을 증강시킨다(13,14). 항원과 함께 투여되었을 때 항원제시세포는 항원의 저장소로 작용하여 항원을 지속적으로 제공함으로써 면역원성을 증강시킨다. 항원의 지속적인 노출은 항체반응의 지속은 물론 면역반응과 기억기능을 갖고 있는 T, B세포가 존재하는 림프절에

Table I. Modes of adjuvant action (65)

Action	Adjuvant type	Benefit
Immunomodulation	Generally small molecules or proteins which modify the cytokine network	Upregulation of immune response. Selection of Th1 or Th2
Presentation	Generally amphipathic molecules or complexes which interact with immunogen in its native conformation	Increased neutralizing antibody response. Greater duration of response
CTL Induction	<ul style="list-style-type: none"> • Particles which can bind or enclose immunogen and which can fuse with or disrupt cell membranes • w/o emulsions for direct attachment of peptide to cell surface MHC-1 • Particulate adjuvants which bind immunogen. 	Cytosolic processing of protein yielding correct class 1 restricted peptides Simple process if promiscuous peptide(s) known Efficient use of adjuvant and immunogen
Targeting	Adjuvants which saturate Kupffer cells <ul style="list-style-type: none"> • Carbohydrate adjuvants which target lectin receptors on macrophages and DCs 	As above. May also determine type targeting selective
Depot generation	<ul style="list-style-type: none"> • w/o emulsion for short term • Microspheres or nanospheres for long term 	Efficiency Potential for single-dose vaccine

서 수지상세포(dendritic cell)와 같은 항원제시세포에게 항원발현시간을 증가시킴으로써 면역반응의 증강효과를 가진다고 추측하고 있다. 예를 들면, alum과 같은 면역보조제의 경우 alum 입자에 항원을 흡착시키거나 광물성 기름에 유화시키는 등의 방법으로 입자화하여 항원제시세포의 탐식작용을 증강시키는 것이다. 대부분의 면역보조제들이 여기에 속하며, alum(aluminum hydroxide) 등의 미네랄류와 유상의 adjuvant, liposome, 생분해성 고분자 microsphere (10 um 이상) 등이 이렇게 작용한다. 과산화물, 디프테리아 독소 등을 glutaraldehyde로 처리한 단백질 항원의 중합(polymerization)화(15,16), 디프테리아 독소 등 단백질 항원의 양이온화(17), 또는 단백질과 다당류의 접합(conjugation)화 등의 작용도 이에 해당된다. 또한, 항원운반체(담체)를 단백질로 이용함으로써 항원의 면역원성을 증강시키는 방법도 시도되고 있는데, 단백질의 담체는 T세포 epitope로 작용하며 또한 항원의 분자량을 증가시킴으로써 면역원성을 증강시킬 수 있기 때문이다(18-20). 최근에는 FIA를 유상의 담체로 포장하는 등 이미 알려진 작용기전을 복합적으로 이용하여 adjuvant의 작용을 극대화시키기 위한 연구도 보고되고 있다(21).

둘째, MDP와 같은 Mycobacterium의 세포막에서 추출된 다수의 저분자들도 면역보조제로 사용한다(22). 저분자 adjuvant는 면역세포를 조절하거나 자극함으로써 비특이적으로 면역세포의 기능을 조절하는 면역조절제 역할을 하는 것으로 추정되는데, 여러 종류의 cytokine을 생성시키거나, 항원제시세포들이 공동자극분자(costimulatory molecule)를 발현하도록 자극하거나 혹은 T세포들의 공동자극신호와 유사한 역할을 하는 것으로 추측된다. 또한 저분자 adjuvant는 면역매개물질(mediators) 분비를 통하여 림프구와 내피세포의 결합력을 조절할 수 있는 부착분자(adhesion molecules)의 발현을 조절함으로써 이동이 가능하게 하며, 따라서 림프구의 유입과 정착을 유도하고 이러한 환경에서 면역세포가 적합한 항원을 인식할 수 있도록 한다.

저분자 면역보조제로 알려진 것은 레바미졸(levamisole, 구충제), 베스타틴(bestatin, 방선균이 생산하는 아미노펩티다제 저해제), 홉페니시놀(방선균이 생산하는 알칼리포스파타제 저해제), FK565(아실트립타이드) 등이 있다. Complete Freund's adjuvant, lipopolysaccharide (LPS, lipid A), cytokine 등이 여기에 해당된다.

셋째, 백신의 효과를 증강시키기 위한 다른 방법으로 cytokine을 동시에 투여하는 것이다(23,24). 예를 들어, 대식세포와 B세포에 의해 생성되는 IL-12는 T세포와 NK세포가 IFN- γ 를 생성하도록 자극해서 Th1반응을 유도한다. 이는 원충성 기생충인 *Leishmania major*에 대한 방어면역을 촉진시키기 위한 면역보조제로 사용되고 있

다.

이상적인 Adjuvant의 조건은 면역증진 효과 외에도 안전성(safety), 안정성(stability) 및 실용성 측면에서 몇 가지 조건을 갖추어야 하는데, 독성이 없어야 하고, 생체분해성이 좋고 안정해야 하며, 사용하기 편리하고, 쉽게 구입할 수 있어야 하며, 가격이 저렴하고 화학적 동정이 가능해야 한다(25). 현재 많은 종류의 adjuvant가 보고되고 있으나 실제 임상적으로 이용 가능한 품목은 몇 가지 되지 않는다. 백신에 사용되는 adjuvant 개발에서 가장 중요한 것은 안전성으로 이에 대한 확실한 연구 자료가 뒷받침 되어야 하기 때문이다. 따라서 앞으로도 adjuvant의 안전성 및 정확한 면역 증강 기전이 밝혀지지 않는 한 소수의 adjuvant만이 백신 제조에 사용 가능할 것이다

Adjuvant가 효과적인 면역반응을 유도하기 위해서는 림프구 침윤과 면역세포의 활성화, 국소 림프기관으로의 항원의 이동이 있어야 한다. 즉, 면역반응에 관계하는 세포들을 항원과 밀접한 위치에 모이도록 하여 항원을 인식할 수 있어야 성공적인 면역반응을 유발할 수 있다. 즉, adjuvant는 염증성 유사반응을 유도해야 한다. 실제로 염증유도물질을 주사하게 되면 많은 수의 대식세포와 호중구들이 신속하게 유입된다. 이것은 항원 epitope에 관한 정보를 면역세포에게 잘 전달시켜 주기 때문에 MHC class II의 발현이 증가하는 것과 관계가 있다(14). 활성화된 대식세포는 IL-1을 분비하고, IL-1은 T세포가 IL-2를 분비하게 하고 또한 분화(clonal expansion)되도록 촉진시킴으로써 면역반응을 더욱 증대시킨다. 그러나 이러한 가설은 면역증강 효과가 높게 나타나는 adjuvant 중에서 염증성 반응이 나타나지 않거나 육아종(granuloma)을 형성하지 않는 것도 많이 존재하고 있으므로 adjuvant의 작용기전에 대한 논의가 아직도 계속되고 있다. 현재 사용되는 adjuvant는 단순하고 저렴한 반면에 최근 유전자 재조합기법에 의해 개발되는 많은 subunit 백신에 적용했을 때에는 기대 효과를 얻지 못하고 있다. 이는 구조가 간단한 subunit, epitope 항원이나 복합적인 항원 또는 병원체 전체에 대한 인체의 면역반응을 올바르게 이해하지 못하기 때문이다. 즉, 보통 병원체로부터 추출한 항원으로 제조된 백신 개발의 경우 면역계 세포가 항원들의 epitope 정보를 전달하는데 적합하도록 고안된 것이 아니라, 면역반응에 관계하는 항원의 본래 특성에 의존하여 개발하는 형편이다. 이렇게 개발된 백신은 병원성에 대해 강력한 체액성 면역반응을 유발한다 해도 세포성 면역반응이 없어 이미 체내에 있는 독소는 중화할 수는 있어도 병원체가 숙주세포를 공격시에는 감염될 수 있으며 결국 방어되기보다는 악화되는 결과를 초래할 수도 있다. 따라서 효과적인 subunit 또는 epitope 백신을 개발하려면 국소 림프조직으로 면역세포가 이동하여야 하고, 항원이나 epitope의 정보를 적절히 전달해야

하고 또한 면역세포에 의해 올바른 방어면역기전이 활성화될 수 있도록 전략을 세워야 한다.

Adjuvant에 의한 면역증강작용을 조절하는 방법으로는 3가지가 있다(26).

첫째, adjuvant는 체액성 면역반응을 자극함으로써 adjuvant에 의해 생성되는 항체의 isotype, IgG의 아형, avidity, 항체의 친화성 등을 조절할 수 있다. T세포는 MHC와 함께 항원제시세포에 표현된 항원을 인식하기 때문에, adjuvant와 함께 주입되는 항원의 형태는 T세포에 의한 인식 및 유도되는 T세포의 종류에 영향을 미친다. 또한 항원제시과정도 adjuvant에 의해 조절받기 때문에, 보조 T세포(helper T cell, Th)와 세포독성 T세포(CTL; cytolytic T lymphocyte) 모두를 유도할 수 있는 백신의 제조가 가능하다. 이와 같이 adjuvant는 체액성 면역 또는 T세포가 관여하는 세포성 면역반응을 선택적으로 조절할 수 있다.

둘째, adjuvant를 사용하여 MHC class I 또는 MHC class II 반응을 조절할 수 있다. MHC class I은 주로 바이러스와 같은 세포내 감염 병원균 항원에 대하여 반응하여 CTL을 유도하며 단백질 항원에 대하여는 유도되지 않는다. 그러나 ISCOMs, QS-21 등의 adjuvant를 사용하였을 경우에는 단백질, 펩타이드, 불활성화 바이러스에 대하여 CTL반응을 유도시킬 수 있다(27). 한편 MHC class II 반응은 대개 단백질항원, 불활성화 균체에 대하여 유도되어 항체를 생성하는데, 대부분의 adjuvant는 MHC class II 반응을 유도하여 효과를 발휘한다고 알려져 있다.

셋째, adjuvant는 각기 다른 Th세포의 면역반응을 조절한다(28,29). T 보조세포의 면역반응은 Th-1형과 Th-2형이 있는데, Th-1형 반응은 IL-2, IFN- γ 에 의해 유도되며, 대개는 바이러스, 세포 내 세균감염, 기생충 감염, 생바이러스를 주사했을 경우에 나타난다. Th-1형 반응의 자극은 세포성 면역반응을 유도하고, 생쥐에서 IgG2a 항체를 고농도로 생성시킨다(30,31). 최근에는 FCA, SAF-1, MDP, LPS, MPL (monophosphoryl lipid A) QS-21 등의 여러 adjuvant가 이러한 Th-1형 반응을 일으킨다고 보고되었다(32). Th-2형 반응은 IL-4, IL-10 등에 의해 조절되고, 단백질 항원이나 불활성화 균체를 감작시켰을 때 자극을 받아 일어난다(28,33,34). 자극을 받은 Th-2형 반응은 실험동물에서 IgG1과 IgE를 생성시킨다고 알려져 있다. 알루미늄염 adjuvant들이 이러한 Th-2형 반응을 자극하는 것으로 알려져 있다.

Adjuvant 개발의 문제점

그동안 많은 발전에도 불구하고 현재 인체 적용 백신의 adjuvant로 사용될 수 있는 것은 알루미늄 화합물로 한정되어 있다. 그것은 지금까지 개발된 후보물질들이

안전성이 확보되지 않았기 때문이다. 그 밖에도 백신개발에 있어서 adjuvant는 adjuvant 특성의 제한, 알루미늄염 adjuvant 최적화 사용의 어려움, 동물모델의 제한, 시험법의 확립 등이 해결해야 할 문제점으로 나타나고 있다.

Adjuvant 특성의 제한. Adjuvant의 효과는 모든 항원에 대하여 동일하게 적용되지 않는다. 일례로 알루미늄 화합물의 경우 장티푸스백신, 인플루엔자 haemagglutinin 항원, 과상풍 독소 결합형 인플루엔자 b형(Hib) 캡슐 다당체 등에 대해서는 adjuvant로서의 기능을 발휘하지 못한다(35). 따라서 새로운 처방의 adjuvant 개발을 위하여 adjuvant의 효과를 평가할 수 있는 ovalbumin과 같은 모델항원(또는 표준항원)을 이용한 연구가 이루어지고 있다(36). 이 모델항원의 이용으로 초기개발 단계의 스크리닝 연구와 연구개발 단계에서의 항원과 adjuvant의 동시처리 시험이 수행된다. 그러나 ovalbumin은 면역원성이 약하여 adjuvant를 평가하는데 적합하지만 ovalbumin 자체가 임상적으로 크게 의의가 없는 항원이고, 임상 적용할 수 없을 정도로 많은 양을 사용해야 하며, adjuvant 처방에 따른 미세한 차이의 구분이 어렵고, ovalbumin 용량에 따른 즉, 항원 용량에 따른 생체 활성도 차이를 측정할 수 있는 특이적인 항체 시험법이 없다는 것이 문제점으로 남아 있다(37). 따라서 동물모델에서 최소 역치의 용량으로 과상풍 독소, 디프테리아 독소, 백일해 독소 등을 항원으로 이용하는 시도가 이루어지고 있으며 이 중에서 디프테리아 독소가 특히 유용한 것으로 평가되고 있다(38,39).

알루미늄염 adjuvant의 최적화 사용의 어려움. 현재 알루미늄 adjuvant는 유일하게 인간 백신에 사용되고 있기 때문에 새로운 adjuvant의 연구 지표로 이용되고 있다. 따라서 개발 대상 adjuvant의 올바른 비교 평가를 위해서는 알루미늄 adjuvant를 최적화한 상태로 사용해야 한다. Adjuvant로 사용되는 알루미늄 화합물은 인산알루미늄(AlPO_4), 수산화알루미늄($\text{Al}(\text{OH})_3$), 알루미늄염(aluminum salt, 백반 또는 명반) 등이 있다(40-42). 많은 자료에서 모든 알루미늄 adjuvant를 alum으로 칭하고 있으나 이것은 잘못된 표기다. Alum의 화학적 조성은 $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ 로 주로 과상풍 독소나 디프테리아 독소 등의 단백질 항원과 혼합하여 alum의 음이온과 단백질 항원을 함께 침강시킴으로써 항원을 부분적으로 정제하는데 이용되어 왔다. 한편 인산알루미늄과 수산화알루미늄은 물리화학적 성질이나 adjuvant로서의 특성이 다른데 수산화알루미늄이 단백질 항원에 대한 흡착력이 더 강하다. 인간 혈청 알부민에 대한 흡착력도 10배나 강하다. 또한 수산화알루미늄은 complete Freund's adjuvant와 동등하거나 보다 높은 항체 반응을 유도하여, 실험동물에서 항원성이 약하고 항원에는 우수한 adjuvant로 작용한다(43). 반면에

saponin 및 complete Freund's adjuvant은 항원성이 강한 항원에 우수한 adjuvant로 작용한다(44,45).

알루미늄 adjuvant에 흡착시킨 항원의 면역원성은 여러 요소에 의해 영향을 받으며, 특히 항원 흡착력과 adjuvant의 용량이 가장 중요한 요소로 작용한다(12). 알루미늄 adjuvant의 항원 흡착력은 항원의 물리화학적 성질, 알루미늄 adjuvant의 형태, 흡착 조건 등에 따라 다르기 때문에 개발시에 adjuvant 특성 시험조건의 표준화가 필요하다. 따라서 WHO에서는 80% 이상의 흡착도를 권장하고 있다. 알루미늄 adjuvant의 용량은 면역원성 전체에 영향을 주는데, 항원을 완전히 흡착시키기 위해 소량의 adjuvant를 사용하면 최적의 adjuvant 효과가 나타나지 않아 과량의 adjuvant를 사용하게 된다. 최적의 사용량은 경우에 따라 다를 수 있지만, 알루미늄 adjuvant는 최소한의 필요량이 되어야 주사부위에서 항원의 저장소 역할을 하며 대식세포의 자극도 최적화된다. Adjuvant 용량을 증가시키면 일정 범위까지 adjuvant의 효과가 증가하지만 또한 과잉의 알루미늄 adjuvant가 사용되면 항원을 완전히 은폐시키거나 대식세포에 세포독성을 나타내기 때문에 오히려 면역원성을 억제한다(35).

동물모델. 백신 연구에 적용할 적합한 동물모델이 부족하기 때문에 개발되는 adjuvant를 평가하는 것은 매우 어려운 과제다. 또한 동물모델과 인간과의 생리적 차이점 때문에 우수한 adjuvant로 평가된 경우에도 실제 임상에서의 효과가 미약한 경우가 많다. 각기 다른 동물 중에서 adjuvant에 대한 면역반응은 각기 다르게 나타나며, 같은 종이라도 strain마다 다른 면역반응을 나타내기 때문이다(12). 따라서 동물시험 결과는 한 종의 한 strain에서 나타난 시험결과를 과신해서는 안되며 결과 해석에 상당한 주의가 요구된다. 백신 연구에는 생쥐 계열의 guinea pig, 토끼 등이 동물모델로 이용되고 있는데, 특히 guinea pig는 백신의 품질 관리에 유용하며, strain간에 큰 차이를 나타내지 않아 Hib 접합백신 등의 면역원성 평가에 적합한 것으로 알려져 있다. 생쥐는 strain에 따라 adjuvant의 효과에 상당한 차이가 있지만, 시험비용이 저렴하고, IgG subclass나 cytokine 등의 이용이 수월하기 때문에 향후에도 adjuvant의 평가에 주로 사용될 것으로 생각된다. 따라서 adjuvant의 평가시에는 생쥐 strain 2종 이상을 이용하여 IgG subclass, cytokine 등의 adjuvant 효과를 시험하는 것이 바람직하다. 또한 동물시험을 통해서 많은 정보를 얻기 위해서는 adjuvant 및 항원의 용량을 인간에게 사용할 백신의 용량에 비례하여 선정하고, 희석되지 않은 상태로 투여하여야 한다.

시험법의 문제. Adjuvant가 항체 반응에 미치는 영향은 주로 ELISA법과 같은 면역분석법으로 측정하고 있다. ELISA법은 간편하고 자동화가 용이하며 안정적으로 데이터를 얻을 수 있으나 시험자간 방법의 차이와 항체의

활성을 측정할 수 없다는 문제점이 있다. 시험자들은 역가, 단위 등을 포함해서 각기 다른 방법으로 항체의 함량을 결정하기 때문에, 각기 다른 시험자간 편차는 물론 동일 실험실에서조차 편차를 나타내고 있다. 따라서 adjuvant의 효과를 평가하기 위해 사용하고 있는 ELISA법의 보완이 필요하다. 또 다른 문제는 adjuvant에 의해 항원의 epitope가 변화될 수 있기 때문에 면역 분석시험에서는 항체와의 결합으로 항체 생성량을 측정할 수 있지만 측정된 항체가 기능적으로 활성을 갖고 있는지를 알 수 없다. 따라서 중화반응, 생식억제반응 등의 기능적으로 항체 활성을 측정할 수 있는 항체시험법이 개발되어야 한다.

Adjuvant의 종류 및 개발현황

전통적으로 사용되어 오던 알루미늄염, Freund' adjuvant 등은 물론 ISCOMs, microsphere 등의 새로운 adjuvant들에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(Table II, Table III).

금속염 화합물. 알루미늄염, 칼슘염 등 여러 종의 금속염이 항원을 흡착하는데 사용될 수 있지만 이 중 알루미늄 화합물이 가장 일반적으로 사용되고 있다. 알루미늄염에 항원을 흡착한 백신은 다른 adjuvant와 같이 유상액을 만들지 않으므로 바로 주사할 수 있으나, 그러나 현재까지도 알루미늄 adjuvant가 면역반응을 증가시키는 기전에 대해서는 잘 규명되지 않았다. 단지 알루미늄이 항원과 물리적 복합체를 형성하여 대식세포가 쉽게 탐식할 수 있도록 돕는 방법으로 면역력을 증가시키는 것이며, 이 면역 증강효과는 알루미늄 겔에 항원이 결합되어 근육 속에 오랫동안 지속적으로 조금씩 방출함으로써 면역체계와 접촉하는 시간을 오래 지속시켜 면역증강작용을 나타내는 것으로 알려지고 있다. 대부분의 연구에서 알루미늄 adjuvant는 항체 반응을 유도하는 체액성 반응에는 효과적이었으나, CTL 세포반응과 같은 세포성 면역반응을 유도하는 데는 그렇지 않았다(35). 따라서 세포성 면역이 중요한 HIV 등의 바이러스 감염이나 세균성 감염에 대해서는 유용성이 낮다고 여겨지고 있다. 또한 오랫동안 백신제조에 사용되었던 알루미늄은 몇 가지 부작용, 즉 흥반, 피하결절, 접촉성 과민반응, 육아종성 염증 등의 부작용을 수반한다(10). 이러한 부작용은 항원을 정제하거나 백신 제조에 사용되는 알루미늄의 함량을 줄임으로써 감소시키고 있다. 그 밖에도 알루미늄 adjuvant가 함유된 백신은 동결건조할 수 없어 냉소 보관해야 하고, adjuvant 생산의 품질 재현성이 떨어져 백신 제조과정에서 생산 로트마다 차이가 나타나기 때문에 백신의 품질관리에 어려움이 남아있다.

면역자극성 adjuvant.

세균성 adjuvant: 균체 성분들이 효과적인 adjuvant가 될

Table II. Types of immunologic adjuvants

Types	
Gel-type adjuvants	Aluminum hydroxide/aluminum phosphate (3,66) Calcium phosphate (66)
Microbial adjuvants	DNA Endotoxin Exotoxins CpG motifs (67) Monophosphoryl lipid A (68) Cholera toxin (69,70) E. coli heat-labile toxin (71-73) Pertussis toxin (74,75)
Oil-emulsion and Emulsifier-based adjuvants	Muramyl dipeptide (MDP) (48,76) Freund's Incomplete Adjuvant (IFA) (77,78) MF59 (79-81) SAF (30,82,83)
Particulate adjuvants	Immunostimulatory complexes (ISCOMs) (82,84,85) Liposomes (86,87) Biodegradable microspheres (63,88) Saponins (QS-21) (8,89)
Synthetic adjuvants	Nonionic block copolymers (90,91) Muramyl peptide analogues (48,92,93) Polyphosphazene (94,95) Synthetic polynucleotides (96,97)

Table III. Selected examples of vaccine adjuvants

Types	Adjuvants
Mineral salts Immunostimulatory adjuvants	Aluminium hydroxide*, aluminium phosphate*, calcium phosphate* Cytokines, e.g. IL-2, IL-12, GM-CSF, saponins, (e.g. QS-21), MDP derivatives, bacterial DNA (CpG oligos), LPS, MPL and synthetic derivatives, lipopeptides
Lipid particles	Emulsions, e.g. Freund's (CFA and IFA), ISA 25, 51, 206, SAF, MF59*, liposomes, virosomes*, ISCOMS, cochleates
Particulate adjuvants	PLG microparticles, poloxamer particles, virus-like particles
Mucosal adjuvants	Heat-labile enterotoxin (LT), cholera toxin (CT), mutant toxins, e.g. LTK63 and LTR72, microparticles, polymerised liposomes, chitosan

With the exception of cochleates and polymerized liposomes, all of these adjuvants have been evaluated in clinical trials. However, only those marked * are currently included as adjuvants in approved vaccine products (98, 99).

수 있다는 최초의 보고는 결핵에 걸린 guinea pig가 정상 군보다 항체를 많이 생산한다는 사실을 발견한 1924년부터였다(46). 이후 결핵병소에 항원을 도입하면 면역반응이 증가하는 것으로 증명되었으며, 이 결과 광유(mineral oil)와 Mycobacterium tuberculosis의 현탁액으로 구성된 Freund's complete가 개발되었다. 이후에 Mycobacterium 성분을 분리, 정제하면서 결핵균의 MDP가 B 세포를 활성화하고 대식세포를 자극한다는 것이 발견되었다. MDP는 효과적인 adjuvant였지만 독성과 부작용이 많이 나타났다. 이후에 MDP 독성인자를 감소시키고 면역증진기능을 향상시키기 위한 연구가 수행되었으며 그 결과 300개 이상의 MDP 유도체가 합성되었다(47). Endorex社의 ImmTher[®]가 대표적이며, 유도체 중 MDP-

PE는 부작용이 적고 강한 면역증강력을 나타내며, threonyl MDP는 Feline leukemia virus (FeLV) 항원에 대해 세포성 면역과 체액성 면역 모두를 증가시켰다. 또한 murametide와 murabutide도 거의 독성 없이 유사한 면역증강 작용을 유도하는 것으로 밝혀졌다. 한편 다른 연구에서는 소수성 또는 친수성에 따른 유도체의 특성과 백신의 제법이 체액성 및 세포성 면역을 유도하는데 영향을 미치는 것으로 보고하였다(48). 그 밖에 다른 세균체 성분도 우수한 adjuvant로 보고되었는데, 파상풍과 디프테리아 toxoid, LPS (특히 lipid A 성분) 등이 여기에 속한다. 이들 세균성 adjuvant들은 대식세포를 자극하여 IL-1, IL-6, TNF와 T, B세포에 영향을 주는 성장인자를 분비한다고 알려지고 있으나 이외에 정확한 작용기전은 아직

상당부분이 밝혀지지 않은 상태다.

LPS의 lipid A를 화학적 조작에 의해 독성을 감소시킨 MPL은 cytokine 중에서도 특히 IFN- γ 의 생성과 유리를 유도하는 것으로 알려져 있다(49). 이는 T보조세포 매개성 면역능의 유도에 효과적이지만, MPL 홀로는 항체 유도능이 그다지 강하지 못해 liposome과 emulsion을 포함하는 복합제형으로 흔히 사용되며 alum 또는 QS-21과 조합하여 사용되기도 한다(50). MPL은 흑색종과 유방암 등의 암백신, 나아가 herpes, hepatitis B virus, malaria, human papilloma virus (유두종바이러스) 등의 감염 질환용 백신과 함께 이미 임상적으로 시험되어 부작용이 적은 것으로 확인되었으며, DNA 백신의 면역보조제로도 사용되고 있다. 대표적으로 Ribi ImmunoChem Research社와 Corixa社의 ENHANZIN[®]가 있다.

식물성 adjuvant: 가장 잘 알려진 식물성 adjuvant는 배당체(glycoside)의 일종인 saponin이다. Saponin은 여러 식물군에 폭넓게 분포하고 있으며 계면활성 작용이 있어 유화제로서 공업용으로 쓰이고 있다. Saponin이 최초로 사용된 것은 1951년 Espinet에 의해 구제역 백신 제조시에 사용되었다. 초기에 사용된 정제되지 않은 saponin은 adjuvant로서 활성은 물론 부작용 또한 다양하였지만 현재는 일반적으로 Quila saponaria에서 추출한 식물성 adjuvant를 사용하고 있다. 처음 Quil A라고 추정되는 추출 물질은 많은 종류의 서로 다른 성분으로 구성되어 있었고, 강한 adjuvant 활성을 가지고 있었으며, 동물의 종류에 따라 독성 및 효과가 서로 다르게 나타났(51). 특히 말, 개, 고양이에서 가장 민감하게 나타났으나, 현재 Quil A를 수산화알루미늄과 혼합한 adjuvant로 사용하여 말(equine influenza), 개(canine parvovirus), 그리고 고양이(FeLV) 백신에 사용하고 있다. 아직 Quil A의 정확한 작용기전은 알려지지 않았지만, Quil A는 단백질의 소수성 부분에 결합하여 탐식세포의 탐식작용을 향상시키고, 국소 림프질의 림프구 이동을 변화시키는 것으로 알려져 있다. 이러한 가설은 saponin이 세포막 성분 또는 비용해성 항원의 소수성 부분과 잘 결합하여 미셀(micelle)을 형성하기 때문인 것으로 인식되고 있다.

1995년 Kensil에 의해서 낮은 독성을 갖는 Quil A의 순수성분이 분리되었으며, 면역보조제 활성에 중요한 구조가 밝혀져 QS-21로 명명되었다. QS-21은 IL-2와 IFN- γ 를 유도하고 IgG2a 아형의 항체 생성을 유도하며, 강력한 세포독성 T세포(CTL) 유도능을 지니는 것으로 알려지고 있다(8). 초기에는 흑색종, 유방암, 전립선암 등의 암백신의 면역보조제로 많은 임상연구가 있었으며, 이어 AIDS, influenza, herpes, malaria, hepatitis B virus 등의 감염질환에 면역보조제로 사용되어 연구 중이다. 대표적으로는 Aquila Biopharmaceuticals社의 Stimulon[®]이 있다. QS-21은 강력한 CTL반응이 요구되는 병원균에 대

한 백신에서 상당히 효과적인 것으로 보이지만, QS-21을 함유하는 백신접종 대상자들에서 주사부위의 통증과 연화효과가 단기간 일어난다. 따라서 QS-21 개발은 수많은 감염질환과 암에 효과적인 백신을 개발할 수 있는 잠재성을 가지고 있지만, 효능과 부작용의 균형이 중요할 것으로 여겨진다.

Cytokine: Cytokine을 adjuvant로 사용하여 생체 내 cytokine의 유도를 증가시키는 방법이 시도되었다(23,32,52-54). IL-1, IL-2, IFN- γ , IFN- α , GM-CSF, IL-12 등의 투여로 생체내 항체 생성이 증가됨이 보고된 바 있으나 효과를 위한 투여 회수의 증가 및 사용량 증대로 심각한 부작용이 유발되었다. Cytokine을 adjuvant로 사용하기 위해서는 이러한 문제점을 극복해야 하며, 제제의 안정성, 체내 반감기의 연장 등에 관한 연구도 이루어져야 한다. 최근에는 Human Genome Science社가 cytokine의 성질을 갖는 BLyD (B lymphocyte stimulator)를 개발하여 악성 B 림프구 종양 및 HIV 백신의 adjuvant로 시도되고 있다.

그 밖에도 면역증강효과를 지닌 생체유래물질을 탐색하는 새로운 개념의 연구들이 활발히 발표되고 있다. Avant Immunotherapeutics社에서는 수용성 polyphosphazene 중합체인 Adjumer[®]를 개발하고 있는데, 이 물질은 수용성에 기초한 간단한 백신 제작방식으로 항원의 특성을 그대로 유지시키며, 백신의 효능을 보이는 농도에서 이 물질로 인한 부작용을 나타내지 않았다. 현재 Aventis Pasteur社와 함께 라임병 백신의 면역보조제로 임상시험 중이다.

지질성 입자형 adjuvant.

Oil emulsion adjuvant: Oil emulsion의 사용은 1916년 Le Moignic 등이 사멸된 대장균을 mineral oil에 emulsion시켜 면역반응을 증강시킨 것이 최초였다(55). 특히, 1937년 complete Freund's adjuvant가 발견되면서 큰 주목을 받게 되었으며(4), Mycobacterium이 없는 water-in-oil emulsion을 incomplete Freund's adjuvant라 하여 동물 백신에 많이 사용되었다. Water-in-oil emulsion은 지속적인 유제 상태를 가지며 높은 수준의 지속적인 면역반응을 유도하나, 매우 점도가 높고 주사하기가 어려운 것이 단점이다. 이러한 단점을 극복하기 위해 삼중 emulsion 또는 water-in-oil in water emulsion이 개발되었다. 이들 emulsion은 water-in-oil emulsion 보다 점도를 낮추었지만 다른 형태의 emulsion보다 안정성이 낮고 생산하기가 어렵다. 또한 보관 시 emulsion의 상분리(phase separation)가 일어나지 않도록 적절하게 유화하는 것이 중요하다. Oil emulsion adjuvant의 작용 기전은 잘 알려져 있지 않지만 알루미늄염의 작용 기전과 유사할 것으로 여겨지며, 1회 접종으로 알루미늄염 adjuvant보다 항원을 오래 유출시키고 보다 높은 면역 반응을 유도한다. 또한 림프구 침윤과 수지상세포 및 대식세포의 항원표현기능도 향상

시키는 것으로 보인다(56). Darkerol 6 VR, Marcol 52, Marcol 82, Sontex 55, vestain A50B, Whitetrex 307과 같은 정제된 mineral oil이 상업용 백신 생산에 이용되고 있다. 최근에 개발된 oil-in-water emulsion 형태의 MF-59는 알루미늄염보다 항체 생산능력이 우수하고 체액성 면역반응과 세포성 면역반응을 모두 유도하는 것으로 보고되고 있어 HIV, HSV 등의 백신에 유용하고, 동물과 인간 모두에게 안전한 것으로 평가되고 있다. Oil emulsion에 사용된 oil은 주로 mineral oil이 접종 부위의 육아종 생성과 지속 기간이 길어 광범위하게 사용되어 왔지만 최근에는 땅콩류, 참기름 등의 식물성 oil과 상어의 간유 등 동물성 oil도 emulsion adjuvant로 개발되고 있다.

Liposome과 virosome: Liposome은 항원 및 adjuvant의 전달체로서 연구되어 왔으며(57), 대개 MPL 등과의 조합에 의해 복합제형으로 사용되기 때문에 전체적인 adjuvant로의 효과에 대해서는 평가하기 어렵다. 최근에는 다른 adjuvant 없이 liposome 형태의 A형 간염 백신이 개발되어 임상시험이 끝나 유럽에서 상업화가 시도되고 있다(58). Virosome은 바이러스 표면의 단백질이나 지질을 표면에 함유하여 바이러스의 항원성을 갖게 하는 liposome으로 정의될 수 있으며, 이미 virosome에 기초한 influenza 백신이 시장에 도입되어 있다(59,60). 최근에는 liposome을 변형한 cochleates가 개발되어 Bioral[®] DNA 백신을 포함한 다양한 감염질환의 점막 적용형 백신으로 시험 중이다. 또한 중합형 liposome은 장내에서의 안정성을 향상시킨 것으로 점막적용형 백신으로의 사용을 시험 중이다.

Immunostimulatory Complexes (ISCOM): ISCOM은 면역자극복합체로 불리며 다양한 항원과 결합할 수 있는 매우 효과적인 adjuvant다. 전통적인 ISCOM은 cholesterol, 인지질, saponin과 항원을 혼합하여 제조하고, 직경 30~40 nm 정도의 열려있는 cage와 비슷한 구조로 되어 있다. ISCOM은 detergent를 함유하는 항원 용액에 용해성 Quil A와 여러 가지의 cholesterol, 인지질 등을 혼합한 후 detergent를 제거함으로써 Quil A와 cholesterol은 자연스럽게 결합되어 cage와 유사한 구조의 ISCOM을 형성한다. 여기에 소수성 단백질 transmembrane anchor membrane이 삽입되면 완전한 ISCOM 구조를 형성한다. 항원으로서 envelope 단백질은 소수성 transmembrane domain을 노출하기 때문에 ISCOM을 사용하면 우수한 효과를 기대할 수 있다. 그러나 용해성 단백질 항원은 노출된 소수성 부위를 갖고 있지 않으므로 ISCOM 구조와 잘 결합하지 않는다. 백신을 제조할 때 대부분 발현시스템에서 생산된 단백질은 배지중으로 분비되는 용해성 단백질로 소수성 anchor를 제거하게 된다. 이와 같은 방법은 재조합 단백질이 다량 생산되도록 해주지만 ISCOM을 이용할 수 없게 된다. 따라서 이러한 단점을 극복하기 위하여

소수성 anchor를 제거하지 않고 낮은 pH에서 단백질을 부분적으로 변성하여 소수성 부위가 노출되도록 연구하고 있지만 이는 단백질의 3차 구조가 변화되고 단백질과 ISCOM간의 결합 비율도 매우 낮아지기 때문에 잘 이용되지 않고 있다(61). 최근에는 공유결합에 의해 palmitic acid를 붙여 용해성 단백질의 ISCOM에 대한 결합을 유도함으로써 극복되어졌는데, 이 기술로 유전공학 기법으로 생산한 대량의 용해성 단백질과 ISCOM의 우수한 결합체를 얻을 수 있게 되었다. 이 외에도 항원단백질에 단백질 분비에는 방해되지 않으면서 ISCOM과 결합하기에 충분한 길이의 짧은 소수성 꼬리를 붙이는 방법도 시도되고 있다. 현재 이러한 실험은 유전자 재조합 등을 이용한 subunit 백신 개발에 대하여 면역반응을 향상시키는 adjuvant로 활용하는데 목적을 두고 진행 중이다(44).

ISCOM은 자체의 면역원성이 없을 뿐만 아니라 면역억제를 일으키지 않으므로 adjuvant나 carrier로서의 사용 목적에 적합하고, 개체에 부작용 없이 반복 투여가 가능하다. 최근의 가장 진보된 ISCOM은 envelope가 있는 바이러스에서 추출한 glycoprotein을 운반하는 system으로 사용하는 것인데, 이 system을 사용하면 influenza virus, FeLV 그리고 HIV의 gp120을 포함한 많은 바이러스에 대하여 면역반응을 크게 증가시킬 수 있다(27). 이 중 equine influenza와 FeLV 백신이 이미 시판되고 있다. ISCOM을 사용할 경우 체액성, 지연형 과민반응(hepersensitivity) 그리고 CTL의 세포성 면역반응이 유도된다. 또한 ISCOM을 경구 또는 생식기로 투여했을 경우에도 효과적인 면역반응을 유도할 수 있다. 또한 ISCOM이 사용된 단백질의 투여는 MHC class I, class II와 이에 대응하는 T세포 등에 의해 광범위한 면역반응을 유도하는 것으로 알려져 있다. 이와 같이 ISCOM에 의해 운반된 항원의 표현과정은 endocytic과 cytoplasmic 양쪽 경로를 통하여 이루어지는 것으로 추정되기 때문에, 항원에 대한 효과적인 면역반응의 개발에 ISCOM은 중요한 것으로 생각된다.

생분해성 microsphere adjuvant. 생분해성 microsphere adjuvant는 poly (lactic)/glycolic acid (PLGA), poloxamer, polyphosphazene, polyanhydrides 등으로 제조한다(62). 특히 PLGA는 그동안 봉합사로 사용되어 왔기 때문에 안전성의 문제점은 없으며 항원의 안정성에 대하여는 더 연구할 필요가 있다. 생분해성 microsphere의 adjuvant 효과는 근육 주사 후 수지상세포, 대식세포 등에 의한 탐식에 의해 일어난다(63). Microsphere는 항원을 점막표면의 항원제시세포로 운반하는 역할을 나타내는데 주사 및 서방출성 제제로의 제조가 가능하기 때문에 많은 주목을 받고 있다. 특히 microsphere는 10 um 이하의 크기여서 점막표면에 항원을 표적 지향적으로 전달할 수 있고,

점막 표면에 적용함으로써 효소, pH, 담즙산 등에 의한 분해를 방지할 수 있는 장점이 있다. 또한 서방출성이 가능하기 때문에 1차 투여 시 용량을 줄일 수 있어 부작용이 낮아지며 궁극적으로는 1회용 백신의 개발이 가능하다(64). 1회용 백신의 개발은 저개발국에서 백신 접종율의 향상을 가져올 것으로 기대되어 전염병 억제에 크게 기여할 수 있다. 대표적으로는 Thom BioScience LLC社가 PLG를 이용한 생분해성 microsphere adjuvant 연구를 하고 있으며, 이를 동물 주사제에 응용한 제품을 선보이고 있다. Poloxamer는 비이온성의 블록형 copolymer로 DNA와 결합하여 스스로 microsphere의 미셀을 만들어 세포막에 결합하는데, 생체에서 대사되지 않아 오랫동안 잔존할 수 있어서 DNA 백신에 유용할 것으로 보인다. 또한 세포 표면활성이 있어서 발현되는 항원과 결합하여 면역반응을 증강시키는 adjuvant로 작용한다. 현재 CytRx社의 CRL1005가 이러한 poloxamer를 이용한 백신을 개발 중이다.

전망 및 결론

최근 바이오 기술에 기반한 지속적인 신기술 개발로 백신도 단순한 질병 예방 뿐만 아니라 질병의 발생 또는 진행을 근절, 억제, 감소시키는 치료용 백신의 개발로 확대되고 있다. 백신관련 기술개발은 인체 면역계에 대한 이해의 증가와 함께 특허권을 수반하는 고부가가치 제품으로서 잠재력을 갖고 있는 분야로 인식되고 있다. 최근 산업화와 더불어 환경오염, 고령화 사회로의 진전으로 면역질환 유병률이 급속히 증가하고 있다. 이에 제약업체 뿐만 아니라 소규모의 벤처기업에서는 미래 가치에 대한 인식의 확산으로 백신과 adjuvant 등의 백신관련 기술과 상품에 대한 많은 연구 개발을 진행하고 있으며, 이미 400여종의 백신이 이용되거나 개발 중에 있다. 따라서 adjuvant 관련 시장은 곧 백신 시장과 동일하게 성장할 것으로 보인다. 전통적인 약물 개발에 비해 미약한 것으로 보이는 백신 시장은 세계적으로 2002년 50억 달러의 규모를 이루고 있으며, 연간 성장률은 10~15% 수준으로 예상되고 있다. 또한 SARS (severe acute respiratory syndrome)와 같이 최근 새로 출현한 감염에 대한 관심은 이러한 치명적일 수 있는 병원균에 대해 새로운 백신을 개발하는데 관심을 더욱 증폭시켰다. HIV와 같은 감염체는 이미 전세계적으로 4천2백만 명을 감염시키고 있어 미래의 새로운 백신에 대한 수요가 높다. 반면 HIV, 결핵, 말라리아 등의 항원 다양성 등으로 인해 진정한 제품 개발까지는 상당한 어려움을 극복해야 할 것으로 보인다. 또한 비강내 투여와 같은 전달 방식이 향상된 새로운 백신이나 새로 출현하는 질환에 대한 백신 등의 새로운 백신이 미래의 성장을 주도하게 될 것으로 여겨지며 전형적인 백신 시장 또한 지속적으로 성장할 것

으로 보인다.

이와 같은 백신 시장의 성장에도 불구하고 백신 개발과 직접적으로 관련된 adjuvant의 시장은 크게 성장되지 못했다. 기술개발을 위한 끊임없는 연구가 계속되어 왔으나 아직까지 인간 백신에 적용할 adjuvant는 소수에 불과하다. 최근에 이르러 유전공학 기술이 급속도로 발전하면서 면역반응에 대한 구체적인 작용기전이 밝혀질 것으로 예상되고 있으며, 이에 따라 학계에서도 면역반응에 관여하는 adjuvant 작용 기전에 대한 분자 수준에서의 이해, cytokine의 역할, 면역반응에 관여하는 다양한 세포의 이해, 질환과 인체 면역계와의 상호관계의 규명이 함께 이루어질 것으로 예상된다. 이러한 연구 성과는 면역반응을 선택적으로 조절할 수 있는 adjuvant의 개발을 가능하게 할 것이며, 특히 T세포를 선택적으로 조절함으로써 효과적인 치료 백신 개발을 가능하게 할 것이다. 또한 adjuvant의 작용기전에 대한 폭넓은 이해를 통해 AIDS와 같이 현재 치료 및 예방이 곤란한 질환을 정복할 수 있는 백신의 개발을 앞당길 것이다.

알루미늄염은 현재까지 안전성과 여러 항원들에 대한 면역원성의 증가가 입증되었기 때문에 앞으로도 계속 사용될 것이다. 특히 항체생성 유도만으로 예방 및 치료가 가능한 질환에 대해서는 기존의 알루미늄염이 adjuvant로 충분히 이용 가능하며 다만 adjuvant로서의 최적화에 대한 연구가 계속 이루어져야 할 것이다. 그러나 정제 백신, subunit 백신, 합성 백신 등에는 보다 강력한 작용을 갖는 adjuvant의 개발이 요구된다. 특히 cytotoxic T세포 반응과 같은 세포성 면역반응을 유도하지 못하는 알루미늄염의 단점 때문에 질병의 예방과 치료에 중요한 세포성 면역반응을 유도할 새로운 adjuvant가 개발되어야 할 것이다. 최근 QS-21, MF-59, MPL 관련 화합물, SAF-1, liposome, 생분해성 고분자 microsphere, cytokine 등이 세포성 면역을 유도할 수 있는 새로운 adjuvant로의 가능성을 보여주고 있고, 단백질-다당체 결합형 등 새로운 형태의 백신이 개발되면서 이 분야의 기술개발도 희망적이다.

참 고 문 헌

1. Ramon, G: Sur l'augmentation anormale de l'antitoxine chez les chevaux producteurs de serum antidiphtherique. Bulletin de Societe Centrale de Medicine Veterinaire 101;227-234, 1925
2. Ramon G: Procédres pour accroire la production des antitoxines. Ann Inst Pasteur 40;1-10, 1926
3. Glenny AT, Pope CG, Waddington H, Wallace V: The antigenic value of toxoid precipitated by potassium alum. J Path Bact 29;38-45, 1926
4. Freund J, Casals J, Hosmer EP: Sensitization and antibody formation bacilli and parafin oil. Proc Soc Exp Biol Med 37; 509-513, 1937
5. Johnson AG, Gaines S, Landy M: Studies on the O antigen of Salmonella typhosa V. Enhancement of antibody response to protein antigens by the purified lipopolysaccharide. J Exp Med

- 103;225-246, 1956
6. Ellouz F, Adam A, Ciorbaru R, Lederer E: Minimal structural requirements for adjuvant activity of bacterial peptidoglycan derivatives. *Biochem Biophys Res Commun* 59;1317-1325, 1974
 7. Masek K, Zaoral M, Jezek J, Straka R: Immunoadjuvant activity of synthetic N-acetyl muramyl dipeptide. *Experientia* 34;1363-1364, 1978
 8. Newman MJ, Wu YJ, Gardner BH, Munroe KJ, Leombruno D, Recchai J, Kensil CR, Coughlin RT: Saponin adjuvant induction of ovalbumin-specific CD8+ cytotoxic T lymphocyte responses. *J Immunol* 148;2357-2362, 1992
 9. Vogel FR, Powell MF: A summary compendium of vaccine adjuvants and excipients. In: Powell MF, Newman MJ eds.: *Vaccine design: The subunit and adjuvant approach*, New York, Plenum Publishing Corp., 1995
 10. Allison AC, Byars NE: Immunological adjuvants: Desirable properties and side-effects. *Molecular Immunology* 28;279- 284, 1991
 11. Alving CR: Design and selection of vaccine adjuvants: animal models and human trials. *Vaccine* 20 Supplement 3;S56-S64, 2002
 12. Gupta RK, Siber GR: Adjuvants for human vaccines--current status, problems and future prospects. *Vaccine* 13;1263-1276, 1995
 13. Wu JY, Gardner BH, Kushner NN, Pozzi LA, Kensil CR, Cloutier PA, Coughlin RT, Newman MJ: Accessory cell requirements for saponin adjuvant-induced class I MHC antigen-restricted cytotoxic T-lymphocytes. *Cell Immunol* 154; 393-406, 1994
 14. Kovacsics-Bankowski M, Rock KL: Presentation of exogenous antigens by macrophages: analysis of major histocompatibility complex class I and II presentation and regulation by cytokines. *Eur J Immunol* 24;2421-2428, 1994
 15. Relyveld EH: Detoxification of microbial toxins with glutaraldehyde and their use in the preparation of vaccines. In: Rosenberg P eds.: *Toxins: Animal, Plant and Microbial*, p1049-1065, Oxford, Pergamon Press, 1978
 16. Relyveld EH, Ben-Efraim S: Preparation of vaccines by the action of glutaraldehyde on toxins, bacteria, viruses, allergens and cells. In: Langone JJ, van Vunakis H eds.: *Methods in Enzymology*, p24-60, New York, Academic Press, 1983
 17. Michael JG, Pesce AJ, Flanagan M: Enhanced immunogenicity of cationized proteins. In: Spriggs DR, Koff WC eds.: *Topics in Vaccine Adjuvant Research*, p99-107, Boca Raton, CRC Press, 1991
 18. Herrington DA, Clyde DF, Losonsky G, Cortesia M, Murphy JR, Davis J, Baqar S, Felix AM, Heimer EP, Gillissen D, et al: Safety and immunogenicity in man of a synthetic peptide malaria vaccine against *Plasmodium falciparum* sporozoites. *Nature*. 16-22;257-259, 1987
 19. Nash H, Talwar GP, Segal SJ, et al: Observations on the antigenicity and clinical effects of a candidate anti-pregnancy vaccine: beta subunit of human chorionic gonadotropin linked to tetanus toxoid. *Fertil Steril* 34;328-335, 1980
 20. Robbins JB, Schneerson R: Polysaccharide-protein conjugates: a new generation of vaccines. *J Infect Dis* 161;821-832, 1990
 21. Crook SJ, Stewart R, Boggs JM, Vistnes AI, Zalc B: Characterization of anti-cerebroside sulfate antisera using a theoretical model to analyse liposome immune lysis data. *Mol Immunol* 24;1135-1143, 1987
 22. Linuma H, Nerome K, Yoshioka Y, Okinaga K: Characteristics of cytotoxic T-lymphocytes directed to influenza virus haemagglutinin elicited by immunisation with muramyl dipeptide-influenza liposome vaccine. *Stand J Immunol* 41;1-10, 1995
 23. Pardoll DM: Paracrine cytokine adjuvants in cancer immunotherapy. *Annu Rev Immunol* 13;399-415, 1995
 24. Heath AW, Playfair JHL: Cytokines as immunological adjuvants. *Vaccine* 10;427-434, 1992
 25. Edelman R: Vaccine adjuvants. *Rev infect Dis* 2;370-383, 1980
 26. Hunter RL: Overview of vaccine adjuvants: present and future. *Vaccine* 20;S7-S12, 2002
 27. Takahashi H, Takashita T, Morein B, Putney S, Germain RN, Berzofsky JA: Induction of CD8+ cytotoxic cells by immunization with purified HIV-1 envelope protein in ISCOMs. *Nature* 344;873-875, 1990
 28. Grun JL, Maurer PH: Different T helper cell subsets elicited in mice utilizing two different adjuvant vehicles: the role of endogenous interleukin 1 in proliferative responses. *Cell Immunol* 121;134-145, 1989
 29. Xu-Amano J, Kiyono H, Jackson RJ, Staats HF, Fujihashi K, Burrows PD, Elson CO, Pillai S, McGhee JR: Helper T cell subsets for immunoglobulin A responses: oral immunization with tetanus toxoid and cholera toxin as adjuvant selectively induces Th2 cells in mucosa associated tissues. *J Exp Med* 178;1309-1320, 1993
 30. Allison AC: The mode of action of immunological adjuvants. *Dev Biol Stand* 92;3-11, 1998
 31. Phillips NC, Emili A: Enhanced antibody responses to liposome-associated protein antigens: preferential stimulation of IgG2a/b production. *Vaccine* 10;151-158, 1992
 32. Bliss J, Van Cleave V, Murray K, Wiencis A, Ketchum M, Maylor R, Haire T, Resmini C, Abbas AK, Wolf SF: IL-12, as an adjuvant, promotes a T helper 1 cell, but does not suppress a T helper 2 cell recall response. *J Immunol* 156;887- 894, 1996
 33. McGhee JR: Helper T cell subsets for immunoglobulin A responses: oral immunization with tetanus toxoid and cholera toxin as adjuvant selectively induces Th2 cells in mucosa associated tissues. *J Exp Med* 178;1309-1320, 1993
 34. Brown WC, Woods VM, Chitko-McKown CG, Hash SM, Rice-Ficht AC: Interleukin-10 is expressed by bovine type 1 helper, type 2 helper, and unrestricted parasite-specific T-cell clones and inhibits proliferation of all three subsets in an accessory-cell-dependent manner. *Infect Immun* 62;4697-4708, 1994
 35. Gupta RK: Aluminum compounds as vaccine adjuvants. *Adv Drug Deliv Rev* 32;155-172, 1998
 36. C'Hagan DT, Jeffery H, Davis SS: Long-term antibody responses in mice following subcutaneous immunization with ovalbumin entrapped in biodegradable microparticles. *Vaccine* 11;965-969, 1993
 37. Sjolander A, Drane D, Maraskovsky E, Scheerlinck J, Suhrbier A, Tennent J, Pearse M: Immune responses to ISCOMw formulations in animal and primate models. *Vaccine* 19;2661- 2665, 2001
 38. Siber GR, Anderson R, Habafy M, Gupta RK: Development of a guinea-pig model to assess immunogenicity of Haemophilus influenzae type b capsular polysaccharide conjugate vaccines. *Vaccine* 13;525-531, 1995
 39. Gupta RK, Anderson R, Cecchini D, Rost B, Griffin P Jr, Benschoter K, Xu J, Montanez-Ortiz L, Siber GR: Development of a guinea-pig model for potency/ immunogenicity evaluation of diphtheria, tetanus acellular pertussis (DTaP) and Haemophilus influenzae type b polysaccharide conjugate vaccines. *Dev Biol Stand* 86;283-296, 1996
 40. Glenny AT, Buttle GAH, Stevens MF: Rate of disappearance of diphtheria toxoid injected into rabbits and guinea-pigs: toxoid precipitated with alum. *J Pathol* 34;267-275, 1931
 41. Maschmann E, Küster E, Fischer W: Über die Fähigkeit des Tonerde-Präparates B, Diphtherie-Toxin zu adsorbieren. *Ber Dtsch Chem Ges* 64;2174-2178, 1931
 42. Ericsson H: Purification and adsorption of diphtheria toxoid. *Nature* 158;350-351, 1946
 43. Mancino D, Ovary Z: Adjuvant effects of amorphous silica and

- of aluminium hydroxide on IgE and IgG1 antibody production in different inbred mouse strains. *Int Arch Allergy Appl Immun* 61;253-258, 1980
44. Barr IG, Sjolander A, Cox JC: ISCOMs and other saponin based adjuvants. *Adv Drug Deliv Rev* 32;247-271, 1998
 45. Claassen E, Boersma WJA: Characteristics and practical use of new-generation adjuvants as an acceptable alternative to Freund's complete adjuvant. *Res Immunol* 143;475-477, 1992
 46. Lewis PA, Loomis D: Allergic irritability. The formation of anti-sheep hemolytic amboceptor in the normal and tuberculous guinea pig. *J Exp Med* 40;503, 1924
 47. Lefrancier P, Derrien M, Lederman I, Niff F, Choay J, Lederer E: Synthesis of some new analogs of the immunoadjuvant glycopeptide MDP (Nacetyl-muramyl-L-alanyl- Disoglutamine). *Int J Pep Prot Res* 11;289-296, 1978
 48. Cohen LY, Bahr GM, Darcissac EC, Parant MA: Modulation of expression of class II MHC and CD40 molecules in murine B cells by various muramyl dipeptides. *Cell Immunol* 169;75-84, 1996
 49. Johnson AG, Tomai MA: A study of the cellular and molecular mediators of the adjuvant action of a nontoxic monophosphoryl lipid A. *Adv Exp Med Biol* 256;567-579, 1990
 50. Ulrich JT, Myers KR: Monophosphoryl lipid A as an adjuvant: past experiences and new directions. *Pharm Biotechnol* 6; 495-524, 1995
 51. Dalsgaard K: A study of the isolation and characterization of the saponin quil A. Evaluation of its adjuvant activity, with a special reference to the application in the vaccination of cattle against foot-and-mouth disease. *Acta Vet Stand* 69;1-40, 1978
 52. Nunberg J, Doyle MV, York SM, York CJ: Interleukin 2 acts as an adjuvant to enhance the potency of inactivated rabies vaccine. *Proc Natl Acad Sci USA* 86;4240-4243, 1989
 53. Odean MJ, Frane CM, Van der Vieren M, Tomai MA, Johnson AG: Involvement of gamma interferon in antibody enhancement by adjuvants. *Infect Immun* 58;427-432, 1990
 54. Luis C, Afonso C, Scharton TM, Vieira LQ, Wysocka M, Trinchieri G, Scott P: The adjuvant effect of interleukin-12 in a vaccine against *Leishmania major*. *Science* 263;235-237, 1994
 55. Le Moignic, Pinoy: Application to man of vaccines consisting of emulsions in fatty substances (lipo-vaccines). *Comp Rend Sot Biol* 29;352-358, 1916
 56. Dupuis M, Murphy TJ, Higgins D, Ugozzoli M, Van Nest G, Ott G, McDonald DM: Dendritic cells internalize vaccine adjuvant after intramuscular injection. *Cell Immunol* 186;18- 27, 1998
 57. Shahum E, Therien HM: Liposomal adjuvant activity: effect of encapsulation and surface-linkage on antibody production and proliferative response. *Int J Immunopharmacol* 17;9-20, 1995
 58. Powers DC, Manning MC, Hanscome PJ, Pietrobon PJF: Cytotoxic T lymphocyte responses to a liposomeadjuvanted influenza A virus vaccine in the elderly. *J Infect Dis* 172; 1103-1107, 1995
 59. Gluck R, Mischler R, Brantschen S, Just M, Althaus B, Cryz SJ Jr: Immunopotentiating reconstituted influenza virus virosome vaccine delivery system for immunization against hepatitis A. *J Clin Invest* 90;2491-2495, 1992
 60. Gkic R, Mischler R, Finkel B, Que JU, Scarpa B, Cryz SJ Jr: Immunogenicity of new virosome influenza vaccine in elderly people. *Lancet* 344;160-163, 1994
 61. Liivgren-Bengtsson K, Sjblander A: Adjuvant activity of iscoms; effect of ratio and co-incorporation of antigen and adjuvant. *Vaccine* 14;753-760, 1996
 62. Men Y, Gander B, Merkle HP, Corradin G: Induction of sustained and elevated immune responses to weakly immunogenic synthetic malarial peptides by encapsulation in biodegradable polymer microspheres. *Vaccine* 14;1442-1450, 1996
 63. Shahin R, Leef M, Eldridge J, Hudson M, Gilley R: Adjuvant activity and protective immunity elicited by Bordetella pertussis antigens encapsulated in poly (DL-lactide-co- glycolide) microspheres. *Infect Immun* 63;1195-1200, 1995
 64. Aguado MT, Lambert PH: Controlled-release vaccines- biodegradable polylactide/polyglycolide (PUPG) microspheres as antigen vehicles. *Immunobiology* 184;113-125, 1992
 65. Cox JC, Coulter AR: Adjuvants—a classification and review of their modes of action. *Vaccine* 15;248-256, 1997
 66. Gupta RK, Siber GR: Comparison of adjuvant activities of aluminum phosphate, calcium phosphate and stearyl tyrosine for tetanus toxoid. *Biologicals* 22;53-63, 1994
 67. Chu RS, Targoni OS, Krieg AM, Lehmann PV, Harding CV: CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. *J Exp Med* 186;1623-1631, 1997
 68. Schneerson R, Fattom A, Szu SC, Bryla D, Ulrich JT, Rudbach JA, Schiffman G, Robbins JB: Evaluation of monophosphoryl lipid A (MPL) as an adjuvant. Enhancement of the serum antibody response in mice to polysaccharide- protein conjugates by concurrent injection with MPL. *J Immunol* 147;2136-2140, 1991
 69. Holmgren J, Lycke N, Czerkinsky C: Cholera toxin and cholera B subunit as oral-mucosal adjuvant and antigen vector systems. *Vaccine* 11;1179-1184, 1993
 70. Okahashi N, Yamamoto M, Vancott JL, Chatfield SN, Roberts M, Bluethmann H, Hiroi T, Kiyono H, McGhee JR: Oral immunization of interleukin-4 (IL-4) knockout mice with a recombinant *Salmonella* strain or cholera toxin reveals that CD4+ Th2 cells producing IL-6 and IL-10 are associated with mucosal immunoglobulin A responses. *Infect Immun* 64; 1516-1525, 1996
 71. Lycke N, Tsuji T, Holmgren J: The adjuvant effect of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins is linked to their ADP-ribosyltransferase activity. *Eur J Immunol* 22; 2277-2281, 1992
 72. de Haan L, Holtrop M, Verweij WR, Agsteribbe E, Wilschut J: Mucosal immunogenicity of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin: role of the A subunit. *Vaccine* 14;260-266, 1996
 73. Chong C, Friberg M, Clements JD: LT(R192G), a non-toxic mutant of the heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*, elicits enhanced humoral and cellular immune responses associated with protection against lethal oral challenge with *Salmonella* spp. *Vaccine* 16;732-740, 1998
 74. Roberts M, Bacon A, Rappuoli R, Pizza M, Cropley I, Douce G, Dougan G, Marinaro M, McGhee J, Chatfield S: A mutant pertussis toxin molecule that lacks ADP-ribosyltransferase activity, PT-9K/129G, is an effective mucosal adjuvant for intranasally delivered proteins. *Infect Immun* 63;2100-2108, 1995
 75. Mu HH, Sewell WA: Regulation of DTH and IgE responses by IL-4 and IFN-gamma in immunized mice given pertussis toxin. *Immunology* 83;639-645, 1994
 76. Ellouz F, Adam A, Ciobaru R, Lederer E: Minimal structural requirements for adjuvant activity of bacterial peptidoglycan derivatives. *Biochem Biophys Res Commun* 59;1317-1325, 1974
 77. Lindblad EB, Elhay MJ, Silva R, Appelberg R, Andersen P: Adjuvant modulation of immune responses to tuberculosis subunit vaccines. *Infect Immun* 65;623-629, 1997
 78. Putkonen P, Nilsson C, Walther L, Ghavamzadeh L, Hild K, Broliden K, Biberfeld G, Thorstensson R: Efficacy of inactivated whole HIV-2 vaccines with various adjuvants in cynomolgus monkeys. *J Med Primatol* 23;89-94, 1994
 79. Dupuis M, Murphy TJ, Higgins D, Ugozzoli M, Van Nest G, Ott G, McDonald DM: Dendritic cells internalize vaccine adjuvant after intramuscular injection. *Cell Immunol* 186;18- 27, 1998
 80. Kahn JO, Sinangil F, Baenziger J, Murcar N, Wynne D, Coleman

- RL, Steimer KS, Dekker CL, Chernoff D: Clinical and immunologic responses to human immunodeficiency virus (HIV) type 1SF2 gp120 subunit vaccine combined with MF59 adjuvant with or without muramyl tripeptide dipalmitoyl phosphatidylethanolamine in non-HIV-infected human volunteers. *J Infect Dis* 170;1288-1291, 1994
81. Ott G, Barchfeld GL, Van Nest G: Enhancement of humoral response against human influenza vaccine with the simple submicron oil/water emulsion adjuvant MF59. *Vaccine* 13; 1557-1562, 1995
 82. Gupta RK, Relyveld EH, Lindblad EB, Bizzini B, Ben-Efraim S, Gupta CK: Adjuvants-a balance between toxicity and adjuvanticity. *Vaccine* 11;294-306, 1993
 83. Byars NE, Fraser-Smith EB, Pecyk RA, Welch M, Nakano G, Burke RL, Hayward AR, Allison AC: Vaccinating guinea pigs with recombinant glycoprotein D of herpes simplex virus in an efficacious adjuvant formulation elicits protection against vaginal infection. *Vaccine* 12;200-209, 1994
 84. Putkonen P, Nilsson C, Walther L, Ghavamzadeh L, Hild K, Broliden K, Biberfeld G, Thorstensson R: Efficacy of inactivated whole HIV-2 vaccines with various adjuvants in cynomolgus monkeys. *J Med Primatol* 23;89-94, 1994
 85. Sjolander A, van't Land B, Lovgren Bengtsson K: Iscoms containing purified Quillaja saponins upregulate both Th1-like and Th2-like immune responses. *Cell Immunol* 177;69-76, 1997
 86. Richards RL, Rao M, Wassef NM, Glenn GM, Rothwell SW, Alving CR: Liposomes containing lipid A serve as an adjuvant for induction of antibody and cytotoxic T-cell responses against RTS,S malaria antigen. *Infect Immun* 66;2859-2865, 1998
 87. Fernandes I, Frisch B, Muller S, Schuber F: Synthetic lipopeptides incorporated in liposomes: in vitro stimulation of the proliferation of murine splenocytes and in vivo induction of an immune response against a peptide antigen. *Mol Immunol* 34;569-576, 1997
 88. Men Y, Gander B, Merkle HP, Corradin G: Induction of sustained and elevated immune responses to weakly immunogenic synthetic malarial peptides by encapsulation in biodegradable polymer microspheres. *Vaccine* 14;1442-1450, 1996
 89. Neuzil KM, Johnson JE, Tang YW, Prieels JP, Slaoui M, Gar N, Graham BS: Adjuvants influence the quantitative and qualitative immune response in BALB/c mice immunized with respiratory syncytial virus FG subunit vaccine. *Vaccine* 15;525-532, 1997
 90. Hunter RL, McNicholl J, Lal AA: Mechanisms of action of nonionic block copolymer adjuvants. *AIDS Res Hum Retroviruses* 10 Suppl 2;S95-S98, 1994
 91. Newman MJ, Todd CW, Lee EM, Balusubramanian M, Didier PJ, Katz JM: Increasing the immunogenicity of a trivalent influenza virus vaccine with adjuvant-active nonionic block copolymers for potential use in the elderly. *Mech Ageing Dev* 93;189-203, 1997
 92. Fast DJ, Vosika GJ: The muramyl dipeptide analog GMTP-N-DPG preferentially induces cellular immunity to soluble antigens. *Vaccine* 15;1748-1752, 1997
 93. Bahr GM, Darcissac E, Bevec D, Dukor P, Chedid L: Immunopharmacological activities and clinical development of muramyl peptides with particular emphasis on murabutide. *Int J Immunopharmacol* 17;117-131, 1995
 94. Payne LG, Jenkins SA, Woods AL, Grund EM, Geribo WE, Loebelenz JR, Andrianov AK, Roberts BE: Poly [di(carboxylatophenoxy)phosphazene] (PCPP) is a potent immunoadjuvant for an influenza vaccine [In Process Citation]. *Vaccine* 16;92-98, 1998
 95. Payne LG, Jenkins SA, Andrianov A, Roberts BE: Water-soluble phosphazene polymers for parenteral and mucosal vaccine delivery. *Pharm Biotechnol* 6;473-493, 1995
 96. Johnson AG: Molecular adjuvants and immunomodulators: New approaches to immunization. *Clin Microbiol Rev* 7;277-289, 1994
 97. Harrington DG, Crabbs CL, Hilmas DE, Brown JR, Hibbee GA, Cole FE Jr, Levy HB: Adjuvant effects of low doses of a nuclease resistant derivative of polyinosinic acid:polycytidylic acid on antibody responses of monkeys to inactivated Venezuelan equine encephalomyelitis virus vaccine. *Infect Immun* 24;160-166, 1978
 98. O'Hagan DT, MacKichan ML, Singh M: Recent developments in adjuvants for vaccines against infectious diseases. *Biomolecular Engineering* 18;69-85, 2001
 99. Singh M, O'Hagan DT: Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. *International J Parasitol* 33;469-478, 2003