



## Ⅱ DNA vaccine의 研究・開發 動向 2 (R & D trends of DNA vaccines)

〈 지난호에 이어 〉

### III. DNA vaccine의 基本的 構成要素 (20,26)

DNA vaccine은 3가지 근본적인 구성요소로 이루어져 있다. 그 모든 것은 개발의 약진에 대한 도전과 기회를 제공하는 것이다.

#### 1) Vaccine vector :

특수한 질병과 관련된 Ag단백질을 산생하게끔 design된 DNA단편을 생체내에 주입(접종)하기 위한 DNA vaccine은 virus vector(27)를 이용하기도 하나, 그 대부분은 bacteria의 plasmid를 vector(媒體)로 사용한다(pDNA). 충분한 량의 DNA가 세포내에 주입되면 그 세포는 Ag단백질을 산생할 것이며, 목적으로 하는 Ab 및 T세포 면역응답을 촉발한다. 치료용 vaccine의 목표는 관련 병원체에 감염된 세포 또는 암세포를 죽이게끔 면역계를 자극하는 것이다. 예방용 vaccine은 해당 질병에 대한 앞으로의 방어를 제공하기 위해 당해 Ag에 대한 면역학적 기억(immunological memory)을 면역계로 하여금 보유케 하는 것이다.

#### 2) Delivery method (傳達方法) :

과학자들은, 의도된 Ag단백질을 산생시키기 위해 생체내 세포속으로 DNA vaccine을 전달하기 위한 서로 상이한 접근방법을 실험하였다. 그러나 이 분야에서의 진전된 안전성, 효능성 및 비용 효과적인 DNA vaccine전달방법의 결여때문에 기대하는 효과를 보지못하였다는 것이다. 사실 원치않는 면역응답이나 다른 독성의 야기없이 목적하는 면역응답이 이루어지게끔 하는 세련된 전달방법이 확립되어야 하였든 것이다.

#### 3) Adjuvant (免疫增強劑; 賦形劑) :

Adjuvant라는 용어는 Latin어의 'adjuvare' (도움의 뜻)로부터 유래되었다. 면역학적 adjuvant는 특이적인 vaccine Ag과 조합하여 사용되었을 때, Ag특이적 면역응답을 촉진하거나 지속시키게끔 작동하는 어떤 물질이라고 정의하고 있다. 많은 단백질Ag은, 그들의 인식을 위한 환경을 갖출 수 있는 화합물의 첨가없이는 면역계에 의해서 약하게 인식될 뿐이다. immunoadjuvant는 전형적으로 생체가 어는 Ab나 T세포를 지시할 것인가 하는 표적을 식별하는데 도움을 주는 면역계에 '위험신호'를 만들게 하는 것이다.

## IV. DNA vaccine의 作成: (19,28~36)

DNA vaccine의 vector로서 adenovirus 등 몇가지 virus들이 vector(26)로 사용되기도 하지만, 현재의 경향은 주로 bacteria의 plasmid를 그 vector로 사용하여 그 효능을 높이고 있다.

DNA-based vaccine의 접종에 사용되는 발현plasmid는 정상적으로 2개 unit를 포함한다. Ag expression unit는 promoter/enhancer sequence로 구성되는데, Ag의 encoding 및 poly-adenylation sequence로 이루어지며, production unit는 plasmid의 증폭과 선발에 필요한 bacteria의 sequence로 구성된다. Vaccine insert와 더불어 plasmid의 작성은 재조합 DNA기술을 사용하여 성취시킨다.

한번 작성되면 그 vaccine plasmid는 세균세포내에서 transformation(形質轉換)되며, 그 세균의 배양으로 다수의 plasmid copy들을 생산한다. 다음 plasmid DNA는 훨씬 그 량이 많은 세균의 DNA와 기타 불순물로부터 circular plasmid들을 순수(정제)분리한다. 이들 순화된 pDNA들이 vaccine으로 사용되는 것이다(25).

### 1) Plasmid DNA vaccine vector design: (19,37~40)

현대의 vaccine design은 기존 vaccine의 한계를 극복하기 위한 여러 도전에 직면하고 있다. 복잡한 감염병을 다루기 위해서는, 신세대 vaccine은 flu virus나 HIV와 같은 전형적인 유전적진화를 다루기 위한 cross strain처리 가능성을 지녀야 한다.

새로운 vaccine은 감염병을 방어할 뿐만아니라 T세포응답을 야기함으로써, 감염 또는 변이된 세포를 사멸시킬 수 있어야 한다. 이와 같은 vaccine은 암세포, HCV 및 HIV 등을 다루는 것이 가능할 것이다. 잠재적인 여러 이점을 발휘할 수 있는 해결책은 복잡함 DNA-based vaccine을 design하는 능력에 달려있다고 볼 수 있다.

DNA vaccine은, 고도로 활성적인 expression vector를 사용하였을 때 최상의 면역응답을 야기한다. 목표로 하는 gene (또는 상보적DNA)의 생체내(in vivo) 轉寫(transcription) 및 翻譯(translation)을 진행시키기 위해서는 강력한 virus promoter로 구성되는 plasmid DNA (pDNA)여야 한다.

pDNA는 면역원(immunogen)이 발현되는 'vehicle'(媒介體)이므로, 최상의 단백질발현을 위한 vector design을 최고로 활용하는 것이 필수적이다.

단백질발현을 촉진하는 한가지 방도는 진핵세포를 위한 병원성 mRNA의 codon사용을 최고로 활용하는 것이기도 하다. 분비되거나 또는 形質膜結合Ag은 cytosol성 Ag보다 Ab응답을 야기

하는데 있어 더욱 효과적이며, 한편 세포독성T세포(CTL)응답은 세포질봉괴를 위한 표적Ag에 의해서, 또한 MHC class I 경로속으로 들어감으로써 증진될 수 있으며, 이것은 흔히 N-terminal ubiquitin signal의 附加에 의해서 성취될 수 있다.

단백질의 配座(conformation)는 또한 virus입자처럼 정연한 구조를 지니는 것이 非整然性 구조보다 더욱 유효하게 Ab응답의 효능을 갖는다는 것이다.

Inovio사가 산생하는 DNA vaccine은 필요한 T세포응답을 야기하게끔 design되고 있는 것으로, 그 공정에는 광범위한 유전적 data, 세련된 algorithm 및 초강력 computing과정과 아울러 bioinformatics를 이용하고 있어, 상이한 virus의 subtype 혹은 HIV, HCV, HPV 및 flu virus 등의 분류group을 뛰어넘어 합성으로 다듬어진 Ag과 gene sequencing이 가능하다는 것이다.

Inovio Pharmaceuticals, Inc.(InovioP)가 개발한 ‘SynCon™ DNA Vaccine Platform’ (41)에 의한 vaccine construct는 유전적 Shift(大變異) 및 drift(小變異)에 대한 해결방법을 제공할 것이며, 그와 같은 변이는 이들 감염병에서 전형적인 virus의 unmatched(非合致의) strain들과 투쟁할 수 있다는 것이다.

BIA Separations사의 manager인 Dr. Peterka는, large size, negative charge, 상이한 수준의 coiling 및 supercoiling 등의 상태를 지니는 plasmid의 순화-정제에 대한 도전을 논하고 있다. Plasmid는 wet biomass의 0.5%이하로 존재하며, endotoxin 및 다른 불순물들을 반드시 제거해야 한다는 것이다. 그들의 size 때문에 plasmid는 溶劑를 통해서 천천히 확산되며, 만약 pore size(孔徑)가 너무 작으면, 그들은 chromatography beads속에 쉽사리 침투할 수 없다는 것이다. 대부분의 chromatography media는 단백질의 응용에 활용되고 있으므로, virus입자 및 plasmid는 bead의 외부에 접촉하는 경향이 있어 bead들의 흡착능력을 크게 감소시킨다는 것이다. 한편, monolithic(單一結晶體性) column이 plasmid의 분리에 훨씬 적합하다고 Dr. Peterka는 말하고 있다.

커다란 flow-through channel (1.5 $\mu$ m) 및 고도의 표면접근 가능성으로 그 column은 ‘mega-molecular purification’에 유용하다는 것이다. 그들은 전략적 계획하에서 선택적침전법, negative ion exchange chromatography 및 친수성상호작용chromatography법에 집중하고 있다고 말하고 있다.

BIA Separations사는 선택적 purification제로 CaCl<sub>2</sub>를 사용하며, 핵산의 분리는 CIM (convection interaction media) DEAE-tube monolithic column을 사용하여 성취한다는

것이다. 이 column은 peptide와 같은 저분자뿐만 아니라 단백질 또는 DNA와 같은 고분자물질의 신속하고 유효한 분리에 이용될 수 있다고 한다. Supercoil되거나 open된 circular pDNA의 효과적인 분리는 CIM C4 HLD-1 tube monolithic column을 활용할 수 있으며, 8,000ml column을 사용할 경우 pDNA 48g을 정제할 수 있다고 한다.

이들의 CIM pDNA purification process는 모든 오염물의 99%이상을 신속히 제거할 수 있으며, 고도의 결합능력과 낮은 buffer소비량과 더불어 고도의 생산성을 초래하여 경제성이 매우 높다는 것이다.

Althea Technologies사도 또한 plasmid design 및 생산에 대한 service를 제공하고 있으며, 생물학적 공정개발(biological process development)에 있어서의 핵심적 능력을 소유하고 있다고 Dr. Marquet는 말하고 있다.

이 회사의 원래의 목표는 임상적응용에 적합한 공정을 실행하는 것으로, plasmid제조에 있어 200~500mg/L에서 2gm/L로 증산시키는 pDNA vaccine의 고농도세포량의 발효 및 순화정제공정을 개발하였다는 것이다. 이 공정은 lot size를 pDNA 30g 크기로까지 생산시키는 다양한 GMP로 성공하고 있다고 한다.

이 회사는 또한 endotoxin (<0.1 EU/mg) 및 RNA level 모두에서 부가적인 log감소를 초래하게끔 processing하고 있다고 말하고 있다. Nature Technology사는, DNA vaccine vector로서 antibiotic-free plasmid를 개발하였다고 한다.

사실 antibiotics의 선택은 plasmid vector(bacteria)의 발육 및 분리의 조작에 있어 표준적인 접근방법이다, 그러나 대규모의 project가 요구될 경우 과비용적이며, plasmid를 존속시키기 위해 antibiotics에 계속 노출시켜야 하는 불이익이 있는 것이다.

따라서 규제기관의 'gene-based therapeutic protocol'에서는 antibiotic-resistance marker의 제거를 권장하고 있다.

이 규정과 관련하여 이 회사는 효소 levansucrase를 encoding하는 SacB gene의 이점을 취하였다고 한다.

이 효소의 활성은 대부분의 Gram-negative bacteria를 위한 sucrose의 존재하에서 致死的이다. Media에 sucrose를 첨가하고, chromosome-encoded SacB gene을 지니는 host strain의 발현을 억제하는 150bp antisense RNA를 encoding하게끔 plasmid를 개변시킴으로써 SacB gene의 발현을 중단시키는 것이 가능하다는 것이다. 그와 같은 plasmid의 유지를 선택함으로써 antibiotics의 사용을 피하는 것이다.

## 2) DNA vaccine의 傳達方法(delivery method) : (42~51)

Vaccine접종법은 역사적으로 사람이나 동물에서의 감염병을 예방하기 위한 가장 중요한 방법의 한가지였다. DNA vaccine은 다수의 상이한 방법으로 숙주의 생체조직내로 도입될 수 있다. 초창기에는 DNA vaccine이 함유된 식염수를 근육내에 직접 주사하거나 ‘gene gun’ 장치에 의한 전달법이 주로 사용되었었다.

pDNA vaccine은 제조에 있어서의 안전성, 관용성 및 실행가능성 등의 점에서 기존vaccine에 비해 몇가지 이점을 제공할 수 있음에도 불구하고, 빈약한 면역원성 때문에 상당기간에 걸쳐 더 많은 연구성취를 필요로 하였던 것이다. 성공적인 DNA vaccine의 접종조작에 대한 커다란 방해물은 숙주조직으로 하여금 pDNA의 충분한 취입을 성취시키는데 있어서의 실패였다. 이 문제는 10여년전에 다수의 임상시험을 좌절시켰던 것이다.

그와 같은 문제점은 현재 electroporation(EP)이라고 하는 transfection기법의 진전을 통해서 해결된 것이다. 사실 nonviral gene transfer에 있어서 흥미로운 일은 EP기술이 세련되고 최대활용성을 초래케 하였으며, 최근의 연구들은 EP기술이 인간을 포함한 많은 생물종에 성공적으로 사용 수 있음을 밝히고 있다(52). Inovio사는 임상용의 전기pulse generator 및 needle-electrode applicator로 구성된 EP-based DNA delivery system의 여러 종류를 개발하였다. 일례로 非人間靈長類를 사용한 preclinical test는 Inovio사의 기술이 DNA vaccine의 효능을 200배 또는 그 이상 증가시켰음을 나타내었다고 한다(53).

최근의 연구data는 액성(humoral)의 Ab와 세포성(cellular)의 면역응답 모두를 자극하는 유용한 전략으로서 EP전달법이 천거되고 있다. Preclinical trial에서 이 전달방법은 prime-boost combination (初回-追加配合接種) protocol에서 성공적으로 사용되었으며, 그 효능이 1st phase clinical trial에서 입증되었다고 한다. 이 전달기법은 그후 더욱 진전되었으며, 인의분야 뿐만 아니라 수의분야에서의 실제적 응용이 기대되고 있다.

Inovio Pharmaceuticals, Inc.(InovioP)사의 Dr. Broderick는, ‘minimally invasive EP device’의 개발을 적극적으로 추구하였으며, 이 장치로 pDNA는 표준 syringe와 needle을 통하여 전달되는 것으로, 숙주조직에 전극이 적용됨으로써 순간적인 전기pulse가 작동되어 주로 세포막을 開孔하는 channel을 만들어 선택된 Ag에 대응하는 gene을 지닌 vector의 진입을 허용하는 것이라고 말하고 있다. 초기의 EP기법은 근육조직내 전달을 택하였으나, 그후 심도있는 연구에 의해, 피부조직이 근육보다 매력적임이 밝혀졌다고 한다. ‘Minimally invasive dermal EP device’를 사용하여 면역응답뿐만 아니라 gene-expression level도 강력한 세포성 및 액

성 면역응답을 야기시킨다고 그녀는 말하고 있다. Inovio사의 이 전달장치로 DNA vaccine의 전달이 치사적인 flu virus challenge에 대응하여 mouse들을 어떻게 100% 방어하였는 가를 그녀는 설명하고 있다. DNA vaccine의 design, 개발 및 전달기법에 있어서의 선두주자라고 할 수 있는 InovioP사는 최근 휴대용으로 cord없이 手動으로 조작할 수 있는 손바닥 크기만 한 'Collectra-SP' 라는 EP device를 개발하였다고 발표하였다. 이 장치는 이동성이 빈약한 기존의 EP device에 비하여 集團免疫措置에서 DNA vaccine을 투여하는데 있어 매우 적합하다는 것이다(54).

EP기법에 의한 DNA vaccine의 전달방법을 약설하면 다음과 같다.

i) DNA vaccine이 들어있는 syringe와 電極針을 선정된 부위(피부 또는 근육)에 삽입한 다음, DNA vaccine을 주입(접종)한다. ii) Millisecond(1/1,000초)로 제어된 전기pulse를 전극침에 작동시켜 전계(electrical field)를 형성케 한다.

iii) 전계형성은 세포막에 일시적으로 침투성이 증진되는 구멍을 만들므로써 상당량의 DNA vaccine이 세포내로 유입되게 한다. 그 구멍은 짧은 시간내에 다시 매워져, 세포는 전연 손상을 잃지 않는다는 것이다. iv) 세포내에 trap된 그 DNA는 암화세포나 HIV와 같은 만성감염병을 제어하게끔 design된 Ag를 산생하도록 세포를 작동시키며, 그 Ag는 질병을 예방하게끔 Ab산생을 촉발시킨다는 것이다. EP device에 의한 pDNA vaccine전달은 다음과 같은 특성을 발휘한다고 한다. i) 이 system은 cell cycle의 어느 단계에서든, 그리고 어떤 cell type에도 사용이 가능하다. DNA vaccine과 같은 생물학적물질의 세포내 취입을 극적으로 증진시킨다. (pDNA vaccine의 경우 기존의 방법보다 1,000배 또는 그 이상을 세포내로 전달하는 것을 촉진할 수 있다고 한다). ii) 다수의 gene을 포함한 매우 큰 DNA배열도 전달이 가능하다. iii) 세포내로의 pDNA의 안전한 移入을 용이하게 한다. 다른 전달방법에 비하여 EP공정에서 발생하는 전기 pulse는 다만 몇 millisecond 동안 생체내에서 지속될 뿐이다.

iv) 취입되어 세포내에 머물러있던 plasmid 자체는 결국 대사작용으로 사라지게 된다. v) 숙주 염색체에서 검출되지 못할 수준으로 융합이 이루어질 수 있으나 변이의 위험은 무시할 정도이다.

vi) 안전성이 적은 naked(裸狀) DNA의 주입에 비하여 EP system은 100배 또는 그 이상의 pDNA의 transgene 발현을 증시킨다고 한다.

vii) 견고한 T-cell 응답이 까다로운 Ag이 접종된 대동물에서도 성취된다. viii) EP기법과 연관되어 사용되는 pDNA는 제조상의 복잡성 없이 용이하게, 그리고 비용효과적으로 제조될 수 있다. ix) 전달기전에 따른 원치않는 면역응답을 야기하지 않으므로 vaccine의 반복투여 즉,

booster shot(추가접종)를 시행할 수 있다. x) EP 그 자체가 생체의 면역계에 의해서 검출될 수 있는 필요한 '위험신호'를 촉진하는 adjuvant로 작동한다. xi) EP system은 안전성, 효능 및 경제성의 기준에 부합하는 유일한 전달방법이라는 衆評이다.

### 3) Immunoadjuvant(免疫增強劑): (55~65)

면역증강 또는 조절제로서 adjuvant는 vaccine Ag에 대응하는 면역응답을 증진시키기 위해 오랫동안 기존 vaccine에 사용되어 왔다. Vaccine formula에 adjuvant를 혼합하여 사용함으로써 원하는 특이적인 면역응답을 촉진시키거나 지속시키는 것이 그 목적이다.

Vaccine에 대한 면역응답을 강화시키기 위해 사용되는 adjuvant는 현대의 vaccine개발에 있어서는 필수적인 것이다. Genetic 또는 immunoadjuvant는 cytokine, chemokine 및 costimulating molecule(共刺戟分子)과 같은 생물학적 활성분자를 encoding하는 발현vector라고 볼 수 있다. DNA vaccine formulation에서 cytokine의 co-delivery는 광범위한 감염성 및 기생충성 질병에서 방어적이라고 알려진 T-cell subset응답을 촉진시키기 위해 널리 사용되고 있는 것이다.

Adjuvant의 이점에는, Ag의 면역원성의 향상, 면역응답 성상의 수식, 성공적인 면역조작에 필요한 Ag량의 감소 등이 포함된다. 필요한 booster(추가) 면역조작의 빈도감소 및 노약자나 免疫抵抗性減弱(immunocompromized)개체에 대한 vaccine접종에서의 면역응답증진이 포함된다. 즉, adjuvant는 원하는 면역응답을 최대한으로 活用하기 위해 사용된다.

Ab 즉, Ig(immunoglobulin) class 및 CTL(Th1, Th2)응답야기의 관점에서, 또한 어떤 adjuvant는 점막표면에서의 Ig응답을 증진시키기 위해 사용되기도 한다.

지난 날 대동물종에서나 인간에게서 면역응답을 유발시키는데 있어서 DNA vaccine의 비교적 낮은 효능은 그들의 실제적 사용을 감소시켰다. DNA vaccine의 전달증진에 경주된 상당한 노력에도 불구하고 다만 소량의 Ag이 DNA vaccine접종에 뒤이은 면역의 유발에 이용되었을 뿐이다. 그러나 그 후 vaccine adjuvant에 대한 관심과 흥미는 몇가지 이유로 급속히 증대되었다. 분자생물학 및 생물공학의 진전은 각가지 adjuvant와 DNA vaccine에서 Ag응답을 증가시키는 면역학적제제의 응용을 촉진하게 하였든 것이다. 사실 많은 예에서 그들 vaccine의 낮은 면역원성 때문에 vaccine은 adjuvant를 필요로 하였다. 분석생화학, 고(거대)분자의 순화(정제) 및 재조합분야에서의 새로운 기술과 면역학적 기전, 질병의 發症病理(pathogenesis)의 더욱 훌륭한 이해는 adjuvant의 개발과 응용에 대한 기술적기초를 확립시킬 것으로 믿어진다.

Adjuvant는 그 유전적 기원성의 것과 기존의 것에 따라 2가지 class로 크게 구분할 수 있다. 유전적기원의 adjuvant는, vaccine Ag과 함께 투여되었을 때 면역응답을 조절할 수 있는 cytokine 또는 다른 분자의 expression vector를 말한다. 반면, 기존의 adjuvant는 Ag특이적 응답을 촉진, 지속 또는 조절하는 화학적 복합물을 뜻한다.

적절한 adjuvant의 사용은 DNA vaccine에 대한 면역응답을 가장 능률적으로 제고하는데 있어 중추적인 역할을 한다. 더구나 DNA vaccine 그 자체는, 특수한 base content에 있어 methyl화 되지않은 CpG motif의 존재 때문에 그들 자체의 adjuvant활성을 지니고 있다는 것이다(66,67).

Immune adjuvant로 작용하는 methyl化 되지않은 CpG motif를 함유하는 oligo-deoxynucleotide는 500배 정도로 Ag특이적 Ab응답을 촉진하고 boosting한다고 한다(68). CpG의 효능은 B cell 및 plasmocytic dentritic cell상에 발현되는 endocytic TLR의 receptor에 의해서 매개되며, 또한 염증성 cytokine의 방출과 Th1면역과 CTL산생의 유도 쪽으로 기울어지는 응답을 촉발시킨다고 한다.

Sun 등(69)은, BCG-PSN이 HIV-1 DNA vaccine의 면역원성을 촉진하는 새로운 adjuvant로 작용할 수 있다고 보고하고 있다. Vical사는, 'vaxfectin' formula가 동물model에서의 DNA vaccine에 능동적으로 작용한 adjuvant임을 시현하였다고 한다(70).

Type III/lambda INF(interferon)이 발견된 것은 100년도 채 못되며, 그 특성화 과정이 아직도 진행되고 있다고 한다. 이전의 연구는 소동물model에서의 IFN-lambda 3(또한 IL-28B로도 알려져 있음)에 집중되었지만, 더 큰 적절한 model에서의 이들의 기능은 잘 알려지지 못하였다. Morrow 등(71)은, 최근 rhesus macaque 원숭이에서의 획득면역응답에 대한 IFN-lambda 3의 영향을 연구하였다. 결과적으로, IFN-lambda 3가 Ag특이적 CD8+T-cell의 기능에 상당한 영향을 미친다는 것을 처음으로 시현하였다. IFN-lambda 3가 투여된 동물로부터의 말초 CD8+T-cell은 perforin방출과 더불어 CD107 및 granzyme B의 공동발현으로 측정됨으로써 상당히 증가된 세포독성응답을 나타내었음을 밝히고 있다. 더구나 IFN-lambda 3가 주사된 동물의 장관막lymph절(MLN)로부터 분리된 CD8+ T-cell은, 확대된 Ag자극으로 granzyme B의 상당량을 積載하고 있으며, 상당히 많은 peptide작용 표적의 granzyme B 매개 細胞死를 야기하였다고 한다. 이와 같은 data들은 IFN-lambda 3가, 가능성 있는 immunoadjuvant로서 더 많은 연구를 보증하는 CD8+T-cell의 killing기능에 대한 특별한 중요성과 더불어 강력한 작동체일 것으로 추정한다고 하였다. InovioP는, 위의



immunoadjuvant인 DNA plasmid encoding IL (interleukin)-28B와 EP기술을 사용한 최적화 SynCon DNA vaccine의 공동전달이 rhesus원숭이에서 Ag특이적 killer T-cell 응답을 상당히 촉진하였다고 발표하였다(72). 이 gene immunoadjuvant는 자연적으로 IL-28B와 같은 면역분자를 생성하는 중요한 유전적 blueprint(청사진)를 encoding하는 DNA plasmid인 것이다. 이 DNA plasmid가 DNA vaccine과 공동으로 전달되었을 때, 이 경우에는 vaccine과 IL-28B protein의 양쪽이 같은 세포에서 생성된다고 한다. IL-28B와 같은 immunoadjuvant는 특히 dendritic cell 혹은 killer T cell과 같은 중요한 면역세포의 견인력을 촉진한다고 한다. CD8+ killer T cell의 발생은 생체로부터의 암화 또는 감염세포를 청소하는 수단, 그리고 암이나 HIV 및 HCV와 같은 virus에 의한 만성질환에 대응하는 새로운 vaccine의 충분한 효능을 성취시키는데 필수적인 것으로 고려되고 있다.

## V. 獸醫分野에서의 DNA vaccine의 應用 : (73~76)

1990년에, Wolff 등은 mouse의 근육조직에서 naked plasmid DNA의 성공적인 발현을 처음으로 보고하였다. 그 수년 후에는 flu virus의 Ag protein을 encoding하는 DNA의 주사가 mouse에서 방어면역을 발현하였음이 보고되었다. 다양한 종류의 virus, bacteria 및 protozoa에 대응하는 DNA에 의해서 방어면역이 야기되었다는 많은 논문이 발표되었다. 또 다른 DNA 면역조작이 실험동물들을 통하여 암, 자가면역병 등의 치료에 이용되었다.

DNA vaccine은 수의학 일부 분야에서 이미 그 발판을 구축하고 있다. 그러나, 현재 이용할 수 있는 선택권과 비교할 때, 그 vaccine이 효능적이고 비용효과적인가의 여부를 포함한, 동물용 DNA vaccine의 개발에 있어 몇가지 중요한 의문점이 검토되어야 할 것이다.

또다른 중요한 의문점은, 질병제어를 위하여 수천마리의 동물, 양어장의 물고기, 그리고 애완동물에서부터 야생동물에 이르는 넓은 범위의 상이한 입장에 이 개발기술을 어떻게 적용해야 할 것인가이다. 어떤 경우 DNA vaccine은 그 접종을 위한 선택권을 요구할 것이며, 또 다른 경우에는 현재 이용할 수 있는 선택이 유용할 수도 있을 것이다. Redding 및 Weiner는 다수의 중요한 동물질병들을 검사하고, 이들 질병에 상응하는 진전된 DNA vaccine기술을 적응시키도록 하였으며, 이용될 수 있는 기존 처치법과 비교검토하였다는 보고이다. DNA vaccine접종은 농장동물이나 반려동물에서의 질병을 예방하기 위한 희망적인 기술이라고 본다. BHV-1, RV 및 PRV와 같은 특정병원체에 대한 DNA vaccine개발에 의한 상풍화도 가능할 것이며, murine model을 이용한 DNA vaccine의 작용기전의 연구도 시행될 수 있을 것이다. 전술한 바와 같은, 적절한 immunoadjuvant 및

vaccine투여의 적절한 경로, 발현plasmid의 표적화에 대한 연구 등으로 동물에서의 면역을 증진 시키는데 가일층의 노력이 집중되어야 한다. Plasmid의 순화정제와 vaccine자체의 고비용 문제, 그리고 DNA vaccine접종량의 감소문제도 아울러 고려되어야 할 것이다.

현재 외국에서 제조가 인정되고 면허가 허용된 동물용 DNA vaccine은 4종류이나, 앞으로 더욱 늘어날 것으로 기대된다. 현재 허가된 품목은 다음과 같다(34). 1) West Nile virus(馬, USA), 2) Infectious hematopoietic necrosis virus(Salmon, Canada), 3) Growth hormone releasing hormone(豚 및 食用動物, Australia), 4) Melanoma(犬, USA)가 그것들이다.

## VI. 國內의 研究動向:

2000년 이래 국내의 여러 대학 및 연구기관에서도 DNA vaccine에 관한 연구가 비교적 활발히 진행되고 있어, 그간 여러 논문이 발표되었다.(77~81). 그러나 까다로운 임상시험을 거쳐 그 효과가 인정되고 비용이 뒷받침되어야 하기 때문에 상용화된 것은 아직 없는 것으로 보인다. 그 중에서 특기할만한 연구는, 포항공대의 성영철교수팀의 결핵에 대한 DNA vaccine의 연구발표(82)가 유명한 과학잡지 Nature와 science에 각각 'Top Story' news(83,84)로 그들의 연구결과를 중요기사(2005년 2월초)로 게재하여 관심을 집중시킨 일이다. 이 연구(연세대 의대 조상래교수와의 공동연구)는 mouse를 사용한 실험이기 때문에, 사람을 위해서는 여러 단계의 임상시험을 거쳐야 하므로 실용화에는 상당한 시일이 걸릴것으로 보인다.

지난 2008년(3월4일)에, 'DNA Vaccines Asia 2008' Conference(85)가 리츠칼튼 호텔에서 개최되었는데, 국내를 비롯한 미국, 일본, 중국 등 전세계 DNA vaccine개발 leader 및 전문가들이 모여 발표 및 토론이 있었다고 한다. 이와 같은 국제회의의 개최는 국내의 DNA vaccine분야의 연구를 더욱 고무하고 촉진시키는 계기가 되었을 것으로 믿어진다. 미국 Inovio사의 계열사인 한국의 VGX International (VGXI)사는 InovioP사와 공동으로 진행하고 있는 'universal flu vaccine' 개발과 관련하여 미국 NIH로부터 310만\$의 연구비를 지원받게 되었다고 한다 (한국경제신문, 2010년 10월 3일).

두 회사가 공동으로 소유하고 있는 "Universal SynCon™ flu DNA vaccine기술"이 NIH의 Common Fund가 지원하는 '변혁연구 project'에 선정된데에 따른 것이라고 한다. 이 지원금은 flu type중 seasonal flu를 target으로 하는 DNA vaccine의 개발에 사용될 것이라고 한다. VGXI(86)는, 현재 개발중인 universal flu DNA vaccine은 유전적으로 不一致(unmatched)한 flu virus에 대해서도 폭넓은 예방이 가능한 vaccine이라고 한다.

즉, 이들 회사는 DNA vaccine 및 therapy platform으로 최적화된 SynCon™ DNA vaccine 기법, cGMP plasmid 작제와 수동의 CELLECTRA-SP DNA delivery device 기술을 적용한다는 것이다. 또한 VGXI는 지난 8월초 AI(조류 flu)의 예방용 DNA vaccine ‘VGX-3400’에 대한 임상시험을 시작하였다고 밝혔다. VGXI는 신약개발 외에도 CMO (Contract Manufacturing Organization ; 醫藥品委託生産施設) 사업 등 다각화된 영역을 통해 사업범위를 확장하고 있다고 한다.

국내에서의 DNA vaccine construction에 있어, 연세대 이상규교수 연구팀의 ‘T세포내 신호전달 매개 단백질을 이용한 autoimmune diseases에 대한 치료제 개발’에 관한 논문(87)을 보면, 사람의 세포내에서 단백질이나 gene 등의 물질을 세포내로 전달하는 기능이 있는 물질전달peptide인 Hph-1을 찾아 내었는데, Hph-1은 단백질전달체 PDH의 일종으로 세포투과력 및 조직침투력이 우수하여 눈, 기도, 피부 등을 통해 약물을 전달할 수 있다고 한다.

그들은 Hph-1을 T세포 특이 단백질과 결합하여 자가면역치료단백질인 신약 ‘FHT-CT4’(면역억제단백질)을 개발하였다. 이 연구를 기반으로 (주) FHT (Forhumantech)사의 생체유래의 단백질 전달체를 이용한 gene의 전달기술에 대한 특허를 획득(2006년 5월 9일)하였다고한다. 다른 매체를 이용하지 않고 gene 자체만을 생체세포내로 전달 할 수 있는 기술인 것이다. 그러므로 pDNA vaccine의 연구에서, 그 DNA의 생체내 전달시 ‘FHT-1006’ (gene 전달체)(88)의 이용을 시도해 볼직하다는 것이 필자의 소견이다.

## VII. 結言 :

약 15년전 유전적으로 조작된 DNA는 Vaccine형태로 전달될 수 있는 면역응답을 야기한다는 발견 이래, 이 platform의 기초생물학의 이해가 크게 진전되었다. 많은 량의 data가 preclinical model system, 그리고 더욱 뒷받침된 세포성면역응답과 더욱 견고한 Ab응답이 임상에서 관찰되었다. DNA vaccine기술은 그 제품이 시장에 출하된 근년(아직은 동물vaccine 뿐이지만) 인상적인 활보를 내딛고 있다. 동물vaccine의 상품화와 더불어 다수의 사람용 vaccine도 후기단계이 임상시험이 진행되고 있다고 한다. 가까운 장래에 신생 flu, HPV 및 몇몇 암vaccine을 포함한 다수의 새로운 사람용 vaccine도 인증(허가)되어 출하될 것으로 기대되고 있다. 이와 같은 결과들은, 임상에서 받아들일 수 있는 더욱 최적화된 작성법, 더욱 개량된 vector design 및 증진된 platform 들이 이 기술에 대한 생산적인 장래를 전망케 한다. [네이버](#)

참고 문헌

- 1) Morrow MP, Weiner DB. 2010, 'DNA Drugs Come of Age'. *Sci Am*, 303:48-53.
- 2) Hirao LA, et al. 2010, Comparative analysis of immune responses induced by vaccination with SIV antigens by recombinant Ad5 vector or plasmid DNA in Rhesus macaques. *Mole Thera* (2010) 18 8, 1568-1576, doi:10.1038/mt.2010.112
- 3) Tang D, et al. 1992, Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 356:152-154.
- 4) Hanahan S. 1997, DNA vaccine outlook. *Access Excellence The National Health Museum: What's News*, P. 1-2.
- 5) Robinson HL, et al. 1997, The Scientific Future of DNA Immunization. *Am Soc Microbiol*, P. 1-31.
- 6) Robinson HL, Pertmer TM. 2000, DNA vaccine for viral infections: basic studies applications. *Adv Virus Res*, 55:1-74.
- 7) Silva CL, et al. 2009, Recent advances in DNA vaccines for autoimmune diseases. *Expert Rev Vaccines* 8:239-252.
- 8) Garren H. 2009, DNA vaccines for autoimmune diseases. *Expert Rev Vaccines* 8:1195-1202.
- 9) Chua KY, et al. 2006, DNA vaccines and allergic diseases. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 33:546-50.
- 10) Chua KY, et al. 2009, DNA vaccines for the prevention and treatment of allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 9:50-54.
- 11) 'Immunotherapy' from Wikipedia, free encyclopedia, P. 1-9.
- 12) EMEA, Overview of comments received on guideline on non-clinical studies required before first clinical use of gene therapy medicinal products. *European Medicines Agency Doc. Ref. EMEA/CHMP/GTWP/6526012008*.
- 13) Inovio Biomedical : 2009, H1N1 influenza DNA vaccines demonstrate 100% responses against swine flu in vaccinated pigs. *Drugs.com*, P. 1-3.
- 14) Brunk D. 2009, DNA technology may revolutionize influenza vaccine development. *H1N1 Flu Resource Centre. The Lancet.com*, P. 1.
- 15) Kim J. 2010, Developing therapeutic and preventive DNA vaccines for cancers and infectious diseases. *Inovio Pharmaceuticals, Inc. Power Point 25 slides*.
- 16) Fioretti D, et al. 2010, DNA vaccines : Developing new strategies against cancer. (Review article). *J Biomd Biotech*, 1-16.
- 17) Rice J, et al. 2008, DNA vaccines : Precision tools for activating effective immunity against cancer 8:108-120.
- 18) Choo AY, et al. 2005, DNA vaccination in immunotherapy of cancer. *Cancer Threat Res*, 123:137-56.
- 19) Morrow Jr. KJ. 2010, DNA vaccines hit their stride with approvals anticipated. *Genet Eng Biotech News*, 30:1-5.
- 20) DNA vaccination, from Wikipedia, the free encyclopedia, P. 1-18.
- 21) Venton LM. 2010, DNA vaccines : Injection of genetic material to induce immunity. *Clin Trials gov 'DNA vaccine'* (Accessed Apr. 28, 2010).
- 22) Weiner DB Kennedy RC. 1999, 'Genetic vaccines'. *Sci Am*, 281:34-41.
- 23) Robinson HL. 1999, DNA vaccines: basic mechanisms and immune responses (review). *Int J Mol Med*, 4:549-55.
- 24) Coban C, et al. 2008, Molecular and cellular mechanisms of DNA vaccines. *Hum Vaccine* 4:453-6.
- 25) Encke J, et al. 1999, DNA vaccines. *Intervirol*, 42:117-124.
- 26) Kaushik SD. DNA vaccines-presentation transcript, 2010 SlideShare Inc.
- 27) Viral vector, from Wikipedia, the free encyclopedia, p. 1-5.
- 28) FDA : DNA Guideline for Industry: Consideration for plasmid DNA vaccines for infectious disease indications. *US Food and Drug Administration*, 2007.
- 29) WHO, Annex 1 : Guidelines for assuring the quality and nonclinical safety? valuation of DNA vaccines. *World Health Organization Technical Report Series No. 941*, 2007.
- 30) Williams JA. 2008, Vectors and methods for genetic immunization. *World Patent Application wo2008153733*.
- 31) Saltzman WM, et al. 2009, DNA Vaccines: Methods and Protocols. 2nd ed. (Methods in Molecular Medicine). *Humana Press*, pp. 384.
- 32) Lewis PJ Babiuk LA. 1999, DNA vaccines: A review. *Adv Virus Res*, 54:129-88.
- 33) Donnelly JJ, et al. 1997, DNA vaccines. *Annu Rev Immunol*, 15:617-48.
- 34) Kutzler MA Weiner DB. 2008, DNA vaccines: Ready for prime time? *Nature Rev Genet*, 9:776-88.
- 35) Moss RB. 2009, Prospects for control of emerging infectious diseases with plasmid DNA vaccines. *J Immune based Ther Vaccines*, 7:3.
- 36) Bower DM Prether KL. 2009, Engineering of bacterial strains and vector for the production of plasmid DNA. *Appl Microbiol Biotechnol*, 82:805-66.

- 37) Williams JA, et al. 2009. Plasmid DNA vaccine vector design : Impact of efficacy, safety and upstream production, *Biotechnol Adv.* 27:353-370.
- 38) Stadler J, et al. 2004. Plasmid DNA purification, *J Gene Med.* 1:S 56-66.
- 39) Ballantyne J. 2006. Practical methods for supercoiled pDNA production method, *Mol Med.* 127:311-37.
- 40) Luke J, et al. 2009. Improved antibiotic-free DNA vaccine vectors utilizing a novel RNA based plasmid selection system, *Vaccine* 27:6454-9.
- 41) Inovio Technology : 'SynCon™ DNA Vaccine Platform', Inovio Pharmaceuticals, Inc. p. 1-2.
- 42) Tjelle TE, et al. 2006. A novel electroporation device for gene delivery in large animals and humans, *Vaccine* 24:4667-70.
- 43) Houk S, et al. 2010. Electroporation for DNA immunization : Clinical application, *Expert Rev Vaccines* 9:503-17.
- 44) Draghia-akli R Khan AS. 2008. Muscle and fat mass modulation in different clinical models, In "Electroporation Protocols : Experimental and Clinical Medicine" ed, Shulin Li, Humana Press. 423:149-60.
- 45) Brown PA, et al. 2008. Delivery of DNA into skeletal muscle in large animals, In "Electroporation Protocols : Experimental and Clinical Medicine" ed, Shulin Li, Humana Press, 423:215-24.
- 46) Rosati M, et al. 2008. Increased immune responses in rhesus macaques by DNA vaccination combined with electroporation, *Vaccine* 26:5223-9.
- 47) Chiarella P, et al. 2010. Application of electroporation in DNA vaccination protocols, *Curr Gene Ther.* 10:281-6.
- 48) Hirano LA, et al. 2008. Intradermal/subcutaneous immunization by electroporation improves plasmid vaccine delivery and potency in pig and rhesus macaques, *Vaccine* 26:440-8.
- 49) Medical News Today: Evaluating Inovio's Electroporation Technology for the delivery of DNA vaccines, [www. medicalnewstoday.com](http://www.medicalnewstoday.com) 26 July 2007, p. 1-3.
- 50) Inovio Technology: Therapeutic DNA vaccine delivery via Inovio's electroporation technology, Inovio Pharmaceuticals, Inc. 2010.
- 51) Hirano LA, et al. 2008. Combined effects of IL-12 and electroporation enhances the potency of DNA vaccination in macaques, *Vaccine* 26:3112-20.
- 52) Bodles-Brakhop AM, et al. 2009. Electroporation for the delivery of DNA-based vaccines and immunotherapeutics : current clinical developments, *Mole Thera* 4:585-592, 53).
- Inovio Technology : Electroporation Delivery Systems, Inovio Pharmaceuticals, Inc. p. 1-3.
- 54) Business Services Industry: Inovio develops cordless electroporation device for delivering DNA vaccines, (Comments), *Business Wire*, March 03, 2010, p. 1-2
- 55) Vogel FR, 1998. Adjuvants in perspective, *Dev Biol Stand.* 92:241-8.
- 56) Immunologic adjuvant, Wikipedia, the free encyclopedia, p. 1-6.
- 57) The European Medicines Agency : 2004. Guideline on adjuvants in vaccines, EMNEA/ CHMP/VEG/134716/2004, p. 1-18.
- 58) Carter D Reed SG. 2010. Role of adjuvants in modeling the immune response, *Curr Opin HIV AIDS* 5:409-13.
- 59) Nicholls EF, et al. 2010. Immunomodulators as adjuvants for vaccines and antimicrobial therapy, *Ann NY Acad Sci*, doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05787.
- 60) Ulmer JB Liu MA, 1999. Delivery systems and adjuvants for DNA vaccines, In *CSH Mono Arch. The Development of Human Gene Therapy: Chap. 13*, p. 309-330.
- 61) Glenn GM O'Hagan DT. 2007. Adjuvants : progress, regress and pandemic prepared-ness, *Expert Rev Vaccines* 6:651-2.
- 62) Petrovsky N, et al. 2007. New age vaccine adjuvants: Friend or foe? *Biopharm International.com* p. 1-10.
- 63) Vogel FR Powell MF. 1995. A compendium of vaccine adjuvant and excipients, *Pharm Biotechnol.* 6:141-228.
- 64) Scheerlinck JY. 2001. Specific adjuvants for DNA vaccines, *Vaccine* 19:2647-56.
- 65) Sin JI, et al. 1999. IL-12 gene as a herpes mouse model : IL-12 enhance Th1-type CD4+T cell-mediated protective immunity against herpes simplex virus-2 challenge, *J Immunol.* 162:2912-21.
- 66) Achim S, et al. 2004. CpG motif are efficient adjuvants for DNA cancer vaccines, *J Invest Dermat.* 123:371-379.
- 67) Medscape: Immunomodulators, adjuvants, and CpG DNA, *Medscape General Medicine*, 1999;1(3).
- 68) Klinman DM, 2003. CpG DNA as? vaccine adjuvant, *Expert Rev Vaccines* 2:305-15.
- 69) Sun J, et al. 2009. PO2-08. Enhancement of HIV-1 DNA vaccin immunogenicity by BCG-PSN, a novel adjuvant.

- Retrovirol, 6(Suppl 3):P13.
- 70) Biotech Patent News : Vical patent for DNA vaccines Vaxfectin adjuvant, Vical, Inc. 2003, ISSN: 0898-2813, p. 1-2.
- 71) Morrow MP, et al, 2010, Unique Th1/Th2 phenotypes induced during priming and memory phases by use of interleukin-12 (IL-12) or IL-28B vaccine adjuvants in rhesus macaques, Clin Vaccine Immunol, 17:1493-9.
- 72) Morrow MP, et al, 2010, IL-28B/IFN-lambda 3 drives granzyme B loading and significantly increases CTL killing activity in macaques, Mol Ther, 18:1714-23.
- 73) Wolff JA, et al, 1990, Direct gene transfer into mouse muscle in vivo, Science 247:1465-68.
- 74) Redding L Weiner DB, 2009, DNA vaccinein veterinary use, Expert Rev Vaccines, 8:1257-78.
- 75) Dufour V, 2001, DNA vaccines:New applications for veterinary medicine, Vet Sci Tommorrow, p. 1-10.
- 76) Draghia-Akli R, et al, 2008, Parameters for DNA vaccination using adaptive constant-current electroporation in mouse and pig models, Vaccine 26:5230-9.
- 77) Sin JI, et al, 2000, Engineering of DNA vaccines using molecular adjuvant plasmids, Dev Biol (Basel), 104:187-96.
- 78) Kim SJ, et al, 2000, Protection against very virulent infectious bursal disease virus in chickens immunized with DNA vaccines, Vet Microbiol, 101:39-51.
- 79) Roh HJ, et al, 2006, Effects of DDA, CpG-ODN, and plasmid-encoded chicken IFN-gamma on protective immunity by ? DNA vaccine against IBD in chickens, J Vet Sci, 7:361-8.
- 80) Park JH, et al, 2009, Efficacy of genetic adjuvant (plasmid-expressed chicken interleukin-6) and chemical adjuvant (levamisole) on the protective immunity of genetic immunity of genetic vaccine against infectious bursal disease virus, Kor J Microbiol, 45:91-98.
- 81) Choi YS, 2009, Enhancement of DNA vaccine-induced immune responses by influenza virus NP gene, Immune Netw, 9 : 169-78.
- 82) Ha SJ, et al, 2005, Brief communication, Protective effect of DNA vaccine during chemotherapy on reactivation and reinfection of Mycobacterium tuberculosis, Gene Therapy e-pub 3 Feb, 2005 : doi : 10.1038/sj.gt.3302465, p. 1-5.
- 83) Ebert J, Vaccine helps to banish tuberculosis, Pub, online 3 Feb, 2005/Nature/doi : 10.1038/news050131-12.
- 84) Bhattacharya S, DNA vaccine offers hope against tuberculosis, New Scientist Health News, 17:35 03 Feb, 2005.
- 85) DNA Vaccines Asia 2008, www.vgxi.com
- 86) Newsshare : 글로벌 제약회사 VGX 인터내셔널, 제약업계 일류화 시동, www.vgxi.com p. 1-4.
- 87) Choi JM ,et al, 2006, Intranasal delivery of the cytoplasmic domain of CTLA-4 using a novel protein transduction domain prevents allergic inflammation, Nat Med, 12:574-9.
- 88) 미래히든챔피언 리포트 : 포휴만텍, www.ibks.com p. 1-2.