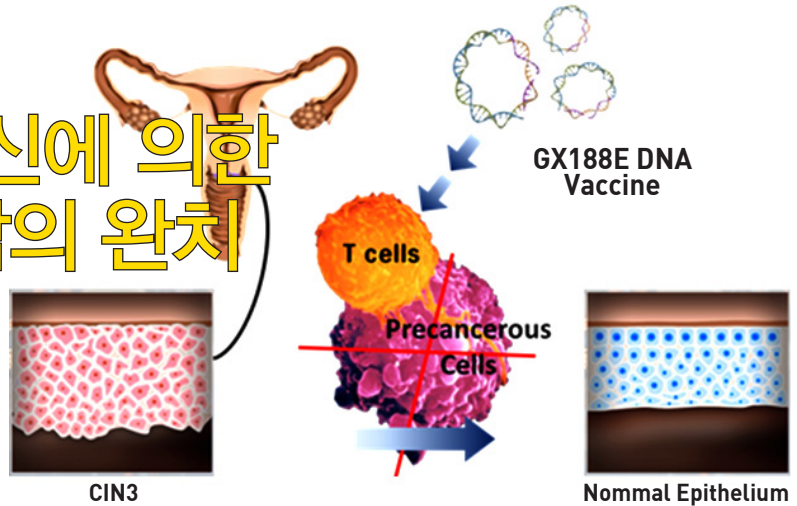


Polyfunctional killer T-cells are the Key Player

DNA 치료백신에 의한 자궁경부전암의 완치



▶ CIN3 병변의 치료에서 GX-188E가 유도하는 다기능성 (polyfunctional) CD8 T 세포의 역할. 다기능성 HPV 특이 킬러 T 세포가 CIN3 병변의 이형화 세포를 파괴하므로 HPV를 제거하고, 정상적인 자궁경부 상피세포로 회복시킴.



글_성영철

포스텍 생명과학과 교수
ycsung@postech.ac.kr

글쓴이는 연세대학교 졸업 후, 미국 미네소타대학에서 박사학위를 받았다. 하버드대학 병리과에서 박사후 연구원을 지냈으며, 제7회 한탄상, 제2회 생명의 신비상을 수상했고, 포스텍 생명공학연구소장, 대한면역학회 회장을 역임했다.



글_서유석

(주)제넥신 연구소장
ysshuh@genexine.com

글쓴이는 포스텍에서 박사학위를 받았고, 독일 영장류연구소에서 박사후 연구원, 제넥신 임상개발실장을 지냈다.

자궁경부전암(Cervical Intraepithelial Neoplasia, CIN)은 자궁경부 상피내종양으로도 불리며 인유두종바이러스(Human Papilloma virus, HPV)의 감염으로 발생한다. 특히 고위험군인 HPV 16 타입의 감염에 의한 2기 및 3기 CIN(CIN2/3)의 경우 자궁경부암으로 진행할 확률은 30%나 된다고 한다. 현재, CIN2/3를 치료하는 방법으로 병소를 수술로 제거하는 원추절제술이 활용되나, 재발률이 10% 정도이며 수술에 의한 합병증으로 조산이나, 출혈, 저체중아 출산 등의 우려가 있다.

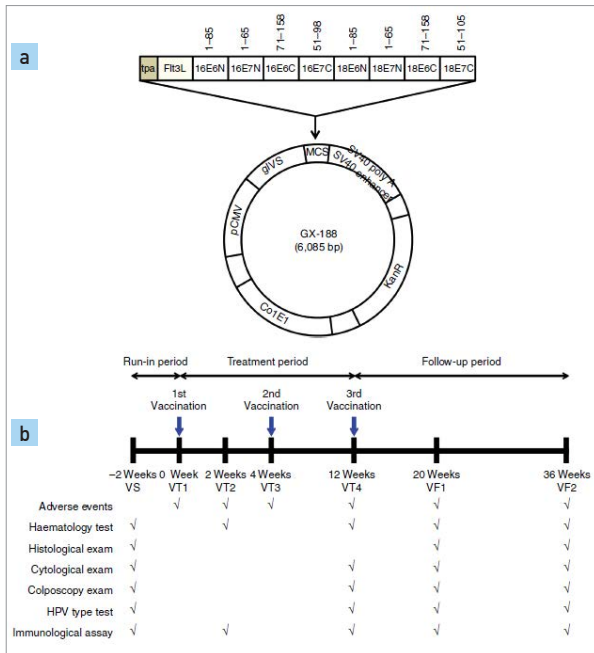
자궁경부암 예방백신으로 HPV L1 항원을 함유한 씨브유닛 백신인 가다실(Gardasil)과 씨바릭스(Cervarix)가 상업화되어 시판 중이나, 이미 HPV에 감염되었거나 자궁경부전암 단계로 진행된 경우에는 치료효과가 없는 것으로 알려졌다. 따라서 자궁경부전암을 치료하기 위한 신규 비수술적인 면역치료법은, 자궁경부암으로의 진행을 막고, 환자의 삶의 질을 향상시킬 것으로 기대하고 있다.

백신 항원으로 HPV E6, E7 발암 단백질

HPV에서 발견되는 E6 및 E7 바이러스 단백질은 종양억제(tumor suppressor) 단백질인 p53과 retinoblastoma(pRb)와 결합하여 분해함으로써 종양을 생성케 하는 발암 단백질로 알려졌다. 또한 CIN2/3 병소 및 자궁경부암에서 E6, E7 단백질이 지속적으로 발견되고 있어, 자궁경부전암을 치료하기 위한 이상적인 암 항원이 될 수 있다. CIN2/3가 자연적으로 치유되는 것에는 T 세포 면역반응이 연관되었다고 알려졌기 때문에 HPV E6 및 E7 특이 T 세포 면역반응을 효과적으로 증가시킬 수 있는 다양한 치료방법을 개발하여 지난 수 십년 동안 평가했지만 아직까지 상용화가 될 정도의 충분한 효능을 낼 수 있는 치료 백신이 개발되지 못했고, 특히 치료 효능에 대한 작용 기전을 밝히지 못하였다.

DNA 치료백신, GX-188의 제조

본 연구팀에서는 자궁경부전암의 주요한 원인 바이러스인 HPV 16 및 HPV 18 타



▶▶ 1. GX-188 치료 DNA 백신의 모식도 (a) 및 임상시험 일정 개략도 (b). GX-188는 HPV 16, 18 타입의 E6, E7 유전자를 각각 N-말단 및 C-말단 부분으로 나누어 shuffling한 다음, tpa 신호서열과 F13L의 extracellular domain의 유전자를 결합하여 DNA 백신 벡터에 삽입하여 제조하였음. 벡터는 CMV 프로모터와 SV40 poly A 서열, gIVS 서열, 대장균에서 생산을 위한 ColE1 유전자와, 카나마이신 (Kanamycin) 저항 유전자를 가짐. 환자 선별 기간 (Run-in period)에 모집된 환자에 0주 (VT1), 4주(VT3), 12주(VT4) 시점에서 GX-188E 를 투여하였고 투여 전과 후 조직학검사, 세포진검사, 질확대경검사, HPV 타입확인, 면역반응 검사를 수행하였음.

입 E6, E7 유전자를 함유한 DNA 백신 GX-188을 고안하였다. 발현된 E6와 E7 단백질을 수지상세포(DC)로 타깃팅하여, DC에 의한 항원의 제시를 효과적으로 유도하기 위해, extracellular Fms-like tyrosine kinase-3 ligand(Flt3L)의 유전자를 항원유전자인 E6, E7 유전자와 결합시켰다. 또한 E6, E7 유전자를 각각 N-말단과 C-말단으로 나누어, E6의 N-말단 다음, E7 N-말단을 위치시켜 3차원적 구조를 바꾸는 방법으로, 발현된 E6, E7 단백질이 p53 및 pRb 결합을 하지 못하도록 설계하였다(그림 1a).

실제, GX-188 DNA 치료 백신에서 발현되는 E6, E7 단백질이 tissue plasminogen activator(tpa)의 신호서열 및 Flt3L의 결합에 의해 발현세포의 핵 안에 위치하지 못함을 확인하였다. 또한 p53이나 pRb를 파괴하는 활성이 없음을 보여주었다. 이는 E6, E7 항원 유전자의 발암성이 제거된 것을 보여주는 결과로서 새로운 GX-188 DNA 치료 백신의 안전성을 증명한다.

CIN3 환자에서 GX-188E의 안전성

GX-188 DNA는 미국의 GMP(Good Manufacturing Practice) 공장에서 생산했으며, 식약처 및 임상기관 윤리위원회의 승인을 거쳐 지원한 9명의 CIN3 환자를 대상으로 투여하여 임상시험을 수행하였다(그림 2). 피험자는 16 또는 18타입의 HPV에 감염되고, 조직병리검사에서 CIN3가 확인된 20세에서 50세 사이 여성을 대상으로 하였다. 0주, 4주, 12주에 1mg, 2mg 또는 4mg의 DNA를 근육투여와 동시에 전기자극(Electroporation)을 하는 방법으로 GX-188E (GX-188 DNA + Electroporation)를 투여 받았다(그림 1b).

GX-188E의 투여로 환자에서 투여부위 통증, 부기(浮氣)와 같은 낮은 단계의 부작용만이 관찰되었으며, 모든 부작용은 투여 후 3일 이내 사라졌고, GX-188E과 연관된 중대 이상반응이 관찰되지 않아, GX-188E 투여가 매우 안전함을 확인하였다. 자가면역질환의 표지자인 항-DNA 항체 역시 검출되지 않았다. 모집된 9명 모두 3회 투여를 마쳐 임상 참여 순응도가 매우 높았다.

HPV 특이 다기능성 CD8 T 세포반응의 유도

GX-188E의 투여는 9명의 환자 모두에서 강력한 HPV E6, E7 특이 IFN- γ ELISPOT 반응을 증가시켰으며, 유도된 IFN- γ ELISPOT 반응은 최종 투여 후 24주까지 유지되는 것을 확인할 수 있었다. E6, E7 특이 IFN- γ 반응에 관여하는 T 세포의 서브셋을 알기 위해, 말초혈액단핵세포(PBMC)를 E6, E7 펩티드로 자극한 다음, IFN- γ 를 발현하는 CD4 T 세포와 CD8 T 세포의 비율을 Intracellular Cytokine Staining(ICS) 방법으로 평가하였다. 흥미롭게도, GX-188E 투여 후 모든 피험



▶▶ 2. 임상시험용 GX-188 DNA 백신. 미국의 GMP 공장에서 제조한 후 품질분석을 통하여 사람에게 사용이 적합함을 증명함. 9명의 CIN3 환자로부터 임상시험용 의약품의 안전성을 확인함.

자에서 IFN- γ + CD4 T 세포 반응의 증가가 관찰된 반면, IFN- γ + CD8 T 세포 반응의 유도는 A04 피험자를 제외하고, 8명의 환자에서 발견되었다.

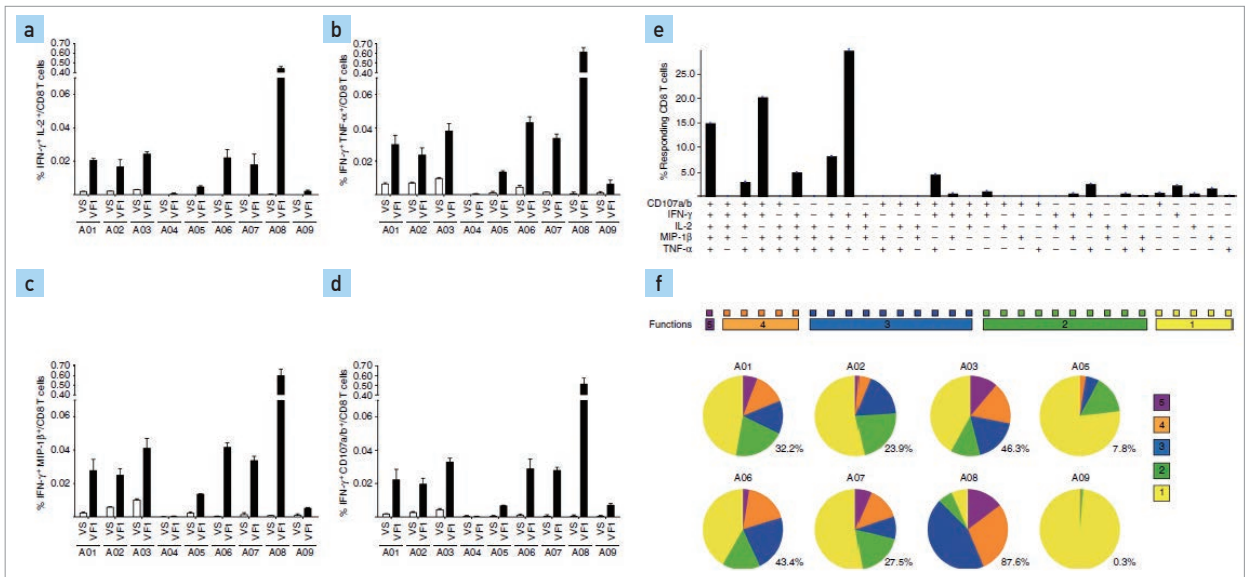
지속적인 HPV 감염으로 Th1 타입의 세포면역반응이 결손되어 있음이 알려진 바와 같이, GX-188E 투여 이전에는 E6, E7 펩티드로 자극한 환자의 PBMC에서 IFN- γ , IL-2, TNF- α 와 같은 Th1 타입의 사이토카인이 분비되지 않은 반면, GX-188E를 3회 투여한 이후에는 모든 환자의 PBMC에서 Th1 사이토카인의 분비가 관찰되었다. 반면 Th2 사이토카인인 IL-4나 Th17 사이토카인(IL-17A)의 분비는 투여 전후 모두에서 관찰되지 않았다. 이는 GX-188E의 투여가 Th1 성향의 HPV 특이 T 세포 반응을 유도했음을 의미한다.

HPV 특이적인 T 세포의 기능을 다각도로 분석하기 위해, 환자에서 얻은 PBMC를 E6, E7 펩티드로 자극한 다음, IFN- γ 뿐 아니라, 서로 다른 활성 기능을 가진 IL-2, TNF- α 사이토카인 및 MIP-1 β 케모카인, 그리고 세포독성 T 세포가 활성을 보일 때 발견되는 CD107a/b의 발현을 평가하였다. A04 피험자를 제외하고, 모든 환자에서, IFN- γ + 반응을 포함하는 두 가지 활성 기능을 가진 HPV 특이 CD8 T 세포반응이 관찰되었다(그

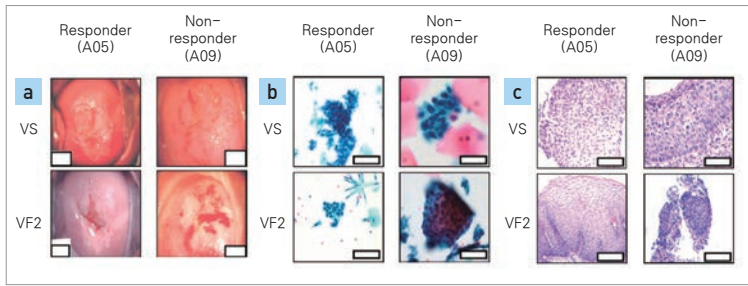
림 3a, 3b, 3c, 3d). 세 가지 이상의 다기능성(polyfunctional) HPV 특이 CD8 T 세포의 비율은 A09번 환자의 경우 0.3%에 불과한 반면, 남은 7명의 환자에서는 다기능성 HPV 특이 CD8 T 세포의 비율이 7.8%에서 46.3%나 됐다(그림 3f).

GX-188E 투여로 HPV 제거 및 CIN3병변 소멸

GX-188E 투여 후 자궁경부에서 HPV 16 및 18의 잔류 여부를 확인하고, 조직학 검사를 통해 CIN3 병변의 지속 여부를 관찰하였다. 투여 시작 후 20주까지 관찰했을 때 HPV를 제거한 환자가 6명(HPV 16 및 18, 모두 없어진 환자 포함)이나 됐으며, 36주에는 추가로 1명의 환자에서 HPV 16이 사라졌다. 전체 9명의 환자 중, HPV 특이 IFN- γ + CD8 T 세포 반응이 검출되지 않았던 A04 환자외, 다기능성 CD8 T 세포의 비율이 0.3%로 매우 낮았던 A09 환자를 제외하고, 모든 환자에서는 HPV가 제거 되었다. HPV의 제거와 동일하게, 9명 중 A04와 A09 환자를 제외한 7명에서 CIN3 병변이 완전 치료되었음을 질확대경검사, 세포진검사, 조직학 검사를 통해 확인하였다(그림 4). 결론적으로, GX-188E의 3회 투여로 인해 HPV 특이 IFN- γ ELISPOT 반응 및



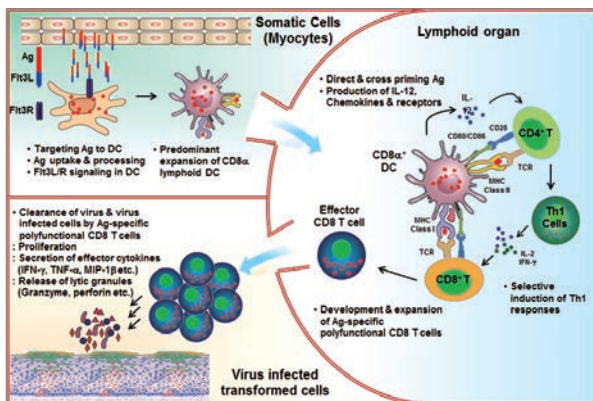
▶▶ 3. GX-188E의 투여에 의한 HPV 특이 다기능성 (polyfunctional) CD8 T 세포반응의 유도. GX-188E 투여 전 (VS) 및 투여 후 (VF1) PBMC를 얻어 HPV 16 타입 E6, E7 펩티드로 자극한 후, 각 환자에서 IFN- γ +IL-2+ CD8 T 세포의 비율 (a), IFN- γ +TNF- α + CD8 T 세포의 비율 (b), IFN- γ +MIP-1 β + CD8 T 세포의 비율 (c), IFN- γ +CD107a/b+ CD8 T 세포의 비율 (d)을 평가함. (e) 대표적으로 A08 환자의 VF1시점에서 다섯 가지 기능 (CD107a/b, IFN- γ , IL-2, MIP-1 β , TNF- α)의 조합으로 반응하는 CD8 T 세포의 비율을 나타냄. (f) 각 피험자의 VF1 시점에서 얻은 PBMC를 HPV E6, E7 펩티드로 자극한 후, 다섯 가지 기능 모두 (보라색), 네 가지 (주황색), 세 가지 (파란색), 두 가지 (녹색), 한 가지 (노란색) 기능을 보이는 CD8 T 세포의 상대적인 비율을 파이 그림으로 나타냄. 오른쪽 아래 숫자는 세 가지 이상의 기능을 나타내는 다기능성 CD8 T 세포의 상대 비율을 표시함. A04 환자는 HPV 특이 CD8 T 세포 반응이 낮아, 결과를 표시하지 않음.



▶ 4. GX-188E 투여에 의해 면역학적/바이러스학적/조직학적 반응을 보인 환자 (A05) 및 반응을 보이지 않은 환자 (A09)에서 투여 전 (VS) 및 투여 이후 (VF2) 질확대경 (a), 세포진 검사 (b), 조직학적 검사 (c) 결과. A05 환자의 경우, 투여 이전 관찰되었던, 핵의 크기가 커진 high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL)이 투여 이후 VF2 시점에서는 관찰되지 않음. 또한 upper layer에서 mitoses가 발견되고 epithelium이 두꺼워지는 CIN3로 진단되었으나, 투여 이후에는 정상적인 squamous epithelium을 보임. 반면 A09 환자는 세포진 검사나 조직학 검사에서 증상의 완화가 관찰되지 않음. (a)의 흰색 박스는 환자의 개인정보를 가리기 위함임. (b)의 흰색 bar는 A05 환자 데이터의 경우 10mm, A09 환자 데이터에서는 5mm의 길이를 표시함. (c)의 흰색 bar는 A05 환자의 데이터의 경우 40mm, A09 환자의 데이터에서는 20mm의 길이를 표시함.

Th1 반응을 효과적으로 유도했으며, 전체 9명 중 7명에서 HPV의 제거 및 CIN3 병변의 소멸을 유도했는데 이는 GX-188E가 유도한 HPV 특이 다기능성 CD8 T 세포 반응이 관여했다고 판단된다.

임상결과에서 확인된 78%의 치료효율은, 타 DNA 백신이나, 백신이나 바이러스 유래의 치료백신, 단백질 치료백신에서는 관찰이 안된 높은 치료율이며, 이는 강력한 HPV 특이 다기능성 CD8 T 세포반응을 유도했기에 가능했다고 본 연구팀은 판단하고 있다. 이 같은 면역반응의 유도가 가능했던 이유로 첫째, DNA



▶ 5. GX-188E 투여 후 다기능성 CD8 T 세포반응 유도 및 CIN3 병변 제거에 있어서 Fc3L의 작용. GX-188 DNA로부터 발현된 Fc3L-E6/E7 융합 단백질은 Fc3 수용체를 매개하여 DC에 타깃팅 됨. Fc3L 활성화에 의해 CD8α+ DC가 선택적으로 증식하며, E6/E7 항원을 함유한 CD8α+ DC는 림프절로 이동하여, CD4 T 세포와 CD8 T 세포에 항원을 제시함. 이로 인해 Th1 반응을 매개로 다기능성 CD8 T 세포가 활성화되고, 이는 다시 CIN3 병변으로 이동하여 활성물질을 분비하고 CIN3 병변의 이형화 세포를 파괴하여, HPV를 제거함.

백신에 사용한 항원유전자를 최적화한 점, 두번째, tpa 신호서열을 결합시켜, 발현되는 E6/E7 단백질의 분비 효율을 높인 점, 세 번째, DNA 백신 투여시 전기가 자극법을 통해 근육세포로 DNA의 전달 효율을 높인 점, 네 번째 p53/pRb 결합능을 제거하기 위해 돌연변이형 E6/E7 항원을 사용한 타연구에서와 달리, 야생형 E6/E7 항원 유전자를 사용함으로써, 온전한 E6/E7 면역 에피토프를 모두 제공할 수 있었던 점 등을 추측할 수 있다.

무엇보다도, Fc3L라는 DC에 타깃팅하는 유전자를 사용했다는 점이 높은 치료율에 중요하게 작용했을 것이다. Fc3L는

CD8α+ 타입의 DC를 선택적으로 증식하게 하여 Th1 반응을 효과적으로 유도할 뿐 아니라, Fc3L-E6/E7 융합단백질이 Fc3 수용체에 의해 DC로 잘 흡수하는 역할을 했을 것이다. E6, E7 항원을 가진 CD8α+ DC는 림프절로 이동하며, CD4 T 세포와 CD8 T 세포에게 항원을 제시하고, 다기능성 CD8 T 세포를 생성케하며, 이 CD8 T 세포는 병변 부위로 이동하여 IFN-γ, TNF-α, MIP-1β와 같은 활성물질을 분비할 뿐 아니라, HPV에 의한 이형화 세포를 파괴하여 HPV를 제거했을 것이다(그림 5).

최초 DNA 백신 상업화 목표

DNA 백신은 1990년 대 초반부터 개념이 정립되어 소동물에서 면역반응 유도 및 방어 효능이 규명되었다. 그러나 환자를 대상으로 한 임상시험에서는 면역반응이 낮아 현재까지도 상업화된 제품이 없다. 이는, 상업적 가치가 높고, 의학적 필요성도 충분하면서, 면역반응 유도가 적합한 적응증을 대상으로 하는 임상연구가 부족했던 측면도 있다. 하지만 강력하고 효과적인 면역반응을 유도하기 위한 최적의 DNA 백신 디자인 및 면역화 전략이 충분히 적용되지 못했던 이유도 있을 것이다. 본 연구진이 개발한 GX-188E는 HPV 유래 타질환, 이를테면, 두경부암이나, 항문 전암병변의 치료에 적용될 수 있을 것으로 기대된다. 무엇보다도, 세계 최초로 DNA 치료백신의 상업화를 목표로 차단계 자궁경부전암 임상 연구 진행에 노력하고 있다. (ST)