

Adjuvant Effect of PAMAM Dendrimer on the Antigenicity of Keyhole Limpet Hemocyanin in Balb/c Mice

Ga-Young Lee¹, Min Jee Kim¹, So Yeon Kim¹, Kyung Bok Lee², Dong Hyun Oh³, Young Ho Cho⁴ and Yung Choon Yoo^{1*}

¹Department of Microbiology, College of Medicine, Konyang University, Daejeon 35365, Korea

²Department of Biochemistry, College of Medicine, Konyang University, Daejeon 35365, Korea

³Department of Radiology, College of Medicine, Konyang University, Daejeon 35365, Korea

⁴Department of Pharmaceutics & Biotechnology, College of Medical Engineering, Konyang University, Daejeon 35365, Korea

Received August 25, 2020 / Revised October 1, 2020 / Accepted October 8, 2020

The adjuvant effect of PAMAM dendrimer G4 (PAMAM) on the induction of humoral and cellular immune responses against keyhole limpet hemocyanin (KLH) was examined. Mice were immunized subcutaneously twice at two-week intervals with KLH, with or without PAMAM dendrimer (100 µg/mouse), and the mice immunized with KLH+PAMAM showed significantly higher antibody titers against KLH than those immunized with KLH alone. The assay for determining the isotypes of the antibodies showed that PAMAM augmented the KLH-specific antibody titers of IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, and IgM. In addition, mice immunized twice with KLH+PAMAM followed by a subcutaneous injection of KLH (20 µg/site) 7 weeks after the primary immunization exhibited a higher delayed-type hypersensitivity (DTH) reaction than those treated with KLH alone. In an *in vitro* analysis of T lymphocyte proliferation in response to KLH in week 8, the splenocytes of mice treated with KLH+PAMAM showed significantly higher proliferating activity than those treated with KLH alone, and the culture supernatants of cell cultures from mice immunized with added PAMAM dendrimer showed higher levels of KLH-specific cytokine (IL-4 and IFN- γ) production. These results suggest that PAMAM dendrimer G4 possesses a potent immune-adjuvant activity for enhancing both humoral and cell-mediated immunity specific to foreign antigens.

Key words : Adjuvant, antibody production, cellular immunity, PAMAM dendrimer, humoral immunity

서 론

질병에 대한 대처는 치료 보다는 예방이 훨씬 더 효율적이며 효과적인 방법이다. 병원체에 의한 감염병을 사전에 예방하기 위한 목적으로 백신이 개발되었고, 이러한 백신은 감염병의 예방은 물론 치료에 있어서도 매우 중요한 역할을 담당하고 있다. 백신은 면역세포가 항원에 대한 정보를 기억하는 기능을 이용하여, 백신으로 투여한 항원을 보유하는 병원체에 의해 감염되었을 때, 면역반응을 더 빠르고 강하게 유도하여 질병의 발생을 억제하게 된다. 하지만 일반적으로 백신으로 사용되는 항원만으로는 충분한 면역능을 유도하기가 어려워, 백신의 대부분은 항원과 함께 면역증강제인 adjuvant를 함께 투여하게 되며, 이 adjuvant는 면역세포가 항원에 대한 면역반응을 더 높게 유도하여 병원체에 대한 억제활성을 상승시키는

역할을 한다[14, 21].

면역증강제(adjuvant)의 개념은 디프테리아(diphtheria)와 파상풍(Tetanus)에 대한 백신을 연구하던 Gaston Ramon에 의해 발견되었으며, 염증반응이 항체가를 높이는데 기여하며 염증 유발물질 중에는 면역반응을 증가시키는 물질이 있다는 이론을 제시하였다[8, 20]. 면역증강제는 T세포에 의한 세포성 면역반응을 효과적으로 상승시켜 백신의 면역효율을 증가시키며, 영유아를 비롯하여 면역기능이 충분히 성숙되지 않은 숙주나 면역기능이 저하된 노인에게 있어서 백신효율을 높이는 작용이 있다[1]. 더욱이 백신에 면역증강제를 첨가 할 경우 항원에 대한 항체가가 상승하며, 항체생산의 유지기간이 길어지는 특징이 있다[17]. 즉 효과적인 면역증강제의 경우, 체액성 면역반응을 자극함으로써 항원에 대한 IgG, IgA 및 IgM 등 면역글로부린의 생성은 물론, 함께 투여된 항원이 T세포에 의해 인식되어 유도되는 T세포 면역반응도 조절할 수 있다. 따라서 면역증강제는 함께 투여된 항원에 대한 세포성 면역은 물론, 항체면역에 있어서도 높은 상승효과를 유도하여 백신의 효능을 높일 수 있다[3, 11, 16].

Dendrimer는 규칙적인 가지 구조를 가지고 있는 거대 분자로, 구성 단위체를 한 단씩 연결하면서 분자량을 조절하며 합성이 가능하고, 또한 구성 단위와 표면 작용기에 따라 화학적

*Corresponding author

Tel : +82-42-600-8694, Fax : +82-42-600-8694

E-mail : yc_yoo@konyang.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

성질을 다양하게 변화시킬 수 있어 연구범위가 매우 넓다[23, 24]. 그 중에서도 polyamidoamine (PAMAM) dendrimer는 표면에 여러 종류의 amide와 amine이 반복적으로 구성되어 있는 dendrimer 종류이며 전체적으로 구형을 나타내고, 구조상의 core type과 표면기능기(functional surface group)의 종류에 따라 10 종류의 세대(generation)로 나뉘고 세대가 높아짐에 따라 표면에 더 많은 분기점이 생성되어 상대적으로 다른 dendrimer에 비해 더 큰 생체 적합성을 부여할 수 있다[4, 7, 12]. 일반적으로 dendrimer는 세포나 생체에 대해 일정 수준의 독성을 나타내는 것으로 알려져 있으나, PAMAM dendrimer의 독성에 관한 초기 연구자료들에 의하면 세포주마다 민감성의 차이는 있지만, 다른 dendrimer 군에 비해 전체적으로 독성이 낮은 것으로 평가되고 있다[6].

In vivo 실험계에서 수행된 연구결과에 의하면, 고농도의 -NH₂기를 부가한 PAMAM dendrimer를 마우스에 투여한 결과, 혈청 중의 AST (aspartate transaminase)와 ALT (alanine transaminase)의 농도가 대조군에 비해 다소 높아지는 것으로 나타났다[2, 7, 10, 19]. AST와 ALT는 간세포 내에 존재하는 효소로서, 정상적인 혈청에서는 일정 농도 이하로 존재하나, 간 손상이 있는 경우에 수치가 상승하게 된다[5]. 따라서, 고농도의 -NH₂ 기를 부가한 PAMAM dendrimer 투여군에서 혈청 AST 및 ALT의 증가는 간에서 고농도의 -NH₂ 그룹이 독성을 유도했다는 것을 의미한다. 하지만 낮은 농도의 -NH₂ 기부가 PAMAM dendrimer나 PAMAM dendrimer만을 투여한 그룹에서는 이들 효소의 혈중 농도는 물론, 총단백질 및 일부 미네랄의 농도에 있어서도 유의미한 차이가 관찰되지 않은 것으로 보아 PAMAM dendrimer는 -NH₂기를 부가한 구조에서 특이적인 간독성이 발현되나, 그 자체만으로는 거의 독성이 없는 것으로 판단된다.

한편 PAMAM dendrimer는 유전체나 약물의 전달체로서의 기능 외에도 그 자체로서 위축증(atrophics)의 억제, 진통효과 그리고 항염증 활성 등 다양한 생리활성이 있는 것으로 알려져 있다[24]. 하지만 아직 PAMAM dendrimer와 면역세포의 상호작용이나 면역학적 기능에 대한 정보는 거의 전무한 실정이다. 본 연구에서는 PAMAM dendrimer의 면역학적 생리활성을 규명하기 위한 목적으로, 마우스를 이용한 동물실험에서 항원 단백질에 대한 면역반응에 미치는 면역증강활성에 대해 조사하였다.

재료 및 방법

시약

본 연구에 사용된 PAMAM dendrimer (ethylenediamine core, generation 4.0 solution PAMAM dendrimer G4, Fig. 1) [10]는 Sigma-Aldrich (St. Louise, MO, USA)에서 구매하였으며, 항원으로 사용한 Keyhole limpet hemocyanin (KLH)

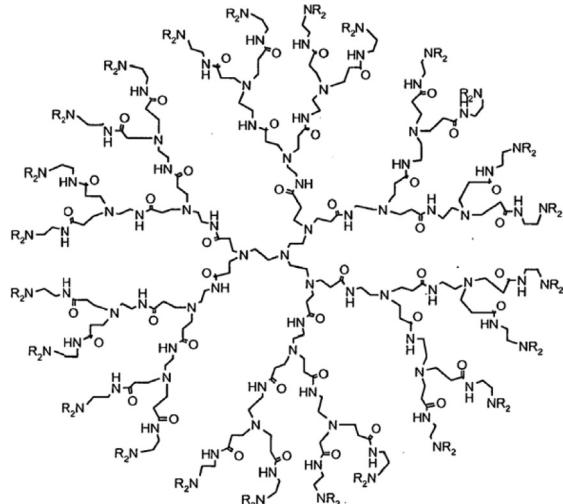


Fig. 1. Schematic structure of PAMAM dendrimer.

단백질은 Calbiochem (California, USA)에서 각각 구입하였다. KLH는 실험 하루 전 phosphate-buffered saline (PBS)에 녹인 후 0.2 μm의 filter로 여과한 후 사용하였다. 항체가 측정을 위한 항체로는 HRP (horse radish peroxidase)가 conjugation된 2차 항체인 Goat Anti-Mouse IgGAM-HRP, Goat Anti-Mouse IgG1-HRP, Goat Anti-Mouse IgG2a-HRP, Goat Anti-Mouse IgG2b-HRP, Goat Anti-Mouse IgG3-HRP 및 Goat Anti-Mouse IgM-HRP는 SouthernBiotech (Birmingham, AL, USA)에서 구매하였고, cytokine 정량에는 Enzyme-linked immunosorbent assay kits (ELISA kits; BD Bioscience, San Diego, CA, USA)를 사용하였다.

세포배양

비장세포는 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco BRL Life Technologies, York, USA)을 포함하는 RPMI 배지 (Welgene, Seoul, Korea)에 penicillin과 streptomycin (Gibco BRL Life Technologies)을 첨가한 배지에서 배양하였으며, 세포의 증식반응은 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-tetrazolium bromide (MTT; Sigma-Aldrich, St. Louise, MO, USA)를 사용하여 측정하였다[25].

실험동물

Balb/c 마우스(6주령, 암컷)는 Raon Bio Inc. (Yongin, Korea)에서 구입하여 사용하였으며, 동물실험은 건양대학교 IACUC (승인번호 P-20-05-A-01)의 승인 하에 수행하였다.

면역유도 및 항체분석

마우스 면역은 대조군(none-treated), KLH (5, 10 혹은 20 μg/mouse) 단독 투여군 그리고 KLH+PAMAM (100 μg/mouse) 투여군으로 나누어, 각 그룹별로 피하주사를 통해 2주

간격으로 2회 실시하였다. 면역 3, 4 그리고 5주째에 안와정맥을 통해 채혈한 후 혈청을 PBS에 희석하여 -30°C에서 보관하였다. KLH에 대한 항체(IgG+IgA+IgM)의 측정은 indirect ELISA법에 의해 측정하였다. ELISA plate에 KLH를 2 µg/ml의 농도로 코팅하고 3% BSA 용액으로 blocking한 후, 각 well에 항혈청을 2배 계단희석하여 첨가하고 2시간 동안 37°C에서 반응시켰다. 그 후 PBS-0.05% Tween 용액으로 각 well을 3회 세척한 후, peroxidase가 부착된 2차 항체인 goat anti-mouse IgGAM-HRP를 넣고 2시간 반응시켰다. PBS-0.05% Tween 용액으로 3회 세척 후, 0.2 mM ABTS (2,2-azino-di-(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (Sigma-Aldrich, MO, USA) 기질용액을 첨가하고 37°C에서 30분간 반응시켰다. 각 well의 흡광도(optical density, O.D.)는 415 nm에서 측정하였다. 항혈청의 KLH에 대한 항체 역가는 정상 마우스 혈청(대조군)에 대한 O.D.값의 2배를 나타내는 희석비로 결정하였다[25]. 그리고 항 KLH 항체의 isotype은 마우스 면역글로부린의 각 isotype에 대한 2차 항체(HRP-conjugated IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM)를 이용하여 결정하였다.

지연형 과민반응 측정

항원에 대한 지연형 과민반응(delayed type hypersensitivity; DTH) 측정은 KLH (20 µg/mouse) 단독 혹은 KLH+PAMAM (100 µg/mouse)의 조건으로 2주 간격으로 면역한 후, 최초 면역 7주째에 마우스의 발바닥(footpad)에 KLH를 20 µg씩 피하주사하고, 48시간 후에 항원에 대해 유도되는 footpad swelling의 두께를 digital caliper (Mitutoyo, Kawasaki, Japan)를 이용하여 측정하였다. DTH 반응의 증가는 대조군에 대한 swelling의 비율로 계산하여 판정하였다[25].

비장세포 증식실험

항원 자극에 대한 특이적인 림프구의 증식반응을 측정하기 위하여, 각 그룹당 3마리씩의 Balb/c 마우스에 KLH (10 µg/mouse) 단독 혹은 KLH+PAMAM (100 µg/mouse)의 조건으로 2회 면역하였다[25]. 최초 면역 8주째에 마우스를 마취한 후 희생시켜 비장을 적출하고 homogenizer를 이용하여 비장세포를 single cell로 하였다. 비장세포를 96-well plate에 5×10^5 cell/well의 농도로 넣고 37°C, 5% CO₂ 조건의 incubator에서 8시간 동안 안정화시켰다. 그 후 각 well에 KLH를 10 µg/ml의 농도로 첨가하고 24시간 배양하였다. 세포의 증식반응은 MTT 법에 의해 수행하였다[25].

Cytokine 정량

KLH 항원에 대한 T세포의 사이토카인 분비에 미치는 PAMAM의 영향은 림프구의 증식반응 시험에 사용한 비장세포를 이용하여 분석하였다. 48-well plate의 각 well에 비장세포를 1×10^6 cell/well씩 넣은 후 KLH (10 µg/ml)를 첨가하여

24시간 자극하였다. 그 후 세포배양액을 취하여 원심분리(900 g, 5 min)하여 상동액을 취한 후 ELISA kit를 이용하여 각 사이토카인을 정량하였다.

통계학적 분석

실험군 간의 통계학적 유의성은 Student's two-tailed t-test를 이용하여 분석하였으며, $p < 0.05$ 수준 이상인 경우 통계학적으로 유의한 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

PAMAM의 항체유도 상승효과

항체 역가(antibody titer)는 특정 항원을 인식한 면역세포의 상호작용에 의해 B세포로부터 생산된 항체가 항원에 대해 나타내는 특이적인 반응 강도를 의미하며, 이 실험에서는 KLH 단독 혹은 KLH+PAMAM으로 면역한 마우스로부터 0, 3, 4 및 5주째에 채혈한 혈액으로부터 분리한 혈청을 이용하여 ELISA assay로 분석하여, 항원에 대해 특이적인 반응을 나타낸 혈청의 최대 희석비의 역수로 계산하여 비교하였다[22, 25].

Fig. 2에서 보듯이, PAMAM (100 µg/mouse)을 KLH (20 µg/mouse)와 함께 면역한 그룹에서 KLH를 단독으로 면역한 그룹과 비교하여 유의하게 항체역자가 상승하는 것으로 나타났다. 이러한 PAMAM에 의한 항 KLH 항체가의 상승은 면역 개시 3주 후부터 인정되었으며, 가장 높은 항체가를 보인 면역 개시 4주째의 항체가를 비교해 보면, PAMAM을 혼합하여 면역함으로서 KLH 단독 면역에 비해 약 32배 이상 항체유도능

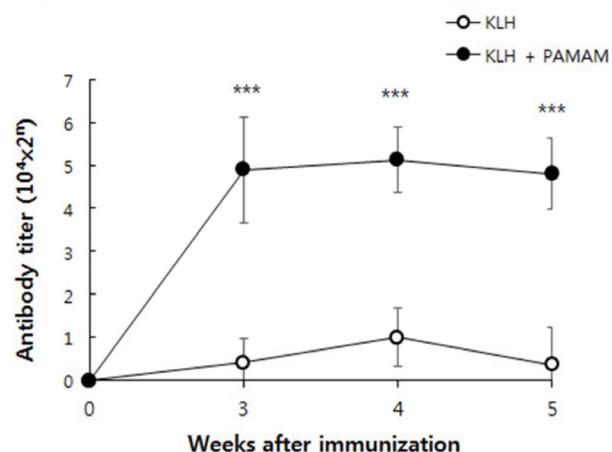


Fig. 2. Effect of PAMAM on induction of KLH-specific antibody response. Five Balb/c mice per group were immunized subcutaneously (s.c.) with KLH (20 µg/mouse) or KLH+PAMAM (100 µg/mouse) twice at the interval of 2 weeks. The antibody titers of serum specimens were measured by ELISA as described in Materials and Methods. *** $p < 0.001$, compared with the control group (KLH alone) by Student's two-tailed t test.

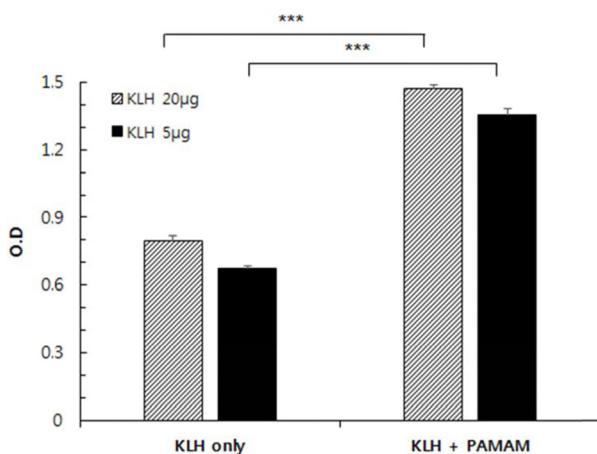


Fig. 3. Adjuvant activity of PAMAM according to the dosage of KLH. Three Balb/c mice per group were immunized s.c. with 5 or 20 µg of KLH admixed with or without PAMAM (100 µg). Immunization schedule and the method to determine antibody titer to KLH were the same with those of Fig. 2. *** $p<0.001$, compared with the control group (KLH alone) by Student's two-tailed t test.

이 상승하는 것으로 나타났다. 또한 면역 개시 5주째에는 KLH 단독 면역그룹에서는 항체가의 하락이 관찰되는데 반해, KLH+PAMAM로 면역한 그룹은 여전히 높은 항체가를 유지하는 것으로 확인되었다. 이를 결과는 PAMAM dendrimer는 KLH 항원에 대한 항체면역을 높이는 adjuvant효과를 가지고 있음은 물론, 항체를 빠른 시기에 유도하며 높은 항체가가 오

랜 기간 유지되도록 하는 활성을 지닌 것으로 확인되었다.

한편 항원의 투여량에 따른 PAMAM의 adjuvant효과를 조사하기 위하여 KLH의 투여량을 마우스당 5 µg 혹은 20 µg으로 하여 각각 PAMAM (100 µg)과 혼합하여 2주 간격으로 2회 면역한 후 3주째의 항체가를 비교하였다. 그 결과, Fig 2에서와 동일하게 20 µg의 KLH 투여에서는 물론, 투여량이 낮은 5 µg의 KLH에 투여에 대해서도 PAMAM은 항체가를 유의하게 상승시키는 것으로 나타났다(Fig. 3). 특히 5 µg의 KLH를 PAMAM과 혼합하여 면역한 그룹이 항원 양이 4배나 높은 20 µg의 KLH 단독으로 면역한 그룹보다도 유의하게 높은 항체가를 나타낸 것으로 보아, PAMAM의 adjuvant 효과는 우수한 것으로 판단되었다.

PAMAM이 IgG의 sub-isotype에 미치는 영향

Fig. 2의 실험에서 PAMAM이 adjuvant활성을 지니는 것이 확인되어, 이번에는 PAMAM이 IgG 항체의 sub-isotype에 어떠한 영향을 미치는 가를 ELISA를 통해 분석하였다. 그 결과, PAMAM을 KLH와 혼합하여 면역함으로서 IgG1, IgG2a, IgG2b 및 IgG3 등 모든 종류의 sub-isotype이 함께 유의하게 증가하였다(Fig. 4). 또한 IgM도 유의한 증가를 나타내었다. IgG는 T세포의 매개에 의해 B세포로부터 분비되는 항체로서, 마우스의 경우 T세포의 반응이 Th1 방향으로 우세한 경우에는 IgG2a가, Th2 방향으로 우세한 경우에는 IgG1의 생성이 높아지게 된다[25]. Fig. 4의 결과에서 PAMAM에 의해 IgG1과 IgG2a가 모두 상승한 것으로 보아, PAMAM은 Th1과 Th2

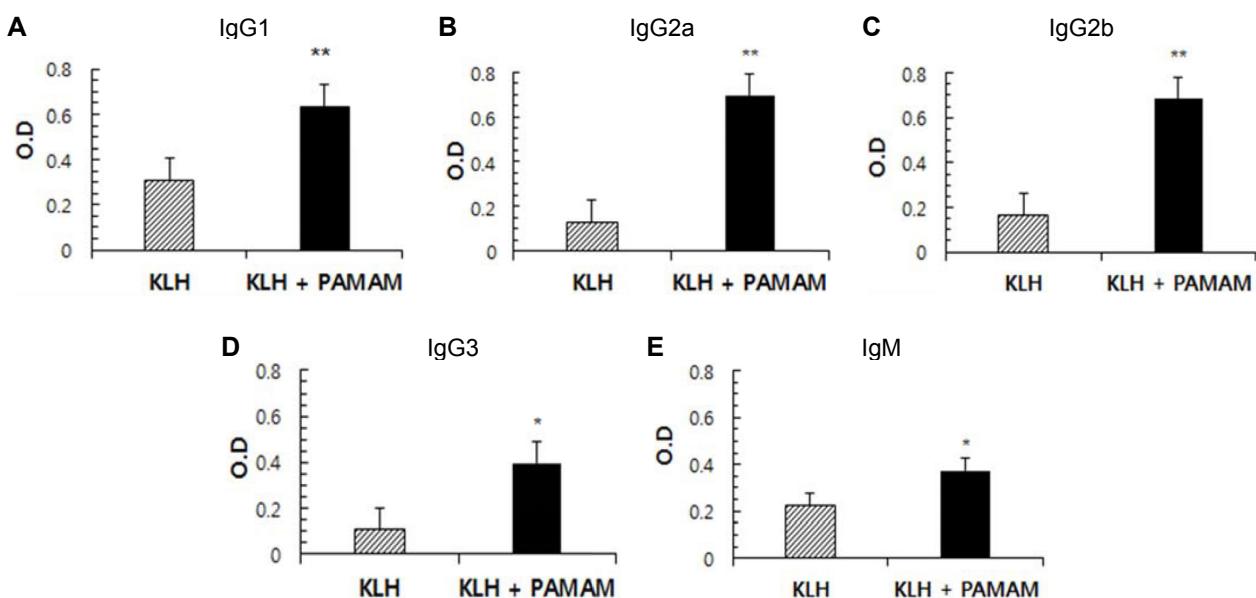


Fig. 4. Determination of subclasses of KLH-specific antibodies in serum specimens. Five mice per group were immunized s.c. twice with KLH (20 µg) or KLH+PAMAM (100 µg) as the same method described in Fig. 2. Isotypes of KLH-specific antibodies were determined by ELISA using 1,000-fold diluted serum specimens. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, compared with the control group (KLH alone) by Student's two-tailed t test.

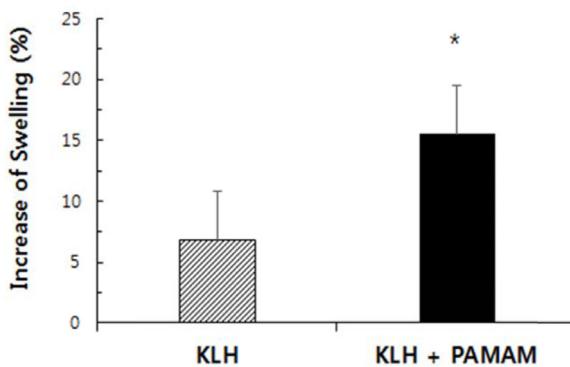


Fig. 5. Effect of PAMAM on induction of KLH-specific DTH reaction. DTH reaction was performed using mice immunized twice with KLH (20 µg) or KLH+PAMAM (100 µg) as described in Materials and Methods. DTH reaction was expressed as the percent increase of footpad swelling. * $p<0.05$, compared with the control group (KLH alone) by Student's two-tailed t test.

반응 모두를 매개로 하여 항체면역을 증진시키는 것으로 추정되었다.

DTH 상승효과

PAMAM이 세포성 면역에 미치는 효과를 *in vivo* 모델을 이용한 지연형 과민반응(DTH)으로 조사하였다. 그 결과, PAMAM을 KLH와 함께 면역한 마우스는 KLH 항원만을 면역한 마우스에 비해 footpad swelling이 2배 이상 유의하게 증가되는 것으로 확인되었다(Fig. 5). 이는 PAMAM이 세포성 면역을 증강시키는 효과가 있음을 시사한다.

Fig. 2, Fig. 4 그리고 Fig. 5의 결과를 토대로 분석해 보면, PAMAM은 항체면역은 물론 세포성 면역을 상승시키는 기전을 통해 높은 항체면역을 유도한 것으로 추정되며, 이러한 현상은 Alum이나 MF59와 같은 인체에 적용되고 있는 adjuvant에서도 보고되었으며[9, 13], 또한 본 연구진이 이전의 연구에서 사용한 *Cudrania tricuspidata* 추출물과 같은 adjuvant 활성이 우수한 천연소재에서도 보고된 예가 있다[15].

항원 특이적인 림프구의 활성화

상기 실험결과에서 PAMAM이 세포성 면역을 활성화하는 가능성이 제시 되었으므로, 이를 확인하기 위하여 PAMAM이 KLH에 대한 T세포 매개 면역반응에 미치는 영향을 조사하였다. T세포 매개 세포성 면역반응은 항원에 대한 증식반응과 사이토카인 분비능을 통해 분석하였다. KLH 단독 혹은 KLH+PAMAM으로 2회 면역한 마우스로부터 8주째에 비장세포를 취한 후, *in vitro*에서 KLH를 첨가하여 24시간 동안 재자극한 뒤 MTT법에 의해 T세포 증식반응을 측정하였다. 한편 T세포가 세포 배양액 중에 분비한 사이토카인은 ELISA kit를 이용하여 정량하였다. 그 결과, PAMAM은 항원 특이적

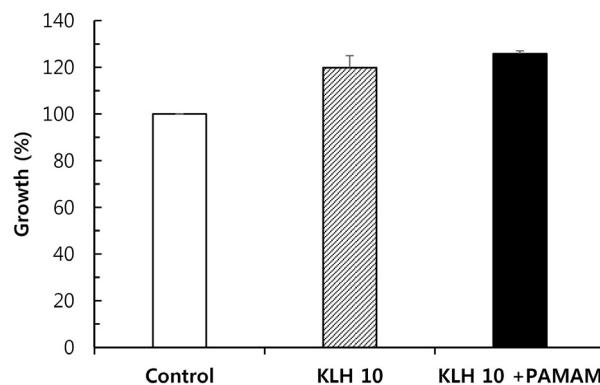


Fig. 6. Effect of PAMAM on T cell proliferating activity to KLH. Splenocytes obtained from the boosted mice 8 weeks after the primary immunization were co-incubated with 10 µg/ml of KLH for 24 hr. Proliferating activity of T cells was measured by MTT assay.

인 T세포 증식반응에는 그다지 큰 영향을 미치지 않았으나 (Fig. 6), 사이토카인 분비에 있어서는 IL-4와 IFN-γ의 생성이 유의하게 증가하는 것으로 확인되었다(Fig. 7). 하지만 IL-2는 약간의 상승은 보였으나, 유의한 증가는 인정되지 않았다.

특정 항원에 대해 T세포가 반응하여 분화 및 활성화될 때 사이토카인을 분비하게 되며, 이 사이토카인의 종류에 따라 항체면역의 방향이 결정된다. 즉 T세포가 Th1 쪽으로 분화될 경우 IFN-γ를 분비하여 B세포 상의 MHC class II 분자와의 상호작용을 통해 IgG2a 항체 생성을 촉진하며, Th2 쪽으로 분화될 경우에는 IL-4를 분비하여 IgG1항체 생성을 촉진하게 된다[9, 18]. 본 연구결과에서 보면, PAMAM을 KLH항원과 함께 면역할 경우, PAMAM은 IgG1은 물론 IgG2a 항체의 유의한 상승을 유도하며(Fig. 4), T세포로부터 항원 특이적인 IL-4와 IFN-γ 사이토카인의 생성을 높이는 것으로 확인되었다 (Fig. 7). 즉 PAMAM은 항원에 대한 세포성 면역반응에 있어서 Th1과 Th2 반응 모두를 활성화시켜 IFN-γ와 IL-4 사이토카인의 분비를 촉진하고, 그 결과 B세포로부터 Th1 type 항체인 IgG2a는 물론 Th2 type 항체인 IgG1의 분비를 상승시키는 것으로 추정되었다.

한편 KLH와 함께 PAMAM을 면역한 마우스의 혈청을 이용하여 PAMAM 투여에 의해 독성이 유발되는 가의 여부를 측정하였다. 100 µg의 PAMAM을 2주 간격으로 2회 KLH와 함께 피하주사하고, 2차 면역 1일 후의 혈중 AST 및 ALT를 정량한 결과 간독성은 인정되지 않았으며, 또한 신독성을 나타내는 혈중 creatinine (CRE)과 blood urea nitrogen (BUN)의 농도도 상승하지 않았다(data not shown). 또한 체중에 있어서도 유의한 체중감소는 인정되지 않았다. 이들 결과는 이 실험에 사용한 투여조건에서는 PAMAM은 전혀 독성이 없음을 의미하는 것이다.

이상의 결과를 종합하면, PAMAM dendrimer는 항원에 대

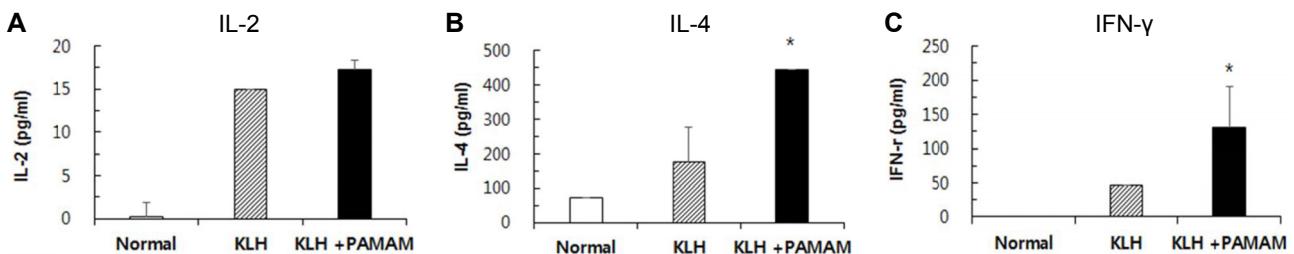


Fig. 7. Cytokine assay for KLH-specific cytokines. Three mice per group were immunized s.c. twice with KLH (10 µg) or KLH+PAMAM (100 µg). Eight weeks after the primary immunization, splenocytes of the immunized mice were co-incubated with KLH (10 µg/ml) for 24 hr. The level of KLH-specific cytokines (IL-2, IL-4 and IFN- γ) in the cell cultures was measured using ELISA kits. * $p<0.05$, compared with the control group (KLH alone) by Student's two-tailed t test.

한 항체생성을 촉진하는 adjuvant 활성을 지니며, 이 adjuvant 활성은 PAMAM dendrimer에 의한 T세포 매개 세포성 면역의 증강에 의한 것으로 확인되었다. 결론적으로 본 연구 결과는 PAMAM dendrimer가 항원에 대한 항체면역과 세포성 면역을 증강시키는 안전한 면역증강제로서 응용 가능성이 높은 소재임을 시사한다.

감사의 글

본 연구는 농림축산식품부의 재원으로 농림식품기술기획 평가원의 농생명산업기술개발사업(과제번호 316007-5)과 미래창조과학부 한국연구재단-전통문화융합연구사업(과제번호 2016 M3C1B5907053)의 지원에 의해 수행되었습니다.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- Black, S., De Gregorio, E. and Rappuoli, R. 2015. Developing vaccines for an aging population. *Sci. Transl. Med.* **7**, 281ps8.
- Chauhan, A. S., Jain, N. K. and Diwan, P. V. 2010. Pre-clinical and behavioural toxicity profile of PAMAM dendrimers in mice. *Proc. R. Soc. A* **466**, 1535-1550.
- Clapp, T., Siebert, P., Chen, D. and Braun, L. T. J. 2010. Vaccines with aluminum-containing adjuvants: Optimizing vaccine efficacy and thermal stability. *J. Pharm. Sci.* **100**, 388-401.
- Esfand, R. and Tomalia, D. A. 2001. Poly (amidoamine) (PAMAM) dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical applications. *Drug Discov. Today* **6**, 427-436.
- Fassati, M., Stepan, J. M., Schon, E. and Hacker, J. 1969. Alkaline phosphatase, lactate dehydrogenase and aspartate aminotransferase and their isoenzymes as indicators of the development of experimental virus hepatitis in mice. *Clin. Chem. Acta* **26**, 497-504.
- Fischer, D., Li, Y., Ahlemeyer, B., Kriegstein, J. and Kissel, T. 2003. *In vitro* cytotoxicity testing of polycation: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials* **24**, 1121-1131.
- Fréchet, J. M. J. and Tomalia, D. A. 2001. Laboratory synthesis of poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers. pp. 587-604. In: Esfand, R. and Tomalia, D. A. (eds). *Dendrimers and other dendritic polymers*. John Wiley & Sons Ltd., United Kingdom.
- Garcon, N. and Di Pasquale, A. 2017. From discovery to licensure, the adjuvant system story. *Hum. Vaccin. Immunother.* **13**, 19-33.
- Gavillet, B. M., Eberhardt, C. S., Auderset, F., Castellino, F., Seubert, A., Tregoning, J. S., Lambert, P. H., de Gregorio E., Giudice, G. D. and Siegrist, C. A. 2015. MF59 mMediates its B cell adjuvanticity by promoting T follicular helper cells and thus germinal center responses in adult and early life. *J. Immunol.* **194**, 4836-4845.
- Heegaard, P. and Boas, U. 2006. Dendrimer conjugates for selective protein aggregates. US Patent App. 10/536,629.
- Hunter, R. L. 2002. Overview of vaccine adjuvant: present and future. *Vaccine* **20**, S7-S12.
- Kojima, C., Kono, K., Maruyama, K. and Takagishi, T. 2000. Synthesis of polyamidoamine dendrimers having polyethylene glycol grafts and their ability to encapsulate anti-cancer drugs. *Bioconjug. Chem.* **11**, 910-917.
- Kool, M., Soullie, T., Van Nimwegen, M., Willart, M. A. M., Muskens, F., Jung S., Hoogsteden, H. C., Hammad, H. and Lambrecht, B. N. 2008. Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *J. Exp. Med.* **205**, 869-882.
- Lee, C. W., Ko, E. J. and Joo, H. G. 2012. Immunostimulatory effects of BCG-CWS on the proliferation and viability of mouse spleen cells. *Kor. J. Vet. Res.* **52**, 89-97.
- Lee, K. B., Song K. S., Moon, E. H., Lee, J. L. and Yoo, Y. C. 2009. Adjuvant Activity of Cudrania tricuspidata Water extracts to enhance antigen specific humoral and cellular immune responses. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* **52**, 234-240.
- Leroux-Roels, G. 2010. Unmet needs in modern vaccinology adjuvants to improve the immune response. *Vaccine* **28**, C25-C36.
- Marrack, P. and McKee, A. S. 2009. Towards an under-

- standing of the adjuvant action of aluminium. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 287-293.
18. Mata-Haro, V., Cekic, C., Martin, M., Chilton, P. M., Casella, C. R. and Mitchell, T. C. 2007. The vaccine adjuvant mono-phosphoryl lipid A as a TRIF-biased agonist of TLR4. *Science* **316**, 1628-1632.
 19. Papadimitriou, J. M. and Van Duijn, P. 1970. The ultrastructural localization of isozymes of aspartate aminotransferases in murine tissues. *J. Cell Biol.* **47**, 84-98.
 20. Pasquale, A., Preiss, S., Silva, F. and Garcon, N. 2015. Vaccine adjuvants: from 1920 to 2015 and beyond. *Vaccine* **3**, 320-343.
 21. Querec, T., Bennouna, S., Alkan, S., Laouar, Y., Gorden, K., Flavell, R., Akira, S., Ahmed, R. and Pulendran, B. 2006. Yellow fever vaccine YF-17D activates multiple dendritic cell subsets via TLR2, 7, 8 and 9 to stimulate polyvalent immunity. *J. Exp. Med.* **203**, 413-424.
 22. Sorensen, R. U., Hidalgo, H., Moore, C. M. and Leiva, L. E. 1996. Post-immunization pneumococcal antibody titers and IgG subclasses. *Pediatr. Pulmonol.* **22**, 167-173.
 23. Tomalia, D. A., Naylor, A. M. and Goddard, III. W. A. 1990. Starburst dendrimers: Molecular-level control of size, shape, surface chemistry, topology, and flexibility from atoms to macroscopic matter. *Angew. Chem. Int.* **29**, 138-175.
 24. Vinicius de Araujo, R., Santos, S., Ferreira, E. and Giallora, J. 2018. New advances in general biomedical applications of PAMAM dendrimers. *Molecules* **23**, 2849.
 25. Yoon, T. J., Yoo, Y. C., Kang, T. B., Her, E., Kim, S. H., Kim, G., Azuma, I. and Kim, J. B. 2001. Cellular and humoral adjuvant activity of lectins isolated from Korean mistletoe. *Int. Immunopharmacol.* **1**, 881-889.

초록 : Balb/c 마우스에서 Keyhole limpet hemocyanine (KLH)의 항원성에 대한 PAMAM dendrimer의 면역증강 효과

이가영¹ · 김민지¹ · 김소연¹ · 이경복² · 오동현³ · 조영호⁴ · 유영춘^{1*}

(¹건양대학교 의과대학 미생물학교실, ²건양대학교 의과대학 생화학교실, ³건양대학교 의과대학 영상의학과, ⁴건양대학교 의료공과대학 제약생명공학과)

본 연구에서는 Keyhole limpet hemocyanin (KLH)에 대한 체액성 및 세포성 면역반응 유도에 대한 PAMAM dendrimer G4 (PAMAM)의 증강 효과를 조사하였다. PAMAM을 KLH와 2주 간격으로 2회 피하주사로 면역한 후, KLH에 대한 특이항체를 측정한 결과, KLH+PAMAM 면역 그룹은 KLH만을 단독으로 면역한 그룹에 약 30배 이상 높은 유의한 항체가(IgG+IgA+IgM) 상승을 나타냈다. ELISA 분석에 의해 KLH 특이적인 면역글로부린의 isotype을 측정한 결과, PAMAM를 혼합하여 면역함으로서 IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 및 IgM 항체의 역가가 유의하게 증가하는 것으로 확인되었다. 또한 면역 개시 7주째에 면역동물에 KLH 항원을 피하주사하고 swelling reaction을 통해 세포성 면역반응인 지연형 과민반응(DTH)을 측정한 결과, KLH+PAMAM으로 면역한 그룹에서 KLH만을 단독으로 면역한 그룹에 비해 높은 DTH 유도활성이 관찰되었다. 한편 면역동물의 비장세포를 취하여 in vitro에서 KLH로 재자극한 후 림프구 증식반응과 사이토카인 유도활성을 측정한 결과, PAMAM을 혼합하여 면역한 그룹에서 KLH 단독 면역 그룹에 비해 림프구의 증식반응에 유의하게 증가하였으며, Th1 type (IFN- γ)과 Th2 type (IL-4) 사이토카인의 생성도 모두 상승하는 것으로 확인되었다. 이상의 결과로부터 PAMAM dendrimer는 함께 투여된 항원물질에 의해 유도되는 세포성 면역과 체액성 면역을 상승시키는 활성이 있는 것으로 확인되었으며, 이는 PAMAM dendrimer가 면역 adjuvant로서 응용 가능한 소재임을 입증하는 것이다.