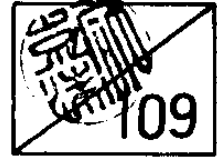


BSN 80470-449-1



간염 백신 개발

Development of Hepatitis B Vaccine

연 구 기 관
한국과학기술연구원
부설 유전공학연구소

과 학 기 술 처

제 출 문

과학기술처장관 귀하

본 보고서를 “간염 백신 개발”에 관한 제 2 차년도 연구의 최종보고서로 제출합니다.

1992. 12.

주관연구기관명 : 한국과학기술연구원 부설 유전공학연구소

총괄연구책임자 : 함 경 수 (유전공학연구소 책임연구원)

연 구 원 : 김 길 룡 (유전공학연구소 책임연구원)

김 승 호 (유전공학연구소 선임연구원)

최 용 경 (유전공학연구소 선임연구원)

배 윤 수 (유전공학연구소 선임연구원)

이 명 규 (유전공학연구소 연구원)

박 필 련 (유전공학연구소 연구원)

염 현 정 (유전공학연구소 연구원)

최 재 형 (유전공학연구소 연구원)

권 형 주 (유전공학연구소 연구원)

손 미 영 (유전공학연구소 연구원)

권 혜 영 (유전공학연구소 연구원)

이 은 옥 (유전공학연구소 연구원)

장 경 선 (유전공학연구소 연구원)

요 약 문

I. 제 목

간염백신 개발

II. 연구의 목적 및 중요성

간염은 바이러스 감염, 박테리아 감염 및 물리 화학적인 요인에 의해 간에 염증이 생기는 현상으로 바이러스에 의한 감염이 가장 일반적이다. 바이러스 감염에 의한 간염은 A형, B형 및 C형 (non A-non B) 등이 있다. 그중 B형 간염 바이러스 (Hepatitis B virus ; HBV)에 의하여 감염되는 B형 간염은 전세계적, 특히 극동아시아 및 아프리카 지역의 풍토병으로 알려질 정도로 심각한 병으로 전세계 인구의 2억명 정도가 만성보균자로 알려져 있고, 국내에서도 전체 인구의 10% 이상이 만성보균자로 알려져 있다. HBV의 감염은 간염과 간경화증의 주된 원인이며, 최근에는 HBV의 감염이 간암을 유발할 수 있다고 밝혀짐에 따라 HBV의 문제는 더욱 심각해져 가고 있다. 따라서 B형 간염 바이러스의 감염을 방지하기 위하여, 높은 면역원성과 안정성을 지닌 효과적인 간염백신의 개발이 시급한 실정이다. 최초의 B형 간염백신은 감염자의 혈장으로부터 획득한 20nm 구형의 HBsAg (B형 간염바이러스 표면항원) 입자를 원료로 사용하였다. 이러한 백신의 생산과정중 감염자의 혈액에 존재할지도 모르는 감염바이러스 등을 제거하기 위하여 펄신, 유레아, 포름알데히드 등으로 처리하는데, 이 과정에서 HBV 표면단백질의 proteolytic cleavage가 일어난다. 좌우간 이러한 혈장백신은 B형 간염 예방에 매우 효과적으로 판명되었으나 백신원료의 제한성, 완전한 항원정제의 어려움, 불완전한 불활성화

등의 여러가지 문제점을 지니고 있다. 따라서 최근에는 유전자 재조합 기술방법에 기초를 둔 새로운 백신 개발이 활발히 진행중이며 효모나 고등 동물 세포로부터 HBsAg 입자의 획득이 성공을 거두었고, 현재는 최초의 유전자 재조합 백신이 시판중에 있다. 유전자 재조합 방법 이외의 가능한 방법으로는 백신원료인 펩티드를 화학합성하는 것으로 가장 궁극적인 백신 개발단계로 여겨지고 있다. 합성백신의 설계를 위해선 면역성이 높은 바이러스 단백질의 구조적 정보를 필요로 하며, 낮은 면역원성과 항원성을 극복하기 위해선 carrier protein과 면역성 adjuvant 등의 개발이 시급한 실정이다. 따라서 본 2차년도 연구에서는 합성백신의 개발을 위해서 비교적 바이러스 단백질의 구조적 정보가 잘 알려진 B형 간염의 표면항원 중 면역원성이 높은 부위인 Pre-S2를 중심으로 화학합성해 낮은 면역원성과 항원성을 극복하는데 연구의 목적을 두고 있다.

Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

B형 간염 바이러스의 표면항원 중 면역원성이 높으며, 간세포 감염에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 인혈청 수용체와 직접 결합하여 감염에 관여하는 것으로 알려진 Pre-S2 부위를 화학적 합성을 통해 분리, 정제한 뒤 낮은 면역원성과 항원성을 극복하기 위해 다음과 같은 연구들이 진행되었다.

- 1) 펩티드는 합성기를 통해 합성후, C18 reverse-phase HPLC로 분리 정제한후, 아미노산 성분분석기와 서열분석기를 통해 원하는 펩티드의 합성, 분리 정제를 확인하였다.
- 2) 순수분리한 Pre-S2 펩티드 (120-145/ayw, 130-145/ayw, 130-145/adr)의 낮은 면역원성을 극복하기 위해 많은 carrier pro-

tein과 coupling 한후 면역원성 증진에 관한 연구를 하였으며, HBsAg와의 교차면역성을 조사하였다.

- 3) 합성 펩티드의 낮은 면역원성을 극복하기 위한 다른 방법으로 adjuvants, 특히 immunological adjuvants인 liposome의 효과가 연구되었다.
- 4) 일회 접종으로 여러가지 질병을 동시에 예방할 수 있는 복합면역백신 운반체로의 BCG 활용 가능성에 대한 기초연구가 진행되었다.
- 5) 문헌자료를 통한 기존 백신의 효율성 조사 연구가 시행되었다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

- 1) B형 간염 바이러스 표면항원 중 면역원성이 높은 Pre-S2의 특정 부위인 펩티드 130-145(ayw), 그리고 130-145(adr)가 펩티드 합성기를 통해 합성된 후 reverse-phase HPLC를 이용해 정제되었으며(순도: > 90%) 아미노산 성분분석기와 서열분석기를 통해 원하는 펩티드의 획득을 입증하였다.
- 2) Carrier protein 중 BSA와 OVA는 Pre-S2(120-145/ayw)의 경우 anti-Pre-S2-antibody를 다량 유도하였고 3번 주사후 생성된 항체는 8주간 지속적으로 높게 유지되었다. 또한 생성된 항체는 HBsAg와 교차면역성을 보여주었다. Pre-S2(130-145/ayw)의 경우는 OVA과 conjugate시킨 경우 anti-Pre-S2-antibody를 다량 유도하였고, HBsAg와의 교차면역성을 보여주었다. Pre-S2(130-145/adr)의 경우는 전의 두 펩티드와 비교할 때 비교적 낮은 항체를 생성하였으나, HBsAg와는 교차면역성을 보여주고 있다. 따라서 Pre-S2 펩티드의 크기와 동종교배 strain에 따라 변화하는 H-2

restricted helper T 임파구의 기능에서 야기되는 carrier protein 특히 OVA의 conjugation이 필요함이 확인되었다.

- 3) PC로 제조된 liposome에 lipid A가 첨가될 경우 면역원성, 즉 ELISA titer가 높게 나타남을 알 수 있었고 liposome을 구성하는 인지질을 변화시키면서 liposome을 제조하여 immunize한 결과 인지질의 상전이 온도가 높은 인지질로 구성된 liposome의 경우 더 높은 ELISA titer를 나타냄을 볼 수 있었다. 또한 ganglioside (G_{M1})을 포함한 liposome의 경우가 G_{M1} 을 포함하지 않은 경우보다 높은 ELISA titer를 나타내었다.
- 4) Pre-S2와 liposome의 최적 결합조건을 구하기 위해 여러 실험이 진행되었는데 결합시약인 glutaraldehyde의 경우 peptide 대 glutaraldehyde가 1 : 10인 경우 최적비율을 나타내었고, 위 조건에서 결합시키는 펩티드 양과 liposome에 분포하는 phosphatidylethanolamine의 양 사이에 존재하는 최적비율을 결정하기 위해 조사한 결과 첨가되는 펩티드량 대 인지질의 비가 0.2에서 1사이의 경우 비율이 증가하면서 결합효율이 증가하다가 감소하는 현상을 알 수 있었다.
- 5) BCG로부터 genomic DNA를 분리하여 *E. coli*에서 자체 증식할 수 있는 벡터인 pUC19에 넣어줌으로써 BCG DNA library를 만들었다. Leucine이 없는 배지에서 영양요구주인 OW1과 pUC19으로 형질전환시킨 OW1 (pUC19/OW1)은 자라지 못하지만 재조합 플라스미드인 pUC19-leucine로 형질전환시킨 OW1은 자랄 수 있었다. 유입된 유전자의 제한효소 지도를 작성하였고 현재 이 유전자의 염기서열을 결정하는 실험을 수행하고 있는데 아직까지 보고되지

양은 유전자로 복합면역백신의 운반체로 활용할 때 유용한 지표로 사용될 수 있다.

SUMMARY

Hepatitis B is a public health problem of worldwide importance and also is a pre-stage of hepatocellular carcinoma(HCC), one of the major causes of mortality in Korea. The first hepatitis B vaccines were prepared from plasma of infected individual using purified 20nm spherical HBsAg particles. All these vaccines were proved to be quite efficient in preventing hepatitis B. However, since the source of the vaccines was not uniform, and extensive purification procedure were required, now vaccines based on recombinant DNA technology were developed. Another possibility is to use synthetic peptides for vaccination. Synthetic peptides are considered the ultimate step in vaccine development.

Pre-S2 region of hepatitis B surface antigen contains both immunodominant region and polymerized human serum albumin receptor. Therefore vaccines using Pre-S2 region may be promising for the prevention of hepatitis B infection.

The goal of present study is to synthesize and purify synthetic Pre-S2 peptide as a source of vaccines and to study on enhancement of its antigenicity and immunogenicity using carriers and adjuvants and also to study on efficacy of pre-existing vaccines.

I. Scope and Content of Research

- 1) Peptides synthesized by automatic peptide synthesizer were subjected to HPLC on a C18 reverse column. All the peptides used were eluted as a single major peak (>90%). Also sequence and composition analysis of purified peptides were carried out.
- 2) All synthetic peptides were found to be not immunogenic in the absence of carrier proteins (BSA, OVA). All anti-peptide-antibody displayed significant cross-reactivity with native HBsAg.
- 3) Both incorporation of lipid A into liposome and preparation of liposome containing ganglioside GM₁ were shown as effective methods for enhancing anti-peptide-antibody formation.

Liposome prepared with phospholipid which has higher phase transition temperature produced more anti-peptide-antibody.

- 4) One of the optimal binding condition of peptide to liposome surface was at a molar ratio of 1:10 of peptides to glutaraldehyde as a coupling reagent. Under the same condition, maximal binding efficiency of Pre-S2(130-145/ayw) peptides to liposome composed with phosphatidyl-ethanolamine was at a ratio of around 0.7 of input peptide to phospholipid.

5) To construct the genomic DNA library, *M. bovis* BCG DNA was partially digested with Sau3A, DNA fragments were ligated into pUC19 which can replicate autonomously in *E. coli*. The transformants containing the pUC19-leu DNA were capable of growing in the absence of leucine. Restriction endonuclease map of PstI-EcoRI fragment was constructed and the experiments for the sequencing of nucleotide are in progress. Yet the nucleotide sequence of this gene is not reported and it can be used as an useful marker for the construction of a vector for multivaccine.

CONTENTS

I. Introduction	13
II. Study on enhancement of antigenicity and immunogenicity of hepatitis B surface antigen(HBsAg-Pre-S2)	19
A. Immunogenicity and antigenicity of Pre-S2-carrier protein	19
1. Materials	19
2. Methods	20
(1) Synthesis of peptide(Pre-S2)	20
(2) Coupling peptides to carrier proteins	21
(3) Electrophoresis and western blotting	23
(4) ELISA	24
3. Results and Discussion	24
B. Liposomes as a immunological adjuvant	35
Introduction	35
1. Materials	36
2. Methods	36
(1) Preparation of liposome and coupling peptides to liposome	36
(2) Immunization	41
3. Results and Discussion	41

C. BCG as a carrier of multi-vaccines	52
Introduction	52
1. Materials and Methods	53
2. Results and Discussion	53
D. Immunogenicity of pre-existing vaccines	59
References	61

목 차

제 1 장 서 론	13
제 2 장 간염 바이러스 표면항원 (HBsAg-Pre-S2) 의 항원성 및 면역원성 증진 연구	19
A. Pre-S2-carrier protein 의 면역원성 및 항원성	19
제 1 절 실험재료	19
제 2 절 실험방법	20
1. 펩티드 (Pre-S2) 의 합성	20
2. Pre-S2 펩티드와 carrier protein 의 conjugation 제조	21
3. 전기영동과 western blotting	23
4. ELISA	24
제 3 절 결과 및 고찰	24
B. Liposome 을 이용한 펩티드의 면역원성 및 항원성	35
서 론	35
제 1 절 실험재료	36
제 2 절 실험방법	36
1. Liposome 의 제조와 펩티드 결합	36
2. Immunization	41
제 3 절 결과 및 고찰	41

C. 복합면역백신 운반체 연구	52
서 론	52
제 1 절 실험재료 및 방법	53
제 2 절 결과 및 고찰	53
제 3 절 결론 및 건의사항	56
D. 기존 백신의 효율성 조사 연구	59
참 고 문 헌	61

제 1 장 서 론

간염은 바이러스 감염, 박테리아 감염 및 물리·화학적인 요인에 의해 간에 염증이 생기는 현상으로 바이러스에 의한 감염이 가장 일반적이다. 바이러스 감염에 의한 간염은 A형, B형 및 C형 (non A-non B) 등이 있다. 그중 B형 간염 바이러스 (Hepatitis B virus ; HBV)에 의하여 감염되는 B형 간염은 전세계적, 특히 극동아시아 및 아프리카 지역의 풍토병으로 알려질 정도로 심각한 병으로 전세계 인구의 2억명 정도가 만성보균자로 알려져 있고, 국내에서도 전체 인구의 10% 이상이 만성보균자로 알려져 있다. HBV의 감염은 간염과 간경화증의 주된 원인이며, 최근에는 HBV의 감염이 간암을 유발할 수 있다고 밝혀짐에 따라 HBV의 문제는 더욱 심각해져 가고 있다(1). 따라서 B형 바이러스의 감염을 방지하기 위하여 높은 면역원성과 안정성을 지닌 효과적인 간염 백신의 개발이 시급한 과제이다.

현재까지 사용되고 있는 간염 백신은 주로 B형 간염 바이러스성 만성보균자의 혈청으로부터 정제된 22nm 입자의 B형 간염 바이러스 표면항원 (hepatitis B surface antigen ; HBsAg)을 이용하는 방법이 사용되고 있는데, 22nm 입자의 외부막은 HBsAg과 지질로 구성되어 있다(2, 3, 4). HBsAg은 항원 결정인자로 group에 공통되는 'a'인자와 subtype으로 구분되는 d, y, w, r 인자들이 있다. 이중 주된 serotype으로는 adw, adr, ayw 등 세종류가 있으며, y결정인자는 극동아시아에 존재하지 않는 등 지역에 따라 그 분포가 다르다. 한국에 분포된 serotype은 adr type이다. HBsAg의 구성 단백질은 전기 영동 및 protein mapping을 이용하면 크게 3가지 종류의 단백질로 구분할 수 있

는데 (5,6,7), 전기 영동시 분자량에 따라 major 단백질 (226개 아미노산), middle 단백질 (281개 아미노산), large 단백질 (ay type 389개, ad type 400개 아미노산)로 나눌 수 있다. Major 단백질은 S유전자에 의해 발현되고, 그 분자량이 24,000 dalton인 순수 단백질 (P24)과 당화된 당 단백질 (GP27)이 있다. 이 단백질 서열의 친수성도를 분석해보면 (8), 전체적으로 상당히 소수성을 띠며, 특히 7-23, 80-98, 169-226은 소수성이 큰 아미노산 서열이다. 이중 처음 두 부위는 지질막에 삽입되어 있으며 친수성이 큰 나머지 부위들은 막 외부에 존재할 것으로 여겨진다. S 단백질은 두 분자가 S-S결합에 의해 연결되어 있으며, β -mercaptoethanol과 같은 환원제로 S-S결합을 절단하면 항원성이 없어진다. 따라서 S 단백질의 활성이 있는 형태는 dimer 상태이다.

Middle 단백질은 Pre-S2와 S유전자에 의해 만들어지며, 당화된 정도에 따라 GP33과 GP36으로 나눈다. Pre-S2 유전자에 의해 코딩된 55개 아미노산의 펩티드는 주로 친수성이 큰 아미노산들로 구성되어 있으며, 바이러스막 표면에 위치하는 것으로 여겨진다 (9,10). Pre-S2 부위는 S-S결합의 존재 여부에 관계 없이 우수한 항원 결정인자 (immunodominant epitope)를 가지고 있다. 또한 Pre-S2 펩티드는 중합된 사람 혈청 알부민 (pHSA)과 결합할 수 있는 능력이 있는데, 사람 간세포도 pHSA와 결합할 수 있는 수용체를 지니고 있으므로 (11,12), 따라서 혈액 내에 존재하는 pHSA를 통하여 HBV가 간세포로 감염될 수 있는 가능성을 보여주고 있다.

Large 단백질은 Pre-S1, Pre-S2 및 S유전자에 의하여 만들어지고 순수 단백질 (P39)과 당 단백질 (GP42)이 존재하며, 아미노 말단 부위는 바이러스막 표면에 위치한 것으로 간주된다. 이중 Pre-S1 부위 역시 B

형 간염 바이러스가 간세포에 결합하는데 관여할 것으로 보인다.

이 단백질들이 바이러스 입자에 존재하는 양을 살펴보면, Dane 입자의 경우는 envelope에 300~400개의 major 단백질이 존재하며, middle과 large 단백질은 약 40~80개 정도 존재한다. 또한 22nm 입자의 경우에는 100개 정도의 major 단백질과 10개 정도의 middle 단백질이 존재하며, large 단백질은 1~2개 존재한다. 그러나 바이러스의 복제가 일어나지 않을 때 22nm 입자는 거의 major 단백질로 구성되며(99% 이상), large 단백질은 전혀 존재하지 않는다.

이와 같이 Pre-S2 부위는 높은 항원성을 보여주고, HBV의 간세포 감염에 중요한 역할을 하는 것 외에 바이러스 조립에도 중요한 역할을 할 것으로 간주되고 있다.

이와 같이 만성간염 환자 피에서 분리한 B형 간염 바이러스 표면 항원(HBsAg)은 그 공급원이 제한적이고, 환자에게서 얻기 때문에 단가가 높고, 혈청에 존재하는 다른 바이러스 등 오염된 물질로 인하여 다른 질병에 감염될 수 있는 가능성이 있기 때문에, 경제적인 문제, 백신의 안정성 문제 등이 발생한다. 따라서 이와 같은 혈청에서 분리한 간염 백신의 단점들을 극복하기 위하여 유전자 재조합에 의해 HBsAg을 미생물이나 동물세포에서 생산하는 방법, 또는 항원성이 높은 epitope 부위를 펩티드 합성에 의해 생산하는 방법 등이 활발히 연구되고 있다.

최근 Persing 등(13)은 S(226 a.a.)와 Pre-S+S(389 a.a.) 유전자를 동물 세포에서 발현시켰는데, S 단백질은 배지로 잘 분비되는 반면에 Pre-S를 가진 S 단백질은 분비가 저해되어 단백질이 세포질내에 축적됨을 알 수 있었다. 이 뿐만 아니라 S와 Pre-S+S를 동시에 한 세포 내에서 발현시키면 S 단백질만의 분비도 저해되었다. 이러한 결과들은 Pre-

S 부위가 바이러스 조립에 중요한 역할을 수행한다는 것을 제시해 주고 있다.

S 단백질은 소수성이 큰 부분이 많기 때문에 *E. coli* 내에서 발현시키는데 여러가지 문제점이 있다. 따라서 소수성이 큰 부위를 제거하거나 대장균내에서 안정한 β -galactosidase 나 β -lactamase 에 융합시킨 형태로 발현이 시도되었다 (14,15,16,17). 또한 최근에 Pre-S2 부위의 중요성이 부각되면서 Pre-S2 유전자에 대한 클로닝이 시도되었다. Fujisawa 등은 (18) S 유전자 앞에 Pre-S2 유전자를 붙여 대장균내에서 발현시켰는데, 수율이 250mg/l 정도로 S 유전자만 클론된 것보다 그 수율이 10 배 이상 증가되었다. 이때 발현된 단백질은 HBsAg 의 항원성은 물론 pHSA 에 결합하는 능력도 가지고 있었다. 최근 Offensperger 등 (19) 은 Pre-S2 부위만을 β -galactosidase (β -gal) 앞에 연결시켜 대장균내에서 Pre-S2 에 특이한 항원성을 갖는 Pre-S2- β -gal 단백질을 200 mg/l 생산되게 발현시켰다. 또한 당 연구소 진핵세포 유전자실에서도 한국형 adr type에 대한 Pre-S2 유전자를 β -galactosidase 야미노 말단 및 서열 일부가 절단된 β -gal 의 C-term 에 연결시켜 발현시켰으며, Pre-S2 에 대해 항원성을 갖는 접합단백질을 생산하였다. *E. coli* 와는 달리 효모에서는 S 단백질이 비교적 쉽게 발현되는데, Valenzuela 등은 S 유전자를 ADHI, GAPDH 및 pk promotor 등에 연결시켜서 효모에서 성공적으로 S 단백질을 생산해 냈다.(21,22). 이들은 또한 Pre-S2 유전자를 S 유전자에 연결하여 발현시켰는데 S 유전자만 발현시켰을 때 수율이 40mg/l 인 반면에 Pre-S2+S 유전자를 발현시켰을 때 수율이 105 mg/l 로 크게 증가하였다 (23). 효모에서 재조합된 HBsAg 은 당화되어 있지는 않지만 22nm 와 비슷한 크기의 세포내 입자를 형성하는데,

입자를 형성하는 HBsAg은 용해된 상태의 HBsAg보다 그 면역원성이 1,000배 정도 더 높다고 알려졌다(24). 효모에서 생산된 HBsAg 입자들은 1986년 7월 미국 FDA에서 간염예방백신으로 사용할 수 있도록 허가되었다.

한편, 고등동물 세포에서도 재조합 DNA를 이용하여 HBsAg을 생산해 내는데 성공하였는데, 이 HBsAg은 효모에서 생산된 것과는 달리 당화되어 있으며, 또 세포밖으로 분비되었다(25,26). Laub 등은 HBsAg 유전자가 클론된 SV-40 벡터를 원숭이 콩팥세포(cos) 안에서 발현시키는데 성공하였는데, 이때 전체 Pre-S2 유전자가 더 삽입된 클론은 S 유전자만 가진 것보다 HBsAg 생산 수율이 40~50배 더 떨어진다고 보고하였다(27). 이 결과는 Persing 등(13)에 의해 보고된 결과와도 일치하는데, 이들은 Pre-S 부위가 S 단백질이 배지로 분비되는 것을 저해한다고 보고하였다. 최근 Michel 등(28,29)은 Pre-S 부위중 Pre-S2만이 더 결합된 S 유전자를 SV-40-pBR322 hybrid 벡터에 삽입하여 클론하였는데, 형질 전환된 CHO(chinese hamster ovary) 세포에서 생산된 HBsAg은 22nm 입자들을 만들었고, 그 subunit의 구성, 항원 결정인자 등이 실제의 입자와 비슷하였으며, pHSA과도 결합하는 능력을 나타내었다. 이 입자들의 면역반응을 조사한 결과 Pre-S2를 포함하고 있는 HBsAg들이 S 단백질만을 가진 것들보다 훨씬 더 강한 면역반응을 일으켰다(30). 재조합 유전자를 이용하여 HBsAg을 합성하는 방법외에 원하는 epitope의 아미노산 서열을 직접 화학 합성하는 방법도 있다. HBsAg 아미노산 서열중 친수성이 큰 서열을 화학합성하여 면역원성을 조사한 결과 면역원성이 낮게 나타났다(9,31,32,33). 하지만 최근 Neurath 등(10)은 항원성이 높은 Pre-S2 부위 26개 아미노산을 합성하여 liposome에 붙여서 그 면

역원성을 높이는데 성공하였다. 뿐만 아니라 이와 같은 합성 펩티드에 의해 생성된 항체들은 HBV 입자들이 사람 간세포에 부착하는 것을 방지해주었다(34). 또 항체들과 HBV 입자들을 섞어서 chimpanzee에 주사하였을 때, HBV에 의해 전혀 감염이 되지 않음을 알 수 있었다(35).

국내에서도 감염예방을 위하여 Pre-S2를 포함하는 간염백신 제조에 관심이 높아지고 있는데, 현재 혈청에서 제조된 간염 백신은 3차례 접종에 그 유효성이 5년 정도에 불과하며, 고가이어서 소외계층이 이용하기에는 큰 부담이 된다. 이런 문제점을 해결하기 위하여 면역원성 및 유효성이 높으면서 저가의 새로운 간염백신 개발이 중요하다. 따라서 본 연구에서는 표면항원을 이용한 B형 간염 백신 개발을 하기 위한 기초연구중 2차년도 사업으로, 표면항원중 Pre-S2의 고면역원성 부위를 합성, 분리 정제후 항원성 및 면역원성 증진 그리고 백신 조제를 위한 기초 운반체 연구, 기존백신의 효율성 조사 연구가 수행되었다.

제 2 장 간염 바이러스 표면항원 (pre-S2) 의 항원성 및 면역원성 증진 연구

A. Pre-S2-carrier protein의 면역원성

제 1 절 실험재료

1. 동 물

본 연구에 사용한 BALB/c mouse 는 당 연구소 실험동물 사업실에서 분양받아 사용하였다.

2. 시 약

Peptide 에 carrier protein 을 conjugation 시킬 때 사용되는 EDC [1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride] 와 conjugation buffer (0.1M MES, 0.9M NaCl, pH4.7), purification buffer (0.083M sodium phosphate buffer, 0.9M NaCl, pH7.2), 그리고 carrier protein 으로서 Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH), Bovine Serum Albumin (BSA) 은 Pierce (U.S.A.) 에서 구입하였고, Ovalbumin 은 Sigma (U.S.A.) 에서 구입하여 사용하였다. ELISA 에 사용되는 Hepatitis B virus pre-S region (120-145) 과 Anti-mouse IgG (whole mol.) peroxidase conjugate, O-phenylenediamine dihydrochloride 과 동물실험에 사용되는 Complete Freund adjuvant 와 Incomplete Freund adjuvant, 전기영동 시약인 Acrylamide, N-N'-methylene-bis (acrylamide), Sodium dodecyl sulfate (SDS), TEMED, Coomassie-brilliant blue R-250 등은 Sigma (U.S.A.) 에서

구입하여 사용하였고 펩티드 합성에 사용된 시약은 ABI (U.S.A.)의 합성 Kit (HMP resin 등)를 사용하였으며, 기타 시약들은 모두 분석용 시약을 사용하였다.

Pre-S2에 대한 단일클론항체는 서울의대 정홍근 박사로부터 분양 받아 사용하였고, hepatitis B surface antigen (HBsAg)은 제일제당에서 공급 받아 사용하였다.

제 2 절 실험방법

1. 펩티드 (Pre-S2)의 합성

펩티드 Pre-S2는 Applied Biosystems model 430A automated peptide synthesizer를 사용해 HMP-resin (4-hydroxymethylphenoxymethyl-copolystyrene-1% divinylbenzene resin)에서 solid phase method를 이용해 합성했다. Peptide-resin sample은 실온에서 90분 동안 thioanisole이 trifluoroacetic acid에 들어 있는 용액에서 cleavage와 deprotection시켰다. 그 다음 펩티드를 침전시키기 위해 cold diethyl ether를 crude product에 가한후 여과하였다. Filter 위에 있는 펩티드를 적당한 aqueous solvent (H₂O or acetic acid)에 녹인후 lyophilization시켰으며, 정제를 위해 약 40여분 동안 0.1% TFA에서 0에서 60% acetonitrile의 aqueous gradient를 이용해 C-18-column의 reverse phase HPLC를 시행하였다. 그후 정제된 물질이 원하는 amino acid로 구성된 펩티드인지를 확인하기 위해 성분 분석과 서열 분석을 하였다.

2. Pre-S2 펩티드 - Carrier Protein Conjugate 제조와 면역원성

Pre-S2 펩티드와 carrier protein의 coupling은 EDC[1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl) carbodiimide hydrochloride, Pierce] coupling 반응에 의해 수행하였다 (Fig.1).

Carrier protein으로 사용되는 Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) 과 Bovine Serum Albumin (BSA), Ovalbumin (OVA)를 증류수에 10 mg/ml로 녹이고, Pre-S2 펩티드는 conjugation buffer (0.1M MES, 0.9M NaCl, pH4.7, Pierce)에 2mg/ml로 녹인 후, carrier protein 용액의 20 μ l에 펩티드 용액 50 μ l를 넣어 섞어준 후, 10mg/ml로 만든 EDC를 BSA와 OVA conjugation의 경우에 240 μ l, KLH conjugation의 경우에 10 μ l를 넣고 실온에서 2시간 반응시켰다. KLH conjugation시 적은 양의 EDC를 넣은 것은 conjugation 반응중 침전물이 생기는 것을 방지하기 위해서이다. 이렇게 하여 생긴 반응물은 cut-off가 10,000 dalton인 centricon (Amicon, U.S.A.)을 이용하여 purification buffer (0.083M sodium phosphate buffer, 0.9M NaCl, pH7.2, Pierce)에 투석 후 농축하였다.

Pre-S2 펩티드와 carrier protein의 conjugation된 양은 marker로서 hepatitis B virus Pre-S region (120-145, Sigma)을 사용하여 ELISA로 측정하였다.

Pre-S2 펩티드와 Pre-S2-carrier protein conjugate의 면역원성을 알기 위해 항원으로서 Pre-S2 펩티드, Pre-S2-BSA, Pre-S2-OVA, Pre-S2-KLH conjugate를 BALB/c mouse에 주사하여 항혈청을 얻었다. 먼저 Complete Freund adjuvant에 각 항원을 20 μ g 넣어 복강내에 주사하고 14일과 21일째에는 Incomplete Freund adjuvant에 각 항원을

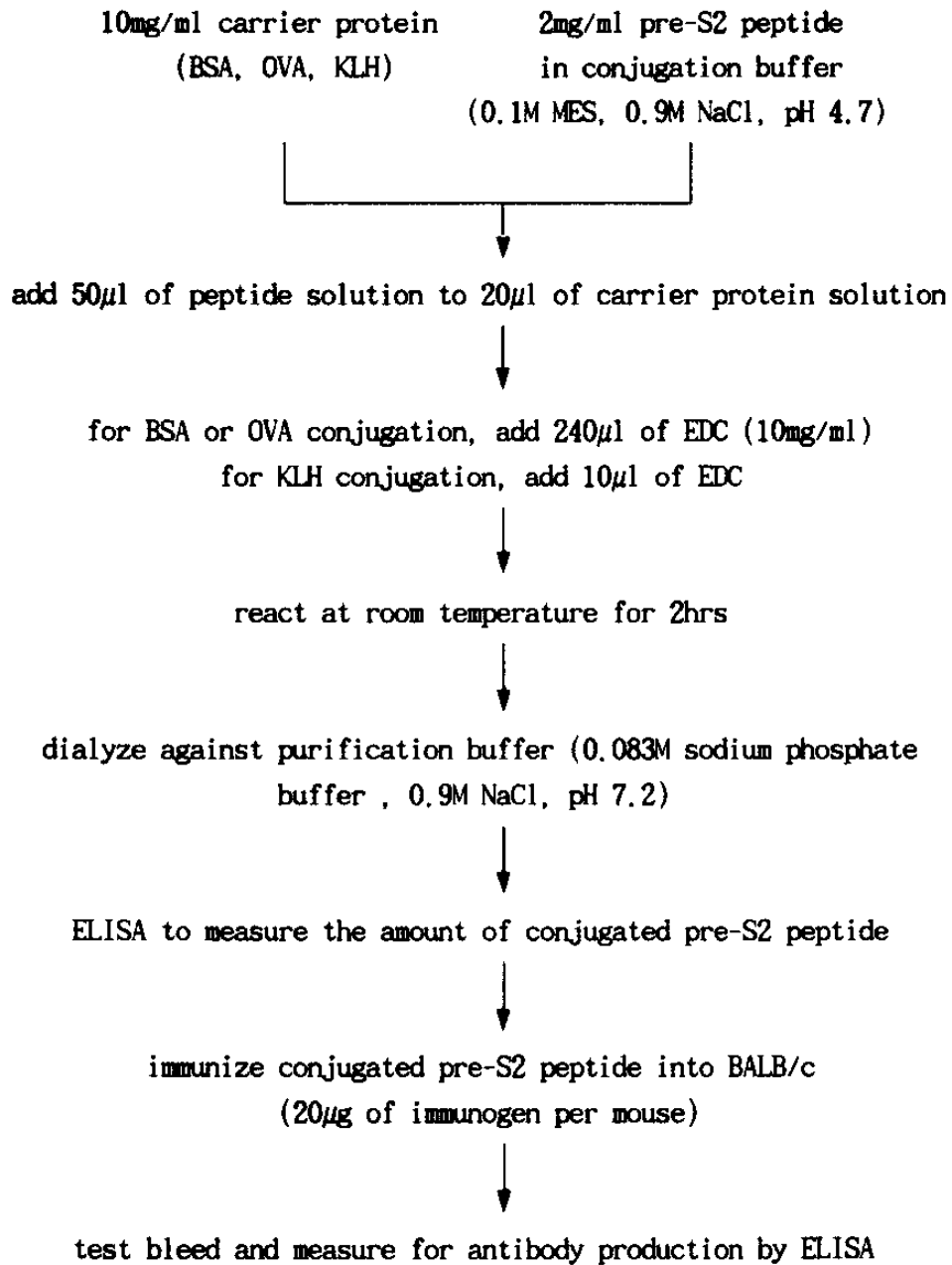


Fig.1 Strategy of conjugation of Pre-S2 peptide to carrier protein with EDC and immunization

넣어 주사하였다. 각 혈액은 주사하기 전과 1번째 주사 후에는 14일째, 2,3번째 주사 후에는 7일 간격으로 꼬리 정맥에서 얻어 PBS에 희석한 후, 14,000 rpm에서 2분간 원심분리하고 그 상등액을 ELISA 방법으로 Pre-S2 펩티드와의 결합정도, hepatitis B surface antigen (HBsAg) 과의 교차면역성을 조사하였다.

3. 전기영동과 Western Blotting

SDS-polyacrylamide gel 전기영동 (SDS-PAGE) 은 Laemmli 법 (36) 에 의하여 수행하였으며 10% polyacrylamide gel 을 사용하였고, nitrocellulose paper 에 BSA와 Pre-S2-BSA conjugate 의 transfer 는 Towbin 등 (37) 의 방법을 다소 수정하여 실시하였다. 즉 Transphor TE50 (Hoefer Scientific Instruments San Francisco) 의 cassette 에 electrotransfer buffer (80mM Tris, 12.8mM Glycine, pH9.3, 20% Methanol) 로 포화시킨 sponge, whatman 3 mm paper, nitrocellulose sheet, gel, whatman paper, sponge 순으로 하여 nitrocellulose 가 + 쪽을 향하도록 한 후, 4 °C에서 40V로 overnight transfer 하였다. Transfer 된 nitrocellulose sheet 는 1% BSA가 포함된 20mM Tris, 0.9% NaCl buffer (pH7.4) 로 37 °C에서 2시간 동안 residual binding sites 를 차단시킨 후, Pre-S2 단일클론항체 (H8) 과 anti-mouse IgG (whole mol.) peroxidase conjugate (Sigma) 을 37 °C에서 2시간 동안 차례로 반응시키고 세척한 후, 0.045% (v/v) hydrogen peroxide 가 포함된 0.018% (w/v) 4-chloro-1-naphthol 액에 넣어 어두운 곳에서 반응시키고 증류수로 효소반응을 정지시켰다.

4. ELISA

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)는 Voller 법 (38)을 일부 변형하여 다음과 같이 수행하였다.

먼저 Pre-S2 펩티드 또는 HBsAg를 1ml 당 0.4 μ g이 되도록 coating buffer로 희석하고 각각을 microtiter plate에 well 당 100 μ l씩 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 결합시킨 다음 residual binding site를 차단하기 위해 3% casein 용액 (w/v)을 100 μ l씩 넣어 실온에서 overnight 반응시킨다. 각 well들을 Tris-Saline-Tween 20 용액 (10mM Tris-HCl, 0.15M NaCl, 0.05% Tween, pH7.4)으로 3번 씻은 다음 각각의 항원에 대해 BALB/c mouse의 꼬리 정맥에서 얻은 혈청을 각 well 당 100 μ l씩 가하고 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 반응시켰다. 각 well을 Tris-Saline-Tween 20 용액으로 2번 씻은 다음 horseradish peroxidase (HRP)가 결합된 anti-mouse-IgG antibody (titer 1:2000)를 0.3% casein 용액이 첨가된 Tris-Saline 용액에 1/2000로 희석한 다음 각 well 당 100 μ l씩 가하고 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 반응시킨 후 Tris-saline-Tween 20 용액으로 well을 3번 세척하였다. 각 well에 발색용액 (10 μ l 39% H₂O₂, 10mg 0-phenylenediamine dihydrochloride가 들어있는 phosphate-citrate 완충용액, pH5.0)을 가하여 발색시키고, 2.5M H₂SO₄ 용액으로 반응을 종료시킨 다음 492nm에서 흡광도를 측정하였다.

제3절 결과 및 고찰

1. Pre-S2-carrier protein conjugates의 제조 및 면역원성

대부분의 작은 분자의 펩티드는 hapten과 같아 단독으로는 면역반응을 나타내지 못하나, 적절한 carrier에 coupling 되었을 때 면역원으

로 작용하여 항체 생성을 유도할 수 있다고 알려져 있다.

본 연구에서는 먼저 일반적으로 많이 사용되고 있는 protein carrier 들인 KLH, OVA, BSA를 사용하여, Pre-S2 펩티드에 대한 항체 생성능 과 생성된 항체와 HBsAg와의 교차 면역성을 조사하였다.

KLH는 매우 커다란 molecular mass ($MW\ 4.5 \times 10^5 \sim 1.3 \times 10^7$) 와 유용한 lysine group으로 널리 사용되며, BSA도 KLH보다 크기가 훨씬 적지만 매우 immunogenic 하고 KLH보다 soluble 하며 59개의 lysine group을 가지고 있다. 또한 20개 lysine group을 갖고 있는 OVA도 second carrier로서 유용하다(39). 이와 같은 carrier에 EDC를 이용하여 Pre-S2 펩티드를 conjugation하고, 이를 항원으로 이용하여 항체 생성을 유도하였다.

본 연구에서 B cell epitope로 사용된 Pre-S2 펩티드는 hepatitis B virus Pre-S region (120-145/ayw, Sigma) 과 본 연구소 단백질 화학실에서 합성한 Pre-S2 (130-145/ayw), (130-145/adr) 을 사용하였다.

먼저 Pre-S2 펩티드(120-145/ayw)를 KLH, BSA, OVA에 EDC를 이용하여 coupling 하였을 때 BSA와 OVA conjugate의 경우에는 soluble한 반면 KLH conjugate는 coupling 반응이 진행됨에 따라 침전물이 생기는 단점이 있었고 EDC의 양을 줄여서 넣었을 때 침전물이 생기는 것을 줄일 수 있었으나 conjugation yield는 떨어졌다 (data not shown).

Fig.2에서는 Pre-S2 펩티드에 BSA를 conjugation 했을 때의 양상을 SDS-PAGE에서 보여주고 있으며, 이 gel을 Western blotting하여 Pre-S2-mAb(H8)로 immunostaining 하였을 때, intact한 BSA는 stain 되지 않았고 Pre-S2-BSA conjugate는 monomer BSA con-

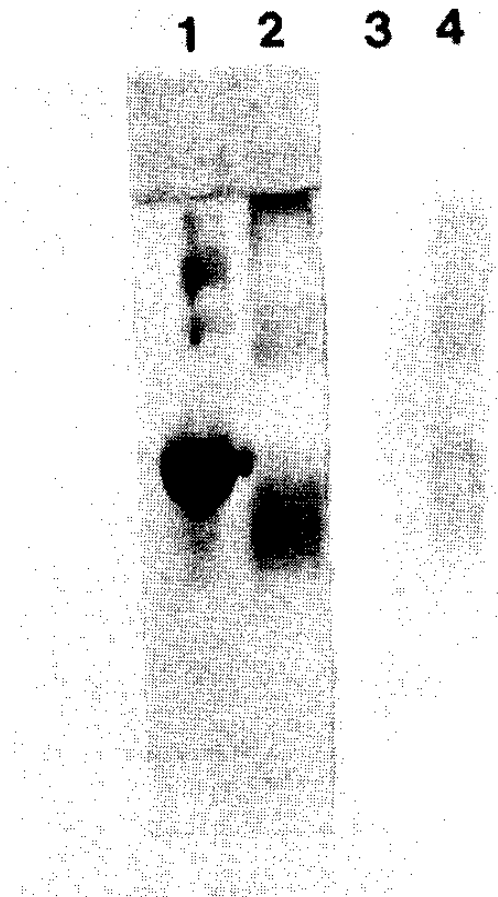


Fig.2 SDS PAGE and Western immunoblots of BSA and BSA-Pre-S2 conjugate
lane 1: SDS PAGE of BSA
lane 2: SDS PAGE of BSA-Pre-S2 conjugate
lane 3: Western immunoblot of BSA with Pre-S2-Mab
lane 4: Western immunoblot of BSA-Pre-S2 conjugate with Pre-S2-Mab

jugate 와 dimer 이상의 conjugate가 stain된 것으로 보아 Pre-S2 펩티드가 conjugation된 것을 확인할 수 있었다. 또한 SDS-PAGE 상에서 BSA보다 BSA conjugate가 더 아래 band로 나타난 것은 cross-linking에 의해 BSA conjugate가 더 compact한 형태를 유지하여 더 빠른 mobility를 나타내기 때문으로 생각된다.

1 mg/ml의 Pre-S2 (120-145/ayw)를 standard로 하여 ELISA를 통해 conjugate를 정량한 후, Pre-S2 펩티드와 Pre-S2-carrier protein conjugates를 20 µg씩 BALB/c mouse에 주사하여 면역원성을 알아 보았다.

Fig.3에서 보는 바와 같이, Pre-S2 만을 주사한 경우 거의 항체를 유도하지 않았고, Pre-S2-KLH conjugate도 Pre-S2 만을 주사한 경우와 비슷한 양상을 보였다. 이와는 달리 Pre-S2-BSA와 Pre-S2-OVA conjugate는 anti-Pre-S2-antibody를 다량 유도하였고 3번 주사후 생성된 항체는 8주간 지속적으로 높게 유지되었다. 이때 생성된 anti-Pre-S2-antibody가 Pre-S2 부위를 포함한 HBsAg의 whole molecule에 결합하는가를 측정 한 결과 (Fig.4), Fig.3에서와 같이 Pre-S2 펩티드만을 주사한 경우와는 달리 conjugate의 경우에 HBsAg와 교차 면역성을 보여주었다.

Fig.5,6에서는 120-145/ayw의 N-말단에서 10개 아미노산을 줄인 Pre-S2 펩티드 (130-145/ayw)를 사용하여 그 면역원성을 알아본 것으로 120-145/ayw를 사용한 실험에서와 같이 Pre-S2 펩티드만을 주사했을 때와는 달리 conjugate의 경우, 특히 OVA를 conjugation한 경우 anti-Pre-S2-antibody를 다량 유도하였고, HBsAg와의 교차 면역성을 보여주었다.

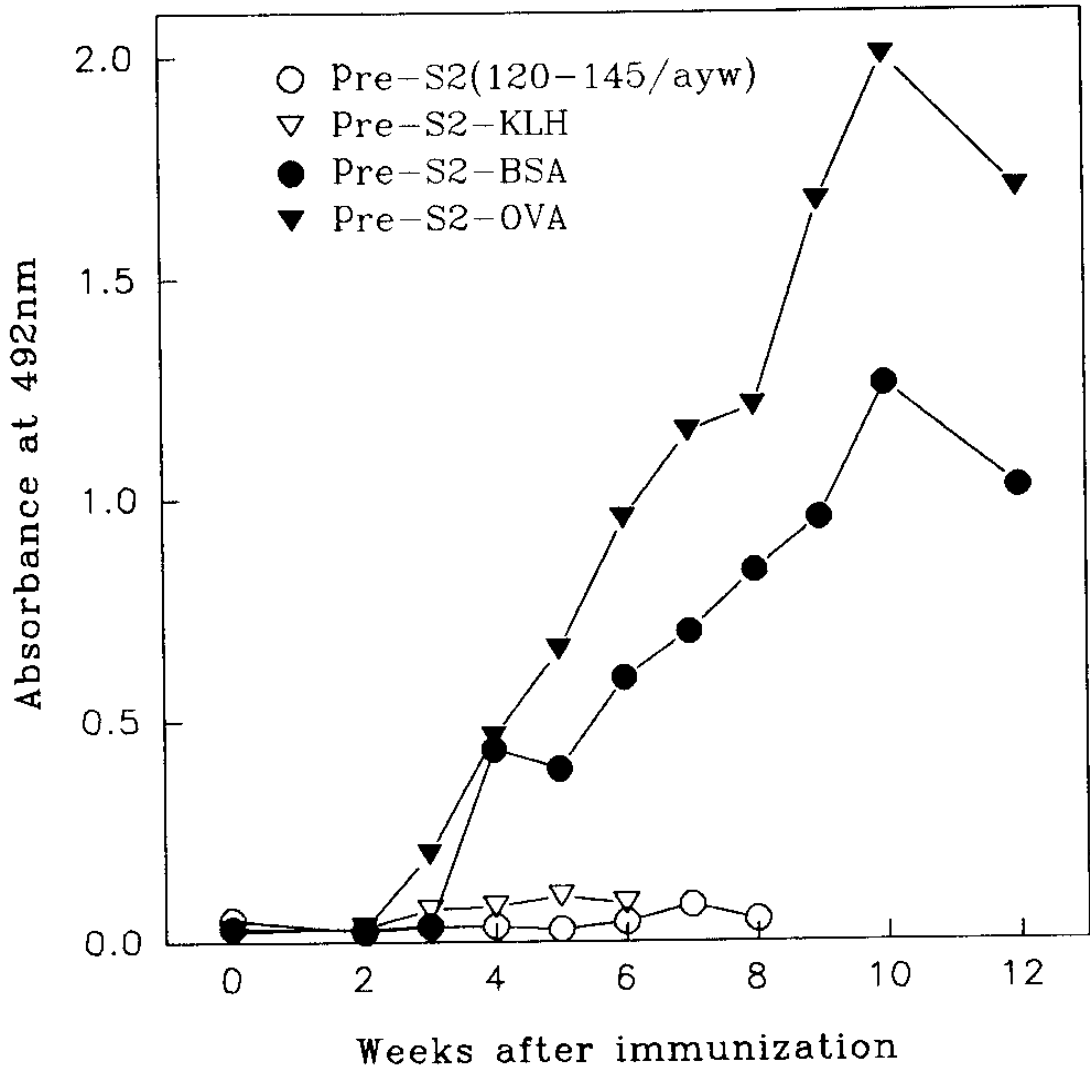


Fig.3 Immune responses of BALB/c mice to Pre-S2 peptide (120-145/ayw). Pre-S2 peptide, Pre-S2-BSA, Pre-S2 KLH and Pre-S2-OVA conjugate were injected into mice.

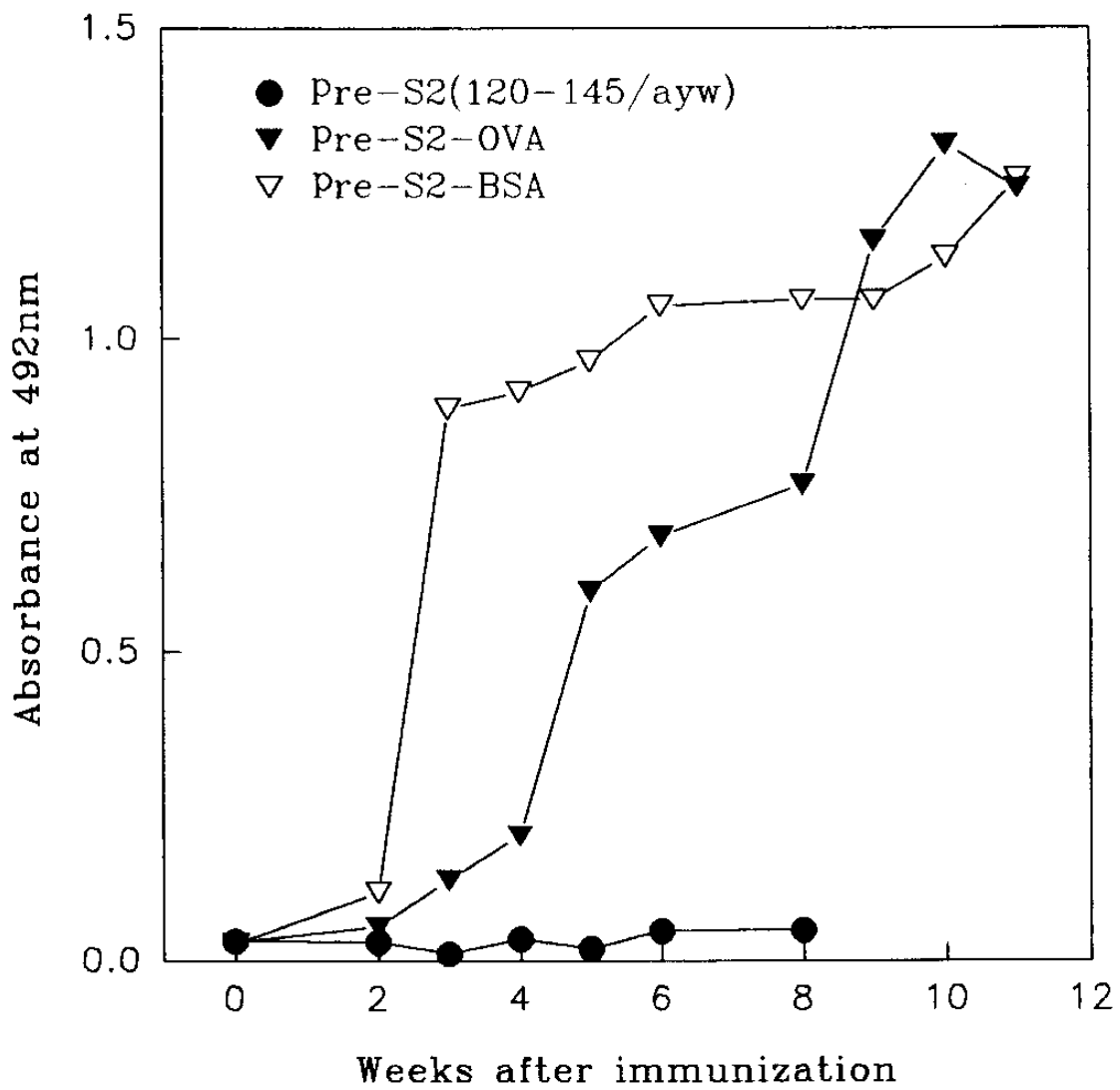


Fig.4 Cross-reactivity of antiserum of Pre-S2 peptide, Pre-S2-BSA and Pre-S2-OVA conjugate to HBsAg.

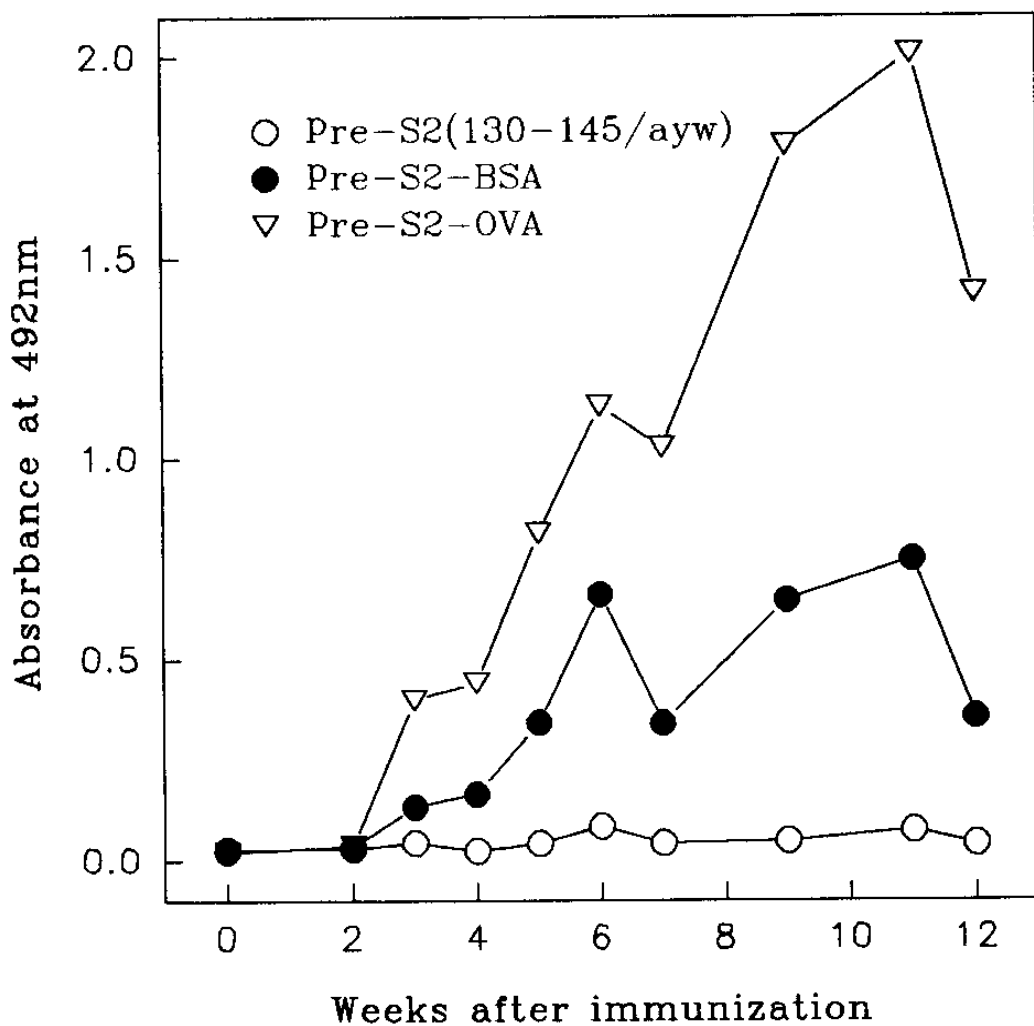


Fig.5 Immune responses of BALB/c mice to Pre-S2 peptide (130-145/ayw). Pre-S2 peptide, Pre-S2-BSA and Pre-S2-OVA conjugate were injected into mice.

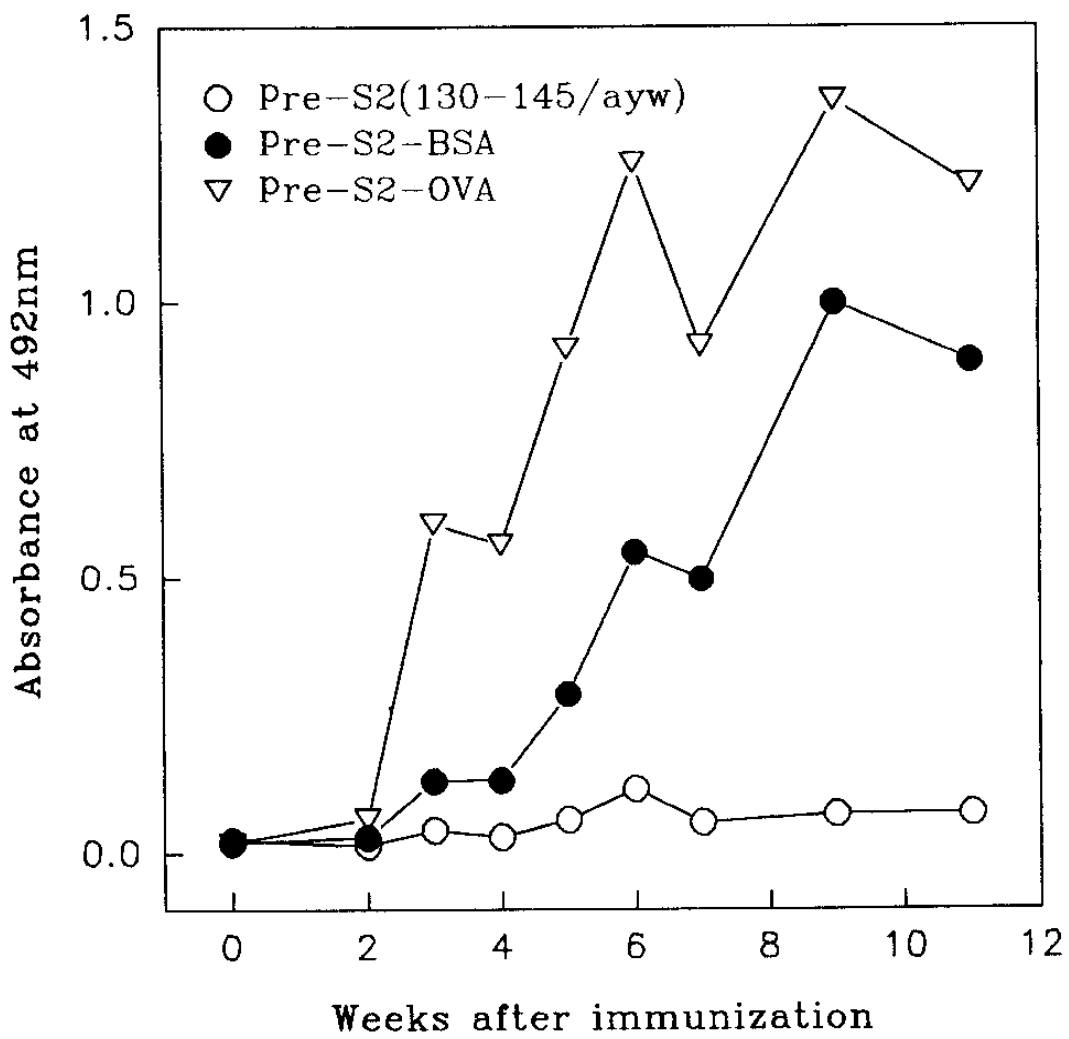


Fig.6 Cross-reactivity of antiserum of Pre-S2 peptide, Pre-S2-BSA and Pre-S2-OVA conjugate to HBsAg.

위의 두 결과는 Pre-S2 펩티드 120-145/ayw 나 130-145/ayw에 OVA 또는 BSA를 conjugation하여 주사했을 때 비슷한 정도의 anti-Pre-S2-antibody를 생성하고, 이 항체는 HBsAg와 교차 면역성을 보여주어 16개 아미노산으로 구성된 이 Pre-S2 펩티드(130-145/ayw)가 본래 HBsAg 내의 Pre-S2 구조에 대한 항체 생성을 유도할 수 있는 B cell epitope를 포함하고 있는 것으로 생각된다.

Fig.7,8에서는 혈청아형을 ayw에서 adr로 바꾸었을 때에 그 면역원성을 조사해 본 것으로 앞서와 같이 Pre-S2(130-145/adr)만을 주사했을 때 보다는 carrier protein을 conjugation했을 때 ayw 혈청아형보다 그 정도는 낮지만 anti-Pre-S2-antibody 생성을 유도하였고 HBsAg와 교차 면역성을 보여주었다.

이상의 결과는 Pre-S2 펩티드의 크기와 동종교배 strain에 따라 변화하는 H-2 restricted helper T 임파구의 기능에서 야기되는 낮은 면역원성을 극복하기 위해서는 carrier protein, 특히 OVA의 conjugation이 필요함을 알 수 있었다.

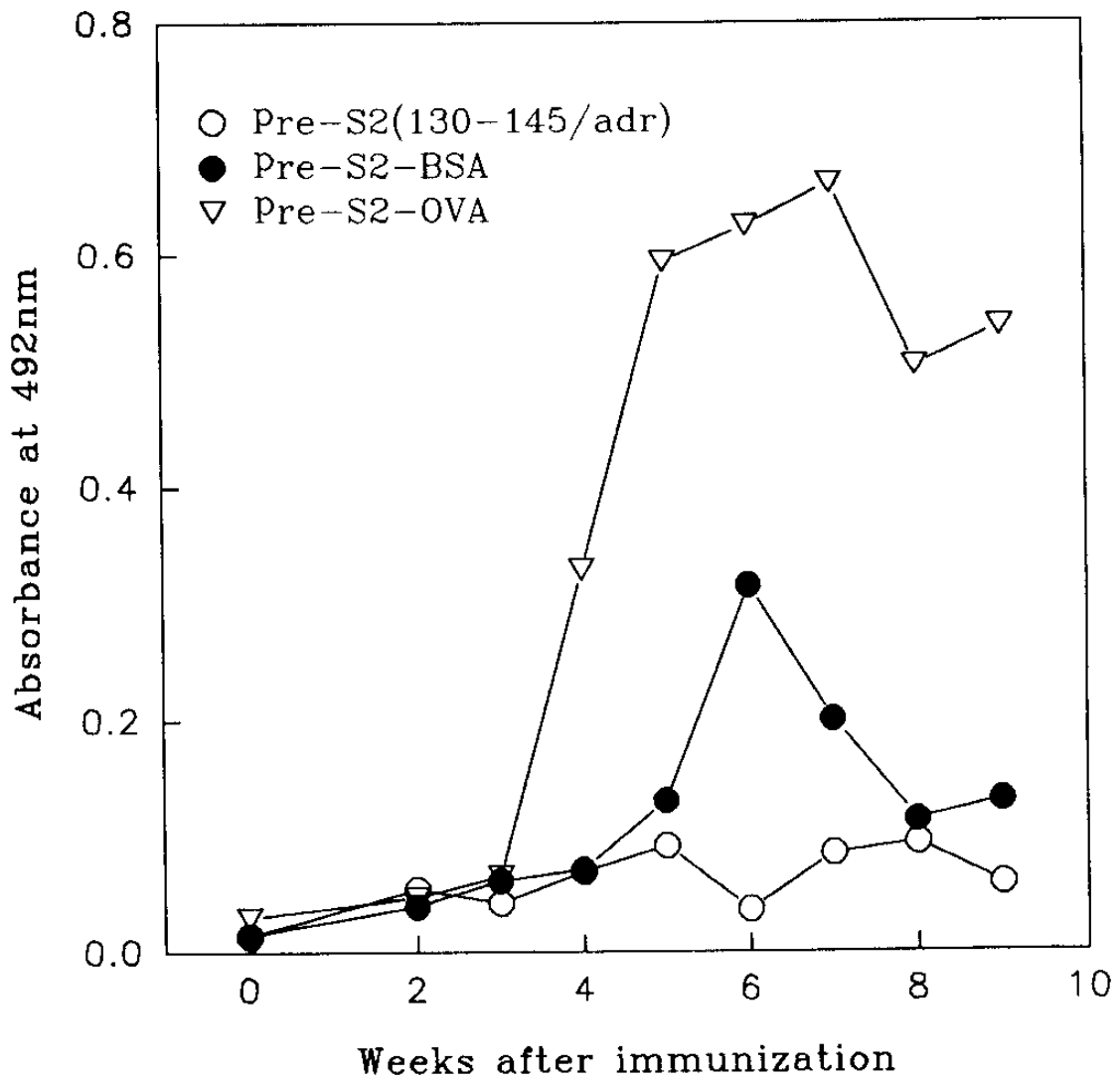


Fig.7 Immune responses of BALB/c mice to Pre-S2 peptide (130-145/adr). Pre-S2 peptide, Pre-S2-BSA and Pre-S2-OVA conjugate were injected into mice.

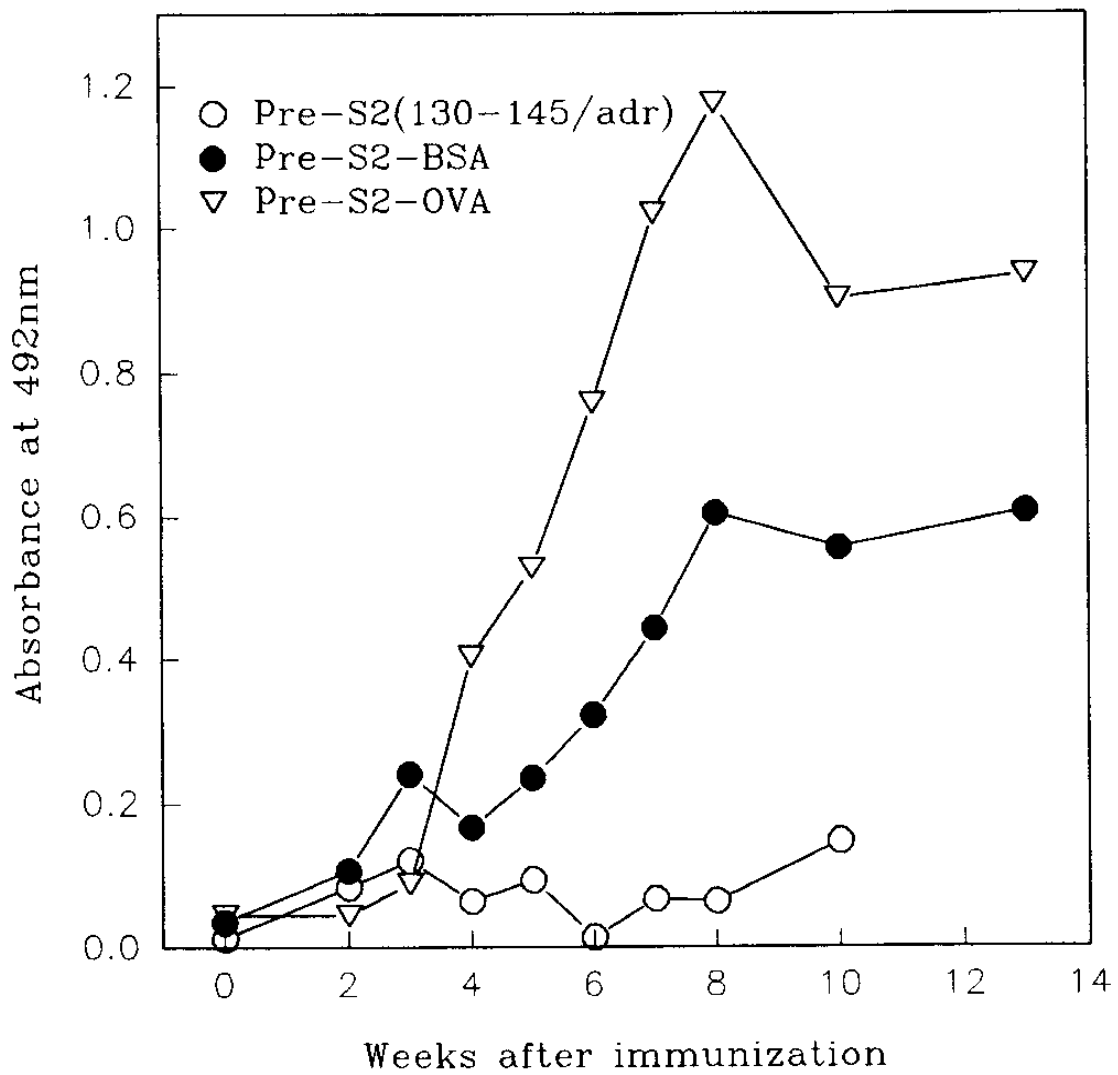


Fig.8 Cross-reactivity of antiserum of Pre-S2 peptide, Pre-S2-BSA and Pre-S2-OVA conjugate to HBsAg.

B. Liposome 을 이용한 펩티드의 면역원성 및 항원성 증진기술 연구

I. 서 론

합성 펩티드를 이용하여 백신을 제조할 경우, 낮은 면역원성으로 인하여 많은 제한을 받고 있다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 BSA, KLH, ovalbumin, polylysine 같은 carrier 단백질에 합성 펩티드를 공유결합시키거나 adjuvant 와 혼합시켜서 사용한다. 그러나 사용되는 adjuvant 들이 독성을 나타내거나, 면역원성을 향상시키는 정도가 약해서 현재 인체에 사용되고 있는 adjuvant 는 aluminium hydroxide 로 제한되어 있다. 이러한 여러가지 제반 문제들을 해결할 수 있는 새로운 보조체의 개발이 중요하다.

인지질을 사용하여 제조하는 liposome 은 독성을 나타내지 않고, 친수성, 소수성의 항원을 모두 포집시킬 수 있으며, 특정기관으로의 적중화가 가능하다는 등의 장점이 있어 백신 개발에 사용되는 보조체로서의 연구가 활발히 진행되고 있다(40-42). Liposome 을 이용하여 면역원성을 향상시키려는 시도는 1970년대에 Kinsky 등에 의해 시도되었으며(43,44), 이를 간염백신에 응용하는 연구는 1980년대에 들어서 활발히 진행되었다. 처음에는 HBsAg 전체 단백질을 liposome 에 결합시키는 연구가 진행되었고(45-47), 1980년대 말기부터 HBsAg 의 일부분인 펩티드를 사용하게 되었다(48-50). 현재는 B-, T-epitope 부분만을 합성한 펩티드를 이용하여 연구되고 있다(51,52). 최근 말라리아 백신에 liposome 을 사용한 경우도 있었으며, FDA 공인을 받아 liposome 을 사용하여 therapeutic gene 을 tumor cell 로 보내는 실험이 phase I 임상 실험 단계에 와있다. 위와 같은 장점을 갖고 있는 liposome 을 간염백

신에 사용되는 합성 펩티드의 보조체로 이용하는 가능성을 타진해 보았다. 우선, 합성 펩티드를 liposome 의 표면에 공유결합시키는 방법을 확립하고, 결합 최적조건을 확립하는 연구를 수행하였다.

제 1 절 실험재료

1. 실험동물

본 연구에 사용한 Balb/c mice 는 당 연구소 실험동물 사업실에서 분양받아 사용하였다.

2. 시 약

Liposome 의 제조에 사용되는 지질인 PC (phosphatidylcholine) 로는 egg PC, DPPC (dipalmytoyl-), DSPC (distearyl-), sphingomyelin 과 PE (phosphatidylethanolamine), cholesterol, lipid A, ganglioside G_{M1}, 결합시약인 glutaraldehyde, ELISA에 사용되는 Hepatitis B Virus Pre-S region (120-145), anti-mouse IgG (whole mol.) peroxidase conjugate, o-phenylenediamine dihydrochloride 는 Sigma (USA) 사로부터 구입하였고, chromatography gel 인 Sepharose 6B는 Pharmacia-LKB Biotechnology 사로부터 구입하였다. 기타 시약들은 모두 분석용시약을 사용하였다.

제 2 절 실험방법

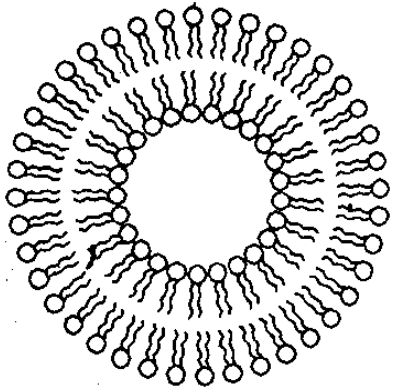
1. Liposome 의 제조와 펩티드 결합

Liposome 은 초음파분쇄 방법 (ultrasonication) 으로 제조하였다. 먼저 주지질로 사용되는 PC (phosphatidylcholine) 와 펩티드와 결

합시키는 결합기로 사용되는 PE (phosphatidylethanolamine), liposome 막의 안정화에 사용되는 cholesterol을 chloroform에 녹인 후 질소가스로 용매를 증발시키며 용기에 얇은 막을 형성시킨다. 이때 필요에 따라 lipid A와 ganglioside G_{M1}을 첨가하였다. 이 지질막을 완충용액으로 수화시켜 혼탁용액을 만든 후 이 용액을 초음파 처리하여 liposome을 제조하였다.

Liposome에 펩티드를 결합시키기 위해 Torrichilin의 방법을 사용하였고 (53) liposome에 포함되어 있는 PE의 amine기와 펩티드에 존재하는 amine기를 결합 시약인 glutaraldehyde를 사용하여 공유결합시켰다 (Fig.9). Phosphatidylcholine : phosphatidylethanolamine : cholesterol = 1 : 0.01 : 0.5로 섞어서 용매인 chloroform을 증발시킨 후 건조된 혼합지질막을 0.01M borate buffer, pH 8.5, 0.145 M NaCl을 넣어 수화시킨 후 4°C에서 5분간 초음파 분쇄시킨다. 이 용액에 25% glutaraldehyde를 PE보다 10배 excess로 넣어 20°C에서 10분간 방치시킨 후 excess glutaraldehyde를 제거하기 위해 상온에서 0.145M NaCl 1ℓ에 1시간 동안 dialysis시키고 다시 borate buffer에 1시간 동안 dialysis시킨다. 펩티드를 PE와 동 mole 넣어주고 4°C에서 overnight incubation시킨다. 반응물을 Sepharose 6B column chromatography (1 cm × 40 cm)에서 PBS로 여과시켜서 결합되지 않은 펩티드를 분리한다 (Fig.10).

Liposome에 펩티드를 결합시키는 간단한 방법으로는 Pierce사에서 제시한 방법을 사용하였다 (Fig.11). Liposome 혼탁용액에 반응시키고자 하는 펩티드를 넣어주고, 여기에 결합시약인 glutaraldehyde를 excess로 넣어주어 상온에서 2시간 동안 반응시킨 후 PBS를 사용하여 결합하



+ Glutaraldehyde + Peptide

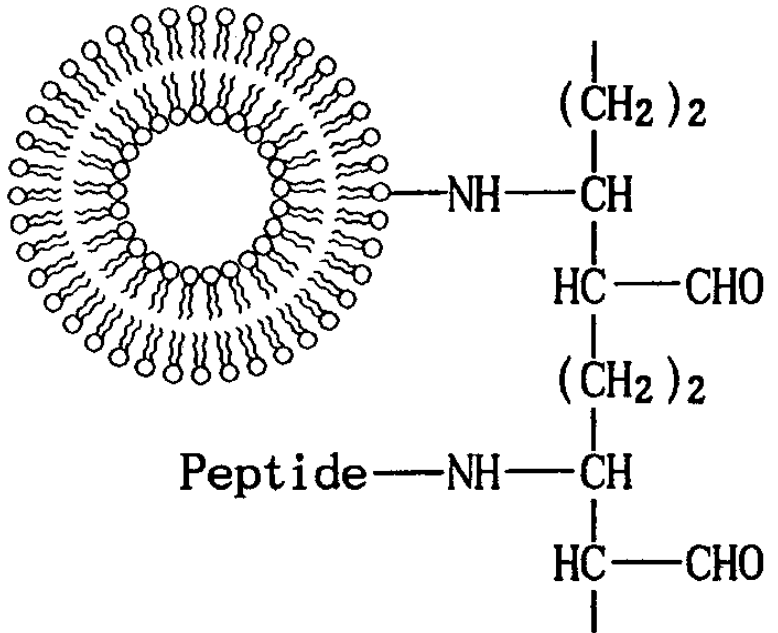


Fig.9 Conjugation of synthetic peptide to liposomes using glutaraldehyde

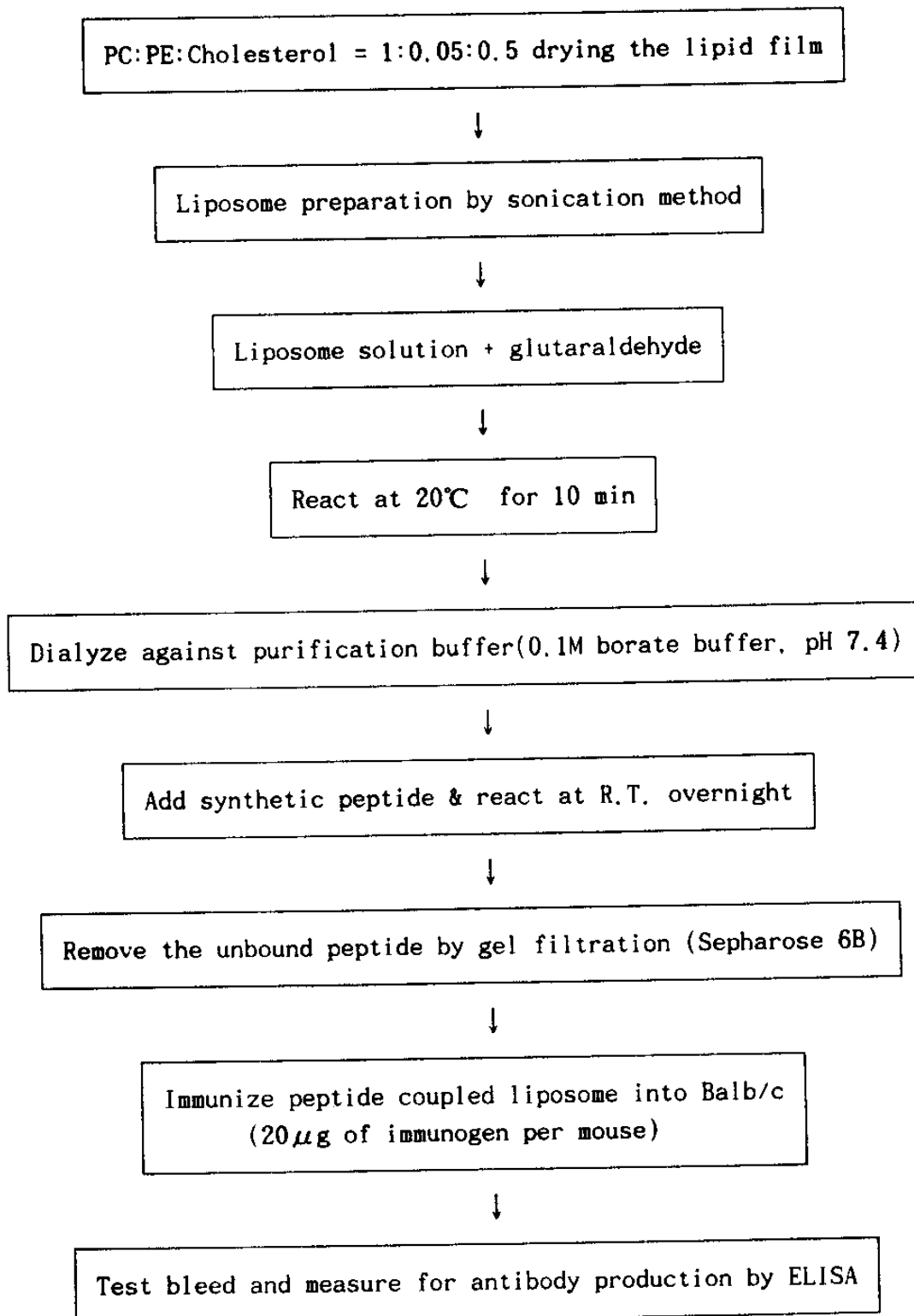


Fig.10 Strategy of synthetic peptide coupled liposome and immunization by Torichilin method

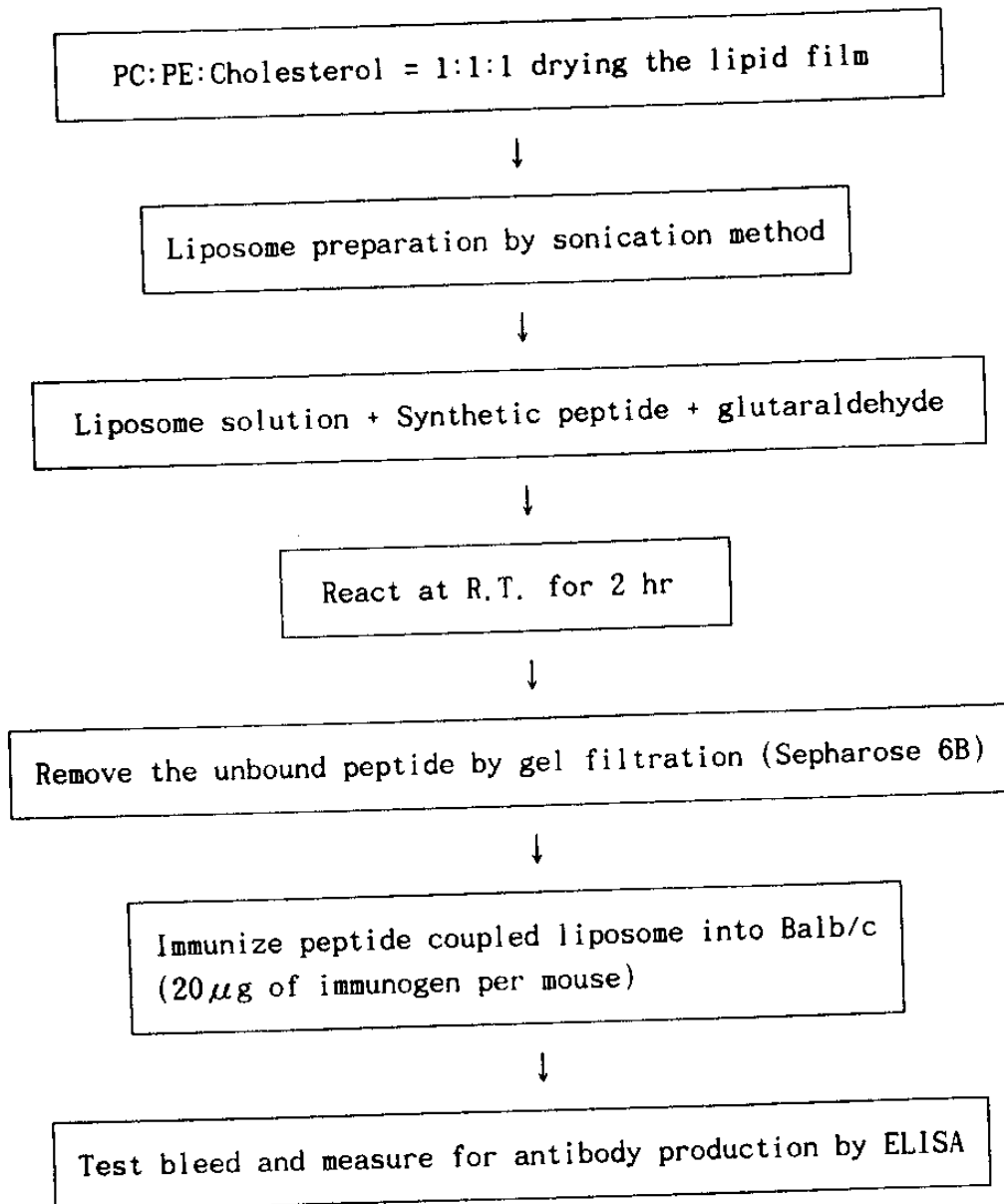


Fig. 11 Strategy of synthetic peptide coupled liposome and immunization by Pierce method

지 않은 펩티드를 Sepharose 6B gel chromatography로 분리시킨다.

2. Immunization

Liposome에 결합된 펩티드의 양을 Lowry 방법으로 정량한 후 한번에 20 μ g의 펩티드에 해당하는 liposome 용액 200 μ l를 i.p.로 주사하였다. 처음 주사한 후 2주가 지나서 1주 간격으로 2번 boost하였다. 항체의 형성은 주사한 mouse의 꼬리에서 항혈청을 채취하여 ELISA로 확인하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

Liposome의 조성은 안정하다고 알려진 조성을 사용하였다. Liposome의 구성성분은 결합 정도에 따라 phosphatidylcholine : phosphatidylethanolamine : cholesterol = 1 : 0.05 : 0.5 와 1 : 1 : 1로 사용하였다. 인지질의 상전이 온도와 면역원성 향상의 관계를 알아보기 위하여 egg PC와 dipalmitoylphosphatidylcholine, distearylphosphatidylcholine, sphingomyelin을 사용하였고, 그 비율은 PC : PE : cholesterol = 1 : 0.05 : 0.5로 하였다. Lipid A를 사용할 경우 전체 지질의 0.4%에 해당하는 lipid A를 사용하였으며 ganglioside G_{M1}은 전체 지질의 10%를 사용하였다. Liposome에 펩티드를 결합시킨 후 gel chromatography하면 Fig.12와 같이 결합되지 않은 펩티드는 분리되어 나온다. 본 실험에 사용한 liposome은 adjuvant를 사용하지 않았고, 펩티드로서 B-cell epitope만을 사용한 관계로 인하여 ELISA에서의 titer가 높게 나타나지 않았다.

PC (phosphatidylcholine)로 제조된 liposome에 lipid A가 첨가

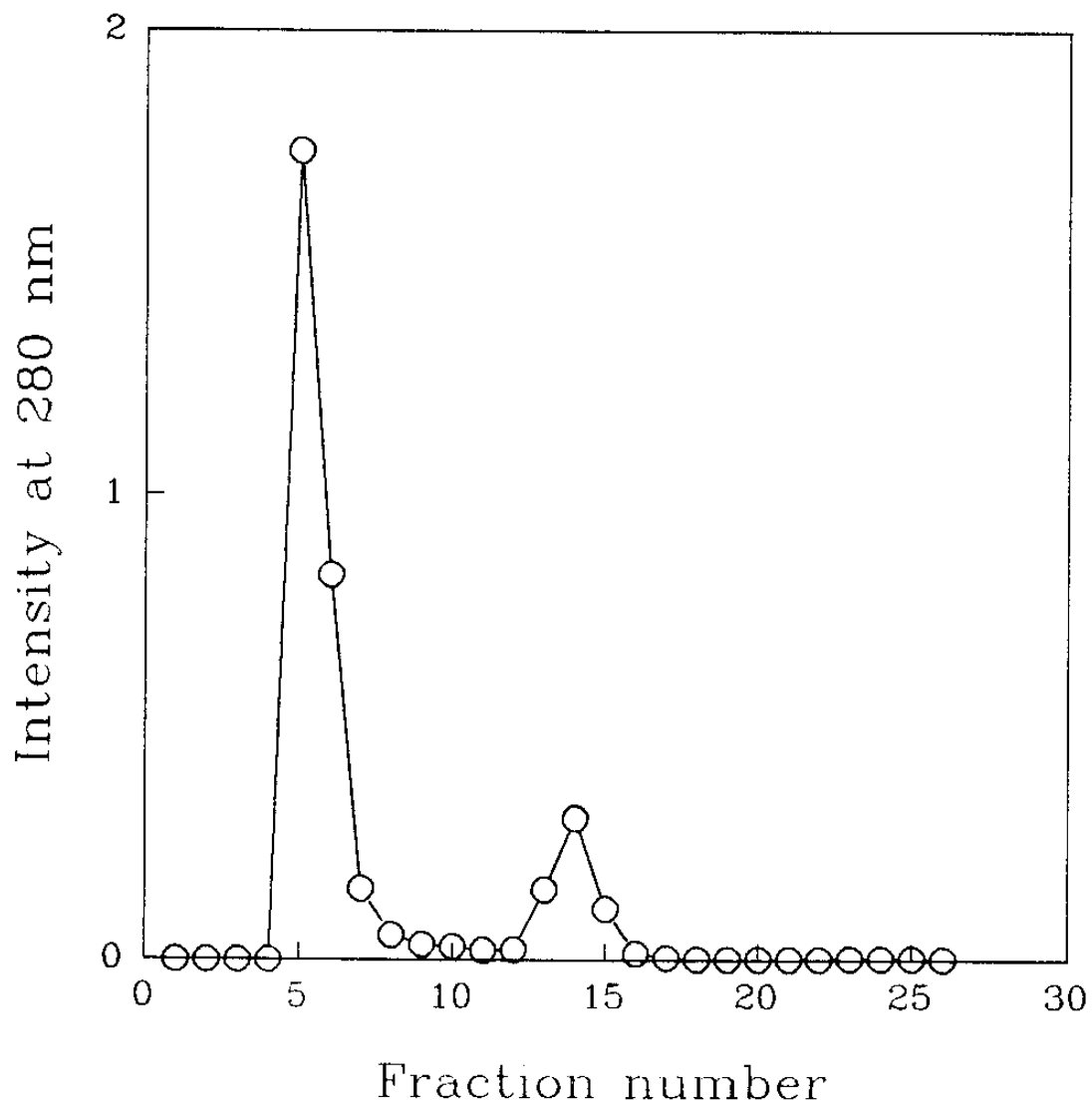


Fig.12 Elution profile of liposome solution from Sepharose 6B gel filtration chromatography

될 경우 면역원성이 증가된다는 보고에 따라 lipid A를 포함한 liposome 과 포함하지 않은 liposome 을 제조하여 Balb/c 에게 주사하여 항체의 생성 정도를 알아보았다. Lipid A를 포함한 경우가 포함하지 않은 경우보다 ELISA titer가 높게 나타남을 알 수 있다 (Fig.13). 이는 lipid A가 mice 의 경우 B cell mitogen 으로 작용하는 것으로 생각된다. 또한 liposome 을 사용하지 않은 free 펩티드의 경우 항체생성을 유도하지 못하는 것을 알 수 있는데 (Fig.13), 이는 사용하는 펩티드가 너무 작아서 immunogen 으로 작용하지 못하는 것으로 생각된다.

상전이 온도가 다른 phospholipid가 liposome 을 형성하였을 경우, 주위의 온도에 따라서 존재하는 liposome bilayer 의 상태가 달라질 것이므로 이로 인한 면역원성 향상 정도가 달라질 것이다. 이러한 이유로 liposome 을 구성하는 인지질을 변화시키면서 liposome 을 제조하여 이를 immunize 하여 그 결과를 알아보았다. 사용하는 인지질에 따라서 항체생성이 달라짐을 볼 수 있는데 (Fig.14), 이를 인지질의 상전이 온도와 연결시켜 보면 상전이 온도가 높은 인지질로 구성된 liposome 의 경우가 더 높은 ELISA titer 를 나타냄을 알 수 있다 (Fig.15). 이는 상전이 온도가 높은 인지질일수록 더 rigid 한 bilayer 를 이루기 때문으로 생각된다.

Liposome 의 표면을 carbohydrate 나, protein 등으로 변조시킴으로 특정기관으로의 적중화가 가능하게 되는데, 이를 vaccine carrier 에 응용할 수 있다. 즉, vaccine 으로 사용되는 liposome 을 spleen 이나, lymph node 로 localize 시킨다면 적은 양으로 높은 효과를 볼 수 있게 된다. 1991년 Huang 등이 ganglioside G_{M1} 이 포함되지 않은 liposome 의 경우 간이나 기타 조직에 분포하는 비율이 80~90%인데 비해 spleen

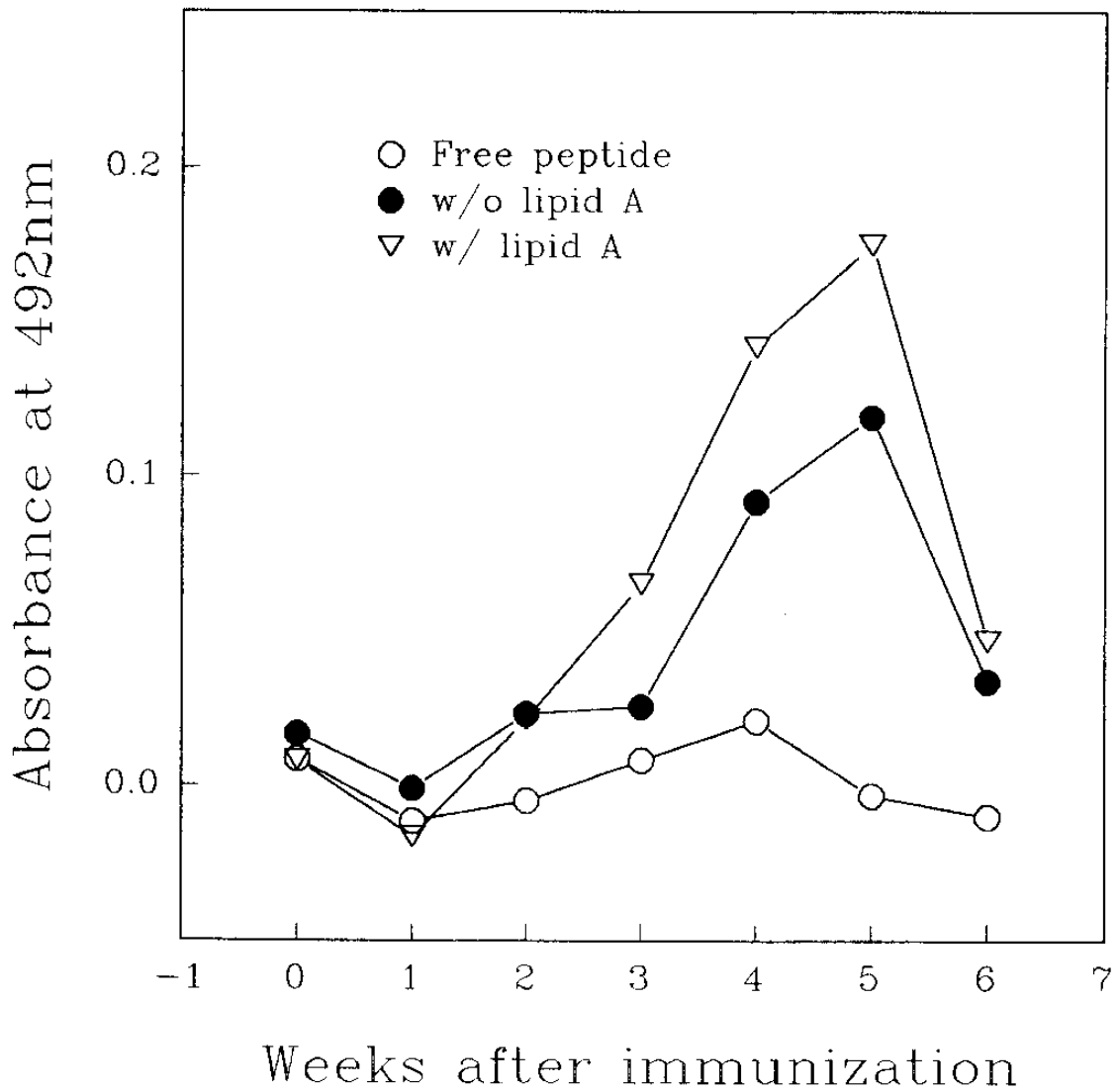


Fig.13 Effects of lipid A on the immune response of BALB/c mice to Pre-S2(134-145) peptide bound to liposome surface. Liposomes were composed of PC:PE:cholesterol =1:0.05:0.5, with or without lipid A 0.4%

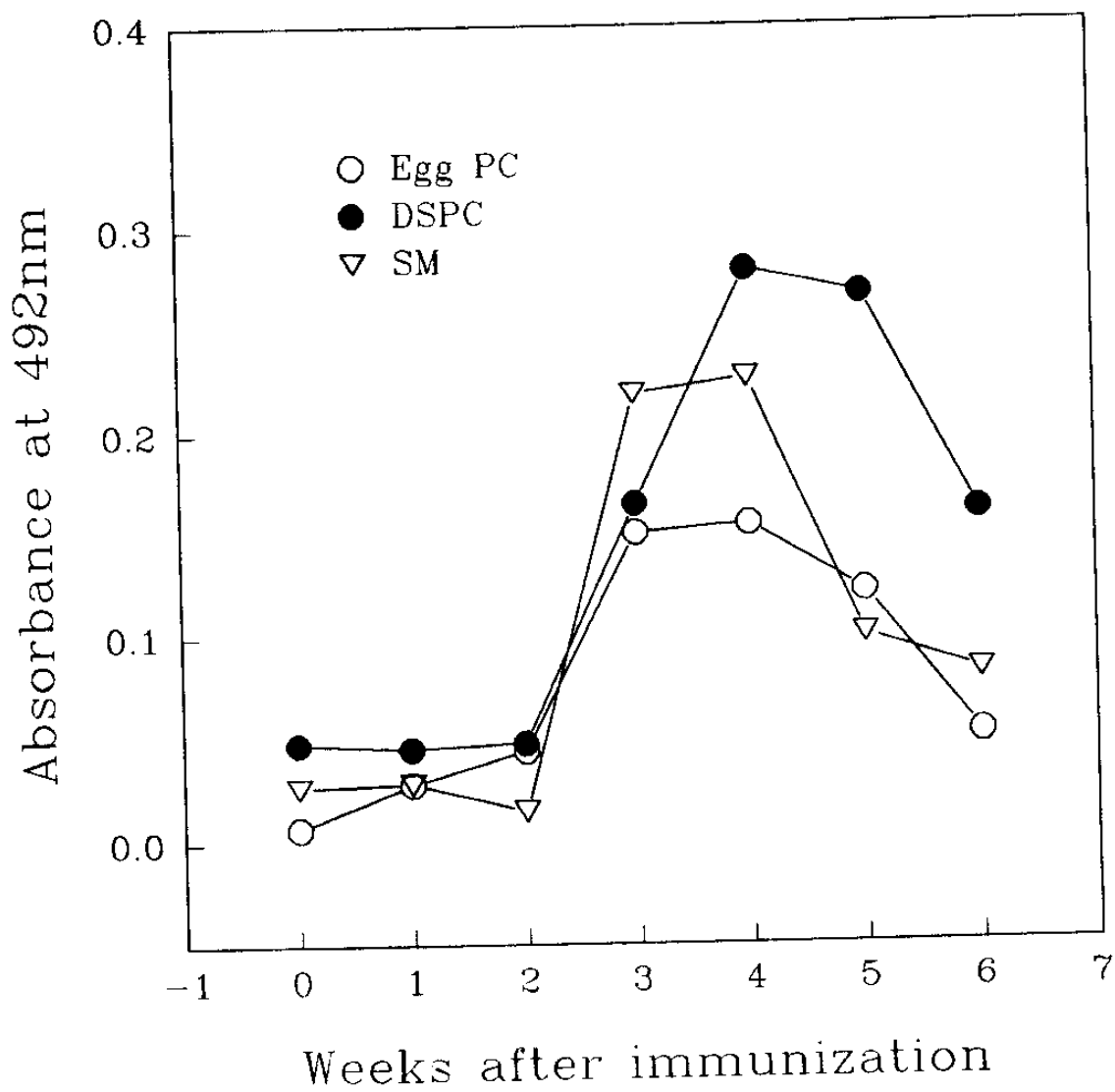


Fig.14 Effects of lipid species on the immune response of BALB/c mice to Pre-S2(134-145) peptide bound to liposome surface. Liposomes were composed of PC:PE:cholesterol = 1:0.05:0.5, with 0.4% lipid A, PC: phosphatidylcholine, DS- : distearyl-, SM: sphingomyelin

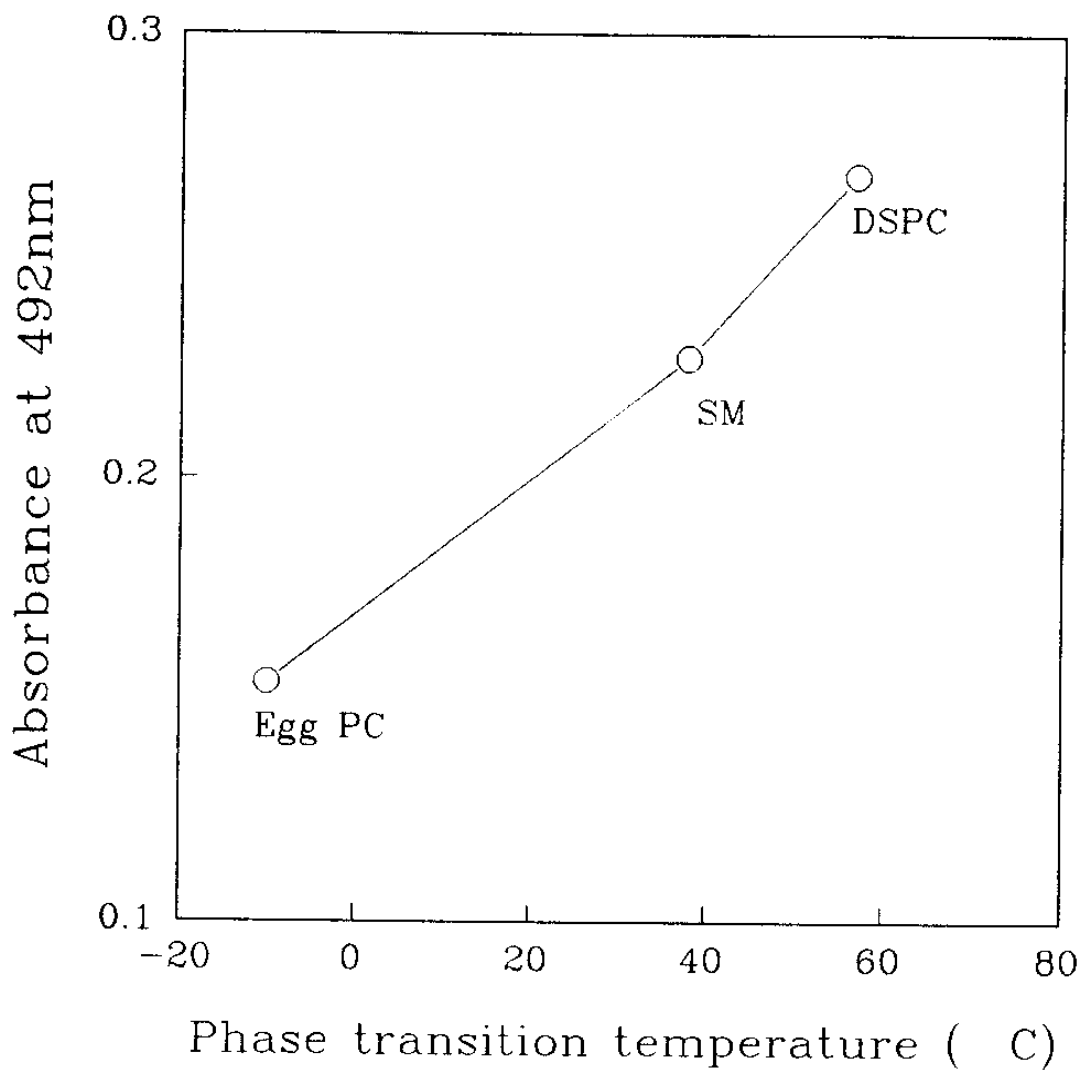


Fig.15 Relation of phase transition temperature of lipid species to immune response of BALB/c mice to Pre-S2 (134-145) peptide bound to liposome surface. Liposomes (PC:PE:cholesterol =1:0.05:0.5, with 0.4% lipid A) were prepared with various lipid species, PC:phosphatidylcholine, DS-:distearyl-, SM: sphingomyelin

으로 가는 비율은 주사한 전체량의 10~20% 정도로 나타난 반면, ganglioside G_{M1}에 포함된 phosphatidylcholine liposome은 spleen으로 가는 비율이 주사한 전체량의 50% 정도임을 실험으로 밝힌 바 있다 (54). 이러한 보고에 의거하여 사용하고 있는 liposome에 ganglioside G_{M1}을 포함시켜 실험하였다. 그 결과 ganglioside G_{M1}을 포함한 liposome의 경우가 ganglioside G_{M1}을 포함하지 않은 liposome의 경우보다 높은 ELISA titer를 나타내었다 (Fig.16). 이러한 결과로 미루어 보아 liposome에 포함된 ganglioside G_{M1}이 spleen으로의 localize에 기여한 것을 알 수 있다.

사용하는 B-cell epitope 부분은 Pre-S2 134-145와 130-145 두 종류를 사용하였다. Pre-S2 134-145 펩티드와 liposome을 결합시킬 때에는 Torichilin의 방법을 사용하여 overnight 시켰을 경우에 결합율은 25~30%로 나타났고 4°C에서 7일간 반응시켰을 경우에 결합율이 80%로 나타났다. 그러나 Pre-S2 130-145 펩티드를 Torichilin 방법으로 overnight 시키며 결합시켰을 경우 전혀 결합하지 않는 현상을 나타내었으나, 반응시간을 4°C에서 7일간으로 증가시키면 결합효율이 40%로 증가하는 것으로 보아, 이는 Pre-S2 130-145 펩티드가 Pre-S2 134-145 펩티드보다 좀 더 hydrophobic하여 liposome 표면에 분포하는 phosphatidylethanolamine과 결합할 기회가 줄어들기 때문으로 여겨진다. Liposome 표면의 phosphatidylethanolamine의 분포밀도를 높이기 위하여 liposome을 구성하는 phosphatidylcholine과 phosphatidylethanolamine의 비율을 1:1로 하여 반응시켰을 경우 반응효율이 35%로 증가하는 것으로 나타났다. Liposome 표면에 펩티드를 결합시키는 방법으로 Torichilin의 방법을 사용하는 것이 매우 번거롭기

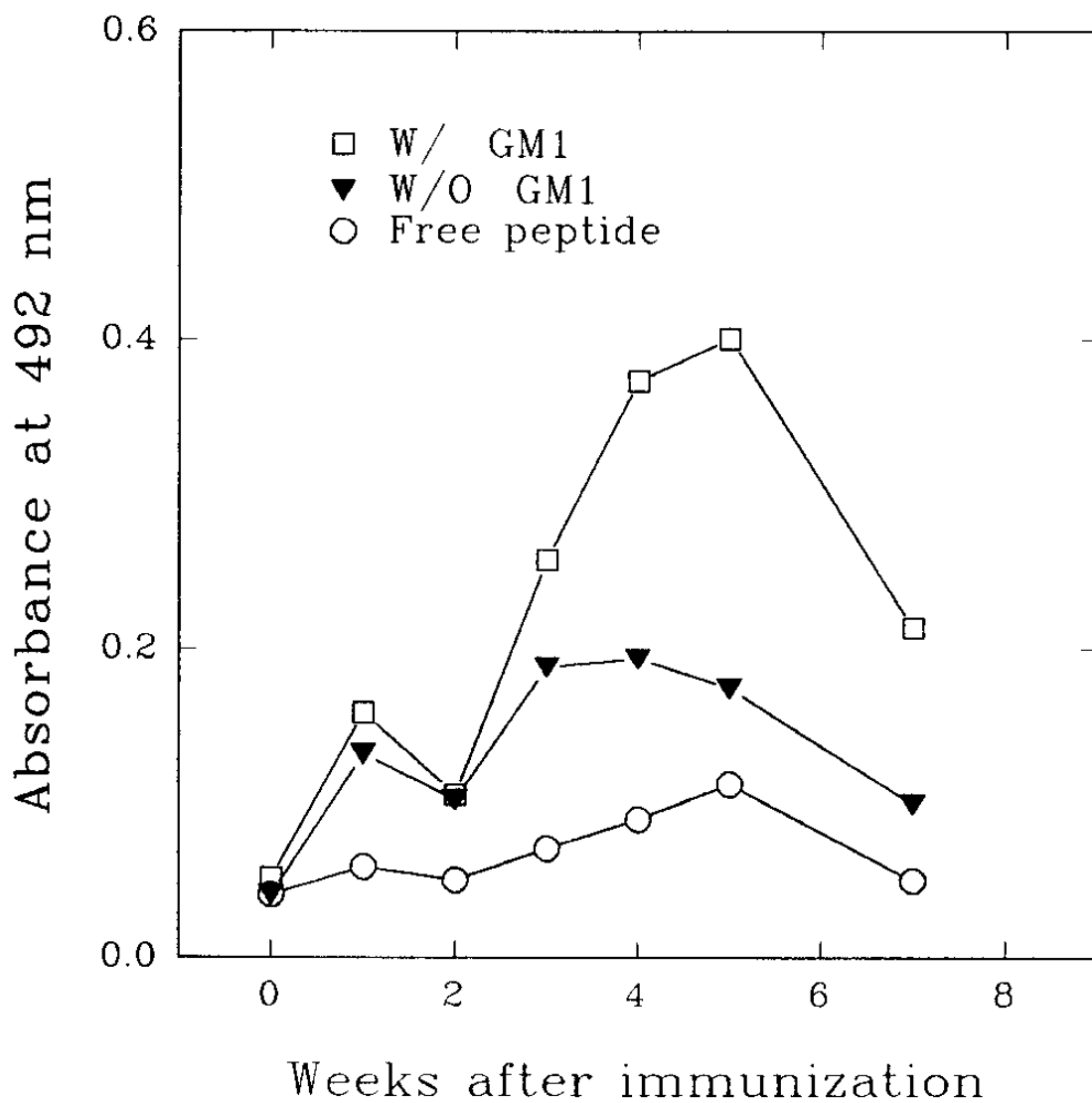


Fig.16 Effects of G_{M1} on the immune response of BALB/c mice to Pre-S2(130-145) peptide bound to liposome surface. Liposomes were composed of PC:PE:cholesterol=1:1:1, with lipid A 0.4% with or without G_{M1} 10%

때문에 Pierce사에서 제시한 방법을 약간 변형시켜서 사용하였다.

본 실험에서 사용하는 결합시약인 glutaraldehyde의 첨가되는 양에 의해서 펩티드 결합율이 영향을 받을 것으로 생각되어 적절한 결합시약의 양을 결정하기 위해서 인지질과 펩티드를 일정하게 하고 glutaraldehyde의 양에 따른 결합효율을 조사하였다. Glutaraldehyde의 양을 결합하는 펩티드 양에 비례하여 증가시키면 결합효율이 증가하다가 다시 감소하는 결과를 알 수 있다 (Fig.17). 여기에서 사용하는 결합시약의 최적비율이 peptide : glutaraldehyde = 1 : 10 정도임을 알 수 있다. 또한 결합시키는 펩티드 양과 liposome에 분포하는 phosphatidylethanolamine의 양 사이에 존재하는 최적비율을 결정하기 위하여 인지질 양을 일정하게 하고 펩티드 양을 변화시키며 반응시켜 결합효율을 조사하였다. 이때 glutaraldehyde 양은 첨가되는 펩티드와 1 : 10의 비율로 첨가하였다. 펩티드 양을 변화시키면서 결합효율을 조사해 보면 첨가되는 펩티드량 대 인지질의 비가 0.2에서 1 사이에서 비율이 증가하면서 결합효율이 증가하다가 감소하는 현상을 알 수 있었다 (Fig.18). 이런 범위에서는 펩티드가 결합하는 최적조건이 존재함을 나타내는데, 그 정도는 펩티드 : 인지질의 비율이 0.6에서 0.8 사이로 나타났다.

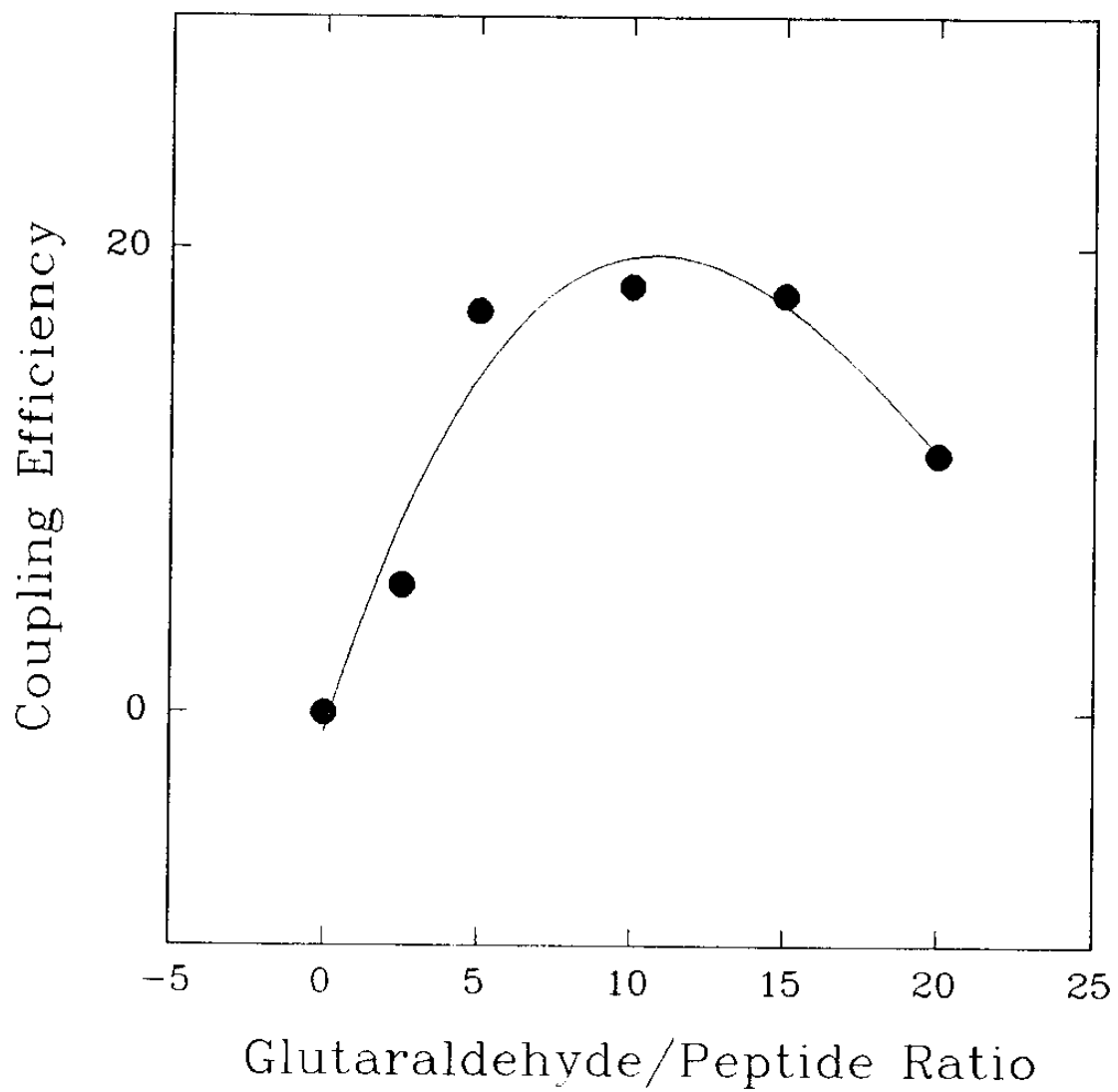


Fig.17 Binding efficiency of Pre-S2(130-145) peptide to liposome surface with various amounts of binding reagent. Liposomes were composed of PC:PE:cholesterol =1:1:1

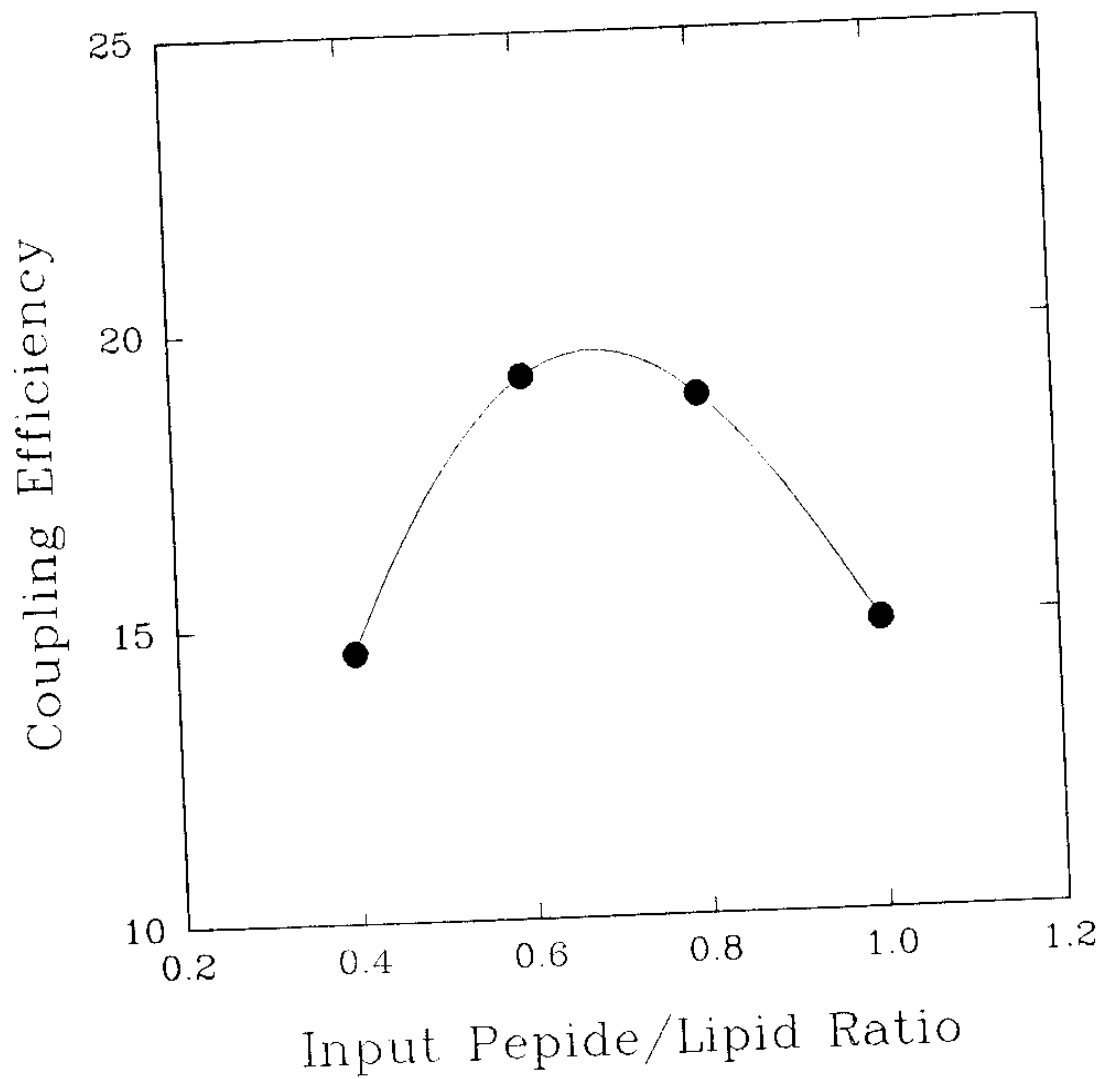


Fig.18 Binding efficiency of Pre-S2(130-145) peptide to liposome surface with peptide to lipid ratio. Liposomes were composed of PC:PE:cholesterol = 1:1:1

C. 복합면역백신 운반체 연구

I. 서 론

새로운 백신을 개발하는데 여러가지 관점에서 다각도로 장점과 단점들을 고려할 때, 불활성화된 세균 백신 (live attenuated vaccines) 들을 유전공학적인 방법으로 조작하여 복합면역백신의 운반체로 활용하면 일회 접종으로 여러가지 질병을 동시에 예방할 수 있으므로 많은 연구자(55) 들이 흥미를 갖고 있는 연구분야 중의 하나이다.

바이러스 백신을 이용하는 방법과 세균 백신을 복합 백신의 운반체로 활용하는 두가지 방법이 있는데, 바이러스 백신은 당화, 인산화, folding, 분비, subunit 결합 등을 진핵세포 안에서 정확하게 진행시키므로 항원 자체를 발현시킬 수 있을 뿐 아니라 세포 독성 T-세포의 생성 뿐 아니라 항체 생성을 유도하는 장점을 갖고 있으며, 세균 백신은 면역효과가 오래 지속되며 장내와 같은 국부 면역을 증강시킬 뿐 아니라 세포 면역을 증강시키는 독특한 특성을 갖고 있다.

Vaccinia virus가 바이러스 백신중 제일 먼저 복합면역백신의 운반체로 활용하는 실험에 사용되었는데 부작용과 중화 항체에 의한 영향 때문에 실용화가 어려운 실정이다. Adeno virus는 미국 군인을 상대로 접종한 결과 부작용이 없고 경구 투여가 가능한 백신이라서 각광을 받고 있는데 이 백신은 불활성화된 백신이 아니라서 안전성에 관한 연구가 계속적으로 이루어져야 하는 단점을 갖고 있다. 이외의 바이러스 vector로는 herpes virus, polio virus, yellow fever 17D vaccine 등이 연구·개발되고 있다.

세균 백신으로는 *Salmonella* 영양요구주, 대장균, BCG 등이 vector

개발의 연구 재료로 사용(56)되고 있는데 이들 중에서 BCG는 45년 동안 사용되면서 안전성이 입증된 백신으로 부작용이 거의 없으며 모체로부터 유입된 항체의 영향을 받지 않으므로 생후 언제든지 접종이 가능할 뿐 아니라 일회 접종으로 면역성이 50년 이상 지속되고 가격이 저렴하며 생균 백신 중에서는 가장 열에 안정하며 자체가 면역증강제로 사용되는 등 많은 장점을 갖고 있어서 복합면역백신의 운반체로 개발하기에 적합한 백신이다. BCG는 외부의 항원 유전자를 도입하였을 때 항체 생성을 유도할 뿐 아니라 세포 면역성도 유도하여 독성 T-세포의 생성을 촉진시킨 연구 결과도 보고되어 있다.

본 연구에서는 BCG의 유전자 library를 만든 후 leucine의 생합성에 관여하는 유전자를 선별하여 이 유전자의 분자생물학적 특성을 규명함으로써 BCG를 복합면역백신의 운반체로 활용하기 위한 기초자료를 수립하였다.

제 1 절 실험재료 및 방법

실험에 사용한 *Mycobacterium bovis* BCG는 결핵연구원에서 제공받았다. Fig.19,20에 나타난 방법으로 BCG DNA library를 만들고 leucine 요구대장균주에서 선별한 후 제한효소 지도를 작성하였다.

제 2 절 결과 및 고찰

BCG로부터 DNA를 분리하여 2~6 kb의 절편이 되게 Sau3AI 으로 절단한 후 pUC19의 BamHI 위치에 ligation시켜 70 만개의 형질전환체를 ampicillin이 포함된 LB 고체배지에서 획득하였다. 영양요구 대장균에서 238개의 균락을 얻었는데 이 중에서 leucine이 없는 배지에서

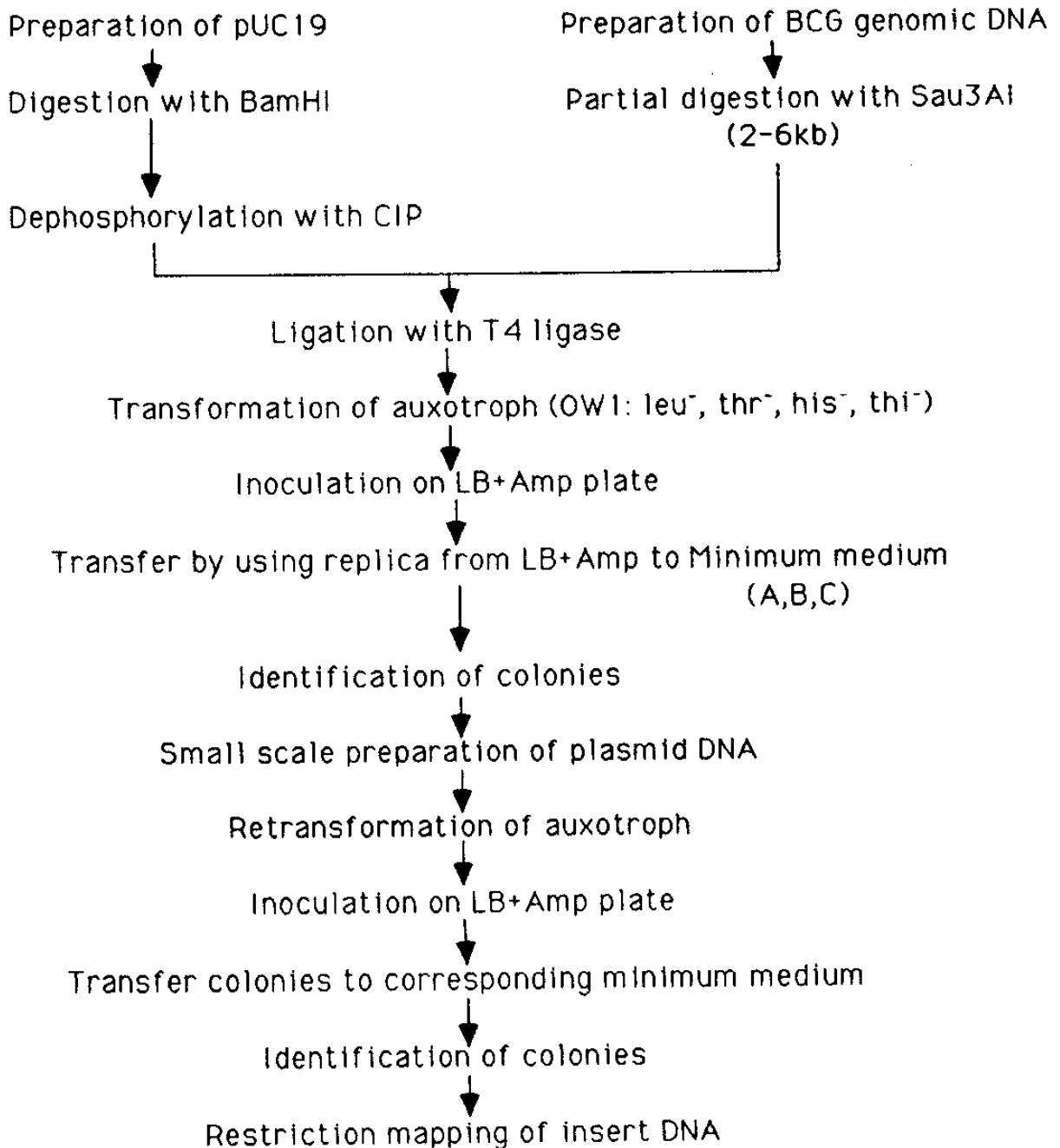


Fig.19 Experimental procedures for the construction of *Mycobacterium E. coli* shuttle vector

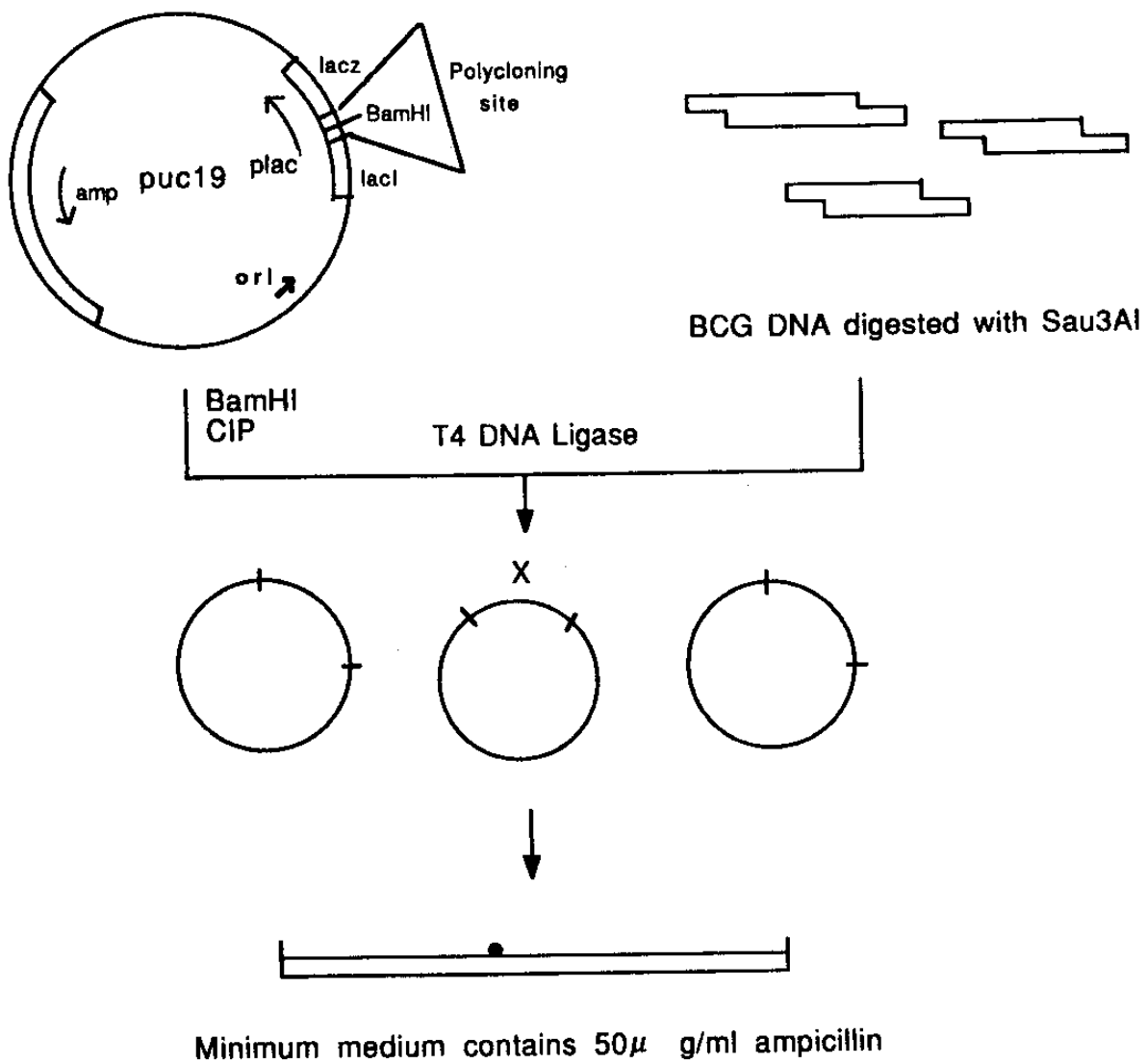


Fig. 20 Strategy of selection for the cloned nutritional marker from mycobacteria

자라는 것은 75 개였었다. 액체 배지로 다시 한번 선별한 결과 27 개의 균락을 얻었는데 제한효소로 잘라 전기영동한 결과 비슷한 양상을 보이므로 동일한 BCG DNA의 절편이 pUC19 속으로 유입된 것으로 판단된다.

이 중에서 하나를 선별하여 “pUC19-leu”라 명명하고 다음의 실험들을 수행하였다. Leucine이 없는 배지에서 영양요구주인 OW1과 pUC19으로 형질전환시킨 OW1 (pUC19/OW1)은 자라지 못하지만 재조합 플라스미드인 pUC19-leu로 형질전환시킨 OW1은 자랄 수 있었다 (Fig. 21의 3).

유입된 유전자의 제한효소 지도를 작성하기 위하여 69종의 효소를 처리하였으며 이 중에서 절단 부위가 하나인 효소들을 이용하여 Fig.22와 같은 지도를 작성하였다. 현재 이 유전자의 염기 서열을 결정하는 실험을 수행하고 있는데 아직까지 보고되지 않은 유전자로 복합면역백신의 운반체로 활용할 때 유용한 지표로 사용될 수 있다.

제 3 절 결 론 및 건 의 사 항

본 연구는 *E. coli*에서 자체적으로 대량 복제되며 BCG 안에서 homologous integration할 수 있는 유전자 운반 방법을 개발하기 위하여 수행하였다.

병원체의 항원 유전자 혹은 B형 간염 바이러스의 항원 유전자를 BCG에 도입시키면 복합면역백신을 개발할 수 있다.

따라서 BCG에서의 안정성에 관한 연구와 실험동물체내에서의 항체 면역성과 세포면역성에 관한 연구가 수행되면 기업화 및 상품화를 위한 정보로 활용할 수 있으므로 지속적인 연구가 이루어지길 바란다.



Fig.21 Confirmation of the transformant on the minimum medium without leucine

1. OW1
2. pUC19/OW1
3. pUC19-leu/OW1

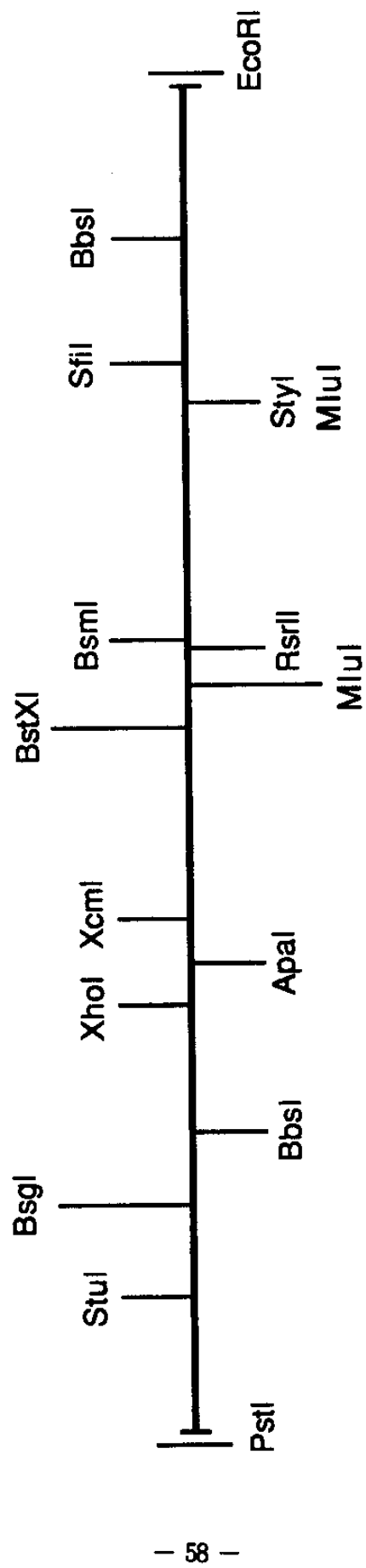


Fig.22 Restriction enzyme map of insert *leu* DNA

D. 기존 백신의 효율성 조사 연구

백신의 효과나 효능을 정확하게 평가하기 위하여는 소위 controlled comparative community trial을 시행하고 장기간 추적관찰을 통하여 백신접종 지역과 비접종 지역에서의 임상적 감염환자 발생율을 비교하고 궁극적으로는 감염사망율을 비교하여야 한다. 그러나 이러한 대규모이면서 장기간의 연구수행은 현실적으로 어렵고 또한 윤리적인 난제도 있다. 그리하여 통상적으로 항체생성을 결과지표로 하여 간이적인 평가를 시행하고 있는 실정이다.

지금까지 국내에 소개된 수종의 감염백신은 그 효율면에서 매우 우수한 것으로 평가되고 있다. 거의 대부분의 경우 단기간의 관찰을 통하여 95% 이상의 항체 생성율을 얻었다고 보고하였으며 (57-61), 1년 이상 추적관찰한 연구에서는 약간 낮은 항체 생성율을 보고하고 있다.

Table 1. 접종후 기간별 항체 생성율의 변화

기 간	항 체 생 성 율	참 고 문 헌
< 1년	>95 %	57-61
13개월	72.9 %	62
15개월	86.6 %	65
56개월	81.3 %	63

한편 유건 (64) 등은 감염백신 접종후 생성된 S항체 지속성을 연구한 결과 최초접종후 52개월째에 32명중 30명 (93.8%)이 항체를 가지고 있었으며 5명은 그 역가가 10 SRU 아래로 저하되어 있었다고 보고하였

다.

그러나 한편 백신의 접종에도 불구하고 항체생성이 없거나 오히려 s항원이 양성으로 나타나는 경우도 있다는 보고가 있다. 안윤옥등(65)은 백신접종자 321명을 추적하여 9.7%에서 항체가 음성이었고 3.7%는 s항원이 양성이었음을 보고하였다.

백신의 효능을 평가하기 위하여는 백신을 맞지 않은 비교 대조 집단에서 자연발생하는 항체 양성율을 알아야 한다. 안윤옥등(65)은 B형간염 감염의 위험요인에 관한 연구에서 혈청학적 표식자가 모두 음성인 성인남녀 341명을 2년 동안 추적 관찰하여 표식자의 변화과정을 조사하였는 바, 그 기간 동안에 s항원의 양전율이 남자에게는 8.5%, 여자의 경우는 3.5%이었으며 s항체 양전율은 남자 55.8%, 여자 43.1%를 보고하여 우리나라 성인에서의 자연발생 항체 양성율이 매우 높은 수준임을 제시하였다. 정환국등(66)은 백신을 맞지 않은 사람들에서 자연발생하는 s항체 양성율이 약 18% 정도라고 추정하였고 이것은 연령이 증가하면서 같이 증가한다고 피력하고 있다. 요컨대, 우리나라 성인에서의 B형간염 백신의 효능은 크게 기대할 수 없다고 하겠으며 따라서 소아집단과 고위험군을 백신접종의 주요 대상으로 할 때 높은 효능을 기대할 수 있다고 하겠다.

참 고 문 헌

- (1) Dejean, A. et al., (1984) *Proc., Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 5350
- (2) Tiollais, P. et al., (1985) *Nature*, 317, 489
- (3) Buynak, E.B. et al., (1976) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 151, 694
- (4) Maupas, P. et al., (1978) *Viral Hepatitis* (Uyas, G.N. et al., ed.) Franklin Institute Press, Philadelphia, pp.539
- (5) Stibbe, W. and Gerlich, W.H., (1982) *Virology*, 123, 436
- (6) Stibbe, W. and Gerlich, W.H., (1983) *J. Virol.*, 46, 626
- (7) Heermann, K.H. et al., (1984) *J. Virol.*, 52, 396
- (8) Hopp, T.P. and Woods, K.R., (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 3824
- (9) Neurath, A.R., Kent, S.B.H. and Strick, N. (1984) *Science* 224, 392
- (10) Neurath, A.R., Kent, S.B.H., Strick, N., Taylor, P. and Stevens, C.E. (1985) *Nature* 315, 154
- (11) Machida, A. et al., (1983) *Gastroenterology*, 85, 268
- (12) Machida, A. et al., (1984) *Gastroenterology*, 86, 910
- (13) Persing, D.H. et al., (1986) *Science*, 234, 1388
- (14) Charnay, P. et al., (1980) *Nature*, 286, 893
- (15) Edman, J.C. et al., (1981) *Nature*, 291, 503

- (16) Mackay, P. et al., (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 4510
- (17) Fujisawa, Y. et al., (1983) Nucleic Acids Res., 11, 3518
- (18) Fujisawa, Y. et al., (1985) Gene, 40, 23
- (19) Offensperger, W. et al., (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 7540
- (20) Choi, Y.C., Lee, S.C., Han, M.H. and Yu, M.H. (1988) Korean Biochem. J. 21,102
- (21) Valenzuela, P. et al., (1982) Nature 298, 347
- (22) Valenzuela, P. et al., (1984) in "Modern Approaches to Vaccines" (Chanock, R.M. and Lerner, R.A. eds.), Cold Spring Harbor, Laboratories, New York, pp.209-213
- (23) Valenzuela, P. et al., (1985) Biotechnology, 3, 317
- (24) Gabral, G.A. et al., (1978) J. Gen. Virol., 38, 339
- (25) Christman, J.K. et al., (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 1815
- (26) Moriarity, A.M. et al., (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 2606
- (27) Laub, O. et al., (1983) J. Virol., 48, 271
- (28) Michel, M. et al., (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 7708
- (29) Michel, M. et al., (1985) Biotechnology, 3, 561
- (30) Milich, D.R. et al., (1985) Science, 228, 1195

- (31) Lerner, R.A. et al., (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 3403
- (32) Dressman, G.R. et al., (1982) Nature, 295, 158
- (33) Bhatnagar, P.K. et al., (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 4400
- (34) Neurath, A.R. Kent, S.B.H., Strick, N., Taylor, P. and Stevens, C.E. (1985) Nature, 315, 154
- (35) Chemical and Engineering News, March 1986, 5
- (36) Laemmli, U.K. (1970) Nature, 227, 680
- (37) Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J., (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 4350
- (38) Voller, A., Bidwell, D.E. and Bartlett, A., (1979) IN ELISA, A guide with abstracts of microplate applications, pp.35-40, Dynatech Laboratories, Inc., Alexandria, VA, USA.
- (39) Harlow, E., et al., (1988) Antibodies; a laboratory manual
- (40) Alving, C.R., (1991) J. Immunol. Methods, 140, 1
- (41) Davis, D. and Gregoriadis, G., (1987) Immunology, 61, 229
- (42) Garcon, N.M.J. and Six, H.R., (1991) J. Immunology, 146, 3697
- (43) Dancey, G.F. et al., (1977) J. Immunology, 119, 1868
- (44) Dancey, G.F. et al., (1978) J. Immunology, 120, 1109
- (45) Manesis, E.K. et al., (1979) FEBS Letters, 102, 107
- (46) Neurath, A.R. et al., (1984) J. gen. Virol., 65, 1009
- (47) Sanchez, Y. et al., (1980) Infection and Immunity, Dec. 728

- (48) Dreesman, G.R. et al., (1982) *Nature*, 295, 158
- (49) Yasuda, T. et al., (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 1234
- (50) Neurath, A.R. et al., (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 7871
- (51) Milich, D.R., (1988) *Immunol. Today*, 9, 380
- (52) Milich, D.R., et al., (1990) *J. Immunology*, 144, 3544
- (53) Torichilin, V.P. et al., (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 89, 1114
- (54) Liu, D. et al., (1991) *Biochem. Biophys. Acta*, 1066, 159
- (55) Bloom, B.R., (1989) *Nature*, 342, 115
- (56) Husson, R.N., B.E. James, and R.A. Young, (1990) *J. Bacteriol.*, 172, 519
- (57) 유건, 의료 종사자들에 있어서의 B형 간염백신의 면역반응, 대한 내과학회지, (1985) 29:639-646
- (58) 김정식, 전종만, B형 간염백신의 임상적 효과, 대한내과학회지, (1986) 31:374-377
- (59) 김세중, 문희식, 남광우 외 2인, B형 간염백신의 면역성 및 안정성에 관한 연구—유·소아군과 청·장년군의 면역성을 중심으로—, 대한내과학회지, (1987) 33:96-105
- (60) 이창홍, 박영태, 유혜경 외 2인, B형 간염백신의 효과, 대한내과학회지, (1987) 32(4):166-173
- (61) 서동진, 김진호, 최중호 외 2인, B형 간염백신의 임상적 효과, 대한의학협회지, (1983) 26:863-869

- (62) 김영식, 김정순, 허봉열, 건강인의 B형간염 바이러스 표식자 양성을
및 B형간염 예방접종후 항체 생성에 관한 연구, 한국역학회지,
(1985) 7(1):8-15
- (63) 김영식, 허봉열, 안윤옥, B형 간염백신 접종후 50개월 이상 경과
시점에서 항체 보유에 관한 조사 연구, 대한의학협회지, (1989)
32:1084-1090
- (64) 유건, 한국인에서의 B형 간염백신 접종의 장기적인 면역원성, 대한
내과학회지, (1988) 35:112-117
- (65) 안윤옥, 유근영, 박병주 외 3인, 성인에서의 B형간염 예방접종 후 혈
청학적 표식자 분포에 관한 연구, 한국역학회지, (1987) 9:28-38
- (66) 정환국, 선희식, 정규원 외 2인, 자연발생 또는 백신 접종후 생긴
HBsAg에 대한 항체의 지속성과 Anamnestic Response, 예방의학
회지, (1987) 20(2):280-286

주 의

1. 이 보고서는 과학기술처에서 시행한 특정연구개발 사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 과학기술처에서 시행한 특정연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안됩니다.