

유전자재조합 B형 간염바이러스 백신(HG-II)의 면역원성 및 안전성

지방공사 강남병원 내과, 경상대학교 의과대학 내과학교실*, 연세대학교 의과대학 영동세브란스병원 소아과**

이계희, 이옥재*, 김영채*, 남궁란**, 손영모**

=Abstract=

Immunogenicity and Safety of a 20 µg Dose of the Green Cross Recombinant Hepatitis B Vaccine (HG-II) in Healthy Adults

Lee Kyeheui, M.D., Lee OkJae, M.D.*, Kim Youngchai, M.D.*,
Namgung Ran, M.D.** , Sohn Youngmo, M.D.**

Department of Internal Medicine, Kangnam General Hospital, Public Corporation, Seoul, Korea
*Department of Internal Medicine, Gyeongsang National University College of Medicine, Chinju, Korea**
Department of Pediatrics, Yongdong Severance Hospital,
*Yonsei University, College of Medicine, Seoul, Korea***

Background/Aims : The introduction of *Hansenula polymorpha* for recombinant hepatitis B vaccine production allowed high product yield with plasmid stability and less glycosylation than conventional *Saccharomyces cerevisiae* system. A Green Cross HG-II vaccine formulated from HBsAg produced by a recombinant strain of the yeast *H. polymorpha* was evaluated for immunogenicity and safety in an open label trial. **Methods :** A 20 µg dose of Green Cross HG-II vaccine was administered intramuscularly at 0, 1 and 6 months at the deltoid region in 118 healthy adults seronegative for HBV markers. The anti-HBs titers were determined at one month after administration of the third dose of vaccine by radioimmunoassay. **Results :** The seroconversion rate was 96.8% (90 out of 93), with seroprotective rate of 95.7% (89 out of 93). The geometric mean titers(GMT) of the anti-HBs response was 153.1mIU/ml in seroconverters. An age-dependent effect was observed in the anti-HBs response. But sex-dependent effect was not prominent. Reactogenicity was in incidence and general reactions were short-lasting and a mainly mild in severity. **Conclusions :** The results of this study have shown that the Green Cross HG-II vaccine is safe and clinically well tolerated, and that it may provide protection against HBV infection.

Key Words : Recombinant Hepatitis B Vaccine, *Hansenula polymorpha* system

책임저자* : 이계희, 서울시 강남구 삼성동 171-1, 지방공사 강남병원

서 론

1971년 Krugman 등이 HBsAg을 함유한 혈장에서 가열처리하여 만든 백신으로 B형간염 바이러스의 감염을 예방할 수 있음을 보고한 이래, 안전하고 효과적인 B형 간염백신이 개발되어 B형간염 예방에 획기적인 전환기가 마련되었다¹⁻¹⁰.

우리나라에서도 1983년 혈장유래 간염백신이 개발되어 이미 그 면역성 및 안정성이 많은 연구에서 인정되었으며²⁻⁵, 이어 유전공학적인 방법으로 효모를 숙주로 이용하여 생산된 재조합백신(recombinant vaccine)도 효과 및 안전성이 입증되어 현재 상용화되어 있다¹¹⁻²⁰.

최근 주식회사 녹십자에서는 *Saccharomyces cerevisiae*를 효모숙주로 사용하는 기존 유전공학 기술보다 생산성 및 안정성 등에서 개선된 *Hansenula polymorpha*를 이용한 재조합 B형간염백신을 개발하였다²¹⁻²³.

이에 저자들은 우리나라의 건강한 성인을 대상으로 *H. polymorpha* system을 이용하여 생산된 재조합 B형 간염백신의 면역효과 및 안전성을 검토하였다.

대상 및 방법

1. 간염 B 백신

저자들이 사용한 B형 간염백신은 주식회사 녹십자의 HG-II vaccine이었다. HG-II는 1992년 주식회사 녹십자와 독일 Rhein Biotech GmbH사와 공동연구로 개발한 *Hansenula polymorpha* system(보사부 기술도입신고 1992)을 이용하여 생산한 효모유래 2세대 재조합 간염백신으로 영국 Huntingdon Research Centre에서 monkey와 rat model로 독성실험과 녹십자중앙연구소에서 rabbit model을 이용한 국소자극실험으로 안전성이 확인되었고 New York University Medical Center의

Laboratory for Experimental Medicine and Surgery in Primates(LEMSIP)에서 전임상시험 결과 백신의 유효성과 항체방어효과가 검증되었으며, 1ml당 20 µg에 해당하는 HBsAg을 함유하고 있다.

2. 대상

혈청 AST, ALT 및 γ-GT 등의 간기능 검사상 정상이고 방사선면역측정법(radioimmunoassay)에 의한 HBsAg, anti-HBs 및 anti-HBc가 음성이며 과거에 간질환을 앓았거나 간염백신의 접종력이 없으며 다른 신체적 질환이 없는 건강한 성인 중 임상시험에 서면 동의하였던 자원자 118명을 대상으로 하였다. 과거에 알레르기성 질환이 있었다든가 기타 과민성 체질자, 임신부나 수유부는 모두 제외하였다.

3. 방법

모든 접종대상자에게 (주)녹십자의 재조합 백신(HG-II) 1ml를 1개월 간격으로 2회 접종하였고, 첫 접종 후 6개월 후에 마지막으로 추가접종하였으며 모두 상박외측부에 근육주사하였다. 면역반응을 알아보기 위하여 첫 접종 후 7개월에 anti-HBs를 측정하여 항체의 역가가 3mIU/ml 이상이면 양성으로 하였고 10mIU/ml 이상이면 방어효과가 있는 것으로 해석하였다. B형 간염바이러스의 혈청학적 표지자들은 상용화된 Abbott사의 제품을 사용하여 방사선면역측정법으로 각각 측정하였다. 부작용을 알아보기 위하여 접종시마다 백신접종후 72시간동안 발생하였던 식욕부진, 구역, 두통, 어지러움, 피부발진, 근육통, 관절통, 피로감 등 전신증상과 주사부위의 발적, 경결, 압통 등 국소반응들에 대하여 증상의 정도, 발생일, 지속기간, 투약관련성, 처치 등에 관하여 문진 및 설문조사로 확인하였다.

결 과

1. 백신접종 후 anti-HBs 양전율

임상시험을 완료한 93명 중 남자가 33명, 여자가 60명이었고 평균연령은 남자가 39.6세(21-74세), 여자가 32.6세(20-75세)로 여자에서 남자보다 젊은 대상이 많았다(Table 1).

Table 1. Sex and Age Distribution of Vaccinees

	No.	Mean Age(yr)*
Male	33	39.6±14.2(21-74)
Female	60	32.6±12.7(20-75)
Total	93	35.1±13.7(20-75)

* : Data expressed as mean S.D.(range).

백신접종 완료 후 1개월 후에 측정된 anti-HBs의 양전율은 96.8% (90/93)이었고, 남자는 93.9% (31/33), 여자는 98.3% (59/60)로 성별에 따른 통계학적인 차이는 없었다(Table 2).

Table 2. Seroconversion Frequencies and Geometric Mean Titers for Anti-HBs Among Initially Seronegative Healthy Adults Receiving 20 microgam Doses of Recombinant HG-II Vaccine

	Seroconversion Rate(%)	GMT(mIU/ml)
Male	31/33(93.9) *	91.6±3.9**
Female	59/60(98.3) *	200.6±2.6**
Total	90/93(96.8)	153.1±1.8

* : p>0.05, ** p<0.05

2. 면역원성

총 대상환자 93례 중 89례(95.7%)에서 방어항체가 protective level인 10mIU/ml 이상으로 생

성되었다(Table 2). 항체 양전을 보인 경우에서의 기하학적 평균 항체가는 153.1mIU/ml이었고, Giunchi등²⁴의 기준에 따른 50mIU/ml 이상의 고역가 항체를 보인 례는 73례(78.5%)이었다(Fig. 1). 여자의 기하학적 평균 항체가는 200.6mIU/ml이었고 남자의 경우는 91.6mIU/ml로 여자에서 높은 항체가를 보였다(Fig. 2). 나이가 젊은 경우 상대적으로 높은 항체가를 보여 연령군에 따른 항체가의 차이가 관찰되었으나 여자의 경우 고령에서도 높은 항체생성을 보인 경우가 있었다(Fig. 2).

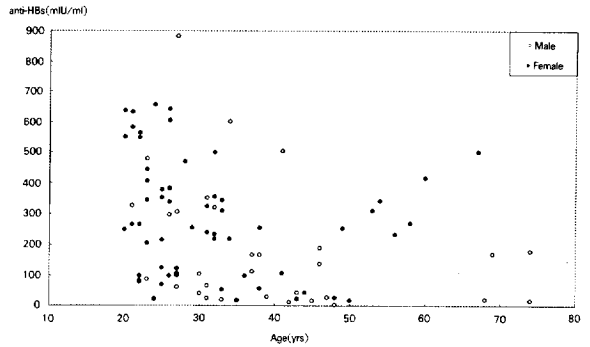


Fig. 1. Anti-HBs titers following 3 doses of HG-II recombinant hepatitis B vaccine

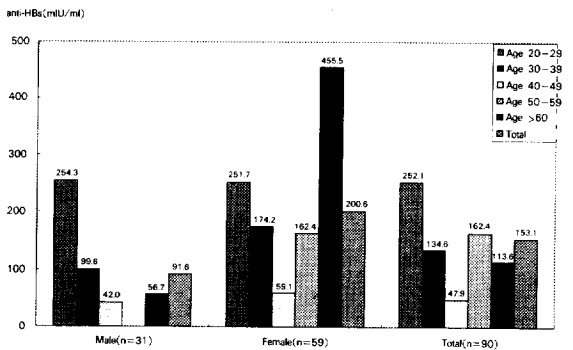


Fig. 2. Geometric mean titers of anti-HBs after HG-II vaccination according to age, sex

3. 부작용

1차 접종을 시행하였던 경우는 118례, 2차 접종을 시행하였던 경우는 109례, 3차 접종을 시행하였던 경우는 104례로 모두 331회의 접종건수 중 134례 (40.5%)에서 모두 275건의 부작용이 관찰되었다. 이 중 주사부위의 동통이 103건(31.1%)로 가장 많이 발생하였고, 그밖에 근육통(20.5%), 권태나 피로감(7.5%), 어지러움(5.7%), 주사부위 발적(5.4%)이 주요 부작용으로 관찰되었다. 매 접종시 가장 많이 발생하는 부작용은 주사부위 동통과 근육통이었으며 어지러움은 1차 접종시 많이 발생하였으나 접종이 진행될수록 감소하였다(Fig. 3, Fig. 4)

이러한 증상들은 모두 일과성으로 접종 후 삼사일 이내에 자연소실되었으며, 전반적으로 2차, 3차 접종으로 진행될수록 부작용 발생률이 감소하였다. 부작용으로 인하여 접종을 중단한 경우는 없었다.

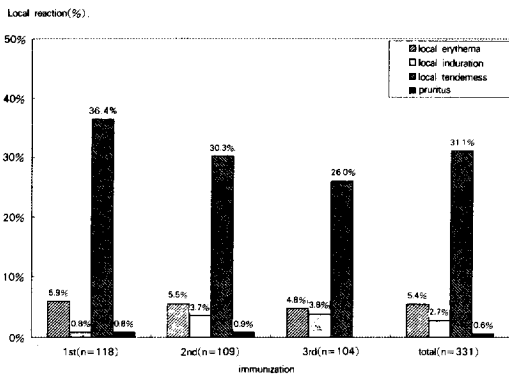


Fig. 3. Frequency of the local side reaction after each HG-II vaccination

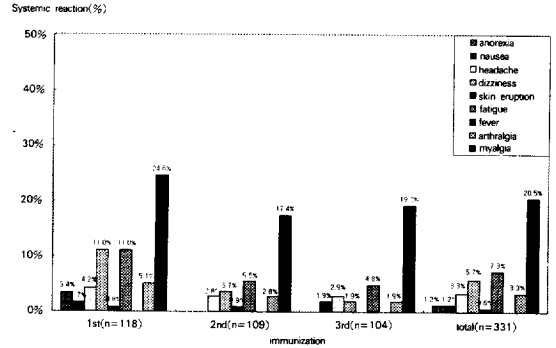


Fig. 4. Frequency of the systemic side reaction after each HG-II vaccination

고찰

B형 간염은 전세계적인 보건문제로 그 감염자 수는 전세계적으로 2억 5천만명 이상이며 매년 약 5천만명의 새로운 감염이 일어난다고 추계되고 있다. 급성 B형 간염이나 만성 B형 간염에 대한 특별한 치료법이 없는 상태에서 가장 중요한 것은 예방을 통해 HBV 감염을 억제하는 것이다. 다행히 HBV에 대한 백신은 이미 1980년을 전후로 혈장유래 백신이 임상에 이용되었고 HBV 감염에 대한 백신의 예방효과 및 안전성은 여러 보고자들에 의해 입증되었다¹⁻¹⁰. 이어서 Smith-Kline사에서 유전공학적인 방법으로 효모 숙주인 *Saccharomyces cerevisiae*를 이용한 백신을 개발하였고 이 재조합 백신도 여러 연구지들에 의하여 유용성이 입증되었는데 Dienstag등¹³은 94%, Jilg등¹⁵은 93%, Davidson등¹⁷은 98%, Papaevangelou등¹⁸은 100%의 항체생성을 보고하였고, 국내에서도 강등¹²은 98.2%의 높은 양전율을 보고하였다. 또한 부작용도 비교적 경미하여 접종 후 국소반응으로 일시적 동통이나 소양증, 경한 홍반이 보이는 정도이며 이러한 부작용으로 더 이상 접종을 시행치 못한 경우는 없어 이러한 보고들에 의해 재조합 백신도 기존 혈장유래 백신과 동등한 우수한 효과와 안전성이 인정되어 현재 상용화되어 널리 사용되고 있다²⁰.

한편 1991년 제네바에서 개최되었던 제45차 연례 회의에서 세계보건기구는 B형 간염 유병율이 8% 이상인 모든 국가의 경우 1995년까지 소아예방접종 프로그램에 B형 간염 예방접종을 포함시키고 1997년까지는 모든 국가에서 이를 시행하도록 결의한 바 있다. 이러한 전세계적인 B형 간염백신 접종 계획은 필연적으로 예방효과가 우수하고 부작용이 적으며 가격이 저렴한 백신의 개발을 요구하게 되며 이에 백신을 연구하는 많은 국가에서 안전하고 면역원성이 우수한 백신개발에 참여하고 있다²⁰⁻²⁵. 현재 국내에서는 혈장유래 백신 뿐 아니라 재조합 백신도 사용되고 있으나, 재조합 백신 제조시 기존에 사용되고 있는 *S. cerevisiae*는 아직 생산성이 낮고 생산공정중 plasmid가 삽입된 효모의 안정성이 떨어지며, 효모유래 B형 간염 S항원단백의 당단백(glycoprotein)이 hyperglycosylation된 상태로 면역원성, 활성도 및 혈청반감기에 좋지 않은 영향을 미치는 단점이 있어 개선의 여지가 있다²¹⁻²³. 그러나 같은 효모균의 일종인 *Hansenula polymorpha*을 이용하여 생산된 단백질의 평균 mannose chain length는 8-14units로 *S. cerevisiae*의 40개이상의 units에 비하면 glycosylation chain이 짧으며²³ 전술한 단점이 없음을 알게되었고, 이어 주식회사 녹십자에 의해 기존의 2세대 간염백신의 단점인 낮은 생산성과 효모의 불안정성을 개선하여 3-4배정도 생산성을 향상시키고 hyperglycosylation을 극복한 *Hansenula* system을 이용한 효모유래 2세대 간염백신(HG-II)이 개발되었다.

본 연구에서 저자들은 우리나라 성인을 대상으로 녹십자 HG-II vaccine의 유효성과 안전성을 확인하였다. 항체역가의 차단치를 Goudeau등⁷의 기준과 같이 3mIU/ml로 정하였을 경우 임상시험을 완료한 총 93명 중 90명에서 anti-HBs가 양성으로 96.8%의 양전율을 보였고, 93례 중 89례에서 최소방어치인 10mIU/ml 이상으로 95.7%의 방어항체 생성율을 보였다. 이 항체양전율 및 방어항체

생성율은 국내에 보고되었던 기존의 유전자재조합 백신의 항체양전율 98.3%¹²와 비교하여 통계학적으로 유의한 차이가 없었다($P>0.7$). 성별에 따른 anti-HBs의 양전율은 여자에게서 더 높다는 보고^{6, 26}도 있으나 일반적으로는 성별에 따른 차이는 없는 것으로 보고되고 있다^{13, 26}. 본 연구에서도 남자의 경우 93.9%, 여자의 경우 98.3%의 양전율을 보여 여자에서 다소 높은 양전율을 보였으나 통계학적으로는 유의하지 않았다. 반면 기하학적인 평균 항체가는 남자의 경우는 평균 91.6mIU/ml, 여자의 경우는 평균 200.6mIU/ml로 여자에서 유의하게 높은 성별간의 차이를 보였다. 연령에 따른 양전율은 저령자에서 잘 생성되며 고령자일수록 생성이 낮다고 보고^{7, 27, 28}되고 있는데 본 연구에서도 젊은 연령에서 고령자에 비하여 높은 항체가를 보여 연령에 따른 차이가 인정되었다. 따라서 여자에게서 남자보다 높은 항체역가를 보인 것은 남녀군이 정규분포를 하지 않는 관계로 정확한 감별은 곤란하나 여자에서 젊은 연령층이 상대적으로 많은 데 따른 결과, 즉 연령에 따른 차이가 반영된 것이라 추측된다. 그러나 여자의 경우에서 일부 고령자에서도 비교적 높은 항체가를 보인 경우가 있어 다른 요인도 있을 것으로 생각된다. 전체적으로 항체역가가 50mIU/ml 이상인 Guinchi등²⁴의 기준에 따른 고반응군은 78.5%로 백신으로서의 면역원성도 양호하였다. 임상시험에 참여하였던 모든 피험자를 대상으로 부작용을 관찰한 결과 총 331회의 접종건수 중 134례(40.5%)에서 275건의 부작용이 관찰되었다. 주로 주사부위의 동통, 근육통, 권태, 피로감, 어지러움, 주사부위 발적이 주 부작용이었는데 이러한 증상들은 모두 일과성으로 접종 후 삼사일 이내에 자연소실되었으며, 전반적으로 접종 횟수가 증가될수록 부작용 발생률이 감소하여 기존의 백신과 같은 양상을 보였다. 부작용으로 인하여 접종을 중단한 경우는 없었으며 결론적으로 안전성 면에서도 양호하다고 사료되었다.

요 약

목적: 기존의 *Saccharomyces cerevisiae* system보다 생산성 및 안정성 등에서 개선된 *Hansenula polymorpha* system으로 생산된 유전자재조합 B형 간염백신, 녹십자 HG-II의 면역효과 및 안전성을 검토하였다. **대상 및 방법:** B형 간염바이러스에 감염이 없었던 건강한 성인을 대상으로 20 µg의 백신을 0, 1, 6개월 방법으로 이두근에 근육주한 후 7개월째 방사선면역측정법으로 생성된 항체가를 측정하였고, 매 접종에 따른 부작용을 설문조사하였다. **결과:** 1) 백신 접종후 항체의 양전율은 96.8% (유효항체 생성율 95.7%)로 기존의 유전자재조합법으로 생성된 백신과 동등한 항체생성효과를 보였다. 성별에 따른 항체 생성율의 차이는 없었다. 2) 양전을 보였던 경우 항체의 기하학적 평균 역가는 153.1mIU/ml이었고 성별에 따른 항체의 역가는 여자에게서 200.6mIU/ml, 남자에게서 91.6 mIU/ml로 여자에게서 높은 결과를 보였으며 연령에 따라서도 차이를 보였다. 3) 백신접종후 보였던 부작용은 주사부위의 동통이 31.1%로 가장 많았고, 근육통(20.5%), 권태, 피로감(7.5%), 어지러움(5.7%), 주사부위 발적(5.4%)이 주요 부작용으로 나타났다. 이러한 증상들은 모두 일과성으로 접종후 3-4일 이내에 자연소실되었으며, 전반적으로 2차, 3차 접종으로 진행될수록 부작용 발생률이 감소하였다. **결론:** 이상의 결과로 보아 *H. polymorpha* system을 이용하여 생산된 재조합 백신인 녹십자 HG-II는 면역성이 높고 안전한 B형 간염백신으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Krugman S, Giles JP, Hammond J. Viral Hepatitis, type B(MS-2 strain) studies on active immunization. JAMA 1971;217:41-45.
2. 김정룡. B형 간염 vaccine에 관한 연구: 정제 간염

B 표면항원을 이용한 B형 간염의 예방. 대한의학협회지 1979;22:1013-1025.

3. 서동진, 김진호, 최중호, 신광순, 김경호. B형 간염 백신의 임상적 효과. 대한의학협회지 1983;6:863-869.
4. 김순호, 손한철, 문한규. B형 간염백신의 임상효과에 관한 연구. 대한소화기병학회잡지 1985;17:381-386.
5. 김세종, 문희식, 남광우, 홍경표, 이상혁. B형 간염 백신의 면역성 및 안전성에 관한 연구. 대한내과학회잡지 1987;33:96-105.
6. Stevens CE, Szmuness W, Goodman AI, Weseley SA, Fotino M. Hepatitis B vaccine: Immune responses in haemodialysis patients. Lancet 1980;2:1211-1213.
7. Goudeau A, Dubois F, Barin G, Dubois MC, Coursaget P. Hepatitis B vaccine: clinical trials in high risk settings in France (September 1975 - September 1982). Develop Biol Standard 1983;54:267-284.
8. Chung WK, Yoo JY, Sun HS, Lee HY, Lee IJ, Kim SM, Prince AM. Prevention of perinatal transmission of hepatitis B virus: A comparison between the efficacy of passive and passive-active immunization in Korea. J Infect Dis 1985;151:280-286.
9. Redfield RR, Innis BL, Scott RM, Cannon HG, Bancroft WH. Clinical evaluation of low-dose intradermally administered Hepatitis B virus vaccine. A cost reduction strategy. JAMA 1985;254:3203-3206.
10. Goudeau A, Denis F, Mounier M, Dubois F, Klein J, Godefroy A, Ballet M, Mountij A. Comparative multicentre study of the immunogenicity of different hepatitis B vaccines in healthy volunteers. Postgr Med J 1987;63(S2):125-128.
11. 윤명순, 김영훈, 한상영, 조균제, 문한규. Recombi-

- nant B형 간염 Vaccine의 안전성과 면역성에 대한 임상적 관찰. 대한의학협회지 1986;29:884-888.
12. 강진경, 김용범, 김경희, 하성규. 효모로부터 생산된 B형 간염 백신의 면역성 및 안전성. 대한내과학회잡지 1986;31:318-322.
 13. Soyletir G, Bahceci E, Akoglu E, Soyogul U, Lawrence RA. Clinical evaluation of low dose intradermally administered hepatitis B vaccine : a comparison of plasma-derived and recombinant yeast-derived vaccines. Vaccine 1992;10:301-4.
 14. Scolnick EM, LeLean AA, West DJ, McAller WJ, Miller WJ, Buynak EB. Clinical evaluation in healthy adults of a hepatitis B vaccine made by recombinant DNA. JAMA 1984;251:2812-2815.
 15. Jilg W, Lorbeer B, Schmidt M, Wilske B, Zoulek G, Deinhardt F. Clinical evaluation of a recombinant hepatitis B vaccine. Lancet 1984;ii:1174-1175.
 16. McAleer WJ, Buynak EB, Maigetter RZ, Wampler DE, Miller WJ, Hilleman MR. Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. Nature 1984;307:178-180.
 17. Davidson M, Krugman S. Immunogenicity of recombinant yeast hepatitis B vaccine. Lancet 1985;1:108-109.
 18. Papaevangelou G, Dandolos E, Roumeliotou Karayannis A, Richardson SC. Immunogenicity of recombinant hepatitis B vaccine. Lancet 1985; i:455-456.
 19. Purcell RH, Gerin JL. Prospects for second and third generation hepatitis B vaccines. Hepatology 1985;5:159-163.
 20. Lai CL, Wong BCY, Yeoh EK, Lim WL, Chang WK, Lin HJ. Five year follow-up of a prospective randomized trial of hepatitis B recombinant DNA yeast vaccine vs. plasma-derived vaccine in children : Immunogenicity and anamnestic responses. Hepatology 1993;18:763-767.
 21. Grinna LS, Tschopp JF. Size distribution and general structural features of N-linked oligosaccharides from the methyltrophic yeast, *Pichz Pastoris*. Yeast, 1989;5(2):107-115.
 22. Buckholz RG, Gleeson MA. Yeast systems for the commercial production of heterogenous proteins. Biotechnol 1991;9:1067-1072.
 23. Hodgson J. Expression systems : A user's guide. Emphasis has shifted from the vector construct to the host organism. Biotechnol 1993;11:887-893.
 24. Giunchi G, Panichi G, Pescini A, Pezzella M, Galli C, Chircu LV, Sorice F. Preliminary results of immune response to hepatitis B(HB) vaccine (Pasteur) in adults. Develop Biol Standard 1983; 54:153-159.
 25. 서정기. B형 간염 백신. 대한의학협회지 1991;34: 257-269.
 26. Dentico P, Buongiorno R, Volpe A, Zavoiani A, Pastore G, Schiraldi O. Long-term immunogenicity safety and efficacy of a recombinant hepatitis B vaccine in healthy adults. Europ J Epidemiol 1992;8:650-655.
 27. Crosnier J, Jungers P, Courouce AM, Laplanche A, Benhamou E, Degos P, Lacour B, Prunet P, Cerisier Y, Guesry P. Randomized placebo controlled trial of hepatitis B surface antigen vaccine in French haemodialysis units : 11 Haemodialysis patients. Lancet 1981;1:797-800.
 28. Shaw FE, Guess HA, Roets JM, Mohr FE, Coleman PJ, Mandel EJ, Roehm RR, Talley WS, Haddler SC. Effect of anatomic injection site, age and smoking on the immune response of preterm infants to hepatitis B vaccine. Vaccine 1989;7:425-430.