

## Vaccine開發의 새로운 動向 : Vaccinia virus를 發現 vector 로 이용하는 再組合 生vaccine의 作成

金 宇 鎬  
江原大學校 畜産大學 獸醫學科  
(1989. 5. 25 접수)

### New trends of vaccine development: Recombinant vaccinia viruses (expression vectors) as vaccines

Uh-ho Kim

College of Animal Agriculture, Kangweon National University

(Received May 25, 1989)

**Abstract:** The prospect of live vaccines consisting of genetically modified vaccinia virus expressing foreign genes is exciting, but important issues concerning safety and efficacy need to be resolved. Vaccinia virus (VV) is an efficient expression vector with broad host range infectivity and large DNA capacity. This vector has been particularly useful for identifying target antigens for humoral and cell-mediated immunity.

The WHO smallpox eradication program, involving the extensive use of VV vaccines, resulted in the late 1970s in the elimination of one of the world's most feared diseases. This achievement is a triumph for preventive medicine and for international collaboration in public health. In 1980, WHO recommended that the routine use of smallpox vaccine should be stopped. Against this background, the prospect of live vaccines consisting of genetically modified VV expressing foreign antigens arising from the work of Moss, and Paoletti and their colleagues in 1982 has been greeted with enthusiasm. These investigators have shown that genes coding for immunogenic proteins can be inserted into VV DNA without impairing the ability of the virus to grow in cell culture. Moreover experimental animals infected with VV recombinants containing genes coding for a variety of immunizing proteins have been shown to be protected against challenge infection with the corresponding infectious agent.

In this communication, I describe current progress in the construction of a novel plasmid vector that facilitates the insertion and expression of foreign genes in VV as well as the selection of recombinants.

**Key words:** recombinant vaccinia virus, vaccine.

오랫동안 전세계의 인류를 위협하던 天然痘(small-pox)가 Africa에서의 환자를 마지막으로 그 모습을 감추어버리므로써 마침내 1980년 WHO가 이 세계에서 天然痘(痘瘡)의 근절을 선언하기에 이른 것은 Edward Jenner가 발명한 種痘(牛痘)接種法의 시행덕택이었다. 이렇게하여 種痘苗 즉, vaccine seed로 사용되었던 vaccinia (種痘疹) virus (VV)의 역할도 끝나버린 것

으로 보였으나 分子生物學을 배경으로한 遺傳子操作 (DNA再組合)技術, peptide化學 및 免疫學의 진전과 더불어 이것들을 이용할 수 있게 되므로써 VV는 다시 되살어나 새로운 역할을 맞게되었다. 즉, 그 계기는 미국 NIH의 Moss group<sup>1</sup>과 NY주 위생연구소의 Paoletti group<sup>2</sup>이 각각 再組合 VV(recombinant vaccinia virus; RVV) 作成의 발표에 의해서 이루어지게 된 것

이다. 以來로 여러 연구자들에 의해서 여러 종류의 病原體의 抗原遺傳子를 분리하여 plasmid insertion vector 에 挿入한 후 사전에 野生株 VV로 感染시킨 培養細胞에 transfection(導入)시켜 相同再組合(homologous recombination)이 일어나게 하여 VV再組合體(VVR)를 작성하므로써 목적하는 抗原을 合成해내는 發現 vector로 이용하는 연구가 이루어지고 있다.<sup>3-6</sup>

이와같이 遺傳的으로 조작된 VV는 다른 感染性因子 즉, 병원체의 항원을 발현하는 것이 가능하게 되었으며, 그리하여 元來의 VV의 모든 유리한 점을 보유하면서 새로운 DNA재조합 vaccine이 생겨나게 할 수 있게되었다. 저자는 지난 6개월간 日本 大阪大學 微生物病研究所에서 HIV(AIDS virus)의 env gene을 삽입하는 RVV작성을 시도한 경험이 있으므로 VV를 vector로 하는 vaccine개발의 새로운 동향에 관해서 기술하고자 한다.

RVV를 生 vaccine으로 이용하는 利點에는 다음과 같은 것들을 들 수 있다. 1) 강력한 免疫力이 있어, 不活化 vaccine과는 달리 液性免疫 즉, 抗體의 산생 뿐만 아니라 細胞性免疫도 誘導할 수 있다.<sup>7</sup> 2) VV의 感染性を 상실함이 없이 여러 종류의 항원을 규정하는 DNA를 이 virus속에 도입하는 것이 가능하므로 多價(multivalent) vaccine의 作製도 될 수 있다.<sup>8</sup> 3) 항원을 규정하는 DNA만 준비될 수 있다면 virus, 細菌은 물론 原蟲, 寄生蟲에 이르기까지 모든 종류의 병원체의 항

원을 발현시킬 수 있을 것이다. 4) 廉價로 제조될 수 있다. 生 vaccine으로 이용하기 때문에 virus의 형태로 정제하면 되므로 component vaccine 등에 비해 그 정제 과정이 훨씬 쉽다.<sup>9</sup> 5) 維持, 管理가 용이하다. 즉 VV는 세포외에서도 안정하여 凍結乾燥 vaccine을 37°C에서 1개월간 방치하여도 사용가능하였으며, RVV生 vaccine도 마찬가지일 것이다. 6) VV의 宿主域이 넓기 때문에 사람뿐만 아니라 동물용 vaccine으로도 널리 응용될 수 있다.

그러나 RVV vaccine의 문제점도 있다. 이것에 관해서는 후술하고자 한다.

## 1. VV의 生物學的 性状

VV는 orthopoxvirus(人痘, 牛痘, 猴痘, 兎痘 등)에 속하는 겹가닥(ds)DNA virus이다. 230~400nm의 크기로 벽돌모양 내지 타원형의 형태를 하고 있으며 중심부에 core라고 하는 nucleocapsid부분과 그 양측에 있는 側體(lateral body), 이것들을 싸고 있는 二重의 脂質膜으로 이루어지는 복잡한 구조를 하고 있다. Virus 粒子는 100개 이상의 polypeptide로 구성되어 있으며 그 중에는 virus複製에 필요한 酵素群도 함유되어 있다. Virus genome은 약 185Kbp의 크기로 약 150~200개의 단백을 code하는 것으로 생각하고 있다. DNA의 兩末端은 cross-link(rouph狀) 되어있으며 10Kbp에 이르는 遺傳子의 反復구조부가 있다. Orthopoxvirus의

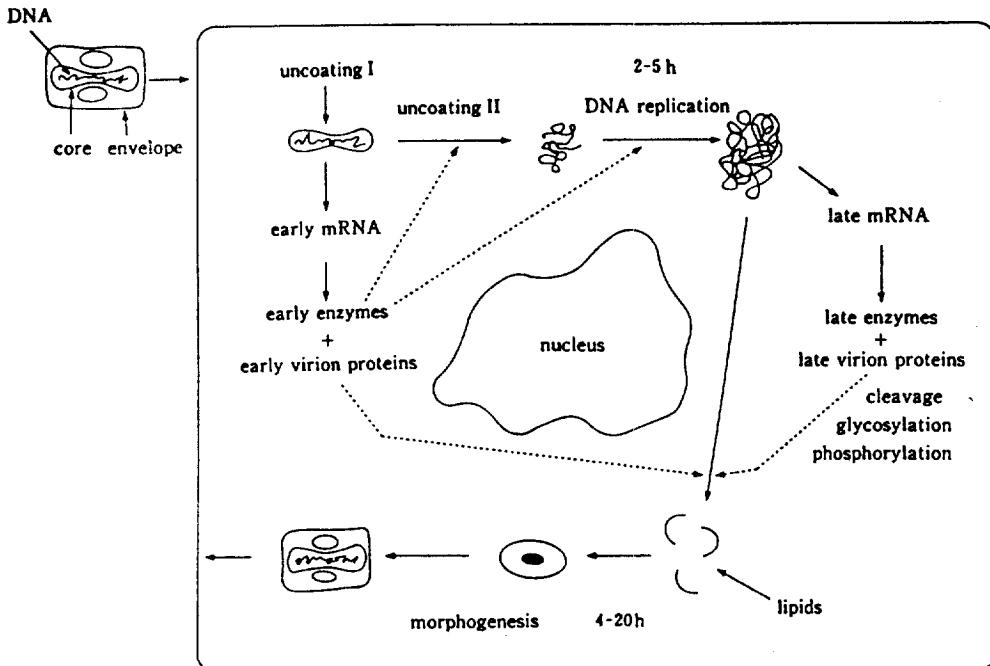


Fig 1. Outline of replication cycle of vaccinia virus.

genome은 우두(cowpox) virus genome에서 보는 바와 같이 3개영역으로 구분된다. 120Kbp의 중앙부와 그 양말단에 40Kbp의 region 1과 region 2가 있다. 우두 virus genome의 region 2의 22~28Kbp는 고빈도로 變異, 缺損을 일으키기 쉽다.

그러나 변이, 결손주도 배양세포나 발육계란의 장노막에서 증식이 가능하므로 이 영역은 virus증식에 있어 非必須인 것으로 보인다. 따라서 재조합 virus 작성시, 이 영역을 외래유전자의 삽입부위로서 이용할 수 있을 것이다. VV에서는 thymidine kinase (TK)유전자<sup>1</sup>, 초기유전자에 해당하는 Hind III F단편<sup>2</sup> 및 혈구응집소 (HA) 유전자<sup>10</sup>가 비필수영역이며 외래유전자 삽입부위로서 이용되고 있다. VV의 유전자 size는 크기때문에 (약 185Kbp) 약 25Kbp까지의 외래 DNA의 삽입이 가능하다고 하며 10개이상의 외래유전자를 도입할 수 있을 것으로 생각되고 있다.<sup>11</sup>

Orthopoxvirus군의 genome중앙부는 상동성이 매우 높고 비교적 잘 보존되어 있으므로 virus증식에 비필수적인 유전자군을 함유하는 영역이다. 그에 반하여 兩末端部에서는 virus株에 따라 鹽基(base)의 配列(sequence)이 상이하며 virus의 型特異性, 宿主域 혹은 病原성에 관련하는 遺傳子群을 함유하는 영역이라고 보고있다. Virus의 複製는 모두 세포질내에서 행해지며, 복제는 初期 transcription과 後期 transcription의 2相으로 나누어진다. (VV유전자의 초기 및 후기급의 promoter 영역의 배열은 30bp이내라는 것이다).<sup>12</sup> Virus가 세포에 吸着한 후 세포질에 취입되면 virus DNA가 아직 core내에 있는 상태로 즉시 mRNA의 합성이 시작된다. 이 시기에는 주로 virus DNA의 복제에 필요한 효소군이 만들어진다. 그후 virus DNA가 복제되며 late transcription이 시작되고 virus의 구조단백이 만들어지며 뒤이어 virus입자가 구축되어 간다(Fig 1).

RNA轉寫의 制禦機構를 밝히기 위해서 early 및 late 유전자의 上流의 鹽基配列을 조사한 결과, early promoter와 late promoter의 열기배열이 상이하어 兩者 모두 동물세포의 promoter의 그것과 상이하다는 것이 밝혀졌다. 즉 이들 promoter는 VV의 RNA polymerase에 특이적인 것이다. 또한 兩轉寫 모두 mRNA의 生成過程에서 splicing을 받지않는다는 것이 알려졌다. VV의 감염은 세포의 DNA, RNA 및 단백질합성 모두를 阻害하는 것이다.

## 2. RVV의 作成

RVV의 작성은 아래에 기술하는 바와같이 *in vivo*로 相同再組合에 의해서 행해진다(Fig 2). 그 이유로는

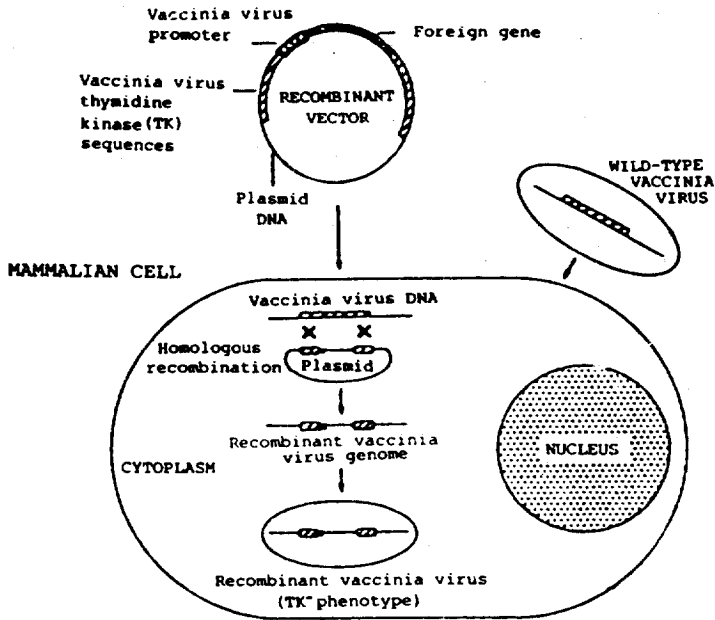
(1) virus DNA가 매우 크므로 *in vitro*에서의 유전자 조각이 곤란하고, (2) virus DNA만으로는 감염성이 없으며, 복제에는 virus입자내에 존재하는 효소군을 필요로하며, *in vitro*에서 조제한 DNA만으로는 복제가 될수 없기 때문이다. 또한 VV는 독자적인 promoter와 DNA polymerase를 지니고있기 때문에 외래유전자 앞에 VV자체의 promoter를 삽입할 필요가 있다. 실제의 RVV의 작성은 크게 다음의 5단계 과정으로 행해진다.

1) 외래유전자의 cloning: 목적으로하는 병원체의 感染防禦免疫에 관하여는 항원유전자를 cloning한다. 보통 이 항원유전자는 開始 codon의 ATG와, 그것에 연결되는 signal peptide배열, 항원단백질의 배열 및 終止 codon을 지니며 兩端에 적당한 制限酵素 site를 갖게끔 설계되어야 한다.<sup>1</sup>

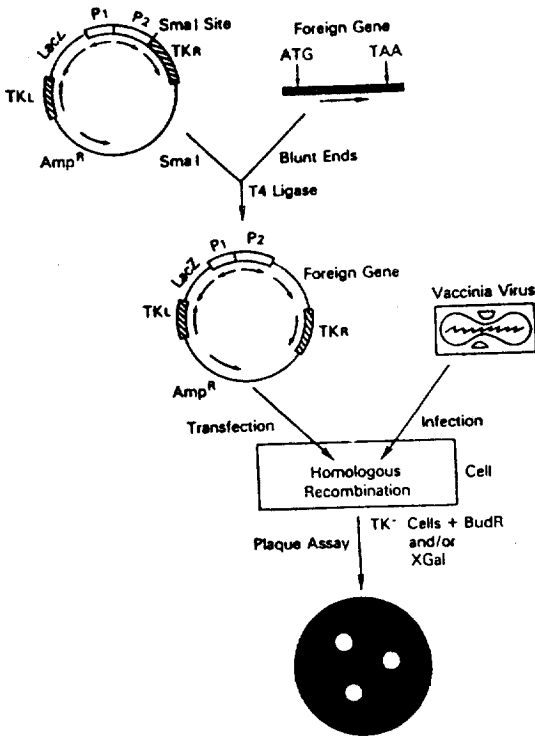
2) Plasmid insertion(cloning) vector의 作成: 진술한 바와같이 외래유전자의 VV로의 삽입은 VV감염 세포내에서 virus와 삽입용 vector DNA의 상동배열부위에서의 유전자의 재조합을 이용하는 것이므로 insertion vector는 VV삽입부위와 동일배열의 유전자를 外來유전자의 兩端에 지니게끔 설계되어야 한다. 또한 VV자체의 RNA polymerase를 사용하므로 외래유전자는 VV의 promoter의 지배하에 놓이게끔 한다. 특히 중요한 것은 외래유전자를 삽입하는 VV의 유전자부위이다. 지금까지 사용된 VV증식에 비필수적인 이들 유전자로서는 TK유전자<sup>1</sup>, Hind III F斷片<sup>2</sup> 및 HA 유전자<sup>10</sup>가 있다. 외래유전자가 얼마나 효율 좋게 발현하는가는 promoter의 능력에 달려있으므로 외래유전자의 上流나 下流에 강력한 promoter를 接續시키거나 또는 이미 삽입된 TK등의 promoter를 이용하게끔 構築되어야 한다(Fig. 3). 외래유전자는 VV의 비필수영역중에 있는 polylinker site의 어느 제한효소 site에 삽입되게 된다.

3) Transfection에 의한 相同再組合: 이와같이 작성한 plasmid insertion vector를 CaPO<sub>4</sub>共沈法(Calcium-phosphate co-precipitation) 또는 電氣의穿孔法(electroporation)으로, 사전에 野生株VV(WR, LO 또는 LC 16m8 등)로 감염된 배양동물세포에 導入한다(transfection). 이 세포내에서 증식하고 있는 VV DNA(virus 증식과정중에 naked DNA가 생김)와 삽입된 plasmid vector에 있는 VV DNA와의 사이에 있는 相同配列部位에서 유전자의 재조합이 일어나 결과적으로 외래유전자가 VV유전중에 삽입되어 RVV가 복제된다.

4) RVV의 選別: 이렇게하여 얻어진 RVV의 出現頻度は 원래의 感染母株 virus에 대해서 0.01~2%(보통



**Fig 2.** Construction of VV recombinant. The DNA sequence coding for the foreign gene is inserted into a plasmid vector downstream of a VV promoter and flanked by vaccinia TK sequences. The resultant recombination vector is introduced into cells infected with VV to generate a TK<sup>-</sup> recombinant virus which expresses the foreign gene.



**Fig 3.** Construction and selection of VV recombinants.

0.1%) 정도이므로, 이것을 효율 좋게 선택할 필요가 있다. TK를 삽입한 vector를 사용하는 경우에는, TK 유전자 가운데에 외래 유전자가 들어있으므로 RVV는 TK가 발현하지 않는 virus(TK<sup>-</sup>)가 되며 TK<sup>+</sup> 母株와 구별될 수 있다. 이 성질을 이용하여 감염세포배양액 속에 BUdR를 넣어두면 母 virus株(TK<sup>+</sup>)는 BUdR를 DNA속에 취입하여 증식능력을 상실하게 되나 TK<sup>-</sup> RVV는 이것을 취입하지 못하기 때문에 증식이 가능하게 되므로 RVV를 선택적으로 증식시켜 효율 좋게 선발할 수 있다(Fig 3). HA vector를 사용하는 경우에는 RVV는 HA<sup>-</sup>의 성질을 지니게 된다. HA<sup>+</sup>의 성질을 갖는 virus가 감염한 세포에서는 감염 후기에 감염세포표면에 HA단백이 출현하게 되므로 이 배양계에 닭적혈구를 가하면 적혈구가 virus증식세포에 흡착되어 이 부분이 적색반점으로서 식별된다. 한편 HA<sup>-</sup> virus(RVV)가 감염하여 증식된 세포는 적혈구를 흡착하지 않으므로 virus증식부위는 白色斑으로 식별되므로 RVV의 선택이 가능하게 된다. Panicali등<sup>2</sup>이 작성한 F단편은 RVV를 선별하는 marker가 없기 때문에 plaque hybridization법에 의해서 색출하지 않으면 안된다.

이외에 B-galactosidase(X-gal), chloramphenicol-acetyltransferase(CAT), *E coli* xanthine guanine phosphoribosyltransferase(Ecogpt), neomycin, influ-

enza neuraminidase를 marker로 사용한 vector도 개발되고 있다. 또한 免疫學的 방법에 의한 선발도 가능하다.

선발된 RVV의 후보주가 목적으로하는 외래유전자 항원을 발현하고 있는가를 확인하기 위해서 ELISA법, 간접형광항체법, 면역침강법, Western blotting 법 등 목적으로 하는 항원에 대한 특이항체를 이용한 면역학적 방법이 사용된다. 항원발현이 확인된 RVV주에 대해서는 recloning으로 virus를 순화시켜야 한다.

5) 動物實驗(感染防禦效果試驗): 동물실험의 주목적은 免疫誘導에 의한 抗體價의 상승, 감염방어능, 그리고 안전성(부작용여부, 병리조직학적 검색) 등을 상세히 조사하여 그 유효성을 확인하는데 있다.

### 3. RVV의 作成例

RVV의 작성 발표례는 1983년이래 주로 미국에서 정력적으로 행해졌다. 본고에서는 지면관계상 상세히 기술할 수 없으므로 Table 1 및 2<sup>6</sup>을 참조하기 바란다.

### 4. RVV vaccine의 문제점

1) 安定性: 1980년까지 사람에게 증두용의 VV vaccine을 사용하였을 때 드물기는 하였으나 증두후腦炎의 발생례가 있었다. WHO에서는 “종래 vaccine으로 사용되어온 virus주보다도 인체 또는 동물실험에 의해서 汎發性痘疹을 일으키는 성질 및 經神病原性이 강한 경향의 virus주는 사용하지 말아야 한다”고 권고하고 있다<sup>13</sup>. Moss group<sup>1</sup>, Paoletti group<sup>2</sup>은 주로 VV WR주를 母株로 하여 RVV작성을 시도하였다. 최근 Flexner 등<sup>14</sup>은 RVV의 弱毒化를 위해서 두가지 접근방법을 취하였으며, 그중 독특한 방법은 VV에 IL-2와 같은 lymphokine유전자를 부가시킨 것이다. 한편 日本에서는 vaccine virus주로 널리 사용되어온 Lister (LO)주 유래의 弱毒變異株 LC16m8주가 Hashizume<sup>15</sup>에 의해서 개발되어 이용되었었다. 이 virus주는 신경병원성이 극히 약하여 종래의 virus주에 비해 부작용이 현저히 적고 안전성이 높다는 것이 확인되어 初種痘用 vaccine주로 인가되었던 것이다. 유사한 약독 LC16m0주와 더불어 LC16m8주는 XhoI map에 있어서 모주인 LO주에는 없는 Xho I site가 Hind III 단편상에 1개소 더 있다는 것이 알려졌다.<sup>16</sup> 필자도 RVV작성실험에서 VV주를 사용한바 있다. RVV의 개발을 위해서 日本에서는 주로 이 virus주를 사용하는 것으로 알려져 있다.

2) 免疫原性: 生 vaccine에 있어서 병원성과 면역원성은 二律背反的인 것으로, 극단적으로 병원성이 약화

되면 아무래도 增殖性이 나빠지며 면역원성이 저하되는 경향이 강하다. Moss group<sup>1</sup>이 보코한바와같이 TK 유전자삽입 vector를 사용하는 경우 母株에 비해 신경병원성이 저하한다. 이것은 virus의 증식성저하에 의한 가능성이 크다. 마찬가지로 LC16m8주와같이 中樞神經系뿐만아니라 皮膚增殖性도 약한 주를 vector로 이용할 경우 면역원성이 불충분하게 될 가능성이 있다. 따라서 증추신경계에서의 증식성이 매우 나쁘나 충분한 면역을 부여할만큼의 적당한 피부증식성을 갖는 變異株의 作出가능성도 기대해볼직 하다. 한편 promotor로서는 지금까지 p7.5가 많이 이용되고 있으나 항원발현을 더욱 좋게 하기 위해서는 더 훌륭한 promoter의 연구도 중요한 과제가 될 것이다. 예컨대 phage T7 RNA polymerase유전자중  $\phi 10$ 을 promoter로 사용하면 CAT gene발현의 경우(Fig 4) 배양세포상에서는 몇 100배 더 발현되지만<sup>17,18</sup> 생체내에서는 제대로 발현되지 못할 것이라고 Moss는 말하고 있다(직접대화).

또한 종래의 RVV vaccine의 연구는 virus표면항원 단백질에 의해서 만들어지는 中和抗體産生을 목적으로 한 것이 주류였으나 virus감염방어에 기여하는 세포성면역의 중요성이 잘 알려져 있으므로, 이런뜻에서의 生 vaccine으로서의 특색을 표출시키기 위해서도 금후에는 virus특이적인 감염세포표면단백질을 규정(code)하는 유전자, 또는 influenza virus의 nucleoprotein과 같이 세포성면역을 유도하는 인자도 동시에 삽입하는 방법도 고려되어야 할 것이다.

3) 再接種時의 효과: 외래유전자가 동일한 경우, 재접종에 의한 bonster효과에 대해서는 증두 및 VV를 사용한 지금까지의 많은 동물실험성적으로 보아 그리 문제가 되지 않을 것이라고 보고있다. 그러나 이미 vaccine을 사용한 개체에 새로운 항원유전자를 삽입한 동인의 vector vaccine을 접종할 경우 과연 새로운 항원에 대한 충분한 면역이 부여될 수 있겠느냐하는 점은 금후의 중요연구과제가 될 듯 싶다. 이것을 해결하기 위해서는 우선 증식의 정도가 상이한 virus vector를 개발하여 대비하거나, 더 좋은 방법으로서의 多價 vaccine을 작제하는 것일 것이다.

### 5. 多價 VV의 作成

多價(polyvalent 또는 multivalent) VV는 複數의 외래유전자를 virus genome속에 삽입하여도 (1) 그 RVV가 감염세포나 접종된 동물개체속에서 증식하며, (2) 삽입된 유전자가 효율 좋게 발현되어야 한다는 조건이 요구된다. 사실 후자는 VV가 獨自의 轉寫系를 갖고 있기때문에 VV고유의 강력한 promoter를 이용하므로

**Table 1.** Proteins expressed by recombinant vaccinia viruses

Origin	Protein	Glycosylation	Cleavage	Cell location or biological activity
<u>DNA Viruses</u>				
Epstein-Barr	Membrane antigen (gp 340)	+	Signal <sup>a</sup>	Cell surface
Hepatitis B	Surface antigen (S, MS, LS)	+		Secreted particle
Herpes simplex 1	Glycoprotein D	+	Signal	Cell surface
	Thymidine kinase			Active enzyme
<u>RNA Viruses</u>				
Friend murine leukemia	Envelope protein	+	Signal, subunit	Basolateral cell surface
Human immunodeficiency (HTLY-III, LAV)	Envelope protein	+	Signal, subunit	Cell surface
Influenza A	Hemagglutinin	+	Signal	Apical cell surface
	Nucleoprotein			Internal
Rabies	Glycoprotein	+	Signal	Cell surface
Respiratory syncytial	Glycoprotein	+		Cell surface
	Fusion protein	+	Signal, subunit	Cell surface
Sindbis	Structural proteins (C, E1, E2)	+	Signal, polyprotein	Cell surface, virion
Transmissible gastroenteritis	Spike protein, (gp195)	+	Signal	
Vesicular stomatitis	Glycoprotein	+	Signal	Basolateral cell surface
	Nucleoprotein			Internal
<u>Protozoa</u>				
<i>P. knowlesi</i>	Circumsporozoite			Internal
<i>P. falciparum</i>	Circumsporozoite			Internal
	S antigen		Signal	Secreted
<u>Bacteria</u>				
<i>E. coli</i>	$\beta$ -galactosidase			Active enzyme
	Chloramphenicol acetyltransferase			Active enzyme
<u>Mammalian</u>				
Human	Factor IX <sup>b</sup>	+	Signal, precursor	Secreted, coagulant
	Interleukin 2	+	Signal	Secreted, lymphokine
	Preproenkephalin		Signal, precursor	Secreted
Bovine	$\gamma$ -interferon		Signal	Secreted, antiviral

<sup>a</sup> Cleavage of signal peptide assumed because of translocation.

<sup>b</sup> Evidence for  $\gamma$ -carboxylation.

서 달성될 수 있을 것이다.

사실 VV의 다가 vaccine의 한 예로서는, Chakrabarti 등<sup>19</sup>이 co-expression vector로 구축한 plasmid vector이다. 즉, 11K dalton 단백질의 DNA promoter(p11) 하류에  $\beta$ -gal 유전자를 接續하고, p7.5 하류에 외래 유전자를 삽입할 수 있는 sma I site를 갖는 구조로 되어 있다. 따라서  $\beta$ -gal 유전자와 새로이 삽입한 외래 유전

자와의 2가 삽입 vector가 된 셈이다. 그러나 그 1價 분으로서의  $\beta$ -gal 유전자는 선택 marker로서 이용되기 때문에 참다운 다가 vaccine이라고 할 수 없다. 더구나  $\beta$ -gal을 발현하고 있는 RVV로 면역된 동물은 이미  $\beta$ -gal에 대한 항체를 지니고 있기 때문에 virus 증식이 억제되기 때문인지 결과적으로 다른 쪽의 외래 항원에 대한 免疫應答이 억제될 것이라고 말하고 있다<sup>5</sup>

**Table 2.** Immune response to vaccinia vectors and disease protection

Infectious agent	Protein expressed	Antibody response	T-cell response	Protection.
<u>DNA Viruses</u>				
Epstein-Barr	Membrane antigen (gp 340)	Neutralizing(rabbit)		
Hepatitis B	Surface antigens (pre-S and S)	anti-S and pre-S (rabbit), priming (chimpanzee)		Hepatitis(chimpanzee)
Herpes simplex I	Glycoprotein D	Neutralizing(mouse, rabbit, cow)	Proliferative(mouse), CTL target(human)	Lethal and latent infections(mouse)
<u>RNA Viruses</u>				
Friend murine leukemia	Envelope	Priming, neutralizing(mouse)	Proliferative, CTL priming(mouse)	Leukemia(mouse)
Influenza A	Hemagglutinin (HA)	Anti-HA, neutralizing (hamster, mouse)	Type specific: CTL priming, target (mouse)	Lower respiratory infection(hamster, mouse)
	Nucleoprotein		Cross-reactive: priming, target (mouse, man)	Lethal infection (partial)
Rabies	Glycoprotein	Neutralizing(mouse, rabbit, fox)	CTL priming(mouse)	Encephalitis(mouse, rabbit, fox)
Respiratory syncytial	Glycoprotein	Neutralizing(cotton rat)		Lower respiratory infection(cotton rat)
	Fusion	Neutralizing(cotton rat)		Lower respiratory infection(cotton rat)
Sindbis	Structural (C, E1, E2)	Neutralizing(cow)		
Transmissible gastroenteritis	Spike (gp 195)	Neutralizing(mouse)		
Vesicular stomatitis	Glycoprotein	Neutralizing (mouse, cow)	Type specific: CTL priming, target (mouse)	Lingual infection(cow)
	Nucleoprotein	Anti-N(mouse, man)	Cross-reactive; CTL priming, target (mouse)	
<u>Protozoan</u>				
<i>P. knowlesi</i>	Circumsporozoite antigen	Anti-sporozoite (rabbit, mouse)		
<i>P. falciparum</i>	Circumsporozoite antigen	Anti-sporozoite (rabbit, mouse)		
	Blood stage secretory (S)antigen	Anti-S(rabbit)		

다른 다가 vaccine의 예로서는, 3價 vaccine의 예가 있다.<sup>8</sup> 즉, HSV의 gD, HBsAg 및 influenza-HA의 각 유전자를 한꺼번에 삽입한 유일한 RVV의 예이다(Fig 5). 이 3가 RVV (vP168)를 家兎에  $5 \times 10^7$  pfu 피내 접종 또는 정맥내접종 결과, 이들 3종의 유전자산물에 대한 항체가 산생되었다는 것이다. 이 사실은 제조할 다가 vaccine이 복수의 외래항원에 대한 면역유도능을 갖는다는 것을 나타내는 것이며 RVV다가 vaccine의 유망성을 강하게 시사한다고 본다. 이와같은 RVV다가

vaccine은 지금까지 없던 형태의 것으로서 그 기대가 크며 급후의 연구가 기대되는 것이다.

## 6. 鷄痘(fowlpox) virus(FPV)를 發現 vector 로 이용하는 再組合 FPV의 작성

FPV도 또한 vaccine vector로서 적합한 성상을 지니고 있다. FPV는 계두의 예방을 위해서 vaccine virus로 안전하고 유효하게 이용되어 왔다. FPV는 매우 안정하여 거의 냉장저장을 필요로하지 않으며 제조비용

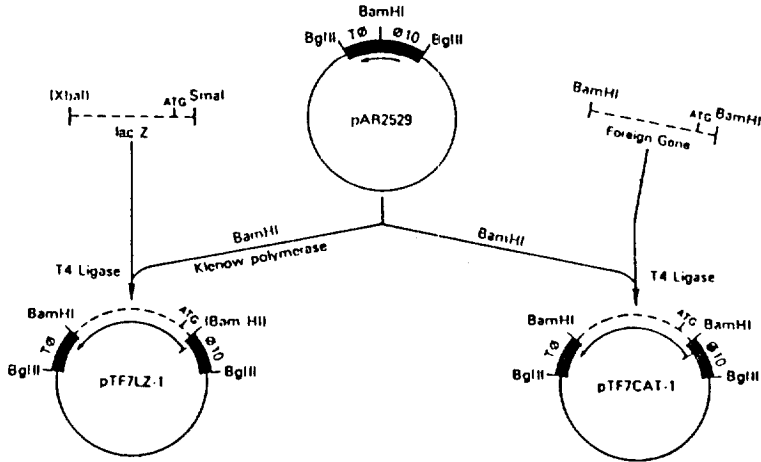


Fig 4. Construction of plasmids containing target genes flanked by T7  $\phi$ 10 promoter and T $\phi$  terminator sequences.

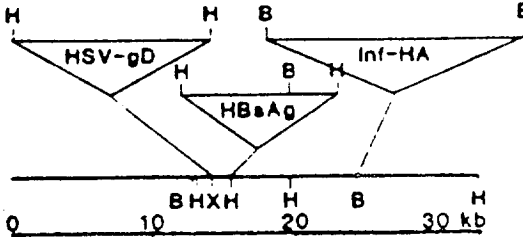


Fig 5. Structure of the vaccinia virus recombinant harboring the HSVgD, HBsAg, and InfHA coding sequences. The leftmost 30kb of the vaccinia Sviant genome encompassing the terminal HindIII F, M, K, and internal F fragment are shown.

B: BamHI; H: HindIII; X: Denotes the deletion of approximately 0.6kb of vaccinia sequences.

도 저렴한 편이다. 만약 일련의 家禽感染病 병원체의 항원결정기들을 발현하는 多價 vaccine이 개발된다면 one dose의 접종만으로 다수의 가금질병을 방어할 수 있게 될 것이다. Boyle 및 Coupar<sup>20</sup>는 가금 vaccine을 위한 vector로서 재조합 FPV(RFPV)를 작성하였음을 보고하였다. 즉, plasmid vector속에 들어있는 FPV TK유전자자운데에 외래항원유전자들을 삽입하고 선택 marker로서는 Ecogpt유전자들을 사용하고 있다. 이 Ecogpt유전자는, PL11 VV promoter의 제어하에 있는 influenza virus A/PR/8/34 HA유전자와 더불어 接續되어 있는 p7.5 VV promoter의 제어를 받게 만들고 있다.

한편 FPV의 自然宿主는 鳥類에 한정되어 있어, FPV를 非鳥類性배양세포에 감염시키면 流産感染(abortive infectioin)되는 것에 착안하여, Taylor등<sup>21</sup>은 狂犬病

virus(RV)의 당단백(glycoprotein; gp)을 발현하게끔 작성된 RFPV를 배양세포에 접종하였던 바 조류세포에서는 許容感染(permissive infection)으로, 비조류세포에서는 非許容(non-permissive)感染으로 RV의 gp가 膜關聯抗原으로 발현되었으며, 6종의 포유동물접종시험에서도 같은 항원(FPV항원 및 RV gp항원)이 발현되었고 3종(마우스, 고양이, 개)의 동물은 防禦的이었다고 보고하고 있다. 따라서 RFPV는 포유동물에서 FPV의 복제없이 면역을 부여할수 있는 면역원으로 이용될수 있는 희망을 안겨주고 있다.

## 7. RVV의 기타 應用例

RVV vaccine은 앞에 기술한바와 같은 실제적가치외에 동물실험계로 병원성을 확인할 길이 없는 질병에 대한 vaccine의 개발에도 매우 유효한 수단이 될 것이다. 또한 血液凝固에 관여하는 factor IX을 삽입한 RVV작성례도 발표된바 있다.<sup>22</sup> 이 RVV를 감염시킨 배양세포에는 천연의 것과 같은 factor IX가 방출되었다고 한다. 이 system에서는 *E coli*에 의한 단백질성과 달리 糖의 첨가등 translation 후의 단백질의 수식이 정상적으로 행해지므로 이 RVV는 생리활성물질의 생산에도 유용하게 이용될 가능성이 있다. 누에의 virus의 1종인 BmNPV에 IFN유전자를 삽입한 RVV를 작성하여 이것을 누에에 감염시켜 IFN을 다량으로 생산하는 방법도 개발되었다.<sup>23</sup> 당이 결합된 천연물에 가까운 생리활성물질을 얻을 수 있다는 점에서 이 system은 *E coli*나 효모를 숙주로한 system보다 훌륭하다고 볼 수 있다. 또한 새로운 면역학적 발상으로는 이와같은 vaccine으로의 이용외에 RVV를 항원특이적인 免疫



應答의 解析의 수단으로서 사용될 可能性의 탐색이었으며, 실제로 항원특이적 T세포의 priming,<sup>7,24</sup> 세포장해성 T세포인식항원의 동경 즉, RVV감염세포를 target로 사용한 CTL assay,<sup>25,26</sup> monoclon항체의 제작<sup>27</sup> 등에 응용되고 있다.

## 結 語

RVV vaccine은 앞에서 기술한 바와같이 실제적 가치 외에 동물실험제에서 병원성을 확인할 길이 없는 질환에 대한 vaccine의 개발에 있어 매우 유효한 수단이 될 것이다. 또한 vaccine뿐만 아니라 각종의 생물학적 제제의 생산에 이용하고자하는 시도<sup>28</sup>와 더불어 금후 다방면에 걸친 응용이 기대되고 있어, 새삼스레 Moss 및 Paoletti group의 탁월한 착상에 감탄을 금할 길이 없다.

## 참 고 문 헌

- Mackett M, Smith GL, Moss B. A selectable eukaryotic cloning and expression vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:74157~7419.
- Panicali D, Paoletti E. Construction of poxviruses as cloning vectors: Insertion of the thymidine kinase gene from herpes simplex virus into the DNA of infectious vaccinia virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:4927~4931.
- Mackett M, Smith GL, Moss B. General method for production and selection of infectious vaccinia virus recombinants expressing foreign genes. *J Virol* 1984;49:857~864.
- Mackett M, Smith GL, Moss B. The construction and characterisation of vaccinia virus recombinants expressing foreign genes. In: Glover DM, ed. *DNA cloning, A practical approach*. vol 2. Oxford: IRL Press, 1985:191~211.
- Mackett M, Smith GL. Review article: Vaccinia expression vectors. *J Gen Virol* 1986;67:2067~2082.
- Moss B, Flexner C. Vaccinia virus expression vectors. *Ann Rev Immunol* 1987;5:305~324.
- Bennink JR, Yewdell JW, Smith GL, et al. Recombinant vaccinia virus primes and stimulates influenza haemagglutinin-specific cytotoxic T cells. *Nature* 1984; 311:578~579.
- Perkus ME, Piccini A, Lipinkas BR et al. Recombinant vaccinia virus: Immunization against multiple pathogens. *Science* 1985; 229: 981~984.
- Wallis T. *Time*, Oct 31, 40, 1983.
- Shida H. Nucleotide sequence of the vaccinia virus hemagglutinin gene. *Virology* 1986; 150:451~462.
- Smith GL, Moss B. Infectious poxvirus vectors have capacity for at least 25000 base pairs of foreign DNA. *Gene* 1983;851:21~28.
- Moss B. Vaccinia virus expression vectors. In: Miller JH, Calos MP, ed. *Gene transfer vectors for mammalian cells*. NY: CSH, 1987;10~14.
- Requirements for smallpox vaccine. *WHO Tech Rep Ser* 1966;322:56~71.
- Flexner C, Hugin A, Moss B. Attenuation of live recombinant vaccinia virus vectors by expression human interleukin-2. In: Ginsberg H, Brown F, Lerner RA, ed. *Vaccines 88, New chemical and genetic approaches to vaccination*. NY: CSH, 1988:179~184.
- 橋爪. 新しい弱毒痘苗株 LC16m8株の基礎. 臨床とウイルス 1975;3:229~235.
- Sugimoto M, Yasuda A, Miki K, et al. Gene structures of low-neurovirulent vaccinia virus LC16m0, LC16m8, and their Lister original (LO) strains. *Microbiol Immunol* 1985;29:421~428.
- Fuerst TR, Niles ED, Studier W et al. Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:8122~8126.
- Fuerst TR, Earl PL, Moss B. Use of a hybrid vaccinia virus-T7 RNA polymerase system for expression of target genes. *Mol Cell Biol* 1987; 7:2538~2544.
- Chakrabarti S, Brechling K, Moss B. Vaccinia virus expression vector: Coexpression of  $\beta$ -galactosidase provides in vitro screening of recombinant vaccinia plaques. *Mol Cell Biol* 1985;5:3404-3409.
- Boyle DB, Coupar, BEH. Construction of recombinant fowlpox viruses as vectors for poultry vaccines. *Virus Res* 1988;10:343~345.
- Taylor J, Weinberg R, Languet B, et al.

- Recombinant fowlpox virus inducing protective immunity in non-avian species. *Vaccine* 1988; 6:497~503.
22. Kieny MP, Lathe R, Drillien R, et al. Expression of rabies virus glycoprotein from a recombinant vaccinia virus. *Nature* 1984;312: 163-166.
23. de la Salle H. et al. Active r-carboxylated human factor IX expressed using recombinant DNA techniques. *Nature* 1985;316:268~270.
25. Yewdell JW, Bennink JR, Smith GL, et al. Influenza A virus nucleoprotein is a major target for cross reactive anti-influenza virus cytotoxic T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82:1785~1789.
26. Walker BD, Flexner C, Paradis TJ, et al. HIV-1 reverse transcriptase is a target for cytotoxic T lymphocyte in infected individuals. *Science* 1988;240:64~66.
27. Chesebro B, Wehrly K. Development of a sensitive quantitative focal assay for human immunodeficiency virus infectivity. *J Virol* 1988;62:3779~3788.
28. Hruby DE, Thomas G. Use of vaccinia virus to express biopharmaceutical products. *Pharm Res* 1987;4:92~97.