

## 생명공학기법을 이용한 백신의 개발

문 애 리

덕성여자대학교 약학대학

### Vaccine Development-Biotechnological Applications

Aree MOON

College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea

(Received March 3, 1995; accepted March 15, 1995)

#### 백신의 정의 및 원리

1796년의 Edward Jenner에 의한 우두 백신 이래 이른바 감염증, 전염병의 병원균 자체나 그 일부를 사용하여 비감염자를 면역시키는 것을 종두 또는 예방접종이라고 하고 사용한 항원을 백신(vaccine)이라 부르게 되었다. 감염성 질환을 침입 부위에 균(세균 또는 바이러스)이 증식하여 염증 반응을 일으키는 국소성 질환과 국소 부위에서 균이 증식한 후 균이나 그 생성물인 독소가 전신으로 퍼지는 전신성 질환으로 나눌 수 있다. 호흡기 바이러스 같은 국소성 감염증에는 국소 분비형 IgA 및 국소 세포매개성 면역(cell-mediated immunity; CMI)이 중요하다. 전신성 질환에서는 전신 세포매개성 면역(systemic CMI)과 혈청 내 IgG, IgM, IgA 등이 면역 반응에 중요한 기능을 한다.

항원의 상태에 따라 백신을 생균 백신(live vaccine)과 사균 백신(killed vaccine)으로 나눌 수 있다(Table I). 일반적으로 생균 백신이 사균 백신보다 더 효과적이다. 생균 백신은 여러가지 방법으로 균의 독성을 약화시킨 것으로서 장기간 지속되는 면역성을 유발하고 체액성 면역 뿐만 아니라 세포성 면역도 유발시키는 장점이 있는 반면, 독성이 있는 균주로 환원되어 면역 기능이 저하된 소아에서는 질병을 일으킬 수 있는 부작용의 가능성도 지니고 있다. 사균 백신은 증식을 할 수 없기 때문에 감염성도 없으며, 고도로 정제된 형태로 제조 가능하고 부작용이 적은 장점이 있으나, 대체로 면역성의 지속 기간이 짧기 때문에 흔히 반복 주사(booster injection)를 요한다.

항원의 크기와 구조의 복잡성 및 물리적인 상태에 따라 면역성이 달라진다. 일반적으로 항원 분자의 크기가 크고 복잡한 구조일수록 면역성이 크며, 수용성 단백질보다는 비수용화되었거나 면역보강제를 쓴 경우에 면역성이 좋

다. 2세 이하의 영아에서는 다당질 항원의 면역성이 좋지 않아서 b형 헤모필루스 인플루엔자나 폐구균 백신 제조에 어려움이 있었으나, 다당질 항원을 운반 단백질(carrier protein)과 결합시킴으로써 영아에서도 면역 반응을 유발시킬 수 있게 되었다.

백신의 첫 접종시 나타나는 반응을 1차 면역 반응(primary immune response)이라고 한다. 혈청에 처음 나타나는 항체는 IgM 항체이며, 후에 IgG 항체가 나타난다. IgA 항체 반응은 IgM과 IgG 항체 반응의 중간에 위치한다. 이후에 백신이나 자연 감염에 의하여 같거나 비슷한 항원에 다시 노출되면 항체 반응이 더 빨리 일어나며 그 역가도 훨씬 높게 된다. 이러한 반응을 2차 또는 기왕 반응(secondary or anamnestic response)이라고 한다. 이 때에는 IgG 항체가 주로 생성되며 IgM은 아주 미량 생성된다. 이러한 부스터(booster) 원리를 이용하여 백신을 반복 주사함으로써 항체 역가가 고농도로 장기간 지속될 수 있는 접종 계획을 만들 수 있게 된다.

예방접종의 지침을 정하는데에 있어서 고려하여야 할 중요한 원칙의 하나는 예방접종을 받는 개체의 면역 능력이다. 어린 영아도 충분한 면역 반응을 보이나 성인에 비하여 양적, 또는 질적으로 차이가 있다. 면역 반응이 다소 미숙한 경우에는 오랫동안 IgM 항체가 주로 생성되는 경향이 있는 바, 이러한 현상은 어린 영아의 예방접종 후 또는 선천성 감염시에 볼 수 있다. 이렇게 IgM 항체가 장기간 생성되는 현상이 지속되는 기간은 개체에 따라 차이가 난다.

성장 중인 개체의 면역 반응에 영향을 미치는 두번째 요소는 수동적으로 받은 항체(passively acquired antibody)의 영향으로서, 이는 산모 IgG 항체의 태반 통과, 수동면역요법에 의한 면역글로불린의 주사, 모유내 항체의 전과 등에 기인할 수 있다. 산모 IgG항체의 태반 통과는 임신 마지막 3분기에 일어나며, 신생아에게 여

**Table I.** 백신의 종류, 면역 효과 및 부작용

	생균(약독화) 백신	사균(불활성화) 백신
백신의 종류	-바이러스: 소아마비, 홍역, 볼거리, 풍진, MMR, 수두 -세균:BCG	-바이러스:인플루엔자, 일본뇌염, 광견병, B형 간염, 유행성 출혈열 -세균: 백일해, 장티푸스, 콜레라, 폐구균 -독소이드: 디프테리아, 파상풍
특성	-체내에서 증식 가능 -병원성 있는 원래 형태로 바뀔 수 있다.	-체내에서 증식할 수 없다. -noninfectious
면역효과	-장기간 지속 -광범위. 단일접종으로 해당되는 질환을 근절시킬 수 있다.	-단기간 지속 -처음 접종시 2~3회 접종 그 후 수회의 추가 접종이 필요
부작용	-혈중 항체외에도 세포 면역, 국소 면역도 얻어진다. -백신 바이러스 자체에 의하여 일어나는 증상 -4~14일 정도의 잠복기가 지난 후에 나타난다. -면역 생산이상이 있는 사람에서는 위독한 증상이 일어나기 쉬우나, 미리 예측하기는 거의 불가능	-혈중 항체만 얻어진다. -이물, allergen으로 작용, 발열, 쇼크 등이 일어날 수 있다. -접종 직후 24시간 내에 일어난다. -쇼크 등이 발생하기 쉬운 사람을 미리 예측하기는 거의 불가능

**Table II.** 현재 사용되고 있는 세균 및 바이러스 백신의 종류<sup>a</sup>

Bacterial	Viral
Anthrax	Adenovirus, live
BCG, live, attenuated	Hepatitis B, subunit
Cholera, inactivated, whole organism	Influenza A, B, inactivated
DTP(Diphtheria and tetanus, toxoids and Pertussis, inactivated, whole organism)	Influenza A, B, subunit
Diphtheria and tetanus, toxoids	Hepatitis B, subunit
Diphtheria, toxoid	Measles, live, attenuated
<i>H. influenzae</i> type B, subunit <sup>b</sup>	Mumps, live, attenuated
<i>H. influenzae</i> B conjugate (diphtheria toxoid-conjugate)	Polio, live, attenuated
Meningococcal, subunit <sup>b</sup>	Polio, inactivated, whole virus
Pertussis, inactivated, whole organism	Rabies, inactivated
Plague	Rubella, live, attenuated
Pneumococcal, subunit <sup>b</sup>	Smallpox
Typhoid, inactivated, whole organism	Yellow fever, live, attenuated

<sup>a</sup>from Ada (1990), Hopps 등 (1988) <sup>b</sup>Capsular polysaccharide

러가지 균에 대한 항체를 풍부하게 제공하게 된다. 이러한 항체들은 신생아에게 예방력을 제공하여 주지만, 생바이러스 백신의 경우 예방접종시 항체 생성을 방해할 수도 있다. 실제 DTP 같은 사균 백신은 생후 2~3 개월에 접종해도 항체 생성에 지장이 없으나, 생바이러스 백신 중 비경구적으로 투여하는 홍역, 유행성이하선염, 풍진 백신의 경우 항체 형성에 지장을 받으므로 산모로부터 받은 항체가 없어지는 생후 15개월경에 접종한다. 그러나 경구적으로 투여하는 소아마비 백신은 혈청 내 IgG 항체에 의하여 방해받지 않으므로 생후 2~4 개월부터 접종을 시작할 수 있다.

### 백신의 역사 및 개관

한 개인이나 집단을 질병으로부터 예방하고 궁극적으로는 질병을 없애려는 목적을 가진 백신 접종으로 인해 지난 200년간 천연두, 디프테리아, 파상풍, 황열, 백일해, 소아마비, 홍역, 유행성이하선염 및 풍진 등의 발생이

현저히 감소하였으며, 특히 그 중 천연두는 1977년 10월 이후 아직 발생한 예가 없어 지구상에서 없어진 것으로 판단되고 있다. 인플루엔자, B형 간염, 폐구균(pneumococci), b형 헤모필루스 인플루엔자 등에 대한 예방접종은 근래에 많은 진전이 있었으며, 향후 그 발생이 현저히 줄어들 것으로 기대된다. 현재 허가받아 사용되고 있는 세균 백신과 바이러스 백신의 종류는 Table II에 나열되어 있다.

최근 분자생물학적 기법의 발달로 인하여 좀더 효과적이고 안전한 백신의 개발이 활발하게 진행되고 있다. 백신의 개발이 요구되는 질병의 리스트가 Table III에 적혀 있다. 박테리아나 바이러스성 질병의 경우 뿐만 아니라 기생충에 의한 감염증에도 효과적인 백신의 개발이 요구되고 있다.

새로운 백신의 개발에 관심이 높아지고 있는 데에는 두 가지 중요한 요인이 있다. 첫째로 과학적 방법과 지식이 향상하여 과거 전통적인 접근 방법의 한계를 극복할 수 있게 되었다. 둘째로는 공중보건 당국이 실질적이고

Table III. 백신 개발이 요구되고 있는 질병들<sup>a</sup>

Viral	Bacterial	Parasitic
AIDS	Leprosy	<i>Ascaris</i>
Cytomegalovirus	Gonorrhea	Malaria
Herpes simplex	<i>E.coli</i> urinary tract infections	Amebae
Genital herpes	Enterotoxigenic <i>E.coli</i>	Schistosomes
Hepatitis A	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Trypanosomes
Hepatitis Non A, Non B	<i>Streptococcus mutants</i> (Caries)	Hookworm
Parainfluenza	<i>Klebsiella</i>	<i>Trichuris</i>
Respiratory syncytial virus	<i>Pseudomonas</i>	Filarias
Rotavirus		<i>Giardia</i>
Lassa fever		<i>Leishmania</i>

<sup>a</sup>from Woodrow GC (1990)

Table IV. 백신 개발에 응용되는 새로운 기술<sup>a</sup>

분야	기술	기여
유전학	재조합 DNA	항원 확인 항원 분리 항원의 variability 결정 단백질 항원 engineering 새로운 제조 방법 약독화 균주를 생산하는 deletion mutants 생 재조합 미생물을 이용한 presentation
화학	펩타이드 합성 단백질 구조 기초 연구	1차염기서열로부터 linear peptide epitope 확인 합성 펩타이드 epitope과 mimotope T-(and B?) cell epitope의 computer prediction 새로운 adjuvants
면역학	단일클론 항체  Anti-idiotypes 면역 조절 기초 연구	정교한 정제 공정 항원 확인 항원 분리 epitope variability 결정 비단백질 epitope 모방 새로운 adjuvants의 가능성 면역성에 관한 세포적, 분자적 이해 점액 면역성(내장 질환에 대한) 발견

<sup>a</sup>from Woodrow GC (1990)

경제적인 고려로 인하여 그 관심을 치료법에서 공중보건 문제로 돌리게 되었음을 들 수 있다. 또한 건강과 안전성 이슈에 대한 대중적인 자각이 과거에 비하여 훨씬 커졌다. 규제 당국은 이제 백신의 안전성과 생화학적 특성에 대하여 과거 30년 전에 비하여 훨씬 더 높은 기준을 요구하게 되었다. 지난 세기에 개발되었던 백신 중 몇몇은 1990년대의 최소기준도 만족시키지 못하는 것들이다. 그러므로 현시점에서 백신을 성공적으로 개발하기 위해서는 과거 15 내지 20년간 가능해진 분자적, 그리고 생물학적 기술(molecular and biological technologies)에 관한 철저한 이해가 필요하다. 이 논문에서는 백신 개발에 이용되는 기술에 대한 개관과 아울러 이러한 분자적 기술들이 새롭게 개선된 백신에 어떤 방식으로 적용되고 있는지에 관하여 중점적으로 서술하고자 한다.

**생명공학을 이용한 백신 개발**

**새로운 기술**

유전학, 화학, 면역학 등 여러 다양한 학문 분야의 눈부신 발전으로 인하여 광범위한 백신 개발에 있어서 새로운 접근 방법이 가능해졌다. 백신 개발에 중요한 영향을 미친 새로운 기술들이 Table IV에 요약되었으며, 그중 현저하게 기여한 것들이 다음에 설명되어 있다.

**유전학과 재조합 DNA를 이용한 접근 방법**

생물학의 다른 분야도 그렇듯이 백신 개발도 재조합 DNA 방법의 응용으로 새로운 가능성의 장(章)을 열었다. 재조합 DNA 기술은 항원의 확인과 분리에 이용된다. 개체가 함유한 모든 항원들을 각각 클로닝하고 발현시키는 것이 가능해짐으로써 재래의 방법을 사용하였을 때 부딪치게 되는 두가지 주된 문제점을 피할 수 있게 되었다. 우선 분석을 위해 충분한 물질을 얻어야 하는 문제가 해결되었다. 재조합 DNA를 이용하기 전에는 적절한 검사를 하기 위한 순수한 형태의 특정 항원을 충분한

양만큼 얻기가 어려웠으나, 재조합 물질의 사용으로 이러한 검사가 용이해졌고 따라서 여러가지 질병에 대해 다양한 후보 물질을 스크리닝할 수 있게 되었다. 둘째로, 재조합 DNA 기법의 이용으로 병원성 미생물에 대한 연구가 더 안전해졌다. 그 이유는 병을 유발하는 개체 그 자체 또는 그 개체로부터 오염되었을 가능성이 있는 항원에 비하여 훨씬 안전한 단일 유전자와 그 산물이 분석 대상이 되기 때문이다.

### 단백질 화학을 이용한 접근 방법

화학적 기술이 분자에 기초를 둔 백신 개발 프로그램의 한 부분으로서 광범위하게 응용되리라는 것은 자명하다. 대부분의 보호 항원(protective antigen)이 단백질이므로 단백질 화학 분야, 특히 단백질 항원의 정제 기술이 백신 개발에 있어서 지대한 기여를 해왔다. 이는 백신 개발의 초기 단계, 또는 미생물로부터 재조합 단백질을 정제하는 단계에서 천연형의 보호 항원을 확인하는 과정의 일부로서 적용되어 왔고 연구 단계, 제조 단계 모두에서 응용된다. 또한 펩타이드 합성 기술의 발달로 특정 단백질에서 면역원성을 나타내는 부위를 합성한 펩타이드 백신이 개발되었으며, 단백질 구조 확인 기술의 발달로 컴퓨터를 이용한 T-cell epitope의 추정이 가능해진 것도 단백질 화학이 백신 개발에 기여한 경우이다.

### 면역학 분야의 기여

백신이라는 것이 병을 예방하는데에 있어서 면역학적 원리에 근거한 것이므로 백신 개발은 면역계에 대한 깊은 이해에 그 바탕을 둔다. 이 분야 중 백신 개발에 가장 폭넓게 응용되는 것은 단일 클론 항체이며, 이는 항원의 확인과 분리에 사용된다. 재조합 DNA 기법이 단백질 항원에만 적용되는데에 비하여 단일 클론 항체는 epitope이 단백질로 되어 있건 그렇지 않건 간에 다 검출할 수 있는 이점이 있다. 몇몇 중요한 보호항원은 탄수화물로 이루어져 있으므로 단일 클론 항체에 의하여 확인된 epitope의 화학적 성질을 결정하여야 백신 개발을 위한 전략을 제대로 세울 수 있다. 또한 비단백질성 epitope을 모방하는 anti-idiotypic antibody의 사용이 최근 각광을 받고 있다. 마지막으로 면역증강제로서의 lymphokine의 사용과 새로운 adjuvants의 이용을 들 수 있다. 그러나 이러한 물질들을 적합한 세포에서 적합한 국소 반응을 유발하도록 운반하는 것이 아직도 극복하여야 할 문제로 남아 있다. 생체내에서 어떠한 인자들이 이러한 물질의 생성을 자극하는지에 대한 이해가 더 중요할지도 모른다.

### 새로운 방법으로 개발된 백신

#### 생균 백신 (Live Vaccines)

약독화된 생균 백신 개발에 사용되어 온 전통적인 접근 방법으로는 계대 배양에 의한 변화, 다른 종(species)으로부터의 변종(variant) 사용 및 온도 선택적인 돌연변이주 (temperature-selected mutants) 개발 등이 있다. 재조합 DNA 기법의 응용으로 인한 분자적 접근 방법의

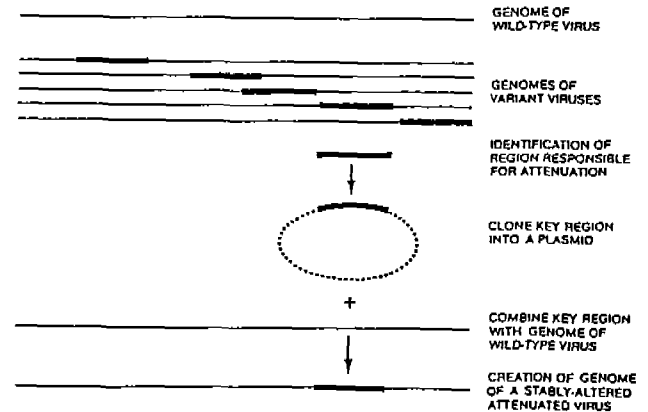
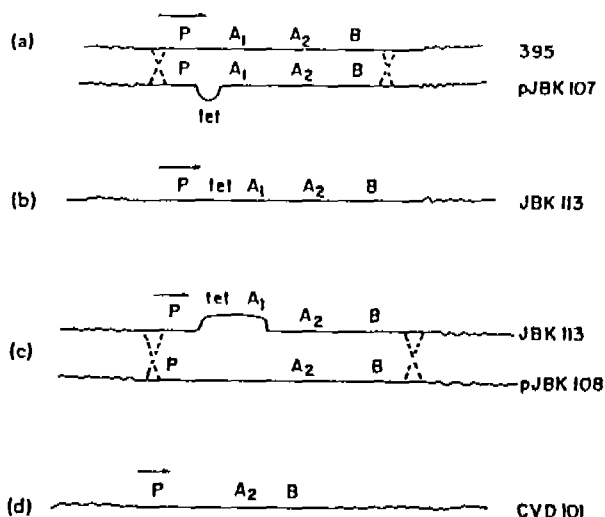


Fig. 1. 분자 생물학을 이용한 약독화 바이러스의 제조 방법

이용으로 더 안전한 protective molecule의 engineering이 가능해졌다. 생명공학을 이용하여 생균 백신을 개발하는 방법으로는 DNA를 변화시킨 변이주의 사용과 재조합 바이러스의 제조 두 가지로 분류할 수 있다.

**DNA를 변화시킨 변이주 (DNA Modification Mutants):** 재조합 DNA 기법은 고전적 유전학 방법과 함께 약독화된 균주의 제조를 용이하게 하여 생균 백신의 개발을 가능하게 하였다. 바이러스, 박테리아 백신에 모두 적용될 수 있으나 바이러스 백신의 경우 연구가 더 많이 되고 있다. 바이러스 유전학과 DNA 염기서열 분석을 이용하여 바이러스 genome의 어떤 부위에 변화를 주었을 때 바이러스의 병원성을 약화시키는지 확인할 수 있게 되었다. Fig. 1에 나타난 바와 같이 재조합 DNA 기법의 발전으로 이러한 부위를 변화시켜 wild-type 바이러스의 genome에 도입시킴으로써 약독화된 바이러스를 생산할 수 있다. 이 방법을 사용할 때 신중한 주의를 요하는 점은 더 병원성이 강한 형태로 되지 않도록 하는 것이다. 이것은 genome의 주요 부위를 reversion의 가능성이 완전히 배제된 방법으로 제거함으로써 가능하다. DNA를 변화시킴으로써 약독화시킨 방법은 Kit 등 (1985)에 의하여 처음 적용되었는데 그들은 pseudorabies 바이러스를 약독화시켜 더 안전한 백신을 제조함으로써 돼지의 심각한 질병 예방에 기여하였다. 이는 유전적으로 변경된 생균 백신으로서 사용 허가받은 첫번째 백신이다. Poliovirus (Omata 등, 1986)와 그 외 사람에게 사용되는 다른 백신들에도 적용되고 있다.

박테리아 백신의 경우에도 이와 유사한 방법이 시도되었다. 콜레라를 유발하는 *Vibrio cholerae*의 경우가 좋은 예이다. Lockman과 Kaper(1983)에 의하여 콜레라 enterotoxin을 encode하는 유전자 *ctx*가 클로닝되고 그 염기서열이 밝혀졌다. 클로닝된 *ctx* 유전자에서 독성을 나타내는 A subunit이 제거된 약독화 균주 CVD101이 Kaper 등(1984a, 1984b)에 의하여 제조되었다 (Fig. 2). 이 CVD101은 그러나 여전히 설사 등의 부작용을 유발함이 밝혀져 더 이상 연구가 진행되지 않고 있다. 한편 독성을

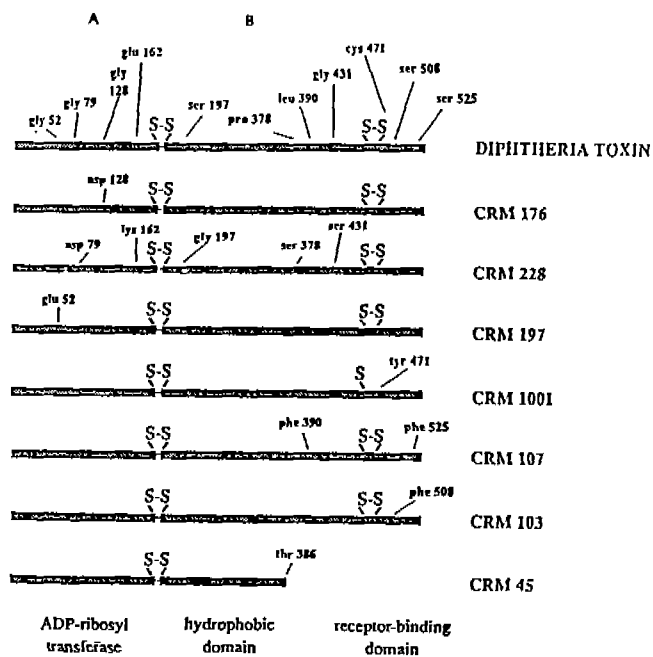


**Fig. 2.** 약독화 콜레라 백신을 만들기 위하여 *V. cholerae* 395의 염색체에 콜레라 독소 유전자의 deletion을 도입하기 위한 전략. 자세한 실험 방법은 Kaper 등(1984a)에 나와 있다. (a) 테트라사이클린 내성 유전자 (*tet*)를 wild type 콜레라 독소 오페론의 Xba I 부위에 클로닝함으로써 insertional mutation 만듦(pJBK 107). (b) 이 pJBK107을 *V. cholerae* 395의 염색체에 transfer시킴으로써 JBK113 균주를 제조. (c) 콜레라 독소의 deletion mutation을 함유하는 재조합 플라스미드 pJBK108를 JBK113에 homologous recombination에 의하여 도입시킴. (d) (c)의 cross-over로 인하여 만들어진 콜레라 균주 CVD101. A1 sequence가 delete되고 B subunit을 생산하며 테트라사이클린에 내성이 없다.

일으킨다고 알려진 또다른 인자인 Shiga-like toxin을 *ctx* 유전자로부터 제거한 균주인 CVD103은 CVD101 보다 부작용이 훨씬 덜함이 밝혀졌다 (Levin 등, 1988). 또한 CVD103의 염색체에서 hemolysin을 encode하는 *hly A* locus에 homologous recombination에 의하여 수은에 내성이 있는 유전자 *mer*를 삽입함으로써 wild-type 균주로부터 쉽게 구별되도록 한 CVD103-HgR 균주가 개발되었는데 (Levin 등, 1988) 이는 *hly A* locus가 disrupt 되어도 콜레라 균의 면역원성에는 영향을 미치지 않기 때문이다. CVD103-HgR은 단일 투여로 면역원성과 보호효과를 나타냄이 입증되어 가능성 있는 백신 후보 물질로 주목받고 있다.

약독화 생균 백신의 또다른 예는 장티푸스 백신의 경우에서 찾아볼 수 있다. *Salmonella typhi* 균주의 mutant중 *gal E* 유전자에 chemical mutagenesis로 mutation을 일으킨 Ty21a 균주가 Germanier 등(1975)에 의하여 개발되었고, Hone 등(1988)에 의하여 정확한 재조합 DNA 기법을 이용하여 *S. typhi* genome의 나머지는 바뀌지 않은 형태로 개선되었다. Ty21a는 면역계를 자극하면서도 질병을 유발하지는 않는 약독화 백신으로 현재 미국, 유럽을 비롯한 여러 나라에서 사용되고 있다.

디프테리아 백신의 경우도 좋은 예이다. Giannini 등 (1984)은 *in vitro* mutagenesis 기법을 이용하여 디프테



**Fig. 3.** 약독화 디프테리아 백신을 만들기 위하여 디프테리아 독소의 아미노산 염기들을 변화시킨 mutant들. 디프테리아 독소 분자 위에 표시한 아미노산들은 mutation을 초래하였을 때 fragment A 또는 fragment B의 기능에 변화를 초래하는 염기들이다. 각 mutant들에서 디프테리아 독소와 다른 아미노산들이 표시되어 있다 (Rappuoli, 1990).

리아 독소 (diphtheria toxin)의 아미노산 염기를 변화시킨 mutant들을 만들었다 (Fig. 3). 이 중 CRM197은 단일 아미노산의 mutation을 초래한, 즉 52번 위치의 glycine을 glutamic acid로 치환한 무독성 mutant이다. 이 CRM197은 NAD<sup>+</sup>에 결합하지 못하는 fragment A를 생산하는데 이것은 효소로서의 활성이 없으므로 무독성이다. CRM197은 그러나 독소 분자의 면역원성 및 보호 특성에는 영향을 미치지 않으므로 새로운 백신 후보 물질로서 주목받고 있다. Porro 등(1986)은 *Streptococcus pneumoniae* type 6A로부터 얻은 oligosaccharide들과 meningococcal group C polysacchride들을 이 CRM197에 결합시킴으로써 다가 백신(multivalent conjugate vaccine)의 가능성을 보였다.

**재조합 바이러스 (Recombinant Viruses):** 재조합 DNA 기술에 의하여 얻어진 또 하나의 주된 결실이라면 바이러스나 박테리아의 유전자를 변화시켜 다른 유전자의 운반체, 즉 벡터로 작용하도록 하는 생 재조합 미생물 (live recombinant microorganism)의 제조를 들 수 있다. 이러한 hybrid 균주는 임상적으로 확립된 백신 균주를 벡터로 하고 그 안에 질병을 유발하는 다른 개체 (heterologous disease-causing organism)로부터 질병에 대한 보호 효과를 줄 수 있는 항원을 encode하는 유전자가 클로닝된 구조를 갖고 있다. 이러한 hybrid 생균 백신을 접종하면 heterologous organism에 대한 보호 효과를

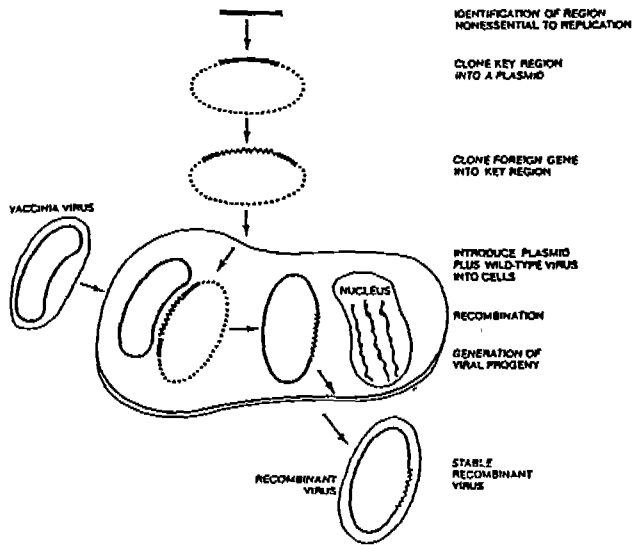


Fig. 4. 다른 병원체의 면역원을 encode하는 유전자를 함유한 재조합 vaccinia 바이러스의 제조 방법

갖게 됨과 동시에 벡터로 사용된 백신에 의한 보호 효과도 아울러 갖게 된다. 즉, 단일 접종으로 두 가지 또는 그 이상의 감염성 물질에 대한 백신의 기능을 나타낼 수 있다. 벡터로 사용되는 live vector organism은 현재 쓰이고 있는 human vector 중에서 선택하는데 바이러스나 박테리아 모두 사용할 수 있다. 그 예로는 vaccinia (Mackett 등, 1982), adenovirus (Morin 등, 1987), poliovirus, varicella-zoster (Lowe 등, 1987), *Salmonella* (Nakayama 등, 1988), BCG 등이 있으며, vaccinia 바이러스를 이용한 방법이 처음으로 시도되었다. Vaccinia 바이러스는 대부분의 포유류와 조류를 감염시키는 효과적인 벡터로서 광범위하게 사용된다. 대략적인 방법이 Fig. 4에 표시되어 있다. Vaccinia 바이러스의 genome에서 바이러스 증식에 불필요한 부위를 플라스미드에 클로닝한 후 외래 유전자, 즉 다른 병원체의 표면 항원을 encode하는 유전자를 삽입시킨다. 이 재조합 플라스미드를 wild-type vaccinia 바이러스와 함께 배양 세포에 도입시키면 외래 유전자를 함유하는 재조합 바이러스를 얻게 된다. 바이러스 벡터에 삽입될 외래 유전자는 면역원(immunogen)을 encode해야 하며 바이러스가 증식될 때 이 면역원의 presentation이 반드시 그 항원에 대하여 protective한 면역 반응을 유발하여야 한다. 재조합 vaccinia 바이러스를 이용하여 면역원을 발현시킨 예는 다음과 같다: Cytomegalovirus (Jonjic 등, 1988); Hepatitis B virus (Moss 등, 1984); Herpes simplex virus (Cantin 등, 1987, Cremer 등, 1985); Measles (Drillien 등, 1988); Influenza B virus (Rota 등, 1987); Epstein-Barr virus lymphoma (Morgan 등, 1988); Friend murine leukemia (Earl 등, 1986); Melanoma (Estin 등, 1988); Tumor (polyoma T antigen: Lathe 등, 1987; rat neu oncogene:

Bernards 등, 1987); AIDS (Hu, 1990).

이러한 생균 재조합 백신의 안전성과 유효성에 관하여 몇가지 고려하여야 할 점이 있다. 우선 안전성에 관하여는 벡터로 쓰이는 parental 바이러스에 대한 광범위한 시험이 선행되어야 부작용의 위험을 제거할 수 있다. 또한 바이러스의 증식에 불필요한 부위에 외래 유전자가 삽입됨으로써 바이러스의 병원성을 약화시켜야 하며 (Buller 등, 1985), 이 약독화는 안정하게 지속될 수 있어야 한다. 또, 재조합 바이러스의 숙주 범위나 조직 특이성, 세포성 수용체의 특성 등이 벡터 바이러스에 비하여 크게 다르지 않아야 한다. 바이러스 감염이 숙주 세포의 증식과 구조에 미치는 영향이 면밀하게 연구되어야 한다. Epstein 등(1985)에 의하면, vaccinia 바이러스는 transforming growth factor- $\alpha$ 와 비슷하며 그 자체가 *erb-B* oncogene과 아주 유사한 epidermal growth factor (EGF)와 유사성이 큰 단백질을 encode하므로 vaccinia 바이러스의 사용은 감염된 세포의 성장과 분열을 자극하는 mitogenic한 결과를 초래할 수도 있으므로 주의하여야 한다.

유효성 측면으로는 첫째, 발현되는 외래 단백질의 양이 효과적인 면역성을 유발하기에 충분한 정도라야 한다. 또한 외래 유전자 여러 개가 동시에 단일 바이러스 genome에 삽입될 수 있으며 이 경우 multiple pathogen에 대한 면역 반응을 유발하게 된다 (Perkus 등, 1985). 몇몇 재조합 vaccinia 바이러스가 전임상 동물 시험에서 유효성을 나타내었으나 임상 시험에서 사람에 대한 효과가 입증되어야 사용될 수 있다.

#### 사균 백신 (Killed Vaccines)

사균 백신의 개발에 사용되어 왔던 전통적인 방법은 생화학적 정제 기술과 개체의 불활성화 방법을 이용한 것들이다. 전체 바이러스 또는 박테리아를 불활성화시키거나 병원균으로부터 독소를 추출하거나 또는 바이러스나 박테리아의 표면을 구성하는 물질을 정제하여 사용하는 방법 등이 있다. 새로운 분자적 접근 방법에는 재조합에서 유래된 단백질, 합성 백신, anti-idiotypic antibody의 세가지가 적용되고 있다.

**재조합에서 유래된 단백질 (Recombinant-Derived Proteins):** 재조합 DNA 기법의 발달로 인하여 원하는 단백질을 대량 생산하여 백신으로 개발하는 것이 가능해졌다. 이 방법의 요건은 바이러스나 박테리아를 구성하는 단백질 중에서 보호 항체의 생성을 유발하고, 생성된 항체가 감염을 중화시킴으로써 병원체로부터 보호할 수 있는 단백질을 확인하는 것이다. 그 단백질의 아미노산 서열이나 그 단백질에 대한 항체를 이용하여 이 단백질을 encode하는 유전자를 검출하고 발현 벡터에 클로닝한 뒤 숙주 세포에 도입시켜 배양하면 특정 단백질을 대량 생산할 수 있다.

이 방법이 사람에게 처음 시도된 것은 간염 B형 바이러스(hepatitis B virus, HBV)에 대한 백신의 개발이다.

Table V. 재조합 유래 단백질의 발현 시스템 비교<sup>a</sup>

	<i>E. coli</i> (Bacteria)	<i>S. cerevisiae</i> (Yeast)	Chinese Hamster Ovary (Mammalian cells)
Yield of product	+++	+++	+
Ease of scale-up	+++	+++	+
Stability of yield with scale-up	+++	+++	+
Inducible expression	+++	+++	+
Consistency of performance	+++	+++	+
Secretion	+	++	+++
Glycosylation	-	++	+++
Proteolytic processing	-	++	+++
Other modifications	-	++	+++
Biology of cell substrate	++	+++	+
Heterologous protein contaminants	++	++	+
Residual DNA (oncogenicity)	+++	+++	+

+++ = most acceptable ++ = acceptable + = least acceptable - = absent <sup>a</sup>from Ellis (1988)

제 1세대 간염 B형 백신은 만성 보유 환자의 혈장으로부터 추출한 주된 viral envelope protein인 hepatitis B surface antigen (HBsAg)을 함유한다 (Hilleman 등, 1983). 재조합 간염 B형 백신은 이 HBsAg 유전자를 효모에서 발현시킨 것으로서 효모에서 생산된 HBsAg는 혈장 유래 HBsAg와 형태학적, 그리고 면역학적으로 가장 유사함이 밝혀졌으며 (Scolnick 등, 1984, Hilleman과 Ellis, 1986), 이는 재조합 백신으로는 처음으로 Merck, Sharp & Dohme 회사에서 개발, 등록되어 사용되고 있다.

이외에도 Young JF 등(1985)은 말라리아 백신 개발에 위의 방법을 이용하여 *Plasmodium falciparum*의 circumsporozoite 단백질을 *E. coli*에서 발현시켰다. 또한 *Mycobacterium tuberculosis* (Young RA 등, 1985a)와 *Mycobacterium leprae* (Young RA 등, 1985b)로부터 만든 λgt 11 expression library를 마우스 단일 클론 항체와 토끼와 사람의 polyclonal 항체를 사용하여 검색한 결과 단백질 항원들을 검출하여 결핵과 나병의 재조합 백신 개발의 가능성을 제시하였다.

재조합 DNA로부터 유래된 단백질을 생산할 수 있는 숙주 세포로는 박테리아 (*Escherichia coli*), 효모(*Saccharomyces cerevisiae*), 그리고 포유류 세포(Chinese hamster ovary, monkey kidney)가 가장 많이 사용되고 있다. 최근 다른 박테리아(*Bacillus subtilis*), 곰팡이(*Aspergillus nidulans*)와 고등 진핵 세포들도 사용되고 있는 추세이다. 이들 세포를 재조합 DNA로부터 유래된 단백질의 발현 시스템으로 사용할 때의 여러 가지 차이점은 Table V에 나타나 있다. 미생물 시스템(박테리아와 효모)은 포유류 시스템에 비하여 생산성이 좋은 반면 적절한 post translational modification을 이룰 수 없는 단점이 있다. 몇몇 예외를 제외하고는 포유류 세포는 대개 “transformed”로 간주되므로 oncogenicity를 야기할 위험이 있다. 또한 포유류 세포들은 재조합 DNA의 발현을 위하여 oncogenic 또는 latent한 바이러스로부터 유래된 유전인자를

사용하는 경우가 많기 때문에 안전성 측면에서 특별한 주의가 요구된다.

**합성 백신 (Synthetic Vaccines)**: 합성 백신이란 면역원으로 전체 분자 대신 단백질의 짧은 부위를 합성한 펩타이드를 사용하는 것이다. 합성 펩타이드를 디자인하기 위하여는 우선 면역원성 단백질을 encode하는 유전자를 검출하여야 한다. 이 유전자의 염기서열을 이용하여 단백질을 이루는 아미노산 서열을 규명하고 어떤 부위가 면역원성을 가지고 있는지 추정한다. 면역원성을 나타내는 부위인 epitope을 화학적으로 합성한 것이 합성 백신이다. 이 때 합성 백신이라 하여도 보통 생합성 과정에서 생성되는 큰 단백질 운반체가 결합되어 있으므로 완전한 의미의 합성 백신은 아니다.

물질은 특정 수용체, 즉 항체 또는 세포성 수용체를 통하여 면역계와 반응한다. 이 수용체의 항원 결합 부위는 단백질 항원의 아주 작은 부분만을 인지하는데 B-cell epitope의 경우는 3~5개 아미노산, T-cell epitope의 경우는 15~20개 아미노산 정도이다. 이러한 크기의 펩타이드는 현재 펩타이드 합성 기술로 쉽게 만들어질 수 있다. 항원의 1차 염기 서열이 알려져 있다면 항원 내의 B-cell epitope을 정확하게 지정하고 확인할 수 있다. 이는 단백질을 구성하는 모든 가능한 펩타이드를 8개 아미노산 정도의 길이로 합성하여 이 펩타이드들을 여러 항체들, 특히 단일 클론 항체들과 반응시킴으로써 가능하다. 이 방법을 위하여는 엄청난 양의 작업이 필요하다고 생각되나 Houghten (1985)에 의하여 개발된 simultaneous multiple peptide synthesis (SMPS) 방법과 Geysen 등(1987)에 의해 고안된 polypropylene pin 유도체를 이용하는 방법 등의 펩타이드 합성 기술의 발전에 힘입어 1주일에 수백 개의 overlapping 펩타이드를 합성하는 것이 가능해져 epitope mapping이 용이해졌다. 이와 유사하게 다양한 algorithm을 사용하여 T-cell epitope을 추정한 뒤 이에 해당하는 펩타이드를 합성하는

것도 가능하다. 또한 이런 펩타이드들이 실제로 T cell에 의해 인지되는 항원의 부위를 나타내는지 직접 시험할 수도 있다.

합성 펩타이드 백신이 처음 사람에게 적용된 것은 간염 B형 바이러스의 경우이다. Lerner 등(1981)에 의하여 HBsAg 폴리펩타이드의 부위에 대한 펩타이드가 합성되었다. 다른 펩타이드 백신의 예로는 *P. falciparum*의 sporozoite stage에 대한 백신이 있다. Tam (1988)에 의하여 *P. falciparum*의 circumsporozoite(CS) protein의 immuno-dominant repeat sequence인 NANP 펩타이드가 제조되었다. 이는 solid-phase 방법(Merrifield, 1986)으로 합성된 multiple-antigen peptide(MAP) system으로서 작은 peptidyl core matrix에 합성된 펩타이드들이 dendritic arm으로 방사성 모양의 가지를 친 구조를 가지고 있다. (NANP)<sub>3</sub>-MAP는 단백질 운반체 없이도 면역원성을 나타내었다. 또한 T-와 B-cell epitope을 함유하는 sporozoite subunit vaccine은 단독, 혹은 blood stage antigen에 대한 펩타이드 백신과 병행하여 사용할 때 효과적인 예방작용을 할 것으로 기대된다.

이론적으로 합성 백신은 기술적인 적용 범위가 넓고 특성이 명확히 규명된 백신이라는 장점이 있지만 실제로 사용하였을 때 종종 문제점에 봉착하게 된다. 이 방법은 linear epitope에만 적용될 수 있다는 사실을 항상 염두에 두어야 한다. 대부분의 epitope들은 nonlinear 하며 따라서 그 분자의 3차원적인 구조에 의존한다. 아마도 합성 펩타이드는 intact한 단백질의 면역원성에 필수적인 모든 conformation을 모방하기는 불가능할 것이다. 실제로 펩타이드에 의하여 생성된 항체는 전체 단백질을 사용하였을 때 비하여 역가와 affinity 및 crossreactivity가 낮은 것이 일반적이다. 즉, 합성 펩타이드에 의해 야기된 면역 반응은 전체 단백질에 의한 면역 반응에 비하여 그 지속력이 떨어진다. 이러한 문제점을 극복하기 위하여 합성 펩타이드들의 완전한 혼합물을 사용하거나 운반체 단백질과 결합시켜 면역성을 증진시키는 방법이 요구된다. 또한 면역원이 당이나 지질을 함유하는 복잡한 구조를 가지는 경우 펩타이드 백신은 사용될 수 없다. 펩타이드 백신에 의해 생성되는 항체는 원래의 native molecule을 인지하지 못하는 경우도 있을 수 있다. 그러므로 펩타이드 백신의 사용에는 세밀하고 심도깊은 면역학적 시험이 요구된다. 합성 펩타이드는 그러나 poliovirus에서 처음으로 입증된 바 있듯이 면역 반응을 priming 하는 데에는 유용하리라 생각된다 (Emimi 등, 1983).

**항 이디오타입 항체(Anti-idiotypic antibodies):** 사균 백신을 만드는 세번째 새로운 전략은 Jerne(1985)에 의하여 그 존재와 면역 반응 조절 기능이 밝혀진 anti-idiotypic antibody의 사용이다. 이 방식은 아직 실험 단계이나 그 주된 적용은 단백질이 아닌 epitope에 대한 백신의 개발이다. Anti-idiotypic이란 질병을 유발하는 개체의 epitope을 인지하는 항체의 mirror image인 항체로서

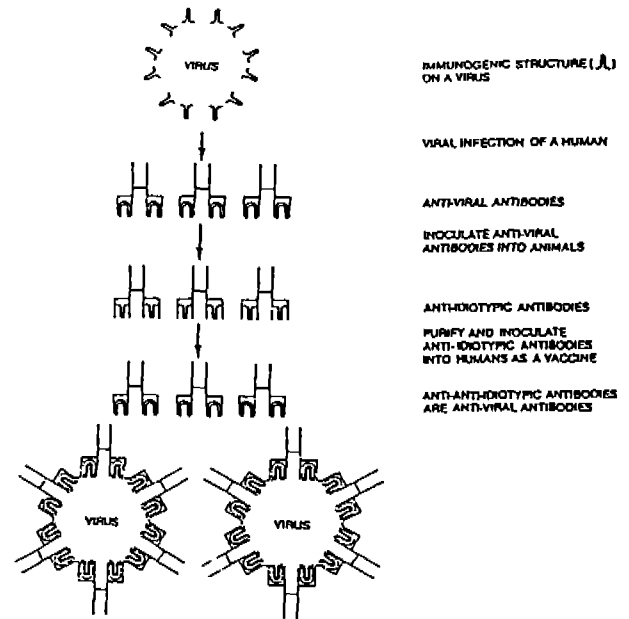


Fig. 5. Anti-idiotypic antibody를 백신으로 사용하기 위한 전략 (Ellis, 1988)

항원의 protective epitope과 면역학적으로 동일한 구조를 가진다. 따라서 이것은 항원의 대응으로 사용될 수 있다. 즉, anti-idiotypic antibody의 접종은 백신의 기능을 나타내어 항체 생성을 유발하는데 이 anti-anti-idiotypic antibody는 처음 항체와 그 구조가 동일하다 (Dressman과 Kennedy, 1985). 백신으로서 anti-idiotypic antibody를 사용하기 위한 전략이 Fig. 5에 나타나 있다.

이 방법은 Kennedy 등(1986)에 의하여 간염 B형 바이러스 백신에 처음 적용되었다. 이 방법은 탄수화물 항원의 경우 유용한데, 그 이유는 탄수화물 항원의 경우 면역원으로 사용되기에 충분한 양과 높은 순도를 얻기가 어렵기 때문이다. 이 anti-idiotypic은 특히 암에 대한 백신으로서 잠재력을 갖고 있다. 대부분의 사람의 암 항원은 tumor-associated differentiation antigens (TADA)인데 이들은 정상 세포에서 소량 발현되므로 외래 항원보다 면역 반응을 유발할 가능성이 적다. Raychaudhuri 등 (1986, 1987a, 1987b)은 마우스의 lymphoma에서도 또한 발현되는 mammary tumor virus의 gp52에 대한 마우스 단일 클론 항체를 사용하여 이에 결합하는 몇 개의 단일 클론 anti-idiotypic들을 만들었다. 이런 anti-idiotypic을 생산하는 hybridoma 세포는 lymphoma로 prime된 syngeneic 마우스를 challenge 하였을 때 delayed-type hypersensitivity (DTH)를 유발하였다. Tumor-specific DTH를 유발하고 gp52에 특이한 항체를 유도하는 두 가지의 anti-idiotypic을 naive한 syngeneic 마우스에 주사했을 때 T helper cell이 유도되었으며, 그 중에서 하나는 tumor challenge 전에 마우스에 주었을 때 암의 성장을 지연시켰다.



Anti-idiotypic antibody의 적용은 새로운 백신 개발 전략으로 주목되고 있지만 몇 가지 중요한 문제점을 안고 있다. 면역원이 자연적으로 존재하는 인간의 항체와 구조적인 연관성이 있는 항체이므로 항원 감작과 관련된 문제가 야기된다. 또한 anti-idiotypic antibody에 의해 생긴 image는 전체 단백질이 아니라 병원체 표면의 펩타이드 domain과 구조적으로 유사하므로 이러한 백신은 항단백질성이라기 보다는 항펩타이드성인 면역 반응을 유발한다.

**분자적 접근법(Molecular Approach)을 사용할 때의 고려하여야 할 점**

전통적인 방법으로 백신을 개발하는데 있어서 일 반적으로 병원체에 주안점을 두는데에 반하여 새로운 방법을 적용할 때에는 분자에 중점을 두게 된다. 분자적 접근법은 감염성 미생물로부터 유래된 몇몇 분자 또는 분자의 부분이 질병 유발 개체에 대하여 효과적인 백신 으로 작용할 수 있으리라는 가정에 근거한다. 이 가정은 디프테리아, 테타누스, 간염 B형 바이러스 및 meningococcal disease 등의 몇몇 질병에 대한 백신의 경우 정 당화되었으나 아직까지 많은 다른 질병에서는 입증되지 않고 있다. 그러므로 분자적 접근법이 현저한 이점을 갖고 있기는 하지만 질병이란 보통 복잡한 개체나 이들의 산물에 의하여 유발되며 단일 분자는 질병에 대하여 완 전한 보호 효과를 나타내기에 충분하지 않을지도 모른 다는 사실을 항상 염두에 둘 필요가 있다. 이러한 이유로 백신 개발 프로그램의 착수 단계에서 분자의 보호 특성에 관하여 가능한 한 많은 정보를 얻어 나중에 보호 효과가 의심스럽게 판명된 물질을 클로닝하고 생산하고 시험하 는데에 많은 시간과 돈과 노력을 허비하지 않도록 하는 것이 중요하다.

어떤 분자가 감염성 병원체의 일부로서 면역계에 제 시될 때에 보호 효과를 나타낸다고 하여도 그 분자가 분리되어 정제된 형태로 제시될 때에는 그만큼 효과를 나타내지 않을 수도 있다. 즉, 분자 백신의 제시 양식(the mode of presentation) 또한 백신의 성패를 가리는 중 요한 이슈가 된다. 이외에도 항원의 확인은 반드시 host-organism interaction에 관한 충분한 이해가 수반 되어야 한다는 점을 기억해야 할 것이다.

백신의 본질과 면역학적 특성은 질병 자체의 본질에 의하여 결정되는 것임을 인지하는 것도 중요하다. 그러 므로 백신 개발 전략을 세우는 데에 있어서 무엇보다 중점을 두어야 할 것은 질병의 본질에 관한 생물학과 면역학에 대한 정보이다. 새로운 생명공학적 기술은 생 물학의 수단으로서 사용되어야 한다. 이 말은 당연하게 들릴지 모르지만 종종 “이 생물학적 문제를 해결하기 위하여 어떤 기술을 사용해야 할까?” 대신에 “이 기술을 가지고 무엇을 할 수 있을까?” 식의 접근으로 연구를 하는 바람직하지 못한 예를 볼 수 있다. 특정 기법은 질병의 생물학과 연계하여서만 적용될 수 있다.

Subunit-type 백신을 개발하고자 할 때 감염성 개체의 조성 중 질병에 대한 보호 효과를 줄 수 있는 분자를 분리하기 위한 “적절한 기법”을 사용하여야 한다. 한 질병에 대하여 적합한 기법이 다른 질병에는 적합치 않은 경우가 있다. 예를 들어 자연적인 면역의 형태가 주로 세포 매개성이라면 non-protective한 항체를 이용하여 cDNA library로부터 발현된 항원을 검색하는 것은 아주 한정된 검색이라고 할 수 있다. 마찬가지로 감염이 장기 (gut)에서 일어나고 보호가 IgA 매개성이라면 혈청으로 부터 얻은 IgG 항체로 gene library를 스크리닝하는 것은 별 의미가 없다.

**결 론**

생명공학을 이용한 새로운 기법은 여러 해 동안 적 용되어 왔지만 지난 10년 내지 20년간 새로 개발된 백 신은 극소수라는 사실로 미루어 볼 때 백신 개발을 위 하여 극복해야 할 문제점들이 얼마나 많이 산재해 있는 지를 알 수 있다. 생명공학적 기법이 새로운 가능성의 장(章)을 연 것은 사실이지만 그것이 곧 손쉬운 성공을 보장해 주는 것은 아니다. 생명공학은 질병의 생물학에 근거하여 백신 개발에 적용되어야 하며 유전학, 화학, 생화학 및 면역학 등의 분야로부터 비롯된 기법들과 함께 응용될 때 그 돌파구를 찾을 수 있다. 그리 멀지 않은 장래에 획기적인 효능을 가진 새로운 백신이 생산될 수 있기를 기대한다.

**참고문헌**

Ada G. L. (1990). The traditional vaccines-An overview. In *New Generation Vaccines*, Woodrow G. C., Levine M.M. (eds), Marcel Dekker Inc., New York, pp. 31-41.

Bernards R., Destree A., McKenzie S., Gordon E., Weinberg R. A. and Panicali D. (1987). Effective tumor immunotherapy directed against an oncogene-encoded product using a vaccinia virus vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 6854-6858.

Buller R. M. L., Smith G. L., Cremer K., Notkins A. L. and Moss B. (1985). Decreased virulence of recombinant vaccinia virus expression vectors is associated with a thymidine kinase-negative phenotype. *Nature* **317**, 813-815.

Cantin E. M., Eberle R., Baldick J. L., Moss B., Willey D. E., Notkins A. L. and Openshaw H. (1987). Expression of herpes simplex virus glycoprotein B by a recombinant vaccinia virus and protection of mice against lethal herpes simplex virus 1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 5908-5912.

Cremer K. J., Mackett M., Wohlenberg C., Notkins A. L. and Moss B. (1985) Vaccinia virus recombinant expressing herpes simplex virus type 1 glycoprotein D prevents latent herpes in mice. *Science* **288**, 737-740.

Dressman G. R. and Kennedy R. C. (1985) Anti-idiotypic antibodies-Implications of internal image based vaccines for

- infectious diseases. *Inf. Dis.* **151**, 761-775.
- Drillen R., Spehner D., Kirn A., Giraudon D., Buckland R., Wild F. and Lecocq J. P. (1988). Protection of mice from fatal measles encephalitis by vaccination with vaccinia virus recombinants encoding either the hemagglutinin or the fusion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 1252-1256.
- Earl P. L., Moss B., Wehrly K., Nishio J. and Chesebro B. (1986). T cell priming and protection against Friend murine leukemia by a recombinant vaccinia virus expressing *env* gene. *Science* **234**, 728-731.
- Ellis R. W. (1988). New technologies for making vaccines. In *Vaccines*, Plotkin S. A. and Mortimer E. A. (eds), W. B. Saunders company, Philadelphia, pp. 568-575.
- Emini E. A., Jameson B. A. and Wimmer E. (1983). Priming for and induction of anti-poliovirus neutralizing antibodies by synthetic peptides. *Nature* **304**, 699-703.
- Eppstein D. A., Marsh Y. V., Schreiber A. B., Newman S. R., Todaro G. J. and Nestor Jr J. J. (1985). Epidermal growth factor receptor occupancy inhibits vaccinia virus infection. *Nature* **318**, 663-665.
- Estin C. D., Stevenson U. S., Plowman G. D., Hu S. L., Sridhar P., Hellstrom I., Brown J. P. and Hellstrom K. E. (1988). Recombinant vaccinia virus vaccine against the human melanoma antigen p97 for use in immunotherapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 1052-1056.
- Germanier R. and Furer E. (1975). Isolation and characterization of galE mutant Ty21a of *Salmonella typhi*: a candidate strain for a live oral typhoid vaccine. *J. Infect. Dis.* **141**, 553.
- Geysen H. M., Rodda S. J., Mason T. J., Tribbick C. T. and Schoofs P. G. (1987). Strategies for epitope analysis using peptide synthesis. *J. Immunol. Methods* **102**, 259-274.
- Giannini G., Rappuoli R. and Ratti G. (1984). The amino acid sequence of two nontoxic mutants of diphtheria toxin: CRM45 and CRM 97. *Nucleic Acids Res.* **12**, 4063.
- Hilleman M. R. and Ellis R. W. (1986). Vaccines made from recombinant yeast cells. *Vaccine* **4**, 75.
- Hilleman M. R., McAleer W. J., Buynak E. B. and McLean A. A. (1983). The preparation and safety of hepatitis B vaccine. *J. Infect.* **7**, 3.
- Hone D., Attridge S. R., Forrest B., Morona R., Daniels D., Labrooy J. T., Bartholomeusz C. A., Shearman D. J. C. and Hackette J. (1988). A galE, *via*(Vi-negative) mutant of *Salmonella typhi* Ty2 retains virulence in man. *Infect Immun* **56**, 1326.
- Hopps H. E., Meyer B. C. and Parkman, P. D. (1988). Regulation and testing of vaccines. In *Vaccines*, Plotkin SA and Mortimer EA (eds), W. B. Saunders company, Philadelphia, pp. 568-575.
- Houghten R. A. (1985). General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen-antibody interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 5131-5135.
- Hu S-L. (1990). Vaccinia expressing HIV envelope antigens as a candidate vaccine against AIDS. In *New Generation Vaccines*, Woodrow GC, Levine MM (eds), Marcel Dekker Inc., New York, pp. 31-41.
- Jerne N. K. (1985). The generative grammar of the immune system. *Science* **229**, 1057-1062.
- Jonjic S., del Val M., Keil G. M., Reddehase M. J. and Koszinowski U. H. (1984). A nonstructural viral protein expressed by a recombinant vaccinia virus protects against lethal cytomegalovirus infection. *J. Virol.* **62**, 1653-1658.
- Kaper J. B., Lockman H., Baldini M. M. and Levine M. M. (1984a). A recombinant live oral cholera vaccine. *Biotechnology* **2**, 345.
- Kaper J. B., Lockman H., Baldini M. M. and Levine M. M. (1984b). Recombinant nontoxigenic *Vibrio cholerae* strains as attenuated cholera vaccine candidates. *Nature* **308**, 665.
- Kennedy R. C., Eichberg J. W., Lanford R. E. and Dressman G. R. (1986). Anti-idiotypic antibody vaccine for type B viral hepatitis in chimpanzees. *Science* **232**, 220-223.
- Kit S., Kit M. and Pirtle E. C. (1985). Attenuated properties of thymidine kinase-negative deletion mutants of pseudorabies virus. *Am. J. Vet. Res.* **46**, 1359-1367.
- Lathe R., Kieny M. P., Gerlinger P., et al. (1987). Tumor prevention and rejection with recombinant vaccinia. *Nature* **326**, 878-880.
- Lerner R. A., Green N., Alexander H., Liu F. T., Sutcliffe G. and Shinnick T. M. (1981). Chemically synthesized peptides predicted from the nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome elicit antibodies reactive with the native envelope protein of Dane particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 3403-3407.
- Levine M. M., Kaper J. B., Herrington D. A., Losonsky G., Tall B., Kaper J. B., Ketley J., Tacket C. O. and Cryz S. (1988). Safety, immunogenicity, and efficacy of recombinant live oral cholera vaccines, CVD103 and CVD103-HgR. *Lancet* **2**, 467.
- Lockman H. and Kaper J. B. (1983). Nucleotide sequence analysis of the A2 and B subunits of *Vibrio cholerae* enterotoxin. *J. Biol. Chem.* **258**, 13722.
- Lowe R. S., Keller P. M., Keech B. J., Davidson A. J., Whang Y., Morgan A. J., Kieff E. and Ellis R. W. (1987). Varicella-zoster virus as a live vector for the expression of foreign genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 3896-3900.
- Mackett M., Smith G. L. and Moss B. (1982). Vaccinia virus: A selectable eukaryotic cloning and expression vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 7415-7419.
- Merrifield B. (1986). Solid phase synthesis. *Science* **232**, 341-346.
- Morgan A. J., Mackett M., Finerty S., Arrand J. R., Scullion F. T. and Epstein M. A. (1988). Recombinant vaccinia virus expressing Epstein-Barr virus glycoprotein gp340 protects cottontop tamarins against EB virus-induced malignant lymphomas. *J. Med. Virol.* **25**, 189-195.
- Morin J. E., Lubeck M. D., Barton J. E., Conley A. J., Davis A. R. and Hung P. P. (1988). Recombinant adenovirus induces antibody response to hepatitis B virus surface antigen in hamsters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 4626.
- Moss B., Smith G. L., Gerin J. L. and Purcell R. H. (1984). Live recombinant vaccinia virus protects chimpanzees against hepatitis B. *Nature* **311**, 67-69.
- Nakayama K., Kelly S. M. and Curtiss R. (1988). Construction of an Asd<sup>+</sup> expression-cloning vector: stable maintenance and high level expression of cloned genes in a *Salmonella*

- vaccine strain. *Biotechnology* **6**, 693.
- Omata T., Kohara M., Kuge S., Komatsu T., *et al.* (1986). Genetic analysis of the attenuation phenotype of poliovirus type 1. *J. Virol.* **58**, 348-358.
- Patarroyo M. E., Romeo P., Torres M. L., *et al.* (1987). Induction of protective immunity against experimental infection with malaria using synthetic peptides. *Nature* **328**, 629.
- Perkus M. E., Piccini A., Lipinskas B. R. and Paoletti E. (1985). Recombinant vaccinia virus: Immunization against multiple pathogens. *Science* **229**, 981-984.
- Porro M., Constantino P., Giovannoni F., Pellegrini V., Tagliaferri L., Vannozzi F. and Viti S. (1986). A molecular model of artificial glycoprotein with predetermined multiple immunodeterminants for gram-positive and gram-negative encapsulated bacteria. *Mol. Immunol.* **23**, 385.
- Rappuoli R. (1990). New and improved vaccines against diphtheria and tetanus. in *New Generation Vaccines*, Woodrow GC, Levine MM (eds), Marcel Dekker Inc., New York, pp. 31-41.
- Raychaudhuri S., Saeki Y., Fuji H. and Kohler H. (1986). Tumor-specific idiotype vaccines. I. Generation and characterization of internal image tumor antigen. *J. Immunol.* **137**, 1743.
- Raychaudhuri S., Saeki Y., Chen J. J., Iribe H., Fuji H. and Kohler H. (1987). Tumor-specific idiotype vaccines. II. Analysis of the tumor-related network response inducing the tumor and by internal image antigens(Ab2 $\beta$ ). *J. Immunol.* **139**, 271.
- Raychaudhuri S., Saeki Y., Chen J. J. and Kohler H. (1987). Tumor-specific idiotype vaccines. III. Induction of T helper cells by anti-idiotype and tumor cells. *J. Immunol.* **139**, 2096.
- Rota P. A., Shaw M. W. and Kendal A. P. (1987). Comparison of the immune response to variant influenza type B hemagglutinins expressed in vaccinia virus. *Virology* **161**, 269-275.
- Scolnick E. M., McLean A. A., West D. J., McAleer W. J., *et al.* (1984). Clinical evaluation in healthy adults of a hepatitis B vaccine made by recombinant DNA. *J. A. M. A.* **251**, 2812-2814.
- Siddiqui W. A. A., Tam L. Q., Kramer K. J., Hui G. S. N., Case S. E., Yamaga K. M., Chang S. P., Chan E. B. T. and Kan S.-C. (1987). Merozoite surface coat precursor protein completely protects *Aotus* monkeys against *Plasmodium falciparum* malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 3014.
- Tam J. P. (1988). Synthetic peptide vaccine design: Synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 5409.
- Woodrow G. C. (1990). An overview of biotechnology as applied to vaccine development. in *New Generation Vaccines*, Woodrow GC, Levine MM (eds), Marcel Dekker Inc., New York, pp. 31-41.