

당첨가가 B형 간염 바이러스 백신의 안정성에 미치는 영향

고려대학교 의과대학 미생물학교실, 고려대학교 부설 바이러스병 연구소

성 인 화

=Abstract=

Effects of Addition of Sugars on the Stability of Hepatitis B Virus Vaccine

Inwha Seong

Department of Microbiology, Medical College, Korea University, Institute for Viral Diseases,
Korea University, Seoul 136-075, Korea

Most of the current licenced hepatitis B vaccines are being produced by recombinant DNA technology in large fermentation cultures of *Saccharomyces cerevisiae* of yeast cells which carry the gene coded for hepatitis B virus surface antigen. These vaccines are proved very effective clinically and the immunogenicity of vaccines could be maintained for a long time under refrigeration.

To develop the stabilizer that could increase the stability of hepatitis B virus vaccine which could be stored for a long period at room temperature or higher conditions, glucose, lactose and sucrose solutions in phosphate buffered saline were added into hepatitis B vaccine respectively to make 2.5%, 5%, 7.5% and 10% final concentration in vaccines. These sugar-vaccine mixtures were stored at room temperature for one month, two months and three months respectively and then inoculated into ICR mice intramuscularly. On the fourteenth day after inoculation, mice were bled and sera were tested for the evaluation of efficacies of vaccines. The results showed that 5% glucose, 7.5% lactose and sucrose increased the stability of vaccines in some degree and this method could be applied for the production of other viral vaccines and bacterial vaccines.

Key Words: hepatitis B vaccine, stability, sugars

서 론

현재까지 사람에게 간염을 일으키는 것으로 알려진 바이러스들은 여러 종류가 발견되었으나 [1~6] 간염 바이러스들 중에 B형 바이러스는 급성 간염을 일으킬 뿐만 아니라 만성간염, 간경변 및 간암을 초래할 수 있고 감염된 사람들중 상당수의 만성보균자가 생겨 다른 사람에게 전파시킬 수 있으며 감염되면 효과적인 치료방법이 없기 때문에 미리 예방하는 것이 가장 중요하다 [7].

B형 간염의 예방백신은 Krugman과 그 동료들에 의하여 처음 개발되었는데 이 백신은 B형 간

염에 걸린 환자들의 혈청을 1: 10으로 희석하여 98℃에서 1분간 가온처리한 것으로 상당한 수준의 방어효과를 나타내었다 [8]. 그러나 이후 B형 간염바이러스가 들어있는 혈청을 불활화한 백신이 여러 가지 부작용을 초래하는 것이 알려진 다음부터 B형 간염바이러스가 들어 있는 혈청을 재료로하는 방법대신 정제된 바이러스를 재료로 사용하다가 [9,10] 유전자 재조합기술을 사용하여 백신을 제조하는 방법으로 전환되었고 현재는 효모나 대장균에서 생산되는 간염 B 바이러스의 표면항원으로 만든 백신이 널리 사용되고 있다 [11~18]. 간염백신개발에 대한 이러한 연구는 지금도 계속되고 있으며 일부에서는 안전

Table 1. Addition of sugar and treatment of HBV vaccines

Vaccine	Concentration of sugar(%)		Storage of vaccines	
			Temperature	Duration (month)
Treated vaccine	glucose	2.5, 5.0, 7.5, 10.0	room temp	1, 2, 3
	lactose	2.5, 5.0, 7.5, 10.0	room temp	1, 2, 3
	glucose & lactose	2.5, 5.0, 7.5, 10.0	room temp	1, 2, 3
	sucrose	2.5, 5.0, 7.5, 10.0	room temp	1, 2, 3
Untreated vaccine		0	room temp	1, 2, 3
Normal control		0	4℃	3

성과 효능이 높은 소단위백신에 대한 연구가 진행되고 있다.

몇 년전까지 B형 간염백신이 국내에서 생산되지 않아 외국에서 생산된 것을 수입하여 사용하였으나 현재는 여러 제약회사에서 경쟁적으로 간염백신을 비롯 많은 종류의 백신이 생산되어 국내 수요를 충족시키고도 남아 외국에 수출하는 상태로 변화되었다 [19].

우리나라는 물론 현재 외국에서 생산되고 있는 간염백신을 비롯한 거의 모든 백신은 항원부유액의 상태로 되어 있으며 냉장보관해야만 항원성을 유지할 수 있어 냉장시설이 없는 지역이나 기온이 높은 저개발국가에서는 백신의 안정성을 제대로 유지할 수 없어 질병의 예방에 큰 문제가 되고 있다. 백신을 장기간 보관하는 방법으로 여러 가지의 동결건조하는 방법이 이용되었지만 백신의 면역원성을 잘 유지시키면서 동결건조시키는 것이 쉽지 않고 비용도 많이 들어 널리 사용되지 않고 있는 실정이다. 따라서 백신의 안정성을 높여 단기간은 냉장보관하지 아니하여도 백신의 효능이 유지될 수 있는 방법이 개발된다면 어느 곳에서나 쉽게 백신접종이 이루어져 감염성질환을 효과적으로 예방할 수 있을 것이나 백신의 안정성을 증가시키기 위한 연구는 국내는 물론 외국에서도 너무나 희소한 상태다.

본 연구는 B형 간염백신의 안정성을 증대시키기 위한 노력의 하나로 몇 가지 종류의 당을 첨가한 백신을 여러 가지 다른 온도 조건에 노출시켜 백신의 안정성이 제대로 유지되는지 여부를 규명하기 위하여 시행되었다.

재료 및 방법

1. 간염 백신

주식회사 녹십자에서 제조한 hepatax B(제조번호 1330005)를 사용하였으며 1 ml중 불활 화한

B형 간염 바이러스 표면항원 단백질 20µg과 흡착제로 수산화 알루미늄겔 0.5mg 등이 들어있었다.

2. 당용액

당은 glucose, lactose 및 sucrose를 사용하였고 각각 멸균된 증류수에 녹여 5%, 10%, 15% 및 20% 용액을 만들었으며 glucose 와 lactose 혼합액은 동량의 glucose 와 lactose를 넣어 똑같은 농도로 만들어 여과, 멸균하였다.

3. 당용액의 첨가

0.5 ml의 백신에 동량의 당용액을 당의 농도별로 각각 가하여 최종 당농도가 2.5%, 5%, 7.5% 및 10% 가 되게 하였다.

4. 당을 첨가한 백신의 실온 방치

당을 첨가한 백신들은 밀봉하여 실온에 각각 1개월, 2개월 및 3개월간 방치하였고 당을 첨가하지 않은 대조백신은 멸균된 완충식염수를 동량 넣어 똑같이 실온에 1~3개월간 방치하였으며 정상대조용은 완충식염수를 동량 넣어 4℃에 3개월간 보관하였다 (Table 1).

5. 백신의 접종

방치하였던 백신들을 각각 5주령된 ICR mouse의 대퇴부 근육에 0.1 ml씩 접종하였다.

6. 혈액채취

백신접종 2주후에 심장을 천자하여 혈액을 채취하고 혈청을 분리하여 항체검사시까지 냉동보관하였다.

7. 항체검사

B형 간염바이러스에 대한 항체검사는 B형 간염바이러스의 표면항원에 대한 항체 검사키트인 유진 hepacrit-안티에스 PHA kits를 사용

Table 2. Titers of antibody against HBsAg in sera from ICR mice inoculated with sugar-added and treated HBV vaccines

Concentration of sugar(%)	Exposure		Titers of antibody against HBsAg			
	Temp.	month	Glucose	Lactose	Glucose & Lactose	Sucrose
2.5	room	1	40 40 -	20 - -	80 - -	40 - -
		2	20 - -	10 - -	10 - -	20 - -
		3	- - -	20 - -	5 - -	- - -
5.0	room	1	80 - -	- - -	20 20 -	80 5 5
		2	40 - -	- - -	10 - -	5 5 5
		3	20 - -	- - -	5 - -	- - -
7.5	room	1	80 - -	80 5 -	80 10 -	80 40 -
		2	20 - -	40 - -	20 20 -	40 40 -
		3	- - -	5 - -	- - -	20 - -
10 0	room	1	20 20 10	10 - -	10 10 -	
		2	20 - -	5 - -	20 20 -	not tested
		3	10 - -	- - -	- - -	
0	room	1	- - -			
		2	- - -			
		3	- - -			
Normal control	4°C	3	320 - -			

하였다.

결 과

Glucose, lactose, sucrose 를 각각 첨가한 백신과 glucose 와 lactose 를 같이 첨가한 백신들을 실온에 1~3 개월간 방치한 후 접종한 ICR mice의 혈청내에서 B형 간염바이러스 표면항원에 대한 항체를 조사한 결과 아래와 같은 결과를 얻었다 (Table 2).

1. 4°C에서 3개월간 보관하였던 정상대조 백신을 접종한 쥐의 혈청은 1: 320의 항체 역가를 나타내었다.

2. 당을 전혀 첨가하지 않은 백신은 실온방치 1개월에 항원성이 완전히 소실되었다.

3. glucose를 첨가한 백신 :

1) 최종 농도 2.5% : 실온에서 한달간 방치한 백신을 접종한 쥐 3마리중 2마리의 혈청내 표면항원에 대한 항체는 1: 40 이었으며 한 마리에서는 항체를 검출할 수 없었다. 2개월 방치한 것은 세 마리중 오직 한 마리만이 1: 20의 항체를 나타내었고, 3개월에는 면역원성이 완전 소실되었다.

2) 5% : 한달간 방치한 백신을 접종한 쥐 3마리 중 오직 한 마리만이 1: 80의 항체를, 2개월

간 방치한 것은 세 마리중 한 마리가 1: 40, 3개월 방치한 것은 한 마리만이 1: 20의 항체를 나타내었다.

3) 7.5% : 한달간 방치한 백신을 접종한 쥐 세 마리중 한 마리만이 1: 80의 항체를, 2개월의 경우에는 한 마리만이 1: 20의 항체를 나타내었고, 3개월의 것은 항체를 검출할 수 없었다.

4) 10% : 한달동안 방치한 백신을 접종한 3마리는 각각 1: 10, 1: 20, 1: 20의 항체를 가지고 있었고, 2개월에는 한 마리만이 1: 20의 항체를, 3개월에는 한 마리만이 1: 10의 항체를 보였다.

4. lactose를 첨가한 백신 :

1) 2.5% : 최종 lactose 농도가 2.5%인 백신을 첨가하고 1개월간 실온에 방치한 백신을 접종한 3마리중 1마리만이 1: 20의 항체를, 2개월에서는 한 마리만이 1: 10, 3개월에서는 한 마리만이 1: 20의 항체를 나타내었다.

2) 5% : 실온에 1, 2, 3 개월 방치한 백신들을 접종한 모든 쥐들에서 항체를 검출할 수 없었다.

3) 7.5% : 1개월 방치한 것은 2마리에서 각각 1: 80, 1: 5의 항체를 보였으며, 2개월에는 한 마리만이 1: 40의 항체를, 3개월에는 한 마리만이 1: 5의 항체를 나타내었다.

4) 10% : 1개월 방치한 것은 한 마리만이 1: 10,

2개월 것은 한 마리만이 1: 5의 항체를 보였으나 3개월된 것은 항체가 검출되지 않았다.

5. glucose와 lactose를 동량 첨가한 백신 :

1) 2.5% : 개월별로 3마리씩 접종하였으나 한 마리씩만이 항체를 형성하여 1개월에 1: 80, 2개월에 1: 10, 3개월에 1: 5의 항체를 나타내었다.

2) 5% : 1개월 방치한 백신을 접종한 쥐 3마리 중 2마리가 1: 20의 항체를 나타내었고, 2개월 것은 한 마리만 1: 10, 3개월 된 것은 1: 5의 항체를 보였었다.

3) 7.5% : 1개월 것은 1: 80과 1: 10을, 2개월된 것은 2마리가 각각 1: 20의 항체를 나타내었고, 3개월된 것은 항체를 증명할 수 없었다.

4) 10% : 1개월간 방치한 백신을 접종한 3마리 쥐 중 2마리만이 1: 10을, 2개월된 것은 2마리가 1: 20의 항체를 나타내었고, 3개월 된 것은 면역성이 소실되었음을 알 수 있었다.

6. sucrose를 첨가한 백신 :

1) 2.5% : 1개월간 실온에 방치한 백신을 접종한 3마리중 한 마리만이 1: 40의 항체를 나타내었고, 2개월 된 것은 한 마리만이 1: 20의 항체를 나타내었고, 3개월 된 것은 항체를 증명할 수 없었다.

2) 5% : 1개월간 방치한 백신을 접종한 3마리의 쥐혈청은 각각 1: 80, 1: 5, 1: 5의 항체를 나타내었고, 2개월 된 것은 3 마리 중 한 마리만이 1: 20의 항체를 보였고, 3개월 된 것은 항체를 증명할 수 없었다.

3) 7.5% : 1개월간 실온에 방치한 백신을 접종한 쥐 3마리중 2마리는 각각 1: 80, 1: 40의 항체를 나타내었으나 한 마리의 혈청에서는 항체를 증명할 수 없었으며, 2개월 된 것은 2마리에서 1: 40의 항체를 볼 수 있었고, 3개월된 에서는 3마리중 오직 한 마리만이 1: 20의 항체를 나타내었다.

4) 10% : 실시하지 않았다.

고 안

전염성 질환들을 예방하고자 하는 많은 시도가 있었으나 효과적으로 많은 사람들에게 적용되기 시작한 것은 1798년 에드워드 제너에 의하여 천연두의 예방법이 발표된 후이며 [20] 그 이후 콜레라 백신, 장티프스백신, 디프테리아와 파상풍백신, BCG등 여러 종류의 세균백신과 바이러스백신이 개발되었으나 효과적인 백신의 대량생산

이 이루어질 수 있게된 것은 1949년 Enders 등에 의하여 신경세포에서만 자라나는 소아마비 바이러스를 배양된 비신경세포 내에서 증식시키는 방법이 개발되었기 때문이다 [21]. 이 방법을 통하여 개발된 소아마비 백신인 Salk백신은 포르말린으로 불활화한 것인데 몇차례의 접종을 통하여 높은 예방효과를 나타내었으며 그 이후 Sabin에 의하여 약독화시킨 더 효과적이고 더 간편한 소아마비 백신이 개발되어 전세계적으로 널리 사용되어 소아마비를 효과적으로 예방할 수 있게 되었으며 이러한 백신 제조방법들은 홍역, 유행성 이하선염, 풍진등 여러 종류의 바이러스백신 제조에 널리 사용되었다 [22,23]. 이제까지 제조되었던 백신중에서 가장 효과적으로 질병을 예방한 것은 천연두 백신으로 세계보건기구가 천연두 박멸운동을 통하여 백신을 공급하고 교육함으로써 전세계에서 천연두가 사라지게 되었다 [24,25]. 그러나 에이즈같은 질병은 매년 수 많은 환자가 발생하고 있지만 아직 효과적인 백신이 개발되지 않은 상태에 있다.

B형 간염백신은 1971년 Krugman등이 B형 간염에 감염된 환자의 혈청을 1: 10으로 희석하여 98℃에서 1분간 가열처리한 것으로 New York주의 Wollowbrook 학교의 정신박아 아동들에게 주사하였던 것이 효시이며 59%에서 완전한 방어 효과가 있었다고 보고되었다 [8]. 그러나 환자의 혈청을 재료로 한 이 백신은 후에 많은 부작용이 있음이 밝혀졌고 [9,10], 그 이후 간염백신 개발에 관한 연구는 유전자 재조합기술을 이용하는 방향으로 전환되어 대장균이나 효모로부터 백신을 생산하는 방법으로 제조된 백신이 사용되고 있다 [11~18].

간염백신 뿐만 아니라 전세계에서 제조되는 거의 모든 백신들이 항원 부유액 상태로 되어 있으며 안정성이 낮아 냉장보관하지 않으면 쉽게 면역원성이 저하되는 단점이 있다. 그러나 백신을 제조하는 제약회사나 연구기관에서도 백신의 면역원성을 증강시키기 위하여 면역증강제를 개발하고자 많은 연구를 하고 있지만 백신의 안정성을 증대시키고자 하는 연구는 국내는 물론 외국에서도 찾아보기 힘들 정도로 적으며 그 연구의 대부분은 효과적인 동결건조방법을 찾아내는 것이며 아직까지도 탁월한 효과를 나타내는 방법은 나오지 않는 실정이다 [26].

Sood등은 황열백신에 여러 종류의 당과 아미

노산 등을 첨가하여 황열백신의 안정성을 증가시키기 위한 연구를 하였으며 [27], 성은 한탄바 이러스 백신과 간염백신에 sucrose를 첨가하고 아세트론 처리로 분말화하는 방법에 대하여 보고한 바 있다 [28,29].

본 연구에서는 간염백신에 sucrose외에 glucose와 lactose를 각각 2.5%, 5%, 7.5% 및 10%가 되게 첨가한 것과 glucose와 lactose를 동량으로 위의 농도로 첨가한 백신들을 실온에 1-3개월간 방치하여 백신의 면역원성의 보존효과를 비교검토하였다. 당을 전혀 첨가하지 않은 백신은 1개월내에 면역원성이 소실되었으나 당을 첨가한 백신들은 어느 정도의 보존 효과를 나타내었음을 알 수 있었다.

첫째, glucose를 첨가한 것들중 2.5% 농도의 백신을 1개월간 실온에 방치한 다음 접종한 3마리중 2마리는 1: 40의 항체를 나타내었고 한 마리는 항체를 검출할 수 없었으며, 2개월 방치후에는 한 마리에서만 1: 20의 항체를 보였고, 2마리에서는 항체를 증명할 수 없었으며, 3개월간 실온에 방치한 백신을 접종한 쥐에서는 항체를 증명할 수 없어 백신의 면역원성이 완전히 소실되었음을 알 수 있었다. 5% 농도의 당이 들어 있는 백신을 1, 2, 3개월 실온에 방치한 후 접종한 쥐들은 각각 3마리중 한 마리씩만이 항체를 보유하고 있었으며 1개월 보관시 정상대조 백신에 비하여 항체가 1/4로 감소하였고 2개월후에는 1/8로, 3개월후에는 1/16로 저하되었다. 따라서 면역원성도 항체가의 저하에 비례하여 저하되었을 것으로 생각할 수 있다. 그리고 같은 백신을 접종한 3마리의 쥐중 한 마리씩만이 항체를 보유하게 된 그 이유는 알 수 없고 쥐 각각의 개인차인지 혹은 접종문제인지 확실히 알 수 없었다. 농도가 7.5%인 경우 1개월간은 5%의 것과 같은 결과를 나타내었으나 2개월 이후부터 보존력의 차이를 나타낸 것으로 보인다. 10%농도의 것은 백신의 안정성 보전능이 다른 농도보다 낮았으며, glucose를 안정제로 사용한다면 최종농도를 5%로 하는 것이 좋을 것 같다.

둘째, lactose를 첨가한 백신들중 2.5% 농도인 백신을 1개월간 실온에 방치한 것을 접종한 3마리의 쥐중 한 마리만이 1: 20의 항체를, 2개월 된 것은 3마리중 한 마리만이 1: 10의 항체를 나타내었고, 3개월 방치한 것은 한 마리만이 1: 20의 항체를 나타내었다. 5%농도의 백신은 1,

2, 3개월 방치한 모두가 항원성이 소실된 것으로 나타났는데 실험과정중 어떤 착오가 있었던 것으로 보인다. 7.5% 농도의 백신들중 실온 방치 1개월된 백신을 접종한 쥐 3마리중 한마리는 항체가 검출되지 않았으나 2마리는 각각 1: 80 및 1: 5의 항체를 보였고, 2개월 된 백신을 접종한 쥐 3마리중 1마리는 1: 40의 항체를 나타내었고 나머지는 항체 음성이었다. 3개월 방치한 것을 접종한 쥐 3마리중 한 마리만이 1: 5의 항체를 보유하고 있었다. 10% 농도의 백신들은 1개월 방치시 3마리중 1마리만이 1: 10의 항체를, 2개월 된 것에서는 1:5의 항체를, 3개월에는 항원성이 소실되었다. Lactose를 첨가한 것중에서 가장 높은 항원보존 효과가 큰 것은 7.5%로 5% glucose와 거의 비슷한 안정능력을 가지고 있었다.

셋째, glucose 와 lactose를 동량으로 첨가한 백신들중 2.5%농도인 것과 7.5% 농도인 것은 1개월 방치시 1:80의 항체를 보여 거의 비슷한 안정성을 나타내었고, 5%와 10%인 것은 2.5%와 7.5% 보다 항원보존 능력이 낮았으며 그 이유는 알 수 없었다.

넷째, sucrose를 첨가한 백신의 경우 2.5%와 5%에서는 2개월까지는 항원성이 보존되었으며 그후에는 항원성이 급속히 소실되었으나 7.5%에서는 3개월까지도 항원성이 유지되었고 실온에서도 항원성이 저하되는 속도도 제일 완만하여 가장 안정성이 높은 농도임을 알 수 있었으며 glucose나 lactose 보다 백신의 안정성을 높이는 데 가장 효과적임을 알 수 있었다. 또 한가지 문제는 sucrose가 백신의 안정성을 유지하는 효과는 크지만 피하나 근육내로 접종이 되었을 때 그 조직에 어떤 영향을 주는 것인지 병리학적 연구가 필요할 것으로 생각된다. 또한 당이외에 아미노산이나 비타민 등을 같이 첨가하였을 때 안정성에 어떠한 영향을 줄 것인지에 대한 연구와 새로운 안정제를 개발하는 연구가 지속되어야 할 것이다.

결 론

간염 B바이러스 백신의 안정성을 높여 실온이나 더 높은 온도 조건에서도 장기간 보관할 수 있는 안정제를 개발하기 위한 노력의 일환으로 백신에 최종농도가 2.5%, 5%, 7.5%, 10%인 glucose, lactose, glucose와 lactose의 혼합물 및 2.5%, 5%,

7.5%의 sucrose를 첨가하여 실온에 각각 1개월, 2개월, 3개월 동안 방치한 후 ICR mice에 접종한 다음 혈청내의 B형 간염 바이러스의 표면항원에 대한 항체를 조사하여 비교한 결과 glucose는 최종농도가 5%, lactose와 sucrose는 7.5%가 안정제로서의 효과가 컸고 그 중에 sucrose가 간염백신의 안정성을 높이는데 가장 효과적임을 알 수 있었다.

앞으로 다른 당들이나 다른 안정제를 찾아내는 연구가 지속되어야 할 것이며 바이러스 백신을 분말화하는 새로운 방법을 개발된다면 실온이나 더 높은 온도에서도 장기간 보관할 수 있게 될 것이며 이러한 방법은 세균백신의 제조에도 적용될 수 있을 것이다.

참 고 문 헌

1. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH: Hepatitis A, Detection by immune electron microscopy of a virus-like antigen associated with acute illness. *Science* 182: 1026, 1973.
2. Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S: A "New" antigen in leukemia sera. *JAMA* 191: 541, 1965.
3. Tiollais M, Poucel C, Dejean A: The hepatitis B virus. *Nature* 317: 489, 1985.
4. Rizzetto M, Canese MG, Arico S: Immunofluorescence detection of a new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated with hepatitis virus in liver and serum of HBsAg carriers. *Gut* 18: 997, 1977.
5. Rizzetto M: The delta agent. *Hematology* 3: 729, 1983.
6. Karajannis P, Saldanha J, Monjardino J: Prevention and treatment of hepatitis delta virus infection. *Prog Clin Biol Res* 364: 377-383, 1991.
7. Beasley RP, Hwang LY, Lin CC: Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective of 22, 707 men in Taiwan, *Lancet* 2: 1129, 1981.
8. Krugman S, Giles JP, Hammond J: Viral hepatitis, type B (MS-2 strain): Studies on active immunization. *JAMA* 217: 41-45, 1971.
9. Hilleman MR, Bertland AU, Buynak EB: Clinical and laboratory studies of HBs Ag vaccine. p. 507-538 In Vyas GN, Cohen SN, Schmid R., (ed.). *Viral hepatitis*, Franklin Institute Press Inc., Philadelphia, 1978.
10. Shaw Jr FE, Graham DJ, Guess HA: Post-marketing surveillance for neurologic adverse events reported after hepatitis B vaccination experience of the first three years. *Am J Epidemiol* 127: 337-352, 1988.
11. Valenzuela P, Medium A, Rutter WJ: Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particle in yeast. *Nature* 298: 347-350, 1982.
12. McAleer WJ, Bunyak EB, Maigetler RZ, wampler DE, Miller WJ, Hileman MR: Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. *Nature* 307: 178-180, 1984.
13. Scolnic EM, Mclean AA, West DJ, McAleer WJ, Miller WJ, Buynack EB: Clinical evaluation in healthy adults of a hepatitis B vaccine made by recombinant DNA. *JAMA* 251: 2812-2815, 1984.
14. Emini EA, Ellis RW, Miller WJ, McAleer WJ, Scolnic EM, Gerety RJ: Production and immunological analysis of recombinant hepatitis B virus vaccine. *J Infect* 13Z (suppl A): 3-9, 1986.
15. Peterman JH: Specification and quality control of a yeast-derived hepatitis B vaccine. *Postgrad Med J* 63 (suppl 2): 97-100, 1987.
16. Petre J, Van Wijnendaele F, DeNeys B: Development of a hepatitis B vaccine from transformed yeast cells. *Postgrad Med J* 63 (suppl 2): 73-81, 1987.
17. Hauser P, Thomas HC, Water J: Induction of neutralizing antibodies in chimpanzees and humans by a recombinant yeast-derived hepatitis surface antigen particle p1031-1037. In Zuckerman AJ, (ed.), *Viral hepatitis and liver disease*. Aln R Liss New York, 1988.
18. Park M, Kim SJ, Gu M, Jung K, Song H, Park K, Kim KH: Studies on the Yeast-derived Hepatitis B Vaccine. *J Kor Soc Virol* 18: 11-19, 1988.
19. Shin KH: Licensure for Development of New Vaccines in Korea. *Kor J Infec Dis* 27: 221-237,

- 1995.
20. Jenner E: An inquiry into the causes and effect of the variab;e vaccines, a disease dis- covered in some od the western countries of England, particularly Gloucestershire and known by the name of complex. Reprinted p213-240. In camac (ed.), Classics of Medicine and Surgery. NewYork, Dover. 1959.
 21. Enders JE, Weller TH, Robbin FC: Cultivation of Lansing strain of poliomyelitis virus in culture of varius human embryonic tissues. Science 109: 85, 1945.
 22. Salk JE: A concept of the mechanism of immunity for preventing poliomyelitis. Ann NY Acad Sci 61: 1023, 1955.
 23. Sabin AB: Dral Poliovirus vaccine : Recent results and recommendations for optimum use. R Soc Health J 2: 51, 1962.
 24. Arita I: Virological evidence for the success of the smallpox eradication program, 279:293, 1979.
 25. Fenner F, Henderson DA, Arita I, Jezek Z, Ladnyi ID: Smallpox and its eradication. Geneva: World Health Organization. 1988.
 26. Bennet PS, Maigetler RZ, Oslon MG, Provost PJ, Scattergood EM, Schofield TL: The effect of freezing-drying on the potency and stability of live varicella vaccine. Developments in Biological Standardization 74: 215-221, 1992.
 27. Sood DK, Aggarwal RK, Sharma SB, Sckhey J, Singh H: Study on the stability of 170-204 yellow fever vaccine before and after stabilization. Vaccine 11: 1124-1128, 1993.
 28. Seong I: Stability of sucrose-acetone treated Hantaan virus vaccine. J Kor Soc Virol29. Seong I: Stability of sucrose-containing Hepatitis B virus vaccine. 25: 147-153, 1995.
 30. Seong I: Effect of addition of sugars on the stability of Hantaan virus vaccine. J Kor Soc Virol 26: 245-249, 1996.
-