

T-cell Epitope를 운반할 수 있는 재조합소아마비바이러스 벡터의 제조 및 특성연구

목암 생명공학 연구소 고등생물유전자발현실

조성필 · 이범용 · 정수일 · 민미경

=Abstract=

Construction and Characterization of Recombinant Poliovirus that Delivers T-cell epitope

Seong-Pil Cho, Bum-Young Lee, Soo-Il Chung and Mi-Kyung Min

Eukaryotic Gene Expression Lab, Mogam Biotechnology Research Institute, Youngin 449-910, Korea

Recombinant polioviruses have been developed by many research groups for use as vaccine vector because poliovirus induces mucosal immunity as well as humoral immunity through oral uptake.

We assessed the potential use of poliovirus as a T-cell epitope carrier. Recombinant poliovirus V129 5L was constructed to have a substituted T-helper epitope from the core protein of Hepatitis B virus at neutralization antigenic site 1 on its VP1 capsid protein. The recombinant virus replicated less efficiently than type 1 poliovirus Mahoney strain. The V129 5L formed a little smaller plaques than the Mahoney strain and showed some 1.25 log unit lower titer at the peak in the one-step growth kinetics though it had similar growth profile to that of the Mahoney strain.

Since V129 5L recombinant virus was genetically stable even after 24 successive passages in HeLa cells, the antigenic site 1 on VP1 capsid protein was confirmed for its ability of carrying T cell epitope. The genetic stability of V129 5L also indicated that recombinant poliovirus can be successfully utilized for the development of the multivalent vaccines.

Key Words: Poliovirus, Hepatitis B virus, T-Helper epitope, Multivalent vaccine

서 론

소아마비바이러스 (poliovirus)는 picornaviridae과에 속하는 human enterovirus로서 소장점막을 통하여 침투한 후 중추신경계의 세포들을 파괴하여 소아마비를 일으킨다 [1]. 혈청학적으로 type 1 (Mahoney), type 2 (Lansing), type 3 (Leon) 세가

지의 혈청형으로 구분되는데 [2], 각각에 대한 약독화 바이러스들이 백신으로 사용되고 있다.

소아마비바이러스의 genome은 단일가닥으로 된 7.5 kb의 (+)RNA 이고 [3], 이 genome으로부터 한 개의 긴 polypeptide가 합성되는데 바이러스로부터 발현된 단백질가수분해효소 (2A, 3C, 3CD)에 의하여 절단되어 바이러스증식에 필요한 형태를 갖추게 된다. Capsid는 VP1, VP2, VP3,

본 연구는 1995년도 과학기술부 특정연구개발사업 과제 4-2-62 연구지원에 의한 결과임

Corresponding author: Mi-Kyung Min, Eukaryotic Gene Expression Lab, Mogam Biotechnology Research Institute, Youngin 449-910, Korea

VP4 네가지 단백질로 구성되어 있는데 이들에 대한 중화항체가 유도되는 것으로 알려져 있다. 중화항원위치 1 (antigenic site 1)은 VP1의 93-104번째 아미노산에 의하여 형성되는 B-세포 epitope를 포함하는 linear loop 구조로서, 양옆에는 β -sheet 구조가 위치해 있다 [4,5]. 중화항원위치 1을 이종바이러스의 antigenic epitope으로 치환시켜 다가백신을 개발하기 위한 시도로 제조된 여러가지 재조합바이러스들이 보고되었다.

Jekins 등은 중화항원위치 1을 human papillomavirus type 16의 capsid단백질인 L1으로부터의 16개 아미노산으로 된 antigenic domain으로 치환한 재조합바이러스로 토끼를 면역하였을 때 L1 단백질을 특이적으로 인지하는 항체가 생성됨을 보고하였다 [6]. 또한 Evan 등은 HIV-1 gp41로부터의 antigenic epitope를 발현하는 재조합바이러스를 제조하였고 이 바이러스로 면역된 토끼에서 HIV-1에 대한 중화항체가 유도됨을 보고하였다 [7].

Hepatitis B virus (HBV)에 의한 성인 간염환자의 경우 2~10% 정도는 치유되지 못하고 만성간염으로 전이되는데, 이들 만성간염환자에게서는 HBV에 대하여 특이성을 갖는 cytotoxic T lymphocyte (CTL)이 약하게 유도되는 특성이 알려져 있다 [8,9,10]. 또한 HBV genome을 발현하는 transgenic mouse에 HBV에 특이성을 보이는 CTL을 정맥주사하여 주입하였을 때 혈액내의 HBV RNA양이 감소함이 보고되었다 [11,12]. 이 결과들은 병원균에 의한 질병중 일부는 치유과정에서 CTL과 밀접하게 관련되어 있음을 시사한다. 따라서 어떤 병원균에 대하여 CTL이 약하게 유도되어 질병에 걸린 환자를 치유하기 위하여는 CTL을 강하게 유도시키는 것이 중요하다.

CTL과 더불어 T-helper lymphocyte도 면역작용에 있어서 중요한 역할을 수행하는데 항체생성과 CTL의 유도를 도와주는 것으로 알려져 있다. 이와같이 인체내의 면역기능에 있어서 humoral immunity뿐만 아니라 T-helper lymphocyte와 cytotoxic T lymphocyte가 관여되는 cell-mediated immunity의 역할 또한 매우 중요하기 때문에 백신에 의한 면역효과를 극대화하기 위하여는 T lymphocyte를 효과적으로 유도할 수 있어야 한다. 본 연구에서는 소아마비바이러스를 T lymphocyte epitope을 운반하는 매개체로 사용할 수 있을지를 알아보려고 중화항체위치 1에 HBV core단백

질 (HBc)의 T-helper epitope p129-140 [13]를 치환시킨 재조합바이러스를 제조하여 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 바이러스 및 동물세포 배양

바이러스증식에 이용한 HeLa cell은 DMEM (10% FBS, penicillin-streptomycin, kanamycin)이 들어있는 polystyrene tissue culture flask에 접종하여 37°C에서 배양하였고 완전한 monolayer를 형성하면 다시 계대배양하였다.

적절히 자란 HeLa monolayer에 바이러스를 감염시키고 cytopathic effect (CPE)를 보일 때까지 배양하였다. 배양액을 동결과 해빙과정을 3회 반복하여 세포를 파쇄하고 2000g에서 10분간 원심 분리하여 세포파편을 제거하고 상층액만을 소분하여 -70°C에서 보관하였다.

2. DNA 조작

중화항체부위 1을 HBc T helper epitope으로 치환한 재조합바이러스를 제조하기 위하여 poliovirus type 1 (Mahoney) cDNA를 그림 1에 나타난 바와 같이 조작하여 최종적으로 VP1 coding sequence의 *SphI*과 *HindIII* site를 제거하고 HBc T helper epitope sequence로 치환한 재조합DNA를 제조하였다. 치환기는 oligomer를 annealing 한 후 ligation하여 만들었고 사용된 oligomer들은 다음과 같다.

A; CCCTCCTGCCTATAGGCCT

a; TGGAGGCCTATAAGCAGGAGGGCATG

B; CCAAATGCCCCTATCCTAA

b; AGCTTTAGGATAGGGGCATT

Oligomer A와 a, B와 b를 annealing하여 Aa, Bb를 만들고 서로 ligation하였다.

Linker 5L의 제조에 사용된 oligomer는 다음과 같다.

5L-A; CGTGACCATTATGACCGTGGATGCA-GCAGCATG

5L-B; CTGCTGCATCCACGGTCATAATGGT-CACGCATG

3. In vitro transcription 및 RNA transfection

바이러스 cDNA의 3' poly A tail뒤에 위치해 있는 *EcoRI* site를 절단한 후 T7 RNA polymerase

(Boehringer Mannheim)를 사용하여 RNA를 합성하였다.

In vitro에서 합성된 RNA로부터 바이러스를 얻기 위하여 다음과 같이 하였다. 35mm dish에서 70~80% 정도 자란 HeLa monolayer를 Opti-MEM (GibcoBRL)으로 2회 세척하고 20 μ g lipofectamin (GibcoBRL), 3~5 μ g viral RNA를 포함하는 Opti-MEM을 처리한 후 37 $^{\circ}$ C에서 배양하였다. 4~5시간 배양한 후 PBS로 2회 세척하고 2ml DMEM을 넣어준 후 37 $^{\circ}$ C에서 배양하면서 현미경으로 virus particle생성에 의한 CPE를 관찰하였다.

4. 바이러스 정제

Minor [14]의 방법에 따라 다음과 같이 수행하였다. 2.07g의 cesium chloride (CsCl)를 바이러스 배양액을 넣고 완전히 용해시킨 다음 Nonidet P-40을 45 μ l넣고 PBS로 4.5ml 되도록 하였다. 4 $^{\circ}$ C에서 14,000g로 20시간 초원심분리하여 얻은 CsCl gradient의 분획 중 바이러스를 포함하는 분획만을 모아서 Centriprep-100 (Amicon)을 사용하여 잔류하는 CsCl을 제거하고 농축하였다.

5. Plaque assay 및 one-step growth curve

바이러스 역가를 조사하기 위하여 plaque assay 방법을 사용하였다. 60mm dish에서 70~80% 정도 자란 HeLa cell에 바이러스를 접종하여 실온에서 30분 방치하여 흡착시키고 PBS로 2회 세척하여 흡착되지 않은 바이러스를 제거하였고 HeLa monolayer 위에 overlay medium을 붓고 agarose가 완전히 굳을 때까지 실온에 방치하였다. Overlay medium은 DMEM에 1.5% SeaPlaque agarose (FMC), 5% FBS, penicillin-streptomycin, kanamycin을 첨가하여 사용하였다. Agarose가 완전히 굳으면 dish를 뒤집어 37 $^{\circ}$ C에서 plaque이 형성될 때까지 배양하였다. 형성된 plaque은 0.2% crystal violet용액으로 염색하여 확인하였다.

One-step growth kinetics를 알아보기 위하여 35mm dish의 80~90% 자란 HeLa cell에 10 m.o.i. (multiplicity of infection)농도로 바이러스를 접종하고 실온에서 30분간 방치하여 바이러스를 cell에 흡착시켰다. PBS로 2회 세척하여 부착되지 않은 바이러스를 제거하고 DMEM (10% FBS) 1.5ml을 넣은 후 지정된 시간동안 37 $^{\circ}$ C에서 배양하였다. 동결과 해빙과정을 3회 반복하여 세포를 파쇄하였고 세포파쇄액속의 바이러스 역가를 pl-

aque assay법으로 조사하였다.

6. Reverse transcription PCR (RT-PCR)

바이러스로 감염된 HeLa cell로부터 전체 RNA를 분리하기 위하여 Trizol reagent (GibcoBRL)을 사용하였다. 바이러스로 감염된 35mm dish의 HeLa cell로부터 분리된 전체 RNA는 DEPC-water 50 μ l에 현탁시키고 10 μ l RNA를 cDNA 합성에 이용하였다. First strand cDNA를 합성하기 위하여 Superscript preamplification system (GibcoBRL)을 이용하였고 primer로는 oligo-dT primer를 사용하였다.

치환된 부위를 증폭하기 위한 PCR에서 50 μ l 반응액에 대하여 cDNA 3 μ l를 template로 사용하였고 VP1 부위의 5'말단과 3'말단에 대한 oligomer (각 50pmol)를 primer로 이용하였다. PCR은 94 $^{\circ}$ C에서 1분 denaturation, 55 $^{\circ}$ C에서 1분 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 3분 primer extension조건으로 하여 30 cycle 반복하였다.

결 과

1. 재조합바이러스의 제조

외래의 T cell epitope를 발현하는 viral vector 개발을 위하여 소아마비바이러스 type1 Mahoney strain의 중화항체부위 1을 HBV core 단백질의 mouse T-helper epitope (p129-140)으로 치환시킨 재조합바이러스 V129 5L을 제조하였다. 재조합 바이러스의 제조방법과 genome의 구조는 그림 1에 나타낸 바와 같다. 소아마비바이러스의 cDNA에는 각각 5개, 3개의 *Sph*I과 *Hind*III site가 있기 때문에 먼저 중화항체부위 1을 포함하는 DNA 절편을 pBluescript II SK(+)로 subcloning한 다음 *Sph*I과 *Hind*III site를 절단하고 T-helper epitope을 coding하는 polynucleotide로 치환하였다. T-helper epitope으로는 Milich 등 [13]에 의하여 보고된 HBc의 129-140번 아미노산으로 구성된 12-mer peptide를 사용하였다. 치환된 부위를 포함하는 *Nhe*I과 *Sna*BI으로 절단된 DNA fragment를 pT7PVM의 *Nhe*I, *Sna*BI site와 치환하여 pW129를 제조하였다.

pW129로부터 합성된 RNA를 HeLa cell에 transfection하였을 때 바이러스를 얻을 수 없었다. 중화항체부위 1은 VP1의 93-104번째 아미노산으로 구성되는데 치환시 사용된 VP1 유전자의 *Sph*I

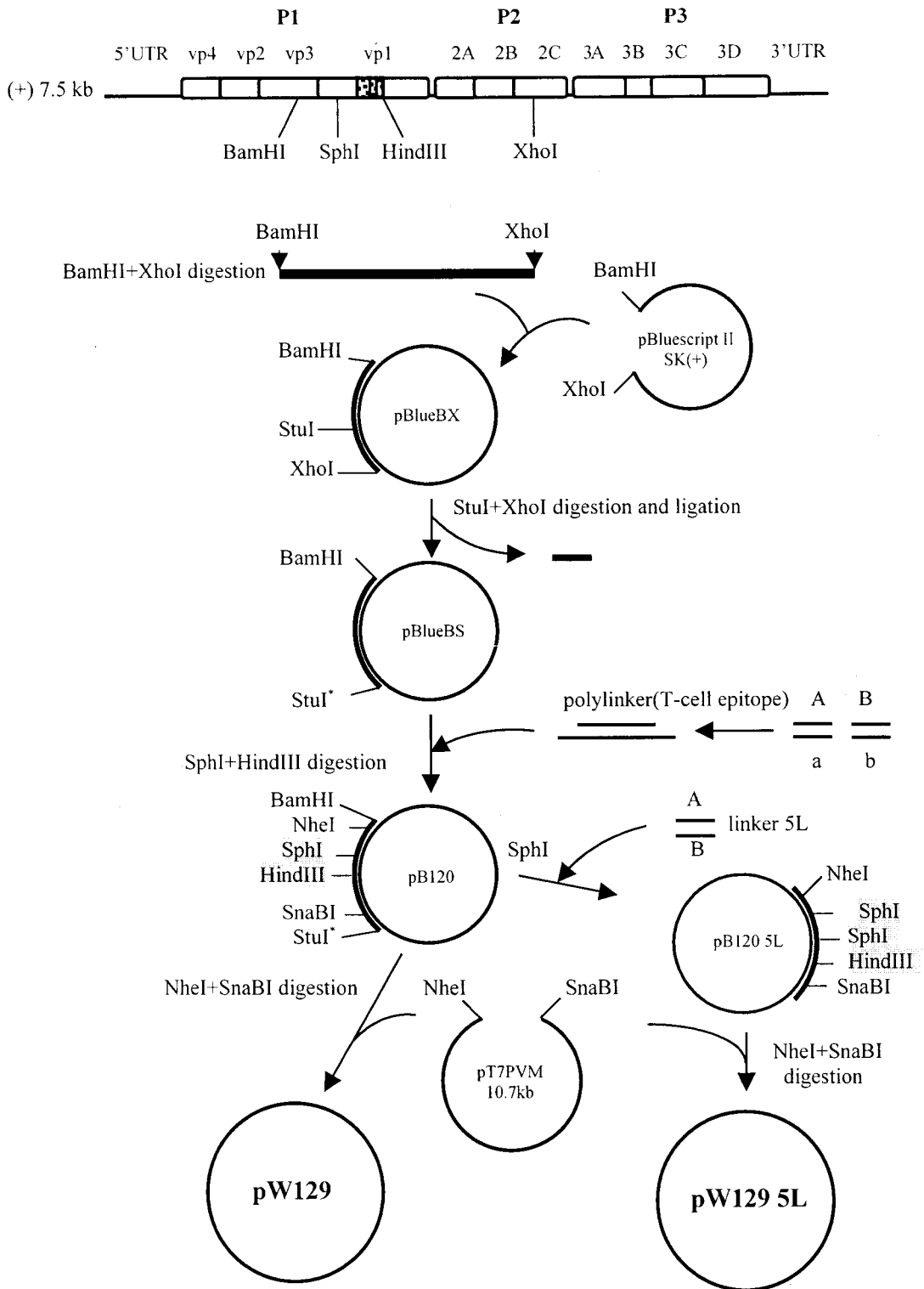


Fig. 1. Construction scheme for pW129 and pW129 5L. ■ represents neutralization antigenic site 1. StuI* indicates this site is no longer available.

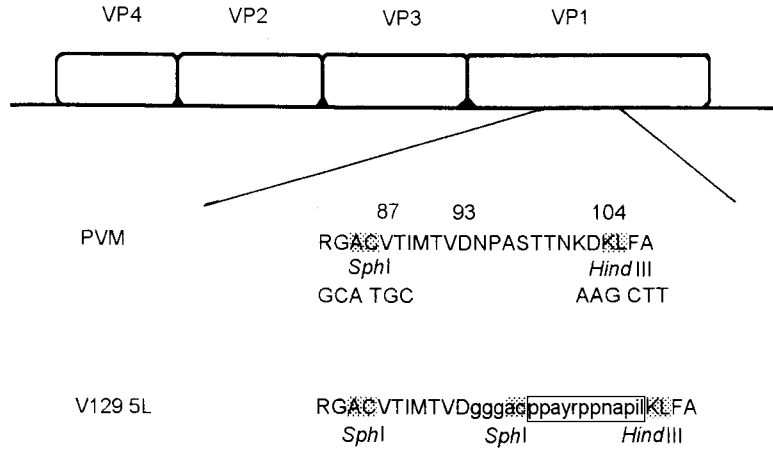


Fig. 2. Genomic organization of polioviral vectors. Amino acid sequences surrounding substitution points are indicated. Lowercase amino acids mark exogenous sequences. Amino acids within box represent T-helper epitope from HBV.

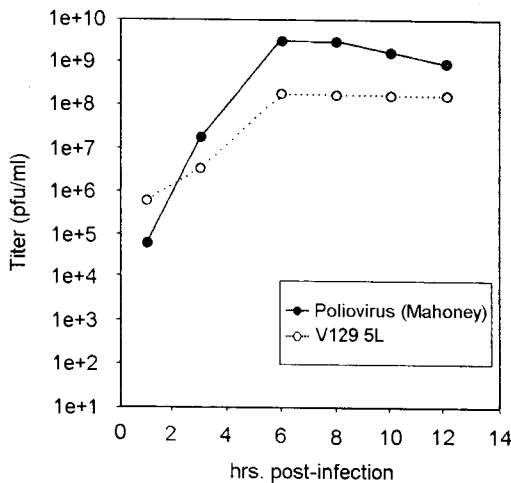


Fig. 3. Plaque formation by Mahoney strain (left) and V129 5L (right). HeLa monolayer cells were infected with viral stocks and stained with 0.2% crystal violet at 72 hr postinfection.

과 *HindIII* site는 각각 85, 103번째 아미노산 codon에 해당한다. 따라서 *SphI* site의 사용에 의하여 증화항체부위 1의 N-말단 앞의 7개 아미노산이 소실되게 되는데 이 부위는 β -구조에 해당한다. pW129로부터 합성된 RNA로부터 재조합바이러스를 얻을 수 없었던 이유가 β -구조의 손상으로 VP1 단백질이 바이러스입자 형성에 필요한 적절한 형태를 갖추지 못하였기 때문인 것으로 추측

되었다. 따라서 손실된 아미노산을 회복시켜주고자 polynucleotide linker 5L을 *SphI* site에 삽입시킨 pW129 5L을 제조하였다. Linker 5L에는 β -구조를 형성해 주기 위한 아미노산 codon (VTIMTVD) 외에 3개의 glycine codon을 첨가하여 β -구조 사이에 위치하게 되는 α -helix 구조의 Th epitope에 flexibility를 부여하고자 하였다.

pW129 5L을 주형으로 하여 합성된 RNA를 HeLa cell에 transfection하였을 때 CPE를 관찰할 수 있었고 transfection으로부터 얻은 supernatant의 일부를 HeLa monolayer에 처리한 후에도 CPE를 관찰할 수 있었다. 2차 CPE는 transfection에서 나타난 CPE가 바이러스생성에 의한 것임을 의미한다. 새롭게 제조된 재조합소아마비바이러스의 분자수준에서의 확인을 위하여 VP1 유전자에 대하여 RT-PCR을 수행하고 합성된 PCR DNA에 *StuI*를 처리하여 Th epitope이 유지되고 있음을 확인하였다. 치환에 사용한 polynucleotide의 Th epitope sequence에는 *StuI* site가 있기 때문에 바이러스 genome이 Th epitope를 그대로 유지하고 있다면 *StuI*에 의하여 PCR DNA는 2개의 fragment로 절단되는데 전기영동하여 분석하였을 때 2개의 fragment를 관찰할 수 있었고 모두 예측된 크기를 보여주었다. 치환부위를 정확히 조사하고자 RT-PCR로부터 얻어진 DNA를 pBluescriptII에 subcloning한 후에 sequencing하여 치환부위의 염기서열이 변화되지 않았음을 확인하였다.

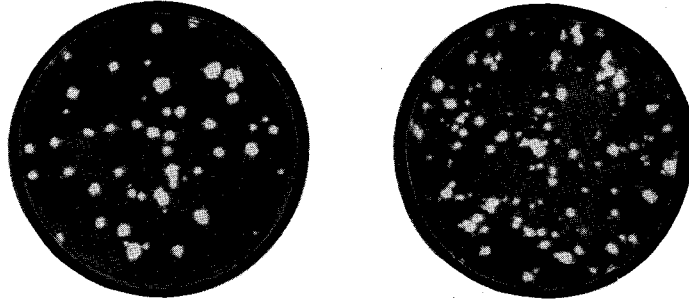


Fig. 4. One-step growth curves of Mahoney strain and V129 5L. HeLa cells were infected with diluted viral stocks at a multiplicity of infection of 10, harvested at the time indicated, and lysed by repeated freezing and thawing. And then virus titers of cell lysates were determined.

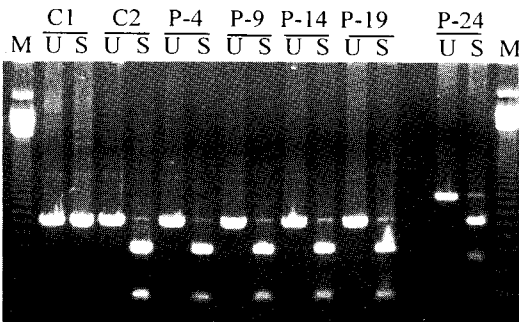


Fig. 5. Genetic stability of V129 5L. Viruses from single plaque was serially passaged on HeLa cells. RT-PCR was performed to amplify VP1 gene comprising the substituted sites on viral genomes from passage No. 4, 9, 14, 19, and 24. Products were digested with *StuI* and analyzed by electrophoresis on a 1.2% agarose gel. VP1 region was also amplified from plasmids pT7PVM (C1) and pW129 5L (C2) and treated with *StuI* as control. P; passage No, U; PCR DNA uncut, S; *StuI*-digested, M; 123 ladder.

2. 재조합바이러스의 성장조사

중화항체부위 1의 치환에 의하여 재조합바이러스의 복제양상이 변화되는 지를 알아보기 위하여 plaque assay와 one-step growth kinetics를 수행하였다.

재조합바이러스를 HeLa monolayer에 감염시켜 얻은 plaque은 poliovirus type 1 strain에 의하여 형성된 plaque보다 약간 작았다 (그림 3). One-step growth curve에서는 type 1 strain과 V129 5L 모두 postinfection 6시간에서 최대 역가에 도달하였고 이때의 역가는 V129 5L이 type 1 strain보다 약 1.25 log unit 정도 낮았다 (그림 4).

3. 재조합바이러스의 genome안정성 조사

Poliovirus는 point mutation이나 deletion같은 유전적 변이가 심한 것으로 알려져 있기 때문에 V129 5L genome에서 치환부위의 안정성을 조사하고자 하였다.

Genome의 안정성을 조사하고자 바이러스를 HeLa monolayer에서 계대배양하였다. 계대배양으로부터 얻어진 바이러스 genome의 VP1 유전자에 대하여 RT-PCR하였고, 얻어진 DNA에 *StuI*를 처리하여 절단되는 DNA의 양으로 genome의 안정성을 분석하였다 (그림 5). 24계대까지 배양한 후에 4, 9, 14, 19, 24계대로부터의 바이러스 genome을 조사하였는데 대조구로 사용된 plasmid pW129 5L의 PCR DNA에 *StuI*를 처리하였을 때와 유사하였다.

고 찰

소아마비바이러스백신은 경구투여에 의하여 humoral immunity와 mucosal immunity를 유도하기 때문에 소아마비바이러스를 이용하여 다른 병원균에 대하여도 면역원성을 갖도록 하는 다가백신 (multivalent vaccine)을 개발할 경우 기존의 백신들이 주사제로서 투여가 번거로운 단점을 해결할 수 있다. 또한 불활화 (killed)바이러스를 사용하지 않고 약독화 (attenuated)바이러스를 사용하기 때문에 소량으로도 동일한 효과를 얻을 수 있다.

지금까지 중화항체부위 1을 치환하여 제조된 바이러스들은 모두 구조가 비슷한 B-cell epitope으로 치환하여 제조된 것으로 동물에 면역하였

결 론

을 때 해당 병원균에 대한 중화항체를 유도함이 보고되었다. 그러나 이러한 재조합바이러스들은 HBV에 의한 질병과 같이 치료에 T-cell이 관여되는 cell-mediated immunity가 중요한 역할을 하는 질병을 퇴치하기 위한 목적에는 적합하지 않다.

중화항체부위 1은 linear loop구조로 양옆에 β -구조가 자리잡고 있어서 치환될 수 있는 외부항원이 매우 제한적이다. 따라서 본 연구에서는 소아마비바이러스가 T-cell epitope을 운반할 수 있는 vector로서 사용될 수 있는지를 알아보기 위하여 중화항체부위 1을 T-helper epitope으로 치환시킨 재조합바이러스를 제조하고자 하였다. VP1 유전자의 *SphI*과 *HindIII* site 사이를 Th epitope으로 치환시킨 DNA pW129로부터는 바이러스를 얻을 수 없었다. 그 이유로 치환시 중화항체부위 1의 N-말단쪽의 7개 아미노산이 결여되게 되는데 그로 인해 β -구조의 일부가 손상되고 결국 VP1 단백질이 바이러스입자형성에 이용될 수 있는 적절한 형태를 갖출 수 없었던 것으로 사료되었다. 결여된 아미노산을 보충하고 β -구조사이에 위치하게 되는 α -helix에 flexibility를 부여하고자 glycine 3개를 첨가한 polynucleotide linker를 *SphI* site에 삽입하여 만든 pW129 5L로부터 합성된 RNA로부터는 재조합바이러스를 얻을 수 있었고 24세대까지도 genome이 안정하게 유지되었다. 이는 polynucleotide linker에 의하여 보충된 아미노산이 VP1이 적절한 형태를 갖추도록 하였음을 의미한다. Plaque assay에서 재조합바이러스의 plaque이 Mahoney strain에 의하여 형성된 plaque보다 약간 작았고 one-step growth curve에서도 가장 높은 역가를 보이는 시간에서의 역가차이가 1.25 log unit으로 낮은 차이를 보였다. 이와 같은 적은 차이들은 VP1 단백질이 매우 안정하고 적절한 형태를 갖추고 있음을 뒷받침한다.

HBV의 core 단백질로부터의 T-helper epitope을 발현하도록 제조된 재조합 소아마비바이러스 V129 5L은 genome에서 치환된 부위가 안정하게 유지되고 또한 복제시 높은 역가를 나타냈는데 이는 소아마비바이러스가 B-cell epitope뿐만 아니라 T-cell epitope의 운반체로도 사용될 수 있는 가능성을 시사한다.

현재 CTL epitope운반체로의 사용가능성을 연구 중이며 이를 통하여 가장 성공적인 백신의 하나인 약독화 소아마비바이러스를 다른 질병퇴치에 이용할 수 있게 될 것이다.

소아마비바이러스의 중화항체부위 1을 HBV의 core단백질로부터의 murine T-helper epitope으로 치환시킨 재조합바이러스 V129 5L을 제조하였다. 재조합바이러스를 HeLa monolayer에 감염시킨 후 전체 RNA를 분리하고 VP1 단백질을 coding하는 부위에 대하여 RT-PCR하여 재조합바이러스 genome의 치환부위가 안정되게 유지되고 있음을 확인하였다.

Plaque assay와 one-step growth curve방법을 이용하여 재조합바이러스의 복제특성을 분석하였다. 바이러스 assembly에 가장 중요한 capsid 단백질중의 하나인 VP1에서 치환을 하였음에도 불구하고 type 1 strain과 비교하였을 때, 최대역가차이를 보인 postinfection 6시간에서의 역가차이가 약 1.25 log unit정도로 작은 차이를 보였고 plaque의 크기에서도 type 1 strain보다 약간 작았다.

재조합바이러스 V129 5L 제조를 통하여 VP1 중화항체부위 1의 upstream sequence가 바이러스입자형성에 중요함을 알 수 있었고 소아마비바이러스가 T cell epitope의 운반체로 사용될 수 있음을 확인하였다.

참 고 문 헌

1. Bodian D: Emerging concept of poliomyelitis infection. Science 12: 105-108, 1995.
2. Murphy BR, Chanock RM: Immunization against viruses. p.522 In Fields BNF and Knipe DM (ed.), Virology. Raven press Inc., New York, 1985.
3. Kitamura N, Semler BL, Rothberg PG, Larsen GR, Adler CJ, Dorner AJ, Emini EA, Hanecak R, Lee JJ, van der Werf S, Anderson CW, Wimmer E: Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. Nature 291: 547-553, 1981.
4. Wiegers KJ, Dernick R: Binding site of neutralizing monoclonal antibodies obtained after in vivo priming with purified vpl of poliovirus type 1 is located between amino acid residues 93-104. Virology 157: 248-251, 1987.
5. Hogle JM, Chow M, Filman DF: Three di-

- mensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. *Science* 229: 1358-1365, 1985.
6. Jenkins O, Cason J, Burke KL, Lunney K, Gillen A, Patel D, Almond JW: An antigenic chimera of poliovirus induces antibodies against human papillomavirus type 16. *J Virol* 64: 1201-1206, 1990.
 7. Evans DJ, Mckeating J, Meredith JM, Burke KL, Katrak K, John A, Ferguson M, Minor PD, Weiss RA, Almond JW: An engineered poliovirus chimera elicits broadly reactive HIV-1 neutralizing antibodies. *Nature* 339: 385-388, 1989.
 8. Bertoletti A, Ferrari C, Fiaccadori F, Penna A, Margolskee R, Schlicht HJ, Fowler P, Guilhot S, Chisari FV: HLA class-I restricted human cytotoxic T cells recognize endogenously synthesized hepatitis B virus nucleocapsid antigen. *Proc Natl Acad USA* 88: 10445-10449, 1991.
 9. Nayersina R, Fowler P, Guilhot S, Missale G, Cerny A, Schlicht HJ, Vitiello A, Chesnut R, Person JL, Redeker AG, Chisari FV: HLA A2 restricted cytotoxic T lymphocyte response to multiple hepatitis B surface antigen epitopes during hepatitis B virus infection. *J Immunol* 150: 4659-4671, 1993.
 10. Rehmann B, Fowler P, Sidney J, Person P, Redeker A, Brown M, Moss B, Sette A, Chisari FV: The cytotoxic T lymphocyte response to multiple hepatitis B virus polymerase epitopes during and after acute viral hepatitis. *J Exp Med* 181: 1047-1058, 1995.
 11. Guidotti LG, Ando K, Hobbs MV, Ishikawa T, Runkel L, Schreiber RD, Chisari FV: Cytotoxic T lymphocytes inhibit hepatitis B virus gene expression by a noncytolytic mechanism in transgenic mice. *Proc Natl Acad USA* 91: 3764-3768, 1994.
 12. Guidotti LG, Ishikawa T, Hobbs MV, Matzke B, Schreiber R, Chisari FV: Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 4: 25-36, 1996.
 13. Milich DR, Hughes J, Mclachlan A, Thornton G, Moriarty A: Hepatitis B synthetic immunogen comprised of nucleocapsid T-cell sites and an envelope B-cell epitope. *Proc Natl Acad USA* 85: 1610-1614, 1988.
 14. Miner PD: Growth, assay and purification of picornaviruses. p.37-40. *In* Mahy BWJ (ed.), *Virology*. IRL Press Inc., Oxford, 1985.
-