

## 구제역의 병리기전 및 진단, 예방백신 개발

문선화 · 양주성\*

성균관대학교 유전공학과

### Pathogenesis, Diagnosis, and Prophylactic Vaccine Development for Foot-and-Mouth Disease

Sun-hwa Moon and Joo-Sung Yang\*

Department of Genetic Engineering, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea

Received November 25, 2005; Accepted December 7, 2005

Foot-and-mouth disease (FMD) is a highly contagious disease of mammals and has a great potential for causing severe economic loss in susceptible cloven-hoofed animals, such as cattle, pigs, sheep, goats and buffalo. FMDV, a member of the Aphthovirus genus in the Picornaviridae family, is a non-enveloped icosahedral virus that contains a positive sense RNA of about 8.2 kb in size. The genome carries one open reading frame consisting of 3 regions: capsid protein coding region P1, replication related protein coding region P2, and RNA-dependent RNA polymerase coding region P3. FMDV infects pharynx epithelial cell in the respiratory tract and viral replication is active in lung epithelial cell. Morbidity is extremely high. A FMD outbreak in Korea in 2002 caused severe economic loss. Although intense research is undergoing to develop appropriate drugs to treat FMDV infection, there is no specific therapeutic for controlling FMDV infection. Moreover, there is an increasing demand for the development of vaccine strategies against FMDV infection in many countries. In this report, more effective prevention strategies against FMDV infection were reviewed.

**Key words:** FMDV, DNA vaccine, Edible vaccine, Peptide vaccine

### 서 론

Foot-and-Mouth Disease(FMD)란 소, 돼지, 양, 염소 등의 cloven-hoofed 동물에서 나타나는 바이러스성 질병으로 입, 코, 유두, 발굽 등에 수포가 형성되는 것이 특징이다. 이 병은 모든 동물 질병 중에서 가장 전염력이 강한 질병의 하나로써 사회 경제적으로 미치는 영향이 크기 때문에 국제수역사무국(國際獸疫事務局; Office International des Epizooties, OIE)에서 A 급 질병(전파력이 빠르고 국제교역상 경제피해가 매우 큰 질병)으로 분류하여 관리하고 있으며, 대부분 국가에서도 제1종 가축전염병으로 지정하여 관리하고 있는 질병이다.<sup>1,2)</sup>

Foot-and-Mouth Disease virus(FMDV)는 넓은 host range를 가지고 있으며, 침입력이 강할 뿐만 아니라 감염범위가 넓다. 폐사율은 높지 않지만 어린 가축에서는 높은 폐사율을 보인다. 잠복기간은 동물마다 다르나 약 6~10일 정도로 짧다. 또한 임상증상을 나타내기 이전에 이미 바이러스를 체외로 배설하기

때문에 전파가 쉽게 일어날 수 있다. 감염 발병한 동물은 많은 양의 바이러스를 체외로 배설하며 특히 호흡기로 배설된 바이러스는 최고 250 km까지 공기로 전파를 일으킬 수 있다.<sup>1)</sup> FMDV는 호흡기, 소화기, 생식기를 통해 감염이 되는데, 소, 양, 염소 등은 호흡기감염이 잘 일어나고 돼지는 일반적으로 소화기감염을 일으킨다. 돼지는 일반적으로 고농도의 바이러스를 배설하기 때문에 구제역 바이러스의 아주 중요한 amplifying host로 간주되고 있으며, 소는 구제역 바이러스에 민감하므로 바이러스의 존재를 알 수 있는 indicator host로 인식되어있다. 양은 구제역 바이러스에 의한 증상이 경미하기 때문에 쉽게 간과되어 이 병 전파에 상당한 원인이 되고 있다.<sup>3,4)</sup>

구제역은 대부분 아시아, 중동지방, 아프리카, 남아메리카에 상재하고 있으며 이 병이 발생을 근절하였거나 오래 동안 발생이 없는 나라는 북미주, 오스트레일리아, 뉴질랜드, 서유럽국가 등이다. 최근에 아시아와 유럽 등지에서 계속 문제되고 있는 구제역은 Pan-Asia O type으로 명명된 독특한 바이러스에 의한 것으로 확인되었다. 이 바이러스는 1990년 인도 북부지방에서 처음 분리된 이래 서쪽으로는 1996년에 터키, 그리스까지 확산되었으며, 동쪽으로는 네팔을 거쳐 1999년에 타이완에 까지 전파되었다.<sup>1,2)</sup> FMDV O type으로 인한 피해로 영국에서는 약 4

\*Corresponding author  
Phone: +82-31-290-7868; Fax: +82-31-290-7906  
E-mail: jsyang@skku.edu

백만 마리 이상의 가축이 도살되어 7억 파운드 이상의 손실을 입었고, 타이완에서는 FMD가 어떤 지역내의 3개의 농장에서 발병 전염되어 5개 도시 15개 지역의 5734개 농장으로 전염되어 2주 동안에 약 3십만 이상의 돼지가 폐사 되었다는 보고가 있다. 한국에서는 지난 2000년 3월과 2002년 5-6월 사이에 구제역이 발생되어 큰 재산 피해를 입은 전례가 있다. 2002년 5월 2일부터 6월 23일 사이에 4개 시군에서 총 16건이 발생하여 102 농가에서 약 16만두가 도살 및 매몰되었으며, 살처분 보상 및 오염물질 보상을 위한 피해액이 약 531억 원에 달했다. 2004년부터 현재까지 한국에서는 구제역이 발생은 되지 않았으나 중국에서 2005년 5월 일부 내륙지방 5개 농장에서 확인된 4천여 마리의 돼지가 폐사 되었다는 보고가 있다.

이런 경제상의 이유 및 기타 여러 이유 등으로 FMD에 대한 예방법과 치료법 개발은 매우 중요한 사항이며 이러한 개발을 위해서는 virus pathogenesis의 충분한 이해가 필요하다. 따라서 이 논문에서는 FMDV에 관련된 여러 논문을 고찰함으로써 FMDV pathogenesis와 diagnosis를 소개하고 다양한 치료법과 예방법을 살펴보고 치료와 예방가능성에 대해 고찰하였다.

본 론

**The Genome Structure and Function of FMDV.** FMDV는 Family Picornaviridae의 Genus Aphthovirus에 속하는 single strand positive RNA virus로써 바이러스 입자의 직경은 약 21-25 nm인 nonenveloped capsid virus이다. FMDV는 genome 중 VP1의 coding region sequence에 따라 7 가지의 serotype(O, A, C, SAT1, SAT2, SAT3, Asia 1)으로 나뉘지며, 80여종의 subtype로 분류된다.<sup>5)</sup> VP1이 host cell infectivity 및 그에 따르는 host range를 결정하는 capsid protein중 하나이므로 그 유전자 서열에 따라 serotype이 결정된다.

FMDV는 총 8.2 Kb이며, 100 bp의 poly A와 2332개의

codon으로 구성되어 있으며 genome은 1개의 open reading frame(ORF)으로 이루어져 있다. ORF는 구성된 유전자가 transcription, translation 과정을 거쳐 polypeptide을 형성한다 (Fig. 1). 5' end에 1200 bp의 UTR(untranslated region)이 존재하고 뒤이어 protease L, capsid protein coding region인 P1 (1A, 1B, 1C, 1D)과 replication 관련 protein coding region인 P2, P3 그리고 3' end의 UTR 등으로 구성되어 있다. 또한 VPg라는 작은 protein이 5' end에 붙어 있고 그 길이는 serotype마다 조금씩 다르다. viral ORF를 encoding하는 Polyprotein은 세가지 viral proteases(Lpro, 2A, and 3Cpro)에 의해 cleavage 된다.<sup>2)</sup>

FMDV protease L은 보통 translation 초기단계에서 virus에 감염된 cell에서 host cellular protein 합성의 shut off에 관여한다.<sup>2,6)</sup>

P1은 FMDV의 capsid protein으로써 RNA genome을 보호하고, cellular receptor의 인식을 통한 host range를 결정한다. 그리고 antigenicity를 제공하며, viral genome의 packaging에 관여한다. 이러한 VP1-VP4의 약 60 copy가 결합하여 icosahedral capsid를 형성하게 된다. P1은 early stage를 거쳐 protease L에 의해 VP1-VP4로 cleavage가 일어난다. 이러한 VP1, VP2, VP3은 외부로 표출되어 있고, VP4의 경우 capsid 내부에 묻혀 있어 표면상에서는 보이지 않는데, VP4와 VP2의 전구체인 VP0는 cis-cleavage activity에 의해 VP2와 VP4로 나뉘어지게 된다.<sup>7)</sup> 이중 VP1은 intermolecular disulfide bond로 형성된 dimer로서<sup>8)</sup> 이후 기술하게 될 FMD 치료와 예방에서 매우 중요한 부분이다. 예로써, VP1의 amino acid residues 141-160과 200-213은 host organism에서 B cell epitope으로 작용하며, 141-160과 또한 21-40은 T cell epitope으로서 작용을 한다.<sup>9,10)</sup> 한편 VP1내에 amino acid G와 H 사이의  $\beta$ -sheet구조로 된 loop가 존재하는데 이러한 loop를 G-H loop라 한다. 이 G-H loop내에는 Arg-Gly-Asp(RGD motif) sequence가 존재하며<sup>11)</sup>

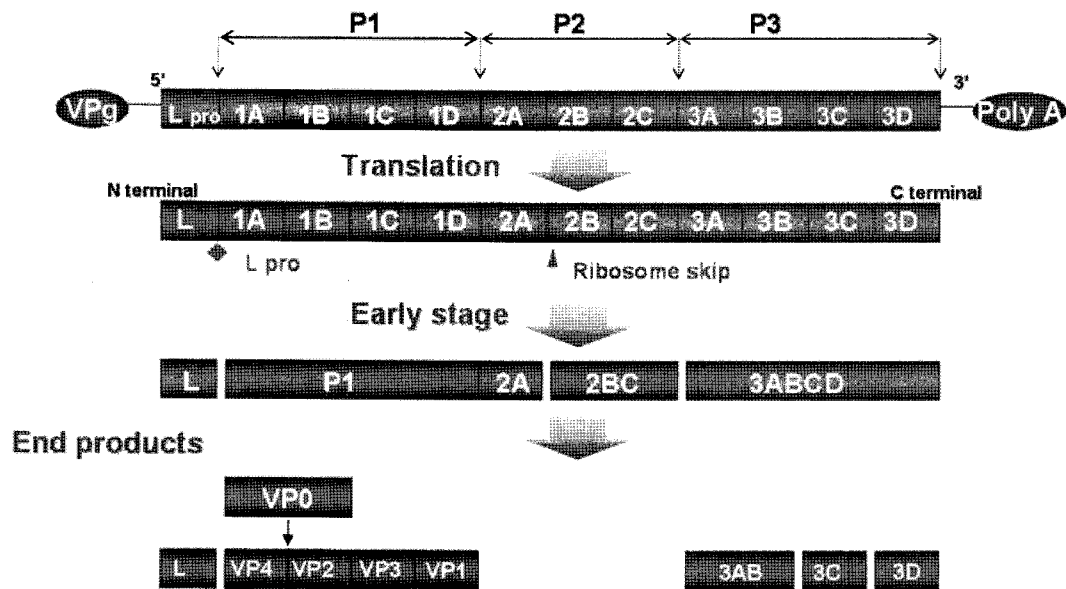


Fig. 1. The genome structure of FMDV.

Table 1. Functions of FMDV non-structural proteins

Protein	Functions	Reference
L	Host protein synthesis shut-off Protease cleavage	[12-14]
2A	Polypeptide cleavage	[13, 14]
2B	Alteration of membrane permeability inhibition of cellular exocytosis Dissociation/rearrangement of ER and Golgi	[15]
2C	Formation of vesicles NTPase Virus encapsidation Direct replication complexes to cell membrane RNA binding in RNA replication	[16, 17]
3A	Inhibition of MHC class I expression Association with intracellular membranes Inhibition of intracellular membrane transport Inhibition of cellular protein secretion Virus interaction with host cells and host range	[18-20]
3B	Primer for RNA synthesis Stimulation of 3Dpol Stimulation of 3CD auto cleavage	[21]
3C	Viral protein processing Host protein cleavage Host protein synthesis shutoff Transcription inhibition RNA binding in RNA replication Stimulation of VPg uridylylation	[22-25]
3D	VPg uridylylation RNA-dependent RNA polymerase Stimulation of RNA synthesis RNA binding	[24, 26-28]

이러한 RGD motif는 host cell의 ECM(extra cellular matrix)에 존재하는 integrin family와 같이 RGD binding motif가 존재하거나 혹은 acidic materials에 존재하는 여러 물질이 결합하여 virus의 infection의 attachment site가 된다. 이러한 G-H loop의 RGD binding sites는 genetic engineering을 통하여 FMDV infected organism의 예방과 치료에 많이 이용되고 있다.

P2 region은 2A, 2B, 2C로 cleavage가 일어나는데, 2A region은 18개의 amino acid로 이루어진 non-functional region이며 2A의 C terminal에서 "ribosome skip"에 의해 non-proteolytic 과정을 통하여 잘려진다.<sup>[12-14]</sup> 한편 2C region은 helicase domain이 존재하여 viral RNA synthesis에 도움을 준다. Polypeptide 2C와 precursor 2BC는 cell membrane과 관련되고, vesicle proliferation을 유도한다.

P3 region은 3A, 3B, 3C, 3D로 구성되어 있으며, 3AB는 VPg의 전구체로 알려져 있다. VPg는 genome의 5'에 위치하며 RNA replication에 있어서 primer로써 혹은 nuclease로써의 기능을 한다고 알려져 있다.<sup>[15]</sup> 3C region, 즉, protease 3C는 전술된 것처럼 host cellular translation의 shut-off에 관여하기도 하지만, trans-cleavage activity 또한 가지고 있어, P1 region을 VP0, VP1, VP2로 나누어주는 역할 및 기타 viral protein의 cleavage에 관여하는데, 그 cleavage 순서는 VP3-VP1, VP0-VP3, VP1-2A, 2C-3A, 2B-2C로 알려져 있어 결국 protease L과 P2의 2A region에서 ribosome skip region을 제외한 대부분

의 viral protein 형성에 관여한다. 나머지 P3 region인 3D는 RNA polymerase coding region으로써 viral RNA genome을 주형으로 cRNA 및 viral RNA를 합성하는 효소이다. 3D부분 역시 VP1 부분처럼 potent한 T cell epitope을 가지고 있다.

Table 1은 FMDV non-structural protein의 기능에 대해 요약해 놓은 것이다.

**Pathogenesis.** FMDV는 respiratory tract의 pharynx epithelial cell을 통해 infection된다. Virus의 replication은 upper respiratory tract의 epithelial cell과 lung에서 일어나며, 특히 lung의 respiratory bronchiolar epithelium cell에서 일어난다.<sup>[16,17]</sup> Stratified squamous epithelial cell에서 viral amplification이 크게 나타나며 initial viraemia site가 된다. 위와 같은 장소에서 infection한 FMDV는 respiratory tract의 lumen으로 release되어 호흡을 통하여 다시 excretion이 되기도 하고, bloodstream 및 lymph node 등을 통하여 다른 장소로 퍼지게 되어 발병을 일으킨다.

소는 일반적으로 aerosolized virus에 의해 respiratory route을 통해 감염된다. 또한 피부나 점막의 상처를 통하여 감염될 수 있으나 매우 낮은 확률로 감염된다. FMDV는 semen, urine과 feces 뿐만 아니라 우유로도 배출되며, 송아지는 우유 한 방울 먹는 것에 의해서도 감염될 수 있다. 잠복기간은 6일 정도이다.

돼지는 감염된 음식을 먹거나, 감염된 동물과 직접 접촉하거나, FMDV에 감염된 동물을 키웠던 곳에서 키워질 때 FMDV

에 감염되나, aerosol로는 감염 되지 않는다. 잠복기간은 virus의 양과 infection route에 의존하는데, 보통 10일 정도이다.

이렇게 FMDV에 감염된 동물은 보통 foot, mouth, 유두 등의 epithelial cell에서 lesion이 관찰되며, breath, saliva, urine, milk등에서 virus를 분리 시킬 수 있는데, 이러한 lesion의 형성은 swollen and spherical cell의 lysis와 그에 따른 intracellular fluid의 releasing으로 인한 수포형성과 intercellular edema에 기인한다.<sup>18)</sup> 한편 발열, 식욕부진, 떨림 등의 부차적 증상이 있으며 그 치사율은 어린 가축에서는 최대 50%이며 성 축에서는 미미하나, 그 강력한 전염성 등으로 그냥 폐사 시키는 경우가 대부분이기 때문에 경제적 피해는 치사율 이상이라 할 수 있다.

**Host Immune Responses.** FMDV에 감염된 동물에서는 humoral-specific response가 나타남으로써 reinfection에 대한 효과적인 protection을 할 수 있다.<sup>19,20)</sup> FMDV에 대한 protection은 high level의 neutralizing antibody에 의해 유도되며, 이에 따라 Virus의 phagocytosis, antibody complexes, viral opsonisation 기작에 의해 virus가 clearance된다.<sup>19)</sup> Neutralizing antibody는 viral capsid에 존재하는 B-cell epitope과 관계가 있고, 이는 FMDV에 감염되거나 예방된 후에 나타난다. 감염되거나 예방된 후 3~4일에 IgM이 생성되고, 주요 neutralizing antibody인 IgG는 post-immunization 2주 후에 생성된다. 일반적으로, IgG1은 IgG2보다 더 큰 response를 나타낸다. Infection되거나 vaccination된 후 초기에는 antibody response가 upper respiratory와 gastrointestinal tract에서 나타난다. FMDV에 감염된 동물에서 innate immune response는 protection에 기여하고, 이를 통해 response를 증강시킬 수 있는 vaccination strategy를 개발할 수 있다.<sup>19)</sup>

Cellular-specific T-cell response 역시 감염되거나 예방되었을 때 나타난다. 소와 돼지에서, B-cell activation과 antibody production은 주로 T cell(대부분은 CD4+)에 의해 나타나게 된다. T helper cell은 주로 capsid와 non-structural protein을 인지하며, 이들은 FMDV에 대한 protective immunity와 antiviral antibody의 production에 필요하다. FMDV infection에 의해 MHC class I을 발현하는 susceptible cell은 감소하게 되고, 그 결과 FMDV-infected cell에 의해 vial peptides의 presentation이 되지 않고, host의 CTL response로부터 virus escape를 용이하게 하게 된다.<sup>22)</sup>

**Infection Cycle.** FMDV infection cycle의 overall scheme을 보면 다음과 같다. 바이러스의 attachment는 receptor specific attachment로서 이 과정에 중요한 역할을 담당하는 것이 VP1 G-H loop내에 존재하는 RGD sequence이다. 이러한 RGD sequence의 host cellular receptor로서 알려진 것은  $\alpha\beta 6$ ,  $\alpha\beta 1$ ,  $\alpha\beta 3$ 의 integrin과 highly acidic materials인 HS(heparan sulfate) 등이 있다.<sup>17)</sup> Receptor에 attachment된 FMDV는 receptor-mediate endocytosis를 통하여 세포질 내에 endosome을 형성한다. Endosome 내부의 pH가 떨어짐에 따라 viral capsid protein 중 하나인 VP4가 uncoating 되고, 그러한 conformational change는 곧 viral genome을 cytosol내로 release 되도록 유도한다.

Viral genome은 cytosol내에서 cap-independent translation mechanism에 따라 translation이 개시되고 그 중 일부가 3D

RNA-dependent DNA polymerase(RdRP)에 의해 replication되어 negative strand를 합성한 후 SER내에서 RIC(replication intermediated complex)라는 일련의 중간체를 거쳐 replication이 된다. 이후 viral genome은 translation products인 structural protein에 packaging되어 host cell lysis를 일으켜 release되어 감염성 있는 virus를 생산한다.<sup>18)</sup>

FMDV가 세포에 감염된 후 시간에 따른 감염 경로과정을 살펴보면 다음과 같다. 감염된 직후부터 1~2시간까지는 host cellular protein의 합성량이 감소한다. 또한 2.5~3시간까지는 viral protein의 합성이 시작되며, MHC class I의 발현율이 70%로 감소한다. 감염 후 4~6시간이 지나면 viral capsid가 assembly되며, MHC class I의 발현율이 53%로 감소한다. 그 후 cell의 lysis로 인해 viral progeny가 방출된다. 10~12시간 경과 후 혀, 발등에 vesicle이 형성되며, 20~24시간에는 viraemia가 일어나며 열이 나기 시작한다. 감염 후 1~2일이 지나면 virus가 bloodstream으로 들어가 다른 조직으로 퍼지게 된다. 2~8일이 지나면 혀, 잇몸, 유두, 발굽 등에서 secondary vesicle이 형성되며 이에 따른 임상증상을 일으킨다.<sup>22)</sup> Virus의 배출은 임상증상이 일어나기 약 24시간 전에 시작하여 수일간 지속된다. 감염동물의 aerosol에는 많은 바이러스가 함유되어 있으며 특히 돼지의 경우는 소보다 약 1,000배 정도의 바이러스를 더 많이 배출한다. 유즙으로도 많은 양의 바이러스가 배출된다. 이렇기 때문에 감염동물의 aerosol과 유즙이 역학적으로 중요시되고 있다.

**Diagnosis.** FMD에 의해 나타나는 특징인 수포성 발진 등이 소나 돼지에서 나타나는 수포성의 장애와 구별할 수 없다. 게다가, 양과 염소의 FMDV 감염은 임상적으로 찾기 어렵다. 따라서 diagnosis는 감염된 동물을 구별하기 위해 사용되며, 예방 주사의 접종 유무를 확인하는데 사용된다. 또한 회복기에 있는 동물은 virus의 운반체로 사용될 수 있으며, 병의 새로운 발생의 근원이 될 수 있기 때문에 필요하다.

Diagnosis를 하는 방법에는 크게 두 가지 방법, 즉 ELISA와 RT-PCR 방법이 널리 사용된다. ELISA 방법은 감염된 동물과 예방주사를 접종한 동물을 구별하기 위해 개발되었는데, epithelial tissue suspension에 있는 specific FMDV antigen을 검출하는데 사용된다.<sup>23)</sup> 초기에는 FMD에 대한 serum screening을 위한 virus neutralization test(VNT)이 널리 사용되었다. 이는 많은 시간이 소요되며, 병이 없는데 있는 것으로 오인되는 경우가 많았다. 이 VNT를 보완하기 위해 개발된 liquid phase blocking ELISA(LPB-ELISA)는 비활성화된 antigen의 다양한 stability와 상대적으로 낮은 specificity의 문제점이 있었다.<sup>24)</sup> 이러한 문제들을 극복하기 위해 solid-phase competitive ELISA(SPC-ELISA)가 개발되었으며,<sup>25)</sup> 최근 mass screening을 위한 solid-phase blocking ELISA 방법이 개발되었다.<sup>26)</sup>

RT-PCR방법은 virus 유전자를 검출하는데 사용되는데, sensitivity와 specificity가 높다는 특징이 있다.<sup>27)</sup> 그러나 FMDV의 serotyping을 위해 많은 노력을 필요로 하기에 새로운 방법인, Multiplex PCR이 개발되었는데, 이는 실험적인 단순성 즉, 적은 시간과 적은 노력으로 할 수 있기에 널리 사용되고 있다.<sup>28)</sup>

FMDV는 주로 가축을 감염시키는 전염성이 매우 높은 virus

Table 2. FMDV antigenic domains and its DNA vaccine efficacies

	Immunogens	Immune Response (IR)		References
Structural protein	P1	TH 1 type IR :		
		VP1 (21-40)	T cell epitope	[45, 46]
		VP1 (141-160 including RGD)	B, T cell epitope	[45, 47, 48]
		VP1 (200-213)	B, T cell epitope	[10]
		VP2 (31,70-73,75,77 in type O)	T cell epitope	[44]
		VP3 (58 in type O)	T cell epitope	[44]
		VP4 (20-34 as synthetic peptide)	T cell epitope	[49]
Non-structural protein	2B, 3D	TH2 type and TH 1 type IR :	T cell epitope	[50, 51]
	3C	TH2 type IR (P1-3C):	Not reported	[52, 53]

이기 때문에 많은 경제적 손실을 낳고 있다. 따라서 FMD에 대한 치료 및 그 예방에 관한 연구가 그 역사만큼이나 계속해서 활발히 진행되고 있으며, 그에 따라 여러 측면에서의 다양한 전략이 개발, 보고되어 있다. 이 section에서는 이미 살펴본 pathogenesis와 genome structure의 이해를 바탕으로 현재 보고된 다양한 therapeutic protection strategies를 DNA vaccine, Edible vaccine 과 기타 다른 전략 등으로 나누어 고찰해보고자 한다.

Current FMD Vaccine. vaccine은 FMD의 control에 널리 사용된다. 현재 사용되는 vaccine은 inactivated vaccine과 live attenuated vaccine이 있다. 그 중 inactivated vaccine은 semi-purified된 whole virus를 이용하여 만든 것이다.<sup>29)</sup> FMDV type 'O' virus를 formaldehyde나 binaryethyleneimine(BEI)로 inactivation 시킨 aluminum hydroxide gel이나 adjuvant인 mineral oil에 섞어 준 후, inactivated vaccine을 양에 vaccination을 하였다. 그 결과 neutralizing antibody response가 생성됨이 확인되었다.<sup>30)</sup> Inactivated vaccine은 질병의 예방을 위한 효과적인 도구이지만, 이를 생산하는데 값이 비싸고 위험하다는 단점이 있다.<sup>31)</sup>

Live attenuated vaccine은 다음과 같은 방법으로 연구되었다. FMDV type A12를 total viral genome에서 VP1 region의 G-H loop에 존재하는 RGD motif coding region을 제거시키고 이 genome을 plasmid vector에 넣고 발현율의 강화를 위해 CMV early gene promoter를 사용하여 recombinant pWRMHX vaccine을 만든 후 이것을 소와 돼지에 intradermal(i.d.), intramuscular (i.m.) route로 inoculation 시킨 결과, 감염성이 결여된 바이러스의 capsid에 대한 antibody가 생성됨이 확인되었다.<sup>32)</sup> 이러한 vaccine이 일반 vaccine과 다른 점은 total viral genome의 cDNA를 넣어 줌으로써 숙주세포 내에서 RNA를 형성하고 RNA replication에 의해 계속해서 genome을 얻을 수 있다는 것과 또한 viral capsid 자체가 생성되기 때문에 면역반응을 유도시킬 수 있다는 것이다.<sup>11)</sup>

**DNA Vaccines.** 현재 보고된 FMDV에 대한 예방법들은 대

부분이 DNA vaccine을 이용하여 감염동물 혹은 숙주동물의 면역반응을 유도하는 전략을 택하고 있다. 즉 DNA vaccine은 숙주동물의 immune response를 일으킬 수 있는 antigen coding DNA를 이용하여 virus 감염에 대한 protection을 유도하는 방식으로서, DNA자체가 숙주동물에 delivery되면 endogenous pathway에 따라 항원 단백질이 분해되어 결국 antiviral protection에 효과적으로 알려진 CTL activation을 일으킬 수 있다는 장점이 있다.<sup>10,33)</sup> 또한 viral genome중 epitope부분만을 사용하기 때문에 infected animals에 대한 다른 기타 vaccine에 비하여 안정성이 있다.

Table 2는 DNA vaccine에 사용된 FMDV genome의 antigenic sites와 그 효능을 요약해놓은 것이다. Immune response type은 delivery system의 특징, 그 투여 경로, 동물의 종류마다 달라질 수 있고, critical amino acid residues가 같은 serotype내에서도 달라질 수 있지만<sup>34)</sup> 전반적인 DNA vaccines에 대한 숙주 면역반응은 다음과 같다.

이러한 antigenic epitopes를 이용한 대표적 DNA vaccine을 소개해 보면 다음과 같다.

**Structural Protein Region.** P1 region은 VP1-VP4로 이루어진 viral capsid coding region으로서 FMDV protection에 있어 특히 VP1은 가장 potent한 immunodominant site이다. 따라서 VP1이 vaccination strategies에 대부분 이용되고 있다.<sup>10,35-38)</sup> VP1은 총 212개의 아미노산으로 이루어져 있으며 141-160 residues, 21-40 residues와 200-213 residues는 각각 B cell, T cell epitopes으로 작용한다. 이렇게 potent한 epitope을 가지고 있기 때문에 대부분의 vaccination 전략에서 VP1을 포함하고 있는 P1-2A precursor를 antigen으로 사용하고 있다. 이러한 VP1이 일으키는 면역반응의 양상은 TH1 response로서 CTL (cytotoxic T lymphocyte)의 proliferation을 증가시킨다는 보고가 있다. 두 가지 유형의 immune response에서 antiviral protection에 있어서는 Th1 response가 대체적으로 중요하게 여겨지고 있으나 Th2 response 역시 간과 될 수 없다. P1 region을 이용한

Table 3. Immune response adjuvants

Immunogen type	Adjuvant	Region	Immunization route	Immune response	Reference	
DNA	IL-2	VP1의 141-160, 200-213	i.m.	Specific T cell proliferation and neutralizing antibody	[40, 41]	
	IL-1 $\beta$	VP1의 141-160, 200-213	i.m.	Significantly increased levels of the specific antibody. T-cell proliferation	[42]	
	CpG-motif	VP1	i.m.	Significantly increased levels of the specific antibody. T-cell proliferation	[43]	
	GM-CSF	P12A3C3D		i.m.	High antibody response and protection	[34]
		P12B3D		i.m.	High antibody response	[44]
Protein/Peptide	CTB	VP1 의 21-40, 135-160, and 200-213	i.p./i.n.	High antibody response and protection	[45, 46]	
	CT	VP1의 141-159	Parenterally/i.n.	High antibody response and protection	[47, 48]	
		VP1의 141-159	i.m.	High antibody response	[48]	

vaccination은 Th2 response가 결여된다는 보고가 있기 때문에 실제 DNA vaccine에 있어서 P1 region만을 이용할 경우 다양한 adjuvants의 사용 및 synthetic peptide의 boosting을 통한 host immune response의 강화 및 균형을 꾀하고 있다.<sup>8,39)</sup> Table 3은 adjuvants에 따라 나타나는 immune response에 대해 요약해 놓은 것인데, 이를 사용함에 따라 immune response를 증강시킬 수 있음을 알 수 있다.

이러한 vaccination strategies중 몇 가지 구체적 예를 들어 살펴보면 다음과 같다.

P1 region을 이용하여 적절한 면역반응을 일으키기 위한 또 다른 방법으로서 숙주동물의 IgG의 constant region 혹은 variable region에 VP1의 B cell, T cell epitope을 fusion시키는 방법이 있다.<sup>10,40)</sup> 이러한 방식은 IgG의 leader peptide의 제거를 통하여 secretory form을 만들어 줌으로써 VP1-IgG fusion protein이 다른 cell에 endocytosis가 됨으로써 결국 exogenous pathway를 통하여 Humoral immune response를 강화시킬 수 있다. 이러한 self-IgG를 이용함으로써 얻게 되는 장점은 IgG가 일반 다른 백신보다 긴 life span을 가지고 있다는 것이다.<sup>41)</sup> 이러한 이유 때문에 FMDV epitope이 숙주 동물 내에서 노출시간이 길어지므로 숙주세포에서의 immunogenicity가 향상 되고 또한 FMDV antigen자체가 숙주 동물 내에서 오랫동안 지속될 수 있어 역시 immunogenicity의 증진에 도움을 줄 수 있다. 실제로 이러한 방식을 이용하여 FMDV type O의 VP1을 sIgG에 fusion 한 후 gene-gun을 이용하여 injection 실험을 한 결과 3마리의 swine 모두 protection되었다는 보고가 있다.<sup>10)</sup> 한편 유사한 방식으로 위와 같은 type에 host self-IgG constant region을 fusion시킨 peptide vaccine을 이용한 실험 또

한 보고되었다.<sup>40)</sup>

P1, 3C를 replication deficient Adenovirus를 이용하여 FMDV를 delivery시키는 방식이 보고되었다. 이것은 Adenovirus의 replication에 중요한 E1 gene을 deletion시킨 후 그곳에 FMDV antigenic region coding DNA를 넣는 방식으로<sup>42)</sup> 이러한 viral vector를 이용한 delivery방식은 *in vivo* study시 cell-type 혹은 tissue type에 대한 specificity가 높아 그 효율성이 높다는 장점과 *ex-vivo*시에 높은 titer를 얻을 수 있다는 장점이 있다. 이러한 system을 이용하여 swine에 i.m. inoculation을 해 본 결과 완전하지는 않지만 그 clinical 증상이 감소됨이 관찰되었고 FMDV type A24를 역시 같은 방식으로 적절한 protocol 및 cytokine과 같은 immune modulator를 이용하여 실험한 결과 complete protection이 되었다는 보고가 있다.<sup>42)</sup>

**Nonstructural Protein Region.** 3C는 P1 polypeptide를 VP0, VP1, VP3으로 maturation시켜주는 기능을 하는 nonstructural protein이다. 3C의 capsid processing activity가 protective immune response에 관여한다는 보고가 있다.<sup>42)</sup> FMDV type A12의 P1-2A와 3C를 이용하여 pP12A3C vector를 제작한 후 3C의 active site를 mutation시킨 pP12A3C-mut를 쥐에 i.d., i.m., epithelium(s.c.)의 경로를 통하여 각각 inoculation시킨 결과 오직 wild type 3C를 투여시킨 쥐에서만 Th2 type의 면역반응이 나타났다.<sup>36)</sup> 이러한 결론은 3C protease가 Humoral immune response에 있어서 중요한 역할을 한다는 사실을 시사한다.

Nonstructural protein 3D는 2B와 더불어 potent T cell epitope을 가지고 있다.<sup>37)</sup> P1 region의 여러 epitope이 Th1 type response를 일으키는 것에 반하여 3D의 경우에는 Th1, Th2

Table 4. Transgenic plant as edible vaccine

Transgenic plant	Immunogen	Immunization route	Immune response	Reference
Alfalfa	P1-3C	i.p.	Specific antibody response against complete virus particles	[42]
	VP1 (135-160)	i.p.	Specific antibody response against complete virus particles	[43]
	VP1 (131-160)	i.p./oral	Antibody response and protection against virulent challenge	[40]
<i>Arabidopsis thaliana</i>	VP1 (141-160)	i.p.	Antibody response and protection against virulent challenge	[41]
Potato	VP1	i.p.	Antibody response and protection against virulent challenge	[44]

type response를 가진다는 특징이 있다. 또한 structural protein의 VP1은 serotype에 대한 specificity가 있는 반면에 VP2, VP3, 3D 특히 3D의 경우 serotypes에 대한 cross-reactivity가 있어 serotype non-specific vaccination이 가능하다.<sup>43)</sup> 이러한 3D를 이용한 vaccination의 예를 보면 다음과 같다.

FMDV O1 type의 P12A3C3D coding sequence에 CMV promoter를 넣어 non-infectivity를 가진 바이러스 capsid를 숙주 동물 내에서 만들어지게 한 후, swine에 i.m. vaccination시킨 후 protection여부를 알아본 결과 4마리 중 2마리에서 fully protection이 나타났고, 위의 strategy에 GM-CSF(granulocyte-macrophage colony stimulating factor)를 immune modulator로서 같이 접종한 결과 neutralizing antibody response 정도가 증가되는 양상을 보였다.<sup>37)</sup> 이와 비슷한 방식으로 2B와 3D coding sequence의 upstream에 VP1의 200-213 residues, 143-160 residues를 fusion시켜 swine에 GM-CSF를 같이 i.m. vaccination 시킨 실험이 보고되었다.<sup>44)</sup>

**Edible Vaccine.** Edible vaccine은 antigen coding DNA를 plant에 형질전환 시킨 후 그 plant를 해당 동물에 경구 투여 시킴으로써 antigen specific immune response를 유도하는 방법이다. Edible vaccine의 장점은 다량의 antigen을 얻을 수 있고, 생산 과정의 비용이 저렴하다는 것이다. 또한 vaccination방법에 있어서 purification과정의 생략이 가능하며, 그 투여 방법이 간단하다는 특징이 있다.<sup>43,45)</sup>

숙주동물에 vaccine을 투여했을 때 나타나는 대표적 immune response양상은 mucosal immunity인데, 이러한 mucosal immunity는 최근 들어 여러 infectious agents에 대하여 인간을 포함한 여러 동물의 protection에 많이 사용되고 있다. FMDV antigen을 발현하는 transgenic plants가 숙주동물에 경구 투여되면 M cell을 통하여 antigen-specific IgA 및 IgG가 생성되며 mucosal microenvironment의 주요 effector cell인 Th cell, Tc cell들에 의하여 FMDV protection이 가능하다. Table 4는 FMDV transgenic plant를 통해 immunity를 알아본 실험에 대해 요약해 놓은 것이다.

**Recombinant Protein Vaccine and Peptide Vaccine.** Chemically inactivated vaccine의 가장 큰 단점은 항원과 유사

한 virus를 주기적으로 예방접종이 필요하며, 항원에 대한 항체가 생기는 동안의 바이러스 방출될 위험이 있다는 것이다. 이러한 단점을 보완하기 위해 만들어 진 것이 안전한 immunogen인, recombinant protein을 이용한 vaccine이다.<sup>46)</sup> Recombinant protein vaccine은 생성과정에서 전염성의 바이러스를 필요로 하지 않기 때문에 virus에 방출될 위험이 없다는 것이 가장 큰 특징이다. 또한, recombinant protein이나 peptide는 생산과정이 쉽고, 보관에 용이하다.<sup>47)</sup>

효과적 vaccine은 high-affinity neutralizing antibody의 유도를 위해 potent B cell site를 필요로 한다.<sup>48)</sup> FMDV의 VP1 capsid prominent G-H loop는 neutralizing antibody를 유도하기 위한 주요한 immunogenic site이다. 이 VP1의 G-H loop peptide를 통한 FMDV recombinant protein vaccine이 보고된 바 있다.<sup>47,49,60)</sup> 그러나, 소와 돼지에 G-H loop synthetic peptide을 administration하였을 때에는 high level의 neutralizing antibody가 생성되었으나 protection 되지 않았다.<sup>47,61)</sup> 왜냐하면 G-H loop synthetic peptide는 제한된 immunogenicity를 가지기 때문이다. VP1은 소와 돼지의 MHC에 의해 인지되는 T-helper cell epitope이 없고, VP1 외부의 promiscuous T-helper cell을 필요로 하기 때문이다.<sup>50)</sup>

FMDV-specific T cell epitope만을 가지고 immunization을 하였을 때, susceptible bovine에서 FMDV T cell epitope의 vaccine은 기대하는 만큼의 protection 효과가 나타나지 않았다.<sup>62,63)</sup> 따라서 효과적인 neutralizing antibody를 유도하는 vaccine은 FMDV type O를 위해 immunogenicity와 cross-reactivity을 위해 최적화된 T와 B cell epitopes site로 디자인 되어야 한다.<sup>50,64)</sup>

## 결 론

FMD는 Picornaviridae family의 Aphthovirus genus에 속하는 FMDV에 의한 바이러스성 질병으로서 FMD가 발병된 지역은 그 지역뿐만이 아니라 그 이외의 FMD에 안전한 지역 또한 발병된 지역과의 가축교역이 불가능해지므로 경제적으로 매우 큰 타격을 입히는 질병이라 할 수 있다. FMDV의 infection은

주로 respiratory tract을 통하여 infection되며 그 infection cycle로는 attachment, uncoating, negative replication, positive replication, capsid assembly, cell lysis 등의 일련의 과정을 거쳐 cytopathic effect가 나타난다. 이후 macrophage 및 dendritic cell등과 같은 infectious carrier에 의해 다른 조직 등으로 퍼져 나가게 되어 발열, 수포형성, 식욕부진의 증상이 나타난다.

이러한 FMD를 예방하기 위한 vaccination strategy는 Table 2에 나타난 antigenic epitope등을 이용하여 다양하게 사용되고 있는데, DNA vaccine에 의해 유도 되어지는 숙주 면역반응은 vaccine의 투여경로 등 기타 다양한 전략 및 adjuvants 등 여러 조건에 따라 차이가 있지만 궁극적으로는 virus의 structural protein에 따라 Th1 immune response와 nonstructural protein에 대한 Th2 immune response가 있다.

한편, 이러한 vaccines 이외에도 interferon 및 guanidine과 같은 FMDV replication 저해효과를 갖는 drug의 사용 가능성이 제시되었으며 edible vaccine, live-attenuated vaccine을 이용한 vaccine등 이밖에도 매우 다양하고 풍부한 strategy등이 계속 연구, 보고 되고 있다.

이렇게 다양한 전략에도 불구하고, 현재 FMD에 대한 실제적 therapeutic approach는 미미한 실정이며 그 강력한 전염성에 의한 경제적 피해는 갈수록 늘어나고 있는 추세이다. 따라서 FMD의 효과적 예방은 매우 중요할 뿐만 아니라 그 치료를 위해 FMDV pathogenesis에 대한 충분한 이해와 연구를 통한 효과적 drug의 고안과 단계별 FMDV life cycle을 저지시킬 수 있는 전략이 필요하며, 현재 알려진 antigenic epitope이외에 더 강력한 epitope에 대한 연구가 요구 되어진다.

## 초 록

구제역(Foot-and-Mouth Disease: FMD)이란 소, 돼지, 양, 염소 등의 cloven-hoofed 동물에서 나타나는 바이러스성 질병으로 입, 코, 유두, 발굽 등에 수포가 형성되는 것이 특징이다. 일곱 가지 혈청형(O, A, C, Asia1, SAT1, SAT2 and SAT3)으로 분류되는 구제역바이러스(Foot-and-Mouth Disease Virus: FMDV)는 single stranded positive RNA virus로 nonenveloped capsid virus이다. Viral genome은 8.2 Kb로 하나의 ORF인 polyprotein으로 되어있으며, 크게 capsid protein coding region인 P1, replication related protein coding region인 P2, RNA dependent RNA polymerase coding region인 P3로 구성된다. FMDV는 respiratory tract의 pharynx epithelial cell에 감염되며, lung epithelial cell에서 replication을 한다. 구제역바이러스는 감염율은 높지만 낮은 치사율을 가진다. 2002년 한국에서 구제역이 발병하여 많은 경제적 손실을 입었다. FMDV의 감염을 조절할 수 있는 조절방법이 없는 실정이며, 현재 많은 나라에서는 구제역바이러스의 감염을 막을 수 있는 효과적인 방법을 연구하고 있다. 본 보고서에서는 FMD에 대한 보다 효과적인 예방방법인 DNA vaccine, edible vaccine, peptide vaccine에 대해 고찰하였다.

**Key words:** 구제역, 구제역바이러스, 병리기전, 진단, 예방백신

## 감사의 글

논문수정에 도움을 주신 박중빈, 배지영 선생님들에게 감사드립니다. 본 논문은 농촌진흥청 바이오그린21 사업(20050301034420)의 지원에 의해 이루어졌으며 이에 심심한 감사를 드립니다.

## 참고문헌

1. Grubman, M. J. and Baxt, B. (2004) Foot-and-mouth disease. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**, 465-93.
2. Saiz, M., Nunez, J. I., Jimenez-Clavero, M. A., Baranowski, E. and Sobrino, F. (2002) Foot-and-mouth disease virus: biology and prospects for disease control. *Microbes. Infect.* **4**, 1183-92.
3. Kitching, R. P. (1998) A recent history of foot-and-mouth disease. *J. Comp. Pathol.* **118**, 89-108.
4. Leforban, Y. (1999) Prevention measures against foot-and-mouth disease in Europe in recent years. *Vaccine* **17**, 1755-1759.
5. Fry, E. E., Stuart, D. I. and Rowlands, D. J. (2005) The structure of foot-and-mouth disease virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **288**, 71-101.
6. McInerney, G. M., King, A. M., Ross-Smith, N. and Belsham, G. J. (2000) Replication-competent foot-and-mouth disease virus RNAs lacking capsid coding sequences. *J. Gen. Virol.* **81**, 1699-1702.
7. Curry, S., Fry, E., Blakemore, W., Abu-Ghazaleh, R., Jackson, T., King, A., Lea, S., Newman, J. and Stuart, D. (1997) Dissecting the roles of VP0 cleavage and RNA packaging in picornavirus capsid stabilization: the structure of empty capsids of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* **71**, 9743-9752.
8. Shieh, J. J., Liang, C. M., Chen, C. Y., Lee, F., Jong, M. H., Lai, S. S. and Liang, S. M. (2001) Enhancement of the immunity to foot-and-mouth disease virus by DNA priming and protein boosting immunization. *Vaccine* **19**, 4002-4010.
9. Logan, D., Abu-Ghazaleh, R., Blakemore, W., Curry, S., Jackson, T., King, A., Lea, S., Lewis, R., Newman, J., Parry, N. and et al. (1993) Structure of a major immunogenic site on foot-and-mouth disease virus. *Nature* **362**, 566-568.
10. Wong, H. T., Cheng, S. C., Chan, E. W., Sheng, Z. T., Yan, W. Y., Zheng, Z. X. and Xie, Y. (2000) Plasmids encoding foot-and-mouth disease virus VP1 epitopes elicited immune responses in mice and swine and protected swine against viral infection. *Virology* **278**, 27-35.
11. Beard, C., Ward, G., Rieder, E., Chinsangaram, J., Grubman, M. J. and Mason, P. W. (1999) Development of DNA vaccines for foot-and-mouth disease, evaluation of vaccines encoding replicating and non-replicating nucleic acids in swine. *J. Biotechnol.* **73**, 243-249.
12. Grubman, M. J., Morgan, D. O., Kendall, J. and Baxt, B. (1985) Capsid intermediates assembled in a foot-and-mouth disease virus genome RNA-programmed cell-free translation system and in infected cells. *J. Virol.* **56**, 120-6.
13. Donnelly, M. L., Hughes, L. E., Luke, G., Mendoza, H., ten Dam, E., Gani, D. and Ryan, M. D. (2001) The 'cleavage' activities of foot-and-mouth disease virus 2A site-directed



- mutants and naturally occurring '2A-like' sequences. *J. Gen. Virol.* **82**, 1027-1041.
14. Donnelly, M. L., Gani, D., Flint, M., Monaghan, S. and Ryan, M. D. (1997) The cleavage activities of aphthovirus and cardiovirus 2A proteins. *J. Gen. Virol.* **78**, 13-21.
  15. Doedens, J. R. and Kirkegaard, K. (1995) Inhibition of cellular protein secretion by poliovirus proteins 2B and 3A. *Embo. J.* **14**, 894-907.
  16. Brown, C. C., Piccone, M. E., Mason, P. W., McKenna, T. S. and Grubman, M. J. (1996) Pathogenesis of wild-type and leaderless foot-and-mouth disease virus in cattle. *J. Virol.* **70**, 5638-5641.
  17. Jackson, T., Ellard, F. M., Ghazaleh, R. A., Brookes, S. M., Blakemore, W. E., Corteyn, A. H., Stuart, D. I., Newman, J. W. and King, A. M. (1996) Efficient infection of cells in culture by type O foot-and-mouth disease virus requires binding to cell surface heparan sulfate. *J. Virol.* **70**, 5282-5287.
  18. Yilma, T. (1980) Morphogenesis of vesiculation in foot-and-mouth disease. *Am. J. Vet. Res.* **41**, 1537-1542.
  19. McCullough, K. C., De Simone, F., Brocchi, E., Capucci, L., Crowther, J. R. and Kihm, U. (1992) Protective immune response against foot-and-mouth disease. *J. Virol.* **66**, 1835-1840.
  20. Collen, T. and Doel, T. R. (1990) Heterotypic recognition of foot-and-mouth disease virus by cattle lymphocytes. *J. Gen. Virol.* **71**, Pt 2, 309-315.
  21. Sobrino, F., Saiz, M., Jimenez-Clavero, M. A., Nunez, J. I., Rosas, M. F., Baranowski, E. and Ley, V. (2001) Foot-and-mouth disease virus: a long known virus, but a current threat. *Vet. Res.* **32**, 1-30.
  22. Sanz-Parra, A., Sobrino, F. and Ley, V. (1998) Infection with foot-and-mouth disease virus results in a rapid reduction of MHC class I surface expression. *J. Gen. Virol.* **79**, Pt 3, 433-436.
  23. Alexandersen, S., Zhang, Z., Donaldson, A. I. and Garland, A. J. (2003) The pathogenesis and diagnosis of foot-and-mouth disease. *J. Comp. Pathol.* **129**, 1-36.
  24. Clavijo, A., Wright, P. and Kitching, P. (2004) Developments in diagnostic techniques for differentiating infection from vaccination in foot-and-mouth disease. *Vet. J.* **167**, 9-22.
  25. Mackay, D. K., Bulut, A. N., Rendle, T., Davidson, F. and Ferris, N. P. (2001) A solid-phase competition ELISA for measuring antibody to foot-and-mouth disease virus. *J. Virol. Methods.* **97**, 33-48.
  26. Chenard, G., Miedema, K., Moonen, P., Schrijver, R. S. and Dekker, A. (2003) A solid-phase blocking ELISA for detection of type O foot-and-mouth disease virus antibodies suitable for mass serology. *J. Virol. Methods.* **107**, 89-98.
  27. Reid, S. M., Forsyth, M. A., Hutchings, G. H. and Ferris, N. P. (1998) Comparison of reverse transcription polymerase chain reaction, enzyme linked immunosorbent assay and virus isolation for the routine diagnosis of foot-and-mouth disease. *J. Virol. Methods.* **70**, 213-217.
  28. Chamberlain, J. S., Gibbs, R. A., Ranier, J. E., Nguyen, P. N. and Caskey, C. T. (1988) Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic. Acids. Res.* **16**, 11141-11156.
  29. Doel, T. R. (1996) Natural and vaccine-induced immunity to foot and mouth disease: the prospects for improved vaccines. *Rev. Sci. Tech.* **15**, 883-911.
  30. Nair, S. P. and Sen, A. K. (1992) A study on the immune response of sheep to foot and mouth disease virus vaccine type 'O' prepared with different inactivants and adjuvants. *Acta. Virol.* **36**, 473-478.
  31. Ishimaru, D., Sa-Carvalho, D. and Silva, J. L. (2004) Pressure-inactivated FMDV: a potential vaccine. *Vaccine* **22**, 2334-9.
  32. Ward, G., Rieder, E. and Mason, P. W. (1997) Plasmid DNA encoding replicating foot-and-mouth disease virus genomes induces antiviral immune responses in swine. *J. Virol.* **71**, 7442-7447.
  33. Sanz-Parra, A., Vazquez, B., Sobrino, F., Cox, S. J., Ley, V. and Salt, J. S. (1999) Evidence of partial protection against foot-and-mouth disease in cattle immunized with a recombinant adenovirus vector expressing the precursor polypeptide (P1) of foot-and-mouth disease virus capsid proteins. *J. Gen. Virol.* **80**, Pt 3, 671-679.
  34. Aggarwal, N. and Barnett, P. V. (2002) Antigenic sites of foot-and-mouth disease virus (FMDV): an analysis of the specificities of anti-FMDV antibodies after vaccination of naturally susceptible host species. *J. Gen. Virol.* **83**, 775-782.
  35. Li, Y., Aggarwal, N., Takamatsu, H. H., Sterling, C. M., Voyce, C. and Barnett, P. V. (2005) Enhancing immune responses against a plasmid DNA vaccine encoding a FMDV empty capsid from serotype O. *Vaccine*.
  36. Chinsangaram, J., Beard, C., Mason, P. W., Zellner, M. K., Ward, G. and Grubman, M. J. (1998) Antibody response in mice inoculated with DNA expressing foot-and-mouth disease virus capsid proteins. *J. Virol.* **72**, 4454-4457.
  37. Cedillo-Barron, L., Foster-Cuevas, M., Belsham, G. J., Lefevre, F. and Parkhouse, R. M. (2001) Induction of a protective response in swine vaccinated with DNA encoding foot-and-mouth disease virus empty capsid proteins and the 3D RNA polymerase. *J. Gen. Virol.* **82**, 1713-24.
  38. Zheng, L. Y., Mou, L., Lin, S., Lu, R. M. and Luo, E. J. (2005) Enhancing DNA vaccine potency against hantavirus by co-administration of interleukin-12 expression vector as a genetic adjuvant. *Chin. Med. J. (Engl.)* **118**, 313-319.
  39. Stratford, R., Douce, G., Bowe, F. and Dougan, G. (2001) A vaccination strategy incorporating DNA priming and mucosal boosting using tetanus toxin fragment C (TetC). *Vaccine* **20**, 516-525.
  40. Chan, E. W., Wong, H. T., Cheng, S. C., Yan, W. Y., Zheng, Z. X., Sheng, Z. T., Zhu, L. Q. and Xie, Y. (2000) An immunoglobulin G based chimeric protein induced foot-and-mouth disease specific immune response in swine. *Vaccine* **19**, 538-546.
  41. Chattergoon, M., Boyer, J. and Weiner, D. B. (1997) Genetic immunization: a new era in vaccines and immune therapeutics. *Faseb. J.* **11**, 753-763.
  42. Moraes, M. P., Mayr, G. A., Mason, P. W. and Grubman, M. J. (2002) Early protection against homologous challenge after a single dose of replication-defective human adenovirus type 5 expressing capsid proteins of foot-and-mouth disease virus (FMDV) strain A24. *Vaccine* **20**, 1631-1639.

43. Carrillo, C., Wigdorovitz, A., Oliveros, J. C., Zamorano, P. I., Sadir, A. M., Gomez, N., Salinas, J., Escribano, J. M. and Borca, M. V. (1998) Protective immune response to foot-and-mouth disease virus with VP1 expressed in transgenic plants. *J. Virol.* **72**, 1688-1690.
44. Cedillo-Barron, L., Foster-Cuevas, M., Cook, A., Gutierrez-Castaneda, B., Kollnberger, S., Lefevre, F. and Parkhouse, R. M. (2003) Immunogenicity of plasmids encoding T and B cell epitopes of foot-and-mouth disease virus (FMDV) in swine. *Vaccine* **21**, 4261-4269.
45. Wigdorovitz, A., Carrillo, C., Dus Santos, M. J., Trono, K., Peralta, A., Gomez, M. C., Rios, R. D., Franzone, P. M., Sadir, A. M., Escribano, J. M. and Borca, M. V. (1999) Induction of a protective antibody response to foot and mouth disease virus in mice following oral or parenteral immunization with alfalfa transgenic plants expressing the viral structural protein VP1. *Virology* **255**, 347-353.
46. Garcia-Briones, M. M., Blanco, E., Chiva, C., Andreu, D., Ley, V. and Sobrino, F. (2004) Immunogenicity and T cell recognition in swine of foot-and-mouth disease virus polymerase 3D. *Virology* **322**, 264-275.
47. Rodriguez, L. L., Barrera, J., Kramer, E., Lubroth, J., Brown, F. and Golde, W. T. (2003) A synthetic peptide containing the consensus sequence of the G-H loop region of foot-and-mouth disease virus type-O VP1 and a promiscuous T-helper epitope induces peptide-specific antibodies but fails to protect cattle against viral challenge. *Vaccine* **21**, 3751-3756.
48. M. J. Francis, G. Z. Hastings, F. Brown, J. Mcdermed, Y. A. Lu. and J. P. Tam, (1991) Immunological evaluation of the multiple antigen peptide (Map) system using the major immunogenic site of foot-and-mouth-disease virus. *Immunology* **73**, 249-254.
49. Murdin, A. D. (1986) Synthetic peptide vaccines against foot and mouth disease. *Vaccine* **4**, 210-211.
50. Wang, C. Y., Chang, T. Y., Walfield, A. M., Ye, J., Shen, M., Chen, S. P., Li, M. C., Lin, Y. L., Jong, M. H., Yang, P. C., Chyr, N., Kramer, E. and Brown, F. (2002) Effective synthetic peptide vaccine for foot-and-mouth disease in swine. *Vaccine* **20**, 2603-2610.
51. Wang, C. Y., Chang, T. Y., Walfield, A. M., Ye, J., Shen, M., Zhang, M. L., Lubroth, J., Chen, S. P., Li, M. C., Lin, Y. L., Jong, M. H., Yang, P. C., Chyr, N., Kramer, E. and Brown, F. (2001) Synthetic peptide-based vaccine and diagnostic system for effective control of FMD. *Biologicals* **29**, 221-228.
52. Wang, C. Y. and Walfield, A. M. (2005) Site-specific peptide vaccines for immunotherapy and immunization against chronic diseases, cancer, infectious diseases, and for veterinary applications. *Vaccine* **23**, 2049-2056.
53. Wiesmuller, K. H., Jung, G. and Hess, G. (1989) Novel low-molecular-weight synthetic vaccine against foot-and-mouth disease containing a potent B-cell and macrophage activator. *Vaccine* **7**, 29-33.
54. Beignon, A. S., Brown, F., Eftekhari, P., Kramer, E., Briand, J. P., Muller, S. and Partidos, C. D. (2005) A peptide vaccine administered transcutaneously together with cholera toxin elicits potent neutralising anti-FMDV antibody responses. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **104**, 273-280.
55. Fischer, D., Rood, D., Barrette, R. W., Zuwallack, A., Kramer, E., Brown, F. and Silbart, L. K. (2003) Intranasal immunization of guinea pigs with an immunodominant foot-and-mouth disease virus peptide conjugate induces mucosal and humoral antibodies and protection against challenge. *J. Virol.* **77**, 7486-7491.
56. Nargi, F., Kramer, E., Mezencio, J., Zamparo, J., Whetstone, C., Van Regenmortel, M. H., Briand, J. P., Muller, S. and Brown, F. (1999) Protection of swine from foot-and-mouth disease with one dose of an all-D retro peptide. *Vaccine* **17**, 2888-2893.
57. Bittle, J. L., Houghten, R. A., Alexander, H., Shinnick, T. M., Sutcliffe, J. G., Lerner, R. A., Rowlands, D. J. and Brown, F. (1982) Protection against foot-and-mouth disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence. *Nature* **298**, 30-33.
58. Brown, F. (1992) New approaches to vaccination against foot-and-mouth disease. *Vaccine* **10**, 1022-1026.
59. Strohmaier, K., Franze, R. and Adam, K. H. (1982) Location and characterization of the antigenic portion of the FMDV immunizing protein. *J. Gen. Virol.* **59**, 295-306.
60. Verdaguer, N., Mateu, M. G., Andreu, D., Giralt, E., Domingo, E. and Fita, I. (1995) Structure of the major antigenic loop of foot-and-mouth disease virus complexed with a neutralizing antibody: direct involvement of the Arg-Gly-Asp motif in the interaction. *Embo. J.* **14**, 1690-1696.
61. Meloen, R. H., Casal, J. I., Dalsgaard, K. and Langeveld, J. P. (1995) Synthetic peptide vaccines: success at last. *Vaccine* **13**, 885-886.
62. Glass, E. J., Oliver, R. A., Collen, T., Doel, T. R., Dimarchi, R. and Spooner, R. L. (1991) MHC class II restricted recognition of FMDV peptides by bovine T cells. *Immunology* **74**, 594-599.
63. Taboga, O., Tami, C., Carrillo, E., Nunez, J. I., Rodriguez, A., Saiz, J. C., Blanco, E., Valero, M. L., Roig, X., Camarero, J. A., Andreu, D., Mateu, M. G., Giralt, E., Domingo, E., Sobrino, F. and Palma, E. L. (1997) A large-scale evaluation of peptide vaccines against foot-and-mouth disease: lack of solid protection in cattle and isolation of escape mutants. *J. Virol.* **71**, 2606-2614.
64. Song, H., Wang, Z., Zheng, D., Fang, W., Li, Y., Liu, Y., Niu, Z. and Qiu, B. (2005) A Novel Mucosal Vaccine Against Foot-and-Mouth Disease Virus Induces Protection in Mice and Swine. *Biotechnol. Lett.* **27**, 1669-1674.