



Overview of Reverse Genetic System for influenza virus

충북대학교 의과대학
최영기 ● choiki55@chungbuk.ac.kr

Reverse genetic system이란? (DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids)

클로닝된 cDNA를 이용하여 influenza A virus를 rescue하는 plasmid DNA

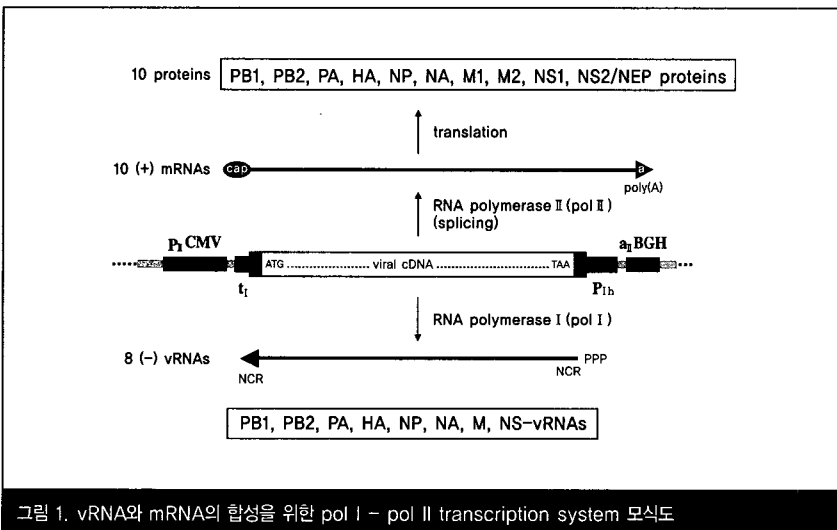
transfection system으로, 이 plasmid-based expression system에서는 viral cDNA가 RNA polymerase I (pol I)과 terminator 시퀀스 사이에 삽입이 되고 이 전체 pol I transcription unit은 RNA polymerase II (pol II)와 polyadenylation site를 옆에 두고 있다. 이 두 transcription

unit의 이러한 배치는 negative-sense viral RNA와 positive-sense mRNA를 하나의 viral cDNA template에서 합성할 수 있게 해준다.(그림 1.) (Hoffmann et al., 2000)

● Pandemic을 대비한 신종 인플루엔자 백신주 생산을 위한 reverse genetics system 개발방법

대부분의 H5N1 바이러스는 수정란 독성으로 인하여 생장이 매우 낮은 단점이 있어 백신의 대량생산에 문제점이 존재하는데, reverse genetics system을 활용하면 이러한 천연형 H5N1 바이러스(백신-숙제)의 단점을 유전적 변이를 통하여 보완함으로써 백신생산수율(및 항원성-숙제)을 극대화시킬 수 있다.

유전적으로 재조합하는 시간이 첨가 되므로(약 1~6개월), 일단 발병한 상황에서는 사용하기 힘든 단점이 있으나, 백신생산의 준비기간이 있으면 가장 효율적인 방법으로 제시되고 있다.



비 병원성의 재조합 바이러스의 제작 원리

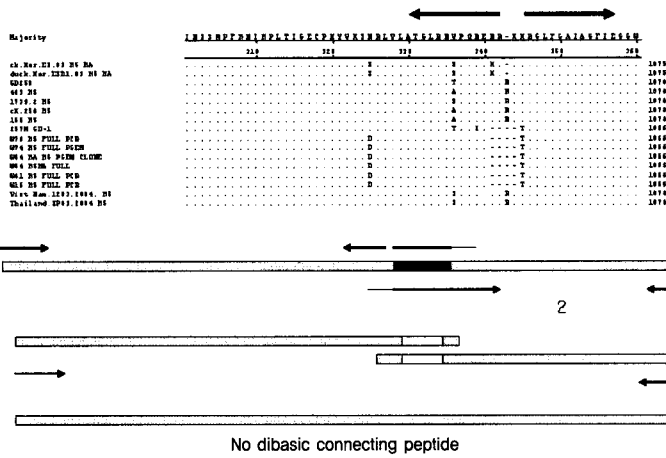


그림 2. 유전자 data를 바탕으로 HA1과 HA2 연결 부위인 connecting peptide의 dibasic 부분을 제작하여 dibasic 염기서열을 제거 함. 1차 PCR에 의해 2가닥으로 증폭된 DNA 가닥을 다시 2차 PCR을 통해 항원성과 관련된 부분의 변형 없이 재조합 바이러스를 위한 full length HA 유전자를 획득 할 수 있다.

비 병원성의 재조합 바이러스의 제작 원리

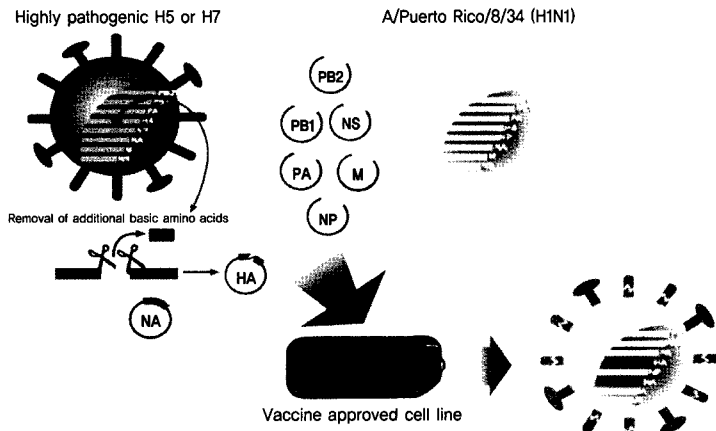


그림 3. Wild virus의 HA 유전자로부터 cleavage site의 dibasic peptide를 제거한 HA와 NA 유전자를 인체 백신생산의 back bone인 PR8 유전자와 혼합하여 인체 vaccine 생산이 가능한 cell line(vero cell)에 transection 하여 wild virus의 HA와 NA 유전자를 가진 예비 백신 virus를 생산 할 수 있다. (Webby et al, Science 2003, 302:1519-22).

>> Reverse genetic system의 장단점을 좀 더 자세히 살펴보면 다음과 같다.

■ Reverse genetic system을 이용한 백신 주 개발 장점.

- 바이러스 분리 후 각 유전자 segment들을 cloning하여 보관할 수 있으므로 sample의 보관과 이동이 자유롭다.
- 고병원성의 바이러스의 경우라도 HA gene중의 Connecting peptide를 제거하여 항원성을 변형시키지 않고도 저병원성의 바이러스로의 전환이 가능하여 수정란에서 높은 바이러스 titer를 얻을 수 있다.
- Cloning된 각 분절을 이용하여 FDA에서 백신 모체로 권장하고 있는 A/PR/8/34 바이러스와의 재조합 바이러스를 생산하여 wild virus를 이용한 경우보다 허가 받는데 용이하다.
- 새로운 변형 바이러스가 출현 시, 직접 바이러스를 분리하지 않고도 유전자 분석 결과만을 가지고도 point mutation 방법을 이용하여 신속히 백신바이러스를 준비 할 수 있다.

■ Reverse genetic system을 이용한 백신 주 개발 단점.

- Reverse genetic system을 이용한 바이러스를 재조합 할 경우 human 293T 세포주를 이용하는 경우 tumor 세포주이기 때문에 인체백신으로 사용하기 곤란한 점이 있으므로 초기 바이러스 분리부터 인체 백신으로 허가된 인체 백신 생산 가능한 Vero 세포주나 primary chicken fibroblast 세포주를 이용하도록 미국 FDA에서 권장하고 있다.
- Reverse genetic system은 human Pol I과 Pol II promotor를 사용하기

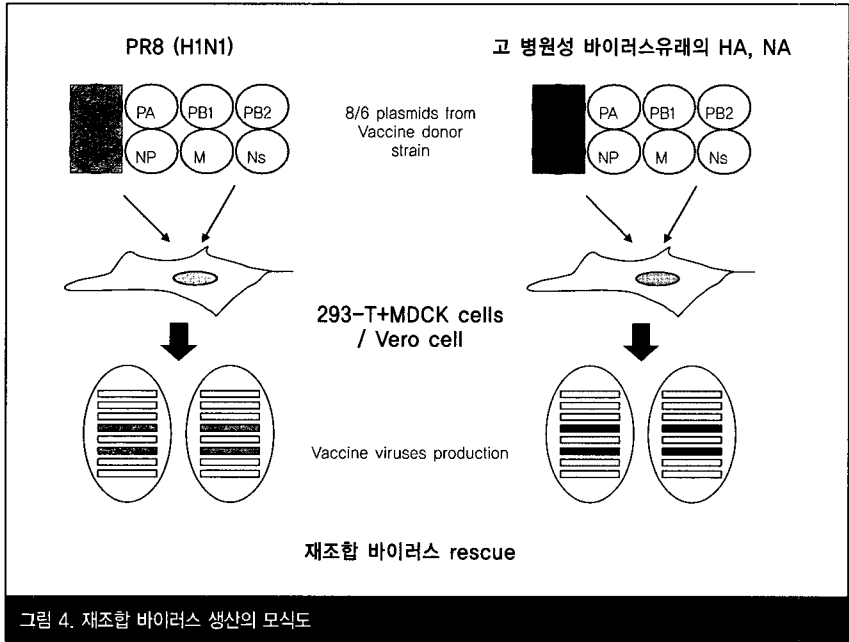


그림 4. 재조합 바이러스 생산의 모식도

때문에 Vero 세포주를 이용할 경우 293T세포주를 이용하는 것 보다 효율이 떨어질 수 있으므로 이를 극복하기 위해서는 인체백신생산 가능한 Vero cell을 이용한 효율적인 바이러스 생산방법과 primary chicken cell을 이용한 pure한 인플루엔자 바이러스 획득 방법이 확립 되어야 한다.

● Reverse genetic system을 이용한 백신 바이러스 제작 및 확인방법

- Reverse genetic system을 이용하여 백신 바이러스를 제작하고 확인하기 위해서는 다음과 같은 여러 단계를 거치게 된다.
 - H5N1 조류인플루엔자로부터 RNA의 추출 및 reverse transcription에 의한 cDNA의 확보 및 RNA Pol I - driven vector에의 cloning

- HA 절단부위의 mutation을 갖는 HA clone 확보
- HA 절단부위를 포함한 바이러스 단백질 coding region에 변이를 도입할 수 정란에서의 유전적 변형 고정장 백신균주 확보
- 8개 유전자의 plasmid를 Vero cell transfection에 의한 infectious 바이러스 rescue의 최적 조건 확립
- 공여바이러스 internal genes(PR8 모체 바이러스)와 H5N1 virus의 HA 및 NA 유전자의 total transfection에 의한 infectious H5N1 바이러스 백신주를 rescue
- 상기 바이러스의 세포배양 및 수정란에서의 titer를 HI assay, cytotoxic effect 및 pfu 등의 인자 결정
- 동물모델(mouse 또는 chicken)에 의한 백신주의 항원성 검증

- 동물모델에서 IgG class의 항체생성 profile을 검색(HI test)

■ 기대효과 및 활용 방안

- Reverse genetic system을 이용한 재조합 influenza virus의 예비 백신 주 생산방법은 빠른 시일 내에 가능함.
- Reverse genetic system을 이용해 생산 재조합 바이러스는 모체 바이러스인 PR8 바이러스의 internal 유전자를 가지고 있으므로 wild 바이러스가 가지고 있던 병원성이 저하됨을 수정란 및 마우스 실험을 통하여 증명 할 수 있음.
- Reverse genetic system을 바탕으로 좀더 다양한 예비 백신 바이러스를 선택 하여, 재조합 바이러스 생산 방법을 확립하고 빠르고 안전한 인체 백신 바이러스의 생산이 가능하도록 할 수 있음.
- 다양한 예비 백신 바이러스의 여러 mammaliana host에 백신 접종하여, 적절한 백신의 dose 및 백신 방법을 확립 할 수 있을 것으로 기대 됨.
- 예비 백신 주들의 비축은 국내 발생에 대한 대응뿐만 아니라 주변국들로의 백신 주 및 기술 이전을 통한 국가 위상을 높일 수 있을 것으로 기대됨.

참고문헌

Hoffmann, E., G. Neumann, Y. Kawaoka, G. Hobom, and R. G. Webster. 2000. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 97:6108-61

Webby RJ and Webster RG, Are we ready for pandemic influenza? 2003, Science, 302:1519-22