

Review

바이러스 질병 예방을 위한 식물 경구 백신 연구 동향

한범수*, 박종석, 김형국, 하선화, 조강진, 김용환, 김종범*
농업생명공학연구원 신기능소재개발팀

Recent Studies of Edible Plant Vaccine for Prophylactic Medicine against Virus-mediated Diseases

Bum-Soo Hahn*, Jong-Sug Park, Hyeong-Kuk Kim, Sun-Hwa Ha, Kang-Jin Cho,
Yong-Hwan Kim, Jong-Bum Kim*

Plant Metabolite Engineering Team, National Institute of Agricultural Biotechnology, 225 Seodun-Dong, Suwon 441-707, Korea

ABSTRACT Transgenic plants have been studied as delivery system for edible vaccine against various diseases. Edible plant vaccines have several potential advantages as follows: an inexpensive source of antigen, easy administration, reduced need for medical personnel, economical to mass produce and easy transport, heat-stable vaccine without refrigerator, generation of systemic and mucosal immunity and safe antigen without fetal animal-virus contaminants. The amount of recombinant antigens in transgenic plants ranged from 0.002 to 0.8% in total soluble protein, depending on promoters for the expression of interested genes and plants to be used for transformation. Throughout the last decade, edible plant vaccine made notable progresses that protect from challenges against virus or bacteria. However edible plant vaccines have still problems that could be solved. First, the strong promoter or inducible promoter or strategy of protein targeting could be solved to improve the low expression of antigens in transgenic plants. Second, the transformation technique of target plant should be developed to be able to eat uncooked. Third, marker-free vector could be constructed to be more safety. In this review we describe advances of edible plant vaccines, focusing on the yields depending on plants/promoters employed and the results of animal/clinical trials, and consider further research for the development of a new plant-derived vaccine.

Key words: Diseases, edible vaccine, mucosal immunity, transgenic plant

서 론

식물체를 이용한 경구 백신 (edible vaccine) 생산은 경제성과 안정성이 높다는 측면에서 생명공학 연구 분야의 중요한 도전 분야 중 하나로 여겨지고 있다. 기존 백신은 약독화되거나 불화된 병원체를 사용함으로써 접종 후 국소 및 전신적인 부작용 (WHO 2000)과 열에 약한 이유로 저온 보관에 따른 부수적인 경제적 부담과 접종을 위해 숙달된 전문인이 필요한 단점들이 있다. 이를 극복하고자 식

물 단백질 발현체계를 이용한 경구 백신 생산 연구는 10년 전 Mason등 (Mason et al. 1992)이 최초로 간염 바이러스의 표면 항원 (HBsAg) 발현을 담배에서 성공한 이래로 현재 세계적으로 경쟁적인 연구들이 진행되고 있다.

현재 일반적으로 사용되고 있는 근육 접종을 통한 면역 반응 유도 방법은 병원체 제거 및 차단을 위하여 일단 병원체의 생체 내 감염이 일어난 후 항원 항체 반응/세포 면역 반응이 주로 혈관계나 조직 내에서 일어나야 한다는 단점을 가지고 있다. 이러한 관점에서 경구나 비장 점막을 이용한 점막 면역반응 유도는 secretory IgA와 세포 면역반응에 의한 병원체의 생체 내 감염을 조기에 차단할 수 있다는 점에서 더욱 효과적인 질병 예방책이다. 또한 식

*Corresponding author Tel 031-299-1740 Fax 031-299-1732

E-mail bshahn@rda.go.kr or jong9571@rda.go.kr

물 경구백신을 이용한 점막 면역 반응의 연구는 홍역 바이러스와 같은 추가 접종을 필요로 하는 질병에 대해서 경구를 통합으로 쉬운 추가 접종을 유도할 수 있는 장점이 있다 (Bouche et al. 2003). 점막 감염에 대한 방어, 혈액내로 과량의 항원 투과 방지, 음식물 항원 또는 장내에 공생하는 박테리아 항원에 대한 tolerance를 주 기능으로는 하는 점막 면역계 (mucosal immune system)가 분포하는 조직으로는 gut associated lymphoid tissue (GALT), bronchus associated lymphoid tissue (BALT), nasopharynx associated lymphoid tissue (NALT) mammary glands, genitourinary lymphoid tissue 등이 있으며, 이중 점막 면역계의 70-80%를 차지하는 gastrointestinal track이 경구 백신의 주 표적 기관으로써 가장 연구가 많이 되어져 있고 GALT에서 장내 점막 면역 반응의 유도는 peyer's patch에서 일어난다 (Brandtzaeg 1996) (Figure 1).

현재 경구 백신의 개발을 위하여 진행 중인 연구는 크게 세균성 질병 예방을 위한 백신 연구와 바이러스성 질병 예방을 위한 목적으로 진행되고 있다. 세균에 대한 항원으로 사용되는 단백질로는 세균의 점막 감염에 필수적인 부착 기능을 수행하는 adhesion protein (Lee et al. 2002)과 세균의 독성 (Haq et al. 1995; Hein et al. 1996; Tacket et

al. 1998; Wang et al. 2001; Chikwamba et al. 2002)을 나타내는 독소 단백질들이 주로 사용되고 있으며 바이러스에 대한 항원으로는 바이러스의 부착 (Huang et al. 2001; Khandelwal et al. 2003; Satyavathi et al. 2003)과 구조를 이루는 단백질 (Carrillo et al. 2001; Gao et al. 2003; Marquet-Blouin et al. 2003) 등이 주로 사용되고 있다. 식물체에 항원 단백질을 발현시킨 성공한 선행 연구 결과에 의하면 재조합 단백질은 본래의 기능을 수행하는 구조를 가지고 있었으며 (Ma et al. 2003; Smith et al. 2003), 동물 모델을 이용한 효능검정 실험과 전임상 단계의 성공적인 연구 결과는 경구 백신의 실용화에 대한 기대를 한층 고무시키고 있다 (Kappusta et al. 1999; Wigdorovitz et al. 1999). 본 논문에서는 바이러스 질병 예방을 위한 경구 백신의 개발 현황을 재고하고 앞으로 개선점과 전망에 대해서 조망하고자 한다.

본 론

식물 경구 백신에 사용된 운반체의 특성

항원 단백질을 발현하는 형질 전환체에 사용된 운반체의 promoter와 terminator는 주로 CaMV 35S와 nos가 사용되어졌고 (Mason et al. 1996; Sandhu et al. 1999) 최근에 발현량의 증대를 목적으로 단백질 전사의 증대를 위한 다른 식물 유래 3' UTR의 사용 (Castanon et al. 2002; Warzecha et al. 2003) 및 단백질 번역 단계에서 양적 증대를 위한 식물 바이러스 유래의 특정 염기서열 (leader sequence)을 이용하는 방법 (Richerter et al. 2000; Huang et al. 2003)이 진행 되었으며 식물체의 이용 목적에 맞게 토마토 과실 (E8 promoter) (Sandhu et al. 2000) 또는 감자 괴경 (patatin promoter) (Martin-alonso et al. 2003)의 특정 부위에 발현을 유도하는 조직 특이적 promoter들을 이용한 방법들이 시도되었다 (Table 1, 2). 또한 plastid를 이용한 항원 단백질의 발현을 시도하여 증대된 발현량의 결과를 얻었다 (Tregoning et al. 2003). 항원 단백질 발현량은 형질전환된 식물체와 사용된 운반체에 따라 0.002%-0.8% 내외로 식물 생중량 g당 수 ng- μ g의 양상을 보이고 있다 (Table 1, 2). 그러나 경구 백신으로 작용하기 위해서는 위장의 강산성 환경과 장내의 소화 효소에 대한 분해 및 변성을 극복하고자 실질적인 양의 증대를 필요로 하고 있다. 또한 양적 증대는 항원 단백질의 고농도 섭취로 야기될 수 있는 oral tolerance를 유도하지 않는 최소 양이 필요하다 하겠다. 실질적으로 전임상 실험 단계에서 효과를 보인 경구 백신의 경우, 상추 50 g 정도면 점막면역을 유도할 수 있음을 보이는 결과도 있다 (Kappusta et al. 1999). 현재 형질 전환체의 선발을 위해 사용되고 있는 selection marker 유전자는 주로

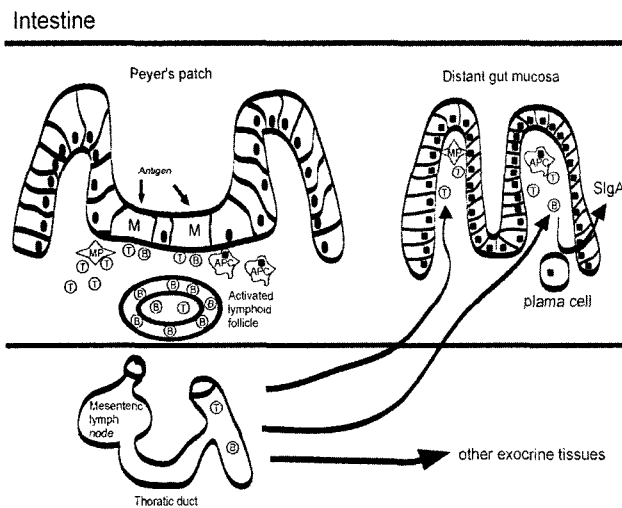


Figure 1. Scheme of inductive sites and cells traffic of intestinal immune system. Antigens are transported mainly into Peyer's patch via M cells (M) and are presented to T cells by macrophages (MP), dendritic cells (APC) and probably by B cells. Lymphoid follicles with germinal centers are activated, where primed B, memory B cells and T cells are generated. These cells migrate through lymph node to the peripheral blood circulation and extravasate mainly in the intestinal lamina propria under the influence of MP, APC and CD4⁺ T cells to plasma cells producing mainly polymeric IgA, which is transported to the intestinal lumen by epithelial transmembrane secretory component and after cleavage formed secretory IgA. Most CD8⁺ T cells migrate into the villus epithelium, where they probably mediate oral tolerance to food antigens and act as cytotoxic cells. [Figure was cited from Brandtzaeg (1996) Ann N Y Acad Sci. 778: 1-27].

Table 1. Properties of edible vaccines produced in transgenic plants (human)

| Source of Disease | Antigen | Promoter, cis acting element /terminator | Resistance marker | Expression level | Transgenic plant | Animal/clinical test | Reference |
|-----------------------------|--|---|---|---|--------------------------------|----------------------|--|
| Norwalk virus | NVCP | CaMV 35S, TEV/nos (pNV102) patatin promoter/nos (pNV140) | kan | 0.23%/TSP (tobacco leaf) (pNV102), 0.37%/TSP (tuber) (pNV140) | tobacco, potato | mouse, human | Masonet al. 1996;Tacketet al. 2000 |
| Respiratory syncytial virus | F | CaMV 35S, AMV leader sequence, pea plastocyanin enhancer/nos | n.u | n.a | apple leaf, protoplast | n.d | Sandhuet al. 1999 |
| | F | CaMV 35S/nos (pJSS3), E8/nos (pJSS4) | kan | 9.01 µg/g of fruit (pJSS3), 12.68 µg/g of fruit (pJSS4) | tomato | mouse | Sandhuet al. 2000 |
| Measles virus | H | CaMV 35S, TEV/35SCaMV (pBinH), 35S, TEV, KDEL/35S (pBinH/KDEL) | kan | n.a | tobacco | mouse | Huang,et al. 2001 |
| | H | CaMV 35S, TEV/35S | kan | 2 µg/g of carrot | carrot | mouse | Marquet-Blouinet. al. 2003 |
| | H-tetanus toxoid (L ₄ T ₄) ₂ | 2x CaMV 35S,TEV/35S | kan | n.a | carrot | mouse | Bouche,et al. 2003 |
| Rotavirus | VP6 | CaMV 35S/nos (pBIVP6), CaMV 35S, enhancer, TMV leader sequence/nos (pBEVP6) | kan | 0.006-0.02%/TSP (pBIVP6), 0.1%/TSP (pBEVP6) | potato | mouse | Matsumura et al. 2002 |
| | VP7 | CaMV 35S, KDEL/nos | kan | 0.18-3.84µg/mg of TSP | potato | mouse | Wuet al. 2003 |
| Papillomavirus | L1 | 2xCaMV 35S, TEV/vsp | kan | 23 ng/g of fresh tuber | potato | mouse | Warzechaet al. 2003 |
| | L1h | CaMV 35S, Q/Ocs | kan | 0.5%/TSP (tobacco leaf), 0.2%/TSP (potato tuber) | tobacco, potato | mouse | Biemeltet al. 2003 |
| Rabies virus | Drq 24 [G (5-24)-N (31D)]-AIMV CP | TMV CP promoter | n.u | n.a | tobacco, spinach | mouse | Yusibovet al. 1977;Modelskaet al. 1998 |
| | [G (253-275)-N (404-418)]-AIMV CP | AIMV RNA3 (NF1-g24), TMV CP (AV/A4g24) | n.u | 0.4 mg/g of tobacco leaf (NF1-g24), 50 µg/g of spinach leaf (AV/A4g24) | tobacco, spinach | mouse | Yusibovet al. 2002 |
| Hepatitis B virus | HBsAg | CaMV 35S/nos (pHB101), CaMV 35S, 2x enhancer, TEV/nos (pHB102) | kan | 2-6 ng/mg of TSP (pHB101), 66 ng/mg of TSP (pHB102) | tobacco | mouse | Masonet al. 1992; Thanavalaet al. 1995 |
| | HBsAg | CaMV 35S/nos | kan | 11-150 ng/g of lupin callus, 1-5.5 ng/g of lettuce leaf | tobacco, lupin callus, lettuce | mouse,human | Kapustaet al. 1999 |
| | HBsAg | patatin/nos | kan | 1.1 µg/g of tuber | potato | mouse | Richterret al. 2000 |
| | HBsAg | CaMV 35S, TEV/nos (pHB103), CaMV 35S, TEV, KDEL/nos (pHB105), CaMV 35S, TEV/vspS/nos (pHB106),CaMV 35S, TEV vspL/nos (pHB107), CaMV 35S,TEV TPSS/nos (pHB110)CaMV 35S, TEV /vsp (pHB104), CaMV 35S, TEV/pin2 (pHB114), CaMV 35S, Q/nos (pHB111) | kan | 0.33 µg/g of tuber (pHB103), 6.50 µg/g of tuber (pHB104), 1.25 µg/g of tuber (pHB105), 0.80 µg/g of tuber (pHB106), 2.40 µg/g of tuber (pHB107), 0.33 µg/g of tuber (pHB111), 16 µg/g of tuber (pHB114) | potato | mouse | Richterret al. 2000;Konget al. 2001 |
| | HBsAg | CaMV 35S/nos | hyg | 90-300 nag/g of leaf,5-15 nag/g of stem,6-7 nag/g of fruit | cherry tomatillo | mouse | Gaet al. 2003 |
| HBsAg | 2x CaMV 35S, TEV/vsp (HB117), 2x CaMV 35S, TEV, vspS/vsp (HB118), 2x CaMV 35S, TEV, vspL/VSP (HB119), 2x CaMV 35S, TEV, KDEL/vsp (HB121.1), 2x CaMV 35S, TEV, vspS, KDEL/vsp (HB122.1), 2x CaMV 35S, TEV, vspL/vsp (HB123.1) | kan | 128 ng/mg of TSP (HB117), 226 ng/mg of TSP (HB118), 49 ng/mg of TSP (HB119), 61 ng/mg of TSP (HB121.1), 177 ng/mg of TSP (HB122.1), 17 ng/mg of TSP (HB123.1) | tobacco cell(NT-1) | mouse | Sojikullet al. 2003 | |
| HBsAg | CaMV 35S, 2x enhancer, TEV/VSP (HB114), Ocs-mas /VSP (HB115) | kan | 2.9 or 8.0 µg/g of tobacco cell (HB115), 25 or 74 µg/g of soybean cell (HB115), 17 or 88 µg/g of potato tuber (HB114) | tobacco cell(NT-1), soybean cell, potato | n.d | Smithet al. 2003 | |
| Hepatitis E virus | ORF2 | CaMV 35S, Q/nos | hyg | 47.9 ng/g of leaf, 61.22 ng/g of fruit | tomato | n.d | Maet al. 2003 |
| Parvovirus | 2L21 epitope-Gus | CaMV 35S/nos | kan | 75 µg/g of leaf | arabidopsis | mouse | Gilet al. 2001 |

TSP: total soluble protein, Antibiotics: kan:kanamycin, ppt: phosphinothricin, hyg:hygromycin, spc:spectinomycin, KDEL: ER retention signal sequence, TEV: tobacco etch virus leader sequence, Q: TMV RNA 5' untranslated leader sequencen.d:not determined, n.u: not used, n.a:not available

Table 2. Properties of edible vaccines produced in transgenic plants (animal)

| Source of Disease | Antigen | Promoter, cis acting element /terminator | Resistance marker | Expression level | Transgenic plant | Animal/clinical test | Reference |
|-------------------------------------|-----------------------|--|-------------------|---|------------------|----------------------|---------------------------|
| Transmissible gastroenteritis virus | Glycoprotein S | CaMV 35S/nos | kan | 0.03-0.06%/TSP (0.02 µg/ 30-60 µg of TSP) | arabidopsis | mouse | Gomez et al. 1998 |
| | Glycoprotein S (N-gS) | CaMV 35S/nos | kan | 0.02-0.07%/TSP | potato | mouse | Gomez et al. 2000 |
| | Glycoprotein S | Super/nos | kan | 0.1-0.2%/TSP | tobacco | pig | Tubolyet et al. 2000 |
| Foot and mouse disease virus | VP1 | CaMV 35S/nos | kan | n.a | alfalfa | mouse | Wigdorovitz et al. 1999 |
| | VP1 | CaMV 35S/nos | kan | n.a | arabidopsis | mouse | Carrillo et al. 1998 |
| | VP1 | CaMV 35S/nos, 2x CaMV 35S/nos | kan | 0.005-0.01%/TSP | potato | mouse | Carrillo et al. 2001 |
| Rabbit hemorrhagic disease virus | VP60 | CaMV 35S, 2x enhancer/nos (pK3-VP60), CaMV 35S, /nos (pK2-VP60) | kan | 0.06-0.43 µg/mg of TSP (leaf) (pK2-VP60), 0.82-2.97µg/mg of TSP (leaf)(pK3-VP60), 195 ng/mg of TSP (tuber) (pK2-VP60), 702 ng/mg of TSP (tuber) (pK3-VP60) | potato | rabbit | Castanet et al. 1999 |
| | VP60 | patatin, ϕ10 leader sequence/proteinase inhibitor II | kan | 6-18 µg/g of tuber | potato | rabbit | Martin-Alonso et al. 2003 |
| | VP60 | CaMV 35S/nos (pK2-VP 60), CaMV 35S, 2x enhancer/nos (pK3-VP 60), CaMV 35S, 2x enhancer, ϕ10 leader sequence /nos (pK3T7-VP 60), ubiquitin/nos (pUBI-VP60), patatin, ϕ10 leader sequence/potato protease inhibitor II (pTUB2T7VP60) | kan | 0.2 µg/mg of TSP(leaf or tuber) (pK2-VP 60), 1.27 µg/mg of TSP (leaf) (pK3-VP 60), 1.11 µg/mg of TSP (leaf, tuber) (pK3T7-VP 60), 1.36 µg/mg of TSP (leaf) (pUBI-VP 60), 1.6 µg/mg of TSP (tuber) (pTUB2T7VP60) | potato | rabbit | Castanet et al. 2002 |
| Rinderpest virus | H | CaMV 35S/nos | kan | 0.12-0.49%/TSP | pigeon pea | mouse | Satyavathiet et al. 2003 |
| | H | CaMV 35S/nos | kan | 0.75%/TSP | tobacco | mouse | Khandelwal et al. 2003 |
| Hog cholera virus | E2 | CaMV 35S/nos, patatin/nos | kan | n.a | potato | n.d | Kim et al. 2002 |
| Infectious bronchitis virus | S1 | CaMV 35S/nos | kan | 3.64-11.44 µg/g of TSP | potato | mouse | Zhou et al. 2003 |

nptII이며, 형질 전환체의 후대분석의 용이함으로 bar 유전자가 또한 사용되고 있으며 GMO의 생체 안정성을 위한 selection marker 유전자가 없는 운반체가 개발되고 있다 (Hajdukiewicz et al. 2001).

식물 경구 백신으로 사용된 형질 전환체

초기 연구에서는 담배를 모델 시스템으로 사용하였으나 실질적인 상용화를 위해 감자를 비롯한 파리, 토마토, 당근, 시금치, 알팔파 등이 연구되었고 (Wigdorovitz et al. 1999; Gao et al. 2003; Ma et al. 2003; Marquet-Blouin et al. 2003), 앞으로는 단백질 함량이 높은 콩과 식물류에 대한 연구도 진행되리라 전망하며, 면역 접종이 어려운 국가의 여건에 맞는 바나나와 같은 현지 재배 가능한 식물체에 형질 전환이 이루어지리라 전망한다 (Sagi et al. 1995; Arntzen 1998). 또한 인체를 대상으로 할 때 비교적 알레르기 유발 물질이 적은 쌀을 비롯한 채소류를 이용한 경구 백신 연구도 진행되리라 전망된다.

표적 질병과 항원력 증진

경구 백신의 주요한 작용 기관인 소화기의 장을 감염 경로로 갖는 바이러스가 이상적인 경구 백신의 표적 질병으로 생각되어졌으나 간염 바이러스등을 비롯한 다른 감염 경로를 갖는 바이러스에 대해서도 현재 경구 백신 연구가 진행 중이다. 일례로 호흡기에 감염하는 바이러스 등 (Sandhu et al. 1999; Carrillo et al. 2001) 이 주 연구 대상이며 점막 면역 유도 방식도 장점막 유도 방식이외에 바이러스의 감염 조직인 비장 점막을 통한 새로운 연구도 시도되고 있다 (Tregoning et al. 2003). 식물체에서 생성된 재조합 항원 단백질의 항원력 향상을 위하여 *Vibrio cholerae* 또는 enterotoxigenetic *Escherichia coli*의 endotoxin인 cholera toxin (CT)과 heat-labile enterotoxin (LT)의 생체 내 수용체 (GM1 ganglioside)와 결합하며 비독성 부분인 CT와 LT의 subunit B를 adjuvant로 사용한 동물실험 결과 항원력을 증진시켰다 (Mason et al. 1996; Richter et al. 2000; Huang et al. 2001; Warzecha et al. 2003; Wu et al. 2003). 또한 DNA 백신과 조합하여 식물 경구 백신의 효능을 향상시키는 예

(Webster et al. 2002)와 adjuvant로 CpG DNA 를 이용하여 식물 경구 백신의 효능을 향상 시킨 연구도 시도되었다 (Biemelt et al. 2003).

바이러스 질병에 대한 식물 경구 백신 연구 (인체)

Norwalk virus

Caliciviridae 과에 속하는 Norwalk virus (NV)는 오염된 음식, 물 또는 사람을 통해서 전파되는 감염경로를 가지고 있고 인체에 급성 위장염 (acute gastroenteritis)을 유발한다 (Kapikian et al. 1996). 또한 바이러스에 감염 시 바이러스에 대한 특이 혈청 항체 (IgG, IgA, IgM)이 유발된다. Mason 등 (1996)은 NV capsid protein (NVCP)을 발현하는 형질전환체를 선발을 하였으며 재조합 단백질 발현양은 TEV leader sequence를 포함하는 운반체가 TEV를 포함하지 않는 운반체보다 3배정도 높았다. 재조합 항원 단백질의 항체 생성 효능 검정을 위한 동물실험 결과, 담배에서 발현된 항원을 cholera toxin (CT)과 함께 투여한 군과 투여하지 않는 군 사이에는 항체를 형성하는 수와 대변 IgA의 역가에 별다른 차이를 보이지 않았으며 형질 전환 감자와 cholera toxin를 함께 처리한 군에서 2배 더 높은 혈청 항체 생성 정도를 볼 수 있었다 (Mason et al. 1996). 또한 NVCP를 발현하는 감자를 20명에게 2-3회를 섭취하게 한 결과 19명에서 NVCP에 특이적인 IgA 항체 분비 세포 수가 증가되었고 이중 4명은 특이 적인 혈청 항체 IgG의 증가를, 6명은 대변 특이 항체 IgA의 역가 증가를 나타내었으며 35% (7/20명)에 해당하는 사람은 정제된 Norwalk virus-like particles 을 섭취한 사람과 같은 혈청 IgG와 IgM의 증가를 보였다 (Tacket et al. 2000).

Respiratory syncytial virus

*Paramyxoviridae*과에 속하는 respiratory syncytial virus (RSV)는 영아, 유아, 어린이 및 노인의 lower respiratory tract에 감염하며 기관지염과 폐렴을 일으키는 병원성 바이러스이다. 항원 단백질들로는 당단백질이며 transmembrane surface protein인 fusion protein (F)과 G protein이 알려져 있다 (Mackie 2003). Sandhu 등 (1999)은 F 단백질을 사과 잎의 protoplast에서 발현시키는데 성공하였으며 AMV leader와 enhancer가 있는 운반체에서 발현양 증대 효과를 확인하였다 (Sandhu et al. 1999). 또한 이들은 RSV의 F단백질을 발현하는 토마토를 선발 하여 생쥐를 이용한 동물실험에서 재조합 단백질이 Th1/Th2 세포 면역 반응을 유발함을 알았다 (Sandhu et al. 2000).

Measles virus

홍역 (measles)은 전염성이 대단히 높은 바이러스 질병으로 폐렴과 뇌염을 야기하고 심하면 사망에 까지 이르게 한

다. 전세계적으로 연간 3천 만 명의 환자가 발생하며 80만 명 정도가 사망 하는 것으로 알려져 있다 (Pan American Health Organization 2000). 홍역 백신을 사용하여 생긴 면역력은 자연적인 야생종 바이러스에 의해 생긴 면역력에 비해서 특이적인 IgG 역가가 낮고 성인이 되어서는 현저하게 감소하는 경향이 있어 백신 접종을 반복해야 한다는 단점을 가지고 있다 (Markowitz et al. 1990). 또한 모체 항체의 간섭을 배제하기 위해서 생후 12-18개월에 백신 접종이 이뤄짐으로 12개월 이전에 감염 시 많은 희생을 낼 수 있는 질병이다. Huang 등 (2001)은 hemagglutinin를 발현하는 형질전환체를 CTB와 함께 섭취 시킨 결과 특이 항체가 생성되는 것과 복강으로 투여한 경우 대조군에 비해 2배정도 많은 항체생성을 관찰하였다. 또한 바이러스 억제 실험 결과 혈청 역가에 따른 두 항체 모두에서 plaque수가 감소함을 알았다 (Huang et al. 2001). 또한 항원력을 증대하기 위해 홍역 바이러스의 hemagglutinin 를 발현하는 DNA 백신과 형질전환체를 조합하여 생쥐를 이용한 동물실험에서 항체가 증가되는 것을 확인한 실험 전략은 앞선 Huang 등 (2001)의 결과에서 보인, 낮은 항체 역가를 높이고자 하는 시도로 항체 역가 증가를 목적으로 하는 질병에 적용 가능성이 있음을 시사한다 (Webster et al. 2002). Marquet-Blouin 등 (2003)은 잎 또는 뿌리 추출물을 복강으로 주사 했을 때 항체가 형성됨을 확인하였으며 동물에서 기원한 항원은 주로 Th2반응을 일으켰으나 당근 유래 항원은 세포성 반응과 체액성 반응인 Th1/Th2-balanced response을 유발하는 사실을 알았다 (Marquet-Blouin et al. 2003). Bouche 등 (2003)은 홍역 바이러스의 hemagglutinin 단백질의 protective loop-forming B cell epitope (H386-400)과 tetanus toxoid T cell epitope (ttt830-844)를 조합한 chimeric polypeptide (L4T4)₂와 hemagglutinin 단백질에 의해서 유도되는 면역반응이 Th1/Th2균형에 차이가 있음을 보여주었다 (Bouche et al. 2003).

Rotavirus

인체에 감염하는 rotavirus는 어린아이의 심각한 설사를 유발하는 원인 바이러스로 알려져 있고 세계적으로 매년 백만 명의 사망자를 일으키는 질병이다 (Avendano et al. 1993). *Reoviridae* 과에 속하는 rotavirus의 capsid는 두 층으로 이루어져 있으며 바깥쪽의 capsid는 단백질 VP7과 VP4로, 안쪽 capsid는 VP6 단백질로 구성되어 있다 (Taraporewala et al. 2004). 계놈은 11개의 절편으로 형성된 이중나선 RNA이며 구조 단백질 VP (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6, VP7)들과 비구조 단백질 NSP (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5)들로 구성되어 있다 (Taraporewala et al. 2004). Matsumura 등 (2002)은 형질 전환한 감자에서 단백질 발현양이 곤충세포 (Sf9)에서 발현된 양의 1/3에 해당하는 효율을 보이며 감자 괴경 (VP6의 750 ng)을 2주 간격으로 두 번 복강 주

사한 결과 비형질 전환체를 주사한 대조군에 비해 2배의 높은 흡광도를 나타냄을 확인하였다 (Matsumura et al. 2002). Wu 등 (2003)은 human group A rotavirus serotype G1의 VP7을 포함하는 감자 괴경과 cholera toxin 또는 cholera toxin B를 함께 투여한 군에서 증가된 항체 역가를 확인하였고 침과 소변에 비하여 대변에서 더 높은 IgA의 역가를 관찰하였다. 바이러스 중화 실험 결과 혈청 내에는 중화항체가 존재하지 않았으나 대변에서 대조군에 비해 대략 60배의 높은 중화 항체가 생성됨을 확인하였다 (Wu et al. 2003).

Papillomavirus

자궁 경부암 (Cervical cancer)의 주 원인 바이러스로 알려진 human papillomavirus (HPV)는 매년 세계적으로 50만 명의 여성에서 발병하고 있으며, 현재 발병을 일으키는 주 바이러스 type으로는 12종류 (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59)가 알려져 있다 (zur Hausen 2002). 바이러스 게놈은 8개의 open reading frame (E6, E7, E1, E2, E4, E5, L2, L1)을 갖는 dsDNA로 구성되어 있으며 크기는 6,800-8,000 bp이다. 이중 L1과 L2는 capsid 단백질을 만드는 유전자이며 capsid 단백질은 구강 투여 시 혈청 IgG와 IgA를 증가 시키는 것으로 알려져 있다 (Rose et al. 1999). Warzecha 등 (2003)은 쌍자엽 식물 codon usage에 맞게 합성된 human papillomavirus 11 (HPV11)의 L1 capsid protein을 발현하는 형질전환체에서 native HPV11 virion (직경 55 nm)과 비슷한 capsid 유사 구조를 확인하였으며 동물실험 결과 LT를 함께 먹인 군에서 대조군에 비해 유의성 있는 항체 역가 증가가 나타남을 관찰하였다 (Warzecha et al. 2003). Papillomavirus 16의 L1h capsid protein을 발현하는 형질전환체를 이용한 동물실험에서 정제된 HPV16 L1 VLP를 피하주사 후 항체가 생성되며 또한 형질 감자 괴경과 cholera toxin B 또는 CpG plasmid를 함께 섭취 한 군에서 항체 증가를 확인하였다 (Biemelt et al. 2003).

Rabies virus

Rhabdoviridae 과에 속하며 광견병 (rabies)를 일으키는 rabies virus는 단일 사슬 RNA로 구성된 게놈을 가지고 있으며 다섯 개 (N, P, M, G, L)의 유전자를 암호화하고 있다. 이 바이러스는 5가지의 혈청형과 7개의 유전형으로 나뉘어져 있다. 매년 세계적으로 30,000명 이상의 환자가 발생하며 감염 후 신경계 장애를 유발하고 혼수 상태를 거쳐 사망에 이르며 치사율이 최대 57%에 달하는 질병이다 (Jackson 2002). 주 항원 물질로 glycoprotein (G protein)이 알려져 있고 단백질 서열이 잘 보존된 nucleoprotein은 진단을 위해 사용되고 있다 (Woldehiwet 2002). Yusibov 등 (1997)은 alfalfa mosaic virus coat protein과 광견병 (rabies virus)의 glycoprotein (G5-24), nucleoprotein (31D)의 chimeric epitope

(Drg 24)를 fusion 시킨 재조합 alfalfa mosaic virus (AIMV)-CPDrg24을 복강 투여 후 특이 항체가 증가됨을 확인하였고 바이러스 중화실험에서 평균 90%의 중화도를 관찰하였다 (Yusibov et al. 1977). 앞선 실험에서 사용한 AIMV-CPDrg24를 복강 주사 후 혈청에서 대조군에 비해 3배 높은 항체 역가가 관찰되었고 광견병 바이러스 CVS-11를 이용한 중화 실험에서 중화 항체 역가가 확인되었다. 또한 광견병 바이러스 CVS-24를 이용한 공격 접종 실험에서 16일 후에도 40%의 생존률이 관찰되었다. 또한 시금치를 위장관 삽입법과 구강 투여법으로 투여한 실험 결과 혈청 내 IgG와 IgA의 2배 증가와 대변 IgA의 2.8배 증가가 각각 확인되었다 (Modelska et al. 1998). Yusibov 등 (2002)은 glycoprotein (G protein) (amino acids 253-275)과 nucleoprotein (N protein) (amino acids 404-418)을 AIMV의 coat protein에 fusion된 형태의 단백질을 발현하는 바이러스를 복강 주사한 후 특이 항체가 형성됨을 관찰하였고 rabies virus 3374L를 이용한 공격접종 실험에서 10마리 모두 생존함을 확인하였다. 인체를 이용한 임상 실험에서 바이러스 백신으로 접종된 군에게 시금치를 먹인 경우 5명중 3명에서 특이적인 혈청 IgG가 증가되었고 바이러스 백신으로 접종 되지 않은 군에게 시금치를 먹인 경우 9명중 4명에서 특이적인 혈청 IgG가 증가되었으며 이중 3명은 혈청 IgA가 증가되었다 (Yusibov et al. 2002).

Hepatitis B virus

Hepadnaviridae 과에 속하는 B형 간염 바이러스는 세계적으로 3억 5천명의 만성 보균자가 있고 간경변 (cirrhosis) 및 간암을 유발하는 바이러스로 알려져 있다 (Ribeiro et al. 2002). 바이러스의 크기는 42 nm이며 게놈은 3.2 kb 크기의 이중 나선으로 된 DNA로 현재까지 알려진 가장 작은 DNA 바이러스이며 4개의 유전자 [surface gene (S), core gene (C), polymerase gene (P), X gene (X)], 4가지의 혈청형 (adw, ayw, adr, ayr)과 7가지의 유전자형 (A-G)이 현재 알려져 있고 다양한 지역적 분포도를 나타내고 있다 (Kao et al. 2002). Mason 등 (1992)은 전자현미경을 이용하여 담배잎 추출물 내에 있는 바이러스 유사 입자 직경이 10-40 nm (평균 직경은 22 nm) 크기임을 관찰하였다 (Mason et al. 1992). 이들 저자들에 의한 연구 결과는 바이러스 질병 예방을 위한 식물 경구백신의 개척적인 연구 결과로 큰 의의가 있다. 또한 위의 담배 형질 전환체에서 정제된 rHBsAg를 생쥐에 복강 주사 후 특이 항체가 증가됨이 확인되었고 T cell을 자극 할 수 있음이 관찰되었다. 이러한 실험 결과는 식물 유래 항원이 동물이나 미생물에서 발현된 단백질과 똑같은 항원력을 갖고 있다는 사실을 증명하고 있다 (Thanavala et al. 1995). 동물실험에서 입증된 식물 경구백신의 효과를 인체를 통해 검증하는 실험 결과로 형질 전환된 상추를 이용한 임상 실험에서 3명중 2명에서 최

소 예방 단위 (10 U/L)보다 높은 혈청 항체가 나타났다 (Kapusta et al. 1999). Richter 등 (2000)은 HBsAg를 발현하는 형질전환체를 cholera toxin 과 함께 구강 투여 후 혈청 항체 증가를 확인 하였고 HBsAg를 복강 투여 후 항체가 증가됨을 확인하였다. 또한 이들 저자들은 8가지 운반체들을 사용하여 전사와 번역의 영향에 따른 항원 발현양을 조사하였다. 이들 운반체중 pHB114 가 가장 많은 발현양을 보였으며 전체 수용성 단백질의 0.25%까지 발현양을 증대 시켰다 (Richter et al. 2000). 형질 전환된 감자의 괴경과 cholera toxin을 먹인 후 6주 후에 특이 항체의 증가와 rHBsAg의 주사 후 형질 전환된 괴경과 cholera toxin를 먹인 경우 항체가 증가됨이 확인 되었다 (Kong et al. 2001). 또한 cholera toxin없이 형질 전환된 괴경을 투여한 군에서 순간적인 항체 증가를 보였고 rHBsAg를 주사 할 경우 항체가 증가되었으며 이는 가열 후에도 항원력이 유지되었다 (Kong et al. 2001). Gao 등 (2003)은 단백질 발현양이 앞에서 상대적으로 높은 수치를 나타냄을 관찰하였고 구강으로 초기 면역 반응을 유도한 후 근육 주사에 의한 booster를 시도 했을 때는 항체 유도에 실패를 했으나, 주사로 초기 면역반응을 유도한 후 생쥐에게 구강으로 booster를 시도한 경우에는 항체가 증가됨을 관찰하였다 (Gao et al. 2003). 또한 다양한 운반체를 사용하여 단백질 발현양을 담배 세포 (NT-1)에서 측정 한 연구결과에서 최대 발현양은 HB118 운반체로 형질 전환된 세포에서 나타났으며 35%의 a determinant (간염 바이러스에 일반적으로 있는 epitope)를 포함하고 있었다. Vsp α S와 fusion된 단백질에서 환원제 DTT를 첨가한 시료의 SDS-PAGE 결과에서 더 많은 HBsAg의 oligomerization (dimer-tetramer)을 보였고 동물 실험에서 vsp α S와 fusion된 단백질이 더 높은 항체 역가를 나타내었다 (Sojikul et al. 2003). 또한 식물체에서 발현된 HBsAg의 세포 내 구조적 특성을 동물세포에서 발현된 HBsAg와 비교 분석한 연구 결과, HB115로 형질 전환된 담배세포에서 발현된 HBsAg는 소포체의 lumen에서 미세관 구조를 형성 하였고 세포 내 막구조 내에 항원 단백질이 존재하고 있음이 확인 되었다. HB114로 형질 전환된 감자의 괴경과 앞에서는 대두세포에서와 유사한 조면 소포체 내의 미세관 구조와 14-15 nm의 둥근 입자구조가 관찰되었으며 세포의 막구조 내에 항원 단백질이 집적됨을 알 수 있었다. 담배세포에서 팽창된 소포체를 관찰하지 못하였으며 그 이유는 단백질 발현양이 콩과 감자에 비해 상대적으로 낮은 것으로 추정하고 있다 (Smith et al. 2003).

바이러스 질병에 대한 식물 경구 백신 연구 (동물)

Transmissible gastroenteritis virus

Coronaviridae 과에 속하는 transmissible gastroenteritis virus (TGEV)는 신생 돼지에게 급성설사를 일으키며 특히

방어 면역체계가 생기기 전인 신생 돼지에게 감염되면 치명적으로 알려져 있다. 현재 바이러스 감염에 대한 예방책으로는 임신한 어미 돼지에게 면역 반응을 유도시킨 후 어린 돼지로 모체 항체를 전이하는 것이 바람직한 방법으로 생각되어 지고 있다. TGEV의 주 항원 단백질은 spike protein (glycoprotein S)으로 아미노 말단에 4개의 (A, B, C, D) epitope들이 밝혀져 있으며 glycoprotein S의 아미노 말단 절반에 해당하는 부분만으로도 면역 방어 체계를 유발하는 것으로 알려져 있다 (Tuboly et al. 1990). Gomez 등 (1998)은 TGEV의 spike protein을 발현하는 형질전환체를 이용한 동물실험 결과 재조합 단백질을 근육 접종한 경우 spike protein에 대한 특이 항체가 생성되었으며 바이러스 중화 실험에서 2.2-3.5의 중화도를 나타냄을 확인하였다 (Gomez et al. 1998). 동일 저자들은 TGEV의 glycoprotein S의 아미노 말단 영역 (N-gS)를 발현하는 괴경을 이용한 동물실험에서 복강으로 면역 반응을 유도한 군에서 항체가 형성됨을 관찰하였다 (Gomez et al. 2000). 또한 발현양의 증대를 목적으로 여러 운반체를 이용한 glycoprotein S의 발현 연구 결과, 앞선 Gomez (1998)등의 결과에 비해 5-10배 정도의 많은 양을 얻었고 (Tuboly et al. 2000) 동물실험에서 특이 항체의 증가와 바이러스중화 효과가 관찰되었다 (Tuboly et al. 2000). 이러한 실험 결과는 돼지를 비롯한 큰 동물에 속하는 가축에 대한 경구 백신 실용화 측면에서 큰 의의가 있다.

Foot and mouth disease virus

Picornaviridae 과에 속하는 foot and mouth disease virus (FMDV)는 주로 가축에 감염하며 Loeffler 등 (1897)이 FMD의 주 원인체를 밝혀냈으며 현재까지 7종의 serotype (A, O, Asia1, SAT1, SAT2, SAT3)이 알려져 있다 (Davies 2002). 바이러스의 게놈은 단일 사슬 RNA로 구성되어 있고 polyprotein 형태로 단백질이 발현되며 바이러스 protease 인 L^{pro}, 2A, 3C^{pro}에 의해서 mature가 일어난다. Capsid를 구성하는 구조 단백질로는 VP0, VP1, VP2 (1AB, 1D, 1C)가 알려져 있다 (Mason et al. 2003). Wigdorovitz 등 (1999)은 FMDV serotype O1 campos (O1C)의 VP1을 발현하는 형질전환체를 이용한 동물실험에서 복강 주사 후 항체가 형성됨을 확인하였고 바이러스 공격접종 실험 결과 복강으로 투여한 군에서 77%-80%의 보호율과 앞을 먹인 군에서는 66%-75%의 보호율이 나타남을 관찰하였다 (Wigdorovitz et al. 1999). 또한 Carrillo 등 (1998)은 FMDV serotype O1 campos (O1C)의 VP1를 발현하는 형질전환체를 선발하여 동물실험한 결과 항체가 생성됨을 관찰하였고 바이러스 공격접종 실험에서 10⁴의 바이러스 치사량을 복강으로 투여한 14마리 모두에서 바이러스에 대한 방어 효과가 있음을 확인하였다 (Carrillo et al. 1998). 동일 저자들은 FMDV의 VP1을 발현하는 감자 형질전환체를 생쥐에게 복강 주사 후 특이 항체 증가되며 FMDV O1C를 이용한 공격접종

실험에서 87%-91%의 방어 효과가 나타남을 관찰하였다 (Carrillo et al. 2001).

Rabbit hemorrhagic disease virus

Caliciviridae 과에 속하는 rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV)는 토끼에 급성 간 손상과 혈관 내 출혈을 유발하는 질병으로 바이러스 capsid를 구성하는 주 단백질로는 VP60가 알려져 있다 (Liu et al. 1984; Parra et al. 1993). Castanon 등 (1999)은 RHDV의 VP60를 발현하는 형질전환체를 토끼에게 피하 주사 및 근육 주사하여 면역 반응을 유도한 경우 특히 항체가 증가됨을 알았고 virulent RHDV를 사용한 공격접종 실험에서 두 마리 토끼는 모두 생존 함을 확인하였다 (Castanon et al. 1999). 동일 저자들은 RHDV의 VP60를 발현하는 형질 전환체를 동결 건조하여 보존하는 방법으로 항원량을 일정하게 유지 하였고 동결 건조된 감자를 토끼에게 피하 및 근육 주사 후 특히 항체의 증가를 확인하였고 RHDV를 이용한 공격접종 실험에서 방어 효과를 관찰하였다 (Castanon et al. 2002). Martin-Alonso 등 (2003)은 항원의 온도에 따른 안정성 분석을 위하여 형질 전환된 감자 괴경을 4°C, 암실조건에서 2달간 보관 후 괴경 g당 18 µg에서 6.25 µg으로 감소하는 결과를 관찰하였다. 형질전환 감자 동결건조 분말을 토끼에게 구강 투여한 결과 특히 항체가 증가하였으며 또한 virulent RHDV 2를 이용한 공격접종 실험에서 가장 높은 항체 역가를 갖는 토끼는 생존함을 관찰하였다 (Martin-Alonso et al. 2003).

Rinderpest virus

소의 역병 (murrain)으로 알려진 rinderpest는 전염성이 강하며 소, 버팔로, 양, 염소 등 반추동물에 감염하는 것으로 알려져 있으며, 주로 아프리카, 중앙아시아, 남아시아에서 발병하고 있다 (Barret et al. 1999). *Paramyxoviridae* 과에 속하는 rinderpest virus는 단일 사슬 RNA로 구성된 게놈을 가지며 항원 단백질로는 두 개의 당단백질인 hemagglutinin 과 fusion protein이 알려져 있다. Satyavathi 등 (2003)은 rinderpest virus의 hemagglutinin 를 발현시키기 위해 비둘기콩의 cotyledonary node를 이용해 실험한 결과 다른 두 과 식물 보다 훨씬 높은 67%의 형질 전환율을 확인하였다 (Satyavathi et al. 2003). Khandelwal 등 (2003)은 rinderpest virus의 hemagglutinin 를 발현하는 형질전환체가 T1세대에서도 재조합 단백질을 발현함을 확인하였고 rinderpest와 peste des petits ruminants virus를 이용한 바이러스 중화 실험에서 식물 유래 hemagglutinin 단백질이 생쥐에서 기능적인 항 hemagglutinin 항체를 생성할 수 있음을 증명하였다 (Khandelwal et al. 2003).

기타 바이러스

Ma 등 (2003)은 Hepatitis E virus의 ORF2 유전자를 발현하는 형질전환체에서 재조합 단백질량은 과실에서 더 많이 발현됨을 확인 하였다 (Ma et al. 2003). Kim 등 (2002)은 hog cholera virus의 1023 bp 크기의 유전자를 발현하는 과정에서 전사효율은 patatin promoter가 10배 이상의 높은 효과를 관찰하였다 (Kim et al. 2002). Gil 등 (2001)은 canine parvovirus (CPV)의 2L21 epitope를 GUS에 결합한 fusion 단백질 형태로 발현하는 형질전환체를 이용한 동물실험에서 복강 투여한 군과 잎 추출물을 구강 투여한 군에서 모두 VP2에 대한 항체가 형성됨을 관찰하였다 (Gil et al. 2001). Zhou 등 (2003)은 Infectious bronchitis virus (IBV)의 S1 glycoprotein을 발현하는 형질전환 감자를 생쥐에게 위장관 삽입법으로 투여한 군에서 항체 증가를 확인하였고 구강 투여와 근육 주사한 병아리에서 항체 증가 및 바이러스를 이용한 공격접종 실험에서 방어 효과를 보였다 (Zhou et al. 2003).

결 론

현재 사용중인 백신은 접종의 불편함과 적정 접종시기를 놓침으로 인한 잦은 발병 및 생약독 백신 사용 시 돌연변이가 발생할 수 있으며 또한 제조 과정이나 보관 중에 병원성 바이러스에 오염될 가능성이 높으며 점막 감염 병원균에 대하여 예방 효율성이 낮다는 문제점을 갖고 있다. 이에 비해 식물체를 이용한 경구 백신은 접종이 편리하고 식물체를 이용한 대량생산이 가능하며 수송이 편리하고 열에 안정함으로 보관과 수송에 대한 경비 절감 효과로 기존의 백신에 비하여 높은 가격 경쟁력을 갖을 수 있는 장점이 있다. 또한 경구법으로 점막면역과 전체적인 면역반응을 유도시킬 수 있기 때문에 호흡기나 구강 또는 장 점막세포를 경유하는 병원성 바이러스와 세균의 감염에 대하여 숙주 세포에 감염하기 전에 점막면역으로 조기에 차단할 수 있어서 예방 효과가 탁월한 경구용 백신 개발이 가능하다.

현재 초기 경구 백신의 단점을 보완하고자 새로운 시도들이 여러 연구자들에서 진행되고 있다. 경구 백신으로의 작용을 위해서 사용되는 항원 단백질은 소화기 내에서 쉽게 분해가 일어나므로 발현양 증대와 항원 단백질의 항원력을 높이기 위해 다양한 연구가 시도되고 있다. 첫째, 항원 단백질의 발현양은 식물에서 대체로 0.002%-0.8%내의 매우 낮은 양이 발현되며 이러한 적은 발현양 문제를 극복하고자 조직 특이적 promoter와 식물 유래 3'UTR의 조합을 통한 단백질 발현양을 극대화 시키는 방법 (Richter et al. 2000; castanon et al. 2002; Warzecha et al. 2003), plastid형질전환을 이용하는 방법 (Tregoning et al. 2003), 단백질 축적을 위해 세포 내 소기관 (소포체)에 발현하는 방법 등에 관한

연구 (Huang et al. 2001; Wu et al. 2003; Sojikul et al. 2003)들이 활발히 시도되고 있고 또한 동물 유래의 유전자를 식물에 맞게 codon을 최적화 시키는 시도들이 있다 (Sojikul et al. 2003). 둘째, 경구 투여 시 항원성이 낮은 단백질의 항원성을 높이기 위해 고전적으로 사용되는 adjuvant인 미생물 유래 cholera toxin 또는 열에 약한 대장균 독소를 이용한 항원력 증대 방법에 대한 연구가 진행되고 있으며 (Mason et al. 1996; Richter et al. 2000; Huang et al. 2001; Warzecha et al. 2003; Wu et al. 2003) 또한 동물이나 사람에게 직접 경구 백신으로 사용하기 위하여 감자, 토마토, 바나나, 시금치 등에서 항원 유전자 발현 연구가 시도되고 있다 (Arntzen 1998; Wigdorovitz et al. 1999; Gao et al. 2003; Ma et al. 2003; Marquet-Blouin et al. 2003). 더 나아가 형질전환될 식물체의 특이적인 당구조적 차이로 인한 알레르기 유발가능성을 방지하기 위해 동물 세포에 존재하지 않는 glycosylation에 관여하는 효소에 대한 특성 연구 (Lerouge et al.1998; Lerouge et al. 2000; Fotisch et al. 2001) 가 진행 중이며 이를 통한 억제 연구가 진행되면 알레르기 유발 문제점을 최소화할 수 있을 것으로 전망되며 앞으로 실용화를 위한 새로운 경구 백신 개발은 주 소비자 인 인체와 가축에 사용하기 위해서 단백질 발현량의 극대화를 위한 inducible promoter 개발과 경구 백신의 생체 내 유해성 연구도 아울러 진행되는 것이 필수적이라 전망된다.

인용문헌

- Arntzen CJ (1998) Pharmaceutical foodstuffs-oral immunization with transgenic plants. *Nat Med* 4: 502-503
- Avendano P, Matson DO, Long J, Whitney S, Matson CC, Pickering LK (1993) Costs associated with office visits for diarrhea in infants and toddlers. *Pediatr Infect Dis J* 12: 897-902
- Barrett T, Rossiter PB (1999) Rinderpest: the disease and its impact on humans and animals. *Adv Virus Res* 53: 89-110
- Biemelt S, Sonnewald U, Galmbacher P, Willmitzer L, Muller M (2003) Production of human papillomavirus type 16 virus-like particles in transgenic plants. *J Virol* 77: 9211-9220
- Bouche FB, Marquet-Blouin E, Yanagi Y, Steinmetz A, Muller CP (2003) Neutralising immunogenicity of a polypeptide antigen expressed in a transgenic food plant: a novel antigen to protect against measles. *Vaccine* 21: 2065-2072
- Carrillo C, Wigdorovitz A, Oliveros JC, Zamorano PI, Sadir AM, Gomez N, Salinas J, Escibano JM, Borca MV (1998) Protective immune response to foot-and-mouth disease virus with VP1 expressed in transgenic plants. *J Virol* 72: 1688-1690
- Carrillo C, Wigdorovitz A, Trono K, Dus Santos MJ, Castanon S, Sadir AM, Ordas R, Escibano JM, Borca MV (2001) Induction of a virus-specific antibody response to foot and mouth disease virus using the structural protein VP1 expressed in transgenic potato plants. *Viral Immunol* 14: 49-57
- Castanon S, Martin-alonso JM, Martin MS, Boga JA, Alonso P, Parra F, Ordas RJ (2002) The effect of the promoter on expression of VP 60 gene from rabbit hemorrhagic disease virus in potato plants. *Plant Sci* 162: 87-95
- Castanon S, Marin MS, Martin-Alonso JM, Boga JA, Casais R, Humara JM, Ordas RJ, Parra F (1999) Immunization with potato plants expressing VP60 protein protects against rabbit hemorrhagic disease virus. *J Virol* 73: 4452-4455
- Chikwamba R, Cunnick J, Hathaway D, McMurray J, Mason H, Wang K (2002) A functional antigen in a practical crop: LT-B producing maize protects mice against Escherichia coli heat labile enterotoxin (LT) and cholera toxin (CT). *Transgenic Res* 11: 479-493
- Davies G (2002) Foot and mouth disease. *Res Vet Sci* 73: 195-199
- Fotisch K, Vieths S (2001) N- and O-linked oligosaccharides of allergenic glycoproteins. *Glycoconj J* 18: 373-390
- Gao Y, Ma Y, Li M, Cheng T, Li SW, Zhang J, Xia NS (2003) Oral immunization of animals with transgenic cherry tomatillo expressing HBsAg. *World J Gastroenterol* 9: 996-1002
- Gil F, Brun A, Wigdorovitz A, Catala R, Martinez-Torrecuadrada JL, Casal I, Salinas J, Borca MV, Escibano JM (2001) High-yield expression of a viral peptide vaccine in transgenic plants. *FEBS Lett* 488: 13-17
- Gomez N, Carrillo C, Salinas J, Parra F, Borca MV, Escibano JM (1998) Expression of immunogenic glycoprotein S polypeptides from transmissible gastroenteritis coronavirus in transgenic plants. *Virology* 249: 352-358
- Gomez N, Wigdorovitz A, Castanon S, Gil F, Ordas R, Borca MV, Escibano JM (2000) Oral immunogenicity of the plant derived spike protein from swine-transmissible gastroenteritis coronavirus. *Arch Virol* 145: 1725-1732
- Hajdukiewicz PT, Gilbertson L, Staub JM (2001) Multiple pathways for Cre/lox-mediated recombination in plastids. *Plant J* 27: 161-170
- Haq TA, Mason HS, Clements JD, Arntzen CJ (1995) Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science* 268: 714-715
- Hein MB, Yeo TC, Wang F, Sturtevant A (1996) Expression of cholera toxin subunits in plants. *Ann N Y Acad Sci* 792: 50-56
- Huang Z, Dry I, Webster D, Strugnell R, Wesselingh S (2001) Plant-derived measles virus hemagglutinin protein induces neutralizing antibodies in mice. *Vaccine* 19: 2163-2171
- Jackson AC (2002) Update on rabies. *Curr Opin Neurol* 15: 327-331
- Kao JH, Chen DS (2002) Global control of hepatitis B virus infection. *Lancet Infect Dis* 2: 395-403
- Kapikian AZ, Estes MK, Chanock RM (1996) Norwalk group of viruses. In *Fields Virology*, eds. Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP,

- Roizman B, Straus SE (Raven, New York): 783-810
- Kapusta J, Modelska A, Figlerowicz M, Pniowski T, Letellier M, Lisowa O, Yusibov V, Koprowski H, Plucienniczak A, Legocki AB (1999) A plant-derived edible vaccine against hepatitis B virus. *FASEB J* 13: 1796-1799
- Khandelwal A, Sita G L, Shaila MS (2003) Expression of hemagglutinin protein of rinderpest virus in transgenic tobacco and immunogenicity of plant-derived protein in a mouse model. *Virology* 308: 207-215
- Kim HS, Jeon JH, Kim CJ, Joung H (2002) Introduction of hog cholera virus gene into potato plants by *Agrobacterium*-mediated transformation and the analysis of its expression. *J Plant Biotechnol* 4: 155-161
- Kong Q, Richter L, Yang YF, Arntzen CJ, Mason HS, Thanavala Y (2001) Oral immunization with hepatitis B surface antigen expressed in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 11539-11544
- Lee YS, Hwang CH (2002) Development of transgenic carrot oral vaccine to protect against diarrhea of piglets. *Korean J Plant Biotechnol* 29: 287-293
- Lerouge P, Bardor M, Pagny S, Gomord V, Faye L (2000) N-glycosylation of recombinant pharmaceutical glycoproteins produced in transgenic plants: towards an humanisation of plant N-glycans. *Curr Pharm Biotechnol* 1: 347-354
- Lerouge P, Cabanes-Macheteau M, Rayon C, Fischette-Laine AC, Gomord V, Faye L (1998) N-glycoprotein biosynthesis in plants: recent developments and future trends. *Plant Mol Biol* 38: 31-48
- Liu SJ, Xue HP, Pu BQ, Quian NH (1984) A new viral disease in rabbits. *Anim Hubs Vet Med* 16: 253-255
- Loeffler F, Frosch P (1897) Summarischer bericht/uber der ergebnisse der untersuchungen zur erforschung der maul-und klauenseuche. *Zentralblatt Bakt Abt Orig* 22: 257-259
- Ma Y, Lin SQ, Gao Y, Li M, Luo WX, Zhang J, Xia NS (2003) Expression of ORF2 partial gene of hepatitis E virus in tomatoes and immunoactivity of expression products. *World J Gastroenterol* 9: 2211-2215
- Mackie PL (2003) The classification of viruses infecting the respiratory tract. *Paediatr Respir Rev* 4: 84-90
- Markowitz LE, Preblud SR, Fine PE, Orenstein WA (1990) Duration of live measles vaccine-induced immunity. *Pediatr Infect Dis J* 9: 101-110
- Marquet-Blouin E, Bouche FB, Steinmetz A, Muller CP (2003) Neutralizing immunogenicity of transgenic carrot (*Daucus carota* L.)-derived measles virus hemagglutinin. *Plant Mol Biol* 51: 459-469
- Martin-Alonso JM, Castanon S, Alonso P, Parra F, Ordas R (2003) Oral immunization using tuber extracts from transgenic potato plants expressing rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein. *Transgenic Res* 12: 127-130
- Mason HS, Ball JM, Shi JJ, Jiang X, Estes MK, Arntzen CJ (1996) Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 5335-5340
- Mason HS, Lam DM, Arntzen CJ (1992) Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 11745-11749
- Mason PW, Grubman MJ, Baxt B (2003) Molecular basis of pathogenesis of FMDV. *Virus Res* 91: 9-32
- Matsumura T, Itchoda N, Tsunemitsu H (2002) Production of immunogenic VP6 protein of bovine group A rotavirus in transgenic potato plants. *Arch Virol* 147: 1263-1270
- Modelska A, Dietzschold B, Sleysh N, Fu ZF, Steplewski K, Hooper DC, Koprowski H, Yusibov V (1998) Immunization against rabies with plant-derived antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 2481-2485
- Pan American Health Organization (2000) Global measles efforts. In: *EPI newsletter*. 22: 5
- Parra F, Boga JA, Marin MS, Casais R (1993) The amino terminal sequence of VP60 from rabbit hemorrhagic disease virus supports its putative subgenomic origin. *Virus Res* 27: 219-228
- Richter LJ, Thanavala Y, Arntzen CJ, Mason HS (2000) Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization. *Nat Biotechnol* 18: 1167-1171
- Ribeiro RM, Lo A, Perelson AS (2002) Dynamics of hepatitis B virus infection. *Microbes Infect* 4: 829-835
- Sagi L, Panis B, Remy S, Schoofs H, De Smet K, Swennen R, Cammue BP (1995) Genetic transformation of banana and plantain (*Musa spp.*) via particle bombardment. *Biotechnology (NY)* 13: 481-485
- Sandhu JS, Krasnyanski SF, Domier LL, Korban SS, Osadjan MD, Buetow DE (2000) Oral immunization of mice with transgenic tomato fruit expressing respiratory syncytial virus-F protein induces a systemic immune response. *Transgenic Res* 9: 127-135
- Sandhu JS, Osadjan MD, Krasnyanski SF, Domier LL, Korban SS, Buetow DE (1999) Enhanced expression of the human respiratory syncytial virus-F gene in apple leaf protoplasts. *Plant Cell Rep* 18: 394-397
- Satyavathi VV, Prasad V, Khandelwal A, Shaila MS, Sita GL (2003) Expression of hemagglutinin protein of Rinderpest virus in transgenic pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] plants. *Plant Cell Rep* 21: 651-658
- Smith ML, Richter L, Arntzen CJ, Shuler ML, Mason HS (2003) Structural characterization of plant-derived hepatitis B surface antigen employed in oral immunization studies. *Vaccine* 21: 4011-4021
- Sojikul P, Buehner N, Mason HS (2003) A plant signal peptide-hepatitis B surface antigen fusion protein with enhanced stability and immunogenicity expressed in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 2209-2214
- Tacket CO, Mason HS, Losonsky G, Clements JD, Levine MM, Arntzen CJ (1998) Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato. *Nat Med* 4: 607-609
- Tacket CO, Mason HS, Losonsky G, Estes MK, Levine MM, Arntzen CJ (2000) Human immune responses to a novel norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes. *J Infect Dis* 182: 302-305
- Taraporewala ZF, Patton JT (2004) Nonstructural proteins involved in genome packaging and replication of rotaviruses

- and other members of the Reoviridae. *Virus Res* 101: 57-66
- Thanavala Y, Yang YF, Lyons P, Mason HS, Arntzen C (1995) Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B surface antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 3358-3361
- Tregoning JS, Nixon P, Kuroda H, Svab Z, Clare S, Bowe F, Fairweather N, Ytterberg J, van Wijk KJ, Dougan G, Maliga P (2003) Expression of tetanus toxin Fragment C in tobacco chloroplasts. *Nucleic Acids Res* 31: 1174-1179
- Tuboly T, Yu W, Bailey A, Degrandis S, Du S, Erickson L, Nagy E (2000) Immunogenicity of porcine transmissible gastroenteritis virus spike protein expressed in plants. *Vaccine* 18: 2023-2028
- Turpen TH, Reinl SJ, Charoenvit Y, Hoffman SL, Fallarme V, Grill LK (1995) Malarial epitopes expressed on the surface of recombinant tobacco mosaic virus. *Biotechnology* 13: 53-57
- Wang XG, Zhang GH, Liu CX, Zhang YH, Xiao CZ, Fang RX (2001) Purified cholera toxin B subunit from transgenic tobacco plants possesses authentic antigenicity. *Biotechnol Bioeng* 72: 490-494
- Warzecha H, Mason HS, Lane C, Tryggvesson A, Rybicki E, Williamson AL, Clements JD, Rose RC (2003) Oral immunogenicity of human papillomavirus-like particles expressed in potato. *J Virol* 77: 8702-8711
- Webster DE, Cooney ML, Huang Z, Drew DR, Ramshaw IA, Dry IB, Strugnell RA, Martin JL, Wesselingh SL (2002) Successful boosting of a DNA measles immunization with an oral plant-derived measles virus vaccine. *J Virol* 76: 7910-7912
- WHO (2000) Supplementary information on vaccine safety. Geneva, World Health Organization (WHO/v&B/00.36)
- Wigdorovitz A, Carrillo C, Dus Santos MJ, Trono K, Peralta A, Gomez MC, Rios RD, Franzone PM, Sadir AM, Escibano JM, Borca MV (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
- Woldehiwet Z (2002) Rabies: recent developments. *Res Vet Sci* 73: 17-25
- Wu YZ, Li JT, Mou ZR, Fei L, Ni B, Geng M, Jia ZC, Zhou W, Zou LY, Tang Y (2003) Oral immunization with rotavirus VP7 expressed in transgenic potatoes induced high titers of mucosal neutralizing IgA. *Virology* 313: 337-342
- Yusibov V, Hooper DC, Spitsin SV, Fleish N, Kean RB, Mikheeva T, Deka D, Karasev A, Cox S, Randall J, Koprowski H (2002) Expression in plants and immunogenicity of plant virus-based experimental rabies vaccine. *Vaccine* 20: 3155-3164
- Yusibov V, Modelska A, Stepiewski K, Agadjanyan M, Weiner D, Hooper DC, Koprowski H (1997) Antigens produced in plants by infection with chimeric plant viruses immunize against rabies virus and HIV-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 5784-5788
- Zhou JY, Wu JX, Cheng LQ, Zheng XJ, Gong H, Shang SB, Zhou EM (2003) Expression of immunogenic S1 glycoprotein of infectious bronchitis virus in transgenic potatoes. *J Virol* 77: 9090-9093
- Zur Hausen H (2002) Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2: 342-350

(접수일자 2004년 5월 15일, 수리일자 2004년 6월 8일)