

Strategy for Novel Vaccine and Antivirals Against Foot-and-Mouth Disease

Jong-Hyeon Park*, Su-Mi Kim, Kwang-Nyeong Lee, Young-Joon Ko,
Hyang-Sim Lee and In-Soo Cho

Foreign Animal Disease Division, National Veterinary Research and Quarantine Service, Anyang, Korea

Foot-and-mouth disease (FMD) is a highly contagious, virally induced disease of cloven-hoofed animals. FMD-affected countries have suffered from a serious economic impact due to their decreased participation in the international livestock trade. Currently, disease control measures include inhibition of susceptible animal movement, slaughter of infected and susceptible in-contact animals, disinfection, and vaccination with an inactivated whole virus antigen. Researchers have attempted to develop new FMD vaccines to overcome the limitations of the current inactivated vaccine as well as new antivirals to more rapidly induce a protective response. In this study, we discuss the most effective novel FMD vaccines and antiviral strategies that are currently being studied. The vaccine research using subunits, synthetic peptides, DNA, cytokine-enhanced DNA, recombinant empty capsids, chimeric viruses, genetically engineered attenuated viruses, recombinant viral vectors, self-replicating DNA and transgenic plants expressing virus proteins is part of a trend towards novel FMD vaccine development. The antiviral methods using RNA interference (RNAi), RNAi-based recombinant adenoviruses and L^{pro} or 3D^{pol} inhibitors represent the current replication-inhibiting medicine used to control FMD.

Key Words: Foot-and-mouth disease, Vaccine, Antivirals

서 론

구제역 바이러스 (foot-and-mouth disease virus: FMDV)는 첫 번째로 확인된 동물 바이러스로, 동물 바이러스연구의 최초 모델이 되었고 그 이후 더 많은 연구정보가 추가되었다 (1). 구제역은 동물의 가축 전염병 중에서 공기 전파 등으로 가장 전파력이 강하며, 동물에 수포증상에 의한 피해와 경제적으로도 영향을 주는 질병이다 (2). 또한 한국에서도 법정 1종 가축 전염병으로 관리

하고 있다. FMDV는 *Picornaviridae*의 *Aphthovirus*속에 속하며, O, A, C, Asia1, SAT1, SAT2 및 SAT3의 7가지 혈청형이 존재한다 (2).

이 바이러스가 감염되어 일으키는 전염병인 구제역은 동물의 건강을 위협하고 경제적으로도 생산성의 손실 때문에 상재적으로 발생되는 국가에서는 경제적으로 심한 타격을 입히는 원인이 될 수 있다. 상재 국가의 유일한 통제방법은 엄격한 예방접종과 동물의 이동 제한이다. 구제역 백신은 바이러스에 감염된 가축 혈액을 포름알데히드로 불활화하여 1920년대 중반에 만들어졌고 이 방법은 1940년대 후반까지 구제역 예방의 기초가 되었다 (1). 한 지역에 다양한 혈청형이 동시 순환되어 감염되는 경우 또는 백신접종된 동물에서 바이러스가 지속적으로 존재하는 경우는 구제역 근절을 어렵게 만든다. 구제역을 제어하는 방법은 격리, 살처분 또는 예방접종의 응용을 근거로 한다. 현재까지 사용되는 불활화 백신은 근육접종에 의하여 1~2주 내 방어가 되도록 예방에 효과적

Received: December 2, 2009/ Revised: December 4, 2009

Accepted: December 9, 2009

*Corresponding author: Jong-Hyeon Park PhD, DVM. National Veterinary Research and Quarantine Service, 480 Anyang 6 dong, Anyang 430-757, Korea.

Phone: +82-31-467-1719, Fax: +82-31-449-5882

e-mail: parkjhvet@korea.kr

**This work was supported by internal fund from National Veterinary Research and Quarantine Service in 2009.

인 방법이기는 하지만 여러 가지 측면에서 극복해야만 하는 한계를 지니고 있다. 이 백신은 장기간 면역지속이 어렵고, 백신의 유효기간도 짧으며, 야외에서 구제역의 항원의 변이가 심하기 때문에 다양한 혈청형 및 아형에 대한 준비를 하여야 하는 어려운 점이 있다 (3). 또한 이를 생산하는데 비용이 비싸고 차폐생산시설이라 할지라도 생산시설로부터 유출될 수 있는 가능성이 있어 매우 위험하다. 따라서 백신이 절실히 필요한 국가에서도 백신생산시설의 구축은 쉽지 않은 일이다. 최근 2007년 영국의 발생과 같이 백신 바이러스의 누출에 의한 사고는 구제역을 살아 있는 바이러스로 다루는 것이 얼마나 위험한 것인지를 알려주었다 (4). 이에 대한 대안으로서 차세대 백신으로 연구되고 있는 백신개발방법이 여러 가지가 존재한다. 재조합 DNA 기술의 출현으로 기존의 방법을 탈피하여 재조합 단백질을 발현과정을 통해 면역원으로 작성하는 방법과 바이러스 유전자를 이용한 구제역 백신의 개발을 위해 다양한 시스템을 이용하여 실험되고 있다. 대표적으로 subunit, 합성 웨타이드, DNA, 사이토카인-첨가 DNA 백신, 재조합 바이러스형 백신, 혼합형 바이러스 백신, 유전자 조작 약독화 백신, 재조합 바이러스 벡터 백신 및 형질전환 식물은 구제역 백신 후보로서 사용되는 전략이다 (5). 또한 이에 부가적으로 백신접종시에 면역효과가 나오기 전까지 사용이 가능한 항 바이러스제의 개발도 진행 중에 있다. 본 논문은 위에 언급된 새로운 기술에 의한 백신개발 및 항 바이러스제의 연구 동향에 대하여 자세하게 알아보고, 향후 우리나라가 연구해야 하고 진행하여야 할 것과 방역을 위하여 해야 할 부분에 대하여 점검해 보고자 한다.

현재 백신의 개발 현황

구제역은 Loeffler와 Frosch에 의하여 1897년에 구제역을 일으키는 원인체에 대하여 처음 서술되었고, 구제역 백신은 19세기 말까지 병원성 바이러스를 노출시켜 동물에 면역을 일으키는 방법을 이용하였다 (6). Vallée 등이 1926년에 처음 formaldehyde (FA)로 생 바이러스를 불활화하여 백신을 만드는 연구를 시작하였다. 1937에 Waldmann 등이 FA로 불활화하여 Al(OH)_3 -gel와 혼합한 구제역 백신을 사용할 수 있었다 (7). 1947년 Frenkel은 혀를 얇게 잘라 실험실에서 바이러스를 접종하여 배양하는 방법을 개발하여 그 당시 널리 이용되었다. 그러나

구제역 발생시 이동 제한 등으로 도축장으로부터 도축되는 소로부터 상피세포를 구하지 못하여 생산에 있어서 불편한 점이 많았다 (7).

1960년 초 소 초대신장세포 (bovine primary kidney cell)를 roller bottle을 이용하여 대량으로 배양할 수 있는 백신생산 라인이 개발되었으며 이 백신은 1960년대 유럽에서는 청정화를 이루는 계기가 되었다 (7). 추후 햄스터 신장 유래세포 (BHK-21)와 같은 세포주가 개발되면서 대체가 가능하였다 (8). BHK-21 세포에서의 구제역 바이러스 배양은 성공적이었으며, 불활화제를 FA에서 추후 aziridines, BEI (binary ethylene immine)에 의한 불활화 체계로 바꾸면서 바이러스의 불활화가 완벽하게 이루어져 백신의 안전성을 확보할 수 있게 된다 (9). 또한, 젤 백신에서 오일 백신으로 전환하여 돼지에서 면역이 문제되던 점을 해결할 수 있게 되었고, 1970년대에 double oil을 이용하여 면역지속력도 향상되었다. 불활화 백신은 야외에서 발생되는 발생축과 백신축과의 감별진단을 위한 비구조 단백질 (NSP, non-structural protein)을 제거하는 정제하는 과정을 거치고 백신접종 후 백신개체에서는 형성되지 않는 비구조 단백질 항체를 마커로 하는 ELISA에 의하여 감별진단이 가능하고 (10), 질병의 예방을 위한 효과적인 방법이지만, 이를 생산하는데 값이 비싸고 생바이러스를 다루기 때문에 위험하다는 단점이 있다 (11). 상재지에서 매년 접종되는 일반용 백신은 3 PD_{50} (50% protective dose)의 역가를 지니고 있으며, 발생시에 바이러스 배출을 차단하고 단 시간 내에 면역을 유도하기 위한 긴급 백신접종을 위한 백신에서는 항원량이 6 PD_{50} 이상의 항원량을 지니고 있다 (3). Table 1은 일반 및 긴급 백신의 특징을 설명하고 있으며, 긴급 백신의 경우는 면역기간 및 다양한 아형의 항원형에 적합하도록 선발된 광범위하게 적용이 가능한 백신이다.

새로운 구제역 백신의 개발 동향

첨단 백신의 조건은 불활화 백신의 한계를 뛰어 넘는 백신이어야 할 것이다. 즉, 구제역은 혈청형이 많기 때문에 여러 혈청형 또는 유전형의 발생에도 면역 후 방어에 문제 없도록 하는 것은 중요하다. 또한, 일반적으로 구제역 백신이 6개월 이내로 면역지속 기간이 한정되어 있으므로 평생 한번 또는 2회 접종하는 백신으로 개발이 되어야 할 것이다. 또한 불활화 백신의 생산과정처럼 고도

Table 1. Characteristics of various FMD vaccine types (5, 25)

	Conventional inactivated vaccines	Emergency vaccines	Viral subunits and synthetic peptides	DNA vaccines and recombinant viral vectors	Bio-engineered attenuated virus
Immunogenicity	High	High	Limited	Potentially high	High
Thermal stability	Low	Low	High	High (DNA), Low (Viral vectors)	Not studied
Safety in production	Limited	Limited	High	Not studied	Not studied
Duration of immunity	Limited	Improved	Not studied	Not studied	Not studied
Spectrum of protection	Limited	Improved	Not studied	Not studied	Not studied
Differentiation of infection and vaccination	Limited	Limited	Good	Good	Potentially Good
Drawbacks	Dangerous to produce	Dangerous to produce	Limited numbers of epitopes	Limited numbers of epitopes in case of VP1	Reversion to virulence

의 차폐시설을 갖추지 않고 일반 백신시설에서도 생산이 가능해야 한다. Subunit 백신으로서 높은 면역원성을 갖는 단백질, 웹타이드, DNA 백신, 벡터 백신 등이 연구되고 있으나 아직까지 현재 사용되고 있는 불활화 백신과 견줄만한 백신은 개발되지 않고 있다.

구제역의 약독 생 바이러스 개발 현황

현재까지 불활화 백신의 단점을 극복하기 위하여 많은 연구가 수행되어 왔다. 약독화된 백신을 개발하기 위한 실험에서는 소에서는 약화되었으나 돼지에서는 병원성이 있어서 제한적으로만 성공하였다 (12). 그러나 약독화 기전은 이와 같은 실험방법으로 확인되기 어려웠고 방어효과가 불완전하였으므로 결과적으로 약독화를 위한 백신 개발연구는 미완성이 되었다. 약독화 바이러스의 제작을 위해 속주세포에 연속 계대하는 노력은 계속되어 왔으나 약독형이 강독형으로 다시 변환되는 회귀 현상 (reversion) 때문에 결국 성공하지 못했다 (13).

감염성 cDNA 재조합 바이러스 및 적용

감염성 cDNA 기술의 출현과 구제역 바이러스 기능 유전학에 대한 연구결과의 축적은 세포배양 뿐만 아니라 동물에서 특이적 변화에 대한 미세한 차이를 알아낼 수 있게 되었다. Figure 1은 구제역 바이러스의 전체 유전자를 보여주고 있으며, 그 중 병원성 분석에 중요한 바이러스 단백질은 polyprotein 중 가장 처음에 위치한 L^{pro}

이다. L^{pro}는 속주세포의 번역시작 물질인 eIF4G를 잘라내고, interferon-β (IFN-β) mRNA의 전사에 영향을 준다 (14). L^{pro}가 결손된 A12 바이러스 (A12-LLV2)는 병원성이 약화되었고, 이 바이러스는 소와 돼지에서는 전파가 되지 않았으며 부분적인 방어 면역반응을 유도했다 (15). 그러나 A12-LLV2를 불활화 처리하여 완전한 방어가 유도되었다 (16).

구제역 바이러스 A12를 전체 게놈에서 VP1 부위 GH loop에 존재하는 RGD motif region을 제거시키고 재조합된 바이러스를 만든 후 이것을 소와 돼지에 피내와 근육 접종한 결과, 감염성이 결여된 바이러스의 capsid에 대한 항체가 생성됨이 확인되었다 (17). 이러한 백신이 일반 백신과 다른 점은 전자 게놈의 cDNA를 넣어 줌으로써 속주세포 내에서 RNA를 형성하고 RNA replication에 의해 계속해서 게놈을 얻을 수 있다는 것과 또한 바이러스 capsid가 생성되기 때문에 그 단백질에 대한 면역반응을 유도시킬 수 있다는 것이다 (17). 또한 RGD 수용체 결합 부위가 결손된 재조합 바이러스에 의해서 방어가 될 수 있었으나 다른 대체 수용체에 의하여 다시 감염될 수 있어 백신으로 사용하기에 안전성에 한계가 있었다 (18).

최근 구제역 바이러스의 병원성 규명 및 연구목적으로 또는 백신개발을 위하여 구제역 바이러스의 전체 유전자를 클로닝하여 주로 O, A 및 Asia1 혈청형에 대하여 감염성 cDNA를 작성하는 일을 많이 추진하여 왔다 (19~21). 또한 이 클론을 이용하여 O형에 3' NCR 부분에 유전자를 결손하여 약독화하는 작업을 시도하기도 하였고, A형에 대하여 일부 유전자를 삽입하여 그 병원성을 확인하

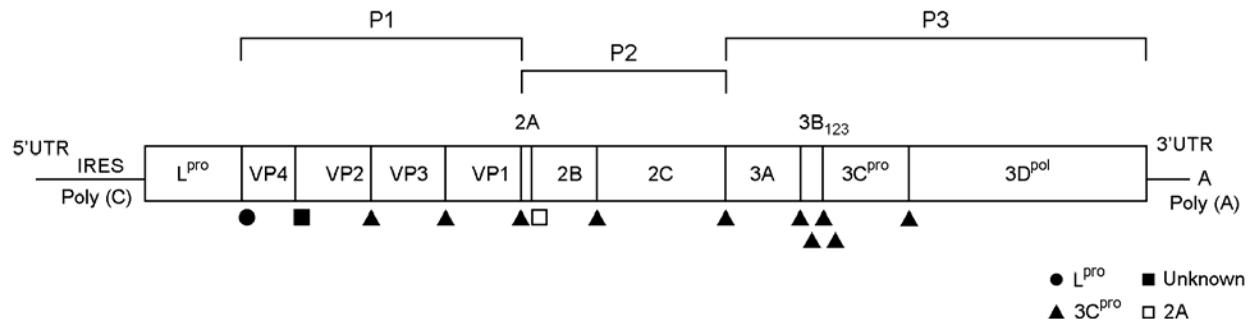


Figure 1. Schematic diagram of foot-and-mouth disease virus-genome (25). The symbols below the protein-encoding regions identify the proteases responsible for cleavage of the viral polyprotein.

여 보기도 하였다 (22, 23). 또한 A형 바이러스에 SAT2의 구조 단백질인 P1 region을 교체하여 온전한 바이러스를 제작하였으나, 원래의 바이러스 보다 중식력이 낮았고, 열에도 불안정하였다 (24) 그 약독화 실험은 계속 겸증 중에 있다.

재조합 단백질 및 에피톱 발현 단백

불활화된 백신의 가장 큰 단점은 바이러스 항원을 주기적으로 접종하는 것이 필요하며, 바이러스가 방출될 위험이 있어 이러한 단점을 보안하기 위해서 할 수 있는 것은 재조합 단백질을 이용한 안전한 백신을 생산하는 것이다. 재조합 백신은 생성과정에서 전염성이 있는 바이러스를 필요로 하지 않기 때문에 바이러스가 방출될 위험이 없다. 재조합 단백질이나 펩타이드는 생산과정이 쉽고, 보관에 용이한 장점도 있다. 1970대 중반까지 구제역 바이러스의 주요한 면역물질인 VP1을 이용하여 발현하였고 (Fig. 1), 이 단백질을 기초로 하여 재조합 단백질을 생산하였다. 대장균에서 발현된 VP1은 돼지, 소에서 중화항체를 유도할 수 있었다 (26).

바이러스의 VP1의 G-H loop는 중화항체를 유도하기 위한 주요한 면역성 유발부위이므로 이 부위의 펩타이드를 이용한 백신개발 연구가 보고되고 있다 (27, 28). 그러나, 소와 돼지에 G-H loop 합성 펩타이드를 접종하였을 때에는 높은 수준의 중화항체가 생성되었으나 질병으로부터 방어되지 않았다 (28, 29). 구제역의 특이 T 세포 에피톱만을 면역하였을 경우, 감수성 소에서 바이러스 T 세포 에피톱 백신은 기대하는 만큼의 방어효과가 나타나지 않았다 (30). 따라서 효과적인 중화항체를 유도하는 백신은 다른 subtype들과의 교차 반응성을 위해 최적화

된 T와 B 세포 에피톱으로 구성되도록 디자인 되어야 한다 (31). 일부 단백질 즉 VP1 또는 중화 에피톱을 발현하는 전략이 시도되었으나 중화항체 형성면에서 효율성의 검토가 필요하였고 (32), 최근 들어 전체 capsid를 발현하는 연구가 많이 수행되고 있다. Capsid 단백질이 발현되는 baculovirus를 곤충에 직접 접종하여 백신에 이용될 항원을 많이 확보할 수 있는 방법으로 소의 공격접종 (virus challenge)에서도 방어하였고, 그 항원의 역가는 6.34 PD₅₀을 나타냈다 (33). 이 방법은 구제역 바이러스 capsid 단백질을 이용한 백신의 가능성을 한층 높였다.

DNA 백신개발 동향

구제역에 대한 DNA 백신의 개발연구는 최근까지 계속 수행되고 있다. DNA 백신은 숙주동물의 면역반응을 일으킬 수 있는 항원을 암호하는 부위를 이용하여 구제역 바이러스 감염에 대한 방어를 유도하는 방식으로서, DNA 자체가 숙주동물에 전달되면 숙주동물에서 합성된 항원 단백질이 내부의 경로를 따라 분해되어 결국 바이러스 방어에 효과적으로 알려진 CTL 활성화를 일으킬 수 있다 (34). 또한 바이러스 계놈 중 일부 에피톱 부분만을 사용하기 때문에 기타 다른 백신에 비하여 감염된 동물에 대한 안정성이 있다는 장점이 있다. 또한 전달시스템의 특징, 그 투여 경로, 동물의 종류마다 면역반응 양상은 달라질 수 있고, 특정 아미노산 서열이 같은 혈청형 내에서도 그 반응은 다양하게 달라질 수 있다 (35). 특정 분자 면역보강제를 첨가함으로 생체 내에서 나타나는 면역반응을 향상시킬 수 있다. 현재까지 IL-1, IL-15, IL-18, CpG-motif, GM-CSF 및 IFN- α 와 병용하여 VP1 또는 구조 단백질인 P1 등에 대한 면역반응을 시도하였고

대부분의 경우 분자 면역보강제와의 병용시에 면역반응이 향상되는 것을 확인하였다 (32, 36~42). 그 이외에도 IL-18이 포함된 DNA 플라스미드와 화학제인 levamisole을 병용하여 면역효과가 향상되는 것도 확인되었다 (39). 세포면역 향상을 위하여 BCG를 결합하여 면역성을 향상시켰고 (43), 보체인 C3d를 이용하여 항체 형성을 증가시키기 위한 실험도 VP1으로 진행되어 실험결과 75~87.5%의 방어율을 보였다 (44). 그러나 아직까지 연구되어 있는 DNA 백신으로 구제역 바이러스 공격에 완전히 방어할 만한 충분한 중화항체를 유도하거나 완벽히 방어된 결과는 찾아보기 어렵다.

전달 수용체 백신의 개발 현황

특정세포에서만 증식되는 복제-결손형 사람 아데노바이러스를 이용한 구조 단백질 capsid 코딩부위와 3C^{pro}부위를 함께 발현하여 바이러스 단백질을 원래 바이러스와 유사하게 발현하는 전략이 좋은 효과를 보고 있다. 이와 동시에 돼지 인터페론 유전자를 삽입하여 발현하게 하는 방법도 접종 후 3~5일 동안은 구제역에 대하여 항 바이러스 효과로 방어할 수 있는 연구가 수행되었다 (45). 이것은 바이러스 capsid 단백질 전구체를 위한 영역인 P1-2A와 3C^{pro} (45)가 포함되지만, 다른 바이러스 비구조 단백질에 대한 영역은 없기 때문에 이 면역원은 온전한 바이러스 핵산 복제에 필요한 유전정보가 결핍되어 동물에 접종될 때 감염성 핵산을 합성할 수 없다. 이 마커 백신은 백신에 존재하지 않는 P2 또는 P3 단백질을 이용하여 설정된 방법을 진단에 활용할 수 있고 백신접종된 동물을 감별할 수 있다. 이 백신의 1 두분의 투여량을 가진 돼지의 비강접종에서 7, 14 또는 42일 후에 공격접종으로부터 방어했고 임상증상, 바이러스 혈증은 없었다 (6). 후속결과로서 P1-3C^{pro}에 2B가 포함된 재조합 아데노바이러스에 의하여 세포질 내 vesicle의 수를 증가시켜 구제역에 대한 특이 면역반응을 향상시켰다 (46). 또한 아데노바이러스에 VP1 및 GM-CSF 유전자를 같이 발현하여 그 효과를 증강시켰으며, 중화항체 유발은 혈중에서 20~40배로 나타났으며, 5마리 중 3마리에서 완전히 방어하였다 (47). 위에 언급된 아데노바이러스 이외에도 오제스키 바이러스 벡터를 이용하여 P1 부위를 발현으로, 낮은 수준이지만 22.4~92배의 중화항체 역ガ를 형성시킨 바 있고 5마리 중 3마리를 방어하였다 (48).

소 헤피스 바이러스를 벡터로 이용한 연구결과도 VP1유전자를 삽입하여 소 전염성 비기판지염 및 구제역 바이러스 2가지 바이러스에 대해 방어하고자 하였다 (49). 또한 fowlpox를 이용한 벡터에 P1-2A 및 3C^{pro}와 IL-18을 삽입하여 돼지에서 면역원성 실험결과 P1-2A 및 3C^{pro}는 5마리 중 3마리, IL-18을 추가한 실험군에서는 5마리 중 4마리가 방어되었고 그 효과도 입증된 바 있다 (50). 이러한 벡터 백신 중에서 아데노바이러스를 이용한 시스템이 가장 가능성이 있는 실험방법으로 여겨지고 있으나, 바이러스 역가에 따라 동물의 방어가 민감하게 반응하므로 접종되는 바이러스의 역ガ를 최고 수준으로 올려야 하는 문제점이 있어 이것은 해결해야 할 과제로 남겨져 있다.

식물 및 식물바이러스를 이용한 백신개발

항원을 암호하는 DNA를 식물에 형질전환시킨 후 그 식물을 해당 동물에 근육접종 또는 경구 투여시킴으로써 항원특이 면역반응을 유도하는 방법이다. 이 백신의 장점은 다량의 항원을 얻을 수 있고, 생산과정의 비용이 저렴하다는 것이다. 또한 백신접종 방법에 있어서 정제과정의 생략이 가능하며, 그 투여방법이 간단하다는 특징이 있다 (51, 52). 형질전환식물 뿐아니라 식물에 감염되는 tobacco mosaic virus를 이용한 방법도 있으며, VP1의 방어 에피톱을 이용한 발현 및 실험동물에서 높은 방어율을 보여 성공적이었다 (51, 53). Bamboo mosaic virus에 의해 발현된 VP1은 돼지에서의 공격접종에 대해 방어하였다 (54). 하지만 한정된 에피톱 수를 갖는 백신의 경우는 약간의 변이가 형성된 바이러스 변이주를 방어하지 못할 가능성이 있으므로 (Table 1), 식물에서도 구조 단백질의 전체를 바이러스양 입자 (virus-like particle)로 발현하는 것도 이 문제를 해결할 수 있는 방법이 될 것이다 (52). 아직까지 식물을 이용한 방법은 많은 연구가 진행되어 있지 않지만 한번에 많은 항원을 생산할 수 있으므로 산업적으로는 경제성이 있다. 숙주동물에 식물을 이용한 백신을 경구 투여했을 때 나타나는 대표적 면역반응 양상은 점막면역인데 M 세포를 통하여 항원특이 IgA 및 IgG가 생성되며 (55), 점막에서의 주요 effector cell인 Th cell, Tc cell들에 의하여 구제역 방어가 가능하리라 보고 있다.

면역보강제를 이용한 백신개발 동향

현재 불활화 백신은 보통 면역보강제로 오일이 사용되고 있으며, 면역성을 좀 더 높이기 위하여 여러 가지 다양한 시도가 이루어져 왔다. 마우스 실험을 통해 긴급 백신접종용으로 사용할 수 있는 IMS1313이 면역성을 향상시켰으며, 면역세포의 증식에 필요한 IL-2, IL-4 및 IFN- γ 수준의 향상을 보였다 (56). SAT 혈청형 백신접종 실험에서 aluminium hydroxide gel-saponin (AS), ISA 206B를 이용한 백신은 방어가 가능하며, ISA 206B를 사용한 백신은 야외실험에서 1년 동안 항체를 지속시키고, 소에서 매우 낮은 항원양에도 동종 바이러스에 방어되었다 (57).

항 바이러스제의 개발

구제역 바이러스의 구조 단백질인 P1 부위는 바이러스의 외부 단백질을 이루기 때문에 환경 또는 숙주와의 상호작용에 의한 변이가 빈번히 발생되는 부위이며, 바이러스의 중화항체를 유발하는 부위이기도 하다. 이 부위는 방어 항원으로 작용되기 때문에 백신개발의 주요 목표가 되어 왔다. 그 외에 비구조 단백질인 L^{pro}는 IFN- β mRNA와 숙주세포의 번역을 억제시켜 숙주의 선천면역 반응을 저해한다 (14). 바이러스 3C^{pro}는 histone H3을 분해하기 때문에 숙주세포의 전사에 영향을 미칠 수 있다 (58). 바이러스 단백질 2B는 2C와 연결된 전구체인 2BC의 작용으로 소포체와 골지 장치를 통하여 이동되는 단백질을 차단한다 (59). 바이러스 감염 동안 세포 표면에 MHC class I 분자의 발현의 감소는 2B, 2C 또는 2BC가 능동면역이 시작되는 것을 지연시킨다 (60). 따라서 구제역 바이러스의 병원성은 비구조 단백질과 밀접한 관련을 가지고 있다. 이러한 부위의 발현 및 전사를 적극 차단하여 증식을 억제하는 아래의 접근방법도 연구되고 있다.

RNAi를 이용한 항 바이러스제 개발

최근 RNA 간섭을 이용하는 기술의 개발로 구제역 바이러스에도 증식의 억제가 보고되었다 (61~63). Kahana 등은 RNAi가 BHK-21 세포에서 FMDV의 증식을 감소 시킬 수 있다고 증명했다 (64). VP1 부위를 목표로 하여

shRNA를 나타내는 플라스미드 (62)와 VP1과 3D 영역 (65)을 목표로 하는 shRNA를 발현하는 중식-결손형 사람 아데노바이러스는 실험실 조건에서 그리고 생체 내에서 항 바이러스성 활성이 있음을 확인하였고, 더욱 동물에서 안정하게 발현할 수 있는 아데노바이러스를 이용한 비구조 단백질 2B 및 3C를 목표로 하는 또 다른 억제반응도 바이러스의 억제를 위하여 사용 가능한 방법이라는 것을 동물실험을 통하여 확인하였다 (61).

현재 백신은 빠르게 방어가 된다 해도 면역이 유도되기까지 7일이 소요되며, 면역형성까지 구제역 바이러스 증식을 억제시키기 위한 방법이 없기 때문에 완벽한 방어에 한계성을 지닌다. RNAi의 응용은 구제역 바이러스의 방역을 위한 가능한 대체 전략 중 하나이다. 빠르고 효과적인 백신을 개발하는 것은 중요한 일이나 RNAi를 이용한 짧은 시간 내에 효과적으로 증식을 억제시킬 수 있는 항 바이러스제로서 RNAi는 동물 임상에서도 사용이 가능한 방법으로 도전할 만한 방법이다. 하지만 짧은 지속기간과 빠른 전파력을 가진 질병의 특성에 따른 목적 동물에서의 완전한 방어를 위해서는 해결해야 할 문제가 많이 남아 있다.

인터페론을 이용한 전달 벡터를 이용한 항 바이러스 제 개발

RNAi와 마찬가지로 백신접종 후 면역이 형성되기 이전인 7일 동안 항 바이러스 물질을 처리함으로 구제역 바이러스가 복제하여 매우 빨리 확산되는 구제역 바이러스를 초기 감염기간에 제어할 수 있게 된다. 위에서 언급한 siRNA를 이용한 방법을 이용할 수 있지만 인터페론은 숙주의 선천 면역반응을 이용한 방법으로 타입 I 인터페론 (IFN- α/β) mRNA의 유도는 초기 감염시 일시적인 방어효과를 나타낼 수 있다. 이 방법은 IFN- α/β 를 발현하는 복제-결손 아데노바이러스 (Ad5) 벡터 시스템을 사용하여 돼지에서 효율적으로 방어가 가능함을 증명한 바 있다 (66).

항 바이러스제의 개발

구제역에 대한 항 바이러스 화학제로서 thiol protease inhibitor인 E-64는 L^{pro}의 작용을 방해하여 구조 단백질 전구체의 형성을 방해하여 실험실 내에서 세포에서 구제역 바이러스의 조립과 증식을 억제하였다 (67). 또 최근 시도된 실험으로 RNA-dependant-RNA polymerase인 3D의

역할을 억제하는 약물로 알려진 T-1105를 이용한 돼지에서의 실험결과 구제역의 임상적인 방어가 확인되었고, 구제역의 발생시 사용된다면 감염지역 내에 일정기간 동안 구제역 바이러스의 배출 양을 감소시킬 것으로 기대되는 약물이다 (68).

결 론

구제역 백신접종이 지속감염의 문제를 야기시킨다는 것에 대해서는 현재까지도 논란이 되고 있으나, 바이러스의 지속감염의 문제 때문에 구제역 청정국가에서 발생시에 백신의 접종을 거리는 이유가 되고 있다 (6). 백신 미접종 정책은 보통은 발생지역의 대량 살처분으로 이어진다. 기존의 백신이라도 적절히 잘 사용된다면 구제역의 재발 등의 방역적인 문제는 없다. 다만 현재의 불활화 백신은 효과가 이미 입증이 되어 있고 사용자가 적용하기에는 어려운 점은 없으나, 생산과정 및 불활화 과정을 거쳐야 하는 등 제작에 많은 시간 소요와 위험성이 있다 (6). 또한 최근에 다변화하는 세계상황에 적용되기에에는 여러 가지 한계점을 지닌다. 구제역 바이러스는 RNA 바이러스로서 산에 약하고, 바이러스의 혈청형이 다양하여 유전적으로 변이가 나올 수 있는 가능성이 크며 이러한 이유 때문에 약독 생백신개발이 어렵고, 지속적으로 숙주 상태에 따라 변이하는 특징 때문에 이미 개발된 백신의 경우도 새로운 바이러스의 출현으로 무용지물이 되기 쉽다. 따라서 새로운 백신의 개발은 이러한 모든 단점을 극복할 수 있어야 한다. 그리고, 상재국에서 사용할 수 있는 백신은 한가지 목적으로는 다양한 형태로 그 나라 상황에 따라 사용 목적에 맞게 사용할 수 있는 백신으로 백신축과 감염축 간의 혈청학적으로 감별이 가능하고 광범위한 방어작용을 가지며 오랫동안 면역을 형성시킬 수 있어야 한다 (6).

새로운 백신개발을 위한 노력은 여러 가지 방법으로 접근되고 있다. 동물에서 사용되므로 개발시에 경제성도 중요하게 생각하여야 하며, 새로운 변이주를 빠른 시간 내에 간단하게 제압하는 방법이 필요하다. 발생시 해당 혈청형 또는 아형에 맞는 백신을 빠르게 제작할 수 있는 조건을 검색하여 빠른 시간 내에 바이러스를 제작할 수 있는 기술이 있어야 한다. 구제역 단백질을 안정적으로 발현하는 재조합 세포주 (cell line)의 경우도 발생여건에 맞는 관련된 유전자를 빠르게 적용할 수 있는 유연성이

있는 방법이 요구된다. 야외 바이러스와 동일한 면역성을 보이는 재조합 항원이 생산되고, 그 항원은 일반 생산 시설에서도 생산이 가능한 형태이어야 할 것이다. 따라서 약독화 백신을 제작하여 생산하는 것 보다는 유전자 재조합에 의하여 많은 양의 항원을 안전하게 생산할 수 있는 방법이 유력한 새로운 백신의 후보가 될 수 있다.

우리나라를 비롯해 세계적으로 가장 위협을 주고 있는 구제역 바이러스 혈청형은 O, A, Asia1형이다 (69). 따라서 바이러스의 전체 유전자를 분석하여, 방어에 필요한 발생지역의 지역형 등에 대하여 구조 단백질 유전자 등 방어에 필수적인 유전자 은행을 구축할 필요가 있으며, 발생시에 그 유전자 은행에서 사용 가능한 확립된 백신 개발방법으로 필요한 유전자를 맞춤형으로 사용하여 바로 적용이 가능한 백신개발 방법은 앞으로는 매우 중요한 방역기술 중의 하나가 될 것이다.

한편 항 바이러스적인 전략은 백신이 접종되기 어려운 조건에서 구제역 바이러스와 관련 없는 선천면역 조절물질 같은 생체방어 유전자를 이용하여 구제역을 미리 예방하는 것으로 구제역에 직접적으로 표적이 될 수 있는 항 바이러스 아데노벡터 제제 및 항 바이러스 약제가 연구되고 있다. 이들은 백신을 보조하는 기능으로 백신을 접종하기 전에 면역형성 기간 이전에 방어가 가능하도록 하는 것이다. 그러나 아직은 연구단계로 실용화 까지는 효과의 지속기간을 늘리고, 구제역에 감염될 수 있는 각종 목적동물에서의 임상실험 등이 체계적으로 추진되어야 할 것이다.

이와 같이 연구되고 있는 백신 전략과 항 바이러스 제제에 의하여 발생시 또는 발생 전에 미리 예측 가능한 상황을 만들고 준비하는 것은 국가적으로 발생시 파급효과가 크고 중요한 해외전염병을 억제를 위해 가장 중요한 방역기술이 될 것이다.

Acknowledgements

The authors acknowledge the contribution of our colleagues at the Foreign Animal Disease Research Division, NVRQS, Korea.

참 고 문 헌

- Balamurugan V, Kumar RM, Suryanarayana VV. Past and present vaccine development strategies for the control of

- foot-and-mouth disease. *Acta Virol* 2004;48:201-14.
- 2) Bachrach HL. Foot-and-mouth disease. *Annu Rev Microbiol* 1968;22:201-44.
 - 3) Paton DJ, Valarcher JF, Bergmann I, Matlho OG, Zakharov VM, Palma EL, et al. Selection of foot and mouth disease vaccine strains--a review. *Rev Sci Tech* 2005;24:981-93.
 - 4) Cottam EM, Wadsworth J, Shaw AE, Rowlands RJ, Goatley L, Maan S, et al. Transmission pathways of foot-and-mouth disease virus in the United Kingdom in 2007. *PLoS Pathog* 2008;4:e1000050.
 - 5) Sobrino F, Saiz M, Jimenez-Clavero MA, Nunez JI, Rosas MF, Baranowski E, et al. Foot-and-mouth disease virus: a long known virus, but a current threat. *Vet Res* 2001;32:1-30.
 - 6) Rodriguez LL, Grubman MJ. Foot and mouth disease virus vaccines. *Vaccine* 2009;27 Suppl 4:D90-4.
 - 7) Barteling SJ. Development and performance of inactivated vaccines against foot and mouth disease. *Rev Sci Tech* 2002; 21:577-588.
 - 8) Capstick PB, Garland AJ, Chapman WG, Masters RC. Production of foot-and-mouth disease virus antigen from BHK 21 clone 13 cells grown and infected in deep suspension cultures. *Nature* 1965;205:1135-6.
 - 9) Bahnemann HG. Binary ethylenimine as an inactivant for foot-and-mouth disease virus and its application for vaccine production. *Arch Virol* 1975;47:47-56.
 - 10) Oem JK, Chang BS, Joo HD, Yang MY, Kim GJ, Park JY, et al. Development of an epitope-blocking-enzyme-linked immunosorbent assay to differentiate between animals infected with and vaccinated against foot-and-mouth disease virus. *J Virol Methods* 2007;142:174-81.
 - 11) Ishimaru D, Sa-Carvalho D, Silva JL. Pressure-inactivated FMDV: a potential vaccine. *Vaccine* 2004;22:2334-9.
 - 12) Mowat GN, Barr DA, Bennett JH. The development of an attenuated foot-and-mouth disease virus vaccine by modification and cloning in tissue cultures of BHK21 cells. *Arch Gesamte Virusforsch* 1969;26:341-54.
 - 13) Saiz M, Nunez JI, Jimenez-Clavero MA, Baranowski E, Sobrino F. Foot-and-mouth disease virus: biology and prospects for disease control. *Microbes Infect* 2002;4:1183-92.
 - 14) de Los Santos T, de Avila Botton S, Weiblen R, Grubman MJ. The leader proteinase of foot-and-mouth disease virus inhibits the induction of beta interferon mRNA and blocks the host innate immune response. *J Virol* 2006;80:1906-14.
 - 15) Mason PW, Piccone ME, McKenna TS, Chinsangaram J, Grubman MJ. Evaluation of a live-attenuated foot-and-mouth disease virus as a vaccine candidate. *Virology* 1997;227:96-102.
 - 16) Chinsangaram J, Mason PW, Grubman MJ. Protection of swine by live and inactivated vaccines prepared from a leader proteinase-deficient serotype A12 foot-and-mouth disease virus. *Vaccine* 1998;16:1516-22.
 - 17) Ward G, Rieder E, Mason PW. Plasmid DNA encoding replicating foot-and-mouth disease virus genomes induces antiviral immune responses in swine. *J Virol* 1997;71:7442-7.
 - 18) McKenna TS, Lubroth J, Rieder E, Baxt B, Mason PW. Receptor binding site-deleted foot-and-mouth disease (FMD) virus protects cattle from FMD. *J Virol* 1995;69:5787-90.
 - 19) Rieder E, Bunch T, Brown F, Mason PW. Genetically engineered foot-and-mouth disease viruses with poly(C) tracts of two nucleotides are virulent in mice. *J Virol* 1993;67: 5139-45.
 - 20) Zibert A, Maass G, Strebel K, Falk MM, Beck E. Infectious foot-and-mouth disease virus derived from a cloned full-length cDNA. *J Virol* 1990;64:2467-73.
 - 21) Xin A, Li H, Li L, Liao D, Yang Y, Zhang N, et al. Genome analysis and development of infectious cDNA clone of a virulence-attenuated strain of foot-and-mouth disease virus type Asia 1 from China. *Vet Microbiol* 2009;138:273-80.
 - 22) Piccone ME, Pauszek S, Pacheco J, Rieder E, Kramer E, Rodriguez LL. Molecular characterization of a foot-and-mouth disease virus containing a 57-nucleotide insertion in the 3' untranslated region. *Arch Virol* 2009;154:671-6.
 - 23) Rodriguez Pulido M, Sobrino F, Borrego B, Saiz M. Attenuated foot-and-mouth disease virus RNA carrying a deletion in the 3' noncoding region can elicit immunity in swine. *J Virol* 2009;83:3475-85.
 - 24) Van Rensburg HG, Mason PW. Construction and evaluation of a recombinant foot-and-mouth disease virus: implications for inactivated vaccine production. *Ann N Y Acad Sci* 2002;969: 83-7.
 - 25) Grubman MJ, Mason PW. Prospects, including time-frames, for improved foot and mouth disease vaccines. *Rev Sci Tech* 2002;21:589-600.
 - 26) Kleid DG, Yansura D, Small B, Dowbenko D, Moore DM, Grubman MJ, et al. Cloned viral protein vaccine for foot-and-mouth disease: responses in cattle and swine. *Science* 1981; 214:1125-9.
 - 27) Verdaguer N, Mateu MG, Andreu D, Giralt E, Domingo E,

- Fita I. 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* 1995;14:1690-6.
- 28) Rodriguez LL, Barrera J, Kramer E, Lubroth J, Brown F, Golde WT. 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* 2003;21:3751-6.
- 29) Meloen RH, Casal JI, Dalsgaard K, Langeveld JP. Synthetic peptide vaccines: success at last. *Vaccine* 1995;13:885-6.
- 30) Taboga O, Tami C, Carrillo E, Nunez JI, Rodriguez A, Saiz JC, et al. 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* 1997;71:2606-14.
- 31) Wang CY, Chang TY, Walfield AM, Ye J, Shen M, Chen SP, et al. Effective synthetic peptide vaccine for foot-and-mouth disease in swine. *Vaccine* 2002;20:2603-10.
- 32) Park JH, Kim SJ, Oem JK, Lee KN, Kim YJ, Kye SJ, et al. Enhanced immune response with foot and mouth disease virus VP1 and interleukin-1 fusion genes. *J Vet Sci* 2006;7: 257-62.
- 33) Li Z, Yi Y, Yin X, Zhang Z, Liu J. Expression of foot-and-mouth disease virus capsid proteins in silkworm-baculovirus expression system and its utilization as a subunit vaccine. *PLoS One* 2008;3:e2273.
- 34) Wong HT, Cheng SC, Chan EW, Sheng ZT, Yan WY, Zheng ZX, et al. Plasmids encoding foot-and-mouth disease virus VP1 epitopes elicited immune responses in mice and swine and protected swine against viral infection. *Virology* 2000; 278:27-35.
- 35) Aggarwal N, Barnett PV. 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* 2002;83:775-82.
- 36) Beard C, Ward G, Rieder E, Chinsangaram J, Grubman MJ, Mason PW. Development of DNA vaccines for foot-and-mouth disease, evaluation of vaccines encoding replicating and non-replicating nucleic acids in swine. *J Biotechnol* 1999;73: 243-9.
- 37) Cedillo-Barron L, Foster-Cuevas M, Belsham GJ, Lefevre F, Parkhouse RM. 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* 2001;82:1713-24.
- 38) Wang X, Zhang X, Kang Y, Jin H, Du X, Zhao G, et al. Interleukin-15 enhance DNA vaccine elicited mucosal and systemic immunity against foot and mouth disease virus. *Vaccine* 2008;26:5135-44.
- 39) Lu H, Huo X, Zhang Y, Zheng M, Ma M, Zhang H, et al. Enhancing effects of the chemical adjuvant levamisole on the DNA vaccine pVIR-P12A-IL18-3C. *Microbiol Immunol* 2008;52(9):440-6.
- 40) Shao HJ, Chen L, Su YB. DNA fragment encoding human IL-1beta 163-171 peptide enhances the immune responses elicited in mice by DNA vaccine against foot-and-mouth disease. *Vet Res Commun* 2005;29:35-46.
- 41) Dory D, Remond M, Beven V, Cariolet R, Zientara S, Jestin A. Foot-and-mouth disease virus neutralizing antibodies production induced by pcDNA3 and Sindbis virus based plasmid encoding FMDV P1-2A3C3D in swine. *Antiviral Res* 2009;83:45-52.
- 42) Zhang A, Jin H, Zhang F, Ma Z, Tu Y, Ren Z, et al. Effects of multiple copies of CpG on DNA vaccination. *DNA Cell Biol* 2005;24:292-8.
- 43) Zhang S, Guo YJ, Sun SH, Wang KY, Wang KH, Zhang Y, et al. DNA vaccination using bacillus Calmette-Guerin-DNA as an adjuvant to enhance immune response to three kinds of swine diseases. *Scand J Immunol* 2005;62:371-7.
- 44) Fan H, Tong T, Chen H, Guo A. Immunization of DNA vaccine encoding C3d-VP1 fusion enhanced protective immune response against foot-and-mouth disease virus. *Virus Genes* 2007;35:347-57.
- 45) Pacheco JM, Brum MC, Moraes MP, Golde WT, Grubman MJ. Rapid protection of cattle from direct challenge with foot-and-mouth disease virus (FMDV) by a single inoculation with an adenovirus-vectored FMDV subunit vaccine. *Virology* 2005;337:205-9.
- 46) Pena L, Moraes MP, Koster M, Burrage T, Pacheco JM, Segundo FD, et al. Delivery of a foot-and-mouth disease virus empty capsid subunit antigen with nonstructural protein 2B improves protection of swine. *Vaccine* 2008;26:5689-99.
- 47) Du Y, Jiang P, Li Y, He H, Jiang W, Wang X, et al. Immune responses of two recombinant adenoviruses expressing VP1 antigens of FMDV fused with porcine granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *Vaccine* 2007;25:8209-19.
- 48) Li X, Liu R, Tang H, Jin M, Chen H, Qian P. Induction of protective immunity in swine by immunization with live

- attenuated recombinant pseudorabies virus expressing the capsid precursor encoding regions of foot-and-mouth disease virus. *Vaccine* 2008;26:2714-22.
- 49) Ren XG, Xue F, Zhu YM, Tong GZ, Wang YH, Feng JK, et al. Construction of a recombinant BHV-1 expressing the VP1 gene of foot and mouth disease virus and its immunogenicity in a rabbit model. *Biotechnol Lett* 2009;31:1159-65.
- 50) Ma M, Jin N, Shen G, Zhu G, Liu HJ, Zheng M, et al. Immune responses of swine inoculated with a recombinant fowlpox virus co-expressing P12A and 3C of FMDV and swine IL-18. *Vet Immunol Immunopathol* 2008;121:1-7.
- 51) Dus Santos MJ, Wigdorovitz A, Trono K, Rios RD, Franzone PM, Gil F, et al. A novel methodology to develop a foot and mouth disease virus (FMDV) peptide-based vaccine in transgenic plants. *Vaccine* 2002;20:1141-7.
- 52) Pan L, Zhang Y, Wang Y, Wang B, Wang W, Fang Y, et al. Foliar extracts from transgenic tomato plants expressing the structural polyprotein, P1-2A, and protease, 3C, from foot-and-mouth disease virus elicit a protective response in guinea pigs. *Vet Immunol Immunopathol* 2008;121:83-90.
- 53) Wu L, Jiang L, Zhou Z, Fan J, Zhang Q, Zhu H, et al. Expression of foot-and-mouth disease virus epitopes in tobacco by a tobacco mosaic virus-based vector. *Vaccine* 2003;21:4390-8.
- 54) Yang CD, Liao JT, Lai CY, Jong MH, Liang CM, Lin YL, et al. Induction of protective immunity in swine by recombinant bamboo mosaic virus expressing foot-and-mouth disease virus epitopes. *BMC Biotechnol* 2007;7:62.
- 55) Mason HS, Ball JM, Shi JJ, Jiang X, Estes MK, Arntzen CJ. Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:5335-40.
- 56) Quattrocchi V, Bianco V, Fondevila N, Pappalardo S, Sadir A, Zamorano P. Use of new adjuvants in an emergency vaccine against foot-and-mouth disease virus: evaluation of conferred immunity. *Dev Biol (Basel)* 2004;119:481-97.
- 57) Cloete M, Dungu B, Van Staden LI, Ismail-Cassim N, Vosloo W. Evaluation of different adjuvants for foot-and-mouth disease vaccine containing all the SAT serotypes. *Onderstepoort J Vet Res* 2008;75:17-31.
- 58) Capozzo AV, Burke DJ, Fox JW, Bergmann IE, La Torre JL, Grigera PR. Expression of foot and mouth disease virus non-structural polypeptide 3ABC induces histone H3 cleavage in BHK21 cells. *Virus Res* 2002;90:91-9.
- 59) Moffat K, Knox C, Howell G, Clark SJ, Yang H, Belsham GJ, et al. Inhibition of the secretory pathway by foot-and-mouth disease virus 2BC protein is reproduced by coexpression of 2B with 2C, and the site of inhibition is determined by the subcellular location of 2C. *J Virol* 2007;81:1129-39.
- 60) Grubman MJ, Moraes MP, Diaz-San Segundo F, Pena L, de los Santos T. Evading the host immune response: how foot-and-mouth disease virus has become an effective pathogen. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008;53:8-17.
- 61) Kim SM, Lee KN, Park JY, Ko YJ, Joo YS, Kim HS, et al. Therapeutic application of RNA interference against foot-and-mouth disease virus *in vitro* and *in vivo*. *Antiviral Res* 2008;80:178-84.
- 62) Chen W, Yan W, Du Q, Fei L, Liu M, Ni Z, et al. RNA interference targeting VP1 inhibits foot-and-mouth disease virus replication in BHK-21 cells and suckling mice. *J Virol* 2004;78:6900-7.
- 63) Liu M, Chen W, Ni Z, Yan W, Fei L, Jiao Y, et al. Cross-inhibition to heterologous foot-and-mouth disease virus infection induced by RNA interference targeting the conserved regions of viral genome. *Virology* 2005;336:51-9.
- 64) Kahana R, Kuznetzova L, Rogel A, Shemesh M, Hai D, Yadin H, et al. Inhibition of foot-and-mouth disease virus replication by small interfering RNA. *J Gen Virol* 2004;85:3213-7.
- 65) Chen W, Liu M, Jiao Y, Yan W, Wei X, Chen J, et al. Adenovirus-mediated RNA interference against foot-and-mouth disease virus infection both *in vitro* and *in vivo*. *J Virol* 2006;80:3559-66.
- 66) de Avila Botton S, Brum MC, Bautista E, Koster M, Weiblen R, Golde WT, et al. Immunopotentiation of a foot-and-mouth disease virus subunit vaccine by interferon alpha. *Vaccine* 2006;24:3446-56.
- 67) Kleina LG, Grubman MJ. Antiviral effects of a thiol protease inhibitor on foot-and-mouth disease virus. *J Virol* 1992;66:7168-75.
- 68) Furuta Y, Takahashi K, Shiraki K, Sakamoto K, Smee DF, Barnard DL, et al. T-705 (favipiravir) and related compounds: Novel broad-spectrum inhibitors of RNA viral infections. *Antiviral Res* 2009;82:95-102.
- 69) Paton DJ, Sumption KJ, Charleston B. Options for control of foot-and-mouth disease: knowledge, capability and policy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2009;364:2657-67.