

## Evaluation of Immune Response for Vi-CRM<sub>197</sub> Conjugated Vaccine against *Salmonella enterica* serovar Typhi in Mice

Kiju Kim<sup>1†</sup>, Junho Shim<sup>1†</sup>, Soyeon Park<sup>1</sup>, Bokyoung Park<sup>1</sup>, Youngjae Cho<sup>1</sup>, Byungung Hur<sup>2</sup>,  
Seon-A Kang<sup>2</sup>, Seuk-Keun Choi<sup>2</sup>, Yeongok Baik<sup>2</sup> and Tae-Wook Hahn<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Veterinary Medicine & Institute of Veterinary Science, Kangwon National University, Chuncheon;

<sup>2</sup>Eubiologics Co., Ltd., Soyang-ro 56, Chuncheon, Korea

Typhoid fever, a serious systemic infection caused by *Salmonella enterica* serovar Typhi, breaks out in developing countries. However, existing vaccines only induce relatively low protective effects with humoral responses and do not stimulate secondary immune response, especially to young people. The objective of this study is to evaluate the immunogenicity of the vaccine containing virulence capsular polysaccharide (Vi) conjugated with the optimal ratios of non-toxic variant of diphtheria toxin (CRM<sub>197</sub>) in mice. Six-week-old BALB/c female mice were injected intraperitoneally three times at intervals of 14 days and sera were collected on days 0, 14, 28, 42 and 56 post-injection. The efficacy of the vaccine was evaluated by comparing between negative control group injected with PBS and vaccine groups injected with Vi or Vi-CRM<sub>197</sub> conjugate of different ratio. Vi and CRM<sub>197</sub>-specific antibody responses were evaluated using enzyme-linked immunosorbent assay. The result showed that Vi-CRM<sub>197</sub>-1 group revealed the highest and significant Vi-specific IgG immune responses among the other groups and Vi group ( $p < 0.01$ ). In conclusion, Vi-CRM<sub>197</sub>-1 conjugate vaccine induced the highest humoral immune response in mice and may be used as an effective vaccine to replace the existing typhoid vaccine for infants under 2 years old.

**Key Words:** Vi, CRM<sub>197</sub>, Conjugated vaccine, *Salmonella* Typhi, Typhoid fever

### INTRODUCTION

장티푸스는 *Salmonella enterica* serovar Typhi에 의해 발생하는 질병으로 주로 오염된 음식과 물의 섭취를 통해 사람에게 급성 전신성 감염을 일으키며 중앙아시아와 동남아시아, 아프리카 그리고 라틴아메리카 등과 같은 많은 개발도상국에서 여전히 공중위생상 중요한 질병으로 남아있다 (1, 2). 전 세계적으로 매년 약 2,000만 명이 장티푸스에 감염되고 20만 명 이상의 환자들이 사망에 이르

며, 그 중 5세 미만의 영유아들이 대부분을 차지하고 있다 (3).

장티푸스를 예방하기 위해 세계보건기구(World Health Organization, WHO)에서는 임상시험을 통해 안정성과 유효성이 입증된 아단위 백신(Virulence capsular polysaccharide, Vi)과 경구용 약독화 생균 백신(Ty21a)의 접종을 권장하고 있다 (4, 5). 하지만 기존의 Vi 백신은 T 세포 비의존 항원으로 다소 낮은 친화도의 항체를 유도하기 때문에 효과적인 면역기억반응을 일으키지 못하는 단점이 있다 (6). 또한 서브유닛 백신과 약독화 생균 백신

Received: February 3, 2014/ Revised: February 19, 2014/ Accepted: February 21, 2014

<sup>†</sup>The first two authors contributed equally to this work.

\*Corresponding author: Tae-Wook Hahn. College of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea.

Phone: +82-33-250-8671, Fax: +82-33-244-2367, e-mail: twhahn@kangwon.ac.kr

\*\*This research was supported by a Grant of Technology Development, Small and Medium Business Administration (SMBA) of Korea.

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>).

은 2세부터 성인까지 접종 대상을 제한하고 있으며, 현재 까지 2세 미만의 영유아를 대상으로 한 장티푸스 백신은 아직 개발되지 않고 있다 (7, 8). 이와 같은 문제점을 개선 하기 위해 기존의 백신인 Vi에 운반 단백질을 접합시킴으로써 T 세포 비의존 면역반응을 T 세포 의존 면역반 응으로 전환하여 더 개선된 면역원성을 유도할 수 있다 (9). 이러한 운반 단백질 후보로는 diphtheria toxoid (DT), tetanus toxoid (TT), CRM<sub>197</sub> (a non-toxic variant of diphtheria toxin) 그리고 rEPA (*Pseudomonas aeruginosa* recombinant exoprotein A) 등이 있으며 (10~12), 그 중 CRM<sub>197</sub>은 디 프테리아 독소의 돌연변이 단백질로서 디프테리아 독소 와 동등한 특성을 가졌지만 독력을 상실하여 어린이를 대상으로 사용이 허가되었으며, 임상시험을 통해 그 효능 과 안전성이 확보되어 있다 (13~16).

따라서 본 연구에서는 사람에게 장티푸스를 일으키는 *S. Typhi*를 효과적으로 예방하기 위해 재조합 CRM<sub>197</sub>을 발현하는 시스템을 구축하여 이 운반 단백질을 Vi에 접 합시킨 백신을 제작하였으며, 이 후보 백신의 면역원성을 마우스에서 조사 및 분석을 통해 기존의 Vi 백신과 비교 평가하였다.

## MATERIALS AND METHODS

### Vi 추출 및 정제

본 연구에서는 *S. Typhi* ATCC 19430 균주를 사용하여 이전에 보고된 방법으로 Vi를 추출하였다 (17). *S. Typhi* 균주를 base media (2% Yeast Extract, 1% Casamino acid, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 37.6 g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 8.2 g, MgSO<sub>4</sub> 5 g, Glucose 6 g, Distilled water 1,000 ml)에서 32°C, 150 rpm으로 4~5시간 동안 배양한 균액을 다시 2,000 ml의 base media에 접종 하여 배양한 뒤, feeding solution (10% Yeast Extract, 10% Casamino acid, 30% Glucose)을 첨가하여 glucose 최종 농 도가 0.1%가 되도록 유지하였다. 32°C, 150 rpm으로 13시 간 동안 배양한 균에 0.37% formalin을 첨가하여 불활화 시킨 뒤 막여과(membrane filtration, MF) 방법을 이용하여 Vi를 추출 및 정제하였다.

### 재조합 CRM<sub>197</sub>의 제작

CRM<sub>197</sub> 유전자의 증폭은 *Corynebacterium diphtheria* C7-beta<sub>197</sub> (ATCC, No. 53281) 균주의 genomic DNA를 주 형으로 N-terminal primer (5'-TATCCATGGCTCATCATCA-

CCATCACCATATCGAAGGTCGTGGCGCTGATGATGT-TGTTGA-3')와 C-terminal primer (5'-TATGCTGACTCAT-TAGCTTTTGATTTCAAAAAATAG-3')를 사용하여 중합 효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 수행하였 으며, 반응조건은 94°C에서 5분 반응시킨 후 94°C 1분, 60°C 1분, 72°C 1분간 25회 반복하였으며, 72°C에서 10 분간 반응하였다. PCR 산물과 본 실험에 맞게 변경된 pBAD/gIII vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)의 플라 스미드 DNA를 각각 제한효소 *Nco* I (Takara, Shiga, Japan) 과 *Sal* I (Takara)으로 동시 처리한 후 T4 DNA ligase (Takara)로 16°C에서 4시간 반응시키고 전기천공법(Micro-Pulser electroporator; BIORAD, CA, USA)을 이용하여 *Escherichia coli* DH5a competent cell (Invitrogen) 내로 형질 전환을 실시하였다. 형질전환된 균주는 0.02% arabinose가 첨가된 2xYT 액체배지(Sigma, St. Louis, MO, USA)에서 22°C, 15시간 동안 배양하여 CRM<sub>197</sub> 유전자의 발현을 유 도하였다. 발현된 CRM<sub>197</sub> 단백질은 HisPur Ni-NTA resin system (Thermo Scientific, Rockford, USA)을 이용하여 정제 한 후, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electro-phoresis (SDS-PAGE)를 실시하였으며, anti-His antibody (IG Therapy, Chuncheon, Korea)와 anti-mouse IgG alkaline phosphatase (AP)-conjugated antibody (Santa Cruz Biotech-nology, Santa Cruz, CA, USA)를 사용하여 Western blot을 실시하였다.

### Vi와 CRM<sub>197</sub>의 접합

Vi와 CRM<sub>197</sub>을 접합하기 위해 linker로 널리 상용되고 있는 adipic acid dihydrazide (ADH; Sigma)를 이용하였다. 80 mM 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES; Sigma) 에 들어있는 10 mg/ml의 CRM<sub>197</sub>에 ADH와 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC, Sigma)를 각각 200 mM, 21 mM이 되도록 첨가한 후 1 M HCl로 pH 5.6 이 되도록 맞추고 실온에서 60분간 반응하였다. 반응 후 1 M NaOH로 pH 7.0으로 맞추고 Vivaspin 20 centrifugal concentrator (Sartorius, Goettingen, Germany)를 이용하여 ADH와 반응하지 않는 30 kDa 이하의 단백질을 제거하 였다. 1.0 mg/ml Vi (in 80 mM MES)에 CRM<sub>197</sub>-ADH를 1.5, 1.0 그리고 0.5 mg/ml를 각각 첨가하고 1 M HCl로 pH 5.6~5.8로 맞추는 후 실온에서 3시간 반응하였다. Vi와 결 합되지 않은 CRM<sub>197</sub>-ADH는 Vivaspin 20 (Sartorius)을 이 용하여 제거한 후 최종적으로 Vi-CRM<sub>197</sub> 접합체를 획득

**Table 1.** Vaccine used in this study.

Group No.	Vaccine	Vi/CRM <sub>197</sub> ratio (w/w)	Dose (μg)	
			Vi	CRM <sub>197</sub>
1	Vi/CRM <sub>197</sub> -1	0.7	2.5	3.6
2	Vi/CRM <sub>197</sub> -2	0.9	2.5	2.8
3	Vi/CRM <sub>197</sub> -3	1.5	2.5	1.7
4	Vi-PS	—	2.5	—
5	Control (PBS)	—	—	—

하였으며, sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 방법에 따라 정량 및 접합 생산성을 확인하였다. 재조합 CRM<sub>197</sub>의 tag에 결합하는 anti-His antibody (IG Therapy)를 coating buffer (0.1 M Sodium bicarbonate, pH 9.6)로 1:3,000 희석하여 MaxiSorp 96-well plate (Nunc, Roskilde, Denmark)에 코팅한 후 정제된 Vi, CRM<sub>197</sub> 그리고 Vi-CRM<sub>197</sub> 시료를 plate에 각각 5 μg/ml씩 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응하였다. 그 다음 마우스에서 제작한 anti-Vi polyclonal antibody와 anti-mouse IgG AP-conjugated antibody (Santa Cruz Biotechnology)를 차례로 반응시킨 후 450 nm 파장에서 흡광도(OD)를 측정하였다.

#### 실험동물 및 접종 방법

실험동물은 6주령의 BALB/c 암컷 마우스(ORIENT BIO, Seongnam, Korea)를 사용하였으며, 모든 마우스는 IVC Rack (ThreesShine, Daejeon, Korea)에서 사육하였다. 실험동물의 윤리적 사용을 위해 3R 원칙을 준수하였으며, 강원대학교 동물실험윤리위원회의 규정하에서 동물실험을 실시하였다(허가번호 KW-130328-2). 접종군은 한 군당 6마리의 마우스를 사용하였고, Vi군과 Vi-CRM<sub>197</sub> ratio (w/w) 0.7 (Vi-CRM<sub>197</sub>-1), 0.9 (Vi-CRM<sub>197</sub>-2) 그리고 1.5 (Vi-CRM<sub>197</sub>-3)인 군으로 나누었으며, 대조군으로는 phosphate buffered saline (PBS)만을 접종하였다(Table 1). 접종 방법은 마우스 1마리당 2.5 μg/0.2 ml/dose를 2주 간격으로 총 3회에 걸쳐 복강으로 접종하였다. 시료의 채취는 최초 접종 후 2주 간격으로 총 5회 시행하였으며, capillary tube를 이용하여 마우스 혈액 약 0.5 ml를 안와채혈하여 상온에서 1~2시간 혈액을 응고시킨 뒤 13,000 rpm으로 10분간 원심분리하였다. 상층액인 혈청을 분리하여 -20°C에 보관한 후 실험에 이용하였다.

#### ELISA

백신에 대한 마우스에서 면역반응의 효과를 확인하기 위해 indirect ELISA를 실시하였으며, 항원은 정제된 Vi와 CRM<sub>197</sub>을 이용하였다. MaxiSorp 96well plate (Nunc)에 0.05 M carbonate buffer (pH 9.6)로 Vi를 1 μg/ml, CRM<sub>197</sub>을 2 μg/ml로 희석하여 각 well당 100 μl씩 첨가하고 4°C에서 16~20시간 동안 coating하였다. Plate를 PBST (0.05% Tween20/PBS)로 3번 세척한 뒤, 2.0% BSA/PBST로 각 well에 200 μl씩 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 blocking하였다. Plate를 PBST로 3번 세척한 뒤, 각 군에서 채집된 마우스 혈청을 0.1% BSA/PBST로 계단 희석하여 37°C에서 1시간 동안 반응하였다. Plate를 PBST로 3번 세척한 뒤, 2차 항체인 goat anti-mouse IgG antibody (KPL, Gaithersburg, MD, USA)를 1:6,000으로 희석하여 각 well에 100 μl씩 첨가하고 37°C에서 1시간 동안 반응하였다. Plate를 PBST로 4번 세척한 뒤, 기질로는 tetramethylbenzidine (TMB; SurModics, Eden Prairie, MN, USA)을 사용하여 각 well에 100 μl씩 첨가하고 3분 동안 암실에서 반응하였다. 각 well에 1 N HCl을 100 μl씩 첨가하여 반응을 중단한 후, microplate reader (BIORAD)를 이용하여 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 양성 판정에 대한 기준은 blank 평균값의 3배보다 큰 값을 역가로 산출하였다.

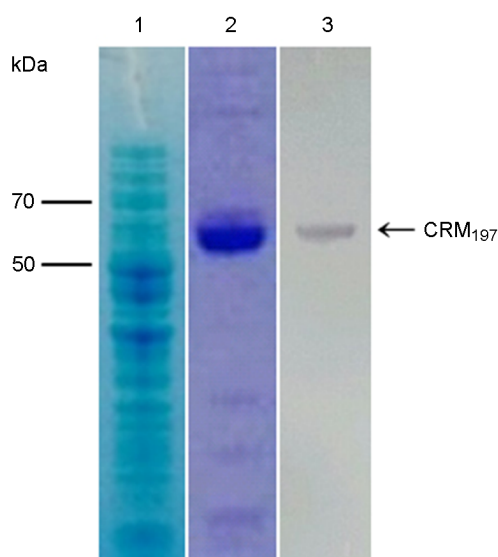
#### 통계분석

통계학적 분석은 one-way ANOVA를 이용하였으며, ELISA 결과에 대한 통계적인 차이는 95% 수준에서 유의성이 있는 것으로 판정하였다( $p < 0.05$ ). 군간의 차이는 Dunnett의 다중비교검정을 추가로 실시하였다.

## RESULTS

#### Vi와 재조합 CRM<sub>197</sub>의 분석

일반적으로 *S. Typhi* Vi의 분자량은 200 kDa 이상을 나타낸다 (18). 본 연구에서는 겔 침투 크로마토그래피(Gel permeation chromatography, GPC)를 수행한 결과 정제된 Vi의 분자량은 3개의 유형으로 분석이 되었으며, 그 중 가장 큰 분자량을 갖는 555 kDa의 Vi를 사용하였다. 또한 재조합 CRM<sub>197</sub> 운반 단백질의 안정된 발현을 확인하기 위해 SDS-PAGE를 실시한 후 Western blot을 수행한



**Figure 1. SDS-PAGE and Western blot of recombinant CRM<sub>197</sub> protein induced by 0.02% arabinose in *E. coli*.** The total extracts (lane 1) of *E. coli* containing pBAD-CRM<sub>197</sub> and purified CRM<sub>197</sub> (lane 2) were separated by SDS-PAGE and stained with Coomassie blue, analyzed by Western blot of the duplicated gel of lane 1 using anti-His antibody and anti-mouse IgG AP conjugated antibody (lane 3).

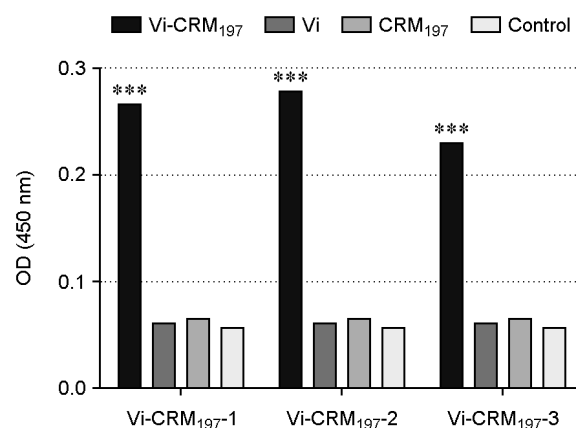
결과 표준 형태로 사용되는 CRM<sub>197</sub>과 동일한 크기인 약 58 kDa의 밴드를 확인할 수 있었다(Fig. 1).

#### Vi-CRM<sub>197</sub> 접합 결과

Vi-CRM<sub>197</sub> 접합체의 분자량 분석 의뢰 결과, 가장 큰 분자량은 3,465 kDa를 나타냈으며, Vi의 분자량에 비해 약 6배 크기의 접합체를 얻을 수 있었다(자료미제시). 또한 Vi와 운반 단백질 CRM<sub>197</sub>의 접합율을 확인하기 위해 sandwich ELISA를 실시하여 450 nm에서 흡광도를 측정 한 결과 Vi와 CRM<sub>197</sub>은 0.07 미만을 나타내 blank 값과 비슷한 수준이었다. 반면에 Vi-CRM<sub>197-1</sub>, Vi-CRM<sub>197-2</sub> 그리고 Vi-CRM<sub>197-3</sub> 후보 백신에 대해 각각 0.27, 0.28 그리고 0.23을 나타내 Vi와 CRM<sub>197</sub>의 접합이 잘 되었음을 확인하였으며, Vi를 표준으로 한 정량에서는 610 µg/ml의 농도를 나타내 초기 농도인 1 mg/ml를 기준으로 61%의 높은 접합율을 나타내었다(Fig. 2).

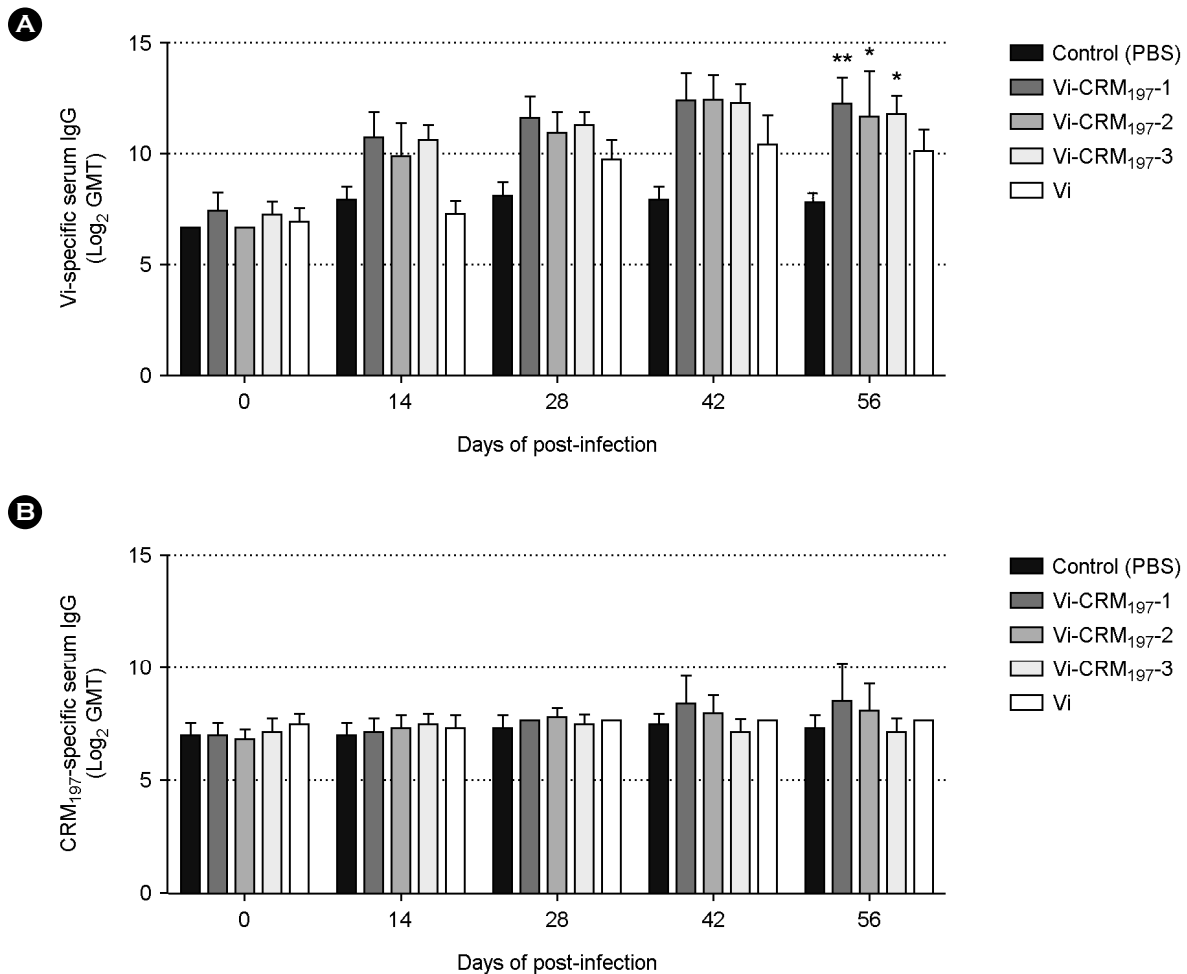
#### Vi-specific 항체가 조사

접합 백신에 대한 마우스에서의 면역반응 효과를 확인 하기 위해 접종 후 2주 간격으로 총 3회에 걸쳐 복강으



**Figure 2. Analysis of Vi-CRM<sub>197</sub> conjugate levels by sandwich ELISA.** For sandwich ELISA, plates were coated with anti-His antibody. Vi, CRM<sub>197</sub> and Vi-CRM<sub>197</sub> were added to each well. Anti-Vi polyclonal antibody was added and then anti-mouse IgG AP-conjugated antibody was added to each well. \*\*\*, Significant difference in Vi-CRM<sub>197</sub> conjugate compared with the control group ( $p < 0.001$ ).

로 접종하였다. 접종 전(0 days of post-injection, dpi), 1차 접종 2주 후(14 dpi), 2차 접종 2주 후(28 dpi), 3차 접종 2주 후(42 dpi), 3차 접종 4주 후(56 dpi)에 각각 수집한 혈청을 대상으로 ELISA를 실시하여 Vi-specific IgG의 항체가를 조사한 결과 접종 전(0 dpi)에는 모든 군에서 비슷한 수준의 항체가를 나타냈으며, 대조군은 접종 전구간에서 매우 낮은 수준의 항체가를 나타냈다. 반면에 Vi-CRM<sub>197</sub> 접합 백신을 접종한 군은 1차 접종 2주 후(14 dpi) 항체가가 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 3차 접종 2주 후(42 dpi)까지 항체가가 지속적으로 증가하는 양상을 나타내다가 3차 접종 4주 후(56 dpi)에는 더 이상 증가하지 않고 유지되었다. 그 중 Vi-CRM<sub>197-1</sub>을 접종한 군은 모든 구간에서 가장 높은 항체가를 보이며 대조군과 유의적인 차이를 나타냈다( $p < 0.01$ ). 특히 접합 백신 접종군은 모든 구간의 평균값에서 대조군을 기준으로 Vi-CRM<sub>197-1</sub>군이 1.42배, Vi-CRM<sub>197-2</sub>군이 1.35배 그리고 Vi-CRM<sub>197-3</sub>군이 1.38배 높은 항체가를 나타냈다. 반면에, 현재 시판되고 있는 Vi 백신을 접종한 군은 대조군에 비해 1.16배 높아 비교적 낮은 수준의 항체가를 보였으며, 유의적인 차이 또한 나타나지 않았다. 한편, Vi 백신 접종군을 기준으로 Vi-CRM<sub>197-1</sub>군이 1.22배, Vi-CRM<sub>197-2</sub>군이 1.16배 그리고 Vi-CRM<sub>197-3</sub>군이 1.19배 높은 항체가를 나타냈다(Fig. 3A).



**Figure 3.** Vi and CRM<sub>197</sub>-specific serum IgG responses in mice following dosing with Vi and Vi-CRM<sub>197</sub> conjugates. BALB/c mice were immunized intraperitoneally three times at 14-day intervals with 2.5 µg of Vi-CRM<sub>197</sub>. Values are reported as log<sub>2</sub> geometric mean titer (GMT) and error bars indicate 95% confidence intervals. \*\* $p < 0.01$  and \* $p < 0.05$  versus control (PBS) immunized mice.

#### CRM<sub>197</sub>-specific 항체가 조사

마우스 혈청 내 CRM<sub>197</sub>-specific IgG의 항체가를 조사한 결과 접종 전구간에서 모든 군이 대조군과 유사하게 낮은 수준의 항체가를 나타냈으며, 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 또한 대조군을 기준으로 Vi-CRM<sub>197</sub>-1군은 1.07배, Vi-CRM<sub>197</sub>-2군은 1.05배, 그리고 Vi-CRM<sub>197</sub>-3군은 1.01배 높은 항체가를 나타냈다. 한편, Vi 백신 접종군 역시 대조군을 기준으로 1.05배 높은 항체가를 나타냈으며, Vi-CRM<sub>197</sub> 접합 백신군은 Vi 백신군을 기준으로 0.96~1.03배의 거의 차이가 없는 항체가를 나타냈다(Fig. 3B).

#### DISCUSSION

세균 표면에 있는 독성인자이자 방어 항원인 polysaccharide는 T 세포 비의존 항원으로 백신 제작에 널리 사용되어 왔지만 면역원성이 비교적 낮으며, 면역기억 또한 유도하지 못하는 단점을 가지고 있어 영유아에게는 효과적이지 못하다 (12, 19). 또한 Vi 백신은 정제하는 과정에 있어서 비용과 시간이 너무 많이 소비되는 관계로 WHO 국제방역사업의 백신으로 활용함에 있어서 적합하지 않다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 기존의 장티푸스 백신인 Vi에 운반 단백질을 접합시켜 지속적인 방어 효과뿐만 아니라 면역기억반응 또한 강화시킬 수

있다 (10, 20, 21). 다양한 운반 단백질 후보 중 CRM<sub>197</sub>은 DT 또는 TT와 같이 포르말린 처리가 필요하지 않으며, 동일한 크기의 정제된 항원을 손쉽게 얻을 수 있는 장점을 가지고 있다 (12). 또한 Vi-CRM<sub>197</sub> 접합 장티푸스 백신은 이미 임상 1상을 통해 안전성을 확보하였고, 성인 및 소아를 대상으로 연령에 따른 접종용량을 탐색하는 임상 2상 중에 있다 (22). 따라서 본 연구에서는 사람에게 장티푸스를 일으키는 *S. Typhi*를 효과적으로 예방하기 위해 Vi와 CRM<sub>197</sub>을 0.7, 0.9 그리고 1.5 비율로 접합시킨 후보 백신에 대해 마우스를 사용하여 면역원성을 비교 평가하였다.

각각의 백신을 2주 간격으로 총 3회에 걸쳐 마우스 복강으로 접종한 뒤 Vi-specific IgG를 측정된 결과 Vi-CRM<sub>197</sub>을 접종한 군이 Vi를 접종한 군보다 높은 면역원성을 나타냈다. 특히 Vi-CRM<sub>197-1</sub>을 접종한 군은 대조군 비해 약 1.42배, Vi 접종군에 비해 약 1.22배 높은 항체가를 보이며 유의적인 차이를 나타냈다( $p < 0.01$ ). Fiorino 등 (19)은 Vi-CRM<sub>197</sub> 0.91 (w/w) 접합 백신을 마우스 피하에 접종한 뒤 혈청 내 Vi-specific IgG를 측정된 결과 Vi를 접종한 군에 비해 상당히 증가한 수준의 IgG를 유도하였으며, 특히 IgG1은 백신 접종 후 최소 60일 동안 지속되었다고 보고하였다. 이와 같이 Vi와 CRM<sub>197</sub>의 특정한 접합비율에서 면역원성이 증가한 이유는 최적의 T 세포 의존 면역반응을 유도하기 위해 요구되는 많은 양의 운반 단백질이 Vi에 접합됨으로써 T 세포가 충분히 자극되었기 때문이라 사료된다 (9). 한편, CRM<sub>197</sub>-specific IgG 면역반응에서는 Vi-CRM<sub>197</sub>을 접종한 군과 Vi를 접종한 군 모두 대조군과 유사하게 낮은 수준의 면역반응을 나타냈다. 이는 Vi에 비해 CRM<sub>197</sub>의 크기가 작고, 그 양 (dose) 또한 상대적으로 적기 때문에 CRM<sub>197</sub>-specific IgG가 충분히 유도되지 않은 것으로 사료된다 (9). 실제로 본 연구의 결과를 보면 Vi에 접합된 CRM<sub>197</sub>의 양이 많을수록 CRM<sub>197</sub>-specific IgG 면역반응이 증가되었으며, CRM<sub>197</sub>에 대한 IgG는 단순히 운반 단백질에 대한 항체이기 때문에 백신의 방어 효과에는 직접적인 영향이 없는 것으로 판단된다.

본 연구를 종합하면 사람에게 장티푸스를 일으키는 *S. Typhi*를 이용하여 Vi를 분리하였으며, 정제가 용이한 운반 단백질 CRM<sub>197</sub>을 생산하는 재조합 *E. coli* 균주를 개발하였다. 또한 Vi-CRM<sub>197-1</sub> 접합 백신은 기존의 Vi 백신보다 마우스에서 유의적으로 높은 체액성 면역반응을 유

도하였다. 이는 CRM<sub>197</sub>을 이용한 국내에서 최초로 시도된 장티푸스 접합 백신으로서 기존의 Vi 백신을 대체할 수 있는 백신 후보로 사용할 수 있으리라 본다. 아울러 본 연구에서 개발된 재조합 CRM<sub>197</sub> 운반 단백질을 적절하게 응용한다면 다양한 질병에 대한 효과적인 백신 개발 가능성이 있을 것으로 사료된다.

## REFERENCES

- 1) Cui C, Carbis R, An SJ, Jang H, Czerkinsky C, Szu SC, *et al.* Physical and chemical characterization and immunologic properties of *Salmonella enterica* serovar typhi capsular polysaccharide-diphtheria toxoid conjugates. Clin Vaccine Immunol 2010;17:73-9.
- 2) Toobak H, Rasooli I, Talei D, Jahangiri A, Owlia P, Darvish Alipour Astaneh S. Immune response variations to *Salmonella enterica* serovar Typhi recombinant porin proteins in mice. Biologicals 2013;41:224-30.
- 3) Lu YJ, Zhang F, Sayeed S, Thompson CM, Szu S, Anderson PW, *et al.* A bivalent vaccine to protect against *Streptococcus pneumoniae* and *Salmonella typhi*. Vaccine 2012;30:3405-12.
- 4) No authors listed. Typhoid vaccines: WHO position paper. Wkly Epidemiol Rec 2008;83:49-59.
- 5) Marathe SA, Lahiri A, Negi VD, Chakravorty D. Typhoid fever & vaccine development: a partially answered question. Indian J Med Res 2012;135:161-9.
- 6) An SJ, Yoon YK, Kothari S, Kim DR, Kim JA, Kothari N, *et al.* Immune suppression induced by Vi capsular polysaccharide is overcome by Vi-DT conjugate vaccine. Vaccine 2012;30:1023-8.
- 7) Guzman CA, Borsutzky S, Griot-Wenk M, Metcalfe IC, Pearman J, Collioud A, *et al.* Vaccines against typhoid fever. Vaccine 2006;24:3804-11.
- 8) DeRoeck D, Ochiali RL, Yang J, Anh DD, Alag V, Clemens JD. Typhoid vaccination: the Asian experience. Expert Rev Vaccines 2008;7:547-60.
- 9) An SJ, Yoon YK, Kothari S, Kothari N, Kim JA, Lee E, *et al.* Physico-chemical properties of *Salmonella typhi* Vi polysaccharide-diphtheria toxoid conjugate vaccines affect immunogenicity. Vaccine 2011;29:7618-23.
- 10) Jones C. Vaccines based on the cell surface carbohydrates of pathogenic bacteria. An Acad Bras Cienc 2005;77:293-324.
- 11) Croxtall JD, Keating GM. Pneumococcal polysaccharide

- protein D-conjugate vaccine (Synflorix; PHiD-CV). *Paediatr Drugs* 2009;11:349-57.
- 12) Micoli F, Rondini S, Pisoni I, Proietti D, Berti F, Costantino P, *et al.* Vi-CRM197 as a new conjugate vaccine against *Salmonella* Typhi. *Vaccine* 2011;29:712-20.
  - 13) Snape MD, Perrett KP, Ford KJ, John TM, Pace D, Yu LM, *et al.* Immunogenicity of a tetravalent meningococcal glyco-conjugate vaccine in infants: a randomized controlled trial. *JAMA* 2008;299:173-84.
  - 14) Jackson LA, Jacobson RM, Reisinger KS, Anemona A, Danzig LE, Dull PM. A randomized trial to determine the tolerability and immunogenicity of a quadrivalent meningococcal glyco-conjugate vaccine in healthy adolescents. *Pediatr Infect Dis J* 2009;28:86-91.
  - 15) Shinefield HR. Overview of the development and current use of CRM<sub>197</sub> conjugate vaccines for pediatric use. *Vaccine* 2010;28:4335-9.
  - 16) Rondini S, Micoli F, Lanzilao L, Pisoni I, Di Cioccio V, Saul AJ, *et al.* Characterization of *Citrobacter* sp. line 328 as a source of Vi for a Vi-CRM<sub>197</sub> glycoconjugate vaccine against *Salmonella* Typhi. *J Infect Dev Ctries* 2012;6:763-73.
  - 17) Jang H, Yoon YK, Kim JA, Kim HS, An SJ, Seo JH, *et al.* Optimization of Vi capsular polysaccharide production during growth of *Salmonella enterica* serotype Typhi Ty2 in a bioreactor. *J Biotechnol* 2008;135:71-7.
  - 18) Santander J, Roland KL, Curtiss R 3rd. Regulation of Vi capsular polysaccharide synthesis in *Salmonella enterica* serotype Typhi. *J Infect Dev Ctries* 2008;2:412-20.
  - 19) Fiorino F, Ciabattini A, Rondini S, Pozzi G, Martin LB, Medaglini D. Immunization with the conjugate vaccine Vi-CRM<sub>197</sub> against *Salmonella* Typhi Induces Vi-specific mucosal and systemic immune responses in mice. *Vaccine* 2012;30:6111-4.
  - 20) Finn A. Bacterial polysaccharide-protein conjugate vaccines. *Br Med Bull* 2004;70:1-14.
  - 21) Vliegthart JF. Carbohydrate based vaccines. *FEBS Lett* 2006;580:2945-50.
  - 22) van Damme P, Kafeja F, Anemona A, Basile V, Hilbert AK, De Coster I, *et al.* Safety, immunogenicity and dose ranging of a new Vi-CRM<sub>197</sub> conjugate vaccine against typhoid fever: randomized clinical testing in healthy adults. *PLoS One* 2011;6:e25398.