

## *Salmonella typhi* Ty21a의 동결 건조와 안정성

김세란 · 박동우\* · 전홍렬\* · 김희준\* · 한성순\*\* · 김기호 · 김홍진#

중앙대학교 약학대학, \*일양약품 중앙 연구소, \*\*충북대학교 약학대학

(Received August 30, 1999)

## The lyophilization and stability of *Salmonella typhi* Ty21a

Sei Rhan Kim, Dong Woo Park\*, Hong Ryeol Jeon\*, Hee Jun Kim\*,  
Seoung-Sun Han\*\*, Ki-Ho Kim and Hong-Jin Kim#

College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul, 156-756, Korea

\*Central Research Institute, Il-Yang Pharm. Co. Ltd. Yongin, Kyunggi, 449-900, Korea

\*\*College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheoungju, 361-763, Korea

**Abstract** — *Salmonella typhi* Ty21a is an attenuated strain of *S. typhimurium* and used for oral typhoid vaccine. In an attempt to increase the stability of Ty21a manufacturing typhoid vaccine, we studied about the stability of freeze-dried Ty21a including additives at various temperature conditions. In order to investigate the freeze-drying rate of Ty21a according to various absorbance, we lyophilized Ty21a by using 8% sucrose as a stabilizer. The optimal freeze-drying rate of Ty21a was appeared when OD (optical density) value of the growth was between 2.5 and 3.0. To investigate the stability of Ty21a at various temperature, the viability was measured after storing the freeze-dried Ty21a at the room temperature, cold and freezing condition for 1 week. The viability of Ty21a in cold and freezing storage condition was 5 times more stable than in room temperature. To search the most stable additives for the freeze-dried Ty21a, the viability of Ty21a including additives at the various storage condition was estimated. Mannitol and lactose were the most stable additives. Theses results suggest that the OD value of Ty21a growth, low temperature, mannitol and lactose are important factors for the optimal freeze-drying rate, the stable storage and the most stable additives, respectively.

**Keywords** □ *Salmonella typhi* Ty21a, lyophilization, optical density, thermal stability, additives.

설사와 발열을 일으키는 장내 세균 감염은 후진국에서는 연간 10억 인구 이상에서 발병하고 있으며 그 중 몇 백만명 이상이 사망하고, 국제적으로 여행을 하는 사람의 경우에서는 흔히 일어나는 질병이다.<sup>1)</sup> 따라서 지난 몇 십 년간 이러한 질병에 대한 백신의 경우 커다란 발전이 이루어졌다.<sup>2)</sup> 그 중에서 장티푸스 백신의 경우 초기에는 약 65%의 효과를 나타내는 heat-phenol-inactivated whole cell typhoid vaccine이 사용되었으나, 그 부작용으로 인하여 사용에 한계가 있

었기 때문에 *S. typhi* Ty21a를 이용한 경구용 약독화 Ty21a 백신이 개발되었다.<sup>3)</sup> *S. typhi* Ty21a는 *S. typhi*의 약독화 균주로 Vi polysaccharide가 부족 하며 UDP-glucose-4-epimerase가 부족한 Gal E mutants이다.<sup>4)</sup> 임상 시험에서도 효과가 67-95%정도 되는 것으로 나타났으며 특히 장용 코팅 캡슐의 형태로 3번 투여 시 적어도 보호 효과가 4년간 지속됨을 보여주고 있다.<sup>5)</sup> 따라서 *S. typhi* Ty21a 경구용 백신은 이미 미국, 유럽, 오스트레일리아 등에서 허가가 나있는 상태이다.<sup>6)</sup> 그러나 위산을 NaHCO<sub>3</sub> 등으로 중화시킨 후 투여해야 효과가 있기 때문에<sup>7)</sup> 장용 코팅 캡슐 등의 형태로 개발되었다.

# 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 02-820-5613 (팩스) 02-820-7338

우리는 경구용 장티푸스 백신을 만드는 과정에 있어서 우선 *S. typhi* Ty21a를 동결 건조했는데 이 방법은 불안정한 활성 물질의 장기 보존에 널리 사용되고 있는 방법이다. 1900년대 초에 Shackell에 의해 세균 및 혈청의 건조에 처음 이용된 동결 건조의 원리는 용액을 얼음 결정과 얼어서 농축된 용질로 분류 후 얼음 결정을 승화시켜 탈수와 건조를 하는 것이며,<sup>8)</sup> 그 후 계속된 연구로 면역 혈청, 각종 병원균, 효모, 의학적 표본 등을 보존성이 높은 우수한 건조물로 얻을 수 있었다. 2차 대전 이후에는 혈장 외에 새로운 항생물질, 페니실린의 건조에 동결 건조가 이용되었으며 의약품 분야에서는 백신의 대량 생산에 기여하였다.<sup>9)</sup>

동결 건조시 안정화제 사용은 원래의 구조를 유지하도록 해서<sup>10)</sup> 활성 상실을 감소시키고, 원상 복구 시 활성 회복도를 증가시키므로<sup>8)</sup> 우리는 Ty21a 동결 건조시 8% sucrose를 안정화제로 사용하였는데, sucrose와 protein 사이의 수소 결합이 탈수 과정에 있어서 protein 손상을 억제한 것으로 보인다.<sup>11)</sup>

본 연구는 Ty21a를 동결 건조함에 있어서 균이 빛을 산란시켜서 나타내는 탁도의 정도를 기계적인 수치로 나타낸 값을 의미하는 OD(optical density)값에 따라 동결 건조율이 달라지는 현상을 관찰하고, 실제로 어떤 OD값에서 동결 건조율이 가장 좋은지 실험하였으며, 동결 건조된 Ty21a의 보관 온도에 대한 안정성과 lactose, sorbitol, mannitol, sucrose와 같은 부형제와 함께 보관 한 경우 균의 활성을 조사하여 가장 안정한 부형제를 찾자 실험하였다.

## 실험방법

**사용 균주 및 배지** - 균주로는 UDP-glucose-4-epimerase가 부족한 *S. typhi* Ty21a를 사용하였고, 배지는 Difco에서 구입한 Brain Heart Infusion (BHI) 배지를 사용하였다.

**시약 및 기기** - 사용한 기기로는 clean bench(Dae-il engineering), centrifuge (Hanil one-chip microprocessor centrifuge), shaking incubator(Vision), vacuum freeze dryer (Martin Christ co.), spectrophotometer (Pharmacia Biotech UV/Visible spectrophotometer), autoclave (SANYO LABO Autoclave), 세척액으로 phosphate buffered saline(PBS)을 사용하였고 동결 건조시 안정화제로 8% sucrose를 사용하고 동결 건조

후 부형제로 lactose, sorbitol, mannitol, sucrose를 사용하였다.

**Ty21a의 배양과 동결 건조** - BHI 5ml 배지에 Ty21a 접종 후 37°C, 150 rpm, shaking incubator에서 15시간 배양 후 이 배양액 5ml를 다시 BHI 100ml배지에 접종한 후 같은 방법으로 배양해서 각각 OD값(610 nm)에 따라 배양을 멈추고 4°C, 2100 g, 10분간 원심분리해서 균을 수확한 후 PBS로 2번 세척하고 마지막 남은 PBS를 제거하고 8% sucrose 5ml로 재 현탁 시킨 후 비커에 넣어 동결 건조하였다.

**동결 건조율의 측정** - 동결 건조하기 전 8% sucrose 5ml로 현탁 시킨 균 중 100 µl를 취하여 BHI 고체 배지 표면에 도말하여 37°C에서 18시간 배양한 후 집락 생성 여부로 그 수를 확인하고, 동결 건조된 균은 PBS로 현탁 시킨 후 같은 방법으로 그 수를 확인해서 동결 건조 전후의 수율을 비교하였다. 2회 실험을 실시하였다.

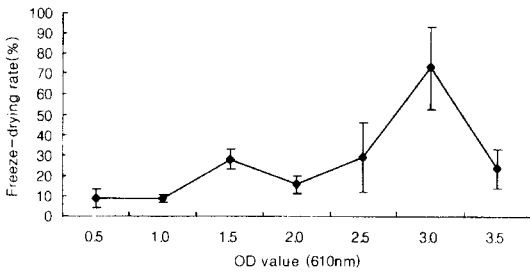
**보관 온도에 따른 Ty21a의 안정성 시험** - 위의 방법으로 동결 건조한 Ty21a를 각각 실온, 냉장, 냉동의 조건하에서 1주일 보관 후 보관하기 전의 균 수와 비교하였다. 2회 실험을 실시하였다.

**부형제에 대한 Ty21a의 안정성 시험** - 위의 방법으로 동결 건조한 Ty21a를 각각 부형제 lactose, sorbitol, mannitol, sucrose, lactose+sorbitol을 넣어 50배산으로 만든 다음 각각 33°C에서 5시간 보관과 냉장, 냉동 조건하에 1주일 보관 후 부형제를 넣지 않고 같은 조건에 보관한 균 수와 비교하였다. 2회 실험을 실시하였다.

## 실험결과

**Ty21a의 흡광도에 따른 동결 건조율** - Ty21a를 8% sucrose를 안정화제로 사용하여 각각 OD값이 다를 때 균을 수확하여 동결 건조한 후 동결 건조 전과의 수율을 비교한 경우 두 실험 모두 OD 값이 2.5에서 3.0 사이일 때 균을 수확해서 동결 건조를 한 경우 동결 건조율이 가장 높은 것으로 나타났다(Fig. 1).

**동결 건조된 Ty21a의 보관 온도에 따른 안정성** - 8% sucrose를 안정화제로 사용하여 동결 건조한 Ty21a를 각각 1주일 동안 상온, 냉동, 냉장 보관 후 동결 건조 즉시 측정된 균 수와 비교 시 상온에서 보관 한 경우 활성 상실의 정도가 가장 컸고, 냉장과 냉



**Fig. 1** – Freeze-drying rate of Ty21a according to various OD value of Ty21a growth. Ty21a was lyophilized using 8% sucrose as a stabilizer. Freeze-drying rate means the ratio of the number of Ty21a before and after the lyophilization. OD (optical density) value was measured at 610 nm.

동 보관의 경우 비슷한 수준으로 상온 보관보다 5배 이상 활성 상실의 정도가 작았다(Table I).

**동결 건조된 Ty21a의 부형제에 대한 안정성** –8% sucrose를 안정화제로 사용하여 동결 건조된 Ty21a를 각각 부형제를 넣어서 코팅 온도와 시간인 33°C에서 5시간 보관 후 부형제를 첨가하지 않은 균 수와 비교한 경우(Table II) lactose의 안정성이 가장 높은 것으로 나타났으며 그 다음이 mannitol이었으며, sorbitol은 안정성이 가장 낮은 것으로 나타났다.

8% sucrose를 안정화제로 사용하여 동결 건조된

Ty21a를 각각 부형제와 함께 1주일 간 냉장 보관한 후 부형제를 첨가하지 않은 균 수와 비교한 경우 (Table III) mannitol의 안정성이 가장 높았으며, 그 다음으로는 lactose이었고 Table II의 결과와 마찬가지로 sorbitol의 안정성이 가장 낮은 것으로 나타났다.

8% sucrose를 안정화제로 사용하여 동결 건조된 Ty21a를 1주일간 각각 부형제와 함께 냉동 보관 후 부형제를 첨가하지 않은 균 수와 비교한 경우(Table IV) Table III의 결과와 같이 mannitol, lactose의 순서로 안정성이 높았으며 sorbitol의 안정성은 가장 낮게 나타났다.

**고 찰**

본 연구는 경구용 장티푸스 백신을 만드는 과정 중 Ty21a를 동결 건조함에 있어서 OD값이 2.5~3.0 일 때 균을 수확한 후 동결 건조할 때 동결 건조율이 가장 좋은 것으로 나타났다. 이것은 동결 건조 시 스트레스가 심하므로<sup>8)</sup> 균이 비교적 물리적 자극에 안정한 시기인 정상기 (stationary phase)<sup>12)</sup>에 있을 때 수확을 해서 동결 건조를 한 경우 동결 건조율이 높게 나온 것으로 사료된다. 또한 동결 건조된 Ty21a는 냉장이나 냉동 보관 시에 가장 안정한 것으로 나타났는

**Table I** – Viability of freeze-dried Ty21a according to the storage condition for 1 week

Storage condition	1st experiment		2nd experiment	
	The number of freeze-dried Ty21a	Sample/Control (% ratio)	The number of freeze-dried Ty21a	Sample/Control (% ratio)
Control*	$3.2 \times 10^{10}/g$	100%	$3.2 \times 10^{10}/g$	100%
Room temperature	$3.4 \times 10^9/g$	10.6%	$3.0 \times 10^8/g$	18.8%
Cold	$1.8 \times 10^{10}/g$	56.3%	$1.5 \times 10^9/g$	93.8%
Freezing	$2.1 \times 10^{10}/g$	65.6%	N.D.#	N.D.#

\*Control is the number of immediate freeze-dried Ty21a.

#N.D. is not determined.

**Table II** – Viability of freeze-dried Ty21a including additives under the coating temperature and time (33°C, 5 hours)

Additives	1st experiment		2nd experiment	
	The number of freeze-dried Ty21a	Sample/Control (% ratio)	The number of freeze-dried Ty21a	Sample/Control (% ratio)
Control* (Without additives)	$5.0 \times 10^9/g$	100%	$3.2 \times 10^9/g$	100%
Lactose	$3.3 \times 10^9/g$	66%	$3.2 \times 10^9/g$	100%
Sorbitol	$4.5 \times 10^8/g$	9%	$2.6 \times 10^8/g$	8%
Mannitol	$2.9 \times 10^9/g$	58%	$1.8 \times 10^9/g$	56.3%
Sucrose	$3.4 \times 10^8/g$	6.8%	$4.0 \times 10^8/g$	12.5%
Lactose+Sorbitol	$1.6 \times 10^9/g$	32%	N.D.#	N.D.#

\*Control is the number of freeze-dried Ty21a without additives under the same condition.

#N.D. is not determined.

**Table III** – Viability of freeze-dried Ty21a including additives under cold storage for 1 week

Additives	1st experiment		2nd experiment	
	The number of freeze-dried Ty21a	Sample/Control (% ratio)	The number of freeze-dried Ty21a	Sample/Control (% ratio)
Control* (Without additives)	$3.4 \times 10^9/g$	100%	$3.0 \times 10^8/g$	100%
Lactose	$2.0 \times 10^9/g$	58.8%	$2.4 \times 10^8/g$	80%
Sorbitol	$5.8 \times 10^8/g$	17%	$3.5 \times 10^7/g$	11.7%
Mannitol	$3.8 \times 10^9/g$	111.8%	$2.9 \times 10^8/g$	96.7%
Sucrose	$8.5 \times 10^8/g$	25%	$1.7 \times 10^8/g$	56.7%
Lactose+Sorbitol	$2.5 \times 10^9/g$	73.5%	$1.5 \times 10^8/g$	50%

\*Control is the number of freeze-dried Ty21a without additives under the same condition.

**Table IV** – Viability of freeze-dried Ty21a including additives under freezing storage for 1 week

Additives	1st experiment		2nd experiment	
	The number of freeze-dried Ty21a	Sample/Control (% ratio)	The number of freeze-dried Ty21a	Sample/Control (% ratio)
Control* (Without additives)	$1.8 \times 10^{10}/g$	100%	$1.5 \times 10^9/g$	100%
Lactose	$8.9 \times 10^9/g$	49.4%	$4.2 \times 10^8/g$	28%
Sorbitol	$2.0 \times 10^9/g$	11.1%	$3.0 \times 10^8/g$	20%
Mannitol	$1.2 \times 10^{10}/g$	66.7%	$9.3 \times 10^8/g$	62%
Sucrose	$3.5 \times 10^9/g$	19.4%	$1.5 \times 10^7/g$	1%
Lactose+Sorbitol	$5.5 \times 10^9/g$	30.6%	$5.0 \times 10^7/g$	3.3%

\*Control is the number of freeze-dried Ty21a without additives under the same condition.

데, 이것은 백신을 오랜 기간 안정성을 유지하기 위해  $5 \pm 3^\circ C$ 에서 저장해야 한다는 다른 문헌<sup>13)</sup>과 일치한다. 실험한 부형제 5가지 중에서 동결 건조된 Ty21a에 가장 안정한 것은 보관 온도에 관계없이 mannitol과 lactose로 나타났으며, sorbitol은 가장 불안정한 것으로 나타났다. Mannitol의 경우는 유기 용매에 노출된 동결 건조 recombinant human growth hormone을 안정화시킨다는 보고가 있다.<sup>14)</sup>

단백질 사이의 거리를 증가시켜서 응집을 방지하는데 사용된 sugars와 polyols과 같은 bulk additives는 쉽게 재결정화되거나 고체 상태에서 무정형으로 남아 있어서는 안되며,<sup>15)</sup> 특히 reducing sugars의 경우는 단백질과 반응을 할 수 있기 때문에 부형제로서 적당하지 않을 수 있다.<sup>16)</sup>

같은 이당류로서 사용된 안정화제와 부형제 역할의 차이점은 안정화제는 동결 건조시 활성 상실의 감소와 원상 복구시 활성 회복도를 증가시키기 위해, 부형제는 희석 또는 증량의 목적으로 사용되었다.

백신의 효력은 살아있는 균의 수에 의존하기 때문에 균이 위에서 죽는 것을 고려하면 코팅 과정에서 사용하는 부형제를 단순히 bulk agents의 측면에서만 볼 것이 아니라, 좀 더 안정하고 더 나아가 균이 위에서

죽지 않고, 장까지 살아서 도달해서 백신으로서 효과를 나타낼 수 있도록 하는 부형제를 찾는 일이 필요하다고 생각된다.

**감사의 말씀**

본 연구는 1998년도 보건복지부 (HMP-98-DA-8-0026) 연구 지원으로 수행되었기에 이에 감사드립니다.

**문 헌**

- Holmgren J. and Svennerholm A. M. : Bacterial enteric infections and vaccine development. *Gastroenterol. Clin. North. Am.* **21**, 283 (1992).
- Edelman R. and Levine M. M. : Enteric vaccines. *Med. J.* **40**, 199 (1991).
- Levin M. M., Ferreccio C., Black R. E., Tacket C. O. and Germanier R. : Progress in vaccines against typhoid fever. *Rev. Infect. Dis.* **11**, 552 (1989).
- Myron M. L., Catterine F., Stanley C. and Edith O. : Comparison of enteric-coated capsules and liquid formulation of Ty21a typhoid vaccine in ran-domised controlled field trial. *Lancet.* **336**, 891 (1990).

- 5) S. J. CRYZ, J. R., E. FURER, S. S. BARON, K. F. NOON, F. A. RUBIN, and D. J. KOPECKO : Construction and Characterization of a Vi-Positive Variant of the *S. typhi* Live Oral Vaccine Strain Ty21a. *Infect. Immun.* **57**, 3863 (1989).
- 6) Bruce D. F. : Oral typhoid vaccine Ty21a. *Lancet.* **338**, 1455 (1991).
- 7) Black R., Levin M. M., Young C., Rooney J., Levine S., Clements ML., O'Donnell S., Hugues T. and Germanier R. : Immunogenicity of Ty21a attenuated "*Salmonella typhi*" given with sodium bicarbonate or in enteric-coated capsules. *Dev. Biol. Stand.* **53**, 9 (1983).
- 8) S. Dean Allison, Theodore W. R., Mark C. M., Kim M., Ashley D. and John F. C. : Effects of Drying Methods and Additives on Structure and Fuction of Actin; Mechanisms of Dehydration-Induced Damage and Its Inhibition. *Arch. Biochem. Biophys.* **358**, 171 (1998).
- 9) 강호식 : A Study on the Drying Characteristics of Fursulthiamine Hydrochloride of Freeze-Drying. *충북대학교* (1992).
- 10) Prestrelski S. J., Arakawa T. and Carpenter J. F. : Separation of freezing-and drying-induced denaturation of lyophilized proteins using stress-specific stabilization II. Structural studies using infrared spectroscopy. *Arch. Biochem. Biophys.* **303**, 465 (1993).
- 11) Allison S. D., Chang B., Randoph T. W. and Carpenter J. F. : Hydrogen bonding between sugar and protein is responsible for inhibition of dehydration-induced protein unfolding. *Arch. Biochem. Biophys.* **365**, 289 (1999).
- 12) 미생물학분과회 저 : *종합미생물학*, 130 (1997).
- 13) Cryz S. J., Pasteris O., Varallyay S. J. and Furer E. : Factors influencing the stability of live oral attenuated bacterial vaccines. *Dev. Biol. Stand.* **87**, 277 (1996).
- 14) Cleland J. L. and Jones A. J. : Stable formulations of recombinant human growth hormone and interferon-gamma for microencapsulation in bio-degradable microspheres. *Pharm. Res.* **13**, 1464 (1996).
- 15) Costantino H. R., Carrasquillo K. G., Cordero R. A., Mumenthaler M., Hsu C. C. and Griebenow K. : Effects of excipients on the stability and structure of lyophilized recombinant human growth hormone. *J. Pharm. Sci.* **87**, 1412 (1998).
- 16) Li S., Patapoff T. W., Overcashier D., Hsu C., Nguyen T. H. and Borchardt R. T. : Effects of reducing sugars on the chemical stability of human relaxin in the lyophilized state. *J. Pharm. Sci.* **85**, 873 (1996).