

## 디프테리아 toxin 정제와 무독화 toxoid 백신 생산

조 민 · †유 연 우

아주대학교 공과대학 화학생물공학부  
(접수 : 1999. 3. 4., 게재승인 : 1999. 4. 15.)

### Purification of Diphtheria Toxin and the Production of Detoxified Toxoid Vaccine

Min Cho and Yeon Woo Ryu†

Division of Chemical Engineering and Biotechnology, College of Engineering, Ajou University, Suwon 442 - 744, Korea  
(Received : 1999. 3. 4., Accepted : 1999. 4. 15.)

Adverse reactions after injection of diphtheria vaccine are induced by impurities present in crude toxoids that cannot be removed completely by purification of toxoids after formalinization. To increase toxoid purity, toxin purification was tried before formalinization. Crude toxin was purified with ultrafiltration and ion-exchange chromatography. Purified toxin purity was improved 2.9 times higher than crude toxin, and purity was 2,560 Lf/mg PN. Purified toxin was detoxified with formalin and lysine, and potency test were performed. Toxoid, prepared from toxin treated with formalin and lysine, did not show reversion to toxin and purity was higher than the toxoid purified after formalinization. Therefore, we concluded that the use of toxoid vaccine prepared from toxin purified is a useful method to minimize adverse reaction after injection of diphtheria vaccine.

Key Words : Diphtheria Toxin, Purification, Ion-Exchange Chromatography, Formalinization

#### 서 론

디프테리아 백신의 품질은 디프테리아 toxin의 순도와 밀접한 관계가 있다(1). 이는 순도가 높을수록 부작용의 원인이 되는 이종 단백질이 적게 포함되어 있기 때문이다. 이러한 순도는 정제 방법에 의해 결정된다. 정제 방법에는 toxin을 무독화한 후 toxoid를 정제하는 방법(2,3)과 toxin을 정제한 후 무독화하여 toxoid화 시키는 방법이 있다(3,4,5). 현재 디프테리아 백신 제조에는 위의 두 가지 정제 방법 모두가 사용되고 있으며 각각의 정제 방법에는 장점과 단점이 있다. Toxoid 정제의 장점은 toxin으로 복귀하지 않는다는 것이다(3). 그러나 이러한 방법으로 정제한 toxoid는 순도가 낮다. 그 이유는 배지 성분에 함유되어 있는 crude toxin액에 formaldehyde가 첨가되면 toxin과 배지 유래의 아미노산 및 peptide 사이에 methyl bridge가 형성되어 수많은 배지 성분의 peptide가 toxin에 붙어 toxoid가 되기 때문이다(6,7). 순도가 낮은 toxoid는 배지 성분으로 인해 부작용을 유발할 수 있다(1). 즉 배지 성분으로 beef meat가 사용될 경우 toxoid는 beef로부터 유래한 수많은 peptide와 결합하게 되고, 이러한 beef 유래 peptide는 toxoid에 공유 결합되어 항원으로 작용하여 부작용을 유발할 수 있다. 특히 bovine antigen에 계속 노출

되어 온 성인들의 경우에는 소아에 비하여 더 많은 부작용을 유발할 수 있다. 1950년대 이전에는 crude toxin을 무독화한 후 toxoid를 정제하는 방법만이 있었으나, 그 후 1958년 Pope와 Steven(8)이 toxin을 대량으로 정제하는 방법을 개발함으로써 toxin을 정제한 후 무독화하는 방법이 개발되기 시작하였다. 즉 toxin 정제는 ultrafiltration(U.F.) 및 column chromatography와 같은 방법을 이용하여 crude toxin으로부터 배지 성분의 peptide를 제거하고 디프테리아 toxin만을 정제한 후에 toxin을 무독화시켜 toxoid vaccine을 제조하는 것이다(9,10). 이와 같이 toxin정제를 통한 toxoid의 생산은 toxoid가 toxin으로 복귀할 위험성이 있으나, 높은 순도의 toxoid를 얻을 수 있고, 배지 유래 물질로 인한 부작용을 줄일 수 있다는 장점을 지니고 있다. 특히 성인용 디프테리아 백신의 경우 대한민국의 생물학적 제제 기준에서 2,500 Lf/mg PN 이상의 순도가 요구되는데, 이는 성인의 경우 오랜 기간동안 bovine antigen에 노출되었기 때문에 beef 유래 물질로 인한 부작용을 줄이기 위해서다. 따라서 toxin 정제를 통한 디프테리아 백신의 생산은 높은 순도의 디프테리아 백신 및 성인용 디프테리아 백신의 생산을 위해 필요한 정제 방법이라 할 수 있다. 이에 따라 본 연구에서는 toxin의 분리, 정제와 toxin 정제 백신과 toxoid 정제 백신과의 역가를 비교하는 연구를 수행하였다.

#### 재료 및 방법

##### 균주 및 배양조건

본 연구에 사용된 균주는 *Corynebacterium diphtheriae* Park-Williams #8 strain으로 한국 식품 의약품 안전청(KFDA)에서 분

† Corresponding Author : Division of Chemical Engineering and Biotechnology, College of Engineering, Ajou University, Suwon 442 - 744, Korea  
Tel : 0331-219-2449, Fax : 0331-216-8777  
e-mail : ywryu@madang.ajou.ac.kr

양 받아 사용하였다. 배지는 2.5%(w/v) maltose(Difco)와 총결소량이 0.29%(w/v) casamino acid(Difco)가 함유된 Muller & Miller 배지(11)를 사용하였다. 배양은 Roux bottle을 이용하여 36°C에서 7일간 정처 배양 하였다.

#### Toxin 생산

동결 건조된 seed를 종균 배지(Wads Worth Broth)가 들어 있는 tube에 접종한 후 36°C에서 48시간 정처 배양하였다. 배양 후 배지 표면에 자란 디프테리아 균체를 Gram 염색하여 오염여부를 확인한 후 Muller & Miller 배지(11)에 접종하여 36°C에서 7일간 정처 배양하였다. 배양 후 Limit of flocculation(Lf) test(12)를 통해 toxin 생성을 확인하였으며, 배양액의 clarification은 Toyo#2 여과지로 균체를 제거한 후 membrane 여과지(Sartorius, 0.2  $\mu$ m)로 세균 여과 하였다. 이를 crude toxin이라 명명하였다.

#### Toxin 정제

Crude toxin을 Sartocron-mini U.F. system(Sartorius)을 이용하여 ultrafiltration(U.F.) 하였다. U.F. 모듈은 2종류를 사용하였는데 molecular weight cut off (M.W.C.O.) 100,000 모듈을 사용하여 여액을 회수한 후 이를 다시 M.W.C.O 30,000 모듈로 10배 농축하여 toxin를 회수하였다. Buffer는 25 mM 인산염액(pH 7.5)를 사용하였으며, U.F. 정제 단계별 정제도는 gel filtration (superdex 200)을 통해 분석하였다. U.F.로 농축한 toxin은 DEAE-sepharose FF (Pharmacia)를 사용하여 ion exchange chromatography를 수행하였다. Column은 지름 5 cm Pharmacia column을 사용하였으며 packing 높이는 5 cm, packing vol은 100 mL이다. Buffer는 50 mM Tris-Cl (pH 8.5)를 사용하였으며, buffer에 NaCl를 첨가하여 전도도를 조절하였다 Chromatography는 시료의 loading과 washing 후에 toxin을 elution시키고, 0.5 M NaCl과 0.5 N NaOH로 다른 단백질 및 색소를 제거 하였다. Loading 및 washing buffer의 전도도는 6.70 mS/cm이고, flow rate는 8 mL/min 이며, elution buffer의 전도도는 10.70 mS/cm이고, flow rate는 6 mL/min 이었다. 또한 0.5 M NaCl washing buffer의 전도도는 16.00 mS/cm 이고 flow rate는 8 mL/min 이었다.

#### Toxin 무독화 및 디프테리아 toxoid 생산

DEAE-sepharose FF로 정제한 toxin의 Lf를 측정된 후 toxin 정제액을 500 Lf/mL이 되도록 조정하였다 Lf가 조정된 toxin 용액에 0.5 % sodium bicarbonate와 0.05 M lysine, 0.5 % formalin을 첨가한 후 pH를 7.5로 조정하여 4주간 37°C 항온실에 방치하여 무독화 시켰다. 무독화 후에는 포화도가 60 %가 되도록 ammonium sulfate(Riedel)를 첨가하여 실온에 하룻밤 방치시킨 후에 7,000 rpm에서 30분간 원심하여 침전을 회수하였다. 침전을 주사용수로 용해시킨 후 투석막 (M.W.C.O. 1,000)에 넣고 증류수에 4일 염화나트륨액에 2일간 투석한 후 membrane filter(sartorius, 0.2  $\mu$ m)로 여과하여 디프테리아 toxoid를 생산 하였다.

#### Lf test 및 단백질 측정

Toxin의 함량을 Lf 값으로 측정하여 나타내었다(3) 즉 100

IU/mL antitoxin (WHO diphtheria antitoxin)을 5 IU 간격으로 30 IU 에서 70 IU까지 다단계로 희석하여 준비하였고, 시료는 50 Lf/mL이 되도록 염화나트륨액으로 희석하여 준비하였다. 5 mL tube에 준비된 antitoxin 1 mL와 시료 1 mL넣고 50°C 항온조에서 반응시켜 가장 먼저 반응이 일어나는 tube의 IU를 확인한 후 희석배수를 곱하여 Lf를 계산하였다. 단백질의 질소 함량은 Kjeldahl method(3)로 측정하였다.

#### Ouchterlony double immunodiffusion

Toxin을 정제한 후에 무독화된 디프테리아 toxoid의 동정 및 항원성을 확인하기 위하여 Ouchterlony double immunodiffusion을 수행하였다(13). 즉 agarose(Sigma)을 1 %가 되도록 0.07 M barbital buffer(pH 8.6)에 가열하여 녹인 후 petridish에 넣어 굳혔다. 2 cm 간격으로 구멍을 뚫어 antitoxin(WHO diphtheria antitoxin) 4 IU와 디프테리아 toxoid 2 Lf를 넣은 후 humidity chamber에 넣고 37°C에서 36시간 반응시켰다. Agar gel을 coomassie brilliant blue로 염색한 후에 탈색하여 침전 반응을 관찰하였다.

#### SDS-PAGE

Toxin을 정제한 후에 무독화된 toxoid의 정제 정도 및 분자량의 확인과 formalin 첨가에 따른 toxin 변화를 관찰하기 위하여 SDS-PAGE를 수행하였다. 즉 10% SDS-polyacrylamide gel에 시료를 loading한 후 전기장이 12.5 V/cm가 되게 전압을 건 후 bromophenol blue가 gel 끝에 갈 때까지 전기영동 하였다(14). 전기영동이 끝난 후 gel을 fixing한 다음 coomassie brilliant blue 및 silver staining으로 염색한 후 탈색하여 밴드패턴을 관찰하였다.

#### 무독화 시험

무독화가 끝난 시료를 0.017 M 인산염완충 염화나트륨액으로 희석하여 1 mL중에 toxoid를 200 Lf 함유되도록 한 것과 최종 원액과 같은 농도가 되도록 하여 37°C에서 20일간 방치한 후 체중 300~400 g의 guinea-pigs 4마리를 사용하여 5 mL 씩 피하 주사 한 후 30일간 관찰하면서 독소에 의한 중독사, 피사, 마비 등의 증독증상, 현저한 체중감소, 기타의 이상이 나타나는지를 확인하였다(3).

#### 역가 시험

Crude toxin을 무독화한 후 정제한 toxoid 와 toxin 정제 후 무독화된 디프테리아 toxoid와의 역가를 비교하기위해 역가 시험을 수행하였다. Toxoid를 aluminium hydroxide gel adjuvant (Superfos Biosector a/s)에 흡착시켜 300~400 g의 guinea-pigs에 0.75 mL 씩 피하 주사한 후 1주간 면역 시켰다. 면역 후 혈청을 채취해 표준 독소 1 L(녹십자)와 중화시켜 이를 230~280 g의 guinea-pigs에 2 mL씩 피하 주사한 후 12시간 단위로 120시간 동안 생존 여부를 관찰하였다(3).

## 결과 및 고찰

#### Ultrafiltration에 의한 분리

*C. diphtheriae* PW #8 strain을 Muller & Miller modified 배

지(11)에 7일간 정치 배양하여 생산한 crude toxin의 Lf와 단백질질을 측정 한 결과 Lf 함량은 100 Lf/mL이고 단백질의 농도는 702  $\mu\text{g/mL}$ 으로 순도는 890 Lf/mg PN이었다 이는 Mueller & Miller(11)가 발표한 디프테리아 정치 배양 결과와 동일하였다. Crude toxin은 toxin과 기타 다른 단백질로 구성되어 있는데, Cox(4)는 crude toxin의 전체 단백질 중 디프테리아 toxin이

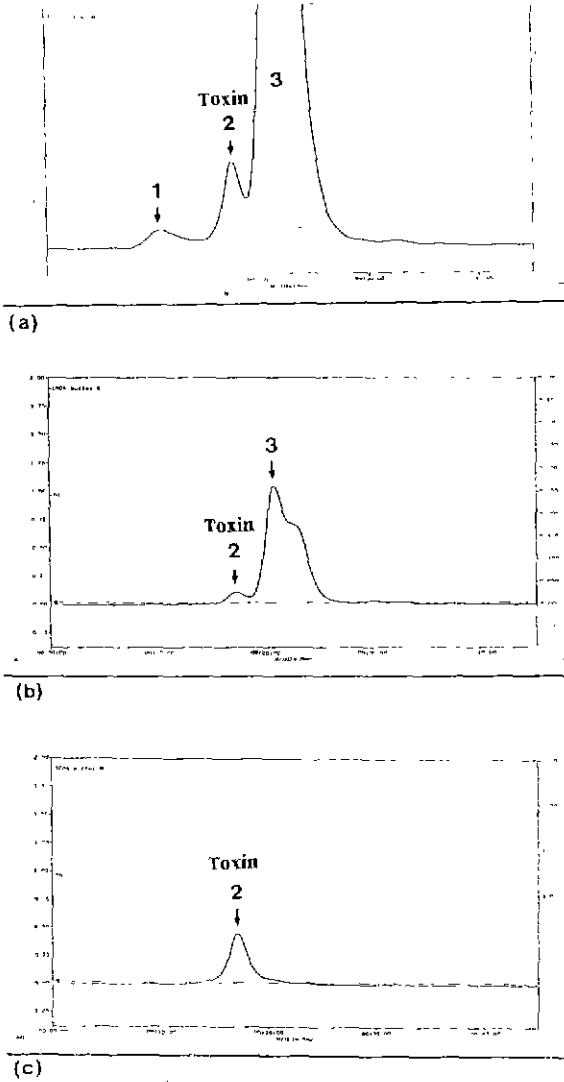


Figure 1. Change of profile pattern during U.F. procedure of crude toxin on Superdex 200. (a) crude toxin, (b) filtrate (M.W.C.O.100,000) of crude toxin, (c) concentrate (M.W.C.O. 30,000) of filtrate (M.W.C.O 100,000).

15 %이고 toxin보다 분자량이 큰 단백질이 12 %이며 toxin보다 분자량이 작은 배지 유래 단백질 및 기타 물질이 73 %로 구성되어 있다고 발표하였다. 본 실험에서도 crude toxin을 gel filtration으로 분석한 결과 3개의 peak가 관찰되었으며(Figure 1 (a)), peak별로 Lf를 측정 한 결과 peak 2에서 만이 Lf 반응이 일어났다 이는 Cox(4)가 발표한 것과 동일한 결과이었다. 분자량이 작은 단백질의 제거를 위해 U.F. 공정이 사용되어지고 있고, toxin 보다 분자량이 큰 단백질을 제거하기 위해 ammonium sulfate(A/S)를 이용한 salting out 방법이 주로 사용되어지고 있다(15) 낮은 농도의 A/S에서 toxin은 침전이 되지 않는 반면 분자량이 큰 물질은 침전이 되기 때문이다. 그러나 A/S를 사용할 경우 A/S에 의해 전도도가 높아지기 때문에 DEAE ion exchange chromatography를 수행하기에 앞서 전도도를 낮추기 위해 buffer exchange가 요구된다 본 연구에서는 이러한 번거로움을 극복하기 위해 2중 U.F.를 수행하였다. 즉, 디프테리아 toxin은 분자량이 58,350 이므로(5) crude toxin(Figure 1(a))을 M.W.C.O. 100,000 모듈로 U.F.하여 filtrate를 회수한 후(Figure 1(b)) 이를 다시 M.W.C.O 30,000 모듈로 농축한 결과(Figure 1(c)) 순도가 1,230 Lf/mg PN로 crude toxin에 비해 약 41 % 향상이 되었으며, 이는 낮은 농도의 A/S 처리 결과와 유사하였다 (Table 1) 따라서 본 연구에서는 2중 U.F. 방법이 toxin 정제에 있어 A/S를 사용하지 않으면서도 디프테리아 toxin 보다 큰 분자량의 다른 단백질을 제거하는데 유용한 방법임을 알 수 있었다. U.F. 후 농축액의 가장 큰 특징은 crude toxin의 짙은 갈색 색소가 제거된다는 것이다. 이 색소는 단백질로 측정되지 않았으며, DEAE-gel에 toxin보다 더 강하게 흡착되어 0.5N NaOH에서 elution되었다. 따라서 이러한 색소 성분이 백신 제조시 aluminium hydroxide gel adjuvant에 toxoid보다 먼저 흡착되어 흡착력을 저해하는 요소가 되리라 생각된다. 따라서 U.F. 공정은 시료의 농축 및 순도 향상 뿐만 아니라 색소 제거에도 큰 의미가 있다.

ion exchange chromatography에 의한 toxin 정제

Crude toxin내에 있는 toxin은 한 종류의 전하량을 지니기 때문에 전하량 차이를 이용한 ion exchange chromatography로 정제가 가능하며, ion exchange chromatography의 경우 대량으로 시료 처리가 용이하기 때문에 대량 생산 체제에 적합한 정제 방법이다. 본 연구에서는 이러한 장점 때문에 ion exchange chromatography 방법을 이용하여 toxin을 정제하였다. Ion exchange chromatography를 위해 DEAE-Sephrose FF를 사용하였으며, toxin이 최초로 elution되는 전도도를 확인하기 위해 15 mM~150 mM NaCl gradient를 걸어 실험을 수행하였다. 실험 결과 전도도 7.7 mS/cm에서 toxin이 최초로 elution되기 시작하였으며,

Table 1 Comparison of toxin purity after ammonium sulfate treatment and ultrafiltration

Procedure	Purity of crude toxin	Purity of purified toxin (Lf/mg of protein nitrogen)
Crude toxin $\rightarrow$ UF <sup>1</sup> (M.W.C.O. <sup>2</sup> 30,000)	870 Lf/mg PN	927 Lf/mg PN
Crude toxin $\rightarrow$ U.F. (M.W.C.O 30,000) $\rightarrow$ Ammonium sulfate treatment	870 Lf/mg PN	1,447 Lf/mg PN
Crude toxin $\rightarrow$ U.F (M.W.C.O. 100,000) $\rightarrow$ U.F. (M.W.C.O. 30,000)	890 Lf/mg PN	1,300 Lf/mg PN

UF<sup>1</sup> : Ultrafiltration

M.W.C.O.<sup>2</sup> : Molecular Weight Cut Off

전도도 10.9 mS/cm에서는 단백질을 검출되었으나 Lf는 검출되지 않았다(Table 2).

반복 실험 결과 전도도 6.7 mS/cm을 평형 buffer로 결정하였고, 전도도 10.7 mS/cm을 elution buffer로 결정하였다. 위의 조건으로 실험을 수행한 결과 다음의 profile이 확인되었다(Figure 2) Profile에는 다음 4가지 peak가 관찰되었는데 sample loading 시 DEAE-Sephrose FF에 흡착되지 않고 elution되는 단백질과 (peak 1), 전도도 10.7 mS/cm에서 elution되는 toxin(peak 2), 그리고 0.5 M NaCl에서 elution되는 단백질(peak 3)과 0.5 N NaOH에서 elution되는 단백질(peak 4)로 구분할 수 있었다 네 가지 peak 중에 디프테리아 toxin(peak 2)을 제외한 peak 1,3,4에서는 Lf가 측정되지 않았다. Peak 2를 회수하여 순도를 측정된 결과 순도는 2560 Lf/mg PN 이었다. 이는 Cox(4)가 toxin 정제 후 무독화한 toxoid의 순도 1,050~2,500과 유사한 결과이다. 특히 peak 2 toxin 회수액은 색소 성분이 거의 없는 투명한 toxin 용액이었으며, 색소 성분은 0.5 M NaCl, 0.5 N NaOH에서 elution 되었다. 정제 단계별 순도 변화는 Table 3과 같으며 정제된 toxin 순도 2560 Lf/mg PN 이었다. 그러나 crude toxin을 무독화한 후 toxoid를 정제할 경우 ion exchange chromatography는 적합하지 않다. 이는 crude toxin을 무독화한 toxoid는 단일 전하량을 지닌 toxoid가 아니라 여러 종류의 전하량을 지니게 되는데 이는

Table 2. Conductivity and purity of fraction from ultrafiltrated toxin by gradient(15mM~150mM) DEAE-Sephrose FF

Fraction#	Conductivity (mS/cm)	Lf/mL	Protein content (μg/mL)	Purity (Lf/mg of protein nitrogen)
6	5.35	-	-	-
7	6.46	-	18	-
8	7.70	320	850	2353
9	8.88	86	228	2357
10	10.90	-	78	-
11	11.46	-	11	-

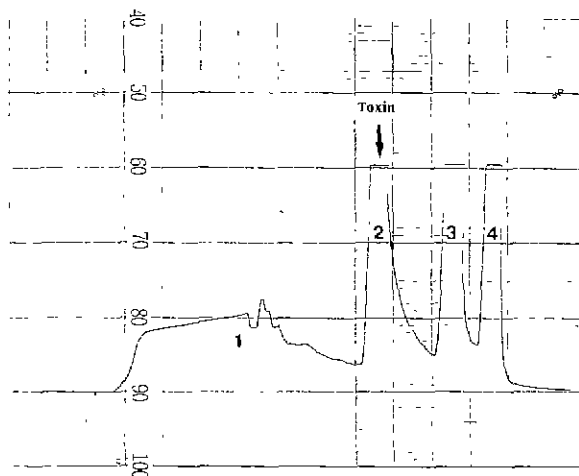


Figure 2. Elution profile of ultrafiltrated diphtheria toxin on DEAE-Sephrose FF.

toxoid에 여러 종류의 배지 유래 peptide가 결합되어 있기 때문이다(7). 따라서 ion exchange chromatography를 수행할 경우 순수하게 toxoid만을 분리하기가 어렵다. 따라서 toxoid 정제의 경우 gel filtration chromatography 방법을 사용하였는데, 이는 crude toxin을 무독화한 toxoid는 toxoid 간의 크기 차이가 거의 없는 단일 크기의 toxoid이므로 분자량 크기에 따라 분류할 수 있는 gel filtration chromatography이 유용하기 때문이다. 그러나 1회 처리 용량이 한정되어 있어 대량 생산 체계에서는 적합하지 않다.

Table 3. Purity of toxin according to purification step.

Purification Step	Purity (Lf/mg of protein nitrogen)
Crude toxin	870
U.F. (MWCO, 100,000 filtrate→ MWCO 30,000)	1,300
DEAE-Sephrose FF	2,560

**Toxin의 무독화**

Toxin의 무독화는 toxin 함량, 사용하는 아미노산 종류와 농도, formalin 농도, 무독화 시간, 온도, pH가 중요한 무독화 요인으로 알려져 있다(9,10,16,17). Toxin에 0.5 % formalin만을 첨가하여 무독화할 경우 불완전한 무독화와 Lf의 감소가 발생하는데 이는 무독화 중 pH 저하와 toxin이 충분한 methyl bridge를 형성하지 못하기 때문이다(9,10). 무독화 중 pH 저하를 방지하기 위해 0.5 % sodium bicarbonate를 첨가할 경우 pH 저하는 방지할 수 있으나 toxin으로의 reversion이 발견된다 이러한 reversion을 방지하기 위해 Neumuller (18)는 toxin을 toxoid화시키기 위해 0.1 M glycine을 사용하였는데, 무독화 후 toxin으로의 reversion은 발견되지 않았으나 안정성 및 면역원성이 낮았다. 그 후 1962년 Linggood 등(10)이 여러 종류의 아미노산을 실험한 결과 lysine이 가장 적합한 아미노산임을 밝혀 내었다. 본 연구에서는 toxin 정제 toxoid가 toxin으로 reversion이 되는지를 확인하기 위하여 toxin 정제 후 무독화한 toxoid 3 batch를 무독화한 후에 무독화 시험을 수행하였다 Toxoid를 37°C에서 20일간 방치한 후 4마리의 guinea-pigs에 주사하여 30일간 관찰한 결과 이 사이에 어느 동물도 독소에 의한 중독사, 괴사, 마비 등의 중독증상, 현저한 체중감소, 기타의 이상이 관찰되지 않았다. 따라서, formalin과 lysine을 이용한 무독화 방법은 적합한 방법이라 판단된다. 무독화 공정 중 lysine과 formalin 첨가 순서에 따라 toxin 액의 성상에 차이가 관찰되었는데, toxin 액에 formalin을 먼저 첨가할 경우 aggregate가 생겼으며 이는 무독화 기간 내내 없어지지 않았다 반면, lysine 첨가 후에 formalin을 넣을 경우 무독화 기간 내내 맑은 성상을 유지하였다. 이는 lysine 없이 formalin을 첨가할 경우 formalin에 의해 toxin과 toxin 사이에 methyl bridge가 형성됨으로써 aggregate가 형성되는 반면, lysine이 있을 경우 lysine과 toxin의 결합으로 인해 toxin과 toxin의 결합이 방지됨으로써 soluble한 형태가 유지되기 때문으로 판단된다(9,10). 따라서 본 연구 결과 lysine을 먼저 첨가한 후 formalin을 첨가하는 것이 toxoid의 손실 없이 무독화시키는 안정된 무독화 방법으로 판단되었다.

**SDS-PAGE를 통한 분자량 확인**

Toxin 정제 toxoid의 분자량을 확인하기 위해 SDS-PAGE를 수행한 결과 이미 알려진 디프테리아 toxin 분자량과 같은 크기인 분자량 58,500 위치에서 toxoid 밴드가 관찰되었다. Crude toxin을 무독화한 후 정제한 toxoid와 분자량 차이가 있는지를 확인하기 위해 SDS-PAGE를 수행한 결과 두 toxoid간의 차이는 발견할 수 없었으며, 두 toxoid 모두 동일하게 분자량 58,500 위치에서 넓게 퍼져있는 밴드형태로 관찰되었다(Figure 3 (a)). Toxoid 밴드가 넓게 퍼지는 원인을 찾기 위하여 crude toxin에 formalin을 첨가한 후 시간에 따른 SDS-PAGE 밴드 형태를 관찰하였는데, formalin을 처리하기 전의 toxin은 SDS-PAGE상에서 밴드가 선명하게 관찰되나 formalin을 처리한 후 시간이 경과할수록 밴드가 넓게 퍼지는 현상이 관찰되었다(Figure 3 (b)) 이러한 밴드 형태의 변화는 formalin 첨가 후 24시간 경과한 toxin에게도 관찰되었는데 이는 formalin 처리 효과가 빠른 시간 안에 나타남을 알 수 있다. 결국 toxoid 밴드가 SDS-PAGE상에서 넓게 퍼져 관찰되는 이유는 formalin 처리에 의한 것이고 이로 인해 SDS-PAGE로는 두 toxoid 간의 차이를 발견할 수 없었다 이러한 밴드형태의 변화는 다음 두 가지 이유로 설명될 수 있다. 하나는

formalin에 의해 toxin과 결합된 다른 단백질의 크기의 차이로 인해 toxoid의 크기 차이가 발생할 수 있다는 것과 다른 하나는 formalin에 의해 toxoid가 SDS 및  $\beta$ -mercaptoethanol 처리에도 불구하고 여러 종류의 3차원적 구조를 지니기 때문으로 예측된다. 이러한 toxoid는 toxin과의 형태는 유사하나 toxin에 비해 온도, 낮은 pH 등의 형태 변화를 일으키는 자극에 잘 견디는 것으로 보고되어 있다(16). 따라서 toxoid의 3차원적 구조 유지로 인해 SDS-PAGE상에서 이동의 제약을 받아 밴드 형태가 넓게 퍼지는 것으로 예측된다. 특히, toxin을 정제한 후 무독화한 toxoid에서도 이러한 형태가 관찰되는 것으로 미루어 toxoid의 3차원적 구조가 더 큰 영향을 주는 것으로 판단된다. 이러한 toxoid의 형태변화에 대한 저항성으로 인해 toxoid는 독성은 없으면서 항원성은 유지되어 백신으로 사용된다(16, 17)

**항원성의 확인**

Toxin 정제 toxoid의 항원성 확인과 crude toxin을 무독화한 후 정제한 toxoid의 항원 성파를 비교하기 위해 Ouchterlony double immunodiffusion (ID)을 수행하였다 ID 결과 toxin 정제 toxoid와 디프테리아 antitoxin이 반응한 침전선이 관찰되었다

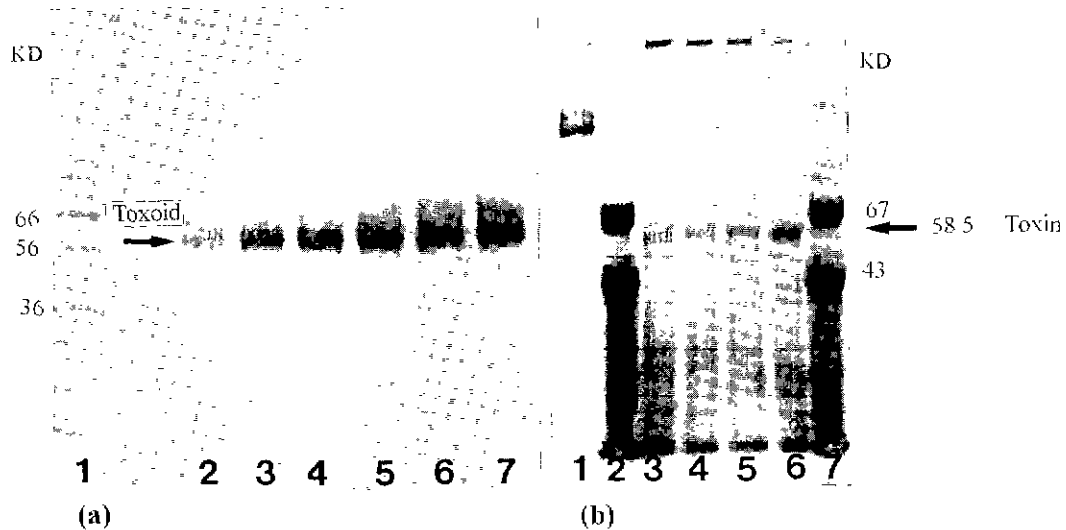


Figure 3. SDS- polyacrylamide gel electrophoresis of (a) toxin purified toxoid and toxoid purified toxin. lane. 1: size marker lane, 2,3,4 : toxoid purified toxin, lane 5,6,7 : toxin purified toxin. and (b) crude toxin treated formalin. lane 1,2,7 : size marker. lane 3: crude toxin treated formalin for 30 days, lane 4: crude toxin treated formalin for 7 days, lane 5: crude toxin treated formalin for 1 day, lane 6: crude toxin before formalin treatment

Table 4 Comparison of potency of purified toxoid between different purification method

Mixing	Dilution rate	Observation time (No. of G.P dead / No. of G.P challenged)				
		24 hrs	48 hrs	72 hrs	96 hrs	120 hrs
Standard antitoxin + Standard toxin	1 IU/mL	0/2	2/2	-	-	-
Antitoxin prepared from toxin purified toxoid - Standard toxin	X2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
	X3	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
Antitoxin prepared from toxoid purified toxoid + Standard toxin	X2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
	X3	0/2	0/2	1/2	1/2	1/2

요 약

본 연구에서는 디프테리아 toxin을 정제한 후 무독화하여 toxoid를 생산하기 위하여 crude toxin을 2중 U.F를 통해 분자량 100,000 이상의 단백질과 30,000 이하의 배지 유래 단백질 및 색소를 제거한 결과 순도 1,300 Lf/mg PN의 toxin을 정제하였다. 이를 다시 DEAE-ion exchange chromatography를 통해 toxin을 정제한 후 무독화하여 순도 2,560 Lf/mg PN의 toxoid를 얻을 수 있었다 이와 같이 생산된 디프테리아 toxoid는 동물 실험 결과 toxin으로 reversion이 발견되지 않았으며, 역가에 있어서도 crude toxin을 무독화한 후 정제한 toxoid와 비교하여 더 우수하였고 대한민국 생물학적 제제 기준에 규정된 성인용 디프테리아 백신 순도 기준 2,500 Lf/mg PN 이상에 적합하였다. 따라서 본 연구를 통해 성인용 디프테리아 백신의 생산 가능성을 확인하였다.

참 고 문 헌

- Gupta, P. K. and E. H. Relyveld (1991), Adverse Reactions after Enjection of Adsorbed Diphtheria-Pertussis-Tetanus (DPT) Vaccine are not due only to Pertussis Organisms or Pertussis Components in Vaccin. *Vaccine*. 9, 699-702.
- Pope, C. G. and F. V. Linggood (1939). Purification of Diphtheria Toxoid. *Brit. J. Exp. Path* 20, 21-30.
- Manual for the Production and Control of Vaccines : Diphtheria Toxoid. Unpublished WHO document BLG/UNDP/77. 1 Rev. 1.
- Cox, J. C. (1975), New Method for the Large-Scale Preparation of Diphtheria Toxoid : Purification of Toxin. *Appl. Microbiol.* 29, 464-468.
- Zaidenzaig, Y. and T. Stern (1980), Simple Procedure for Purification of Diphtheria Toxin and Separation of Its Fragments by Hydrophobic Chromatography. *Anal Biochem.* 109, 71-75
- Pappenheimer, A. M. Jr. (1984), *Bacterial Vaccines*, pp 1-36, Academic Press, NewYork.
- Sinkovic D. (1975), Effect of Formaldehyde on Diphtheria Toxin Protein Molecule. *Rad Imunol Zadova Zagrab.* 18, 85-90.
- Pope, C. G. and M. F. Stevens. (1958), The Purification of Diphtheria Toxin and the Isolation of Crystalline Toxin-protein *Brit. J. Exp. Path.* 39, 139-149.
- Scheibel, L. and P. E. Christensen (1965), Irreversible Detoxification of Purified Diphtheria Toxin. *Acta path. Et microbiol. Scandinav.* 65, 117-128.
- Linggood, F. V., M. F. Stevens, A. J. Fulthorpe, A. J. Woiwod and C. G. Pope (1962). The Toxoiding of Purified Diphtheria Toxin. *Brit. J. Exp. Path.* 55, 177-188.
- Mueller. J. H. and P. A. Miller (1941), Production of Diphtheria Toxin of High Potency (100Lf) on a Reproducible Medium. *J. Immunol.* 40, 21-32.
- Ramon, G. (1922), Flocculation dans un Melange neutre de

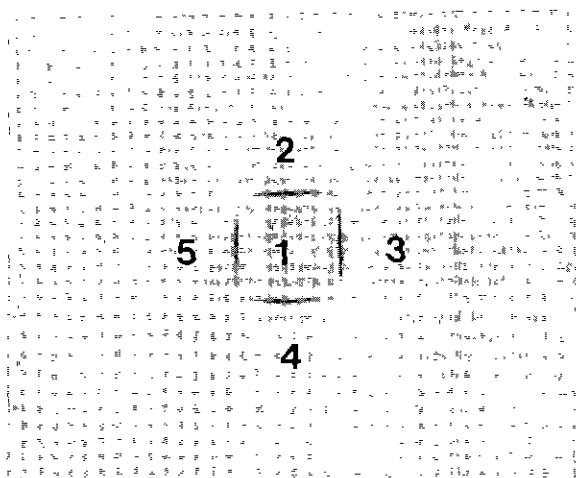


Figure 4. Immunodiffusion against diphtheria antitoxin of toxin purified toxoid and toxoid purified toxoid. ① diphtheria antitoxin, ②③ toxin purified toxoid, ④⑤ toxoid purified toxoid.

Table 5. Comparison of characters of purified toxoid between different purification method.

Procedure	Purity (Lf/mg of protein nitrogen)	Potency (IU/mL)	Reversion
Toxoid prepared from detoxified toxoid purification	2000	3	Nil
Toxoid prepared from toxin purification	1560	> 3	Nil

(Figure 4). 따라서 toxin 정제 toxoid의 항원성을 확인할 수 있었다. Crude toxin을 무독화한 후 정제한 toxoid와의 항원성을 비교한 결과 두 toxoid 모두 디프테리아 antitoxin에 반응하였고, 또한 같은 위치에서 침전 라인이 관찰되었다 따라서 두 toxoid는 같은 항원성이 존재함을 확인할 수 있었다(Figure 4). 그러나 두 toxoid중 어느 toxoid가 항원성이 더 우수한 지는 ID로 확인이 안 되기 때문에 디프테리아 역가 시험을 수행하였다. 역가 시험 결과 toxin 정제 toxoid의 경우 2, 3단위에서 모두 생존하는 결과를 보인 반면, crude toxin을 무독화한 후에 정제한 toxoid의 경우 2단위에서는 모두 생존하였으나 3단위에서 72시간째 1마리가 사망하는 결과를 보였다(Table 4). 따라서 역가는 toxin 정제 toxoid가 crude toxin을 무독화한 후 정제한 toxoid 보다 더 우수한 결과를 나타내었다. 즉, crude toxin을 무독화하다 후 U.F. 농축, A/S 처리 및 gel filtration 을 통해 toxoid를 회수한 toxoid와 toxin 정제 toxoid를 비교한 결과 순도 및 역가에서 toxin 정제 toxoid가 우수하였다(Table 5). 따라서 toxin 정제를 통한 toxoid 생산은 무독화 조건을 엄격히 지키고, 무독화 시험을 철저히 수행한다면 crude toxin을 무독화한 후 정제한 toxoid보다 순도가 높고 역가가 우수한 디프테리아 toxoid 생산 및 성인용 디프테리아 백신 생산이 가능하리라 판단되었다.

- Toxin-Antitoxine diphteriques. *CR Soc Biol.* **86**, 661-663.
- 13 Oudin, J. (1980), Immunochemical Analysis by Antigen-antibody Precipitation in Gels in *Methods in Enzymology*. **70**(eds. Van Vunakis, H., and Langone, J.J.), pp.166-198, Academic Press, New York
  - 14 Weber, K. and M. Osborn (1969), The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**, 4406-4412
  - 15 Stainer, D. W. (1968), Preparation and Properties of Diphtheria Toxoids in Submerged Culture, *Can. J. Microbiol.* **14**, 327-330.
  - 16 Paliwal, R. and E. London (1996), Comparison of Conformation, Hydrophobicity and Model Membrane Interactions of Diphtheria Toxin to those of Formaldehyde-treated Toxin (Diphtheria Toxoid) Formaldehyde Stabilization of the Native Conformation Inhibits Changes that Allow Membrane Insertion. *Biochemistry* **35**, 2374-2379.
  - 17 Dumont, M. E. and F. M. Richards (1988), The pH-Dependent Conformational Change of Diphtheria Toxin. *J. Biol. Chem.* **263**, 2087-2097.
  - 18 Neumuller, C. (1954), Detoxification of Diphtheria Toxin with Formaldehyde Mixed with an Amino Acid. *Nature*, **174**, 405-412.