

마우스에서 CFC-101 (녹농균 백신)의 감염 방어효과

김영지 · 김제학 · 박완제 · 안동호 · 홍광희

김현수* · 김유삼¹ · 함경수²

제일제당 종합연구소, ¹연세대학교 생화학과, ²유전공학 연구소

Protective Effect of CFC-101, a Pseudomonas Vaccine, in Mice

Young Gi KIM, Je Hak KIM, Wan Je PARK, Dong Ho AHN, Kwang Hee HONG
Hyun Su KIM*, Yu Sam KIM¹ and Kyung Soo HAHM²

R&D Center, Cheil Foods and Chemicals Inc., 522-1 Dokpyong, Majang, Ichon, Kyonggi 467-810, Korea

¹Department of Biochemistry, College of Science, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

²Genetic Engineering Research Institute, KIST P.O. Box 115, Taejon 305-600, Korea

(Received October 28, 1994; accepted November 30, 1994)

Abstract—To optimize the immunological efficacy of CFC-101, an outer-membrane protein vaccine purified from relatively less pathogenic 4 different *Pseudomonas aeruginosa* strains, we investigated to establish its dose, administration route, interval and frequency of vaccination in mice. As expected, the 4 CFC-101 producing strains were less pathogenic than the challenging organism, *P. aeruginosa* GN11189. CFC-101 completely protected the death caused by *P. aeruginosa* at above 0.05 mg/kg vaccinated by 3 times with 7-day intervals. At the optimally effective dose of 0.2 mg/kg of CFC-101, at least 3 immunizations were necessary for complete protection against *P. aeruginosa*-induced death. If immunized 3 times, the immunization interval could be shortened up to 2 days to acquire the best protection against *P. aeruginosa*. CFC-101 was effective either by intraperitoneal, subcutaneous or intramuscular but not by oral administration. The present results show that the newly developed Pseudomonas vaccine, CFC-101, is highly effective for the protection from death caused by pseudomonal infections.

Keywords □ CFC-101, Pseudomonas vaccine, protective effect, immunization

녹농균은 그람 음성간균으로서 패혈증, 호흡기감염증 (Jarvis와 Martone, 1992), 췌낭포성 섬유증 등의 난치성 감염을 일으키는 병원성 세균이다. 특히 녹농균에 의해 야기되는 패혈증은 수술, 열상 및 외상 등에 의해 저항력이 저하된 환자의 혈액중에 미생물이 침입하여 고열 및 혈압저하 등의 쇼크를 일으켜 결국 사망에까지 이르게 하는 것으로 알려져 있다. 또한 치료법의 개발 노력에도 불구하고, 녹농균에 의한 균혈증과 폐렴으로 인한 사망율이 지난 20여년간 감소하지 않고 있다(Pennington, 1990). 따라서, 녹농균에 의해 야기되는 난치성 감염증을 효과적으로 치료할 수 있는 약제의 개발이 절실히 요구되어 왔다. 그러나, 녹농균은 많은 항생제에 대해 내성을 가지고 있을 뿐만 아니라, 형이 다양하여 현재까지도 좋은 효과를 갖는 백신제제나 치료제가 개발되어 있지

않아 녹농균 감염증이 심각한 문제점으로 지적되고 있다.

최근에는 녹농균 등과 같은 그람 음성균의 세포벽 단백질을 백신으로 이용할 수 있는 항원으로 사용하고자 하는 연구를 하고 있다(Homma 등, 1976; Loeb 등, 1988; Makela 등, 1988; Stanislavsky 등, 1986). 그 결과, 하나 혹은 여러 형태의 균주로부터 제조된 녹농균 단백질 백신에 대한 실험적 연구결과가 발표되고 있다(Joo 등, 1982; Stanislavsky 등, 1985).

필자 등은 녹농균 감염환자로부터 분리된 녹농균을 면역형에 따라 7종으로 구분하여 이들 중 국내 및 외국에서 가장 감염율이 높은 Fisher 1형, 2형, 3형 및 6형에 각각 상응하는 CFCPA10142, CFCPA20215, CF-CPA30720 및 CFCPA60534를 선발하여 일련의 과정을 거쳐서 세포외막 단백질을 분리 정제하여 녹농균 백신을 제조하였다.

본 연구의 목적은 세포외막 단백질을 주성분으로 하는

* To whom correspondence should be addressed.

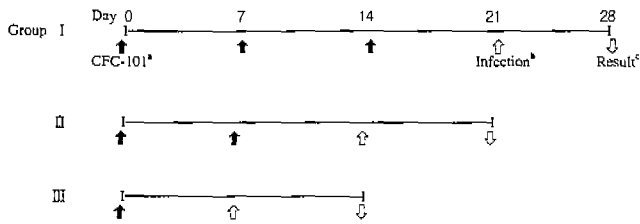


Fig. 1. Experimental schedule to determine treatment frequency of CFC-101 in mice. ^aCFC-101 was administered intraperitoneally at the dose of 0.2 mg/kg. ^b*P. aeruginosa* GN 11189 was infected intraperitoneally. ^cThe results were presented on the basis of survival rate.

녹농균 백신의 적절한 투여용량, 투여간격, 투여횟수 및 투여경로를 알아보하고자 함에 있다.

실험방법

실험균주

약독화시킨 *P. aeruginosa* CFCPA10142, CFCPA20215, CFCPA30720 및 CFCPA60534 등 4종류의 균에서 세포벽 단백질을 추출, 정제하여 *Pseudomonas vaccine* (PV)으로 사용하였으며, 감염유발용 시험균으로는 *P. aeruginosa* GN11189를 사용하였다(Masuyoshi 등, 1991).

실험동물

6주령의 건강한 음성 ICR mouse(20~25 g)를 PV 약효시험용 동물로 사용하였다.

Pathogenicity

PV 제조시 사용한 균주(*P. aeruginosa* CFCPA10142, CFCPA20215, CFCPA30720 및 CFCPA60534)와 감염용 시험균주(*P. aeruginosa* GN11189)의 pathogenicity를 확인하기 위하여, 각 균주를 생리식염수에 농도별로 희석하여 mouse 복강내 감염시킨 후 7일간 mouse의 생존 여부를 관찰하여 생존율을 산출하였다.

투여용량 결정

시험물질을 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 및 0.8 mg/kg의 용량으로 0.3 ml씩 복강내에 7일 간격으로 3회 반복 투여하고 마지막 투여 7일 후에 감염용 시험균(*P. aeruginosa* GN11189)을 2.5×10^7 CFU/mouse로 복강내 접종하였다. 감염된 mouse의 생존여부를 7일간 관찰하고 생존율을 비교하여 최적 투여용량을 결정하였다.

투여횟수 결정

시험물질(CFC-101)을 0.2 mg/kg 용량으로 7일 간격으로 복강내에 1회, 2회 및 3회씩 각각 투여하고 마지막 투여 7일 후에 감염용 시험균(*P. aeruginosa* GN11189)을 mouse 복강내에 감염시키고 7일간 mouse 생존율을 관찰하여 최적 투여횟수를 결정하였다(Fig. 1).

투여간격 결정

시험물질(CFC-101)의 최적 투여간격을 결정하기 위하여, 7일, 4일 및 2일 간격으로 시험물질(CFC-101)을 복강내

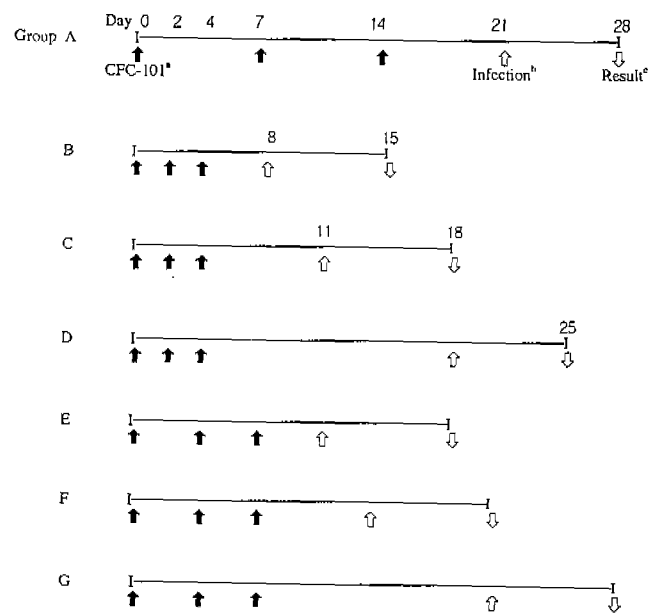


Fig. 2. Experimental schedule to determine treatment interval of CFC-101 in mice. ^aCFC-101 was administered intraperitoneally at the dose of 0.2 mg/kg. ^b*P. aeruginosa* GN11189 was infected intraperitoneally. ^cThe results were presented on the basis of survival rate.

3회 반복투여후 감염용 시험균(*P. aeruginosa* GN11189)으로 감염시키고 mouse 생존율을 관찰하였다(Fig. 2). 투여경로 결정

시험물질(CFC-101)을 복강내, 경구, 피하 및 근육에 7일 간격으로 3회 반복 투여하고 마지막 투여 7일 후에 감염용 시험균(*P. aeruginosa* GN11189)을 mouse 복강내에 접종하여 감염시키고 mouse 생존율을 관찰하여 투여경로별 면역효과를 비교하였다.

실험결과

Pathogenicity

PV 제조에 사용한 4개 균주(*P. aeruginosa* CFCPA10142, CFCPA20215, CFCPA30720 및 CFCPA60534)의 pathogenicity 시험결과 LD₅₀(CFU/mouse)이 각각 7.6×10^7 , 2.7×10^7 , 2.5×10^8 및 2.0×10^7 이었고, 감염용 시험균인 *P. aeruginosa* GN11189의 LD₅₀은 4.0×10^6 이었다(Table I).

투여용량 결정

시험물질(CFC-101)을 각종 투여용량으로 복강내에 7일 간격으로 3회 반복투여하고 마지막 투여 7일 후에 감염용 시험균주를 mouse 복강내에 감염시켜 감염방어 효과를 시험한 결과, 0.05 mg/kg 이상의 투여용량에서는 mouse 생존율이 100%로 완벽한 감염방어 효과를 나타내었다(Table II). 이후의 시험에서는 0.2 mg/kg을 표준 투여용량으로 설정하여 시험하였다.

Table I. Pathogenicity of CFC-101-producing and challenging organisms in mice.

Microorganism	Challenge dose (CFU/mouse)	Survival rate ^a	LD ₅₀ ^b (CFU/mouse)
<i>P. aeruginosa</i>	2.4×10 ⁹	0/5	7.6×10 ⁷
CFCPA10142 ^c	2.4×10 ⁸	0/5	
	2.4×10 ⁷	5/5	
	2.4×10 ⁶	5/5	
<i>P. aeruginosa</i>	1.9×10 ⁸	0/5	2.7×10 ⁷
CFCPA20215 ^c	1.9×10 ⁷	1/5	
	1.9×10 ⁶	3/5	
	1.9×10 ⁵	4/5	
<i>P. aeruginosa</i>	8.1×10 ⁸	1/5	2.5×10 ⁸
CFCPA30720 ^c	8.1×10 ⁷	4/5	
	8.1×10 ⁶	5/5	
	8.1×10 ⁵	5/5	
<i>P. aeruginosa</i>	1.4×10 ⁹	0/5	2.0×10 ⁷
CFCPA60534 ^c	1.4×10 ⁸	1/5	
	1.4×10 ⁷	3/5	
	1.4×10 ⁶	4/5	
<i>P. aeruginosa</i>	2.2×10 ⁸	0/5	4.0×10 ⁶
GN11189 ^d	2.2×10 ⁷	0/5	
	2.2×10 ⁶	5/5	
	2.2×10 ⁵	5/5	
	2.2×10 ⁴	5/5	

^aSurvival mice/treated mice ^bMedian lethal dose (LD₅₀, CFU/mouse) was calculated using Reed-Muench method. ^cCFC-101-producing microorganism ^dChallenging microorganism for intraperitoneal infection in mice.

투여횟수 결정

시험물질(CFC-101)을 0.2 mg/kg의 투여용량으로 7일 간격, 3회(Group I), 2회(Group II) 및 1회(Group III) 투여하고 감염방어 효과를 구한 결과, 3회 투여한 Group I에서 100%, 2회 투여한 Group II에서 50%, 1회 투여한 Group III에서 37.5%를 나타내었다(Table III).

투여간격 결정

시험물질(CFC-101)을 0.2 mg/kg의 투여용량으로 투여 간격을 달리하여 3회 투여했다. 그 결과 100%의 감염방어 효과를 보인 군은 7일 간격 투여군(Group A), 2일 간격 투여 4일 후 감염군(Group B) 및 14일 후 감염군(Group D) 등 이었으며, 2일 간격 투여 7일 후 감염군(Group C)에서는 87.5%의 감염방어 효과를 나타내었다. 또한 4일과 3일간의 간격을 두고 투여한 군(Group E, F 및 G)에서는 4일, 7일 및 14일 후 감염접종시 각각 62.5%, 62.5% 및 75%의 감염방어 효과를 보였다(Table IV).

투여경로 결정

시험물질의 투여경로별 감염방어 효과를 알아보기 위하여, CFC-101을 0.2 mg/kg의 투여용량, 7일 간격으로

Table II. Effect of dose of CFC-101 following intraperitoneal treatment in mice.

Dose (mg/kg)	Survival rate ^a
0.02	10/16
0.05	16/16
0.1	16/16
0.2	16/16
0.4	16/16
0.8	16/16
Control ^b	1/16

^aThe survival rate was expressed on the basis of no. of survival mice/no. of treated mice. *P. aeruginosa* GN11189 was infected intraperitoneally at the dose of 2.5×10⁷ CFU/mouse. ^bSaline.

Table III. Effect of treatment frequency of CFC-101 in mice.

Group	Treatment frequency ^a	Challenge dose ^b (CFU/mouse)	Survival rate ^c	
			CFC-101 ^d	Vehicle ^e
I	3	2.0×10 ⁷	8/8	0/8
II	2	2.4×10 ⁷	4/8	1/8
III	1	2.3×10 ⁷	3/8	0/8

^aTreatment interval was 7 days. See Fig. 1 for the detailed treatment schedule. ^b*P. aeruginosa* GN11189 ^cSurvival mice/treated mice ^dCFC-101 was administered intraperitoneally at the dose of 0.2 mg/kg with an interval of 7 days. ^eSaline.

복강내, 경구, 피하 및 근육내 등의 투여경로를 달리하여 3회 접종한 후 감염시킨 결과, 복강내 주사시 90.5%, 피하와 근육내 주사에서 약 61%의 감염방어 효과를 나타내었다. 반면에 경구투여시는 5%로서 거의 효과가 없었다(Table V).

고 찰

세포외막 단백질을 주성분으로하는 녹농균 백신인 CFC-101의 실험동물에서의 감염방어효과를 확인하고, 가장 적절한 투여용량, 횟수, 간격 및 투여경로 등에 대해 결정하였다.

CFC-101의 제조에 사용된 4종류의 녹농균 균주는 감염용 시험균주인 *P. aeruginosa* GN11189 strain보다 pathogenicity가 약한 것을 알 수가 있다(Table I). 이는 연구 초기단계의 CFC-101 제조용 균주의 선정 과정에서, 균주자체의 pathogenicity가 비교적 약하고 immunogenicity가 높은 요건을 갖춘 균주일 것임을 확인한 시험 결과에 근거한 것이며, 반면 mouse 감염에 사용된 균주는 pathogenicity가 높아 임상병리학적으로 중요한 의미를 가지는 균주를 사용하고자 하는 의도를 반영하는 결과이다.

이상의 조건하에서, 일반적인 *in vivo* 항체 생성 time course와 부합되는 1주일 투여간격으로 3회 투여에 의해 감염유발균에 의한 치사 발생을 0.02 mg/kg의 용량에서

Table IV. Effect of treatment interval of CFC-101 in mice.

Group	Treatment schedule(day) ^a	Challenge dose ^b (CFU/mouse)	Survival rate ^c	
			CFC-101 ^d	Vehicle ^e
A	0-7-14	1.8×10 ⁷	8/8	0/8
B	0-2-4	2.0×10 ⁷	8/8	0/8
C	0-2-4	2.2×10 ⁷	7/8	1/8
D	0-2-4	1.9×10 ⁷	8/8	1/8
E	0-4-7	2.2×10 ⁷	5/8	1/8
F	0-4-7	2.1×10 ⁷	5/8	1/8
G	0-4-7	3.2×10 ⁷	6/8	0/8

^aTreatment frequency was 3 times. See Fig. 2 for the detailed treatment schedule. ^b*P. aeruginosa* GN11189 ^cSurvival mice/treated mice. ^dCFC-101 was administered intraperitoneally 3 times at the dose of 0.2 mg/kg. ^eSaline.

는 부분적으로 0.05 mg/kg 이상의 용량에서는 완전하게 방어함으로써, 본 녹농균 백신의 약효를 명확히 확인할 수가 있었다(Table II). 이 실험결과에 근거하여 최소 유효용량의 4배에 해당하는 0.2 mg/kg을 표준 투여용량으로 설정하여 투여횟수, 간격 및 투여경로의 변화에 따른 mouse 감염방어효과에 대한 다양한 시험을 수행하였다.

임상 적용시의 투여횟수는 환자의 편리성, 치료비용의 경제성 등 의약품으로서의 실질적인 백신의 가치를 평가하는데 중요한 요소라 할 수 있다. CFC-101 녹농균 백신은 단회투여보다는 3회 투여하는 것이 감염방어효과를 유의성있게 증가시키는 것으로 확인되었다(Table III). 투여횟수 뿐 아니라 투여간격 또한 감염이 우려되는 수술환자 등에 적용하기 위해서는 고려해야 할 요소인바, 본 시험에서 얻은 결과인 2일 간격의 투여로 녹농균의 감염을 완전하게 방어한다는 사실은 향후 임상시험에서 시사하는 의미가 매우 크다고 사료된다.

본 백신은 피하, 근육 및 복강 투여에 의해서도 감염 방어 효과를 발휘하는 것을 확인하였다(Table V). 다만 동일한 용량 투여군에서 피하 및 근육 투여군에 비하여 복강투여군의 감염 방어능이 우수한 것을 알 수가 있었는데, 이는 복강투여의 경우 전신으로의 흡수 및 분포가 피하 및 근육 투여보다 우수하다는 것에 그 이유를 찾을 수 있겠다. 따라서 피하 또는 근육내 투여의 경우도 투여용량을 증가시킨다면 방어효과가 증강될 것으로 사료된다. 한편 경구투여시는 감염방어효과가 없음이 확인되었는데, CFC-101이 세포벽 단백질을 주성분으로 하고 있기 때문에 경구투여후 위산에 의해 항원으로 작용할 수 있는 단백질 구조가 대부분 파괴되었거나, 위장관의 단백질분해 효소에 의해 분해되었을 것으로 사료된다.

종합하면, 새로이 개발된 세포벽 단백질을 주성분으로 하는 CFC-101은 녹농균 감염에 따른 실험동물의 패혈치사 현상을 완벽하게 방어하는 것을 확인하였으며, 그

Table V. Effect of administration route of CFC-101 in mice.

Administration route ^a	Survival rate ^b
Intraperitoneal	19/21
Oral	1/20
Subcutaneous	14/23
Intramuscular	14/23
Control	0/16

^aCFC-101 was administered 3 times at the dose of 0.2 mg/kg with an interval of 7 days. ^bSurvival mice/treated mice.

방어효과는 2일 이상의 간격으로 최소 3회 투여함으로써 발휘됨을 알 수가 있었다. 본 CFC-101은 녹농균에 의해 유발되는 사망을 억제하기 위한 목적으로 임상적용이 크게 기대되는 물질이다.

참고문헌

- Homma, J. Y., Abe, C. and Shinoya, H. (October 19, 1976). Method for prevention of *Pseudomonas aeruginosa* infection. *US Patent* 3,987,164.
- Jarvis, W. R. and Martone, W. J. (1992). Predominant pathogens in hospital infections. *J. Antimicrob. Chemother.* **29**(Suppl. A), 19-24.
- Joo, I., Stanislavsky, E. S., Zhvanetskaya, M. J., Mashilova, G. M. and Gladus, M. A. (1982). Active and passive mouse-protecting capacity of *Pseudomonas aeruginosa* protein vaccines. *Acta Microbiologica Acad. Sci. Hung.* **29**, 267.
- Loeb, M. R. and Smith, D. H. (1988). Outer membrane protein composition of disease isolates of *Haemophilus influenzae*. In: *Bacterial vaccines* (Eds Robbins J. B. et al.) Thiema-Stratton Inc., New York, **4**, 334.
- Makela, P. H., Kuusi, N., Nurminen, S., Saxen, H. and Valtonen, M. (1988). Porins: the major outer membrane proteins of enteric bacteria as protective antigens. In: *Bacterial vaccines* (Eds Robbins J. B. et al.) Thiema-Stratton Inc., New York, **4**, 363.
- Masuyoshi, S., Mitsunashi, S., Inoue, M., Hiraoka, M. and Matsui, H. (1991). *In vitro* and *in vivo* antibacterial activity and β -lactamase stability of cefepime, a new parenteral cephalosporin. *Chemotherapy* **39**(S-2), 1-14.
- Pennington, J. E. (1990). *Pseudomonas aeruginosa*. Vaccines and immunotherapy. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **4**, 259-270.
- Stanislavsky, E. S., Edvabnaya, L. S., Zaidner, I. G., Makarenko, T. A., Boolk, V. F., Zhvanetskaya, M. I. and Mashilova, G. M. (1986). Immunochemical and immunological study of cell-wall proteins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Microbiologica Hungarica* **33**, 245.
- Stanislavsky, E. S., Joo, I., Mashilova, G. M., Boolk, V. F., Boltutsy, L. G., Zakgeim, D. A., Severtsova, M. K., Yedvabnaya, L. S., Gladus, M. A., Fatkhinurova, T. I., Kolker, I. I., Grishina, I. A. Terekhova, R. P. and Zhvanetskaya, M. I. (1985). Vaccines against *Pseudomonas aeruginosa* infection: 1. Experimental studies *Vaccine* **3**, 128.