

## Development of recombinant *S. typhimurium* as a model for *S. typhi*-based vaccine vectors

VMB-6

S.J. Dunstan<sup>1</sup>, C.P. Simmons<sup>1,2</sup>, R.A. Strugnell<sup>1,2</sup>

### Abstrak

Keberhasilan uji serta peredaran vaksin baru berasal dari mutan *S. typhi* yang dilemahkan telah membuka kesempatan untuk mengembangkan vaksin-vaksin bivalen atau multivalen yang baru. Pengembangan vaksin semacam ini perlu memperhatikan analisis yang teliti terhadap sistem optimal ekspresi gen yang dipakai (dosis gen, kekuatan promoter dsb) untuk menjamin bahwa rekombinan *S. typhi* menimbulkan respons maksimal dibandingkan antigen heterolog yang diekspresi bersamanya. Penelitian ini mengembangkan model vaksin bivalen *S. typhimurium* yang dicoba pada mencit tifoid. Sebagai model antigen digunakan fragmen C toksin tetanus (TT) yang ternyata sangat imunogenik pada mencit bila diekspresikan dengan rekombinan protein dari *S. typhimurium* yang dilemahkan. Pada penelitian ini diteliti berbagai parameter yang penting seperti mutasi yang mungkin ada, jumlah plasmid dan stabilitasnya, kekuatan promoter dan efek translasi. Mutan gen yang isogenik seperti *purA*, *aroA*, *aroA/aroD*, *htrA* dan *ompR* dari *S. typhimurium* SL 1344 akan dibandingkan dengan mutan *cya/crp* dari SR - 11 dalam hal pertumbuhan *in vivo* dan penetrasi ke organ limfoid dan dibandingkan pula dengan imunisasi fragmen C. Efek protektif dari antibodi spesifik - TT ditemukan pada seluruh rekombinan *Salmonella* kecuali mutan *purA*. Reaksi imunogenisitas terbukti tidak ada hubungannya dengan kemampuan kuman melakukan penetrasi ke limpa dan tidak berhubungan pula dengan respons spesifik sel T; namun berkorelasi dengan kolonisasi kuman dalam plak Peyer. Imunogenitas maksimal dari konstruksi plasmid yang mengandung fragmen C berkorelasi dengan stabilitas plasmid; dan replikon dengan jumlah yang rendah, namun stabil (mis. pRSF 1010) akan sangat efektif sebagai wahana pembawa vaksin. Fragmen C yang diekspresikan oleh Co1E1 plasmid pBR 322 dan derivatnya pAT 153 dapat menginduksi antibodi spesifik TT dalam level yang tinggi, sedangkan derivat plasmid pIC20H yang jumlah plasmid/sel sangat tinggi ternyata justru tidak memacu respon imun spesifik - TT, dan juga tidak stabil *in vivo*. Gen *p<sub>pagC</sub>*, *p<sub>nirB</sub>* dan *p<sub>katG</sub>* yang merupakan promoter yang diregulasi *in vivo* dibandingkan dengan promoter constitutive *p<sub>trc</sub>* dalam hal ekspresi *in vivo* antigen reporter firefly luciferase, dan dalam hal imunogenitas konstruksi fragmen C *in vivo*. Promoter *in vivo* yang terkuat (*p<sub>trc</sub>*) ternyata kurang efektif pada imunisasi dibandingkan dengan promoter yang diregulasi *in vivo* (*p<sub>pagC</sub>*). Informasi ini akan digunakan untuk secara optimal mengekspresikan antigen heterolog lain pada mutan rekombinan *S. typhimurium*, dengan tujuan akhir mengembangkan vaksin bivalen *S. typhi* yang baru.

### Abstract

The successful testing and development of a new live, attenuated mutant (s) of *S. typhi* as a typhoid vaccine creates an opportunity for developing novel bivalent or multivalent human vaccines. Development of such vaccines will require careful analysis of optimal expression system (gene dosage, promoter strength,...) to ensure that the recombinant *S. typhi* elicit a maximal response against the co-expressed heterologous antigen. We have modelled the construction of bivalent vaccines in *S. typhimurium* using the murine model of typhoid fever. The model antigen used in these studies, the C fragment of tetanus toxin (TT), is highly immunogenic in mice when expressed as a recombinant protein from live, attenuated *S. typhimurium*. Parameters including background mutation, plasmid copy numbers and stability, promoter strength/regulation and translation effects were examined in this study. Isogenic *purA*, *aroA*, *aroA/aroD*, *htrA* and *ompR* mutants of *S. typhimurium* SL1344 were compared with the *cya/crp* mutant of SR-11 for *in vivo* growth and penetration into central lymphoid organs, and immunisation against C fragment. Protective levels of TT-specific antibody were elicited by all recombinant *Salmonellae* except the *purA* mutant. Immunogenicity did not correlate with penetration into the spleen or specific splenic T cell responses, but did correlate with Peyer's patch colonisation. Maximal immunogenicity of plasmid constructs of C fragment correlated with plasmid stability, and low copy, but stable replicons (eg. pRSF 1010) were effective in vaccine delivery. C fragment expressed from Co1E1 plasmids pBR322 and its derivative pAT153, induced very high levels of TT-specific antibody whereas the high copy derivative pIC20H did not elicit TT-specific immune response and was highly unstable *in vivo*. *In vivo*-regulated promoters (*p<sub>pagC</sub>*, *p<sub>nirB</sub>* and *p<sub>katG</sub>*) were compared with the constitutive promoter *p<sub>trc</sub>* for *in vivo* expression of the reporter antigen firefly luciferase, and *in vivo* immunogenicity of C fragment constructs. The strongest *in vivo* promoter (*p<sub>trc</sub>*) was less effective at immunisation than the *in vivo* regulated promoter *p<sub>pagC</sub>*. Information from these studies will be used to optimally express other heterologous antigens from recombinant *S. typhimurium* mutants, with the ultimate aim of developing novel bivalent *S. typhi* vaccines.

<sup>1</sup>Department of Microbiology and Immunology,  
University of Melbourne

<sup>2</sup>CRC for Vaccine Technology, University of Melbourne,  
Parkville, Vic. 3052, Australia.