

유기인 계열 독성물질 분해를 위한 바이오스캐빈저 최신 연구 동향

김희정 · 정근홍 · 계영식[†]

육군사관학교 물리화학과

(2020년 3월 3일 접수, 2020년 3월 19일 심사, 2020년 3월 21일 채택)

Recent Trend in Bioscavengers for Inactivation of Toxic Organophosphorus Compounds

Heejeong Kim, Keunhong Jeong, and Young-Sik Kye[†]

Department of Physics and Chemistry, Korea Military Academy, Seoul 01805, Republic of Korea

(Received March 3, 2020; Revised March 19, 2020; Accepted March 21, 2020)

초 록

최근 몇 년간 유기인 계열 독성물질이 민간인을 대상으로 사용되어 전 세계적으로 큰 위협이 되고 있다. 독성물질에 대한 예방이 불가능한 현 치료대책 대신, 보다 개선된 치료 대책으로서의 바이오스캐빈저에 대한 연구가 활발히 진행됐다. 바이오스캐빈저는 유기인 계열 독성물질이 인체 내 표적 기관에 도달하기 전, 독성물질 자체를 비활성 상태로 전환하거나 독성물질과 기질 간의 결합을 차단함으로써 중독을 예방하는 단백질 및 효소를 일컫는다. 특히 독성물질을 분해하는 과정에서 활성 상태를 유지함으로써 적은 양의 단백질로도 독성물질의 중독을 빠르게 치료하는 촉매성 바이오스캐빈저 개발에 많은 노력이 투여되어 왔다. 본 리뷰에서는 촉매성 바이오스캐빈저 개발을 위해 분자진화 및 단백질 공학 기술을 적용한 최신 연구들에 대해 소개하고, 끝으로 이러한 효소들을 임상적으로 승인된 약으로 개발하기 위해 남은 몇 가지 과제들을 간단히 제시할 것이다.

Abstract

In recent years, toxic organophosphorus compounds (OPs) have been used for civilians, becoming a great threat to the world. Alternative to the current treatment policy unpredictable for any prevention, researches on bioscavenger as an improved treatment have been actively conducted. Bioscavengers refer to proteins and enzymes that prevent intoxication by inactivating or binding toxic OPs before they reaches the target. In particular, extensive efforts have been made to develop catalytic bioscavengers that quickly detoxify OPs even with a small dose of the protein by performing multiple binding and hydrolysis processes with OPs. This review introduces the latest studies and results for developing catalytic bioscavengers using molecular evolution and protein engineering techniques. We will briefly present some of the remaining challenges on developing enzymes into clinically approved drugs.

Keywords: Organophosphorus compounds (OPs), Bioscavengers, Chemical Warfare Agent (CWA), Directed evolution, Protein engineering techniques

1. 서 론

최근 영국의 노비츠크(Novichok) 및 말레이시아 공항의 VX 테러 사건에서 보았듯이 독성물질 피독 시 초기 처치는 매우 중요한 과정이다. 두 사건에서 쓰인 독성물질은 유기인 화합물(organophosphorus compounds, OPs)이라는 큰 범주에 포함되는데, OPs는 인과 탄소가 결합되어 있는 화합물로 농약, 비료, 화학작용제 등 그 쓰임이 다양하다. 최초 살충제나 제초제로 널리 사용되던 OPs는 그 강한 독성으로 인해 화학작용제로 합성 및 무기화되었으며, 사린(sarin, GB), 소만(soman,

GD), 사이클로 사린(cyclosarin, GF), 타분(tabun, GA), VX, 노비츠크 등이 이에 포함된다(Figure 1).

유기인산 독성물질 중독을 치료하기 위한 대표적인 물질은 아트로핀, 옥심, 비옥심계 비스피리디늄 및 카르바산 등이 있다(Figure 2)[1]. 이를 초기에 또한 적시에 적용한다면, 치사율을 줄일 수 있고 중독 증상을 완화할 수 있다. 하지만 앞서 언급한 치료물질들은 사후 조치에 해당하는 치료제이기 때문에 회복 이후에도 의식소실이나 영구적인 뇌의 손상을 야기하는 콜린성 위기(cholinergic crisis)를 예방하는 데는 한계가 있다[2]. 또한 현재까지 개발된 치료법들은 유기인산 독성물질 중독 이전에 적용할 경우에 중추신경계 손상, 혈압 및 심박수 증가 등과 같은 심각한 부작용을 야기하기 때문에 중독되기 전 예방 대책으로는 적합하지 않다[3]. 따라서 최근 10여 년간, 적은 양의 단백질만으로 많은 양의 유기인산 독성물질을 효과적으로 예방할 수 있는 촉매성 바이오스캐빈저가 차세대 대책으로서 제시되어 왔다[4]. 촉매

[†] Corresponding Author: Korea Military Academy,
Department of Physics and Chemistry, Seoul 01805, Republic of Korea
Tel: +82-10-6496-4238 e-mail: kye@mnd.go.kr

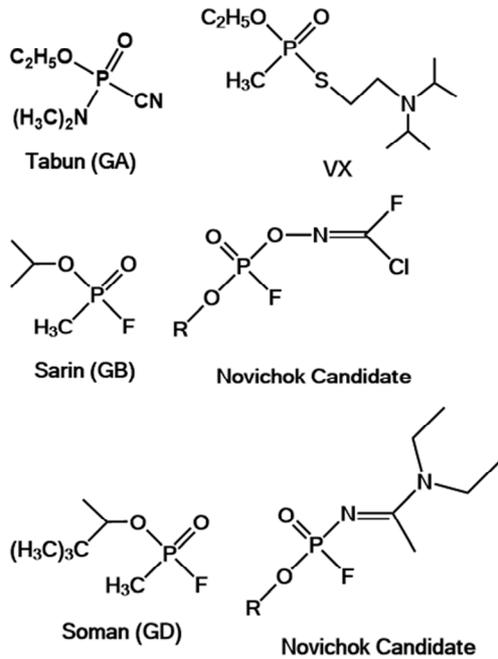


Figure 1. Structures and names of representative toxic organophosphorus chemicals.

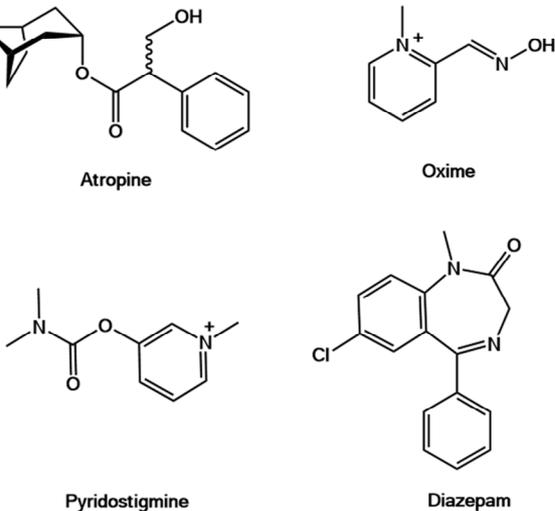


Figure 2. Representative medical organic materials for inactivating toxic organophosphorus chemicals.

성 바이오스캐빈저의 후보로는 크게 B-에스테라제 계열의 화학량론적 바이오스캐빈저(stoichiometric bioscavengers)를 촉매성으로 전환한 형태의 단백질들과 천연 유기인산 가수분해 효소들이 있으며, 각각의 후보군의 특성과 촉매성 바이오스캐빈저로서의 효율성을 논의해보고자 한다(Figure 3).

촉매성 바이오스캐빈저는 일반적인 효소가 작용하는 방식처럼, 하나의 바이오스캐빈저가 다수의 유기인산 독성물질을 가수분해할 수 있다. 대조적으로 부티릴콜린 에스테라제(BChE) 또는 아세틸콜린 에스테라제(AChE)와 같은 화학량론적 바이오스캐빈저들은 하나의 유기인산 독성물질 분자에 하나의 비촉매성 바이오스캐빈저가 결합해야 한다는 점에서, 효과적인 독성물질의 가수분해가 이루어지려면 수백

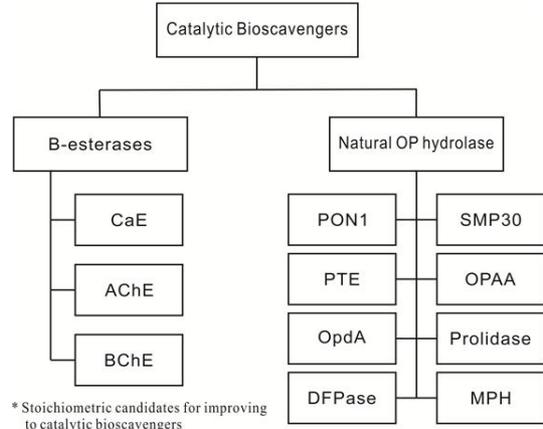


Figure 3. Classification of catalytic bioscavenger candidates.

mg 이상의 단백질이 필요하다[5]. 따라서 고분자량의 BChE 또는 AChE를 치료물질로 사용하는 것은 비용 면에서도 부담이 있을 뿐만 아니라, 투여 후 부적절한 생리적 반응이 발생할 가능성도 배제하기 어렵다(Figure 4)[6].

촉매성 바이오스캐빈저와 동일한 효과를 얻기 위해 AChE, BChE 또는 카르복실 에스테라제(CaE)와 같은 B-에스테라제 계열의 화학량론적 바이오스캐빈저를 옥심 재활성화제(oxime reactivators)로 처리하여 복합체를 형성한 것을 유사촉매 바이오스캐빈저(pseudocatalytic bioscavengers)라고 한다[7,8]. 유사촉매 바이오스캐빈저의 경우, 독성물질의 촉매 세린 잔기(catalytic serine residue)에 공유 결합을 한 후 옥심 재활성화제에 의하여 불활성화 독성물질을 가수분해 및 방출하는 순서로 작용한다[9]. 통상적으로 촉매성 세린으로부터 억제제가 자발적으로 분리되는 속도는 효소 및 유기인 화합물의 유형에 따라 다르지만, 유기인산 독성물질과 상호작용하는 B-에스테라제의 경우는 일반적으로 그 속도가 매우 느리기 때문에 외부 친핵체(옥심 재활성화제)가 필요한 것이다[10,11]. 유사촉매 바이오스캐빈저의 경우, 그 구성성분이 통상 혈액 내에 존재하며(간간혈청의 BChE 및 적혈구의 AChE), AChE는 모든 유형의 유기인산 독성물질을 신속하게 유리시킨다는 장점을 갖고 있다[12]. 뿐만 아니라, 옥심이 말초 신경 조직 및 일부의 경우 중추신경계에까지 도달하여 억제된 AChE를 다시 활성화 할 수 있다는 점 또한 큰 장점이다[13-15]. 반면, 현재 이용 가능한 옥심 재활성화제가 갖는 단점들은 다음과 같다. 이들은 소수의 유기인산 독성물질에서만 특이성을 나타내고[16], 유기인 화합물-콜린에스테라제 결합의 빠른 노화(aging)에 따라 효과가 없으며, 이러한 특성 때문에 소만과 같은 독성물질에 대해서는 크게 억제력이 없다. 인체 내 순환 체류 시간이 짧은 뿐더러 독성물질 노출이 계속되는 경우에는 주기적인 보충이 필요하다. 현재까지 밝혀진 옥심매개 재활성화(oxime-mediated reactivation)에 의한 독성물질 가수분해 속도는 $k_2 = 9.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ 정도가 가장 빠르는데, 독성물질 중독을 효율적으로 방지하기 위해 필요한 가수분해 속도에 비해서는 100~1,000배 정도 느리다[17]. 이러한 점들로 인해 유사촉매 바이오스캐빈저는 효과적인 예방을 위한 치료물질로서 사용되기에는 한계가 있다.

결국 독성물질 중독을 예방하는 가장 효과적인 방법은 여러 종류의 독성물질을 고효율로 분해할 수 있는 촉매성 바이오스캐빈저를 사용하는 것이다. 통상적으로 적은 효소용량(< 1 mg/kg)을 사용하여 충분한 효과를 보기 위한 이론적 모델은 촉매성 바이오스캐빈저가 독성물질에 대해 $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ 이상의 촉매 효율(k_{cat}/K_M)을 갖는 경우로

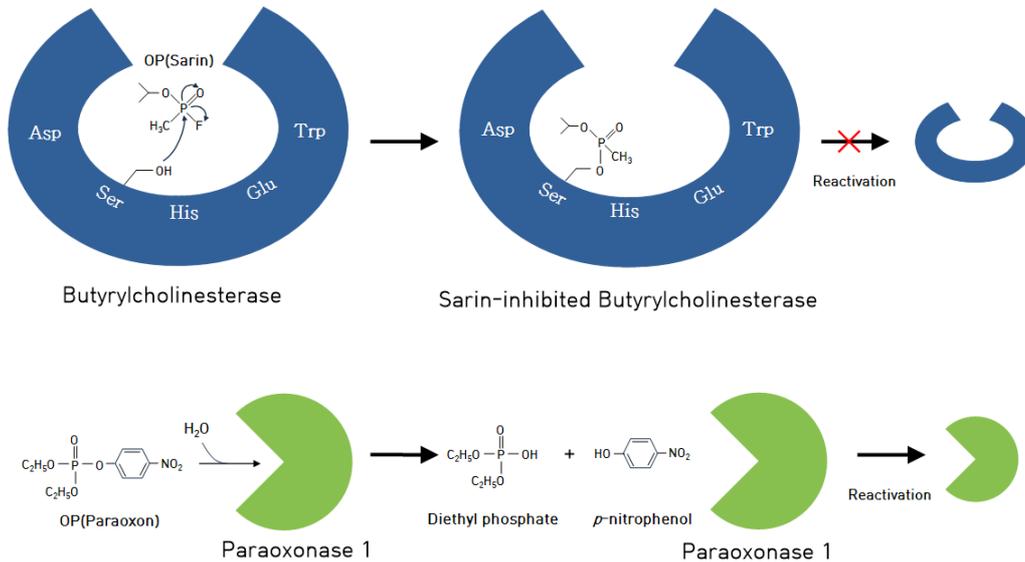


Figure 4. Comparison between stoichiometric and catalytic bioscavengers upon their detoxifying mechanism of organophosphorus compounds.

알려져 있다[18]. 독성물질은 유기인 화합물 가수분해 효소에 대한 비선택적 기질로서 작용하고 낮은 촉매 효율로 가수분해 되는 외인성(exogenous) 화합물이며[19], 지금까지 분리된 대부분의 유기인산 가수분해 효소는 독성 효소보다 독성물질의 저독성 이성질체에 더 효율적으로 결합하고 불활성화하는 경향이 있다[20]. 따라서 독성물질에 대한 천연 효소의 활성 및 선택성을 모두 향상시킴으로써 효과적인 치료물질로 사용될 수 있는 촉매성 바이오스캐빈저를 개발하기 위해 분자 진화(molecular evolution)와 단백질 공학 기술(protein engineering techniques)이 사용되어 왔다[21]. 우리는 여기서 촉매성 바이오스캐빈저의 후보 단백질들과, 그 단백질들의 활동 및 독성물질 가수분해 기능을 높이기 위해 개발하고 있는 단백질 효소에 대해서 논의하고자 한다.

2. 본 론

2.1. 화학량론적 바이오스캐빈저

화학량론적 바이오스캐빈저 중에서도 B-에스테라제는 유기인 계열 독성물질과의 결합력이 우수하고 가수분해 효율이 높으면서도 활성 능력을 잘 유지한다. 카르복실 에스테라제(CaE), 아세틸콜린 에스테라제(AChE), 부티릴콜린 에스테라제(BChE)가 B-에스테라제의 대표 효소들이며, 각각의 변이체 생산 및 단백질 공학 기술을 적용하여 촉매성 바이오스캐빈저로의 전환을 시도하였다.

2.1.1. 카르복실 에스테라제(carboxylesterase, CaE)

CaE는 카르복실산 에스테르를 알코올 및 카르복실산으로 가수분해하는 유비쿼터스(ubiquitous) 에스테라제 계열이다(Table 1)[22,23]. 사람이 보유하고 있는 5가지 CaE 중에서도 간, 대식세포 및 폐 상피에 주로 존재하는 카르복실 에스테라제1(hCE1)과 소장, 신장, 심장 및 골격근에서 특히 발현되는 장 카르복실 에스테라제(hiCE)가 가장 활발히 연구되고 있다. hiCE의 경우 HuAChE에 비해 활성 부위의 포켓(active-site pocket)이 훨씬 크기 때문에 크기가 더 큰 기질에도 결합할 수 있다[24]. CaE는 에스테르를 가수분해하는 데 있어 3개의 아미노산(Ser221, Glu353, His 464)을 사용하는 것으로 알려져 있다[25]. CaE

는 콜린계 에스테라제의 촉매 부위에 보존된 트립토판 잔기(tryptophan residue)를 갖고 있지 않기 때문에[26], 독성물질에 의해 억제된 CaE의 재활성화 속도를 증가시키기 위한 실험에서 하전된(charged) 유기인 화합물 및 옥심 재활성화제와는 잘 반응하지 않고 하전되지 않은(un-charged) 화합물과 훨씬 더 잘 반응했음이 확인됐다[27]. 하지만, 하전되지 않은 옥심과의 반응조차도 충분한 재활성화 속도를 보이지는 못함으로써 CaE 자체가 갖는 촉매성 바이오스캐빈저로서의 활용 가능성은 낮아보였다.

이러한 한계를 극복하기 위해 두 가지의 방식으로 돌연변이체(mutants)를 설계하였는데, 첫 번째는 *L. cuprina*로부터 추출한 E3 CaE의 G137D 돌연변이체로부터 아이디어를 얻어[28] hCE1의 활성부위에서 2개의 아미노산을 치환함으로써 얻은 돌연변이체이고, 두 번째는 *Bacillus subtilis*로부터 얻은 *p*-nitrobenzylesterase (pNBE)의 돌연변이체를 hCE1로 치환하여 재활성화 속도를 높이려고 노력했다. 먼저, hCE1의 2개의 활성 아미노산 부위를 치환하는데 있어 물 분자를 유기인 화합물이 결합하는 Ser221 잔기 주변에 위치시킴으로써 활성 부위의 재활성화 촉진을 시도했다. V146H/L363E hCE1 돌연변이체의 경우 활성 부위 포켓의 반대편에 있는 2개의 소수성 잔기가 하전된 상태로 대체됨으로써 독성물질에 대한 친화성을 감소시키지 않으면서 효소의 재활성화 속도를 증가시킬 수 있었다[29]. 결과적으로, V146H/L363E hCE1는 wild type (wt) hCE1에 비해 사린, 소만, 사이클로 사린에 노출 후 재활성화 속도가 각각 5, 20, 33,000배까지 증가하였고, 반감기 시간(half-time)은 각각 9.5, 11.5 및 1.2 h로 감소하였다[29]. 하지만, 효과적인 촉매성 바이오스캐빈저로 활용되기 위해서는 재활성화 속도를 약 1,000배 이상 높여야 했기 때문에 여전히 한계에 부딪혔다.

두 번째로는 *Bacillus subtilis*의 hCE1의 구조적 동족체(structural homolog)인 pNBE를 사용하여 돌연변이체를 생성하였는데, pNBE는 박테리아 세포에서 조작 및 발현하기 쉬운 박테리아 효소라는 점에서 HuAChE, HuBChE, hCE1와는 차별화된다[30]. 자발적으로 재활성화를 촉진하도록 설계된 돌연변이(A107H)에 pNBE의 활성 세린 인근 5개의 잔기를 표적화 및 치환함으로써 다수의 pNBE 돌연변이체를 생성하였다[31]. 소만에 대해 재활성화 속도를 4,000배가량 개선시킨 pNBE 돌연변이체(A107H/A190C)를 식별했으나, hCE1로 해당 돌연

Table 1. Catalytic Bioscavengers and Their Strategy for Improvement of Hydrolysis Efficiency on Toxic Organophosphorus Chemicals

Catalytic bioscavengers	Molecular weight	Structure and length	Characteristics	Methods	References
hCE1 (EC 3.1.1.1)	180 kDa	α/β fold, 566-568 amino acids	Serin hydrolase	Active site mutagenesis	[24,29]
AChE (EC 3.1.1.7)	70 kDa	α/β fold, 531 amino acids	Serin hydrolase	PEGylated site-specific mutagenesis, post-exposure treatment with an HI-6 oxime	[44,45,123]
BChE (EC 3.1.1.8)	85 kDa	α/β fold, 574 amino acids	Serin hydrolase	Active site mutagenesis	[31,124]
PON1 (EC 3.1.8.1)	40 kDa	6-bladed β propeller, 355 amino acids	Ca ²⁺ -dependent Hydrolase	Directed evolution	[66,67]
PTE (EC 3.1.8.1)	39 kDa	(α/β) ₈ TIM-barrel, 365 amino acids	Zn ²⁺ -dependent Hydrolase	Directed evolution, computational design techniques	[80,125]
OpdA (EC 3.1.8.1)	35 kDa	(α/β) ₈ TIM-barrel, 384 amino acids	Binuclear metallohydrolase	Directed evolution	[99,126]
DFPase (EC 3.1.8.2)	35 kDa	6-bladed β -propeller, 314 amino acids	Ca ²⁺ -dependent hydrolase	Site-directed mutagenesis, X-ray and neutron scattering, PEGylation	[100,103]
SMP30 (EC 3.1.8.2)	33 kDa	6-bladed β -propeller, 299 amino acids	Mg ²⁺ , Mn ²⁺ , Co ²⁺ -dependent hydrolase	Expression using chaperones in <i>E. coli</i>	[107,127]
OPAA (EC 3.1.8.2)	59 kDa	Pita bread fold of two domains, 517 amino acids	Mn ²⁺ -dependent bimetallohydrolase	Encapsulation in stabilized liposomes, encapsulation in meta-organic frameworks, site-specific mutagenesis	[112,113,128]
HuProlidase (EC 3.4.13.9)	54 kDa	Pita bread fold of two domains, 493 amino acids	Mn ²⁺ -dependent Bi-metallic dipeptidase	Directed evolution, computational design techniques	[117,129]
MPH (EC 3.1.8.1)	35 kDa	$\alpha/\beta/\alpha$ sandwich, (metallo-hydrolase/oxidoreductase fold) 331 amino acids	Zn ²⁺ -dependent aryldialkylphosphatase	Directed evolution	[120,130]

변이체를 치환하였을 때에는 동일한 효과를 얻지 못했다.

가장 최근 수행된 연구에서는, 어류의 한 종류인 *Sparus aurata*의 간에서 추출한 CaE (hepatic CaE)가 뇌의 AChE보다도 유기인 화합물과의 결합력이 우수하며, 특히 항아세틸콜린 에스테라제(anti-acetylcholinesterases) 계열의 독성물질에 대한 효율이 높다는 것이 밝혀졌다. Hepatic CaE에 대해서는 다양한 유기인 계열 독성물질에 대한 가수분해 효율 측정 및 단백질 공학 기법을 통해 해당 효소의 유용성을 평가하는 것이 우선되어야 할 것이다[32].

2.1.2. 아세틸콜린 에스테라제(acetylcholinesterase, AChE)

AChE는 신경전달물질 아세틸콜린을 가수분해하여 콜린성 시냅스에서 신경 자극의 전달을 종료시키는 세린 가수분해 효소(serine hydrolase)이다(Table 1)[33]. AChE 및 BChE는 $\sim 10^7$ M⁻¹min⁻¹의 이분자 속도 상수(k₂)로 독성물질에 신속하게 결합하지만, 느린 속도로 자발적인 재활성화를 거치거나 효소-독성물질 복합체가 노화됨에 따라 영구적으로 불활성화된다. 독성물질의 가수분해 효율에 대해 여러 포유류의 AChE를 실험한 결과, 사람의 AChE가 가장 효율이 높은 것으로 나타났다[34,35].

AChE는 독성물질의 생리적 표적이기 때문에 특정 아미노산의 치환을 통해 AChE가 유기인 화합물과 결합 후 재활성화를 촉진할 수 있도록 하기 위한 많은 노력이 있어왔다. 여러 곤충 중에서 돌연변이된 형태의 AChE가 유기인 농약 독성에 저항성을 보였으나, 이들 돌연변이체는 결합된 유기인 화합물의 가수분해를 촉진시키는 것이 아니라 돌연변이된 AChE 활성 부위에 대한 유기인 화합물의 결합을 감소 시킴으로써 작용하는 것으로 확인되었다[36,37]. 효소의 자발적 재활

성화 속도를 증가시키기 위해 다양한 출처의 AChE를 재조합(recombination)하고 부위-지정(site-directed) 돌연변이 및 부위-특이적(site-specific) 돌연변이를 활용하여 실험한 결과, 부위-특이적 돌연변이의 경우 독성물질에 노출 후 AChE의 옥심-매개 재활성화 효율이 현저하게 개선되고 노화 속도를 감소시키는 것으로 밝혀졌다[38-40]. 그 중에서도 특히 W286A 돌연변이의 경우 비스피리듐 옥심의 친핵체로서의 역할을 극대화함으로써 wt AChE에 비해 타분에 대한 재활성화 속도가 2~5배 정도 향상되었으며 이 때 모노옥심(mono-oximes)인 K203과 비스옥심(bis-oximes)인 K075, 두 가지의 비스피리듐 옥심(bispyridium oximes)에 의한 효율이 가장 높았다[41].

소만에 대해서는 Y337A/F338A-HuAChE 돌연변이가 가장 높은 가수분해 효율을 보였으며, 이를 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol, PEG)로 전처리(PEGylated)하고 HI-6 옥심으로 후처리 한 경우, 쥐는 고용량의 소만에 의한 2번의 순차적 중독에서도 생존하는 것으로 나타났다[42-44]. Y337A/F338A-HuAChE 돌연변이를 다수의 독성물질에 대해서도 효율을 높이기 위해 타분을 활용하여 추가 연구하였고, 이 연구에서는 재활성제로서 가장 적합한 옥심을 선별해내는 실험이 시도되었다. 시험된 새로운 옥심 중에는 2-PAM보다 긴 알킬 사슬(alkyl chain)을 갖고 있는 hexyl 2-PAM이 재활성제로 사용되었을 경우, Y337A/F338A-HuAChE가 타분에 대해 높은 효율을 가질 수 있었다[45].

이렇게 옥심과 결합된 AChE는 일부 독성물질에 최적화된 촉매성 바이오스캐빈저로서 치료물질을 추가적으로 개발하는 데 발판을 마련해주었다. 그러나 이러한 종류의 치료는 여전히 고용량의 바이오스캐빈저를 사용해야 한다는 점과 특정 옥심-AChE 돌연변이체 조합에

의존한다는 점에서 한계가 있다.

2.1.3. 부티릴콜린 에스테라제(butyrylcholinesterase, BChE)

BChE는 사람의 혈장, 간, 피부 및 다리 근육에서 주로 발견되는 세린 가수분해 효소로, 성인의 경우 AChE보다 훨씬 더 많은 BChE를 보유하고 있는 것으로 추정된다[46]. BChE의 생리학적 역할은 아직 정확하게 밝혀지지 않았으나, 일반적으로 AChE를 불활성화하고 이를 보호하도록 작용할 수 있는 해독 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 [47], 특정한 경우에는 AChE를 대체하고 음식 섭취를 조절하는 호르몬 그렐린(ghrelin)을 조절할 수 있는 것으로 밝혀졌다[48]. BChE의 활성은 Ser198, Glu325 및 His438에 의존하고, Ser198이 유기인 화합물에 결합되면 억제된다[49].

BChE의 경우 200 mg 정도의 용량이 투여되어야 $2 \times LD_{50}$ 의 소만에 대해 인체를 보호할 수 있다[50]. BChE의 자발적 재활성화 속도를 증가시키기 위해 여러 돌연변이체를 설계했는데, 그중 하나인 BChE-G117H는 wt BChE보다 사린 및 VX에 대해 각각 1,000배 및 7,900배 정도 저항력이 강했고, 탈인산화 속도(dephosphorylation rates)는 각각 100 및 2,000배 더 높았다[32]. 이 연구에서는 BChE의 재활성화 속도를 높이기 위해 노화에 주역할을 하는 Glu197을 돌연변이 시킴으로써 전하를 제거했다. 실제로, 단일 G117H 돌연변이체와는 달리, 2중 돌연변이체 BChE-G117H/E197Q는 소만에 의한 억제 후 촉매 활성을 자발적으로 재생시킬 수 있었다. 해당 돌연변이체를 사린 및 VX에 대해 재활성화 속도를 개선하였으나, 독성물질 가수분해의 전체 속도는 여전히 촉매성 바이오스캐빈저로 활용되기에는 충분하지 않았다[32].

또한, 고용량의 BChE의 사용은 비용 면에서 부담이 크기 때문에 BChE의 대량 생산에 초점을 두고 재조합 BChE를 생산했지만, 이는 wt BChE와 비교했을 때 혈장 반감기가 훨씬 짧았다. 반감기 연장을 위한 노력으로 재조합 BChE를 AChE와 마찬가지로 PEGylated 하던 기니피그에 $2 \times LD_{50}$ 의 소만을 주사한 후 2 h가 지난 뒤에 72 mg/kg의 PEGylated 재조합 BChE를 투여한 경우 최소한의 중독 징후 및 생존율 100%의 효과를 거둘 수 있었다. 옥심을 통한 재활성화에 대해서는 효소의 노화를 늦출 수는 있었지만 노화 자체를 방지할 수는 없었다[50].

최근 연구에서는 촉매 부위로부터 멀리 떨어져 있는 47잔기의 아미노산 치환을 통해 얻은 BChE 돌연변이체(BChE-M47)를 성공적으로 대장균에서 발현시킬 수 있었는데, 이에 E377C/A516C를 추가 도입하여 얻어진 BChE-M48의 경우에는 특히 37 °C에서 거의 일주일의 반감기를 가지므로써 고도로 안정된 바이오스캐빈저로서 활용될 수 있음을 보여주었다[51].

결론적으로, 앞서 언급된 에스테라제들은 독성물질과의 결합력이 우수하며, 독성물질을 1차적으로 방어하는 이상적인 생리학적 위치를 갖는 내인성(endogenous) 단백질이다. 단백질 공학 기술 및 부위-지정 돌연변이 유발 방법을 통해 반감기를 늘리는 데에는 어느 정도 성과를 거두었으나, 이들 단백질의 변이체를 자체적으로 또는 화학적 재활성화제와 조합하여 높은 촉매 효율 속도($k_{cat}/K_M \geq 1 \times 10^7 M^{-1}min^{-1}$)로 독성물질을 가수분해시키는 데는 아직 추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다.

2.2. 천연 유기인산 가수분해 효소

사람, 박테리아, 해조류 등으로부터 발견된 천연 유기인산 가수분해 효소들은 인공 제노바이오틱(xenobiotic) 독성물질에 대해서는 높은

촉매 효율을 나타내지 않을 것이라는 인식이 확대된 가운데, 유도 진화(directed evolution) 및 전산 설계 방법(computational design)의 진보는 이러한 천연 효소들을 재설계함으로써 그 촉매 효율을 상당히 향상시키는 데 많은 기여를 해오고 있다. 이번 장에서는 천연 효소들을 어떻게 재설계하였고, 또 그로 인해 어느 정도의 촉매 효율 향상이 이루어졌는지에 대하여 다뤄보겠다.

2.2.1. 파라옥소나제1(paraoxonase 1, PON1)

PON1은 칼슘 의존성 가수분해 효소(Ca^{2+} -dependent hydrolase)이며 사람의 PON1 (HuPON1)의 경우 간에서 합성되는 당단백질(glycoprotein)로 혈액 내에서 산화된 인지질(phospholipids) 및 콜레스테릴 리놀레이트(cholesteryl linoleates) 수산화물을 가수분해함으로써 저밀도 지단백질(low density lipoprotein, LDL) 및 고밀도 지단백질(high density lipoprotein, HDL)의 산화를 예방하고, 이러한 역할 덕분에 죽상동맥 경화증(atherosclerosis) 및 심혈관 질환의 예방에 중요한 단백질로 알려져 있다(Table 1)[52-54]. HuPON1는 넓은 스펙트럼의 에스테르, 인지질 및 유기인산을 가수분해 할 수 있고 특히 락톤(lactone)을 가장 효과적으로 분해한다[55].

유기인산 살충제에 대해 동물들의 반응 민감성이 상이한데, 이는 혈장 PON1의 활성과 관련이 있는 것으로 밝혀졌다[56]. 살충제에 의해 노출된 후 PON1을 주입하거나 PON1-knockout된 쥐에게 PON1을 주입하는 실험 및 그 결과를 통해 PON1이 유기인산 살충제로부터 생체 내 보호를 제공한다는 것이 확인되었다[55].

인체 내에서 HuPON1의 유기인 화합물 가수분해 활동과 유기인 화합물 독성에 대한 반응 민감성 간의 연관성을 밝혀내는 것은 PON1 유전자 다형체(genetic polymorphs)와 개체 간 발현 수준의 차이 및 유기인 화합물의 인체 내 대사 능력의 차이와 더불어 연령, 성별, 건강 상태 등의 요인들로 인해 상당히 복잡한 문제이다[57]. 그럼에도, PON1의 활동 수준이 낮은 사람이 유기인 화합물에 노출 시 인체에 위험요소로 작용한다는 충분한 근거가 있다는 점에서 PON1에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

PON1은 혈액 내 풍부한 단백질이자 사린, 소만, 타분 및 VX와 같은 다양한 유기인산 독성물질 및 살충제를 가수분해 할 수 있다는 점 [58-60]에서 촉매성 바이오스캐빈저에 적합한 후보로 떠올랐다. $1.2 \times LC_{50}$ 의 사린 또는 소만에 중독 시킨 기니피그에 사람 및 토끼의 PON1, 또는 기타 포유동물의 PON1을 재조합한 효소를 정제하여 투여하였을 때 기니피그의 생존 및 회복율이 크게 향상되는 것이 실험을 통해 확인되었다(Table 2)[61,62]. 정제된 PON1을 독성물질 중독 이전에 투여 시 생존율이 20%에서 75%까지 향상되었으며 중독 이후에도 혈액 및 뇌에서의 AChE 활동을 보호할 수 있었다. 그러나 더 높은 용량($2 \times LD_{50}$)의 사린, 소만, 사이클로 사린 또는 타분에 노출된 기니피그의 경우에는 재조합 PON1의 양을 늘려도 예방적인 치료의 효과가 없었다. 동일한 실험에서, 다른 동물들의 경우 $4 \times LD_{50}$ 용량의 클로르피리포스 옥손(chlorpyrifos oxon) 또는 $2 \times LD_{50}$ 용량의 다이아존(diazoxon)에서도 살아남을 수 있었는데[63], 이는 PON1을 효과적인 바이오스캐빈저로서 활용하기 위해서는 혈중 농도가 아니라 유기인 화합물과의 촉매 효율을 향상시키는 것이 중요하다는 점을 시사한다.

이에 향상된 유기인 화합물 가수분해 능력을 갖추고 동시에 인체 내 효과적으로 발현될 수 있는 HuPON1을 얻기 위해 유도 진화 및 전산 설계 방법이 사용되었다. 유도 진화 및 전산 설계 방법은 유전자 조작(유전자 돌연변이 유발과 같은), 단백질 변이체(variants)의 발현 및 변이체들의 촉매 효율에 대한 검사의 단계로 진행된다. 위의 방법을 통

Table 2. Recent Research Trend on Catalytic Bioscavenger as a Post Prevention and Treatment on Toxic Organophosphorus Chemicals[131]

Toxic OPs	Exposure route	OPs dose	Bioscavengers	Protein dose	Timing (min)	Animal	% survival	Intoxication symptoms	Experiment length (days)
GB	Inhalation	1.2 × LC ₅₀ (846 mg/m ³)	HuPON1	4	-30	Guinea pigs	67%	Light	1
GD	Inhalation	1.2 × LC ₅₀ (841 mg/m ³)	HuPON1	4	-30	Guinea pigs	75%	Light	1
GB	Inhalation	1.2 × LC ₅₀ (846 mg/m ³)	RPON1	2	-30	Guinea pigs	73%	Light	1
GD	Inhalation	1.2 × LC ₅₀ (841 mg/m ³)	RPON1	2	-30	Guinea pigs	71%	Light	1
Sp-CMP-Coumarin	i.v.	2 × LD ₅₀	rePON1(4E9)	2.2 / 1.1	-60	Mice	63% / 45%	Light/Moderate	14
GF	s.c.	2 × LD ₅₀	rePON1(IIG1)	1 / 0.2	-60	Guinea pigs	100%	Light/Moderate	0.125
GA, GB, GD, GF	s.c.	5 × LD ₅₀	rePON1(I-F11)	0.3~12	ND	Mice	90~100%	Light	4
VX	s.c.	2 × LD ₅₀	rePTE(C23)	5 / 2	+5 / 15	Guinea pigs	100%	Light/ Moderate-sever	0.125
VX	s.c.	2 × LD ₅₀	rePTE(C23AL)	1 / 2	+5	Guinea pigs	100%	Sever	0.125
GD	s.c.	3 × LD ₅₀	DFPase	71	-5	Rats	50%	Sever	> 1
GD	s.c.	3 × LD ₅₀	DFPase-Mut	35.8	-5	Rats	100%	Light	> 1
GB	s.c.	1/2 × LD ₅₀	Human liver prolidase	ND	ND	Mice	50% / 0%	ND	1
GD	s.c.	1/2 × LD ₅₀	Human liver prolidase	ND	ND	Mice	0% / 0%	ND	1
GF	s.c.	1/2 × LD ₅₀	Human liver prolidase	ND	ND	Mice	33% / 0%	ND	1

*ND - Not determined, *i.v. - Intravenous injection, *s.c. - Subcutaneous injection.

해 네 종류의 포유동물 PON1 유전자의 유전자 셔플링(gene-shuffling) 후 재조합 PON1 변이체를 선별함으로써 HuPON1의 수율을 높일 수 있었다. 이렇게 생성된 단백질(rePON1)은 대장균에서 높은 수율로 발현되었고 HuPON1과는 유사한 촉매 특성을 나타냈다[64,65]. 유도 진화 및 전산 설계 방법으로 여러 차례의 돌연변이 및 스크리닝 작업을 거쳐, rePON1에 비해 사이클로 사린 가수분해 능력이 135배 개선된 rePON1 변이체(4E9)를 얻을 수 있었다(Table 3)[66]. 2 × LD₅₀ 용량의 사이클로 사린 유사(Sp-CMP-coumarin) 독성물질로 쥐를 중독 시키기 1 h 전, 저용량(1.1 mg/kg)의 정제된 4E9를 예방 차원에서 투여했을 때, 증상이 최소화되고 생존율을 50%까지 증진시킬 수 있었다. 대조군으로 wt rePON1를 투여하였을 때에는 쥐가 생존하지 못했으며, 중독 5 min 전 표준 화학해독제인 Atropine plus 2-PAM를 투여하였을 때에는 일시적으로만 생존할 수 있었다.

추가적인 유도 진화 방법을 통해 얻은 rePON1은 모든 G계열 유기인 독성물질(사린, 소만, 사이클로 사린 및 타분)과의 촉매 효율이 개선되었다[67,68]. G계열 독성물질에 비해 가수분해가 어려운 V계열 유기인 독성물질에 대해서도 가수분해 효율을 높이기 위해 유도 진화 및 계산 설계 방법을 사용하여 rePON1 변이체를 진화시키고자 노력했으나, 촉매성 바이오스캐빈저에 요구되는 만큼의 충분한 효율을 얻지 못했다(rePON1 변이체의 최고 촉매 효율: $k_{cat}/K_M \sim 10^5 M^{-1}min^{-1}$).

사후 치료제로서의 효용성을 확인하기 위해 파라티온(parathion)과 파라옥손 살충제를 효율적으로 가수분해하는 rePON1 변이체를 사용해 실험하였다. 이 연구에서는 2 mg/kg 용량에서 중독된 지 1 min이 지난 쥐의 경우에도 글루타메이트-옥살로아세트아미나제 (glutamate-oxaloacetate transaminase, GOT) 효소가 개선된 rePON1 변이체와 함께 투여될 경우 1.4 × LD₅₀ 용량의 파라옥손에서도 생존할

수 있음을 확인하였다[69]. 글루타메이트(Glu) 및 옥살로아세트아미나제(OxAc)를 2-케토글루타레이트(2-ketoglutarate) 및 아스팔테이트(aspartate)로 전환시키는 GOT1은 혈액 및 뇌에서 흥분성 신경 전달물질이자 신경 조직의 손상 및 여러 뇌질환과 직결되는 Glu 농도를 빠르게 낮추기 위한 촉매성 Glu 바이오스캐빈저로서 사용될 수 있다. 사람의 GOT1과 OxAc를 동시에 투여하였을 때, 유기인 화합물 중독에 대해 뉴런이 효과적으로 보호되는 것으로 나타났다[70-72].

아데노바이러스(adenovirus)를 통한 HuPON1의 발현은 클로르피리포스 옥손 및 다이아족손에 의한 중독을 예방하고[71,73-75] 뇌 전체의 AChE 활성을 유지하는 것으로 밝혀졌다. 유도 진화된 rePON1 변이체(VII-D11, I-F11)를 아데노바이러스 벡터로 클로닝(cloning) 한 후 쥐에 투여하였을 때, 해당 쥐는 6.3 × LD₅₀ 용량의 파라옥손이나 5 × LD₅₀의 용량의 사린, 소만, 사이클로 사린 또는 타분을 4회 반복 투여한 경우에도 완벽하게 보호되었다[76]. 발현된 rePON1 변이체는 wt PON1과 같이 감염된 동물의 혈액에서 HDL과 관련이 있는 것으로 밝혀졌으며, 혈장에서 6~7 day 동안 고농도(최대 4.1 mg/mL)로 유지되었다.

높은 촉매 효율, 생체 내 적절한 농도, 유기인산 독성물질에 노출된 후의 생존율 등 효과적인 바이오스캐빈저로서 갖추어야 할 구비조건들에 있어, HuPON1 자체로서는 충분히 그 조건들을 충족시키지 못했다[18,63,77,78]. 그러나 유도 진화 및 전산 설계 방법을 거쳐 얻어진 rePON1의 변이체는 HuPON1의 한계를 극복하고 G계열 유기인 독성물질에 대한 촉매성 바이오스캐빈저로서 좋은 후보가 될 수 있을 것이다.

2.2.2. 포스포트리에스테라제(phosphotriesterase, PTE)

PTE는 파라티온 살충제를 가수분해한 토양 박테리아에서 처음으로 발견된 박테리아 효소이다(Table 1)[79,80]. 유기인산 살충제는 토양

Table 3. Bioscavengers Catalytic Efficiency of Wild Type and the Most Improved Variants[131]

Enzyme	Variant name	GA	GB	GD-f	GD-s	GF	VX
PON1	wt	0.043	0.008	0.0055	0.0015	0.013	$< 2 \times 10^{-7}$
PON1	4E9	ND	0.03 (4×)	0.74 (135×)	0.058 (39×)	1.75 (135×)	8×10^{-6} ($> 40\times$)
PON1	IIG1	0.23 (5×)	0.32 (40×)	5.1 (927×)	5.1 (3400×)	3.4 (262×)	ND
PTE	wt	69	0.82	0.1	0.01	0.005	0.001
PTE	YT	ND	12 (15×)	3 (30×)	3 (300×)	4.8 (960×)	ND
PTE	C23	15.8 (0.2×)	14.8 (18×)	0.83 (8.3×)	0.83 (83×)	0.46 (92×)	0.5 (500)
PTE	d1-IV	ND	ND	0.38 (3.8×)	0.11 (11×)	0.15 (30×)	0.35 (350×)
PTE	10-1-D11	12.6 (0.2×)	5.5 (6.7×)	0.07 (0.7×)	0.07 (7×)	0.32 (64×)	5.1 (5,100×)
DFPase	wt	ND	0.25	ND	ND	0.1	ND
DFPase	Mut1	ND	1.4 (6×)	ND	ND	2.9 (29×)	ND
OPAA	wt	ND	ND	ND	ND	ND	ND
OPAA	FLYD	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Prolidase	wt	ND	8×10^{-3}	2×10^{-3}	3×10^{-3}	3×10^{-3}	ND

*Attributed to the two toxic isomers of GD: S_pR_c and S_pR_c; f - fast, s - slow; *ND - Not determined.

박테리아의 세포 내로 유입된 후 인산과 같은 더 단순한 분자로 분해됨으로써 박테리아의 성장 및 에너지에 필요한 인을 공급한다. 박테리아의 세포 내에서 살충제를 분해하는 PTE는 본연의 특성 때문에 유기인산 독성물질 해독을 위한 잠재적 효소로 인식되었다[81-83]. PTE는 유기인산 화합물과 대체로 높은 촉매 효율을 가짐에도 불구하고, 유기인산 계열의 작용제에 대해서는 그 효율이 낮다는 조사가 있다. 정제된 PTE는 소만 및 사이클로 사린 가수분해의 경우 중간 정도의 효율을 보였지만[84] VX에 대해서는 효율이 훨씬 낮았으며[85], 파라옥손에 대한 가수분해 효율과 비교했을 때에도 작용제에 대한 가수분해 효율은 현저히 낮은 수준이었다(Table 3)[83]. 따라서 PTE를 기반으로 한 효율적이고 넓은 스펙트럼을 갖는 촉매성 바이오스캐빈저를 개발하기 위해 유도 진화 및 전산 설계 방법의 적용이 필요했다.

유기인산 독성물질 가수분해 효율을 높인 PTE 변이체를 진화시키는 작업에 있어, PTE를 발현하는 *opd* 유전자를 발현 플라스미드로 클로닝하여 대장균 세포로 형질 전환시켰다. 또 다른 방식으로는 *Escherichia coli* (*E. Coli*)에서 PTE의 발현 수준을 초기 단계로 개선하기 위해 유도 진화 방법을 사용하였다[86,87]. DNA 서플링[88], 무작위 돌연변이[89], 부위-특이적 돌연변이[90], 전산 설계[21] 등과 더불어 언급된 방법들의 조합을 통해 PTE 돌연변이체의 라이브러리(library)를 생성하기 위해 PTE의 결정 구조와 촉매 시스템 분석에 노력을 기울였다[91]. 다양한 방식으로 활성에 대해 측정함으로써 여러 PTE 변이체를 생산할 수 있었고, 그 중 일부는 충분한 촉매 효율로 G- 및 V-형 독성물질의 독성 이성질체를 가수분해 할 수 있는 변이체로 개선하여 예방 차원의 활용을 도모했다[21,91].

PTE가 현재까지 발견된 가장 효율적이고 자연적인 유기인산 가수분해 효소이긴 하지만 효과적인 촉매성 바이오스캐빈저 역할을 수행하기 위해서는 유기인산 독성물질과의 가수분해 활성을 증가시켜야 했다. 유도 진화 및 전산 설계 방법을 통해 보다 효율이 개선된 PTE 변이체(10-1-D11, Table 3)를 얻을 수 있었고, 사후치료제로 활용 시에도 생존 및 회복을 촉진하는데 이 변이체가 성공적으로 사용되었다. 또한, PTE 변이체를 유기인산 독성물질에 중독된 기니피그에 투여하기 위해 골내 주사(intradermal injection)의 방식을 채택한 결과, VX에 의한 사망 및 전신 독성을 예방하고 혈액에서 VX의 농도를 급격히

감소시키며 뇌의 AChE 활성을 부분적으로 보존할 수 있음이 확인되었다. 이는 독성물질에 중독 시 가장 안전하고 신속하게 혈액 내로 치료물질의 투여가 가능하게 함으로써, PTE 변이체의 사후 치료제로서의 활용성에 대한 기대감을 높여주었다[92].

2.2.3. 포스포트리에스테라제 상동체(PTE homologs)

PTE보다 20개의 아미노산을 더 보유하면서 아미노산 서열에 있어 PTE와 90%의 동일성을 갖는 OpdA (organophosphate-degrading enzyme from *Agrobacterium*)는 호주의 *Agrobacterium radiobacter* P230이라는 토양 박테리아 균주로부터 분리되었다(Table 1)[93]. PTE와 유사하게 OpdA도 소만과 사이클로 사린의 독성 이성질체에 대해서는 적당한 효율로 가수분해가 가능했으나, V계열 유기인 독성물질에 대해서는 덜 효율적이었다. OpdA (0.15 mg/kg)는 $3 \times LD_{50}$ 용량의 디클로로보스(dichlorobos), 에틸파라티온(ethyl parathion), 메틸파라티온(methyl parathion)과 같은 살충제와의 실험에서 살충제 가수분해에 높은 촉매 효율을 보였다[94]. 디클로로보스에 중독 시킨 쥐의 경우 중독 직후 OpdA를 투여 시 24 h가 경과한 시점에서도 100%의 생존율을 보였고, 에틸파라티온의 경우에는 중독 직후나 10 min 후 OpdA를 투여해도 생존에 큰 영향을 미치지 않았다. 하지만 중독 후 45, 90 min이 지났을 때 반복하여 OpdA를 투여한 결과, 24 h가 경과한 시점에서 62.5%의 생존율을 보였다.

다수의 PTE 상동체는 유기인 화합물의 가수분해에 있어 그 효율이 상이하므로[95-98] 유기인산 독성물질에 대해 경제성과 생산성을 갖춘 효율적인 효소로의 개선이 필요했다. 이전 연구에서 파라옥손 가수분해 효율을 높인 *Sulfolobus solfataricus* (*Sulfolobus solfataricus*, Ssopox)가 선별되었고 사이클로 사린의 독성 이성질체에 대해 그 촉매 효율이 4배가량 개선되었다는 점을 바탕으로, 이 변이체의 유기인산 독성물질에 대한 활성 또한 향상시킬 수 있을 것이라 전망된다[99].

2.2.4. 디아이소프로필 플루오로포스파테이스(diisopropyl-fluorophosphatase, DFPase)

DFPase는 북대서양 오징어 *Loligo pealei* 및 유럽 오징어 *Loligo vulgaris*의 축삭으로부터 분리된 효소로서, 각각 사린과 유사한 DFP와

타분, 소만, 사린, 사이클로 사린을 가수분해할 수 있는 것으로 밝혀졌다(Table 1)[100]. wt DFPase는 독성물질의 저독성 이성질체에 대한 높은 선호도에도 불구하고, 사린 및 사이클로 사린에 대한 촉매 효율이 아주 높다(Table 3)[101].

DFPase에 대해 부위-지정 돌연변이와 X선 및 중성자 산란(neutron scattering)을 통해 가수분해 효율이 개선된 변이체를 생성하고, 이를 비활성 폴리머인 PEG와 접합하여 비인간 치료 약물에 대한 인체의 면역원성 특성(immunogenic properties)까지 개선하려는 연구가 시도되었다. 먼저, 부위-지정 돌연변이를 거친 S271A-DFPase는 wt DFPase에 비해 DFP에 대한 가수분해 효율이 30% 증가되었고[100], DFPase의 결정 구조를 바탕으로 X선 및 중성자 산란을 활용하여 설계한 4중 돌연변이체(Mut1, Table 3)도 DFP, 사린, 사이클로 사린에 대해 최대 29배의 가수분해 효율 증대 및 결합력 향상의 결과를 이루었다[101]. DFPase는 비포유류 단백질이기 때문에 포유동물의 면역원성으로 인해 혈액 내에서 제거될 확률이 높다. 따라서 혈액 내 단백질 반감기 시간을 늘리기 위한 방법으로 비활성 폴리머로 단백질을 변형시켜 면역원성 감소, 단백질 분해와 세포독성으로부터의 보호, 분자량 증가로 신장에서의 제거를 감소 등의 효과를 얻고자 했다[102,103]. 이 모든 과정을 거쳐 만들어진 PEGylated DFPase 변이체를 $3 \times LD_{50}$ 용량의 소만에 노출시키기 5 min 전 쥐에 투여한 결과, 무처리의 대조군은 중독 후 15 min 내에 사망한 반면 PEGylated DFPase 변이체를 주사한 쥐는 중독 후 24 h가 경과한 이후에도 생존하였다(Table 2)[103]. 본 연구에서 실험된 DFPase 돌연변이체는 사린 및 사이클로 사린의 독성 이성질체에 대해 높은 촉매 효율을 보이며 촉매성 바이오스캐빈저로서 잠재력이 충분함을 입증했다.

2.2.5. 노화마커 단백질-30(senescence marker protein-30, SMP30)

HuSMP-30은 간 및 신장 조직에서 주로 발견되며, 항 세포자멸(antiapoptotic) 및 항산화(antioxidant) 역할뿐만 아니라 Ca^{2+} 조절 및 뼈내장 발생·발달에 대해 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Table 1)[104]. SMP30은 사린, 소만, 타분, DFP 순으로 가수분해가 효율적이며, 소만의 경우에는 4가지 이성질체를 동일한 속도($\sim 2 \times 10^4 M^{-1}min^{-1}$)로 가수분해하는 것으로 보고되었다[105,106]. 재조합 HuSMP30을 대장균에서 발현시키는 데 성공함으로써[107], SMP30을 활용하여 보다 효율적인 촉매성 바이오스캐빈저를 개발하기 위한 유도 진화 및 전산 설계에 박차를 가할 수 있을 것이라 전망된다.

2.2.6. 유기인산 엔하이드릴라아제(organophosphate acid anhydrolase, OPAA)

OPAA는 미국 유타주 솔트레이크시티 근처에서 발견된 중중호염성(moderately-halophilic) 박테리아(*Aleromonas* Sp. 균주 JD6.5)에서 분리되었으며 여러 유기인 화합물에 대해 높은 수준의 효소 활성을 나타냈다(Table 1)[108]. OPAA는 C-말단(C-terminal)에서 2개의 Mn^{2+} 이온에 결합하여 DFP, 소만, 타분, 사린, 사이클로 사린, 파라옥손 및 GP(2,2-dimethylcyclopentyl methylphosphonofluoridate)의 가수분해를 촉진할 수 있으며, 최근에는 노비축에 대해서도 꽤 높은 활성을 보인다는 연구 결과가 있었다[109,110].

OPAA의 VX에 대한 가수분해 효율을 높이기 위한 방법으로 부위 특이적 돌연변이 방법이 사용되었다. 개선된 OPAA 3중 돌연변이체는 VX의 저독성 이성질체에 대해 촉매 효율이 36배까지 개선되었다(Table 3)[111]. 독성이 더 높은 VX의 이성질체를 가수분해할 수 있도록 추가적인 돌연변이 설계를 통해 만들어진 OPAA 4중 돌연변이체

는 그 촉매 효율이 16배 정도밖에 개선되지 못했지만, 두 가지 이성질체를 모두 가수분해할 수 있다는 데 의의가 크다.

한편, OPAA의 체내 안정성 확보를 위해 입체적으로 안정화된 리포솜(stabilized liposome, SL)에 OPAA를 캡슐화하였더니 혈액 내에서 상당히 안정적인 상태를 유지하면서도 높은 활성을 나타내는 것이 식별되었다[112]. OPAA를 개선시키고자 하는 연구는 이에 그치지 않고, 결정성이 높고 다공성의 특성을 가진 금속-유기 구조체(meta-organic frameworks, MOFs)에 300 nm의 크기로 OPAA를 캡슐화 함으로써 독성물질 가수분해 효율을 크게 개선했다[113].

결론적으로 OPAA는 유기인산 독성물질(소만, GP)을 가수분해할 때 촉매 효율이 매우 높을 수 있지만 저독성 이성질체에 대한 선호도 또한 높을 수 있다. OPAA의 촉매 효율을 개선하기 위한 앞으로의 연구 방향은 독성물질의 이성질체를 선호하고 가수분해 할 수 있는 개선 변이체를 선별하는 것이 될 것이다.

2.2.7. 프롤리다아제(prolidase)

사람의 프롤리다아제(HuProlidase)는 단백질 대사의 최종 단계에서 중요한 역할을 하며, C-말단에 프롤린(proline) 또는 하이드록시프롤린(hydroxyproline) 잔기를 함유하는 디펩티드의 가수분해, 특히 Gly-Pro 결합의 가수분해를 담당한다(Table 1)[114]. 사람의 간이나 대장균 세포로부터 정제된 재조합 reHuProlidase는 소만, 사린, 타분, 사이클로 사린 등의 독성물질을 가수분해할 수 있다고 보고되었다[106,115].

아데노바이러스 발현 벡터를 활용하여 reHuProlidase가 DFP 또는 유기인산 독성물질에 의한 중독으로부터 쥐를 어느 정도 보호할 수 있는지 확인하는 실험에서, 이 유전자는 쥐의 체내에서 높은 수준으로 발현되고 프롤리다아제의 혈액 내 양도 100~150배 증가되었음에도, $1 \times LD_{50}$ 용량의 DFP에 두 번 누적 노출된 쥐의 경우 사망시간이 겨우 4~8 h 정도 지연되었을 뿐이었다. 마찬가지로, $1 \times LD_{50}$ 용량의 사린, 소만 또는 사이클로 사린으로부터 쥐를 보호하는 데에도 실패했다(Table 2)[116,117].

동일하게 아데노바이러스 발현 벡터로 감염시킨 쥐에서 mouse BChE를 발현시킨 경우는 대조군에 비해 500~1,500배가량 높은 수준으로 BChE가 발현되었으며, 해당 쥐는 사린, 소만 및 사이클로 사린과의 동일한 실험에서 24 h 동안 생존할 수 있었다[117]. 이는 아데노바이러스 발현 벡터로 감염시킨 쥐의 혈중 reHuProlidase의 농도가 대조군에 비해 30배 정도밖에 높지 않았다는 점에 비추어보았을 때, 발현된 reHuProlidase의 혈중 농도가 독성물질로부터 쥐를 보호하기에는 역부족이었을 것이라는 결론을 내렸다. 또한 prolidase는 유기인 화합물에 대한 촉매 효율이 낮기 때문에 쥐의 생존 결과에서 BChE의 경우와 차이가 있었던 것으로 보인다. wt HuProlidase는 유기인산 독성물질에 의한 중독에 대항하기에는 효율성이 부족하지만, 유도 진화 및 전산 설계 방법을 적용할 수 있었던 시발점이 되어주었다.

2.2.8. 메틸파라티온 가수분해효소(methyl parathion hydrolase, MPH)

MPH는 *Plesiomonas* sp. WBC-3종의 pZWLO 플라스미드에서 발견된 메틸파라티온 가수분해 유전자(*mph*)에 의해 발현되며 메틸파라티온, 파라티온과 같은 유기인 화합물을 가수분해하는 것으로 알려져 있다(Table 1)[118]. *mph* 유전자는 이 박테리아가 메틸파라티온만을 탄소, 질소 및 에너지 공급원으로서 이용할 수 있게 한다. MPH는 대장균으로부터 발현되고 정제될 수 있으며, $\alpha \beta / \beta \alpha$ 샌드위치라고 묘사되는 단량체(monomer) 내 아연 및 카드뮴 이온의 이핵 센터(binuclear center)를 함유한다는 점에서 아연 이온만을 함유하는 wt 단백질과는

차이가 있다[119]. MPH는 메틸파라티온에 대해서는 촉매 효율이 높지만, 에틸파라옥손과 같은 유기인 화합물에 대한 효율은 약 3배까지 낮은 것으로 밝혀졌다[120]. 유도 진화 방법을 통해 개선된 MPH 변이체는 에틸파라옥손과의 효율을 100배까지 증가시킬 수 있었으나 [120], 촉매성 바이오스캐빈저로서의 잠재력을 평가하기 위해서는 다양한 유기인산 독성물질과 그 이성질체에 대한 효율성이 연구되어야 한다는 결론을 내렸다.

3. 결론 및 발전전망

새로 개발된 약물이 상용화되기 위해서는 우선적으로 인체 내에서의 안전성과 효능이 입증되어야 한다. 특히 단백질을 기반으로 한 약물의 경우, 체내에서 단백질 약물이 분해되지 않도록 하기 위한 처리, 면역원성이나 단백질 변성 및 응집 등의 경향을 갖고 있기 때문에 특별한 주의가 필요하다[121]. 단백질 기반 약물의 여러 가지 제약에도 불구하고, 지난 40여 년 동안 PEG와 같은 중합체를 통한 단백질의 화학적 변형, 단백질 공학 기술 적용 등의 노력을 통하여 단백질 약물을 다양한 질병 치료제로서 활용해 왔다[122]. 촉매성 바이오스캐빈저 또한, 이러한 전략을 바탕으로 충분히 차기 치료물질로 발전시킬 수 있을 것이라 전망된다.

약 70년간의 연구에도 불구하고, 유기인산화합물 중독 치료를 위한 치료물질의 개발이 더디게 진행되어 왔다. 대부분의 국가가 여전히 아트로핀, 2-PAM 및 디아제팜 등을 표준 치료제로서 활용하고 있으나, 더 이상 사후치료가 아닌 예방적 차원의 치료제가 개발되어야 할 필요가 있다. 현재로서 효과적인 예방대책으로 고려되고 있는 것은 단백질 바이오스캐빈저가 유일하다. 바이오스캐빈저 중에서도 화학량론적 바이오스캐빈저는 독성물질에 중독 후 치료제로서도 효과적인 예방대책으로서도 그 역할을 할 수 있으나, 재활성화가 불가능하다는 점에서 다량의 단백질 약물을 반복적으로 투여해야 한다는 치명적 단점을 갖고 있다. 하지만 촉매성 바이오스캐빈저의 경우에는 하나의 분자가 다수의 유기인산화합물 분자에 대해 반응이 가능하기 때문에 저용량의 단백질로도 치료제 역할을 할 수 있다.

최근 10년간, 기존에 독성물질을 가수분해하는 것으로 알려져 있던 천연 효소들을 단백질 공학 기술을 활용하여 리모델링함으로써 기질 특이성을 가지면서도 촉매효율이 높은 돌연변이체를 얻는 데 상당한 진전이 있었다. 결과적으로 다수의 효소(PON1, PTE, DFPase)가 V계열 유기인 독성물질을 고효율($k_{cat}/K_M > 1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$)로 가수분해할 수 있도록 개선하는 데 성공하였다. 이론으로만 제시되었던 촉매성 바이오스캐빈저의 활용모형을 다양한 효소, 유기인산화합물 및 동물에 적용하여 그 일반성을 입증하였으며, 독성물질에 대한 예방 대책으로서 필요한 촉매성 바이오스캐빈저의 용량 또한 신뢰성을 가지게 되었다.

하지만, 아직 촉매성 바이오스캐빈저가 상용화되기 위해 해결해야 할 많은 과제들이 남아 있다. 촉매성 바이오스캐빈저를 진정한 치료물질로 채택하기 위해서는, 앞서 언급한 바와 같이 단백질 약물이 가질 수 있는 면역원성, 약동학 및 약력학적 특성, 교차 반응성, 안정성, 생산, 저장 및 전달 등 다양한 미결과제들을 하나씩 풀어나가야 할 것이다.

감 사

이 연구는 육군사관학교 핵 WMD 방호연구센터의 지원을 받아 수행되었습니다.

References

1. I. Koplovitz, S. M. Schulz, R. F. Railer, M. Sigler, and R. B. Lee, Effect of atropine and diazepam on the efficacy of oxime treatment of nerve agent intoxication, *J. Med. CBR. Def.*, **5**, 1-15 (2007).
2. J. Newmark, *Seminars in Neurology*, **24**, 185-196, Thieme Medical Publishers, Inc., New York, USA (2004).
3. P. Taylor, Anticholinesterase agents, In: L. L. Brunton, B. A. Chabner, B. C. Knollmann (eds.), *Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics*, 239-254, McGraw-Hill, New York, USA (2011).
4. M. Trovaslet-Leroy, L. Musilova, F. Renault, X. Brazzolotto, J. Misik, L. Novotny, M. T. Froment, E. Gillon, M. Loiodice, L. Verdier, and P. Masson, Organophosphate hydrolases as catalytic bioscavengers of organophosphorus nerve agents, *Toxicol. Lett.*, **206**, 14-23 (2011).
5. F. Nachon, X. Brazzolotto, M. Trovaslet, and P. Masson, Progress in the development of enzyme-based nerve agent bioscavengers, *Chem. Biol. Interact.*, **206**, 536-544 (2013).
6. J. Descotes, *Immunotoxicology of Drugs and Chemicals: An Experimental and Clinical Approach*, 2-18, Elsevier, Amsterdam, Netherlands (2004).
7. N. Aurbek, H. Thiermann, F. Eyer, P. Eyer, and F. Worek, Suitability of human butyrylcholinesterase as therapeutic marker and pseudo catalytic scavenger in organophosphate poisoning: A kinetic analysis, *Toxicology*, **259**, 133-139 (2009).
8. K. G. McGarry, R. F. Lalisie, R. A. Moyer, K. M. Johnson, A. M. Tallan, T. P. Winters, J. E. Taris, C. A. McElroy, E. E. Lemmon, H. S. Shafaat, Y. Fan, A. Deal, S. C. Marguet, J. A. Harvilchuck, C. M. Hadad, and D. W. Wood, A novel, modified human butyrylcholinesterase catalytically degrades the chemical warfare nerve agent, sarin, *Toxicol. Sci.*, **174**, 133-146 (2019).
9. J. Estevez and E. Vilanova, Model equations for the kinetics of covalent irreversible enzyme inhibition and spontaneous reactivation: Esterases and organophosphorus compounds, *Crit. Rev. Toxicol.*, **39**, 427-448 (2009).
10. W. N. Aldridge, Organophosphorus compounds: Molecular basis for their biological properties, *Sci. Prog.*, **67**, 138-139 (1981).
11. F. Worek, N. Aurbek, T. Wille, P. Eyer, and H. Thiermann, Kinetic prerequisites of oximes as effective reactivators of organophosphate-inhibited acetylcholinesterase: A theoretical approach, *J. Enzyme Inhib.*, **26**, 303-308 (2010).
12. R. L. Maynard and F. W. Beswick, *Clinical and Experimental Toxicology of Organophosphates and Carbamates*, 373-385, Elsevier, Oxford, UK (1992).
13. G. E. Garcia, A. J. Campbell, J. Olson, D. Moorad-Doctor, and V. I. Morthole, Novel oximes as blood-brain barrier penetrating cholinesterase reactivators, *Chem. Biol. Interact.*, **187**, 199-206 (2010).
14. G. Mercey, T. Verdet, G. Saint-André, E. Gillon, A. Wagner, R. Baati, L. Jean, F. Nachon, and P. Y. Renard, First efficient uncharged reactivators for the dephosphorylation of poisoned human acetylcholinesterase, *Chem. Commun.*, **47**, 5295-5297 (2011).
15. J. Kalisiak, E. C. Ralph, and J. R. Cashman, Nonquaternary reactivators for organophosphate-inhibited cholinesterases, *J. Med. Chem.*, **55**, 465-474 (2011).

16. M. Katalinić, N. Maček Hrvat, K. Baumann, S. Morasi Piperčić, S. Makarić, S. Tomić, O. Jović, T. Hrenar, A. Miličević, D. Jelić, S. Žunec, I. Primožic, and Z. Kovarik, A comprehensive evaluation of novel oximes in creation of butyrylcholinesterase-based nerve agent bioscavengers, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **310**, 195-204 (2016).
17. J. G. Clement, D. G. Bailey, H. D. Madill, L. T. Tran, and J. D. Spence, The acetylcholinesterase oxime reactivator HI-6 in man: Pharmacokinetics and tolerability in combination with atropine, *Biopharm. Drug Dispos.*, **16**, 415-425 (1995).
18. D. Josse, O. Lockridge, W. Xie, C. F. Bartels, L. M. Schopfer, and P. Masson, The active site of human paraoxonase (PON1), *J. Appl. Toxicol.*, **21**, S7-S11 (2001).
19. B. Mackness, M. Mackness, M. Aviram, and G. Paragh (eds.). *The Paraoxonases: Their Role In Disease Development And Xenobiotic Metabolism*, 3-32, Springer Science & Business Media (2007).
20. L. Briseño-Roa, J. Hill, S. Notman, D. Sellers, A. P. Smith, C. M. Timperley, J. Wetherell, N. H. Williams, G. R. Williams, A. R. Fersht, and A. D. Griffiths, Analogues with fluorescent leaving groups for screening and selection of enzymes that efficiently hydrolyze organophosphorus nerve agents, *J. Med. Chem.*, **49**, 246-255 (2006).
21. M. Goldsmith, N. Aggarwal, Y. Ashani, H. Jubran, P. J. Greisen, S. Ovchinnikov, H. Leader, D. Baker, J. L. Sussman, A. Goldenzweig, S. J. Fleishman, and D. S. Tawfik, Overcoming an optimization plateau in the directed evolution of highly efficient nerve agent bioscavengers, *Protein Eng.*, **30**, 333-345 (2017).
22. T. Imai and K. Ohura, The role of intestinal carboxylesterase in the oral absorption of prodrugs, *Curr. Drug Metab.*, **11**, 793-805 (2010).
23. U. T. Bornscheuer, Microbial carboxylesterases: Classification, properties and application in biocatalysis, *FEMS Microbiol. Rev.*, **26**, 73-81 (2002).
24. T. Imai, Human carboxylesterase isozymes: Catalytic properties and rational drug design, *Drug Metab. Pharm.*, **21**, 173-185 (2006).
25. M. J. Hatfield, R. A. Umans, J. L. Hyatt, C. C. Edwards, M. Wierdl, L. Tsurkan, M. R. Taylor, and P. M. Potter, Carboxylesterases: General detoxifying enzymes, *Chem. Biol. Interact.*, **259**, 327-331 (2016).
26. T. Satoh and M. Hosokawa, Molecular aspects of carboxylesterase isoforms in comparison with other esterases, *Toxicol. Lett.*, **82**, 439-445 (1995).
27. A. C. Hemmert, T. C. Otto, M. Wierdl, C. C. Edwards, C. D. Fleming, M. MacDonald, J. R. Cashman, P. M. Potter, D. M. Cerasoli, and M. R. Redinbo, Human carboxylesterase 1 stereoselectively binds the nerve agent cyclosarin and spontaneously hydrolyzes the nerve agent sarin, *Mol. Pharmacol.*, **77**, 508-516 (2010).
28. P. Masson and S. V. Lushchekina, Emergence of catalytic bioscavengers against organophosphorus agents, *Chem. Biol. Interact.*, **259**, 319-326 (2016).
29. A. C. Hemmert, T. C. Otto, R. A. Chica, M. Wierdl, J. S. Edwards, S. L. Lewis, C. C. Edwards, L. Tsurkan, C. L. Cadieux, S. A. Kasten, J. R. Cashman, S. L. Mayo, P. M. Potter, D. M. Cerasoli, and M. R. Redinbo, Nerve agent hydrolysis activity designed into a human drug metabolism enzyme, *PLoS One*, **6**, e17441 (2011).
30. P. Masson, P. L. Fortier, C. Albaret, M. T. Froment, C. F. Bartels, and O. Lockridge, Aging of di-isopropyl-phosphorylated human butyrylcholinesterase, *Biochem. J.*, **327**, 601-607 (1997).
31. P. M. Legler, S. M. Boisvert, J. R. Compton, and C. B. Millard, Development of organophosphate hydrolase activity in a bacterial homolog of human cholinesterase, *Front Chem.*, **2**, 46 (2014).
32. F. Soto-Mancera, J. M. Arellano, and M. G. Albenzin, Carboxylesterase in *Sparus aurata*: characterisation and sensitivity to organophosphorus pesticides and pharmaceutical products, *Ecol. Indic.*, **109**, 105603 (2020).
33. V. V. Frolkis, V. V. Bezrukov, Y. K. Duplenko, I. V. Shchegoleva, V. G. Shevtchuk, and N. S. Verkhatsky, Acetylcholine metabolism and cholinergic regulation of functions in aging, *Gerontology*, **19**, 45-57 (1973).
34. F. Wore, H. Thiermann, L. Szinicz, and P. Eyer, Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes, *Biochem. Pharmacol.*, **68**, 2237-2248 (2004).
35. K. G. McGarry, K. E. Schill, T. P. Winters, E. E. Lemmon, C. L. Sabourin, J. A. Harvilchuck, and R. A. Moyer, Characterization of cholinesterases from multiple large animal species for medical countermeasure development against chemical warfare nerve agents, *Toxicol. Sci.*, **174**, 124-132 (2019).
36. Z. Chen, R. Newcomb, E. Forbes, J. McKenzie, and P. Batterham, The acetylcholinesterase gene and organophosphorus resistance in the Australian sheep blowfly, *Lucilia cuprina*, *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **31**, 805-816 (2001).
37. P. Menozzi, M. Shi, A. Lougarre, Z. H. Tang, and D. Fournier, Mutations of acetylcholinesterase which confer insecticide resistance in *Drosophila melanogaster* populations, *BMC Evol. Biol.*, **4**, 4 (2004).
38. Y. Ashani, Z. Radic, I. Tsigelny, D. C. Vellom, N. A. Pickering, D. M. Quinn, B. P. Doctor, and P. Taylor, Amino acid residues controlling reactivation of organophosphonyl conjugates of acetylcholinesterase by mono- and bisquaternary oximes, *J. Biol. Chem.*, **270**, 6370-6380 (1995).
39. L. Wong, Z. Radić, R. J. Brüggemann, N. Hosea, H. A. Benman, and P. Taylor, Mechanism of oxime reactivation of acetylcholinesterase analyzed by chirality and mutagenesis, *Biochemistry*, **39**, 5750-5757 (2000).
40. T. Küçükkılıç, R. Cochran, J. Kalisiak, E. Garcia, A. Valle, G. Amitai, Z. Radić, and P. Taylor, Investigating the structural influence of surface mutations on acetylcholinesterase inhibition by organophosphorus compounds and oxime reactivation, *Chem. Biol. Interact.*, **187**, 238-240 (2010).
41. M. Katalinić, G. Šinko, M. N. Hrvat, T. Zorbaz, A. Bosak, and Z. Kovarik, Oxime-assisted reactivation of tabun-inhibited acetylcholinesterase analysed by active site mutations, *Toxicology*, **406-407**, 104-113 (2018).
42. O. Mazar, O. Cohen, C. Kronman, L. Raveh, D. Stein, A. Ordentlich, and A. Shafferman, Aging-resistant organophosphate bioscavenger based on polyethylene glycol-conjugated F338A human acetylcholinesterase, *Mol. Pharmacol.*, **74**, 755-763 (2008).
43. C. Kronman, O. Cohen, O. Mazar, A. Ordentlich, L. Raveh, B. Velan, and A. Shafferman, Next generation OP-bioscavengers: A circulatory long-lived 4-PEG hypolysine mutant of F338A-HuAChE with optimal pharmacokinetics and pseudo-catalytic character-

- istics, *Chem. Biol. Interact.*, **187**, 253-258 (2010).
44. N. M. Hrvat, S. Žunec, P. Taylor, Z. Radić, and Z. Kovarik, HI-6 assisted catalytic scavenging of VX by acetylcholinesterase choline binding site mutants, *Chem. Biol. Interact.*, **259**, 148-153 (2016).
 45. Z. Kovarik, N. M. Hrvat, J. Kalisiak, M. Katalinić, R. K. Sit, T. Zorbaz, Z. Radić, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, and P. Taylor, Counteracting tabun inhibition by reactivation by pyridinium aldoximes that interact with active center gorge mutants of acetylcholinesterase, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **372**, 40-46 (2019).
 46. J. Massoulié, J. Sussman, S. Bon, and I. Silman, Structure and function of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase, *Brain Res.*, **98**, 139-146 (1993).
 47. L. Raveh, J. Grunwald, D. Marcus, Y. Papier, E. Cohen, and Y. Ashani, Human butyrylcholinesterase as a general prophylactic antidote for nerve agent toxicity, *Biochem. Pharmacol.*, **45**, 2465-2474 (1993).
 48. V. P. Chen, Y. Gao, L. Geng, and S. Brimijoin, Butyrylcholinesterase gene transfer in obese mice prevents postdieting body weight rebound by suppressing ghrelin signaling, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **114**, 10960-10965 (2017).
 49. S. V. Lushchekina, B. L. Grigorenko, D. I. Morozov, I. V. Polyakov, A. V. Nemukhin, and S. D. Varfolomeev, Modeling of the mechanism of hydrolysis of succinylcholine in the active site of native and modified (Asp70Gly) human butyrylcholinesterase, *Russ. Chem. Bull.*, **59**, 55-60 (2010).
 50. K. A. González, E. H. Viana, and R. V. Duhalt, Enzymatic detoxification of organophosphorus pesticides and related toxicants, *J. Pestic. Sci.*, **43**, 1-9 (2018).
 51. Y. Cai, S. Zhou, M. J. Stewart, F. Zheng, and C. G. Zhan, Dimerization of human butyrylcholinesterase expressed in bacterium for development of a thermally stable bioscavenger of organophosphorus compounds, *Chem. Biol. Interact.*, **310**, 108756 (2019).
 52. B. Mackness, P. N. Durrington, and M. I. Mackness, Human serum paraoxonase, *Gen. Pharmacol.*, **31**, 329-336 (1998).
 53. M. Aviram, M. Rosenblat, C. L. Bisgaier, R. S. Newton, S. L. Primo-Parmo, and B. N. La Du, Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase, *J. Clin. Invest.*, **101**, 1581-1590 (1998).
 54. P. N. Durrington, B. Mackness, and M. I. Mackness, Paraoxonase and atherosclerosis, *Arter. Thromb. Vasc. Biol.*, **21**, 473-480 (2001).
 55. R. C. Stevens, S. M. Suzuki, T. B. Cole, S. S. Park, R. J. Richter, and C. E. Furlong, Engineered recombinant human paraoxonase 1 (rHuPON1) purified from *Escherichia coli* protects against organophosphate poisoning, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **105**, 12780-12784 (2008).
 56. L. G. Costa, G. Giordano, T. B. Cole, J. Marsillach, and C. E. Furlong, Paraoxonase 1 (PON1) as a genetic determinant of susceptibility to organophosphate toxicity, *Toxicology*, **307**, 115-122 (2013).
 57. G. Kaur, A. K. Jain, and S. Singh, CYP/PON genetic variations as determinant of organophosphate pesticides toxicity, *J. Genet.*, **96**, 187-201 (2017).
 58. H. G. Davies, R. J. Richter, M. Keifer, C. A. Broomfield, J. Sowalla, and C. E. Furlong, The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin, *Nat. Genet.*, **14**, 334-336 (1996).
 59. M. W. Peterson, S. Z. Fairchild, T. C. Otto, M. Mohtashemi, D. M. Cerasoli, and W. E. Chang, VX hydrolysis by human serum paraoxonase 1: A comparison of experimental and computational results, *PLoS One*, **6**, e20335 (2011).
 60. D. G. Mata, P. Sabnekar, C. A. Watson, P. E. Rezk, and N. Chilukuri, Assessing the stoichiometric efficacy of mammalian expressed paraoxonase-1 variant I-F11 to afford protection against G-type nerve agents, *Chem. Biol. Interact.*, **259**, 233-241 (2016).
 61. M. Valiyaveetil, Y. Alamneh, P. Rezk, L. Biggemann, M. W. Perkins, A. M. Sciuto, B. P. Doctor, and M. P. Nambiar, Protective efficacy of catalytic bioscavenger, paraoxonase 1 against sarin and soman exposure in guinea pigs, *Biochem. Pharmacol.*, **81**, 800-809 (2011).
 62. M. Valiyaveetil, Y. Alamneh, P. Rezk, M. W. Perkins, A. M. Sciuto, B. P. Doctor, and M. P. Nambiar, Recombinant paraoxonase 1 protects against sarin and soman toxicity following microinhalation exposure in guinea pigs, *Toxicol. Lett.*, **202**, 203-208 (2011).
 63. S. M. Hodgins, S. A. Kasten, J. Harrison, T. C. Otto, Z. P. Oliver, P. Rezk, T. E. Reeves, N. Chilukuri, and D. M. Cerasoli, Assessing protection against OP pesticides and nerve agents provided by wild-type HuPON1 purified from *Trichoplusia ni* larvae or induced via adenoviral infection, *Chem. Biol. Interact.*, **203**, 177-180 (2013).
 64. A. Aharoni, L. Gaidukov, S. Yagur, L. Toker, I. Silman, and D. S. Tawfik, Directed evolution of mammalian paraoxonases PON1 and PON3 for bacterial expression and catalytic specialization, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **101**, 482-487 (2003).
 65. M. Harel, A. Aharoni, L. Gaidukov, B. Brumshtein, O. Khersonsky, R. Meged, H. Dvir, R. B. Ravelli, A. McCarthy, L. Toker, I. Silman, J. Sussman, and D. S. Tawfik, Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes, *Nat. Struct. Biol.*, **11**, 412-419 (2004).
 66. R. D. Gupta, M. Goldsmith, Y. Ashani, Y. Simo, G. Mullokanov, H. Bar, M. B. David, H. Leader, R. Margalit, I. Silman, J. L. Sussman, and D. S. Tawfik, Directed evolution of hydrolases for prevention of G-type nerve agent intoxication, *Nat. Chem. Biol.*, **7**, 120-125 (2011).
 67. M. Goldsmith, Y. Ashani, Y. Simo, M. B. David, H. Leader, I. Silman, J. L. Sussman, and D. S. Tawfik, Evolved stereoselective hydrolases for broad-spectrum G-type nerve agent detoxification, *Chem. Biol.*, **19**, 456-466 (2012).
 68. F. Worek, T. Seeger, M. Goldsmith, Y. Ashani, H. Leader, J. S. Sussman, D. S. Tawfik, H. Thiermann, and T. Wille, Efficacy of the rePON1 mutant IIG1 to prevent cyclosarin toxicity *in vivo* and to detoxify structurally different nerve agents *in vitro*, *Arch. Toxicol.*, **88**, 1257-1266 (2014).
 69. M. Goldsmith, Y. Ashani, R. Margalit, A. Nyska, D. Mirelman, and D. S. Tawfik, A new post-intoxication treatment of paraoxon and parathion poisonings using an evolved PON1 variant and recombinant GOT1, *Chem. Biol. Interact.*, **259**, 242-251 (2016).
 70. A. Zlotnik, S. E. Gruenbaum, A. A. Artru, I. Rozet, M. Dubilet, S. Tkachov, E. Brotfain, Y. Klin, Y. Shapira, and V. I. Teichberg, The neuroprotective effects of oxaloacetate in closed head injury in rats is mediated by its blood glutamate scavenging activity, *J. Neurosurg. Anesthesiol.*, **21**, 235-241 (2009).
 71. A. Ruban, B. Mohar, G. Jona, and V. I. Teichberg, Blood glutamate

- mate scavenging as a novel neuroprotective treatment for paraoxon intoxication, *J. Cerebr. Blood. F. Met.*, **34**, 221-227 (2013).
72. A. Ruban, I. Biton, A. Markovich, and D. Mirelman, MRS of brain metabolite levels demonstrates the ability of scavenging of excess brain glutamate to protect against nerve agent induced seizures, *Int. J. Mol. Sci.*, **16**, 3226-3236 (2015).
 73. J. Cowan, C. M. Sinton, A. W. Varley, F. H. Wians, R. W. Haley, and R. S. Munford, Gene therapy to prevent organophosphate intoxication, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **173**, 1-6 (2001).
 74. L. G. Costa, R. J. Richter, W. F. Li, T. Cole, M. Guizzetti, and C. E. Furlong, Paraoxonase (PON1) as a biomarker of susceptibility for organophosphate toxicity, *Biomarkers*, **8**, 1-12 (2003).
 75. A. L. Fu, Y. X. Wang, and M. J. Sun, Naked DNA prevents soman intoxication, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **328**, 901-905 (2005).
 76. D. G. Mata, P. E. Rezk, P. Sabnekar, D. M. Cerasoli, and N. Chilukuri, Investigation of evolved paraoxonase-1 variants for prevention of organophosphorous pesticide compound intoxication, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **349**, 549-558 (2014).
 77. G. Amitai, L. Gaidukov, R. Adani, S. Yishay, G. Yacov, M. Kushnir, S. Teitlboim, M. Lindenbaum, P. Bel, O. Khersonsky, and D. S. Tawfik, Enhanced stereoselective hydrolysis of toxic organophosphates by directly evolved variants of mammalian serum paraoxonase, *FEBS J.*, **273**, 1906-1919 (2006).
 78. S. D. Kirby, J. R. Norris, J. R. Smith, B. J. Bahnson, and D. M. Cerasoli, Human paraoxonase double mutants hydrolyze V and G class organophosphorus nerve agents, *Chem. Biol. Interact.*, **203**, 181-185 (2013).
 79. W. W. Mulbry, J. S. Karns, P. C. Kearney, J. O. Nelson, C. S. McDaniel, and J. R. Wild, Identification of a plasmid-borne parathion hydrolase gene from *Flavobacterium* sp. by southern hybridization with opd from *Pseudomonas diminuta*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **51**, 926-930 (1986).
 80. D. P. Dumas, S. R. Caldwell, J. R. Wild, and F. M. Raushel, Purification and properties of the phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*, *J. Biol. Chem.*, **264**, 19659-19665 (1989).
 81. E. Ghanem and F. M. Raushel, Detoxification of organophosphate nerve agents by bacterial phosphotriesterase, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **207**, 459-470 (2005).
 82. C. M. Theriot and A. M. Grunden, Hydrolysis of organophosphorus compounds by microbial enzymes, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **89**, 35-43 (2011).
 83. P. Masson, *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*, 2nd ed., 1107-1123, Elsevier, Kentucky, USA (2015).
 84. D. P. Dumas, H. D. Durst, and W. G. Landis, Inactivation of organophosphorus nerve agents by the phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **277**, 155-159 (1990).
 85. V. K. Rastogi, J. J. Defranck, and T. C. Cheng, Enzymatic hydrolysis of Russian-VX by organophosphorus hydrolase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **241**, 294-296 (1997).
 86. A. D. Griffiths and D. S. Tawfik, Directed evolution of an extremely fast phosphotriesterase by *in vitro* compartmentalization, *EMBO J.*, **22**, 24-35 (2003).
 87. C. Roodveldt and D. S. Tawfik, Directed evolution of phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta* for heterologous expression in *Escherichia coli* results in stabilization of the metal-free state, *Protein Eng. Des. Select.*, **18**, 51-58 (2005).
 88. C. M. H. Cho, A. Mulchandani, and W. Chen, Bacterial cell surface display of organophosphorus hydrolase for selective screening of improved hydrolysis of organophosphate nerve agents, *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 2026-2030 (2002).
 89. C. M. Hill, W. S. Li, J. B. Thoden, H. M. Holden, and F. M. Raushel, Enhanced degradation of chemical warfare agents through molecular engineering of the phosphotriesterase active site, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 8990-8991 (2003).
 90. I. Cherny, P. Greisen, Y. Ashani, S. D. Khare, G. Oberdorfer, H. Leader, D. Baker, and D. S. Tawfik, Engineering V-type nerve agents detoxifying enzymes using computationally focused libraries, *ACS Chem. Biol.*, **8**, 2394-2403 (2013).
 91. P. Jacquet, J. Hiblot, D. Daudé, C. Bergonzi, G. Gotthard, N. Armstrong, E. Chabrière, and M. Elias, Rational engineering of a native hyperthermostable lactonase into a broad spectrum phosphotriesterase, *Sci. Rep.*, **7**, 1-15 (2017).
 92. T. Wille, K. Neumaier, M. Koller, C. Ehinger, N. Aggarwal, Y. Ashani, M. Goldsmith, J. L. Sussman, D. S. Tawfik, H. Thiermann, and F. Worek, Single treatment of VX poisoned guinea pigs with the phosphotriesterase mutant C23AL: Intraosseous versus intravenous injection, *Toxicol. Lett.*, **258**, 198-206 (2016).
 93. F. Ely, K. S. Hadler, N. Mitić, L. R. Gahan, D. L. Ollis, N. M. Plugis, M. T. Russo, J. A. Larrabee, and G. Schenk, Electronic and geometric structures of the organophosphate-degrading enzyme from *Agrobacterium radiobacter* (OpdA), *J. Biol. Inorg. Chem.*, **16**, 777-787 (2011).
 94. S. B. Bird, T. D. Sutherland, C. Gresham, J. Oakeshott, C. Scott, and M. Eddleston, OpdA, a bacterial organophosphorus hydrolase, prevents lethality in rats after poisoning with highly toxic organophosphorus pesticides, *Toxicology*, **247**, 88-92 (2008).
 95. J. Hiblot, G. Gotthard, E. Chabriere, and M. Elias, Structural and enzymatic characterization of the lactonase SisLac from *Sulfolobus islandicus*, *PLoS One*, **7**, e47028 (2012).
 96. J. Hiblot, G. Gotthard, E. Chabriere, and M. Elias, Characterisation of the organophosphate hydrolase catalytic activity of SsoPox, *Sci. Rep.*, **2**, 779 (2012).
 97. M. M. Meier, C. Rajendran, C. Malisi, N. G. Fox, C. Xu, S. Schlee, D. P. Barondeau, B. Höcker, R. Sterner, and F. M. Raushel, Molecular engineering of organophosphate hydrolysis activity from a weak promiscuous lactonase template, *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 11670-11677 (2013).
 98. J. Bzdrenka, J. Hiblot, G. Gotthard, C. Champion, M. Elias, and E. Chabriere, SacPox from the thermoacidophilic crenarchaeon *Sulfolobus acidocaldarius* is a proficient lactonase, *BMC Research Notes*, **7**, 333 (2014).
 99. L. Merone, L. Mandrich, E. Porzio, M. Rossi, S. Müller, G. Reiter, F. Worek, and G. Manco, Improving the promiscuous nerve agent hydrolase activity of a thermostable archaeal lactonase, *Bioresour. Technol.*, **101**, 9204-9212 (2010).
 100. E. I. Scharff, J. Koepke, G. Fritzsche, C. Lücke, and H. Rüterjans, Crystal structure of diisopropylfluorophosphatase from *Loligo vulgaris*, *Structure*, **9**, 493-502 (2001).
 101. H. Allahyari and A. M. Latifi, Diisopropyl-fluorophosphatase as a catalytic bioscavenger, *J. Appl. Biotechnol. Rep.*, **3**, 477-482 (2016).
 102. R. Webster, E. Didier, P. Harris, N. Siegel, J. Stadler, L. Tilbury, and D. Smith, PEGylated Proteins: Evaluation of their safety in the absence of definitive metabolism studies, *Drug Metab. Dispos.*,

- 35, 9-16 (2006).
103. M. Melzer, A. Heidenreich, F. Dorandeu, J. Gäb, K. Kehe, H. Thiermann, T. Letzel, and M. M. Blum, *In vitro* and *in vivo* efficacy of PEGylated diisopropyl fluorophosphatase (DFPase), *Drug Test. Anal.*, **4**, 262-270 (2011).
 104. D. Zhou, D. Yin, F. Xiao, and J. Hao, Expressions of senescence-associated β -galactosidase and senescence marker protein-30 are associated with lens epithelial cell apoptosis, *Med. Sci. Monit.*, **21**, 3728-3735 (2015).
 105. J. S. Little, C. A. Broomfield, M. K. Fox-Talbot, L. J. Boucher, B. MacIver, and D. E. Lenz, Partial characterization of an enzyme that hydrolyzes sarin, soman, tabun, and diisopropyl phosphorofluoridate (DFP), *Biochem. Pharmacol.*, **38**, 23-29 (1989).
 106. R. C. diTargiani, L. Chandrasekaran, T. Belinskaya, and A. Saxena, In search of a catalytic bioscavenger for the prophylaxis of nerve agent toxicity, *Chem. Biol. Interact.*, **187**, 349-354 (2010).
 107. M. S. Choi, A. Saxena, and N. Chilukuri, A strategy for the production of soluble human senescence marker protein-30 in *Escherichia coli*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **393**, 509-513 (2010).
 108. T. C. Cheng, S. Harvey, and A. N. Stroup, Purification and properties of a highly active organophosphorus acid anhydrolase from *Alteromonas undina*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 3138-3140 (1993).
 109. T. C. Cheng, S. P. Harvey, and G. L. Chen, Cloning and expression of a gene encoding a bacterial enzyme for decontamination of organophosphorus nerve agents and nucleotide sequence of the enzyme, *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 1636-1641 (1996).
 110. S. P. Harvey, R. M. Leslie, and J. B. Frederic, Hydrolysis and enzymatic degradation of Novichok nerve agents, *Heliyon*, **6**, e03153 (2020).
 111. C. M. Dackowski, S. D. Pegan, and S. P. Harvey, Engineering the organophosphorus acid anhydrolase enzyme for increased catalytic efficiency and broadened stereospecificity on russian VX, *Biochemistry*, **54**, 6423-6433 (2015).
 112. I. Petrikovics, Long circulating liposomes encapsulating organophosphorus acid Anhydrolase in diisopropylfluorophosphate antagonism, *Toxicol. Sci.*, **57**, 16-21 (2000).
 113. P. Li, S. Y. Moon, M. A. Guelta, L. Lin, D. A. Gómez-Gualdrón, R. Q. Snurr, S. P. Harvey, J. T. Hupp, and O. K. Farha, Nanosizing a metal-organic framework enzyme carrier for accelerating nerve agent hydrolysis, *ACS Nano*, **10**, 9174-9182 (2016).
 114. G. Zanaboni, K. M. Dyne, A. Rossi, V. Monafó, and G. Cetta, Prolidase deficiency: Biochemical study of erythrocyte and skin fibroblast prolidase activity in italian patients, *Haematologica*, **79**, 13-18 (1994).
 115. L. Chandrasekaran, T. Belinskaya, and A. Saxena, *In vitro* characterization of organophosphorus compound hydrolysis by native and recombinant human prolidase, *Toxicology in vitro*, **27**, 499-506 (2013).
 116. V. Aleti, G. B. Reddy, K. Parikh, P. Arun, and N. Chilukuri, Persistent and high-level expression of human liver prolidase *in vivo* in mice using adenovirus, *Chem. Biol. Interact.*, **203**, 191-195 (2013).
 117. P. E. Rezk, P. Zdenka, P. Sabnekar, T. Kajih, D. G. Mata, C. Wrobel, D. M. Cerasoli, and N. Chilukuri, An *in vitro* and *in vivo* evaluation of the efficacy of recombinant human liver prolidase as a catalytic bioscavenger of chemical warfare nerve agents, *Drug Chem. Toxicol.*, **38**, 37-43 (2014).
 118. H. Liu, J. J. Zhang, S. J. Wang, X. E. Zhang, and N. Y. Zhou, Plasmid-borne catabolism of methyl parathion and *p*-nitrophenol in *Pseudomonas* sp. strain WBC-3, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **334**, 1107-1114 (2005).
 119. Y. J. Dong, M. Bartlam, L. Sun, Y. F. Zhou, Z. P. Zhang, C. G. Zhang, Z. Rao, and X. E. Zhang, Crystal structure of methyl parathion hydrolase from *Pseudomonas* sp. WBC-3, *J. Mol. Biol.*, **353**, 655-663 (2005).
 120. T. K. Ng, L. R. Gahan, G. Schenk, and D. L. Ollis, Altering the substrate specificity of methyl parathion hydrolase with directed evolution, *Arch. Biochem. Biophys.*, **573**, 59-68 (2015).
 121. A. Ozgur and Y. Tutar, Therapeutic proteins: A to Z, *Protein Pept. Lett.*, **20**, 1365-1372 (2013).
 122. H. D. Lagassé, A. Alexaki, V. L. Simhadri, N. H. Katagiri, W. Jankowski, Z. E. Sauna, and C. Kimchi-Sarfaty, Recent advances in (therapeutic protein) drug development, *F1000Res.*, **6**, 113 (2017).
 123. J. L. Sussman and I. Silman, Acetylcholinesterase: Structure and use as a model for specific cation-protein interactions, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2**, 721-729 (1992).
 124. O. Lockridge, C. F. Bartels, T. A. Vaughan, C. K. Wong, S. E. Norton, and L. L. Johnson, Complete amino acid sequence of human serum cholinesterase, *J. Biol. Chem.*, **262**, 549-557 (1987).
 125. M. M. Benning, J. M. Kuo, F. M. Raushel, and H. M. Holden, Three-dimensional structure of phosphotriesterase: An enzyme capable of detoxifying organophosphate nerve agents, *Biochemistry*, **33**, 15001-15007 (1994).
 126. I. Horne, T. D. Sutherland, R. L. Harcourt, R. J. Russell, and J. G. Oakeshott, Identification of an *opd* (Organophosphate Degradation) gene in an *agrobacterium* isolate, *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 3371-3376 (2002).
 127. S. Chakraborti and B. J. Bahnson, Crystal structure of human senescence marker protein 30: Insights linking structural, enzymatic, and physiological functions, *Biochemistry*, **49**, 3436-3444 (2010).
 128. N. K. Vyas, A. Nickitenko, V. K. Rastogi, S. S. Shah, and F. A. Quioco, Structural insights into the dual activities of the nerve agent degrading organophosphate anhydrolase/prolidase, *Biochemistry*, **49**, 547-559 (2010).
 129. A. Lupi, R. Tenni, A. Rossi, G. Cetta, and A. Forlino, Human prolidase and prolidase deficiency: An overview on the characterization of the enzyme involved in proline recycling and on the effects of its mutations, *Amino Acids*, **35**, 739-752 (2008).
 130. C. Zhongli, L. Shunpeng, and F. Guoping, Isolation of methyl parathion-degrading strain M6 and cloning of the methyl parathion hydrolase gene, *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 4922-4925 (2001).
 131. M. Goldsmith and Y. Ashani, Catalytic bioscavengers as countermeasures against organophosphate nerve agents, *Chem. Biol. Interact.*, **292**, 50-64 (2018).