

독성을 제거한 재조합 리신 백신 개발 및 효능평가

윤형석¹⁾ · 조혜은¹⁾ · 송동현¹⁾ · 유치호¹⁾ · 송영조¹⁾ · 허경행^{*1)}

¹⁾ 국방과학연구소 국방첨단기술연구원

Development of Non-toxic Recombinant Ricin Vaccine and Evaluation of Vaccine Efficacy

Hyeongseok Yun¹⁾ · Hae-Eun Joe¹⁾ · Dong Hyun Song¹⁾ · Chi Ho Yu¹⁾ · Young-Jo Song¹⁾ · Gyeong Haeng Hur^{*1)}

¹⁾ Defense Advanced Science and Technology Research Institute, Agency for Defense Development, Korea

(Received 24 November 2023 / Revised 7 February 2024 / Accepted 7 February 2024)

Abstract

Ricin is a highly toxic protein which is produced in the seeds of the castor oil plant. Ricin toxin A chain has ribosomal RNA N-glycosylase activity that irreversibly hydrolyses the N-glycosidic bond of the adenine residue at position 4324 within the 28S rRNA. In this study, we developed non-toxic recombinant ricin vaccine(R51) in *E. coli* expression system, and evaluated efficacy of the R51 according to adjuvants. When the R51 was administered using aluminum hydroxide as an adjuvant, the vaccine efficacy was higher than that of TLR agonists or aluminum phosphate. Because it is time-consuming to administer the vaccine three times at three-week intervals, we investigated the survival rate and antibody titer of mice according to the change of time interval of vaccination. Interestingly, there was no difference in survival rate and antibody titer when R51 was administered at 0, 1, and 3 weeks or 0, 2, and 4 weeks compared to when administered at 0, 3, and 6 weeks. Therefore, the developed R51 vaccine is promising to protect soldiers from Ricin attack.

Key Words : Ricin(리신), Ricin Vaccine(리신 백신), Adjuvants(보조제), R51

1. 서론

리신 독소(RTx, 576 amino acid)는 파자마 씨에서 추출한 family of type II ribosomal inactivate proteins(RIPs)

로 높은 치사율을 보이는 독소이다^[1]. 단백질의 크기는 64 kDa로, signal peptide(1-35 residues of RT), A 사슬(RTA, 36-302 residues of RTx), linker(303-314 residues of RTx), B 사슬(RTB, 315-576 residues of RTx)으로 구성되어있다^[2]. RTA는 진핵생물의 리보솜(ribosome)인 28S rRNA에서 광범위하게 보존되어 되어있는 sarcin-ricin loop의 아데노신 부위를 비가역적으로 가수분해

* Corresponding author, E-mail: hurgh@add.re.kr
Copyright © The Korea Institute of Military Science and Technology

시킨다. RTB는 세포 표면에 있는 당단백질에 결합하여 리신 독소가 세포 내부로 들어갈 수 있도록 유도한다^[3]. 리신 독소는 리보솜으로부터 단백질 합성을 억제하여 독성을 나타내는데, 일반적으로 흡입, 주사, 섭취에 의해 중독된다. 인간에서 추정되는 리신 독소의 치사량은 1-10 µg/kg인데, 높은 독성과 대량생산이 가능하여 잠재적인 생물위협 물질로 취급되고 있다^[4].

기존의 연구에서 RTA의 활성부위로 Y80, Y123, E177, R180, N209 그리고 W211이 관여되어 있음이 밝혀진 바 있으며, 활성부위와는 별개로 RTA의 74-76 residues가 vascular leak syndrome(VLS)을 일으키는 것으로 알려져 있다^[6,8,22]. 기존의 연구들에서 리신 백신의 후보물질로 탈당화된(deglycosylated) RTA 또는 포름알데이드로 불활성화된 리신 특소이드를 사용했으나, 생독소에 비해 독성이 약해졌음에도 불구하고 동물시험에서 vascular leak syndrome과 같은 부작용이 관찰되어 개발이 중단되었다^[4,7]. RiVax는 RTA의 재조합 백신으로 V76M, Y80A 변이를 통해 활성 부위를 변형시킴으로써 독성을 제거했다^[8]. RiVax는 임상 1상 시험이 진행중일 뿐만 아니라, 백신을 투여한 영장류(rhesus macaques)에서 리신 흡입 노출을 성공적으로 방어하는 등 활발하게 연구가 진행되고 있다. RVEc는 truncated version으로 RTA의 소수성 도메인을 제거하여 1-33 잔기와 44-198 잔기만을 가지고 있다^[9]. 기존의 연구결과에 의하면 RiVax와 RVEc 모두 10×LD₅₀의 리신 독소에 대하여 방어능이 있음을 마우스에서 확인한 바 있다^[8-11].

백신에 의한 면역체계의 반응을 증가시키는 물질을 보조제(adjuvants)라고 하며 Toll-like receptor(TLR) 신호전달 체계에 영향을 미치는 유무에 따라 두 개의 그룹으로 나눌 수 있다^[12,13]. Aluminum hydroxide와 aluminum phosphate는 대표적인 TLR 독립 보조제로 정확한 메커니즘은 불분명하지만 상용화된 백신에서 가장 널리 사용되는 보조제이다^[14,15]. TLR은 병원체가 특이적으로 보유한 병원체 연관 분자 패턴(pathogen associated molecular pattern)을 인지하여 면역반응을 자극하는 수용체이다^[16]. TLR4는 그람 음성 박테리아의 외막에서 발견되는 지질다당류(lipopolysaccharides, LPS)를 인지하며, TLR5는 flagellin을, TLR7/8은 poly-U 또는 GU-rich 서열이 포함된 단일 가닥 RNA(single stranded RNA, ssRNA)를, TLR9은 메틸화되지 않은(unmethylated) CpG motifs를 인지한다^[13,17-21].

본 논문에서는 리신 독소의 구조를 분석하여 독성 활

성을 제거한 리신 백신 개발 및 독성 평가 결과에 대한 내용을 서술했다. 또한 리신 백신에 최적화된 보조제 선별에 관한 내용과 리신 독소에 대한 최대 방어능, 그리고 리신 백신 투여 기간의 단축에 관한 시험과 그 결과를 정리했다.

2. 실험방법

리신 백신(R51)은 pET28a 발현벡터에 제한효소 *Nde* I과 *Not* I을 사용하여 삽입한 뒤 *Escherichia coli* strain BL21(DE3)에 형질전환시키고 Luria-Bertani(LB) 배지(1 % tryptone, 0.5 % yeast extract, 1 % NaCl)에 Kanamycin을 100 µg/ml의 농도로 첨가하여 형질전환된 후보균을 선별했다. 대장균으로부터 단백질 발현을 확인하기 위해 37 °C에서 배양한 후 OD₆₀₀이 0.4일 때 isopropylthiogalactoside(IPTG)를 0.5 mM 농도로 첨가한 후 25 °C에서 12시간 동안 추가 배양한다. 배양한 대장균은 원심분리하여 세포만 획득한 후 Lysis buffer(20 mM TRIS-Cl pH 8.0, 200 mM NaCl)에 현탁시킨 후 초음파 파쇄기를 통해 세포를 용해시켰다. 용해물은 Ni-NTA 컬럼을 이용하여 1차 정제를 진행하고 thrombin을 처리하여 히스티딘을 제거한 후 size-exclusion chromatography를 이용해 2차 정제를 진행했다.

리신 백신의 *in vitro* 세포독성을 확인하기 위해 RPMI 배지(10 % FBS, 1 % Penicillin/Streptomycin)에서 배양한 Jurkat 세포를 2×10⁴ cells/well로 96 well plate에 준비했다. RTA 또는 R51을 0.2 - 10,000 ng/ml 농도로 처리한 후 24시간 동안 37 °C에서 배양했다. 이후 WST-1을 처리한 후 37 °C에서 2시간 배양하고 450 nm에서 흡광도 측정을 통해 세포독성을 관찰했다. 리신 백신의 *in vivo* 독성을 관찰하기 위해 R51을 근육주사로 투여한 후 생존율을 14일간 관찰했다.

보조제에 따른 리신 백신의 효능을 관찰하기 위해 6주령 female ICR 마우스에 1 µg/head의 R51을 보조제와 혼합한 후 100 µl 용량으로 3주 간격으로 3회 근육주사 투여했다. 보조제는 Phosphate buffered saline(PBS)를 완충용액으로 하여 Aluminum hydroxide(Al), Imiquimod(Im), Flagellin(Fl), CpG oligodeoxynucleotide(ODN), Monophosphoryl lipid(MPL) 또는 Aluminum phosphate(Al-phos)를 제조사 메뉴얼에 따라 첨가했다(Table 1). 마지막 백신 투여 2주 후 채혈하여 리신에

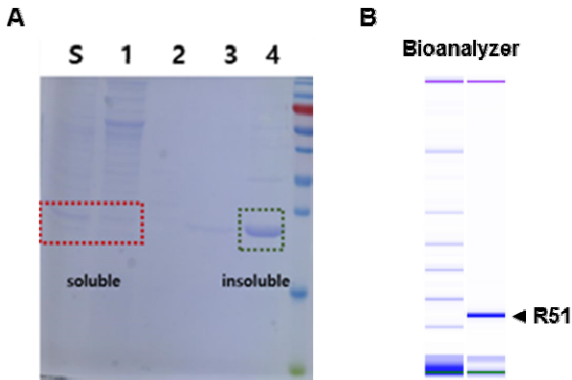
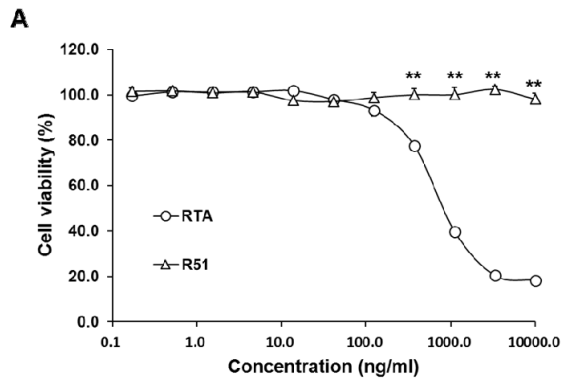


Fig. 2. Solubility test and purification of R51

시커 이황화 결합을 유도함으로써 단백질의 독성을 제거하는 것으로 설계했다(Fig. 1). R51의 발현 분석 결과 배양 상층액(Fig. 2A, S)과 세포 파쇄 상층액(Fig. 2A, 1)에서 R51의 발현을 관찰 할 수 있었고 불용성의 형태 또한 관찰되었다(Fig. 2A, 4). 세포 파쇄 상층액으로부터 Ni-NTA 컬럼을 이용해 1차 정제를 진행하고 thrombin을 처리하여 히스티딘을 제거한 후 size-exclusion chromatography를 이용해 2차 정제를 진행함으로써 R51을 정제했다. 정제한 R51은 bioanalyzer로 순도를 측정했다(Fig. 2B).

제작한 R51이 예상과 같이 세포독성을 나타내지 않는지 확인하기 위해 Jurkat 세포주 및 WST-1을 활용하여 독성 평가를 수행했다. RTA 또는 R51을 세포에 0.2 ng/ml부터 10 µg/ml까지의 농도로 처리해 준 결과 RTA는 0.37 µg/ml에서 세포 생존율이 77.5±2.2 %로 감소하여 유의미하게 세포 독성을 나타내기 시작했으나 R51은 같은 농도에서 100.2±2.6 %로 독성을 나타내지 않았다. 또한 R51은 최대 농도인 10 µg/ml에서도 생존율이 98.2±2.5 %로 독성을 나타내지 않았다(Fig. 3A). 제작한 백신의 *in vivo* 독성을 관찰하기 위해 ICR 마우스에 근육주사로 R51을 투여하고 2주간 생존율을 관찰한 결과 100 % 생존함을 확인했다(Fig. 3B). 또한 R51을 최고농도인 100 µg/head로 단회투여 후 3주간 체중 변화를 관찰했을 때 PBS를 투여한 대조군과 차이를 보이지 않았다(Fig. 3C).

리신 백신 효능 평가를 위해 리신 독소의 반수 치사량(LD₅₀) 산정 시험을 수행한 결과 0.305 µg/head임을 확인했다(Fig. 4A)^[23]. 리신 백신에 최적화된 보조제 선별을 위해 기존 논문에서 RiVax 보조제로 사용한 aluminum hydroxide를 포함하여 6종의 보조제에 따른



B

R51 (µg/head)	N	14 days survivability
0.5	7	100%
1.0	7	100%
5.0	7	100%
25	5	100%
50	5	100%
90	5	100%
100	10	100%

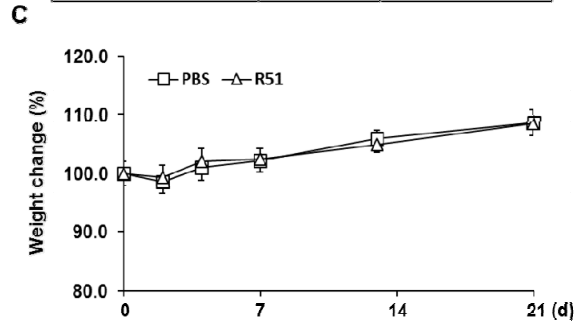


Fig. 3. *In vitro* and *in vivo* toxicity test of R51. ***p*<0.01

R51의 효능 평가를 실시했다^[10]. 보조제의 농도는 제조사의 권장 농도로 하여 Table 1에 따라 PBS에 혼합했으며 R51은 1 µg/head의 농도로 3주 간격으로 3회 근육 투여했다. 마지막 투여 후 2주 뒤 채혈 및 20×LD₅₀(6.1 µg/head)의 리신 독소로 공격하고 2주간 생존율을 관찰했다. 백신 비투여군의 모든 마우스는 1 일 이내에 100 % 죽었으며 알루미늄 계열인 aluminum hydroxide나 aluminium phosphate를 보조제로 사용했을 때 생존율은 각각 60 %, 20 %로 관찰되었다(Fig. 4B). 반면 TLR agonist 보조제의 생존율은 7일 이후 모두 0 %였다. 항체가 측정 결과 A1군이 가장 높은 3730±1089

로 관찰되었으며 Im, MPL, Al-phos군은 각각 564±459, 595±198, 522±458로 관찰되었다(Fig. 4C). 항체가 가장 낮았던 FI, ODN군은 각각 47±20, 26±14로 관찰되었다. 측정치를 이용하여 ANOVA 분석 결과 $p < 0.05$ 로 보조제별 유의미한 차이를 보였으며 추가분석에서 Al 군이 모든 보조제들과 비교했을 때 유의미한 차이를 나타내는 것을 확인했다. 본 시험에서는 보조제에 따른 효능의 차이를 관찰하기 위해 기존 문헌에서 사용한 백신의 용량(10 µg/head)보다 낮은 용량(1 µg/head)으로 면역화를 진행하여 백신 투여군의 생존율이 100%로 포화 되지 않는 조건에서 생존율 측정을 수행했다^[10]. 또한 해당 문헌에 기술되어 있지는 않으나 aluminum

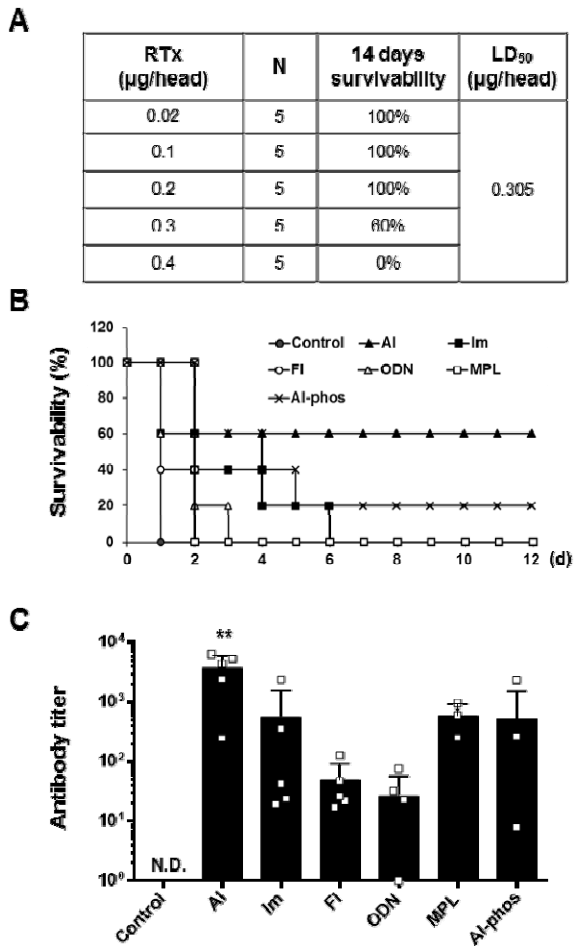


Fig. 4. Survival rate and antibody titer of R51 vaccine according to adjuvants. N.D., not detected. ** $p < 0.01$.

hydroxide를 보조제로 사용했을 때 리신 백신의 효능이 뛰어나기 때문에 이를 보조제로 사용했을 가능성이 있다^[10].

개발한 리신 백신의 리신 독소에 대한 최대 방어능 확인을 위해 ICR 마우스에 백신 5 µg과 aluminum hydroxide 100 µg을 100 µl PBS에 혼합한 후 3주 간격으로 3회 근육 투여하여 면역화를 진행했으며, 마지막 백신 투여 2주 뒤 혈액 채취 및 20-50×LD₅₀(6.1-15.3 µg/head)의 농도로 리신 독소 공격을 진행했다. 공격 결과 20×LD₅₀의 농도로 공격한 대조군은 이틀이내에 생존율이 0%였으며 면역화한 ICR 마우스를 20×LD₅₀과 30×LD₅₀(9.2 µg/head)의 농도로 리신 공격을 했을 때 100% 생존율을 관찰할 수 있었다(Fig. 5A). 가장 높은 농도인 50×LD₅₀(15.3 µg/head)의 독소를 투여했을 때 생존율은 86%였다. 투여군 간 항체 형성에 차이가 있었는지를 확인하기 위해 항체가를 분석한 결과 낮은 농도의 독소 투여군부터 각각 2013±405, 2410±815 그리고 1207±284로 50×LD₅₀의 독소 투여군에서 다소 낮은 항체가를 보였으나 유의미한 수준은 아니었다(Fig. 5B).

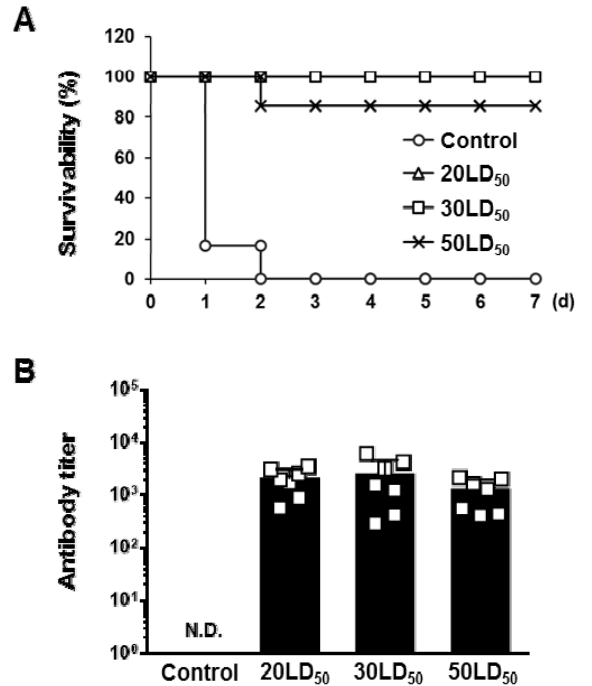


Fig. 5. Dose-dependent survival rate of immunized mice against ricin toxin. N.D., not detected

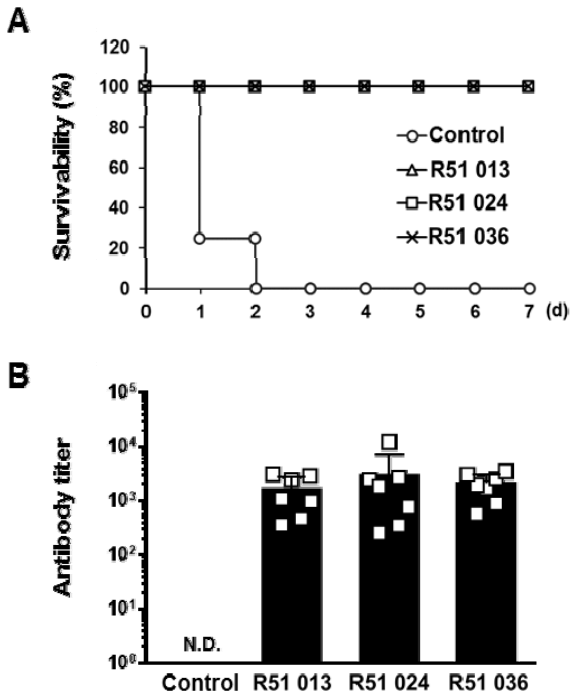


Fig. 6. Evaluation of vaccine efficacy according to change in vaccine administration period. N.D., not detected

리신 백신의 투여기간 단축 가능성을 관찰하기 위해 0, 1, 3주 백신 투여군(R51 013)과 0, 2, 4주 백신 투여군(R51 024), 그리고 0, 3, 6주 투여군(R51 036)의 항체가 및 20×LD₅₀ 리신 방어능을 관찰했다. ICR 마우스에 5 µg/head의 농도로 근육투여를 진행했으며 마지막 백신 투여 후 2주 뒤 혈액채취 및 20×LD₅₀의 리신 독소 공격을 진행한 결과 백신 투여군 별 항체가는 R51 013, R51 024, R51 036 순서대로 각각 1062±436, 2917±714, 2013±405로 유의미한 차이를 보이지 않았다(Fig. 6B). 백신을 투여한 마우스에 20×LD₅₀으로 리신 독소 공격을 했을 때 백신 비투여군은 1일차 생존율이 25 %, 2일차에 모두 죽었으나 모든 백신 투여군은 100 % 생존하는 것을 확인했다(Fig. 6A).

4. 결론

본 연구에서는 리신 독소의 구조를 분석하여 독성 활성을 제거한 리신 백신을 개발했다. R51을 순수정

제하여 보조제 별 리신 독소에 대한 방어능을 비교한 결과 aluminum hydroxide를 보조제로 사용했을 때 가장 뛰어난 백신 효능을 보였다. 또한 aluminum hydroxide를 보조제로 사용하여 리신 백신을 투여한 ICR 마우스의 리신 독소에 대한 방어능은 30×LD₅₀에서 100 %로 관찰되었으며 50×LD₅₀에서는 86 %로 관찰했다. 백신의 투여 기간을 6주 동안 3회 투여에서 3주 동안 3회 투여로 투여 기간을 단축시켰을 때 백신의 효능은 감소하지 않는 것으로 확인했다. 본 연구로부터 개발한 리신 백신은 향후 비임상 독성평가등 안전성 평가를 거쳐 임상 시험을 진행 할 수 있을 것으로 기대한다.

References

- [1] Vance DJ, Mantis NJ., "Progress and challenges associated with the development of ricin toxin subunit vaccines," *Expert Rev Vaccines.*, Sep;15(9), pp. 1213-1222, 2016.
- [2] Endo Y, Tsurugi K., "RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain. Mechanism of action of the toxic lectin ricin on eukaryotic ribosomes," *J Biol Chem*, Jun 15;262(17), pp. 8128-8130, 1987.
- [3] Magnusson S, Kjekken R, Berg T., "Characterization of two distinct pathways of endocytosis of ricin by rat liver endothelial cells," *Exp Cell Res*, Mar;205(1), pp. 118-125, 1993.
- [4] Smallshaw JE, Richardson JA, Pincus S, Schindler J, Vitetta ES., "Preclinical toxicity and efficacy testing of RiVax, a recombinant protein vaccine against ricin," *Vaccine*, Sep 15;23(39), pp. 4775-4784, 2005.
- [5] Griffiths GD, Phillips GJ, Holley J., "Inhalation toxicology of ricin preparations: animal models, prophylactic and therapeutic approaches to protection," *Inhal Toxicol*, Aug;19(10), pp. 873-887, 2007.
- [6] Baluna R, Rizo J, Gordon BE, Ghetie V, Vitetta ES., "Evidence for a structural motif in toxins and interleukin-2 that may be responsible for binding to endothelial cells and initiating vascular leak syndrome," *Proc Natl Acad Sci U S A.*, Mar 30;96(7), pp. 3957-3962, 1999.

- [7] Griffiths GD, Phillips GJ, Bailey SC., "Comparison of the quality of protection elicited by toxoid and peptide liposomal vaccine formulations against ricin as assessed by markers of inflammation," *Vaccine*, Jun 4;17(20-21), pp. 2562-2568. 1999.
- [8] Smallshaw JE, Firan A, Fulmer JR, Ruback SL, Ghetie V, Vitetta ES., "A novel recombinant vaccine which protects mice against ricin intoxication," *Vaccine*, Sep 10;20(27-28), pp. 3422-3427, 2002.
- [9] Olson MA, Carra JH, Roxas-Duncan V, Wannemacher RW, Smith LA, Millard CB., "Finding a new vaccine in the ricin protein fold," *Protein Eng Des Sel*, Apr;17(4), pp. 391-397, 2004.
- [10] Smallshaw JE, Richardson JA, Pincus S, Schindler J, Vitetta ES., "Preclinical toxicity and efficacy testing of RiVax, a recombinant protein vaccine against ricin," *Vaccine*, Sep 15;23(39), pp. 4775-4784, 2005.
- [11] Carra JH, Wannemacher RW, Tammariello RF, Lindsey CY, Dinterman RE, Schokman RD, Smith LA., "Improved formulation of a recombinant ricin A-chain vaccine increases its stability and effective antigenicity," *Vaccine*, May 22;25(21), pp. 4149-4158, 2007.
- [12] De Gregorio E, D'Oro U, Wack A., "Immunology of TLR-independent vaccine adjuvants," *Curr Opin Immunol*, Jun;21(3), pp. 339-345, 2009.
- [13] Steinhagen F, Kinjo T, Bode C, Klinman DM., "TLR-based immune adjuvants," *Vaccine*, Apr 12;29(17), pp. 3341-3355, 2011.
- [14] Apostolico Jde S, Lunardelli VA, Coirada FC, Boscardin SB, Rosa DS., "Adjuvants: Classification, Modus Operandi, and Licensing," *J Immunol Res.*, pp. 14593-14594, 2016.
- [15] Hutchison S, Benson RA, Gibson VB, Pollock AH, Garside P, Brewer JM., "Antigen depot is not required for alum adjuvanticity," *FASEB J*, Mar;26(3), pp. 1272-1279, 2012.
- [16] Delneste Y, Beauvillain C, Jeannin P., "Immunité naturelle: structure et fonction des Toll-like receptors [Innate immunity: structure and function of TLRs]," *Med Sci (Paris)*, Jan;23(1), pp. 67-73, 2007.
- [17] Akira S, Uematsu S, Takeuchi O., "Pathogen recognition and innate immunity," *Cell*, Feb 24;124(4), pp. 783-801, 2006.
- [18] Qureshi N, Mascagni P, Ribì E, Takayama K., "Monophosphoryl lipid A obtained from lipopolysaccharides of *Salmonella minnesota* R595. Purification of the dimethyl derivative by high performance liquid chromatography and complete structural determination," *J Biol Chem*, May 10;260(9), pp. 5271-5278, 1985.
- [19] Mazzeo S, Cappelli C, Caramella D, Belcari A, Forasassi F, Battaglia V, Giannini A, Pasquariello R, Pallocci S, Caproni G, Marcocci C, Pinchera A, Miccoli P, Bartolozzi C., "Multidetector CT in diagnostic work-up of patients with primary hyperparathyroidism," *Radiol Med*, Aug;112(5), pp. 763-775, 2007.
- [20] Gorden KB, Gorski KS, Gibson SJ, Kedl RM, Kieper WC, Qiu X, Tomai MA, Alkan SS, Vasilakos JP., "Synthetic TLR agonists reveal functional differences between human TLR7 and TLR8," *J Immunol*, Feb 1;174(3), pp. 1259-1268, 2005.
- [21] Wagner H., "Bacterial CpG DNA activates immune cells to signal infectious danger," *Adv Immunol.*, 73, pp. 329-368, 1999.
- [22] Olson MA., "Ricin A-chain structural determinant for binding substrate analogues: a molecular dynamics simulation analysis," *Proteins*, Jan;27(1), pp. 80-95, 1997.
- [23] Armitage P, Allen I., "Methods of estimating the LD 50 in quantal response data," *J Hyg(Lond)*, Sep;48(3), pp. 298-322, 1950.