B103

공유결합으로 고정화된 urokinase 칼럼의 스케일업과 solid-phase refolding에 의한 반복 사용

서창우, 안상점[1], 이은규*
한양대학교 화학공학과 생물공정연구실, [1](주)녹십자백신 QA팀
전화 (031) 400-5275, FAX (031) 408-3127

ABSTRACT

We scaled up a covalent immobilization system of urokinase to the activated Sepharose and used it repeatedly to cleave a fusion protein consisting of human growth hormone and GST fragment. After scale up from 6 ml to 250 ml, the column system still demonstrated basically the same performance in terms of urokinase immobilization and fusion protein cleavage. When the column was washed with 6M guanidine HCl after the cleavage reaction, the immobilized urokinase showed no activity probably because it was fully unfolded. However, as the denaturant was gradually removed from the column the immobilized urokinase fully regained its bioactivity, which indicated it was properly refolded into its native conformation as covalently attached to the solid matrix. After 20 cycles of this 'solid-phase unfolding/refolding', the immobilized urokinase maintained approx. 80% of the initial bioactivity. This method provides an efficient protocol to apply the solid-phase refolding technique to improve the longevity of immobilized enzyme columns.

서 론

유전자 재조합 기술의 발전에 따라 미생물 발현체계를 이용한 여러 유용 단백질, 특히 생물의약용 단백질들이 대량생산되어 왔다. 숙주세포에 의한 발현 효율을 증대시키기 위해, 또는 안정성 및 정제 특성을 향상시키기 위해 목적 단백질을 융합 단백질의 형태로 발현시키는 방법에 대한 연구가 활발히 진행 중이다(1). 이때 발현된 융합 단백질로부터 단백질 분해 효소를 이용하여 목적 단백질을 절단 분리하는 과정은 목적 단백질 생산 공정의 생산 단가 및 최종 정제되는 단백질의 순도와 수율에 영향을 미치는 가장 중요한 단계의 하나이다.

고정화 효소 반응을 도입하여 효소를 재사용할 경우 효소 비용이 대폭 절감되고 절단 반응 후 회수 및 정제 공정이 용이하여 융합 단백질 절단 공정의 경제성이 크게 향상된다. 또한 고정화된 효소는 pH 및 온도에 대한 안정성이 향상되고, 고농도 효소 반응과 연속 반응을 통해 높은 생산성을 가질 수 있는 장점도 있다.

혈전 용해제로 사용되고 있는 serine protease 계통의 urokinase (two chain urokinase type plasminogen activator)는 enterokinase, thrombin, Factor Xa 등과 같이 절단 효소로 이용되어 왔다(2). Urokinase(UK)는 뇨(urine)로부터의 대량생산공정이 이미 개발되어 있으며, 특히 대장균과 같은 원핵 세포의 발현 체계를 이용하여 활성이 있는 UK를 대량 제조할 수 있다. 본 연구에서는 기존에 본 연구팀에 의해 발표된 공유결합을 통한 고정화 UK 칼럼을(3) 스케일업하여 이를 반복

적으로 사용하는 방법을 강구하는데 초점을 맞추었다. 반복 사용하는 방법으로서 절단 반응 후 강력한 변성제인 guanidine HCl을 주입하여 고정화된 상태에서 UK의 unfolding을 유도하고 이를 서서히 제거함으로써 UK가 고정화된 상태에서 refolding되어 효소 역가를 회복하는 실험을 수행하였다. 20회 이상의 반복적인 unfolding/refolding 후에도 UK 역가는 처음의 80% 이상을 유지함을 확인하였다. 고가의 UK 투입 비용의 절감할 수 있는 고정화 UK 시스템의 반복 사용은 다른 융합단백질 생산 공정에도 적용되어 파급효과가 클 것으로 기대된다.

재료 및 방법

본 실험에 사용된 UK는 (주)녹십자로부터 제공받았으며 352,000 IU/ml의 활성을 가지고 있다. 융합단백질은 인성장 호르몬의 C-말단기에 GST(glutathione S transferase)의 절편을 (69개의 아미노산) 융합시킨 것으로 UK 절단 부위로서 Gly-Thr-Gly-Arg의 아미노산 서열을 가진 linker로 융합되어 있다(4). Sepharose CL-6B는 Amersham Pharmacia Biotech사(Uppsala, Sweden)에서 구입하였고 gel 활성화 물질로 사용된 glycidol(2,3-epoxy-1-propanol), sodium periodate, sodium borohydride 등의 시약들은 모두 Sigma사(St. Louis, USA)에서 구입하였다.

고정화 UK의 풀림과 재접힘을 통한 반복 사용

융합단백질의 절단 반응이 끝난 고정화 UK 칼럼(6 ml 규모)에 6M GuHCl를 1 BVH(bed volume per hour)의 유속으로 30분 간 주입하여 칼럼 내에 축적된 비용출된 반응 찌꺼기 등을 변성시켜 용출시키는 동시에 고정화된 UK를 풀린 구조로 변환시킨다. 그 후 칼럼을 0.1 M phosphate 완충액(pH 7.5)을 1 BVH으로 1 시간 동안 세척하여 GuHCl을 서서히 제거함으로써 고정화된 상태에서 3차원적 구조를 형성하는 'solid-phase refolding' 반응을 유도하였다(5).

Expanded bed adsorption 크로마토그래피를 이용한 hGH 단량체의 분리

고정화 UK 칼럼을 이용한 융합단백질의 절단 반응 후에는 미반응 융합단백질과 목적 단백질인 hGH 단량체 그리고 GST 단편이 함께 용출된다. 이러한 혼합물에서 목적 단백질인 hGH 단량체만을 분리하는 방법으로 산 침전법을 사용하였다. 침전물을 제거하고 hGH를 회수하는 방법으로 기존의 원심분리 대신 expanded bed adsorption 크로마토그래피(Streamline 25^{TM}, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)를 도입하였다(6).

결과 및 고찰

UK의 고정상 풀림과 재접힘을 통한 반복사용

고정화 효소 칼럼의 경제성은 몇 회까지 반복 사용할 수 있는가에 달려 있으므로, 고정화 UK 칼럼을 반복 사용하는 방법으로서 GuHCl을 이용하여 UK의 solid-phase unfolding 및 refolding을 인위적으로 유도하였다. Fig. 1에서 보듯이 22회까지 반복 사용하여도 초기 역가의 약 80% 수준을 유지함을 확인하였다. 이는 고정화 UK 칼럼의 공정 경제성을 획기적으로 향상시키는 방법이 될 것으로 기대되며 고가의 기타 절단효소들에 의한 절단 반응에도 이용될 수 있을 것이다.

EBA 칼럼을 이용한 hGH 단량체의 분리회수

고정화 UK 칼럼에 의한 절단 반응에서의 용출액을 pH 3.5로 조정한 후 EBA 칼럼에 통과시킴으로써 hGH 단량체를 높은 수율과 순도로 회수하고 동시에 침전 이물질들을 칼럼 외부로 용출 제거할 수 있었다. Fig. 2은 각 단계에서의 SDS-PAGE를 보여 주고 있다. hGH 단량체는 Streamline SP-XL resin에 양이온 교환작용에 의해 높은 수율로 흡착되었고 이는 Wright(6)와 Frej(7)의 연구결과와 흡사하였다. 흡착된 단량체는 NaCl에 의해 높은 순도로 용출되었고 (lane 5), loading 때 flow through에 의한 손실은 거의 없었다 (lane 6). 즉 컬럼 주입 후 미흡착된 용출액을 원심분리하였을 때 상층액에는 아무런 단백질도 검출되지 않았다. 따라서 고정화 UK 칼럼에 의한 융합단백질의 절단, pH stat을 이용한 산 침전에 의한 이물질 침전, EBA 크로마토그래피를 이용한 침전물 제거와 단량체 흡착 정제를 연속 공정으로 수행할 수 있는 가능성을 제시하였다.

요 약

hGH와 GST 절편으로 구성된 융합 단백질의 고정화 UK 칼럼에 의한 절단 반응 후 용출액의 pH를 3.5로 낮춤으로써 이물질들을 침전시키고 이를 expanded bed chromatography 칼럼에 통과시킨 결과, 이물질들의 제거와 hGH 단량체의 흡착분리가 동시에 이루어졌다. 흡착된 단량체는 NaCl에 의해 용출되었으며 이 단계의 수율은 거의 100%이었다. 따라서 칼럼에 의한 절단 반응과 산 침전에 의한 이물질 침전 반응, EBA에 의한 이물질 제거 및 단량체 회수 반응을 연속적으로 진행할 수 있는 기초를 제시하였다. 또한 고정화된 UK는 guanidine HCl(6M)을 이용하여 unfolding 시키고 이를 세척하여 refolding 시킨 결과 20회의 반복적인 처리 후에도 초기 활성의 약 80% 수준을 유지하였다. 이는 UK가 공유결합된 상태에서 solid-phase refolding이 가능하다는 증거이며, 고정화 효소 칼럼의 수명을 크게 향상시켜 경제성을 확보하는 방안으로 이용될 것으로 기대된다.

참고문헌

1. Pryor, K. D and B. Leighting (1997), High level expression of soluble protein in *Escherichia coli* using a His-tag and maltose-binding double affinity fusion system, *Protein Expr. Purif.*, **10**, 309-319.

2. Harris, Y. J. (1987), Second-generation plasminogen activators, *Protein Engineering*, **1(6)**, 449-458.

3. Suh, C. W., K. Y. Kang, H, Lee, S. J. Ahn, and E. K. Lee (2000), Fusion protein cleavage by urokinase covalently immobilized to activated Sepharose gels, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **15**(1), 42-48.

4. Cooke, N. E., J. Ray, J. G. Emery, and S. A. Libhaber (1988), Two distinct species of human growth hormone-variant mRNA in the human placenta predict the expression of novel growth hormone proteins, *J. Biol. Chem.*, **263(18)**, 9001-9006.

5. Soler, G., A. Bastida, R. M. Blanco, R. Fernandez-Lafuente, and J. M. Guisan (1997), Reactivation strategies by unfolding/refolding of chymotrypsin derivatives after inactivation by organic solvents, *Biochnica et Biophysica Acta*, **1339**, 167-175.

6. Wright, P. R., F. J. Muzzio, and B. J. Glasser (1999), Effect of resin characteristics on fluidized bed adsorption of proteins, *Biotechnol. Prog.*, **15**, 932-940.

7. Frej, A. B., R. Hjorth, and A. Hammarstrom (1994), Pilot scale recovery of recombinant annexin V from unclarified *Escherichia coli* homogenate using expanded bed adsorption, *Biotech. Bioeng.*, **44**, 922-929.

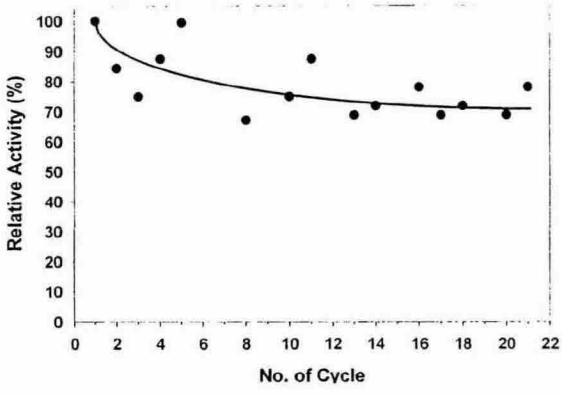

Figure 1. Stability of the immobilized UK activity upon repeated solid-phase unfolding and refolding up to 22 cycles. For each cycle, the column was fed with 6M GuHCl for 1 hour(2 bed volume/hour) for unfolding, and then the denaturant was washed with 0.1M phosphate buffer for 2 hours(2 bed volume /hour) for refolding. The UK activity of the resin was measured after the refolding step and compared with the initial activity.

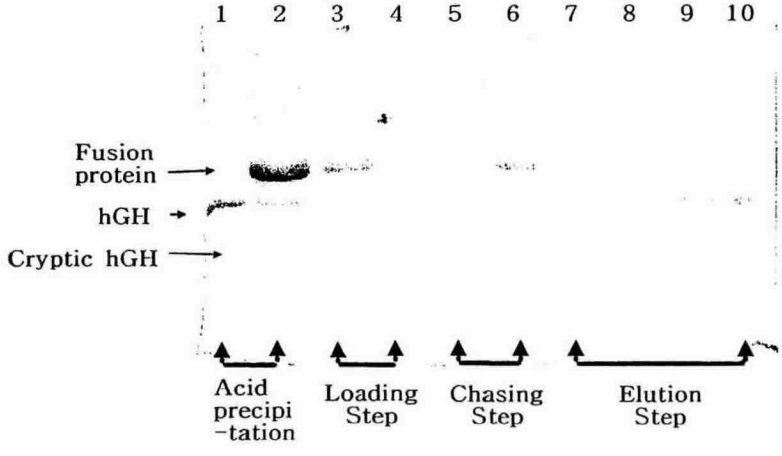

Figure 2. Purification of hGH monomer from the cleaved fusion protein by using Streamline25 column equipped with Streamline SP-XL(50 ml) (Streamline25 operating conditions were: loading buffer of 0.1 M sodium phosphate (pH 3.5) at 10 ml/min, elution buffer of 1M NaCl at 8 ml/min). Lane 1: hGH, lane 2: resolved pellet after acid precipitate, lane 3: resolved pellet of elute at loading step, lane 4: sup. of elute at loading step, lane 5: sup. of elute at chasing step, lane 6: resolved pellet of elute at chasing step, lane 7-10: elute at elution step.