

## PEGylation된 Lipase의 *In-vitro* 재접힘

<sup>1</sup>김민영 · 권진숙 · †이은규

한양대학교 화학공학과 생물공정연구실, <sup>1</sup>(주)한미제약 연구센터

(접수 : 2005. 1. 3., 게재승인 : 2005. 8. 20.)

## *In-vitro* Refolding of PEGylated Lipase

Min Young Kim<sup>1</sup>, Jin Sook Kwon, and Eun Kyu Lee†

Bioprocessing Research Laboratory, Department of Chemical Engineering, Hanyang University, Ansan 426-791, Korea

<sup>1</sup>Hanmi Research Center, Hanmi Pharm. Co., Ltd., Hwaseong 445-813, Korea

(Received : 2005. 1. 3., Accepted : 2005. 8. 20.)

Covalent modification of a protein with polyethylene glycol (PEG) has become one of the most widely used and well established drug enhancement strategies in the biopharmaceutical industry. The general benefits enjoyed by PEGylation, such as prolonged serum half-lives or reduced immunogenicity *in vivo*, are well known. By now the PEGylation process has been performed with purified proteins, and it is required to recover the desired PEGylate by a multi-step purification process. The ultimate aim of our research is to develop an integrated process of PEGylation and *in vitro* refolding starting with inclusion body material. For this, we investigated the feasibility that a protein could be PEGylated under a denaturing condition and also the PEGylated proteins could be refolded correctly. Using lipase as a model protein, we found that it was PEGylated in the presence of 8 M urea and that the PEG molecules covalently attached to lipase did not appear to hinder its refolding.

**Key Words** : PEGylated lipase, PEGylation, refolding, integrated process

### 서론

단백질의 기능성 향상을 위한 방법으로 표면 수식과 같은 화학적 변형 방법이 개발되어 왔다. 이는 polyethylene glycol (PEG)과 같은 인체에 무해한 고분자를 단백질 표면에 공유결합시켜 단백질의 안정성을 향상시키고 동시에 단백질의 높은 면역원성을 감소시키는 효과를 기대할 수 있기 때문이다(1-3). 이 단백질 수식 방법은 주로 정제된 단백질을 대상으로 연구되어 왔다.

재조합 대장균에서 내포체 형태로 과발현되는 단백질의 정제에는 비활성의 내포체를 재생 (renaturation) 시키는 과정이 필수적이다. 만약 이 재생 과정에 PEGylation 공정을 통합시켜 PEGylation된 형태로 재생된 단백질을 얻을 수 있다면 내포체 재접힘, 재생된 단백질의 분리정제, PEGylation, PEGylation된 변형 단백질의 분리정제로 연결되는 다단계 공정을 단순화시켜 공정 효율 및 성능을 크게 향상시킬 수 있을 것이다.

이러한 통합공정의 타당성을 조사하기 위한 본 연구에서는 lipase를 모델 단백질로 하여, 내포체 용해용 변성제를 함유한 버퍼 내에서 풀린 (unfolded) 단백질을 대상으로 PEGylation을 시킴으로써 변성 버퍼 상에서의 PEGylation 가능성을 살펴보고, PEGylation된 단백질의 *in vitro* 재접힘 가능성 및 수율에 대해 살펴보았다.

### 재료 및 방법

본 실험에서 사용된 lipase는 Amano Enzyme Inc.에서 구입하였다 (제품명: LP "Amano" S, Nagoya, Japan). 이 lipase는 *Burkholderia cepacia*로부터 유래한 것으로 분자량이 33 kD이고 등전점이 4.3이며 총 7개의 lysine 잔기를 함유하고 있다 (4). 이 lipase 용액에는 20~30%의 glycine이 안정제로 첨가되어 있어 투석을 통해 이를 제거하였고, GPC 칼럼 (Superdex 200 HR 10/30, Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)을 사용하여 기타 불순물을 제거하였다. 활성화 PEG는 평균 분자량이 5 kD인 methoxy polyethylene glycol-aldehyde (mPEG-aldehyde)를 (주)선바이오사(안양)에서 구입하여 사용하였다. Sodium phosphate, 변성제로 사용한 urea, 환원제로 사용한 sodium cyanoborohydride (NaBH<sub>3</sub>CN) 및 dithiothreitol (DTT), 기타 시약은 Sigma사 (St. Louis, USA)에서 시약급으로 구입

† Corresponding Author : Bioprocessing Research Laboratory, Department of Chemical Engineering, Hanyang University, Ansan 425-791, Korea

Tel : +82-31-400-5275, Fax : +82-31-408-3779

E-mail : eklee@hanyang.ac.kr

하였다.

**폴린 Lipase의 PEGylation과 분리**

변성 버퍼 (8 M urea, 0.1 M sodium phosphate, 1 mM DTT)의 pH를 4.0으로 조절한 후 2 mg/mL의 농도가 되게 lipase 용액을 첨가하여 효소의 폴림을 유도하였다. 여기에 변성 버퍼에 미리 용해한 mPEG-aldehyde 용액을 lipase 대비 PEG의 몰 비율이 50, 75, 100, 150배 되도록 첨가하고, 환원제로서 50 mM NaBH<sub>3</sub>CN를 사용하여 3시간 동안 상온에서 반응시켜 PEGylation을 시도하였다. 낮은 pH에서 환원제 존재 하에서 PEGylation을 수행한 이유는 lipase의 질소 말단기의 아민기를 우선적으로 수식하기 위한 것이었다(5). PEG의 몰 비율과 환원제의 농도가 비교적 높은 이유는 BSA를 사용한 사전 실험에서 urea가 함유된 변성 버퍼에서의 PEGylation 시 urea가 없는 버퍼에서보다 많은 PEG가 요구되었기 때문이다(data not shown).

**PEGylation된 lipase의 *in vitro* 재접힘**

PEGylation된 lipase의 재접힘 가능성 및 수율을 살펴보기 위해 다음과 같은 절차의 실험을 수행하였다. 즉, (1) lipase를 PEGylation 시킨 후 각각의 PEGylate들을 GPC로 분리한 후, (2) 이들을 변성제 및 환원제가 함유된 변성 버퍼에 첨가하여 폴림을 유도한 후, (3) 전통적인 회석 방법에 의해 *in vitro* 재접힘시킨 후, (4) 효소 역가를 측정하여 재접힘 수율을 분석하였다. 우선 PEGylation을 위하여 0.1 M sodium phosphate 버퍼 (pH 8.0)에 8 mg/mL의 농도로 녹인 lipase 용액과 lipase 대비 PEG의 몰 비율이 20배 되도록 mPEG-aldehyde를 첨가하였다. 이 때 20 mM NaBH<sub>3</sub>CN를 환원제로 첨가하여 3시간 동안 상온에서 반응시켰다. PEGylation 공정 후 mono-PEGylate와 di-PEGylate를 분리하기 위하여 GPC (Superdex 200 HR 10/30)를 사용하였다. 칼럼 부피는 25 mL이고 시료 부피는 1 mL이었다. 유동상 버퍼로는 0.1 M sodium phosphate 버퍼 (pH 8.0)를 사용하였고 유속은 0.5 mL/min으로 일정하게 유지하여 용출하였다. 각 피크에 용출된 용액은 SDS-PAGE (12%)를 이용하여 분석하였다.

GPC에 의해 분리된 mono-PEGylate, di-PEGylate 및 미수식된 단량체 lipase 각 0.5 mL를 변성 버퍼 (8 M urea, 0.1 M sodium phosphate, 5 mM DTT, pH 8.0) 내에서 상온에서 2시간 동안 폴림시킨 후 rapid dilution시키는 방법에 의해 재접힘시켰다. 재접힘 버퍼로는 0.1 M sodium phosphate 버퍼 (pH 8.0)를 사용하였으며, 회석 배수를 10배로 하여 최종 농도가 100 µg/mL이 되게 하였다.

GPC에 의해 분리한 PEGylated lipase의 효소 역가를 측정하여 native lipase의 역가와 비교함으로써 PEGylated lipase의 활성을 평가하였다. 또 재접힘된 PEGylated lipase의 역가를 측정함으로써 재접힘 수율을 결정하였다. Lipase의 활성은 Lesuisse의 방법 (흡광도 측정법)을 사용하였다(6). 이때 lipase의 기질로는 *p*-nitrophenyl palmitate (Sigma, USA)를 사용하였으며 lipase 1 unit은 *p*-nitrophenyl palmitate가 분당 1 µmol의 *p*-nitrophenol로 유리되는 양으로 정의하였다. 재접힘된 lipase의 활성 측정은 NaOH 적정법을 사용하였으며 이때의 기질로 olive oil (Sigma, USA)를 사용하였다(6). 재접힘된

lipase의 활성 측정법으로 NaOH 적정법을 사용한 이유는 재접힘 후 잔존하는 urea가 기질(*p*-nitrophenyl palmitate)의 흡광도에 영향을 미치지 때문이다.

**결과 및 고찰**

**변성 버퍼 상에서 폴린 lipase의 PEGylation**

변성 버퍼 상에서 mPEG-aldehyde와 lipase의 접합반응도 PEG의 몰 비가 증가할수록 PEGylation이 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 1). 변성 버퍼의 pH를 4.0으로 한 이유는 reductive alkylation을 통해 backbone에 존재하는 lysine 잔기의 ε-amine기의 pKa 값 (7.0)과 질소 말단기의 α-amine기의 pKa 값 (10.0)의 차이를 이용하여 질소 말단기의 아민을 부위 특이적 (site-specific)으로 수식시키기 위해서이었다(5). 이 방법은 높은 pH에서 모든 lysine의 아민기를 대상으로 한 'random' PEGylation에 비해 수율은 비교적 낮다(5). Fig. 2에서 보듯이 PEG의 몰비가 증가할수록 di-PEGylate도 생성되는 것으로 미루어 보아 변성제 및 환원제 존재 하에서도 PEGylation이 된다는 것을 알 수 있다. PEGylation 수율은 lipase의 모든 아민기의 약 55%가 PEG에 의해 수식되었다는 다른 보고에 비하면 비교적 낮았다(8).

폴린 상태에서 PEGylation된 lipase의 재접힘 가능성을 조사하기 위해서는 각각의 PEGylates들, 즉 mono-PEGylate, di-PEGylate 등을 변성된 상태에서 분리해야 했다. 그러나 urea 존재 하에서는 분리되지 않았다. 즉, pH 6.0 이하에서 urea를 제거하면 곧 lipase의 응집현상이 일어나기 때문이었다(data not shown).

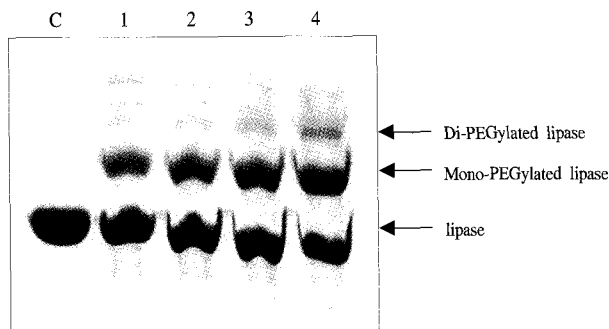


Figure 1. PEGylation of lipase in 8 M urea (pH 4.0). Lane C: lipase, lane 1-4: 50, 75, 100, 150 molar ratio of mPEG-aldehyde (MW. 5 kDa)-to-lipase.

**PEGylated lipase의 *in vitro* 재접힘**

Urea가 없는 0.1 M sodium phosphate 버퍼 (pH 8.0)에서 PEGylation시킨 후 각각의 분자량 차이를 이용하여 GPC에 의해 mono-, di-PEGylate 및 미수식된 단량체 lipase를 성공적으로 분리할 수 있었다(Fig. 2). Native lipase 대비 mono-, di-PEGylated lipase의 활성은 각각 76, 65%이었다(Fig. 3). 이 결과는 PEGylation된 PEG 분자수가 증가할수록 lipase의 생물학적 활성이 감소된다는 Inada 등의 결과와 일치하였다(8). Inada 등은 활성화 PEG를 이용하여 lipase의 총 아민 그룹 중 약 55%를 수식하였고 이렇게 PEGylation된 lipase는 유기용매 상에서 native lipase 대비 약 80%의 활성을

나타내었다고 보고하였다.

GPC로 분리한 mono-, di-PEGylated lipase를 대상으로 8 M urea를 첨가하여 풀림시킨 후 회석을 통해 재접힘 시켰다. Native한 단량체 lipase의 경우 재접힘 수율은 약 30%이었고, mono-, di-PEGylated 경우에도 각각 27.9%, 28.1%로 거의 동일한 수율을 나타내었다. 이 결과는 공유결합에 의해 접합된 PEG 분자가 효소의 재접힘에 부정적인 영향을 미치지 않는 것을 의미한다.

요 약

변성제 (urea)와 환원제에 의해 완전히 풀린 상태의 lipase도 PEG에 의해 수식되는 것을 관찰하였다. 또한 mPEG-aldehyde로 수식된 mono-PEGylated과 di-PEGylated을 변성제와 환원제를 이용해 unfolding 시킨 후 회석에 의한 재접힘 시킨 결과, lipase에 공유결합된 PEG 분자는 재접힘 수율에 거의 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 따라서 내포체 단백질을 대상으로 변성된 상태에서 PEGylation시킨 후 *in vitro* 재접힘 공정을 통해 PEGylation된 상태의 재생된 단백질을 회수할 수 있는 통합공정의 타당성을 제시하였다.

감 사

본 연구는 인하대학교의 초정밀생물분리기술 연구센터 (ERC)의 연구비 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Bailon, P., and W. Verthold (1998), Polyethylene glycol-conjugated pharmaceutical proteins, *Pharm. Sci. & Tech. Today* 1, 352-356.
- Hinds, K. D. and S. W. Kim (2002), Effect of PEG conjugation on insulin properties, *Advanced Drug Delivery Reviews* 54, 505-530.
- Greenwald, R. B., Y. H. Choe, J. McGuire, and C. D. Conover (2003), Effective drug delivery by PEGylated drug conjugates, *Advanced Drug Delivery Reviews* 55, 217-250.
- Yohalem, D. S. and J. W. Lorbeer (1994), Intraspecific metabolic diversity among strains of *Burkholderia cepacia* isolated from decayed onions, soils, and the clinical environment, *Antonie Van Leeuwenhoek* 65(2), 111-131.
- Lee, E. K. and J. D. Lee (2004), Solid-phase, N-terminus-specific, mono-PEGylation of recombinant interferon alpha-2a: Purification, Characterization, and Bioactivity, presented at ISPPP 2004, Aachen, Germany.
- Lesuisse E., K. Schanck, and C. Colson (1993), Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme, *Eur. J. Biochem.* 216, 155-160.
- Kinstler, O. B., N. E. Grabriel, C. E. Farrar, and R. B. DePrince (1994), N-terminally chemically modified protein compositions and methods, US patent No. 5,824,784.
- Inada, Y., H. Nishimura, and K. Takahashi (1984), Ester synthesis catalyzed by polyethylene glycol-modified lipase in benzene, *Biochem. Biophys. Research Comm.* 122(2), 845-850.

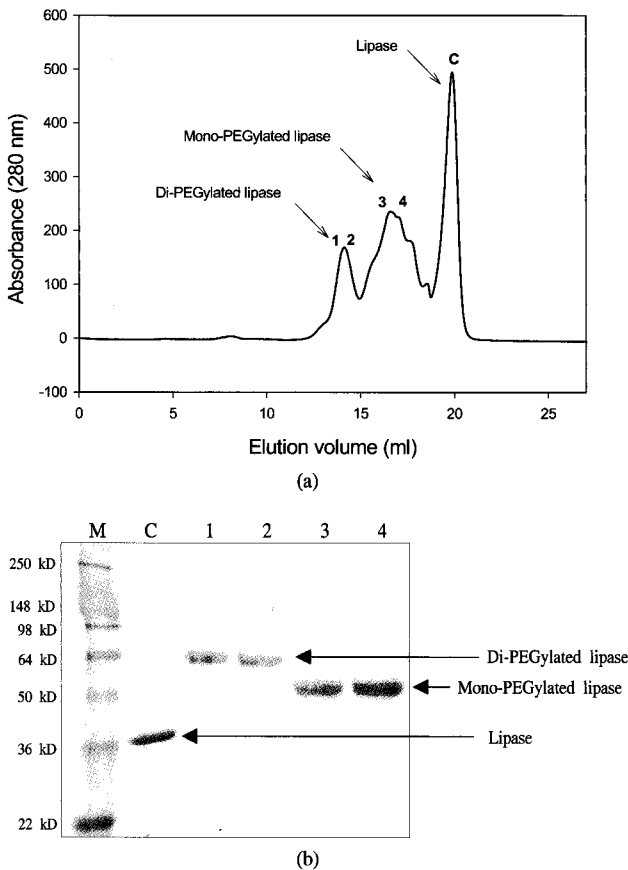


Figure 2. GPC chromatogram of randomly PEGylated lipase (a), and SDS-PAGE of each fraction (b).

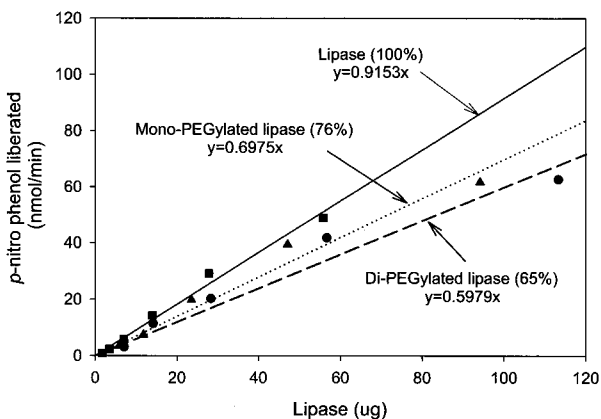


Figure 3. Relative activity of mono- and di-PEGylated lipase. Native lipase (■), mono-PEGylated lipase (▲), and di-PEGylated lipase (●).