J Plant Biotechnol (2010) 37:292-304
DOI:10.5010/JPB.2010.37.3.292

Review

의약용 당단백질에 부가된 당사슬의 중요성

김성훈 · 권오석 · 오두병

Impacts of glycans attached to therapeutic glycoproteins

Seonghun Kim · Ohsuk Kwon · Doo-Byoung Oh

Received: 9 August 2010 / Accepted: 20 August 2010
ⓒ Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract High value-added therapeutic proteins have been leading the biologics industry and occupied major portion of the market. More than 60% of the currently available protein therapeutics are glycoproteins attached with glycans which play crucial roles for the protein folding, therapeutic efficacy, *in vivo* half-life and immunogenecity. This review introduces the process of glycosylation and the impacts of glycans in the aspects of therapeutics. The important glycan structures in therapeutic performances were also summarized focusing on three representative categories of glycoproteins, cytokines, therapeutic antibody and enzyme. Currently, mammalian expression systems such as Chinese hamster ovary cells are preferred for the production of therapeutic glycoproteins due to their ability to synthesize glycans having similar structures with human type glycans. However, recent advances of plant glycoengineering to overcome the limitation originating from different glycan structures will soon allow to develop more efficient and economic plant-based production systems for therapeutic glycoproteins.

서 론

기존의 의약품 시장은 화학합성 의약품들이 대부분을 차지하고 있었으나, 연평균 10%가 넘는 고성장을 구가하고 있는 바이오의약품들이 전체 의약품 시장의 주력으로 빠르게 자리를 잡아가고 있다. 현재까지 개발된 대부분의 바이오의약품들은 주로 재조합 단백질들로서 2010년 시장 규모가 1,300억 달러에 이를 것으로 예상되며, 그 특성상 거대한 매출을 올리는 블록버스터 제품들에 대한 의존성이 높은 편이다. 이러한 고부가가치 단백질 의약품의 60% 이상을 당사슬이 부가된 당단백질들이 차지하고 있으며, 향후 이 비중은 70% 이상으로 높아질 것으로 예측 되고 있다. 이러한 당단백질 의약품의 대표적인 예로는 치료용 항체, 조혈인자 (erythropoietin; EPO), 인터페론, 과립구콜로니자극인자 (granulocyte-colony stimulating factor; G-CSF), 난포자극호르몬, 효소 치료제 등이 있다 (Table 1).

재조합 단백질 의약품은 유전자 조작 기술을 이용하여 제조되는 펩타이드 또는 단백질 등을 유효 성분으로 하는 의약품을 말한다. 즉, 목적 단백질을 생산하기 위해서 해당 유전자를 인체가 아닌 미생물이나 식물 또는 동물 세포 등에 도입하여 발현을 시키게 된다. 따라서, 해당 유전자가 동일하다 하더라도 이를 발현하는 생산 숙주가 다르기 때문에, 재조합 단백질은 자연에 존재하는 천연형 단백질과 번역 후 수식 (post-translational modification; PTM) 등에서 커다란 차이를 보일 수 있다. 특히, 단백질에 당사슬이 부가되는 당질화 (glycosylation) 반응은 대표적인 번역 후 수식 과정으로서 생산 숙주별로 다양한 구조와 양상을 보이게 된다. 이렇게 당단백질 의약품에 부착된 당사슬의 성분과 구조가 천연형과 다를 경우에 치료 효능이나 체내 지속성 및 조직 분포가 달라지며, 인체에 연속 투여 시에 항원으로 작용하여 면역 부작용 등을 유발할 수 있다. 반대로 최적의 당사슬이 부가된 형태로 당단백질 의약품을 만들게 되면, 치료 효능과 체내 지속성이 증진되고 면역 부작용이 줄어들어서 보다 성능이 우수한 형태로 만들 수 있기 때문에 이러한 당사슬 공학 (glycoengineering) 연구가 활발히 이루어지고 있다. 현재, 재조합 단백질 의약품을 생산하는 발현 숙주로는 균주

S. Kim · O. Kwon · D.-B. Oh (✉)
한국생명공학연구원 오믹스융합연구센터
(Integrative Omics Research Center, Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology, 52 Eoeun-dong, Yuseong-gu, Daejeon, 305-333, Korea)
e-mail: dboh@kribb.re.kr

Table 1 Therapeutic glycoproteins in market

Class	Glycoproteins	Product (Company)	Indication
Cytokine	EPO	Epogen (Amgen, Kirin)	Anemia
		Procrit/Eprex (Johnson & Johnson, Schering-Plough)	
		NeoRecormon (Roche)	
	Engineered EPO	Aranesp (Amgen)	Anemia
		Micera (Hoffmann-La Roche)	
	Interferon α	Wellferon (Wellcome)	Chronic hepatitis C
	Interferon β1a	Avonex (Biogen Idec)	Multiple sclerosis
		Betaseron (Shering AG, Berlex)	
		Rebif (Merck Serono)	
Antibody & Fusion protein	anti-VEGF	Avastin (Genentech)	Cancer
	anti-EGFR	Erbitux (Imclone/BMS)	Cancer
		Vectibix (Amgen)	
	anti-HER2	Herceptin (Genentech)	Breast cancer
	anti-TNFα	Humira (Abbott)	Rheumatoid arthritis & Crohn's disease
		Remicade (Centocor, Johnson & Johnson)	
	anti-CD20	Rituxan (Genentech, IDEC)	Non-Hodgkin's lymphoma
	Anti-C5 Ab	Soliris (Alexion)	Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria
	Anti-RSV	Synagis (MedImmune)	Respiratory syncytial virus
	Anti-VLA4	Tysabri (Biogen IDEC)	Multiple sclerosis
	Fc Fusion Protein	Arcalyst (Regeneron)	Cryoporin-associated periodic syndromes
		Enbrel (Amgen)	Rheumatoid arthritis
		Orencia (Brystol-Myers Squibb)	
Enzyme	Gluco-cerebrosidase	Cerezyme (Genzyme)	Gaucher disease
	α-Galactosidase	Fabrazyme (Genzyme)	Fabry disease
		Replagal (TKT/Shire)	
	Iduronate sulfatase	Elaprase (Shire)	Hunter syndrome
	α-Glucosidase	Myozyme (Genzyme)	Pompe disease
	Galsulfase	Naglazyme (Biomarin)	MPS VI
	tPA	TNKase (Biogen IDEC)	Multiple sclerosis

조작이 용이하고 경제적인 생산이 가능한 대장균이나 효모와 같은 미생물들을 일차적으로 고려하지만, 인체 유래의 복잡한 당단백질들을 활성형으로 생산하기 어려운 문제점들을 갖고 있다. 대장균은 소포체 (endoplasmic reticulum; ER)와 골지체 (Golgi apparatus)와 같은 소기관이 없는 원핵생물로서 당사슬 부가 능력이 없으며, 진핵생물인 효모는 당단백질을 생산할 수 있지만 인체 주입 시 면역 부작용을 일으키는 고-만노스 타입 (high-mannose type)의 당사슬이 부가되는 문제점을 갖고 있다.

따라서, 현재 대부분의 의약용 당단백질들은 인간과 비슷한 당사슬이 부가되는 CHO (chinese hamster ovary) 세포 등의 동물세포에서 주로 발현되고 있다. 그러나, 생산세포주 개발에 걸리는 긴 시간과 고가의 생산 비용, 인간에게 해로운 바이러스와 프라이온 등의 오염 가능성 등 심각한 문제점을 안고 있다. 한편, 식물의 경우 저비용으로 대량의 단백질들을 바이러스와 프라이온 등의 오염 없이 목적 단백질을 대량으로 생산할 수 있는 녹색 생산기술로써 커다란 잠재성을 갖고 있다. 하지만, 소포체에서 초기 *N*-당질화 과정 이후에 식물의 골지체에서 진행되는 당사슬 수식 과정이 인간과 달라서 식물 특이적인 당사슬 가지가 부가된다. 이러한 식물 특이적인 당사슬은 인체 주입시 엘러지와 같은 면역 부작용을 유발할 가능성이 있기 때문에 식물 특이적인 당사슬 생합성 경로를 제거하고, 인간 유래의 당전이 효소 (glycosyltransferase)

를 도입하여 인간과 유사한 당사슬 생합성 경로를 구축하기 위한 연구들이 활발히 이루어지고 있다 (Ko et al. 2008). 본 총설에서는 당단백질에 주로 부가되는 당사슬의 형성에 관한 소개를 하고, 이렇게 부가된 당사슬이 실제 당단백질 의약품의 치료 효능과 체내 지속성 등에 미치는 영향에 관해서 소개하고자 한다. 이러한 내용은 재조합 단백질을 생산하기 위한 녹색 생산기술로써 주목받고 있는 식물발현 시스템을 고부가가치의 의약용 당단백질 생산 시스템으로 개발하는데 유용한 기반 정보로 활용될 수 있을 것이다.

당질화 및 당사슬 수식 과정

진핵생물에서 단백질에 당사슬이 부가되는 반응에는 *N*-결합 혹은 *O*-결합 당질화 (*N*-linked or *O*-linked glycosylation)의 두 가지 형태가 있으며, 세포 내의 대표적인 번역 후 수식 과정의 하나로 알려져 있다. 이 두 당질화 과정은 Table 2에 보여지는 것과 같이 당사슬 합성 및 부가 메커니즘에 약간의 차이가 있으며, 이중 단백질의 *N*-결합 당질화는 단백질의 폴딩, 단백질의 분비 및 막단백질의 자리 옮김 (translocation), 단백질 품질 조절 (protein quality control), 단백질의 올리고머화 및 단백질의 분류 (sorting)에 관여하는 중요한 생체 메커니즘이다 (Helenius and Aebi 2004; Kelleher et al. 2007; Kelleher and Gilmore 1994). 진핵생물에서 당사슬의 합성은 소포체와 골지체에서 이루어지는데 (Helenius and Aebi 2004), *N*-당사슬 합성의 시작은 소포체에서 돌리콜 피로인산 (dolichol pyrophosphate, PP-Dol)에 ALG (Asparagine-Linked Glycosylation)로 명명된 일련의 ALG 당전이 효소 (glycosyltransferase)들이 *N*-아세틸글루코사민 (N-acetylglucosamine, GlcNAc), 만노스 (mannose, Man), 포도당 (glucose, Glc) 등을 부가하여, 최종적으로 지질과 연결된 올리고당 (lipid-linked oligosaccharide; LLO) 형태의 복합 당사슬인 $Glc_3Man_9GlcNAc_2$-PP-Dol을 합성하게 된다 (Helenius and Aebi 2004). 이를 좀더 자세히 설명하면 다음과 같이 세 단계로 나누어 설명할 수 있다: 첫 단계에서의 당사슬의 생합성은 세포질 (cytoplasm)의 7개의 ALG 당전이효소 (glycosyltransferase: ALG7, ALG1, ALG2, ALG11 이외에 미 규명된 3개의 ALG)에 의해 $Man_5GlcNAc_2$-PP-Dol 형태로 당사슬이 합성된다. 두번째 단계에서는 세포질에서 합성된 $Man_5GlcNAc_2$-PP-Dol 형태의 당사슬이 ATP 의존적인 flippase Rft1에 의해 소포체 막 안쪽인 루멘 (lumen)으로 플리핑 (flipping)되고, 루멘에 들어간 당사슬에 소포체 내에 존재하는 나머지 6개의 만노실트랜스퍼라아제 (mannosyltransferase)인 ALG 당전이효소 (ALG3, ALG9, ALG12, ALG6, ALG8, ALG10)에 의해 4개의 만노스와 3개의 포도당이 순차적으로 전달되어 최종적으로는 $Glc_3Man_9GlcNAc_2$-PP-Dol로 생합성된다. 최종적으로 합성된 돌리콜 피로인산 지질과 연결된 올리고당은 소포체 루멘에서 8개 이상의 서브 유닛 (subunit)으로 구성된 복합체 형태의 효소인 올리고당 전이효소 (oligosaccharyltransferase)에 의해 단백질 합성을 위해 트랜스로콘 (translocon) 시스템으로 부터 번역되어 나오는 N-x-S/T를 포함하는 펩타이드 (nascent polypeptide)의 *N*-당질화 시퀀 (sequon)에 한 번 (*en bloc*)에 전달 된다 (Chavan et al. 2005; Helenius and Aebi 2004).

소포체에서 합성된 *N*-당사슬이 수식된 펩타이드는 소포체에서 글루코시다아제 (α-glucosidase I, Gls1p ; α-glucosidase II, Gls2p)와 만노시다아제 (α-mannosidase I, Mns1p)에 의한 글루코스 잔기 및 만노스 잔기의 일부 트리밍 (trimming)을 통해 단백질 품질 조절 과정인 calnexin/calreticulin cycle을 경유한 후, 최종적으로 $Man_8GlcNAc_2$ 형태의 당사슬을 갖는 완전히 폴딩된 형태의 단백질로 완성되며, 그 후 골지체로 옮겨지게 된다 (Aebi et al. 2010; Ruddock and Molinari 2006).

소포체에서 골지체로 이동하기 전까지의 단백질의 *N*-당사슬 생합성은 하위 진핵 생물인 효모에서 동물세포 그리고 식물에 이르기 까지 거의 동일한 과정을 거쳐 이

Table 2 Comparison of *N*-linked and *O*-linked glycosylation mechanisms

	N-glycosylation	*O*-glycosylation
Glycan acceptor	Premature peptide	Matured protein
Acceptor sequon	Asn-Xaa-Ser/Thr (Xaa≠Pro)	Ser/Thr
Glycan donors	Lipid-linked oligosaccharides Nucleotide-sugars	Nucleotide-sugars
Location	Endoplasmic reticulum Golgi apparatus	Golgi apparatus
Related mechanism	Protein translation	Protein phosphorylation
Protein folding status	Premature status (Unfolded protein)	Folded status (Folded protein)

루어진다 (Pattison and Amtmann 2009; Gomord et al. 2010). 하지만 소포체에서 골지체로 넘어간 $Man_8GlcNAc_2$ 형태의 당사슬을 갖는 당단백질은 골지체에서 다시 $Man_5GlcNAc_2$ 형태로 트리밍된다. 그리고 여기에 새로운 당들이 부가되는데, 이때 동물, 식물, 곤충 그리고 효모 등 각 종에 특이적인 당사슬이 형성 된다 (Fig. 1) (Gomord et al. 2010). 골지체에서 일어나는 당사슬 수식 과정을 통해서 당사슬의 구조는 더욱 다양하게 되는데, 주로 고-만노스형 (high-mannose type), 하이브리드형 (hydrid type) 및 복합형 (complex type) 당사슬의 세 그룹으로 구분할 수 있다 (Fig. 1). 특이적으로 식물 및 곤충세포에서는 결핍만노스형 (paucimannosidic)의 당사슬을 갖는 당단백질들이 관찰되기도 한다 (Gomord et al. 2010). 이러한 종에 따른 당사슬 생합성 반응의 차이는 골지체에 존재하는 당사슬 결합 특이적인 당전이효소 (glycosyltransferase)들에 의해 결정되는데, 현재까지 보고된 골지체 내의 당전이 효소들로는 *N*-acetylglucosaminyltransferase (GNT), β-galactosyltransferase (β-GALT), α-fucosyltransferase (α-FUCT), α-sialyltransferase (SIALT), β-xylosyltransferase (XYLT) 등이 있으며, 각 효소별로 다양한 아이소머 (isomer)들이 존재한다.

식물에서 생산되는 당단백질의 경우 동물세포와 달리 단백질의 아스파라진 잔기에 결합되어 있는 첫 번째 N-아세틸글루코사민에 α(1,3)-퓨코스 (fucose)가 결합하기도 하며, 만노스 코어 (mannose core) bisecting에 β(1,2)-자일로스 (xylose), 말단의 N-아세틸글루코사민 잔기에는 β(1,3)-갈락토스 (galactose) 와 α(1,4)-퓨코스 결합을 갖는 복합 당사슬 구조 (complex glycan structure)를 갖는 것으로 보고되었다 (Fig. 1) (Gomord et al. 2010). 또한 골지체에서 합성된 당단백질의 일부가 복합 당사슬의 생합성 중에 β(1,3)-갈락토스가 부가되기 전 혹은 후에 액포 (vacuole)로 이동하면서 결핍 만노스형의 *N*-당사슬이 발견되는데 이 메커니즘은 아직 명확히 규명되어 있지 않다. 식물 특이적인 당사슬 구조로는 β(1,2)-자일로스, α(1,3)-퓨코스 및 Lewis a (Le^a) 항원 등이 알려져 있으며, 토끼와 인간 혈청에서 강한 면역원성을 갖는 것으로 알려져 있으나, 흥미롭게도 이러한 당사슬 항원을 특이적으로 인지하는 항체들은 알려진 식물 당단백질을 선택적으로 인식하지 못하는 것으로 보고되고 있다 (Jin et al. 2008).

식물에서 의약용 당단백질 및 치료용 항체를 효과적으로 생산하기 위해서 면역 부작용을 일으킬 수 있는 식물 특이적인 당전이 효소 유전자를 제거하고, 인간화 당사슬을 생합성 할 수 있는 당전이 효소 유전자를 도입하여 동물세포와 유사한 *N*-당사슬 생합성 메커니즘을 갖는 식물체 개발이 현재 이루어지고 있다 (Saint-Jore-Dupas et al. 2007). *Arabidopsis*를 이용하여 식물 특이적인 당사슬 생합성이 차단된 변이주 개발, 여러 종의 식물에서의 RNA

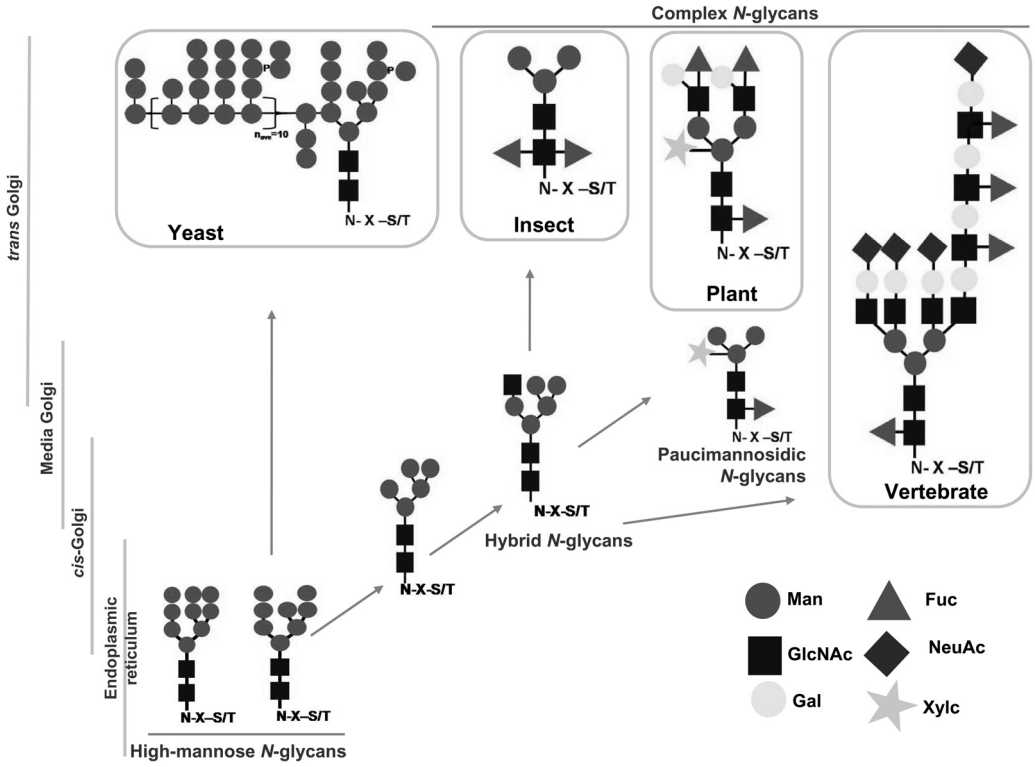

Fig. 1 Dominant *N*-glycosylation pathways of yeast, insect, plant and vertebrate. *N*-glycosylation pathways in ER are conserved among different taxonomic groups but the different modifications in Golgi lead to diverse glycan structures. Symbols used for glycans are those suggested by the Consortium for Functional Glycomics (htpp://www.functionalglycomics.org/)

interference (RNAi)을 이용한 α(1,3)-FucT, β(1,2)-XylT 유전자의 파쇄 기술 개발, 그리고 식물에서 생합성 되지 않는 동물세포 특이적인 β(1,4)-갈락토스와 시알산 (sialic acid) 생합성 경로의 도입 및 CMP-NeuAc transporter의 골지체 발현 등과 같은 다양한 접근법을 통한 연구들이 수행되고 있다 (Gomord et al. 2010).

복잡한 형태의 당화 전구체가 만들어진 후에 번역후 수식이 일어나는 *N*-결합 당사슬과 달리 *O*-당사슬의 생합성은 골지체에서 완전히 폴딩이 끝난 단백질에 순차적으로 당전이 효소가 작용하여 만들어진다. 또한, N-x-S/T의 당질화 시퀀을 가지고 있는 *N*-당사슬과 달리 serine이나 threonine 등의 산소 원자에 당들이 차례로 연결된다. 하지만, 부근 아미노산들의 특징을 보면 serine과 threonine 등의 잔기가 반복적으로 나타나고 proline도 잦은 빈도로 나타나는 특징을 갖고 있어서 이를 예측하는 프로그램도 개발되었다 (Julenius et al. 2005). 특히, 일부 재조합 당단백질을 동물과 효모에서 발현한 경우, 발현 숙주의 차이에 따라 연결되는 *O*-당사슬의 서열과 구조가 완전히 다름에도 불구하고 같은 위치에 *O*-당질화 반응이 일어난다는 보고도 있다 (Ernst et al. 1992).

O-당사슬의 또 다른 특징은 매우 다양한 형태로 나타나난다는 점이다. 동물에서 가장 많이 부가되는 당사슬은 뮤신 타입으로 맨 처음에 GalNAc이 serine과 threonine의 산소원자에 연결되면서 *O*-당사슬의 부가가 시작된다. 이외에도 효모 등에서 많이 부가되는 *O*-만노스 당사슬을 비롯하여 *O*-글루코스, *O*-퓨코스 및 세포질과 핵에서 일어나는 *O*-GlcNAc 당사슬을 비롯한 다양한 종류의 *O*-당사슬이 존재한다. 나아가 hydroxylation 반응으로 변형된 아미노산인 hydroxylysine이나 hydroxyproline의 산소 원자에 *O*-당사슬이 연결되기도 한다. 특히, hydroxyproline에 아라비노스 (arabinose) 또는 갈락토스 등이 연결되는 *O*-당사슬은 식물의 당단백질들에서 많이 발견되는 것으로 알려졌다. 현재까지 시판되고 있는 동물세포에서 생산된 의약용 당단백질에서 주로 발견되는 *O*-당사슬은 뮤신 타입으로 대부분 끝 부분에 시알산이 부가된다.

체내 지속성에 중요한 시알산

당단백질에 부착된 당사슬의 말단에는 시알산이 캡핑 (capping)되며, 혈액 내에서 당단백질의 수명을 결정하는 주요인자로 작용한다. 특히, 당사슬의 말단을 캡핑하는 역할을 하는 시알산이 제거되고 말단에 갈락토스가 노출되면 간에 존재하는 비시알산당단백질 (asialoglycoprotein) 수용체에 의해 해당 단백질이 제거된다 (Fig. 2). 이 수용체는 당사슬에 결합하는 특성을 가진 렉틴의 일종으로 1970년대에 이를 발견한 Ashwell 교수의 이름을 따서 Ashwell 수용체로 불리기도 한다 (Ashwell and Kawasaki 1978). 당사슬 말단의 시알산 캡핑의 여부는 당단백질 의약품의 체내 지속성을 결정하기 때문에 이에 관한 많은 연구들이 진행되었지만, Ashwell 수용체가 인체 내에서 실제로 수행하는 역할에 대한 단서가 밝혀진 것은 극히 최근의 일이다. 2008년 UCSD의 Marth 교수 연구팀은 Ashwell 수용체가 병원균 감염에 의해서 유발된 패혈증에서 생존율을 높여주는 역할을 수행한다는 사실을 발표하였다 (Grewal et al. 2008). 패혈증을 유발하는 모델 세균으로 폐렴구균 (*Streptococcus pneumoniae*)을 Ashwell 수용체가 결손된 Knockout 생쥐에 감염시키면, 세균의 표면에 있는 시알산 절단효소 (neuraminidase, NanA)가 혈소판과 von Willebrand factor (VWF)의 시알산을 제거하면서 패혈증의 무서운 합병증인 "파종성 혈관내 응고 (disseminated intravascular coagulation, DIC)"가 높은 비율로 유도되었다.

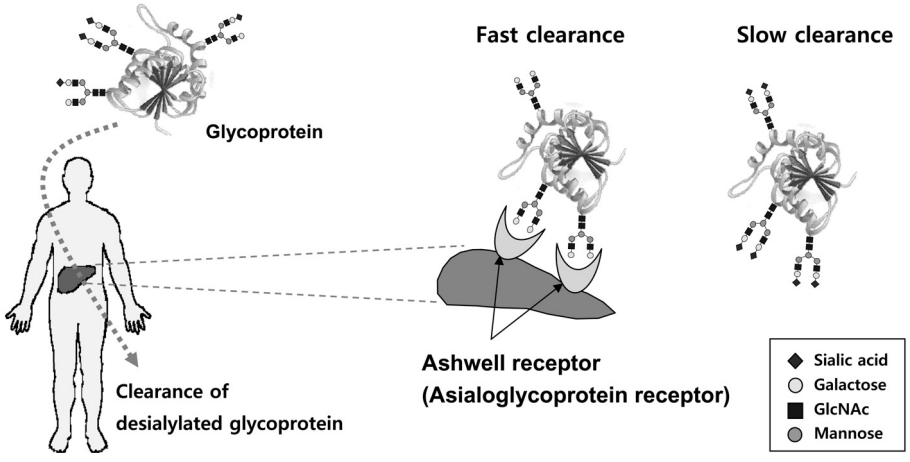

Fig. 2 Clearance of desialylated glycoprotein by asialoglycoprotein receptor. Exposed galactose residues of glycans are recognized by asialoglycoprotein receptors located in the liver, resulting in the rapid clearance of desialylated glycoproteins. In contrast, glycoproteins capped with terminal sialic acid usually display long half-life in serum

하지만, 정상 생쥐에서는 Ashwell 수용체가 시알산이 제거된 혈소판과 VWF를 효과적으로 제거하면서 DIC를 감소시켜 생존 확률을 크게 높여주었다.

이와 같이 간에 존재하는 Ashwell 수용체는 시알산이 부가되지 않고 갈락토스로 끝난 당사슬이 부착된 당단백질들을 혈액에서 빠르게 제거하는 역할을 한다. 하지만, 당사슬의 말단이 갈락토스로 끝나는 경우에만 체내 지속성이 짧아지는 것은 아니며, 만노스나 GlcNAc으로 끝나는 경우에도 체내 지속성이 짧아진다고 보고되어 있다. 혈액에 존재하는 만노스 수용체와 만노스 결합 렉틴 등이 만노스와 GlcNAc에 결합해서 빠른 속도로 해당 당단백질을 혈액에서 제거한다 (Rademacher 1993; Jones et al. 2007). 유사하게 세망내피계 (reticuloendothelial system)를 통해서도 만노스와 GlcNAc을 말단에 가진 당단백질이 제거되기도 한다 (Maynard and Baenziger 1981).

대표적인 바이오블록버스터인 EPO는 신장에서 만들어지는 조혈인자로서 악성 빈혈환자와 만성 신부전 환자 등에 사용되는데, EPO의 체내 지속성은 시알산 부가 정도에 매우 민감하게 반응한다. 설치류에서 실험한 바에 따르면 정상적으로 시알산이 부가된 EPO는 5~6 시간의 체내 반감기를 갖는 반면, 시알산이 제거된 EPO는 2분 이내의 체내 반감기를 갖는다 (Erbayraktar et al. 2003). 특히, GlcNAc 두 개가 연결된 두 개의 안테나 구조 (bi-antennary)의 당사슬에 비해서 4개의 안테나 구조 (tetra-antennary)에 시알산이 부가된 경우에 체내 활성이 높으며, 체내 지속성도 더 긴 것으로 나타났다. EPO는 시알산 함량이 높을수록 체내 지속성이 더 길게 나타나는데, 이는 EPO와 EPO 수용체와의 결합을 약화시키는 덕분에 혈액에서 제거되는 속도가 감소하기 때문이다 (Elliott et al. 2004). 암젠은 이를 이용하여 오리지널 EPO 제품인 Epogen의 차세대 제품으로 2개의 당질화 위치를 더 도입하여 시알산 함량을 크게 증가시킨 Aranesp를 개발하여 성공적으로 상용화하였다 (Fig. 3). Aranesp는 시알산 함량의 증가 덕분에 수용체와의 결합력이 감소하였으며, *in vivo* 효능을 유지한 채로 체내 반감기가 3배 증가하여 환자의 편의성이 증대되었다 (Elliott et al. 2004). Aranesp는 2001년에 처음 시장에 도입된 이래 매출이 급성장하여 Epogen과 Procrit와 같은 기존 오리지널 제품들을 제치고 베스트셀러 제품으로 등극하여 당사슬 공학이 재조합 단백질 의약품의 성능 향상에 효율적인 전략임을 입증해 주는 대표적인 사례가 되었다.

인체에 주로 존재하는 시알산은 *N*-acetylneuraminic acid (Neu5Ac)이며, 인간을 제외한 다른 포유류에서 일정 부분 관찰되는 *N*-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc)는 거의 관찰되지 않는다. Neu5Ac는 당화 전구체인 CMP-Neu5Ac로 활성화된 후에 CMP-Neu5Ac hydroxylase (CMAH) 효소에 의해서 CMP-Neu5Gc로 전환된다 (Fig. 4A). 이 CMAH 유전자는 침팬지와 인류의 공통 조상에서 침팬지가 갈라지고 난 이후, 뇌 용적의 팽창이 일어나기 직전인 2백 80만 년 전 무렵에 6번째 엑손 (exon)에서 92 bp의 DNA가 결손되는 돌연변이가 발생해서 비활성화 된 것으로 추정된다 (Fig. 4B) (Chou et al. 2002). 따라서, 대부분의 포유류와 침팬지 등의 영장류들도 합성하는 Neu5Gc를 인류와 이미 멸종한 네안데르탈인만이 합성하지 못하기 때문에 이를 비인간 시알산 (non-human sialic acid)라고 부르기도 한다. 하지만, 육류와 우유를 섭취 함으로써 이 비인간 시알산을 체내에 흡수할 수 있기 때문에 소량이지만 인체 내에도 Neu5Gc가 존재하며, 암 등의 이상 조직에 많이 분포한다 (Tangvoranuntakul et al. 2003). 이러한 이유로 인체 내에는 Neu5Gc를 항원으로 인식하는 항체들이 존재하여, 시알산으로 Neu5Gc가 부가된 재조합 단백질이 인체 내에 주입되었을 때 면역 반응의 문제를 유발할 소지가 있다.

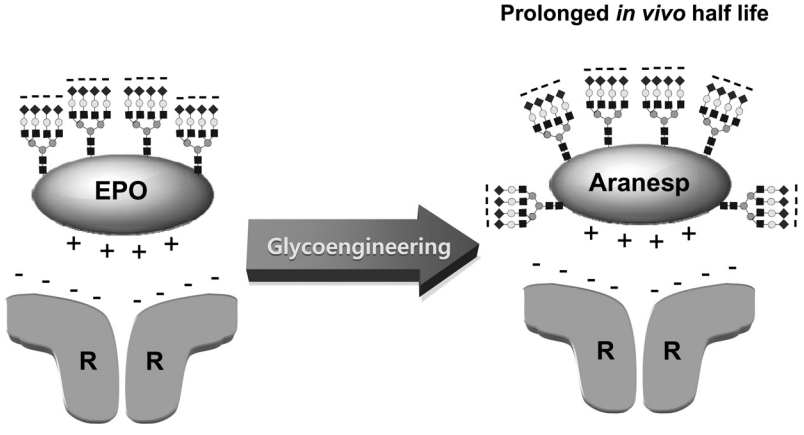

Fig. 3 Prolonged *in vivo* half-life of glycoengineered EPO (Aranesp). Amgen developed advanced version of EPO, Aranesp, which has gained two additional *N*-glycosylation sites by changing the five amino acids. Aranesp has a threefold longer serum half-life due to the decreased internalization by the receptor. Increased negative charges introduced by added sialic acids leads to the reduced receptor binding through charge repulsion

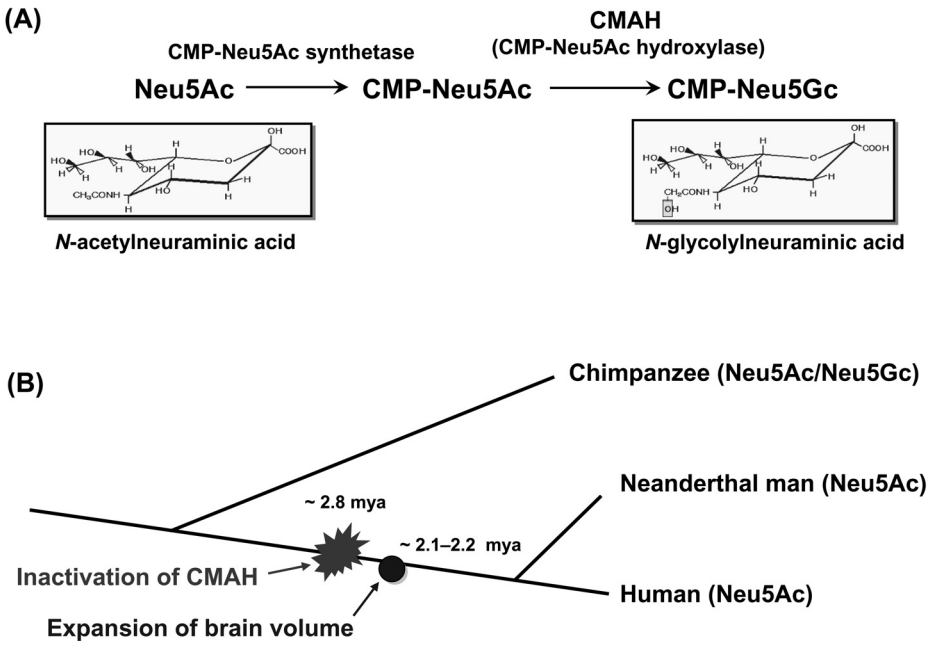

Fig. 4 Non-human sialic acid, *N*-glycolylneuraminic acid. (A) CMP-*N*-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc) is generated from CMP-*N*-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) by CMP-Neu5Ac hydroxylase (CMAH). (B) Gene encoding CMAH was estimated to be inactivated around ~2.8 million years ago (mya) shortly before the brain expansion began in human kind's ancestry (~2.1-2.2 mya) (Chou et al. 2002)

동물세포인 CHO 세포도 Neu5Gc를 합성할 수 있는 능력을 가지고 있으나 무혈청 배지에서 재조합 단백질을 발현하는 경우에는 단백질에 부가되어 있는 Neu5Gc의 양은 매우 미미한 수준으로 관찰된다. 하지만, 혈청 배지를 사용하는 경우나 배양 조건에 따라서는 때때로 이 양이 증가하게 되는 데 이 경우 Neu5Gc에 대한 면역 반응 때문에 체내에서 단백질이 빨리 제거되기도 한다 (Flesher et al. 1995).

치료용 항체의 성능을 향상 시키는 당사슬 구조

최근에 치료용 항체가 각광을 받게 된 것은 하이브리도마 세포에서 생산 되어 생쥐의 아미노산 서열들을 갖고 있는 단클론 항체를 인간화 시키는 기술이 개발되면서 부터이다. 1980년대 후반 CDR-grafting과 CDR-walking 등의 "인간화 항체 제작기술"이 개발되었고, 이후 더욱 진보하여 1990년대에는 display 기술과 형질전환 생쥐 등을 이용한 "완전 인간항체 제작기술"이 개발되며 큰 발전을 거듭하고 있다. 그러나, 이제는 항체의 아미노산 서열만이 인간화 대상은 아니다. 초창기에는 치료용 항체를 NS0와 SP2/0와 같은 생쥐 유래의 하이브리도마 세포 등에서 발현하기도 하였으나, 최근에는 보다 인간과 유사한 당사슬이 부가되는 중국 햄스터 난소 (Chinese hamster ovary; CHO) 세포를 주로 생산 세포주로 선택하는 추세이다 (Fig. 5A). 암 치료용 항체로 Imclone과 BMS에서 개발한 항-EGFR 항체인 Erbitux는 SP2/0 세포에서 생산되는데, 당사슬 말단에 인간에게는 존재하지 않는 (1,3)-갈락토스가 부가되어서 면역 반응을 일으킨다고 보고되었다 (Chung et al. 2008). 최근 Crucell (http://www.crucell.com/)은 CHO 세포보다 더 인간화된 당사슬이 부가되는 생산 세포주를 만들기 위해서 인간의 망막 세포로부터 유래된 PER.C6 세포주를 개발하여 이를 사업화하고 있다.

모든 IgG 항체는 항체 불변영역 (Fc) heavy chain의 Asn297에 당질화 위치를 갖고 있으며, 약 ~20%의 일부 IgG는 Fab의 가변영역 (variable region)에도 당사슬이 부착되기도 한다 (Fig. 5A). 가변영역에 부가되는 당사슬은 다른 일반적인 당질화 위치와 마찬가지로 보통 두 개에서 네 개 정도의 안테나에 시알산이 부가되는 구조를 갖는다. 그러나, 불변영역에 있는 Asn297에 부착된 당사슬은 두 개의 안테나에 보통 갈락토스 (G로 표시)가 1-2개 정도 부가되거나 (G1 또는 G2 형태), GlcNAc으로 끝나는 형태 (G0)를 갖는다. 혈액 내에 존재하는 약 ~5% 내외의 일부 IgG 항체는 Asn297의 당사슬에 시알산이 부가되어 있기도 한다. 하지만, CHO 세포에서 생산하는 치료용 항체는 시알산이 부가된 형태가 거의 관찰되지 않으며, 갈락토스가 부가되는 정도도 인간의 혈액에 존재하는 항체들에 비해 낮은 편이어서 갈락토스가 부가되지 않은 G0 형태가 제일 많이 관찰된다. 항체의 불변영역에 부가되는 당사슬은 항원과의 결합에는 영향을 미치지는 않지

만, 항체가 표적 세포를 제거하기 위해서 일으키는 다양한 면역 반응들에는 큰 영향을 미친다는 것이 밝혀지며 이에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

이러한 연구들의 결과로 항체의 불변영역에 부착된 당사슬의 구조를 제어하여 항체의 치료 효능을 극대화하기 위한 기술로 당사슬 공학 기술이 각광 받고 있다. 특히, 항체의 당사슬 구조가 외래 병원균 및 자가 이상세포 등을 제거하는 ADCC (antibody dependent cell cytotoxicity) 성능의 주요 결정인자로서 이를 이용한 기술들이 개발되어 사업화되었다 (Fig. 5B). 스위스 ETH의 연구 그룹은 두 개의 안테나 사이에 위치하는 bisecting GlcNAc이 부가된 당사슬을 갖는 항체가 월등한 ADCC 성능을 보인다는 사실을 발견하고 (Umaña et al. 1999), 항체의 성능 향상 기술 (GlycoMAb^{TM})을 제공하는 Glycart 회사를 설립하였다. 한편, 일본의 거대 제약회사인 Kyowa-Hakko는 코어 퓨코스가 부가되지 않은 당사슬을 갖는 항체가 50-100 배 이상의 ADCC 성능 향상을 보인다는 사실을 발견하고 (Shinkawa et al. 2003), 미국에 자회사인 Biowa를 설립하여 퓨코스 제거에 의한 성능향상 기술 (POTELLIGENT^{TM})을 이용한 차세대 제품 개발에 주력하고 있다. 이러한 ADCC 성능의 향상 효과는 코어 퓨코스가 부가되지 않은 당사슬에 의해서 유도되는 것으로 알려졌으며, bisecting GlcNAc 부가에 의한 효과는 코어 퓨코스의 부가 반응과 같은 기질을 두고 경쟁적으로 이루어지기 때문에 발생하는 간접적인 효과인 것으로 밝혀졌다 (Shinkawa et al. 2003; Ferra et al. 2006).

코어 퓨코스가 없는 당사슬을 갖는 항체는 FcRIIIa 수용체와의 결합력이 증가하므로 세포 표면에 이 수용체를 가지고 있는 자연살해 (natural killer) 세포 등을 끌어 모아서 ADCC 성능이 향상되는 것이다. 혈액 내에 존재하는 대부분의 항체들은 코어 퓨코스를 가지고 있기 때문에, 코어 퓨코스가 부가되지 않은 항체는 이들보다 자연살해 세포에 대한 결합력이 높아져서 보다 효율적으로 끌어 모을 수 있는 것이다 (Shinkawa et al. 2003; Nechansky et al. 2007). 그러나, 최근에 이와는 조금 다른 기작도 보고되었다. 항-EGFR 항체의 경우 전체 혈액을 가지고 실험했을 때, 코어 퓨코스의 함량이 높은 항체와 낮은 항체 모두 비슷한 수준의 ADCC 성능을 보였다 (Peipp et al. 2008). 말초혈액 단핵세포 (peripheral blood mononuclear cell PBMC)를 가지고 보다 자세한 실험을 했을 때 코어 퓨코스 함량이 낮은 항체는 좀 더 높은 ADCC 성능을 보였고, 다형핵 호중구 (polymorphonuclear neutrophil PMN)을

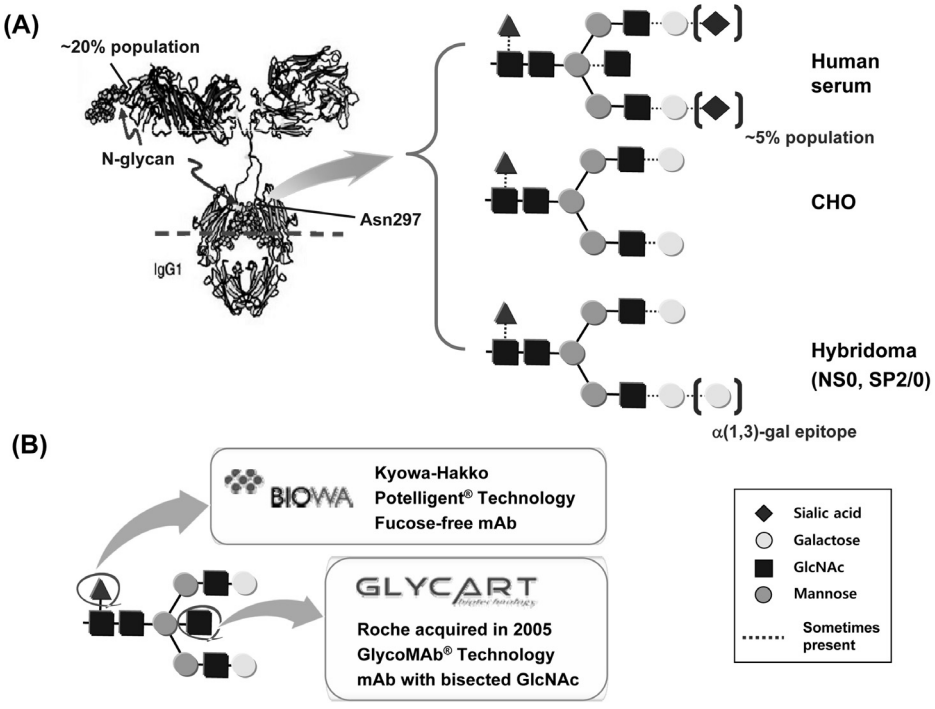

Fig. 5 Glycan structure of IgG antibody. (A) All human IgGs have conserved glycosylation site at Asn297 of heavy chain in Fc region. In addition, ~20% of polyclonal IgGs in serum seem to have *N*-glycan in the variable region of Fab. The *N*-glycans at Asn297 of IgG has bi-antennary complex glycans mostly terminated with galactose and/or GlcNAc while ~5% of serum IgG population contain *N*-glycans terminated with sialic acids. The NS0 and Sp2/0 cell lines derived from mouse cells sometimes produce IgG with *N*-glycans containing galactose-α(1,3)-galactose epitope which would cause immunogenic problem in human. (B) Glycart developed GlycoMAb technology to add bisecting GlcNAC for improved ADCC. Biowa, subsidiary of Kyowa-Hakko, developed Potelligent technology to produce nonfucosylated antibody

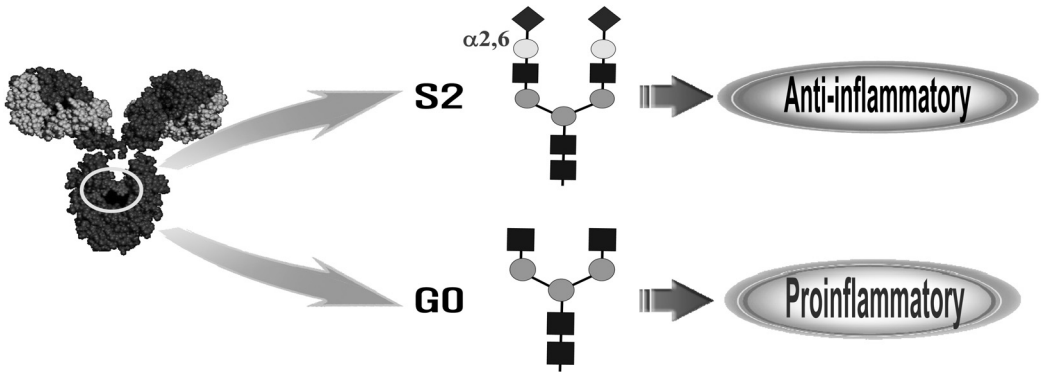

Fig. 6 Sugar switch of IgG. The α(2,6)-sialylated glycans of IgG antibody have anti-inflammatory activity. S2 represents the *N*-glycan capped with two terminal sialic acids while G0 is the *N*-glycan terminated with GlcNAc residues without galactosylation. IgGs with G0 glycan bind to the mannose-binding lectin through terminal GlcNAc residues, which would trigger the activation of inflammation

가지고 실험을 했을 때 코어 퓨코스 함량이 높은 항체는 좀 더 높은 ADCC 성능으로 보였다. 이는 코어 퓨코스가 없는 항체는 FcRIIIa와의 결합력이 높아서 PBMC에 의한 ADCC 성능이 좋고, 코어 퓨코스 함량이 높은 항체는 FcRIIa에의한 ADCC 성능이 좋다고 해석되었다 (Peipp et al. 2008). 그러나, 이러한 주장은 향후 연구에 의해서 더 증명될 필요가 있다.

항체에 부착된 당사슬은 ADCC 외의 CDC (complement dependent cytotoxicity)에서도 중요하다는 사실들이 보고되었다. 카이메릭 항체인 alemtuzumab의 경우 당사슬 말단의 갈락토스가 제거되면 불변영역 수용체와 관련된 활성은 변화가 없으나 CDC가 감소하였다 (Boyd et al. 1995). 또한, 항-CD20 항체인 rituxan의 경우에도 갈락토스가 하나 붙어 있는 G1F 당사슬을 가진 항체가 갈락토스가 전혀 없는 당사슬 G0F가 부착된 항체보다 두 배의 CDC 성능을 보였다 (FDA website). 따라서, 이들 항체의 경우 인허가를 받을 때 생산되는 항체에 일정 함량 이상의 갈락토스가 부가되어야 한다는 규격을 따라야하고, 제조 공정에서 당사슬 분석을 통해서 품질 관리가 되도록 엄격하게 제어되고 있다.

다른 당단백질들에 있어서 당사슬 말단에 부가되는 시알산이 체내 지속성을 결정하는데 반해서, 항체의 불변영역에 부가되는 당사슬은 시알산이 부가되지 않아도 2~4주에 이르는 매우 긴 체내 반감기를 갖는다. 이는 Asn297에 부착되는 당사슬이 두 개의 heavy chain이 이량체 (dimer)를 이루는 안 쪽에 위치하여 간에 존재하는 asialoglycoprotein 수용체 등에 의해서 인식이 되지 않기 때문으로 생각되고 있다. X-ray 크리스탈 구조 분석에 의하면 불변영역의 당사슬은 단백질의 표면과 다수의 비공유 상호작용을 하고 있어서 불변영역의 3차 구조를 이루는 일부로 볼 수 있다 (Krapp et al. 2003). 그래서, 불변영역에 부착된 당사슬의 종류와 구조에 따라서 불변영역의 3차구조가 변하게 되며, 이는 항체의 불변영역 (Fc)과 불변영역 수용체들 (FcI, FcII, FcIII, C1q 등) 간의 상호작용에 영향을 미치게 되는 것이다. 항체 불변영역에 의해서 유도되는 ADCC와 CDC 등의 작용 기능이 치료 효능을 결정하므로, 결론적으로 부착된 당사슬이 항체의 성능을 결정하게 된다. 항체의 불변영역에 당사슬이 부가되지 않은 항체는 이러한 기능이 심각하게 저해되는 것으로 알려져 있다 (Nimmerjahn and Ravetch 2008).

IgG 항체 불변 영역의 당사슬에 부가되는 시알산은 체내 지속성보다는 항염증 작용을 위한 스위치로 작용한다는 연구결과들이 발표되었다 (Kaneko et al. 2006). 인간의 혈액 내에는 IgG 항체의 불변영역에 시알산이 부가된 당사슬이 부착되어 있는 경우가 약 5% 정도 존재하는데, 이들은 불변영역 수용체에 의존하지 않는 기작으로 염증반응을 억제한다 (Fig. 6). 이러한 연구 결과들을 바탕으로 미국 록펠러 대학의 Ravetch 교수 그룹은 항체의 불변영역만을 CHO 세포에서 재조합 발현한 후에 효소 반응을 통하여 α(2,6)-연결가지의 시알산을 부가하여 이를 생쥐에 주사하면 항염증 반응을 유도한다는 것을 보여주었다 (Anthony et al. 2008). 특히, 류마티스 관절염이나 루푸스 및 크론병 등과 같은 자가면역질환을 치료할 수 있다는 것을 모델동물 실험으로 확인하여 새로운 치료제로 개발될 가능성을 보여주었다.

항체 치료제는 인체에 주사하는 분량 (dose)이 매우 높아서, 많은 양의 원료 의약품이 생산되어야 한다. 이러한, 이유로 CHO 세포 외에 항체를 대량 생산하기 위한 다양한 발현 시스템들의 개발이 시도되고 있다. 그러나, 이들 발현 시스템을 통해 부착된 당사슬이 인간의 것과 다를 경우에 이들의 당사슬 생합성 경로를 인간화 해야 하는 선결과제를 갖는다. 대부분의 치료용 항체의 당사슬은 시알산의 부가를 요구하지 않으므로 다른 당단백질 의약품들보다는 최적의 당사슬을 부가하는 발현 시스템을 개발하기 쉬운 편이다. 미국의 GlycoFi사는 효모의 당사슬 생합성 경로를 인간화하는데 성공하였고, 더 나아

가 1 g/L 수준으로까지 항체를 생산하는데 성공하였다 (Potgieter et al. 2009). 식물의 경우에도 인간화 당사슬이 부착된 항체를 생산하려는 다양한 시도들이 있었으며, 이 방법들은 크게 두 가지로 나뉠 수 있다. 우선, 항체의 C-말단에 소포체 체류 신호 (ER retention signal)를 달아서 식물 특이적인 당사슬이 부가되지 않도록 유도하여 고만노스형의 당사슬이 부가된 항체를 생산하려는 시도들이 있다 (Ko et al. 2003; Fujiyama et al. 2009). 또 다른 방법으로는 Biolex사가 식물 특이적인 당사슬을 부가하는 α(1,3)-퓨코스 전이효소와 β(1,2)-자일로스 전이효소의 발현을 억제하는 RNAi를 동시에 발현하여 식물 특이적인 당사슬 가지가 없는 형태로 항체를 발현하는데 성공하였다 (Cox et al. 2006; Strasser et al. 2008).

효소 치료제의 타겟팅을 결정하는 당사슬

라이소좀 저장질환 (lysosome storage disease)은 선천적인 유전자 이상으로 라이소좀에 존재하는 분해효소의 기능이 결핍되어 대사물질이 축적되어 발생하는 질환들이며, 치료를 하지 않으면 대부분의 환자들은 어린 나이나 젊은 시기에 죽음을 맞이하게 된다. 현재까지 이를 치료할 수 있는 유일하게 승인 받은 치료법은 효소 대체요법 (enzyme replacement therapy)으로 정상적인 효소 치료제를 외부에서 주입하는 방법이다. 미국회사 Genzyme는 1998년에 첫 번째 효소 대체요법을 위한 제품으로 고셔병 치료제 Ceredase를 시판한 이래 Cerezyme, Fabrazyme, Aldurazyme 및 Myozyme 등의 효소 치료제를 개발하여 이 분야의 독보적인 영역을 구축하고 있다 (표 1). 효소 치료제는 고가의 재조합 의약품으로서 유전적 대사 질환을 가진 소수의 환자들을 대상으로 하고 있음에도 불구하고, 비싼 가격 때문에 전체 규모가 2.5조원이 넘는 큰 시장을 형성하고 있다. 그러나, 원하는 세포의 라이소좀으로 효소 치료제를 타겟팅하기 위해서는 당사슬을 제어하여 원하는 구조로 최적화 해야 하는 높은 기술적 장벽을 갖고 있어서 전 세계적으로 1-2개 기업이 전체 시장을 독점하는 비정상적인 구조를 보이고 있다.

라이소좀은 세포에서 불필요한 물질들을 분해하여 재활용하도록 하는 소화와 자기 분해 기능을 가진 소기관이다. 그래서, 다양한 소화 효소들이 라이소좀으로 이동해야 하기 때문에 특수한 전달 신호를 가지고 있는데, 이러한 신호가 바로 만노스-6-인산 (mannose-6-phosphate)이다. 골지체에서 *N*-acetylglucosamine-1-phosphotransferase (GlcNAc-PT)가 라이소좀으로 이동할 당단백질들의 3차 구조를 인식하여 GlcNAc-인산을 당사슬의 만노스 잔기에 부가한다 (Fig. 7). 그리고, 여기에 다시 uncovering 효소 (phosphodiester glycosidase)가 작용하여 GlcNAc 잔기만을 제거하여 만노스에 인산이 남게 되는 두 단계의 과정으로 만노스-6-인산이 형성된다. 한편 만노스-6-인산 당사슬을 인식하는 수용체에는 양이온 의존적 만노스-6-인산 수용체 (cation-dependent mannose-6-phosphate receptor; CD-MPR)와 양이온 비의존적 만노스-6-인산 수용체 (cation-independent mannose-6-phosphate receptor; CI-MPR)의 두 종류가 존재한다. 양이온 의존적 만노스-6-인산 수용체는 ~45 kDa 정도의 분자량으로 dimer

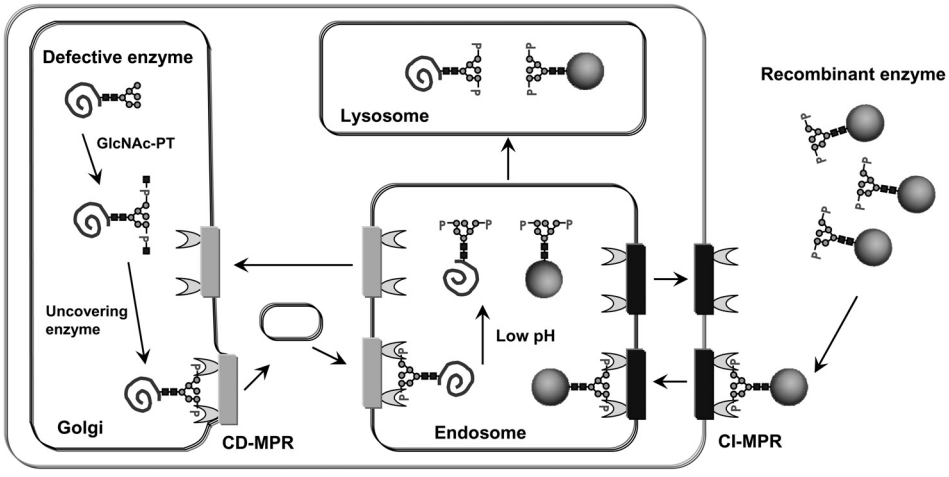

Fig. 7 Targeting of therapeutic enzymes to lysosome directed by mannose-6-phosphate signal. Glycoproteins programmed to move to lysosome are recognized and phosphorylated by *N*-acetylglucosamine-1-phosphotransferase (GlcNAc-PT). Then, GlcNAc moiety is removed to leave phosphate group linked mannose residue by uncovering enzyme, which generates mannose-6-phosphate. Two types of mannose-6-phosphate receptors (MPR), cation-dependent (CD) MPR and cation-independent (CI) MPR, can recognize glycoproteins containing mannose-6-phosphate and mediate their trafficking to lysosome. Some portions of lysosomal enzymes escape this pathway and are secreted outside the cells. CI-MPR is capable of recapturing such secreted lysosomal enzymes by endocytosis mechanism. Enzyme replacement therapy employs this mannose-6-phosphate-dependent secretion-recapture pathway to target the administered recombinant enzyme to lysosome where they can hydrolyze the accumulated metabolites instead of patient's defective enzymes

또는 tetramer로 작용하는 반면에 양이온 비의존적 수용체는 250-300 kDa 정도의 큰 분자량을 지니며 만노스-6-인산 외에도 다른 여러 리간드에 대한 결합 부위를 가지고 있다.

만노스-6-인산 수용체는 골지체에서 만노스-6-인산을 가지고 있는 당단백질에 결합하여 이를 내포 (endosome)를 거쳐 라이소좀으로 이동시킨다. 그러나, 이때 만노스-6-인산 수용체와 결합하지 못한 당단백질은 세포 밖으로 분비되게 된다. 이렇게 분비된 당단백질들을 다시 내포 반응 (endocytosis)을 통해서 라이소좀으로 이동시키는 "분비-재도입 (secretion-recapture)" 경로가 존재하는데 주로 양이온 비의존적 만노스-6-인산 수용체가 기능을 한다. 바로 이 경로가 효소 대체요법이 이용하는 중요한 기작이다 (Fig. 7). 라이소좀 저장 질환을 가지고 있는 환자들은 잘못된 효소가 라이소좀으로 이동하여 축적된 대사물질을 분해할 수가 없다. 이 경우 외부에서 만노스-6-인산 당사슬을 가진 정상 효소를 투여하면, 분비-재도입 경로를 거쳐서 정상 효소가 라이소좀으로 이동하여 축적된 대사물질을 대신 분해해 주는 것이다. 따라서, 이러한 효소 치료제에 있어서는 만노스-6-인산 당사슬의 부가를 정밀하게 제어하는 것이 품질 관리에 있어서 매우 중요한 것이다. 만노스-6-인산 당사슬을 가진 효소 치료제로는 파브리병을 위한 Genzyme사의 Fabrazyme과 TKT와 Shire사의 Replagal, 폼페병을 위한 Myozyme (Genzyme), 헌터증후군을 위한 Elaprase (Shire), 뮤코다당침착증 I형을 위한 Aldurazyme (Genzyme) 및 IV 형을 위한 Naglazyme (Biomarin) 등이 있다.

효소 치료제 중에서 최대의 매출을 보이는 고셔병 치료제, Cerezyme은 다른 효소 치료제들과 달리 만노스-6-인산 대신에 당사슬의 비환원 말단이 만노스로 끝나는 것이 중요하다. 고셔병은 α-glucocerebrosidase 효소 활성의 결핍으로 대식 세포에 glucocerebroside가 축적되어 생기는 질환으로 부풀어오른 대식세포가 간, 비장 골수 등의 조직에 쌓이면서 심각한 빈혈, 혈소판 감소증 및 간비장 비대와 골괴사를 수반한 골격 합병증이 나타난다. 1970년대에 태반에서 분리한 glucocerebrosidase를 정제하여 환자에게 투여하였을 때 처음에는 일관된 결과가 나오지 않았다. 이는 외부에서 투여한 효소가 대식세포의 라이소좀으로 이동하기 위해서는 대식세포의 표면에 있는 만노스 수용체와 결합하여야 하기 때문이다. 따라서, 복합형 당사슬을 가지고 있는 효소에 시알산 분해효소 (sialidase), 갈락토스 분해효소 (galatosidase) 및 hexosamine 분해효소 (hexosaminidase) 등을 순차적으로 처리해서 당사슬 말단에 만노스를 노출시킨 후에야 효과적인 효소 치료제인 ceredase를 개발하게 되었다. 이후 CHO 세포에서 glucocerebrosidase를 재조합으로 발현하고 동일하게 세 개의 당분해 효소들을 처리해서 만노스가 노출된 당사슬을 가지도록 한 효소 치료제가 Cerezyme이다.

결 론

본 총설에서는 당사슬이 중요한 역할을 하는 당단백질 의약품으로 사이토카인과 호르몬, 치료용 항체 및 효소 치료제 등을 다루며 어떠한 당사슬 구조가 의약품의 성능에 있어서 중요한지를 소개하였다. 당단백질 의약품에 있어서 당사슬은 치료 효능, 체내 지속성, 타겟팅 및 면역반응 등의 품질을 결정하는 주요 인자이다. 그러나, 현재 당단백질의 주요 발현 시스템인 CHO 세포에서 생산하는경우에도 최종적으로 결정되는 생산세포주와 배양 조건 등에 따라서 당화 부가 정도가 달라지는 macroheterogeneity와 부착된 당사슬의 성분과 구조가 달라지는 microheterogeneity 등의 불균일성이 발생한다. 따라서, 국제 수준의 ICH (International Conference on Harmonization) 가이드라인에서는 당단백질 의약품에 부착된 불균일성을 규명하고, 각 배치마다 재현성 있게 생산된다는 것을 증명하도록 요구하고 있다. 한국 식품의약품안전청에서도 국내 바이오업체들의 당분석 수준을 국제화시키고자 "당단백질 의약품의 당구조 분석시험법 길라잡이 (2007년)"와 "당단백질 의약품의 당구조 특성분석 및 규격 설정에 관한 가이드라인 (2009년)" 등을 고시하며, 당 분석의 품질 제어를 강화해가고 있다. 고부가가치의 당단백질 의약품을 생산하는 식물 발현 시스템을 개발하기 위해서는 엘러지 등의 면역반응을 유발할 수 있는 식물 특이적인 당사슬 구조를 제거하고, 인간화된 당사슬 구조가 균일하게 부가 될 수 있도록 리모델링 하는 연구 개발이 더욱 중요해질 것이다.

사 사

본 연구는 바이오그린 21 사업 (20070401034026), 한국연구재단의 일반연구자지원사업 (2010-0016437) 및 국토해양부의 해양극한생물 분자유전체사업의 지원으로 수행된 연구결과이다.

인용문헌

Aebi M, Bernasconi R, Clerc S, Molinari M (2010) *N*-glycan structures: recognition and processing in the ER. Trends Biochem Sci 35:74-82

Anthony RM, Nimmerjahn F, Ashline DJ, Reinhold VN, Paulson JC, Ravetch JV (2008) Recapitulation of IVIG anti-inflammatory activity with a recombinant IgG Fc. Science 320:373-376

Ashwell G, Kawasaki T (1978) A protein from mammalian liver that specifically binds galactose-terminated glycoproteins. Methods Enzymol 50:287-288.

Boyd PN, Lines AC, Patel AK (1995) The effect of the removal of sialic acid, galactose and total carbohydrate on the functional activity of Campath-1H. Mol Immunol 32:1311-1318

Chavan M, Yan A, Lennarz WJ (2005) Subunits of the translocon interact with components of the oligosaccharyltransferase complex. J Biol Chem 280:22917-22924

Chou HH, Hayakawa T, Diaz S, Krings M, Indriati E, Leakey M, Paabo S, Satta Y, Takahata N, Varki A (2002) Inactivation of CMP-*N*-acetylneuraminic acid hydroxylase occurred prior to brain expansion during human evolution. Proc Natl Acad Sci USA 99:11736-11741

Chung CH, Mirakhur B, Chan E, Le QT, Berlin J, Morse M, Murphy BA, Satinover SM, Hosen J, Mauro D, Slebos RJ, Zhou Q, Gold D, Hatley T, Hicklin DJ, Platts-Mills TA (2008) Cetuximab-induced anaphylaxis and IgE specific for galactose-alpha-1,3-galactose. N Engl J Med 358:1109-1117

Cox KM, Sterling JD, Regan JT, Gasdaska JR, Frantz KK, Peele CG, Black A, Passmore D, Moldovan-Loomis C, Srinivasan M, Cuison S, Cardarelli PM, Dickey LF (2006) Glycan optimization of a human monoclonal antibody in the aquatic plant *Lemna minor*. Nat Biotechnol 24:1591-1597

Elliott S, Egrie J, Browne J, Lorenzini T, Busse L, Rogers N, Ponting I (2004) Control of rHuEPO biological activity: the role of carbohydrate. Exp Hematol 32:1146-1155

Erbayraktar S, Grasso G, Sfacteria A, Xie QW, Coleman T, Kreilgaard M, Torup L, Sager T, Erbayraktar Z, Gokmen N, Yilmaz O, Ghezzi P, Villa P, Fratelli M, Casagrande S, Leist M, Helboe L, Gerwein J, Christensen S, Geist MA, Pedersen LØ, Cerami-Hand C, Wuerth JP, Cerami A, Brines M (2003) Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity in vivo. Proc Natl Acad Sci USA 100:6741-6746

Ernst JF, Mermod JJ, Richman LH (1992) Site-specific *O*-glycosylation of human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor secreted by yeast and animal cells. Eur J Biochem/FEBS 203:663-667

FDA (US Food and Drug Administration) website: http://www.fda.gov/downloads/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/HowDrugsareDevelopedandApproved/ApprovalApplications/TherapeuticBiologicApplications/ucm113330.pdf

Ferra C, Brünker P, Suter T, Moser S, Püntener U, Umaña P (2006) Modulation of therapeutic antibody effector functions by glycosylation engineering. Biotechnol Bioeng 93:851-861

Flesher AR Marzowski J, Wang WC, Raff HV (1995) Fluorophore-labeled carbohydrate analysis of immunoglobulin fusion proteins. Biotechnol Bioeng 46:399-407

Fujiyama K, Misaki R, Sakai Y, Omasa T, Seki T (2009) Change in glycosylation pattern with extension of endoplasmic reticulum retention signal sequence of mouse antibody produced by suspension-cultured tobacco BY2 cells. J Biosci Bioeng 107:165-172

Gomord V, Fitchette AC, Menu-Bouaouiche L, Saint-Jore-Dupas C, Plasson C, Michaud D, Faye L (2010) Plant-specific glycosylation patterns in the context of therapeutic protein production. Plant Biotechnol J 8:564-857

Grewal PK, Uchiyama S, Ditto D, Varki N, Le DT, Nizet V, Marth JD (2008) The Ashwell receptor mitigates the lethal coagulopathy of sepsis. Nat Med 14:648-655

Helenius A, Aebi M (2004) Roles of *N*-linked glycans in the endoplasmic reticulum. Ann Rev Biochem 73:1019-1049

Jin C, Altmann F, Strasser R, Mach L, Schähs M, Kunert R, Rademacher T, Glössl J, Steinkellner H (2008) A plant-derived human monoclonal antibody induces an anti-carbohydrate immune response in rabbits. Glycobiology 18: 235-241

Jones AJ, Papac DI, Chin EH, Keck R, Baughman SA, Lin YS, Kneer J, Battersby JE (2007) Selective clearance of glycoforms of a complex glycoprotein pharmaceutical caused by terminal *N*-acetylglucosamine is similar in humans and cynomolgus monkeys. Glycobiology 17:529-540

Julenius K, Mølgaard A, Gupta R, Brunak S (2005) Prediction, conservation analysis and structural characterization of mammalian mucin-type *O*-glycosylation sites. Glycobiology 15:153-164

Kaneko Y, Nimmerjahn F & Ravethc JV (2006) Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. Science 313:670-673

Kelleher DJ, Banerjee S, Cura AJ, Samuelson J, Gilmore R (2007) Dolichol-linked oligosaccharide selection by the oligosaccharyltransferase in protist and fungal organisms. J Cell Biol 177:29-37

Kelleher DJ, Gilmore R (1994) The *Saccharomyces cerevisiae* oligosaccharyltransferase is a protein complex composed of Wbp1p, Swp1p, and four additional polypeptides. J Biol Chem 269:12908-12917

Ko K, Ahn MH, Song M, Choo YK, Kim HS, Ko K, Joung H (2008) Glyco-engineering of biotherapeutic proteins in plants. Mol Cells 25:494-503

Ko K, Tekoah Y, Rudd PM, Harvey DJ, Dwek RA, Spitsin S, Hanlon CA, Rupprecht C, Dietzschold B, Golovkin M, Koprowski H (2003) Function and glycosylation of plant-derived antiviral monoclonal antibody. Proc Natl Acad Sci USA 100:8013-8018

Krapp S, Mimura Y, Jefferis R, Huber R, Sondermann P (2003) Structural analysis of human IgG-Fc glycoforms reveals a correlation between glycosylation and structural integrity. J Mol Biol 325:979-989

Maynard Y, Baenziger JU (1981) Oligosaccharide specific endocytosis by isolated rat hepatic reticuloendothelial cells. J Biol Chem 256:8063-8068

Nechansky A, Schuster M, Jost W, Siegl P, Wiederkum S, Gorr G, Kircheis R (2007) Compensation of endogeneous IgG mediated inhibition of antibody-dependent cellular cytotoxicity by glyco-engineering of the therapeutic antibodies. Mol Immunol 44:1815-1817

Nimmerjahn F, Ravetch J (2008) Fc receptors as regulators of immune responses. Nature Rev Immunol 8:34-47

Pattison RJ, Amtmann A (2009) *N*-glycan production in the endoplasmic reticulum of plants. Trends Plant Sci 14:92-99

Peipp M, Lammerts van Bueren JJ, Schneider-Merck T, Bleeker WW, Dechant M, Beyer T, Repp R, van Berkel PH, Vink T, van de Winkel JG, Parren PW, Valerius T (2008) Antibody fucosylation differentially impacts cytotoxicity mediated by NK and PMN effector cells. Blood 112:2390-2399

Potgieter TI, Cukan M, Drummond JE, Houston-Cummings NR, Jiang Y, Li F, Lynaugh H, Mallem M, McKelvey TW, Mitchell T, Nylen A, Rittenhour A, Stadheim TA, Zha D, d'Anjou M (2009) Production of monoclonal antibodies by glycoengineered *Pichia pastoris*. J Biotechnol 139:318-325

Rademacher TW (1993) Glycosylation as a factor affecting product consistency. Biologicals 21:103-104

Ruddock LW, Molinari M (2006) *N*-glycan processing in ER quality control. J Cell Sci 119:4373-4380

Saint-Jore-Dupas C, Faye L, Gomord V (2007) From planta to pharma with glycosylation in the toolbox. Trends Biotechnol 25:317-323

Shinkawa T, Nakamura K, Yamane N, Shoji-Hosaka E, Kanda Y, Sakurada M, Uchida K, Anazawa H, Satoh M, Yamasaki M, Hanai N, Shitara K (2003) The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting *N*-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. J Biol Chem 278:3466-3473

Strasser R, Stadlmann J, Schähs M, Stiegler G, Quendler H, Mach L, Glössl J, Weterings K, Pabst M, Steinkellner H (2008) Generation of glyco-engineered *Nicotiana benthamiana* for the production of monoclonal antibodies with a homogeneous human-like *N*-glycan structure. Plant Biotechnol J 6:392-402

Tangvoranuntakul P, Gagneux P, Diaz S, Bardor M, Varki N, Varki A, Muchmore E (2003) Human uptake and incorporation of an immunogenic nonhuman dietary sialic acid. Proc Natl Acad Sci USA 100:12045-12050

Umaña P, Gagneux P, Diaz S, Bardor M, Varki N, Varki A, Muchmore E (1999) Engineered glycoforms of an anti-neuroblastoma IgG1 with optimized antibody-dependent cellular cytotoxic activity. Nat Biotechnol 17:176-180