

고삼투압이 제조합 Erythropoietin의 생산과 당쇄구조에 미치는 효과

정연태, 김정희

한국과학기술원 생물학과

전화 (042) 869-2654, FAX (042) 869-5614

Abstract

Effect of hyperosmotic pressure on growth of recombinant Chinese hamster ovary cells and Erythropoietin (EPO) production was investigated. Cells were cultivated in batch modes at various osmolalities. When the osmolality increased from 314 to 463mOsm/Kg, specific EPO productivity (qp) was increased up to 1.6-fold but cell growth was inhibited.

EPO has a complex oligosaccharide structure that plays an important role in biological activity in vivo. To investigate the influence of hyperosmotic pressure on the glycosylation, structural analysis of oligosaccharide was carried out. Recombinant human EPO was produced by CHO cells grown under various osmotic pressure and purified from culture supernatants by heparin-sepharose affinity column and immunoaffinity column. N-linked oligosaccharides were released enzymatically and isolated by paper chromatography. The isolated oligosaccharides were labeled with a fluorescent dye, 2-aminobenzamide and analyzed with MonoQ anion exchange chromatography and GlycosepN amide chromatography for the assignment of GU (glucose unit) value. Glycan analysis by HPLC showed that neutral (asialo) oligosaccharide was increased slightly with an increase in osmolality. In portion of sialylated glycan, total relative amount of mono- and di-sialylated glycan was increased but that of tri- and tetra-sialylated glycan decreased as osmolality was increased.

서론

EPO(Erythropoietin)는 포유동물에서 적혈구의 생산을 조절하기 위해 신장에서 생산되는 당단백질이다. 적혈구는 산소를 운반하는 기능을 수행하므로, 혈액에서 산소의 농도를 조절하는데 혈장에서의 EPO 생산 수준은 매우 중요하다. 인간의 EPO는 166개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 한 개의 O-linked 와 세 개의 N-linked 당쇄가 연결되어 있다. EPO의 당쇄는 수용성 성질(solubility), 세포내에서의 가공(cellular processing), 분비(secretion) 등에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 특히 생물공학적으로나 약리적으로 중요시되는 EPO의 생물학적 활성에 결정적인 영향을

나타내는 것으로 보고되고 있다.¹⁾

삼투압은 동물세포 배양에서 중요한 공정 변수이다. 배양중의 배지 삼투압이 변하게 되면 세포의 크기, 모양, 영양분의 수송, 세포내 합성 등에 영향을 미치는데, 특히 세포의 성장속도와 생산속도에 변화를 준다. 배지의 삼투압을 증가시키면 비록 세포주 사이의 차이가 있어도 많은 종류의 hybridoma 세포에서 항체의 비생산 속도(specific productivity, q_{Ab})가 증가되었다.²⁾ 그러나, Chinese hamster ovary (CHO) 세포가 치료용 단백질의 상업적인 생산에 가장 널리 알려진 숙주 동물세포임에도 불구하고 대부분의 생산력 향상에 관한 고삼투압의 연구는 hybridoma 세포에 집중되어져 왔다. 본 연구에서는 고삼투압이 CHO 세포의 성장과 EPO 생산에 미치는 영향을 알아보고 이때 생산되는 EPO의 당쇄구조의 변화를 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

모든 세포배양은 온도가 37°C, humidified 5% CO₂ 농도로 유지되는 incubator에서 진행되었다. 배지는 1% antibiotic-antimycotic solution이 첨가된 Minimal essential medium alpha를 이용하였다. 혈청은 dialyzed fetal bovine serum (dFBS)를 사용하였는데, 계대 배양시에는 배지에 10% 첨가하였다. 고삼투압 배지는 위의 언급된 MEMa에 NaCl를 첨가하여 만들었다. NaCl를 첨가하지 않는 배지는 314mOsm/Kg 이었고, 고삼투압 배지는 385, 425, 463mOsm/Kg로 준비하였다.

고삼투압이 세포의 성장과 EPO 생산에 미치는 영향을 알아보기 위한 배양은 6 well plate에서 시행되었다. 3일동안 10% dFBS가 첨가된 MEMa에서 배양하다가 4% dFBS가 첨가되고 삼투압이 314, 385, 425, 463mOsm/Kg인 배지로 각각 바꾸어 주었다. 고삼투압 배양시부터 12시간마다 sampling 하여 세포수를 측정하고 ELISA 방법을 이용하여 EPO 농도를 측정하였다. 당쇄분석을 하기 위하여 EPO 대량생산 배양은 T-185 flask에서 시행되었다. 마찬가지로 3일동안 10% dFBS가 첨가된 MEMa에서 배양하다가 4% dFBS가 첨가되고 삼투압이 314, 385, 463mOsm/Kg인 배지로 바꾸어 24시간 동안 배양하였다.

당쇄분석을 위해 생산된 재조합 EPO는 Heparin-Sepharose column과 monoclonal anti-hEPO가 부착된 Immunoaffinity column을 이용하여 배지 상층액으로부터 분리·정제하였다. 정제한 EPO로부터 N-glycosidase F를 처리하여 N-linked 당쇄만을 분리한 다음 2-Aminobenzamide(2-AB)로 형광 표지하였다. 형광표지된 sample의 당쇄구조는 HPLC에 연결된 MonoQ와 GlycosepN column를 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

삼투압이 증가할수록 세포의 성장은 억제되었으며, 배지내 EPO의 농도는 전반적으로 그다지 큰 차이가 없었다. (Fig. 1) 삼투압 환경에 노출된 후 모든 경우 최소 24 시간 동안은 세포의 생존력(viability)이 유지되었는데, q_p 값은 이 구간에서의 자료만을 가지고 계산하였다. 삼투압이 증가할수록 q_p 는 점차적으로 증가하였다. 463mOSm/Kg까지 삼투압이 상승하였을 때 q_p 는 1.6배까지 증가하였다.

당쇄구조를 분석하기 위해 EPO를 정제하여야 했는데, SDS-PAGE 결과는 재조합 EPO가 고순도로 분리되었음을 보여준다. (Fig. 2)

표지된 당 sample을 pH 4.0 조건에서 MonoQ column에 통과시켰다. 당의 음이온에 따라 분리되었으며 이는 sialic acid의 함량에 기인한 것이다. neutral glycoform의 경우 control(314mOsm/Kg)에 비해 385mOsm/Kg은 거의 변화가 없었고 463mOsm/Kg에서는 증가하였다. Sialylated form에서는 각각의 상대적인 양의 변화는 있었지만 전반적으로 경향은 볼 수 없었다. 그러나, EPO의 당쇄중 in vivo 활성이 가장 큰 tetrasialylated form은 삼투압이 증가함에 따라 현저한 감소를 보였다. (Fig. 3) 이것은 전체적인 sialylated oligosaccharide의 함량이 어느 정도의 삼투압 증가에는 변하지 않다가 그 이상의 삼투압 증가에는 감소한다는 것을 의미하며 tetrasialylated oligodaccharide 함량의 변화 정도는 삼투압의 변화에 민감하여 어느 정도의 삼투압증가에도 변한다는 것을 의미한다. Glycosep-N에 의한 당쇄구조분석 결과에서는 자세한 당쇄구조의 차이를 볼 수 있었지만, 전체적으로 core structure의 pattern 변화는 볼 수 없었다. 이것을 종합하여 생각해 보면 최종적으로 sialic acid가 충분히 붙지 않은 상태에서 세포 외로 분비된다는 것을 의미한다.

EPO의 당쇄구조를 분석하기 전에 GU(glucose unit)값을 결정하기 위하여 Glucose-homopolymer standard를 Glycosep-N column에 주입했다. MonoQ에서 얻어진 각 peak에 해당하는 sample을 GlycosepN column으로 분석한 후 peak의 Retention time을 이용하여 GU값을 계산했다. EPO의 N-linked oligosaccharide 당쇄구조는 계산된 GU값과 Guile 연구팀이 보고했던 자료³⁾, 기존에 우리 실험실에서 분석했던 자료등을 기준으로 하여 예측했다. 당쇄구조를 설명하는데 사용한 명명법은 우리 실험실에서 당쇄구조를 분석할 때 사용했던 방법으로 Guile 연구팀의 명명법을 응용한 것이다.: A(1-4)는 trimannosyl core에 연결된 안테나 수; S(1-4)는 sialic acid; L(1-7)은 N-acetylactosamine의 반복횟수; F는 core fucose. 특별히 A2S1L3F, A3S2L3F, A4S2L4F, A4S2L5F, A4S4L5F, A4S4L6F가 상대적인 양에서 다른 당쇄구조의 경우에 비해 3배 이상의 차이를 보였다.

참고문헌

1. Dordal, M. S., Wang, F. F., Goldwasser, E. 1985. The role of carbohydrate in erythropoietin action. *Endocrinology*. 116: 2293-2299.

- Ozturk, S. S., Palsson, B. O. 1991. Effect of medium osmolality on hybridoma growth, metabolism, and antibody production. *Biotechnol Bioeng.* 37: 989-993.
- Guile, G.R., Rudd, P.M., Wing, D.R., Prime, S.B., Dwek, R.A. 1996. A rapid high-resolution high-performance liquid chromatographic method for separating glycan mixtures and analyzing oligosaccharide profiles. *Anal Biochem.* 240: 210-226.

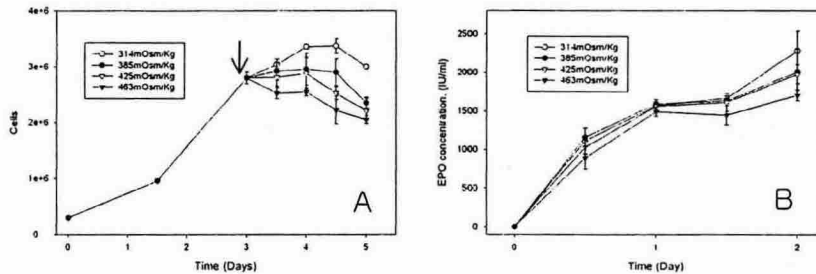


Fig. 1 Cell growth (A) and EPO production (B) under various osmolalities. The arrow indicate the time of osmotic shock.

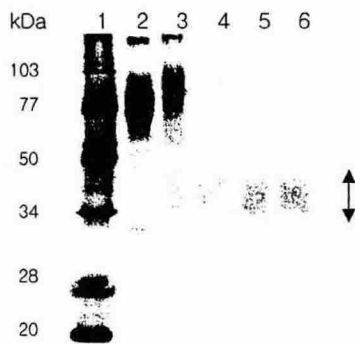


Fig. 2 SDS-PAGE of the fractions from each steps in purification of Recombinant EPO. lane1, size marker; lane2, cell supernatant; lane3, heparin sepharose pool; lane4, immunoaffinity pool (314mOsm/Kg); lane5, immunoaffinity pool (385mOsm/Kg); lane6, immunoaffinity pool (463mOsm/Kg)

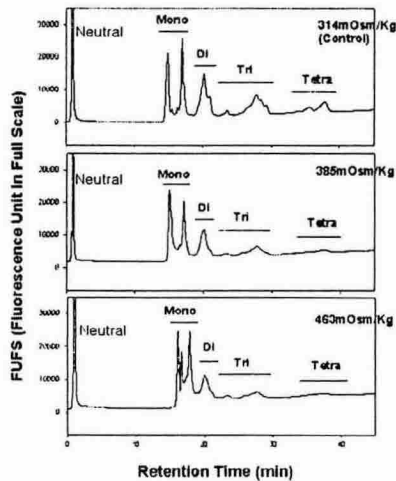


Fig. 3 MonoQ chromatogram of oligosaccharide from sample under various osmotic pressure. The ranges indicate the distribution of sialylated oligosaccharides.