

Sialic Acid 함량 증가 배양기술에 의한 재조합 인간 다당쇄 에리스로포이에틴의 생산

박세철* · 이승오 · 박만식 · 김승훈 · 김준환 · 송무영 · 이병규 · 고인영¹ · 강희일
(주)유한양행 중앙연구소 바이오텍연구소, ¹춘천 바이오산업진흥원

Production of Recombinant Human Hyperglycosylated Erythropoietin Using Cell Culture Technology by Improving Sialylation. Park, Se-Cheol*, Seoung Oh Lee, Man Sik Park, Seung Hoon Kim, Jun Hwan Kim, Moo-Young Song, Byung-Kyu Lee, In-Young Ko¹, Heu-Il Kang. *Biotech Laboratory, Yuhan Research Institute, Yuhan Corporation, Gunpo 435-715, Korea, ¹Chuncheon Bioindustry Foundation, Gangwon-do 200-161, Korea* – Erythropoietin is a main regulator of human erythropoiesis. Recombinant human erythropoietin (rhEPO) is one of the glycoproteins produced in animal cells, and it has oligosaccharides chains which comprise about 40% of its molecular mass. Because the content of sialic acid can extend circulatory lifetime, the high degree of sialylation is often a desirable feature of therapeutic glycoproteins. In this study, the sialylation of rhEPO produced by chinese hamster ovary cell culture was maximized by supplementing the culture medium with N-acetylmannosamine (ManNAc), a direct intracellular precursor for sialic acid synthesis and 2-deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminic acid (NeuAc2en), a sialidase inhibitor. Feeding of 20 mM ManNAc/0.5 mM NeuAc2en into culture medium increased the sialic acid content by nearly tenfold compared with unsupplemented medium. This effect was achieved without affecting the cell growth or product yield. Six erythropoietin fractions differing in sialic acid content, ranging from 11~15% of EPO, were identified from chinese hamster ovary cell-derived rhEPO by mono Q column chromatography. It was found that, at 20 mM ManNAc/0.5 mM NeuAc2en feeding, productivity of hyperglycosylated EPO increased up to 50%, compared with the unsupplemented medium.

Key words: Hyperglycosylation, erythropoietin, N-acetylmannosamine, sialic acid, 2-deoxy-2,3-hydro-N-acetylneuraminic acid

Erythropoietin(EPO)는 신장피질부의 peritubular interstitial cell[15] 또는 tubular cell[11]에서 생성되며 적혈구 전구세포(CFU-E, colony forming unit-erythroid)와 전적아구(erythroid progenitor cell)의 분열과 분화를 촉진한다[9]. EPO는 태아기 때에는 간에서 생성되지만 출생 후 6주가 지나면 신장에서 생성되기 시작하며[3], 적혈구는 체내의 각 조직의 산소 요구도에 따라 feed back 조절을 받아 산소부족 상태가 되면 평상시 혈중 EPO 농도가 1,000배까지 증가되어 적혈구 생성을 촉진하는 역할을 한다[19]. EPO는 1977년 재생 불량성 빈혈환자의 오줌으로부터 최초 순수 정제되었으나 원료수급의 어려움 때문에 널리 보급되지 못하다가 Jacobson 등[8]과 Lin 등[13]이 유전자 클로닝에 성공함에 따라 rhEPO(recombinant human erythropoietin)의 대량생산이 가능하게 되었다. EPO는 신성빈혈, ESRD(end stage renal disease), 만성빈혈, 조산에 의한 빈혈, 화학요법, 방사선 치료 후의 혈액회복 등에 널리 사용되어 왔으며 최근에

는 HIV와 관련된 빈혈 등의 임상치료에도 활용되고 있다[10, 20]. EPO는 3개의 N-결합 당쇄와 1개의 O-결합 당쇄를 포함하고 있으며 전체당쇄는 EPO 분자량의 40%에 해당한다. 천연형 EPO는 단일형의 당단백질로서 전체 분자량이 약 34,000달톤 정도이며, 당을 제외한 단백질 부분만의 분자량은 약 18,000달톤이다. 또한 EPO는 아미노산 Asn24, Asn38 및 Asn83의 위치에 3개의 N-결합 당쇄와 Ser126 위치에 하나의 뮤신형(mucin-type) O-결합 당쇄를 가지고 있다. EPO 분자량의 약 40%를 구성하는 당쇄부분은 EPO의 생체내 활성에 필수적인 역할을 담당하고 있으며, 당함량이 감소될 경우 EPO의 생물학적 반감기가 급격히 감소되어 생체내 생물학적 활성이 소실되는 것으로 보고되고 있다[5]. 특히, 말단의 시알산(sialic acid) 잔기는 EPO의 두 번째 갈락토오스기를 보호함으로써 간세포 수용체에 의한 갈락토오스기의 분해를 차단하여 EPO의 반감기를 연장시켜 생체내 활성도에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 이에 시알산 함량이 높은 rhEPO에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며 시알산잔기는 또한, EPO의 열안정성, protease에 의한 분해 및 비활성(specific activity) 증가 등에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[14].

*Corresponding author

Tel: 82-31-452-4111, Fax: 82-31-456-4418
E-mail: parkse@yuhan.co.kr

당단백질의 시알산 생합성 마지막 단계의 전구물질인 N-acetylmannosamine(ManNAc)을 배양 중 인위적으로 첨가한 경우에도 세포골지체 내의 시알산 농도를 증가시켜 당단백질의 sialylation이 증가하는 것으로 알려져 있으며, Gu 등은 실제 Chinese Hamster Ovary(CHO) 세포배양시 첨가한 ManNAc에 의하여 골지체 내의 시알산 농도가 증가하여 IFN- γ 에서의 시알산 함량이 증가되는 효과를 보고하였다 [6]. 또한 일반적으로 CHO 세포에서 생성된 당단백질의 시알산은 당단백질의 생성과 함께 분비발현되는 sialidase, β -galactosidase, β -hexosaminidase 및 fucosidase 등에 의하여 배양액의 목적산물이 분해되는 것으로 알려져 있다. Michael 등은 CHO 세포에서 발현되는 당단백질인 fetuin 관련연구에서 sialidase 저해제인 2-deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminic acid(NeuAc2en)를 첨가하여 배양함으로써 fetuin의 시알산 분해를 막을 수 있음을 보고하였다 [16, 17].

본 연구에서는 rhEPO 생산 세포주를 사용하여 시알산 전구물질인 ManNAc와 sialidase 저해제인 2-deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminic acid(NeuAc2en)를 배지 중에 첨가함으로써 시알산 함량이 높은 rhEPO의 생산을 시도하였다. 또한, 시알산 함량이 높은 rhEPO만을 선별적으로 생산하기 위한 mono Q column chromatography 조건을 확립하였다.

재료 및 방법

세포주 및 시약

Dihydrofolate reductase(DHFR) 결손 Chinese Hamster Ovary 세포(DHFR- CHO Cell)에 hEPO 유전자를 삽입시켜 단일클론으로 선별하고, 유전자 증폭과정을 거쳐 최종 확인된 CHO 세포인 EPO-2-AS-16을 사용하였다. 우 태아 혈청(Fetal bovine serum, dialyzed)은 Gibco-BRL사(cat #26300-061)에서 구입하여 사용하였으며, 기본배지인 DMEM/F12는 JRH사(cat # 56498)에서 유전자 증폭에 사용한 methotrexate (MTX)와 N-acetylmannosamine(ManNAc), 2-deoxy-2, 3-hydro-N-acetylneuraminic acid(NeuAc2en) 등 기타 다른 시약들은 Sigma 및 Gibco-BRL사의 cell culture grade 시약을 사용하였다.

계대배양

세포주의 계대배양은 세포배양용 플라스크(T-75cm², Costar사)를 이용하여 배지 10 ml에 1×10^5 cell/ml의 세포 농도로 접종한 후 CO₂ 배양기(5% CO₂, 37°C)에서 3일 배양하였으며 단층세포들은 trypsin-EDTA로 분리한 후, 1,300 rpm으로 5분간 원심분리하여 회수하였다. 회수된 세포는 배지를 1 : 7의 비율로 첨가하여 회석한 후 새로운 플라스크에 옮겨 계대배양하였다. 세포수는 0.4% trypan blue 용액으로 염색한 후 hemacytometer를 사용하여 측정하였다.

세포배양

rhEPO 생산 세포주의 배양은 세포배양용 플라스크(T-225 cm², Costar사) 및 roller bottle(1,700 cm², Corning사)를 이용하였으며 roller bottle system은 Belco 사의 것을 사용하였다. 배양단계는 세포성장단계와 rhEPO 생성단계로 구분하였으며 세포성장 단계에서는 세포농도를 1.0×10^5 cells/ml로 접종하여 5% FBS가 함유된 DMEM/F12(1:1) 배지로 3일 동안 배양하여 세포성장이 최대가 되도록 하였다. 세포 농도가 최대에 도달하였을 때 성장배지를 제거하고 phosphate buffered saline(PBS)으로 1회 세척한 후 DMEM/F12(1:1) 배지로 교환하였다. 이때, 실험목적에 따라 0.2~20 mM ManNAc와 0.5 mM NeuAc2en를 첨가하여 2일 배양 후 배양 상등액을 회수하고 새로운 배지를 교환하는 방법으로 플라스크 배양의 경우 6일동안 배양하였으며 roller bottle 배양의 경우 최대 10일동안 배양하였다. 배양액내의 residual glucose 농도는 Automatic Clinical Chemistry Analyzer (550 Express, CIBA-Corning, USA)를 이용하여 분석하였으며 ammonia 농도는 Sigma 사의 암모니아 정량 kit(cat #171-C)를 사용하였다.

rhEPO의 정제

배양액 각 1 l를 회수하여 0.2 μ m까지 체균 여과한 후, PBS로 미리 평형화한 blue sepharose column(Bio-Rad, 3 \times 30 cm)에 시료를 loading한 후 20 mM의 sodium phosphate 완충용액과 0.15 M의 NaCl이 함유된 세척용액(pH 7.0)으로 세척하였고 20 mM sodium phosphate 완충용액과 0.75 M의 NaCl이 함유된 용출용액(pH 7.0)을 사용하여 rhEPO를 용출하였다. 용출액을 20 mM의 sodium phosphate 완충용액으로 평형화된 C₄ column(Bio-Rad, 1.5 \times 30 cm)에 흡착시킨 후, 20 mM의 sodium phosphate 완충용액에 60%의 에탄올이 함유된 용출용액(pH 7.0)으로 rhEPO를 회수하였다. 동일 buffer로 평형시킨 Macroprep Q column(Bio-Rad, 1.5 \times 30 cm)에 회수한 rhEPO를 흡착시키고 20 mM의 sodium phosphate 완충용액과 100 mM의 NaCl이 함유된 용출용액(pH 7.0)으로 용출하였다.

다당쇄 rhEPO 분리

정제된 rhEPO를 Pharmacia FPLC system(P-900)을 이용하여 다당쇄 rhEPO를 분리하였다. 50 mM tris-HCl(pH 7.2)로 평형화되어있는 Mono Q 5/5 음이온 교환 column(0.5 \times 5 cm; Pharmacia, Sweden)에 정제된 rhEPO loading한 후 0.3 M NaCl로 분당 5%씩 증가시키는 linear gradient 방식으로 다당쇄 rhEPO를 용출하였다. 분리된 다당쇄 rhEPO는 SDS-PAGE를 수행한 후 [11], human erythropoietin (hEPO)에 대한 단일 클론 항체를 이용하여 웨스턴블롯 분석하였으며 [21], IEF(isoelectric focusing)는 Novex 사의 IEF 분석 kit를 사용하였다.

N-말단 및 아미노산 조성확인

아미노산 서열분석은 ABI 사의 아미노산 분석기(476A)를 사용하여 분석하였다. 또한, 아미노산조성은 general hydrolysis 방법을 사용하였으며 cysteine은 formic acid, tryptophan은 4 M methylsulfonic acid를 사용하여 110°C에서 24시간동안 가수분해 후 Pico-Tag(3.9×300 mm) HPLC용 컬럼으로 분리하였다.

rhEPO의 *in vitro* 활성측정

rhEPO의 *in vitro* 활성은 R&D system사의 EPO ELISA kit(cat. DEP00)를 사용하여 정량하였다. 시료를 2.5~200 mIU/ml 범위로 희석하여 96 well plate에 0.1 ml씩 넣은 다음 25°C 항온기에서 2시간동안 방치하였다. 각 well을 PBS로 3회씩 세척한 후 peroxidase substrate 혼합액(Bio-rad 172-1064)을 각 well에 0.2 ml씩 첨가하여 20분간 반응시킨 다음 0.05 ml의 1 M sulfuric acid를 가하여 반응을 종결시키고 ELISA reader(Danatech, 5000)로 450 nm에서 흡광도를 측정하여 rhEPO의 활성을 계산하였다.

시알산 정량

시알산은 George 등의 방법[4]을 변형하여 정량하였다. 시료와 표준물질에 각각 0.1 ml의 0.04 M periodic acid를 가하여, 4°C에서 35분간 반응시킨 다음 1.25 ml의 resorcinol 용액을 넣어 얼음에서 5분간 방치하고 100°C에서 15분간 가열한 후 수돗물에 중탕하여 상온까지 냉각시켰다. 냉각 후 1.25 ml의 부탄올을 가하여 잘 섞은 후 37°C에서 3분간 반응시킨 다음 상온까지 냉각시키고 630 nm에서 흡광도를 측정하여 시알산 함량을 정량하였다. 이때, 결정된 시알산 함량을 rhEPO 역가(IU/ml)로 나누어 백분율(%)로 표시하였다.

결과 및 고찰

전구체 및 저해제 첨가에 의한 배양

rhEPO의 시알산 함량을 증가시키기 위하여 시알산 생합성 마지막 단계의 전구물질인 N-acetylmannosamine (ManNAc)을 배양 중 첨가하였으며, 생성된 rhEPO의 시알산이 CHO 세포에서 분비되는 sialidase에 의하여 분해되는 것을 막기위하여 sialidase 저해제인 2-deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminic acid(NeuAc2en)를 첨가하여 배양하였다.

세포배양용 플라스크를 사용하여 Table 1에서와 같이 기본배지인 DMEM/F12 배지에 ManNAc를 각각 0, 0.2, 2, 20 mM 첨가하여 6일동안 배양한 결과 단위세포당 발현역가는 ManNAc 첨가여부와 무관하게 $10^3 \sim 11^6$ IU/ 10^6 cells로 유사하였다. 이에 비하여 시알산 함량을 rhEPO 역가(IU/ml)로 나눈 EPO 역가 대비 시알산 함량은 대조구가 20%인 것에 비하여 20 mM ManNAc를 첨가 시에는 70%로 대조구에 비하여 시알산 함량이 최대 3.5배 이상 증가하였다. 이때,

Table 1. Effect of supplemental ManNAc/NeuAc2en on the sialylation of rhEPO.

Supplemental additives (mM)		Ammonia (mmole/l)	Residual glucose (g/l)	Specific activity ^a (IU/ 10^6 cells)	Sialic acid (%)	Culture method
NeuAc2eu	ManNAc					
	0	1.7	0.04	116	20	Flask
	0.2	1.7	0.04	115	24	
	2	1.8	0.03	103	25	
	20	1.8	0.04	114	70	
	0	0	1.7	140	15	Roller bottle
	0	20	1.8	152	73	
	0.5	0	1.8	137	100	
	0.5	20	1.8	222	180	

Values are means of duplicate culture

^aSpecific activity = EPO unit measured by ELISA/ 10^6 cells

각 배양시간에 따른 세포성장정도는 ManNAc와 NeuAc2en 첨가유무와 무관하게 배양 5일에서 5×10^6 cell/ml로 유사하였다(Fig. 1A). Roller bottle을 이용한 대량배양에서는 기본배지인 DMEM/F12 배지에 20 mM ManNAc과 0.5 mM NeuAc2en를 첨가하여 10일동안 배양한 경우 대조구에 비하여 20 mM ManNAc과 0.5 mM NeuAc2en를 동시에 첨가하여 배양한 경우가 10^6 세포당 발현역가로 표시한 specific activity는 140 IU/ 10^6 cell에서 222 IU/ 10^6 cell로 1.5배, 시알산 함량을 rhEPO 역가(IU/ml)로 나눈 EPO 역가 대비 시알산 함량은 15%에서 180%로 10배 이상 증가하였다(Table 1). 또한, 각 배양상등액을 취하여 IEF(isoelectric focusing)를 수행한 후, 웨스턴블롯 분석으로 rhEPO만을 선택적으로 확인한 결과에서도 20 mM ManNAc와 0.5 mM NeuAc2en를 동시에 첨가하여 배양한 경우가 대조구에 비해 pI값이 3에서 5사이에 분포하는 rhEPO의 비율이 높다는 것을 확인하였다(Fig. 1B).

이는 발현된 rhEPO의 시알산 함량이 높다는 것을 의미하는 것으로 배양과정에서 첨가된 전구체와 sialidase 저해제에 의하여 EPO 당체의 N-glycan 말단 시알산 함량이 증가한 결과로 추정된다. Gu 등에 의하면 전구체 첨가에 의하여 배양액 중에 합성된 시알산은 세포막내 투과성이 비교적 낮기 때문에 배양액내에 확인된 시알산이 EPO에 결합된 형태인지 EPO에 유리된 형태로 존재하는 free form인지 여부에 대한 추가적인 확인이 필요하다[6]. 이를 위하여 EPO에 유리된 형태로 존재하는 시알산을 제거하기 위하여 배양액 성분을 완전히 제거하여 시알산이 결합된 EPO 만을 얻기위한 정제를 시도하였다.

다당쇄 rhEPO의 정제

Roller bottle을 사용하여 DMEM/F12 배지로 배양한 배양상등액과 20 mM ManNAc와 0.5 mM NeuAc2en를 동시에 첨가하여 배양한 배양상등액을 각각 회수하여 0.2 μ m

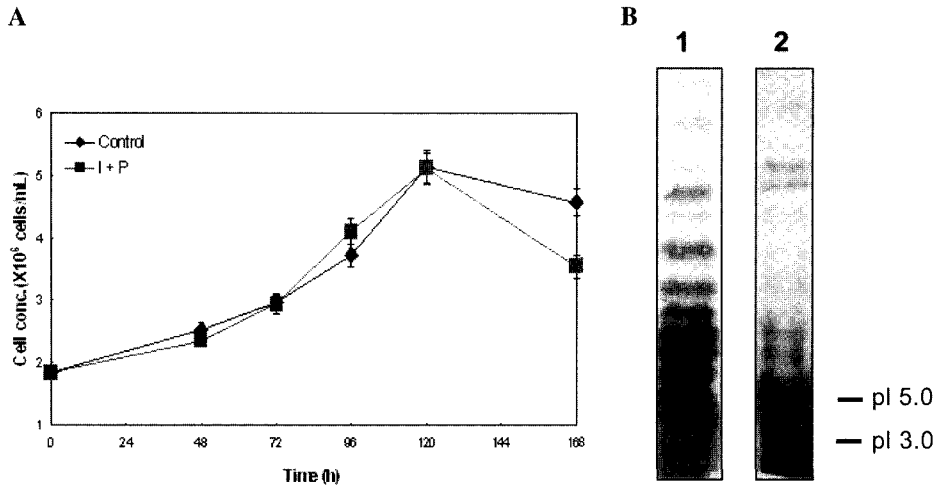


Fig. 1. Comparison of cell growth profiles in DMEM/F12 medium with or without supplements (A). IEF-Western blot analysis of CHO-derived rhEPO (B). Control means culturing in DMEM/F12 medium without supplements. I+P means culturing with inhibitor (I) and sialic acid precursor (P). Western blot analysis was carried out using mouse anti-human EPO monoclonal antibody. Lane 1, control medium; Lane 2, I+P medium

까지 제균 여과한 후 전처리 없이 정제에 활용하였다. Hydrophobic한 특성을 갖는 resin 중에서 group 특이적인 결합력을 갖는 blue sepharose resin을 사용하여 염농도의 증가에 의한 용출을 시도하였다. Blue sepharose chromatography 과정에 이어 C4 column chromatography와 Macrorep high Q column chromatography를 수행하여 98%이상 순도의 rhEPO를 정제하였다. 그 결과, 20 mM ManNAc와 0.5 mM NeuAc2en를 동시에 첨가하여 배양한 경우의 rhEPO 정제량이 5.824 mg/l로 DMEM/F12 배지만 첨가한 경우의 rhEPO 정제량인 3.478 mg/l보다 약 70% 정도 높았다. 또한, Fig. 2에서와 같이 정제된 rhEPO를 FPLC로 분리하여 시알

산 함량이 11~15%인 다당쇄 rhEPO 분획(fraction #7~12)을 pooling하였으며 이때, 시알산 함량을 rhEPO 역가(IU/ml)로 나눈 EPO 역가 대비 시알산 함량은 12% 이상이었다. 또한, Fig. 3에서와 같이 mono Q column을 사용하여 FPLC로 분리한 각 분획에서의 시알산 함량을 확인한 결과 기본배지에 전구체와 sialidase inhibitor를 첨가하여 배양한 경우가 배지만 첨가하여 배양한 후 정제한 경우에 비하여 EPO에 결합된 시알산 함량이 20%이상 높게 분포함을 확인하였다. FPLC로 분획하여 얻은 시알산 함량이 12%이상인 다당쇄 rhEPO 양은 대조구의 2.396 mg/l에 비하여 20 mM ManNAc와 0.5 mM NeuAc2en를 동시에 첨가 시 3.593

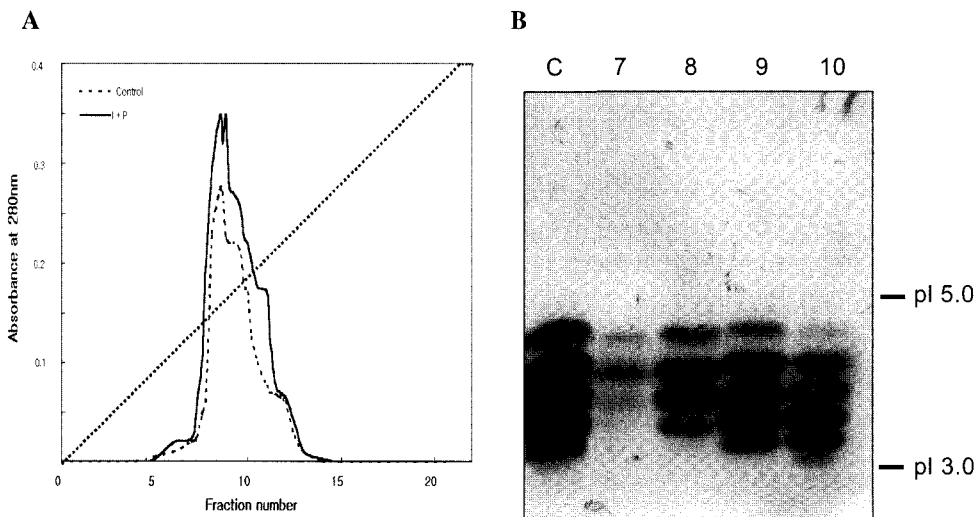


Fig. 2. FPLC profiles (A) and IEF gel banding patterns (B) of the isoforms of rhEPO purified by Mono Q column chromatography. Dashed line is the linear gradient of 0.3 M NaCl. Lane C is control rhEPO and lanes 7-10 are each of fraction number. I+P means culturing with inhibitor(I) and sialic acid precursor (P).

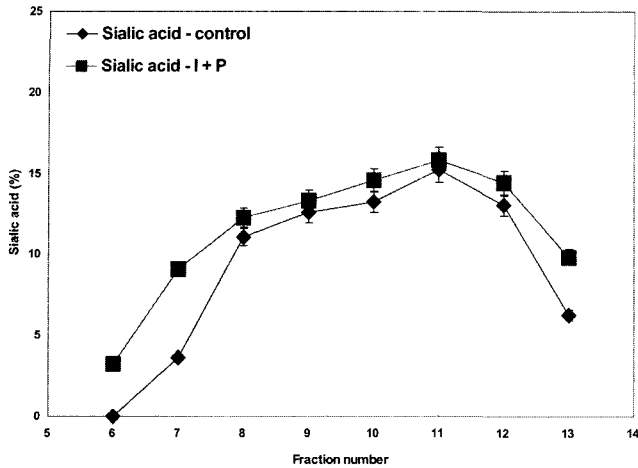


Fig. 3. Sialic acid content of the isoforms of rhEPO purified by Mono Q column chromatography.

Values of sialic acid contents are measured by resorcinol method [4]. Control means culturing in DMEM/F12 medium without supplement. I+P means culturing with inhibitor (I) and sialic acid precursor (P).

mg/l로 약 50% 가까이 증가한 결과를 보였다. 특히, 본 실험에서는 anion exchange FPLC column chromatography를 사용하여 다당쇄 rhEPO만이 선택적으로 용이하게 분리가능하였다. 이는 Morimoto 등에 의하여 시도된 방법[18]과 유사한 결과로 전구체와 sialidase inhibitor를 첨가하여 배양하는 방법을 활용하여 *in vitro*에서 당단백질의 시알산 함량이 높은 다당쇄 단백질을 고효율로 얻을 수 있었다.

다당쇄 rhEPO의 특성

Anion exchange FPLC column chromatography 과정으로 얻어진 분획의 IEF(isoelectric focusing) 분석결과 Fig. 2에서와 같이 NaCl의 농도가 증가할수록 산성의 특성을 갖는 다당쇄 rhEPO의 함량이 높아지는 것을 확인할 수 있었으며 #7~12번 분획(60~150 mM NaCl)은 모두 12% 이상의 다당쇄 rhEPO를 함유하고 있었다. 12% 이상의 시알산을 함유한 분획을 pooling하여 N말단의 잔기를 확인한 결과 Ala-Pro-Pro-Arg-Leu로 나타나 천연형 hEPO와 아미노산서열이 일치하였다. 또한, 아미노산조성을 확인한 결과에서는 Table 2에서와 같이 DMEM/F12 배지만 첨가하여 배양한 경우와 20 mM ManNAc와 0.5 mM NeuAc2en를 동시에 첨가하여 배양한 경우 모두에서 천연형 hEPO 아미노산 조성과 일치하였다. hEPO는 3개의 N-결합 당쇄를 가지고 있으며 이론적인 천연형 hEPO의 Asn과 Asp의 개수는 12.0이다. 이에 비하여 DMEM/F12 배지와 20 mM ManNAc와 0.5 mM NeuAc2en 첨가에 의하여 얻어진 다당쇄 rhEPO의 Asn과 Asp의 개수는 각각 13.2와 12.8이었다. 이는 아미노산서열의 변형없이 배양 중 첨가한 전구체인 20 mM ManNAc와 sialidase 저해제인 0.5 mM NeuAc2en의 첨가에 의하여 시

Table 2. Comparison of amino acid composition of hyperglycosylated rhEPO in DMEM/F12 medium with or without supplements

Amino acids	Theoretical No. (natural EPO)	Calculated No. (Control)	Calculated No. (I+P)
Cys	(4)	4.8	5.0
Asp + Asn	12	13.2	12.8
Gln + Glu	19	20.0	19.9
Ser	10	8.4	8.3
Gly	9	10.2	10.3
His	2	2.1	2.0
Arg	12	11.5	11.5
Thr	11	10.4	10.1
Ala	19	19.3	18.5
Pro	8	8.9	9.4
Tyr	4	2.4	3.0
Val	11	10.8	10.8
Met	1	0.7	0.5
Ile	5	4.9	4.9
Leu	23	23.2	23.3
Phe	4	3.9	3.9
Trp	(3)	(2.4)	(2.6)
Lys	8	8.0	8.2

Control means culturing without supplements.

I+P means culturing with inhibitor (I) and sialic acid precursor (P).

알산 함량이 증가된 다당쇄 rhEPO를 얻을 수 있었음을 의미한다. Egrie 등에 의하면 천연형에 존재하는 EPO는 시알산 함량이 8에서 14인 isoform이 존재하며 시알산 함량이 높을수록 생체내 반감기는 증가하는데 비하여 시알산 함량이 낮아질수록 수용체 결합력은 감소하는 것으로 보고한 바 있다[1].

전구체와 sialidase inhibitor를 첨가하여 배양한 배양액을 정제하여 각 분획을 pooling 한 경우 Fig. 4에서와 같이 ELISA에 의하여 측정된 *in vitro* 생물학적 역가를 단백질농도로 나눈 비활성이 1.8로서 DMEM/F12 배지만 첨가하여 배양한 대조구의 비활성인 1.2에 비하여 우수하였다. 본 연구에서는 시알산 함량이 높은 다당쇄 rhEPO의 생산을 위하여 전구체를 첨가하는 방법을 시도한 결과 첨가한 전구체 첨가에 의하여 시알산 함량이 높은 다당쇄 rhEPO를 얻을 수 있다는 것을 알 수 있었다. 실제 Egrie 등에 의하면 N 당쇄의 수와 생체내 반감기(half-life)는 비례관계에 있는 것으로 알려져 있으며 랫드 대상의 실험결과에 의하면 N 당쇄의 수를 천연형인 3개에서 4개 또는 5개로 증가시키면 따라서 반감기가 2.7시간에서 4.2시간과 6.5시간으로 각각 증가하였다 [1]. rhEPO 유전자의 전체 아미노산 서열 변형을 통하여 시알산의 함량을 증가시키려는 연구는 아미노산 서열이 변형됨으로서 EPO 자체의 구조적인 변화가 나타나는 단점이 제기되었다. 이에 비하여 본 연구에서 시도된 시알산 전구체 첨가에 의한 당쇄 및 시알산 함량 증가 배양법은 물리화학적 구조가 천연형 EPO와 유사하면서 시알산 함량만을 증가

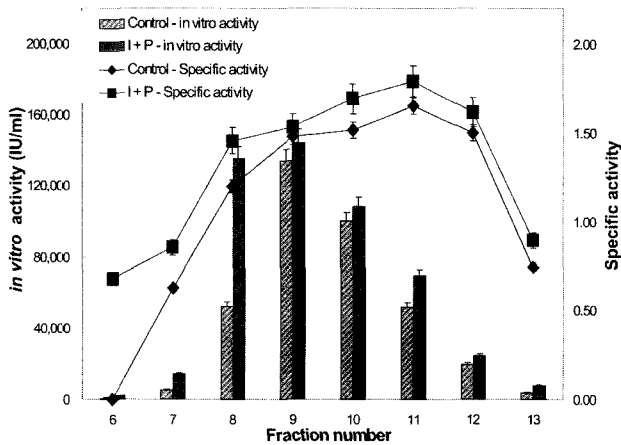


Fig. 4. *In vitro* bioactivity for the isoforms of rhEPO purified by Mono Q column chromatography.

Values of *in vitro* bioactivity are measured by ELISA. EPO units divided by protein concentration equal specific activity (%). Control means culturing in DMEM/F12 medium without supplements. I+P means culturing with inhibitor (I) and sialic acid precursor (P).

시킨 다당체 rhEPO를 얻을 수 있어 산업적으로도 매우 유용한 연구결과라 할 수 있다. 또한, 배양액내의 시알산은 N-glycan에 결합된 형태와 결합되지 않은 두 가지 형태로 존재가 가능한데 향후 시알산 결합 형태 및 N-glycan의 microheterogeneity를 분석함으로써 다당체 rhEPO 당쇄구조의 정확한 이해가 가능하리라 사료된다[2]. 또한, 각 당쇄 구조와 rhEPO의 생물학적 활성간의 상관관계 연구를 통하여 전구체 첨가에 의하여 생성된 다당체 rhEPO의 특성 규명이 가능하리라 판단된다.

요 약

에리스로포이에틴은 인간 적혈구분화의 조절인자로 작용한다. 유전자 재조합 인간에리스로포이에틴(rhEPO)은 동물세포에서 생산되고 있는 재조합 당단백질의 하나이며 당쇄부분이 전체 분자량의 40%를 차지한다. 시알산 함량은 체내약물 투여 지속기간과 직접적인 연관이 있어 시알산 함량은 의약품 당단백질의 중요한 성질로 여겨진다. 본 연구에서는 CHO 세포 배양액에 시알산 생합성 전구물질인 N-acetylmannosamine(ManNAc)과 sialidase 저해제인 2-deoxy-2, 3-hydro-N-acetylneuraminic acid(NeuAc2en)를 첨가하여 rhEPO의 sialic acid 함량을 증가시킬 수 있었다. 특히, 배양액에 20 mM ManNAc/0.5 mM NeuAc2en를 첨가할 때 대조구에 비하여 약 10배의 시알산 함량이 증가하였으며 세포성장이나 배양액의 rhEPO 생산량에는 영향이 없었다. rhEPO의 정제시 시알산 함량이 11~15%인 다당체 rhEPO 분획을 얻었으며, 배양액 내에 20 mM ManNAc와 0.5 mM NeuAc2en를 동시에 첨가함으로써 대조구에 비하여 시알산 함량이 높은 다당체 rhEPO의 생산성이 50% 증가하였다.

감사의 글

본 연구는 2003년도 보건복지부의 보건의료기술진흥사업의 지원(과제번호 : HMP-00-PT-21100-0003)으로 수행되었으며 이에 감사드린다.

REFERENCES

- Egrie, J. C. and J. K. Browne. 2001. Development and characterization of novel erythropoietin stimulating protein(NESP). *British J. Cancer* **84**: 3-10.
- Elliott, S., T. Lorenzini, D. Chang, J. Barzilay, and E. Delorme. 1997. Mapping of the active site of recombinant human erythropoietin. *Blood* **89**: 493-502.
- Fisher, J. W. 1993. Recent advances in erythropoietin research. *Pro. Drug. Res.* **41**: 293-311.
- George, W. J., L. Dean, and S. Roseman. 1971. The sialic acids. *J. Biol. Chem.* **246**: 430-435.
- Goochee, C F., M. J. Gramer, D. C. Anderson, J. B. Bahr, and J. R. Rasmussen. 1991. The oligosaccharides of glycoproteins: bioprocess factors affecting oligosaccharide structure and their effect on glycoprotein properties. *Bio/Technology* **9**: 1347-1355.
- Gu, X. and D. I. C. Wang. 1998. Improvement of Interferon- α sialylation in chinese hamster ovary cell culture by feeding of N-acetylmannosamine. *J. Biol. Chem.* **58**: 642-648.
- Gu, X., B. J. Harmon, and D. I. C. Wang. 1997. Site- and branch-specific sialylation of recombinant human Interferon- α sialylation in chinese hamster ovary cell culture. *Biotechnol. Bioeng.* **55**: 390-398.
- Jacobson, K., C. Shoemaker, R. Rudersdorf, S. D. Neil, R. J. Kaufman, A. Mufson, J. Seehra, S. S. Jones, R. Hewick, E. F. Fritsh, M. Kawakita, T. Shimizu, and T. Miyaki. 1985. Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature* **313**: 806-810.
- Jelkmann, W. 1992. Erythropoietin: Structure, control of production and function. *Physiol. Rev.* **722**: 449-489.
- Kazuo, O., A. Shoichi, S. Takako, O. Tomako, N. Naoki, and I. Yoshiko. 1990. Metabolic fate of erythropoietin (TYB-5220). *Yakuri Chiryō* **18**: 2009-2019.
- Koury, S. T., M. C. Bondurant, and M. J. Koury. 1988. Localization of erythropoietin synthesizing cells in murine kidneys by *in situ* hybridization. *Blood* **71**: 524-527.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lin, F. K., S. Suggs, C. H. Lin, J. K. Browne, R. Smalling, J. C. Egrie, K. K. Cjen, G. M. Fox, F. Martin, Z. Stabinsky, S. Bdrawi, P. H. Lin, and E. Goldwasser. 1985. Cloning and expression of human erythropoietin gene. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* **49**: 807-815.
- Louise, C. W., G. Timony, P. Murtha, J. Stoudemire, A. J. Dorner, J. Caro, M. Krieger, and R. J. Kaufman. 1991. The

- importance of N- and O-linked oligosaccharides for the biosynthesis and *in vitro* and *in vivo* biological activities of erythropoietin. *Blood* **77**: 2624-2632.
15. Maxwell, A. P., T. R. J. Lappin, C. F. Johnson, J. M. Bridges, and M. G. McGeown. 1990. Erythropoietin production in kidney tubular cells. *Brit. J. Hematol.* **74**: 535-539.
 16. Michael, J. G. and C. F. Goochee. 1993. Glycosidase activities in chinese hamster ovary cell lysate and cell culture supernatant. *Biotechnol. Prog.* **9**: 363-373.
 17. Michael, J. G., C. F. Goochee, V. Y. Chock, D. T. Brousseau, and M. B. Sliwkowski. 1995. Removal of sialic acid from a glycoprotein in CHO cell culture supernatant by action of an extracellular CHO cell sialidase. *Bio/Technology* **13**: 692-698.
 18. Morimoto, K., E. Tsuda, A. A. Said, E. Uchida, S. Hatakeyama, M. Ueda, and T. Hayakawa. 1996. Biological and physicochemical characterization of recombinant human erythropoietins fractionated by mono Q column chromatography and their modification with sialyltransferase. *Glycoconjugate J.* **13**: 1013-1020.
 19. Schuster, S. J., E. V. Badiavas, P. Costa-Giomni, R. Weinmann, A. J. Erslev, and J. Caro. 1989. Stimulation of erythropoietin gene transcription during hypoxia and cobalt exposure. *Blood* **73**: 633-634.
 20. Terumasa, M., O. Tsuyoshi, H. Yasuko, S. Takaka, and H. Hamki. 1990. General pharmacological studies of erythropoietin (TYB-5220). *Yakuri Chiryō* **18**: 953-971.
 21. Towbin, H. T., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 4350-4355.

(Received Feb. 2, 2004/Accepted June 11, 2004)