한국생물공학회지 제18권 제6호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 18, No. 6, 500-505(2003)

Packed Bed Adsorption과 Expanded Bed Adsorption 크로마토그래피를 이용한 내포체 단백질의 고체상 재접힘

최 원 찬 · 김 민 영 · 서 창 우 · † 이 은 규
한양대학교 화학공학과 생물공정연구실
(접수 : 2003. 9. 1. 게재승인 : 2003. 12. 26.)

Solid-Phase Refolding of Inclusion Body Protein in Packed Bed Adsorption and Expanded Bed Adsorption Chromatography

Won Chan Choi, Min Young Kim, Chang Woo Suh, and Eun Kyu Lee†
Bioprocessing Research Laboratory, Department of Chemical Engineering, Hanyang University, Ansan 425-791, Korea
(Received : 2003. 9. 1. Accepted : 2003. 12. 26.)

'LK (lipoprotein kringle) 68' is a polypeptide of a modified ansiostatin consisting of three kringle structures that might be clinically useful as a potential cancer therapeutics. It can be produced by overexpressing it as inclusion body in recombinant *E. coli*. In this study, solid-phase refolding processes using packed bed adsorption (PBA) and expanded bed adsorption (EBA) column were carried out to compare their refolding yields with that of the conventional, solution-phase refolding process. For the solution-phase and the PBA-mediated processes employing Q-Sepharose, washed inclusion body was used as the starting material, whereas both washed inclusion body and *E. coli* homogenate were used for the EBA-mediated process employing streamline DEAE. On the final recovery LK68 per unit mass of wet cell basis, the EBA- and PBA-mediated processes showed about 2.7- and 1.5-fold higher yields, respectively, than the solution-phase refolding method. The solid-phase refolded LK68 demonstrated the same lysine binding bioactivity and the retention time in the RP-and SEC-HPLC as those of the native protein.

Key Words : Inclusion body, solid-phase refolding, renaturation, angiostatin, expanded bed adsorption chromatography

서 론

신혈관형성 (angiogenesis) 억제제는 기존의 혈관에서 모세혈관이 생성되는 것을 막아 종양의 성장이나 전이를 억제함으로써 최근 암치료제로서 연구되고 있다(1, 2). 원발성 종양과 전이성 종양은 그들의 성장을 위하여 신생혈관의 생성을 필요로 하기 때문에(3), 종양이 존재하더라도 신생혈관형성을 억제하거나 제거하면 종양은 성장할 수가 없기 때문이다. 크링글 (kringle) 구조를 가지는 단백질의 하나인 아포리포단백질(a)(apolipoprotein a)는 신생혈관생성 저해제의 신규 후보물질이다. 크링글은 약 80개의 아미노산과 세 개의 분자내 이황화결합으로 구성된 구조로서 프로트롬빈, 유로키나제, 간세포 성장인자 및 아포리포단백질 등 다수의 단백질에서 발견된다. 이러한 영역은 독립적인 접힘 단위로 나타나지만 그 기능적인 역할은 아직 알려져 있지 않다. 아포리포단백질(a)는 두 종류의 크링글 영역과 비활성의 단백질 분해효소와 유사한 영역을 포함한다(4). 아포리포단백질(a)는 플라스미노겐형의 크링글 영역을 포함하므로 종양 신생혈관의 형성 및 성장을 저해하는 생물학적 활성을 가진다(5). LK (lipoprotein kringle) 68은 아포리포단백질(a)의 36, 37, 38 크링글만을 클로닝하여 신혈관생성 억제 활성을 갖게 한 새로운 항암제이다(6).

재조합 미생물을 이용한 내포체 형태의 단백질 발현에서 비활성의 내포체로부터 생물학적 활성을 가지는 형태를 얻기 위해서는 반드시 재접힘 공정이 필요하다. 그러나 대규모 재접힘 공정에서는 응집 현상으로 인한 수율의 감소가 항상 큰 문제이다(7). 이러한 응집 현상을 해결하기 위하여 Creighton은 고체 담체 표면과 단백질 사이의 이온작용을 이용한 packed bed adsorption (PBA) 크로마토그래피 내에서의 고체

† Corresponding Author : Bioprocessing Research Laboratory, Department of Chemical Engineering., Hanyang University, Ansan 425-791, Korea.
Tel : 031-400-5275, Fax : 031-408-3779,
E-mail : eklee@hanyang.ac.kr

상 재접힘 (matrix-assisted refolding) 공정을 도입하였다(8). 이온작용 이외에 소수성 작용과 친화적 상호작용을 이용한 고체상 재접힘 공정도 연구되었다(9). 고체상 재접힘 공정은 변성제에 의해 풀린 단백질을 고체 담체에 흡착시킨 후 변성제를 제거하여 재접힘을 유도하는 방식으로 몇 가지 이점을 가지고 있다. 첫째 단백질간의 상호작용을 최소화할 수 있기 때문에 응집 문제를 근본적으로 해결할 수 있다. 둘째 재접힘 공정 중 상대적으로 높은 단백질 농도를 유지할 수 있어 과다한 희석에 의한 공정부피 증가를 피할 수 있다. 또한 재접힘 공정 후 응집체와 단량체를 분리하는 공정 단계를 감소시킬 수도 있다(9, 10)

Expanded bed adsorption (EBA) 크로마토그래피는 세포파쇄액으로부터 고체 불순물을 제거하는 동시에 목적 단백질을 얻는 공정으로 원심분리 (또는 여과)와 흡착 크로마토그래피를 단일 공정으로 대체할 수 있는 공정으로 이용되어 왔다(11). 최근 EBA 크로마토그래피를 이용한 고체상 재접힘 공정이 도입되어, 세포파쇄액으로부터 세포찌꺼기 (cell debris)를 제거하며 목적단백질을 레진에 흡착시킨 후 고체상 재접힘을 수행하여 재접힘 수율과 순도를 향상시켰으며 공정의 단순화로 공정 시간을 단축시켰다고 보고되었다(7). EBA를 이용한 재접힘 공정은 기존의 응집 현상을 방지하는 고체상 재접힘 공정의 잇점과 고형물 및 불순단백질을 목적단백질과 분리시키는 고액분리 및 선택적 흡착이 동시에 수행되는 잇점이 있다.

본 연구에서는 재조합 LK68 내포체의 재접힘 공정으로 기존의 액상 재접힘 공정, PBA 크로마토그래피를 이용한 고체상 재접힘 공정, 그리고 EBA 크로마토그래피를 이용한 고체상 재접힘 공정을 수행하여 각 공정의 수율과 특성을 비교하고자 하였다. 또한 EBA 크로마토그래피를 이용한 재접힘에서는 세척된 내포체를 이용한 재접힘 공정과 세포파쇄액을 이용한 재접힘 공정을 각각 수행하여 재접힘 수율을 비교하였다.

재료 및 방법

모델 단백질 및 내포체 용해

본 연구에서 사용된 재조합 대장균과 LK68 표준물질은 목암생명공학연구소로부터 제공받았다. 재조합 대장균 BL21 (DE3)에 pETⅡa 벡터를 이용하여 LK68 (pI 6.1, 37 kDa)을 발현하였다. 총 발현 단백질 중 20-30%가 LK68이며 내포체 (77% 함습율) 형태로 발현되었다. 발효액을 10,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 세포를 회수한 후 세포파쇄 버퍼를 가한 후 초음파분쇄기 (550 Sonic Dismembrator, Fisher, USA)로 파쇄하였다. 파쇄정도는 입도 크기를 Dynamic Light Scattering (LPA-3000, Otsuka, Japan)을 이용하여 측정하여 확인하였다. 세포파쇄액을 10,000 rpm에서 30분간 원심분리 후 내포체를 회수하였다. 회수된 내포체를 두 가지 세척 버퍼를 번갈아가며 4회 세척하였다. 그 후 세척된 내포체를 용해 버퍼를 사용하여 20시간 동안 용해시켰다. 세포 파쇄, 내포체 세척 및 용해, 고체상 재접힘 공정에 필요한 모든 버퍼의 종류와 조성을 Table 1에 나타내었다. 실험에 사용된 시약은 모두 Sigma (St. Louis, USA)로부터 구입하였다.

Table 1. Buffer compositions

Buffers	Compositions
Cell disruption	25 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 7.5
IB washing	20 mM Tris-HCl, pH 7.5, and 50 mM deoxycholic acid, pH 7.5
Dissolution	8 M urea, 20 mM Tris-HCl, 100 mM DTT, pH 9.0
Column washing	8 M urea, 20 mM Tris-HCl, pH 9.0
Refolding	20 mM Tris-HCl, pH 9.0
Elution	20 mM Tris-HCl containing 1 M NaCl, pH 9.0
Regeneration	0.5 M NaOH, and 1.0 M NaCl

PBA-mediated 재접힘 공정

PBA 크로마토그래피를 이용한 고체상 재접힘 공정에서는 먼저 Q-Sepharose 칼럼 (HiTrap 1 ml, Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)를 용해 버퍼를 사용하여 1 ml/min의 유속으로 평형을 잡은 후 LK68 내포체 용해액 1 ml (2.5 mg/ml)을 loading하였다. 칼럼 세척 버퍼를 5 칼럼 부피로 흘려 주어 물리적으로 entrap된 단백질들을 제거하였다. 그 후 20 칼럼 부피의 재접힘 버퍼를 주입시켜 urea를 서서히 제거함으로써 레진에 흡착된 LK68의 재접힘을 유도하였다. 고체상 재접힘 후 LK68을 회수하기 위해 용출 버퍼를 20-100%로 30분간 선형적 농도구배를 주어 용출시켰다.

EBA-mediated 재접힘 공정

고체상 재접힘에 사용된 Streamline® 25 칼럼은 Amersham Biosciences사 (Uppsala, Sweden)로부터 구입하였고 matrix로 Streamline® DEAE를 사용하였다. 용해된 내포체 50 mg (2 mg/ml)을 50 ml의 Streamline® DEAE 레진이 채워진 Streamline® 25 칼럼에 아래에서 위 방향으로 주입하였다. 이 때 expansion ratio는 3.0으로 유지하였다. 주입이 끝난 후 흡착되지 않고 끼어 있는 고형 물질들을 칼럼세척 버퍼를 사용하여 4 칼럼 부피로 제거시켰다. 재접힘 버퍼 10 칼럼 부피를 흘려주어 urea를 세척하여 재접힘을 유도하였다. 그 후 레진을 침강시키고 LK68을 용출시키기 위해 10, 20, 30, 40, 100%의 용출 버퍼를 단계적으로 위에서 아래 방향으로 흘려주었다. 그리고 칼럼은 재생 버퍼를 사용하여 재생하였다(7). 세포파쇄액으로부터의 재접힘 공정 역시 동일한 방법으로 수행되었다.

RP-HPLC, SEC-HPLC 분석

환원된 (또는 풀린) 단백질과 산화된 (또는 재접힘된) 단백질을 분리하고 정량화하는데 C18 칼럼 (Jupiter 300, 5 micron, 4.6 x 250 mm, Phenomenex, USA)이 장착된 RP-HPLC (Gilson 302, USA)를 사용하였고 측정파장은 280 nm이다(12). 버퍼 A는 deionized water에 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA)를, 버퍼 B는 80% acetonitrile에 0.075% (v/v) TFA를 넣어 만들었다. %B를 10~100%까지 45분간 선형 농도구배를 주었다. 산화된 LK68 경우 약 25분의 체재시간을 보여 주었고, 환원된 경우 약 27분에 용출됨으로써 두 형태의 단백질을 구별할 수 있었다.

고체상 재접힘 후 LK68 용출액 내의 응집체 농도를 분석하기 위해 SEC-HPLC 칼럼 (Biosep-SEC-S3000, 7.8 x 600 mm, Phenomenex, USA)을 사용하였으며, 20 mM sodium

phosphate (pH 6.8)를 0.5 ml/min의 유속으로 사용하였고 loading한 시료 부피는 20 $\mu\ell$이었다.

Lysine binding 측정을 통한 재접힘 수율 결정

Plasminogen의 internal fragment에 해당하는 단백질은 3차원 구조를 갖추게 되면 lysine이 binding할 수 있는 pocket이 형성된다(3). 이는 재접힘된 37 크링글에 lysine이 결합할 수 있는 부위가 형성되어 완전한 생물학적 기능을 나타낼 수 있다는 것을 의미한다(12). Lysine binding을 측정하기 위해 lysine-Sepharose 4B (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)을 사용하였다. 재접힘 공정 후 투석에 의해 NaCl이 제거된 LK68 용출액을 50 mM phosphate 버퍼 (pH 7.5)로 평형을 잡은 lysine-Sepharose에 loading하여 흡착된 LK68의 양을 측정하여 활성화 수율을 계산하였고 이에 근거하여 재접힘 수율을 산출하였다.

Disulfide bond 형성 분석

LK68은 3개의 크링글로 구성되어 있으므로 9개의 이황화결합과 19개의 cysteine을 함유하고 있다. 따라서 이황화결합 형성이 단백질의 3차원적인 구조를 갖추는데 큰 영향을 준다. 재접힘 전후의 free thiol 기의 수를 측정하여 lysine binding 결과와 비교하여 간접적으로 재접힘 정도를 예측하였다. Free thiol 기의 수는 Ellman 방법을 이용하여 결정하였다(13). 즉, 단백질 용액 100 $\mu\ell$에 같은 부피의 Ellman's reagent (5,5'-dithio-bis(6-nitrobenzoic acid))를 섞어서 412 nm에서 증가한 흡광도 값으로 free thiol 기의 수를 측정하였다.

결과 및 고찰

액상 재접힘 공정

고체상 재접힘 공정의 성능 평가를 위한 control 데이터를 확보하기 위해 액상 재접힘 공정을 수행하였다. 액상 재접힘은 용해된 내포체 (2 mg/ml)를 대상으로 전통적인 재생공정인 simple dilution과 rapid dilution을 적용하였다. Simple dilution은 단백질 용액에 재접힘 버퍼를 천천히 첨가하여 희석을 하면서 공기 중에 노출시켜 산화시키는 방법이며, rapid dilution은 재접힘 버퍼에 단백질 용액을 천천히 첨가함으로써 urea 농도를 급속히 희석하는 방법으로 수행하였다. 두 경우 모두 최종적으로 20배 희석되며 pH 9.0에서 약 16시간 동안 재접힘을 수행하였다. 재접힘의 결과는 재접힘된 LK68의 이황화결합 수를 측정하고 LK68의 생물학적 활성인 lysine binding 정도를 정제된 LK68 표준물질의 lysine binding과 비교하여 평가하였다. Fig. 1에서 보듯이 이황화결합이 형성되는 과정과 lysine binding이 증가하는 과정은 매우 밀접한 상관관계를 보여 주었다. 따라서 LK68의 3차구조가 형성되는 것에 비례하여 생물학적 활성이 복원됨을 확인할 수 있었다. 또한 재접힘 초기 비교적 높은 속도로 free thiol 기가 이황화결합에 참여하여 약 100분 이내에 약 12-13개의 thiol 기가 반응되어 6-7개의 이황화결합이 형성됨을 볼 수 있었다.

LK68 표준물질의 lysine binding은 89%이었고, 이를 용해 버퍼에서 완전히 푼 상태에서는 14%이었다. 또한 용해된 LK68 내포체는 12%의 lysine binding을 나타내었다. Simple dilution과 rapid dilution의 경우 총단백질 대비 재접힘 수율은 38%, 34%이었다(Table 2). 액상 재접힘 공정의 낮은 수율은 단백질간 상호작용에 의한 응집현상에 기인한 것으로 판단된다(14, 15). Tang은 재조합 유로키나제 (urokinase)의 액상 재접힘시 35%의 순도를 가진 내포체로부터는 10%의 재접힘 수율을 얻었으나 95% 순도의 내포체로부터 40%의 수율을 얻었다고 보고하였다(16). 따라서 더 높은 재접힘 수율을 얻기 위해서는 내포체 세척 후 높은 순도와 낮은 단백 농도의 조건이 필요하며 다양한 첨가제에 대한 영향을 통해 최적의 조건을 찾을 필요가 있다(17).

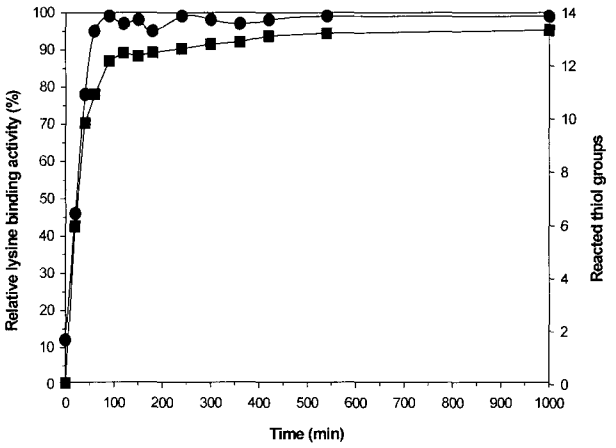


Figure 1. Correlation between disulfide bond formation and lysine binding activity during refolding (■: the number of reacted thiol groups and ●: lysine binding activity.

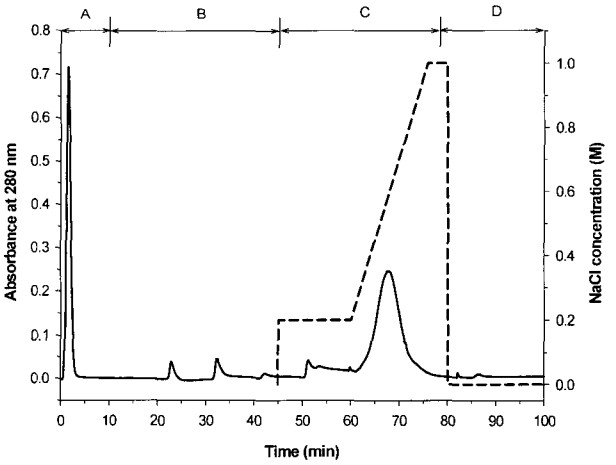


Figure 2. Solid-phase refolding chromatogram using packed bed adsorption chromatography (A: loading/chasing, B: urea washing C: NaCl elution, D: regeneration step. Solid line (—) is UV absorbance at 280 nm and dash line (---) is NaCl concentration for protein elution).

PBA-mediated 재접힘 공정

고체상 재접힘 공정은 담체에 풀린 단백질을 이온결합을 통해 고정화시켜 재접힘을 수행하기 때문에 분자상호간 작용에 의한 응집현상을 최소화할 수 있다(9, 10). Fig. 2에 PBA-mediated 재접힘 공정에서의 단백질 용출 결과를

나타내었다. Loading/chasing 단계에서 용출된 강한 흡광물질은 단백질이 아닌 환원제 (DTT)인 것으로 확인되었다. LK68은 약 0.5 M NaCl에서 용출되었다. 재접힘된 LK68 용액을 RP-HPLC에 의해 분석하고 이황화결합 수를 확인한 결과, LK68 표준물질과 같은 체류시간에서 용출되었고 free thiol 기는 0.36 개로 모두 이황화결합에 참여했음을 확인하였다.

재접힘 후 총 단백질은 1 g wet cell당 16 mg이 회수되었으나 lysine binding 측정 결과 재접힘된 LK68은 64%로서 액상 재접힘 대비 약 1.7배 향상되었다(Table 2). EGF (epidermal growth factor)와 angiogenin의 융합단백질의 재접힘 실험에서 액상 재접힘에서는 5%의 재접힘 수율이 이온교환수지에 흡착한 후 고체상 재접힘을 한 경우 34%의 재접힘 수율을 얻었고, Heparin-Sepharose에 친화결합을 한 후 수행된 고체상 재접힘에서는 64%의 높은 수율을 얻을 수 있었다(10). 따라서 고체상 재접힘에서는 단백질이 레진에 특이적으로 강력하게 고정화될수록 재접힘시 변형이나 탈착이 일어나지 않아 수율이 향상되는 것으로 생각된다.

Table 2. LK68 refolding yield profiles

Process	Total protein recovery ($mg/g_{wet\ cell}$)	LK68 recovery* (%)	Refolded LK68 ($mg/g_{wet\ cell}$)
Soluble phase refolding			
Simple dilution	18	38	6.8
Rapid dilution	18	34	6.1
PBA chromatography			
Inclusion body loading	16	64	10.2
EBA chromatography			
Inclusion body loading	15	68	10.2
Cell homogenate loading	42	44	18.5

* Based on yield calculation from the lysine-binding activity measurement.

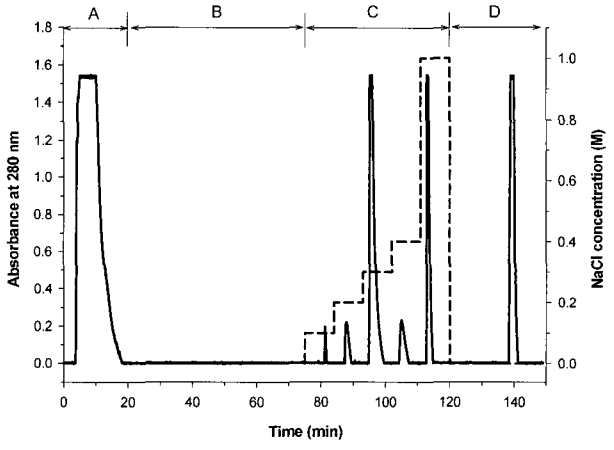


Figure 3. Solid-phase refolding chromatogram of cell homogenate using expanded bed adsorption chromatography. A: loading/chasing, B: urea washing, C: NaCl elution D: regeneration. Solid line (—) is UV absorbance at 280 nm and dash line (---) is NaCl concentration for protein elution.

EBA-mediated 재접힘 공정

세포파쇄액을 대상으로 EBA 크로마토그래피를 이용한 고체상 재접힘을 시도하였다. Fig. 3에 EBA를 사용한 고체상 재접힘 공정에서의 용출특성을 나타내었다. Loading 단계에서 결합하지 못한 단백질은 칼럼 세척 단계에서 제거되고, 대부분의 불순단백질들은 0.1-0.2 M NaCl에서, LK68은 0.3 M NaCl에서 용출되었다. 0.3 M NaCl 용출액을 RP-HPLC 분석 결과 LK68 표준물질과 같은 체류시간에 용출됨을 확인하였다. 용출액내 총 단백질은 1 g wet cell당 42 mg이며 lysine binding을 측정하여 LK68의 재접힘 수율을 계산해 본 결과 44%의 수율을 나타내었다(Table 2). 재접힘 수율은 PBA 재접힘에 비하여 낮으나 총 단백질 회수량이 PBA에 비하여 매우 높다. 재접힘 수율이 PBA 재접힘에 비해 낮은 이유는 세포파쇄액을 이용한 재접힘 공정이기 때문에 내포체의 순도가 낮아 내포체 세척 후 재접힘한 PBA 재접힘보다 재접힘 수율이 낮은 것으로 생각된다. 이를 확인하기 위해 세척된 LK68 내포체를 이용하여 EBA 재접힘을 수행한 경우 총 단백질은 1 g wet cell당 15 mg의 단백질을 얻었으며 lysine binding에 의해 확인된 재접힘 수율은 68%를 나타내었다(Table 2).

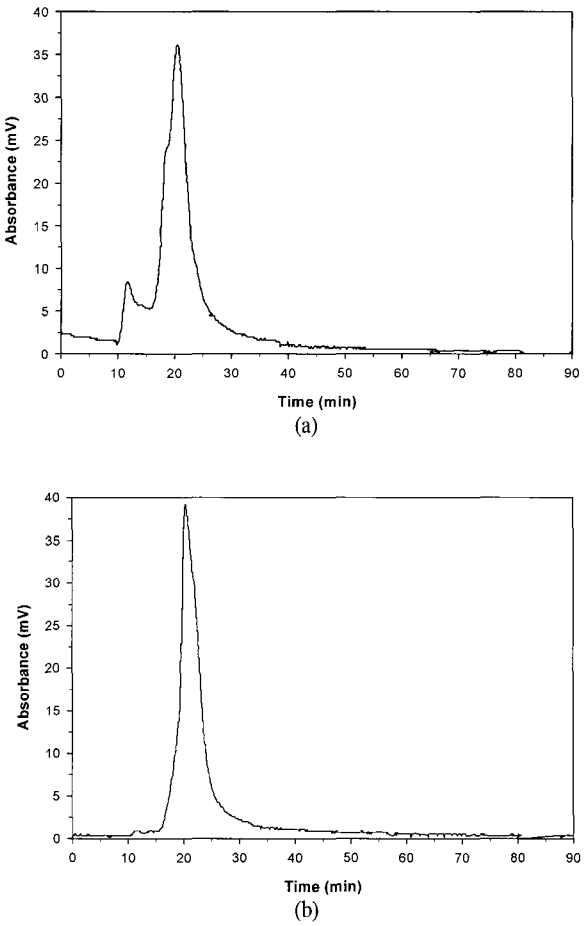
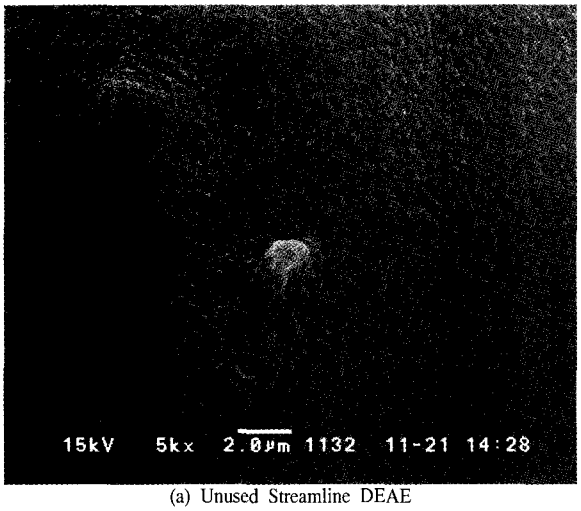


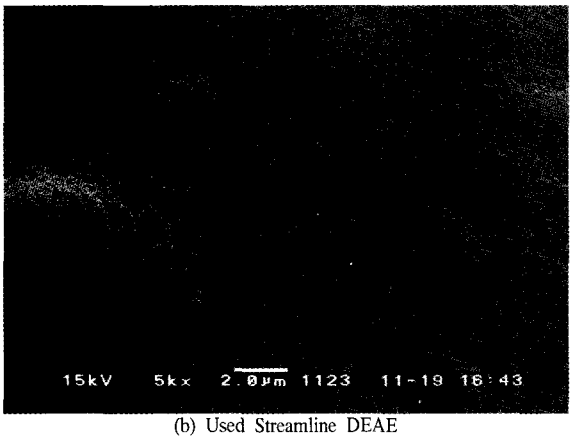
Figure 4. SEC-HPLC chromatogram of (a) 0.3 M NaCl eluate from the EBA-mediated refolding and (b) LK68 standard.

세척된 내포체를 사용할 경우 PBA 재접힘과 EBA 재접힘은 거의 동일한 결과를 보여준다. 즉 세포파쇄에서 내포체

세척 후 회수과정에서 많은 단백질의 손실이 생기기 때문에 세포파쇄액에 대한 EBA 재접힘 공정은 매우 효과적임을 알 수 있다. EBA를 이용한 인성장호르몬 (human growth hormone)의 고체상 재접힘 결과에 따르면 세척된 내포체를 시작물질로 한 경우 84%의 재접힘 수율을 얻었으며 세포파쇄액을 시작물질로 한 경우에는 70%의 재접힘수율을 얻었다(7). 이러한 결과는 재접힘 전의 단백질의 순도가 재접힘 수율에 많은 영향을 미친다는 것을 알 수 있다. 따라서 세포파쇄액을 EBA 레진에 흡착 후 효과적인 세척기술의 개발이 필요함을 알 수 있다. Fig. 4는 0.3 M NaCl에서 용출된 시료를 SEC-HPLC를 사용하여 분석한 결과이다. 재접힘된 LK68의 체류시간이 표준물질의 체류시간과 동일하였다.



(a) Unused Streamline DEAE



(b) Used Streamline DEAE

Figure 5. SEM images of: (a) unused, and (b) used resin (Streamline DEAE).

세척된 내포체를 시작물질로 한 경우, EBA를 이용한 재접힘 공정과 PBA를 이용한 재접힘 공정은 매우 유사한 결과를 보였으나 액상 재접힘 공정 대비 1.7배의 수율 향상을 보였다. 그러나 재조합 대장균 (wet cell) 1 g 당 재접힘 후 회수된 LK38의 양을 비교하면 액상 재접힘, PBA 재접힘, EBA 재접힘 각각의 경우 7, 10, 19 mg의 재접힘된 LK68을 얻었다. 따라서 wet cell의 세포파쇄액을 전처리 없이 EBA를 이용하는 재접힘 공정은 기존의 액상 재접힘 공정과 PBA 재접힘 공정에서 필요한 세포파쇄액에서 내포체의 회수 및 세척을 위한 수차례의 원심분리 공정이 필요 없게 되어 수율 감소가 방지되고 공정의 간소화와 이에 따른 공정시간이 단축되는 잇점이 있다.

EBA 공정에서의 세포찌꺼기 응집 현상

EBA를 이용하는 공정에는 세포파쇄액 내 세포찌꺼기들이 레진에 붙어 레진이 응집되는 현상이 문제시되고 있다(18). 따라서 본 EBA 재접힘 공정에서 용출되지 않고 레진에 흡착되어 있는 세포찌꺼기를 정량화하고자 용출액의 흡광도를 600 nm에서 측정하여 적분하여 초기 loading한 세포파쇄액의 흡광도 값과 비교하였다. 그 결과 98.7%의 세포찌꺼기 등 고형물질들이 용출되는 것으로 확인되었다. EBA에서 80% 이상의 세포체가 흡착되지 않고 용출되는 경우 세포체와 레진 사이의 흡착력이 낮은 것으로 판단되고 있다(18). 또한 SEM (15 kV, SM-300, Topcon, Japan) 측정을 통해 레진의 표면에 세포찌꺼기가 있는지의 유무를 관찰하였다. Fig. 5은 한번도 사용하지 않은 Streamline® DEAE 레진과 세포파쇄액을 주입하고 칼럼 세척 단계 후 흡광도가 초기값 (baseline)으로 돌아왔을 때의 레진을 5,000배 확대한 SEM 사진이다. 다양한 확대 배율을 통해 Streamline® DEAE 레진을 다각도로 측정하여도 어떠한 세포찌꺼기도 레진에 붙어 있지 않음을 확인하였다. 따라서 본 EBA-mediated 재접힘 공정에서는 세포찌꺼기의 흡착 문제는 없는 것으로 판명되었다.

요 약

재조합 대장균에서 내포체 형태로 발현시킨 LK68을 생물학적 활성을 가진 native한 단백질로 재생시키기 위해서 PBA 크로마토그래피와 EBA 크로마토그래피를 이용한 고체상 재접힘을 수행하였다. 내포체와 세포파쇄액을 시작물질로 하여 재접힘 공정을 수행하였으며 총 단백질 회수율과 재접힘 수율을 비교한 결과, EBA 공정이 기존의 액상 재접힘이나 PBA를 이용한 재접힘 공정에 비하여 우수함을 확인하였다. 또한 lysine binding, RP-HPLC, SEC-HPLC, Ellman method 등을 사용하여 분석한 결과 재접힘된 LK68이 native LK68와 동등함을 확인하였다. 본 연구를 통해 EBA 크로마토그래피를 이용한 재접힘 방법은 재접힘 단계의 수율을 향상시킬 뿐 아니라 공정 단계, 시간 등을 감소시켜 공정 성능을 전체적으로 향상시킬 수 있음을 제시하였다.

감 사

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

REFERENCES

1. Carmeliet, P. and R. K. Jain (2000), Angiogenesis in cancer and other diseases, *Nature* **407**, 249-257.
2. Folkman, J. and Y. Shing (1992), Angiogenesis, *J. Biol. Chem.* **267**,

1093-10934.
3. Cao, Y., R. W. Ji, D. Davidson, J. Schaller, D. Marti, S. Sohndel, S. G. McCance, M. S. O'Reilly, M. Llinas, and J. Folkman (1996), Kringle domanis of human angiostatin, *J. Biol. Chem.* **271**, 29461-29467.
4. Anglés-Cano, E. and G. Rojas (2002), Apolipoprotein (a): structure-function relationship at the lysine-binding site and plasminogen activator cleavage site, *Biol. Chem.* **383**, 93-99.
5. Trieu, V. N. and F. M. Uckun (1999), Apolipoprotein(a), a link between atherosclerosis and tumor angiogenesis, *Biochem. Biophy. Res. Comm.* **257**, 714-718.
6. Jang, J. H., J. S. Kim, E. J. Park, J. S. Yeum, and S. I. Jung, Korean patent, 10-2002-7003512 (2002)
7. Cho, T. H., S. J. Ahn, and E. K. Lee (2002), Refolding of protein inclusion bodies directly from *E. coli* homogenate using expanded bed adsorption chromatography, *Bioseparation* **10**, 189-196.
8. Creighton, T. E., US patent 4,977,248 (1990)
9. Stempfer, G., B. Höll-Neugebauer, and R. Rudolph (1996), Improved refolding of an immobilized fusion protein, *Nature Biotech.* **14**, 329-334.
10. Park, S. J., R. Kang, C. W. Suh, Y. G. Chai, O. B. Kwon, S. K. Park, and E. K. Lee (2002), Solid-phase refolding of poly-lysine tagged fusion protein of hEGF and Angiogenin, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **7**, 1-5.
11. Hjorth, R., S. Kämpe, and M. Carlsson (1995), Analysis of some operation parameters of novel adsorbents for recovery of proteins in expanded beds, *Bioseparation* **5**, 217-223.
12. MacDonald, N. J., A. C. Murad, W. E. Fogler, Y. Lu, and K. L. Sim (1999), The tumor-suppressing activity of angiostatin protein residues within kringles 1 to 3, *Biochem. Biophys. Res. Commu.* **264**, 469-477.
13. Ellman, G. L. (1959), Tissue sulfhydryl groups, *Arch. Biochem. Biophys.* **82**, 70-77.
14. Buchner, J. and R. Rudolph (1991), Renaturation, purification and characterization of recombinant F_{ab}-fragments produced in *Escherichia coli*, *Bio/Technology* **9**, 157-162.
15. Cleland, J. L. and D. I. C. Wang (1990), Cosolvent assisted protein refolding, *Bio/Technology* **8**, 1274-1278.
16. Tang, W., Z. Y. Sun, R. Pannell, V. Gurewich, and J. N. Liu (1997), An efficient system for production of recombinant urokinase-type plasminogen activator, *Protein Exp. Purif.* **11**, 279-28.
17. Kim, C. S. and E. K. Lee (2000), Effects of operating parameters in *in vitro* renaturation of a fusion protein of human growth hormone and glutathione *S* transferase from inclusion body, *Proc. Biochem.* **36**, 111-117.
18. Feuser, J., J. Walter, M. R. Kula, and J. Thommes (1999), Cell/adsorbed interactions in expanded bed adsorption of proteins, *Bioseparation* **8**, 99-109.