

총 설

유전자재조합 단백질 회수 공정에서의 고체상 재접힘 기술:  
여러 바이오의약 단백질에의 적용 사례

김민영 · 서창우\* · 김창성\*\* · 조태훈\*\*\* · 박상중\*\*\*\* · 최원찬\*\*\*\*\* · 이은규†

한양대학교 화학공학과 생물공정연구실  
426-791 경기도 안산시 사1동 1271  
\*(주)대웅 생명과학연구소  
449-814 경기도 용인시 포곡면 심계리 503-1  
\*\*듀폰  
135-080 서울시 강남구 역삼동 726  
\*\*\*Univ. of Southern California, Dept. of Chem. Eng.,  
Los Angeles, CA, USA.  
\*\*\*\*(주)중근당 바이오 중앙연구소  
425-100 경기도 안산시 단원구 목내동 454  
\*\*\*\*\* (주)녹십자  
449-900 경기도 용인시 기흥읍 구갈리 272  
(2004년 8월 31일 접수, 2005년 2월 20일 채택)

Solid-Phase Refolding Technology in Recombinant Proteins Recovery:  
Application Examples to Various Biopharmaceutical Proteins

Min Young Kim, Chang Woo Suh\*, Chang Sung Kim\*\*, Tae Hoon Jo\*\*\*, Sang Joong Park\*\*\*\*,  
Won Chan Choi\*\*\*\*\* and Eun Kyu Lee†

Bioprocessing Research Laboratory, Department of Chemical Engineering, Hanyang University,  
1271, Sa-1-dong, Ansan, Gyeonggi-do 426-791, Korea

\*Biotechnology Research Center, Daewoong Corp., 503-1, Samgye-ri, Pogok-myon, Yongin, Gyeonggi-do 426-791, Korea

\*\*Dupont Korea Ltd., 726, Yeoksam-dong, Gangnam-gu, Seoul 135-080, Korea

\*\*\*Department of Chem. Eng., Univ. of Southern California, Los Angeles, CA, U.S.A.

\*\*\*\*CKD Bio Research Institute, CKD Bio Corp., 454, Mongnae-dong, Danwon-gu, Ansan, Gyeonggi-do 425-100, Korea

\*\*\*\*\*Quality Control Team, Green Cross Plasma Derivatives, Corp., 272, Gugal-ri, Giheung-eup, Yongin, Gyeonggi-do 449-900, Korea

(Received 31 August 2004; accepted 20 February 2005)

요 약

최근 전통적인 액체상 공정을 대체하는 기술로서 고체 담체와 단백질 사이의 ‘생물인식’ 기능을 이용하는 새로운 생물공정기술이 개발되고 있다. 통상 고체 담체로는 표면에 특정한 기능기가 노출되어 있는 크로마토그래피용 담체를 사용한다. 단백질의 반응이나 상호작용이 단백질이 담체 표면에 부착되어 있는 상태에서 일어나기 때문에 이 ‘고체상 기술’은 액체상 기술에 비해 뚜렷한 장점을 갖고 있다. 고체상 재접힘은 변성체에 의해 용해된 내포체 형태의 재조합 단백질을 이온교환수지 표면에 흡착시켜 시작한다. 변성체를 단백질 주위로부터 서서히 제거시키면서 고유의 3차 구조로 재접힘시킨다. 재접힘이 완료되면 염 구배와 같은 전통적인 방법에 의해 재접힘된 단백질을 정제된 상태로 용출시킨다. 이 개념은 ‘확장층 흡착 재접힘’에도 연장 적용된다. 세포파쇄액에 변성체를 첨가하여 용해한 내포체 단백질은 확장층 흡착 크로마토그래피용 Streamline 담체에 흡착되고 세포찌꺼기와 불순 단백질들은 확장층 사이로 빠져 칼럼 밖으로 제거된다. 흡착된 목적 단백질은 고체상 재접힘 방법에 의해 재접힘 된 후 용출된다. 수년간 연구·발전되어 온 이 새로운 재접힘 기술은 정제수율 향상, 공정 단계 감축, 공정 시간 및 부피 감소에 따라 생물공학공정의 경제성을 크게 향상시킬 수 있는 것으로 증명되고 있다. 본 논문에서는 실험실에서 수행한 여러 생물의약품 단백질들을 대상으로 한 연구 실험 자료를 바탕으로 고체상 재접힘 기술의 적용 사례를 서술하였다.

† To whom correspondence should be addressed.

E-mail: eklee@hanyang.ac.kr

\*이 논문은 한양대학교 문세기 교수의 정년을 기념하여 투고되었습니다.

**Abstract** – Bioprocessing technologies utilizing ‘biorecognition’ between a solid matrix and a protein is being widely experimented as a means to replacing the conventional, solution-based technology. Frequently the matrices are chromatographic resins with specific functional groups exposed outside. Since the reactions of and interactions with the proteins occur as they are attached to the solid matrix, this ‘solid-phase’ processing has distinct advantages over the solution-phase technology. Solid-phase refolding of inclusion body proteins uses ion exchange resins to adsorb denaturant-dissolved inclusion body. As the denaturant is slowly removed from the microenvironment around the protein, it is refolded into a native, three-dimensional structure. Once the refolding is complete, the folded protein can be eluted by a conventional elution technique such as the salt-gradient. This concept was successfully extended to ‘EBA (expanded bed adsorption)-mediated refolding,’ in which the denaturant-dissolved inclusion body in whole cell homogenate is adsorbed to a Streamline resin while cell debris and other impurity proteins are removed by the EBA action. The adsorbed protein follows the same refolding steps. This solid-phase refolding process shows the potential to improve the refolding yield, reduce the number of processing steps and the processing volume and time, and thus improve the overall process economics significantly. In this paper, the experimental results of the solid-phase refolding technology applied to several biopharmaceutical proteins of various types are presented.

**Key words:** Solid-phase Refolding, Inclusion Body, Biopharmaceutics, Packed Bed Adsorption Chromatography, Expanded Bed Adsorption Chromatography

## Case 1. 액체상 재접힘: rhGH과 rhIFN- $\alpha$

### 1. 서 론

재조합 단백질의 원핵세포 내 과발현(overexpression)은 종종 내포체(inclusion body) 형태로 나타내며 이를 정확한 3차원적 구조로 재접힘 시키는 것이 재조합 단백질 생산에 있어 가장 중요한 단계의 하나이다. 내포체는 대개 불용성의 응집된 형태를 이루고 있으며 많은 양의 재조합 단백질을 포함하고 있고, 광학 현미경상에서 dense한 cytoplasmic granule로 보인다. 그 형성 기전은 아직 확실히 규명되지는 않았으나 cytoplasm 내에서 단백질의 낮은 용해도로 인해 생성된다는 견해가 지배적이다[1].

세포질 내에 발현된 내포체를 생물학적 활성을 가진 native한 단백질로 재생시키는 공정은 각각의 단백질 구조 및 성질에 따라 다르므로 실험적으로 최적 공정 조건들이 결정되어야 한다. 하지만, 일반적으로 널리 쓰이는 재생 공정을 도시하면 Fig. 1과 같다[2]. 세포 파쇄 후 원심분리를 통해 내포체를 pellet 형태로 얻는다. 이 pellet에서 세척을 통해 불순물을 제거한 후, 변성제를 첨가함으로써 응집된 불용성 단백질을 random coil로 용해한다. 용해공정에 쓰이는 변성제로는 8 M urea나 6 M guanidine-HCl(Gu-HCl) 같은 강한 chaotropes, 또는 SDS(sodium dodecyl sulfate)같은 계면 활성제가

사용된다. 때때로 강한 염기 환경(pH 12)에서 수행되기도 한다. 재접힘 공정은 단백질이 모두 용해된 후 첨가된 변성제를 부분적으로 제거하면서 시작된다. 변성제 농도를 낮추기 위해 희석, 투석, 투석여과(diafiltration), 탈염 column 등을 이용한다. 정확히 재접힘된 단백질의 농도 및 순도, 변성제의 종류 및 농도, 완충제의 종류와 이온 강도, pH, 온도, 재접힘 용액의 redox potential, 재접힘 촉진 첨가제의 영향 등이 고려되어야 한다.

재접힘 단계에서 cysteine 잔기 사이의 misfolding과 이에 기인한 단백질 응집은 심각한 문제를 유발한다. 응집체의 형성은 2차 또는 그 이상의 차수 반응이고 정확한 재접힘 반응은 1차 반응으로 알려져 있다[3]. 따라서 재접힘 조건을 적절히 설정하여 응집체의 형성을 극소화하는 방법이 여러 가지 방향으로 시도되고 있다. 전통적으로 sucrose나 glycerol을 재접힘 용액에 첨가하면 단백질 간의 상호 작용을 최소화할 수 있다[4]. 최근에는 ‘molecular chaperones’의 이용이 연구되고 있다. 이들은 단백질의 일종으로 접힘 중간체(refolding intermediates)와 결합하여 비정상적인 응집현상을 억제하는 것으로 알려져 있다[5-6]. 그러나 이 방법은 두 가지의 단점이 있는데 그 중 하나는 변성제 존재하에서 chaperone도 변성이 되어 그 기능을 손실할 수 있다는 것이다[7]. 최근에는 비이온성 계면 활성제가 응집을 억제하고 접힘 중간체를 안정화시켜 침전을 줄이는 목적으로 사용되기도 한다[8-12]. 본 연구에서는 재조합 interferon- $\alpha$  (rIFN- $\alpha$ )와 인성장 호르몬(rhGH)을 목적 단백질로 하여 실험을 수행하였으며, 전체 재접힘 공정을 크게 두 부분, 즉 내포체 용해 공정과 재접힘 공정으로 나누어 목적 단백질의 수율에 중요한 열쇠가 되는 공정 변수들의 영향을 비교 분석하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2-1. 모델단백질(rhGH과 rhIFN- $\alpha$ )

rIFN- $\alpha$ 와 rhGH이 내포체의 형태로 발현된 재조합 대장균 MC1061은 (주)녹십자로부터 제공받았다. rIFN- $\alpha$ 는 단량체 단백질 형태로 발현되며, rhGH는 GST(glutathione S transferase) 내의 69개의 아미노산으로 구성된 polypeptide와 융합된 형태로 발현되었다. rIFN- $\alpha$ 는 166개의 아미노산으로 구성된 단일사슬 단백질로 Cys 1-98, Cys 29-138

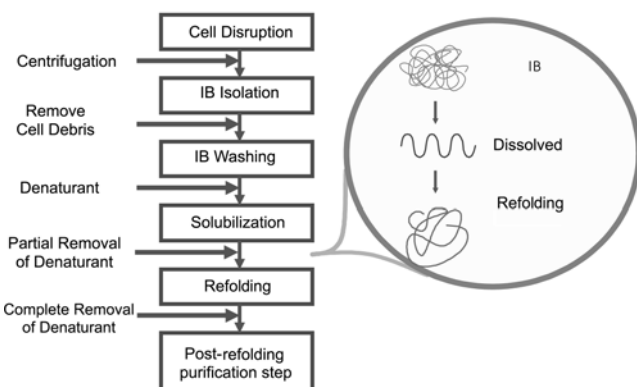


Fig. 1. Standard process to renature inclusion body protein.

에 두개의 이황화 결합을 가지고 있으며 pI는 5.9이다. rhGH도 191개의 아미노산 잔기를 가지는 단일사슬 단백질로 Cys 53-165, Cys 182-189에 두 개의 이황화 결합을 가지고 있으며 pI는 5.2이다.

2-2. 내포체 회수 및 용해 공정

내포체가 포함된 재조합 대장균 세포를 초음파 분쇄기(Sonic disintegrator, model 550, Fisher Co., U.S.A.)를 이용하여 파쇄시킨 후, 5,600×g로 20분간 원심분리하여 내포체 pellet을 얻는다. 이 pellet에 4배 부피의 세척액(0.2 M sodium bicarbonate, 10 mM EDTA, pH 7.5)을 가하여 2번 세척한다. 내포체 paste는 8 M urea, 6 M Gu-HCl, 또는 0.5% SDS가 포함된 46 mM sodium bicarbonate buffer(pH 9.0)를 이용하여 4-6시간 동안 실온에서 용해시킨다. Urea와 Gu-HCl를 포함한 변성제 용액은 4배 희석하여 재접힘 초기 농도를 각각 2 M과 1.5 M로 조정 한 후, 실온에서 재접힘을 시작하였으며, SDS를 포함한 변성제 용액은 먼저 0-4 °C에서 저온 침전을 수행하여 SDS를 침전 제거한 후 실온에서 재접힘 공정을 시작하였다. 변성제의 완전제거를 위해서 urea와 Gu-HCl은 투석 여과를 이용하여 제거하였고 SDS는 음이온 교환수지(Amberlite IRA420, Rohm & Hass Co., Philadelphia, PA, U.S.A.)를 이용 흡착, 제거하였다. SDS의 분석은 1% acridine orange 용액으로 단백질 용액 내 SDS를 발색시킨 후 toluene으로 추출하여 추출액을 499 nm에서 흡광도를 측정하여 농도를 결정하였다. 모든 시약은 Sigma사(St. Louis, MO, U.S.A.)에서 시약급으로 구입하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. 변성제의 내포체 용해 성능 평가

동일한 질량의 내포체 paste(건조질량으로 1.75 g)를 각각 8 M urea, 6 M Gu-HCl 그리고 0.5% SDS가 함유된 100 ml buffer(46 mM sodium carbonate, pH 9.0)에 첨가한 후 실온에서 24시간 용해시켰다. 완전히 용해된 후 0.2 μm filter를 이용하여 여과시킨 후 단백질의 양을 분석하여 총 발현단백질(내포체 형태와 용해되어 있는 형태의 합)과 비교하였다. 총 발현단백질은 별도의 절차에 따라 분석하였다[13]. Fig. 2에서 보듯이 SDS가 가장 높은 효과를 보이는 것을 알 수 있었다. 이 결과는 rINF-α와 rhGH 내포체 용액에서도 동일하게 관찰되었다. 변성제의 비용 면에서 Gu-HCl이 가장 비싸고, 폐수 처리 면에서 urea나 Gu-HCl 경우 질소함량이 높아 불리하다. 또한, urea의 경우 carbamylation 가능성과 Gu-HCl의 경우 이온 교환 크로마토그래피 및 SDS-PAGE와의 상충성을 고려해서 SDS를 가장 효과적인 변성제로 채택하였다.

3-2. 재접힘 공정 중 변성제 및 단백질 농도의 영향

일반적으로 재접힘 공정은 내포체 용해를 위해 첨가된 변성제를 급속히 제거시켜 변성조건을 완화시키면서 시작된다. 이러한 중간 농도에서의 단백질은 active-like한 2차 구조를 형성하기 시작하며, 분자 간 상호작용이 억제됨으로써 응집현상이 최소화될 수 있다. 이러한 중간 농도는 변성제마다 다르며, urea나 Gu-HCl의 경우 각각 약 2 M, 1.5 M이라고 보고되고 있다. 이것은 용해 공정에 사용된 농도가 약 4배 희석된 농도이다. 변성제 농도를 감소시키기 위해 urea와 Gu-HCl이 포함된 용해액은 완충액을 이용하여 4배 희석시켰고, SDS가 포함된 용해액은 4 °C에서 SDS가 포함된 침전

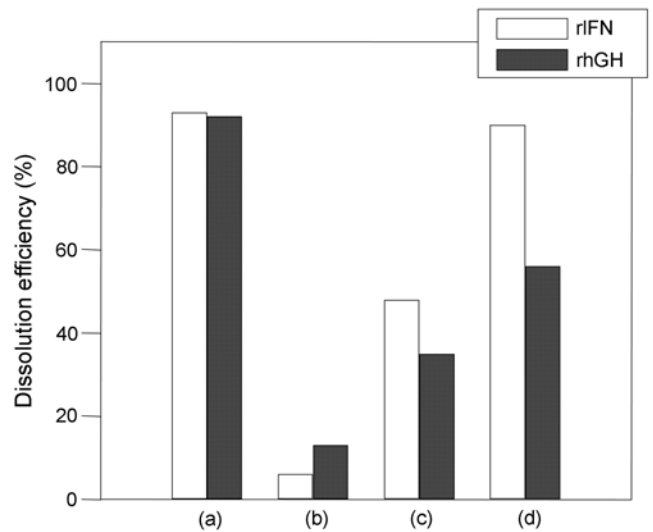


Fig. 2. Effect of denaturants on dissolution efficiency of rINF-α and rhGH inclusion body. Washed inclusion body was placed in a 100 ml sodium bicarbonate buffer solution containing (a) 0.5% SDS, (b) 8 M urea, and (c) 6 M Gu-HCl. The buffer pH was 9.0 (for all) and the dissolution was carried out at room temperature except one buffer with Gu-HCl that was at 4 °C (d).

물을 원심분리하여 제거하였다. SDS의 경우 저온침전에 의해 약 30%의 SDS가 침전 제거됨을 확인하였다. 처리 후 단백질 용액을 완충액으로 희석시킨 후, 실온에서 24시간 동안 공기산화 시켰다. 이 반응은 shuffling을 통한 이황화 결합을 유도하기 위한 것으로 환원된 형태의 thiol기를 산화된 형태의 이황화 결합으로 변화시키기 위한 것이다.

변성제 농도와 더불어 단백질 농도는 재접힘 공정에 가장 중요한 요소로 작용한다. 단백질 간의 상호작용은 억제하고 단백질 내부의 소수성 결합, 이온 결합, 이황화 결합 등을 촉진하기 위하여 단백질의 농도는 낮게 유지하는 것이 효과적이다. rhGH나 rpGH의 경우 1-4 mg/ml 농도에서도 정확한 재접힘이 된다고 보고되고 있지만 [14], 일반적으로 1-20 μg/ml 또는 최대 0.1 mg/ml을 넘지 않는 것이 관례로 되어 있다[15]. 그러나 이러한 농도는 산업적 공정으로 이용하기에는 너무 낮기 때문에 증가시킬 필요가 있다. 본 실험에서는 SDS의 저온침전 후 용해액 중 rhGH의 농도를 0.1 mg/ml에서 5 mg/ml가 되도록 조정하고 SDS의 농도는 0.35%로 일정하게 유지시켜 재접힘 공정 중 단백질 농도의 영향을 살펴보았다.

Fig. 3에서 보듯이 재접힘 효율은 0.5-1.0 mg/ml(17-34 μM)의 단백질 농도에서 높은 효과를 보였다. 2 mg/ml 이상에서는 수율이 많이 감소하였는데, 이것은 단백질 간의 상호작용이 심화되어 응집체가 과도하게 형성된 것으로 생각된다. 또한, 0.1 mg/ml의 낮은 농도에서도 효율이 낮은 것으로 관측되었는데 이는 잔류 SDS 농도가 단백질 농도에 비해 상대적으로 높아 3차 구조 형성을 억제하기 때문인 것으로 생각된다. Kiefhaber 등[16]에 의하면 재접힘 공정은 단백질 농도만의 영향이라고 가정할 때 10 μM 이상에서는 재접힘 수율이 거의 0%에 접근한다고 보고하였다. 그러나 이 보고는 변성제의 영향을 감안하지 않은 것으로서 적당 농도의 변성제 존재 하에서는 재접힘 수율을 향상시킬 수 있으며 이는 변성제가 단백질 간의 응집현상을 억제하기 때문인 것으로 유추된다. 즉, 단백질의 농도에 비하여 SDS의 농도가 상대적으로 낮으면 과도한 응집

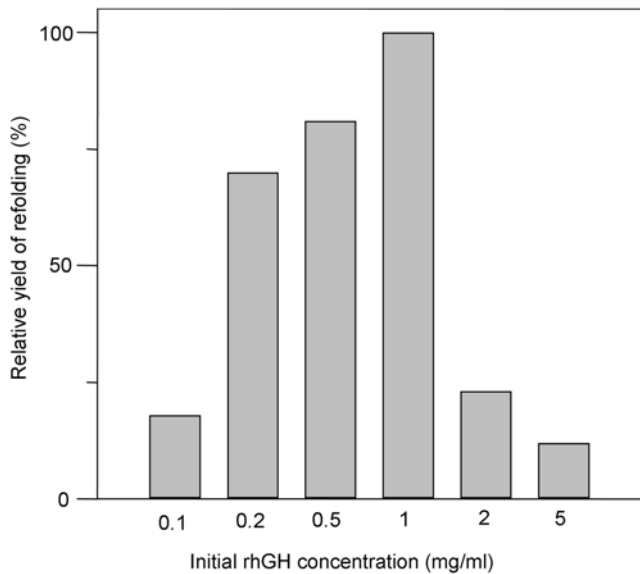


Fig. 3. Effect of rhGH concentration on refolding yield. Washed rhGH inclusion body was dissolved as described in Fig. 2. After the dissolution, the buffer was subjected to cryoprecipitation at 4 °C for partial removal of SDS. The buffer was diluted with the sodium bicarbonate buffer containing 0.35% SDS accordingly to (a) 0.1, (b) 0.2, (c) 0.5, (d) 1, (e) 2, and (f) 5 mg/ml rhGH concentration. Each solution was air-oxidized at room temperature for 24 h, and then fed to IRA420 column for complete removal of SDS. The eluates were analyzed for oxidized form of the monomeric rhGH by RP-HPLC.

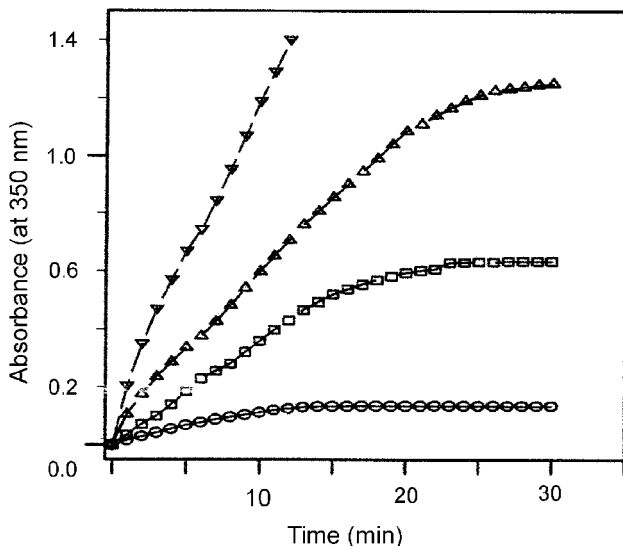


Fig. 4. Aggregation profiles at various rhGH concentrations. Washed rhGH inclusion body was dissolved and cryoprecipitated as described in Fig. 2. The buffer was diluted with the sodium bicarbonate buffer containing 0.35% SDS to 0.34 (○), 0.75 (□), 1.95 (△), and 3.5 (▽) mg/ml rhGH concentration. Each solution was air-oxidized and the aggregate formation profiles were determined by measuring the absorbance at 350 nm at room temperature.

이 유발되고, 높으면 3차 구조 형성을 억제하게 됨을 유추할 수 있다. 따라서 효율적인 재접힘 공정을 위해서는 SDS와 단백질이 일정 범위 내의 적정 비율로 존재하여야 함을 알 수 있었다.

단백질 농도가 응집현상에 미치는 영향을 Fig. 4에 나타내었다. 단백질의 초기 농도가 높을수록 응집현상이 과도하게 일어났으며 겔보기 응집반응상수는 약  $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 로 계산되었다. 이 값은 Zettlmeissl 등[17]이 lactic dehydrogenase의 응집반응실험에서 유추한 반응상수와 비슷한 값이었다.

#### 4. 결 론

rhGH와 rINF- $\alpha$ 를 대상으로 내포체 단백질의 재생공정에 영향을 미치는 주요 공정 변수들을 용해 및 재접힘 공정의 수율에 초점을 맞추어 비교 분석하였다. 내포체 용해용 변성제로는 8 M urea, 6 M Gu-HCl, 0.5% SDS 중 SDS가 두 단백질 모두 가장 높은 수율을 나타내었다. 또한, rhGH의 경우 단백질 농도가 0.5-1.0 mg/ml일 때의 재접힘 효과가 가장 높은 것으로 관찰되었다. 효율적인 재접힘 공정을 위해서는 변성제와 단백질이 일정 범위 내의 적정 비율로 존재하여야 함을 알 수 있었다.

#### Case 2. Packed bed adsorption (PBA) chromatography를 이용한 고체상 재접힘: EGF-angiogenin 융합 독소 단백질

##### 1. 서 론

액체상 재접힘 공정은 세포파쇄와 원심분리에 의해 얻어진 내포체를 세척한 후 변성제를 사용하여 용해한 뒤 희석 및 투석, 투석 여과 등의 방법이 사용되어 왔다. 하지만, 이러한 전통적인 방법의 재접힘 공정은 용액을 교반하면서 수행되므로 단백질 간의 상호작용에 의한 응집현상이 자주 일어나며, 이에 따라 재접힘 수율이 매우 낮아지게 된다[18-19]. 또한, 단백질간의 상호작용을 낮추기 위해 단백질 농도를 통상 50  $\mu\text{g/ml}$  이하로 낮게 유지해야 하므로 공정 부피가 증가하고, 연속식 공정에서의 적용이 힘들며, 보통 30시간 이상의 오랜 공정 시간이 소요되는 등의 단점을 가지고 있다.

액체상 공정의 문제점을 해결하기 위하여 고체상 재접힘(solid-phase refolding) 공정을 도입할 수 있다[20-21]. 고체상 재접힘 공정은 변성제에 의해 풀린 단백질을 고체 matrix에 흡착시킨 후 변성제를 제거하여 재접힘을 유도하는 방식이다. 단백질이 레진에 흡착된 상태에서 재접힘 되기 때문에 단백질 간의 상호작용을 최소화할 수 있고 이로 인해 재접힘 수율을 극대화시킬 수 있다. 레진에 대한 단백질의 흡착능에 따라 액체상 공정에 비해 100-300배 정도의 높은 단백질 농도에서도 재접힘 공정이 가능하므로 공정 부피를 획기적으로 줄일 수 있다[22]. 또한, 재접힘 공정이 칼럼 내에서 수행되므로 공정시간을 대폭 단축할 수 있고, 재접힘 공정과 정제 공정이 함께 수행될 수 있다는 장점이 있다.

이번 연구에서는 재조합 대장균에서 내포체 형태로 발현된 EGF (epidermal growth factor)와 angiogenin이 5개의 아미노산으로 구성된 linker pentapeptide에 의해 결합한 융합 단백질(E5A)에 고체상 재접힘 공정을 적용하였다. 또한, 재접힘 수율을 최대화시키기 위해 E5A에 6개의 lysine과 절단부위인 factor Xa protease의 인식부위인 tetrapeptide를 tagging(6L10E5A) 시킨 후 고체상 재접힘 공정을 적용하여 보았다.

## 2. 재료 및 방법

### 2-1. EGF-angiogenin 융합 독소 단백질의 발현 공정

최근 단백질 의약품 제조 분야에서 여러 형태의 융합단백질들이 이용되고 있다. 특히 융합단백질을 사용하여 특정 세포의 receptor에 cytotoxin을 전달하는 기술은 높은 선택도와 효과로 인해 최근 새로운 암 치료법으로 기대되고 있다[23-24]. Human EGF(pI 4.5, 6 kDa)는 암세포 인식부위로서 사용되고[25], human angiogenin(pI 9.0, 14 kDa)은 암세포 괴사부위로서 사용된다[26-27]. 여기서 EGF의 탄소 말단은 5개의 아미노산(GGGGS)으로 구성된 linker peptide에 의해 angiogenin의 질소 말단에 연결되었다. EGF는 targeting marker로서 작용하여 특정 암세포의 표면에 과다 발현된 EGF receptor에 융합 독소 단백질을 전달하게 한다. 융합단백질이 internalization되면서 angiogenin은 암세포를 죽이는 ribonucleolytic toxin으로 작용한다[26-27].

본 연구에서는 EGF를 coding하는 유전자를 pTE105 벡터에 cloning하고, human liver cDNA library로부터 얻은 angiogenin의 유전자를 plasmid pRSET A에 cloning한 재조합 대장균 균주(주) 대용으로부터 기증받아 사용하였다. GNPF 배지(glycerol 25 g/L, casein enzymatic hydrolysate 25 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.224 g/L, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.01 g/L, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.0005 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.3 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·8H<sub>2</sub>O 0.4 g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.25 g/L)를 사용하여 5 L 규모의 회분식 발효를 통해 배양하였다. 발효기(B-Braun Biotech International, Germany)를 사용한 재조합 대장균의 배양조건은 37 °C, 400 rpm, pH 7, 통기 속도는 1 v/v/m을 유지하였으며, mid-exponential phase에서 1 mM IPTG를 사용하여 E5A 및 6L10E5A의 두 가지 융합단백질의 발현을 유도하였다. 모든 시약은 Sigma사에서 시약급으로 구입하였다. 세포 농도는 분광광도계(Ultaspec 2000, Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)를 사용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다. 발현된 융합단백질은 SDS-PAGE와 EGF 항체 및 angiogenin의 항체를 이용한 western blotting을 사용하여 확인하였고, SDS-PAGE gel을 scanning densitometer를 사용하여 융합 단백질의 발현율을 측정하였다.

### 2-2. 내포체 회수 및 용해 공정

발효액을 12,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 세포를 회수한 후 세포파쇄 완충액(0.1 M sodium phosphate, 20 mM EDTA, 0.1% Tween 20, pH 7.0)를 가한 후 초음파 분쇄기(Fisher Co., U.S.A.)를 사용하여 강도 8에서 30분간 파쇄를 하였다. 세포파쇄액을 8,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 내포체를 회수하였다. 회수된 내포체는 세척 완충액(50 mM sodium phosphate, 0.1% Tween 20, pH 7.0)을 사용하여 3회 세척하였다. 그 후 세척된 내포체를 용해용 완충액(8 M urea, 50 mM sodium phosphate, pH 7.0)을 사용하여 용해했다.

### 2-3. 고체상 재접힘 공정

고체상 재접힘을 위한 기초실험으로서 여러 레진에 대한 융합단백질(E5A, 6L10E5A)의 흡착능을 조사하였다. 내포체 용해액을 여러 pH 조건(6, 7, 8, 9, 10)에서 4가지 이온교환수지(CM-, Q-, DEAE-, Heparin-Sepharose) (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)와의 흡착능을 조사하였다. 0.5 ml의 레진에 용해된 내포체 0.5 mg를 1 mg/ml 농도로 첨가한 후 5분간 저속교반하고 자연 침강시킨 후 상등액을

취하여 Bradford assay 법에 의해 단백질 농도를 측정하여 흡착량을 계산하였다.

칼럼을 이용한 고체상 재접힘 공정에서는 칼럼을 용해용 완충액(8 M urea, 50 mM sodium phosphate, pH 7.0)을 사용하여 평형 시킨 후 내포체 용해액을 칼럼에 loading하였다. 같은 완충액으로 비특이적으로 결합한 단백질들을 제거한 후 세척용 완충액(50 mM sodium phosphate, pH 7.0)을 주입하여 urea를 제거하여 레진에 흡착된 융합단백질의 재접힘을 유도하고, 2 M NaCl을 사용하여 융합단백질을 용출시켰다.

### 2-4. 융합독소 단백질의 활성 측정

융합단백질의 활성을 측정하기 위하여 tRNA assay와 ELISA method를 사용하였다. tRNA assay는 융합단백질을 reaction buffer(120 mM HEPES, 120 mM NaCl, 0.004% BSA, pH 6.8)에 용해한 후, 1.2% yeast tRNA와 융합단백질 용해액을 동일한 부피로 혼합한 후 15,000×g (4 °C)에서 원심분리한 뒤 상등액을 취하여 260 nm에서 흡광도를 측정하였다. 모든 시약은 Sigma사에서 시약급을 구입하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3-1. E5A의 흡착능

액체상 재접힘의 주요한 단점인 응집현상을 극소화하기 위하여 도입된 고체상 재접힘 공정에서 가장 중요한 요소 중 하나는 목적 단백질이 선택된 레진에 최대한 흡착되는 공정 조건을 찾는 것이다. Fig. 5에서 보듯이 E5A 경우 모든 경우에 40%(0.4 mg-E5A/ml-resin) 이하의 낮은 흡착능을 보여주었다. 단량체 단백질인 hEGF와 human angiogenin의 pI 값이 각각 4.5와 9 이상이라는 것을 고려하여 양이온교환수지(CM-Sepharose)와 음이온교환수지(DEAE-Sepharose)를 같은 비율로 혼합한 혼합 레진을 사용하여 pH에 따른 흡착능을 조사하였으나 흡착능은 역시 40%를 넘지 않았다(Fig. 6). E5A는 일정 pH에서 EGF와 angiogenin이 각각 반대의 전기부하를 띠기 때문에 어떤 종류의 이온교환 레진과도 흡착능이 낮아 고체상 재접힘 공정을 적용하기 어려웠다.

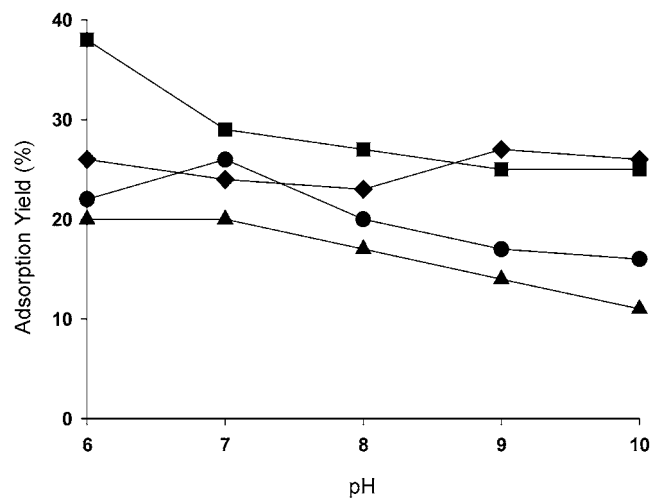


Fig. 5. Adsorption yield of E5A in different resin and pH. Q-Sepharose (◆), CM-Sepharose (●), DEAE-Sepharose (▲), Heparin-Sepharose (■).

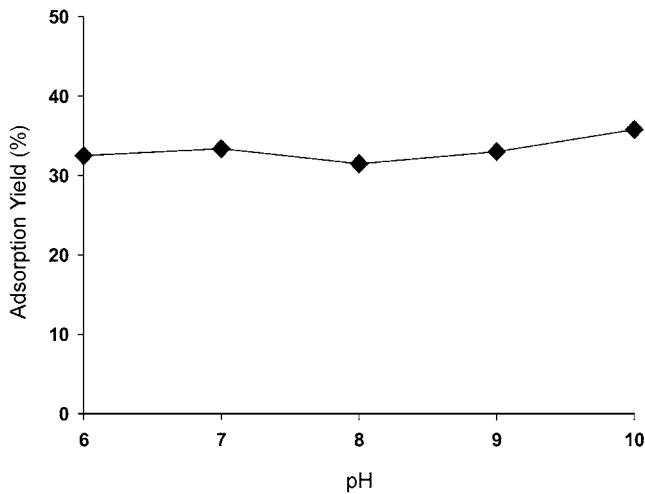


Fig. 6. Adsorption yield of E5A to mixed resin of equal volume of CM- and DEAE-Sephacrose.

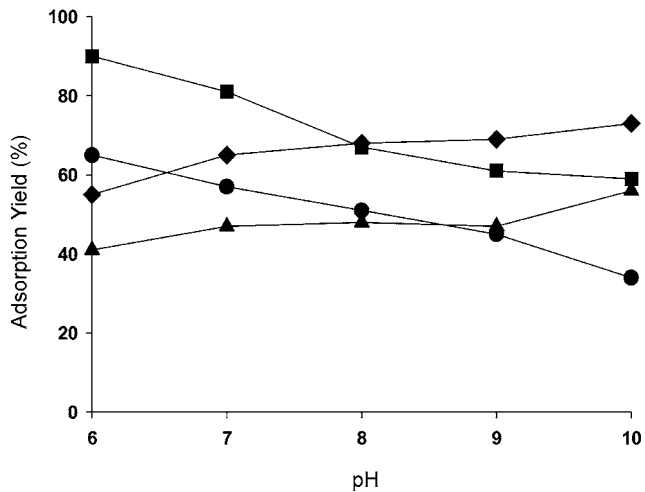


Fig. 7. Adsorption yield of 6L10E5A in different resin and pH. Q-Sephacrose (◆), CM-Sephacrose (●), DEAE-Sephacrose (▲), Heparin-Sephacrose (■).

3-2. 6L10E5A의 흡착능

E5A의 흡착능을 향상시키기 위해 EGF의 질소 말단에 6개의 lysine을 tagging하였다. 이 6L10E5A의 내포체를 용해한 후 여러 pH(6, 7, 8, 9, 10)에서 여러 가지 이온교환수지(CM-, Q-, DEAE-, Heparin-Sephacrose)에 대한 흡착능을 조사하였다. Fig. 7에서와 같이 6L10E5A의 흡착능은 2.5-3.0배 향상되었다. 특히 Heparin-Sephacrose 경우 80% 이상의 높은 흡착능을 보여 주었다. Angiogenin과 Heparin-Sephacrose의 높은 친화력은 기존의 논문에서 발표되었으나[28], 본 연구에서는 E5A 자체로는 다른 이온교환수지에 비하여 Heparin-Sephacrose에 대한 흡착능이 높지 않았으나, poly-lysine을 tagging 시킨 후에는 흡착능이 매우 높아졌다. 6L10E5A가 Heparin-Sephacrose에 대한 친화력이 크게 증가한 것은 poly-lysine tagging에 의해 양이온 교환 능력을 강화시킨 결과인 것이 분명하다. 이러한 고찰에 따라 고체상 재접힘을 위한 레진으로서 Heparin-Sephacrose를 선택하게 되었다.

3-3. 6L10E5A의 고체상 재접힘

Heparin-Sephacrose를 사용한 고체상 재접힘 공정에서는 5 ml 부

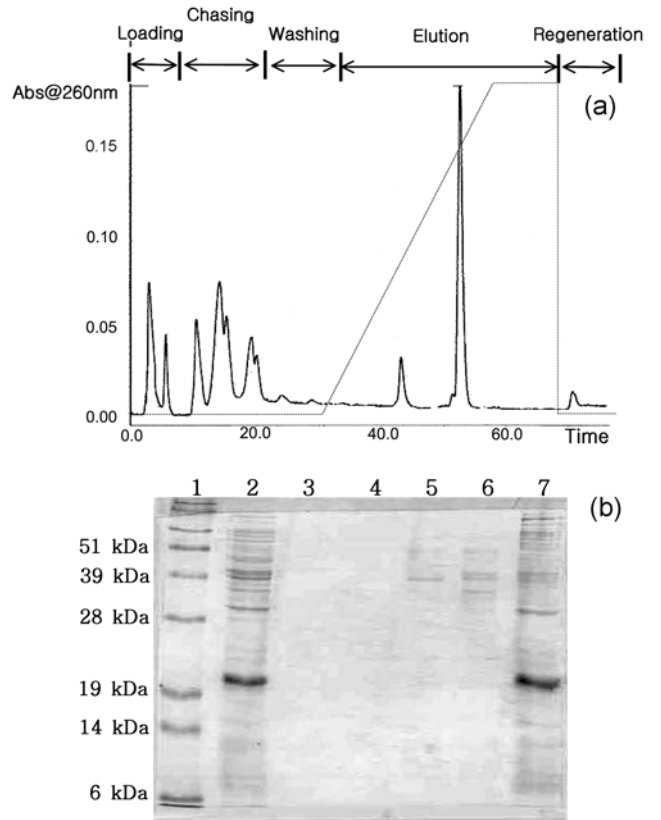


Fig. 8. Solid-phase refolding results of 6L10E5A in Heparin-Sephacrose column. (a) Heparin-Sephacrose chromatogram. (b) SDS-PAGE result of Heparin-Sephacrose chromatogram (Lane 1: Size marker, Lane 2: solubilized IB, Lane 3: 3 min, Lane 4: 10 min, Lane 5: 13 min, Lane 6: 14.5 min, Lane 7: 52 min).

피의 칼럼을 사용하여 용해된 6L10E5A 내포체의 최대 흡착량을 조사하였다. 1.0 mg/ml 농도의 6L10E5A 내포체 용해액을 2 ml/min의 유속으로 흘려주었을 때 최대 약 50 mg 정도가 흡착되어 레진 1 ml 당 최대 흡착량은 10 mg 이었다. 최대 흡착량의 약 20% 정도가 칼럼 공정에서 가장 효율적이란 점을 고려하여[29] 용해된 6L10E5A 내포체(1.0 mg/ml) 10 mg을 loading 하였다. Fig. 8에서 보듯이 1.5 M NaCl에서 목적단백질이 용출되었으며, 회수율은 약 64%였다. 이는 E5A 내포체를 희석 또는 투석을 이용한 액체상 재접힘 공정에 의해 재생시킨 결과[30]에 비하면 약 15배 정도 향상된 것이다(Table 1). 이는 고체상 재접힘 공정의 장점과 poly-lysine tagging의 장점이 결합된 결과라 할 수 있다. 또한, 액체상 재접힘 경우 보통 30시간 이상의 시간이 걸리는 반면, 고체상 재접힘 경우에는 4시간 정도로 공정시간이 단축될 수 있다. 그리고 액체상 재접힘 공정의 경우 50 µg/ml 이하의 농도에서 재접힘 공정을 수행하는 반면 고체상 재접힘은 레진 1 ml 당 약 2 mg의 단백질 농도에서도 재접힘이 가능하여 공정 부피도 약 40배 정도 감축시킬 수 있다.

4. 결 론

암세포 추적 마커인 hEGF와 암세포 괴사물질인 human angiogenin의 융합단백질인 E5A 내포체의 재생을 위하여 희석 또는 투석에 의한 액체상 재접힘 공정을 수행하였을 때 심한 응집현상으로 인하여

**Table 1. Refolding yield profile of hEGF-angiogenin fusion protein**

Method	Conventional method		Solid-phase refolding		
	Dilution/dialysis /CM-Sepharose chromatography		CM-Sepharose chromatography		Heparin-Sepharose
Fusion protein	E5A		E5A	6L10E5A	6L10E5A
Solubilized IB mass	1 g		1 g	1 g	1 g
Refolded fusion protein mass	0.048 g		0.136 g	0.337 g	0.636 g
Refolding yield	4.8%		13.6%	33.7%	63.6%

재접힘 수율이 매우 낮았다. 고체상 재접힘의 효율성을 높이기 위해 6개의 lysine 잔기와 factor Xa protease 절단부위인 tetrapeptide를 E5A의 질소 말단에 tagging한 6L10E5A를 제작하였다. E5A에 비해 이온교환작용에 의한 흡착능이 2.5-3배 향상되었다. 특히 Heparin-Sepharose의 경우 80% 이상의 높은 흡착력을 보였다. Heparin-Sepharose를 사용한 고체상 재접힘 공정에 의해 재접힘된 6L10E5A를 1.5 M NaCl에서 용출시킬 수 있었다. ELISA와 tRNA assay에 의하여 활성을 측정하였을 때 각각 50%, 60% 이상의 활성을 나타내었다. 6L10E5A 재생에 Heparin-Sepharose를 이용한 고체상 재접힘 공정을 적용했을 때 기존의 E5A를 액체상 재접힘 하였을 때에 비해 약 15배의 수율 향상과 약 7배의 공정시간 단축 및 약 40배의 공정부피 감소 효과가 있었다.

**Case 3. Expanded bed adsorption (EBA) chromatography를 이용한 고체상 재접힘: rhGH-GST 융합단백질**

**1. 서 론**

Expanded bed adsorption(EBA) 크로마토그래피는 고액분리와 목적단백질의 흡착을 단일단계공정(single-step process)으로서 동시에 수행할 수 있는 새로운 장치이다. 생물공정에서는 세포 파쇄액으로부터 세포찌꺼기(cell debris) 등 고체 불순물을 제거하는 동시에 목적단백질을 흡착 회수하는 목적으로, 전통적인 원심분리(또는 여과)공정과 초기 흡착 크로마토그래피 공정을 통합시킬 수 있는 공정으로 연구되고 있다. 목적단백질의 흡착에는 정전기적 상호작용에 기반을 둔 이온교환이 가장 많이 이용되나 protein A와 면역글로부린 사이의 친화성 상호작용(affinity interaction)과 수소성 상호작용 등도 사용되고 있다[31-33].

본 연구에서는 세포 파쇄액 내에 있는 내포체 형태의 목적단백질을 별도의 내포체 분리회수 단계를 거치지 않고 EBA 칼럼 내에서 직접 고체상 재접힘에 의해 재생시킬 수 있는 공정을 개발하였다. 즉, 세포 파쇄액 내의 목적단백질 내포체를 urea로 용해한 후 EBA 칼럼에 밑에서 위로 주입시킴으로써 세포 찌꺼기 및 기타 고형 불순물을 EBA 원리에 의해 제거하고, 풀린 상태의 단백질을 이온교환 메커니즘에 의해 레진 표면에 결합시켰다. 그 후 완충액을 주입하여 칼럼 내 urea 농도를 서서히 낮춤으로써 고체상에서 재접힘시킨 후 염 구배에 의해 접힌 단백질을 용출시켰다.

**2. 재료 및 방법**

**2-1. 모델단백질(rhGH-GST 융합단백질)**

hGH-GST(69개 아미노산 잔기로 구성된 fragment)의 융합단백질을 모델단백질로 사용하였다. Urokinase 절단부위인 tetrapeptide를

linker sequence로 이용하여 hGH의 탄소 말단과 GST의 질소 말단을 연결하였다. 융합단백질은 arabinose promotor를 사용한 *E. coli* BL21 안에 내포체 형태로 발현되었고, 융합단백질의 발현율은 전체 단백질의 약 40%이었다. 재조합 세포 및 융합단백질의 표준물질은 (주)녹십자에서 제공받았다.

**2-2. EBA 크로마토그래피**

Streamline 25 칼럼은 Amersham Biosciences사(Uppsala, Sweden)로부터 구입하였고 레진으로는 Streamline DEAE를 사용하였다. 이 레진은 100-300 μm의 다양한 입자 크기가 있고(평균 직경은 200 μm) 밀도는 약 1.20 g/ml이다[34]. 본 실험에 사용한 레진 부피는 50 ml 이었고 bed의 침강 높이(settled height)는 약 10 cm이었다. 단백질 농도의 영향을 조사하기 위하여 단백질 loading은 1 ml 레진 당 1-10 mg/ml로 변화시켰다. Loading 단계의 유속 영향을 보기 위해 bed expansion ratio는 2, 3, 4로 변성제 감소속도가 재접힘 효율에 미치는 영향을 조사하기 위해 urea 세척 단계에서의 완충액의 위 방향(upflow) 유속은 80, 120, 160 cm/h로 다양하게 실험하였다.

**2-3. EBA-mediated 재접힘 공정 순서**

정제된 rhGH 단량체, hGH-GST 융합단백질 내포체 그리고 융합단백질 내포체를 내포하는 재조합 대장균 세포 파쇄액 등 세 가지의 다른 시작물질을 가지고 재접힘 실험을 수행하였다. 첫째로 rhGH 단량체를 이용하여 urea에 의해 풀린 단백질이 레진에 흡착되는지, 그리고 urea를 제거함으로써 재접힘이 되는지를 확인하는 실험을 하였다. 동결 건조된 rhGH 분말을 sodium bicarbonate buffer(46 mM, pH 8.0)에 1.8 mg/ml 농도로 용해시킨 후 urea를 8 M 농도로 첨가하여 rhGH 단량체를 unfolding 시켰다. 이 용액 20 ml을 10 ml의 Streamline DEAE로 충전된 일반 칼럼에 흡착시키기 위해 주입하였다. 레진에 흡착된 단백질을 urea가 없는 bed volume 8배의 sodium bicarbonate buffer(46 mM, pH 8.0)를 이용하여 세척하면서 재접힘 시켰다.

둘째로 세척된 내포체에 8 M urea를 첨가하여 풀린 융합단백질이 칼럼에 흡착되고 재접힘 되는지, 또 세척된 내포체 내에 융합단백질이 40% 정도이므로 고체상 재접힘 공정 중 기타 불순 단백질의 영향도 관찰하였다. 세척된 내포체 46 mg을 sodium bicarbonate buffer(46 mM, pH 9.0)에 넣은 후 8 M urea를 첨가하여 용해하였다. 용해된 내포체 용액 50 ml을 Streamline DEAE 레진으로 채워진 EBA 칼럼에 아래에서 위 방향으로 주입하였다. 주입이 끝난 후 용해되지 않은 고형물질들을 용출 제거하기 위해 8 M urea가 포함된 buffer 100 ml(bed volume의 2배 부피)을 위 방향으로 주입하였다. Urea를 세척하여 재접힘을 유도하기 위해 urea가 없는 동일한 sodium bicarbonate buffer(46 mM, pH 9.0) 400 ml(bed volume의 8 배 부피)를 위 방향으로 주입하였다. 레진을 침강시킨 후 NaCl이 함

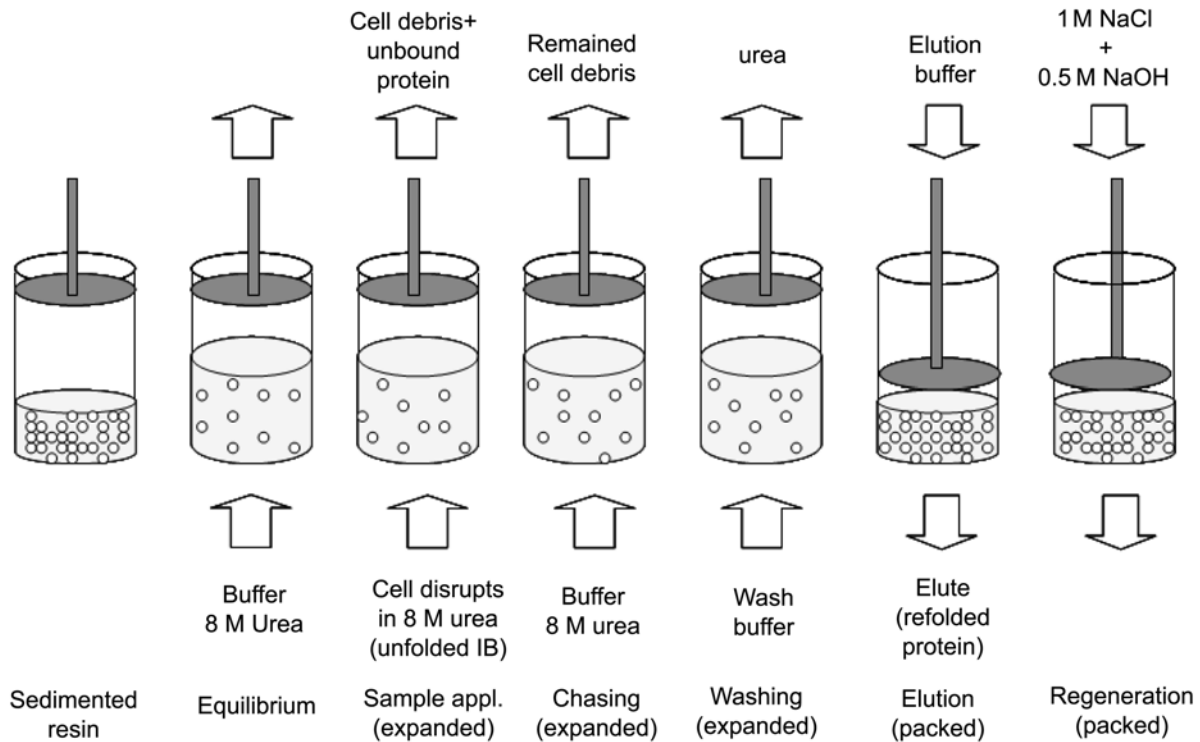


Fig. 9. Process sequence of the EBA-mediated refolding of the inclusion body protein from cell homogenate.

유된 용출용 완충액을 위에서 아래 방향으로 흐름을 주어 재접힘된 융합단백질을 용출시켰다. EBA 레진은 0.5 M NaOH와 1.0 M NaCl 을 사용하여 재생시켰다.

마지막으로 세포파쇄액을 이용하였는데, 이는 세포 파쇄액 내 고형 불순물의 제거와 동시에 융합단백질이 고체상 재접힘 되는 것을 확인하기 위한 것이다. 8 M urea가 함유된 완충액 100 ml 당 10 g의 재조합 대장균 세포를 슬러리 시킨 후 고압 homogenizer(model FA-078-E1, SLM Instruments Inc., U.S.A.)를 사용하여 800 기압에서 2번 통과시켜 파쇄하였다. 세포파쇄액(40 ml)은 50 ml의 Streamline DEAE 레진이 채워진 EBA 칼럼에 아래에서 위 방향으로 주입시켰다. 레진 사이에 끼이거나 물리적으로 부착된 세포 찌꺼기 고체들은 8 M urea가 포함된 sodium bicarbonate buffer(46 mM, pH 9.0) 100 ml(2 bed volume 부피)을 추가로 흘려줌으로써 제거시켰다. 그 이후 urea 세척, 재접힘된 융합단백질의 용출 그리고 칼럼 재생은 위와 동일한 방법을 사용하였다. Fig. 9는 세포파쇄액으로부터의 EBA-mediated 재접힘 공정 순서를 도식적으로 나타내고 있다.

2-4. 재접힘 분석

환원된(또는 풀린) 단백질과 산화된(또는 재접힘된) 단백질을 분리하고 정량화하는데 C18 칼럼(Macrosphere 300, 5 micron, 4.6×140 mm, Alltech Inc., U.S.A.)이 장착된 역상 HPLC를 사용하였다[35]. Buffer A는 탈이온수에 0.1%(v/v) trifluoroacetic acid(TFA)를, buffer B는 0.1%(v/v) TFA가 함유된 acetonitrile이었다. Buffer B 농도를 24-75%까지 35분간 선형 구배를 주었다. Fig. 10은 RP-HPLC를 사용하여 풀린 단백질과 접힌 단백질이 분리됨을 나타내었다. 용액 내 융합단백질의 순도는 coomassie blue로 염색된 SDS-PAGE(Mini Protein II, Bio-Rad, U.S.A.) gel을 scanning densitometer를 사용하여 정량화하

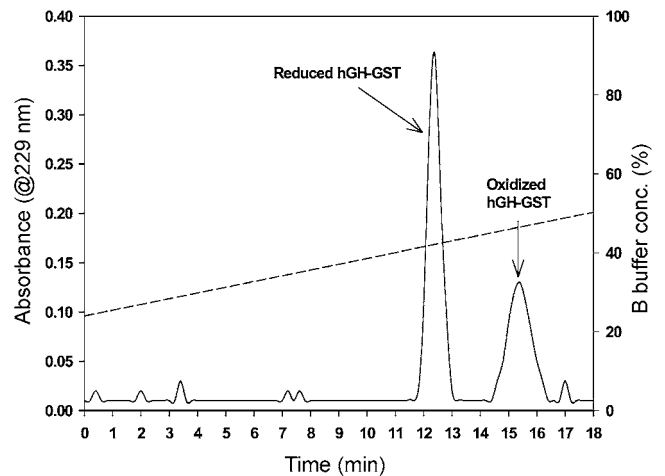


Fig. 10. RP-HPLC chromatogram for the resolution of the oxidized and the reduced forms of the fusion protein. Buffer A was 0.1% (v/v) TFA in deionized water and buffer B was 0.1% TFA in acetonitrile. Fifty microliter of the sample containing both oxidized and beta-mercaptoethanol-reduced protein was injected into the C18 column (Macrosphere 300, 5 micron, 4.6×140 mm, Alltech Inc., U.S.A.). The gradient was 24-75% buffer B in 35 min.

였다. 또한, Superose 12 HR10/30 칼럼을 사용한 FPLC 시스템(model P-500, Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)은 재접힘 후 용출액 내 융합단백질 단량체와 응집체의 농도를 비교분석하기 위해 사용되었다.

융합단백질 표준물질과 EBA에 의해 재접힘된 융합단백질의 2차 구조를 비교하기 위해 spectropolarimeter(Jasco, model J-715, Japan)를 사용하였다.



### 3. 결과 및 고찰

#### 3-1. 세포 찌꺼기 고형물과 urea 제거 결과

EBA-mediated 고체상 재접힘 공정의 성능은 세포파쇄액을 loading 한 후 칼럼 내 고형 불순물을 잘 제거시킬 수 있는냐에 달려있다. 왜냐하면, 만약 불순물들이 레진 표면이나 내부에 결합하여 있다면, 또 고체 입자와 레진 간의 인력작용으로 응집체를 형성하여 유체의 원활한 흐름을 방해한다면 재접힘 수율을 떨어뜨릴 수 있기 때문이다. 따라서 칼럼 내 고형물질을 완전히 제거하기 위해 필요한 완충액 부피를 결정하기 위해 % Brix로 측정된 고체 농도가 47.2%인 세포파쇄액 100 ml을 칼럼에 주입하였고 용출액의 % Brix가 0이 될 때까지 sodium bicarbonate buffer(46 mM, pH 9.0)로 세척하였다. Fig. 11에서 보듯이 bed expansion ratio가 3의 유속에서 bed volume의 약 2.5배의 완충액에 의해 평균 크기 약 0.5  $\mu\text{m}$ 의 고체 찌꺼기의 93.4%가 성공적으로 제거되었다. 이는 세포 찌꺼기와 레진 사이의 상호작용이 비교적 약해서 세포 찌꺼기가 완충액 세척에 의해 효과적으로 제거될 수 있음을 보여주는 것이다. 또한, Fig. 11에서 보듯이 urea가 함유되어 있지 않은 sodium bicarbonate buffer(46 mM, pH 9.0)를 bed volume의 2.5배 부피로 주입시켜 urea를 100% 제거할 수 있었다(8 M urea가 함유된 완충액의 % Brix는 28.7%).

#### 3-2. 고체상 재접힘 공정 수율

단량체 hGH의 경우 칼럼으로부터 점차 urea를 제거함으로써 8 M urea에 의해 풀린 단백질이 고체상 재접힘 되었다. 재접힘 공정 수율은 약 81%이었다. 같은 방법을 세척된 내포체에 적용해 본 결과 약 84%의 수율로서, 단량체의 경우와 거의 차이가 없었다. 이 결과에 따라 내포체 내에 존재하는 불순물 단백질들이 고체상 재접힘을 크게 방해하지 않는다는 결론을 내릴 수 있었다. 또한, 이 수율은 종래의 액체상 재접힘에서의 낮은 수율(약 28%)과 비교시 많이 향상된 값이었다.

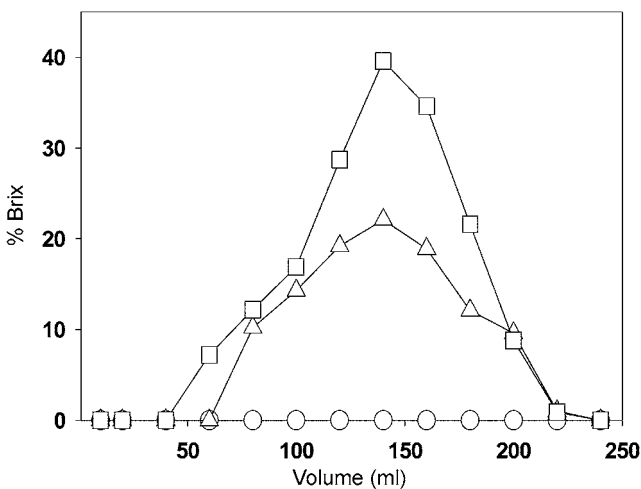


Fig. 11. Elution profile of the solid matters from the expanded bed.  $\circ$  : sodium bicarbonate buffer only,  $\Delta$  : the same buffer containing 8 M urea (the feed showed 28.7% Brix),  $\square$  : cell homogenate containing 8 M urea (the feed showed 47.2% Brix). All the feed was at pH 9.0. The expansion ratio was maintained at 3.0. For  $\Delta$  and  $\square$ , 100 ml was fed and the column was washed by the buffer.

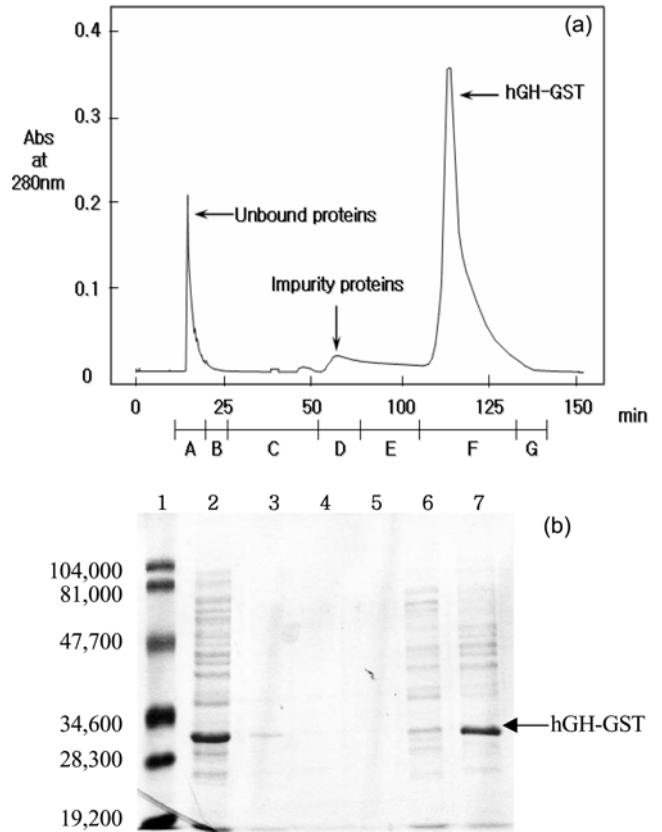


Fig. 12. (a) UV monitoring (at 280 nm) profile of the elution from the EBA-mediated refolding monitored, A: loading, B: chasing, C: urea washing D: 0.2 M NaCl elution E: 0.3 M NaCl elution, F: 0.4 M NaCl elution, G: 1 M NaCl, and (b) the SDS-PAGE of each eluate, lane 1: molecular weight markers, 2: cell homogenate in 8 M urea, 3: loading step eluate, 4: chasing step eluate, 5: urea-wash step eluate, 6: 0.2 M NaCl eluate, 7: 0.4 M NaCl eluate.

#### 3-3. EBA 칼럼에서의 용출 profile

Fig. 12(a)와 (b)는 각각 280 nm에서 모니터링한 EBA-mediated 재접힘 공정 후 용출 profile과 각 단계 용출액의 SDS PAGE 결과를 나타내었다. Loading 단계에서 결합하지 못한 단백질은 chasing 단계에서 대부분 용출되었고, 대부분의 대장균 유래 불순 단백질들은 0.2 M NaCl에서, 목적단백질은 0.4 M NaCl에서 용출되었다. Fig. 13(a)은 0.4 M NaCl에서의 용출액을 FPLC에 의해 분석한 것이다. 응집체의 농도는 단량체 농도보다 현저히 낮음을 볼 수 있다. 용합단백질의 fraction을 동일한 FPLC로 2차 정제하였을 때 대칭적인 단일 peak를 얻었다(Fig. 13(b)). 이 peak 내 단백질 농도는 0.87 mg/ml이었다. EBA-mediated 재접힘 공정을 통해 높은 수율과 함께 높은 순도의 단백질 용액을 얻을 수 있었다. 이 방법에 의해 응집현상을 근본적으로 해결할 수 있었기 때문에 응집체 제거가 주목적인 재접힘 후 정제과정 (post-refolding purification)을 생략할 수 있는 것으로 기대된다.

#### 3-4. 재접힘된 융합단백질의 2차 구조 분석 결과

Fig. 14는 표준 융합단백질과 재접힘된 융합단백질의 far-UV spectra를 보여주고 있다. 두 spectra는 최대흡수파장, 흡수광도 및 분광학적 profile에서 동일함을 볼 수 있다. 208 nm와 220 nm에서

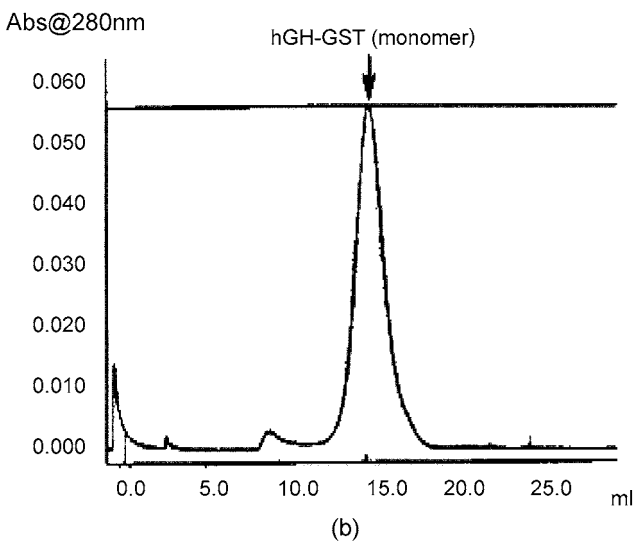
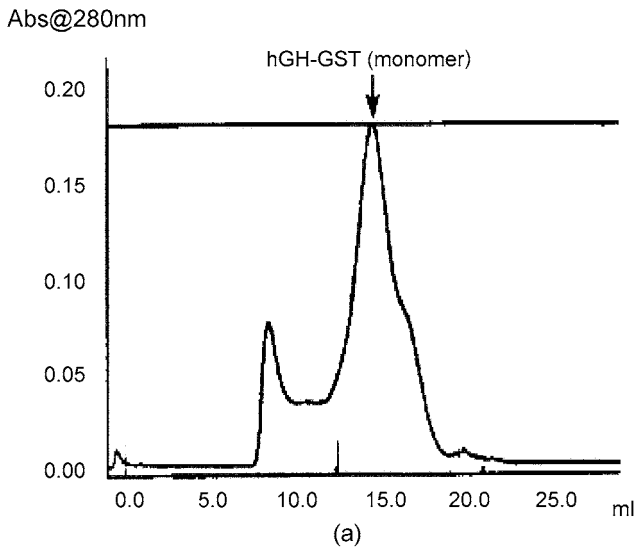


Fig. 13. FPLC (Superose 12 HR10/30) chromatogram of: (a) the initial fraction from the 0.4 M NaCl elution, and (b) the fractionated peak from (a).

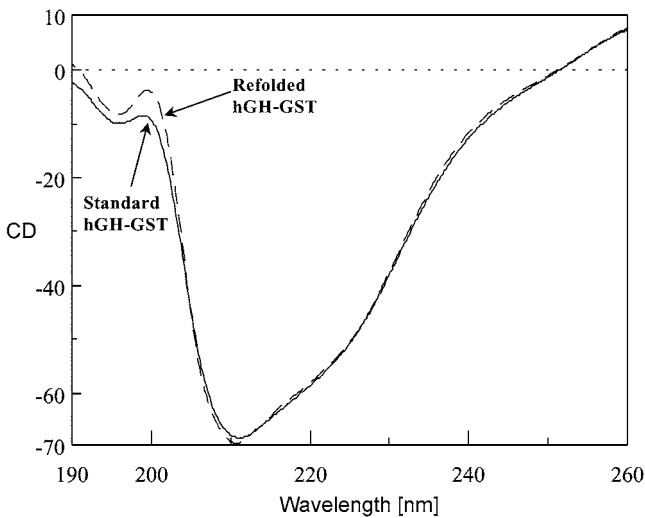


Fig. 14. Far-UV CD spectra of the standard fusion protein and the refolded protein from the EBA-mediated refolding.

관찰되는  $\alpha$ -helix의 조성은 동일하였고, 195 nm에서 관찰되는  $\beta$ -sheet의 경우 약간의 차이에도 불구하고 두 가지 형태의 단백질은 동일한 2차 구조를 갖는다고 볼 수 있다. 따라서 EBA-mediated 재접힘 공정은 내포체 단백질을 native한 구조로 재생시킬 수 있다는 결론을 얻을 수 있었다.

#### 4. 결 론

재조합 대장균 세포파쇄액으로부터 내포체 단백질을 고체상 재접힘을 통해 직접 재생시킬 수 있는 새로운 공정을 개발하였다. 세포 파쇄액 내 용해된 풀린 내포체 융합단백질은 레진에 흡착되고 세포 찌꺼기 등 고체 입자물은 EBA 원리에 의해 효과적으로 제거되었다. Urea를 점차 제거함으로써 융합단백질은 레진 표면에서 재접힘되었고 염 농도 구배에 의해 용출되었다. 이 새로운 EBA-mediated 재접힘 방법에 의해 재접힘 중 응집현상을 획기적으로 줄여 공정 수율을 향상시킬 뿐 아니라 공정 단계 수를 줄일 수 있다. 이 공정은 우리가 알고 있는 한 세계에서 최초로 개발된 것으로서 다른 단백질에도 성공적으로 적용되기를 기대한다.

#### Case 4. PBA와 EBA 크로마토그래피를 이용한 고체상 재접힘의 공정 성능 비교: 'LK 68'

##### 1. 서 론

본 연구에서는 내포체 단백질의 재접힘 공정으로 전통적인 액상 재접힘, PBA 크로마토그래피를 이용한 고체상 재접힘 그리고 EBA 크로마토그래피를 이용한 고체상 재접힘 공정을 수행하여 각 공정의 수율과 특성을 비교하고자 하였다. 또한, EBA 크로마토그래피를 이용한 재접힘에서는 세척된 내포체와 세포파쇄액을 시작물질 (starting material)로 하는 재접힘 공정을 각각 수행하여 재접힘 수율을 비교하여 세포파쇄액 내 불순물들의 영향을 분석하였다.

LK(lipoprotein kringle)은 아포리포단백질(a)(apolipoprotein a)의 일종으로 신혈관 생성(angiogenesis)을 억제하는 활성을 갖는 단백질이다. 신혈관 생성 억제제는 기존의 혈관에서 모세혈관이 생성되는 것을 막아 종양의 성장이나 전이를 억제함으로써 최근 새로운 암 치료제로 연구되고 있다[36-37]. 원발성 종양과 전이성 종양은 그들의 성장을 위하여 신생혈관의 생성이 필요하기 때문에, 종양이 존재하더라도 신생혈관형성을 억제하거나 제거하면 종양은 성장할 수가 없기 때문이다[38]. 아포리포단백질(a)은 두 종류의 크링글(kringle) 영역과 비활성의 단백질 분해효소와 유사한 영역을 포함한다[39]. 크링글은 약 80개의 아미노산 잔기와 3개의 분자내 이황화 결합으로 구성된 구조로서, 프로트롬빈, 유로키나제, 간세포 성장인자 및 아포리포단백질 등 다수의 단백질에서 발견된다. 크링글 영역은 독립적인 접힘 단위로 나타나지만 그 기능적인 역할은 아직 알려져 있지 않다. 아포리포단백질(a)은 플라스미노겐형의 크링글 영역을 포함하므로 종양 신생혈관의 형성 및 성장을 저해하는 생물학적 활성을 가진다[40].

##### 2. 재료 및 방법

###### 2-1. 모델단백질(LK 68) 및 내포체 용해 공정

본 연구에서 사용된 재조합 대장균과 LK68 표준물질(pI 6.1, 37

**Table 2. Buffer compositions used for solid-phase refolding of LK68**

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

kDa)은 (재)복합생명공학연구소로부터 제공받았다. LK68은 아포리포단백질(a)의 36, 37, 38 크딩글만을 클로닝하여 변형시켜 신혈관 생성 억제 활성을 갖게 한 새로운 항암제 후보물질이다[41]. 재조합 대장균 BL21(DE3)에 pET IIa 벡터를 이용하여 LK68 유전자를 발현하였다. LK68은 총 발현단백질 중 20-30%이었으며 내포체 형태로 발현되었다. 발효액을 10,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 세포를 회수한 후 세포파쇄 버퍼를 가한 후 초음파분쇄기(550 Sonic Dismembrator, Fisher Co., U.S.A.)로 파쇄하였다. 파쇄 정도는 파쇄된 세포찌꺼기의 입도 크기를 dynamic light scattering(LPA-3000, Otsuka, Japan)을 이용하여 측정 확인하였다. 세포파쇄액을 10,000 rpm에서 30분간 원심분리 후 내포체를 회수하였다. 회수된 내포체(약 77% 함습율)를 두 가지 세척 완충액을 번갈아가며 4회 세척하였다. 세척된 내포체를 용해 버퍼를 사용하여 20시간 동안 용해했다. 세포 파쇄, 내포체 세척 및 용해, 고체상 재접힘 공정에 사용된 모든 완충액의 종류와 조성을 Table 2에 나타내었다. 실험에 사용된 시약은 모두 Sigma 사(St. Louis, MO, U.S.A.)로부터 시약급으로 구입하였다.

**2-2. PBA-mediated 고체상 재접힘**

PBA 크로마토그래피를 이용한 고체상 재접힘 공정에서는 먼저 Q-Sepharose 칼럼(HiTrap 1 ml, Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)에 용해 완충액을 1 ml/min의 유속으로 주입시켜 평형을 잡은 후 LK68 내포체 용해액 1 ml(2.5 mg/ml)을 loading하여 흡착시켰다. 칼럼 세척 완충액을 bed volume의 5배 부피로 흘려주어 물리적으로 끼어 있는 단백질들을 제거하였다. 그 후 bed volume의 20 배 부피의 재접힘 완충액을 주입시켜 urea를 서서히 제거함으로써 레진에 흡착된 LK68의 재접힘을 유도하였다. 고체상 재접힘 후 LK68을 회수하기 위해 용출 버퍼를 20-100%로 20분간 선형 농도 구배를 주어 용출시켰다.

**2-3. EBA-mediated 고체상 재접힘**

Streamline 25 칼럼과 Streamline DEAE 레진은 Amersham Biosciences 사(Uppsala, Sweden)로부터 구입하였다. 용해된 내포체 50 mg(2 mg/ml)을 expansion ratio 3.0의 유속으로 아래에서 위 방향으로 주입하였다. 끼어 있는 고형 물질들을 칼럼 세척 완충액(bed volume의 4배 부피)으로 제거시켰다. 재접힘 완충액(bed volume의 10배 부피)을 흘려주어 urea를 세척하여 재접힘을 유도하였다. LK68을 용출시키기 위해 레진을 침강시키고 20, 40, 60, 100%의 용출 완충액을 단계적으로 위에서 아래 방향으로 흘려주었다. 칼럼은 재생 완충액을 사용하여 재생하였다[42]. 세포파쇄액 내 내포체의 재접힘 공정 역시 동일한 방법으로 수행하였다.

**2-4. LK68 구조 및 응집체 분석법**

환원된(또는 풀린) 단백질과 산화된(또는 재접힘된) 단백질을 분리하고 정량화하는데 C18 칼럼(Jupiter 300, 5 micron, 4.6×250 mm, Phenomenex, U.S.A.)이 장착된 RP-HPLC(Gilson 302, U.S.A.)를 사용하였다. 버퍼 A는 탈이온수에 0.1%(v/v) TFA가, 버퍼 B는 80% acetonitrile에 0.075%(v/v) TFA가 함유되었다. %B를 10-100%까지 45분간 선형 농도 구배를 주었다. 접힌 LK68 경우 약 25분에, 풀린 LK68 경우 약 27분에 용출됨으로써 두 형태의 단백질을 분리할 수 있었다. 고체상 재접힘 후 LK68 용출액 내의 응집체 농도를 분석하기 위해 SEC-HPLC 칼럼(Biosep-SEC-S3000, 7.8×600 mm, Phenomenex, U.S.A.)을 사용하였다. Loading 부피는 20 µl 이었고, 20 mM sodium phosphate(pH 6.8)를 0.5 ml/min의 유속으로 주입하였다.

**2-5. Lysine binding 측정을 통한 재접힘 수율 결정**

Plasminogen의 internal fragment에 해당하는 단백질은 3차원 구조를 갖추게 되면 lysine이 결합할 수 있는 pocket이 형성된다[38]. LK68 경우 37 크딩글에 lysine이 결합할 수 있는 부위가 형성되어 생물학적 기능을 나타낼 수 있다는 것을 의미한다[43]. 재접힘된 LK68의 lysine binding을 측정하기 위해 lysine-Sepharose 4B(Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)를 사용하였다. 투석에 의해 NaCl을 제거한 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.

**2-6. Disulfide bond 형성 분석**

LK68은 3개의 크딩글로 구성되어 있으므로 9개의 이황화결합과 19개의 cysteine을 함유하고 있다. 따라서 이황화결합 형성이 단백질의 3차원적인 구조를 형성하는데 영향을 줄 수 있다고 판단되어 재접힘 전후의 free thiol기의 수를 측정하여 lysine binding 결과와 비교하여 재접힘 성능을 유추하였다. Free thiol기의 수는 Ellman 방법을 이용하여 결정하였다[44]. 즉, 단백질 용액 100 µl에 같은 부피의 Ellman's reagent(5,5'-dithio-bis(6-nitrobenzoic acid))를 섞어서 412 nm에서 증가한 흡광도 값으로 free thiol기의 수를 측정하였다.

**3. 결과 및 토론**

**3-1. 액상 재접힘 공정**

고체상 재접힘 공정의 성능을 평가하기 위한 control 데이터를 확보하기 위해 액상 재접힘 공정을 수행하였다. 액상 재접힘은 용해된 내포체(2 mg/ml)를 대상으로 전통적인 재생 공정인 희석 방법으로서 'simple dilution'과 'rapid dilution' 방법을 적용하였다. Simple dilution은 용해된 단백질 용액에 재접힘 완충액을 천천히 첨가하여 변성제를 서서히 희석시키는 방법이며, rapid dilution은 용해된 단백질 용액을 재접힘 완충액에 첨가함으로써 변성제 농도를 급속히 감소시키는 방법이다. 두 경우 모두 최종적으로 20배 희석되며 pH 9.0에서 약 16시간 동안 재접힘을 수행하였다. 재접힘 결과는 재접힘된 LK68의 이황화결합 수를 측정하고 LK68의 생물학적 활성인 lysine binding 능력을 정제된 LK68 표준물질의 lysine binding과 비교하여 평가하였다. Fig. 15에서 보듯이 이황화결합이 형성되는 과정과 lysine binding이 증가하는 과정은 매우 밀접한 상관관계를

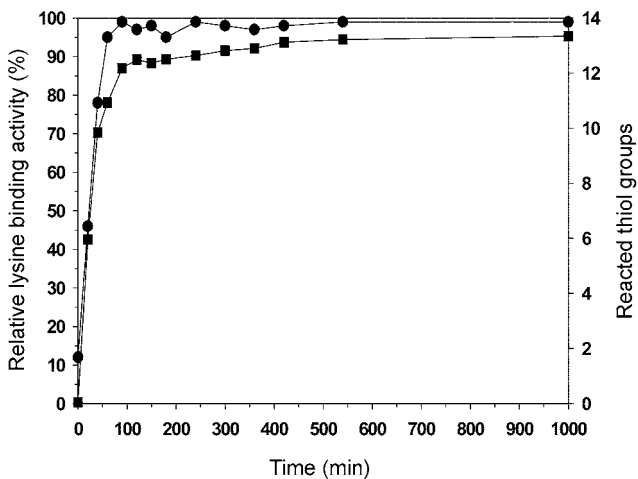


Fig. 15. Correlation between disulfide bond formation and lysine binding activity during refolding. ■ : the number of reacted thiol groups and ● : lysine binding activity.

Table 3. LK68 refolding yield comparison

Process	Total protein recovery (mg/g-wet cell)	LK68 recovery (%)	Refolded LK68 (mg/g-wet cell)
<b>Soluble phase refolding</b>			
Simple dilution	18	38	6.8
Rapid dilution	18	34	6.1
<b>PBA chromatography</b>			
Inclusion body loading	16	68	10.9
<b>EBA chromatography</b>			
Inclusion body loading	15	68	10.2
Cell homogenate loading	42	44	18.5

보여 주었다. 따라서 LK68의 3차 구조가 형성되는 것에 비례하여 생물학적 활성이 복원됨을 확인할 수 있었다. 재접힘 초기 비교적 높은 속도로 free thiol기가 이황화결합을 형성하며, 약 100분 이내에 약 12-13개의 thiol기가 반응되어 6-7개의 이황화결합을 형성하였다.

LK68 표준물질과 용해 원충액에 의해 완전히 풀린 상태의 LK68의 lysine binding은 각각 89%와 14%이었다. 또한, 용해된 LK68 내 포체는 약 12%의 lysine binding을 나타내었다. Simple dilution과 rapid dilution의 경우 총 단백질 대비 재접힘 수율은 각각 38%와 34%이었다(Table 3). 액상 재접힘 공정의 비교적 낮은 수율은 단백질 간 상호작용에 의한 응집현상에 기인한 것으로 판단된다[19, 45]. 재조합 urokinase의 액상 재접힘시 내포체 용액의 순도가 재접힘 수율에 큰 영향을 미친다는 보고가 있다[46]. 따라서 더 높은 재접힘 수율을 얻기 위해서는 내포체 세척 후 높은 순도와 낮은 단백질 농도의 조건이 필요하며 다양한 첨가제에 대한 영향을 조사해 최적 조건을 찾을 필요가 있다[35].

### 3-2. PBA-mediated 재접힘 공정

고체상 재접힘은 풀린 단백질을 이온결합을 통해 레진에 고정화시킨 상태에서 진행되기 때문에 분자상호 간 작용에 의한 응집현상을 최소화할 수 있다. Fig. 16에 PBA-mediated 재접힘 공정에서의 용출 결과를 나타내었다. Loading/chasing 단계에서 용출된 강한 흡광물질은 환원제로 쓰인 DTT(dithiothreitol)인 것으로 확인되었다.

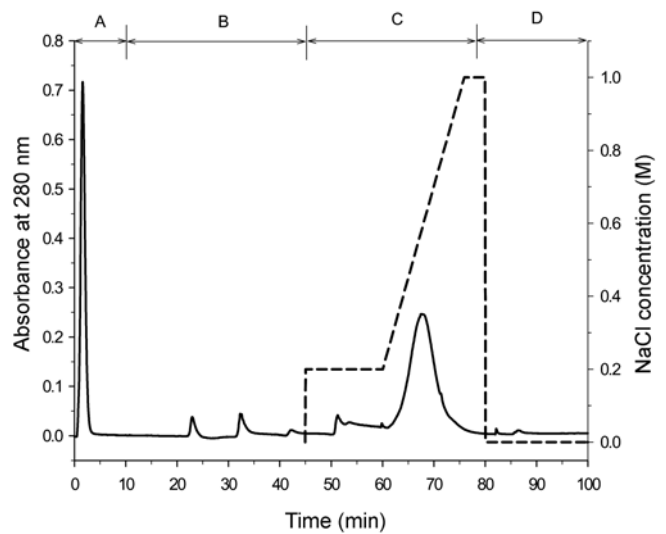


Fig. 16. Solid-phase refolding chromatogram using packed bed adsorption chromatography. A: loading/chasing, B: urea washing C: NaCl elution, D: regeneration step. Solid line (—) is UV absorbance at 280 nm and dash line (---) is NaCl concentration for protein elution.

LK68은 약 0.5 M NaCl에서 용출되었다. 재접힘된 LK68 용액을 RP-HPLC에 의해 분석한 결과 LK68 표준물질과 같은 체류 시간에서 용출되었고 이황화결합수를 확인한 결과 free thiol기는 0.36개로 모든 cysteine이 이황화결합 형성에 참여했음을 확인하였다.

재접힘된 LK68의 lysine binding은 68%로서 액상 재접힘 대비 약 1.7배 향상되었다(Table 3). EGF-angiogenin 융합단백질의 재접힘 실험에서 액상 재접힘 경우 약 5%의 재접힘 수율이 이온교환수지를 이용한 고체상 재접힘 경우 약 34%로 향상되었고, poly-lysine tagging시켜 Heparin-Sepharose에 보다 강력하게 흡착시킨 경우 약 64%로 향상되었다[47]. 따라서 고체상 재접힘에서는 단백질이 레진에 특이적으로 강력하게 흡착될수록 재접힘시 변형이나 탈착이 일어나지 않아 수율이 향상되는 것으로 생각된다.

### 3-3. EBA-mediated 재접힘 공정

Fig. 17에 세포파쇄액을 대상으로 EBA 크로마토그래피를 이용한 고체상 재접힘 공정에서의 용출 특성을 나타내었다. Loading 단계에서 결합하지 못한 단백질은 칼럼 세척 단계에서 제거되고, 대부분의 불순 단백질들은 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. Fig. 18은 0.3 M NaCl에서 용출된 시료를 SEC-HPLC를 사용하여 분석한 결과이다. 재접힘된 LK68과 표준물질의 체류시간과 동일하므로 두 단백질은 같은 크기의 구조로 되어 있다고 확인되었다.

용출액 내 총 단백질은 1 g wet cell 당 42 mg이며 lysine binding을 분석한 결과 44%의 재접힘 수율을 나타내었다(Table 3). 재접힘의 단계수율(step yield)은 PBA 재접힘에 비하여 낮으나 총 단백질 회수율은 PBA에 비하여 매우 높다. EBA를 이용한 인성장 호르몬의 고체상 재접힘 결과에 따르면 세척된 내포체를 시작물질로 한 경우 84%의 재접힘 수율을 얻었으나 세포파쇄액을 시작물질로 한 경우에는 70%로 수율이 감소함을 관찰하였다[42]. 이러한 결과를

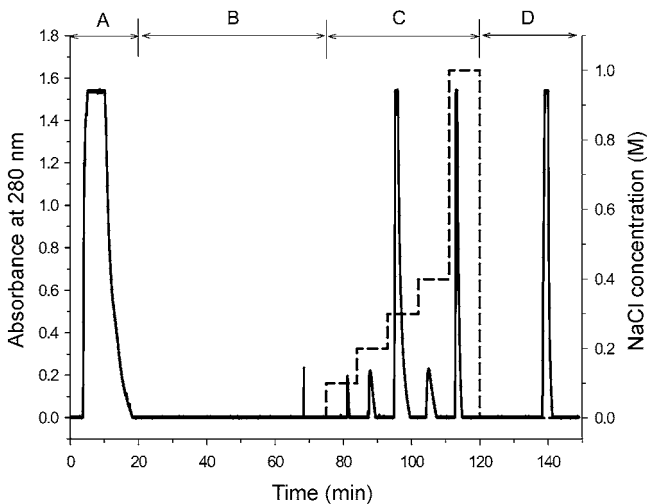


Fig. 17. Solid-phase refolding chromatogram of cell homogenate using expanded bed adsorption chromatography. A: loading/chasing, B: urea washing, C: NaCl elution D: regeneration. Solid line (—) is UV absorbance at 280 nm and dash line (---) is NaCl concentration for protein elution.

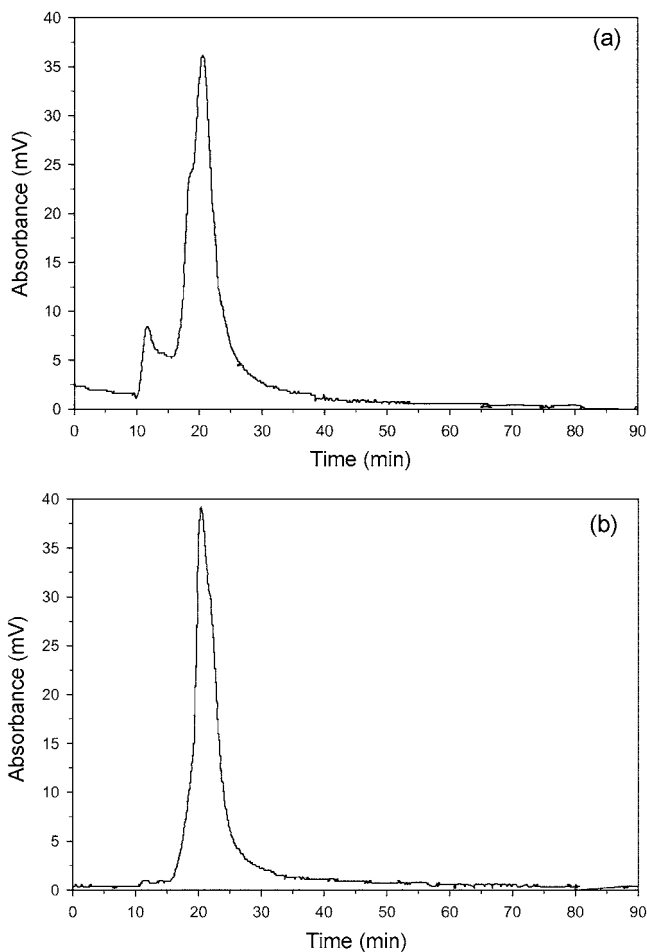


Fig. 18. SEC-HPLC chromatogram of: (a) 0.3 M NaCl eluate from the EBA-mediated refolding and (b) LK68 standard.

통해 용해된 내포체 용액의 단백질 순도가 재접힘 수율에 영향을 미친다는 것을 알 수 있다. 이를 확인하기 위해 세척된 LK68 내포

체를 이용하여 EBA 재접힘을 수행한 경우 1 g wet cell 당 약 15 mg의 총 단백질을 얻었으며 lysine binding에 의한 재접힘 수율은 약 68%이었다(Table 3). 세척된 내포체를 시작물질로 사용할 경우 PBA 재접힘과 EBA 재접힘의 수율은 거의 같았고 액상 재접힘 대비 약 1.7배의 수율 향상을 보였다.

재조합 대장균 1 g(wet cell) 당 재접힘된 LK68의 양을 비교하면 액상 재접힘, PBA 재접힘, EBA 재접힘 각각의 경우 약 7, 11, 19 mg이었다. 세포파쇄액을 대상으로 한 EBA 재접힘 공정은 내포체 세척 및 회수과정이 생략됨으로 세포파쇄에서 내포체 세척 후 회수과정까지 단백질이 손실되는 것을 방지하여 총괄 수율이 향상될 뿐 아니라 공정이 간소화되고 공정 시간도 단축되는 이점이 있다.

### 3-4. EBA 공정에서의 세포찌꺼기 제거 결과

EBA를 이용하는 공정에는 세포찌꺼기 등 고체입자 물질들이 레진에 붙어 응집되는 현상이 문제되고 있다[48]. 따라서 본 EBA 재접힘 공정에서 레진에 흡착되어 용출되지 않는 고형물질들을 정량화하고자 용출액의 흡광도를 600 nm에서 측정하여 적분하여 초기 loading한 세포 파쇄액의 흡광도 값과 비교하였다. 그 결과 98.7%의 세포찌꺼기 등 고형물질들이 성공적으로 용출 제거되는 것으로 확인되었다(data not shown). EBA 공정에서는 80% 이상의 세포체가 용출되는 경우 세포체와 레진 사이의 흡착력이 낮은 것으로 판단하고 있으므로[48], 본 EBA-mediated 재접힘 공정에서는 레진과 세포찌꺼기와의 응집 문제는 없는 것으로 확인되었다.

## 4. 결 론

재조합 대장균에서 내포체 형태로 발현시킨 LK68을 재생시키기 위해서 PBA 크로마토그래피와 EBA 크로마토그래피를 이용한 고체상 재접힘을 수행하였다. Lysine binding, RP-HPLC, SEC-HPLC, Ellman method 등의 분석을 통해 재접힘된 LK68이 native LK68과 구조나 생물학적 기능면에서 동등함을 확인하였다. 내포체와 세포파쇄액을 시작물질로 하여 시작물질의 순도가 재접힘 수율에 영향을 미치는 것을 확인하였다. 세척된 내포체를 시작물질로 한 경우 PBA나 EBA를 이용한 고체상 재접힘의 경우 재접힘 수율은 거의 동일하였다. 재접힘 공정의 총괄 수율을 비교한 결과, EBA 공정이 기존의 액상 재접힘이나 PBA를 이용한 재접힘 공정에 비하여 우수함을 확인할 수 있었다. 본 연구를 통해 EBA 크로마토그래피를 이용한 재접힘 방법은 재접힘 단계의 수율을 향상시킬 뿐 아니라 공정 단계, 시간 등을 감소시켜 공정성능을 전체적으로 향상시킬 수 있음을 확인하였다.

## 감 사

본 연구의 연구비를 지원해 준 (주)녹십자, (주)대웅 및 산업자원부에 감사드립니다. 인하대학교 초정밀생물분리기술센터의 연구비 지원에도 감사드립니다.

## 참고문헌

- Schonor, E. G., Ellis, L. F. and Shonor, B. E., "Isolation and Purification of Protein Granules from *E. coli* cells Overproducing Bovine Growth Hormone," *Bio/Technol.*, **3**, 151-154(1985).

2. Lowe, E. G., Rhind, S. K., Sugrue, R. and Marston, F. A. O., "Solubilization, Refolding and Purification of Eukaryotic Proteins Expressed in *E. coli*, Protein Purification: Micro to Macro," 429-442, Alan R. Liss, Inc.(1987).
3. Bowden, G. A., Paredes, A. M. and Georgiou, G., "Structure and Morphology of Protein Inclusion Body in *Escherichia coli*," *Bio/Technol.*, **9**, 725-734(1991).
4. Gekko, K. and Timasheff, S. N., "Mechanism of Protein Stabilization by Glycerol: Preferential Hydration in Glycerol-Water Mixtures," *Biochemistry*, **20**(16), 4667-4676(1981).
5. Badcoe, I., Smith, C., Wood, S., Halsall, D., Holbrook, J., Lund, P. and Clarke, A., "Binding of a Chaperonin to the Refolding Intermediates of Lactate Dehydrogenase," *Biochemistry*, **30**(38), 9195-9200(1991).
6. Martin, J., Langer, Y., Boteva, R., Schramal, A., Horwich, A. and Hartl, F., "Chaperonin-Mediated Protein Folding at the Surface of groEL Through a 'Molten Globule'-Like Intermediate," *Nature*, **352**, 36-42(1991).
7. Bam, N. B., Cleland, J. L. and Randolph, T. W., "Molten Globule Intermediate of Recombinant Human Growth Hormone: Stabilization with Surfactants," *Biotechnol. Prog.*, **12**(6), 801-809(1996).
8. Brems, D. N., "Solubility of Different Folding Conformers of Bovine Growth Hormone," *Biochemistry*, **27**(12), 4541-4546(1988).
9. Defellippis, M. R., Alter, L. A., Pekar, A. H., Havel, H. A. and Brems D. N., "Evidence for a Self-Associating Equilibrium Intermediate During Folding of Human Growth Hormone," *Biochemistry*, **32**(6), 1555-1562(1993).
10. Cleland, J. L. and Wang, D. I. C., "Refolding and Aggregation of Bovine Anhydrase B: Quasi-Elastic Light Scattering Analysis," *Biochemistry*, **29**(50), 11072-11078(1990).
11. Cleland, J. L., Hedgepeth, C. and Wang, D. I. C., "Polyethylene Glycol Enhanced Refolding of Bovine Carbonic Anhydrase B," *J. Biol. Chem.*, **267**(19), 13327-13334(1992).
12. Cleland, J. L. and Randolph, T. W., "Mechanism of Polyethylene Glycol Interaction with the Molten Globule Intermediate of Bovine Carbonic Anhydrase B," *J. Biol. Chem.*, **267**(5), 3147-3153(1992).
13. Kim, Y. H., "Direct Quantification of Interferon- $\alpha$  Inclusion body in Recombinant *E. coli*. Fermentor Beer Using Reversed-phase HPLC," M.S. Thesis, Dept. of Chem. Eng., Hanyang Univ., Seoul, Korea(1995).
14. Hermann, R., "Protein Folding, in EPO Applied Technology Series," **12**(7), European Patent Office, Netherlands(1993).
15. Fischer, B., Summer, I. and Goodenough, P., "Isolation, Renaturation, and Formation of Disulfide Bonds of Eukaryotic Proteins Expressed in *Escherichia coli* as Inclusion Bodies," *Biotech. Bioeng.*, **41**(1), 3-13(1993).
16. Kiefhaber, T., Rudolph, R., Kohler, H.-H. and Buchner, J., "Protein Aggregation *in vitro* and *in vivo*: A Quantitative Model of the Kinetic Competition Between Folding and Aggregation," *Bio/Technol.*, **9**, 825-829(1991).
17. Zettlmeissl, G., Rudolph, R. and Jaenicke, R., "Reconstitution of Lactic Dehydrogenase. Noncovalent Aggregation vs. Reactivation," *Biochemistry*, **18**(25), 5567-5571(1979).
18. Buchner, J. and Rudolph, R., "Renaturation, Purification and Characterization of Recombinant Fab-Fragments Produced in *Escherichia coli*," *Bio/Technol.*, **9**, 157-162(1991).
19. Cleland, J. L. and Wang, D. I. C., "Cosolvent Assisted Protein Refolding," *Bio/Technol.*, **8**, 274-278(1990).
20. Creighton, T. E., "Process for the Production of a Protein," US Patent No. 4,977,248(1990).
21. Stempfer, G., Neugebauer, B. H. and Rudolph, R., "Improved Refolding of Immobilized Fusion Protein," *Nat. Biotechnol.*, **14**(3), 329-334(1996).
22. Lee, E. K., Cho, T. H. and Suh, C. W., "In vitro Refolding of Inclusion Body Proteins Directly from *E. coli* Homogenate in Expanded Bed Adsorption Chromatography," *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **16**(2), 146-152(2001).
23. Psarras, K., Ueda, M., Yamamura, T., Ozawa, S., Kitajima, M., Aiso, S., Komatsu, S. and Seno, M., "Human Pancreatic RNase1-Human Epidermal Growth Factor Fusion; an Entirely Human 'Immunotoxin Analog' with Cytotoxic Properties Against Squamous Cell Carcinomas," *Protein Eng.*, **11**(12), 1285-1292(1998).
24. Yoon, J. M., Han, S. H., Kwon, O. B., Kim, S. H., Park, M. H. and Kim, B. K., "Cloning and Cytotoxicity of Fusion Proteins of EGF and Angiogenin," *Life Science*, **16**, 1435-1445(1999).
25. Hirata, Y. and Orth, A. N., "Epidermal Growth Factor (Urogastone) in Human Fluids: Size Heterogeneity," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **48**, 673-679(1979).
26. Shapiro, R., Riordan, J. F. and Vallee, B. L., "Characteristic Ribonucleolytic Activity of Human Angiogenin," *Biochemistry*, **25**(12), 3527-3532(1986).
27. Wu, Y. N., Saxena, S. K., Ardelt, W., Gadina, M., Mikulshki, S., Lorenzo, C. D., Alessio, G. D. and Youle, J., "A Study of the Intracellular Routing of Cytotoxic Ribonucleases," *J. Biol. Chem.*, **270**(29), 17476-17481(1995).
28. Soncin, F., Strydom, D. J. and Shapiro, R., "Interaction of Heparin with Human Angiogenin," *J. Biol. Chem.*, **272**(15), 9818-9824(1997).
29. Tice, P. A., Mazsaroff, I., Line, N. T. and Reginer, F. E., "Effect of Large Sample Loads on Column Lifetime in Preparative-Scale Liquid Chromatography," *J. chromatography*, **410**, 43-51(1987).
30. Lee, Y. S., "Fermentation and Purification Processes for Fusion Protein of Human Epidermal Growth Factor and Angiogenin from Recombinant *E. coli*," M.S. Thesis. Hanyang University, Dept. of Chemical Engineering, Korea(1999).
31. Lali, A., Kaul, R., Yu, I. and Mattiason, B., "Purification of L-Lactate Dehydrogenase from Crude Homogenate of Porcine Muscle by Expanded Bed Affinity Chromatography (EBAC)," *Isolation and Purification*, **2**, 289-300(1997).
32. Thommes, J., Bader, A., Halfar, M., Karau, A. and Kula, M.-R., "Isolation of Monoclonal Antibodies from cell Containing Hybridoma Broth Using a Protein A Coated Adsorbent in Expanded beds," *J. Chromatography*, **752**, 111-122(1996).
33. Smith, M. P., Bulmer, M., Hjorth, R. and Titchener-Hooker, N. J., "A Comparative Engineering Study of the Use of Expanded Bed and Packed Bed Routes for the Recovery of Labile Proteins from Crude Feedstocks," *Proceedings of 5th World Congress of Chemical Engineering*, **2**, 565-570(1996).
34. Chang, Y. K. and Chase, H. A., "Expanded Bed Adsorption for the Direct Extraction of Proteins," *Separation for Biotechnology*, **3**, 106-112(1994).
35. Kim, C. S. and Lee, E. K., "Effect of Operating Parameters On in Vitro Renaturation of a Fusion Protein of Human Growth Hormone and Glutathione S Transferase from Inclusion Body," *Process Biochemistry*, **36**, 111-117(2000).

36. Carmeliet, P. and Jain, R. K., "Angiogenesis in Cancer and Other Diseases," *Nature*, **407**, 249-257(2000).
37. Folkman, J. and Shing, Y., "Angiogenesis," *J. Biol. Chem.*, **267**(16), 10931-10934(1992).
38. Cao, Y., Ji, R. W., Davidson, D., Schaller, J., Marti, D., Sohndel, S., McCance, S. G., O'Reilly, M. S., Llinas, M. and Folkman J., "Kringle Domains of Human Angiostatin," *J. Biol. Chem.*, **271**(46), 29461-29467(1996).
39. Anglés-Cano, E. and Rojas, G., "Apolipoprotein (a): Structure-Function Relationship at the Lysine-Binding Site and Plasminogen Activator Cleavage Site," *Biol. Chem.*, **383**, 93-99(2002).
40. Trieu, V. N. and Uckun, F. M., "Apolipoprotein (a), a Link Between Atherosclerosis and Tumor Angiogenesis," *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **257**(3), 714-718(1999).
41. Jang, J. H., Kim, J. S., Park, E. J., Yeum, J. S. and Jung, S. I., Korean Patent No. 10-2002-7003512(2002).
42. Cho, T. H., Ahn, S. J. and Lee, E. K., "Refolding of Protein Inclusion Bodies Directly from *E. coli* Homogenate Using Expanded bed Adsorption Chromatography," *Bioseparation*, **10**, 189-196(2002).
43. MacDonald, N. J., Murad, A. C., Fogler, W. E., Lu, Y. and Sim, K. L., "The Tumor-Suppressing Activity of Angiostatin Protein Residues Within Kringles 1 to 3," *Biochemical and Biophys. Res. Commu.*, **264**(2), 469-477(1999).
44. Ellman, G. L., "Tissue Sulfhydryl Groups," *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**(1), 70-77(1959).
45. Buchner, J. and Rudolph, R., "Renaturation, Purification and Characterization of Recombinant Fab-Fragments Produced in *Escherichia coli*," *Bio/Technology*, **9**, 157-162(1991).
46. Tang, W., Sun, Z. Y., Pannell, R., Gurewich, V. and Liu, J. N., "An Efficient System for Production of Recombinant Urokinase-type Plasminogen Activator," *Protein Exp. Purif.*, **11**(3), 279-283(1997).
47. Park, S. J., Kang, R., Suh, C. W., Chai, Y. G., Kwon, O. B., Park, S. K. and Lee, E. K., "Solid-Phase Refolding of Poly-Lysine Tagged Fusion Protein of hEGF and Angiogenin," *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **7**(1), 1-5(2002).
48. Feuser, J., Walter, J., Kula, M. R. and Thommes, J., "Cell/Adsorbed Interactions in Expanded Bed Adsorption of Proteins," *Bioseparation*, **8**, 99-109(1999).