

재조합사람상피성장인자의 안정성에 미치는 몇가지 인자들의 영향

편정민, 김영호

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《당의 과학기술중시로선을 철저히 관철하여 첨단과학기술분야를 개척하며 나라의 과학기술을 높은 수준에 올려세워야 합니다.》(《김정일선집》 증보판 제23권 502페이지)

사람상피성장인자(hEGF)는 피부와 각막, 폐 등의 상피조직을 이루는 세포의 성장과 분화를 촉진하며 위산분비를 억제한다.[5] 이로부터 유전자공학적방법으로 재조합사람상피세포성장인자(rhEGF)를 제조하여 화상과 창상, 외과적상처의 회복, 육창, 위 및 십이지장궤양, 피저, 방사선피부염치료뿐만아니라 정형수술과 화장품첨가제로도 리용하고있다.[4, 6]

rhEGF를 리용하는데서 제기되는 문제의 하나는 그것이 안정성이 낮은것으로 하여 용액속에서 점차 회합침전되는것이다. 일반적으로 글리세롤, 사탕, 트레할로즈와 같은 당 및 다가알콜류, NaCl과 같은 염류, 계면활성제류 등 여러가지 물질을 리용하여 단백질의 안정성을 높일수 있다.[2, 3]

우리는 몇가지 물질을 리용하여 용액속에서 재조합사람상피성장인자의 안정성을 높이기 위한 연구를 하였다.

재료와 방법

재료로는 재조합대장균(*E. coli* BL21(DE3)/pET-hEGF)으로부터 제조[1]한 rhEGF용액(360 $\mu\text{g/mL}$)을 리용하였다.

기구로는 자외가시선분광광도계(《BECKMAN COULTER DU[®] 730》)를 리용하였다.

rhEGF용액에 여러가지 물질을 각이한 농도로 첨가하고 25℃에서 일정한 기간 방치한 후 분광광도법으로 상층액에 남아있는 재조합사람상피성장인자의 농도를 결정하고 초기농도와 비교하여 안정화제들의 영향을 밝혔다.

rhEGF농도($\mu\text{g/mL}$)는 다음의 식으로 결정하였다.

$$C_{\text{rhEGF}} = 144 \cdot (A_{215} - A_{225})$$

결과 및 논의

1) rhEGF의 안정성에 미치는 몇가지 물질들의 영향

글리세롤의 영향 rhEGF용액에 글리세롤을 각이한 농도로 첨가하고 25℃에서 90일동안 방치한 후 조사하였는데 대조구(글리세롤농도 0%)에서는 많은 침전물이 있었으며 글리세롤농도가 높을 때에는 침전물을 거의나 볼수 없었다. 글리세롤농도에 따르는 상층액속의 rhEGF함량은 그림 1과 같다.

그림 1에서 보는바와 같이 글리세롤을 첨가하지 않고 90일 보관할 때에는 침전되지 않고 용액중에 남아있는 rhEGF가 초기량의 15.1%밖에 안되지만 글리세롤농도가 높아짐에 따라 남아있는 rhEGF의량이 대폭 증가하고 안정성이 높아졌다. 글리세롤농도가 12.5%이상일 때에는 rhEGF의 안정성이 약간씩 높아졌다.

NaCl의 영향 rhEGF용액에 NaCl을 각이한 농도로 첨가하고 25°C에서 90일 방치하였을 때 대조구(NaCl농도 0%)에서는 물론 NaCl농도가 제일 높은 시험구(NaCl농도 13%)에서도 많은 침전물이 보였다. NaCl농도에 따르는 상층액속의 rhEGF함량은 그림 2와 같다.

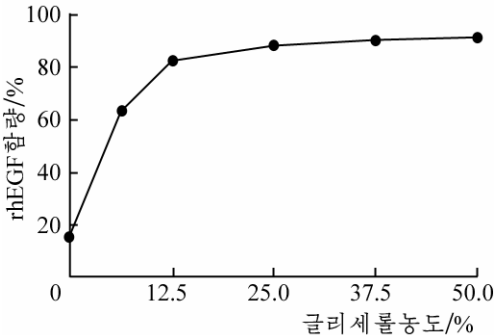


그림 1. 글리세롤농도에 따르는 상층액속의 rhEGF함량
rhEGF의 초기농도 180μg/mL

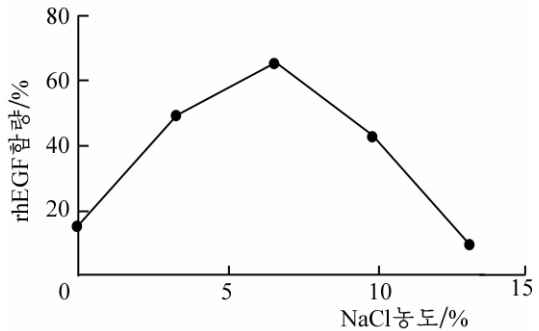


그림 2. NaCl농도에 따르는 상층액속의 rhEGF함량
rhEGF의 초기농도 180μg/mL

그림 2에서 보는바와 같이 NaCl농도가 높아짐에 따라 침전되지 않고 남아있는 rhEGF량이 높아지다가 NaCl농도가 약 10%이상일 때에는 다시 낮아졌다. 이것은 NaCl농도가 너무 높을 때에는 NaCl의 염석효과에 의하여 rhEGF의 용해도가 떨어지기때문이라고 볼수 있다. 그림 1과 2를 비교하면 NaCl의 rhEGF안정화효과는 글리세롤의 효과보다는 높지 않다는것을 알수 있다.

트윈20의 영향 rhEGF용액에 계면활성제인 트윈20을 각이한 농도로 첨가하고 25°C에서 90일 방치하였을 때 대조구와 시험구들에서 많은 침전물이 생겼다. 트윈20농도에 따르는 상층액속의 rhEGF함량은 그림 3과 같다.

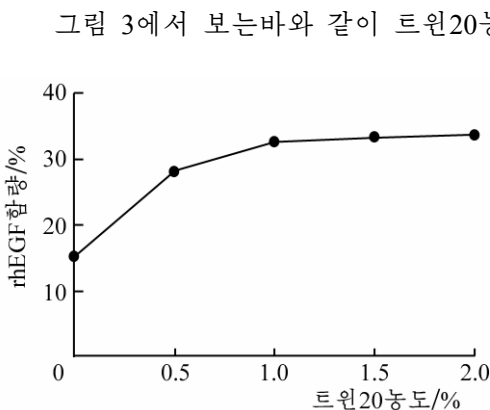


그림 3. 트윈20농도에 따르는 상층액속의 rhEGF함량
rhEGF의 초기농도 180μg/mL

그림 3에서 보는바와 같이 트윈20농도가 높아짐에 따라 rhEGF의 안정성이 일정하게 높아지다가 1%이상의 농도에서부터는 안정성이 더이상 높아지지 않았다.

사탕의 영향 rhEGF용액에 사탕을 각이한 농도로 첨가하고 25°C에서 90일 방치한 후 조사하였는데 대조구(사탕농도 0%)에서는 많은 침전물이 있었으며 사탕을 첨가한 시험구들에서는 침전물량이 적어졌다. 사탕농도에 따르는 상층액속의 rhEGF함량은 그림 4와 같다.

그림 4에서 보는바와 같이 사탕농도가 높아짐에 따라 rhEGF의 안정성이 높아지다가 22.5%이상부터는 거의 변화가 없었다. 그림 1과 4를 비교하면 사탕의 안정화효과는 글리세롤의 효과보다 훨씬

낮다는것을 알수 있다.

글리세롤과 NaCl, 트윈20, 사탕이 rhEGF의 안정성을 높이는것은 단백질변성반응의 기브즈에네르기차(ΔG)를 크게 하여 변성반응이 잘 일어나지 않게 하기때문[2, 3]이라고 볼수 있다.

2) rhEGF의 안정성을 높이기 위한 최적조건

글리세롤, NaCl, 트윈20, 사탕을 인자로 선택하고 품질공학적수법을 리용하여 rhEGF의 안정성을 높이기 위한 최적조건을 얻기 위한 연구를 하였다.

매 인자들을 4수준으로 하여 표 1과 같이 농도값들을 정하였다.

표 1. 인자들의 수준과 그에 따르는 첨가농도(%)

수준	인자			
	A (글리세롤)	B (NaCl)	C (트윈20)	D (사탕)
1	10	5.0	0.00	0
2	15	7.5	0.25	10
3	20	10.0	0.50	15
4	25	12.5	1.00	20

SN비의 합을 구하였다.(표 3)

표 2. 안정화조건에 따르는 rhEGF농도와 SN비

No.	직교표				rhEGF농도 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	SN비 /dB
	A	B	C	D		
1	1	1	1	1	163.7	44.28
2	1	2	2	2	148.0	43.41
3	1	3	3	3	115.3	41.24
4	1	4	4	4	108.7	40.73
5	2	1	2	3	158.0	43.97
6	2	2	1	4	159.1	44.03
7	2	3	4	1	117.9	41.43
8	2	4	3	2	125.6	41.98
9	3	1	3	4	124.6	41.91
10	3	2	4	3	113.0	41.06
11	3	3	1	2	140.8	42.97
12	3	4	2	1	105.3	40.44
13	4	1	4	2	101.1	40.09
14	4	2	3	1	128.0	42.15
15	4	3	2	4	109.9	40.82
16	4	4	1	3	134.9	42.60

매 시험구들에서 rhEGF의 초기농도는 $180\mu\text{g/mL}$

표 4로부터 매 rhEGF의 안정성에 영향을 주는 인자들의 순서는 C(트윈20) > A(글리세롤) > B(NaCl)이며 D인자(사탕)는 뚜렷한 영향을 미치지 않는다는것을 알수 있다. 트윈20을

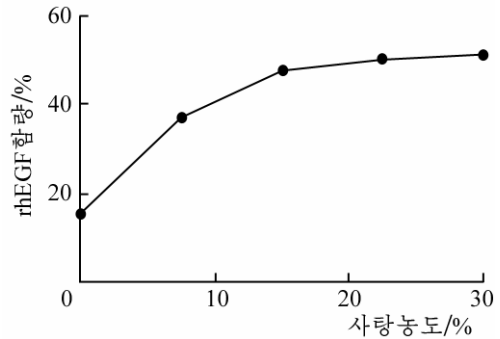


그림 4. 사탕농도에 따르는 상층액속의 rhEGF함량
rhEGF의 초기농도 $180\mu\text{g/mL}$

4수준인자가 4개이므로 $L_{16}(2^{15})$ 직교표에서 2수준렬 3개당 4수준렬 1개씩 만들어넣은 직교표 $L_{16}(4^4 \times 2^3)$ 을 리용하였다.

용액중의 rhEGF농도(y)는 망대측정값이므로 SN비(η)를

$$\eta = -10 \cdot \lg \frac{1}{y^2}$$

에 의하여 계산하고(표 2) 인자들의 수준별

표 3. 인자들의 수준별 SN비의 합

수준	인자			
	A	B	C	D
1	169.6	170.3	173.9	168.3
2	171.4	170.7	168.6	168.4
3	166.4	166.4	167.3	168.9
4	165.7	165.7	163.3	167.5
계	673.1	673.1	673.1	673.1

표 3으로부터 rhEGF의 안정성이 제일 높아지는 최적조건 즉 인자들의 수준별 SN비합이 제일 큰 무이는 $A_2B_2C_1D_3$ 이다. 다시말하여 rhEGF용액에 글리세롤 15%, NaCl 7.5%, 사탕 15% 되게 첨가하고 트윈20은 첨가하지 않을 때 rhEGF의 안정성이 제일 높아진다.

표 2와 3으로부터 매 인자들의 변동과 분산을 계산하면 표 4와 같다.

표 4. 매 인자들의 변동과 분산, 기여률

지표	인자				e	e'
	A	B	C	D		
변동(S)	5.54	4.80	14.3	0.25	2.40	
자유도(f)	3	3	3	3	3	
분산(V)	1.85	1.60	4.77	0.08	0.80	0.44
순변동(S')	4.21	3.48	12.99			6.64
기여률(ρ)/%	15.4	12.7	47.6			24.3

e 와 e' 는 각각 오차와 순오차

넣지 않을 때 rhEGF의 안정성이 제일 높아진다는 표 3의 결과와 트윈20이 rhEGF의 안정성에 제일 큰 영향을 미친다는 표 4의 결과를 종합해보면 트윈20이 rhEGF를 안정화시키는 것이 아니라 불안정화시킨다는 것을 알 수 있다. 트윈20만을 첨가할 때에는 rhEGF의 안정성이 약간 높아졌다.(그림 3) 반면에 트윈20을 글리세롤 및 NaCl과 함께 첨가할 때 안정화효과가 떨어지는 것은 트윈20이 이 물질들과 호상작용하면서 자체도 안정화효과를 나타내지 못 할뿐 아니라 글리세롤과 NaCl도 안정화효과를 나타내지 못하게 하기 때문이라고 볼 수 있다.

최적조건 $A_2B_2C_1$ 에서의 공정평균을 구하면 44.85(dB)이며 이에 해당하는 rhEGF농도값은 174.8 μ g/mL이다. 이것은 rhEGF용액에 글리세롤을 15%, NaCl을 7.5% 되게 첨가하고 25°C에서 90일 방치할 때 97.1%의 rhEGF가 용액속에 침전되지 않고 남아있게 된다는 것 즉 rhEGF의 안정성이 6.4배로 높아진다는 것을 말해준다. 최적조건에서 확인실험을 한 결과 상층액 속의 rhEGF함량은 171.2 μ g/mL로서 초기량의 95.1%였으며 따라서 rhEGF의 안정성이 6.3배로 높아진 것으로 된다.

맺 는 말

글리세롤, NaCl, 트윈20, 사탕은 rhEGF용액에 개별적으로 첨가할 때에는 모두 rhEGF의 안정성을 높이지만 함께 존재할 때에는 글리세롤과 NaCl은 rhEGF의 안정성을 높이고 트윈20은 안정성을 낮추며 사탕은 뚜렷한 작용을 나타내지 않는다.

글리세롤을 15%, NaCl을 7.5% 되게 첨가하여 rhEGF의 안정성을 6.3배로 높일 수 있다.

참 고 문 헌

- [1] 김영호; 생물학, 4, 4, 주체105(2016).
- [2] N. T. Becker et al.; WO02/08398, 2002.
- [3] Ernesto Carrillo-Nava et al.; J. Chem. Thermodynamics, 34, 443, 2002.
- [4] Imen Elloumi et al.; Biomaterials, 27, 3451, 2006.
- [5] J. Mohammadian et al.; Advanced Pharmaceutical Bulletin, 3, 2, 473, 2013.
- [6] L. F. Soler et al.; Journal of Chromatography, B 788, 113, 2003.

Influence of Several Factors on the Stability of Recombinant Human Epidermal Growth Factor

Phyon Jong Min, Kim Yong Ho

Glycerol, NaCl, Tween 20 and sucrose increase the stability of recombinant human epidermal growth factor (rhEGF) individually. But when they are together in rhEGF solution, glycerol and NaCl increase the stability of rhEGF, but Tween 20 decreases the stability and sucrose hasn't a significant effect.

The stability of the rhEGF can be increased 6.3 times by adding glycerol 15% and NaCl 7.5%.

Key words: rhEGF, stability, glycerol