

Butyrate처리된 차이니즈 햄스터 난소세포에서 Hepatitis B 바이러스 인간화항체의 생산

박세철* · 이재선 · 이병규 · 강희일
(주)유한양행 중앙연구소 바이오텍연구소실

Production of Humanised Anti-hepatitis B Antibody in Butyrate-Treated Chinese Hamster Ovary Cells. Park, Se-Cheol*, Jae-Sun Lee, Byung-Kyu Lee, and Heui-Il Kang. *Biotech Laboratory, Yuhan Research Institute, Yuhan Corporation, Yongin-si 449-902, Korea* - Sodium butyrate (NaBu) is used as an enhancer for the production of recombinant proteins in Chinese hamster ovary (CHO) cells. However, NaBu is well-known for its cytotoxic effect, thereby inducing apoptosis. CHO cells which had been engineered to express a humanised anti-HBV antibody were cultured using serum-free medium, Ex-cell 301. From a seeding density of 2×10^5 cells/ml, CHO cells grown with serum-free medium reached a maximum cell density of 1.3×10^6 cells/ml after 9 days in culture and produced a maximal antibody concentration of 130 mg/l after 13 days in culture. In the perfusion culture system, CHO cells producing anti-HBV antibody grown in an 7.5 l bioreactor seeded with 2×10^5 cells/ml reached a maximal antibody concentration of 85 mg/l after 720 h in culture. The addition of 0.3 mM NaBu and lowering culture temperature to 33°C elongated the culture period to 60 days and increased the production yield by 2-fold, compared to control culture.

Key words: Anti-hepatitis B antibody, Chinese hamster ovary cell, sodium butyrate (NaBu), serum-free, low temperature culture

B형 간염 바이러스는 *Hepadnaviridae*과에 속하는 바이러스로, 전 세계에 걸쳐서 분포하며 전염성이 강한 바이러스로 공공위생에 심각한 문제를 일으키는 바이러스이다. 전 세계적으로 약 3억 명이 B형 간염 바이러스의 보균자로 알려져 있으며 우리나라에서만도 약 3백만명이 감염보균자로 보고되고 있다[5]. B형 간염 바이러스에 감염된 혈장에서 분리된 바이러스는 여러 가지 형태와 크기가 있으며 캡시드 외부를 둘러싸고 있는 외피는 숙주유래로서 3종류의 표면항원이 존재하는데 각각 pre S1, S2, S3 항원으로 불린다[2]. S 표면항원(HBsAg)은 바이러스 전체 표면항원의 약 80%를 차지하는 주요항원으로도 불린다. S 표면항원의 역할은 간 세포에 대한 바이러스 결합에 관여하는 것으로 알려져 있는데 인간 간 혈장막 상에 존재하는 apolipoprotein H, endonectin 등과 결합하는 것으로 보고 되어있다[7, 15, 17].

목적 단백질을 유전자 재조합 방법으로 대량생산하기 위해서는 유전자 증폭시스템, 발현벡터 선정 및 세포주 개발 등을 통하여 외래단백질을 고발현하는 세포주를 선별하는 것이 중요하게 작용하며 실제 생산규모에서는 배양배지 공급방법 또는 조성의 변화 및 단백질 과발현 유도물질의 첨가 등 세포배양환경을 변화시켜 단백질의 생산성을 높여

는 방법이 시도되고 있다[3, 8]. 배양 중에 sodium butyrate (NaBu)를 첨가하여 세포주기(cell cycle)를 조절하므로 γ -glutamyl transferase, tissue plasminogen activator(t-PA), follicle stimulating hormone(FSH), 단클론항체 등의 발현단백질의 생산성을 증가시켰으나 NaBu의 세포독성으로 인하여 세포사멸을 유도하는 문제점이 제기되었다[21, 1, 6, 4, 7, 12]. 단위세포 당 단백질의 발현량은 세포사멸로 인하여 세포수가 감소하여 전체 발현단백질 양은 같아지는 결과를 초래하므로 NaBu의 첨가시에는 세포사멸을 억제하는 물질인 *bcl-2* 유전자를 형질전환시키거나 caspase-3 저해제를 첨가하여 생산성을 향상시키는 연구가 진행되었다[10, 11]. NaBu 첨가 후 세포사멸을 막기 위하여 배양 중 항산화제인 *N*-acetylcystein(NAC)이나 pyrroline dithiocarbamate(PDTC)를 처리하거나[16], 배양온도를 37°C에서 32~34°C까지 낮추어 배양하여 NaBu에 의한 세포독성을 감소시켜 배양기간 및 생산성을 증가시켰다[18]. 이산화탄소의 공급을 중단하거나 매우 낮은 농도로 공급하여 발현단백질의 생산성을 향상시켰으며 이산화탄소의 농도를 감소시켰을 때 세포의 성장이 제대로 이루어지지 않는 단점이 있어 세포수를 최대한 늘린 후 이산화탄소의 농도를 감소시키는 것이 중요하며 이산화탄소의 생산성에 미치는 영향 역시 세포주기와 연관되는 것으로 밝혀졌다[23]. 또한, transfectoma 세포의 경우 hyperosmotic pressure가 증가하므로 항체유전자의 전사속도를 높여 세포외부로의 분비발현속도를 높이는 것으로 알려

*Corresponding author
Tel: 82-31-899-4167, Fax: 82-31-275-6145
E.mail: parkse@yuhan.co.kr

저 있으며 이와는 반대로 hyperosmotic 조건에서 배양하는 chinese hamster ovary(CHO) 세포에 glycine betaine을 처리하게 되면 osmoprotective 효과가 증가하여 TPO의 생산성을 증가시켰다[13, 14, 20, 22].

본 연구에서는 HBV 바이러스의 S 표면항원에 특이적으로 결합할 수 있도록 단세포균 항체를 제조하였으며 그 중에서 S 표면항원에 대하여 높은 결합력을 갖는 단세포균 항체의 중쇄 및 경쇄 가변지역에 대한 유전자를 변형하여 제조한 anti-HBV 인간화항체에 단백질 과발현 유도물질인 NaBu의 첨가 및 배양온도의 변화를 통하여 anti-HBV 인간화항체의 고발현 생산을 시도하였다. 또한, 최적화된 배양조건을 활용하여 spinner 플라스크 또는 bioreactor를 이용한 대량배양을 시도하였다.

Dihydrofolate reductase(DHFR) 결손 Chinese Hamster Ovary 세포(DHFR- CHO Cell)에 인간화된 anti-HBV 항체 유전자를 삽입시켜 single clone을 선별하고, 유전자 증폭과정을 거쳐 최종 확립된 CHO 세포주인 YHB1110-13 세포주를 사용하였다. 선별된 고생산 세포주를 이용하여 항체를 산업적으로 대량생산하기 위하여 무혈청 또는 무단백배양과 현탁배양은 필수적인 과정으로 무혈청배지를 사용하는 이유는 세포배양 이후 배지로부터 항체의 분리정제를 용이하게 할 수 있으며 prion이나 바이러스 감염으로부터 안전하다는 이유이다[9]. CHO 세포에서 효율적인 anti-HBV 항체발현을 확인하기 위하여 α -MEM 배지에서 2×10^5 cells/ml로 접종하여 7일동안 배양한 후 SDS-PAGE 및 western blot 분석 결과 Fig. 1에서와 같이 표준품으로 사용한 human IgG와 동일한 위치에서 발현되는 항체단백질임을 확인하였다. 무혈청배지 Ex-cell 301배지에 현탁적응된 anti-HBV 항체 발현 세포주의 생산특성을 확인하기 위하여 Erlenmeyer 플라스크에 2×10^5 cells/ml로 접종하여 13일동안 배양하였으며 시간

경과에 따른 세포의 성장성과 항체 생산성을 확인하였다(Fig. 2). 실험결과 5일 배양까지 세포의 농도가 급격히 증가하였

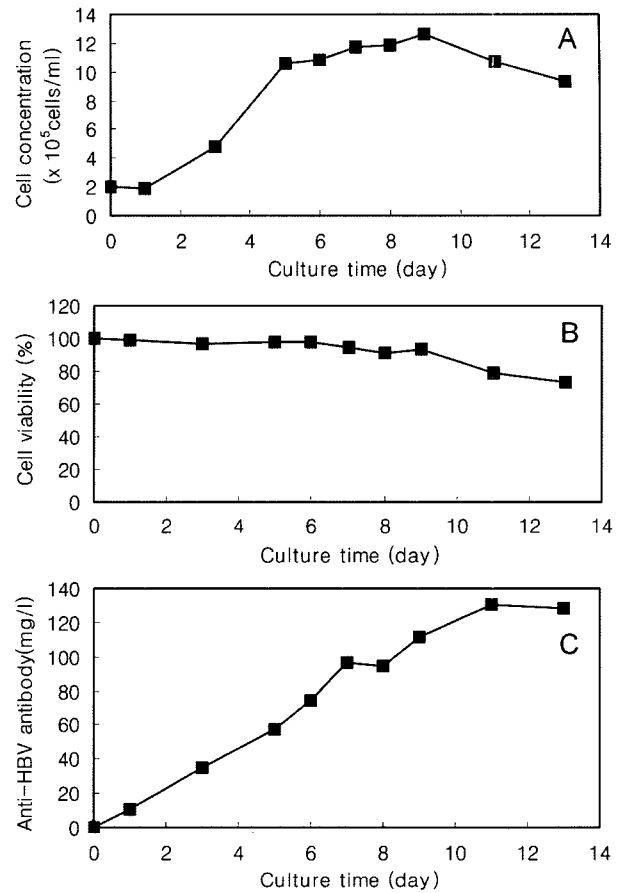


Fig. 2. CHO cell growth (A), cell viability (B) and anti-HBV antibody production (C) in static culture using Ex-cell 301 serum-free medium. Cell counts are means of duplicate culture.

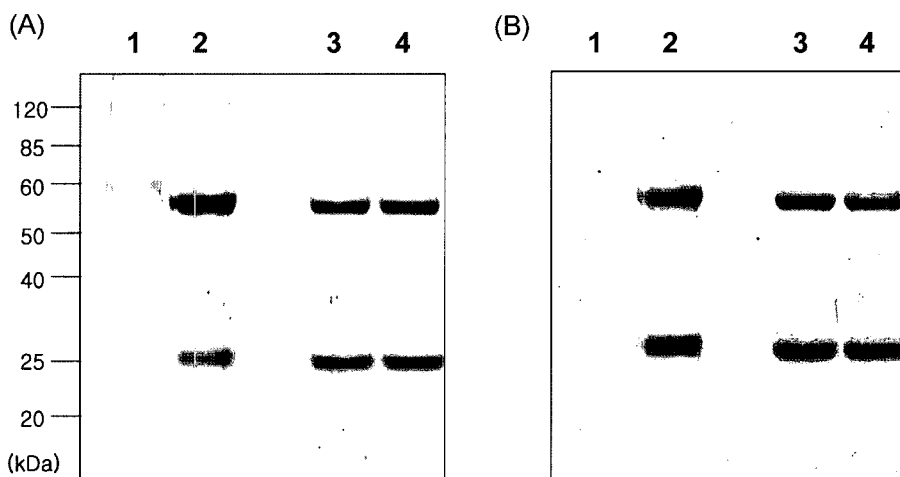


Fig. 1. SDS-PAGE (A) and western blot (B) analysis for anti-HBs antibody expressed in CHO cells. In all cases, samples applied to the gel are equivalent to 35 μ l culture supernatant. Lane 1; Multi mark colored standard (invitrogen, USA), 2; human IgG (3 μ g; Sigma, USA), 3-4; culture supernatant after 7 days culture.

으며 이후 서서히 증가하여 9일 배양에서 최대 세포농도는 1.3×10^6 cells/ml에 도달하였다. 최대세포농도에 도달할 때까지 세포생존율은 93% 이상 유지하였다. 13일간의 배양에서 세포생존율은 74%를 유지하였으며 배양액으로 발현된 항체의 농도는 130 mg/l이었다(Fig. 2-A, C).

유전자재조합 단백질의 생산성을 높이기 위하여 배양 중에 NaBu를 첨가하는데 세포주는 도입된 항체 유전자의 chromosome integration site에 따라 외부환경에 다르게 반응하며 이러한 NaBu는 세포내로 유입되어 cell cycle에 영향을 줌으로서 항체의 생산성을 증가시키는 반면 apoptosis를 유발하는 단점이 있는 것으로 알려져 있다[12]. Fig. 3(A)에서와 같이 배양 3일 후 NaBu를 첨가하였을 때 세포가 급격하게 사멸하기 시작하여 배양 7일 후에는 세포농도가 $0.4\text{--}1.4 \times 10^5$ cells/ml로 NaBu를 처리하지 않은 세포주의 1×10^6 cells/ml에 비하여 90% 감소하는 것으로 확인하였다. 또한 NaBu를 처리하지 않은 세포주의 세포생존율은 90% 이상을 유지하였으나 NaBu를 처리하였을 때의 세포생존율은 4~13%로 매우 낮았다. 2.5 mM NaBu를 처리하였을 때 항체의 생산성은 140 mg/l로 대조구에 비하여 3배 이상 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3-B, C). 이와 같이 고농도의 NaBu의 처리 시 세포가 급격하게 사멸하는 현상이 관찰되었는데, 실제로 배양 후 CHO 세포의 DNA를 분리하여 세포사멸을 확인한 결과 0.5 mM NaBu농도 이상에서 DNA 분절현상이 일어나는 것을 확인할 수 있었다(data not shown). 5 mM 이상의 NaBu를 첨가하면 항체 생산성은 증가하였으나 세포의 사멸로 인하여 전체 세포농도가 감소하여 생산성은 오히려 감소하였다. NaBu에 의한 세포사멸효과를 최소화하기 위하여 DNA 분절효과를 보이지 않는 0.5 mM NaBu 농도이하로 세분화하여 배지에 첨가한 후 최적의 NaBu 첨가농도를 결정하였다. 항체생산성은 0.5 mM NaBu 첨가에 의하여 40% 이상 증가하였으나 세포생존율은 대조구에 비하여 25% 감소하였다. 이에 비하여 0.3 mM NaBu 첨가의 경우 생존세포가 대조구 대비 99% 이상 안정적으로 유지하며 항체생산성도 30% 이상 증가하여 0.3 mM NaBu농도를 최적의 NaBu 첨가농도로 세포주 대량배양에 활용하였다.

Celligen plus(NBS) bioreactor를 이용하여 항체 발현세포주의 장기간 대량배양을 수행하였다. 6×10^5 cells/ml를 접종한 후, fibra-cel disk에 고정시켜 perfusion 배양을 진행하였으며 perfusion rate는 glucose 소비속도에 따라 배양 초기에는 day당 2~5 l이었으며 배양 15일에서 30일까지는 day당 6 l수준을 유지하였다. 이후에는 perfusion rate를 점차 감소시켜 배양 50일 이후에는 day당 3 l수준이었다. 배양 중에 NaBu첨가, 온도, pH, DO 변화에 따른 항체생산성 변화를 모니터링하였다(Fig. 4-A, B). 항체발현 세포주는 Bioreactor 내에서 fibra-cel disk에 부착하여 성장하게 되므로 배양 중 세포의 계수가 불가능하여 부착되지 않은 배양액의 세포수

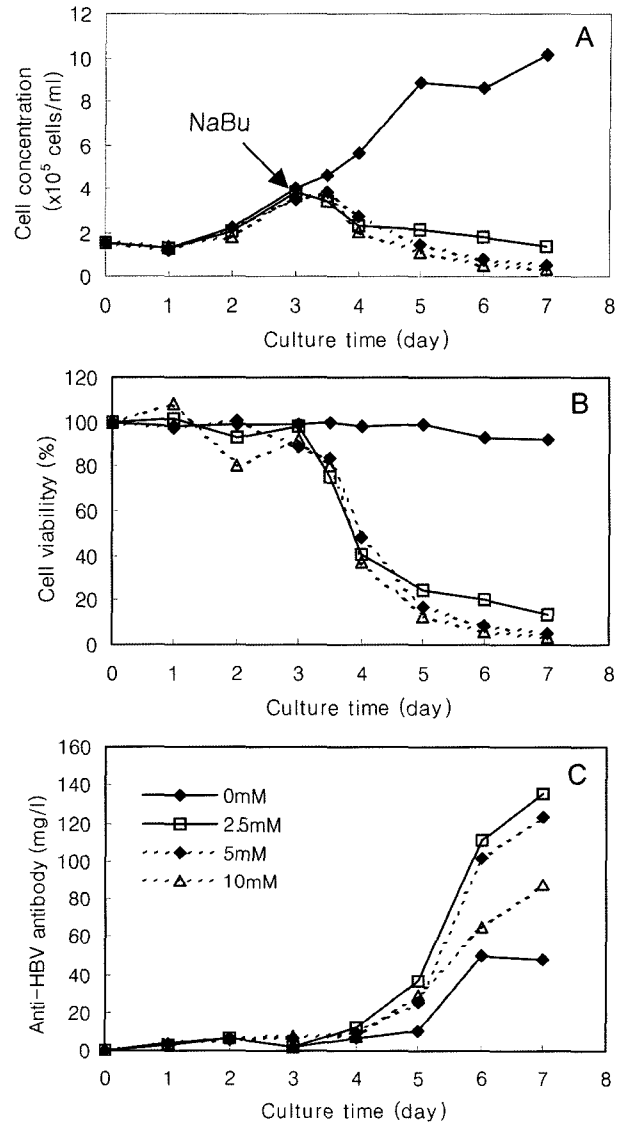


Fig. 3. Comparison of spinner flask culture of CHO cells producing anti-HBV antibody in the presence of each concentration of NaBu. This experiment was repeated three times and performed in 125 ml shake flasks inoculated at 2×10^6 cells/ml. NaBu was added to a culture medium after 3 days culture. Values reflect the mean of three independent determinations. (A) Cell growth (B) Cell viability (C) anti-HBV antibody production.

를 계수하였다. 대량배양 30일까지 세포성장이 지속적으로 진행되어 fibra-cell disk에 부착되지 않은 세포가 2.5×10^5 cells/ml로 확인되었으며 이후 배양에서는 일정한 세포농도를 유지하였다(Fig. 4-C). 배지성분 중 탄소원으로 공급한 glucose 농도는 세포성장에 반비례하여 배양초기 3 g/l에서 배양 5일에는 1 g/l로 감소하여 배양 30일까지 1 g/l 수준을 유지하였다. 이후에는 서서히 증가하여 배양종료 시에는 2 g/l 수준을 유지하였다. Table 1에서 요약한 바와 같이 배양 6일 이후에 배양온도를 37°C에서 33°C로 낮추어 배양하였으며 21일 배양 이후에는 0.3 mM NaBu를 첨가 배양하여

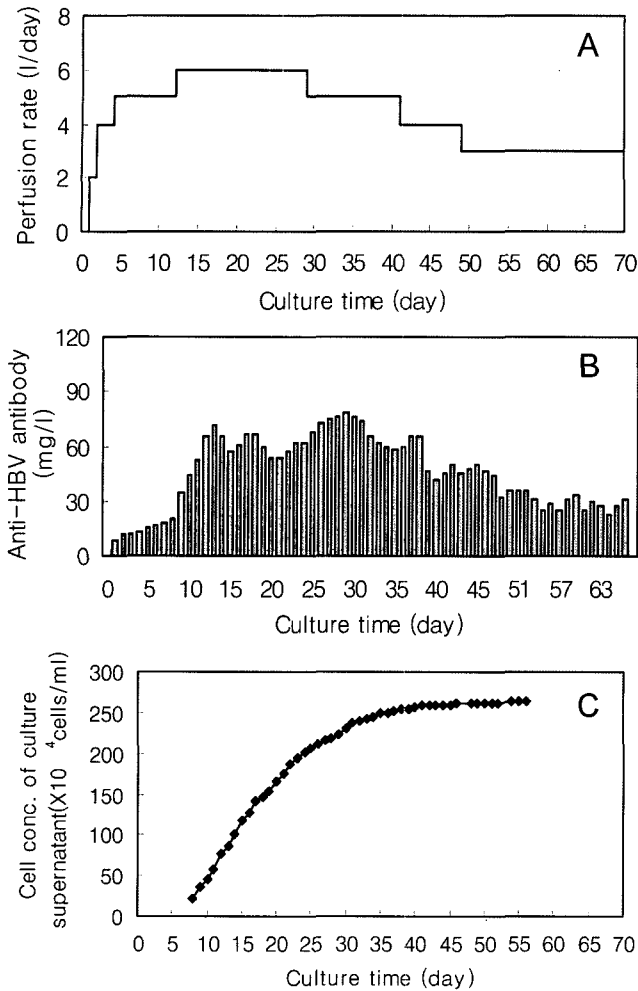


Fig. 4. Perfusion rate (A), anti-HBV antibody production (B) and cell concentration of culture supernatant (C) of CHO cells producing anti-HBV antibody in 7 l bioreactor using Ex-cell 301 serum-free medium.

Table 1. Summary of perfusion culture for the production of anti-HBV antibody expressed in CHO cells using Ex-cell 301 serum-free medium.

Culture time (day)	anti-HBV antibody ^a (mg/l)	NaBu ^b (mM)	Culture temperature ^c
60	50.7	0.3 mM	37°C/33°C
45	25.8	0.3 mM	37°C

^a mean productivity of total culture supernatant

^b added to a culture medium after 21 days culture

^c lowered culture temperature to 33°C after 6 days culture

항체생산성이 37°C에서 0.3 mM NaBu를 첨가하여 배양한 대조배양에 비하여 평균 항체생산성이 50.7 mg/l로 2배 증가하였다. 그러나 NaBu 처리 후 약 10일이 경과한 다음부터 glucose 소비속도와 배지의 perfusion 비율이 감소하였으며, 이는 NaBu 첨가로 인한 세포의 사멸로 전체 세포농도가 감소하였기 때문인 것으로 추정된다. 37°C 배양에 비하

여 33°C에서 배양한 결과 60일 이상 대량배양이 가능하였 으며 최대 항체생산성은 30일차 배양에서 85 mg/l이었다. 배 양온도를 변화시키므로 나타나는 성장속도의 감소문제는 고 농도의 세포를 접종하거나 growth phase에서는 37°C로 배 양한 후 전체 세포농도가 일정수준에 도달하였을 때 33°C로 배양온도를 낮추는 방법으로 해결할 수 있을 것으로 판단된 다. NaBu 첨가에 의한 세포사멸을 막기 위하여 *bcl-2*와 같 은 apoptosis 저해 유전자를 과발현시키는 세포주를 활용하 거나 apoptosis를 유발하지 않도록 배양온도를 낮추어 세포 사멸의 유발을 최소화하는 배양방법이 있다. Oh 등에 의하 면 NaBu에 의한 세포사멸을 감소시키기 위하여 항산화제를 첨가하여 배양하였으며 항산화제 첨가로 200시간 이상 장기 배양이 가능하였으며 항체생산성이 2배 증가한 결과를 보고 한 바 있다[19]. 이에 비하여 본 연구에서는 항산화제의 첨 가에 의하여 생산성 증가는 보이지 않았으나 배양온도를 33°C로 낮추어 배양한 경우 최대 60일 이상 장기배양이 가능 하였으며 항체생산성 또한 최대 2배 이상 증가하였다.

항체의약품 특성상 생물학적 효력을 갖기 위하여는 고용 량 투약이 불가피하여 고발현 세포주 및 배양공정 개발이 중 요한 의약품개발의 관건이라 할 수 있다. 동물세포를 이용 한 의약품 생산공정의 문제점은 산업용 동물세포주 제조를 위하여 외래 유전자 도입, 유전자 증폭, 고발현 세포주 선별 및 장기적 세포주 안정성 확인 등에 많은 시간과 노력이 소 요되고 세포주 제조시에 배양 및 정제공정의 특성이 고려되 지 않아 장기간 대량배양시 세포의 안정성이 감소하여 생산 성이 크게 떨어지는데 있다. 산업적으로 채택하여 활용되고 있는 항체의약품 생산공정인 fed-batch 방식은 산업적인 생 산을 위하여 대규모의 배양시설이 필요한 반면 본 연구에서 시도한 perfusion 배양방식은 희석율(dilution rate)에 의하여 일정한 비율로 장기간 동안 배지의 공급과 회수가 가능하여 비교적 소규모 생산시설을 유지할 수 있다는 장점이 있다. 산업적으로 유용한 perfusion 배양공정 확립을 위하여 앞서 확인된 NaBu 첨가 및 배양온도를 낮추어 배양하는 배양법 을 활용하여 배양을 위한 물리적 환경의 최적화가 성공적으 로 달성된다면 항체 생산공정의 경제성이 확보된 scale-up이 가능하리라 사료된다.

감사의 말

본 연구는 2005년도 보건복지부의 보건의료바이오기술개발사업의 지원(과제번호: 02-PJ10-PG4-PT02-0010)으로 수행 되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Arts, J., M. Lansink, J. Grimbergen, K. H. Toet, and T. Kooistar. 1995. Stimulation of tissue-type plasminogen

- activator gene expression by sodium butyrate and trichostatin A in human endothelial cells involves histone acetylation. *Biochem. J.* **310**: 171-176.
2. Blumberg, B. S. 1977. Australian antigen and the biology of Hepatitis B. *Science.* **41**: 293-311.
 3. Castro, P. M. L., P. M. Hayter, A. P. Ison, and A. T. Bull. 1992. Application of a statistical design to the optimization of culture medium for recombinant interferon-gamma production by chinese hamster ovary cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**: 84-90.
 4. Cherlet, M., A. Marc. 2000. Stimulation of monoclonal antibody production of hybridoma cells butyrate: evaluation of a feeding strategy and characterization of cell behaviour. *Cytotechnology* **32**: 17-29.
 5. Chisari, F. V., C. Ferrari. 1995. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Anual Rev. Immunol.* **13**: 29-62.
 6. Gebert, C. A., and P. P. Gray. 1995. Expression of FSH in CHO cells. Stimulation of hFSH expression levels by defined medium supplements. *Cytotechnology* **17**: 13-19.
 7. Hertogs, K., W. Leenders, E. Depla, W. De Bruin, L. Meheus, J. Raymackers, H. Moshage, and S. Yap. 1993. Endotoxin II, present on human liver plasma membrane, is a specific hepatitis B virus (HBV) envelope protein. *Virology* **197**: 549-557.
 8. Hunt, S. M., S. C. Pak, M. W. Bridges, P. P. Gray, and M. J. Sleight. 1997. Chinese hamster ovary cells produce sufficient recombinant insulin-like growth factor I to support growth in serum-free medium. *Cytotechnology* **24**: 55-64.
 9. Keen, M. J. and M. T. Rapson. 1995. Development of a serum-free culture medium for the large scale production of recombinant protein from a chinese hamster ovary cell line. *Cytotechnology* **17**: 153-163.
 10. Kim, N. S., and G. M. Lee. 2001. Overexpression of *bcl-2* inhibits sodium butyrate-induced apoptosis in chinese hamster ovary cells, resulting in enhanced humanized antibody production. *Biotechnol. Bioeng.* **71**: 184-193.
 11. Kim, N. S., and G. M. Lee. 2002. Inhibition of sodium butyrate-induced apoptosis in recombinant Chinese hamster ovary cells by constitutively expressing antisense RNA of Caspase-3. *Biotechnol. Bioeng.* **78**: 217-228.
 12. Kim, N. S., K. H. Chang, B. S. Chung, S. H. Kim, J. H. Kim, and G. M. Lee. 2003. Characterization of humanized antibody produced by apoptosis-resistant CHO cells under sodium butyrate-induced condition. *J. Microbiol. Biotechnol.* **13**: 926-936.
 13. Kim, T. K., J. S. Ryu, J. Y. Chung, M. S., and G. M. Lee. 2000. Osmoprotective effect of glycine betaine on thrombopoietin production in hyperosmotic chinese hamster ovary cell culture: Clonal variations. *Biotechnol. Prog.* **16**: 775-781.
 14. Lee, M. S., and G. M. Lee. 2000. Hyperosmotic pressure enhances immunoglobulin transcription rates and secretion rates of KR12H-2 transfectoma. *Biotechnol. Bioeng.* **68**: 260-268.
 15. Leeders, W, H. Glansbeek, W. De Bruin., and S. Yap. 1990. Binding of the major and large HBsAg to human hepatocytes and liver plasma membrane: Putative external and internal receptors for infection and secretion of hepatitis B virus. *Hepatology* **12**: 141-147.
 16. Mastrangelo, A. J., and M. J. Betenbaugh. 1998. Overcoming apoptosis: new methods for improving protein-expression systems. *TIBTECH.* **16**: 88-95.
 17. Medhi, H., M. Kaplan, F. Anlar, X. Yang, R. Bayer, K. Sutherland, and M. Peeples. 1994. Hepatitis B virus surface antigen binds to apolipoprotein H. *J. Virol.* **68**: 2415-2424.
 18. Moore, A., J. Mercer, J. Dutina, C. J. Donahue., K. D. Bauer, J. P. Mather, T. Etcheverry, and T. Ryll. 1997. Effects of temperature shifts on cell cycle, apoptosis and nucleotide pools in CHO cell batch cultures. *Cytotechnology* **23**: 47-54.
 19. Oh, H. K., M. K. So, J. H. Yang, H. C. Yoon, J. S. Ahn, J. M. Lee, J. T. Kim, J. U. Yoo, and T. H. Byun. 2005. Effect of N-Acetylcystein on butyrate-treated chinese hamster ovary cells to improve the production of recombinant human interferon- β -1a. *Biotechnol. Prog.* **21**: 1154-1164.
 20. Oh, S. K. W., P. Vig., F. Chua, W. K. Teo, and M. G. S. Yap. 1993. Substantial overproduction of antibodies by applying osmotic pressure and sodium butyrate. *Biotechnol. Bioeng.* **42**: 601-610.
 21. Oster, T., C. Thioudelt, I. Chevalot, C. Masson, M. Wellman, A. Marc, and G. Siest. 1993. Induction of recombinant human γ -glutamyl transferase by sodium butyrate in transfected V79 and CHO Chinese hamster cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **193**: 406-412.
 22. Ryu, J. S., T. K. Kim, J. Y. Chung, and G. M. Lee. 2000. Osmoprotective effect of glycine betaine on foreign protein in hyperosmotic recombinant chinese hamster ovary cell cultures differs among cell line. *Biotechnol. Bioeng.* **70**: 167-175.
 23. Yook, S. K., Y. Ahn, and K. Han. 2001. Enhancement of recombinant erythropoietin production in CHO cells in an incubator without CO₂ addition. *Cytotechnology* **37**: 119-132.

(Received Nov. 27, 2005/Accepted Feb. 1, 2006)