

## CHO 세포의 저온배양에서 Glycine Betaine이 재조합 FSH의 생산에 미치는 영향

† 윤성관 · 안용호

LG생명과학 바이오연구소

(접수 : 2007. 4. 2., 게재승인 : 2007. 4. 24.)

## Effect of Glycine Betaine on Follicle-Stimulating Hormone Production by Chinese Hamster Ovary Cells at Low Culture Temperature

Sung Kwan Yoon† and Yong-Ho Ahn

Bioprocess R&D, LG Life Science Ltd, P. O. Box 61, Yusong-Gu, Daejeon 305-380, Korea

(Received : 2007. 4. 2., Accepted : 2007. 4. 24.)

Suspension culture of recombinant Chinese hamster ovary (CHO) cells producing follicle-stimulating hormone was performed to investigate the effect of glycine betaine on cell growth and FSH production at low culture temperature. At 28°C, cell growth was suppressed, but cell viability remained high for a longer culture period. When the culture temperature was lowered from 37°C to 28°C, more than 14-fold increase in the maximum FSH titer was achieved. In batch culture at 28°C, the use of 15 mM glycine betaine (GB) to culture medium resulted in the enhancement of maximum cell density and FSH titer by 11% and 17%, respectively, compared to the culture without GB. In pseudo-perfusion culture at 28°C with the exchange of fresh medium containing 15 mM GB, a final FSH of 2,058 µg which is approximately 1.4-fold higher as compared to the culture without GB was obtained. This enhanced FSH production with 15 mM GB was not just because of enhanced specific FSH productivity (qFSH), but mainly because of the extended culture longevity. Taken together, this result demonstrates that the application of GB at low culture temperature is feasible to enhance the production of recombinant proteins in rCHO cells.

**Key Words** : Glycine betaine, CHO cells, low culture temperature, follicle-stimulating hormone

### 서 론

Chinese hamster ovary (CHO) 세포는 1990년대 이후 재조합 단백질의 생산숙주로 널리 사용되고 있다. CHO 세포를 사용하여 재조합 단백질을 생산하는 경우에 적절한 당화 구조를 유지하여 활성이 높은 재조합 단백질을 얻을 수 있는 반면에 재조합 단백질의 낮은 생산성은 해결되어야 할 과제이다. 많은 연구자들에 의하여 CHO 세포에서 재조합 단백질의 생산성을 높이기 위한 온도, pH, 삼투압과 같은 환경인자의 최적화가 시도되어졌다(1-3).

CHO 세포의 성장과 재조합 단백질의 생산에 영향을 주는 환경인자 중 온도는 배양공정에서 쉽게 제어할 수 있

다는 특성이 있다. 일반적으로 CHO 세포를 포함한 동물세포는 세포가 유래한 포유동물의 체온인 36~37°C에서 최적의 성장을 나타낸다. 한편 CHO 세포를 37°C보다 낮은 저온인 28~32°C에서 배양하였을 때 세포성장은 저해되지만 세포의 생존율 (Viability)이 오랫동안 높게 유지될 뿐 아니라 재조합 단백질의 생산성도 크게 증가됨이 보고되었다(4-7).

CHO 세포는 이론적으로는 세포의 성장에 필요한 조건이 유지되는 한 계속적으로 성장할 수 있는 Continuous cell line이지만 실제의 배양조건 하에서는 세포의 성장에 따라 세포 성장에 유해한 부산물의 축적 또는 배지 내 특정 성분의 고갈 등의 이유로 배양 후 일정 시간이 경과하면 세포의 생존율이 급격히 떨어지며 죽게 된다. 세포의 사멸로 세포내에 존재하던 많은 종류의 당 분해효소와 Protease들이 배지로 배출되는 경우 이미 생산되어 배지에 존재하는 재조합 단백질의 분해를 일으켜 활성을 떨어뜨리게 된다. 이러한 이유로 일반적으로 세포의 생존율이

† Corresponding Author : Bioprocess R&D, LG Life Science Ltd, P.O. Box 61, Yusong-Gu, Daejeon 305-380, Korea

Tel : +82-42-866-4974, Fax : +82-42-862-0331;

E-mail : skyoonb@lgls.co.kr

70~80%일 때 배양을 중단하게 된다. 따라서 재조합 단백질의 생산성을 최대화하려면 세포의 생존율을 오랫동안 높은 상태로 유지하면서 재조합 단백질의 생산도 최대화 하는 최적의 배양온도에서 CHO 세포를 배양해야 한다.

Glycine Betaine (이하 GB라 명명)은 다양한 생물군에 존재 하는 Compatible solute로서 CHO 세포의 배양에 있어서 고삼투압의 배지에 GB를 첨가함으로써 GB가 Osmoprotectant의 역할을 하여 재조합 단백질의 생산을 증대시키는 보고가 있다(8-10). 한편 식물세포에서는 저온에서 GB가 Cyroprotectant의 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (11-13). 그러나 CHO 세포의 배양에 있어서 앞서 언급한 Osmoprotectant로서 GB의 사용 이외에 저온배양 시에 GB를 사용한 예는 아직 보고된 바가 없다.

본 연구에서 재조합 난포자극호르몬 (Follicle-stimulating hormone, FSH)을 생산하는 CHO 세포에 있어서 저온에서의 배양이 CHO 세포의 성장과 FSH의 생산에 미치는 영향을 알아보았고 배지에 GB를 첨가하였을 때 저온배양에서 세포의 생존율을 오랫동안 유지할 수 있는지를 조사하여 GB의 Cyroprotectant로서의 역할을 알아보았다. 또한 유사배지교환식 배양 (Pseudo-perfusion culture) 방식에 GB를 첨가하였을 때 세포생존율의 변화와 FSH 생산증대 효과를 알아보았다.

## 재료 및 방법

### 세포주

본 연구에서는 세포주로 난포자극호르몬 (FSH)을 생산하도록 유전자 조작된 CHO 세포를 사용하였다. FSH생산 세포주의 확립과정을 간단히 기술하면 다음과 같다. 먼저 Dihydrofolate reductase (dhfr) 유전자가 결손된 CHO 숙주세포 (DUKX-B11, ATCC CRL-9096)에 인간 FSH의  $\alpha$ 와  $\beta$  subunit, 그리고 dhfr유전자를 포함하는 벡터를 만들어 transfection 하여 재조합 CHO 세포를 얻었다. 다음에 배지에 Methotrexate (MTX)의 농도를 0.01  $\mu$ M에서 1  $\mu$ M까지 순차적으로 높이며 FSH 유전자의 증폭을 시도하여 최종적으로 1  $\mu$ M의 MTX에서 안정적으로 자라는 세포주를 얻고 이를 실험에 사용하였다.

### 배양배지

CHO 세포의 배양에는 자체개발한 무혈청 배지 (LG-SFSH, LG Life Sciences, Korea)를 사용하였다. CHO 세포가 LG-SFSH 배지에서 잘 자랄 수 있도록 스피너플라스크 (Bellco Glass, USA)에서 약 1달간 연속적으로 계대배양하여 CHO 세포를 LG-SFSH 배지에 적응시켰다.

### 세포배양

모든 실험은 125 mL짜리 스피너플라스크를 사용하여 수행하였다. 이때 배지의 부피는 80 mL, 회전수는 60 rpm이었고 5%의 CO<sub>2</sub> 농도가 조절되는 습윤 인큐베이터에서 배양하였다.

온도 영향을 알아보기 위한 회분식 배양의 경우 먼저

두개의 스피너플라스크에 세포의 초기농도가  $2.5 \times 10^6$  cells/mL이 되도록 CHO 세포를 접종하고 각각 28°C와 37°C의 인큐베이터에 넣고 배양을 하였다.

저온 배양에 있어서 Glycine betaine (GB, Sigma, USA)의 영향을 알아보기 위한 회분식 배양의 경우 먼저 두개의 스피너플라스크에 각각 0 mM과 15 mM의 GB를 함유한 LG-SFSH 배지를 넣고 여기에 세포의 초기농도가  $2.5 \times 10^6$  cells/mL이 되도록 접종한 후 28°C의 인큐베이터에서 배양을 하였다. 배양은 세포의 생존율이 60%에 이를 때까지 진행하였다.

저온에서의 유사배지교환식 배양의 경우 2일에 한번씩 새로운 80 mL의 배양액을 교환하는 방식으로 수행하였다. 즉 두개의 스피너플라스크에 각각 0 mM과 15 mM의 GB를 함유한 LG-SFSH 배지를 넣고 여기에 세포의 초기농도가  $2.5 \times 10^6$  cells/mL이 되도록 접종한 후 28°C의 인큐베이터에서 배양을 하였다. 2일 간격으로 각각의 스피너플라스크의 배지를 0 mM과 15 mM의 GB를 함유한 새로운 배지로 교환하였다. 배양은 세포의 생존율이 70%에 이를 때까지 진행하였다.

### 분석

배양을 하면서 매일 약 0.3 mL의 배양액을 스피너플라스크로부터 취하였다. 원심분리 후 상등액을 모아 -70°C 냉동고에 보관하였다. 생세포수와 세포생존율은 trypan blue dye를 사용하여 세포를 염색한 후 hemacytometer를 사용하여 dye에 염색되지 않은 세포 (생세포)와 염색된 세포를 측정하여 계산하였다. 배지에 존재하는 FSH의 양은 ELISA kit (IBL, Germany)를 구입하여 제조회사의 지시에 따라 사용하여 측정하였다.

### 비세포성장속도 ( $\mu$ )와 단위세포당비생산성 ( $q_{FSH}$ ) 계산

$\mu$ 는 세포의 지수성장기동안에 시간에 대한 생세포수의 Log값을 Plot하여 그래프로부터 직선의 기울기로 구하였고  $q_{FSH}$ 는 Renard (14)의 방법에 의하여 계산하였다.

## 결과 및 고찰

### 저온에서 CHO 세포의 성장과 FSH생산

CHO 세포의 저온배양이 세포의 성장과 FSH의 생산에 미치는 영향을 알아보기 위하여 스피너플라스크에 세포의 초기농도가  $2.5 \times 10^6$  cells/mL이 되도록 접종한 후 각각 28°C와 37°C의 인큐베이터에서 배양을 하였다. 동일한 배양을 두 번 수행하였다.

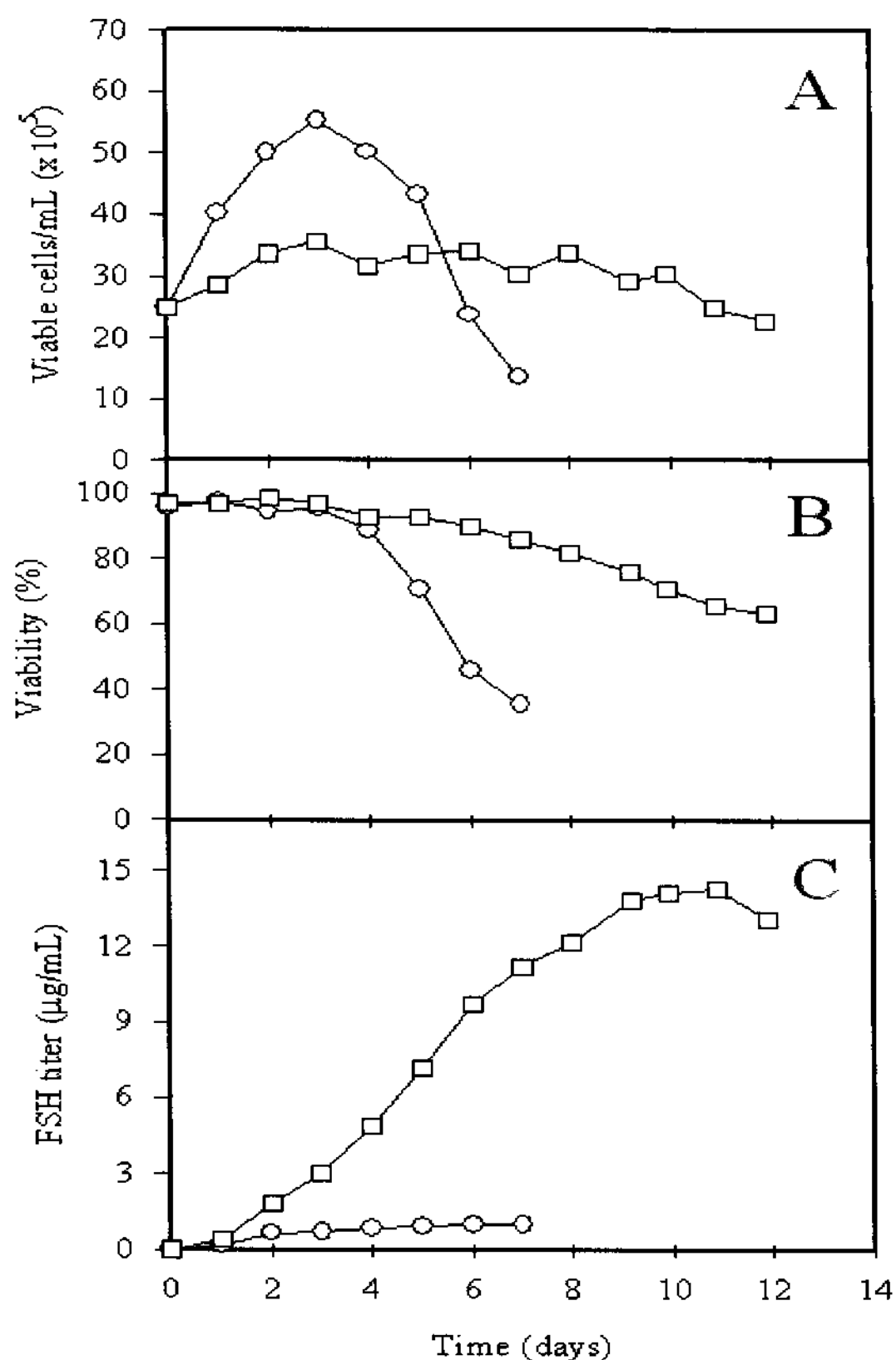
Fig. 1에 두 온도에서의 배양시간에 따른 CHO 세포농도와 세포생존율, 배지 내의 FSH양을 나타내었다. CHO 세포를 37°C에서 배양하였을 때에는 lag없이 자라기 시작하여 4일 후 최대세포농도인  $5.6 \times 10^6$  cells/mL에 도달한 반면 28°C에서 배양하였을 때에는 세포성장이 저해되어 최대세포농도는  $3.5 \times 10^6$  cells/mL이었다(Fig. 1A). 그러나 37°C에서는 세포의 농도가 최대에 도달한 후 세포생존율이 급격하게 떨어지는데 비하여 28°C에서는 세포생존율이 오랫동안

안 높게 유지되었다(Fig. 1B). 또한 FSH의 양은 37°C에서는 배양 7일 후 40%의 낮은 세포생존율에서 1.02 µg/mL에 불과하였으나 28°C에서는 배양 11일 후 65%의 높은 세포생존율에서 14.3 µg/mL로 37°C 배양에 비하여 14배 이상 증가하였다. 두 온도에서의 비세포성장속도 ( $\mu$ )와 단위세포당 비생산성 ( $q_{FSH}$ )을 계산하여 Table 1에 나타내었다. 37°C에서 배양하였을 때  $\mu$ 는  $0.254 \pm 0.015 \text{ day}^{-1}$ 이었으나 28°C에서 배양하였을 때에는 세포성장이 저해되어  $\mu$ 는  $0.062 \pm 0.011 \text{ day}^{-1}$ 에 불과하였다. 반면에 28°C에서 배양하였을 때  $q_{FSH}$ 는  $0.462 \pm 0.037 \text{ µg}/10^6 \text{ cells/day}$ 로 37°C에서 배양하였을 때에 비하여 11배가 증가하였다. 다른 연구자들이 재조합 CHO 세포를 28~32°C의 저온에서 배양하였을 때 얻은 결과와 유사하게(5, 6) 본 연구에 사용한 FSH를 생산하는 재조합 CHO 세포의 경우에도 28°C의 저온배양에서 세포성장의 억제와 재조합 단백질의 생산성 증가를 확인하였다.

**Table 1.** Effect of culture temperature on specific growth rate and specific FSH productivity<sup>a</sup>

Culture temperature, (°C)	Specific growth rate, $\mu$ (day <sup>-1</sup> )	Specific FSH productivity, $q_{FSH}$ (µg/10 <sup>6</sup> cells/day)
28	$0.062 \pm 0.011$	$0.462 \pm 0.037$
37	$0.254 \pm 0.015$	$0.044 \pm 0.015$

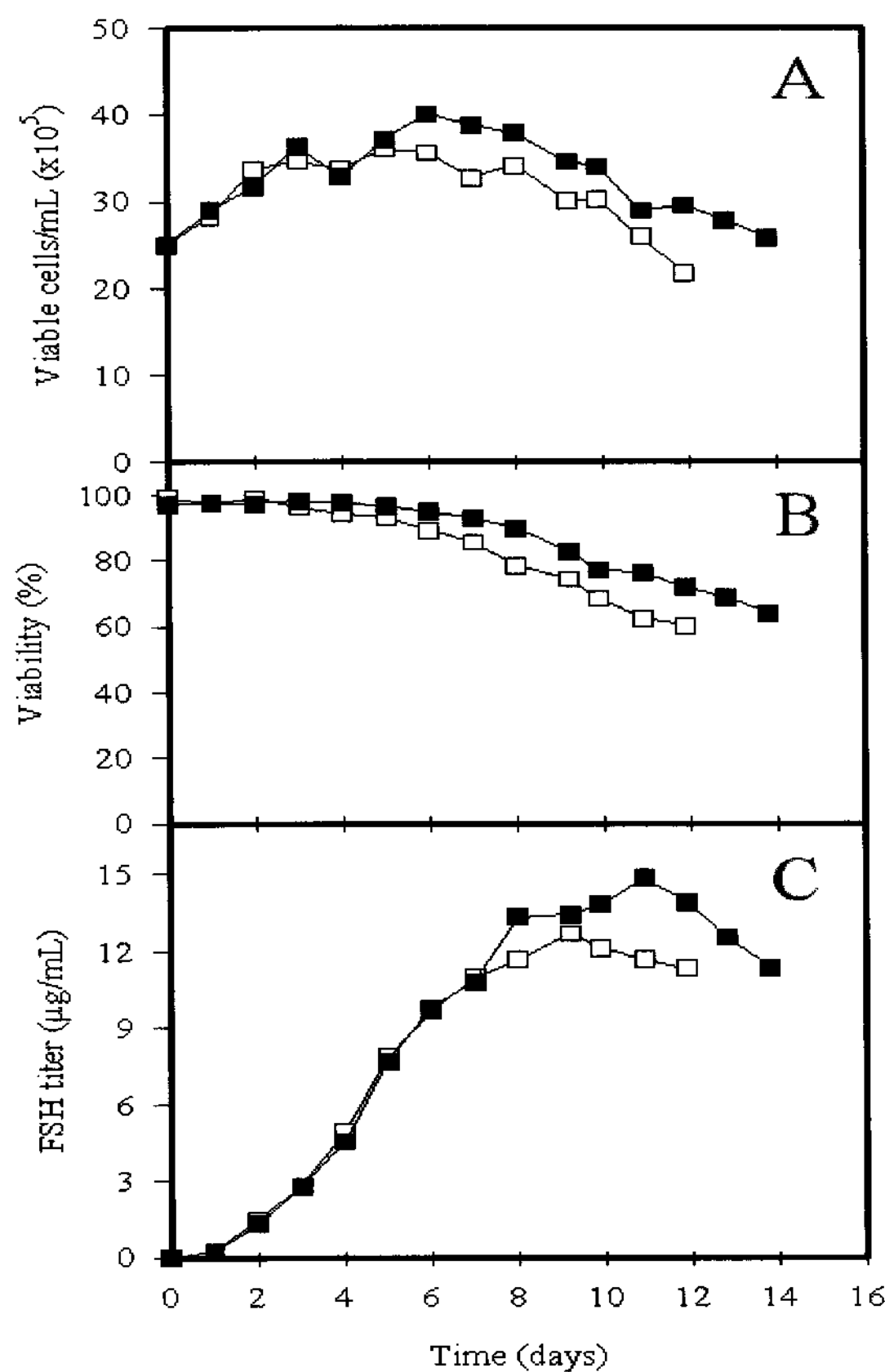
<sup>a</sup>Values are means  $\pm$  S.D. of two independent experiments



**Figure 1.** Viable cell concentration (A), cell viability (B) and FSH titer (C) during batch cultures at two different culture temperatures (○: 37°C; □: 28°C).

**저온배양에서 GB의 첨가가 세포성장과 FSH생산에 미치는 영향**

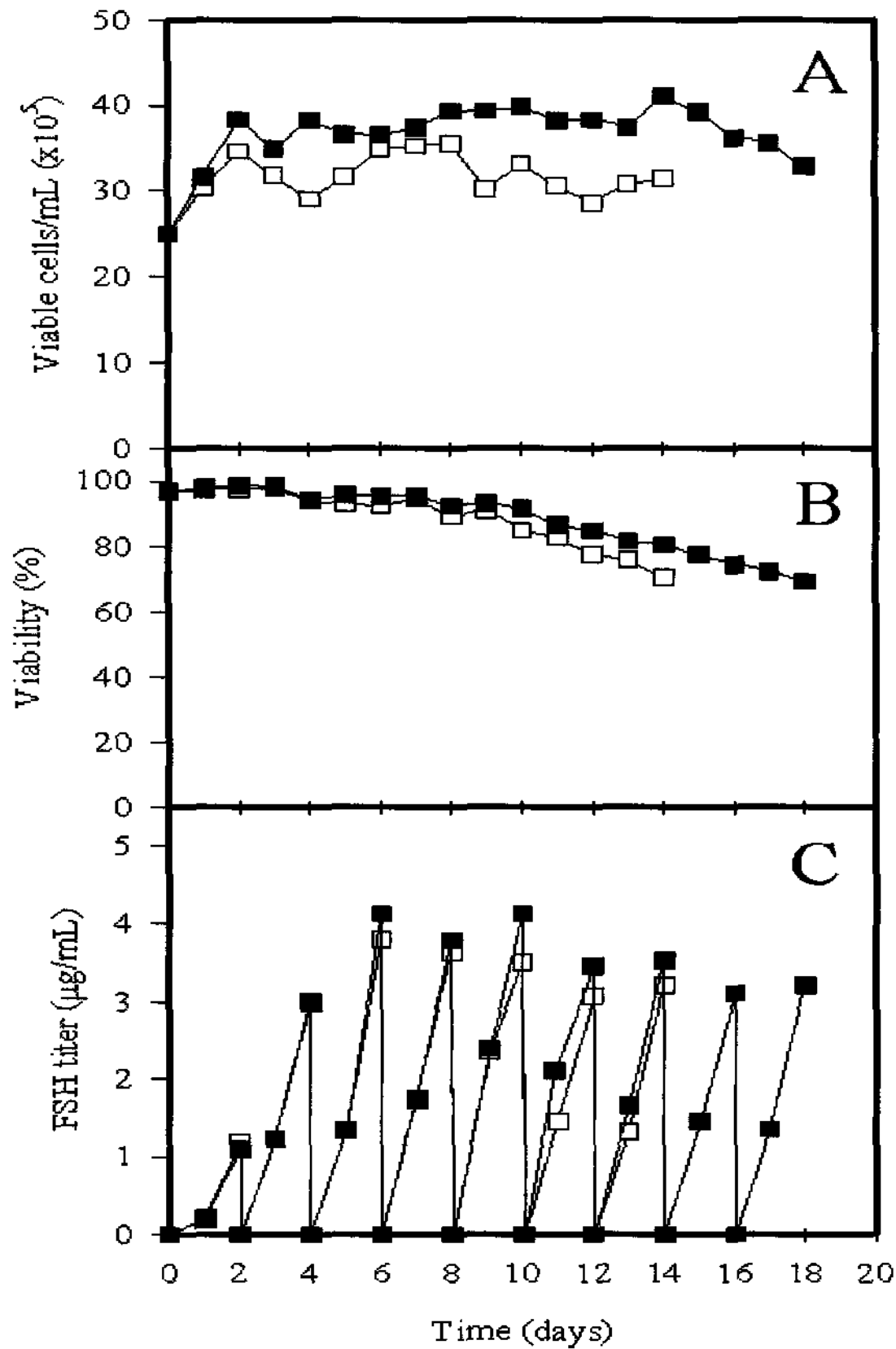
앞서의 회분식 배양에서 저온인 28°C에서 CHO 세포를 배양할 때 37°C에 비해 세포생존율이 오랫동안 높게 유지될 뿐 아니라  $q_{FSH}$ 값이 크게 증가하였다. 따라서 FSH의 생산 양을 최대화하려면 세포생존율을 높게 유지하며 저온 배양의 기간을 최대한 늘려야 함을 유추할 수 있다. 본 연구에서는 식물세포에서 각종 stress 환경으로부터 세포를 보호하는 것으로 알려진 GB를 CHO 세포의 배양배지에 첨가하였을 때 저온에서 세포생존율을 높게 유지하며 배양기간을 늘릴 수 있는지의 여부와 FSH의 생산증가 가능성을 알아보았다.



**Figure 2.** Viable cell concentration (A), cell viability (B) and FSH titer (C) during batch cultures at 28°C with 15 mM glycine betaine (■) and without glycine betaine (□) in culture medium.

스피너플라스크에 각각 0 mM과 15 mM의 GB를 함유한 배양배지를 넣고 여기에 세포의 초기농도가  $2.5 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 이 되도록 접종한 후 28°C의 인큐베이터에서 배양을 하였다. 배양은 세포생존율이 60%에 이를 때까지 진행하였다. Fig. 2에 CHO 세포의 저온배양에서 배지에 GB를 첨가 하였을 때와 첨가하지 않았을 때의 세포농도와 세포 생존율, 배지내의 FSH양을 나타내었다. 배지에 15 mM의 GB가 있는 경우 최대세포농도와 최대FSH양은 GB가 없는 경우에 비하여 각각 11%, 17% 높았다(Fig. 2A, C). 주목할 점은 배지에 15 mM의 GB가 있는 경우 세포생존율이 GB가 없는 경우에 비하여 더 오랫동안 높게 유지되어 배양

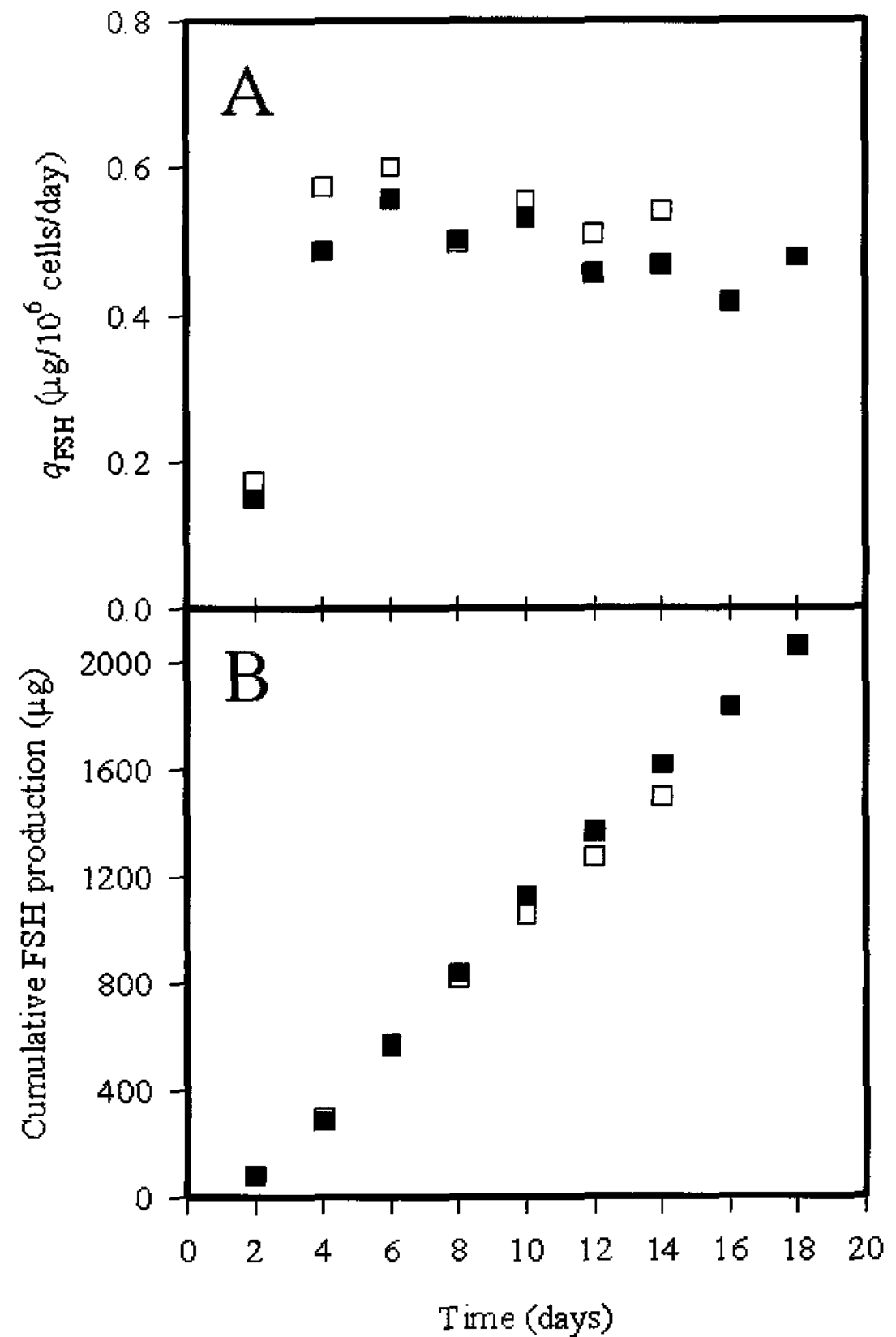
의 종료를 세포생존율 60%로 하였을 때 배양기간이 2일 더 늘어나는 것이다(Fig. 2B). 한편 세포생존율이 70% 이하에서 배지에 분비된 FSH의 분해가 관찰되었다(Fig. 2C). 이것은 세포의 사멸과 용혈 (Lysis)로 인하여 세포내의 다양한 당분해효소와 단백질분해효소들이 세포 밖의 배지에 존재하게 되어 이미 배지에 분비된 FSH를 분해하기 때문으로 생각되며 따라서 28°C의 저온배양에서 FSH양을 최대한으로 얻으려면 세포생존율 70% 이상에서 배양을 종료해야 할 것으로 생각된다.



**Figure 3.** Viable cell concentration (A), cell viability (B) and FSH titer (C) during pseudo-perfusion cultures with the exchange of fresh medium containing 0 mM (□), 15 mM (■) glycine betaine. Cells were seeded at an initial density of  $2.5 \times 10^6$  cells/mL into spinner flasks. Every other day, the spent media were completely exchanged with fresh media containing 0 and 15 mM glycine betaine, respectively.

GB를 첨가한 회분식 저온배양에서 15 mM GB를 배지에 첨가 하였을 때 배양기간을 더 늘려 FSH 생산에 유리함을 확인하였다(Fig. 2). 저온에서의 배지교환식 배양 (Perfusion culture)에서도 GB를 배지에 첨가하였을 때 배양기간을 더 늘려 FSH의 생산을 증가시킬 수 있는지 확인하고자 스피너플라스크에서 유사배지 교환식 배양 (Pseudo-perfusion culture)을 하였다. 스피너플라스크에 각각 0 mM과 15 mM의 GB를 함유한 배양배지를 넣고 여기에 세포의 초기농도가  $2.5 \times 10^6$  cells/mL이 되도록 접종한 후 28°C의 인큐베이터에서 배양을 하였다. 2일 간격으로 스피너플라스크의 배지를 0 mM과 15 mM의 GB를 함유한 새로운 배지로 교

환하였다. 앞서의 회분식 배양에서 세포생존율이 70% 이하일 때 FSH의 분해가 관찰되어 유사배지 교환식 배양은 세포생존율이 70%에 이를 때까지 수행하였다. Fig. 3에 유사배지 교환식 배양에서 CHO 세포농도와 세포생존율, 배지 내의 FSH양을 나타내었다. 유사 배지교환식 배양에서도 15 mM의 GB를 첨가한 경우 저온배양에서 세포농도가 증가하였다(Fig. 3A). 또한 GB를 첨가하지 않았을 때 배양기간이 14일인데 비하여 15 mM의 GB를 첨가한 경우 세포생존율이 더 높게 유지되어 배양기간이 18일로 4일간 증가하였다(Fig. 3B).



**Figure 4.** Specific FSH productivity,  $q_{FSH}$  (A) and cumulative FSH production (B) in pseudo-perfusion culture. Symbols are the same as those shown in Fig. 3.

Fig. 4에 유사배지 교환식 배양에서 GB를 첨가하였을 때와 첨가하지 않았을 때의  $q_{FSH}$ 값과 배지에 축적된 FSH의 양을 나타내었다. 15 mM의 GB 첨가가  $q_{FSH}$ 값에 영향을 주지는 않았지만(Fig. 4A) GB를 첨가하였을 때 배양기간이 4일 늘어남에 따라 배지에 축적된 FSH의 양은 증가하였다(Fig. 4B). 15 mM의 GB를 첨가한 유사배지 교환식 배양을 통하여 배양이 끝나는 시점에 2,058 μg의 FSH를 얻을 수 있었고 이것은 GB를 첨가하지 않은 배양에 비하여 1.4배가 증가된 결과이다.

산업적인 관점에서 볼 때 재조합 단백질 생산 기간의 연장은 세포 접종과정이나 운전설비의 세척 등에 소요되는 시간을 단축시켜주고 바이오 리액터의 운전시간을 늘이기 때문에 재조합 단백질의 부피생산성 (Volumetric

productivity) 증가에 유리하다. 이러한 측면에서 본 연구에서 시도한 배지에 GB를 첨가하는 것은 저온배양에서 세포의 배양기간을 연장하여 FSH의 생산량을 증가시키는 유용한 수단으로써 상업적인 이용가치가 크다고 생각된다.

지금까지 Cold stress의 상황 하에서 어떠한 경로를 통하여 GB가 세포생존율을 높게 유지시키는데 역할을 하는 것인지에 대한 연구가 전무한 실정이다. Cold stress 하에서 세포내 GB의 역할에 대한 보다 자세한 연구는 향후 GB의 상업적 응용에 많은 도움을 주는 의미있는 일로 판단된다. 또한 Osmoprotectant로서 GB의 최적농도가 존재하는 것으로 알려져 있는 것으로 보아(9) 세포의 배양기간을 최대화시키는 GB의 최적농도에 대한 연구도 필요한 것으로 생각된다.

### 요 약

본 연구에서는 FSH를 생산하도록 유전자 조작된 CHO 세포의 저온배양이 세포성장과 FSH의 생산에 미치는 영향을 알아보았다. 28°C에서 배양하였을 때 세포의 성장은 억제되었으나 37°C에서의 배양에 비하여 세포생존율이 더 오랫동안 높게 유지되었고 최대 FSH의 양도 14배 증가하였다. 28°C에서의 회분식 배양의 경우 배지에 15 mM의 GB를 첨가하였을 때 최대세포농도와 FSH 양은 GB를 첨가하지 않았을 때에 비하여 각각 11%, 17% 증가하였다. 28°C에서의 유사배지 교환식 배양의 경우 15 mM의 GB를 포함하는 배지를 교환하였을 때 세포생존율이 GB를 포함하지 않는 배지를 교환하였을 때에 비하여 더 높게 오랫동안 유지되어 최종적으로 배양기간을 4일간 더 연장할 수 있었다. 이러한 배양기간의 연장으로 인하여 15 mM의 GB를 포함하는 배지를 교환하는 유사배지 교환식 배양에서 총 2,058 µg의 FSH를 얻었고 이는 GB를 포함하지 않는 배지를 교환하는 유사배지 교환식 배양에 비하여 1.4배 증가한 것이다. 본 연구를 통하여 저온배양에 있어서 배지에 GB를 첨가함으로써 CHO 세포에서의 재조합단백질 생산을 증대시킬 수 있다는 것을 알았다.

### REFERENCES

1. Kurano, N., C. Leist, F. Messi, S. Kurano, and A. Fiechter (1990), Growth behavior of Chinese hamster ovary cells in a compact loop bioreactor: 1. Effects of physical and chemical environments, *J. Biotechnol.* **15**, 101-112.
2. Borys, M. C., D. I. H. Linzer, and E.T. Papoutsakis (1993), Culture pH affects expression rates and glycosylation of recombinant mouse placental lactogen proteins by Chinese hamster ovary (CHO) cells, *Bio/Technology* **11**, 720-724.
3. Kimura, R. and W. M. Miller (1996), Effects of elevated pCO<sub>2</sub> and/or osmolality on the growth and recombinant tPA production of CHO cells, *Biotechnol. Bioeng.* **52**, 152-160.
4. Furukawa, K., and K. Ohsuye (1998), Effect of culture temperature on a recombinant CHO cell line producing a C-terminal α-amidating enzyme. *Cytotechnology* **26**, 153-164.
5. Fox, S. R., U. A. Patel, M. G. S. Yap, and D. I.C. Wang (2004), Maximizing interferon-γ production by Chinese hamster ovary cells through temperature shift optimization: Experimental and modeling, *Biotechnol. Bioeng.* **85**, 177-184.
6. Schatz, S. M., R. J. Kerschbaumer, G. Gerstenbauer, M. Kral, F. Dorner, and F. Scheiflinger (2003), Higher expression of Fab antibody fragments in a CHO cell line at reduced temperature, *Biotechnol. Bioeng.* **84**, 433-438.
7. Yoon, S. K., J. Y. Song, and G. M. Lee (2003), Effect of low culture temperature on specific productivity, transcription level, and heterogeneity of erythropoietin in Chinese hamster ovary cells, *Biotechnol. Bioeng.* **82**, 289-298.
8. Kim, T. K., J. S. Ryu, J. Y. Chung, M. S. Kim, 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.
9. Ryu, J. S., T. K. Kim, J. Y. Chung, and G. M. Lee (2000), Osmoprotective effect of glycine betaine on foreign protein production in hyperosmotic recombinant Chinese hamster ovary cell cultures differs among cell lines, *Biotechnol. Bioeng.* **70**, 167-175.
10. Øyaas, K., T. E. Ellingsen, N. Dyrset, and D. W. Levine (1994), Hyperosmotic hybridoma cell cultures: increased monoclonal antibody production with addition of glycine betaine, *Biotechnol. Bioeng.* **44**, 991-998.
11. Chen, W. P., P. H. Li, and H. H. Chen (2000), Glycinebetaine increases chilling tolerance and reduces chilling-induced lipid peroxidation in *Zea mays* L., *Plant, Cell and Environment* **23**, 609-618.
12. Holmström, K.-O., S. Somersalo, A. Mandal, T. E. Palva, and B. Welin (2000), Improved tolerance to salinity and low temperature in transgenic tobacco producing glycine betaine, *J. Experimental Botany* **51**, 177-185.
13. Sakamoto, A. and N. Murata (2002), The role of glycine betaine in the protection of plants from stress: clues from transgenic plants, *Plant, Cell and Environment* **25**, 163-171.
14. Renard, J. M., R. Spagnoli, C. Mazier, M. F. Salles, and E. Mandine (1988), Evidence that monoclonal antibody production kinetics is related to the integral of viable cells in batch systems, *Biotechnol. Lett.* **10**, 91-96.