

# 유전자재조합 CHO 세포에서 Histone Deacetylase Inhibitor를 이용한 Albumin-erythropoietin 생산성 증진

김수진, 서준석, 최성훈, 차현명, 임진혁, 신수아, 신연경, 김동일\*

## Enhanced Production of Albumin-erythropoietin by Histone Deacetylase Inhibitors in Recombinant CHO Cells

Su-Jin Kim, Joon-Serk Seo, Sung-Hun Choi, Hyun-Myoung Cha, Jin-Hyuk Lim, Soo-Ah Shin, Yeon-Kyeong Shin, and Dong-II Kim\*

Received: 5 January 2015 / Accepted: 25 February 2015

© 2015 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

**Abstract:** Chinese hamster ovary (CHO) cells are the most widely used mammalian host for the commercial production of recombinant proteins. However, they show relatively low yields of recombinant proteins in comparison with microbial cells. Various strategies have been tried to overcome this drawback. The acetyl moieties are attached to the N-terminus of histone by histone acetyltransferase (HAT) while histone deacetylase (HDAC) removes histone-bound acetyl groups. HDAC inhibitor (HDACi), such as sodium butyrate, sodium propionate and valproic acid, can enhance specific productivity of CHO cells. Human albumin-erythropoietin (Alb-EPO) is a novel 105 kDa protein comprising recombinant human EPO fused to human albumin. In this study, we examined the effects of HDACi on the production of Alb-EPO in CHO cells with various concentrations in the range of 0-1 mM. The results showed that sodium butyrate was found to be the best HDACi for enhancing productivity. It enhanced not only the production of Alb-EPO but also the apoptosis of recombinant CHO cells.

**Keywords:** Chinese hamster ovary cells, Histone deacetylase inhibitor, Albumin-EPO, Cell death

### 1. INTRODUCTION

동물세포 배양으로 단백질을 생산하는 경우 숙주세포로 유전자 조작된 CHO 세포가 가장 널리 이용된다. CHO 세포는 소아마비, 헤르페스, B형 간염, 독감 바이러스 그리고 HIV 등이 쉽게 증식하지 않으며, 목적 유전자만을 증폭하여 대상 단백질만을 과발현시킬 수 있는 dihydrofolate reductase (DHFR) 시스템을 보유하고 있고, 현탁배양이 용이하여 생산성을 높이기 쉬운 장점을 가진다 [1]. 또한 단백질에 추가되는 당쇄의 합성이나 구조가 인체 내에서의 특성과 유사하여 천연 단백질과 유사한 단백질을 생산할 수 있다.

하지만 CHO 세포를 이용하여 유전자 재조합 단백질을 대량 생산하기 위해서는 규모가 큰 세포배양기가 필요하게 되므로 대부분의 경우 제한을 받게 된다 [2]. 소규모 시설에서 생산성을 증진시키기 위해 시간에 따른 integral viable cell density (IVCD)와 생산성 (Qp)의 증가에 따른 연구들이 진행되고 있으며, 그중 하나로 유전자의 발현 조절에 중요한 히스톤 아세틸화 기작을 들 수 있다.

포유류 세포에 있는 genomic DNA의 3-5%의 cytosine은 5-methylcytosine 형태로, 그 중 대략 70%가 CpG 염기 상에 존재한다 [3]. 히스톤 octamer가 코어를 형성하며, 주위로 이중나선구조의 DNA가 감겨 nucleosome을 구성한다. DNA hypermethylation은 주로 특정한 유전자의 프로모터에서 일어난다. 과메틸화에 의해 생성되는 methyl cytosine은 전사인자가 결합하는 것을 억제하게 된다. Histone acetyltransferase (HAT)와 histone deacetylase (HDAC)는 히스톤 아세틸화에

인하대학교 공과대학 생물공학과  
Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea  
Tel: +82-32-860-7515, Fax: +82-32-872-4046  
e-mail: kimdi@inha.ac.kr

관여하는 효소들로 특정한 유전자의 프로모터에 CpG가 메틸화 되면, 그 DNA의 헬릭스를 열어서 유전자의 발현을 돕는 히스톤의 아세틸 그룹을 떼어내기 위해 HDAC가 메틸화 DNA 결합 단백질에 결합한다. HDAC가 히스톤에 결합한 아세틸 그룹을 떼어내고 나면, 이 메틸화 DNA 결합 단백질에 HMT (histone methyltransferase)가 결합하게 된다. 결합한 HMT는 메틸 그룹을 히스톤에 연결시킴으로써, HMT-methyl 그룹 복합체를 형성한다. 이로써 그 유전자의 프로모터를 억제시키는 구조를 가지게 된다.

Histone deacetylase inhibitor (HDACi)를 첨가할 경우 이러한 기작을 방해하여 Qp의 증진이 가능하며, HDACi에는 sodium butyrate, valproic acid, sodium propionate, trichostatin A, trapoxin, depudecin, oxamflatin, MS-27-275 등이 알려져 있다. 이 중에서도 sodium butyrate는 동물세포배양에서 단백질 발현을 증가시키기 위해 가장 많이 사용되며, 특히 CHO 세포에서 erythropoietin (EPO), 성장호르몬, 항체, 인터루킨-2 등을 생산할 때 흔히 사용된다. Sodium butyrate는 미국 식품의약품안전청 (FDA)의 허가를 받은 제품이지만, 상대적으로 비싼 단가와 이를 사용하였을 때 생성물의 품질의 변화가 문제가 된다 [4]. Sodium propionate는 sodium butyrate와 함께 alkanolic acid 계열의 물질로 혈액 응고인자를 생산하는 형질 전환 CHO 세포에 첨가할 경우 단백질 발현이 크게 증가된다. Sodium butyrate에 비해서 세포주에 미치는 독성이 약한 반면 세포주에 따라서 세포 사멸 정도의 차이가 크다는 특징을 가지고 있다 [5]. Valproic acid는 DG-44 세포주의 단백질 발현을 크게 증가시키는 것으로 알려져 있다. 또한 가격 면에서 sodium butyrate보다 5배 이상 저렴한 장점도 있다 [6].

HDACi의 첨가는 세포사를 유발한다. 세포사는 일반적으로 체계적인 분자 신호 전달 체계에 의해 매개되는 programmed cell death (PCD)와 분자 신호 전달 과정이 없이 급격하게 이루어지는 necrosis 두 형태로 구별한다. Apoptosis는 세포의 조절된 죽음으로 복잡한 과정이다. 초기에는 염색소 응축과 세포막 안쪽으로 노출되는 phosphatidylserine 막지질이 세포막 바깥쪽으로 노출이 된다. 또한 세포막의 blebbing 현상과 함께 DNase 활성에 의해 조각난 DNA와 세포질 일부를 포함하는 apoptotic body로 분열된다. Apoptotic body는 주변의 phagocyte 면역 세포에 의해 제거되어 세포 내 항원 물질이 세포 밖으로 새어나오지 않기 때문에 염증반응에 의한 주변 세포의 피해를 최소화 시킨다 [7]. Necrosis는 과도한 세포 독성이나 지속적인 환경 스트레스로 인해 유발되는 비가역적 세포사로서 apoptosis나 autophagy와 달리 세포에너지를 사용하지 않는다. 세포 사멸시, 부피의 증가로 세포막과 함께 lysosome 막 구조가 허물어져 산성 가수분해 효소가 세포질로 흘러들게 된다. 이는 세포 내 항원 물질이 그대로 흘러나와 면역 시스템에 의한 염증반응으로 인하여 주변 세포에 피해를 주게 된다.

EPO는 적혈구 형성 과정을 조절하는 주된 사이토카인으로 적혈구 생성은 단일 막관통 수용체와 EPO 간의 상호작용에 의존한다. 인간 EPO (hEPO)는 분자량이 34~36 kDa이며

아미노산 166개로 구성된 당단백질로 구조적으로 Ser 126에 1개의 O-linked 당쇄와 Asn 24, 38, 83에 3개의 N-linked 당쇄를 포함하고 있다 [8]. 특히 N-linked 당쇄는 EPO의 대사와 관련되어 생물학적 활성에 결정적인 영향을 미치며, 당쇄가 전체 분자량의 40% 정도로 생체 내 활성 및 안정성에 중요한 역할을 한다 [9]. EPO의 경우 1주일에 3번 피하주사로 투여하여야 하는데 이러한 문제 해결을 위해 체내 약동학적 특성과 반감기를 고려하여 최근에는 큰 분자량을 가지는 화합물을 EPO에 융합하는 과정을 통해 체내 반감기를 조절하려는 연구가 진행되고 있다. 이와 같은 연구의 일환으로 알부민 융합 기술이 있다. 알부민 융합은 단백질의 생산에 있어서 연장된 체내 반감기의 장점을 가지는 간단하고 유연한 기술이다. 인간 알부민은 가장 일반적인 혈청 단백질로 특이적으로 19일에 이르는 긴 반감기를 포함하는 drug-design platform으로 이상적인 물질이다. 이 기술을 이용하여 얻어지는 albumin-erythropoietin (Alb-EPO)은 hEPO에 인간 알부민을 융합시킨 105 kDa의 단백질로 연장된 반감기, 향상된 약동학적 특성, 1회 투여시 요구되는 약물 감소와 같은 이점을 부여한다.

본 연구에서는 Alb-EPO를 생산하는 형질전환된 CHO 세포에 HDACi인 sodium butyrate, sodium propionate, valproic acid를 각 농도 별로 처리하였을 때 세포의 증식과 생산성에 미치는 영향을 알아보려고 하였다. 또한 HDACi 첨가는 apoptosis로 인한 세포사멸을 유도하게 되는데, 또 다른 세포 사멸인 necrosis와 함께 생존도의 변화를 확인하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 세포주

본 연구에 사용된 세포는 Alb-EPO를 생산하는 형질전환 CHO 세포주이다. DHFR 유전자와 hEPO와 인간 알부민이 융합된 유전자가 같이 coding되어 있는 벡터를 이용하여 DHFR-deficient CHO 세포주인 DUKX-B11 (ATCC CRL-9096)에 도입하였다. Alb-EPO를 생산하는 형질전환 CHO 세포주는 MTX를 이용한 유전자 증폭법을 사용하여 고발현주를 선별하였다.

### 2.2. 세포배양

세포배양에 사용된 배지는 ProCHO5 (Lonza, Belgium)이며, 125-mL Erlenmeyer 플라스크에 20 mL씩 배지를 분주한 후에  $3 \times 10^5$  cells/mL와 4 mM GlutaMax (Gibco BRL, USA), 400 nM의 MTX를 첨가하였다. 배양은 orbital shaker에서 100 rpm으로, 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 37°C humidified CO<sub>2</sub> 배양기 (Sanyo Electric Co., Japan)에서 유지하였다. 계대배양은 3일 간격으로 수행하였다.

### 2.3. Histone deacetylase inhibitor (HDACi)

ProCHO5 배지에 선별한 3가지 HDACi인 sodium butyrate,

sodium propionate, valproic acid를 녹인 후, 0.22 mm syringe filter를 사용하여 여과하였다. HDACi를 첨가하지 않은 대조군의 경우에 Alb-EPO의 생산성이 4일차 이후에 급격히 증가하는 것을 확인하여, 4일이 지난 배양 세포에 첨가해 주었다. 각각의 HDACi는 0~1 mM에서 선별 실험을 진행하였다.

#### 2.4. 세포 수 및 생존도 측정

CHO 세포 배양액을 125-mL Erlenmeyer 플라스크에서 취한 후 trypan blue (Lifetechnology, USA) 염료를 이용한 염색과 현미경을 사용하여 hemocytometer에서 세포 수와 생존도를 확인하였다.

#### 2.5. Alb-EPO 정량분석

배양액 내의 Alb-EPO의 정량분석을 위하여 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)를 수행하였다. 125-mL Erlenmeyer 플라스크에서 배양한 CHO 세포의 배양액은 -20°C에서 보관하였다. Goat anti-human albumin antibody (Abcam, USA)와 peroxidase-labeled goat anti-human albumin (Abcam, USA)를 각각 first와 second antibody로 사용하여 sandwich ELISA를 수행하였고, 발색반응을 위한 기질로는 ABTS peroxidase substrate (KPL, USA)를 사용하였다. 발색정도는 405 nm에서 흡광도를 측정하였고, 표준물질로는 인간 혈청 알부민 (Abcam, USA)을 사용하였다. 분석에 사용된 버퍼의 조성은 Table 1에 정리하였다.

#### 2.6. Metabolite assay

배양액 내의 glucose와 lactate의 함량의 측정을 위해서 HPLC를 사용하였다. 사용된 HPLC 시스템은 영인 펌프 (model 910)와 refractive index (RI) detector를 사용하였다. 컬럼은 Shodex사의 Sugar SH1011 컬럼 (8.0 × 300 mm)을 이용하였고, 이동상으로는 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 사용하여 0.6 mL/min의 유속으로 60°C 오븐 조건에서 분석하였다.

#### 2.7. Cell cycle assay

Alb-EPO를 생산하는 형질전환 된 CHO 세포의 세포 주기 분석을 위해서, 우선 배양 후 얻은 1.0×10<sup>6</sup> 세포를 phosphate buffered saline (PBS)로 1회 세척하였다. 세척한 세포를 30% PBS와 70% 에탄올이 포함된 수용액으로 반응시켜 세포막을 용해하였다. 1,300 rpm에서 3분간 원심분리를 통해 세포

를 모아 상층액은 버리고 1 mM EDTA가 첨가된 1 mL PBS를 넣은 후, RNase를 5 mL 첨가한 후 37°C에서 1시간 반응시켰다. Propidium iodide (Sigma, USA)를 10 mL 넣고 15분간 암반응 후 FACSCalibur (Becton Dickinson, USA)를 이용하여 분석하였다. 분석 프로그램으로는 CellQuest software (Becton Dickinson, USA)를 사용하여 세포 주기에 따른 DNA 함량을 확인하였다.

#### 2.8. Cell death assay: Apoptosis/Necrosis

HDACi에 의한 Alb-EPO를 생산하는 CHO 세포의 사멸을 확인하기 위해, 배양 후 얻은 1.0 × 10<sup>6</sup> cells/mL 세포를 PBS로 2회 세척하였다. Calcium binding 버퍼를 100 mL 씩 넣은 후, annexin V-PE (Becton Dickinson, USA)와 propidium iodide를 5:1 씩 넣어 상온에서 15분간 암반응시켰다. 분석을 위해서는 FACSCalibur와 CellQuest software를 이용하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. Sodium butyrate가 미치는 영향

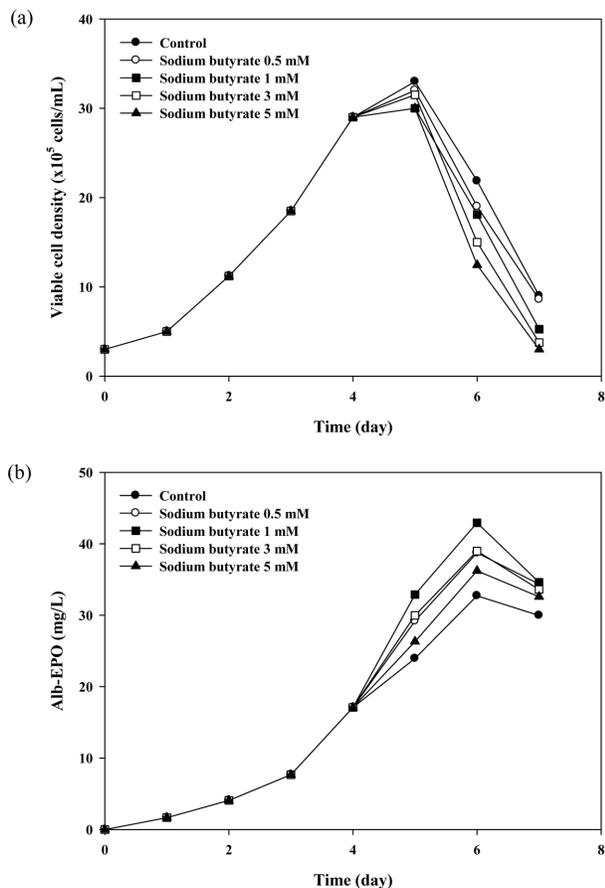
Sodium butyrate는 단백질의 생산성을 높이는데 사용되는 대표적인 HDACi로서 최적 농도를 결정하기 위하여 0.5, 1, 3, 5 mM의 농도로 세포의 생산성이 증가되는 시점인 배양 4일차에 첨가하였다. 시간 변화에 따른 Alb-EPO의 생산을 확인하기 위해 viable cell density (VCD)와 단백질 생산을 측정하였다.

대조군의 경우 배양 5일차에 최대 VCD가 3.3 × 10<sup>6</sup> cells/mL에 도달하였다. 하지만 배양 5일 이후 급격히 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 보통의 용합 단백질에서 나타나는 양상으로, 비교적 짧은 세포주기를 보인다. Sodium butyrate를 각각의 농도로 처리한 결과, 대조군과 비교해서 VCD는 농도에 따라 낮아짐을 확인할 수 있었다. 특히 6일차에 대조군의 2.2 × 10<sup>6</sup> cells/mL에 비해 0.5 및 5 mM 처리시 1.9 × 10<sup>6</sup>과 1.2 × 10<sup>7</sup> cells/mL로 감소하였다. 가장 높은 VCD를 보인 sodium butyrate 농도는 0.5 mM 이지만, 생산성에서는 1 mM에서 가장 높은 결과를 나타냄을 확인할 수 있었다 (Fig. 1(a)).

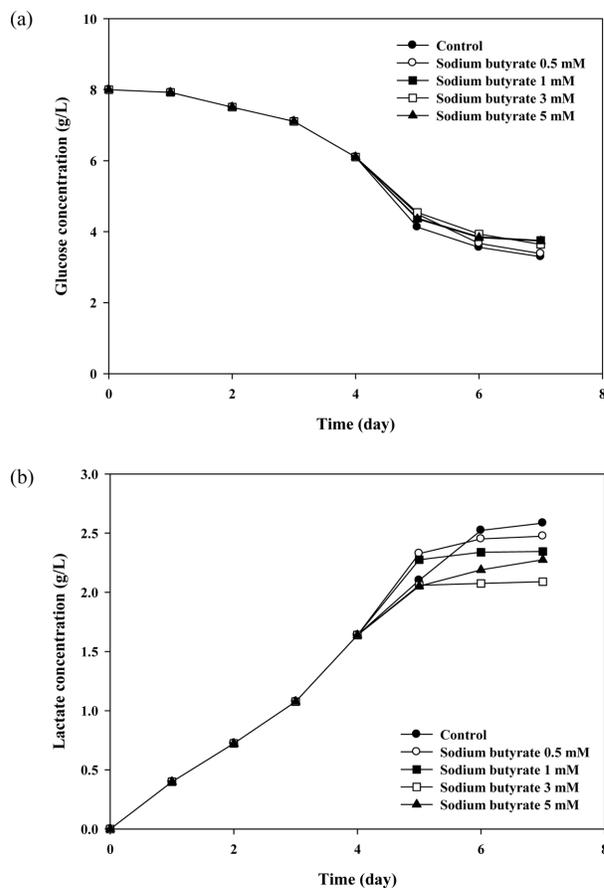
배양환경에서 중요한 인자 중 하나로 대사물질을 들 수 있다. 동물세포는 배양 중에 glucose와 glutamine의 소비로 lactate와 암모니아와 같은 독성물질을 배출하게 되는데, 이로 인해 세포의 성장 저해 현상과, 단백질 생산성 및 품질 저하 문제와 함께 심할 경우 세포의 사멸이 유발되는 문제를 가지고 있다. 배지 내 glutamine 성분이 암모니아로 자연 분해될 경우 암모니아 축적 문제가 가중된다. 또한 탄소원인 glucose 사용으로 lactate 축적이 배양액의 pH를 저하시켜 비교적 좁은 pH 범위 내에서 최적의 생산을 위한 동물세포 배양에 있어 문제가 된다. Sodium butyrate를 처리할 경우 glucose 소모는 대조군과 유사한 결과를 보였다. Lactate의 경우에는 배양 5일차에서는 대조군보다 높은 농도로 생성되지만, 6일차 이후는 대조군에 비해서 낮은 농도로 축적됨을 확인할 수

**Table 1.** Buffer composition for ELISA

Buffer	Composition
Coating buffer	1.59 g/L Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 2.93 g/L NaHCO <sub>3</sub> , pH 9.6
PBS	8.0 g/L NaCl, 0.2 g/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1.15 g/L Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0.2 g/L KCl pH 7.4
Blocking buffer	5% skim milk in PBS
Washing buffer	0.05% tween20 in PBS
Assay buffer	1% skim milk in PBST



**Fig. 1.** Effect of sodium butyrate on (a) viable cell density and (b) Alb-EPO production. Cell were initially cultivated at no-addition (control, ●) for 4 day and then cultivated at 0.5 mM (○), 1 mM (■), 3 mM (□), 5 mM (▲) of sodium butyrate addition.



**Fig. 2.** Effect of sodium butyrate on (a) glucose concentration and (b) lactate concentration. Cell were initially cultivated at no-addition (control, ●) for 4 day and then cultivated at 0.5 mM (○), 1 mM (■), 3 mM (□), 5 mM (▲) of sodium butyrate addition.

있었다. 따라서 Fig. 2에서 볼 수 있듯이 sodium butyrate 처리가 lactate 축적을 줄일 수 있었다.

대조군에서 최대 생산량은 6일차에 32.7 mg/L로, sodium butyrate를 첨가한 경우 역시 6일차에서 최대 생산량을 보였다. 네 가지 농도 모두 대조군에 비해서 더 높은 생산량을 보였으며, 이는 배양이 종료되는 시점까지도 같은 양상을 보였다. 그 중에서도 1 mM에서 42.9 mg/L의 최대 생산량을 확인할 수 있었다. 0.5 mM과 3 mM에서는 비슷한 양을 보였으며, 5 mM의 경우 대조군에 비해서는 높은 생산량을 보이지만 농도 구배에 있어서는 36.2 mg/L로 상대적으로 낮은 수치

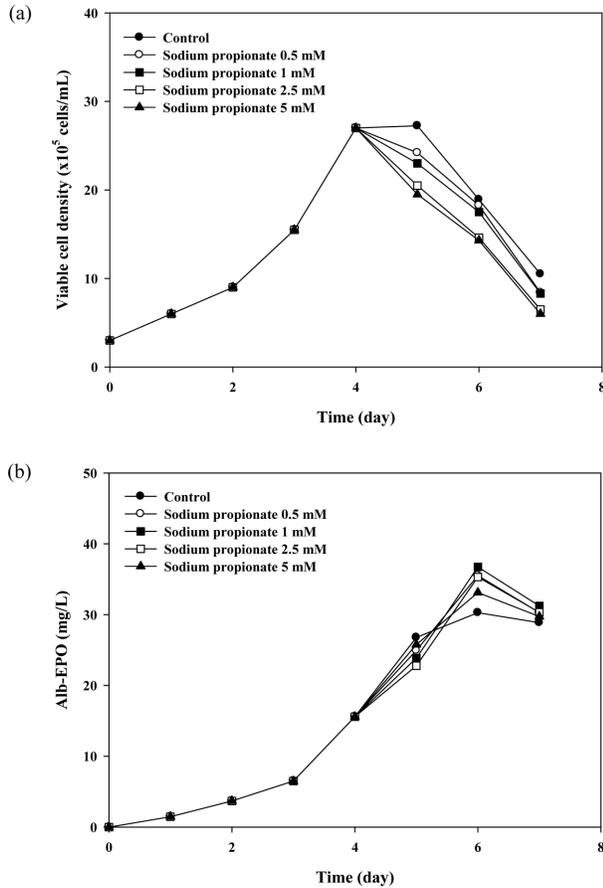
를 보였다 (Fig. 1(b)). 이를 Table 2에 정리한 것과 같이 비생산성으로 확인해 본 결과 대조군에 비해 1.7배 향상된 결과를 나타내었다.

### 3.2. Sodium propionate가 미치는 영향

Sodium propionate는 sodium butyrate와 같은 alkanolic acid 계열이지만 sodium butyrate에 비해 낮은 단가이면서 세포의 사멸에 비교적 영향을 미치지 않는다고 알려져 있다 [10]. 최적 농도를 결정하기 위하여 0.5, 1, 2.5, 5 mM의 농도를 비교 실험하였다.

**Table 2.** Comparison of specific productivity for 3 type HDACi in growth period

Parameter	Sodium butyrate 1 mM	Sodium propionate 1 mM	Valproic acid 250 mM
Growth days (days)		7	
Initial viable cell density ( $\times 10^5$ cells/mL)		3.0	
Maximum viable cell density ( $\times 10^5$ cells/mL)	30.0	27.0	32
Maximum Alb-EPO concentration (mg/L)	42.9	36.7	42.3
Specific productivity ( $Q_p$ , $\mu\text{g}/10^5$ cells/day)	0.54	0.48	0.42

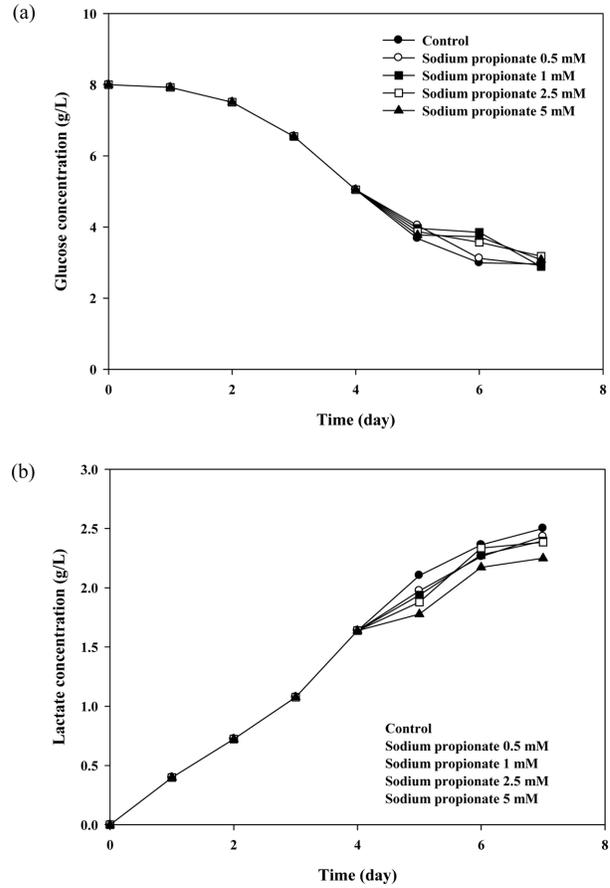


**Fig. 3.** Effect of sodium propionate on (a) viable cell density and (b) Alb-EPO production. Cell were initially cultivated at no-addition (control, ●) for 4 day and then cultivated at 0.5 mM (○), 1 mM (■), 3 mM (□), 5 mM (▲) of sodium butyrate addition.

대조군의 경우 5일차에 최대 VCD인  $2.2 \times 10^6$  cells/인 것을 확인할 수 있었다. Sodium propionate를 농도에 따라 첨가한 결과, 배양 4일차에 첨가한 이후 VCD가 농도에 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 sodium butyrate를 첨가하였을 때 VCD가 배양 6일차에 감소한 결과에 비해서 빠르게 세포사멸이 일어남을 볼 수 있다. Sodium propionate 처리에 있어 최대 VCD를 보인 농도는 0.5 mM 이지만, 1 mM 에서 최대 생산성을 보였다 (Fig. 3(a)).

Glucose 소모는 1 mM에서 가장 적었다. 또한 lactate 축적도 대조군에 비해서 낮은 것을 확인할 수 있었는데 (Fig. 4), 이는 sodium propionate 첨가로 인한 세포 사멸에 의한 VCD가 낮은 이유 때문으로 사료된다.

Alb-EPO의 생산성은 대조군과 sodium propionate 첨가배양 모두에서 6일차에서 최대값을 보였다. 6일차에서 대조군의 경우 30.3 mg/L에 비해 1 mM에서 36.7 mg/L의 최대 생산성을 보였다. 하지만 특이적으로 sodium propionate를 처리한 후 5일차에서는 생산성이 오히려 대조군에 비해서 낮은 것을 확인할 수 있었다. 5일차에서는 대조군의 경우 26.7



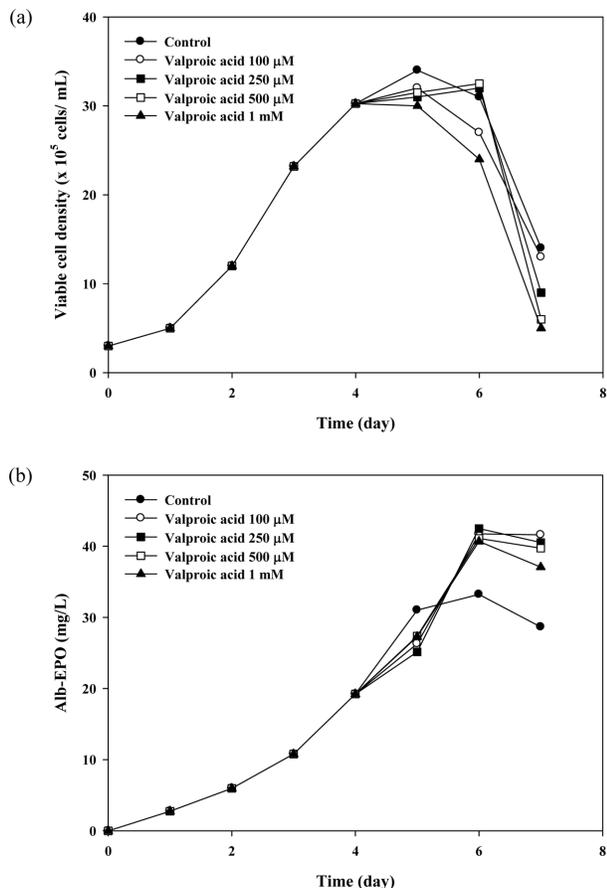
**Fig. 4.** Effect of sodium propionate on (a) glucose concentration and (b) lactate concentration. Cell were initially cultivated at no-addition (control, ●) for 4 day and then cultivated at 0.5 mM (○), 1 mM (■), 3 mM (□), 5 mM (▲) of sodium butyrate addition.

mg/L, 1 mM 첨가한 경우 23.8 mg/L로, Fig. 2(b)의 sodium butyrate 결과와는 다른 양상을 보였다. 이를 비 생산성(specific productivity)으로 확인해 본 결과 대조군에 비해 1.5배 향상된 결과를 보였다 (Table 2).

### 3.3. Valproic acid 농도에 따른 영향

Valproic acid는 FDA로부터 항경련제로 허가를 받았고, sodium butyrate에 비해서 비용 효율이 높다. HDACi로서 DUKX-B11에 비해 DG-44에 형질전환 된 세포주의 단백질 발현을 약 2배 정도 증가시킨다. Valproic acid를 DG-44에 처리할 경우 최적화된 농도는 500 mM이라고 보고되었다. 또한 항체 생산에 있어서 sodium butyrate를 처리한 배양에 비해서 비 생산성이 2배 높은 결과를 보이기도 하였다. 따라서 최적 농도 결정을 위해서 100, 250, 500 mM, 1 mM의 농도로 처리하고 하루에 한 번씩 배양액을 회수하여 분석하였다.

대조군이 5일차에서 최대 VCD를 보이는 반면, valproic acid를 처리한 경우 250, 500 M에서는 6일차 이후 VCD가 감소하는 것을 볼 수 있다. 7일차에서는 valproic acid를 처리한



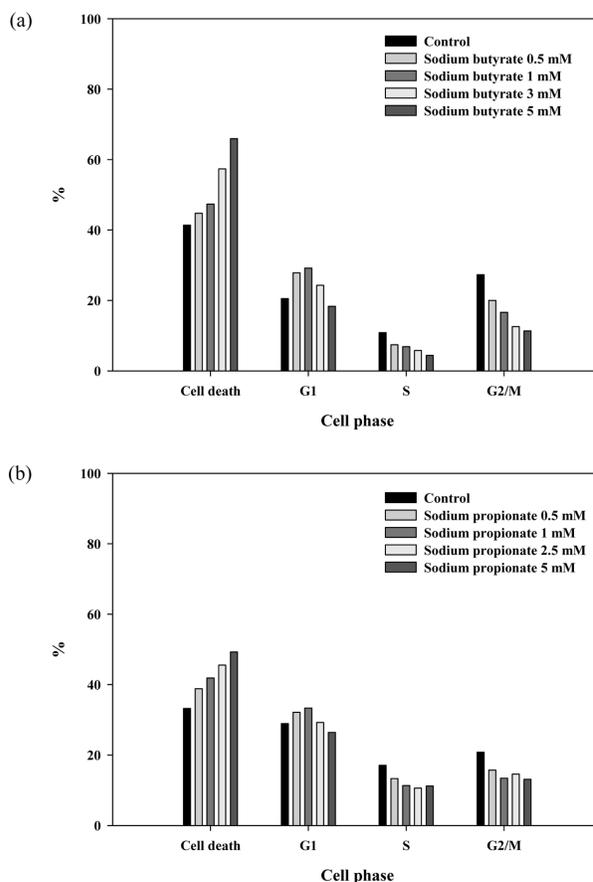
**Fig. 5.** Effect of valproic acid on (a) viable cell density and (b) Alb-EPO production. Cell were initially cultivated at no-addition (control, ●) for 4 day and then cultivated at 100 μM (○), 250 μM (■), 500 μM (□), 1 mM (▲) of valproic acid addition.

경우 모두 대조군보다 낮은 VCD를 확인할 수 있었다 (Fig. 5(a)). Valproic acid를 첨가한 경우 생산성을 보면, sodium propionate와 유사하게 4일차에 처리한 이후, 5일차에서는 대조군에 비해서 생산성이 낮지만, 6일차에서 급격히 증가함을 볼 수 있었다.

Alb-EPO의 생산량은 대조군과 valproic acid 첨가배양 모두에서 6일차에서 최대값을 보였다. 배양 6일차에서 대조군의 경우 33.2 mg/L의 생산량을 보인 반면, 모든 실험군에서 대조군에 비해 7.5 mg/L 더 높은 생산량을 보였다. 250 μM을 첨가한 경우에 42.48 mg/L의 최대 생산량을 확인할 수 있었다 (Fig. 5(b)). 이를 비 생산성으로 확인해 본 결과 대조군에 비해 1.4배 향상된 결과를 확인하였다 (Table 2).

### 3.4. Sodium butyrate와 sodium propionate가 세포 주기에 미치는 영향

생산성 측면에서 상대적으로 좋은 결과를 보인 sodium butyrate와 sodium propionate가 세포주기에 미치는 영향을 비교해 보았다. Sodium butyrate가 존재하면 단백질의 생산량과



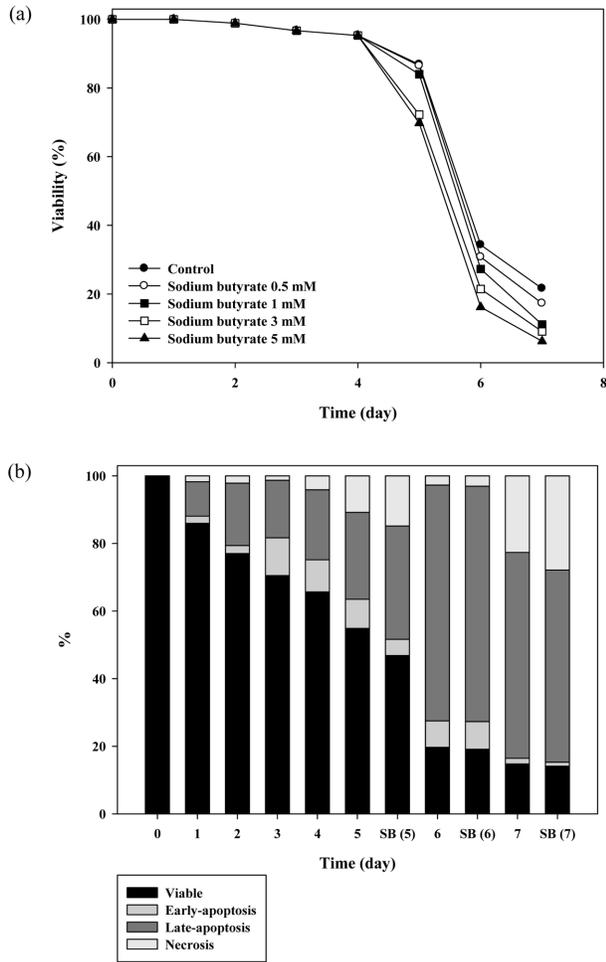
**Fig. 6.** Effect of sodium butyrate and sodium propionate on cell cycle at day 5. (a) sodium butyrate and (b) sodium propionate.

관련 있는 G1기의 경우, 1 mM의 sodium butyrate를 처리할 경우 대조군에 비하여 1.4배 정도 높은 결과를 보였다. Sodium propionate를 1 mM로 첨가하는 경우 대조군에 비해 가장 높게 G1기에 정체가 되었다. 이러한 결과는 정량분석을 통한 Alb-EPO 생산량을 보았을 때, 같은 양상을 보이는 것을 알 수 있다. 이로써 세포주기 분석을 통한 G1기의 정체는 생산량에 영향을 미치는 농도를 선별하는데도 이용 가능하다 (Fig. 6).

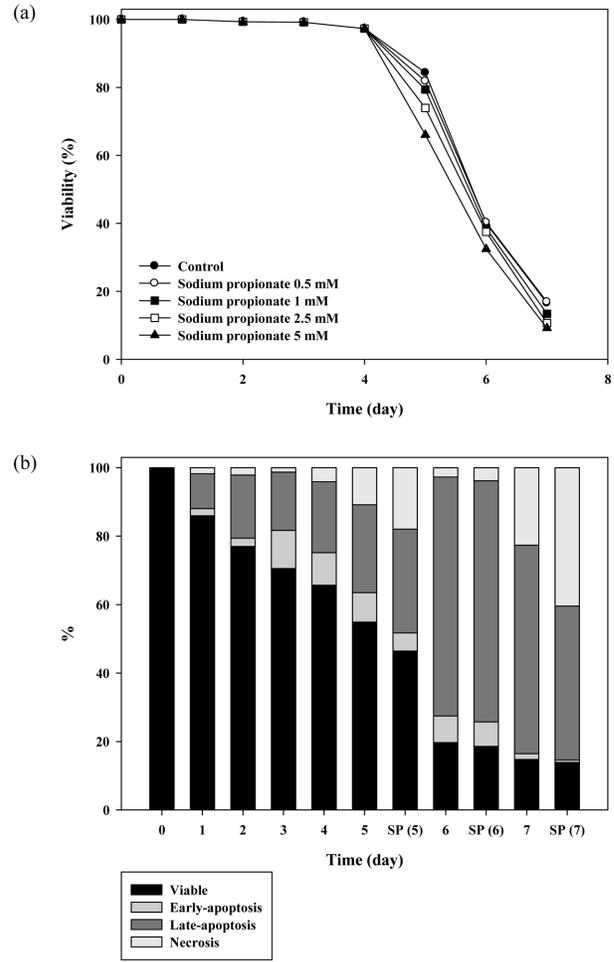
두 가지 HDACi 첨가물 모두 세포 사멸을 유도함을 알 수 있었다. 대조군에서 세포 사멸이 가장 적고, 첨가 농도가 높을수록 세포 사멸에 정체가 현저함을 알 수 있었다.

### 3.5 Sodium butyrate와 sodium propionate가 세포 사멸에 미치는 영향

세포의 사멸을 크게 apoptosis와 necrosis로 나누어서 확인하기 위해서 최대 생산성을 보인 sodium butyrate 및 sodium propionate 각각 1 mM 조건을 선택하였다. Sodium butyrate와 sodium propionate를 배양 4일차에 첨가한 후, 6일차에는 두 가지 배양에서 late-apoptosis가 급격히 증가하였다 (Figs. 7, 8). 전체적으로 apoptosis는 배양이 진행될수록 급격히 증가하지만, 배양 7일차에서는 early-apoptosis의 감소와 함께 apopto-



**Fig. 7.** Effect of sodium butyrate on (a) viability (b) cell death: apoptosis, necrosis. Cell were initially cultivated at no-addition (control, ●) for 4 day and then cultivated at 0.5 mM (○), 1 mM (■), 3 mM (□), 5 mM (▲) of sodium butyrate addition.



**Fig. 8.** Effect of sodium propionate on (a) viability (b) cell death: apoptosis, necrosis. Cell were initially cultivated at no-addition (control, ●) for 4 day and then cultivated at 0.5 mM (○), 1 mM (■), 3 mM (□), 5 mM (▲) of sodium butyrate addition.

sis는 다소 줄어들고, necrosis가 증가함을 알 수 있었다. 또한, 생존도도 배양 5일차 이후에 확연히 줄어드는 것은 trypan blue로 확인한 결과와 같은 경향을 보인다. 따라서 sodium propionate보다 sodium butyrate가 더 apoptosis를 유발함을 확인할 수 있었다.

**4. CONCLUSION**

Alb-EPO를 생산하는 형질전환 CHO 세포를 무혈청배지에서 세포의 생존도 및 생산성에 적절한 MTX 농도로 유전자 증폭이 가능하도록 하였다. 이를 교반기를 이용하여 최적의 100 rpm으로 교반속도를 선택하였다.

효율적인 Alb-EPO의 생산성 증대를 위해 histone deacetylase inhibition 기작을 이용하였다. HDACi인 sodium butyrate, sodium propionate 그리고 valproic acid를 이용해서 전사의

억제를 막아, 단백질의 생산성과의 연관성을 확인하였다. 이를 위해 0-1 mM 농도의 HDACi를 세포의 생산성이 증가하는 배양 4일차에 첨가하였다. 3가지 물질 중 최대 생산량은 1 mM sodium butyrate에서 42.9 mg/L였으며 대조군과 대비하여 비 생산성은 1.7배 증가하였다. Alb-EPO의 생산성 증대를 유전자 수준에서 확인하기 위해, 세포 주기를 분석하였다. G1기에서 단백질의 합성이 이루어지게 되어, G1기에 오래 머무르는 세포의 경우 생산성이 높아짐을 확인해 보았다. HDACi는 세포의 apoptosis를 유발하게 되는데, 이를 necrosis와 비교 확인해 보았다. 배양 6일차에서 가장 높은 apoptosis가 일어남을 확인할 수 있었고, 배양 7일차에선 early-apoptosis의 감소와 함께 apoptosis는 다소 줄어들고, necrosis의 정도가 늘어난 것을 볼 수 있다. 또한, 생존도도 배양 5일차 이후에 확연히 줄어드는 것을 보아서, 이는 trypan blue로 확인한 결과와 같은 경향을 보인다. Alb-EPO를 생산하는 CHO 세포에 HDACi를 첨가할 경우 배양 6일차에서 가장 높은 생산성을

확인할 수 있는 반면, 세포의 사멸이 대조군에 비해 빠르게 일어나는 문제를 가짐을 확인하였다. 세포의 apoptosis를 막아줄 수 있는 anti-apoptosis 유전자인 bcl-2를 도입하거나 anti-apoptotic agent를 이용할 경우, 세포의 생산성이 더 증가될 것으로 판단된다.

### Acknowledgements

이 논문은 2014년도 산업통상자원부의 지식경제 기술혁신 사업비 지원 (No. 10048311)으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

### REFERENCES

- Hacker, D. L., M. De Jesus, and F. M. Wurm (2009) 25 years of recombinant proteins from reactor-grown cells: Where do we go from here? *Biotechnol. Adv.* 27: 1023-1027.
- Dingermann, T. (2008) Recombinant therapeutic proteins: Production platforms and challenges. *Biotechnol. J.* 3: 90-97.
- Ehrlich, M., M. A. Gama-Sosa, L. H. Huang, R. M. Midgett, K. C. Kuo, R. A. McCune, and C. Gehrke (1982) Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues or cells. *Nucleic Acids Res.* 10: 2709-2721.
- Crowell, C. K., Q. Qin, G. E. Grampp, R. A. Radcliffe, G. N. Rogers, and R. I. Scheinman (2008) Sodium butyrate alters erythropoietin glycosylation via multiple mechanisms. *Biotechnol. Bioeng.* 99: 201-213.
- Yoon, S. K. and Y. H. Ahn (2007) Application of sodium propionate to the suspension culture of Chinese hamster ovary cells for enhanced production of follicle-stimulating hormone. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 12: 497-501.
- Backliwal, G., M. Hildinger, I. Kuettel, F. Delegrange, D. L. Hacker, and F. M. Wurm (2008) Valproic acid: A viable alternative to sodium butyrate for enhancing protein expression in mammalian cell cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 101: 182-189.
- Arden, N. and M. J. Betenbaugh (2004) Life and death in mammalian cell culture: Strategies for apoptosis inhibition. *Trends Biotechnol.* 22: 174-180.
- Joung, C. H., J. Y. Shin, J. K. Koo, J. J. Lim, J. S. Wang, S. J. Lee, H. K. Tan, S. L. Kim, and S. M. Lim (2009) Production and characterization of long-acting recombinant human albumin-EPO fusion protein expressed in CHO cell. *Protein Expr. Purif.* 68: 137-145.
- Durocher, Y. and M. Butler (2009) Expression systems for therapeutic glycoprotein production. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20: 700-707.
- Fike, R. (2010) Nutrient supplementation strategies for biopharmaceutical production, Part 3. *Bioproc. International* 8: 24-31.