

CHO 세포의 2단계 배양을 통한 Albumin-erythropoietin의 시알산 증대

임진혁[†], 신수아[†], 차현명, 김동일*

Enhanced Sialylation of Albumin-erythropoietin by Biphasic Cultivation in CHO Cells

Jin-Hyuk Lim[†], Soo-Ah Shin[†], Hyun-Myoung Cha, and Dong-Il Kim*

Received: 31 August 2016 / Revised: 17 December 2016 / Accepted: 21 December 2016

© 2016 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: In glycoprotein, Terminal sialic acid residues of *N*-linked glycan are imperative things because they prevent the recognition from asialoglycoprotein-receptor that affect the half-life of glycoproteins. So establishment of culture process for enhancing sialic acid is important to maximize sialic acid contents of glycoprotein. In this study, we investigated effects of biphasic culture of Chinese hamster ovary (CHO) cells producing albumin-erythropoietin to increase sialylation. Biphasic cultures were performed with shift of CO₂ concentrations and temperatures at day 5 when viable cell density was decreased and sialidase was started to be released by cell lysis. The examined temperature set points were 33, 35 and 37°C respectively and the CO₂ concentration was 1, 5, 10 and 15%. We confirmed that sialidase activity was the lowest in biphasic culture that was shifted from normal culture condition to 1% of CO₂ and 33°C on day 5. However, the temperature and concentration of CO₂ have little effect on activity of α 2,3-sialyltransferase. Also, sialic acid contents were enhanced 1.13-fold higher than that in control culture. In conclusion, Biphasic cultivation in CHO cells led to inhibition of sialidase activity and increases of sialylated glycan.

Keywords: Albumin-erythropoietin, Biphasic culture, Chinese hamster ovary cells, Glycosylation, Sialidase

[†]These authors contributed equally to this work as the first author.

인하대학교 공과대학 생물공학과
Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 22212, Korea
Tel: +82-32-860-7515, Fax: +82-32-872-4046
e-mail: kimdi@inha.ac.kr

1. INTRODUCTION

Chinese hamster ovary (CHO) 세포는 다양한 장점을 가지는 세포주로 치료용 단백질을 생산하기 위해 널리 이용되고 있다. CHO 세포는 무혈청 배지에서 현탁식 배양이 가능하여 대량의 단백질 생산이 가능하고, 유전자 증폭 기술을 이용하여 높은 단백질 생산성을 가질 수 있다 [1]. 또한, post-translational modification 과정이 가능하여 인간과 유사한 글리칸 (glycan)을 가진 당단백질을 생산할 수 있다. CHO 세포의 유전자 서열을 분석한 결과 glycosylation에 관여하는 유전자의 99% 이상이 인간과 유사하므로 CHO 세포에서 생산된 단백질을 치료제로 사용할 경우 기능이나 면역반응에 문제가 없다 [2].

당단백질의 글리칸 구조는 치료 효능과 조직 분포도, 체내 반감기 등에 큰 영향을 준다 [3]. 따라서, 유전자 조작이나 배양 환경 조절을 통하여 치료 목적에 맞게 최적화된 글리칸을 당단백질에 부착시키는 것이 중요하다. 생물의약품에 대한 연구가 초기에는 단백질의 생산성을 증대시키는데 집중되었지만 최근에는 글리칸과 같은 단백질 효능과 관련된 품질을 향상하는 연구가 집중되고 있다 [4,5]. 글리칸은 여러 종류의 효소들이 순차적으로 작용하여 당단백질에 부착이 된다 [2]. 따라서, 생산 세포주 및 배지 조성, 배양 환경 등 다양한 요소들이 글리칸 생합성에 영향을 주어 비균질한 글리칸이 형성된다 [6]. 생산 세포주의 종류에 따라서 고유의 글리칸 형태를 형성하기 때문에 치료 목적에 맞게 적절한 세포주를 선택하는 것이 중요하다 [7]. 또한, 글리칸 생합성에 관련된 유전자를 결손시키거나 과발현하여 당단백질에 부착되는 글리칸을 최적화할 수 있다. 배양 중 pH, CO₂, 온도 등과 같은 배양 조건을 변경하여 글리칸 형태를 조절하는 방법도 이용되고

었다 [8].

Recombinant human erythropoietin (rhEPO)은 조혈줄기세포를 자극하여 적혈구 세포로 분화시키며 구조적으로 최대 3개의 *N*-글리칸과 1개의 *O*-글리칸을 가지며 글리칸의 차이로 인해 분자량에 차이가 발생한다. rhEPO와 같은 사이토카인의 경우 체내 반감기가 중요한 요소로 글리칸 말단에 존재하는 시알산 (sialic acid)에 의해 조절될 수 있다 [9]. 시알산이 캡핑 (capping)된 글리칸은 갈락토스의 노출을 막아주고, 당단백질이 비시알산당단백질 수용체 (asialoglycoprotein receptor)와 결합하여 분해되는 것을 억제한다 [10]. 그러므로 최대 14개의 시알산이 부착될 수 있는 rhEPO의 글리칸 말단의 시알산 함량을 조절하여 약동학적 특성이나 체내 반감기를 향상시킨 연구가 진행되었다. 시알산 함량을 증가시키기 위해 *N*-acetylmannosamine을 첨가하거나 CMP-sialic acid transporter와 sialyltransferases를 과발현하여 시알산의 부착을 향상시키는 방법이 있다 [11,12].

배양 중 세포의 사멸로 인해 용해 (lysis)가 발생하면 세포 내에 존재하던 sialidase가 배양액으로 방출되어 생산된 당단백질 말단의 시알산을 분해한다 [13,14]. Sialidase는 NEU1, NEU2, NEU3, NEU4가 존재하며 이 중 배양 후반부 세포사멸로 인하여 방출되는 대표적인 것은 NEU1이 있다. 방출된 sialidase는 37°C, pH 5.9에서 최적의 활성을 나타내는 것으로 알려졌다 [15]. 당단백질의 sialidase에 의한 분해를 억제하기 위한 방법으로는 유전자 조작을 통하여 sialidase 발현을 억제하거나 배양 조건을 조절하여 sialidase의 활성을 조절하는 것이 있다 [16]. 이와 같은 방법으로 sialidase로부터 글리칸에 부착된 시알산을 보호하여 당단백질의 시알산 함량을 증가시킬 수 있다. 하지만 이와 같은 유전자를 조작하는 방법은 시간이 오래 소요되는 단점이 있다. 이와 반대로 배양공정을 조절하는 방법은 세포주 개발에 대한 시간 소요를 줄일 수 있다. 하지만 배양공정 조절을 통하여 sialidase를 억제하는 연구는 미비하다.

본 연구에서는 Albumin-erythropoietin (Alb-EPO)을 생산하는 CHO 세포의 2단계 배양 (biphasic culture)을 통하여 sialidase의 활성을 억제함으로써 Alb-EPO의 시알산 함량 증대를 목적으로 하였다. 세포의 사멸로 sialidase가 배양액으로 방출될 가능성이 높은 배양 5일차에 온도와 CO₂의 공급을 조절하여 2단계 배양을 진행하였다. Sialidase의 활성이 가장 낮은 조건을 선정하여 시알산 관련 효소의 유전자 발현 정도와 활성을 측정하고 2단계 배양을 통해 글리칸 말단의 시알산이 증가한 것을 확인하였다.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. 세포주 및 세포배양

실험에 사용한 세포주는 Alb-EPO를 생산하는 CHO DUKX-B11를 사용하였다 [17]. 배양은 125-mL Erlenmeyer flask에 20 mL의 working volume으로 ProCHO5 (Lonza, Verviers, Bel-

gium) 배지를 분주한 후 4 mM glutamine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 첨가하여 진행하였다. 또한 orbital shaker (Vision Scientific Co., Daejeon, Korea)에서 100 rpm과 37°C humidified CO₂ incubator (Sanyo Electric, Osaka, Japan)에서 배양하였다. 초기 세포 접종 농도는 3×10⁵ cells/mL로 배양을 하였다.

배양 중 온도와 CO₂를 조절하는 2단계 배양에서는 0일차에 5% CO₂로 배양을 진행 후 5일차에 온도는 33, 35, 37°C로 CO₂는 1, 5, 10, 15%로 각각 조절하였다.

2.2. 세포 수 및 생존도 측정

배양 중 24시간마다 샘플링을 하여 trypan blue (Sigma-Aldrich)로 염색을 진행 후 광학 현미경 (Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하여 hemocytometer (Superior, Marienfeld, Germany)로 세포 수 및 생존도를 확인하였다.

2.3. 배양 중 생산된 Alb-EPO 정량분석

회수한 배양액을 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)를 이용하여 정량분석 하였다. Sandwich ELISA를 진행하기 위하여 1차 항체로 albumin에 결합하는 goat anti-human albumin antibody (Abcam Inc., Cambridge, MA, USA)와 2차 항체로 peroxidase-labeled goat anti-human albumin antibody (Abcam Inc., USA)를 사용하였다. 항체와 Alb-EPO와의 결합이 완료된 후 기질로 ABTS peroxidase substrate (KPL, Gaithersburg, MD, USA)를 이용하여 발색반응을 진행하였다. 발색 후 Multiskan GO Microplate Spectrophotometer (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)를 이용하여 405 nm에 흡광도를 측정하였다.

2.4. Sialidase 활성 분석

배양액에 존재하는 sialidase를 측정하기 위하여 회수한 배양액을 Neuraminidase assay kit (Abcam Inc., USA)를 사용하여 sialidase의 활성을 측정하였다. 샘플을 assay buffer에 희석 후 NeuroBlue dye stock solution을 첨가하여 37°C에서 60분 동안 암반응을 시켰다. 반응 후 DyNA Quant 200 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)을 이용하여 Ex/Em=365/460 nm에서 측정하였다.

2.5. Sialyltransferase 활성 분석

세포 내의 sialyltransferase 활성을 측정하기 위하여 3, 6, 8일차의 세포를 7×10⁵개 회수하여 PBS로 3회 세척하였다. Protein Extraction Solution (Elpis biotech, Korea)을 이용하여 lysis 반응을 진행한 후 12,500 g에서 원심분리 후 상등액을 회수하였다. 회수한 상등액은 sialyltransferase activity kit (R&D Systems, USA)를 사용하여 메뉴얼에 따라서 실험을 진행하였고 Multiskan GO Microplate Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA)를 이용하여 620 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Table 1. Oligonucleotide primers for detection of mRNAs

mRNA	Sense / antisense sequences	Size (bp)	Annealing temperature (°C)
GAPDH	5'-CCTCTACTGGCGCTGCCAAG-3' 5'-TCCGACGCCTGCTTACCAC-3'	175	57
α 2,3-ST	5'-CAGAAAAACAACCTGGCCGAA-3' 5'-GGCCTGATTGTTCCAGATT-3'	201	57
NEU1	5'-AAGCGATCAAGCAGCGACTA-3' 5'-CCTCAGTTTGAATGCATGGG-3'	65	57

2.6. 역전사 증합효소 연쇄반응 (RT-PCR)과 quantitative RT-PCR

세포를 회수하여 RNeasy PlusMini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 RNA를 추출하였다. RNA를 정량 후 Maxime RT Premix Kit (iNtRon, Seongnam, Korea)를 이용하여 T 100 Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)에서 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA를 이용하여 GAPDH, α 2,3-sialyltransferase (α 2,3-ST), NEU1 유전자를 확인하기 위하여 제작한 primer와 함께 PCR반응을 진행 후 전기영동을 통하여 확인하였다. 사용한 primer의 정보 및 Annealing temperature는 Table 1과 같다.

2.7. Alb-EPO 정제

배양 종료인 8일차에 배양액을 회수하여 원심분리 후 상등액을 회수하였다. Econo-column (Bio-Rad, USA)에 Blue Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) 레진을 충전 시키고 유체를 흘려주었다. Binding buffer는 20 mM sodium phosphate (pH 7.0)를 사용하였고 elution buffer는 20 mM sodium phosphate로 실험을 진행하였다.

2.8. 시알산 함량 분석

시알산 함량을 분석하기 위하여 정제된 Alb-EPO 10 μ g과 10 mM sodium periodate (Sigma-Aldrich, USA)를 20 μ L를 4°C에서 45분간 반응시켰다. 다음 단계로 50 mM sodium thiosulfate (Sigma-Aldrich, USA)를 이용하여 반응을 정지시킨 후 500 μ L와 100 mM acetoacetanilide (Alfa Aesar, Ward Hill, MA, USA) 400 μ L를 첨가하여 상온에서 10분간 반응시켰다. 반응 진행 후 microplate reader (Safire2, Tecan Group Ltd., Maennedorf, Switzerland)를 이용하여 Ex/Em=388/471 nm의 조건에서 확인하였다.

2.9. High-performance liquid chromatography (HPLC)

Alb-EPO의 antennary 구조를 확인하기 위하여 HPLC를 이용하여 분석하였다. 동결 건조한 Alb-EPO 100 μ g을 PNGase F (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) 처리를 하였다. Graphitized carbon columns (Grace Davison Discovery Sciences, Deerfield, IL, USA)을 이용하여 유리화된 N-글리칸만을 정제하여 2-aminobenzamide (2-AB; TCI, Tokyo, Japan)와 반응시켰다. 2-AB labeling 후에 GlycoClean S-cartridge (Prozyme, San Leandro, CA, USA)을 이용하여 N-글리칸을 정제하

고 TSKgel DEAE-5PW column (Tosoh bioscience, Tosoh, Tokyo, Japan)을 사용하여 HPLC 분석을 하였다.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. 2단계 배양에 의한 세포의 viable cell density (VCD), 생존도 및 생산성 확인

CHO 세포배양에 영향을 미치는 가장 큰 요인 중 온도와 CO₂ 농도에 대한 효과를 확인하기 위하여 배양을 진행하였다. 배양 중 CO₂ 농도가 높아지면 배양액의 pH가 낮아지는 효과를 얻을 수 있었다 (data not shown). 낮은 온도와 CO₂ 농도로 배양조건을 변화시킨 각각의 조건에서 8일차의 VCD가 높은 것으로 확인되었다 (Fig. 1(a)). 33°C로 온도를 변화시킨 실험군은 1, 5, 10, 15%의 CO₂ 농도에서 37°C로 배양한 같은 CO₂ 농도의 실험군에 비하여 8일차 VCD가 각각 1.16, 1.29, 1.34, 1.81배 증가한 것을 확인할 수 있었다. 또한 35°C로 온도를 변화시킨 실험군은 각각의 CO₂ 조건에서 37°C로 배양한 실험군에 비하여 1.02, 1.05, 1.36, 1.22배 VCD가 증가한 것을 알 수 있었다. 이를 통하여 같은 CO₂ 농도에서 온도가 감소할수록 VCD가 높아지는 것을 알 수 있었다. 같은 온도의 실험군에서 CO₂ 농도 변화에 따른 VCD를 비교하였을 때 모든 온도에서 CO₂의 농도가 가장 낮은 1% 조건에서 8일차에 VCD가 가장 높게 확인되었다. 5일차 이후 33, 35, 37°C의 온도 조건의 순서로 생존도가 높게 유지되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 1(b)). 또한 같은 온도의 배양 조건에서 CO₂의 값이 낮아질수록 생존도가 5일차 이후 높게 확인되었다. 이를 통하여 33°C 1%의 조건에서 가장 높은 생존도를 확인하였다. 이러한 결과에 따른 생산성을 확인하였다 (Fig. 1(c)). 8일 차의 생산성을 확인한 결과 1, 5, 10, 15%의 CO₂ 농도순서로 33도의 조건에서 30.2 \pm 0.6, 36.4 \pm 2.3, 35.0 \pm 0.8, 28.8 \pm 0.7 mg/L의 생산성을 확인하였으며 35°C와 37°C의 배양조건에서도 같은 CO₂ 농도순서로 29.41 \pm 0.80, 33.60 \pm 1.76, 32.67 \pm 2.65, 27.96 \pm 1.19 mg/L와 31.43 \pm 2.22, 28.21 \pm 0.87, 33.74 \pm 1.07, 29.81 \pm 0.98 mg/L의 생산성을 확인하였다. 시간에 따른 생산성을 확인한 결과 VCD와 생존도와 유사하게 낮은 온도와 CO₂의 농도에 따라서 생산성이 높아지는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 일부 실험군에서 VCD의 증가에 비해 생산성이 많이 증가하지 않은 것을 확인할 수 있었다.

CHO 세포배양 중 온도 및 pH를 조절해주는 CO₂의 농도를

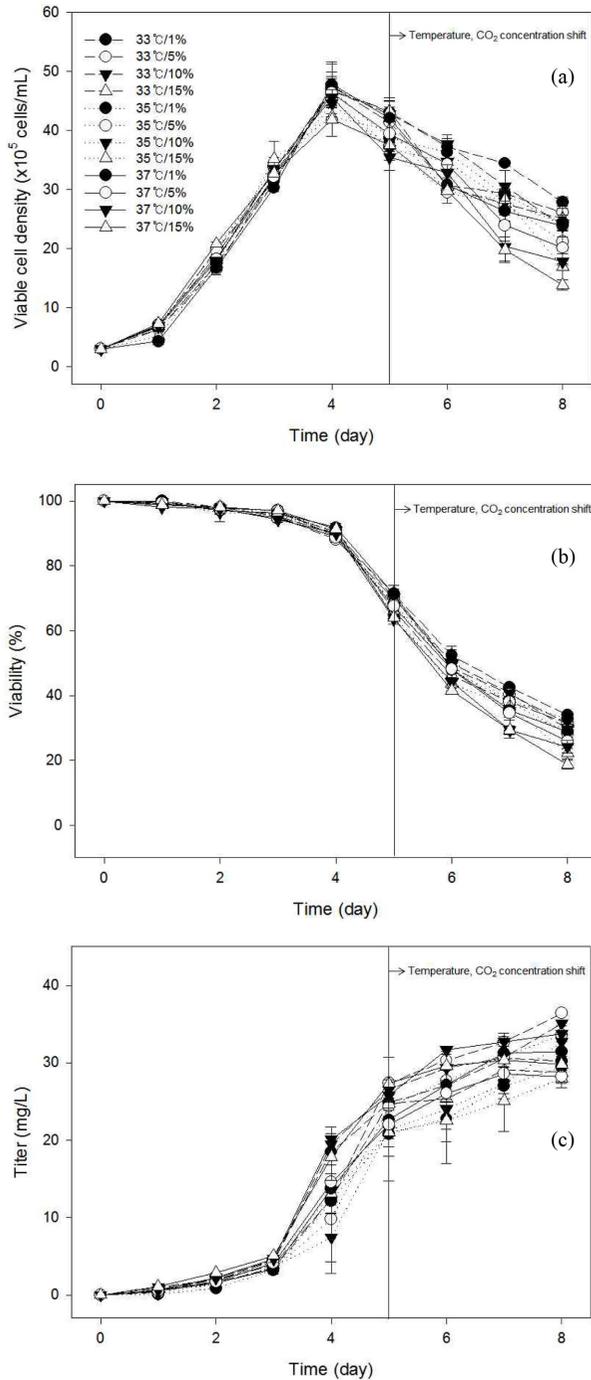


Fig. 1. Effect of biphasic culture on (a) cell density, (b) viability and (c) titer of Alb-EPO. Cultivation temperature and concentration of CO₂ were shifted at day 5. Values of each parameter represent average ± SD from three independent experiments (n=2).

변화시키면 세포의 증식 및 생산성에 많은 영향을 미치게 된다. 선행 연구에서 배양시 37°C보다 낮은 온도로 배양을 진행하게 되면 세포의 생존도가 높아지는 것으로 보고되었다 [17, 18]. 본 실험은 배양 세포사멸이 시작하는 5일차부터 조건을

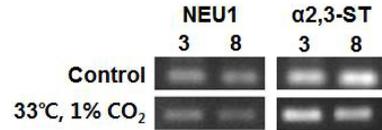


Fig. 2. mRNA expressions of lysosomal sialidase (NEU1) gene and alpha-2,3-sialyltransferase (α2,3-ST) gene at day 3, 8.

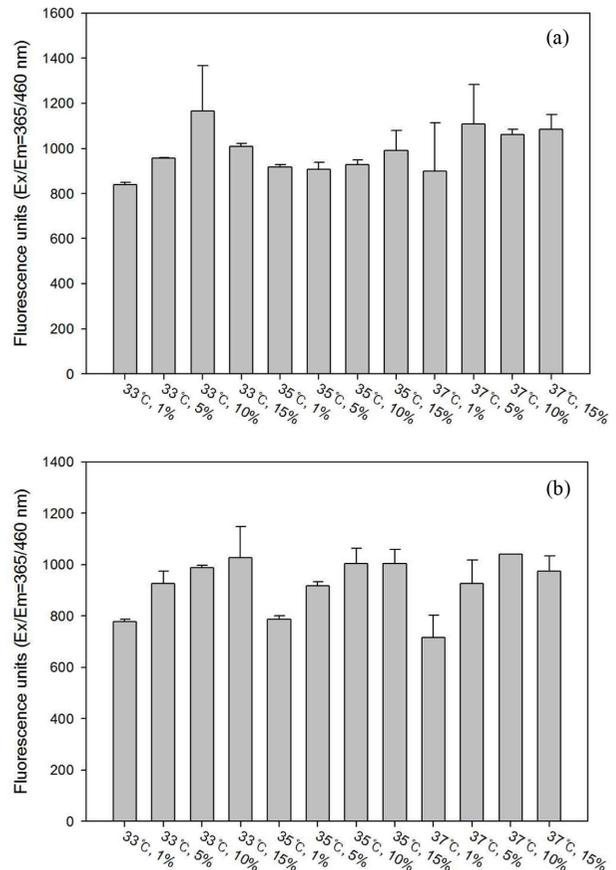


Fig. 3. Measurement of the extracellular sialidase activities on different biphasic culture condition at (A) day 7 and (B) day 8. Values of each parameter represent average ± SD from three independent experiments (n=2).

변화시켰기 때문에 선행연구 결과처럼 생산성의 증가가 확인되었지만 큰 상승이 없는 것으로 사료된다.

3.2. 2단계 배양에 의한 sialidase 활성 비교

배양 후반부 배지 내 영양분 고갈 등의 원인으로 세포사멸이 발생하게 된다. 세포 사멸이 발생하게 되면 세포 내 존재하는 sialidase가 배양액으로 방출되어 생산된 당단백질 말단에 위치하는 시알산을 분해하는데 영향을 준다 [13]. 2단계 배양이 세포내 sialidase의 발현에 영향을 주는지 확인하기 위하여 RT-PCR을 진행하였다. 확인 결과 온도와 CO₂의 농도 변화에

따라서 sialidase의 mRNA 발현에는 크게 영향을 주지 않는 것으로 확인되었다 (Fig. 2). 이후 세포사멸이 가장 많이 일어나는 시점인 배양 7일차와 8일차의 배양액내의 sialidase를 측정하였다 (Fig. 3). 배양 7일차와 배양 8일차 모두 온도와 CO₂가 감소함에 따라서 sialidase의 활성도가 감소하였다 (Fig. 3(a)). 배양 7일차의 33°C, 1% CO₂ 농도 조건에서는 같은 온도의 10% CO₂ 농도 조건에 비하여 sialidase 활성이 28% 낮게 확인되었다. 하지만 35°C와 37°C의 조건에서는 CO₂ 농도에 따라서 sialidase 활성에 크게 영향을 주지 않음을 확인하였다. 배양 8일차의 경우 온도와 CO₂ 농도에 따른 sialidase 활성과의 관계가 배양 7일차보다 확연하게 관찰되었다 (Fig. 3(b)). 하지만 같은 CO₂의 농도에서 온도의 변화에 따른 sialidase 활성도의 차이는 크지 않은 것으로 관찰되어 2단계 배양 시 온도에 따른 영향보다는 CO₂ 농도에 따른 영향이 더 큰 것을 확인하였다.

CHO 세포는 37°C의 온도와 pH 7.0-7.2에서 가장 높은 증식률을 보인다. 선행연구에 따르면 CHO 세포의 sialidase 활성도는 37°C와 pH 5.9에서 가장 높은 활성을 보이는 것으로 확인되었다 [15]. 하지만 pH 5.9는 CHO 세포의 배양에는 적절하지 않은 조건이므로 세포의 증식에 부정적인 영향을 주지 않는 범위 내에서 sialidase 활성도를 억제하는 것이 중요하다. 배양 8일차는 배양기간의 마지막에 해당하므로 배양 중반부인 7일차에 가장 sialidase 활성도가 낮게 측정되는 33°C, 1% CO₂를 최적 조건으로 선정하여 향후 실험을 진행하였다.

3.3. 2단계 배양에 의한 α 2,3-ST 활성 비교

앞서 진행한 방법과 같이 2단계 배양이 α 2,3-ST의 mRNA 발현에 영향을 주는지 확인한 결과 mRNA 발현에는 영향을 주지 않는 것을 알 수 있었다 (Fig. 2). 2단계 배양이 α 2,3-ST의 활성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 배양 3, 6, 8일차의 세포를 lysis 하여 분석을 진행하였다. 33°C, 1% CO₂ 농도와 동물세포에서 기준으로 사용하는 조건인 37°C, 5% CO₂에서 각

각 분석을 진행하였다 (Fig. 4). 6일차 α 2,3-ST의 활성이 대조군보다 1.1배 높게 확인되었고 3, 8일차는 각각 큰 차이가 없는 것으로 확인되었다. 따라서 세포내 α (2,3)-ST의 활성도는 배양 조건에 따라서 유사한 결과를 나타내는 것으로 확인하였다.

앞서 sialidase는 33°C 1% CO₂에서 가장 활성이 낮게 확인된 반면 α 2,3-ST의 활성은 같은 조건에서 변화가 없는 것을 알 수 있었다. 이러한 이유는 sialidase는 세포 사멸로 인하여 배지 내에 존재하기 때문에 온도나 pH에 따른 영향을 많이 받게 된다. 하지만 α 2,3-ST는 세포내에 존재하므로 세포의 항상성으로 인해 세포내부의 환경은 유지되기 때문으로 사료된다.

3.4. Alb-EPO의 시알산 정량 및 glycosylation 안테나 구조 분석

앞서 얻은 결과를 통하여 33°C, 1% CO₂의 2단계 배양이 Alb-EPO의 시알산 및 안테나 구조에 어떠한 영향을 주는지 확인하기 위하여 배양 8일차의 샘플을 회수하여 분석하였다. 첫 번째로 Alb-EPO의 전체 시알산 함량을 분석하여 2단계 배양이 어떠한 영향을 주었는지 확인하였다 (Fig. 5). 그 결과 sialidase의 활성이 가장 낮게 확인된 33°C, 1% CO₂의 조건에서 대조군에 비하여 시알산의 함량이 13.3% 높게 확인되었다. 또한 시알산이 포함된 안테나 구조를 확인하기 위하여 분석을 진행하였다. 대조군에 비하여 실험군에서 Bi-, tri-, tetra-antenna의 상대 비율이 모두 증가한 것을 알 수 있었다. Bi-antenna는 16.8%에서 18.8%로, tri-antenna는 17.0%에서 20.5%로 tetra-antenna는 10.7%에서 11.5%로 대조군보다 실험군에서 각각 함량이 증가한 것을 알 수 있었다.

Alb-EPO의 시알산은 체내 반감기에 중요한 역할을 한다. 시알산의 부가 및 제거에 영향을 주는 효소는 앞서 언급한 것과 같이 sialidase와 CHO cell에서 발현하는 α 2,3-ST가 있다.

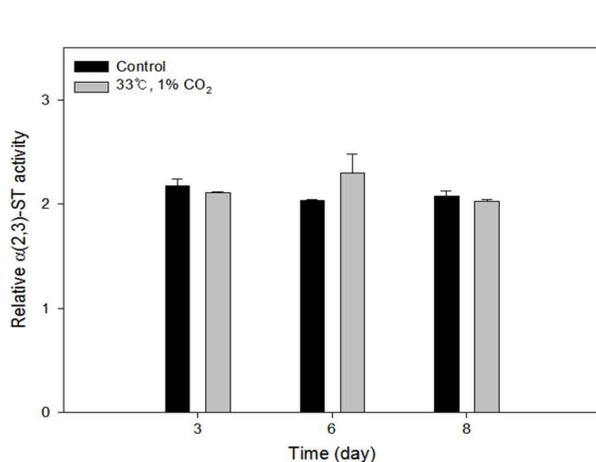


Fig. 4. Measurement of the α 2,3-ST activities on biphasic condition at day 3, 6, 8. Values of each parameter represent average \pm SD from three independent experiments (n=2).

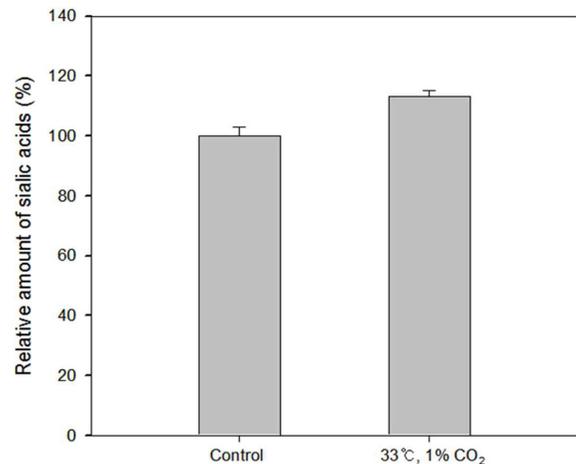


Fig. 5. Relative amount of sialic acid content of Alb-EPO. Values of each parameter represent average \pm SD from three independent experiments (n=2).

Table 2. Sialylation profile of the 2-AB-glycans from the Alb-EPO produced by biphasic culture

Sialylated glycans	Control (%)	Biphasic culture (%)
Bi-	16.8	18.8
Tri-	17.0	20.5
Tetra-	10.7	11.5

실험결과 33°C, 1% CO₂의 조건에서 sialidase는 최대 28%까지 활성이 감소하는 것을 알 수 있었다 (Fig. 3). 반면에 같은 조건에서 시알산을 부가해주는 α 2,3-ST의 활성에는 영향이 없는 것을 알 수 있었다 (Fig. 3). 이러한 결과를 종합할 때 Alb-EPO의 전체 시알산 함량의 증가는 2단계 배양을 통한 sialidase의 활성 억제가 주요한 역할을 한 것으로 사료된다.

4. CONCLUSION

CHO 세포 배양을 통하여 생산하는 당단백질은 glycosylation이 단백질의 품질에 중요한 역할을 한다. 특히 N-글리칸의 말단에 위치하는 시알산은 당단백질의 체내 반감기에 많은 영향을 주게 된다. 본 연구에서는 CHO 배양 중 방출되는 sialidase의 활성을 pH에 영향을 주는 CO₂ 농도와 온도 조절을 통하여 2단계 배양을 진행하였다. sialidase의 방출이 증가하는 5일차에 배양조건 변화를 통하여 33°C, 1% CO₂의 조건이 가장 배양액 내의 sialidase의 활성이 낮은 것을 확인하였다. 또한 이러한 조건이 N-글리칸에 시알산을 부가해주는 α 2,3-ST의 활성에는 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다. 최종적으로 시알산 함량을 분석한 결과 대조군에 비하여 13%의 시알산이 증가한 것을 확인하였다. 이러한 결과를 바탕으로 CHO 세포의 2단계 배양이 N-글리칸의 시알산 함량에 긍정적인 효과를 얻는 것으로 확인되었으며 치료용 단백질 생산에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

Acknowledgements

본 연구는 정부 (미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단 바이오의료기술개발사업 (No. NRF-2013M3A9B6075887)으로 수행 되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Jayapal, K. P., K. F. Wlaschin, W. -S. Hu, and M. G. S. Yap (2007) Recombinant protein therapeutics from CHO Cells - 20 years and counting. *Chem. Eng. Prog.* 103: 40-47.
- Xu, X., H. Nagarajan, N. E. Lewis, S. Pan, Z. Cai, X. Liu, W. Chen, M. Xie, W. Wang, S. Hammond, M. R. Andersen, N. Neff, B. Passarelli, W. Koh, H. C. Fan, J. Wang, Y. Gui, K. H. Lee, M. J. Betenbaugh, S. R. Quake, I. Famili, B. O. Palsson, and J. Wang (2011) The genomic sequence of the Chinese hamster ovary (CHO)-K1 cell line. *Nat. Biotechnol.* 29: 735-741.
- Lingg, N., P. Zhang, Z. Song, and M. Bardor (2012) The sweet tooth of biopharmaceuticals: Importance of recombinant protein glycosylation analysis. *Biotechnol. J.* 7: 1462-1472.
- Kaisermayer, C., D. Reinhart, A. Gili, M. Chang, P. -M. Aberg, A. Castan, and R. Kunert (2016) Biphasic cultivation strategy to avoid Epo-Fc aggregation and optimize protein expression. *J. Biotechnol.* 227: 3-9.
- Schmidberger, T., C. Posch, A. Sasse, C. Glch, and R. Huber (2015) Progress toward forecasting product quality and quantity of mammalian cell culture processes by performance-based modeling. *Biotechnol. Prog.* 31: 1119-1127.
- Davies, S. L., C. S. Lovelady, R. K. Grainger, A. J. Racher, R. J. Young, and D. C. James (2013) Functional heterogeneity and heritability in CHO cell populations. *Biotechnol. Bioeng.* 110: 260-274.
- Li, F., N. Vijayasankaran, A. Shen, R. Kiss, and A. Amanullah (2010) Cell culture processes for monoclonal antibody production. *mAbs.* 2: 466-479.
- Costa, A. R., M. E. Rodrigues, M. Henriques, R. Oliveira, and J. Azeredo (2014) Glycosylation: Impact, control and improvement during therapeutic protein production. *Crit. Rev. Biotechnol.* 34: 281-299.
- Long, D. L., D. H. Doherty, S. P. Eisenberg, D. J. Smith, M. S. Rosendahl, K. R. Christensen, D. P. Edwards, E. A. Chlipala, and G. N. Cox (2006) Design of homogeneous, monopegylated erythropoietin analogs with preserved in vitro bioactivity. *Exp. Hematol.* 34: 697-704.
- Bork, K., W. Reutter, W. Weidemann, and R. Horstkorte (2007) Enhanced sialylation of EPO by overexpression of UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManAc kinase containing a sialuria mutation in CHO cells. *FEBS Lett.* 581: 4195-4198.
- Wong, N. S. C., M. G. S. Yap, and D. I. C. Wang (2006) Enhancing recombinant glycoprotein sialylation through CMP-sialic acid transporter over expression in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol. Bioeng.* 93: 1005-1016.
- Zhang, X., S. H. L. Lok, and O. L. Kon (1998) Stable expression of human α -2,6-sialyltransferase in Chinese hamster ovary cells: Functional consequences for human erythropoietin expression and bioactivity. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1425: 441-452.
- Munzert, E., J. Mthing, H. Bntemeyer, and J. Lehmann (1996) Sialidase activity in culture fluid of Chinese hamster ovary cells during batch culture and its effect on recombinant human antithrombin III integrity. *Biotechnol. Prog.* 12: 559-563.
- Chuan, K. H., S. F. Lim, L. Martin, C. Y. Yun, S. O. H. Loh, F. Latsne, and Z. Song (2006) Caspase activation, sialidase release and changes in sialylation pattern of recombinant human erythropoietin produced by CHO cells in batch and fed-batch cultures. *Cytotechnology.* 51: 67-79.
- Gramer, M. J. and C. F. Goochee (1993) Glycosidase activities in Chinese hamster ovary cell lysate and cell culture supernatant. *Biotechnol. Prog.* 9: 366-373.
- Ngantung, F. A., P. G. Miller, F. R. Brushett, G. L. Tang, and D. I. C. Wang (2006) RNA interference of sialidase improves glycoprotein sialic acid content consistency. *Biotechnol. Bioeng.* 95: 106-

- 119.
17. Trummer, E., K. Fauland, S. Seidinger, K. Schriebl, C. Lattenmayer, R. Kunert, K. Vorauer-Uhl, R. Weik, N. Borth, H. Katinger, and D. Müller (2006) Process parameter shifting: Part I. Effect of DOT, pH, and temperature on the performance of Epo-Fc expressing CHO cells cultivated in controlled batch bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* 94: 1033-1044.
18. Yoon, S. K., S. L. Choi, J. Y. Song, and G. M. Lee (2005) Effect of culture pH on erythropoietin production by Chinese hamster ovary cells grown in suspension at 32.5 and 37.0°C. *Biotechnol. Bioeng.* 89: 345-356.