

(S5-C)

DESIGN AND OPERATION OF MAMMALIAN CELL CULTURE REACTORS

Ik-Hwan Kim

Genetic Engineering Research Institute, KIST
P.O.Box 17, Daeduk Science Town, Daejeon, Korea

1. 서 론

1980년대 들어서면서부터 몇몇 당단백질들이나 또는 복잡한 구조를 가진 단백질들은 동물세포 배양시에만 적합한 생물학적 활성을 가질 수 있다는 사실이 보고되면서 동물세포배양이 전보다 더 많은 주목을 받게 되었다(1,2). 최근의 추세로 보면 전세계에서 약 750여개의 기업들과 270여개의 연구기관들에서 동물세포 배양에 관련된 연구에 투자하고 있는것을 보면(3), 세포배양의 중요성을 알 수 있다. 근래 GENENTEC 등의 회사에서 Tissue Plasminogen Activator의 시장을 잘못 예측하여 과대하게 투자하는 실수때문에 동물세포 배양에 대한 연구가 약간 위축받은 것이 사실이지만 그럼에도 불구하고 여러종류의 vaccines, monoclonal antibodies, Factor VIII, Human growth hormone, Erythropoietin 등의 동물세포배양 산물들의 급속한 시장증가에 따라서 동물세포배양 공학에 대한 더 많은 투자가 필요한 실정이다. 표1은 중요한 동물세포배양 산물들의 1988년과 1993년(예상) 세계시장을 나타낸 것이다.

Table 1. World market of mammalian cell culture products (1988, 1993)

| Products | World market (Million U.S.\$) | |
|------------------------------|-------------------------------|------------------|
| | 1988 | 1993 (estimated) |
| Tissue plasminogen activator | 170 | 170 |
| Hepatitis B vaccine | 70 | 100 |
| Monoclonal antibodies | 25 | 225 |
| Factor VIII | 70 | 110 |
| Human growth hormone | 250 | 400 |
| Human insulin | 200 | 270 |
| Erythropoietin | 15 | 250 |

2. 동물세포대량 배양의 문제점

동물세포를 대량으로 배양하기 위해서 고려해야 할 사항들로는 대량생산용 배지의 개발, 전단응력의 정량적 분석, 산소전달, 독성물질들의 제거 등이 있다. 이와같은 사항들은 동물세포를 실험실 수준으로 배양할 경우에는 큰 문제가 되지 않지만 대량 배양을 통한 유용물질의 경제적 생산을 위해서는 필히 해결해야 할 사항들이다. 특히 미생물 배양과 경쟁적인 경우에는 고농도로 세포배양을 해야 하는데 이때에는 다음과 같은 문제점들이 해결되어야 한다.

1) 대량생산용 배지의 개발

생산용 배지라 함은 주로 저혈청 또는 무혈청 배지를 지칭하는데 5~10% 정도로 첨가되는 혈청은 세포배양의 필수불가결한 성분인 것이 사실이지만 문제점 또한 많다. 예를들면 같은 회사의 제품이라도 lot 마다 성분이 달라서 동일한 생산성을 유지하는데 어려움이 있으며 virus 나 mycoplasma 의 주된 오염원이기도 하다. 또 분리정제시의 어려움을 유발해 생산비용을 높이기도 한다. 5% 정도의 값싼 혈청을 사용할 경우라도 배지 원료비중 90% 이상이 혈청비용인 것을 생각하면 생산용 배지로서 저혈청 배지의 개발은 필수적이라 하겠다. 미국의 FDA 도 제품의 인가를 얻을때 무혈청 배지의 사용을 권장하는데 이는 동물 virus 등의 오염원이 인체를 위한 약물에 오염되는 확률을 줄일수 있기 때문이다. 무혈청 배지를 사용하면 동물 보호론자들의 공격으로 부터도 벗어날 수 있으며 공장의 폐수처리 문제에도 도움이 된다. 여러가지 무혈청 배지들이 개발되어 시판되고 있는데 이들은 대부분 상당히 고가이므로 공장에서의 사용에는 경제성이 맞지 않아서 자체적으로 생산용 배지를 개발해야 한다.

2) 독성물질의 제거

미생물 배양과 달라서 동물세포 배양시에는 몇가지 독성물질들이 분비되는데 이중에는 암모니아, lactate, unknown toxin 등이 있다. 이들의 제어를 위해서는 세포의 대사를 조절하기도 하며(4~8), perfusion culture 를 이용하여 독성물질을 회색하기도 한다(9-11). 독성물질과는 약간 다르지만 FDA 에서는 retroviruses 의 오염여부에 관심이 많다. 대량생산용으로 사용되는 대부분의 cell line 들은

transformed cell line 이기 때문에 자연적으로 retrovirus 를 가지고 있는 경우가 많으며 따라서 동물세포배양 산물이 특히 인체용일 경우는 retrovirus 에 대한 분리 또는 검색이 문제가 된다.

3) 전단응력과 산소전달

세포배양 반응기를 설계할때 특히 고려해야할 사항으로서 전단응력과 산소전달 문제가 대두되는데 최근까지는 반응기내의 전단응력을 정량적으로 분석하는데 어려움이 있어서 효과적인 반응기 설계가 어려웠다. 전단응력을 최소화하고 산소전달은 극대화 하기 위하여 여러가지 반응기들이 제시되어 왔는데 이들을 비교 분석하기 위하여 그리고 scale-up 을 위하여는 무엇보다도 전단응력의 측정 방법이 필요하다. 전단응력으로 부터 세포들은 보호하기 위해서는 배지에 shear protecting agent 를 첨가해 줄 필요가 있으며 세포고정화도 전단응력으로 부터 세포를 보호하는 방법의 하나로 볼 수 있다.

3. 생물반응기내의 전단응력 측정

세포배양 반응기에서의 전단응력을 표시하기 위한 여러가지의 index 들이 제시된 바 있는데, 이들은 1)교반기의 tip speed(12), 2)Integrated shear factor(13), 3)Kolmogoroff's eddy scale(14) 등이었다. 최근 새로 제시된 shear index 들로는 Average shear rate 와 Reynolds shear stress 가 있는데(15) 기존에 제시된 여러가지 indices 와 비교하기 위하여 Hybridoma 세포를 이용하여 높은 전단응력하에서 세포들이 손상되는 정도를 각각의 shear index 로 표시한 결과는

그림1-5와 같다. 표2와 같이 다양하게 반응기의 크기, 교반기의 크기등을 변화시키면서 부유성 세포의 손상되는 정도를 나타낸 결과 교반기의 tip speed 나 Integrated shear factor 는 shear indices 로 부적합한 것으로 판명되었으며, Kolmogoroff's eddy scale, Average shear rate, 그리고 Reynolds shear stress 등이 shear indices 로 적합하였다. 한편 배지의 viscosity 가 변화하는 경우에는 Kolmogoroff's eddy scale 이나 Average shear rate 보다는 Reynolds shear stress 를 사용하는 것이 더 효과적이었다. 동물세포 배양시에는 배지의 viscosity 가 변하지 않기 때문에 전술한 세가지의 shear indices 가 반응기의 설계나 scale-up 에 이용될 수 있을 것으로 사료된다. 세가지의 shear indices 를 식으로 표현하면 각각 다음과 같다.

Kolmogoroff's eddy scale :

$$l = \frac{\mu^{3/4}}{\rho^{1/2}} \left(\frac{P}{V} \right)^{-1/4} \quad (\text{식 1})$$

Average shear rate :

$$\gamma = \left(\frac{P}{V\mu} \right)^{1/2} \quad (\text{식 2})$$

Reynolds shear stress :

$$\tau_{Re} = 2\rho \left(\frac{Pd_c}{V\rho} \right)^{2/3} \quad (\text{식 3})$$

여기에서 l 은 the length of the smallest eddy, μ 는 배지의 점도, ρ 는 배지의 밀도, P 는 power consumption by the impeller, V 는 배지의 부피, γ 는 Average shear rate, τ_{Re} 는 Reynolds shear stress 그리고 d_c 는 세포의 평균지름을 각각 가리킨다.

전술한 세가지 shear indices 중에서 Average shear rate 를 세포배양 반응기의 설계에 응용하기 위하여 stirred tank reactor(STR)과 Air-lift 그리고 bubble column 에서의 산소전달과 shear rate 사이의 상관관계를 알아본 결과는 그림6과 같다. 그림6에서는 새로운 무차원수의 개념인 oxygen transfer efficiency of shear rate(η)를 도입하였는데 η 은 다음과 같이 정의하였다.

$$\eta = \frac{k_L a}{\gamma} \quad (\text{식 4})$$

여기에서 $k_L a$ 는 총괄 산소전달계수를 가리킨다. STR 에서는 propeller impeller 를 사용할 때가 turbine impeller 를 사용할 때보다 같은 shear rate 에서 oxygen transfer efficiency 가 높았으며 여러가지 반응기 형태중에서는 air-lift 형태의 반응기가 작은 shear rate 에서, 비교적 oxygen transfer efficiency 가 좋은 것으로 나타났다. 250 sec^{-1} 이상의 shear rate 에서는 bubble column 이 air-lift 보다 좋은 것으로 보여진다.

4. 부유성세포의 Shear-sensitivity 에 영향을 미치는 인자들

부유성세포인 hybridoma 의 shear sensitivity 는 환경조건에 따라서 달라지게 된다. 배양온도의 경우는 37°C 일때 보다는 낮은 온도에서 세포들이 더 shear resistant 한것으로 나타났다. 그 이유는 낮은 온도에서는 세포의 membrane 을 구성하는 phospholipid 분자들 사이의 결합력이 높은 온도에서보다 더 강하기 때문인 것으로 사료된다. 한편 삼투압의 영향을 살펴본 결과 75~300 mOsm/kg 에서 세포의 shear sensitivity 는 별차이가 없었다. 다만 450mMsm/kg 의 삼투압에서는 세포들이 정상 삼투압(290~310 mOsm/kg)에서보다 좀더 손상을 받는 것으로 나타났다.

세포의 shear sensitivity 에 영향을 미치는 또하나의 인자로는 culture age 가 있다. 접종후 즉 새배지를 갈아넣은 직후의 세포는 배양후 며칠 지난 세포들보다 shear 에 더 약한 경향이 있다(16-18). Culture age 효과에 대한 설명으로는 세포의 phenotypic response 로 설명하기도 하지만(18), 이보다는 세포가 분비하는 미지의 수용성 폴리머에 의한 효과로 설명하는 것이 더 타당성이 있는 것으로 생각된다. 세포의 모양도 shear sensitivity 에 영향을 미친다. 둥그런 모양의 세포들이 울퉁불퉁하거나 불거져 나온 모양의 세포보다 shear 에 더 강한 것으로 볼 수 있다. 전단응력으로부터 세포를 보호하기 위해서 shear protecting activity 가 있는 polymer 를 screen 한 결과 Serum, Bovine serum albumin, Pluronic F-68, Tetronic 707, 그리고 Polyethylene glycol 등의 polymer 가 shear protecing activity 가 있는 것으로 밝혀졌다(그림7). 이들의 shear protecting activity 는 polymer 분자들의 elastic body behavior 때문인 것으로 사료된다.

5. 고정화 세포배양 반응기

동물세포의 고농도 배양을 위해 여러가지의 고정화 방법들이 사용되어 왔다. Hollow fiber(17, 18), Microencapsulation(19-21), Ceramic matrix(22) 등을 이용하여 고농도로 세포를 배양하고자 하는 시도가 되어져 왔으며 macroporous microcarrier(23)는 주로 anchorage-dependent 세포의 배양에 사용되어지고 있다. 각각의 세포고정화 방법은 장단점이 있으며 최근 본 연구실에서는 permeable capillary 를 이용한 새로운 세포고정화 방법을 개발하였기에 이를 소개한다. Capillary 는 Barium alginate 를 이용하여 만들었으며 그림8과 같은 장치를 사용하여 조업한 결과 주반응기의 dilution rate 0.1 hr^{-1} 에서 약 80mg/l 의 수율로 monoclonal antibody 를 연속적으로 생산할 수 있었다(그림9).

한편 permeable capillaries 에 고정화된 세포들은 capillary 내부에서 자라면서 over growth 한 세포들이 capillary 바깥으로 빠져나와 free cell 들로서 성장을 계속하였으며 free cell 들은 1차와 2차의 숙성반응기에서 계속적으로 monoclonal antibody 를 생산하여 약 150mg/l 의 수율로 antibody 를 얻을 수 있었다. 주반응기에서의 cumulative monoclonal antibody production 은 그림10에서 보는 바와 같이 400시간에 약 3g/l 의 antibody 를 생산하였다. Permeable capillary 를 이용한 고정화 방법의 장점은 Hollow fiber 나 encapsulation 과는 달리 free cell 들을 숙성반응기에 유입시켜서 미사용된 serum 이나 유용한 배지의 성분들을 최대한 활용하여 product 의 수율을 올릴수 있다는 장점이 있다. 이와같이 고정화 세포반응기는 고농도로 세포를 배양하여 생산성을 올릴수 있으며 또한 저혈청 배지의 사용도 가능하므로 이에대한 연구가 지속적으로 이루어지면 동물세포배양을 통한 산물의 생산가격도 크게 감소될 수 있을 것이다.

Table 2. Dimensions and working volumes of STRs for shear damaging experiments. d_i : impeller diameter. d_T : tank diameter.

| | | d_i (cm) | d_T (cm) | Volume (ml) |
|------|---|------------|------------|-------------|
| I | □ | 1.5 | 2.5 | 5 |
| II | ● | 1.5 | 2.5 | 10 |
| III | ■ | 1.5 | 2.5 | 20 |
| IV | ◆ | 4.9 | 8.5 | 100 |
| V | ■ | 1.9 | 3.0 | 10 |
| VI | □ | 6.5 | 16.5 | 600 |
| VII | ▲ | 4.9 | 8.5 | 250 |
| VIII | △ | 4.9 | 8.5 | 600 |

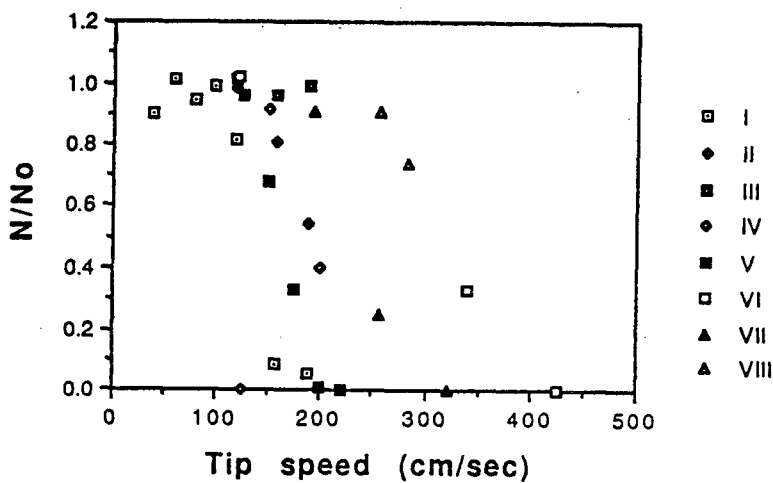


Fig. 1. Correlation of cell damage and tip speed of turbine impellers. N/N_0 denotes the fraction of viable cells survived after shearing for 40minutes in various reactors. List of symbols is the same as in Table 2.

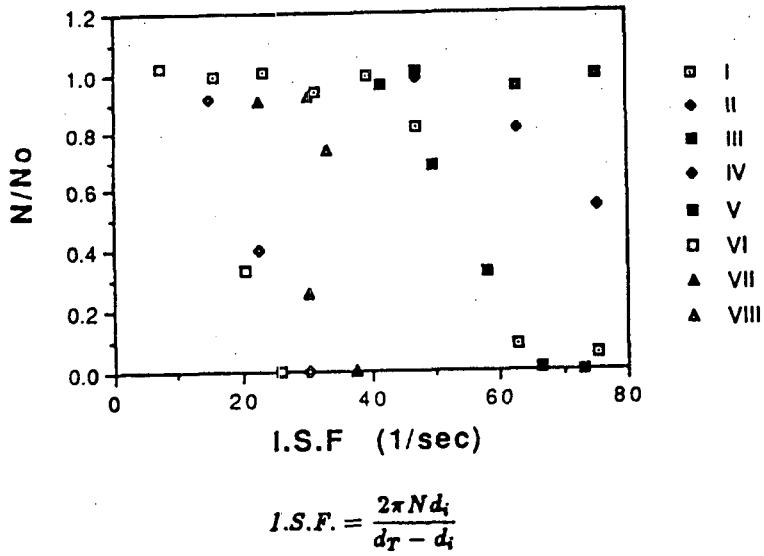


Fig. 2. Correlation of cell damage and Integrated shear factor.

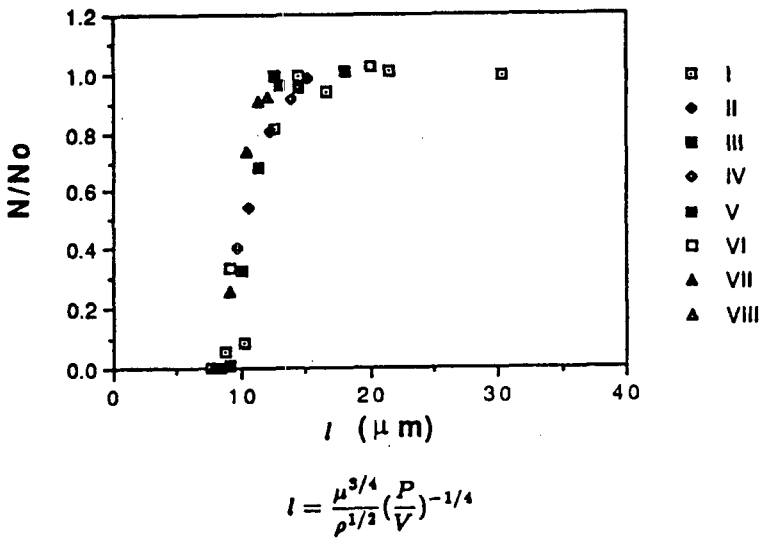


Fig. 3. Correlation of cell damage and Kolmogoroff's eddy scale.

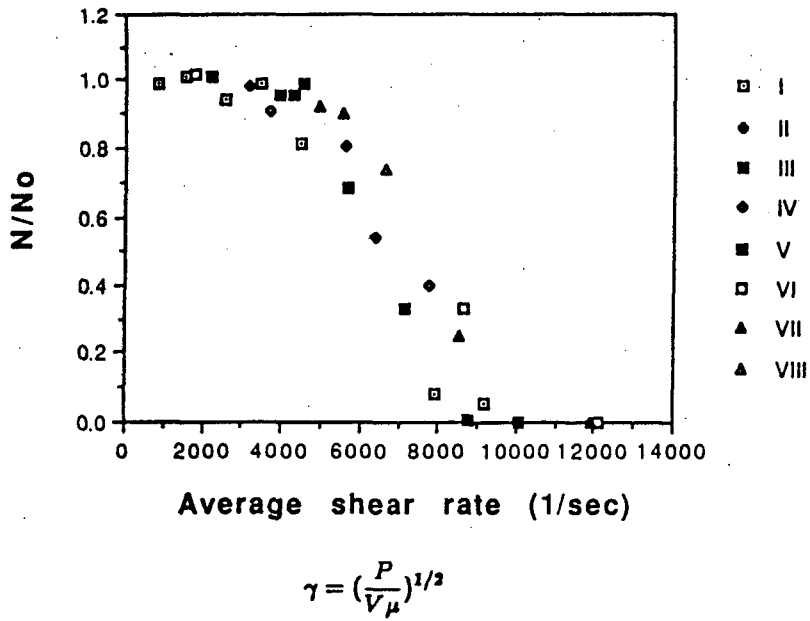


Fig. 4. Correlation of cell damage and average shear rate.

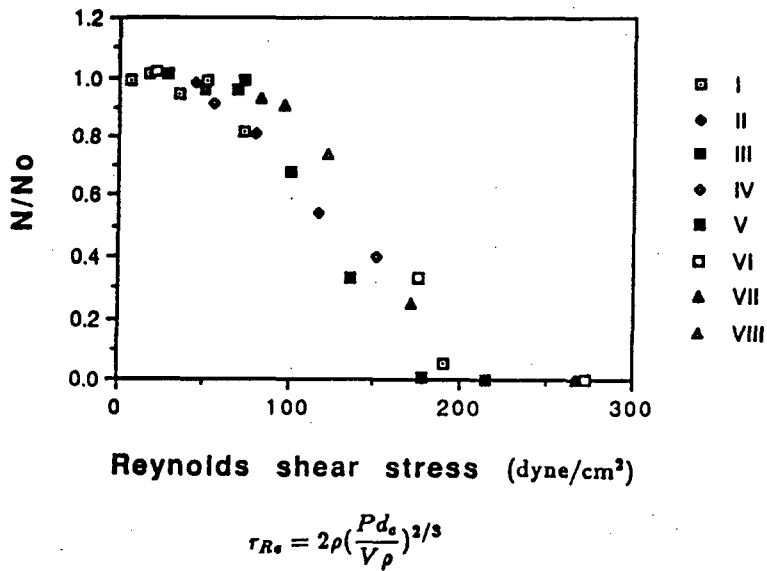


Fig. 5. Correlation of cell damage and Reynolds shear stress.

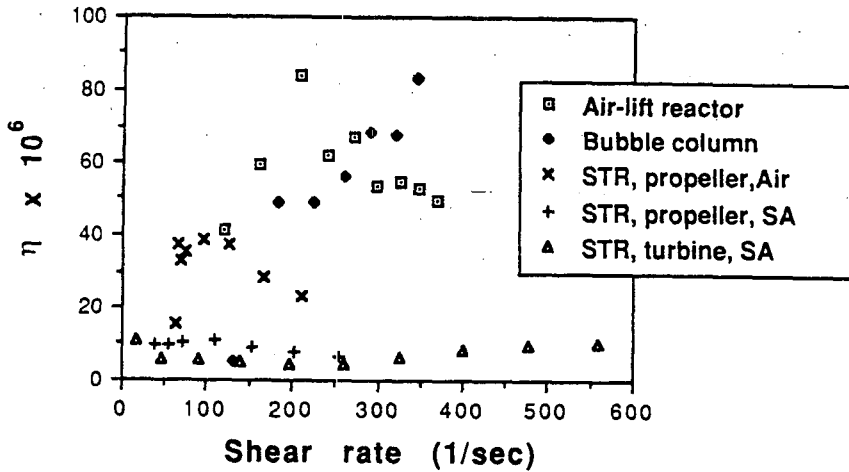


Fig. 6. Oxygen transfer efficiency of shear rate in various reactor types.
 Air : Air sparge. SA : Surface aeration.

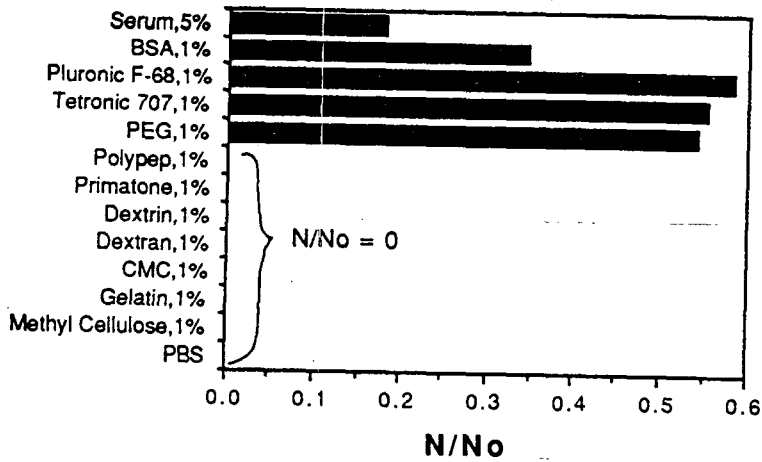


Fig. 7. Screening of shear protecting polymers.
 Cells were sheared at 260 dyne/cm for 10 minutes in various PBS-polymer solutions.

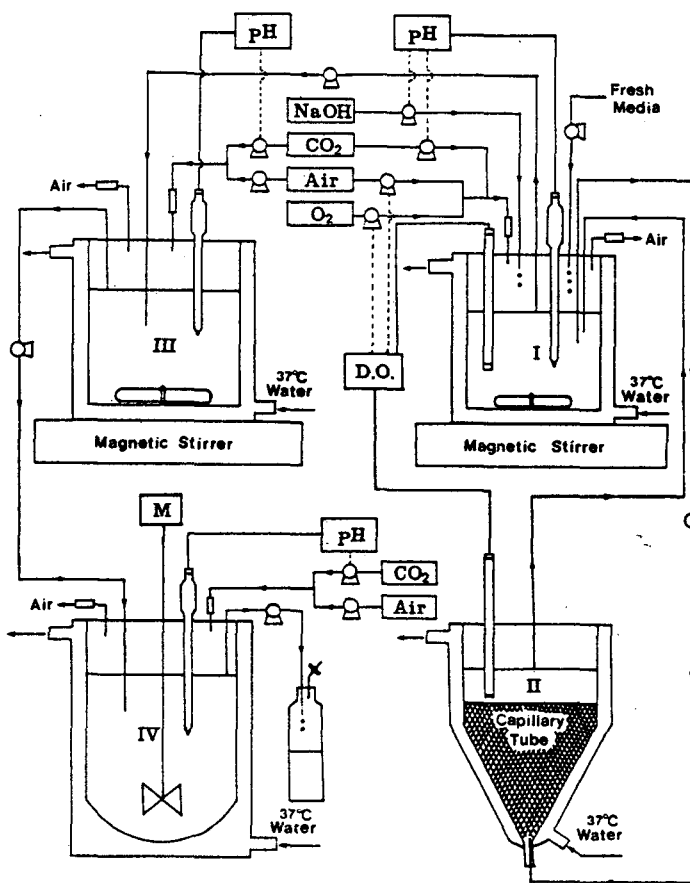


Fig. 8. Hybridoma cell culture by using capillaries.
 I : Oxygenator, W.V. : 70 ml
 II : Main reactor with capillaries, W.V. : 130 ml
 III : First maturation stage, W.V. : 400 ml
 IV : Second maturation stage, W.V. : 1000 ml

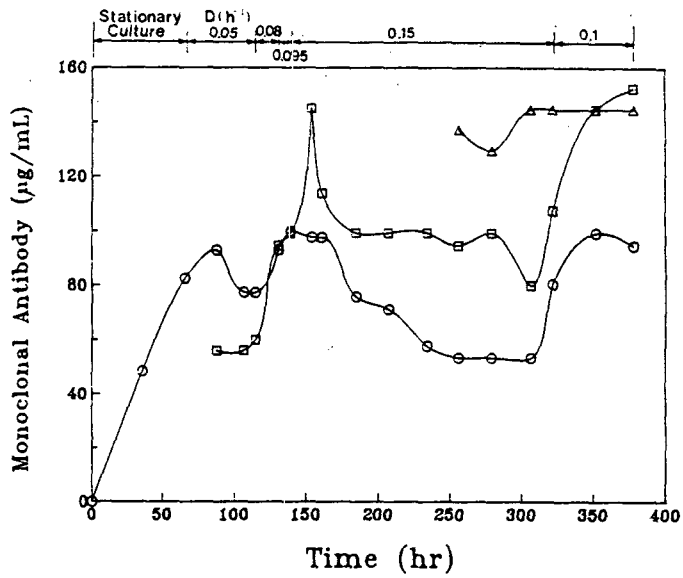


Fig. 9. Concentration profiles of MAb during the continuous culture of Alps 25-3.
 Main reactor : \circ , First maturation stage : \square ,
 Second maturation stage : \triangle

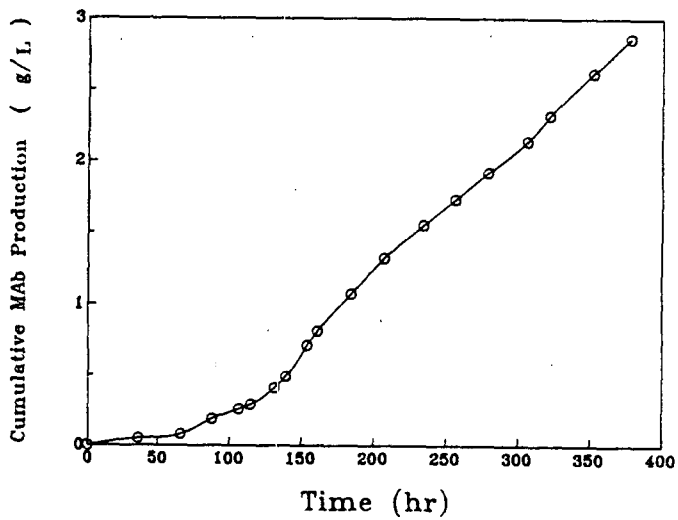


Fig. 10. Cumulative MAb production in the main reactor.

참 고 문 헌

1. Spier, R.E.(1981) : Animal cells or genetically engineered bacteria for the manufacture of particular bioproducts. *Develop. Biol. Standard.*, 50, 311-321.
2. Wood, W.I. et al.(1984) : Expression of active human factor VIII from recombinant DNA Clones, *Nature*, 312, 330-337.
3. Technology management group(1987) : Mammalian cell culture : A world-wide Study on Markets, products and technologies. New Haven, CT. U.S.A.
4. Reitzer, L.J, Wice, B.M. and Kennell, D.(1979) : Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for Hela cells. *J. Biol. Chem.*, 254, 2669-2676.
5. Zielke, H.R. et al.(1978) : Reciprocal regulation of glucose and glutamine utilization by cultured human diploid fibroblasts. *J. Cell. Physiol.*, 95, 41-48.
6. Fleischaker, R.J.(1982) : An experimental study in the use of instrumentation to analyze methabolism and product formation in cell culture. Ph.D. thesis, MIT, Cambridge, MA. U.S.A.
7. Glacken, M.W., Fleischaker, R.J. and Sinskey, A.J.(1986) : Reduction of waste product excretion via nutrient control : Possible strategies for maximizing product and cell yield on serum in cultures of mammalian cells. *Biotechnol. Bioeng.*, 28, 1376-1389.
8. Hu, W.S., Dodge, T.C., Frame, K.K., and Himes, V.B.(1985) : Effect of glucose on the cultivation of mammalian cells. *Develop. Biol. Standard.*, 66, 279-290.
9. Reuveny, S., Velez, D., Macmillan, J.D. and Miller, L.(1985) : Fractors affecting monoclonal antibody production in culture. *Develop. Biol. Standard.*, 66, 175.
10. Arathoon, W.R. and Birch, J.R.(1986) : Large-scale cell culture in biotechnology, *Science*, 232, 1390-1395.
11. Tolbert, N.K. et al.(1985) : Perfusion culture systems for production of mammalian cell biomolecules : Large-scale Mammalian Cell Culture, Academic Press, New York, 97-119.

12. Midler, Jr., M. and Finn, R.K.(1966) : A model system for evaluating shear in the design of stirred tank fermentors. *Biotechnol. Bioeng.*, 8, 71-84.
13. Sinskey, A.T., Fleischaker, R.J., Tyo, M.A., Giard, D.J. and Wang, D.I.C. (1981) : Production of cell-derived products : Virus and interferon. *Annal. N. Y. Acad. Sci.*, 81, 47-60.
14. Kolmogoroff, A.N.(1941) : *Comp. Rend. Acad. Sci. U.S.S.R.*, 30, 301-305
15. Kim, I.H.(1990) : Shear characterization and protection in the design and scale-up of hybridoma cell culture reactors. Ph.D. dissertation, Rutgers University, New Brunswick, NJ. U.S.A.
16. Petersen, J.F., McIntire, L.V. and Papoutsakis, E.T.(1988) : Shear sensitivity of cultured hybridoma cells(CRL-8018) depends on mode of growth, culture age and metabolite concentration. *J. Biotechnol.* 7, 229-246.
17. Jager, V., et al.(1987) : Increasing the rate of production of monoclonal antibodies by combining a stirred tank reactor with a hollow fibber perfusion system. *Proc. 4th European Congress on Biotechnology. Vol.3.* 581-584.
18. Thrakan, J.P. and Chau, P.C.(1986) : Operation and pressure distribution of immobilized cell hollow fiber bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.*, 28, 1064-1071.
19. Lim, F.(1984) : *Biomedical applications of microencapsulation*, CRC press, 137-154.
20. Lamberti, F.V. et al.(1984) : Microencapsulation of mammalian cells in polyacrylates. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 10, 101-103.
21. Gharapetian, H. et al.(1986) : Encapsulation of viable cells within polyacrylate membranes. *Biotechnol. Bioeng.*, 28, 1595-1600.
22. Lydersen, B.K. et al.(1985) : Ceramic matrix for large-scale animal cell culture. *Bio/technology*, 3, 63-76.
23. Nilsson, K. et al.(1986) : Growth of anchorage-dependent cells on macroporous microcarriers. *Bio/technology*, 4, 989-990.