

## Strategies for Transmissible Gastroenteritis Virus(TGEV) Vaccine Production by Swine testicle cells

Min-Young Kim, Yeon-Ho Jeong, Myoung-Hwa Kim, Yun-mi Ko.

Division of Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

### Abstract

TGE (Transmissible Gastroenteritis) caused by a virus belonging to family coronavirus, results in an acute infection of the small intestine of the pig. The optimum operation variables such as multiplicity of infection (MOI), infection time and harvest time were investigated for TGE vaccine production by immobilized ST(swine testicle) cells. In the culture supplemented with 5% serum, maximum virus titer of  $1.2 \times 10^6$  pfu/ml was obtained at the conditions of 0.01 MOI, 2day infection time, and 1 day harvest time. Serum is a potential source of bacterial, mycoplasmal and viral contamination, and it has a possibility of the introduction of serum proteins, prion and pyrogens into the final product. For these reasons, much attention has been focused on the development of serum-free media. A new serum-free media (SFM) has been developed in order to produce TGE vaccine of high quality with low cost. The performance of SFM developed was compared with other commercially available serum-free media and serum supplemented media in terms of virus productivity. The cultures with serum-free media showed higher titer than that with serum supplemented media. Among various serum-free media tested, CHO-S-SFMII showed highest virus titer.

### 서 론

구토와 수양 성 설사를 일으키는 소화기 질병인 돼지 전염성 위장염(TGE)은 TGEV가 위장세포에 친화력을 가지고 있어 상피 세포를 파괴함으로써 매년 양돈 농가에 막대한 피해를 주고 있다.<sup>1)</sup> 현재 돼지 전염성 위장염의 생산에는 roller bottle에서 primary cell을 이용하여 생산하고 있는데, 보다 생산성을 높이면서 균일한 제품을 생산하기 위해서는 생물반응기에서 cell line으로 형성된 host cell을 이용하여 생산하는 것이 요구된다. 또한 현재 혈청을 첨가한 배양액을 사용하고 있는데, 혈청은 가격이 비싸고 박테리아나 바이러스의 오염 가능성이 있고 혈청 단백질, prion,

pyrogens 등이 최종 생산물 안으로 삽입되는 등의 문제점을 가지고 있기 때문에, 면역 부반응이 적은 고품질의 돼지 전염성 위장염 백신을 생산하기 위해서는 무혈청 배지를 사용하는 것이 요구된다.<sup>2)</sup> 따라서 본 연구에서는 생물반응기에서 효율적으로 돼지 전염성 백신을 생산하기 위해 swine testicle cell을 host cell로 하는 백신 생산 시스템을 확립하였고, 이를 위한 최적 백신 생산 조건을 확립하였다. 또한 보다 안전한 백신 생산을 위해 무혈청 배지를 개발하였고 백신 생산 면에서의 성능을 평가하였다.

### 재료 및 방법

RPMI 1640 medium을 기본으로 하여 ST cell(돼지 고환세포)을 이용하여 TGEV를 생산하였고 그 최적 MOI, infection time, harvest time을 조사하였다. Plackett-Burman 방법과 response surface method를 이용하여 무혈청 배지를 개발하였고, 혈청배지, 상업용으로 시판되고 있는 CHO-S-SFMII, VP-SFM, Ex-cell 301, protein-free, MDBK medium, 그리고 개발한 무혈청 배지 등에서의 virus titer 비교실험을 수행하였다.

### 결과 및 고찰

5% serum이 첨가된 배지에서 MOI를 변화시키면서 virus titer를 조사하였고 결과를 Fig. 1에 나타내었다. Infection time과 harvest time을 각각 3일, 2일로 하여 virus를 생산한 결과 0.01MOI에서 약  $3.5 \times 10^5$  pfu/ml의 최대 titer를 보여주어 0.01MOI를 최적의 MOI로 선정하였다. 선정된 최적 MOI를 바탕으로 최적 infection time과 harvest time을 조사한 결과를 Fig. 2.에서 볼 수 있으며, 그림에서 최적의 infection time은 배양 후 3일째이고 최적의 harvest time은 infection 후 2일째임을 알 수 있었다.

Fig. 3은 5% serum이 첨가된 RPMI 배지에서 세포를 배양한 후 virus를 생산할 경우, serum의 첨가가 virus titer에 미치는 영향을 조사하였다. 본 연구에서 개발한 무혈청 배지나 RPMI에 serum을 첨가하지 않은 경우에 높은 virus titer를 보여줌으로서 TGEV의 생산에는 무혈청배지가 유리함을 알 수 있었다. 하지만 trypsin의 첨가는 titer 향상에 도움이 되지 않는다는 것을 확인하였다. 따라서 virus 생산 시 무혈청배지가 요구되기 때문에 최적의 무혈청 배지 선정을 위하여 본 연구에서 개발된 무혈청 배지와 여러 가지 시판되는 무혈청 배지를 사용한 경우의 virus titer를 조사하였고 그 결과를 Fig.4에 나타내었다. 그 결과 상업용 배지인 CHO-S-SFMII가  $7.5 \times 10^5$  pfu/ml의 가장 높은 titer를 보여주었다.

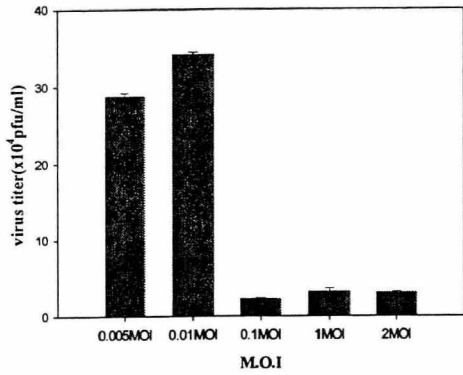


Fig. 1. Optimal MOI in 5% serum supplemented media.

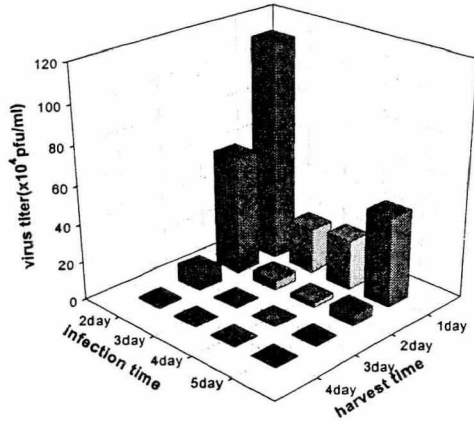


Fig. 2. Optimal infection and harvest time with 0.01MOI (5% ST cell).

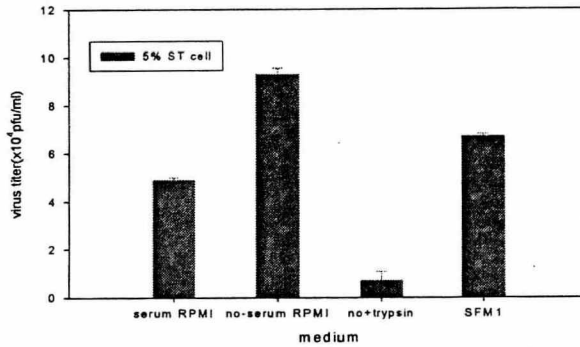


Fig. 3. Comparison of serum-free and serum-containing medium (infection time: 3days, harvest time: 2days)

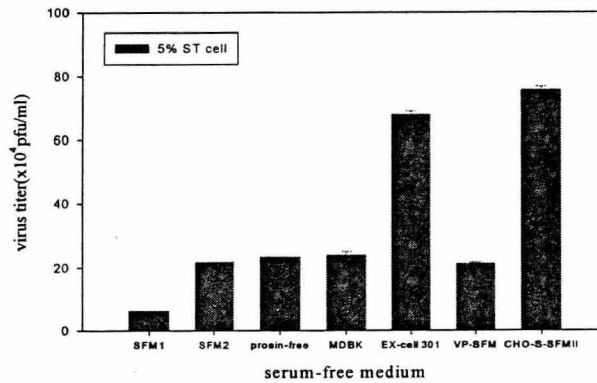


Fig. 4. Comparison of virus titer in each other serum-free medium (infection time: 3days, harvest time: 2days)

## 요 약

본 연구에서는 생물반응기에서 효율적으로 돼지 전염성 백신을 생산하기 위해 swine testicle cell을 host cell로 하는 백신 생산 시스템을 확립하였고, 이를 위한 최적 MOI, 최적 감염시기, 최적 수확시기 등 백신 생산 조건을 확립하였다. 또한 보다 안전한 백신 생산을 위해 통계적 방법에 의해 무 혈청 배지를 개발하였고 백신 생산 면에서의 가장 우수한 무 혈청 배지를 선정하였다.

## References

1. Luis Enjuanes, Ana Mendez, Cristian Smerdou, Ander Izeta. Molecular characterization of transmissible gastroenteritis coronavirus defective interfering genomes: Packaging and Heterogeneity. 1996. *Virology* 217:495-507.
2. Helder J. Curz, Jose L. Moeira, Glyn Stacey. Adaptation of BHK cells producing a recombinant protein to serum-free media and protein-free medium. 1998. *Cytotechnology* 26:59-64.