

tPA생산을 위한 동물 세포 배양에 관한 동력학적 연구

이 현 용

강원대학교 식품공학과

Kinetics of Cultivating Large Quantities of Mammalian Cells

Lee, Hyeon Y.

Department of Food Engineering, Kangweon National University, Chuncheon 200-701, Korea

Growth kinetic parameters for mass cultivation of Chinese Hamster Ovary (CHO) cells are estimated by measuring oxygen uptake rates. It is found that there is strong correlation between cell growth and oxygen consumption, showing that correlation factor is 0.83. Derived linear model predicts actual cell density very well. It tells that oxygen uptake rate can play important role in indirectly measuring cell density when conventional method of estimating cell density is no longer meaningful due to heavy cell clumpings. Cell yield per oxygen consumption, $Y_{x/o}$ and mass transfer coefficient for oxygen, $K_L a$ are also estimated as 1.26×10^4 cells/mmmole O_2 consumed and 1.0 1/h, respectively. Average specific growth rate over all runs is 2.89 1/day for CHO cells with producing 2 grams of tPA per day under continuous perfusion operations.

과거 십여년간 연구되어온 유전자 조작 및 동물 세포 배양기술을 바탕으로 최근에는 동물 세포의 *in vitro* 배양에 의한 의약품들의 생산이 본격화되고 있다(1-20). 이에 발맞추어 산업화를 위한 대량배양에 관한 연구들이 세계적으로 활발히 진행되고 있다(1, 2, 6, 7). 하지만 동물 세포의 *in vitro*에서 대량배양을 위한 생물공학적인 자료들이 부족한 실정이다. 또한 미생물 발효의 scale-up에 대한 연구는 많이 되었지만(8, 9), 동물 세포의 경우는 극히 초보적인 상태이다. 그 이유는 동물 세포 배양시 고려되어야 하는 점들이 일반 발효와 다르기 때문이다. 특히 동물 세포는 shear stress에 약하고, 거품이 안생기는 효과적인 산소 전달이 중요한 관점이 되며, 세포 성장시 나오는 유독 물질(주로 암모니아와 lactic acid 계통)에 매우 민감하기 때문에, 현재까지는 배양조의 대형화에 문제점이 있었다. 그리하여 최근에 연속 배양공법 방식이 크게 대두되고 있다. 이 system은 batch공정보다 10배이상 효과적인 것으로 보고되고 있다(12). 즉 100L의 연속 배양조는 batch reactor의 1000L에 상당함을 의미한다.

이 연속 배양공법을 현재 동물 세포 배양에 사용하고 있지만, 이 system에 대한 연구가 극히 미미한

상태이다. 특히 세포성장의 동력학적 연구는 전무한 실정이다. 따라서 본 논문은 최근에 각광을 받고있는 연속 배양공법 방식중의 하나인 perfusion system을 이용해, 의약적 가치가 높은 tissue Plasminogen Activator(tPA) (13)의 생산에 관한 연구를 수행하고자 한다. 세포의 대량배양시, 특히 세포수가 많아 서로 clumping이 될때, 정확한 세포수의 측정이 어려운데 이때 산소 소비속도를 이용해 정확한 세포증식을 측정할 수 있는 방법을 제시하며, 세포증식과 tPA생산과의 관계에 관한 생물공학적 접근을 할 것이다.

재료 및 방법

Cell line과 배양 조건

Chinese Hamster Ovary(CHO, ATCC-k1)에 SV-40을 transformation시켜, 이의 논문에서 기술된 방법으로 배양시켜 100L 배양조건에 scale-up시켰다(2). 배지의 이동속도는 매일 측정된 세포수와 viability에 따라 변화시켜 24시간 steady state 상태에 도달하도록 해, 30일동안 배양시켰으며, 배지의 perfusion을 위해 $1 \mu m$ filter membrane을 사

Key words: Mammalian cell, cultivating of large quantities, kinetics

용해 세포를 다시 배양조로 recycle시켰다. 산소 소비속도(Oxygen Uptake Rate)의 측정은 off-line gas chromatography(GC)로 측정해 Oxygen mass balance에 의해 계산되었으며(14), 생산되는 tPA양은 enzyme linked immunosorbant assay(ELISA) 방법으로 측정했다(15).

세포수와 전체 산소 소비량과의 관계

System이 steady state인 경우 산소 소비속도(OUR)과 세포의 성장과의 관계는(16) 다음과 같이 표시될 수 있다.

$$OUR = X \cdot \mu / Y_{x/o} \tag{1}$$

여기서 X는 세포수(cells/ml), Y_{x/o}는 산소 소비당 세포 수율(cells/mmmole O₂ consumed)이고 OUR은 oxygen uptake rate(mmmole O₂/l/h)이며, μ는 specific growth rate(1/day)이다. 본 실험의 perfusion system은 앞에서 언급한 바와 같이 연속 배양과는 달리 세포가 배양조 내에서 계속 증식하는 feed-back loop이므로 μ=D가 성립될 수 없다. 이는 실험 결과에서 자세히 설명될 것이다. 따라서 μ의 일반적 정의인 (1/X)·(dX/dt)를 식 [1]의 μ에 대입해 적분을 하면

$$X = Y_{x/o} \cdot \sum_{t=0}^t OUR \cdot \Delta t \tag{2}$$

로서 산소 소비속도와 세포 증식과의 직선관계가 성립된다. 여기서 $\sum_{t=0}^t OUR \cdot \Delta t$ 는 전체 산소 소비량(mmmole O₂/l)이고, Y_{x/o}는 식 [2]의 linear regression으로 결정되며, growth model(21)의 maintenance term, m_e은 고려되지 않았다. 따라서 실험적으로 Y_{x/o}를 구한 후, 측정된 OUR로서 세포수의 간접 계산이 가능해진다.

세포 생육속도(Specific growth rate)의 계산

세포의 증식속도, μ는 정의에 의해(16)

$$\mu = 1/X \cdot (dX/dt) \tag{3}$$

이 되며, 이 식 [3]에 식 [1]과 [2]를 대입하면

$$\mu = OUR / \sum_{t=0}^t OUR \cdot \Delta t \tag{4}$$

가 된다. 즉, 산소 소비속도(OUR)만 정확히 측정하면 세포 성장속도, μ를 직접 계산할 수 있다.

산소 전달상수(K_{1a})의 계산

대량배양시 용존 산소양 및 산소 전달속도를 확인하기 위해 산소 전달상수의 on-line 측정은 매우 중

요하다. 이 상수를 계산하기 위해, steady state의 경우

산소 소비속도=산소 용존속도 라는 가정에서(16)

$$X \cdot \mu / Y_{o_2} = OUR = K_{1a}(C^* - C) \tag{5}$$

로 표시될 수 있다. 여기서 X는 세포수이고, μ는 specific growth rate(1/h), Y_{o₂}는 산소 수율이며, K_{1a}는 산소 전달상수(1/h)이며 C*는 배양온도 및 배지조건에서 용존 산소양으로, 대부분의 경우 약 30 ml O₂/l로 존재한다(17). C는 측정당시 산소 용존양(ml O₂/l)으로 D.O. probe로 쉽게 측정될 수 있다. 본 실험에서 용존 산소양은 대기 포화 산소압을 10%로 일정하게 유지시켰다. 따라서 식 [5]에 의해 산소 전달상수(K_{1a})는

$$K_{1a} = OUR / (C^* - C) \tag{6}$$

로 계산될 수 있다. 즉, 산소 소비속도(OUR, mmmole O₂/l/h)와 용존 산소양을 측정하면 위 상수를 측정할 수 있다.

결과 및 고찰

Table 1은 CHO cell line을 perfusion system에 30일간 연속 배양시킨 결과이다. 매일 trypan-blue dye exclusion 방법에 의해 세포수를 측정했으며, on-line GC로써 산소 소비속도를 측정했다(14). 이 실험 결과들을 앞에서 유도한 식 [2]에 적용시켜

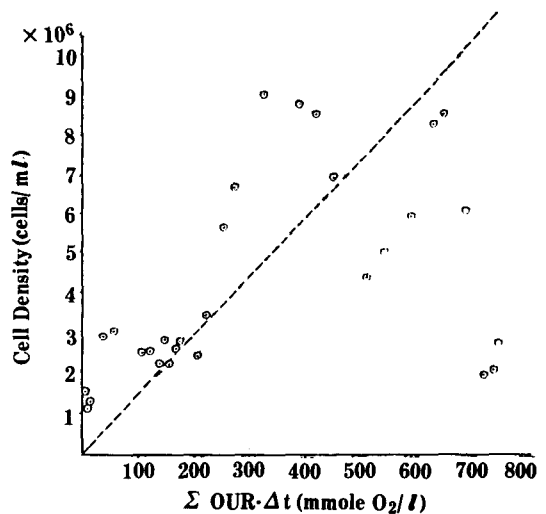


Fig. 1. Correlation between cell density and summation of oxygen uptake rate denotes ○ from Table 1. ----- is result of linear regression analysis.

Table 1. Results of cultivating recombinant CHO (CHO MT-2-1-8MCB) to produce tissue Plasminogen Activator under perfusion chemostat operations [2].

day	cell density $X \cdot 10^{-6}$ (cells per ml)	oxygen uptake rate, (mmole O_2 per l per hr)	tPA production (μ g per ml)
1	1.60	0.20	36.0
2	1.19	0.23	52.0
3	1.92	0.27	38.0
4	2.90	0.48	24.5
5	3.00	0.62	25.6
6	2.40	0.47	31.0
7	2.40	0.50	25.0
8	2.10	0.42	20.0
9	2.80	0.36	19.0
10	2.02	0.35	19.0
11	2.55	0.44	20.0
12	2.70	0.32	17.0
13	2.30	0.41	16.0
14	3.40	0.67	16.0
15	5.60	0.84	28.0
16	6.70	0.92	31.0
17	9.05	1.22	26.0
18	8.70	1.48	26.0
19	8.30	1.23	24.0
20	6.90	1.33	16.0
22	2.50	0.46	9.0
23	2.60	0.82	9.0
24	5.60	1.12	15.0
25	8.20	1.59	19.0
26	8.50	0.78	26.0
27	2.90	0.87	18.0
28	1.82	0.78	17.0
29	1.94	0.65	18.0
30	1.40	0.84	10.0

model의 타당성 및 산소 수율을 계산한 것이 Fig. 1이다

Fig. 1에서 점선은 Table I의 자료를 식 [2]에 linear regression시킨 결과로서 correlation factor, ρ 가 0.83이며, 계산된 $Y_{x/o}$ 의해 예측된 세포수와 (Fig. 1의 점선) 실제 측정된 세포수 (Fig. 1의 원형)와의 오차를 나타내는 predicted standard deviation (22)이 2.10으로, maintenance term이 무시된 $Y_{x/o}$ 의 타당성 및 식 [2]의 유용성이 입증됐다. 또

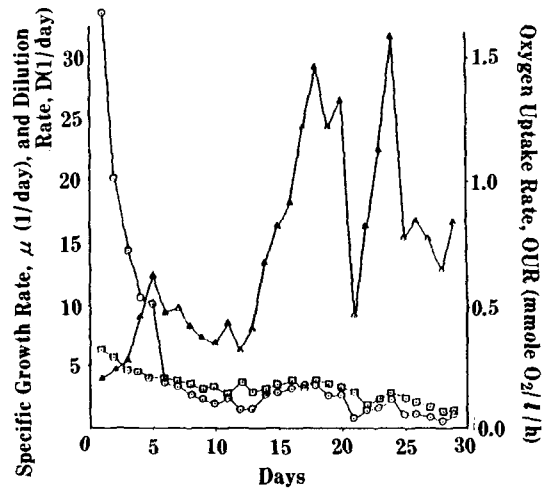


Fig. 2. Results of plotting data of specific growth rate and oxygen uptake rate according to operating days; ○, specific growth rate, 1/day; △, oxygen uptake rate, mmole O_2 /l/h; □, dilution rate, 1/day.

$\sum_{i=1}^n OUR \cdot \Delta t$ 는 각 산소 소비속도를 시간당 적분시켜 얻은 수치이다 (18). $Y_{x/o}$ 는 식 [2]의 관계에서 기율기로 구했으며, 1.26×10^4 (cells/mmole O_2)였다. 95% confidence interval은 $0.89 \times 10^4 \sim 2.14 \times 10^4$ 이였으며, 마지막 3개의 data point는 직선(점선)에서 상당히 떨어져 outlier로 처리했다. 그 이유는 세포의 clumping이 심해, 측정된 세포수의 정확도가 떨어지기 때문이었다. 따라서 계산된 $Y_{x/o}$ 값으로 다른 CHO cell line의 배양시 산소 소비속도만 측정하면 간접 세포수 측정이 가능하다.

Fig. 2는 식 [4]에 의해 간접 계산된 세포 성장속도, μ 와 산소 소비속도 및 배지의 perfusion 속도를 나타낸 것이다. 배지 이동속도를 바꾼 후 steady state에 도달될 때까지 24시간 동안 유지시켰다. 그림의 원형들이 세포 성장속도로써 배양초기에는 감소하여 5일 이후부터 steady 상태에 도달했으며, 이때 평균 성장속도가 2.89(1/day)다. 이 증식속도는 다른 동물 세포들과 비교해 빠른 것이다. 또한 전체적으로 세포 성장속도가 perfusion 속도보다 낮음을 보이고 있다. 그 이유는 이 system이 feed-back loop으로 $\mu = D$ 의 등식이 아닌, $\mu < D$ 의 관계가 있기 때문이다 (21). 이 $\mu/D < 1$ 이 되는 factor들은 세포의 recycle ratio 및 filter에 세포의 유착 등이다. 즉, 배지만 빠져 나가고 세포가 recycle되어야 하는데, 세포가 filter 막에 붙거나 통과에 의한 세포의 유실이 그 원인이다. 산소 소비속도에 근거를 둔 이 세포 증식속도는 clumping에 의한 세포수 측정 오차에 따른 μ 값의 오차가 배제되었다고 생각할 수 있다.

역으로 Fig. 4에서 볼 수 있듯이 세포수와 배양시간의 실험으로 실제 specific growth rate의 측정이 가능하지만, 앞에서 언급된 clumping에 의한 세포수 오차 때문에 의미가 없었다. 따라서 oxygen uptake rate의 증가로 세포의 연속적인 증식을 확인했으며, Fig. 2에서 나타났듯이 간접 계산된 μ 와 dilution rate과의 비교로써 식 [4]의 타당성을 증명할 수 있다.

Fig. 3은 산소 소비속도와 산소 전달 상수와의 관계를 보여주고 있다. 식 [6]에 의해 계산된 산소 전달 상수로서 최대값이 1.30(1/h)로 나타났다. 이는 미생물 발효의 경우(평균 5-50<1/h>) (9) 보다는 적은 값이지만, 급격한 교반이 불가능하며 거품의 성장을 저해하며 산소공급을 해야하는 동물 세포 배양을 고려하면 만족할만한 수치이다. 또한 다른 배양 system들(batch, hollow-fiber 혹은 ceramic type bioreactor)과 비교해 볼 때 산소 전달속도가 높은 것을 알 수 있다(19). 특히 Fig. 2와 3과 같은 자료들이 보고된 바가 극히 없어 이 결과들은 대량으로 동물 세포 배양을 위한 scale-up에 중요한 정보를 제공할 것이다.

Fig. 4는 tPA생산과 세포 평균수 및 산소 소비속도와의 관계를 보고자 배양 시간에 따라 표시한 그림이다. 산소 소비속도 및 세포수가 최대일 때 tPA 생산이 31.0 $\mu\text{g/ml}$ 로서 최대치를 나타내고 있다. 단지 연속 배양 초기의 tPA양이 52.0 $\mu\text{g/ml}$ 로 나타났는데, 이는 scale-up 마지막 단계인 15L

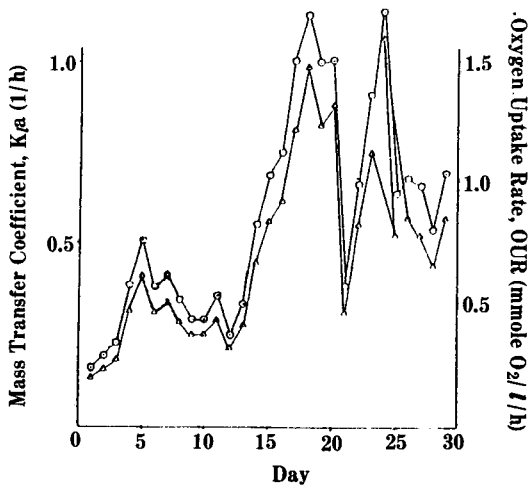


Fig. 3. Relationship between mass transfer coefficient and oxygen uptake rate from data of Table 1; \circ , mass transfer coefficient, 1/h; \triangle , oxygen uptake rate, mmole O_2 /l/h.

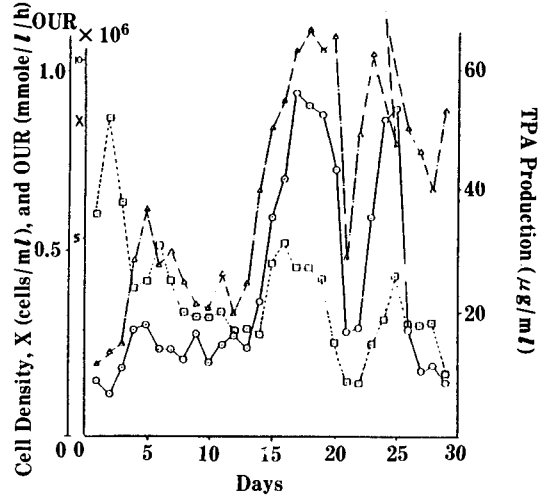


Fig. 4. tPA production correlated with cell density and oxygen uptake rate according to cultivation days; \circ , and —, viable cell density, cells/ml; \triangle , and ---, oxygen uptake rate, mmole O_2 /l/h; \square , and ---, tPA production, $\mu\text{g/ml}$.

spinner vessel에서 성장 최적조건으로 자랐기 때문에 연속 배양조로 옮기면서, 세포가 변화된 환경에 적응하는 동안 tPA가 나왔기 때문이다. 그 후 tPA양이 감소되다가 10일 이후에 세포수가 증가함에 따라 다시 생성양 증가함을 보여주고 있다. 또한 tPA생산이 세포수보다는 산소 소비속도와 보다 밀접한 관계가 있음을 알 수 있다. 그 이유는 배양중 세포끼리 서로 clumping이 되 세포수 측정에 오차가 많지만, 산소 소비속도는 산소의 mass balance에 의한 값이므로 GC 측정 오차 $\pm 0.05\%$ 만이 있기 때문이다. Table 1에서 보듯이 이 배양에서 생성되는 tPA가 매일 평균 20 $\mu\text{g/ml}$ 이며, 이 연속 배양조의 크기가 100 l이므로 매일 2g의 tPA가 생산 가능하며, 6개월까지 생산 가능하다고 보면 전체 생산량은 360g이 된다. 이 양은 다른 동물 세포 배양 system으로 얻을 수 있는 양보다 월등히 높음을 알 수 있다(20).

결 론

동물 세포의 대량배양에 따른 세포 성장속도 및 산소 전달속도 등을 산소 소비속도의 측정으로서 on-line으로 계산할 수 있는 식들을 유도했으며, 실제 실험한 결과와 비교해 큰 차이가 없음을 알 수 있었다. 이는 세포수의 정확한 측정이 불가능한 경우 산소 소비속도를 이용한 간접적인 세포수 측정이 가능함을 보여주고 있다. 또한 연속 배양공법에 의해

생산된 tPA양이 기존의 배양 system에 의한 생산양보다 월등히 많음이 입증되었다. 지금까지 보고되고 있지 않은 동물 세포의 산소 수율, $Y_{x/o}$ 및 specific growth rate들을 계산할 수 있었으며, 대량배양을 위한 bioreactor 설계에 중요한 산소 전달 상수값도 계산되었다. 이러한 자료들이 세포 배양에 의한 의약품의 대량생산을 위한 scale-up에 중요한 기초적 정보를 제공할 것이다.

요 약

Chinese Hamster Ovary 세포의 대량배양을 위한 동력학적 변수들을 산소 소비속도의 on-line 측정으로 구하였다. 세포성장과 산소 소비속도의 상관관계 계수가 0.83으로 밀접한 상호 직선관계가 있음을 입증하며, 이에 근거를 둔 model에 의해 간접 계산된 세포수가 실제 측정된 세포수와 상당히 일치하였다. 따라서 세포끼리 서로 뭉쳐 직접 세포수 측정이 부정확한 경우 산소 소비속도의 측정에 의해 간접적으로 세포수를 예측할 수 있음을 입증하였다. 산소 세포수율, $Y_{x/o}$ 와 mass transfer coefficient, K_{La} 가 각각 1.26×10^4 cells/mmol O_2 consumed와 1.01 1/h로 측정되었으며, 평균 세포 성장속도는 2.89 1/day로 계산되었다. 이는 매일 2 gram의 tPA를 연속 생산할 수 있는 조건이었다.

참고문헌

- Lee, H.Y., *Korean J. Appl. Micro. Bioeng.*, **16**, 246 (1988).
- Lee, H.Y., *Tenth Symposium on Korean Scientist and Engineers in America*, **10**, 127 (1988).
- Philip, C.F., and J.E. Fredericks, *Bio/Technology*, **6**, 41 (1988).
- Grougham, N., and D.I.C. Wang, *Biotech. Bioeng.*, **32**, 130 (1987).
- Mizrahi, A., and A.L. Van Wezel, *Adv. Biotechnol. Processes*, **2**, 1 (1983).
- Glacken, M.W., R.J. Fleischaker, and A.J. Sinsky, *Annal. N. Y. Acad. Sci.*, **413**, 355 (1983).
- Hu, W.S., and T.C. Dodge, *Bio/Technology*, **1**, 209 (1985).
- Aiba, S., A.E. Humphrey, and N.E. Millis (eds.), *Biochemical Engineering*, second edition, University of Tokyo press, Japan (1973).
- Stanbury, P.F., and A. Whitaker (eds.), *Principles of Fermentation Technology*, Pergamon press, N.Y. (1984).
- Randerson, D.H., *J. Bacteriol.*, **2**, 241 (1985).
- Ratafia, M., *Pharmaceutical Technol.*, **11**, 48 (1987).
- Tolbert, W.R., and W.R. Srigley, *Biopharm.*, **4**, 249 (1987).
- Klausner, A., *Bio/Technology*, **5**, 869 (1987).
- Lee, H.Y., *Korean J. Biochemical Eng.*, (submitted for publication) (1988).
- Freshney, R.I. (ed.), *Culture of Animal Cells*, Alan R. Liss, Inc., N.Y. (1983).
- Bailey, J.E., and D.F. Ollis (eds.), *Biochemical Engineering Fundamentals*, (2nd ed.) McGraw-Hill Co., N.Y. (1986).
- Robert, C.W., and M.J. Astle (eds.), *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 63rd ed., p. B-126, CRC press, FL (1982).
- Statistical Packages for Social Science-X (SPSS-X), Kangweon National University, Cyber 170-720.
- Folkman, J., W.G. Hardison, L.F. Rudolf, and F.J. Veith (eds.), *Organ Perfusion and Preservation*, Appleton-Century-Crofts press, N.Y. (1968).
- Tolbert, W.R., Personal communication, Invitron, St. Louis, MO. (1987).
- Pirt, S.J., (ed.), *Principles of Microbe and Cell Cultivation*, John Wiley & Sons, N.Y. (1975).
- Snedecor, G.W., and W.G. Cochran (ed.), *Statistical Methods* (7th ed.), pp. 351, Iowa State Univ. press, Iowa (1980).

(Received June 7, 1988)