

혈청 요구성 세포의 생육을 위한 무혈청 배지의 새로운 적응 공법

김영남 · 유호금 · *전병철 · *김영도 · 이현용

강원대학교 식품공학과, *삼일제약 중앙연구소

New Adaptation Process to Serum Free Media for the Growth of Serum-requiring Human Cell Line

Young Nam Kim, Ho Keum You, *Byung Chul Chun,
*Young Do Kim and Hyeon Yong Lee

Department of Food Engineering, Kangweon National University

*Central Research institute, Samil Pharmaceutical Co.

ABSTRACT

Serial adaptation technique of conditioned media has been applied to cultivate human cell line which can not survive in a serum free medium without adding any growth factors in basal medium. Doubling time and scu-PA production from serum free adapted cells were 5 days and 890 (IU/mL), respectively in a T-flask, whose values were not much lower than the productivity of 1100(IU/mL) from 5% serum containing medium. It was required to use conditioned media for attaching cells on microcarriers when cells were inoculated into a spinner vessel. Then, cells could continuously grow in serum free medium with having specific growth rate of 0.106 (1/day) and specific scu-PA production rate of 1.58×10^{-5} (IU/cell/day) in batch cultivation.

서 론

최근 동물세포의 체외(in vitro) 배양기술을 이용해 의약적 특성을 지닌 단백질의 생산에 관한 연구가 다각적으로 행해지고 있다(1-3). 이들 연구들은 체외 대량배양이 가능한 배양기와 효율적인 배양공정의 개발, 생육 변수들과 세포 생육 및 물질 생산성과의 관계, 생산성 증진위반 prokaryotic and eukaryotic 유전자 조작기법, 목적 물질의 활성화와 의약적 특성의 개선 및 향상을 위한 단백질 공학과 같은 분야들에서 집중적으로 행해지고 있다(4-10). 하지만 동물 세포는 일반 미생물과 달리 체외 배양 시 고가의 혈청 및 배지의 사용과 이들의 연속적 소모가 요구되는 연속배양(perfusion cultivation)의 필요성 때문에, 생산되는 단백질이 유전자 조작된 미생물에 의해 생산되는 것들보다 의약적 특성이 높음에도 불구하고 경제적 타당성 때문에 산업화에 많은 어려움이 있다(11-13). 이같은 문제점을 해결하

기 위해 고농도 배양이 가능한 배양조의 설계와 배양공정의 효율적인 조절을 위한 동물세포 배양의 최적화 등을 통해 보다 경제적인 배양공정을 개발하려고 하고 있다. 또한 이와 더불어 보다 근본적이며 세포 생물학(cell biology)적인 접근으로 무혈청에서 세포성장 및 물질 생산이 유지가 가능한 배지 성분에 관한 연구와 무혈청 배지에서 생육이 가능한 세포주의 확립에 대해 많은 연구가 진행되고 있다(14-15).

무혈청 배지에서의 세포 생육은 목적 단백질의 생산 비용을 절감하며 분리 수율을 현저히 향상시키는 장점들이 있어 현재는 산업적 생산을 위한 배양에서는 대부분이 무혈청 배지를 사용하고 있다. 하지만 이같은 무혈청 배지의 대부분은 세포 생육을 위해 insulin, transferrin, lipo-proteins, fibronectins, epidermal growth factors, polysaccharides, polypeptide 등과 같은 macromolecule의 생육 인자들을 첨가하고 있다(16-18). 또한 특이한 세포주들은 이

같은 생육 인자들을 첨가해도 무혈청 배지에서 생육 혹은 목적 단백질의 생산이 안되는 경우가 있다. 따라서 세포 생육시 반드시 혈청을 필요로 하는 세포주를 생육 인자가 포함되지 않은 무혈청 배지에서 연속적 생육이 가능하도록 하는 새로운 적응 방법에 대한 연구가 필요한 실정이다. 이를 위해 본 연구는 적응공법의 경제성을 높이며 적응 효율(adaptation efficiency)을 높이기 위해, 세포 생육시 생육 및 접착 인자를 생산하는 세포를 배양한 배지(spent media)와 동시에 배양하는 새로운 co-culture 기술을 개발하고자 한다.

재료 및 방법

생육을 위해 혈청(Fetal bovine or calf serum, FBS or FCS)을 필수적으로 요구하는 인간 세포주인 HEK sub.6 (Human embryonic kidney cell line subclone 6)의 배양을 위해 75 T-flask (Corning, USA) 에서 30($\mu\text{g/mL}$)의 gentamicine을 포함한 기본 배지인 DMEM에 5% FBS를 보강한 배지를 매 3-4일마다 갈아주며 nuclei count방법으로 생 세포수(viable cells)를 측정했다(19). 또한 HEK sub. 6 세포주의 물질 생산성을 측정하기위해 chromogenic substrate인 S-2444를 이용해 single chain Urokinase type Plasminogen Activator (scu-PA)의 농도를 측정했다(20). 이 세포가 무혈청 배지(DMEM 배지)에서 생육하는가를 확인하기위해 5% FBS 배지에서 약 80% 이상의 confluent 상태를 유지했을때 무혈청 배지로 갈아준 후 세포수와 세포상태(attachment and morphological changes)를 도립 현미경을 통해 관찰했다.

HEK 세포를 무혈청 배지에 적응시키기 위해 CCD-19 SK (Human skin fibroblasts, CRL 1471)를 RPMI 1640에 1% FBS로 37°C에서 48시간 배양한 배양액(conditioned spent medium, CSM)을 이용해 다음과 같은 serial dilution 방법으로 적응시켰다. HEK 세포를 75 T-flask에 약 5×10^4 viable cell/mL의 농도로 seeding 한 후 기본 배지인 DMEM과 CSM을 3:7(v/v)의 비율로 섞은 혼합 배지에서 매일 세포 형태를 관찰하며 confluent 상태에 도달할 때까지 배양했다. Confluent 상태에 도달했을 때의 농도를 측정한 후 세포수를 다시 5×10^4 viable cell/mL의 농도로 희석해 이번에는 5:5로 희석된 배지에도 배양했다. 다음 passage에서는 7:3으로 혼합된 배지로 배양했으며 마지막 passa-

ge에서 10:0으로 순수한 DMEM 배지만으로 배양했다. 이같이 adaptation 된 후에는 계속 무혈청 배지로 DMEM만을 사용해 배양하며 세포수, 세포 형태를 관찰하고 이에 대응하는 증식 속도(doubling time)과 scu-PA 생산량을 측정했다. CSM과 혼합된 배지로 배양할 경우는 fibroblasts가 scu-PA를 생산할 수도 있는 가능성 때문에 목적물질(scu-pA)의 농도를 측정하지 않았다.

배양 공정의 scale-up시 이같은 무혈청 배지에서의 생육을 확인하기위해 1 L spinner vessel(Bellico, USA)에서 배양 실험을 행했다. DMEM과 CSM이 5:5의 비율로 혼합된 배지 300 mL에 1 g/L의 Cytodex III를 넣은후 약 5×10^4 viable cell/ml의 세포를 접종해 30분 정도 정지한후 35 rpm으로 교반하며 37°C로 데워진 DMEM 배지 700 mL와 2 g/L의 Cytodex III를 추가로 첨가해 전체 부피가 1 L가 되도록 했다. (예비 실험에서 순수한 DMEM 배지에서는 세포가 미립 단체에 부착 능력이 없음이 확인 됬음) 이같이 접종한 후 head space aeration 방법으로 5% CO₂가 포함된 공기를 투입하며 37°C에서 45 rpm으로 교반 배양했다. 또한 매일 세포수와 scu-PA양을 측정함과 함께 미립단체(microcarrier)에 부착한 세포의 형태를 관찰해 무혈청 배지에서 세포 생육과 물질 생산속도를 계산했다.

결과 및 고찰

Fig. 1은 HEK-6 세포를 T-flask에서 5% FBS를 포함한 배지로 약 3일간 배양해 완전히 confluent 상태에 도달했을 때의 형태로 이때의 세포 농도는 약 1×10^6 (viable cell/mL)이며 생성된 scu-PA의 양은 1100(IU/mL)이다. 세포가 완전한 fiber를 형성하며 정상적으로 생육하고 있음을 알 수 있다. 이같은 상태에서 무혈청 배지에서의 생육 가능성을 확인하기위해 DMEM 배지만으로 교체한 후 4일간 배양한 결과가 Fig. 2로서 정상적으로 생육하던 fiber들이 수축, 분리되고 세포가 원형 형태로 떨어지는 것을 볼 수 있다. 이같이 떨어진 세포가 접착성에서 비 접착성 상태로 전환돼 생육할 수 있는지 알기 위해 이 세포의 생육도를 측정한 결과 0%에 가까우며 2일이 더 지난 후에는 완전히 사멸해, HEK 세포주는 생육 인자가 없는 무혈청 배지에서는 생육이 불가능한 것으로 판명됐다.

이 세포주를 CSM와 DMEM 배지가 3:7로 혼합된 배지(the third passage)로 serial dilution 시켜

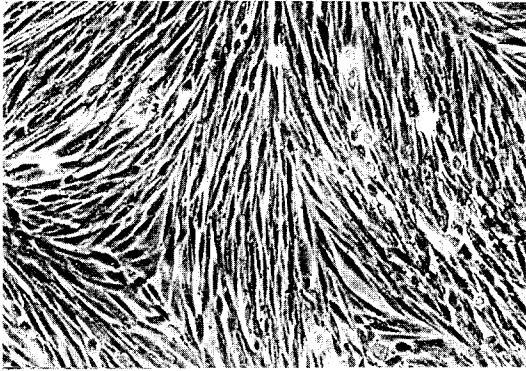


Fig. 1. Three days of cultivating HEK cells on 5% FBS containing DMEM medium in a 75 T-flask.



Fig. 2. The death of cells after changing serum containing medium to a basal medium of DMEM medium.

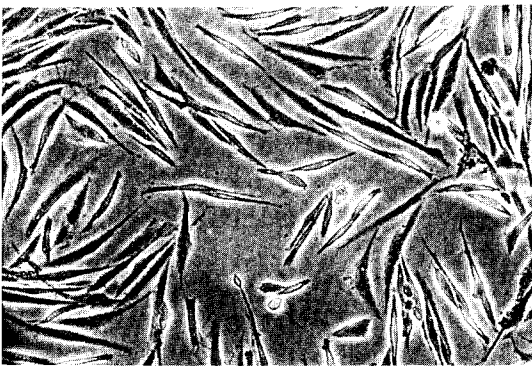
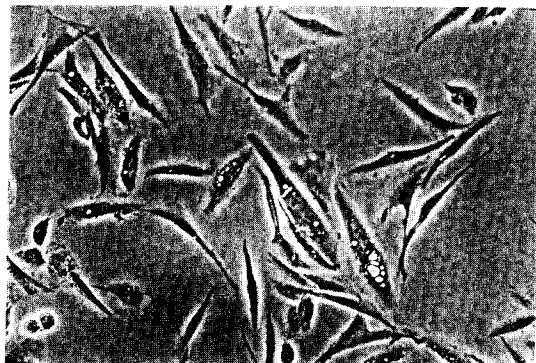


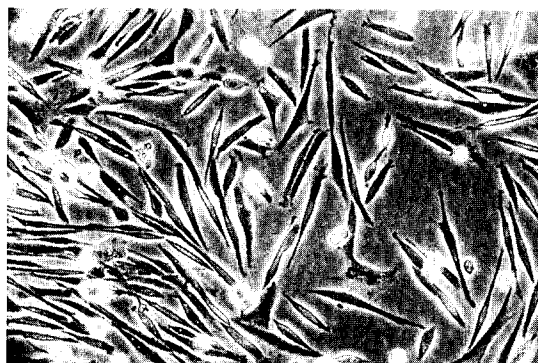
Fig. 3. The picture of starting the growth of HEK cells after adding 3:7 CSM medium to suspension cells in Fig. 2.

배양 후 2일이 지난 후의 상태로, 생육 속도가 다소 느리기는 하나 Fig. 3에서 보듯이 각 핵에서 돌기를 형성해 fiber 상태로 뻗으며 성장하고 있음을 알 수 있다. 이같이 CSM의 농도를 단계적으로 감소하며 macromolecule이 전혀 존재하지 않는 순수한 DMEM 배지에 적응돼 생육하는 있는 것을, 접종 후 confluent 상태에 도달할 때까지의 매일의 변화를 나타낸 것이 Fig. 4이다. CSM과 DMEM이 3:7 혼합된 배지에서 confluent 상태로 자란 후 0.04% trypsin으로 처리해 DMEM만 존재하는 배지로 subculture 한 후 1일 지난 후의 상태로 세포가 표면에 정착돼 돌기를 형성하고 있음을 알 수 있다. 배양 2일째 부터는 세포들이 fiber를 형성하며 성장하여 T-flask를 덮기 시작해 배양 후 5일 때에는 완전한 confluent 상태에 도달해 (Fig. 4) 이후부터는 단지 DMEM 배지에서도 생육이 가능해 졌으며, 수차의 subculture에서도 세포의 morphology나 생육의 변화가 없이 (Fig. 1과 비교) 안정된 상태에 도달했다. 이같이 무혈청 배지 적응된 세포를 HEK sub.6-SF로 명했다.

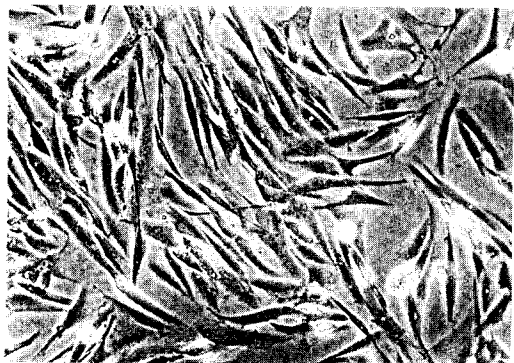
Scu-PA 생산 공정의 scale-up을 위해 HEK sub.6-SF 세포의 배양기(bioreactor)에서 생육 가능성을 확인하기 위해 1L spinner vessel에서 회분 배양 실험을 수행했다. 이때 HEK sub.6-SF 세포가 미립 담체에 DMEM 배지만 존재할 경우 정착하는 것을 알기 위해 1 (g/L)의 Cytodex III가 존재하는 DMEM 배지에 1×10^4 (viable cell/mL)의 세포를 접종해 3시간 동안 방치한 후의 약 30 rpm으로 1일간 배양 후의 사진이 Fig. 5로서, 세포 정착이 안 이루어 졌으며 세포의 생육도 또한 안됐음을 알 수 있다. 정착되지않고 유동되고 있는 세포의 생육도를 알기위해 trypan dye 방법으로 확인한 결과 대부분이 죽은 세포로 판명돼, DMEM 배지만 있는 경우에는 세포의 정착이 이루어지지 않아 생육이 불가능한 것으로 추정됐다. 이같은 가능성은 Fig. 6에서 나타나듯이 CSM과 DMEM이 5:5로 혼합된 배지에서 30분간 정치후 30 rpm으로 1일간 배양 후 세포가 담체에 정착해 fiber를 형성하며 생육하고 있는 것으로 입증됐다. 세포가 담체에 붙는 동안 배지내 낮은 attachment factor 농도와 HEK sub.6-SF 세포의 약한 정착성 때문에 미 정착 담체의 농도가 높은 경우 bead/bead/cell collision에 의해 정착율의 저하가 야기될 것으로 예측돼, 우선 1 (g/L)의 담체에 정착한후 다시 2 (g/L)의 담체를 추가로 유입하는 배양 방식을 택했다.



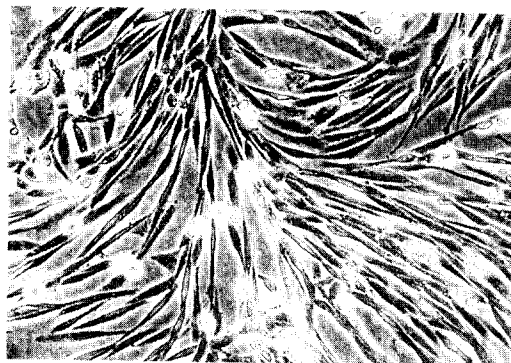
a.



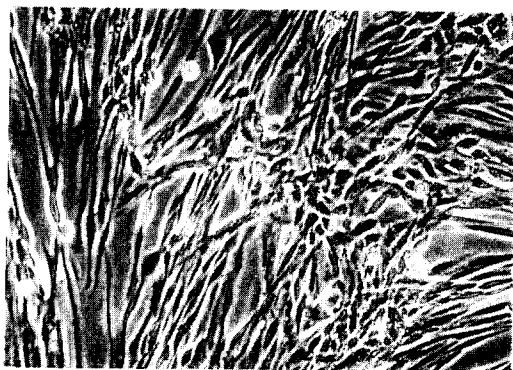
b.



c.



d.



e.

Fig. 4. The growth of HEK cells cultivated by only basal medium after the subculture from the confluent cells in 3:7 CSM medium according to cultivation time: a, the first day of cultivation; b, the second day; c, the third day; d, the fourth day; e, the fifth day.

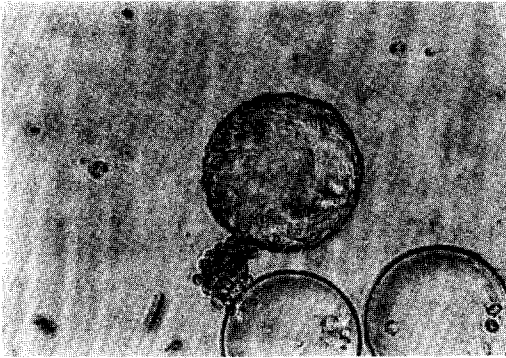


Fig. 5. The detachment of HEK sub.6-SF cells from Cytodex III in inoculating cells with only DMEM medium for the cultivation in a 1 L spinner vessel.

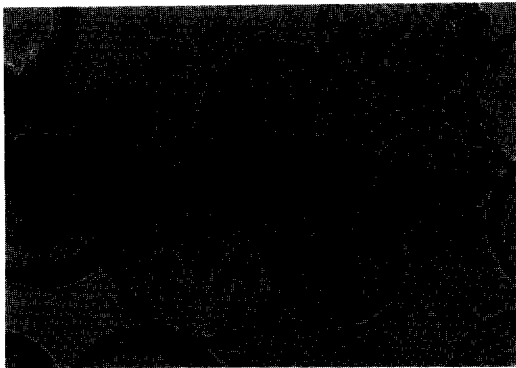


Fig. 6. Cell growth of HEK sub.6-SF after attaching cells on Cytodex III by adding 5:5 CSM medium in inoculating cells into a spinner vessel.

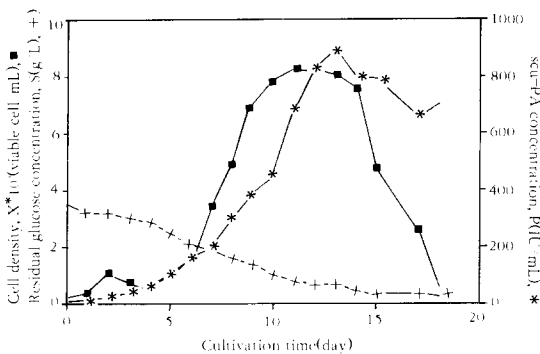


Fig. 7. Cell growth and scu-PA production from batch cultivation of HEK sub.6-SF cells in only DMEM medium.

이같은 방법으로 HEK sub.6-SF 세포를 회분 배양한 결과가 Fig. 7이다. 접종 후 약 6일 정도의 상대적으로 느린 lag 기간을 나타내고 있으며 배양후 약 3일 정도까지는 생육이 적은 양이지만 증가한 이유는 접종 초기의 CSM 배지에 기인돼 CSM 배지가 소모됐을 시점에서 생육이 감소된 후 대수 증식기에 도달했을 가능성이 큰 때문으로 예측된다. 생 세포 농도는 배양후 약 12일후에 8.5×10^5 (viable cell/mL)의 최대치에 도달한 후 급속히 감소하는 반면에 생산되는 scu-PA는 배양 후 약 13일 후에 약 900 (IU/mL)의 최대치를 유지하며 배양 시간이 지남에도 감소 속도가 극히 완만히 진행됐다. 이는 scu-PA 생산이 다른 세포 물질 생산과 유사하게 non-growth related or partially growth related process임을 입증하며, 이같은 무혈청 배지에서는 생육 속도가 느리지만 전체 scu-PA 생산이 약 15일정도 지속돼므로 혈청이 포함된 배지에서 회분 배양시 약 5-6일 정도 후부터는 세포 생육이 감소함에 따라 연쇄적으로 scu-PA의 생산성도 감소하는 경향에 비해 상대적으로 오래 물질 생산성을 유지할 수 있다. 이때 최대 비 생육속도는 0.106 (1/day)이며 scu-PA의 비 생산 속도는 약 1.58×10^{-5} (IU/cell/day)로서 연속 배양시 혈청 배지에서의 생산속도인 1×10^{-3} (IU/Cell/day)와 유사함을 알 수 있다(21). 본 연구는 새로운 적응방법 개발에 주안점을 둔 것으로 보다 장기적인 세포 및 물질 생산성에 관한 연구를

Table 1. Comparison of cell growth and scu-PA production from the cultivations with serum containing and serum free media in a T-flask and a bioreactor.

	5% FBS		Serum free medium	
	T-flask*	Reactor**	T-flask*	Spinner+
Doubling time (day)	1.4	1.5	5.1	6.52
scu-PA production (IU/mL)	1100	1240	890	830
Maximum cell density (viable cell/mL)	—	2.7×10^6	—	8.5×10^5

* Maximum cell density of 1×10^6 (viable cell/mL) and scu-PA concentration were measured just before subcultivation of confluent cells. Initial cell concentration was about 1×10^4 (viable cell/mL).

** Perfusion cultivation of human cell line in a 2L bioreactor at a dilution rate of 0.02 (1/h) (21).

+ Batch cultivation of HEK cells in a 1 L spinner vessel.

위해서는 본 세포주를 이용해 연속배양(perfusion cultivation) 실험을 차기에 수행해야 할 것이다.

또한 Table 1이 기존의 5% 혈청이 포함된 배지와 생육 인자가 없는 무혈청 배지에 적응된 세포의 생육 속도와 물질 생산성을 비교한 결과로서, 5% 혈청이 포함된 배지에서는 T-flask에서 배양된 경우와 reactor로 scale-up된 후에도 증식 속도와 scu-PA 생산량의 차이가 없으며 최대 세포수는 5.7×10^6 (viable cell/mL)를 유지한 반면, 무혈청 배지로 적응된 세포는 생육 속도가 약 5배이상 느리게 차이가 났고, reactor에서는 T-flask에서보다 생육 속도가 다소 감소했으며 최대 세포수도 혈청이 포함된 배지에서 보다 낮음을 알 수 있다. 하지만 생산되는 scu-PA 양은 큰 차이가 없어 비생산성(specific productivity)의 증가를 피할 수 있을 것이다.

요 약

생육 인자가 들어있지 않은 순수한 무혈청 배지에서 생육이 불가능한 사람 세포인 fibroblasts를 배양한 배양액과 혼합된 배지를 연속적으로 희석 배양하는 방법으로 4계대를 거친 후에 순수 무혈청 배지에서 생육이 가능한 상태로 적응 시켰다. 이 세포는 순수 무혈청 배지에서 배수 증식기를 약 5일로 유지하며 지속적으로 성장했다. 이같은 생육 속도는 혈청이 포함된 배지에서 보다 느리지만 scu-PA 생산량은 890 (IU/mL)로서 5% 혈청이 포함된 배지에서 1100(IU/mL)와 비교해 그리 큰 차이는 없다. 또한 적응된 세포의 bioreactor로의 scale-up때 초기 접종시 혼합 배지를 사용해 정착성을 향상 시킨 후에는 무혈청 배지로 성장이 가능했으며, 생육 및 물질 생산성은 회분 배양시 최대 세포수가 8.5×10^6 (viable cell/mL)와 약 6.5일의 배수 증식 속도로 혈청이 포함된 경우보다 낮지만 약 830 (IU/mL)의 scu-PA를 생산해 물질 생산은 상대적으로 높아 단백질이 전혀 없는 무혈청 배지에서 경제적 생산 및 분리수율의 향상이 가능하다. 또한 순수 무혈청 배지로 회분배양해 0.106 (1/day)의 비 생육 속도와 1.5×10^{-5} (IU/cell/day)의 비생산 속도를 얻었다. HEK sub. 6-SF 세포주의 보다 정확한 산업적 응용의 타당성 확인을 위해 차기 연구로 무혈청 배지에 적응된 세포주의 연속 배양에 의한 세포 생육 및 물질 생산성을 검토해야 할 것이다.

사 사

본 연구의 일부는 독일 Alexander Humboldt Fellowship과 생물 공정 연구 센터의 지원으로 수행됨에 있어 심심한 사의와 함께, 독일 GBF의 기자재 등을 제공한 Dr. W. D. Deckwer에도 감사의 뜻을 포함합니다.

참고 문헌

1. Z. B. Salama, T. Collins, and H. Jaeger (1992), *BFE* **9**, 148.
2. T. J. Nikolai, M.V. Peshwa, S. Goetghebeur, and W. S. Hu (1991), *Cytotechnol.* **5**, 141.
3. W. Eichner, V. Jager, D. Herbst, H. Hauser, and J. Hoppe (1989), *Eur. J. Biochem.*, **185**, 135.
4. G. Kaplan, Z. A. Cohn, and K. Smith (1992), *Bio/Technol.*, **10**, 157.
5. T. Cartwright, and A. Crespo (1991), *Production of Biologicals from Animal Cells*, R.E. Spier and G. B. Griffiths (eds.), pp. 669, Butterworth co., Carwell.
6. P. Contino, D. Repke, and Y. Nemerson (1991), *Throm. Haemo.* **66**, 138.
7. H. K. Yo, S. Choi, Y. S. Lee, K. W. Shin, and H. Y. Lee (1991), *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **19**, 504.
8. J. Caldwell, B. Locey, M. Clarke, S. G. Emerson, and B. O. Palsson (1991), *Biotechnol. Prog.* **7**, 1.
9. K. Zygorakis, R. Biozos, and P. Markenscoff (1991), *Biotechnol. Bioeng.* **38**, 459.
10. J. D. Brotherton, and P. C. Chau (1990), *Biotechnol. bioeng.*, **35**, 375.
11. J. B. Griffiths (1991), *Cytotechnol.*, **5**, 193.
12. E. Meilhoc, K. D. Wittrup, and J. E. Bailey (1990), *Biopro. Eng.*, **5**, 263.
13. W. R. Arathoon, and J. R. Birth (1986), *Science*, **232**, 1390.
14. W. Reiser, and H. Hauser (1987), *Drug. Res.*, **37**, 482.
15. T. Matsushita, M. Ketayama, K. Kamihata, and K. Funatsu (1990), *Eur. Microbiol. Biotechnol.*, **33**, 287.

16. A. Lang, U. Schuerch, and S. Cryz (1991), *Hybridoma*, **10**, 401.
17. M. C. Glassy, R. E. Peters, and A. Mikhalev (1987), *In Vitro*, **23**, 745.
18. S. P. C. Cole, E. H. Vreeken, S. E. L. Mirski, and B. G. Campling (1987), *J. Immunol. Methods*, **97**, 29.
19. J. P. Kalenbach, M. H. Kalenbach, and W. Lyans (1958), *Exp. Cell Res.*, **15**, 112.
20. S. Kasai, H. Arimura, M. Nishida, and T. Suyama (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 12377.
21. J. K. Kang, and H. Y. Lee (1990), *Biotech. Lett.*, **12**, 173.