

무혈청 배지로부터 scu-PA의 생산을 위한 배지의 재사용 공정에 관한 연구

김 영 남 · *박 경 유 · **전 병 철 · 이 진 하 · 이 현 용
강원대학교 식품공학과, *한림대학교 의과대학, **삼일제약 중앙연구소

Medium Recycle Process for the Production of scu-PA from Serum Free Medium

Young Nam Kim, *Kyung You Park, **Byung Chul Chun,
Jin Ha Lee and Hyeon Yong Lee

Department of Food Engineering, Kangweon National University

*College of Medicine, Hanlym University

**Central Research Institutue, Samil Pharmaceutical Co.

ABSTRACT

1.96×10^{-5} (IU/cell/hr) of specific scu-PA production rate was obtained from HEK cells in maintaining ca. 8×10^5 (cells/ml) of maximum cell density at 10 (ml/hr) of perfusion rate with recycling 20% serum free conditioned media. It can be compared to 4×10^6 (cells/ml) of maximum cell density and 4.56×10^{-4} (IU/cell/hr) of specific production rate in cultivating cells with 1% serum containing medium. The conversion ratio of scu-PA to tc-UK increased up to 55% as the recycling ratio increased; however, recycling the used medium seemed to have least negative effect on cell growth. It also showed that the recycling process had definitive advantage of using serum free medium in perfusion cultivation of HEK cell line.

서 론

동물세포의 체외 배양을 통해 생물 의약품을 생산하고자 하는 연구가 전세계적으로 다각적인 방면에서 진행되고 있으며, 현재는 세포 생물학적인 기초 연구 단계를 지나 목적 의약품의 경제적 생산이 가능한 배양공정 개발 및 의약품 특성의 활성화를 위해 생물학 및 공학적인 접목을 통한 총체적 방법을 모색하고 있다(1~4). 특히 유전자 재조합된 세포의 이용보다는 천연세포를 배양해 기존의 낮은 생산성을 보다 높이며 의약품 특성이 향상된 단백질의 생산에 많은 관심을 갖고 있으며, 단백질 공학의 응용

및 대사 조절에 의한 최종 목적 물질의 특성 향상 등에 광범할 만한 결과들이 보고되고 있다(5~7). 이와 함께 물질 생산성 향상을 위해 과거부터 꾸준히 연구돼온 분야로 무혈청 배지의 개발이 중요한 과제로 인식돼, 현재는 많은 hybridoma와 수종의 세포주에 대한 무혈청 배지가 개발됐으며 일부는 상품화되고 있다(8~10).

하지만 이같이 개발된 무혈청 배지는 대부분의 hybridoma의 배양에 이용이 가능하지만 다른 세포주에 직접적인 적용이 어려우며, 특히 물질 생산을 위해서는 새로운 무혈청 배지를 개발해야 하는 문제점을 갖고 있다. 또한 연속 배양(perfusion cultiva

tion)시 전체 배지의 이동 속도의 증가에 따른 배지 내 유용 성분의 비소비에 기인한 비경제적 요소들을 제거할 수 있는 배지의 재사용 공정의 응용이 요구된다(11). 동물세포 배양과 같이 고가의 배지 및 혈청을 사용하는 공정에서는 소비되지 않은 배지 성분의 재활용은 물질 생산을 위한 경제성 향상에 매우 중요한 부분을 점하고 있으나, 세포 배양시 생산되는 세포 생육 유해물질, 즉 lactate, ammonia 및 기타 목적 단백질 저해 인자들이 배양조 밖으로 유출되는 배지에 존재해 이의 재사용시 생육에 나쁜 영향을 줄 가능성이 높아 지금까지 이같은 연구에 관심이 적었다. 하지만 본 연구는 사용된 배지의 연속적 회석 방법을 통해 배지내 유해 성분의 영향을 극소화하며 유용 성분의 재활용이 가능한 배양 방법을 이용해, 무혈청 배지만으로는 생육이 어려운 세포주를 무혈청 배지에서 생육이 가능하며 전체 배지의 사용이 적은 경제적인 배양 공정의 응용성에 관한 결과들을 검토하고자 한다.

재료 및 방법

Single chain Urokinase type Plasminogen Activator(scu-PA)를 생산할 수 있는 3개월 된 태아로부터 확립된 Human Embryonic Kidney(HEK sub. 6) 세포주를 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 gentamicine이 포함된 DMEM 배지에 5% FBS(GIBCO, USA)를 보강해 75 cm^2 -flask에서 배양했다. 이같이 배양된 세포를 약 1×10^4 (cell/ml)의 농도가 되도록 3.0g/l의 Cytodex III가 포함된 35 $^{\circ}\text{C}$ 로 데워진 배지가 있는 배양장치(Celligen, NBS, working volume 1.5 l)에 접종하였다(그림 1). 이때 배양조내 세포수가 일정 농도에 도달할 때까지 1% 혈청을 포함한 배지로 pH 6.8, 30% D. O., 40rpm을 유지하며 회분 배양을 실시했다. 연속 배양 초기에는 무혈청 배지(DMEM/F12 기본 배지에 10mg/l mixture of insulin and transferrin and selenium(Sigma), 200 mg/l BSA, 0.5mg/l Excyte III(Miles, USA), 5ml/l MEM vitamin solution)를 약 5-7(ml/hr) 정도의 매우 느린 속도로 10일 정도 유입시켰다.

이같이 배양조내 혈청 성분의 대부분이 제거된 시점부터 그림 1의 harvest tank에 모아진 배지를 mixing tank로 보내 신선한 무혈청 배지와 일정 부피비로 섞어 배양조로 다시 재순환시켰다. 또한 배양 초기의 혈청 유입을 위해 mixing tank 전에 혈청 병을 연결해 필요시 혼합 유입되도록 했다. Mi-

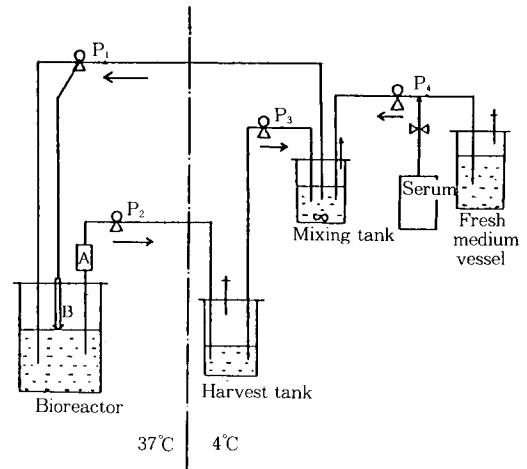


Fig. 1. A diagram of recycling harvested medium into the bioreactor. Arrows indicate the direction of medium flow. A: decanting filter(10/80 μm) B: level controller P: peristaltic pump

xing tank의 부피는 1 l로 재사용 배지와 신선한 배지를 섞은 후 약 2~3일 동안 배양조내로 완전히 유입시켜 혼합된 상태로 존재하는 시간을 극소화해 배지 성분 파괴 및 scu-PA의 전환을 최소화 하도록 했다. 또한 harvest tank의 부피는 8 l로서 가장 빠른 배지 이동속도에서도 매 4일마다 배지를 모아 정제를 실시했으며 일부는 mixing tank로 보내 재순환시켜 배양조로부터 나온 배지가 다시 배양조로 재순환되는 시간이 4 $^{\circ}\text{C}$ 상태에서 5일을 넘지 않도록 했다. 혼합 배지의 연속적 공급을 위해 배양조내의 수위 조절기와 mixing tank의 peristaltic pump와 연결해 배양조내 배지 용량을 일정하게 유지시켰다.

세포의 생육은 nuclei count 방법으로 매일 증식된 세포수(total cell density)를 측정했으며(12), 배양조내 및 harvest와 mixing tank에 존재하는 scu-PA 양은 chromogenic 기질인 pGlu-Gly-Arg-p-nitroanilide를 이용해 선택적으로 정량했다(13). 또한 scu-PA가 저장중 혹은 재순환 과정에서 two chain으로의 전환을 확인하기 위해 fibrin plate 방법으로 total UK의 양을 측정후(14) scu-PA와의 차이로 계산했다. 각 배지내 존재하는 glucose와 lactate양은 HPLC(Waters, USA)로 측정했으나 효소 정량법으로 측정할 수 있는 glutamine과 ammonia는 harvest 및 mixing tank 내에 존재하는

물질들에 영향을 받았으며 및 저장 기간 중의 변화가 심해 측정치의 신뢰도가 크게 감소하는 경향을 나타내 본 결과에 포함시키지 않았다.

결과 및 고찰

그림 2는 배지의 재 사용시의 배양 결과들과 비교하기 위해 1% 혈청을 포함한 배지를 사용해 재순환 없이 연속 배양을 실시한 결과로 배양후 처음 6일간 회분 배양후 연속 배양을 시작해 35일 경과 후 4×10^6 (cells/ml)의 최대 세포수를 얻었으며, 40일 배양액 1100(IU/ml)의 최대 scu-PA 농도를 생산했다. 이때의 최대 배지 이동속도는 45(ml/hr)였으며 30(ml/hr)의 배지 이동 속도에 20일 정도 평균적으로 1.0×10^6 (cells/ml)의 세포수에서 950(IU/ml)의 scu-PA 농도를 생산하여 약 4.56×10^{-4} (IU/cell/day)의 생산속도를 유지했다.

배양 말기에는 세포수의 감소보다는 scu-PA의 생산량이 급속히 감소하는 경향을 보였으며 물질 생산은 배양후 약 16일째부터(15ml/hr의 배지 이동 속도) 빠르게 증가해 그후부터는 생산량이 어느 정도 일정하게 유지됐다.

그림 3은 harvest된 배지의 10%(v/v)를 신선한 무혈청 배지에 섞어 연속 배양한 결과로, 처음 7일간 회분 배양을 실시한 후 6(ml/hr)의 속도로 신선한 무혈청 배지만을 8일간 유입시켰다. 이후 순환 배지의 10%가 포함된 무혈청 배지를 12(ml/hr)의 속도로 유입하며 재순환 배양을 실시했다. 무혈청 배지만으로 연속 배양시 10(ml/hr)보다 빠른 속도로 배지가 공급될 경우는 세포가 미립 담체로부터 유리돼 사멸되는 현상을 보여 단순한 무혈청 배지만으로는 연속 배양이 불가능한 것으로 판명됐다. 재순환 배지를 공급하기 시작해 약 4~5일간은 지속적인 세포수의 감소가 있었으나 그후부터는 정상적인 배양(그림 2)의 경우 보다는 세포 증식 속도가 느리지만 세포수의 증가가 있으며, 배지 이동 속도를 변화시킬 때마다 1~2일간의 적응 기간을 요구하고 있음을 알 수 있다. 또한 최대 세포수는 5×10^7 (cells/ml)로 정상적인 배양보다 약 10배 정도 낮았으며 이때의 최대 배지 이동 속도는 28(ml/hr)로 낮게 유지시켰다. 최대 세포수에 도달하기 직전 단계에서 약 810(IU/ml)의 최대 scu-PA의 생산량에는 많은 차이가 있었다. 이는 system이 완전한 안정상태에 도달하기 전에 배지의 이동 속도를 변화시켰기 때문이기도 하지만, 재순환 배지를 사용해 배양하는 경우 세포의 생육이 배

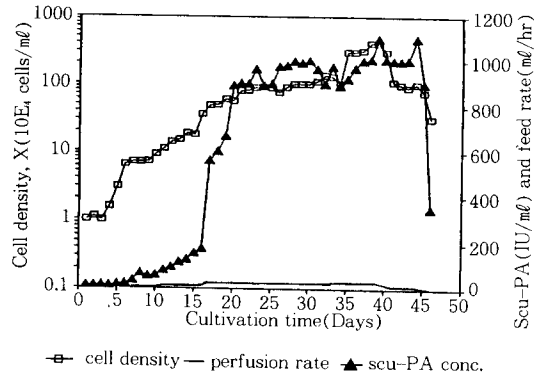


Fig. 2. Cell growth and scu-PA production in perfusion cultivation of HEK cells without recycling 1% serum containing medium.

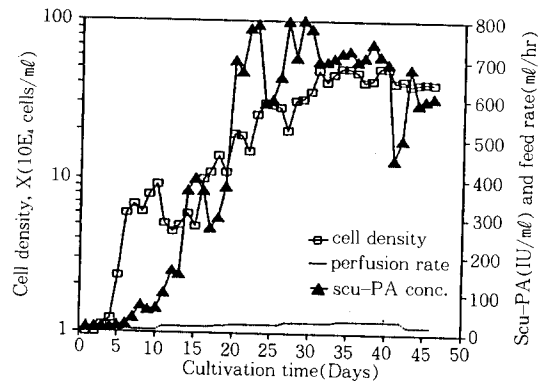


Fig. 3. Kinetics of cell growth and scu-PA production by recycling 10% of conditioned medium in perfusion cultivations of HEK cells. An arrow indicates the starting point of recycling conditioned medium.

지의 이동 속도의 조절만으로는 안정 상태에 도달하기 어려움을 나타내고 있다. 또한 배지 이동 속도가 변할 때마다 scu-PA 생산에 차이가 나타나는데 이는 배지 이동 속도의 변화에 다른 세포의 적응 기간과 재순환 배지에 잔류된 scu-PA의 유입에 기인한 것으로 추측된다. 생산된 scu-PA의 two chain UK로의 전환율은 약 25~30%였으며 harvest tank와 mixing tank 내에 존재하는 scu-PA와 two chain UK의 비도 약 30~40%로 전환율의 증가는 있으나 그 정도가 미미해 harvest tank에서의 잔류 시간이 4일 이내인 경우는 재순환 배지에 따른 two chain UK의 증가는 무시될 수 있을 것이다.

그림 4는 10%의 재순환 배지를 사용해 배양시

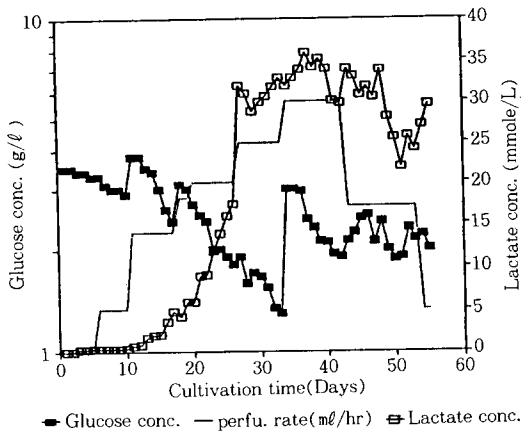


Fig. 4. Residual concentrations of glucose and lactate in recycling 10% of harvested medium. An arrow indicates the starting point of re-using harvested medium.

배양 시간에 따른 glucose의 농도와 이의 대사 유해 산물인 lactate 농도를 나타낸 동력학적 자료다. 배지의 재순환이 시작되며 이동 속도가 증가된 초기에는 배지 유입 속도의 증가와 순환 배지에 잔류된 glucose의 첨가로 인해 배양조 내의 glucose 양이 증가했으나, 세포 생육의 감소에 따라 생성되는 lactate 양의 급속한 증가를 보였으며 최대 lactate 생산 양도 약 33(mmole/l)의 상대적인 높은 수치를 나타내고 있다. 하지만 배양 중반기(배양후 약 35일 이후)이후에는 세포수가 어느 정도 일정하게 유지됨에도 불구하고(그림 3) glucose와 lactate 양의 변화가 심한 것은 배지의 이동 속도의 증가에 따른 유입되는 glucose 양의 증가(신선한 배지 및 순환 배지로부터)와 함께 사용 배지의 유입 증가로 인해 maintenance 상태에서 호흡 기간(respiration period)의 연장에 기인된 것으로 예측된다. 따라서 harvest tank의 배지에 잔류하는 0.5~1.0(g/l)의 glucose와 5~7(mmole/l)의 lactate 양은 이 배지의 10%를 재 사용시 세포 생육에 영향을 미치지 않음은 확인했다.

이같이 배지의 재순환 양에 따라 세포의 생육 및 scu-PA의 생산과의 관계를 알기 위해 배지의 혼합 비를 변화하며 연속 배양으로 도달할 수 있는 최대 세포수와 scu-PA 양을 나타낸 것이 그림 5이다. 각각 다른 혼합비로 배양할 때마다 최대 세포수를 유지할 수 있는 배지의 이동 속도의 차이가 있으며, 이 같은 재순환 배양 system은 짧은 기간(5일 이내)

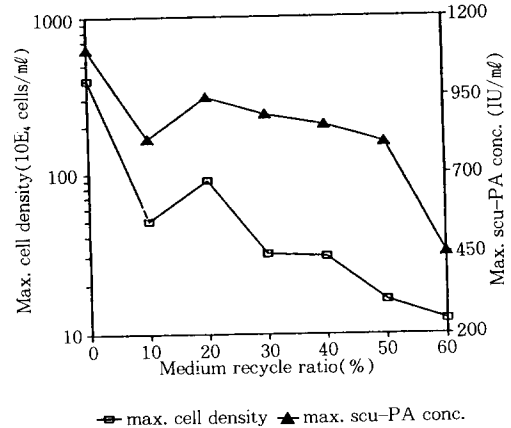


Fig. 5. The cell growth and scu-PA production according to the ratios of recycling conditioned media in perfusion cultivations.

동안만 준안전상태(quasi-steady state)를 유지하는 불균형적인 배양 공정으로 배지의 이동 속도의 변화는 세포의 생육과 함께 scu-PA의 생산량 및 배지의 재순환비 등의 전체적인 조화를 필요로 한다. 그림 2에서도 언급된 바와 같이 배지를 다시 사용하지 않고 1% 혈청만을 포함해 배양한 경우가 세포수와 단백질량 둘다 제일 높았으며 무혈청 배지의 10%의 재순환 배지로 연속 배양시 세포수와 scu-PA 양이 급격히 감소한다. 재순환 비율을 상승시켜 배양한 결과 20% 재순환 배지를 첨가한 경우에 약 900(IU/ml)의 최대 세포수를 유지했다. 또한 50% 이상의 혼합시는 배양 자체가 어려웠다. 최적 혼합 비율인 20%의 재순환시 약 25(ml/hr)의 배지 이동 속도로 8 동안 최대 세포수의 유지가 가능했으며 이때 scu-PA의 비생산속도는 약 1.96×10^5 (IU/cell/hr)로서 일반적인 배양의 최대 생산 속도인 $6.0-18 \times 10^4$ (IU/cell/hr)에 비해 낮은 양이나 배지의 재순환에 의한 전체 배지의 사용량 감소 및 무혈청 배지의 사용 가능성을 고려하면 매우 긍정적인 결과이다. 특히 배양조에서 나온 배지가 harvest와 mixing tank 내에 존재하는 기간이 4°C에서 약 2~4일 정도로 이 기간 동안 scu-PA가 tcu-PA로의 전환이 극히 낮은(약 10~15%) 안정성을 보여 재순환에 따른 단백질 생산의 감소는 없을 것으로 예측됐다.

또한 그림 6의 점선이 배지의 재순환 비의 증가에 따른 two chain으로의 전환 정도를 나타낸 것으로 배지의 저장기간 연장 및 배지내 존재하는 protease에 기인해 혼합 비율이 높을수록 two chain으로

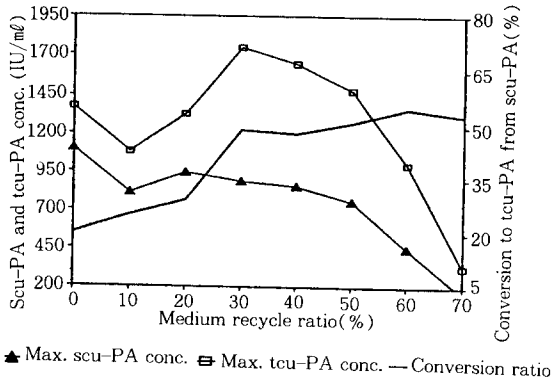


Fig. 6. The conversion of scu-PA to tcu-PA as a function of recycling ratio in cultivating HEK cells by reutilizing conditioned medium.

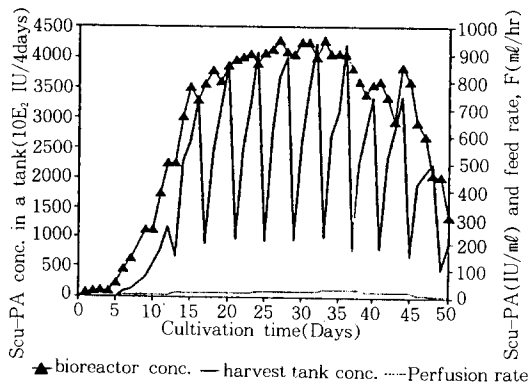


Fig. 7. The concentrations of scu-PA in a bioreactor and a harvest tank in cultivating HEK cells with 20% recycling medium mixed with serum free medium.

의 전환이 증가되었다. 하지만 무혈청 배지에 protease inhibitor로서 10KIU/ml의 aprotinin을 첨가해 재순환 배양할 경우 two chain으로의 전환 수율이 25% 정도로 일정하게 유지됐다(이같은 배지의 경제성에 문제가 있어 본 결과에는 포함시키지 않았음). 사용 배지의 약 30% 혼합시까지의 전환정도가 급속히 증가했으나 그 이후는 완만히 상승해 생산된 scu-PA의 55% 정도까지 two chain으로 전환됐다. 이는 배지의 재순환없이 배양해 생산된 scu-PA의 two chain으로 전환량인 20~35%에 비해 높은 수치이지만 최적 혼합비인 20~30%의 재순환의 경우는 약 20~35%로서 재순환시키지 않은 경우와 유

사하다. 또한 그림 7은 20% 혼합 배양시 harvest tank 내 축적된 scu-PA와 이때 배양조 내에 존재하는 scu-PA 양을 나타낸 것으로 매 4일마다 harvest tank 내의 배지의 일정 비율 배양조로 혼합하며 나머지는 분리 정제를 위해 수거했다. 배지의 이동 속도가 증가할수록 harvest tank 내의 축적되는 속도와 양이 증가했으나 배양조 내의 양에는 큰 차이가 없었다.

결론

약 20%의 배지를 배양조로 재순환시켜 배양한 경우가 다른 혼합비에서 보다 높은 세포수와 scu-PA의 생산성을 유지할 수 있었으며 전반적으로 재순환을 하지 않은 경우보다 낮은 최대 세포수를 얻었고 보다 긴 적응 기간을 필요로 했다. 재순환을 하지 않고 1% 혈청을 사용해 배양한 경우 최대 세포수는 4×10^6 (cells/ml)이고 scu-PA의 비생산속도는 약 4.56×10^{-4} (IU/cell/hr)인 반면 20% 재순환 배양의 경우는 8×10^3 (cells/ml), 1.96×10^{-3} (IU/cell/hr)로 측정됐다. 이같은 공정으로 4일간 harvest tank에 축적되는 scu-PA이 양은 약 4000(IU)였으며 이 배지를 배양조로 다시 보내 two chain UK로의 전환은 20~55% 정도였으며 배지내에 존재하는 lactate는 약 15(mmol/l)로 혼합되는 정도에 따라 생육에 크게 영향을 미치지 않는았다. 이와 함께 목적 단백질의 양도 20% 이상 감소했으나, 배지의 재사용에 따른 전체 배지의 사용량 감소 및 무혈청 배지를 사용한 체외 연속 배양이 가능 등으로 인해 전체적으로는 보다 경제적인 공정으로 평가됐다. 하지만 이같은 공정의 범용성을 확인하기 위해서는 다른 세포주에도 적용이 필요할 것이다.

사사

본 연구의 일부는 생물공정 연구센터의 지원으로 수행된 결과로 이에 심심한 사의를 표합니다.

참고문헌

1. K. Yanagi, H. Miyoshi, H. Fukuda and N. Oshima(1992), Appl. Microbiol. Biotechnol., **37**, 316.
2. J. Robert, J. Cote and J. Archambault(1992), Biotechnol. Bioeng., **39**, 697.

3. L. J. Escalde, S. Carrel and P. Peringer (1991), *Biotechnol. Bioeng.*, **38**, 159.
4. S. Reuveny, D. Velez, L. Miller and J. D. McMillan(1986), *J. Immunol. Methods*, **86**, 61.
5. J. Hodgson(1992), *Bio/Technol.*, **10**, 863.
6. H. Saragovi, M. Green, R. A. Chrusciei and M. Kahn(1992), *Bio/Technol.*, **10**, 773.
7. A. O. Miller(ed.)(1989), *Adv. Reseach on Animal Cell Technology*, NATO serires, Kluwer Acad. Pub., London.
8. T. Rylle, M. Lucki, V. Jager and R. Wagner (1990), *J. Biotechnol.*, **14**, 377.
9. J. P. Klerx, C. G. Blonk and L. C. Twaalfhoven(1988), *J. Immunol. Methods*, **111**, 179.
10. H. Butemyer, B. G. Bodeker and J. Leheman (1991), *Cytotech.*, **5**, 57.
11. A. Mizrahi, A. Avihoo(1977), *J. Biol. Stand.*, **5**, 31.
12. J. P. Kalenbach, M. H. Kalenbach and W. Lyans(1958), *Exp. Cell Res.*, **15**, 112.
13. S. Kasai, H. Arimura, M. Mishida and T. Suyama(1985), *J. Biochem.*, **260**, 12377.
14. V. Gurewich, R. Pannell, S. Loui, P. Kelley and R. Greenlee(1984), *J. Clin. Invest.*, **73**, 1731.