

인간 신장세포로부터 scu-PA의 경제적 생산을 위한 무혈청 배지의 개발

김 현 규 · 김 현 구 · 성 기 돈 · 박 영 식 · 이 현 용
강원대학교 식품공학과

The Development of Serum Free Medium for the Economic Production of scu-PA from HEK Cells

Hyeon Gyu Kim, Hyeon Goo Kim, Ki Don Sung, Young Shik Park
and Hyeon Yong Lee

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

ABSTRACT

Serum free medium was developed to cultivate Human Embryonic Kidney cells with Cytodex III microcarriers. The cells normally attached and spreaded on the microcarriers in serum free medium, and grew well by bead to bead processes. 85% of attachment yield was obtained on Cytodex III in this medium, compared to about 93% in 1% serum containing medium. About 90% of the attached HEK cells spreaded after 6 hours of post-attachment periods on the surface of microcarrier. Maximum cell density and scu-PA concentration in a serum free medium were 9.1×10^5 cells/ml and 1790 IU/ml, respectively, with fed-batch cultivation. Maximum cell density and scu-PA concentration in this medium with perfusion cultivation were 2.5×10^6 cells/ml and 1820 IU/ml, respectively. The conversion of single chain urokinase type plasminogen activator(scu-PA) into two chain type plasminogen activator(tc-PA) was less than 5% in a serum free medium compared to about 10% in 0.5% serum containing medium.

서 론

최근에 무혈청 배지에서의 세포 배양은 목적 단백질의 생산 비용을 절감하며 분리수율을 현저히 향상시키는 장점들이 있어 오늘날 산업적 생산을 위한 배양으로써 대부분이 무혈청 배양 배지와 무 단백질 배양 배지를 계속하여 개발되고 있다(1-2). 이같은 무혈청 배지의 대부분은 세포 생육을 위하여 insulin, transferrin, lipo-proteins, fibronectins, epidermal growth factors, polysaccharides과 polypeptide 등의 각종 macromolecule의 생육인자들을 첨

가하고 있다(3-4). 하지만 이들 배지에 배양되는 세포들은 pH 변화에 상당히 민감하고 성장 조건이 상당히 까다로우며, 세포들이 쉽게 깨지는 등의 단점이 있다(5). 또한 교반에 따른 전단응력에 의한 세포에 손상은 배지 성분중에 albumin의 첨가에 의하여 조절하는 것으로 알려지고 있다(6).

현재 많은 잡종세포(hybridoma cell)와 수종의 세포주에 대한 무혈청 배지가 개발됐으며 일부는 상품화되고 있다(7-8). 하지만 이같이 개발된 무혈청배지는 하나의 세포주에만 가능하고 다른 세포주에 직접적인 적용이 어려우며, 특히 물질 생산을 위해

서는 새로운 무혈청 배지를 개발해야 하는 문제점을 갖고 있다(9).

본 논문에서는 인간 신장 세포의 생육을 위한 무혈청 배지의 개발 및 배지의 혈청 농도에 따른 담체에 세포 부착(Attachment)과 확산(Spread)을 조사하여 세포 친화력 정도를 살펴 보았다. 그리고 회분식(Batch), 유가식(Fed-batch), 연속배양(Perfusion cultivation)에 따른 세포 생육과 scu-PA 생산을 조사하였다. 한편 배양중에 single chain urokinase type plasminogen activator(scu-PA)가 two chain type plasminogen activator(tc-PA)로의 전환되는 것을 저혈청 배지와 무혈청 배지에서 비교하여 보았다.

재료 및 방법

세포주 및 세포배양 배지

이 실험에서 사용된 세포주는 Human Embryonic Kidney (HEK) 세포주를 사용하였다(10). 이 세포주는 본래 DMEM/F-12 mixture(Sigma, U. S. A.)에 20% Fetal Bovine Serum(Gibco, U. S. A.)을 보강된 배지에서 생육하였으나 이 세포를 단계별로 10%, 5%, 1% 및 0.5%의 혈청 농도를 감소시키면서 적응하여 배양하였다(11). 그리고 이 세포들이 무혈청 배지에서 생육하도록 배지에 Transferrin(5 μ g/ml)-Insulin(5 μ g/ml)-Sodium selenite(5ng/ml) mixture, 0.2mg/ml bovine serum albumin, 10 μ g/ml Fibronectin, 그리고 Trace elements(Sigma, U. S. A.)들을 보충하였다.

세포배양

T-flask와 Spinner vessel을 이용한 세포배양은 37°C에서 5% CO₂의 공기 조성을 갖는 CO₂ Incubator 안에서 행하였다. T-flask를 이용한 회분식 배양에는 25cm² T-flask (Corning, U. S. A.) 7개에 같은 양의 세포를 접종한 후 각각의 flask를 일정한 시간 간격으로 해서 0.05% trypsin-EDTA (Sigma, U. S. A.)을 처리하여 세포를 분리하였으며, 분리된 세포를 현탁시킨 후 hemocytometer에서 세포수를 측정하였고 배양액을 회수하여 scu-PA의 생산성을 측정하였다. Spinner vessel을 이용한 배양에서는 Sigmacote(Sigma, U. S. A.)로 처리하여 멸균된 1ℓ spinner vessel(Bellco, U. S. A.)에 무혈청 배지를 넣고 75cm² T-flask(Corning, U. S. A.)에서 약 2×10⁶ viable cells/ml의 농도로 배양된 세

포를 trypsin용액으로 처리하여 T-flask 표면으로부터 분리, 현탁시킨 후 접종하였다. 또한 세포의 부착 표면을 제공하기 위하여 미리 무균 상태로 처리된 Cytodex III(Sigma, U. S. A.)을 첨가하였다. Spinner vessel에 세포를 접종한 후 세포가 미립담체 표면에 부착하도록 2시간 정도로 정지시킨 후 20rpm으로 4시간 정도 교반하였다. 이후 원활한 영양분 공급을 위하여 30rpm으로 교반하였다. 이어서 Spinner vessel을 이용하여 유가식 배양에 따른 세포 생육 및 scu-PA의 생산성을 측정하였다. 배양조(N. B. S., Celligen, U. S. A.)을 이용한 연속배양은 pH 7.0, 용존산소 30% 및 온도 37°C에서 배양조 부피를 level probe로 1.2ℓ에서 자동 조절하며 perfusion 배양을 수행하였다. 배양조에 세포를 접종한 후 약 2시간 정도 정지하고 이어서 약 1시간 가량 30rpm으로 교반하는 조작을 3회 반복하여 접종된 세포를 미립담체에 부착시킨 후 온도 37°C, 교반속도 40rpm을 유지하여 배양하였다. 또한 매 6시간 간격으로 배지 내의 온도, pH 및 용존산소량을 측정하여 일정하게 유지하도록 조절하였다. 매 24시간마다 sampling port로 sampling하여 배지 내 세포 및 scu-PA의 농도를 측정하였다. 세포농도는 미립담체에 부착한 세포의 생육을 측정하는 방식으로 nuclei count방법을 사용하였다(12). 유가식 배양과 연속 배양에서 배지 유입속도는 일정한 세포 농도에 도달하였을 때 배지의 유입속도를 변화시켰으며 변화된 속도에서 세포수가 일정하게 유지되면 다시 배지의 유입속도를 변화시키면서 실행하였다.

Attachment Rate Constant 및 Spreading Index의 측정

세포주가 혈청 농도에 따라서 미립담체에 친화력 정도 차이를 비교하기 위해 부착속도상수(attachment rate constant, K)와 spreading index을 산출하였다. 부착속도상수(K)는 아래의 식으로 계산하였다(13).

$$dc/dt = K \cdot C$$

여기서 dc/dt는 시간에 따른 부착된 세포들의 증가를 나타낸 값으로 c는 미립담체에 부착된 세포의 수(cells/ml)을 말하고, C는 세포의 전체수(cells/ml)이며 K는 부착속도상수(1/min)이다. Spreading index는 미립담체를 시간 간격에 따라서 부착된 세포수를 측정된 것으로 약 100개 정도의 미립담체를 조사하여 부착된 세포(rounded cell)와 확산된

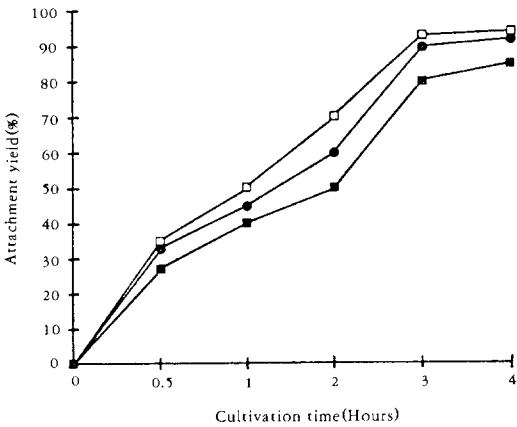


Fig. 1. Attachment yield of HEK cells on Cytodex III grown in various serum concentrations: —□— 1% serum in medium, —●— 0.5% serum in medium, —■— a defined serum free medium.

세포(spreaded cell)의 수를 세어 전체 정착된 세포 중 확산된 세포의 비율로 조사하였다. 이것은 퍼센트(%)로 표시하여 10% 이하로 spreading은 O로, I (10~40%), II (45~55%), III (60~70%), IV (75~85%)와 V (90~100%)로 표시하였다(14).

scu-PA와 전체 u-PA의 농도 측정

배지 중에 존재하는 scu-PA의 측정을 위하여 Chromogenic substrate인 S-2444를 이용한 amidolytic assay방법을 사용하였다(15). 아울러 배양 중에 존재하는 모든 형태의 urokinase type-plasminogen activator(u-PA)의 농도를 fibrin plate 방법으로 측정하여 배양액 중에 전체 u-PA(scu-PA + tcu-PA)의 농도로 측정하였다(16).

결과 및 고찰

Fig. 1은 여러 혈청 농도에 따른 미립담체 표면에 세포들의 attachment yield를 나타낸 것으로 저혈청 배지에서는 접종 후 4시간 정도에서 약 90% 이상의 높은 값을 나타냈으나 무혈청 배지에서는 약 85% 정도로 나타냈다. 따라서 Spinner vessel을 접종 후 4시간 이후부터 원활한 영양분 공급을 위하여 30rpm으로 교반하였다. 여기서 attachment yield는 미립담체에 정착된 세포의 수에 접종한 전체 세포수

Table 1. Attachment rate constant and spreading index on Cytodex III.

Serum Conc.	K* (min ⁻¹)	Spreading Index**					
		Time Intervals(hours)					
1%	0.022 ± 0.003***	I	II	III	IV	V	V
0.5%	0.016 ± 0.001	I	II	III	IV	V	V
Serum free	0.015 ± 0.002	O	I	II	III	IV	V

*dc/dt = K · C, where dc/dt represents the increase in attached cell numbers in a certain period of time, cell numbers(C) and attachment rate constant(K)

**O, corresponds to less than 10% spreading; I, corresponds to 10~40%; II(45~55%); III(60~70%); IV(75~85%); V (90~100%).

***Mean ± S. D.

를 나눈 값으로 퍼센트(%)로 나타낸 값이다. 무혈청 배지에서 85% 정도의 정착 수율은 T-flask에서 배양 4~5일 정도에서부터 세포들은 aggregation을 형성하여 표면으로부터 분리되어 부유성으로 생육하였으나 미립담체 배양에서는 세포들이 미립담체 표면에 정착하여 확산하며 생육하였다.

여러 혈청 농도에 따른 attachment rate constant와 spreading index를 비교한 결과들이 Table 1이다. 여기에 표시한 수치들은 3번 반복 실행하여 평균치를 나타낸 값이다. 정착속도상수는 혈청농도가 감소할수록 1% 혈청을 포함한 배지에서는 0.022min⁻¹인 것에 비교하여 무혈청 배지에서는 0.015min⁻¹으로 낮은 값을 나타냈다. 하지만 확산 지표를 보면 1시간 가량 1%와 0.5% 혈청을 포함한 배지에서 20~30% 정도가 확산하였으나 무혈청 배지에서는 10% 이하의 확산을 나타냈다. 6시간 이후에는 1% 혈청을 포함한 배지와 무혈청 배지에서 같은 95~100%의 높은 확산 지표로 나타났다. 따라서 혈청은 세포가 미립담체 표면에 정착하는데 관여하지만 확산에는 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다. 이는 저혈청배지가 무혈청배지에서도보다 정착속도는 다소 빠른 것으로 측정되었고 확산속도에서는 별 차이가 없는 것으로 나타났다.

Fig. 2는 세포가 미립담체 표면에 정착하여 확산하면서 생육하는 형태를 나타낸 사진들로서 무혈청 배지에서도 정상적으로 미립담체 표면에 정착하며 생육하는 것으로 확인되었다. 배양 후 6일째 세포는 미립담체 표면에 포화상태로 도달하였다. 이후 미립

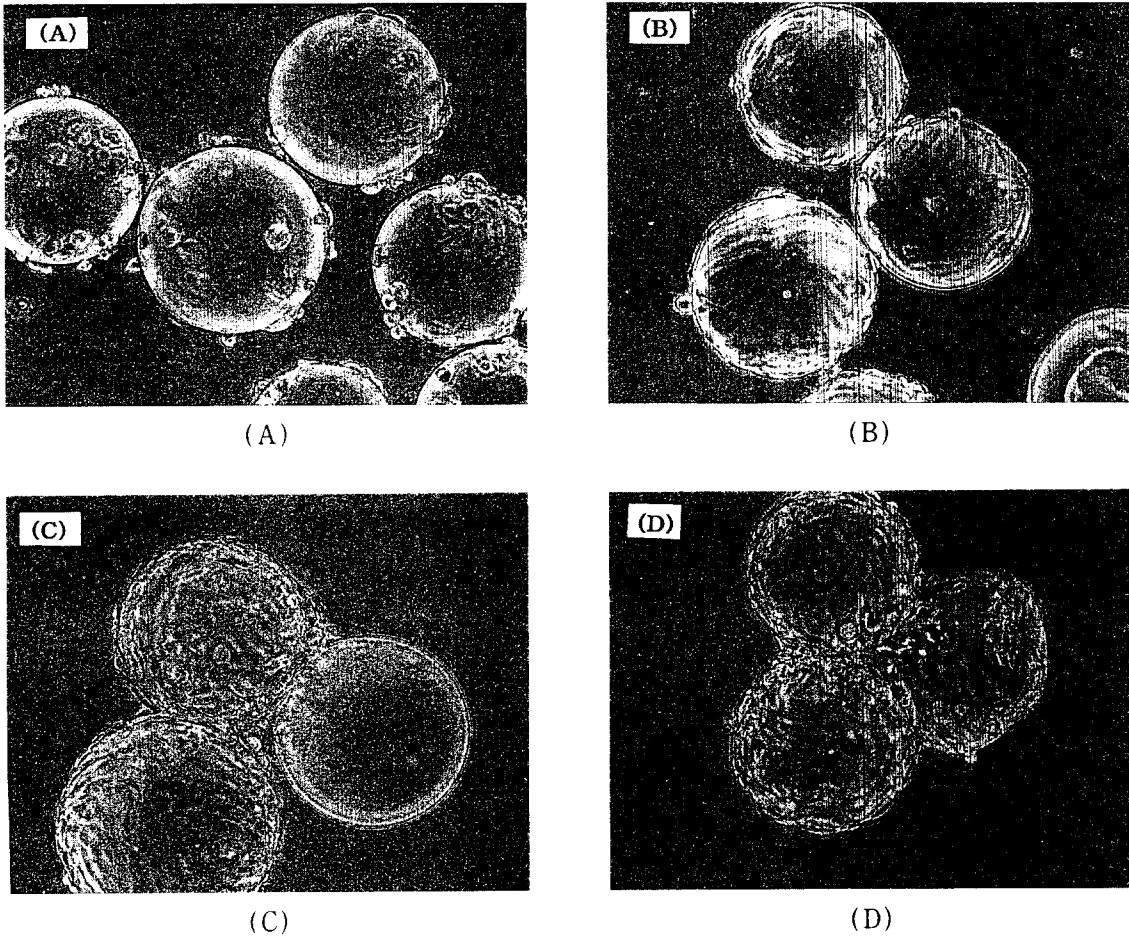


Fig 2. Photographs of HEK cells grown on Cytodex III in serum free medium.

(A) 1day after inoculation (B) 6days after inoculation
(C) 8days after inoculation (D) 10days after inoculation

담체 침가에 의하여 (C)와 (D)에 보듯이 세포는 담체에서 담체로 이동하여 생육하는 것으로 관찰되었다. Fig. 3은 T-flask를 이용하여 무혈청배지에서 배양하였을 때 세포 생육 및 scu-PA 생산을 나타낸 것이다. 여기서 초기 세포농도가 1×10^5 total cells/ml로 배양하여 배양 7일째 최대 9.9×10^5 total cells/ml로 나타났다. 이때 최대 scu-PA의 농도는 1410 IU/ml로 측정되었다. 특히 생존율은 접종할 때 95%인 반면에 배양 4일 정도까지 증가하였으나 배양 7일째는 90% 정도의 생존율을 보였다. 이것은 aggregated clump 중심 부위에 있는 세포들이 영양분과 산소 부족으로 인하여 서서히 사멸되는

것이다. Fig. 4는 유가식 배양에 따른 세포 생육 및 scu-PA 생산을 나타낸 것이다. 배양조의 초기와 최종 부피는 각각 0.4l 와 1.2l 이었으며 배양 7일째까지 회분 배양으로 실행하였고, 세포수가 약 8×10^5 cells/ml로 도달된 배양 8일부터 0.05ml/min의 속도로 배지를 공급하여 최대 feeding rate을 0.15ml/min까지 증가시켰다. 배양 9일째 최대 scu-PA 농도가 1790 IU/ml로 나타났고 이후 배지 공급속도를 증가시켰을 때 scu-PA의 농도가 서서히 감소되는 경향을 나타냈다. 하지만 배양 최종일 scu-PA의 농도는 1550 IU/ml로 T-flask 배양에서보다 높은 것을 알 수 있다.

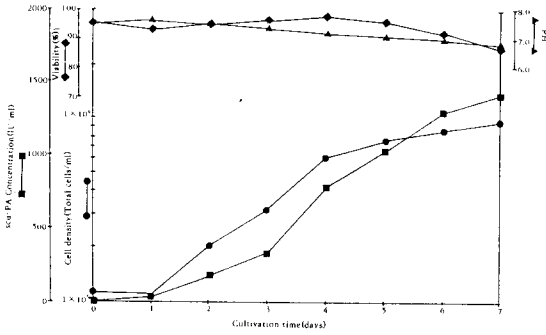


Fig. 3. Cell growth and scu-PA production according to the cultivation time for the growth of HEK cells in a serum free medium.

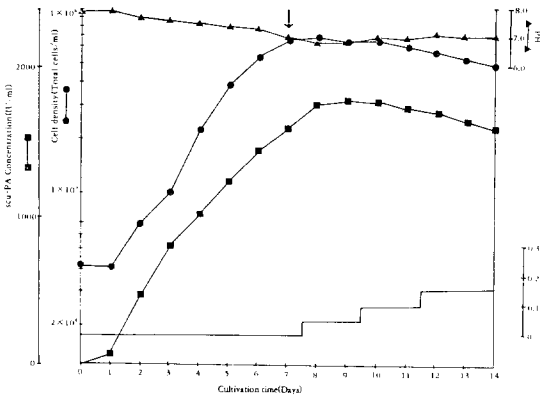


Fig. 4. Fed-batch cultivation of HEK cells and scu-PA production for the growth of HEK cells with serum free medium in a spinner vessel. Initial and final volume were 0.4ℓ and 1.2ℓ, respectively. An arrow indicates the point of starting fed-batch cultivation.

scu-PA는 세포배양 중에 아직까지 알려지지 않은 원인으로 해서 그 일부가 tc-PA로 전환되며 tc-PA는 scu-PA에 비해 fibrin에 대한 친화력이 낮아 혈전 용해력이 급격히 감소한다(17). 따라서 혈청농도에 따른 scu-PA의 전환율을 비교한 Table 2를 보면 무혈청배지에서 scu-PA가 저혈청배지에서 보다 전환율이 낮은 것으로 나타났다. 저혈청배지에서는 전환율이 9.95%로 높는데 비교하여 무혈청 배지에서는 전환율이 4.79%로 낮은 것으로 나타났다. 이는 혈청이 포함된 배지에서 생성된 serine protease 계통의 단백질(주로 t-PA, scu-PA 등)이

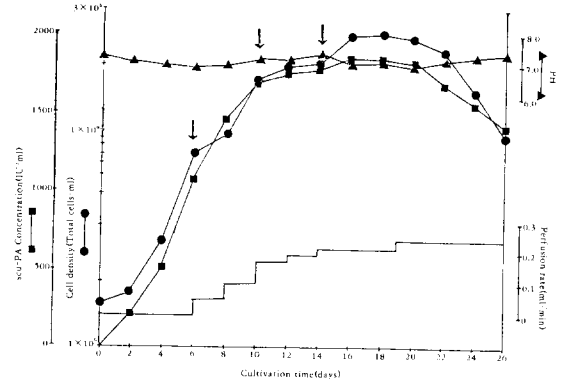


Fig. 5. Perfusion cultivation of HEK cells growth and scu-PA production in a serum free medium by a bioreactor. Arrows indicate the point of adding microcarries.

Table 2. Comparison of the conversion ratio of scu-PA in 0.5% serum containingmg and serum free medium for fed-batch cultivation.

Max. cell density (viable cells/ml)	scu-PA Conc. (IU/ml)	Total UK Conc. (IU/ml)	Conversion ratio(%)*
0.5% serum 1.05 × 10 ⁶	1810	2010	9.95
serum free 9.1 × 10 ⁵	1790	1880	4.79

*This ratio was calculated based upon the difference between total UK and scu-PA concentration.

혈청 내 존재하는 proteolytic enzymes과 PA Inhibitor 등에 의해 two chain form으로 전환되기 때문이다(18). 또한 이때 최대세포농도는 저혈청 배지와 무혈청 배지에서 각각 1.05 × 10⁶ viable cells/ml와 9.1 × 10⁵ viable cells/ml이다.

Fig. 5는 연속배양에 의한 세포 생육과 scu-PA 생산을 나타낸 것이다. 여기에서 화살표는 미립담체를 첨가한 시간으로서 최종 미립담체의 양은 2g dry weight/ℓ 이다. 미립담체의 양을 첨가함에 따라서 세포와 scu-PA 농도가 증가하였다. 배양 6일부터 연속배양을 시작하여 배양 26일째 배지 유입속도를 0.25ml/min까지 증가시켰다. 집중시 세포농도가 1.7 × 10⁶ cells/ml이었으나 배양 16일 정도에서는 최대 2.5 × 10⁶ cells/ml로 상당히 높은 세포농도를 나타냈다. 그리고 이때 scu-PA의 농도는 1820 IU/ml이었으나 배지 유입속도를 0.25ml/min로 유지하

Table 3. The comparison of cell growth and scu-PA production in serum free medium for different cultivation processes.

Maximum cell density (viable cells/ml)	Specific growth rate (1/day)	Maximum scu-PA (IU/ml)	Specific scu-PA productivity (IU/cell/day)
batch* 8.9×10^5	0.349	1410	2.26×10^{-4}
fed-batch** 9.1×10^5	0.393	1790	2.19×10^{-4}
perfusion*** 2.5×10^6	0.314	1820	2.2×10^{-4}

*Cultivated in 75cm² T-flask.

**Cultivated in a spinner vessel. Initial and final volume were 0.4ℓ and 1ℓ, respectively.

***Cultivated in a bioreactor.

였을 때 서서히 감소되어 최종 26일 정도에 세포농도는 급속한 감소를 보인 반면 scu-PA의 생산은 느린 속도로 감소하여 1500 IU/ml의 농도로 유지되었다.

Table 3은 무혈청배지에서 여러 배양 형식에 따른 세포 생육과 scu-PA 생산을 비교한 것이다. 회분 배양에서 최대세포농도와 scu-PA농도는 각각 8.9×10^5 cells/ml과 1410 IU/ml인 반면에 유가식과 연속배양에서는 세포농도가 각각 9.1×10^5 cells/ml와 2.5×10^6 cells/ml로 나타났고 최대 scu-PA농도는 각각 1790 IU/ml와 1820 IU/ml로 나타났다. 하지만 scu-PA의 비생산성은 서로 유사한 값으로 나타났다.

요 약

Cytodex III 미립담체를 이용하여 무혈청배지에서 인간신장 세포를 배양하였다. 무혈청배지에서 미립담체 표면에 세포들은 정상적으로 부착하고 확산하면서 세포들은 담체에서 담체로 이동하여 생육하였다. 미립담체에 정착 수율은 1%의 혈청을 포함한 배지에서는 약 93%인 반면에 무혈청배지에서는 85% 정도로 나타났다. 정착된 세포의 90% 이상이 유가식 및 연속배양에서 담체의 표면에 정착한 후 6시간 후에 확산하며 생육하였다. 유가식 배양에서 세포농도와 최대 scu-PA 농도는 각각 9.1×10^5 cells/ml와 1790 IU/ml이었고 연속배양에서는 각각 2.5×10^6 cells/ml와 1820 IU/ml로 나타났다. 또한 저혈청배지에서는 scu-PA가 tc-PA로의 전환율이 10% 정도로 높는데 비교하여 무혈청

배지에서는 전환율이 4.8%로 낮은 것으로 나타났다. 이처럼 무혈청배지는 저혈청배지에서도 낮은 tc-PA로의 전환율을 유지할 수 있는 이점이 있다.

사 사

본 연구는 생물공정 연구센터 및 (주) 녹십자의 지원에 의해 수행된 결과로 이에 심심한 사의를 표합니다.

참고문헌

1. S. L. Danheiser (1993), *Genetic Engineering News*, **13**, 1.
2. Kjell Bertheussen (1993), *Cytotechnology*, **11**, 219-231.
3. A. Lang, U. Schuerch and S. Cryz (1991), *Hybridoma*, **10**, 401.
4. H. R. Maurer (1992), *Animal Cell Culture*, R. I. Freshney, eds, p. 15.
5. Lee, H. Y. (1988), *Kor. J. Biochem. Eng.*, **4**, 100.
6. F. J. Darfler and P. A. Insel, (1983), *J. Cell Physiol.*, **31**, 115.
7. T. Rylle, M. Lucki, V. Jager and R. Wagner (1990), *J. Biotechnol.*, **14**, 377.
8. Z. Chen, Y. Ke and Y. Chen (1993), *Cytotechnology*, **11**, 169-174.
9. F. Dhainaut, N. Bihoreau, J. L. Meterreau, J. Lirochon, R. Vincetelli and G. Mignot (1992), *Cytotechnology*, **10**, 33-41.
10. Y. N. Kim, K. Y. Park, B. C. Chun, J. H. Lee and H. Y. Lee (1993), *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **8**, 17-22.
11. Y. N. Kim, H. K. You, B. C. Chun, Y. D. Kim and H. Y. Lee (1992), *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **7**, 132-138.
12. J. P. Kalenbach, M. H. Kalenbach and W. Lyans (1958), *Exp. Cell Res.*, **15**, 112.
13. A. Mukhopadhyay, S. N. Mukhopadhyay and G. P. Talwar, (1992), *J. Chem. Tech. Biotechnol.* In Press.
14. A. Mukhopadhyay, S. N. Mukhopadhyay and G. P. Talwar, (1993), *Biotechnology Techniques*, **7**, 173-176.

15. S. Kasai, H. Arimura, M. Nishida and T. Suyama (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 1237–1239.
16. D. J. Binnema, G. Dooijewaard and P. V. Turion, (1991), *Thromb. Haemostasis.*, **65**, 144.
17. H. R. Lijnen, C. Zamarron, M. Blaber, M. E. Winkler and D. Collen (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 1253–1258.
18. M. Butler (1987), *Animal Cell Technology*, p. 129.