

교반형 막 반응기를 이용한 재조합 인간 세포의 무혈청 배지에 의한 γ -Interferon의 생산

박영식 · 김현규 · 임서규¹ · 박경유¹ · 이현용*

강원대학교 식품공학과, ¹한림대학교 의과대학

Economic Production of γ -Interferon from Recombinant Human Cells in Serum Free Medium by a Moving Aeration Membrane Bioreactor

Park, Young-Shik, Hyun-Kyu Kim, Seo-Kyu Lim¹,
Kyung-You Park¹ and Hyeon-Yong Lee*

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

¹Department of Medicine Hanlym Univeristy, Chuncheon 200-605, Korea

Abstract — 8×10^6 (viable cells/ml) of maximum cell density and 9000(IU/ml) of γ -IFN production were obtained at 55(ml/hr) of a perfusion rate by cultivating HSF cells using a moving membrane aeration bioreactor. This system proves to be an efficient culture process by maintaining 90% of viable cells during the whole cultivation periods. The metabolic molar quotient of glucose to lactate was 0.81 for overall ranges of glucose consumed while the evolution of ammonia was not linearly related to the consumption of glutamine. Low molar conversion ratio was observed in low consumptions of glutamine and high molar conversion ratio in high consumptions. It also shows that the glutamolysis plays important role in the steady state conditions by evolving larger quantities of ammonia than lactate. At the above of 50 rpm, which is the optimum agitation speed for this bioreactor, the cell growth was severely affected while the IFN production was less decreased, maintaining 1.5×10^{-3} (IU/cell/day) specific IFN production rate. The cumulative γ -IFN production was 7.2×10^8 (IU) for 70 days of the cultivation, which yields 1×10^7 (IU/day) of IFN production rate. Therefore, a commercial production of γ -IFN by this culture process can be achievable by maintaining the above IFN productivity in a scaled-up culture system.

포유동물 세포의 체외(*in vitro*) 대량 배양을 통해 미생물에서 생산이 어렵거나 불가능한 새로운 생물 의약품의 생산하고자 하는 시도는 십여년 전부터 전 세계적으로 여러 분야에서 다양하게 진행되고 있다(1-3). 이로 인해 배양조의 scale-up, 효율적인 배양공정 개발 등과 같은 배양장치 분야 및 세포주의 규격화(standardization), 새로운 세포주의 개발과 이의 유전적 조절 등과 같은 세포 생물학적 접근 분야 등에서 상당한 발전이 이루어지고 있다(4-6). 현재의 연구는 배양조와 세포간의 상호 관계 규명 및 범용적 배양 system의 개발에 집중되고 있는 추세이다(7, 8).

이 분야의 진척도에 따라 현재 세포 배양 공학 분야의 여러 난제들이 해결될 것이며 이로 인해 새로운 혹은 기능이 향상된 생물 의약품의 경제적 생산이 가능할 것이다. 현재도 목적 단백질의 대량 생산 기술의 상당한 진전이 있어 tissue type Plasminogen Activator (tPA)는 이미 상품화가 이루어졌으며 향후 3년 내에 3~4개의 Interferon(IFN), Colony Stimulating Factor(CSF), Interleukin's(IL's) 등과 같은 생물 의약품들이 동물세포 배양에 상품화가 될 것이다(9, 10). 단 일군 항체(monoclonal antibody, MAb)의 경우는 상당한 수율로 생산이 가능하며 주로 임상 및 진단 시약으로서의 응용으로 인해 많은 분야에서 실용화되고 있는 상황이지만(11), 이외의 세포배양에 의해 생산된 생물 의약품들은 아직은 미생물에 의해 생산된 경쟁 제품에 비해 의약적 특성이 우수함에도 불구하고 가격

Key words: Moving aeration membrane bioreactor, γ -interferon, serum free medium, recombinant human cells

*Corresponding author

경쟁력이 약해 선호도가 낮은 경우가 많다.

따라서 현재 상업화 시점에 가장 근접한 생물 의약품의 하나인 IFN 중 α 와 β 형태와는 기능적으로 다르며 항 바이러스 효과가 크고 lymphotoxin 존재 하에서 암 세포 생육을 효과적으로 저해해 항암 치료에 사용될 수 있는 γ -IFN(12)의 경제적 대량 생산을 위한 배양 공정의 개발이 필요하다. 이 같은 목적을 위해 동물 세포 배양시 적은 전단응력으로 효율적인 산소 공급을 위해서는 간접 통기 방식인 silicone tube 등을 이용한 membrane aeration 방법이 흔히 이용된다(13, 14). 본 연구실에서는 이 방법을 변형한 aeration membrane이 전체적으로 회전하며 산소를 공급할 수 있는 배양조를 개발했다(15). 이 배양조를 이용해 γ -IFN을 생산할 수 있는 세포주의 체외 배양을 통해 배양조와 세포간의 관계를 규명하여 기존의 배양조들과 비교해 고농도 연속 배양에 의한 경제적 생산 가능성을 제시하고자 한다.

재료 및 방법

사람 비세포(splenocytes)에서 얻은 γ -IFN cDNA를 SV 40 virus를 이용해 co-transformation 방법으로 normal human skin fibroblasts(En Son, Albany Medical Center, USA)에 유전자 재조합된 세포주인 HSF (E.S. sub. 9)를 DMEM에 5% FBS(GIBCO, USA)와 1.0 nM Tetradecanoyl phorbol 13-acetate(TPA)를 포함한 배지로 CO₂ incubator 안에서 75 cm² T-flask를 이용해 1×10⁴(viable cells/ml)에 도달할 때까지 배양했다. 이 같이 배양된 세포를 Fig. 1과 같이 silicone tube frame 자체가 움직이는 배양조(working volume 1.5 l)(15)에 접종했다. 배지내 용존산소는 air saturation의 30%가 유지되도록 0.22 μ m membrane filter(Fig. 1의 13번)를 통해 유입시켰으며 37°C water bath에서 배양했다. 이때 3.0(g/l)의 Cytodex III를 첨가했으며 일정 기간동안 회분 배양 후 연속 배양 시는 DMEM/F12 기본 배지에 10(μ g/ml) Insulin, Transferrin, Selenite mixture, 5(μ g/ml) fibronectin, 1.0 nM TPA가 보강된 무혈청 배지를 유입시켰다. 배양조 상층부에 위치한 20과 80 μ m pore size screen이 부착된 decantor를 통해 배지(conditioned medium)만 4°C 냉장고로 저장되고 세포는 배양조 내에 머무는 연속배양(perfusion cultivation) 방식에 의해 배양하며 매일 측정된 세포수와 잔류 glucose 농도에 따라 배지의 희석율을 변화시켰다 했으며 총 세포수와 생 세포수는 매일 일정량의 sample을 채취해 nuclei count 및 trypan blue dye exclusion

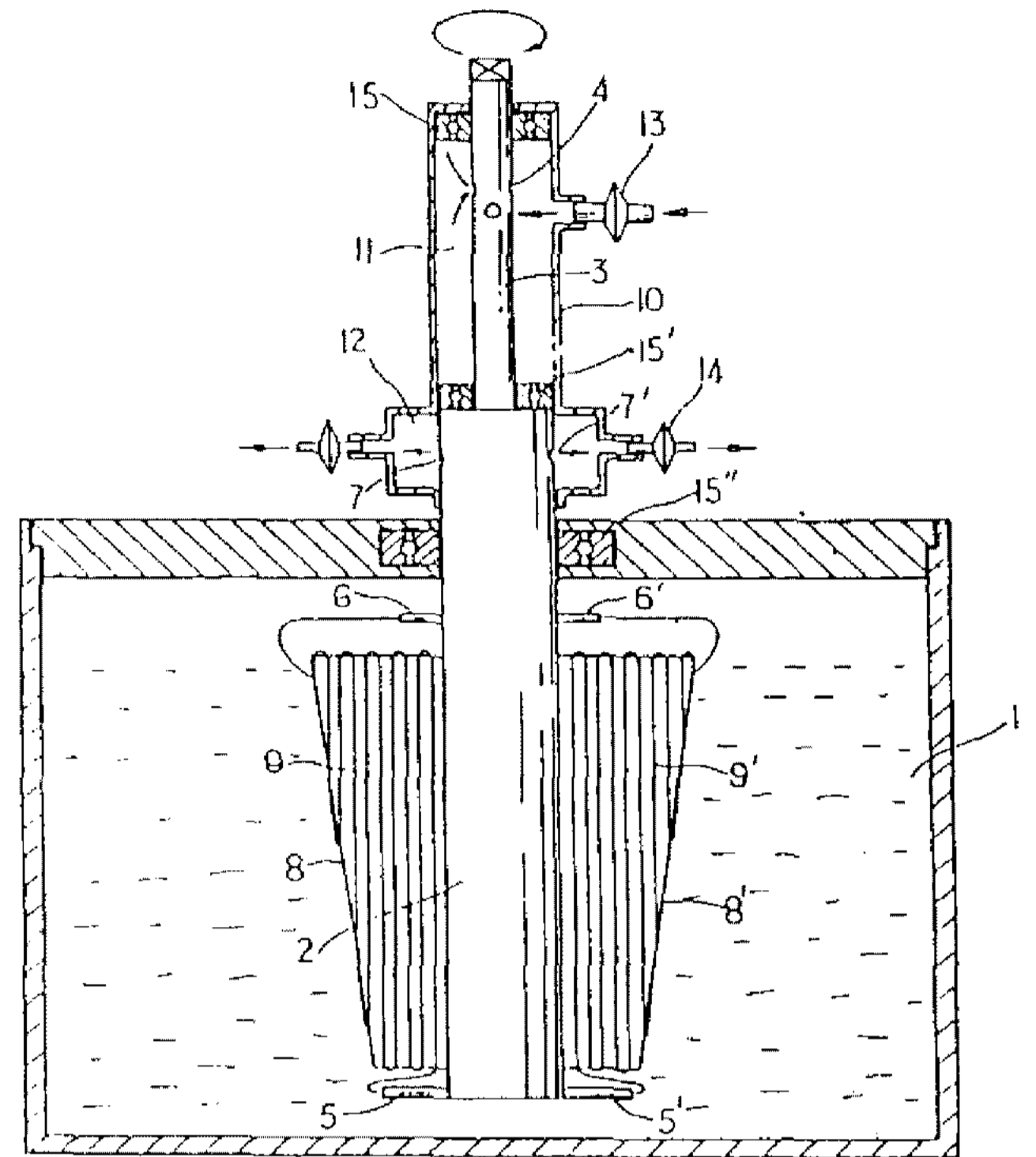


Fig. 1. Diagram of a moving membrane aeration bio-reactor.

1. reactor vessel, 2. agitation shaft, 3. center of the shaft, 4. holes for supplying air, 5. connectors to silicone tubing, 6. exhaust gas-out connectors, 7. holes for exhaust gas, 8. frame to hold tubings, 9. silicone tubings, 10. housing for the shaft, 11. empty space, 12. empty space, 13. 0.2 μ m air filter, 14. 0.2 μ m air filter, 15. compact bearing set

방법으로 측정했으며(19) 배지 및 harvest tank 내 존재하는 γ -IFN은 ELISA kit(Genzyme, USA)를 이용해 정량했다. 또한 배지 내 존재하는 glucose, lactate, glutamine, ammonia는 HPLC(Waters, USA)와 효소 발색반응을 이용해 측정했다.

Membrane frame shaft(Fig. 1)의 회전에 의해 발생하는 전단응력의 대부분은 배양조의 외벽과 silicone tubing frame과의 간격에서 야기되므로 다음과 같이 나타낼 수 있다(16).

$$\tau = \frac{T}{2R^2L} \quad (1)$$

여기서 τ 는 전단응력(dyne/cm²)이며 T는 membrane frame shaft를 회전시키기 위해 배양조 윗 부분에 위치한 motor에 걸리는 torque(dynes.cm)로서 배양조 축의 회전 속도(RPM)와 선형적인 관계가 있다. 또한 R과 L은 각각 배양조의 반지름 및 높이(cm)다. 따라서 배양조 축의 회전속도에 따른 전단응력은 식 (1)에 의해 계산될 수 있다.

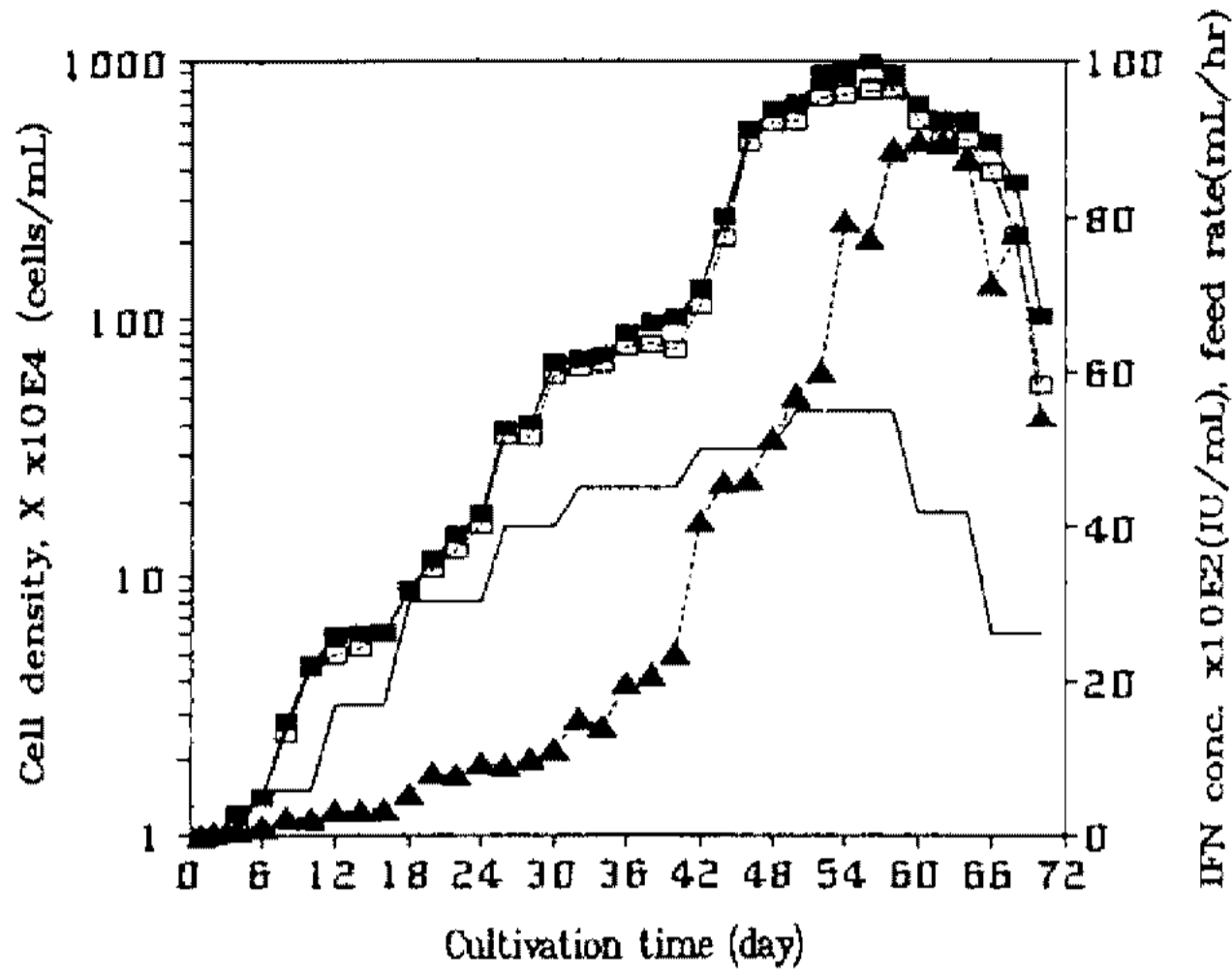


Fig. 2. The cell growth and γ -IFN production in perfusion cultivations of recombinant human skin fibroblast according to cultivation time.

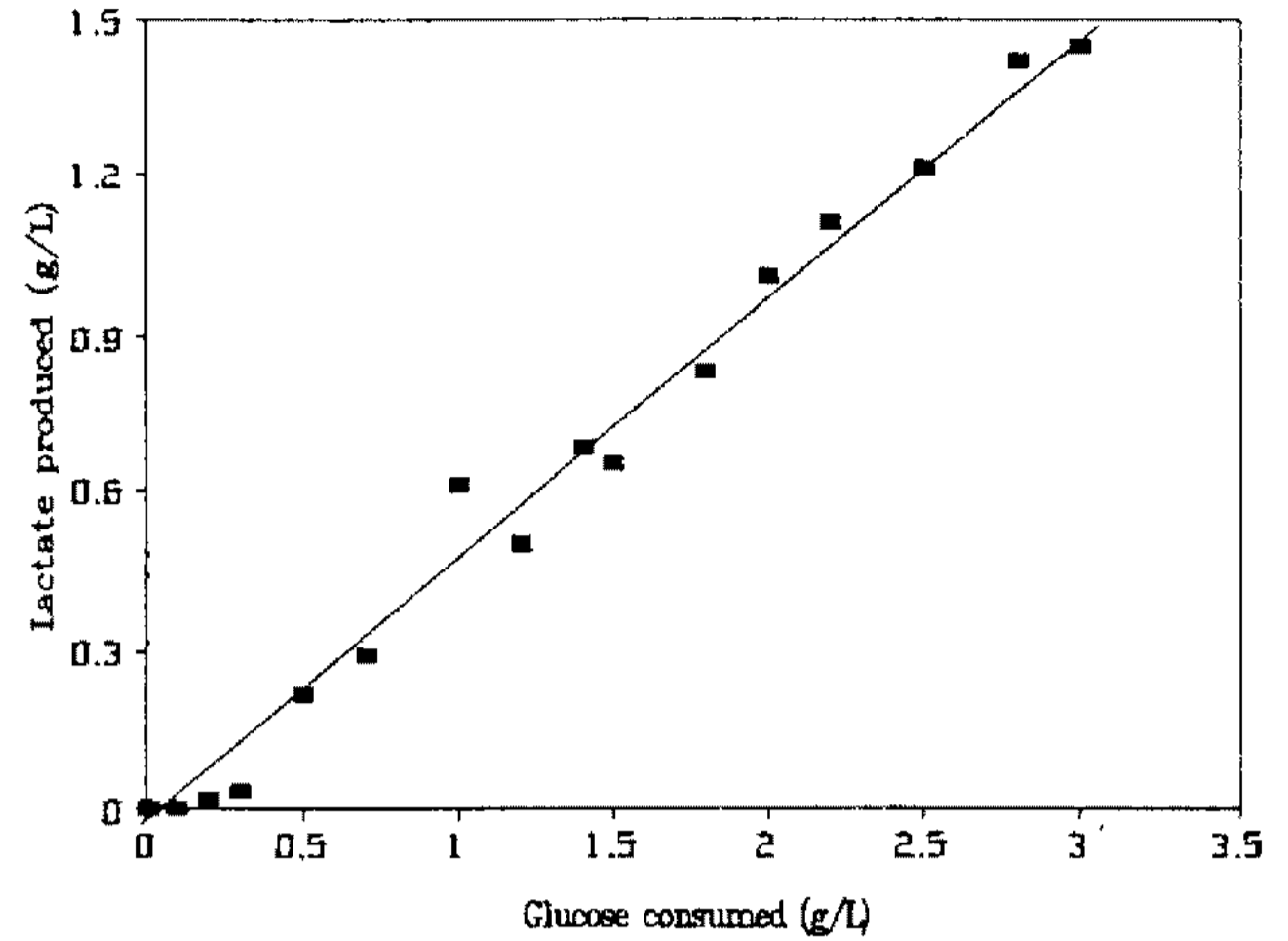


Fig. 3. The relationship between glucose consumption and lactate production for the growth of HSF cells. Solid line is the results of linear regression analysis.

결과 및 고찰

Fig. 2는 HFS 세포주를 Fig. 1의 배양조에서 연속 배양한 결과로서 배양 후 약 48일 후에 8×10^6 (viable cells/mL)의 최대 세포수에 도달했으며 이때 배지의 유입 속도는 55(mL/hr) (0.037 l/hr의 희석율에 해당)였다. 또한 γ -IFN의 최대 생산은 배양 후 약 60일이 경과했을 때 9000(IU/mL)였다. 60일 이후 세포수의 급격한 감소는 산소 공급의 한계가 아니라 세포 생육의 저하에 기인된 것임이 배양 초기에서 말기까지 세포 생존율이 90% 이상을 유지한 것으로 알 수 있다. 특히 본 배양조를 BHK 세포에 회분 배양한 결과를 비교해 봐도 고농도 배양시 산소전달이 우수한 것으로 미루어(15) 본 배양조에서 배양시 전반적으로 양호한 생육조건을 유지할 수 있는 것으로 평가됐다.

Fig. 3과 4는 체외 배양시 대사 산물들의 소비 및 생산과의 관계를 규명하기 위한 것으로 Fig. 3은 glucose 소비에 대한 lactate 생산과의 관계로서 glucose 소비량이 적은 배양 초기를 제외하고는 두 변수의 직선 회귀상수(linear regression coefficient)가 0.92로서 비례적인 관계임을 알 수 있다. Glucose의 lactate로의 전환에 대한 metabolic molar quotient는 평균 0.81로서 소비된 1 mole glucose의 80%가 lactate로 전환되는 것을 알 수 있다. 이는 다른 동물세포들의 체외 배양시 측정치 들인 0.66~0.90(17)과 유사한 값을 알 수 있다. 이에 대해 Fig. 4는 소비된 glutamine에 대한 ammonia 생성을 비교한 것으로 생성된 ammonia는 배지 내 glutamine을 제외한 다른 아미노산들의 농도가 매우 낮으므로 대부분은 gluta-

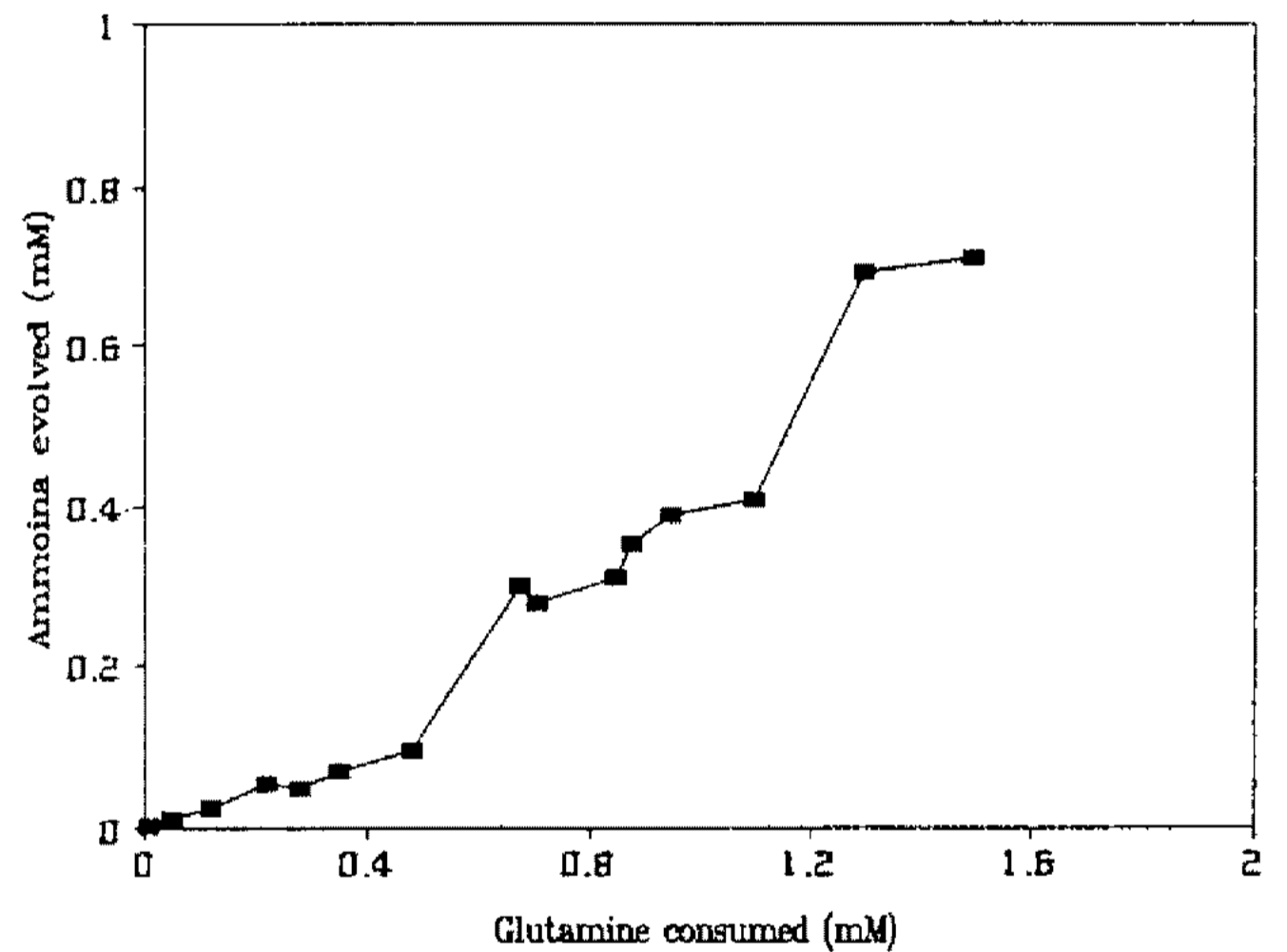


Fig. 4. The correlation between glutamine consumption and ammonia evolution for the growth of HSF cells.

mine의 소비에 기인된 것으로 가정했다. 이 같은 경우 배양 초기에는 ammonia로의 전환이 극히 낮다가 생육 속도가 빠르며 배양이 전반적으로 준 안정상태(quasi steady state)에 도달한 경우에는(glutamine의 소비가 0.8 mM 이상의 경우) metabolic quotient가 약 0.49로 직선적인 관계를 보이고 있다. 따라서 세포 생육시 전반적으로 glycolysis가 glutamolysis 보다 높은 전환 수율을 갖는 효율적인 생화학적 경로임을 예상할 수 있다. 하지만 배양 공정이 안정 상태에 도달해 배지 내 glucose와 glutamine의 농도가 상대적으로 낮은 경우(glucose와 glutamine의 소비가 높은 경우)에는 lactate보다 ammonia 생성 mole 수가 높은 것으로 미루어 이 같은 상태에서는 glutamolysis가 더 중요한 역할을 하고 있음을 입증하고 있다(18).

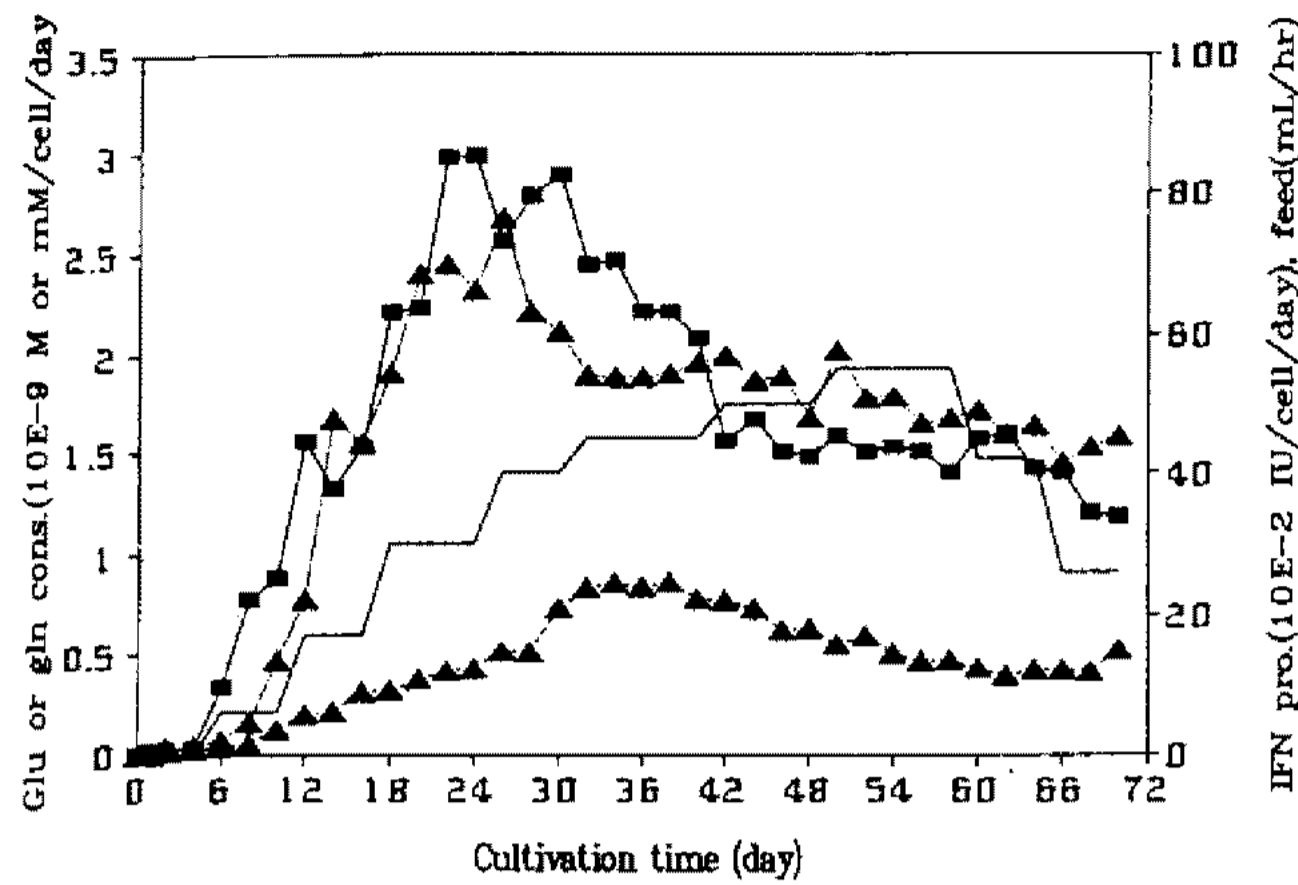


Fig. 5. Specific consumption rates of glucose and glutamine and production rate of γ -IFN in perfusion cultivations of HSF cells.

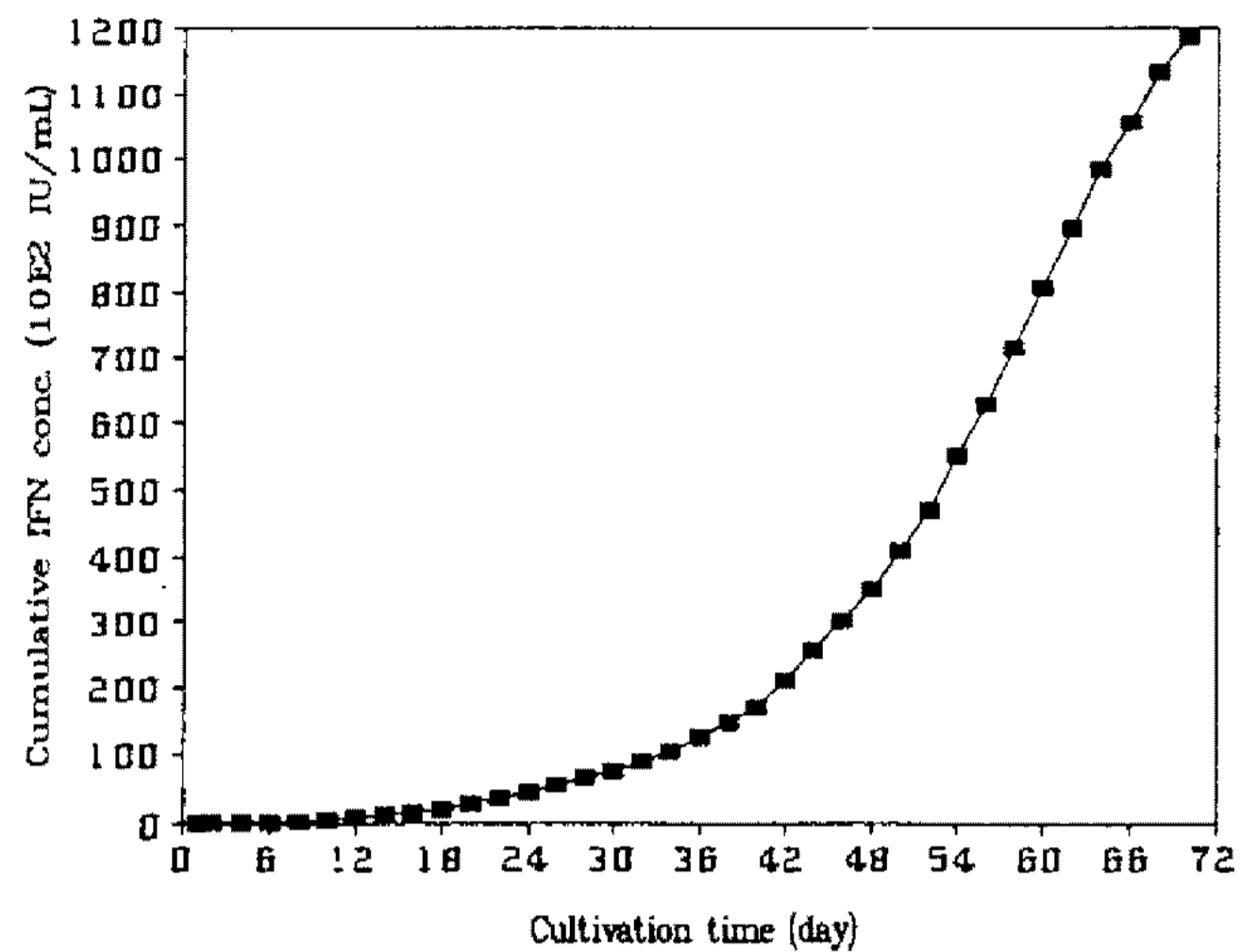


Fig. 7. Cumulative γ -IFN production from the growth of HSF cells under perfusion cultivations.

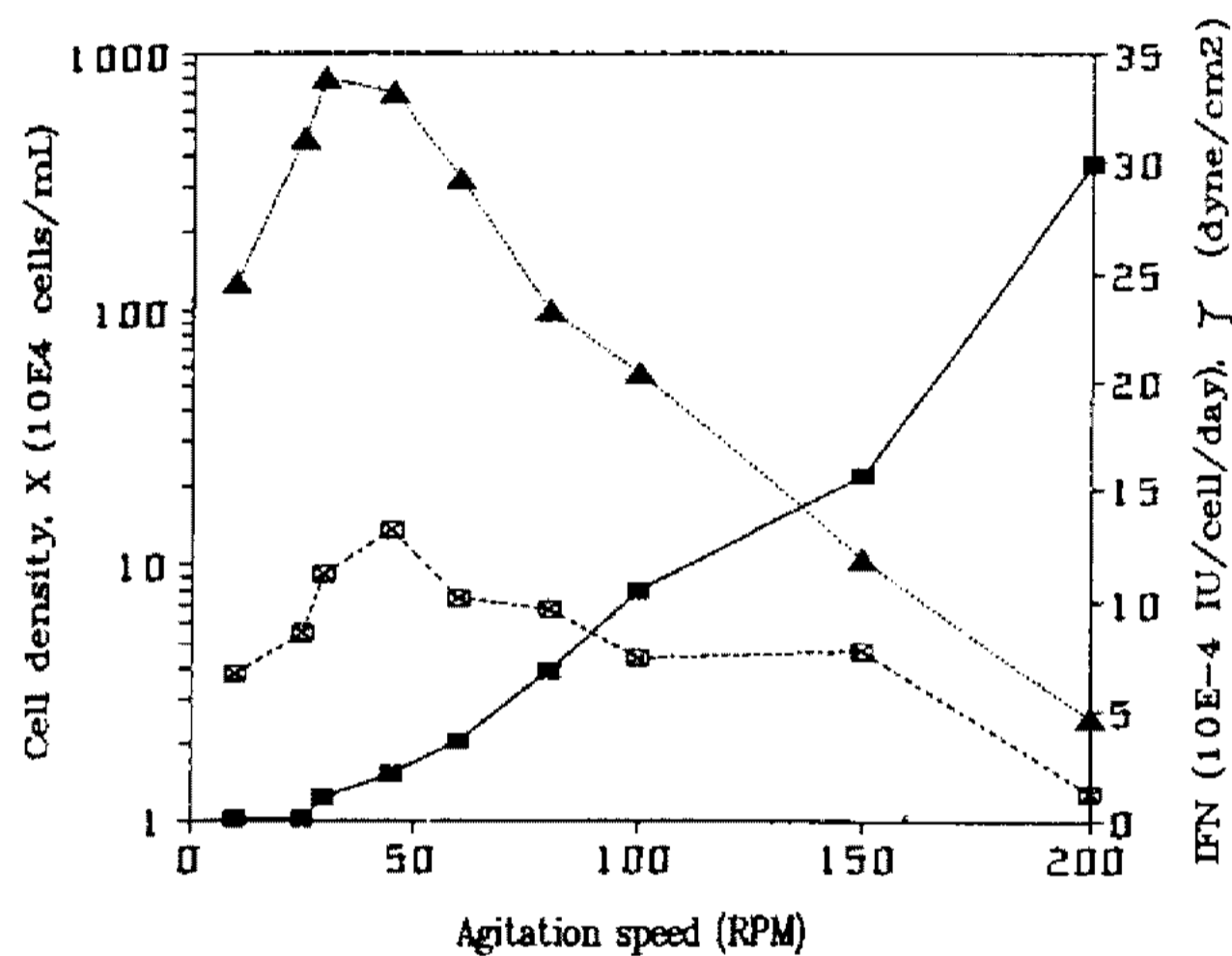


Fig. 6. The cell growth, γ -IFN production rate and shear stress as a function of agitation speed in growing HSF cells by a moving membrane aeration bioreactor.

생육 및 물질 생산에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 이를 위해 통기축을 일정 회전속도로 회전하며 회분 배양해 유지될 수 있는 최대 세포수와 이때 생산된 γ -IFN의 양을 측정해 나타낸 그림이다. 약 30 rpm 정도의 교반 속도까지는 교반이 빨라짐에 따라 세포 생육 및 IFN의 생산 속도가 증가하나 이보다 높은 속도에서는 세포의 생육이 급속히 감소하는 현상을 보였다. 이는 통기축 전체가 교반되는 형태로서 상대적으로 빠른 교반 속도에서는 일반 교반축보다 더 큰 전단응력이 발생해 세포 생육을 극히 저해하는 것으로 예측된다. 하지만 교반에 따른 전단 응력의 증가에 따라 세포 생육은 크게 영향을 받는 반면 IFN의 생산은 매우 빠른 교반속도를 제외하고는 그리 크게 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 따라서 본 배양조를 이용한 세포 배양시 교반속도가 중요한 변수이며 50 rpm 이상은 교반이 어려운 것으로 판단된다. 이 같은 교반 속도와 전반적으로 낮은 회석율에서도 최대 세포수가 일반 배양조의 경우보다 높은 것으로 미루어 산소전달 속도에는 영향을 미치지 않는 것으로 평가되나 배양조 및 전 공정의 scale-up 시 여러 단점을 갖고 있어 이에 관한 연구가 보다 진척되어야 할 것이다.

Fig. 5는 glucose와 glutamine의 비 소비 속도에 따른 γ -INF의 비 생산속도를 나타낸 것으로 45(ml/hr) (0.03l/hr의 회석율에 해당)의 배지 유입 속도에서 1.47×10^{-3} (IU/cell/day)의 최대 비 생산 속도를 유지했으며 이는 배양 후 약 20일 경에 glucose와 glutamine의 최대 소비 속도를 나타내는 때보다 10일 정도 늦은 glucose와 glutamine의 소비가 급격히 떨어지는 때로서 γ -IFN의 생산이 세포 생육과 간접적인 관계를 갖고 있음을 유추할 수 있다. 또한 이같은 현상은 다른 유전자 재조합된 세포들에서도 유사하게 나타나고 있다(20, 21). 이에 반해 glucose와 glutamine의 비 소비 속도는 서로 유사한 소비 형태를 보이고 있으며 배양 후반기에는 이 같은 소비 속도들이 일정해져 전반적인 안정상태에 도달한 것을 알 수 있다. Fig. 6은 통기 축의 회전에 의해 야기된 전단응력이 세포

Fig. 7은 배양에 따른 γ -IFN의 총 생산량을 보여주는 것으로서 72일간 약 60l의 배양액이 산출되 7.2×10^8 IU의 γ -IFN이 생산됐다. 이는 전체 배양 평균 1×10^7 (IU/day)의 매우 높은 생산 속도를 유지할 수 있음을 알 수 있다. 특히 배양 후 약 40일 쯤부터 축적된 IFN의 양이 급격히 증가했는데 이는 배지의 유입 속도 및 생산되는 IFN 양의 급속한 증가에 기인된 때문이다. 이 같이 γ -IFN이 축적되는 양은 기하

급수적으로 증가하는 형태로서 배양조를 이용한 체외 배양시 배양 기간을 연장할 경우 γ -IFN 생산에 영향을 미치는 주요한 요소들인 pH 및 용존 산소의 양을 최적 조건으로 유지하면 이의 상업적 생산이 가능할 수 있을 것으로 예측된다.

요 약

통기축이 회전하는 배양조를 이용해 γ -IFN을 생산할 수 있는 유전자 재조합된 세포주인 HSF를 연속 배양한 결과 55(ml/hr)의 배지 유입 속도에서 8×10^6 (viable cells/ml)의 최대 세포수의 유지가 가능했으며 9000(IU/ml)의 γ -IFN을 생산할 수 있었다. 이 같은 배양은 전반적으로 90% 이상의 생 세포수를 유지하는 우수한 공정이었다. 소비된 glucose mole 수의 80% 정도가 lactate로 일정하게 반면 glutamine의 ammonia로의 mole 전환은 배양 초기에는 극히 낮다가 배양이 안정 상태에 도달했을 때 0.4 정도의 전환율을 보였다. 특히 배양 공정이 안정상태에 도달한 경우는 lactate보다 많은 양의 ammonia가 생성돼 glutamolysis가 중요한 역할을 하고 있음을 알 수 있었다. 또한 교반에 따른 전단응력에 대해 최적 교반 속도인 50 rpm 이상의 속도에서 세포 생육은 매우 민감하게 영향을 받는 반면 최대 IFN의 비 생산 속도는 1.5×10^{-3} (IU/cell/day)로서 γ -IFN의 생산은 다소의 감소는 있었으나 그리 크게 영향을 받지 않았다. 전체 70 일간의 배양으로 총 7.2×10^8 (IU)의 γ -IFN이 생산돼 약 1×10^7 (IU/day)의 생산성을 보여 연속 고농도 배양에 의한 상업적 생산 가능성을 확인했다.

감사의 말

본 연구는 한국 학술진흥 재단의 지방대학 육성 지원사업의 일환으로 추진된 결과로 이에 심심한 사의를 표합니다.

참고문헌

- Pelosi, P. and M. Garibotti. 1993. Peripheral aspects of olfaction. *Cytotechnol.* **11**: 7-11.
- Merritt, S. and B.O. Palsson. 1993. Loss of antibody productivity is highly reproducible in multiple hybridoma subclones. *Biotechnol. Bioeng.* **42**: 247-250.
- Morrison, S.L. and M.D. Scharff. 1981. Mutational events in mouse myeloma cells. *CRC Crit. Rev. Immunol.* **1**: 1-22.
- Scahill, S.J., R. Devos, J. Heyden, and W. Fiers. 1983. Expression and characterization of the product of a human immune interferon cDNA gene in Chinese hamster ovary cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**: 4654-4658.
- Graham, F.L. and A.J. van der EB. 1973. Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology* **54**: 536-539.
- Hiller, G.W., D.S. Clark, and H.W. Blanch. 1993. Cell retention-chemostat studies of hybridoma cells-analysis of hybridoma growth and metabolism in continuous suspension culture on serum free medium. *Biotechnol. Bioeng.* **42**: 185-195.
- Hawboldt, K.A., N. Kalogerakis, and L.A. Behie. 1994. A cellular automaton model for microcarrier cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **43**: 90-100.
- Fenge, C., C. Klein, C. Heuer, U. Siegel, and E. Fraune. 1993. Agitation, aeration and perfusion modules for cell culture bioreactors. *Cytotechnol.* **11**: 233-244.
- Contradt, H.S., M. Nimtz, K. Dittmar, and H. Hauser. 1989. Expression of human interleukin-2 in recombinant baby hamster kidney. *J. Biol. Chem.* **264**: 17368-17373.
- Mizrahi, A. 1988. Biologicals produced from animal cells in culture. *Biotech. Adv.* **6**: 207-220.
- Butler, J.L., H.C. Lane, and A.S. Frauci. 1982. Delineation of optimal conditions for producing hybridomas from human peripheral blood by lymphocytes of immunized subjects. *Clin. Res.* **30**: 344A.
- Trinchieri, K. and M. Katos. 1985. The enhancement of NK toxicity and tumor killings by human gamma-interferons. *Immunology Today* **6**: 131-139.
- Shi, Y., D.Y. Ryu, and S. Park. 1993. Monoclonal antibody productivity and the metabolic pattern of perfusion cultures under varying oxygen tensions. *Biotechnol. Bioeng.* **42**: 430-439.
- Kuhlmann, W. 1987. Optimization of a membrane oxygenation system for cell culture in stirred tank bioreactors. *Develop. Biol. Std.* **66**: 263-268.
- Kim, Y.N., B.C. Jeon, J.H. Lee, and H.Y. Lee. 1993. Performance of a novel bioreactor equipped with moving membrane tube-aeration system. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 348-353.
- Charm, S.E. and G. Kurland. 1962. A comparison of the tube flow behavior and shear stress characteristics of canine blood. *Am. J. Physiol.* **103**: 417-425.
- Miller, W.M., C.R. Wilke, and K.W. Blanch. 1988. Transient responses of hybridoma metabolism to changes in the oxygen supply rate in continuous culture. *Bioproc. Eng.* **3**: 103-111.
- Miller, W.M. 1987. A kinetic analysis of hybri-

- doma growth and metabolism. Ph. D. dissertation, Univ. of California at Berkeley.
19. Freshney, R.I. 1983. *Cultivation of Animal Cells*. Pp. 199-215. Alan R. Liss, Inc.
 20. Lin, A.A., R. Kimura, and W. Miller. 1993. Production of tPA in recombinant CHO cells under oxygen-limited conditions. *Biotechnol. Bioeng.* **42**: 339-350.
 21. Petterson, E.O., N.O. Juul, and O.W. Ronning. 1986. Regulation of protein metabolism of human cells during and after acute hypoxia. *Cancer Res.* **46**: 4346-4351.

(Received May 3, 1994)