

베쿨로 바이러스 발현 시스템에 의한 곤충세포에서의 인간 트롬보포이에틴 생산 최적화

고 여 옥 · 손 미 영 · 박 상 규 · 안 혜 경 · 박 승 국 · 박 명 환 · 양 제 명
서강대학교 이과대학 생명과학과, ¹대웅제약(주)연구소
(접수 : 1997. 12. 1., 게재승인 : 1997. 12. 16.)

Optimization of Human Thrombopoietin Production in Insect Cells Using Baculovirus Expression System

Yeo Wook Koh, Mi Young Son¹, Sang Kyu Park¹, Hyea Kyung Ahn¹, Seoung Kook Park¹,
Myung Hwan Park¹, and Jai Myung Yang[†]
Department of Life Science, Sogang University, Seoul 121-742, Korea
¹R&D Center, Daewoong Pharmaceutical Co., Ltd, Sungnam, Kyunggi 462-120, Korea
(Received : 1997. 12. 1., Accepted : 1997. 12. 16.)

In order to obtain high-level production of recombinant human thrombopoietin (rhTPO) in insect cell line, BTI-TN-5B1-4 (TN5), conditions for optimal rhTPO expression such as multiplicity of infection (MOI), the cell density at infection, harvesting time and type of culture method as well as growth media were determined. When TN5 cells were cultured as anchorage-dependent state in 60-mm dish, cell density of 2×10^6 cells, MOI of 10 and harvesting the culture media at 72 hr post-infection were the conditions for highest rhTPO production. High production of rhTPO was also achieved by using EXPRESS FIVE serum free media rather than SF900II or serum free media-1. Anchorage-dependent TN5 cells were adapted as a suspension culture when they were grown in the presence of heparin. TN5 cells were successfully cultured at 0.2 L scale in suspension culture without having aggregation. When TN5 cells were cultured as suspension state, cell density of 0.6×10^6 cells/mL, MOI of 1 and harvesting the culture media at 72 hr post-infection, gave the highest yield of rhTPO.

Key Words: thrombopoietin, baculovirus, TN5, suspension culture

서 론

베쿨로바이러스 발현 시스템은 많은 고등 생물의 단백질, 특히 대장균에서 번역후 수식 (post-translational modification)이 완전한 형태로 일어나지 않는 단백질의 생산에 널리 사용되고 있다. 곤충세포는 N-linked와 O-linked glycosylation, phosphorylation, myristylation, folding, 및 활성형으로의 절단과 같은 기능을 수행할 수 있으므로 이 시스템은 세포외로 분비되거나 생물학적 활성도가 중요한 단백질 발현에 널리 사용되고 있다(1).

지금까지 곤충세포에서 발현된 단백질은 세포내에 위치하는 단백질 보다 세포외로 분비되는 단백질의 발현양 (<5 mg/L)이 훨씬 낮은 경향을 나타내었다 (2). 이러한 이유 때문에 베쿨로바

이러스를 이용한 곤충세포 발현 시스템은 산업적으로 이용하는 데 한계가 있었다. 이러한 한계점을 극복하기 위해 최적의 시그널펩티드를 삽입하여 분비효율을 높이거나, 다각체축진자로 부터의 전사효율극대화, 그리고 분비효율이 증강된 곤충세포주 이용 등의 방법을 적용하여 단백질 발현량을 증대시키고자하는 연구 (1, 2, 3, 4)가 활발히 진행되고 있다.

현재 *Spodoptera frugiperda* 9 (Sf9) 세포가 베쿨로바이러스 발현 시스템을 이용한 재조합 단백질의 생산 세포로 가장 널리 이용되고 있다. 그러나 Sf9 세포는 단백질의 번역후 수식 (post-translational modification)과 세포외로의 분비에 대한 속도 제한 단계 (rate-limiting step)가 존재함이 밝혀져서, 번역과 번역후 수식율이 높다고 알려진 BTI-TN-5B1-4 (TN5) 세포를 이용하는 발현 시스템이 연구되고 있다 (5). 실제로 TN5 세포가 Sf9 세포보다 세포외 단백질을 2~20 배 더 생산한다는 결과가 보고된 바 있다 (6). 반면 TN5 세포는 Sf9 세포와 달리 부유 배양에 쉽게 적응되지 않는 것으로 알려져 있다 (7, 8).

인간 트롬보포이에틴 (hTPO)은 최근 발견된 조혈세포 성장 인자로서 거핵구 (megakaryocyte)의 성장과 분화에 작용함으로

[†]Corresponding Author : Dept. of Life Science, Sogang University, C.P.O. Box 1142, Seoul 121-742, Korea.
Tel : 02-705-8457, Fax : 02-701-8550
e-mail : jaimyang@ccs.sogang.ac.kr

써, 혈소판 생성을 촉진한다. 이 단백질은 chemotherapy를 받는 암 환자나 골수 이식 수술 환자에게서 나타나는 혈소판 감소증에 대한 치료용 단백질로서 사용될 수 있어 의학학적으로 매우 중요한 단백질로서 주목받고 있다 (9).

치료용 단백질로서 사용하기 위해서 그리고 단백질의 구조와 활성관계를 규명하기 위해서는 hTPO의 대량생산이 필수적으로 요구된다. 현재까지 대장균을 이용한 hTPO의 발현연구에서는 hTPO가 대장균내에서 비가용성 형태 (insoluble form)로 발현됨으로써 (10) 생물학적으로 활성이 있는 형태로 전환하기 위해서 복잡한 변성 및 refolding 등의 과정이 요구되었고, 동물세포를 이용한 hTPO의 발현연구는 가용성 형태 (soluble form)로 발현되나 발현양은 높지 않은 것으로 나타났다 (11).

본 연구에서는 벡클로 바이러스 발현 시스템을 이용하여 TN5 곤충세포에서 인간 트롬보포이에틴의 발현을 시도할 때 생산량을 증대시키기 위해 필요한 여러 조건의 최적화 연구를 수행하였다. 아울러 부착의존성 세포주인 TN5 세포가 0.2 L 규모 (1 L spinner flask)에서 세포간의 응집현상이 부유배양에 적용하여 성공적으로 배양이 가능하였음을 보고한다.

재료 및 방법

세포주, 배지 및 바이러스

BTI-TN-5B1-4 (TN5) 곤충세포는 *Trichoplusia ni* eggs (R. R. Granados, unpublished)로부터 생성되었으며, SF900II (Gibco, Grand Island, NY), EXPRESS FIVE (Gibco, Grand Island, NY) 또는 serum free insect medium-1 (Sigma, St. Louis, MO) 배지를 사용하여 정체배양 조건으로 27°C에서 배양하였다. 부유배양은 배양배지에 초기 10 unit/ml 헤파린을 첨가하여 50 mL 규모 (125 mL spinner flask)로 27°C에서 적응시킨 후, 세포응집이 없어질 때까지 헤파린 농도를 5 unit/mL, 2.5 unit/mL로 순차적으로 감소시키면서 적응 배양하여 최종적으로는 헤파린을 첨가하지 않고 배양하였다. 배양시 교반속도는 70-80 rpm이었다. hTPO를 발현할 수 있는 재조합 바이러스인 AcBac404-2는 pBlueBacIII 이동벡터 (Invitrogen, San Diego, CA)를 사용하여 건설하였으며 정체배양한 TN5 세포에 감염시켜 얻은 바이러스를 배양 배지상태로 냉장 보관하였다.

세포 수 및 바이러스 titer 결정

세포 수는 혈구계산판 (haemocytometer)을 사용하여 도치 현미경 (inverted microscope)으로 관찰하여 측정하였으며 생존율 (viability)은 trypan blue exclusion 방법으로 측정하였다. 0.4% trypan blue 시약을 배양액과 1:1로 섞은 후 염색된 세포를 죽은 세포로 간주하여 계수하고 염색되지 않은 생존 세포수를 계수하여, 총 세포수 대비 산 세포수의 비율을 결정하였다. 바이러스의 titer는 Invitrogen 사의 바이러스 플라크 (plaque) 검정법 (Invitrogen사 MaxBac 2.0 transfection and Expression manual, Version A 151219)에 따라 결정하였다.

감염조건

정체배양세포에서는 먼저 60 mm dish에 2×10^6 cells의 세포를 1 시간 동안 부착시킨 후, 재조합 바이러스를 multiplicity of infection (MOI) 1, 5, 10, 20으로, rocker platform (5 oscil-

lation/min)에서 1 시간 동안 감염한 뒤, 새로운 배지 2 mL로 교환하였다. 부유배양세포에서는, spinner flask에서 배양한 TN5 세포 (0.6×10^6 cells/mL, 1.6×10^6 cells/mL, 2.0×10^6 cells/mL, and 3.0×10^6 cells/mL)를 재조합 바이러스 (MOI of 1)로 감염시킨 후 교반속도 80 rpm으로 27°C에서 배양하였다. 감염 후 24 시간마다 배양 배지를 취하여 SDS-PAGE, immunoblot 분석 및 ELISA 방법으로 배지로 분비된 hTPO 단백질을 분석하였다.

hTPO 단백질의 분석

각각의 배양 시료를 취한 뒤, 10,000 xg에서 10 분간 원심분리하여 세포침전물과 배양 배지로 분리한 후, 세포외로 분비된 hTPO의 발현양을 ELISA와 immunoblot 방법으로 분석하였다. Immunoblot 분석은 단백질 시료를 10~20% 구배 또는 12% SDS-폴리아크릴아미드 겔 (NOVEX, San Diego, CA)로 전기영동한 후, 단백질을 니트로셀룰로오즈 멤브레인에 전기이동법으로 흡착시켰다. 멤브레인을 5% 탈지분유를 포함한 TBS 용액 (20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7.5)으로 1 시간 동안 처리한 다음, goat anti-human TPO polyclonal antibodies (R&D Systems Inc., Mckinley, MN)를 1:1,000의 희석 비율로 하여 18 시간 반응시켰다. 그 후 2 차 항체로서 alkaline phosphatase-conjugated anti-goat IgG (Sigma, St. Louis, MO)를 1:10,000의 희석 비율로 하여 2 시간 동안 처리하고 발색 기질인 BCIP/NBT (Sigma, St. Louis, MO) 용액을 부가하여 발색시켰다. hTPO의 정량은 R&D Systems사 (McKinley, MN)로부터 구입한 hTPO를 표준품으로 사용하여 antigen-capture ELISA 법으로 정량하였다.

결과 및 고찰

MOI 및 배양기간이 rhTPO 생산에 주는 영향

rhTPO를 곤충세포에서 발현하기 위하여 재조합 바이러스를 곤충세포에 감염할 때 MOI가 rhTPO 발현양에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 60 mm dish에 배양한 2×10^6 TN5 세포를 각각 MOI 1, 5, 10, 20 으로 감염시킨 후, 27°C에서 배양하면서 24 시간 간격으로 배양 배지 2 ml를 취하여 rhTPO 발현양을 immunoblot 방법으로 분석하였다. Figure 1에서와 같이 MOI 1 또는 5로 감염하였을 때 72 시간까지는 rhTPO가 거의 발현되지 않았으나 MOI 10 또는 20으로 감염하였을 때는 72 시간 후 10-12 mg/L 수준으로 발현되었다. MOI 1 또는 5로 감염하였을 때 rhTPO가 72 시간 후 소량 발현되고 96 시간 후에 4-7 mg/L 정도 발현된 것으로 보아 낮은 MOI로 감염시켰을 때는 감염된 숙주세포의 수가 상대적으로 적으며 이들로부터 복제되어 세포밖으로 분비된 자손 바이러스에 의한 2차 감염속도가 늦어 생산량이 적고 96 시간 후까지 생산량이 조금씩 증가하는 것으로 보인다.

rhTPO 생산을 위한 최적 배양시간을 조사하기 위하여 TN5 세포를 AcBac404-2로 MOI 10으로 감염시킨 후 27°C에서 배양하고 일정한 시간이 경과 후 배양배지를 채취하여 rhTPO의 발현양을 immunoblot 방법으로 분석하였다. 감염 후 72 시간 경과 시 (Figure 2, lane 6)에 발현양이 최대를 나타냈고, 100 시간 경과 이후에는 발현양이 급격히 감소했다. 감염 후 72시간 이후에는 분자량 약 24 kDa 에서 48 kDa의 범위에 걸쳐서 여러종의 작은 분자량에 해당하는 단백질 band가 나타나기 시작하는

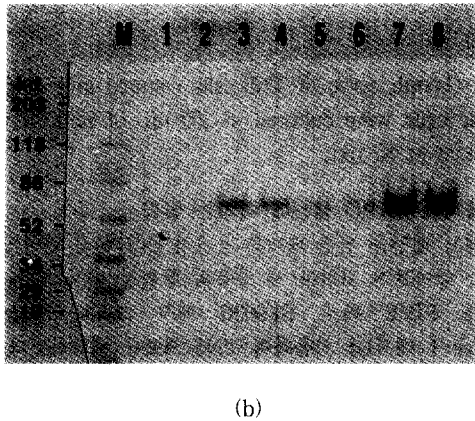
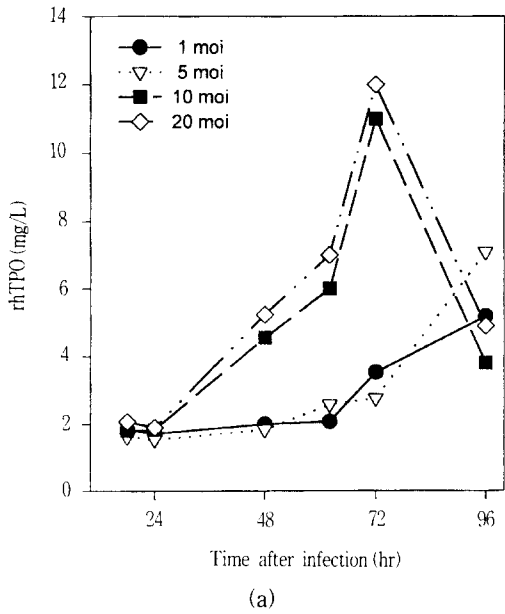


Figure 1. Effect of MOI on rhTPO production in insect cells. Monolayers of TN5 cells were infected with AcBac404-2 at different MOI. Expression level of rhTPO in the culture medium was analyzed by either ELISA (A) or immunoblot analysis (B). Lane M; prestained molecular weight markers, lanes 1 and 5; TN5 cells infected at 1 MOI, lanes 2 and 6; TN5 cells infected at 5 MOI, lanes 3 and 7; TN5 cells infected at 10 MOI, and lanes 4 and 8; TN5 cells infected at 20 MOI. Lanes 1, 2, 3, and 4; culture medium was collected at 48 hr post-infection, lanes 5, 6, 7, and 8; culture medium was collected at 72 hr post-infection.

데 (Fig. 2, lanes 9, 10), 이것은 곤충세포내의 단백질 분해효소에 의해 rhTPO가 분해되기 때문인 것으로 생각된다. 따라서 rhTPO의 대량회수를 위해서는 rhTPO의 최대발현이 일어난 시점인 감염후 72 시간 이전에 배양액을 수집하는 것이 필요하며, 경우에 따라서는 단백질 분해효소 저해제를 처리하여 rhTPO의 분해를 최소화 하는 것이 요구되었다.

감염시의 세포밀도 및 세포 성장시기에 따른 rhTPO의 발현
정체배양된 TN5 세포에서 감염시의 세포밀도에 따른 rhTPO

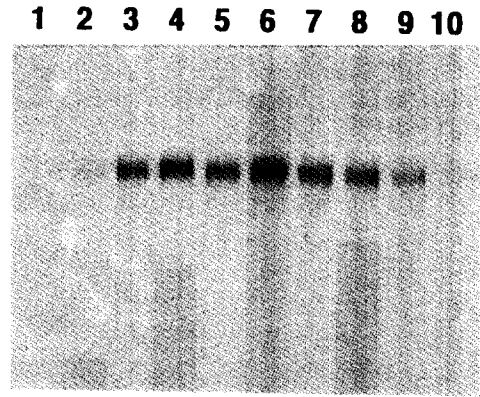
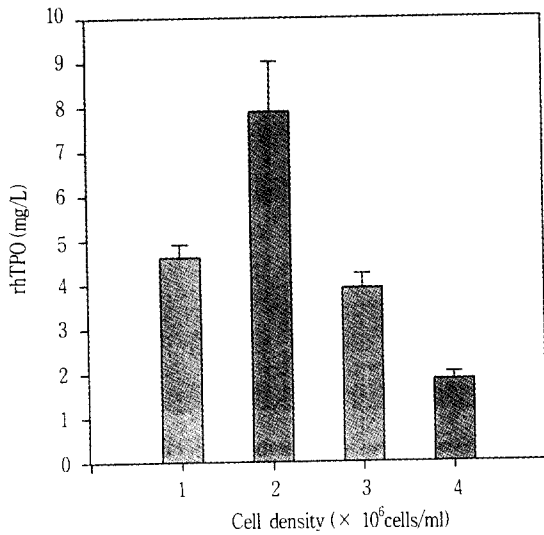


Figure 2. Time course expression of hTPO. Monolayers of TN5 cells were infected with AcBac404-2 at MOI of 10. Culture medium was collected at time course intervals and analyzed by immunoblot analysis. Lane 1; 24 hpi, lane 2; 33 hpi, lane 3; 48 hpi, lane 4; 54 hpi, lane 5; 58 hpi, lane 6; 72 hpi, lane 7; 84 hpi, lane 8; 96 hpi, lane 9; 100 hpi, and lane 10; 144 hpi.

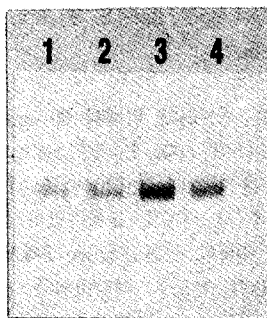
발현양의 상관관계를 조사하기 위해서 60 mm dish에 TN5 세포를 1×10^6 cells, 2×10^6 cells, 3×10^6 cells, 4×10^6 cells의 세포밀도로 정체 배양한 다음 AcBac404-2를 MOI 10으로 감염시키고 감염 1 시간 후 새 배지로 교체하였다. 27°C에서 72 시간 배양하여 발현양을 측정된 결과 Figure 3에서와 같이, 60 mm dish에 2×10^6 cells의 밀도로 배양하였을 때 약 8 mg/L의 rhTPO가 발현되어 가장 높은 발현양을 나타내었다.

세포를 부유배양할 때 세포성장시기가 rhTPO의 발현양에 미치는 효과를 조사하기 위해서, TN5 세포를 125 mL spinner flask에서 50 mL SF900II 무혈청 배지를 사용하여 부유배양에 적용시켰다. 정체배양된 TN5 세포를 spinner flask내 부유배양 상태로 전환시킨 초기 배양시에는 대부분의 곤충세포가 세포간 응집 (clumping) 현상이 발생하여 플라스크 밑바닥으로 가라앉았다. 따라서 헤파린 (heparin)을 약 10 unit/mL로 첨가하여 TN5 세포간 응집현상을 최소화 시키면서 부유배양에 적용시켰다. TN5 세포를 처음 10 unit/mL의 헤파린 존재하에 7 회 계대배양하고 5 unit/mL, 2.5 unit/mL의 헤파린이 포함된 배지에 순차적으로 배양하여 최종적으로는 헤파린이 첨가되지 않은 배지에 부유배양상태로 적용시켜 세포간 응집현상이 나타나지 않고 생존율도 우수한 TN5 세포주를 얻을 수 있었다. 세포의 응집 현상은 적용시 교반속도가 영향을 주었으며, 40-50 rpm 이하의 교반속도에서는 세포응집이 일어났으나, 70-80 rpm의 교반속도에서는 세포응집 없이 98% 이상의 생존율을 나타내었다.

부유배양 상태로 적용시킨 TN5 세포를 1 L spinner flask에서 200 mL의 배지에 배양하여 얻은 성장곡선으로부터 (Figure 4) TN5 세포의 doubling time은 약 24 시간임을 알 수 있었고, 80 rpm에서 최대 세포밀도인 4.5×10^6 cells/mL을 얻을 수 있었다. 부유배양된 TN5 세포에 재조합바이러스로 감염시 세포 성장시기에 따라 rhTPO의 발현양에 미치는 영향을 조사하기 위하여 0.6×10^6 cells/mL, 1.6×10^6 cells/mL, 2×10^6 cells/mL, 3×10^6 cells/mL의 TN5 세포에 AcBac404-2를 MOI 1로 감염시



(a)



(b)

Figure 3. Effect of cell density on rhTPO production. TN5 cells cultured as anchorage-dependent state in SF900II medium were infected with AcBac404-2 at MOI of 10. Culture medium was harvested at 3 days post-infection and expression level of rhTPO was analyzed by either ELISA (A) or immunoblot analysis (B). Lane 1; 4×10^6 cells, lane 2; 3×10^6 cells, lane 3; 2×10^6 cells, and lane 4; 1×10^6

킨 후 27°C에서 배양하고 일정한 시간이 경과된 뒤 시료를 채취하여 rhTPO의 발현양을 ELISA와 immunoblot 방법으로 분석하였다 (Figure 5). 부유배양된 Sf9 세포에서는 MOI가 재조합 단백질 발현양의 증가에 큰 영향을 미치지 않으며 특히 mid-exponential 이후의 세포에서 1.0-20 범위 내의 MOI가 재조합 단백질의 발현양에는 유의한 영향을 미치지 않기 때문에 (13, 14) MOI 1로 감염하였고, TN5 세포밀도가 성장곡선의 early exponential 상태인 0.6×10^6 cells/mL에 도달하였을 때 8.7 mg/L의 rhTPO가 발현된 반면 1.6×10^6 cells/mL 이상의 mid-exponential 상태의 세포밀도에서는 발현이 거의 일어나지 않았다. 이 결과는 Reuveny 등 (14)과 Caron 등 (15)이 Sf9 세포로 수행한 연구결과와 일치하는 것으로서, 본 연구에서 늦은 세포 성장시기의 부유배양된 TN5 곤충세포에 AcBac404-2 재조합바이러스를 감염시 rhTPO 단백질의 발현양이 저하되는 것은 배지내 영양분 결핍과 노폐물의 축적에 기인하는 것 (14, 15)으로 추정된다.

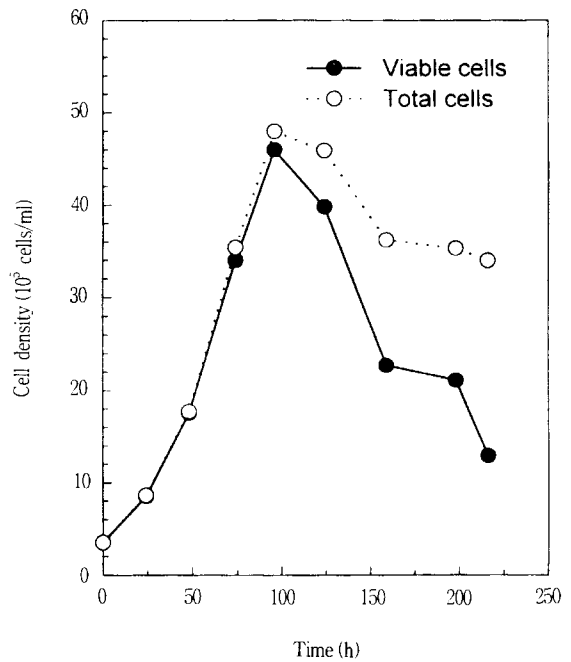


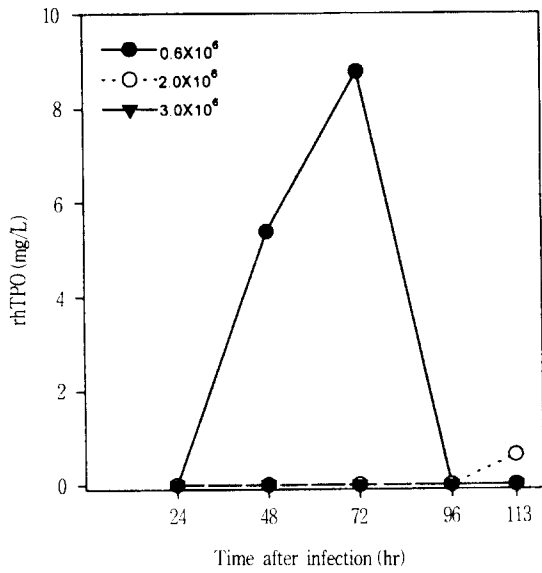
Figure 4. Growth curve of TN5 cells cultured in 1 L spinner flask. The cells were cultured in 200 mL of SF900II serum free medium at 80 rpm.

배양 배지가 rhTPO 생산에 미치는 영향

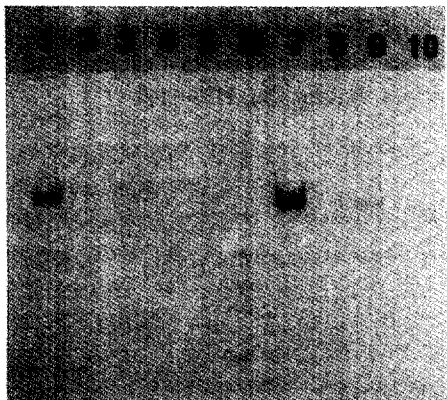
TN5 세포 배양을 위한 배지의 종류가 rhTPO의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 세 종류의 무혈청 배지 (Gibco사의 EXPRESS FIVE 배지, SF900II 배지 그리고 Sigma사의 serum free-1 배지)를 사용하여 TN5 세포를 배양하였다. 각각의 배지에 적응된 세포를 60 mm dish에 2×10^6 개의 세포밀도로 배양한 다음 AcBac404-2를 MOI 10으로 감염시키고 27°C에서 72 시간 배양한후 배양배지내의 rhTPO의 발현양을 ELISA와 immunoblot 방법으로 분석한 결과, EXPRESS FIVE 배지에서 발현시킨 세포가 SF900II 배지나 Sigma사의 serum free-1 배지에서 발현시킨 세포보다 약 1.3-2 배 높은 발현양을 나타내었다 (Figure 6). 이러한 배양배지에 따른 발현양의 차이가 재조합 단백질 발현 수준의 직접적인 변수로 작용한다고 볼 수는 없겠지만, 최적의 배지를 선정하는 것은 결과적으로 재조합 단백질의 발현양을 높이는 데 기여한다고 볼 수 있다.

요 약

부착의존성 세포주인 *Trichoplusia ni* 유래의 BTI-TN-5B1-4 (TN5) 곤충세포주를 이용하여 인간 혈소판생성촉진인자인 재조합 인간 트롬보포이에틴 (rhTPO)의 배양조건 최적화 연구를 수행하였다. 배양 배지, 세포감염에 투입되는 재조합 벡로바이러스와 숙주세포의 비율 (MOI), 세포감염시의 세포밀도, 배지 회수시간 및 배양방법 등이 rhTPO의 생산에 미치는 효과를 연구하여 60 mm dish로 정체 배양시 10 MOI 이상, 2×10^6 cells의 세포밀도, 바이러스 감염 후 72 시간에서 rhTPO의 최대 발현양 (약 12 mg/L)을 나타내었다. 배양 배지로서는 EXCELL FIVE 배지가 SF900II 나 Insect serum free media-1



(a)



(b)

Figure 5. Effect of growth phases on rhTPO production. TN5 cells were grown as suspension culture in 1 L spinner flask with 200 mL of SF900II serum free medium at 80 rpm. The cells were infected with AcBac404-2 at MOI of 1. Culture medium was collected at given time intervals and the expression level of rhTPO was analyzed by ELISA (A) or immunoblot analysis (B). Lanes 1 and 7; cell density of 0.6×10^6 cells/mL, lanes 2 and 8; cell density of 1.6×10^6 cells/mL, lanes 3 and 9; cell density of 2.0×10^6 cells/mL, lanes 4 and 10; cell density of 3.0×10^6 cells/mL, lane M; prestained molecular weight marker (Bio-Rad). Lanes 1, 2, 3, and 4; culture medium was collected at 48 hpi and lanes 7, 8, 9, and 10; culture medium was collected at 72 hpi.

에 비해 더 증가된 발현양을 나타내었다. TN5 세포주를 0.2 L 규모 (1 L spinner flask)에서 세포간의 응집현상 없이 부유배

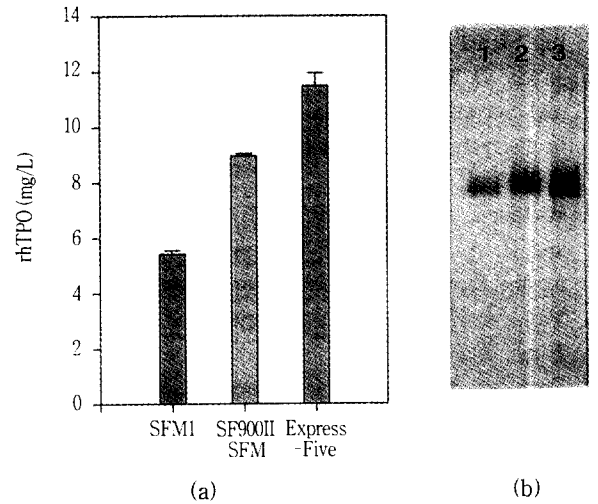


Figure 6. Effect of culture media on rhTPO production. TN5 cells grown with different culture media were infected with AcBac404-2 at 10 MOI. 10 μ L of culture medium was run on SDS-PAGE and immunoblot analysis was performed. Lane 1; TN5 cells cultured with insect serum free medium-1 (Sigma), lane 2; TN5 cells cultured with SF900II serum free media (Gibco), and lane 3; TN5 cells cultured with EXPRESS FIVE serum free media (Gibco).

양에 적용, 배양시킨 후 세포성장 시기에 따른 발현을 조사한 결과 1 MOI의 감염조건 하에서는 0.6×10^6 cells/mL의 early exponential 시기의 세포밀도에서 72 시간 배양하였을 때 최대 발현양을 나타내었다.

감 사

본 연구는 한국과학기술처의 G7선도기술 개발사업 연구비에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Viliard, J. E., M. A. Basil, and C. D. Richardson (1995), Introduction to the Molecular Biology of Baculovirus, Baculovirus Expression Protocols. (C. D. Richardson eds.), pp.1-25, Humana Press, New Jersey.
- Murphy, C. I., J. R. McIntire, D. R. Davis, H. Hodgdon, J. R. Seals, and E. Young (1993), Enhanced Expression, Secretion, and Large-scale Purification of Recombinant HIV-1 gp120 in Insect Cells Using the Baculovirus *egt* and P67 Signal Peptides, *Protein Expr. Purif.*, 4, 349-357.
- Mroczkowski, B. S., A. Huvar, W. Lernhardt, K. Misono, and K. Nielson (1994), Secretion of Thermostable DNA Polymerase Using a Novel Baculovirus Vector, *J. Biol. Chem.*, 269, 13522-13528.
- Tessier, D. C., D. Y. Thomas, H. E. Khouri, F. Laliberte, and T. Vernet (1991), Enhanced Secretion from Insect

- Cells of a Foreign Protein Fused to the Honeybee Melittin Signal Sequence, *Gene*, **98**, 177-183.
5. Jarvis, D. L. and M. D. Summers (1989), Glycosylation and Secretion of Human Tissue Plasminogen Activator in Recombinant Baculovirus Infected Insect Cells, *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 214-223.
 6. Wickham, T. J., T. Davis, R. R. Granados, M. L. Shuler, and H. A. Wood (1992), Screening of Insect Cell Lines for the Production of Recombinant Proteins and Infectious Virus in the Baculovirus Expression System, *Biotechnol. Prog.*, **8**, 391-396.
 7. Wickham, T. J. and G. R. Nemerow (1993), Optimization of Growth Methods and Recombinant Protein Production in BTI-TN-5B1-4 Insect Cells Using the Baculovirus Expression System, *Biotechnol. Prog.*, **9**, 25-30.
 8. Chung, I. S., R. A. Taticek, and M. L. Shuler (1993), Production of Human Alkaline Phosphatase, a Secreted, Glycosylated Protein, from a Baculovirus Expression System and the Attachment Dependent Cell Line *Trichoplusia ni* BTI-TN-5B1-4 Using a Split-flow, Air-lift Bioreactor, *Biotechnol. Prog.*, **9**, 675-678.
 9. Eaton, D. L. and F. J. de Sauvage (1997), Thrombopoietin: The Primary Regulator of Megakaryocytopoiesis and Thrombopoiesis, *Exp. Hematol.*, **25**, 1-7.
 10. Jiang, X., S. Li, A. Zhou, F. Li, X. Xu, and D. Zhu (1996), Translation Initiation Region Plays an Important Role in the Expression of Human Thrombopoietin in *Escherichia coli*, *Biochem and Molecul. Biol. Inter.*, **39**, 1109-1113.
 11. de Sauvage, F. J., P. E. Hass, S. D. Spencer, B. E. Malloy, A. L. Gurney, S. A. Spencer, W. C. Darbonne, W. J. Henzel, S. C. Wong, W. Kuang, K. J. Oles, B. Hutgren, L. A. Solberg Jr, D. Goeddel, and D. L. Eaton (1994), Stimulation of Megakaryocytopoiesis and Thrombopoiesis by the *c-mpl* Ligand, *Nature*, **369**, 533-538.
 12. Maiorella, B., D. Inlow, A. Shauger, and D. Harano (1988), Large-scale Insect Cell Cultures for Recombinant Protein Production, *Bio/Technology*, **6**, 1406-1410.
 13. Murhammer, D. W. (1991) The Use of Insect Cell Cultures for Recombinant Protein Synthesis: Engineering Aspects, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **31**, 283-310.
 14. Reuveny, S., Y. J. Kim, C. W. Kemp, and J. Shiloach (1993), Production of Recombinant Proteins in High-density Insect Cell Cultures, *Biotechnol. Bioeng.*, **42**, 235-239.
 15. Caron, A. W., J. Archambault, and B. Massie (1990), High-level Recombinant Protein Production in Bioreactors Using the Baculovirus-insect Cell Expression System, *Biotechnol. Bioeng.*, **36**, 1133-1140.