

## QT35 세포주에서의 재조합 에리스로포이에틴 생산을 위한 무혈청 배지의 개발

<sup>1,2</sup>주형민 · <sup>1,2</sup>†김병기 · <sup>1</sup>김선영 · <sup>3</sup>김태한 · <sup>3</sup>김태용

<sup>1</sup>서울대학교 유전공학연구소 및 <sup>2</sup>서울대학교 공과대학 응용화학부, <sup>3</sup>(주) 일동제약 중앙연구소  
(접수 : 1999. 2. 11., 게재승인 : 1998. 3. 16.)

### Serum Free Medium Development for Recombinant Erythropoietin Production using Novel Cell Line (QT35)

Hyoung-Min Ju<sup>1,2</sup>, Byung-Gee Kim<sup>1,2</sup>†, Sun-Young Kim<sup>1</sup>, Tae-Han Kim<sup>3</sup>, and Tae-Yong Kim<sup>3</sup>

<sup>1</sup>The Institute for Molecular Biology and Genetics, and

<sup>2</sup>School of Chemical Engineering, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

<sup>3</sup>Research Laboratory, Ildong Pharmaceutical Co.

(Received : 1998. 2. 11., Accepted : 1998. 3. 16.)

Human Erythropoietin (EPO) gene is cloned in quail fibrosarcoma cell, QT35. Because molecular weight of EPO is similar to that of serum albumin, cell culture with serum containing medium makes purification of EPO very difficult. Using fractional factorial study, we have developed serum free medium for the recombinant QT35 cell lines, QT N4D4 and QT SY-IMP, which have cloned EPO with glutamine synthetase (GS) gene amplification system and with puromycin selective marker, respectively. Among the seven frequently used medium components, fibronectin, BSA, and EGF were the most important for EPO production. However, sufficient fibronectin supplement to the medium did not make any good attachment of QT35 to culture plate over 3 days. Therefore, to maximize EPO production, we attempted a medium-shift at confluence from serum containing medium to serum free medium(QT SFM6). Using the medium-shift protocol with QT SFM6, nearly the same productivity of EPO was achieved comparing with that without medium-shift. This result was true in both QT35 cell lines in three types of culture, i.e. T flask, microcarrier and roller bottle cultures.

Key Words : erythropoietin (EPO), serum free medium, quail fibrosarcoma cell (QT35), fractional factorial design, cell culture engineering

### 서론

정상적인 인간은 보통 하루에 약  $2 \times 10^{11}$  개 정도의 적혈구를 생산하는 것으로 알려져 있다. 그러나, 혈중의 산소농도가 감소하면 이러한 혈중 적혈구의 숫자도 증가하게 된다. 이러한 혈중 산소농도의 감소나 혹은 혈중 적혈구의 농도가 감소하게 되면 인체는 적혈구의 생산 및 분화를 촉진하게 되는데, 이때 작용하는 인자들 중의 하나가 erythropoietin이다. 이것은 erythropoietic progenitor들인 BFU-E, CFU-E 등이 proerythroblast를 거쳐 mature erythrocyte (적혈구)로 분화되는 기작인 erythropoiesis에 작용하게 되어 적혈구 생산을 촉진한다.

EPO는 주로 신장이나 간에서 만들어지며 크기가 약 30.4 kDa

정도의 glycoprotein hormone인데, 이것의 glycosylation 형태가 *in vivo* 활성도를 결정하게 되어 보통 이것 때문에 동물세포에서 발현한 EPO만이 *in vivo* 활성도를 나타내는 것으로 알려져 있다. 또한, EPO는 그 발현이 inducible하여 보통 anemia나 hypoxemia 현상이 오면 발현 정도가 매우 높아지는 경향성을 띠는데 이것이 빈혈이나 저산소 상태에서 인체가 대응할 수 있게 해준다.

따라서, EPO는 여러 가지의 빈혈증상을 치료하는데 사용되어 왔으며, 초기에 혈청이나 소변으로부터 분리해서 사용하던 것을, 1985년 유전자가 클로닝되고 염기서열이 밝혀짐에 따라 유전공학적 기법으로 생산할 수 있게되었고 현재 재조합 단백질 의약품 중 매우 큰 시장을 확보하고 있는 제품의 하나가 되었다.

그런데, EPO는 *in vivo* 활성도의 문제로 현재까지는 동물세포가 아닌 다른 미생물에서는 생산하지 못하고 있는 실정이며, 이에 따라 동물세포 배양공학(1)을 이용한 대표적인 산물로서 자리매김하고 있다. 한편, 이러한 EPO의 생산은 종래에 포유류 세포에서 발현, 생산하던 것이 일반적이었다. 하지만, 본 연

† Corresponding Author : The Institute for Molecular Biology and Genetics, and School of Chemical Engineering, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea  
Tel : 02-880-6774, Fax : 02-874-1206  
e-mail : byungkim@plaza.snu.ac.kr

구에서는 조류(鳥類)계 세포의 하나인 quail fibrosarcoma 세포, QT35 세포주를 이용하여 EPO를 발현, 생산하는 연구를 진행하였다. QT35 세포주는 1977년에 Carlo Moscovici등이 일본 메추라기(Japanese quail)로부터 화학적인 발암물질을 가함으로써 종양을 유도하여 제작된 세포주이다(2). 이 세포주는 종래에 바이러스학 등의 분자생물학 연구에 많이 사용되었던 세포인데, 본 연구에서 처음으로 목적 단백질 발현, 생산공정에 응용하여 보았다.

EPO는 분자의 크기가 혈청내의 serum albumin과 유사하여 동물세포 배양에 흔히 쓰이는 혈청이 존재하게 되면, 분리정제가 거의 불가능하게됨을 알 수 있었다. 따라서, EPO 생산공정의 개발에 있어서 무혈청 배지의 개발(3-14)은 필수적인 과제가 되었으며 또한, QT35 세포는 이전에 목적 단백질 발현 및 생산에 이용된 적이 없었기 때문에 이를 위한 무혈청 배지의 개발은 매우 의미있는 일이라 생각된다. 이에 따라 본 연구에서는 실험계획법의 일종인 fractional factorial design (5, 6, 7, 8) 을 이용하여 무혈청 배지에 가해지는 배지 성분들의 EPO발현에 미치는 영향성을 분석하고 이것을 기초로 무혈청 배지를 개발하여 각종 세포배양 방법에 대해서 EPO의 생산수율을 평가해보았다.

**재료 및 방법**

**세포주 (Cell Line)**

EPO 생산 세포로 사용된 QT35계열 세포는 QT N4D4와 QT SY-IMP 세포가 사용되었다. 이중 QT N4D4는 glutamine synthetase (GS) 유전자 증폭 시스템(1,15,16)을 이용하여 EPO 발현량을 증가시킨 것이며, QT SY-IMP의 경우는 항생제 marker인 puromycin marker를 사용하여 클로닝된 것으로 재조합 세포주는 농 연구소의 김 선영 교수님의 협조에 의해 제공되었다. 여기에 사용된 플라스미드는 pIGA-WNY 및 pIMP-WNY이며 Figure 1에 나타내었다.

**사용 배지**

배지는 DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium, Gibco BRL, cat. No. 12800-058) 과 F12 (Gibco BRL, cat. No. 21700-075) 배지를 1:1로 섞은 DMEM:F12를 사용하였고, 1 L 당 sodium bicarbonate 2 g (Sigma, S-5761), HEPES 2.38 g (Sigma, H-9136), kanamycin monosulfate 0.1 g (Sigma, K-1377) 을 가하여 3차 증류수에 녹인 후, 0.22 μm filter 로 걸러 autoclave 된 멸균병에 담은 후, 4℃에 보관하며 사용하였다.

혈청은 FBS (fetal bovine serum, Gibco BRL, cat. No. 16000-044)를 사용하였으며 58℃ 에서 30분 동안 heat inactivation 시킨 후, -20℃에 보관하여 사용하였다.

한편, 무혈청 배지인 SFM6를 위한 첨가 성분으로 Bovine Serum Albumin (BSA)는 Janssen Chimica사에서, 다른 성분인 Insulin, Transferrin, Epidermal Growth Factor(EGF), Linoleic acid 및 Fibroblast Growth Factor (FGF)는 Sigma사 (MI, USA)에서 구입하여 사용하였다.

**세포 계대 배양 및 저장**

세포 계대 배양은 37℃ CO<sub>2</sub> incubator에서 이루어졌으며, 계대시 원래의 세포를 trypsin-EDTA 용액 처리로 T25 flask (Falcon) 바닥에서 떼어내었으며, 이것을 다음 계대배양해줄 T25 flask에 접종, 배양하였다. 세포를 장기간 저장할 때는 FBS:DMSO (9:1 부피비) 용액과 세포를 잘 섞은 후, 이것을 액체 질소 탱크에 보관하였다.

**Microcarrier culture 및 roller bottle culture**

100 mL spinner flask, 50 mL Falcon tube, pipette을 모두 silanization 하여 autoclave 한다. Microcarrier(17-24)로 사용하는 Cytodex 3는 0.31g을 재어 30 mL정도의 PBS 속에서 약 3시간 이상 자주 흔들어주며 불린 후, PBS를 제거하고 새 PBS를 30 mL을 가한 후 이를 멸균한다. 멸균된 microcarrier는 PBS 제거 후, 4회에 걸쳐 배지로 세척해주고 이것을 spinner

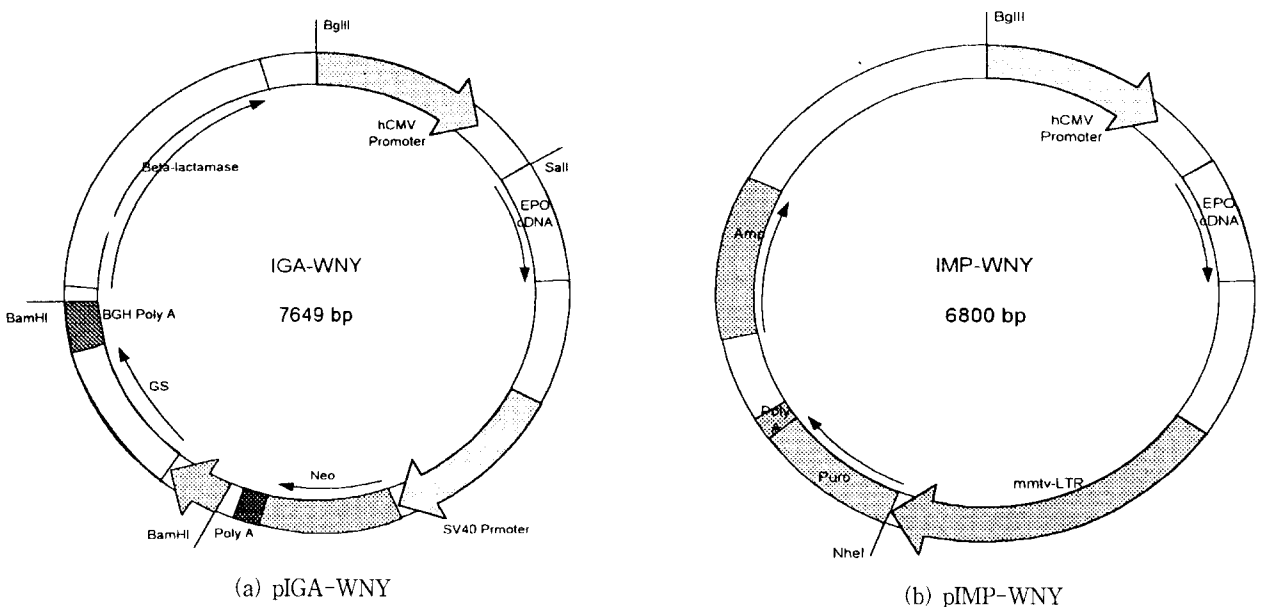


Figure 1. Plasmids used for the construction of (A)QT N4D4 and (B)QT SY-IMP.

flask 속에 담는다. 초기에는 혈청 10 mL과 배지 20~30 mL 정도에 세포를 접종하고 약 6시간 동안 2분 stirring, 30분 sedimentation을 반복해주어 세포를 충분히 microcarrier에 정착시키고 6시간 이후에 배지를 100 mL로 맞추어주고, 37°C CO<sub>2</sub> incubator 내에서 35~40 rpm 정도로 stirring 시켜주며 배양한다.

세포수의 측정은, total cell 농도의 경우, 0.1M citric acid, 0.1% (w/v) crystal violet 용액과 세포를 일정한 비율로 섞어 37°C에서 1시간 방치하여 핵이 세포에서 빠져나오게 하고 이것을 PBS로 희석한 후, 이때 crystal violet에 의해 염색된 핵의 수를 hemacytometer에서 세는 released nuclei 방법을 사용하여 측정하였고, cell viability의 경우는 trypsin을 처리하여 세포를 microcarrier bead에서 떼어낸 후 이것을 trypan blue exclusion method를 이용하여 측정하였다.

Roller bottle culture는 표면적이 850 cm<sup>2</sup> 인 roller bottle에 혈청이 든 배지를 200 mL 가하고 2×10<sup>5</sup>/mL농도의 세포를 접종하며, 이때 세포의 정착이 잘 되도록 하기 위해서 37°C CO<sub>2</sub> incubator 내에서 초기 2시간 동안 10~20 r.p.h.로 저속으로 회전시키다가 그 이후에는 25~30 r.p.h. 정도로 회전시켜주며 배양한다.

### EPO 역가 분석

R&D systems사의 Quantikine™ IVD™ 의 EPO ELISA kit을 이용하여 분석하였으며, 96 well ELISA reader에서 450nm의 흡광도를 측정하였다. 매 실험의 ELISA마다 새로 표준곡선(standard curve)을 잡아주었다.

## 결과 및 고찰

### 무혈청 배지 디자인을 위한 fractional factorial study

QT35계열 세포로부터의 EPO 생산을 위한 무혈청 배지 개발에 있어서 초기에는 무혈청 배지에 세포를 접종하여 cell culture plate의 바닥에 정착시키고 성장시키도록 하려고 노력하였다. 그러나, 세포부착에 관계하는 fibronectin(1,25,26)과 같은 성분을 충분히 가해주고 여러 가지 growth factor 및 BSA 등의 성분을 부가하여 넣어주는 방식으로 여러 차례 세포접종 실험을 진행해보았으나, fibroblast나 근섬유계열세포가 정상적으로 부착되었을 때의 morphology인 rod type이나 star-like type으로 되지않고 세포가 불완전하게 부착된 상태인 round type morphology를 나타내었으며 약 2일이 경과하면 대부분이 다시 cell culture plate의 바닥에서 떨어져 나오고 세포수의 증가도 일어나지 않아 QT35의 특성상 세포의 부착, 성장 및 EPO의 생산을 모두 무혈청 배지에서 진행하기 위해서는 장기적이고, 더욱 세심한 실험이 요구됨을 알 수 있었다. 또한 fibronectin 과 growth factor들의 가격이 너무 고가이기 때문에 무혈청 배지의 경제성에 있어서도 문제가 제기되었다. 따라서, 우리는 EPO 생산공정을 cell growth phase와 EPO production phase 의 둘로 나누어 진행하기로 하였다. 다시 말해서, 우선 10% FBS를 포함한 배지에서 QT35를 culture plate바닥에 정착, confluence까지 성장시키고 이 배지를 EPO 생산용 무혈청 배지로 교환해주어 여기에 분비된 EPO를 회수하기로 하였다. 이러한 배지교환식 방법은 세포 성장시 발생하는 nutrient

limitation을 방지해주며 fibronectin 및 growth factor 등 세포 성장에 필요한 고가의 단백질들의 사용을 많이 줄여주어 경제성에 있어서도 장점이 있지만, 대부분의 유전자 재조합 단백질 생산시기가 보통의 동물세포에서 일반적으로 confluence시기인 것으로 알려져 있기 때문에 cell growth phase와 EPO production phase로 나누는 EPO 생산공정은 효율적일 수도 있다. 이러한 이유로 초기의 본 무혈청 배지 개발 실험은 confluence에서 무혈청 배지를 가해주어 EPO를 생산할 때 EPO를 많이 생산해낼 수 있는 무혈청 배지의 개발에 초점을 맞추었다.

무혈청 배지를 개발하기 위하여 우선 7 가지의 대표적인 무혈청 배지 첨가성분에 대하여 fractional factorial test를 수행하였다. 여기서 사용된 7가지 성분들은 BSA, Transferrin, Insulin, Linoleic acid, Fibronectin, FGF, EGF이다.

이들을 선택한 이유를 요약하면, BSA는 serum albumin이 일반적으로 혈청성분의 70%정도를 차지하는 성분이며, 반응기 속의 agitation이나 sparging에 대해 세포를 보호하고 lipid 및 여러 가지 trace metal (Mo, Co, Sn, V, Ni, etc.)등의 source로서 작용하는 등의 역할을 하는 것으로 알려져 있다(10).

Transferrin은 철분 이온의 세포내 이동에 관여하는 물질로서 많이 사용되는 성분의 하나이며, insulin은 흔히 알려진 것과 같이 glucose 흡수를 촉진하고 insulin-like growth factor-1 (IGF-1)의 세포 receptor를 자극하며 한편으로는 GS gene amplification system에서 사용하는 glutamine synthetase gene을 자극하여 발현을 촉진하는 역할도 하는 것으로 알려져 있다(11, 16).

Linoleic acid는 세포막 등을 구성하기 위해서 사용하는 지질의 일종으로서, EPO생산을 위한 무혈청 배지의 경우, EPO의 분자크기가 serum albumin과 유사하여 실제로 어느 수준이상 BSA를 가하면 분리 정제가 거의 불가능해지는 단점을 가지고 있는데 이러한 분리정제상의 결정적인 단점을 극복해내기 위해서 BSA 대신 지질을 가해주시기로 하였으며(10), 이것은 일반적으로 무혈청 배지에 많이 사용되고 있는 성분이기도 하다. Fibronectin은 세포와 matrix간의 접촉을 도와주는 물질이다. 하지만 이러한 attaching 작용뿐 아니라 일종의 growth factor와 같은 작용도 하는 것으로 알려져 있다.

FGF와 EGF는 모두 growth factor의 일종으로서 세포의 성장을 도울 뿐만 아니라 각각의 receptor에 작용하여 tyrosine kinase domain을 자극하여 세포 내 signal을 전달하는 역할도 하고 있다.

앞서 설명한 바와 같이 QT35는 혈청이 없는 조건에서는 fibronectin등을 가해주어도 cell culture plate 바닥에 정착이 잘 되지 않고, 일단 정착을 한 세포도 2일후면 다시 떨어져 나오는 경향을 나타내므로 처음부터 무혈청 배지로 세포를 접종하여 실험을 수행할 수는 없었다. 따라서, 이 실험은 96 well에 4% FBS를 포함한 DMEM:F12배지 100 μL와 함께 4×10<sup>4</sup> 개의 QT N4D4를 접종하여 2일간 세포를 배양하여 세포가 confluence를 이루도록 하고 이렇게 한 후, Table 2.와 같은 조성으로 만든 sample배지로 배지를 교환해주어 각각의 EPO 수율을 측정하였다. 이때, EPO 수율 측정을 위한 ELISA는 3회 반복 수행하여 모든 sample에서 최대오차가 50 U/mL이하인 값을 얻었다.

Table 1과 Table 2에 fractional factorial 실험 디자인과 실험 결과를 나타내었다. Table 1은 fractional factorial design의 upper level과 lower level concentration을 나타낸 표이며 Table 2는 이에 따른 2<sup>7-3</sup> 실험디자인과 그 실험 결과를 나타내었다. 이 실험에서 무혈청 배지의 성분이 전혀 들어가지 않은 1번 sample과 모두 가해준 16번 sample의 EPO titer차이는 약 260 U/mL정도였으며, fractional factorial design에 따라 계산되어진 main effect는 각각 BSA: 44.3, transferrin: 1.24, insulin: 28.7, linoleic acid: 34.2, fibronectin: 54.7, FGF: 23.7, EGF: 40.7으로 나타났다. BSA는 혈청의 주성분이어서 main effect가 높을 것을 예상하였는데 이 실험에서도 실제로 그 main effect가 상대적으로 높은 것으로 나타났다. 이것은 가격 면에서도 저가이기 때문에 무혈청 배지에 사용하기에 좋은 성분

Table 1. Upper level and lower level concentration of each component for fractional factorial study.

Composition		Concentrations
BSA	+	4 mg/mL
	-	0 mg/mL
Transferrin	+	20 µg/mL
	-	0 µg/mL
Insulin	+	20 µg/mL
	-	0 µg/mL
Linoleic acid	+	20 µg/mL
	-	0 µg/mL
Fibronectin	+	8 µg/mL
	-	0 µg/mL
FGF (Fibroblast growth factor)	+	20 µg/mL
	-	0 µg/mL
EGF (Epidermal growth factor)	+	100 µg/mL
	-	0 µg/mL

Table 2. Fractional factorial experiment design and results. (basal medium: DMEM:F12)

Exp.	1	2	3	4	5	6	7	EPO (U/mL)
	BSA	Transferrin	Insulin	Linoleic acid	Fibronectin	FGF	EGF	
1	-	-	-	-	-	-	-	71.2
2	+	+	-	+	-	-	-	81.3
3	-	+	+	-	+	-	-	135
4	-	-	+	+	+	-	-	190
5	+	-	+	-	-	+	-	95.8
6	-	+	+	+	-	+	-	143
7	-	+	-	-	+	+	-	158
8	+	-	-	+	+	+	-	203
9	-	+	+	-	-	-	+	150
10	+	-	+	+	-	-	+	193
11	+	-	-	-	+	-	+	228
12	-	+	-	+	+	-	+	96.6
13	+	+	-	-	-	+	+	149
14	-	-	-	+	-	+	+	138
15	-	-	+	-	+	+	+	116
16	+	+	+	+	+	+	+	332
Main effect	44.3	1.24	28.7	34.2	54.7	23.7	40.7	

이긴 하지만, EPO생산에 있어서는 앞서 서술한 바와 같이 분리 정제시 문제를 발생시키는 성분이므로 사용에 한계를 둘 수 밖에 없었다. Transferrin은 그다지 높지않은 main effect를 나타내고 있으며 insulin과 linoleic acid는 높은 main effect를 나타내고 있다. Fibronectin, FGF, EGF와 같은 성분들은 높은 main effect를 나타내고 있긴 하지만 실제 생산 공정에 이용하기에는 비교적 가격이 높아서 우리의 무혈청 배지에는 상대적으로 가격이 싸고 대량 구입이 가능한 EGF만을 사용하기로 하였다.

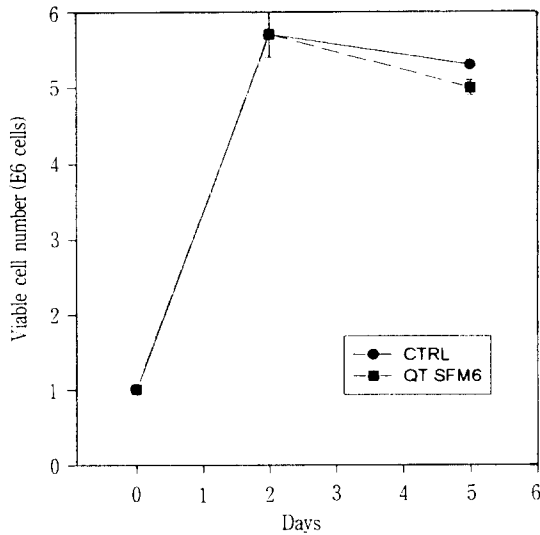
QT SFM6 디자인 및 T25 플라스크 배양실험

앞서의 fractional factorial experiment를 바탕으로 QT SFM6를 디자인하였다. QT SFM6는 basal medium인 DMEM:F12에 BSA 0.2 g/L, transferrin 5 µg/L, insulin 30 mg/L, linoleic acid 50 mg/L, EGF 70 µg/L를 가하여 제작되었다. BSA는 높은 main effect에도 불구하고 앞서 말한 분리정제상의 문제 때문에 많이 가해줄 수는 없었으며 이를 대체하기 위해 지질인 linoleic acid를 좀더 많이 가해주었다. Insulin과 EGF는 높은 main effect를 가지므로 비교적 충분한 양을 넣어 주었으며 transferrin은 main effect값이 그다지 높지않아 비교적 작은 양을 가해주었다. 그외의 FGF나 fibronectin등은 가격이 EGF에 비해 동일한 질량당 가격이 약 5배 이상 비싼 성분이므로 무혈청 배지의 경제성에 맞지 않아서 첨가해주지 않았다. 특히 fibronectin은 세포의 부착과 성장을 혈청 배지에서 수행하므로 넣어주지 않아도 무방하다고 판단하였다.

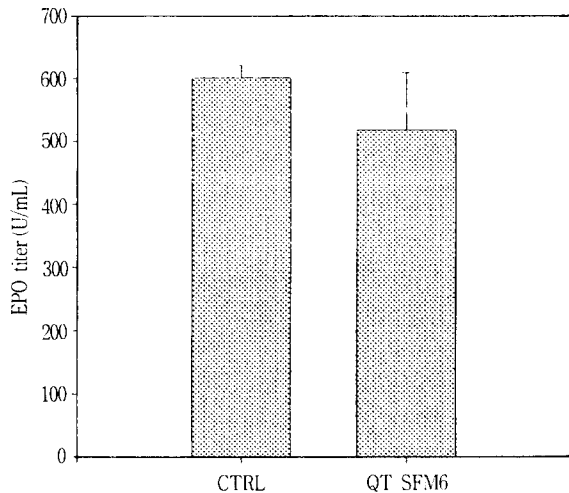
이상과 같이 디자인된 QT SFM6 무혈청 배지의 EPO 생산능을 알아보기 위하여 T25 flask 에서 10% FBS 함유 혈청배지와 비교실험을 수행하였다. 10% FBS를 가한 DMEM:F12 배지 5 mL과 함께 QT N4D4 세포 1×10<sup>6</sup>개씩을 T25 flask 4개에 접종한 후, 이중 2개의 flask는 control로서 그대로 5일간 batch로 배양하고, 나머지 2개의 flask는 cell이 confluence에 도달한 2일째에 배지를 QT SFM6로 교환하고 이후 3일간을 세포 배양한 두 가지 실험군에서의 EPO 수율을 서로 비교하였다. Figure 2-(A)는 viable cell의 증가로 나타낸 세포 성장곡선이며, Figure 2-(B)는 5일째 되는 날의 EPO 생산 도표이다. 세포 성장곡선에서 알 수 있듯이 모든 T25 flask에서 세포는 2일째에 confluence에 도달했음을 알 수 있으며, viable cell의 수도 역시 모든 T25 flask에서 제 5일까지 거의 일정하게 유지되었다. Figure 2-(B)는 실험 시작부터 5일째 되는 날 배지 속에 들어있는 EPO를 ELISA해 본 결과 그래프인데, 여기서 5일간 batch배양한 control은 평균 601 U/mL의 역할을 떠었으며, 2일째 배지를 교환하여, 3일간만 무혈청 배지로 배양한 QT SFM6는 평균 518 U/mL의 역할을 나타내었다. 이 결과에서 control은 QT SFM6보다 약 20% 정도 높은 수율을 나타내지만, 사실상 QT SFM6의 경우는 전체 5일 중에서 3일동안만 생산된 EPO의 양을 나타내므로, 단위 시간당 EPO 생산량을 계산해보면, control은 120 U/mL/day, QT SFM6은 173 U/mL/day로서 오히려 QT SFM6쪽이 더 높음을 알 수 있다.

QT SFM6를 이용한 microcarrier culture

T25 flask와 같은 정지배양(static culture)이 아닌 동적배양(dynamic culture)에서도 EPO 생산성을 검증해보기 위하여 microcarrier 배양을 수행하였다. 실험 초기단계에서 마찬가지로



(a) Cell growth curve



(b) EPO production at 5th day

Figure 2. Cell growth curve(A) and EPO production yield at 5th day(B) from T25 flask culture of QT N4D4 cells.

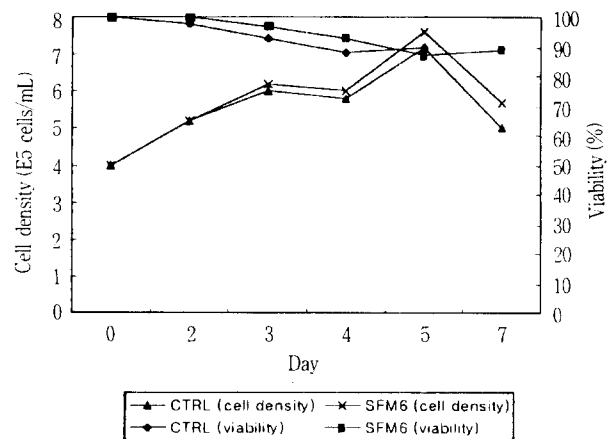
동적배양인 suspension 배양도 시도해보았지만, 1 주일이 채 되지않아 거의 대부분의 세포가 죽어버렸고(결과는 제시하지 않았음.) 따라서, suspension adaptation과정까지 진행할 수가 없었다.

Microcarrier 배양의 경우는 control 실험으로서 100 mL spinner flask에  $4 \times 10^7$ 개의 QT N4D4를 10% FBS를 포함한 DMEM:F12 100 mL 배지에 접종하여 8일간 batch culture로 진행하였고, QT SFM6을 사용하는 배양에서는 실험 5일째까지 control과 동일한 조건에서 성장한 세포에 대하여 초기 spinner flask 내의 혈청배지를 모두 제거하고, 50 mL 정도의 무혈청 basal medium (DMEM:F12)으로 2회 세척한 후, QT SFM6 100 mL로 배지를 교환하여 3일간 EPO를 생산해주는 방식으로 진행되었다.

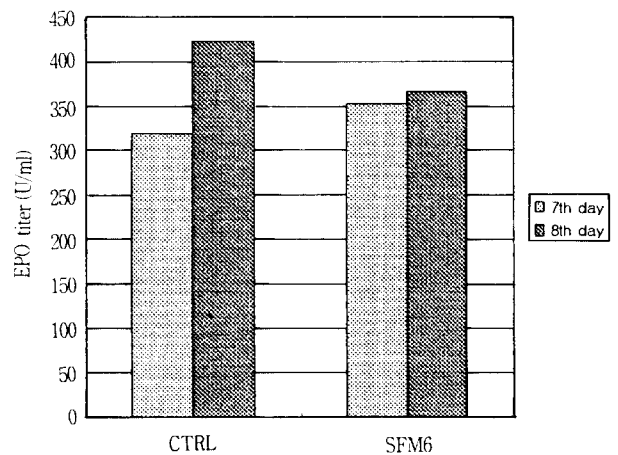
이렇게 QT N4D4에 대하여 microcarrier 배양을 수행한 결과

가 Figure 3에 나타나있다. Figure 3-(A)의 세포성장곡선을 살펴보면, control과 QT SFM6 모두 제 5일까지 전체 세포농도가  $7 \times 10^3$  cells/mL 정도의 confluence에 도달하며 세포의 viability도 대략 90%정도로 유지되는 것을 알 수 있다. 제 7일이 되면, 전체 세포농도가 양쪽 모두 많이 감소하는 경향을 나타내는데, 이것은 viability의 감소에서 나타나듯이 죽은 세포의 증가에 따라 Cytodex 3 bead에서 떨어져 나온 세포의 수가 증가하게 되어 bead에 붙어 있는 전체 세포의 수가 감소하기때문에 나타나는 현상으로 보인다. 이 곡선에서 전반적으로 QT SFM6의 곡선이 조금 더 높은 값을 나타내고는 있지만 이것은 released nuclei count 방법의 오차범위를 고려하면, control과 QT SFM6가 사실상 서로 비슷한 세포성장곡선을 나타낸다고 볼 수 있겠다. Figure 3-(B)는 제 7일과 제 8일의 EPO생산 수율을 나타낸 그래프이다. 이 그래프를 살펴보면 역시 ELISA의 오차범위를 감안한다고 할 지라도 EPO의 생산수율은 QT SFM6가 control과 비슷한 값(약 350 U/mL)을 나타내는 것을 알 수 있다.

EPO가 클로닝된 QT35 계열 세포주 중에서 QT SY-IMP 세



(a) QT N4D4 microcarrier cell growth with SFM6

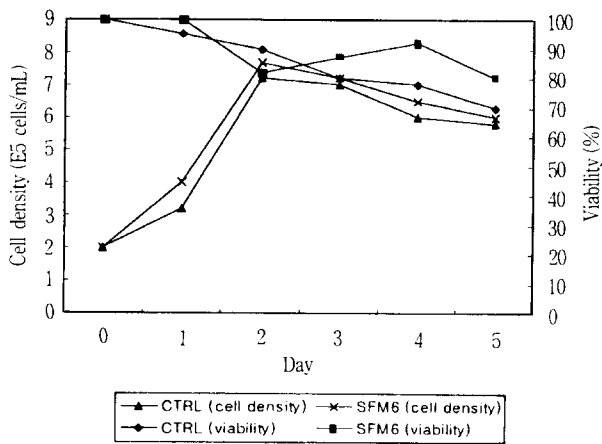


(b) QT N4D4 microcarrier EPO production with SFM6

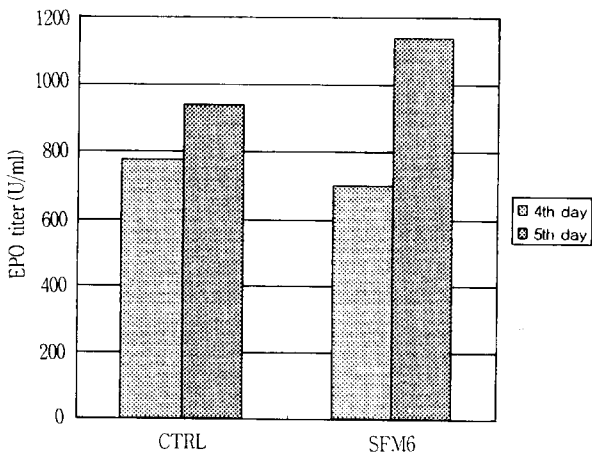
Figure 3. QT N4D4 microcarrier culture with SFM6.

포는 puromycin 항생제 내성을 이용하여 별다른 (GS나 DHFR과 같은) 유전자 증폭시스템이 없이 클로닝된 EPO 생산 세포주이다. 그런데 이 세포주에서의 EPO 발현이 여러 차례의 계대 배양 후에도 1000 U/mL 정도의 높은 역가로 안정하게 발현되는 경향을 나타내었기 때문에 이를 이용한 EPO 생산 수득률도 동시에 비교하였다.

QT SY-IMP를 이용한 microcarrier culture의 실험조건은 다음과 같다. 일반적인 세포접종과 운전 조건은 앞서 QT N4D4에서의 조건과 같으며 다만 세포의 접종수에 있어서는, 앞선 QT N4D4 실험에서의 접종수가 비교적 너무 많았다고 판단하였기 때문에 이 실험에서는  $2 \times 10^7$  개로 해주었다. 이 실험에서 전체 배양시간은 5일이었으며 QT SFM6의 경우, 제 3일에 배지를 QT SFM6로 교환해주었다. Figure 4에 이 실험의 결과가 나타나있다. Figure 4-(A)를 살펴보면, 세포성장양이 초기 접종수는 적었음에도 불구하고 역시 전체 세포농도는  $7 \times 10^5$  cells/mL 정도의 confluence에 도달하였음을 알 수 있다. 이 결과로 보아,  $2 \times 10^7$  개의 접종수가 작은 것은 아니며, 또한 전체 세포의 confluence는 bead의 총 개수에 의해서 제한됨을 알 수 있다.



(a) QT SY-IMP microcarrier cell growth with SFM6.



(b) QT SY-IMP microcarrier EPO production with SFM6.

Figure 4. QT SY-IMP microcarrier culture with SFM6

한편, viability는 전체 배양시간에 걸쳐 80%이상을 유지함을 알 수 있다. Figure 4-(B)는 제 4일과 제 5일의 EPO 생산 수득률을 나타낸 것으로, 제 4일에 QT SFM6가 약간 낮은 값을 나타내던 것이 제 5일에는 QT SFM6가 control보다 높은 값을 나타내는 경향을 보였다. 이 결과는 적어도 QT SFM6를 이용한 EPO생산량이 control에 비해 비슷하거나 약간 높은 값을 나타냄을 알 수 있다.

**QT SFM6를 이용한 perfusion-type roller bottle culture**

Microcarrier 배양은 1개의 생물반응기에서도 대량생산이 가능하며, pH, DO, CO<sub>2</sub> control, nutrient feeding 등의 여러 가지 발효조 제어변수를 제어할 수 있다는 장점이 있긴 하지만, 운전 방법이 비교적 복잡하며, 배지 교환 생산 방법을 쓸 경우, 발생하는 일부 bead의 유실 등의 단점 때문에 이후의 scale-up 문제가 큰 문제점으로 대두된다. 이러한 문제점 때문에 일반적인 동물세포 배양생산공정에서 가장 널리 쓰이고 공정이 비교적 쉬운 roller bottle 배양방법으로 EPO의 생산을 시도하였다. Roller bottle 배양을 하게 되면, 혈청 배지로 confluence까지 세포를 성장시킨 후 배지를 QT SFM6로 교환해주는 상기한 방법을 유지할 경우, microcarrier 배양방법에 비해서 배지 교환이 쉬우며, 여러차례 주기적으로 QT SFM6 배지를 교환해주며 EPO함유 배지를 회수하는 방법인 perfusion-type 배양을 하기가 비교적 용이해진다. 즉, 이 공정을 사용하면 한번의 cell growth phase를 거치고 나면 세포의 EPO 생산 활성이 유지되는 한 주기적으로 몇 차례 EPO production phase를 진행할 수 있게 된다.

Figure 5에 나타난 QT SY-IMP의 roller bottle생산에서의 EPO생산곡선을 살펴보면, 초기 5일간의 confluence까지 성장시키는 과정에서는 약 900 U/mL 정도의 EPO를 얻을 수 있었으며, 이후 3일간씩 3회에 걸쳐 반복된 SFM6 배지 교환 생산에서는 EPO 생산량이 거의 변하지 않고 400 U/mL 정도의 일정한 값을 나타냄을 알 수 있다. 3일당 약 400 U/mL이 발현된다는 점은 전체 배양과정에 있어서 거의 동일하며, EPO production phase에서 생산을 3 차례 수행할 수 있게되어 세포 성장을 위해 사용되는 시간 및 배지사용을 절감할 수 있기 때문에 이러한 perfusion-type 배양은 단순한 회분식 배양에 비해 경제성이 매우 높다고 볼 수 있다.

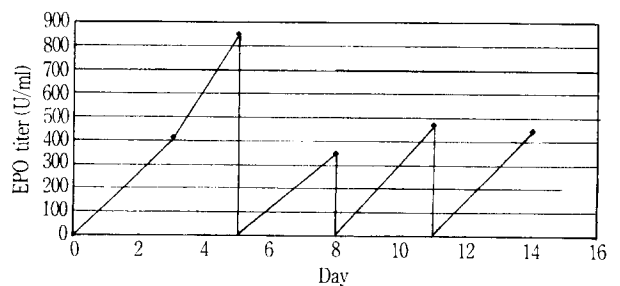


Figure 5. QT SY-IMP EPO production with roller bottle.

**요 약**

메추라기 근섬유 종양세포인 QT35 세포주에 재조합 EPO 유

전자가 클로닝되었다. 이중 QT N4D4는 glutamine synthetase 유전자 증폭 시스템을 이용하여 EPO 유전자가 증폭되었으며, QT SY-IMP는 puromycin 항생제 내성을 이용하여 스크리닝 한 세포이다. EPO는 분자의 크기가 혈청 알부민과 거의 비슷하여 혈청 배지에서 세포 배양 생산시 분리 정제가 매우 힘들기 때문에 EPO 생산에 이용할 QT35 세포주의 무혈청 배지를 실험계획법의 일종인 fractional factorial design을 이용하여 개발하게 되었다. BSA, transferrin, insulin, linoleic acid, fibronectin, FGF, EGF의 7가지 무혈청 배지 성분에 대한 main effect를 분석해본 결과, 각 성분은 각각 44.3, 1.24, 28.7, 34.2, 54.7, 23.7, 40.7의 main effect 값을 나타내었고 이를 바탕으로 QT SFM6라는 무혈청 배지를 개발하게 되었다. 이 과정에서 fibronectin을 과량으로 가해주어도 QT35세포가 3일 이상의 기간동안 충분히 부착, 성장되지않는 현상이 관찰되었고, 특히 fibronectin과 FGF는 가격이 고가인 단백질이어서 경제성을 고려해 무혈청 배지에 포함시켜주지는 못하였다. 이에 따라 10% 혈청배지에서 세포를 성장시킨 후 QT SFM6 무혈청 배지로 교환하여 생산하는 공정을 제안하게되었으며 T 플라스크 배양, microcarrier 배양, roller bottle 배양을 수행하여 10% 혈청 배지 생산의 경우와 비교해본 결과, QT N4D4 및 QT SY-IMP 모두 비슷한 정도의 EPO 생산성을 획득할 수 있음을 확인할 수 있었다.

## 감 사

본 연구는 일동제약 주식회사의 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

- Butler, M. (1991), *Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach*, PP. 27-81 IRL PRESS, Oxford.
- Moscovici, C., M. G. Moscovici, and H. Jimenez (1977), Continuous Tissue Culture cell Lines Derived from Chemically Induced tumors of japanese quail, *Cell*, **11**, 95-103.
- Mizrahi, A., and A. Lazar (1988), Media for cultivation of animal cells: an overview, *Cytotechnology*, **1**, 199-214.
- Barnes, D., and G. Sato (1980), Review: Methods for Growth of Cultured Cells in Serum-Free Medium, *Anal. Biochem.*, **102**, 255-270.
- Lao, M., and C. Schalla (1996), Development of a Serum-free Medium Using Computer-Assisted Factorial Design and Analysis, *Cytotechnology*, **22**, 25-31.
- Gaertner, J. G., and P. Dhurjati (1993), Fractional factorial Study of Hybridoma Behavior. 1. Kinetics of Growth and Antibody Production, *Biotechnol. Prog.*, **9**, 298-308.
- Gaertner, J. G., and P. Dhurjati (1993), Fractional Factorial Study of Hybridoma Behavior. 2. Kinetics of Nutrient Uptake and Waste Production, *Biotechnol. Prog.*, **9**, 309-316.
- Kaminogawa, S. (1993), *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects*, Vol. 5, PP. 375-381 Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Shacter, E. (1989), Serum-free Media for Bulk Culture of Hybridoma Cells and the Preparation of Monoclonal Antibodies, *TIBTECH*, **7**, 248-253.
- Qi, Y. M., P. F. Greenfield, and S. Reid (1996), Evaluation of a Simple Protein Free Medium That Supports High Levels of Monoclonal Antibody Production, *Cytotechnology*, **21**, 95-109.
- Zhou, W., and W. Hu (1995), Effect of Insulin on a Serum-free Hybridoma Culture, *Biotechnol. Bioeng.*, **47**, 181-185.
- Xie, L., and D. I. C. Wang (1996), High Cell Density and High Monoclonal Antibody Production Through Medium Design and Rational Control in a Bioreactor, *Biotechnol. Bioeng.*, **51**, 725-729.
- Jan, D. C. H., D. A. Petch, N. Huzel, and M. Butler (1997), The Effect of Dissolved Oxygen on the Metabolic Profile of a Murine Hybridoma Grown in Serum-Free Medium in Continuous Culture, *Biotechnol. Bioeng.*, **54**, 153-164.
- Wang, J., H. Honda, H. Watanabe, and T. Kobayashi (1995), Enhancement of tPA Production under Hyperoxic Conditions by BHK Cells in Serum-Free and Serum-Containing Cultures, *J. Ferment. Bioeng.*, **79**, 579-584.
- Peakman, T. C., J. Worden, R. H. Harris, H. Cooper, J. Tite, M. J. Page, D. R. Gewert, M. Bartholemew, J. S. Crowe, and S. Brett (1994), Comparison of expression of a humanized monoclonal antibody in mouse NSO myeloma cells and Chinese Hamster Ovary cells, *Hum. Antibod. Hybridomas*, **5**, 65-74.
- Bhandari, B., R. H. Wilson, and R. E. Miller (1987), Insulin and Dexamethasone Stimulate Transcription of an Amplified Glutamine Synthetase Gene in Chinese Hamster Ovary Cells, *Mol. Endocrinol.*, **1**, 403-407.
- Chevalot, I., A. Visvikis, P. Nabet, J. Engasser, and A. Marc (1994), Production of a Membrane-Bound Protein, the Human  $\gamma$ -Glutamyl Transferase, by CHO cells Cultivated on Microcarriers, in Aggregates and in Suspension, *Cytotechnology*, **16**, 121-129.
- Kennard, M. L., and J. M. Piret (1995), Membrane Anchored Protein Production from Spheroid, Porous, and Solid Microcarrier Chinese Hamster Ovary Cell Cultures, *Biotechnol. Bioeng.*, **47**, 550-556.
- Brenner, J., and D. F. Hülser (1996), Production of Tissue Plasminogen Activator (tPA) in Two and Three Dimensionally Growing Cultures of Bowes Melanoma Cells, *Biotechnol. Bioeng.*, **51**, 422-433.
- Alves, P. M., J. L. Moreira, J. M. Rodrigues, J. G. Aunins, and M. J. T. Carrondo (1996), Two-Dimensional Versus Three-Dimensional Culture Systems: Effects on Growth and Productivity of BHK Cells, *Biotechnol. Bioeng.*, **52**, 429-432.
- Forestell, S. P., N. Kalogerakis, and L. A. Behie (1992),

- Development of the Optimal Inoculation Conditions for Microcarrier cultures, *Biotechnol. Bioeng.*, **39**, 305-313.
22. Takagi, M., and K. Ueda (1994), On-Line Determination of Optimum Time Switching from Growth Phase to Production Phase in Tissue Plasminogen Activator Production in a Microcarrier Cell Culture, *J. Ferment. Bioeng.*, **77**, 655-658.
23. Nilsson, K. (1987), Methods for Immobilizing Animal Cells, *TIBTECH*, **5**, 73-78.
24. Michaels, J. D., J. E. Nowak, A. K. Mallik, K. Koczo, D. T. Wasan, and E. T. Papoutsakis (1995), Interfacial Properties of Cell Culture Media with Cell-Protecting Additives, *Biotechnol. Bioeng.*, **47**, 420-430.
25. Dai, W., and W. M. Saltzman (1996), Fibroblast Aggregation by Suspension with Conjugates of Poly(ethylene glycol) and RGD, *Biotechnol. Bioeng.*, **50**, 349-356.
26. Wierzba, A., U. Reichl, R. F. B. Turner, R. Antony, J. Warren, and D. G. Kilburn (1995), Adhesion of Mammalian Cells to a Recombinant Attachment Factor, CBD/RGD, Analyzed by Image Analysis, *Biotechnol. Bioeng.*, **46**, 185-193.