

## 유전자 재조합된 레트로바이러스의 생산을 위한 무혈청 배지의 개발과 레트로바이러스의 연속 생산공정 개발

<sup>1</sup>안 지 수 · <sup>2</sup>조 수 형 · <sup>1,2</sup>김 병 기

<sup>1</sup>서울대학교 유전공학연구소 및 공과대학 응용화학부

<sup>2</sup>서울대학교 유전공학연구소 및 공과대학 협동과정 생물화학공학 전공

(접수 : 2001. 4. 28., 게재승인 : 2001. 6. 23.)

## The Development of Serum-Free Media for the Retrovirus Production and Using It in Continuous Production

Ji-Soo Ahn<sup>1</sup>, Suhjung Cho<sup>2</sup>, and Byung-Gee Kim<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Molecular Biology and Genetics, and School of Chemical Engineering,

<sup>2</sup>Interdisciplinary Program for Biochemical Engineering and Biotechnology Institute for Molecular Biology and Genetics, Seoul National University, Seoul 151-742, Seoul, Korea

(Received : 2001. 4. 28., Accepted : 2001. 6. 23.)

A serum-free media for CRIP/MFG-LacZ retrovirus production was developed and applied to continuous packed-bed culture system. The serum-free media developed by fractional factorial design contains insulin (10  $\mu\text{g/mL}$ ), transferrin (5  $\mu\text{g/mL}$ ), BSA (4 mg/mL), EGF (25 ng/mL), and linoleic acid (10  $\mu\text{g/mL}$ ). Operation of continuous packed-bed reactor using Fibracel enabled the packaging cell to stably maintain retrovirus titer for about 1 week. The optimal operation conditions for dilution rate and temperature were 0.67( $\text{h}^{-1}$ ) and 32°C, respectively. Using this media, the retrovirus titer(cfu/mL) in the packed continuous culture was about 50% that of continuous culture with serum containing DMEM media.

**Key Words** : TCRC, retrovirus, serum-free media, packed-bed reactor, continuous cell culture

### 서 론

유전자요법이란 DNA 재조합 방법을 이용하여 새로운 유전자를 환자의 세포안으로 주입시켜 유전자 결손 내지는 결함을 교정시키거나 세포에 새로운 기능을 추가시켜서 질병을 치료하는 기술이다. 이러한 기술의 목표는 유전적 결함을 치료하고, 유전자치료에 유용한 물질을 세포 내에서 발현시켜 tissue engineering 기법을 사용하여 인체에 이식하는 것이다(1,2). 이러한 유전자 치료법에서 가장 중요한 것은 결손된 유전자를 효과적으로 전달하여 발현시킬 수 있는 유전자 전달체를 개발하는 일이다. 현재까지 알려지고 또, 사용되고 있는 유전자 전달체는 크게 non-viral method와 viral vector로 나눌 수 있다. Non-viral method는 리포좀 (liposome),

electroporation, receptor-mediated DNA transfer 등의 방법이 있고, viral vector로는 레트로바이러스, adenovirus, adeno-associated virus, herpes virus 등이 있다. 그 중에서 현재까지 가장 많이 사용되고있는 레트로바이러스는 single-strand RNA genome을 가지고 있다. 세포가 레트로바이러스에 감염되면, 바이러스의 RNA가 double stranded DNA로 역전사 되어 목적 세포의 염색체에 삽입되는 방식으로 유전자를 전달하기 때문에 한 번 전달된 유전자가 오랜 기간동안 안정적으로 발현되는 장점을 가지고 있다. 반면에 생체 내 기술에 매우 제한적으로 사용되는 여러 가지 문제점들도 내재하고 있다. 먼저, 레트로바이러스는 다른 바이러스에 비해 매우 불안정하기 때문에 생산 세포의 배양 온도에서 매우 쉽게 비활성화되고(3), 레트로바이러스의 감염을 위해 목적 세포가 특정한 receptor를 가져야 하므로 감염세포수가 제한되어 있다(4). 또한 일반적인 재조합 레트로바이러스의 경우 생산 세포의 바이러스 생산성이 낮고, 생산 세포에 의해 생성되는 여러가지 proteoglycan이 목적세포로의 감염을 방해하기 때문에  $10^5$ - $10^6$  cfu/mL을 넘지 못하고, 따라서 효율적인 유전자 전달이 어려우며(5,6), amphotropic retroviral vector는 영양류의 혈청에 의

†Corresponding Author : Institute of Molecular Biology and Genetics, and School of Chemical Engineering, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea  
Tel : +82-2-880-7528, Fax : +82-2-874-1206  
E-mail : byungkim@plaza.snu.ac.kr

해 비활성화 되는 문제점들을 안고 있다.

레트로바이러스를 생산하는 데 있어서 가장 중요한 점은 생산세포의 효과적인 배양이다. 혈청은 생산세포의 배양에 필수적인 성분이지만, 혈청에는 혈청성분의 약 70%를 차지하는 BSA 외에도 다량의 미지 단백질이 포함되어 있다. 따라서, potential pathogenicity를 가지고 있고, 분리·정제과정 상의 문제를 야기한다. 또, 대부분의 혈청은 가격이 비싸기 때문에 동물세포 배양에서의 가격 경쟁력을 떨어뜨린다. 레트로바이러스의 경우도 유전자 치료에 사용되기 위해서는 동물 유래의 혈청에서 나온 단백질들을 모두 제거해야하기 때문에 분리·정제에 관한 연구가 활발히 진행되고 있지만 분리과정 중 쉽게 활성을 잃는 등 해결해야 할 문제점이 많이 있다(7, 8). 그래서 본 연구에서는 혈청의 역할을 대신한다고 알려진 여러 가지 첨가물을 포함한 무혈청 배지 조성에 관한 실험을 수행하였다(9,10). 또한 생산된 레트로바이러스의 온도 비활성화 (37℃에서 약 5.5-7.2시간의 반감기)를 방지하기 위해서는 생산된 레트로바이러스를 빨리 회수할 수 있는 생산시스템이 필요하다(1,11,12). 본 그룹에 의해 진행된 연구에 의하면 반복회분식(repeated batch) 반응기 보다는 충전층 연속반응기에서 전체적인 레트로바이러스의 수율이 높다는 연구결과를 얻었다(13). 이를 근거로 하여 이 연구에서는 부착성 세포인 CRIP/MFG-LacZ 세포를 disk type의 충전 물질인 Fibracel에 부착하여 충전층 배양기 안에서 연속배양하여 레트로바이러스를 생산하는 실험을 수행하였으며, 연속생산에서의 온도의 영향을 고찰하여 보았다. 또한, 개발된 무혈청 배지를 충전층 배양기를 이용한 레트로바이러스의 생산에 적용해 보았다.

## 재료 및 방법

### 세포주 및 배지

레트로바이러스의 생산을 위해서는 CRIP/MFG-LacZ packaging 세포(이후 생산세포라 칭함)를 사용하였고, 바이러스 농도측정을 위한 숙주세포로는 NIH-3T3를 사용하였다. 무혈청 배지는 RPMI, F12 및 DMEM 배지를 사용하였으며 이에 첨가 물질로서 insulin (sigma, cat. No. I-1882), transferrin (Sigma, cat. No. T-2158), Epidermal Growth Factor(EGF)(sigma, cat. No. E-4127), Fibroblast Growth Factor(FGF)(sigma, cat. No. F-5392), linoleic acid (sigma, cat. No. L-1376), Bovine Serum Albumin(BSA) (Acros, cat. No. 26813-0100) 등을 사용하였다.

### 세포 배양

세포 접종은 무혈청배지를 이용하는 T-25 flask 실험의 경우  $2.5 \times 10^5$ 개의 세포를 10%(v/v) calf serum이 포함된 DMEM을 사용하여 접종하였고, 접종 후 3일 째와 4일 째날 각각의 첨가물이 포함된 무혈청배지로 교환하였고, 4일 째와 5일 째 날 샘플을 취해 레트로바이러스의 농도를 측정하였다. 세포 배양은 10% (v/v)의 calf serum이 포함된 DMEM을 사용하여 humidified 37℃ CO<sub>2</sub> incubator에서 약 3일 동안 배양한 후 CRIP/LacZ는 1/5로, NIH-3T3는 1/10으로 각각 희석하여 10 cm dish에 계대배양하였으며, 부피는 10 mL로 유지하였다. 계대 방법으로는 10 cm dish에 세포를 confluence 하게 자라게 한 후 세포에서 배지를 제거하여 phosphate

buffered saline(PBS)으로 세척하고, trypsin 2 mL을 첨가하여 세포를 떼어내고, 새 배지를 첨가하여 원심분리 한 후 일정 비로 희석하여 다시 접종하였다.

사용한 PBS 용액은 pH 7.4로 맞추어 사용하였고, trypsin 용액은 trypsin (Sigma, cat. No. T-0646) 1 g, EDTA 0.5 g, Dextrose 1 g을 PBS 용액에 녹여 부피가 1 L 되게 만들어 0.22 μm 필터로 여과하여 사용하였다.

### 바이러스의 정량

생산된 레트로바이러스의 정량을 위해서는 다음과 같은 방법을 사용하였다. NIH-3T3 세포를 24 well plate에  $2.3 \times 10^4$  만큼 접종하고, 다음날, 배지를 제거한 후 원하는 만큼의 희석된 바이러스와 polybrene 8 g/mL이 포함된 새 배지 0.5 mL을 새로 넣어준다. 이 때 사용한 바이러스는 모두 샘플을 취한 직후 -70 ℃에 동결시킨 후 37 ℃에서 해동하는 과정을 거친 것이다. 셋째날, 바이러스 감염 후 24시간이 지나면 배지를 제거하고 새 배지 0.5 mL을 넣어준다. 넷째날, 0.5% glutaraldehyde 용액으로 세포를 고정시키고 X-gal 용액으로 염색한다. 다섯째날, X-gal 용액을 제거하고 PBS 용액을 넣은 후 현미경으로 염색된 세포수를 측정한다. 희석률을 고려하여 바이러스 titer (colony forming unit/mL)를 결정한다. 정량에 사용한 X-gal 용액은 PBS 1 mL 당 0.2 M K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 20 μL, 0.2 M K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> · 3H<sub>2</sub>O 20 μL, 1 M MgCl<sub>2</sub> 2 μL, 40 mg/ DMF 1 mL X-gal 10 μL을 넣어서 사용하였다.

### 충전층 배양기를 이용한 연속생산

충전층 배양기는 가동부피 45 mL인 유리컬럼 (OMG)을 사용하였고, 컬럼에 충전할 충전물질은 전하를 띠지 않는 polyester와 polypropylene으로 이루어진 disk type의 bead인 Fibracel (New Brunswick scientific Co., NJ)를 사용하였다. Bead 선정은 본 그룹에서 행했던 10 mL continuous culture 결과를 토대로 하였다(13). 2.5 g (총 표면적 300 cm<sup>2</sup>)의 충전물질을 PBS에 넣고 멸균한 뒤 접종 전날 calf serum에 침적하여 표면을 코팅한다. 다음날, 충전물질을 10 cm 배양접시에 깔고 루 편 후  $3 \times 10^7$  개의 CRIP/LacZ 세포를 충전물질 위에 접종하여 세포 배양기에서 4시간 동안 부착시킨다. 세포가 부착된 충전물질을 배양반응기 안에 넣고, peristaltic pump (Gilson, multiplus 3, Villies le bel, France)를 이용하여 배지를 연속공급한다. 배지 저장조에는 CO<sub>2</sub>와 공기를 유량측정기 (Alltech, IL, USA)를 통하여 공급하여 pH 7.0-7.4를 유지하도록 하였으며, 배양반응기에는 수조에 연결된 water-jacket을 달아서 온도를 조절하였다.

## 결과 및 고찰

### 기본배지의 선정

본 연구에서 개발하고자 하는 무혈청 배지의 선택을 위해서는 레트로바이러스 생산세포의 접종기 및 지수성장기가 아닌 정지기(stationary phase)에서의 레트로바이러스 생산에 중점을 두었고, 따라서 세포의 접종과 confluence 직전까지는 10% calf serum이 포함된 배지를 사용하였으며, 그 이후에 무혈청배지로 교환하여 주었다. 먼저, CRIP/LacZ 세포의 배

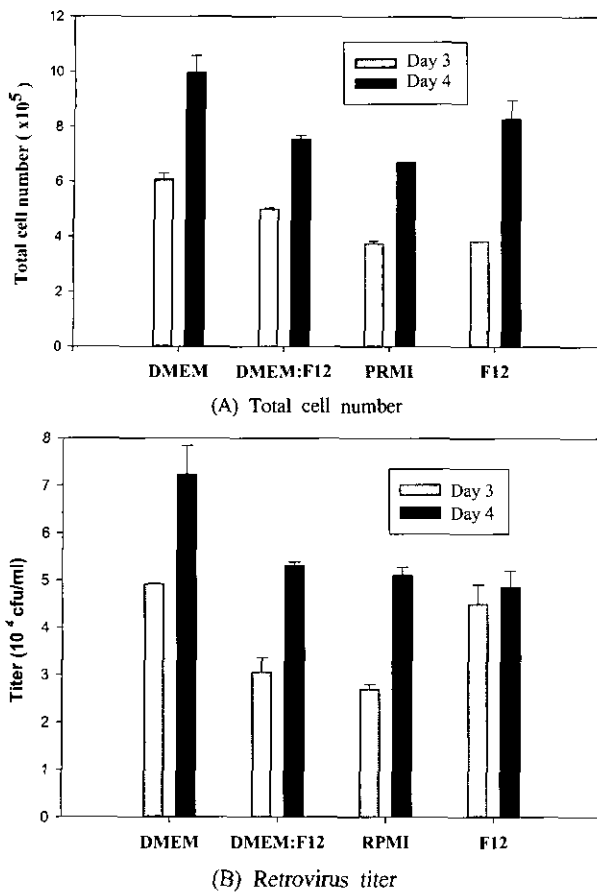


Figure 1. Basal media decision; (A) Total cell number (B) Retrovirus titer (error bars:s.d.)

양에 사용할 기본 배지를 선정하기 위하여 일반적으로 가장 많이 사용되는 배지인 DMEM, RPMI, F12, DMEM:F12(부피비 1:1)의 4가지 배지를 사용하여, 각각의 배지가 세포의 성장과 레트로바이러스의 생산에 미치는 영향을 조사하였다.

본 실험은 3 cm dish에  $1 \times 10^5$  개의 CRIP/LacZ를 10% (v/v) calf serum이 포함된 각각의 배지를 사용하여 접종한 후, 4일째와 5일째 되는 시각에 세포 수와 생산된 레트로바이러스의 농도를 측정하는 방식으로 진행되었다. 그 결과 Figure 1.(a), Figure 1.(b)에서 볼 수 있듯이 DMEM의 경우가 세포의 성장과 레트로바이러스의 생산에 가장 적합하다는 것을 알 수 있었다. 그 이유로는 다른 3가지 배지에 비해 DMEM이 glucose, glutamine의 농도가 월등히 높으며, vitamin 같은 기타 영양분도 풍부하기 때문이라 사료되며, 이후의 레트로바이러스 생산을 위한 기본배지로 DMEM을 선정하였다. 본 실험은 3회 반복 수행하였다.

#### 무혈청 배지 조성성분의 영향

생산세포에 의해 생산된 레트로바이러스는 세포에 의해 배지 내로 배출된다. 그러나 배지 내에는 세포에 의해 생산된 여러 부산물들도 같이 존재하므로 유전자 치료에 사용하기 위해서는 생산된 레트로바이러스의 분리 정제과정이 필수적이다. 그 중에서도 동물 혈청에 들어 있는 여러 단백질들은 잠재적 병원성(pathogenicity) 내지는 면역 반응을 유발할 수 있는 가능성을 가지고 있고, 그 양이 매우 많기 때문에 받

Table 1. The components of serum-free media in Fractional factorial test

component	concentration	
Insulin	+	10 $\mu$ g/mL
	-	0 $\mu$ g/mL
Transferrin	+	25 $\mu$ g/mL
	-	0 $\mu$ g/mL
BSA	+	4 $\mu$ g/mL
	-	0 $\mu$ g/mL
EGF	+	100 $\mu$ g/mL
	-	0 $\mu$ g/mL
Linoleic acid	+	20 $\mu$ g/mL
	-	0 $\mu$ g/mL

Table 2. Fractional factorial test design

	BSA	Trans-ferrin	Insulin	Linoleic acid	EGF	FGF
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	+	-	-	+
3	-	+	-	+	-	+
4	-	+	+	+	-	-
5	+	-	-	+	-	+
6	+	-	+	+	-	-
7	+	+	-	-	-	-
8	+	+	+	-	-	+
9	-	-	-	+	+	-
10	-	-	+	+	+	+
11	-	+	-	-	+	+
12	-	+	+	-	+	-
13	+	-	-	-	+	+
14	+	-	+	-	+	-
15	+	+	-	+	+	-
16	+	+	+	+	+	+

시 제거되어야 하지만 분리 정제가 매우 어렵다. 따라서, 레트로바이러스 생산에 있어서 무혈청 배지의 개발은 필수적이라고 하겠다. 따라서 본 연구에서는 일반적인 무혈청 배지에 첨가되어 혈청의 역할을 대신한다고 알려진 insulin, transferrin, EGF, FGF, BSA, linoleic acid를 사용하여 배지 최적화 실험을 수행하여 레트로바이러스의 생산에 가장 적합한 각각의 농도를 정하였다. 본 연구는 지수성장기를 지나 생산단계에 이른 후의 레트로바이러스 생산을 위한 무혈청 배지의 개발을 목표로 하였기 때문에 생산세포의 접종시는 10% (v/v) calf serum을 포함한 DMEM을 사용하였고, 세포가 confluence 하게 자란 후 무혈청 배지로 교환하여 각각의 영향을 살펴보았다.

무혈청 배지의 조성을 결정하기 위한 수단으로 먼저 fractional factorial test를 이용하였다. 본 연구에서는 위에서 언급한 6가지 첨가물에 대하여 two level 실험으로  $2^{6-2}$  factorial design을 하여 총 16가지 경우에 대한 실험을 수행하였으며, 각각의 경우에 대해 세포 수와 생산된 레트로바이러스의 농도를 측정하였다.

첨가물의 종류와 high level, low level의 농도는 Table 1에 자세히 소개하였고, 그 결과를 Table 3, Table 4에 나타내었

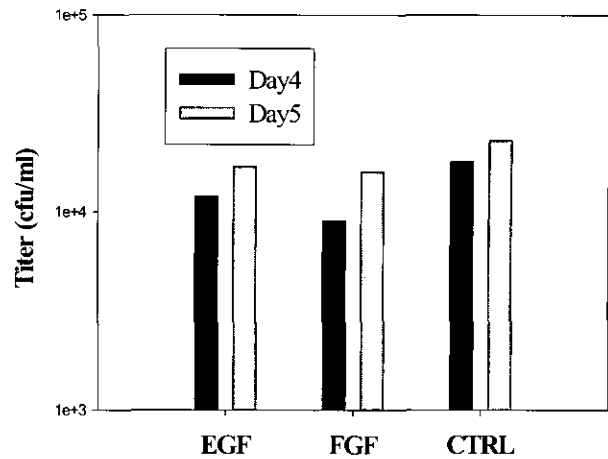
**Table 3.** Fractional factorial test cell number and retrovirus titer

	cell number ( $\times 10^5$ )	Titer ( $\times 10^4$ cfu/mL)
1	2.56	1.62
2	5.24	4.24
3	4.72	3.96
4	3.80	2.52
5	6.08	5.62
6	4.08	1.92
7	3.72	1.12
8	5.60	3.50
9	4.36	3.62
10	6.32	4.38
11	5.16	2.90
12	5.92	5.48
13	5.64	4.04
14	5.88	3.92
15	6.00	4.32
16	5.32	4.48

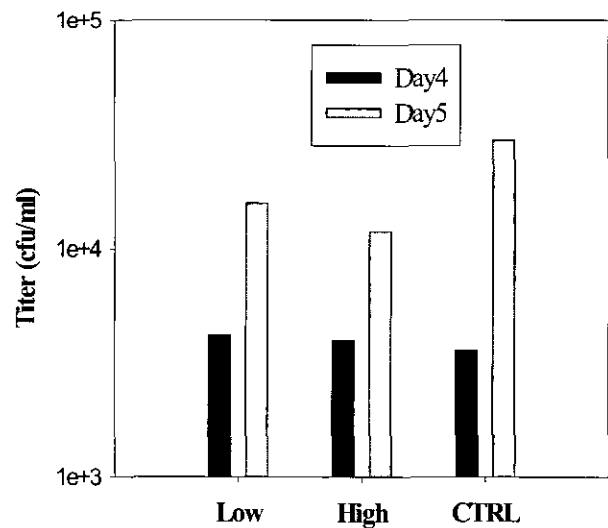
**Table 4.** The main effects of the componetnts on cell number and retrovirus titer

	BSA	Trans-ferrin	Insulin	Linoleic acid	EGF	FGF
Main effect on cell number	0.53	0.01	0.49	0.12	1.10	0.97
Main effect on retrovirus titer	0.03	-0.14	0.41	0.50	1.08	1.08

다. Insulin, EGF, FGF가 세포 수와 레트로바이러스의 수율 향상에 긍정적인 효과를 가지고 있는 것으로 나타났고, BSA는 세포의 성장에는 효과가 있으나, 레트로바이러스의 생산에는 별로 영향이 없다는 사실을 알 수 있었다. 또한 위의 실험 결과로부터 EGF와 FGF는 모두 레트로바이러스의 생산에 긍정적인 효과를 가지고 있음을 알 수 있었다. 하지만 EGF와 FGF는 모두 growth factor로써 세포의 성장과 증식에 미치는 효과가 비슷하였으나 두 물질을 모두 첨가하는 것은 무혈청 배지의 제조 가격 증가에 결정적인 요인이라고 생각되어 model system 실험을 통하여 두 물질 중 좀 더 큰 효과를 보이는 물질 하나만을 선택하고자 하였다. 앞 실험의 main effect를 고려하여 insulin, transferrin, BSA, linoleic acid의 농도를 각각 10 g/mL, 5 g/mL, 4 mg/mL, 10 g/mL로 정하였고, 여기에 EGF와 FGF 100 ng/mL을 각각 첨가하여 비교하였다. Figure 2에서 보는 바와 같이 두 실험군이 큰 차이를 보이지는 않았으나 EGF의 효과가 더 높았으며, 가격 면에서도 저렴하여 FGF를 배제하도록 하였다. 이 후 본 연구의 무혈청 배지에 사용되는 성장인자는 EGF로 결정하게 되었다. 다음으로 fractional factorial test에서 상대적으로 성장인자들 다음으로 레트로바이러스 수율향상에 높은 main effect를 보인 linoleic acid의 농도 최적화 실험을 수행하였다. 다른 첨가물들의 농도는 이 전과 동일하게 하고 linoleic acid의 농도를 각각 10 g/mL, 20 g/mL로 하여 각각의 효과를 조사하였다. Figure 3에서와 같이 10 g/mL의 linoleic acid를 사용할 경우 레트로바이러스의 생산이 증대됨을 알 수 있었고,



**Figure 2.** The effect of EGF and FGF on retrovirus titer. The concentrations of insulin, transferrin, BSA, and linoleic acid in the modified DMEM media are 10 g/mL, 5 g/mL, 4 mg/mL and 10 g/mL, respectively. EGF and FGF mean the experiments used 100 ng/mL of EGF and 100 ng/mL FGF, respectively, in addition to the modified DMEM. CTRL means the experiment using 10% calf serum in only basal DMEM media.

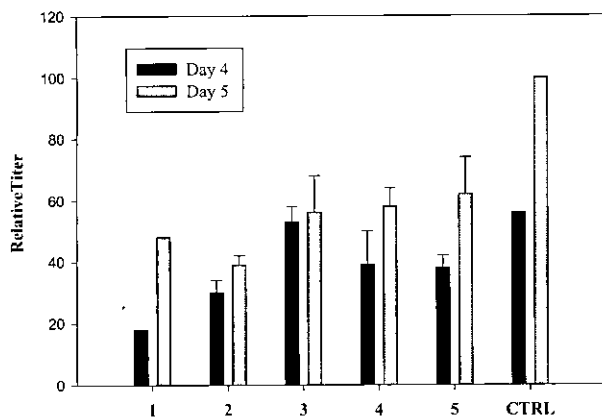


**Figure 3.** The effect of linoleic acid concentration on retrovirus titer. The concentrations of insulin, transferrin, BSA, and EGF in the modified DMEM media are 10 g/mL, 5 g/mL, 4 mg/mL and 100 ng/mL, respectively. Low and High mean the experiments used 10 g/mL and 20 g/mL of linoleic acid, respectively, in addition to the modified DMEM. CTRL means the experiment using 10% calf serum in the basal DMEM media.

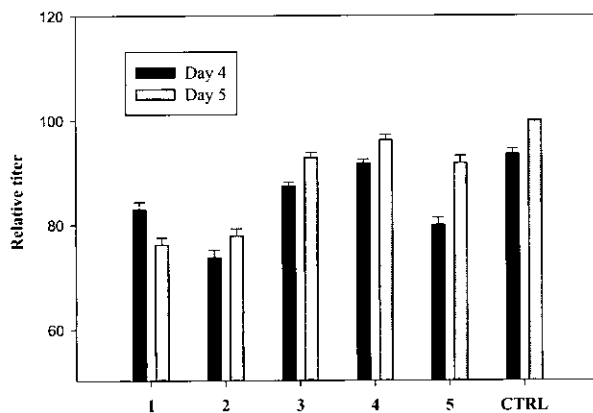
이를 근거로 본 연구에 사용할 무혈청 배지에 첨가되는 linoleic acid의 농도를 10 g/mL로 정하였다.

**무혈청 배지 조성성분의 농도**

무혈청 배지 첨가물 중 EGF와 BSA의 농도에 따른 레트로바이러스의 생산수율 변화에 대한 실험을 수행하였다. EGF는 일반적으로 개발된 무혈청 배지에 첨가되는 양의 범위가 다양하고, 무혈청 배지의 제조 가격에 결정적인 영향을 미치기 때문에 최적 농도를 정확히 알 필요가 있고, BSA의 경우

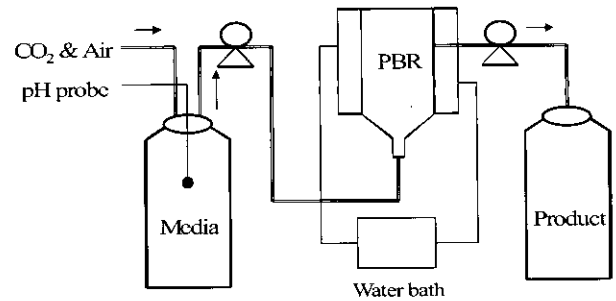


**Figure 4.** The effect of EGF concentration. The concentration of insulin, transferrin, BSA and linoleic acid in the modified DMEM are 10 g/mL, 5 g/mL, 4 mg/mL, 100 ng/mL, and 10 g/mL, respectively. The numbers from 1 to 5 of the X-axis mean the concentration of EGF 0 ng/mL, 10 ng/mL, 25 ng/mL, 50 ng/mL and 100 ng/mL, respectively, in addition to the modified DMEM. CTRL means the experiment using 10% calf serum in the basal DMEM media (error bar:s.d.).



**Figure 5.** The effect of BSA concentration. The concentrations of insulin, transferrin, EGF and linoleic acid in the modified DMEM are 10 g/mL, 5 g/mL, 25 ng/mL, 100 ng/mL, and 10 g/mL respectively. The numbers from 1 to 5 of the X-axis mean the concentration of BSA 0 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL, 4 mg/mL, and 8 mg/mL, respectively, in addition to modified DMEM. CTRL means the experiment using 10% calf serum in the basal DMEM media (error bar:s.d.).

레트로바이러스 생산 이후의 분리 정제 과정을 고려할 때 가능한 적은 농도를 첨가하는 것이 유리하기 때문에 이와 같은 실험을 수행하게 되었다. EGF의 경우 일반적인 무혈청 배지에 포함되는 농도 범위인 0 ng/mL-100 ng/mL 사이에서 효과를 수행하여 고찰하였다. 실험은 3회 반복 수행하였다. Figure 4에서 보듯이 0 ng/mL일 때를 제외하고는 비슷한 효과를 보임을 알 수 있었고, 25 ng/mL 이상일 경우 더 이상의 EGF 농도 증가는 레트로바이러스의 생산수율에 영향을 미치지 못함을 알 수 있었다. BSA의 경우도 0 mg/mL - 8 mg/mL 범위에 대하여 같은 실험을 수행하였고 그 결과를 Figure 5에 나타내었다. 4 mg/mL까지는 BSA 농도가 증가함



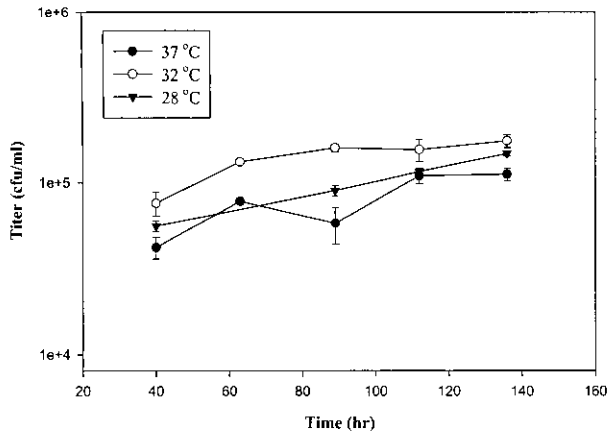
**Figure 6.** The schematic diagram of packed-bed reactor (PBR).

에 따라 생산된 레트로바이러스의 수율도 증가하였으나, 8 mg/mL의 농도를 사용할 경우 레트로바이러스 생산수율에 오히려 부정적인 효과를 보임을 알 수 있었다. 이상의 실험 결과를 근거로 하여 레트로바이러스의 생산을 위한 무혈청 배지에 첨가할 물질들의 농도를 insulin 10 g/mL, transferrin 5 g/mL, EGF 25 ng/mL, BSA 4 mg/mL, linoleic acid 10 g/mL로 최종 결정하였고, 본 배지를 이후 실험에 사용하였다.

#### 충전층 배양기를 이용한 레트로바이러스의 연속생산

충전층 배양기에 충전한 후 세포를 접종하는 방법으로 접종할 경우 생산세포인 CRIP/LacZ 세포는 Fibracel에 효율적으로 부착되지 않으며, 또 생산된 레트로바이러스가 spinner flask에서의 교반에 의해 비활성화를 겪기 때문에 레트로바이러스의 고농도 생산에 적합하지 않다(13). 충전층 배양기는 세포가 부착된 충전물인 disk를 유리 컬럼에 충전시킨 후, 새로운 배지를 연속적으로 공급하여 주는 culture system으로써 교반과 같은 별도의 shear stress가 존재하지 않기 때문에 생산된 레트로바이러스의 비활성화를 막을 수 있고, 산소와 접촉한 새로운 배지를 연속적으로 공급하여 주기 때문에 영양분과 산소를 효율적으로 세포에 전달할 수 있으며, 소모된 배지에 포함된 해로운 대사산물을 효율적으로 제거할 수 있는 장점이 있다(15,16). 또한 레트로바이러스는 표면을 둘러싸고 있는 envelope protein이 매우 쉽게 비활성화 되기 때문에 37°C에서의 반감기가 7.2-5.5시간 밖에 되지 않는다. 따라서, 감염성을 가지고 있는 레트로바이러스를 많이 얻기 위해서는 생산된 레트로바이러스를 빨리 낮은 온도로 옮기거나, 생산속도는 감소되더라도 낮은 온도에서 배양하는 것이 중요하다. 충전층 배양기를 이용한 레트로바이러스의 연속생산 공정의 경우, 소모된 배지와 함께 생산된 레트로바이러스가 배양기를 빠져나가기 때문에 상대적으로 생산된 레트로바이러스의 비활성화를 줄일 수 있다. 위와 같은 이론들을 근거로 하여 본 연구에서는 충전층 배양기를 이용한 레트로바이러스의 고농도 생산에 대하여 조사하였다. Figure 6은 충전층 배양기의 개략도를 나타낸다.

충전층 배양기를 이용한 레트로바이러스의 연속생산 공정에서 중요한 조업변수는 배지내의 포도당 농도, 아미노산 농도 등의 부족현상, 생성되는 암모니아, 젖산 및 산소부족 등으로 인한 세포성장 및 레트로바이러스의 생산이 영향을 받지 않는다고 가정하면, 충전물질, 초기 접종수, 초기 접종방법, 배지 주입속도, 배양 온도 등을 들 수 있다(실제적으로 T-flask에서 배양실험을 한 결과 배지의 포도당 농도, 아미노

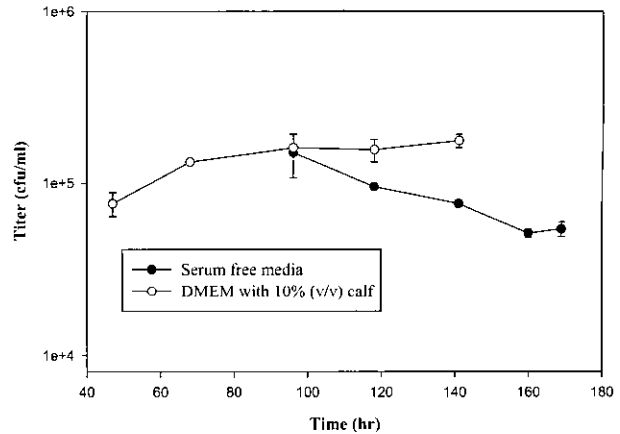


**Figure 7.** Effect of temperature on the retrovirus yields in continuous culture in the packed-bed reactor. The dilution rate in this experiments is  $0.67(h^{-1})$  (error bars:s.d.).

산 농도, 산소공급 등의 영향을 크게 받지 않았다. (미발표 결과)). 이들 중 충전물질과 초기 접종방법, 접종수, 배지 주입속도는 15 mL 크기에서 10% calf serum을 포함한 혈청배지에서 실험을 통해서 결정하였다. 배양기 안의 세포가 Monod-Equation을 따른다고 가정할 때, 회석속도에 따라 생산된 레트로바이러스 최대역가와 최소역가의 차이는 2배 이상이며, 생성된 부산물인 암모니아의 농도도 세포성장에 부정적인 영향을 미치므로 연속생산 시 최적 회석속도 결정은 중요한 일이다. 또한 30-40°C 사이에서는 온도가 증가할수록 생산세포의 레트로바이러스 생산성이 좋아지지만, 생산된 레트로바이러스의 비활성속도도 더 커지므로 최적의 레트로바이러스 생산온도를 결정하는 실험을 수행하였다. 앞서 설명한 바와 같이 레트로바이러스는 온도에 의한 비활성화가 심하고, 정치배양의 경우 37°C보다 32°C에서 더 높은 수율로 레트로바이러스가 생산됨이 보고된 바 있다(17). 본 연구에서는 이러한 현상이 충전층 배양기에서도 나타나는지 고찰하기 위하여 동일한 회석속도 ( $D=0.67(h^{-1})$ )에서 37°C, 32°C, 28°C에서 각각 배양하여 생산된 레트로바이러스의 수율을 비교하여 그 결과를 Figure 7에 나타내었다. 그림에서 32°C가 세포 성장은 37°C에서 보다 느리나, 레트로바이러스의 낮은 비활성화로 인한 바이러스 생산수율이 가장 높은 것을 알 수 있다. 37°C의 온도에서는 생산된 바이러스의 비활성화가 급격하게 진행되어 수율이 낮아지게 되고, 28°C인 경우는 바이러스의 비활성화보다는 생산세포의 레트로바이러스 생산성이 떨어지기 때문에 수율이 낮아진다고 생각된다(17).

**무혈청 배지를 사용한 연속생산**

본 연구에서 개발한 무혈청 배지를 충전층 배양기를 통한 레트로바이러스의 연속생산 공정에 이용하는 실험을 수행하였다. 실험 방법은 앞의 실험과 동일하고, 단지 접종시에 10% (v/v) calf serum을 포함한 DMEM에서 시작하여, 80 시간이 흐른 후에 본 연구에서 개발한 무혈청 배지로 교환하여 계속 배양하였다. 생산된 레트로바이러스의 농도를 Figure 8에 나타내었다. 무혈청배지를 이용한 연속생산 실험을 수행한 결과 혈청배지를 사용했을 때의 수율 ( $1.2 \times 10^5$  cfu/mL)에 비해 약 50%의 수율( $6.7 \times 10^4$  cfu/mL)을 가진 레트로바



**Figure 8.** Retrovirus yields in the continuous culture in the packed-bed reactor using the developed serum-free media (error bars:s.d.).

이러스를 얻을 수 있었다. 배양시간이 증가할수록 레트로바이러스의 농도가 떨어져서 1주일 후에는 최대 레트로바이러스 농도가 약 50% 정도로 감소하였다. Effluent 배지용액에서 점점 많은 세포수가 관찰되는 것으로 보아 혈청 성분 중 세포의 부착을 위해 필요한 extra cellular matrix인 fibronectin과 같은 물질의 부족으로 인한 영향인지를 확인하기 위해 이들 성분들을 첨가해 보았으나 별다른 효과는 보지 못했다. Fibra-cel의 경우 부착된 세포를 모두 떼어내서 정확한 세포수를 측정하는 것이 불가능하여 연속배양시의 세포농도를 직접 비교할 수 없지만, 생산되어 나온 배지를 관찰한 결과 무혈청 배지를 사용한 연속생산의 경우에 생산배지 내에서 많은 수의 생산세포를 관찰할 수 있었다. 이는 bead에 부착되어 자라던 생산세포가 떨어져 나온 것이라 생각되며, 따라서 레트로바이러스의 수율이 감소하는 이유는 부착되어 자라는 생산세포 농도의 감소 때문이라 생각된다.

**요 약**

본 연구에서는 레트로바이러스 생산 세포인 CRIP/LacZ 세포의 배양시에 혈청의 역할을 대체할 수 있는 여러 첨가물을 선정하고 그 농도를 정하는 실험을 수행하여, 레트로바이러스 생산을 위한 무혈청 배지를 개발하였다. 그 결과 DMEM을 기본배지로 하고 insulin, transferrin, BSA, EGF and linoleic acid를 포함한 무혈청 배지를 개발하였다. 이를 충전층 연속배양기를 이용한 레트로바이러스의 연속생산 실험에 본 결과  $6.7 \times 10^4$  cfu/mL수 수율을 가진 레트로바이러스를 약 8일간 생산할 수 있었다. 충전층 연속반응기에서도 T-flask와 같이 온도의 영향이 매우 중요하였고 32°C에서 가장 높은 수율의 레트로바이러스를 생산할 수 있었다. 이는 레트로바이러스의 온도에 따른 비활성속도가 바이러스 생산수율에 매우 큰 영향을 미침을 시사해 주는 결과이다. 또한 충전층 배양기에서 무혈청배지를 이용한 세포배양 시에는 무혈청배지 첨가물로 세포 부착 물질에 대한 연구가 필요하다고 생각된다.

## REFERENCES

1. Shen, B. Q., M. F. Clarke, and B. O. Palsson (1996), Kinetics of retroviral production from the amphotropic  $\Psi$  CRIP murine producer cell line, *Cytotechnology*, 22, 185-195.
2. Hodgson, C. P. (1995), The vector void in gene therapy, *Bio/technology*, 13, 222-229.
3. Dusty, M. A. (1990) Retrovirus packaging cell, *Hum. gene Ther.*, 1, 5-14
4. P. Kurre, H. P. Kiem, J. Morris, S. Heyward, J. L. Battini, and A. D. Miller (1999), Efficient transduction by an amphotropic retrovirus is dependent on high-level expression of the cell surface virus receptor, *J. Virol.*, 73; 1, 495-500.
5. Le Doux, J. M., J. R. Morgan, R. G. Snow, and M. L. Yarmush (1996), Proteoglycans secreted by packaging cell lines inhibit retrovirus infection, *J. Virol.*, 70 ; 9, 6468-6473.
6. Le Doux, J. M., J. R. Morgan, and M. L. Yarmush (1999), Differential inhibition of retrovirus transduction by proteoglycans and free glycosaminoglycans, *Biotechnol. prog.*, 15, 397-406.
7. McGrath, M., O. Witte, T. Pincus, and I. L. Weissman (1978), Retrovirus purification : method that conserves envelope glycoprotein and maximizes infectivity, *J. Virol.*, 25 ; 3, 923-927.
8. O'neil, P. F. and E. S. Balkovic (1993), Virus harvesting and affinity-based liquid chromatography, *Biotechnology*, 11, 173-178.
9. Butler, M. and N. Huzel (1995), The effect of fatty acids on hybridoma cell growth and antibody productivity in serum-free cultures, *J. Biotechnol.*, 39 ; 165-173.
10. Dieter P., A. Lipton, and I. Klinger (1971), Serum factor requirements of normal and simian virus 40-transformed 3T3 mouse fibroblasts, *Microbiology*, 68 ; 3, 645-649.
11. Le Doux, J. M., H. E. Davis, and J. R. Morgan (1999), Kinetics of retrovirus production and decay, *Biochnol. Bioeng.*, 63 ; 6, 654-662
12. Kotani H, PB Newton, Zhang S, YL Chiang, E. Otto, L. Weaver, RM Blease, WF Anderson, and G. J. McGarrity, Improved methods of retroviral vector transduction and production for gene therapy, *Hum. gene Ther.*, 5 ; 19-28
13. Kang, S. H, S. G. Lee, and B. G. Kim (2000), Justification of continuous packed-bed reactor for a retrovirus vector production from amphotropic  $\Psi$  CRIP murine producer cell, *Cytotechnology*, 34, 1-2 ; 151-158
14. Lao, M. S. and C. Schalla (1996), Development of a serum-free medium using computer-assisted factorial design and analysis, *Cytotechnology*, 22, 25-31.
15. Griffiths, J. B., D. Lobby, and A. J. Racher (1992), Maximization of perfusion systems and process comparison with batch type cultures, *Cytotechnology*, 9, 3-9.
16. Whiteside, J. P. and R. E. Spier (1981), The scale-up from 0.1 to 100 liter of a unit process system based on 3-mm-diameter glass spheres for the production of four strains of FMDV from BHK monolayer cells, *Biotechnol. Bioeng.*, 23, 551-565.
17. Le Doux J. M., H. E. Davis, and J. R. Morgan, Kinetics of retrovirus production and decay, *Biotechnol. Bioeng.*, 63; 6, 654-662