

무혈청 배지를 이용한 CHO 세포의 동결보존

¹김 유 강 · ²박 홍 우 · † ¹최 태 부
¹건국대학교 미생물공학과, ²한양대학교 화학공학과
(접수 : 2005. 8. 24., 게재승인 : 2006. 4. 14.)

Cryopreservation of CHO Cell using Serum-Free Media

Yoo-kang Kim¹, Hong-woo Park², and Tae-boo Choe^{1†}

¹Department of Microbial Engineering, Konkuk University, Hwayang-dong 1, Kwangjin-gu, Seoul 143-701, Korea

²Department of Chemical Engineering, Hanyang University, Haengdang-dong 17, Seongdong-gu, Seoul 133-791, Korea

(Received : 2005. 8. 24., Accepted : 2006. 4. 14.)

During routine maintenance, animal cell lines are commonly cryopreserved in growth medium containing serum with 10% DMSO. But, in case of bioprocess under the serum-free conditions, including cultivation of cell lines and producing of pharmaceuticals, the cryopreservation should be executed without serum to prevent a cross-contamination. This experiments were performed to investigate the effects of the serum-free cryopreservation on the CHO cells. To improve the survival rates of the cryopreserved CHO cells in serum-free condition, first, the effects of permeable and non-permeable additives for substitute serum on cell viability were investigated. The combination of 10% DMSO and 0.03 M raffinose in MEM- α without serum indicated 76% of cell viability. However, it did not reach the survival rates (more than 95%) of the conventional cryopreservation. In the second, to evaluate the cryopreservative ability of the serum-free medium (SFM) we compared viability of the CHO cells cryopreserved in the SFMs (Sigma C5467, C4726, and C1707, JBI SF486 and PF486), the cryoprotectant (Genenmed CAN-1000) and the MEM- α with serum. All solution contained 10% DMSO. As a result of the comparison, cryopreserved cells in the SFMs showed over 95% of viability and appeared predominant viability better than cryoprotectant CAN-1000. Finally, we assessed the stability of the CHO cells in the long-term cryopreservation (LTC) using SFM. Every three months, the cryopreserved CHO cells were thawed to estimate the cell viability and the recovery rates. Then, real-time RT-PCR analyzed the inserted CHO DHFR gene. All results for the LTC appeared the same stability as the serum containing cryopreservation. In the conclusion, it could be seen that the LTC in the SFM can substitute for serum using methods in the bioprocess proceeded by CHO cells for more than 18 months.

Key Words : Serum free media, cryopreservation, cryoprotectant, DHFR, RT-PCR

서 론

동물세포 배양방법의 발전과 더불어 동물세포는 다양한 분야의 생물학적 연구에 널리 적용되고 있으며, 현재 단백질 의약품의 생산에도 동물세포가 이용되고 있다(1). 의약품 생산에 있어서 동물세포는 생산 batch의 처음에서부터 끝까지 동일한 성분의 단백질을 생산해야 하며, 모든 batch는 동일한 성분으로 구성되어야 한다(2). 동물세포를 이용한 단백질 생산에 있

어 장기간 동안 세포주의 특성을 유지할 수 있는 보존방법이 필수적인데, 이러한 세포주의 보존 방법으로 동결보존이 주로 사용되고 있다. 동결보존을 통해 세포 배양 및 유지의 어려움을 극복할 수 있고, 세균이나 mycoplasma 등으로부터의 오염을 방지할 수 있다. 또한 세포주의 형질전환을 방지할 수 있을 뿐만 아니라 실험 및 생산의 재현성을 확립하는데 중요한 역할을 한다(3, 4). 세포 배양 및 공정에서 필수과정인 동결보존 후에 세포주의 동일성을 확보하기 위해서는 세포주에 따른 특성과 생존율을 유지할 수 있는 동결보존 방법의 개발과 검증이 실시되어야 한다(5).

일반적으로 동결보존 과정에서 동물세포는 세포손상을 입게 되는데, 세포가 낮은 온도에 노출되면서 세포내의 기관과 세포 기능에 장애가 발생하게 된다(6). 동결보존에 의한 세포막 구조의 변화로 막투과성의 변화가 발생하고, 세포질의 수

† Corresponding Author : Department of Microbial Engineering, Konkuk University, Hwayang-dong 1, Kwangjin-gu, Seoul 143-701, Korea

Tel : +82-2-450-3523, Fax : +92-2-3436-5594

E-mail : tbchoe@konkuk.ac.kr

축이나 세포골격의 응집 등 형태학적 및 기능적 손상이 초래되고, 생리적 변화가 발생하는데, 이러한 세포손상은 냉각속도가 빠를수록 손상이 커지는 것으로 알려져 있다. 동결보존액으로 현탁된 동물세포는 동결보존 과정에서 온도가 내려가면 세포막 외부가 먼저 동결되기 시작하고, 세포내부는 세포외액의 얼음 결정에 의해 물리적 손상을 입게 된다. 얼음결정은 세포막을 파괴하고, 각종 세포기관에 치명적인 손상을 입힌다(7). 반대로 온도를 천천히 내리면 세포내액이 세포 밖으로 충분히 유출되면서 세포내부에 얼음결정이 천천히 형성되고, 크기가 작은 입방체를 이루게 되어 세포기관에 큰 손상을 입히지 않는 것으로 알려져 있다(8, 9). 하지만, 동결 속도를 천천히 하면, 세포내 용매가 밖으로 빠져나와 세포외부가 고장액으로 변하는데, 이 과정에서 세포막 내외부의 삼투압 차이가 발생하고, 세포내부에 탈수 현상이 발생하게 된다. 이 때 세포의 부피가 줄어들면서 세포막의 손상이 발생할 수 있고, 세포액의 점도나 pH 변화에 의해 세포손상이 일어난다(10).

이처럼 동결보존 과정에서 발생하는 세포손상을 막기 위해 동결보존제를 사용하는데, 세포막 투과성인 glycerol, dimethylsulfoxide (DMSO), glycols 등과 비투과성인 sucrose, raffinose, lactose, trehalose, polyvinylpyrrolidone, dextran, albumin 및 혈청 등이 있다. 세포막투과성 동결보존제는 세포내 수분을 대체하여 수분량을 감소시켜 동결보존 시 얼음결정의 형성을 억제하고, 비투과성 동결보존제는 세포동결 직전에 세포내 수분을 유출시켜 세포내외의 삼투평형을 유지하는 방법으로 세포막 손상을 방지한다(11).

동물세포를 동결보존하는 일반적인 방법으로는 혈청이 포함된 세포배양용 배지에 10% DMSO를 첨가하여 세포막을 보호하고, 서서히 냉각하여 -196°C 액체질소에서 보존하는 방법이 사용되고, 또한 해동시 급속히 융해함으로써 얼음결정 형성에 의한 세포손상을 최소화 한다(12).

동물세포를 이용한 단백질 의약품의 생산의 경우, 무혈청 배지에서 확립된 세포주는 배양 및 생산과정이 모두 무혈청 환경에서 진행되므로 세포주의 동결보존 과정에서도 교차오염 및 혈청으로부터 유래되는 오염을 막기 위해 무혈청 배지가 사용되어야 한다. 혈청은 세포 배양 시 5-10% 첨가되어 세포 증식에 도움을 주지만, 혈청이 갖는 문제점으로 인해 단백질 생산 등의 공정에서 점점 제외되고 있다(13, 14). 혈청은 albumin 등의 고분자 단백질, 영양분, 그리고 transferrin 등을 함유하고 있으며, 호르몬과 부작 인자와 같은 세포 배양에 필요한 성분들을 함유하고 있다. 또한 insulin, EGF 등의 성장 인자를 가지고 있으며, 배지의 독성 성분을 중화시키는 역할을 하기도 한다. 그러나 혈청에는 미확인된 미량 성분이 있으며, 이러한 미량 성분들이 세포의 성장에 상당한 영향을 미치고 있는 것으로 알려져 있다(15, 16). 혈청 내의 미량 성분들은 분석이 어려울 뿐만 아니라, 생산 시기나 장소에 따라 그 성분이 달라질 수 있으므로, 재현성 있는 실험 및 생산 공정을 진행하기 위해서는 미량 성분이 없거나, 성분이 완전히 분석된 무혈청 배지를 사용해야 한다. 또한, 혈청은 동물에서 채취되므로 광우병 등 동물의 질병이나 바이러스 등 다른 요인으로부터의 오염에 대한 위험성을 갖고 있을 뿐만 아니라(17-19), 세포 배양을 통한 생산물을 이용하고자 할 때, 혈

청 성분들을 정제가 어려워 공정이 복잡해지는 경우가 많다. 이와 같은 이유로 현재 동물세포를 이용한 단백질 의약품 생산에 있어 혈청을 대체하는 성분으로 구성된 무혈청 배지가 혈청의 단점을 보완하면서 사용되고 있다(20).

현재 혈청의 기능을 대체할 수 있는 다양한 요소들이 단일화된 물질로 개발되어 무혈청 배지에 첨가되고 있으며, 동물에서 유래된 단백질 성분을 제거한 무단백 배지도 사용되고 있다(21, 22). 무혈청 배지에는 trypsin 작용을 억제하는 protease inhibitor(23), 세포성장을 조절하는 insulin, 5-triiodo thyronin, hydrocortisone, estrogen, androgen, progesterone, prolactin 등의 growth hormone, 세포증식을 촉진하는 heparin-binding growth factor, fibroblast growth factor, epidermal cell growth factor, platelet-derived growth factor, insulin-like growth factor, interleukin 등의 성장인자, 그리고 L-glutamine 등의 영양소가 포함되어 있다(24). 또한 항산화 기능을 하는 selenium과 lipid 전구물질로 linoleic acid, cholin, ethanolamine, phosphorylethanolamine 등이 첨가되는 경우도 있다(25). 이외에도 미량의 무기물질로 철분, 구리 등 각종 무기물질을 포함하고 있으며, iron에 대한 운반체로 transferrin이 첨가되기도 한다(26, 27). 이와 같은 무혈청 배지의 혈청 대체 물질들은 정량되어 첨가되고, 그 출처가 분명하며, 외부로부터의 오염이 차단된 상태에서 만들어지므로, 혈청 배지의 단점을 극복할 수 있다(28). 하지만, 무혈청 배지를 사용한 세포배양의 경우, 배양하는 세포의 종류에 따라 사용되는 무혈청 배지의 종류가 달라지고, 배양 방법이 달라지는 등의 단점을 갖기도 한다. 세포주의 종류에 따라 달라지는 배지의 종류나 배양 방법처럼 무혈청 배지를 이용한 동결보존 역시 기존의 동결보존 방법과는 다른 조건으로 진행해야 하고, 그 안정성이 검증되어야 할 것이다.

위와 같은 이유로 본 실험은 무혈청 배지를 이용한 CHO 세포 동결보존의 세포주 보존능력과 유전자 안정성을 확인하여, 무혈청 배지를 이용한 동결보존방법을 확립하고 안정성을 검증하기 위하여 진행하였다. 혈청은 동결보존에 있어 비투과성 동결보존제로 사용되고, 급속한 삼투압 변화를 완충시키는 역할을 하는데(11), 실험의 첫 단계로 혈청이 제거된 상태의 동결보존이 CHO 세포의 생존율에 미치는 영향을 확인하기 위해 혈청 농도에 따른 동결보존을 통해 생존율을 확인하였다. 두 번째로 혈청을 대체하기 위한 다양한 동결보존제와 무혈청 배지를 사용한 동결보존에서 CHO 세포의 생존율을 비교하고, 무혈청 배지 자체의 동결보존 능력을 검증하기 위하여 다양한 세포주들을 이용하여 동결보존 후의 생존율을 비교하였다(29). 또한, 무혈청 배지를 이용한 장기간 동결보존이 세포에 미치는 영향을 알아보기 위해 세포 생존율과 성장 회복율을 측정하였고, real-time RT-PCR을 통해 삽입 유전자에 대한 안정성을 측정하여, 혈청배지를 이용한 장기간 동결보존과 비교하였다(30).

재료 및 방법

세포주 및 세포배양

본 실험에서는 CHO DG44 세포주에 dihydrofolate reductase (DHFR) selection system을 적용하여 재조합한

S/CHO hu-17 A3 세포주를 한양대학교에서 분양받아 사용하였다. 이 세포주에는 DHFR 유전자가 벡터와 함께 삽입되어 있어, methotrexate (MTX) 농도 증가 방법으로 DHFR 발현 세포주를 선별할 수 있다(31).

무혈청 배지에 대한 세포주의 적응은 2.0×10^5 cells/ml 농도의 세포에 기존의 5% fetal bovine serum (FBS, GibcoBRL), 2.2% sodium bicarbonate, 320 nM MTX를 첨가한 MEM- α (GibcoBRL) 배지와 무혈청 배지가 1 : 1로 혼합된 배지를 사용하여 1.0×10^6 cells/ml 농도가 되도록 배양하였고, 배지를 각각 1 : 3, 1 : 7의 비율로 혼합하여 순차적으로 적응시켰다. 적응된 CHO 세포의 배양에는 320 nM MTX가 첨가된 CHO Protein-free Medium (Sigma, C5467)을 사용하였고, 대조군으로 기존의 혈청 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 습윤 배양기에서 배양하였다.

다양한 동물세포에 대한 무혈청 배지의 동결보존 능력을 알아보기 위한 실험에 사용된 human dermal fibroblast (HDF)와 mouse melanocyte (B16F10)는 10% FBS가 첨가된 DMEM에서 배양하였고, CHO DG44와 CHO DUKX 세포주는 5% FBS가 첨가된 MEM- α 배지에서 위의 조건으로 배양하였다.

혈청이 동결보존에 미치는 영향

동결보존 과정에서 비투과성 동결보존제로 사용되는 혈청의 중요성을 확인하기 위하여 혈청의 농도에 따른 동결보존 능력을 측정하였다. MEM- α 배지에 FBS를 20%, 10%, 5%, 2%, 1%, 0%로 첨가하여 동결보존하고, 7일 후 해동하여 생존율을 측정하였다.

동결보존 방법은 5.0×10^6 cells/ml 농도의 세포를 각 농도의 FBS가 첨가된 배지에 10% DMSO를 첨가하여 동결 vial에 1 ml씩 넣어 보존하였다. 동결 vial은 isopropanol이 담긴 cryocontainer에 넣어 -70°C에서 overnight하고, 다시 -196°C 액체질소에 보관하여, 약 -1°C/min의 속도로 온도를 낮췄다. 해동 방법은 질소탱크에서 vial을 꺼내어 37°C water bath에서 녹인 후, 10배 volume의 새 배지에 loading 하여 DMSO를 희석하고, 원심분리하여 세포를 resuspension 하였다. 동결보존 후, CHO 세포의 생존율은 trypan blue를 이용해 측정하였다(12).

다양한 동결보존 첨가제와 동결보존 용액, 무혈청 배지에 대한 비교

혈청을 대체하기 위한 각종 투과성, 비투과성 동결보존 첨가제와 무혈청 동결보존 용액, 무혈청 배지가 세포의 생존율에 미치는 영향을 비교하여 최적화된 조건을 설정하였다(32). 실험에 사용된 첨가제는 FDA의 21CFR610을 고려하여 USP에 수록된 물질을 중심으로 선택하였다.

첨가제를 선택하기 위한 실험에 사용된 동결보존 용액은 MEM- α 배지를 기본으로 세포막 투과성인 DMSO, glycerol, methanol과 비투과성인 sucrose, lactose, raffinose, trehalose, sorbitol을 동시에 첨가하여 동결보존 및 해동 후 생존율을 비교하였다. 비투과성 첨가제는 70°C에서 녹인 후, 0.2 μ m 필터로 여과하여 첨가하였다. 동결 및 해동은 5.0×10^6 cells/ml 농도의 세포를 위의 방법에 따라 진행하였다.

무혈청 동결보존 용액을 이용한 동결보존은 시판중인 CAN-1000 (Genemed) 제품을 사용하였으며, 동결방법은 제품의 사용방법을 따랐다. 즉, 5.0×10^6 cells/ml 농도의 세포를 동결보존액에 resuspension하여, ice-cold water에 10분간 방치한 후, 10% DMSO를 첨가하여, -70°C에서 overnight 하고, 다시 -196°C 액체질소에 보관하였다.

무혈청 배지 종류에 따른 동결보존 능력과 안정성을 비교하기 위해 시판중인 무혈청 배지를 이용하여 생존율과 회복율을 비교하였다. CHO Protein-free Medium (Sigma, C5467), CHO Medium, Chemically-defined, Animal Component-free (Sigma, C4726), CHO Serum-free Medium (Sigma, C1707), Protein-free CHO Medium (JBI, PF486), Serum-free CHO Medium (JBI, SF486) 등의 무혈청 배지를 사용하여 동결보존 실험을 진행하였으며(33), 무혈청 배지에 대한 적응과 동결 및 해동은 위 방법을 따랐다.

다양한 세포주에 대한 무혈청 배지의 동결보존 능력

다양한 세포주에 대한 무혈청 배지의 동결보존 능력을 알아보기 위하여 CHO DG44, CHO DUKX, HDF와 B16F10 세포주를 이용하여 동결보존한 후, 혈청배지를 이용한 동결보존과 생존율을 비교하였다. 무혈청 동결보존액으로는 C5467 배지에 10% DMSO를 첨가하여 사용하였으며, 대조군으로 기존의 5% 혈청 배지에 10% DMSO를 첨가하여 동결보존 하였다. 또한, 해동용액이 생존율에 미치는 영향을 비교하기 위하여 무혈청 배지와 혈청 배지를 이용하여 동결보존 한 세포주를 각각 무혈청 배지와 혈청 배지에 해동하여, 생존율을 비교하였다.

무혈청 배지를 이용한 장기간 동결보존의 안정성

무혈청 배지를 이용한 장기간 동결보존이 CHO 세포에 미치는 영향을 알아보기 위해 세포를 5.0×10^6 cells/ml 농도로 동결보존하고 3, 6, 12, 18 개월 후, 해동하여 생존율을 확인하였다. 또한, 장기간 동결보존이 유전자에 미치는 영향을 알아보기 위하여 real-time RT-PCR을 통해 삽입 DHFR 유전자의 안정성을 평가하였다. 동결보존에 사용한 배지는 무혈청 배지로 C5467을 사용하고, 대조군으로 혈청 배지와 CAN-1000을 사용하였으며, 유전자 안정성을 평가하기 위한 실험은 아래의 방법을 따랐다.

RNA 분리

배양된 세포는 TRIzol[®] kit (Invitrogen)를 이용하여 total RNA를 분리하였으며, 분리방법은 제품의 사용방법을 따랐다.

즉, 혈청 배지에서 배양된 부착세포는 PBS washing 후, TRIzol을 첨가하여 용해시킨 후, microcentrifuge tube에 옮겼고, 무혈청 배지에서 배양된 현탁세포는 원심분리 후, 5.0×10^6 cells/ml 농도의 세포를 microcentrifuge tube에 준비하여 TRIzol로 용해시켰다. 여기에 chloroform을 첨가하여 15초 동안 강하게 vortexing한 뒤, 2-3분간 상온에서 방치하고, 4°C에서 14000 \times g로 15분간 원심분리 하였다. 상등액을 새 microcentrifuge tube에 옮기고 isopropanol을 첨가하여 10분간 침전시킨 뒤, 다시 10분간 원심분리하여 RNA

pellet을 얻었다. RNA는 75% ethanol로 washing한 후, DEPC-treated water에 녹여 -70°C에 보관하였다. RNA의 순도 측정과 정량은 spectrophotometer를 이용하였다.

Real-time reverse transcription polymerase chain reaction (Real-time RT-PCR)

cDNA 합성은 total RNA 5 μg 과 5 \times M-MLV reaction buffer 5 μl , 10 mM dNTP 4 μl , 100 mM DTT 2.5 μl , M-MLV reverse transcriptase 200 units, 50 pmol/ μl oligo-dT 1 μl 를 혼합하고, DEPC-treated water로 총 volume이 25 μl 가 되도록 조절하였다. cDNA 증폭은 iCycler iQ system (Bio Rad)을 이용하였으며, extension 37°C, 60분, denaturation 95°C, 5분을 진행하였다.

Real-time PCR은 준비된 cDNA 2 μl 와 2 \times Supermix iTaq (Bio-Rad) 25 μl , 10 pmol/ μl primer set (Bioneer) 1 μl 를 혼합하고 총 volume이 50 μl 가 되도록 DEPC-treated water로 조절한 후, iCycler iQ system을 이용하여 Ct 값을 측정하였다. PCR 조건은 initial denaturation 95°C, 5분을 실시한 후, denaturation 95°C, 30초, annealing 57°C, 30초, extension 72°C, 30초의 cycle을 35회 실시하고, final extension 72°C, 5분을 진행하였다. CHO DHFR primer는 NCBI database를 이용하여 PRIMER3 software로 디자인하였으며, 모든 product의 크기는 200 bp 내외로 하였다. PCR의 정확도를 검증하기 위한 control로는 mouse GAPDH primer를 사용하였다(34)(Table 1).

Table 1. The primers used for reverse transcription polymerase chain reaction

Gene bank	Gene	Primer sequence	
M19869	CHO DHFR	sense	AATGACCACCACCTCTCTCAG
		anti-sense	GCCTCCAACCTATCCAAACCA

결과 및 고찰

혈청이 동결보존에 미치는 영향

동결보존에서 비투과성 첨가제로서 혈청의 중요성을 확인하기 위하여 혈청의 농도에 따른 동결-해동 후의 생존율을 측정된 결과, 5% 이하의 혈청 농도에서부터 생존율이 80% 이하로 급격히 감소하는 것을 관찰할 수 있었고, 혈청이 없는 상태에서는 50% 정도의 세포가 사멸하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 이는 Trounson의 실험에서 비투과성 첨가제인 단백질의 농도가 동결보존에 미치는 영향을 관찰한 것과 유사한 결과를 보였고, 동물세포를 동결보존 하는 과정에 있어 혈청이 비투과성 동결보존제로 작용한다는 것을 확인할 수 있었다(35). 이외에도 혈청은 단백질 성분으로써의 작용 뿐 아니라 무기염류 등의 미량성분이 heat shock protein의 발현을 활성화시켜 저온에 의한 세포손상을 줄여주는 역할을 하기도 하고, 동결보존 중에 발생할 수 있는 활성산소를 억제하는 항산화제 성분을 제공하기도 한다(36, 37). 이처럼 혈청은 동결보존에 있어 비투과성 동결보존제, heat shock protein 전구체, 항산화제 등의

기능을 함으로써 세포의 저온손상을 최소화하는 등 중요한 역할을 한다. 이러한 결과를 바탕으로 혈청을 대체할 수 있는 첨가제를 선별하고, 혈청을 제거한 상태에서 이를 첨가하는 방법으로 무혈청 동결보존에 대한 실험을 진행하였다.

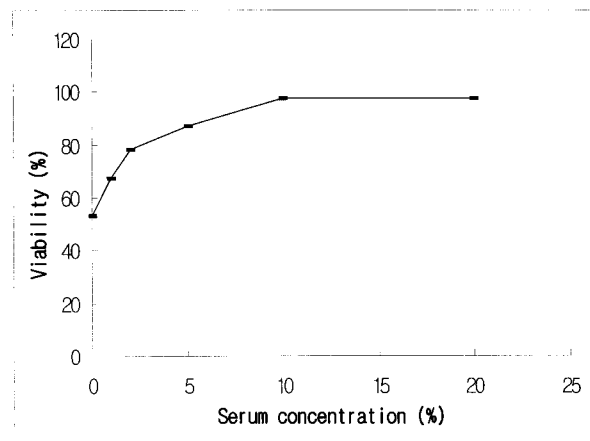


Figure 1. Effect of serum concentration on the viability of the CHO cells during the cryopreservation.

동결보존에서 혈청을 대체하기 위한 첨가제의 이용

혈청을 제거한 상태의 동결보존에서 생존율을 확보하기 위해 우선 세포농도에 따른 생존율을 비교하여 최적의 세포농도를 결정하고, 다양한 투과성, 비투과성 동결보존제를 첨가하여 동결보존 후의 생존율을 비교하였다.

우선, 혈청을 대체하기 위한 다양한 동결보존 첨가제를 이용한 생존율의 비교결과를 보면 투과성 동결보존제로 10% DMSO와 20% glycerol 만을 첨가한 경우, 비투과성 동결보존제가 없는 상황에서도 동결보존제로서의 능력을 보였으며, methanol을 사용한 경우는 동결보존 과정에서 거의 모든 세포가 사멸하였다. 이는 DMSO와 glycerol이 투과성 동결보존제로 작용하여 일차적으로 생존율을 유지할 수 있는 것을 나타내며, 첨가제 농도에 따른 세포독성은 Nelson의 실험에 의해 이미 확인되었다(38). DMSO와 glycerol 등의 투과성 동결보존제만을 사용한 경우에, 비투과성 첨가제를 사용하지 않더라도 40-50% 정도의 생존율을 확보할 수 있었지만, 기존의 혈청을 이용한 동결보존 방법으로는 95% 이상의 생존율을 유지할 수 있으며, 실제 동결보존에 적용하기 위한 방법으로는 85% 이상의 생존율을 확보할 수 있어야 한다. 이 차이를 극복하기 위해 두 종류의 투과성 첨가제에 다양한 비투과성 첨가제를 혼합 사용하여 동결 및 해동 후의 생존율을 측정된 결과, 10% DMSO와 0.03M raffinose를 동시에 처리할 경우, 76%의 가장 높은 생존율을 보였다. 하지만, 이 역시 기존의 혈청을 이용한 동결보존 효과에는 미치지 못하였다(Fig. 2). Glycerol을 이용한 동결보존의 경우, osmotic stress를 받는 것으로 알려져 있는데(39), 투과성 첨가제만을 사용할 경우에는 20% glycerol을 사용하는 방법이 조금 높은 생존율을 보였지만, 투과성 첨가제와 비투과성 첨가제를 동시에 첨가할 경우는 10% DMSO와 동시에 처리한 경우가 전반적으로 우수

한 생존율을 보였다. 하지만 첨가제의 조합에 따른 생존율이 투과성과 비투과성 첨가제를 각각 처리한 경우와 상반된 결과를 보이기도 하므로 투과성 및 비투과성 첨가제의 최적화된 조합을 찾을 경우, 동결보존에서 혈청을 대체할 수 있을 것으로 기대된다.

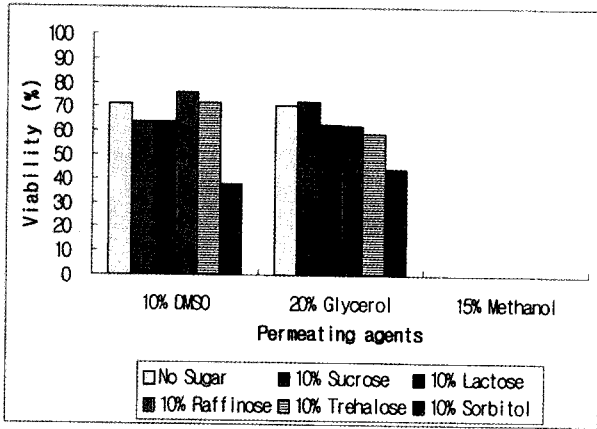


Figure 2. Effect of various permeating or non-permeating additives on the CHO cell viability during the cryopreservation.

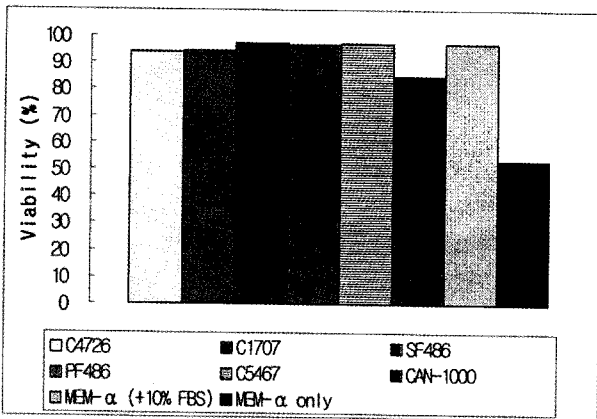


Figure 3. Effect of various serum-free media on the CHO cell viability during the cryopreservation.

무혈청 동결보존제와 무혈청 배지를 이용한 동결보존

MEM-α 배지에 투과성 및 비투과성 첨가제를 이용해 동결보존에서 생존율을 높이는 실험을 진행하는 것과 동시에 상용화된 무혈청 배지와 무혈청 동결보존제를 이용한 동결보존이 혈청 배지를 이용한 동결보존을 대체할 수 있는지 확인하였다. 시판중인 무혈청 배지를 이용하여 CHO 세포를 각각의 무혈청 배지에 적응시킨 후, 각각의 배지에 10% DMSO를 첨가하여 동결 및 해동 후 생존율을 측정하였다. 그 결과 무혈청 배지를 이용한 동결보존에서 모두 94% 이상의 우수한 동결보존 능력을 보였으며, C5467이나 SF486, PF486을 이용한 경우에는 10% 혈청을 이용한 동결보존과 거의 동일한 97% 이상의 생존율을 나타냈다. 이는 무혈청 동결보존제인 CAN-1000을 이용한 동결보존의 경우에 관찰되는 생존율보다 약 10% 가량 높은 생존율이며, 무혈청 배지를 이용한 동결보존이 혈청을 이용한 경우만

큼 우수한 동결보존 능력을 갖고 있음을 나타낸다(Fig. 3). 시판중인 무혈청 배지의 경우 그 조성이 공개되어 있지 않아 동결보존제 기능을 하는 물질이 첨가되었는지 알 수 없으나, 위에서 언급한 것처럼 혈청의 기능을 대체하기 위해 기본적으로 첨가되는 단백질이나 각종 성장인자, 항산화제 등이 동결보존제의 역할을 하는 것으로 생각된다(23-27). 하지만, 이러한 결과만으로는 무혈청 배지가 지니고 있는 동결보존제로서의 능력을 평가할 수 없으므로, 다양한 세포주에 대한 동결보존 및 해동 실험을 추가적으로 진행하였다.

다양한 세포주에 대한 무혈청 배지의 동결보존의 능력을 비교하기 위하여 무혈청 배지에 대한 적응과정 없이 CHO DG44, CHO DUKX, HDF, B16F10 등의 세포주를 10% DMSO가 첨가된 C5467 무혈청 배지에 동결보존 하였다. 또한 해동용액의 혈청 첨가여부가 세포의 생존율에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위한 실험을 동시에 진행하였다. Brockett의 실험에서 해동용액의 조성이나 해동 온도가 동결된 세포의 생존율에 영향을 주는 것으로 나타났다(40), 본 실험에서는 혈청 배지와 무혈청 배지의 해동능력을 평가하였다. 동결 및 해동 조건에 대한 실험 결과, 모든 조건의 과정에서 기존의 배양배지를 이용한 동결보존의 경우와 거의 차이가 없는 약 90% 이상의 생존율을 보였다. 이는 무혈청 배지를 이용한 동결보존 및 해동이 무혈청 배지에 적응되지 않은 세포주의 생존율에도 거의 영향을 주지 않는 것으로 볼 수 있으며, 무혈청 배지 자체에 혈청을 대체할만한 동결보존제로서의 능력이 있음을 짐작할 수 있다(Fig. 4).

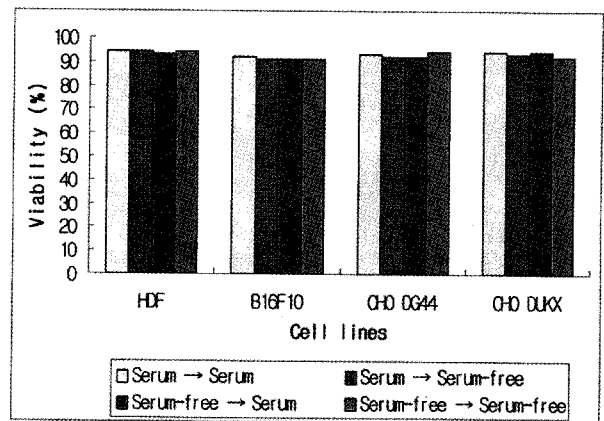


Figure 4. Change of the cell viability during the cryopreservation using various cell lines.

무혈청 배지를 이용한 장기간 동결보존의 유전적 안정성

혈청을 이용한 장기간 동결보존의 경우, 다양한 동물세포에 대한 생존율 및 회복율에 대한 실험이 진행되었으며, 세포의 종류에 따라 다양하지만 1-15년 혹은 그 이상의 기간에서도 세포주 동결보존의 안정성을 증명할 수 있었다(41, 42). 또한, 무혈청 배지를 이용한 동결보존의 경우, 3년 후의 동결보존 안정성에 대한 실험이 진행되었지만, 30% 이하의 생존율을 보이는 결과가 나타났다(43). 하지

만, 동결보존 기간에 따른 장기간 동결보존에 대한 검증이 진행되지 않았으므로, 무혈청 배지로 동결보존된 CHO 세포의 생존율 및 성장 회복율을 측정하고, 유전적 안정성을 확인하는 실험을 진행하였다.

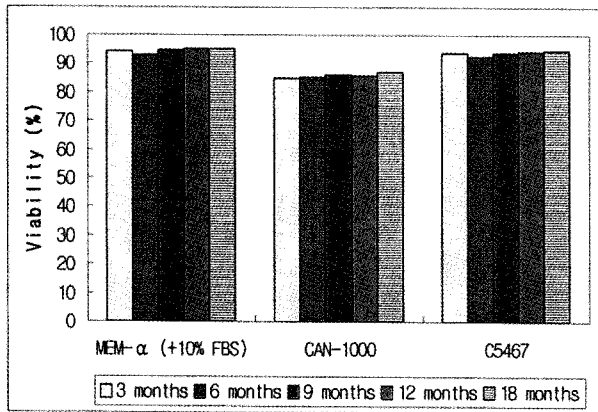
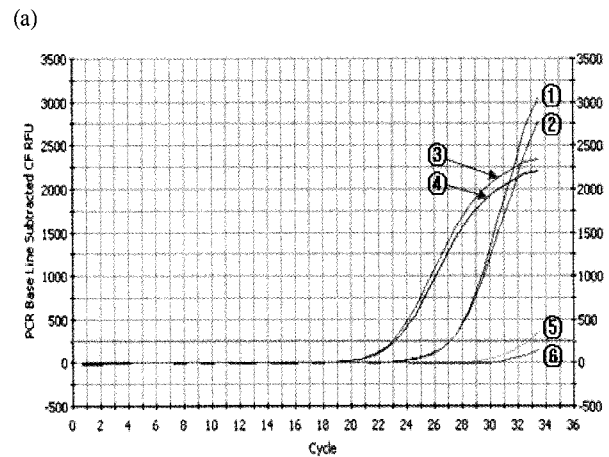


Figure 5. Change of the CHO cell viability during the long-term cryopreservation.

무혈청 배지의 동결보존 능력을 확인한 후, 장기간 동결보존에 있어서의 유전적 안정성을 평가하기 위하여 10% DMSO가 첨가된 무혈청 배지로 동결보존된 세포주를 3개월 단위로 해동하여 생존율과 성장 회복율을 확인하고, real-time RT-PCR을 통해 유전적 안정성을 확인하였다. 우선, 장기간 동결보존에 따른 생존율의 변화에 대한 실험의 경우, 무혈청 배지나 혈청 배지를 사용한 동결보존에서 18개월 동안 90% 이상의 생존율을 유지하고 있음을 확인할 수 있었다. 이 결과는 CAN-1000을 이용한 동결보존의 경우보다 5% 이상 높은 생존율이었으며, 세 가지 동결보존 방법 모두 보존기간에 따른 생존율의 변화는 거의 없었다 (Fig. 5). 또한, 해동 후의 성장 회복율을 평가한 결과, 혈청 배지와 무혈청 배지를 이용한 동결보존의 경우에는 보존기간에 따른 성장률의 변화가 거의 없었지만, 무혈청 동결보존체의 경우는 성장곡선의 유도기가 조금씩 길어지는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 6). 이는 무혈청 동결보존체를 이용한 장기간 동결보존이 생존율에는 거의 영향을 주지 않지만, 성장 회복율은 동결보존 기간에 영향을 받는 것으로 해석할 수 있다.

마지막으로 무혈청 배지를 이용한 장기간 동결보존이

삽입 유전자의 안정성에 미치는 영향을 평가한 결과, 혈청 배지와 동일한 유전적 안정성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. Real-time RT-PCR을 통해 CHO DHFR 유전자의 mRNA에 대한 Ct 값을 확인한 결과, 무혈청 배지를 이용하여 장기간 동결보존된 CHO 세포의 삽입 유전자가 혈청 배지의 경우와 동일한 Ct 값을 나타냈으며, control인 GAPDH mRNA의 RT-PCR 결과로 data를 검증할 수 있었다(Fig. 7).



(b)

Identifier	Threshold Cycle, Ct
① Serum, DHFR	27.1
② C5467, DHFR	27.1
③ Serum, GAPDH	22.9
④ C5467, GAPDH	23.1
⑤ Negative DHFR	N/A
⑥ Negative GAPDH	N/A

Figure 7. Result of the real-time RT-PCR to estimate the stability of the inserted CHO DHFR gene during the cryopreservation after 18 months ((a) Graph of the real-time RT-PCR; (b) Value of the threshold cycle).

생물공정에 있어 세포주의 보존 및 생산성 유지는 가장 중요한 요소 중에 하나이다. 동결보존을 이용하여 세포주를 보존하고, master cell bank와 working cell bank를 확립하여 생산에 이용하게 되는데, 기존에는 고농도의 혈청을 첨가하여 동결보존을 진행하였다. 위에서 언급한 것과 마찬가지로 혈청은 공정에 있어 여러 가지 문제점을 갖는데,

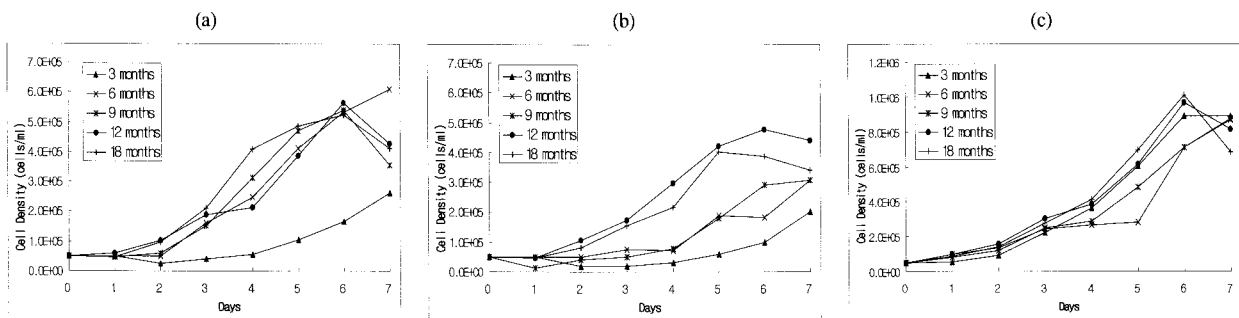


Figure 6. Change of the growth curves of the CHO cells after long-term cryopreservation ((a) Control, serum-containing; (b) Commercial cryoprotectant, CAN-1000; (c) Serum-free media, C5467).

현재 무혈청 배지를 이용한 세포주의 확립 및 생산공정은 validation 되어 있지만, 동결보존 방법에 있어서는 여전히 혈청이 사용되고 있다. 이는 cGMP의 개념에 맞지 않으며, 문제가 될 수도 있는 부분이기도 하다(44). 이에 본 실험은 무혈청 배지를 이용한 동결보존이 세포주의 안정성에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 진행되었다. 무혈청 배지를 이용한 동결보존의 다양한 실험 결과, 약 2년간의 동결보존에는 무혈청 배지를 사용하는 방법이 혈청을 사용하는 동결보존을 대체할 수 있을 것으로 판단되고, 무혈청 환경의 생물공정에서 사용되는 세포주 동결보존에서 혈청에 의한 교차오염 방지할 수 있을 것으로 생각된다.

무혈청 배지를 이용한 동결보존이 CHO 세포의 생존율 및 안정성을 유지할 수 있는 것으로 확인되었고, 기존의 혈청배지를 이용한 동결보존 방법을 대체할 수 있을 것으로 생각된다. 현재 무혈청 배지를 이용한 2년 이상 장기간 동결보존 후의 생존율 및 회복율, 유전자 안정성에 대한 실험이 진행 중이며, 생물공정에 있어 무혈청 배지를 이용한 동결보존 방법이 확립될 것으로 기대된다.

요 약

일반적인 세포주의 동결보존은 혈청이 첨가된 배양배지에 10% DMSO를 첨가하여 실행하게 된다. 그러나 무혈청 환경에서 배양되는 세포주를 이용하여 생물의약품 생산하는 공정에 사용되는 세포주의 경우는 교차오염 방지를 위해 동결보존 역시 혈청을 제거한 상태에서 실시되어야 한다. 본 실험은 무혈청 동결보존이 CHO 세포에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 실시되었다. 우선, 무혈청 동결보존에서 세포 생존율을 높이기 위해 투과성 및 비투과성 첨가제를 배지에 첨가하는 방법으로 동결보존 및 해동하여 생존율을 측정하였다. 그 결과, 10% DMSO와 0.03 M raffinose를 동시에 첨가한 경우에 76%의 생존율을 확보할 수 있었지만 기존의 혈청을 이용하는 동결보존에는 미치지 못하였다. 두 번째로 무혈청 배지의 동결보존 능력을 알아보기 위해 시판 중인 무혈청 배지와 무혈청 동결보존제를 사용하여 동결보존 후의 생존율을 비교한 결과, 무혈청 배지를 이용한 실험에서는 혈청 배지를 이용한 동결보존과 유사한 95% 이상의 생존율을 확인할 수 있었다. 이는 무혈청 동결보존제의 동결보존 능력보다 우수한 결과이다. 마지막으로 무혈청 배지를 이용한 장기간 동결보존에서 CHO 세포의 안정성을 확인하기 위하여 무혈청 배지로 동결보존된 CHO 세포를 3개월 단위로 해동하여 생존율 및 성장 회복율을 측정하고, real-time RT-PCR을 통해 삽입된 CHO DHFR 유전자의 안정성을 평가하였다. 혈청배지와 비교할 때, 생존율과 성장 회복율, 유전자 안정성 측면에서 모두 동일한 결과를 보여, 무혈청 배지를 이용한 18개월 이상의 동결보존이 안정적임을 검증할 수 있었다. 결과적으로 생물의약품 공정에서 무혈청 배지를 이용한 동결보존이 혈청을 이용한 동결보존을 대체할 수 있을 것으로 생각된다.

REFERENCES

- Link, T., M. Bäckström, and T. Noll (2004), Bioprocess development for the production of a recombinant MUC1 fusion protein expressed by CHO-K1 cells in protein-free medium, *Journal of Biotechnology* **110**(1), 51-62.
- Nam, S. W. (1995), Antitumor activities of polysaccharides fractuubized from *Zoogloea* sp. against meth a cells, *Korean Journal of Life Science* **5**(2), 90-100.
- Karlsson, J. O. M. and M. Toner (2000), Cryopreservation, In Principles of Tissue Engineering, 2nd edition, p293-307, Academic Press, San Diego.
- Davis, J. M. (2001), Basic cell culture. 2nd edition, p176-186, Oxford University Press, New York.
- Martin, Moe S. W., W. H. Kelsey, and M. A. Karmarck (2000), Process validation in biopharmaceutical manufacturing, *Biopharmaceutical Process Validation*, 287-298.
- Mazur, P., S. P. Leibo, and E. H. Chu (1972), A two-factor hypothesis of freezing injury: Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells, *Exp. Cell Res.* **71**(2), 345-355.
- Toner, M. (1993), Nucleation of ice crystals inside biological cells, In Advances in Low-Temperature Biology, Vol. 2. P. L. Steponkus, editor. p1-51, JAI Press, London.
- Hubel, A., E. G. Cravalho, B. Nunner, and C. Korber (1992), Survival of directionally solidified B lymphoblasts under various crystal growth conditions, *Cryobiology* **29**(2), 183-98.
- Ishiguro, H. and B. Rubinsky (1994), Mechanical interactions between ice crystals and red blood cells during directional solidification, *Cryobiology* **31**(5), 483-500.
- Mazur, P., W. F. Rall, and N. Rigopoulos (1981), Relative contributions of the fraction of unfrozen water and of salt concentration to the survival of slowly frozen human erythrocytes, *Biophys. J.* **36**(3), 653-675.
- Liu, Z. and R. H. Foote (1998), Osmotic effects on volume and motility of bull sperm exposed to membrane permeable and nonpermeable agents, *Cryobiology* **37**(3), 207-218.
- Rowley, S. D. (1992), Hematopoietic stem cell cryopreservation: A review of current techniques, *Journal of Hematology* **1**, 233-250.
- Foster, P. R. (1999), Assessment of the potential of plasma fractionation processes to remove causative agents of transmissible spongiform encephalopathy, *Transfus. Med.* **9**(1), 3-14.
- Liu, Chi-Hsein, I-Ming Chu, and Shiao-Min Hwang (2001), Factorial designs combined with the steepest ascent method to optimize serum-free media for CHO cells, *Enzyme and Microbial Technology* **28**, 314-321.
- Igudin, L. I., S. D. Orlov, N. V. Katsnel'son, and G. A. Markman (1983), Relationship between bovine serum composition and its capacity to stimulate cell culture growth, *Tsitologiia* **25**(10), 1216-1218.
- Boyd, J. W. (1989), Relationships between acid-base balance, serum composition and colostrum absorption in newborn calves, *Br. Vet. J.* **145**(3), 249-256.
- Omar Lupi (2002), Prions in dermatology, *Journal of the American Academy of Dermatology* **46**(5), 790-793.
- Jochems C. E, J. B. van der Valk, F. R. Stafleu, and V. Baumanns (2002), The use of fetal bovine serum: ethical or scientific problem?, *Altern. Lab Anim.* **30**(2), 219-227.
- Zabal, O., A. L. Kobrak, I. A. Lager, A. A. Schudel, and E. L. Weber (2000), Contamination of bovine fetal serum with bovine viral diarrhoea virus, *Rev. Argent Microbiol.* **32**(1), 27-32.
- David, W. Jayme and Shawn R. Smith (2000), Media formulation options and manufacturing process controls to safeguard against introduction of animal origin contaminants in animal cell culture, *Cytotechnology* **33**(1-3), 27-36.

21. David, J., W. Toshio, and S. Toshiaki (1997), Basal medium development for serum-free culture: a historical perspective, *Cytotechnology* **23**(1-3), 95-101.
22. Merten, O. W. (1999), Safety issues of animal products used in serum-free media, *Dev. Biol. Stand.* **99**, 167-180.
23. Nakamura, T., O. Asami, K. Tanaka, and A. Ichihara (1984), Increased survival of rat hepatocytes in serum-free medium by inhibition of a trypsin-like protease associated with their plasma membranes, *Exp. Cell Res.* **155**(1), 81-91.
24. Regina Labitzke and Peter Friedl (2001), A serum-free medium formulation supporting growth of human umbilical cord vein endothelial cells in long-term cultivation, *Cytotechnology* **35**(2), 87-92.
25. Shamsuddin M., B. Larsson, and H. Rodriguez-Martinez (1993), Culture of bovine IVM/IVF embryos up to blastocyst stage in semi-defined medium using insulin, transferrin and selenium or growth factors, *Reproduction of Domestic Animals* **28**, 209-210.
26. Metcalfe, H., R. P. Field, and S. J. Froud (1994), The use of 2-hydroxy-2,4,6-cycloheptarin-1-one (tropolone) as a replacement for transferrin, In *Animal Cell Technology: Products of Today, Prospects for Tomorrow*, R. E. Spier, J. B. Griffiths, and W. Berthold, Eds., Butterworth-Heinemann, Oxford, 88-90.
27. Raghu, H. M., S. Nandi, and S. M. Reddy (2002), Effect of insulin, transferrin and selenium and epidermal growth factor on development of buffalo oocytes to the blastocyst stage in vitro in serum-free, semidefined media, *Veterinary Record* **151**, 260-265.
28. Merten, O. W. (2002), Development of serum-free media for cell growth and production of viruses/viral vaccines: safety issues of animal products used in serum-free media, *Dev. Biol. (Basel)* **111**, 233-257.
29. Corsini Joe, Christy Hacker and Charles Bare (2004), Serum-free cryopreservation of five mammalian cell lines in either a pelleted or suspended state, *Biol. Proced. Online* **6**(1), 61-66.
30. Sikorskya Jan A., Donald A. Primerano, Terry W. Fenger, and James Denvir (2004), Effect of DNA damage on PCR amplification efficiency with the relative threshold cycle method, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **323**, 823-830.
31. Crouse, G. F., R. N. McEwan, and M. L. Pearson (1983), Expression and amplification of engineered mouse dihydrofolate reductase minigenes, *Mol. Cell. Biol.* **3**, 257-266.
32. Kelbe, R. J. and M. G. Mancuso (1983), Identification of new cryoprotective agents for cultured mammalian cells, *In Vitro* **19**, 167-170.
33. Dobo, I., P. Mossuz, L. Campos, F. Girodon, A. Allegraud, V. Latger-Cannard, N. Boiret, D. Pineau, E. Wunder, M. Zandecki, V. Praloran, and S. Hermouet (2001) Comparison of four serum-free, cytokine-free media for analysis of endogenous erythroid colony growth in polycythemia vera and essential thrombocythemia, *Hematol J.* **2**(6), 396-403.
34. Collier Hilary A., Carla Grandori, Pablo Tamayo, Trent Colbert, Eric S. Lander, Robert N. Eisenman, and Todd R. Golub (2000), Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion, *PNAS* **97**(7), 3260-3265.
35. Shaw, J. M. and A. O. Trounson (1989), Effect of dimethyl sulfoxide and protein concentration on the viability of two-cell mouse embryos frozen with a rapid freezing technique, *Cryobiology* **26**(5), 413-421.
36. Cheng, Y., Y. F. Liu, and J. Liang (2002), Protective effect of zinc: a potent heat shock protein inducer in cold preservation of rat liver, *Hepatobiliary Pancreat Dis. Int.* **1**(2), 258-61.
37. Askari, H. A., J. H. Check, N. Peymer, and A. Bollendorf (1994), Effect of natural antioxidants tocopherol and ascorbic acids in maintenance of sperm activity during freeze-thaw process, *Archives of Andrology* **33**, 11-15.
38. Bourne, W. M., D. R. Shearer, and L. R. Nelson (1994), Human corneal endothelial tolerance to glycerol, dimethylsulfoxide, 1,2-propanediol, and 2,3-butanediol, *Cryobiology* **31**(1), 1-9.
39. Dooley, D. C., P. Law, P. Schork, and H. T. Meryman (1982), Glycerolization of the human neutrophil for cryopreservation: osmotic response of the cell, *Exp. Hematol* **10**(5), 423-434.
40. Chen, Y., R. H. Foote, and C. C. Brockett (1993), Effect of sucrose, trehalose, hypotaurine, taurine, and blood serum on survival of frozen bull sperm, *Cryobiology* **30**(4), 423-431.
41. Elisabeth, E. S., E. W. Nicole, A. M. Katherine, M. L. Raymond, and J. R. Scott (2002), Cryopreserved human haematopoietic stem cells retain engraftment potential after extended (5-14 years) cryostorage, *Cryobiology* **44**(3), 210-217.
42. Lusinskas, F. W., F. J. Lionetti, A. J. Melaragno, and C. R. Valeri (1983), Long-term cryopreservation of dog granulocytes, *Cryobiology* **20**(1), 1-6.
43. Van Langendonck A., A. Vansteenbrugge, I. Donnay, U. Berg, E. Semple, B. Grisart, P. Mermillod, G. Brem, A. Massip, and F. Dessy (1996), Three year results of in vitro production of bovine embryos in serum-poor bovine oviduct conditioned medium, *Reprod Nutr. Dev.* **36**(5), 493-502.
44. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (1998), International Conference on Harmonisation; Guidance on Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived From Cell Lines of Human or Animal Origin; Availability, *Federal Register* **63**(185).