

동물 세포 배양에 의한 물질생산 model 에 관한 연구

이현용·강재구

강원대학교 식품공학과
(1988년 12월 26일 접수, 1989년 3월 20일 채택)

Kinetics of Producing Products from Mammalian Cell Cultivation

Hyeon Yong Lee and Jae K. Kang

Department of Food Engineering, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea
(Received 26 December 1988; accepted 20 March 1989)

요 약

연속 배양 공법하에서, product 생산을 예측 및 조절할 수 있는 product formation model을 유도해, tPA, EPO와 pro-UK 생산자료에 적용시킨 결과, 세 경우 다 correlation factor가 0.90에서 0.93으로 잘 맞음을 확인했으며, 이 model의 상수인 α 와 β 가 shear stress 및 용존산소에 크게 영향을 받음을 알 수 있었다. EPO 생산을 위한 최적조건은 35%의 용존산소와 25-50 rpm이 교반속도였다.

Abstract—A product formation model including growth associated and maintenance terms is developed for the growth of mammalian cells under Perfusion Chemostat (PC) cultivation. Two parameters in this model, growth associated term, α , and maintenance factor, β , are estimated for the production of tPA, EPO and pro-UK, and fitting these data with correlation factors of 0.90 to 0.93 for each case. It turned out that essential factors for cell growth, such as shear stress and dissolved oxygen tension play important role with respect to productivity, showing optimal values of 30-40% of dissolved oxygen tension and 20-50 rpm of agitation speed for the production of EPO from recombinant CHO cells.

1. 서 론

최근 일반 미생물의 발효공정보다 제약조건이 많은 동물 세포 배양에서, 의약품의 생산에 관한 많은 연구가 진행되고 있다[1-19]. 그 주된 이유는 동물 세포가 인체조성과 유사할 뿐만 아니라, 미생물이 생산할 수 없는 특이한 단백질의 생성이 가능하며, 생성 단백질의 의약적 특이성이 높기 때문이다[5, 6]. 하지만 이런 장점에도 불구하고 세포 배양에 관한 생물공학적 연구가 미흡한 실정이다. 특히, 공업화를 위한 대량 배양에 대해서는, 새로운 배양조 및 배양 공법의 개발이 활발히 추진되고 있지만[7-9], 아직은 초보적인 단계라고

할 수 있다.

따라서 최근 그 우수성이 입증되고 있는 연속 배양 공정(Perfusion Chemostat, PC system)으로 세포의 대량 배양에 의한[10, 11], 의약적 가치가 높은 단백질의 생산에 관한 동력학적 model의 설정 및 타당성을 입증하고자 한다. 이 model의 유도로서, 연속 배양시 배양 공정의 조절에 의해 생산성 예측 및 조절이 용이할 것이다.

2. 이 론

본 논문에서 사용된 세포주들은 SV-40 transform

된 Chinese Hamster Ovary(CHO K-1)와 Hamster Kidney(BHK-21)로서, Erythropoietin(EPO)과 tissue Plasminogen Activator(tPA)는 recombinant CHO 세포에서, pro-Urokinase는 정상 kidney 세포를 사용했다. 각 세포주의 배양 및 scale-up 과정은 이의 논문에서 자세히 기술돼 있다[12-14]. 생성되는 단백질은 특히 monoclonal antibodies로서 Enzyme Linked Immunosorbent Assay(ELISA)에 의해 정량 측정됐다[15].

배지를 perfusion 시키기 위해 배양조 상부에 원통형의 compartment를 설치해, microcarrier를 임시 침전시킬 수 있는 settling bottle을 이용해 bead가 filtration system(hollow-fiber)로 가기 전에 일단 걸러고 hollow fiber에서 다시 걸러진 세포를 배양기로 recycle 시키는 방법을 사용했다[7]. 세포수는 0.1%(w/w) crystal violet(Sigma, USA)을 사용하는 nuclei count 방법을 사용해 측정했다[20].

연속 배양 공정(Perfusion Chemostat, PC system)하에서 단백질 생산의 동력학적 이해를 위해 여러 product 생산 model 중 growth associated와 non-growth associated term들을 동시에 포함하고 있는 model[16]을 채택했다. 그 이유는 대부분의 동물 세포에서 분비되는 단백질들은 생체 대사 energy를 생산하는 과정에서 생성되므로[17], 이같은 energy-yielding metabolism에 적합하기 때문이다[18].

따라서, 세포 성장에 따른 체외 단백질 생성속도는 다음과 같이 표시될 수 있다.

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \cdot \frac{dX}{dt} + \beta \cdot X \quad (1)$$

여기서 P는 생산되는 단백질량($\mu\text{g/ml}$), X는 세포수(viable cells/ml)이고 t는 배양시간(hour)이며, α 와 β 는 물질생산 상수로서 각각 cell growth와 maintenance term이 고려된 것으로, 각각 growth-associated term($\mu\text{g protein/ml}$)과 non-growth associated term($\mu\text{g/cells/h}$)으로 표시된다.

식 (1)을 정리하면

$$\frac{1}{X} \frac{dP}{dt} = \alpha \cdot \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} + \beta \quad (2)$$

로 표시되는데, 여기서 $(1/X) (dP/dt)$ 는 specific product formation rate, q_p ($\mu\text{g/cells/h}$)고 $(1/X) (dX/dt)$ 는 specific growth rate, μ (1/h)이다. 따라서 식(2)는

$$q_p = \alpha \cdot \mu + \beta \quad (3)$$

로 간단히 나타내진다. 연속 배양 공법(PC)하에서 μ 는 공정조절변수인 dilution rate, D(1/h)와 다음과 같은 상호관계가 있음이 입증됐다[19].

$$\mu = (1 + \gamma - \gamma \times f) \times D \quad (4)$$

여기서 γ 는 recycle ratio이고, f는 세포 농축도이다. 이 γ 와 f는 perfusion system에서의 공정상수로 정상적인 운영조건에서는, γ 는 0.01, f는 90이다[19]. 이같이 식 (4)에 의해 specific growth rate가 공정변수인 dilution rate와 직선관계가 있으므로, 식 (3)과 (4)의 결합에 의해 다음과 같은 결과 식이 유도된다.

$$q_p = \alpha \times (1 + \gamma - \gamma \times f) \times D + \beta \quad (5)$$

여기서 γ 는 0.01이고 f는 90이므로,

$$q_p = 0.09 \times \alpha \times D + \beta \quad (6)$$

로 정리된다. 따라서, 배양조 외부에서 배지의 이동속도의 변화에 따라 세포 성장속도 및 단백질의 생산성을 조절할 수 있다. 여기서 배지의 이동속도를 바꾼 후 system이 steady state에 도달될 때까지 약 48-50시간 정도 일정 시간마다 cell density를 측정해 세포수의 변화가 없는 것으로 system의 안정도를 확인했다. 배지의 이동속도가 너무 빠르면, 즉 식 (4)의 직선관계를 넘으면, wash-out 현상이 일어나 cell density 및 productivity가 떨어질 것이다. 이때의 dilution rate이 이 PC system의 한계속도이다.

3. 결과 및 고찰

Table 1은 recombinant CHO 세포주를 이용해 연속 배양 공법으로 EPO를 생산한 결과이다. 배지의 이동속도(dilution rate)를 바꿀 때마다 생균수와 EPO 양을 측정했으며, Q_p 는 specific product formation rate다. Dilution rate가 증가함에 따라 세포수 및 product 양이 증가함을 알 수 있다. 하지만 0.0226과 0.0202(1/h)의 dilution rate에서는 세포수가 낮은 배지 이동속도의 경우보다 적었다. 이와는 반대로 EPO의 생산량은 감소되지 않았다. 그 이유는 이 세포가 고 농도에서 서로 clumping이 되기 때문에 세포수의 측정이 정확하지 않기 때문이다[19, 21]. 이 결과를 그림으로 나타낸 것이 Fig. 1이다. 원으로 표기된 것이 세포수이고, 삼각형이 product로서 EPO 생산량이 세포 증식과 비례관계에 있어, 세포수가 일정수에 도달했을 때 최대 product를 생산함을 알 수 있다. 이 경우

Table 1. Results of cultivating recombinant CHO (CHO K-1) cells under Perfusion Chemostat operation*[13]

Dilution rate, D (1/h)	Cell Density, X ($\times 10^5$ cells/ml)	Product (EPO) Conc., P ($\mu\text{g/ml}$)	Specific Product Formation Rate, $Q_p \times 10^7$ ($\mu\text{g/cells/h}$)
0.0031	1.00	1.41	0.43
0.0037	2.01	1.74	0.84
0.0159	8.70	8.40	1.50
0.0196	9.30	9.85	2.10
0.0202	7.40	8.30	2.27
0.0226	5.10	6.31	2.80

* Cultured with Rubb's Essential media with 5% of FBS, $6\mu\text{M}$ of glutamine and 75 nM of Methylothredate at 37°C .

Working volume of the reactor was 100 liter.

A sail type agitator with four blades was used [7].

는 dilution rate 이 $0.020(1/\text{h})$ 일 때 최대치를 이루고 있으며, 높은 dilution rate ($>0.022\text{ 1/h}$)인 경우 세포수의 감소와 함께 product 량도 줄어들었다.

Fig. 2는 Table 1의 결과로, 식 (6)의 관계를 검토한 것으로, dilution rate에 따른 specific product formation rate의 상관도를 나타내고 있다. 직선은 data point를 linear regression시킨 결과로, correlation factor, ρ 가 0.93이었다. 이 linear regression 결과로 product constant, α 와 β 는 각

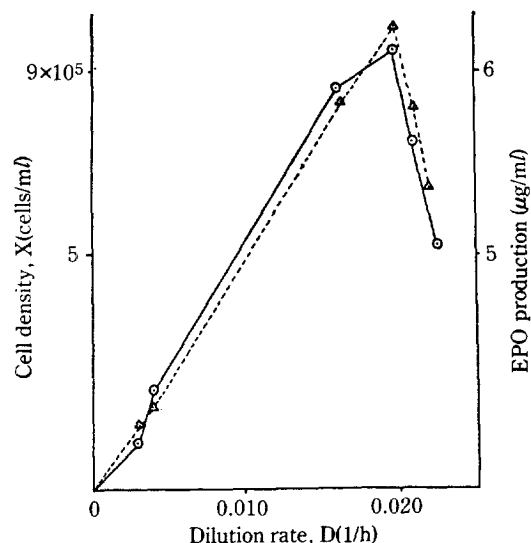


Fig. 1. Results of plotting data from Table 1; ○, —, cell density (cells/ml); Δ, ----, product conc. ($\mu\text{g/ml}$).

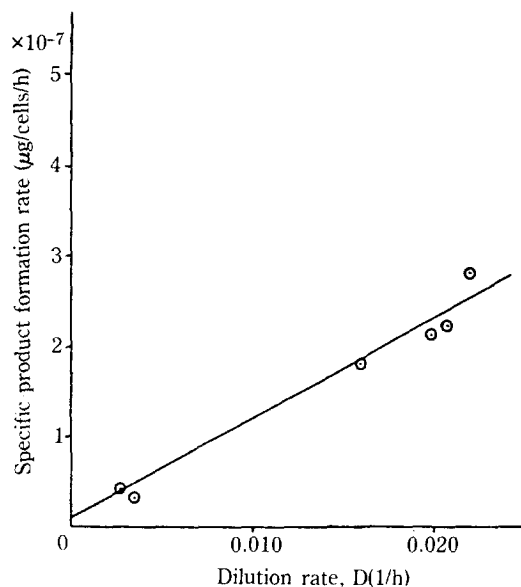


Fig. 2. Correlation between dilution rate and specific EPO product formation rate. Solid line is the result of linear regression analysis.

각 $11.01 \times 10^{-5} (\mu\text{g/cells})$ 와 $0.11 \times 10^{-7} (\mu\text{g/cells/h})$ 로 계산되었다. 이 product constant들은 명백히 culture parameter들에 영향을 받으므로[16], 세포 배양시 가장 중요한 변수들인 dissolved oxygen 농도

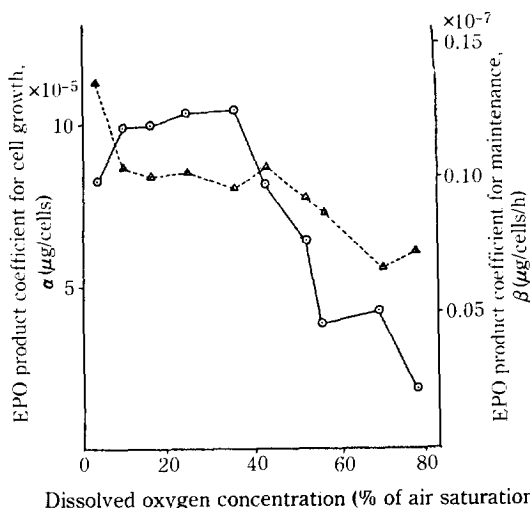


Fig. 3. Product constants as a function of dissolved oxygen conc. in cultivating recombinant CHO cells; ○, —, growth associated term ($\mu\text{g/cells}$); Δ, ----, maintenance term ($\mu\text{g/cells/h}$).

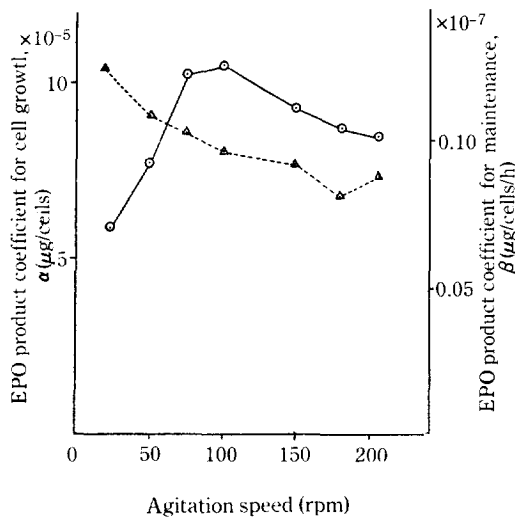


Fig. 4. The effect of shear stress on product formation coefficient; \circ , —, growth associated term ($\mu\text{g}/\text{cells}$); \triangle , ---, maintenance associated term ($\mu\text{g}/\text{cells}/\text{h}$).

와 shear stress와의 관계를 확인한 결과가 Fig. 3과 4이다.

Fig. 3은 용존산소량을 변화시키면서 식 (5)를 이용해 product constant, α , β 를 계산한 것이다. 각 용존산소에서의 α 와 β 값은 dilution rate를 여섯번 이상 변화시킨 자료를 식 (6)을 이용해 linear regression시킨 결과이다. 용존산소량이 30-40%일때, growth associated constant인 α 가 최대치를 나타내고 있어 이때의 용존산소량이 product 생산의 최적조건임을 암시하고 있다. 특히 이 product constant들은 낮은 용존산소 농도에서 민감한 반응을 나타냈다. Fig. 4는 shear stress와 product constant의 상관도를 보기 위해 교반속도를 변화시켜, product constant를 측정했다. Fig. 4에서 shear stress의 계산치 대신에 shear rate와 직접 관계가 있는 rpm만을 표시한 이유는 Table 1에서 언급한 바와 같이 본 실험에 사용된 배양조의 교반방식은 shear stress를 줄이기 위해, 일반 impeller와 다른 돛(sail) 모양으로 만들었기 때문에 기존의 shear stress의 계산방식으로는 무리가 있어, 측정된 rpm으로 표시했다. 따라서 이 교반 system의 shear stress에 관한 연구가 있어야 할 것이다. 높은 rpm(>100 rpm)에서 세포 성장 속도의 감소에 따른 product constant가 급격히 떨어졌다. 그 이유는 강한 교반에 의한 세포의 damage를 생각할 수 있다. 따라서 operational 교반속도는 100

Table 2. Results of estimating product formation parameters for the growth of several animal cells

Products	Product Parameters		Correlation Factor, ρ
	α $\times 10^5(\mu\text{g}/\text{ml})$	β $\times 10^7(\mu\text{g}/\text{cells}/\text{h})$	
tPA*	17.30	0.05	0.91
EPO**	11.01	0.11	0.93
pro-UK***	3.89	0.33	0.90

* Cultured with DMEM with 10% of FBS and 55 nM of MTX [12].

** From Table 1

*** Cultured with DMEM with 10% of FBS and 10 mM of glutamine [14].

rpm을 초과하지 말아야 될 것이다. 또한 극히 낮은 rpm(<15 rpm)의 경우는 효과적인 산소전달이 제한된 non-growth 상태이므로 maintenance energy term, β 값이 높게 나타났다.

Table 2는 앞에서 유도된 product model의 타당성을 확인하기 위해 EPO 이외의 product, tPA와 pro-Urokinase의 생산자료를 식 (6)으로 regression시킨 결과로서, 마지막 column의 상관도가 0.9 이상이므로 식 (6)과 밀접한 상관관계가 있음이 입증됐다. 따라서 유도식 (6)이 세포 배양에 의한 물질생산을 설명할 수 있을 것이다. 또한 세 물질중 tPA의 α 값이 가장 큰 데, 이는 tPA 생산속도가 가장 빠름을 암시한다. Pro-UK의 생산속도가 낮은 이유는 이 product는 transformed 세포가 아닌 정상 세포주로부터 분리되기 때문이다.

4. 결 론

동물 세포 배양시 생산되는 물질의 동력학적 접근에 의해, 연속 배양시 세포 성장 조절인자인 배지 이동속도의 조절에 따른 product model을 유도해, 몇 종의 주요 세포 분비물 data에 적용시켜 본 결과, 서로 잘 상충됨을 알 수 있었다. 더불어 유도 model의 상수들을 측정했으며, 이들은 세포 성장의 주요 factor인 용존산소량과 shear stress와 함수관계를 나타냈다. 따라서 이 product formation model의 정립으로, 세포의 대량 배양이 가능한 연속 배양 방식에서 dilution rate의 조절로서 product 생산량을 예측할 수 있을 뿐만 아니라, productivity의 조절가능성에 따른 배양 공정의 scale-up에 필요한 생물공학적 자료를 제공할 수

있게 됐다. 더불어 보다 정확한 model의 설정을 위해 많은 실험자료와 비교, 분석해야 될 것이다.

REFERENCES

1. Griffiths, J.B.: *Dev. Biol. Stand.*, **55**, 113 (1984).
2. Jensen, M.D.: *Biotech. Bioeng.*, **23**, 2703 (1981).
3. Nilsson, K. and Mosbach, K.: *FEBS Lett.*, **118**, 145 (1980).
4. Good, N.E.: *Biochem.*, **5**, 467 (1966).
5. Tovey, M.G.: *Adv. Cancer Res.*, **33**, 1 (1980).
6. Collen, D.: *Arteriosclerosis*, **4**, 579 (1984).
7. Tolbert, W. and Feder, J.: *Sci. Am.*, **248**, 24 (1983).
8. Hu, W.S. and Wang, D.I.C.: *Biotech. Bioeng.*, **30**, 548 (1987).
9. Feder, J. and Tolbert, W. (eds.): "Large Scale Mammalian Cell Culture", Academic Press, New York (1985).
10. Tolbert, W.R. and Srigley, W.R.: *Biopharm.*, **2**, 149 (1987).
11. Nilsson, K., Scheirer, W., Merton, O.W., Ostberg, L., Leihl, E., Katinger, H.W., and Mosbach, K.: *Nature*, **302**, 629 (1983).
12. Lee, H.Y.: *Kor. J. Appl. Microbio. Bioeng.*, **16**, 266 (1988).
13. Lee, H.Y.: *Kor. J. Biochem. Eng.*, **4**, 36 (1989).
14. Lee, H.Y. and Kim, G.S.: "Kinetic Studies of Mammalian Cell Culture to Produce Pro-Urokinase", presented at SICHEM 88 symposium, Nov. 23-26, KOEX, Korea (1988).
15. Freshney, R.I. (ed.): "Culture of Animal Cells", Alan R. Liss, Inc., New York (1983).
16. Leudeking, R. and Piret, E.L.: *J. Biochem. Microbiol. Tech.*, **1**, 393 (1959).
17. Atkinson, B. and Mavituna, F. (eds.): "Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook", pp. 307, The Nature Press, London (1983).
18. Bailey, J.E. and Ollis, D.F. (eds.): "Biochemical Engineering Fundamentals", (2nd ed.), pp. 421, McGraw-hill Co. New York (1986).
19. Lee, H.Y.: *Kor. J. Chem. Eng.*, **26**, 659 (1988).
20. van Wezel, A.L.: *Nature*, **216**, 64 (1967).
21. Lee, H.Y.: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **16**, 282 (1988).