

## 혈청배지와 무혈청배지에서의 재조합 CHO 세포 성장과 Erythropoietin 생산

변태호·<sup>†</sup>전복환·김진만·장신재·오한규·허재욱·김희철

(주)녹십자 종합연구소, <sup>†</sup>목암생명공학연구소

### Characteristics of Recombinant CHO Cell Growth and Erythropoietin Production in Serum-Containing Media and Serum-Free Media

Tae-Ho Byun, Bok-Hwan Chun<sup>†</sup>, Jin-Man Kim, Shin-Jae Chang  
Han-Kyu Oh, Jae-Wook Huh, and Hee-Chul Kim

Central Research Institute, Korea Green Cross Corp., Yongin, Kyunggi 449-900, Korea  
Mogam Biotechnology Research Institute, Yongin, Kyunggi 449-910, Korea

#### ABSTRACT

We have investigated the characteristics of recombinant CHO cell growth and erythropoietin(EPO) production at different concentrations of serum and inoculation density. Cell growth and EPO production were increased with the increase of serum concentration and inoculation density. Enhancement of CHO cell growth and EPO production by medium exchange using serum-free medium at the growth phase of cells was studied. It was found that the exchange of culture medium with serum-free medium was favorable for growth of cells and production of EPO. The maximum number of cell and concentration of EPO obtained by exchanging culture medium were  $6.2 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> and 7,470 units/ml, respectively, compared to  $2.1 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> and 2,380 units/ml in serum-containing medium without medium exchange. It was observed that CHO cell growth was correlated with EPO production in serum-free media.

#### 서론

적혈구 생성 자극 물질로 알려진 erythropoietin (EPO)은 1985년 Genetic Institute사와 Amgen사에 의해 EPO 유전자의 클론이 성공되어 재조합 human erythropoietin(rHuEPO)의 생산이 가능하게 되었다(1, 2). 재조합된 세포에서 생산한 rHuEPO는 노

에서 분리한 천연형 EPO와 면역학적 성상, 아미노산 배열, 당쇄 구조, 생물학적 활성 등이 동일하여 rHuEPO에 대한 항체는 생기지 않는 것으로 보고 되었으며, 실제로 rHuEPO가 1989년 시판되어 만성신부전 환자의 빈혈 치료에 효과적으로 응용되고 있어서 수혈에 따른 감염, 세포 독성, 항체 발생, 철분 저장 과다 등의 위험이 사라지게 되었다.

재조합 산물을 세포 배양으로 대량 생산하여 상품화하기 위해서는 세포 성장 및 재조합 산물의 생산

<sup>†</sup> Corresponding Author

에 미치는 여러 조건들을 최적화하여야 한다. 그러므로, 재조합 산물을 세포배양으로 대량생산하기 전에 실험실적 소규모 배양에서부터 세포의 배양 특성 및 목적 산물의 생산에 미치는 여러 요소들을 정확하게 이해하여야 할 필요가 있다. 특히 재조합된 동물세포 자체의 조절 능력이나 제한된 생산력을 고려할 때 세포 배양을 통하여 목적하는 재조합 물질을 고농도로 생산하는 것은 매우 까다로운 공정이므로 생산성이 높은 세포주의 개발, 단위 부피당 생산성을 높이기 위한 고농도 세포배양 및 배양 공정의 최적화, 정제 수율을 높이기 위한 저혈청배지나 무혈청배지의 사용 등 여러 측면에서 연구가 진행되고 있다(3-9). 더욱이 상업적으로 유용한 물질을 경제적으로 대량생산 하기 위해서는 저혈청 배지나 무혈청 배지의 사용을 세포배양 초기단계에서부터 고려하여 그 조건을 확립하지 않으면 안된다.

따라서 본 연구에서는 재조합 rHuEPO를 생산하도록 유전자가 재조합된 Chinese Hamster Ovary (CHO) 세포의 성장 특성과 EPO 생산 정도에 미치는 혈청 농도의 영향을 조사하였으며, 특히 혈청 배지에서 세포를 배양한 후 무혈청배지로 배지를 교환하였을 경우 세포 성장과 EPO 생산 수준의 차이를 조사하여 무혈청배지로 교환된 배양에서의 세포 성장과 EPO 생산 수준과의 상호 관계를 이해함으로써 보다 효율적인 세포 성장과 EPO 생산을 위한 기본 배양 조건을 확립하였다.

## 재료 및 방법

### 세포 및 세포 배양

본 실험에 사용한 세포주는 rHuEPO를 생산하도록 유전자 재조합된 CHO 세포이다. 이 CHO 세포는 5% CO<sub>2</sub>가 유지되는 CO<sub>2</sub> 배양기에서 5%(v/v) FBSd(fetal bovine serum dialyzed; GibcoBRL, U.S.A.)가 첨가된 MEM $\alpha$ (minimum essential medium alpha; GibcoBRL, U.S.A.) 배지를 이용하여 T-flask(75cm<sup>2</sup>, Costar, U.S.A.)에서 정지배양하여 유지하였으며, T-flask에서 거의 단층을 형성한 CHO 세포를 0.25% Trypsin(Difco) 처리하여 수확한 후, 동일 배지에서 1:4의 비율로 계대배양하였다. 한편 본 실험에 사용된 재조합 CHO 세포는 rHuEPO의 발현을 증폭시키기 위하여 최종적으로 50 $\mu$ M의 methotrexate(MTX, 50mg/vial, 녹십자)에서 선발되어 안정화된 세포주로서 안정된 세포 성장과 EPO 생산을 위하여 seed-lot system을 사용

하였으며, 본 실험 수행중에는 별도의 MTX를 첨가하지 않고 배양하였다.

### 무혈청배지 교환에 의한 세포 배양

혈청배지에서 3일 동안 완전히 성장된 CHO 세포로부터 배양 배지를 제거하고, T-flask 표면에 부착된 세포를 PBS(phosphate buffered saline, pH 7.4)로 세척 후 무혈청배지로 교환하였다. 사용된 무혈청배지는 CHO 세포를 배양하기 위하여 특별히 제조되어 상업화된 HyQ-CCM5(Hyclone, U.S.A.), CHO-S-SFM(Gibco, U.S.A.), CHO-S-SFMII(Gibco, U.S.A.) 등을 사용하였으며, 별도의 무혈청배지 적용 과정은 거치지 않고 직접 배양 배지를 무혈청배지로 교환하는 방법으로 세포 성장과 EPO 생산을 조사하였다. 배지를 무혈청배지로 교환한 후 부착성 세포인 CHO 세포가 무혈청 배양에 의해 변화되는 세포 성장 정도는 trypan blue를 이용한 세포의 생사판정 및 세포수 측정으로 조사하였다.

### EPO 분석

배양액 중의 EPO의 정량 분석은 EPO-Trac™<sup>125</sup>I RIA Kit(INCSTAR, U.S.A.)를 사용하였다. 배양중 일부의 배지를 취하여 원심분리하여 세포 과편을 제거하고, 상층을 EPO 정량 분석에 사용하였다. 적절히 희석된 (20~80mU/mL) 시료 200 $\mu$ L를 튜브에 넣고, 1차 항체를 전체 역가 측정용 튜브를 제외한 모든 튜브에 넣어 2시간 동안 상온에서 반응하였다. 여기에 2차 항체를 넣고 4℃에서 16~20시간 방치하고, 500 $\mu$ L의 DAG-ppt를 튜브에 넣었다. 30분 동안 항온하고, 1600rpm으로 20분간 원심분리한 후, 전체 역가 측정용 튜브를 제외한 모든 튜브의 상층을 제거하였다. 감마 카운터(PRIS-2, Packard Co., U.S.A.)를 이용하여 <sup>125</sup>I를 측정하고, 표준 농도와 비교하여 EPO 농도를 계산하였다.

## 결과 및 고찰

### 세포 성장과 EPO 생산에 미치는 혈청의 영향

혈청이 첨가된 배지에서 재조합된 CHO 세포의 성장 특성을 비교하여 세포 성장에 가장 적절한 혈청 농도를 결정하기 위하여 75cm<sup>2</sup> 표면적을 가진 T-flasks를 이용하여 세포 성장을 비교하였다. 재조합 CHO 세포를 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5% 농도의 FBSd를 함유한 MEM $\alpha$  배지에 1 $\times$ 10<sup>4</sup>cells/cm<sup>2</sup>와 2 $\times$ 10<sup>4</sup>cells/cm<sup>2</sup>의 초기 농도로 정지배양하였다. 그

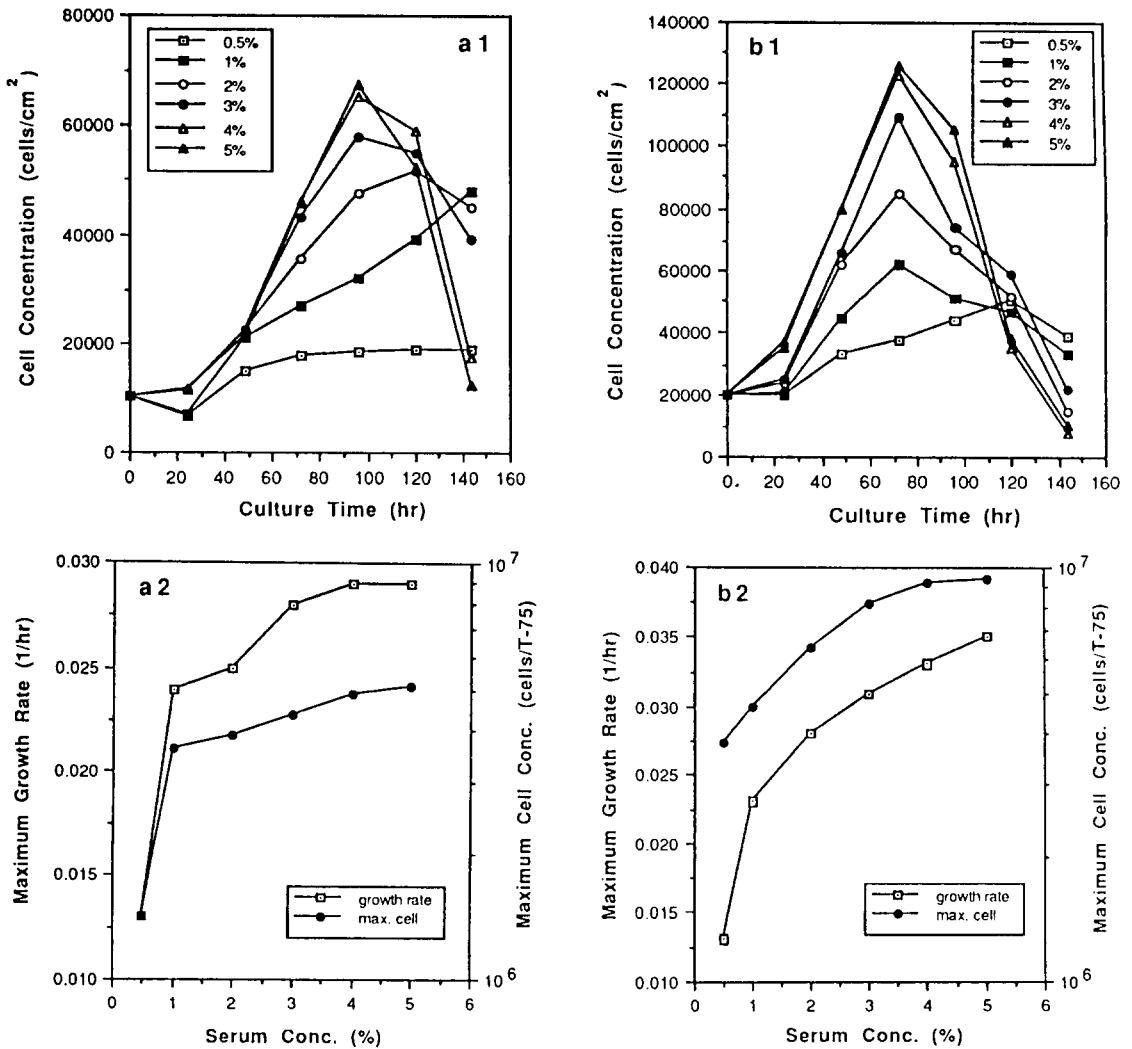


Fig. 1. Kinetics of CHO cell growth at various concentrations of FBS dialyzed, 0.5, 1, 2, 3, 4, and 5% (v/v) in MEM $\alpha$ : a) profiles of cell growth at inoculum size,  $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>; b) profiles of cell growth at inoculum size,  $2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>.

결과 CHO 세포 성장이 접종 농도에 무관하게 혈청 농도를 증가시키기에 따라 증가하였으며 (Fig. 1), 최대 세포 농도에 도달된 후 혈청 농도가 증가할수록 빠른 세포 사멸율을 보였다. 또한, 세포 성장 비율과 최대 세포 농도의 관계에 있어서도 접종 농도에 관계없이 혈청 농도가 증가함에 따라서 세포 증식 속도와 최대 세포 농도가 증가하는 경향을 보였으며, 4%와 5% 혈청을 사용한 배양에서는 비슷한 세포 성장을 보였다. 그러나,  $2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>의 접종 농

도의 배양에서는  $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>의 접종 농도에서의 배양보다 2배 정도의 높은 세포 성장을 보였다. 이것은 높은 접종 농도가 혈청 농도가 2% 이상 함유된 배양의 경우에 세포의 증식 속도를 증가시켜 최대 세포 농도에 도달되는 배양시간을 단축시키는 특성을 보였다. 이 결과로부터 초기 세포 농도가 재조합된 CHO 세포 성장에 영향을 미치며 세포성장의 최적화를 위해서는 적절한 혈청 농도의 선택이 필요하다고 할 수 있다.

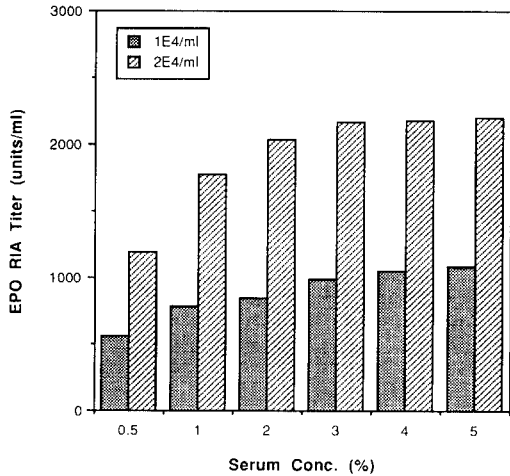


Fig. 2. Comparison of EPO production at various concentrations of FBS dialyzed, 0.5, 1, 2, 3, 4, and 5% (v/v) in MEM $\alpha$ . The CHO cells were inoculated at different size of  $1 \times 10^4$  cells/cm $^2$  and  $2 \times 10^4$  cells/cm $^2$ , respectively.

두개의 다른 농도로 접종된 정지배양에서 혈청 농도의 변화에 따른 각 배양에서의 EPO 생산을 비교하여, 혈청 농도와 EPO 생산과의 관계를 조사한 결과 접종 농도에 관계없이 혈청 농도가 증가할 경우 EPO 생산이 증가하였으나, 3% 이상의 혈청을 사용한 배양에서는 비슷한 정도의 EPO 생산을 보였다 (Fig. 2). 이 결과를 Fig. 1의 세포 성장과 관련하여 보면, 높은 세포 성장으로 인하여 EPO 생산이 증가함을 알 수 있다. 즉, 혈청을 사용한 배양으로부터 얻을 수 있는 EPO 생산량은 혈청 및 초기 세포농도의 증가에 따른 세포 성장에 의하여 영향을 받으며, 이는 세포배양으로 목적 산물을 생산할 때 혈청 및 접종 세포 농도가 세포 증식과 산물의 생산에 영향을 미친다는 보고(10)와 일치하는 결과였다.

무혈청배지 교환에 따른 세포 성장과 EPO 생산  
혈청이 첨가된 배양에서 CHO 세포를 성장시키고, 배양 배지를 무혈청배지로 교환하였을 경우 세포 성장과 EPO 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 즉, 4% FBSd를 함유한 MEM $\alpha$  배지에  $2 \times 10^4$  cells/cm $^2$ 의 세포 농도로 CHO 세포를 T-flasks에 배양하고, 72시간 후 배양 배지를 무혈청배지(CHO-S-SFMII)로 교환하여 세포 성장 특성을 조사하였다 (Fig. 3). 배지를 교환하지 않았을 경우 세포 성장

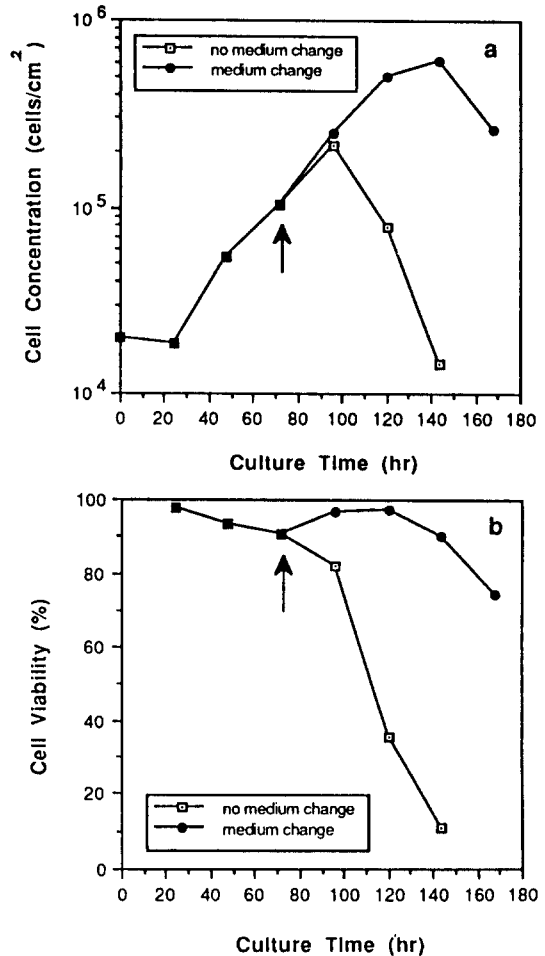


Fig. 3. Growth characteristics of CHO cells in different cultures :a, profiles of cell growth with or without medium exchange using serum-free medium after 72 hr culture (arrow indicated); b, profiles of cell viability with or without medium exchange using serum-free medium. The cells were inoculated at concentration of  $2 \times 10^4$  cells/cm $^2$  in MEM $\alpha$  supplemented with 4% FBSd.

이 최대( $2.1 \times 10^5$  cells/cm $^2$ )에 도달된 후 급격히 세포농도가 감소하는 높은 사멸율을 보였으나, 무혈청 배지로 교환한 배양에서는 세포 성장이 크게 증가하여 배지 교환 후 72시간에는  $6.2 \times 10^5$  cells/cm $^2$  ( $3.1 \times 10^6$  cells/mL)의 최대 세포농도에 도달되었다. 배

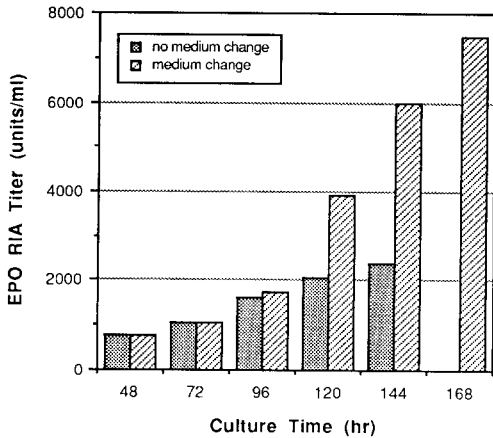


Fig. 4. Comparison of EPO production in different cultures with or without medium exchange using serum-free medium, CHO-S-SFMII.

지를 교환하지 않은 배양에서의 세포 생존도는 배양 시간이 경과함에 따라 낮아져 144시간 배양 후에는 약 11%의 생존도를 보였다. 그러나, 무혈청배지로 교환한 배양에서는 배지를 교환 후 세포 생존도가 다소 높아졌고, 4일 배양 후에도 약 75%의 높은 생존도를 보였다. 이 결과는 무혈청배지로 배지를 교환함에 따라 세포의 성장이 지속되어 배지를 교환하지 않은 배양에 비하여 3배의 성장과 높은 세포 생존도를 보인 것이라 할 수 있다. 따라서 세포의 장기간 배양동안 세포 생존도를 유지하도록 하는 것이 고농도 세포 배양과 목적 산물의 생산 증대에 필요한 중요한 요소중의 하나이므로 혈청배지를 이용하여 세포를 증식시킨 후 적절한 배양 시기에 무혈청배지로의 배지 교환이 CHO 세포의 고농도 배양에 유리하다고 할 수 있다.

혈청배지에서 세포를 성장시킨 후 무혈청배지로 배지를 교환한 배양과 혈청을 사용하여 배지를 교환하지 않은 배양에서의 EPO 생산 정도를 비교한 결과 배지 교환 후의 EPO 생산이 배지를 교환하지 않은 배양에 비하여 크게 증가하여 배지를 교환한 후 96시간에는 7,470units/mL의 높은 RIA 역가를 얻었으며(Fig. 4), 이는 배지를 교환하지 않은 혈청을 사용한 배양에서 얻어진 최고 EPO 역가에 비하여 3배 이상의 높은 생산력을 보인 것이다. 세포 증식기 중 사멸기에도 전체적으로 일정한 비율로 EPO 생산이 증가되는 것은 하이브리도마 세포의 배양에

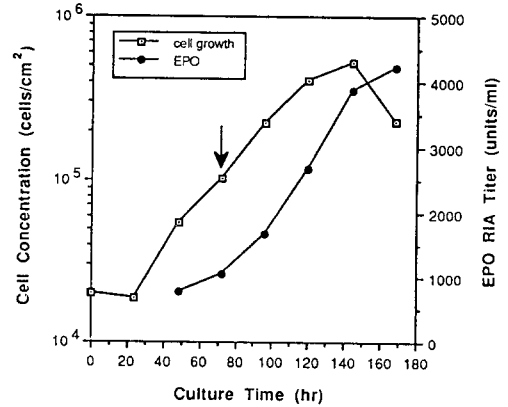
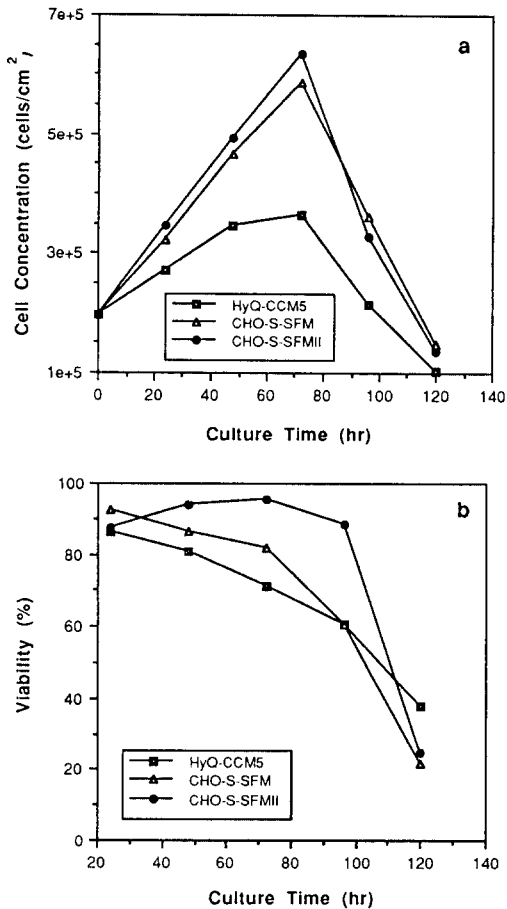


Fig. 5. Kinetics of CHO cell growth and erythropoietin production with medium exchange using MEM $\alpha$  supplemented with 4% FBSd after 72 hr culture (arrow indicated. The cells were inoculated at concentration of  $2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> in MEM $\alpha$  supplemented with 4% FBSd.

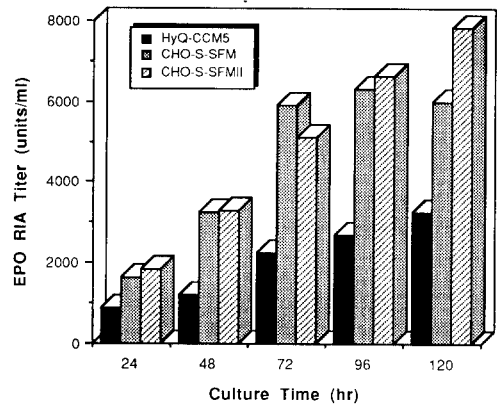
서 단일클론항체 생산이 정지기와 사멸기에도 증가하는 것과 유사하다고 할 수 있다(10). 이 결과를 Fig. 3의 세포 성장과 비교하여 보면 CHO 세포의 최대 성장과 EPO 생산량과는 서로 관련이 있으며, 세포배양으로부터 높은 역가의 EPO를 생산하기 위해서는 고농도의 세포배양이 절대적으로 필요하다고 할 수 있다. 또한, 혈청배지에서 세포를 성장시킨 후 교환하는 배지를 4% 혈청을 함유한 MEM $\alpha$  배지를 사용하였을 경우에는 무혈청배지로 교환한 배양보다 세포 성장과 EPO 생산 정도가 낮았다(Fig. 5). 이것은 무혈청배지의 성분 조성이 혈청을 사용한 배지에 비하여 보다 세포 성장에 유리하고, EPO 생산이 세포 성장과 밀접한 관련이 있으므로 향상된 세포 성장이 EPO 생산에 영향을 주었다고 예측할 수 있다. 배지 교환에 의해 세포 성장과 EPO 생산을 향상시키는 배양 방법에서는 혈청배지에서 세포를 증식시킨 후 무혈청배지로 교환하여 주는 것이 세포 성장과 EPO 생산에 유리하며, 생산된 EPO의 정제를 고려하여도 혈청배지로 교환하는 것보다 잇점을 제공한다고 할 수 있다.

무혈청배지 종류에 따른 세포 성장과 EPO 생산  
재조합된 CHO 세포를 배양하여 목적하는 산물을



**Fig. 6. Comparison of growth of CHO cells in commercial serum-free media :a, profiles of cell growth ;b, profiles of cell viability. The cells were inoculated at concentration of  $2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> in MEM $\alpha$  supplemented with 4% FBSd, and the culture media in cell growth phase at concentration of  $2 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> were exchanged with serum-free media.**

연구 위한 많은 연구들이 수행되어졌으며, CHO 세포 배양을 위하여 특별히 제조된 무혈청배지가 이미 상업화되어 이용되고 있다. 그러므로, 재조합된 CHO 세포를 이들 상업화된 무혈청배지로 배양하는 것은 무혈청배지에서의 CHO 세포 성장 특성을 이해하는데 도움이 되며, 목적하는 재조합 산물을 생산하기 위한 세포 배양 특성에 알맞는 새로운 무혈



**Fig. 7. Comparison of EPO production in commercial serum-free media, HyQ-CCM5, CHO-S-SFM, and CHO-S-SFMII.**

청배지의 개발에 응용될 수 있다. 혈청배지에서 CHO 세포를 증식시킨 후 무혈청배지로 배지를 교환 하였을 때 높은 세포 성장과 EPO 생산을 얻었으므로, 상품화된 여러 무혈청배지를 이용하여 EPO 생산 정도를 비교하였다. 무혈청배지는 HyQ-CCM5, CHO-S-SFM, CHO-S-SFMII 등을 사용하였다. 4% FBSd를 함유한 MEM $\alpha$  배지에  $2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>의 접종 농도로 T-flasks에서 CHO 세포를 배양하고, 세포 성장이 약  $2 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>에 도달된 후 배양 배지를 각각의 무혈청배지로 교환하여 무혈청배지에서의 세포 성장을 비교하였다. 그 결과 HyQ-CCM5 배지( $3.7 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>)에 비하여 CHO-S-SFM과 CHO-S-SFMII 배지에서 각각  $5.9 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>와  $6.3 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>의 높은 세포 성장을 보였다(Fig. 6). 또한, HyQ-CCM5와 CHO-S-SFM 배지에서 배양 시간이 경과함에 따라 세포 생존도가 계속 낮아졌으나, CHO-S-SFMII 배지에서는 배지 교환 후 생존도가 95% 이상으로 증가되었으며, 세포 성장이 지속되는 동안 다른 두 무혈청배지에 비하여 높은 세포 생존도를 유지하였다. 무혈청배지의 종류에 따른 EPO 생산에 있어서도 HyQ-CCM5 배지에 비하여 CHO-S-SFM과 CHO-S-SFMII 배지에서 높았으며(Fig. 7), CHO-S-SFMII 배지에서의 최대 EPO 역가는 7,850 units/mL이었다. 이것은 각 무혈청배지의 정확한 조성은 밝혀지지 않았으나 배지 조성의 차이로 인해 세포 성장에 영향을 미친 결과라고 사료된다. 세포 성장이 최대에 도달된 후 세포 생존도의 급격한 감소와 함께

EPO 생산이 증가된 것은 세포의 파괴로 인하여 세포내의 EPO가 배지로 분비된 것이라고 할 수 있으므로, 정제면을 고려한다면 세포 생존도가 높고 EPO 역가도 높은 시점에서 세포배양을 멈추는 것이 바람직하다. 따라서, CHO-S-SFMII 배지를 사용하여 배지를 교환 한 후 세포 생존도가 85~90% 이하로 낮아지기 전인 96시간 전후가 세포배양으로 생산된 높은 역가의 EPO 수확에 적절한 시기라고 할 수 있다.

이상의 결과로부터 혈청농도 및 초기 세포 농도가 재조합된 CHO 세포성장과 EPO 생산에 영향을 미치며, CHO 세포를 무혈청 배지에 적응시키는 기간을 주지 않고 혈청 배지에서 배양 도중 직접 무혈청배지로 교환함으로써 세포 성장 및 EPO 생산을 크게 증가시킬 수 있음을 알 수 있었다. 또한 세포 성장과 EPO 생산과는 밀접한 관계를 이루고 있으므로 재조합 CHO 세포 배양으로부터 EPO 생산을 증대하기 위해서는 고농도 배양이 필요하다고 할 수 있다.

## 요 약

CHO 세포를 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4% 및 5% 농도의 FBSd를 함유한 MEM $\alpha$  배지에  $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>와  $2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>의 초기 농도로 정지배양하여 세포 성장과 EPO 생산 특성을 조사하였다. 혈청 농도와 접종 농도를 증가시킴에 따라 세포 증식 속도와 최대 세포 농도가 증가하는 경향을 보였으며, 적절한 혈청 농도의 선택이 세포 성장의 최적화에 필요하다고 할 수 있다. 세포 성장 도중에 무혈청배지로 교환한 결과 세포 성장과 EPO 생산이 증가되었다. 배지를 교환하지 않았을 경우 세포 성장이 최대 ( $2.1 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>)에 도달된 후 급격히 세포농도가 감소하는 높은 사멸율을 보이고, EPO의 최대 농도도 2,380units/mL에 불과하였으나, 무혈청배지로 교환한 배양에서는 세포 성장이 크게 증가하여  $6.2 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>의 최대 세포농도와 7,470units/mL의 EPO 농도를 얻었다. 따라서 CHO 세포 성장과 EPO 생산과는 상호 연관이 있으며, 세포배양으로

EPO 생산을 극대화하기 위해서는 CHO 세포의 고농도 배양이 필요하다고 할 수 있다.

## 참고 문헌

1. K. Jacobs, S. Shoemaker, R. Rudersdorf, S. D. Neill, R. J. Kaufman, A. Mufson, J. Seebra, S. S. Jones, R. Hewick, E. F. Fritsch, T. Kawakita, and T. Miyake(1985), *Nature*, **313**, 806.
2. F-K Lin, S. Suggs, C-H Lin, J. K. Browne, R. Smalling, J. C. Egrie, K. K. Chen, G. M. Fox, F. Martin, Z. Stabinsky, S. M. Badrawi, P.-H. Lai, and E. Goldwasser(1985), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **82**, 7580.
3. J. M. Davis and T. Arakawa(1987), *Biochemistry*, **26**, 2633.
4. L. Keay, J. M. Walsh, R. M. Buchholz, and J. M. Terando(1990), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **34**, 198.
5. E. I. Taso, M. A. Bohn, V. Numsuwan, D. R. Omsread, and M. J. Munster(1992), *Biotechnol. Bioengin.*, **40**, 1190.
6. P. M. Hayter, E. M. A. Curling, A. J. Baines, N. Jenkins, I. Salmon, P. G. Strange, and A. T. Bull(1991), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **34**, 559.
7. M. Ogata, Y. Marumoto, K. Oh-I, S. Shimizu, and S. Katoh(1994), *J. Ferm. Bioengin.*, **77**, 46.
8. E. Watson, B. Shah, L. Leiderman, Y-R Hsu, Subhash Karkare, H. S. Lu, and F-K Lin (1994), *Biotechnol. Prog.*, **10**, 39.
9. Y. Takazawa and M. Tokashiki(1989), *Biotechnol. Bioeng.*, **31**, 168.
10. B. H. Chun, S. Y. Park, E. C. Jo, K. H. Jung, D. I. Kim, and H. M. Moon(1994), *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **9**, 253.